

· 基础研究 ·

激光治疗对噻唑酮诱导的溃疡性结肠炎大鼠细胞因子的影响

杜金刚 刘畅格 黄力平 李猛 韩玉山 韩秀娟

【摘要】目的 探讨低能量激光治疗溃疡性结肠炎(UC)的分子机制,观察治疗前、后细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-10(IL-10)变化,为临床治疗提供依据。**方法** 将健康成年雄性 SD 大鼠 30 只分为正常组(6 只)、UC 对照组(8 只)、200 mW 激光治疗组(8 只)和 400 mW 激光治疗组(8 只)。采用改良的噻唑酮致敏法制备大鼠 UC 模型。造模后对 2 个激光治疗组大鼠分别以功率为 200 mW 与 400 mW 的砷铝化镓半导体激光进行治疗,每次照射 10 min,每日 1 次,连续 10 d。治疗后将大鼠处死,酶联免疫吸附分析(ELISA)测定各组大鼠血清和组织匀浆液中 TNF- α 、IL-6、IL-10 的含量。**结果** UC 对照组大鼠与正常组比较,体重显著降低($P < 0.01$),黏液脓血便,血清和结肠组织匀浆中 TNF- α 和 IL-6 含量显著升高($P < 0.05$),IL-10 显著下降($P < 0.01$),造模成功。激光治疗后,大鼠体重和大便性状显著好转;400 mW 激光治疗组血清和结肠组织匀浆中 TNF- α 、IL-6 显著降低($P < 0.01$),IL-10 显著提高($P < 0.05$),接近正常水平;200 mW 激光治疗组血清中 TNF- α 和 IL-6 显著降低($P < 0.05$),结肠组织匀浆中 IL-6 显著降低($P < 0.01$),TNF- α 降低不显著($P > 0.05$),血清和结肠组织匀浆中 IL-10 提高没有达到显著性水平($P > 0.05$)。**结论** 400 mW 砷铝化镓半导体激光能够有效地双向调节噻唑酮诱导的 UC 大鼠细胞因子,减低致炎细胞因子,增加抗炎因子作用,可能是低能量激光治疗 UC 产生较优疗效的机制之一。

【关键词】 溃疡型结肠炎; 激光; 细胞因子

Effects of laser therapy on cytokines in rats with oxazolone induced ulcerative colitis DU Jin-gang*, LIU Chang-ge, HUANG Li-ping, LI Meng, HAN Yu-shan, HAN Xiu-juan. * Department of Rehabilitation Medicine, Tianjin People's Hospital, Tianjin 300121, China

Corresponding author: HUANG Li-ping, Email: hlping36@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects and molecular mechanisms of laser therapy on serum and colon tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) in rats with oxazolone induced ulcerative colitis (UC). **Methods** Thirty adult male SD rats were randomly divided into four groups: a normal group ($n = 6$), a UC model group ($n = 8$), a 400 mW laser treatment group ($n = 8$) and a 200 mW laser treatment group ($n = 8$). Odified oxazolone sensitization was used to induce UC models in the rats. The AsAlGa semiconductor laser used in the treatment had a power of 200 mW or 400 mW. The therapy lasted for 10 days with daily 10 min sessions. The rats were sacrificed after treatment and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure IL-6, IL-10 and TNF- α in serum and ulcer tissues in all groups. **Results** Compared with the normal group, the weights of the UC model rats were significantly lower, and they had severe mucoid bloody stool. TNF- α and IL-6 levels in serum and colon tissues increased significantly and IL-10 decreased significantly, so the UC model was successfully established. After laser treatment, body weight gain and stool moderation in rats were observed. in the 400 mW group, and average TNF- α and IL-6 levels in both serum and colon tissue decreased significantly. IL-10 increased significantly, close to the level of the normal group. In the 200 mW group, serum TNF- α and IL-6 levels were significantly lower, and IL-6 in the colon tissue was reduced significantly. TNF- α did not lessen significantly, and serum and colon tissue IL-10 levels did not improve significantly compared with the model group. **Conclusions** 400 mW AsAlGa semiconductor laser irradiation can effectively regulate cytokines after oxazolone induced UC in rats in two ways. It reduces pro-inflammatory cytokines and increases the level of anti-inflammatory cytokines. This may imply one of the underlying molecular mechanisms of low energy laser treatment of UC.

【Key words】 Ulcerative colitis; Lasers; Cytokines

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.010.007

作者单位:300121 天津,天津市人民医院康复医学科(杜金刚、韩玉山、韩秀娟);天津体育学院健康与运动科学系(刘畅格、黄力平、李猛)

通信作者:黄力平,Email: hlping36@yahoo.com.cn

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称非特异性 UC,是与免疫相关的炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种类型,表现为持续或反复发作的腹泻,黏液脓血便伴腹痛、里急后重等,严重影响

患者的身体健康和日常生活质量。目前对 UC 尚无安全有效的治疗措施,通常是采用药物治疗控制症状。在医学领域中,照射生物组织后不会直接造成该生物组织不可逆损伤的激光称为低能量激光。砷铝化镓半导体激光是低能量激光的一种,它是治疗炎症和疼痛有效的物理因子治疗方法。目前临床上也尝试辅助治疗 UC,并取得较好疗效,但对治疗剂量还处在摸索阶段,没有定论,对其机制研究亦鲜见报道。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 等细胞因子是免疫性炎症反应中的活跃分子,前二者有致炎作用,而后者有抗炎作用。实验研究发现,药物治疗 UC 能有效控制细胞因子异常^[1]。激光治疗是否对这些细胞因子产生影响尚未知。

本研究利用不同治疗剂量激光对 UC 模型大鼠进行治疗,分析治疗前、后血液和结肠组织中细胞因子变化,探讨激光治疗 UC 的机制,并为临床激光治疗 UC 提供实验依据。

材料与方法

一、实验动物与分组

健康成年(10 周龄)雄性 SD 大鼠 30 只,体重(300±20)g,购自北京大学医学部实验动物科学部,适应性饲养 1 周后将其分为正常组(6 只)、UC 对照组(8 只)、200 mW 激光治疗组(8 只)和 400 mW 激光治疗组(8 只)。

二、造模方法

参照改良的噻唑酮致敏法制备大鼠 UC 模型^[1]。用 10% 水合氯醛(0.2 ml/100 g 体重)腹腔注射麻醉大鼠,之后于俯卧位四肢固定于动物操作台,轻轻剪除大鼠颈背部毛约 2 cm×2 cm,不伤及皮肤。噻唑酮(美国 Sigma 公司)配制成 300 μ l 溶液(50 g/L,无水乙醇配制),用 1 ml 注射器吸取溶液滴涂在大鼠除毛部位,使皮肤致敏,缓慢操作,防止溶液外溢于大鼠其他部位。然后分别于第 5 天、第 7 天用直径 1 mm 左右的橡胶管,经肛门插入大鼠结肠内约 7 cm,用噻唑酮溶液 450 μ l(50 g/L,500 ml/L 乙醇配制)各灌肠 1 次,灌肠前 12h 禁食不禁水。为确保灌入的噻唑酮溶液能够在大鼠肠内弥散分布,注入药液后将大鼠尾巴提起,倒置持续 60 s 左右后放回自然体位。分笼喂养

(2 只/笼)并观察记录体重及粪便性状。

三、激光治疗方法

治疗采用砷铝化镓半导体激光器(SUNDOM-300IB 型,北京产),激光波长 810 nm,输出功率为 0~500 mW 可调,出口处光斑直径不大于 10 mm,光束发散角: $\Phi_x=0.26\text{rad}$, $\Phi_y=0.78\text{rad}$ 。2 个激光治疗组大鼠腹部行剪毛处理,避免因激光反射而造成的能量衰减。用 10% 水合氯醛(0.2 ml/100 g 体重)腹腔注射麻醉,于仰卧位四肢固定于动物操作台,剪除大鼠腹部毛发至皮肤完全裸露。在腹部剪毛部位,进行激光照射。调整激光探头距离大鼠腹部约 4 cm,激光照射结肠映射在体表的剪毛区,面积 2.5 cm²。2 个激光治疗组所用照射功率分别为 200 mW 和 400 mW。每日激光照射 10 min,1 次/d,连续 10 d。UC 对照组大鼠每日仰卧位固定于操作台 10 min,不进行激光治疗。在治疗期间,正常组无死亡,UC 对照组中途死亡 1 只,200 mW 激光治疗组中途死亡 2 只,400 mW 激光治疗组无死亡。大鼠处理流程见图 1。

四、血清和组织匀浆制备与细胞因子检测

治疗结束后 24 h,用 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g 体重)腹腔注射麻醉大鼠,开腹,腹主动脉取血。于 4℃ 静置 2 h 后离心,3500 转/min,10 min,取上清液,分装,置于 -20℃ 保存待测各炎症细胞因子。处死动物后,分离结肠,沿肠系膜缘剪开肠腔,冷生理盐水冲洗粪便,然后用滤纸吸干,于结肠中下段选择炎症严重部位切取长为 1 cm 左右组织,迅速称重加冷生理盐水置于匀浆机,制成 20% 的结肠组织匀浆液。然后再离心,4℃ 下,5000 转/min,15 min,取上清液,分装,置于 -20℃ 保存待测。测定方法为酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),严格按照试剂盒(美国 R&D 公司)说明书操作,分别测定大鼠血清及结肠组织匀浆上清液 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的含量。

五、统计学分析

采用 SPSS 16.0 版软件进行数据分析。组间两两比较采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、激光治疗对噻唑酮诱导的 UC 大鼠体重、粪便性状的影响

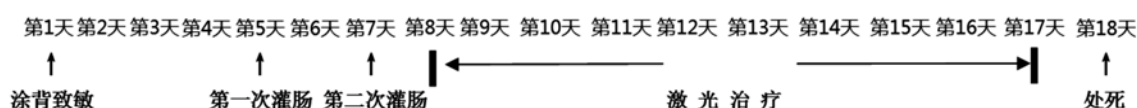


图 1 大鼠处理流程

UC 对照组大鼠体重均较正常组显著降低 ($P < 0.01$), 400 mW 激光治疗组体重较 UC 对照组显著增加 ($P < 0.05$), 200 mW 激光治疗组体重同样有所增加, 但与 UC 对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 2 个激光治疗组大鼠体重仍低于正常组 ($P < 0.01$), 见表 1。正常组大鼠大便性状为成型干软便。UC 对照组大鼠先排黏液脓血便, 5 d 左右后排稀水样便, 又持续 1 周左右后排稀软便, 以黏液便为主, 持续 15 d 左右, 少数一直为稀水样便。2 个激光治疗组在治疗 4~5 d 后大便由黏液脓血便转变为稀软便, 治疗 6~8 d 后排便基本正常, 2 组间无明显不同。

二、激光治疗对噻唑酮诱导的 UC 大鼠血清 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量的影响

UC 对照组大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 含量比正常组均显著升高 (分别是 $P < 0.05$, $P < 0.01$); 200 mW 及 400 mW 激光治疗组大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 含量较 UC 对照组显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且 2 个激光治疗组大鼠血清 TNF- α 已基本恢复至正常组水平 ($P > 0.05$); UC 对照组大鼠血清 IL-10 含量较正常组显著降低 ($P < 0.01$), 400 mW 激光治疗组血清 IL-10 含量较 UC 对照组显著升高 ($P < 0.05$), 且基本恢复至正常组水平 ($P > 0.05$), 而 200 mW 激光治疗组血清 IL-10 含量与 UC 对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 400 mW 激光治疗组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量与 200 mW 激光治疗组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

三、激光治疗对噻唑酮诱导的 UC 大鼠结肠组织匀浆液 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量的影响

UC 对照组大鼠结肠组织匀浆液 TNF- α 和 IL-6 含量较正常组均显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$); 2 个激光治疗组大鼠结肠组织匀浆液 IL-6 含量较 UC 模型组均显著下降 ($P < 0.01$, $P < 0.01$); 400 mW 激光治疗组 TNF- α 含量较 UC 模型组显著降低 ($P < 0.01$), 基本恢复至正常水平, 与正常组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 200 mW 激光治疗组 TNF- α 含量与 UC 模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); UC 对照组大鼠结肠组织匀浆液 IL-10 含量较正常组显著降低 ($P < 0.01$), 400 mW 激光治疗组 IL-10 含量较 UC 对照组显著升高 ($P < 0.01$), 基本恢复至正常水平 ($P > 0.05$),

而 200 mW 激光治疗组 IL-10 含量与 UC 对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 400 mW 激光治疗组大鼠结肠组织匀浆液 TNF- α 和 IL-10 含量与 200 mW 激光治疗组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 IL-6 的含量差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 200 mW 激光治疗组显著高于 400 mW 激光治疗组, 见表 1。

讨 论

UC 是一种原因不明的慢性非特异性肠道疾病, 多数学者认为其可能与遗传易感性相关, 而免疫功能调节紊乱是发病机制的关键, 肠道菌群失调是这种免疫损伤过程的重要诱发因素^[2]。噻唑酮是一种半抗原, 已证实其用于动物身体的各个部位均可诱发接触性过敏反应。国内外均有研究显示, 噻唑酮诱导的结肠炎模型, 其组织学特征和炎症分布均类似于人类 UC, 并且此模型细胞因子属性对研究人类疾病的发病机制及治疗具有重要的意义^[3]。

目前 UC 患者的治疗主要采用氨基水杨酸制剂、糖皮质激素和免疫抑制剂等。UC 患者通常需要长期用药, 停止或间断用药会造成症状加重, 然而长期服药副作用较多且效果不佳。激光作为一种辅助治疗手段, 已有文献报道取得一定的临床疗效, He-Ne 激光照射治疗对单纯慢性结肠炎患者具有解痉镇痛、收敛止泻等作用^[4]。在细胞学水平, 低能量激光治疗可在生理及病理条件下激活纤维母细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等, 还可对血管及淋巴管内皮细胞起刺激作用, 增加淋巴管的直径及其流量, 并能通过降低前列腺素的合成, 发挥抗炎及抗水肿的效果^[5]。实验发现, 使用波长 830 nm 的砷铝化镓半导体激光直接照射部分游离体外的大鼠肠系膜可使肠系膜局部小动脉直径增大, 微循环改善明显。血管交感神经在控制小动脉收缩机制中起重要作用, 而低能量激光照射减弱了感觉神经后根的神经过传导^[6]。本研究中激光作用深度完全可以抵达大鼠结肠区域, 所以推测其可能对腹壁和结肠的神经血管都有一定的调节作用。研究发现, 细胞因子在肠道免疫反应中起着关键性作用, 在时间及空间上细胞因子对炎症性肠病的发生发展及恶化进行着调控^[7]。目前对于激光治疗炎症性肠病中细胞

表 1 4 组大鼠体重、血清和结肠组织匀浆液 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	体重 (g)	血清 (pg/ml)			结肠组织匀浆液 (pg/ml)		
			TNF- α	IL-6	IL-10	TNF- α	IL-6	IL-10
正常组	6	339.58 $\pm$ 10.29	368.07 $\pm$ 53.28	47.35 $\pm$ 0.21	12.27 $\pm$ 1.59	1709.3 $\pm$ 311.09	338.25 $\pm$ 20.43	101.67 $\pm$ 2.94
UC 对照组	7	242.48 $\pm$ 13.18 ^a	434.46 $\pm$ 14.08 ^b	55.37 $\pm$ 0.73 ^a	9.51 $\pm$ 0.76 ^a	2606.6 $\pm$ 234.09 ^a	680.07 $\pm$ 8.00 ^a	77.86 $\pm$ 8.86 ^a
200 mW 治疗组	6	266.47 $\pm$ 26.12 ^a	376.85 $\pm$ 34.02 ^d	51.78 $\pm$ 2.76 ^{ac}	10.87 $\pm$ 2.78	2165.9 $\pm$ 592.78	657.25 $\pm$ 7.87 ^{ad}	80.83 $\pm$ 16.33
400 mW 治疗组	8	268.07 $\pm$ 21.45 ^{ac}	361.78 $\pm$ 17.74 ^d	51.30 $\pm$ 2.73 ^{ad}	11.23 $\pm$ 1.78 ^c	1885.4 $\pm$ 403.46 ^d	600.25 $\pm$ 52.68 ^{ade}	95.62 $\pm$ 8.24 ^d

注: 与正常组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与 UC 对照组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与 200 mW 激光治疗组比较, ^e $P < 0.05$

因子作用的研究报道较少。本研究发现,砷铝化镓半导体激光体外照射 UC 大鼠的结肠区,能够显著改善动物症状,促进恢复大便正常性状,提高体重,有较为显著的疗效。

IL-6 主要由单核巨噬细胞产生,有广泛的促炎作用。McCormack 等^[8]发现,炎症性肠病患者结肠黏膜组织中 IL-6、TNF- α 含量显著升高,疾病炎症表现与致炎细胞因子的高表达相关。本实验中,UC 对照组血清和结肠组织匀浆液致炎性细胞因子 IL-6 的表达均显著升高,经 200 mW 或 400 mW 激光治疗后,均显著下降。说明激光治疗能有效降低 IL-6 的表达,减轻炎症反应。这可能是激光治疗 UC 的分子作用机制之一。

TNF- α 主要由单核巨噬细胞和 T 细胞产生,它可通过进一步诱导单核巨噬细胞等分泌 IL-6、L-1 β 等炎性介质发挥致炎作用,在 IL-6 的协同下,TNF- α 诱导凝血酶形成,导致黏膜微循环障碍,进一步减弱了肠道黏膜的屏障保护功能^[7]。临床研究发现,活动期 UC 患者血清 TNF- α 和 IL-6 水平与病情严重程度呈正相关,它们相互协同在疾病的发生发展中起到重要的作用^[9]。本实验中,UC 对照组大鼠血清和结肠组织匀浆液致炎细胞因子 TNF- α 的含量较正常组大鼠显著升高,说明 TNF- α 是伴 UC 高度表达的致炎因子,这与人类 UC 中 TNF- α 的异常高度表达相一致^[9]。经 400 mW 激光治疗后,血清和组织中 TNF- α 的过度表达被显著下调,含量基本降至正常水平。经 200 mW 激光治疗后,血清 TNF- α 的含量较 UC 对照组显著下降,但结肠组织匀浆液 TNF- α 的含量较 UC 对照组并未达到显著性降低。理论上,低能量激光照射可诱导血管扩张、胶原合成及增加组织的氧合作用,从而被推荐用于组织修复等局部反应^[10]。当局部免疫失衡得到调节时可以通过血液及淋巴循环影响全身反应。本实验中低能量激光治疗对免疫循环的全身调节亦突出,这可能与激光照射的治疗周期和剂量等相关。Aimbire 等^[11]报道,低能量激光治疗能显著降低免疫炎症反应中 TNF- α 的含量,但成功的疗效取决于激光波长和剂量等相关因素。本实验结果表明,400 mW 激光治疗能够有效降低 TNF- α 的表达且效果优于 200 mW。

IL-10 为多效性抗炎细胞因子,又名细胞因子合成抑制因子,主要由 Th2 细胞、单核巨噬细胞产生。它是一种重要的负向调节细胞因子,对免疫炎症反应过程中的很多环节均有阻止作用,具有广泛的免疫抑制特性。同时,它可以抑制抗原提呈及致炎细胞因子的释放,从而减弱黏膜免疫炎症反应^[7]。研究发现,IL-10 可以诱导 CD4⁺ T 细胞子集 (Tr1) 的产生,下调活化的免疫反应,动物体内实验中能抑制炎症性肠病的发展^[12]。本研究发现,UC 对照组血清和结肠组织匀浆

液 IL-10 含量明显低于正常组,400 mW 激光治疗组经 400 mW 激光治疗后,血清和结肠组织匀浆液 IL-10 的表达均明显上调且接近正常水平。而 200 mW 激光治疗组血清和结肠组织匀浆液 IL-10 含量均不能有效提高,其与 UC 对照组比较差异无统计学意义。表明 400 mW 激光剂量有降低致炎因子和激活抗炎因子的双向有益调节作用,而 200 mW 仅能降低致炎因子,不足以有效激发抗炎因子活化,可能是 400 mW 疗效较好的原因之一。本实验研究中 400 mW 的激光治疗在人体安全剂量范围内,可供临床治疗参考。

总之,400 mW 砷铝化镓半导体激光能够有效地双向调节噁唑酮诱导的 UC 大鼠细胞因子,减低致炎细胞因子,增加抗炎因子作用,可能是低能量激光治疗 UC 产生较优疗效的机制之一。

参 考 文 献

- [1] Zhang HQ, Ding TT, Zhao JS, et al. Therapeutic effects of clostridium butyricum on experimental colitis induced by oxazolone in rats. *World J Gastroenterol*, 2009, 15: 1821-1828.
- [2] Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, et al. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 1646-1656.
- [3] Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, et al. Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med*, 1998, 188: 1929-1939.
- [4] 卞学平, 王利军, 刘永连, 等. 氦-氖激光穴位照射治疗单纯慢性结肠炎. *中华理疗杂志*, 1990, 13: 27-29.
- [5] Kozanoglu E, Basaran S, Paydas S, et al. Efficacy of pneumatic compression and low-level laser therapy in the treatment of postmastectomy lymphedema: a randomized controlled trial. *Clin Rehabil*, 2009, 23: 117-124.
- [6] Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, et al. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg Med*, 2000, 27: 427-437.
- [7] Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2008, 14: 4280-4288.
- [8] McCormack G, Moriarty D, O'Donoghue DP, et al. Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res*, 2001, 50: 491-495.
- [9] 卢艺涛, 高静, 姚桂琴. 溃疡性结肠炎患者相关细胞因子的实验性研究. *现代预防医学*, 2005, 32: 735-736.
- [10] Ihsan FR. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg*, 2005, 23: 289-294.
- [11] Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF α levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg*, 2006, 24: 33-37.
- [12] Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 278: G829-G833.

(修回日期: 2011-07-11)

(本文编辑: 松 明)