

高压氧对体外培养的成骨细胞增殖和分化的影响*

吴东^{1, 2)} 吴建珊³⁾ 阎福华¹⁾ 陈江^{1)**}

(¹⁾福建医科大学口腔医学院, 福州 350002; ²⁾福州市第八医院口腔科, 福州 350013; ³⁾福建中医学院现代医学系, 福州 350108)

摘要 为探讨高压氧对成骨细胞增殖和成骨分化的影响, 把来源于牙槽骨的成骨细胞接种在 24 孔培养皿中, 每孔 2 500 个细胞, 4 个治疗组分别接受不同条件的高压氧治疗, 分别是 2.4ATA 90 min, 2.4ATA 30 min, 1.5ATA 90 min 和 1.5ATA 30 min, 每天一次, 共 10 天. 对照组进行常规的细胞培养. 分别在高压氧治疗前和高压氧治疗后的 1、2、3、4、6、8、10 天, 采用 WST-1 分析试剂进行成骨细胞的增殖分析. 使用乳酸脱氢酶(LDH)毒性分析法检测高压氧对成骨细胞的毒性影响. 另将细胞接种于 96 孔培养皿中, 每孔 10 000 个细胞, 正常培养 3 天后, 改用成骨化培养基, 24 h 后, 两个治疗组分别接受 2.4ATA 90 min 和 1.5ATA 90 min 的高压氧治疗, 每天一次共 19 次. 采用钙沉积分析法、碱性磷酸酶(ALP)活性分析和 Von Kossa 染色进行成骨分析. 同样的方法观察高压空气对细胞增殖和分化的影响. 结果显示, 在 10%小牛血清培养基条件下, 高压氧刺激了成骨细胞的增殖, 而在使用 2%小牛血清培养基时, 并未观察到高压氧对细胞增殖的促进作用. 高压氧治疗前后细胞外乳酸脱氢酶含量没有发生改变, 提示了高压氧未对成骨细胞造成毒性影响. 另一方面, 高压氧增加了骨结节的形成, 同时钙沉积增加, 碱性磷酸酶的活力也显著增强, 表明了高压氧促进了成骨细胞的成骨分化.

关键词 高压氧, 成骨细胞, 增殖, 分化

学科分类号 R734

高压氧治疗是将病人放置于高压氧舱内进行加压, 使舱内的气压超过 1 个大气压, 同时让病人吸入纯氧或高浓度氧, 使机体得到较高分压的氧气, 以达到治疗疾病的目的^[1]. 高压氧用于延迟骨愈合、骨不连、放射性骨髓炎等疾病的治疗取得了显著的效果^[2~6]. 高压氧治疗口腔疾病, 如牙周病、颌骨骨折以及促进种植体骨结合也见报道. 研究表明, 高压氧在治疗过程中, 通过增加局部组织的氧分压, 进而增加了胶原的合成和新生血管的形成, 最终刺激新骨的形成^[5, 7, 8].

骨折是临床的一种常见病, 重建骨结构是骨折治疗的主要目标. 然而, 骨折的愈合过程常常由于骨缺损大、断端不稳定、感染、软组织缺乏和血管形成困难等原因而受到影响^[9, 10]. 这些影响常导致骨不连的发生. 对于延迟骨愈合和骨不连, 常规的治疗方法包括骨移植、骨断端的固定、电刺激等方法. 高压氧治疗的方法在骨折^[11~15]、骨髓炎^[14~16]、骨牵张^[17, 18]、骨移植^[11, 19]和牙种植^[20]等疾病的治疗取得了一定的疗效. 然而, 由于缺乏可信的基础研究证据来印证上述的治疗疗效^[21], 特别是细胞和分子水平的研究仍然处于起步阶段, 高压氧的临床应用

仍然存在着很大的争议^[12, 22~24]. 在骨折的愈合过程中, 骨髓细胞迁移并分化为骨祖细胞和成骨细胞, 不断形成骨基质并最终导致矿化骨的形成是一个重要的新骨形成过程, 但是有关高压氧对骨髓干细胞和成骨细胞增殖、成骨分化影响的研究至今未见报道. 本研究的目的在于观察高压氧对体外培养的来源于人牙槽骨的成骨细胞增殖和分化的影响. 研究结果将有助于了解高压氧在促进骨基质形成过程中的机理, 为临床开展高压氧治疗提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 人牙槽骨成骨细胞的分离和培养

成骨细胞分离自人的牙槽骨. 牙槽骨取自在澳大利亚昆士兰大学牙学院布里斯班牙科医院就诊的

* 中华人民共和国教育部国家留学基金管理委员会(2003935010), 澳大利亚国家医学和健康研究中心基金(NHMRC 199925)和澳大利亚昆士兰州查尔斯王子医院研究基金(FRC0206-22)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0591-83754882, E-mail: dentistjiang@sina.com

收稿日期: 2007-12-09, 接受日期: 2008-03-02

13~19岁的正畸病人正常的牙槽骨,实验过程取得澳大利亚昆士兰大学动物实验伦理委员会的批准.取得的牙槽骨碎片标本,通过扩增获得可培养的成骨细胞.获得的细胞培养于含有10%小牛血清和1%青霉素/四环素的DMEM(dulbecco's modified eagle's medium)培养液中,放置于37℃、标准湿度、充有5% CO₂和95%空气的孵育器中.成骨细胞的特性通过其成骨分化潜在的形态和功能标准加以确定.本研究过程使用经过4~6代培养的成骨细胞.

1.2 高压氧治疗

经过培养的实验组成骨细胞放置于容量为7L的实验用高压氧舱(澳大利亚, Fink Engineering 公司)中进行高压氧治疗,每天1次,根据增殖和分化实验的不同要求共进行10~19天的高压氧治疗.治疗开始前,实验舱密闭后用高浓度氧气灌洗2 min,排除舱内原有的空气,以保证在高压氧治疗过程中舱内充满氧气.根据实验的设计,舱内压力分别加压至1.5ATA和2.4ATA个大气压,治疗时间分别为30 min和90 min两种.治疗结束后,缓慢减压5 min后出舱,将培养皿重新放置于孵育器中待测.同时对成骨细胞加以高压空气治疗,以观察压力对细胞的影响.高压空气的使用方法与高压氧治疗相同.

1.3 成骨细胞增殖分析

在高压氧治疗前和高压氧治疗后的1、2、3、4、6、8、10天分别对成骨细胞进行细胞增殖分析.按上述方法准备成骨细胞,将成骨细胞培养于每孔含1 ml培养基的24孔培养皿中,每孔初始细胞为2 500个,培养基中小牛血清浓度分别为2%和10%两种.成骨细胞贴附24 h后,给与100%的纯氧,进行每天一次的高压氧治疗,共治疗10天.高压氧治疗组共分为4组,分别为2.4ATA 90 min组、2.4ATA 30 min组、1.5ATA 90 min组和1.5 ATA 30 min组.对照组置于37℃、含5% CO₂和95%空气的细胞培养箱中.

细胞增殖分析采用WST-1分析试剂(德国, Roche Applied Science 公司).分析在高压氧治疗后16 h进行,将100 μl的WST-1试剂加入到含有1 ml培养基的已经过高压氧治疗后的培养皿中,放入37℃含有5% CO₂的孵育箱中,4 h后取出,使用色度反应分析仪在440 nm的波长下读数,可吸收参考波长为660 nm.使用标准曲线算出实际的细胞数.高压空气对细胞增殖影响的检测方法以

上方法相同.

1.4 成骨细胞分化分析

成骨细胞培养于96孔培养皿中3天,每孔初始细胞数为10 000个.3天后将普通培养基换为成骨化培养基(10%小牛血清的DMEM培养基,含1%青霉素/四环素,50 mg/L 枸橼酸,10 mmol/L 磷酸甘油,10 μmol/L 地塞米松).24 h后进行高压氧治疗,每天1次,共19天,压力和治疗时间分别为2.4ATA 90 min和1.5ATA 90 min.

钙沉积分析:采用钙反应试剂(美国, Sigma 公司)进行钙沉积分析.用不含钙和镁的PBS清洗培养皿中的每个孔后,在每孔中加入200 μl含0.6 mol/L的HCl,5 min后,取经过HCl溶解后的10 μl样本加入到含有300 μl的钙反应试剂的96孔培养皿中,颜色反应分析使用ELISA培养皿读数仪在575 nm波长下读数.分别测定不同压力和时间的高压氧和高压空气治疗后钙沉积数值.

碱性磷酸酶(ALP)活性分析:在高压氧治疗后的第5、9、13天进行,按照操作说明(美国, Sigma 公司)对碱性磷酸酶(ALP)活性进行测定.即在96孔培养皿中,取20 μl的样本加入到200 μl的ALP试剂中,混合后放入孵育箱中30 s,在405 nm的波长下进行第一次色度反应测量,2 min后进行第二次色度反应测量.ALP活性的测定结果取决于两次色度测定间的变化,即同一样本两次数值差.

Von Kossa 染色:矿化结果采用Von Kossa 染色进行镜下观察.96孔细胞培养皿用蒸馏水清洗后加入5%硝酸银,放置于亮光下60 min.随后再用蒸馏水轻洗3次,加入5%的硫代硫酸钠,室温下放置5 min后再次以蒸馏水轻洗培养皿,自然干燥.数码相机(Nikon Coolpix 4500, 澳大利亚)拍摄显微镜下图像(Leitz Laborlux S 公司, 澳大利亚).

1.5 成骨细胞细胞膜完整性分析

通过高压氧治疗后细胞膜的完整性来评价氧的毒性作用对成骨细胞的影响.将成骨细胞培养于24孔培养皿中,每孔2 500个细胞,培养液为含有10%和2%小牛血清的DMEM,接受2.4ATA 90 min、2.4ATA 30 min、1.5ATA 90 min和1.5ATA 30 min的高压氧治疗.高压氧治疗前和高压氧治疗后立即测定培养液中乳酸脱氢酶的含量.应用乳酸脱氢酶(LDH)体外毒性分析试剂盒(Sigma 公司, 美国)来检测高压氧治疗后渗透到培养液中的LDH.即从培养皿中吸取200 μl的样本上清液,

与 100 μ l 的 LDH 分析试剂混合. 培养皿上覆盖铝箔纸避光静置 30 min. 30 min 后加入 30 μ l 1 mol/L 的 HCl 中止反应, 在波长 490 nm 下分别测量高压氧治疗前和治疗后的可吸收度.

1.6 统计学处理

所有资料的数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示. 方差分析法 (ANOVA) 用于进行多组均数的比较, t 检验用于分析高压氧组和对照组之间的不同. 显著性差异水平设为 $P \leq 0.05$.

2 结 果

2.1 10%小牛血清培养基条件下, 高压氧治疗促进了成骨细胞的增殖

在 10% 小牛血清培养基培养 24 h 后, 分 4 组进行高压氧治疗: 2.4ATA 90 min, 2.4ATA 30 min, 1.5ATA 90 min, 1.5ATA 30 min. 采用

WST-1 分析法进行细胞增殖的分析(图 1a). 高压氧治疗后第 3 天, 治疗组细胞数显著高于对照组 ($P < 0.05$). 同样, 在高压氧治疗后第 4 天, 除 1.5ATA 30 min 组外, 其余 3 组的细胞数都显著高于对照组 ($P < 0.05$). 治疗后第 6 天, 仅有 2.4ATA 30 min 和 1.5ATA 90 min 两组的细胞数显著高于对照组 ($P < 0.05$). 最后, 在治疗后第 8 天和第 10 天, 实验组和对照组间没有观察到显著差异. 在高压空气治疗组中(2.4ATA 90 min 和 1.5ATA 90 min), 治疗组和对照组间细胞的增殖没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 1b). 为了评估高压氧是否对细胞产生毒性作用, 利用乳酸脱氢酶(LDH)渗漏分析来判定高压氧治疗前后细胞膜的完整性. 结果显示, 在 10%FCS 培养基条件下, 所有治疗组高压氧治疗后细胞外的 LDH 没有明显的增加, 这表明了高压氧治疗前后细胞膜的完整性没有改变(图 1c).

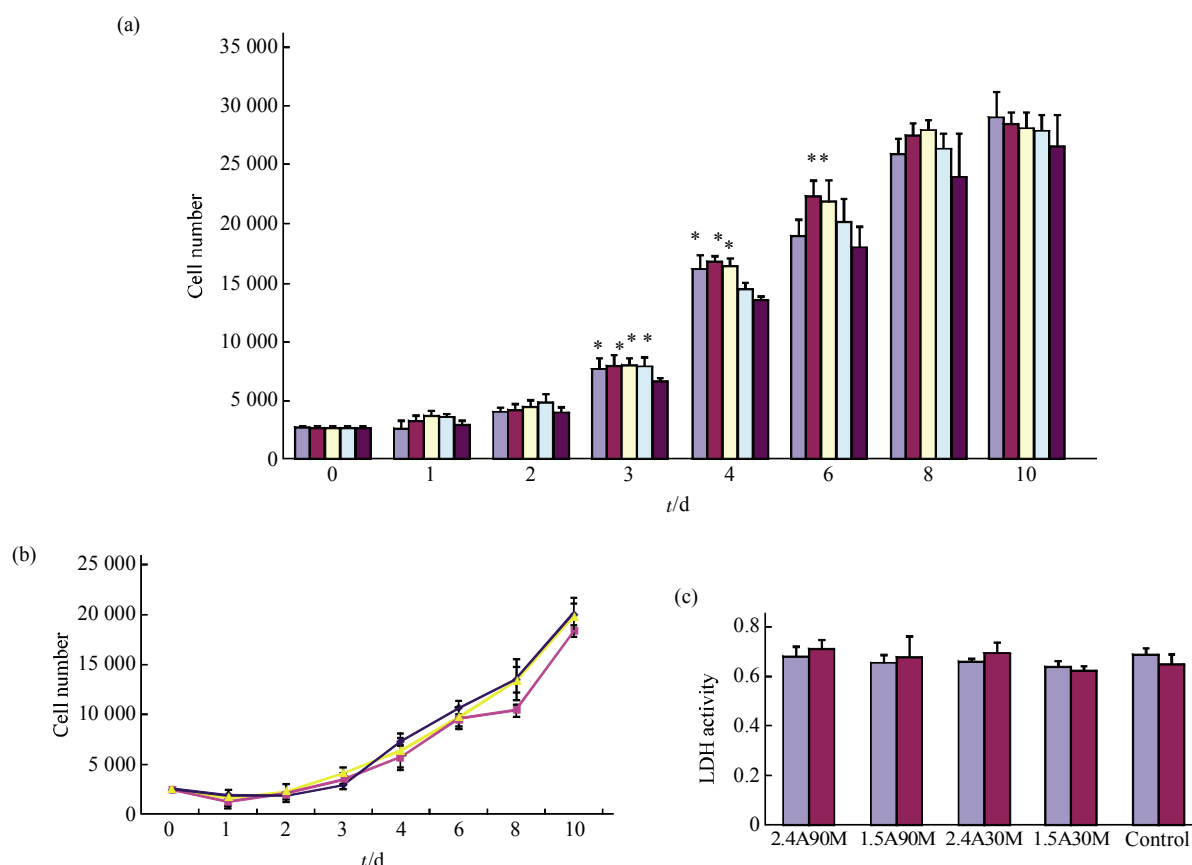


Fig. 1 Effect of oxygen levels and pressure on proliferation of osteoblasts cultured in 10% FCS

(a) Human osteoblasts derived from alveolar bone were cultured in 10% FCS for 24 h and subsequently treated with HBO (2.4ATA 90 min, 2.4ATA 30 min, 1.5ATA 90 min, 1.5ATA 30 min). Compared with the untreated control group, cell number was significantly increased under HBO treatment ($P < 0.05$). (b) There was no significant effect on cell proliferation when cultures were treated with pressure only. (c) Extracellular LDH activity before and after HBO treatment was not significantly affected ($P > 0.05$).

2.2 2%小牛血清培养基条件下, 高压氧抑制成骨细胞的增殖

为了评估血清因素对细胞增殖的影响, 增殖实验采用了 2% 小牛血清培养基条件下的高压氧治疗. 在此条件下, 高压氧治疗后细胞数目减少 (图 2a). 在治疗后第 3 天和第 4 天, 高压氧治疗组 (2.4ATA 90 min 和 1.5ATA 90 min) 的细胞数显著低于对照组 ($P < 0.05$). 同样, 在治疗后第 6、8、10 天所有高压氧治疗组都显示细胞数显著低于对照组

($P < 0.05$, 图 2a). 值得注意的是, 在 2% 血清培养基条件下, 从第 5 天开始, 高压空气同样引起了细胞数的减少 ($P < 0.05$, 图 2b). 细胞膜的完整性研究显示, 在 2% 浓度血清培养基条件下, 高压氧治疗后 LDH 活性没有明显增加 (图 2c). 这表明在 2% 血清培养基条件下, 高压氧治疗后细胞增殖受到抑制的结果与高压氧治疗的毒性反应没有直接的关系.

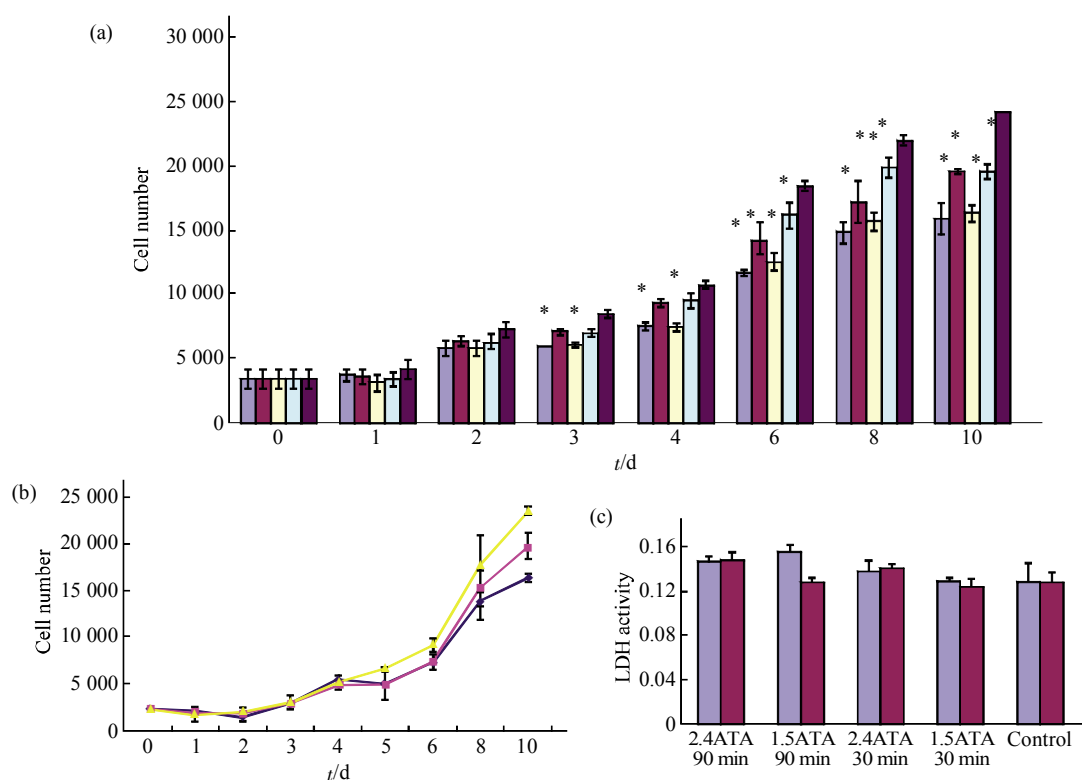


Fig. 2 Effect of elevated oxygen levels and pressure on proliferation of osteoblasts cultured in 2% FCS

(a) Human osteoblasts derived from alveolar bone were cultured in 2% FCS for 24 h and subsequently treated with HBO (2.4ATA 90 min, 2.4ATA 30 min, 1.5ATA 90 min, 1.5ATA 30 min). Compared with the untreated control group, cell number was significantly decreased under HBO treatment ($*P < 0.05$). (b) An inhibition of cellular proliferation was observed when cultures were treated with pressure alone. (c) Extracellular LDH activity before and after HBO treatment was not significantly affected ($P > 0.05$).

2.3 高压氧治疗有利于成骨细胞的成骨分化

在成骨分化培养条件下, 高压氧治疗后第 3 天, 实验组就可测出明显的钙沉积出现, 而对照组直到第 6 天才测出少许钙沉积水平. 在 19 天的实验中发现, 高压氧治疗组的钙沉积水平都显著高于对照组 ($P < 0.05$, 图 3a). 同样, 将两组实验组、对照组和空白对照组样本放置于 96 孔培养皿中, 也能肉眼观察到高压氧组与对照组和空白对照组之间色度的显著差异 (图 3b). 在高压空气治疗和对照组的检测中, 没有发现两者间钙沉积的不同

($P > 0.05$, 图 3c), 这表明单纯的压力 (高压空气) 条件下不会增加成骨的矿化. 另外, 作为成骨分化生物学标记的碱性磷酸酶活性在高压氧治疗后也明显提高 (图 4). 通过 von Kossa 染色显示骨结节形成来评价高压氧对成骨细胞成骨分化的影响, 结果显示, 高压氧治疗 7 天后就可以观察到骨结节的形成, 而对照组没有明显的骨结节形成. 第 12 天时, 实验组和对照组均可见骨结节形成, 但高压氧治疗组骨结节的数量和大小都较对照组高 (图 5).

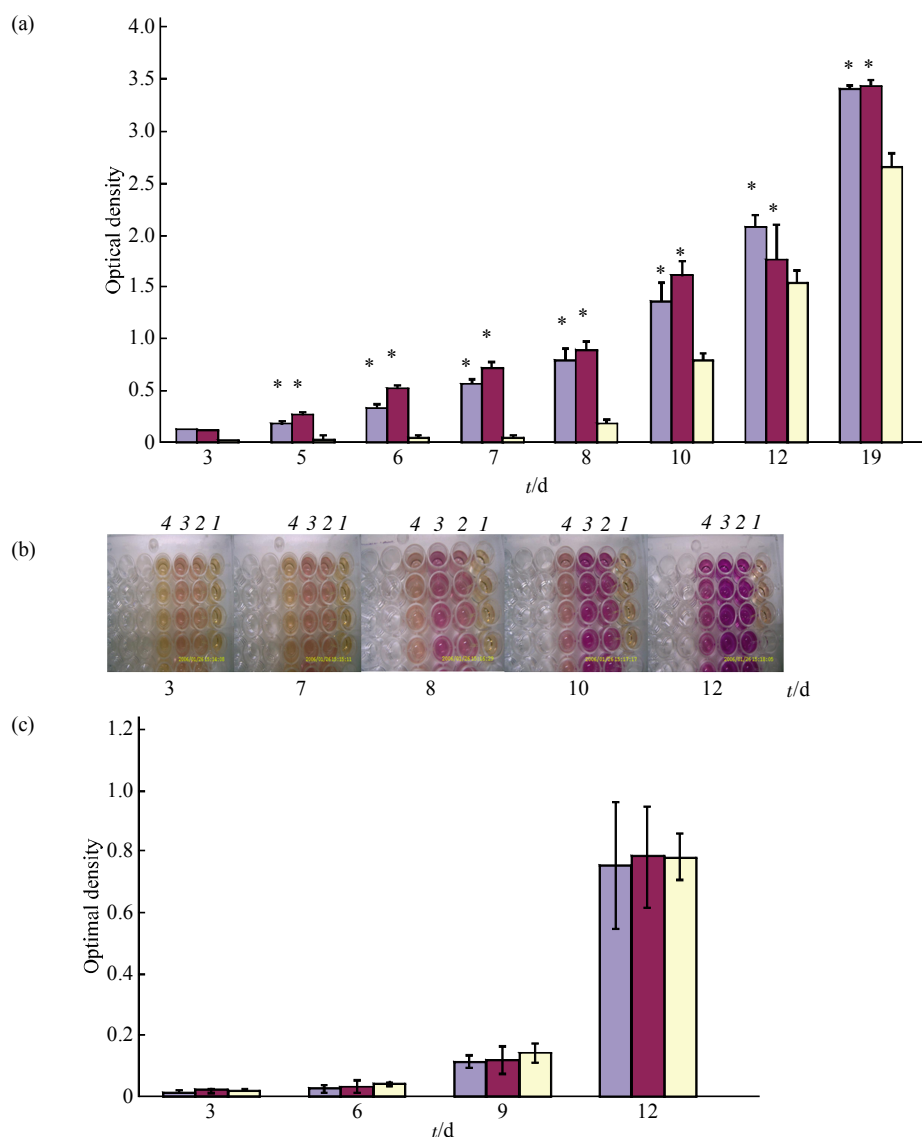


Fig. 3 Effect of HBO on osteoblast calcium deposition in osteogenic inducing culture

(a) Osteoblasts in osteogenic inducing medium were treated under HBO. Significant increase in calcium deposition was detected under HBO treatment compared with the untreated control group ($P < 0.05$). (b) Significant colour different between HBO group and control group (1: Zero control, 2: 2.4ATA 90 min, 3: 1.5ATA 90 min, 4: Control). (c) Without oxygen, air pressure itself did not have any effect on calcium deposition. No changes were noted between the treated and untreated groups ($P > 0.05$). * $P < 0.05$.

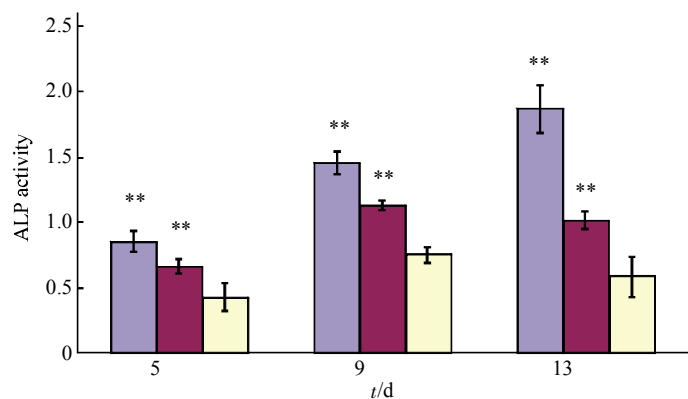


Fig. 4 Effect of the exposure to HBO on the expression of ALP in osteoblasts

Osteoblasts cultured under osteogenic conditions were treated with HBO and the extracellular ALP activity was measured at day 5, 9 and 13. Significant increase in ALP activity was detected as a result of HBO treatment compared with the untreated control group (** $P < 0.01$). (b) Significant colour different between HBO group and control group (1: Zero control, 2: 2.4ATA 90 min, 3: 1.5ATA 90 min, 4: Control). (c) Without oxygen, air pressure itself did not have any effect on calcium deposition. No changes were noted between the treated and untreated groups ($P > 0.05$). * $P < 0.05$.

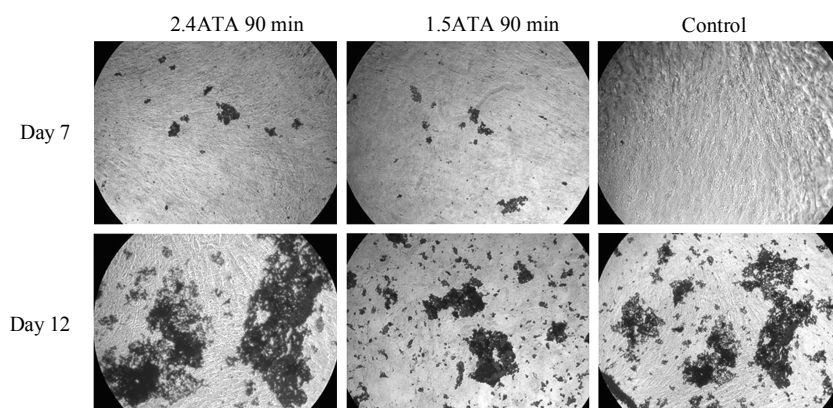


Fig. 5 Effect of the exposure to HBO on bone nodule formation

Osteoblasts cultured under osteogenic conditions were treated with HBO and bone nodule formation was assessed by von Kossa staining at day 7 and 12. At day 7 bone nodules were only detectable in HBO-treated cultures. At day 12 bone nodules were obvious in all cultures. However, they appeared larger in the HBO-treated cultures.

3 讨 论

高压氧的治疗机理包括：**a.** 高压氧能提高血氧分压，增加血氧含量及毛细血管血氧弥散距离，改善局部组织的缺氧状态；**b.** 高压氧能促进血管内皮细胞、纤维细胞分裂及胶原纤维产生，加速侧枝循环的建立，改善血液循环和组织营养状况，加速骨组织的修复；**c.** 高压氧能增加吞噬细胞吞噬和消化坏死组织的能力，加速坏死组织清除^[5, 7, 8]。本研究主要对来源于人牙槽骨的成骨细胞进行高压氧治疗，观察其对细胞增殖和分化的影响。

以往已有许多的报道报告了高压氧对细胞增殖的影响。如高压氧对人的皮肤成纤维细胞^[25, 26]、肝细胞^[27]和内皮细胞^[28, 29]增殖的促进作用。在无血清培养基条件下的研究发现，高压氧增加了正常人成纤维细胞的增殖和生长因子的产生^[25]；在连续 24 h 的高压氧治疗后，成纤维细胞增殖明显，同时 DNA 合成，蛋白质生成和复制率也有明显增加^[26]。Mizuguchi 等^[27]进行了高压氧对鼠肝细胞增殖影响的研究，结果表明，在高压氧治疗后第 1 天，实验组和对照组的肝细胞都出现了增殖，但在高压氧治疗后的第 3 天，多个组别的实验结果都显示高压氧组的肝细胞增殖显著高于对照组 ($P = 0.0033$)，因此他们的实验结论认为，适当的高压氧治疗能够刺激肝细胞的增殖，有利于提高肝脏的再生能力。相反，高压氧治疗抑制了淋巴细胞、早幼粒细胞^[30, 31]

和乳腺上皮细胞^[32]的增殖。如，Granowitz 等^[32]观察了高压氧对体外培养的乳腺细胞增殖的影响，研究结论认为，高压氧治疗抑制了良恶性乳腺上皮细胞的增殖，但没有增加细胞的死亡。上述研究采用了从 1.5ATA 到 3.0ATA 多个压力条件的高压氧治疗，大多数临床和动物实验研究均采用了这个范围的治疗压力，其中的 2.4ATA 是目前在临床治疗中最为常用的治疗压力，它既能够保证治疗的效果又不会对人体正常的组织造成伤害。在本研究中，我们使用了 1.5ATA 和 2.4ATA 两个治疗压力的高压氧与正常培养进行对照。

本研究中，高压氧对成骨细胞增殖的研究结果表明，高压氧治疗后的第 3 天就可检测到成骨细胞的明显增殖，表明高压氧刺激了成骨细胞而使其产生增殖。有报道认为，这个时间点的影响提示了高压氧与促进细胞生长的生长因子之间的关系，即高压氧治疗后生长因子的产生是促进细胞增殖的主要原因。高压氧治疗后生长因子自分泌产物的生成已被认为是促进细胞增殖的主要因素。更明确地说，大量的生长因子，包括血管内皮生长因子(VEGF)，成纤维细胞生长因子(b-FGF)和转化生长因子(TGF)等在高压氧治疗后都出现了增加^[25]。本研究中我们观察到，在常规的 10%小牛血清培养基条件下高压氧刺激了成骨细胞的增殖，而当培养基血清浓度降低到 2%的低浓度时，高压氧对成骨细胞的增殖是抑制的。在高压氧治疗中，培养基中血清对细胞

增殖所起的作用仍不清楚,但在有氧环境中,血清所起的保护性作用在以往的研究中已有描述^[33]。另外一个可能的因素是,在低血清浓度条件下,细胞对环境的改变更加敏感。本研究中,在 2% FCS 的低血清浓度条件下,1.5ATA 和 2.4ATA 高压空气的治疗影响了细胞的增殖。

在 10% FCS 和 2% FCS 培养液条件下,本研究均未发现高压氧对成骨细胞的毒性影响。这可能与本研究所选择的治疗压力和治疗时间有关。有研究表明,较长时间和超过 3.0ATA 的高压氧治疗,会由于细胞凋亡的增加而导致细胞增殖的减少,以往的研究认为这是高氧产生的氧自由基的毒性作用和过高压力的影响^[26,34]。这表明只有在氧和压力达到一定的平衡时才有利于细胞的生长,其中低浓度的氧自由基在伤口愈合中起重要作用,而高浓度的氧自由基和过氧化氢则被认为对细胞是有毒性作用的。这样的压力和治疗时间的相互关系,对于指导临床的高压氧治疗具有一定的意义。本研究中令人感兴趣的是,在 2% FCS 培养条件下,高压氧对成骨细胞的抑制作用究竟是细胞凋亡的增加还是 DNA 和蛋白质合成的减少,这有待于进一步的研究。

为了观察高压氧对成骨细胞分化的影响,本研究对高压氧治疗前后成骨细胞的钙沉积分析、骨结节形成的观察和碱性磷酸酶活性的分析表明,高压氧能够增加成骨细胞的成骨分化。其中采用的钙沉积分析方法是成骨分析的一种常用方法,它通过对沉积物中钙含量的测定,能够间接反映骨形成的多少。同时,碱性磷酸酶是成骨分化的重要生物学标记,它的增加表明了高压氧对成骨细胞成骨分化途径的调节作用。早在 20 世纪 60 年代, Bassett^[35]就研究了氧浓度和骨形成之间的关系。在低氧(5% 氧气)和缺氧培养的条件下,较多的软骨基质合成。而在富氧条件下,间充质组织分化成骨较多^[36]。我们的研究显示,在高压氧条件下,成骨细胞的成骨分化能力显著提高。而且可以观察到,在高压氧治疗的第 3 天就已经检测到明显的钙沉积出现。在临床的骨折愈合治疗中,早期较好质量的新骨生成是临床医师最为期望的一个结果,这对于骨折患者较快的康复具有积极的作用。本研究结果表明高压氧对成骨细胞成骨分化具有明显的促进作用,能够解释临床治疗中高压氧加快骨折愈合的效果,为临床采用高压氧治疗促进骨愈合提供了理论依据。以往的研究早已表明,高压氧治疗能够促进骨折的愈

合^[12,16,37,38],但尚未有高压氧对人成骨细胞影响的研究报道。然而,一部分的研究报道了缺氧条件下细胞增殖的减少和成骨细胞血管内皮生长因子表达的增加^[39~42],这也从另外一方面印证了高氧或有氧条件对细胞增殖的促进作用。其他的研究表明,在缺氧条件下,观察到了类成骨细胞系(MC3T-E1)的增殖减少^[42]。还有一些临床和动物实验的研究报道了高压氧对细胞成骨活性的影响,如通过骨形成蛋白(BMP)产生加速骨引导的特性,加快了自体骨移植中的骨愈合和在口腔种植治疗中增加骨的形成等^[19,43,44]。以往的这些研究揭示了氧分压在骨改建过程中三个主要作用,即调节胶原合成、碱性磷酸酶活性和转化生长因子(TGF)^[39,40]。细胞分化过程中氧的作用机理已被证实与调节 Sox9 和 Runx2 的转录活性有关^[36]。由于高压氧刺激了一氧化氮(NO)的合成,治疗后增加了组织和骨髓中一氧化氮的水平,而一氧化氮的增加能够动员骨创伤区干细胞和内皮祖细胞生成^[29,45]。

本研究结果表明,成骨细胞在常规的 10% 小牛血清培养基条件下培养时,高压氧刺激了细胞的增殖。反之,在低血清浓度的 2% 小牛血清培养基条件下培养时,高压氧抑制了成骨细胞的增殖。另外,分化培养的研究结果显示,通过对钙沉积、碱性磷酸酶活性的分析和钙节结形成的观察,高压氧治疗对细胞的分化起积极的促进作用,显示了高压氧治疗明显刺激了成骨细胞的成骨分化。

总之,本研究的结果提供了在成骨化过程中高压氧所起作用的直接的细胞学证据,为临床应用高压氧促进骨折愈合和引导骨形成提供了理论依据。目前,高压氧对细胞影响的研究逐渐深入,其对细胞因子的影响和高压氧诱发细胞突变等方面的研究已有报道^[46~48],这些研究更进一步探讨了高压氧治疗的机理,已有可能使用基因分析的方法,检测高压氧对蛋白质产物在基因方面的影响。此外,有关高压氧对成骨细胞凋亡和 DNA 合成等的影响也将进行更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 Bakker D, Cramer F. Hyperbaric Surgery. Best Publishing Company, 2002. 2~12
- 2 Bennett M H, Stanford R, Turner R, *et al.* Hyperbaric oxygen therapy for promoting fracture healing and treating fracture non-union. J Cochrane Database Syst Rev, 2005, (1): CD004712
- 3 Ueng S W, Lee S S, Lin S S, *et al.* Hyperbaric oxygen therapy mitigates the adverse effect of cigarette smoking on the bone healing

- of tibial lengthening: an experimental study on rabbits. *J Trauma*, 1999, **47** (4): 752~759
- 4 Urayama H, Takemura H, Kasajima F, *et al.* Hyperbaric oxygenation therapy for chronic occlusive arterial diseases of the extremities. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 1992, **93** (4): 429~433
 - 5 Ang E, Black C, Irish J, *et al.* Reconstructive options in the treatment of osteoradionecrosis of the craniomaxillofacial skeleton. *Br J Plast Surg*, 2003, **56** (2): 92~99
 - 6 Braune C, Hamm J, Bohmer D, *et al.* Hyperbaric oxygenation as a successful therapeutic approach in oral wound dehiscence after operative stabilization of an unstable post-traumatic odontoid non-union. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2002, **122** (2): 115~119
 - 7 Mainous E G, Hart G B. Osteoradionecrosis of the mandible. Treatment with hyperbaric oxygen. *Arch Otolaryngol*, 1975, **101** (3): 173~177
 - 8 van Merkesteyn J P, Balm A J, Bakker D J, *et al.* Hyperbaric oxygen treatment of osteoradionecrosis of the mandible with repeated pathologic fracture. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1994, **77** (5): 461~464
 - 9 Polyzois V D, Papakostas I, Stamatis E D, *et al.* Current concepts in delayed bone union and non-union. *Clin Podiatr Med Surg*, 2006, **23** (2): 445~453
 - 10 Soucacos P N, Dailiana Z, Beris A E, *et al.* Vascularised bone grafts for the management of non-union. *Injury*, 2006, **37** (Suppl): 41~50
 - 11 Kerwin S C, Lewis D D, Elkins A D, *et al.* Effect of hyperbaric oxygen treatment on incorporation of an autogenous cancellous bone graft in a nonunion diaphyseal ulnar defect in cats. *Am J Vet Res*, 2000, **61** (6): 691~698
 - 12 Wray J B, Rogers L S. Effect of hyperbaric oxygenation upon fracture healing in the rat. *J Surg Res*, 1968, **8** (8): 373~378
 - 13 Yablon I G, Cruess R L. The effect of hyperbaric oxygen on fracture healing in rats. *J Trauma*, 1968, **8** (2): 186~202
 - 14 Lentrodt S, Lentrodt J. Effects of hyperbaric oxygen therapy (HBO) during treatment of infected free bone transplants. A case report. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2006, **10** (4): 263~268
 - 15 Donovan D J, Huynh T V, Purdom E B, *et al.* Osteoradionecrosis of the cervical spine resulting from radiotherapy for primary head and neck malignancies: operative and nonoperative management. Case report. *J Neurosurg Spine*, 2005, **3** (2): 159~164
 - 16 David L A, Sandor G K, Evans A W, *et al.* Hyperbaric oxygen therapy and mandibular osteoradionecrosis: a retrospective study and analysis of treatment outcomes. *J Can Dent Assoc*, 2001, **67** (7): 384
 - 17 Clark C L, Strider J, Hall C, *et al.* Distraction osteogenesis in irradiated rabbit mandibles with adjunctive hyperbaric oxygen therapy. *J Oral Maxillofac Surg*, 2006, **64** (4): 589~593
 - 18 Wang I C, Yuan L J, Tu Y K, *et al.* Early administration of hyperbaric oxygen therapy in distraction osteogenesis—a quantitative study in New Zealand rabbits. *J Trauma*, 2005, **58** (6): 1230~1235
 - 19 Sawai T, Niimi A, Takahashi H, *et al.* Histologic study of the effect of hyperbaric oxygen therapy on autogenous free bone grafts. *J Oral Maxillofac Surg*, 1996, **54** (8): 975~981
 - 20 Granstrom G, Tjellsrom A, Branemark P I. Osseointegrated implants in irradiated bone: a case-controlled study using adjunctive hyperbaric oxygen therapy. *J Oral Maxillofac Surg*, 1999, **57** (5): 493~499
 - 21 Esposito M, Grusovin M G, Worthington H V, *et al.* Interventions for replacing missing teeth: bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006, (1), CD003607
 - 22 Ueng S W, Lee S S, Lin S S, *et al.* Bone healing of tibial lengthening is enhanced by hyperbaric oxygen therapy: a study of bone mineral density and torsional strength on rabbits. *J Trauma*, 1998, **44** (4): 676~681
 - 23 Annane D, Depondt J, Aubert P, *et al.* Hyperbaric oxygen therapy for radionecrosis of the jaw: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial from the ORN96 study group. *J Clin Oncol*, 2004, **22** (24): 4893~4900
 - 24 Laden G. Hyperbaric oxygen therapy for radionecrosis: clear advice from confusing data. *J Clin Oncol*, 2005, **23** (19): 4466~4468
 - 25 Kang T S, Gorti G K, Quan S Y, *et al.* Effect of hyperbaric oxygen on the growth factor profile of fibroblasts. *Arch Facial Plast Surg*, 2004, **6** (1): 31~35
 - 26 Conconi M T, Baiguera S, Guidolin D, *et al.* Effects of hyperbaric oxygen on proliferative and apoptotic activities and reactive oxygen species generation in mouse fibroblast 3T3/J2 cell line. *J Investig Med*, 2003, **51** (4): 227~232
 - 27 Mizuguchi T, Oshima H, Imaizumi H, *et al.* Hyperbaric oxygen stimulates cell proliferation and normalizes multidrug resistance protein-2 protein localization in primary rat hepatocytes. *Wound Repair Regen*, 2005, **13** (6): 551~557
 - 28 Tompach P C, Lew D, Stoll J L, *et al.* Cell response to hyperbaric oxygen treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1997, **26** (2): 82~86
 - 29 Goldstein L J, Gallagher K A, Bauer S M, *et al.* Endothelial progenitor cell release into circulation is triggered by hyperoxia-induced increases in bone marrow nitric oxide. *Stem Cells*, 2006, **24** (10): 2309~2318
 - 30 Gadd M A, McClellan D S, Neuman T S, *et al.* Effect of hyperbaric oxygen on murine neutrophil and T-lymphocyte functions. *Crit Care Med*, 1990, **18** (9): 974~979
 - 31 McIntyre K M, Dixon P S, Krock L P, *et al.* The influence of hyperbaric oxygenation on leukocyte viability and surface protein expression. *Aviat Space Environ Med*, 1997, **68** (12): 1129~1133
 - 32 Granowitz E V, Tonomura N, Benson R M, *et al.* Hyperbaric oxygen inhibits benign and malignant human mammary epithelial cell proliferation. *Anticancer Res*, 2005, **25** (6B): 3833~3842
 - 33 Burdon R H, Gill V, Rice-Evans C, *et al.* Oxidative stress and tumour cell proliferation. *Free Radic Res Commun*, 1990, **11** (1-3): 65~76
 - 34 Ganguly B J, Tonomura N, Benson R M, *et al.* Hyperbaric oxygen enhances apoptosis in hematopoietic cells. *Apoptosis*, 2002, **7** (6): 499~510
 - 35 Bassett C A, Herrmann I. Influence of oxygen concentration and

- mechanical factors on differentiation of connective tissues *in vitro*. Nature, 1961, **190**: 460~461
- 36 Hirao M, Tamai N, Tsumaki N, *et al*. Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. J Biol Chem, 2006, **281** (41): 31079~31092
 - 37 Dayoydkin N F. Healing of a closed fracture with the use of hyperbaric oxygenation. Ortop Travmatol Protez, 1977, (2): 7~9
 - 38 Penttinen R, Niinikoski J, Kulonen E, *et al*. Hyperbaric oxygenation and fracture healing. A biochemical study with rats. Acta Chir Scand, 1972, **138** (1): 39~44
 - 39 Warren S M, Steinbrech D S, Mehrara B J, *et al*. Hypoxia regulates osteoblast gene expression. J Surg Res, 2001, **99** (1): 147~155
 - 40 Tuncay O C, Ho D, Barker M K, *et al*. Oxygen tension regulates osteoblast function. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1994, **105** (5): 457~463
 - 41 Steinbrech D S, Mehrara B J, Saadeh P B, *et al*. Hypoxia increases insulinlike growth factor gene expression in rat osteoblasts. Ann Plast Surg, 2000, **44** (5): 529~534
 - 42 Steinbrech D S, Mehrara B J, Saadeh P B, *et al*. Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts *in vitro*. Plast Reconstr Surg, 1999, **104** (3): 738~747
 - 43 Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, *et al*. Effect of hyperbaric oxygenation on bone induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2. British J of Oral and Maxillo Surgery, 2001, **39** (2): 91~95
 - 44 Johnsson A A, Sawaii T, Jacobsson M, *et al*. A histomorphometric study of bone reactions to titanium implants in irradiated bone and the effect of hyperbaric oxygen treatment. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999, **14** (5): 699~706
 - 45 Thom S R, Bhopale V M, Velazquez O C, *et al*. Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, **290** (4): H1378~1386
 - 46 Andreas Rothfub, Wolfgang Stahl, Peter Radermacher. Evaluation of mutagenic effect of hyperbaric oxygen *in vitro*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 1999, **34**: 291~296
 - 47 Patel V, Chivukula I, Roy S. Oxygen: From the benefits of inducing VEGF expression to managing the risk of hyperbaric stress. Antioxidants and Redox Signaling, 2005, **7** (9~10):1377~1387
 - 48 Hinoi E, Takarada T, Tsuchihashi Y, *et al*. A molecular mechanism of pyruvate protection against cytotoxicity of reactive oxygen species in osteoblasts. Molecular Pharmacology Fast Forward. 2006, **70** (3): 925~935

Effect of Hyperbaric Oxygen on Proliferation and Differentiation of Osteoblasts *In vitro**

WU Dong^{1,2)}, WU Jian-Shan³⁾, YAN Fu-Hua¹⁾, CHEN Jiang^{1)**}

⁽¹⁾School of Stomatology of Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China; ⁽²⁾Department of Stomatology, Fuzhou No.8 Hospital, Fuzhou 350013, China; ⁽³⁾Department of Modern Medical, Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

Abstract In order to investigate the effects of hyperbaric oxygen (HBO) on the proliferation and differentiation of human osteoblasts isolated from alveolar bone under various pressure and exposure time, osteoblasts from human alveolar bone were seeded in 24 well plates at a cell density of 2 500 cells per well. There are four treatment groups which were 2.4ATA for 90 min, 2.4ATA for 30 min, 1.5ATA for 90 min and 1.5ATA for 30 min. Osteoblasts culture were treated one time everyday for up to 10 days in a temperature and humidity controlled custom-made seven-litre hyperbaric unit. Control samples were incubated in a standard humidified incubator at 37°C containing 5% CO₂ and 95% atmospheric air. Proliferation of osteoblasts were evaluated by WST-1 assay before and 16 h after HBO on day 1,2,3,4,6,8,10. The cytotoxic effect of HBO on osteoblasts was assessed by a toxicology assay kit. For differentiation study, osteoblasts were seeded in 96 well plates at a cell density of 10 000 cells per well. After 3 days normal culture, medium was changed to osteogenic medium. Subsequently, cultures were exposed daily to HBO of 2.4ATA for 90 min and 1.5ATA for 90 min up to 13 days. Mineralization was evaluated by calcium deposition assay, alkaline phosphatase (ALP) activity and von Kossa staining. To assess the effect of pressure on cell proliferation and differentiation, hyperbaric air treatment was observed in this study. It showed that HBO treatment promotes proliferation of osteoblast in the presence of 10% foetal calf serum (FCS). No significant change in extracellular LDH activity before and after HBO treatment. The study of differentiation demonstrated that HBO enhanced differentiation associated with increased bone nodule formation, calcium deposition and alkaline phosphatase activity. These result suggests that HBO treatment

significantly stimulated osteogenic differentiation, which implies a potential application of HBO in bone tissue engineering.

Key words hyperbaric oxygen, osteoblast, proliferation, differentiation

*This work was supported by grants from China Overseas Visiting Scholar Program (2003935010), The Prince Charles Hospital Foundation, Brisbane, Australia (FRC 0206-22) and National Health and Medicine Research Center(NHMRC), Australia (199925).

**Corresponding author.

Tel: 86-501-83754882, E-mail: dentistjiang@sina.com

Received: December 9, 2007 Accepted: March 2, 2008