

· 基础研究 ·

低强度激光照射对小鼠烫伤创面转化生长因子- $\beta 1$ 和白细胞介素- 1β 基因表达的影响

段强 王冰水 单守勤 牟翔 袁华 刘卫

【摘要】目的 观察低强度激光照射后烫伤小鼠创面的变化及其对小鼠创面炎症介导因子转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 和白细胞介素- 1β (IL- 1β) 基因表达的影响。**方法** 将清洁级雄性 BALB/c 小鼠 60 只随机分为激光照射组与对照组, 每组 30 只。2 组小鼠均采用蒸汽烫伤造模。激光照射组小鼠行低强度氦氖激光照射烫伤创面, 对照组治疗时间和疗程同激光照射组, 但仪器处于电源关闭状态。2 组小鼠均于烫伤后即刻和烫伤 1、3、7 和 14 d 后计算创面愈合率, 并取全层创面组织标本, 采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测 TGF- $\beta 1$ 、IL- 1β 的基因表达。**结果** 烫伤 7 和 14 d 后, 激光照射组小鼠的创面愈合率分别为 $(51.48 \pm 5.89)\%$ 和 $(73.96 \pm 7.25)\%$, 与对照组同时间点比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。烫伤 1、3 d 后, 激光照射组 TGF- $\beta 1$ 基因的表达显著增强, 并于烫伤 7 d 后达到峰值, 上述 3 个时间点 TGF- $\beta 1$ 基因表达情况分别与对照组同时间点比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 烫伤 14 d 后, 激光照射组 TGF- $\beta 1$ 基因的表达显著低于对照组同时间点 ($P < 0.05$)。烫伤 1 和 3 d 后, 激光照射组 IL- 1β 基因的表达显著降低, 并于烫伤 7 d 后降至最低, 上述 3 个时间点 IL- 1β 基因表达情况分别与对照组同时间点比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 低强度氦氖激光照射可以加速烫伤创面愈合, 这可能与调节烫伤创面 TGF- $\beta 1$ 和 IL- 1β 因子表达相关。

【关键词】 低强度激光; 炎症; 转化生长因子- $\beta 1$; 白介素- 1β

The effect of low intensity laser irradiation on the expression of transforming growth factor- $\beta 1$ and interleukin- 1β in scalded dermal tissues Duan Qiang, Wang Binghui, Shan Shouqin, Mu Xiang, Yuan Hua, Liu Wei. Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Corresponding author: Wang Binghui, Email: wbshui@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the effect of low intensity laser irradiation on wound healing and the expression of transforming growth factor beta-1 (TGF- $\beta 1$) and interleukin beta-1 (IL- 1β) in wounded tissue. **Methods** Steam was used to scald 60 BALB/c mice. They were then randomly divided into a laser group and a control group with 30 in each group. The wounds in the laser group were irradiated with a low-intensity He-Ne laser, while the control group was given the same treatment except that the instrument was turned off. The wound healing rate was calculated, and the full wound thickness was measured and a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of TGF- $\beta 1$ and IL- 1β right after the scalding and 1, 3, 7 and 14 days later. **Results** Seven and 14 days later, the wound healing rates in the laser group were $(51.48 \pm 5.89)\%$ and $(73.96 \pm 7.25)\%$, respectively. Compared with the control group at the same time points, the difference was statistically significant. In the laser group the expression of TGF- $\beta 1$ had increased significantly at days 1 and 3, then increased to a maximum at day 7. It was significantly greater than in the control group at all three of those time points. At day 14 the expression of TGF- $\beta 1$ in the laser group was significantly lower than in the control group. The expression of IL- 1β in the laser group had decreased significantly at days 1 and 3, and gradually reduced to a minimum at day 7. It was significantly lower than in the control group at all three of those time points. **Conclusion** Low intensity He-Ne laser irradiation can accelerate wound healing after scalding, at least in mice. Its effect may be related to its regulation of the expression of IL- 1β and TGF- $\beta 1$.

【Key words】 Lasers; Inflammation; Transforming growth factor beta-1; Interleukin- 1β ; Scalds

伤口愈合需要多种细胞因子的参与和调控, 过度

释放的炎症因子会加重创面局部和全身的炎症反应, 甚至造成创面加深和坏死。有研究证实, 局部的抗炎和促炎因子的调控, 可促进伤口的愈合, 而低强度激光照射具有生物刺激和调节作用, 可治疗多种原因引起的炎症, 并促进损伤组织的修复^[1]。本研究采用低强度氦氖激光照射烫伤小鼠皮肤伤口, 观察伤口愈合过

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.03.004

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (210JM4019), 应用基础研究项目 (BWS11J003)

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学附属西京医院康复理疗科

通信作者: 王冰水, Email: wbshui@fmmu.edu.cn

程中损伤部位转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor beta-1, TGF- $\beta 1$) 和白细胞介素- 1β (interleukin beta-1, IL- 1β) 的基因表达变化,初步探讨了氦氖激光促进伤口愈合的分子机制。

材料和方法

一、实验动物分组和模型制作

清洁级雄性 BALB/c 小鼠 (第四军医大学实验动物中心提供) 60 只, 体重 (20 ± 2.0) g, 室温下用混合饲料饲养。60 只小鼠按随机数字表法分为激光照射组和对照组, 每组 30 只。实验前, 2 组小鼠均自由饮水, 于禁食 12 h 后以 3% 戊巴比妥钠溶液 (40 mg/kg 体重) 腹腔麻醉, 采用 10% Na₂S 水溶液背部脱毛, 固定于烫伤专用模具上, 将直径 2 cm 的耐热塑料环形模具置于小鼠背部, 挂烫机预热 1 min, 待蒸汽温度稳定在 93 ℃, 将蒸汽喷头紧贴耐热塑料环形模具致伤 5 s。小鼠背部形成深 II 度烫伤创面 (均经病理切片证实), 且经 Meeh's 公式计算, 实际烫伤面积约为体表面积的 20% 即为造模成功^[2]。

二、激光照射方法与标本制作

低强度氦氖激光照射采用上海产 JH30 型氦氖激光治疗仪, 输出功率密度为 20 mW/cm², 波长 632.8 nm, 光斑直径 1 cm, 能量密度 15 J/cm², 分区照射损伤部位。激光照射组于损伤后第 1 天开始照射, 每日上午 10 时照射 1 次, 连续治疗 14 d; 对照组治疗时间和疗程同激光照射组, 但仪器处于电源关闭状态。2 组小鼠均于烫伤后即刻和烫伤 1、3、7 和 14 d 后下午 5 时观察创面愈合情况, 测量创面面积, 并取创面的皮肤标本, 于液氮速冻后, 保存于 -80 ℃ 冰箱。

三、炎性细胞因子的 mRNA 转录水平测定

采用 Trizol 法提取创面组织培养细胞的总 RNA, 参照逆转录试剂盒操作, 并将提取的 RNA 逆转录为 cDNA。引物设计如下, IL- 1β (305 bp): 上游 5'-CTTC-CTTGTGCAAGTGTCTGAAGC-3'、下游 5'-AAGAAG-GTCCTTGGGTCCTCATCC-3'; TGF- $\beta 1$ (398 bp): 上游 5'-ACCGGCCCTTCCTGCTCCTCAT-3'、下游 5'-GGAGCGCACCATCATGTTGGA-3'。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用北京产 Champ Gel™ 型凝胶成像仪观察并拍照保存结果, 将扩增后的 IL- 1β mRNA 和 TGF- $\beta 1$ mRNA 条带及其对应的 β -actin mRNA 条带的 A 值经 Genetools 软件测量后计算出两者的比值, 比较 2 组小鼠在不同时间点伤口愈合过程中 IL- 1β 、TGF- $\beta 1$ 基因的表达量。

四、烫伤创面愈合率计算

烫伤后对创面留取照片、用透明膜描记称量法记

录烫伤后即刻和烫伤 1、3、7、14 d 后的创面面积, 并按公式 (1) 计算创面愈合率^[3]。

$$\text{创面愈合率}(\%) = \frac{(\text{开始烫伤面积} - \text{未愈合创面面积})}{\text{开始烫伤面积}} \quad (1)$$

五、统计学分析

采用 SPSS 17.0 版统计软件包进行数据分析, 所有数据采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 计量资料用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、2 组小鼠创面愈合率比较

烫伤 7 和 14 d 后, 激光照射组小鼠的创面愈合率分别为 $(51.48 \pm 5.89)\%$ 和 $(73.96 \pm 7.25)\%$, 与对照组同时间点比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 1。

表 1 2 组小鼠不同时间点创面愈合率以及 TGF- $\beta 1$ 和 IL- 1β 阳性表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	创面愈合率 (%)	TGF- $\beta 1$	IL- 1β
对照组				
烫伤后即刻	30	0	2.01 ± 1.38	21.93 ± 2.01
烫伤 1 d 后	30	4.09 ± 2.03	2.89 ± 1.70	17.03 ± 2.43
烫伤 3 d 后	30	27.98 ± 3.08	4.98 ± 1.62	10.29 ± 1.88
烫伤 7 d 后	30	43.37 ± 4.97	9.25 ± 1.93	7.41 ± 1.62
烫伤 14 d 后	30	62.85 ± 6.19	7.54 ± 2.09	9.46 ± 2.09
激光照射组				
烫伤后即刻	30	0	2.09 ± 1.49	22.01 ± 1.92
烫伤 1 d 后	30	4.98 ± 2.12	6.17 ± 1.66^a	12.38 ± 2.32^a
烫伤 3 d 后	30	29.52 ± 3.16	12.25 ± 2.14^a	5.48 ± 2.17^a
烫伤 7 d 后	30	51.48 ± 5.89^a	15.29 ± 2.01^a	4.32 ± 1.89^a
烫伤 14 d 后	30	73.96 ± 7.25^a	5.09 ± 2.11^a	9.87 ± 2.13

注: 与对照组同时间点比较, ^a $P < 0.05$

二、2 组小鼠烫伤创面 TGF- $\beta 1$ 和 IL- 1β 基因表达比较

烫伤 1 d 和 3 d 后, 激光照射组 TGF- $\beta 1$ 基因的表达显著增强, 并于烫伤 7 d 后达到峰值, 上述 3 个时间点 TGF- $\beta 1$ 基因表达情况分别与对照组同时间点比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 烫伤 14 d 后, 激光照射组 TGF- $\beta 1$ 基因的表达显著低于对照组同时间点 ($P < 0.05$), 详见表 1。

烫伤 1、3 d 后, 激光照射组 IL- 1β 基因的表达显著降低, 并于烫伤 7 d 后降至最低, 上述 3 个时间点 IL- 1β 基因表达情况分别与对照组同时间点比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 1。

讨 论

本研究结果显示, 2 组小鼠 TGF- $\beta 1$ 基因表达在烫伤 1、3 d 后表达增加, 烫伤 7 d 后达到波峰, 烫伤 14 d

后开始降低,但仍高于损伤初期(烫伤后即刻),呈现出先升后降的趋势,与对照组同时时间点比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。本研究结果提示,TGF- $\beta 1$ 在创伤早期可促进创面愈合,但是在后期过度表达可能会延迟创面的愈合,这与 Wang 等^[4]的研究结果一致。伤口愈合是一个非常复杂的过程,炎症反应伴随始终。TGF- $\beta 1$ 是 TGF- β 细胞因子超家族之一,是目前公认的与创伤愈合关系密切的细胞因子之一^[5],其通过激活细胞内 smad2 和 smad3 介导的信号通路,诱导细胞内目的基因表达和蛋白合成^[6]。在早期,TGF- $\beta 1$ 作为趋化因子,使单核细胞、中性粒细胞和成纤维细胞到达创口,导致炎症反应^[7];在修复期,通过旁分泌或自分泌直接或间接作用于成纤维细胞,促进细胞增生分化,合成大量 I、III 胶原蛋白、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、弹性蛋白等多种细胞外基质成分^[8],并能够刺激创面肉芽组织,增加伤口组织抗张强度,促进创面愈合^[9]。

本研究结果显示,烫伤 1 d 和 3 d 后,激光照射组 IL-1 β 基因的表达显著降低,并于烫伤 7 d 后降至最低,上述 3 个时间点 IL-1 β 基因表达情况分别与对照组同时时间点比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示低强度氦氖激光对小鼠 IL-1 β 基因表达抑制明显;烫伤 14 d 后,激光照射组 IL-1 β 基因表达缓慢增加,与对照组同时时间点比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究结果提示,低强度氦氖激光在早期可降低炎症反应,后期可调节炎症因子 IL-1 β 的表达^[14],加速愈合。IL-1 β 是一种炎性活细胞素,可促进炎症蛋白和炎症递质的释放,增强炎症反应^[10]。皮肤损伤时 IL-1 β 基因表达上调,并通过转录因子核因子- κB 和活化蛋白-1 介导来促进炎症反应基因的表达^[11]。有研究发现,烫伤、感染等应激因素激活体内单核-巨噬细胞系统所产生的细胞因子(IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 等)达到适当浓度时可促进炎症发展并抵抗微生物,但过高的浓度可引起组织损伤,并促进感染性休克的发生^[12],这可能与过度释放的毒性因子(如 IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α)可降低肾上腺素能受体对其激动剂的反应性使受体数目下调,阻碍了受体与肾上腺素之间的偶联有关^[13]。由此可见,伤口愈合时细胞因子网络尤其是 IL-1 β 、TNF- α 等表达水平及功能调节极为重要。

低强度氦氖激光是波长为 632.8 nm 的红光,能够促进伤口愈合。有研究发现,激光照射可以提高血小板衍生生长因子和 TGF- β 的基因表达,降低促炎性细胞因子 IL-1 β 、干扰素- γ 、降低血浆中炎症标志物肿瘤坏死因子- α 及纤维蛋白原等,减轻炎症反应,改善炎症环境^[15]。本研究中,采用低强度氦氖激光对深 II 度烫伤小鼠创面进行照射中发现,TGF- $\beta 1$ 含量表达先升后降,IL-1 β 含量表达先降后缓慢增加。这种升降变

化表明,氦氖激光对创面组织中炎症介导因子 TGF- $\beta 1$ 与 IL-1 β 的基因表达具有调节作用,即在初期减轻炎症反应促进损伤组织修复,恢复期抑制炎症细胞的过度增殖。本研究中,烫伤 7 和 14 d 后,激光照射组小鼠的创面愈合率与对照组同时时间点比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),本结果提示,低强度氦氖激光照射可加快烫伤创面的愈合。

综上所述,低功率氦氖激光照射可通过调节烫伤创面炎性细胞因子 TGF- $\beta 1$ 和 IL-1 β 的基因表达,加速烫伤创面的愈合。

参 考 文 献

- [1] Kuhn A, Porto FA, Miraglia P, et al. Low-level infrared laser therapy in chemotherapy induced oral mucositis: a randomized placebo-controlled trial in children[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2009, 31(1): 33-37.
- [2] 姚庆军,贾赤宇,陈壁,等. 一种大鼠蒸气烫伤模型的建立[J]. *中华烧伤杂志*, 2004, 20(3): 169-170.
- [3] 唐世杰,朱镇森,胡素鑫,等. TGF- $\beta 3$ 基因转染成纤维细胞促进大鼠深 II 度烫伤创面愈合的实验研究[J]. *中华损伤与修复杂志*, 2010, 5(1): 27-28.
- [4] Wang XJ, Han G, Owens P, et al. Role of TGF beta mediated inflammation in cutaneous wound healing[J]. *Investig Dermatol Symp Proc*, 2006, 11(1): 112-117.
- [5] Rhett J M, Ghatnekar G S, Palatinus J A, et al. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds[J]. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(4): 173-180.
- [6] Evans RA, Tian Y C, Steadman R, et al. TGF-beta1 mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of smad proteins[J]. *Exp Cell Res*, 2003, 282(2): 90-100.
- [7] Klass BR, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. Transforming growth factor beta1 signaling, wound healing and repair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance[J]. *Postgrad Med*, 2009, 85(999): 9-14.
- [8] Rolfe K J, Irvine LM, Grobbelaar AO, et al. Differential gene expression in response to transforming growth factor beta1 by fetal and postnatal dermal fibroblast[J]. *Wound Repair Regen*, 2007, 15(6): 897-906.
- [9] Zhang F, Liu H, Stile F, et al. Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2003, 112(6): 1613.
- [10] Bartchewsky W Jr, Martini MR, Masiero M, et al. Effect of Helicobacter pylori infection on IL-8, IL-1beta and COX-2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2009, 44(2): 153-161.
- [11] Ahmed S, Wang N, Lalonde M, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308(2): 767-773.
- [12] Chen J, Zhou Y P, Rong X Z. An experimental study on systemic inflammatory response syndrome induced by subeschar tissue fluid[J]. *Burns*, 2000, 26(2): 149-155.
- [13] 刘都户,栗永萍,程天民. 严重创伤后应激反应的调控机理[J]. *中国病理生理杂志*, 2001, 17(1): 89-92.

(修回日期:2014-12-23)

(本文编辑:阮仕衡)