

文章编号: 0258-7025(2009)Supplement 1-0190-04

单色光治疗 Alzheimer 病的细胞模型研究

朱 玲¹ 刘承宜^{1, 2} 胡滨娜^{1, 3} 李晓云^{1, 2} 王永庆^{1, 4}

(¹华南师范大学激光运动医学实验室, 广东 广州 510006; ²华南师范大学生命科学院, 广东 广州 510006)
³平顶山教育学院, 河南 平顶山 467000; ⁴心理学研究所, 北京 100101)

摘要 阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)的药物疗效欠佳,单色光照射治疗是候选方案之一。本文综述了开展的单色光治疗 AD 的细胞模型研究。 β 淀粉样蛋白(amyloid- β protein, A β)或过氧化氢可诱导体外培养的神经细胞凋亡。发光二极管红光(640 \pm 15 nm)(RLED640)照射能够降低 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞凋亡,抑制过氧化氢诱导的分化 PC12 细胞凋亡,它们分别由 cAMP 和酪氨酸羟化酶所介导。Tau 蛋白功能缺失可用秋水仙素模拟。用秋水仙素和过氧化氢共同孵育可致分化 PC12 细胞流产凋亡,用 RLED640 照射能够抑制这种凋亡。节律紊乱可以用肿瘤坏死因子 α 来模拟。研究发现,低强度 810 nm 激光照射可以拮抗肿瘤坏死因子 α 诱导的 NIH3T3 成纤维细胞时钟基因表达抑制。

关键词 医用光学;光生物调节作用;细胞;凋亡;时钟基因;阿尔茨海默症

中图分类号 Q631;Q253 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/CJL200936s1.0190

Cellular Model Studies of Brain-Mediated Monochromatic Phototherapy on Alzheimer's Disease

Zhu Ling¹ Liu Chengyi^{1, 2} Hu Binna^{1, 3} Li Xiaoyun^{1, 2} Wang Yongqing^{1, 4}

¹Laboratory of Laser Sports Medicine, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510006, China
²College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510006, China
³Pingdingshan College of Education, Pingdingshan, Henan 467000, China
⁴Institute of Psychology, Beijing 100101, China

Abstract Alzheimer's disease (AD) is now the most common neurodegenerative disease. As drugs approved are not very effective, the brain-mediated monochromatic phototherapy is one of therapeutic candidate approaches. The cellular model studies of AD have been conducted in our laboratory and will be reviewed in this paper. Genetic studies have shown that dysfunction of amyloid- β (A β) or tau is sufficient to cause AD. A β or hydrogen peroxide (H₂O₂) induced neuron apoptosis might be a cellular model of AD. We found red light at 640 \pm 15 nm from light emitting diode array (RLED640) might inhibit PC12 cell apoptosis induced by A β_{25-35} and apoptosis of differentiated PC12 cell (dPC12) induced by H₂O₂, which might be mediated by cAMP and tyrosine hydroxylase, respectively. The dysfunction of tau might be mimicked by colchicine. We found H₂O₂ and colchicines might lead to dPC12 abortive apoptosis, and the abortive apoptosis might be inhibited with RLED640. The rhythm dysfunction in AD might be mimicked by tumor necrosis factor α (TNF- α). We also found low intensity 810 nm laser irradiation might rehabilitate inhibition of circadian gene expression of NIH 3T3 fibroblasts induced by the TNF- α .

Key words medical optics; photobiomodulation; cell; apoptosis; circadian clock gene; Alzheimer's disease

1 引 言

低水平激光或单色光(low level laser irradiation or monochromatic light, LLL)广泛用于疾病的预防和治

疗^[1]。最近 Nature 的专栏作家 Lane^[2]建议 LLL 用于癌症和退行性病变的治疗,对 LLL 的临床应用起到了推波助澜的作用。Alzheimer 病(AD)是一种慢性神经

基金项目: 国家自然科学基金(60878061)资助课题。

作者简介: 朱 玲(1979—),女,讲师,博士,主要从事激光运动医学方面的研究。E-mail: biozhu9@yahoo.com.cn

导师简介: 刘承宜(1963—),男,教授,博士生导师,主要从事光生物调节作用方面的研究。E-mail: liutcy@scnu.edu.cn

退行性病变。业已发现,鼻腔内低强度激光照射^[3]和血管内低能量激光照射^[4]对 AD 有一定的疗效。

当前,全世界有 2500 万的痴呆症患者,并且这个数值还正以每年 500 万的速度递增。AD 等痴呆的几率正随着年龄的增加而急速升高:国际 AD 组织估计,65~69 岁的人群中,有 1.4% 具有老年痴呆,而 85 岁及以上的人群中,几乎有 1/4 的老人具有老年痴呆。几乎所有的老年痴呆患者都随着认知和功能的下降而产生一些神经精神损害症状。这些症状包括躁动、攻击性以及精神病,它们会对患者、家人和护理带来危害。一百多年来,人们从 β 淀粉样蛋白 (amyloid β protein, A β) 和 tau 蛋白等方面寻找 AD 的成因^[5]。尽管有几种允许的药物可以对 AD 进行治疗,但是这种疾病仍然掠走了数百万人的记忆以及他们的生命。幸运的是,当前一些针对 AD 发病机理的新治疗方法的探索正在进行当中^[6]。正在临床试验中调查的 AD 治疗方法所使用的策略有阻断病原 A β 和拯救退化的神经元。尚不成熟的补充策略是制止阿普脂蛋白 E 和微管蛋白 tau 的联合致病作用。关于神经元选择性、易损性以及衰老与 AD 之间关系的探讨将为新的治疗方法提供思路。对接下来几十年之内 AD 患者人数增加的预测,促使人们将开发新的治疗方案放到首要和紧急的地位。尽管如此,AD 是慢性病,需要长期治疗,AD 药物治疗至少在代谢方面的副作用无法避免。而 LLL 治疗没有副作用^[1]。Firbank 等^[7]的研究表明,波长在 650 nm 以上的红光或红外光是可以穿透头盖骨的。而且 LLL 已经用于缺血性中风的直接照射治疗^[8]。本实验室开展了 AD 直接光疗方面的细胞模型研究。本文综述这方面的研究进展。

2 LLL 可抑制淀粉样蛋白 25~35 诱导的 PC12 细胞凋亡

A β 是 AD 病人脑中老年斑的主要成分,该蛋白的聚合与 AD 病程发展密切相关,并可诱导体外培养的神经元表现出凋亡的特征。鉴于直接抗凋亡是 AD 药物治疗的一个重要策略之一^[9],本实验室致力于开发头盖骨直接光照射抗神经元凋亡作为 AD 光疗的可能路径。段锐等^[10]沿用国际惯例采用 A β_{25-35} 诱导鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12 细胞)凋亡作为 AD 光疗初步研究的细胞模型,再用发光二极管红光(640 \pm 15 nm)(RLED640)照射,发现功率为 0.09 mW/cm² 的 RLED640 红光照射 60 min 能够显著减少 A β_{25-35} 诱导

的 PC12 细胞凋亡。进一步的机理研究发现^[11],这样的光照处理对 PC12 细胞增殖没有影响,其作用机制可能是促进胞内环化腺苷酸(Cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP)浓度升高并引起细胞分泌抗凋亡的因子。A β_{25-35} 引起 PC12 细胞内 cAMP 的增加,RLED640 可以促进其浓度进一步上升。对细胞培养液的研究发现,光照产生的抗凋亡作用还可能由某种细胞外泌的抗凋亡因子参与。

3 LLL 可抑制过氧化氢诱导的分化 PC12 细胞凋亡

近年的研究发现,过氧化氢(H₂O₂)是皮质神经元的细胞毒性因子^[12],自由基对神经元所造成的氧化应激损伤是造成 AD 的重要原因之一^[13,14]。研究发现,A β 就是线粒体产生活性氧的一个诱因^[15~17]。选择 50 ng/mL 神经生长因子(nerve growth factor, NGF)诱导 PC12 细胞形成稳定的分化细胞(differentiated PC12 cells, dPC12),用 150 μ M H₂O₂ 诱导 dPC12 细胞凋亡模拟氧化应激反应,从氧化应激的角度建立了神经系统损伤的细胞模型^[18]。研究发现 0.06 mW/cm² 的 RLED640 照射 20 min 可以显著减低 H₂O₂ 引起的 dPC12 细胞的中期凋亡,提高细胞的活性以及存活率,但对末期凋亡和早期凋亡无显著影响,其单次照射延缓凋亡的作用可以持续 24 h 以上。进一步研究发现,RLED640 的光照虽然对凋亡基因 bax 和 bcl-2 的比值无显著影响,但明显降低促凋亡基因 caspase-3 的表达。同时,RLED640 光照明显上调 dPC12 细胞的脑源神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和多巴胺合成过程中的限速酶-酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的 mRNA 表达,后者可能因此促进了多巴胺的分泌。验证了前期工作^[11]的推测,RLED640 照射可促进细胞分泌营养因子,对氧化应激的 dPC12 细胞有保护。

本实验发现,在多个光照剂量中,0.06 mW/cm² \times 20 min 具有最佳抑制 H₂O₂ 诱导的 dPC12 细胞凋亡的作用,其作用效果比我们之前报道的^[10,11]显著抑制 A β_{25-35} 诱导的 PC12 凋亡的光照剂量(0.09 mW/cm² \times 60 min)更佳。在作用频率上,隔天照射一次比每天都照射或隔两天照射的效果更显著。针对存在差异的不同个体和不同的生理功能,RLED640 有一个最佳光照剂量和作用频率。同时,研究了相同的 0.06 mW/cm² \times 20 min 光照剂量下,紫色(400 \pm 5 nm)、蓝色(460 \pm 5 nm)、绿色

(550 ± 5 nm)、橙色(610 ± 5 nm)及红色(635 ± 5 nm)发光二极管光照的不同效果。结果显示红光效果最好,而紫光效果最弱;从强到弱依次为:红橙绿蓝紫。

4 LLL 可抑制分化 PC12 细胞的流产凋亡

对 AD 患者大脑的解剖发现,经历漫长的记忆丧失,神经元依然存在。但是细胞凋亡的周期是很短的。针对这一现象,A. K. Raina 等^[19]提出了新的看法——AD 患者脑中神经元流产凋亡现象。A β 和 tau 蛋白是 AD 的两大主要病原^[5],人们通常分别从 A β 和 tau 蛋白两方面建立实验模型。细胞凋亡需要微管参与,A β 或 H₂O₂ 可以诱导细胞凋亡,tau 蛋白的过度磷酸化正好干扰了细胞凋亡所需要的微管结构。本实验室选用非致凋亡剂量的秋水仙碱(2.5 nM)模拟 tau 蛋白的过度磷酸化对微管的作用,与 100 μ M 的 H₂O₂ 共同处理 dPC12 细胞,构建了流产凋亡的体外细胞模型。通过细胞形态学观察、细胞周期检测和对凋亡基因 caspase-3 基因表达的检测,发现本细胞模型并没有完成凋亡的经典途径,而是退出了依赖 caspase 的凋亡程序而继续存活下来,符合 Raina 等人^[19]所假设的流产凋亡现象。研究发现,0.03 mW/cm² × 60 min 和 0.06 mW/cm² × 20 min 两个剂量的 RLED 光照,均可以降低早期凋亡的发生而提高存活率,其中 0.06 mW/cm² × 20 min 的光照更有效地抑制凋亡中期的发生。在秋水仙碱和 H₂O₂ 共同诱导细胞流产凋亡的初期,凋亡基因 caspase-3 的 mRNA 表达上调,处理后 12 h 达到高峰,同时 BDNF 及 TH 的 mRNA 表达也伴随升高,细胞可能通过分泌营养因子而拮抗凋亡的进行。处理 24 h 后凋亡得以控制时,caspase-3 与 TH 基因表达都下调。可推测,促凋亡和抑凋亡因子的相互拮抗存在一种动态平衡,使细胞长期处于流产凋亡状态,一旦这种拮抗作用被破坏时,细胞可能走向快速凋亡或者修复后正常存活。RLED640 光照可能正是通过上调抑凋亡因子的分泌而抑制流产凋亡改变了细胞的命运。

5 LLL 可拮抗由肿瘤坏死因子诱导的 NIH3T3 成纤维细胞时钟基因表达下降

A β 诱导下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic

nucleus, SCN)神经元凋亡^[20],引起 AD 患者 SCN 呈现明显退行性改变^[21],造成昼夜节律混乱。初步实验结果证明,明光刺激可通过视网膜路径使 AD 的昼夜节律紊乱得到改善^[21]。而胛窝等体表照射是否可以改变昼夜节律是近年来研究的热点^[22, 23]。我们初步研究了 LLL 对细胞生物节律的潜在影响^[24]。利用肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 降低 NIH3T3 细胞时钟基因的表达水平^[25],建立时钟基因表达受抑的细胞模型。用低强度 810 nm 半导体激光对该细胞模型进行不同剂量的光照处理。结果表明,TNF- α 处理显著抑制 NIH3T3 细胞时钟基因 mPer1, mPer2, mPer3, mDbp 的 mRNA 表达水平;在 TNF- α 作用细胞初时,同时给予剂量为 10 mW/cm² × 10 min 的 810 nm 半导体激光照射,可以明显拮抗 TNF- α 对以上时钟基因表达的抑制,显示了 LLL 在调节细胞时钟系统方面发挥着作用。这为寻找一种新的体外抑制 TNF- α 副作用的治疗手段提供了理论依据。鉴于 LLL 在时钟系统调节方面所发挥的作用,我们将进一步探讨 LLL 可能对 AD 患者时钟紊乱的调节作用及其机制。

6 讨 论

基于 AD 的 A β 假说,用 A β 诱导 PC12 细胞凋亡,发现 RLED640 通过增加 cAMP 水平诱导抗凋亡因子分泌抑制凋亡。基于 AD 的氧化应激假说,用 H₂O₂ 诱导 dPC12 细胞凋亡,发现 RLED 通过促进 TH 的基因的表达将细胞凋亡延迟 24 h。还分别用 H₂O₂ 和秋水仙碱模拟 A β 和 tau 蛋白的作用,建立了 AD 的流产凋亡模型,发现 RLED 可以抑制流产凋亡的发生。基于 AD 昼夜节律混乱,用 TNF- α 诱导了 NIH3T3 成纤维细胞时钟基因表达下降,发现低强度半导体 810 nm 激光可以康复时钟基因的表达。对这些细胞模型的研究初步为开发一种新的 AD 防治方法提供了理论依据。LED 的成本非常低,可以根据大脑脑区的分布设计一个特殊的 AD 治疗光帽,不但可以应用于临床,而且可以走入社区和家庭。正如前面所指出的,LLL 是没有副作用的安全疗法^[1]。针对 AD 这个老年人的多发性慢性病,AD 治疗光帽的意义不仅在治疗,更重要的是在预防。除了体力和脑力劳动^[26],AD 的对策研究目前还没有发现有效的预防方法。最近有报道发现视皮层神经元的 LLL 预照射也有抗凋亡作用^[27],进一步支持了本文的研究思路。

参 考 文 献

- 1 J. Tunér, L. Hode. Low Level Laser Therapy [M]. Graengesberg: Prima Books in Sweden AB, 1999, 30~45
- 2 N. Lane. Cell biology: power games [J]. *Nature*, 2006, **443**(7114): 901~903
- 3 Xu Changchun, Wang Lili, Shang Xumin *et al.*. The treatment of Alzheimer's disease with hypoenery He-Ne laser[J]. *Prac. J. Med. & Pharm.*, 2002, **19**(9): 647~648
许长春, 王黎荔, 商旭敏等. 低能量 He-Ne 激光治疗 Alzheimer 病[J]. *实用医药杂志*, 2002, **19**(9): 647~648
- 4 Zhang Guochuang, Zhao Baolong, Shi Yongbin *et al.*. A comparison between vascular dementia and Alzheimer's disease treated by intravascular diode green laser irradiation[J]. *Applied Laser*, 2001, **21**(2): 136~139
张国川, 赵宝龙, 施永斌等. 半导体绿激光血管内照射治疗血管性痴呆与阿尔茨海默病的疗效比较[J]. *应用激光*, 2001, **21**(2): 136~139
- 5 M. Goedert, M. G. Spillantini. A century of Alzheimer's disease [J]. *Science*, 2006, **314**(5800): 777~781
- 6 E. D. Roberson, L. Mucke. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease [J]. *Science*, 2006, **314** (5800): 781~784
- 7 M. Firbank, M. Hiraoka, M. Essenpreis *et al.*. Measurement of the optical-properties of the skull in the wavelength range 650-950 nm [J]. *Phys. Med. Biol.*, 1993, **38** (4): 503~510
- 8 Y. Lampl, J. A. Zivin, M. Fisher *et al.*. Infrared laser therapy for ischemic stroke: a new treatment strategy: results of the neuro thera effectiveness and safety trial-1 (NEST-1) [J]. *Stroke*, 2007, **38**(6): 1843~1849
- 9 P. C. Waldmeier. Prospects for antiapoptotic drug therapy of neurodegenerative diseases [J]. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*, 2003, **27**(2): 303~321
- 10 R. Duan, L. Zhu, T. C. Liu *et al.*. Light emitting diode irradiation protect against the amyloid beta 25-35 induced apoptosis of PC12 cell in vitro[J]. *Lasers Surg. Med.*, 2003, **33**(3): 199~203
- 11 L. Zhu, B. Hu, T. C. Liu. Mechanism of inhibition of red light on amyloid beta 25-35 peptides induced PC12 cell apoptosis[J]. *Lasers Surg. Med.*, 2008, **40**(S20): 108~108
- 12 J. Ara, R. Ali. Polynucleotide specificity of anti-reactive oxygen species(ROS) DNA antibodies[J]. *Clin. Exp. Immunol.*, 1993, **94**(1): 134~139
- 13 C. Behl. Alzheimers disease and oxidative stress: Implications for novel therapeutic approaches [J]. *Prog. Neurobiol.*, 1999, **57**(3): 301~323
- 14 Y. D. He, Z. Fei, X. Zhang *et al.*. Gene expression of metabotropic glutamate receptor 1a after brain injury and efficacy of its antagonist MCPG [J]. *Di-si Junyi Daxue Xuebao (J. Fourth Mil. Med. Univ.)*, 2001, **22** (7): 612~615
- 15 C. Behl, F. Holsboer. Oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease and antioxidant neuroprotection [J]. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.*, 1998, **66**(3): 113~121
- 16 F. S. Tao, J. L. Zhang, G. T. Mei *et al.*. Projection of serotonergic neurons to the trigeminal motor nucleus and sensory nucleus [J]. *Di-si Junyi Daxue Xuebao (J. Fourth Mil. Med. Univ.)*, 2000, **21** (11): 1321~1324
- 17 Z. Y. Fu, R. S. Ma. Both circadian rhythm and repeated-testing act on event related potential P300 [J]. *Di-si Junyi Daxue Xuebao (J. Fourth Mil. Med. Univ.)*, 2001, **22**(2): 110~112
- 18 Zhu Ling. Protective effect of PBM of RLED on dPC12 cells against oxidative stress induced by H₂O₂ [D]. Guang Zhou: South China Normal University, 2008, 30~60
朱 玲. 过氧化氢诱导的 PC12 细胞凋亡及其光生物调节作用研究 [D]. 广州: 华南师范大学博士论文, 2008, 30~60
- 19 A. K. Raina, A. Hochman, X. Zhu *et al.*. Abortive apoptosis in Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol.*, 2001, **101**(4): 305~310
- 20 A. M. Furio, R. A. Cutrera, T. V. Castillo *et al.*. Effect of melatonin on changes in locomotor activity rhythm of Syrian hamsters injected with beta amyloid peptide 25-35 in the Suprachiasmatic nuclei [J]. *Cell Mol. Neurobiol.*, 2002, **22**(5-6): 699~709
- 21 S. Ancoli-Israel, J. L. Martin, P. Gehrman *et al.*. Effect of light on agitation in institutionalized patients with severe Alzheimer disease [J]. *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, 2003, **11**(2): 194~203
- 22 S. S. Campbell, P. J. Murphy. Extraocular circadian phototransduction in humans [J]. *Science*, 1998, **279** (5349): 396~399
- 23 K. P. Wright, C. A. Czeisler. Absence of circadian phase resetting in response to bright light behind the knees [J]. *Science*, 2002, **297**(5581): 571~571
- 24 Wang Yongqing. The effects of low intensity laser irradiation on TNF- α induced expression suppression of circadian clock genes in cultured NIH3T3 fibroblasts [D]. Guangzhou: South China Normal University, 2008, 45~80
王永庆. 低强度激光对 TNF- α 引起的 NIH3T3 细胞时钟基因表达抑制的影响 [D]. 广州: 华南师范大学, 2008, 45~80
- 25 G. Cavadini, S. Petrzilka, P. Kohler *et al.*. TNF- α suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**(31): 12843~12848
- 26 J. Marx. Preventing Alzheimer's: a lifelong commitment [J]. *Science*, 2005, **309**(5736): 864~866
- 27 H. L. Liang, H. T. Whelan, J. T. Eells *et al.*. Photobiomodulation partially rescues visual cortical neurons from cyanide-induced apoptosis [J]. *Neuroscience*, 2006, **139** (2): 639~649