

· 基础研究 ·

发光二极管红光照射对骨髓间充质干细胞增殖的影响

尚林¹ 吴华² 王翔宇¹ 王爱国¹ 贾光辉¹ 李琦¹¹郑州市骨科医院足踝外科, 郑州 450052; ²华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科, 武汉 430030

通信作者: 王翔宇, Email: 453616978@qq.com

【摘要】 目的 观察发光二极管(LED)红光照射对大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)增殖的影响。**方法** 通过体外培养 SD 大鼠骨髓 MSCs, 将 LED 红光光源置于 MSCs 上方 2 cm 处, 红光波长 620 nm, 测得光功率密度为 6.67 mW/cm², 能量密度分别设定为 0, 0.5, 1 和 2 J/cm², 其中 0 J/cm² 组作为对照组, 其它组作为实验组。0.5 J/cm² 组、1 J/cm² 组和 2 J/cm² 组分别给予 75 s, 150 s 和 300 s LED 红光照射, 12 h 后重复照射 1 次, 共照射 3 次。于照射后 48 h 分别采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测各组细胞增殖活性, 采用 EdU 细胞增殖试剂盒检测各组细胞 DNA 复制水平, 采用流式细胞仪检测各组 MSCs 细胞周期变化情况。**结果** 经 620 nm 红光照射后, 发现各实验组细胞增殖活性及 DNA 复制水平均较对照组明显增强 ($P < 0.05$), 细胞生长周期均较对照组明显缩短 ($P < 0.05$), 且上述指标变化幅度均以 0.5 J/cm² 组最显著。**结论** 低能量 LED 红光照射能增强 SD 大鼠骨髓 MSCs 细胞 DNA 复制活性, 缩短细胞生长周期, 从而促进 MSCs 体外增殖。

【关键词】 低能量光疗法; 发光二极管; 光生物调节作用; 间充质干细胞; 增殖**基金项目:** 国家自然科学基金(51077065)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.10.002

The effect of red light irradiation on the proliferation of mesenchymal stem cells

Shang Lin¹, Wu Hua², Wang Xiangyu¹, Wang Aiguo¹, Jia Guanghui¹, Lin Qi¹¹Department of Foot and Ankle Surgery, Zhengzhou Orthopaedics Hospital, Zhengzhou 450052, China; ²Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: Wang Xiangyu, Email: 453616978@qq.com

【Abstract】 Objective To study the effect of red light on the proliferation of mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** BMSCs were isolated from Sprague-Dawley rats and cultured in vitro. They were irradiated with red light delivered by a light-emitting diode placed 2 cm above the cell layer. The light had a wavelength of 620 nm and a maximum power of 1 W. The measured optical power density was 6.67 mW/cm². The cells were randomly divided into a control group and three experimental groups. The control group was not irradiated, while the other 3 groups were irradiated at 0.5, 1 and 2 J/cm² for 75 s, 150 s or 300 s, repeated twice with an interval of 12 hours. Forty-eight hours after the irradiation, cellular proliferation was evaluated using CCK-8 assays and DNA replication was quantified with a Cell-Light EdU. Changes in the cell cycle parameters were detected using flow cytometry. **Results** After the irradiation, the proliferation and DNA replication of the experimental group were significantly strengthened, while the cell growth cycle was significantly shortened compared with the control group, especially in the group irradiated at 0.5 J/cm². **Conclusion** Low-energy red light irradiation can promote the proliferation of mesenchymal stem cells in vitro by enhancing DNA replication and shortening the cell growth cycle.

【Key words】 Low-energy phototherapy; Light-emitting diodes; Photobiomodulation; Mesenchymal stem cells; Proliferation**Funding:** National Natural Science Foundation of China (grant 51077065)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.10.002

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类来源于骨髓且具有自我增殖能力和横向分化潜能的干细胞, 能给骨组织修复提供潜在细胞来源, 目前已成为骨组织工程中的种子细胞^[1]。由于 MSCs 在骨髓中

的含量并不高, 因此如何将体内骨髓 MSCs 在离体条件下进行分离纯化并实现体外扩增具有重要临床意义。光生物调节干预(photobiomodulation, PMB)作为一种非侵入性治疗技术, 在生物医学中应用日趋广泛, 能促进

MSCs 增殖、分化及组织修复,可应用于再生医学领域^[2]。目前骨组织工程研究进行光生物调节干预时主要将低能量激光作为刺激因素,如波长 650 nm、0.04 J/cm² 低能量激光照射能促进培养的人类脐带血 MSCs 增殖^[3]。目前发光二极管(light emitting diode, LED)作为一种新型光源在医疗领域应用迅速发展,一定功率和能量密度的 LED 照射能激活靶细胞,发挥与相干光源类似的生物学效应^[4]。基于此,本研究采用 LED 光源发出的波长 620 nm 红光照射 Sprague-Dawley (SD) 大鼠来源的骨髓 MSCs,并观察 LED 红光照射对其增殖的影响。

材料与方法

一、主要实验仪器及试剂

本研究主要实验仪器包括 LED 光源(北京佳光公司)、倒置相差显微镜(Olympus 公司)、DG3022A 型酶联免疫检测仪(华东电子管厂)、台式微型离心机、冷冻桌面离心机(Eppendorf 公司)等。主要实验试剂包括优质胎牛血清(Gibco 公司)、达尔伯克 DMEM-F12 培养基(Hyclone 公司)、胰酶(Amersco 公司)、Rnase 酶、碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染液、EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyundine)细胞增殖检测试剂盒(锐博生物科技有限公司)、细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)(碧云天生物技术研究)等。

二、实验方法

1. MSCs 提取、纯化与培养:选取 100~120 g 的 4 周龄 SD 大鼠数只,雌雄不限,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。将 SD 大鼠颈椎脱臼处死,经 75%酒精浸泡 10 min,在超净工作台上分离双侧股骨及胫骨,剔除周围肌肉组织,剪去包括骺板在内的两骺端;采用 5 ml 注射器抽取 10 ml 含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养基(内含青霉素、链霉素各 100 U/ml)并冲洗骨髓腔,将冲洗液反复吹打制成骨髓细胞悬液后缓慢注入预先加有 50 ml Percoll(密度为 1.082 g/ml)分离液的离心管中,在 4 ℃ 环境下离心(500 r/min)20 min。小心吸取离心液界面上乳白色云雾状细胞层,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)漂洗杂质 2 次,再用含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养基漂洗,离心(80 r/min)10 min 后去上清;计数并调整细胞密度为 5×10^6 个/ml 后直接接种于 50 ml 培养瓶内,置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度细胞培养箱中进行培养,接种后约 24 h 半量换液,去除非贴壁细胞,以后每 2 天换液 1 次,约 5~7 d 后当细胞铺满单层 90%时,先用 PBS 清洗 2 次,再用 0.25%胰蛋白酶按 1:2 进行消化传代。

2. MSCs 分组与红光照射:将 LED 红光光源置于 MSCs 上方 2 cm 处,光源发出红光波长为 620 nm,最大

功率为 1 W,测得细胞处光功率密度为 6.67 mW/cm²,能量密度分别设定为 0, 0.5, 1 和 2 J/cm²,其中 0 J/cm² 组作为对照组,其它组作为实验组。0.5 J/cm² 组、1 J/cm² 组和 2 J/cm² 组分别给予 75 s, 150 s 和 300 s 红光照射,12 h 后重复照射 1 次,共照射 3 次。照射时注意避免各组细胞间相互干扰及其它光源影响。

三、细胞增殖活性检测

取呈对数生长的第 3 代细胞,接种于 96 孔板中(100 μl/孔, 1×10^3 个/μl),每组均设立 10 个复孔。待细胞充分贴壁后(约接种 24 h 后)给予红光照射,各组于照射后 48 h 去除培养基,用 PBS 漂洗细胞 2 次,小心吸干孔内液体后,每孔加入 100 μl 无血清 DMEM-F12,避光条件下每孔再加入 10 μl CCK-8 溶液,以加相应量细胞培养基及 CCK-8、但不注入细胞的孔作为调零孔,置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中避光孵育 1 h,使用酶标仪检测各组标本在 450 nm 处光密度值(optical density, OD),重复检测 3 次。

四、细胞 DNA 复制活性检测

取呈对数生长的第 3 代细胞,按每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,每组均设立 10 个复孔。待细胞充分贴壁后给予相应红光照射,于照射后 48 h 检测细胞 DNA 复制活性,经 EdU 标记、细胞固定、EdU 染色、DNA 染色等操作后立即进行荧光显微镜检测,并采用 Image Pro Plus 6.0 版软件进行分析。上述检测重复进行 3 次。

五、细胞周期检测

取呈对数生长的第 3 代细胞,按每皿 1×10^4 个细胞密度接种于直径 35 mm 细胞培养皿中,每组均设立 6 个复孔。待细胞充分贴壁后给予相应红光照射,于照射后 48 h 采用 0.25%胰蛋白酶充分消化细胞,离心收集细胞并经预冷 PBS 洗涤后制成单细胞悬液,将细胞悬液加入到预冷 70%酒精中并在 4 ℃ 环境下固定过夜,将配置好的 PI 染液对各组细胞进行染色,4 ℃ 避光孵育 30 min,采用流式细胞仪以标准程序进行检测,共计数 2~3 万个细胞,结果用细胞周期拟和软件 ModFit 进行分析。上述检测重复进行 3 次。

六、统计学分析

本研究所得计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 20.0 版统计学软件包进行数据分析,应用单因素方差分析进行数据比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组 MSCs 形态学观察比较

通过倒置相差显微镜观察发现,分选后的 MSCs 呈长梭形或多角形,经红光照射第 3 天后,发现各实验组细胞生长状况、融合程度均明显优于对照组,其中以 0.5 J/cm² 组细胞生长形态最佳,具体情况见图 1。

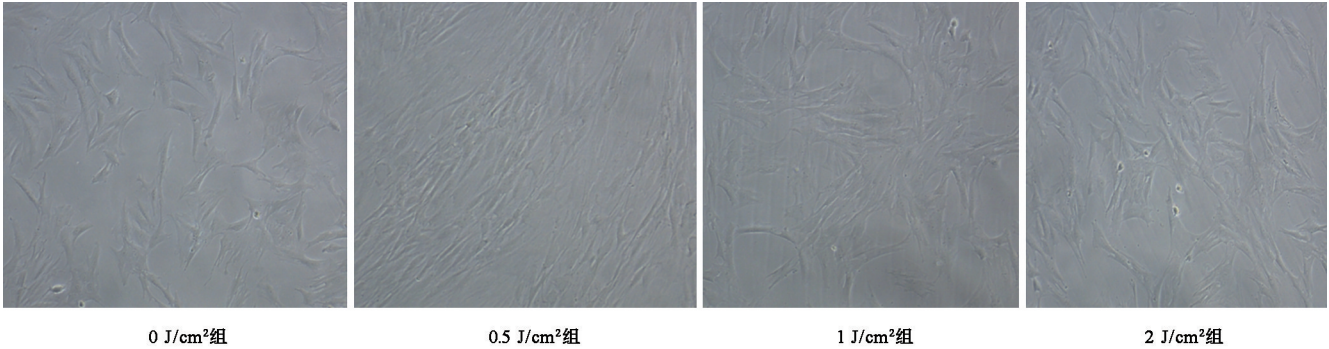


图 1 各组 MSCs 形态学比较(倒置相差显微镜,×100)

二、各组 MSCs 增殖活性比较

各组 MSCs 增殖情况详见表 1,经红光照射后第 1 天、第 2 天时各组细胞 OD 值组间差异均无统计学意义($P>0.05$);经红光照射第 3 天后发现各实验组细胞 OD 值均较对照组明显增加($P<0.05$),并以 0.5 J/cm² 组细胞增殖活性最显著。

表 1 经不同能量密度红光照射后各组细胞增殖活性比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	光照第 1 天后 OD 值	光照第 2 天后 OD 值	光照第 3 天后 OD 值
对照组	0.2236±0.0627	0.3375±0.0489	0.5623±0.0815
0.5 J/cm ² 组	0.2591±0.0638	0.4103±0.0378	1.3291±0.0538 ^a
1 J/cm ² 组	0.2563±0.0358	0.3921±0.0630	0.9745±0.0655 ^a
2 J/cm ² 组	0.2721±0.0571	0.3769±0.0462	0.7767±0.0709 ^a

注:与对照组比较,^a $P<0.05$

三、各组 MSCs DNA 复制活性比较

各组细胞 DNA 复制情况详见图 2,蓝色荧光代表未处于复制状态的细胞(A),红色荧光代表处于复制

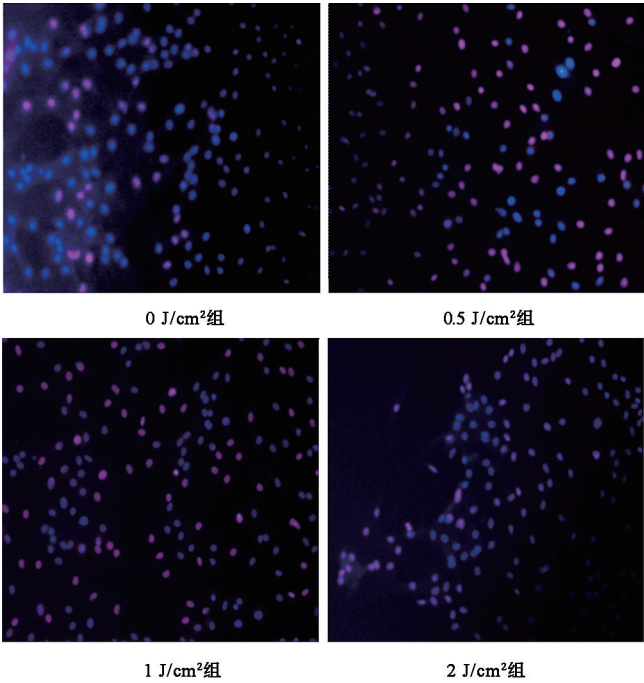


图 2 各组细胞 DNA 复制活性比较

状态的细胞(B);经 Image Pro plus 6.0 版软件分析后发现,各实验组细胞 B/A 比值均显著高于对照组水平,其中以 0.5 J/cm² 组 B/A 比值增高幅度最显著。

四、各组 MSCs 细胞周期变化比较

各组 MSCs 细胞周期变化情况详见表 2,与对照组比较,发现各实验组处于 G₀-G₁ 期细胞数量均明显减少,处于 S、G₂-M 期细胞数量均明显增多,且 DNA 合成旺盛,与对照组间差异均具有统计学意义($P<0.05$);其中以 0.5 J/cm² 组进入 DNA 合成期及合成后期的细胞数量最多。

表 2 经不同能量密度红光照射后各组 MSCs 细胞周期变化分析(%)

组别	G ₀ -G ₁ 期	S 期	G ₂ -M 期
对照组	76.71±0.23	9.47±0.21	13.42±0.50
0.5 J/cm ² 组	64.73±0.56 ^a	15.56±0.42 ^a	22.61±0.25 ^a
1 J/cm ² 组	68.53±0.45 ^a	13.21±0.30 ^a	19.86±0.68 ^a
2 J/cm ² 组	71.49±0.37 ^a	13.65±0.58 ^a	16.16±0.43 ^a

注:与对照组比较,^a $P<0.05$

讨 论

传统 PBM 干预通常采用激光器,价格较昂贵,且对人体健康具有潜在危害。LED 能将电能转化为非相干性单色光能,具有体积小、低能量、特定脉冲、光谱范围窄、转换效率高、寿命长、易操作、经济安全等特点^[5],是目前国外医用光源的研究热点,在光疗领域中得到广泛应用。Yang 等^[6]采用波长 620 nm、能量密度 2 J/cm² 的 LED 照射人脐带血 MSCs,发现能促进 MSCs 增殖及向成骨细胞分化。本研究采用 LED 发射的 620 nm 红光照射 SD 大鼠骨髓 MSCs,经照射一段时间后分别从细胞增殖、DNA 复制活性及细胞周期变化等方面进行检测,证实特定参数的 LED 红光照射能促进 MSCs 增殖。

CCK-8 法可简便而准确地检测细胞增殖水平,该试剂中含有 WST-8,在电子载体作用下被线粒体内脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲臞产物,生成的甲臞量与存活细胞数量具有正相关性,能间接反映存

活细胞数量。本实验结果显示,经波长 620 nm 红光照射后 3 d 时,各实验组细胞增殖活性均较对照组明显增强($P<0.05$),其中以 0.5 J/cm² 组细胞增殖活性最显著。EdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物,能在细胞增殖期代替胸腺嘧啶渗入正在复制的 DNA 分子中,本研究通过基于 EdU 与 Apollo 荧光染料的特异性反应,能快速检测细胞 DNA 复制活性,本研究结果显示各实验组细胞 DNA 复制活性均较对照组明显增强,其中以 0.5 J/cm² 组细胞 DNA 复制活性最显著。细胞生长周期主要包括 DNA 合成前期(G_1)、DNA 合成期(S)、DNA 合成后期(G_2)及细胞分裂期(M),后三期通常较稳定,细胞周期所经历时间主要取决于 G_1 期长短。本研究结果显示,经 LED 红光照射后 3 d 时各实验组细胞 G_1 期比例均较对照组明显减小,后三期比例均较对照组明显增加,其中以 0.5 J/cm² 组细胞周期变化幅度最显著,提示 LED 红光照射能缩短 MSCs DNA 合成前期,在后 3 期比较稳定情况下,从而使整个细胞生长周期缩短。上述结果表明,620 nm LED 非相干红光照射能通过提高细胞 DNA 复制活性,缩短细胞生长周期,从而促进 MSCs 体外增殖水平。

目前研究显示,不同波长光照具有不同生物学作用,如 LED 蓝光波长主峰为 450~470 nm,可应用于新生儿黄疸治疗^[7]。张丽敏等^[8]在研究光生物调节对糖尿病视网膜病变的防治作用时发现,620 nm LED 光照能激活抗凋亡 P13K/AKT 通路,抑制高糖引起的细胞凋亡。Martignago 等^[9]评估不同波长 LED 光照对大鼠全层皮肤移植物的影响,发现 630 nm 红光照射可有效改善皮肤-表皮连接并调节与组织修复相关的蛋白水平。光生物调节作用存在“窗口特异性”(window-specificity),即在某些特定波长条件下,一定能量密度范围内的光照可产生较明显生物刺激效应。Hou 等^[10]采用 635 nm 低能量激光对骨髓 MSCs 进行照射,功率密度为 6.61 mW/cm²,在照射 0,2,4,6,8 和 10 d 后分别采用 MTT 比色法和 BrdU 法检测细胞增殖情况,发现各实验组细胞在照射 0~4 d 期间呈对数生长,其中以 0.5 J/cm² 组细胞增殖效应最明显;在照射 4~6 d 期间细胞增殖处于平台期;照射 8 d 后发现对细胞增殖产生抑制作用。彭飞等^[11]观察不同能量密度非相干性红光(波长 620 nm)照射对骨髓 MSCs 分化的影响,发现光照后 4 d 时 1 J/cm² 组和 2 J/cm² 组细胞增殖活性均较对照组明显增强($P<0.05$),而 4 J/cm² 组细胞增殖活性与对照组间差异无统计学意义($P>0.05$)。Li 等^[12]采用 630 nm 低能量红光照射骨髓 MSCs,光功率密度分别设定为 5,10 和 15 mW/cm²,能量密度包括 2,4 J/cm²,结果发现 15 mW/cm²、4 J/cm² 是 630 nm 低能量红光照射促进骨髓 MSCs 增殖的理想参数。本研究也得到类似结果,如

各实验组 MSCs 经相应参数 620 nm 红光照射后,发现其细胞增殖活性均较对照组明显增强,并以 0.5 J/cm² 组细胞增殖水平最显著,说明 LED 红光照射对骨髓 MSCs 的促增殖作用也存在窗口效应。

综上所述,本研究结果表明,LED 发出的波长 620 nm 非相干红光在特定光强及照射时间条件下,能促进体外骨髓 MSCs 增殖,为骨组织工程创造有利条件,而 LED 最佳光刺激参数及促进体外 MSCs 增殖的确切生物学机制还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Guan M, Xu Y, Wang W, et al. Differentiation into neurons of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Eur Cytokine Netw, 2014, 25(3): 58-63. DOI: 10.1684/ecen.2014.0357.
- [2] Chen H, Wu H, Yin H, et al. Effect of photobiomodulation on neural differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Lasers Med Sci, 2019, 34(4): 667-675. DOI: 10.1007/s10103-018-2638-y.
- [3] Vakhruhev IV, Yusupov VI, Raeva OS, et al. Effect of low-level laser irradiation on proliferative activity of Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells [J]. Bull Exp Biol Med, 2019, 5(1): 136-139. DOI: 10.1007/s10517-019-04477-1.
- [4] Oh PS, Jeong HJ. Therapeutic application of light emitting diode: photo-oncologic approach [J]. J Photochem Photobiol B, 2019, 192(8): 1-7. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.01.003.
- [5] 崔鸿忠, 李正佳, 范晓红. 发光二极管光源疗法在生物医学中的应用 [J]. 激光技术, 2006, 30(6): 638-642. DOI: 10.3969/j.issn.1001-3806.2006.06.003.
- [6] Yang D, Yi W, Wang E, et al. Effects of light-emitting diode irradiation on the osteogenesis of human umbilical cord mesenchymal stem cells in vitro [J]. Sci Rep, 2016, 6: 37370. DOI: 10.1038/srep37370.
- [7] 周婷, 周晓玉. 蓝光发光二极管在新生儿高胆红素血症治疗中的应用 [J]. 国际儿科学杂志, 2014, 41(1): 15-17.
- [8] 张丽敏, 张凤久, 林安岭, 等. 发光二极管照射对高糖培养的视网膜神经元凋亡的光生物调节作用及其机制 [J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(7): 591-596. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.07.004.
- [9] Martignago CCS, Tim CR, Assis L, et al. Effects of red and near-infrared LED light therapy on full-thickness skin graft in rats [J]. Lasers Med Sci, 2019, 7(5): 1-8. DOI: 10.1007/s10103-019-02812-6.
- [10] Hou JF, Zhang H, Yuan X, et al. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation [J]. Lasers Surg Med, 2008, 40(10): 726-733. DOI: 10.1002/lsm.20709.
- [11] 彭飞, 吴华, 郑亚东, 等. 620 nm 非相干性红光照射对大鼠成骨细胞增殖及分化的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2011, 33(5): 332-335. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.05.004.
- [12] Li WT, Leu YC. Effects of low level red-light irradiation on the proliferation of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow [J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2007, 2007: 5830-5833. DOI: 10.1109/IEMBS.2007.4353673.

(修回日期: 2019-06-19)

(本文编辑: 易 浩)