

文章编号: 0258-7025(2004)03-0381-04

He-Ne 激光与丹参注射液联用对牛中性粒细胞呼吸爆发的影响

李艳玲¹, 角建瓴³, 刘承宜^{2*}, 刘颂豪¹

(华南师范大学¹ 信息光电子科技学院, ² 激光运动医学实验室, 广东 广州 510631; ³ 暨南大学中医系, 广东 广州 510632)

摘要 临床上低强度 He-Ne 激光与丹参注射液配合使用治疗缺血、缺氧性心血管疾病取得良好疗效,但其机理未明。采用化学发光法研究低强度 He-Ne 激光与丹参注射液联合作用对中性粒细胞(PMN)呼吸爆发的影响,以进一步探讨低强度 He-Ne 激光与丹参注射液配合使用产生抗缺血、缺氧性损伤效应的机制。实验结果表明低强度 He-Ne 激光具有对受激 PMN 呼吸爆发的双向调节作用。200 J/m², 2000 J/m² 和 3000 J/m² 的 He-Ne 激光能刺激 PMN 产生呼吸爆发, 40 J/m², 1000 J/m² 和 6000 J/m² 的 He-Ne 激光能抑制 PMN 产生呼吸爆发。4~16 μL 的丹参注射液能抑制受激 PMN 的呼吸爆发,且呈一定的量效关系。8 μL 的丹参注射液与 1000 J/m² 的 He-Ne 激光联合作用能对受激 PMN 的呼吸爆发产生抑制效应,并且有协同作用。

关键词 心血管病学;低强度 He-Ne 激光;丹参注射液;中性粒细胞;呼吸爆发

中图分类号 Q 631;Q 256 文献标识码 A

Effects of He-Ne Laser Irradiation Combined with Salvia Miltiorrhiza Injection on the Respiratory Burst of Bovine Neutrophils

LI Yan-ling¹, JIAO Jian-ling³, LIU Cheng-yi², LIU Song-hao¹

¹School for Information and Optoelectronic Science and Technology, ²Laser Sport Medicine Laboratory, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China
³Department of Traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

Abstract He-Ne laser irradiation combined with salvia miltiorrhiza injection (SM) can treat ischemia and anoxemia well in clinic, but the mechanism remains obscure. In this paper, the effects of low intensity He-Ne laser irradiation, SM, and the combination of He-Ne laser irradiation and SM on the respiratory burst of bovine neutrophils were studied, respectively, which may help to understand the mechanism of the combination of He-Ne laser irradiation and SM fight against ischemic injury. The chemiluminescence was used to measure the respiratory burst of neutrophils. The results showed that 200 J/m², 2000 J/m², 3000 J/m² He-Ne laser irradiation can stimulate the respiratory burst of neutrophils, 40 J/m², 1000 J/m², 6000 J/m² He-Ne laser irradiation can inhibit the respiratory burst of neutrophils. 4~16 μL SM can inhibit the respiratory burst of neutrophils, and have the dose-effect relation. The inhibitory effect of the combination of 1000 J/m² He-Ne laser irradiation and 8 μL SM is more marked than that of only laser or SM.

Key words cardiovascularology; low intensity He-Ne laser; salvia miltiorrhiza injection; neutrophil; respiratory burst

收稿日期:2002-10-14;收到修改稿日期:2002-12-31

基金项目:国家自然科学基金(60178003和6027812)、广东省自然科学基金团队项目(20003061)和重点项目(20011480)以及广东省“千百十工程”优秀人才培养基金(Q02087)资助课题。

作者简介:李艳玲(1977—),女,华南师范大学信息光电子科技学院硕士研究生,研究方向为光生物学与光子医学。E-mail:deerlinger@163.com

* 通信联系数据

1 引 言

缺血、缺氧性损害可能是导致心、脑血管疾病的重要发病因素。中性粒细胞(PMN)呼吸爆发能产生氧自由基,氧自由基是造成心脏和脑组织缺血、缺氧的重要原因之一。缺血、缺氧性病症是低强度 He-Ne 激光血管内照射疗法的首选适应症^[1],临床表明低强度 He-Ne 激光治疗缺血、缺氧性心、脑血管疾病效果显著^[2]。丹参注射液能在组织和器官缺血、缺氧时对组织和器官起保护作用^[3,4]。低强度 He-Ne 激光与丹参注射液联用在临床上治疗脑梗塞等^[1,5]心、脑血管疾病取得了良好疗效,但其治疗机制尚未完全明晰。

为了探讨低强度 He-Ne 激光与丹参注射液联合作用在细胞水平的生物效应,采用粒细胞的化学发光法^[6]检测了单用低强度 He-Ne 激光或丹参注射液及低强度 He-Ne 激光与丹参注射液联用对中性粒细胞呼吸爆发的影响,以进一步探讨其抗缺血、缺氧性损伤的机制。

2 实验与结果

2.1 材料

趋化三肽(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP), 鲁米诺(5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione, Luminol), Dextran T-500(均购自 Sigma), 淋巴细胞分离液(购自上海华精生物科技有限公司), HEPES(购自华美生物工程公司), 丹参注射液(购自上海第一制药厂), PBS(phosphate balanced salt solution, 不含 Ca^{2+} , Mg^{2+} , pH 7.2), HBSS(hanks' balanced salt solution, 不含 Ca^{2+} , Mg^{2+} , 添加 10 mmol/L HEPES 和 4 mmol/L NaHCO_3 , pH 7.4)。

2.2 中性粒细胞的分离纯化

取健康牛外周血,肝素抗凝,经淋巴细胞分离液(Ficoll-Hypaque)密度梯度离心,中分子右旋糖酐(分子量 70000, Pharmacia)沉降,分离纯化获得 PMN,用双蒸水低渗除去残存红细胞。PMN 悬于 HBSS 液中,瑞氏染色法检验纯度大于 98%,台盼蓝检验细胞活性大于 95%。调整细胞浓度($1\sim 2\times 10^6$ 个/mL)后置冰浴待用。

2.3 数据处理

文中实验数据均表示为 $\text{mean}\pm\text{SEM}$, 并采用 t 测验中的成对数据比较法进行统计分析, $P < 0.05$ 为有显著差异。

2.4 鲁米诺增强的 PMN 化学发光测量

2.4.1 低强度 He-Ne 激光对 PMN 呼吸爆发的影响

将悬于 HBSS 液的 PMN 分为 6 组,分别用 40 J/m^2 , 200 J/m^2 , 1000 J/m^2 , 2000 J/m^2 , 3000 J/m^2 , 6000 J/m^2 6 个剂量范围的 He-Ne 激光照射,并设空白对照组(不照激光)。处理完毕后,加入 Luminol(终浓度为 $5\ \mu\text{mol/L}$),再加入刺激剂 fMLP(终浓度为 $20\ \mu\text{mol/L}$),立即放入中国科学院生物物理所研制的高灵敏度单光子计数型超弱发光测量仪中, 37°C 恒温连续检测发光强度。

如图 1 所示,不同剂量的低强度 He-Ne 激光对 PMN 化学发光产生的效应不同。一定剂量的低强度 He-Ne 激光能明显降低受激 PMN 的化学发光值。 40 J/m^2 和 6000 J/m^2 的 He-Ne 激光均能对 PMN 的化学发光产生抑制效应($P < 0.05$)。 1000 J/m^2 的 He-Ne 激光明显抑制 PMN 的化学发光($P < 0.01$)。而 200 J/m^2 , 2000 J/m^2 和 3000 J/m^2 的 He-Ne 激光均能增强 PMN 的化学发光($P < 0.05$)。其中以 3000 J/m^2 的 He-Ne 激光刺激效应最明显($P < 0.01$)。由图 1 可以看出,上述 6 个剂量范围内,随着激光剂量的增加,He-Ne 激光对 PMN 呼吸爆发的效应呈多个倒钟形折线关系。表明低强度 He-Ne 激光对 PMN 的呼吸爆发产生的效应呈现出起伏的特征。

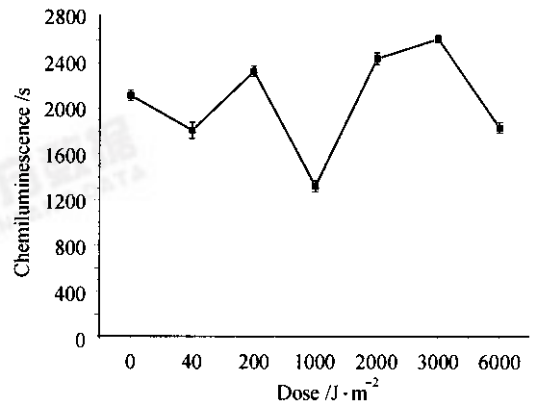


图 1 低强度 He-Ne 激光对 PMN 化学发光的影响 ($P < 0.05$)

Fig. 1 Effects of low intensity He-Ne laser on the chemiluminescence of PMN ($P < 0.05$)

2.4.2 丹参注射液对 PMN 呼吸爆发的影响

将悬于 HBSS 液的 PMN 分为 4 组,分别用 $4\ \mu\text{L}$, $8\ \mu\text{L}$, $12\ \mu\text{L}$, $16\ \mu\text{L}$ 的丹参注射液 37°C 水浴预孵育 10 min 后用 HBSS 洗 2 次。并设对照组(不加丹参注射液)。处理完毕后,加入 Luminol(终浓度

为 $5 \mu\text{mol/L}$), 再加入刺激剂 fMLP (终浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$), 同上测量。

丹参注射液能明显降低受激 PMN 的化学发光值 ($P < 0.01$), 如图 2 所示。在 $4 \sim 16 \mu\text{L}$ 的剂量范围内能明显抑制 PMN 的呼吸爆发, 并且呈剂量-效应关系折线。随着剂量的增加, 其抑制效应更加明显。但当剂量增大到 $8 \mu\text{L}$ 之后, 其抑制效应的强度就呈较为平稳的趋势。

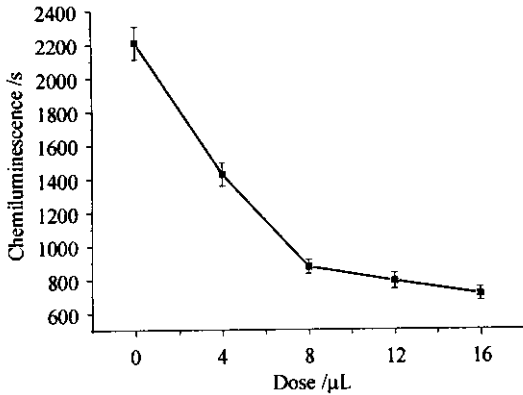


图 2 丹参注射液对 PMN 化学发光的影响 ($P < 0.01$)

Fig. 2 Effects of salvia miltiorrhiza injection on the chemiluminescence of PMN ($P < 0.01$)

2.4.3 低强度 He-Ne 激光与丹参注射液联合作用对 PMN 呼吸爆发的影响

将悬于 HBSS 液的 PMN 分为 4 组: 对照组 (不加丹参注射液, 不照激光); He-Ne 激光照射 (剂量为 1000 J/m^2); 丹参注射液 ($8 \mu\text{L}$) 预孵育 10 min; 丹参注射液 ($8 \mu\text{L}$) 预孵育 10 min + He-Ne 激光照射 (剂量为 1000 J/m^2)。

PMN 与丹参注射液 37°C 水浴振摇 10 min 后用 HBSS 洗 2 次, 然后进行 He-Ne 激光照射。处理完毕后, 加入 Luminol (终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$), 再加入刺激剂 fMLP (终浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$), 同上测量。

如图 3 和图 4 所示, 低强度 He-Ne 激光、丹参注射液、低强度 He-Ne 激光与丹参注射液联用均能明显降低受激 PMN 的化学发光值, 低强度 He-Ne 激光与丹参注射液联用时对 PMN 化学发光的抑制效应比二者单独使用时更明显。与对照组相比, He-Ne 激光照射 (剂量为 1000 J/m^2)、丹参注射液 ($8 \mu\text{L}$) 预孵育 10 min 及 He-Ne 激光与丹参注射液联用等处理均能明显抑制 PMN 的呼吸爆发 ($P < 0.01$)。另外, 将上述三种处理的结果之间作 t 检验, 结果均有显著差异 ($P < 0.01$)。

万方数据

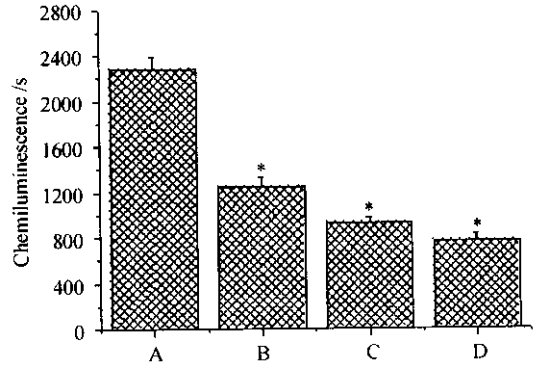


图 3 低强度 He-Ne 激光与丹参注射液联用对 PMN 化学发光的影响 ($P < 0.01$)

A: 对照组 (不加丹参注射液, 不照激光); B: He-Ne 激光照射 (剂量为 1000 J/m^2); C: 丹参注射液 ($8 \mu\text{L}$) 预孵育 10 min; D: 丹参注射液 ($8 \mu\text{L}$) 预孵育 10 min + He-Ne 激光照射 (剂量为 1000 J/m^2)

Fig. 3 Effects of low intensity He-Ne laser irradiation combined with salvia miltiorrhiza injection on the chemiluminescence of PMN ($P < 0.01$)

A: contrast (without He-Ne laser and SM); B: He-Ne laser irradiation at a dose of 1000 J/m^2 ; C: cultured in salvia miltiorrhiza injection ($8 \mu\text{L}$) for 10 minutes; D: cultured in salvia miltiorrhiza injection ($8 \mu\text{L}$) for 10 minutes then He-Ne laser irradiation at a dose of 1000 J/m^2

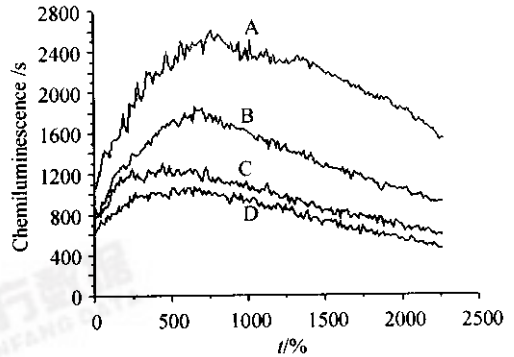


图 4 低强度 He-Ne 激光与丹参注射液联用对 PMN 化学发光的影响 (代表性原始实验记录曲线)

曲线 A, B, C, D 的说明同图 3

Fig. 4 Effects of low intensity He-Ne laser irradiation combined with salvia miltiorrhiza injection on the chemiluminescence of PMN (one of the original data is shown)

Explanation of curves A, B, C, D as same as Fig. 3

3 讨论

氧自由基是 PMN 呼吸爆发的重要产物之一。PMN 呼吸爆发是机体防御病原微生物的有效手段, 也是许多疾病组织细胞损伤的原因之一。目前认为心绞痛、心肌梗塞、冠心病、脑梗塞等心、脑血管

疾病的发生与氧自由基损伤有密切关系。心、脑血管疾病的发生率及死亡率都居于各种疾病之首^[2,7]。近年来对 PMN 与心肌损伤之间的关系的也越来越受关注。研究认为,中性粒细胞导致心肌缺血损伤的机制之一是在活化时氧化代谢活性加强,生成并释放大量的活性氧自由基^[8]。

低强度 He-Ne 激光能对 fMLP 刺激的 PMN 产生的呼吸爆发进行双向调节。本实验中,在给定的 6 个剂量范围内,随着激光剂量的增加,He-Ne 激光对 PMN 呼吸爆发的效应呈多个倒钟形折线关系,表明低强度 He-Ne 激光对 PMN 的呼吸爆发产生的效应呈现出起伏的特征。低强度激光的剂量关系与一般药物的剂量关系有很大的区别。药理学将刺激与抑制交替的规律称为 Arndt-Schulz 定律,这个定律也适用于低强度激光对细胞的生物调节作用^[9]。一般将刺激与抑制的交替看成倒钟形关系。激光一般有多段倒钟形曲线,可能归因于激光与集合受体作用的非共振性质^[9]。

在 fMLP 的刺激下,PMN 产生呼吸爆发,不同剂量的低强度 He-Ne 激光可以对 PMN 的呼吸爆发产生抑制或增强的效应。根据文献^[9]提出的激光生物效应的信息转换模型(BITML):在不引起损伤的前提下,当激光的剂量超过一定阈值,其产生的生物效应使信使的浓度超过一定的阈值,这个时候生物系统内部的平衡机制会使激光所启动的信使系统转换成与现有系统相拮抗的信使系统。根据激光生物刺激作用的信息生物模型(BIML)^[9]:低强度激光的生物效应是低强度激光信号通过细胞膜表面处于相干态的某一类受体(称为集合受体)物理放大,和相继的细胞膜受体介导的第二信使的生物放大两次级联放大实现的。光子与细胞膜表面受体结合后,可以活化 G 蛋白或受体耦连蛋白酶。G 蛋白继而可以调节腺苷酸环化酶(AC),从而调节环磷酸腺苷(cAMP)的浓度。呼吸爆发过程中 cAMP 系统和 Ca²⁺系统是互相拮抗的一对信号控制系统。当低强度 He-Ne 激光激活 Gi/Gq 蛋白时则抑制 AC,使 cAMP 的浓度下降, Ca²⁺浓度升高;当低强度 He-Ne 激光激活 Gs 蛋白时则活化 AC,使 cAMP 的浓度升高, Ca²⁺浓度下降。本实验中,40 J/m², 1000 J/m² 和 6000 J/m² 的 He-Ne 激光可能激活 Gs 蛋白使 cAMP 的浓度升高,从而对 PMN 的呼吸爆发有抑制效应;200 J/m², 2000 J/m² 和 3000 J/m² 的 He-Ne 激光可能激活 Gi/Gq 蛋白使 cAMP 的浓度下降,从而增强 PMN 的呼吸爆发。

本实验结果也表明丹参注射液对 PMN 的呼吸爆发有抑制作用,且呈一定的量效关系。丹参注射液与低强度激光配合使用后产生协同作用,并存在一最佳配合使用剂量。本实验中 8 μL 的丹参注射液与 1000 J/m² 的 He-Ne 激光联合作用抑制 PMN 呼吸爆发的效果较佳,且比 He-Ne 激光或丹参注射液单独作用的效果都要明显 ($P < 0.01$)。这可能是由于丹参注射液中的分子在 PMN 细胞膜上的受体与 He-Ne 激光在 PMN 细胞膜上的集合受体不同,因而两者的效应产生了协同作用。

研究结果表明,低强度 He-Ne 激光与丹参注射液联用能够共同抑制 PMN 氧化代谢产生的氧自由基,从而对心脏和脑组织具有保护作用。这为临床治疗缺血、缺氧性心、脑血管疾病提示了新的路子,并且也为治疗炎症、肿瘤等病症时抑制中性粒细胞的过激反应提供了新的方法。

参 考 文 献

1. Quan Yongjian. Chinese traditional medicine combined with He-Ne laser intravascular irradiation in 36 cases in brain thrombus [J]. *Journal of Sichuan Traditional Chinese Medicine*, 1999, 17(5):23~24
全永健. 中药结合氦氖激光血管内照射治疗脑血栓形成 36 例 [J]. *四川中医*, 1999, 17(5):23~24
2. Dong Weiren, Xiao Yingqing, Cheng Jieluan. Combined treatment of cerebrovascular diseases by endovascular laser irradiation of blood [J]. *Laser Journal*, 1997, 18(1):56~58
董为人,肖应庆,程洁莹. 血管内激光照射血液综合治疗脑血管病 [J]. *激光杂志*, 1997, 18(1):56~58
3. Ji X. Y., Tan B. K., Zhu Y. Z.. Salvia miltiorrhiza and ischemic diseases [J]. *Acta Pharmacol Since*, 2000, 21(12):1089~1094
4. Li Xiaotian, Zhuang Yiliang, Chang Cai *et al.*. Effect of salvia miltiorrhiza injection on umbilical artery hemodynamics during fetal distress in ewe [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 1998, 18(9):543~545
李笑天,庄亿亮,常才等. 胎羊窘迫时丹参注射液对脐动脉血液动力学的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1998, 18(9):543~545
5. Miao Qing. Laser and salvia miltiorrhiza injection on treatment of cerebral embolism in clinic [J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 1998, 25(1):22~23
苗青. 激光加丹参注射液治疗脑梗塞临床观察 [J]. *辽宁中医杂志*, 1998, 25(1):22~23
6. C. Dahlgren, A. Karlsson. Respiratory burst in human neutrophils [J]. *J. Immunol. Methods*, 1999, 232(1-2):3~14
7. Zhao B. L., Jiang W., Zhao Y. *et al.*. Scavenging effects of salvia miltiorrhiza on free radicals and its protection for myocardial mitochondrial membranes from ischemia-reperfusion injury [J]. *Biochem. Mole. Biol. Intern.*, 1996, 38(6):1171~1182
8. B. R. Lucchesi. Myocardial ischemia reperfusion and free radical injury [J]. *Am. J. Cardiol.*, 1990, 65(19):141~231
9. Liu Chengyi, Luo Ganguyue, Li Xuemei. The discuss of literature about the biological effect of low intensity laser—biological information model [J]. *Chin. J. Laser Med. Surg.*, 1999, 8(2):121~122
刘承宜,罗刚跃,李学梅. 关于低强度激光生物效应的文献探讨——生物信息模型 [J]. *中国激光医学杂志*, 1999, 8(2):121~122