

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2013.09.007

·基础研究·

发光二极管红光对实验性高脂血症大鼠血脂的调节作用

卢建丽, 刘翠霞, 尹昱, 安经克, 贾子善

[摘要] 目的 探讨发光二极管(LED)红光照射对高脂血症大鼠血脂的调节作用。方法 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只随机分为正常对照组(n=12)和高脂模型组(n=24)。正常对照组饲喂普通饲料, 高脂模型组采用高脂饲料喂养 6 周。造模成功后, 再将高脂模型组随机分为高脂对照组(n=12)和 LED 治疗组(n=12)。高脂对照组不予照射, LED 治疗组给予 LED 红光照射, 波长(630±15) nm, 每天 30 min, 连续照射 28 d。生化法检测大鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)水平及脂蛋白酯酶(LPL)和肝脂酶(HL)活性。肝脏组织免疫组化染色观察羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-CR)的表达。结果 LED 治疗组大鼠血清 TC、TG 和 LDL-C 水平较高脂对照组明显减低($P<0.01$), 而 HDL-C 水平明显升高($P<0.01$); LED 治疗组血清 LPL 和 HL 的活性明显高于高脂对照组($P<0.01$), LED 治疗组肝脏组织中 HMG-CR 的表达低于高脂对照组($P<0.05$)。结论 LED 红光照射通过增强 LPL、HL 的活性及降低 HMG-CR 的表达, 影响血清脂质的代谢, 从而达到调节血脂的作用。

[关键词] 红光照射; 高脂血症; 脂蛋白酯酶; 肝脂酶; 羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 大鼠

Effect of Light Emitting Diode Red Light Irradiation on Hyperlipidemia Rats LU Jian-li, LIU Cui-xia, YIN Yu, et al. Department of Rehabilitation, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of light emitting diode (LED) red light irradiation on serum lipid in experimental hyperlipidemia rats. **Methods** 36 healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group (n=12) and hyperlipidemic model group (n=24). The normal group was fed with normal diet while the hyperlipidemic model group with fat-rich forage for 6 weeks. The hyperlipidemic model group rats were randomly divided into the hyperlipidemic control group (n=12) and LED treatment group (n=12), and the latter accepted LED red light irradiation for 28 d. The levels of serum lipid including total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein (LDL-C), high-density lipoprotein (HDL-C), and the activities of lipoproteinesterase (LPL) and hepatic lipase (HL) were detected with biochemical assay. The expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CR) of hepatic tissue were measured with immunohistochemical staining. **Results** Compared with the hyperlipidemic control group, the levels of serum TC, TG and LDL-C decreased while the serum HDL-C increased significantly in the LED treatment group ($P<0.01$) after treated with LED. The levels of LPL and HL in serum increased ($P<0.01$) while the activity of HMG-CR decreased ($P<0.05$). **Conclusion** LED red light irradiation might play a regulating effect on serum lipid by enhancing the activities of LPL and HL and inhibiting the expression of HMG-CR to interfere the metabolism of TC, TG, LDL-C and HDL-C.

Key words: red light irradiation; hyperlipidemia; lipoproteinesterase; hepatic lipase; 3-hydroxy -3-methylglutaryl coenzyme A reductase; rats

[中图分类号] R589.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2013)09-0824-04

[本文著录格式] 卢建丽, 刘翠霞, 尹昱, 等. 发光二极管红光对实验性高脂血症大鼠血脂的调节作用[J]. 中国康复理论与实践, 2013, 19(9): 824-827.

高脂血症是临床上的常见病, 多发病, 与心脑血管疾病的发生密切相关, 如何安全有效地降低血脂已成为临床研究的热点。有研究表明, 低强度激光照射治疗可以降低血脂含量^[1], 改善血液流变学^[2]。发光二极管(LED)红光波长 390~670 nm, 与低强度激光的波长范围相似, 且具有功耗低、易集成、可靠性高、发光光谱单色性好、波段范围宽等特点^[3]。本科小样本临床试验初步显示, LED 红光在调节血脂方面有一定

的作用。为此, 我们在建立大鼠高脂血症模型的基础上, 观察 LED 红光照射对高脂血症大鼠血脂的调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级近交系雄性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只, 8 周龄, 体重 218~287 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号: SCXK(京)2006-0009。每

作者单位: 河北省人民医院康复科, 河北石家庄市 050051。作者简介: 卢建丽(1983-), 女, 河北石家庄市人, 硕士研究生, 主要研究方向: 脑卒中康复。通讯作者: 贾子善, 男, 博士, 主任医师, 主要研究方向: 神经康复。

笼 5 只, 清洁级饲养环境, 温度 18~22 ℃, 湿度 50%~60%。所有大鼠适应性喂养普通饲料 1 周后, 随机分为正常对照组(n=12)和高脂模型组(n=24)。正常对照组喂普通饲料, 高脂模型组喂高脂饲料。高脂饲料喂养 6 周后, 用 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉, 内眦静脉丛取血, 分离血清, 测定空腹血清胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL-C)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL-C)含量。两组间有非常高度显著性差异($P<0.001$), 造模成功。见表 1。造模成功后再将高脂模型组大鼠随机分为高脂对照组和 LED 治疗组。

表 1 高脂饮食 6 周时血脂水平(mmol/L)

组别	n	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常对照组	12	1.79±0.24	0.45±0.11	0.78±0.06	0.51±0.08
高脂模型组	24	2.68±0.65	0.68±0.11	0.99±0.20	0.52±0.08
<i>t</i>		-4.57	-6.00	-3.57	-2.70
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.79

1.2 高脂饲料配方

2%胆固醇、10%猪油、10%蛋黄粉、0.2%胆酸钠、77.8%普通饲料按比例计算出所需量, 于河北医科大学实验动物学部统一加工而成。普通饲料购自河北医科大学实验动物学部。

1.3 主要试剂及仪器

TC 试剂、TG 试剂、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL-C)试剂、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL-C)试剂、总酯酶试剂盒: 南京建成生物工程研究所, 批号: 201011, 201011, 2010019, 2010028, 20110322; 兔抗大鼠羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMG-CR)多克隆抗体: Santa Cruz 公司, 批号: 10210; 红光治疗仪(PKHGY-II 型): 河北普康医疗设备有限公司。

1.4 LED 照射

将 LED 治疗组大鼠放到自制的鼠笼中(120×60×60 mm), 鼠笼置红光治疗仪光头上, 使光头对准大鼠的腹部, 每次照射 30 min, 每天 1 次, 连续照射 28 d。照射期间各组喂养饲料不变。

1.5 血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 的测定

分别于照射前和照射第 29 天, 大鼠禁食 12 h 后, 3%戊巴比妥 30 mg/kg 腹腔注射, 内眦静脉丛取血, 3000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 用半自动生化分析仪(德国豪迈)测定 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 的含

量。

1.6 血浆脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)和肝脂酶(hepatic lipase, HL)的测定

于照射后第 29 天, 大鼠尾静脉注射肝素 130 U/kg^[4], 15 min 后内眦静脉丛采血, 制备血浆。参照改良的 Krauss 和 Blache 的方法^[5-7], 在 37 ℃、pH=8.3 的条件下, 将肝素后血浆与底物(脂肪乳剂)一起保温 30 min, 血浆中的 LPL 和 HL 可将底物中的 TG 水解为甘油和游离脂肪酸(FFA)。用铜试剂法测定生成的 FFA 量, 即可分别计算出 LPL 和 HL 的活性。

1.7 免疫组织化学染色

于照射后第 29 天, 大鼠禁食 12 h, 3%戊巴比妥 30 mg/kg 腹腔注射麻醉, 留取所需的血液标本后腹主动脉放血处死大鼠, 立即取出肝脏, 冰生理盐水漂洗 3 次, 滤纸吸干, 在肝脏最大叶距边缘 1 cm 处取 1×1×1 cm 肝组织, 4%多聚甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片厚 5 μm。将各组切片置于二甲苯中脱蜡, 梯度酒精水化, 高压热抗原修复, 3% H₂O₂封闭内源性过氧化物酶, 正常山羊血清封闭非特异性抗原。滴加 HMG-CR 抗体(1:75), 4 ℃冰箱过夜。用兔抗鼠二抗 37 ℃恒温孵育 60 min, 加 DBA 显色液, 室温下反应, 显微镜下染色充分, PBS 漂洗, 苏木素复染, 梯度酒精逐级脱水, 二甲苯透明, 树胶封片。每张切片选取 5 个视野, 用多功能真彩色细胞图像分析管理系统, 在同一光强度、同一放大倍数下进行图像分析, 分别记录每张切片的阳性细胞数分级及阳性细胞显色强度(5 个视野的均值), 并进行总评分^[8]。

阳性细胞数分级(A): 0~1%=0, 1%~10%=1, 10%~50%=2, 50%~80%=3, 80%~100%=4。

阳性细胞数显色强度分级(B): 0=阴性, 1=弱阳性, 2=阳性, 3=强阳性。

总评分(IHS)=A×B

1.8 统计学分析

所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料进行正态分布和方差齐性检验; 方差齐, 则采用独立样本 *t* 检验; 方差不齐, 则采用非参数检验。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C

照射前, LED 治疗组与高脂对照组血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 均无显著性差异。照射后, 与

高脂对照组相比, LED 治疗组血清 TC、TG 和 LDL-C 明显降低($P<0.01$), HDL-C 明显升高($P<0.01$)。见表 2、表 3。

2.2 血浆 LPL、HL 活性

照射 28 d 后, 高脂对照组大鼠血浆 LPL、HL 的活性低于正常对照组($P<0.05$); LED 治疗组大鼠血浆 LPL、HL 活性明显高于高脂对照组($P<0.01$); LED 治疗组大鼠血浆 LPL、HL 的活性高于正常对照组, 但无显著性差异($P>0.05$)。见表 4。

表 2 LED 红光照射前各组血脂水平(mmol/L)

组别	n	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常对照组	12	1.79±0.24	0.45±0.11	0.78±0.06	0.51±0.08
高脂对照组	12	2.67±0.56	0.69±0.09	0.99±0.19	0.52±0.10
LED 治疗组	12	2.69±0.75	0.68±0.13	0.98±0.21	0.52±0.07
t_1^a		-4.97	-5.74	-3.19	-0.33
P_1^a		0.00	0.00	0.00	0.74
t_2^b		-3.96	-4.74	-3.73	-0.11
P_2^b		0.00	0.00	0.00	0.91
t_3^c		0.08	-0.06	-0.12	-0.25
P_3^c		0.94	0.95	0.91	0.81

注: a: 高脂对照组与正常对照组比较; b: LED 治疗组与正常对照组比较; c: LED 治疗组与高脂对照组比较。

2.3 HMG-CR

HMG-CR 阳性部位在肝细胞胞浆内, 呈棕黄色。见图 1。正常对照组大鼠肝脏中央静脉及汇管区周围可见散在分布的阳性细胞, 免疫组化评分(1.9±0.99)。高脂对照组大鼠肝脏中央静脉及汇管区周围可见较多阳性细胞, 免疫组化评分(3.8±1.99), 高于正常对照组($t=-2.70, P=0.02$)。LED 治疗组阳性细胞数少, 免疫

组化评分(2.1±1.29), 低于高脂对照组($t=-2.27, P=0.04$)。

表 3 LED 红光照射后各组血脂水平(mmol/L)

组别	n	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常对照组	12	1.92±0.27	0.60±0.07	0.81±0.13	0.53±0.04
高脂对照组	12	2.91±0.33	0.74±0.11	1.13±0.18	0.51±0.07
LED 治疗组	12	2.08±0.66	0.57±0.08	0.87±0.17	0.70±0.08
t_1^a		-8.00	-3.75	-5.00	0.92
P_1^a		0.00	0.00	0.00	0.37
t_2^b		-0.78	0.88	-0.92	-6.44
P_2^b		0.44	0.39	0.37	0.00
t_3^c		-3.85	-4.22	-3.69	6.38
P_3^c		0.00	0.00	0.00	0.00

注: a: 高脂对照组与正常对照组比较; b: LED 治疗组与正常对照组比较; c: LED 治疗组与高脂对照组比较。

表 4 LED 红光照射后各组血浆 LPL、HL 活性(U/ml)

组别	n	LPL	HL
正常对照组	12	1.34±0.37	0.90±0.21
高脂对照组	12	1.01±0.27	0.65±0.19
LED 治疗组	12	1.55±0.36	1.07±0.21
t_1^a		2.28	2.83
P_1^a		0.04	0.01
t_2^b		-1.13	-1.63
P_2^b		0.26	0.10
t_3^c		-3.81	-4.65
P_3^c		0.00	0.00

注: a: 高脂对照组与正常对照组比较; b: LED 治疗组与正常对照组比较; c: LED 治疗组与高脂对照组比较。

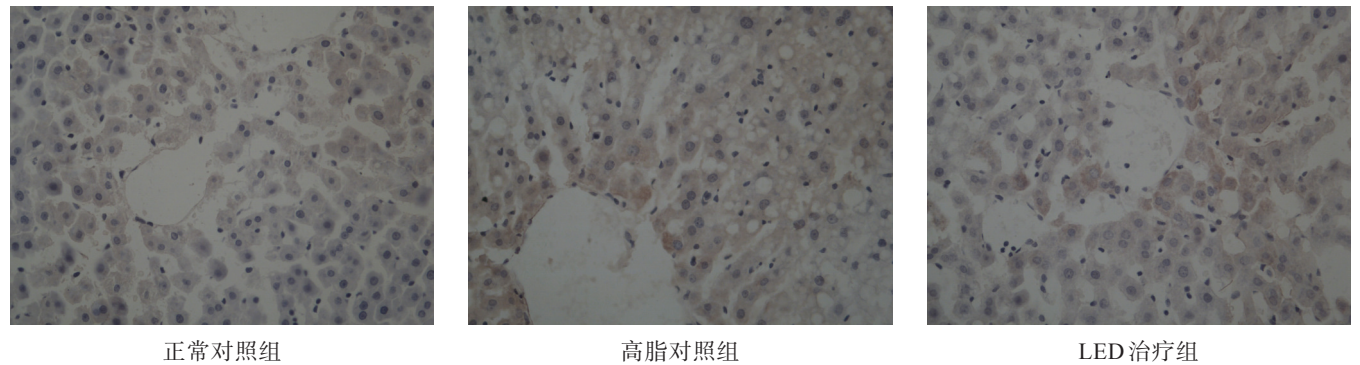


图 1 各组 HMG-CR 表达(免疫组织化学染色, 100×)

3 讨论

红光是指用物理学方法滤去对皮肤有损害作用的紫外线和具有明显热效应的红外线, 仅保留 600~700 nm 波段的红光, 其主要作用是光化学作用, 而并非

热效应。

目前临床上应用的红光大多为低强度激光。LED 红光作为一种新型的光源, 其波长范围与低强度激光相同, 且具有成本低、节能、光束面积大等优点, 正

广泛应用于医疗照明、美容及肿瘤治疗等领域,而应用 LED 红光调节血脂的相关研究,国内外还比较少见。

有研究表明,血浆脂质浓度的高低与脂蛋白代谢密切相关,调节影响脂蛋白代谢的酶活性即可调节血浆脂质浓度^[9]。LPL 和 HL 是脂质代谢过程中两个关键酶,其缺陷或活性降低,均可导致甘油三酯血症水平升高。

LPL 可以催化乳糜微粒(CM)和极低密度脂蛋白(VLDL-C)核心的 TG 分解为脂肪酸和单酰甘油酯,以供组织氧化和贮存。同时还参与 VLDL 和 HDL 间的载脂蛋白和磷脂的转换。LPL 活性的增强可影响血浆中 TG 和胆固醇(TC、LDL-C、HDL-C、VLDL-C 等)的水平,从而调节血浆中脂蛋白的代谢,降低高脂血症的发生^[10-11]。

HL 是血液中内源性 TG 代谢的关键酶之一。研究表明,HL 可水解 CM、VLDL-C 和 LDL-C,释放出 FFA^[12],还可以选择性作用于 HDL2,水解其中的甘油三酯和磷脂,有助于肝摄取 HDL2 中胆固醇及胆固醇酯,在胆固醇的逆向转运中起重要作用^[13]。

LED 红光照射可以增加高脂血症大鼠血清 LPL 和 HL 的活性,可促进甘油三酯的水解和胆固醇的逆向转运,进而发挥调节血脂的作用。

HMG-CR 是胆固醇合成过程中的限速酶,它存在于胞浆及滑面内质网膜上。抑制 HMG-CR 活性,能减少胆固醇合成时,促使细胞消耗储存的胆固醇,进而促使肝细胞增加 LDL-C 受体的数量与活性,加强对血液中 LDL-C 的摄取利用,从而将低血中总胆固醇及 LDL-C,同时影响其他脂类的代谢。

我们推测,LED 红光照射可能会抑制肝脏 HMG-CR,使血清胆固醇浓度降低。LED 红光如何作用于 HMG-CR,机制尚不清楚,有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 池景泉,胡桂芳,林湘,等. 低强度激光鼻腔内照射对血脂异常作用的研究[J]. 激光生物学报, 2005, 14(4): 265-268.
- [2] 杨玉东,陆战红,梁勇,等. 低功率半导体激光血管外照射对血脂、血液流变学指标的影响[J]. 激光杂志, 2002, 23(1): 80-81.

- [3] Sazonov AM, Romanov GA, Portnoy LM. Low intensity non-coherent red light in the complex treatment of peptic ulcer [J]. Ulcer Soviet Medicine, 1985, 12: 42-46.
- [4] 张琪,马博,朱玲玲,等. 银杏叶提取物对实验性高脂血症大鼠的调节机制[J]. 华西药理学杂志, 2007, 22(6): 605-608.
- [5] Krauss RM, Leco RI, Fredrickson DS. Selective measurement of two lipase activities in postheparin plasma from normal subjects and patients with hyperlipoproteinemia [J]. J Clin Invest, 1974, 54(5): 1107-1124.
- [6] Blache D, Bouthillier D, Davignon J. Simple, reproducible procedure for selective measurement of lipoprotein lipase and hepatic lipase [J]. Clin Chem, 1983, 29(1): 154-158.
- [7] 张蓉,刘宇,刘秉文. 血浆脂蛋白及肝脂酶的比色测定法[J]. 华西医科大学学报, 1996, 27(1): 106-110.
- [8] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors [J]. Cancer, 2000, 89(12): 2637-2645.
- [9] Nakaya N, Homma Y, Tamachi H, et al. The effect of CS-514 on serum lipids and apolipoproteins in hypercholesterolemic subjects [J]. JAMA, 1987, 257(22): 3088-3093.
- [10] Pulinikunnil T, Rodrigues B. Cardiac lipoprotein lipase: metabolic basis for diabetic heart disease [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(2): 329-340.
- [11] Tsutsumi K. Lipoprotein lipase and atherosclerosis [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2003, 1(1): 11-17.
- [12] Kirchgesner TG, Chuat JC, Heinzmann C, et al. Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(24): 9647-9651.
- [13] Junik R, Piechowski A, Sowiński J, et al. The thyroid function markers and their prognostic significance patients with ischemic stroke [J]. [in Polish]. Neurol Neurochir Pol, 1995, 29(3): 317-323.

(收稿日期:2013-01-09 修回日期:2013-03-15)