

近红外脉冲激光体外照射大鼠对心肌细胞功能的影响

司 歌, 刘远山, 龚琬玲, 黄时俊, 黄俊杰, 陈仲本*

(中山大学中山医学院生物医学工程系, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】研究不同功率的脉冲激光体外照射大鼠对心肌细胞功能及心肌微循环的影响,探索脉冲激光体外照射心脏控制心肌细胞功能的可行性。【方法】用多模式脉宽调制(PWM)刺激仪的输出信号作为激光器的激励信号源,使激光器输出多种模式的等强度、脉宽可变的脉冲激光;对实验组的 SD 大鼠连续 10 d 照射心前区,30 min/d,10 d 后取大鼠心肌标本,光镜下观察大鼠心肌细胞病理形态的改变及心肌毛细血管内径和数目的变化。【结果】功率为 100 mW 激光照射组心肌内层毛细血管的内径与对照组比较有显著性差异($P < 0.001$);100 与 30 mW 照射组对心肌内、中层毛细血管密度的改善程度均优于对照组($P < 0.05$);100 mW 照射组引起部分心肌细胞有水肿及淋巴细胞浸润,而 30 mW 照射组未见此现象。【结论】用 100 与 30 mW 的脉冲激光照射大鼠心前区均能显著增加心肌内、中层毛细血管密度,改善心肌微循环,其中用 30 mW 的激光照射无不良反应,有较好的效果。

关键词: 脉冲激光; 音频调制; 体外照射; 心肌毛细血管

中图分类号: R358.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2013)01-0131-04

Influence of Near Infrared Pulse Laser In Vitro Irradiation on Rats Myocardial Cell Functioning

SI Ge, LIU Yuan-shan, GONG Wan-ling, HUANG Shi-jun, HUANG Jun-jie, CHEN Zhong-ben*

(Department of Biomedical Engineering, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 This article focuses on how different power laser in vitro irradiation affects the function of myocardial cells and myocardial microcirculation, and explores the feasibility of controlling the function of myocardial cells through pulse laser in vitro irradiation. 【Method】 With multi-mode pulse width modulation (PWM) electrical stimulation output as incentive signal source, makes the laser output various patterns pulse laser with constant intensity and various pulse width. The precordial region of experimental groups of SD rats were irradiated for 10 days at 30 min/day. Myocardial specimens would be obtained after 10 days. Light-microscopy pathological changes of rats myocardial cell and effect of the number and inner-diameter of myocardial capillaries. 【Results】 The myocardial capillaries inner-diameter in 100 mW group (5.7 ± 0.41) were significantly higher than that of control ones ($P < 0.001$) in the internal layer of myocardium. The density of myocardial capillaries in 30 mW and 100 mW irradiated groups were better than control group ($P < 0.05$). In 100 mW irradiated group, part of myocardial cells had edema and lymphocytic infiltrates, while 30 mW irradiated group did not show this phenomenon. 【Conclusion】 Using 30 mW and 100 mW pulse laser irradiation in rats precordial significantly increased myocardial capillary density in the internal and middle layer of myocardial, improving myocardial microcirculation. Using 30 mW pulse laser irradiation has good effect without any side effect.

Key words: pulse laser; audio modulation; in vitro irradiation; myocardial capillary

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(1): 131-134]

心脏起搏器已广泛应用于具有心律失常等起搏功能障碍的病人的诊疗,而心脏起搏器属于有创的植入式器械,且成本较高,国外学者正在探索

体外无创起搏的新方法,推动心脏起搏器技术的发展。美国科学家 Michael Jenkins 2010 年在 *Nature Photonics* 杂志上发表论文^[1],首次发现用脉

收稿日期: 2012-04-20

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B030801162)

作者简介: 司歌,研究方向: 激光生物效应研究,E-mail:563389341@qq.com; *通信作者: 陈仲本,教授,硕士生导师, E-mail: chenzhb@mail.sysu.edu.cn

冲激光束可控制心脏的跳动,离体活胚胎的心跳与激光的脉冲频率同步,该研究预示未来有可能用激光在体外控制心脏起搏,但研究仅在离体细胞上进行,未见在体动物的体外激光照射研究。本文用可调制的脉冲激光束体外照射大鼠心前区,观察激光对心肌细胞功能的影响,探讨体外控制的可能性,为进一步研究体外脉冲激光照射同步控制提供参考。本文的实验观察了SD大鼠心肌内层的毛细血管大小及密度的变化,发现用适当的激光剂量照射,毛细血管明显增粗、毛细血管密度明显增加,初步验证了脉冲激光在体外照射大鼠心脏也能对心肌细胞产生作用。

1 材料与方 法

1.1 近红外音频脉冲激光器

实验采用多模式音频脉冲电刺激仪作为脉冲发生源^[2],选用波长为808 nm,输出光功率分别为100和30 mW的半导体激光器为治疗端。多模式音频脉冲电刺激仪将脉冲信号从音频信息中提取,取样频率为100 Hz,脉冲波形非重复性,避免机体因持续照射产生适应性。仪器设计了一个开关控制电路,当开关电路处于“通”的状态,输出的激励电压为3 V,激光器产生脉冲激光;当开关电路处于“断”的状态,输出电压为2 V,激光器产生小功率的连续激光,此小功率连续光为基础照射剂量,以保证足够的光照能量产生生物效应。仪器还设计了恒流驱动电路,保证激光输出的稳定性。实验分别用了最大输出功率为100和30 mW的两种激光器。100 mW激光器在激励电压3 V时输出光功率为100 mW,2 V时输出70 mW;30 mW激光器在3 V时输出30 mW,2 V时输出20 mW。

1.2 实验仪器与试剂

半导体激光器两个,波长808 nm,最大输出功率为30 mW和100 mW(广州市镭拓光电有限公司);多模式音频脉冲电刺激仪(中山大学中山医学院生物医学工程系);普通光学显微镜(日本尼康公司)。试剂水合氯醛为国药集团化学试剂有限公司产品。

1.3 实验动物及分组

SPF级健康SD大鼠21只,雌性,体质量260~310 g。所有大鼠均由广东省医学动物实验中心提供(合格证号:SYXK(京)2006-0009)。标准平衡饲料适应性喂养4 d后,依据随机数字表随机分

为3组,每组7只,A组为波长808 nm、功率100 mW的脉冲激光照射组,B组为波长808 nm、功率30 mW的脉冲激光照射组,C组为空白对照组。

1.4 实验方法

激光照射前对3组的SD大鼠均心前区备皮,用70 g/L的水合氯醛,以350 mg/kg的剂量对大鼠施腹腔注射麻醉。将大鼠四肢固定在固定板上,头部用遮光罩遮盖,以免受外界环境干扰,照射组用脉冲激光器贴紧大鼠心前区垂直照射,A组的照射功率为100 mW、B组的照射功率为30 mW音频,30 min/d,用上述方法连续照射10d;C组不做激光照射。

1.5 检测方法与指标

10 d后处死大鼠,打开胸腔,取出心脏将心肌组织浸入40 g/L的多聚甲醛溶液浸泡固定3 d,经脱水、透明、浸蜡、包埋制作蜡块,旋转切片机上切成连续切片,厚100 μm ,行HE染色后置光学显微镜下观察各组大鼠心肌组织显色情况,及其分布范围、染色强度,光镜200倍放大倍数下观察大鼠心肌毛细血管数目及内径大小。心肌毛细血管内径观察使用目镜测微尺,测量左心室前壁心肌内层、中层和外层毛细血管内径;心肌毛细血管密度观察方法与100 μm 的直线长度相切的最大心肌毛细血管支数 $\times 10$,即为与每毫米长度相切的毛细血管支数。并观察组织有无坏死、水肿等病理形态,随机采集图像。

1.6 统计学处理

使用SPSS 13.0统计软件包,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 激光照射对心肌细胞形态与管径的影响

在光镜下,心肌各层纤维间可见丰富的毛细血管,形状多样,在心肌中层环行排列,相互间连接成网,在心肌内、外层呈短条索状斜行排列。100 mW激光照射组A组的心肌内层毛细血管明显增粗,大小为 $(5.70 \pm 0.41) \mu\text{m}$,大于对照组的 $(4.36 \pm 0.48) \mu\text{m}$,两组比较有显著性差异($P < 0.001$),且可见心肌细胞变性肿大,伴少量淋巴细胞渗出。而30 mW激光照射组心肌三层毛细血管内径与对照组比较均无显著差异($P > 0.05$),心肌细胞亦未见变性肥大,无淋巴细胞渗出(表1,图1A、B)。

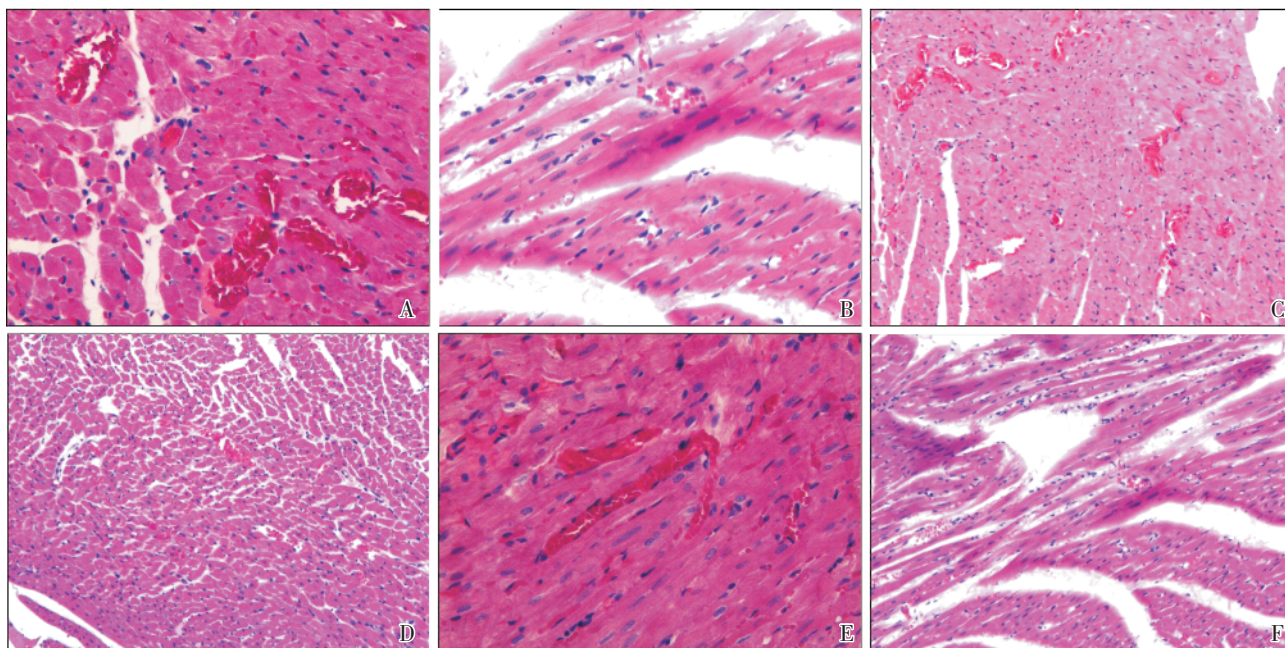


图 1 心肌毛细血管照片

Fig.1 Myocardium Photos

A: Inner diameter of internal layer of rats myocardial capillary in 100 mW group. HE, $\times 200$. B: Inner diameter of internal layer of rats myocardial capillary in control group. HE, $\times 200$. C: Internal layer of rats myocardial capillary count in 100 mW group. HE, $\times 100$. D: Internal layer of rats myocardial capillary count in control group. HE, $\times 100$. E: Internal layer of rats myocardial capillary count in 30 mW group. HE, $\times 200$. F: Internal layer of rats myocardial capillary count in control group. HE, $\times 200$.

表 1 三组大鼠心肌内、中、外层毛细血管内径大小的比较

Table 1 Comparison of myocardial capillaries inner-diameter among 3 groups (μm)

Groups	Myocardial capillary inner-diameter		
	Internal	Middle	Outer
30 mW	5.93 ± 2.13	5.86 ± 0.90	5.07 ± 0.91
100 mW	$5.7 \pm 0.41^{1)}$	4.96 ± 0.96	5.54 ± 1.25
Control	4.36 ± 0.48	5.43 ± 0.45	6.64 ± 1.18

1) $P < 0.001$ compared with control group

表 2 三组大鼠心肌内、中、外层毛细血管密度比较

Table 2 Comparison of myocardial capillaries density among three groups (number/mm)

Groups	Myocardial capillary density		
	Internal	Middle	Outer
30 mW	$12.86 \pm 3.50^{1)}$	$8.57 \pm 1.99^{1)}$	4.86 ± 1.22
100 mW	$12.14 \pm 2.41^{1)}$	$8.43 \pm 3.10^{1)}$	6.57 ± 2.57
Control	6.57 ± 2.70	5.14 ± 1.46	4.57 ± 1.27

1) $P < 0.001$ compared with control group.

2.2 激光照射对心肌细胞密度的影响

100 与 30 mW 激光照射组 A、B 组心肌内、中层毛细血管密度明显高于对照组, 有显著性差异 ($P < 0.05$); 3 组心肌外层毛细血管密度均无统计学差异 ($P > 0.05$, 表 2; 图 1C-F)。

3 讨 论

本实验发现: ①功率为 100 mW 与 30 mW 的激光经调制后输出的脉冲激光对 SD 大鼠心肌照射, 100 mW 激光照射组心肌内层的毛细血管明显

增粗, 与对照组相比较有显著性差异, 且可见心肌细胞水变性肿大, 伴少量淋巴细胞渗出; 30 mW 激光照射组心肌三层毛细血管内径与对照组比较均无显著差异, 且心肌细胞亦未见变性肥大, 无淋巴细胞渗出。②100 mW 与 30 mW 的激光照射均能使心肌内、中层毛细血管密度明显增加, 与对照组比较有显著性差异; 心肌外层毛细血管密度与对照组比较, 改变均不明显。

实验结果说明, 可能是因为心肌内、中层细胞的供血情况不如心肌外层细胞, 且易感性较强, 当有激光照射、外源血流灌注压等外界因素的影响

下时,心肌内、中层细胞容易接受刺激,进而产生 VEGF 等血管活性物质,影响心肌毛细血管的功能状况^[3]。VEGF 可直接作用于血管内皮细胞,增加血管通透性,促进血管生成,其表达增加、血管新生是特异性激光促进血管新生作用^[4]。已有研究表明:有效能量密度的 He-Ne 激光照射心前区可使心肌细胞和血管内皮细胞产生 VEGF 增加血管的通透性及促进心肌毛细血管的增生^[5-7]。

张卫光用三种不同能量密度的 He-Ne 激光连续 10 d 照射成年 Wistar 大鼠的心前区后,检测其血液流变指标^[8],发现 60.5 J/cm² 的剂量可延长红细胞聚集时间,增强其变形性,降低全血黏度及红细胞压积;其后期研究还发现,以 60.5 J/cm², 11 min/d 剂量的 He-Ne 激光垂直照射激光照射组大鼠心前区^[9],心肌内层毛细血管开放率明显增高。因此一定剂量的 He-Ne 激光照射大鼠心前区,可使心肌组织中的 eNOS 表达增强^[6],催化生成更多的 NO,延长了心肌舒张的时间,并松弛了心肌平滑肌细胞,会引起心肌毛细血管舒张,内径增粗,增加局部心肌组织的血流灌注量,改善心肌微循环。

本实验中,100 mW 和 30 mW 的激光照射组均使心肌毛细血管密度增加,其中 100 mW 激光照射组使大鼠心肌内层毛细血管内径增粗,但同时也引起心肌变性肿大,光镜下观察发现部分心肌细胞变性肥大,伴少量淋巴细胞浸润。而 30 mW 激光照射大鼠心肌能更好地增加心肌内中层毛细血管密度,有利于改善心肌内层的微循环状况;高倍光镜下观察心肌细胞,细胞横纹明显,形态正常,照射无明显副作用。

本实验结果显示,使用波长为 808 nm 的半导体激光器经音频调制后输出低频脉冲激光,选择合适的剂量照射,体外照射 SD 大鼠心前区可对心肌细胞产生作用,并可改善心肌的微循环。同时表明,该脉冲激光体外照射对心肌细胞具有可控制性,为进一步研究体外脉冲激光照射心脏的频率同步可能性提供有价值的参考。

参考文献:

- [1] Jenkins MV, Duke AR, Gu S, et al. Optical pacing of the embryonic heart [J]. *Nature Photonics*, 2010, 4 (9): 623-626.
- [2] 龚琬玲, 黄时俊. 音频调制半导体脉冲激光器的设计及对大鼠照射剂量的研究 [J]. *中国医学物理学杂志*, 2011, 28(1): 2418-2421.
Gong WL, Huang SJ, Si G, et al. The design of audio modulating semiconductor pulse -laser and the study about dosage of laser irradiation on rats[J]. *Chin J Med Phys*, 2011, 28(1): 2418-2421
- [3] Chilian WM. Microvascular pressures and resistances in the left ventricular subepicardium and subepicardium and subendocardium[J]. *Circ Res*, 1991, 69(3): 561-570.
- [4] Roethy W, Yamamoto N, Burkhoff D. An examination of potential mechanisms underlying transmyocardial laser revascularization induced increase in myocardial blood flow[J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 1999, 11(1): 24-28.
- [5] Zhang WG, Xia JL, Tian L, et al. Low-power helium-neon laser irradiation enhances expression of myocardial VEGF of the rat [J]. *Chin Med J*, 2004, 117(10): 1476-1480.
- [6] 张卫光, 王新生, 田垅, 等. He-Ne 激光照射大鼠心肌微动脉内皮细胞和心肌组织内皮一氧化氮合酶表达的影响[J]. *中国激光医学杂志*, 2002, 11(2): 93-95.
Zhang WG, Wang XS, Tian L, et al. Effect of He-Ne laser irradiation on the expression of eNOS in rat myocardial arteriolar endothelium[J]. *Chin J Laser Med Surg*, 2002, 11(2): 93-95.
- [7] Zhang WG, Sun GR, Xia JL, et al. Effect of He-Ne laser irradiation on myocardial capillary permeability of the rat: An Experimental Study [J]. *Chin J Laser Med Surg*, 2002, 11(4): 225-228.
- [8] 张卫光, 夏家骝, 陶平, 等. 氦氖激光照射大鼠心前区对血液流变学指标的影响 [J]. *中华理疗杂志*, 2000, 23(2): 93-95.
Zhang WG, Xia JL, Tao P, et al. Influence of He-Ne laser irradiation to precordial region for hemorrheology in rats[J]. *Chin J Physic Ther*, 2000, 23(2): 93-95.
- [9] Zhang WG, Chen XX, Tian L, et al. Effect on the Ratio of Myocardial Capillary opening by He - Ne Laser Irradiation on Precordial Region of Wistar Rat [J]. *Chin J Laser Med Surg*, 2001, 10(2): 111-114.

(编辑 徐杰)