

低功率激光对 Raji 细胞膜 生物学效应的研究

张 擎 张孟丹 阮绪芝 蔡福筹

(中山大学生命科学院, 广州 510275) (中山医科大学生物室)

摘 要 报道了 He-Ne 激光 ($0.0075, 0.38, 0.75, 1.5, 4.5 \text{ J/cm}^2$) 照射对培养 Raji 细胞的作用. 发现 0.38 J/cm^2 的激光使膜表面 -SH 基增加, 大于或小于此剂量时, 膜的 -SH 基的变化都不明显; 0.38 J/cm^2 及大于此剂量的各剂量组均使细胞电泳率 (EPM) 下降, 膜表面电荷减少; 4.5 J/cm^2 的激光可使膜脂微粘度升高, 膜流动性下降, 较小的各剂量的作用不明显.

关键词 He-Ne 激光, 膜流动性, 膜表面 -SH 基, 细胞电泳率

分类号 Q 631

本世纪 60 年代末, 国外就已开始研究低功率激光的生物刺激作用, 目前已取得一系列成果并应用于临床. 但有关低功率激光对细胞膜作用的研究国内外报道较少. 本实验以荧光偏振、细胞电泳及分光光度等方法分别测定 He-Ne 激光 ($0.0075, 0.38, 0.75, 1.5, 4.5 \text{ J/cm}^2$) 对膜脂流动性, 膜表面电荷及膜表面 -SH 基的影响, 了解低功率激光对癌细胞作用的膜生物学效应.

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

Raji 细胞由中山医科大学肿瘤研究所提供. DPH(1, 6-二苯基 1, 3, 5-己三烯) Sigma 产品, 用四氢呋喃配成 $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的储备液, 4°C 避光保存, 临用前用 PBS 稀释成 $2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的应用液. Ellman 试剂 (5, 5'-二硫代双硝基苯甲酸) Serva 产品, 用时称取 39.6 mg, 溶于 10 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0), 在棕色瓶中保存.

1.2 激光处理

He-Ne 激光 $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $P = 10 \text{ mW}$, 功率密度为 2.21 mW/cm^2 , 照射距离 5.5 cm, 光斑直径 2.4 cm, 培养瓶侧起, 光从上而下垂直照射, 48 h 照一次, 分 3 次照, 最后一次照后 24 h 测量各项指标.

1.3 膜脂流动性的测定

取 Raji 细胞 (10^6 /mL, 95% 为活细胞) 液 4 mL, 离心 100 r/min, 10 min) PBS洗 1次, 离心, 加 2 mL DPH应用液, 25°C 温育 30 min, 离心, PBS洗 1次, 最后悬浮在 4 mL PBS液中测量. 测量仪器为荧光分光光度计 MPF-4型, 光源为 150W 氙灯, 激发波长为 360 nm, 发射波长为 432 nm, 加 390 nm 的滤光片, 分别测出 I_w , I_{VH} , I_{HV} , I_{MH} , 按公式计算出荧光偏振度 P 及微粘度 $\eta^{[1]}$.

1.4 膜表面 SH的测定

取 Raji (10^6 /mL, 95% 的活细胞) 液各 3 mL于甲、乙两试管, PBS洗 1次, 各加 pH8.0 的 0.02 M 的磷酸缓冲液 2 mL, 在乙管中加 Ellman 试剂 $20\mu\text{L}$, 待 3 min 显色完全后, 两管同时离心, 分取两管上清液 3 mL, 于另两支试管, 再在甲管上清液中加入 Ellman 试剂 $20\mu\text{L}$, 3 min 充分显色后, 在 412 nm 处测两管的消光度, 二者之差为细胞表面 -SH 产生的消光值. 按前文计算出细胞表面的 -SH 量^[2].

1.5 EPM的测量

细胞离心后, 悬浮在生理盐水中, 浓度为 10^9 /mL 左右. 采用微量细胞电泳装置测量, 按文献 [3] 提供的公式计算出 EPM 值.

2 结 果

2.1 低功率激光对 Raji 细胞膜脂流动性的影响

不同剂量的 He-Ne 激光 (0.0075 , 0.38 , 0.75 , 1.5 , 4.5 J/cm^2) 照射后其膜脂微粘度的变化见表 1.

表 1 He-Ne 激光对 Raji 细胞膜流动性的影响

激光剂量 (J/cm^2)	膜脂微粘度	变化百分率 (%)	P 值
0	0.877 ± 0.065	-	+
0.0075	0.772 ± 0.059	- 12.0	> 0.05
0.38	0.761 ± 0.068	- 13.2	> 0.05
0.75	0.804 ± 0.089	- 8.3	> 0.05
1.5	0.863 ± 0.064	- 7.6	> 0.005
4.5	1.110 ± 0.101	+ 6.6	< 0.05

结果显示, 4.5 J/cm^2 的 He-Ne 激光可使 Raji 细胞膜脂微粘度增加, 其膜流动性下降. 较小的各剂量组的作用不明显.

2.2 低功率 He-Ne 激光对 Raji 细胞膜表面 -SH 的影响

表 2 表明: 0.38 J/cm^2 的 He-Ne 激光可使 Raji 细胞膜表面 -SH 含量增加, 而其他各剂量组的作用不明显.

表 2 He- Ne激光对 Raji 细胞膜表面 - SH 的影响

激光剂量 (J/cm ²)	膜表面 SH量 × 10 ⁻⁴ mol/L	变化百分率 (%)	P值
0	2.56± 0.27	-	-
0.0075	2.28± 0.21	- 10.9	> 0.05
0.38	5.19± 0.95	14.5	< 0.05
0.75	2.5± 0.35	- 3.9	> 0.05
1.5	2.78± 0.48	8.6	> 0.05
4.5	2.38± 0.39	7.0	> 0.05

2.3 低功率的 He- Ne激光对 Raji 细胞 EPM 的影响

表 3 显示, 0.38 J/cm² 及较大各剂量的 He- Ne 激光均使 EPM 明显下降, 0.0075 J/cm² 的 He- Ne 激光对 EPM 无显著影响.

表 3 低功率的 He- Ne激光对 Raji 细胞 EPM 的影响

激光剂量 (J/cm ²)	EPM × 10 ⁻³ mol/L	变化百分率 (%)	P值
0	1.584± 0.044	-	-
0.0075	1.508± 0.066	- 4.8	> 0.05
0.38	0.857± 0.074	45.9	< 0.05
0.75	0.954± 0.054	- 39.8	< 0.05
1.5	0.967± 0.032	- 40.0	< 0.05
4.5	0.828± 0.047	- 44.7	< 0.05

3 讨 论

本实验显示出 4.5 J/cm² 的 He- Ne 激光可使 Raji 细胞膜流动性下降. 其原因可能是该能量的 He- Ne 激光作用于细胞可产生氧化自由基, 可引起膜脂质过氧化, 使膜中不饱和双键减少, 导致膜流动性下降. 值得注意的是实验中用 4.5 J/cm² 的激光处理 Raji 细胞其 EPM 显示下降, 即细胞表面的电荷密度降低了. 这必然会减弱细胞表面带电基团之间的静电斥力, 增强磷脂疏水侧链间的相互作用, 导致膜脂堆积密度增大, 流动性降低.

细胞膜存在有许多含 SH基的蛋白,膜蛋白有 - SH与膜的许多重要功能有关.本次实验显示出 0.38 J/cm^2 的 He-Ne激光使表面 - SH基增加,正说明 0.38 J/cm^2 是含 - SH基膜蛋白的适宜刺激量.需要注意的是用 0.38 J/cm^2 的激光处理 Raji细胞时,其 EPM下降,细胞表面负电荷减少可能是由于膜表面唾液酸基团的脱落或移位,导致膜 - SH基暴露增加.

肿瘤细胞普遍存在着细胞表面糖蛋白糖脂的酸化^[4,5],其表面负电荷增加,EPM升高.本实验显示当 He-Ne激光达到或超过 0.38 J/cm^2 时,均引起 EPM下降,其原因可能有两方面:一方面是由于激光的热效应使膜通透性增加,导致细胞周围正离子增多,中和了部分负电荷使 EPM下降;另一方面是由于低功率激光的共振效应可能引起细胞表面唾液酸基的丢失,从而导致膜表面负电荷减少,EPM下降.

参 考 文 献

- 1 Shinitzky M, Barenholz Y. *Biochim, Brophys Acte*, 1978, 515-367
- 2 Ellman G L. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 82-70
- 3 梁子钧. *生物化学与生物物理进展*, 1979, 11: 199
- 4 Barker SA *Nature* 184 BA 68 1959
- 5 Markry EW. *Experientia*, 1972, 28-182

The Bioeffect of Low Energy Laser Irradiation on Raji Membrane

Zhang Qing* Zhang Mengdan Ruan Xuzhi Lai Fuchan

Abstract The effect of He-Ne Laser ($0.0075, 0.38, 0.75, 1.5, 4.5 \text{ J/cm}^2$) irradiate on Raji cell was studied in this paper. A obvious increase of - SH amount on the membrane surface was found when 0.38 J/cm^2 was used. He-Ne Laser equal to or higher than 0.38 J/cm^2 can make EPM decreased, but has no prominent effect on - SH amount. 4.5 J/cm^2 can make membrane fluidity decreased.

Keywords He-Ne laser, membrane fluidity, EPM, - SH amount on membrane surface

* School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275