

文章编号: 0258-7025(2004)02-0253-04

He-Ne 激光照射巨噬细胞对胞内钙浓度及其免疫活性的影响

徐朝阳, 谭石慈, 邢 达*

(华南师范大学激光生命科学研究所, 广东 广州 510631)

摘要 用 He-Ne 激光辐照巨噬细胞, 实时观测活体单细胞内钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 分布和细胞免疫活性随激光功率和照射时间的变化。实验结果表明, 随激光照射时间的增加, $[Ca^{2+}]_i$ 出现上升达到最大值后又下降, 逐渐回复初始状态, 且呈现中心最强, 径向衰减的环形梯度分布。不同激光剂量对巨噬细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 及其免疫活性有着不同的影响, 同一波长激光, 当剂量不同时, 可以表现为完全相反的效应。同时激光功率也是影响巨噬细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 及其免疫活性的一个重要因素, 同一波长、同一剂量情况下, 如果激光功率不同, 巨噬细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 及其免疫活性的变化也有着显著的差异。当照射功率为 0.16 mW 时, 胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 峰值是照射功率为 0.40 mW 时的近 6 倍。最大值时对应细胞免疫活性最高。对其机理作了初步探讨。

关键词 免疫病理学; 激光共焦扫描显微镜; He-Ne 激光; 巨噬细胞; 钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$); 免疫活性

中图分类号 R 318.51 文献标识码 A

Effect of He-Ne Laser Irradiation on $[Ca^{2+}]_i$ and Immunocompetence in Macrophages

XU Chao-yang, TAN Shi-ci, XING Da

(Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China)

Abstract Using He-Ne laser to irradiate macrophages, the $[Ca^{2+}]_i$ distribution of the single macrophage and the immunocompetence are studied in real-time by change laser power and irradiated time. Experimental result indicated that the $[Ca^{2+}]_i$ of the macrophages increases with time and reaches the max value then decreases to preliminary station gradually, presenting cricoid-scalar distribution, the best strong in center and decrease radially. Different laser doses have different impact to macrophages $[Ca^{2+}]_i$ and immunocompetence. With same laser wavelength but different laser dose, there shows complete different effect. The laser power is also a important factor to macrophages $[Ca^{2+}]_i$ and immunocompetence. With same laser wavelength and dose but different laser power, the change of $[Ca^{2+}]_i$ and immunocompetence are also different obviously. When laser power is 0.16 mW, the max value of $[Ca^{2+}]_i$ is almost six folds higher than that of the laser power is 0.40 mW. The max value of $[Ca^{2+}]_i$ corresponding the station of the best strong immunocompetence. The action mechanism is primary discussed in this paper.

Key words immunity nosology; LSCM; He-Ne laser; macrophages; $[Ca^{2+}]_i$; immunocompetence

1 引 言

有报道表明, 激光作用于生物体或细胞可以调

节机体的免疫能力^[1]。巨噬细胞作为机体免疫系统的重要组成部分, 其胞内第二信使及其生理活性状态是机体免疫系统的重要指标, Ca^{2+} 处于多种细胞

收稿日期: 2002-09-13; 收到修改稿日期: 2002-12-26

基金项目: 国家重大基础研究前期专项(2002CCC00400)及广东省自然科学基金团队项目(015012)资助课题。

作者简介: 徐朝阳(1976—), 男, 华南师范大学激光生命科学研究所硕士, 现在广州市体育科学研究所工作, 任助理研究员, 主要从事激光生命科学和运动人体科学的研究。

* 通讯联系数据 mail: xingda@scnu.edu.cn

信息传递途径的中心位置,它与细胞的许多生理和病理状态的改变密切相关,细胞内钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)的变化是钙信使系统调节细胞各种反应的重要因素^[2]。呼吸爆发是巨噬细胞完成机体防御功能的主要手段之一,它通过产生大量超氧阴离子来消灭外来细菌与异物,呼吸爆发强弱是表征巨噬细胞免疫活性的重要指标之一^[3]。

生物学通常采用统计的方法研究群体的行为,但是这种方法只是宏观粗略地了解群体,对于个体的微观情况无法了解清晰,特别是影像的变化情况更难以研究。利用激光共焦扫描显微镜(LSCM)可以直观、实时观测激光照射后的活体单个细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的时空变化,以及 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化如何调节巨噬细胞免疫活性。本研究利用同一细胞体系,在相同生物环境条件和不同激光剂量处理下,对巨噬细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化及其呼吸爆发特性同时进行了研究。实验中利用了新型选择性化学发光试剂 MCLA,它的最适发光 pH 值在中性,而且是水溶性的,适应于中性生理条件下细胞的活体研究。

2 材料和方法

试剂: Fluo-3/AM (sigma); Pluronic F-127 (molecular probes); 培养液 RPMI1640 (sigma), MCLA(海萤荧光素类似物, 2-methyl cypridina luminescent analog, sigma), PMA(佛波酯, phorbol 12-myristate 13-acetate, sigma)。

仪器: LSCM, Bio-rad; He-Ne 激光器; 单光子计数超弱发光测量仪(SPC)。

巨噬细胞培养: 20 g 左右的昆明小白鼠腹腔注射不含血清的 RPMI1640 1 mL/天, 注射 3 天, 暂停 1 天后抽提腹腔液, 离心, 得到巨噬细胞, 用 RPMI1640 在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养 2 天后, 用浓度为 10 μmol/L 的 Fluo-3/AM(Ca²⁺ 特异标记物)标记细胞 40 min, 加入 0.1% 浓度的 Pluronic F-127 辅助 Fluo-3/AM 进入细胞^[4]。

LSCM 观测胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 变化: 照射处理好的巨噬细胞, 用 LSCM 观测单细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的分布及其时空的变化。显微镜物镜用 60 倍的水镜, 观察时可保留培养液, 以避免干燥导致细胞死亡, 在与生理条件最接近的实验条件下进行观测, 从而使观测结果与正常活体状态最大程度地接近。

细胞免疫活性测定: 巨噬细胞经不同激光剂量处理后, 放入灵敏度高的单光子计数超弱发

光测量仪, 检测巨噬细胞的发光强度, 先加入 MCLA(浓度为 2 μmol/L), 1 min 后再加入刺激剂 PMA(浓度为 200 nmol/L), 使细胞产生呼吸爆发, 产生大量的活性氧。其中 O₂⁻, ¹O₂ 能特异和 MCLA 结合反应而发光。

3 实验结果与讨论

从图 1 中(a)~(i)各细胞获得荧光强度 I_f , I_f 的大小代表 $[Ca^{2+}]_i$ 的高低, 激光功率为 0.16 mW, 光斑直径为 0.5 cm, 照射时间 T_i [(a)~(i)]分别为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 min。图 2 为 T_i - I_f 曲线图, 各数据均为 5 次独立实验结果的平均值, 对实验各组数据采用 t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为有显著差异, $P < 0.01$ 为有极显著差异。

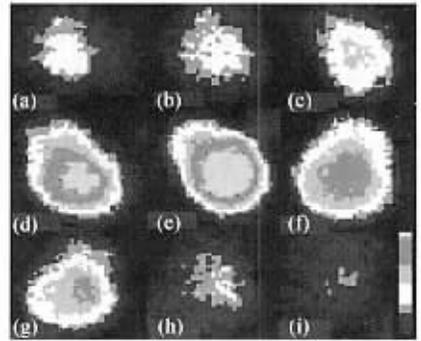


图 1 巨噬细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 空间分布随 He-Ne 激光照射时间的变化图

Fig.1 Images of the distribution of the $[Ca^{2+}]_i$ of macrophages after irradiated with different dose of He-Ne laser

图 1 中, 当 T_i 为 10 min 时(图 1(b)), 胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 没有明显变化。当 T_i 达 20 min 时(图 1(c)), 胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显上升, 而且细胞中间荧光强度的增高大大高于周围。当 T_i 达 30 min 时(图 1(d)), 胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 出现显著变化 ($P < 0.01$): $[Ca^{2+}]_i$ 显著上升并呈现出环形梯度分布, 中心最强, 径向衰减。当 T_i 达 40 min 时(图 1(e)), 胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 达峰值, 约为初始值的 6 倍 ($P < 0.01$)。当 T_i 进一步加大时(图 1(f)~(i)), 巨噬细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 开始减少, 逐渐回复到初始状态。

对比图 2 曲线 a 和 b, 有激光照射时, 巨噬细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 有一个很明显的变化: 先升高达到峰值后又慢慢下降, 最后回复到初始值(曲线 a); 而无激光照射时, 巨噬细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 没有明显的上升, 总

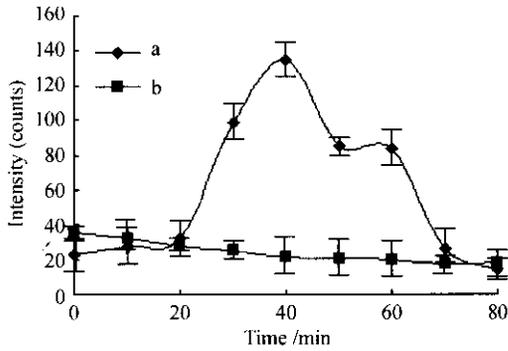


图 2 巨噬细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度随 He-Ne 激光照射时间的变化曲线
a: 有激光照射; b: 无激光照射

Fig. 2 Changing of concentration of calcium of macrophages using LSCM after irradiated with different dose He-Ne laser
a: with laser irradiation; b: without laser irradiation

体大致一样(曲线 b)。实验结果提示 He-Ne 激光能够激活启动细胞内钙库中钙离子的释放与回收。

改变激光功率,并用同一方法获得图 3 和图 4。当 He-Ne 激光的功率增高到 0.4 mW 时,光斑直径不变, T_i [(a)~(g)]分别为 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min。 T_i 仅 5 min 时,胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显上升 ($P < 0.01$)。当 T_i 达 15 min 时,胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 达峰值,约为初始值的 5 倍 ($P < 0.01$)。当 T_i 进一步延长时, $[Ca^{2+}]_i$ 下降,并慢慢恢复到初始状态甚至更低。

对比图 2 与图 4, 可以看到照射功率为 0.16 mW 比 0.40 mW 更有效地刺激巨噬细胞自由钙,当照射功率为 0.16 mW 时,胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 峰值是照射功率为 0.40 mW 时的近 6 倍。如果照射功率 P 不同,即使照射时间 T_i 或照射剂量 D_i [D_i (J/cm^2) = $P(W) \times T_i(s)/area(cm^2)$] 相同, $[Ca^{2+}]_i$ 显著不同,可见不同激光功率对巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的状态有着明显不同的影响。两曲线的形状非常相似,只是曲线上沿开始时斜率有些不同,表明在不同激光功率、不同细胞及其初始状态下,胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 在激光作用下随剂量的变化规律是相同的。

Ca^{2+} 作为一种胞内信使,它仅起到传递低强度激光对巨噬细胞的生物刺激效应的信号作用,这信号代表什么生物效应, $[Ca^{2+}]_i$ 的变化与巨噬细胞免疫活性有何联系? 它们之间的信号传导通路是什么? 为此,我们设计下列实验来进一步研究这些问题。巨噬细胞免疫活性的大小主要由巨噬细胞产生活性氧能力的大小来体现。吞噬细胞呼吸爆发增加非线粒体氧消耗,分子氧经 NADPH 氧化酶的作用

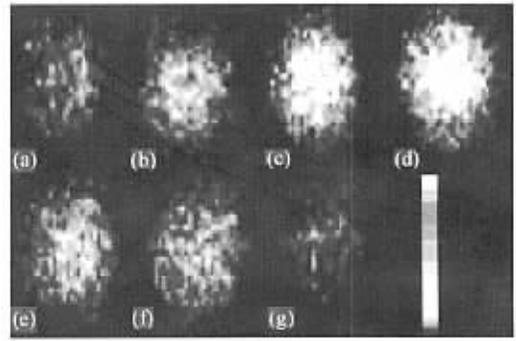


图 3 不同剂量 He-Ne 激光照射时巨噬细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的空间分布图

Fig. 3 Images of the distribution of the $[Ca^{2+}]_i$ of macrophages which irradiated with different dose He-Ne laser

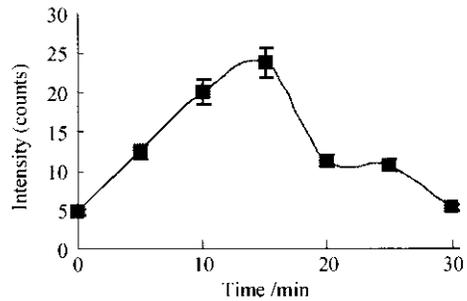


图 4 不同剂量下随 He-Ne 激光照射时间的变化巨噬细胞内荧光强度的变化曲线

Fig. 4 Change of mean fluorescent intensity of macrophages using LSCM after irradiation with different dose of He-Ne laser

形成超氧阴离子,超氧阴离子歧化产生过氧化物: O_2^- , H_2O_2 , 1O_2 , $\cdot OH$ 。这些物质在参与消灭外来异物与杀菌的同时,还能与被吞噬颗粒或细胞内成分结合,形成电子激发态物质,当其恢复到基态时,释放能量产生光。因此被刺激吞噬细胞的发光强度一定程度上反应了细胞产生活性氧的能力,它属于一种生物超弱发光。生物超弱发光是灵敏、快速反映生命体生命状态的物理指标,它是有机体本身具有的一种属性,和机体内氧化代谢等过程有关。但这种发光非常微弱,需要高灵敏度的仪器才能检测到。为了便于检测这种超弱发光,研究者们加入发光增强剂,如 luminal(鲁米诺), MCLA 和 FCLA(一种海萤荧光素类似物)等, luminal 是最常用的一种发光增强剂,但它是脂溶性的,其最适发光 pH 值在碱性,当 pH 在中性时其发光效率很低。我们在实验中选用 MCLA,它是水溶性的,其最适发光 pH 值在中性,能够特异性地与 O_2^- 和 1O_2 反应,生成

一个激发态的中间物质,此物质退激发产生光,这一反应效率非常高。所以 MCLA 比 luminal 更加适合用于在生理条件下的实验研究。其反应发光机制为

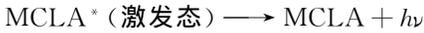


图 5 为 He-Ne 激光照射后 MCLA 增强的巨噬细胞呼吸爆发产生的化学发光强弱的统计图。(a) 是激光功率为 0.16 mW,照射时间分别为 0,20,40,60,80 min。图中各组数据都是 5 次不同细胞实验结果的平均值,并进行统计处理,第 3 组照射 40 min 时,经统计和显著性分析表明对巨噬细胞免疫活性有极其显著效应 ($P < 0.01$),第 4 组照射 60 min 时对巨噬细胞免疫活性有较显著效应 ($P < 0.05$),对于第 2 和第 5 组,巨噬细胞免疫活性无明显提高 ($P > 0.05$)。

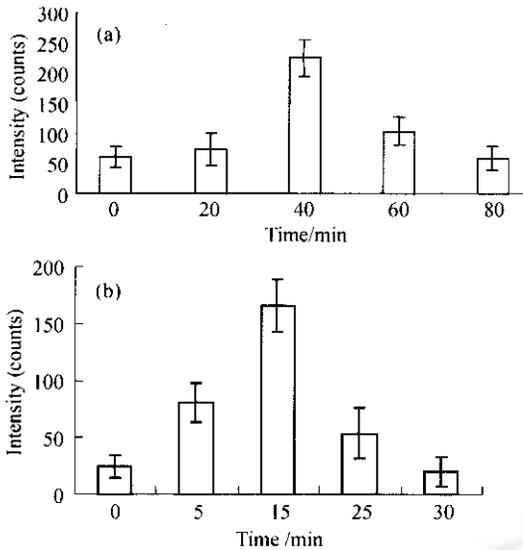


图 5 He-Ne 激光照射巨噬细胞呼吸爆发产生的化学发光

Fig. 5 Chart of chemiluminescence of macrophages irradiated with He-Ne laser

(a) $P = 0.16 \text{ mW}$; (b) $P = 0.40 \text{ mW}$

当照射 40 min 时,胞内 Ca^{2+} 明显升高,是初始时的近 4 倍,发光强度明显升高,发光强度表征的是巨噬细胞活性的大小。由此可知,适当低剂量 He-Ne 激光可能通过第二信使 Ca^{2+} 的介导激活巨噬细胞,提高其免疫活性,进而达到治疗某些疾病的作用。

He-Ne 激光照射功率改为 0.40 mW,照射时间分别为 0,5,15,25,30 min,同样方法处理得图 5

(b)。经统计和显著性分析得第 3 组照射 15 min 时对巨噬细胞免疫活性有极其显著的提高 ($P < 0.01$); 第 2 与第 4 组分别照射 5 min 与 25 min 时,对巨噬细胞免疫活性有明显的提高 ($P < 0.05$)。

低剂量 He-Ne 激光作为一种刺激剂,作用于特异光受体后,通过 G_i 或 G_s 蛋白作用于细胞膜特异的 PLC,影响膜 PIP_2 的分解,进而通过 IP_3 - Ca^{2+} 信号传递途径和 DAG-PKC 信号传递途径调节细胞的免疫活性^[2]。

Ca^{2+} 已和 IP_3 , DAG 一起被确认为第二信使联合体。 IP_3 的作用是通过胞内 Ca^{2+} 的动员进行的,而 DAG 对 PKC 的激活需要 Ca^{2+} 的参与,PLC 活性也对 Ca^{2+} 具有依赖性, Ca^{2+} 可反馈调节 IP_3 的产生。反过来, IP_3 /DAG 系统中 PKC 可通过激活水解 IP_3 的酶及激活膜上的钙抽运而减弱 Ca^{2+} 的动员, IP_3 的磷酸化产物 IP_4 也可能参与 Ca^{2+} 的跨膜内流^[2]。所以,激光刺激细胞后,可能通过 IP_3 作用于胞内钙库导致胞浆内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高,当有外界刺激时,胞内 DAG 激活蛋白激酶 C(PKC)使钙由胞浆移向质膜并激活 NADPH 氧化酶,使电子从膜内的 NADPH 转移至膜外的分子氧,形成超氧阴离子^[5]。巨噬细胞通过超氧阴离子及其歧化产物 O_2^- , H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ 等活性氧,它们具有强大的吞噬外界异物与杀菌能力,行使着机体的防御功能,消灭外界入侵病毒。实验表明,这是低强度激光通过提高机体免疫功能来治疗疾病的可能途径之一。

参 考 文 献

- 1 Yang Zaifu, Yang Jinggen, Gao Guanghuang. The review of the action of immune modulation of low-intensity laser [J]. *Chin. J. Phys. Ther.*, 2001, **24**(4):244~247
杨在富,杨景庚,高光煌. 低能量激光免疫调节作用研究进展 [J]. *中华理疗医学杂志*, 2001, **24**(4):244~247
- 2 Liu Jingsheng. *Cellular Information and Regulation* [M]. Beijing: The United Publishing Company of Beijing Medical University and Xiehe Medical University of China, 1998. 168~206
刘景生. *细胞信息与调控* [M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 168~206
- 3 Hu Tianhui, Bei Ling, Shen Xun. The respiratory burst and the intra & extracellular calcium signal of neutrophil [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 1998, **14**(2):233~239
胡天惠,贝冷,沈恂. 嗜中性白细胞呼吸爆发与胞内外钙信号的关系研究 [J]. *生物物理学报*, 1998, **14**(2):233~239
- 4 J. L. Pace, S. W. Russell, B. A. Torres *et al.*. Recombinant mouse gamma interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing [J]. *J. Immunol.*, 1983, **130**(5):2011~2013
- 5 B. De Wald, M. Thelen, M. Baggiolini. Two transduction sequences are necessary for neutrophil activation by receptor agonists [J]. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**:16179~16184