

· 基础研究 ·

氦-氖激光对体外培养神经元生长发育与存活的影响

吴爱群 张顺清 张伟宏 阎志勇 李宛青 章萍

【摘要】 目的 研究氦-氖激光照射对培养神经元生长发育、存活及衰老的影响。方法 采用氦-氖激光照射无血清培养基培养的神经元,观测其生长发育、存活、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)等的变化。结果 氦-氖激光照射可促进神经元生长及其网络形成、存活时间延长、增加 SOD 含量和减少 MDA 生成。结论 氦-氖激光照射可促进神经元发育、延缓神经元衰老及增强神经元的抗氧化能力。

【关键词】 氦-氖激光; 神经元培养; 神经元发育; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

Effects of laser irradiation on the development and survival of cultured neurons in vitro WU Ai-qun*, ZHANG Shun-qing, ZHANG Wei-hong, YAN Zhi-yong, LI Wan-qing, ZHANG Ping. * Department of Human Anatomy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of He-Ne laser irradiation (HNLI) on the growth and development, survival of cultured neurons. **Methods** The neurons cultured with serum-free medium were treated by HNLI, and then the changes of growth and survival, SOD, and MDA were observed and measured after irradiation. **Results** HNLI promoted the growth and network formation of neurons, prolonged survival period, increased the content of SOD, and reduced MDA. **Conclusion** HNLI could promote the development of neuron, delay the aging of neurons and increase the ability of anti-oxidation.

【Key words】 He-Ne laser; Neuron culture; Neuron development; SOD; MDA

近年来,氦-氖激光以其特有的局部和远距离生物效应,在中枢神经系统疾病的治疗和抗衰老保健等方面已被临床应用。有研究表明,氦-氖激光照射能改善血液流变学,提高脑血流量,减轻自由基引起的损伤^[1,2],改善中枢神经系统的功能。但其对中枢神经元是否具有确切的促进生长发育、维持存活、延缓衰老的作用,其作用机制是源于激光对神经元所处的微环境因素改变或是对神经元本身可引发生物效应?至今尚未明确。因此,本实验采用新生大鼠的海马和前额叶皮质神经元进行体外培养,给予一定剂量的低强度氦-氖激光照射,观察其对神经元生长发育、存活时间及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)含量、脂质过氧化产物丙二醛(malonyldialdehyde, MDA)生成的影响,探讨氦-氖激光对神经元的直接作用及其机制,为治疗中枢神经系统的有关疾病和延缓中枢神经系统衰老提供实验依据。

材料与方法

一、动物

新生 1 d 的 Wistar 大鼠 12 只,体重(6.3 ± 0.5)g,雌雄不拘,由河南省实验动物中心提供。

二、仪器设备

波长为 632.8 nm 的 KX-350-2B 氦-氖激光治疗仪(桂林康兴医疗器械有限公司生产),普通红光手电筒,超净工作台,CO₂ 培养箱,眼科手术器械,手术显微镜,24 孔培养板,盖玻片(美国产),微量移液器,1700 型可见分光光度计,电热恒温水浴箱,倒置相差显微镜,全自动摄相及图象分析系统。

三、药品

自配的高糖 DMEM (Dulbecco's modified eagle media, DMEM),神经基础培养基, B27-Supplement, 0.25% 胰蛋白酶,胎牛血清,多聚赖氨酸, SOD 和 MDA 试剂盒(均购于武汉博士德公司),脑活素(奥地利依比威制药厂生产)。

四、培养液成分

1. 解剖液:平衡盐溶液,蔗糖-葡萄糖液, Hepes 缓冲液。
2. 种植培养液:高糖 DMEM(自配),含 10% 胎牛血清。

基金项目:河南省科技攻关项目(No. 02110438);河南省教育厅科技攻关项目(No. 023100015)

工作单位:200433 上海,第二军医大学解剖学教研室(吴爱群);郑州大学医学院解剖学教研室(张顺清、张伟宏、阎志勇),物理教研室(章萍);郑州师范高等专科学校生命科学系(李宛青)

3. 饲养培养液:神经基础培养基,B27-Supplement。

五、神经元培养、鉴定与与分组

随机取足月新生 1 d 的 Wistar 大鼠 12 只。参照 Dichter 方法^[3],在无菌条件下断头取脑,分离双侧海马及前额叶皮质,剪切、消化分散后,用种植培养液稀释,以 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞密度悬液,将细胞接种于预先经多聚赖氨酸处理过的 4 块 24 孔培养板中,每孔中均有经多聚赖氨酸处理过的无菌盖玻片一块,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱内种植培养。24 h 后将种植培养液置换为饲养培养液,此后每 3 d 更换饲养培养液 1 次。于培养第 3 天采用神经元特异性烯醇化酶(neurone specific enolase, NSE)抗血清按 ABC 法免疫组化染色进行神经细胞鉴定^[4]。随机将每培养板按列分为下列 4 组(每组为 6 孔)。

空白对照组(I组):单纯饲养培养液培养,不加任何处理。

普通红光对照组(II组):饲养培养液培养第 2 天开始用普通红光进行照射,输出功率为 3 mW,光斑直径为 3 mm,每次 3 min,垂直照射,距离为 4~5 cm,保证照射范围局限。

脑活素药物对照组(III组):饲养培养液加入脑活素,浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

激光照射组(IV组):饲养培养液培养第 2 天开始采用波长为 632.8 nm 的氦-氖激光进行照射,输出功率为 3 mW,光斑直径为 3 mm,照射方法同 II 组。II 组和 IV 组照射时,将另外两组培养神经元同样取出与放置,但不照射。

六、实验指标测定

1. 形态学观察:(1)神经元存活计数、胞体面积及直径检测。每天定时在倒置相差显微镜下观察 4 组神经元的生长发育情况,分别取 7,14,21,28 d 共 4 组神经元在倒置相差显微镜下随机取每组各 50 个视野,分别计算存活神经元数目,取均值作卡方检验;并在图像分析仪上随机选择每组各 50 个神经元,分别测定每个神经元胞体的面积及长短直径,记录并分析比较。(2)神经元突起长度的观察。于培养后第 3,7,14 天随机取每组各 50 个神经元分别测其突起的长度,取均值,用方差分析进行比较。

2. HE 与 Nissl 染色:于培养后 14 d 生长旺盛时期,取出各组培养皿内盖玻片进行 HE、Nissl 染色,光镜下观察细胞存活和生长状况,并以 Nissl 染色结果行细胞计数、灰度测定分析与统计学处理。

3. 神经元培养液 SOD、MDA 浓度测定:于培养后 21 d 神经元开始进入衰老、死亡时期,测定此后换取第 3 天的培养液中 SOD、MDA 浓度,按试剂盒说明进行操作,按下列公式计算 SOD、MDA 浓度。

$$\text{MDA}(\text{nmol}/\text{ml}) = \frac{\text{测定管 A 值} - \text{测定空白管 A 值}}{\text{标准管 A 值} - \text{标准空白管 A 值}} \times 10 \text{ nmol}/\text{ml}$$

(式中 A 表示吸光度)

$$\text{SOD}(\text{U}/\text{L}) = \frac{\text{测定管 A 值} - \text{测定空白管 A 值}}{\text{标准管 A 值} - \text{标准空白管 A 值}} \times 10 \text{ nmol}/\text{ml}$$

(式中 A 表示吸光度)

七、统计学分析

组间比较采用方差分析,存活率统计采用卡方检验。实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 10.0 统计软件包对数据进行处理,以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

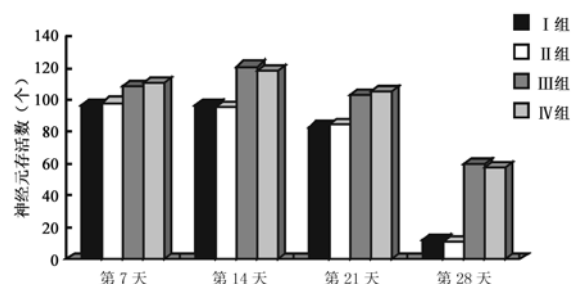
结 果

一、神经元培养鉴定与观察

神经元于接种后 24 h 均已贴壁。神经元大部分呈分散生长,部分细胞聚集成团。多数细胞长出突起,最长可达 30~50 μm 。培养至 3 d 采用 NSE 经 ABC 法鉴定,显示培养细胞几乎全部是神经元。培养至 3~5 d 神经细胞突起增多并延长,生长锥明显,神经元类型呈单极或多极,胞体呈梭形、锥体形、椭圆形或多边形等。胞体中部较暗,光晕明显,神经细胞突起相互连接形成网络。培养至 7~14 d 神经元生长迅速,细胞体光亮,突起明显增粗增长呈网络交错,部分呈束状排列。

二、氦-氖激光照射对培养神经元存活、胞体面积及直径的影响

培养至第 7、14 天, I 组、II 组、III 组和 IV 组相比(图 1), III 组和 IV 组神经元数目明显增加(细胞团块解聚),而 I 组和 II 组神经元数目较少。至 14 d 后 I 组和 II 组神经元部分已开始死亡,而 III 组和 IV 组神经元长势良好,存活数目明显多于 I 组和 II 组。培养至第 28 天,可见 I 组和 II 组神经元快速死亡, III 组和 IV 组神经元仍有半数以上存活。采用图象分析系统分别测量不同时期神经元的胞体面积、直径,培养第 7~14 天 III 组和 IV 组神经元胞体面积、直径均大于 I 组和 II 组神经元(表 1)。I、II 组分别与 III、IV 组相比,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$); I 组与 II 组或 III 组与 IV 组相比,组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注: I 组与 II 组、III 组与 IV 组比较, $P > 0.05$; I 组与 III 组、I 组与 IV 组、II 组与 III 组、II 组与 IV 组比较, $P < 0.05$

图 1 各组培养不同时间的神经元存活数目比较

表 1 各组培养不同时间的神经元面积、最大直径($\bar{x} \pm s$)

组别	7 d		14 d		21 d		28 d	
	面积(μm^2)	最大直径(μm)	面积(μm^2)	最大直径(μm)	面积(μm^2)	最大直径(μm)	面积(μm^2)	最大直径(μm)
I 组	72.43 $\pm$ 11.55 ^{*△}	12.20 $\pm$ 2.10 ^{*△}	94.22 $\pm$ 15.08 ^{*△}	15.12 $\pm$ 2.25 ^{*△}	122.45 $\pm$ 13.11 ^{*△}	17.31 $\pm$ 0.88 ^{*△}	134.75 $\pm$ 17.34 ^{*△}	17.50 $\pm$ 2.65 ^{*△}
II 组	71.32 $\pm$ 12.00 [*]	11.80 $\pm$ 2.40 [*]	94.85 $\pm$ 13.62 [*]	16.20 $\pm$ 2.04 [*]	112.34 $\pm$ 12.86 [*]	18.15 $\pm$ 1.21 [*]	132.70 $\pm$ 15.46 [*]	18.24 $\pm$ 2.07 [*]
III 组	87.35 $\pm$ 12.42 [#]	14.06 $\pm$ 2.12 [#]	117.55 $\pm$ 11.34 [#]	18.15 $\pm$ 1.21 [#]	134.50 $\pm$ 12.31 [#]	20.58 $\pm$ 1.69 [#]	151.15 $\pm$ 11.60 [#]	21.82 $\pm$ 2.32 [#]
IV 组	86.65 $\pm$ 10.38	13.24 $\pm$ 2.14	115.36 $\pm$ 12.08	18.75 $\pm$ 3.07	132.60 $\pm$ 14.51	19.55 $\pm$ 1.27	152.37 $\pm$ 12.33	22.20 $\pm$ 2.14

注: I 组与 II 组比较, ^{*} $P > 0.05$; III 组与 IV 组比较, [#] $P > 0.05$; I 组与 III 组、I 组与 IV 组比较, [△] $P < 0.05$; II 组与 III 组、II 组与 IV 组比较, ^{*} $P < 0.05$

三、神经元突起长度与网络形成

培养至第 7 天, I 组和 II 组神经元突起短而细, III 组和 IV 组神经元突起长而粗(图 2)。培养至第 14 天(图 3), III 组和 IV 组的培养神经元突起长度(表 2)明显大于 I 组和 II 组($P < 0.05$)。I 组与 II 组、III 组与 IV 组间相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。第 21 天, III、IV 组神经元的突起形成网络较 I、II 组稠密,神经元密度亦大于 I 和 II 组。

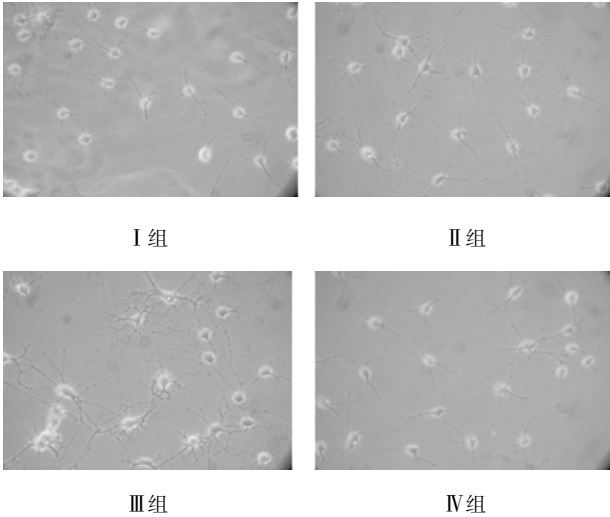


图 2 各组海马和额叶神经元培养 7 d 神经元突起($\times 400$)

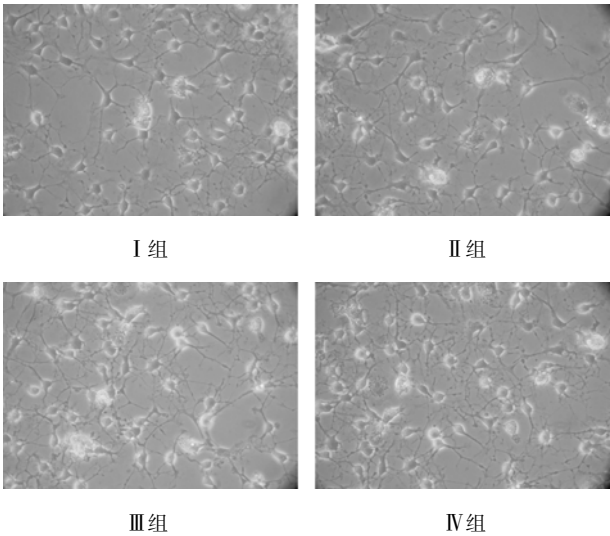


图 3 各组海马和额叶神经元培养 14 d 神经元突起($\times 400$)

表 2 各组培养不同时间的神经元突起长度(μm , $\bar{x} \pm s$)

组别	培养时间		
	3 d	7 d	14 d
I 组	132.6 $\pm$ 1.3 ^{*△}	148.8 $\pm$ 1.2 ^{*△}	164.4 $\pm$ 1.5 ^{*△}
II 组	131.2 $\pm$ 1.5 [*]	150.6 $\pm$ 1.4 [*]	172.4 $\pm$ 1.6 [*]
III 组	145.2 $\pm$ 1.4 [#]	180.4 $\pm$ 1.5 [#]	191.2 $\pm$ 1.1 [#]
IV 组	140.8 $\pm$ 1.4	187.3 $\pm$ 1.1	190.2 $\pm$ 1.3

注: I 组与 II 组比较, ^{*} $P > 0.05$; III 组与 IV 组比较, [#] $P > 0.05$; I 组与 III 组、I 组与 IV 组比较, [△] $P < 0.05$; II 组与 III 组、II 组与 IV 组比较, ^{*} $P < 0.05$

四、HE 染色

培养至第 14 天, III、IV 组神经元形态结构清晰完整。I、II 组部分神经元结构模糊,呈现变性坏死现象,HE 染色可见点状或片状嗜伊红增强或减弱。

五、Nissl 染色

培养至第 14 天, III、IV 组神经元胞浆中布满深蓝色颗粒状尼氏体, I、II 组神经元胞浆中尼氏体较 III、IV 组神经元尼氏体稀疏,着色较淡。I、II 组与 III、IV 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$), I 组与 II 组、III 组与 IV 组间相比,差异无统计学意义(表 3)。

表 3 各组神经元尼氏体灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	尼氏体灰度值
I 组	10	95.70 $\pm$ 10.20 ^{*△}
II 组	10	96.50 $\pm$ 10.40 [*]
III 组	10	73.48 $\pm$ 11.10 [#]
IV 组	10	73.47 $\pm$ 10.50

注: I 组与 II 组比较, ^{*} $P > 0.05$; III 组与 IV 组比较, [#] $P > 0.05$; I 组与 III 组、I 组与 IV 组比较, [△] $P < 0.05$; II 组与 III 组、II 组与 IV 组比较, ^{*} $P < 0.05$

六、神经元培养液 SOD、MDA 含量

III、IV 组 SOD 含量明显高于 I、II 组(图 4), MDA 含量 III 组和 IV 组明显低于 I 组和 II 组(图 5); III、IV 组 SOD 和 MDA 含量分别与 I、II 组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。I 组与 II 组, III 组与 IV 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

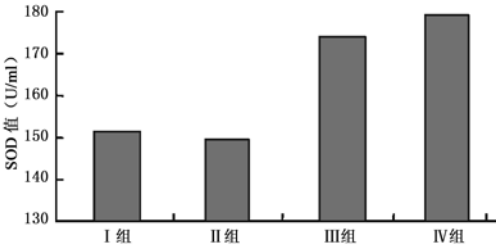


图 4 培养 21 d SOD 含量

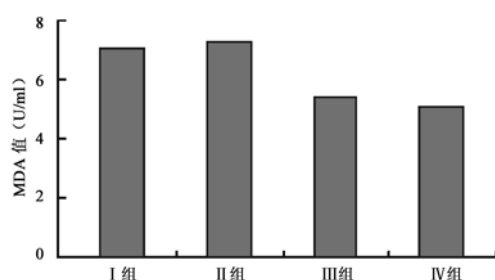


图 5 培养 21 d MDA 含量

讨 论

激光生物学是激光技术向生物学渗透而形成的新兴边缘学科。低强度氦-氖激光照射有可能成为中枢神经系统疾病防治的有效方法,但氦-氖激光对神经元的直接作用及其机制至今尚不清楚。我们采用体外神经元培养实验,主要是观察氦-氖激光单因素对神经元的作用,以排除心理及内环境等其他因素的影响。

细胞是生命活动的基本单位,脑的生长发育、衰老死亡必定以神经元的生长发育、衰老死亡为基础。神经元的生长发育与衰老对内外环境诸因素变化均较敏感,胞体尼氏体和突起的形态变化反映其发育与衰退的程度或功能状态^[5]。然而,有关神经元衰老的学说较多,其中生物氧化副产品的 MDA 自由基是造成衰老的直接和重要因素^[6,7],它能使质膜中不饱和脂肪酸氧化,从而使膜蛋白变性、膜脂流动性下降、膜脆性增加^[8]及膜的运输功能紊乱甚至丧失;同时还将蛋白质中的巯基氧化而使蛋白质发生交联、变形,导致酶失活,引起 DNA 损伤。在细胞内清除氧自由基的机制之一是通过具有抗氧化作用的 SOD 而实现。研究表明,SOD 随年龄增长而降低,MDA 随年龄增长而升高^[8,9]。

我们的实验结果显示,神经元培养的早期(7~14 d),IV 组与 I 组和 II 组相比,神经元生长较快,细胞体积较大、突起较长;IV 组与 III 组相比,神经元生长速度和大小无明显差异,表明氦-氖激光直接照射神经元具有与脑活素相似的促进其生长发育的作用。

激光对神经元功能影响的实验结果显示:其一,神经元之间相互联系方面,IV 组与 I 组和 II 组相比,IV 组神经元之间网络形成密度较高;IV 组与 III 组相比,两者基本相似;其二,尼氏体含量,IV 组与 I 组和 II 组相比,IV 组神经元的尼氏体较为丰富,颗粒密集度较大,IV 组与 III 两组间相比无明显差异。此两项指标表明,氦-氖激光具有与脑活素相似的促进神经元趋向接触、增加其相互联系及促进其尼氏体及其颗粒增多的作用。由于神经元之间的突起联系反映其功能的广泛程度,尼氏体是合成蛋白质的场所,其含量多少与颗粒密度反映其功能旺盛程度,由此表明氦-氖激光照射具有改善

和增强神经元功能的直接作用。

细胞培养中晚期(14,21,28 d),存活的神元与 HE 染色结果显示:IV 组与 I 组和 II 组相比,神经元数目较多,且存活时间延长,形态完整;IV 组与 III 组相比,神经元数目以及存活时间基本相同。SOD 和 MDA 检测结果显示:IV 组与 III 组神经元培养液中 SOD 含量较 I 组和 II 组明显升高,自由基反应终产物 MDA 含量显著下降;IV 组与 III 组相比,差异无统计学意义。结果表明,氦-氖激光具有与脑活素相似的促进神经元抗氧化酶合成、降低氧自由基生成、延缓神经元衰老、保护其存活的作用。

有关氦-氖激光促进神经元生长发育的作用机制,结合我们以往的在体动物实验结果,即氦-氖激光穴位照射可使神经元的脑源性神经营养因子表达增多,可以推测氦-氖激光直接照射亦能促进其脑源性神经营养因子表达,并以此促进培养神经元的生长与发育。而氦-氖激光延缓神经元衰老、维持其存活的机制可能与其增加神经元的 SOD 合成,以此调节氧自由基代谢、加快氧自由基清除^[10]及降低氧自由基浓度有关,进而维持了细胞膜和 DNA 结构的完整性。至于氦-氖激光直接照射可维持神经元存活、延缓神经元衰老,激光是否兼有增强神经元 DNA 修复酶合成与活性的效应,促进受损 DNA 修复,有待进一步研究。

参 考 文 献

- Boev SS, Selivonenko VG. The impact of intravenous He-Ne laser therapy on the antioxidant system in patients with stable exertion angina and postinfarct cardiosclerosis. *Klin Med (Mosk)*, 1997, 75:30-33.
- Korochkin IM, Barbarash OL, Chukaeva II, et al. Effects of low-intensity laser irradiation on the function activity of leukocytes and blood antioxidant system in acute myocardial infarction. *Sov Med*, 1990, 5:36-39.
- Dicher MA. Rat cortical neurons in cell culture: culture method, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res*, 1978, 149: 279-293.
- 胡刚. 体外培养人胚神经细胞衰老性变化的初步观察. *中华老年医学杂志*, 1991, 10:229-232.
- 蔡文琴, 李海标, 主编. 发育神经生物学. 北京: 科技出版社, 1999. 98-105, 250-253.
- Leibovitz BE, Siegel BV. Aspects of free radical reactions in biological systems: ageing. *J Gerontol*, 1980, 35: 45-56.
- 凌治萍, 主编. 细胞生物学. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 9.
- 阮绪芝, 蔡福筹. 不同剂量的 He-Ne 激光对 Raji 细胞膜脂流动性的影响. *激光生物学报*, 1997, 6:971-974.
- Cand F, Verdetti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of aging rats. *Free Radic Biol Med*, 1989, 7:59-63.
- Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*, 1998, 108: 101-106.

(修回日期:2005-11-18)

(本文编辑:松 明)