

· 基础研究 ·

红光照射对大鼠缺氧缺血性脑损伤急性期凋亡因子表达的影响

陈龙 江伟 张小建 李献超 陈洁 肖农

【摘要】 目的 观察红光照射对大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)急性期凋亡因子 Caspase-8 及 Caspase-3 表达的影响。方法 采用随机数字表法将 45 只 SD 大鼠分为假手术组、缺氧缺血性脑损伤组(简称模型组)及红光照射组。采用经典 Rice 法将模型组及红光照射组大鼠制成 HIBD 模型,假手术组仅分离左颈总动脉后缝合。红光照射组于 HIBD 损伤后立即对其额顶部进行红光照射,连续照射 3 d。于制模后第 3 天时取各组大鼠损伤侧海马组织,采用实时 PCR 技术检测 Caspase-8 及 Caspase-3 mRNA 表达,采用 Western blot 技术检测 Caspase-8 及 Caspase-3 蛋白表达;采用免疫荧光法观察各组大鼠 Caspase-8 及 Caspase-3 定位并进行半定量分析。结果 制模后第 3 天时发现模型组和红光照射组 Caspase-8、Caspase-3 基因及蛋白表达均较假手术组明显增强($P < 0.05$);红光照射组 Caspase-8 基因表达(1.55 ± 0.12)及蛋白表达(0.70 ± 0.18)、Caspase-3 基因表达($[1.48 \pm 0.16] \times 10^{-4}$)及蛋白表达(0.74 ± 0.13)均较模型组显著降低($P < 0.05$)。结论 红光照射可通过抑制细胞凋亡因子 Caspase-8、Caspase-3 表达,减轻 HIBD 急性期神经细胞凋亡,从而发挥 HIBD 治疗作用。

【关键词】 缺氧缺血性脑损伤; 红光照射; 细胞凋亡因子

The effect of red light on the expression of apoptosis factors during acute hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats CHEN Long*, JIANG Wei, ZHANG Xiao-jian, LI Xian-chao, CHEN Jie, XIAO Nong.

* Rehabilitation Center, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

Corresponding author: XIAO Nong, Email: xiaonongwl@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of red light on the expression of caspase-8 and caspase-3 mRNA and protein during the acute stage of hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in neonatal rats. **Methods** Forty-five seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham group, an HIBD model group (model group) and an irradiation group. The rats in the model and irradiation groups were subject to HIBD induced using the Rice-Vannucci method. The irradiation group was treated by irradiation with red light on the forehead immediately after the establishment of the HIBD model for 30 min/d on 3 consecutive days, while the sham group and the model group received no treatment. On the 3rd day after the operation, 10 rats from each group were sacrificed by cervical dislocation and the left hippocampus was rapidly isolated and snap-frozen in liquid nitrogen for mRNA and protein examination. Another 5 rats in each group were used for immunofluorescence testing to localize and semi-quantify the expression of caspase-8 and caspase-3. **Results** In the model group, expression of caspase-8 and caspase-3 mRNA and protein in the left hippocampus was higher than in the sham group on the 3rd day. After red light irradiation, expression of caspase-8 and caspase-3 mRNA and protein decreased significantly in the irradiation group compared with the HIBD group. In the CA1 region of the hippocampus, the levels of caspase-8 and caspase-3 in the irradiation group were significantly lower than in the model group. **Conclusion** Red light irradiation can decrease the expression of such apoptosis factors as caspase-8 and caspase-3 in hypoxic-ischemic brain damage at the acute stage and inhibit neural cell apoptosis so as to exert therapeutic effects for hypoxic-ischemic brain damage.

【Key words】 Hypoxia; Ischemia; Brain damage; Red light; Apoptosis

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic ischemic brain

damage, HIBD)是由于围生期各种因素引起脑缺氧、缺血所导致的脑损伤综合征,是新生儿期最常见的中枢神经系统疾病,也是儿童致残的主要原因之一^[1]。已有证据表明,细胞凋亡在整个损伤过程中具有重要作用^[2],而凋亡通路中半胱氨酸特异性天冬氨酸蛋白酶(cysteine-containing aspartate-specific proteases, Caspase)家族具有核心地位,其中 Caspase-8、Caspase-3 是凋亡通路中关键的启动子^[3-4]。目前临床对于 HIBD 尚无

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.06.001

作者单位:400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿童康复中心(陈龙、江伟);重庆医科大学附属儿童医院儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地(陈洁、肖农、张小建);重庆大学生物医学工程系(李献超)

通信作者:肖农,Email:xiaonongwl@163.com

特效治疗手段,主要采用支持疗法、营养脑细胞、亚低温或高压氧等治疗^[5-7],但疗效均不理想,愈后不良率偏高,故如何开发、改进 HIBD 治疗手段迫在眉睫。

红光是波长为 650 ~ 760 nm 的可见光,因能引起视网膜红色光感,故名。有研究发现,红光照射具有促进细胞增殖、调节细胞凋亡、分化等多种生物学效应^[8],部分基础及临床研究还发现红光照射能治疗缺氧、缺血性损伤,降低多种有害物质毒性作用,改善机体疲劳^[8-10]。基于上述背景,本研究拟采用发光二极管(light-emitting diode, LED)产生的红光照射急性期 HIBD 大鼠,并观察对大鼠缺血脑组织中 Caspase-8 及 Caspase-3 表达的影响,旨在为临床采用红光治疗 HIBD 患儿提供实验依据。

材料与方法

一、分组及制模

共选取健康 7 日龄 Sprague-Dawley (SD) 新生大鼠(购于第三军医大学附属大坪医院)45 只,实验大鼠合格证号:SCXK(渝)2002003,雌雄不限。采用随机数字表法将其分为假手术组、HIBD 模型组(简称模型组)和红光照射组。采用 Rice-Vannucci 法^[11]将模型组及红光照射组大鼠制成 HIBD 模型,按每千克体重 1 mg 腹腔注射丙泊酚麻醉后分离左侧颈总动脉,经双线结扎血管近端及远端后从中间剪断,缝合皮肤后置于低氧箱(含 92% N₂ 及 8% O₂)内持续 2.5 h。红光照射组于 HIBD 损伤后立即对其额顶部进行红光照射(红光照射仪由重庆大学生物工程研究室提供),设置红光波长为 660 nm,能量密度为 30 mW/cm²,每天照射 30 min,连续照射 3 d。假手术组大鼠仅进行颈部切口,分离左侧颈总动脉后不结扎,然后缝合切口,也不给予缺氧干预。实验期间各组大鼠均饲养于重庆医科大学附属儿童医院无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级动物房内,环境温度控制在(23 ± 2)℃,每天给予 12 h 光照,饲养期间大鼠均自由摄食、饮水。

二、实时 PCR 检测

于制模后第 3 天时各组分别取 5 只大鼠断头取脑,于冰面上分离出左侧海马组织,采用 RNA 提取试剂盒(型号为 D9108S,日本 Takara 公司)提取总 RNA,再经 PrimeScript 逆转录试剂盒(型号为 DRR037A,日本 Takara 公司)逆转录为 cDNA 后,采用 RealMaster-Mix 试剂盒(型号为 DRR420A,日本 Takara 公司)在实时 PCR 仪中进行实时 PCR 反应,检测 Caspase-8 及 Caspase-3 mRNA 表达水平,以 β-actin 作为内参。

三、蛋白免疫印迹检测

于制模后第 3 天时各组分别取 5 只大鼠断头取脑,于冰面上分离出左侧海马组织,选用蛋白提取试剂

盒(型号为 D6110A,北京百泰克生物技术有限公司)提取总蛋白。采用二辛可酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定 Caspase-8 及 Caspase-3 浓度后以蛋白 marker 作标识,在 80 V 电压下进行电泳。按 marker 条带位置切割目标蛋白,在 80 V 电压下转膜 43 min 后,用含三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和吐温-20 的缓冲液(tris-buffered saline and tween 20, TBST)配置 5% 牛血清白蛋白,并置于室温环境下封闭 1 h,一抗 Caspase-8、Caspase-3 及 β-actin(型号分别为 SC-5263, SC-56055, SC-8432,配置浓度分别为 1:500, 1:500, 1:800,美国 Santa Cruz 生物技术公司)均置于 TBST 液(4℃)中过夜。次日将 1:5000 辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠二抗(型号为 ZB-2303,北京中杉金桥生物技术有限公司)孵育后行增强化学发光法(enhanced chemiluminescence method, ECL)发光,通过化学发光成像系统拍照检测蛋白质水平变化。利用 Image J 图像处理分析软件检测 Caspase-3 及 Caspase-8 蛋白表达(以与 β-actin 灰度的比值表示)。

四、免疫荧光检测

于制模后第 3 天时各组分别取 5 只大鼠按每千克体重 0.3 g 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,经 4% 多聚甲醛行左心室灌注固定后断头取脑,于凶门处用美蓝标记,取侧脑室(前凶前 0.8 ~ 1.0 mm)脑组织并制成 4 μm 厚石蜡切片。石蜡切片经常规脱蜡、抗原修复后置于 8% 胎牛血清中封闭。一抗(Caspase-3 及 Caspase-8 浓度均为 1:100)置于湿盒内 4℃ 过夜,次日将荧光二抗(羊抗鼠 1:1000,型号为 ZF-0311,北京中杉金桥生物技术有限公司)置于湿盒内避光孵育 1 h。用 1:5000 的 4,6-二脒基-2-苯基吲哚盐酸(4,6-diamino-2-phenyl indole, DAPI)(型号为 C1006,上海碧云天技术有限公司)避光室温孵育 10 min 进行核染,最后用抗淬灭封片剂封片。将切片置于显微镜下观察 Caspase-3 及 Caspase-8 在大鼠海马 CA1 区及胞质中的表达,并在颗粒层随机选取 5 个视野,利用 NIS-Elements 图像处理软件(日本尼康公司)分析检测 Caspase-3 及 Caspase-8 原位蛋白表达情况,其结果以阳性区平均光密度值表示。

五、统计学分析

本研究所得计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

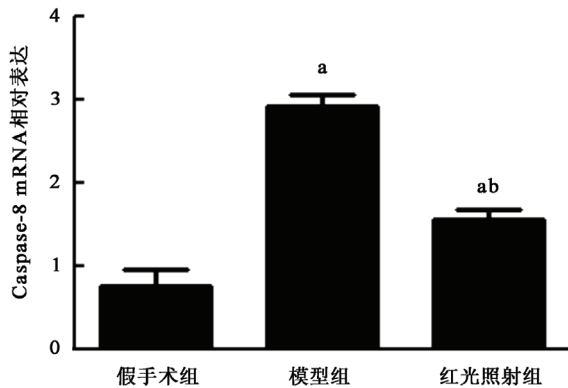
一、制模后各组大鼠实时 PCR 检测结果比较

制模后第 3 天时各组大鼠左侧海马细胞凋亡因子 Caspase-8、Caspase-3 基因表达结果详见表 1 及图 1、图 2,

表 1 制模后第 3 天时各组大鼠 Caspase-8 及 Caspase-3 表达比较($\bar{x} \pm s$)

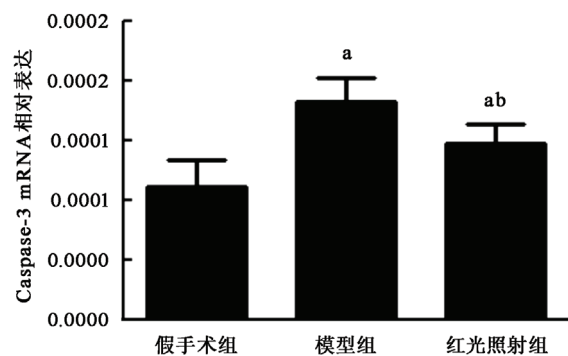
组别	只数	Caspase-8			Caspase-3		
		mRNA 表达	蛋白灰度比值	平均光密度值	mRNA 表达($\times 10^{-4}$)	蛋白灰度比值	平均光密度值
假手术组	5	0.75 ± 0.20	0.62 ± 0.11	42.79 ± 3.35	1.11 ± 0.22	0.19 ± 0.22	48.30 ± 3.04
模型组	5	2.91 ± 0.14 ^a	1.07 ± 0.22 ^a	69.17 ± 4.22 ^a	1.82 ± 0.20 ^a	0.16 ± 0.32 ^a	75.9 ± 6.38 ^a
红光照射组	5	1.55 ± 0.12 ^{ab}	0.70 ± 0.18 ^{ab}	60.25 ± 2.62 ^{ab}	1.48 ± 0.16 ^{ab}	0.74 ± 0.13 ^{ab}	60.22 ± 5.09 ^{ab}

注:与假手术组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$



注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

图 1 制模后第 3 天时各组大鼠 Caspase-8 mRNA 表达比较



注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

图 2 制模后第 3 天时各组大鼠 Caspase-3 mRNA 表达比较

发现模型组及红光照射组在制模后第 3 天时,其左侧海马细胞凋亡因子 Caspase-8、Caspase-3 mRNA 表达均较假手术组显著增强 ($P < 0.05$);红光照射组海马细胞 Caspase-8、Caspase-3 mRNA 表达均较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。

二、制模后各组大鼠蛋白免疫印迹检测结果比较

制模后第 3 天时各组大鼠左侧海马细胞凋亡因子 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达情况详见图 3、表 1,发现模型组及红光照射组在制模后第 3 天时,其凋亡因子 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达均显著高于假手术组 ($P < 0.05$);红光照射组 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达均显著低于模型组 ($P < 0.05$)。

三、制模后各组大鼠免疫荧光检测结果比较

制模后第 3 天时各组大鼠左侧海马 CA1 区细胞凋亡因子 Caspase-3、Caspase-8 蛋白表达情况详见图 4、表 1,可见 Caspase-8、Caspase-3 阳性表达主要位于海马锥

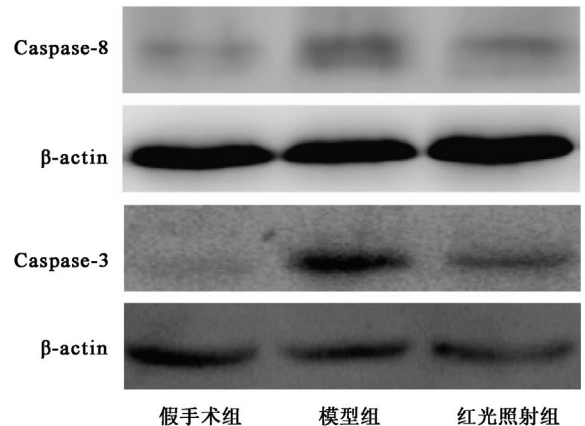


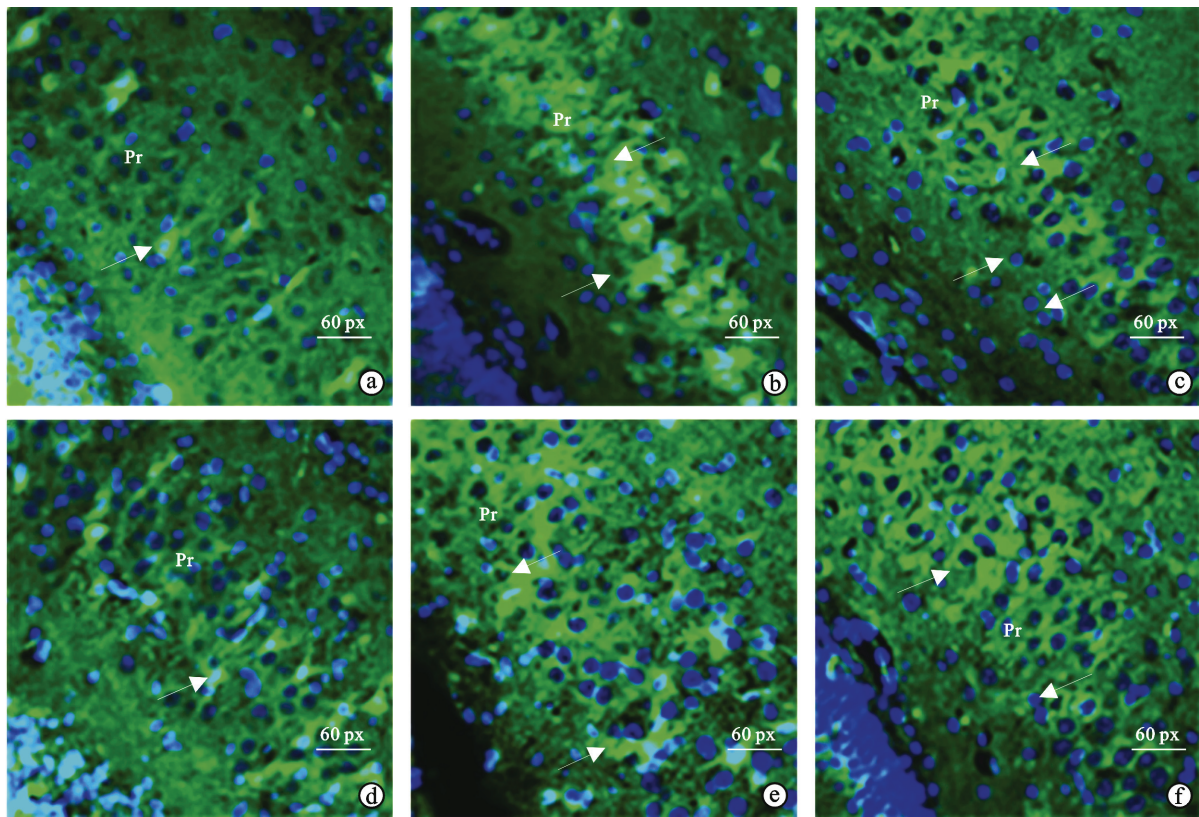
图 3 制模后第 3 天时各组大鼠 Caspase-8、Caspase-3 免疫印迹检测结果比较

体细胞层,模型组及红光照射组在制模后第 3 天时其细胞凋亡因子 Caspase-3、Caspase-8 蛋白表达均显著高于假手术组 ($P < 0.05$);进一步观察发现,红光照射组 Caspase-3、Caspase-8 蛋白表达显著低于模型组 ($P < 0.05$)。

讨 论

目前关于 HIBD 的发病机制尚未完全明确。新生儿期脑组织结构、功能不成熟,在此基础上发生窒息、缺氧、缺血将容易引发一系列连锁反应。当发生 HIBD 后,其病理进展通常分为三个阶段,分别是炎症凋亡期、再生凋亡期、坏死组织吸收及胶质增生期,可见细胞凋亡在缺氧、缺血性损伤整个修复过程中均发挥重要作用。细胞凋亡通路可分为内源性(线粒体)凋亡和外源性凋亡两类,当细胞缺氧、缺血时,最先发生的是能量耗竭,从而导致电子链传递阻断,进而激活外源性自杀相关因子(factor associated suicide, Fas)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors, TNF)等死亡受体或其他信号从而介导细胞凋亡。在上述凋亡途径中,细胞凋亡因子 Caspase 家族具有核心作用, Caspase-8 是死亡受体介导的凋亡途径中关键的启动子,而 Caspase-3 则是下游凋亡关键枢纽之一,无论是内源性或外源性凋亡途径,必将汇集于此并执行最终凋亡程序。

相关研究表明,红光主要通过其光效应发挥生物学作用,包括增强细胞功能、降低血液黏度、提高血液携氧能力、清除自由基、调节免疫功能等,对促进受损



注:a 为假手术组 Caspase-8 阳性表达,b 为模型组 Caspase-8 阳性表达,c 为红光照射组 Caspase-8 阳性表达,d 为假手术组 Caspase-3 阳性表达,e 为模型组 Caspase-3 阳性表达,f 为红光照射组 Caspase-3 阳性表达,图中箭头示 Caspase-8 或 Caspase-3 阳性表达

图 4 制模后第 3 天时各组大鼠海马 CA1 区 Caspase-8 及 Caspase-3 阳性表达比较(免疫荧光染色, ×200)

组织愈合及修复具有重要意义^[12-15]。Huang 等^[16]采用不同波长(660、730、810 和 980 nm)低能量激光治疗脑卒中动物模型,发现波长为 810 nm 和 660 nm 的光照具有显著神经保护作用。Wu 等^[17]采用能量密度为 150 mW/cm² 低能量激光照射脑外伤模型小鼠 4 h,4 周后通过神经功能评分发现,波长为 665 nm、810 nm 的光照可显著改善小鼠神经功能,促进创伤后神经功能恢复。上述研究均表明 660 nm 的红光照射能促进脑损伤修复,但其确切机制目前尚未明确,关于红光照射对细胞凋亡的影响国内、外亦鲜见报道。朱玲等^[18]研究发现波长为(640 ± 15) nm 的红光照射能降低人 β 淀粉样蛋白 25-35 (human amyloid beta peptide 25-35, Aβ25-35) 诱导的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (rat pheochromocytoma cell, PC12 cell) 凋亡,抑制过氧化氢诱导的分化 PC12 细胞凋亡,它们分别由环磷腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 和酪氨酸羟化酶所介导。Sussai 等^[19]也发现 660 nm、100 mW 低能量红光照射能显著改善高强度体育锻炼诱发的肌肉酸痛、疲劳、炎症反应及细胞凋亡等。

本研究采用 660 nm、30 mW/cm² LED 红光照射 HIBD 模型大鼠,发现模型组及红光照射组 Caspase-3、Caspase-8 基因及蛋白表达均显著高于假手术组,提示

缺氧、缺血性损伤可促进细胞凋亡;进一步分析发现,红光照射组 Caspase-8、Caspase-3 基因及蛋白表达均较模型组降低,提示在 HIBD 急性期,660 nm、30 mW/cm² LED 红光照射能显著抑制神经细胞凋亡,减轻神经组织损伤。目前关于红光照射的生物学机制仍未明确。Greco 等^[20]从细胞水平发现红光照射的主要作用靶点位于线粒体。Reddy 等^[21]发现线粒体是红光照射能量的主要吸收体,而线粒体又是细胞的供能站,可通过增加过氧化氢酶活性,诱导 ATP 合成,为机体提供能量,加快氧自由基等有害物质清除。Lapchak 等^[22]也发现 808 nm 近红外光照射可提高脑卒中大鼠皮质 ATP 含量。因此推测红光照射可能通过向细胞线粒体供能,提高神经细胞内 ATP 含量,抑制 HIBD 损伤凋亡早期线粒体能量耗竭,有助于维持线粒体膜稳定性,从而阻断下游 Caspase 家族级联表达,减少脑缺血后神经细胞凋亡。

另外目前还有大量研究发现,红光的光动力学 (photodynamic therapy, PDT) 效应可能导致线粒体膜通透性改变,激活细胞凋亡信号分子级联反应,加速细胞凋亡^[23-24]。Wang 等^[25]研究结果也发现高能量密度光照可上调 Caspase-3 表达,促进细胞凋亡。Haxsen 等^[26]通过检测不同能量密度、690 nm 红光照射对成骨

细胞碱性磷酸酶的影响,发现当红光能量密度为 51 mW/cm^2 时,成骨细胞碱性磷酸酶水平无明显变化,当红光能量密度为 102 mW/cm^2 或 204 mW/cm^2 时,其碱性磷酸酶水平均较对照组明显增强。Lanzafame 等^[27]采用 670 nm 红光治疗大鼠溃疡,并观察不同照射时间(分别照射 62.5 s 、 125 s 、 312.5 s 、 625 s ,每天照射 1 次或 2 次)及能量密度(8 mW/cm^2 、 40 mW/cm^2)与溃疡创面评分间的相关性,结果表明不同照射时间都有与之相对应的最佳能量密度。提示红光照射可能通过双向调节机制影响细胞凋亡,其能量密度及照射时间在细胞凋亡过程中均具有重要作用,所以探讨红光不同能量密度及作用时间与神经细胞凋亡间的相关性是必需的,对临床采用红光照射治疗急性期 HIBD 患儿具有重要意义。

综上所述,本研究结果表明,红光照射可能通过抑制 HIBD 急性期能量耗竭、缓解继发神经细胞损伤进而减少神经细胞凋亡,达到改善 HIBD 患儿神经功能预后的目的。有关红光照射抗神经细胞凋亡的确切机制及理想治疗参数,还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Fung C, Evans E, Shin D, et al. Hypoxic-ischemic brain injury exacerbates neuronal apoptosis and precipitates spontaneous seizures in glucose transporter isoform 3 heterozygous null mice. *J Neurosci Res*, 2010, 88:3386-3398.
- [2] Hannah C, Donna M. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns. *Curr Treat Options Neurol*, 2007, 9:414-423.
- [3] D'Amelio M, Sheng M, Cecconi F. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends Neurosci*, 2012, 35:700-709.
- [4] Li H, Zhu H, Xu C, et al. Cleavage of BID by Caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998, 94:491-502.
- [5] Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, et al. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol*, 2011, 10:372-382.
- [6] Hasegawa M, Ogihara T, Tamai H, et al. Hypothermic inhibition of apoptotic pathways for combined neurotoxicity of iron and ascorbic acid in differentiated PC12 cells: reduction of oxidative stress and maintenance of the glutathione redox state. *Brain Res*, 2009, 128:1-13.
- [7] Liu XH, Yan H, Xu M, et al. Hyperbaric oxygenation reduces long-term brain injury and ameliorates behavioral function by suppression of apoptosis in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *Neurochem Int*, 2013, 62:922-930.
- [8] Whelan HT, Smits RL, Buchman EV, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg*, 2001, 19:305-314.
- [9] Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *J Clin Laser Med Surg*, 2003, 21:67-74.
- [10] Desmet KD, Paz DA, Corry JJ, et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed Laser Surg*, 2006, 24:121-128.
- [11] 尚凤伟,王军,侯艳艳. 神经干细胞移植对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织 Foxg1 基因表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2013, 35:337-341.
- [12] Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, et al. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol*, 2009, 95:89-92.
- [13] Petersen S, Botes C, Olivier A, et al. The effect of low level laser therapy (LLLT) on wound healing in horses. *Equine Vet J*, 2010, 31:228-231.
- [14] Alves AC, de Carvalho Pde T, Parente M, et al. Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. *Lasers Med Sci*, 2013, 28:529-536.
- [15] AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci*, 2012, 27:237-249.
- [16] Huang YY, Gupta A, Vecchio D, et al. Transcranial low level laser (light) therapy for traumatic brain injury. *J Biophotonics*, 2012, 5:827-837.
- [17] Wu Q, Xuan W, Ando T, et al. Low-level laser therapy for closed-head traumatic brain injury in mice: effect of different wavelengths. *Lasers Surg Med*, 2012, 44:218-226.
- [18] 朱玲,刘承宜,胡滨娜,等. 单色光治疗 Alzheimer 病的细胞模型研究. *中国激光*, 2009, 32:190-193.
- [19] Sussai DA, Carvalho Pde T, Dourado DM, et al. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers Med Sci*, 2010, 25:115-120.
- [20] Greco M, Guida G, Perlino E, et al. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 163:1428-1434.
- [21] Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen*, 2001, 9:248-255.
- [22] Lapchak PA, De Taboada L. Transcranial near infrared laser treatment (NILT) increases cortical adenosine-5'-triphosphate (ATP) content following embolic strokes in rabbits. *Brain res*, 2010, 1306:100-105.
- [23] Ramaiah D, Eckert I, Arun KT, et al. Squaraine dyes for photodynamic therapy: mechanism of cytotoxicity and DNA damage induced by halogenated squaraine dyes plus light ($>600 \text{ nm}$). *Photochem Photobiol*, 2004, 79:99-104.
- [24] Drochioiu G. Laser-induced ATP formation: mechanism and consequences. *Photomed Laser Surg*, 2010, 28:573-574.
- [25] Wang F, Chen TS, Xing D, et al. Measuring dynamics of caspase-3 activity in living cells using FRET technique during apoptosis induced by high fluence low-power laser irradiation. *Lasers Surg Med*, 2005, 36:2-7.
- [26] Haxsen V, Schikora D, Sommer U, et al. Relevance of laser irradiance threshold in the induction of alkaline phosphatase in human osteoblast cultures. *Lasers Med Sci*, 2008, 23:381-384.
- [27] Lanzafame RJ, Stadler I, Kurtz AF, et al. Reciprocity of exposure time and irradiance on energy density during photoradiation on wound healing in a murine pressure ulcer model. *Lasers Surg Med*, 2007, 39:534-542.

(修回日期:2013-04-20)

(本文编辑:易浩)