

國立臺灣大學

生物資源暨農學院動物科學技術學系

碩士論文

Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

低能量紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞之影響

The Effect of Low Energy Red Light Irradiation on Mouse Bone

Marrow Mesenchymal Stem Cell Fate

李妍樺

Yen-Hua Lee

指導教授：吳信志 博士

Advisor: Shinn-Chih Wu, Ph.D.

中華民國 100 年 6 月

June, 2011

謝誌

本論文成蒙恩師 吳信志老師之指導，就學期間老師給予諸多生活及課業上之關心及指導，使我得以完成本論文。亦感謝口試委員臺灣大學動物科學技術學系 鄭登貴老師及 劉逸軒老師、臺灣大學生物科技所 林劭品老師對論文之指正及試驗上之建議。感謝中央研究院基因體醫學國家型計畫台灣小鼠診所國家表現型鑑定中心協助小鼠骨密度及骨小樑二維 X 光影像之分析。以及臺灣大學電機工程學研究所林巧瑩學姊於實驗設計之建議及協助。亦感謝康舒科技股份有限公司楊松柏先生協助實驗光源之設計及製作。特別感謝動物生殖科技實驗室鄭淳淳學姊在實驗上的教導及幫助以及生活上的支持及照顧，還有感謝蕭士翔學長、黃馨儀學姊、楊卓真學姊、林育聖學長、周志任學長、劉重威學長、彭劭于學長、王兆中學長、陳守真學姊、沈盈姣學姊、鄭岱翰學長、馬耘逸學長、顏雅萍學姊、張晏嘉、曾哲揚、陳碩甫、張家駿、葛奕辰、蕭冠宇、許慈宇、張乃云對於實驗及生活上的幫忙協助。感謝所有為實驗犧牲的小鼠，沒有牠們的犧牲我無法完成這本論文。最後感謝我的家人及朋友，一直以來的支持及幫助。

中文摘要

間葉幹細胞(mesenchymal stem cell) 位於骨髓、脂肪等成體組織中，具有複能性分化潛能 (multipotency) 和自我更新 (self-renew) 的能力，因此可做為治療某些先天性疾病或退化性疾病的細胞來源。其在骨髓內所佔比例約為 0.003%，要應用於臨床治療必須透過體外培養擴增，然而，間葉幹細胞之增殖 (proliferation)、分化 (differentiation) 及遷移 (migration) 能力隨體外培養繼代次數而下降，且其治療效果會受細胞移入體內後增生、遷移及分化之能力影響。目前已有研究證實，特定波長的低能量光照可影響細胞增生、移動、貼附等能力。為探討低能量光照對小鼠骨髓間葉幹細胞之影響，以提升其臨床應用之療效，本試驗採用波長 650 nm 之紅光磷化銦鎵鋁 (AlGaInP) 發光二極體為光源，以功率密度 (power density) 5.09 mW/cm^2 ，不同能量密度 (包括：0, 0.3, 0.9 或 1.5 J/cm^2) 照射，分別觀察其照射後細胞之增生及遷移與脂肪、硬骨分化及細胞衰老等情形。以噻唑藍 (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) 比色法進行細胞增生之分析，傷口癒合測試 (wound healing assay) 測量其遷移能力，並以油紅染色及茜素紅染色定量脂肪及硬骨分化情形。結果顯示經 $0.3\sim 1.5 \text{ J/cm}^2$ 之紅光照射之處理組，其增殖能力皆顯著高於未照光之控制組。經紅光照射後以硬骨分化液誘導分化三天，經能量密度 0.9 J/cm^2 之間葉幹細胞，其硬骨分化形態較其他處理組成熟，其骨橋蛋白 (osteopontin) mRNA 表現量上升 40%，但經茜素紅色定量結果顯示，其鈣堆積情形和其他處理組間並無顯著差異。光照後以脂肪分化液誘導分化九天後，其油紅色定量結果顯示，細胞經紅光照射者其油滴堆積情形與控制組無顯著差異 ($p > 0.05$)。經能量密度 0, 0.3, 0.9 或 1.5 J/cm^2 之低能量紅光照射十二小時後，其細胞遷移區域依序分別為 28.2 ± 5.9 , 37.6 ± 5.3 , 44 ± 3.2 , $41.4\pm 3.0\%$ ，但各處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)。測量端粒長度、端粒酶活性、細胞週期抑制因子 p16 及 p21，以評估間葉幹細胞經低能量紅光照射後之老化情形。實驗結果顯示，經低能量紅光照射之間葉幹細胞，其老化情形和未照射之控制組間無顯著差異 ($p > 0.05$)。活體實驗部分，將經紅光照射之小鼠骨髓間葉幹細胞以脛骨髓內注射方式注入骨質疏鬆症小鼠骨髓，四週後注射未照射紅光間葉幹細胞之小鼠其骨體積及骨小樑數目顯著高於注射經紅光照射間葉幹細胞之處理組 ($p < 0.05$)。由此可知，經紅光照射後小鼠骨髓間葉幹細胞可能會抑制骨小樑之再生。

綜合上述，於體外培養時，低能量紅光照射可顯著促進小鼠骨髓間葉幹細胞增生，且有提升細胞遷移、硬骨及脂肪分化能力之趨勢。此外，以此條件照射小鼠骨髓間葉幹細胞並不會增加其老化速度。然而將已照射之小鼠骨髓間葉幹細胞做為治療骨質疏鬆症之細胞來源，則會削減其對於骨再生之功能，此結果提示低能量紅光療法可能不適合應用於骨質疏鬆症之間葉幹細胞治療。

關鍵字：光療法、小鼠骨髓間葉幹細胞、細胞老化、骨質疏鬆症



ABSTRACT

Due to their differentiation potential and self-renewal ability, mesenchymal stem cells (MSCs) can be applied for the treatment of some congenital or degenerative diseases. The efficacy of grafted MSCs is limited in proliferation, migration and differentiation ability. In addition, it is rare, only one MSC in 3.4×10^4 bone marrow cells. It is essential to culture and expand MSCs in vitro before putting them to therapeutic use. However, these abilities will decrease during in vitro culture process. Low energy red light irradiation was proved to be able to stimulate cell growth, migration, and adhesion. In order to validate the effect of low energy red light irradiation on mouse bone marrow MSCs proliferation, migration, adipogenic and osteogenic differentiation. MSCs were exposed to aluminum gallium indium phosphide light emitting diode at wavelength of 650 nm with different energy density (0, 0.3, 0.9 or 1.5 J/cm², respectively). Cell proliferation was evaluated by using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Cell migration ability was tested by wound healing assay. Adipogenic and osteogenic differentiation were analyzed by Oil Red O staining and Alizarin red staining and quantified by soluble dye measurement. The results showed that the cell number was significantly increased at day 4 in all irradiated groups ($p < 0.05$). In the wound healing assay, 12 hours after irradiation at the energy density of 0, 0.3, 0.9 or 1.5 J/cm², the percentage of migration area was 28.2 ± 5.9 , 37.6 ± 5.3 , 44 ± 3.2 , $41.4 \pm 3.0\%$, respectively. To further investigate the differentiation ability, MSCs were incubated with adipogenic induction medium after low energy red light irradiation for 9 days. The oil droplets accumulation in irradiated groups were no significant different than control groups. After 3 days of osteogenic induction, the osteopontin mRNA expression was 40 % higher than control. However, there was no significant

discrepancy ($p > 0.05$) in calcium accumulation.

To elucidate the cell senescence condition after low energy red light irradiation. We test the telomere length, telomerase activity, cell cycle inhibitor p16 and p21 gene expression. The results showed that there was no significant aging found in these cells after they had exposed to red light irradiation. To further confirm the above investigated results, we transplanted the low energy red light irradiated mouse bone marrow MSCs into osteoporosis model mouse to validate the effect *in vivo*. The treatment group that injecting MSCs could increase the bone volume and trabecular bone number. Surprisingly, the bone density in the group of injecting the irradiated MSCs could not be increased. The reason why the low energy red light irradiation result in significant decrease of the MSCs function needs further investigation to clarify.

In summary, low energy red light irradiation can stimulate mouse bone marrow MSCs proliferation, and slightly increase their differentiation and migration abilities *in vitro*. Moreover, the low energy red light irradiation won't accelerate cell senescence.

Key words: phototherapy, mouse bone marrow mesenchymal stem cells, cell senescence, osteoporosis

目次

	頁次
口試委員會審定書	
誌謝	i
中文摘要	ii
ABSTRACT	iv
目次	vi
圖目錄	viii
表目錄	x
第 1 章、 前言	1
第 2 章、 文獻檢討	2
2.1 幹細胞	2
2.1.1 幹細胞介紹	2
2.1.2 間葉幹細胞	2
2.1.3 骨髓間葉幹細胞之臨床應用	3
2.2 細胞衰老	5
2.2.1 細胞衰老介紹	5
2.2.2 端粒及端粒酶與細胞老化	5
2.2.3 細胞週期抑制因子	6
2.2.4 間葉幹細胞之老化	8
2.3 骨質疏鬆症	9
2.3.1 骨骼之持恆	9
2.3.2 骨質疏鬆症	9
2.3.3 骨質疏鬆症對骨髓間葉幹細胞之影響	10
2.4 光療法	11
2.4.1 光療法介紹	11
2.4.2 低能量紅光療法之機制	11
2.4.3 低能量紅光影響細胞增殖之研究探討	12
2.4.4 低能量紅光影響幹細胞分化之研究探討	13

2.4.5	發光二極體於光療法之應用	14
第 3 章、	試驗研究	15
3.1	低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞增生、分化和遷移之影響	15
3.1.1	前言	15
3.1.2	材料與方法	16
3.1.3	結果討論	25
3.2	低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞老化之影響	36
3.2.1	前言	36
3.2.2	材料與方法	37
3.2.3	結果討論	40
3.3	低能量紅光照射小鼠骨髓間葉幹細胞於改善小鼠骨質疏鬆症 可能性之探討	43
3.3.1	前言	43
3.3.2	材料與方法	44
3.3.3	結果討論	48
第 4 章、	綜合討論	60
第 5 章、	結論	61
第 6 章、	未來展望	62
REFERENCES	63

圖次

	頁次
圖 1 經 p53 及 p16-pRb 調控之細胞衰老路徑.....	7
圖 2 AlGaInP LED 之相對強度波長範圍.....	17
圖 3 光照設備.....	18
圖 4 利用噻唑藍比色法分析低能量紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞增殖 之影響.....	26
圖 5 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞硬骨分化能力之影響 (第三天).....	28
圖 6 硬骨分化三天後茜素紅染色定量結果.....	29
圖 7 硬骨分化三天後之基因表現.....	29
圖 8 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞脂肪分化能力之影響.....	30
圖 9 脂肪分化九天後油紅染色定量結果.....	31
圖 10 不同能量低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞遷移之影響.....	33
圖 11 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞遷移能力定量結果.....	34
圖 12 低能量紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞端粒長度之影響.....	40
圖 13 低能量紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞端粒酶活性之影響.....	41
圖 14 低能量紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞細胞週期抑制因子基因表現 之影響.....	42
圖 15 綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞.....	45
圖 16 骨髓腔內注射 (intra-bone marrow cavity injection) 示意圖.....	46
圖 17 骨質疏鬆症小鼠之股骨二維 X 光影像.....	48
圖 18 骨小樑定量分析結果.....	49

圖 19 骨質疏鬆症小鼠骨髓間葉幹細胞之硬骨分化能力	50
圖 20 骨質疏鬆症小鼠與年輕小鼠骨髓間葉幹細胞之硬骨分化定量結果	50
圖 21 年輕小鼠與骨質疏鬆症小鼠骨髓細胞之纖維母細胞聚落形成單位 (CFU-F) 數目比較	51
圖 22 骨質疏鬆症小鼠骨髓內注射綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞四週後 之脛骨骨髓細胞顯微照相圖	53
圖 23 細胞移植四週後之二維 X 光影像及骨小樑三維合成圖	54
圖 24 骨髓內注射間葉幹細胞四週後之骨小樑定量結果	55
圖 25 注射表現綠色螢光蛋白殖轉基因小鼠骨髓間葉幹細胞四週後脛骨 免疫組織化學染色顯微照相	56
圖 26 注射經紅光照射之表現綠色螢光蛋白質轉基因小鼠骨髓間葉幹細 胞四週後脛骨免疫組織化學染色顯微照相	56
圖 27 注射表現綠色螢光蛋白質轉基因小鼠骨髓間葉幹細胞四週後股骨 免疫組織化學染色顯微照相	57
圖 28 注射經紅光照射之表現綠色螢光蛋白質轉基因小鼠骨髓間葉幹細 胞四週後股骨免疫組織化學染色顯微照相	57
圖 29 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞 IL-6 及 IL-11 基因表現之影響	59

表次

	頁次
表 1 利用低能量紅光刺激細胞增殖相關研究	13
表 2 試驗設計	19
表 3 即時定量 PCR 引子序列	24
表 4 TRAPEZE® XL Telomerase Detection Kit 試驗設計	39



第1章 前言

由於間葉幹細胞可分離自多種組織如：骨髓、脂肪 (Zuk *et al.*, 2002)、羊水 (amniotic fluid) (in 'tAnker *et al.*, 2003)、骨膜 (periosteum) (Nakahara *et al.*, 1991)、牙髓 (dental pulp) (Miura *et al.*, 2003)、臍帶血 (umbilical cord blood) (Mareschi *et al.*, 2001) 及胎兒組織 (Campagnoli *et al.*, 2001)，且具有自我更新 (self-renew) 及複能性分化潛能 (Gerson, 1999)，目前已被證實可運用於骨髓根除療法 (myeloablative therapy) (Koc *et al.*, 2000)，使骨髓之微環境 (microenvironment) 更適合造血細胞生長。在人類疾病動物模式方面，已有研究團隊利用移植骨髓間葉幹細胞，促進大鼠骨骼再生 (Bruder *et al.*, 1998)。或是利用間葉幹細胞做為基因療法 (gene therapy) 之載體 (vector) (Fukuda *et al.*, 2000)。未來利用上述方式將間葉幹細胞應用於臨床醫學有其發展性。

然而，間葉幹細胞於人類體內所佔之比例非常低。根據研究顯示，平均每 3.4×10^4 個人類骨髓細胞中才有一個間葉幹細胞，而人類臍帶血中所含間葉幹細胞之比例又比骨髓中更低 (Wexler *et al.*, 2003)。若要將間葉幹細胞應用於臨床醫學，必須透過體外培養擴大間葉幹細胞之數目。先前研究指出，經多次繼代 (passage) 及長時間體外培養後，骨髓間葉幹細胞之返位 (homing) 能力降低 (Rombouts and Ploemacher, 2003)、群體倍增時間 (population doubling time) 增加，且在倍增次數 (doubling number) 達十八次時，部分細胞開始失去脂肪分化能力，倍增二十二次時開始失去軟骨分化能力 (Banfi *et al.*, 2000)。因此，建立提升間葉幹細胞增殖、分化及返位能力之方法，以解決上述問題，對間葉幹細胞之臨床應用，有其迫切需要性。

光療法 (phototherapy) 泛指一切利用光照來達到治療效果的行為。其中之低能量紅光被證實可促進細胞增殖 (Ghali and Dyson, 1992)、ATP 合成 (Passarella *et al.*, 1984)、生長因子分泌 (Yu *et al.*, 1994)、膠原蛋白合成 (Reddy *et al.*, 1998) 及抗發炎反應 (Lim *et al.*, 2007)。因此，本實驗欲利用低能量紅光刺激細胞生長、增加細胞代謝之特性，探討其對小鼠骨髓間葉幹細胞增殖、分化、遷移及老化之影響。並藉由骨質疏鬆症小鼠模式，探討經低能量紅光照射之骨髓間葉幹細胞移植，是否能增加骨質疏鬆症小鼠之骨密度。

第2章 文獻檢討

2.1 幹細胞

2.1.1 幹細胞介紹

幹細胞 (stem cells) 為具有自我更新 (self-renew) 及分化能力之細胞。幹細胞之自我更新方式可分為對稱性分裂及非對稱性分裂，對稱性分裂可產生兩個同樣具有幹細胞特性的細胞，而非對稱性分裂可產生一特化細胞 (specialized cell) 及一幹細胞，此機制可維持體內幹細胞之數目，以供體內受損組織修復。幹細胞依分化潛能可分為全能性 (totipotent)、多能性 (pluripotent)、複能性 (multipotent)、寡能性 (oligopotent) 及單能性 (unipotent) 幹細胞。全能性幹細胞可分化成一完整胚胎，如：受精卵。多能性幹細胞可分化成三胚層來源之各種細胞，如：胚幹細胞 (embryonic stem cells)。複能性幹細胞為只能分化成單一胚層的幹細胞，如：造血幹細胞 (hematopoietic stem cells)，可分化成紅血球 (red blood cells)、單核球 (monocytes)。寡能性幹細胞能分化成少數幾種細胞，如：淋巴幹細胞 (lymphoid stem cells)，可分化成T淋巴球 (T lymphocytes) 和B淋巴球 (B lymphocytes)。單能性幹細胞只能分化成一種細胞，如：纖維母細胞 (fibroblast)，可分化成纖維細胞 (fibrocytes)。

2.1.2 間葉幹細胞

1974年Friedenstein等人將骨髓細胞於體外培養，四小時後去除未貼附於培養皿的血液細胞，發現貼附於培養皿之細胞大多為紡錘狀，且於培養二至四天後開始快速分裂，形成聚落 (colonies) (Friedenstein *et al.*, 1974)。其後實驗證明這些來自骨髓且具有貼附性的細胞，可分化成成骨細胞 (osteoblasts)、軟骨細胞 (chondrocytes) (Ashton *et al.*, 1980) 及脂肪細胞 (adipocytes) (Bab *et al.*, 1986)。此種具貼附性、可形成聚落並具有自我更新能力，且展現硬骨、軟骨、脂肪細胞分化潛能的細胞，即為間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSC) (Caplan, 1991)。

間葉幹細胞的來源包含骨髓、脂肪 (Zuk *et al.*, 2002)、羊水 (amniotic fluid) (in 'tAnker *et al.*, 2003)、骨膜 (periosteum) (Nakahara *et al.*, 1991)、牙髓 (dental pulp)

(Miura *et al.*, 2003) 及胎兒組織 (Campagnoli *et al.*, 2001)等。間葉幹細胞表面分子標誌 (cell surface markers) 大多不具有專一性，目前已知人類骨髓間葉幹細胞不表現血液細胞表面分子標幟 CD45, CD34, CD14, CD11 及輔助刺激因子 (costimulatory molecules) CD80, CD86, CD40 及第二型主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex class II, MHC II) 血小板內皮細胞附著因子 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1; PECAM-1) CD31, 白血球作用相關抗原 (leukocyte function-associated antigen-1; LFA-1) CD18, 神經細胞附著因子 (neuronal cell adhesion molecule-1) CD56；但會表現第一型主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex I, MHC I) ，及 CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71, Strol-1, 血管細胞附著因子 (vascular cell adhesion molecule; VCAM-1) CD106, 白血球活化附著因子 (activated leukocyte cell adhesion molecule; ALCAM) CD166, 細胞內附著因子 (intracellular adhesion molecule; ICAM-1), CD29 (Chamberlain *et al.*, 2007)。

骨髓間葉幹細胞除可分化成硬骨、軟骨及脂肪之外，目前已知可於體外誘導分化成中胚層來源的肌肉 (Saito *et al.*, 1995)、血管內皮細胞 (vascular endothelium cells) (Li *et al.*, 2007)，及外胚層來源之神經細胞 (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000)，內胚層來源之胰島素分泌細胞 (insulin-producing cells) (Oh *et al.*, 2004)、肝臟細胞 (Lee *et al.*, 2004)。

2.1.3 骨髓間葉幹細胞之臨床應用

近來研究發現間葉幹細胞可抑制 T 細胞增殖，具有免疫調節功能 (Di Nicola *et al.*, 2002)。且間葉幹細胞不表現第二型主要組織相容性複合體及輔助刺激因子，異體移植時宿主不需免疫抑制 (immunosuppression)。又間葉幹細胞具有多分化潛能，且在體外可藉由培養方式擴增，因此可作為組織修復之材料。

由於間葉幹細胞在體內即具有硬骨分化潛能，在臨床上被運用於治療成骨不全症 (Osteogenesis imperfecta)，研究結果顯示：經骨髓間葉幹細胞移植之成骨不全症孩童，相較於未進行移植之孩童，其生長速率及骨密度有顯著提升 (Horwitz *et al.*, 2002)。其他利用動物模式進行之試驗，目前已有結果證明，將 Lin⁻c-kit⁺的小鼠骨髓細胞分離後注射至心肌梗塞小鼠之梗塞部位旁，結果顯示注射至心臟之骨髓細

胞可分化成心肌細胞、內皮細胞、周圍細胞及平滑肌細胞，並可促進心肌再生及血管生成，修復梗塞組織 (Orlic *et al.*, 2001)；腹腔注射博來黴素 (bleomycin) 造成肺纖維化之小鼠，經頸靜脈注射間葉幹細胞後，其肺纖維化情形顯著下降，且可觀察注射至體內的間葉幹細胞出現內皮細胞之型態 (Ortiz *et al.*, 2003)。此外，間葉幹細胞已在動物試驗上被證實可改善腎臟疾病 (Kunter *et al.*, 2006)、糖尿病 (Lee *et al.*, 2006)、移植物對抗宿主疾病 (graft versus host disease) (Ringden *et al.*, 2006)。此外，Hofstetter 等人將間葉幹細胞注射至脊髓損傷大鼠之受損部位，一週後可觀察到間葉幹細胞在受損部位形成束帶狀，引導脊髓再生促進復原 (Hofstetter *et al.*, 2002)。上述結果說明骨髓間葉幹細胞不只在體外具有多分化潛能，在體內也能分化成不同胚層來源之細胞。



2.2 細胞衰老

2.2.1 細胞衰老介紹

細胞衰老 (cell senescence) 指細胞停止分裂的現象，通常衰老的細胞型態較大且扁平，細胞週期維持在 G1 期但仍維持代謝活性。造成細胞衰老的原因包含：端粒長度縮短、DNA 受損、染色質擾動 (chromatin perturbation)、致癌基因 (oncogene)、強烈的有絲分裂訊號 (mitogenic signal) 或壓力 (stress) (Campisi and di Fagagna, 2007)。研究指出，當纖維母細胞粒線體代謝不正常、細胞色素 c 氧化酶 (cytochrome c oxidase) 和菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷脫氫酶 (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase, NADH dehydrogenase) 活性上升、粒線體膜電位下降時，細胞內會產生大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 對細胞產生氧化壓力，造成細胞老化 (Passos *et al.*, 2007)。此外，不同的操作程序、培養條件及細胞類型也會造成不同程度的細胞衰老 (Sethe *et al.*, 2006)。一般非癌症細胞在體外培養的條件之下，最多可分裂四十至六十次，便會開始產生衰老，此種現象又稱為 "Hayflick limit" (Hayflick, 1965)。

2.2.2 端粒及端粒酶與細胞老化

端粒 (telomere) 為一串重複的寡核甘酸序列 (5'-TTAGGG-3') 及其相關蛋白質，存在於真核生物染色體的兩端，其功能為確保 DNA 的完整性及防止 DNA 重組。端粒確切的結構仍然未知，但目前認為哺乳類動物端粒尾端為一大型圓圈 T 環 (t-loop) 結構。由於 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 不能完整複製染色體尾端的 DNA (DNA replication problem)，以致細胞每經過一次 S 期 (S phase) 其端粒就會減少五十至兩百個鹼基對 (Harley *et al.*, 1990)，此現象又稱 DNA 末端複製問題 (DNA end-replication problem)。一般人類細胞之端粒長度從數千個到一萬五千個鹼基對，當端粒縮短至失去功能時，會使 DNA 雙鏈斷裂 (DNA double-strand break)，產生 DNA 受損反應 (DNA damage response, DDR)，DNA 受損反應會使細胞週期停止，以利其修復受損 DNA (di Fagagna *et al.*, 2003)。

端粒酶 (telomerase) 分為端粒酶反轉錄酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 和 RNA 模板 (telomerase RNA component, TERC) 兩部分，可在染色體兩端加上重複的端粒 DNA 片段，避免 DNA 末端複製問題 (Collins and Mitchell, 2002)。

大部分細胞表現極少量或不表現 TERT，因此無法避免端粒縮短造成的細胞衰老，但生殖細胞或癌細胞表現大量端粒酶可避免端粒縮短造成細胞老化。小鼠之端粒長度大於兩萬個鹼基對，比人類長上許多，且大多表現端粒酶。儘管如此，小鼠細胞在體外培養僅能培養數代後便老化，造成此現象的原因是多數體外培養條件氧氣含量為 20%，遠高於正常生理值，而小鼠細胞對於氧氣濃度較人類細胞敏感，造成 DNA 損傷，若又無法有效修復受損 DNA，則會造成細胞老化 (Parrinello *et al.*, 2003)。

2.2.3 細胞週期抑制因子

當細胞衰老時，其基因表現顯著改變，衰老細胞表現細胞週期抑制因子 (cell cycle inhibitor)，如：p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1a, CDKN1a) 和 p16 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2a, CDKN2a) (圖 1) (Campisi and di Fagagna, 2007)。其中 p21 可結合 cyclin-CDK2 或 cyclin-CDK4 複合體，抑制細胞週期從 G1 期進入 S 期。當細胞 DNA 受損、遭受環境壓力時，會使 p14^{ARF} 表現，p14^{ARF} 阻隔 MDM2 和 p53 作用，使 MDM2 無法促進 p53 降解，以致細胞內 p53 量上升，p53 進而促使 p21 等細胞週期抑制因子表現，導致細胞週期停止或細胞凋亡。過短的端粒也是一種細胞衰老的訊號，會使早幼粒細胞白血病蛋白 (promyelocytic leukemia protein, PML) 表現量上升，PML 是一種腫瘤抑制蛋白，會和乙醯轉移酵素 (acetyltransferase) CBP 或 p300 作用，乙醯化 p53 使其活性上升，加速 p53 調控之細胞衰老路徑 (Campisi, 2001)。p16 抑制細胞週期蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4) 作用，使 CDK4 無法磷酸化視網膜細胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein, pRb)，因此當細胞表現 p16 時，細胞中的 pRb 處於低度磷酸化的狀態，會抑制細胞週期進行 (Serrano *et al.*, 1993)。有研究結果顯示 p16 的表現量也會受 pRb 的影響，目前認為 p16 和 pRb 之間為回饋調控關係 (Li *et al.*, 1994)。

圖 1 經 p53 及 p16-pRb 調控之細胞衰老路徑

當細胞 DNA 受損、遭受環境壓力時，會使 p14^{ARF} 表現，p14^{ARF} 阻隔 MDM2 和 p53 作用，使 MDM2 無法促進 p53 降解，以致細胞內 p53 量上升，p53 進而促使 p21 等細胞週期抑制因子表現，導致細胞週期停止或細胞凋亡。p16 抑制細胞週期蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4) 作用，使 CDK4 無法磷酸化視網膜細胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein, pRb)，因此當細胞表現 p16 時，細胞中的 pRb 處於低度磷酸化的狀態，會抑制細胞週期進行。

Fig. 1. Senescence controlled by the p53 and p16-pRB pathways.

Senescence-inducing signals causes p14^{ARF} expression to rise p14^{ARF} sequesters MDM2, a protein that facilitates p53 degradation, which leads to an increase in p53 activity. p53 induces the transcription of several genes, including the cyclin-dependent protein kinase (CDK) inhibitor p21, that cause or facilitate the senescence arrest. Senescence signals induce the expression of p16, another CDK inhibitor that prevents pRB phosphorylation and inactivation that cause the senescence arrest.

2.2.4 間葉幹細胞之老化

間葉幹細胞和其他體細胞一樣具有有限的壽命，當細胞分裂達一定次數後便會產生老化。間葉幹細胞在初代培養 (primary culture) 時，其細胞直徑約為 10~30 μm ，經過繼代培養後，間葉幹細胞開始出現擴大、扁平及多核的型態，細胞內產生大量的機動蛋白纖維 (actin fibers)，貼附性下降，細胞內脂褐質 (lipofuscin) 堆積容易產生自體螢光 (autofluorescence)，細胞週期停止在 G1 期，且表現老化相關的乙型半乳糖酶 (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal)，上述現象代表間葉幹細胞已開始老化。且細胞來源動物之年齡、性別、部位及體外培養的方法，如：細胞分離方式、培養皿材質、冷凍保存方法、培養液、血清、繼代比例和培養密度不同，皆會影響間葉幹細胞之增殖能力及衰老情形 (Ksiazek, 2009)。

間葉幹細胞老化之分子機制可分為兩部分，第一是端粒的縮短，每經過一次 S 期，其端粒長度平均減少 50~100 個鹼基 (Serakinci *et al.*, 2007)，當端粒縮短至 5.8~10.5 kb 時開始失去功能 (Baxter *et al.*, 2004)，使細胞停止複製。而間葉幹細胞是否具有端粒酶活性至今仍受爭議，目前認為間葉幹細胞中只有少數的亞群 (subpopulation) 表現端粒酶活性 (Sethe *et al.*, 2006)。其次是由於氧化壓力使 DNA 受損，細胞內細胞週期抑制因子堆積造成細胞衰老的現象。

間葉幹細胞老化會影響其分化能力，目前研究多著重於其硬骨分化能力。早在西元 1971 年即有研究指出，隨細胞來源動物年齡上升，其間葉幹細胞硬骨分化能力下降，脂肪分化能力上升 (Meunier *et al.*, 1971)，此現象又被稱為「adipogenic switch」 (Ross *et al.*, 2000)，上述現象也解釋了老年骨質疏鬆症 (senile osteoporosis) 之成因。體外培養研究結果顯示，經多次繼代 (passage) 及長時間體外培養後，人類骨髓間葉幹細胞之群體倍增時間 (population doubling time) 增加，且在倍增次數 (doubling number) 達十八次時，部分細胞開始失去分化成脂肪之能力；倍增二十二次時，開始喪失分化成軟骨之能力，但仍具有硬骨分化能力 (Banfi *et al.*, 2000)。

2.3 骨質疏鬆症

2.3.1 骨骼之持恆

在成年人體內，每年約有 25 %的骨小樑 (trabecular bone) 被吸收並再造。骨再造 (bone remodeling) 在骨髓內持續進行，其中蝕骨細胞 (osteoclast) 利用酸化 (acidification) 和蛋白酵素分解 (proteolytic digestion) 使骨再吸收 (resorption)，而成骨細胞 (osteoblast) 分泌膠原蛋白 (collagen) 和蛋白質組成骨質 (osteoid)，接著骨質礦化成為新骨。

成骨細胞源自於骨髓間葉幹細胞，和間葉幹細胞有許多共同特徵，同樣表現細胞介白素第六因子 (interleukin-6, IL-6)、細胞介白素第十一因子 (interleukin-11, IL-11)、顆粒球巨噬細胞聚落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 及巨噬細胞聚落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF)，且在造血功能 (myelopoiesis) 中扮演重要的角色。蝕骨細胞源自於造血前驅細胞 (colony forming unit-granulocyte and macrophage, CFU-GM)，當成骨細胞或間葉幹細胞受到細胞介白素第一因子 (interleukin-1, IL-1)、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor)、副甲狀腺素 (parathyroid hormone)、1,25-二羥維生素 D₃ (1,25-dihydroxyvitamin D₃) 刺激後，會分泌 IL-6, IL-11, GM-CSF, M-CSF 等細胞激素 (cytokine)，可促使血液前驅細胞分化為蝕骨細胞 (Manolagas and Jilka, 1995)。

2.3.2 骨質疏鬆症

骨質疏鬆症是由於骨再造過程失衡所造成的骨質密度下降。可依其成因分為兩類，第一型骨質疏鬆症指因性腺失去功能而引發的骨質疏鬆症，其骨密度下降多由於骨小樑密度降低造成；第二型骨質疏鬆症則是由年齡增長造成，多發生於七十五歲以上，其骨密度下降部位主要集中在皮質骨 (cortical bone) (Manolagas and Jilka, 1995)。統計指出，年齡介於四十至五十歲時，其骨質平均每年下降 0.3~0.5%。但在女性更年期或是男性去勢後，其骨質流失之速率增加至原本的十倍 (Gallagher *et al.*, 1987)。當性腺失去功能後，骨形成及骨吸收的能力皆會上升，但骨吸收的能力上升程度較骨形成高，導致骨再造過程失衡 (Jilka *et al.*, 1998)。

動情素 (estrogen) 會抑制成骨細胞和間葉幹細胞分泌 IL-6 (Girasole *et al.*, 1992)，雄性素 (androgen) 也可利用類似的機制，經由雄激素受器調控之路徑影響

IL-6 的轉錄活性 (Bellido *et al.*, 1993)。當性腺失去功能時，性荷爾蒙分泌量下降，使其對 IL-6 分泌抑制消失，IL-6 分泌上升使蝕骨細胞分化增加，骨再吸收作用上升。在正常骨再造過程中，當蝕骨細胞進行骨再吸收時，會釋出轉化生長因子 (transforming growth factor- β , TGF- β) 等有助於間葉幹細胞分化成成骨細胞的細胞激素 (Oreffo *et al.*, 1989)。因此，當性腺失去功能時會造成骨再吸收及成骨作用同時上升的現象。

2.3.3 骨質疏鬆症對骨髓間葉幹細胞之影響

骨質疏鬆症對骨髓間葉幹細胞的影響至今仍受爭議，部分研究顯示：以卵巢摘除引發骨質疏鬆症之大鼠，其骨髓間葉幹細胞之增殖能力及纖維母細胞群落形成單位 (colony forming unit-fibroblast, CFU-F) 數目遠不如未摘除卵巢之大鼠者，又經體外誘導分化後，其鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 表現量及鈣堆積量也較正常大鼠者低 (Li *et al.*, 2006)。其他研究顯示卵巢摘除之小鼠血清中骨鈣素 (osteocalcin) 濃度，在卵巢摘除後兩週後顯著上升，且其 CFU-F 及成骨細胞群落形成單位 (colony forming unit-osteoblast, CFU-OB) 數目為偽手術小鼠之二至六倍 (Manolagas *et al.*, 1995)。另在臨床研究結果顯示，有骨質疏鬆症之病患其骨髓間葉幹細胞的 CFU-F 和成骨細胞分化能力，分別均如正常人者然，竟無顯著差異 可言 (Stenderup *et al.*, 2001)。

2.4 光療法

2.4.1 光療法介紹

光療法 (phototherapy) 泛指一切利用光照來達到治療效果的行為。目前多利用光療法來治療皮膚疾病或是睡眠障礙。研究指出利用波長 280~400 nm 之紫外光 (ultraviolet) 可抑制免疫系統降低發炎反應以治療疥瘡 (psoriasis) (Diffey, 1980)。以波長 415~430 nm 之藍光活化痤瘡丙酸桿菌 (*Propionibacterium acnes*) 中的紫質 (porphyrin)，可釋出單氧 (singlet oxygen) 殺死細菌治療痤瘡 (acne vulgaris) (Papageorgiou *et al.*, 2000)。波長 420~470 nm 之藍光，可將反式膽紅素 (trans-bilirubin) 轉換成水溶性的順式膽紅素 (cis-bilirubin)，使其可藉由尿液或糞便排出體外，以治療新生兒黃疸 (neonatal jaundice) (Newman *et al.*, 2009)。此外波長介於 600~900 nm 之紅光也被證實可藉由促進細胞增殖、細胞移動及抗發炎反應、加速傷口癒合。

1967 年匈牙利醫師 Endre Mester 將小鼠背部毛剃除，利用低能量紅寶石雷射照射，以測試紅寶石雷射是否會引發癌症，結果發現低能量紅光照射不但不會引發癌症，反而加速小鼠背毛生長。隔年研究發現以紅寶石雷射照射慢性潰瘍的傷口，可加速復原能力。其後，低能量紅光被證實可促進細胞增殖 (Ghali and Dyson, 1992)、ATP 合成 (Passarella *et al.*, 1984)、生長因子分泌 (Yu *et al.*, 1994)、膠原蛋白合成 (Reddy *et al.*, 1998) 及抗發炎反應 (Lim *et al.*, 2007)。

2.4.2 低能量紅光療法之機制

光之波長 (wavelength)、頻率 (frequency) 及光子能量 (photon energy) 構成的圖譜稱為作用光譜 (action spectrum)。而能影響細胞生理的作用光譜即為細胞內光受體 (photoacceptor) 的吸收光譜 (absorption spectrum)。先前研究指出，刺激 DNA 和 RNA 合成的作用光譜範圍為 313 ~ 860 nm (Karu *et al.*, 1984)，其作用光譜分別在 400, 620, 680, 760 及 825 nm 處均有明顯的高峰，此等現象與粒線體中參與電子傳遞鏈 (electron transport chain, ETC) 酵素之吸收光譜相符合。在 400 nm 已知係黃素蛋白 (flavoprotein) 之吸收光譜；另外其他四個波長分別為細胞色素 C 氧化酶中還原態銅中心 A (reduced Cu_A), (620 nm), 氧化態銅中心 B (oxidized Cu_B), (680 nm), reduced Cu_B (760 nm) 及 oxidized Cu_A (825 nm) 等之吸收光譜 (Karu, 1999)。

光由光受器接收後，如何達到其作用，目前有多種假說。其中，「單態氧假說」(singlet oxygen hypothesis) 認為黃素蛋白等感光物質接收光刺激後產生單態氧，而單態氧可刺激細胞內的 RNA 及 DNA 合成 (Karu *et al.*, 1981)。「氧化還原特性改變假說」(redox properties alteration hypothesis) 提出當細胞色素 C 氧化酶受到光照後，其中的 Cu_A 和 Cu_B 氧化還原特性會被改變也會因此加速粒線體中的電子轉移 (Karu, 1986)。另一個「一氧化氮假說」(NO hypothesis) 指出當細胞色素 C 氧化酶接受光照後，除了加速電子轉移，同時也可以逆轉一氧化氮對細胞色素 C 氧化酶催化中心的抑制，使更多氧分子可以和催化中心結合以加速呼吸作用 (Karu *et al.*, 2001)。當細胞受到光照時，無論波長，含能量皆會產生熱，「短暫局部加熱假說」(transient local heating hypothesis) 表示當受到光照後所產生的熱，會造成細胞內物質結構改變因而影響其生化活性 (Karu *et al.*, 1991)。1993 年 Karu 等人提出「超氧化陰離子假說」(superoxide anion hypothesis)，Karu 認為當光照加速粒線體的電子傳遞鏈時，會產生超氧化陰離子，而引發進一步的訊息傳遞 (Karu *et al.*, 1993)。

位於粒線體的光受器，在接收到光刺激後，必須藉由細胞內訊息傳遞來影響到細胞核內的 DNA 合成或基因表現。其可能機制如：提升細胞內三磷酸腺苷 (adenosine-5'-triphosphate, ATP) 含量，影響細胞代謝、藉由 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 或活化蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 等氧化還原敏感的轉錄因子傳遞訊息 (Karu, 1986)。

2.4.3 低能量紅光影響細胞增殖之研究探討

低能量紅光要達到刺激細胞生長之效果，除了其波長必須在光受器的吸收光譜範圍內外，其功率密度 (power density) 及能量密度 (energy density) 也扮演關鍵的角色。研究顯示，波長 660 nm 之磷化銦鎵鋁雷射 (aluminium gallium indium phosphide, InGaAlP laser) 以 20 mW/cm² 能量密度 3J/cm² 照射後，可使牙髓幹細胞 (dental pulp stem cells) 增殖能力上升，但若將功率密度提升至 40 mW/cm² 其他條件不變，則無法提升增殖能力 (Eduardo Fde *et al.*, 2008)。其他有關低能量紅光刺激細胞增殖之研究整理如表 1，其有效波長範圍為 632.8~904 nm，功率密度由 5.5~180 mW/cm²，能量密度為 0.14~8 J/cm²。

表 1 利用低能量紅光刺激細胞增殖相關研究

Table 1. The research of low energy red light irradiation on cell proliferation

細胞	光源	波長 (nm)	功率密度 (mW/cm ²)	能量密度 (J/cm ²)	時間 (秒)	參考文獻
牙齦纖維母細胞 (gingival fibroblast)	鎵鋁砷雷射 (GaAlAs laser)	809		1.96 ~ 7.84	75 ~ 300	(Kreisler <i>et al.</i> , 2002)
人類牙周韌帶纖維母細胞 (human periodontal ligament fibroblasts, PDLF)	鎵鋁砷雷射	809		1.96~7.84	75 ~ 300	(Kreisler <i>et al.</i> , 2003)
纖維母細胞 (NIH-3T3 fibroblasts)	砷化鎵脈衝雷射 (Ga-As-pulsed laser)	904		3~5		(Pereira <i>et al.</i> , 2002)
成骨細胞	氦氖雷射 (HeNe laser)	632.8	180	0.14, 0.43	1, 3	(Stein <i>et al.</i> , 2005)
人類臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)	二極體雷射 (diode laser)	670	20	2, 4, 8		(Schindl <i>et al.</i> , 2003)
間葉幹細胞、心肌幹細胞 (cardiac stem cell)	砷化鎵雷射	804	50	1、3 J/cm ²	20, 60	(Tuby <i>et al.</i> , 2007)
間葉幹細胞	磷化銦鎵砷二極體雷射 (InGaAsP diode laser)	635	6.61	0.5, 1, 2, 5	75, 150, 300, 750	(Hou <i>et al.</i> , 2008)
人類脂肪來源幹細胞 (human adipose derived stem cell)	二極體雷射	635	5.5	5	900	(Abrahamse <i>et al.</i> , 2008)

2.4.4 低能量紅光影響幹細胞分化之研究探討

低能量紅光目前已被證實可促進幹細胞之肌肉、硬骨及神經之分化能力。以波長 635 nm 功率密度 6.61 mW/cm² 之磷化銦鎵鋁二極體雷射，照射大鼠骨髓間葉幹細胞 750 秒，並以誘導分化液培養兩週後，其肌肉分化情形顯著提升 (Hou *et al.*, 2008)。波長 880 nm 能量密度 3 J/cm² 及 6 J/cm² 之鎵鋁砷雷射照射間葉幹細胞，其

神經細胞分化能力顯著提升，而經 2 J/cm^2 及 6 J/cm^2 之能量密度照射後可促進硬骨分化 (Soleimani *et al.*, 2011)。利用波長 635 nm 功率密度 180 mW/cm^2 之氦氖雷射，照射人類成骨細胞系 (human osteoblast cell line)，分別照射 0、1、3、10 秒，結果顯示，照射一秒及三秒之組別可有效提升成骨細胞鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 表現量，但照射十秒之處理組無法顯著提升其 ALP 表現量。照射三秒之處理組其骨橋蛋白 (osteopontin) 及骨涎蛋白 (bone sialoprotein) 之表現量顯著高於未照射之控制組 (Stein *et al.*, 2005)。然而，於 2009 年另有相關研究結果顯示，波長 880 nm 、功率密度約 44 mW/cm^2 之鎵鋁砷 (gallium aluminium arsenic, GaAlAs) 雷射，照射小鼠之骨髓細胞 91 秒，其對成骨細胞及蝕骨細胞分化結果皆與控制組無顯著差異 (Bouvet-Gerbetaz *et al.*, 2009)。

2.4.5 發光二極體於光療法之應用

發光二極體 (light emitting diode) 是一種特殊的二極體 (diode)。發光二極體由半導體 (semiconductor) 晶片組成，半導體會產生 p、n 架構。與其它二極體一樣，發光二極體中電流可以輕易地從 p 極 (陽極) 流向 n 極 (負極)，而相反方向則不能。兩種不同的載流子：空穴 (holes) 和電子 (electrons) 在不同的電極電壓作用下從電極流向 p、n 架構。當空穴和電子相遇而產生複合，電子會跌落到較低的能階，同時以光子 (photon) 的模式釋放出能量。發展初期，採用砷化鎵的發光二極體只能發出紅外線或紅光。隨著材料科學的進步，現今已可製造多種顏色的發光二極體，(維基百科, 2011)。相較於雷射，發光二極體具有較廣之波長範圍，可涵蓋不同吸收光譜，其光束較寬，可治療大範圍之損傷。且雷射光照射組織時將產生較高的熱，可能會傷害組織，而發光二極體產熱較少，可減少組織之傷害。美國食品藥物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 已認同發光二極體不會對人體造成顯著危害，且可做為臨床光療法之光源。

研究顯示，以發光二極體為光源可有效刺激細胞增殖及硬骨分化。波長 570 nm 能量密度 0.1 J/cm^2 之綠光、能量密度 0.53 J/cm^2 波長 660 nm 、 950 nm 之紅光及紅外光皆能有效刺激纖維母細胞增殖 (Vinck *et al.*, 2003)。以波長 647 nm 、功率密度 9.29 mW/cm^2 之紅光發光二極體，照射 10、30 及 90 秒，其能量密度分別為 0.093、0.279 及 0.836 J/cm^2 ，可有效促使成骨細胞分化成熟，但在此照設條件下無法有效刺激細胞增殖 (Kim *et al.*, 2009)。

第3章 試驗研究

3.1 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞增生、分化和遷移之影響

3.1.1 前言

骨髓為造血幹細胞 (hematopoietic stem cells) 及間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells) 的主要來源。目前認為間葉幹細胞為中胚層來源細胞，研究結果證實其可於體外被誘導分化成為包括：硬骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肌肉細胞、神經細胞、胰臟細胞、及肝臟細胞等三胚層來源細胞型式；因此，一般可將之定義為具備複能性分化潛能 (multipotency) 之幹細胞。鑑於間葉幹細胞具有複能性分化潛能和自我更新 (self-renew) 的能力，因此可提供做為治療某些先天性疾病或退化性疾病之細胞來源。其療效取決於細胞增殖、分化、及遷移能力。然而，上述能力隨著體外培養過程而下降 (Banfi *et al.*, 2000)。因此，設若能有效找出提升間葉幹細胞增殖分化及遷移能力之方法，則有助於提升利用間葉幹細胞，進而提升臨床醫療材料之療效，當有其發展性。

低能量紅光已被證實可促進包括：細胞之增殖 (Ghali and Dyson, 1992), ATP 之合成 (Passarella *et al.*, 1984), 生長因子之分泌 (Yu *et al.*, 1994), 膠原蛋白之合成 (Reddy *et al.*, 1998) 與抗發炎反應 (Lim *et al.*, 2007)；因此，本試驗欲利用低能量紅光刺激細胞生長、加速細胞代謝之特性，針對其於小鼠骨髓間葉幹細胞之增殖、分化、及遷移能力之影響進行試驗探討之。

3.1.2 材料與方法

3.1.2.1 實驗動物

本試驗採用八至十二週齡之 ICR 母小鼠，購自台大醫學院實驗動物中心。飼養環境為本系動物舍，溫度維持於 23~25 °C，相對濕度保持在 40%~60%，使用自動控制光照循環，每天十四小時光照十小時黑暗，早上六點亮燈，晚上八點熄燈。採任食飼養，提供充足的飲水及小鼠專用飼糧 (#5001, PMI Feeds Inc., USA)，並定期更換墊料。

3.1.2.2 光照設備

本試驗光源之波長範圍為 600 ~ 700 nm，波峰位於 650 nm 之磷化鋁銦鎵 (aluminium gallium indium phosphide, AlGaInP) 發光二極體 (圖 2)，依九十六孔盤之間距設置發光二極體燈泡，光源距離培養皿 1.5 cm 由下往上照射，其中間隔一厚度 0.3 cm 之透明玻璃板，電路板下方加裝風扇避免電路板產熱影響實驗結果 (圖 3)，經五分鐘照射後，其培養液溫度上升小於 0.5 °C。培養皿底部接受之光照功率密度為 $5.08 \pm 0.24 \text{ mW/cm}^2$ ，分別照射 0, 1, 3, 及 5 分鐘，其能量密度依序為 0, 0.3, 0.9, 及 1.5 J/cm^2 。細胞增殖及分化實驗使用黑壁透明底之九十六孔培養皿和二十四孔培養皿 (PerkinElmer)，避免光線散射影響光照強度。

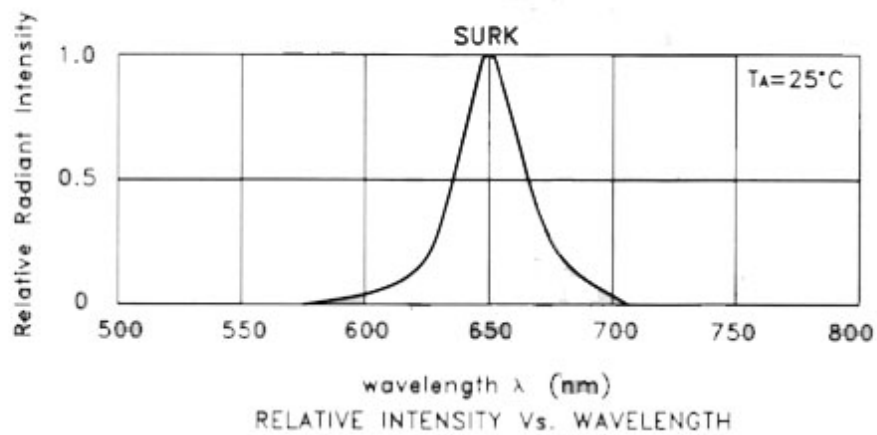


圖 2 AlGaInP LED 之相對強度波長範圍。

本試驗所使用光源之 AlGaInP LED 波長範圍為 600 nm 至 700 nm，主要波長為於 650 nm。

Fig. 2. The relative intensity and wavelength of AlGaInP LED.

The AlGaInP LED used in this study has wavelength range from 600 nm to 700 nm, and has a peak in 650 nm.



圖 3 光照設備。

本試驗光源為磷化鋁銦鎵發光二極體。為避免光源產熱影響實驗，於光源及培養皿中間隔一厚度 0.3 cm 之透明玻璃板，電路板下方加裝風扇以利散熱。光源至細胞之距離為 1.5 cm。在此條件下之功率密度為 5.08 mW/cm^2 。

Fig. 3. The red light irradiate light source.

The indium–gallium–arsenate–phosphate light emitting diode was used in this study. To avoid the heat that produced by LED influence experiment result, we put a glass slide between LED and culture plate. And put a fan under the light. The distant from light source to cell mono layer was 1.5 cm. Thus the power density was 5.08 mW/cm^2 .

3.1.2.3 試驗設計

小鼠骨髓間葉幹細胞以不同密度培養一天後，移除培養液後，加入含有 2%FBS 之磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffer saline, PBS) (Amresco, 0780)，以避免培養液顏色影響光照。分別照射 0 分鐘 (0 J/cm^2), 1 分鐘 (0.3 J/cm^2), 3 分鐘 (0.9 J/cm^2), 及 5 分鐘 (1.5 J/cm^2)，培養後進行分析；其條件綜合如表 2 所示。

表 2 試驗設計

Table 2. Experimental design

試驗項目	細胞密度 (cells/well)	能量密度 (J/cm ²)	培養時間	分析方法
細胞增殖試驗	1.5×10 ³ 九十六孔盤	0, 0.3, 0.9, 及 1.5	0, 2, 4, 6, 8, 10 (天)	噻唑藍比色法
硬骨分化試驗	1×10 ⁵ 二十四孔盤	0, 0.3, 0.9, 及 1.5	3 (天)	茜紅素染色
脂肪分化試驗	1×10 ⁵ 二十四孔盤	0, 0.3, 0.9, 及 1.5	9 (天)	油紅染色
細胞遷移試驗	5×10 ⁵ 六孔盤	0, 0.3, 0.9, 及 1.5	0, 12, 18, 24 (小時)	傷口癒合分析

3.1.2.4 小鼠骨髓間葉幹細胞分離

將八至十二週齡之 ICR 母小鼠以頸椎脫臼方式犧牲後，取下其股骨及脛骨部位，將肌肉剝除乾淨，剪開骨頭兩端，利用 23 G 之針頭以 8 mL 含 100 U/mL penicillin 及 100 µg/mL streptomycin (gibco, 15140), 3.7 mg/mL 碳酸氫鈉 (sodium bicarbonate, NaHCO₃) (sigma, s5761), 及 20% 胎牛血清 (bovine fetal serum, FBS) (SAFC bioscience, 12003C) 之 αMEM (minimum essential medium alpha-modification) (sigma, m0894) 培養液將骨髓液沖出，脛骨利用 26 G 支針頭以 6 mL 培養液將骨髓液沖出，將沖出之骨髓液以培養液定量至 36 mL，平分於兩個 10 cm 直徑之培養皿，將股骨和脛骨放入培養皿中，放置於 37 °C 含有 5% CO₂ 之培養箱，三天後將未能貼附之懸浮細胞移除，加入新的培養液，每三天更換一次培養液，培養約八至十天後細胞達飽和 (confluence)。

當細胞長滿後，移除骨頭並吸去培養液，以 0.25% 之 trypsin-EDTA (gibco, 2500056) 將細胞懸浮，並以孔徑 70 µm 之篩網過濾，以 1200 rpm 離心五分鐘後吸去上清液。每 1×10⁷ 個細胞以 180 µL 之 auto MACS running buffer (MACS Miltenyi Biotec, 130-091-221) 重新懸浮，加入 10 µL 之 microbeads anti-mouse CD11b (MACS Miltenyi Biotec, 130-049-601) 及 10 µL microbeads anti-mouse CD45 (MACS Miltenyi Biotec, 130-052-301)，混合均勻後於 4 °C 反應十五分鐘，加入 1 mL auto MACS

running buffer 終止反應，以 2000 rpm 離心五分鐘。離心後吸去上清液，以 500 μ L auto MACS running buffer 懸浮細胞，將細胞液加入以 2 mL auto MACS running buffer 潤濕過之 LD column (MACS Miltenyi Biotec, 130-042-901)，再以 1 mL 之 auto MACS running buffer 將未和抗體結合之細胞自管柱沖出，重複沖兩次後收集自管柱流出之細胞液，離心後吸去上清液，加入培養液懸浮細胞，以 5×10^4 cell/cm² 之密度培養於細胞培養皿，並置於培養箱繼續培養。

3.1.2.5 小鼠骨髓間葉幹細胞培養與保存

當細胞長滿後，吸去培養液，以 0.25% 之 trypsin-EDTA 於 37 $^{\circ}$ C 反應五分鐘，細胞懸浮後加入等量之培養液終止反應，1200 rpm 離心五分鐘後，以一比二之比例分盤。當細胞進行冷凍保存時，將細胞顆粒懸浮於含有 10 % 之二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma, d2650) 之胎牛血清中，以大約每分鐘降低 1 $^{\circ}$ C 之速率降溫，緩慢冷凍細胞至 -85 $^{\circ}$ C 後至於液態氮中保存。

3.1.2.6 細胞計數

取 20 μ L 細胞液加入等量之錐藍 (trypan blue) (gibco, 15250) 染色，取 10 μ L 染色後之細胞液滴在血球計數器 (hemocytometer) 上，計算未被染色之細胞數目，加以換算後可得總細胞數。

3.1.2.7 噻唑藍比色法

經紅光照射後第 0, 2, 4, 6, 8, 及 10 天，以噻唑藍 (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) 比色法 (Mosmann, 1983) 測量細胞數目，並每兩天更換一次培養液。測量時將 10 μ L 的 MTT (5mg/mL) 加入含有 100 μ L 培養液之九十六孔盤，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱培養四小時後，移除培養液，加入 100 μ L 的 DMSO (sigma, d5879)，室溫放置六分鐘後，以分光光度計在波長 570 nm 及 690 nm 進行分析。計算方式為 570 nm 讀值扣除 690 nm 讀值後，除以第 0 天測得之讀值；所得之比例即為細胞增殖之倍數。

3.1.2.8 遷移測試

將細胞培養至九分滿後，使用含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 絲裂黴素 C (mitomycin C) 之細胞培養液處理兩小時，再以細胞培養液清洗三次。利用 P-200 微量吸管將細胞刮出一條線，每隔一段時間觀察細胞遷移情形，並拍照記錄。將顯微照相圖以 Image J 軟體分析遷移面積。

3.1.2.9 體外硬骨誘導分化及分析

小鼠骨髓間葉幹細胞經紅光照射後移除緩衝液，加入含 10% FBS, 0.1 μM dexamethasone (sigma, d4902), 10 mM glycerol-2-phosphate (sigma, g9891), 及 50 μM ascorbate-2-phosphate (sigma, a8960) 之 αMEM 骨細胞誘導培養液，培養三天後進行分析。

骨細胞之鈣化可以茜素紅染色 (Alizarin Red S, ARS) (sigma, a5533) 進行分析。首先以 PBS 清洗三次，以將細胞表面之培養液清洗乾淨，接著以 10% formaldehyde (mallinckrode, H121-08) 在室溫下處理十分鐘使細胞固定，再用 PBS 清洗兩次，加入 2% Alizarin Red S (以 0.5% ammonium hydroxide (Riedel-de Haën, 05002) 將 pH 值調整至 4.1~4.3) 反應十五分鐘，以 PBS 充分清洗後，利用顯微鏡觀察細胞鈣離子堆積情形。

若要進行定量，以溶解於磷酸緩衝液 (8 mM Na_2HPO_4 (sigma, s5136), 1.5 mM KH_2PO_4 (sigma, p5655)) 之 10% cetylpyridinium chloride (sigma, c0732) 將 ARS 溶出，以分光光度計分析 550 nm 之吸光值，對照 ARS 的定量標準曲線計算。

3.1.2.10 體外脂肪誘導分化及分析

細胞經紅光照射後移除緩衝液，加入含 10% FBS, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin (sigma, i6634), 1 μM dexamethasone, 0.5 mM isobutyl-methylxanthine (sigma, i5879), 及 100 μM indomethacin (sigma, i7378) 之 αMEM 脂肪細胞誘導培養液，每三天更換一次培養液，培養九天後進行分析。

脂肪細胞之油滴堆積係以油紅染色 (Oil Red O) (sigma, o9755) 進行分析。首先以 PBS 清洗三次，以將細胞表面之培養液清洗乾淨，接著以 10% formaldehyde 在室溫下處理十分鐘使細胞固定，再用 PBS 清洗兩次，加入 0.5% Oil Red O 反應

十五分鐘，以 PBS 充分清洗後，利用顯微鏡觀察細胞油滴堆積情形。

若要進行定量，以 DMSO 將 Oil Red O 溶出，以分光光度計對 550 nm 及 650 nm 進行分析，計算方式為將 550 nm 讀值扣除 650 nm 讀值後，對照 Oil Red O 的定量標準曲線計算。

3.1.2.11 總 RNA 萃取

總 RNA 以 TRIzol reagent (ambion, 15596) 萃取。將培養液吸乾後加入 TRIzol 混勻後置於 1.5 mL 離心管室溫靜置五分鐘。加入 200 μ L chloroform 輕搖混勻一分鐘，冰上靜置三十分鐘。以 12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 離心十五分鐘。吸取上清液至另一乾淨離心管，再加入 200 μ L chloroform 輕搖混勻一分鐘，以 12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 離心十五分鐘。取出上清液並加入等量之 isopropanol，搖晃混勻約一分鐘，以 12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 離心十五分鐘後，移除廢液並以含 DEPC 之 75%酒精清洗 RNA 團塊，12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 離心十五分鐘。離心後將酒精吸除，風乾 RNA 團塊。最後以 DEPC 水溶解 RNA 團塊，儲存於-80 $^{\circ}$ C 冰箱。

3.1.2.12 DNase 處理

取 19 μ L 之 RNA 加 2.5 μ L RQ1 DNase 10 \times Reaction Buffer (Promega, M198A), 1 μ L RQ1 RNase-Free DNase (Promega, M610A), 2.5 μ L ddH₂O, 37 $^{\circ}$ C 反應三十分鐘，加入 1 μ L RQ1 DNase Stop Solution, 65 $^{\circ}$ C 反應十分鐘以終止 DNase 反應。其後加入 2.5 μ L 3M sodium acetate (Ambion, AM9740), 1 μ L glycogen (Fermentas, R0551), 及 75 μ L 100% 酒精，混合均勻後置於-20 $^{\circ}$ C。隔日以 12000 rpm 4 $^{\circ}$ C 離心十分鐘，以 1 mL 70% 酒精充分清洗 RNA 團塊，以 12000 rpm 4 $^{\circ}$ C 離心五分鐘。離心後將酒精吸除，風乾 RNA 團塊。最後 DEPC 水溶解 RNA 團塊，利用超微量分光光度計 (Nanodrop) 測量其 RNA 濃度及純度。

3.1.2.13 反轉錄反應

依照 SuperscriptTM III Reverse Transcriptase (invitrogen, 18080-044) 之說明，取 1 μ g 至 5 μ g 之 RNA 加 1 μ L 之 Oligo (dT) primer (invitrogen, 18418-012), 1 μ L 10mM dNTP (invitrogen, 18427-013), 加 dd H₂O 至總體積為 13 μ L, 於 65 $^{\circ}$ C 反應五分鐘，

再於冰上反應一分鐘，加 4 μ L 5 \times First-Strand Buffer, 1 μ L 0.1M DTT, 1 μ L RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (invitrogen, 10777-019), 及 1 μ L SuperscriptTM III Reverse Transcriptase，重複吸放將其混合均勻，25 $^{\circ}$ C 反應五分鐘，50 $^{\circ}$ C 反應六十分鐘，70 $^{\circ}$ C 反應十五分鐘後將互補 DNA (complementary DNA, cDNA) 保存於-20 $^{\circ}$ C 冰箱。

3.1.2.14 即時定量 PCR

依照 DyNAmoTM Flash SYBR Green qPCR Kit (FINNZYMES, F415) 說明。將 cDNA 以五倍至十倍稀釋，取 4 μ L 稀釋後 cDNA，加入 5 μ L 2 \times qPCR master mix，1 μ L 之 5 μ M 引子 (primer) (序列如表 3 所示)，95 $^{\circ}$ C 七分鐘，其後以 95 $^{\circ}$ C 十秒、60 $^{\circ}$ C 三十秒進行三十九個循環，最後 60 $^{\circ}$ C 反應一分鐘，反應停止在 95 $^{\circ}$ C。



表 3 即時定量 PCR 引子序列

Table 3. The qPCR primer sequences

名稱	引子序列 (5'→3')	Tm (°C)
GAPDH	Forward : CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA	60
	Reverse : GCGGCACGTCAGATCCA	60
Runx2	Forward : GCTTTCATTAGGCAGGGCCAACAA	60
	Reverse : AGGGCTGGATCTCAAACCTCACACA	59.9
Secreted phosphoprotein 1 (Spp1) (osteopontin)	Forward : TCAGCTGGATGAACCAAGTCTGGA	59.7
	Reverse : ACTAGCTTGTCCTTGTGGCTGTGA	60
Bone gamma carboxyglutamate protein 1 (Bglap1) (osteocalcin)	Forward : TCATGTCCAAGCAGGAGGGCAATA	60.1
	Reverse : TGATAGCTCGTCACAAGCAGGGTT	60
p16	Forward : GAACTCTTTCGGTCGTACCC	60
	Reverse : CGAATCTGCACCGTAGTTGA	60
p21	Forward : CCAGGCCAAGATGGTGTCTT	60
	Reverse : TGAGAAAGGATCAGCCATTGC	60
Acidic ribosomal phosphoprotein P0 (36B4)	Forward : ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG	60
	Reverse : TCAATGGTGCCTCTGGAGATT	60
Telomeric primer	Forward : CGGTTTGTTTGGGTT TGGGTTTGGGTTTGGGTT	60
	Reverse: GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACC CTTACCCT	60
IL-6	Forward : ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC	59.8
	Reverse : TGATGCACTTGCAGAAAACA	58.9
IL-11	Forward : AGGCGAGACATCAAGAGCTG	60.7
	Reverse : GCAGGTGGTCCTTCCCTAA	60

3.1.2.15 統計分析

本試驗之數據使用 SAS 軟體中之鄧氏新多變域測驗法 (Duncan's New Multiple Range Test) 將處理均值兩兩比較，並以平均值±標準誤差 (mean ± standard error) 的方式表示， $p < 0.05$ 時則定義為兩者兼具顯著差異。

3.1.3 結果討論

3.1.3.1 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞增殖能力之影響

小鼠間葉幹細胞經紅光照射後，利用噻唑藍比色法比較細胞數目。結果顯示如圖 4，經紅光照射後第二天 0.3 J/cm^2 及 1.5 J/cm^2 之處理組其細胞數目顯著高於未照射之控制組，照射後第四天經紅光照射之處理組其細胞數目皆顯著高於控制組，第六天所有處理組之細胞數目皆高於控制組，其中經能量密度 1.5 J/cm^2 照射之處理組其細胞數目顯著高於 0.9 J/cm^2 之處理組，照射後第八天 1.5 J/cm^2 處理組之細胞數目顯著高於未照射之控制組及 0.9 J/cm^2 處理組。第十天 0.9 J/cm^2 及 1.5 J/cm^2 之處理組細胞數目顯著高於控制組，其他處理組間無顯著差異。

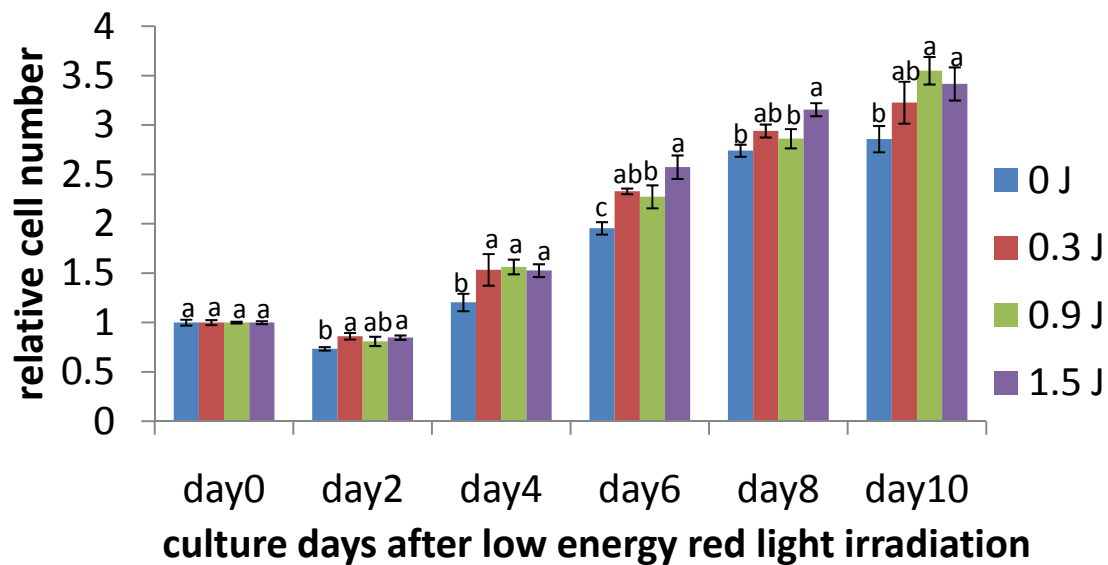


圖 4 利用噻唑藍比色法分析低能量紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞增殖之影響。

小鼠骨髓間葉幹細胞經能量密度 0 J/cm^2 (對照組) 與處理組分別為 0.3 , 0.9 , 及 1.5 J/cm^2 之紅光照射。經紅光照射後第 0 , 2 , 4 , 6 , 8 , 及 10 天進行噻唑藍比色法並測量 570 nm 、及 690 nm 之讀值計算細胞增殖倍率 (數據以六重複之實驗數值平均值 \pm 標準誤差方式表示)。

Fig. 4. The effect of low energy red light irradiation on proliferation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells was measured by MTT assay.

Mouse bone marrow MSCs were irradiated at the energy density of 0 (control), 0.3 , 0.9 , and 1.5 J/cm^2 . After irradiation, MTT assay was performed and optical densities at 570 nm and 690 nm were compared at the experimental day 0 , 2 , 4 , 6 , 8 , and 10 . (error bar=standard error, $n=6$, a b c represent Duncan grouping).

本試驗使用之光源波長範圍為 $600 \sim 700 \text{ nm}$ ，包含了細胞色素C氧化酶中還原態銅中心A (reduced Cu_A) (620 nm)、氧化態銅中心B (oxidized Cu_B) (680 nm) 之吸收光譜。根據實驗結果可知，經能量密度 0.3 J/cm^2 至 1.5 J/cm^2 之紅光照射後，皆可顯著提升小鼠骨髓間葉幹細胞之增殖能力，與理論相符。根據前人研究顯示：經波長 635 nm 與能量密度介於 $0.5 \sim 5 \text{ J/cm}^2$ 可有效提升大鼠骨髓間葉幹細胞增殖能力 (Hou *et al.*, 2008)；波長 670 nm 及能量密度 $2 \sim 8 \text{ J/cm}^2$ 者可有效提升人類臍靜脈內皮

細胞增生(Schindl *et al.*, 2003)。皆與本試驗結果相似，證明本試驗所用之光照條件，可刺激細胞內光受器達到刺激增生之效果。

3.1.3.2 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞分化能力之影響

經低能量紅光照射並以硬骨誘導分化液培養三天後，以茜素紅染色以觀察其鈣離子堆積情形。結果顯示，經能量密度 0 及 0.3 J/cm² 之組別者，其鈣離子分布情形較廣，而經 0.9 及 1.5 J/cm² 之組別，其鈣離子分布較集中，且可看到較成熟之硬骨分化形態 (圖 5)。然而，經分光光度計定量其染劑濃度 (圖 6)，結果顯示四處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)。為分析經 0.9 J/cm² 紅光照射之處理組，其硬骨分化情形是否較為成熟，以及時定量 PCR 分析硬骨分化相關基因 mRNA 之表現量。其中硬骨分化早期表現的 Runx2，在能量密度 0.9J/cm² 之處理組表現量為控制組之 1.15 倍；骨分化中期表現之造骨蛋白 (osteopontin)，在能量密度 0.9J/cm² 之處理組表現量為控制組之 1.4 倍；骨分化晚期表現之骨鈣素 (osteocalcin)，在能量密度 0.9J/cm² 之處理組表現量為控制組之 1.08 倍，但在統計上皆無顯著差異 (圖 7) ($p > 0.05$)。

經脂肪分化液誘導分化九天後，其細胞型態及油紅染色結果如圖 8，其油紅染色定量 (圖 9) 結果顯示：能量密度 0.9J/cm² 之處理組其油低堆積情形顯著高於 1.5J/cm² 之處理組 ($p < 0.05$)，其餘處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)。



圖 5 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞硬骨分化能力之影響 (第三天)。

經不同能量密度 (A) 0, (B) 0.3, (C) 0.9, 及 (D) 1.5 J/cm² 之低能量紅光照射，並以硬骨分化液誘導分化三天後之顯微照相圖。圖 (E) ~ (H) 依序為經 能量密度 0, 0.3, 0.9, 及 1.5 J/cm² 之低能量紅光照射，並以硬骨分化液誘導分化三天後經茜素紅染色後之顯微照相圖 (比例尺=200 μm)。

Fig. 5. The effect of low energy red light irradiation on osteogenic differentiation ability of mouse bone marrow mesenchymal stem cells.

The mouse bone marrow mesenchymal stem cells were irradiated at different energy density (A) 0, (B) 0.3, (C) 0.9, and (D) 1.5 J/cm², incubated in osteogenesis induction medium for 3 days. (E) ~ (H) were the Alizarin red staining results. (scale bar= 200μm)

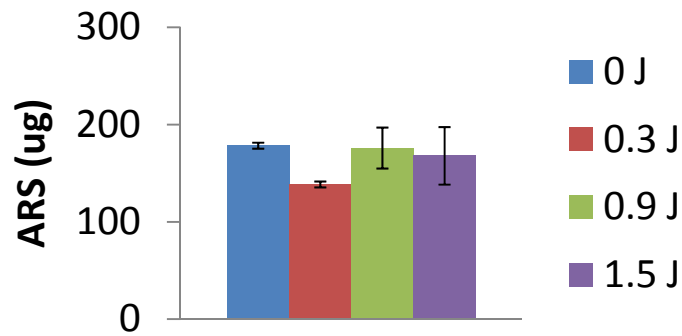


圖 6 硬骨分化三天後茜素紅染色定量結果。

經統計後各處理組間無顯著差異，數據以三重複之實驗數值平均值±標準誤差方式表示。

Fig. 6. The quantitative result of Alizarin staining.

There were not significant different between four treatment groups. (n=3, error bar =standard error).



圖 7 硬骨分化三天後之基因表現。

比較經能量密度 0.9 J/cm^2 及未照射之控制組，於硬骨誘導分化液培養三天後，其 (A) 硬骨分化早期表現基因 Runx 2，(B) 硬骨分化中期表現基因 Spp1 (osteopontin)，與(C) 硬骨分化晚期表現基因 Bglap 1 (osteocalcin) 之表現量。(數據以三重複之實驗數值平均值±標準誤差方式表示)

Fig. 7. The gene expression level of mouse bone marrow MSCs after low energy red light irradiation and osteogenic induction.

(A) Runx2 is the gene express in early stage of osteogenesis, (B) Spp1 is the marker of middle stage osteogenesis, (C) Bglap1 express in late osteogenesis (error bar= standard error, n=3)



圖 8 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞脂肪分化能力之影響。

經不同能量密度 (A) 0, (B) 0.3, (C) 0.9, 及 (D) 1.5 J/cm² 之低能量紅光照射，並以脂肪分化液誘導分化九天後之顯微照相圖。圖 (E) ~ (H) 依序為經 能量密度 0, 0.3, 0.9, 及 1.5 J/cm² 之低能量紅光照射，並以脂肪分化液誘導分化九天後經油紅染色後之顯微照相圖 (比例尺=200 μm)。

Fig. 8. The effect of low energy red light irradiation on the osteogenic differentiation of mouse bone marrow stem cells.

9 days after irradiation at energy density (A) 0, (B) 0.3, (C) 0.9, and (D) 1.5 J/cm² incubated with adipogenic induction medium. (E) ~ (H) were the oil red O staining results. (scale bar=200 μm).

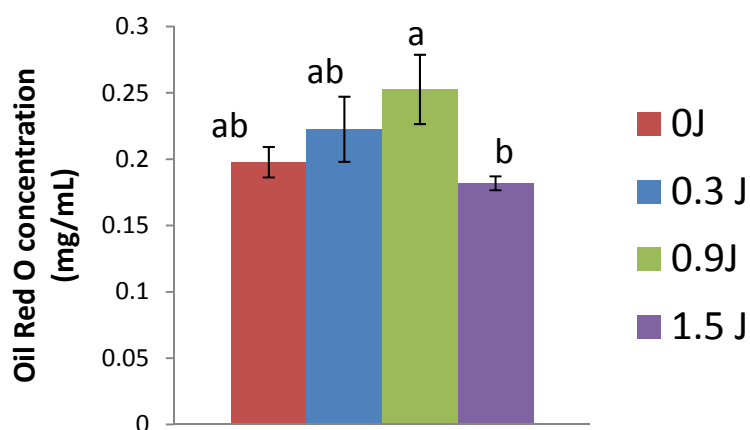


圖 9 脂肪分化九天後油紅染色定量結果。

照射 0.3 J/cm^2 紅光之處理組其油紅染劑濃度顯著高於照射 1.5 J/cm^2 紅光之處理組，a, b 為鄧氏分組。其餘處理組間無顯著差異。

Fig. 9. The quantitative result of Oil Red O Staining after 9 days induction.

a and b mean Duncan grouping. The 0.3 J/cm^2 irradiated group had significantly higher Oil Red O concentration than 1.5 J/cm^2 irradiated group. And there were no significant different between other treatment groups.

本試驗結果顯示，經能量密度 0.9 J/cm^2 紅光照射之處理組，其硬骨分化情形較為成熟，硬骨分化中期表現之基因 *Spp1* 為控制組之 1.4 倍。先前研究顯示，利用波長 635 nm 功率密度 180 mW/cm^2 之氦氖雷射，照射人類成骨細胞細胞系 (human osteoblast cell line)，分別照射 0, 1, 3, 及 10 秒，其中照射一秒及三秒之組別可有效提升成骨細胞 ALP，但照射十秒之處理組無法顯著提升其 ALP 表現量。照射三秒之處理組其骨蛋白 (osteopontin) 及骨涎蛋白 (bone sialoprotein) 之表現量顯著高於未照射之控制組 (Stein *et al.*, 2005)。Kim 等人在小鼠骨髓間葉幹細胞硬骨分化第三天時，以波長 647 nm 的 LED 光源照射 10, 30, 90 秒 (總能量分別為 $0.093, 0.279$ 及 0.836 J/cm^2)，照射 30 秒，可有效提升其硬骨分化之能力。皆與本試驗研究結果相似。

利用低能量紅光刺激間葉幹細胞之脂肪分化，目前仍未見相關研究。而本試驗研究結果顯示，經 0.3 及 0.9 J/cm^2 紅光照射之處理組其油滴堆積情形較控制組佳，但經能量密度 1.5 J/cm^2 之油滴堆積情形卻顯著低於 0.9 J/cm^2 之處理組。綜合上述結果，無論脂肪及硬骨分化，皆有最適之能量密度範圍。過低或過高之能量密度，

便無法刺激小鼠骨髓間葉幹細胞分化。而在 Stein 等人於 2005 年之研究結果所使用之有效能量密度為 0.18 與 0.54 J/cm²，殊與本試驗之能量密度者相近，惟其波長集中於 635 nm，且功率密度為本試驗者之三十六倍。不同的功率密度及照射時間是否會影響光照效果？以及過高的能量密度無法達到刺激效果？分別均係未來值得進一步試驗研究詳加證明之。

3.1.3.3 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞遷移能力之影響

經能量密度 0, 0.3, 0.9, 及 1.5 J/cm² 之低能量紅光照射十二小時後，其細胞遷移區域依序為 28.2 ± 5.9, 37.6 ± 5.3, 44 ± 3.2, 41.4 ± 3.0 %, (圖 10 E, F, G, H)；十八小時後，細胞遷移區域依序為 56.6 ± 0.9, 53.7 ± 4.1, 61.7 ± 5.1, 54.8 ± 3.0 %, (圖 10 I, J, K, L)；二十四小時後，細胞遷移區域依序為 56.3 ± 1.5, 66.6 ± 10.6, 76.7 ± 3.9, 65.6 ± 0.5% (圖 10 M, N, O, P)，但各處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$) (圖 11)。



圖 10 不同能量低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞遷移之影響。

經能量密度 0, 0.3, 0.9, 及 1.5 J/cm² 之低能量紅光照射後 0 小時 (A ~ D), 12 小時 (E ~ H), 18 小時(I ~ L), 及 24 小時(M ~ P)之顯微照相圖。(比例尺=200 μm)。

Fig. 10. The effect of low energy red light irradiation on mouse bone marrow mesenchymal stem cells migration.

(A)~(D) 0 hour, (E)~(H)12 hours, (I)~(L)18 hours, and (M)~(P) 24 hours after red light irradiation at energy density 0, 0.3, 0.9, and 1.5 J/cm², respectively. (scale bar=200μm)

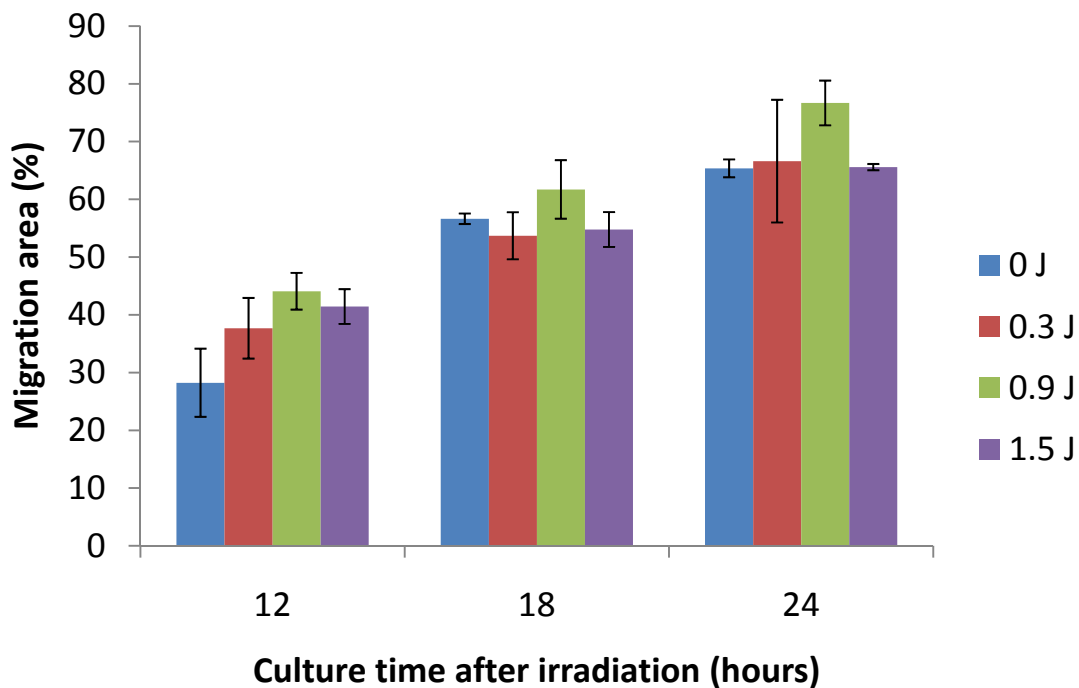


圖 11 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞遷移能力定量結果。

能量密度 0, 0.3, 0.9, 及 1.5 J/cm² 之低能量紅光照射十二小時後，其細胞遷移區域依序為 28.2 ± 5.9, 37.6 ± 5.3, 44 ± 3.2, 41.4 ± 3.0 %；十八小時後，細胞遷移區域依序為 56.6 ± 0.9, 53.7 ± 4.1, 61.7 ± 5.1, 54.8 ± 3.0 %；二十四小時後，細胞遷移區域依序為 56.3 ± 1.5, 66.6 ± 10.6, 76.7 ± 3.9, 65.6 ± 0.5%，但各處理組間無顯著差異 (p > 0.05)。

Fig. 11. The quantitative results of mouse bone marrow mesenchymal stem cells migration.

12 hours after irradiation the cell migration percentage were 28.2±5.9, 37.6±5.3, 44±3.2, 41.4±3.0%; 18 hours after irradiation the cell migration percentage were 56.6±0.9, 53.7±4.1, 61.7 ± 5.1, 54.8±3.0% ; 24 hours after irradiation, the migration percentages were 56.3±1.5, 66.6±10.6, 76.7±3.9, 65.6±0.5%.

本試驗結果顯示，經能量密度 0.9 J/cm² 紅光照射之處理組，其遷移區域於照射後 12, 18, 及 24 小時皆高於控制組者，代表能量密度 0.9 J/cm² 紅光照射有增加小鼠骨髓間葉幹細胞遷移能力之趨勢。本試驗結果和先前研究結果具相同趨勢，以波長 659.6 nm 之紅光二極體雷射照射幹細胞十五分鐘後，其遷移能力較控制組上升 20%，若同時添加基質細胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α)

可提升此效果，若將光源改為波長 958 nm 之紅外光，其細胞遷移能力更佳 (Gasparyan, 2004)。在 Gasparyan 等人 2004 年之研究中未說明其光源之功率密度及能量密度，而以本試驗之光照參數，僅需三分鐘之光照便可提升細胞遷移，為較佳之光照條件。未來可進一步研究不同波長光照影響細胞遷移之機制，以找出最適之波長。

在 Gasparyan 等人研究結果顯示添加 SDF-1 α 可提升光照之刺激效果，由此可推論低能量紅光照射可能促進幹細胞之 SDF-1 α 受體「趨化素受體」(C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4) 表現，未來可研究低能量紅光對於小鼠骨髓間葉幹細胞 CXCR4 表現量之影響，以釐清紅光刺激細胞遷移之機制。



3.2 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞老化之影響

3.2.1 前言

細胞衰老 (cell senescence) 指細胞停止分裂的現象，通常衰老的細胞型態較大且扁平，細胞週期維持在 G1 期但仍維持代謝活性。間葉幹細胞和其他體細胞一樣具有有限的壽命，當細胞分裂達一定次數後便會產生老化 (Wagner *et al.*, 2008)。造成細胞衰老的原因包含：端粒長度、DNA 受損、染色質擾動 (chromatin perturbation)、致癌基因 (oncogene)、強烈的有絲分裂訊號 (mitogenic signal) 或壓力 (Campisi and di Fagagna, 2007)。

低能量紅光由粒線體中之細胞色素 C 氧化酶接收，改變粒線體代謝，以刺激細胞增殖。先前研究顯示，利用 $3.6\text{J}/\text{cm}^2$ 之低能量光照可增加細胞內 ROS 含量，並短暫提升細胞內鈣離子濃度；但若將能量提升至 $12\text{J}/\text{cm}^2$ 則會造成鈣離子濃度大幅上升並造成細胞損傷 (Lavi *et al.*, 2003)。

當粒線體代謝不正常，細胞色素 C 氧化酶 (cytochrome C oxidase) 和菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷脫氫酶 (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase, NADH dehydrogenase) 活性上升，及粒線體膜電位下降之際，細胞內會產生大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 對細胞產生氧化壓力，造成細胞老化 (Passos *et al.*, 2007)。根據試驗一結果，能量密度 $0.9\text{J}/\text{cm}^2$ 波長 650 nm 之紅光照射後可顯著提升細胞增殖能力，且有促進硬骨脂肪分化及細胞遷移能力之趨勢。本試驗利用測量端粒長度、端粒酶活性及細胞週期抑制因子 mRNA 表現，探討在此光照條件下，是否會影響小鼠骨髓間葉幹細胞之老化情形。

3.2.2 材料與方法

3.2.2.1 試驗設計

小鼠骨髓間葉幹細胞以 5×10^4 cells/cm² 之密度培養於 3.5 cm 或 6 cm 培養皿，培養一天使細胞貼附於培養皿，將培養液移除，加入含有 2% FBS 之 PBS，以能量密度 0.9 J/cm² 之紅光照射細胞，移除 PBS 後加入培養液，培養一天後抽取基因體 DNA (genomic DNA) 及 mRNA 進行分析。

3.2.2.2 基因體 DNA 抽取

依照 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, 69504) 套組之說明方式抽取基因體 DNA。準備 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 個細胞，以 PBS 將細胞洗淨，以 1,200 rpm 離心五分鐘後吸去 PBS，儲存於 -80 °C 冰箱。要抽取 DNA 時將細胞團塊解凍，加入 200 μL 之 PBS 將細胞懸浮，再加入 40 μL 之 proteinase K (1.2AU) 及 200 μL AL buffer 充分混勻後，於 56 °C 反應十分鐘使細胞破裂。反應結束後加 200 μL 100% 酒精，混勻後將液體移至管柱內，以 6,000 ×g 離心一分鐘。離心後將管柱移至乾淨離心管，在管柱內加入 500 μL 的 AW1 buffer，6,000 ×g 離心一分鐘。將管柱移至乾淨離心管，在管柱內加入 500 μL AW2 buffer，20,000 ×g 離心三分鐘。離心後將管柱換至乾淨離心管，再以 20,000 ×g 離心一分鐘使緩衝液完全移除。最後將管柱套上 1.5 mL 微量離心管，在管柱內加入 100 μL AE buffer 室溫靜置一分鐘後，以 6,000 ×g 離心一分鐘，離心後所得液體即為基因體 DNA。以超微量分光光度計測其 DNA 濃度及 OD_{260/280} 吸光值，其讀值介於 1.7 至 1.9，且在吸光值 260 nm 處有明顯波峰。所得之 DNA 溶液可保存於 -20 °C 冰箱。

3.2.2.3 端粒長度分析

將抽出之基因體 DNA，以即時定量 PCR 方式測量其平均端粒長度 (Callicott and Womack, 2006)。以單份基因 (single-copy gene) 酸性核糖體磷蛋白 P0 (acidic ribosomal phosphoprotein P0) (36B4) 作為基準，計算平均每條染色體之端粒長度比例。引子序列如表 3 所示，即時定量 PCR 方法如試驗一所述。

3.2.2.4 端粒酶活性分析

本試驗使用TRAPEZE® XL TelomeraseDetection Kit (Millipore, s7707) 分析小鼠骨髓間葉幹細胞經紅光照射後細胞內之端粒酶活性。為避免端粒酶之RNA模板受核糖核酸酶 (RNase) 降解，分析過程須注意防止RNase污染。

取 1×10^5 至 1×10^6 個細胞以PBS清洗後，以1,200 rpm離心五分鐘後吸去PBS，儲存於-80 °C冰箱。要分析端粒酶時將細胞團塊解凍，加入200 μ L之CHAPS Lysis Buffer將細胞懸浮，冰上反應三十分鐘，以12,000 $\times g$ 4°C離心二十分鐘，離心後取上清液並測其蛋白質濃度。將各樣本以CHAPS Lysis Buffer稀釋至蛋白質濃度為0.1 mg/mL。

將TSR8 control template (2 amole/ μ L) 以一比五之比例序列稀釋後放置於4°C冰箱備用。根據表 4配製PCR反應溶液，於30°C反應三十分鐘，之後以94°C三十秒、59°C三十秒、72°C一分鐘依序進行三十六個循環，最後以72°C三分鐘、55°C二十五分鐘進行最終反應，所得產物置於4°C待分析。

取用50 μ L PCR產物加入150 μ L含10 mM Tris-HCL, 0.15 M NaCl, 及2 mM MgCl₂稀釋液稀釋後置於九十六孔黑色反應盤，以多功能微盤讀儀 (FlexStation 3 microplate reader) 測量其螢光 (fluorescein) (激發波長：485 nm、偵測波長：535 nm) 及酸性桃紅 (sulforhodamine) (激發波長：585 nm、偵測波長：620 nm) 讀值，並以下列公式計算：

$$\log \frac{dF}{dR} = \log \frac{\text{sample}_{\text{fluorescein}} - \text{MTC}_{\text{fluorescein}}}{\text{sample}_{\text{sulforhodamine}} - \text{MPC}_{\text{sulforhodamine}}}$$

(MTC= Minus Telomerase Control, MPC=Minus Taq Polymerase Control)

計算後所得 $\log \frac{dF}{dR}$ 值對照TSR8之對數標準曲線，即可得待測細胞之端粒酶活性 (amole/ μ L)。

表 4 TRAPEZE® XL Telomerase Detection Kit 試驗設計

Table 4. The experiment design of TRAPEZE® XL Telomerase Detection Kit

Minus taq polymerase control	5X TRAPEZE ®XL Reaction Mix*	10.0µL
	CHAPS Lysis Buffer	2.4µL
	dH ₂ O	37.6µL
Minus telomerase control	5X TRAPEZE ®XL Reaction Mix*	10.0µL
	Taq Polymerase (5 units/µL)	0.4µL (2 Units)
	dH ₂ O	37.6µL
	CHAPS Lysis Buffer	2.0µL
TSR8 standard	5X TRAPEZE ®XL Reaction Mix*	10.0µL
	Taq Polymerase (5 units/µL)	0.4µL (2 Units)
	dH ₂ O	37.6µL
	TSR8 standard	2.0µL
sample	5X TRAPEZE ®XL Reaction Mix*	10.0µL
	Taq Polymerase (5 units/µL)	0.4µL (2 Units)
	dH ₂ O	37.6µL
	Cell extract	2.0µL

3.2.2.5 蛋白質濃度測定

以牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (BioLab, B9001s) 配製標準液。將 Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-rad, 500-0006) 五倍稀釋後以濾紙 (whatman #4 filter) 過濾，取 300 µL 之 protein assay dye 加入 15 µL 之標準液或待測樣本，充分混勻後取 200 µL 至九十六孔盤，以分光光度計測量 595 nm 之讀值，對照 BSA 的定量標準曲線計算樣本濃度。

3.2.2.6 細胞週期抑制因子基因表現分析

小鼠骨髓間葉幹細胞之總 RNA 萃取、DNase 處理、反轉錄反應及即時定量 PCR 方法如試驗一所述，GAPDH, p16, 及 p21 引子序列如表 3 之所示。

3.2.2.7 統計分析

本試驗之數據使用 Sigma Plot 10.0 軟體中之 Student's t test 將實驗組對比於控制組加以比較，並以平均值±標準誤差 (mean ± standard error) 的方式表示， $p < 0.05$ 時則定義為兩者兼具顯著差異。

3.2.3 結果討論

3.2.3.1 低能量紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞端粒長度及端粒酶活性之影響

經能量密度 0.9 J/cm^2 之紅光照射後一天，其細胞端粒長度為未照射控制組之 1.02 倍 (圖 12)，兩者間無顯著差異 ($p > 0.05$)。端粒酶活性為控制組之 1.27 倍 (圖 13)，兩者間無顯著差異 ($p > 0.05$)。

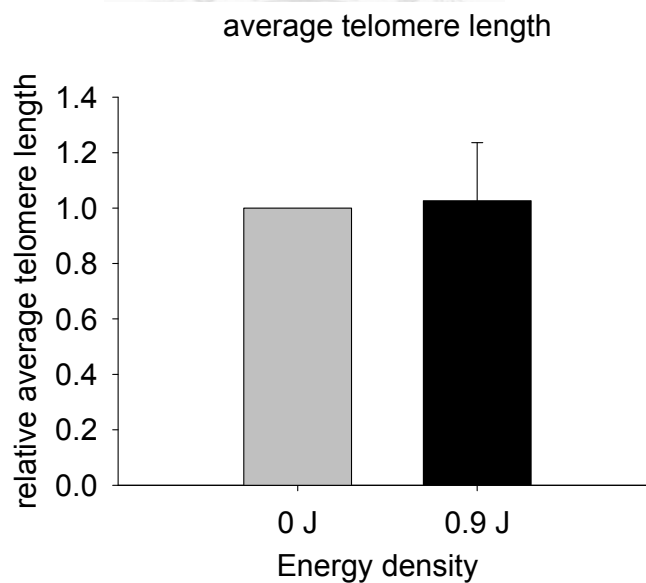


圖 12 低能量紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞端粒長度之影響。

經 0.9 J/cm^2 紅光照射後一天，小鼠骨髓間葉幹細胞端粒長度為未照射之小鼠骨髓間葉幹細胞之 1.02 倍。

Fig. 12. The effect of low energy red light irradiation on average telomere length. One day after irradiated at energy density 0.9 J/cm^2 . The telomere length of mouse bone marrow mesenchymal stem cells were 1.02 fold of control group.

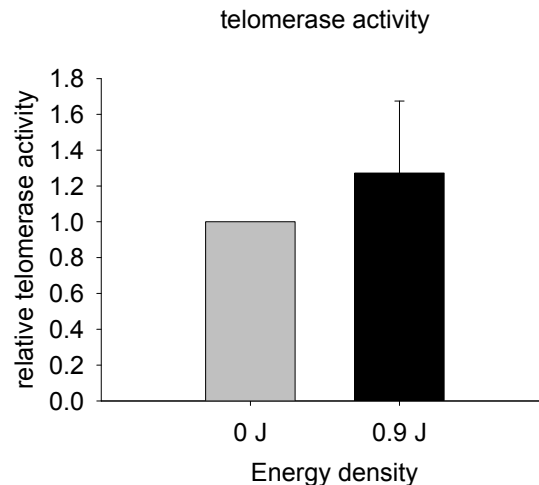


圖 13 低能量紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞端粒酶活性之影響。

經 0.9 J/cm² 紅光照射後一天，小鼠骨髓間葉幹細胞端粒酶活性為控制組之 1.27 倍。

Fig. 13. The effect of low energy red light irradiation on telomerase activity.

One day after irradiated at energy density 0.9 J/cm². The telomerase activity of mouse bone marrow mesenchymal stem cells is 1.27 fold of control group.

本試驗結果顯示，經能量密度 0.9 J/cm² 紅光照射後一天，其端粒長度和控制組幾乎相同，但其端粒酶活性上升 27%。先前研究顯示，於人類間葉幹細胞細胞壽命晚期，其端粒長度會顯著低於早期之間葉幹細胞 (Stenderup *et al.*, 2003)。而端粒酶可在染色體兩端加上重複的端粒 DNA 片段，避免端粒縮短 (Collins and Mitchell, 2002)。低能量紅光是否可藉由提升端粒酶活性，減緩端粒縮短之速度，延長細胞壽命，以及是否會因為端粒酶活性上升有致癌可能，仍需進行長期培養試驗證實。

3.2.3.2 低能量紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞中細胞週期抑制因子基因表現之影響

試驗結果顯示，經紅光照射後一天之小鼠骨髓間葉幹細胞，其細胞週期抑制因子 p16 及 p21 之 mRNA 表現量依序為控制組的 1.16 倍及 0.98 倍，經 student's t test 統計後並無顯著差異 ($p > 0.05$) (圖 14)。

圖 14 低能量紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞細胞週期抑制因子基因表現之影響。

細胞週期抑制因子 (A) p16、(B) p21 之 mRNA 相對表現量。

Fig. 14. The effect of low energy red light irradiation on the expression of gene relating to the cell cycle.

Expression level of the cell cycle inhibitor (A) p16, and (B) p21 mRNA.

由於低能量紅光照射光照可能透過光受體使氧原子產生不成對電子，形成活性氧 (reactive oxygen species, ROS)。ROS 因為含有不成對的電子，所以有高度活性，對於細胞內訊息傳遞扮演著重要的角色，但過量的 ROS 會造成氧化壓力而損害細胞。研究證實，利用 $3.6\text{J}/\text{cm}^2$ 之低能量光照可增加細胞內 ROS 含量，並短暫提升細胞內鈣離子濃度；但若將能量提升至 $12\text{J}/\text{cm}^2$ 則會造成鈣離子濃度大幅上升並造成細胞損傷 (Lavi *et al.*, 2003)。細胞內過高的氧化壓力會表現細胞週期抑制因子，如：p21 及 p16 (Campisi and di Fagagna, 2007)，抑制細胞週期，造成細胞衰老。為確認本試驗之光照條件不會加速細胞衰老，利用即時定量 PCR 測量細胞內 p16 及 p21 mRNA 表現量。研究結果顯示，以能量密度 $0.9\text{J}/\text{cm}^2$ 紅光照射後，其細胞週期抑制因子未顯著上升，證實本試驗之光照條件不會加速細胞之衰老。

3.3 低能量紅光照射小鼠骨髓間葉幹細胞於改善小鼠骨質疏鬆症可能性之探討

3.3.1 前言

世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 於 1994 公佈成年人骨質疏鬆症的定義為「一種因骨量減少或骨密度降低而使骨骼微細結構發生破壞的疾病，惡化的結果將導致骨骼脆弱，並使骨折的危險性明顯增高」。美國國家衛生院 (National Institute of Health, NIH) 的定義則強調骨質疏鬆症為「一種因骨骼強度減弱致使個人增加骨折危險性的疾病」。從 1999-2001 年的健保局資料顯示台灣地區 50 歲以上成人骨質疏鬆症診斷比率約為男性 1.63%，女性 11.35% (中華民國骨質疏鬆學會, 2007)。由此可知骨質疏鬆症為我國常見之疾病。骨質疏鬆症使骨折機率升高，美國醫學會指出老人股骨骨折後，大約有百分之五到百分之二十的患者在一年內死亡，百分之五十以上的人會造成行動不便，需要終身依賴別人照顧 (Prentice *et al.*, 2003)。

為避免上述問題，骨質疏鬆症必須及早治療。目前常使用 17 β -雌素二醇 (17 β -estradiol) 治療更年期婦女停經後導致的骨質疏鬆症，但近年研究指出這種荷爾蒙療法易提高心血管疾病之發生率 (Clarke *et al.*, 2002)。由於間葉幹細胞具有自我更新及硬骨分化潛能，目前已有研究結果顯示，同時移植骨髓細胞及卵巢至卵巢摘除導致骨質疏鬆症之小鼠，可有效改善其骨質疏鬆情形 (Feng *et al.*, 2007)。移植骨髓細胞至衰老引發骨質疏鬆症之小鼠，可使其骨組織恢復正常結構 (Takada *et al.*, 2006)。因此本試驗利用骨質疏鬆症之小鼠模式，研究低能量紅光照射是否可以提升間葉幹細胞治療骨質疏鬆症之療效。

3.3.2 材料與方法

3.3.2.1 攜帶綠色螢光蛋白質之轉基因小鼠來源

攜帶綠色螢光蛋白質之轉基因小鼠為本實驗室利用小鼠胚原核基因顯微注射法，產製全身表現綠色螢光蛋白質報導基因之轉基因小鼠。

3.3.2.2 試驗設計

本試驗分為三個處理組，每組各五隻。於骨質疏鬆症小鼠之脛骨，分別注射 PBS、綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞，及經 0.9 J/cm^2 之紅光照射之綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞，四週後以頸椎脫臼方式犧牲，取下其中一隻股骨測量其骨密度，取一隻脛骨將骨髓沖出觀察骨髓中是否有帶綠色螢光之細胞。另一隻股骨及脛骨進行切片，利用組織免疫化學染色觀察移入細胞之分布。

3.3.2.3 骨質疏鬆症小鼠模式之建立

本試驗以卵巢摘除方式模擬停經後婦女由於雌激素分泌降低及年齡增長而造成的骨質疏鬆症。十二至十四週齡之 ICR 母小鼠，以腹腔注射 2.5% avertin (2,2,2-tribromoethanol) (sigma, t48402) 將小鼠麻醉後，在背部肋骨下緣約 0.5~1 cm 處，將皮膚橫切約 1 cm，將切口往腹腔兩側移動，確認卵巢位置後，以眼科夾穿過肌肉撐開約 0.5 cm 之開口，以鈍鑷夾住脂肪墊將卵巢拉出後，以燒熱之手術刀將卵巢切除，將剩餘組織放回原位後縫合，七個月後測量骨密度。

3.3.2.4 骨密度檢測

將小鼠以頸椎脫臼方式犧牲後，取下股骨剝除皮膚及肌肉，浸泡於 70% 酒精，委託台灣小鼠診所 (Taiwan mouse clinic) 以 SkyScan1076 High resolution in-vivo micro-CT scanner 測量骨小樑及二維 X 光影像。骨小樑選取區域為距離生長板 0.4mm 開始，至遠離生長板 1.5mm 之區域。

3.3.2.5 細胞移植

將綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞 (圖 15) 以 5,000 cells/ μL 之濃度懸浮於 PBS，使用骨髓內注射 (intra-bone marrow injection) 方式 (圖 16) (Takada *et al.*, 2006)，將

骨質疏鬆症小鼠膝部毛剃除，酒精消毒後剪開約 0.5 cm 之開口，膝部彎曲約 90°，利用 26G 針頭穿過膝關節之髌骨肌腱 (patellar tendon) 在脛骨前端刺穿一個洞，再以 28 1/2 G 胰島素專用塑膠注射針 (insulin syringe) (BD, 329461) 插入脛骨骨髓腔，於每隻脛骨注射 10 μ L 之細胞液。

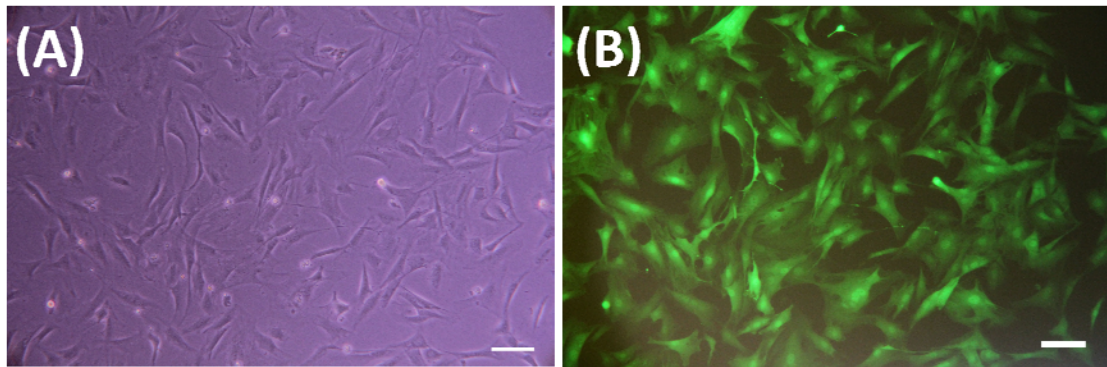


圖 15 綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞。

於 (A) 自然光 (B) 綠色螢光之顯微照相圖 (比例尺 = 100 μ m)。綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞與 ICR 小鼠骨髓間葉幹細胞一樣為紡錘狀，且所有細胞均表現綠色螢光蛋白質。

Fig. 15. Bone marrow derived-mesenchymal stem cells isolated from transgenic mouse harboring with enhanced green fluorescence protein (EGFP) gene.

The microscope image under (A) Bright field, and (B) fluorescent light emission and filter set, and all of the bone marrow-derived MSC expressed green fluorescence protein and exhibit spindle shape.



圖 16 骨髓腔內注射 (intra-bone marrow cavity injection) 示意圖。

將小鼠膝關節固定成九十度，以 26G 針頭穿過膝關節之髌骨肌腱，在脛骨前端刺穿一個洞，再以 28 1/2 G 胰島素專用塑膠注射針插入脛骨骨髓腔，將細胞液注入。

Fig. 16. The schematic diagram of intra-bone marrow cavity injection.

The knee was flexed to 90 degrees. A 26-gauge needle was inserted into the joint surface of the tibia through the patellar tendon and then penetrated into the bone marrow cavity, then assemble the insulin syringe (28 1/2 G) to inject the cell.

3.3.2.6 組織免疫化學染色

將小鼠頸椎脫臼犧牲後，取出股骨及脛骨，清除周圍的肌肉、肌腱、韌帶等軟組織，並浸泡於 4% paraformaldehyde 中 4°C 固定一日。再以 14% EDTA (pH 7.7) 於 37°C 放置三日脫鈣。爾後進行包埋，切片。

將切片置於二甲苯 (xylene) (Sigma 62190 USA) 中浸泡五分鐘脫臘 2 次，再依序浸泡於 100, 95, 90, 80, 70% 之酒精五分鐘進行復水。爾後置於 PBS 浸泡五分鐘。將切片置於 95 °C 之檸檬酸鈉緩衝液 (10 mM sodium citrate, 0.05 % Tween 20, pH6.0) 放置十五分鐘使抗原恢復 (antigen retrieval)，其後將裝有檸檬酸鈉緩衝液及切片之染色壺移至室溫冷卻二十分鐘，以 PBS 沖洗兩次每次兩分鐘。利用阻隔緩衝液 (blocking buffer) (5% BSA, 0.1 % Triton-X 之 PBS) 室溫阻隔 (blocking) 一小時，後以 PBS 浸泡五分鐘。

後加入稀釋倍數 1:200 之小鼠抗綠色螢光蛋白質之一級抗體 (Santa Cruz, SC-9996) 培養於 4°C 至隔夜 (overnight)，翌日使用 PBST 搖晃清洗 3 次，每次 5 min，清洗完後加入稀釋倍數 1:200 之驢子抗小鼠-488 綠色螢光蛋白質二級抗體 (Jackson, 80642) 室溫培養一小時，以 PBST 搖晃清洗三次，每次五分鐘。再加入溶於 70% 酒精之 0.1% 蘇丹黑染劑 (Sudan black)，室溫反應三十分鐘，以阻隔背景

螢光，以 PBST 搖晃清洗五分鐘，最後以含有 DAPI 的 mounting medium 封片，以螢光顯微鏡觀察記錄之。

3.3.2.7 統計分析

本試驗之數據使用 Sigma Plot 10.0 軟體中之 Student's t test 將實驗組對比於控制組加以比較，或 SAS 軟體中之鄧氏新多變域測驗法 (Duncan's New Multiple Range Test) 將處理均值並兩兩比較，且以平均值±標準誤差 (Mean ± Standard error) 的方式表示， $p < 0.05$ 時則定義為兩者兼具顯著差異。



3.3.3 結果討論

3.3.3.1 卵巢摘除對小鼠骨密度及骨髓間葉幹細胞數目與硬骨分化能力之影響

根據小鼠股骨二維 X 光影像可得知，經卵巢摘除七個月後，小鼠的骨小樑分布較年輕小鼠稀疏 (圖 17)。骨小樑定量結果顯示，卵巢摘除小鼠之骨體積、骨小樑數目顯著低於年輕小鼠 ($p < 0.05$)，而骨小樑分離程度顯著升高 ($p < 0.05$)，但其骨小樑厚度並無顯著差異 (圖 18)。

比較骨質疏鬆症小鼠與正常年輕小鼠之骨髓間葉幹細胞硬骨分化及聚落形成能力。經硬骨分化液誘導分化十三天後，以茜紅素染色觀察其鈣粒子堆積情形，可觀察到骨質疏鬆症小鼠之鈣離子堆積分布較廣且較緊密，呈現較成熟的骨分化形態 (圖 19)。茜紅素染色定量結果顯示，骨質疏鬆症小鼠骨髓間葉幹細胞之鈣離子堆積顯著高於正常年輕小鼠 (圖 20)。而其聚落形成能力如圖 21 所示，正常年輕小鼠骨髓細胞之聚落形成能力約為 302.5 ± 23.3 CFU，顯著高於 ($p < 0.05$) 骨質疏鬆症小鼠 (204 ± 14.9 CFU) (圖 21)。

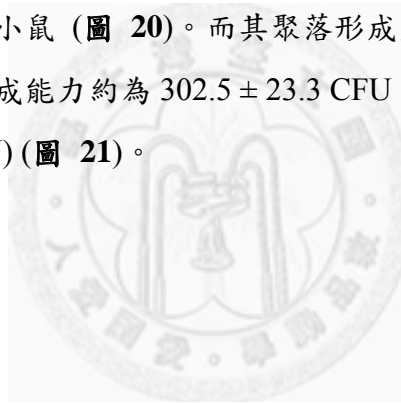


圖 17 骨質疏鬆症小鼠之股骨二維 X 光影像。

(A)為十二週齡小鼠 (左圖) 及骨質疏鬆症小鼠 (右圖) 之股骨二維 X 光影像。(B)為十二週齡小鼠 (左圖) 及骨質疏鬆症小鼠 (右圖) 之股骨骨小樑之 3D 模擬圖，圖中左方為側視圖，右方為俯視圖。

Fig. 17. The 2D X-ray image of femurs isolated from normal and osteoporosis mouse.(A) The femoral 2D X-ray image of 12 weeks old female mouse (left) and osteoporosis model mouse (right). (B) The 3D composite image of 12 weeks old female mouse (left) and osteoporosis model mouse (right).



圖 18 骨小樑定量分析結果

(A)骨體積，(B) 骨小樑厚度，(C) 骨小樑分離程度，及(D) 骨小樑數目等之定量結果，骨小樑選取區域為距離生長板 0.4mm 開始，至遠離生長板 1.5mm 之區域。
(*p < 0.05, t-test)

Fig. 18. Quantitative assay of the mouse trabecular bone in femur.

(A) Percentage of bone volume, (B) trabecular thickness, (C) trabecular separation, and (D) trabecular number. The trabecular bone was counted at 0.4 mm to 1.5 mm apart from growth plate. (*p < 0.05, t-test)

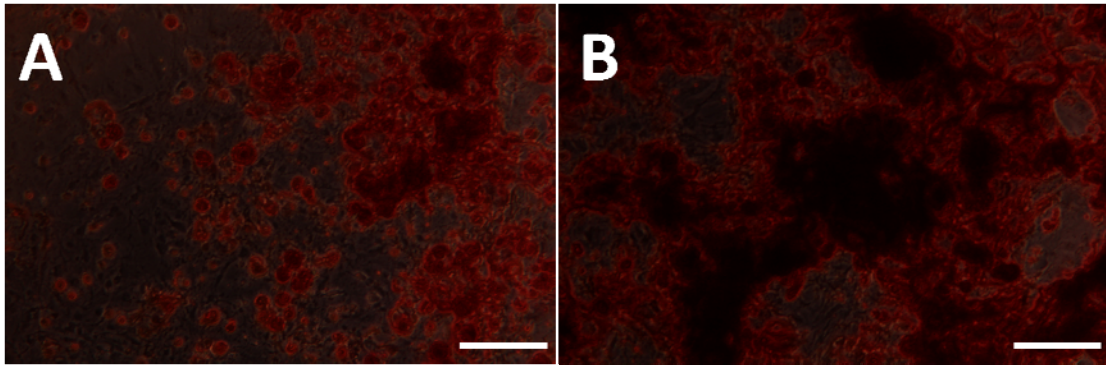


圖 19 骨質疏鬆症小鼠骨髓間葉幹細胞之硬骨分化能力。

經硬骨誘導分化液培養十三天後，(A) 十二週齡小鼠及(B) 骨質疏鬆症小鼠 骨髓間葉幹細胞之茜紅素染色顯微照相圖。(比例尺=200 μm)

Fig. 19. The osteogenic ability of mesenchymal stem cells derived from osteoporosis model mouse.

After incubated with osteogenic induction medium for 13 days, results of the Alizarin Red Staining: bone marrow mesenchymal stem cells derived from (A) 12 weeks old ICR mouse, and (B) osteoporosis mouse.

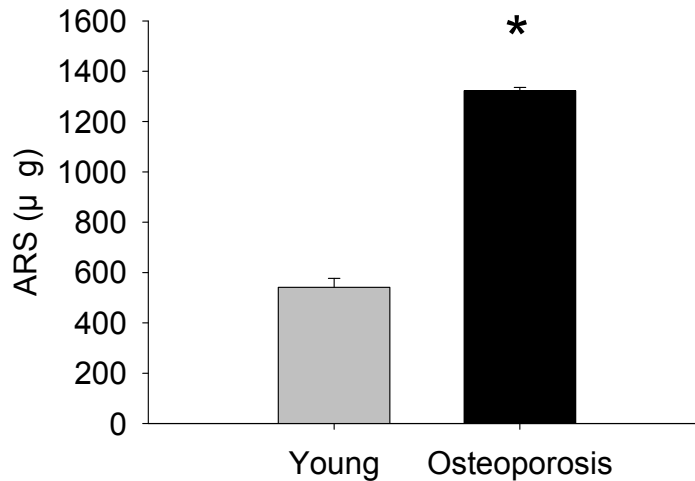


圖 20 骨質疏鬆症小鼠與年輕小鼠骨髓間葉幹細胞之硬骨分化定量結果。

經硬骨分化液誘導分化十三天後茜素紅染色定量結果。(*代表 $p < 0.05$)

Fig. 20. Quantified results of osteogenesis ability of marrow-derived MSC isolated from osteoporosis mice and young mice after 13 days osteogenic induction and Alizarin Red Staining.

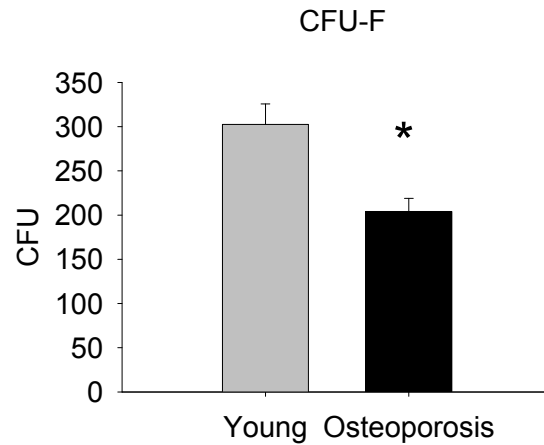


圖 21 年輕小鼠與骨質疏鬆症小鼠骨髓細胞之纖維母細胞聚落形成單位 (CFU-F) 數目比較。

正常年輕小鼠骨髓細胞之聚落形成能力約為 302.5 ± 23.3 CFU，骨質疏鬆症小鼠骨髓細胞之聚落形成能力為 204 ± 14.9 CFU。(* $p < 0.05$)

Fig. 21. Bone marrow colony forming unit-fibroblast (CFU-F) number of osteoporosis mice compared with young mice.

There were 302.5 ± 23.3 CFU in ICR mice and 204 ± 14.9 CFU in osteoporosis model mice. ($p < 0.05$)

本試驗結果顯示，卵巢摘除可有效降低小鼠骨密度，和先前研究相同 (Feng *et al.*, 2007)。根據實驗結果推論造成骨密度下降的原因是骨小樑數目下降，而不是骨小樑厚度改變。卵巢摘除後七個月小鼠骨髓間葉幹細胞之硬骨分化能力顯著提升，和 Manolagas 等人於 1995 年之研究結果相似 (Manolagas *et al.*, 1995)。先前研究指出，當性腺失去功能時，性荷爾蒙分泌量下降，其對 IL-6 分泌抑制消失，IL-6 分泌上升使蝕骨細胞分化增加，骨再吸收作用上升 (Manolagas *et al.*, 2002)。在正常骨再造過程中，當蝕骨細胞進行骨再吸收時，會釋出 TGF- β 等有助於間葉幹細胞分化成成骨細胞的細胞激素 (Oreffo *et al.*, 1989)。由此可知，卵巢摘除後由於性荷爾蒙下降，使蝕骨細胞分化增加，而蝕骨細胞分化增加使骨再吸收作用上升，所釋出的 TGF- β 增加，使間葉幹細胞之硬骨分化能力上升。

而在聚落形成能力方面，本試驗結果顯示卵巢摘除小鼠其 CFU 數目顯著低於年輕小鼠 ($p < 0.05$)，與 Li 等人 2006 年之結果相同。然而，在此研究中 Li 等人也提出以卵巢摘除引發骨質疏鬆症之大鼠，其骨髓間葉幹細胞經體外誘導分化後鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 表現量及鈣堆積也較正常大鼠低 (Li *et al.*,

2006)，和本實驗結果及 1989 年 Oreffo 等人提出理論不同。因此，卵巢摘除後是否有其他因素影響間葉幹細胞之硬骨分化能力，仍需進一步試驗結果釐清之。

3.3.3.2 移植經紅光照射之小鼠骨髓間葉幹細胞對骨質疏鬆症小鼠之影響

骨質疏鬆症小鼠經骨髓內注射攜帶綠色螢光蛋白質之轉基因小鼠骨髓間葉幹細胞四週後，其脛骨骨髓細胞中可發現帶有綠色螢光蛋白質之細胞團 (圖 22)，證明注入之細胞可在骨髓內存活至少四週。而由股骨二維 X 光影像顯示出注射間葉幹細胞之骨質疏鬆症小鼠較注射經紅光照射間葉幹細胞及注射 PBS 之處理組有較多的骨小樑 (圖 23)。

而其骨小樑定量結果如圖 24，注射表現綠色螢光蛋白質間葉幹細胞之處理組，其骨體積及骨小樑數目皆顯著高於注射經 0.9 J/cm^2 紅光照射之綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞之處理組。而注射 PBS 之控制組，其骨小樑厚度顯著高於注射經紅光照射間葉幹細胞之處理組。而骨小樑分離程度於三處理組間無顯著差異。

免疫組織化學染色結果指出，注入之綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞，四週後仍存在於脛骨中 (圖 25)，而經紅光照射後不會影響其在骨髓腔內之存活狀況，且分布於骨小樑、緻密骨周圍或骨髓腔中 (圖 26)。且不論有無經紅光照射之處理組，皆可在股骨切片中觀察到帶有綠色螢光之細胞 (圖 27 及圖 28)。表示注入之骨髓間葉幹細胞，無論有無經紅光照射，皆可由脛骨遷移至股骨。

圖 22 骨質疏鬆症小鼠骨髓內注射綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞四週後之脛骨骨髓細胞顯微照相圖。

骨質疏鬆症小鼠經骨髓內注射表現綠色螢光蛋白質轉基因小鼠骨髓間葉幹細胞，飼養四週後，其脛骨骨髓細胞於 (A) 白光下與(B) 螢光下之顯微照相圖。及注射經 0.9 J/cm^2 紅光照射之表現綠色螢光蛋白質轉基因螢光小鼠之骨質疏鬆症小鼠脛骨骨髓細胞於 (C) 白光與(D) 螢光下之顯微照相圖。黃色方框為帶有綠色螢光之細胞團塊。(比例尺=200 μm)

Fig. 22. The cells isolated from tibia bone marrow of osteoporosis mice after cell transplantation for 4 wks.

Bone marrow cells were flushed from the tibia and observed under (A) bright field, and (B) fluorescent light. And the bone marrow cells of irradiated MSCs injected group were observed under (C) bright field, and (D) fluorescent light. (scale bar = 200 μm)

圖 23 細胞移植四週後之二維 X 光影像及骨小樑三維合成圖。

以骨髓內注射 (A) PBS, (B) 攜帶綠色螢光蛋白質轉基因小鼠之骨髓間葉幹細胞, 與(C) 經 0.9 J/cm^2 之紅光照射之攜帶綠色螢光蛋白質轉基因小鼠之骨髓間葉幹細胞四週後之股骨二維 X 光影像 (上) 及其骨小樑三維合成圖 (下)(下圖左為側視圖, 右方為俯視圖)。

Fig. 23. The 2D X-ray image and trabecular bone composite image after cell transplantation for 4 wks.

The 2D X-ray image (upper) and 3D composite image (lower) of (A) PBS, (B) EGFP mouse bone marrow mesenchymal stem cells, and (C) irradiated EGFP mesenchymal stem cells injected groups.

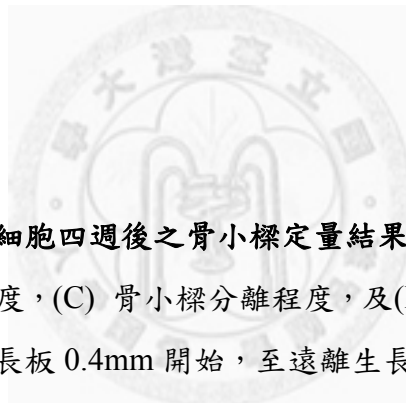


圖 24 骨髓內注射間葉幹細胞四週後之骨小樑定量結果。

(A)骨體積，(B) 骨小樑厚度，(C) 骨小樑分離程度，及(D) 骨小樑數目定量結果，骨小樑選取區域為距離生長板 0.4mm 開始，至遠離生長板 1.5mm 之區域。數據以五重複之實驗數值平均值±標準誤差方式表示，a, b 為 Duncan grouping， $p < 0.05$ 時定義為具顯著差異。

Fig. 24. The quantitative results of trabecular bone after cell transplantation for 4 wks.

(A) Percentage of bone volume, (B) trabecular thickness, (C) trabecular separation, and (D) trabecular number. The trabecular bone was counted at 0.4 mm to 1.5 mm apart from growth plate. (a, b means Duncan grouping)

圖 25 注射表現綠色螢光蛋白殖轉基因小鼠骨髓間葉幹細胞四週後脛骨免疫組織化學染色顯微照相。

注射表現綠色螢光蛋白殖轉基因小鼠骨髓間葉幹細胞四週後脛骨免疫組織化學染色後之 (A) DAPI 染色、(B) 綠色螢光顯微照相圖，及 (C) DAPI 和綠色螢光合併圖。(比例尺= 100 μm)

Fig. 25. Immunohistochemistry photos of tibia samples were taken from osteoporotic mice finishing the treatment of EGFP MSCs for 4 weeks.

The image of (A) DAPI, (B) GFP, (C) merge. (scale bar = 100 μm)

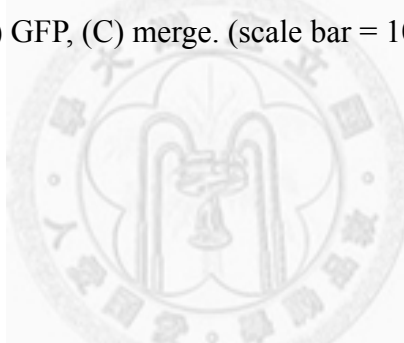


圖 26 注射經紅光照射之表現綠色螢光蛋白殖轉基因小鼠骨髓間葉幹細胞四週後脛骨免疫組織化學染色顯微照相。

注射經能量密度 0.9 J/cm^2 紅光照射之綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞四週後脛骨免疫組織化學染色 (A) DAPI 染色，(B) 綠色螢光顯微照相圖，及 (C) DAPI 和綠色螢光合併圖。(比例尺= 100 μm)

Fig. 26. Immunohistochemistry photos of tibia samples were taken from osteoporotic mice finishing the treatment of red light irradiated EGFP MSCs for 4 weeks.

The image of (A) DAPI, (B) GFP, (C) merge. (scale bar = 100 μm)

圖 27 注射表現綠色螢光蛋白質轉基因小鼠骨髓間葉幹細胞四週後股骨免疫組織化學染色顯微照相。

注射表現綠色螢光蛋白質轉基因小鼠骨髓間葉幹細胞四週後股骨免疫組織化學染色後之 (A) DAPI 染色、(B) 綠色螢光顯微照相圖，及 (C) DAPI 和綠色螢光合併圖。(比例尺= 100 μm)

Fig. 27. Immunohistochemistry photos of femur samples were taken from osteoporotic mice finishing the treatment of EGFP MSCs for 4 weeks.

The image of (A) DAPI, (B) GFP, (C) merge. (scale bar = 100 μm)

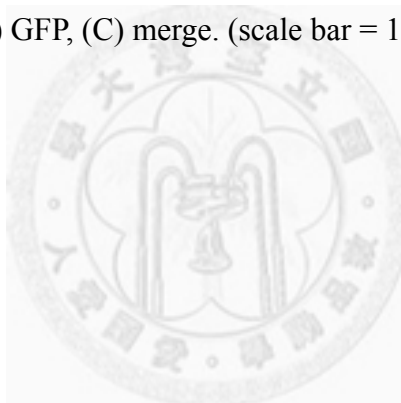


圖 28 注射經紅光照射之表現綠色螢光蛋白質轉基因小鼠骨髓間葉幹細胞四週後股骨免疫組織化學染色顯微照相。

注射經能量密度 0.9 J/cm^2 紅光照射之綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞四週後股骨免疫組織化學染色 (A) DAPI 染色、(B) 綠色螢光顯微照相圖，及 (C) DAPI 和綠色螢光合併圖。(比例尺= 100 μm)

Fig. 28. Immunohistochemistry photos of femur samples were taken from osteoporotic mice finishing the treatment of red light irradiated EGFP MSCs for 4 weeks.

The images represent (A) DAPI, (B) GFP, (C) merge. (scale bar = 100 μm)

本試驗結果顯示，無論有無經紅光照射，利用骨髓腔內注射方式將綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞移入骨質疏鬆症小鼠脛骨中，移入之細胞皆可存活在骨質疏鬆症小鼠骨髓中，且可成功遷移至股骨。此結果提示，低能量紅光照射並不會影響細胞在骨髓內的存活及遷移情形。在細胞移植後四週測量骨密度，移植未照射紅光間葉幹細胞之組別，其骨體積及骨小樑數目較注射 PBS 之控制組稍高，代表其骨密度稍微提升，與先前研究結果相似 (Takada *et al.*, 2006)。但注射間葉幹細胞雖可提升骨質疏鬆症小鼠之骨體積及骨小樑數目，但仍無法達到正常年輕小鼠的骨小樑狀況 (圖 18)。而由組織切片結果可發現，有攜帶綠色螢光之細胞存在骨髓腔中，這些移入之間葉幹細胞是否可以長期存在骨髓中，並達到修復骨小樑之效果，仍需長期研究觀察。

本試驗中注射經紅光照射之綠色螢光小鼠骨髓間葉幹細胞四週後，其骨體積及骨小樑數目顯著低於注射未經光照細胞之處理組 ($p < 0.05$)。先前研究曾提及，經紅光照射後可提升細胞激素之分泌，其研究指出，腦部受到冷凍傷害的大鼠，若在患處使用低能量紅光照射，則其血液中 IL-6 含量顯著提升 (Moreira *et al.*, 2009)。此外，B 細胞經紅光照射後，所分泌之 IL-6 顯著提升 (Fenyo *et al.*, 2002)。根據上述研究結果推測可能由於光照之後增加間葉幹細胞之 IL-6 分泌，造成細胞移入骨髓後蝕骨細胞分化上升，造成骨密度下降。然而，在 Fenyo 等人 2002 年的研究也指出，同樣的光照條件會因細胞種類不同，造成 IL-6 分泌上升或下降。

3.3.3.3 紅光照射對小鼠骨髓間葉幹細胞 IL-6 及 IL-11 表現量之影響

為確認低能量紅光照射是否會增加小鼠骨髓間葉幹細胞之 IL-6 及 IL-11 表現量，本試驗測量經紅光照射後一日，小鼠骨髓間葉幹細胞之 IL-6 及 IL-11 基因表現量。結果如圖 29 所示，紅光照射後一日，經能量密度 0.9 J/cm^2 之紅光照射之處理組，其 IL-6 表現量為未照射之控制組的 0.97 倍；IL-11 表現量為未照射之控制組的 0.99 倍，兩者於統計上並無顯著差異 ($p > 0.05$)。

圖 29 低能量紅光對小鼠骨髓間葉幹細胞 IL-6 及 IL-11 基因表現之影響

經能量密度 0.9 J/cm^2 之紅光照射後一日，以紅光照射之處理組其 IL-6 基因表現量為未照射之控制組的 0.97 倍；IL-11 基因表現量為未照射之控制組的 0.99 倍，兩者於統計上並無顯著差異 ($p > 0.05$)。

Fig. 29. The effect of low energy red light irradiated on mouse marrow-derived mesenchymal stem cells to expression level of IL-6 and IL-11 genes.

One day after low energy red light irradiated at energy density 0.9 J/cm^2 , the IL-6 gene expression level was 0.97 fold of control group; and the IL-11 gene expression level was 0.99 fold of control group. There were no significant differences in two groups. ($p > 0.05$)

本實驗結果顯示，低能量紅光照射小鼠骨髓間葉幹細胞，對其 IL-6 及 IL-11 表現量之刺激不明顯。此結果提示，骨質疏鬆症小鼠注射經紅光照射之間葉幹細胞，可能非透過其 IL-6 及 IL-11 分泌量上升之路徑而導致其注射後四週骨密度顯著低於注射未照射之間葉幹細胞 (圖 24)。因此，低能量紅光照射是否會影響其他細胞特性，或是其於體內體外有不同之作用機制，仍需未來進一步實驗證明。

第4章 綜合討論

關於刺激細胞增殖之最適光照波長、功率密度及能量密度至今仍未有定論。本試驗使用波長範圍 600 nm 至 700 nm，主要波長 650 nm 之磷化銦鎵鋁發光二極體，其波長範圍包含細胞色素 C 氧化酶中還原態銅中心 A (reduced Cu_A) (620 nm)、氧化態銅中心 B (oxidized Cu_B) (680 nm) 之吸收光譜 (Karu, 1999)。在功率密度為 5.08 mW/cm²、能量密度範圍 0.3~1.5 J/cm² 可有效刺激細胞增殖。而根據前人研究，以功率密度 20 mW/cm²、能量密度 8 J/cm²、波長 670 nm 之雷射，其功率密度為本試驗之四倍、能量密度為本試驗之 6 倍，仍可有效刺激臍靜脈內皮細胞生長 (Schindl *et al.*, 2003)。然而，間葉幹細胞之骨分化能力部分之相關研究，在 0.9 J/cm² 之能量密度對骨分化有較成熟之趨勢，而 0.3 及 1.5 J/cm² 之處理組此現象不明顯。先前研究顯示經分化液誘導分化三天後，再以 0.279 J/cm² 紅光發光二極體照射，可顯著促進硬骨分化，而若能量提升至 0.836 J/cm² 則刺激硬骨分化之效果減弱 (Kim *et al.*, 2009)。由此可推知，刺激間葉幹細胞分化之有效能量密度範圍較窄，且在分化後再照光可獲致較好的刺激效果，是否由於光刺激分化之分子機制與刺激增殖之路徑不同造成此現象，仍需進一步試驗證實。

光療法主要藉由刺激細胞增生、遷移及影響細胞激素分泌而達到療效。於試驗一及試驗二之結果中已證明 0.9 J/cm² 能量密度之紅光可刺激細胞增殖，並有促進分化及遷移之趨勢，且不會加速細胞老化。然而，試驗三之結果顯示，以此光照條件照射小鼠骨髓幹細胞後移入骨質疏鬆症小鼠體內，反而降低其骨密度。目前已知，停經後婦女骨質疏鬆症之成因是由於雌激素下降，使其對間葉幹細胞及成骨細胞分泌 IL-6 之抑制消失，IL-6 大量分泌促進蝕骨細胞分化及增進骨再吸收作用。本實驗已證實低能量紅光並不是藉由促進間葉幹細胞分泌 IL-6，造成骨密度下降。紅光照射是否於體外或體內有不同之作用機制，目前尚無相關文獻供參考，仍需未來研究證實。

第5章 結論

本試驗結果顯示，利用波長範圍 600 nm 至 700 nm，主要波長 650 nm，功率密度 5.08 mW/cm^2 之磷化銦鎵鋁發光二極體，照射小鼠骨髓間葉幹細胞一至五分鐘，其能量密度為 0.3 J/cm^2 至 1.5 J/cm^2 時，可顯著提升其體外增殖能力。其中能量密度 0.9 J/cm^2 有提升小鼠骨髓間葉幹細胞硬骨、脂肪分化，及細胞遷移能力之趨勢。且在此光照條件下對細胞老化影響不顯著。活體試驗結果顯示，以骨髓腔內注射方式注射小鼠骨髓間葉幹細胞至骨質疏鬆症小鼠脛骨內，可提升股骨之骨密度；然而，若以 0.9 J/cm^2 之低能量紅光照射小鼠骨髓間葉幹細胞後，再注射入骨質疏鬆症小鼠之脛骨，則不具有提升骨密度之能力。證明低能量紅光照射小鼠骨髓間葉幹細胞雖可提升其體外增生能力，但仍無法達到治療骨質疏鬆症之效果。



第6章 未來展望

為增進低能量紅光刺激細胞增生之效率，未來可測試不同功率密度及波長，以更高之能量照射細胞，在不影響細胞溫度上升之條件下，找出最有效之光照參數，以利光療法之應用。此外，低能量紅光刺激細胞增殖、遷移及分化之詳細分子機制迄今仍未釐清，未來可進行相關研究並探討其機制，以確認其應用於臨床醫學之安全性及可能性。

本試驗結果顯示，移植低能量紅光照射細胞後會使骨密度下降，且於體外低能量紅光照射對於小鼠骨髓間葉幹細胞分泌 IL-6、IL-11 沒有影響。未來仍需進一步實驗確認低能量紅光照射於體內和體外之作用機制是否相同，以釐清低能量紅光影響間葉幹細胞治療骨質疏鬆症之機制。此外，先前研究顯示，低能量紅光可藉由促進血管內皮生長因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 之分泌，達到治療心肌梗塞之效果 (Oron *et al.*, 2009)。未來是否可利用低能量紅光促進其他生長因子分泌之特性，將其應用於其他疾病模式之治療，仍有待進一步試驗探討。



REFERENCES

- Abrahamse, H., B. Mvula, T. Mathope, and T. Moore. 2008. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. *Laser Med. Sci.* 23: 277-282.
- Ashton, B. A., T. D. Allen, C. R. Howlett, C. C. Eaglesom, A. Hattori, and M. Owen. 1980. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 151: 294-307.
- Bab, I., B. A. Ashton, D. Gazit, G. Marx, M. C. Williamson, and M. E. Owen. 1986. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J. Cell Sci.* 84: 139-151.
- Banfi, A., A. Muraglia, B. Dozin, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, and R. Quarto. 2000. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp. Hematol.* 28: 707-715.
- Baxter, M. A., R. F. Wynn, S. N. Jowitt, J. E. Wraith, L. J. Fairbairn, and I. Bellantuono. 2004. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22: 675-682.
- Bellido, T., G. Girasole, R. L. Jilka, D. Crabb, and S. C. Manolagas. 1993. Demonstration of Androgen Receptors in Bone-Marrow Stromal Cells and Their Role in the Regulation of Transcription from the Human Interleukin-6 (Il-6) Gene Promoter. *J. Bone Miner. Res.* 8: S131-S131.
- Bouvet-Gerbettaz, S., E. Merigo, J. P. Rocca, G. F. Carle, and N. Rochet. 2009. Effects of Low-Level Laser Therapy on Proliferation and Differentiation of Murine Bone Marrow Cells Into Osteoblasts and Osteoclasts. *Lasers Surg. Med.* 41: 291-297.
- Bruder, S. P., A. A. Kurth, M. Shea, W. C. Hayes, N. Jaiswal, and S. Kadiyala. 1998. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J. Orth. Res.* 16: 155-162.
- Callicott, R. J., and J. E. Womack. 2006. Real-time PCR assay for measurement of mouse telomeres. *Comp. Med.* 56: 17-22.
- Campagnoli, C., I. A. Roberts, S. Kumar, P. R. Bennett, I. Bellantuono, and N. M. Fisk. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human

- first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98: 2396-2402.
- Campisi, J. 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 11: S27-S31.
- Campisi, J., and F. D. di Fagagna. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 729-740.
- Caplan, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641-650.
- Chamberlain, G., J. Fox, B. Ashton, and J. Middleton. 2007. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25: 2739-2749.
- Clarke, S. C., J. Kelleher, H. Lloyd-Jones, M. Slack, and P. M. Schofield. 2002. A study of hormone replacement therapy in postmenopausal women with ischaemic heart disease: the Papworth HRT atherosclerosis study. *BJOG* 109: 1056-1062.
- Collins, K., and J. R. Mitchell. 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21: 564-579.
- di Fagagna, F. D., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter, and S. P. Jackson. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426: 194-198.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanese, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti, and A. M. Gianni. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838-3843.
- Diffey, B. L. 1980. Ultraviolet-Radiation Physics and the Skin. *Phys. Med. Biol.* 25: 405-426.
- Eduardo Fde, P., D. F. Bueno, P. M. de Freitas, M. M. Marques, M. R. Passos-Bueno, P. Eduardo Cde, and M. Zatz. 2008. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg. Med.* 40: 433-438.
- Feng, W., Y. Cui, C. Song, H. Zhan, X. Wang, Q. Li, W. Cui, K. Guo, M. Maki, H. Hisha, T. Mori, and S. Ikehara. 2007. Prevention of osteoporosis and hypogonadism by allogeneic ovarian transplantation in conjunction with intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Transplantation* 84: 1459-1466.
- Fenyo, M., J. Mandl, and A. Falus. 2002. Opposite effect of linearly polarized light on biosynthesis of interleukin-6 in a human B lymphoid cell line and peripheral human monocytes. *Cell Biol. Int.* 26: 265-269.

- Friedenstein, A. J., U. F. Deriglasova, N. N. Kulagina, A. F. Panasuk, S. F. Rudakowa, E. A. Luria, and I. A. Ruadkow. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* 2: 83-92.
- Fukuda, K., N. Sakamoto, T. Narita, K. Saitoh, T. Kameda, H. Iba, and S. Yasugi. 2000. Application of efficient and specific gene transfer systems and organ culture techniques for the elucidation of mechanisms of epithelial-mesenchymal interaction in the developing gut. *Dev. Growth Differ.* 42: 207-211.
- Gallagher, J. C., D. Goldgar, and A. Moy. 1987. Total Bone Calcium In Normal Women - Effect of Age and Menopause Status. *J. Bone Miner. Res.* 2: 491-496.
- Gasparyan, L., G. Brill, A. Makela. 2004. Influence of low level laser radiation on migration of stem cells. In: K. A. K. Leonardo Longo, Mihail-Lucian Pascu, Wilhelm R. A. Waidelich, (ed.) *Laser Florence*.
- Gerson, S. L. 1999. Mesenchymal stem cells: No longer second class marrow citizens. *Nat. Med.* 5: 262-264.
- Ghali, L., and M. Dyson. 1992. The direct effect of light therapy on endothelial cell proliferation in vitro. *EXS* 61: 411-414.
- Girasole, G., R. L. Jilka, G. Passeri, S. Boswell, G. Boder, D. C. Williams, and S. C. Manolagas. 1992. 17-Beta-Estradiol Inhibits Interleukin-6 Production by Bone Marrow-Derived Stromal Cells and Osteoblasts In vitro - a Potential Mechanism for the Antiosteoporotic Effect of Estrogens. *J. Clin. Invest.* 89: 883-891.
- Harley, C. B., A. B. Futcher, and C. W. Greider. 1990. Telomeres Shorten during Aging of Human Fibroblasts. *Nature* 345: 458-460.
- Hayflick, L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp. Cell Res.* 37: 614-636.
- Hofstetter, C. P., E. J. Schwarz, D. Hess, J. Widenfalk, A. El Manira, D. J. Prockop, and L. Olson. 2002. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2199-2204.
- Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul, and T. Hofmann. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99: 8932-8937.

- Hou, J. F., H. Zhang, X. Yuan, J. Li, Y. J. Wei, and S. S. Hu. 2008. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg. Med.* 40: 726-733.
- in 'tAnker, P. S., S. A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur, W. A. Noort, F. H. J. Claas, R. Willemze, W. E. Fibbe, and H. H. H. Kanhai. 2003. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102: 1548-1549.
- Jilka, R. L., K. Takahashi, M. Munshi, D. C. Williams, P. K. Roberson, and S. C. Manolagas. 1998. Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow - Evidence for autonomy from factors released during bone resorption. *J. Clin. Invest.* 101: 1942-1950.
- Karu, T. 1999. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* 49: 1-17.
- Karu, T., T. Andreichuk, and T. Ryabykh. 1993. Changes in oxidative metabolism of murine spleen following laser and superluminous diode (660-950 nm) irradiation: effects of cellular composition and radiation parameters. *Lasers Surg. Med.* 13: 453-462.
- Karu, T. I. 1986. [Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation]. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 291: 1245-1249.
- Karu, T. I., L. V. Pyatibrat, and G. S. Kalendo. 2001. Donors of NO and pulsed radiation at $\lambda=820$ nm exert effects on cell attachment to extracellular matrices. *Toxicol. Lett.* 121: 57-61.
- Karu, T. I., O. A. Tiphlova, A. Matveyets Yu, A. P. Yartsev, and V. S. Letokhov. 1991. Comparison of the effects of visible femtosecond laser pulses and continuous wave laser radiation of low average intensity on the clonogenicity of *Escherichia coli*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 10: 339-344.
- Karu, T. J., G. S. Kalendo, and V. S. Letokhov. 1981. Control of Rna-Synthesis Rate in Tumor-Cell HeLa by Action of a Low-Intensity Visible-Light of Copper Laser. *Lett. Nuovo. Cimento.* 32: 55-59.
- Karu, T. J., G. S. Kalendo, V. S. Letokhov, and V. V. Lobko. 1984. Biostimulation of HeLa-Cells by Low-Intensity Visible-Light .2. Stimulation of DNA and Rna-Synthesis in a Wide Spectral Range. *Nuovo. Cimento. D.* 3: 309-318.

- Kim, H. K., J. H. Kim, A. A. Abbas, D. O. Kim, S. J. Park, J. Y. Chung, E. K. Song, and T. R. Yoon. 2009. Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Lasers Med. Sci.* 24: 214-222.
- Koc, O. N., S. L. Gerson, B. W. Cooper, S. M. Dyhouse, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan, and H. M. Lazarus. 2000. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 18: 307-316.
- Kreisler, M., A. B. Christoffers, H. Al-Haj, B. Willershausen, and B. d'Hoedt. 2002. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 30: 365-369.
- Kreisler, M., A. B. Christoffers, B. Willershausen, and B. d'Hoedt. 2003. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J. Clin. Periodontol.* 30: 353-358.
- Ksiazek, K. 2009. A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation Res.* 12: 105-116.
- Kunter, U., S. Rong, Z. Djuric, P. Boor, G. Muller-Newen, D. H. Yu, and J. Floege. 2006. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 2202-2212.
- Lavi, R., A. Shainberg, H. Friedmann, V. Shneyvays, O. Rickover, M. Eichler, D. Kaplan, and R. Lubart. 2003. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J. Biol. Chem.* 278: 40917-40922.
- Lee, K. D., T. K. Kuo, J. Whang-Peng, Y. F. Chung, C. T. Lin, S. H. Chou, J. R. Chen, Y. P. Chen, and O. K. Lee. 2004. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40: 1275-1284.
- Lee, R. H., M. J. Seo, R. L. Reger, J. L. Spees, A. A. Pulin, S. D. Olson, and D. J. Prockop. 2006. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 17438-17443.
- Li, L., D. Li, J. Wu, W. Wu, H. Chen, and Y. Mao. 2006. [A potential role for the bone marrow mesenchymal stem cell in the pathogenesis of osteoporosis by

- ovariectomy in rat]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 23: 129-135.
- Li, Q., X. Xu, Z. Wang, W. Liu, and Z. Li. 2007. [Investigation of canine mesenchymal stem cells differentiation to vascular endothelial cell in vitro]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 24: 1348-1351.
- Li, Y., M. A. Nichols, J. W. Shay, and Y. Xiong. 1994. Transcriptional Repression of the D-Type Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P16 by the Retinoblastoma Susceptibility Gene-Product Prb. *Cancer Res.* 54: 6078-6082.
- Lim, W., S. Lee, I. Kim, M. Chung, M. Kim, H. Lim, J. Park, O. Kim, and H. Choi. 2007. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers Surg. Med.* 39: 614-621.
- Manolagas, S. C., T. Bellido, and R. L. Jilka. 1995. New Insights into the Cellular, Biochemical, and Molecular-Basis of Postmenopausal and Senile Osteoporosis - Roles of Il-6 and Gp130. *Int. J. Immunopharmacol.* 17: 109-116.
- Manolagas, S. C., and R. L. Jilka. 1995. Mechanisms of Disease - Bone-Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling - Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. *New Engl. J. Med.* 332: 305-311.
- Manolagas, S. C., S. Kousteni, and R. L. Jilka. 2002. Sex steroids and bone. *Recent Progress in Hormone Research, Vol 57* 57: 385-409.
- Mareschi, K., E. Biasin, W. Piacibello, M. Aglietta, E. Madon, and F. Fagioli. 2001. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 86: 1099-1100.
- Meunier, P., J. Aaron, C. Edouard, and G. Vignon. 1971. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 80: 147-154.
- Miura, M., S. Gronthos, M. R. Zhao, B. Lu, L. W. Fisher, P. G. Robey, and S. T. Shi. 2003. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5807-5812.
- Moreira, M. S., I. T. Velasco, L. S. Ferreira, S. K. Ariga, D. F. Barbeiro, D. T. Meneguzzo, F. Abatepaulo, and M. M. Marques. 2009. Effect of phototherapy with low intensity laser on local and systemic immunomodulation following focal brain damage in rat. *J. Photochem. Photobiol. B.* 97: 145-151.
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival -

- Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
- Nakahara, H., J. E. Dennis, S. P. Bruder, S. E. Haynesworth, D. P. Lennon, and A. I. Caplan. 1991. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp. Cell. Res.* 195: 492-503.
- Newman, T. B., M. W. Kuzniewicz, P. Liljestrang, S. Wi, C. McCulloch, and G. J. Escobar. 2009. Numbers Needed to Treat With Phototherapy According to American Academy of Pediatrics Guidelines. *Pediatrics* 123: 1352-1359.
- Oh, S. H., T. M. Muzzonigro, S. H. Bae, J. M. LaPlante, H. M. Hatch, and B. E. Petersen. 2004. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab. Invest.* 84: 607-617.
- Oreffo, R. O. C., G. R. Mundy, S. M. Seyedin, and L. F. Bonewald. 1989. Activation of the Bone-Derived Latent Tgf Beta-Complex by Isolated Osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158: 817-823.
- Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S. M. Anderson, B. S. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri, and P. Anversa. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705.
- Oron, U., H. Tuby, and L. Maltz. 2009. Implantation of Low-Level Laser Irradiated Mesenchymal Stem Cells into the Infarcted Rat Heart Is Associated with Reduction In Infarct Size and Enhanced Angiogenesis. *Photomedicine and Laser Surgery* 27: 227-233.
- Ortiz, L. A., F. Gambelli, C. McBride, D. Gaupp, M. Baddoo, N. Kaminski, and D. G. Phinney. 2003. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *P Natl Acad Sci USA* 100: 8407-8411.
- Papageorgiou, P., A. Katsambas, and A. Chu. 2000. Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 142: 973-978.
- Parrinello, S., E. Samper, A. Krtolica, J. Goldstein, S. Melov, and J. Campisi. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 5: 741-747.
- Passarella, S., E. Casamassima, S. Molinari, D. Pastore, E. Quagliariello, I. M. Catalano,

- and A. Cingolani. 1984. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett.* 175: 95-99.
- Passos, J. F., G. Saretzki, S. Ahmed, G. Nelson, T. Richter, H. Peters, I. Wappler, M. J. Birket, G. Harold, K. Schaeuble, M. A. Birch-Machin, T. B. Kirkwood, and T. von Zglinicki. 2007. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol.* 5: e110.
- Pereira, A. N., P. Eduardo Cde, E. Matson, and M. M. Marques. 2002. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 31: 263-267.
- Prentice, A., J. P. Bonjour, F. Branca, C. Cooper, A. Flynn, M. Garabedian, D. Muller, D. Pannemans, and P. Weber. 2003. PASSCLAIM - Bone health and osteoporosis. *Eur. J. Nutr.* 42 Suppl 1: I28-49.
- Reddy, G. K., L. Stehno-Bittel, and C. S. Enwemeka. 1998. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg. Med.* 22: 281-287.
- Ringden, O., M. Uzunel, I. Rasmusson, M. Remberger, B. Sundberg, H. Lonnies, H. U. Marschall, A. Dlugosz, A. Szakos, Z. Hassan, B. Omazic, J. Aschan, L. Barkholt, and K. Le Blanc. 2006. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81: 1390-1397.
- Rombouts, W. J. C., and R. E. Ploemacher. 2003. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 17: 160-170.
- Ross, S. E., N. Hemati, K. A. Longo, C. N. Bennett, P. C. Lucas, R. L. Erickson, and O. A. MacDougald. 2000. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289: 950-953.
- Saito, T., J. E. Dennis, D. P. Lennon, R. G. Young, and A. I. Caplan. 1995. Myogenic Expression of Mesenchymal Stem Cells within Myotubes of mdx Mice in Vitro and in Vivo. *Tissue Eng* 1: 327-343.
- Sanchez-Ramos, J., S. Song, F. Cardozo-Pelaez, C. Hazzi, T. Stedeford, A. Willing, T. B. Freeman, S. Saporta, W. Janssen, N. Patel, D. R. Cooper, and P. R. Sanberg. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* 164: 247-256.

- Schindl, A., H. Merwald, L. Schindl, C. Kaun, and J. Wojta. 2003. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br. J. Dermatol.* 148: 334-336.
- Serakinci, N., R. Christensen, J. Graakjaer, C. J. Cairney, W. N. Keith, J. Alsner, G. Saretzki, and S. Kolvraa. 2007. Ectopically hTERT expressing adult human mesenchymal stem cells are less radiosensitive than their telomerase negative counterpart. *Exp. Cell Res.* 313: 1056-1067.
- Serrano, M., G. J. Hannon, and D. Beach. 1993. A New Regulatory Motif in Cell-Cycle Control Causing Specific-Inhibition of Cyclin-D/Cdk4. *Nature* 366: 704-707.
- Sethe, S., A. Scutt, and A. Stolzing. 2006. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res. Rev.* 5: 91-116.
- Soleimani, M., E. Abbasnia, M. Fathi, H. Sahraei, Y. Fathi, and G. Kaka. 2011. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts-an in vitro study. *Lasers Med. Sci.*
- Stein, A., D. Benayahu, L. Maltz, and U. Oron. 2005. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 23: 161-166.
- Stenderup, K., J. Justesen, C. Clausen, and M. Kassem. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33: 919-926.
- Stenderup, K., J. Justesen, E. F. Eriksen, S. I. S. Rattan, and M. Kassem. 2001. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 16: 1120-1129.
- Takada, K., M. Inaba, N. Ichioka, Y. Ueda, M. Taira, S. Baba, T. Mizokami, X. Wang, H. Hisha, H. Iida, and S. Ikehara. 2006. Treatment of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. *Stem Cells* 24: 399-405.
- Tuby, H., L. Maltz, and U. Oron. 2007. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg. Med.* 39: 373-378.
- Vinck, E. M., B. J. Cagnie, M. J. Cornelissen, H. A. Declercq, and D. C. Cambier. 2003. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power

- laser irradiation. *Lasers Med. Sci.* 18: 95-99.
- Wagner, W., P. Horn, M. Castoldi, A. Diehlmann, S. Bork, R. Saffrich, V. Benes, J. Blake, S. Pfister, V. Eckstein, and A. D. Ho. 2008. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* 3: e2213.
- Wexler, S. A., C. Donaldson, P. Denning-Kendall, C. Rice, B. Bradley, and J. M. Hows. 2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br. J. Haematol.* 121: 368-374.
- Yu, W., J. O. Naim, and R. J. Lanzafame. 1994. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* 59: 167-170.
- Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, and M. H. Hedrick. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13: 4279-4295.
- 中華民國骨質疏鬆學會. 2007. 骨鬆防治指引及風險評估. http://www.toa1997.org.tw/index.php?page_id=9bf31c7ff062936a96d3c8bd1f8f2ff3.
- 維基百科. 2011. 發光二極體. <http://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E7%99%BC%E5%85%89%E4%BA%8C%E6%A5%B5%E7%AE%A1>.