

致 谢

本论文是在导师范广涵教授和刘承宜教授的亲切关怀和悉心指导下完成的。两位导师在论文的选题、实验设计、文章修改、论文撰写等各方面倾注了大量的精力和心血。范广涵教授宽阔的胸怀、渊博的知识、求实严谨的工作态度、对科研工作一丝不苟、精益求精的作风；刘承宜教授严谨的治学态度、敏捷的才思以及高效的工作方法，深深地影响着我，令学生终身受益。借完成博士论文工作之际，谨向两位导师表示我深深的谢意！

感谢导师廖常俊教授传授的光学专业知识以及科研工作方法！

感谢刘颂豪院士的关心和教诲！

感谢华南师范大学研究生处的各位老师、信息光电子科技学院的兰曼娜老师、光电子材料与技术研究室的郭志友教授、孙慧卿和郑树文老师对我学习和工作上的关怀和支持！

感谢华南师范大学物理系的程敏熙博士在光学实验测试上的指导和帮助！

感谢华南师范大学体育学院领导和运动人体科学教研室的全体老师对激光运动医学实验室建设的支持和帮助！

感谢段锐老师、朱玲同学、李燕同学、黄平同学、蔡雄伟同学、殷建玲同学、刘鲁同学、王浩博士、谭春华同学、曹明德同学、李成长同学多年来的友好合作及真诚的友谊！

感谢在百忙之中评审和前来参加我论文答辩的各位教授！

最后，谨向所有曾经关心、鼓劲和帮助过本论文工作的老师、同学、亲人和朋友表示我衷心的感谢！

中 文 摘 要

发光二极管(light emitting diode, LED)是一种高亮度、高效率、长寿命的新型固体光源。被广泛应用于大屏幕显示, 交通信号灯, 多媒体信息存储, 照明等领域, 无论是产值还是产量, 在半导体光电器件中均占据主导地位。近年来, 研究开发 LED 在生命科学中的应用受到日益广泛的关注, 本论文的工作主要是研制出 LED 生物光源, 然后用该光源进行细胞生物学实验。

论文的第一章, 首先从非相干单色光的细胞生物效应、光生物调节作用机理、光生物调节中非共振作用的特征、以及生物信息模型(BIMP)等几方面, 论述和确立了研制 LED 生物光源的理论依据。接着第二章简要综述了最近几年来 LED 在生命科学领域中的研究进展, 主要包括 LED 在植物、动物、人体临床、生物医学材料、环境监测和科研方面的应用。由于在 LED 光生物刺激研究中, 对光源的照射剂量、光强调节和光强的均匀性等参数的要求非常准确, 而目前的 LED 生物应用装置又缺乏这些功能, 因此, 开发出一套针对不同生物实验对象, 光强度高、中、低搭配的 LED 光源将是十分必要的, 该生物光源的研制, 将使 LED 这种新型光生物实验技术进一步标准化和实用化,

第三章进行了 LED 生物光源的研制, 采用透镜组扩大光束、透镜阵列聚焦和点阵光曲面聚集光能三种光路设计, 设计出可用于动物细胞和组织培养使用的, 低强度、中等强度和较高强度的 LED 生物光源。在这三种光源中, 是通过选择每个光源中的四个工作参数来调节输出光的辐射照度。实际测试数据表明: 低强度光源输出的辐射照度范围为 $0.0021\text{--}0.9961(\text{W}/\text{m}^2)$, 在直径 20mm 的照射面积内所测辐射照度的标准偏差为 $0.02\text{W}/\text{m}^2$ ($n=40$, Mean: $0.71\text{ W}/\text{m}^2$); 中等强度光源输出的辐射照度范围为 $0.3579\text{--}11.2286(\text{W}/\text{m}^2)$, 在直径 30mm 照射面积内所测辐射照度的标准偏差为 $0.02\text{W}/\text{m}^2$ ($n=60$, Mean: $6.37\text{ W}/\text{m}^2$); 较高强度光源输出的辐射照度范围为 $17\text{--}110(\text{W}/\text{m}^2)$, 在直径 40mm 照射面积内所测辐射照度的标准偏差为 $0.02\text{W}/\text{m}^2$ ($n=80$, Mean: $71.54\text{ W}/\text{m}^2$)。经检验这三种光源在被照射面上的辐射照度都呈匀称分布, 对测试所得数据, 使用统计分析软件 SPSS 拟合得出三种光源的辐射照度经验计算公式, 它们显著性检验的 P 值都小于 0.05。该系

列光源除了具备光强可调、分布均匀优势外，还具有波长、波峰宽适宜，以及小巧、价廉、能耗低、发热少等特点，尤其是该生物光源在设计时采用的单元组装模式，使得不同强度的光照能够在同一批生物样品上实现，大大拓宽了生物实验的可选择性，提高了工作效率和实验准确性。

第四章和第五章，使用以上自制的中等强度的LED生物光源，研究在波长为 $640\pm 17\text{nm}$ 的LED红光作用下，对细胞的促进增殖和抑制凋亡。

促进增殖方面，是用 $5.93(\text{W}/\text{m}^2)$ 和 $7.13(\text{W}/\text{m}^2)$ 两种辐射照度的LED，照射所培养的人皮肤成纤维细胞，48小时后用细胞计数检测增殖。结果发现，培养人皮肤成纤维细胞的增殖在接受 $89\text{mJ}/\text{cm}^2$ 、 $214\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射剂量后无变化，而在接受 $428\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射后，与对照组相比有显著性差异。该实验结果支持BIMP模型，正如1.3节所指出的，促进增殖属于途径II， $89\text{mJ}/\text{cm}^2$ 和 $214\text{mJ}/\text{cm}^2$ 这两个剂量满足BIMP1，无增殖效应，而 $428\text{mJ}/\text{cm}^2$ 剂量满足BIMP2，促进增殖。

抑制凋亡方面，是用 $0.9(\text{W}/\text{m}^2)$ 和 $10(\text{W}/\text{m}^2)$ 两种辐射照度的LED，照射所培养的，由 $\text{A}\beta$ (25-35)诱导的鼠嗜铬细胞瘤细胞系PC12。结果表明，不同剂量的LED照射对细胞凋亡有不同影响，以 $0.9(\text{W}/\text{m}^2)$ 辐射照度的LED照射60分钟，则能显著减少由 $\text{A}\beta$ 诱导的PC12细胞凋亡。该实验结果可以为探讨使用光学技术这种绿色疗法，来防治老年痴呆病提供一定的启示。

关键词：发光二极管；辐射照度；成纤维细胞；PC12细胞；细胞增殖；细胞凋亡

Abstract

LEDs(light emitting diodes) have become new attractive solid light sources with superiority in high reliability, high brightness, long life and high energy efficiency and extensively been used in the area of big screen displaying, traffic signal lights, multimedia information storage and lighting. Whether in production value or in output, LEDs was dominating over the semiconductor photoelectricity apparatus. In recent years the potential for the development of LEDs for study of the visible light function in life science is also well recognized despite the difficulties to be overcome. In this paper three LED biology light sources were developed and have been used for cell biology experiments.

In the first part of this thesis, the reasons of develop LED biology light source have been discussed from the effects of non-coherent monochromy light on cells, the mechanisms and non-resonance characters of photobiomodulation on cells, the biological information model of photobiomodulation(BIMP) of low intensity laser(LIL) proposed by Professor Liu TCY. Recent advance of investigations of LEDs irradiation in life science were summarized in the second part of this thesis. Applications of LEDs to plant, animal cell, animal model, human clinical, biomaterial, environment survey and scientific research were review in the literatures. It is highly important for photobiomodulation on cells to measure irradiation dose, light intensity and uniformity. Presently, LED biology application equipments are rarely function above Because of its business purpose. So it is necessary to develop a set of LED biology light sources with different intensity. This work will make LED light biology technique more standardization and practicality.

Three LEDs biology light sources with different intensity for cell or tissue culture have been developed in the third part of this thesis. A concave (convex) lens to expand the beams of light, to focus the rays of light and an array of LEDs being set in the sphere connected with Fresnel lenses are three newly-designed in our systems. In

each source the illumination can easily be adjusted by selection of four parameters respectively. The illuminations radiate from three systems were measured and their experiential formulae for calculating illumination were obtained by SPSS. The illumination of light from the three LED systems ranges from: 0.0021 to 0.9961 W/cm² with the spot diameter 20 mm in low intensity LEDs source, the Standard Deviation is 0.02 W/cm²(n=40, Mean: 0.71 W/cm²); 0.3579 to 11.2286 W/cm² with the spot diameter 30 mm in moderate intensity LEDs source, the Standard Deviation is 0.02 W/cm²(n=60, Mean: 6.37 W/cm²); 0.3579 to 11.2286 W/cm² with the spot diameter 40 mm in high intensity LEDs source, the Standard Deviation is 0.02 W/cm²(n=80, Mean: 71.54 W/cm²). All the formulae get by SPSS was significantly different from P—test (P<0.05). The measured illuminations show not only they agree with calculations but also their distributions are all uniformity. The formulae get by SPSS is reliable. These LEDs light sources are not only adjustment and uniformity but also smaller, less expensive, required less power, generated less heat. Especially, the pattern of the construct both aggregate and desegregate in design was to realize different light intensity illumination on same biology sample at the same time. The selectivity, work efficiency and experiment veracity have been improve greatly.

In the fourth and fifth part of this thesis, the investigations of red LEDs light with the wavelength of $640 \pm 17\text{nm}$ on cell accelerating proliferation and controlling apoptosis using our moderate intensity LEDs source were carried through.

In promote cell proliferation, the effects of LEDs with the two irradiances of 5.93 W/m² and 7.13 W/m² on the proliferation of human skin fibroblasts have been explored. After 48 hours, cells were counted. After 89mJ/cm² and 214mJ/cm² irradiation, the proliferation of the cells showed no difference compared with the control group. The cells proliferation was enhanced by 428mJ/cm² irradiation. The experimental results supported BIMP. The lights used in the experiment are red lights. As 1.3 had pointed out, enhancing proliferation belongs to pathway two. 89mJ/cm² and 214mJ/cm² satisfied BIMP1, which showed no proliferation phenomena. 428mJ/cm² satisfied BIMP2, which showed proliferation phenomena.

In controlling cell apoptosis, monolayer cell cultures of PC12 induced by A β were irradiated with LEDs at the two irradiances of 0.9 W/m² and 10 W/m². Cell apoptosis was confirmed by DNA fragmentation assay and FAScan flow cytometer assay. The results shows different doses of LEDs irradiation have different effects on the apoptosis. The LED irradiation, when utilized at power of 0.9W/m² and 60 minute has significantly diminished A β induced apoptosis of PC12 cells. The experimental results provided usefulness revelations of photo-therapeutics in prevention and cure Alzheimer disease(AD).

Key words: light emitting diode(LED), irradiance, Fibroblasts (FBs), PC12 cells, proliferation, apoptosis

攻读博士期间所完成的论文

1. 刘江, 角建瓴, 刘承宜, 范广涵. LED 在生物医学方面的应用和前景. 激光杂志. 2002, 23 (6): 1~4.
2. 刘江, 范广涵, 刘承宜. 用于细胞及组织培养的低强度 LED 生物光源. 激光杂志. 2003, 24 (4): 78-80
3. 刘江, 刘承宜, 范广涵. 用于细胞及组织培养的中等强度 LED 生物光源. 光学技术. 2003, 29 (5): 526-529
4. 刘江, 范广涵, 刘承宜. 用于细胞及组织培养的高强度 LED 生物光源. 激光生物学报. 2003, 12 (4): 308-312
5. 刘江, 刘承宜, 范广涵. 用于动物细胞和组织培养的新型 LED 生物光源系列. 光子学报. 2004, 33 (2): 151-154
6. 刘江, 范广涵, 刘承宜. 改进实用型 LED 生物光源系列. 应用激光. 2003, 23 (3): 147-151 (EI 收录)
7. 刘江, 刘承宜, 范广涵. LED 技术在光生物及医学等领域的应用 (第十六届全国激光学术会议邀请报告) 中国激光. 2004 增刊, 31 (3): 1-3
8. Liu J, Liu TCY, Jiao JL, Fan GH, Liu SH. 2004. Design of light-emitting diode light sources for photobiomodulation on cells. Lasers Surg. Med. S16: 41 (SCI 收录)

第一章 LED 生物光源的研制背景

1.1 LED 的特性和用于生物光源的前景

发光二极管简称 LED(light Emitting Diodes)是在半导体 p-n 结为基础的多层结构或者是与其类似的结构中通以正向电流时,能够高效率发出可见光或其它波长光的器件,可见光是指人眼睛能感觉到的辐射,波长范围为紫光 380nm 到红光 760nm,目前已有红外、红、黄、绿、蓝、紫等各种发光二极管。

LED 具有把电能直接转化成光能的特点。与白炽灯相比,LED 具有以下优点[方志烈 1992]:(1)尺寸小、重量轻、易小型化和集成化;(2)全固体化,机械性能好,可靠性高;(3)冷光源,转化效率高;(4)高亮度、功率小、驱动电压低,可与集成电路匹配使用;(5)寿命长,亮度半衰期大于 10^5 小时;(6)响应时间短,一般为毫微秒数量级;(7)可多色显示,选择不同的半导体材料,控制不同的掺杂元素和浓度,可获得不同波长的光。

随着 LED 材料生长技术的发展和制备工艺的完善,商品化 LED 的发光效率几乎每十年提高一个数量级,其性能的提高推动了 LED 的应用发展,从汽车车灯、交通指示灯到多媒体信息存储,从全彩色大屏幕显示到白光照明,其应用范围日益广阔,可以说已进入千家万户,遍及国民经济各部门。

目前生命科学研究中所采用的人工光源按照发光原理可分为热辐射和电致发光两大类,如在动植物科研以及生物医学材料开发应用中已经普遍使用的白炽灯、金属卤化物灯、各种气体放电灯(如荧光灯、高压钠灯、高压氙灯、高压汞灯等)和激光器等,前面几种光源给出的光谱都比较宽,无法确定生物反应对什么波长最强烈,而且产生的热和红外辐射较多,需要用滤光片和吸热滤片将光谱窄化并降低辐射热,以获得符合要求的光谱分布,使光谱半宽窄化的另外方法是选择衍射光栅单色仪或棱镜单色仪,但这些仪器中复杂和昂贵的机械零部件往往使操作者难度加大,在这些方法中当光能经过各种滤光片和多级单色仪后,损失增大,从而不得不使用更强的光源,增加了能耗。

激光器是目前最好的单色光源,它所给出的光强度高,单色性和相干性都较好,对细胞的微束照射很有用,近些年来激光用于生命科学研究已经取得很大成

功,但激光器目前可供选择的波长有限,发射的光束十分细小,而细胞的培养和生物育种都需要大面积的光源,另外激光的谱线较窄,它一般发出仅仅 0.01nm 宽的单一波长的光,而大多数生物实验并不需要非常窄的光,一般地说半高宽从几到几十纳米的光就可以,而这正好是 LED 的光谱半宽范围,目前 LED 光谱峰的半宽最窄已可达到十几个纳米以下,这使得利用 LED 来进行光生命作用机理的研究成为可能。

近年来随着 LED 制作水平的飞速进步,尤其是在发光强度、波长与价格方面,目前已开发的 LED 与激光器相比也毫不逊色,甚至更有优势,尤其是在后两方面,由于 LED 发光效率大为提高,如目前最强的橙红色 LED(波长 615nm),发光效率为 100 流明/瓦,它所产生的光通量已相当于 4mW 左右的氦氖激光器,完全可以满足一般的临床低强度治疗的需要。而在波长、实用性与价格方面,目前的 LED 则远远胜过激光器,同激光器只能输出几个有限的波长不同,目前的 LED 的波长范围已经可以覆盖整个可见光区,在实际使用时,还可以将各种不同波长的 LED 做在同一个光源里使用,这一点又是目前的激光器所不能做到的。而从实用方面看,激光器的电源技术要求高,耗能大,泵浦源物质的能量转化效率很低,第一代激光器均需要复杂的水循环散热系统才能工作,而半导体激光器由于技术含量高,开发成本高,价格昂贵,也限制了它的应用[Jiang Jian Ping 2000],在市场价格方面,二者更是不可相比,LED 由于结构简单、供电电源小巧、功耗低、寿命长、可靠易推广,因此它的价格远远低于目前市场上的任何一类激光器。因此,这些原因使得用 LED 这种新光源来代替目前的激光器,进行生命科学的研究和应用,具有了广阔的前景和较高的实用价值。

1.2 Karu 关于非相干单色光的细胞生物效应

Karu 在六年时间里,从动物细胞分子水平上,系统地研究了细菌、酵母菌和哺乳动物细胞在 LIL 与可见光作用下的行为,发现光刺激效应主要与波长、照射剂量和照射方式有关,而相干光的条件不是必须[karu T 1989]。因此,LED 可以代替目前在生物医学中普遍使用的激光。

Karu 对这些不同水平的生物体,用相干性好的激光与相同波段的可见光进行的对比实验表明:无论是在 DNA 或蛋白质的合成速率[Fedoseyeva et al 1984, Karu TI 1984],细胞或细菌生长速率[Tiphlova 1986, Karu TI 1983];以及各种酶

的活性[Fedoseyeva 1986]和 c AMP 水平[Karu TI 1985, 1987]的测试结果来看,二者具有相同的刺激效果。而用相干和不相干的红光在治疗消化道溃疡方面也会有相同的效果[Sazonv et al 1985],从而说明非相干性可见光同样可以达到激光的生物刺激效果。另外, Karu[Karu 1998]还根据大量的实验结果从氧化还原电位的角度提出了这样的观点,如果细胞的氧化还原电位已经处于细胞可以发挥正常功能的状态,细胞对低强度单色光就没有响应;细胞的氧化还原电位比这个正常值越低,细胞对低强度单色光的响应越大。Tunér 等人[Tunér J and Hode L 1999]进一步指出,只有对那些生物功能需要调整的生物组织,低强度单色光才能产生影响。这跟下面要介绍的光生物调节作用机理是相符的。

1.3 光生物调节作用机理

低强度单色光对生物细胞和组织具有生物调节作用,也就是说,既具有刺激作用,也具有抑制作用,这种生物调节作用可能既与单色光的波长、剂量有关,也与细胞本身的功能状态有关。影响低强度单色光生物效应的因素非常复杂,因此,实验条件稍有不同就容易导致不同、甚至相反的结果。

如果单色光的能量刚好与色素的分子能级间隔相匹配,单色光与色素就可以发生共振作用。哺乳动物或人的视觉细胞膜上的视色素就可以共振吸收可见光,但一般非视觉细胞膜上没有这样的色素分子。研究表明[Karu 1998],低强度单色光对非视觉细胞有信号作用。目前光对细胞的调节通路可以分为两类,特异性通路由细胞色素 c 氧化酶[Karu 1987, 1989&1998, Yu et al 1997, Eells et al 2003]、血色素[Borisenko et al 1997, Stadler et al 2000, Vygovsky et al 2002, Mi et al 2004]、单线态氧[Lindgard et al 2003]和内源性卟啉[Klebanov et al 2003a]等光敏物质[Lavi et al 2003]与光发生共振作用的分子所介导,非特异性通路由与光不能发生共振作用的细胞的膜分子所介导[Liu TCY et al 1999, 2000&2003a]。

关于低强度单色光的作用机制,目前主要有 Karu[Karu 1998]的线粒体学说和刘承宜[LiuTCY1999~2000]等人的生物信息模型学说。Karu 认为,低强度单色光可被细胞线粒体中的细胞色素所吸收,随后不但促进 ATP 的合成,而且可以通过电子传递链产生的氧化还原反应调节细胞的功能。刘承宜等人认为低强度单色光的生物信息调节作用是由细胞膜受体所介导的,细胞膜化学配体的受体可与低强度单色光发生非共振作用。按照量子力学,非共振作用可以忽略,然而,当细胞膜受体处于相干状态时,这种非共振作用可被相干状态下的受体数目非线性放

大，只有病理状态下的细胞膜受体才会处于相干状态，因此，低强度单色光只能对病理状态下的细胞产生效应。病理细胞处于相干状态的受体接受光信号以后，将改变构型，并启动细胞内部的信号转导通路。刘承宜等人[Liu et al 1999&2000&2003a]将这种光信号转导称为协同光信号转导。

1.4 光生物调节中的非共振作用特征

共振作用是特异性的，只要有满足相应条件的光子和分子，共振作用肯定可以发生，非共振作用是非特异性的，因为发生的几率很小，需要特殊的条件才可以发生。而光生物调节作用只能作用于病理的细胞或组织。对于共振作用来说，只要满足相应条件的分子系统吸收相同数目的光子（光的照射剂量一样），效应应该是相同的，即倒易规则成立。然而倒易规则对光生物调节作用不成立，根据倒易规则（Bunsen-Roscoe 规律），当光剂量（光强乘以光照时间）保持恒定时，光化学响应对光强和光照时间是独立的。但对于光生物调节作用，给定剂量的光，存在一个最佳光强或最佳照射时间[Van Breugel et al 1992, Karu 1998, Schindl et al 2001]。光参数如果不在最佳强度附近，光就没有生物调节作用。这是非共振作用的第一个最显著特点。大量实验证明，这种非共振作用的另外几个显著特点是：第二，低强度单色光所产生的细胞效应非常弱。正如 Karu[Karu 1998]所指出的，尽管低强度单色光的细胞效应很弱，有时甚至观察不到，关于低强度单色光的细胞效应研究还是屡见报道。这说明，低强度激光细胞效应确实存在，但效应很弱，而且只有具备了一定的条件才可以观察到。第三，几乎可见光波段的每一种单色光都可以产生细胞效应[Karu 1998]。非视觉细胞不同于视觉细胞，即使线粒体的细胞色素对可见光有共振吸收，也不会像视色素那样覆盖整个可见光波段，蛋白质或核酸等细胞生色团的光谱吸收峰的波长都比可见光短得多，生色团对可见光的吸收只能是非共振吸，也正是这种非共振吸收可以解释所有波段的可见光都有细胞效应。第四，与共振作用不同的是低强度细胞效应不是精确依赖于激光的波长或频率。例如，620nm 和 680nm 的激光都可以促进 HeLa 细胞在玻璃上的黏附[Karu et al 1996]。第五，非共振吸收的损伤阈值远远高于共振吸收。

由于非共振作用的以上这些特点。因此，对大多数动物细胞或组织的光生物调节作用，光源并不需要非常窄的光，一般来说谱线半宽度从几到几十纳米就可以，而这正好是在发光二级管的波段宽范围。

1.5 生物信息模型(BIMP)

细胞膜受体非共振吸收单色光信号后所发生的下游过程与一般信号转导类似。通过分析大量的基础与临床研究,刘承宜等人[Liu et al 1999&2000&2003a, 刘承宜等 1997&2000]提出了光生物调节作用的生物信息模型(BIMP),从协同光信号转导(collective phototransduction)的角度成功解释了低强度单色光的信息功能。将可见光划分为, UVA(320-400nm)、紫、蓝和绿等冷色和红外(IR)、红、橙和黄等暖色两类。Almeida-Lopes 等人[Almeida-Lopes et al 2001]研究了 670、692、780 和 786 nm 四种波长的激光对人齿龈成纤维细胞的增殖作用,发现相同强度的激光诱导的细胞增殖作用与波长无关。这个结果支持 BIMP 对可见光的分类。

细胞对不同剂量段的暖色光或冷色光作出不同的反应,而且不同细胞的剂量效应规律不同。不同细胞的生理过程,有不同的分类。对于血细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞等细胞,可以按照信号转导途径来分类:

生理过程 1: Gs 蛋白介导的信号通路: cAMP ↑;

生理过程 2: Gq 蛋白, Gi 蛋白或受体关联酶介导的信号通路: cAMP ↓。

人二倍体成皮肤纤维细胞用氦氛激光照射后,对细胞数量和胶原蛋白 I 型量进行了测定。低能量的激光(低于 2.91mW)和较短的照射时间(0.5 到 2 分钟)大多具有促进作用,高能量(5.98mW)则无影响。值得注意的是,胶原蛋白 I 型的产生与细胞的增殖相互拮抗:当细胞增殖提高,则胶原蛋白 I 型就会减少[van Breugel et al 1992]。因此,对于成纤维细胞,可以按照细胞的功能来分类:

生理过程 1: 胶原合成

生理过程 2: 细胞分裂

按照 BIMP,

暖色兴奋信号生理过程 1

冷色兴奋信号生理过程 2

为了讨论的方便,将上述模型称为 BIMP1。

根据 BIMP 可知, BIMP1 的成立有一定的剂量范围。当激光的剂量超过 BIMP1 成立的阈值时,可以得到 BIMP2:

冷色兴奋生理过程 1

暖色兴奋生理过程 2

这个剂量范围是研究得最多的。BIMP2 得到了 $300\text{J}/\text{m}^2$ 低强度 He-Ne 激光诱导牛中性粒细胞产生呼吸爆发实验[Duan et al 2001]的直接验证。用化学发光法测量激光诱导中性粒细胞在体外呼吸爆发，用 genistein 等胞内信号转导分子活性抑制剂研究产生这一效应的信号转导途径。实验发现，酪氨酸蛋白激酶（PTKs）抑制剂 genistein（ 100M ）完全抑制了这一效应，磷脂酶 C（PLC）抑制剂 U-73122（ 1M ）和蛋白激酶 C（PKC）抑制剂 calphostin C（ 5M ）部分抑制了这一效应。实验结果表明，PTKs 在诱导呼吸爆发过程中起重要作用；[PTKs-PLC-PKC-NADPH 氧化酶]这一信号转导途径可能参与了激光诱导呼吸爆发产生的过程。 $300\text{J}/\text{m}^2$ 属于第二个剂量段。He-Ne 激光属于暖光。PTKs 介导的信号通路属于途径 2。显然，BIMP2 成立。

当激光的剂量超过 BIMP($2n-1$)成立的阈值时，根据 BIMP，可以得到 $\text{BIMP}_{2n}=\text{BIMP}_2$ ；当激光的剂量超过 BIMP $_{2n}$ 成立的阈值时，根据 BIMP，可以得到 $\text{BIMP}_{(2n+1)}=\text{BIMP}_1$ 。

由以上的理论模型，我们可以将不同可见光对动物细胞悬液的影响归纳为表 1。从表 1 可以看出，不同细胞的剂量段是不同的。通过应用不同剂量的 He-Ne 激光照射离体培养的兔和人的血管内皮细胞（VEC）和平滑肌细胞（VSMC）研究发现，剂量为 $0.54\times 10^4\text{J}/\text{m}^2$ 时，VEC（符合 BIMP2）与周围组织的粘贴力增加、生长和繁殖速度加快、活性增强，而 VSMC（符合 BIMP3）无明显增殖；剂量为 $1.6\times 10^4\text{J}/\text{m}^2$ 时，VEC（符合 BIMP3）的增殖速度已低于对照组，而 VSMC 仍无明显增殖；剂量为 $5.4\times 10^4\text{J}/\text{m}^2$ 时，VEC 和 VSMC 的生长速度、活性等均被明显抑制[Kipshidze et al 1996, 2001]。该实验表明，对 He-Ne 激光，VEC 的剂量关系与 VSMC 的剂量关系是不同的，这一点可以用来对不同的细胞进行不同的生物调节作用。

表 1. 不同波段的光对哺乳动物培养细胞的作用

Tab. 1.1 Action of various bands of light on mammalian cellular cultures

λ (nm)	Culture	Activity	Stimulation	Inhibition	BIMP	References *
			Dose, J/m^2	Dose, J/m^2		
Cold color	HeLa	Proliferation	10	-	1	Figs. 1.12&3.1
632.8	HT29 cells	Proliferation	-	1~10	1	p.205
633	HeLa	CAMP \uparrow	10	-	1	Fig. 7.10
632.8	Human diploid skin fibroblast s	Collagen type I production	<3	-	1	p.206
632.8	Human lymphocy tes+ PHA	Proliferation	56	-	2	Tabs. 5.2&5.3
Hot color	HeLa	Proliferation	10^2	-	2	Figs. 1.12&3.1
630-63 3	Chinese hamster fibroblast s	Proliferation	10^3	-	2	Tab. 7.1
632.8	Human embryoni c foreskin fibroblast s	Proliferation	10^2	-	2	Tab. 7.1
632.8	Red	Deformabilit	-	10^4	2	Yova et al

	blood cells	y				1994 ⁸
632.8	HeLa	Proliferation	10^2	-	2	Tab. 7.1
632.8	HeLa	Clonogenic ity	$10^2 \sim 10^3$	$>10^4$	2	Fig. 4.5A
632.8	Mouse mast cells	Cell granule release	2.4×10^4		2	Trelles et al 1988 ²¹
660	3T3 fibroblast s	Proliferation	10^4		2	Yu et al 1993 ²²
660	Human mononuclear leukocyte s	Proliferation	10^4		2	Shields et al 1992 ²³
660	CD4 T-cells +PHA	IL-2 release	10^4		2	McGowan et al 1996 ²⁴
660	Hypertrophic scar-derived fibroblast s	Proliferation	$2.4-4 \times 10^4$		2	Webb et al 1998 ²⁵
660	Human neutrophils	Bacteria killing	$2.4, 4.8 \times 10^4$		2	Yu et al 1997 ²⁶
405	Human lymphobl	Proliferation	-	10^5	3	Tab. 7.1

	astoid cells					
632.8	Rat macrophages	cAMP↓	10^6	-	4	Zheng et al 1991 ²⁷
694.3	Human melanoma culture	Proliferation	$(2.4-2.8) \times 10^6$	-	4	Tab. 7.1
694.3	Mouse fibroblasts L929	Proliferation	10^5	-	4	Tab. 7.1

*Karu 1998

1.6 LED 生物光源研制的立论依据

根据以上几节的讨论，可以归纳出研制 LED 生物光源的立论依据主要如下：

(1) 从 Karu 关于非相干单色光的细胞生物学效应实验可知，非相干单色光完全可以取得同激光一样的生物刺激效应，因此，可以用 LED 单色光代替激光。(2) 由于非共振作用的以上这些特点，因此，对大多数动物细胞或组织的光生物调节作用，光源并不需要波段非常窄的单色光，这方面 LED 要比激光更具优势。(3) 另外由非共振作用还知道，非视觉细胞几乎可对任何波段的可见光在适当的条件下产生响应，而 LED 的可选择波段要比现有的激光器多得多，因此，使用 LED 生物光源可以得到比激光更多的生物刺激信息。(4) 从生物信息模型 (BIMP) 可知，虽然非共振作用不要求波宽非常窄的单色光，但也不能用白光，因为冷光与暖光的作用会相互抵消，即使白光有效应，但剂量的可操作性很差；当然，单色光的谱线宽度也不能太宽，因为不同单色光的剂量关系是不同的，因此，一般来说谱线半宽度从几到几十纳米就可以，而这正好是在 LED 的波段宽范围。

第二章 LED 目前用于生物医学的研究进展

2.1 LED 用于植物的太空发育

利用人工光源在外太空对植物在微重力环境下的研究已进行多年。美国和前苏联在以往进行的多次太空植物试验中，光源都是用荧光灯，它由红、蓝等光谱波段的单色光混合提供白光，试验的种类有拟南芥、小麦、水稻等谷物、莴苣、马铃薯、卷心菜等叶菜类和根茎植物。这些试验表明，缺乏重力并不会阻碍这些植物在太空的正常生长发育，与第一代种子相比，微重力作为胁迫因子，对在太空中正常出产的第二代和第三代种子的影响，已在细胞水平上发现[Bingham et al 2000]。目前许多在太空搭载中结出的作物种子带回地面后，已经发育并正在为我们生产着绿色健康的食物。

LED 第一次作为植物光源是在 2001 发射到国际空间站（International Space Station, ISS）的 ADVANCED ASTROCULTURE（ADVASC）装置里，它由美国威斯康星航天自动化控制中心研制，用蓝色和红色 LED 做光源，作物生长密闭室高 34cm²，面积 486cm²，用拟南芥在太空生长八周后将结出的豆荚种子带回了地面[Kostov et al 2002]。

2.2 LED 用于动物细胞的体外试验

在研究可见光对细胞繁殖的影响中，Whelan 等用不同波长和照射剂量的 LED 对体外培养的细胞进行照射，如对人的正常上皮细胞用 688nm 的 LED，以 4J/cm² 剂量进行照射后，测其细胞增长为 155-171%[Whelan et al 2001a]，从 Sprague Dawley 小鼠皮中提取的成纤维细胞(3T3)，用 670nm 的 LED 以 4J/cm² 的剂量进行照射，在照射后第二天开始测定其 DNA 合成为 43%，第三天为 28%，第四天为 10%，从小鼠骨中提取成骨细胞(MC3T3-E1)，分别用 670nm、728nm 和 880nm 的 LED 以 4J/cm² 的剂量进行照射，同样在照射后第二天开始测定其 DNA 合成为 119%，第三天为 33%，第四天为 17%(以 880 nm 组为例)[Whelan et al 2001b]。

在 LED 用于杀灭肿瘤细胞的研究中，Whelan 等对在体外培养的犬神经瘤细

胞 (2A9) 和人成胶质瘤细胞 (U 3 7 3), 用 Lutetium Texaphyrin (Lutex, 吸收峰 7 4 0 nm) 和 Benzoporphyrin Derivative (BPD, 吸收峰 6 9 0 nm) 做光敏剂, 用 PDT 方法进行杀死肿瘤细胞实验, 分别用发射峰在 7 2 8 nm 和 6 8 0 nm 的 LED 做光源时, 二种细胞系中 5 0 %—8 6 % 的癌细胞被杀死 [Whelan et al 2001b, Whelan et al 1998]。

在研究可见光对细胞附着行为的影响方面, Karu 对在体外培养的 HeLa 细胞, 使用波长为 820 ± 10 nm、10Hz、16-120J/m² 的脉冲 LED, 来研究细胞与玻璃基质间的附着行为。Karu 发现, 在加入哇巴因 (Quabain)、花生四烯酸 (arachidonic acid) 和 ATP 之前, 先用 LED 对细胞进行照射, 则可以消除这些化学物质加入后对细胞附着的抑制效应, 当在细胞培养液中加入阿的平 (quinacrine) 后再进行脉冲照射, 也可以消除它对细胞附着的抑制影响, 而氨基吡啶 (amiloride) 与脉冲 LED 光对细胞附着有协同效应, 通过脉冲 LED 光来刺激细胞附着的照射阈值随着细胞悬浮液中加入氨基吡啶或哇巴因的量而减少 [Karu et al 2001a], 同时还发现, 对细胞用抗氧化剂 (如自由基清除剂) 处理, 可以消除光对细胞附着的影响, 呼吸链中的抑制剂如鱼藤酮 (rotenone) 和叠氮化物 (azide) 强烈地影响光照效果, 氧化剂如过氧化氢 (H₂O₂) 在低浓度, 以及亚甲基兰 (methylene blue) 会增加细胞的附着, 超氧化物歧化酶不会影响光的作用, 而过氧化氢酶 (catalase) 刺激或抑制细胞的附着, 则取决于它的浓度与作用次序 [Karu et al 2001b]。

在研究可见光抑制细胞生长方面, Ohara 等对 B16 黑瘤细胞分别用红色 LED (634nm, 2.9 mW/cm²) 光、黄色 LED (518nm, 2.3 mW/cm²) 光和蓝色 LED (470nm, 5.7mW/cm²) 光, 结合 5-溴 2-脱氧尿苷 (BrdU) 渗入进行 DNA 分析, 用流式细胞仪对光照后该细胞周期进行分析, 发现照射 20 分钟后 96 小时, 蓝色 LED 光可明显减少 S 期的细胞数, 由 43.60% 下降到 4.09% (同对照组相比), 而相应增大 G₀/G₁ 和 G₂/M 期的细胞数, 分别由 42.92% 上升到 70.85% 和由 13.49% 上升到 25.06% (同对照组相比), 从 G₁ 到 S 期过度的滞后和 M 期的延长导致了 B16 黑瘤细胞的生长抑制。从该 B16 细胞光照后克隆的形态、数量及每个克隆里的细胞数量表明, LED 蓝光可增强 B16 黑瘤细胞的静止状况, 但没有杀死效果。该试验还表明用塑料薄膜覆盖细胞培养器后再进行光照, 可完全消除紫外光 UV

(320—380nm)对B16细胞照射后克隆形态的抑制效果,而LED蓝光则不会受这一影响,说明这两种光对细胞的作用机制不同[Ohara et al 2002]。

最后,在研究可见光抑制细胞凋亡方面,段锐等用红光LED(640-670nm),对由淀粉样多肽(Amyloid β -peptide, A β 25-35)诱导而凋亡的单层PC12细胞悬浮液,施加不同的照射剂量,强度0.5-10W/m²,时间30至60分不等,用荧光显微镜、流式细胞仪和DNA电泳断层分析仪,对凋亡细胞进行确定。发现在PC12细胞培养液加入30毫摩尔的A β 25-35后,24小时后该细胞的凋亡率由7%上升到42%,而如果用0.9 W/m²强度的LED红光照射60分钟后,该PC12细胞的凋亡率在24小时后仅达到15%。用琼脂糖胶进行的DNA电泳断层分析也得出了同样的结果,用LED红光照射后DNA电泳断层明显减少,细胞凋亡得到抑制。该试验得出的另一个结论是,在相对高的光强度下,用不同的照射时间来进行光照,对细胞的凋亡影响没有显著差别[Duan et al 2003]。

2.3 LED用于动物模型的试验

某些创伤由于周围的动脉血流受到阻碍而产生局部缺氧,导致营养不足和易受感染从而形成更难愈合的缺血性慢性创伤,目前对这类创伤的形成还知道得很少,尤其是在分子水平上,为了研究LED和高压氧治疗(hyperbaric oxygen therapy, HBO)对这类创伤的效果,Whelan等在Sprague Dawley正常鼠上进行动物模型实验,在鼠皮上创造11mm直径的创伤,用小硅片植入皮肤肌肉下面来阻碍血管生长以形成慢性创伤,在14天时间里,分为四组,每组15只鼠,分别进行对照(无LED和HBO)、HBO、LED(880nm)和LED与HBO结合,来进行创伤愈合实验,创伤的大小由计算机扫描测量,实验的同时对动物模型进行解剖取样,用酶联免疫吸附(ELISA)测定其成纤维生长因子(FGF- β)浓度和血管内皮生长因子(VEGF)。其实验数据表明,只有用LED和HBO结合,小鼠皮肤创伤才可以在规定时间内愈合得最快,其VEGF和FGF- β 浓度的量与其它组比较也是最高的。这几组实验中的VEGF和FGF- β 都是在创伤中期,约第七天左右浓度达到最高,以后随创伤的进一步愈合而浓度逐渐降低[Whelan et al 2001b]。

在研究光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)肿瘤方面,体外细胞实验中已经证明光敏剂photofrin、BPD和Lutex有杀灭肿瘤细胞的功能,在进一步的动物模型实验中,用犬类动物对这几种光敏剂的毒性进行了研究,得出了在一

定 LED 照射剂量下正常蒙古犬(约 20kg)所能忍受的最大药物剂量 (MTD), 用 photofrin 当照射 LED 剂量为 3.63 J/cm^2 时, MTD 为 1.6 mg/kg [Schmidt et al 1996], 用 BPD 当照射 LED 剂量为 1.00 J/cm^2 时, MTD 为 0.75 mg/kg , 当 LED 保持 1.00 J/cm^2 剂量, BPD 剂量增加到 1.0 mg/kg 时, 会在动物上观察到皮肤损伤和神经中毒现象, 当 BPD 剂量保持 0.75 mg/kg , 而 LED 增加到 1.25 、 1.50 和 1.75 J/cm^2 时, 也会在动物身上观察到皮肤损伤, 严重神经中毒和死亡结果[Whelan et al 1998]。

在研究单色光对动物视觉神经细胞损伤的调节方面, Eells 等以小鼠 (Haran-Sprague-Dawley) 为模型, 通过用视网膜电位图 (electroretinogram, ERG)、组织病理解剖分析等手段, 研究了红光 LED (670nm , 4J/cm^2) 对由甲醇中毒而导致的视神经功能下降的保护作用。发现在用 LED 阵列治疗 72 小时后, 分析记录的 ERG 后表明, 被甲醇诱导中毒而下降的视功能得到了一定程度的恢复, 尤其是在高光强水平照射时恢复效果更为明显。通过组织病理解剖分析, 与对照组相比, 由甲醇中毒而产生的视网膜水肿、空泡、光受体的肿胀以及视网膜细胞中线粒体的异常冠状增大等病理特征, 通过红光 LED 阵列治疗后会消失。该研究结果为利用单色光的光生物调节作用来治疗视网膜损伤和相关疾病提供了启示 [Eells et al 2003]。

利用小型 LED 作为刺激光源, 置入活鼠头内, 再配合置入的记录电极和参考电极, Robert 等获得了 Wistar 鼠在不同睡眠阶段的 ERG。发现在慢波睡眠 (SWS) 时的 ERG 振幅要高于醒目 (W) 状况下的 ERG 振幅两倍以上; 慢波睡眠 (SWS) 和深度睡眠 (REM) 时的 ERG 图不同; 被 LED 激发的视皮层电位响应同 ERG 的电位变化非常相似 [Robert et al 1994]。最近 Robert 等又将记录电极分别置入活鼠角膜、交叉视神经束和视皮层附近, 通过记录这些部位在 W、SWS 和 REM 阶段的 ERG, 来研究大脑不同部位在不同睡眠阶段对神经节细胞的反应和调节 [Robert et al 2001]。

Wiltchko 等还用一种澳大利亚侯鸟银眼 (silvereye), 研究了在夜里绿光 LED (565nm) 的强度对该鸟的磁场接受体定向能力的影响。该研究发现, 在 $0.0021\text{--}0.0075\text{W/m}^2$ 范围强度下, 该鸟的磁场定向功能正常, 如光强低于 0.002 W/m^2 该鸟表现为缺乏活性, 但仍能基本正确定向, 比正常定向方向反时针偏差

12° 以内，但在高光强 0.015 W/m^2 时，该鸟的磁场定向会比正常定向方向反时针偏差近 70° [Wiltshko et al 2000]。

2.4 LED 应用于人体临床医疗

在太空医学实验应用中，对长期在太空执行任务的宇航员，由于在微重力环境下，人体细胞的生理状态会发生相应变化，肌肉和骨骼会发生一定程度的萎缩与虚脱，在太空执行任务时受到的意外创伤由于缺乏重力来刺激细胞生长，其伤口很难愈合，往往需要一直等到返回地面才得以治疗。对此，美国宇航局（NASA）在太空飞船中用 LED 点阵光源（630-800nm）来对宇航员的肌肉与骨骼进行恢复治疗和加速伤口的愈合，均收到很好效果，同时 NASA 还用 LED-PDT 技术来对太空中由于宇宙射线可能引发的肿瘤对宇航员进行早期检查与防治 [Whelan et al 1999]。

对于一些患有白血病的儿科病人，在植入与他们的细胞抗原相匹配的骨髓前，要接受最大剂量的放化治疗以杀死他们体内的瘤变骨髓，由于化疗药物和放射疗法会不加区别地杀死快速分裂的细胞，如口腔黏膜细胞和胃肠道细胞系，进而导致严重的胃肠效应（GI effects），这些化疗病人经常会引发急性口腔溃疡，导致食咽困难。使用 NASA 的 688nmLED，当每天病人接受完最后一次化疗后，再接受 4 J/cm^2 的 LED 照射剂量，在 30 位受 LED 治疗的病人中，47% 的人口腔疼痛受到缓解，其口腔溃疡的治愈程度比预想的要好 [Whelan et al 2001b]。

在用 LED 治疗肿瘤疾病方面，由于 LED 光谱分布的半峰宽比激光宽 20nm 左右，可以激发更多的光敏剂，利用 LED 内置球型光源在光动力治疗食道癌，以及用 LED 阵列治疗皮肤癌已取得一定临床效果。目前美国食品与药物管理局（FDA）已经批准将以 LED 为基础的 PDT 用于在儿童和成人中治疗脑肿瘤，例如用光敏剂 photofrin 与 LED 结合，已成为当前对肺癌和食道癌的普遍疗法，BPD 与 LED 球型改进装置 [Schmidt et al 1996]、LED 点阵光源和 LED 探针结合可用来治疗皮肤癌、银屑病和类风湿关节炎 [Whelan et al 2001b]。使用 630 nmLED 点阵光源，结合 2% 的 Aminolaevulinic acid (ALA) 对肢体的鲍思病（Bowen's disease），一种癌前皮炎来进行治疗，照射剂量为 240 J/cm^2 ，前后间隔时间 90 分钟，此 LED 点阵功率为 40 mw/cm^2 ，其治疗效果与传统外科治疗相比，不会产生伤疤和使肢体功能丧失 [Wong et al 2001]。

Miyake等发明了一种新型ERG测试系统,用来监测在玻璃体摘除和其它人眼外科手术时视网膜功能的变化,该系统是将红、绿、蓝LED置入接触透镜中,该透镜外围的金属圈相当于记录电极,用这种透镜接触近人眼时,它既是记录电极又是刺激光源。用该系统记录下了人眼手术时玻璃体出血、非导电物质进入眼体空穴、不同内眼压和患细菌性眼膜炎时的ERG,结果说明在进行玻璃体摘除手术时,改变眼体空穴内的注入介质和剧烈提升内眼压都会使ERG图形发生改变[Miyake et al 1998]。

2.5 LED 用于生物医学材料加工

在牙体修复手术过程中,所用的修补材料一般为复合树脂,它由光敏剂和光引发剂组成,常用的光敏剂为樟脑醌(Camphoroquinone, CQ),它吸收 400—500nm 蓝光,光引发剂一般为胺活化剂如 N, N-二甲胺基甲基丙烯酸乙酯(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate, DMAEMA)等,使用时将光敏剂和胺活化剂做成糊状放在要修补的牙部位,再将高亮度的蓝光用光纤导入口中,在光照下两者产生聚合反应而固化。目前光固化灯(curing light)是用钨卤灯做光源,使用时要将产生的白光用干涉滤波器等器件滤掉红外光和波长在 500nm 的可见光,该灯能耗高,使用中间要停顿用风扇散热数分钟,只能间隙使用,而用高亮度 LED 蓝光做光固化灯,则可完全省去滤波器等附件,也无需散热,所产生的光也会被光敏剂等充分吸收利用。

Jandt 等人用 27 个蓝色 LED 做成光源,总功率 $350\text{mW}/\text{cm}^2$,钨卤灯功率为 $755\text{mW}/\text{cm}^2$,用这两种光源分别对一种以樟脑醌为光敏剂的牙科材料(Spectrum TPH)的 A2 和 A4 面光固化 40 秒后,固化深度(cure depth)和材料的耐压强度测试结果表明,钨卤灯固化深度(6.4mm A2, 5.19mm A4)和 LED 固化深度(5.33mm A2, 4.27mm A4)都超过了 ISO4049 要求,三种方差统计分析结果显示,用这两种光源处理后的材料耐压强度没有显著差异,并都超过了人体牙臼在自然咀嚼时所承受的压力,符合临床要求。由于 LED 光发射峰完全在的樟脑醌的吸收峰包裹之内,所以低功率 LED 光源的固化效果相当于二倍功率的钨卤灯的固化效果,显示了 LED 在这方面更大的优势[Jandta et al 2000]。

Hofmann 等对三种聚合树脂材料(Herculite XRV, Filtek Z250, Definite)用钨卤灯($800\text{mW}/\text{cm}^2$)和两种光强的 LED 灯($320\text{mW}/\text{cm}^2$, $160\text{mW}/\text{cm}^2$),采用固

定光强照射和逐渐增大光强两种照射方式，照射时间总共都为 40 秒，使用一种圆盘倾斜技术（deflecting disc technique）[Watts et al 1991]，同时测定光聚合反应后这些树脂材料的收缩应变动力学参数和温度的变化。硬度测试表明，对 Herculite XRV 和 Filtek Z250（两种材料只含樟脑醌 CQ 为光引发剂），经钨卤灯和高光强的 LED 照射后会产生相同的硬度，而 Definite（除 CQ 外还含有另一种光活性剂吸收更低波段的光）经 LED 照射后硬度降低。同钨卤灯相比，经 LED 照射后的这三种树脂材料在聚合反应中升高的温度和由于光照而产生的热都低于前者。三种树脂材料光聚合后最快的聚合体积收缩都发生在经钨卤灯固定光强照射后，随后是高光强的 LED 和低光强的 LED，采用逐渐增大光强照射则可降低聚合反应的体积收缩。对 Herculite XRV 和 Definite 经钨卤灯光聚合后 60 分钟所产生的收缩应变均高于两种 LED 光聚合后的收缩应变，而对 Filtek Z250 用三种光源光聚合后 60 分钟所产生的收缩应变大致接近[Hofmann et al 2002]。

2.6 LED 新器件的开发利用

在医疗应用方面，目前已经开发出一种新型 LED 球型装置[Schmidt et al 1996]，此装置的 10 cm 长空心管内有三个通道，分别导入 LED 电线，冷却蒸馏水和 0.1%脂肪乳液，冷却蒸馏水围绕 LED 发光芯片进行循环冷却，可保持整个装置处于 37℃以下，脂肪乳液使 LED 光均匀分散，球心中央共放置 144 个 LED 发光芯片，可使其 LED 总输出功率达到 1.0W，球的直径从 2 cm 到 5cm，装入的 LED 芯片波长可根据治疗的需要来决定，这种装置输出功率高，由于不靠光纤输出，可减少 50%的输出损耗，在 PDT 食道癌时，可将此装置放入食道内，以杀死那些食道内避光处的肿瘤细胞。

在医学检验方面，还开发出一种波长在 570nm 的 LED 光电仪，它利用血浆与血液沉积物之间的光吸收差别来监测人的血液沉积，以获取红细胞沉积速度（erythrocyte sedimentation rate, ESR）。LED 方法与传统的 Westergreen(WG)方法相比，需要的血液样少（LED 方法只需 30 μ l，而 WG 方法需 1ml），测试时间缩短了 4 倍，同时可以得到更多的有关红细胞聚合方面的信息[Ciorte et al 2001]。其它还有，利用 LED 作光源，与光接受器、固相 ELISA 等一起组成光学三通道细胞流动免疫传感器，可以同时自动测定毒素，如葡萄球菌肠毒素 B(staphylococcal enterotoxin B, SEB)；病毒因子，如嗜菌体 M13(bacteriophage，

M13);以及细菌因子, 如大肠埃氏杆菌(*Escherichia coli*)[Koch et al 2000]。

在监测有害细菌和病毒方面, James 等人研制出一种现场手提式核酸分析仪, 内置 25—30 微升 PCR (polymerase chain reaction, PCR) 聚合酶链反应塑料管, 以硅和铂为材料的热循环器可快速加热和冷却 PCR 反应管, 490nm 和 525nm 的两种 LED 光分别用来激发两个通道中的 FAM 和 JOE/TAMRA 荧光染料, 该仪器重量在 1Kg 以下, 可在 12V/3.5A 电池供电下测出四个样品, 检测一个样品时间少于 30min, 用该仪器成功分析出炭疽、大肠杆菌等[James et al 2003]。

在环境监测方面, Tao 等利用紫外 LED 的发射波谱峰与六价铬离子的吸收峰非常重合这一特点, 用紫外 LED 作为激发光源, 折射率在 1.29 至 1.31 的聚四氟乙烯 (Teflon AF 2400) 为材料, 做成内径 0.9mm 外径 1.17mm 的两米长细管。测定时将检测样品直接注入细管内, 形成以水为核芯的光纤, 由于检测时光程大大高于通常的 1cm 长度, 因此可大大提高检测的灵敏度, 同时由于激发光的发射峰与被检测物 Cr^{6+} 的吸收峰非常吻合, 因此可省去滤波器等附加的光学器件, 该仪器用电池供电, 小巧便于携带, 可在野外作业, 在 pH 高于 8 时, 对 Cr^{6+} 的最低检出限量为 0.1ppb, 在通常的水质 pH6 左右, Cr^{6+} 最低检出限量为 0.2ppb[Tao et al 2002]。

在利用 LED 改进科研仪器方面也做了大量工作, 如植物中的痕量元素钼对调节植物中固氮酶的活性十分重要, 为了在 $\mu\text{g l}^{-1}$ 的含量上检出钼, Ana 等设计出多通道液流抽取检测系统, 用微机控制六个阀门的开关和进入螺线管反应器的液体量, 475nm 的 LED 做激发光源, 光电二极管做探测器, 该装置在钼的含量为 25 到 $150\mu\text{g l}^{-1}$ 之间, 检出结果的线性响应相关系数为 0.999, 最低检出限量为 $4.6\mu\text{g l}^{-1}$ [Comitre et al 2003]。而 Sean 等将光纤与各波段的 LED 耦合后形成激发光源, 导入体积为 721nl 的流动微室, 该微室有四个相互垂直的接口, 被检测荧光是在与激发光垂直的方向, 通过滤波片和微透镜后由光纤导出, 微室的另两个接口分别接入毛细微管以注入和排出分析试液, 这个毛细流动注入分析系统, 可通过光纤耦合不同波段的 LED 来检测不同的荧光信号[Sean et al 2002]。

2.7 LED 生物光源研制的意义

随着近年来 LED 开发技术的迅猛发展, 尤其是管芯超高亮度和波段全色化的实现, 使 LED 在上述生物医学的应用也进一步普及。但由于 LED 的最初应用是在信号显示、背光源或交通安全指示等领域, 在这些应用中对 LED 光源的照

射剂量、光强和光照的均匀性等参数要求不高，或根本不用考虑。而在光生物刺激实验中，对光源的这些参数往往要求得非常准确，而不同的生物实验又需要不同强度的光源来照射。因此，有必要开发出一套针对不同生物实验对象，光强高、中、低搭配的 LED 光源，另外，能够有一套较可靠、实用的经验公式，来对该系列光源的工作参数进行准确计算，也是十分必要的。这样，就可以使 LED 这种廉价、方便、可靠的新型光生物实验技术进一步标准化、系列化和实用化。为它在生物医学和细胞生物学等领域开拓更广阔的应用，提供可靠的理论和实验基础。

第三章 LED 生物光源的研究

3.1 生物光源的技术要求

一般对生物光源最基本的技术要求有这四点：第一，光强能够连续可调，光源可对不同的生物对象进行不同强度的照射；第二，光源波段的选择范围广，实验时能选择到所需波段的单色光，对生物对象进行光刺激；第三，在整个照射范围内的光能密度要均匀，以保证在计算总照射剂量时的准确性；第四，能够照射比较大的面积，不但可以进行细胞规模的研究，而且可以进行组织培养乃至作物光照发育的研究。

3.2 LED 作为生物光源的优势与缺陷

近年来随着半导体工业的飞速发展，不但铝磷铟镓、砷化镓和氮化镓等 LED 关键材料的研究取了突破性进展，而且 LED 管芯的制造工艺也在不断提高，从而逐步实现了 LED 光能转换的高效率、超高亮度和全色化，从而使该发光器件具有了节电、长寿命、波长覆盖宽、固体非真空器件、不需散热、体积小和重量轻等特点。

动物细胞或组织与单色光的作用是非共振作用[角建瓴等 2003，刘承宜等 1997，Liu TCY 1999, 2000]，因此光生物调节作用不是严格依赖于波长[Karu 1998]。研究表明[Karu 1998, 1989]，普通单色光与激光的光生物调节作用没有显著性差异。发光二极管(LED)所发出光正好是满足这种要求的单色光。研究进一步发现，不同的动物细胞[Karu 1989]或组织[Tunér et al 1999]的光生物调节作用的剂量依赖关系是不同的。实际上，LED 已经广泛用于生物医学的研究[刘江等 2002]。

但是，目前 LED 与激光相比最大的劣势就是其强度可调性。激光可以通过调节激光器的电流来控制它的输出功率，而 LED 的调节电流范围有限，主要是当电流超出 LED 的最大正向直流电流时，会使管芯 PN 结的温度上升，影响 PN 结的复合发光，导致电流减小，发光效率迅速降低；其次 LED 发光中心波长还随温度上升向长波侧移动，光谱宽度也随之增加[Lorenz et al 1966]，这是带隙宽度、载流子能量分布和晶格振动等因数相互作用随温度变化的结果；另外 LED

的封装材料如环氧树脂等对温度的承受也有一定的极限要求。

基于上述原因，本论文是在一定的有限电流调节范围内，主要是通过采用不同的光学设计，使 LED 输出光的强度能够得以改变，如光源的辐射照度得以降低或提高，从而克服了 LED 光强调节较差的缺陷，使其能够更好地适合于生命科学的研究。

3.3 LED 生物光源的基本设计要求

针对生物光源的基本技术要求，在设计 LED 生物光源时，是通过以下几种方法来使光源达到生物光源的要求。

光强调节方面：在选定好适合亮度的 LED 管芯，对光源采用了一定的光学设计后，便得到了高、中、低三种强度的 LED 生物光源，每种光源均可在 LED 的正常工作电流范围内（一般 20mA 至 40mA），通过控制 LED 的电流来调节光强，操作简单，调控准确。

光能密度均匀方面：在本光源系统的光学设计中，由于是采用了透镜组扩展光束、透镜阵列和菲涅尔透镜这些光学器件，使输出光最后都尽可能以平行光到达生物样品上，因此，可以最大限度地使整个照射范围内各部分的光能密度都相同时，这样就可通过调节照射时间来准确计算出生物样品所接受到的照射剂量。

照射面积方面：本光源系统的光学设计既可以和细胞培养孔板结合，又可以和较大面积的玻璃培养器套用，这样就可以满足不同的生物实验对不同光照面积的需要。

光源波段选择方面：是通过选择不同波段的 LED 管芯，来满足生物实验对不同单色光的需要。

3.4 LED 生物光源系列的光学设计与制作

3.4.1 光源的光学设计

通过采用透镜组扩大光束、透镜阵列聚焦和点阵光曲面聚集光能三种光路设计，分别得到低强度、中等强度和较高强度的 LED 生物光源。对于低强度 LED 光源，是采用透镜组扩束来降低 LED 输出光的辐射照度，其光路图如图 3.1 所示；对于中等强度 LED 光源，是通过透镜阵列聚焦来提高 LED 输出光的辐射照度，其光路图如图 3.2 所示；对于高强度 LED 光源，是首先将安装在曲面点阵上的 LED 光汇聚在曲面的曲率中心，然后经一菲涅耳透镜把光线平行照射出去，

既提高了 LED 输出光的辐射照度，又使输出光改变了方向，其光路图如图 3.3 所示。

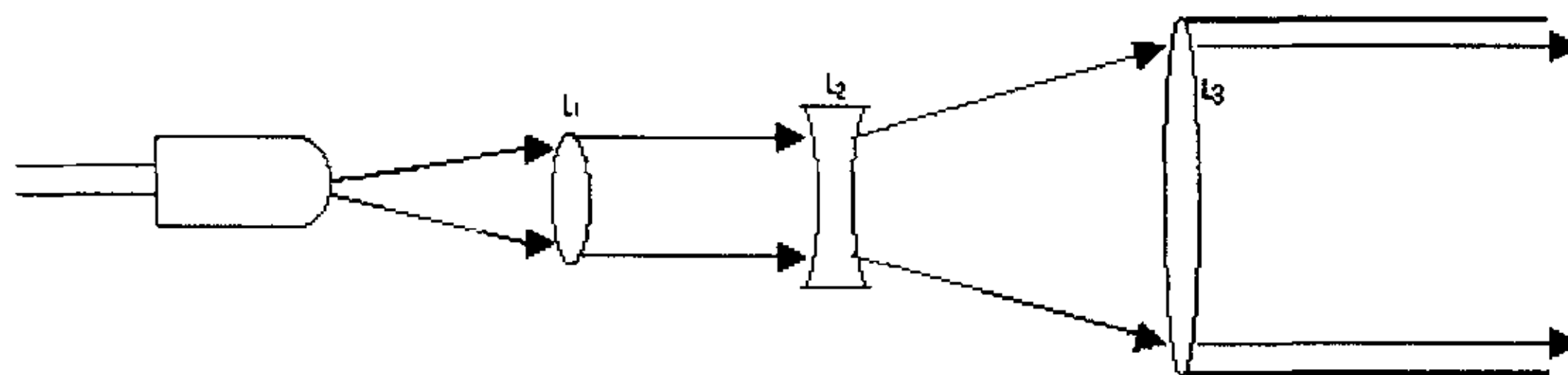


图 3.1 低强度 LED 光源光路图

Fig 3.1 The scheme of optical system in low intensity LED sources

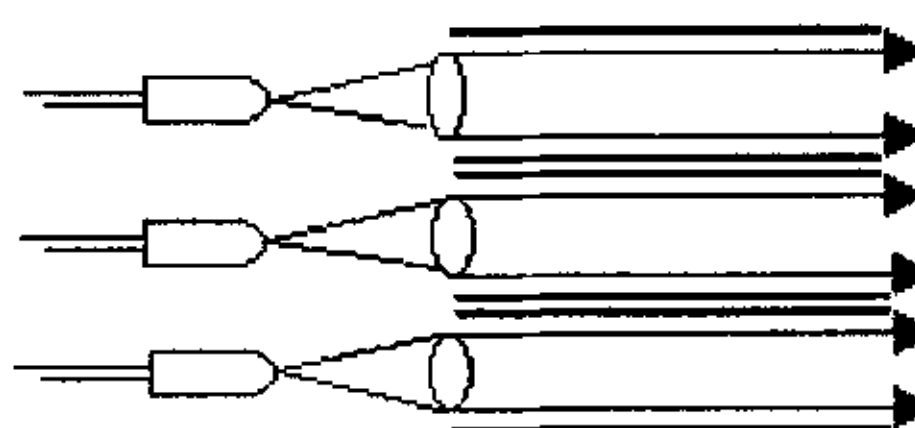


图 3.2 中等强度 LED 光源光路图

Fig 3.2 The scheme of optical system in moderate intensity LED sources

因为对于透镜来说，LED 从严格意义讲不是点光源，发的光也有一定的谱宽，但本文从实际应用出发，采用合理近似，将 LED 看成是类点光源，在光度导轨上通过 LED 对不同曲率的透镜在光屏上所成的最小像的像距，利用高斯公式反求得选定的 LED 对图 3.2 中阵列透镜和图 3.1 中透镜 L_1 的经验焦距，而透镜 L_2 与 L_3 则采用已知焦距的二个透镜组合而成，所不同的只是它们的焦距之比 f_3/f_2 不同，从而导致输出光的强度不同。

对低强度和中等强度的 LED 生物光源，采用最简单的透镜组光学元件，是为了便于光简单单元的集成。例如，对同一个细胞培养板，既可以把相同的光简单单元组装在一起，得到每孔光强相同的照射；又可以把不同的光简单单元组装在一起，得到每孔光强不同的照射。而后面一种单元组装使用，往往在对同一批生物样品，要求采用不同的光强照射，把光照剂量曲线在一次操作完成时，显得十分便捷。

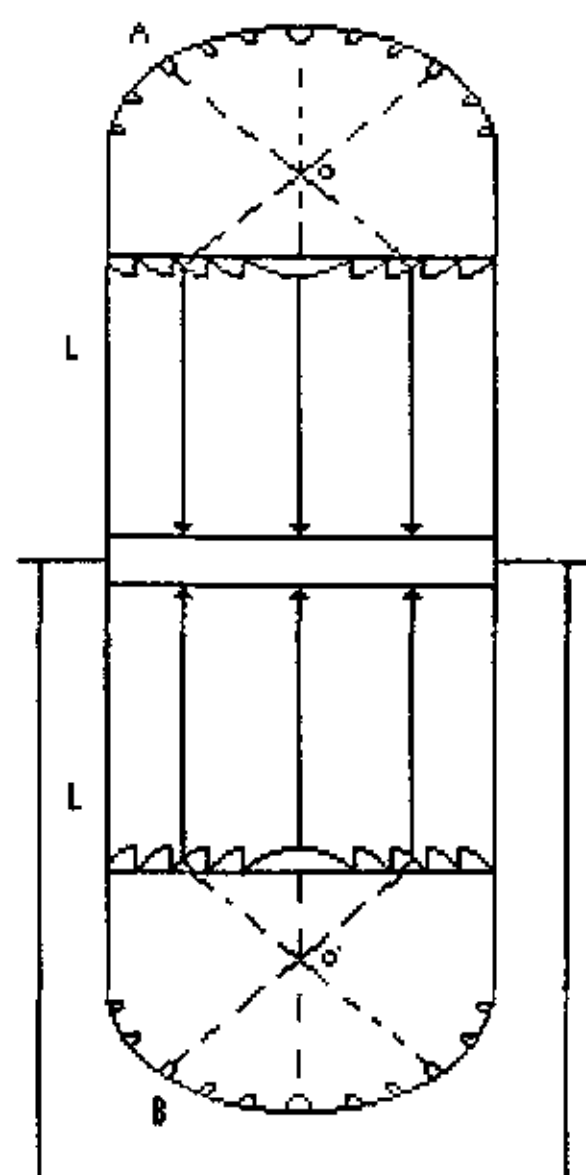


图 3.3 高强度 LED 光源光路及结构剖视图

Fig 3.3 The illustration of optical and structural system in high intensity LED sources

图 3.3 中由 A 和 B 二个球冠内的若干个 LED 发出的光线在曲率中心 O 和 O' 点汇聚后，经一菲涅耳透镜把光线从上下二面平行照射到生物样品上去，增强了光源的辐射照度和光能分布的均匀性，中部的长方形装置内用来放置细胞培养孔板或玻璃培养器，上下玻璃套管的长度 L 都相同，以保证生物样品上下二面接受到的辐射剂量相同。图 3.3 中的 A、B 二球冠的曲率半径都为 150 mm，用来照射口径较大的玻璃培养器，这种光源可根据照射面积的不同，采用不同大小的球冠来安装不同数量的 LED。

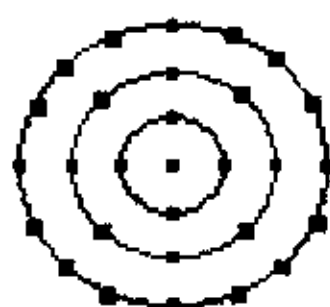


图 3.4 球冠内 LED 点阵分布的平面俯视图

Fig 3.4 The distribution of LEDs array inside semi-sphere

另外经测试表明，球冠内 LED 点阵分布不同，所得到的辐射照度也不同，本光源设计采用的 LED 点阵分布，如图 3.4 所示，是从球冠顶点第一个 LED 开始，按 1、2、4、8、16 的比例来依次增加外围各圈上的 LED 数，并保持各圈之

间的距离相等，使 LED 在球冠内均匀分布。

对高强度 LED 生物光源，采用菲涅耳透镜来输出光，主要是考虑到与普通透镜相比，它的优点是成本便宜、体积轻薄，组装方便，面积也可根据需求和可能做得很大，而用一个大面积的透镜不但十分昂贵，也非常笨重。但菲涅耳透镜的缺点是有色散，这里是由于 LED 光的单色性较好，克服了菲涅耳透镜的色散缺陷。

3.4.2 光源的制作

(1) 简要结构：

以上三种光源中的透镜均是选自广州光学仪器厂的产品，图 3.1 中 L_1 经验焦距为 75mm，图 3.2 中阵列透镜的经验焦距为 37mm，这二种光源可通过调整透镜 L_3 和阵列透镜的直径，来分别照射口径不同的细胞培养板，使用时将 LED 与上述对应的透镜结合后，再用外侧包紧光亮锡箔的玻璃筒与之固定，做成光源筒后，插入细胞培养装置内照射，其简要结构如图 3.5 所示：

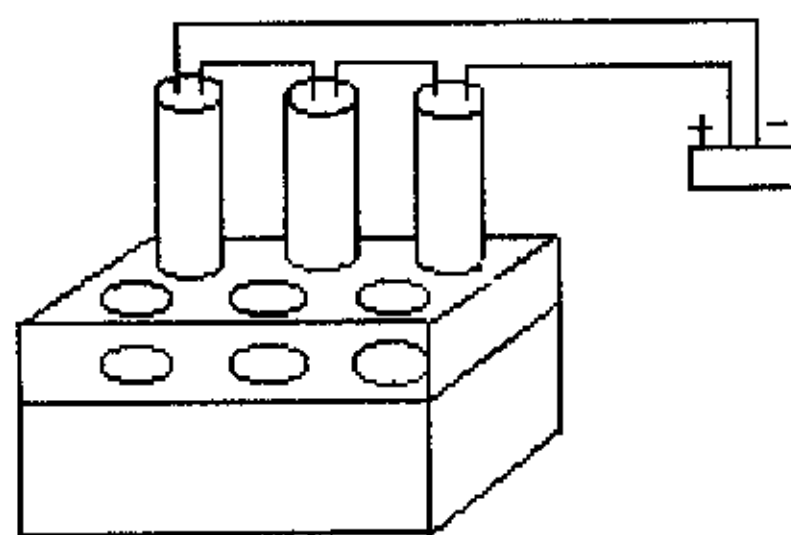


图 3.5 中、低强度 LED 生物光源结构简图

Fig 3.5 The structure of moderate or low intensity LED sources

这三种光源都可以根据需要，选择不同波长和管芯光强的 LED，还可使用多管芯比如双色或多色 LED，还可根据照射面积的不同，采用不同面积的球冠来安装不同数量的 LED，以满足不同的生物光照需要，本光源采用的是发散角为 30° ，波长 640nm，半波峰宽范围约 17 nm 的红光 LED，照射对象为直径不同的细胞培养板或者玻璃培养器。

(2) 电源配置：

以上系列光源可根据所需的 LED 数目和实验的目的，选择干电池和直流电源二种，选用干电池做电源时，可将该光源连同电源一起放入细胞培养箱进行实验。在电路设计上采用串联与并联组合，以稳压驱动，恒电流供电，配合补偿电阻，使每串 LED 光强相等。在供电方式上，除了使用连续供电外，还可采用间

隙供电，如用 12 伏稳压电源供电，然后通过一个无稳态多谐振荡器，其振动频率在 1—10Hz 范围，使 LED 光源按选定时间间隔闪烁。

3.5 光源辐射照度的确定

3.5.1 辐射照度的强度测定

首先用 PHILIPS 公司的 PLM100 光荧光面扫描仪来准确校正已选定 LED 的波长 λ (nm)，根据波长数值，再用日本 ADVANTEST CORPORATION 的辐射照度功率计 TQ8200SERIES OPTICAL SENSORC (connected with power meter) 来直接测定光源在该波长范围输出的辐射照度 $E(W/m^2)$ ，另外 LED 的法向光强 $I_{(cd)}$ 则是用浙江大学光电系的 GCD-99 LED 测试仪来精确测定。

3.5.2 辐射照度的分布测定

测量的方法是用一带狭缝的遮光板，狭缝宽度为 2mm，长度足够合适，在距光源照射的适当距离处，对照射面从 X 和 Y 二垂直方向进行逐行扫描，每次测量宽度为 2 mm，用以上辐射照度功率计读出辐射照度值 $E_{(X)}$ 和 $E_{(Y)}$ 后，再进行统计学分析比较。

3.5.3 辐射照度的经验表达式的推导

对于不同强度的 LED 生物光源，分别选择各光源中的四个工作参数，在准确测定出不同工作参数下的辐射照度后，再使用统计分析软件 SPSS 拟合得出它们的辐射照度经验计算公式。

3.6 低强度 LED 生物光源

3.6.1 设计参数对辐射照度的影响

(1) 光筒长度对辐射照度的影响：

在 LED 工作电流为 20mA，管芯光强 1.5cd，透镜 L_3 与 L_2 焦距之比 $f_3/f_2=2$ 时，测得在不同光筒长度下，该生物光源的辐射照度并做出散点图，用 SPSS 软件拟合出相应线形如下：

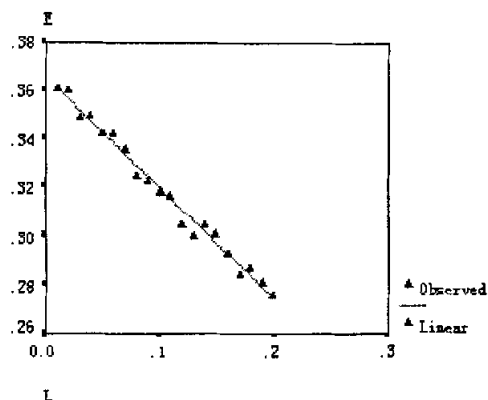


图 3.6 辐射照度 E (W/m^2) 与光筒长度 L (m) 的线性关系

Fig 3.6 The linear relation between E (W/m^2) and L (m)

由图 3.6 可看出此光源的辐射照度会随光筒长度的增加而衰减，大呈直线关系。

(2) 工作电流对辐射照度的影响：

在光筒长度 12cm，管芯光强 1.5cd，透镜 L_3 与 L_2 焦距之比 $f_3/f_2 = 2$ 时，用上述辐射照度功率计测得在不同电流下该光源的辐射照度，做出散点图并拟合出相应线形如下：

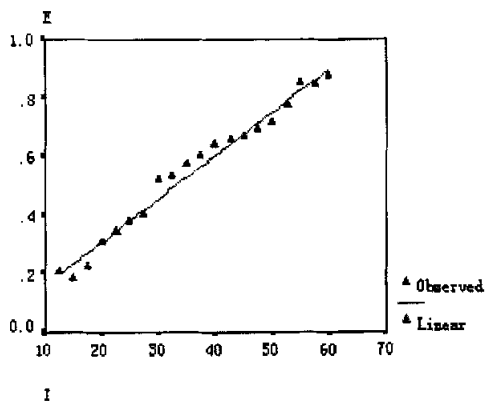


图 3.7 辐射照度 E (W/m^2) 与电流强度 I (mA) 的线性关系

Fig 3.7 The linear relation between E (W/m^2) and I (mA)

由图 3.7 可知该光源的辐射照度会随 LED 通过电流的增大而快速增强，在所测的从 10mA 到 60mA 电流范围内，大致呈直线关系，考虑到对光源输出光能的要求以及能耗，并尽量降低高电流下 LED 散热对生物实验的影响，另外由于

是低强度光源，因此取 LED 工作电流为 20mA，即在标准电流下工作。

(3) 管芯光强对辐射照度的影响：

在 LED 工作电流为 20mA，透镜 L_3 与 L_2 焦距之比 $f_3/f_2=2$ ，光筒长度 12cm 时，测出在 640nm 波长下的不同管芯的 LED 光强下，该光源的辐射照度，做出散点图并拟合出相应线形如下：

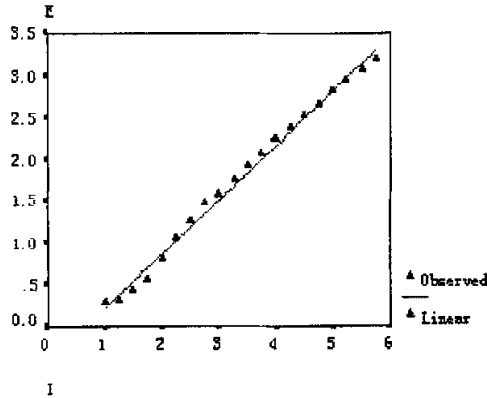


图 3.8 辐射照度 E (W/m²) 与 LED 管芯光强 I (cd) 的线性关系

Fig 3.8 The linear relation between E (W/m²) and I (cd)

由图 3.8 可知该光源的辐射照度会随 LED 管芯光强的增大而增强，也呈线性关系，因此可根据细胞和组织培养的不同需要，选用不同光强的 LED 管芯，考虑到本光源是低强度光源，所以选用 1.5 cd 的 LED 管芯。

(4) 焦距之比对辐射照度的影响：

最后在 LED 工作电流为 20mA，管芯光强为 1.5cd，光筒长度 12cm 时，改变透镜 L_3 和 L_2 的焦距之比 f_3/f_2 ，测得在不同比值下，该光源的辐射照度，做出散点图并拟合出相应线形如下：

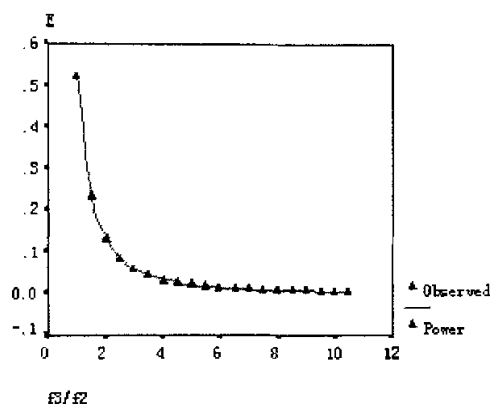


图 3.9 辐射照度 E (W/m²) 与 f_3/f_2 比值的幂函数关系

Fig 3.9 The power relation between E (W/m²) and f_3/f_2

由图 3.9 可知该光源的辐射照度会随透镜 L_3 和 L_2 焦距比值的增大而迅速减低，二者是呈较典型的幂函数关系，因此通过调整透镜焦距 f_3/f_2 的比值，可大大降低该生物光源的辐射照度。

3.6.2 辐射照度的分布检测

在 LED 管芯光强 1.5cd，发散角度 30° ，电流为 20mA，光筒长度为 12cm，透镜 L_1 经验焦距为 75mm，透镜 L_3 与 L_2 焦距之比 $f_3/f_2 = 2$ 时，照射六孔细胞培养板，每孔直径 40mm，用狭缝为 2 mm 宽的遮光板在 X 与 Y 二垂直方向进行逐行扫描，每次测量宽度为 2 mm，用以上辐射照度功率计分别读出 20 个 $E_{(X)}$ 和 $E_{(Y)}$ 辐射照度值，做出它们强度分布的直方图如下：

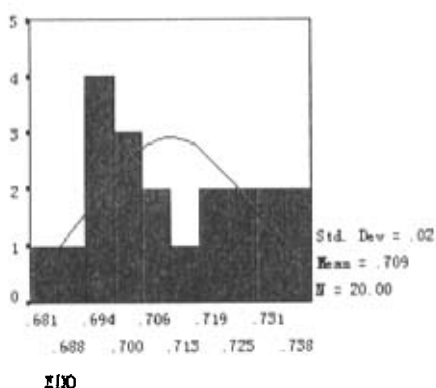


图 3.10 被照射表面 X 方向辐射照度分布图

Fig 3.10 The distribution of radiance on X directional area

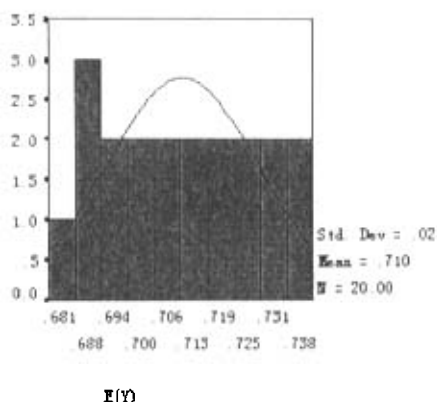


图 3.11 被照射表面 Y 方向辐射照度分布图

Fig 3.11 The distribution of radiance on Y directional area

图 3.10 和图 3.11 中的横坐标表示各组之间间距，纵坐标表示间距内的组出现的次数，从这二个分布图可看出，在被照射表面所测的 X 和 Y 二垂直方向的 20 个辐射照度，它们的分布曲线都呈典型的均匀分布，用 SPSS 软件对这些数据进行统计分析的结果是：X 方向的辐射照度 $E_{(X)}$ 和 Y 方向的辐射照度 $E_{(Y)}$ 平均值 (Mean) 分别为 0.709 和 0.710；标准偏差 (SD.) 都为 0.02；双侧检验中均匀分布的概率 P 值分别为 0.992 和 0.977。说明该光源的辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ 在所照射平面内呈较好的均匀分布 [Spiegel et al 2002] 可以满足生命科学研究中对辐射光源均匀性的要求。

3.6.3 辐射照度对设计参数的回归分析

(1) 测量结果：

在不同的 LED 管芯光强 $I_{(cd)}$ 、LED 工作电流 $I_{(A)}$ 、光筒长度 $L_{(m)}$ 和透镜 L_3 与 L_2 焦距之比 f_3/f_2 时，测得该生物光源的辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ ，建立数据文库如表 3.1 所示：

表 3.1 辐射照度与其它因素的关系

Tab 3.1 The relations between $E_{(w/m^2)}$ and other factors

变 量	Y	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
定 义	$E_{(w/m^2)}$	$I_{(cd)}$	$L_{(m)}^{-1}$	$\frac{1}{Ln^{\frac{f_2}{f_1}}}$	$I_{(A)}^2$
1	0.0021	1.0000	5.0000	0.4255	0.0001
2	0.0782	1.2500	5.2631	0.4347	0.0002
3	0.1569	1.5000	5.5555	0.4444	0.0003
4	0.2296	1.7500	5.8823	0.4545	0.0004
5	0.3033	2.0000	6.2500	0.4672	0.0005
6	0.3824	2.2500	6.6666	0.4807	0.0006
7	0.4591	2.5000	7.1428	0.4975	0.0007
8	0.5325	2.7500	7.6923	0.5128	0.0009
9	0.6103	3.0000	8.3333	0.5347	0.0010
10	0.6784	3.2500	9.0909	0.5586	0.0012
11	0.7626	3.5000	10.0000	0.5882	0.0014
12	0.8396	3.7500	11.1111	0.6211	0.0016
13	0.9165	4.0000	12.5000	0.6666	0.0018
14	0.9960	4.2500	14.2857	0.7194	0.0020
15	1.0747	4.5000	16.6666	0.8000	0.0022
16	1.1495	4.7500	20.0000	0.9090	0.0025
17	1.2349	5.0000	25.0000	1.0869	0.0027
18	1.3082	5.2500	33.3333	1.4492	0.0030
19	1.3859	5.5000	50.0000	2.4390	0.0033
20	1.4645	5.7500	100.0000		0.0036

(2) 线性回归:

用 SPSS 软件对辐射照度 Y 与 LED 管芯光强 X₁、光筒长度的倒数 X₂、透镜 L₃ 和 L₂ 焦距比值对数的倒数 X₃、LED 工作电流的平方 X₄ 进行四元线性回归, 得出辐射

照度 Y 与这些因素的回归方程 a:

$$Y=-0.290+0.296X_1+0.001333X_2-0.0254X_3+13.590X_4$$

..... a

(3) 方差分析:

对以上四元线性回归的结果，用 SPSS 软件对其显著性与否进行方差分析，结果如下:

表 3.2 四元线性回归的方差分析

Tab 3.2 The analysis of variance by four variables linear regression

方差来源	自由度	平方和	均方	F	F _{0.05}	F _{0.01}	P 值
回归	4	3.368	0.842	110658.17	3.11	5.04	0.000
残差	14	1.065E-4	7.608E-6				
总和	18	3.368					

从以上方差分析表中可知: P 值小于 α (0.05), 所以 Y 对 X₁、X₂、X₃、X₄ 有显著的线性关系,即回归方程 a 线性显著;另外从 F 值大于 F_{0.05}(4, 14)或 F_{0.01}(4, 14)的事实也可得到上述同样结论。

3.6.4 结论:

将回归方程 a 通过变量代换可得到下列公式 A:

$$E_{\left(\frac{W}{m^2}\right)}=-0.290+0.296\times I_{(cd)}+\frac{0.001333}{L_{(m)}}-\frac{0.0254}{Ln\left(\frac{f_3}{f_2}\right)}+13.590\times I_{(A)}^2$$

..... A

即为低强度 LED 生物光源的辐射照度经验计算公式，在 0.0021—0.9961(W/m²)这个区间，可用它来比较准确地对该光源的辐射照度进行估算，与实际测量值吻合。

3.7 中等强度 LED 生物光源

3.7.1 设计参数对辐射照度的影响

(1) 光筒长度对辐射照度的影响:

在 LED 工作电流为 20mA，管芯光强 1.5cd，透镜半径为 30mm 时，测得在不同光筒长度下，该生物光源的辐射照度并做出散点图，用 SPSS 软件拟合出相应线形如下：

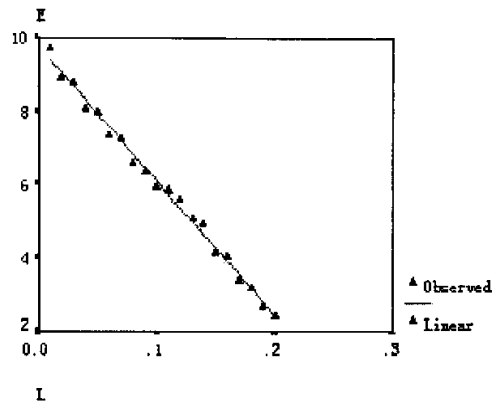


图 3.12 辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ 与光筒长度 $L_{(m)}$ 的线性关系

Fig 3.12 The linear relation between $E_{(W/m^2)}$ and $L_{(m)}$

由图 3.12 可看出此光源的辐射照度会随光筒长度的增加而衰减，大致呈直线关系。

(2) 工作电流对辐射照度的影响：

将光筒固定在 14cm 长度下，管芯光强 1.5cd，透镜半径为 30mm 时，只改变通过 LED 的电流大小，用上述辐射照度功率计测得在不同电流下该光源的辐射照度，做出散点图并拟合出相应线形如下：

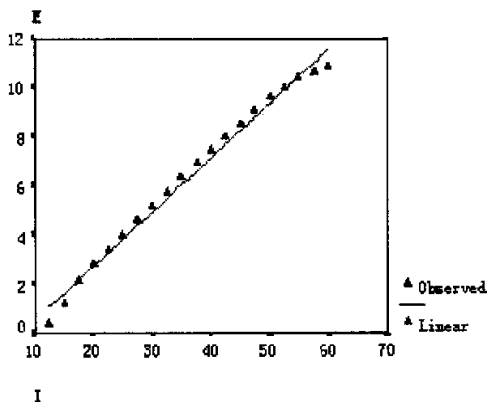


图 3.13 辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ 与电流强度 $I_{(mA)}$ 的线性关系

Fig 3.13 The linear relation between $E_{(W/m^2)}$ and $I_{(mA)}$

由图 3.13 可知该光源的辐射照度会随 LED 通过电流的增大而快速增强，在所测的从 10mA 到 60mA 范围内，大致呈直线关系。由于是中等强度生物光源，在考虑满足光源的输出光能，并尽可能降低高电流下 LED 散热对生物实验的影响前提下，可取适当的电流作为 LED 工作电流。

(3) 管芯光强对辐射照度的影响：

在 LED 工作电流为 20mA，光筒长度 14cm，透镜半径为 30mm 时，测出在 640nm 波长下的不同管芯的 LED 光强下，该光源的辐射照度，做出散点图并拟合出相应线形如下：

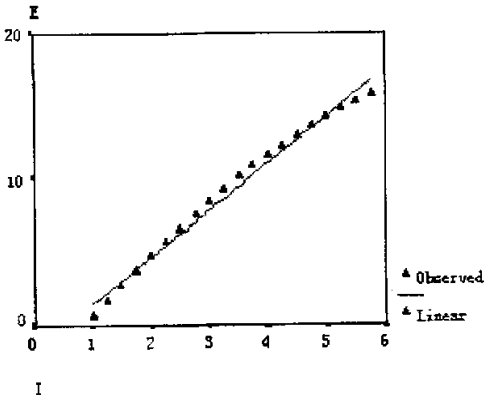


图 3.14 辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ 与 LED 光强 $I_{(cd)}$ 的线性关系

Fig 3.14 The linear relation between $E_{(W/m^2)}$ and $I_{(cd)}$

由图 3.14 可知该光源的辐射照度会随 LED 管芯光强的增大而增强，也呈线性关系，因此可根据细胞和组织培养的不同需要，选用不同光强的 LED 管芯。

(4) 透镜半径对辐射照度的影响：

在 LED 工作电流为 20mA，光筒长度 14cm，管芯光强 1.5cd 下，只改变阵列透镜的半径和光筒的直径，透镜焦距不变，测得用不同半径透镜时，该光源的辐射照度，做出散点图并拟合出相应线形如下：

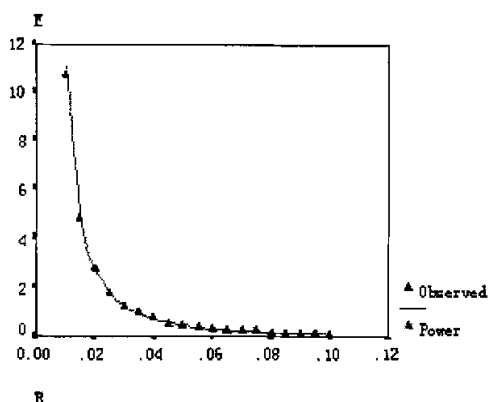


图 3.15 辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ 与透镜半径 $R_{(m)}$ 的幂函数关系

Fig 3.15 The power relation between $E_{(W/m^2)}$ and $R_{(m)}$

由图 3.15 可知该光源的辐射照度会随阵列中透镜半径的增大而迅速减低，二者是呈较典型的幂函数关系，因此如要提高该光源的输出光能，不宜过分增大透镜的半径。

3.7.2 辐射照度的分布检测

在 LED 管芯光强 2.5cd，发射角度 30° ，电流为 20mA，光筒长度为 14cm，阵列中透镜的经验焦距为 37mm，透镜半径为 30mm 时，照射四孔细胞培养板，每孔直径 60mm，用狭缝为 2 mm 宽的遮光板在 X 与 Y 二垂直方向进行逐行扫描，每次测量宽度为 2 mm，用以上辐射照度功率计分别读出 30 个 $E_{(x)}$ 和 $E_{(y)}$ 辐射照度值，做出它们强度分布的直方图如下：

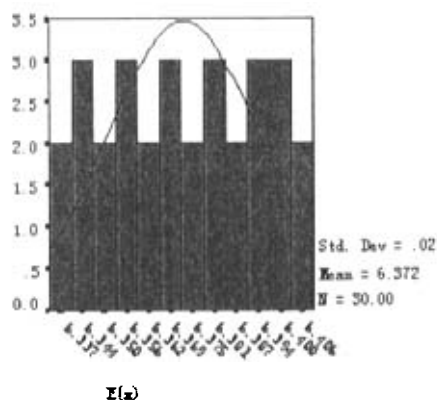


图 3.16 被照射表面 X 方向辐射照度分布图

Fig 3.16 The distribution of radiance on X directional area

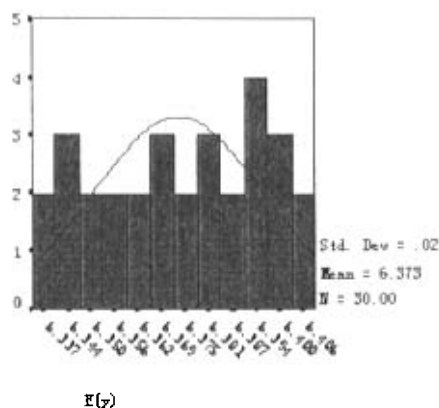


图 3.17 被照射表面 Y 方向辐射照度分布图

Fig 3.17 The distribution of radiance on Y directional area

图 3.16 和图 3.17 中的横坐标表示各组之间间距，纵坐标表示间距内的组出现的次数，从这二个分布图可看出，在被照射表面所测的 X 和 Y 二垂直方向的 30 个辐射照度，它们的分布曲线都呈典型的均匀分布，用 SPSS 软件对这些数据进行统计分析的结果是：X 方向的辐射照度 $E_{(X)}$ 和 Y 方向的辐射照度 $E_{(Y)}$ 平均值(Mean)分别为 6.372 和 6.375；标准偏差(SD.)都为 0.02；双侧检验中均匀分布的概率 P 值分别为 0.979 和 0.974。说明该光源的辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ 在所照射平面内呈较好的均匀分布[Spiegel et al 2002]，可以满足生命科学研究中对辐射光源均匀性的要求。

3.7.3 辐射照度对设计参数的回归分析

(1) 测量结果：

在不同的 LED 管芯光强 $I_{(cd)}$ 、工作电流 $I_{(A)}$ 、光筒长度 $L_{(m)}$ 和阵列中透镜半径 $R_{(m)}$ 时，测得该生物光源的辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ ，建立数据文库如表 3.3 所示：

表 3.3 辐射照度与其它因素的关系

Tab 3.3 The relations between $E_{(w/m^2)}$ and other factors

变 量	Y	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
定 义	$E_{(w/m^2)}$	$I_{(cd)}$	$L_{(m)}^{-1}$	$R_{(m)}^{-1}$	$I_{(A)}^2$
1	0.3579	1.0000	5.0000	19.0476	0.0001
2	0.8344	1.2500	5.2631	20.0000	0.0002
3	1.3963	1.5000	5.5555	21.0526	0.0003
4	1.9727	1.7500	5.8823	22.2222	0.0004
5	2.4987	2.0000	6.2500	23.5294	0.0005
6	3.0612	2.2500	6.6666	25.0000	0.0006
7	3.6459	2.5000	7.1428	26.666	0.0007
8	4.1542	2.7500	7.6923	28.5714	0.0009
9	4.7280	3.0000	8.3333	30.7769	0.0010
10	5.3016	3.2500	9.0909	33.3333	0.0012
11	5.8165	3.5000	10.0000	36.3636	0.0014
12	6.8548	3.7500	11.1111	40.0000	0.0016
13	7.3789	4.0000	12.5000	44.4444	0.0018
14	7.9874	4.2500	14.2857	50.0000	0.0020
15	8.5979	4.5000	16.6666	57.1428	0.0022
16	9.0917	4.7500	20.0000	66.6666	0.0025
17	9.6957	5.0000	25.0000	80.0000	0.0027
18	10.2053	5.2500	33.3333	100.0000	0.0030
19	10.8237	5.5000	50.0000	133.3333	0.0033
20	11.2286	5.7500	100.0000	200.0000	0.0036

(2) 线性回归:

用 SPSS 软件对辐射照度 Y 与 LED 管芯光强 X₁、光筒长度的倒数 X₂、透镜半径的倒数 X₃、LED 工作电流的平方 X₄ 进行四元线性回归, 得出辐射照度 Y

与这些因素的回归方程 b:

$$Y=-1.2520+1.7140X_1+0.0221X_2-0.0212X_3+1298.8230X_4$$

..... b

(3) 方差分析:

对以上四元线性回归的结果, 用 SPSS 软件对其显著性与否进行方差分析, 结果如下:

表 3.4 四元线性回归关系的方差分析

Tab 3.4 The analysis of variance by four variables linear regression

方差来源	自由度	平方和	均方	F	F _{0.05}	F _{0.01}	P 值
回归	4	200.689	50.172	4808.575	3.11	5.04	0.000
残差	14	0.146	1.043E-2				
总和	18	200.835					

从以上方差分析表中可知: P 值小于 α (0.05), 所以 Y 对 X₁、X₂、X₃、X₄ 有显著的线性关系, 即回归方程 b 线性显著; 另外从 F 值大于 F_{0.05}(4, 14) 或 F_{0.01}(4, 14) 的事实也可得到上述同样结论。

3.7.4 结论:

将回归方程 b 通过变量代换可得到下列公式 B:

$$E_{\left(\frac{W}{m^2}\right)} = -1.2520 + 1.7140 \times I_{(cd)} + \frac{0.0221}{L_{(m)}} - \frac{0.0212}{R_{(m)}} + 1298.8230 \times I_{(A)}^2$$

..... B

即为中等强度 LED 生物光源的辐射照度经验计算公式, 在 0.3579—11.2286(W/m²) 这个区间, 可用它来比较准确地对该光源的辐射照度进行估算, 与实际测量值吻合。

3.8 较高强度 LED 生物光源的研制

3.8.1 设计参数对辐射照度的影响

(1) 光筒长度对辐射照度的影响:

在 LED 工作电流为 20mA，管芯光强 2.5cd，LED 数量 29 个时，测得在不同玻璃套管长度下，该光源的辐射照度并做出散点图，用 SPSS 软件拟合出相应线形如下:

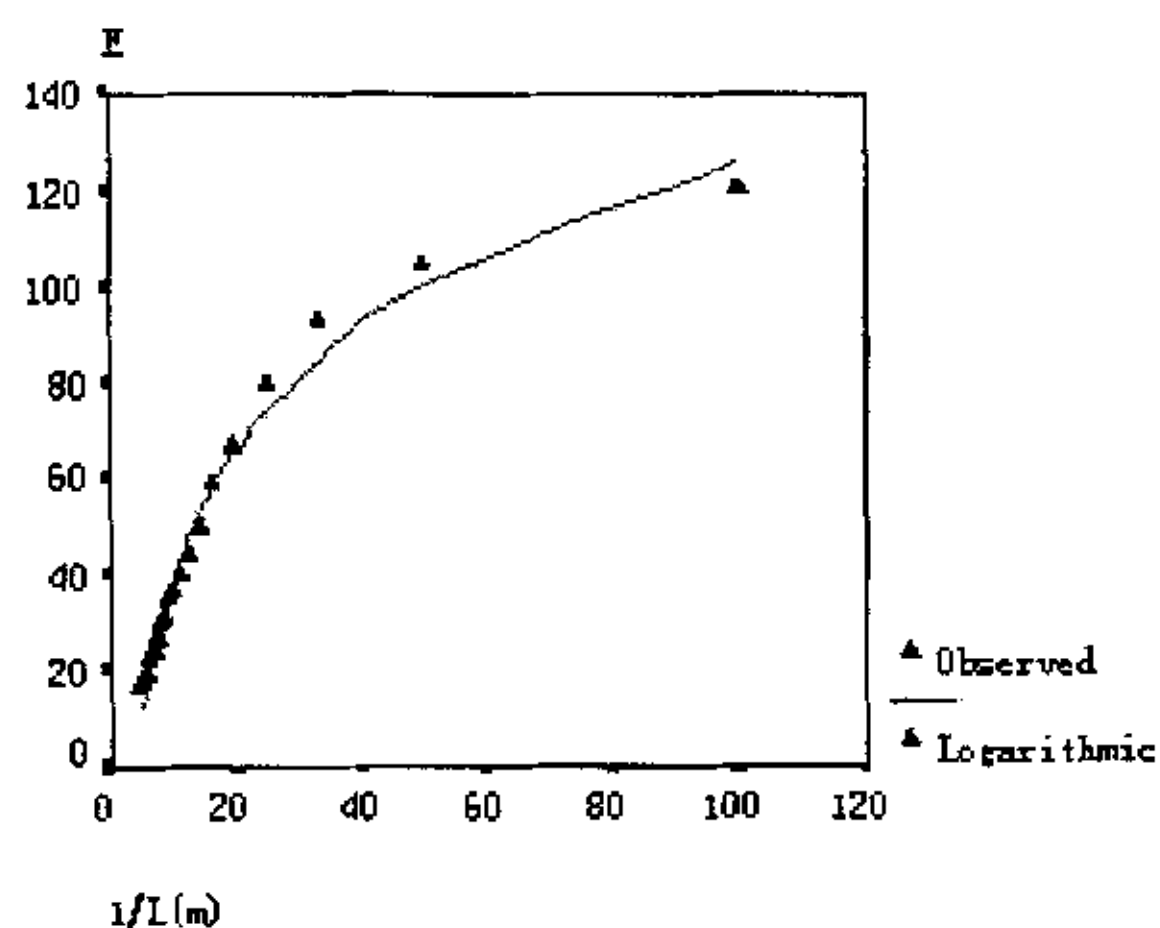


图 3.18 辐射照度 $E \text{ (W/m}^2\text{)}$ 与光筒长度倒数 $1/L \text{ (m)}$ 的对数关系

Fig 3.18 The logarithmic relation between $E \text{ (W/m}^2\text{)}$ and $1/L \text{ (m)}$

由图 3.18 可看出此光源的辐射照度与光筒长度的倒数呈对数关系，在比较短的管长范围内以内，辐射照度可基本保持不变，而后会随着管长的增加而快速衰减。

(2) 工作电流对辐射照度的影响:

将光筒固定在 12cm 长度，管芯光强 2.5cd，LED 数量 29 个时，只改变 LED 的工作电流大小，用上述辐射照度功率计测得在不同电流下该光源的辐射照度，做出散点图并拟合出相应线形如下:

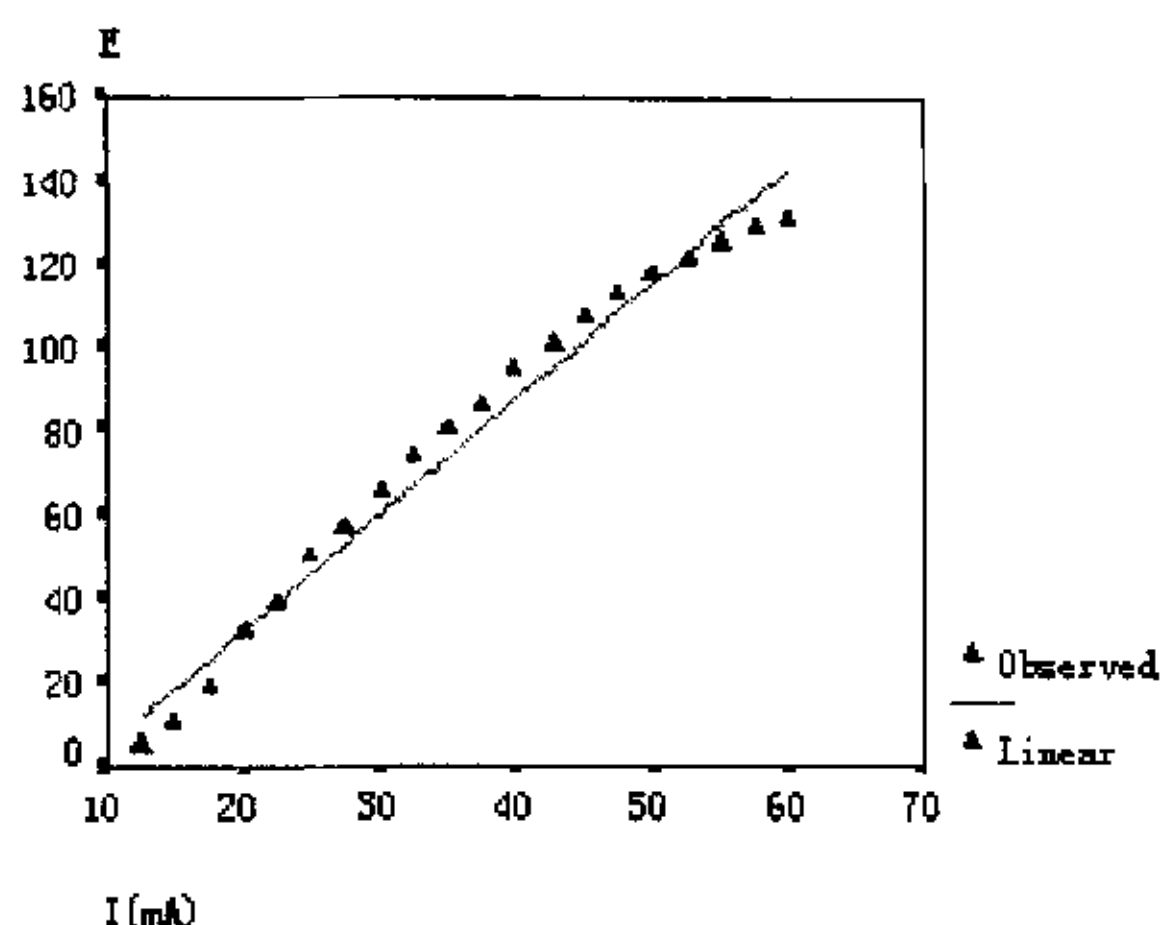


图 3.19 辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ 与电流强度 $I_{(mA)}$ 的线性关系

Fig 3.19 The linear relation between $E_{(W/m^2)}$ and $I_{(mA)}$

由图 3.19 可知该光源的辐射照度会随 LED 工作电流的增大而快速增强，在所测的 20 mA 到 50 mA 电流范围内，呈较好的线性关系，只是当电流增大到 60 mA 以上时，由于发热而导致 LED 输出光能下降，考虑到对光源的辐射照度要求以及能耗，并尽可能降低高电流下 LED 散热对生物实验的影响，可取 LED 工作电流在 20 mA 到 50 mA 之间。

(3) 管芯光强对辐射照度的影响：

在 LED 工作电流为 20mA, 光筒长度 12cm, LED 数量 29 个时，测出在 640nm 波长下的不同管芯的 LED 光强下，该光源的辐射照度，做出散点图并拟合出相应线形如下：

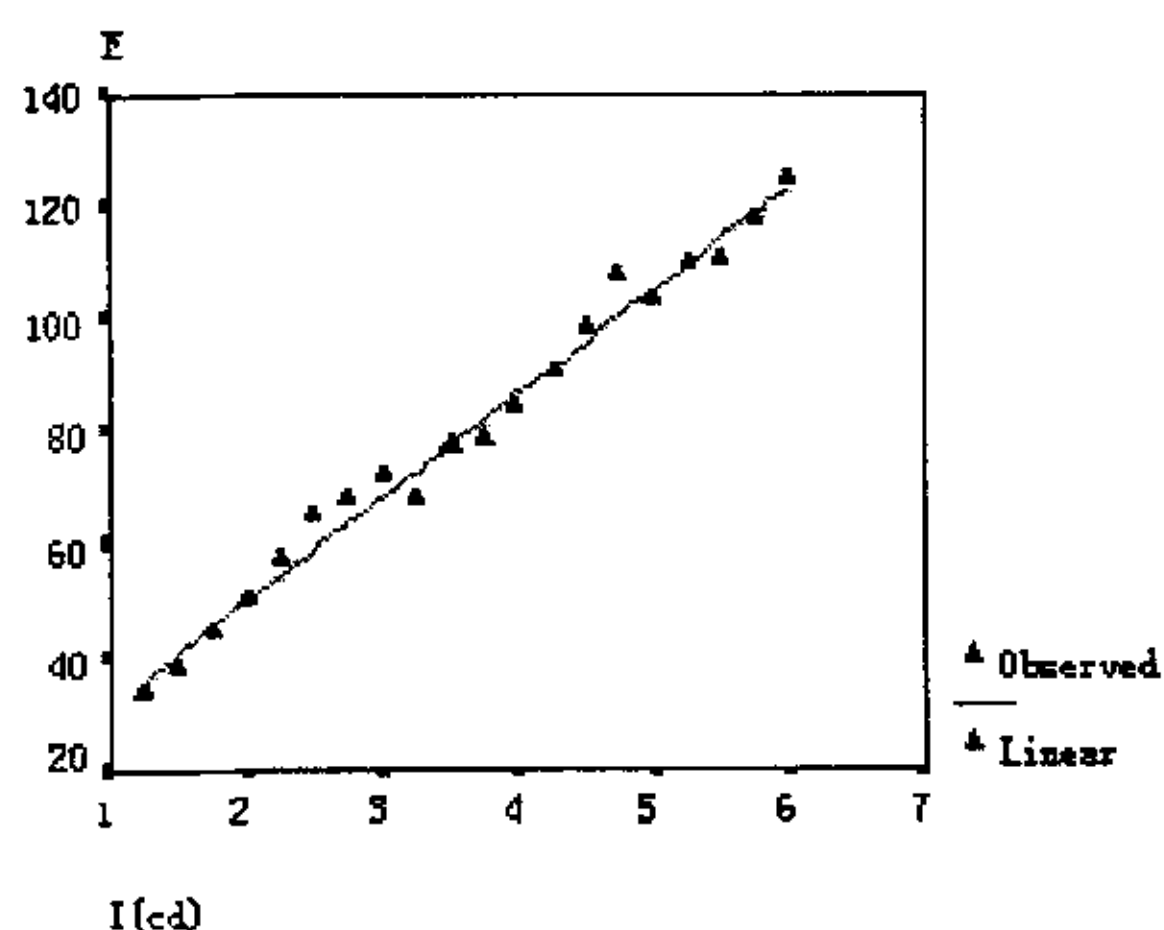


图 3.20 辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ 与 LED 光强 $I_{(cd)}$ 的线性关系

Fig 3.20 The linear relation between $E_{(W/m^2)}$ and $I_{(cd)}$

由图 3.20 可知该光源的辐射照度会随 LED 管芯光强的增大而增强，也大致呈线性关系，因此可根据生物光照的不同需要，选用不同光强的 LED 管芯来设计光源。

(4) LED 数目对辐射照度的影响：

最后，在 LED 工作电流 20mA，管芯光强 2.5cd，光筒长度 12cm 下，只改变 LED 的数目，使 LED 数目从球冠顶部开始，按 1: 2: 4: 8 的比例依次增加各圈上的 LED 数目，测得在不同 LED 数量时，该光源的辐射照度，做出散点图并拟合出相应线形如下：

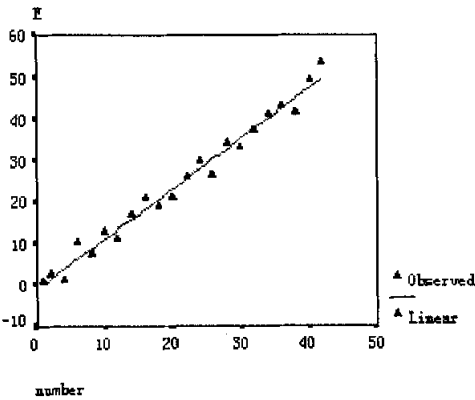


图 3.21 辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ 与 LED 数量(N) 的线性关系

Fig 3.21 The linear relation between $E_{(W/m^2)}$ and LEDs' numbers

由图 3.21 可知该光源的辐射照度会随 LED 数目的增加而提高，也呈线性关系，但与 LED 电流强度和 LED 管芯光强对辐射照度的影响相比，此直线的斜率较低，因此如要增强该光源的辐射照度，主要还是应从增加 LED 工作电流和提高管芯光强出发，由于安装的 LED 数目受球冠面积限制，同时过密的 LED 点阵会使散热困难，影响生物实验效果，所以不宜过分增加球冠内 LED 的数目。

3.8.2 辐射照度的分布检测

在 LED 发射角度 30° ，管芯光强 3.5cd，工作电流为 20mA，光筒长度为 12cm，球冠内 LED 的数目 29 个时，照射直径 80 mm 玻璃培养器。用狭缝为 2 mm 宽的遮光板在 X 与 Y 二垂直方向进行逐行扫描，每次测量宽度为 2 mm，用以上辐射照度功率计分别读出 40 个 $E_{(X)}$ 和 $E_{(Y)}$ 辐射照度值，做出它们强度分布的直方图如下：

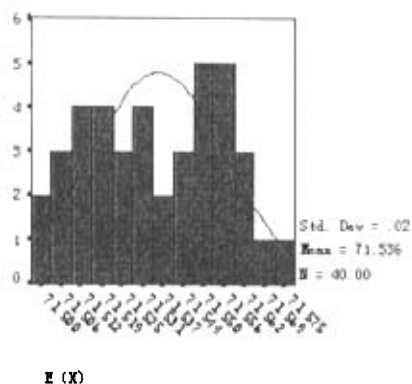


图 3.22 被照射表面 X 方向辐射照度分布图

Fig 3.22 The distribution of radiance on X directional area

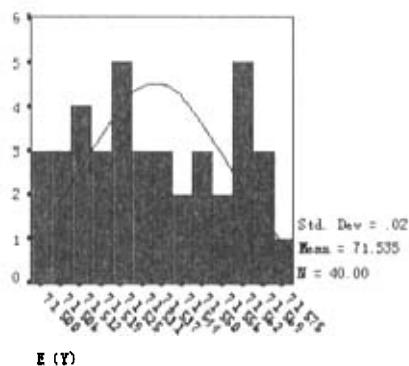


图 3.23 被照射表面 Y 方向辐射照度分布图

Fig 3.23 The distribution of radiance on Y directional area

图 3.22 和图 3.23 中的横坐标表示各组之间间距，纵坐标表示间距内的组出现的次数，从这二个分布图可看出，在被照射表面所测的 X 和 Y 二垂直方向的 40 个辐射照度，它们的分布曲线都呈典型的均匀分布，用 SPSS 软件对这些数据进行统计分析的结果：X 方向的辐射照度 $E_{(X)}$ 和 Y 方向的辐射照度 $E_{(Y)}$ 平均值 (Mean) 分别为 71.536 和 71.535；标准偏差(SD.)都为 0.02；双侧检验中均匀分布出现的概率 P 值分别为 0.899 和 0.897。说明该光源的辐射照度 $E_{(w/m^2)}$ 在所照射平面内呈较好的均匀分布[Spiegel et al 2002]。

3.8.3 辐射照度对设计参数的回归分析

(1) 测量结果：

首先在以上精确测量的基础上，得到在不同的 LED 管芯光强 $I_{(cd)}$ 、LED 工作电流 $I_{(A)}$ 、光筒长度 $L_{(m)}$ 和 LED 数目 N 时，该生物光源的辐射照度 $E_{(W/m^2)}$ ，建立数据文库如表 3.5 所示：

表 3.5 辐射照度与其它因素的关系

Tab 3.5 The relations between $E_{(W/m^2)}$ and other factors

变 量	Y	X_1	X_2	X_3	X_4
定 义	$E_{(W/m^2)}$	$\sqrt{I_{(cd)}}$	\sqrt{N}	$I_{(A)}^2$	$L_{(m)}^{-1}$
1	17.6263	1.0000	1.4142	0.0001	5.0000
2	22.6307	1.1180	2.0000	0.0001	5.2631
3	27.5718	1.2247	2.4494	0.0002	5.5555
4	32.4944	1.3228	2.8284	0.0003	5.8823
5	37.4236	1.4142	3.1622	0.0004	6.2500
6	42.3830	1.5000	3.4641	0.0005	6.6666
7	47.1914	1.5811	3.7416	0.0006	7.1428
8	52.0645	1.6583	4.0000	0.0007	7.6923
9	56.9242	1.7320	4.2426	0.0009	8.3333
10	61.7640	1.8027	4.4721	0.0010	9.0909
11	66.7399	1.8708	4.6904	0.0012	10.0000
12	71.6364	1.9364	4.8989	0.0014	11.1111
13	76.4441	2.0000	5.0990	0.0016	12.5000
14	81.3704	2.0615	5.2915	0.0018	14.2857
15	86.2988	2.1213	5.4772	0.0020	16.6666
16	91.1247	2.1794	5.6568	0.0022	20.0000
17	96.0427	2.2360	5.8309	0.0025	25.0000
18	100.8524	2.2912	6.0000	0.0027	33.3333
19	105.7492	2.3452	6.1644	0.0030	50.0000
20	110.5265	2.3979	6.3245	0.0033	100.0000

(2) 线性回归:

用 SPSS 软件对辐射照度 Y 与 LED 管芯光强的平方根 X_1 、LED 数目的平方根 X_2 、LED 工作电流的平方 X_3 、光筒长度的倒数 X_4 进行四元线性回归, 得出辐射照度 Y 与这些因素的回归方程 c:

$$Y = -47.809 + 76.623X_1 - 8.36X_2 + 8575.843X_3 - 0.013X_4$$

..... c

(3) 方差分析:

对以上四元线性回归的结果, 用 SPSS 软件对其显著性与否进行方差分析, 结果如下:

表 3.6 四元线性回归关系的方差分析

Tab 3.6 The analysis of variance by four variables linear regression

方差来源	自由度	平方和	均方	F	F _{0.05}	F _{0.01}	P 值
回归	4	18371.26	4592.815	222535.41	3.01	4.77	0.000
残差	16	0.330	2.064E-2				
总和	20	18371.59					

从以上方差分析表中可知: P 值小于 α (0.05), 所以 Y 对 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 有显著的线性关系, 即回归方程(1)线性显著; 另外从 F 值大于 $F_{0.05}(4, 14)$ 或 $F_{0.01}(4, 14)$ 的事实也可得到上述同样结论。

3.8.4 结论

将回归方程 c 通过变量代换可得到下列公式 C:

$$E_{\left(\frac{W}{m^2}\right)} = -47.809 + 76.623 \times \sqrt{I_{(cd)}} - \frac{0.013}{L_{(m)}} - 8.360 \times \sqrt{N} + 8575.843 \times I_{(A)}^2$$

..... C

即为较高强度 LED 生物光源的辐射照度经验计算公式, 在 17—110(W/m²) 这个区间, 可用它来比较准确地对该光源的辐射照度进行估算, 与实际测量值吻合。

3.9 讨论

由于 LED 最初是应用于信号显示、背光源或交通安全指示,因此,在这些 LED 装置中,一般是选择相同波段和光强的 LED,用阵列方式进行排列安装。据文献所查[Ohara et al 2002],最初使用 LED 来进行细胞生物学实验的照射装置,也是沿用这种装置来进行实验的。由于这种装置是用相同颜色和光强的 LED 排成阵列进行照射,所以一次实验中只能进行一次相同光剂量的照射,而在细胞生物学实验中,尤其是在应用细胞多孔板实验时,往往经常要对同一批样品用不同波段和光剂量的 LED 来进行照射,这样就必需对以上装置进行改进。本章所介绍的前两种细胞培养孔板照射装置,每个光筒里 LED 的波段和光强都可以不同,这样在进行实验时,可以对同一批生物样品,用不同波段和光剂量的 LED 同时独立进行均匀照射,光剂量关系曲线可以一次做出,大大方便和提高了实验的效率。

本章介绍的三种 LED 生物光源,通过采用不同的光学设计,可分别使 LED 光源输出光的辐射照度得以提高或降低,来满足生物实验对不同强度单色光的需要。推导出的这些 LED 生物光源辐射照度经验计算模型,使这种廉价、方便、可靠的新型光生物实验技术进一步标准化、系列化和实用化,为将这种新的实验技术应用于生物细胞学和其它方面的研究提供了一定的理论依据。

从表 1、3、5 中看出 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 都应与 Y 成正相关,但方程 a、b、c 中的 X_3 前符号却为负,其原因是由于 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 之间存在着多重共线性,即它们之间有一定的相关性所致[何晓群等 2001],这里引进四个自变量的目的,是为了对影响光源辐射照度的因素做尽可能全面的分析,但是当涉及的自变量较多时,很难找到一组自变量,它们之间互不相干,而且它们又都对因变量有显著线性关系。由于这里建立方程 a、b、c 的目的是为了分别在 $0.0021\text{—}0.9961(\text{W}/\text{m}^2)$ 、 $0.3579\text{—}11.2286(\text{W}/\text{m}^2)$ 、 $17\text{—}110(\text{W}/\text{m}^2)$ 这三个区间进行辐射照度预测,而这些自变量的相关类型在这些区间都是不会改变的,所以尽管回归系数的符号没有合理解释,但并不影响该方程在此区间的预测效果,从表 1、3、5 中可知其拟合效果较好,甚至比不存在多重共线性时还好,因此在本光源设计的辐射照度范围内,本文认为公式 A、B、C 可以做作为这三种光源的辐射照度经验公式。

另外,为了使该系列光源能更好地满足生命科学研究的需要,还有必要做进

一步的改进：首先，可在被照射的细胞培养板底部再加一个辐射照度功率计，然后再用一个电脑将电源控制端与此功率计联成一闭合控制回路，这样就可通过功率计反馈到电脑里的数据来选择加给电源的工作参数，其自动化程度和准确性将会大大提高；其次，本系统中对于透镜组和光筒管内壁对光的吸收是采用简单的忽略，而对于精确度要求更高的实验工作，则需要进一步考虑这些问题；最后，随着目前 LED 生产工艺水平的提高，各种双色、多色、变频 LED 已经投放市场，如将这些新产品设计进 LED 生物光源系列，必将大大提高这种新型生物光源的适用性能与应用范围。

第四章 LED 照射离体人皮肤成纤维细胞促进增殖的研究

4.1 人皮肤成纤维细胞的培养

4.1.1 成纤维细胞的生物学特性

成纤维细胞(fibroblast)是结缔组织中最常见的细胞, 由胚胎时期的间充质细胞(mesenchymal cell)分化而来。成纤维细胞的分离培养主要是用于研究各种外来因素对细胞的作用、细胞的老化、细胞在体外条件下的恶性转化、以及某些先天性代谢异常、酶缺陷等。由于皮肤成纤维细胞易于获取, 又易于在体外生长, 故目前皮肤成纤维细胞培养已在基础医学和临床医学研究中得到较广泛的运用。

体外培养人 FBs 作为目前常用的研究手段之一, 具有明显的优点。第一, FBs 体外培养所需的组织, 来源广泛、丰富, 取材简便; 第二, 应用培养细胞进行研究, 经济可行, 重复性好; 第三, 在研究观察中, 可按具体要求控制细胞生长环境, 达到体内研究所难以达到的实验条件。

4.1.2 材料来源及试剂

细胞: 原代正常人皮肤成纤维细胞 HSFs (中山大学医学院动物中心提供)。

试剂:

- (1) MTT 为美国 Sigma 公司产品
- (2) DMEM 为美国 GIBCOBRL 公司产品
- (3) 小牛血清为杭州四季清生物材料厂生产
- (4) 细胞培养基中另加有青霉素、链霉素等

4.1.3 人皮肤成纤维细胞的传代准备

4.1.3.1 细胞培养液的配制:

(1) 材料的准备

三蒸水	1000mL
碳酸氢钠 (NaHCO_3)	3.7g
青霉素注射液	100U/ml
链霉素注射液	100 μ g/mL
DMEM 干粉 (13.4g/袋)	1 袋

(2) 培养液配制

- a. 将 DMEM 干粉加入三蒸水玻璃棒充分搅拌均匀。
- b. 将准备的配方材料一并加入 DMEM 液中，拌匀。
- c. 在量杯中严格补充三蒸水总量共 1000mL。

(3) 无菌处理

- a. 将多个容量分别为 100mL、250mL 的耐高压瓶及瓶塞高压灭菌处理备用。
- b. 清洁超净工作台，75%酒精擦台面，紫外线将工作台灭菌 60 分钟
- c. 清洁双手，穿无菌衣，在超净工作台中，酒精灯进行瓶口及塞子灭菌，用漏网直径为 $0.2\mu\text{m}$ 的漏斗形过滤器，分小瓶过滤好培养液，无菌状态下配装好，放 -20°C 冰箱中保存。
- d. 取 10mL 培养液（无菌）作细菌及霉菌培养。如细菌及霉菌培养有菌则全部培养液重新处理或重新配制。如无菌则冰冻保存，使用前复温

(4) 小牛血清 100mL，使用前进行水浴灭活，无菌状态下加入配制好 DMEM 培养液，按 10%浓度新鲜配制使用。

4.1.3.2 D-Hank 的配制

(1) 材料的准备

KCl	0.4g
KH_2PO_4	0.06g
NaCl	8g
NaHCO_3	0.35g
$\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.06g
酚红	0.02g
三蒸水	1000mL

(2) D-Hank 的配制

- a. 每个成分依次溶解于水中；
- b. 用数滴 5.6%的 NaHCO_3 溶液溶解酚红；
- c. 将 b 加入 a 中；

- d. 将 c 移入容量瓶中，补足水充分混匀；
- e. 分装瓶中，高压灭菌，4℃冰箱内保存。

4.1.3.3 胰蛋白酶溶液的配制

- (1) 将 D-Hank 盐溶液高压消毒灭菌，用 HCl 液调整 pH 至 7.2 左右；
- (2) 称取胰蛋白酶粉末置烧杯中，先用少许消毒的盐溶液调成糊状，然后再补足盐溶液，搅拌均匀，置冰箱内过夜，并不时搅拌震荡；
- (3) 次日先用滤纸粗滤，再进行过滤除菌，分装入瓶中，低温冰箱保存备用，常用浓度为 0.25%。

4.1.3.4 HSFs 的培养、传代前准备

- (1) 熟悉 HSFs 细胞的细胞形态
- (2) 观察 HSFs 细胞的生长特性及对新配制的培养液中生长情况
 - a. 每隔 12 小时即在倒置显微镜下观察细胞的形态，生长状况，增殖情况。将购置的两瓶源细胞，严格无菌状态下观察、饲养。
 - b. 将其中一瓶源细胞生长到一定数量，即在低倍镜下观察细胞到瓶壁 60%空间时，新鲜配好培养液进行更换原培养液。另一瓶仍用原培养液培养。观察细胞对新配培养液反应。观察指标为细胞是否继续生长，是否继续倍增，死亡细胞数量增减，细胞形态学是否改变，有无细菌及霉菌污染。细胞倍增速度快慢，新配培养液与原培养液中细胞生长的对比情况。
 - c. 确定新配的培养液能使 HSFs 细胞适应、稳定、健康生长后即可将另一瓶细胞中培养换置培养，准备进行 HSFs 细胞传代。

4.1.4 人皮肤成纤维细胞的培养和传代

- (1) 细胞培养：
 - a. 将密闭、无菌、盛有培养液的培养瓶平放，置于 37℃恒温，5%CO₂ 培养箱中培养，HSFs 细胞呈贴壁生长，不可将培养瓶竖放或倒置。培养液需充足、平满一侧底部，但以不溢到瓶口为度（防止传代时倒流，污染）。
 - b. 于每隔 8~12 小时将培养瓶取出，放在倒置显微镜下观察细胞生长情况，观察细胞是否长满瓶底。生长良好状态，继续放入培养箱培养。

细胞老化，无生长则更换培养液，继续培养。约 1~2 天后细胞长满瓶底，在其未形成集落堆积生长前，准备传代。

(2) 细胞传代:

- a. 传代前的准备工作，包括清洁无菌的工作台、酒精灯、滴管、无菌的培养瓶、消化细胞脱离用的胰酶、洗手、穿无菌衣。
- b. 将生长满瓶壁的培养瓶中的培养液吸出，作废液弃置。
- c. 在培养瓶中加入消化液—胰酶约 0.5~1.0ml 以均匀铺满瓶壁为度，放置约 1 分钟。
- d. 在显微镜下看细胞是否脱离，松动。如不松动则继续放置。如已松动落，则放回工作台。
- e. 无菌下加入含 10% 小牛血清的新鲜培养液约 20ml，用吸管吸瓶中培养液反复冲洗原贴壁侧的细胞，使细胞脱离且在培养液中混匀。
- f. 从培养瓶中吸取适量细胞悬液（根据传代瓶数需要）加入另一无菌培养瓶中，加入充分培养液旋好培养瓶盖。
- g. 每个培养瓶均作好标记，包括传代时间、源细胞瓶、营养液瓶等。于显微镜下观察倒悬浮于培养液中的细胞。
- h. 放入培养箱中，定期观察细胞生长情况，待传代细胞数量到一定的程度时施行实验时，将所有细胞消化后收集，用于实验。

4.1.5 细胞计数的方法

细胞计数板计数，是对细胞悬液进行细胞计数的一种方法。具体方法如下：细胞计数前弃培养液，以 0.25% 胰酶消化，倒置显微镜下观察细胞消化情况。细胞全部皱缩为球形时，倒出胰酶，准确定量的 DMEM 稀释成细胞悬液，在细胞计数板上计数。

MTT 比色分析法的原理是利用活细胞线粒体对 MTT[3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 的代谢产生紫色的 formazane 结晶，溶解结晶后，可通过直接测定光吸收反映出细胞的增殖和衰减。具体方法是：培养终止前 4h，轻轻吸出上清 100 μ l 于各小孔内加入 5mg/ml MTT 液 0.01ml。将小板送回 5%CO₂ 培养箱内培养 4 小时。培养中止时，加入 SDS-DMF 溶解液 100 μ l，4 小时后，轻轻振荡 15min，用酶标仪(EL311S, Bio-Tek

Instruments)测定吸光度(Absorbance values), 检测波长为 570nm, 参考波长为 630nm。

4.2 LED 照射对人皮肤成纤维细胞增殖的影响

4.2.1 LED 照射光源

选用中等强度 LED 生物光源, 光源中 LED 红光波长为 $650 \pm 17\text{nm}$, 辐射照度范围在 $0.3579\text{—}11.2286(\text{W}/\text{m}^2)$, 通过控制 LED 的工作电流来调节光源的辐射照度, 再由照射时间来确定成纤维细胞所接受到的辐射剂量。

4.2.2 培养液与工作溶液

(1) DMEM 细胞培养液(Gibco BRL) 内含 16mmol/LNaHCO_3 、 100U/ml 青霉素和 $100\mu\text{g/ml}$ 链霉素及 10%灭活小牛血清(杭州四季青)。另备无酚红 DMEM 细胞培养液(Gibco BRL)。

(2) 台盼蓝工作溶液

称取2克台盼蓝, 加少量三蒸水研磨粉碎后, 再加水至50ml。离心后取上清液, 再加入1.8%NaCl溶液至100ml, 即成工作液。

4.2.3 细胞培养

正常人皮肤成纤维细胞HSFs(中山大学医学院动物中心提供)的培养 收集HSFs细胞, 经台盼蓝染色后光镜下观察, 细胞成活率大于97%, 然后接种于培养瓶中, 接种量分为 $3 \times 10^5/\text{瓶}$, 培养方法同前。LED照射实验组给予LED照射, 空白组不照射。每组均做3组重复实验。

4.2.4 照射细胞试验分组

通过控制中等强度 LED 生物光源的工作电流, 得到 $5.93(\text{W}/\text{m}^2)$ 和 $7.13(\text{W}/\text{m}^2)$ 两种辐射照度下的光强, 对下列三组培养正常人皮肤成纤维细胞 HSFs 进行照射:

表 4.1 LED 照射正常人皮肤成纤维细胞的试验

Tab 4.1 Experiments of LED irradiation on human skin fibroblasts

LED 照射正常人皮肤成纤维细胞的试验分组				辐射强度	照射时间	照射剂量
第一组	对 照	不给照射	实 验	5.93 W/m ²	150 秒	89mJ/cm ²
第二组	对 照	不给照射	实 验	7.13 W/m ²	300 秒	214mJ/cm ²
第三组	对 照	不给照射	实 验	7.13 W/m ²	600 秒	428mJ/cm ²

4.2.5 细胞计数和统计学分析

(1) 细胞计数:

照射后 48h, 细胞计数。具体方法如下: 细胞计数前弃培养液, 以 0.25%胰酶消化, 倒置显微镜下观察细胞消化情况。细胞全部皱缩为球形时, 倒出胰酶, 准确定量的 DMEM 稀释成细胞悬液, 在细胞计数板上计数。结果进行统计分析。

(2) 统计学分析:

对以上的实验结果进行t检验, $P^* < 0.05$ 为差异有显著性, $P^{**} < 0.01$ 为差异有极显著性。

4.3 结果

4.3.1 台盼蓝染色检测结果

台盼蓝染色示对照组及各种辐射照度下照射组细胞成活率大于97%, 提示在中等强度LED光源的辐射照度范围内照射, 不会引起细胞坏死。

4.3.2 第一组实验结果

第一组HSFs用5.93(W/m²)辐射照度的LED照射150秒, 细胞接受的照射剂量为89mJ/cm², 图6.1可见, 照射150秒后, 实验组细胞总数与对照组相比无差异($P > 0.05$), 显示在这一剂量下LED照射对细胞增殖无影响

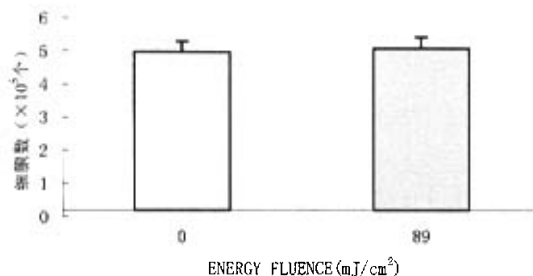


图 4.1 89mJ/cm²LED照射对细胞增殖的影响

Fig 4.1 Effects of 89mJ/cm²LED Irradiation on HSFs Proliferation

4.3.3 第二组实验结果

第二组HSFs用7.13(W/m²)辐射照度的LED照射300秒，细胞接受的照射剂量为214mJ/cm²，图3.2可见，照射300秒后，实验组细胞总数与对照组相比仍然无差异（ $P>0.05$ ），显示在这一剂量下LED照射对细胞增殖仍然无影响。

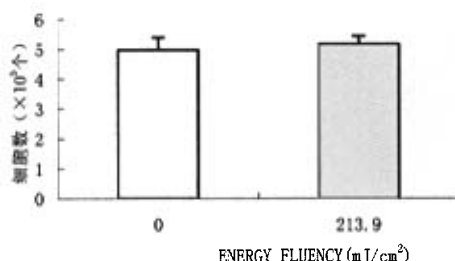


图 4.2 214mJ/cm²LED照射对细胞增殖的影响

Fig 4.2 Effects of 214mJ/cm²LED Irradiation on HSFs Proliferation

4.3.4 第三组实验结果

第三组HSFs用7.13(W/m²)辐射照度的LED照射600秒，细胞接受的照射剂量为428mJ/cm²，图3.3可见，照射600秒后，实验组细胞总数多于对照组，两组对比呈显著性差异（ $p^*<0.05$ ），说明在这一照射剂量下用LED照射会促进细胞增殖。

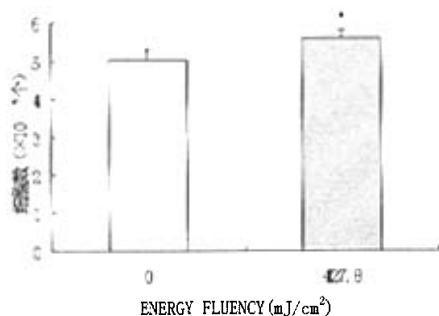


图 4.3 428mJ/cm²LED照射对细胞增殖的影响

Fig 4.3 Effects of 428mJ/cm²LED Irradiation on HSFs Proliferation

4.4 讨论

成纤维细胞是胶原合成的主要细胞，其在线粒体的粗面内质网将氨基酸装配成胶原蛋白的前体多肽链，进入内质网腔内结合成3股螺旋的前胶原蛋白分子，由高尔基复合体运出细胞外转变为原胶原，再按一定极性排列并聚合成胶原原纤维，而后进一步聚合成胶原纤维 [翟中和等 2002]。胶原分子的 α 肽链中氨基酸的排列顺序，每隔两个其它氨基酸即有一个甘氨酸，故整个结构可用（甘、X、Y） $_n$ 来表示，X、Y代表其它氨基酸，通常是甘氨酸—脯氨酸—羟脯氨酸，或甘氨酸—赖氨酸—羟赖氨酸。羟脯氨酸是脯氨酸羟化而成，需要脯氨酰羟化酶的催化 and 亚铁、维生素C、 α 酮戊二酸和分子氧的辅助。缺少任何一种辅酶都能抑制脯氨酸的羟化，妨碍胶原的合成。在维生素C缺乏所致的坏血病中，伤口愈合不良为众所周知。从功能角度看，胶原是愈合组织中重要的组分，而且在一定时间内，创伤愈合部位组织中的胶原含量会反映其愈合程度[Gottrup 1991，刘锬等 1994]。羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)则是胶原中的特征性氨基酸，

Lam等[Lam et al 1986]用氩氛激光($\lambda=632.8\text{nm}$)或GaAs激光($\lambda=904\text{nm}$)，照射人皮肤成纤维细胞(来源于外科样品的正常皮肤)可在不提高任何繁殖率的条件下都可得到胶原蛋白合成相当大的提高(最高可达36倍)。令人注意的有趣现象是氩氛激光可以使那些原本胶原蛋白产生能力很低的纤维细胞株的胶原蛋白合成力大大提高。在另一方面已显示对胶原蛋白原的蛋白合成潜力的大部分能力的纤维细胞株，对氩氛激光的促进作用却无反应。这些现象与光生物调节中非共振作用的特征是相吻合的，即光生物调节作用只调节功能不正常的细胞。

创伤愈合是以成纤维细胞的增殖、迁移、肉芽组织形成、胶原分泌、创口胶原化瘢痕形成及改建为特点的过程,成纤维细胞参与了创伤愈合的全过程,其数量及功能变化影响创伤愈合。在创伤愈合的研究中,许多学者用FBs体外培养,观测各种化学物质、生物活性因子对创伤愈合的影响。1996年Elilis[Elilis et al 1996]等利用人FBs,研究创伤因子,如血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblasts growth factors, bFGF)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)及其浓度对培养的FBs生长、分裂增殖的影响,以及它们相互间的促进和抑制作用。结果表明:单个生长因子对促进FBs的DNA合成的刺激作用在第三天最明显。EGF活性可被bFGF和PDGF所抑制。bFGF和PDGF的共同作用比加和作用稍弱。Clark等人[Clark et al 1997]利用人胎肺培养FBs,研究 β -转移生长因子(transforming growth factor beta, TGF- β)对其形态学和细胞增殖的影响,在正常情况,FBs生长至融合铺满瓶底后停止增殖,经研究发现,含TGF- β 的培养液使FBs增殖至16层厚,并产生一种纤维化组织。

在低强度单色光治疗伤口的研究中,许多学者用培养的成纤维细胞为模型,研究低强度单色光对创伤愈合影响的机理。低强度激光信号能促进成纤维细胞增殖已被实验证实[Webb et al 1998]。Van Breugel用不同能量密度和照射时间的He-Ne激光照射人单层成纤维细胞,发现小于2.91mW时可促进成纤维细胞的增殖,而大于5.98mW时则无效果[Breugel et al 1992]。Almeida等用强度为2 J/cm²的670 nm, 780 nm, 692 nm, 和 786 nm四种波长低强度激光照射牙龈成纤维细胞,同样发现低强度激光能引起牙龈成纤维细胞的增殖[Almeida et al 2001]。Hrnjak等发现单次照射,剂量为0.5、1、1.5、2J/cm²均有显著的刺激作用[Hrnjak et al 1995]。Kipshidze等人用He-Ne激光从0.1到6.3J/cm²的照射强度照射成纤维细胞时发现在成纤维细胞中血管内皮生长因子(VEGF)的分泌量是非照射组的1.6倍,并且效应都是呈剂量依赖关系的。成纤维细胞用2.1 J/cm²激光照射时效应最为明显[Kipshidze et al 2001]。但某些实验也有相反的结果, Hallman等发现He-Ne激光对培养不同代数的成纤维细胞的增殖均无促进作用[Hallman et al 1998]。Gutknecht等用Nd:YAG激光(脉冲能量30~120mJ,脉冲速率20~100Hz,能量输出1.5~3.0mW,照射时间10~60s)照射L-929成纤维细胞,结果显示激

光的照射能使细胞 DNA 合成和细胞分裂受到抑制[Gutknecht et al 1998]。Glassberg 等人用 577nm 闪光泵浦可调染料激光照射成纤维细胞, $5\sim 12\text{J}/\text{cm}^2$ 的照射剂量能抑制成纤维细胞的增殖, 大于 $12\text{J}/\text{cm}^2$ 的照射剂量能抑制成纤维细胞的蛋白质合成。 $5\sim 8.5\text{J}/\text{cm}^2$ 的照射剂量对细胞活力无影响[Glassberg et al 1988]。Joyce 等人早先的试验已发现了低强度激光照射能诱导细胞对致电离辐射的适应性、保护性反应。接着他们又研究了低强度激光照射对 Indian muntjac 成纤维细胞对致电离辐射破坏作用的适应性、保护性反应。 11.5 和 $23.0\text{J}/\text{cm}^2$ 的 660nm 低强度激光照射能诱导明显的适应性反应, 表现为降低了辐射引起的染色体失常。但细胞存活量并没有增加。进一步的分析表明: 染色体失常率的改变是由于激光引起了 G2 期延迟的延长。所以适应性反应是由于低强度激光对细胞周期的调节, 在这一波长的激光不会由 DNA 损伤而引起细胞周期进程的改变[Joyce et al 1999]。

Karu 和 Tiphlova 等人在多年时间里, 从动物细胞分子水平上, 系统地研究了细菌、酵母菌和哺乳动物细胞在 LIL 与可见光作用下的行为, 发现光刺激效应主要与波长、照射剂量和照射方式有关, 而相干光的条件不是必须的[Tiphlova et al 1986, Fedoseyeva et al 1986]。Karu 对这些不同水平的生物体, 用相干性好的激光与相同波段的可见光进行的对比实验表明: 无论是在 DNA 或蛋白质的合成速率; 细胞或细菌生长速率; 以及各种酶的活性和 c AMP 水平的测试结果来看, 二者具有相同的刺激效果[Karu et al 1983, 1984, 1985 1987]。而用相干和不相干的红光在治疗消化道溃疡方面也会有相同的效果 从而说明非相干性可见光同样可以达到激光的生物刺激效果。

由此可见, 用 640nm 波段的 LED 红光, 同样可以取代该波段的氦氖激光而对培养的人纤维细胞产生增殖。以上实验证明了该论断, 并且实验结果支持 BIMP 模型, 正如 1.3 节所指出的, 促进胶原合成属于途径 1, 促进增殖属于途径 2。本章研究红色 LED 照射对成纤维细胞增殖的影响, 所用的剂量为 $89\text{mJ}/\text{cm}^2$ 、 $214\text{mJ}/\text{cm}^2$ 和 $428\text{mJ}/\text{cm}^2$, 相应的实验结果基本符合 BIMP1 (前两个剂量) 和 BIMP2 (第三个剂量)。显然细胞接受 LED 的照射剂量不同, 对细胞增殖的影响也不相同。

成纤维细胞是创伤发生后伤口底部及边缘未分化的间充质细胞转化而成的。成纤维细胞增殖在创伤修复中起着重要作用,低强度单色光能通过促进成纤维细胞的增殖达到创伤愈合的加速、移植组织的再生等效果[Pereira et al 2002]。LED的输出功率是毫瓦级的单色光,照射组织不仅温度无明显改变,对组织无病理损害而且还会产生治疗疾病的生物刺激作用。如何加速创伤愈合是临床医学和运动医学研究的重要课题之一,在这一方面,LED照射有望成为一种重要的治疗手段,能够在低强度激光疗法中代替一些激光器起作用。

第五章：LED 照射离体 PC12 细胞抑制由 A β 诱导的细胞调亡研究

5.1 实验背景和目的

阿尔茨海默病人脑内含有衰退神经元，这些神经元表现出细胞调亡的特征，如 DNA 断裂损伤。尤其是一种名为淀粉样 β 蛋白的毒性蛋白质，它在条件适当的情况下似乎能够驱动细胞进入调亡途径[Cotman et al 1995]。为了减慢阿尔茨海默病症中神经元恶化，人们在抑制神经元调亡这方面做了许多工作[Shaw et al 2002, Peng et al 2002, Hosoda et al 2001]，但几乎所有的治疗措施都是化学或生物化学性质的，而在本实验中，我们首次提出通过 LED 生物光源照射来抑制 A β 诱导的细胞调亡的可能性新方法。

A β ，神经炎沉积物的主要成分，它含有 40 到 42 个氨基酸，是淀粉样前体蛋白的水解片段[Glennner et al 1984, Kang et al 1987]。其 25-35 的氨基酸序列形成纤维，且该段序列可能是所观察到的 A β 体外细胞毒性的有效部分[Pike et al 1993, Yankner et al 1996, Cardoso et al 2001]。本研究中，我们用 A β ₂₅₋₃₅ 作用于鼠嗜铬细胞瘤细胞系 PC12，该细胞系通常用于神经细胞调亡研究，是具有代表性的细胞模型系统[Pittman et al 1993]，在对 A β ₂₅₋₃₅ 的毒性进行评估以后，再用 LED (640 \pm 15 nm) 照射，看其是否抑制 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞调亡。试验中我们发现，用中等强度功率为 0.9 W/m² 的 LED 生物光源，照射 60 分钟就能够显著减少 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞调亡。

5.2 实验材料

(1) 化学试剂：

A β ₂₅₋₃₅，Tris，Triton X-100，嗅乙啶，以上均购于 Sigma 公司；RPMI 1640 培养基，胰酶，小牛血清和马血清购于 Gibco。所有试剂均为分析纯。

(2) 细胞培养：

未分化 PC12 细胞，培养于 RPMI 1640 培养基中（每两到三天更换一次培养基），其中含有 5% 热灭活的马血清，10% 热灭活的胎牛血清，100U/ml 的青霉素，100g/ml 链霉素。为便于照射，先将细胞从培养瓶上刮下，离心收集（4 分钟，800 rpm），以低密度（1500 个细胞/cm²）植入 6 孔板中，试验前使之生长

至汇合。所有细胞置于 37℃, 95%空气, 5% CO₂ 的培养箱中。所有试验中的细胞浓度为 1×10⁶ cells/ml。

(3) Aβ₂₅₋₃₅:

所需 Aβ₂₅₋₃₅ 溶液用无菌水配制成 1 毫摩尔的原液备用。

(4) LED 生物光源:

用自制的中等强度 LED 生物光源 ($\lambda = 640 \pm 15 \text{ nm}$), 对系统进行照射。

5.3 实验方法

试验使用 PC12 单层培养细胞, 使其经过 Aβ 单独作用或和不同强度 LED 照射共同作用, 之后进行细胞调亡率的检测。细胞调亡通过 DNA 断裂检测, 结合流式细胞仪细胞计数检测进行判定。

5.3.1 LED 生物光源照射

照射时通过光筒使均匀光斑完全覆盖六孔板的单孔(9.6cm²), 通过调节 LED 的工作电流, 使光源辐射照射控制在 0.5W/m²~10W/m² 范围内, 照射时间 30 到 60 分钟, 照射在暗室中室温下进行。

5.3.2 流式细胞计数

用流式细胞仪计数前, 细胞要经过以下处理。胰酶消化; 1500 rpm, 5 分钟离心; PBS 清洗两次; 冰水溶液 (27% PBS, 3% 初生小牛血清, 70% 乙醇) -20℃ 固定。之后, 解冻的细胞离心收集, PBS 清洗, 再重新悬浮于 0.5ml 加入了 50μg/ml RNaseA (Sigma) 的 PBS 中, 37℃ 孵育 30 分钟。样品用 20μg/ml Annexin-V-FITC 和 50μg/ml Propidium Iodide (Sigma) 染色过夜。用 FACScan (Becton-Dickinson) 进行流式细胞分析。细胞周期分布和调亡数据用 CellFIT 细胞周期分析程序处理。

5.3.3 DNA 碎片检测

使用琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 碎片分析。简言之, 即将 PC12 细胞从板中移出, 离心收集, 然后用磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4) 洗两次。用裂解液 [0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA, and 10 mM Tris (pH 7.4)] 4℃ 裂解 30 分钟, 再用苯酚/氯仿萃取三次, 在 -20℃ 下用异丙醇和 0.1 M NaCl 沉淀 DNA, 之后用 RNase 作用 30 分钟, 37℃。点样 (1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 5V/cm.) 后电泳。最后将用溴乙啶染色的 DNA 置于紫外灯下显色。

5.3.4 细胞调亡的形态学观察

应用染色法可观察到凋亡细胞的各种形态学特征,如染色质固缩、凋亡核小体的形成、细胞发泡等现象,这里对凋亡细胞分别使用了 Giemsa 和 Hoechst 33258(5 $\mu\text{g/ml}$)染色后,用荧光显微观察细胞损伤情况和凋亡细胞核的形态变化,在所有对照实验中,这两种荧光染料对正常活性的 PC12 细胞的形态结构没有影响。

5.3.5 数据统计分析

数据以 S.E.M 方式表示,至少四次重复。统计显著性用双尾学生氏 t 测验判定 ($P < 0.05$ 被认为显著)。

5.4 实验结果

5.4.1 A β 单独或与 LED 联合作用于 PC12 细胞结果

凋亡细胞的量化用流式细胞分析仪评估。凋亡细胞表现为细胞缩小,出现质膜小泡,染色质凝缩以及核破碎(Hoechst 33258 染色,数据未显示)。A β_{25-35} 诱导细胞凋亡的作用随其浓度增大而增强(图 5.1A)。我们进行了一项时间因素的研究。PC12 细胞被置于 30 μM A β_{25-35} 条件下 4~48 小时,在 4 小时处理中,只有 7%的细胞凋亡,而这一数值在 24 小时处理中增长并达到一个峰值 42%(图 5.1B)。在随后的试验中我们选定 24 小时这个时间。置于 20 μM A β_{25-35} 条件下 24 小时的 PC12 细胞有 34-42%凋亡(图 5.1A 和 5.1C)。LED 照射抑制 PC12 细胞凋亡有剂量依赖的特点。经 A β_{25-35} 处理前或处理后的细胞,再用 LED 照射(0.9W/m^2 , 60 分钟),都能显著减小凋亡百分比(图 5.1C)。

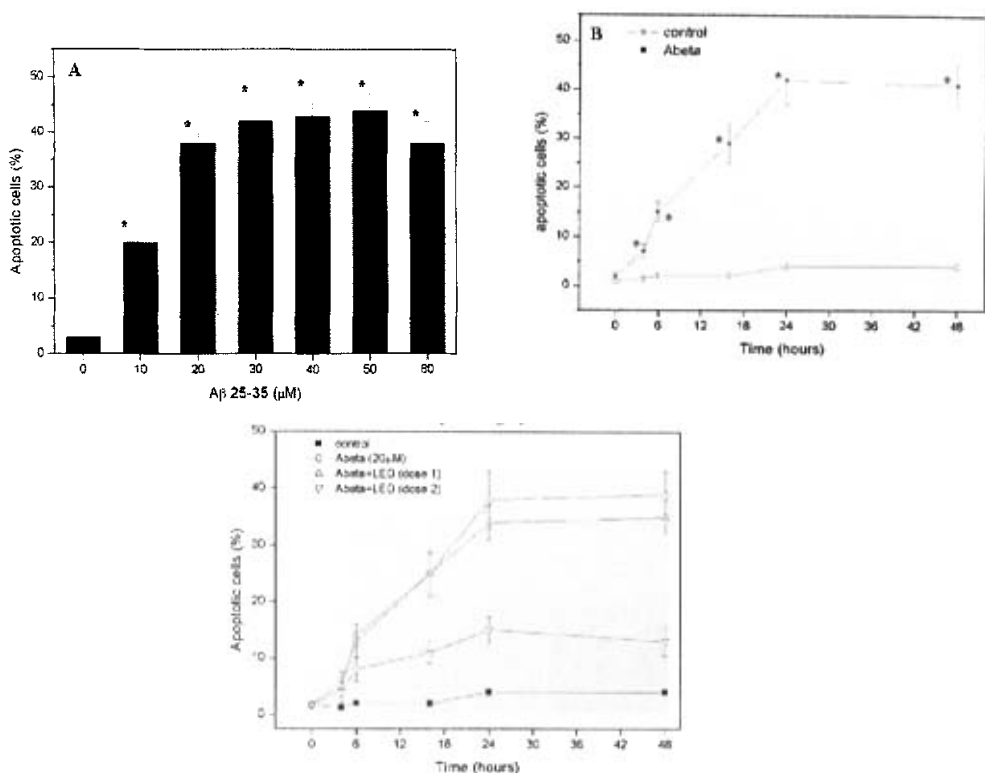


图 5.1 Aβ 单独或与 LED 联合作用于 PC12 细胞的试验

Fig 5.1 Experiments on PC12 cells exposed to Aβ₂₅₋₃₅ or/and LED irradiation.

在这些试验里细胞均经过如前所述的处理。细胞凋亡用流式细胞仪分析。图中数值显示了四次试验的方差分析的方式。(A) 24 小时 Aβ 处理导致的 PC12 细胞凋亡是剂量依赖性的；与空白对照相比 $*p<0.05$ 。(B) Aβ 作用时间(4-48 小时)的影响；与 0 小时组相比 $*p<0.05$ 。(C) Aβ 处理后用 LED 照射。照射剂量 1, 10W/m², 60min；剂量 2, 0.9W/m², 60min。

5.4.2 核内 DNA 片段化分析结果

核内染色质断裂，即 DNA 断裂，是细胞凋亡的征兆。用 20μM, 30μM 的 Aβ₂₅₋₃₅ 分别处理 24 小时，之后进行琼脂糖电泳，结果显示有低分子量核小体状 DNA 片段出现（图 5.2，线 2, 3），而未经 Aβ₂₅₋₃₅ 处理的细胞没有可测知 DNA 片段（图 5.2，线 1）。Aβ₂₅₋₃₅ 处理后用 LED 照射（0.9W/m², 60min）可明显减少 DNA 碎片（图 5.2，线 4, 5）。

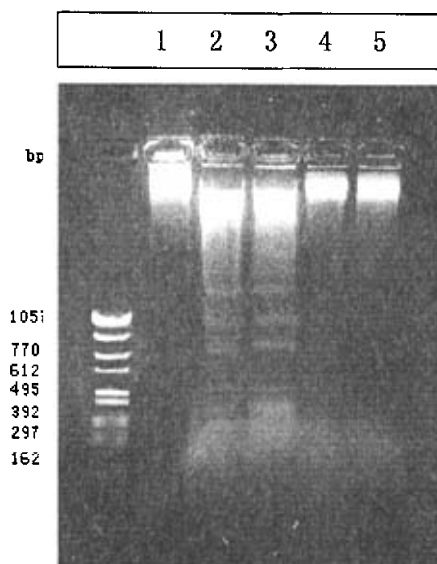


图 5.2 PC12 细胞 DNA 片段琼脂糖电泳

Fig 5.2 Agarose gel electrophoresis of DNA fragmentation in PC12 cells.

电泳完毕后溴乙啶染色的 DNA 在紫外光下显色。所有样品在萃取前都经 A β ₂₅₋₃₅ 处理 24 小时。线 1，空白[未加 A β (25-35)]；线 2，20 μ M A β ₂₅₋₃₅ 作用 24 小时；线 3，30 μ M A β ₂₅₋₃₅ 作用 24 小时；线 4，5，A β ₂₅₋₃₅ 处理后用 LED 照射 (0.9W/m², 60min)

5.4.3 用 Giemas 染色后的细胞损伤观察

用 Giemas 对由 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞和对照组进行染色后，用荧光显微检查凋亡所导致的细胞损伤，损伤细胞和对照组的显微拍照(40倍放大)如下：

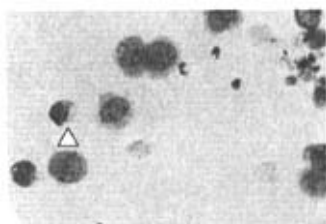


图5.3 PC12细胞被10 μ M A β ₂₅₋₃₅诱导

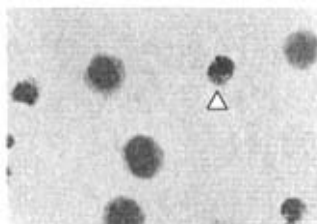


图5.4 PC12细胞的对照组

Fig. 5.3 and 5.4 Giemsa's stain. Morphological appearance of PC12 cells treated with either 10 μ M A β ₂₅₋₃₅(Fig5.3) or (Fig5.4) for 24h. Cells were stained with Giemsa and photomicrographs ($\times 40$ magnification) were taken. Δ is apoptosis cell.

由图5.3可以观察到,加入 $10\mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 后,出现了细胞损伤,如图中的细胞核收缩,细胞膜破损导致胞浆外泻,说明是由 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的细胞凋亡所致,而图5.4对照组的细胞基本完好无损。

5.4.4 用Hoechst 33258染色后的细胞核形态观察

用Hoechst 33258($5\mu\text{g}/\text{ml}$)对由 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞核和对照组进行染色后,用荧光显微检查凋亡所导致的细胞核形态改变,凋亡细胞和对照组的显微拍照(200倍放大)如下:

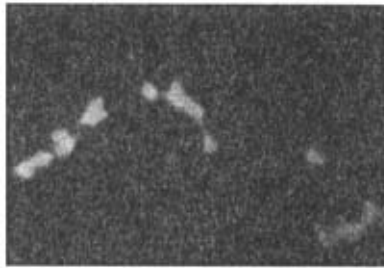


图5.5 PC12细胞的对照组



图5.6 PC12细胞被 $10\mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导



图5.7 PC12细胞被 $10\mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导凋亡后用630nmLED红光进行照射

Fig 5.5-5.7 Morphological appearance of PC12 cells treated with either vehicle alone (5.5) or $10\mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ (5.6) for 24h or $10\mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ plus LED light (630nm) irradiation (5.7) for 24h. Nuclei were stained with Hoechst 33258 and fluorescence photomicrographs ($\times 200$ magnification) were taken.

由图5.6可以观察到,加入 $10\mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 后,明显出现了细胞核的破碎、核内物质外泄等细胞凋亡的特征,如图中的蓝色部分所示。而对照组图5.5则没有这些变化。有趣的是,先加入 $10\mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导凋亡,再用LED红光(630nm)进行照射,则能较显著地抑制PC12细胞的凋亡进程,如图5.7所示,用荧光显微所观察

到的这些凋亡特征大为减少。

5.5 结论

用波长 ($\lambda = 640 \pm 15 \text{ nm}$)，辐射照度为 0.9 W/m^2 的 LED 生物光源，照射 60 分钟能显著减少 $A\beta_{25-35}$ 导的 PC12 细胞凋亡。

5.6 讨论

Alzheimer 病 (AD) 是一种不可逆的中枢神经系统变性疾病,其主要病变损害位于记忆有关的海马等结构,病理特征是 AD 脑内神经元之间出现大量的淀粉样老年斑 (senile plaques, SP) 和神经元轴突出现双股螺旋细丝扭曲形成纤维缠结(neuro fibrillary, NFT)[Orpiszewski et al 2000, Lovell et al 2002]。其中 SP 是 AD 重要的病理基础。 β -淀粉样蛋白(amyloid β peptide, $A\beta$)是 SP 核心且重要组成成分。 $A\beta$ 由 39~43 个氨基酸组成,有 β -折叠和 α -螺旋两种构型。一般来说,具有 β 折叠结构的蛋白质容易形成积聚,而纤维状的蛋白质积聚体中往往含有大量的 β 结构存在[Merlini et al 1995, 胡红雨等 1999, Serpell 2000]。 $A\beta$ 可以积聚形成淀粉样纤维 (fibril), 并进一步形成 SP[Serpell 2000]。

关于 AD 的发病机制,众说纷纭,但基本上可以分为两类。Hardy 等[Hardy et al 1992]在 Science 发表的“淀粉样级联假说”是主流学说。该假说认为:淀粉肽前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的变相蛋白水解导致 $A\beta_{1-42}$ 在脑间隙液中量的堆积, $A\beta_{1-42}$ 的低聚和沉淀引发脑内形成可扩散性斑块,这为 $A\beta_{1-40}$ 和其它蛋白的继续沉淀提供了“聚种”。这种纤维化的 $A\beta$ 的不断堆积,造成斑块内及周围的神经损伤。在聚种上的累积性损伤导致神经元功能的丧失和稳态的破坏,最终导致神经元的死亡。这种神经炎症性斑块数量的增加引发由神经元缺失造成的痴呆的级联反应。这个假说最近进一步得到转基因动物模型研究的支持 [Gotz et al 2001, Lewis et al 2001]。

Robinson 等[Robinson et al 2002]提出“ $A\beta$ 生物絮凝假说”,他们认为: $A\beta$ 在 AD 的病因病理机制中的作用是解毒功能而非神经毒性。不论是纤维化的 $A\beta$ 还是可溶性的 $A\beta$ 所起的不仅是非毒性作用,而是一种普遍性的对损伤的生理反应,这正是大脑不完全消除引起 AD 神经元损伤的各种致病因素的解毒机制。 $A\beta$ 絮凝吸附脑间隙液中的金属粒子等有害可溶性物质并递呈给巨噬细胞。

从中医的观点来看,上述两类假说并不矛盾,它们各自陈述了 $A\beta$ 在 AD 发

病的不同阶段所起的作用。一方面,在发病前作为生理机制,A β 絮凝吸附脑间隙液中的金属粒子等有害可溶性物质并递呈给巨噬细胞;另一方面,当纤维化的A β 堆积达到一定的程度,造成斑块内及周围的神经损伤最终导致AD。这里的关键是神经炎性斑块数量,尽管不一定存在神经炎性斑块数量与AD痴呆程度关联[Holtzman 2002],但应该存在一个产生病理效应的阈值,而且这个阈值是有个体差异的。Lorenzo等[Lorenzo et al 1994]发现,无定形A β 不致病,但A β 淀粉样纤维致病。[Holtzman 2002]指出,非 β -折叠型A β 形成扩散型斑块, β -折叠型A β 形成神经炎型斑块。前者与“A β 生物絮凝假说”相关,后者与“淀粉样级联假说”。因此,[Holtzman 2002]进一步指出,A β 结构转换才是AD的中心。Orpiszewski等[Orpiszewski et al 2000]提出的蛋白质衰老假说揭示了A β 结构转换的机制。

综上所述,A β 形成淀粉样纤维或SP是AD发病过程中关键性的一步,少量的淀粉样纤维或SP是非毒性的,但大量沉积时会导致AD。因此,抑制淀粉样纤维或SP的形成或使已经形成的淀粉样纤维或SP解聚,是可以发展成为AD治疗的一种临床方法。抑制蛋白质凝聚并非不是一种治疗方法[Merlini et al 1995, Kisilevsky et al 1995, Lansbury 1997, Yang et al 1999, Talaga 2001, Ono et al 2002, Kiuchi et al 2001&2002]。从这个角度来说,淀粉样纤维可以看成AD的化学生物学模型。

目前AD的临床治疗都是用药物,由于该病为慢性病,长期服药存在副作用。采用光则可以直接作用于病灶部位,而且迄今没有发现副作用。光子的静止质量为零。它被淀粉样纤维或细胞吸收后,除了改变淀粉样纤维或细胞的状态,不会留下任何痕迹。因此,LED单色光方法有可能发展成为AD治疗的绿色方法。

在单色光疗法对Alzheimer病(AD)的临床应用中,主要是通过两种途径,即视网膜通路和非视网膜通路。如在视网膜通路中,利用明光刺激可以使AD的昼夜节律紊乱得到改善[Ancoli Israel et al 2003]。在非视网膜通路中,金丽英等人[金丽英等 2000]发现,半导体激光(波长670nm,功率7~10mW)鼻腔内照射疗法可以降低轻度认知障碍病人血清的 β -类淀粉样蛋白浓度。腭窝等体表照射是否可以改变昼夜节律是近年来的热点[Campbell et al 1998, Wright et al 2002]。

Firbank 等[Firbank et al 1993]的研究表明, 波长在 650nm 以上的红光或红外光是可以穿透头盖骨的。我们发现的红光发光二极管(LED)可以抑制 Beta 淀粉样蛋白诱导的 PC12 细胞凋亡, 这个结果可以用于开发 AD 光疗的第三条方法, 即神经元的直接 LED 照射, 作用的途径可以用光穿透头盖骨, 也可以在大脑植入遥控的 LED, 目前正在研究之中。

红光发光二极管(LED)可以抑制 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 凋亡, 而且这种效应不满足倒易关系(只要剂量相同, 单色光效应与光的强度或照射时间无关)。低强度激光可以产生细胞效应。我们利用辐射与物质相互作用的时间量子理论在总结了大量的实验数据的基础上提出了低强度激光的生物信息模型(BIML)。根据 BIML, 低强度激光产生细胞效应的关键是因为它可以通过对电子的激发达到改变细胞膜受体构型的目的。细胞受体对可见光的吸收是非共振的, 只有当受体处于协同状态才可以通过正比于受体数目的平方的非线性放大才可以产生细胞效应。Rensink 等[Rensink et al 2002]发现, A β 诱导人脑 pericyte 恶化的关键步骤是 A β 在细胞膜表面组装, 抑制细胞膜表面淀粉样纤维的形成是降低脑血管病淀粉样病变的重要因素。我们认为, β -折叠的 A β ₂₅₋₃₅ 在 PC12 细胞膜上的组装是诱导 PC12 凋亡的关键。红光 LED 抑制 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 凋亡的效应不满足倒易关系, 说明单色光与细胞的作用是非共振作用。在产生细胞效应这个方面, 低强度激光与单色光没有本质的区别[Karu1998]。根据我们提出的低强度激光的生物信息模型(BIML)[LiuCY1998, LiuTCY1999, LiuTCY et al 1999~2001], 吸附在细胞膜上的 A β 之间发生了相干作用, 这种相干作用将单色光与单个 A β 的非共振作用非线性放大, 通过对电子的激发使 A β ₂₅₋₃₅ 的 β -折叠向 α -螺旋转化, 从而抑制了的 β -折叠的 A β ₂₅₋₃₅ 在 PC12 细胞膜上的组装, 进而抑制了 PC12 的凋亡。研究发现[Antzutkin et al 2000], A β 淀粉样纤维中 β -折叠是平行排列的。根据 Gazit[Gazit 2002]的 π 堆积假说, 淀粉样纤维中的 π 堆积也可以实现 A β 之间的平行排列。因此, A β 可以形成协同状态, 因此可以非线性放大单个 A β 与单色光的非共振作用, 从而通过电子激发促使 A β 由 β -折叠向 α -螺旋转化, 从而使淀粉样纤维解聚。

另外, 还根据生物信息模型(BIMP), 暖色光和冷色光可以在不同的剂量段分别激活不同的信号通路, 本实验中用 640 \pm 15nm 的 LED 红光属暖色, 用 0.9W/m²

的 LED 生物光源, 照射 60 分钟后, PC12 细胞接受的照射剂量总共为 3240J/m^2 , 是在第一剂量段内, 符合 BIMP1 模型, 兴奋由 Gs 蛋白介导的途径 1, 导致 cAMP 浓度升高, 使细胞分化, 这里可以把凋亡理解为分化的逆过程, 因此用 BIMP 仍然可以得以解释。

包含 A β 的斑块沉积物是阿尔茨海默病病理学的特征, 而且有大量证据表明 A β 也是阿尔茨海默病的病因所在[Barinaga et al 1998, Gibson 2001, Cotman 1998]。很明显, 不溶的 A β 沉积物形成了阿尔茨海默病脑中的斑块并且这些不溶物能诱导体外细胞凋亡[Pike et al 1991]。现在, 越来越多的研究表明阿尔茨海默病的神经元恶化是由 A β 诱导的细胞凋亡[Cotman et al 1995, Barinaga et al 1998, Gibson 2001, Cotman 1998]。很多研究人员做了关于 A β 诱导体外多种细胞凋亡的工作, 我们通过用 A β_{25-35} 处理 PC12 细胞也得出了类似的结果。在经过 24 小时 $30\text{ }\mu\text{M}$ A β_{25-35} 处理后, PC12 细胞表现出凋亡的多项特征, 包括 DNA 损伤等。

细胞凋亡的分子机制, 目前主要有线粒体学说和细胞膜说法两种。这两种说法的最后都是归结为活化 caspase3/7, 进而执行凋亡, 所不同的是通过膜的途径可能是经过膜上配体/受体的连接器蛋白, 而使 caspase8 和 10 活化, 进而再活化 caspase3/7 来执行凋亡, 这个过程将会导致 cAMP 浓度的升高; 而通过线粒体的途径则可能是通过降低线粒体的膜电位, 使线粒体膜的通透性增大, 细胞色素 c 分子释放, 通过启动 caspase9 的活化来使 caspase3/7 活化后, 再执行凋亡。

A β 诱导的细胞凋亡机制尚未完全搞清楚。A β_{25-35} 的细胞毒性被证实是经它对线粒体的作用介导的[Cardoso et al 2001, Cardoso et al 2002, Pereira et al 1998]。就是说 A β_{25-35} 的细胞毒性的实现需要功能线粒体电子传递链的参与。当正常电子传递链被破坏时, A β 能诱导细胞凋亡, 其途径可能是通过降低正常线粒体膜电位并最终导致细胞色素 c 释放和 caspase 酶的激活[Cardoso et al 2001, Cardoso et al 2002]。另一方面, 基于线粒体对光照 (630nm, 632.8nm, 820nm and 812nm) 的敏感性而引起的膜电位和质子梯度的增加会使线粒体的光学等性质发生改变[Anders et al 1995, Passarella et al 1988, Passarella et al 1984]。这就说明 A β_{25-35} 和光照对线粒体膜电位的影响机制是相反的。Shefer 等人报道用氩氦激光照射骨骼肌卫星细胞培养物可增强抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 同时减少促凋亡蛋

白 BAX 的表达。当然，这些有趣的现象其机制是需要深入研究的。

从图 5.1C 可以看出，不同剂量的 LED 照射对细胞凋亡有不同影响。考虑到剂量因素，我们的预试验显示最重要的影响因素是照射强度。在相同强度下照射 30-60 分钟不等，而其作用无显著差异。当照射强度相对高时，光对凋亡会产生相反的影响，这就象我们在早先的研究中发现的一样[Beranek 1998, Gu Y et al 1999, Xu Q et al 1999]。这一作用机制我们在另一篇文章中进行了讨论[Liu TCY et al 2003]。

由于缺乏理想的病理动物模型，不能检验干扰细胞凋亡是否有助于减慢疾病的发展。但考虑到干扰凋亡对该病可能有好的疗效，阿尔茨海默研究人员毫无疑问将会继续努力[Barinaga 1998]。我们的数据显示，但还未确定，光可能在防止阿尔茨海默病神经元恶化中起作用。进一步的研究需要从光对抑制 PC12 细胞凋亡的原因入手，如用圆二色谱仪或核磁共振等手段来弄清导致淀粉样蛋白由 α 构型向 β 构型转变的分子机理。

第六章 总结

作为一种小巧轻便、有效、省电、高亮度的新型固体光源，与半导体激光器相比，发光二极管具有更大的光谱宽度和照射面积。大量相关研究实验表明，在可见光范围内，发光二极管可以取代同样波段的激光器，成为在生物医学应用中很有潜力的经济光源。首先，本论文从非相干单色光的细胞生物效应、光生物调节作用机理、光生物调节中非共振作用的特征、以及生物信息模型(BIMP)等几方面，论述了研制 LED 生物光源的立论依据。然后，论文从发光 LED 生物光源的光学设计、工作参数测定、辐射照度计算模型推导等几方面入手，进行了较深入的研究，研制出低、中、高三种强度的 LED 生物光源，该系列生物光源的研制成功，将使 LED 这种廉价、方便、可靠的新型生物光源技术进一步标准化、系列化和实用化，从而为它在生物医学等领域开拓更广阔的应用。最后，论文用自制的生物光源进行了细胞生物学的相关研究，证明了该系列光源的可靠性，尤其是这种生物光源在设计时采用的单元组装模式，使得不同强度的光照能够在同一批生物样品上实现，大大拓宽了生物实验的可选择性，提高了工作效率和实验准确性。取得的主要结果如下：

1. 采用透镜组扩束可以降低 LED 输出光的辐射照度，得到低强度 LED 生物光源。其辐射照度 $E_1(\text{W}/\text{m}^2)$ 与光筒长度 $L_{(m)}$ 的倒数、工作电流 $I_{(A)}$ 和管芯光强 $I_{(cd)}$ 均为线性增加，但会随透镜组焦距 f_3/f_2 比值的增大呈幂函数衰减，在辐射照度 $0.0021—0.9961(\text{W}/\text{m}^2)$ 范围内，辐射照度的计算模型为：

$$E_{\left(\frac{\text{W}}{\text{m}^2}\right)} = -0.290 + 0.296 \times I_{(cd)} + \frac{0.001333}{L_{(m)}} - \frac{0.0254}{Ln\left(\frac{f_3}{f_2}\right)} + 13.590 \times I_{(A)}^2$$

2. 采用透镜阵列聚焦可以提高 LED 输出光的辐射照度，得到中等强度 LED 生物光源。其辐射照度 $E_2(\text{W}/\text{m}^2)$ 与光筒长度 $L_{(m)}$ 的倒数、工作电流 $I_{(A)}$ 和管芯光强 $I_{(cd)}$ 均为线性增加，但会随透镜直径 $2R_{(m)}$ 的增大呈幂函数衰减，在辐射照度 $0.3579—11.2286(\text{W}/\text{m}^2)$ 范围内，辐射照度的计算模型为：

$$E_{\left(\frac{\text{W}}{\text{m}^2}\right)} = -1.2520 + 1.7140 \times I_{(cd)} + \frac{0.0221}{L_{(m)}} - \frac{0.0212}{R_{(m)}} + 1298.8230 \times I_{(A)}^2$$

3. 用曲面点阵与菲涅耳透镜结合，可以得到较高强度 LED 生物光源。其辐

射照度 $E_3(\text{W/m}^2)$ 与工作电流 $I_{(A)}$ 、管芯光强 $I_{(cd)}$ 和 LED 数目 N 均为线性增加, 但与光筒长度 $L_{(m)}$ 的倒数是对数关系, 会随 $L_{(m)}$ 倒数的增大而趋于常数, 在辐射照度 17—110(W/m^2) 范围内, 辐射照度的计算模型为:

$$E_{\left(\frac{W}{m^2}\right)} = -47.809 + 76.623 \times \sqrt{I_{(cd)}} - \frac{0.013}{L_{(m)}} - 8.360 \times \sqrt{N} + 8575.843 \times I_{(A)}^2$$

4. 使用中等强度 LED 生物光源, 对培养的人皮肤成纤维细胞进行照射。观察促进细胞增殖, 结果发现, 细胞的增殖在 89mJ/cm^2 、 214mJ/cm^2 照射后无变化, 428mJ/cm^2 照射后, 与对照组相比有显著性差异, 该实验结果支持 BIMP 模型等理论。

5. 使用中等强度 LED 生物光源, 照射所培养的, 由 $A\beta(25-35)$ 诱导的 PC12 细胞。观察抑制细胞凋亡, 结果发现, 以 $0.9(\text{W/m}^2)$ 辐射照度的 LED 照射 60 分钟, 则能显著减少由 $A\beta$ 诱导的 PC12 细胞凋亡, 该实验结果可以为探讨使用光学技术这种绿色疗法, 来防治老年痴呆病提供一定的启示。

参考文献

- Almeida AL, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. 2001. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 29(2): 179-84.
- Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. 2001. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Laser Surg Med* 29 (2): 179-184 2001.
- Ancoli-Israel S, Martin JL, Gehrman P, Shochat T, Corey-Bloom J, Marler M, Nolan S, Levi L. 2003. Effect of light on agitation in institutionalized patients with severe Alzheimer disease.
- Anders JJ, Mysliwiec V, Preston S. 1995. Low power laser irradiation alters the fluorescence intensity of rhodamine 123 labeled mitochondria in human fibroblasts. *Lasers Surg. Med.*, 1995, 30(7): 7-8
- Antzutkin ON, Balbach JJ, Leapman RD, Rizzo NW, Reed J, Tycko R. 2000. Multiple quantum solid-state NMR indicates a parallel, not antiparallel, organization of beta-sheets in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Nov 21;97(24):13045-50
- Barinaga M. 1998. Is Apoptosis Key in Alzheimer's Disease? *Science*, 1998, 281: 1303-1304
- Beranek JT. 1998. Induction of apoptosis by laser: a new therapeutic modality. *Lasers Surg. Med.*, 1998, 23(2):65-69
- Bingham GE, Levinskikh MA, Sychev VN, et al. 2000. Effects of Gravity on Plant Growth. *J. Gravit Physiol.*, 2000, 7(2):P5-8.
- Borisenko GG, Osipov AN, Kazarinov KD, Vladimirov YA. 1997. Photochemical reactions of nitrosyl hemoglobin during exposure to low-power laser irradiation. *Biochemistry-Moscow* 62 (6): 661-666 JUN 1997.

- Breugel HH, Bar RR. 1992. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 12(5):528-37.
- Campbell SS, Murphy PJ. 1998. Extraocular circadian phototransduction in humans. *Science*. 1998 Jan 16;279(5349):396-9.
- Cardoso SM, Santos S, Swerdlow RH, et al. 2001. Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity. *FASEB*, 2001, 15(8):1439-1441
- Cardoso SM, Swerdlow RH, Oliveira CR. 2000. Induction of cytochrome c-mediated apoptosis by amyloid beta 25-35 requires functional mitochondria. *Brain Res.*, 2002, 931(2): 117-125.
- Ciorrea L, Chirtoc M, Antoniow JS, et al. 2001. New Optoelectronic Device for Real Time Monitoring of Human Blood Sedimentation. *Instrumentation Science and Technology*, 2001, 29(4): 267-281
- Clark RA, McCoy CA, Folkvord JM, et al. TGF- β 1 Stimulates Cultured Fibroblasts to Proliferate and Produce Tissue-like Fibroplasia: A Fibronectin Matrix-Dependent Event. *J Cell Physiol*, 1997,170(1)69-80.
- Comitre ALD and Reis BF. 2003. Liquid-liquid extraction procedure exploiting multicommutation in flow system for the determination of molybdenum in plants. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 479: 185-190
- Cotman CW. 1998. Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 1998, 19: S29-32
- Cotman CW and Anderson AJ. 1995. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.*, 1995, 10: 19-45
- Duan R, Liu TCY, Li Y, et al. 2001. Signal transduction pathway involved in low intensity He-Ne laser-enhanced respiratory burst in bovine neutrophils: a potential mechanism of low intensity laser biostimulation. *Lasers Surg. Med.*, 2001, 29(2): 174-178
- Duan R, Zhu L, Liu TCY, et al. 2003. Light emitting diode irradiation protect against the amyloid beta 25-35 induced apoptosis of PC12 cell in vitro. *Lasers Surg.*

- Med., 2003, 33(3):199-203
- Eells JT, Henry MM, Summerfelt P, et al. 2003. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. of U S A*, 2003, 100(6):3439-3444
- Elilis DG, Cheng Q, Lee DA. et al. 1996. The Effects of Growth Factors On Tenon's Capsule Fibroblasts in Serum-free Culture. *Curr Eye Res.* 15(1): 27—35.
- Fedoseyeva GE, Karu TI, Letokhov V. S., et al. 1984. Effect of He-Ne laser Radiation on the Reproduction Rate and Protein Synthesis in the Yeast. *Laser Chemistry*, 1984 5:27-33
- Fedoseyeva GE, Karu TI, Lyapunova TS, et al. 1986. The Effect of Low-Intensity Red Light on the Activity of Yeast Enzymes. *Microbiologiya*, 1986, 55:944-948
- Firbank M, Hiraoka M, Essenpreis M, Delpy DT. 1993. Measurement of the optical-properties of the skull in the wavelength range 650-950 nm. *Phys Med Biol.* 38 (4): 503-510 APR 1993.
- Gazit E. 2002. A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J* 2002 Jan;16(1):77-83
- Gibson RM. 2001. Does apoptosis have a role in neurodegeneration? *BMJ.*, 2001, 322:1539-1540
- Glassberg E, Lask GP, Tan EML, Uitto J. 1988. Cellular Effects of the Pulsed Tunable Dye Laser at 577 Nanometers on Human Endothelial Cells, Fibroblasts, and Erythrocytes: An In Vitro Study. *Lasers Surg Med.* 8(6): 567-572.
- Glenner GG and Wong CW. 1984. "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 120: 885-890
- Gottrup F. 1981. Healing of incisional wounds in stomach and duodenum collagen distribution and relation to mechanical strength. *Am J Surg.* 141:222.
- Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. 2001. Formation of neurofibrillary tangles in P301 τ transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* 2001 Aug 24;293(5534):1491-5
- Gu Y, Liu F, Jiang Y, et al. 1999. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vivo

- induced by 510.6 nm laser irradiation. *Chin J. Lasers Surg. Med.*, 1999, 8(3): 141-144
- Gutknecht N, Kanehl S, Moritz A, Mittermayer C, Lampert F. 1998. Effects of Nd:YAG-Laser Irradiation on Monolayer Cell Cultures. *Lasers Surg Med.* 22(1):20-36.
- Hallman HO, Basford JR, O'Brien JF, Cummins LA. 1998. Dose low-energy helium-neon laser irradiation alter "in vitro" replication of human fibroblasts. *Lasers Surg Med* 8(2):125-9.
- Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992 Apr 10;256(5054):184-5
- Hofmann N, Hugo B, Klaiber B. 2002. "Effect of irradiation type (LED or QTH) on photoactivated composite shrinkage strain kinetics, temperature rise, and hardness." *European Journal of Oral Sciences*, 2002, 110: 471-479
- Holtzman DM. 2002. Abeta conformational change is central to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2002 Nov-Dec;23(6):1085-8
- Hosoda T, Nakajima H, Honjo H. 2001. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptotic cell death. *Neuroreport*, 2001, 12(9): 1965-1970
- Hrnjak M, Kuljic-Kapulica N, Budisin A, Giser A. 1995. Stimulatory effect of low-power\ density He-Ne laser radiation on human fibroblasts in vitro. *Vojnosanit Pregl.* 52(6):539-46.
- James AH, Shanavaz N, Jeffrey SK, et al. 2003. A handheld real time thermal cycler for bacterial pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 18: 1115-1123
- Jandta KD, Millsa RW, Blackwellb GB, et al. 2000. Depth of cure and compressive strength of dental composites cured with blue light emitting diodes (LEDs). *Dental Materials*, 2000, 16: 41-47
- Joyce KM, Downes CS, Hannigan BM. Radioadaptation in Indian muntjac fibroblast cells induced by low intensity laser irradiation *Mutat Res* 1999 Sep 13;435(1):35-42.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, et al. 1987. The precursor of Alzheimer's disease

- amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 1987, 325: 733-736
- Karu TI, Tiphlova OA, Letokhov VS, et al. 1983. "Stimulation of E. coli Growth by Laser and Incoherent Red Light." *Il Nuovo Cimento D.*, 1983, 2: 1138-1144
- Karu TI, Kalendo GS, Letokhov VS, et al. 1984. "Biostimulation of Hela Cells by Low Intensity Visible Light. II. Stimulation of DNA and RNA Synthesis in a Wide Spectral Range." *Il Nuovo Cimento D.*, 1984, 3: 309-318
- Karu TI, Lukpanova GG, Parkhomenko IM, et al. 1985. Changes in cAMP Level in Mammalian Cells after Irradiation with Monochromatic Visible Light. *Proc. USSR Acad. Sci.(Biophysics)*, 1985, 281:1242-1244
- Karu TI, Lukpanova GG, Parkhomenko IM, et al. 1987. Effect of Irradiation with Monochromatic Visible Light on cAMP Content in Chinese-hamster Fibroblasts. *Il Nuovo Cimento D.*, 1987, 9:1245-1251
- Karu T. 1989. Photobiology of Low-Power Laser Effects. *Health Physics*, 1989, 56: 691-704
- Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS and Esenaliev RO. 1996. Effects of Monochromatic Low-Intensity Light and Laser Irradiation on Adhesion of HeLa Cells In Vitro. *Laser Sur Med*, 18: 171~177
- Karu TI. The Science of Low-Power Laser Therapy. Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam, 1998
- Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. 2001a. Cell Attachment to Extra Cellular Matrices is Modulated by Pulsed Radiation at 820nm and Chemicals that Modify the Activity of Enzymes in the Plasm Membrane. *Lasers Surg. Med.*, 2001a, 29:274-281
- Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. 2001b. Cell Attachment Modulation by Radiation from a Pulsed Light($\lambda=820\text{nm}$) and Various Chemicals. *Lasers Surg. Med.*, 2001b, 28:227-236
- Kipshidze N, Keelan MM, Horn JB, et al. 1996. Photobiomodulation of vascular endothelial and smooth muscle cells in vitro with red laser light. *Proceedings-Bios Europe*, 1996, 2922

- Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, et al. 2001. Low-power helium-neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg. Med.*, 2001, 28(4): 355-64
- Kisilevsky R, Lemieux LJ, Fraser PE, Kong X, Hultin PG, Szarek WA. 1995. Arresting amyloidosis in vivo using small-molecule anionic sulphonates or sulphates: implications for Alzheimer's disease. *Nat Med.* 1995 Feb;1(2):143-8.
- Kiuchi Y, Isobe Y, Fukushima K. 2001. Entactin-induced inhibition of human amyloid beta-protein fibril formation in vitro. *Neurosci Lett* 2001 Jun 8;305(2):119-22
- Kiuchi Y, Isobe Y, Fukushima K. 2002. Type IV collagen prevents amyloid β -protein fibril formation. *Life Sciences* 70: 1555-1564.
- Klebanov GI, Poltanov EA. 2003a. Primary free-radical and secondary molecular-cellular mechanisms behind laser therapy. *LASER PHYS* 13 (1): 70-83 JAN 2003.
- Koch S, Wolf H, Danapel C, et al. 2000. Optical Flow-cell Multichannel Immunosensor for the Detection of Biological Warfare Agents. *Biosensors and Bioelectronics* 2000, 14(10-11): 779-784
- Kostov P, Ivanova T, Dandolov I, et al. 2002. Adaptive Environmental Control for Optimal Results during Plant Microgravity Experiments. *Acta Astronautica*, 2002, 51(1): 213-220
- Lam T, Abergel P, Mukar CA, Gastel JC, Dwyer RM and Uitto J. 1986. Laser stimulation of collagen synthesis in human skin fibroblast cultures. *Lasers Life Sci.* 1: 61-67.
- Lansbury PT Jr. 1997. Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol.* 1997 Aug;1(2):260-7.
- Lavi R, Shainberg A, Friedmann H, Shneyvays V, Rickover O, Eichler M, Kaplan D, Lubart R. 2003. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J Biol Chem.* 2003. 278(42):40917-22.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N,

- Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. 2001. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 2001 Aug 24;293(5534):1487-91
- Lindgard A, Lundberg J, Rakotonirainy O, Elander A, Soussi B. 2003. Preservation of rat skeletal muscle energy metabolism by illumination. *LIFE SCI* 72 (23): 2649-2658
- Liu TCY, Gao YQ, Liu SH. 1996. "Light-cell interaction: quasi-hormone model and time theory." *SPIE.*, 1996, 2887: 140~151
- Liu TCY and Liu SH. 1998. Low Intensity Laser Biostimulation. *Lasers Surg. Med.*, 1998, S10: 59
- Liu TCY and Zhao YP. 1999. Information Biology on Low Intensity Laser. *SPIE.*, 1999, 3863: 444~451
- Liu TCY, Duan R, Yin PJ, et al. 2000. Membrane mechanism of low intensity laser Biostimulation on a cell. *SPIE.*, 2000, 4224: 186-192
- Liu TCY, Duan R, Li Y, et al. 2001a. "Collective phototransduction: a potential mechanism of laser biomodulation." *Lasers Surg. Med.*, 2001a, S13: 10
- Liu TCY, Duan R, Li Y, et al. 2001b. Biomodulation of light on cells in laser surgery. *Lasers Surg. Med.*, 2001b, S13: 8
- Liu TCY, Duan R, Li Y, et al. 2001c. Biomodulation of Light on Cells in Transmyocardial Laser Revascularization. *Lasers Surg. Med.*, 2001c, S13: 13
- Liu TCY, Li Y, Cai XW et al. 2002a. Interaction of UV with Cells in Laser surgery. *Lasers Surg. Med.*, 2002a, S14: 38
- Liu TCY, Li Y, Duan R et al. 2002b. Biomodulation of light on cells in laser surgery. *SPIE.*, 2002b, 4536 3(26): 123-126
- Liu TCY, Jiao JL, Xu XY, et al. 2003a. On the mechanism of low intensity light induced apoptosis. *Lasers Surg. Med.*, 2003a, S15
- Liu TCY, Jiao JL, Liu SH. 2003b. Extended biological information model of laser biomodulation. *Lasers Surg. Med.*, 2003b, S15: 42
- Lorenzo A, Yankner BA. 1994. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Dec

6;91(25):12243-7

- Lovell MA, Robertson JD, Buchholz BA, Xie CS. (2002). Use of bomb pulse carbon-14 to age senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*.23: 179-186.
- Lorenz MR and Pilkuhn MP. 1966. *Appl. Phys.*, 1966, 37: 4049
- McGowan M, Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. 1996. The effect of low level laser irradiation on IL-2 release from CD4 T-cells. *Laser Surg. Med.*, 1996, S8: 6.
- Merlini G, Ascari E, Amboldi N, Bellotti V, Arbustini E, Perfetti V, Ferrari M, Zorzoli I, Marinone MG, Garini P, et al. 1995. Interaction of the anthracycline 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with amyloid fibrils: inhibition of amyloidogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 28;92(7):2959-63.
- Mi XQ(密现强), Chen JY(陈暨耀), Cen Y, Liang ZJ(梁子钧), Zhou LW. 2004. A comparative study of 632.8 and 532 nm laser irradiation on some rheological factors in human blood in vitro. *J Photoch Photobio B* 74 (1): 7-12 MAR 19 2004.
- Miyake Y and Horiguchi M. 1998. Electroretinographic alterations during vitrectomy in human eyes. *Graefe's Arch Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1998, 236(1):13-17
- Ohara M, Kawashima Y, Katoh O, et al. 2002. Blue Light Inhibits the Growth of B16 Melanoma Cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2002, 93(5):551-558
- Ono K, Hasegawa K, Yamada M, Naiki H. 2002. Nicotine breaks down preformed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biol Psychiatry* 2002 Nov 1;52(9):880-6
- Orpiszewski J, Schormann N, Kluve-Beckerman B, Liepnieks J and Benson M. (2000) Protein aging hypothesis of Alzheimer disease. *The FASEB J*.14: 1255-1263.
- Passarella S, Casamassima F, Molinari S, et al. 1984. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne laser. *FEBS lett.*, 1984, 175: 95-99
- Passarella S, Ostuni A, Atlante A, et al. 1988. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 156(2):978-86

- Peng Q, BuzZard AR, Lau BH. 2002. Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid-beta peptide-induced apoptosis in vitro. *Med. Sci. Monit.*, 2002, 8(8):BR328-37
- Pereira AN, Eduardo CP, and Matson E et al. 2002. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Cell Growth and Procollagen Synthesis of Cultured Fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine*. 31:263–267.
- Pereira C, Santos MS, Oliveira C. 1998. Mitochondrial function impairment induced by amyloid beta-peptide on PC12 cells. *Neuroreport*, 1998, 9: 1749–1755
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, et al. 1993. “Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state.” *J. Neurosci.*, 1993, 13: 1676-1687
- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, et al. 1991. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.*, 1991, 563(12):311-314
- Pittman RN, Wang SW, Dibeneditto AJ, et al. 1993. A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J. Neurosci.*, 1993, 13(9):3669-80
- Rensink AA, Verbeek MM, Otte-Holler I, ten Donkelaar HT, de Waal RM, Kremer B. 2002. Inhibition of amyloid-beta-induced cell death in human brain pericytes in vitro. *Brain Res* 2002 Oct 11;952(1):111-21
- Robert G, Gabor J, Adrienna KK, et al. 1994. Natural sleep modifies the rat electroretinogram. *Neurobiology*, 1994, 91(5): 5153-5157
- Robert G, Orsolya SS, Erzsebet S, et al. 2001. Sleep modifies retinal ganglion cell responses in the normal rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. of U S A*, 2001, 98(4): 2083- 2088
- Robinson SR, Bishop GM. 2002. Abeta as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2002 Nov-Dec;23(6):1051-72.
- Sazonv AM, Romanov GA, Portnoy LM. 1985. Low Intensity Non-coherent Red Light in the Comprehensive Treatment of Gastroduodenal Ulcers. *Soviet Medicine*,

- 1985, 12:42-46:
- Schindl A, Rosado-Schlosser B, Trautinger F. 2001. Reciprocity regulation in photobiology. *Hautarzt*. 2001 Sep;52(9):779-85.
- Schmidt MH, Bajic DM, Kenneth W, et al. 1996. light-emitting Diodes as a Light Source for Intraoperative Photodynamic Therapy. *Neurosurgery*, 1996, 38(3): 552-557
- Sean J and Jiji RD. 2002. A simple, low-cost, remote fiber-optic micro volume fluorescence flowcell for capillary flow-injection analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 374: 385–389
- Serpell LC. 2000. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta* 2000 Jul 26;1502(1):16-30
- Shaw S, Bencherif M, Marrero MB. 2002. “Janus kinase 2, an early target of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against Abeta-(1-42) amyloid.” *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(47):44920-44926
- Shields TD, O'Kane S, Leckey D, et al. 1992. The effect of laser irradiation upon human mononuclear leucocytes in vitro. *Laser Surg. Med.*, 1992, S4: 11
- Spiegel MR, Schiller J, Srinivasan RA. Outline of Theory and Problems of Probability and Statistics, Second Edition. Science Press, Beijing, 2002
- Stadler I, Evans R, Kolb B, Naim JO, Narayan V, Buehner N, Lanzafame RJ. 2000. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. *Lasers Surg Med*. 2000;27(3):255-61.
- Talaga P. 2001. Beta-amyloid aggregation inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: dream or reality? *Mini Rev Med Chem* 2001 Jul;1(2):175-86
- Tao Shiquan, Christopher BW, Hui Xian, et al. 2002. A highly sensitive hexachromium monitor using water core optical fiber with UV LED. *J. Environ. Monit.*, 2002, 4: 815–818
- Tiphlova OA and Karu TI. 1986. “Active of Argon Laser Irradiation and Incoherent Blue Light on Growth of E. coli.” *Radiobiologiya*, 1986, 26:829-832
- Trelles ME, Mayayo E, Miro L, et al. 1988. Are mast cells implicated in the interaction of low intensity-laser and tissue? *Lasers Surg. Med.*, 1988, 8: 174.

- Tunér J and Hode L. Low Level Laser Therapy. Prima Books in Sweden AB, Graengesberg, 1999
- van Breugel HH, Bär PR. 1992. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 12:5 528-37
- Vygovsky YN, Malov AN, Malov SN, Molotsilo VY, Bogdan IV. 2002. Nonlinear dynamics of blood photomodification upon intravenous laser irradiation. *LASER PHYS* 12 (10): 1309-1313 OCT 2002.
- Watts DC and Cash AJ. 1991. "Determination of polymerization shrinkage kinetics in visible-light-cured materials: methods development." *Dent. Mater*, 1991, 7: 281–287
- Webb C, Dyson M, Lewis WHP. 1998. "Stimulatory effect of 660nm low level energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: Possible mechanisms for increase in cell counts." *Lasers Surg. Med.*, 1998, 22(5): 294-301
- Whelan HT, Houle JM, Bajic DM, et al. 1998. "Benzoporphyrin Derivative and Light Emitting Diode for Use in Photodynamic Therapy: Applications of Space Light Emitting Diode Technology." *Space Technology and Applications International Forum* 1998, 420: 729-735
- Whelan HT, Houle JM, Donohoe DL, et al. 1999. Medical Applications of Space Light-Emitting Diode Technology Space Station and Beyond. *Space Technology and Applications International Forum* 1999
- Whelan HT, Smits RL, Buchman EV, et al. 2001a. Effect of NASA Light-emitting Diode Irradiation on Wound Healing. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery* 2001a, 19(6): 305-314
- Whelan HT, Buchmann EV, Whelan NT, et al. 2001b. NASA Light Emitting Diode Medical Applications from Deep Space to Deep Sea. *Space Technology and Applications International Forum* 2001b
- Wiltschko W and Wiltschko R. 2000. "Light-Dependent Magnetoreception in Birds: Does Directional Information Change with Light Intensity?" *Naturwissenschaften*, 2000, 87: 36–40

- Wong TW, Sheu HM, Lee JYY, et al. 2001. "Photodynamic Therapy for Bowen's Disease (Squamous Cell Carcinoma in Situ) of the Digit" *Dermatological Surgery*, 2001, 27(5): 452-4456
- Wright KP Jr, Czeisler CA. 2002. Absence of circadian phase resetting in response to bright light behind the knees. *Science*. 2002 Jul 26;297(5581):571.
- Xu Q, Liu B, Tan L, et al. 1999. Experimental study of early apoptotic phase of the mice thymocytes induced by He-Ne laser irradiation in vitro. *Chin Laser*, 1999, 26(7): 661-666
- Yang DS, Yip CM, Huang TH, Chakrabartty A, Fraser PE. 1999. Manipulating the amyloid-beta aggregation pathway with chemical chaperones. *J Biol Chem* 1999 Nov 12;274(46):32970-4
- Yankner BA. 1996. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Nature*, 1996, 382: 685-691
- Yova D, Haritou M, Koutsouris D. 1994. Antagonistic effects of epinephrine and helium-neon (He-Ne)laser irradiation on red blood cells deformability. *Clinical Hemorheology*, 1994, 14(3):369-378.
- Yu W, MacGowan M, Smith MS. et al. 1997. Enhanced bacteria killing efficacy of neutrophils following photo-irradiation. *Lasers Surg. Med.*, 1997, S9: 6
- Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. 1994. The effect of laser irradiation on the release of fibroblast growth factor from 3T3 fibroblasts in vitro. *Photochem. Photobiol.*, 1994, 59: 167-170
- Zheng H, Qin JZ , Xin SY. et al. 1991. "He-Ne laser irradiation effects on the membrane acceptor Fc, membrane acceptor C₃b and the intracellular cAMP concentration of the macrophages of rat abdominal cavity." *Chinese Physiotherapy Journal*, 1991, 14(1): 17-1.
- 方志烈, 半导体发光材料与器件, 复旦大学出版社, 上海, 1992, P. 80
- 何晓群, 刘文卿. 应用回归分析, 中国人民大学出版社, 北京, 2001, P. 56
- 翟中和主编. 2000.细胞生物学.第1版.北京:高等教育出版社.
- 胡红雨, 许根俊. 1999. 蛋白质的结构转换. *生物化学与生物物理进展*. 26(1):

9-12.

江剑平, 半导体激光器, 电子工业出版社, 北京, 2000, P. 335

角建瓴, 刘承宜, 段锐. 非视觉细胞光信号转导及其应用. 广州医药, 2003, 34(1): 1~3

金丽英, 石秉霞, 周畅. 2000. 半导体激光疗法对轻度认知障碍病人 β -类淀粉样蛋白的影响. 青岛大学医学院学报. 36(3): 175-176.

刘承宜, 刘颂豪. 低强度激光的生物光子学研究. 中国激光医学杂志. 1997, 6(3): 125~131.

刘江, 角建瓴, 刘承宜. LED 在生物医学方面的应用和前景. 激光杂志, 2002, 23(6): 1~4

刘锟, 王云杰, 范萌, 等. 1994. 食管胃吻合口的组织学病理学功能学及临床研究. 中华胸心血管外科杂志. 10(1):70

博士学位论文授权书

本授权书所授权的论文为本人在华南师范大学信息光电子科技学院（系）取得的博士学位论文。

论文题目：发光二极管生物光源及其医学应用研究

☒同意 ☐不同意

本人具有著作财产权的论文全文资料，授予中国科技信息研究所、中国社会科学院文献情报中心、国家图书馆、中国学术期刊电子杂志社论文合作部及本人毕业学校图书馆，可不限地域、时间与次数以微缩、光碟等各种方式重制后散布发行或上载网络。

本论文为本人向_____申请专利的附件之一，请将全文资料在本授权书签订两年后公开。（请注明文号：_____）

☐同意 ☐不同意

本人具有著作财产权的论文全文资料，授予教育部指定送缴的图书馆及本人毕业学校图书馆，为学术研究的目的以各种方式复制，或为上述目的再授权他人以各种方法复制，不限地域与时间，每人以一份为限。

上述授权内容均无须签证转让和授权契约书。依本授权的发行权为非专属性发行权利。依本授权所收录、重制、发行及学术研究利用均为无偿。上述同意与不同意栏若没有选，则视本人同意授权。

指导教师签名：

研究生本人签名：

刘江

学 号：

（务必填写）

授权日期： 年 月 日