

# LED多波段光谱治疗对大鼠皮肤创伤愈合的影响

柏鑫<sup>1,2</sup>,侯雪峰<sup>2</sup>,何文芳<sup>2</sup>,何玥颖<sup>2</sup>,王中琪<sup>1,2</sup>,吴西<sup>1,2</sup>,陈克明<sup>1,2</sup>

(1.甘肃中医药大学中医临床学院,甘肃兰州730030;

2.解放军联勤保障部队第九四〇医院基础医学实验室,甘肃兰州730050)

**摘要:**目的 研究LED多波段光谱治疗对大鼠皮肤创伤愈合的影响。方法 选取50只雄性Wistar大鼠,在大鼠背部制备小面积全层皮肤缺损创面模型,随机分为模型对照(MC)组、LED治疗(LED T)组、红外线治疗(IR)组、红光治疗(RL)组以及紫外线治疗(UV)组,每组10只。各治疗组大鼠每天暴露于对应光源下照射40 min,模型对照组放入治疗仪但不通电。每组分别于第3、7、14天处死3只大鼠,计算创面愈合率,观察HE染色结果,并检测相关蛋白表达量。结果 LED T组、IR组、RL组和UV组创面愈合率治疗第3、7、14天愈合率均高于MC组( $P<0.05$ );创面HE染色显示,LED多波段光谱治疗能够降低炎症反应,促进皮肤组织增殖分化,加速创伤愈合进程;LED T组、IR组、RL组和UV组治疗第14天后EGF、VEGF、TGF- $\beta_1$ 表达量均高于MC组( $P<0.05$ ),但LED T与IR组TGF- $\beta_1$ 比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 LED多波段光谱治疗能够促进大鼠皮肤创伤愈合,促进皮肤再上皮化进程,提高创面中EGF、TGF- $\beta_1$ 及VEGF蛋白表达水平。

**关键词:**LED多波段光谱治疗;创面愈合;红外线;红光;紫外线

中图分类号:R44

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.18.008

文章编号:1006-1959(2022)18-0034-05

## Effect of LED Multiband Spectral Therapy on Skin Wound Healing in Rats

BAI Xin<sup>1,2</sup>, HOU Xue-feng<sup>2</sup>, HE Wen-fang<sup>2</sup>, HE Yue-ying<sup>2</sup>, WANG Zhong-qi<sup>1,2</sup>, WU Xi<sup>1,2</sup>, CHEN Ke-ming<sup>1,2</sup>

(1. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730030, Gansu, China;

2. Basic Medical Laboratory, the 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Lanzhou 730050, Gansu, China)

**Abstract:** **Objective** To study the effect of LED multi-band spectral therapy on skin wound healing in rats. **Methods** Fifty male Wistar rats were randomly divided into model control (MC) group, LED treatment (LED T) group, infrared treatment (IR) group, red light treatment (RL) group and ultraviolet treatment (UV) group, with 10 rats in each group. The rats in each treatment group were exposed to the corresponding light source for 40 minutes every day, and the model control group was put into the therapeutic apparatus but not electrified. Three rats in each group were sacrificed on the 3rd, 7th and 14th day respectively. The wound healing rate was calculated, the results of HE staining were observed, and the expression of related proteins was detected. **Results** The wound healing rate of LED T group, IR group, RL group and UV group was higher than that of MC group on the 3rd, 7th and 14th day of treatment ( $P<0.05$ ). Wound HE staining showed that LED multi-band spectroscopy could reduce the inflammatory response, promote the proliferation and differentiation of skin tissue, and accelerate the process of wound healing. The expression levels of EGF, VEGF and TGF- $\beta_1$  in LED T group, IR group, RL group and UV group were higher than those in MC group after 14 days of treatment ( $P<0.05$ ), but there was no significant difference in TGF- $\beta_1$  between LED T group and IR group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** LED multi-band spectral therapy can promote the healing of skin wounds in rats, promote the process of skin re-epithelialization, and increase the expression levels of EGF, TGF- $\beta_1$  and VEGF proteins in wounds.

**Key words:** LED multi-band spectral therapy; Wound healing; Infrared; Red light; Ultraviolet

皮肤是人体最大的器官,具有保护、感觉、分泌、排泄、呼吸等功能,具有重要的屏障保护作用<sup>[1]</sup>。由于皮肤直接与外界环境接触,因而皮肤创伤也是临床上常见问题之一。据统计<sup>[2]</sup>,在美国,受到伤口长期难以愈合影响的人数超过650万,年治疗费用超过97亿美元。近年来,针对慢性难愈合创面的研究不断深入,其治疗手段也逐渐丰富,如负压封闭引流技术、血小板血浆、外用重组人表皮生长因子、自体全血及各种功能性敷料等都取得了较好的治疗效果<sup>[3-6]</sup>。光生物调节疗法(photobiomodulation therapy, PBMT)是一种安全、无痛、易操作的治疗手段,主要

利用光的辐射能治疗疾病。研究表明<sup>[7]</sup>,PBMT能够减轻创面疼痛、促进创面血管新生、调节免疫反应、加快组织愈合和再生。目前PBMT的光源类型包括低水平激光(low-level laser, LLL)及发光二极管(light-emitting diode, LED)光源<sup>[8]</sup>,而且对于PBMT的研究也更多集中于LLL上。为研究LED多波段光谱治疗能否促进大鼠皮肤创伤愈合,本研究采用LED多波段光谱治疗仪照射大鼠小面积全层皮肤缺损创面,检测其对大鼠皮肤创伤愈合的影响,现报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 实验仪器与试剂** LED多波段光谱治疗仪(河北奥特维力科技有限公司);组织匀浆仪(上海净信实业发展有限公司);荧光酶标仪(美国美谷分子公司);电泳仪,凝胶成像分析系统,半干转膜仪(美国BIO-RAD);病理切片扫描仪(山东志盈医学科技有限公司);自制直径18 mm打孔器;4%多聚甲醛中

基金项目:军队后勤科研计划项目(编号:CLB18J028)

作者简介:柏鑫(1993.7-),男,天津人,硕士研究生,主要从事骨折加速愈合的研究

通讯作者:陈克明(1968.8-),男,河南洛阳人,博士,教授,主要从事创伤骨科基础研究

性组织固定液(塞维尔生物科技有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(索莱宝科技有限公司);免封闭 PAGE 凝胶快速制备试剂盒(10%),彩虹 180kd 广谱蛋白 Marker(上海翊圣生物科技有限公司);VEGF 抗体(美国 Santa cruz 公司);EGF、TGF- $\beta$ 1 抗体(美国 affinity 公司); $\beta$ -actin 抗体(英国 abcam 公司)。

1.2 动物分组与处理 50 只雄性 Wistar 大鼠,体重(200 $\pm$ 10)g,购自解放军联勤保障部队第九四〇医院实验动物中心,许可证号:SCYK(军)2017-0023,适应性喂养 1 周后建立大鼠小面积全层皮肤缺损创伤模型,再按照随机数字表法分为模型对照组(model control group,MC)、LED 治疗组(light-emitting diode treatment group,LEDT)、红外线治疗组(infrared,IR)、红光治疗组(red light,RL)和紫外线治疗组(ultraviolet,UV),每组 10 只。各治疗组大鼠暴露于对应光源下照射 20 min,模型对照组大鼠放入治疗仪但不通电,2 次/d。其中,LEDT 由 IR、RL 及 UV 三种光源的混合光组成,具体光源参数见表 1。本研究经过医院伦理委员会批准,动物伦理审批编号:2020KYLL128。

表 1 LED 多波段光谱治疗参数

参数	红外线	红光	紫外线
波长(nm)	940	630	310
功率(W)	4.6	10.2	1.5
光斑大小(cm <sup>2</sup> )	700	700	700

1.3 造模方法 按照赵京禹等<sup>[9]</sup>的方法建立大鼠小面积全层皮肤缺损创面模型。大鼠麻醉后将背部剃毛,面积约 7 cm $\times$ 5 cm,在后背中部脊柱两侧各旁开 1 cm,距肩胛骨以下 2 cm 处使用直径 18 mm 的圆钻垂直于皮肤压出圆形痕迹(面积 2.54 cm<sup>2</sup>),再使用手术剪沿压痕剪去全层皮肤,深达筋膜层,纱布压迫止血备用。每只大鼠制备 1 个创面,由于皮肤的牵拉,造模后创面的面积约为 3.675 cm<sup>2</sup>。

#### 1.4 观察指标

1.4.1 创面面积测量 在创伤造模后的即刻及干预的第 3、7、14 天后,将大鼠麻醉,在固定的高度与角度下对创面进行拍照记录。利用 Photoshop 裁剪图片,利用 Image-Pro Plus 对创面面积进行计算。创面愈合率=(初始面积-当日面积)/初始面积 $\times$ 100%。

1.4.2 组织病理学检测 治疗第 3、7、14 天后,随机从各组中取 3 只大鼠,将创面剪下,置于 4%多聚甲醛中性组织固定液中固定 48 h,然后进行石蜡包埋、切片,以及 HE 染色处理。将制作好的切片置于病理切片扫描仪下观察组织病理学变化。

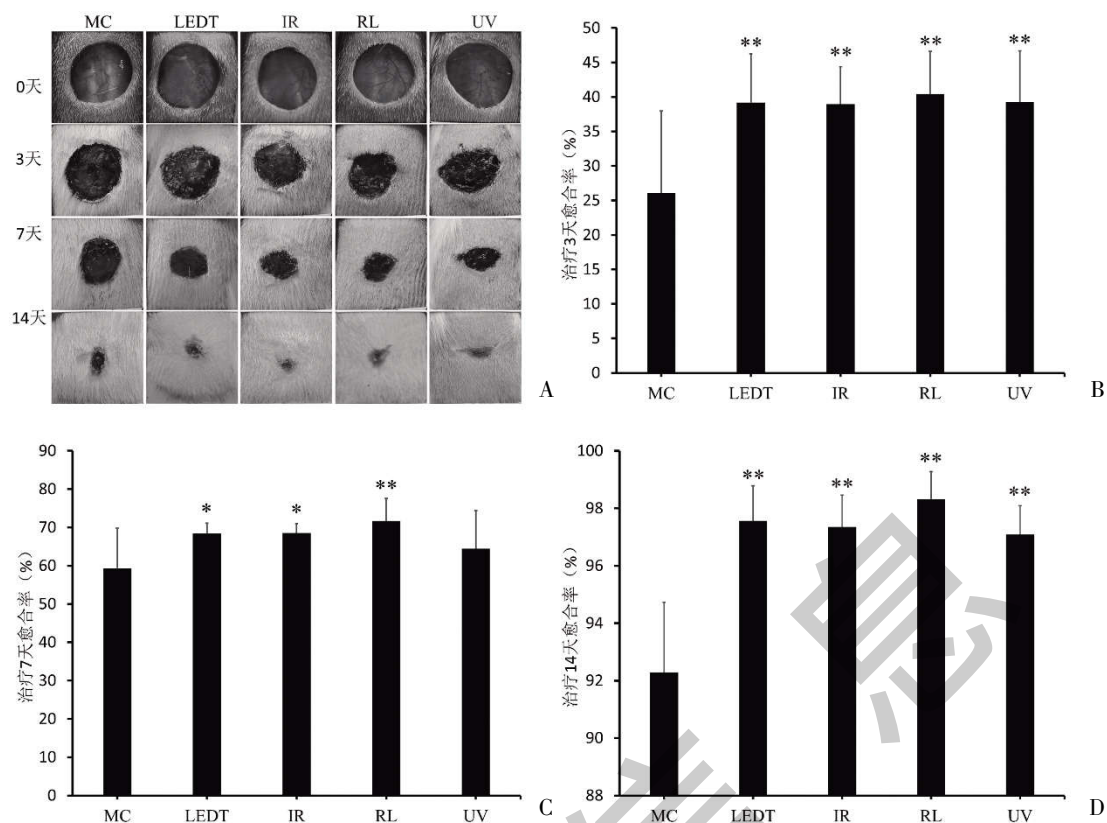
1.4.3 蛋白免疫印迹 治疗第 14 天后,对创面中表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1,TGF- $\beta$ 1)以及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的蛋白表达量进行检测。随机从各组中取 3 只大鼠,将创面剪下,液氮冷冻后置于组织研磨仪中研磨 3 次,90 s/次,研磨后按比例加入高效组织蛋白裂解液冰上裂解 30 min,裂解完成后 12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液放置于冷冻工作站。使用 BCA 法检测样品中蛋白浓度,完成蛋白定量检测后加热变性,-80 ℃保存。检测时应用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶制备试剂盒配置 10%的分离胶和 5%浓缩胶,待其凝固后取 5  $\mu$ l 变性蛋白上样,电泳完成后使用干转膜仪进行转膜,脱脂奶粉封闭 2 h,按照抗体说明在对应的一抗稀释液中 4 ℃孵育过夜,次日,复温 1 h 后使用 TBST 清洗 5 次,10 min/次。二抗按照来源不同分别使用山羊抗兔与山羊抗鼠,按照 1:10 000 稀释,将按照属性对应加入蛋白孵育盒中,摇床震荡孵育 2 h 后,使用 TBST 溶液清洗,清洗完成后进行曝光。利用 Photoshop 软件统一裁剪条带,Image J 软件对图像进行灰度值定量分析。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析,计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用  $t$  检验。以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义, $P<0.01$  表示统计学意义显著。

## 2 结果

2.1 大鼠创面愈合率比较 随着时间延长,各组大鼠创面逐渐愈合。治疗第 3 天,各组大鼠创面均已结痂(图 1A),其中 LEDT 组、IR 组、RL 组和 UV 组创面愈合率高于 MC 组( $P<0.05$ ,图 1B);治疗第 7 天,LEDT 组、IR 组、RL 组创面愈合率均高于 MC 组( $P<0.05$ ),但 UV 组与 MC 组创面愈合率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图 1C);治疗第 14 天,LEDT 组、IR 组、RL 组和 UV 组创面愈合率高于 MC 组( $P<0.05$ ),其中 RL 组的愈合率最高(图 1D)。

2.2 创面 HE 染色结果 治疗第 3 天,各组大鼠创面均有结痂覆盖创面,创面可见大量炎性细胞浸润;治疗 7 天后可见表皮层明显增厚,LEDT 组、IR 组、RL 组和 UV 组的炎性细胞已逐渐减少,成纤维细胞等修复细胞逐渐增多,角质形成细胞由圆形变为长条形增生活跃,而 MC 组的炎性细胞较多,成纤维细胞数量相对较少;治疗 14 天后,LEDT 组、IR 组、RL 组和 UV 组的创面已经由再上皮化组织覆盖整个创面,可见新生毛囊结构,MC 组部分再上皮化组织不连续,再生不完全,见图 2。



注: A:创面各时间点愈合情况; B、C、D: 治疗第 3、7、14 天后各组创面愈合率比较, 且与 MC 组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

图 1 LED 多波段光谱治疗对创面愈合率的影响

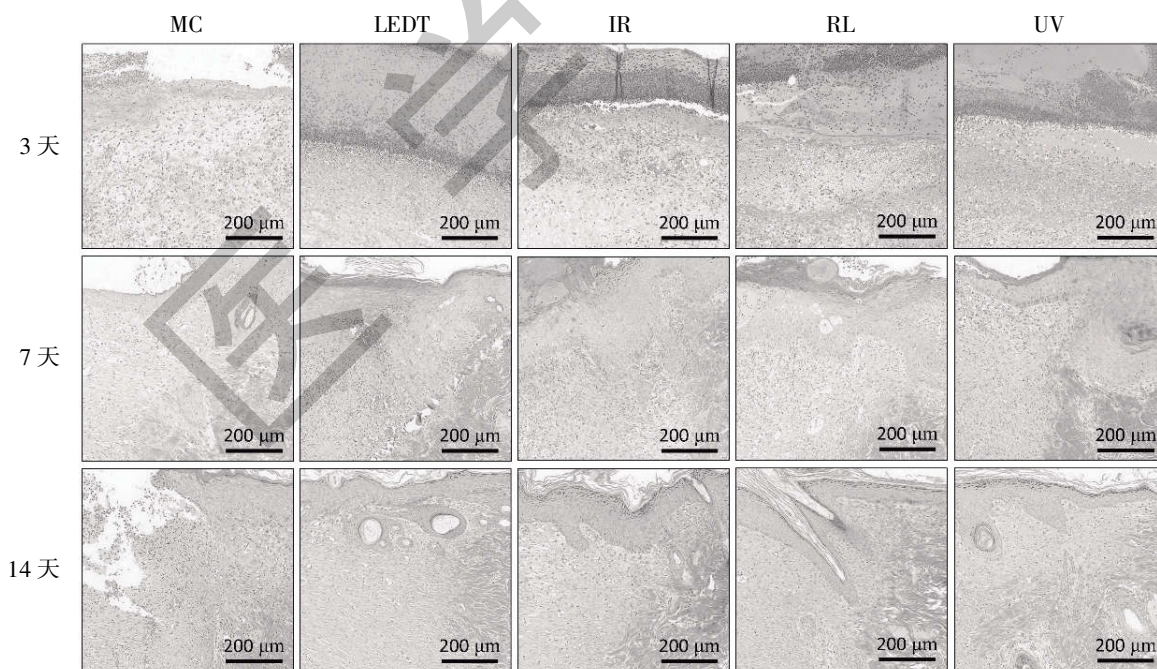
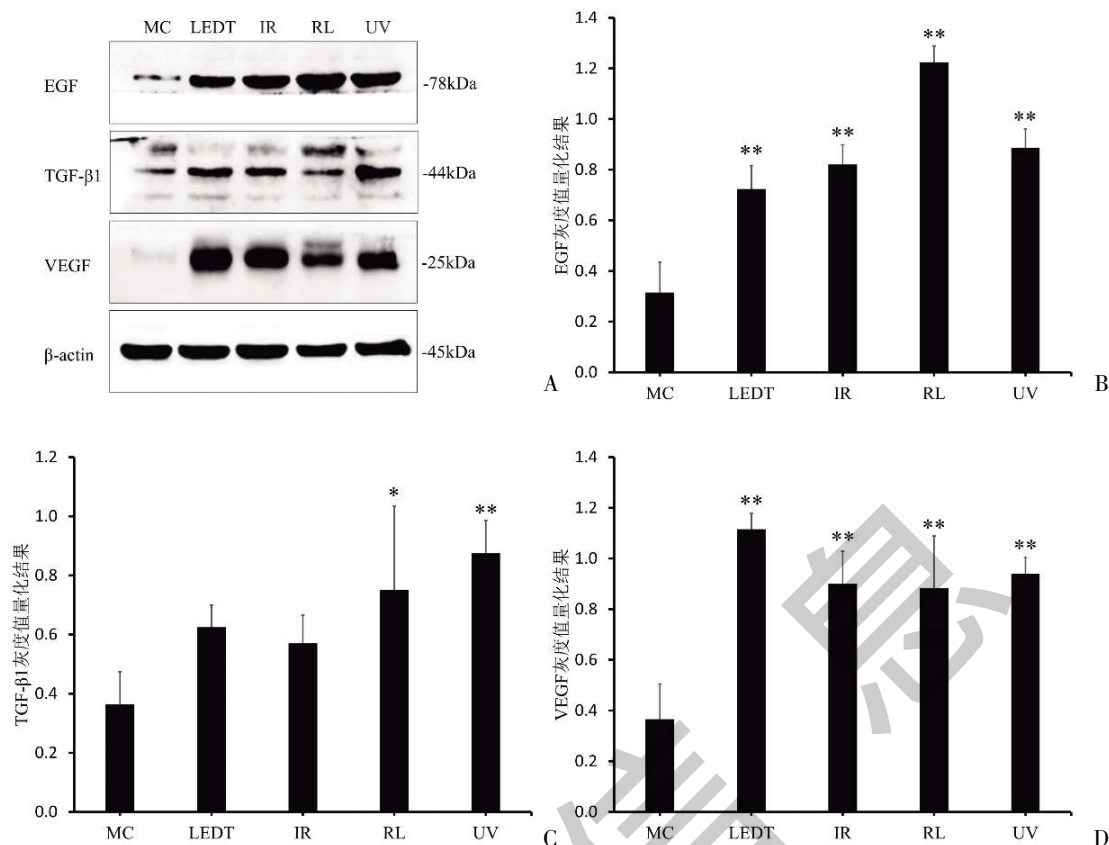


图 2 各组不同时间点 HE 染色结果比较

2.3 各组大鼠创面 EGF、TGF- $\beta_1$ 、VEGF 表达水平比较 治疗第 14 天后, LEDT 组、IR 组、RL 组和 UV 组 EGF、VEGF、TGF- $\beta_1$  表达量均高于 MC 组 ( $P<0.01$ ),

但 LEDT 与 IR 组 TGF- $\beta_1$  比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见图 3。



注:A:Western blot 蛋白条带;B、C、D:EGF、TGF-β<sub>1</sub>、VEGF 条带灰度值量化结果,且与 MC 组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01

图 3 LED 多波段光谱治疗对大鼠创面 EGF、TGF-β<sub>1</sub>、VEGF 表达水平的影响

### 3 讨论

皮肤创伤愈合是一个复杂而连续的过程,主要包括炎症期、增生期和重塑期,这几个过程相互重叠,其中任何一个过程异常或时间延长均会导致伤口愈合的延迟。创伤早期伤口局部组织遭到破坏,多伴有组织坏死和血管的破裂,短时间即会出现炎症反应。创伤早期组织主要以炎症细胞为主,有利于异物及坏死组织的吞噬,同时伤口中的血液和渗出液中的纤维蛋白原形成凝块,在创伤表面结痂,能够对伤口起到保护作用。炎症反应后成纤维细胞等修复细胞在损伤部位大量增多,创面由新生的肉芽组织逐渐覆盖,同时伤口边缘新生的肌纤维母细胞产生牵拉作用,引起伤口的收缩,加快创面的修复。肉芽组织表面则由角质形成细胞迁移和增生为主的表皮,通过再上皮化进程覆盖肉芽组织进而完成组织的修复。创面完全覆盖后,幼稚肉芽组织逐渐经过组织改建转变为瘢痕组织,而后还会经过较为漫长组织改建的过程,即组织重塑期<sup>[10]</sup>。

随着现代光医学的发展,PBMT 的应用越来越广泛,研究证明 PBMT 具有减轻炎症反应、降低疼痛、增加循环血量及促进组织修复等多种治疗作用,在创面修复领域中应用最为广泛<sup>[11,12]</sup>。本研究所

使用的 LED 多波段光谱治疗仪具有 IR、RL 及 UV 三种光源,研究表明<sup>[13,14]</sup>,IR 与 RL 能够提升伤口温度、减轻疼痛、促进伤口愈合,UV 能够刺激新生组织的生长,提高局部血液循环和供氧,降低水肿,抑制细菌生长。通过比较各组大鼠创面愈合率可以看出,LEDT、IR、RL 及 UV 组治疗第 3 天后创面愈合率高于 MC 组,治疗第 14 天后愈合率更高,说明 LED 多波段光谱治疗能够有效促进大鼠创面愈合。通过比较 HE 染色结果可以看出,LED 多波段光谱治疗能够减轻大鼠创面早期的炎症反应,并且能够促进再上皮化的进程,从而加速创面的愈合。

EGF 作为一种内源性保护物质,具有提高细胞再生能力,加快表皮生长的作用<sup>[15]</sup>。TGF-β<sub>1</sub> 是促进细胞分裂、增殖和趋化的重要的生长因子,并且有研究发现<sup>[16]</sup>,TGF-β<sub>1</sub> 能够加速愈合初期上皮细胞的增殖。VEGF 是促进血管内皮细胞有丝分裂的细胞因子,具有促进血管内皮细胞增殖的作用,是促进血管生成的直接相关因子<sup>[17]</sup>。此外,本研究结果发现,LEDT 组、IR 组、RL 组和 UV 组治疗第 14 天后 EGF、VEGF、TGF-β<sub>1</sub> 表达量均高于 MC 组(P<0.01),但 LEDT 与 IR 组 TGF-β<sub>1</sub> 比较,差异无统计学意义(P>0.05),提示 LED 多波段光谱治疗能够有效促进

大鼠创面中相关蛋白的表达,对创面愈合起到有效的促进作用。

综上所述,LED多波段光谱治疗能够有效提高大鼠创面各个阶段的愈合率,促进皮肤再上皮化进程,提高创面中EGF、TGF- $\beta_1$ 及VEGF蛋白表达水平。

#### 参考文献:

- [1] Peng X, Dong K, Ye C, et al. A breathable, biodegradable, antibacterial, and self-powered electronic skin based on all-nanofiber triboelectric nanogenerators [J]. *Science Advances*, 2020, 6(26): eaba9624.
- [2] Bickers DR, Lim HW, Margolis D, et al. The burden of skin diseases: 2004 a joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology [J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2006, 55(3): 490-500.
- [3] 修一平, 张丽艳, 钱学义, 等. 自体富血小板血浆修复慢性难愈性创面的作用: 回顾性研究和文献检索证据分析 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(8): 1231-1237.
- [4] 龙锐, 陈智, 费军. 负压封闭引流联合局部氧疗对创伤性创面愈合的影响 [J]. *中华创伤杂志*, 2020, 36(3): 262-268.
- [5] 张春连, 孙振龙, 王璐. 人脂肪干细胞与表皮生长因子促进皮肤创面愈合的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(9): 1690-1695.
- [6] 董敏, 黄素群, 殷学利, 等. 两种功能性敷料联合优力抒弹力绷带用于皮片移植术供皮区创面的疗效研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(20): 2000-2005.
- [7] Tsai SR, Hamblin MR. Biological effects and medical applications of infrared radiation [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 170: 197-207.
- [8] Hanna R, Dalvi S, Amaroli A, et al. Effects of photobiomodulation on bone defects grafted with bone substitutes: A systematic review of in vivo animal studies [J]. *J Biophotonics*, 2021, 14(1): e202000267.
- [9] 赵京禹, 付小兵, 雷永红, 等. 大鼠小面积全层皮肤缺损创面模型的制备 [J]. *感染、炎症、修复*, 2008, 9(1): 64.
- [10] 张永强. CKIP-1 在小鼠皮肤创伤愈合中的作用 [D]. 西安: 第四军医大学, 2014.
- [11] Chung H, Dai T, Sharma S K, et al. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2012, 40(2): 516-533.
- [12] Nani LS, De ATAM, Santos MMDD, et al. Phototherapy promotes healing of cutaneous wounds in undernourished rats [J]. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 2014, 89(6): 899-904.
- [13] 车明海, 曾攀, 刘先成, 等. 蓝红光治疗创伤性伤口的效果观察 [J]. *西部医学*, 2016, 28(9): 1214-1217.
- [14] 张钊, 林希圣, 高月明, 等. LED-254 nm 紫外线对大鼠皮肤伤口愈合及血管生成的影响 [J]. *解放军医学院学报*, 2021, 42(3): 334-338.
- [15] Feng Y, Sanders AJ, Morgan LD, et al. Potential roles of suppressor of cytokine signaling in wound healing [J]. *Regenerative Medicine*, 2016, 11(2): 193-209.
- [16] 王秋实, 李平. TGF- $\beta_1$  受体 1 和 2 在 TGF- $\beta_1$  调节细胞增殖中的作用 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(2): 122-127.
- [17] 靳丽丽, 王瑞萍, 孙梦, 等. 外源性 VEGF 促进大鼠 II 度烫伤创面中晚期愈合 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2019, 28(3): 221-227.

收稿日期: 2022-02-11; 修回日期: 2022-03-08

编辑/杜帆