

激光与光电子学进展

808 nm 激光介导的光生物调节对高糖环境下成纤维细胞活性氧稳态的影响

韩广^{1,3}, 高静静¹, 屠梦茹¹, 石嘉^{2,3}, 潘振华⁴, 陈洪丽^{1,3*}¹天津工业大学生命科学学院, 天津 300387;²天津工业大学电子与信息工程学院, 天津 300387;³天津市光电检测技术与系统重点实验室, 天津 300387;⁴天津医科大学总医院肺癌研究所, 天津 300052

摘要 创面愈合延迟是最具挑战性的糖尿病临床并发症之一, 其与活性氧(ROS)的过量生成有关。光生物调节作用(PBM)可以从多方面促进创面愈合, 可作为糖尿病患者创面延迟愈合的一种治疗方法。本文研究了PBM对高糖培养的人胚胎皮肤成纤维细胞(CCC-ESFs)活性氧稳态的影响, 探讨了PBM对改善细胞氧化应激损伤的作用。首先体外培养CCC-ESFs, 细胞被随机分为对照组(正常培养基和高糖培养基)和808 nm激光照射组(功率密度分别为10, 20, 40 mW/cm², 能量密度分别为1.5, 3, 6, 12 J/cm²), 对照组不照光。高糖造模48 h后进行激光照射, 随后分别检测细胞的增殖活力、ROS含量、总超氧化物歧化酶含量、总抗氧化能力、线粒体膜电位和相关细胞因子表达量。结果表明: 高糖环境降低了细胞的增殖活力, ROS含量显著增多, 抗氧化能力下降, 细胞凋亡增多; 采用808 nm激光照射后, 细胞的增殖效应没有得到明显改善, 但细胞的ROS含量下降, 抗氧化酶表达量出现上升趋势, 促炎细胞因子表达量降低。这些结果表明, PBM可以修复高糖环境下产生的氧化应激损伤, 调节炎症反应, 促进创面愈合。

关键词 生物技术; 光生物调节作用; 高糖细胞模型; 活性氧; 创伤愈合

中图分类号 R318.51

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202158.0917001

Effect of Photobiomodulation Mediated by 808 nm Laser on Active Oxygen Steady-State in CCC-ESFs under High Glucose Environment

Han Guang^{1,3}, Gao Jingjing¹, Tu Mengru¹, Shi Jia^{2,3}, Pan Zhenhua⁴, Chen Hongli^{1,3*}¹School of Life Sciences, Tiangong University, Tianjin 300387, China;²School of Electronic and Information Engineering, Tiangong University, Tianjin 300387, China;³Tianjin Key Laboratory of Photoelectric Detection Technology and Systems, Tianjin 300387, China;⁴Institute of Lung Cancer, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Abstract Delayed wound healing is one of the most challenging clinical complications of diabetes mellitus (DM) and is related to the excessive production of reactive oxygen species (ROS). Photobiomodulation (PBM) can promote the healing of delayed wounds in DM patients. We studied the effect of PBM on the active oxygen homeostasis of human embryonic skin fibroblasts (CCC-ESFs) that were cultured in a high glucose environment,

收稿日期: 2020-08-04; 修回日期: 2020-09-11; 录用日期: 2020-09-30

基金项目: 国家自然科学基金(61705164, 61905176)、天津市自然科学基金(19JCQNJC01600)、博士后科学基金(2019M651036)

*E-mail: chenhl0107@163.com

and explored the effect of PBM on improving oxidative stress injuries. CCC-ESFs were cultured *in vitro*, and the cells were randomly divided into control group (normal glucose group and high glucose group) and 808 nm laser irradiation group (power density: 10, 20, and 40 mW/cm²; energy density: 1.5, 3, 6, and 12 J/cm²). After 48 hours of high glucose modeling, the experimental group was irradiated with a laser and we measured the cell proliferation, ROS content, total superoxide dismutase, total antioxidant capacity, mitochondrial membrane potential and the expression level of the related cytokines. The results show that cell proliferation activity was reduced, ROS content was significantly increased, antioxidant capacity was decreased and cell apoptosis was increased in the high glucose environment; however, the proliferation effect of the cells was not significantly improved after 808 nm laser irradiation, but ROS content of the cells decreased, the expression of antioxidant enzymes showed an upward trend, and the expression of pro-inflammatory cytokines decreased. These results show that PBM can repair oxidative stress damage, regulate inflammatory responses, and promote wound healing under a high glucose environment.

Key words biotechnology; photobiological regulation; high glucose cell model; reactive oxygen species; wound healing

OCIS codes 140.3450; 140.5960; 170.1530; 170.1870

1 引言

糖尿病(DM)是一种以高血糖为特征的慢性退行性疾病^[1]。对于 I 型糖尿病,高血糖的发生主要是由于胰岛素分泌不足对胰腺造成了损伤,以及外周组织对葡萄糖摄取减少;对于 II 型糖尿病,高血糖的发生主要是因为细胞异位脂肪酸引起胶糖异生增加^[2]。在所有与糖尿病相关的并发症中,伤口愈合延迟是糖尿病患者的主要表现之一^[3]。高浓度葡萄糖会导致活性氧(ROS)产量增多^[4],破坏细胞的氧化平衡,从而诱导氧化应激反应。目前已经证明过量的 ROS 会刺激炎性细胞因子的生成,导致炎症期失调^[5],最终导致伤口愈合不良。目前,糖尿病创伤主要的治疗方法有清创后伤口用药或敷料治疗^[6],以及电刺激、负压治疗、机械辅助治疗等一些辅助治疗方法,但治疗效果一般。因此,寻找一种有效抗氧化治疗的方式具有重要的临床意义。

随着激光医疗技术的发展,光生物调节作用(PBM)已成为临床实践中常用的治疗方法^[7]。PBM 能够诱导机体产生良性生物刺激和光化学反应,从而可以通过促进组织修复、减少炎症和产生镇痛作用来促进伤口愈合,而且不会产生不可逆的组织损伤^[8]。成纤维细胞是高糖环境下诱导皮肤病变过程中重要的效应细胞,参与创伤愈合的全过程,因此增强成纤维细胞的增殖活性、降低氧化应激水平对糖尿病患者伤口愈合具有重要意义。研究表明,激光照射可以加速糖尿病患者的伤口愈合^[9],波长为 800~830 nm 的低功率激光在促进神经修复、减轻伤口疼痛等方面有显著效果^[10]。因此,

本文通过检测 808 nm 激光对高葡萄糖浓度下人胚胎皮肤成纤维细胞(CCC-ESFs)增殖活性、ROS 水平、线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)以及细胞因子水平的影响,来探索 PBM 对高糖诱导的氧化应激的调控机制,为弱激光应用于临床糖尿病治疗提供新的理论依据。

2 材料和方法

2.1 材料及仪器

培养基(DMEM)和胎牛血清购于 Gibco 公司;噻唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)购自 Sigma 公司;ROS 检测试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(WST-8 法)、总抗氧化能力(TAC)检测试剂盒(ABTS 法)、聚氧基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒均购于碧云天生物技术研究。核转录因子(NF- κ B)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。CCC-ESFs 购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。光源为 808 nm 的半导体激光器,由天津滨海华医光电技术有限公司研制。此外,实验中使用的仪器还有激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 710)、全波长多功能酶标仪(Thermo)、功率计(Gentec)。

2.2 细胞培养与高糖造模

将细胞接种在 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养液中,在 CO₂ 体积分数为 5%、温度为 37 °C 的培养箱(饱和湿度)中传代培养。使用 0.25% 胰酶消化对数期细胞。每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

根据前期实验结果与文献调研配制高糖(浓度为 30 mmol/L)培养基^[11-12]:称取 229.5 mg 葡萄糖粉并将其置于 50 mL 离心管中,取 45 mL 低糖 DMEM 培养基到离心管中,充分混匀后,用 0.22 μm 滤头过滤灭菌,再加入 5 mL 胎牛血清和 500 μL 双抗培养基。高糖培养基培养 48 h 视为高糖造模^[13]。高糖培养基现配现用,剩余的培养基置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.3 实验分组与光照剂量

实验分为正常培养基组和高糖培养基组,每个实验组设置 8 个复孔,以每孔 200 μL 的剂量加入培养基,培养 48 h 后采用光学显微镜观察细胞的形态;之后分别用能量密度为 1.5, 3, 6, 12 J/cm^2 以及功率密度为 10, 20, 40 mW/cm^2 的 808 nm 激光照射培养基,照光期间避光,连续照射 3 d,每天照射 2 次,照射间隔在 4 h 以上。激光照射参数如表 1 所示,激光照射剂量如表 2 所示。

表 1 辐照参数

Table 1 Irradiation parameters

Parameter	Value
Wavelength /nm	808
Output mode	Continuous
Average radiant power /mW	40
Spot area / cm^2	2
Vertical distance /cm	4
Beam profile	Round
Beam divergence angle /($^{\circ}$)	90

表 2 激光照射剂量

Table 2 Laser irradiation dose

Power density / ($\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Energy density / ($\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Irradiation time /min
10	1.5	2.5
	3	5
	6	10
	12	20
20	1.5	1.25
	3	2.5
	6	5
	12	10
40	1.5	0.625
	3	1.25
	6	2.5
	12	5

2.4 实验方法

2.4.1 采用 MTT 法检测细胞增殖活性

使用胰酶消化对数期细胞,终止后离心收集细胞,然后分别用含 10% 胎牛血清的普通培养基和高糖培养基将细胞制成细胞悬液,以每孔 1×10^3 个细胞的接种密度将细胞接种到 96 孔板中,每孔加入 200 μL 细胞悬液,孵育 48 h;之后用 808 nm 激光均匀照射,并分别于照光 24, 48, 72 h 后,在避光条件下于每孔中加入 10 μL 配好的 MTT 溶液(0.5 mg/mL),培养箱培养 4 h,去上清液 150 μL ,每孔加入 150 μL 的 DMSO 溶剂,15 min 后用 490 nm 全波长多功能酶标仪检测各组的吸光度(OD)值。

2.4.2 检测细胞内的 ROS 水平

采用荧光探针对 ROS 进行检测。将细胞接种到 6 孔板,光照后原位装载活性氧探针 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)(10 mmol/L , 1 $\text{mL}/\text{孔}$),将细胞收集后放入 EP 管中,按 1:1000 的体积比用无血清培养液稀释 DCFH-DA,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3~5 min 颠倒混匀一下,使探针与细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。无荧光的 DCFH 被细胞内的 ROS 氧化生成有荧光的二氯荧光素(DCF),用多功能酶标仪检测 DCF 的荧光,即可检测出细胞内的 ROS 含量。

2.4.3 检测细胞内的总 SOD 水平

用含 WST-8 的总超氧化物歧化酶检测试剂盒检测细胞内的总 SOD 水平,细胞接种到 6 孔板,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)进行洗涤,每孔加 200 μL SOD 样品制备液,离心后配制适量 WST-8 酶工作液。WST-8 可以与黄嘌呤氧化酶催化产生的超氧化物阴离子反应生成水溶性的甲臞染料,该反应步骤会被 SOD 抑制。对 WST-8 产物进行比色分析即可计算 SOD 的酶活力。

2.4.4 测定细胞的 TAC 水平

用总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 法)检测细胞的 TAC 水平。ABTS 在适当的氧化剂作用下会被氧化成绿色的 ABTS⁺,在抗氧化物存在时 ABTS⁺ 的产生会被抑制。将细胞接种到 6 孔板,每孔加入 200 μL 冰冷的 PBS。在 96 孔板的每个检测孔中加入 20 μL 过氧化物酶工作液,每个孔内加入 170 μL ABTS 工作液,孵育 6 min 后在 405 nm 波长下测定吸光度,根据吸光度即可计算出样品的 TAC 水平。

2.4.5 观察细胞的线粒体膜电位

JC-1 是一种理想的检测线粒体膜电位的荧光探针。将细胞接种到 6 孔板,光照后加入 JC-1 染色工作液,37 °C 下孵育 20 min,配制 JC-1 染色缓冲液(1X);将该缓冲液置于冰浴锅中,孵育结束后,吸去上清液,用 JC-1 染色缓冲液(1X)洗涤 2 次,加入 2 mL 培养基,采用激光共聚焦显微镜观察染色情况。正常的线粒体膜电位具有极性,JC-1 依赖于线粒体膜电位的极性在线粒体内形成多聚体,发出红色荧光;当细胞凋亡时,红光强度减弱,此时 JC-1 以单体的形式存在于胞质内,并发出绿色荧光。

2.4.6 NF-κB、TNF-α 和 IL-1β 检测

采用酶联免疫试剂盒(ELISA)对细胞因子进行检测。将细胞接种到 6 孔板,激光照射后收集细胞培养液,以 3000 r/min 的转速离心处理 20 min,取上清液,用双抗体夹心 ELISA 法进行检测。用酶标仪在 450 nm

波长下测量各孔中细胞的吸光度,绘制标准曲线,对照样品吸光度值计算出样品中的靶蛋白浓度。

2.5 数据处理及统计

采用 SPSS 25.0 数据统计软件对数据进行处理,所有结果数据均以平均值±标准差的形式表示。对数据进行单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。采用 Origin 8.0 软件作图。

3 实验结果

3.1 显微镜观察细胞的增殖情况

正常培养基与高糖培养基对细胞活性的影响情况如图 1 所示。可以发现,孵育 48 h 后,在正常培养基组中,细胞呈现良好的扩散延伸状态,而高糖组中的细胞数量明显少于正常组。这一结果表明高糖环境会抑制细胞的增殖活性。

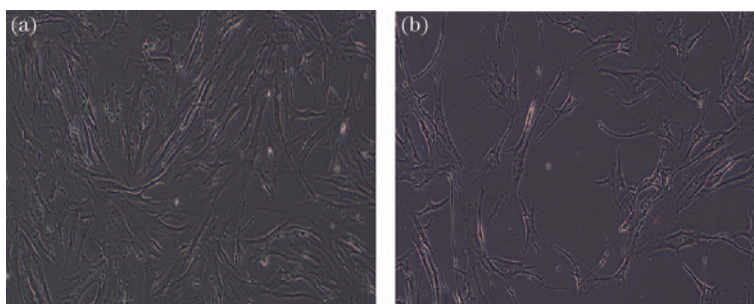


图 1 细胞形态观察结果。(a)正常培养基;(b)高糖培养基

Fig. 1 Cell morphology observation results. (a) Normal medium; (b) high glucose medium

3.2 功率密度对 CCC-ESFs 增殖活性的影响

激光功率密度对 CCC-ESFs 增殖活性的影响如图 2 所示。可以发现:高糖(HG)对照组的

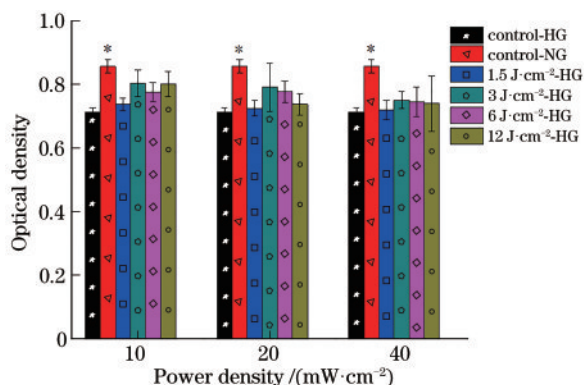


图 2 在不同功率密度的 808 nm 激光照射下,CCC-ESFs 的吸光度($n=3$; *表示与高糖对照组相比 $p < 0.05$)

Fig. 2 Absorbance of CCC-ESFs irradiated by 808 nm laser with different power densities ($n=3$; * means $p < 0.05$, compared with high glucose control group)

增殖活性显著低于正常(NG)对照组($p < 0.05$);经不同功率密度的激光照射后,高糖环境下的细胞活性增加,但与高糖对照组相比无显著差异;经不同功率密度的激光照射后,吸光度变化不明显,表明 808 nm 激光对细胞增殖活性几乎没有影响。

3.3 能量密度对 CCC-ESFs 增殖活性的影响

根据上述实验结果,激光功率密度选择 20 mW/cm²,分别在不同的能量密度(1.5, 3, 6, 12 J/cm²)下对细胞进行照射。能量密度对 CCC-ESFs 增殖活性的影响如图 3 所示。由图 3 可以发现:正常对照组的细胞活性明显高于高糖对照组($p < 0.05$);对于高糖照射组,随着照射时间延长,细胞增殖活性增加;与高糖对照组相比,不同能量密度的激光照射对高糖环境中的细胞增殖有所促进,但无明显差异。

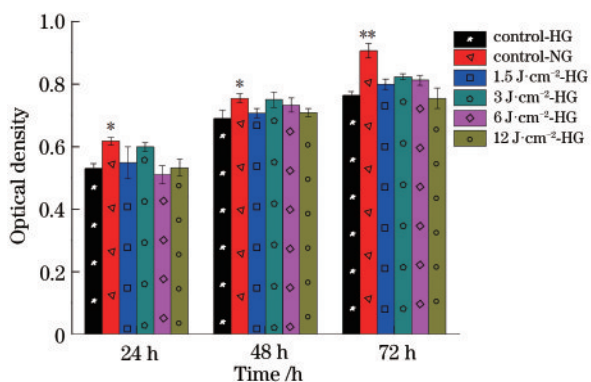


图 3 在不同能量密度的 808 nm 激光照射下, CCC-ESFs 的吸光度 ($n=3$; *表示与高糖对照组相比 $p<0.05$; **表示与高糖对照组相比 $p<0.01$)

Fig. 3 Absorbance of CCC-ESFs irradiated by 808 nm laser with different energy densities ($n=3$; * means $p<0.05$, compared with high glucose control group; ** means $p<0.01$, compared with high glucose control group)

3.4 808 nm 激光对 CCC-ESFs 内 ROS 水平的影响

细胞内的 ROS 水平如图 4 所示。可以看出:与正常对照组相比,正常照射组的 ROS 含量均上升,当激光能量密度为 3 J/cm²时,ROS 的含量达到最大,显著高于正常对照组 ($p<0.01$);与高糖对照组

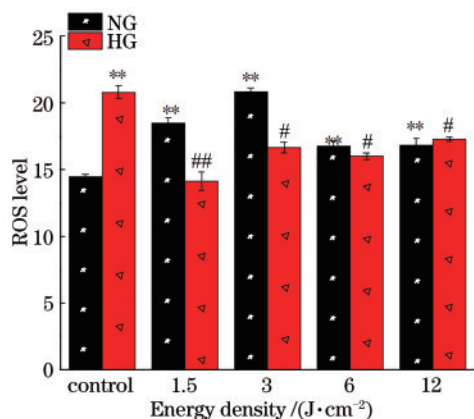


图 4 细胞内的 ROS 水平 ($n=3$; *表示与正常对照组相比 $p<0.05$; **表示与正常对照组相比 $p<0.01$; #表示与高糖对照组相比 $p<0.05$; ##表示与高糖对照组相比 $p<0.01$)

Fig. 4 Intracellular ROS level ($n=3$; * means $p<0.05$, compared with normal glucose control group; ** means $p<0.01$, compared with normal glucose control group; # means $p<0.05$, compared with high glucose control group; ## means $p<0.01$, compared with high glucose control group)

相比,高糖培养基组经激光照射后,ROS 含量均下降,当激光能量密度为 1.5 J/cm²时,高糖培养基组细胞内的 ROS 水平显著降低 ($p<0.01$);当激光能量密度为 3~6 J/cm²时,高糖培养基组细胞内的 ROS 水平明显低于高糖对照组 ($p<0.05$)。

3.5 808 nm 激光对 CCC-ESFs 内总 SOD 水平的影响

细胞内的总 SOD 活性如图 5 所示。经 808 nm 激光照射后,SOD 活性与对照组相比增大,且 NG 组的表达量明显高于 HG 组 ($p<0.05$);当能量密度为 3~6 J/cm²时,NG 组的总 SOD 表达量高于正常对照组 ($p<0.01$);当能量密度为 1.5~3 J/cm²时, HG 组总 SOD 表达量高于高糖对照组 ($p<0.05$)。这说明高糖环境降低了 SOD 的活性,但在激光照射后 SOD 表达量有所增加。

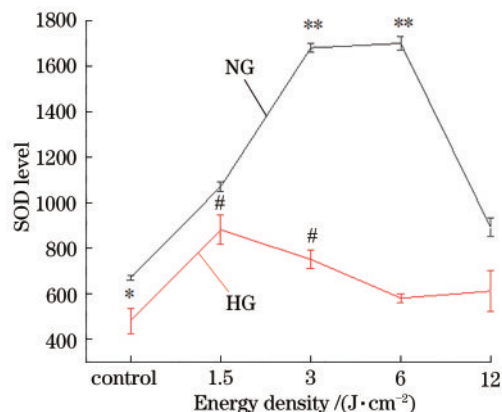


图 5 细胞内总 SOD 水平 ($n=3$; *表示与正常对照组相比 $p<0.05$; **表示与正常对照组相比 $p<0.01$; #表示与高糖对照组相比 $p<0.05$)

Fig. 5 Total intracellular SOD level ($n=3$; * means $p<0.05$, compared with normal glucose control group; ** means $p<0.01$, compared with normal glucose control group; # means $p<0.05$, compared with high glucose control group)

3.6 808 nm 激光对 CCC-ESFs TAC 水平的影响

细胞的 TAC 水平如图 6 所示。结果显示:在一定能量密度范围的激光照射后,TAC 表达量相对对照组出现不同程度的增加,细胞总体的抗氧化能力增强;当能量密度为 3~6 J/cm²时,高糖照射组的 TAC 表达量显著高于高糖对照组 ($p<0.01$)。

3.7 细胞的线粒体膜电位

选择 3 J/cm²激光照射的细胞,对其线粒体膜电位进行检测,结果如图 7 所示。红色荧光表示细胞

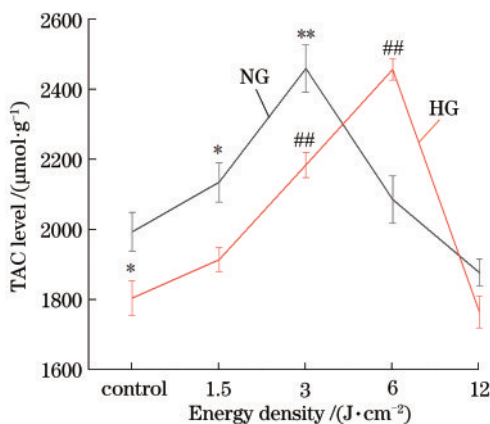


图6 细胞的 TAC 水平 ($n=3$; *表示与正常对照组相比 $p<0.05$; **表示与正常对照组相比 $p<0.01$; #表示与高糖对照组相比 $p<0.05$; ##表示与高糖对照组相比 $p<0.01$)

Fig. 6 TAC level of cells ($n=3$; * means $p<0.05$, compared with normal glucose control group; ** means $p<0.01$, compared with normal glucose control group; # means $p<0.05$, compared with high glucose control group; ## means $p<0.01$, compared with high glucose control group)

膜电位正常,绿色荧光表示膜电位降低(说明细胞可能处于凋亡的早期阶段)。从图7中可以看出:高糖环境下的绿色荧光强度明显大于红色荧光强度,表明高糖环境可能会诱导细胞凋亡;当采用弱激光照射后,红色荧光显示增多而绿色荧光减少,说明弱激光照射会减弱细胞的凋亡。

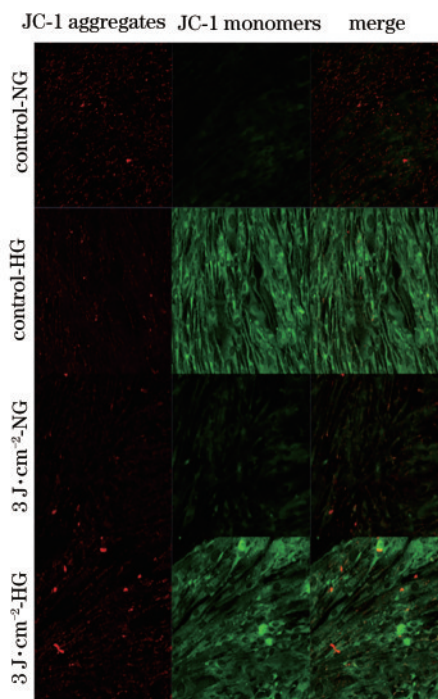


图7 细胞内的线粒体膜电位水平

Fig. 7 Intracellular mitochondrial membrane potential level

3.8 细胞的 NF-κB、TNF-α、IL-1β 水平

选择 3 J/cm^2 、808 nm 激光照射的细胞,检测它的 NF-κB、TNF-α 和 IL-1β 水平,结果如表3所示。可以看出:高糖对照组中三种因子的分泌均明显高于正常对照组 ($p<0.05$);激光照射 3 d 后,高糖照射组的 NF-κB、TNF-α 和 IL-1β 含量相比高糖对照组明显减少 ($p<0.01$)。

表3 808 nm 激光照射下细胞的 NF-κB、TNF-α 和 IL-1β 水平

Table 3 NF-κB, TNF-α and IL-1β levels of cells irradiated by 808 nm laser

Item	NF-κB level / (pg·mL ⁻¹)		TNF-α level / (pg·mL ⁻¹)		IL-1β level / (pg·mL ⁻¹)	
	A ₄₅₀	Standard deviation	A ₄₅₀	Standard deviation	A ₄₅₀	Standard deviation
Control-HG	1066.22	±6.81	74.11	±0.55	71.33	±0.55
Control-NG	1171.22	±10.86*	78.23	±0.37*	74.92	±0.15**
3 J·cm ⁻² -HG	1061.22	±66.35	75.72	±2.26**	66.48	±0.79**
3 J·cm ⁻² -NG	1111.22	±36.8##	74.45	±0.96#	69.72	±1.16##

Notes: * represents statistically significant data ($p<0.05$), compared with normal glucose control group; ** represents statistically significant data ($p<0.01$), compared with normal glucose control group; # represents statistically significant data ($p<0.05$), compared with high glucose control group; ## represents statistically significant data ($p<0.01$), compared with high glucose control group. A₄₅₀ represents absorbance at 450 nm.

4 讨论与结论

糖尿病患者创面愈合能力受损是糖尿病的典型并发症之一。有效地干预糖尿病患者创面的进程,可降低伤口进一步发生溃疡等风险^[14]。作为非

侵入性干预手段^[15],光疗产生的光生物效应具有减轻疼痛、抑制炎症并促进伤口愈合的作用^[16]。研究 PBM 在高糖环境下促进创伤愈合的分子机制,对于光疗在临床应用的转化和推广上具有重要意义^[17]。

本研究将 CCC-ESFs 在浓度为 30 mmol/L 的

高葡萄糖环境中培养 2 d, 建立高糖细胞模型, 采用显微镜对细胞形态进行观察, 结果发现高糖环境抑制了细胞的生长速率。PBM 不同的剂量参数会对成纤维细胞产生不同的光生物效应^[18-19], 例如, 光波长、功率密度、能量密度等都会对细胞活性产生影响。本研究表明: 采用不同功率密度的 808 nm 连续激光照射细胞后, 与高糖对照组相比, 高糖照射组的细胞活力无明显差异; 采用不同能量密度的激光照射后, 照射时间与细胞增殖活性呈剂量依赖性, 但与高糖对照组相比, 高糖照射组的细胞增殖活力有一定程度的提升, 但差异不明显。Silva 等^[20]使用弱激光照射小鼠巨噬细胞后发现, 波长为 808 nm 的激光不会影响细胞的生存力。有研究人员采用连续激光照射间充质干细胞, 然后采用 MTT 法检测细胞的增殖情况, 结果未观察到 808 nm 激光诱导组的细胞数量发生显著变化^[8]。由此可见, 在 808 nm 连续激光照射下, 功率密度、能量密度对细胞活性都无显著影响。黄平等^[21]采用 1064 nm 高脉冲激光照射人类正常皮肤成纤维细胞时发现, 照射 24 h 和 48 h 都显著促进了细胞增殖。可以推测, 连续近红外激光对细胞增殖效果不明显, 而脉冲近红外激光对细胞增殖有促进作用。因此, 后续可以进行脉冲近红外激光照射实验, 以进一步探索激光发射方式对细胞增殖的影响。

高糖会导致自由基生成系统和清除自由基系统之间失衡, 促进额外的 ROS 形成, 从而引起氧化应激损伤^[22]。Panahi 等^[23]发现, 高糖能促进 HepG2 细胞中 ROS 的产生。本实验结果显示: 与正常对照组相比, 高糖环境促使细胞生成了更多的 ROS, 过多的 ROS 可能会诱导细胞发生氧化应激损伤并抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡; 激光照射会降低 ROS 含量, 从而在一定程度上减弱了细胞的氧化应激损伤。同时, 本文研究了 PBM 对活性氧稳态的影响, 实验结果发现: 高糖对照组的 SOD、TAC 表达量都较正常对照组含量低; 与高糖对照组相比, 高糖照射组的 SOD、TAC 表达量出现了增长, 当激光能量密度为 3 J/cm² 时, 细胞内的 SOD、TAC 含量能同时达到较高水平。SOD 和其他抗氧化剂通过将超氧化物自由基转化为过氧化氢和氧分子来维持氧化还原稳态; 而 TAC 包括了组织中所有抗氧化剂的累积效应, 可以提供了比测量单个成分的抗氧化能力更多的生物学信息^[24]。Li 等^[25]研究了 PBM(450 nm) 对牙周炎的影响, 认为调节 ROS 和活性氮的水

平可以改善氧化应激损伤。内源性抗氧化酶作为抗氧化防御系统的重要组成部分, 可介导由 ROS 引起的损伤。因此, PBM 不仅降低了高糖环境下细胞内的 ROS 含量, 还提高了细胞抗氧化酶活性和总抗氧化能力, 消除了高糖环境下产生的过量 ROS, 同时改善了细胞产生的氧化应激损伤。

线粒体是调控细胞凋亡的主要细胞器, 而线粒体膜电位是评价线粒体功能的重要指标之一, 线粒体功能失衡会直接导致细胞进入早期凋亡^[26]。本文的研究结果显示, 高糖干预下细胞内的 ROS 水平升高, 线粒体膜电位比正常环境下培养的降低。据此, 本文推测高糖环境会对 CCC-ESFs 线粒体造成损伤, 增加线粒体膜的通透性, 降低线粒体膜电位, 诱导细胞凋亡。而当采用弱激光照射后, 线粒体膜电位逐渐升高, 这意味着细胞凋亡减少。Chen 等^[27]发现, 高糖环境下线粒体钙通道上调, ROS 表达量的升高促进了细胞凋亡, 而采用弱激光照射后, 线粒体膜电位升高, 细胞凋亡减少。此外, Chen 等^[12]发现, 在高浓度葡萄糖环境下, 细胞的线粒体膜电位比在正常浓度葡萄糖下培养的低, PBM(635 nm) 可在一定程度上减少细胞凋亡。因此, PBM 可以有效改善细胞线粒体的功能, 减少细胞凋亡。

细胞因子 TNF- α 是导致糖尿病的重要因素, 它通过产生 ROS 和抑制 NF- κ B 信号通路促进伤口的氧化应激^[28]。有证据表明, ROS 可以直接激活 NF- κ B, 也可以通过 TNF- α 、白细胞介素-1 和佛波酯参与 NF- κ B 的间接激活^[29]。NF- κ B 作为关键性的核转录因子, 可参与调节炎症反应, 诱导氧化应激^[30]。对于糖尿病患者, 在伤口未愈合的情况下, 炎症细胞因子(IL-1 β 和 TNF- α) 高表达^[31]。正如本文实验结果所示, 与正常对照组相比, 高糖对照组的 TNF- α 和 IL-1 β 升高, NF- κ B 表达量增加, 而当采用弱激光照射后, 高糖照射组的 NF- κ B、TNF- α 和 IL-1 β 含量相比高糖对照组都显示下降。高糖环境下产生的过量 ROS 可直接激活 NF- κ B, 促进炎症反应。过多的炎症因子(TNF- α 和 IL-1 β) 增加了对 NF- κ B 的刺激, 诱导氧化应激反应, 而 PBM 通过调节炎症因子的含量来改善细胞的氧化应激损伤。Lee 等^[32]的研究表明, 高糖可以显著诱导人牙龈成纤维细胞, 产生促炎细胞因子(IL-1、IL-6、IL-8 和 TNF- β), 而在 8 J/cm² 激光照射下的 PBM 能有效降低这些促炎细胞因子的 mRNA 表达水平。研究发现, IL-1 β 在 670 nm 近红外光照射时的表达量显著

增加,显著降低了促炎细胞因子的表达水平,对外伤口愈合具有积极效果^[33]。因此,PBM可通过调节NF- κ B的过度激活来修复细胞的氧化应激损伤,清除更多的炎症因子,减轻炎症反应,促进组织以及功能受损细胞的修复。

综上所述,808 nm 介导的 PBM 可以通过提高细胞抗氧化酶的活性维持活性氧稳态,同时可以有效抑制细胞凋亡、调节炎症反应,加速伤口愈合,从而改善细胞的氧化应激损伤。本文研究充分证明了激光可以调控氧化应激机制,并对糖尿病患者伤口愈合有促进作用,但是实验仍存在不足之处,没有对多种波长和脉冲的弱激光进行对比探究,在接下来的实验中将进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Zaccardi F, Webb D R, Yates T, et al. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective [J]. *Postgraduate Medical Journal*, 2016, 92(1084): 63-69.
- [2] Suharningsih, Winarni D, Husen S A, et al. The effect of electric field, magnetic field, and infrared ray combination to reduce HOMA-IR index and GLUT₄ in diabetic model of *Mus musculus* [J]. *Lasers in Medical Science*, 2020, 35(6): 1315-1321.
- [3] Arya A K, Tripathi K, Das P, et al. Promising role of ANGPTL4 gene in diabetic wound healing [J]. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 2014, 13(1): 58-63.
- [4] Buranasin P, Mizutani K, Iwasaki K, et al. High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts [J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0201855.
- [5] Zhu L N, Tang L Q. Effect of oxidative stress on inflammatory cytokines in diabetic nephropathy [J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2012, 16(9): 1226-1229.
朱玲娜,唐丽琴.糖尿病肾病中氧化应激对炎症细胞因子的影响[J].*安徽医药*, 2012, 16(9): 1226-1229.
- [6] Li B, Du X Y, Liu Y D, et al. Detection research of seed potato starch in kudzu using terahertz time-domain spectroscopy [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2019, 56(20): 203001.
李斌,杜秀洋,刘燕德,等.太赫兹时域光谱葛粉掺薯粉检测研究[J].*激光与光电子学进展*, 2019, 56(20): 203001.
- [7] de Oliveira R F, de Andrade Salgado D M, Trevelin L T, et al. Benefits of laser phototherapy on nerve repair [J]. *Lasers in Medical Science*, 2015, 30(4): 1395-1406.
- [8] Chen H L, Wu H J, Yin H J, et al. Effect of photobiomodulation on neural differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Lasers in Medical Science*, 2019, 34(4): 667-675.
- [9] Houreld N, Abrahamse H. Low-intensity laser irradiation stimulates wound healing in diabetic wounded fibroblast cells (WS₁) [J]. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2010, 12(12): 971-978.
- [10] Houreld N N, Sekhejane P R, Abrahamse H, et al. Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2010, 42(6): 494-502.
- [11] Yang R, Chang L, Liu S Y, et al. High glucose induces Rho/ROCK-dependent visfatin and type I procollagen expression in rat primary cardiac fibroblasts [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10(4): 1992-1998.
- [12] Chen H L, Tu M R, Shi J, et al. Effect of photobiomodulation on CCC-ESF reactive oxygen species steady-state in high glucose mediums [J]. *Lasers in Medical Science*, 2020, 36: 1-8.
- [13] Xing Y, Ming J, Liu T, et al. Decreased expression of TRPV₄ channels in HEI-OC₁ cells induced by high glucose is associated with hearing impairment [J]. *Yonsei Medical Journal*, 2018, 59(9): 1131-1137.
- [14] McColloch A, Liebman C, Liu H, et al. Altered adipogenesis of human mesenchymal stem cells by photobiomodulation using 1064 nm laser light [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2021, 53(2): 263-274.
- [15] Chen H L, Wang Y H, Tu W J, et al. Effects of photobiomodulation combined with MSCs transplantation on the repair of spinal cord injury in rat [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(2): 921-930.
- [16] Tie L, Yilixiati X K T, Wang X, et al. Molecular mechanisms of diabetic wound healing [J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2010, 41(6): 407-412.
铁璐,伊利夏提·肖开提,王宪,等.糖尿病伤口愈合的分子机制[J].*生理科学进展*, 2010, 41(6): 407-412.
- [17] Zhang Z X, Li B H, Wu C F, et al. Introduction for special issue on sixty-year crossing and integration for laser and biomedicine [J]. *Chinese Journal of*

- Lasers, 2020, 47(2): 0207000.
张镇西, 李步洪, 吴长锋, 等. “六十载激光与生物医学的融合发展”专题前言[J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207000.
- [18] de Andrade A L M, Luna G F, Brassolatti P, et al. Photobiomodulation effect on the proliferation of adipose tissue mesenchymal stem cells[J]. Lasers in Medical Science, 2019, 34(4): 677-683.
- [19] Zhang H B, Li Y X, Hu T T, et al. Impact of laser acupuncture on CIA rat serum IL-1 β , IL-15, IL-17, TNF- α , VEGF and COR [J]. Chinese Journal of Lasers, 2014, 41(3): 0304002.
张海波, 李迎新, 胡甜甜, 等. 激光针灸对 CIA 大鼠血清 IL-1 β 、IL-15、IL-17、TNF- α 、VEGF 和 COR 的影响[J]. 中国激光, 2014, 41(3): 0304002.
- [20] Silva I H M, de Andrade S C, de Faria A B S, et al. Increase in the nitric oxide release without changes in cell viability of macrophages after laser therapy with 660 and 808 nm lasers [J]. Lasers in Medical Science, 2016, 31(9): 1855-1862.
- [21] Huang P, Liu C Y, Xu X Y, et al. Photobiomodulation action of the marginal irradiation of high intensity KTP laser irradiations on monolayer skin fibroblasts [J]. Chinese Journal of Lasers, 2005, 32(5): 723-728.
黄平, 刘承宜, 徐晓阳, 等. 强激光束边缘对单层皮肤成纤维细胞的光生物调节作用[J]. 中国激光, 2005, 32(5): 723-728.
- [22] Madiseh M R, Tehrani A M, Bahmani M, et al. The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2016, 9(9): 825-831.
- [23] Panahi G, Pasalar P, Zare M, et al. MCU-knockdown attenuates high glucose-induced inflammation through regulating MAPKs/NF- κ B pathways and ROS production in HepG2 cells [J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0196580.
- [24] Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, et al. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids [J]. Journal of Clinical Pathology, 2001, 54(5): 356-361.
- [25] Li H, Sun T, Liu C, et al. Photobiomodulation (450 nm) alters the infection of periodontitis bacteria via the ROS/MAPK/mTOR signaling pathway [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2020, 152: 838-853.
- [26] Tucker L D, Lu Y, Dong Y, et al. Photobiomodulation therapy attenuates hypoxic-ischemic injury in a neonatal rat model [J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2018, 65(4): 514-526.
- [27] Chen W, Yang J, Chen S, et al. Importance of mitochondrial calcium uniporter in high glucose-induced endothelial cell dysfunction [J]. Diabetes & Vascular Disease Research, 2017, 14(6): 494-501.
- [28] Cho M, Hunt T K, Hussain M Z, et al. Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release [J]. American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology, 2001, 280(5): H2357-H2363.
- [29] de Freitas L F, Hamblin M R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy [J]. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2016, 22(3): 348-364.
- [30] Carroll J D, Milward M R, Cooper P R, et al. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry [J]. Dental Materials, 2014, 30(5): 465-475.
- [31] Brandner J M, Zacheja S, Houdek P, et al. Expression of matrix metalloproteinases, cytokines, and connexins in diabetic and nondiabetic human keratinocytes before and after transplantation into an *ex vivo* wound-healing model [J]. Diabetes Care, 2008, 31(1): 114-120.
- [32] Lee K D, Chiang M H, Chen P H, et al. The effect of low-level laser irradiation on hyperglycemia-induced inflammation in human gingival fibroblasts [J]. Lasers in Medical Science, 2019, 34(5): 913-920.
- [33] Lu Y Z, Natoli R, Madigan M, et al. Photobiomodulation with 670 nm light ameliorates Müller cell-mediated activation of microglia and macrophages in retinal degeneration [J]. Experimental Eye Research, 2017, 165: 78-89.