

文章编号: 0258-7025(2006)12-1692-07

软骨细胞光生物调节作用的体外实验

杨小红¹, 刘承宜², 刘少杰¹, 李斯明¹, 沈雁¹, 谭见容¹, 梁佩红¹

(¹ 广州市创伤外科研究所 暨南大学医学院第四附属医院, 广东 广州 510220)

² 华南师范大学激光运动医学实验室, 广东 广州 510631

摘要 研究了低强度激光对兔软骨细胞增殖和变异的潜在性影响。选取3周龄新西兰白兔分离软骨细胞,在新生牛血清(NCS)体积分数分别为10%,5%,2.5%和无血清4种培养媒介中培养,采用功率6.5 mW的He-Ne激光辐照(HNI)(5.74 mW/cm²)软骨细胞。用四氮唑复合物法(XTT)检测细胞的活性。通过检测羟脯氨酸(Hrp)含量了解细胞合成胶原的能力。在激光共聚焦显微镜下观察吖啶橙标记软骨细胞形态及DNA的表达。在营养缺乏培养状态中(5%,2.5%新生牛血清),辐照时间为16,30,45 min的照射组细胞数量显著增加,具有明显的光生物调节作用(PBM);其中最佳辐照时间为30 min,实际最佳辐照能量密度为9.42 J/cm²;当光生物调节作用显著时,软骨细胞的DNA及胶原的合成也明显增强。He-Ne激光照射兔软骨细胞后在营养缺乏的媒介中增殖明显,所产生的光生物调节作用仅限在一定的剂量范围内产生,这一特性可为临床使用提供参考。

关键词 医用光学与生物技术;光生物调节作用;软骨细胞;胶原;羟脯氨酸

中图分类号 Q 631;Q 253 **文献标识码** A

Photobiomodulation on Chondrocyte Proliferation: in Vitro Evaluation

YANG Xiao-hong¹, LIU Cheng-yi², LIU Shao-jie¹, LI Shi-ming¹,

SHEN Yan¹, TAN Jian-rong¹, LIANG Pei-hong¹

¹Guangzhou Research Institute of Traumatology, The 4th Affiliated Hospital of
Medical College of Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510220, China

²Laboratory of Laser Sports Medicine, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China

Abstract There have been controversial reports on photobiomodulation on cartilage healing so that the research on the potential effect of low intensity He-Ne laser irradiation (HNI) on the proliferation and variation of rabbit cartilage cells in vitro was systematically done in this paper. The chondrocytes isolated from the cartilage sample of 3-week-old New Zealand white rabbits were cultured with newborn calf serum (NCS) at 0%, 2.5%, 5%, and 10%, irradiated by HNI at 5.74 mW/cm² for 2, 8, 16, 30 and 45 min per day for 6 days, and then incubated till the 13th day. The proliferation and collagen synthesis were assessed by XTT assay and hydroxyproline (Hrp) content measurement, respectively. The DNA expression was observed by acridine orange stain and confocal laser scanning microscope. The chondrocyte morphology and ultrastructure have been observed on the 9th and 13th day after the first HNI by scan electron microscope. There is no significant photobiomodulation (PBM) on the proliferation of the chondrocytes (PPC) cultured with NCS at 10%. There is PPC cultured with NCS at 2.5% or 5%, and the effects are significant when the cells were irradiated by HNI for 16, 30 and 45 min, respectively, among which the radiation time 30 min corresponds the optimum dose 9.42 J/cm². Hrp secretion increased steadily with days in NHI group. When the photobiomodulation is significant, the chondrocyte DNA expression was significant, and its morphological characteristics have no significant differences from the one cultured with NCS at 10%. There might be photobiomodulation on the proliferation of the chondrocytes cultured in nutritional deficit condition and irradiated by HNI at limited dosage, which is of clinic importance.

Key words medical optics and biotechnology; photobiomodulation; chondrocyte; collagen; hydroxyproline

收稿日期:2006-02-13; **收到修改稿日期**:2006-06-12

基金项目:国家自然科学基金(60178003,60478048)和广东省卫生厅(A2003653)资助项目。

作者简介:杨小红(1967—),女,广东省南海市人,广州市创伤外科研究所医学实验副主任技师,主要从事骨关节创伤与康复的医学实验研究。E-mail:dryang1192@tom.com

1 引言

激光的生物刺激作用(biostimulation)直接产生于辐射而不是热效应(温度升高不超过 $0.1\sim 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$),相应的疗法称为低强度激光疗法^[1]。对于细胞离体实验,激光与单色光没有显著性差异^[1],近年来人们将激光的效应和单色光的效应统一称为光生物调节作用(PBM)^[2]。由于激光共聚焦显微镜技术^[3]和 DNA 芯片技术^[4]等先进技术的引入,光生物调节作用逐渐成为研究热点,人们不但从细胞色素 C 氧化酶^[1, 2, 5]、药物分子协同作用^[6, 7]、信号传导^[8~11]和基因表达^[4, 5]等方面阐述了光生物调节作用的机制,而且开展了广泛的应用研究^[1, 2, 5, 9~11]。

关节软骨损伤后的自愈能力很差,目前临床上仍然未能找到理想的治疗方法。光生物调节作用是一种无创安全的细胞功能康复方法^[9, 10],其促进软骨损伤愈合的功能一直是一个很吸引人的课题^[12~18]。大多数研究表明光生物调节作用有一定的疗效^[12~15],但也有研究发现光生物调节作用无效^[16~18]。为了弄清相应的作用机制,人们用软骨细胞开展了细胞模型研究^[19~21],证明光生物调节作用确实可以促进软骨细胞增殖。但是,所进行的研究非常初步,人们只研究了细胞增殖,而且缺乏量效关系,对在体研究和临床应用帮助不大。本文研究了低强度 He-Ne 激光辐照(HNI)对软骨细胞增殖的量效关系、对胶原合成的动态关系及其安全性。

2 实验材料和方法

2.1 材料

DMEM-F12(1:1)培养液(Gibco),新生牛血清(Hyclone),羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所),SABC 试剂盒(博士德),Type II Collagen (Ab-1) (Oncogene), II 型胶原酶、透明质酸酶、胰蛋白酶、四氮唑复合物(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydricide, XTT)、硫酸酚嗪甲酯(phenazine methosulfate, PMS)、吖啶橙(Acridine Orange)等均购自 Sigma 公司。

2.2 方法

取 3 周龄新西兰白兔处死,无菌片状切取肱骨近端和股骨近、远端及胫骨近端关节面软骨,切成 1 mm^3 左右的小颗粒。分别用透明质酸酶, II 型胶原酶和胰蛋白酶消化关节软骨碎片,200 目筛网过滤,获得软骨细胞悬液后,加入含体积分数为 10%

新生牛血清(NCS)的 DMEM-F12 培养液,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养,原代细胞贴壁并融合成单层细胞后,用 0.25% 胰酶消化传代培养,收获的细胞于液氮中冻贮备用。采用第 3,4 代细胞进行实验。

将软骨细胞接种于 24 孔板中,每孔 1 mL,浓度为 $4\times 10^3/\text{mL}$,每个剂量重复 4 孔,第二天待细胞贴壁后进行实验。He-Ne 激光经光纤传输至照射部位(500-C 型氦氖激光治疗仪,广州产),波长为 632.8 nm ,光纤末端输出功率调节为 6.5 mW ,光斑直径为 1.2 cm ,照射组时间分别为 2, 8, 16, 30, 45 min,每天照射 1 次共 6 天,然后继续在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 6 天,隔天更换 MEM-F12 培养液;对照组不需激光辐照,其余条件与实验组相同。分别采用理想营养状态(10%NCS)、营养缺乏状态(5%, 2.5%NCS)及无血清(serum free)四种培养体系进行培养。在第一次 He-Ne 激光照射后 13 天用四氮唑复合物法^[22]检测细胞的吸光度,寻找最佳辐照剂量。

采用上述方法辐照细胞后,于 2.5%NCS, DMEM-F12 培养液中培养,隔天收集细胞的培养液(第一次照射后第 2, 4, 6, 8, 10, 12 天),用氯胺 T 消化法测定羟脯氨酸(Hrp)的含量,并按照试剂盒说明书步骤进行操作。反应产物于分光光度计 550 nm 处比色,根据其呈色的深浅计算出 Hrp 含量,以反映软骨细胞合成胶原的情况。

调节细胞浓度为 $4\times 10^3/\text{mL}$,滴加在涂有多聚赖氨酸的盖玻片上作细胞爬片,每片 1 mL。待细胞贴壁后,于 5%NCS, DMEM-F12 培养液中培养,按照上述方法进行激光辐照;测定时加入 0.01% Acridine Orange 2~3 滴,染色 5 min 后在激光共聚焦显微镜(BIO-RAD MRC-600)下观察软骨细胞 DNA 标记情况^[23],激发波长为 488 nm ,阻断波长为 520 nm 。

分离培养的软骨细胞均采用 II 型胶原免疫组化染色以确定其表型。按照以上方法作细胞爬片及培养;用 SABC 试剂盒,并按照说明书进行操作,一抗 Type II Collagen (Ab-1)稀释度为 1:200,以 $3'3'$ 二氨基联苯胺(DAB)显色,梯度乙醇脱水,中性树脂固封。

倒置显微镜下每天观察细胞的生长情况,并采用扫描电镜观察细胞的超微结构变化。用上述同样方法制作细胞爬片,于 5%NCS, DMEM-F12 中培养。He-Ne 激光照射方法:1) 6.5 mW ,每天 30 min 共 4 天;2) 6.5 mW ,每天 30 min 共 6 天;继续培养至第 9

天观察。收集盖玻片,用冷 PBS 洗涤,戊二醛固定,丙酮脱水,二氧化碳干燥,喷金,扫描电镜观察。

辐照剂量光密度(OD)值组间差别采用单因素方差分析,SPSS for windows 11.0 统计学软件处理;Hrp 的含量采用两因素(处理因素及时间因素)重复测定资料的方差分析及趋势分析,SAS 统计学软件处理。

3 结 果

3.1 不同营养条件下 He-Ne 激光照射后软骨细胞的生长状况

对理想营养状态(10% NCS)、营养缺乏状态(5%, 2.5% NCS)和无血清培养四种不同培养体系,用剂量相同的 He-Ne 激光每天照射一次,连续照射 6 天。第一次照射后第 13 天的结果相差较大,如图 1 所示。在营养状态较理想时,所有剂量组辐照前后差异均无显著性意义($P > 0.05$)。在无血清培养基中细胞不增殖。在营养缺乏培养状态中(5%, 2.5% NCS),辐照时间为 16 min 时细胞数量开始明显增加,与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.01$),45 min 时呈现出下降趋势;实验结果显示最佳辐照时间为 30 min,激光通过培养皿的损耗为 8.9%,实际最佳辐照能量密度为 9.42 J/cm^2 。

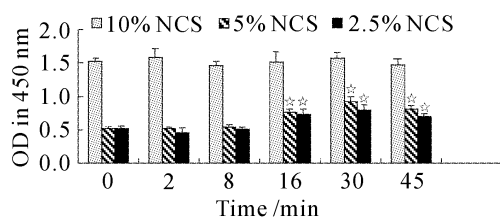


图 1 不同营养条件下 He-Ne 激光照射后软骨细胞的生长状况

0 剂量组为对照组;☆与对照组比较, $P < 0.01$

Fig. 1 Growth situation of chondrocytes by HNI in different nutrition mediums

0 min group is control group;

☆ comparing with control group $P < 0.01$

3.2 羟脯氨酸含量动态测定

两因素重复测定资料的方差分析结果显示,在 2.5% NCS 培养状态下,不同时间的 Hrp 含量的差别无统计学意义($P = 0.2242$),处理方法及时间之间有明显的交互作用($P = 0.0001, P < 0.01$),实验组与对照组的 Hrp 含量趋势分析最高阶(第 5 阶, $P = 0.0055, P < 0.01$)具有统计学意义,表明两组细胞 Hrp 含量曲线趋势不同,He-Ne 激光照射

后软骨细胞合成胶原的能力在逐步增加,而对照组在培养至第 2 周开始 Hrp 含量明显下降,如图 2 所示。

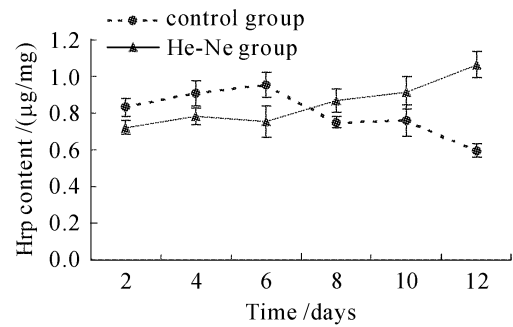


图 2 羟脯氨酸含量动态测定

Fig. 2 Hrp content dynamic detection

3.3 细胞形态学观察

细胞形态学观察均在 5% NCS 培养状态下进行。分离培养的软骨细胞 II 型胶原免疫组织化学染色均为阳性,具有正常软骨细胞的表型,如图 3 所示。倒置显微镜及激光共聚焦显微镜下观察到实验组软骨细胞形态多为三角形,与正常软骨细胞无明



图 3 He-Ne 激光照射后软骨细胞 II 型胶原免疫组织的化学染色

Fig. 3 Chondrocytes type II collagen immunohistochemistry staining after HNI 6.5 mW, 30 min (400X)

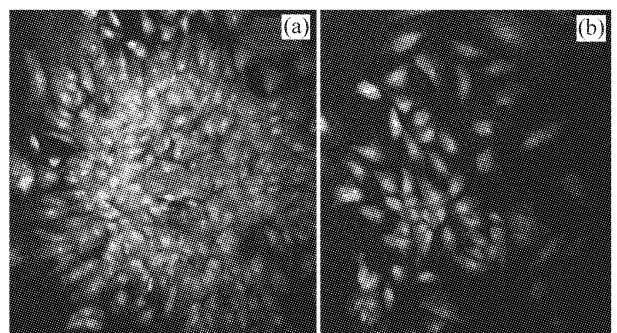


图 4 激光共聚焦显微镜下观察吖啶橙标记软骨细胞 DNA 表达(200X)

(a) He-Ne 激光照射组;(b) 对照组

Fig. 4 DNA expression observed by acridine orange stain and confocal laser scanning microscope (200X)

(a) HNI group; (b) control group

显差别;DNA 标记呈黄绿色荧光,荧光信号较对照组强;实验组细胞可见数量较多的集落生长现象,而且细胞集落明显增大,如图 4 所示。

扫描电镜观察两组细胞均具有典型的软骨细胞特征,He-Ne 激光照射后的细胞未见畸形等异常形

态。照射 4 天的两组细胞表面均有较多分泌物和突起,两组细胞无明显区别;培养至第 9 天,实验组细胞表面仍然有较多的分泌物,而且仍能找到具有分裂相的软骨细胞,如图 5 所示;而对照组的细胞已伸展和变平,缺乏分泌物。

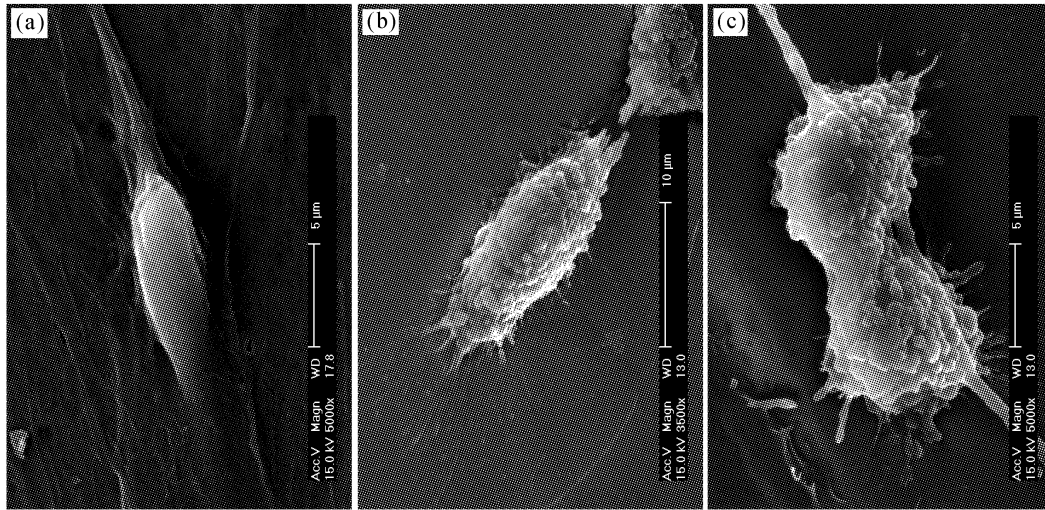


图 5 He-Ne 激光照射后软骨细胞的扫描电镜照片

(a) 对照组;(b) 照射组;(c) 具有分裂相的照射组

Fig. 5 Images of chondrocytes by scan electron microscope after He-Ne laser irradiation

(a) control group; (b) irradiated group; (c) irradiated group cells exhibiting fissive phenomenon

4 讨 论

系统地研究了低强度 He-Ne 激光对软骨细胞的光生物调节作用,发现 He-Ne 激光照射能促进营养缺乏状态下软骨细胞的增殖。通过了解 He-Ne 激光照射对软骨细胞的代谢、基质合成和超微结构变化的作用,进一步研究了软骨细胞光生物调节作用的特性。

4.1 光生物调节作用的剂量关系

光生物调节作用的原初过程是光与细胞中分子两者的相互作用。光用角频率 ω 和光强或功率密度 I 来表征,光子的能量为 $\hbar\omega$ (\hbar 为普朗克常数)。不同分子状态的能量是不连续的,能量由低到高可以排成能级,低能级 k 与高能级 n 之间的能量差用 $\hbar\omega_{kn}$ 来表示。分子受到光子的作用,将从能级 k 跃迁到能级 n ,跃迁速率 r 为

$$r = \frac{1}{2\hbar^2} |D_{kn}|^2 I \frac{\sin(\omega_{kn} - \omega)t}{\omega_{kn} - \omega}, \quad (1)$$

式中 D_{kn} 为从能级 k 跃迁到能级 n 的跃迁矩阵元, t 为光照时间。对于共振作用, $\omega_{kn} = \omega$, (1) 式可以写为

$$r = \frac{1}{2\hbar^2} |D_{kn}|^2 I \cdot t, \quad (2)$$

式中 I_t 表示光照剂量。从(2)式可知,只要物质接收到的光子数(剂量)一样,光效应应该相同,这就是倒易规则(Bunsen-Roscoe 规律)^[1]。显然,共振作用几乎是肯定可以发生的,而且满足倒易规则。对于非共振作用,倒易规则是不成立的。

大量的剂量关系研究表明^[10],跃迁几率实际上表征了光生物调节作用的生物效应,(1)式或(2)式正好体现了光生物调节作用的剂量关系,因此光生物调节作用的原初过程就是光生物调节作用的关键过程。可以有三种方法研究光生物调节作用的剂量关系^[10],即固定照射剂量 ($I \cdot t$ 为常数)^[1]、固定照射时间 (t 为常数)^[8] 和固定照射光强 (I 为常数)^[4]。在剂量固定的条件下,(1)式存在一个极大值点。HeLa 细胞增殖的光生物调节作用实验表明^[1],剂量固定时存在一个最佳功率密度 I 或照射时间 t 。在固定照射时间的条件下,式(1)和(2)都表明存在线性的剂量关系。Duan 等^[8]用固定照射时间的方法研究了 He-Ne 激光对中性粒细胞呼吸爆发的影响,发现了线性剂量关系。本实验采用固定光强的方法研究剂量关系,所用光强为 5.23 mW/cm^2 。图 1 表明,剂量关系不是线性的,照射时间在 16 min 时光密度值开始增加,30 min 时为高峰,45 min 出现下降趋

势,近似于正弦函数在第一象限的情况。因此,(2)式不成立,(1)式近似成立。Zhang 等^[4]用类似的方法研究了628 nm红光对成纤维细胞作用的剂量关系,发现了类似的情况。即倒易规则对软骨细胞光生物调节作用不成立,后者的原初过程应当是 He-Ne 激光与细胞分子的非共振作用。

4.2 光生物调节作用依赖于细胞的状态

角频率 ω 的量级一般很大(约 10^{15})。比较式(1),(2)可知,非共振作用发生的几率几乎是零,单个孤立的分子不可能发生非共振作用。因此,只有当分子之间利用协同作用放大单个分子对光的响应时,才可以观察到光生物调节作用^[10]。即光生物调节作用依赖于细胞的状态。Karu^[1]从氧化还原电位的角度总结了大量的实验现象,发现如果细胞的氧化还原电位已经处于细胞可以发挥正常功能的状态,细胞对低强度激光就没有响应;细胞的氧化还原电位比这个正常值越低,细胞对低强度激光的响应就越大。刘承宜等^[9]根据量子力学的研究进一步指出,细胞功能正常时处于亚辐射态,对外界的作用没有响应;细胞功能不正常时处于超辐射态,单个分子对辐射的响应会被非线性放大到可以观察的程度。因此可以将光生物调节作用的功能总结为细胞康合作用^[1, 9, 10]。

在实验初期设计了各种照射方案,使软骨细胞在理想的营养媒介中(10%NCS)繁育后进行实验,结果证实实验组与对照组的细胞活性没有显著性区别(见图1)。在后来的研究中考虑到,由于体内关节软骨细胞由胶原纤维及蛋白多糖包裹,没有血管及神经组织,其营养水平较低。为模仿体内的营养缺乏环境,将培养液中血清浓度降低,实验结果出现了明显变化。图1表明,体外培养的软骨细胞的增殖能力依赖于营养状态,理想营养状态(10%NCS)下的增殖能力最强,营养缺乏状态(5%,2.5%NCS)下的增殖能力受到抑制。当理想营养状态下软骨细胞的增殖能力正常时,He-Ne 激光的照射没有任何影响;当营养缺乏状态下的软骨细胞的增殖能力低下时,适当的照射可以提高软骨细胞的增殖能力。

4.3 软骨细胞光生物调节作用的特性

软骨细胞在常规培养条件下,细胞的分裂相在接种后第三天达到高峰,此后会逐渐下降,到第8天几乎没有细胞的分裂^[24]。研究发现,在营养缺乏条件下(2.5%NCS),经 He-Ne 激光照射的软骨细胞培养至第9天,在扫描电镜下仍然可以较容易地找到具有分裂相的细胞(见图5(b),(c)),而此时对照

组的细胞缺乏分裂相,分泌能力减弱。这一电镜结果证实剂量适当的 He-Ne 激光辐照能加强软骨细胞的分裂增殖能力。在激光共聚焦显微镜下可见,He-Ne 激光照射促使软骨细胞 DNA 合成明显增强(见图4(a)),繁殖能力强的细胞集落增多,可能是细胞增殖的主要原因之一。

胶原对细胞分裂有协同作用,大量研究证实在胶原培养基上生长的多种细胞在其刺激下增殖和生长加速^[25]。Hrp 在胶原蛋白中占13%,在弹性蛋白中占极少量,而其他蛋白中均不存在。因此,Hrp 的量能反映胶原的代谢情况。用氯氨 T 法连续监测 He-Ne 激光照射后软骨细胞的 Hrp 含量,结果显示随着照射次数的增多及培养时间的延长,软骨细胞合成胶原的能力呈现有规律的上升趋势(见图4),表明合成胶原能力的增加。实验表明,He-Ne 激光辐照的增殖效应要到13天才可以检测到,而胶原分泌在照射后就有上升的趋势。与对照组相比,He-Ne 激光照射组细胞表面有大量的细胞外基质(见图5(b)),正在分裂的细胞表面也有大量的细胞外基质(见图5(c))。可以认为,He-Ne 激光照射后使胶原分泌增多,并刺激细胞分裂、生长加速,可能是细胞增殖的另一个主要原因。

II 型胶原对软骨细胞增殖是必须的^[26,27]。在常规培养条件下,随着时间的延长及传代增多,软骨细胞 II 型胶原的分泌物会逐渐减少,I 型胶原的分泌物逐渐增加^[28]。实验结果显示,光生物调节作用后软骨细胞的胶原合成不断增加,而免疫组织化学染色结果证实软骨细胞仍具有正常 II 型胶原的表型(见图3),说明本实验所用剂量的光生物调节作用是通过促进 II 型胶原分泌从而促进细胞增殖的。II 型胶原是由分泌到细胞外的前 II 型胶原经交联反应合成的,前 II 型胶原 $\alpha 1$ 链基因(COL2A1)的转录和表达可以被 TGF- 1β 或 IL- 1β 抑制^[29,30]。已有实验表明,光生物调节作用可以调节基因的表达^[4, 6],增加成骨样细胞 TGF- 1β 的产生^[31],抑制牙周韧带细胞 IL- 1β 的产生^[32]。这些结果说明光生物调节作用有可能直接上调 COL2A1 的表达,或者抑制 TGF- 1β , IL- 1β 的产生。进一步的实验正在进行。

实验所采用的 He-Ne 激光照射剂量是通过促进 II 型胶原合成从而促进软骨细胞增殖的,因此观察软骨细胞增殖所需要的时间较长。根据光生物调节作用的生物信息模型^[9, 10],可以通过降低或升高 He-Ne 激光照射的剂量段直接促进软骨细胞增殖。

相关实验正在进行。

4.4 光生物调节作用的安全性

只要光强足够低(一般小于 20 mW/cm^2), 低强度的单色光或激光就不会引起内源性光动力损伤^[10], 光生物调节作用对胚胎发育没有不良影响, 是一种安全的治疗方法^[33]。Logan 等^[34]专门研究了低强度红色激光(660 nm , 12 mW , 5 kHz , 2 和 20 J/cm^2)对几种哺乳动物细胞的毒性作用, 没有发现细胞毒性和基因毒性。Applegate 等^[35]发现红外 A($700 \sim 2000 \text{ nm}$)皮肤照射不会引起 DNA 损伤、产生氧化应激蛋白和皮肤癌变或光老化所涉及的蛋白酶。本实验 He-Ne 激光照射的软骨细胞在光学显微镜及扫描电镜下均未见显著的形态学改变; 免疫组织化学染色结果显示同样具有 II 型胶原的表型(见图 3)。

5 结 论

尽管光生物调节作用的基础与临床研究日益广泛深入, 但在软骨细胞方面的研究尚浅。本实验通过系统研究初步表明, 在营养缺乏条件下软骨细胞的光生物调节作用明显, 并局限在一定的剂量范围内产生; 光生物调节作用通过促进胶原合成促进细胞增殖, DNA 合成明显增强; 低强度 He-Ne 激光照射能增强软骨细胞的分裂增殖能力, 但不会导致增殖细胞产生变异。

致谢 本院计算机中心陈玲统计师在统计学方面给予了帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Tiina Karu. The Science of Low-Power Laser Therapy [M]. Amsterdam; Grodon and Breach Science Publishers, 1998. 1~213
- 2 J. T. Eells, M. M. Henry, P. Summerfelt *et al.*. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity [J]. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**(6):3439~3444
- 3 Xu Chaoyang, Tan Shici, Xing Da. Effect of He-Ne laser irradiation on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and immunocompetence in macrophages [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(2):253~256
徐朝阳, 谭石慈, 邢 达. 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[J]. *中国激光*, 2004, **31**(2):253~256
- 4 Y. O. Zhang, S. P. Song, C. C. Fong *et al.*. CDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light [J]. *J. Invest. Dermatol.*, 2003, **120**(5):849~857
- 5 J. T. Eells, M. T. Wong-Riley, J. VerHoeve *et al.*. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy [J]. *Mitochondrion*, 2004, **4**(5-6):559~967
- 6 Li Yan, Jiao Jianling, Liu Chengyi *et al.*. Effects of ketamine in

- combination with 468. 7 mJ/cm^2 He-Ne laser irradiation on proliferation in human skin fibroblasts [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(4):509~512
- 李 燕, 角建瓴, 刘承宜 等. 氯胺酮对 He-Ne 激光照射促人正常皮肤成纤维细胞增殖作用的影响[J]. *中国激光*, 2004, **31**(4):509~512
- 7 Li Yanling, Jiao Jianling, Liu Chengyi *et al.*. Effects of He-Ne laser irradiation combined with salvia miltiorrhiza injection on the respiratory burst of bovine neutrophils [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(3):381~384
- 李艳玲, 角建瓴, 刘承宜 等. 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[J]. *中国激光*, 2004, **31**(3):381~384
- 8 R. Duan, TC-Y. Liu, Y. Li *et al.*. Signal transduction pathway involved in low intensity He-Ne laser-induced respiratory burst in bovine neutrophils; a potential mechanism of low intensity laser biostimulation [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2001, **29**(2):174~178
- 9 Timon Chengyi Liu, Jianling Jiao, Rui Duan *et al.*. Membrane mechanism of low intensity photobiomodulation on a cell. IN: Simunovic Z (ED). *Lasers in Medicine, Surgery and Dentistry* [C]. Croatia; European Medical Laser Association, 2003. 83~105
- 10 Timon Chengyi Liu, Jianling Jiao, Xiaoyang Xu *et al.*. Photobiomodulation; Phenomenology and its mechanism [C]. *SPIE*, 2005, **5630**:185~191
- 11 S. S. Campbell, P. J. Murphy. Extraocular circadian phototransduction in humans [J]. *Science*, 1998, **279**(5349):396~399
- 12 M. Akai, M. Usuba, T. Maeshima *et al.*. Laser's effect on bone and cartilage change induced by joint immobilization [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1997, **21**(5):480~484
- 13 G. Morrone, G. A. Guzzardella, P. Torricelli *et al.*. Osteochondral lesion repair of the knee in the rabbit after low-power diode Ga-Al-As laser biostimulation; an experimental study [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil. Biotechnol.*, 2000, **28**(4):321~336
- 14 R. J. Schultz, S. Krishnamurthy, W. Thelmo *et al.*. Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage; a preliminary study [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1985, **5**(6):577~588
- 15 J. M. Spivak, D. A. Grande, A. Ben-Yishay *et al.*. The effect of low-level Nd:YAG laser energy on adult articular cartilage in vitro [J]. *Arthroscopy*, 1992, **8**(1):36~43.
- 16 M. Bayat, A. Ansari, H. Hekmat. Effect of low-power helium-neon laser irradiation on 13-week immobilized articular cartilage of rabbits [J]. *Indian J. Exp. Biol.*, 2004, **42**(9):866~870
- 17 G. A. Guzzardella, D. Tigani, P. Torricelli *et al.*. Low-power diode laser stimulation of surgical osteochondral lesion; results after 24 weeks [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil. Biotechnol.*, 2001, **29**(3):235~244
- 18 E. M. Hardie, C. S. Carlson, D. C. Richardson. Effect of Nd:YAG laser energy on articular cartilage healing in the dog [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1989, **9**(6):595~601
- 19 G. Morrone, G. A. Guzzardella, P. Torricelli *et al.*. In vitro experimental research of rabbit chondrocytes biostimulation with diode laser Ga-Al-As; a preliminary study [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil. Biotechnol.*, 1998, **26**(4):437~439
- 20 G. Morrone, A. Gaetano, G. A. Guzzardella *et al.*. Biostimulation of human chondrocytes with Ga-Al-As diode laser; "in vitro" research [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil. Biotechnol.*, 2000, **28**(2):193~201
- 21 P. Torricelli, G. Giavaresi, M. Fini *et al.*. Laser biostimulation of cartilage; in vitro evaluation [J]. *Biomed*

- Pharmacother.*, 2001, **55**(2):117~120
- 22 Shen Yan, Liu Xilin, Tang Yi *et al.*. XTT colorimetric method for detecting cellular growth of human fibroblasts [J]. *Prog. Biochem. Biophys.*, 2002, **29**(4):659~662
沈 雁, 刘锡麟, 唐 毅 等. 检测人成纤维细胞增殖的 XTT 比色法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29**(4):659~662
- 23 Xu Ping. Fluorescence and Immunofluorescence Staining Technic [M]. The second edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000. 25~29
许 屏. 荧光和免疫荧光染色技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 第二版, 2000. 25~29
- 24 Han Yisheng, Hu Yunyu, Jin Gele *et al.*. Effect of recombinant PcDNA3-hBMP3 transfection on rabbit articular chondrocytes proliferation [J]. *Chin. J. Orthop.*, 2000, **20**(6):366~371
韩 一生, 胡蕴玉, 金格勒 等. 重组 PcDNA3-hBMP3 转染兔关节软骨细胞和对其增殖的影响[J]. *中华骨科杂志*, 2000, **20**(6):366~371
- 25 Li Yurui. Biochemistry and Research Method by Extracellular Matrix [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1988. 124~133
李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1988. 124~133
- 26 S. P. Scully, J. W. Lee, P. M. A. Ghert *et al.*. The role of the extracellular matrix in articular chondrocyte regulation [J]. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2001, **391**(Suppl.):S72~S89
- 27 L. Terpstra, J. Prud'homme, A. Arabian *et al.*. Reduced chondrocyte proliferation and chondrodysplasia in mice lacking the integrin-linked kinase in chondrocytes [J]. *J. Cell. Biol.*, 2003, **162**(1):139~148
- 28 S. Marlovits, M. Hombauer, M. Truppe *et al.*. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes [J]. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 2004, **86**(2):286~295
- 29 C. Chadjichristos, C. Ghayor, J. F. Herrouin *et al.*. Down-regulation of human type II collagen gene expression by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in articular chondrocytes involves SP3/SP1 ratio [J]. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**(46):43903~43917
- 30 C. Chadjichristos, C. Ghayor, M. Kypriotou *et al.*. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 beta down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes [J]. *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**(41):39762~39772
- 31 M. Khadra. The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies [J]. *Swed. Dent. J. Suppl.*, 2005, (172):1~63
- 32 N. Shimizu, M. Yamaguchi, T. Goseki *et al.*. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells [J]. *J. Dent. Res.*, 1995, **74**(7):1382~1388
- 33 B. C. Wong, C. A. Boyd, S. E. Lanzendorf. Randomized controlled study of human zona pellucida dissection using the Zona Infrared Laser Optical System; evaluation of blastomere damage, embryo development, and subsequent hatching [J]. *Fertil. Steril.*, 2003, **80**(5):1249~1254
- 34 I. D. Logan, P. G. McKenna, Y. A. Barnett. An investigation of the cytotoxic and mutagenic potential of low-intensity laser irradiation in friend-erythroleukemia cells [J]. *Mutat. Res. Lett.*, 1995, **347**(2):67~71
- 35 L. A. Applegate, C. Scaletta, R. Panizzon *et al.*. Induction of the putative protective protein ferritin by infrared radiation; Implications in skin repair [J]. *Int. J. Mol.*, 2000, **5**(3):247~251

《光学手册》简介

顾问 龚祖同 主编 李景镇
16 开 1541 页 定价 100 元

我国编写的第一本基础性大型光学手册。全书有 2700 多个公式, 1400 余幅插图和 400 多个数据表格, 230 万字。是“一本兼顾光学工作者和非光学科技工作者的参考书”(引自王大珩院士为本书的题词)。

能使读者在较短时间内全面了解某门光学分科的主要内容, 查阅公式、数据省时省力。

电 话: 021-69918253
电子信箱: gfhai@siom.ac.cn
地 址: 上海 800-211 信箱
邮 编: 201800
联 系 人: 高福海

