

· 基础研究 ·

光生物调节作用对软骨细胞基质分泌及超微结构变化的影响

杨小红 刘承宜 刘少杰 谭见容 梁佩红

【摘要】目的 了解低强度 He-Ne 激光(HNL)照射对软骨细胞基质的分泌及其超微结构的影响。**方法** 选取 3 周龄新西兰白兔分离培养软骨细胞,采用 HNL 照射第 4 代软骨细胞后,在营养缺乏的培养媒介中培养。收集激光照射后第 2,4,6,8,10 和 12 天的细胞培养液,用氯胺 T 消化法检测羟脯氨酸(Hrp)的含量;在 HNL 照射后第 9 天,用激光共聚焦显微镜观察吖啶橙染色后细胞内 DNA 及 RNA 含量的变化,在扫描电镜下观察软骨细胞的形态及细胞的分泌,在透射电镜下观察软骨细胞超微结构的改变。**结果** 在营养缺乏的培养状态中,HNL 对软骨细胞具有明显的光生物调节作用:(1) 双因素重复测定资料的方差分析结果显示,HNL 照射后软骨细胞合成胶原的能力在逐步增加,而对照组在培养至第 2 周开始 Hrp 含量明显下降;(2) 吖啶橙染色荧光定量分析结果显示,HNL 照射后第 9 天细胞的 DNA 含量较对照组增高;(3) HNL 照射后的细胞在培养至第 9 天,扫描电镜下观察细胞表面仍然有较多的分泌物和突起,而对照组的细胞已伸展和变平,缺乏分泌;(4) 透射电镜观察,HNL 照射后第 9 天的细胞质内有丰富的粗面内质网,而对照组较多的细胞呈现出衰老现象,死亡细胞较多。**结论** HNL 照射可能通过抑制营养缺乏引起内质网应激,促进 II 型胶原和蛋白多糖等细胞外基质的分泌,并进一步促进细胞增殖。

【关键词】 光生物调节作用; 软骨细胞; 内质网应激; II 型胶原; DNA

Effect of photobiomodulation on extracellular matrix secretion and the chondrocytes ultrastructure YANG Xiao-hong*, LIU Cheng-yi, LIU Shao-jie, TAN Jian-rong, LIANG Pei-hong. * Guangzhou Institute of Traumatology, The 4th Affiliated Hospital of Medical College of Jinan University, Guangzhou 510220, China

【Abstract】Objective To study the effects of low intensity He-Ne laser irradiation (HNL) on the secretion of extracellular matrix and ultrastructure of the chondrocytes. **Methods** The chondrocytes isolated from the cartilage sample of 3-week old New Zealand white rabbits were cultured with newborn calf serum (NCS), irradiated with HNL at 5.74 mW/cm² for 30 min daily for 6 days, and then incubated till the 13th day in nutrition-deficit medium. The type II collagen synthesis was assessed by a hydroxyproline (Hpr) content measurement on the 2nd, 4th, 6th, 8th, 10th and 12th days after the first HNL irradiation, respectively. On the 9th day after the first HNL irradiation, the DNA synthesis was observed by acridine orange staining and con-focal laser scanning microscope, and the cellular morphology and ultrastructure were observed by a scan electron microscope and a transmission electron microscope, respectively. **Results** The type II collagen synthesis increased steadily in HNL group. On the 9th day after the first HNL irradiation, the DNA synthesis and the matrix secretion such as type II collagen and aggrecan were more in HNL group than those in the control group, and the structure of endoplasmic reticulum was clearer in HNL group than in control group. **Conclusion** HNL might inhibit nutrition-deficit induced endoplasmic reticulum stress of rabbit chondrocytes, promote the secretion of matrix such as type II collagen and aggrecan, and then promote their proliferation at the observed irradiation dose.

【Key words】 Photobiomodulation; Chondrocytes; Endoplasmic reticulum stress, type II Collagen; DNA

关节损伤的修复有限,其结果常常导致关节功能紊乱。而目前尚无完善的方法使受损的关节软骨修复正常。低强度激光的光生物调节治疗(photobiomodulation, PBM)是一种无创、安全的细胞功能康复方法,

对其促进软骨损伤愈合的研究一直是热门的课题^[1-7]。大多数研究表明,PBM 有一定的疗效^[1-4],但也有研究发现 PBM 无效^[5-7]。为弄清相应的作用机制,人们用软骨细胞开展了细胞模型研究^[8-10]。我们的前期研究证明,PBM 确实可以促进软骨细胞增殖^[3]。在确定低强度 He-Ne 激光(He-Ne laser irradiation, HNL)对软骨细胞增殖的量效关系的基础上,本研究将进一步对胶原合成的动态关系、核酸的合成、细胞超微结构变化及

基金项目:国家自然科学基金资助项目(60478048)、广东省卫生厅资助项目(A2003653)

作者单位:510220 广州,暨南大学医学院第四附属医院,广州市创伤外科研究所(杨小红、刘少杰、谭见容、梁佩红);华南师范大学激光运动医学实验室(刘承宜)

PBM 应用的安全性进行评估。

材料与方法

一、实验材料

达乐伯克改良必需培养基-F12 (Dulbecco's modified Eagles's medium-F12, DMEM-F12) 培养液 (1:1) (Gibco), 新生牛血清 (newborn calf serum, NCS) (Hyclone), 羟脯氨酸试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 链酶亲和素-生物素-酶复合物 (strept avidin-biotin complex, SABC) 试剂盒 (博士德), II 型胶原第一抗体 (Ab-1) (Oncogene), II 型胶原酶、透明质酸酶、胰蛋白酶、四氮唑复合物 (2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydricide, XTT)、硫酸酚嗪甲酯 (phenazine methosulfate, PMS)、吖啶橙 (acridine orange)、甲苯胺蓝等均购自 Sigma 公司。

二、方法

1. 软骨细胞的分离与培养: 采用本所已建立的方法^[3]。

2. 激光照射: HNL (500-C 型氩氟激光治疗仪, 广州产) 波长为 632.8 nm, 经光纤传输至 CO₂ 培养箱原位照射, 每次照射用 TQ8210 型光功率计检测。

3. 胶原合成分析: 将软骨细胞接种于 24 孔板中, 每孔 1 ml, 浓度为 4×10^3 个/ml, 每个时间点重复 4 孔, 第 2 天待细胞贴壁后进行激光照射。HNL 光纤末端输出功率调节为 6.5 mW, 光斑直径为 1.2 cm, 功率密度为 5.74 mW/cm², 照射时间为 30 min, 每天照射 1 次, 共 6 d。然后继续在 37℃、CO₂ 培养箱中培养 6 d, 隔天更换 DMEM-F12 培养液^[3]。对照组不行激光照射, 其余条件与实验组相同。于 2.5% NCS、DMEM-F12 培养液中培养, 隔天收集细胞的培养液 (第 1 次照射后第 2, 4, 6, 8, 10, 12 天), 用氯胺 T 消化法测定羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hrp) 的含量, 并按照试剂盒说明书步骤进行操作。反应产物于分光光度计波长 550 nm 处比色, 根据其呈色的深浅计算出 Hrp 含量, 以反映软骨细胞合成胶原的情况。

4. 吖啶橙染色标记软骨细胞 DNA 及 RNA^[11]: 把涂有多聚赖氨酸的盖玻片放入 6 孔细胞培养板的培养孔中, 小心加入细胞液 0.6 ml (细胞浓度调节与 24 孔板接种比例一致) 于 24 mm × 24 mm 盖玻片中作细胞爬片, 然后在 37℃、CO₂ 培养箱中静置培养 24 h; 第 2 天待细胞贴壁后, 补足 5% NCS、DMEM-F12 培养液, 并进行激光照射; HNL 组 ($n=4$), 方法为功率 6.5 mW, 每天照射 30 min, 共 6 d, 然后继续培养至第 9 天进行观察; 对照组 ($n=4$) 不行激光照射, 其余条件与实验组相同。测定时加入 0.01% 吖

啶橙 2~3 滴, 染色 5 min 后, 用 PBS 缓冲液洗净染料, 在激光共聚焦显微镜 (Zeiss LSM510 Meta) 下观察软骨细胞形态标记情况, 控制图像采集的参数 (激光发射功率、针孔大小、光切厚度、增益等因素) 为同一条件, 每张细胞爬片随机选择 3 个视野作图像采集, 荧光定量分析 2 种核酸的含量变化。激发波长为 DNA 488 nm, RNA 453 nm; 发射波长为 DNA 520 nm, RNA 615 nm。

5. 免疫组织化学染色: 分离培养的软骨细胞均采用 II 型胶原免疫组织化学染色以确定其表型。细胞爬片样品制备方法同上, 收集样品并用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 于双蒸水中洗涤 3 次, 备用; 免疫组织化学染色用 SABC 法, 并按照试剂盒说明书进行操作, 一抗 Type II Collagen (Ab-1) 稀释度为 1:200, 以 DAB 显色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶固封。

6. 甲苯胺蓝染色: 分离培养的软骨细胞均作此染色, 以了解蛋白多糖的分泌。细胞爬片样品制备、收集及固定方法同上; 于甲苯胺蓝液中染色 20 min, 快速脱水, 二甲苯透明, 中性树胶固封。

7. 超微结构观察: 采用扫描电镜和透射电镜观察细胞的超微结构变化。用上述同样方法制作细胞爬片, 于 5% NCS、DMEM-F12 中培养。(1) 扫描电镜观察。①功率 6.5 mW, 每天照射 30 min, 共 4 d; ②功率 6.5 mW, 每天照射 30 min, 共 6 d。继续培养至第 9 天观察。收集盖玻片, 用冷 PBS 洗涤, 戊二醛固定, 丙酮脱水, 二氧化碳干燥, 喷金, 扫描电镜观察。(2) 透射电镜观察。将软骨细胞接种于 6 孔板中, 每孔 5 ml, 浓度为 4×10^3 个/ml, 照射用 HNL 光纤末端输出功率调节为 17 mW, 光斑直径为 35 mm, 照射时间为 45 min, 培养至第 9 天进行观察。

三、统计学分析

Hrp 的含量采用双因素重复测定资料的方差分析及趋势分析, SAS 统计学软件处理。DNA 及 RNA 荧光定量分析光密度值组间差异采用单因素方差分析, SPSS for windows 11.0 统计学软件处理。

结 果

一、羟脯氨酸含量动态测定

双因素 (处理因素及时间因素) 重复测定资料的方差分析结果显示, 不同时间的 Hrp 含量的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 处理方法及时间之间有明显的交互作用 ($P<0.01$), HNL 组与对照组的 Hrp 含量趋势分析最高阶 (第 5 阶, $P<0.01$), 具有统计学意义, 表明两组细胞 Hrp 含量曲线趋势不同, HNL 照射后软骨细胞合成胶原的能力在逐步增加, 而对照组在培养至第 2 周开始 Hrp 含量明显下降 (图 1)。

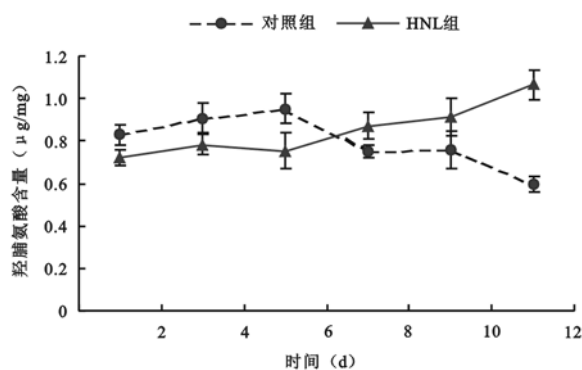


图1 羟脯氨酸含量动态测定

二、细胞形态学观察

1. 软骨细胞表型鉴定: 分离培养的软骨细胞Ⅱ型胶原免疫组化染色均为阳性, 具有正常软骨细胞的表型(图2)。甲苯胺蓝染色为蓝色, 显示蛋白多糖分泌旺盛(图3)。

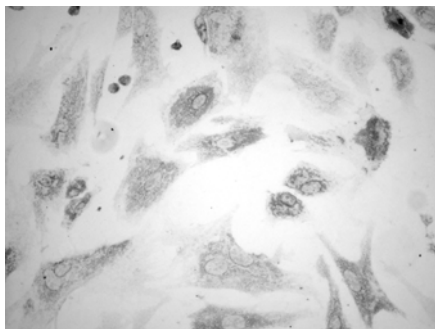


图2 HNL照射后第9天软骨细胞Ⅱ型胶原染色, 细胞浆阳性(免疫组织化学染色, ×400)

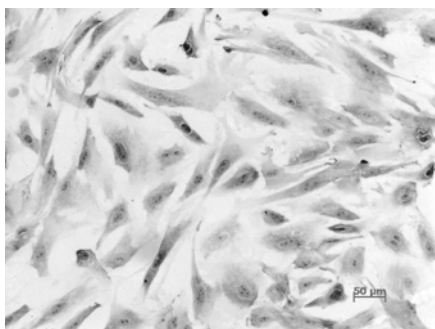
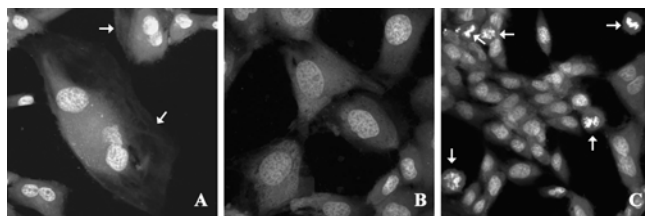


图3 HNL照射后第9天软骨细胞基质染色(甲苯胺蓝染色, ×400)

2. 激光共聚焦显微镜观察: 实验组软骨细胞结构清晰, 形态多为三角形; DNA 标记呈黄绿色荧光, RNA 标记呈红色荧光。HNL 组软骨细胞表面有较多绿色胶原纤维(图4A), 并可见较多的染色体分裂相(图4C)。荧光定量分析结果显示 HNL 组细胞 2 种核酸含量均较对照组增高, 其中 DNA 结果有统计学意义($P < 0.01$), 见表1、图5; RNA 结果无统计学意义。

3. 扫描电镜观察: 2 组细胞均具有典型的软骨细

胞特征, HNL 照射后的细胞未见畸形等异常形态。照射 4 d 的 2 组细胞表面均有较多分泌物和突起, 2 组细胞无明显区别; 培养至第 9 天, HNL 组细胞表面仍然有较多的分泌, 而且仍能找到具分裂相的软骨细胞(图 6B, 6C); 而对照组的细胞已伸展和变平, 缺乏分泌(图 6A)。



注: A. NHL 照射后软骨细胞表面分泌的绿色雾状或丝状胶原纤维(箭头所示); B. 对照组软骨细胞; C. NHL 照射组有较多的中期染色体分裂相(箭头所示)

图4 HNL照射后第9天吖啶橙染色标记细胞、DNA 及 RNA(激光共聚焦显微镜, ×400)

表1 HNL照射后第9天 DNA 与 RNA 含量的荧光定量分析比较($\bar{x} \pm s$)

组别	DNA(OD 值)	RNA(OD 值)
HNL 组	1816.97 ± 81.00 ^a	1061.35 ± 139.00
对照组	1087.02 ± 144.00	858.47 ± 128.00

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$

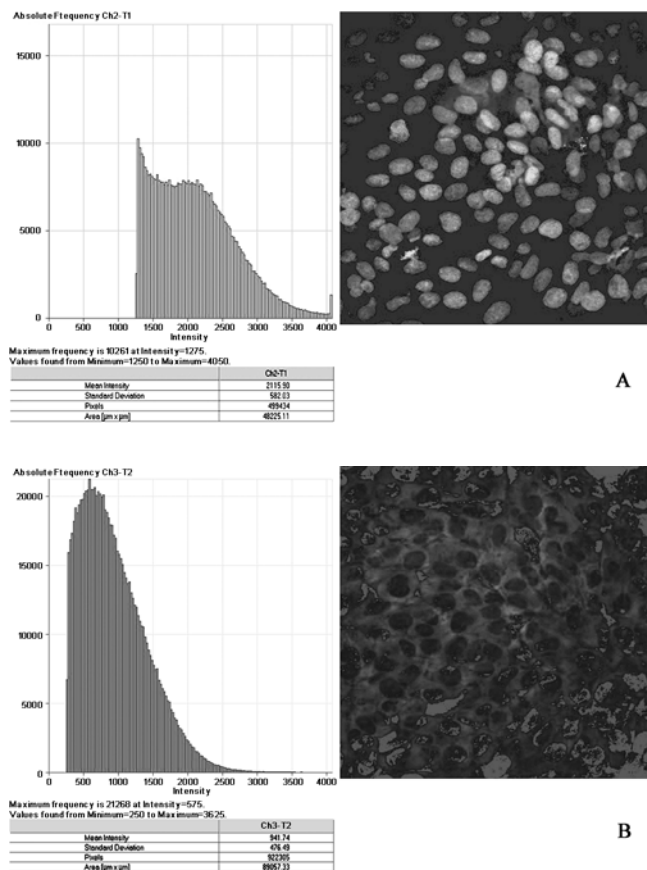
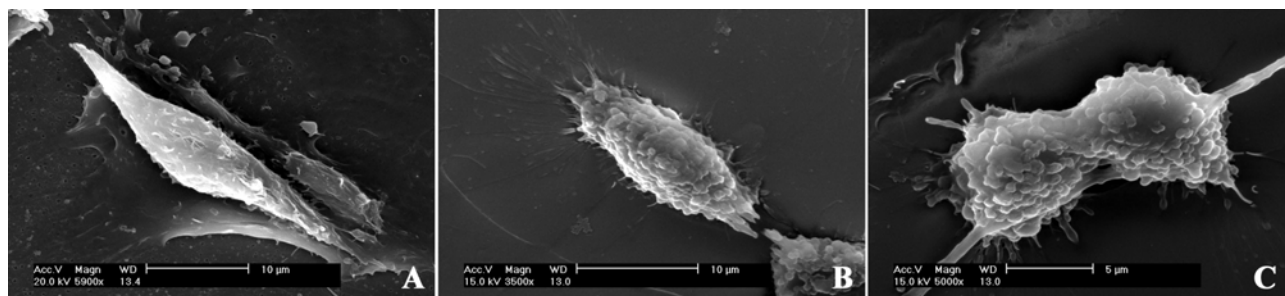


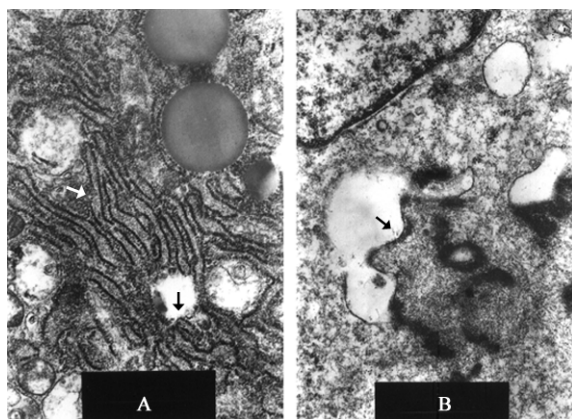
图5 HNL照射后第9天荧光定量分析 DNA(A)与 RNA(B)模式图



注:A 为对照组,B 为 NHL 组,C 为具分裂相的 NHL 组

图 6 HNL 照射后培养至第 9 天的软骨细胞扫描电镜

4. 透射电镜观察:HNL 组的细胞内各种细胞器的结构清晰,有较多的双核现象,胞质内有丰富的粗面内质网(图 7A);而对照组的较多的细胞呈现出衰老现象,死亡细胞较多(图 7B)。



注:A 为 NHL 组,粗面内质网池轻度扩张;B 为对照组,细胞核溶解
图 7 HNL 照射后培养至第 9 天的软骨细胞透射电镜观察,标尺为 500 nm

讨 论

Tunér 等^[12]指出,只有对那些生物功能需要调整的生物组织,低强度激光才能产生影响。Karu^[13]根据大量的实验结果从氧化还原电位的角度指出,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,细胞对低强度激光就没有响应;细胞的氧化还原电位比这个正常值越低,细胞对低强度激光的响应就越大。软骨细胞在营养缺乏环境中的氧化还原电位比在理想营养媒介中的低,对低强度激光的响应较大。本课题的前期研究首次系统地研究了低强度 HNL 对软骨细胞的 PBM,发现 HNL 能促进营养缺乏状态下软骨细胞的增殖^[3]。在此基础上,本研究通过了解 HNL 对软骨细胞的代谢、基质合成、核酸合成和超微结构变化的作用,进一步研究了软骨细胞 PBM 的特性。

荧光素吖啶橙是一种良好的细胞化学染料,其主要优点是既能观察到细胞的清晰结构,又能同时反映出细胞内 DNA(绿色)和 RNA(红色)两种核酸成分的

变化,特异性强;核酸的含量越多,荧光的颜色越鲜亮^[11]。为了进一步探讨 HNL 促进软骨细胞增殖的机制,本实验用吖啶橙染色标记分别研究了 HNL 照射后第 9 天的 DNA 和 RNA 合成。实验发现,HNL 组的软骨细胞表面有较多绿色雾状或丝状胶原纤维分泌,并可见较多的染色体分裂相。荧光定量分析结果显示,HNL 照射后可使软骨细胞的 DNA 合成显著增多,而 RNA 含量在本研究中虽无统计学意义,但从结果中也能观察到 HNL 照射后荧光光密度值较对照组有明显提高。这说明,HNL 照射后第 9 天,DNA 合成已经显著增多,但 RNA 的合成还没有达到有显著差异的程度。

需要指出的是,软骨细胞在常规培养条件下(10% NCS),细胞的分裂相在接种后第 3 天达到高峰,此后会逐渐下降,到第 8 天几乎没有细胞的分裂^[14]。本研究在营养缺乏条件(5% NCS)下培养软骨细胞,HNL 照射后第 9 天,扫描电镜下仍然可以较容易找到具分裂相的细胞,而对照组的细胞此时多呈伸展或平铺状态,细胞表面缺乏分泌物,很难找到分裂的细胞。在透射电镜中观察到培养 9 天的 HNL 组细胞有较多的双核,而对照组较多的细胞呈现出衰老现象,并有部分死亡细胞。

Nishida 等^[15]发现,CTGF/Hcs24 通过促进蛋白多糖和 II 型胶原的分泌而促进软骨细胞增殖。本实验也从多方面研究了 HNL 促进增殖的机制。与对照组相比,HNL 照射后第 9 天细胞表面有大量的细胞外基质,正在分裂的细胞表面也有大量的细胞外基质。II 型胶原免疫组化和甲苯胺蓝染色分别表明,HNL 照射后第 9 天,软骨细胞的 II 型胶原和蛋白多糖的分泌都十分旺盛,已经具有成熟细胞的显著特征。本实验进一步的研究发现,随着照射次数增多及培养时间的延长,软骨细胞合成胶原的能力呈现有规律的上升趋势,表明合成胶原的能力在不断增加。

胶原对细胞分裂有协同作用。研究证实,在胶原培养基上生长的多种细胞在其刺激下增殖和生长加速^[16]。李莉等^[17]证实,HNL 照射能够提高受损跟腱

中胶原蛋白的含量,促进跟腱的愈合。II 型胶原对软骨细胞增殖是必需的^[18,19]。本研究表明,HNL 照射后合成胶原的能力在不断增加。值得指出的是,前期实验表明^[3],HNL 的增殖效应要到 13 d 才可以检测到,而胶原分泌在 HNL 照射后就有上升的趋势。可以认为,HNL 照射后使 II 型胶原和蛋白多糖分泌增多,并刺激细胞分裂、生长加速,可能是细胞增殖的一个主要原因。

内质网是蛋白质分泌、合成和折叠的场所^[20]。在分泌蛋白质旺盛的细胞中,粗面内质网特别发达,一般来说,可根据粗面内质网的发达程度来判断细胞的功能状态和分化程度^[21]。在透射电镜中观察到,HNL 照射后第 9 天的软骨细胞有较多的双核,胞质内有丰富的粗面内质网并紧密排列成阵,内质网池轻度扩张,而对照组较多的细胞呈现出衰老现象,并有部分死亡细胞,提示适当的 HNL 照射使软骨细胞更具旺盛的蛋白质合成与分泌能力,并能维持软骨细胞具有丰富的粗面内质网的超微结构特性,延缓细胞的衰老。对照组的情况表明,营养缺乏条件下培养的软骨细胞的内质网存在应激^[20],有可能导致细胞凋亡,相关研究有待进一步的实验证实。这些电镜观察结果进一步支持前述 II 型胶原和蛋白多糖的分泌与核酸的合成的准确性。可以认为,HNL 照射可能通过抑制营养缺乏引起的内质网应激,维持细胞分泌 II 型胶原和蛋白多糖等细胞外基质,促进细胞增殖。

只要光强度足够低(一般 $< 20 \text{ mW/cm}^2$),低强度的单色光或激光就不会引起内源性光动力损伤,PBM 对胚胎发育没有不良影响,是一种安全的治疗方法^[22]。Logan 等^[23]专门研究了低强度红色激光(660 nm , 12 mW , 5 kHz , 2 和 20 J/cm^2)对几种哺乳动物细胞的毒性作用,没有发现细胞毒性和基因毒性。Applegate 等^[24]发现,红外 A($700 \sim 2\,000 \text{ nm}$)照射皮肤不会引起 DNA 损伤、产生氧化应激蛋白和皮肤癌变或光老化所涉及的蛋白酶。由于 HNL 照射的剂量很小,增殖细胞变异的可能性极小,在倒置显微镜及扫描电镜下均未见显著的形态学改变。免疫组化结果显示,HNL 照射的软骨细胞同样具有 II 型胶原的表型,并富含蛋白多糖。

本实验通过系统研究初步表明,HNL 照射可能通过抑制营养缺乏引起的内质网应激,维持细胞分泌 II 型胶原和蛋白多糖等细胞外基质,促进细胞增殖。本实验研究结果为低强度激光修复关节软骨缺损的临床研究提供了可靠依据。

致谢:衷心感谢本院计算机中心陈玲统计师在统计学方面给予的帮助!

参 考 文 献

- [1] Akai M, Usuba M, Maeshima T, et al. Laser's effect on bone and cartilage change induced by joint immobilization: an experiment with animal model. *Lasers Surg Med*, 1997, 21:480-484.
- [2] Morrone G, Guzzardella GA, Torricelli P, et al. Osteochondral lesion repair of the knee in the rabbit after low-power diode Ga-Al-As laser biostimulation: an experimental study. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2000, 28:321-336.
- [3] 杨小红,叶惠贞,李斯明,等. 低强度 He-Ne 激光对软骨细胞增殖的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:68-71.
- [4] Spivak JM, Grande DA, Ben-Yishay A, et al. The effect of low-level Nd:YAG laser energy on adult articular cartilage in vitro. *Arthroscopy*, 1992, 8:36-43.
- [5] Bayat M, Ansari A, Hekmat H. Effect of low-power helium-neon laser irradiation on 13-week immobilized articular cartilage of rabbits. *Indian J Exp Biol*, 2004, 42:866-870.
- [6] Guzzardella GA, Tigani D, Torricelli P, et al. Low-power diode laser stimulation of surgical osteochondral defects: results after 24 weeks. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2001, 29:235-244.
- [7] Hardie EM, Carlson CS, Richardson DC. Effect of Nd:YAG laser energy on articular cartilage healing in the dog. *Lasers Surg Med*, 1989, 9:595-601.
- [8] Morrone G, Guzzardella GA, Torricelli P, et al. In vitro experimental research of rabbit chondrocytes biostimulation with diode laser Ga-Al-As: a preliminary study. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1998, 26:437-439.
- [9] Morrone G, Guzzardella GA, Tigani D, et al. Biostimulation of human chondrocytes with Ga-Al-As diode laser: "in vitro" research. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2000, 28:193-201.
- [10] Torricelli P, Giavaresi G, Fini M, et al. Laser biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. *Biomed Pharmacother*, 2001, 55:117-120.
- [11] 许屏. 荧光和免疫荧光染色技术. 第二版. 北京:人民卫生出版社, 2000: 25-29.
- [12] Tunér J, Hode L. Low Level Laser Therapy. Graengesberg: Prima Books in Sweden AB, 1999:6-122.
- [13] Karu T. The Science of low-power laser therapy. Amsterdam: Grodon and Breach Science Publishers, 1998: 1-213.
- [14] 韩一生,胡蕴玉,金格勒,等. 重组 PcDNA3-hBMP3 转染兔关节软骨细胞和对其增殖的影响. *中华骨科杂志*, 2000, 20:366-371.
- [15] Nishida T, Kubota S, Nakanishi T, et al. CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, stimulates proliferation and differentiation, but not hypertrophy of cultured articular chondrocytes. *J Cell Physiol*, 2002, 192:55-63.
- [16] 李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法. 北京:人民卫生出版社, 1988:124-133.
- [17] 李莉,孙俊英,徐岚. 氦-氖激光照射对兔跟腱羟脯氨酸含量的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28:295-297.
- [18] Scully SP, Lee JW, Ghert PMA, et al. The role of the extracellular matrix in articular chondrocyte regulation. *Clin Orthop Relat Res*, 2001, (391 Suppl):72-89.
- [19] Terpstra L, Prud'homme J, Arabian A, et al. Reduced chondrocyte proliferation and chondrodysplasia in mice lacking the integrin-linked

- kinase in chondrocytes. *J Cell Biol*, 2003, 162:139-148.
- [20] Yang L, Carlson SG, McBurney D, et al. Multiple signals induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis. *J Biol Chem*, 2005, 280:31156-31165.
- [21] 王春梅, 黄晓峰, 杨家骥. 细胞超微结构与超微结构病理基础. 西安:第四军医大学出版社, 2004: 39-49.
- [22] Wong BC, Boyd CA, Lanzendorf SE. Randomized controlled study of human zona pellucida dissection using the zona infrared laser optical system: evaluation of blastomere damage, embryo development, and subsequent hatching. *Fertil Steril*, 2003, 80: 1249-1254.
- [23] Logan ID, McKenna PG, Barnett YA. An investigation of the cytotoxic and mutagenic potential of lowintensity laser irradiation in Friend erythroleukemia cells. *Mutat Res*, 1995, 347: 67-71.
- [24] Applegate LA, Scaletta C, Panizzon R, et al. Induction of the putative protective protein ferritin by infrared radiation: implications in skin repair. *Int J Mol Med*, 2000, 5: 247-251.
- (修回日期:2007-04-21)
(本文编辑:松 明)

· 研究简报 ·

氩-氦激光穴位照射对阿尔茨海默病模型大鼠皮质和海马 Bcl-2 表达的影响

李宛青 刘华 任秀花

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种临床常见的中枢神经系统变性疾病,最早表现为海马病变所致的记忆缺损,接着是大脑皮质病变,最终导致记忆减退及语言、空间等认知功能降低^[1]。流行病学研究表明,随着人口的老齡化,AD 的发病率呈上升趋势^[2]。目前对 AD 的病因尚未明了,治疗上亦缺少疗效理想的药物,因此深入探讨 AD 的发病机制,研究有效的防治措施是医学界急需解决的一项重大课题。有学者将氩-氦激光照射用于老年脑血管病和 AD 的治疗,并取得了较好的疗效^[3]。但氩-氦激光对 AD 大鼠治疗效果的实验研究鲜有报道。本研究首次应用氩-氦激光对 AD 大鼠“百会”、“大椎”两穴进行穴位照射,观察其对皮质和海马 Bcl-2 表达的影响,以期为临床治疗 AD 提供实验依据。

材料与方法

一、药品与试剂

瑞士 Alexis 公司产鹅膏蕈氨酸(Ibotenic acid, IBO), 分析纯;美国 Sigma 公司产 Bcl-2 抗体(1:200)、生物素化羊抗兔 IgG (1:500)和链霉卵白素-过氧化物酶(streptavidin-horseradish peroxidase, SP)复合物(1:500)。

二、实验动物及分组

取健康 Sprague-Dawley 大鼠 40 只,体重 200 ~ 230 g,雌雄不拘,由河南省实验动物中心提供,合格证号为 410116。动物于清洁动物室饲养,室温为(22 ± 2)℃,湿度为 40% ~ 50%,自由摄食、饮水,每日光照 12 h。将动物随机分为假手术组、AD 模型组(模型组)、氩-氦激光非穴位照射组(激光治疗组)和氩-氦激光穴位照射组(激光穴位治疗组),每组 10 只。实验动物饲养 1 周后造模,除去造模时死亡的动物,剩余假手术组 10 只、模型组 8 只、激光治疗组 9 只以及激光穴位治疗组 8 只。

基金项目:河南省科技攻关项目(0524410024)

作者单位:450044 郑州,郑州师范高等专科学校生命科学系(李宛青);郑州大学医学院细胞生物学与医学遗传学教研室(刘华),人体解剖学教研室(任秀花)

三、AD 动物模型的建立

采用国内、外广泛采用的非遗传性 AD 动物模型制作方法建立动物模型^[4]。用 100 g/L 的水合氯醛(300 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉大鼠后,将其固定于立体定位仪上,剪掉手术区毛发,局部消毒,于头顶正中作一 1.5 cm 长的矢状切口,钝性分离骨膜,参照大鼠脑立体定位图谱^[5],于双侧内特基底核(nucleus basalis of Meynert)处进行立体定位(坐标前后径 1.4 mm,左右径 2.4 mm,垂直径 7.4 mm),然后于双侧颅骨各对应点分别钻 1 个直径为 1 mm 的孔,用玻璃微量进样器垂直注射。注射液为溶于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.4)的 IBO 1 μl(5 μg)。每针注射时间 5 min,留针 5 min,以保证溶液充分弥散,然后缓缓抽针,缝合手术切口,动物清醒后放回笼中常规饲养。假手术组手术方法相同,但仅注射等量生理盐水。

四、氩-氦激光照射方法

于手术后第 2 天,采用桂林产氩-氦激光多功能治疗仪对 2 个治疗组进行氩-氦激光照射,氩-氦激光波长为 632.8 nm,功率为 4.5 mW,光斑直径为 3 mm,功率密度为 56.62 mW/cm²,能量密度为 33.97 J/cm²。激光治疗组照射大鼠腹部,激光穴位治疗组照射大鼠百会穴和大椎穴。百会穴位于在顶骨正中,大椎穴位于大鼠背部正中第 7 颈椎与第 1 胸椎间^[6]。2 组均每次照射 5 min,每天照射 1 次,10 d 为 1 个疗程,共 2 个疗程,疗程间间隔 2 d。

五、检测方法

各组动物均于造模后第 23 天,用 100 g/L 的水合氯醛麻醉,开胸暴露心脏,经左心室插管,快速灌注生理盐水及 4% 多聚甲醛后迅速取脑,置于 4℃ 的生理盐水及 4% 多聚甲醛中后固定,常规脱水、石蜡包埋,用石蜡切片机取冠状切面连续切片,片厚 5 μm,隔五取一。参照免疫组织化学试剂盒说明进行 SP 法染色,阴性对照用正常羊血清代替一抗。每个样本 Bcl-2 免疫组织化学染色切片各取 5 张,于观察区域随机选取 5 个视野,在 400 倍光镜下记录皮质和海马 CA1 区 Bcl-2 阳性细胞数。

六、统计学分析

所得数据用($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 10.0 版统计软件做单因