

低能量激光照射对成骨细胞增殖中 Hedgehog 信号通路的作用

李秋实¹ 曲宙² 蔡青³ 陈英新¹ 柳淑杰¹ 周延民^{3*}

¹ 吉林大学口腔医院 VIP 综合科, 吉林 长春 130021
² 长春工程技术学院控制系, 吉林 长春 130117
³ 吉林大学口腔医院种植科, 吉林 长春 130021

摘要 探讨低能量激光照射是否对体外培养的成骨细胞增殖过程中的 hedgehog 信号通路产生影响, 揭示低能量激光照射促进骨形成的分子学机制, 为其在口腔种植的临床应用提供理论依据。体外培养小鼠成骨样细胞系 MC3T3-E1, 用 hedgehog 信号通路增强剂 N 端 hedgehog 重组蛋白(N-Shh)、hedgehog 信号通路抑制剂环巴胺对低能量激光照射后的 MC3T3-E1 进行干预, 随机分为 4 组, 采用细胞计数, MTS, 流式细胞术检测照射后 12, 24, 48, 72 h 成骨细胞的增殖活性。结果显示, 与激光照射组相比, 激光照射+N-Shh 组的细胞增殖活性明显增加, 激光照射环巴胺组的细胞增殖活性明显降低, 激光照射环巴胺组的细胞增殖活性仍高于对照组。研究发现低能量激光照射活化了成骨细胞增殖过程中的 hedgehog 信号通路, hedgehog 信号通路是参与低能量激光照射调控成骨细胞增殖的通道之一。

关键词 医用光学; 低能量激光照射; 增殖; 成骨细胞

中图分类号 Q631; R783.4

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201441.1204002

Low-Level Laser Irradiation Affects Osteoblast Proliferation Through Activation of Hedgehog Signaling Pathway

Li Qiushi¹ Qu Zhou² Cai Qing³ Chen Yingxin¹ Liu Shujie¹ Zhou Yanmin³

¹ VIP Department, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China

² Department of Control, Institute of Changchun Engineering and Technology, Changchun, Jilin 130117, China

³ Implant Department, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China

Abstract The aim of the present study is to examine whether low level Ga-Al-As laser irradiation has an effect on hedgehog signaling pathway during osteoblast proliferation *in vitro*. The molecular mechanism of how low level Ga-Al-As laser irradiation promotes bone formation is explored. This study provides a theoretical basis for the clinical application of low level Ga-Al-As laser irradiation in oral implant. Mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 is cultured *in vitro*. The cultures after laser irradiation are treated with recombinant N-terminals sonic hedgehog (N-Shh) or hedgehog inhibitor cyclopamine respectively. The experiment is divided into 4 groups. The proliferation activity is detected by cell counting, MTS, flow cytometry at 12, 24, 48, 72 h after laser irradiation. Proliferation activity of laser irradiation and N-Shh group is remarkably increased compared with those of laser irradiation group. Proliferation activity of laser irradiation and cyclopamine group is remarkably decreased compared with those of laser irradiation group, meanwhile proliferation activity of laser irradiation and cyclopamine group is remarkably increased compared with those of control group. These results suggest that low level Ga-Al-As laser irradiation activate hedgehog signaling pathway during osteoblast proliferation *in vitro*. hedgehog signaling pathway is one of the signaling pathways by which low level Ga-Al-As laser irradiation regulates osteoblast proliferation.

收稿日期: 2014-05-26; 收到修改稿日期: 2014-06-29

基金项目: 吉林大学基本科研业务费科学前沿与交叉学科创新项目(450060481130)

作者简介: 李秋实(1981—), 女, 博士, 主治医师, 主要从事低能量激光照射促进种植体周围成骨方面的研究。

E-mail: qiushili_jlu@126.com

* 通信联系人。E-mail: zhouym62@126.com

Key words medical optics; low-level laser irradiation; proliferation; osteoblast

OCIS codes 170.1850; 170.1610

1 引 言

种植义齿具有咀嚼效率高、口感舒适、不调磨邻牙等显著优点,但对于传统义齿来讲,种植义齿的修复疗程较长,这在一定程度上限制了种植义齿的应用。如何促进种植体周围的骨形成以有效地缩短种植义齿的修复疗程已被口腔种植工作者们列为首要的研究课题。低能量激光照射(LLLI)是一种生物物理学刺激,对多种细胞具有光生物调节效应,已在多个学科进行应用,主要用于促进伤口愈合和组织修复,减轻炎症、疼痛及水肿等^[1]。体外研究证实 LLLI 可以改变线粒体活性^[2],促进成骨细胞增殖^[3]。LLLI 可以促进成骨细胞分化,促进成骨相关基因碱性磷酸酶(ALP),骨钙素(OC),骨唾液酸蛋白(BSP)的表达,增加钙的沉积量^[4-6]。此外,LLLI 也可以刺激动物实验的骨形成,通过增加成骨细胞数量,增加血管生成,活化破骨细胞以促进骨形成^[7-8]。由于光生物调节作用的分子学机制尚不清楚,目前尚未应用于口腔种植领域。

Hedgehog(Hh)信号通路是一个在胚胎阶段调控多种组织器官发育的重要的信号通路。配体 Hh 与碎片蛋白(Ptc)的结合可以解除 Ptc 对于平滑蛋白(Smo)的抑制作用。Smo 通过转录因子来调控相关基因的转录。所有的 Hh 蛋白功能性 N 末端结构域 93% 一致,具有相似的生物学作用^[9]。hedgehog 通道抑制剂环巴胺是一种植物性甾体类生物碱,主要通过对抗 Smo 而抑制 hedgehog 信号通路。已有研究证实 hedgehog 信号通路在骨形成中起着重要的调节作用,它可以促进成骨细胞的增殖和分化以促进骨形成^[10-11],尚未出现关于 hedgehog 信号通路是否作用于激光照射后成骨细胞增殖的报道。

本文检测了低能量激光照射对体外培养的小鼠成骨样细胞系 MC3T3-E1 增殖过程中 hedgehog 信号通路的影响,尝试揭示低能量激光照射促进骨形成的分子学机制,为低能量激光照射在口腔种植的临床应用提供理论依据。

2 材 料 和 方 法

小鼠成骨样细胞系 MC3T3-E1(中科院细胞库,北京)培养于 35 mm 的培养皿中,所用培养液为含 10% (体积分数)胎牛血清(Hyclone,美国)、

100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的高糖细胞培养基(DMEM)(Invitrogen,美国)培养液。在 5% (体积分数)二氧化碳孵育箱内 37℃ 恒温培养,2 天换液 1 次,4 天传代 1 次。

低能量 Ga-Al-As 激光器由中国科学院长春光学精密机械与物理研究所研制,波长 808 nm,输出方式为连续(CW)输出,功率范围为 0~5 W,光电转换效率为 33.3%,由直径为 0.4 mm 的光纤探头输出。根据以往研究^[12-13],采用单次照射,实际输出功率为 330 mW,能量密度为 3.75 J/cm²。激光照射垂直于孔板,为完全覆盖孔板,光纤被固定于不同的高度。每个实验均随机分为 4 组。组 1:激光照射;组 2:激光照射+N 端 hedgehog 重组蛋白(N-shh)(R&D,美国)(100 ng/mL);组 3:激光照射环巴胺(Biomol,美国)(10 μmol/L);组 4:未进行激光照射。

将细胞培养皿内对数生长期的细胞接种于 12 孔板中,接种密度为 9×10^4 hole⁻¹。培养 24 h 后更换含 0.5% (体积分数)血清的培养液继续培养 24 h,以达到细胞状态同步化。按照上述分组,每组 3 个复孔。组 2,组 3 分别加入 100 ng/ml 的 N-shh 和 10 μmol/L 的环巴胺,组 1,组 2,组 3 进行激光照射。照射距离为 4 cm,照射时间为 54 s。照射后 24,48,72 h 分别收集细胞,采用血细胞计数板进行计数。

将细胞培养皿内对数生长期的细胞接种于 24 孔板中,接种密度为 4×10^4 hole⁻¹,按照上述分组,共 4 个孔。组 2,组 3 分别加入 100 ng/mL 的 N-shh 和 10 μmol/L 的环巴胺,组 1,组 2,组 3 进行激光照射。照射距离为 2.2 cm,照射时间为 48 s。照射后立即将每个 24 孔板中的细胞接种于 6 个 96 孔板中,接种密度为 5×10^3 hole⁻¹。照射后 24,48,72 h,每孔加入 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲氧基胺)-2-(4-苯磺基)-2 氢-四唑盐(MTS)溶液 20 μl(Promega,美国),继续培养 2 h 后用酶标仪(Bio-Rad,日本)测定在 490 nm 处的光密度值(OD)。各组 OD 值等于各组实测 OD 值减去空白对照组所测 OD 值。计算各组平均值为最终 OD 值。

将细胞培养皿内对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,接种密度为 3×10^5 hole⁻¹。细胞状态同步化步骤同上。按照上述分组,每组 3 个复孔。组 2,组 3 分别加入 100 ng/mL 的 N-shh 和 10 μmol/L 的环巴胺,随机进行激光照射。照射距离为 8.4 cm,照射时

间为 274 s。照射后 12 h 和 24 h 分别收集细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 70% (体积分数) 的乙醇固定, 4°C 过夜, 加入 $100 \mu\text{l}$ RNaseA 后 37°C 水浴 30 min。加入 $400 \mu\text{l}$ 碘化丙啶(PI)染色混匀, 4°C 避光 30 min。1 h 内上机检测, 记录激发波长 488 nm 处的红色荧光。记录细胞周期各时相的细胞数, 计算细胞增殖指数。 $I_p = S + G_2/G_1 + S + G_2$ 。

采用 SPSS 19.0 统计软件, 各组比值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的显著性检验用单因素方差分析法, 两

组间差异的显著性检验用 q 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结 果

细胞计数结果显示(图 1), 照射后 24, 48, 72 h, 组 1, 组 2, 组 3 的计数结果高于组 4, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。其中, 组 1 的计数结果低于组 2, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。组 1 的计数结果高于组 3, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

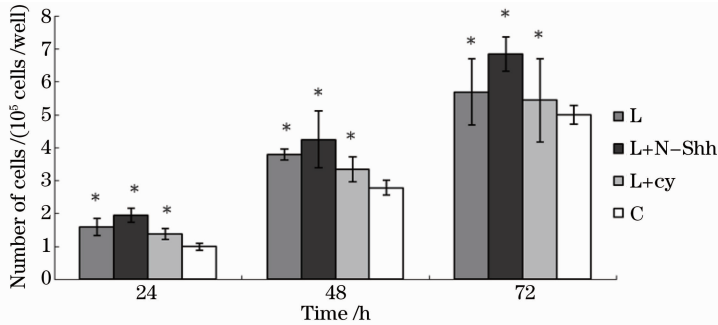


图 1 激光照射后 24, 48, 72 h 各组的细胞计数结果

Fig. 1 Effect of laser irradiation of four groups on number of cells of osteoblasts at 24, 48, 72 h

MTS 结果显示(图 2), 照射后 24, 48, 72 h, 组 1, 组 2, 组 3 的 OD 值高于组 4, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。其中, 组 1 的 OD 值低于组 2, 差异有显著

性 ($P < 0.05$)。组 1 的 OD 值高于组 3, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

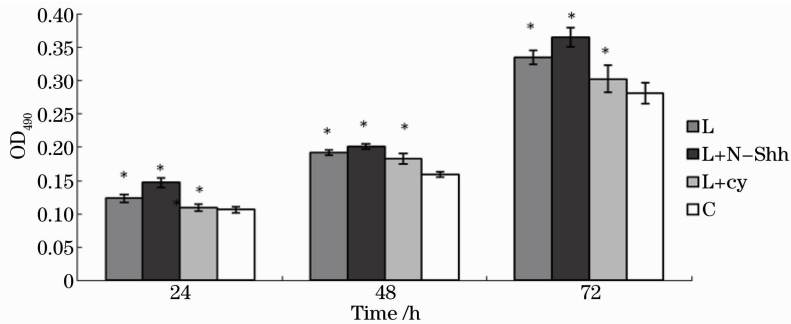


图 2 激光照射后 24, 48, 72 h 各组的 MTS 结果

Fig. 2 Effect of laser irradiation of four groups on MTS of osteoblasts at 24, 48, 72 h

细胞周期结果显示(图 3, 图 4), 照射后 12 h 和 24 h, 组 1, 组 2, 组 3 的 S 期细胞数高于组 4, 细胞增

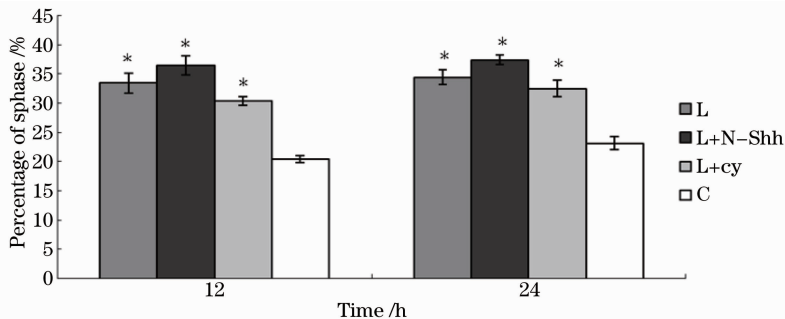


图 3 激光照射后 12 h 和 24 h 各组的 S 期细胞数

Fig. 3 Effect of laser irradiation of four groups on percentage of S phase of osteoblasts at 12 h and 24 h

殖指数高于组 4, 差异有显著性($P < 0.05$)。其中, 组 1 的 S 期细胞数低于组 2, 细胞增殖指数低于组 2, 差

异有显著性($P < 0.05$)。组 1 的 S 期细胞数高于组 3, 细胞增殖指数高于组 3, 差异有显著性($P < 0.05$)。

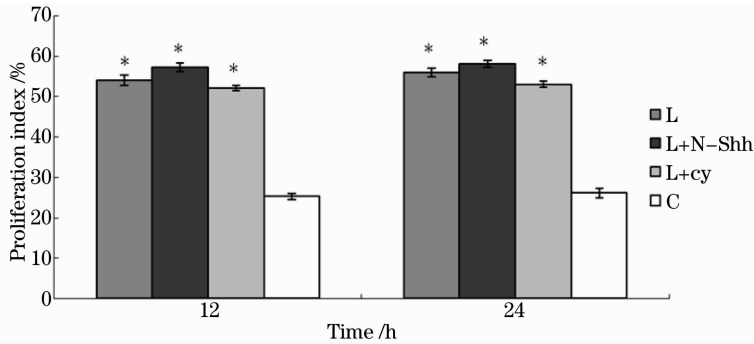


图 4 激光照射后 12 h 和 24 h 各组的细胞增殖指数

Fig. 4 Effect of laser irradiation of four groups on proliferation index of osteoblasts at 12 h and 24 h

4 讨 论

尽管有研究证实 LLLI 对成骨细胞的增殖具有刺激作用, 其确切的分子学机制尚不清楚。采用了 MC3T3-E1 细胞系为研究对象, 检测了 hedgehog 信号通路在低能量激光促进成骨细胞增殖中的作用。结果显示, LLLI(1 W, CW, 3.75 J/cm²) 活化了成骨细胞增殖过程中的 hedgehog 信号通路。激光照射同时加入 N-Shh 组的细胞增殖活性明显高于其他组, 此外, 激光照射同时加入环巴胺组的细胞增殖活性明显高于未进行激光照射组, 且低于激光照射组。

采用的低能量激光照射的方法及参数参考了以往与 LLLI 及成骨细胞相关的体外实验^[14-16]。影响激光器作用效果的主要照射参数包括波长、功率、照射剂量(能量密度、功率密度)、照射时间、照射距离等。现有研究中不同种类的低功率激光器最佳的照射参数差异较大。也有学者认为 LLLI 对体外培养的成骨细胞增殖及分化没有促进作用^[17-18]。本研究证实 3.75 J/cm² 的 LLLI 对体外培养的成骨细胞具有刺激作用, 可以促进细胞增殖, 符合以往研究建议的剂量范围 1.8~5.4 J/cm²^[19]。

LLLI 在促进细胞增殖的过程中可以激活多种信号通路^[20-24]。结果显示, 激光照射环巴胺组的细胞增殖活性低于激光照射组, 这提示环巴胺阻断了 LLLI 对成骨细胞增殖的促进作用。激光照射环巴胺组的细胞增殖活性高于对照组, 这提示 hedgehog 信号通路并非是 LLLI 促进成骨细胞增殖的唯一途径, LLLI 还可能通过其他通路或因子促进成骨细胞增殖, 如丝裂原活动蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶(MAPK/ERK)^[20], 促生长因子(IGF-1)^[25]等。此外, 激光照射+N-Shh 组的细胞增殖活性高于激

光照射组, 这说明 hedgehog 信号通路参与了 LLLI 促进成骨细胞增殖的过程, LLLI 可能通过激活 hedgehog 信号通路以促进成骨细胞的增殖, LLLI 和 N-Shh 在促进成骨细胞增殖上可能具有协同作用。因此, 通过本研究可以推断, LLLI 促进细胞增殖与 hedgehog 信号通路的活化有密切关联。

5 结 论

LLLI 活化了成骨细胞增殖过程中的 hedgehog 信号通路, hedgehog 信号通路是参与 LLLI 对成骨细胞增殖调控的通道之一。对 hedgehog 信号通路的调控可能成为 LLLI 促进骨形成和骨修复的又一有效途径。

参 考 文 献

- Jiang Xiaoxiao, Gong Longlong, Huang Lei. Triglycerides biosynthesis induced by low-power laser irradiation via regulation of ERK and Akt in adipocytes[J]. Chinese J Lasers, 2013, 40(12): 1204002.
- 蒋笑笑, 巩龙龙, 黄磊. 低功率激光调节脂肪细胞内 ERK 与 Akt 促进甘油三酯的合成[J]. 中国激光, 2013, 40(12): 1204002.
- Pires Oliveira DA, de Oliveira RF, Zangaro RA, et al.. Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells[J]. Photomed Laser Surg, 2008, 26(4): 401-404.
- Huertas RM, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, et al.. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation[J]. Biol Res Nurs, 2014, 16(2): 191-196.
- Medina-Huertas R, Manzano-Moreno FJ, De Luna-Bertos E, et al.. The effects of low-level diode laser irradiation on differentiation, antigenic profile, and phagocytic capacity of osteoblast-like cells (MG-63)[J]. Lasers Med Sci, 2014, 29(4): 1479-1484.
- Petri AD, Teixeira LN, Crippa GE, et al.. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium[J]. Braz Dent J, 2010, 21(6): 491-498.
- Saracino S, Mozzati M, Martinasso G, et al.. Superpulsed laser

- irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors[J]. *Lasers Surg Med*, 2009, 41: 298—304.
- 7 Ekizer A, Uysal T, Güray E, *et al.*. Light-emitting diode photobiomodulation; effect on bone formation in orthopedically expanded suture in rats-early bone changes[J]. *Lasers Med Sci*, 2013, 28(5): 1263—1270.
- 8 Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, *et al.*. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts [J]. *Bone*, 2007, 40(1): 140—148.
- 9 Jemtland R, Divieti P, Lee K, *et al.*. hedgehog promotes primary osteoblast differentiation and increases PTHrP mRNA expression and iPTHrP secretion[J]. *Bone*, 2003, 32(6): 611—620.
- 10 Baht GS, Silkstone D, Nadesan P, *et al.*. Activation of hedgehog signaling during fracture repair enhances osteoblastic-dependent matrix formation[J]. *J Orthop Res*, 2013, 32(4): 581—586.
- 11 Horikiri Y, Shimo T, Kurio N, *et al.*. Sonic hedgehog regulates osteoblast function by focal adhesion kinase signaling in the process of fracture healing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76785.
- 12 Li Qiushi, Zhang Tianfu, Zhou Yanmin. Effect of low level laser irradiation with different doses on proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells in vitro[J]. *J Jilin University Med Ed*, 2009, 35(6): 1123—1126.
李秋实, 张天夫, 周延民. 不同剂量低能量激光照射对体外人成骨样细胞增殖和分化的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2009, 35(6): 1123—1126.
- 13 Li Qiushi, Zhou Yanmin, Chen Yingxin, *et al.*. Effect of low level laser therapy on bone defect of an animal model[J]. *Chinese J Lasers*, 2011, 38(11): 1104004.
李秋实, 周延民, 陈英新, 等. 低能量激光治疗对骨缺损动物模型的影响[J]. *中国激光*, 2011, 38(11): 1104004.
- 14 Fukuhara E, Goto T, Matayoshi T, *et al.*. Optimal low-energy laser irradiation causes temporal G2/M arrest on rat calvarial osteoblasts[J]. *Calcif Tissue Int*, 2006, 79(6): 443—450.
- 15 Stein A, Benayahu D, Maltz L, *et al.*. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*[J]. *Photomed Laser Surg*, 2005, 23(2): 161—166.
- 16 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[J]. *Bone*, 1998, 22(4): 347—354.
- 17 Ferreira M P, Ferrari R A, Gravalos E D, *et al.*. Effect of low-energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium gallium indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model[J]. *Photomed Laser Surg*, 2009, 27(6): 901—906.
- 18 Pacheco P S, de Oliveira F A, Oliveira R C, *et al.*. Laser phototherapy at high energy densities do not stimulate pre-osteoblast growth and differentiation[J]. *Photomed Laser Surg*, 2013, 31(5): 225—229.
- 19 Pinheiro A L, Cavalcanti E T, Pinheiro T I, *et al.*. Low-level laser therapy in management of disorders of the maxillofacial region[J]. *J Clin Laser Med Surg*, 1997, 15(4): 181—183.
- 20 Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, *et al.*. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK[J]. *Lasers Med Sci*, 2010, 25(4): 559—569.
- 21 Miyata H, Genma T, Ohshima M, *et al.*. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation of cultured human dental pulp cells by low-power gallium-aluminium-arsenic laser irradiation [J]. *Int Endod J*, 2006, 39(3): 238—244.
- 22 Zhang L, Xing D, Gao X, *et al.*. Low-power laser irradiation promotes cell proliferation by activating PI3K/Akt pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219(3): 553—562.
- 23 Chen C H, Hung H S, Hsu S H. Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway [J]. *Lasers Surg Med*, 2008, 40(1): 46—54.
- 24 Feng J, Zhang Y, Xing D. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(6): 1116—1125.
- 25 Shimizu N, Mayahara K, Kiyosaki T, *et al.*. Low-intensity laser irradiation stimulates bone nodule formation via insulinlike growth factor-I expression in rat calvarial cells[J]. *Lasers Surg Med*, 2007, 39(6): 551—559.

栏目编辑: 韩峰