维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0615-04

低强度脉冲超声波促进皮肤成纤维细胞增殖的实验研究

柯 丹[1,2],李发琪[1],刁庆春[2],朱小娟[2],刘春梅[1],龚晓波[1]

(1.重庆医科大学生物医学工程系/医学超声工程研究所,重庆 400016;2.重庆市第一人民医院皮肤科,重庆 400011)

【摘 要】目的:研究不同辐照参数(频率、声强、辐照时间)低强度脉冲超声波(LIPUS)对成纤维细胞增殖的影响。方法:采用MTT法测定频率 1MHz、1.2MHz、1.7MHz,每一频率下四种声强的 LIPUS,同一声强分别辐照 5min、10min、15min、20min 和 30min 体外培养的人真皮成纤维细胞 24h 后的生长增殖情况,筛选出促进成纤维细胞生长的最适宜频率、声强和辐照时间。结果:①在 MTT 法测定细胞活性中三种频率(1MHz、1.2MHz、1.7MHz),每一频率下四种声强的 LIPUS 辐照成纤维细胞 5min,24h 后吸光光度值均增加,辐照成纤维细胞 10min,24h 后吸光光度值增加最高,较对照组都有显著性差异($P<0.01$)。超过一定辐照时间后,吸光光度值下降,且随着辐照时间的延长,吸光光度值下降显著。②频率 1MHz、声强 0.1W/cm²、辐照时间 10min 下的细胞相对成活率最高,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:不同频率、不同声强的 LIPUS 辐照一定时间均能促进人真皮成纤维细胞增殖,超过一定辐照时间则会抑制细胞生长。而频率 1MHz、声强 0.1W/cm²、辐照时间 10min 为促进成纤维细胞增殖较为适宜的辐照参数。

【关键词】低强度脉冲超声波;成纤维细胞;增殖

【中国图书分类法分类号】R454.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-01-15

Proliferation of cultured skin fibroblast after low intensity pulsed ultrasound exposure

KE Dan, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of different low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on proliferation of fibroblast and to screen out the optimum parameters of LIPUS. *Methods*: LIPUS of different frequency(1、1.2、1.7MHz)and different intensity was used to stimulate the cultured human fibroblast cells for 5 min, 10 min, 20 min and 30min, respectively, and examination of cell proliferation by MTT after 24h. *Results*: ①Optical absorption value of cell activity in MTT assay increased significantly in the cell culture with LIPUS of different frequency (1、1.2、1.7MHz) and four intensity of each frequency treatment for 5, 10 minutes, as compared with the control group ($P<0.01$). With a peak detected in the cell culture with LPUS treatment for 10 minutes. But optical absorption value decreased with longer treat time, optical absorption value decreased significantly in human skin fibroblasts with LIPUS stimulation for more than 30 minutes ($P<0.01$), as compared with the control group. ②The peak relative survival rate detected in the cell culture with LIPUS of 1MHz, 0.1W/cm² treatment for 10 minutes. *Conclusion*: Stimulation with LIPUS could induce cell proliferation at a shorter time and could inhibit cell growth in vitro at a longer time. 1MHz, 0.1W/cm² treatment for 10 minutes is the better parameter for promote cell proliferation.

【Key words】Low intensity pulsed ultrasound; Fibroblast; Proliferation

低强度脉冲超声波(Low Intensity Pulsed Ultrasound, LIPUS)的频率为 1~3MHz,剂量可低至 30mW/cm²,发射方式为脉冲式,其传递给组织的机械能一般低于 3mg/cm²,能克服一般超声波使组织致热的副作用。研究发现 LIPUS 具有刺激细胞增殖和细胞外基质增殖的作用[1,2]。目前 LIPUS 已应用于骨与软组织创伤的愈合,且近年来 LIPUS 在结缔组织疾病的治疗中也得到了越来越多的重视和研究,并逐渐应用于促进神经修复、治疗椎间盘突出以及上皮的修复中。由于 LIPUS 这种独特的生物学活性,我们设想如果 LIPUS 能促进真皮中主要细胞成纤维细胞的增殖,那么将可用于皮肤疾病的治疗和创伤的愈合。本课题旨在研究不同超声辐照参数的 LIPUS 辐照体外培养的人真皮成纤维细胞后,对成

作者介绍:柯 丹(1974-),女,主治医师,硕士,
主要研究方向:皮肤变态反应及超声治疗学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

纤维细胞增殖的影响，筛选出促进人皮肤成纤维细胞增殖的适宜辐照参数，为进一步临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

DMEM 培养基(GIBCO 公司)、新生牛血清(FCS，TBD 公司)、Dispase Ⅱ、四甲基偶氮唑蓝(MTT GIBCO 公司)、0.25%胰蛋白酶(Sigma 公司)、二甲亚砜(DMSO，国产分离纯)、PBS 液(自配)。

1.2 仪器

LIPUS 辐照装置由重庆医科大学医学超声工程研究所研制，其工作频率为 1MHz、1.2MHz、1.7MHz 可调，重复频率 1kHz，输出方式为脉冲式，占空比 20%，标准型超净工作台(SW-CJ-2A 重庆汇城空调净化设备制造有限公司)，CO_2 培养箱 (NUAIR)，倒置显微镜 (日本 Olympus)，酶标仪(S/N 5810)，台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 原代皮肤成纤维细胞培养方法 取健康小儿外科包皮环切手术切下的包皮 1.5cm 大小立即放入含生理盐水的无菌瓶内，迅速带入实验室，立即在超净工作台内进行操作。将皮肤组织块用 75%的酒精冲洗，然后用含青链霉素的 PBS 缓冲液冲洗 3 次。用眼科剪将皮下组织去除，然后将皮肤组织块剪为 0.5cm 大小的组织块，置于 2.5g/L Dispase Ⅱ于 4℃条件下消化作用 14~16h 后将表皮和真皮分离，将真皮组织剪成 1mm 大小，然后将组织块贴附于 6 孔板内，加少量含加 10%FCS 的 DMEM 培养液，放入 37℃恒温和 5%CO_2 的培养箱中培养。3~5 天换液 1 次，待细胞 75%融合，进行传代，取 2~8 代皮肤成纤维细胞进行实验(见图 5A)。

1.3.2 超声辐照 选 2~8 代皮肤成纤维细胞消化，接种于 12 孔培养板中，密度为 1×10^5/ml，2ml/孔。待细胞培养 24h 贴壁后，进行超声辐照。LIPUS 辐照装置的换能器直径 2.5cm，面积 4.9cm²，采用水下辐照法，超声换能器置于培养板底部，距培养板 5mm，脱汽水做介质，声波由下向上发出(图 1)，辐照参数设置如表 1，每剂量组设 3 个重复孔，辐照后立即换液。

表 1 LIPUS 辐照参数设置

频率(MHz)	声强(W/cm²)	辐照时间(min)				
1.0	0.10	5	10	15	20	30
	0.16	5	10	15	20	30
	0.22	5	10	15	20	30
	0.28	5	10	15	20	30
1.2	0.15	5	10	15	20	30
	0.20	5	10	15	20	30
	0.26	5	10	15	20	30
	0.28	5	10	15	20	30
1.7	0.10	5	10	15	20	30
	0.16	5	10	15	20	30
	0.20	5	10	15	20	30
	0.28	5	10	15	20	30

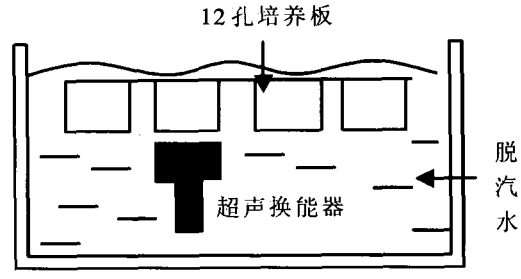


图 1 超声辐照装置示意图

1.3.3 MTT 法观察细胞增殖情况 辐照后培养 24h。倒置显微镜下观察细胞形态。然后去除培养液，每孔加含 DMEM 培养液 1ml 和 100μl MTT。4h 后，去除培养液，加 DMSO 1ml/孔，充分混匀，移至 96 孔板中，200μl/孔。用酶标仪测 OD570nm 值，相对成活值 $=\frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}}$，重复实验 3 次。

2 结 果

2.1 LIPUS 辐照对人皮肤成纤维细胞增殖的影响

MTT 法测定细胞活性的结果显示频率 1MHz 声强 0.10、0.16、0.22、0.28W/cm²，频率 1.2MHz 声强 0.15、0.20、0.26、0.28W/cm²，频率 1.7MHz 声强 0.10、0.16、0.20、0.28W/cm² 的 LIPUS 辐照成纤维细胞 5min，24h 后吸光光度值增加，辐照成纤维细胞 10min，24h 后吸光光度值达到最高，较对照组都有显著性增高，且差异具有统计学意义($P<0.01$)。随着辐照时间的延长，吸光光度值反而下降，且时间越长，下降越显著，辐照细胞超过 30min 后吸光光度值较对照组低，且差异具有统计学意义($P<0.05$)。这表明在频率、声强一定时细胞的增殖与辐照时间有关，辐照 5min 时细胞开始增殖，10min 时细胞增殖达最大，之后又逐渐下降，当 LIPUS 辐照成纤维细胞超过一定时间后 (30min)，细胞的增殖被抑制。(见图 2、3、4)。

2.2 LIPUS 辐照促进人皮肤成纤维细胞增殖的适宜参数

比较不同频率不同声强不同辐照时间下细胞的相对存活值的结果表示：频率 1MHz、声强 0.1W/cm²、辐照时间 5min 时细胞相对成活值为 1.198，10min 时达 1.324，与其它辐照参数组比较差异有统计

维普资讯 http://www.cqvip.com

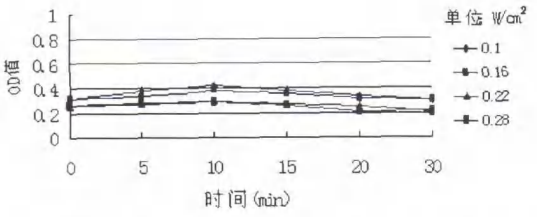


图 2 频率 1MHz 不同声强的 LIPUS 辐照不同时间后 MTT OD 值

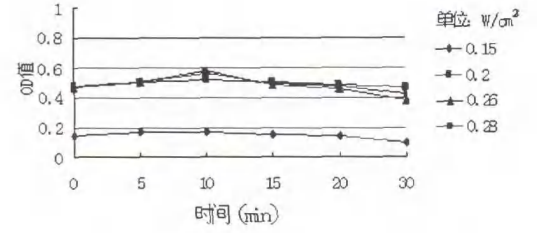


图 3 频率 1.2MHz 不同声强的 LIPUS 辐照不同时间后 MTT OD 值

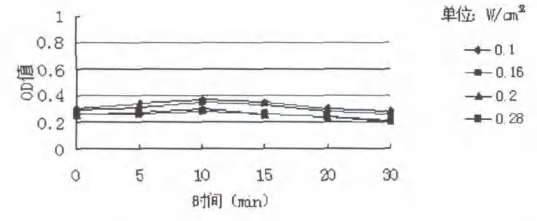
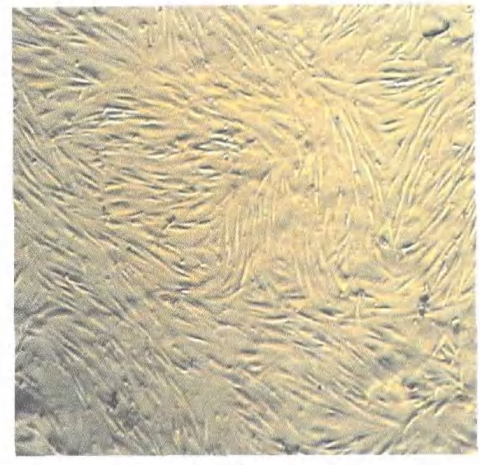
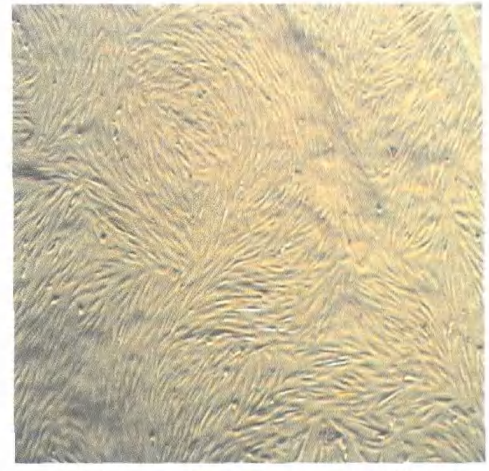


图 4 频率 1.7MHz 不同声强的 LIPUS 辐照不同时间后 MTT OD 值

学意义（$P<0.05$），两者之间比较 $P<0.05$，有统计学意义，见表 2。同时倒置显微镜下亦观察到频率 1MHz、声强 0.1W/cm² 辐照 10min，24h 后成纤维细胞数较未辐照组成纤维细胞数明显增加（见图 5）。说明频率 1MHz、声强 0.1W/cm² 辐照 10min 是促进皮肤成纤维细胞增殖的适宜辐照参数。



正常成纤维细胞（×50）



1MHz，0.1W/cm² 的 LIPUS 辐照 10min24h 后成纤维细胞（×50）

图 5 倒置显微镜下成纤维细胞的生长情况

表 2 不同辐照参数 LIPUS 辐照细胞 24h 后的相对存活值（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

频率（MHz）	声强（W/cm²）	相对成活值				
		5min	10min	15min	20min	30min
1.0	0.10	1.198±0.003	1.324±0.001	1.203±0.001	1.061±0.002	0.965±0.003
	0.16	1.064±0.004	1.224±0.002	1.123±0.003	1.000±0.005	0.967±0.004
	0.22	1.087±0.005	1.167±0.005	1.042±0.004	0.977±0.014	0.787±0.002
	0.28	1.049±0.002	1.122±0.001	0.998±0.002	0.789±0.006	0.830±0.011
1.2	0.15	1.161±0.003	1.164±0.002	1.076±0.008	1.007±0.006	0.713±0.006
	0.20	1.050±0.005	1.089±0.003	1.037±0.003	1.014±0.002	0.972±0.005
	0.26	1.070±0.005	1.222±0.014	1.038±0.002	0.977±0.003	0.828±0.009
	0.28	1.047±0.003	1.182±0.007	1.023±0.005	0.998±0.008	0.890±0.009
1.7	0.10	1.127±0.001	1.215±0.001	1.144±0.002	1.000±0.005	0.935±0.001
	0.16	1.077±0.001	1.219±0.001	1.146±0.002	0.955±0.001	0.885±0.001
	0.20	1.079±0.001	1.153±0.002	1.004±0.001	0.950±0.003	0.824±0.001
	0.28	1.037±0.001	1.421±0.003	0.998±0.001	0.921±0.002	0.792±0.001

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

一定强度的超声波在生物体内传播时可引起生物体功能或结构的变化。目前公认的超声治疗作用有 3 种效应:机械效应、热效应和空化效应。高强度超声波对机体组织器官起抑制或破坏作用[1],低强度、小剂量则起刺激调节作用。LIPUS 传递给组织的能量较低且发射方式为脉冲式,避免了连续超声波使组织过热的副作用,同时还有其独特的非致热性细胞生物学效应。Xavier 和 Duarte[2]等最早于 1983 年将 LIPUS 用于骨不连合的临床治疗中,以后的研究表明,LIPUS 不但可以促进骨细胞的增殖,还可以促进细胞的蛋白合成[3,4],影响细胞因子的分泌[5],目前主要用于促进骨折的愈合以及放射性骨坏死的治疗[6],已获得美国 FDA 认证。

成纤维细胞是真皮组织中的主要细胞,皮肤衰老反映在细胞水平即为细胞衰老,大量研究证明成纤维细胞因其特有的生物学特性改变,在皮肤老化过程中扮演着重要的角色,在老化皮肤尤其是光老化性皮肤中细胞生长受抑制,细胞的分裂活性下降,由具分裂活性的分裂表型转化为不具分裂活性的分裂后表型[7],细胞周期发生改变,出现间隙期阻滞[8],间隙期细胞增加,S 期(DNA 合成期)细胞数下降。如何促进成纤维细胞增殖,是改善皮肤老化的重要途经。同时成纤维细胞增殖是创伤修复中的主要过程之一,在创伤修复的第 2 天成纤维细胞即开始增殖。创伤愈合是以成纤维细胞的增殖、迁移、肉芽组织形成、胶原分泌、创口胶原化、瘢痕形成及改建为特点的过程,成纤维细胞参与了创伤愈合的全过程,其数量及功能变化影响创伤愈合。因此促进成纤维细胞增殖有利于创伤的愈合。本研究通过对体外培养的成纤维细胞的研究结果证实了 LIPUS 辐照在一定时间内能促进真皮成纤维细胞增殖,为 LIPUS 运用于改善和抑制皮肤的老化,促进创伤愈合提供了理论依据。同时超声波的机械作用还可改善局部血液和淋巴循环,改善新陈代谢,促使生长因子及细胞因子等成分的运输加强,提高组织再生能力。

超声波属于机械波的一种,强度和频率是超声波最重要的参数,而超声辐照时间长短也对其效应有重要影响。本实验发现 LIPUS 辐照 10min 时成纤维细胞的增殖率达到高峰;辐照 20min 后细胞的增殖已不明显,而辐照 30min 后可见细胞增殖较对照组明显下降,与孔璐等[9]研究相似,但通常用于骨折愈合的治疗时间为 20min[10],很多研究也发现 20min 的治疗对骨组织来说是最佳治疗时间,说明 LIPUS 对不同的作用靶点效应不同,我们在应用 LIPUS 时应根据不同的目的选用适宜的辐照方式。本实验选用不同频率、强度的 LIPUS 按不同时间辐照体外培养的人真皮成纤维细胞,观察细胞的增殖情况,筛选出促进其增殖的适宜辐照参数为频率 1MHz、声强 0.1W/cm^2、辐照时间 10min,可作为今后的临床应用的参考辐照参数。

参 考 文 献

[1] 王春毅,杨祖奎,张 军,等.聚焦超声对肝癌细胞 SMMC7721 增殖能力的影响[J].重庆医科大学学报,2005;30(1):5-8.

[2] Xavier CAM, Duarte LR.Stimulation of bone callus by ultrasound[J].Rev Brasil Orthop,1983;18(1):73-80.

[3] Sun JS,Hong RC,Chang WH,et al.In vitro effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells[J].J Biomed Mater Res,2001;57(3):449-456.

[4] Zhang ZJ,Huckle J,Francomano CA,et al.The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability,proliferation,gene expression and matrix production[J].Ultrasound Med Biol,2003;29(11):1645-1651.

[5] Li JK,Chang WH, Lin JC,et al.Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation[J].Biomaterials,2003;24(13):2379-2385.

[6] Sena K,Leven RM,Mazhar K,et al. Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells[J].Ultrasound Med Biol,2005;31(5):703-708.

[7] 刘仲荣,张国威,刘荣卿,等.8-MOP/VUA 诱导培养真皮成纤维细胞衰老的作用[J].中国皮肤性病学杂志,2002;17(5):307-310.

[8] Gentile,Massimiliano,Latonen,et al.Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation—induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses[J].Nucleic Acids Research,2003;31(16):4779-4790.

[9] 孔 璐,杨 红,赵进顺.低剂量脉冲超声波对培养细胞的生物学效应[J].中国工业医学杂志,2005;18(1):16-18.

[10] Warden SJ,Favaloro JM,Bennell KL,et al.Low-intensity pulsed ultrasound stimulates a bone-forming response in UMR-106 cells[J].Biochem Biophys Res Commun,2001;286(3):443-450.