文章编号:1000-5404(2010)14-1563-03

短篇论著

650 nm 半导体激光照射豚鼠视网膜诱导细胞凋亡及 Fas 蛋白的表达

吴小兰[1],邱良秀[2],王双勇[2],刘文陆[3],徐 惠[4],周和政[5] (430063 武汉,武汉理工大学:医院[1],物流学院[3];430030 武汉,华中科技大学同济医学院:附属同济医院眼科[2],超微病理研究室[4];430070 武汉,广州军区武汉总医院眼科[5])

[摘要] **目的** 探讨 650 nm 半导体激光照射豚鼠视网膜后的细胞损伤情况。**方法** 根据 650 nm 半导体激光照射功率(2、3、4、5 mW)将 40 只豚鼠分为 4 组,各组按照射次数(1、2 次/d)分两个亚组,另取 5 只作为正常对照组。用 TUNEL 检测豚鼠视网膜细胞凋亡,用免疫组织化学法和医学图像分析法检测 Fas 蛋白的平均光密度值(AOD),用透射电镜观察视网膜细胞的形态学变化。**结果** 不同照射功率组凋亡指数(AI)差异有统计学意义($P<0.05$),其中 2、3 mW 处理组与对照组 AI 无统计学差异($P>0.05$),不同照射次数对 AI 影响无统计学意义($P>0.05$);不同照射功率组间 Fas AOD 有统计学差异($P<0.05$),其中 2 mW 处理组和对照组间 Fas AOD 无统计学差异($P>0.05$),不同照射次数对 Fas AOD 无统计学差异($P>0.05$);透射电镜观察,2 mW 处理组及对照组未见明显损伤反应;3 mW 处理组视网膜少许细胞变性,而在 4 mW 和 5 mW 处理组细胞变性明显增加。**结论** 照射功率在 3 mW 以上的豚鼠视网膜存在细胞凋亡,Fas 蛋白的表达也存在异常,说明 3 mW 以上的 650 nm 半导体激光照射豚鼠视网膜存在损伤反应。

[关键词] 半导体激光;视网膜;细胞凋亡
[中图法分类号] R322.91;R329.2;R363.122 [文献标志码] A

光脉冲刺激仪作为儿童弱视治疗的一种手段,目前还处在探索阶段。由于半导体激光具有体积小、光电转化效能高、操作简便、价格便宜、易于移动等特点[1],因此,该激光在临床上的应用越来越受到关注,但其对人眼是否存在损伤及其合适的能量范围目前尚不清楚。本研究观察 650 nm 半导体激光照射豚鼠视网膜后的细胞凋亡及 Fas 蛋白的表达,以了解该激光是否会对视网膜结构及细胞造成损伤,并试图探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验对象与主要材料

4~5 周豚鼠 45 只,体质量 100~150 g,雌雄不限,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。RS-100 型半导体激光弱视治疗仪(武汉亚昆光电子有限公司),发射波长 650 nm,功率有 2、3、4、5 mW 4 种,光斑直径 6 mm;原位细胞凋亡检测试剂盒(德国 Roche 公司),即用型 SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物公司)。

1.2 分组

根据照射功率的不同将 45 只实验动物按随机数字表法分为正常对照组($n=5$)、2 mW 处理组($n=10$)、3 mW 处理组($n=10$),4 mW 处理组($n=10$)和 5 mW 处理组($n=10$),不同照射功率处理组又分每天照射 1 次($n=5$)和每天照射 2 次($n=5$)组。

1.3 实验处理

将豚鼠四肢和眼球固定(做内、外直肌牵引线),根据不同照射功率及照射次数,将 RS-100 型半导体激光弱视治疗仪置于距离豚鼠视网膜约 33 cm 处,光束垂直于角膜顶点,每天每次在固定时间照射 3 min,持续 30 d。各组动物均用 0.25% 阿托品滴眼液扩瞳,并在相同光线条件下正常喂养。实验结束时处死动物,取眼球组织。

1.4 透射电镜观察

豚鼠眼球组织取材后分为 2 份,将其中一份放入 2.5% 戊二醛中固定 2 h,用磷酸缓冲液漂洗 2 次,用 1% 锇酸固定 20 min,用梯度乙醇丙酮脱水,Epon812 包埋,半薄切片后,在光镜定位下制作超薄切片,用醋酸双氧铀/柠檬酸铅染色,在 FEI Tecnai G^2 12 型透射电镜(荷兰飞利浦公司)下观察。另一份置于 4% 中性甲醛中固定,凋亡及免疫组织化学检测时备用。

1.5 TUNEL 检测

豚鼠眼球组织在 4% 中性甲醛中固定 48 h 后进行石蜡包埋,做 4 μm 切片,DAB 显色,苏木精复染,用中性树胶封片。以细胞核染成棕黄色判定为阳性细胞。每个标本中任意 1 张切片有阳性细胞即为 TUNEL 反应阳性。计数随机 5 个高倍视野(×400)下的阳性细胞数和细胞总数,以凋亡指数(AI)评估细胞凋亡程度。

AI = 阳性细胞数/细胞总数 ×100%

1.6 免疫组织化学反应

豚鼠眼球组织采用 SABC 法进行 Fas 免疫组化染色,具体步骤按试剂盒说明书进行。结果判定:阳性细胞为细胞质和/或细胞膜棕黄色染色。每张切片随机采集 5 个高倍视野,所见视野输入计算机,经 HPIAS-1000 型全自动医学彩色图像分析系统(华中科技大学同济医学院病理教研室)分析处理,得到 5 个视野的平均光密度值(AOD),AOD 越大,表明 Fas 表达水平越高。

1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方

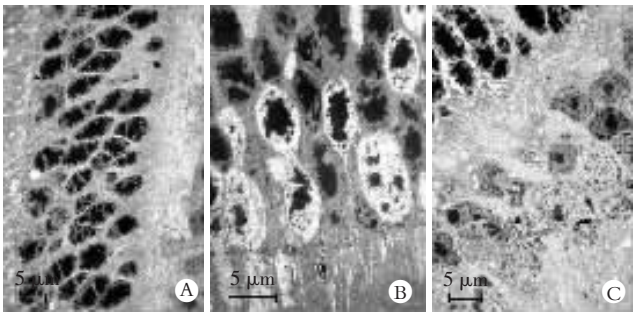
[通信作者] 吴小兰,电话:(027)86534520,E-mail:xiaolanwu@126.com

差分析,并用LSD法行组间两两比较。

2 结果

2.1 透射电镜观察结果

各组实验动物视网膜十层结构分界清楚,正常对照组和2 mW处理组视网膜结构清楚,膜盘整齐,内、外核层细胞结构正常;3 mW处理组外节膜盘结构稍紊乱,内核层偶见少许细胞变性;4 mW和5 mW处理组外节膜盘结构紊乱,内外核层细胞变性增多,偶见节细胞层细胞凋亡(图1)。



A:正常对照组(×10 000);B:3 mW处理组(×16 000);C:5 mW处理组(×16 000)

图1 各组豚鼠视网膜的超微电镜观察 (醋酸双氧铀/柠檬酸铅染色)

2.2 TUNEL检测结果

不同照射功率组AI有统计学差异($P<0.05$),其中对照组与2、3 mW处理组组间AI无统计学差异($P>0.05$),表明2 mW处理组和3 mW处理组半导体激光没有引起豚鼠视网膜细胞凋亡,而随照射功率的增加,细胞凋亡增加;每天照射1次和每天照射2次对AI无统计学意义($P>0.05$)。各组AI结果见表1。

表1 各组不同照射次数处理后AI和Fas表达的变化

($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	AI(%)		Fas表达(AOD)	
	照射1次	照射2次	照射1次	照射2次
2 mW处理组	18.05±4.37	18.49±4.44	160.94±5.21	163.48±5.59
3 mW处理组	20.97±4.28	21.41±4.03	167.12±3.03	172.03±1.50
4 mW处理组	33.11±3.76[a]	35.90±7.85[a]	173.32±2.70[a]	174.36±4.26
5 mW处理组	42.71±7.13[ab]	44.51±6.07[ab]	180.56±3.68[ab]	188.10±3.84[ab]

对照组AI:(17.07±3.63)%,Fas表达:163.26±5.06

a:$P<0.05$,与3 mW组比较; b:$P<0.05$,与4 mW组比较

2.3 Fas光密度值检测

各组Fas表达AOD结果见表1。不同照射功率组AOD有统计学差异($P<0.05$),其中每天照射1次时,对照组与2、3 mW处理组间AOD无统计学差异($P>0.05$);每天照射2次时,对照组与2 mW处理组组间AOD无统计学差异($P>0.05$),2 mW处理组与4、5 mW处理组组间AOD有统计学差异($P<0.05$),表明2 mW半导体激光没有引起豚鼠视网膜细胞凋亡,而随照射功率的增加,细胞凋亡增加;每天照射1次和每天照射2次AOD无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

由于激光具有良好的物理性能,包括能量高度集中、方向性好、光的波粒二相性等,因此激光在生物组织中可以产生光热效应、光化学作用、压强效应和电磁场效应。本研究中弱视的治疗机制正是利用激光的光学活性来刺激视网膜感光细胞的活化和发育,促进视觉通路的建立和完善[2]。已有报道利用低功率氦氖激光治疗儿童弱视[3,4],与传统的氦氖激光技术相比,650 nm半导体激光具有波长相近、功率输出稳定、电光转换效率高、故障率低、体积小、质量轻、的特点,这为人们提供了一种新的思路,应用半导体激光替代氦氖激光对弱视进行治疗,使儿童弱视的治疗家庭化,便于治疗的良好依从性,因此有人尝试利用该激光来治疗儿童弱视[5]。但是半导体激光的这种优良组织理化性能在产生激活调节作用的同时,也有可能造成生物体的损伤[2]。本实验采取不同激光功率的650 nm半导体激光经瞳孔照射豚鼠眼底视网膜,对其视网膜进行电镜观察及细胞凋亡和免疫组化检测,从形态学和分子水平研究该激光照射是否对视网膜细胞存在损伤反应。

细胞凋亡是细胞的一种主动死亡形式,不产生炎症反应。Fas抗原是一种细胞膜抗原,其主要功能是介导细胞凋亡,FasL是Fas抗原的配体。在凋亡诱导因素的作用下,二者结合后导致Fas胞内的死亡区形成三聚体的活化形式,随后引起与之结合的Fas死亡区结合蛋白(FADD)构象发生改变,经过一系列信号转导,从而启动"死亡蛋白酶"(Caspase相关蛋白酶),最终导致细胞凋亡。本实验通过检测豚鼠视网膜AI和Fas AOD判断半导体激光照射后豚鼠视网膜细胞凋亡的程度,推测该激光照射是否存在损伤反应及安全使用的能量。实验表明2 mW和3 mW半导体激光没有引起明显豚鼠视网膜细胞凋亡,而随照射功率的增加,细胞凋亡增加。3 mW以上半导体激光照射后,Fas蛋白的异常表达,也说明了Fas/FasL系统可能在豚鼠视网膜细胞凋亡发生中发挥了作用。本实验结果还显示:每天照射1次和每天照射2次对视网膜细胞的影响没有差异。此外,本实验采取了扩瞳、稳定室内温度以及统一时间点检测,减少了各种因素造成的实验误差。

为了从形态学上了解650 nm半导体激光经瞳孔照射豚鼠眼底视网膜后是否存在损伤,本实验进行了透射电镜观察,以便了解眼底结构的超微变化。结果表明:2 mW处理组未见明显损伤反应,随着激光照射功率的增加,视网膜细胞存在不同程度的变性。

黄梅等[6]研究显示:810 nm 单脉冲激光照射兔眼视网膜功率为 0.35 ~ 1.4 W,脉宽为 0.1 s 的单脉冲时,检眼镜未发现兔眼视网膜的损伤,光镜下受照区视感受器与色素上皮层有轻度水肿及少许渗出。本实验使用激光能量远小于该研究。有国外专利报道使用波长为 890 nm、照射功率 2 mW 组的半导体激光治疗弱视可以获得较高的疗效。国内报道[3,7],照射功率为 0.8 mV、照射距离 10 cm、照射时间为 3 min 的氦氖激光对儿童弱视有治疗作用。由于人眼和动物眼的差异,该实验结果能否直接应用于儿童弱视以及使用的效果和安全性有待于临床的进一步证实。

参考文献:

[1] 杨中伟, 孙佳英, 杨家太, 等. 低强度半导体激光治疗少年儿童弱视逐米观察法的疗效检验[J]. 中国激光医学杂志, 2003, 12(2): 126.
[2] 王双勇, 邱良秀. 半导体激光对豚鼠视网膜电图的影响[J]. 眼视光学杂志, 2008, 10(3): 194 - 197.
[3] 林再雄, 符曼雅, 唐平, 等. 氦氖激光联合弱视综合治疗仪治疗儿童弱视[J]. 中国斜视与小儿眼科杂志, 2007, 15(1): 22 - 25.
[4] 邱良秀, 张泺, 赵小杭, 等. 脉冲氦氖激光治疗弱视[J]. 实用眼科杂志, 1993, 11(1): 42 - 43.
[5] 石迎辉, 王丽娅. 弱激光治疗大龄儿童及成人弱视[J]. 医药论坛杂志, 2006, 27(6): 17 - 18.
[6] 黄梅, 吴楠, 刘翔, 等. 半导体激光对兔眼视网膜损伤及修复的观察[J]. 激光杂志, 2002, 23(3): 85 - 86.
[7] 项玉武. 低功率氦氖激光治疗小儿弱视[J]. 航空航天医药, 2004, 15(1): 26.

(**收稿**:2010-01-02;**修回**:2010-02-09)
(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2010)14-1565-03

短篇论著

人舌癌细胞株 Tca8113 中侧群细胞的分离及其 ABCG2 的表达

刘 凯,季 平,邓 诚,伍明毅 (400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院颌面外科)

[摘要] **目的** 通过流式细胞技术分选人舌癌细胞株 Tca8113 中的侧群细胞(SP 细胞)、非侧群细胞(MP 细胞),检查 ABCG2 蛋白在 SP 细胞、MP 细胞、T(Tca8113)细胞中的表达情况,并探讨其意义。**方法** 用流式细胞仪检测 SP 细胞、MP 细胞、未分选 Tca8113 细胞中的 ABCG2 表达情况。**结果** 人舌癌细胞株 Tca8113 中存在 SP 细胞,ABCG2 在 Tca8113 SP 细胞中较高表达(表达率 13.16%),在 MP 细胞中几乎不表达(表达率 1.07%)、在 Tca8113 细胞中少量表达(表达率 3.29%)。**结论** 人舌癌细胞株 Tca8113 中的 SP 细胞较高表达 ABCG2,通过 $ABCG2^+$ 分选侧群细胞,将有可能进一步分选纯化类肿瘤干细胞,为今后分离肿瘤干细胞提供有效手段。

[关键词] 舌肿瘤;SP 细胞;MP 细胞; 流式细胞术;肿瘤干细胞
[中图法分类号] R73-35;R730.23;R739.86 **[文献标志码]** A

随着肿瘤干细胞的研究不断深入,人们对肿瘤的发生、发展有了全新认识,肿瘤干细胞学说也逐渐被认同,然而肿瘤干细胞身份识别——肿瘤干细胞的分离与筛选是肿瘤干细胞研究的关键,同时亦是制约肿瘤干细胞研究的瓶颈[1]。目前,在头颈鳞癌中较为常见的舌癌肿瘤干细胞特异性表面标志物尚未确定。SP 细胞是在流式细胞检测时可外排 Hoechst33342 的细胞,主要表达 ABC 转运蛋白家族成员 ABCG2,已经在多种正常组织和癌细胞株被发现[2-5]。本实验作为探索发现头颈鳞癌 Tca8113 中肿瘤干细胞特异性表面标志物工程中的一个环节,拟证实外排泵蛋白 ABCG2 是否存在于 Tca8113 细胞的某一部分肿瘤细胞中。

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2005DB5241)
[通信作者] 季 平,电话:(023)89035838,E-mail:jiping@cta.cq.cn

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

人舌癌细胞株 Tca8113,细胞培养液 1640 和小牛血清由重庆医科大学基础研究所提供;鼠抗人 ABCG2 一抗购于 Abcam 公司;Hoechst33342 和碘化吡啶(PI) 购于 Sigma 公司;FITC 标记的羊抗鼠二抗(北京博奥森);ABCG2 转运蛋白阻滞剂维拉帕米(上海禾丰)。

1.2 仪器

FACSAria 流式细胞仪(BD 公司);超净工作台(Air TECH 苏净集团安泰公司制造)、TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机(湘仪离心机)、YCP-200CO2 细胞培养箱(上海易亮医疗器械有限公司)、倒置相差显微镜(Nicon ECLiPSE TE2000-u),37 ℃恒温水浴箱(DK-60,上海贺德实验设备厂),由重医实验室和四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室干细胞生物学研究室提供。