

# 低能量氦氖雷射對人類破骨細胞分化的影響

劉威忠<sup>1</sup> 黃川原<sup>2</sup> 李文星<sup>3</sup> 耿念慈<sup>1</sup> 黃玉芬<sup>4</sup> 莊輝<sup>2</sup> 康秀璠<sup>1</sup> \*林群智<sup>5</sup>

<sup>1</sup>慈濟技術學院 放射系,  
<sup>2</sup>南華大學 自然醫學研究所  
<sup>3</sup>慈濟醫院大林分院 放射腫瘤科  
<sup>4</sup>嘉義大學 應用化學研究所  
<sup>5</sup>南華大學 通識教育中心/自然醫學研究所

## 摘要

癌細胞轉移至骨組織常造成骨組織破壞及引起骨骼疼痛，目前常以游離輻射局部照射來加以處理，而由於低能量氦氖雷射已被發現可促進受傷骨組織進行修復作用，為瞭解其作用機制，本研究利用低能量氦氖雷射評估其對破骨細胞分化的影響，並同時比對游離輻射對破骨細胞的影響。本研究採分離人類周邊幹細胞與造骨細胞共同培養之模式，以誘發破骨細胞的分化，進而給與不同條件刺激，觀察其差異。結果顯示接受雷射照射組，其破骨細胞分化的數目相對少於對照組，但對已分化之破骨細胞的活性則較無影響，顯示低能量氦氖雷射可經由抑制分化的方式抑制破骨細胞。此外，游離輻射(10 Gy)照射組所得到的結果顯示其對破骨分化之抑制作用較氦氖雷射照射組為小，但對於已分化之破骨細胞，其抑制作用則很明顯。由此可知低能量氦氖雷射與游離輻射經由不同的機制抑制破骨細胞的分化；由 RT-PCR 分析破骨細胞分化因子的製造即可獲得証實。因此，低能量氦氖雷射與游離輻射均可抑制破骨細胞的分化數目，但前者是透過減少造骨細胞分泌破骨細胞分化因子來達成抑制破骨細胞的分化，就抑制破骨細胞數量方面效果較佳，但游離輻射照射對於破骨細胞的活性則有明顯的抑制作用。

**關鍵字：**低能量氦氖雷射、幹細胞、破骨細胞

## 前言

一些癌症如前列腺癌、乳癌(Brest cancer)轉移至骨組織時，常引發骨組織的崩解破壞(6)，增加病患骨骼疼痛與骨折機率，影響生活品質。癌細胞轉移至骨骼引發之骨組織病變，一般認為是癌細胞刺激骨組織，分泌破骨細胞增生或分化的因子，如破骨細胞分化因子(osteoclast differentiation factor, ODF)與破骨細胞活化因子如 IL-1(interleukin-1)(9)、RANKL (receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand)(8)等。

正常狀態下，骨生成作用與骨吸收作用會達到特定的平衡，其中主要兩種細胞為造骨細胞與破骨細胞；造骨細胞負責骨質製造，與骨組織微環境調節，破骨細胞則負責骨質吸收。破骨細胞源自血源性幹細胞，造骨細胞源自基質性(非血源性)幹細胞。目前幹細胞來源主要有骨髓幹細胞、周邊血幹細胞、臍帶血幹細胞與胚胎幹細胞。就成熟個體之幹細胞而言，以

功能簡單區分成血源性幹細胞與基質(非血源性)幹細胞，血源性幹細胞可分化成血球細胞，基質幹細胞則可分化成造骨細胞、軟骨細胞和神經細胞等。

破骨細胞可分泌抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)，促進骨質的分解，依其量的多寡可評估其活性狀態。目前處理破骨細胞過度活化的方式主要有兩種：一為物理方式，如放射線照射。二為藥物治療，如前列腺素(prostaglandin)(7)，然而受限於副作用治療效果受到限制，若能找到副作用較少，且有療效之方法將有助於病患減少病痛。一些研究發現低能雷射可促進造骨細胞的分化(4)，可增加骨量；故本研究以低能雷射照射幹細胞，觀察其分化狀態與其活性，藉以評估其療效。

## 實驗材料與方法

### 骨髓幹細胞培養

小鼠(C57BL/6 mice)經二氧化碳安樂死後，迅速取股骨與脛骨骨髓，細胞培養密度  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ ，在  $\alpha$  MEM medium，內含 10% 的血清與  $10^{-8}$  M 的 Dex. 溶液中培養 7 天，使其先分化成造骨細胞，培養期間，每三天更換新的培養基。

### 人類周邊幹細胞分離

採健康人類手部靜脈血 20 ml(含抗凝血劑)，離心後，取 Buffy coat，加入 Ficoll 試劑離心，將幹細胞(含淋巴球)分離備用。

### 誘發破骨細胞分化

將已分化之造骨細胞與人類周邊幹細胞 ( $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ ) 共同培養，以  $\alpha$  MEM medium(內含 10% 的血清及 Vit. D)，此共同培養系統會誘發破骨細胞分化。

### 實驗處理

以低能雷射(刺激時間 10 秒)，或  $\gamma$  射線(10 Gy) 照射，照射後於第 2 天萃取造骨細胞的 RNA，以 RT-PCR 檢測破骨細胞分化因子，比較其 mRNA 之相對含量，另外於第 10 天以染色法染破骨細胞，觀察實驗組與對照組破骨細胞數目。

### 反轉錄聚合酶連鎖反應

#### (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

周邊幹細胞與造骨細胞共同培養一天後，以磷酸鹽緩衝溶液(PBS)，沖洗兩次，加入 RNA 萃取試劑，將萃取之 RNA 冰存於  $-80^\circ\text{C}$  冰箱備用。接著，加入反轉錄酶，進行反轉錄作用。將反轉錄之 cDNA 利用聚合酶連鎖反應進行放大，引子(primer)的序列為：

Gapdh, 5' CCAGC CCCAG CGTCA AAGGA G 3' 和 5' GCGGG GCTCT CCAGA- AACAT CA 3' ; ODF,

5' GCTAT TATGG AAGGC TCATG 3' 和 5' CACCA- TCAGC TGAAG ATAGT 3' 聚合酶連鎖反應步驟： $94^\circ\text{C}$  的溫度下 3 分鐘, 1 cycle, 接著  $94^\circ\text{C}$  的溫度下 30 秒,  $55^\circ\text{C}$  30 秒,  $72^\circ\text{C}$  40 秒, 共 30 cycle, 之後在  $72^\circ\text{C}$  的溫度下 5 分鐘, 1 cycle, 步驟完成後，溫度設定在  $25^\circ\text{C}$ 。將產物加入 ethidium bromide 進行洋菜膠(2%)電泳，之後在電泳膠攝影系統中拍照分析。

### TRAP 染色

共同培養 10 天後，細胞經固定後，以 TRAP 染劑組套(Sigma, Co.)，染破骨細胞，加入染劑後避光，經 60 分鐘後，以去離子水沖掉染劑，再以 Hematoxylin 染細胞核。

## 結果與討論

人類周邊血幹細胞細胞與小鼠(C57BL/6 mice)的造骨細胞共同培養 10 天後，可發現破骨細胞的分化(圖 1,A)，而破骨細胞可分泌 TRAP(一種與骨質吸收有關的酶)，其量的多寡可作為破骨細胞活性的指標，並可經由染色劑呈色(圖 1,B)，TRAP 正染的部位呈粉紅色。由結果(圖 1,A)可發現破骨細胞(※標示處)相較於造骨細胞(箭頭標示處)顯得非常巨大，且破骨細胞周邊有帶狀突起邊緣。圖 1, B 為染色後之破骨細胞，可見 TRAP 被染成粉紅色，一般 TRAP 正染(經染色處理後可被染色)且細胞核  $\geq 3$  個的細胞，可歸類於破骨細胞(或稱為類破骨細胞)。

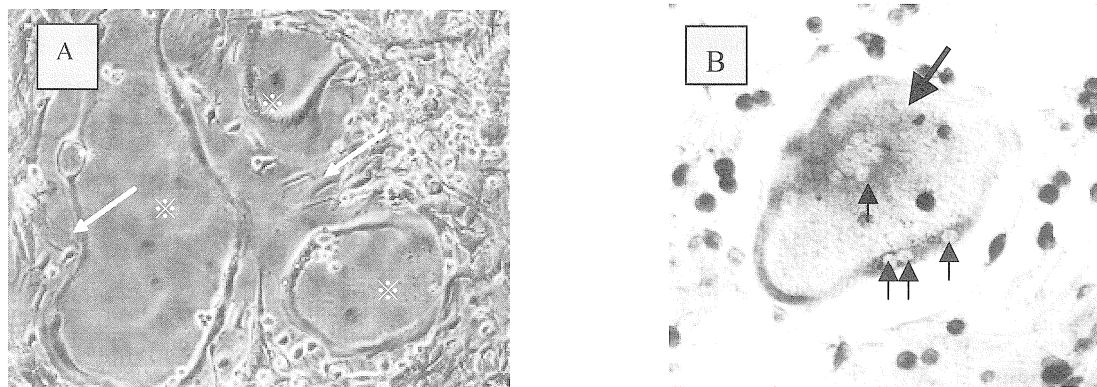


圖 1. 人類周邊幹細胞與小鼠造骨細胞共同培養 10 天後，誘發破骨細胞的分化。其中圖 A. 為利用相位差倒立顯微鏡所拍之未染色之細胞型態，符號※標示處，為三個已分化之破骨細胞，其細胞周圍有帶狀突起之邊緣；箭頭指示處為小鼠造骨細胞。圖 B. 為利用 TRAP 染劑所染出之破骨細胞，呈粉紅色，另外箭頭指示處，可見破骨細胞內有多個細胞核。

經氦氖雷射(照射 10 秒)或  $\gamma$  射線(10 Gy)照射後 10 天，以對照組為 1 的 TRAP 正染細胞統計結果(圖 2.)顯示，經氦氖雷射或  $\gamma$  射線照射後，TRAP 正染細胞數目都有減少的趨勢，其中以氦氖雷射組抑制效果

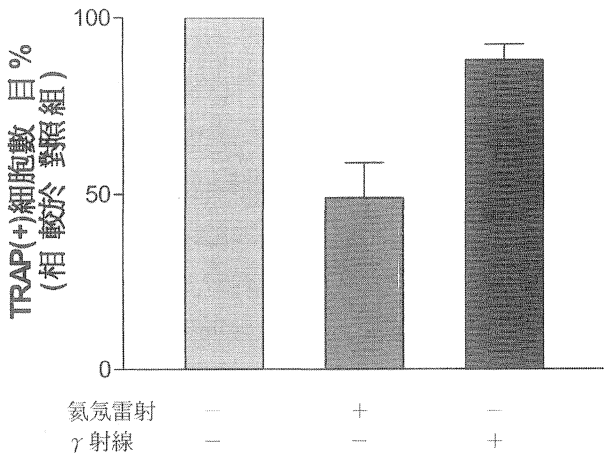


圖 2.不同處理方式，對 TRAP 正染細胞數目的影響。周邊幹細胞與小鼠造骨細胞共同培養，經氦氖雷射(照射 10 秒)或  $\gamma$  射線(10 Gy)照射後 10 天，細胞經固定後，染 TRAP，正染者數目與對照組比較，換算成百分比，柱狀圖表示法為平均值  $\pm$  標準誤，數據以三次實驗結果平均。符號(-)表示不經左列方法處理，(+) 表示經左列方法處理。

較顯著，此結果顯示兩個處理組都可降低 TRAP 正染的細胞數目，而氦氖雷射組的抑制作用將近 50%，故就減少 TRAP 正染細胞數量的效果而言，雷射組效果大於  $\gamma$  射線照射組。

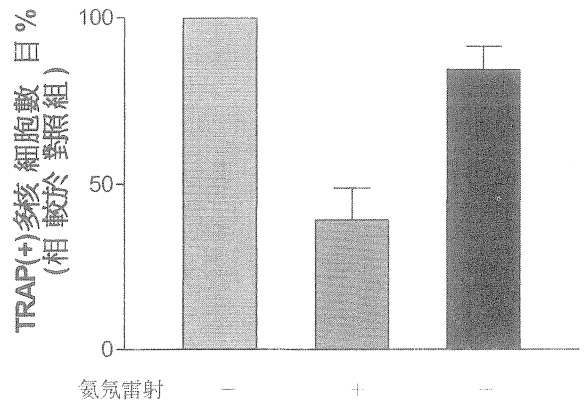


圖 3.低能氦氖雷射或  $\gamma$  射線照射於周邊幹細胞與造骨細胞共同培養系統中，對多核( $\geq 3$ )破骨細胞生成的影響。照射後繼續培養 10 天，細胞經固定後，染 TRAP 染劑，正染多核者數目與對照組比較，換算成百分比，柱狀圖表示法為平均值  $\pm$  標準誤，數據以三次實驗結果平均。符號(-)表示不經左列方法處理，(+) 表示經左列方法處理。

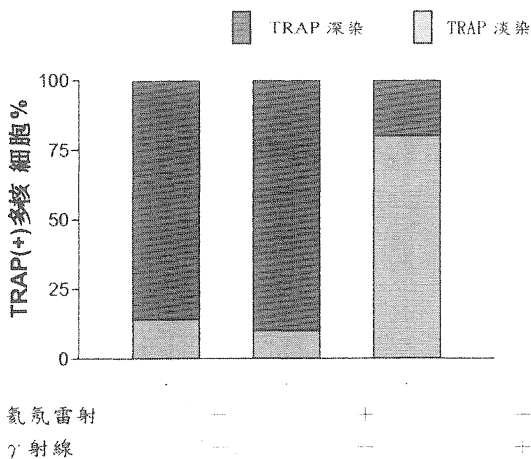


圖 4. 多核破骨細胞的 TRAP 染色，淡染或深染的出現的頻率。以氦氖雷射(照射 10 秒)或  $\gamma$  射線(10 Gy)照射，10 天後染 TRAP，被染者呈粉紅色，每組多核( $\geq 3$ )之破骨細胞中，各自計算淡染和深染所佔的比率，淡染者代表破骨細胞的活性較弱，深染者代表破骨細胞的活性較強，數據以三次實驗結果平均。

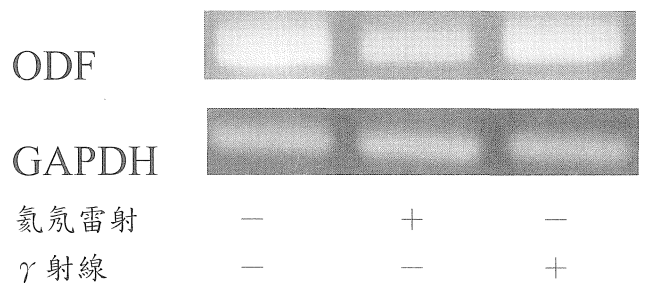


圖 5. 氦氖雷射或  $\gamma$  射線照射，對周邊幹細胞與造骨細胞共同培養的基因表現影響。經低能氦氖雷射或  $\gamma$  射線照射處理後 1 天，萃取 RNA 經 RT-PCR 所表現 ODF 的 mRNA 相對量。其中 GAPDH 的電泳結果作為定量參考用，ODF 電泳結果作為造骨細胞的 ODF 基因表現量的參考，由電泳的結果顯示，氦氖雷射或  $\gamma$  射線照射組都會抑制 ODF 基因表現量(亮度較暗者基因表現量較少)，但以氦氖雷射組抑制作用較明顯。

一般破骨細胞分化成熟後，細胞核呈多核狀態，故 TRAP 正染且核數 $\geq 3$ 的細胞，才將其歸類為破骨細胞。若將對照組之 TRAP 正染且核數 $\geq 3$ 的細胞數目當作百分之百，各組換算結果(圖 3)顯示，經氦氖雷射或 $\gamma$ 射線照射後，TRAP 正染且核數 $\geq 3$ 的細胞數都呈現破骨細胞被抑制的趨勢，其中以氦氖雷射組抑制效果較顯著，由此結果顯示兩個處理組都可降低破骨細胞數目，而氦氖雷射組之破骨細胞數目，只約對照組的 40%，顯示就抑制破骨細胞數量的效果而言，雷射組效果大於 $\gamma$ 射線照射組。

此外，破骨細胞可分泌 TRAP,此酵素有助於破骨細胞進行骨質吸收，故 TRAP 量的多寡，可指示破骨細胞的活化狀態。為了進一步了解，經氦氖雷射或 $\gamma$ 射線照射後所分化之破骨細胞活性，將 TRAP 深染及 TRAP 淡染；其中淡染定義為多核( $\geq 3$ )，但染色呈色極微(或無呈色者)。各組單獨換算自身之 TRAP 深染及 TRAP 淡染所佔之百分比，由結果(圖 4)顯示，控制組與氦氖雷射組的多核 TRAP 深染細胞數目佔多數(約 80%)，而 $\gamma$ 射線照射組，則以淡染為主，顯示控制組與氦氖雷射組的已分化破骨細胞活性高，然而 $\gamma$ 射線照射組的已分化破骨細胞相較於前面兩組顯示活性極低。

ODF 乃由造骨細胞所分泌，可刺激破骨細胞的分化。氦氖雷射或 $\gamma$ 射線之照射對於破骨細胞 ODF 的影響如圖 5 所示，由電泳的結果顯示，氦氖雷射或 $\gamma$ 射線照射組都會抑制 ODF 基因表現量(亮度較暗者，基因表現量較少)，其中以氦氖雷射組抑制作用較明顯。此結果與氦氖雷射可抑制 TRAP 正染細胞數目之現象相印證。破骨細胞的分化，可分為兩個途徑，分別為細胞激素與造骨細胞的誘發分化。在發炎組織細胞激素分泌量大，故長期組織發炎者，該部位骨質量相對減少(2)；而造骨細胞會亦分泌相關生長因子，調控破骨細胞的分化(5)。目前認為破骨細胞源自單核球的融核現象，或源自於幹細胞，本實驗破骨細胞分化自周邊血分離之幹細胞，此部份亦混雜單核球，故分化之破骨細胞來源含括此兩種不同的細胞。

正常狀態下，骨生成作用與骨吸收作用會達特定的平衡，其中主要兩種細胞為造骨細胞與破骨細胞，

此兩種細胞可相互影響，在本實驗模式中即先培養造骨細胞，再與周邊血分離之幹細胞共同培養，造骨細胞分泌的一些因子(如 ODF)，可誘發破骨細胞之分化，而破骨細胞亦能分泌一些因子(如 TRAP)，使靠近破骨細胞之造骨細胞生長受到限制(圖 1.A)，此結果與一些學者的推論相符(1,5)。

由前述之研究結果可發現，不管是以氦氖雷射或 $\gamma$ 射線照射都會抑制破骨細胞的數目，然而以氦氖雷射組較明顯。而破骨細胞分化數目的減少，推測有兩種可能路徑：第一個路徑，可能是兩種射線先影響造骨細胞(如抑制 ODF 分泌)再間接影響幹細胞分化成破骨細胞。第二個路徑，可能是氦氖雷射對幹細胞直接影響，使其分化成其他細胞，進而會降低破骨細胞分化數目。在本實驗室先前的實驗中，發現以氦氖雷射直接照射小鼠骨髓幹細胞，會促進造骨細胞的分化，一些文獻亦發現氦氖雷射可促進骨組織生成(4)，故可間接支持第二種可能性；而本實驗利用 RT-PCR 間接分析由造骨細胞所分泌的破骨細胞分化因子相對量(圖 5)，發現氦氖雷射亦會直接作用在造骨細胞。故推論氦氖雷射抑制破骨細胞的分化途徑，可能是直接影響周邊幹細胞或對造骨細胞的刺激，再間接影響周邊幹細胞的分化。

一些癌症如前列腺癌、乳癌(3)，轉移至骨組織時，常引發骨組織的崩解破壞(6)，增加病患骨節疼痛與骨折機率，影響生活品質，癌細胞轉移至骨骼引發之骨組織病變，常以 $\gamma$ 射線照射來治療。由 $\gamma$ 射線照射組的結果(圖 2, 3, 4)顯示，該組雖能抑制破骨細胞分化數目，但也會降低造骨細胞所分泌的破骨細胞分化因子相對量，但效應較氦氖雷射組小，然而 $\gamma$ 射線照射，卻可使已分化之破骨細胞活性遭到抑制，雖然該組破骨細胞分化數量與對照組差不多，但已可達到抑制骨質被吸收的效果。由以上結果可發現，氦氖雷射與 $\gamma$ 射線照射皆可抑制破骨細胞分化的數目。氦氖雷射可能經由抑制破骨細胞分化因子的相對量，來減少破骨細胞分化的數目，但對於破骨細胞活性較沒有影響。 $\gamma$ 射線照射組，雖然破骨細胞數目只稍微減少，但破骨細胞活性會明顯受到抑制。

### 參考文獻

1. Aoki K, Ohya K [RANKL/RANK signaling-inhibitor]. Nippon Rinsho 2005; 63:1620-1626.
2. Koinuma D, Imamura T [Bone formation and inflammation]. Nippon Rinsho 2005;63:1523-1528.
3. Kozlow W, Guise TA Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2005; 10:169-180.
4. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. Photomed Laser Surg 2005; 23:161-166.
5. Wang J, Zhao ZH, Luo SJ, Fan YB [Expression of osteoclast differentiation factor and intercellular adhesion molecule-1 of bone marrow mesenchymal stem cells enhanced with osteogenic differentiation]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2005;23:240-243.
6. Clines GA, Guise TA Mechanisms and treatment for bone metastases. Clin 2004.
7. Take I, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Tsuboi H, Ochi T, Uematsu S, Okafuji N, Kurihara S, Udagawa N, Takahashi N Prostaglandin E2 strongly inhibits human osteoclast formation. Endocrinology. 2005.
8. Yasuda H [OPG, anti-rANKL antibody]. Nippon Rinsho 2005; 63:1647-1653.
9. Zhao YM, Ge LH, Grigoriadis AE (2005) [Effect of TNF-alpha on murine osteoclast differentiation]. Beijing Da Xue Xue Bao 2005; 37:433-435.

# Effects of Low-Energy He/Ne Laser Irradiation on the Differentiation of Human Osteoclasts

Wei-Chung Liu<sup>1</sup> Chuan-Yuan Huang<sup>2</sup> Moon-Sing Lee<sup>3</sup> Nien-Tzu Keng<sup>1</sup> Yu-Fen Huang<sup>4</sup>

Yuth Nimit<sup>2</sup> \*Chun-Chih Lin<sup>5</sup>

*1 Department of Radiological Technology, Tzu-Chi College of Technology*

*2 Institute of Natural Healing Science, Nanhua University*

*3 Department of Radiation Oncology, Tzu-Chi Hospital*

*4 Department of Applied Chemistry, National Chia-Yi University*

*5 General Education Center/Institute of Natural Healing Science, Nanhua University*

## Abstract

Metastasis of cancer cell to bone tissues usually causes bone damages and bone aches. Presently, they are approached with ionizing radiation. On the other hand, low-energy He/Ne laser has been found able to enhancing restoration of damaged bone tissues. In order to investigate its mechanism, we utilized low-energy He/Ne laser to evaluate its influence on the differentiation of osteoclasts. Meanwhile, we compared the above results with those using ionizing radiation. In this study, we co-cultured peripheral stem cells of human with osteoblasts to initiate the differentiation of osteoclasts, and investigated the difference when giving various stimuli. The results shown that the number of differentiating osteoclasts was less under the irradiation of low-energy He/Ne laser than that of the control group. However, no apparent effect was found on the activity of differentiated osteoclasts. This represented that low-energy He/Ne laser were capable of suppressing osteoclasts by their differentiation. Besides, the suppressing ability of ionizing radiation (10 Gy) on osteoclast differentiation was less than that of low-energy He/Ne laser. Nevertheless, the suppression was apparent on the differentiated osteoclasts. From above investigations, the differentiation of osteoclasts were suppressed through different mechanisms by low-energy He/Ne laser and the ionizing radiation, which was corroborated by RT-PCR analysis of the production of osteoclast differentiation factors. Therefore, both low-energy He/Ne laser and ionizing radiation were capable of inhibiting osteoclast differentiation, however, the former worked through reducing the secretion of osteoclast differentiation factors from osteoblasts, which is more effective.

[Taiwanese Journal of Applied Radiation and Isotopes. December 2005; Vol. 1, No.1, p 55 -60]

**Keywords:** He/Ne laser, stem cell, osteoclast