

· 基础研究 ·

红光激光对内皮细胞一氧化氮分泌及表达的影响

李文健 王亚男 郭云良 石秉霞

【摘要】目的 研究红光激光对血管内皮细胞一氧化氮(NO)分泌及表达的影响。**方法** 应用红光激光分别照射体外培养的血管内皮细胞 10 min、20 min 和 30 min 后,分别于照射后 15 min、30 min、1 h、3 h 和 6 h 检测培养上清液中 NO 的含量,并应用免疫组化方法检测内皮细胞内诱生型一氧化氮合酶(iNOS)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的表达。**结果** 2 mW 红光激光分别照射 10 min、20 min、30 min 可使内皮细胞内 eNOS 表达增强,分泌 NO 水平上升,并于 1 h 后达峰值,随后逐渐降低,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其中照射 30 min 组作用最明显;红光激光照射对内皮细胞内 iNOS 的表达各组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 红光激光可通过增强内皮细胞内 eNOS 的表达来促进 NO 的分泌;红光激光对内皮细胞内 iNOS 的表达无明显影响。

【关键词】 激光; 内皮细胞; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

The effects of red laser irradiation on endothelial cells secreting and expressing nitric oxide Li Wen-jian*, WANG Ya-nan, GUO Yun-liang, SHI Bing-xia. * Department of Emergency Neurology, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China

【Abstract】Objective To observe endothelial cells secreting and expressing nitric oxide by using red laser irradiation (RLI) on cultured endothelial cells. **Methods** Cultured endothelial cells were irradiated with a red laser for 10, 20, and 30 minutes, respectively, and the concentration of nitric oxide in the cell supernatant was measured after 15 min, 30 min, 1 h, 3 h and 6 h. In addition, the expression of inducible nitric oxide synthetase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) was measured through immunohistochemical staining. **Results** Compared with that in the control group, the expression of eNOS by the endothelial cells and the concentration of NO were stimulated by 2 mW RLI for 10 min, 20 min and 30 min, and reached a peak at 1 h, then declined gradually. The expression of iNOS, however, showed no significant difference. **Conclusion** RLI can increase NO concentrations in endothelial cells by stimulating the expression of eNOS rather than iNOS.

【Key words】 Lasers; Endothelial cells; Nitric oxide; Nitric oxide synthesis

近十年来,对血管内皮细胞的研究有很大进展,并引起极大关注。血管内皮细胞不仅是机体内重要的屏障和半透膜,而且具有重要的代谢和内分泌功能,通过合成和分泌某些血管活性物质及细胞生长因子调节血管张力、维持血压及防止血栓形成,并参与心脑血管疾病的病理生理过程。一氧化氮(nitric oxide, NO)是内皮细胞分泌的活性物质之一,具有舒张血管、抑制血管平滑肌增殖、抗血小板聚集和抗血栓形成的作用^[1]。本研究采用 Wistar 大鼠腹主动脉的血管内皮细胞体外培养方法,用红光激光对其进行照射,观察红光激光对内皮细胞一氧化氮合酶(nitric oxide synthetase, NOS)表达以及分泌 NO 的影响。

材料与方法

一、主要试剂和仪器

作者单位:266003 青岛,青岛大学医学院附属医院急诊神经科(李文健、王亚男),脑血管病研究所(郭云良、石秉霞)

1. 主要试剂:M199 培养基、胎牛血清均由 GIBCO 公司提供;兔抗人Ⅷ因子相关抗原抗血清、荧光标记羊抗兔 IgG、正常兔 IgG、NO 试剂盒为深圳晶美生物工程有限公司产品;抗诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthetase, iNOS)抗体、抗内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthetase, eNOS)抗体、链酶亲和素-生物素-过氧化酶复合物(streptavidin-biotin-peroxidase complex, SABC)试剂盒及二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色剂均购自武汉博士德生物公司。

2. 主要仪器:FSI 公司生产的 3111 型水套式二氧化碳培养箱;Olympus 公司生产的 IX70 型倒置荧光显微镜;Bio-Rad550 型酶标仪;NY-1 型半导体激光保健治疗仪,输出功率 5 mW,波长 670 nm,为红光激光。

二、实验过程

1. 内皮细胞培养:用体重为 (180 ± 20) g 的健康 Wistar 大鼠,雌雄不限,取腹主动脉,以组织贴块法进

行内皮细胞的原代培养。经Ⅷ因子抗体免疫组化法鉴定后证实为内皮细胞^[2,3]。

2. 实验分组:取出一内皮细胞已长成片的培养瓶,进行消化后加入含 10% 胎牛血清的 M199 培养基 10 ml,计数后稀释成 1×10^4 个/100 μ l 的浓度。分别接种到 3 块 48 孔培养板中,每板加 24 孔,每孔 100 μ l,每 6 孔为一组,共 4 组,其中 1 组为对照组,采用模拟光照,余下为光照组。接种后放入培养箱中,待细胞长成单层后,用 3 mW 的红光激光照射,分别为照射 10 min、20 min、30 min 组,照射距离为 2 cm,光斑直径为 1 cm,照射时激光头紧贴培养板盖,实验前用光功率计测得培养板盖的透光率为 70%,因此,3 mW 红光激光透过玻璃培养板盖的实际功率为 2 mW^[4]。

3. 培养上清液的收集:每组照射结束后,加 M199 培养基 1 ml,继续培养。分别于照射结束后 15 min、30 min、1 h、3 h、6 h 取上清液 0.9 ml, -80℃ 保存,成批检测,同时对每孔活细胞(台盼蓝染色)进行计数。

4. 免疫组化细胞的收集处理:按上述步骤处理的细胞,经消化后收集各对照组细胞,参考文献[5,6]的方法进行固定、包埋、常规切片,供免疫组化使用。

5. NO 的测定:NO 检测采用酶法,操作步骤按说明书进行,检测结果换算成每 10^5 个细胞所分泌 NO 的量。

6. NOS 表达的检测:常规组织切片,进行免疫细胞化学染色,一抗分别为 iNOS 抗体(1:150 稀释)和 eNOS 抗体(1:150 稀释),二抗为生物素化山羊抗人 IgG,DAB 显色,苏木素轻度复染。阴性对照片,一抗为磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)。随机选取 10~15 个视野,每片记取 200 个细胞,并根据反应强度,将其分为 5 个等级(-, ±, +, ++, +++)进行分类计数。

三、统计学分析

数据以($\bar{x} \pm s$)表示,进行方差分析,NOS 的表达情况按等级资料进行统计分析,采用 SPSS 11.0 版统计分析软件进行统计分析。

结 果

一、红光激光对内皮细胞分泌 NO 的影响

激光照射后 15 min,各光照组内皮细胞分泌水平较对照组明显升高($P < 0.01$);激光照射后 1 h,各实验组分泌 NO 的水平均达峰值,其中以照射 30 min 组最为明显,以后逐渐下降,照射后 6 h 各实验组分泌 NO 水平较对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

二、红光激光照射对内皮细胞表达 eNOS 的影响

激光照射后 15 min~3 h,各光照组内皮细胞 eNOS 的表达较对照组明显增强($P < 0.05$);照射后 1 h 时,照射 30 min 组内皮细胞表达 eNOS 最强($P < 0.05$),激光照射后 6 h,各组内皮细胞表达 eNOS 强度差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

三、红光激光照射对内皮细胞表达 iNOS 的影响

不同照射时间对内皮细胞表达 iNOS 的影响随照射后时间增加而逐渐增强,但是各组间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

讨 论

目前,在治疗脑血管病中应用的光主要有紫外线、低强度氦-氖激光和红光激光。临床观察发现,各类低强度激光均能改善血液流变学指标及微循环,并能增强免疫功能。低强度激光照射对细胞的生物学作用可能主要是影响细胞的生化和代谢过程,促进基因的转导和翻译过程,而不引起基因结构的改变^[7]。本研究采用作用效果较好的红光激光进行实验^[4]。

表 1 红光激光不同照射时间对内皮细胞分泌 NO 的影响(μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)

组 别	照射后 15 min	照射后 30 min	照射后 1 h	照射后 3 h	照射后 6 h
对照组	14.98 $\pm$ 2.69	18.12 $\pm$ 2.64	19.21 $\pm$ 1.42	21.36 $\pm$ 3.98	24.42 $\pm$ 3.68
照射 10 min 组	40.63 $\pm$ 2.87 *	40.14 $\pm$ 3.29 *	42.16 $\pm$ 3.19 *#	32.92 $\pm$ 2.41 *	25.47 $\pm$ 3.98
照射 20 min 组	41.73 $\pm$ 4.64 *	41.20 $\pm$ 2.17 *	44.56 $\pm$ 3.21 *#	35.28 $\pm$ 5.06 *	26.13 $\pm$ 3.78
照射 30 min 组	44.38 $\pm$ 4.68 *	45.82 $\pm$ 7.64 *	51.85 $\pm$ 7.82 *	34.67 $\pm$ 3.18 *	27.26 $\pm$ 3.34

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与照射 30 min 组比较,# $P < 0.05$

表 2 红光激光不同照射时间对内皮细胞表达 eNOS 的影响(个)

组 别	照射后 15 min					照射后 30 min					照射后 1 h					照射后 3 h					照射后 6 h				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
对照组	23	57	98	22	0	4	58	119	19	0	0	45	127	28	0	0	40	131	29	0	0	28	129	43	0
照射 10 min 组	0	0	57	122	21 *	0	0	38	131	31 *#	0	0	30	122	48 *#	0	0	43	118	39 *	0	23	135	42	0
照射 20 min 组	0	0	51	128	21 *	0	0	36	124	40 *△	0	0	27	129	44 *△	0	0	47	109	44 *	0	27	132	41	0
照射 30 min 组	0	0	50	131	19 *	0	0	41	115	44 *	0	0	29	125	46 *	0	0	40	122	38 *	0	20	137	43	0

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与照射 30 min 组比较,# $P < 0.01$,△ $P < 0.05$

表 3 红光激光不同照射时间对内皮细胞表达 iNOS 的影响 (个)

组 别	照射后 15 min					照射后 30 min					照射后 1 h					照射后 3 h					照射后 6 h				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
对照组	30	165	5	0	0	24	161	15	0	0	17	149	34	0	0	7	158	35	0	0	0	139	42	19	0
照射 10 min 组	24	171	4	0	0	23	165	12	0	0	17	151	32	0	0	10	153	37	0	0	0	141	44	15	0
照射 20 min 组	24	170	6	0	0	19	171	10	0	0	21	150	29	0	0	9	162	29	0	0	0	135	48	17	0
照射 30 min 组	21	176	3	0	0	20	167	13	0	0	18	148	34	0	0	4	165	31	0	0	0	138	35	27	0

Furchgott 等^[8]发现,内皮细胞可以合成一种血管舒张因子(endothelium-derived relaxing factor, EDRF),具有舒张血管、抑制血管平滑肌增殖、抗血小板聚集和抗血栓形成的作用。Palmer 等^[9]证实,这种因子的本质是一种气体自由基 NO,具有更广泛的生物学效应,在机体稳态维持和自身防病机制中起重要的调节作用。当 NO 从内皮分泌出来后弥散至平滑肌细胞,激活细胞内鸟苷酸环化酶,引起环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的升高,后者通过 cGMP 依赖性钙通道使许多钙依赖性的细胞内传导信号蛋白磷酸化,使细胞内钙减少从而抑制钙介导的磷酸化而使血管扩张^[10]。

细胞内 NOS 为 NO 合成的限速酶。NOS 可分为原生型(cNOS)和诱导型(iNOS)两大类,其中 cNOS 又可分为神经细胞型(nNOS)和内皮型(eNOS)。cNOS 主要存在于内皮细胞、神经组织和血小板中,一般情况下 cNOS 不能被诱导产生,但是可被相应的激动剂迅速激活,其活性依赖 Ca^{2+} 信号的改变,作为一种信息传递机制参与许多生理功能的调节^[11]。在脑缺血动物模型上,用药理学和遗传学方法业已清楚地表明,eNOS 和血管性 NO 在维持脑血流和防止神经元损伤方面起重要作用^[12]。iNOS 主要存在于巨噬细胞、中性白细胞、血管平滑肌细胞、心肌和肾髓质细胞等,在正常生理情况下,iNOS 基因一般不表达,在脂多糖、内毒素和某些细胞因子刺激下激活,不需要 Ca^{2+} 的参与,可引起 NO 长时间释放,产生大量 NO,具有细胞毒性作用^[11]。

本实验结果显示,激光照射后 15 min,各光照组内皮细胞分泌 NO 水平较对照组明显升高。照射后 1 h,各光照组分泌 NO 水平达高峰,其中以 30 min 组最为明显。激光照射后 15 min ~ 3 h,各光照组内皮细胞 eNOS 的表达较对照组明显增强,在照射后 1 h 时,照射 30 min 组内皮细胞表达 eNOS 最强。不同的照射时间照射后 15 min ~ 3 h,内皮细胞表达 iNOS 随照射后时间增加而渐增强,但各组间无显著性差异。从中可以看出,照射 30 min 组,在照射后 1 h NO 分泌水平和 eNOS 的表达为各组最高,这为临床选择最佳治疗时间提供了理论依据。证明红光激光具有良好的生物学

作用。

激光照射后各光照组 eNOS 表达较对照组明显增强,推测与激光照射后内皮细胞内 Ca^{2+} 浓度变化有关,而 iNOS 的表达与 Ca^{2+} 浓度变化无关,因此各组间 iNOS 的表达无差异性。由于内皮细胞可以分泌多种血管活性物质和生长因子,本实验只研究了其中几种,激光对内皮细胞分泌物质的影响还有待进一步研究。另外,本实验仅是从动物细胞上取得的结果,尚需进一步通过临床应用加以验证。

参 考 文 献

- 1 Pasyk KA, Jakobczak BA. Vascular endothelium; recent advances. Eur J Dermatol, 2004,14:209-213.
- 2 颜培华,李凤芝. 大鼠主动脉内皮细胞培养及鉴定方法. 军事医学科学院院刊,1993,17:124-125.
- 3 端重高,修瑞娟. 大鼠脑微血管分离及内皮细胞培养. 中华医学杂志,1987,67:597-599.
- 4 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黏附分子 1 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志,2001,23:294-297.
- 5 刘福川,王小兵. 胸腹水细胞块的免疫细胞化学研究. 中国肿瘤,2004,13:42-44.
- 6 黄雅萍,蔡路兵. 胸腹水细胞沉渣包埋技术及应用. 临床与实验病理学杂志,2004,20:112-113.
- 7 Vacca RA, Marra E, Quagliariello E, et al. Increase of both transcription and translation activities following separate irradiation of in vitro system components with He-Ne laser. Biochem Biophys Res Commun, 1994,203:991-1002.
- 8 Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature,1980,288:373-376.
- 9 Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, 1987,327:524-526.
- 10 Vaandrager AB, de Jonge HR. Signalling by cGMP-dependent protein kinase. Mol Cell Biochem, 1996,157:23-30.
- 11 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev, 1991,43:109-142.
- 12 Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. Stroke, 1997,28: 1283-1288.

(修回日期:2006-05-23)

(本文编辑:松 明)