

· 研究简报 ·

单层培养细胞的脉冲 Nd:YAG 激光损伤模型研究

陈虹霞 杨在富 杨景庚 马萍 高光煌 钱焕文

从细胞和分子生物学的水平探讨激光生物效应是激光生物医学研究的热点。在进行激光生物效应研究,特别是探讨生物组织受到较强激光作用的损伤修复规律及信号传导通路的分子机制时,为避免体内诸多因素的影响,需要建立体外培养细胞的激光损伤模型,以便为深入探讨组织受到激光损伤后的变化提供直观、有效的方法。

材料与方法

一、细胞培养

1. 主要试剂:包括 DMEM 培养液 (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, USA)、新生小牛血清 (杭州四季青公司)、胰蛋白酶 (Sigma, USA)、台盼蓝 (北京化学试剂厂)、TUNEL 试剂盒 (TdT mediated dUTP nick end labeling, 原位缺口末端标记, Boehringer Mannheim, Germany) 和 DAB 显色试剂盒 (Diaminobenzidine, 二氨基联苯胺, 华美生物技术公司)。

2. 细胞爬片制作:将人口腔上皮癌细胞 (KB 细胞) 株 (军事医学科学院基础医学研究所提供) 在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的条件下培养。当 KB 细胞处于对数生长期时,消化,制成适当密度的单细胞悬液。吹打均匀后,滴于消毒后的洁净载玻片 (置于玻璃培养皿内) 上,继续培养 12 h。在倒置显微镜下观察,待形成分布均匀的单层贴壁细胞,换液后准备激光照射。

二、激光照射

1. 照射方法:照射光源为静态输出的脉冲 Nd:YAG 激光器 (Neodymium:yttrium-aluminium-garnet laser, 掺钕钇铝石榴石激光器),由天津大学研制。激光波长 1 064 nm,单脉冲能量最大约 3 00 mJ。照射光路如图 1 所示。激光通过光阑后光斑变成较规则的圆形,经转向棱镜改变传播方向,再经透镜聚焦后照射到样品上。调节样品与透镜之间的距离,就可以改变照射到样品上的光斑大小。照射完毕移开样品,用感光纸记录该距离处的光斑大小。

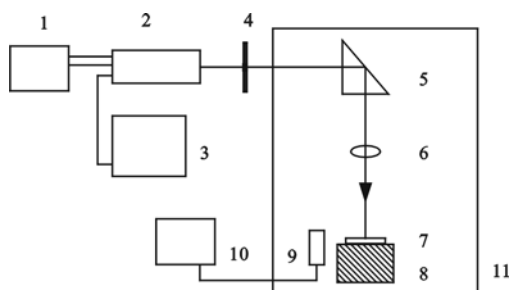


图1 脉冲 Nd:YAG 激光照射光路图

1—水冷系统 2—Nd:YAG 激光器 3—激光器电源 4—光阑
5—转向棱镜 6—透镜 7—样品 8—三维位移调节架
9—能量计探头 10—能量计显示器 11—超净工作台

2. 照射剂量:激光照射剂量的准确控制和测量对于激光生物效应的科学分析非常重要。我们用 LE-3A 激光能量计 (北京产,全军激光医学计量测试研究总站校准) 测量激光脉冲能量;借助显微标尺测量感光纸所记录的光斑直径,计算出光斑面积;照射剂量计算公式为:照射剂量 = 照射能量/光斑面积。

3. 照射分组:按检测时间点分为照射后即刻、2 h 及 6 h 三组。每组照射 4 张细胞爬片。每张细胞爬片大致均匀地照射约 20 个光斑,每个光斑照射 1 个脉冲。统计时,每一时间点随机选择 15 个照射光斑进行分析 (即 $n=15$)。

三、台盼蓝染色

在激光照射后的细胞爬片上滴加 0.04% 台盼蓝进行染色,选择镜下可观察到光斑中心有蓝染细胞 (死细胞) 的部分,用感光纸记录光斑大小。显微镜下测量其直径为 0.025 cm,用能量计测得单脉冲激光输出能量在 (0.108 ~ 0.126) J 范围内,计算求得单脉冲的能量密度为 (220 ~ 257) J/cm²。

四、TUNEL 检测

TUNEL 检测采用德国宝灵曼 TUNEL 检测试剂盒,按产品说明进行检测。

TUNEL 着色区域大小测量:选择带有测微尺的目镜,将物镜调至 ×10 倍,放入标本进行显微测量。分别测量照射后不同时间点 TUNEL 着色区的直径,并记录结果。

五、统计学分析

采用 SAS 6.12 统计软件,进行 t 检验和方差分析。

结 果

一、台盼蓝染色

光镜下,可见光斑中心细胞扭曲固缩,呈深蓝色;靠近边缘的细胞结构完整,有轻微着色 (图 2)。

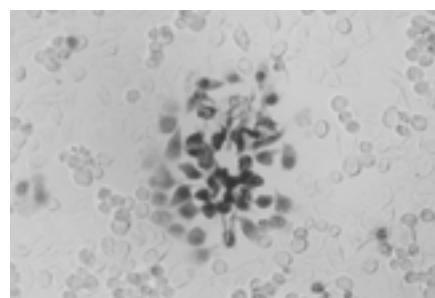


图2 照射后即刻光斑及周围细胞的光镜显示 (台盼蓝染色 ×200)

二、TUNEL 染色结果

1. 照射后即刻:光斑中心的细胞受到严重破坏,出现粘连、破裂,稍远处的细胞则被拉伸,呈现辐射样,TUNEL 染色呈强阳性,深褐色着色颗粒密布于固缩变形的核内;而紧靠光斑边缘的细胞则形态完整,着色较淡,为弱阳性 (图 3)。

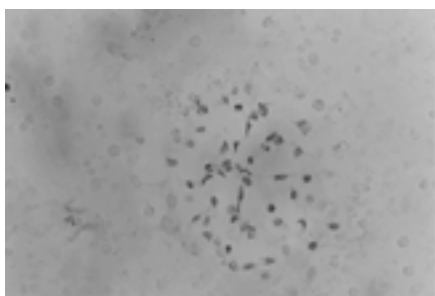


图3 照射后即刻光斑及周围细胞的光镜显示(TUNEL × 200)

2. 照射后 2 h: 光斑中心的细胞粘连成片, 排列紊乱, 仍浓染为强阳性; 靠近边缘细胞形态仍保持完整, 但胞核染成深褐色, 为强阳性(图 4)。

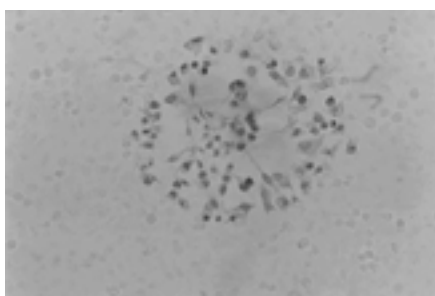


图4 照射后 2 h 光斑及周围细胞的光镜显示(TUNEL × 200)

3. 照射后 6 h: 光斑中心及靠近边缘细胞着色均减弱, 为淡黄色呈弱阳性(图 5)。

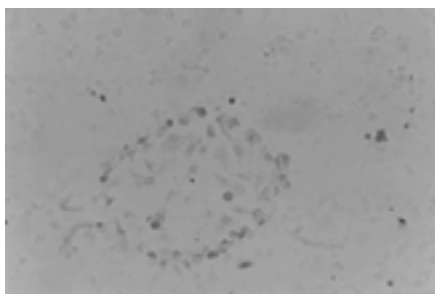


图5 照射后 6 h 光斑及周围细胞的光镜显示(TUNEL × 200)

图 2 ~ 5 均可见照射区细胞与周围细胞有明显界限, 未照射细胞不着色。

4. 平行对照: 激光照射区域之外的未照细胞与照射区细胞处于同一细胞爬片, 故可作为理想的平行对照。这些细胞在所有的 TUNEL 染色中均不着色, 与照射区细胞有明显的界限。

三、TUNEL 着色区大小定量分析

采用单因素三水平实验设计的方差分析, 结果表明激光照射后不同时间点 TUNEL 着色区直径的差别有显著性意义 ($P = 0.0001$), 即 TUNEL 着色区直径随照射时间, 先显著扩大后显著缩小。经单组设计的 t 检验发现, 照射后即刻和 6 h TUNEL 着色区直径均明显偏小 (均 $P = 0.0001$), 照射后 2 h, TUNEL 着色区直径则明显扩大 ($P = 0.0145$), 详见表 1。

讨 论

以往研究激光损伤组织时, 主要是进行活体或离体组织实

表 1 照射光斑和 TUNEL 着色区直径 (mm, $\bar{x} \pm s$)

光斑直径	TUNEL 着色区直径		
	照射后即刻	照射后 2 h	照射后 6 h
0.250	0.205 ± 0.009	0.262 ± 0.013	0.207 ± 0.008 *
t^*	-15.81	2.95	-18.02
P^*	0.0001	0.0145	0.0001

注: * 照射后各时间点的光斑直径比较, 单组设计 t 检验; 照射后各时间点之间比较, 用方差分析 (单因素三水平), $F = 104.02$, $P = 0.0001$

验^[1,2], 而关于直接照射离体培养细胞的报道较少。已有的文献^[3,5]虽描述了激光损伤细胞的形态学改变, 但缺乏对激光光斑面积的准确描述, 因此很难确定激光损伤的量-效关系。本研究以细胞死亡作为评价激光损伤的效应指标, 采用台盼蓝染色和 TUNEL 法进行检测; 对激光的照射能量进行严格、准确地控制, 并利用显微标尺精确测量光斑面积。因此, 可以通过对激光能量密度的准确控制来调节单层细胞损伤的程度 (坏死、凋亡、可逆性损伤)。

在研究脉冲 Nd:YAG 强激光对体外培养的单层 KB 细胞的损伤特点时, 我们发现当激光剂量为 (220 ~ 257) J/cm² 时, 光斑中央部分细胞被台盼蓝染成深蓝色, 细胞结构完全破坏, 并且相邻细胞出现粘连、拉伸, 呈放射状, 说明该区域细胞受强激光直接作用致死。而光斑周边的细胞轻微着色, 但形态完整, 这可能是激光这种强刺激引起细胞膜通透性增加, 导致染料渗入造成。照射区与未照区的明显分界是激光损伤细胞模型的特征之一, 其受损细胞可精确定位, 损伤范围可随意控制, 因此在同一样品中能研究正常细胞与损伤细胞, 该作用特性是其它理化因素所不能及的。

本实验所用激光波长处于近红外波段, 激光脉冲为长脉冲 (微秒级), 照射时通过聚焦作用提高照射剂量, 根据激光生物效应的一般规律和本实验观察的现象, 我们认为该激光主要通过热效应, 其次是机械效应致死细胞。

为进一步了解激光损伤的特点, 本实验采用了 TUNEL 方法来检测细胞损伤。TUNEL 法是一种较为特异、灵敏的检测细胞凋亡的方法^[6], 该方法最大的优点是能在组织切片上识别形态学早期难以辨认的凋亡细胞, 不足之处是专一性不佳, 对于某些外界因素直接引起细胞 DNA 的断裂则较难辨别。在本实验的结果中, 照射后即刻 TUNEL 染色结果为强阳性, 说明脉冲强激光可能直接引起细胞 DNA 的严重断裂。而光斑边缘细胞在照射后的几个检测时间点, 并未观察到细胞形态的明显改变, 但在 TUNEL 染色中却发现呈阳性变化, 尤其在照射后 2 h 为强阳性。该结果表明脉冲激光照射后, 光斑边缘区域的细胞虽然没有直接坏死, 但也受到了损伤, DNA 链出现断裂或缺口。

实验中我们还发现照射边缘区域细胞 TUNEL 着色的范围具有一定的时相关系。照射后 6 h 边缘区阳性结果范围的缩小说明细胞受到激光损伤后可能发生了保护性的应激反应, 阻止 DNA 损伤并竭力修复已发生损伤的 DNA 链, 从而阻止细胞死亡。但如果细胞 DNA 损伤较为严重, 无法修复, 则可能诱导细胞凋亡。该结果提示我们进一步探讨细胞激光损伤应激下的基因表达变化规律。

实验结果中, 光斑中央与周围细胞损伤程度不同主要是激光能量密度分布不均匀造成的。通过这种激光强度梯度, 我们虽可直观地观察到不同类型的细胞损伤, 但却较难对激光剂量

进行准确测量。因此,今后研究中要进一步改善光束质量,使激光能量密度分布尽可能均匀,这样可以为更精确地研究激光损伤的剂量-效应规律提供条件。

本文建立的单层 KB 细胞脉冲 Nd:YAG 激光损伤模型,可以直观、原位观察对比照射区与未照区的细胞损伤情况,为进一步研究激光损伤生物效应及细胞发生的应激反应、修复机制提供了一个较好的技术平台。

参 考 文 献

- 1 Till SJ, Till J, Milsom PK, et al. A new model for laser-induced thermal damage in the retina. *Bull Math Biol*, 2003, 65:731-746.
- 2 Topping A, Gault D, Grobbelaar A, et al. Successful reduction in skin

damage resulting from exposure to the normal-mode ruby laser in an animal model. *Br J Plast Surg*, 2001, 54: 144-150.

- 3 Kreisler M, Daubländer M, Willershausen-Zönnchen B, et al. Effect of Diode laser irradiation on the survival rate of gingival fibroblast cell cultures. *Lasers Surg Med*, 2001, 28:445-450.
- 4 Gutknecht N, Kanehl S, Moritz A, et al. Effects of Nd:YAG-laser irradiation on monolayer cell cultures. *Lasers Surg Med*, 1998, 22: 30-36.
- 5 Chen YJ, Jeng JH, Lee BS, et al. Effects of Nd:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*, 2000, 27: 471-478.
- 6 刘文兰, 张颖. 细胞凋亡检测方法——TUNEL. *解剖科学进展*, 1999, 5: 330-332.

(修回日期:2003-11-11)

(本文编辑:熊芝兰)

· 短篇论著 ·

超短波并调制中频电疗治疗慢性盆腔炎疗效观察

洪雁 鹿欣

我从 2000 年 2 月~2003 年 5 月采用超短波并调制中频电疗治疗慢性盆腔炎 53 例,疗效满意,报道如下。

一、资料和方法

慢性盆腔炎患者 105 例,临床表现为不同程度的持续或反复出现的腹痛、腹胀、腰痛、月经不规则或脓性白带等症状。妇科检查大多有下腹压痛、触痛伴子宫活动受限,附件增厚或触及到边界不清的包块;B 超主要表现为子宫轻度增大,子宫内膜肿胀、增厚,单侧附件区探及包块影像,双侧附件包块,子宫直肠窝积液等。105 例患者分为两组,超短波并调制中频电疗组(治疗组)53 例,年龄 23~48 岁,平均 35.2 岁;病程 3~5 个月 21 例,6 个月~1 年 14 例,1 年以上 18 例;其中单侧附件区炎性包块 17 例,双侧附件区炎性包块 5 例,子宫直肠陷凹积液 7 例。药物治疗组(对照组)52 例,年龄 23~47 岁,平均年龄 34.8 岁;病程 3 个月~5 个月 22 例,6 个月~1 年 12 例,1 年以上 18 例;其中单侧附件区炎性包块 16 例,双侧附件区炎性包块 6 例,子宫直肠窝积液 5 例。两组患者的年龄、病程、临床和 B 超表现差异无显著性意义($P>0.05$)。

治疗组采用上海产 LDT CDB-1 型超短波治疗机,频率 40.68 MHz,波长 7.3 m,最大输出功率 200 W,下腹部与腰骶部对置,间隙 2~3 cm,微热量,每日 1 次,每次 20 min,20 次为 1 个疗程,疗程间隔 1 周,治疗 3 个疗程,月经期停止治疗。调制中频电疗采用北京产 J28 型电脑脉冲治疗仪,选用 5 号处方,输出峰值电压 100 V,输出最大电流 100 mA,下腹部与腰骶部对置,砂袋固定,每日 1 次,每次 20 min,20 次为 1 个疗程,疗程间隔 1 周,共治疗 3 个疗程。

对照组口服千金片,每日 3 次,每次 6 片,20 d 为 1 个疗程。肌肉注射胎盘注射液,每日 1 次,每次 2 ml,20 次为 1 个疗程,经 3 个疗程治疗后,观察疗效。

疗效标准:痊愈——临床症状及体征消失,B 超复查子宫大小正常,炎性包块及子宫直肠窝积液消失;显效——临床

症状明显减轻,体征显著改善或部分消失,B 超复查子宫大小基本正常,炎症包块缩小 $>1/2$,子宫直肠窝积液减少;无效——临床症状,体征无明显改变,B 超复查包块大小及子宫直肠窝积液无变化。

统计学分析采用 χ^2 检验。

二、结果

两组治疗 3 个疗程后疗效评价见表 1。

表 1 两组疗效比较(例)

组别	例数	治愈	显效	无效	总有效率(%)
治疗组	53	30	19	4	92.44*
对照组	52	12	21	19	73.45

注: * 与对照组比较, $\chi^2 = 11.26, P < 0.01$

三、讨论

超短波治疗慢性盆腔炎,是通过高频电场产生的热效应和非热效应,使治疗部位均匀受热,加速血液循环,促进机体组织的新陈代谢,提高组织抗感染能力^[1]。小剂量的超短波可扩张血管,帮助炎症吸收,减少炎性渗出,加快子宫直肠窝部积液的吸收,减轻疼痛。

调制中频电流可明显改善和促进局部血液循环,具有消炎、松解粘连、软化瘢痕及镇痛等作用^[2]。调制中频电流还能提高神经、肌肉的兴奋性,增强内脏平滑肌的活力和张力,进一步加强止痛的效果。

超短波并调制中频治疗慢性盆腔炎,疗效明显优于药物治疗,且具有安全、副作用小、无痛苦、患者易于接受等优点,值得推广。

参 考 文 献

- 1 董燕. 超短波并远红外线治疗盆腔炎性包块. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:383.
- 2 余和平, 夏新蜀, 党元秀. 等幅正弦中频电离子导入并超短波治疗慢性盆腔炎. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24:390.

(修回日期:2003-11-14)

(本文编辑:阮仕衡)