

· 基础研究 ·

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

彭飞 吴华 郑亚东 徐西强 虞冀哲

【摘要】目的 研究发光二极管(LED)发射的非相干性红光对大鼠成骨细胞增殖及分化的影响。**方法** 通过体外培养 SD 大鼠成骨细胞,将 620 nm 波长的 LED 光源置于细胞上方 2 cm 处,根据红光照射时间将细胞分为对照组、1 J/cm² 组、2 J/cm² 组及 4 J/cm² 组,分别给予红光照射 0 s、150 s、300 s 和 600 s,红光照射每天 1 次。采用 CCK-8 法检测红光照射后第 2、4 天时各组细胞增殖活性;采用碱性磷酸酶(ALP)活性试剂盒检测照射后第 9 天时细胞 ALP 比活性;采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组细胞 I 型胶原(Collα1)、骨钙素(Bglap)及 Runx2 的表达情况。**结果** 在红光照射后第 4 天时,发现 1 J/cm² 组、2 J/cm² 组成骨细胞增殖活性较对照组明显增强($P < 0.05$);在红光照射后第 9 天时,4 J/cm² 组 ALP 比活性较对照组明显提高($P < 0.05$);各红光照射组细胞骨钙素及 Runx2 表达均较对照组明显增强。**结论** LED 来源的 620 nm 非相干性红光照射能显著促进成骨细胞增殖及分化。

【关键词】 成骨细胞; 增殖; 分化; 光生物调节作用

The effects of 620nm noncoherent red light irradiation on proliferation and osteogenic differentiation of rat osteoblasts PENG Fei, WU Hua, ZHENG Ya-dong, XU Xi-qiang, YU Ji-zhe. Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: WU Hua, Email: hwhust@yahoo.cn

【Abstract】Objective To investigate the effects of 620nm noncoherent red light emitted from light-emitting diode (LED) on proliferation and osteogenic differentiation of rat osteoblasts. **Methods** Osteoblasts were isolated from SD rat and cultured in vitro. The LED was placed at 2cm above the cell layer. Cells were divided into four groups and each group was irradiated for 0s, 150s, 300s and 600s at energy dose of 0, 1, 2, and 4J/cm², respectively. Cells were irradiated once every day. Cellular proliferation activities were evaluated by using cell counting kit-8 (CCK-8) at 2nd and 4th d. The alkaline phosphatase (ALP) ratio activity was evaluated by alkaline phosphatase activity kit at the 9th d, and expressions of osteoblast master genes (Collα1, Bglap and Runx2) were monitored as indicators of osteoblast differentiation by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. **Results** In the group irradiated with 1 and 2 J/cm² proliferation activities of osteoblasts enhanced significantly compared with the control group at the 4th d ($P < 0.05$). In the group irradiated with 4 J/cm² ALP ratio activity elevated significantly compared with the control group at the 9th d ($P < 0.05$). In the group of red light irradiation expressions of Bglap and Runx2 enhanced significantly. **Conclusion** The 620nm noncoherent red light emitted from LED can promote proliferation of osteoblasts and enhance osteogenic differentiation significantly.

【Key words】 Osteoblast; Proliferation; Differentiation; Photobiomodulation

上世纪 70 年代匈牙利科学家 Endre Mester 通过一系列实验及临床观察后,首次提出光生物刺激(photobiostimulation)的概念^[1-3]。随着对该领域认识逐渐深入,2003 年美国激光医学年会将光生物刺激作用修正为光生物调节作用(photobiomodulation)。当前研究已证实,由激光器或发光二极管(light emitting diode,

LED)产生的低能量光可对细胞增殖^[4]、生长因子释放^[5-6]、胶原合成^[7]等多种生理过程发挥调节作用。由于激光具有较好的单色性和均一性,目前有关光生物调节作用的研究主要将激光作为光源,而涉及非相干性光源 LED 的研究偏少。根据 Karu 的研究理论^[8],相干性光源及非相干性光源具有类似的光生物学效应。Vinck 等^[9]通过对比 LED 和激光后发现,两者均能刺激成纤维细胞生长与增殖。为探讨非相干性光源对成骨细胞活性的调节作用,本研究采用 LED 发出的红光照射大鼠来源的成骨细胞,检测其对成骨细胞增殖及分化的影响。现报道如下。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.03.002

基金项目:国家自然科学基金项目(50477043)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科

通信作者:吴华,Email: hwhust@yahoo.cn

材料与方法

一、主要试剂及仪器

主要试剂包括 DMEM 培养基 (Hyclone 公司)、优质胎牛血清 (Hyclone 公司)、胰蛋白酶、青霉素 G、硫酸庆大霉素 (Amersco 公司)、TRIZOL 试剂 (Invitrogen 公司)、CCK-8 试剂盒、BCA 试剂盒 (碧云天生物技术研究所)、逆转录试剂盒 (Toyoba 公司)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性检测试剂盒 (南京生物建成公司出品) 等。主要仪器包括倒置相差显微镜 (Olympus 公司)、台式微型离心机、酶标仪、冷冻桌面离心机 (Eppendorf 公司)、620 nm 波长 LED 光源 (北京佳光公司提供)。

二、实验动物

出生 24 h 内的 Sprague-Dawley (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。

三、实验方法

1. 成骨细胞分离及体外培养: 将 SD 大鼠颈椎脱臼处死后, 用 75% 乙醇浸泡 10 min, 取出后置于含有双抗 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素 G, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸庆大霉素) 的磷酸缓冲液 (Phosphate Buffer Solution, PBS) 中洗去酒精, 然后置于无菌培养皿中。剪开乳鼠头部皮肤, 切取颅盖骨, 分离颅盖骨的骨膜及软组织, 经 PBS 液漂洗 2 次, 在 PBS 液中将骨片剪成 1 mm $\times$ 1 mm 碎片。将颅盖骨碎片接种于 50 cm^2 培养瓶中, 加入少量 5% 胰蛋白酶, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的细胞培养箱中消化 1 h; 移除消化液, 加入适量含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的细胞培养箱中, 每 3~4 天进行全量换液 1 次; 培养 7~10 d 至细胞铺满单层时, 用 0.5% 胰蛋白酶消化, 进行 1:3 传代培养, 取 3~4 代成骨细胞进行实验。

2. 分组与红光照射: 取 3~4 代成骨细胞按 6×10^4 个/皿的密度接种于直径 35 mm 的细胞培养皿中, 或以 2×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中。待细胞铺满皿底约 90% 时, 更换为含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗坏血酸、10 mM β -磷酸甘油钠的 DMEM 培养基进行培养。将 620 nm 波长 LED 光源置于细胞层上方 2 cm 处, 测得此时光功率密度为 6.67 mW/cm^2 , 将细胞分为 4 组, 分别为对照组、1 J/cm^2 组、2 J/cm^2 组及 4 J/cm^2 组, 所对应的红光照射时间分别为 0 s、150 s、300 s 及 600 s。红光照射每天 1 次。

3. 细胞增殖测定: 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖活性, 依照试剂盒说明书在红光照射后第 2 天及第 4 天时进行检测, 采用酶标仪在 450 nm 波长处检测各组细胞样本的吸光度值 (optical density, OD)。

4. 细胞 ALP 比活性测定: 于红光照射后第 9 天时检测 ALP 比活性, 采用 PBS 液漂洗皿中细胞 3 次, 每皿加入 0.1% TritonX-100 500 μl , 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内 12 h, 期间将培养皿中裂解液置于 -30 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内反复冻融 3 次。依据试剂盒说明书流程, 检测单位体积裂解液中的 ALP 活性, 同时使用 BCA 试剂盒检测细胞裂解液中的总蛋白浓度做内参调平, 计算每克样本中 ALP 的活性。

5. 总 RNA 提取与逆转录-聚合酶链反应: 于红光照射后第 9 天时按照 TRIZOL 试剂说明书提取总 RNA, 根据逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA, 在 25 μl 体系中对模板 cDNA 进行扩增。扩增产物行水平琼脂糖凝胶电泳, 待电泳结束后取出凝胶进行成像分析。引物序列如下, I 型胶原 (Collagen Type I Alpha 1, Coll α 1): 5'-GGTGTTATGACTTCAGCTTCC-3', 5'-CAGTACTCTCCGCTCTTCCAGT-3'; 骨钙素 [bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein, Bglap]: 5'-AGCTCAACCCCAATTGTGAC-3', 5'-AGCTGTGCCGTCCATACTTT-3'; Runx2: 5'-CAGAC-CAGCAGCACTCCATA-3', 5'-CAGCGTCAACACCAT-CATTC-3'; β -actin: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3', 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'。

四、统计学分析

采用 SPASS 13.0 版统计学软件包进行数据分析, 应用单因素方差分析进行比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组成骨细胞增殖活性比较

红光照射后各组成骨细胞增殖活性结果详见表 1, 表中数据显示, 红光照射后第 2 天时各组细胞增殖活性组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 第 4 天时发现 1 J/cm^2 组和 2 J/cm^2 组增殖活性较对照组明显增加 ($P < 0.05$), 4 J/cm^2 组成骨细胞增殖活性虽有增加趋势, 但与对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 红光照射后各组成骨细胞增殖活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	光照 2 d 后 OD 值	光照 4 d 后 OD 值
对照组	0.645 $\pm$ 0.081	1.186 $\pm$ 0.137
1 J/cm^2 组	0.649 $\pm$ 0.113	1.421 $\pm$ 0.183 ^a
2 J/cm^2 组	0.663 $\pm$ 0.124	1.364 $\pm$ 0.162 ^a
4 J/cm^2 组	0.671 $\pm$ 0.102	1.286 $\pm$ 0.156

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$

二、各组成骨细胞 ALP 比活性比较

红光照射后第 9 天时各组成骨细胞 ALP 比活性检测结果详见表 2, 表中数据显示, 4 J/cm^2 组成骨细

胞 ALP 比活性较对照组明显升高 ($P < 0.05$), 而 1 J/cm² 组、2 J/cm² 组成骨细胞 ALP 比活性与对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 红光照射后各组成骨细胞
ALP 比活性比较 (U/g 蛋白, $\bar{x} \pm s$)

组别	ALP 比活性
对照组	58.28 ± 6.43
1 J/cm ² 组	61.29 ± 11.74
2 J/cm ² 组	67.65 ± 9.48
4 J/cm ² 组	79.96 ± 14.06 ^a

注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$

三、各组成骨细胞分化情况比较

红光照射后第 9 天时,各组成骨细胞分化情况详见图 1、表 3,对各组成骨细胞凝胶电泳结果分析后发现,各组成骨细胞 I 型胶原 (Collα1) 表达组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 2 J/cm² 组及 4 J/cm² 组骨钙素表达均较对照组明显提高 ($P < 0.05$); 各红光照射组 Runx2 表达均较对照组明显增多 ($P < 0.05$)。

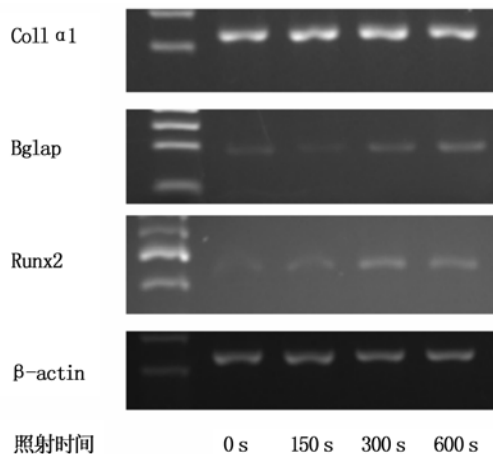


图 1 红光照射后第 9 天时各组成骨细胞电泳结果比较

表 3 红光照射后第 9 天时各组成骨细胞分化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Collα1	Bglap	Runx2
对照组	100.0 ± 9.1	100.0 ± 7.7	100.0 ± 10.7
1 J/cm ² 组	111.4 ± 11.6	104.8 ± 10.3	126.9 ± 14.6 ^a
2 J/cm ² 组	94.5 ± 16.8	145.3 ± 13.4 ^a	188.0 ± 21.3 ^a
4 J/cm ² 组	92.7 ± 14.2	142.6 ± 15.7 ^a	129.0 ± 17.6 ^a

注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$

讨 论

目前临床关于光生物调节作用机制仍未明了,一般认为光照刺激提高了细胞线粒体活性,并由此引发一系列生理反应,从而影响 mRNA 合成,最终导致各种细胞因子发生改变^[4]。低能量光照 (low level laser therapy, LLLT) 对骨组织的影响一直是光生物研究领

域的重点,早期体内研究结果显示,LLLT 可促进人齿部根尖及牙槽、小鼠胫骨和兔桡骨的骨折愈合^[10-12];一些体外实验结果亦表明,LLLT 可促进骨骼肌来源的卫星细胞表达成骨细胞特征,并促进其增殖^[13];而进一步研究证实,LLLT 在促进骨骼肌细胞增殖过程中,还激活了 MAPK/ERK 信号传导通路等^[14]。

Karu^[17]认为光生物学效应存在一个“窗口特异性”(window-specificity),即在某些波长下,一定能量密度范围内的光照可产生较显著的生物刺激效应。Khadra 等^[18]曾使用 830 nm 的半导体激光在 1 J/cm²、3 J/cm² 强度下照射种植在钛皿中的成骨细胞,发现第 4 天时 2 组细胞均表现出明显增殖效应。本实验也有类似结果发现,如通过低能量非相干性红光照射大鼠成骨细胞并观察其对细胞增殖及分化的影响,结果发现短时间光照刺激可促进各光照组细胞增殖(如接受红光刺激的成骨细胞在第 4 天时其细胞增殖活性明显高于对照组),同时还能显著加快成骨细胞分化速度。Khadra 等所使用的光源及照射参数均与本实验不同,但两研究均表现出相似的增殖效果,这在另一层面上也支持了 Karu 的观点,即相干性光源及非相干性光源具有类似的光生物学效应。

ALP 高表达是成骨细胞分化的重要标志之一,它通过水解有机磷酸盐而增加局部磷酸盐的浓度,从而导致该处形成羟基磷灰石结晶。在体外成骨诱导条件下,骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 或成骨细胞完成增殖后,细胞 ALP 活性会逐渐增高;而当细胞进入矿化期时则表现出较低的 ALP 活性^[19]。因此本研究选择在第 9 天、即钙盐沉积出现之前进行 ALP 比活性检测,发现 4 J/cm² 组细胞 ALP 活性明显增强,约为对照组的 1.32 倍,提示一定强度的红光照射能够促进早、中期成骨细胞分化、加快其成熟速度。

在成骨细胞发育过程中,其基因表达变化分为三个阶段,分别是细胞增殖、细胞外基质成熟及矿化阶段。在细胞增殖阶段,调控细胞周期及生长的基因表达旺盛,同时还分泌纤粘连蛋白或 I 型胶原等细胞外基质;随后细胞进入外基质成熟阶段,细胞 ALP 活性逐渐升高;在矿化发生阶段,骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 和骨钙素表达则显著增加^[19]。本实验进行 9 d 后,发现各组细胞 I 型胶原表达组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),这可能与细胞增殖阶段结束后 I 胶原合成停止有关;各光照组骨钙素表达均较对照组明显增强,表明其成骨细胞更加成熟。

由于 Runx2 是骨分化过程中的一个早期调控基因,能够调控 MSCs 定型及向成骨细胞系分化^[20],故通过观察 Runx2 水平对了解细胞分化程度具有重要

意义,本实验结果发现各光照组成骨细胞 Runx2 表达均较对照组明显增强,同时结合细胞 ALP 活性升高等现象,故推测在体外培养环境下,红光照射能促进成骨细胞成熟。

与光化学作用不同,光生物调节作用并不存在能量的线性依赖,也就是说并非照射能量越高,光生物调节作用就越显著,而是存在一个最佳的光照时间或光照能量^[21],只有在最佳参数附近,才能表现出显著的生物学效应。Niemz^[22]在综合大量文献后提出,当能量密度在 $1 \sim 10 \text{ J/cm}^2$ 范围内时,激光对机体组织能产生显著的生物刺激效应;另一些研究发现, $1 \sim 4 \text{ J/cm}^2$ 剂量的激光照射对间充质干细胞、成骨细胞均可产生较明显刺激作用^[6,23]。本研究借鉴激光与组织相互作用的模型,在实验中采用 $1, 2, 4 \text{ J/cm}^2$ 三种剂量的红光照射,初步探讨非相干性红光的光生物调节作用与剂量间的相关性,发现剂量为 1 J/cm^2 的红光照射表现出增殖刺激作用,而 2 J/cm^2 及 4 J/cm^2 红光照射主要表现出促细胞分化作用,因此我们推测非相干性红光促进细胞增殖及分化的机制可能存在差异,光照剂量也许是相关因素之一,但需要进一步研究加以证实。

综上所述,本研究结果表明,LED 来源的红光在特定光强及照射时间条件下,对成骨细胞增殖及分化均有促进作用。由于 LED 光源相对激光发生器更加经济、照射范围更广泛,因此更适合在科研及临床工作中广泛普及,为成骨细胞体外扩增及分化提供新的途径。至于红光照射促进细胞增殖、分化的理想参数及确切机制,还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Mester E, Spiry T, Szende B, et al. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg*, 1971, 122:532-535.
- [2] Mester E, Korenyi BA, Spiry T, et al. The effect of laser irradiation on the regeneration of muscle fibers. *Z Exp Chir*, 1975, 8:258-262.
- [3] Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med*, 1985, 5:31-39.
- [4] Karu T. Photobiology of low-power laser effect. *Health Physics*, 1989, 56:691-704.
- [5] Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol*, 1994, 59:167-170.
- [6] 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. *Lasers Surg Med*, 2008, 40:726-733.
- [7] Balboni GC, Brandi ML, Zonfrati R, et al. Effects of He-Ne/IR laser irradiation on two lines of normal human fibroblasts in vitro. *Arch Ital Anat Embryol*, 1986, 91:179-188.
- [8] Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J Quant Electr*, 1987, 23:1703-1711.
- [9] Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci*, 2003, 18:95-99.
- [10] Nagasawa A, Kato K, Negishi A. Bone regeneration effect of low level lasers including argon laser. *Laser Ther*, 1991, 3:59-62.
- [11] Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low power laser. *Lasers Surg Med*, 1987, 7:36-45.
- [12] Tang XM, Chai BP. Effect of CO_2 laser irradiation on experimental fracture healing; a transmission electron microscopic study. *Lasers Surg Med*, 1986, 6:346-352.
- [13] Ben DN, Shefer G, Irintchev A, et al. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1448:372-380.
- [14] Shefer G, Oron U, Irintchev A, et al. Low-energy laser radiation activates specific signal transduction pathways in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol*, 2001, 187:73-80.
- [15] Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, et al. Low-power helium: Neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med*, 2001, 28:355-364.
- [16] Kreisler M, Christoffers AB. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*, 2002, 30:365-369.
- [17] Karu TI. Effects of visible radiation on cultured cells. *Photochem Photobiol*, 1990, 52:1089-1098.
- [18] Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, et al. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*, 2005, 26:3503-3509.
- [19] Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*, 1990, 143:420-430.
- [20] Kern B, Shen J, Starbuck M. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem*, 2001, 276:7101-7107.
- [21] van Breuge HH, Bar PR. 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. *Lasers Surg Med*, 1992, 12:528-537.
- [22] Niemz MH. Laser-tissue interactions: fundamentals and applications. Berlin: Springer, 2003:45-46.
- [23] Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, et al. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*, 1998, 22:347-354.

(修回日期:2011-02-25)

(本文编辑:易 浩)