

微波辐射减轻瘢痕形成的疗效及其作用机制研究

李雁婷 沈晓艳 李韵 曹曼林

【摘要】 目的 探讨微波辐射对原代培养的人瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞增殖活性的影响,进而分析微波辐射后成纤维细胞的胶原蛋白合成的变化及相关信号的激活情况。**方法** 将瘢痕成纤维细胞分为对照组(自然生长无任何处理)、10 mW/cm²微波辐射组和 20 mW/cm²微波辐射组,然后再根据辐射时间,将 10 mW/cm²微波辐射组和 20 mW/cm²微波辐射组分为辐射 5 min、15 min、30 min 各 3 个亚组。采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐法(MTT)测定成纤维细胞的生长情况。采用 Western blot 方法分析微波辐射后对细胞 I 型胶原蛋白表达水平的影响。采用抗磷酸化形式的 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)抗体,通过 Western blot 方法观察微波辐射后瘢痕来源的成纤维细胞 JNK 磷酸化(pJNK)的情况。**结果** 辐射后,10 mW/cm²微波辐射组 3 个亚组的瘢痕成纤维细胞增殖率与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);20 mW/cm²微波辐射组 3 个亚组的瘢痕成纤维细胞增殖率明显受到抑制,与对照组和 10 mW/cm²微波辐射组相同时间点比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),且 20 mW/cm²微波辐射组各时间点间两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。辐射后,20 mW/cm²微波辐射组的瘢痕成纤维细胞中 I 型胶原的表达量显著降低,其降低程度随着微波辐射时间的延长而增加。辐射后,20 mW/cm²微波辐射组各时间点的瘢痕成纤维细胞内 JNK 信号通路的激活水平均显著上调,且分别与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 20 mW/cm²强度的微波辐射可显著抑制瘢痕成纤维细胞的增殖,且辐射时间越长抑制效果越明显;20 mW/cm²强度的微波辐射可显著抑制胶原的表达,并通过激活 JNK 信号转导通路而起到减轻瘢痕形成的作用。

【关键词】 瘢痕成纤维细胞; 微波; I 型胶原蛋白; c-Jun 氨基末端激酶

基金项目:上海市卫生局课题资助项目(2010113)

The effects of microwave irradiation on the proliferation of cultured human keloid-derived fibroblasts and the mechanism involved Li Yanting, Shen Xiaoyan, Li Yun, Cao Manlin. Department of Rehabilitation Medicine, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Corresponding author: Cao Manlin, Email: c_ml2009@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of microwave irradiation on the proliferation of keloid-derived fibroblasts so as to analyze the expression of collagen-1 and the activation of the signaling pathway involved. **Methods** Cells from a human keloid scar were cultured in vitro and randomly divided into a control group without any intervention, a 10 mW/cm² microwave irradiation (10-MI) group and a 20 mW/cm² microwave irradiation (20-MI) group. Aliquots of the latter 2 groups were irradiated at their corresponding intensities for 5 min, 15 min and 30 min. The growth of fibroblasts was evaluated using MTT assay. The expression of collagen-1 and changes in the phosphorylation of protein JNK were detected using western blotting. **Results** Compared with the control group, no significant differences in the average growth of the keloid-derived fibroblasts were observed in the 10-MI group, but significant differences were observed in the 20-MI group and among the three sub-groups irradiated for different durations. The expression of type 1 collagen was significantly down-regulated after irradiation in a time-dependent manner. After microwave radiation at 20 mW/cm², JNK was significantly activated compared to the control group at the different time points. **Conclusions** Microwave irradiation at 20 mW/cm² can significantly inhibit the proliferation of keloid-derived fibroblasts and the down-regulation is correlated with the irradiation's duration. It can also significantly inhibit collagen-1 expression and relieve scar formation through activating the JNK signal pathway.

【Key words】 Keloids; Fibroblasts; Microwaves; Collagen-1; JNK protein

Fund program: A project supported by the Shanghai Municipal Health Bureau

创伤后瘢痕愈合是人类特有的一种病理现象,至今鲜见阻止瘢痕发生的治疗方法。传统理论认为,促进创伤修复与防止瘢痕增生之间是相矛盾的,故如何加快伤口愈合,同时又无瘢痕成为临床研究的难题^[1-2]。有研究证实,瘢痕组织是机体创伤修复过程中必然的产物,抑制瘢痕必然影响愈合;而促进修复细胞增殖(尤其是成纤维细胞)在促进愈合的同时也可造成瘢痕增大^[3]。

临床和实验研究均发现,微波可以促进伤口的愈合^[4-6]。Schüz 等^[7]针对手术创伤模型兔采用微波(37 GHz, 30 min/d)进行治疗,治疗 5~7 d 后,微波治疗组的伤口愈合速度显著快于对照组。Lewicka 等^[3]将微波应用于临床术后患者的伤后治疗,结果发现,微波治疗组的伤口愈合速度显著快于对照组,且具有良好的消炎和消肿作用。还有研究发现,联合应用红外辐射和微波辐射可促进大鼠创伤模型伤口愈合^[8]。虽然大量研究均发现,微波具有消炎止痛、消肿、软化瘢痕组织、扩张血管、改善局部组织营养和代谢等作用,但对于微波辐射对伤口愈合产生的一系列生物效应的作用机制至今仍不清楚^[3,9]。

本研究旨在通过体外实验观察微波辐射减轻瘢痕形成的效果及其作用机制,以期为将来的实验研究和临床应用提供参考。

材料和方法

一、原代培养人瘢痕成纤维细胞

参照文献^[10]的方法,将手术切除的患者瘢痕疙瘩组织(2 例)收集于一个无菌管中,用含低葡萄糖(1000 mg/ml)和抗生素(100 U/ml 青霉素,链霉素 100 mg/ml)的杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)培养液浸泡。皮肤样品用含抗生素的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 2 次,孵育在含胶原酶 I 型(0.5 mg/ml)和胰蛋白酶(0.2 mg/ml)的培养液中,置于 37 °C 环境中消化 6 h 后收集,并培养于组织培养瓶中。离体成纤维细胞在含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基中培养。生长至汇合后传代,8 代以内的细胞用于本研究。实验过程严格遵守伦理学准则。

二、实验分组

将瘢痕成纤维细胞接种于 96 孔细胞培养板中,待细胞融合至 70%~80% 后,将其分为空白对照组(自然生长无任何处理)、10 mW/cm² 微波辐射组和 20 mW/cm² 微波辐射组,然后再根据辐射时间,将 10 mW/cm² 微波辐射组和 20 mW/cm² 微波辐射组分为辐射 5 min、15 min、30 min 各 3 个亚组。采用 Cleary 等^[11]设计的微波辐射系统,并进行改进,使用

2450 MHz 连续微波。将成纤维细胞分为对照组(自然生长无任何处理)、10 mW/cm² 微波辐射组和 20 mW/cm² 微波辐射组,然后再根据辐射时间,将 10 mW/cm² 微波辐射组和 20 mW/cm² 微波辐射组分为辐射 5 min、15 min、30 min 各 3 个亚组。实验前,将微波治疗仪置于超净工作台内,经紫外照射消毒,将培养的细胞置于辐射窗口,根据分组的不同选用相对应的辐射强度和辐射时间。空白对照组也在同样的环境做假辐射,超声波功率输出为 0 W/cm²,并于相应的时间点设立对照。经电磁辐射检测仪准确测定,经微波辐射后,培养液平均温度上升幅度 < 16 °C。

三、比色法检测

3 组细胞于辐射结束后继续培养,观察微波辐射对细胞增殖的影响,进行 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] 比色法检测。于检测前 4 h(此时细胞培养已终止)吸取各小孔内上清液 0.1 ml,再加入 5 mg/ml 的 MTT 液 0.01 ml,然后将培养板置入 CO₂ 培养箱内继续培养 4 h。待细胞培养终止后,于每孔中加入二甲基亚砷(Dimethyl sulphoxide, DMSO)溶解 100 μl,反应 4 h 后轻轻振荡 15 min,用酶标仪测定 570 nm 处的光密度(optical density, OD)值。

四、Western blot 分析成纤维细胞 I 型胶原蛋白的表达

微波照射后,收集各组细胞总蛋白后,取等量蛋白,经 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白,随后将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜上后,用含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲盐溶液(Tris-buffered saline, TBS)封闭 1 h 后,加入一抗(稀释度为 1:1000),4 °C 过夜。随后加入相应的辣根酶标记的二抗孵育。清洗后按强化化学发光显色试剂盒说明书进行操作,X 光片曝光显影。使用 IMAGE J 软件分析图像信号条带的灰度值,计算蛋白相对含量并进行比较。

五、Western blot 分析 JNK 信号通路蛋白活化状态

采用 Western blot 分析微波辐射后 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal Kinase, JNK)信号通路蛋白活化状态。具体实验条件和步骤同上述检测成纤维细胞 I 型胶原蛋白表达的方法。

六、统计学方法

采用 SPSS 10.0 版统计软件进行数据处理。对各组数据先进行正态性检验,正态分布数据以($\bar{x} \pm s$)表示,非正态数据以中位数 M 及其 5%~95% 分布范围表示,组间数据分析采用配对 *t* 检验和相关性分析,以 *P* <

0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、原代培养人瘢痕疙瘩成纤维细胞的形态观察

人瘢痕成纤维细胞生长至第 7 天,细胞伸展呈梭形,细胞连续传代,单层细胞呈漩涡状生长,形态舒展。生长至汇合后传代,8 代以内的细胞用于实验(图 1)。

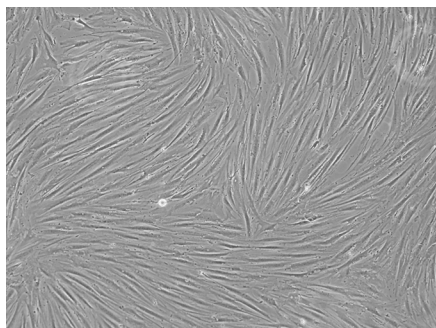
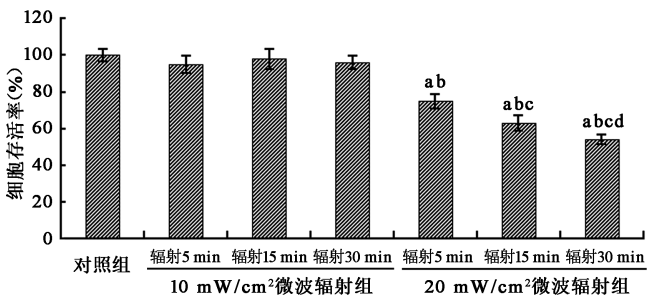


图 1 倒置显微镜下原代培养的人皮肤成纤维细胞形态($\times 10$)

二、微波辐射对瘢痕成纤维细胞增殖的影响

辐射后,10 mW/cm²微波辐射组 3 个亚组的瘢痕成纤维细胞增殖率与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);20 mW/cm²微波辐射组 3 个亚组的瘢痕成纤维细胞增殖率明显受到抑制,与对照组和 10 mW/cm²微波辐射组相同时间点比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),且 20 mW/cm²微波辐射组各时间点间两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。详见图 2。



注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 10 mW/cm²微波辐射组相同时间点比较,^b $P<0.05$;与组内辐射 5 min 比较,^c $P<0.05$;与组内辐射 10 min 比较,^d $P<0.05$

图 2 微波辐射对瘢痕成纤维细胞增殖活性的影响

三、微波辐射后瘢痕成纤维细胞中 I 型胶原的表达情况

辐射后,20 mW/cm²微波辐射组的瘢痕成纤维细胞中 I 型胶原的表达量显著降低,其降低程度随着微波辐射时间的延长而增加(图 3)。

四、微波辐射后瘢痕成纤维细胞内 JNK 信号通路的激活状态

辐射后,20 mW/cm²微波辐射组各时间点的成纤

维细胞内 JNK 信号通路的激活水平均显著上调,且分别与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)(图 4)。

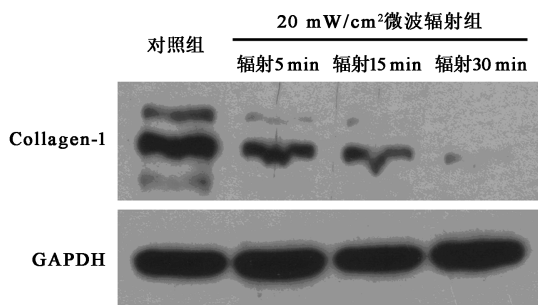
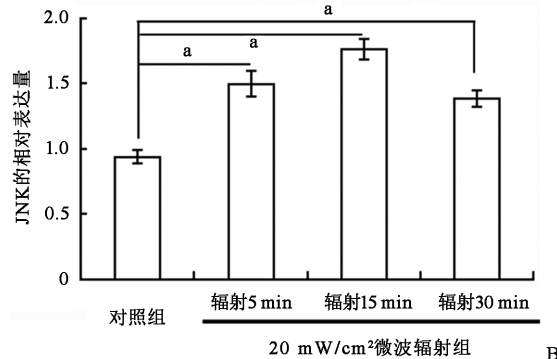
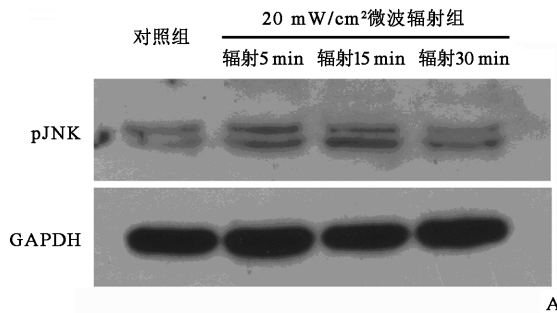


图 3 微波辐射抑制人瘢痕成纤维细胞 I 型胶原蛋白的表达



注:A 为微波辐射诱导人瘢痕成纤维细胞后 JNK 磷酸化的电泳图;B 为微波辐射后磷酸化的 JNK 蛋白与内参 GAPDH 的灰度比,与对照组相比,^a $P<0.05$

图 4 微波诱导人瘢痕纤维细胞 JNK 磷酸化情况

讨 论

本研究结果显示,20 mW/cm²强度的微波辐射可显著抑制瘢痕成纤维细胞增殖,与对照组和 10 mW/cm²微波辐射组相同时间点比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),且 20 mW/cm²微波辐射组各时间点间两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。此外,辐射后,20 mW/cm²微波辐射组的瘢痕成纤维细胞中 I 型胶原的表达量显著降低,其降低程度随着微波辐射时间的延长而增加。以上结果提示,微波辐射在达到一定能量密度时(20 mW/cm²),可显著抑制成纤维细胞的增殖,且其抑制率随辐射时间的延长而

增高,即微波辐射可能具有治疗疤痕疙瘩和增生性瘢痕的作用。成纤维细胞是创面愈合中的主要修复细胞,在伤口局部大量增殖,是伤后肉芽组织形成、组织修复的关键环节^[12]。因此,成纤维细胞的过度增殖和胶原的过量沉积是产生疤痕疙瘩及增生性瘢痕的主要病理机制。据报道,低强度微波辐射可以促进伤口愈合^[13-14],且大多应用在皮肤局部^[15]。因此,本研究首先借助原代培养人疤痕疙瘩来源的成纤维细胞,随后利用 MTT 方法和 Western blot 方法分观察了微波辐射对疤痕疙瘩来源的成纤维细胞增殖能力和胶原合成能力的抑制作用,为临床开发应用低强度微波在抑制瘢痕形成中的治疗价值提供了实验基础。

本研究结果还显示辐射后,20 mW/cm² 微波辐射组各时间点的成纤维细胞内 JNK 信号通路的激活水平均显著上调,且分别与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。该结果提示,微波辐射可能主要通过上调 JNK 凋亡信号,激活凋亡信号通路,抑制成纤维细胞增殖。JNK 信号转导通路是 MAPK 通路的一重要分支,它在细胞周期、增殖、凋亡和细胞应激等多种生理和病理过程中起重要作用。研究发现 JNK 信号通路能介导多种胞外刺激诱导的细胞凋亡,当受到外界刺激后,JNK 被磷酸化而转到核内,使其下游作用底物 c-Jun 等磷酸化,进而激活凋亡信号通路^[16]。本实验显示体外短时间高强度微波辐射后成纤维细胞的 JNK 迅速磷酸化,可能是微波抑制瘢痕成纤维细胞增殖的机制之一。

综上所述,微波在创伤愈合的瘢痕形成阶段可起到减少瘢痕形成的作用,体外短时间高强度微波辐射能抑制瘢痕成纤维细胞的增殖。这一作用机制可能与细胞 I 型胶原的表达显著下降密切相关;此外,微波辐射可激活皮肤成纤维细胞 pJNK 信号转导通路,提示 JNK 信号转导通路对成纤维细胞功能具有调节作用。本课题组还认为,微波所发挥的生物学功效并非由单个基因和蛋白的行为引起,而是由多基因的协同调控作用和蛋白的表达所造成,因此具体的分子机制仍有待更全面的基因表达谱方面的研究。

参 考 文 献

[1] Joshi GP, Ogunnaike BO. Consequences of inadequate postoperative pain relief and chronic persistent postoperative pain[J]. *Anesthesiol Clin North America*, 2005, 23(1):21-36.

[2] Graham DJ, Campen D, Hui R, et al. Risk of acute myocardial infarction and sudden cardiac death in patients treated with cyclo-oxygenase 2 selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs: nested case-control study[J]. *Lancet*, 2005, 365(9458):475-81.

[3] Lewicka M, Henrykowska GA, Pacholski K, et al. The impact of e-

lectromagnetic radiation of different parameters on platelet oxygen metabolism -in vitro studies[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2015,24(1):31-5. DOI: 10.17219/acem/38169.

[4] Seeliger C, Falldorf K, Sachtleben J, et al. Low-frequency pulsed electromagnetic fields significantly improve time of closure and proliferation of human tendon fibroblasts[J]. *Eur J Med Res*, 2014, 19(7):37. DOI: 10.1186/2047-783X-19-37.

[5] Glushkova OV, Khrenov MO, Novoselova TV, et al. The role of the NF- κ B, SAPK/JNK, and TLR4 signalling pathways in the responses of RAW 264.7 cells to extremely low-intensity microwaves[J]. *Int J Radiat Biol*, 2015, 91(4):321-328. DOI: 10.3109/09553002.2014.996261.

[6] Zhang Y, Li Z, Gao Y, et al. Effects of fetal microwave radiation exposure on offspring behavior in mice[J]. *J Radiat Res*, 2015, 56(2):261-268. DOI: 10.1093/jrr/rru097.

[7] Schütz J, Böhrer E, Schlehöfer B, et al. Radiofrequency electromagnetic fields emitted from base stations of DECT cordless phones and the risk of glioma and meningioma (Interphone Study Group, Germany)[J]. *Radiat Res*, 2006,166(1):116-119.

[8] Schramm JM, Warner D, Hardesty RA, et al. A unique combination of infrared and microwave radiation accelerates wound healing[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2003, 111(1):258-66.

[9] Radziewsky AA, Gordiienko OV, Alekseev S, et al. Electromagnetic millimeter wave induced hypoalgesia: frequency dependence and involvement of endogenous opioids[J]. *Bioelectromagnetics*, 2008, 29(4):284-295.

[10] Park G, Yoon BS, Moon JH, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses collagen production and proliferation in keloid fibroblasts via inhibition of the STAT3-signaling pathway[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(10):2429-41.

[11] Cleary SF, Cao G, Liu LM, et al. Stress proteins are not induced in mammalian cells exposed to radiofrequency or microwave radiation[J]. *Bioelectromagnetics*, 1997, 18(7):499-505.

[12] de Sousa AP, Gurgel CA, Ramos EA, et al. Infrared LED light therapy influences the expression of fibronectin and tenascin in skin wounds of malnourished rats--a preliminary study[J]. *Acta Histochem*, 2014, 116(7):1185-91. DOI: 10.1016/j.acthis.2014.06.006.

[13] Ye D, Xu Y, Wang G, et al. Thermal effects of 2450 MHz microwave exposure near a titanium alloy plate implanted in rabbit limbs[J]. *Bioelectromagnetics*, 2015, 36(4):309-18. DOI: 10.1002/bem.21912.

[14] Belfiore MP, Sciandra M, Romano F, et al. Preliminary results in unresectable head and neck cancer treated by radiofrequency and microwave ablation: feasibility, efficacy, and safety[J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2015, 26(8):1189-1196. DOI: 10.1016/j.jvir.2015.05.021.

[15] Haghnegahdar A, Khosrovanah H, Andisheh-Tadibir A, et al. Design and fabrication of helmholtz coils to study the effects of pulsed electromagnetic fields on the healing process in periodontitis: preliminary animal results[J]. *J Biomed Phys Eng*, 2014, 4(3):83-90.

[16] Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, et al. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(5):391-403.

(修回日期:2016-12-17)

(本文编辑:阮仕衡)