

基础研究

810nm 弱激光对 M1 型骨髓源性巨噬细胞的作用及其机制

李 鲲, 宋基伟, 张家玮, 孙嘉锴, 梁卓文, 胡学昱, 王 哲

(第四军医大学西京骨科医院 710032 陕西省西安市)

【摘要】目的:体外建立 M1 型骨髓源性巨噬细胞(bone marrow derived macrophage, BMDM)-弱激光照射模型,探讨弱激光照射对 M1 型 BMDM 炎症因子分泌的影响及其可能机制。**方法:**体外分离 BALB/c 小鼠 BMDM,应用巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)条件性培养基培养,流式细胞术检测巨噬细胞标志物 F4/80 的表达,确定所获得细胞为纯度较高的 BMDM。应用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激 24h 诱导原代 BMDM 向 M1 型 BMDM 方向极化。将细胞随机分为弱激光治疗(low level laser therapy, LLLT)组和对照组,LLLT 组采用 810nm 波长激光照射,光斑面积 4.5cm²,照射功率密度 2mW/cm²,照射持续 440s,最终获得照射能量为 4J,对照组置于暗箱,不进行照射。应用 CCK8 实验测定细胞活性,RT-PCR 检测肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)及诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthases, iNOS)的 mRNA 表达情况,ELISA 检测 TNF- α 及 IL-1 β 蛋白分泌,Western blot 测定 iNOS 和 M1 型巨噬细胞极化的重要转录因子核因子- κ B p65(nuclear factor- κ B, NF- κ B p65)的表达。组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。**结果:**LPS 刺激后,使用弱激光照射的 M1 型 BMDM 细胞活性显著提高,升高至对照组的 2.313 $\pm$ 0.630 倍($P < 0.05$)。LLLT 组 IL-1 β mRNA 表达为 0.586 $\pm$ 0.145,对照组为 1.000 $\pm$ 0.022,两组比较有统计学差异($P < 0.05$);LLLT 组 TNF- α 的 mRNA 表达为 0.862 $\pm$ 0.152,对照组为 1.000 $\pm$ 0.082,两组比较无统计学差异($P = 0.082$);LLLT 组 iNOS 的 mRNA 表达为 0.720 $\pm$ 0.039,对照组为 1.000 $\pm$ 0.024,两组比较有统计学差异($P < 0.05$)。对照组 TNF- α 为 270.478 $\pm$ 26.831pg/ml,LLLT 组为 209.365 $\pm$ 5.600pg/ml,两组比较有统计学差异($P < 0.05$);对照组的 IL-1 β 为 98.941 $\pm$ 12.430pg/ml,LLLT 组为 77.076 $\pm$ 2.023pg/ml,两组比较有统计学差异($P < 0.05$)。对照组的 iNOS 蛋白表达为 1.005 $\pm$ 0.075,LLLT 组为 0.210 $\pm$ 0.010,两组比较有统计学差异($P < 0.05$);对照组的 NF- κ B p65 蛋白表达为 1.006 $\pm$ 0.260,LLLT 组为 0.428 $\pm$ 0.169,两组比较有统计学差异($P < 0.05$)。**结论:**810nm LLLT M1 型 BMDM 可抑制其炎症因子 IL-1 β 及 iNOS 的 mRNA 表达,下调炎症因子 IL-1 β 及 TNF- α 的分泌,降低 M1 型 BMDM 表面标志物 iNOS 的表达,同时显著下调 M1 型巨噬细胞经典极化转录因子 NF- κ B p65 的表达。810nm LLLT 可调控 M1 型巨噬细胞的极化状态,抑制其炎症因子分泌,该调控作用和其下调 M1 型巨噬细胞经典极化转录因子 NF- κ B p65 有明显相关性。

【关键词】弱激光治疗;炎症反应;M1 型巨噬细胞

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.04.12

中图分类号:R312,Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2018)-04-0360-08

The effect of 810nm low level laser on M1 bone-marrow derived macrophage and its related mechanism/LI Kun, SONG Jiwei, ZHANG Jiawei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28 (4): 360-367

【Abstract】 Objectives: To investigate the effect of low level laser therapy on the secretion of inflammatory cytokines in M1 type cells and its possible mechanism by establishing a M1 type bone marrow-derived macrophages(BMDM)-low level laser irradiation model in vitro. **Methods:** BMDM of BALB/c mice were isolated and cultured in macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) conditioned media. The flow cytometry was used to detect the expression of macrophage marker F4/80 to identify the culture results. The cells were stimulated for 24 hours with lipopolysaccharide(LPS) to induce M1 polarization. Cells were randomly divided into

第一作者简介:男(1989-),住院医师,硕士研究生在读,研究方向:脊柱脊髓损伤

电话:(029)84775299 E-mail:352173343@qq.com

通讯作者:胡学昱 E-mail:huxueyu@fmmu.edu.cn;王哲 E-mail:wangzhe@fmmu.edu.cn

low level laser therapy (LLLT) group and control group. The LLLT group was irradiated with low level laser at 810nm wavelength, the area of light spot was 4.5cm², the irradiation power density was 2.2mW/cm², and the irradiation time was 440s. The total irradiation energy was 4J. The two groups were put into the dark boxes. But only the LLLT group received a laser irradiation. The cell viability was determined by Cell Counting Kit 8 (CCK8) assay. The mRNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were detected by Real Time PCR (RT-PCR). The secretion of TNF- α and IL-1 β protein was detected by ELISA. Western blot was used to determine the expression of iNOS and the expression of NF- κ B p65, an important transcription factor of M1 macrophage signaling pathway. Student's *t* test was chosen as the statistical method, $P < 0.05$ was considered statistically significant. **Results:** After LPS stimulation, M1 BMDM was irradiated. CCK8 assay showed that compared with control group, the LLLT group could significantly increase the cell viability of BMDM to 2.313 ± 0.630 folds of control group ($P < 0.05$). RT-PCR results showed that compared with control group, the mRNA expression of IL-1 β decreased from 1.000 ± 0.022 in control group to 0.586 ± 0.145 in LLLT group ($P < 0.05$). The expression of TNF- α mRNA decreased from 1.000 ± 0.082 in control group to 0.862 ± 0.152 in LLLT group ($P = 0.082$), the iNOS mRNA level also decreased from 1.00 ± 0.024 in control group to 0.720 ± 0.039 in LLLT group ($P < 0.05$). ELISA showed that LLLT could down-regulate the secretion of TNF- α from 270.478 ± 26.831 pg/ml in control group to 209.365 ± 5.600 pg/ml in LLLT group ($P < 0.05$). IL-1 β was down-regulated from 98.941 ± 12.430 pg/ml in control group to 77.076 ± 2.023 pg/ml in LLLT group ($P < 0.05$). Western blot assay showed that, compared with control group, LLLT down-regulated the protein secretion of iNOS from 1.005 ± 0.075 to 0.210 ± 0.010 ($P < 0.05$). LLLT also significantly decreased NF- κ B p65 expression, which decreased from 1.006 ± 0.260 in control group to 0.428 ± 0.169 in LLLT group ($P < 0.05$). **Conclusions:** 810nm low level laser therapy can directly affect M1 BMDM, down-regulate the mRNA expression of IL-1 β and iNOS and suppress the secretion of TNF- α and IL-1 β . LLLT can also significantly decrease the expression of M1 macrophage surface marker iNOS and NF- κ B p65, a classic transcription factor is involved in macrophage polarization. The results show that LLLT can regulate the polarization status of M1 macrophages and inhibit its inflammatory secretion, and this regulatory role has a strong correlation with the suppression on classic transcription factor NF- κ B p65.

【Key words】 Low level laser therapy; Inflammation; M1 macrophage

【Author's address】 Xijing Orthopaedics Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China

脊髓损伤预后较差,致残率高且缺乏有效的治疗手段^[1]。由炎症反应介导的继发性损伤是脊髓损伤的重要组成部分,而巨噬/小胶质细胞作为炎症反应的主要参与细胞,在脊髓损伤中扮演着重要的角色^[2,3]。脊髓损伤病程中,骨髓源性巨噬细胞 (bone marrow derived macrophage, BMDM) 占据损伤区中央,并持续炎性分泌,致使组织、细胞坏死凋亡,最终导致不可逆损伤^[4-6]。巨噬/小胶质细胞在不同的刺激下,会发生极化,表现出不同的细胞特征。具体来说,极化后的巨噬/小胶质细胞主要可分为经典活化型即 M1 型细胞,具有促进炎症反应及细胞毒性等特征;以及替代活化型即 M2 型细胞,具有抑制炎症反应促修复等作用。近年来的研究证实,脊髓损伤后,损伤区不同亚型巨噬细胞的特异表达,即具有细胞毒性的 M1 型巨噬/小胶质细胞持续表达,具有神经保护促修复的 M2 型巨噬/小胶质细胞仅一过性增高,严重阻

碍了损伤修复进程^[7,8]。大量研究证明,降低 M1 型巨噬细胞、增加 M2 型细胞的时空表达,可促进脊髓损伤的修复^[9-11]。弱激光治疗 (low level laser therapy, LLLT) 因其特有的无创、抑制炎症反应的治疗作用,目前已经广泛应用于许多临床领域,并取得了满意的疗效^[12-14]。国内外研究证实,在多种脊髓损伤动物模型中,LLLT 可以显著促进脊髓损伤的修复,提高其运动功能^[15-18]。本课题组前期研究进一步发现,LLLT 可显著抑制脊髓损伤区促炎因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 等的分泌,下调损伤区 M1 型巨噬细胞数量,上调 M2 型巨噬细胞比例^[19-22]。上述结果说明,LLLT 可以促进脊髓损伤的修复,改变损伤区炎症因子表达,同时影响损伤区巨噬细胞的极化状态,但是尚不明确 LLLT 是否可以直接作用于巨噬细胞,并改变其极

化状态和分泌情况。本研究旨在探讨弱激光对 M1 型 BMDM 极化的作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂和仪器

BALB/c 小鼠由第四军医大学动物实验中心提供;红外半导体激光器(型号 MW-IR-808,长春镭仕光电);激光器准直镜(上海大恒光学仪器);改良杜氏伊戈尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)-高糖培养基、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Gibco, 美国);巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)(义翘神州, 北京);F4/80-PE 抗体, CD16/32-FITC 抗体(Biolegend, 美国);兔抗诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、小鼠抗核因子 κ B p65(NF- κ B p65)、小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde -3 -phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体(Abcam, 英国);偶联 HRP 的山羊抗兔二抗(碧云天, 上海);偶联 HRP 的兔抗小鼠二抗(碧云天, 上海);小鼠 IL-1 β 、TNF- α 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(博士德, 武汉);Trizol Reagent、实时荧光定量 PCR(Real-Time PCR, RT-PCR)试剂盒(Takara, 日本);FC500 流式细胞仪(Beckman Coulter, 美国);7500 定量 PCR 仪(AB, 美国);Architect c8000 自动生化检测仪(雅培公司, 美国)。

1.2 BMDM 的分离培养诱导及极化

将 6~8 周龄 BALB/c 小鼠过量麻醉处死后, 浸泡于 70% 医用酒精处理 10min, 取 2ml PBS 放入直径 35mm 的培养皿中, 并将培养皿放置于冰上。使用剪刀, 从腹部向后肢剪开小鼠皮肤, 充分暴露后肢肌肉, 随后用剪刀仔细剔除后肢肌肉, 再将后肢从髋关节处整体取下。用 1ml 注射器吸取 PBS 将股骨和胫骨中的骨髓冲入培养皿中, 此过程重复 2 次。将浸泡于 PBS 中的骨髓组织经 200 目的滤网过滤并移入离心管中, 加入红细胞裂解液, 静置 10min。将离心管放入离心机, 1000r/min 离心 5min, 弃上清, 用含 M-CSF 的条件性培养基(100ml/L FBS、100IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、10g/L 谷氨酰胺、10ng/ml M-CSF 的 DMEM

液)重悬细胞并计数, 并以 1.2×10^6 个/ml 细胞数接种于 12 孔培养板;在 37℃、5%CO₂ 的环境中培养, 每 3d 换液 1 次, 换液前将细胞复温至常温, 培养 7d 后使用 F4/80-PE 抗体进行流式细胞检测, 获得成熟 M0 型巨噬细胞(图 1a)。于培养 7d 换液, 培养基中加入 100ng/ml 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(Sigma, 美国), 刺激 24h, 使用 CD16/32-FITC 抗体进行流式检测, 获得 M1 型巨噬细胞(图 1b)。每只 BALB/c 小鼠可提取细胞量约为 2.5×10^5 个, 实验共使用小鼠 30 只。

1.3 细胞分组及激光照射

将培养成熟的 M1 型巨噬细胞随机分为对照组和 LLLT 组。参考相关文献^[23], 在弱激光有效照射功率范围内, 通过锁定一组功率, 改变照射时间, 获得多组能量(0~10J), 对其进行预实验, 最终选取弱激光照射最佳参数为:波长 810nm, 功率密度 2mW/cm², 光斑面积 4.5cm², 照射时间为 440s, 获得照射能量为 4J。对照组置于避光暗室内, 不进行照射。

1.4 细胞活性检测

采用 CCK8 法检测细胞活性。细胞成熟后, 调整细胞数为 2×10^4 个/ml, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ l, 对照组与 LLLT 组分别接种 5 个复孔, LLLT 组进行激光照射, 对照组置入暗箱。24h 后, 每孔加入 CCK8 试剂 10 μ l(Dojindo, 日本), 混匀后充分反应, 使用酶标仪进行检测, 波长选取 450nm, 计算每组细胞的吸光度, 对比 LLLT 组与对照组吸光度差异, 具体检测方法参照厂家说明。

1.5 目的基因 TNF- α 、IL-1 β 及 iNOS 表达的检测

利用 RT-PCR 技术对 M1 型巨噬细胞相关基因进行定量检测。检测步骤如下:LLLTT 6h 后, 利用 RNA 抽提试剂 TRizol 溶液提取总 RNA, 进行浓度测定, 随后使用反转录试剂盒合成 cDNA。反转录体系如下:冰上准备, 反应所用试剂 10 μ l, 具体成分如下:5 $\times$ PrimeScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time) 2 μ l, 根据所测 RNA 浓度算出 RNA 体积和 Nase Free dH₂O 剂量。逆转录后获得的 cDNA, 通过 qPCR 对相关基因 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 进行扩增, 管家基因 GAPDH 作为内参。配制反应液(冰上进行), 考虑到吸取误差, 配置的预混液体积至少多于反应总体积的 10%, 每孔反应所用试剂 20 μ l, 具体成分如下:SYBR

Premix Ex Taq II 10 μ l、PCR 前引物 0.8 μ l、PCR 后引物 0.8 μ l、ROX Reference Dye II 0.4 μ l、cDNA 2 μ l、dH₂O 6 μ l。7500 定量 PCR 仪采用以下程序进行 RT-PCR 反应:第一阶段(stage 1),预变性循环次数(Reps)1 次,95℃维持 30s;第二阶段(stage 2),PCR 反应循环次数(Reps)40 次,95℃维持 5s,60℃维持 30s。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因的相对表达量。引物序列由 Primer 5.0 软件合成,序列如表 1 所示。

1.6 TNF- α 及 IL-1 β 的分泌情况检测

按照 ELISA 试剂盒说明准备待测样品及 TNF- α 、IL-1 β 标准品,于 LLLT 24h 后进行检测,

每个样品均做 5 个复孔,实验步骤严格参照试剂盒操作说明进行。反应结束后在酶标仪上 450nm 波长处测量各孔的吸光度,用对照孔调零,得出待测样品及标准品吸光度数值。绘制标准曲线,得出各待测样品的浓度(pg/ml)。

1.7 iNOS 及 NF- κ B p65 蛋白表达的检测

用 Western Blot 实验检测 iNOS 及 NF- κ B p65 蛋白的表达情况。LLLT 24h 后,提取样本蛋白,使用 BCA 定量法测定标本总蛋白浓度,每个泳道加入 20 μ g 的蛋白。按照标准步骤进行电泳、转膜。转膜完成后使用丽春红染色,观测转膜效果,将预染标记(Marker)条带分子量作参照,剪取

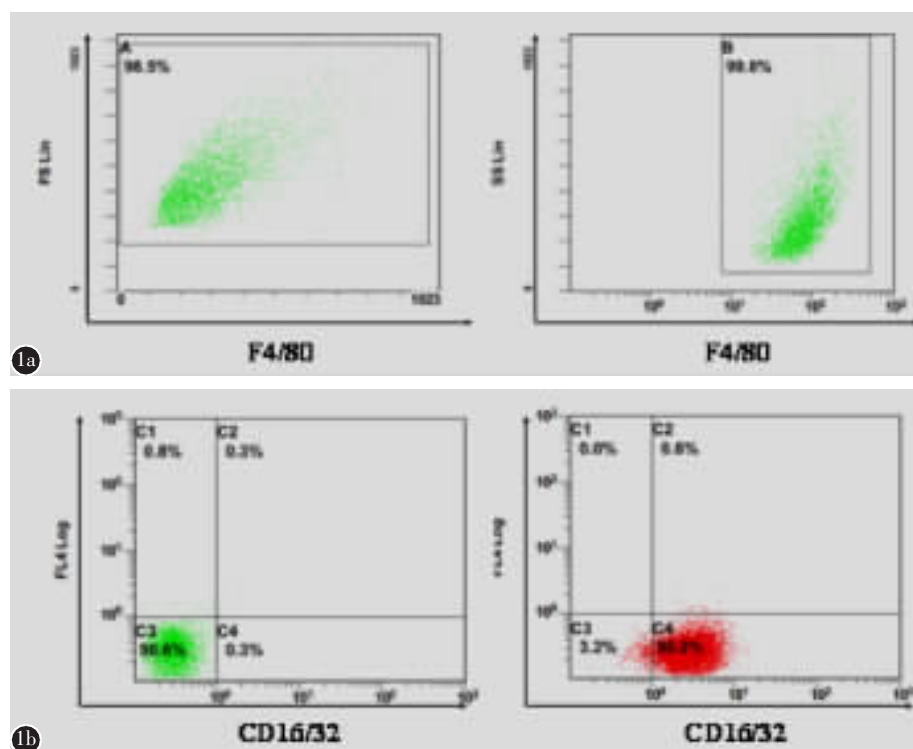


图 1 骨髓源性巨噬细胞的诱导与极化 a 骨髓源性巨噬细胞表面标志物 F4/80 鉴定,阳性率可达 99.8%(B 区域) b M1 型巨噬细胞表面标志物 CD16/32 鉴定,脂多糖(LPS)刺激后,阳性率从 0.3%升至 96.2%(C4 象限)

Figure 1 Induction and polarization of bone marrow-derived macrophages a Identification of bone marrow-derived macrophage surface marker F4/80, the positive rate up to 99.8%(B area) b Identification of M1 macrophage surface marker CD16/32, after the LPS stimulation, the positive rate rose from 0.3% to 96.2%(C4 quadrant)

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-PCR

引物名称 Primer name	基因序列 Sequence(5'-3')	
	上游序列 Forward	下游序列 Reverse
肿瘤坏死因子 α TNF- α	5'-GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTTCT-3'	5'-GTGCTTTGTGAGTGTGAGGGTCTG-3'
白细胞介素-1 β IL-1 β	5'-TTCAGGCAGGCAGTATCACTCATTG-3'	5'-ACACCAGCAGGTTATCATCATCATCC-3'
诱导型一氧化氮合酶 iNOS	5'-ATCTTGGAGCGAGTTGTGGATTGTC-3'	5'-GGTCGTAATGTCCAGGAAGTAGGTGA-3'

目标蛋白及内参蛋白条带。使用 5% 脱脂牛奶封闭 1h, 4℃ 孵育一抗 (兔抗 iNOS, 1:500; 小鼠抗 NF-κB p65, 1:1000; 小鼠抗 GAPDH, 1:1000) 过夜, Tris Buffered saline Tween (TBST) 缓冲液漂洗条带 10min, 共 3 次。37℃ 孵育二抗 (偶联 HRP 的山羊抗兔二抗, 1:1000; 偶联 HRP 的兔抗小鼠二抗, 1:1000) 2h。在凝胶成像系统中进行化学发光, 按照配套软件进行图像分析, 计算出对照组和 LLLT 组目标蛋白条带光密度值与内参 GAPDH 的光密度值之比, 得到 iNOS 和 NF-κB p65 蛋白的相对表达量。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 进行统计学分析, 每组实验独立重复 5 次后取均值, 组间比较采取独立样本 *t* 检验, 各组数据均采用均数±标准误表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 弱激光照射对 M1 型 BMDM 活性的影响

使用 CCK8 法检测 M1 型 BMDM 的细胞活性发现, 相较于对照组, 弱激光照射可以显著提高 M1 型 BMDM 细胞活性, 升高至对照组的 2.313 ± 0.630 倍 ($P < 0.05$)。

2.2 弱激光照射对 M1 型 BMDM 的 IL-1β、TNF-α 和 iNOS mRNA 的影响

使用 RT-PCR 技术观察 M1 型 BMDM 特异性分子 IL-1β、TNF-α 和 iNOS 的 mRNA 表达情况, 扩增曲线、溶解曲线及溶解峰如图 2 所示。与对照组相比, 弱激光照射可以显著下调 M1 型

BMDM 的特征性炎性因子 IL-1β 的 mRNA 表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 同样, 弱激光照射可下调 M1 型 BMDM 的表面标志物 iNOS 的 mRNA 表达, 且差异显著 ($P < 0.05$); 相较于对照组, 弱激光照射虽可抑制 M1 型 BMDM 促炎因子 TNF-α 的 mRNA 表达, 但差异无统计学意义 ($P = 0.082$, 表 2)。

2.3 弱激光照射对 M1 型 BMDM 的 TNF-α 和 IL-1β 分泌的影响

采用 ELISA 检测 M1 型 BMDM 的炎性因子 TNF-α 和 IL-1β 分泌情况, 结果显示, 相较于对照组, 弱激光照射可下调 TNF-α 和 IL-1β 的分泌, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 3)。

2.4 弱激光照射对 M1 型 BMDM 的 iNOS 和 NF-κB p65 表达的影响

弱激光照射后, 使用免疫印迹法检测 M1 型 BMDM 表面标志物 iNOS 和极化经典转录因子 NF-κB p65 的表达情况, 相较于对照组, 弱激光照射可显著下调 iNOS 的表达 (图 3a, $P < 0.05$); 相比对照组, 弱激光照射抑制了极化经典转录因子 NF-κB p65 的表达情况 (图 3b), 且差异显著 ($P < 0.05$, 表 4)。

3 讨论

继发性损伤是脊髓损伤病理过程的重要组成部分, 对受损部位持续损害, 最终导致功能丧失。炎症反应是继发性脊髓损伤的中心环节, 其过程复杂多样, 而巨噬/小胶质细胞则是炎症反应的主要参与者, 其不同表型和分泌, 对炎症反应有着重

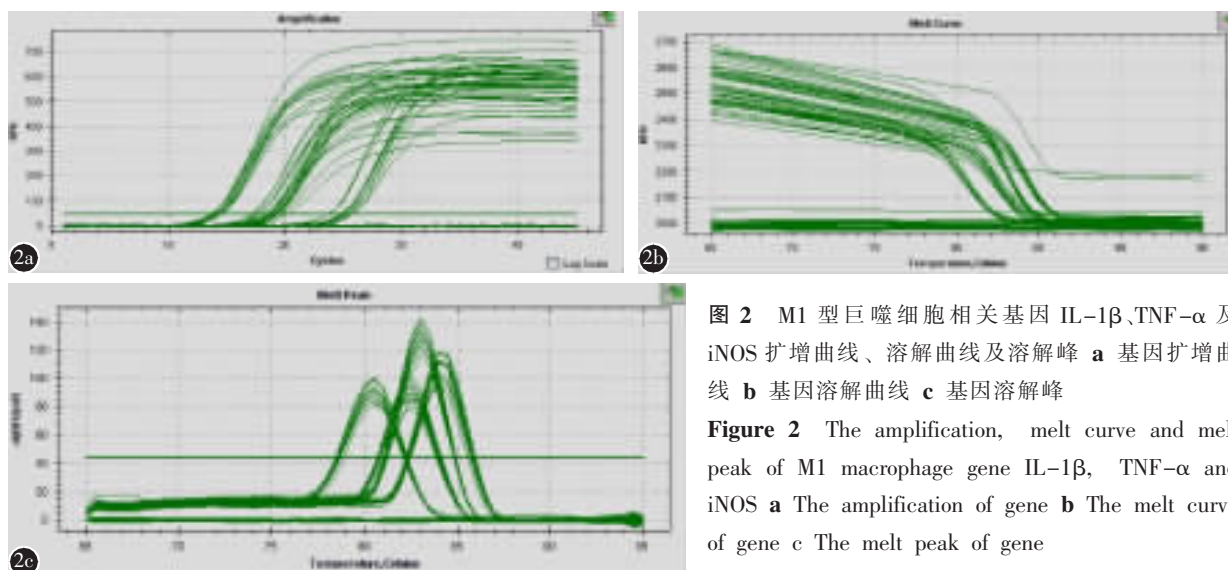


图 2 M1 型巨噬细胞相关基因 IL-1β、TNF-α 及 iNOS 扩增曲线、溶解曲线及溶解峰 a 基因扩增曲线 b 基因溶解曲线 c 基因溶解峰

Figure 2 The amplification, melt curve and melt peak of M1 macrophage gene IL-1β, TNF-α and iNOS a The amplification of gene b The melt curve of gene c The melt peak of gene

要的调节作用。相较于小胶质细胞, BMDM 在损伤区占主导地位, 持续性分泌炎性物质, 对于损伤区组织、细胞的坏死有着重要意义。脊髓损伤中, 具有细胞毒性的 M1 型巨噬细胞持续占主导, 而 M2 型巨噬细胞仅一过性增高, 这在相当程度上导致了脊髓损伤的预后不良。通过调节脊髓损伤后

表 2 两组 M1 型巨噬细胞 IL-1 β 、TNF- α 及 iNOS 的 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 The level of the M1 macrophage relative gene expression (IL-1 β , TNF- α and iNOS) of LLLT group and control group

	弱激光治疗组 LLLT group	对照组 Control group
白细胞介素-1 β IL-1 β	0.586 $\pm$ 0.145 ^①	1.000 $\pm$ 0.022
肿瘤坏死因子 α TNF- α	0.862 $\pm$ 0.152	1.000 $\pm$ 0.082
诱导型一氧化氮合酶 iNOS	0.720 $\pm$ 0.039 ^①	1.000 $\pm$ 0.024

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$

Note: ①Compared with control group, $P < 0.05$

表 3 两组 M1 型巨噬细胞 TNF- α 及 IL-1 β 的分泌情况 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/ml}, n=5$)

Table 3 The secretion of M1 macrophage pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in LLLT group and control group

	弱激光治疗组 LLLT group	对照组 Control group
肿瘤坏死因子 α TNF- α	209.365 $\pm$ 5.600 ^①	270.478 $\pm$ 26.831
白细胞介素-1 β IL-1 β	77.076 $\pm$ 2.023 ^①	98.941 $\pm$ 12.430

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$

Note: ①Compared with control group, $P < 0.05$

损伤区巨噬细胞的极化表型, 改变其炎症状态, 从而促进损伤修复, 是目前的研究热点之一[2,5,11,6,9]。

LLLT 指采取功率在 500mW 以下、波长介于 600~1000nm 的激光进行低能量照射, 从而发挥生物学治疗作用的一种治疗手段。相关研究证实, LLLT 在神经损伤的修复中, 具有抑制炎症反应、神经保护和促修复作用。其治疗作用被认为是通过光生物学机制进行的, 线粒体被认为是重要靶点, 其内存在的细胞色素 C 氧化酶可作为载色体吸收光谱, 进而发挥生物学效用[24]。国内外及本课题组前期研究均表明, LLLT 具有显著的抗炎促脊髓损伤修复作用[17,21]。具体来说, LLLT 可以减少脊髓损伤后空洞形成的面积, 促进神经的再生, 抑制瘢痕的形成, 下调炎症因子的表达, 提高神经运动功能[19-22]。本课题组的前期研究分别采用了大鼠皮质脊髓束全横断损伤、撞击损伤和标准化钳夹损伤模型, 研究证实, 在全横断-LLLT 模型中, LLLT 可以增加损伤区神经微丝蛋白 (neurofilaments, NF) 含量, 且伴行神经生长蛋白-43 (growth associated protein-43, GAP-43) 高表达, 促进神经再生, 减少脊髓损伤后空洞形成面积, 且降低了胶质瘢痕的形成; 在撞击损伤-LLLT 模型中, 研究发现 LLLT 可显著降低促炎因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β , 上调 IL-10 的分泌; 在标准化钳夹损伤-LLLT 模型中, 我们进一步证实 LLLT 在损伤后第 3 天、第 7 天下调损伤区 M1 型巨噬细胞数量, 提高 M2 型巨噬细胞的比例, 并且 LLLT 可以提高 IL-4、IL-13 的表达, 最终促进神经功能的恢复。但是 LLLT 是否可以直接作用于 BMDM,



图 3 弱激光治疗 (LLLT) 组和对照组 M1 型巨噬细胞 iNOS 及 NF- κ B p65 的表达情况 a M1 型巨噬细胞 iNOS 表达情况 b M1 型巨噬细胞 NF- κ B p65 表达情况

Fig 3 The expression of M1 macrophage surface marker iNOS and transcription factor NF- κ B p65 in LLLT group and control group **a** The expression of M1 macrophage surface marker iNOS **b** The expression of classic M1 macrophage polarization transcription factor NF- κ B p65

表 4 两组 M1 型巨噬细胞 iNOS 及 NF- κ B p65 的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 The expression of M1 macrophage surface marker iNOS and transcription factor NF- κ B p65 in LLLT group and control group

	弱激光照射组 LLLT group	对照组 Control group
诱导型一氧化氮合酶 iNOS	0.210 $\pm$ 0.010 ^①	1.005 $\pm$ 0.075
核因子 κ B p65 NF- κ B p65	0.428 $\pm$ 0.169 ^①	1.006 $\pm$ 0.260

注:①与对照组比较, $P<0.05$

Note: ①Compared with control group, $P<0.05$

从而改变其 M1 表型的主导地位, 改变其炎性分泌, 尚不明确。目前针对 LLLT 直接作用于巨噬细胞的研究开展较少, 且研究所采用的细胞多为细胞系, 如 raw 264.7、J774 等, 与损伤环境中占据主导的 BMDM 并不相同^[25-26]。

本研究参考文献及预实验结果, 选取了功率密度 2mW/cm²、照射时间 440s、能量 4J 的最佳照射参数^[23], 在此基础上进一步构建了可以更好模拟脊髓损伤内环境的体外细胞模型, 利用 CCK8、RT-PCR、ELISA、Western blot 等技术研究了 LLLT 对 LPS 激活的 M1 型 BMDM 的影响。CCK8 实验结果表明, LLLT 组的细胞活性明显高于对照组, 这可能是由于 LLLT 对于线粒体的作用: 激活的 M1 型 BMDM 一氧化氮(NO)表达大量增加, 与氧(O₂)竞争性结合线粒体内的细胞色素 C 氧化酶, 使其解离, 导致细胞活性降低, 而 LLLT 可以促使 NO 和细胞色素 C 解离, 促进氧合成增加, 进一步增加 ATP 生成^[24]。TNF- α 、IL-1 β 作为脊髓损伤后巨噬细胞分泌的重要炎性因子, 在损伤早期表达显著增加, 诱导相应的炎性细胞进入损伤区, 进一步加重受损脊髓的损害, 其分泌和表达与 M1 型巨噬细胞极化表型占据主导密切相关, 可作为检测极化的标志物。下调 BMDM 的 TNF- α 和 IL-1 β 分泌, 对脊髓损伤的修复有着重要的意义。iNOS 作为 M1 型巨噬细胞经典极化标志物, 其在脊髓损伤后的缺血再灌注损害过程中起着重要作用, 降低活化巨噬细胞 iNOS 的表达, 同样对脊髓损伤修复十分重要。通过使用 RT-qPCR 技术, 我们研究了 LLLT 对 M1 型巨噬细胞分泌的促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 及 iNOS 的 mRNA 表达的作用, 结果证实, LLLT 照射 6h 后可以显著降低 IL-1 β 和 iNOS 的 mRNA 水平, TNF- α 表达虽然

下降, 但无统计学意义。我们还研究了 LLLT 对 TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS 蛋白表达的影响, 我们发现, 相较于对照组, LLLT 均可以降低其表达。TNF- α 在 mRNA 和蛋白层面均下降, 但在 mRNA 层面下降不具有统计学意义, 这可能是因为 mRNA 检测时间和蛋白检测时间不同造成(mRNA 照射后 6h, ELISA 照射后 24h), 也可能是因为 LLLT 影响 TNF- α 分泌的靶点位于转录的下游等, 具体仍需进一步研究。以上结果说明 LLLT 可以直接下调 M1 型 BMDM 的炎性表达, 减轻继发性炎症反应。我们在此基础上进一步研究了 LLLT 对 M1 型 BMDM 经典极化通路 NF- κ B p65 的影响, 结果证实弱激光照射后, M1 型 BMDM 的 NF- κ B p65 表达显著下调。NF- κ B p65 作为 M1 型巨噬细胞极化的重要通路, 抑制其表达, 可降低 M1 型巨噬细胞数量, 是研究巨噬细胞极化调控的热门通路, 但在弱激光影响巨噬细胞极化领域相关研究较少^[27, 28]。本研究的结果说明, LLLT 抑制 NF- κ B p65 的表达可能是其下调 M1 型巨噬细胞极化的生物学机制。但巨噬细胞极化机制复杂多样, 弱激光影响其极化的具体机制仍需进一步研究。

本研究通过构建体外 M1 型 BMDM-LLLT 模型, 通过多种实验技术, 在多个层面证明, LLLT 可以下调 M1 型 BMDM 的特异性标志物 iNOS 及炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 和蛋白表达, 且 LLLT 可以显著下调 M1 型巨噬细胞极化经典转录因子 NF- κ B p65 的表达。LLLT 对 BMDM 的上述抗炎作用, 辅以 LLLT 无创性的优势, 使其在治疗脊髓损伤中有着巨大的应用前景。

4 参考文献

1. 李景伟, 冯世庆, 焦新旭, 等. 急性脊髓损伤患者早期并发症及危险因素分析[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(7): 569-572.
2. Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade[J]. Acta Neurobiol Exp(Wars), 2011, 71(2): 281-299.
3. Wang X, Cao K, Sun X, et al. Macrophages in spinal cord injury: phenotypic and functional change from exposure to myelin debris[J]. Glia, 2015, 63(4): 635-651.
4. Hines DJ, Hines RM, Mulligan SJ, et al. Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels[J]. Glia, 2009, 57(15): 1610-1618.
5. Shechter R, London A, Chen V, et al. Infiltrating blood-de-

- rived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice[J]. *PLoS Med*, 2009, 6(7): e1000113.
6. Greenhalgh AD, David S. Differences in the phagocytic response of microglia and peripheral macrophages after spinal cord injury and its effects on cell death[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(18): 6316–6322.
7. Gensel JC, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury [J]. *Brain Res*, 2015, 1619: 1–11.
8. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, et al. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(43): 13435–13444.
9. Li F, Cheng B, Cheng J, et al. CCR5 blockade promotes M2 macrophage activation and improves locomotor recovery after spinal cord injury in mice[J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 126–133.
10. Ji XC, Dang YY, Gao HY, et al. Local injection of lenti-BDNF at the lesion site promotes M2 macrophage polarization and inhibits inflammatory response after spinal cord injury in mice[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(6): 881–890.
11. Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, et al. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9 (1): 40.
12. Burger M, Kriel R, Damon A, et al. The effectiveness of low-level laser therapy on pain, self-reported hand function, and grip strength compared to placebo or "sham" treatment for adults with carpal tunnel syndrome: a systematic review [J]. *Physiother Theory Pract*, 2017, 33(3): 184–197.
13. Li ZJ, Yao W, Zhang HF, et al. Effectiveness of low-level laser on carpal tunnel syndrome: a meta-analysis of previously reported randomized trials [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(31): e4424.
14. Bjordal JM, Lopes-Martins RA, Joensen J, et al. A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of Low Level Laser Therapy in lateral elbow tendinopathy(tennis elbow)[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2008, 9: 75.
15. Chung H, Dai T, Sharma SK, et al. The Nuts and bolts of low-level laser(light) therapy[J]. *Ann Biomed Eng*, 2012, 40 (2): 516–533.
16. Mojarad N, Janzadeh A, Yousefifard M, et al. The role of low level laser therapy on neuropathic pain relief and interleukin-6 expression following spinal cord injury: an experimental study[J]. *J Chem Neuroanat*, 2018, 87: 60–70.
17. 尹振春, 董英海, 朱菁, 等. He-Ne 激光对急性脊髓损伤总 NOS、iNOS 和 ET-1 的影响[J]. *应用激光*, 2005, 25(3): 214–216.
18. 陈浩贤, 盛伟斌. 低能激光照射及嗅鞘细胞移植在脊髓损伤中的应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(51): 10179–10183.
19. 王哲, 夏雷, 龚凯, 等. 激光照射对急性脊髓损伤后脊髓再生的促进作用[J]. *中国激光*, 2009, 36(11): 3084–3088.
20. 梁卓文, 王继猛, 胡学昱, 等. 大鼠脊髓损伤的弱激光治疗参数选择[J]. *激光生物学报*, 2013, 22(5): 403–408.
21. 王继猛, 梁卓文, 胡学昱, 等. 激光照射对脊髓损伤大鼠 TNF- α , IL-6 和 IL-10 表达的影响[J]. *中国激光*, 2014, 41 (2): 253–257.
22. Song JW, Li K, Liang ZW, et al. Low-level laser facilitates alternatively activated macrophage/microglia polarization and promotes functional recovery after crush spinal cord injury in rats[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 620.
23. Freitas LFD, Hamblin MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy[J]. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*, 2016, 22(3): 348–364.
24. Tafur J, Mills PJ. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms[J]. *Photomed Laser Surg*, 2008, 26 (4): 323–328.
25. Gavish L, Perez LS, Reissman P, et al. Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression[J]. *Lasers Surg Med*, 2008, 40(5): 371–378.
26. Fernandes KP, Souza NH, Mesquita-Ferrari RA, et al. Photobiomodulation with 660nm and 780nm laser on activated J774 macrophage-like cells: effect on M1 inflammatory markers[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2015, 153: 344–351.
27. Wang L, Zhai D, Ruan B, et al. Quaking deficiency amplifies inflammation in experimental endotoxemia via the aryl hydrocarbon receptor/signal transducer and activator of transcription 1 - NF- κ B pathway [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1754.
28. Li J, Lei HT, Cao L, et al. Crocin alleviates coronary atherosclerosis via inhibiting lipid synthesis and inducing M2 macrophage polarization[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 120–127.

(收稿日期:2018-01-01 修回日期:2018-03-12)

(英文编审 郑国权/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)