第36卷，第7期
2016年7月

光谱学与光谱分析
Spectroscopy and Spectral Analysis

Vol. 36, No. 7, pp2178-2182
July, 2016

低能量激光联合压力对成骨细胞ALP活性和胞内Ca^{2+}浓度的影响

史瑞新[1]，付喜宏[2]，庄金良[1]，杨陆一[1*]

1. 吉林大学口腔医学院正畸科，吉林 长春 130021
2. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所，吉林 长春 130033

摘 要 探讨低能量激光照射(low-level laser irradiation，LLLI)联合压力刺激对人成骨样细胞的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase，ALP)活性和胞内Ca^{2+}浓度的变化规律的影响，揭示LLLI促进正畸牙齿压力侧骨改建的机制。将对数生长期的人成骨样细胞MG-63随机分为4组，对细胞施加压力采用Forcel四点弯曲体外细胞力学加载装置，用Ga-Al-As半导体激光器(808 nm，500 mW)进行照射。组Ⅰ(对照组)：不加力，不进行激光照射。组Ⅱ(压力组)：利用细胞加载装置对细胞加压力，加力板变形量为3 000 ustrain，加力时间1 h。组Ⅲ(激光组)：激光照射1 min，剂量3.75 J·cm^{-2}。组Ⅳ(联合组)：细胞加力(加力方式同组Ⅱ)后，激光照射(方式同组Ⅲ)。四组细胞均用分光光度计测量细胞内ALP活性。第二部分实验对胞内Ca^{2+}浓度变化进行测定，将MG-63细胞分为2组：压力组和激光张力组，2组细胞分别加力0，5，15，30，60 min，激光压力组再激光照射1 min后收取细胞。用荧光探针Fluo-3-AM测定成骨样细胞内Ca^{2+}浓度。结果显示第一部分实验与对照组相比，其余3组的ALP活性均明显增强($p<0.05$)，但联合组的ALP活性分别低于压力组和激光组($p<0.05$)。第二部分实验显示：第1组压力引起胞内Ca^{2+}浓度随时间剧烈变化，第2组变化曲线平缓，但Ca^{2+}浓度水平两组无明显差异。由此得出结论适宜的压力和弱激光及联合应用均能增加成骨细胞的ALP活性，两者联合应用时较单独应用时成骨细胞的ALP活性稍有降低，压力组和激光压力组胞内Ca^{2+}浓度的变化曲线不同，说明在正畸牙齿的压力侧，低能量激光的应用可以降低由压力引起的成骨细胞活性增加，减少成骨，破骨相对增加，促进牙齿移动，LLLI极可能通过调节Ca^{2+}浓度的变化规律来调节成骨细胞活性。

关键词 低能量激光照射(LLLI)；成骨细胞；压力；碱性磷酸酶
中图分类号：R318.5 **文献标识码**：A **DOI**：10.3964/j.issn.1000-0593(2016)07-2178-05

引 言

成骨细胞在骨对机械应力的响应中起非常重要的作用，成骨细胞的功能活性与正畸中的牙齿移动、种植体周围的骨愈合和牵张成骨密切相关。众多的离体细胞实验显示拉伸、剪切、压缩等各种机械刺激都会对成骨细胞的功能和活性产生一定影响[1-3]。低能量激光照射(LLLI)在实验和临床中证明是对促进创伤愈合有明显作用[4-7]，体外研究也显示低能量激光照射对不同来源的细胞均有生物刺激作用。

人们在对细胞生理行为受力学刺激的影响方面做了大量研究，但是细胞将胞外的力学信号如何转导为胞内生化的响应，依然是有待研究的热点，大量实验表明，Ca^{2+}作为第二信使参与细胞的力转化过程，许多的物理刺激对胞内Ca^{2+}浓度都有一定影响，进一步调节细胞对刺激的响应。有研究显示鼠嗜铬细胞瘤PC-12细胞受正弦低频弱磁场照射，胞内Ca^{2+}浓度明显升高[8]，原代成骨细胞和MC3T3-E1细胞受到剪切力后，胞内Ca^{2+}浓度的迅速增加[9]，成骨样细胞MC3T3-E1受到电流刺激，引起到胞内Ca^{2+}浓度的增加[10]，胞内Ca^{2+}浓度的增加与NO的释放和PG的合成有关，胞内Ca^{2+}浓度变化参与细胞对物理刺激的响应过程但低能量激光照射联合压力刺激对成骨细胞的影响未见报道。本试验的目的是研究低能量激光照射联合压力刺激对成骨细胞碱性磷酸酶活性和胞内Ca^{2+}浓度的变化规律的影响，进一步揭示低能量激光如何通过影响压力侧的成骨细胞活性，来调节正畸牙齿压力侧骨形成和骨吸收的平衡。

收稿日期：2015-12-31，**修订日期**：2016-04-21
基金项目：国家自然科学基金项目(61405190)和吉林省卫计委项目(2013zc007)资助
作者简介：史瑞新，女，1978年生，吉林大学口腔医学院正畸科主治医师 e-mail：srx781110@sina.com
*通讯联系人 e-mail：Yangluyi1234@sina.com

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 实验部分

1.1 材料与仪器

H-DMEM 培养基(Gibco)，新生牛血清(Gibco)，胰酶(Gibco)，碱性磷酸酶试剂盒(碧云天)，细胞力学加载装置为 Forcel 四点弯曲力学加载仪（四川大学华西口腔医院与电子科技大学联合开发)，低能量半导体激光器(Ga-Al-As)中国科学院长春光机所研制。

1.2 细胞培养

人成骨样细胞株 MG-63(吉大基础医学院病理实验室赠予)，加入含 10%胎牛血清的 H-DMEM 中。置于温度 37 ℃含 5%CO_2 的培养箱中孵育，2 天换液，3 天传代 1 次。将传代后的 MG-63 细胞，胰蛋白酶消化离心，接种于已消毒的加力板上。

1.3 细胞加力

加力装置为 Forcel 四点弯曲细胞力学加载仪，将接种细胞的加力板放入加载仪，施加压力，原理如图 1 所示，加力时间为 3 h，频率为 0.5 Hz。

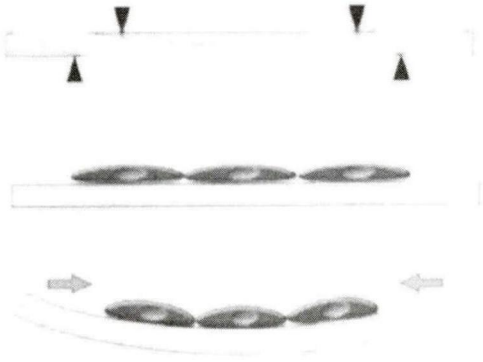

图 1　Forcel 四点弯曲细胞力学加载仪压力原理图

Fig. 1　Diagram of the four-point bending system for applying strain on cells

1.4 激光对 MG-63 细胞的照射

低能量半导体激光功率 66 mW，光纤探头 0.4 mm，波长 808 nm，照射时间为 1 min，能量密度 3 J·cm^{-2}。

1.5 实验分组

将细胞随机分成四组：组Ⅰ(对照组)：不做任何处理。组Ⅱ(压力组)：细胞加载装置对细胞加压力，加力板变形量为 3 000 ustrain，加力时间 3 h。组Ⅲ(激光组)：激光照射 1 min，剂量 3 J·cm^{-2}。组Ⅳ(联合组)：细胞加力(加力方式同组Ⅱ)后，激光照射(方式同组Ⅲ)。4 组细胞均在 12 h 后收集细胞，检测细胞碱性磷酸酶，重复 3 次。四组测量值用±SD 表示，用单因素方差分析法检验组间差异显著性，组间比较用 q 检验。

第二部分实验分两组，第一组(张力组)：分别在加力 0，5，15，30，60 min 时立即收取细胞，重复 3 次。第二组(激光张力组)：分别在加力 0，5，15，30，60 min 后激光照射 1 min，立即收取细胞，重复 3 次。用胰酶消化各组细胞，D-hanks 液重悬细胞，加入荧光探针 Fluo-3/AM-DMSO(浓度为 5 μmol·L^{-1})，放入 37 ℃水浴箱孵育 30～45 min，pbs 洗涤细胞 3 次，流式细胞仪检测，使用 FL1 通道，观察钙离子荧光表达强度。测定数据，3 次测量的数据表示为±SD，用方差分析组间差异。

2 结果与讨论

2.1 LLLT 联合压力对成骨样细胞 ALP 活性的影响

组Ⅰ—组Ⅳ的 ALP 活性值分别为 35.54±4.46，47.31±2.15，46.55±3.24，40.28±2.73 见表 1。与组Ⅰ相比，其余三组的 ALP 值均有增高，差异有显著性($p<0.05$)，说明压力和低能量激光照射及其联合应用均能促进成骨细胞碱性磷酸酶活性增强，与组Ⅱ(压力组)、Ⅲ(激光组)相比，组Ⅳ(联合组)的细胞 ALP 活性值降低，且有显著性差异($p<0.05$)，说明压力和低能量激光的联合应用较单独应用碱性磷酸酶活性降低，组Ⅱ和组Ⅲ之间无明显差异，表明压力和低能量激光各自对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响无明显差别，各组间 ALP 表达量比较图如图 2。

表 1　各组 ALP 检测结果比较

Table 1　Result of ALP in osteoblasts

	ALP(U/gprot)		ALP(U/gprot)
Group Ⅰ	35.54±4.46	Group Ⅲ	46.55±3.24*△
Group Ⅱ	47.31±2.15*△	Group Ⅳ	40.28±2.73*

* $p<0.05$ compared with Group Ⅰ; △ $p<0.05$ compared with Group Ⅳ

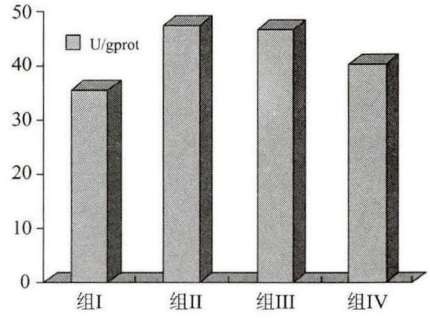

图 2　各组 ALP 表达量比较图

Fig. 2　Diagram of ALP in osteoblasts

2.2 LLLT 联合压力对成骨样细胞内 Ca^{2+} 浓度变化的影响

(1)各组成骨细胞的细胞内游离 Ca^{2+} 荧光强度值见表 2。压力组胞内 Ca^{2+} 荧光强度随着受力时间(0，5，15，30，60 min)的变化趋势为减弱增强再减弱，为波浪形，在 30 min 是峰值。激光压力组胞内 Ca^{2+} 的荧光强度随受力时间变化趋势是逐渐增强，变化波形较平缓，峰值出现在 60 min(如图 3)。

(2)激光压力组 0 min(即激光组)与压力组 0 min(即空白对照组)相比，细胞内 Ca^{2+} 浓度减少($p<0.05$)，表明 MG-63 对 LLLI 的响应也是通过 Ca^{2+} 浓度变化发挥作用。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表2 各组成骨细胞内 Ca^{2+} 荧光强度值($\bar{X}\pm SD$)

Table 2 Result of luorescence intensity in osteoblasts($\bar{X}\pm SD$)

受力时间	0 min	5 min	15 min	30 min	60 min
压力组	5.71±0.86	3.63±0.77	4.14±0.67	11.8±0.82	7.65±1.02
激光压力组	3.13±0.77*	6.12±0.65*	6.75±0.59	7.53±0.81*	7.85±0.69*

$p<0.05$ compared with stress group

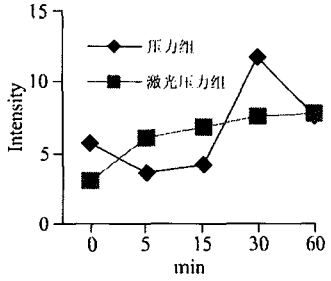

图3 各组成骨细胞内 Ca^{2+} 荧光强度值图(arbitrary unit)

Fig. 3 Diagram of luorescence intensity in osteoblasts(arbitrary unit)

2.3 讨论

大量关于机械力作用下的成骨细胞信号传导途径、增殖活性和基因表达变化的研究[11-13]，显示：细胞受到机械力学刺激后，其本身的形态、细胞骨架甚至细胞核骨架发生明显变化，活化第二信使系统，最终引起细胞生物学特性的改变。对细胞体外加力的装置有许多种，力的性质也不尽相同[14]，本实验应用四点弯曲加载仪。

目前普遍认为 ALP 是成骨细胞分化和功能的标志，体外研究已证实，没有 ALP 的存在，钙化就不会发生。Wuthier 等[15]研究显示碱性磷酸酶具有转运磷酸盐、Ca^{2+} ATP 酶或作为钙结合蛋白的作用。Encina 等[16]实验显示 ALP 通过水解有机磷酸酯，使局部 PO_4^{+} 浓度明显升高，而且进一步水解 ATP、焦磷酸等晶体生长抑制剂，从而使钙化程序启动。Jane 等[17]发现碱性磷酸酶属于细胞膜蛋白，能与细胞质膜的磷脂复合体共价结合，介导信号的跨膜传导。可见成骨细胞的增殖、迁移及分化 ALP 都参与调节，ALP 与成骨细胞的成熟及分化呈正相关，是调节骨形成的重要物质。

郑翼等[18]发现顶底轴向压力对成骨样细胞的功能状态和增殖活性有显著影响，并且随着时间的推移而恢复，未产生病理性的损害。胡立桉等[19]发现持续压力可降低成骨细胞碱性磷酸酶的分泌活性，适当值的压力在恢复正常后碱性磷酸酶的分泌活性可恢复正常，力值过大则可能影响细胞的功能。Roelofsen[20]研究表明间歇性的静水压提高了细胞的碱性磷酸酶活力。不同的研究其结果不尽相同，分析可能与力值大小不同以及加力装置的不同有关。本研究结果显示压力使成骨细胞碱性磷酸酶活力增加。

Haxsen[21]研究了人成骨细胞 ALP 的诱导和低能量激光照射阈值的相关性，采用 51，102，204 $mW\cdot cm^{-2}$ 三种功率密度的低能量激光照射细胞，发现成骨细胞受到低能量激光照射后产生的 ALP 呈对数变化规律，具有明显的阈值。Xu 研究脉冲激光照射鼠颅骨成骨细胞后，细胞数目及活性都显著增加，碱性磷酸酶活性增加，说明 LLLI 可以促进成骨细胞增殖和分化，在骨重建中地位十分重要。

实验显示压力组和激光组均较对照组的 ALP 活性增加，说明适宜的压力和低能量激光照射均能刺激成骨细胞的功能，增加其分化成熟。当压力和低能量激光联合应用时，成骨细胞的 ALP 活性较对照组增加，但较压力组和激光组均有所下降。说明 LLLI 使受到压力的成骨细胞 ALP 活性稍有降低，使其成骨减少，相对的破骨增加，促进正畸压力侧的破骨过程。

成骨细胞的增殖、分化及迁移等过程十分复杂，细胞间的相互作用均是通过多种第二信使(包括 Ca^{2+})来调控。机械力学刺激作用于成骨细胞时，细胞内 Ca^{2+} 浓度发生改变，通过 Ca^{2+} 浓度变化来调节成骨细胞的各种生理行为。Peake[22]的实验证明成骨细胞内 Ca^{2+} 浓度变化早期参与了成骨细胞对机械刺激的响应。Chellini[23]发现 LLLI 使成骨样细胞内 Ca^{2+} 浓度增高，从而调节成骨样细胞的分化。Chen[24]的研究显示剪切力作用于成骨细胞数秒后引起细胞内 Ca^{2+} 浓度增加。有临床实验[25]对患者尖牙施加拉力 150 g/侧，使其向远中移动，同时采用 LLLI(780 nm)，连续 9 个月每个月连续 3 天，结果显示加快牙齿移动速度，而且牙槽骨和根尖吸收的概率并不增加，说明 LLLI 对牙周组织的改建包括成骨及破骨均有促进作用，与本实验结果 LLLI 促进压力侧的破骨相一致。本课题组前期实验证明显示 LLLI 联合张力刺激对成骨细胞内 Ca^{2+} 浓度变化早期参与了成骨细胞对机械刺激和 LLLI 的响应[26]。

对成骨样细胞施加压力，5 min 后发现和未受力时相比，细胞内 Ca^{2+} 浓度降低，显示成骨细胞对压力刺激的生理响应也是通过胞内 Ca^{2+} 浓度变化来完成。受到压应变的成骨样细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化随加力时间在 0，5，15，30，60 min 时的变化趋势为先减低，后增高再减低，30 min 为峰值。研究资料显示如果细胞内 Ca^{2+} 的浓度持续快速地大幅增加会对细胞造成显著损伤，甚至会引起细胞的死亡。对受到压力的成骨样细胞施加低能量激光照射后，细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化曲线变的相对缓和，由此推测 LLLI 可能是通过调节胞内 Ca^{2+} 浓度变化节奏来调节成骨细胞的分化，从而调控成骨与破骨之间的平衡，为临床应用 LLLI 加速牙齿移动提供实验基础和理论支持。口腔正畸治疗是在力的作用下，张力侧和压力侧牙槽骨均有成骨和破骨发生，但张力侧以成骨为主，而压力侧以破骨为主的过程。本研究中，LLLI 使受到压力的成骨细胞 ALP 活性稍有降低，牙槽骨钙化程度的降低有利于破骨过程的进行，与 LLLI 加速牙齿移动的理论一致。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 结 论

在正畸治疗过程中，低能量激光照射使压力侧的成骨细胞ALP活性稍有降低，降低了牙槽骨钙化程度，有利于压力侧牙槽骨的破骨过程的进行，可能是LLLI加速牙齿移动的机理之一。受到压应变的成骨样细胞施加低能量激光照射后，细胞内Ca^{2+}浓度的变化曲线变的相对缓和，由此推测LLLI极有可能是通过调节胞内Ca^{2+}浓度的变化节奏，来达到进一步调控成骨细胞的分化成熟。

References

[1] Liu J, Liu T, Zheng Y, et al. Biochem Biophys Res Commun., 2006, 348(3): 1167.
[2] Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, et al. J. Biomechanics, 2000, 33(1): 45.
[3] Duncan R L, Turner C H. Calcif Tissue Int, 1995, 57(5): 344.
[4] Stein E, Koehn J, Sutter W et al. Wien Klin Wochenschr., 2008, 120(3—4): 112.
[5] Ma Z, Liu Q Y, Yang H X, et al. Light: Science & Applications, 2013, 2: e68.
[6] Judith S, Alexander F G, Brian M S. Light: Science & Applications, 2016, 5: e16001.
[7] Takaaki M, Mitsumasa I. Light: Science & Applications, 2016, 5: e16040.
[8] HUANG Chun-ming, YE Hui, XU Jian-hua, et al(黄春明，叶 辉，徐建华，等). J. Biomed. Eng.(生物医学工程学杂志), 2000, 79(1); 63.
[9] Allen F D, Hung C T, Pollack S R, et al. Cell Eng., 1996, 1(1): 117.
[10] Brighton C T, Wang W, Selders R, et al. J. Bone. Joint. Surg., 2001, 83(10); 1514.
[11] Sandy J R, Famdate R W, Meikle M C. Am. J. Orthod Dentofac Orthop, 1993, 103(3): 212.
[12] Pavalko F M, Chen N X, Turner C H, et al. Am. J. Physiol., 1998, 275(6 Pt 1): C1591.
[13] Bierbaum S, Notbohm H. Eur. J. Cell. Biol., 1998, 77(1): 60.
[14] El Haj A J, Walker L M, Preston M R, et al. Med. Biol. Eng. Comput., 1999, 37(3): 403.
[15] Wuthier R E, Register T C. Birmingham Alabama: Ebsco. Media. Inc., 1985. 13.
[16] Encina N R, Billotte W G, Hofmann M C. Lab. Invest, 1999, 79(4): 449.
[17] Duong L T, Rodan G A. Reviews in Endocrine&Metabolie Disodrers, 2001, 2(1): 95.
[18] ZHENG Yi, CHEN Guo-ping, ZHOU Zheng, et al(郑 翼，陈国平，周 征，等). West China Journal of Stomatology(华西口腔医学杂志), 2002, 20(1): 18.
[19] HU Li-an, CHEN Wei-min, MAO Jing, et al(胡立桉，陈卫民，毛 靖，等). Journal of Clinical Stomatology(临床口腔医学杂志), 2003, 19(2): 79.
[20] Roelofsen J, Klein-Nulend J, Burger E H. J. Biomech., 1995, 28(12): 1493.
[21] Haxsen V, Schikora D, Sommer U, et al. Lasers Med. Sci., 2008, 23(4): 381.
[22] Peake M A, Cooling L M, Magnay J L, et al. J. Appl. Physiol., 2000, 89(6): 2498.
[23] Chellini F, Sassoli C, Nosi D, et al. Lasers Surg Med., 2010, 42(6):527.
[24] Chen N X, Ryder K D, Pavlko F M, et al. Am. J. Physiol., 2000, 278: C989.
[25] da Silva Sousa M V, Scanavini M A, Sannomiya E K, et al. Photomed Laser Surg., 2011, 29(3): 191.
[26] SHI Rui-xin, ZHOU Yan-min, HU Min, et al(史瑞新，周延民，胡 敏，等). Optics and Precision Eng.(光学精密工程), 2015, 23(7): 1984.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Effect of LLLI on Secretion of ALP and Intracellular Calcium Concentration in Osteoblasts under Mechanical Stress

SHI Rui-xin[1], FU Xi-hong[2], ZHUANG Jin-liang[1], YANG Lu-yi[1*]

1. Orthodontics Department, School and Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China
2. Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China

Abstract In order to reveal the mechanism of LLLI accelerating teeth moving, we investigated the changes of alkaline phosphatase and intracellular calcium concentration when osteoblasts under stress were subjected low-level-laser-irradiation (LLLI). MG-63 cells were divided into four groups: control group, stress group, LLLI group and LLLI-stress group. Osteoblasts were subjected to the mechanical stress by a four-point bending system at 0.5 Hz and 3 000 μstrain. The secretions of ALP of each group are measured by spectrophotometer. In the second part, MG-63 cells were divided into two groups: stress group and LLLI-stress group. We checked intracellular calcium concentration via FCM and fluorescent indicator fluo-3/AM at 0, 5, 15, 30 and 60 min under stress. LLLI- stress group will receive LLLI for 1 min after stress. Compared to a control group, increased ALP secretions were observed in the other three groups. But ALP secretions in LLLI-stress group were lower than stress group and LLLI group. THE changing curve of intracellular calcium concentration in laser-stress groups is gentle instead of "jumping" in stress group. Proper stress, LLLI and combined application of these two can increase the secretions of ALP in osteoblasts compared to the control group. But the secretions of ALP decreased when combined application of stress and LLLI compared to using alone. LLLI can regulate the changing rhythm of concentration of the intracellular calcium to promote proliferation of MG-63 cell under stress, which means LLLI can reduce the bone-formation of osteoblasts under stress.

Keywords Low-level-laser-irradiation(LLLI); Osteoblast; Stress; Alkaline phosphatase (ALP)

(Received Dec. 31, 2015; accepted Apr. 21, 2016)

* Corresponding author

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net