

· 基础研究 ·

低功率半导体激光照射对体外培养嗅鞘细胞的影响

孟祥玉 郑新峰 魏琴 盛伟斌

【摘要】目的 研究低功率 810 nm 半导体激光对体外培养嗅黏膜嗅鞘细胞增殖的影响。**方法** 取成年 SD 大鼠嗅黏膜,采用差速贴壁法获得嗅鞘细胞,对细胞进行不同功率密度的半导体激光照射,波长为 810 nm,在 10.3 mW/cm² 功率密度下分别照射 30,60,120 s,每日 1 次,连续 3 d,各次间隔 24 h。最后一次照射后细胞培养。主细胞培养第 3,5,8 天时采用细胞计数法和四氮唑蓝 (MTT) 法分别检测照射后不同时间细胞增殖的变化。**结果** 最后一次照射后细胞培养第 3 天时,不同时间照射组和对照组细胞增殖无差异。细胞培养第 5 天和第 8 天时,不同时间照射组细胞数均高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);60 s 和 120 s 照射组 OD 值高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);但 30 s 照射组 OD 值与对照组差异无统计学意义。其中以 60 s 照射组细胞增殖最为明显。**结论** 低功率半导体激光对体外培养嗅黏膜嗅鞘细胞的增殖有促进作用,其作用与照射的时间剂量有关。最佳照射时间是每日 1 次,连续 3 d,各次间隔 24 h。

【关键词】 激光; 功率; 嗅鞘细胞; 增殖

Effects of low power laser irradiation on olfactory ensheathing cells in vitro MENG Xiang-yu*, ZHENG Xinfeng, WEI Qin, SHENG Wei-bin. *Department of Spine Surgery, Sixth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Corresponding author: SHENG Wei-bin, Email: wxymxy@sohu.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of 810 nm semi-conductor laser irradiation on the proliferation of olfactory ensheathing cells in vitro. **Methods** Olfactory ensheathing cells obtained from adult rat olfactory mucosa using the method based on different rates of attachment were irradiated with a semi-conductor laser (wave length 810 nm; power density 10.3 mW/cm²) for 30, 60 or 120 seconds. Laser irradiation was performed 3 times with a 24 h interval. After the last irradiation, the cells were cultured. At the 3rd, 5th and 8th day of cell culture, cell proliferation was assessed with cell counts and a methylthiazolotetrazolium (MTT) colorimetric method. **Results** After 3 days of cell culture, the number of cells and average MTT values showed no statistically significant difference between the irradiated and control groups. At the 5th and 8th day, the differences among all the laser exposure groups and with the control group were significant, except for the average MTT values of the control group and the 30 s exposure group. Maximal effect was achieved with a 60 s exposure. **Conclusions** Low power laser irradiation can stimulate the proliferation of olfactory ensheathing cells in vitro, and the effect is time-dose dependent. The optimal irradiation time was found to be 60 s daily for 3 times, with a 24 h interval.

【Key words】 Lasers; Power; Olfactory ensheathing cells; Proliferation

低功率激光照射 (low-power laser irradiation, LPLI) 的基本原理是在不产生明显热效应的条件下,利用激光照射具有的波长相关性的光效应改变细胞的生物活性^[1]。常用的低功率激光有 He-Ne 激光、GaAlAs 激光、GaAs 激光、Nd:YAG 激光、半导体激光等。国内外学者已从整体、细胞、分子等水平对低功率激光进行了大量的研究,发现低功率激光可以止痛、促

进伤口愈合以及周围和中枢神经再生,还可以改变基因的表达、蛋白的表达和影响细胞的增殖。不同细胞对不同波长^[2]、不同功率^[3]的激光反应不同。对不同细胞选择适合的照射条件尤其重要。

材料与方法

一、材料

清洁级 SD 大鼠 4 只,体重 250 ~ 300 g,雌雄不拘;DMEM/F12 (Dulbecco's modification of Eagle's medium/Ham's F-12 medium) 培养基 (美国 Sigma 公司);10% 胎牛血清,0.125% 胰蛋白酶,中性蛋白酶 II (美国 Gibco 公司);青/链双抗 (石药集团);四氮唑蓝

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.05.002

作者单位:830002 乌鲁木齐,新疆医科大学第六附属医院脊柱外科 (孟祥玉);第一附属医院骨科 (郑新峰、盛伟斌),实验动物科学部 (魏琴)

通信作者:盛伟斌, Email: wxymxy@sohu.com

(MTT)(北京中杉生物公司);二甲基亚砷(上海新高化学试剂有限公司);24孔、96孔无菌培养板(美国Costar);解剖显微镜(德国Zeiss公司);倒置相差显微镜(日本Olympus公司);超净台(苏净集团安泰公司);Avanti J-20 XP水平离心机(Beckman公司);二氧化碳培养箱(德国Heraeus);酶联检测仪(美国Bio-rad 550);半导体激光器 LY/JG650-D500-16(西安凌越机电科技有限公司);双通道光功率探测仪(西安凌越机电科技有限公司)。

二、方法

1. 嗅鞘细胞的分离与培养:将取下的SD大鼠嗅区鼻中隔(嗅黏膜和骨质)放入盛有2.4 U/ml中性蛋白酶II的玻璃瓶,在37℃水育箱中孵育45 min,DMEM/F12冲洗3遍后,放置于盛有DMEM/F12的培养皿内,解剖显微镜下剥离嗅黏膜固有层,用剪刀将其剪碎成约0.2 mm的小块,细管吹打至浑浊,吸出仍未消化的组织块后加0.125%胰酶4 ml,在37℃二氧化碳培养箱中消化15 min左右,然后用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液4 ml终止消化。4℃、800转/min离心10 min去除上清液后,加完全培养液(DMEM/F12+10%胎牛血清)12 ml种植于无多聚赖氨酸包被处理的培养皿,于37℃二氧化碳培养箱培养。按改良Nash差速贴壁法^[4],18 h后将培养液吸出过滤后种植于另一个无多聚赖氨酸包被处理的培养皿,继续培养36 h后,加入适量培养液与原培养液混匀,调整接种细胞数为 5×10^4 个/ml,重新种植于包被多聚赖氨酸的24孔细胞培养板内,激光照射备用。

2. 低功率半导体激光照射细胞:实验前激光器开机20 min使其输出功率稳定,光功率探测仪测定激光输出功率为 11.6 mW/cm^2 ,激光器透过培养板顶盖的透光率为89%,激光的最终功率密度为 10.3 mW/cm^2 ,激光自24孔培养板正上方10 cm处垂直照射细胞,调整光斑大小与培养孔相一致,根据照射时间将细胞分对照组和不同时间照射组(30, 60, 120 s),每日照射1次,连续3 d。

3. 细胞增殖检测:最后一次照射后第3, 5, 8天,分别将不同照射组细胞各取两培养孔,制成单细胞悬液。①台盼兰计数,将细胞悬液0.5 ml加入试管中,加入0.5 ml 0.4%台盼兰染液,染色2~3 min。将细胞悬液吸出少许,滴加在盖片边缘,使悬液充满盖片和计数板之间,镜下观察,计算计数板4大格细胞总数,按下式计算:细胞数/ml=4大格细胞总数/4×10 000,每孔计数3遍,取平均值。②MTT法,每孔计数后的细胞悬液接种至96孔板,每孔加入100 μl,设3个复孔,5% CO₂、37℃孵育24 h,倒置显微镜下观察,每孔

再加入20 μl MTT/PBS(10 mg/ml),继续培养4 h,终止培养,小心吸去孔内培养液,每孔加入100 μl二甲基亚砷,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪OD 490 nm处测量各孔的吸光值,重复3次,同时设置对照孔(培养基、MTT、二甲基亚砷)。

三、统计学分析

细胞数及吸光度值(OD)数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 13.0版统计软件进行方差检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、细胞计数法

最后一次照射后细胞培养第3天时,各组细胞数差异无统计学意义($P > 0.05$)。培养第5天时,各组细胞数差异有统计学意义($P < 0.05$)。对各组进行两两比较,对照组与各照射组均有差异,60 s照射组细胞数最多,30 s照射组与120 s照射组细胞数无差异,但均多于对照组。培养第8天时,各组细胞数差异有统计学意义($P < 0.05$)。对各组进行两两比较,对照组与各照射组均有差异,60 s照射组和120 s照射组细胞数最多,两组之间无差异,30 s照射组细胞数次之,但多于对照组。细胞计数法结果显示,培养第3天时各照射组对嗅鞘细胞增殖的影响与对照组相比无明显差别,培养第5天和第8天时各照射组均对嗅鞘细胞增殖有明显的促进作用,以60 s照射组促进作用最明显(图1)。各组细胞数量均随着细胞生长而增加(图2)。

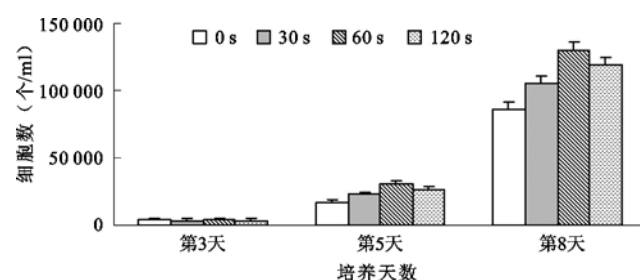


图1 低功率半导体激光对细胞增殖的影响(细胞计数法)

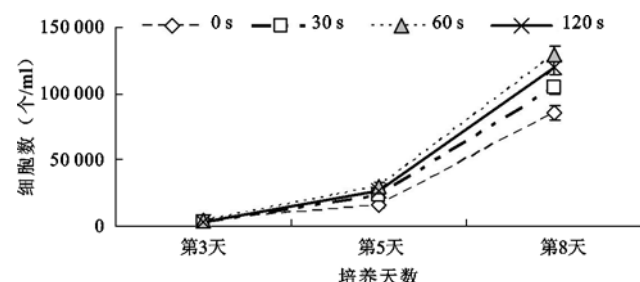


图2 低功率半导体激光对细胞增殖的影响(细胞计数法)

二、MTT 法

培养第 3 天时,各组 OD 值差异无统计学意义($P > 0.05$),说明照射组和对照组细胞增殖在第 3 天时无差异。培养第 5 天时,各组 OD 值差异有统计学意义($P < 0.05$)。对各组进行两两比较,对照组与 60 s 照射组和 120 s 照射组均有差异而与 30 s 照射组无差异,60 s 照射组细胞增殖最明显,30 s 照射组与 120 s 照射组细胞增殖无差异并且与对照组也无差异,但 120 s 照射组细胞增殖高于对照组。培养第 8 天时,各组 OD 值差异有统计学意义($P < 0.05$)。对各组进行两两比较,对照组与 60 s 照射组和 120 s 照射组均有差异而与 30 s 照射组无差异,60 s 照射组细胞增殖最明显,30 s 照射组与 120 s 照射组细胞增殖无差异并且和对照组也无差异,但 120 s 照射组细胞增殖高于对照组。MTT 法结果显示,在培养第 3 天时照射组对嗅鞘细胞增殖的影响与对照组相比无明显差别,在培养第 5、8 天时 30 s 照射组与对照组也无差别,60 s 照射组与 120 s 照射组均对细胞增殖有明显的促进作用,以 60 s 照射组促进作用最明显(图 3),各组细胞 OD 值均随细胞生长而增加(图 4)。

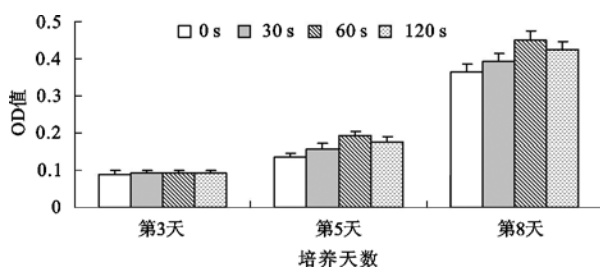


图 3 低功率半导体激光对细胞增殖的影响(MTT 法)

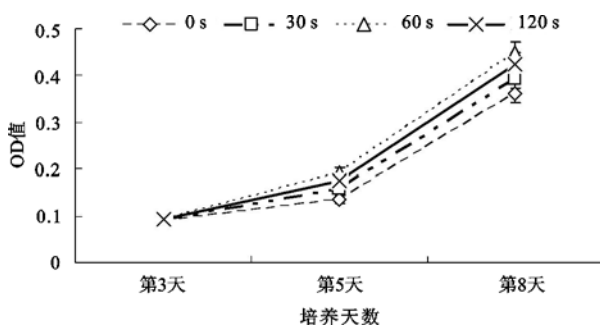


图 4 低功率半导体激光对细胞增殖的影响(MTT 法)

讨 论

自 1976 年首次报道生物光调节 (photobiomodulation, PBM) 以来,有关 LPLI 对神经系统及嗅鞘细胞的作用也陆续见诸于报道。研究表明,LPLI 能保留甚至促进受损神经元的活性、减少瘢痕的形成、阻止神经元的退行性改变^[4]。同时,LPLI 又能通过干扰一些因素而增强嗅鞘细胞的活性,这些因素包括增加神经生长

因子(neurotrophic growth factors, NGF)的数量、促进细胞外基质蛋白(extracellular matrix proteins, EMP)的表达等^[5]。Byrnes 等^[6]在实验中发现,经过 0.2 J/cm² 激光照射 7 d 后的嗅鞘细胞,细胞内 BDNF、NT3、连接素等均未见明显变化,而在照射 21 d 后却有明显的基因表达。同时,到第 21 天后,生长因子的表达(包括 BDNF、GDNF、VEGF、NT3 等)以及细胞外基质(连接素)均有明显的扩增。

本研究结果显示,低功率半导体激光照射后嗅鞘细胞增殖在培养第 3 天时与对照组无明显差异,而在培养第 5 天和第 8 天均有明显差异,这与认为激光对细胞作用是即刻的报道^[7-9]不一致,而与 Byrnes 等^[6]的报道一致。

我们采用细胞计数法和 MTT 法检测细胞增殖并进行对比,是因为细胞计数法的误差较大,约为 20%~30%,而 MTT 法虽然较为准确,但不能直接反映出细胞的数量。通过对不同照射时间细胞增殖结果比较表明,对细胞促进作用最明显的是 60 s 照射组,在照射后第 3 天的细胞数是对照组的约 2 倍,而第 6 天的细胞数是对照组的约 1.7 倍,而 MTT 法不能反映出这种变化。该结果表明,激光可促进细胞增殖,但作用有限,与 Pereira 等^[10]报道的增加细胞数量 3~6 倍,差距较大,可能与细胞的不同,激光的差异以及检测的时间有关。

LPLI 的生物学效应的具体机制目前还不明确。细胞和分子生物学研究发现,细胞线粒体氧化呼吸链中某些特异的发色团可以吸收一定波长的低功率激光,改变氧化还原酶中电子传递速度^[11-12]。照射的功率密度低时促进氧化还原反应,促进细胞的生长;功率密度高时则可产生大量的自由基,对细胞产生抑制和损伤作用。因此,LPLI 的生物学效应呈现双重性。另外,LPLI 首先要通过细胞膜,引起细胞膜上某些离子通道和跨膜蛋白(如整合蛋白等)的构型和功能发生改变,激活细胞内多种信息传递,最终可影响 DNA 的表达和复制。还有研究表明,激光可改变细胞对钙离子的穿透性^[13]和细胞的氧化-还原状态^[14]。

本研究表明,810 nm 的半导体激光能够改变嗅鞘细胞的活性,促进嗅鞘细胞的增殖。这种增殖作用与照射剂量有关,尤以 60 s 照射组作用最明显。本实验为进一步研究激光对嗅黏膜嗅鞘细胞基因表达,生长因子的表达及可能的机制奠定了一定的基础。

参 考 文 献

- [1] Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. IEEE J Quantum Electronics, 1987, 23: 1703.
- [2] Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, et al. Effect of wavelength on

- low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. Lasers Surg Med, 2005, 36:8-12.
- [3] Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, et al. 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, 28:355-64.
- [4] Kimberly RB, Xingjia W, Ronald W, et al. Low power laser irradiation alters gene expression of olfactory ensheathing cells in vitro. Lasers Surg Med, 2005, 37:161-171.
- [5] Kimberly RB, Ronald W, Waynant, et al. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. Lasers Surg Med, 2005, 36:171-185.
- [6] Byrnes KR, Wu X, Waynant RW, et al. Low power laser irradiation alters gene expression of olfactory ensheathing cells in vitro. Lasers Surg Med, 2005, 37:161-171.
- [7] Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, et al. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. Lasers Surg Med, 2002, 30:365-369.
- [8] Grossman N, Schneid N, Reuveni H, et al. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures; involvement of reactive oxygen species. Lasers Surg Med, 1998, 22: 212-218.
- [9] Webb C, Dyson M, Lewis WH. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts; possible mechanisms for increase in cell counts. Lasers Surg Med, 1998, 22:294-301.
- [10] Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, et al. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. Lasers Surg Med, 2002, 31:263-267.
- [11] Karu TI. Helium-Neon laser induced respiratory burst of phagocytic cell. Laser Surg Med, 1989, 9:585-588.
- [12] Karu TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. Laser Life Sci, 1988, 2:47-53.
- [13] Lubart R, Friedmann H, Levinshal T, et al. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. J Photochem Photobiol B, 1992, 15:337-341.
- [14] Lubart R, Breitbart H. Biostimulative effects of low energy lasers and their implications for medicine. Drug Dev Res, 2000, 50:471-475.

(修回日期:2009-11-06)

(本文编辑:松 明)

· 消息 ·

关于举办国家级继教项目 “骨关节伤病功能障碍康复治疗新技术学习班”的通知

为尽快普及、提高骨关节伤病功能障碍康复治疗技术,特邀请国内、外著名康复专家就目前最前沿的 Thera-Band 渐进式训练系统、SET(悬吊式训练)技术、运动控制理论、中国传统“太极运动”在骨关节伤病中的应用等康复治疗新技术进行授课,并在开展上述康复治疗新技术最早、最全的广州市康复中心进行现场演示。现将有关事项通知如下。

本次学习班主要授课内容包括:SET 技术在骨关节伤病中的应用、运动控制理论、Thera-Band 渐进式训练系统在骨关节伤病及下背痛中的应用、“太极运动”在骨关节伤病中的应用、类风湿关节炎的作业治疗进展、膝关节韧带损伤的生物力学及康复治疗、骨关节伤病康复中心心理因素的探讨等。学员对象为康复科、理疗科、神经外科、中医科及其他相关技术人员。

本学习班学费为 700 元/人,食宿统一安排,费用回单位报销;市内学员学费为 500 元/人(不包食宿)。学习结束经考核合格后授予国家级继续教育 I 类学分 10 分。

学习时间为 2010 年 8 月 13-16 日,13 日全天报到,16 日撤离;报到及学习地点:广州市康复中心(天河区龙口西路 375 号);联系电话:020-81332880;手机:13710777319(张秘书),传真:020-81332880;网址:www.gdrehab.com。

广东省康复医学会

2010 年 3 月

本刊办刊方向:

立足现实;;关注前沿;;贴近读者;;追求卓越