

# 低能量氮氬雷射照射對骨量生成的影響

劉威忠<sup>1</sup> 耿念慈<sup>1</sup> 黃川源<sup>2</sup> 郭倩妤<sup>1</sup> 黃雅令<sup>2</sup> \*林群智<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 慈濟技術學院放射系

<sup>2</sup> 南華大學自然生物科技系/自然醫學研究所

## 摘要

本研究以低能量氮氬雷射照射骨髓細胞，觀察其對骨細胞分化及相關基因(破骨細胞分化因子及骨形態蛋白)之表現，以探討低能量氮氬雷射對小鼠骨量生成之影響。實驗中取小鼠脛骨與股骨之骨髓細胞，以低能量氮氬雷射(波長 632 nm)照射(0、10、15 及 20 秒)，培養 3 天後，收集培養液(作為培養破骨細胞的 condition medium)，並分析骨形態蛋白及破骨細胞分化因子的基因表現。培養 7 天後，計算造骨細胞分化之百分比，於第 14 天統計骨小結(bone nodule)的生成數目，並於第 30 天觀察骨組織生成量。此外，以上述收集之 condition medium 培養骨髓細胞，並於培養後第 14 天統計破骨細胞的數量。結果顯示接受雷射照射組，其骨量較對照組多，且在細胞分化方面，破骨細胞的數目較少，但造骨細胞數目則較多。此外，低能量氮氬雷射可抑制 ODF 及促進 BMP 之基因表現。以此推測，低能量氮氬雷射可透過減少破骨細胞的分化及增加造骨細胞的分化，以增加骨量生成。

關鍵字: 低能量氮氬雷射、破骨細胞、造骨細胞、骨髓

## 前言

造骨細胞由骨髓間葉幹細胞分化而來，可分泌鹼性磷酸酶[alkaline phosphatase (ALP)]及骨型態蛋白[bone morphogenetic protein (BMP)]，協助鈣離子沉積於骨基質，以促進骨組織生成[4]。破骨細胞源自於血源幹細胞，可分泌酸性磷酸酶[tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)]，協助骨組織分解，故該酵素可做為該細胞之活化指標。骨組織的生成由上述兩種細胞所調控，正常狀態下，骨生成作用與骨吸收作用會達到特定的平衡，若破骨細胞過度活化，骨組織將被過度分解，導致骨組織結構變弱，而增加骨折機率。此外，破骨細胞分化因子[osteoclast differentiation factor; ODF]與破骨細胞的分化有直接關係[7-9]，當其與幹細胞上之受器結合，可刺激幹細胞分化成破骨細胞。故

該基因之表現可作為破骨細胞分化能力的參考。研究文獻指出，低能量氮氬雷射可促進造骨細胞的分化[8]，但較缺少對整體骨量影響之評估，故本研究以低能量氮氬雷射照射骨髓細胞，探討其對骨生成量的影響及其可能機轉。

## 材料與方法

### 骨髓細胞培養

小鼠(C57BL/6 mice)經二氧化碳安樂死後，迅速取其股骨與脛骨骨髓，以內含 10%血清與  $10^{-8}$  M dexamethasone (DEX)之  $\alpha$ MEM medium 培養細胞 ( $1 \times 10^4$  cell/mL)，並以低能量氮氬雷射照射處理之(時間 0、10、15 及 20 秒)，於照射後第 3 天收集培養液(作為 condition medium)備用。

## 基因表現分析

於照射後第3天萃取上述細胞之RNA,以RT-PCR檢測ODF及BMP的基因表現。

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為:

94°C的溫度下3分鐘, 1 cycle, 接著94°C的溫度下30秒, 55°C 30秒, 72°C 40秒, 共30 cycle, 之後在72°C的溫度下5分鐘, 1 cycle, 步驟完成後, 溫度設定在25°C。將產物加入ethidium bromide進行洋菜膠電泳, 之後在電泳膠攝影系統中拍照分析。

## 造骨細胞分化百分率

上述骨髓細胞培養7天後, 以鹼性磷酸酶染劑(Sigma)染色, 因造骨細胞分化後, 可分泌鹼性磷酸酶, 以協助骨組織生成, 該酵素會與染劑反應成粉紅色, 故已分化的造骨細胞會被染成粉紅色, 而未分化的細胞因不含該酵素, 所以不會被染成粉紅色。將上述所培養細胞染色後, 以0.1%胰蛋白酶(Trypsin)打散細胞, 統計個100細胞中被染成粉紅色之百分比, 以評估造骨細胞分化率。

## 骨小節(bone nodule)計數

骨髓細胞培養14天後, 會零散出現小型的鈣化骨組織, 稱為骨小節, 該結構以茜素紅S(alizarin red S)染色可被染成紅色, 統計每個培養盤(24 well)中鈣化之骨小節數目。

## 骨組織生成染色

骨髓細胞培養30天後, 以茜素紅S染骨組織, 鈣化之骨組織可被染成紅色, 骨量愈多顏色愈深, 藉

由紅色的深淺評估骨組織的生成量。

## 破骨細胞培養與染色

取骨髓細胞( $1 \times 10^4$ /mL)以 $\alpha$ MEM medium(內含10%的血清與 $10^{-8}$  M的Vit. D)培養在24 well培養盤, 並加入之前收集之condition medium (250  $\mu$ L)。培養14天後, 使其分化成破骨細胞, 培養期間, 每三天更換新的培養液。細胞以酸性磷酸酶(TRAP, Sigma)染劑染色, 含TRAP的細胞可被染成紫紅色。因破骨細胞為多核且含酸性磷酸酶的細胞, 故破骨細胞之分化以每個well被染成紫紅色且細胞核數目 $\geq 3$ 的細胞數目統計之。

## 結果與討論

當骨髓基質細胞分化成造骨細胞時, 會分泌鹼性磷酸酶(ALP), 以協助骨組織生成, 該酵素的量多寡可作為造骨細胞活性的指標, 此酵素可利用染劑染色, ALP(-)者, 則為暗灰色, 如圖1(A), ALP(+)者, 則為粉紅色, 如圖1(B), 染色後, 以胰蛋白酶將細胞打散成單一細胞, 統計每100個細胞中ALP(+)者的細胞比例。其結果, 如圖1(C)所示; 隨著照射的時間的增加, 細胞含鹼性磷酸酶的細胞比例亦跟著增加, 顯示以低能量氮氬雷射照射, 可刺激造骨細胞分化成造骨細胞, 其結果與相關研究以低能量雷射照射人類造骨細胞株MG-63、Saos-2、小鼠造骨細胞株(MC3T3)之結果一致[2, 12, 15, 18]。

造骨細胞可分泌骨基質(bone matrix), 當鈣離子沉積在骨基質後, 轉化成鈣化骨組織。在骨組織形成初期, 會散佈零散的鈣化中心, 即骨小節[如圖2(A), 箭頭標示處], 再依此中心向外擴展鈣化範圍。在此期間, 新的骨小節會陸續形成, 最後佈滿整面, 形成片狀骨組織。因此, 骨小節數目的多寡可用來評估造骨細胞的骨生成能力。由圖2(B)所示, 低能量氮氬雷射可誘發骨小節生成, 顯示低能量氮氬雷射可刺激骨頭的生成。在人類造骨細胞株(MG-63)之研究中亦可觀察到相

同之生物效應[12]，而由圖 1 之結果可推測其機轉是因細胞受到照射後誘發細胞分泌與骨生成作用之相關蛋白質（如：鹼性磷酸酶），促進骨頭之生成。

在細胞培養中，鈣化骨組織會沉積在培養盤底部，此鈣化物質可被茜素紅染成紅色，依其被染顏色的深淺，可評估骨組織之生成量；顏色愈深紅，顯示鈣化骨組織量愈多。

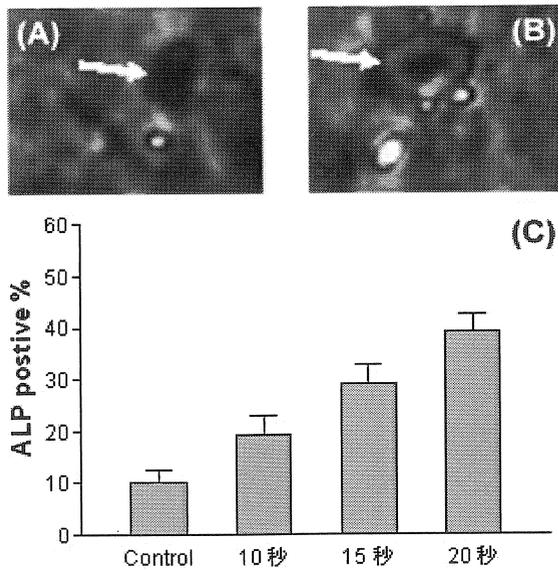


圖 1 低能量氦氖雷射照射對造骨細胞分化的影響。用  $\alpha$ MEM 培養液(內含  $10^{-8}$  M 的 Dex.)培養小鼠骨髓幹細胞 (細胞密度  $1 \times 10^4$ /mL)，以低能量氦氖雷射照射(刺激時間 0, 10, 15, 20 秒)，照射後 10 天，以鹼性磷酸酶 (ALP) 染劑將細胞染色，細胞若 ALP(-) 者，呈暗灰色 1(A)，細胞若 ALP(+) 者，呈粉紅色 1(B)；細胞染色後，以 Trypsin (0.1%) 加入培養盤，將貼附細胞打散成單一之懸浮細胞，於顯微鏡下計算 100 個細胞中含鹼性磷酸酶的細胞百分比，由圖可發現低能量氦氖雷射可刺激骨髓幹細胞分化成造骨細胞。柱狀圖表示法為平均值  $\pm$  標準差，\* :  $P < 0.05$

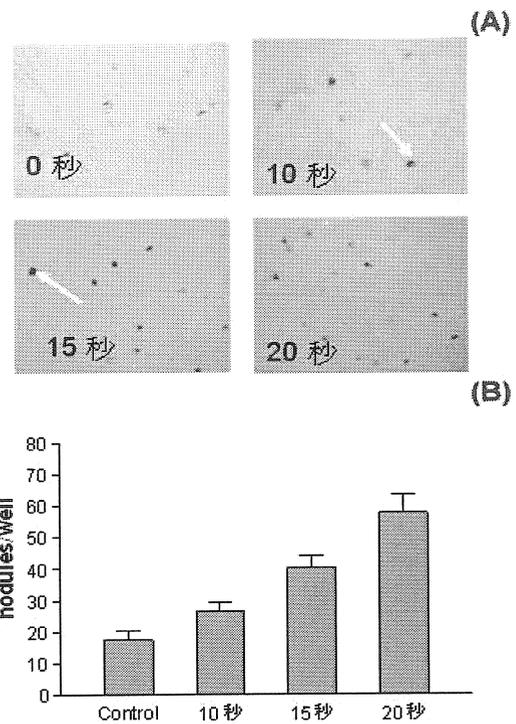


圖 2 低能量雷射照射對骨小結生成的影響。小鼠骨髓幹細胞以  $\alpha$ MEM 培養液(內含  $10^{-8}$  M 的 Dex.)培養在 24 well 之細胞培養盤中 (細胞密度  $1 \times 10^4$ /well)，再以低能量雷射照射(時間 0, 10, 15 及 20 秒)。骨髓細胞於培養 14 天後，以茜素紅 S 染鈣化的骨小結；圖 2(A) 可見被染成紅色的骨小結(箭頭標示處)。圖 2(B) 為不同照射時間對骨小結生成影響之統計圖。柱狀圖表示法為平均值  $\pm$  標準差，\* :  $P < 0.05$

圖 3 顯示，隨著低能量氦氖雷射照射時間增加，鈣化骨組織量亦有增加的趨勢。由上述結果可得知，以低能量氦氖雷射照射骨髓細胞，可刺激骨髓細胞分化成造骨細胞，進而增加其製造骨組織之能力。為探討低能量氦氖雷射對細胞基因表現的影響，本研究取小鼠骨髓細胞，照射時間分別為 0、10、15、20 秒，照射後 3 天，觀察骨型態蛋白(BMP)及破骨細胞分化因子(ODF)的基因表現。BMP 不僅可以促進造骨細胞的分化，亦可以增加骨組織的生成[10, 16, 17]。結果發現，隨著照射時間增加，BMP 的基因表現量亦隨之增加，如圖 4，此效應與在大鼠與人類細胞株實驗中有相似的結果[2,12]。

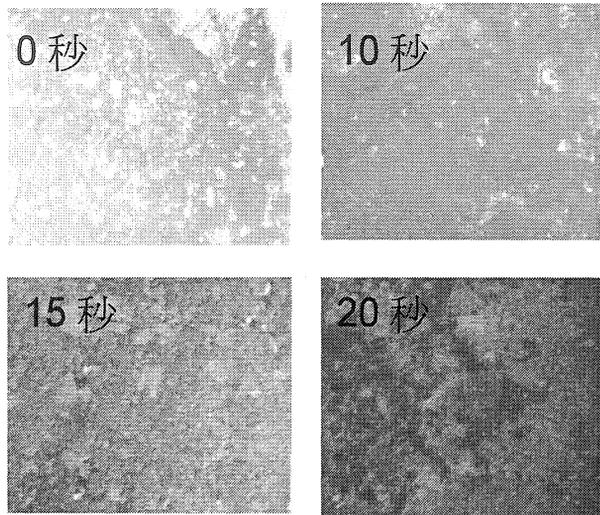


圖 3 低能量雷射照射對骨組織生成的影響。小鼠骨髓幹細胞以  $\alpha$ MEM 培養液(內含  $10^{-8}$  M 的 Dex.)培養在 24 well 之細胞培養盤中 (細胞密度  $1 \times 10^4$ /well )，再以低能量雷射照射(時間 0, 10, 15 及 20 秒)。照射後 30 天，以茜素紅 S 染骨組織，鈣化之骨組織可被染成紅色，骨量愈多其顏色愈深，藉由紅色的深淺可評估骨組織之生成量

骨髓基質細胞(如造骨細胞或間葉幹細胞等)可分泌 ODF [19]，當此因子與單核球結合時，可誘發該細胞分化為破骨細胞，所以該因子常作為破骨細胞分化能力之參考指標 [13]。破骨細胞為多核細胞，其細胞膜在所接觸之骨表面形成刷狀緣(rough border)，並分泌酸性磷酸酶，以進行骨吸收作用。破骨細胞若過度活化將使骨組織大量被分解，使骨量流失。雷射對骨組織之生物效應大多以造骨細胞為研究對象，破骨細胞則是近幾年才有相關研究。本研究發現隨著照射時間增加，ODF 之基因表現量會減少，如圖 4。而由圖 5 的結果可發現，隨著照射時間增加，破骨細胞數目亦隨之減少，顯示低能量氦氖雷射確可抑制破骨細胞的分化，此結果與大鼠顱骨細胞之低能量雷射照射效應雷同 [14]。由於某些發炎因子(如 IL-6、TNF- $\alpha$ )亦會引起破骨細胞分化 [3, 11]，故慢性發炎病患的骨組織常在發炎部位因破骨細胞過度活化，而導致局部骨量流失 [8]，目前已發現雷射可降低發炎相關因子的產生

(如 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 及 IL-6 等) [1, 5, 6]。因此，低能量雷射照射亦可能經由減少上述細胞激素之分泌而抑制破骨細胞的分化。

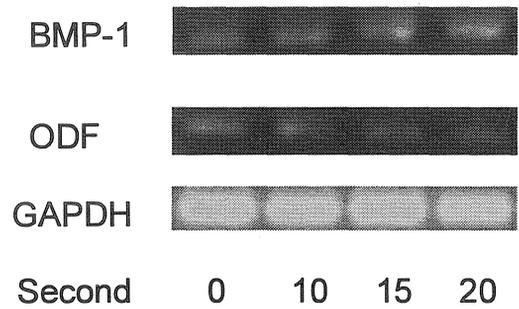


圖 4 低能量氦氖雷射照射對 BMP 與 ODF 基因表現的影響。取小鼠股骨與脛骨骨髓，細胞培養密度  $1 \times 10^4$ /mL，用  $\alpha$ MEM medium 培養，內含 10% 的血清與  $10^{-8}$  M 的 Dex。以低能量氦氖雷射(刺激時間 0, 10, 15, 20 秒)處理，於照射後第 3 天萃取細胞的 RNA，以 RT-PCR 檢測 ODF 及 BMP 的基因表現，其中 GAPDH 的電泳結果作為定量參考用，BMP-1 與 ODF 電泳結果作為基質細胞相關基因表現量的參考，由電泳的結果顯示，低能量氦氖雷射照射會促進 BMP-1 基因表現量，及抑制 ODF 基因表現量(亮度較亮者基因表現量較大)

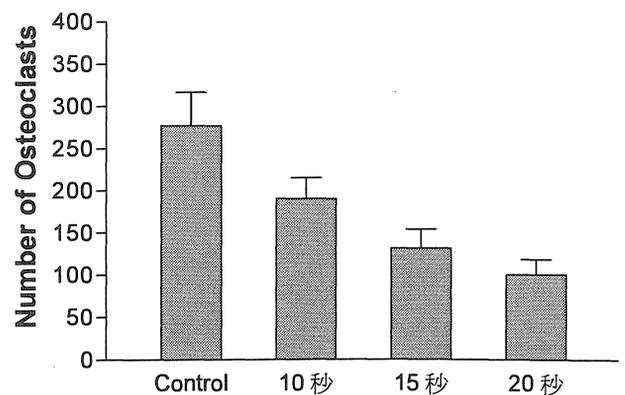


圖 5 低能量氦氖雷射照射對破骨細胞分化的影響。取小鼠骨髓細胞(培養密度  $1 \times 10^4$ /mL)培養於  $\alpha$ MEM 培養基(內含 10% 的血清與  $10^{-8}$  M 的 Dex 溶液)。以低能量氦氖雷射照射(時間 0, 10, 20 及 30 秒)骨髓細胞，並於照射後第 3 天收集培養液(作為 condition medium)。另取骨髓細胞( $1 \times 10^4$ /mL)以  $\alpha$ MEM 培養基

(內含 10% 的血清與  $10^{-8}$  M 的 Vit. D) 培養在 24 well 的培養盤，並加入之前收集之 condition medium (250  $\mu$ L)。培養 14 天後，以酸性磷酸酶染劑染色。柱狀圖表示法為平均值 $\pm$ 標準差，\* : $P < 0.05$

本研究在體外細胞培養實驗中，發現以低能量氦氖雷射照射小鼠骨髓細胞，可以增加骨組織的生成，由上述結果推測其機制是經由增加 BMP-1 並抑制 ODF 基因的表現，進而促進造骨細胞的分化並抑制破骨細胞的數目而造成此生物效應。

### 參考文獻

1. Albertini, R., Villaverde, A. B., Aimbire, F., Bjordal, J., Brugnera, A., Mittmann, J., Silva, J. A., and Costa, M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg* 26:19-24; 2008.
2. Arisu, H. D., Turkoz, E., and Bala, O. Effects of Nd:Yag laser irradiation on osteoblast cell cultures. *Lasers Med Sci* 21:175-80; 2006.
3. Devlin, R. D., Reddy, S. V., Savino, R., Ciliberto, G., and Roodman, G. D. IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* 13:393-9; 1998.
4. Farley, J. R., Hall, S. L., Tanner, M. A., and Wergedal, J. E. Specific activity of skeletal alkaline phosphatase in human osteoblast-line cells regulated by phosphate, phosphate esters, and phosphate analogs and release of alkaline phosphatase activity inversely regulated by calcium. *J Bone Miner Res* 9:497-508; 1994.
5. Funk, J. O., Kruse, A., and Kirchner, H. Cytokine production after helium-neon laser irradiation in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *J Photochem Photobiol B* 16:347-55; 1992.
6. Funk, J. O., Kruse, A., Neustock, P., and Kirchner, H. Helium-neon laser irradiation induces effects on cytokine production at the protein and the mRNA level. *Exp Dermatol* 2:75-83; 1993.
7. Haxsen, V., Schikora, D., Sommer, U., Remppis, A., Greten, J., and Kasperk, C. Relevance of laser irradiance threshold in the induction of alkaline phosphatase in human osteoblast cultures. *Lasers Med Sci* 23:381-4; 2008.
8. Herrera, B. S., Ohira, T., Gao, L., Omori, K., Yang, R., Zhu, M., Muscara, M. N., Serhan, C. N., Van Dyke, T. E., and Gyurko, R. An endogenous regulator of inflammation, resolvin E1, modulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Br J Pharmacol* 155:1214-23; 2008.
9. Kotobuki, N., Hirose, M., Funaoka, H., and Ohgushi, H. Enhancement of in vitro osteoblastic potential after selective sorting of osteoblasts with high alkaline phosphatase activity from human osteoblast-like cells. *Cell Transplant* 13:377-83; 2004.
10. Kuo, P. L., Huang, Y. T., Chang, C. H., and Chang, J. K. Bone morphogenetic protein-2 and -4 (BMP-2 and -4) mediates fraxetin-induced maturation and differentiation in human osteoblast-like cell lines. *Biol Pharm Bull* 29:119-24; 2006.
11. Kurihara, N., Bertolini, D., Suda, T., Akiyama, Y., and Roodman, G. D. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol* 144:4226-30; 1990.
12. Martinasso, G., Mozzati, M., Pol, R., Canuto, R. A., and Muzio, G. Effect of superpulsed laser irradiation on bone formation in a human osteoblast-like cell line. *Minerva Stomatol* 56:27-30; 2007.
13. Matsuzaki, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Shima, N., Morinaga, T., Toyama, Y., Yabe, Y., Higashio, K., and Suda, T.

- Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 246:199-204; 1998.
14. Ninomiya, T., Hosoya, A., Nakamura, H., Sano, K., Nishisaka, T., and Ozawa, H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. *Bone* 40:140-8; 2007.
  15. Renno, A. C., McDonnell, P. A., Parizotto, N. A., and Laakso, E. L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg* 25:275-80; 2007.
  16. Rickard, D. J., Sullivan, T. A., Shenker, B. J., Leboy, P. S., and Kazhdan, I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 161:218-28; 1994.
  17. Samee, M., Kasugai, S., Kondo, H., Ohya, K., Shimokawa, H., and Kuroda, S. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Pharmacol Sci* 108:18-31; 2008.
  18. Stein, E., Koehn, J., Sutter, W., Wendtlandt, G., Wanschitz, F., Thurnher, D., Baghestanian, M., and Turhani, D. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr* 120:112-7; 2008.
  19. Takahashi, N., Udagawa, N., and Suda, T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 256:449-55; 1999.

# Effects of Low-Energy He/Ne Laser Irradiation on Bone Mass Formation

Wei-Chung Liu<sup>1</sup>   Nien-Tzu Keng<sup>1</sup>   Chuan-Yuan Huang<sup>2</sup>   Qian-Yu Kuok<sup>1</sup>  
Ya-Ling Huang<sup>2</sup>   \*Chun-Chih Lin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Radiological Technology, Tzu-Chi College of Technology*

<sup>2</sup>*Institute of Natural Healing Science, Nanhua University*

## Abstract

Bone marrow cells were stimulated with low-energy He/Ne laser in this study to investigate the effect on bone growth of mice from differentiation of bone cells and expressions of related genes of receptor activator of osteoclast differentiation factor (ODF) and bone morphogenic proteins-1 (BMP-1). In the experiment, bone marrow cells taken from tibia and femur bones were irradiated with low-energy He/Ne laser (wavelength=632 nm) for 0,10,15 and 20 s and then cultured for 3 days. The culture medium was collected for osteoclast culture as a condition medium, and the gene expression of BMP and ODF was analyzed. After 7 days of culture, percentage of differentiation of osteoblasts was counted. Bone nodules formed were totaled on the 14<sup>th</sup> day, and the mass of bone tissue was estimated. Bone marrow cells were cultured with the collected condition medium, and the amount of osteoclasts were counted on the 14<sup>th</sup> day after culture. The results indicated that bone mass of the experimental group was higher than that of the control. Moreover, the number of osteoclasts was higher in experimental group than in the control; however, the number of osteoblasts exhibited reverse result. Additionally, gene expression of ODF was inhibited while that of BMP-1 was enhanced by low-energy He/Ne laser irradiation. Accordingly, low-energy He/Ne laser was suggested capable of increasing bone mass via suppressing differentiation of osteoclasts and increasing that of osteoblasts.

**Keywords:** low-energy He/Ne laser, osteoblast, osteoclast, bone marrow