

激 光 生 物 学

刘 颂 豪 孟 耀 勇

(华南师范大学激光生命科学实验室, 广州 510631)

本文全面评述了激光同生物大分子、细胞、组织、器官、个体和群体各个生命层次的相互作用; 介绍了激光技术在分子生物学、细胞生物学和医学及工农业生产中的运用, 并指出生命现象有可能用激光理论来作解释。

Abstract

We describe laser interactions with biomolecules, cells, tissue, organs, individuals and populations which have led to many applications in molecule biology, cell biology, medicine, industry and agriculture. It is possible that life phenomena can be explained by the laser principle.

自从1960年 Maiman 制造了第一台激光器以后, 激光就以其高亮度、高方向性、高相干性以及单色性在人们从事的许多领域中发挥着前所未有的作用。1961年 Zere 和 Solon 等发表了《激光的生理作用》和《相干光源产生的光凝固》, 从而揭开了激光同生物物质相互作用的序幕。30年来, 随着激光波长覆盖范围的加宽, 可调谐激光器的出现和激光脉冲宽度的窄化, 使激光技术同生物技术结合得越来越紧密, 激光不再局限于仅同生物组织作用, 而是同生物大分子、细胞、组织、器官、个体和群体各个生命层次都有着作用, 并且发展成为了一门新兴的边缘学科——激光生物学。激光生物学^[1]包括激光生物学本身的基础研究及其派生出来的激光医学、激光遗传操作、激光育种、激光农业应用和激光生物技术等应用学科。近代激光生物学的成就已经证明, 它对揭示生命现象的奥秘, 改进生物学研究中的分析和测试手段以及促进生物化学与生物物理, 生物工程, 遗传学, 医学, 药理学, 农业科学与环境科学的发展等方面都具有潜在的应用前景。

一、生物大分子及其聚集状态

1. 生物大分子的结构和聚集状态

拉曼光谱反映了生物大分子的振动和转动模式。而分子的振动模式不但能提供分子的组分信息, 而且还能帮助我们确定生物大分子的结构。由于拉曼散射光非常弱, 这就要求激发光的光强足够大, 而激光的高亮度是其他光源所无法比拟的。激光具有高的方向性, 可聚集成很小的光斑, 又能使我们对极微量的样品进行测定。由于拉曼光谱测量的是光波长的变化, 在研究分子的低频振动时, 就要求激发光的谱线要足够窄。对于一些重要的生物分子, 与其生物学功能紧密相关的结构变化, 主要关系到分子的低频振动。比如, A型 DNA 分子向 B型 DNA 分子的构型转化^[2], 是由于最低光学模式的软化, 反映到拉曼光谱上, 就是 A型 DNA 分子的 22cm^{-1} 峰在 B型 DNA 分子中红移到了 16cm^{-1} 。要获得这样的低频拉曼光谱, 就需要激发光源具有高度的单色性, 而激光

正是一种理想光源。

激光拉曼光谱技术还能为我们提供关于生物分子结构转变的动态特性信息,这就在某种程度上弥补了只能给出分子静止图象的X射线衍射技术。如 Siddharth^[3] 用脉宽为 30ps 的激光脉冲对含一氧化碳肌红蛋白 (MbCO) 进行光解,同时以这束光作为探测源,把测得的拉曼共振光谱同肌蛋白 (Mb) 的稳态光谱作了比较,发现卟啉环模频 (porphyrin skeletal mode) ν_{10} , ν_{10} 和 ν_{11} 下移了大约 4cm^{-1} 。这些频率相反地联系着卟啉环的核心体积 (core size),这就说明光解后 30ps 的 Mb 还呈现未脱配体状态,血红素核心较稳定时膨胀了 $0.008-0.01\text{\AA}$ 。激光拉曼光谱技术对生物大分子结构变化的动态追踪对理解分子生物学功能极为重要。

光散射技术是一门古老的技术,激光的引入使这一技术获得革命性的进展。由于散色光的性质是由产生散射光物质的分子的物理参数所决定的,因而研究散射光的强度分布和偏振状态,就可以测得生物大分子的大小和形状,这一技术还可以用来研究生物大分子的聚集状态,如液晶的形成等。

另外,利用时间分辨激光荧光光谱技术通过研究分子间的能量传递同样能为我们提供生物分子的聚集和拓扑性质信息。激光高强度引起分子的非线性,也可以帮助我们获得分子聚集情况。如在研究光合作用的原初过程时,通

过考察激子的相互作用就可以推断出光合作用系统的拓扑特点和色素不均性。

2. 生物大分子的生物学功能

生物体内的生物物理和生物化学过程,特别是其中的能量转移过程,许多都是快过程,须用微微秒、甚至是飞秒时标进行研究。在复杂的生物分子系统中,如光合作用,由于分子非常靠近,会导致激子的快速迁移。生物大分子中的原子、分子或分子支链在生物物理过程中常出现重新分布,而重新分布的时间量级为微微秒。激光通过调Q和锁模技术,它的脉冲宽度可以做得很窄,因而利用激光来研究生物大分子的动力学过程就显得非常有效。例如,对视觉的原初过程的研究,由于起主要作用的视觉分子之一的视紫红质在视觉的原初过程中要形成前视紫红质 (primerhodopsin)、高视紫红质 (hypsorhodopsin) 和深视紫红质 (bathorhodopsin) 多个中间态,这些中间态的形成速度非常快,早期研究都是在低温下进行。但是,低温下研究所得的结果是否能同生理温度下的一样呢?直到超快光谱技术的出现,才使我们能回答这个问题。现代皮秒光谱技术在室温下的确找到了低温下测得的中间态,证实了它们的形成和寿命都是 ps 量级^[4]。可见激光皮秒光谱技术在这一快速生物学过程的研究中所起的作用是其其他常规方法无法代替的。

表 1 列出了用高时间分辨的激光光谱技术

表 1 生物系统的快速过程

生物系统	快速过程	检测方法
光合作用	能量转移,电子转移,激子迁移	PS 吸收光谱 PS 荧光光谱
核 酸	链动力学 光损伤	PS 荧光光谱 PS, nS 非线性光化学方法
视 觉	异构化	CW, PS 拉曼光谱
视紫红质	质子转移	PS 吸收光谱, PS, mS 荧光
血红素蛋白	配体动力学	NS 吸收光谱
血红蛋白	血红素,蛋白质动力学	PS 吸收光谱
肌红蛋白	变构效应	PS, nS 拉曼光谱, fS 吸收光谱, pS 荧光光谱
氨基酸,多肽	振动动力学	NS 拉曼谱, pS CARS 谱
蛋白质	整体运动,侧链运动,链动力学	PS 荧光光谱
趋光性	质子转移	PS 荧光光谱
膜	分子取内,输运过程	PS, nS 荧光光谱

研究的若干生物系统的快速过程及其检测方法^[1]。

3. DNA 分子的选择激发

激光在分子生物学中不仅可被用来探测生物大分子的结构和功能,而且还可利用来对生物大分子进行选择性的激发和剪接。一般来说,生物大分子都有数百 Å 宽的电子吸收带,任何选择方法都必须依靠振动激发。对于 DNA 分子,Letokhov 提出先用红外激光脉冲激发相应的振动能级,然后用可见光脉冲来对振动能级已被激发的部分进行离解。由于液相中振动去激活的退集居时间一般为 10ps 左右,因此为了避免由热去激活作用造成振动能级非选择性去激活,能量必须存储在一个 ps 量级的超短脉冲内,脉冲同步范围要保持在振动弛豫时间内。采用这种多步激发方式对 DNA 分子的选择激发与剪接实验已获得初步结果。

二、细胞和细胞器^[1]

1. 激光流动显微光度计

细胞是生命的最小单位,激光被用于细胞学研究首先是激光流动显微光度计,它是采用特殊流动室,使悬浮液中的细胞在流动室中排列成行,一个个依次通过。从激光器发出的光束经透镜会聚到细胞上,这样在垂直于激光束和细胞流的方向上便可检测得荧光信号,同时也可得到前向的散射信号。根据荧光强度的大小可以测得:(a)各种细胞群体 DNA 的含量;(b)利用荧光抗体技术可测得感染细胞中病毒的存在;(c)各种组织培养细胞中的蛋白质含量。通过分析散射信号,可以测出细胞的大小和细胞内微粒的数目(the number of intracellular granules)。

2. 激光 Doppler 技术

由于激光具有很窄的谱线宽度,因而可以测量出来微小的 Doppler 频移。利用激光作用于运动物体产生的多普勒效应,可以用来研究生物物质的动态过程。这一技术还可以用来测量微血管中血流的速度,如果把这种技术同

显微技术相结合,就可能测出植物细胞中细胞质的流动(protooplasmic streaming)速度或精子细胞的能动性(motility)。激光 Doppler 测速仪还可以测得活细胞或细胞器的电泳速度,从而可研究它们的电泳(electrophoretic)性质。

3. 激光漂白荧光恢复术

荧光染料标记细胞膜后,用一束聚焦光斑小于 $10\mu\text{m}^2$ 的强激光脉冲照射样品,使荧光分子产生不可逆的光化学漂白,接着用衰减了 10^3 — 10^4 倍的同一激光束探测漂白区域中荧光恢复动力学过程,从而可以得到单个活细胞细胞膜的分子运动和扩散系数。

4. 激光微束照射术

利用激光方向性好、单色性好和高亮度的优点,把激光束聚焦到微米和亚微米的光点,选择性地损伤和破坏细胞的某个部位或某个细胞器,从而实现细胞显微外科手术。这种技术主要在下面几个方面得到应用:

(1) 选择性地损伤和破坏细胞器和细胞结构,以发现它们在细胞生理中的作用。例如,在有丝分裂期间,破坏个别纺锤丝以观察染色体是怎样分离的。

(2) 染色体的切割。用激光微束对染色体进行切割,其损伤光斑为 $0.5\mu\text{m}$,这一技术同微克隆技术相结合,为遗传病在染色体上的基因定位提供了可能性。

(3) 激光打孔导入外源基因。在细胞膜上打一亚微米级大小并能在一秒钟内自我愈合的小孔,使培养基内含有的外源 DNA 在小孔愈合前流入细胞,这种方法比其他方法如化学方法等更有优越性。

(4) 细胞融合。用激光微束在细胞膜上打孔,可以导致两细胞相互融合。激光融合的优点是无毒、无损伤,融合后成活率高,是一种动物育种的好方法。

5. 激光捕获^[6]

利用激光对生物粒子产生的辐射光压来对其捕获,为无接触、无损害地操作生物粒子提供了一个可行的方法。对于有丝分裂时期的细

胞,把激光捕获产生的力作用于染色体上,对研究有丝分裂时染色体的运动机制是非常有用的。把激光捕获技术对细胞的无损害操作同激光微束辐照技术相结合,这对细胞生物学和细胞遗传学有着重要的应用价值。激光捕获技术也为鉴定活动性细胞如精子的能动性提供了一种新的手段。

三、组织和器官^[7]

研究激光对组织和器官的作用主要是为了克服早期激光运用于医学单靠临床经验的缺陷,因而在研究激光同组织和器官生命层次时,主要限制在激光同人或动物的活组织和器官上。

1. 切割烧蚀

由于激光具有很好的方向性和高亮度,所以它很容易在一个小的区域内获得很高的光功率密度。强激光对生物组织的作用常常引起组织烧蚀。对于可见或红外激光,组织吸收光能后,主要转化为热能,加热使得组织中水分蒸发,造成细胞爆炸,进而导致组织汽化。脉冲激光烧蚀,通常包括复杂的现象,如水的过热、爆炸、蒸发以及超声波和冲击波的产生等。这些效应的结果同样导致组织的切割烧蚀,因而激光在医学上可以用来汽化病变组织和代替手术刀来切割组织。由于热效应,激光切割部位邻近血管会自动凝固,可起止血的作用。另外,激光切割是非接触的,而且激光产生高热还可杀死伤口中的细菌而不容易感染。激光较传统手术刀的这些优点使得它在医学上得到广泛应用。

2. 非烧蚀过程

利用大功率的激光产生的热效应,可凝固血液和封闭血管。如在眼科中,可以非接触地对糖尿病损伤的视网膜血管进行光凝固;在皮肤科,通过选择合适的激光波长和脉宽,可以封闭表皮下的扩张血管而不烧伤皮肤组织,这对治疗葡萄酒痣是非常有用的。

激光非烧蚀过程另一个例子是非线性耦合

过程的光击穿。这一过程最初是激光引发的介质(通常为液体)光击穿,所产生的等离子体以逆韧致辐射形式吸收激光能量而膨胀,等离子体的膨胀发射应力波并形成腔泡,使组织受到破坏。这种方式在临床上被用来破碎肾结石和胆结石。

3. 光动力学疗法

光动力学疗法是利用组织中的光敏物质吸收激光光子而激发,然后通过能量传递,使组织中的分子氧激发,形成单态氧。单态氧是一种激发态形式的活性氧分子,它可以破坏生物物质,从而杀死细胞。利用光敏物质在癌组织中比在正常组织内滞留更长时间的特点,就可以选择性地杀死癌组织而使正常组织不受损坏。通过调节激光波长激发光敏物质产生的诱导荧光,还能用来诊断癌症。

4. 激光测量和诊断

利用激光光谱技术分析生物组织应用得很广泛。如利用光声光谱诊断白血病,激光诱导人体组织自体荧光诊断肿瘤组织等。激光技术的发展,使激光测距技术能用来测量生物组织,如测量皮肤成分的厚度,切割角膜的深度等。激光全息技术首先在眼科和牙科中得到应用,近来又发现这一技术可用来诊断乳腺癌。

四、生物个体和群体

1. 弱激光刺激作用

所谓弱激光是指照射时不会对生物体直接造成不可逆损伤的低水平激光。弱激光对生物体的刺激作用应用得极为广泛。如在农业科学中,激光刺激植物生长,改善生理机能以提高农作物产量,改善家禽家畜的品质,促进微生物有益性状的突变,选育优良新品种;在医学上用毫瓦级 He-Ne 激光以及扩束 CO₂ 激光,通过穴位照射(光针),来治疗多种疾病。弱激光研究的对象也很多,从微生物、动物、植物直到人体,而且还包括生物的各个生长阶段。

(1) 微生物:用弱激光照射微生物,能加速多种菌类生长和繁殖。如果胶酶产生菌 ASP

3.396, 谷氨酸生产菌钝齿棒状杆菌。对棘孢小单孢菌、龟裂链霉菌、谷氨酸产生菌的弱激光照射,可以提高它们的单位产量。 Ar^+ 激光对啤酒酵母菌的作用,可以提高与合成乙醇有关酸的活性,降低发酵液中双乙酰的含量,有利于啤酒风味的改善。

(2) 动物: 弱激光对动物的刺激包括精子和受精卵,如人、猪、山羊的精子,蚕卵、鸡受精卵等,以及动物幼体及成体,如罗非仔鱼、果蝇等。实验表明,小剂量的激光刺激对动物有利,而大剂量的刺激则表现出不良效果。

(3) 植物: 用弱激光辐照植物种子应用非常广泛。对水稻、小麦等几十种植物进行辐照处理,表明弱激光能打破种子休眠,提高发芽率、发芽势,促进苗期生长,早熟高产并提高植物对环境的适应性。

对植株的辐照同样可以促进植物的生成,对大麦、小麦、燕麦、番茄、青瓜等作物的辐照,能控制其开花、结果。

(4) 人体: 弱激光的刺激作用在临床上的应用已非常普遍,特别是同中医的经络理论相结合,被用来治疗多种疾病,如高血压、各种炎症等。

对弱激光作用生物体的机理,由于生物个体的复杂性,目前还不十分清楚,虽然各国学者提出多种假设,但各有其优缺点,所以对生物弱激光刺激的机理,还需作进一步的研究。

2. 激光除莠剂和激光除害剂^[8]

1986年 Constantin Rebeiz 和他在美国伊利诺斯州大学的研究组获得了有关光动力作用激光除莠剂。把某种除莠剂喷在植物上,在激光的作用下,通过光动力学反应,就可以有选择性地杀灭某种有害植物(杂草)而作物本身却能正常生长。同样,对昆虫也有类似的情况,现在有了利用光动力学反应来杀灭害虫的除害剂。

激光生物学是激光技术同生物技术的结合而产生的一门新兴学科,它的研究内容和方法

还在不断发展,我们还不能认为激光只是作为一种工具在生物学中得到应用。现在,理论和实验表明,生物系统本身同激光系统极其相似。首先,它们都是远离平衡态的耗散结构。另外,现已证实,任何有生命的物质,从细胞到人,都在不间断地向外辐射从紫外到红外的准连续光,其波长覆盖200—800nm的范围,它的强度极为微弱,在每平方厘米面积上每秒辐射几个光子到几百个光子之间,相当于10 km外一根蜡烛的光强。生物体系这种辐射光子的现象就被称为生物超弱发光(ultraweak photo emission)。生物超弱发光不同于如萤火虫这样的生物发光,它与生物系统的氧化代谢、细胞分裂、肿瘤发生、光合作用及细胞死亡等重要生命过程有着内在的联系,是生物体的固有性质。Popp^[9]等人的实验表明,生物超弱发光具有高度相干性,这为人们展现了一个崭新的量子生物学的雏型。激光与生物学的结合就不仅仅是激光技术在生物学中的应用,而是激光理论本身也可能运用到生物学中,去解释各种生命现象。可见,激光生物学是一门方兴未艾的交叉边缘学科,在探索生命现象奥秘的进程中,其贡献将是无法估量的。

- [1] 中国科学院上海光学精密机械研究所,上海市激光技术研究所,我国激光发展战略研究,上海科学技术文献出版社,(1988),97.
- [2] Hisako Urabe et al., *J. Chem. Phys.*, **78-10** (1983), 5937.
- [3] Siddharth Dasgupta et al., *Biochemistry*, **24** (1985), 5295.
- [4] Hiroyuki Ohtani et al., *Biophys. J.*, **53** (1988), 17.
- [5] 刘颂豪,激光生物学与激光医学学术讨论会论文集,杭州,国家自然科学基金委员会生物科学部 信息科学部合编,(1988),2.
- [6] W. H. Wright et al., *IEEE J. Quantum Electron.*, **QE-26** (1990), 2148.
- [7] T. Deutsch, *Physics Today*, **41-10**(1988), 56.
- [8] 李芬,陈玉凤译,国外激光, No. 9,(1990), 25.
- [9] F. A. Popp, Proceedings of the International Conference on Lasers'85 STS PRESS MCLEAN, VA, (1986), 311.