

· 基础研究 ·

低强度 He-Ne 激光照射对成纤维细胞功能的调节作用

池景泉 刘承宜 程蕾 李燕 黄平 朱玲 刘颂豪

【摘要】目的 研究低强度 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞增殖及胶原合成功能的调节作用。**方法** 采取固定照射时间、选用不同激光照射强度的方法来研究激光生物调节效应与照射剂量间的关系。采用 MTT 法[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]和羟脯氨酸试剂分别检测不同强度激光照射对细胞增殖及胶原合成功能的影响。**结果** 激光照射剂量由低至高可分为 3 个剂量段,激光强度在第一剂量段时的生物调节效应主要表现为抑制细胞增殖,在第二剂量段时则能促进细胞增殖并抑制胶原合成,在第三剂量段时则可促进胶原合成,且每个剂量段内的激光生物调节效应与照射剂量间大致呈线性相关。上述结果均支持生物信息模型的光生物调节作用分析。**结论** 低强度 He-Ne 激光照射可以调节成纤维细胞的增殖及胶原合成功能,这可能是其促进伤口愈合的相关机制之一。

【关键词】 伤口愈合; 光生物调节作用; 成纤维细胞; 细胞增殖; 胶原合成

The regulative effects of low intensity He-Ne laser irradiation on the function of fibroblast cells CHI Jing-quan*, LIU Cheng-yi, CHENG Lei, LI Yan, HUANG Ping, ZHU Ling, LIU Song-hao. * University Hospital, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

【Abstract】 Objective To investigate the regulative effects of low intensity He-Ne laser irradiation (LIHNLI) on the proliferation of fibroblast cells and collagen synthesis in normal human skin. **Methods** Cultured normal human skin fibroblast cells were treated by LIHNLI with different concentrations. The cell proliferation and collagen synthesis were measured by using of a proliferation colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay and the spectrophotometric method for the determination of hydroxyproline, respectively. **Results** Fibroblast cells were divided into three groups, and cell proliferation was inhibited in the low-dose group, but promoted in the middle-dose group, while the collagen synthesis was inhibited in the middle-dose group, but promoted in the high-dose group. It was found that the effects of LIHNLI were lineally related to irradiation dosage in each group. The photobiomodulation effectes of the biological information model was supported by all results above. **Conclusion** The cell proliferation and the collagen synthesis of normal human skin fibroblast cells could be regulated by LIHNLI, which might be the relative mechanism of promoting wound healing.

【Key words】 Wound healing; Photobiomodulation; Fibroblast; Cell proliferation; Collagen synthesis

光生物调节作用是指低强度单色光或激光对细胞或生物组织的生物功能调节作用。目前对光生物调节作用的伤口愈合效应一直存在争议^[1],根据相关文献报道,有学者曾否定了低强度激光促进伤口愈合的临床应用价值^[2],但随后又有学者肯定了其临床效应^[3]。循证医学研究表明^[4],低强度激光照射对创伤愈合确实具有促进作用,因此有必要利用相关的细胞模型开展进一步研究。

光照射剂量是由照射强度与照射时间共同决定的,但目前相关的基础研究或临床研究对于光照射剂量的应用都是比较混乱的,如人们在改变照射剂量时

往往没有明确指出是固定照射时间或是固定照射强度,有时甚至同时改变照射时间与照射强度,故造成所研究的剂量-效应关系缺乏参考价值。本研究选用固定照射时间、改变照射强度的方法,来观察低强度激光对人正常成纤维细胞增殖及胶原合成功能的调节作用^[5-9],从而探讨激光的光生物调节效应与不同照射剂量间的关系,为临床更好地应用激光提供理论依据。

材料与方法

一、培养液与试剂

DMEM 细胞培养基、无酚红 DMEM 细胞培养基及 2-巯基乙醇购于美国 Gibco BRL 公司;小牛血清购于杭州四季青公司;HEPES 为华美生物工程公司产品;其它所需试剂均为国产分析纯。利用这些试剂配成如下培养液或试剂备用,具体配制方法如下:向 DMEM

作者单位:510631 广州,华南师范大学校医院(池景泉),激光运动医学实验室(刘承宜、程蕾、李燕、黄平、朱玲),信息光电子科技学院(刘颂豪)

通讯作者:刘承宜

细胞培养基内添加 2 mmol/L 谷氨酰胺、25 mmol/L HEPES、16 mmol/L NaHCO_3 、 5×10^{-5} mol/L 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素及 10% 灭活小牛血清。羟脯氨酸试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

二、细胞培养

正常皮肤成纤维细胞由中山大学医学院实验动物中心提供。将细胞制成悬液,取一滴细胞液经 4% 的台盼蓝染色后,于光镜下进行细胞成活率观察,如细胞成活率大于 97%,则接种于 96 孔板(5×10^3 个细胞/孔)中,并加入含 10% 胎牛血清的无酚红 DMEM 细胞培养液,随后再置入 CO_2 培养箱内培养 24 h (5% CO_2 、37℃ 环境下)待用。

三、He-Ne 激光照射及分组

取第 3~6 代细胞制成细胞悬液,接种于 24 孔板中,每孔 1 ml (细胞浓度约为 2×10^5 个/ml),将其置于 CO_2 培养箱(5% CO_2 、37℃ 环境下)内培养 24 h 后,轻轻吸去每孔中含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,并改用无血清、无酚红的 DMEM 培养液继续培养,每孔添加 1 ml 培养液。涉及研究胶原合成的激光照射组根据照射强度的不同,共分为 6 小组,激光照射时间均为 300 s,光斑面积约为 1.91 cm^2 ,照射功率分别为 2.55 mW (能量密度为 401 mJ/cm^2)、3.35 mW (能量密度为 526 mJ/cm^2)、4.55 mW (能量密度为 714 mJ/cm^2)、5.90 mW (能量密度为 926 mJ/cm^2)、9.80 mW (能量密度为 1539 mJ/cm^2) 和 11.00 mW (能量密度为 1727 mJ/cm^2),于照射 48 h 后吸取细胞培养上清液并检测胶原含量。涉及研究细胞增殖的激光照射实验改在 96 孔细胞培养板中进行,细胞培养方法同上,也根据照射强度的不同,分为 6 小组进行照射,激光照射时间均为 300 s,光斑面积约为 1.91 cm^2 ,照射功率分别为 0.10 mW (能量密度为 16 mJ/cm^2)、0.15 mW (能量密度为 24 mJ/cm^2)、0.65 mW (能量密度为 102 mJ/cm^2)、1.90 mW (能量密度为 298 mJ/cm^2)、3.20 mW (能量密度为 503 mJ/cm^2) 及 3.80 mW (能量密度为 597 mJ/cm^2)。上述各项实验均设有对照组,在实验过程中均不给予激光照射,细胞培养方法与各激光照射组一致。

四、细胞增殖水平检测

接种于 96 孔细胞培养板中的人正常皮肤成纤维细胞经不同能量密度的激光照射后,于第 3 天进行 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 法检测。于检测前 4 h (此时细胞培养已终止)轻轻吸去各小孔内上清液 0.1 ml,再加入 5 mg/ml 的 MTT 液 0.01 ml,然后将培养板置入 CO_2 培养箱(5% CO_2 、37℃ 环境下)内继续培养 4 h。待细胞

培养终止后,于每孔中加入 SDS-DMF 溶解液 100 μl ,反应 4 h 后轻轻振荡 15 min,用酶标仪测定 570 nm 处的吸光度(A)值。

五、细胞羟脯氨酸含量检测

待处理样品于激光照射 48 h 后,轻轻吸去细胞培养上清液,按羟脯氨酸检测试剂说明书制备稀释倍数为 1 的检测液,另取 Hyp 标准品作为反应标准对照管,按照羟脯氨酸检测试剂说明书加入相应的试剂,混匀后于 60℃ 水浴中作用 15 min,随后流水冷却,再以 3 500 r/min 的速度离心 10 min,取上清液,于分光光度计下测定 550 nm 处的吸光度(A)值,计算标准曲线回归方程,并以此计算样品含量。以上各项实验操作均重复 6 次,取其平均值纳入研究数据。

六、数据处理及统计学分析

根据相关资料介绍,羟脯氨酸($\mu\text{g/ml}$)含量 = $\frac{\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准管浓度} \times \text{稀释倍数}$; 胶原蛋白($\mu\text{g/ml}$)含量 = 羟脯氨酸($\mu\text{g/ml}$)/13.4% (参照羟脯氨酸检测试剂说明书介绍)。实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示,统计学方法选用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、He-Ne 激光照射对人正常皮肤成纤维细胞增殖水平的影响

He-Ne 激光照射对人正常皮肤成纤维细胞增殖水平的影响详见图 1。设对照组增殖率为 100%,各激光照射组数据以与对照组的百分比表示,其中以激光照射强度为 24 mJ/cm^2 时的增殖抑制作用最为显著($P < 0.05$),而激光照射强度为 503 mJ/cm^2 时的促细胞增殖作用最为明显($P < 0.05$)。

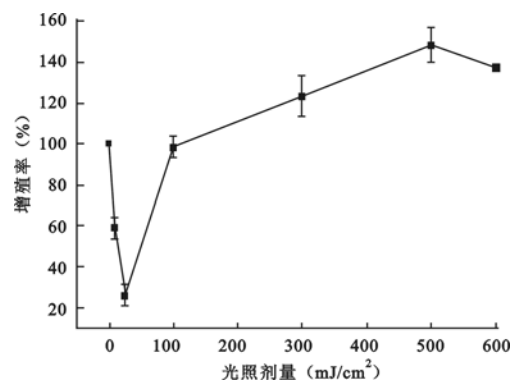


图 1 不同强度激光照射对人正常皮肤成纤维细胞增殖水平的影响

二、He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞胶原合成功能的影响

He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞胶原合成的影响如图 2 所示。在相同的培养条件下, 714 mJ/cm^2

He-Ne 激光照射具有轻度促胶原合成的功效,但与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);926 mJ/cm² He-Ne 激光照射具有显著促进胶原合成的作用($P < 0.05$);而 1 539 mJ/cm² 及 1 727 mJ/cm² He-Ne 激光照射均能极显著地促进胶原合成功能($P < 0.01$)。

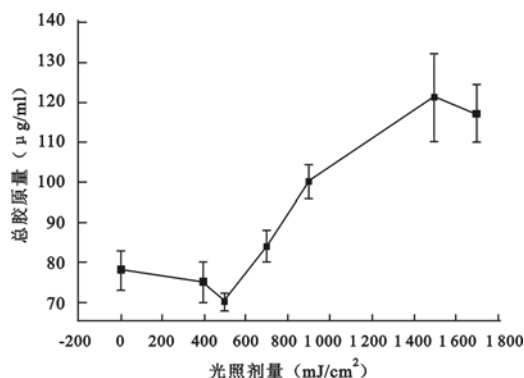


图 2 不同强度 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞胶原合成功能的影响

讨 论

一、低强度 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞的生物调节作用

由于不同强度激光对不同成纤维细胞的光生物调节作用不一致,故本研究选择人正常皮肤成纤维细胞作为细胞模型来观察低强度 He-Ne 激光的生物调节效应。低强度 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞功能的调节是肯定的^[5],但 Colver 等^[6]也曾发现低强度 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞增殖或胶原合成无任何调节作用。Zhang 等^[7]的研究结果表明,628 nm 红光可以通过 MAPK/p38 和启动血小板生长因子的信号通路促进 HS27 成纤维细胞增殖。Al-Watban 等^[8]则进一步从克隆率的角度证实了低强度 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞的增殖具有促进作用。李燕等^[9]研究了麻醉剂(氯胺酮)对低强度 He-Ne 激光促进人正常皮肤成纤维细胞增殖作用的影响,证实氯胺酮可以抑制 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞增殖的促进作用。尽管目前有许多研究均报道了低强度 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞增殖及胶原合成的影响,但还很少见到关于低强度 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞上述影响间的相关性分析。本研究分别观察了不同低强度 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞增殖及胶原合成的影响,并探讨了低强度 He-Ne 激光照射对这两项功能调节作用间的关系。根据本研究结果,可以将低强度 He-Ne 激光剂量段分为三个部分:第一剂量段为 16,24 mJ/cm²;第二剂量段为 298,401,503,526,597 mJ/cm²,第三剂量段为 926,1 539,1 727 mJ/cm²。Al-Watban 等^[8]研

究了低强度 He-Ne 激光(1.25 mW/cm²)照射人正常皮肤成纤维细胞不同时间后的克隆率,发现照射 60 ~ 360 s 可促进细胞增殖,照射 600 s 则抑制细胞增殖。本研究还发现,低强度 He-Ne 激光在第一剂量段主要表现为抑制人正常皮肤成纤维细胞增殖,并且当强度为 24 mJ/cm² 时其抑制增殖效应最为显著($P < 0.05$);第二剂量段(298,503,597 mJ/cm²)则主要表现为促进人正常皮肤成纤维细胞增殖效应,并且以强度为 503 J/cm² 时最为显著($P < 0.05$)。

上述人正常皮肤成纤维细胞经低强度 He-Ne 激光照射后,采用检测细胞羟脯氨酸含量评价胶原合成情况,结果表明强度处于第二剂量段(401,526 mJ/cm²)的 He-Ne 激光照射能显著抑制人正常皮肤成纤维细胞的胶原合成;而第三剂量段的激光照射能显著促进人正常皮肤成纤维细胞的胶原合成($P < 0.05$),并且以强度为 1 539 和 1 727 mJ/cm² 的激光照射效应最为显著($P < 0.01$)。低强度 He-Ne 激光在第二剂量段时能促进人正常皮肤成纤维细胞增殖,抑制人正常皮肤成纤维细胞胶原合成,也就是说该低强度 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞的增殖及胶原合成作用是相互拮抗的。这与 Van Breugel 等^[10]用低强度 He-Ne 激光研究人皮肤二倍体成纤维细胞功能时发现的规律基本一致。

关于光生物调节作用的细胞机制,刘承宜等^[11,12]提出了可解释光生物调节作用的生物信息模型(Biological Information Model of Photobiomodulation, BIMP)。根据 BIMP 分析,低强度 He-Ne 激光的作用效应主要依赖于激光剂量。在不损伤细胞的前提下,照射剂量由低到高可以分为若干剂量段,分别命名为第 n 剂量段, n 越大表明剂量越高。具体对于成纤维细胞而言,根据 BIMP 分析后可知:第一剂量段,He-Ne 激光主要抑制细胞增殖;第二剂量段,He-Ne 激光主要促进细胞增殖,抑制胶原合成;第三剂量段,He-Ne 激光主要促进胶原合成。本研究结果支持 BIMP 的剂量段分类标准,也支持 BIMP 所预测的各个剂量段的功能,这一点对临床应用具有重要意义,例如在进行激光照射治疗时,如所选择的某个剂量不能促进细胞增殖或胶原合成,可以通过增加或降低剂量段来实现所需功能。

二、光生物调节作用的物理学性质

倒易规则指出,只要物质接收到的光子数(剂量)一样,其光效应应该是相同的^[13]。Van Breugel 等^[10]研究了相近剂量但强度不同的激光效应后,发现它们间的差异较大。Karu^[13]研究同一剂量下不同光强的激光生物学效应后,发现激光强度只有在最佳范围时才有明显的光生物调节效应;同时更多的研究则表明倒易规则对于光生物调节作用是不成立的^[14]。

光剂量由照射强度与照射时间共同决定,目前绝大部分剂量-效应关系曲线都是通过固定照射强度、改变照射时间来实现的^[7, 9, 13]。本研究选择了固定照射时间(激光照射 300 s)、改变照射强度的方法来研究剂量效应关系,发现具有细胞生物调节功能的激光强度存在剂量窗现象,处于不同剂量段的激光,其效应是不同的,而且在各个剂量段内的生物调节效应与照射剂量间的关系近似为线性关系。本研究选择改变照射剂量的方法揭示了低强度激光照射的剂量段与所产生的生物效应间具有很好的对应关系,这为临床更合理应用激光提供了很好的参考依据。

三、部分实验的阴性结果原因分析

低强度激光照射对创伤愈合的临床疗效是显然的^[1, 3, 4],但 Lucas 等^[2]的文献综述及最近的部分循证医学研究都得出了阴性结果^[16]。尽管涉及细胞层面的大部分研究^[5, 7-9]都还是阳性结果,但有时也有阴性结果出现^[6]。根据上节的讨论,可以推断倒易规则并不适用于激光对细胞的生物调节效应。Karu^[13]研究指出,同一剂量、不同光强的激光照射只有在最佳强度附近时才存在光生物调节作用。Colver 等^[6]的研究只给出了剂量,并没有给出照射时间或照射强度,故无法深入讨论他们阴性结果的原因。Colver 等^[6]之所以没有发现低强度 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞增殖或胶原合成有任何光生物调节作用,可能是由于他们所选择的激光强度离最佳强度太远的缘故。Lucas 等^[2, 16]在过去及近期的一些循证医学研究中可能也存在着同样问题。

根据前面的讨论,我们知道每种光生物调节功能都有其相应的最佳剂量段,而且不同剂量段的生物调节功能间有着一定的关联,如成纤维细胞的增殖与胶原合成是相互拮抗。如果选择促进细胞增殖的剂量段来观察胶原合成情况,就有可能得到阴性结果。另外,即使选择促进细胞增殖的剂量段来观察激光对细胞增殖功能的调节效应,如果所选择的激光强度与最佳强度相差甚远,也不一定都能观察到显著的生物调节效应。

参 考 文 献

1 Karu TI. A suitable model for wound healing; how many times are we to

- stumble over the same block. *Laser Surg Med*, 1999, 25: 283-283.
- 2 Lucas C, Criens-Poublon LJ, Cockrell CT, et al. Wound healing in cell studies and animal model experiments by low level laser therapy were clinical studies justified. A systematic review. *Lasers Med Sci*, 2002, 17: 110-134.
- 3 Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg*, 2004, 22: 241-247.
- 4 Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, et al. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans; a triple-blind, sham-controlled study. *J Athl Train*, 2004, 39: 223-229.
- 5 Hawkins D, Abrahamse H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg*, 2005, 23: 251-259.
- 6 Colver GB, Priestley GC. Failure of a helium-neon laser to affect components of wound healing in vitro. *Br J Dermatol*, 1989, 121: 179-186.
- 7 Zhang YO, Song SP, Fong CC, et al. CDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol*, 2003, 120: 849-857.
- 8 Al Wathan FA, Andres BL. The effect of He-Ne laser (632.8 nm) and solcoseryl in vitro. *Lasers Med Sci*, 2001, 16: 267-275.
- 9 李燕, 角建筑, 刘承宜, 等. 氯胺酮对低强度 He-Ne 激光照射促人正常皮肤成纤维细胞增殖作用的影响. *中国激光*, 2004, 31: 509-512.
- 10 Van Breugel HH, Bär PR. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-bio-modulation of human fibroblasts in vitro. *Laser Surg Med*, 1992, 12: 528-537.
- 11 刘承宜, 刘颂豪. 低强度激光的生物光子学研究. *中国激光医学杂志*, 1997, 6: 125-131.
- 12 Liu TCY, Jiao JL, Duan R, et al. Membrane mechanism of low intensity photobiomodulation on a cell. In: Simunovic Z, eds. *Lasers in medicine, surgery and dentistry*. Croatia: Eur Med Laser Assoc, 2003. 83-105.
- 13 Karu T. The science of low-power laser therapy. Amsterdam: Gord Brea Sci Pub, 1998. 53-94.
- 14 Schindl A, Rosado-Schlosser B, Trautinger F. Reciprocity regulation in photobiology. *Hautarzt*, 2001, 52: 779-785.
- 15 Sidhu GS, Thaloor D, Singh AK. Enhanced biosynthesis of ECM protein and TGF-beta1 by polyinosinic-polycytidylic acid during cutaneous wound healing in vivo. *J Cell Physiol*, 1996, 169: 108-114.
- 16 Lucas C, Van Gemert MJC, De Haan RJ. Efficacy of low-level laser therapy in the management of stage III decubitus ulcers: a prospective, observer-blinded multicentre randomised clinical trial. *Laser Med Sci*, 2003, 18: 72-77.

(修回日期: 2005-09-13)

(本文编辑: 易 浩)