

· 基础研究 ·

低强度 He-Ne 激光对软骨细胞增殖的影响

杨小红 叶惠贞 李斯明 钟灿灿 沈雁 任国梅 梁佩红

【摘要】目的 研究低强度 He-Ne 激光对兔软骨细胞增殖和变异的影响。**方法** 选取 3 周龄新西兰白兔分离培养软骨细胞,分别在浓度为 10%、5%、2.5% 的新生牛血清 (newborn calf serum, NCS) 及无血清 4 种培养媒介中培养。采用波长为 632.8 nm,功率为 6.5 mW 的 He-Ne 激光照射软骨细胞,每天分别照射 2、8、16、30 和 45 min,共 6 d。在培养至第 13 天时,用 XTT 法检测细胞的活性,了解细胞的增殖情况;用吖啶橙标记软骨细胞 DNA,激光共聚焦显微镜下观察软骨细胞形态及 DNA 的表达。**结果** (1) XTT 结果显示,在营养缺乏培养状态中(5%、2.5% NCS),照射时间为 16、30 和 45 min 的照射组细胞数量明显增加,与无激光照射组的差异有统计学意义($P < 0.01$),其中最佳照射时间为 30 min,实际最佳照射能量密度为 9.42 J/cm^2 。(2) 照射组软骨细胞形态与正常软骨细胞差异无统计学意义;DNA 荧光信号较对照组强;未见显著的形态改变。**结论** 低强度 He-Ne 激光能促进兔软骨细胞的生长,使 DNA 表达明显增强。

【关键词】 激光; 软骨细胞; 增殖

The effect of low intensity He-Ne laser irradiation on chondrocytes proliferation YANG Xiao-hong, YE Hui-zhen, LI Si-ming, ZHONG Can-can, SHEN Yan, REN Guo-mei, LIANG Pei-hong. Guangzhou Institute of Traumatology, the 4th Affiliated Hospital of Medical College of Jìnan University, Guangzhou 510220, China

【Abstract】Objective To investigate the potential effect of low intensity He-Ne laser irradiation on the proliferation and mutation of rabbit cartilage cells in vitro. **Methods** The sample of cartilage of New Zealand white rabbits aged 3 weeks were used. The chondrocytes were isolated and suspended in medium with different concentrations (0%, 2.5%, 5% and 10%) of newborn calf serum (NCS). The chondrocytes were treated by He-Ne laser irradiation with the wavelength of 632.8nm, 6.5mW for 2, 8, 16, 30 or 45 minutes daily, respectively, for 6 days. After treatment the chondrocytes were incubated till the 13th day, and the proliferation and activity were assessed by a XTT tests, and DNA expression by acridine orange stain and confocal laser scanning microscope. **Results** The XTT tests showed that, in nutrition-deficit condition of culture, laser irradiation for 16, 30 and 45 minutes significantly increased the number of the chondrocytes as compared with that without laser irradiation ($P < 0.01$). The optimal irradiation time for proliferation was 30 minutes, and the optimal energy density was 9.42 J/cm^2 . The chondrocytes DNA fluorescence signal was significantly stronger in the irradiation groups than that in the non-irradiation group. However, there was no significant morphological difference between the irradiated and normal chondrocytes. **Conclusion** Low intensity of He-Ne laser irradiation can promote the proliferation and DNA expression of chondrocytes.

【Key words】 Laser; Chondrocytes; Proliferation

激光生物刺激效应的研究是当前激光医学基础研究的热点,尤其是低强度激光(low intensity laser, LIL)对离体细胞作用的研究更为广泛。业已证实 LIL 对成纤维细胞、内皮细胞、造血细胞、神经细胞等多种细胞的增殖有不同程度影响^[1-3],但对软骨细胞影响的研究鲜见报道。我们采用四氮唑复合物[2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-(phenylamino) carbonyl-2H-tetrazolium hydricide, XTT]法检测 He-Ne 激光照射后软骨细胞线粒体功能,并用激光共聚焦显微镜观察软骨细胞 DNA 的变化,以了解 LIL 对软骨细胞的作用。

材料与方法

一、实验材料

所用材料有 DMEM-F12 (1:1) 培养液 (Gibco)、新生牛血清 (Hyclone) 以及 Sigma 公司产的 II 型胶原酶、透明质酸酶、胰蛋白酶、XTT、硫酸酚嗪甲酯 (phenazine methosulfate, PMS)、吖啶橙 (acridine orange) 等。

二、兔软骨细胞的分离和培养

改进文献[4,5]的方法,取 3 周龄新西兰白兔处死,无菌条件下,片状切取肱骨近端和股骨近、远端及胫骨近端关节面软骨,再切成 1 mm^3 左右的小颗粒,分别用透明质酸酶、II 型胶原酶、胰蛋白酶消化关节软骨碎片,获得软骨细胞悬液,加入含体积分数为 10% 的新生牛血

基金项目:广东省卫生厅资助项目 (No. 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)

清的 DMEM-F12 培养液,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,原代细胞贴壁并融合成单层细胞后,用 0.25% 胰酶消化传代培养,并用第 3,4 代细胞进行实验。

三、细胞接种密度的选择

调节细胞浓度为 4×10^5 个/ml,并用 DMEM-F12 培养液作逐级等倍稀释,共 10 管,接种于 24 孔板中,每孔 1 ml,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h,用 XTT 法测定细胞的吸光度(OD 值)。

四、激光照射方法

将软骨细胞接种于 24 孔板中,每孔 1 ml,浓度为 4×10^3 个/ml,每个剂量重复 4 孔,第 2 天待细胞贴壁后进行实验。实验组采用的 He-Ne 激光经光纤传输至照射部位(500-C 型氦-氖激光治疗仪,广州产),波长为 632.8 nm,光纤末端输出功率调节为 6.5 mW,光斑直径为 1.2 mm,照射时间分别为 2,8,16,30 和 45 min,每天照射 1 次,共 6 d。然后继续在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 6 d,隔天更换 MEM-F12 培养液。对照组不进行激光照射,其余条件与实验组相同。第 13 天用 XTT 法检测细胞的吸光度,寻找最佳照射剂量。

五、血清浓度的选择

按上述方法照射细胞。分别采用理想营养状态[10% 新生牛血清(newborn calf serum, NCS)]、营养缺乏状态(5%、2.5% NCS)及无血清(serum free)4 种培养体系对激光照射后的软骨细胞进行培养,寻找合适的实验条件。

六、XTT 测定^[6,7]

XTT 用预热至 60℃ 的培养基配制,浓度为 1.458 mmol/L, PMS 浓度为 5 mmol/L,显色工作液 XTT/PMS 体积比为 200:1。终止反应时每孔加入显色工作液 250 μl,孵育 4 h,然后在酶标仪中比色,检测波长为 450 nm,参考波长为 650 nm。

七、吖啶橙标记软骨细胞 DNA^[8]

调节细胞浓度为 4×10^3 个/ml,滴加在涂有多聚赖氨酸的盖玻片上作细胞爬片,每片 1 ml,按照上述方法进行激光照射;测定时加入 0.01% 吖啶橙 2~3 滴,染色 5 min 后,在激光共聚焦显微镜(BIO-RAD MRC-600)下观察软骨细胞的 DNA 标记情况,激发波长为 488 nm,阻断波长为 520 nm。

八、统计学分析

统计软件采用 SPSS 11.0,对照射剂量 OD 值的组间差异用单因素方差分析。

结 果

一、细胞密度生长曲线

选取生长良好的第 3 代软骨细胞(图 1)作生长密度测定,XTT 检测结果 OD 值在 $3.125 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$

个/ml 之间成线性关系(图 2)。提示应根据培养时间的不同在线性范围内合理选择适当的细胞接种浓度。本实验考虑到培养周期较长,选择线性低限 4×10^3 个/ml 作为接种浓度。

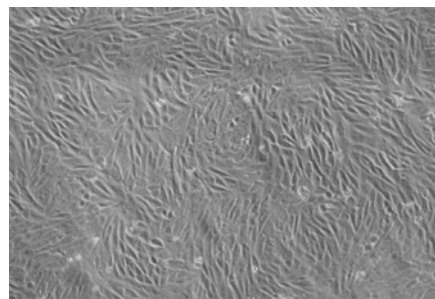


图 1 第 3 代正常软骨细胞(倒置相差显微镜, ×100)

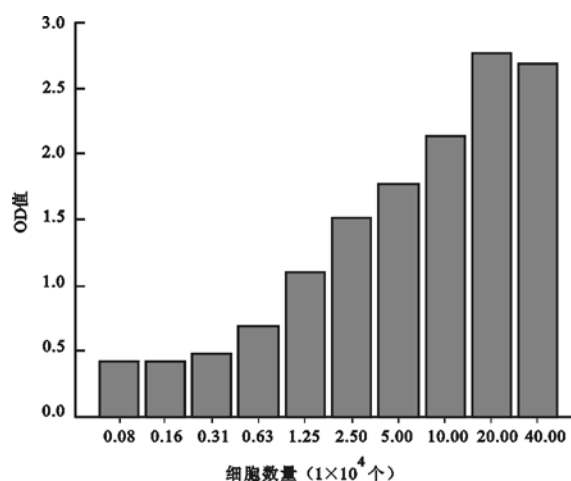


图 2 软骨细胞密度生长直线图

二、照射剂量生长曲线

如图 3 所示,剂量相同的 He-Ne 激光连续照射 6 次后,采用 10% NCS、5% NCS、2.5% NCS 及无血清 4 种不同培养体系,结果相差较大。在营养状态较理想时,细胞培养 1 周左右即发生接触性抑制,所有剂量组照射前后差异均无统计学意义($P > 0.05$);在无血清培养基中细胞可以存活,但不增殖;而在营养缺乏培养状态中,照射时间为 16 min 时细胞数量开始明显增加,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),45 min 时呈现出下降趋势。实验结果显示,最佳照射时间为 30 min,激光通过培养皿的损耗为 8.9%,实际最佳照射能量密度为 9.42 J/cm^2 。

三、细胞形态观察

激光共聚焦显微镜下观察到实验组软骨细胞形态多为三角形,与正常软骨细胞无明显差别;DNA 标记呈黄绿色荧光,荧光信号较对照组强;实验组细胞可见数量较多的集落生长现象,而且细胞集落明显增大(图 4,5)。

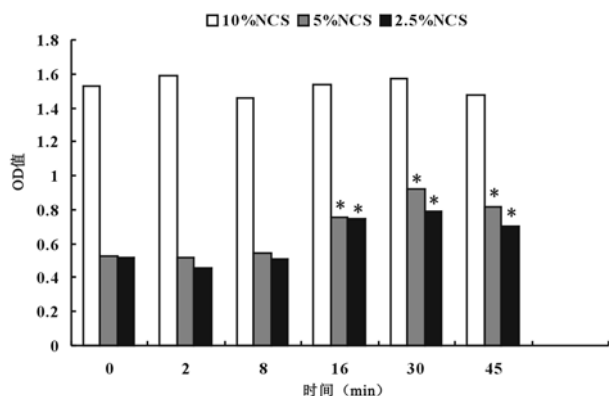


图3 软骨细胞照射后不同培养条件下生长结果比较
注:0 剂量组为对照组,与对照组比较,* $P < 0.01$

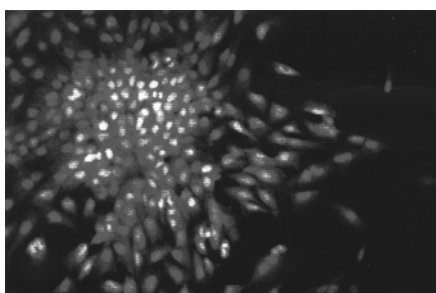


图4 激光照射后软骨细胞 DNA 表达增强,细胞集落增大(吖啶橙标记,激光扫描共聚焦显微镜,×200)

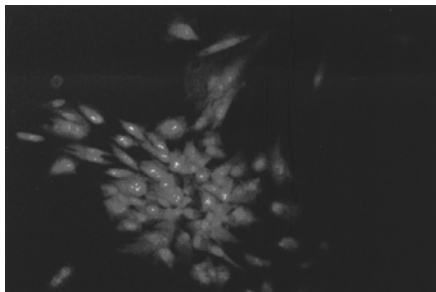


图5 对照组软骨细胞 DNA 表达(吖啶橙标记,激光扫描共聚焦显微镜,×200)

讨 论

关节软骨损伤后难以修复,学者们虽经长期探索,但尚未找到理想的修复方法。LIL 对软骨细胞的生物刺激效应的研究可为 LIL 在软骨缺损修复的临床应用中提供可靠依据。业已证实,在 LIL 对离体细胞的刺激作用中,存在着光的生物学特性:一是光照射的累加作用;二是抛物线特点^[9,10]。体内关节软骨细胞由胶原纤维及蛋白多糖包裹,没有血管及神经组织,其营养要求较低。体外培养的软骨细胞在理想的营养媒介中生长旺盛,其生长速度较一般组织快,干扰了 LIL 照射实验。因此,在本研究中为模仿体内的营养缺乏环境,采用降低培养液中的血清浓度的方法,以适合较长的细胞培养周期。在照射次数方面,曾尝试 1 次、3 次、5 次,最后发

现连续照射 6 次并培养至第 13 天才出现显著改变,符合光照射累加作用的生物学特性;照射时间在 16 min 时,OD 值开始增加,30 min 时为高峰,45 min 出现下降趋势,照射剂量呈现出明显的抛物线特点(图 3)。

XTT 法是近年来采用的较理想的细胞活性检测方法^[7],具有灵敏度高、操作简便、结果准确等优点。XTT 法作软骨细胞密度生长曲线检测,结果显示,接种浓度在 $3.125 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ 个/ml 之间成线性关系(图 2)。软骨细胞常规实验接种浓度在 8×10^3 /ml 以上,培养数天后细胞数量接近最大量,细胞融合、生长缓慢甚至停止;为最大限度延长培养周期,避免细胞出现接触抑制,在多次试验后选择了线性低限 4×10^3 个/ml 作为接种浓度,取得了满意的效果。

由于 LIL 照射的剂量很小,增殖细胞变异的可能性极小,在倒置显微镜及激光共聚焦显微镜下均未见显著的形态学改变。激光照射后的细胞由于吸收了更多的能量从而使更多的用于维持碱基配对的氢键离断,解开更多的 DNA 双链,促使以母链 DNA 为模板的 DNA 复制过程加快,细胞增殖加速^[9]。本实验在激光共聚焦显微镜下可见,He-Ne 激光照射后使软骨细胞 DNA 表达明显增强,繁殖能力强的细胞集落增多,可能是细胞增殖的主要原因之一。

在 LIL 对离体细胞生物刺激作用的研究中,波长、功率、照射时间等激光参数的选用十分关键,但靶细胞接种浓度、培养体系选择的重要性常被忽视。LIL 能促进成纤维细胞增殖已被证实^[11,12];但 Hallman 等却得到相反的结果,发现 He-Ne 激光对培养不同代的成纤维细胞的增殖均无促进作用^[13,14];Almeida-Lopes 等^[12]在几种 LIL 对成纤维细胞影响的研究中证实,在理想营养媒介(10% 胎牛血清)下无增殖作用,但在采用营养缺乏培养媒介后(5% 胎牛血清)细胞数量出现显著的增加;本研究初期在常规培养条件下对不同代的软骨细胞进行多次实验,经 He-Ne 激光照射后均无增殖作用,在改变细胞接种浓度及降低培养液血清浓度后,得到与 Almeida-Lopes 类似的结果。因此,在实验前应根据各种细胞的不同特点建立适当的培养体系,才能使光照实验得到可靠结果。

目前,围绕 LIL 生物刺激效应的基础与临床研究日益广泛深入,但在骨科方面的研究报道较少,对软骨细胞的生物刺激效应的相关研究更是鲜为人知。本实验初步表明,低强度 He-Ne 激光能促进软骨细胞的增殖,使 DNA 表达明显增强,但不会导致增殖细胞产生变异。实验结果可为 LIL 修复关节软骨缺损的临床研究提供可靠依据。

致谢:本研究得到华南师范大学激光生命研究所郭周义教授、贾雅丽老师的协助,特此表示感谢!

参 考 文 献

- 1 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.
- 2 李燕, 角建瓴, 刘承宜, 等. 低强度激光对离体细胞效应的若干新进展. *激光生物学报*, 2003, 12: 67-70.
- 3 Schindl A, Merwald H, Schindl L, et al. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol*, 2003, 148: 334-336.
- 4 何清义, 李起鸿, 许建中, 等. 人关节软骨细胞的永生化及其表型的诱导. *中华创伤杂志*, 2002, 18: 727-731.
- 5 宋卫东, 刘尚礼, 李卫平, 等. 人关节软骨细胞培养法的改良及其特有表型的检测. *中华实验外科杂志*, 2003, 20: 147-148.
- 6 Li ZS, Pan X, Xu GM, et al. Killing effects of cytosine deaminase gene mediated by adenovirus vector on human pancreatic cancer cell lines in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2003, 2: 147-151.
- 7 沈雁, 刘锡麟, 唐毅, 等. 检测人成纤维细胞增殖的 XTT 比色法. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29: 659-662.
- 8 许屏. 荧光和免疫荧光染色技术及应用. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 25-29.
- 9 李文健, 石秉霞, 邵济均, 等. 半导体激光对内皮细胞增殖和胞间粘附分子 1 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, 23: 294-297.
- 10 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: 125-131.
- 11 Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci*, 2003, 18: 95-99.
- 12 Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*, 2001, 29: 179-184.
- 13 Human HO, Basford JR, O'brien JF, et al. Dose low-energy helium-neon laser irradiation alter "in vitro" replication of human fibroblasts? *Lasers Surg Med*, 1988, 8: 125-129.
- 14 Pogrel MA, Chen JW, Zhang K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers Surg Med*, 1997, 20: 426-432.

(修回日期: 2004-09-27)

(本文编辑: 熊芝兰)

· 消息 ·

呼唤伯乐——《中华物理医学与康复杂志》诚聘审稿专家

随着物理医学与康复学科的迅猛发展以及广大读者与作者对《中华物理医学与康复杂志》认知度的不断提升,近年来我刊稿源呈现迅速大幅增长的态势。为了进一步提高审稿质量,加快审稿速度,缩短论文发表时差,提高论文发表时效性,满足广大作者与读者的热切需求,本刊现面向全国诚聘审稿专家。要求如下:

1. 从事物理医学与康复、物理治疗、作业治疗、语言治疗及各相关学科(如神经科、神经外科和骨科等)的高级专业人员(硕士或以上学历,并有正高或副高职称),具有丰富的临床经验和较深的学术造诣,熟知国内、外康复医学或其相关领域的最新理论、最新技术和发展趋势。
2. 精于科学研究和论文写作,并且在本刊或相同级别的其他医学杂志上发表过多篇学术论文。
3. 熟悉学术论文审稿标准,态度严谨、认真、公正,有较充裕的时间和充沛的精力,能按时反馈审稿意见(具备 E-MAIL 审稿条件者更好)。

如果您具备上述条件,同时又愿意用您的慧眼帮助我们发掘物理医学与康复研究领域的千里马,就请填写下面的表格,连同个人简历一份邮寄给我们(邮寄地址:430030 武汉市解放大道 1095 号同济医院内《中华物理医学与康复杂志》编辑部)。一旦入选,即发聘书。

《中华物理医学与康复杂志》审稿专家登记表

姓 名		性 别		身份证号码		职称/职务	
工作单位				通讯地址			
邮政编码			传真/电话			E-mail	
从事专业				研究领域			
是否研究生 导师	是: 否	硕导	博导	外语水平			
目前从事的研究课题:							
审稿情况	能否通过 E-MAIL 审稿:			能	否		
	能否保证及时、高质量审阅稿件:			能	否		
	擅长审阅何种专业领域的稿件:						