

· 基础研究 ·

氦-氖激光照射对兔跟腱羟脯氨酸含量的影响

李莉 孙俊英 徐岚

【摘要】目的 研究低强度氦-氖(He-Ne)激光照射对跟腱损伤兔的跟腱组织羟脯氨酸(Hyp)含量的影响,并探讨其最佳照射时间。**方法** 选取 22 只新西兰雄兔,兔龄 10~12 周,随机分为对照组和激光照射组。对照组 4 只,跟腱切断缝合手术后不进行激光照射;激光照射组 18 只,于术后第 1 天即以低功率 He-Ne 激光(波长为 632.8 nm、功率为 18.9 mW)经皮损伤部位光斑扩束照射,每日照射 1 次,共照射 14 d。激光照射组再根据每次照射时间的长短分为激光照射 10 min、20 min 和 30 min 亚组,每亚组 6 只。分别于术后 14 d 及 28 d 处死各组实验动物,采集跟腱标本,用 Hyp 检测试剂盒对 Hyp 含量进行检测。**结果** 各激光照射组术后 14 d Hyp 含量均明显高于对照组($P<0.01$);激光照射 20 min 亚组的 Hyp 含量明显高于激光照射 10 min 亚组,差异有统计学意义($P<0.01$);激光照射 20 min 亚组术后 28 d 时 Hyp 含量较术后 14 d 明显增高,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** He-Ne 激光照射可促进兔跟腱组织胶原蛋白的合成,单次照射 20 min 效果最好。

【关键词】 氦-氖激光; 羟脯氨酸; 跟腱

The effect of He-Ne laser irradiation on the level of hydroxyproline in healing rabbit Achilles tendons LI Li*, SUN Jun-ying, XU Lan. * Department of Rehabilitation, The First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of low intensity He-Ne laser irradiation on the level of hydroxyproline in the Achilles tendons of rabbits after experimental tenotomy, and to determine the best irradiation cycle. **Methods** Twenty-two male New Zealand rabbits, aged 10-12 weeks, were randomly divided into control and experimental groups. The control group received no laser irradiation after tenotomy. The experimental animals were treated with a He-Ne laser (632.8 nm, 18.9 mW) daily for 14 days. The treated animals received 10 minutes, 20 minutes or 30 minutes of irradiation daily. At the 14th day or the 28th day after the operation, the rabbits were sacrificed and the level of hydroxyproline (Hyp) in their Achilles tendons was measured. **Results** Hyp was significantly higher in all experimental animals than that in the controls. Hyp level in the 20 minutes group was significantly higher than in the 10 minutes group. Hyp level in the 20 minutes group at the 28th day were significantly higher than at the 14th day. **Conclusions** He-Ne laser irradiation facilitates the synthesis of collagen and enhances the healing of Achilles tendons. The best irradiation time might be 20 minutes.

【Key words】 He-Ne laser; Hydroxyproline; Achilles tendon

跟腱和韧带损伤在临床上较为常见,完全断裂者需常规手术缝合,而撕裂伤者应采用固定等非手术治疗。但无论采用手术方法或非手术固定的方法来治疗跟腱损伤,均有愈合慢、易形成疤痕等缺点,更难以使其在组织结构、化学成分以及力学性能等方面完全恢复正常。近年来国内外学者研究发现,非侵入性低功率氦-氖(He-Ne)激光光斑照射刺激,可促进跟腱、韧带的愈合和组织的修复^[1-3]。目前,关于激光照射治疗损伤跟腱的疗效已获肯定,但在同一功率条件下,照射时间长短对疗效的影响,至今尚未达成共识。为此,我们通过研究低强度 He-Ne 激光照射对损伤的兔跟腱

组织羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)含量的影响,来探讨不同照射时间对跟腱损伤修复的作用。

材料和方法

一、实验动物分组

选取新西兰雄兔 22 只,兔龄为 10~12 周龄,由苏州大学实验动物中心提供。实验动物分笼饲养于安静、舒适的环境下,标准饲料喂养,并随机分为对照组(4 只)和激光照射组(18 只)。激光照射组又根据每次照射时间的不同分为激光照射 10 min、20 min 和 30 min 亚组,每亚组 6 只。

二、仪器和试剂

仪器:上海激光研究所生产的 LJL40-HA 型 He-Ne 激光治疗仪。试剂:Hyp 测定采用南京建成生物工程

作者单位:215006 苏州,苏州大学附属第一人民医院康复医学科(李莉),骨科(孙俊英);苏州大学生物化学教研室(徐岚)

研究所研制的 Hyp 检测试剂盒,蛋白含量测定采用 Folin-酚试剂。

三、跟腱损伤模型的制作

用 1% 戊巴比妥溶液以 1 ml/kg 体重的剂量经耳缘静脉缓慢注射麻醉。剔除右侧跟腱处的兔毛,安尔碘消毒后,加用 2% 利多卡因行局部麻醉。于跟腱边缘纵向切开皮肤、皮下脂肪,解剖分离跟腱,在跟骨附着点上方 1.5 cm 处横向切断跟腱后行“8”字形断端缝合,最后缝合皮肤。采用热塑板材,于伸直位固定动物患肢,以胶布缠绕,不宜过紧,以免影响末梢循环而发生水肿。上、下固定的胶布之间,即跟腱切割处需暴露约 4 cm 宽,以备日后激光照射。术后常规肌肉注射庆大霉素 4 万 U 以预防感染。实验兔术后采用毛毯保温,直至动物苏醒。

四、He-Ne 激光照射方法

对照组跟腱缝合手术后均不行激光照射。激光照射组于跟腱缝合术后第 1 天即采用低功率 He-Ne 激光(波长为 632.8 nm、功率为 18.9 mW)经皮损伤部位光斑扩束照射,照射面积约 4 cm²,每日照射 1 次,持续照射 14 d。激光照射 10 min、20 min 和 30 min 亚组每次分别照射 10 min、20 min 和 30 min。所有动物实验期间均在相同条件下分笼饲养。

五、跟腱标本的采集

对照组于跟腱缝合术后第 14 天随机取 2 只兔,其余各组随机取 3 只兔,于耳缘静脉注射空气 20 ml 处死后钝性分离跟腱,然后分别于远端靠近跟骨处及近端跟腱-肌腹交界处切断跟腱,将跟腱标本迅速储存于 -70℃ 冰箱中。在跟腱缝合术后第 28 天,以同样的方法处死其余 11 只兔,采集跟腱标本。检测时将跟腱标本置于 20~25℃ 室温下解冻 30 min 后进行生物化学分析。

六、跟腱组织中 Hyp 含量的测定

1. 组织匀浆中 Hyp 含量的测定:将缝合端跟腱组织块称重,放在匀浆管口部,用小剪刀剪碎,加入 9 倍的生理盐水冲入匀浆管内,缓慢地上下旋转研磨,每次研磨 30 s,间隔 30 s,反复 5 次;或者采用匀浆机,在冰水中进行,每次匀浆 10 s,间隔 30 s,连续 3~5 次。匀浆后以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清 0.1 ml,加入 0.4 ml 生理盐水,稀释为 2% 的组织匀浆进行检测。Hyp 检测严格按试剂盒说明操作,先进行消化处理,混匀各管浆液,37℃ 下水浴 3 h。然后将混匀的各管浆液置于 60℃ 下水浴 15 min,流水冷却后以 3 500 r/min 离心 10 min。取上清液,于 721 型分光光度计 550 nm 波长处(1 cm 光径,蒸馏水调零)测定其吸光度值,按试剂盒中说明计算组织匀浆中 Hyp 含量。

2. 组织匀浆中蛋白含量的测定:按照 Folin-酚试

剂法测定蛋白含量^[4]。首先进行标准曲线制作,然后取试管 2 支,分为测定管和空白管进行样品测定。测定管内加入 1 ml 上述匀浆溶液,各管加试剂甲 2.5 ml,混匀放置 10 min 后,加入试剂乙 0.25 ml,立即混匀,30 min 后比色。根据光密度读数查得标准曲线,计算检测液内的蛋白含量。

3. 蛋白中 Hyp 含量的计算:蛋白中 Hyp 含量(μg/mg) = 组织匀浆中 Hyp 含量/组织匀浆中蛋白含量。

七、统计学分析

用 SPSS 10.0 版统计软件进行分析,实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间均数比较采用方差分析。

结 果

各激光照射组于术后 14 d 与对照组相比,Hyp 含量明显增高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。激光照射 20 min 亚组的 Hyp 含量明显高于激光照射 10 min 亚组,差异有统计学意义($P < 0.01$);激光照射 30 min 亚组的 Hyp 含量和激光照射 20 min 及 10 min 亚组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。激光照射 10 min 和 30 min 亚组术后 28 d 的 Hyp 含量与术后 14 d 比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);激光照射 20 min 亚组术后 28 d 的 Hyp 含量较术后 14 d 明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。提示 He-Ne 激光照射具有促进跟腱胶原蛋白合成的作用,每次激光照射 20 min 效果最好。具体数据见表 1。

表 1 不同照射时间对术后 14 d 和 28 d 兔跟腱 Hyp 含量变化的影响(μg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	术后 14 d	术后 28 d
对照组	4	0.35 ± 0.03	0.38 ± 0.04
激光照射组			
激光照射 10 min 亚组	6	0.50 ± 0.05 *	0.54 ± 0.01
激光照射 20 min 亚组	6	0.63 ± 0.07 * #	0.69 ± 0.03 * △
激光照射 30 min 亚组	6	0.60 ± 0.05 *	0.59 ± 0.03

注:与对照组相应时间点比较,* $P < 0.01$;与激光照射 10 min 亚组相应时间点比较,# $P < 0.01$;组内与术后 14 d 比较,△ $P < 0.01$

讨 论

目前,非侵入性激光照射对促进跟腱、伤口的愈合和加速组织修复的作用备受关注^[5-7]。低功率 He-Ne 激光光束集中,对组织的穿透深度较浅,约为 16 mm^[8],非常适合治疗表浅的跟腱损伤。Enwemeka 等^[3,9]在 He-Ne 激光促进兔跟腱愈合方面做了大量的研究,发现激光照射后,兔跟腱的生物力学及生物化学特性均得以改善,证实其可促进胶原蛋白的合成。胶原的合成代谢状态可反映跟腱的重建程度,Hyp 在胶原纤维的代谢中起重要作用,其含量可代表胶原的合成量,且 Hyp 在胶原

纤维中所占比例相对恒定,因此测定 Hyp 含量可直接反映胶原的含量^[10]。本研究通过测定的 Hyp 含量,证实了 He-Ne 激光照射能够提高受损跟腱中胶原蛋白的含量,促进跟腱的愈合,与 Enwemeka 等的研究结果相符。

激光对跟腱愈合的促进作用与细胞的活动有关。跟腱损伤后,腱外膜迅速增殖,迁移至受损处,在相关因素的影响下,腱外膜间充质细胞分化、增殖为大量的成纤维细胞并分泌胶原蛋白,然后成纤维细胞继续合成胶原纤维;腱内膜未分化细胞也开始分化、增殖,与腱外膜的反应过程相同。但其机制目前仍不十分清楚,可能是通过基因或酶来调控胶原的代谢过程,涉及合成或分解途径。光刺激理论认为,线粒体呼吸链吸收了光能,引起 NADH 氧化,使胞浆和线粒体中氧化还原状态发生改变,引起 ATP 池内电子传递链活化,造成线粒体膜电位增高^[7],进而促进核酸的合成。另外,一定频率的激光能量不但可以调节细胞的增殖,还可促进成纤维细胞释放生长因子^[11,12]。这些生长因子是一些具有生物活性的多肽,具有趋化性,可促进有丝分裂和胞外基质的合成,它们可与细胞表面特异性受体结合,产生第二信使,使细胞核根据特定的基因来诱导或抑制基因组 DNA 向 mRNA 转录,从而改变某些蛋白质的表达水平,进而促进 DNA 的复制和有丝分裂^[13]。同时,生长因子的释放还可促进细胞外基质胶原的合成和降解^[14,15]。低功率激光照射可促使成纤维细胞释放碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)^[11]。Frederick^[16]认为,bFGF 主要参与血管形成,为修复活动提供营养。还有研究认为,bFGF 在愈合过程中有促进兼性细胞转化和分裂的作用,而滑膜、腱膜与肌腱均源于胚胎时期的间充质细胞,属兼性细胞^[17]。

小功率 He-Ne 激光具有多次照射后能量累加作用的生物学特性,即在照射剂量不变的条件下,机体反应从第 3~4 天起逐渐增强,第 10~17 天达到峰值,此后作用效果逐渐减弱,若继续照射反而出现抑制作用。我们采用 He-Ne 激光照射 14 d,遵循了该规律。有学者认为,弱刺激能增进生理机能,中等刺激作用更强,较大刺激会产生抑制作用,强刺激则可使生理机能全部停止^[18]。本研究结果显示,术后 28 d 激光照射 10 min 亚组 Hyp 含量增加,20 min 亚组明显增加,30 min 亚组开始下降,表现出抛物线的特点,与此理论相符。这是因为弱激光作为刺激源,作用于组织后产生一系列应答反应,其中包括在分子水平调整蛋白质和核酸的合成,促进 DNA 复制和调节各种酶的活性以及在细胞水平动员代偿、营养、修复、免疫和其他防御机制^[19],而较大剂量的 He-Ne 激光照射可引起 G₀/G₁ 期细胞停滞和细胞凋亡^[20],所以激光照射 30 min 亚组促进胶原蛋白的合成作用反而下降。因此我们认为激光对跟腱的促愈合作用

与剂量有密切关系,单次照射 20 min 效果最好。

由于兔跟腱与人类跟腱不完全相同,在跟腱断裂缝合术后如采用 He-Ne 激光照射,每次持续 20 min,是否也可获得理想疗效,尚需进一步的临床研究来证实。

参 考 文 献

- Reddy GK, Stehno-Bittle L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. *Lasers Surg Med*, 1998, 22: 281-287.
- Enwemeka CS. Ultrastructural morphometry of membrane-bound intracytoplasmic collagen in tendon fibroblasts exposed to He-Ne laser beam. *Tissue Cell*, 1992, 24: 511-523.
- Enwemeka CS, Rodriguez O, Gall NG, et al. Morphometric of collagen fibril population in He-Ne laser photostimulated tendons. *J Clin Laser Med Surg*, 1990, 8: 151-156.
- 吴士良, 钱晖, 周亚军, 主编. 生物化学与分子生物学实验教程. 北京: 科学出版社, 2004. 65-64.
- Romanos GE, Pelekanos S, Strub JR. Effects of Nd:YAG laser on wound healing processes: clinical and immunohistochemical findings in rat skin. *Lasers Surg Med*, 1995, 16: 368-379.
- Braverman B, McCarthy RJ, Ivankovich AD, et al. Effect of He-Ne and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers Surg Med*, 1989, 9: 50-58.
- Yu W, Naimm JO, Lanzafame RJ. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg Med*, 1997, 20: 56-63.
- 许松井, 主编. 激光技术与医学应用. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 308-313.
- Enwemeka CS. Laser photostimulation. *Clin Management*, 1990, 10: 24-29.
- 李同森, 时宏富, 张树松. 带蒂肌腱移植修复鞘内腱缺损的实验研究. *中国矫形外科杂志*, 1999, 6: 43-45.
- Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photo*, 1994, 59: 167-170.
- Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. The effect of photoradiation on the secretion of TGF- β PDGF and bFGF from fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med(Suppl)*, 1994, 6: 8.
- McGrath MH. Peptide growth factors and wound healing. *Clin Plastic Surg*, 1990, 17: 421.
- Chua CC, Geiman DE, Keller GH, et al. Induction of collagenase secretion in human fibroblasts by growth promoting factors. *J Biol Chem*, 1985, 260: 5213-5216.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 4167-4171.
- Frederick J. Growth factors and canine flexor tendon healing: Initial studying in uninjured and repair models. *J Hand and Surg*, 1998, 23: 1052.
- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, et al. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol*, 1997, 137: 1445-1457.
- 乔志恒, 主编. 新编物理治疗学. 北京: 华夏出版社, 1993. 5.
- 江新, 主编. 临床激光医学. 南京: 东南大学出版社, 1993. 73.
- 舒彬, 吴宗耀, 李涛, 等. 氦氛激光抑制培养瘢痕成纤维细胞生长的实验研究. *中华理疗杂志*, 2000, 23: 23.

(修回日期: 2006-01-27)

(本文编辑: 吴倩)