

·运动人体科学·

低强度激光对电刺激引起的 C2C12 自由基损伤的光生物调节作用

赵秀峰^{1,2}, 徐晓阳², 刘承宜², 潘红英²

(1. 泰山学院 体育科学系, 山东 泰山 271021; 2. 华南师范大学 体育科学学院, 广东 广州 510631)

摘 要: 利用电刺激 C2C12 作为细胞模型, 研究低强度激光对电刺激引起的 C2C12 线粒体功能自由基损伤的光生物调节作用。以 45 V 20 ms 5 Hz 电刺激 C2C12 细胞, 采用固定照射时间、不同照射强度的 LIL, 以荧光探针标记法检测电刺激及 LIL 对 ROS 含量的影响, 研究 LIL 对电刺激后肌管 ROS 的代谢变化的影响。结果: 1) ES 75 min 组与对照组比较 ROS 生成显著增加($P < 0.01$), 线粒体功能显著性下降($P < 0.05$), 电刺激引起的 C1C12 线粒体功能自由基损伤的细胞模型建立; 2) 0.33~8.22 J/cm² 激光对正常培养细胞线粒体功能无影响, 但可以改善电刺激引起的线粒体功能低下的状态, 此剂量段为 PBM 的作用剂量范围; 3) 0.33~2.646 J/cm² 激光可以促进细胞内稳态的康复, 其机制主要与通过光化学作用提高机体的抗氧化作用有关。结果说明: 适当剂量的低强度激光对骨骼肌细胞有光生物调节作用, 是一种无损伤的促进运动性疲劳或自由基损伤康复的新型手段。

关 键 词: 运动医学; 低强度激光; 光生物调节作用; 电刺激; 小鼠骨骼肌肌母细胞

中图分类号: G804.5; G804.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-7116(2008)01-0100-05

Effects of photobiological modulation of low intensity laser on the damage of free radicals of C2C12 caused by electrical stimulation

ZHAO Xiu-feng^{1,2}, XU Xiao-yang², LIU Cheng-yi², PAN Hong-ying²

(1. Department of Physical Education, Taishan University, Taishan 271021, China; 2. School of Physical Education, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: By utilizing electrically stimulated C2C12 as the cell model, the authors studied the effects of photobiological modulation (PBM) of low intensity laser (LIL) on the damage of functional free radicals of mitochondria of C2C12 caused by electrical stimulation. The authors applied electrical stimulation with such parameters as 45 V, 20 ms and 5 Hz to stimulate C2C12, tested the effects of electrical stimulation and LIL on the content of reactive oxygen species (ROS) by using fixed radiation time, LIL at different levels of radiation intensity and fluorescent probe marking method, studied the effects of LIL on the metabolic change of ROS of myotubes after electrical stimulation, and revealed the following findings: 1) comparing the 75 min electrically stimulated group with the control group, the production of ROS is significantly increased ($P < 0.01$), while the functions of mitochondria are significantly weakened ($P < 0.01$), which indicate that the cell model of the damage of functional free radicals of mitochondria of C2C12 caused by electrical stimulation is established; 2) laser at the energy level of 0.33~8.22 J/cm² has no effect on the functions of mitochondria of normally cultured cells, but can improve the condition of low performance of mitochondrial functions, this range of energy level is the functional range of PBM; 3) laser at the energy level of 0.33~8.22 J/cm² can boost steady recovery within the cells, whose mechanism is chiefly related to enhancing the anti-oxidation function of organisms via photochemical action. The said findings indicate that an appropriate level

收稿日期: 2007-09-05

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(31526)

作者简介: 赵秀峰(1979~), 女, 讲师, 硕士研究生, 研究方向: 运动生物化学与营养。

of low intensity laser has the effects of PBM on skeletal muscular cells, being a new trauma free means that can boost the recovery of kinetic fatigue or free radical damage.

Key words: sports medicine; low intensity laser; effects of photobiological modulation; electrical stimulation; skeletal muscular myotube metrocytes of mice (C2C12)

延迟性肌肉酸痛(DOMS)等运动性肌肉疲劳是竞技运动和大众健身中常见的现象,但还没有有效的防治办法^[1]。光生物调节作用(PBM)已获得了广泛的应用^[2]。研究表明,PBM可以调节多种组织,产生多种细胞及亚细胞效应,包括对细胞活性降低的康复效应^[3]。PBM对细胞无毒副作用,可能是一种治疗运动损伤的绿色手段^[4],业已发现PBM对强直性肌肉收缩有一定疗效^[5],对DOMS虽然可以缓解疼痛但无助于损伤的恢复^[6-7]。大量的研究表明,电刺激C2C12(小鼠骨骼肌肌母细胞)肌管引起其收缩,所导致的ROS(Reactive oxygen species,活性氧)增加和线粒体功能下降可以模拟运动时由线粒体自由基损伤引起的骨骼肌疲劳^[8]。本文应用这个肌肉疲劳的细胞模型^[9]来研究PBM机理。为了进一步探讨相关的机理,本文沿用国际惯例开展细胞模型^[8-9]研究。

鉴于肌肉组织在皮肤组织下面,激光需要有一定的穿透深度。810 nm与其他波长激光相比具有较强的组织穿透深度^[10],因此有望成为一种重要的在体治疗运动性肌肉损伤与消除疲劳的“绿色”疗法^[9]。到目前为止还没有人研究过低强度红外激光对肌细胞的PBM。为了进一步探讨肌细胞的PBM,本文应用810 nm低强度Ga-Al-As半导体激光研究电刺激诱导的肌管线粒体功能退化的PBM,为PBM的临床应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

C2C12细胞由中国医学科学院基础医学研究所提供;活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所;高糖DMEM、胎牛血清、马血清、胰蛋白酶等为GIBCOBRL产品,MTT为Sigma产品;TY-C型电刺激器购自成都仪器厂,刺激电极及细胞培养皿为本实验室自行设计制造;960MC荧光分光光度计购自上海三科仪器有限公司;810 nm SUNDOM-300IB半导体激光器由北京三顿电子技术有限公司生产;TQ8210型功率计为ADVANTEST公司产品。

1.2 方法

1)细胞培养:C2C12细胞生长在含10%胎牛血清的DMEM培养基,并置于37℃,体积分数为5%CO₂培养箱中,当细胞生长到瓶壁的80%左右时,将所有细胞

消化后收集,转入直径为3.5 cm的培养皿中,大约培养1 d后,细胞长满皿底,培养液即换为分化培养液(2%马血清),隔天换液1次,分化6 d后进行实验。

2)刺激方式:采用TY-C型电刺激器电刺激分化6 d的肌管,强度定为45 V 20 ms 5 Hz^[11-12]。对照组不刺激,实验组刺激时间为15、30、45、60、75、90、105、120、150和180 min。

3)激光照射方式:采用便携式半导体激光器以连续方式照射,波长810 nm,圆形光斑直径为3.5 cm,照射时间为10 min。每次照射前后均用功率计(Advantest optical power meter, TQ8210)测量细胞表面的实际功率,其能量密度分别为0.330、1.338、2.646、5.358、8.220、11.220和14.160 J/cm²。

4)ROS的测试:利用荧光探针二氯荧光素双醋酸盐(DCFH-DA)进行活性氧检测^[13]。采用原位装载探针的方法,在37℃细胞培养箱内孵育20 min,然后电刺激和激光处理,用荧光分光光度计检测,激发波长488 nm,发射波长522 nm。

5)MTT法检测线粒体的整体功能:用PBS溶液配制MTT(比例为1 mL和5 mg)。实验处理完毕,吸弃培养皿中的培养液,加入100 μL MTT溶液和900 μL PBS,振荡均匀,放于37℃体积分数为5%CO₂培养箱中继续培养4 h。培养中止后,置于相差显微镜下观察细胞是否被充分染色(兰紫色),然后吸弃废液,加入2 mL的DMSO试剂,充分震荡5 min,用移液枪移入96孔酶标板中,每孔200 μL(每个实验组为8孔)。轻轻振荡15 min,用酶标仪(EL311S, Bio-Tek Instruments)测定吸光度(Absorbance values),检测波长为570 nm波长,参考波长为630 nm。

1.3 统计处理

实验数据用SPSS11.0统计软件包进行统计学处理,各数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有极显著性。

2 结果

2.1 电刺激对C2C12肌管自由基代谢和线粒体功能的影响

电刺激分化6 d的肌管,ES(electrical stimulation,电刺激)75 min组与对照组比较ROS生成达到一个峰值且有显著性增加($P < 0.01$,见表1),OD值呈显著

性下降 ($P < 0.05$, 见表 2), 且均与 ES 60 min 组无显著性差异 ($P > 0.05$).

表 1 电刺激肌管引起的 ROS ($\bar{x} \pm s$) 的变化

分组	ROS	分组	ROS
对照	13.233±2.650 157 ²⁾	ES90	33.966 ± 1.724 34 ²⁾
ES15	19.566 ± 6.468 64	ES105	37.033 ± 2.715 39
ES30	37.466 ± 7.333 03	ES120	83.966 ± 7.432 59 ¹⁾
ES45	40.633 ± 2.437 9 ¹⁾	ES135	52.166 ± 2.135 821 ¹⁾
ES60	48.2 ± 3.124 1 ¹⁾	ES150	35.133 ± 3.082 75
ES75	61.9 ± 0.556 78 ¹⁾	ES180	71.366 ± 1.700 98 ¹⁾

1)与对照组比较 $P < 0.01$; 2)与 ES75 min 组比较 $P < 0.01$

表 2 电刺激对 C2C12 线粒体功能 OD 值 ($\bar{x} \pm s$) 的影响

分组	OD 值	分组	OD 值
对照	2.126±0.053 3	ES90	2.339 5 ± 0.072 90 ²⁾
ES15	1.697 ± 0.197 2 ¹⁾	ES105	1.987 5 ± 0.167 8
ES30	1.7428 ± 0.085 3 ¹⁾	ES120	1.9184 6 ± 0.129
ES45	1.8966 ± 0.058	ES135	1.781 24 ± 0.134 ¹⁾
ES60	1.7215 ± 0.263 6 ¹⁾	ES150	1.938 9 ± 0.063
ES75	1.8266 ± 0.109 67 ¹⁾	ES180	2.014 46 ± 0.148 377

1)与对照组比较 $P < 0.01$; 2)与 ES75 min 组比较 $P < 0.01$

2.2 单纯激光照射对肌管自由基代谢和线粒体功能的影响

单纯激光照射不经电刺激的肌管, 激光照射剂量 0.33~14.16 J/cm² 时, 肌管内 ROS 生成呈增加趋势; 0.33~2.646 J/cm² 剂量与对照组比较差异无显著性; 5.358~14.16 J/cm² 剂量与对照组比较差异有极显著性 (见图 1)。激光照射剂量 0.33~8.22 J/cm² 时, OD 值与对照组比较差异无显著性, 11.22~14.16 J/cm² 剂量两组与对照组比较差异显著性下降 (见图 2)。

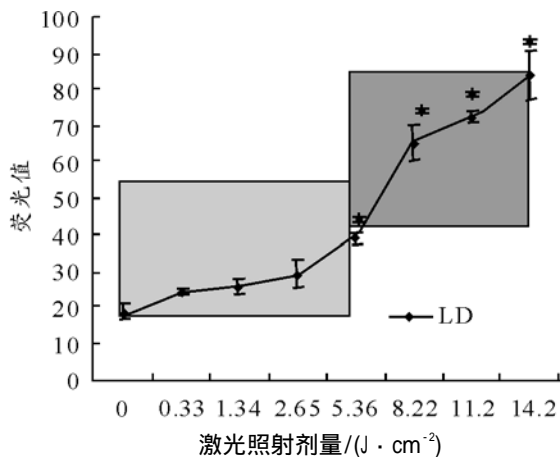


图 1 810 nm LIL 对正常培养细胞 ROS 代谢的影响

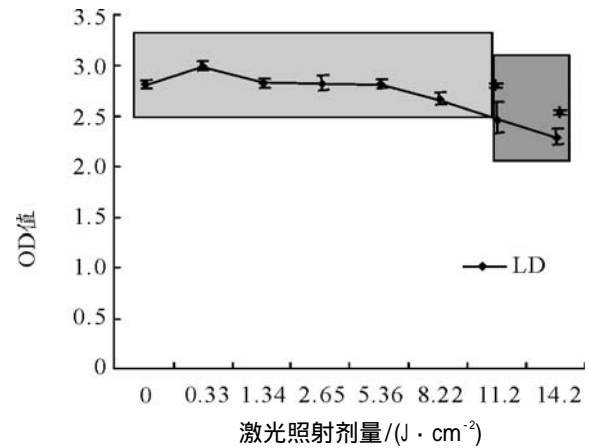


图 2 810 nm LIL 对正常培养细胞线粒体功能的影响

2.3 激光照射对电刺激 75 min 肌管自由基代谢和线粒体功能的影响

ES+0.33~5.358 J/cm² LD 组与 ES 75 min 组 ROS 生成均有所下降, 其中 ES+0.33 J/cm² LD 组与 ES 75 min 组比较差异有极显著性 ($P < 0.01$); ES+14.16 J/cm² LD 组与 ES75 min 组比较显著性升高 (见图 3)。ES+0.33~8.22 J/cm² LD 组与 ES 75 min 组比较 OD 值均有极显著性增加, 且照射剂量越小效果越明显 (见图 4)。

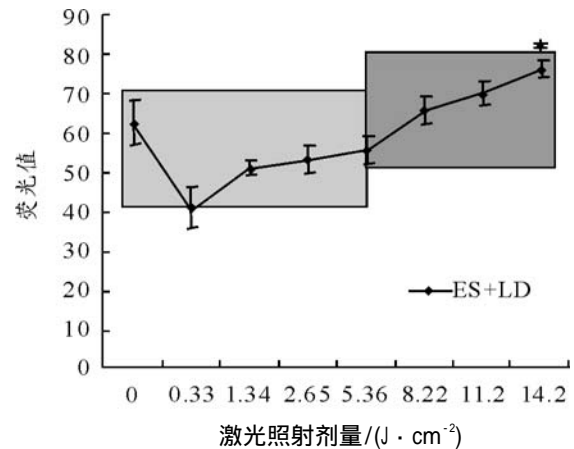


图 3 LIL 对 ES 75 min 后肌管 ROS 代谢的影响

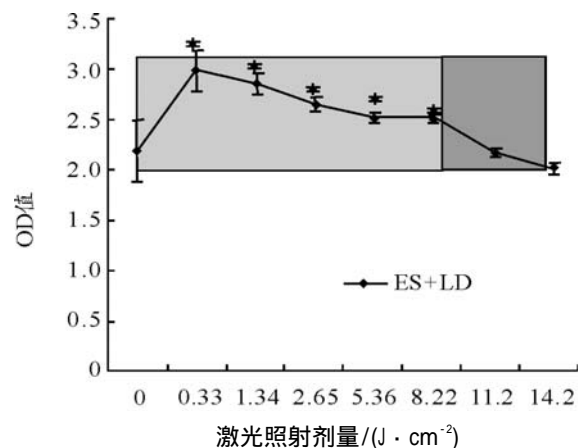


图 4 LIL 对 ES 75 min 后肌管线粒体功能的影响

3 讨论

3.1 细胞模型

剧烈运动可以提高骨骼肌细胞内外空间和血管分隔间的 ROS 水平,促使线粒体自由基生成增加;骨骼肌可能是体内 ROS 的重要来源^[14],而线粒体则被认为是运动时 ROS 产生的胞内重要部位。ROS 的产生与电刺激的电压强度、刺激频率和时间有关^[15],同时许多研究者都认为肌肉收缩时 ROS 的产生与线粒体活性增加导致的氧耗增加有关^[16]。过高的自由基水平将影响细胞及线粒体功能,并对机体造成一定程度的损伤。研究表明,电刺激 C2C12 引起其收缩,可以模拟运动时骨骼肌细胞的收缩^[8-9]。在体和离体的肌肉组织都被用来进行 ROS 生成的研究,但是与培养的骨骼肌细胞不同的是肌肉组织含有内皮细胞、淋巴细胞、成纤维细胞,这些细胞都会产生 ROS。因此,很难准确测定骨骼肌细胞收缩所引起的自由基代谢变化的情况,而用培养的细胞则可以解决这一问题。

由不同时间电刺激对肌管 ROS 代谢的影响的结果可知(见表 1),ROS 变化出现双峰曲线的原因被认为与运动引起的线粒体氧耗变化和细胞的抗氧化系统的调动有很大关系,电刺激 75 min 时达到一个峰值,此时运动肌氧耗增加,而细胞的抗氧化系统还未被充分调动起来,Na⁺-K⁺-ATPase 活性变化不明显^[8];随着抗氧化系统逐步调动,到 90 min 时活性氧清除大于生成,ROS 生成量迅速降低;在刺激到 120 min 时抗氧化系统自由基清除的能力跟不上其产生的速率,ROS 又出现峰值。本文结果与潘红英^[8]研究中 ROS 代谢的趋势基本相同,但又有差别,原因在于培养肌管的分化时间不同(^[8]文为 5 d,本文为 6 d),且 ES 75 min 组线粒体功能有显著性下降($P<0.05$,见表 2),且均与 ES 60 min 组无显著性差异($P>0.05$),因此,为了统一数据,我们选择 ROS 生成量的一个峰值 ES 75 min 建立运动训练的细胞模型。

3.2 细胞康复作用

PBM 是单色光或激光(monochromatic light or laser irradiation, LI)对生物系统功能的刺激或抑制作用,不会引起生物系统的损伤。人们研究 PBM 所使用的 LI 的强度一般在 10 mW/cm²左右,相应的 LI 先后被称为低能量 LI、低水平 LI、低强度 LI(low intensity LI, LIL)和低功率 LI 等。随着研究的深入,人们发现即使对于强度在 10² mW/cm²左右的 LI,只要照射时间足够短,也会产生 PBM。人们将这类研究所使用的 LI 仍然称为低能量 LI 或低水平 LI。后一种 LI 的作用机理通常是通过活性氧(ROS)来介导的^[17],与前一种 LI 的作用机理明显不同。鉴于它们在强度上的差异,

这里将前一种 LI 规范称为 LIL,将后一种 LI 称为中等强度 LI(Moderate intensity LI, MIL),并将相应的 PBM 分别称之为 LIL 的 PBM(PBM of LIL, LPBM)和 MIL 的 PBM(PBM of MIL, MPBM)。当然,对于具体的激光和细胞,低强度和中等强度的范围会有不同。

由图 2 可知,激光照射剂量 0.33~8.22 J/cm²时,线粒体功能与对照组差异无显著性,此剂量段属于 PBM 的调节范围;11.22 和 14.16 J/cm²(18.70 和 23.60 mW/cm²)造成线粒体功能下降,激光已经超出 PBM 的范围。由图 1 和 2,0.33~2.646 J/cm²(0.55、2.23 和 4.41 mW/cm²)激光照射与对照组 ROS 无显著变化,且线粒体功能无变化,说明此时肌管仍处于内稳态,激光属于低强度范围。这种情况下,如果肌管远离内稳态,激光可以促进内稳态的康复(图 3 和 4 所示);5.358 和 8.22 J/cm²(8.93 和 13.70 mW/cm²)促进 ROS 的产生,激光属于中等强度。这个剂量打破了功能正常的肌管的内稳态,促进了 ROS 的产生,而此时线粒体功能虽有下降,但无显著差异。激光对 ES 75 min 后肌管内 ROS 的变化趋势与单纯激光照射时大体一致,只是剂量范围有所不同(如图 3 所示)。

由于采用固定照射时间的方法^[18],从中等强度以上的激光照射所产生的 ROS 基本上呈线性增加关系($r=0.96$, $P<0.05$)(见图 1): $y_p=17.895+4.8262x$

3.3 抗氧化作用

与多数研究都集中在低强度激光抗自由基损伤的间接证据上所不同的是,本研究通过直接测定照射后 ROS 含量的变化,更直接地说明了低强度激光的自由基清除及产生机制。目前,关于低强度激光照射对机体自由基代谢的作用详细机制尚未探明。一般认为,低强度激光主要通过光化学作用使抗氧化酶恢复或提高其活性,从而加速自由基的清除,减少过氧化脂质产生。从分子水平来说,低强度激光作用于机体时,光子与机体内的生物分子发生相互作用,生物分子吸收光子的能量并转化为生物能,在不破坏生物分子的情况下,改变处于失活状态的抗氧化酶分子的构象,恢复酶的活性,从而提高机体的抗氧化能力,因此在自由基方面即表现为 ROS 的含量下降或者升高^[19]。

由图 4 与图 2 对照表明,电刺激后激光的 PBM 剂量范围与单纯激光照射一样,0.33~8.22 J/cm²的激光照射对电刺激引起的线粒体功能低下状态有调理作用,而 11.22 和 14.16 J/cm²造成线粒体功能下降,激光已经超出 PBM 的范围。PBM 可以恢复线粒体功能,但只有低强度激光抑制 ROS 产生。其中差异的原因可能与这两个功能指标的测试有关,细胞内 ROS 的代谢比较迅速,具有一定的时效性,而激光的作用效应也具

有时间效应,因此,对 ROS 代谢起作用的激光剂量范围就比较窄;线粒体的检测需要孵育 4 h,这为激光的作用提供了必要的时间条件,因此,对线粒体的功能起调节作用的激光范围相对比较大一些。其详细机制还有待进一步探讨。

从本实验的结果可以看出,低强度激光通过提高线粒体内抗氧化酶的活性来增强线粒体功能,进而抑制 ROS 的产生,促进由电刺激引起的自由基损伤的康复效应。

本研究采用电刺激培养的 C2C12 作为运动训练的细胞模型,发现适当剂量的低强度激光照射可以改变氧自由基的代谢速率,其中 0.33~5.358 J/cm² 的激光照射可以清除部分活性氧,这可能与低强度激光提高机体的抗氧化能力和改变了细胞的氧化-还原状态有关。因此,我们认为 LIL 作为一种无损伤的促进运动性疲劳或自由基损伤康复的新型手段,可以用于临床研究中抑制骨骼肌疲劳。

参考文献:

- [1] Cheung K, Hume P, Maxwell L. Delayed onset muscle soreness: treatment strategies and performance factors[J]. *Sports Med*, 2003, 33(2): 145-164.
- [2] Lane N. Cell biology: Power games[J]. *Nature*, 2006, 443(7114): 901-903.
- [3] 刘承宜, 胡滨娜, 段锐, 等. 血管内低强度激光照射疗法研究概况[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28(4): 284-287.
- [4] 刘承宜, 角建瓴, 徐晓阳, 等. 低强度激光或单色光效应及其在运动医学中的应用[J]. *中国运动医学杂志*, 2003, 22(2): 166-170.
- [5] Lopes-Martins R A, Marcos R L, Leonardo P S, et al. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats[J]. *J Appl Physiol*, 2006, 101(1): 283-288.
- [6] Douris P, Southard V, Ferrigi R, et al. Effect of phototherapy on delayed onset muscle soreness[J]. *Photomed Laser Surg*, 2006, 24(3): 377-382.
- [7] Vinck E, Cagnie B, Coorevits P, et al. Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: A pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans[J]. *Lasers Med Sci*, 2006, 21(1): 11-8.
- [8] 潘红英, 徐晓阳, 刘承宜, 等. 电刺激 C2C12 细胞时活性氧生成的变化[J]. *中国运动医学杂志*, 2006, 25(1): 46-49.
- [9] 徐晓阳, 潘红英, 刘承宜, 等. 骨骼肌收缩及线粒体功能研究的细胞模型[J]. *中国运动医学杂志*, 2004, 23(4): 409-502.
- [10] Byrnes K R, Waynant R W, Ilev I K, et al. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury[J]. *Lasers Surg Med*, 2005, 36(3): 171-185.
- [11] Marotta M, Bragos R, Gomez-Foix A M. Design and performance of an electrical stimulator for long-term contraction of cultured muscle cells[J]. *Biotechniques*, 2004, 36(1): 68-73.
- [12] Connor M K, Irrcher I, Hood D A. Contractile activity-induced transcriptional activation of cytochrome c involves Sp1 and is proportional to mitochondrial ATP synthesis in C2C12 muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(19): 15898-15904.
- [13] Driver A S, Kodavanti P R, Mundy W R. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2000, 22(2): 175-181.
- [14] McArdle A, Pattwell D, Vasilaki A, et al. Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses[J]. *Am J Physiol*, 2001, 280(3): 621-627.
- [15] Pattwell D M, McArdle A, Morgan J E, et al. Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(7): 1064-1072.
- [16] Davies K J A, Quintanilha A T, Brooks G A, et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res Commun*, 1982, 107(4): 1198-1205.
- [17] Lubart R, Eichler M, Lavi R, et al. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity[J]. *Photomed Laser Surg*, 2005, 23(1): 3-9.
- [18] 吴敏, 刘承宜, 程蕾, 等. 生物系统光响应的剂量关系[J]. *中国激光医学杂志*, 2006, 15(1): 56-58.
- [19] 刘承宜, 刘颂豪. 低强度激光的生物光子学研究[J]. *中国激光医学杂志*, 1997, 6(3): 125-131.

[编辑: 郑植友]