

· 基础研究 ·

低能量氦-氖激光照射对体外培养大鼠海马神经元微管结合蛋白表达的影响

张顺清 常成 张娟 宋波 赵青赞 许予明 刘乐喜 郭雅聪

【摘要】目的 探讨氦-氖激光照射对体外培养神经元微管结合蛋白(MAP2)表达的影响。**方法** 采用无血清细胞培养方法,分离并体外培养新生大鼠海马神经元,并以低能量氦-氖激光对其照射,于培养后 14 d 神经元生长旺盛时期取出各组培养皿内盖玻片进行 MAP2 免疫学组织化学染色,光镜下观察,拍照计数,与其他对照组比较,观察激光照射对神经元微管结合蛋白(MAP2)表达的影响。**结果** 将氦-氖激光照射组与对照组比较,阳性表达细胞轮廓清晰,照射后阳性表达 MAP2 的培养神经元数目为 (15.85 ± 2.79) 个/高倍视野,明显高于对照组 $[(9.23 \pm 2.56)$ 个/高倍视野]的数量,且组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 氦-氖激光照射能促进体外培养新生大鼠海马神经元 MAP2 的表达。

【关键词】 氦-氖激光; 体外培养神经元; 微管结合蛋白

Effect of low energy He-Ne laser radiation on microtubule-associated protein 2 expression in cultured rat hippocampal neurons Zhang Shunqing*, Chang Cheng, Zhang Juan, Song Bo, Zhao Qingzan, Xu Yuming, Liu Lexi, Guo Yacong. * Department of Neurology, People's Hospital of Puyang, Puyang 457000, China

Corresponding author: Xu Yuming, Email: xuyuming@zzu.edu.cn

【Abstract】Objective To study the effect of low energy He-Ne laser radiation on microtubule-associated protein 2 (MAP2) expression in cultured rat hippocampal neurons. **Methods** Neonatal rat hippocampal neurons were isolated and cultured in vitro. After 14 days culture with or without low energy He-Ne laser radiation, neurons were taken out; MAP2 expression was shown by using immunohistochemistry method and MAP2-positive neurons were counted on the photographs taken under light microscope. **Results** The amount of MAP2-positive neurons in laser radiation group was (15.85 ± 2.79) /high power field and was much higher than that in control group (9.23 ± 2.56) . Positive expression neurons had clear contours. The difference of MAP2 expression between laser radiation group and control group was statistically significant ($P < 0.01$). Expression of MAP2 was up-regulated after laser radiation in cultured neurons. **Conclusions** He-Ne laser radiation may up-regulate the expression of MAP2 in cultured neurons.

【Key words】 He-Ne laser; Cultured neuron, in vitro; Microtubule-associated protein 2

多年来,低能量氦-氖激光已作为一种非药物治疗手段广泛应用于中枢神经系统疾病及其它相关疾病的防治^[1]。为进一步探讨氦-氖激光对中枢神经系统的作用机制,本研究采用无血清培养法,体外培养新生大鼠海马神经元,并以低强度氦-氖激光对其进行一定剂量的照射,观察激光照射对体外培养神经元微管结合蛋白 2 (Microtubule-associated protein 2, MAP2) 表达的影响,旨在为低强度氦-氖激光应用于神经系统疾病的临床辅助治疗和康复保健提供理论依据,寻找新的方法。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物: 新生 Wistar 大鼠(出生 1 d 内) 12 只,体重 (6.45 ± 0.50) g。雌雄不拘,普通级动物(由河南省实验动物中心提供,合格证号:410116)。

2. 实验仪器设备: 多功能氦氖激光治疗仪(波长为 632.8 nm; 桂林康兴医疗器械有限公司 KX-350-2B)、眼科常用手术器械、普通红光手电筒(市售)、超净工作台、HF90 CO₂ 细胞培养箱、微量移液器、塑料培养板、进口盖玻片、手术显微镜、倒置相差显微镜、全自动摄像及图象分析系统。

3. 试剂药品: 自配高糖种植培养液(Dulbecco's modified eagle media, DMEM)、神经基础培养基(Neuro-Basal-Medium, 不含 L-谷氨酰胺, Sigma 公司进口分装)、B27 辅助培养基(B27-supplement, Sigma 公司进

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.05.002

作者单位: 450052 郑州, 郑州大学第一附属医院神经内科(张顺清、许予明、宋波); 河南省濮阳市人民医院神经内科(张顺清、刘乐喜、郭雅聪); 郑州大学基础医学院人体解剖学教研室(常成、赵青赞); 北京大学第五临床医学院(卫生部北京医院)核医学科(张娟)

通信作者: 许予明, Email: xuyuming@zzu.edu.cn

口分装)、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清、SPTM 免疫染色试剂盒 (SP900 试剂盒, Sigma 公司进口分装)、兔抗大鼠 MAP2 单克隆抗体 (购自武汉博士德生物工程有限公司)、SABC 试剂盒 (购自武汉博士德生物工程有限公司)、DAB 显色试剂盒 (购自武汉博士德生物工程有限公司)、多聚赖氨酸溶液 (Sigma 公司进口分装, 用时蒸馏水 1:10 稀释)。

解剖液: 平衡盐溶液、蔗糖-葡萄糖液。饲养培养液: 神经基础培养基 (NeuroBasal-Medium)、B27 辅助培养基 (B27-Supplement)。种植培养液: 高糖种植培养液 (自配)、10% 胎牛血清。

二、实验方法

1. 细胞的无血清培养和标本采集: 取足月新生 1 d 内的 Wistar 大鼠 12 只, 采用随机数字表分为 3 组, 参照 Dicher^[2] 的方法, 用络合碘消毒后迅速断头取脑, 在无菌条件下分离出双侧海马, 消化分散后, 用种植培养液稀释, 然后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 ℃、5% CO₂ 培养箱内种植培养。24 h 后弃去培养皿内种植培养液, 全量换入饲养培养液 (不含血清), 后每 3 d 更换 1/3 量饲养培养液一次。

2. 神经元鉴定: 于种植第 3 天用神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolization enzyme, NSE) 抗血清按 ABC 法免疫组化染色进行神经细胞鉴定。

3. 培养神经元的分组及干预方法: 神经细胞种植后 3 d, 挑选细胞分散均匀、生长较好的两块培养板, 采用随机数字表分为 3 组: ① I 组 (空白对照组)——单纯饲养培养液培养不加任何光照; ② II 组 (普通红光对照组)——饲养培养第 2 天开始用普通红光进行照射, 普通红光选用照射 10 min 皮温升高不超过 0.5 ℃ 的普通市售红色手电筒, 垂直照射, 每次照射 3 min, 距离为 3 cm, 保证照射范围略小于每皿面积, 每日定时照射 1 次, 共照射 10 d; ③ III 组 (激光照射组)——饲养培养第 2 天开始采用波长为 632.8 nm、输出功率为 3 mW、光斑直径均为 3 mm 的氦-氖激光进行照射, 照射方法同普通红光对照组。照射时将空白对照组培养神经元取出, 同样放置但不照射。

4. 检测标本采集和染色: 于饲养培养后 14 d 神经元生长旺盛时期取出各组皿内盖玻片进行 MAP2 免疫组织化学染色。光镜下观察, 拍照计数。

5. MAP2 免疫组织化学染色步骤: ①贴壁有培养神经元的盖玻片经多聚甲醛固定 4 h 后, 蒸馏水冲洗; ②新鲜 3% H₂O₂ 室温 10 min, 灭活内源性过氧化物酶, 0.01 MPBS 冲洗 5 min × 3 次; ③0.01 MPBS 缓冲液, 高压抗原修复 10 min; ④0.01 MPBS 冲洗 5 min × 3

次, 滴加 10% 正常山羊封闭血清, 室温湿盒内孵育 20 min, 甩去不洗; ⑤滴加一抗工作液, 湿盒内 4 ℃ 孵育过夜; ⑥0.01 M PBS 冲洗 5 min × 3 次, 加入相应生物素化二抗, 37 ℃ 孵育 20 min; ⑦0.01 MPBS 冲洗 5 min × 3 次, 滴加辣根过氧化物酶标记的链酶亲合素 37 ℃ 孵育 20 min; ⑧0.01 M PBS 冲洗 5 min × 3 次, DAB 显色; ⑨苏木素轻度复染, 常规脱水、透明、中性树胶封片。对照实验: 以正常山羊血清代替一抗, 同步进行免疫组织化学染色。

6. MAP2 免疫阳性神经元计数: 每一张盖玻片随机选取 10 个相邻视野, 计数 MAP2 免疫阳性细胞数 (40 × 10 倍视野), 求出免疫阳性细胞的算术平均值, 并进行阳性细胞形态结构观察比较。

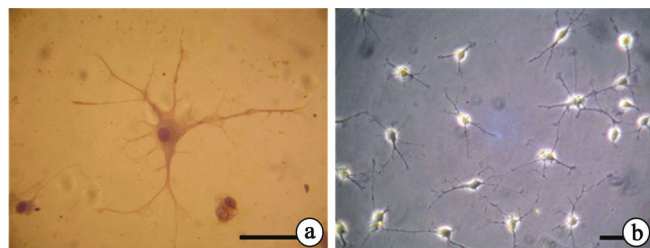
三、统计学方法

使用 SPSS 13.0 版统计软件包对数据进行统计学处理, 实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。先对每组数据做正态性检验, 再做方差齐性检验。若方差齐, 则做单因素方差分析和 q 检验; 若方差不齐, 则进行变量转换。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

结 果

一、神经元大体形态学镜下观

神经元于接种后 24 h 大部分已贴壁。培养至 3 d 按 ABC 法神经元鉴定, 结果显示培养细胞几乎全部是神经元 (图 1a); 神经元大部分呈分散生长, 部分细胞聚集成团, 在倒置相差显微镜下可见有光亮的细胞体、交织成网络状的突起及蓝色的背景 (图 1b)。

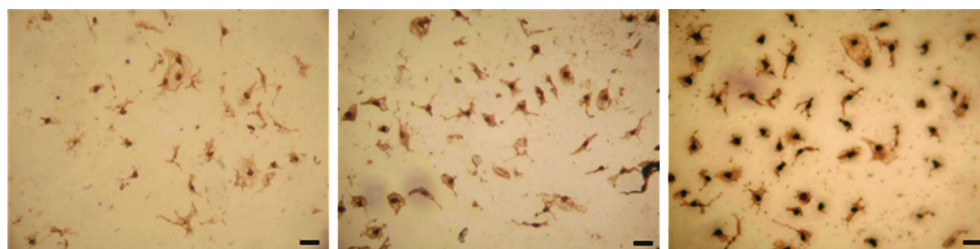


注: a 为高倍镜下示单个神经元的胞体和突起 (无染色, ×400); b 为低倍镜下示神经元部分呈分散生长, 部分细胞聚集成团 (无染色, ×200)。比例尺: 100 μm

图 1 培养 3 d 后的大鼠海马神经元镜下观

二、培养神经元 MAP2 表达的变化

I 组和 II 组培养神经元 MAP2 表达明显减弱, 树突变化比胞体显著, 细胞轮廓不清晰, 其阳性细胞数减少, 染色变浅。经氦-氖激光照射的 III 组培养神经元 MAP2 在细胞内广泛表达, 强阳性染色的树突呈条索状分布, 神经元胞体和树突染色明显, 树突连续, 其阳性染色呈树枝状分布, 详见图 2 和图 3。



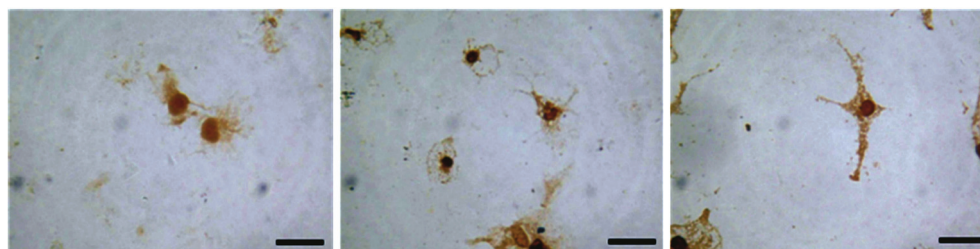
I 组

II 组

III 组

注:阳性表达 MAP2 神经元的数量明显增加。比例尺:100 μm

图 2 低倍镜下各组 MAP2 的表达免疫组化图(DAB 染色, $\times 200$)



I 组

II 组

III 组

注:阳性表达 MAP2 神经元的树突和轴突明显增长。比例尺:100 μm

图 3 高倍镜下各组 MAP2 的表达免疫组化图(DAB 染色, $\times 200$)

三、培养神经元 MAP2 阳性表达数目的比较

各组神经元高倍($\times 400$)视野下 MAP2 免疫阳性神经元的细胞数目的具体数据详见表 1。经过氩-氟激光照射后,Ⅲ组阳性神经元的细胞数明显高于普通红光照射的Ⅱ组和无光线照射的Ⅰ组,组间差异有统计学意义($P < 0.05$),而Ⅰ组和Ⅱ组比较,则差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组神经元 MAP2 免疫阳性细胞数变化(个)

分组	视野	阳性细胞数
I 组	10	8.86 ± 2.83^a
II 组	10	9.23 ± 2.56^a
III 组	10	15.85 ± 2.79

注:与Ⅲ组比较,^a $P < 0.05$

讨 论

近年来,氩-氟激光以其特有的局部和远距离生物效应越来越受到医学工作者的重视。体外培养神经元及动物在体氩-氟激光照射实验研究表明,激光照射具有促进神经元生长发育、延缓衰老及凋亡、促进大鼠海马齿状回神经细胞增殖、改善大鼠的认知功能的作用^[3-4]。相关研究显示,氩-氟激光照射能改善血液流变学、提高脑血流量、减轻自由基反应、抗损伤、改善中枢神经系统的功能^[5-10]。目前,低能量弱激光血管内照射及穴位照射疗法已经广泛应用于神经科临床治疗,并取得了一定的疗效。为低强度氩-氟激光多方位、多靶点治疗中枢神经系统疾病提供了广阔的前景。

MAP2 是一类可与微管结合并与微管蛋白共同组成微管系统的蛋白,其主要功能是调节微管的特异性,并将微管连接到特异的细胞器上。MAP2 与微管蛋白

结合,参与微管的构成,为神经元所特有,其正常表达于成熟神经元的核周胞质和树突,具有组装微管、构成并稳定细胞骨架结构的作用^[11-12]。微管由于神经细胞骨架蛋白的磷酸化状态在中枢神经系统的学习记忆功能中起重要作用,MAP2 的表达情况直接关系到微管生物学功能的执行。微管大量存在于神经元中,对维持细胞形态、神经元的物质输送及神经递质的传递起着重要的作用。MAP2 对缺血性损伤反应敏感,是神经元内缺血时敏感性的遗传标记,并在脑损伤时表达下调^[13],MAP2 的表达下调,使微管稳定性受到破坏,而微管是缺血性损伤后迟发性神经元凋亡(delayed neuronal death, DND)中凋亡小体形成的重要物质。研究发现,MAP2 活性下降可造成微管变性堆积,影响细胞骨架的完整,并可使线粒体的轴突转运发生障碍,最终导致神经元凋亡^[14-15]。

本研究结果显示,氩-氟激光照射组体外培养大鼠海马神经元 MAP2 较其他两组培养神经元表达增强,神经元胞体、树突内强染颗粒丰富,强染色的树突呈条索状分布,细胞轮廓清晰,而空白对照组和普通红光对照组 MAP2 表达明显减弱,细胞质内强染颗粒稀疏,树突内染色颗粒减少,可见神经元胞体内苍白区及树突染色间断或消失,细胞轮廓不清晰。可见,低能量氩-氟激光照射能够上调体外培养神经元 MAP2 的表达,这有可能对促进神经元胞体及树突的生长和发育,增强神经元营养物质的运输功能,延缓神经元衰老凋亡具有一定的作用。

光学理论研究显示,氩-氟激光为低能量生物弱激光,无光热效应,照射后局部温度升高不超过 0.1 ~ 0.5 $^{\circ}\text{C}$,对组织结构无任何损伤,氩-氟激光对组织所产

生的生物效应要靠激光生物刺激来实现的^[16]。医学临床报道,氦-氖激光可以穿透皮肤、皮下软组织,其生物学辐射可以深达 1.0~1.5 cm,至大脑皮质^[17]。本研究结果表明,采用与临床及动物实验相同的输出功率(3 mW),氦-氖激光直接照射体外培养神经元,对神经元的生长发育无任何不良反应,进一步证实了该剂量低强度氦-氖激光照射的安全性。通过本实验,可见氦-氖激光直接照射体外培养神经元,能促进神经元生长发育、促进体外培养神经元 MAP2 的阳性表达,故笔者认为,低强度氦-氖激光具有以下特点:①一定范围剂量的照射是安全的;②具有促进体外培养神经元生长发育、延缓衰老凋亡及抗损伤作用;③以其远距离生物效应有望应用于神经系统疾病的临床治疗。

需要注意的是,体外及动物实验毕竟与人类临床应用是有区别的。在低能量氦-氖激光有效地应用于中枢神经系统疾病的临床治疗之前,尚需对其作用机制、照射剂量、穿透距离及安全性等进行更加深入的基础研究和探讨以及大规模的临床实验和严谨的临床疗效监测、评估等。希望本研究结果能为低能量氦-氖激光的临床应用提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 赵燕平. 影响低强度氦氖激光临床疗效诸多因素探讨[J]. 中国临床康复, 2004, 24(8): 5128-5130.
- [2] Dicher MA. Rat cortical neurons in cell culture, culture method of morphology, electrophysiology and synapse formation[J]. Brain Res, 1978, 149(6): 279-293.
- [3] Ghaleb R, Naciri M, Al-Majmaie R, et al. Enhancement of monoclonal antibody production in CHO cells by exposure to He-Ne laser radiation[J]. Cytotechnology, 2013, E1. [2013-08-14]. <http://link.springer.com/article/10.1007/s10616-013-9625-8>. [Epub ahead of print Aug 14, 2013].
- [4] 黄玲, 吴智辉, 莫华, 等. 低功率激光对细胞端粒 DNA 长度影响的实验研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2013, 30(3): 592-596.
- [5] Sakota D, Takatani S. Quantitative analysis of optical properties of flowing blood using a photon-cell interactive Monte Carlo code: effects of red blood cells' orientation on light scattering[J]. J Biomed Opt, 2012, 17(5): 057007.
- [6] Prabhu V, Rao SB, Chandra S, et al. Spectroscopic and histological evaluation of wound healing progression following Low Level Laser Therapy (LLLT)[J]. J Biophotonics, 2012, 5(2): 168-184.
- [7] Hegde VN, Prabhu V, Rao SB. Effect of laser dose and treatment schedule on excision wound healing in diabetic mice[J]. Photochem Photobiol, 2011, 87(6): 1433-1441.
- [8] 林志娟, 任敏, 贾文博等. 氦氖激光对缺血缺氧性脑损伤新生大鼠认知功能的影响及机制研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2013, 16(9): 21-24.
- [9] 张顺清. 氦氖激光照射对缺血性脑血管疾病的临床研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2009, 12(1): 1-5.
- [10] Saied GM, Kamel RM, Labib AM, et al. The diabetic foot and leg: combined He-Ne and infrared low-intensity lasers improve skin blood perfusion and prevent potential complications, a prospective study on 30 Egyptian patients[J]. Lasers Med Sci, 2011, 26(5): 627-632.
- [11] Li YC, Tsai LK, Wang JH, et al. A neural stem/precursor cell monolayer for neural tissue engineering[J]. Biomaterials, 2013, S0142-9612(13): 01322-01327.
- [12] Poplawski GH, Tranziska AK, Leshchyn'ska I, et al. L1CAM increases MAP2 expression via the MAPK pathway to promote neurite outgrowth[J]. Mol Cell Neurosci, 2012, 50(2): 169-178.
- [13] Kühn J, Meissner C, Oehmichen M, et al. Microtubule-associated protein 2 (MAP2): a promising approach to diagnosis of forensic types of hypoxia-ischemia[J]. Acta Neuropathol, 2005, 110(6): 579-586.
- [14] Guo Y, Gong HS, Zhang J, et al. Remarkable reduction of MAP2 in the brains of scrapie-infected rodents and human prion disease possibly correlated with the increase of calpain[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30163.
- [15] Furutani R, Kibayashi K. Morphological alteration and reduction of MAP2-immunoreactivity in pyramidal neurons of cerebral cortex in a rat model of focal cortical compression[J]. J Neurotrauma, 2012, 29(6): 1266-1276.
- [16] 温静霞, 张杰. 低强度激光生物效应与临床应用研究进展[J]. 中华临床医学杂志, 2005, 6(2): 59-61.
- [17] 杨淑兰, 顾瑛, 刘凡光. 氦氖激光照射促进皮肤溃疡愈合研究现状[J]. 现代康复, 2000, 4(9): 1382-1383.

(修回日期: 2013-12-29)

(本文编辑: 汪 玲)

· 消息 ·

2014 年现代假肢矫形器新技术论坛会讯

2014 年现代假肢矫形器新技术论坛拟于 2014 年 7 月 25 至 27 日在福建省福州市召开。本次会议的目的在于推广现代假肢矫形器新技术。会议由中国康复医学会康复治疗专业委员会、香港义肢矫形师学会共同主办, 福建省康复医学会、福建漳州肢残康复中心、伊贝欧力假肢矫形器技术(漳州)有限公司协办。会议将邀请国内外知名专家主讲, 内容包括现代假肢矫形器新技术的临床应用等。

欢迎广大从事康复医学、矫形外科、神经科、儿科等相关临床科室工作的医生、治疗师、假肢矫形器师、护士积极参会。欢迎民政、残联系统各级肢残康复医疗机构及假肢矫形器中心等单位的医生、假肢矫形器或康复辅具适配专业技术人员参加。

联系人: 胡耀全; 联系电话: 0596-2961553, 13906945202; Email: zckangfu@126.com。

中国康复医学会康复治疗专业委员会
2014 年 5 月