

红外偏振光对骨髓间充质干细胞的影响*

毕迎立¹ 范建中¹ 陈银海^{2,3}

摘要

目的:观察红外偏振光治疗仪的临床治疗剂量对骨髓间充质干细胞(BMSCs)生长情况的影响。

方法:采用全骨髓培养法获取SD大鼠的原代BMSCs,取传代培养的细胞分为:实验组:红外偏振光处理10min;对照组:空气暴露相同时间。采用CCK8法检测细胞的增殖活性,流式细胞术进行细胞凋亡检测和细胞周期分析。

结果:CCK8法检测结果显示,实验组的光密度(OD)值与对照组相比,差异无显著性意义($P > 0.05$);细胞凋亡检测显示,两组的差异无显著性意义($P > 0.05$);细胞周期分析结果显示,两组差异无显著性意义($P > 0.05$)。

结论:红外偏振光的临床治疗剂量对骨髓间充质干细胞的增殖无明显影响,没有发现引起细胞凋亡,对细胞周期无明显影响。

关键词 红外偏振光;骨髓间充质干细胞;增殖;凋亡;细胞周期

中图分类号:R329, R454.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-12-1093-04

The effect of linear polarized near-infrared on bone marrow stromal stem cells/ BI Yingli, FAN Jianzhong, CHEN Yin Hai//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(12): 1093—1096

Abstract

Objective: To investigate the effect of linear polarized near-infrared on the growth of bone marrow stromal stem cells (BMSCs).

Method: The primary BMSCs were got from Sprague-Dawley rats with the method of whole bone marrow adherent cultivation. The passage cells were divided into trial group with linear polarized near-infrared irradiation for 10min and control group with disposing for the same time without linear polarized near-infrared irradiation. The condition of cell proliferation was measured using CCK8 method. The cell apoptosis and cell cycle were analysed with flow cytometry (FACS).

Result: CCK8 assay revealed no significant change of optical density(OD) in proliferation of the cells irradiated by linear polarized near-infrared($P > 0.05$). Flow cytometry results had no significant variation of cell apoptosis ($P > 0.05$), nor had significant variation of cell cycle ($P > 0.05$).

Conclusion: The linear polarized near-infrared with clinical treatment dosage has no effect on the proliferation, apoptosis and cell cycle of BMSCs.

Author's address Rehabilitation Medicine Department, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, 510515

Key word linear polarized near-infrared; bone marrow stromal stem cell; proliferation; apoptosis; cell cycle

骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能,在体内和体外特定诱导条件下可以分化成脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、神经、肝、心肌、内皮等多种组织细胞,可

作为种子细胞用于多种疑难重症引起的组织器官损伤的修复,因其来源方便,细胞扩增简单易行,可以实现自体移植,免疫反应低,所以在细胞疗法的应用

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.12.002

*基金项目:广东省自然科学基金项目(8451051501000460);广州市海珠区科技计划项目(2009-Y-018)

1 南方医科大学南方医院康复医学科,广州,510515;2 南方医科大学珠江医院门诊部;3 通讯作者

作者简介:毕迎立,男,硕士研究生;收稿日期:2012-03-17

中备受青睐。本实验通过观察红外偏振光的临床治疗时间对骨髓间充质干细胞增殖、凋亡、周期分布的影响,为探讨物理因子对骨髓间充质干细胞移植的影响奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

动物:SD大鼠1只,雌性,120g左右,由南方医科大学实验动物中心提供。试剂及耗材:DMEM/F12培养基(Hyclone),优级胎牛血清(gibco),青链霉素(吉诺),无水乙醇,Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(凯基),细胞周期分析试剂盒(凯基),CCK8试剂盒(日本同仁),25cm²培养瓶(美国Corning),96孔板(美国Corning)。仪器:采用珠海康嘉医疗器械有限公司产CZ-6601型红外偏振光治疗仪,波长0.6—1.6μm,输出功率800—4500mW。ELX800酶标仪(美国),流式细胞仪(美国),倒置光学显微镜,超净操作台,离心机,CO₂孵箱(美国)。

1.2 细胞培养

获取无菌状态下的SD大鼠的股骨和胫骨,注射器吸取5ml DMEM/F12培养基反复冲洗骨髓腔,将冲洗后的骨髓悬液离心(1000r/min,5min)。离心结束后培养基重悬细胞并移入25cm²培养瓶中,采用含10% FBS的DMEM/F12培养基,在37℃,5% CO₂孵箱中培养,2d换液一次,细胞90%融合后按1:3传代培养,取对数生长期的细胞作为实验对象。

1.3 骨髓间充质干细胞的表型鉴定

取P1代细胞,0.125%胰酶消化离心后,PBS重悬,调整细胞数约为 5×10^5 个,在1.5ml的EP管中加入Anti-CD29 PE-CY5, Anti-CD45 FITC, Anti-CD90 APC-CY7各1μg,另取一管不加抗体作为空白对照,30min内流式细胞仪检测^[1]。

1.4 实验分组及处理方法

将同一只大鼠处于相同培养条件下的同一代传代细胞分为实验组和对照组,实验组为红外偏振光处理10min,对照组为空气暴露相同时间。增殖实验在96孔板进行,实验组和对照组细胞数均调整为4000个/100μl/孔,细胞铺板后放于孵箱中培养3h,使细胞贴壁,于每天的相同时间段进行细胞处理,每天处理2次,连续处理5次。处理结束后,迅速将细

胞转入孵箱中培养,次日进行CCK8检测,共观察4d,每天取4个复孔。凋亡实验和细胞周期分析实验时,将细胞用培养基重悬后移至5ml冻存管中,实验组红外偏振光探头离管口5cm高度直射细胞悬液,对照管则在操作台中放置相同时间,无红外偏振光照射处理。试验结束后将细胞重悬转入25cm²培养瓶中,在孵箱中培养。

1.5 测定细胞增殖活性

采用CCK8法:取4孔细胞,每孔加10μl的CCK8试剂液,37℃孵育3h,至酶标仪检测光密度(optical density, OD)值,采用双波长检测,测定波长为630nm,参考波长为450nm^[2]。

1.6 细胞凋亡检测

培养3d后,细胞达70%融合,用不含EDTA的胰酶消化后离心(1000r/min,5min),弃去上清,PBS重悬并调整细胞数大约 5×10^5 个/管,PBS清洗一遍后,加500μl缓冲重悬细胞,再加5μl的Annexin V-FITC,和5μl PI后室温避光孵育10min后,用流式细胞仪检测^[3]。

1.7 细胞周期分析

取培养4d达80%—90%融合的细胞,离心、清洗后调整细胞数为大约 1×10^6 个/管,70%的酒精固定4℃过夜后,洗去固定液,加100μl RNase A 37℃ 30min,再加入400μl PI染色混匀,4℃避光30min,用流式细胞仪检测^[4]。

1.8 统计学分析

各组数据以均数±标准差表示,采用SPSS 13.0软件处理。对OD值检测数据用重复测量的方差分析,对凋亡率和周期分析数据用*t*检验分析。

2 结果

2.1 细胞形态观察

光学显微镜下观察:原代细胞培养7d左右达90%融合,细胞形态呈现杂乱的涡旋状,传代后细胞生长速度加快,大约5h后,细胞基本全部贴壁,培养24h后,达40%—50%融合,48h后达70%融合,呈现纤维状或纺锤体状,见图1,图2。

2.2 表型鉴定

表型鉴定结果可见CD90、CD29表达阳性,CD45表达弱阳性,可能是P1代细胞中含有较多的

图1 原代骨髓间充质干细胞

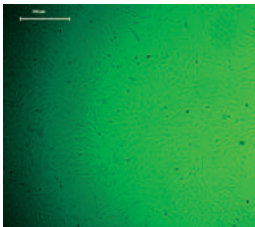
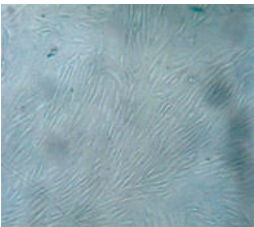
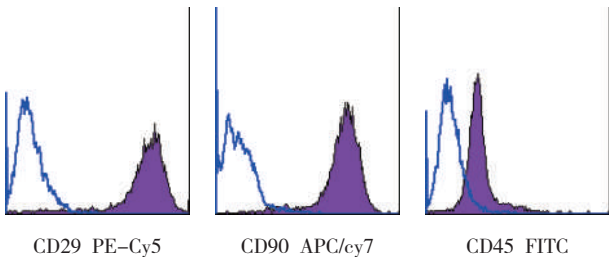


图2 P3代骨髓间充质干细胞



造血干细胞的原因,符合骨髓间充质干细胞的表型特点^[5],见图3。

图3 表型鉴定结果



2.3 红外偏振光对骨髓间充质干细胞增殖活性的影响

经重复测量分析后结果显示:实验组各时间点的细胞OD值略大于对照组,两组组间差异比较 $F=0.445, P=0.53$,差异无显著性意义,见表1。

2.4 红外偏振光对骨髓间充质干细胞凋亡情况的影响

经 t 检验分析显示,两组间细胞凋亡率、坏死率、正常率差异无显著性意义 ($P>0.05$),见表2。

2.5 红外偏振光对骨髓间充质干细胞周期分布情况的影响

流式细胞术分析细胞周期结果,见图4。各期分布率经 t 检验分析显示,两组细胞间差异无显著性意义 ($P>0.05$),见表3。

3 讨论

红外偏振光是波长在 600—1600nm 之间的近红外直线偏振光,正是由于这种波长特点,红外偏振光不容易被体液和血液吸收^[6],可以达到深部透热的作用,而且未见不良反应报道,临床上应用广泛,多用来治疗疼痛性疾病^[6]和炎症性疾病^[7],对一些难治性疾病,如严重性呃逆^[8]、斑秃^[9]等,也有明显效果,

表1 红外偏振光照射及不同培养时间的骨髓间充质干细胞OD值的变化 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

	第1天	第2天	第3天	第4天
实验组	0.80 ± 0.01	0.90 ± 0.01	1.40 ± 0.03	1.83 ± 0.13
对照组	0.77 ± 0.01	0.89 ± 0.03	1.39 ± 0.01	1.83 ± 0.04

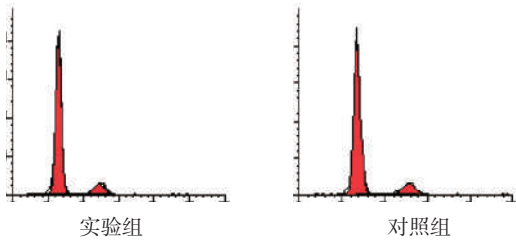
表2 红外偏振光对骨髓间充质干细胞凋亡情况的影响 ($\bar{x}\pm s, \%, n=3$)

	坏死率	中晚期凋亡率	早期凋亡率	正常细胞率
实验组	3.77 ± 0.87	5.57 ± 0.55	1.20 ± 0.30	89.47 ± 0.23
对照组	4.50 ± 1.78	5.37 ± 0.67	1.43 ± 0.06	88.73 ± 1.72
t	-1.15	1.31	-1.32	0.84
P	0.37	0.32	0.32	0.49

表3 红外偏振光对骨髓间充质干细胞周期分布的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

	G0-G1	S	G2-M
实验组	87.10 ± 0.41	2.36 ± 0.38	10.54 ± 0.24
对照组	86.21 ± 1.04	2.82 ± 0.82	10.97 ± 0.22
t	1.07	-0.70	-1.72
P	0.38	0.56	0.23

图4 流式细胞术分析细胞周期结果



还可用于运动员的肌肉被动热身^[10]。目前关于红外偏振光的作用机制研究较少,被普遍认可的观点是光热效应^[10],另外,红外偏振光可以产生一个与偏振方向垂直的电磁场^[11],这种光电磁效应可能会对机体产生一定的影响。以往研究证实,低能量激光具有生物刺激效应,可以促进细胞的生长^[12],临床上可以降低感觉神经传导速度,治疗颞下颌关节紊乱所致的肌肉痛,这一点与红外偏振光的治疗效应类似,所以红外偏振光可能具有与低能量激光类似的光学效应^[13]。

研究发现,红外偏振光可以对机体的生理生化情况产生影响:可以促进血液循环,改善供氧^[11],促进大鼠肝生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及HGF活化剂的表达^[9],改变神经元膜电位^[13]。骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能,可以应用在神经

系统、骨关节系统、心血管系统损伤中,但是细胞移植存活率受局部炎症反应等因素影响而不能发挥最大的治疗效应,鉴于红外偏振光的深部透热效应能改善损伤区域氧供,减轻炎症反应,可能会对移植物的存活有帮助,所以本实验通过体外细胞学实验验证红外偏振光是否会对骨髓间充质干细胞的生长产生影响。作为一种光学疗法,红外偏振光的生物效应与它的治疗模式及参数的设定都有密切关系。本研究采用红外偏振光治疗仪的C治疗模式,作用时间为10min。通过观察经红外偏振光处理后,细胞增殖、凋亡、细胞周期分布的变化,揭示红外偏振光对骨髓间充质干细胞的影响。

细胞增殖的检测方法主要有细胞计数法、MTT法、CCK8法等,但细胞计数法误差较大,MTT法灵敏度不够高,而CCK8法操作简便,灵敏度高,目前多用来进行细胞增殖检测。研究结果显示,红外偏振光处理后骨髓间充质干细胞的增殖无明显影响,原因可能是红外偏振光的光学效应对骨髓间充质干细胞增殖无影响,也可能是处理10min并非最佳治疗时间。

在光动力疗法的研究中发现,一氧化氮和氧自由基等活性物质可诱导细胞凋亡^[14]。据文献报道,红外偏振光可以减少中性粒细胞活性氧的产生^[15]。这一点提示红外偏振光可能会对细胞凋亡产生影响,为验证红外偏振光对骨髓间充质干细胞应用的安全性,本研究采用流式细胞术观察红外偏振光处理后3d的细胞凋亡率,结果未发现引起细胞凋亡情况,提示红外偏振光对大鼠骨髓间充质干细胞所产生的效应仍属安全效应,从而为进一步实验研究奠定可行性基础。

本研究还通过流式细胞术观察红外偏振光处理后骨髓间充质干细胞的周期分布情况,结果未发现静止期(G0-G1)和增殖期(S,G2-M)有明显变化,从DNA层面揭示了红外偏振光作用后骨髓间充质干细胞的变化,也进一步验证了红外偏振光对骨髓间充质干细胞增殖的影响。

综上所述,采用单一输出功率、输出模式的红外偏振光、作用时间10min时对骨髓间充质干细胞的增殖没有明显影响,未发现引起细胞凋亡和干扰细胞周期分布。红外偏振光对骨髓间充质干细胞的影

响是否具有时间或照射的能量依赖性还需要更多的实验研究来探讨。

参考文献

- [1] Poliseti N, Chaitanya VG, Babu PP, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells[J]. Neurol India, 2010, 58(2):201—208.
- [2] Fu X, He Y, Xie C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage[J]. Cytotherapy, 2008, 10(4):353—363.
- [3] Sui X, Yin J, Ren X. Antiviral effect of diammonium glycyrrhizinate and lithium chloride on cell infection by pseudorabies herpesvirus[J]. Antiviral Res, 2010, 85(2):346—353.
- [4] Zhang HZ, Wang Y, Gao P, et al. Silencing stathmin gene expression by survivin promoter-driven siRNA vector to reverse malignant phenotype of tumor cells[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(11):1457—1461.
- [5] Li L, Bai X, Gong X, et al. Differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells in duck[J]. J Genet Genomics, 2009, 36(3):133—140.
- [6] Muneshige H, Toda K, Ma D, et al. Antinociceptive effect of linear polarized 0.6 to 1.6 microm irradiation of lumbar sympathetic ganglia in chronic constriction injury rats[J]. J Rehabil Res Dev, 2006, 43(4):565—572.
- [7] Shibata Y, Araki H, Oshitani T, et al. Effects of linear polarized infrared light irradiation on the transcriptional regulation of IL-8 expression in IL-1 β -stimulated human rheumatoid synoviocytes involves phosphorylation of the NF- κ B RelA subunit[J]. J Photochem Photobiol B, 2009, 94(3):164—170.
- [8] Chang CC, Chang YC, Chang ST, et al. Efficacy of near-infrared irradiation on intractable hiccup in custom-set acupoints: evidence-based analysis of treatment outcome and associated factors[J]. Scand J Gastroenterol, 2008, 43(5):538—544.
- [9] Yamazaki M, Miura Y, Tsuboi R, et al. Linear polarized infrared irradiation using Super Lizer is an effective treatment for multiple-type alopecia areata[J]. Int J Dermatol, 2003, 42(9):738—740.
- [10] Demura T, Demura S, Aoki H, et al. Effect of linear polarized near-infrared light irradiation and light exercise on muscle performance[J]. J Physiol Anthropol, 2011, 30(3):91—96.
- [11] Sasaki A, Touma Y, Ishino Y, et al. Linear polarized near-infrared irradiation stimulates mechanical expansion of the rat sagittal suture[J]. Luminescence, 2003, 18(1):58—60.
- [12] Gulsoy M, Ozer GH, Bozkulak O, et al. The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro[J]. J Photochem Photobiol B, 2006, 82(3):199—202.
- [13] Yokoyama K, Oku T. Rheumatoid arthritis-affected temporomandibular joint pain analgesia by linear polarized near infrared irradiation[J]. Can J Anaesth, 1999, 46(7):683—687.
- [14] Carneiro ZA, de Moraes JC, Rodrigues FP, et al. Photocytotoxic activity of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex—a system capable of producing nitric oxide and singlet oxygen[J]. J Inorg Biochem, 2011, 105(8):1035—1043.
- [15] Shiraishi M, Suzuki K, Nakaji S, et al. Effect of linear polarized near-infrared ray irradiation on the chemiluminescence of human neutrophils and serum opsonic activity[J]. Luminescence, 1999, 14(5):239—243.