DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.032
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
1094 2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)11-1094-03

He-Ne激光重复照射抑制培养增生性瘢痕成纤维细胞胶原合成的实验研究

舒 彬[1],郝林林[1],代佳平[2],吴宗耀[3] (第三军医大学:[1]附属大坪医院康复理疗科,重庆 400042;[2]基础医学部分子遗传学教研室;[3]附属西南医院康复理疗科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨He-Ne激光重复照射对培养增生性瘢痕成纤维细胞胶原合成的抑制作用。方法 以不同功率密度(10、50、100和150 mW/cm^2)He-Ne激光照射培养增生性瘢痕成纤维细胞30 min,1/d,连续照射3 d,在3 d重复照射后24 h用^{3}H-脯氨酸掺入法和斑点杂交法分别检测成纤维细胞胶原合成和I型前胶原基因表达。结果 培养增生性瘢痕成纤维细胞的胶原合成、I型前胶原基因表达水平在10、50 mW/cm^{2}照射后无变化,100 mW/cm^{2}重复照射后降低,与对照组相比有显著性差异($P<0.05$);以150 mW/cm^{2}重复照射,细胞胶原合成与I型前胶原基因表达水平亦显著低于对照组($P<0.05$),且150 mW/cm^{2}照射后的I型前胶原基因表达水平低于100 mW/cm^{2}照射($P<0.05$)。结论 100 mW/cm^{2}或150 mW/cm^{2}功率密度He-Ne激光重复照射能抑制培养增生性瘢痕成纤维细胞胶原合成,原因可能与I型前胶原基因表达下调有关。

关键词:He-Ne激光;增生性瘢痕,成纤维细胞;胶原合成;I型前胶原mRNA
中图法分类号:R730.57/R619.6 文献标识码:A

Inhibitory effects of He-Ne laser repeated irradiation on collagen synthesis in hypertrophic scar-derived fibroblasts in culture

SHU Bin, HAO Lin-lin, DAI Jia-ping, WU Zong-yao (Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory effects of He-Ne laser repeated irradiation on the collagen synthesis of cultured scar fibroblasts. **Methods** Cultured fibroblasts derived from hypertrophic scars (HS) were irradiated with He-Ne laser for 30 min at various power densities (10 mW/cm^2, 50 mW/cm^2, 100 mW/cm^2 and 150 mW/cm^2), once a day for 3 consecutive days. In 24 h after repeated irradiation collagen production and type I procollagen mRNA level of fibroblasts were measured with the incorporation of [^{3}H] proline and blot hybridization techniques respectively. **Results** Collagen synthesis and type I procollagen mRNA level remained unchanged when the laser was irradiated at the power density of 10 mW/cm^2 or 50 mW/cm^2. Compared with control, collagen synthesis and type I procollagen mRNA level were significantly decreased at the power density of 100 mW/cm^2 or 150 mW/cm^2 ($P<0.05$). Type I procollagen mRNA level at the power density of 150 mW/cm^2 was lower than that at 100 mW/cm^2 ($P<0.05$). **Conclusion** Repeated He-Ne laser irradiation at the power density of 100 mW/cm^2 or 150 mW/cm^2 can suppress collagen synthesis of cultured fibroblasts in HS. The cause of suppression may be associated with down-regulation of type I procollagen mRNA expression.

Key words: He-Ne Laser; hypertrophic scar, fibroblast; collagen synthesis; type I procollagen mRNA

增生性瘢痕(Hypertrophic scar, HS)是以胶原等结缔组织基质的过量产生与沉积为特征的皮肤纤维化疾患,因此,抑制成纤维细胞的胶原合成与沉积是防治增生性瘢痕的重要途径[1]。本实验采用不同功率密度的He-Ne激光重复照射培养增生性瘢痕成纤维细胞,探讨He-Ne激光对胶原合成的抑制效应,试图将低强度He-Ne激光用于增生性瘢痕的防治。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

HN-120型大功率He-Ne激光照射仪为重庆万力兴科技开发公司生产,CLP-1型柱状激光功率计为北京放射医学研究所生产,LKB-1217型液体闪烁计数仪为LKB公司,LS-9000型薄层

作者简介:舒 彬(1968-),男,重庆市人,主治医师,主要从事创伤康复的基础与临床方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68757356

收稿日期:2000-01-24;修回日期:2000-09-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

扫描仪为 SHIMADIU 公司, ^{3}H-脯氨酸购自中国原子能科学研究院同位素研究所, 含人 I 型前胶原 cDNA 质粒由美国 Uitto 博士馈赠, DNA 限制内切酶 *EcoR* I 购自华美生物工程公司, 地高辛 DNA 标记与检测试剂盒购自 Boechringer 公司, 质粒抽提与纯化试剂盒购自 Qiagen 公司, 总 RNA 抽提试剂盒、DMEM 为 Gibco BRL 公司, 胰酶、β-氨基丙腈为 Sigma 公司, 小牛血清购自杭州四季春公司。

1.2　细胞培养与分组

人体增生性瘢痕 5 例, 年龄 12～31 岁, 其中男 2 例, 女 3 例, 瘢痕存在时间 9～12 月。按组织块法行成纤维细胞的原代培养[2], 于含有体积分数为 10% 小牛血清的 DMEM 培养基、CO_2 培养箱中, 100% 湿度、37 ℃条件下培养, 待培养细胞完全融合后, 用质量分数为 0.25% 胰酶与 0.02% EDTA-Na_2 共同消化传代, 每 4～5 d 传代 1 次, 以 4～10 代细胞为实验细胞。

以 5 000 个/孔密度将细胞接种于 96 孔培养板, 间隔一行一列接种, 每个培养板接种 5 孔, 相应分为 10、50、100、150 mW/cm^2 组和对照组, 前 4 组采用相应功率密度照射, 对照组没有进行激光照射。共接种 10 个培养板, 其中 5 个培养板用于测定胶原合成, 另 5 个培养板用于研究 I 型前胶原基因表达。细胞接种后在 CO_2 培养箱中继续培养 24 h, 然后进行激光照射。激光照射前弃培养液, Hanks 平衡液冲洗, 激光直接照射无培养液细胞, 每次照射后即刻添加新鲜培养液。

1.3　照射方法

He-Ne 激光照射仪波长 632.8 nm, 携带 3 根输出光纤。照射前调整光纤距离, 使光斑完全覆盖整个培养孔底部(面积 0.32 cm^2), 垂直照射, 实际输出功率由功率计测定, 本研究输出功率分别为 3、16、32 和 48 mW, 相应功率密度约为 10、50、100 和 150 mW/cm^2, 照射时间为 30 min, 1/d, 连续照射 3 d。

1.4　细胞胶原合成测定

激光重复照射 3 d 后 24 h, 弃培养液, 加入无血清培养液 100 μl、0.5 μCi ^{3}H-脯氨酸、抗坏血酸(50 μg/ml)和 β-氨基丙腈(100 μg/ml), 继续培养 24 h 后, 消化收集细胞于过氯酸预处理的玻纤滤纸上, 用质量分数为 5% 的三氯醋酸和甲醇冲洗滤纸数次, 干燥后进行闪烁计数, 测定^{3}H-脯氨酸掺入量。

1.5　Ⅰ型前胶原基因表达检测

Ⅰ型前胶原 cDNA 质粒的酶切鉴定与探针标记见文献[3]。激光重复照射 3 d 后 24 h, 消化收集细胞, 一步法抽提细胞总 RNA; 取 10 μl RNA 水溶液, 加入相应甲酰胺、甲醛和 20× SSC, 68 ℃孵育 15 min, 使 RNA 变性, 然后用点样器将 RNA 点样于 NC 膜上, 80 ℃烤箱干烤 3 h, 封入塑料袋中, 加预杂交液浸润 NC 膜, 42 ℃预杂交过夜; 按 0.5 ml 预杂交液加 1 μl 探针的比例加入探针, 42 ℃杂交 24 h; 分别用缓冲液Ⅰ、Ⅱ洗膜, 而后加入 1∶5 000抗体, 37 ℃作用 30 min; 再用缓冲液Ⅰ、Ⅲ漂洗, 加显色液在暗处显色, 显色适度后, 用缓冲液Ⅳ终止反应, 用薄层扫描仪进行密度扫描分析, 确定 I 型前胶原 mRNA 的相对量[5]。

1.6　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用本校数学教研室的 SPMR 统计软件进行 t 检验。

2　结果

成纤维细胞胶原合成在 10、50 mW/cm^2 He-Ne 激光重复照射无改变, 100 mW/cm^2 照射后降低, 与对照组相比差异显著($P<0.05$), 150 mW/cm^2 重复照射后的胶原合成量亦显著低于对照组($P<0.05$)。

成纤维细胞 I 型前胶原基因表达在 10、50 mW/cm^2 照射后无明显变化, 100、150 mW/cm^2 重复照射后降低, 与对照组相比差异都显著($P<0.05$), 且 150 mW/cm^2 照射后的Ⅰ型前胶原基因表达水平低于 100 mW/cm^2 照射($P<0.05$), 见表 1, 图 1。

表 1　**He-Ne** 激光对成纤维细胞胶原合成与 **I** 型前胶原基因表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of He-Ne laser on collagen synthesis and type I procollagen mRNA level of cultured fibroblasts in HS($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Collagen synthesis (1×10^{-4} dpm△)	Type Ⅰ procollagen mRNA level
Control	5	274.32±14.56	64.32±5.16
He-Ne laser irradiated			
10 mW/cm^2	5	267.39±13.53	62.15±4.98
50 mW/cm^2	5	252.41±12.87	58.01±4.94
100 mW/cm^2	5	185.34±4.86*	48.25±4.72*
100 mW/cm^2	5	126.13±4.21*	29.57±3.24#*

△: 1 dpm= 60 Bq;　*: $P<0.05$ *vs* control;　#: $P<0.05$ *vs* power density of 100 mW/cm^2

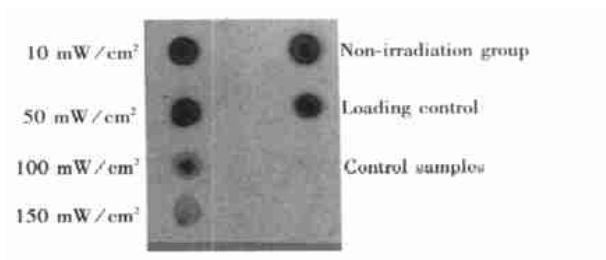


图 1　培养成纤维细胞中 **I** 型前胶原 **cDNA** 斑点杂交

Fig 1　Blot hybirdization of type I procollagen cDNA in cultured fibroblasts

3　讨论

以往研究表明 CO_2 激光、氩离子、Nd:YAG 激光等高强度激光能抑制成纤维细胞胶原合成[5], 但仅为暂时性, 高强度激光照射后常常在局部形成新创面, 故不可避免地出现瘢痕再生, 大量临床实践已证实, 采用高强度激光治疗增生性瘢痕, 效果不理想[6]。630 nm 波长是成纤维细胞的吸收峰之一[7], 低强度 He-Ne 激光(632.8 nm 波长)照射, 无论照射时间多长都不会损伤局部组织, 但它能否用于增生性瘢痕的防治, 则不清楚。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

低强度 He-Ne 激光对胶原合成的生物刺激效应已有大量报道,临床上广泛使用低强度激光的这种特性来促进创伤愈合、治疗顽固性溃疡等[8],但低强度激光对细胞胶原合成的抑制效应则存在明显争议[9],本文以不同功率密度 He-Ne 激光重复照射培养瘢痕成纤维细胞,结果发现 10、50 mW/cm^2 重复照射后,细胞胶原合成无明显改变,100、150 mW/cm^2 照射后显著降低,提示 He-Ne 激光对培养瘢痕成纤维细胞胶原合成的抑制作用可发生在 100 mW/cm^2 或 150 mW/cm^2 功率密度水平。

增生性瘢痕组织中Ⅰ型前胶原基因表达增强,约为正常皮肤的 3~4 倍[10]。本实验发现Ⅰ型前胶原基因表达水平在 10、50 mW/cm^2 重复照射后无变化,而 100、150 mW/cm^2 照射后显著降低。Ⅰ型前胶原基因表达变化与细胞胶原合成改变相一致,提示 He-Ne 激光对培养增生性瘢痕成纤维细胞胶原合成的抑制效应可能与Ⅰ型前胶原基因表达下调相关。

He-Ne 激光的功率密度不同,对细胞胶原合成的影响不同。100 或 150 mW/cm^2 He-Ne 激光重复照射能抑制培养瘢痕成纤维细胞胶原合成,提示临床上也许可采用大功率密度 He-Ne 激光来治疗增生性瘢痕。

参考文献:

[1] 杨松林,何清濂. 胶原代谢的控制与病理性瘢痕的防治[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1997, 13(1): 66—68.

[2] 司徒镇强, 吴军正, 主编. 细胞培养[M]. 天津: 世界图书出版公司, 1996. 45—55.

[3] 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 250—285.

[4] Ghahary A, Shen Y J, Scott P G, *et al*. Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor-α, type Ⅰ and type Ⅲ procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissues[J]. J Lab Clin Med, 1993, 122(4): 465—473.

[5] Sherman R, Rosenfeld H. Experience with the Nd: YAG laser in the treatment of keloid scars[J]. Ann Plast Surg, 1988, 21(3): 231—235.

[6] Alster T S. Laser treatment of hypertrophic scars, keloids and striae[J]. Dermatol Clin, 1997, 15(3): 419—429.

[7] van Breugel H H, Bar P R. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts *in vitro*[J]. Lasers Surg Med, 1992, 12(5): 528—537.

[8] 黄卓正, 李峻亨, 主编. 现代激光医学[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1996. 76—78.

[9] Basford F R. Low-energy laser therapy: Controversies and new research findings[J]. Lasers Surg Med, 1989, 9: 1—5.

[10] Zhang L Q, Laato M, Muona P, *et al*. Normal and hypertrophic scars: Quantification and localization of messenger RNAs for type Ⅰ, Ⅲ and Ⅳ collagens[J]. Br J Dermatol, 1994, 130(3): 453—463.

(编辑 薛国文)

(上接 1093 页)

实质性和囊性肿瘤及其内部结构与周围大血管的关系;④磁共振成象(MRI)可清楚地显示纵隔的囊性和实性肿瘤,提供冠状面图像,其特有的"流空效应"尚可明显地区分血管病变;⑤经皮穿刺活检,因纵隔肿瘤的多样性和复杂的组织来源,有时难以病理确诊,且尚有发生和加重瘤内出血和/或误穿胸内大血管瘤而造成致命性意外的危险,故应慎重;⑥选择性地进行纤维支气管镜及食管镜检查,可了解肿瘤的外侵和压迫情况,有助于精心设计手术方案,做好术前准备[2]。

切口选择:应以尽量靠近瘤体、暴露充分为切口选择原则。对病变位于前纵隔且偏于一侧者,可采用单侧前肋间切口,如发现肿瘤延伸至对侧时可横断胸骨,扩大切口。对凸向双侧的前纵隔肿瘤,可采用胸骨正中劈开切口。对中、后纵隔肿瘤或位于一侧胸腔的巨大纵隔肿瘤,应选用后外侧切口。若瘤体较大从颈部降入前、中纵隔或偏于一侧者,宜采用颈、胸分别或联合切口。我们曾采用半蛤壳状切口[3]向颈部略作延伸,对 1 例蒂部位于颈部的后纵隔巨大神经鞘瘤完整切除,取得良好效果。

巨大纵隔肿瘤的治疗:本组 15 例长径达 10 cm 以上的巨大纵隔肿瘤中有 6 例均占据相当于一侧胸腔的 1/2 以上,其中 4 例致全肺受压萎陷。巨大纵隔肿瘤不仅因其临床表现复杂,如合并胸腔积液、肺部感染等致使诊断困难,还因其占据大部或全部胸腔并与周围粘连严重,甚至侵犯或包绕重要血管使其手术切除十分困难。因此,术前应了解瘤体与心脏、大血管等重要器官的关系,做好充分准备。术中宜仔细探明与邻近器官的关系后方可摘除。本组 1 例类癌侵及心包、包绕上腔静脉者,术中采用上腔静脉插管至右房,于肿瘤上、下缘阻断血管后,细心分离,完整切除肿瘤。2 例巨大畸胎瘤侵犯肺、支气管者附加肺叶和肺段切除。1 例截瘫病人为巨大神经鞘瘤,呈哑铃状经椎间孔侵入椎管内,完整切除肿瘤后,痊愈出院。对于囊性病变采用先行穿刺或切开囊腔尽可能吸出内容物后再分离切除囊壁。对包膜完整、表面血供不丰富的实质性肿瘤采取分块部分切除。对与大血管粘连不能分离时,宁可残留部分肿瘤组织,采用碘酒或石炭酸烧灼,此法既安全,又不影响疗效。本组 3 例探查手术,均为侵犯头臂血管和肺门,无法分离。

关键词:纵隔肿瘤;外科

中图法分类号:R734.5 文献标识码:B

参考文献:

[1] Strollo D C, Rosado de Christenson M L, Jett J R. Primary mediastinal tumors. Part 1: Tumors of the anterior mediastinum[J]. Chest, 1997, 112(2): 511—522.

[2] 陈龙奇, 平育敏, 张合林, 等. 巨大纵隔肿瘤的临床特点及外科治疗[J]. 中华肿瘤杂志, 1996, 18(6): 448—450.

[3] Bains M S, Ginsberg R J, Jons W G, *et al*. The clamshell incision: An improved approach to bilateral pulmonary and mediastinal tumor[J]. Ann Thorac Surg, 1994, 58(1): 30—33.

(编辑 冯崇英)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net