

文章编号: 0258-7025(2004)04-0509-04

# 氯胺酮对 He-Ne 激光照射促人正常皮肤成纤维细胞增殖作用的影响

李 燕<sup>1</sup>, 角建瓴<sup>2</sup>, 刘承宜<sup>1,3,\*</sup>, 洪 岸<sup>4</sup>, 刘颂豪<sup>5</sup>

华南师范大学<sup>1</sup> 激光运动医学实验室,<sup>5</sup> 信息光电子学院, 广东 广州 510631

暨南大学<sup>2</sup> 中医系,<sup>4</sup> 生物工程研究所, 广东 广州 510632

<sup>3</sup> 华中科技大学教育部生物医学光子学重点实验室和激光技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430074

**摘要** 针对动物模型伤口的光生物调节作用,用 He-Ne 激光对人正常皮肤成纤维细胞增殖的促进作用作为细胞模型,研究了麻醉药氯胺酮的影响。用 MTT 法测定细胞增殖作用,分别研究了 1.56 mW/cm<sup>2</sup> He-Ne 激光(0,10,30,100 和 300 s 照射)对人正常皮肤成纤维细胞的增殖作用和氯胺酮(0,0.6,1.2 和 2.0 μg/mL)预处理对 He-Ne 激光(300 s 照射)细胞增殖作用的影响。氯胺酮(0.6,1.2,2.0 μg/mL)预处理能抑制 468.7 mJ/cm<sup>2</sup> He-Ne 激光促人正常皮肤成纤维细胞增殖的作用。这说明动物实验中用于麻醉的药物可能对激光促进伤口愈合的实验结果有影响。

**关键词** 激光技术;成纤维细胞;低强度激光;氯胺酮

中图分类号 R 318.51 文献标识码 A

## Effects of Ketamine in Combination with 468.7 mJ/cm<sup>2</sup> He-Ne Laser Irradiation on Proliferation in Human Skin Fibroblasts

LI Yan<sup>1</sup>, JIAO Jian-ling<sup>2</sup>, LIU Cheng-yi<sup>1,3,\*</sup>, HONG An<sup>4</sup>, LIU Song-hao<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Laser Sport Medicine Laboratory, <sup>5</sup> School for Information and Optoelectronic Science and Engineering, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China

<sup>2</sup> Department of Traditional Chinese Medicine, <sup>4</sup> Institute of Biological Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

<sup>3</sup> The Key Laboratory of Biomedical Photonics of Ministry of Education of China and State Key Laboratory of Laser Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China

**Abstract** Based on the photobiomodulation on wound healing of animal models, the stimulative effects of He-Ne laser irradiation on proliferation of human normal skin fibroblasts were used as the cell model to investigate the role of ketamine as an anesthetics in animal model experiments in this paper. The cell proliferation was measured using MTT-based colorimetric assay. The effects of 1.56 mW/cm<sup>2</sup> He-Ne laser irradiation on human normal skin fibroblasts for 0, 10, 30, 100, 300 s, and on the cells preincubated with different concentrations of ketamine (0, 0.6, 1.2, 2.0 μg/mL) for 300 s were investigated, respectively. The results show that human normal skin fibroblast proliferation induced by He-Ne laser irradiation (468.7 mJ/cm<sup>2</sup>) was inhibited when the cells were preincubated with different concentrations of ketamine (0.6, 1.2, 2.0 μg/mL). These results suggest that anesthetics may affect photobiomodulation on wound healing.

**Key words** laser technique; fibroblast; low intensity laser; ketamine

收稿日期:2002-10-29;收到修改稿日期:2003-02-12

**基金项目** 美国激光医学会 2001 年度暑期资助项目、国家自然科学基金(60178003 和 6027812)、广东省自然科学基金团队项目(20003061)和重点项目(20011480)、华中科技大学激光技术国家重点实验室开放基金以及广东省“千百十工程”优秀人才培养基金(Q02087)资助项目。

**作者简介** 李 燕(1977—),女,广东韶关人,现为华南师范大学 2000 级硕士研究生,研究方向为光生物学。E-mail: liyan9696@21cn.com

\* 通信联系人。

## 1 引 言

低强度激光(LIL)疗法的输出功率一般为毫瓦量级,照射组织不仅温度无明显改变,对组织无病理损害而且还会产生治疗疾病的生物刺激作用。如何加速创伤愈合是临床医学和运动医学研究的重要课题之一。在这一方面,低强度激光疗法有望成为一种重要的治疗手段。但是,低强度激光照射治疗实验动物伤口愈合的实验结果的不一致一直是阻碍其发展的严重障碍。我们在总结大量低强度激光治疗动物皮肤伤口模型的实验中发现:有的低强度激光能促进动物的伤口愈合,有的低强度激光不能促进动物的伤口愈合,而在很多低强度激光无效的试验中,麻醉动物所用的麻醉剂为氯胺酮<sup>[1~7]</sup>。

成纤维细胞是创伤发生后伤口底部及边缘未分化的间充质细胞和静止的纤维细胞转化而成的。成纤维细胞增殖在创伤修复中起着重要作用。低强度激光能通过促进成纤维细胞的增殖达到创伤愈合的加速、移植组织的再生等效果<sup>[8]</sup>。

氯胺酮是 NMDA 受体  $Ca^{2+}$  通道孔的非竞争性抑制药<sup>[9]</sup>。对氯胺酮的研究集中在其对神经系统的影响上。

在低强度激光治疗伤口的研究中,许多学者用成纤维细胞培养,观测其对创伤愈合的影响。本文观察氯胺酮对 He-Ne 激光促人正常皮肤成纤维细胞增殖作用的影响,以初步探讨低强度激光疗法对实验动物模型治疗结果不一致的原因,为低强度激光广泛应用于临床打下初步基础。

## 2 材 料 和 方 法

所用的激光器件为 400-A 型 He-Ne 激光器,波长 632.8 nm,光导纤维末端输出功率 0.5 mW。

培养液用 RPMI 1640 细胞培养液(Gibco BRL),另备无酚红 RPMI1640 细胞培养液。MTT 试剂(Sigma)用 pH7.2 PBS 配成 5 mg/mL,0.22  $\mu$ m 滤器过滤除菌,4℃避光保存。SDS-DMF 溶解液用 20%(W/V) SDS(Sigma)溶于 50%(V/V) DMF(Amerco)去离子水中,以 1 mol/LHCl 调 pH 至 2.0 左右。氯胺酮为 Hampshire 产品。

### 2.1 细胞培养

正常人皮肤成纤维细胞 HSF 的培养。收集 HSF 细胞,经 4%的台盼蓝染色后光镜下观察,细胞成活率大于 97%,然后接种于 96 孔板,接种量分为  $5 \times 10^3$ /孔,加无酚红 RPMI1640 细胞培养液,置

37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。以下实验均做 6 组重复处理。

### 2.2 He-Ne 激光照射细胞的实验分组

1) 对照组:不给激光照射。2) 激光照射组:分 3 组照射参数,功率为 0.5 mW,光斑面积为 0.32 cm<sup>2</sup>(96 孔板),照射时间分为 10 s(能量密度 15.6 mJ/cm<sup>2</sup>),30 s(46.8 mJ/cm<sup>2</sup>),100 s(156.3 mJ/cm<sup>2</sup>)和 300 s(468.7 mJ/cm<sup>2</sup>)三种,每日照射 1 次,共照射 3 天。

### 2.3 细胞增殖状态检测

接种于 96 孔的 HSF 细胞经不同能量密度激光照射 3 天后,进行 MTT 检测<sup>[10]</sup>。MTT 比色分析法的原理是利用活细胞线粒体对 MTT[3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide]的代谢产生紫色的 formazane 结晶,溶解结晶后,可通过直接测定光吸收反映出细胞的增殖和衰减。培养终止前 4 h,轻轻吸出上清 100  $\mu$ L 于各小孔内加入 5 mg/mL MTT 液 0.01 mL。将小板送回 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 4 h。培养中止时,加入 SDS-DMF 溶解液 100  $\mu$ L,4 h 后,轻轻振荡 15 min,用酶标仪(EL311S,Bio-Tek Instruments)测定吸光度,检测波长为 570 nm,参考波长为 630 nm。

### 2.4 氯胺酮对细胞增殖作用的实验分组

1) 对照组:不加任何药物;2) 氯胺酮组:分为 3 个亚组。氯胺酮的终浓度分别为 0.6,1.2,2.0  $\mu$ g/mL。于第 3 天终止培养后,用 2.3 所示方法但不照射激光测定细胞增殖状态。

### 2.5 氯胺酮对细胞增殖作用影响的实验分组

把 2.2 中最能刺激成纤维细胞增殖的剂量用作这一步骤的照射剂量。1) 对照组:不给药物和激光照射;2) 单纯照激光组:功率为 0.5 mW,光斑面积为 0.32 cm<sup>2</sup>(96 孔板),照射时间均为 300 s(能量密度 468.7 mJ/cm<sup>2</sup>),每日照射 1 次,共照射 3 天;3) 激光照射+药物组:分为 4 个亚组。激光剂量与 2) 组相同。氯胺酮的终浓度分别为 0,0.6,1.2,2.0  $\mu$ g/mL。人正常成纤维细胞经激光照射和药物处理 3 天后,进行 MTT 检测。

### 2.6 统计学分析

实验结果进行 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有显著性, $P < 0.01$  为差异有极显著性。

## 3 结 果

### 3.1 激光促细胞增殖作用

图 1 显示,468.7 mJ/cm<sup>2</sup> He-Ne 激光照射最能

促进细胞增殖 (\*  $P < 0.05$ )。100% 为对照组, 激光照射组以空白组的百分比表示。

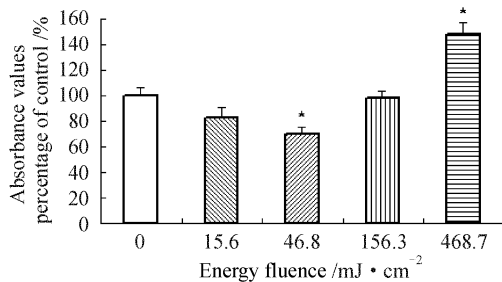


图 1 不同剂量 He-Ne 激光照射对人正常成纤维细胞的影响

Fig. 1 Effects of He-Ne laser irradiation at different doses on proliferation of HSFs

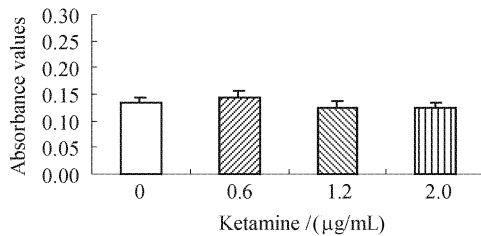


图 2 氯胺酮对人正常成纤维细胞的影响

Fig. 2 Effects of ketamine on proliferation of HSFs

### 3.2 氯胺酮对细胞增殖的作用

图 2 显示, 氯胺酮对成纤维细胞生长没有明显作用。各剂量组与对照组以及各剂量组间均不存在显著差异 ( $P > 0.01$ )。

### 3.3 氯胺酮对 He-Ne 激光照射促人正常皮肤成纤维细胞增殖作用的影响

图 3 显示, 与对照组 (0 mJ/cm<sup>2</sup> 激光照射 + 氯胺酮 0 μg/mL) 相比较, 468.7 mJ/cm<sup>2</sup> 激光照射 +

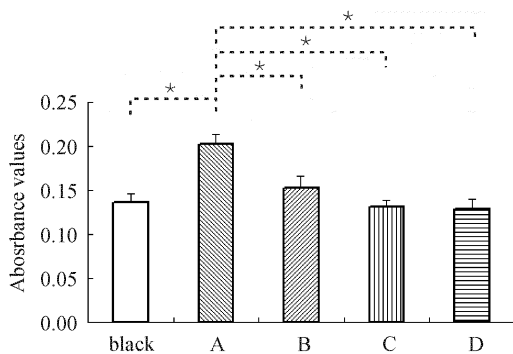


图 3 氯胺酮对 He-Ne 激光促人正常皮肤成纤维细胞增殖作用的影响

Fig. 3 Effects of ketamine in combination with 468.7 mJ/cm<sup>2</sup> He-Ne laser irradiation on proliferation of HSFs

氯胺酮 0 μg/mL (A 组) 有显著差异。与对照组相比较, 468.7 mJ/cm<sup>2</sup> 激光照射 + 氯胺酮 0.6 μg/mL (B 组), 468.7 mJ/cm<sup>2</sup> 激光照射 + 氯胺酮 1.2 μg/mL (C 组) 和 468.7 mJ/cm<sup>2</sup> 激光照射 + 氯胺酮 2 μg/mL (D 组) 没有显著差异。He-Ne 激光能刺激细胞增殖, He-Ne 激光和氯胺酮同时作用不能促进细胞的增殖。

## 4 结 论

研究表明, 低强度激光可以引起多种确定的细胞效应<sup>[11,12]</sup>, 如刺激成纤维细胞增殖和分泌胶原<sup>[13]</sup>、诱导中性粒细胞呼吸爆发<sup>[14]</sup>和调节 HeLa 细胞增殖<sup>[11]</sup>等等。

在低强度激光治疗伤口的研究中, 许多学者用成纤维细胞培养, 观测低强度激光对创伤愈合的影响。相当多的实验<sup>[13]</sup>证实, 低强度激光不但能促进成纤维细胞增殖, 还能通过促进成纤维细胞合成 I 型及 III 型胶原纤维, 加快伤口纤维化作用。

实验观察到 He-Ne 激光刺激成纤维细胞增殖的作用可被氯胺酮抑制。推测麻醉剂的选择使用可能是低强度激光疗法对实验动物模型实验结果不一致的原因之一。本文对低强度激光照射治疗伤口愈合中麻醉剂的选择有一定的指导意义, 但哪种麻醉剂是最优选择, 将作进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 1 J. D. F. Allendorf, M. Bessler, J. Huang *et al.*. Helium-neon laser irradiation at fluence of 1, 2, and 4 J/cm<sup>2</sup> failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate and tensile strength [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1997, **20**: 340~345
- 2 J. R. Basford, H. O. Hallman, C. G. Sheffield *et al.*. Comparison of cold-quartz ultraviolet, low-energy laser, a occlusion in wound healing in a swine model [J]. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 1986, **67**:151~154
- 3 B. Braverman, R. J. McCarthy, A. D. Ivankovich *et al.*. Effect of He-Ne and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1989, **9**:50~58
- 4 P. Whittaker, S. M. Zheng, M. J. Patterson *et al.*. Histologic signatures of thermal injury: applications in transmural laser revascularization and radiofrequency ablation [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2000, **27**:305~318
- 5 J. S. Kana, G. Hutschenreiter, D. Haina *et al.*. Effect of low-power density laser irradiation on healing of open skin wound in rats [J]. *Arch. Surg.*, 1981, **116**:293~296
- 6 G. Anneroth, G. Hall, H. Ryden *et al.*. The effect of low-energy infrared laser radiation on wound healing in rats [J]. *Br. J. Oral. and Maxillofac Surg.*, 1988, **26**:12~17
- 7 M. M. H. In de Braekt, F. A. Van Alphen, A. M. Kuijpers-Jagtman *et al.*. Effect of low level laser therapy on wound healing after palatal surgery in beagle dogs [J]. *Lasers Surg.*

- Med.*, 1991, **11**:462~470
- 8 A. N. Pereira, C. P. Eduardo, E. Matson *et al.*. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2002, **31**:263~267
  - 9 L. S. Kegeles, D. Martinez, L. D. Kochan *et al.*. NMDA antagonist effects on striatal dopamine release; positron emission tomography studies in humans [J]. *Synapse*, 2002, **43**(1):19~29
  - 10 M. B. Hansen, S. E. Nielsen, K. Berg. Re-examination and further development of precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill [J]. *J. Immunol. Meth.*, 1989, **119**:203~210
  - 11 J. R. Basford. Low-energy laser therapy: controversies and new research finding [J]. *Laser Surg. Med.*, 1989, **9**:1~5
  - 12 T. I. Karu. A suitable mode for wound healing; how many times are we to stumble over the same block [J]. *Laser Surg. Med.*, 1999, **25**:283
  - 13 C. Webb, M. Dyson, W. H. Lewis. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts; possible mechanism for increase in cell counts [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 1998, **22**(5):294~301
  - 14 R. Duan, T. C. Y. Liu, Y. Li *et al.*. Signal transduction pathway involved in low intensity He-Ne laser-induced respiratory burst in bovine neutrophils; a potential mechanism of low intensity laser biostimulation [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2001, **29**(2):174~178