

· 基础研究 ·

蓝紫光照射对烧伤大鼠免疫功能的影响

李凤敏 马健 王伟 王铮 强茹玲 周淑梅

【摘要】目的 研究蓝紫光照射对烧伤大鼠免疫功能的影响。方法 将 48 只大鼠随机分为正常对照组、烧伤对照组及烧伤蓝紫光照射治疗组(治疗组),在烧伤对照组及烧伤蓝紫光组背部皮肤造成大鼠体表面积(BSA)20%深Ⅱ度烧伤模型,并用蓝紫光对治疗组进行照射。测定烧伤后 3 d、12 d 腹腔吞噬细胞吞噬活性、血清免疫球蛋白含量及肿瘤坏死因子细胞毒性的变化。结果 蓝紫光照射可以显著提高烧伤大鼠腹腔吞噬细胞的吞噬能力,并可提高烧伤大鼠血清 IgA 含量及调节血清中的 TNF 水平。结论 蓝紫光照射可通过提高大鼠腹腔吞噬细胞的吞噬能力、调节 B-细胞功能、TNF 水平来提高机体免疫力,从而促进烧伤创面的愈合。

【关键词】蓝紫光; 大鼠; 烧伤; 免疫

Effects of blue-purple light irradiation on the immune function in burned rats LI Feng-min*, MA Jian, WANG Wei, WANG Zheng, QIANG Ru-ling, ZHOU Shu-mei. * Department of Rehabilitation, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

【Abstract】Objective To elucidate the effects of blue-purple light (BPL) irradiation on the immune function of burned rats. Methods 48 adult Wistar rats were randomly divided into the BPL treatment group, burn control group, and normal control group after replicating 20% BSA deep partial thickness burn models of rats. Changes in phagocytic index, phagocytic rate, level of serum immunoglobulin A, G, M and TNF from 3rd day and 12th day after the burn were measured. Results After irradiation of BPL, the phagocytic index, phagocytic rate and level of serum immunoglobulin A, G, M in burned rats were increased when compared with those of the control group. The level of serum TNF post-irradiation was higher than that of the normal control and lower than that of the burn control. Conclusion The study suggested that BPL irradiation could improve immune function in burned rats.

【Key words】Blue-purple light(BPL); Rat; Burn; Immune function

随着科学技术的进步,新的激光种类不断被开发出来用于临床治疗。近年来我科引进了天津激光研究所最新研制的蓝紫光治疗仪,临床主要用于难愈的皮肤溃疡、软组织损伤及类风湿性关节炎等病的治疗,并取得了较好的疗效,但国内、外尚未见相关研究报道。我们以往的实验曾证实^[1,2],蓝紫光照射对大鼠烧伤创面愈合有促进作用。许多研究表明,机体免疫功能与烧伤后感染、创面愈合有极大关系。本实验初步研究了蓝紫光照射对烧伤大鼠免疫功能影响,并探讨了其可能机制。

材料和方法

一、动物分组及造模

雄性 Wistar 大鼠 48 只、体重 180 ~ 210 g,由军事医学科学院四所提供,分笼饲养,水及饲料自由摄入,随机分为正常对照组、烧伤对照组及烧伤蓝紫光照射

治疗组(治疗组),每组 16 只。

向大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(35 mg/kg 体重)麻醉,并在大鼠背部用 8% 硫化钠脱毛。烧伤对照组及治疗组大鼠按纳氏公式计算大鼠体表面积(BSA), $BSA(\text{cm}^2) = 9.13 \times W^{2/3}$,用 3% 凝固汽油致 20% BSA 深Ⅱ度烧伤^[3]。

二、试剂、仪器及照射方法

免疫球蛋白测定试剂盒为上海太阳生物技术公司生产,其余试剂均为国产分析纯。分光光度计为日本岛津(SHIMADZU)公司产 UV-1206 型。酶标仪为南京产 DG-3022a 型。

蓝紫光治疗仪为天津产 LB-40 型,其输出光波长范围为 380 ~ 460 nm,峰值为 410 nm,输出功率 40 mW。照射方法为自烧伤后第 1 天开始照射,每天 1 次,每次 10 min,连续 12 d。照射距离 8 cm,光斑直径约 65 mm,每次照射剂量 0.72 J/cm²。

三、腹腔吞噬细胞吞噬率、吞噬指数测定

腹腔吞噬细胞吞噬率、吞噬指数的测定参照文献[4],每组取 8 只大鼠分别于伤后第 3 和第 12 天进行。

吞噬率 = (100 个吞噬细胞中吞噬鸡 RBC 的吞噬细胞数/100 个吞噬细胞) × 100

基金课题:天津医科大学总医院青年基金资助项目(No. 9835)

作者单位:300052 天津,天津医科大学总医院康复科(李凤敏、王伟、王铮、周淑梅);新疆体育局摔跤管理中心卫生室(马健);天津市激光技术研究所(强茹玲)

吞噬指数 = 100 个吞噬细胞吞噬的鸡 RBC 总数 / 100 个吞噬细胞

四、免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 及肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 的测定

每组取 8 只大鼠分别于伤后第 3 和第 12 天, 无菌条件下行心脏穿刺采血, 3 000 r/min 离心 10 min, 无菌操作取血清, 冻存于 -35℃, 待测免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 及 TNF。

按照免疫球蛋白测定试剂盒说明书, 采用免疫浊度法进行免疫球蛋白含量测定。

TNF 的测定参照文献[5]进行。TNF 特异性杀伤靶细胞株 L₉₂₉, 通过检测剩余活细胞数量, 可计算 TNF 的细胞毒性^[6]。以无样品细胞悬液孔为对照光密度 (optical density, OD) 值, 用 DG-3022a 型酶标仪测 OD_{570 nm}。

五、统计学分析

实验结果均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 除吞噬率 (为百分数) 数据先经平方根反正弦转换后进行 *t* 检验外, 其余均直接采用 *t* 检验进行处理。

结 果

一、烧伤大鼠腹腔吞噬细胞吞噬率、吞噬指数的变化

与正常对照组比较, 烧伤后 3 d 烧伤对照组、治疗组大鼠腹腔吞噬细胞吞噬率分别降低 27.3% 和 11.9% ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而治疗组较烧伤对照组显著提高 ($P < 0.01$); 与正常对照组比较, 烧伤后 12 d 烧伤对照组腹腔吞噬细胞吞噬率明显降低 ($P < 0.05$), 而治疗组差异则无统计学意义 ($P > 0.05$)。

与正常对照组比较, 烧伤后 3 d 烧伤对照组、治疗组大鼠腹腔吞噬细胞吞噬指数均有不同程度降低 ($P < 0.01$), 而治疗组较烧伤对照组有显著提高 ($P < 0.05$); 与正常对照组比较, 烧伤后 12 d 烧伤对照组及治疗组分别降低 26.8%、15.1% ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 与烧伤对照组比较, 治疗组明显提高 ($P < 0.05$); 与烧伤后 3 d 比较, 烧伤后 12 d 烧伤对照组吞噬细胞吞噬指数明显提高, 治疗组亦然 ($P < 0.05$), 详见表 1。

二、烧伤大鼠血清免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 含量的变化

烧伤后 3 d, 烧伤对照组大鼠血清 IgA 含量较正常

对照组有所降低, 但治疗组与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 烧伤后 12 d 各组之间血清 IgA 含量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 较烧伤后 3 d, 烧伤后 12 d 烧伤对照组血清 IgA 提高非常显著 ($P < 0.01$), 治疗组亦然 ($P < 0.05$)。

烧伤后 3 和 12 d 烧伤对照组、治疗组大鼠血清 IgG、IgM 含量较正常对照组均有明显降低 ($P < 0.01$); 与烧伤对照组比较, 治疗组大鼠血清 IgG、IgM 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与烧伤后 3 d 的同一组数据比较, 烧伤后 12 d 的血清 IgG、IgM 含量均无恢复迹象 (表 2)。

三、烧伤大鼠血清 TNF 细胞毒性的变化

烧伤后 3 d 与正常对照组比较, 烧伤对照组、治疗组大鼠血清 TNF 细胞毒性均有不同程度的升高 ($P < 0.01$), 而较烧伤对照组, 治疗组大鼠血清 TNF 细胞毒性明显降低 ($P < 0.01$); 与正常对照组比较, 烧伤后 12 d 烧伤对照组及治疗组血清 TNF 细胞毒性分别升高 67.1%、19.2% ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而与烧伤对照组比较, 治疗组血清 TNF 明显降低 ($P < 0.01$, 见图 1)。

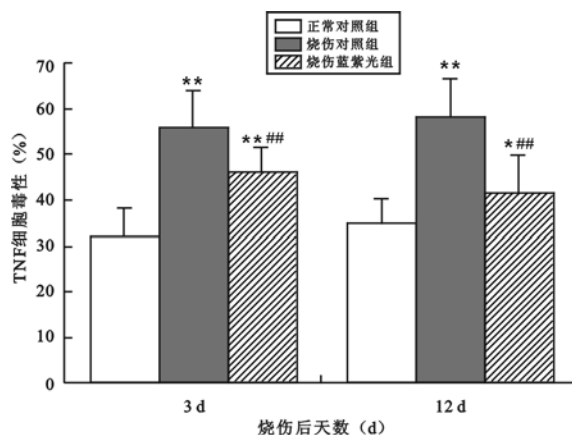


图 1 烧伤大鼠血清 TNF 细胞毒性的变化 ($n = 8$)

注: * 与正常对照组比较, $P < 0.05$; ** 与正常对照组比较, $P < 0.01$; ## 与烧伤对照组比较, $P < 0.01$

表 1 烧伤大鼠腹腔吞噬细胞吞噬率、吞噬指数的变化 ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	吞噬细胞吞噬率 (%)		吞噬细胞吞噬指数	
	3 d	12 d	3 d	12 d
正常对照组	86.2 ± 12.3	85.7 ± 12.1	1.82 ± 0.31	1.79 ± 0.33
烧伤对照组	62.7 ± 9.4**	74.3 ± 11.5*	1.07 ± 0.19**	1.31 ± 0.88**
治疗组	75.9 ± 10.3**##	79.8 ± 10.9	1.28 ± 0.25**#	1.52 ± 0.27**

注: * 与正常对照组比较, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; # 与烧伤对照组比较, $P < 0.05$; ## $P < 0.01$

表 2 烧伤大鼠血清免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 含量的变化 ($n = 8$, g/L, $\bar{x} \pm s$)

组 别	IgA		IgG		IgM	
	3 d	12 d	3 d	12 d	3 d	12 d
正常对照组	0.509 ± 0.113	0.515 ± 0.097	4.952 ± 1.037	5.103 ± 1.226	0.462 ± 0.101	0.486 ± 0.094
烧伤对照组	0.414 ± 0.076*	0.517 ± 0.074	3.438 ± 0.831**	3.264 ± 0.842**	0.339 ± 0.071**	0.354 ± 0.069**
治疗组	0.432 ± 0.081	0.510 ± 0.069	3.301 ± 0.764**	3.526 ± 0.771**	0.340 ± 0.057**	0.329 ± 0.072**

注: * 与正常对照组比较, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

讨 论

低能量激光在临床的应用远超过实验研究,已证明其有调节机体免疫功能的作用。

蓝紫光是激光的一种。我们以往的实验曾证实:蓝紫光照射可刺激大鼠烧伤皮肤肉芽组织再生,提高其腹腔巨噬细胞的吞噬能力,从而加速伤口愈合^[1,2]。

创面愈合是复杂的生物化学和细胞学过程,也是免疫细胞参与和调节的过程^[7,8]。本文实验结果表明,烧伤 3 d 后大鼠腹腔吞噬细胞的吞噬率及吞噬指数明显降低,烧伤后 12 d,蓝紫光照射腹腔吞噬细胞的吞噬率及吞噬指数已基本恢复,说明蓝紫光照射可提高大鼠腹腔吞噬细胞的吞噬能力。

有学者研究表明,低能量激光可通过影响免疫细胞的细胞膜及胞内结构等发挥其免疫调节效应^[9]。另有研究表明,氦氖(He-Ne)激光照射小鼠神阙穴后可导致巨噬细胞的超微结构呈活化状态^[10]。但有关蓝紫光照射提高大鼠腹腔吞噬细胞吞噬能力的机制仍有待进一步研究。

烧伤 3 d 后血清中 IgA、IgG 及 IgM 含量明显下降,但经蓝紫光照射治疗后,IgA 在烧伤后第 3 天即已恢复正常,而烧伤 12 d 后 IgG、IgM 仍低于正常对照组水平。说明烧伤影响 B 细胞功能,蓝紫光照射可以通过调节 B-细胞而影响机体免疫功能。

TNF 主要是由外周单核细胞和组织中的巨噬细胞产生的细胞因子,具有广泛的生物学活性。根据其浓度、结合受体的不同,可以产生促进或抑制细胞生长的双重作用。烧伤后 12 d,TNF 浓度持续、明显升高,可能是由于烧伤后机体大部分器官 TNF mRNA 水平升高,翻译相对明显加强所致。但 TNF 的过度升高,不但抑制脂蛋白酶和乙酰辅酶 A 羧化酶的活性,使脂肪酸合成降低,抑制内皮细胞的增殖、甚至产生杀伤作用,从而影响烧伤创面愈合,并预示烧伤程度更加严重,预后较差^[11-13]。另有研究证实,低剂量 TNF 可明显增加鼠背部创伤肉芽组织中总蛋白、DNA、羟脯氨酸含量^[14],小剂量 rTNF- α 可使脓毒症感染发生率下降、动物存活率增加^[15]。因此我们推测,蓝紫光照射降低过高的 TNF 水平对促进伤口愈合是有积极意义的。

免疫功能对创面的影响主要表现为免疫细胞在创伤局部的调控作用。已有研究证实,创面上激活的巨噬细胞、中性粒细胞及 T 细胞等通过分泌各种细胞因子促进或抑制表皮细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞的增殖,由此影响创面的愈合^[16]。

关于免疫细胞及细胞因子之间的相互作用,有研究表明,IL-2 通过巨噬细胞表面表达的高亲和力 IL-2 受体作用于巨噬细胞,而巨噬细胞内 NF- κ B 途径参与

TNF- α 表达的调控,TNF 又参与活化吞噬细胞和自然杀伤细胞,增加其趋化性,向创伤处游走^[17]。由于机体的免疫调控网络错综复杂,有关蓝紫光照射对免疫细胞及细胞因子之间相互作用的影响仍有待进一步研究探讨。

总之,结合我们以往的实验结果^[1,2],可以证实蓝紫光照射可通过提高大鼠腹腔吞噬细胞的吞噬能力、调节 B-细胞功能和 TNF 水平来提高机体免疫力,对创面愈合产生积极的促进作用。

参 考 文 献

- 1 李凤敏,王伟,王铮,等. 蓝紫光对大鼠皮肤伤口及烧伤愈合的影响. 中华理疗杂志,2001,24:294-295.
- 2 李凤敏,马健,王伟,等. 蓝紫光和毫米波照射对大鼠皮肤伤口及烧伤愈合的影响. 中国康复,2001,16:132-134.
- 3 施新猷,主编. 医学动物实验方法. 北京:人民卫生出版社,1980. 245,447.
- 4 王先远,金宏,许志勤,等. 精氨酸对烧伤大鼠免疫功能的影响. 氨基酸与生物资源,1998,20:1-5.
- 5 Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Method,1989,119: 203-210.
- 6 Flick DA, Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. J Immunol Method,1984,68: 167-175.
- 7 陈玉林,方勇,衣承东,等. 细胞免疫与烧伤创面愈合的实验研究. 中华整形烧伤外科杂志,1997,13:326-329.
- 8 Schwacha MG, Chaudry IH. The cellular basis of post-burn immunosuppression; macrophages and mediators. Int J Mol Med,2002,10: 239-243.
- 9 孙星炯. 低能量激光照射的免疫调节效应. 国外医学物理医学与康复学分册,1999,19:75-78.
- 10 任明姬,王宇一,崔明玉,等. 氦氖激光照射对小鼠腹腔巨噬细胞超微结构的影响. 内蒙古医学院学报,2000,22:238-240.
- 11 Yuan JC, Xiao GX, Qing XJ, et al. Early expression of tumor necrosis factor mRNA in rat visceral organs after burn. Proceedings of the Third Sino-American Conference on Burn and Trauma,1993. 92.
- 12 高潮,王润田,刘殿武. 烧伤小鼠巨噬细胞功能变化及中药黄芪对其影响的研究. 细胞与分子免疫学杂志,2001,17:454.
- 13 李利平,丁腊春,段非交,等. 严重烧伤病人 TNF- α 和 TNFR I、II 水平测定的临床意义. 中国烧伤创疡杂志,2001,13:159-161.
- 14 Steenfors HH, Hunt TK, Scheuenstuhl H, et al. Selective effects of TNF-alpha on wound healing in rats. Surgery,1989,106: 171-175.
- 15 林峰,杨雁,张载福. 大鼠血浆 TNF- α 的测定以及小剂量 rTNF- α 对感染的大鼠保护作用. 安徽医科大学学报,2001,36:441-444.
- 16 Barbul A. Immune aspects of wound repair. Clin Plast Surg,1990,17: 433-442.
- 17 王勇,黄文华,彭代智,等. 严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞 NF- κ B、I κ B- α 、TNF- α 的变化及调控. 第三军医大学学报,2001,23:1153-1156.

(收稿日期:2003-03-31)

(本文编辑:熊芝兰)