

基础研究

810nm 弱激光作用下巨噬细胞
对星形胶质细胞的影响

孙嘉锴, 张家玮, 李 鲲, 郑 峤, 宋基伟, 梁卓文, 胡学昱, 王 哲

(空军军医大学西京医院骨科 710032 西安市)

【摘要】目的: 探讨 810nm 弱激光作用下巨噬细胞对星形胶质细胞活化及硫酸软骨素蛋白多糖(Chondroitin sulfate proteoglycans, CSPG)分泌的影响。**方法:** 构建脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)动物模型, 设立脊髓损伤(SCI)组和脊髓损伤后弱激光治疗(low level laser therapy, LLLT)组, 免疫荧光检测脊髓损伤区星形胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和 CSPG 的表达情况; 建立体外巨噬细胞-星形胶质细胞共培养模型, 分为 Ctrl 组(空白对照), M1 组(采用 M1 型巨噬细胞条件培养基培养星形胶质细胞); M1+LLLT 组(采用 M1 条件培养基培养星形胶质细胞, 同时进行弱激光照射), 采用 Western Blot 检测 M1 型巨噬细胞标志物诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和星形胶质细胞活化经典通路信号传导及转录激活因子 3(signal transducers and activators of transcription, STAT3)的表达, 细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)法检测星形胶质细胞的活性, 实时定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)和酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 CSPG 的核心蛋白聚集蛋白聚糖(aggrecan)和多功能蛋白聚糖(versican)的表达情况。**结果:** 体内实验发现, LLLT 组小鼠脊髓损伤区 GFAP 和 CSPG 表达较 SCI 组均减少($P<0.05$)。体外实验结果显示, LLLT 后巨噬细胞 iNOS 的表达显著降低($P<0.05$)。与 Ctrl 组相比, M1 组星形胶质细胞的活性明显升高($P<0.05$), 磷酸化信号转导与转录激活因子 3(phosphorylated-signal transduction and activators of transcription 3, pSTAT3)的表达显著增加($P<0.05$)。而相较于 M1 组, M1+LLLT 组星形胶质细胞活性显著下降($P<0.05$), pSTAT3/STAT3 的表达明显抑制($P<0.05$)。RT-qPCR 及 ELISA 结果显示, M1 组星形胶质细胞 aggrecan, versican 的 mRNA 和蛋白的表达比 Ctrl 组均显著增强($P<0.05$); M1+LLLT 组相较于 M1 组, aggrecan 的 mRNA 和蛋白的表达受到抑制($P<0.05$), versican 的蛋白表达虽有下降, 但无统计学差异。**结论:** LLLT 可抑制小鼠脊髓损伤区星形胶质细胞的活化, 减少 CSPG 的表达, 且这种作用可通过弱激光作用下的巨噬细胞实现。

【关键词】 脊髓损伤; 弱激光治疗; M1 型巨噬细胞; 星形胶质细胞; 硫酸软骨素蛋白多糖

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2019.02.10

中图分类号: R683.2, Q813.1 文献标识码 A 文章编号: 1004-406X(2019)-02-0156-08

Effect of macrophages on astrocytes under 810nm low level laser therapy/SUN Jiakai, ZHANG Jiawei, LI Kun, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(2): 156-163

【Abstract】Objectives: To investigate the effects of macrophages controlled by 810nm low level laser on the activation of astrocytes and the secretion of chondroitin sulfate proteoglycans (CSPG). **Methods:** An animal model of spinal cord injury was established, including spinal cord injury group (SCI) and low level laser therapy group (LLLT). Immunofluorescence was used to detect the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and CSPG in spinal cord injury area. The macrophage-astrocyte model was established in vitro, which was divided into Ctrl group(blank control), M1 group(astrocytes were cultured in M1 conditioned medium) and M1+LLLT group (astrocytes were cultured in M1 conditioned medium with low level laser), Western Blot was used to detect the expression of M1 marker inducible nitric oxide synthase (iNOS) and astrocyte activation pathway signaling and activators of transcription (STAT3). The activity of astrocytes was detected by CCK-8.

基金项目: 国家自然科学基金(81572151), 陕西省社会发展攻关计划项目(2016SF-143)

第一作者简介: 男(1994-), 医学硕士, 研究方向: 脊髓损伤修复

电话: (029)84775290 E-mail: sjk_young@163.com

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

RT-qPCR and ELISA were used to assay the expression of the core protein of CSPG (aggrecan and versican).

Results: In vivo experiments showed that the expression of GFAP and CSPG in the spinal cord injury area in LLLT group was lower than that in SCI group ($P<0.05$). The results of in vitro experiments showed that the expression of iNOS in macrophages significantly decreased ($P<0.05$) after LLLT. The activity of astrocytes in M1 group was significantly increased, compared with the Ctrl group ($P<0.05$), and the expression of pSTAT3/STAT3 significantly increased ($P<0.05$). Compared with M1 group, the activity of astrocytes in M1+LLLT group significantly decreased ($P<0.05$), and the expression of pSTAT3 was significantly inhibited ($P<0.05$). RT-qPCR and ELISA showed the expression of aggrecan and versican mRNA and protein in M1 group was significantly higher than that in Ctrl group ($P<0.05$). Compared with M1 group, the expression of aggrecan mRNA and protein in M1+LLLT group was inhibited ($P<0.05$). However, while the protein expression of versican decreased, but there was no statistical difference. **Conclusions:** Low level laser therapy can inhibit the activation of astrocytes and reduce the expression of CSPG in the spinal cord injury region of SCI mice, which can be achieved by macrophages under low level laser.

[Key words] Spinal cord injury; Low level laser therapy; M1 macrophage; Astrocyte; Chondroitin sulfate proteoglycans

[Author's address] Department of Orthopedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)预后差,目前缺少有效的治疗方法^[1]。SCI发生后,损伤区严重的炎性环境激活星形胶质细胞,促使其活化增殖、分泌硫酸软骨素蛋白多糖(chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG)等细胞外基质,形成具有物理和化学屏障作用的胶质瘢痕,导致脊髓功能恢复受阻^[2-6]。作为主要的炎症细胞,巨噬细胞在脊髓损伤中扮演着重要角色^[7]。其中骨髓源性巨噬细胞在SCI后迅速占据损伤区,持续分泌炎症物质,导致损伤持续加重^[8]。巨噬细胞具有极化的特性,可极化为具有细胞毒性的M1型细胞和抑炎促修复作用的M2型细胞^[9]。在SCI病程中,M1型巨噬细胞占据主导并持续浸润损伤区。弱激光治疗(low level laser therapy, LLLT)因具有调控细胞因子、炎症介质,增加组织的含氧量,无创性等优点,被广泛应用于脑卒中及周围神经损伤等临床治疗中^[10,11]。本课题组前期研究发现,810nm弱激光能显著促进脊髓损伤大鼠运动功能的恢复,抑制损伤后微环境炎症因子的表达,促进损伤区及损伤旁区神经的存活,抑制巨噬细胞向M1型极化^[12-14]。但LLLT能否调控SCI后星形胶质细胞的活化和CSPG的表达,且这种调控作用是否通过LLLT对M1型巨噬细胞的抑制作用进行,尚不得知。本研究拟对810nm弱激光调控下的巨噬细胞对星形胶质细胞的作用进行探讨。

1 材料和方法

1.1 主要材料、试剂和仪器

BALB/c小鼠来自第四军医大学实验动物中心。氙灯光源激光照射器(型号GLORIA-X150A,北京卓立汉光);激光准直镜(上海大恒光学仪器);外科显微镊(Fine Science Tools, Germany);巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)(义翘神州,北京);脂多糖(LPS, Sigma, 美国); γ -干扰素(IFN- γ , Sigma, 美国);兔抗GFAP(Abcam, 英国);鼠抗含生长因子样模体粘液样激素样受体(EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1, EMR1, 又称F4/80)(Abcam, 英国);鼠抗CSPG(Sigma, 美国);兔抗iNOS(CST, 美国);兔抗pSTAT3(CST, 美国);兔抗STAT3(CST, 美国);小鼠酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(华美生物, 武汉);实时荧光定量PCR(Real-Time PCR)试剂盒(Takara, 日本);多功能酶标仪(BioTek, 美国)。

1.2 脊髓损伤模型建立

参照课题组前期经验^[12],建立双侧脊髓压迫标准化动物模型。选取6~8周、体重18~20g的雌性BALB/c小鼠,分为脊髓损伤(SCI)组和脊髓损伤后弱激光治疗(LLLT)组,每组10只。小鼠以1%戊巴比妥腹腔注射麻醉,在T9椎体上方进行椎板切除术,暴露脊髓,随后用镊子(Fine Science Tools, Germany)进行横向压缩,通过这些镊子中间放置一个金属垫片,使其在完全关闭时尚存

0.5mm 的间隙。将镊子垂直放置在椎管上并保持夹闭时间 20s 然后释放,随后止血、闭合切口。术后每天给予小鼠人工辅助排尿 2 次。

1.3 细胞提取和培养

巨噬细胞:将 BALB/c 小鼠麻醉致死,70% 酒精浸泡消毒,剥离股骨和胫骨,使用冷的磷酸盐缓冲盐水(PBS)将骨髓从髓腔中冲出。过滤后,加入红细胞裂解液裂解 10min,1000r/min 离心 5min。采用含有 M-CSF(10ng/ml)DMEM 培养基重悬并接种,置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。使用 100ng/ml 的 LPS 和 20ng/ml 的 IFN- γ , 将其极化为 M1 型巨噬细胞。采用 F4/80 作为巨噬细胞标志物进行免疫荧光鉴定,结果显示 F4/80 阳性细胞数占 95%以上(图 1)。

星形胶质细胞:取出新生 BALB/c 仔鼠大脑皮层,仔细剥去脑膜并剪碎皮层,消化后过滤离心,用 DMEM 培养基重悬并接种于 T75 培养瓶中,每 3d 换液。将细胞培养至铺满瓶底后,以 180r/min 震荡培养瓶 15h,然后传代使用。采用 GFAP 作为标志物对星形胶质细胞进行免疫荧光鉴定,结果显示 GFAP 阳性细胞数占 90%以上(图 2)。

条件培养基来自未干预的巨噬细胞(Ctrl 组)、M1 型巨噬细胞(M1 组)和经弱激光照射的 M1 型巨噬细胞(M1+LLLT 组)的上清液。实验均采用 50%条件培养基+50%常规培养基模式培养星形胶质细胞。

1.4 弱激光照射

照射时将动物或细胞置于暗箱,在垂直方向上照射(经皮照射 SCI 小鼠)。LLLT 组 SCI 小鼠连

续照射 14d。所有照射参数均依据课题组前期研究^[13,15]得到,参数见表 1。

1.5 组织准备

SCI 术后 14d,采用 1%戊巴比妥将 SCI 组和 LLLT 组小鼠麻醉后,迅速先后使用 0.9%生理盐水和 4%多聚甲醛(PFA)对小鼠灌注并固定。固定后取出以损伤部位为中心的长 2cm 的脊髓段,放入 4%PFA 过夜固定,之后将脊髓转移到 25%葡萄糖溶液中 4℃低温保护。使用低温切片机将脊髓组织切成 40 μ m 切片,放置于载玻片上-20℃保存备用。

1.6 免疫荧光染色

PBS 清洗切片或细胞爬片,使用 0.2% Triton X-100 通透 15min,PBS 清洗 3 次,每次 5min,5% 驴血清室温下封闭 1h,然后加入稀释好的一抗:兔抗 GFAP (1:300),鼠抗 CSPG (1:300),鼠抗 F4/80(1:500)4℃孵育过夜。次日 PBS 清洗 3 次,每次 5min,加入稀释好的 Alexa Fluor 二抗 (1:300)在 37℃孵育 1h,PBS 清洗 3 次,每次 5min,使用 DAPI 标记细胞核,PBS 清洗 3 次,每次 5min,观察小鼠脊髓中星形胶质细胞和 CSPG 的表达,以及进行体外巨噬细胞和星形胶质细胞的鉴定。

1.7 细胞活性检测

使用不同组条件培养基(Ctrl、M1、M1+LLLT)培养星形胶质细胞 3d 后,将每组星形胶质细胞以 2 $\times$ 10⁴ 密度接种于 96 孔板,每孔加入 100 μ l 培养基和 10 μ l CCK-8 溶液,在 37℃避光孵育 2h,使用多功能酶标仪在 450nm 波长测量每组吸光度值。

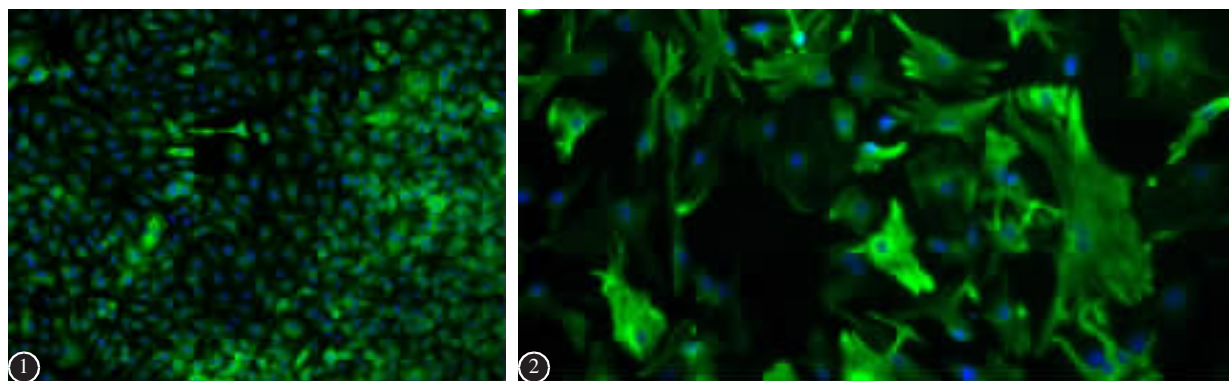


图 1 小鼠骨髓源性巨噬细胞纯度鉴定($\times$ 200) 图 2 小鼠第 3 代星形胶质细胞纯度鉴定($\times$ 400)

Figure 1 Purity identification of mouse bone-marrow derived macrophages **Figure 2** Purity identification of mouse third generation astrocytes

1.8 实时荧光定量 PCR

所有的 RNA 均使用 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa, 日本), 操作流程参照厂家说明。使用 1 μ g RNA 样本, 加入 PrimeScript RT Master Mix Kit 进行反转录获取 cDNA。实时定量荧光 PCR 步骤参照 Takara 试剂盒说明, 实验选取 10 μ l 体系, 加入 1.5 μ l cDNA, 2.5 μ l ddH₂O, 1 μ l 引物和 5 μ l SYBR Green, 内参选用 GAPDH。数据分析采用 $\delta\delta t$ 法。引物在 NCBI 的 nucleotide 中搜索得到, 引物序列如表 2。

1.9 酶联免疫吸附实验 (ELISA)

采用巨噬细胞条件培养基培养 72h 后, 更换正常培养基培养 72h, 获取细胞上清液作为样品。按照 ELISA 试剂盒说明准备待测样品和标准品。免疫反应程序严格根据 ELISA 试剂盒提供的实验方案进行。用多功能酶标仪在 450nm 的波长处测量每组的吸光度, 计算每个样品的浓度。

1.10 免疫蛋白印迹实验

收集干预 48h 后的星形胶质细胞提取蛋白, BCA 法测量蛋白含量。取 25 μ g 蛋白上样, 电泳, 转膜, 封闭 1h。加入相应的一抗 (兔抗 iNOS 1:2000; 兔抗 pSTAT3 1:1000; 兔抗 STAT3 1:1000) 4℃过夜。使用 HRP 缀合的山羊抗兔的二抗 (1:1000) 室温孵育 1h。利用凝胶成像系统观察结果。采用 Image J 软件测量灰度值, 计算目标蛋白与 GAPDH 灰度值的百分比, 用于统计分析。

1.11 统计分析

数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 以 Graphpad Prism 软件进行制图, 用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 每组实验均独立重复 5 次。两组间比较采用 student's *t* 检验, 三组以上均值比较采取单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对损伤区 GFAP 和 CSPG 的影响

为探究 LLLT 对 SCI 小鼠损伤区星形胶质细胞和 CSPG 的影响, 实验采用免疫荧光染色方法对 SCI 后 14d 的小鼠脊髓切片进行检测。结果发现, 相较于 SCI 组, LLLT 组脊髓损伤区 GFAP (绿色) 的平均荧光密度显著下降, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 3, 表 3), LLLT 组星形胶质细胞的突起明显少于 SCI 组 (图 3c, 3g)。LLLT 组 CSPG

(红色) 的平均荧光密度明显降低, 与 SCI 组相比, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 3, 表 3)。这说明 SCI 后 LLLT 可显著抑制星形胶质细胞活化, 减少损伤区 CSPG 的生成。

2.2 对 M1 型巨噬细胞标志物的影响

使用免疫蛋白印迹方法检测 M1 型巨噬细胞的标志物 iNOS^[7] 的表达。结果发现, 与 Ctrl 组相比, M1 型巨噬细胞高表达 iNOS, 具有统计学差异 ($P<0.05$), 而在弱激光照射后, iNOS 的表达较 M1 组显著下降, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$, 表 4、图 4)。结果说明弱激光可显著抑制巨噬细胞向 M1 型极化。

2.3 对星形胶质细胞活性的影响

结果发现, 相较 Ctrl 组, M1 组星形胶质细胞活性增加 ($P<0.05$), 而 M1+LLLT 组活性相比 M1 组显著下降 ($P<0.05$, 表 4)。STAT3 作为星形胶质细胞活化关键通路, 结果发现, M1 组 pSTAT3 的表达增加 ($P<0.05$), 而 M1+LLLT 组 pSTAT3 的表达相较 M1 组明显下降, pSTAT3/STAT3 的改变具有统计学差异 ($P<0.05$, 表 4、图 5)。

2.4 对星形胶质细胞 CSPG mRNA 表达的影响

与对照组相比, M1 组星形胶质细胞 aggrecan 及 versican 的 mRNA 表达水平平均明显增加 ($P<0.05$), 弱激光照射后两者的 mRNA 表达较 M1 组均显著下降 ($P<0.05$, 表 5)。

2.5 对星形胶质细胞 CSPG 蛋白的表达影响

与对照组相比, M1 组星形胶质细胞 aggrecan 及 versican 的蛋白表达水平平均均显著提高 ($P<0.05$, 表 6)。尽管 M1+LLLT 组两种蛋白表达相比

表 1 弱激光参数

Table 1 low level laser parameters

	体内实验 In vivo	体外实验 In vitro
波长 Wave length (nm)	810	810
输出功率 Output power (mw)	150	19
光斑面积 Facula area (cm ²)	0.3	4.5
时间 Time	3000s	440s

表 2 RT-qPCR 引物序列

Table 2 Primer sequences used for RT-qPCR

	基因序列 (5'-3') Primer sequences	长度 Range
聚集蛋白聚糖 Aggrecan	F: CCGGTACCCTACAGACACT R: ACATTGCTCCTGCTGCAA	7612
多功能蛋白聚糖 Versican	F: GCTTTAAACGACCTGATCTCTGC R: TAACAGGTGCTCCGTTGAG	4335

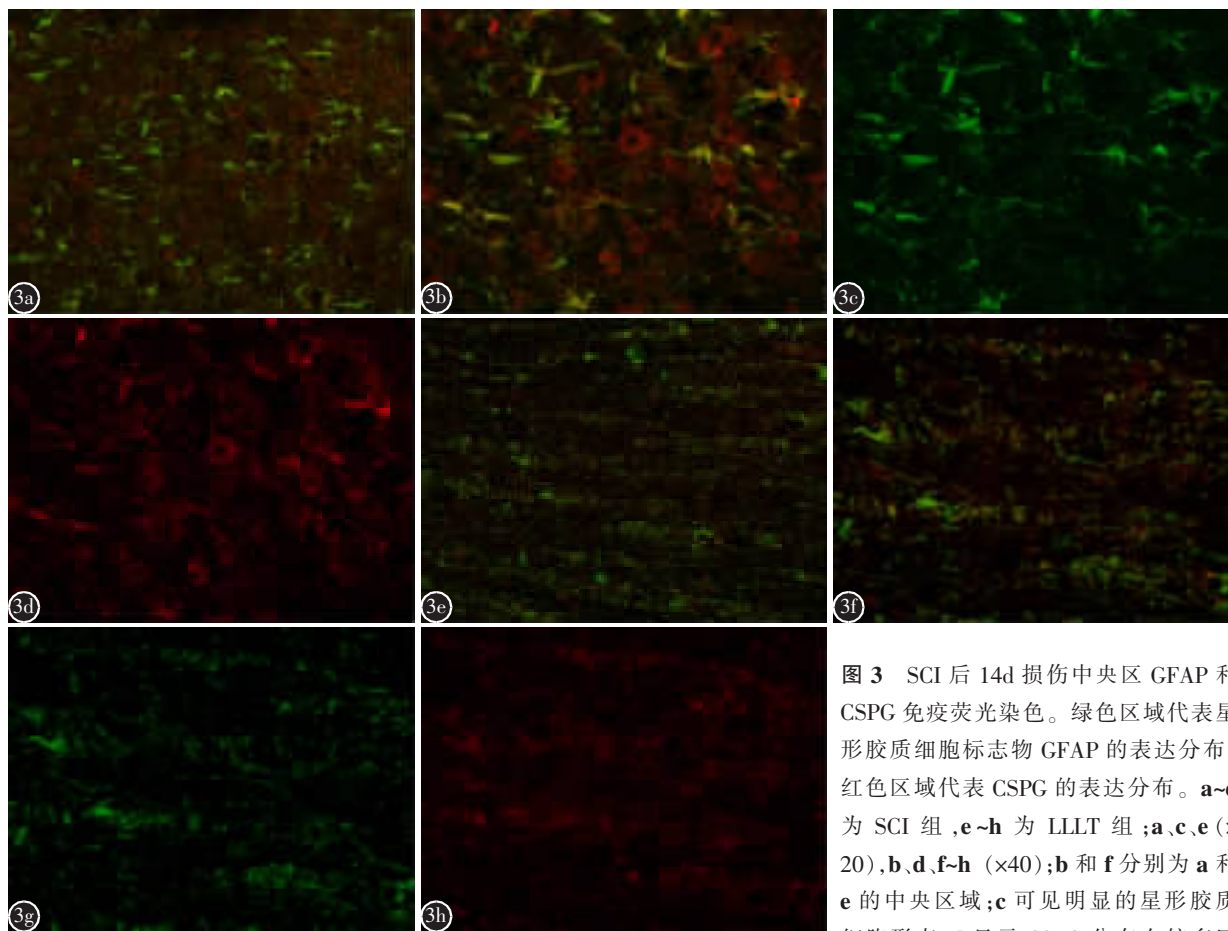


图3 SCI后14d损伤中央区GFAP和CSPG免疫荧光染色。绿色区域代表星形胶质细胞标志物GFAP的表达分布,红色区域代表CSPG的表达分布。a~d为SCI组,e~h为LLLT组;a,c,e($\times 20$),b,d,f~h($\times 40$);b和f分别为a和e的中央区域;c可见明显的星形胶质细胞形态;d显示CSPG分布在较多区域;g和h可见弱激光治疗后损伤区星形胶质细胞和CSPG表达分布区域明显减少

域;g和h可见弱激光治疗后损伤区星形胶质细胞和CSPG表达分布区域明显减少

Figure 3 The GFAP and CSPG staining was performed in the transverse section of the central region of the injured area 14d after SCI. The green region represented the expression distribution of GFAP (astrocyte marker) and the red region was the expression distribution region of CSPG. a~d was the SCI group, and e~h was the LLLT group. a, c, e($\times 20$); b, d, f~h($\times 40$). b and f were respectively the central regions of a and e; c showed visible astrocyte morphology; d revealed CSPG distribution in more areas; g and h showed that the expression distribution areas of GFAP and CSPG in the injured area were significantly reduced after weak laser treatment

M1组均呈减少趋势,但只有aggrecan的差异具有统计学意义($P < 0.05$,表6)。

3 讨论

脊髓损伤后,由经典活化型巨噬细胞主导的

表3 脊髓损伤区GFAP和CSPG的平均荧光密度

Table 3 Mean fluorescence density of GFAP and CSPG in spinal cord injury area

	脊髓损伤组 SCI group	弱激光治疗组 LLLT group
胶质纤维酸性蛋白 GFAP	0.116 $\pm$ 0.009	0.058 $\pm$ 0.009 ^①
硫酸软骨素蛋白多糖 CSPG	0.131 $\pm$ 0.010	0.083 $\pm$ 0.110 ^①

注:①与SCI组比较 $P < 0.05$

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

损伤区微环境紊乱,显著促进星形胶质细胞活化,大量分泌CSPG等细胞外基质,形成严重阻碍神经再生和功能恢复的胶质瘢痕^[16]。LLLT作为一种经典的无创性治疗方法,广泛应用于诸多临床领域^[17]。课题组前期研究发现,LLLT可显著促进脊髓损伤大鼠的修复,改善其运动功能,减少损伤区M1的数量,抑制损伤区炎性因子的分泌^[12,13]。本研究在此基础上发现,LLLT明显抑制脊髓损伤小鼠星形胶质细胞的活化和CSPG的表达,且这种作用与巨噬细胞表型的改变相关。

国内外很多学者对LLLT在中枢神经系统疾病治疗中的作用进行了研究,Xuan等^[18]对小鼠脑损伤模型进行810nm弱激光照射,结果发现LLL

表 4 不同组巨噬细胞 iNOS、星形胶质细胞活性及 pSTAT3/STAT3 比值的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Expression of iNOS in different groups of macrophages

	iNOS 相对表达量 Relative expression of iNOS	星形胶质细胞活性(%) Cell activity of astrocytes	pSTAT3/STAT3 比值 Ratio of pSTAT3/STAT3
对照组 Ctrl group	1.109±0.260	94.067±11.035	0.952±0.128
M1 组 M1 group	6.566±1.048 ^①	129.467±12.205 ^①	1.551±0.138 ^①
LLLTL 组 LLLT group	2.561±0.689 ^②	95.183±6.131 ^②	1.001±0.186 ^②

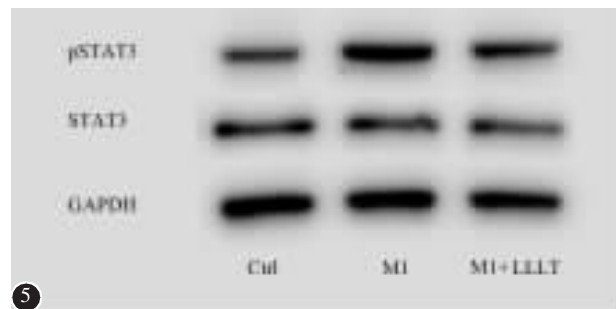
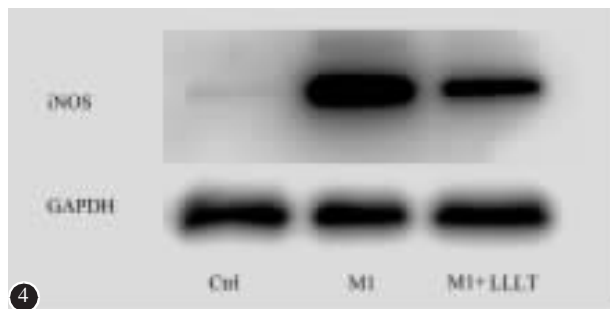
注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与 M1 组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with control group, $P<0.05$; ②Compared with the M1 group, $P<0.05$ 

图 4 Ctrl 组、M1 组、M1+LLLTL 组巨噬细胞 iNOS 的表达情况, M1 组即 M1 型巨噬细胞 iNOS 表达明显增多, 但经弱激光照射 (LLLTL) 后, 其表达量显著下降 图 5 三组星形胶质细胞 pSTAT3 和 STAT3 的表达情况, 三组 STAT3 表达量基本一致, 但 M1 组 pSTAT3 的表达量明显升高, 而 M1+LLLTL 组则显著下降

Figure 4 The expression of iNOS in macrophages of Ctrl group, M1 group and LLLTL group. The expression of iNOS in M1 group increased significantly, but decreased significantly after low-level laser therapy (LLLTL) **Figure 5** The expression of pSTAT3 and STAT3 in astrocytes of three group. The three groups have approximately same expression of STAT3. The expression of pSTAT3 significantly increased in the M1 group, but decreased significantly in the LLLTL group

表 5 星形胶质细胞 aggrecan 和 versican 的 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Relative mRNA expression levels of astrocyte aggrecan and versican

	Aggrecan	Versican
对照组 Ctrl group	1.000±0	1.000±0
M1 组 M1 group	1.969±0.310 ^①	1.774±0.298 ^①
M1+LLLTL 组 M1+LLLTL group	1.293±0.174 ^②	1.222±0.070 ^②

注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与 M1 组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with Ctrl group, $P<0.05$; ②Compared with the M1 group, $P<0.05$ 表 6 星形胶质细胞上清液中 aggrecan 和 versican 蛋白的含量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Levels of aggrecan and versican protein in astrocyte supernatants

	Aggrecan	Versican
对照组 Ctrl group	52.363±10.057	249.124±31.676
M1 组 M1 group	153.392±15.354 ^①	335.762±21.475 ^①
M1+LLLTL 组 M1+LLLTL group	85.673±13.248 ^②	308.323±17.661

注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与 M1 组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with Ctrl group, $P<0.05$; ②Compared with the M1 group, $P<0.05$

可明显抑制脑部 GFAP 的表达。Yang 等^[19]在阿尔兹海默病中采用 LLLTL 照射星形胶质细胞发现, LLLTL 可抑制其炎性表达和氧化应激反应。目前尚缺乏 LLLTL 对脊髓损伤后星形胶质细胞的研究, 本研究构建了小鼠脊髓钳夹损伤模型, 采用免疫荧光染色方法, 发现 LLLTL 明显抑制 SCI 后 GFAP

的表达, 抑制星形胶质细胞的活化。

SCI 后星形胶质细胞的活化与损伤区炎症微环境有关, 其中巨噬细胞与星形胶质细胞间的相互作用起到重要作用^[10]。Haan 等^[20]分别使用 M1 和 M2 条件培养基培养星形胶质细胞, 实验发现, M1 可显著促进神经巢蛋白 (nestin) 等经典活化基

因的表达,而 M2 则起抑制作用。这表明,巨噬细胞表型的改变可对星形胶质细胞产生不同的作用。课题组前期实验证明 LLLT 可改变 M1 型巨噬细胞的表型,抑制其炎性分泌^[13],基于此,本实验进一步探究 LLLT 对星形胶质细胞活化的影响。结果发现,M1 型巨噬细胞可增强星形胶质细胞活性,但 LLLT 显著抑制该影响。同时,采用弱激光照射后的巨噬细胞条件培养基可显著抑制星形胶质细胞 pSTAT3/STAT3 的表达。这证明 LLLT 可通过改变巨噬细胞的表型和分泌,进而调节星形胶质细胞的活化状态。

CSPG 作为抑制轴突再生和 SCI 恢复的关键性环境因素,其成分主要包括:aggrecan, neurocan, versican 和 NG2 等^[21]。以往研究采用干细胞移植、鞘内注射硫酸软骨素酶 ABC 等多种手段^[22,23],降低 CSPG 的表达,可明显改善脊髓损伤预后,促进运动功能恢复,但有关 LLLT 对 CSPG 作用的研究较少。为明确 LLLT 在 SCI 中对 CSPG 的影响,实验采用免疫荧光染色方法检测发现,在 LLLT 治疗后,SCI 小鼠脊髓损伤区 CSPG 含量显著下降。体外实验采用 RT-qPCR 和 ELISA 对星形胶质细胞的 CSPG 核心蛋白(aggrecan、versican)的表达进行测定,结果发现两者在基因转录和蛋白水平的表达均减少,但 versican 在蛋白层面的减少不具有统计学意义。这可能与 mRNA 在翻译时所受到的多种调节因素有关。本实验在课题组前期基础上进一步证明弱激光可通过调节 M1 型巨噬细胞的表型,从而抑制星形胶质细胞的活化和 CSPG 的表达。但目前 LLLT 在 SCI 中对星形胶质细胞的影响的机制较为复杂,仍需进一步探究。

综上所述,本次实验研究表明,LLLTT 可调控脊髓损伤后巨噬细胞和星形胶质细胞的生物学行为,下调 M1 巨噬细胞极化,减轻脊髓损伤后炎症微环境,抑制星形胶质细胞活化,降低 CSPG 表达,抑制星形胶质理化屏障作用,促进脊髓损伤修复,为 LLLT 应用于脊髓损伤的临床治疗提供理论基础。

4 参考文献

- Jain NB, Ayers GD, Peterson EN, et al. Traumatic spinal cord injury in the United States, 1993–2012[J]. *JAMA*, 2015, 313(22): 2236–2243.
- Herrmann JE, Imura T, Song B, et al. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(28): 7231–7243.
- Fan H, Zhang K, Shan L, et al. Reactive astrocytes undergo M1 microglia/macrophages-induced necroptosis in spinal cord injury[J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11(1): 14–29.
- Gliem M, Krammes K, Liaw L, et al. Macrophage-derived osteopontin induces reactive astrocyte polarization and promotes re-establishment of the blood brain barrier after ischemic stroke[J]. *Glia*, 2015, 63(12): 2198–2207.
- John GR, Lee SC, Brosnan CF. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation[J]. *Neuroscientist*, 2003, 9(1): 10–22.
- Su Y, Wang Y, Zhou Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor activates inflammatory responses of astrocytes through interaction with CD74 receptor[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(2): 2719–2730.
- David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12(7): 388–399.
- Vereyken EJ, Heijnen PD, Baron W, et al. Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8(1): 58–73.
- 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.
- Tsai SR, Hamblin MR. Biological effects and medical applications of infrared radiation [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 170: 197–207.
- Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature[J]. *Muscle Nerve*, 2005, 31(6): 694–701.
- 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): 620–632.
- 李鲲, 宋基伟, 张家玮, 等. 810nm 弱激光对 M1 型骨髓源性巨噬细胞的作用及其机制[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2018, 28(4): 360–367.
- 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.
- 宋基伟, 梁卓文, 李鲲, 等. 810nm 弱激光照射对大鼠急性脊髓损伤后巨噬细胞极化的作用研究[J]. *激光生物学报*, 2017, 26(1): 17–23.
- Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration[J]. *Nat Rev Neurosci*. 2006, 7(8): 617–627.
- de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy[J]. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*, 2016, 22(3). pii: 7000417. doi: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.
- Xuan W, Huang L, Hamblin MR. Repeated transcranial

- low-level laser therapy for traumatic brain injury in mice: biphasic dose response and long-term treatment outcome[J]. J Biophotonics, 2016, 9(11-12): 1263-1272.
19. Yang X, Askarova S, Sheng W, et al. Low energy laser light (632.8nm) suppresses amyloid-beta peptide-induced oxidative and inflammatory responses in astrocytes [J]. Neuroscience, 2010, 171(3): 859-868.
20. Haan N, Zhu B, Wang J, et al. Crosstalk between macrophages and astrocytes affects proliferation, reactive phenotype and inflammatory response, suggesting a role during reactive gliosis following spinal cord injury [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12(1): 109-118.
21. Tang X, Davies JE, Davies SJ. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue [J]. J Neurosci Res, 2003, 71(3): 427-444.
22. Bartus K, James ND, Didangelos A, et al. Large-scale chondroitin sulfate proteoglycan digestion with chondroitinase gene therapy leads to reduced pathology and modulates macrophage phenotype following spinal cord contusion injury [J]. J Neurosci, 2014, 34(14): 4822-4836.
23. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury[J]. Nature, 2002, 416(6881): 636-640.
- (收稿日期:2018-10-23 修回日期:2018-11-27)
(英文编审 郑国权/贾丹彤)
(本文编辑 彭向峰)

消息

第四届中山骨科论坛学术周通知

由复旦大学附属中山医院骨科、上海市中西医结合学会骨伤科专业委员会、上海医师协会骨科医师分会关节工作组、中国临床医学杂志主办,上海医学会创伤专业委员会、上海市医学会骨科分会脊柱学组、复旦大学基础医学院解剖与组织胚胎学系、中华骨科杂志、中华创伤杂志、中国脊柱脊髓杂志协办的第四届中山骨科论坛学术周将于2018年4月11~15日举行。

中山骨科论坛学术周是复旦大学附属中山医院骨科在连续举办七届全国脊柱及关节学习班和两届围关节创伤及肩关节镜学习班的基础上,于2015年开始举办的。前三届学术周邀请了顾玉东、戴尅戎、邱贵兴、付小兵院士和来自美国、德国、法国、日本、韩国、中国香港等国家和地区的著名教授及各相关专业专家参与,获得了广泛好评。第四届中山骨科论坛学术周将继续邀请国内外著名专家,日程安排如下:2018年4月11-13日举行全脊椎肿瘤整块切除学习班暨脊柱外科新技术论坛,董健教授、姜晓幸教授担任主席;4月12-14日举行人工关节置换技术规范与新进展学习班,阎作勤教授、姚振均教授担任主席;4月13-15日举行围关节骨折手术治疗规范学习班暨创伤骨科论坛,施德源教授、周建平教授担任主席;4月14-15日举行肩关节镜操作学习班暨关节镜新技术论坛,林建平教授担任主席;4月11日举行四肢骨与软组织肿瘤诊治规范及新进展论坛,王毅超教授担任主席。

本届学术周各学习班可分别报名,详情请关注 www.zs-hospital.sh.cn 的“学术会议”栏和 www.zs-guke.cn 的“骨科公告”栏。实践操作不接受现场报名,有报名意愿的学员请先联系陆医师(手机:13917306891,电话:021-64041990 转 2336)预先报名,操作报名截止日期为2018年4月5日。