

文章编号: 0258-7025(2004)02-0249-04

# 氦氖激光对鼠体液免疫因子 IL-2 影响的 实验研究

黄保续<sup>1</sup>, 王洪斌<sup>1\*</sup>, 刘焕奇<sup>1</sup>, 曲志娜<sup>2</sup>, 刘西锋<sup>1</sup>, 程绍辉<sup>1</sup>, 高 利<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 东北农业大学动物医学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; <sup>2</sup> 农业部动物检疫所, 山东 青岛 266032)

**摘要** 为探讨氦氖激光照射对小鼠脾淋巴细胞 IL-2 诱生活性的影响,以 BALB/c 小鼠为研究对象,应用 7.33, 11.00, 14.67, 22.00 和 36.67 J/cm<sup>2</sup> 5 种剂量的氦氖激光作小鼠内眼角照射,连续照射 8 天,并于照射开始后第 3, 6, 9, 13 和 17 天动态监测实验鼠脾淋巴细胞 IL-2 诱生活性。结果表明,以日剂量为 7.33, 11.00, 14.67 和 22.00 J/cm<sup>2</sup> 氦氖激光照射小鼠后,IL-2 活性出现不同程度的增强或升高,而 36.67 J/cm<sup>2</sup> 剂量组却呈现降低趋势。由此可见,适当剂量的低能量激光照射可对小鼠 IL-2 诱生活性产生增强效应,而过大剂量氦氖激光照射则对 IL-2 诱生活性产生抑制效应。

**关键词** 免疫病理学; 氦氖激光照射; 免疫调节效应; 小鼠; 脾淋巴细胞 IL-2 诱生活性

中图分类号 R 318.51 文献标识码 A

## Study on the Effects of He-Ne Laser Irradiation on the Activity of Humoral Immune Factors IL-2 in Mice

HUANG Bao-xu<sup>1</sup>, WANG Hong-bin<sup>1</sup>, LIU Huan-qi<sup>1</sup>,  
QU Zhi-na<sup>2</sup>, LIU Xi-feng<sup>1</sup>, CHENG Shao-hui<sup>1</sup>, GAO Li<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, North Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)  
(<sup>2</sup>Animal Quarantine of Agricultural Ministry, Qingdao, Shandong 266032, China)

**Abstract** In order to illustrate mechanism of the immune modulation effect of He-Ne laser irradiation with the concentration changes of splenic T lymphocytes induced IL-2 activity in mice, the effects of He-Ne laser irradiation on splenic T lymphocytes induced IL-2 activity in mice were studied. By irradiating upon the inner corners of the mice eyes with He-Ne laser at five different dosages of 7.33, 11.00, 14.67, 22.00 and 36.67 J/cm<sup>2</sup> for eight days, the splenic T lymphocytes induced IL-2 activity was monitored kinetically at the 3rd, 6th, 9th, 13th and 17th day after laser irradiation. The values of splenic T lymphocytes induced IL-2 activity increased in the groups of 7.33, 11.00, 14.67 and 22.00 J/cm<sup>2</sup>, while the values decreased significantly in the group of 36.67 J/cm<sup>2</sup>. The results indicated that He-Ne laser irradiation at proper dosages produced up regulation effects on the splenic T lymphocytes induced IL-2 activity in mouse, while the large dose showed the down regulation effects.

**Key words** immunity nosology; He-Ne laser irradiation; immune modulation; mice; splenic T lymphocytes induced IL-2 activity

白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)是 Morgan 于 1970 年在致有丝分裂原刺激的淋巴细胞培养上清液中发现的,后被命名为白细胞间介素 II (IL-2),

也就是所谓的 T 细胞生长因子(T cell growth factor, TCGF)。其主要的生物活性是促进 T 淋巴细胞和 NK 细胞的增殖,促进 B 细胞分化和增殖,

收稿日期:2002-07-22; 收到修改稿日期:2002-10-31

基金项目:国家自然科学基金(项目批准号:30170712)资助项目。

作者简介:黄保续(1970—),男,山东嘉祥人,博士,副研究员,现工作单位为农业部动物检疫所。主要从事激光生物学和动物流行病学研究。E-mail:huangbx@epizoo.org

\* 通信联系人

促进抗体生成等。实验也证实,IL-2 具有广泛的免疫增强效应,能增强胸腺细胞和 T 细胞对致有丝分裂原的应答,促进细胞毒前体细胞分化为 CTL 细胞,激活脾淋巴细胞对 SRBC 产生抗体的应答,促进  $\gamma$ -IFN 的产生,相应提高 NK 活性等<sup>[1~3]</sup>。因此,IL-2 在机体免疫应答、免疫调节和抗肿瘤免疫中具有十分重要的作用。本实验就是研究氦氖激光照射对脾淋巴细胞 IL-2 诱生活性的影响,从而探讨氦氖激光照射对机体的免疫调节作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 激光照射方法

H-N18-1 型氦氖激光治疗机预热 30 min 后调整激光功率为 12 mW。将光束垂直照射小鼠内眼角(小鼠内眼角处既有丰富的神经,又有免疫器官——哈德尔氏腺,哈德尔氏腺是动物机体一种较大的免疫器官),距离 30 cm,光斑直径 0.25 cm,根据照射时间计算激光剂量,计算公式<sup>[4]</sup>为

$$\text{照射剂量}(\text{J}/\text{cm}^2) = 4 \cdot P \cdot T / \pi \cdot D^2$$

公式中,  $P$  为激光功率(W);  $T$  为照射时间(s);  $D$  为光斑直径(cm)。

### 1.2 实验动物分组与实验方法

4 周龄雄性 BALB/c 小鼠,体重  $20 \pm 1$  g,中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供,预饲一周后体重至  $25 \pm 1$  g 进入实验,体重不合格者剔除。BALB/c 小鼠共计 150 只,随机分成 I, II, III, IV, V, VI 6 组,每组 25 只。其中第 1 组为正常对照组,不作激光照射。其余 5 组均作氦氖激光照射,其日剂量为 7.33, 11.00, 14.67, 22.00 和 36.67 J/cm<sup>2</sup>,相应照射时间分别为 30, 45, 60, 90 和 150 s,连续照射 8 天。从激光照射开始后第 3, 6, 9, 13 和 17 天,每组小鼠各割杀 5 只,在无茵条件下取出脾脏,放入预冷的 Hanks 液平皿中将脾脏用针尖刺破,吹打细胞使单个淋巴细胞进入平皿中,然后收集 Hanks 液经 4 层纱布滤过移入刻度离心管内,用氯化胺裂解法溶解红细胞后离心沉淀两次,加入 RPMI1640 全培养液混匀即为所得的脾淋巴细胞悬液,台盼蓝染色活细胞率大于 95%。同时进行细胞计数,调整细胞浓度至  $1 \times 10^7$  /mL。待测 IL-2 诱生活性<sup>[5,6]</sup>。

小鼠脾淋巴细胞 IL-2 诱生活性测定采用 MLTT 法<sup>[7]</sup>,分三步进行。

活化小鼠脾细胞的制备:在无茵条件下制成的

浓度为  $1 \times 10^7$  /mL 的单个脾细胞悬液,加入 ConA (刀豆蛋白, Sigma 产品,用 pH7.4 的 0.1 mol/L PBS 配成 200  $\mu$ g/mL ConA 溶液,过滤除菌,  $-20^\circ\text{C}$  冻存),使终浓度为 10  $\mu$ g/mL,置入 CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 48 h。收集培养细胞用  $\alpha$ -MM 洗液。洗涤 3 次除去 ConA,以 RPMI1640 完全培养液重新悬浮,使其浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,台盼蓝拒染,检测活细胞率 >95%,当天测定 IL-2 活性。

小鼠待测 IL-2 制备:将配制好的小鼠脾细胞悬液加入等体积内含 30  $\mu$ g/mL ConA 的 RPMI-1640 培养液中混合,使 ConA 终浓度为 15  $\mu$ g/mL。置于 48 孔培养板中,常规条件下,CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 h,3000 r/min 离心 20 min 收集上清液,  $-20^\circ\text{C}$  保存,待测 IL-2 活性。

小鼠 IL-2 活性的测定:96 孔培养板中,每孔先加入 RPMI1640 培养液 100  $\mu$ L,再加入待测 IL-2 样品或标准品 100  $\mu$ L 进行倍稀释,每样品中稀释度设三个复孔,最后孔吸出 100  $\mu$ L 弃去,然后每孔加入活化小鼠脾细胞 100  $\mu$ L,使待测样品稀释度为 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 和 1:64,同时设 RPMI1640 培养液空白对照孔,细胞培养板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养 25 h。培养结束,每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10  $\mu$ L 继续培养 4~6 h,取出后每孔加入 100  $\mu$ L SDS 液并充分混合,2 h 后测定 OD<sub>570</sub> 值。

小鼠 IL-2 活性单位的计算:根据标准品不同稀释所取得的 OD 值模拟标准曲线,根据样品 1:8 稀释度下的 OD<sub>570</sub> 计算相应的 IL-2 活性单位。

### 1.3 数据处理方法

应用 SAS 软件进行数据处理,为排除时期和处理间的相互作用效应对试验结果的影响,特对同一时期的不同处理间数值进行差异显著性检验。

将各类数据分别列入不同表格,在数据上角应用字母标示法注明差异显著性水平,其中大写字母完全不同者表示处理间有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ),角码大写字母有相同者而小写字母完全不同者为处理间有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),小写字母有相同者表示两处理间无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。为更加清晰地表示出一些主要免疫学指标的动态变化,以及一些相关指标间的关系,以 Excel 软件绘制相应图形。

## 2 试验结果

试验结果表明,低能量氦氖激光照射对小鼠脾

淋巴细胞 IL-2 诱生活性具有明显的免疫增强或抑制双重调节效应, 这种调节效应是随照射剂量的变化而变化的。在本试验所设 5 种照射剂量中, 7.33, 11.00, 14.67 和 22.00 J/cm<sup>2</sup> 氦氖激光照射组在总体趋势上可增强 IL-2 诱生活性, 其中 14.67 和 22.00 J/cm<sup>2</sup> 剂量组在第 3 天就达到峰值, 此后逐渐下降, 第 13 天降至正常水平或稍低于正常水平;

7.33 和 11.00 J/cm<sup>2</sup> 组在第 6 天或第 9 天时达到峰值, 此后逐步下降; 对于大剂量 36.67 J/cm<sup>2</sup> 照射组则完全相反, 在第 3 天时就对 IL-2 诱生活性呈现出抑制效应, 第 6 天时达峰值, 激光照射后其活性逐渐恢复并在第 13 天时恢复至正常水平。各组实验鼠 IL-2 诱生活性变化趋势见表 1 及图 1。

表 1 低能激光照射对正常小鼠脾淋巴细胞 IL-2 诱生活性的影响

Table 1 Effects of He-Ne laser on the splenic T lymphocytes induced IL-2 activity in mice (U/mL, n=5)

| Group | Treatments              | Days post laser irradiation  |                              |                             |                           |                           |
|-------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|       |                         | 3                            | 6                            | 9                           | 13                        | 17                        |
| I     | Control                 | 69.6 ± 25.5 <sup>ABbc</sup>  | 84.0 ± 22.4 <sup>ABbc</sup>  | 71.0 ± 11.2 <sup>ABab</sup> | 69.4 ± 16.3 <sup>Aa</sup> | 72.8 ± 18.3 <sup>Aa</sup> |
| II    | 7.33 J/cm <sup>2</sup>  | 78.6 ± 24.6 <sup>ABabc</sup> | 101.0 ± 27.5 <sup>ABab</sup> | 80.6 ± 14.5 <sup>ABab</sup> | 74.6 ± 13.7 <sup>Aa</sup> | 81.6 ± 33.2 <sup>Aa</sup> |
| III   | 11.00 J/cm <sup>2</sup> | 78.4 ± 16.3 <sup>ABabc</sup> | 107.4 ± 30.3 <sup>Aa</sup>   | 90.6 ± 21.5 <sup>Aa</sup>   | 57.8 ± 13.7 <sup>Aa</sup> | 74.6 ± 15.6 <sup>Aa</sup> |
| IV    | 14.67 J/cm <sup>2</sup> | 100.2 ± 20.2 <sup>Aa</sup>   | 68.0 ± 24.9 <sup>ABbc</sup>  | 81.4 ± 35.9 <sup>ABab</sup> | 57.8 ± 13.6 <sup>Aa</sup> | 74.4 ± 15.6 <sup>Aa</sup> |
| V     | 22.00 J/cm <sup>2</sup> | 97.6 ± 16.0 <sup>Aab</sup>   | 79.6 ± 14.2 <sup>ABbc</sup>  | 60.6 ± 16.9 <sup>ABbc</sup> | 62.2 ± 10.6 <sup>Aa</sup> | 72.8 ± 22.5 <sup>Aa</sup> |
| VI    | 36.67 J/cm <sup>2</sup> | 53.4 ± 21.7 <sup>Bc</sup>    | 57.0 ± 19.5 <sup>Bc</sup>    | 43.8 ± 12.1 <sup>Bc</sup>   | 79.2 ± 21.2 <sup>Aa</sup> | 81.4 ± 17.1 <sup>Aa</sup> |

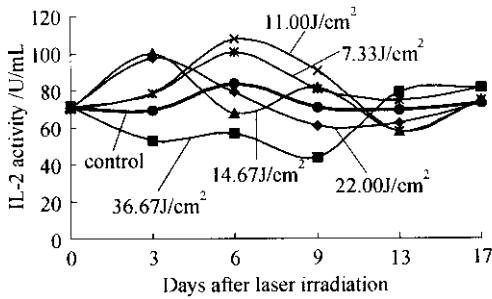


图 1 低能量激光照射对正常鼠脾淋巴细胞 IL-2 诱生活性的影响

Fig. 1 Kinetic changes of splenic T lymphocyte induced IL-2 activity in mice after laser irradiation

### 3 分析与讨论

#### 3.1 低能激光照射对 IL-2 诱生活性的影响

试验结果表明, 低能氦氖激光照射对脾淋巴细胞 IL-2 诱生活性的影响随着照射剂量的改变而改变。7.33, 11.00, 14.67 和 22.00 J/cm<sup>2</sup> 氦氖激光照射组在总体趋势上可增强 IL-2 诱生活性。从总体上讲, 以日剂量 7.33, 11.00, 14.67 和 22.00 J/cm<sup>2</sup> 氦氖激光照射小鼠内眼角时, 均可对机体免疫力起到增强作用, 也就是产生所谓的向上调节效应。而 36.67 J/cm<sup>2</sup> 剂量组却产生了明显的免疫抑制作用, 也就是所谓的向下调节效应。这种效应的产生可能是氦氖激光照射对机体免疫细胞作用的结果, 无论体内 (in vivo) 还是体外 (in vitro) 均有实验证

明, 适当剂量低能激光照射可以使 T 淋巴细胞增多, TH/Ts 增高, 淋巴细胞转化率增高<sup>[8]</sup>, 巨噬细胞活性增强, 吞噬指数及吞噬细胞数明显增高。由于各种淋巴细胞活性增高<sup>[9]</sup>, 其分泌功能亦相应增强, 一些参与机体免疫调节作用的重要细胞因子如 IL-10, IL-2, TNF- $\alpha$ ,  $\gamma$ -IFN 在低能激光照射下呈现活性增高趋势<sup>[10]</sup>。大剂量氦氖激光照射可使细胞免疫功能下降<sup>[11]</sup>。由此可以得出结论, 应用不同剂量的低能氦氖激光照射, 可产生不同的免疫学调节效应, 适当剂量氦氖激光照射起免疫增强效应, 大剂量则起免疫抑制效应。

#### 3.2 低能激光对 IL-2 诱生活性影响的特点

从实验结果和 3.1 的讨论中可以看出, 低能激光对脾淋巴细胞 IL-2 诱生活性影响与照射剂量密切相关, 一般情况下, 小剂量引起兴奋, 大剂量引起抑制, 从而呈现出两个明显的特点: 一是累加效应, 小剂量并不能立即引发免疫学指标的明显变化, 只有随着照射次数的增加和照射总剂量的加大, 才开始出现免疫增强效应, 而增大剂量照射则很快就出现免疫增强效应, 再增大剂量则有可能很快出现抑制效应; 另一特点就是抛物线特性, 如每天照射剂量保持一致, 但机体反应强度却不一致, 而是刺激作用逐渐增强, 至峰值后又逐渐减弱, 甚至逐渐变成抑制相。本试验中, 22.00 J/cm<sup>2</sup> 氦氖激光照射对 IL-2 活性的影响就表现出了这一点。但需提出的是: 激光的抛物线特性并非一单纯的抛物线, 在机体免疫

机能保持相对稳定的情况下,随着时间延长和刺激原刺激效应的停止,其指标有时表现为“正弦曲线”的形式。22.00 J/cm<sup>2</sup> 氦氖激光照射对 IL-2 活性的影响就说明了这一点,从 36.67 J/cm<sup>2</sup> 氦氖激光照射组也有这一趋势,具体来说就是随着激光照射停止后 IL-2 诱生活性的回升(或下降),其值并不是升(或降)至正常值为止,而是高(或低)于正常值,而后才返回正常值基准点。这有可能是机体免疫机能长时期受到抑制或增强刺激后的一种代偿性表现。

### 3.3 低能激光对 IL-2 诱生活性影响的可能机制

对动物来说,一方面,由于眼内角内有丰富的血管神经分布,所以,适当剂量氦氖激光照射眼内角,可能对神经是一种有益的刺激,能激活机体的免疫系统,而产生向上调节效应;另一方面,位于眼内角的哈德氏腺是动物机体的一个较大的免疫器官,适当剂量氦氖激光照射对位于眼内角的哈德氏腺可能是一种有益的刺激,激活哈德氏腺,从而使哈德氏腺产生有益的免疫调节效应,诸如,可以使 T 淋巴细胞增多,TH/T<sub>s</sub> 增高,淋巴细胞转化率增高<sup>[8]</sup>,巨噬细胞活性增强,吞噬指数及吞噬细胞数明显增高。由于各种淋巴细胞活性增高<sup>[9]</sup>,其分泌功能亦相应增强,一些参与机体免疫调节作用的重要细胞因子如 IL-10,IL-2,TNF- $\alpha$ , $\gamma$ -IFN 在低能激光照射下呈现活性增高趋势<sup>[11]</sup>。大剂量氦氖激光照射对位于眼内角的哈德氏腺可能是一种抑制性甚至损伤性的刺激,抑制或损伤哈德氏腺,从而使哈德氏腺产生免疫调节效应的抑制或损伤,可使细胞免疫功能下降<sup>[11]</sup>,导致机体的免疫细胞,如 T 淋巴细胞、巨噬细胞等的活性受到抑制,其分泌功能亦相应减弱,这样,一些参与机体免疫调节作用的重要细胞因子在大剂量氦氖激光照射下呈现活性降低趋势。

## 4 结 论

应用不同剂量的低能量氦氖激光照射小鼠内眼角,可对小鼠 IL-2 诱生活性产生明显的调节效应。以 7.33,11.00,14.67 和 22.00 J/cm<sup>2</sup> 的日剂量照射小鼠内眼角,可起到增强小鼠免疫机能的效应,也就是产生所谓的向上调节效应;以 36.67 J/cm<sup>2</sup> 氦

氖激光照射内眼角可对小鼠产生明显的免疫抑制作用,也就是所谓的向下调节效应。

## 参 考 文 献

- 1 A. Rey, B. Klein, M. Rucheton *et al.*. Human autologous rosettes: IV. Their relation with interleukin-2 activity production and natural killer cells in cancer patients [J]. *Cell Immunol.*, 1984, **86**:155~164
- 2 L. H. Elliot, W. H. Brooks, T. L. Roszman. Cytokinetic basis for the impaired activation of lymphocytes from patients with primary intracranial tumors [J]. *J. Immunol.*, 1984, **132**:1208~1215
- 3 M. T. Lotze, Y. L. Matory, S. E. Ettinghausen *et al.*. *In vivo* administration of purified human interleukin 2: half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells *in vivo* with recombinant IL-2 [J]. *J. Immunol.*, 1985, **135**:2865
- 4 Y. H. Wang, S. Z. Li. Application of Laser in Veterinary [M]. Harbin: Heilongjiang Publishing House, 1986. 13~16  
王云鹤,李树滋. 激光在兽医领域的应用[M]. 哈尔滨:黑龙江人民出版社, 1986. 13~16
- 5 J. Shen, W. X. Zhu, S. H. Zhu. Observation on the activity of interleukin-2 and NK cell of the animal model of large intestine [J]. *Shanghai Journal of Immunology*, 1992, **12**(2):78~81  
沈 杰,祝文娴,朱圣禾. 大肠癌模型动物脾细胞的 IL-2 诱生水平和 NK 细胞活性的动态观察[J]. 上海免疫学杂志, 1992, **12**(2):78~81
- 6 L. Bai, L. Z. Zhang, X. T. Kong. Effects of recombination interleukin-2 on the activity of NK, ADCC of chronic second hepatopathy [J]. *Journal of Immunology*, 1992, **8**(3):173~175  
白 岚,张玲珍,孔宪涛. 重组白细胞介素-2 对慢性乙肝病患者 NK, ADCC 活性的影响[J]. 免疫学杂志, 1992, **8**(3):173~175
- 7 H. Tada, O. Shiho, Kuroshimak *et al.*. An improved calorimetric assay for interleukin-2 [J]. *J. Immunol. Methods*, 1986, **93**:157
- 8 Lees, D. J. McAuliffe, T. J. Flotte *et al.*. Cellular effects of laser-generated stress waves. American Society for laser medicine and surgery abstracts [J]. *Laser Surg. Med.*, 1997, **9**(Suppl.):4
- 9 J. O. Naim, W. Yu, K. M. Lippolito *et al.*. The effects of low level laser irradiation on nitric oxide production by mouse macrophages. American Society for laser medicine and surgery abstracts [J]. *Laser Surg. Med.*, 1996, **8**(Suppl.):7
- 10 M. McGowan, W. Yu, J. O. Naim *et al.*. The effects of low level laser irradiation on IL-2 release from CD4 T-cells. American Society for laser medicine and surgery abstracts [J]. *Laser Surg. Med.*, 1996, **8**(Suppl.):6
- 11 X. C. Wei, K. X. Liu, J. L. Feng *et al.*. Low energy He-Ne laser intravascular irradiation therapy [J]. *Chinese Journal of Physiotherapeutics*, 1995, **18**(1):45~48  
韦兴昌,刘开祥,俸军林等. 低能量氦氖激光血管内照射疗法 [J]. 中华理疗杂志, 1995, **18**(1):45~48