

文章编号: 0258-7025(2004)12-1543-04

He-Ne 激光对兔正畸牙周组织血管改建影响的实验研究

孙新华¹, 王 旭¹, 张晓英²

(吉林大学口腔医学院¹ 正畸科, ² 激光科, 吉林 长春 130041)

摘要 采用 CD34 抗体标记正畸牙周组织的血管内皮细胞, 探讨 He-Ne 激光照射对兔正畸牙周组织血管改建的影响。35 只大耳白兔随机分未加力组及加力组, 对实验标本进行 CD34 免疫组化染色, 用计算机图像分析系统测定正畸牙周组织的微血管密度(MVD)与微血管面积(MVA), 应用 SPSS 统计软件进行统计学分析。经 He-Ne 激光照射侧的微血管密度与微血管面积均普遍大于对照侧。除加力 1d 组外, 其余各加力组照射侧与对照侧之间的微血管密度、微血管面积的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

关键词 医用光学与生物技术; 口腔正畸; 血管改建; He-Ne 激光; 免疫组化; CD34

中图分类号 R 783.5 文献标识码 A

Effect of He-Ne Laser Irradiation on the Blood Vessel Remodeling of Orthodontic Periodontal Tissue of Rabbit

SUN Xin-hua¹, WANG Xu¹, ZHANG Xiao-ying²

(¹Department of Orthodontics, ²Department of Laser,
School of Stomatology, Jilin University, Changchun, Jilin 130041, China)

Abstract Applying the antibody of CD34 stained the vascular endothelial cell of periodontal tissue and investigated the effects of He-Ne laser irradiation on the blood vessel remodeling (BVR) of orthodontic periodontal tissue in rabbit. 35 rabbits were divided into normal group and experimental group randomly. All of the tissue sections proceeded with CD34 immunohistochemical staining, measured the microvessel density (MVD) the microvessel area (MVA) of periodontal tissue by computer image analyzing system using SPSS software to proceed with statistic test. MVD and MVA received He-Ne laser irradiation were higher than those of the control side. The differences of MVD, MVA between the irradiated and control side in every experimental group were all significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$), except for the 1st day group.

Key words medical optics and biotechnology; orthodontics; blood vessel remodeling; He-Ne laser; immunohistochemistry; CD34

正畸牙齿移动依赖于牙周组织改建这一复杂的过程。血管改建是正畸牙周组织改建的基础, 也是评价正畸牙周组织改建活跃性的一项重要指标。已有研究证实, CD34 是目前血管内皮细胞最可靠的标记物, 可以用来检测微血管的构筑^[1,2]。目前许多研究已公认弱激光对机体有生物刺激作用, 但较

少见关于 He-Ne 激光对正畸牙周组织血管改建影响作用方面的研究报道^[3]。本实验采用 CD34 标记兔正畸牙周组织的血管, 探讨通过 He-Ne 激光的局部照射对兔正畸牙周组织血管改建的影响作用, 为在口腔正畸临床中推广应用弱激光提供理论依据。

收稿日期: 2003-06-09; 收到修改稿日期: 2003-12-05

基金项目: 吉林大学创新基金(编号: 2002085)资助项目。

作者简介: 孙新华(1954—), 女, 辽宁省沈阳市人, 吉林大学口腔医院正畸科教授, 硕士研究生导师, 主要从事口腔正畸牙齿移动生物学方面的研究。E-mail: s_xinhua@yahoo.com.cn

1 材料和方法

选用体重 2.0 kg 左右的日本大耳白兔,雌雄不限,随机将其分为未加力组(正常组)与加力 1,3,5,7,14,21d 组,每组 5 只,共 35 只。右侧为 He-Ne 激光照射侧,左侧为对照侧。

称重后 2% 戊巴比妥钠行兔耳缘静脉麻醉(2 mL/kg),于双侧上颌第一磨牙及相应上颌切牙间拴结不锈钢闭合螺簧。以上颌切牙为支抗,牵引上颌第一磨牙向近中移动,经正畸测力计(ZL-1 型)测定双侧力值均为 80 g。

将兔右侧上颌第一磨牙相应的颊部备皮,经 He-Ne 激光局部照射。激光波长 632.8 nm,输出功率 20 mW,功率密度 2.83 mW/cm²,能量密度 2.5 J/cm²,照射距离 50 cm,光斑直径 3.0 cm,照射时间 15 min,每日一次。除 1d,3d 组分别照射 1 次,3 次外,其余各组均照射 5 次。

正常组动物未做任何处置,饲养一周后处死。加力组实验动物均分别于 1,3,5,7,14,21d 应用 4% 多聚甲醛颈总动脉灌注后处死。切取上颌骨组织,固定 1 周后,修整并保留上颌第一磨牙近、远中的牙槽骨组织作为组织标本,乙二胺二乙酸(EDTA)脱钙。常规酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。组织标本切片,经 CD34 免疫组化染色(CD34 单克隆抗体,SP 免疫组化试剂盒产品编号: MAB-0034)。每组标本选取 5 张切片,在每张切片的压力

区和张力区分别随机选取 5 个低倍视野,运用计算机图像系统(HPIAS-1000)进行图像分析。利用图像分析软件的功能对 CD34 染色阳性的血管进行描记。系统将自动计算出所描记的微血管个数及面积并求出其平均数。

应用 SPSS10.0 统计软件,对加力组照射侧与对照侧图像分析所得数据结果进行照射侧与对照侧两样本比较的时间检验统计分析。

2 结 果

2.1 压力区的对比分析

如表 1,2 中,统计学分析表明在牙周组织的压力区,除加力 1d 组的微血管密度、微血管面积照射侧与对照侧的差异无统计学意义以外,照射侧压力区 3d,5d 组的微血管密度、微血管面积与对照侧均有显著性差异, $P < 0.01$; 7d,14d,21d 组照射侧与对照侧的微血管密度、微血管面积均有统计学意义, $P < 0.05$ 。表明 He-Ne 激光照射有效地促进了正畸牙周组织压力区的血管新生。表 1,表 2 还显示与未加力组相比,在压力区照射侧的微血管密度从加力 1d 组至加力 21d 组均高于未加力组;在压力区照射侧的微血管面积从加力 3d 组开始高于未加力组。而对照侧压力区的微血管密度从加力 3d 组开始高于未加力组,对照侧压力区的微血管面积亦从加力 3d 组开始高于未加力组(表 1,2 中,与对照组

表 1 压力区 He-Ne 激光照射侧与对照侧微血管密度的比较($\bar{X} \pm SD$)

Table 1 MVD of the irradiated and control side in the pressure zone ($\bar{X} \pm SD$)

| Group | Irradiated side | Control side | <i>t</i> | <i>P</i> |
|-------|-----------------|--------------|----------|-----------------|
| 1d | 8.09 ± 5.27 | 5.62 ± 5.74 | 1.262 | 0.243 |
| 3d | 14.33 ± 2.38 | 8.76 ± 1.95 | 6.881 | $P < 0.01^{**}$ |
| 5d | 15.28 ± 4.32 | 9.78 ± 4.39 | 3.555 | $P < 0.01^{**}$ |
| 7d | 20.34 ± 6.06 | 13.58 ± 8.29 | 2.915 | $P < 0.05^*$ |
| 14d | 15.28 ± 1.92 | 10.34 ± 5.55 | 3.350 | $P < 0.05^*$ |
| 21d | 13.24 ± 7.81 | 8.20 ± 5.77 | 2.231 | $P < 0.05^*$ |

Normal group MVD: 7.42 ± 3.35 (MVD number/mm²)

表 2 压力区 He-Ne 激光照射侧与对照侧微血管面积的比较($\bar{X} \pm SD$)

Table 2 MVA of the irradiated and control side in the pressure zone ($\bar{X} \pm SD$)

| Group | Irradiated side | Control side | <i>t</i> | <i>P</i> |
|-------|------------------|------------------|----------|-----------------|
| 1d | 1177.19 ± 248.38 | 1078.65 ± 415.13 | 0.811 | 0.441 |
| 3d | 1965.73 ± 589.58 | 1258.09 ± 565.40 | 3.448 | $P < 0.01^{**}$ |
| 5d | 2303.82 ± 779.93 | 1450.67 ± 514.18 | 3.635 | $P < 0.01^{**}$ |
| 7d | 2949.55 ± 786.70 | 2217.53 ± 443.04 | 3.227 | $P < 0.05^*$ |
| 14d | 2304.04 ± 394.61 | 1584.72 ± 261.48 | 6.048 | $P < 0.01^{**}$ |
| 21d | 1910.79 ± 605.07 | 1303.03 ± 625.20 | 2.780 | $P < 0.05^*$ |

Normal group MVA: 1248.99 ± 210.88 (MVA μm²)

相比, * 表示有差异, ** 表示有显著差异)。

2.2 张力区的对比分析

由表 3,4 可以看出,统计学分析表明在牙周组织的张力区,除加力 1d 组照射侧与对照侧差异无统计学意义以外,其余各加力组照射侧与对照侧的微血管密度、微血管面积均有统计学意义。照射侧张力区的微血管密度、微血管面积始终明显高于对照侧,14d 的微血管密度于 21d 的微血管密度、微血管面积与对照侧有显著性差异, $P < 0.01$ 。其余各组

照射侧与对照侧的微血管密度、微血管面积均有统计学意义, $P < 0.05$ 。表明 He-Ne 激光照射有效地促进了正畸牙周组织张力区的血管新生。与未加力组相比,从表 3,表 4 还可以看出,照射侧张力区的微血管密度与微血管面积从加力 1d 至 21d 组均高于未加力的正常组;对照侧张力区的微血管密度从加力 3d 组开始高于未加力组;微血管面积从加力 1d 组至加力 21d 组均高于未加力组(表 3,4 中,与对照组相比, * 表示有差异, ** 表示有显著差异)。

表 3 张力区 He-Ne 激光照射侧与对照侧微血管密度的比较 ($\bar{X} \pm SD$)
Table 3 MVD of the irradiated and control side in the tension zone ($\bar{X} \pm SD$)

| Group | Irradiated side | Control side | t | P |
|-------|-----------------|--------------|-------|-----------------|
| 1d | 9.44±5.85 | 6.18±6.67 | 1.462 | 0.182 |
| 3d | 14.38±11.63 | 7.08±3.36 | 2.401 | $P < 0.05^*$ |
| 5d | 15.49±10.60 | 8.76±9.71 | 2.172 | $P < 0.05^*$ |
| 7d | 20.79±11.34 | 13.03±8.60 | 2.645 | $P < 0.05^*$ |
| 14d | 15.90±5.94 | 11.05±4.83 | 3.971 | $P < 0.01^{**}$ |
| 21d | 13.82±4.56 | 10.11±2.24 | 2.905 | $P < 0.05^*$ |

Normal group MVD: 6.74±5.10 (MVD number/mm²)

表 4 张力区 He-Ne 激光照射侧与对照侧微血管面积的比较 ($\bar{X} \pm SD$)
Table 4 MVA of the irradiated and control side in the tension zone ($\bar{X} \pm SD$)

| Group | Irradiated side | Control side | t | P |
|-------|-----------------|-----------------|-------|-----------------|
| 1d | 1382.91±2184.90 | 1273.49±1048.99 | 0.268 | 0.791 |
| 3d | 2176.85±1090.99 | 1365.62±399.22 | 2.779 | $P < 0.05^*$ |
| 5d | 2741.57±975.03 | 1979.55±861.00 | 2.332 | $P < 0.05^*$ |
| 7d | 3284.16±1051.65 | 2426.63±640.20 | 2.772 | $P < 0.05^*$ |
| 14d | 2600.11±649.03 | 1883.37±303.23 | 3.982 | $P < 0.01^{**}$ |
| 21d | 2087.64±464.65 | 1319.21±455.01 | 4.703 | $P < 0.01^{**}$ |

Normal group MVA: 1197.26±1264.24 (MVA μm^2)

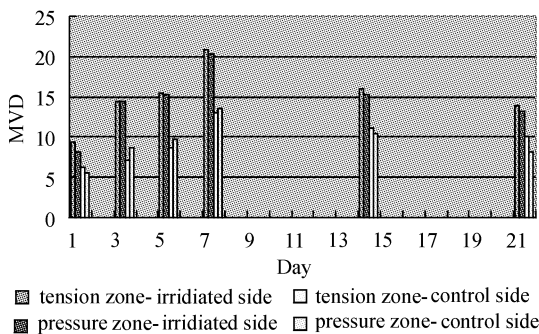


图 1 He-Ne 激光照射侧与对照侧张力区与压力区微血管密度变化的比较

Fig.1 MVD's comparisons between He-Ne laser irradiated and the control side in the tension and pressure zone

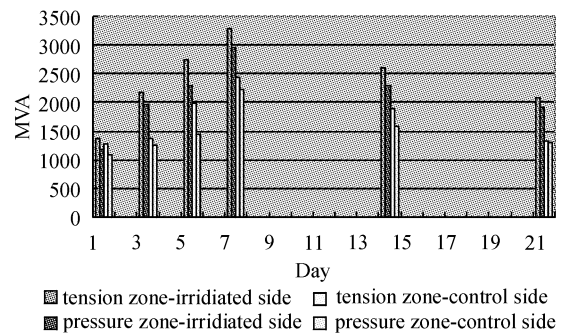


图 2 He-Ne 激光照射侧与对照侧张力区与压力区微血管面积变化的比较

Fig.2 MVA's comparisons between He-Ne laser irradiated and the control side in the tension and pressure zone

2.3 张力区与压力区微血管密度变化的比较

由图 1 可以看出,无论在张力区、压力区,He-

Ne 激光照射侧的微血管密度在各加力天数均明显高于对照侧,表明照射侧单位面积内血管新生的个

数显著高于对照侧。

2.4 张力区与压力区微血管面积变化的比较

由图 2 可以看出,无论在张力区,还是在压力区,He-Ne 激光照射侧的微血管面积在各加力天数都明显高于对照侧。

3 讨 论

在正畸牙齿移动过程中,牙周组织的血管改建起着十分重要的作用。由于以往研究方法的局限,对正畸血管化的研究受到影响。CD34 分子是细胞表面高度糖基化的 I 型跨膜糖蛋白,作为血管内皮细胞表面分子,可用于标记血管内皮细胞。其突出优点是不需向血管内灌注填充剂、示踪剂等物;不受灌注充盈的影响,对毛细血管无刺激作用;保持了微血管的自然状态和管径大小;对未形成管腔或管腔过小的新生血管也能显示^[4]。有学者证实,用抗 CD34 抗体作微血管染色较之 CD31 和第八因子能提供更多有用的和可靠的信息^[5,6]。因此用 CD34 免疫组化染色方法研究正畸牙周组织血管改建应是有效而可靠的方法。

He-Ne 激光照射能有效地促进血管的新生^[7]。杨俊等^[8]经研究认为,He-Ne 激光能促进兔骨折端血循环重建,从而促进兔新鲜骨折的愈合。实验结果显示,在对照侧兔正畸牙周组织压力区与张力区的微血管密度、微血管面积要高于未加力的正常组,这表明兔正畸牙周组织在受力后存在一个血管改建的过程。而经 He-Ne 激光照射后,照射侧的兔正畸牙周组织中的微血管密度、微血管面积的表达增强,与对照侧存在着显著的差异;表明经 He-Ne 激光照射后促进了兔正畸牙周组织的血管新生,提示 He-Ne 激光照射可以促进正畸过程中牙周组织的血管改建过程。

推测 He-Ne 激光促进正畸牙周组织血管改建过程的作用主要表现为弱激光的生物刺激效应。它可使牙周组织中的巨噬细胞和内皮细胞的活性增加,从而增加血管活性因子的释放,加速血管内皮细胞的复制,促进牙周组织的血管新生,从而促进牙周组织的血管改建过程。现代细胞生物学研究认为,任何刺激信号都要通过特定的受体或离子通道等由细胞外传导到细胞内,再经过特定的细胞内信号传导途径,诱导核内的基因表达细胞的生物学效应^[9]。弱激光的生物刺激效应可能是通过刺激信号传导系

统而促使血管生成因子活化,从而促进血管新生。

正畸牙周组织的血管改建是骨改建的前提与基础。已有研究显示弱激光照射能加速兔正畸牙齿移动速度:在弱激光照射侧,破骨活动与成骨活动均活跃于对照侧^[10]。而本实验则进一步证实了弱激光照射能促进正畸牙周组织的血管改建;从而能进一步促进正畸牙周组织的骨改建。本研究为弱激光在正畸临床的推广应用进一步提供了理论依据。

参 考 文 献

- Helen C. Hollingsworth, Elise C. Kohn, Seth M. Steinberg *et al.*. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma [J]. *Amer. J. Pathol.*, 1995, **147**(1):33~41
- Luo Le, Zong Renhe, Yan Zhongya *et al.*. Study on laser myocardial revascularization improving myocardial blood microcirculation [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(3):285~287
罗 乐,宗仁鹤,严中亚等. 激光心肌血管重建术改善心肌血液微循环的研究[J]. 中国激光, 2003, **30**(3):285~287
- Jia Yali, Guo Zhouyi. Influence of low-energy He-Ne laser irradiation on rabbit hyaline chondrocytes activity [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(5):635~639
贾雅丽,郭周义. 低强度 He-Ne 激光辐射对兔透明软骨细胞活性的影响[J]. 中国激光, 2004, **31**(5):635~639
- Li Xiaojing, Ning Jinlong, Zhang Lin. The application of CD34 histochemical method in the study of micro-vascular architecture of human scar [J]. *The Chinese Journal of Burns Wounds & Surface Ulcers*, 2000, **42**(1):13~15
李小静,宁金龙,张 林. CD34 组化法在瘢痕微血管构筑中的应用研究[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2000, **42**(1):13~15
- Xue Gang, Yao Zhenxiang. MVD and clinical significance of thyroid gland cancer [J]. *Chinese Journal of Surgery*, 2000, **38**(8):636
薛 刚,姚榛祥. 甲状腺癌的微血管密度及其临床意义[J]. 中华外科杂志, 2000, **38**(8):636
- T. Yano, S. Tanikawa, T. Fujie *et al.*. Vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in non-small cell lung cancer [J]. *Eur. J. Cancer*, 2000, **36**(5):601~609
- Y. Takahashi, S. Hitomi, T. Hirata *et al.*. Neovascularization effect with He-Ne laser in the rat trachea [J]. *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1992, **40**(5):288~291
- Yang Jun, Wu Siqian, Huang Zhaomin. The experimental study of the effect of helium-neon laser irradiation on the fracture healing in rabbits [J]. *The Journal of Bone and Joint Injury*, 1999, **14**(2):111~113
杨 俊,吴思乾,黄兆民. 低功率 He-Ne 激光照射对兔骨折愈合影响的实验研究[J]. 骨与关节损伤杂志, 1999, **14**(2):111~113
- Li Xiaomei, Tang Jiahui, Wang Haiyan. Effect of interleukin-1 on subfamily of mitogen-activated protein kinases in renal mesangial cells [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 1998, **14**(4):300~302
李晓玫,唐嘉薇,王海燕. 白细胞介素 1 对肾系膜细胞分裂原活化蛋白激酶不同亚类的作用[J]. 中国免疫学杂志, 1998, **14**(4):300~302
- Sun Xinhua, Zhu Xianchun, Xu Chengwei *et al.*. Effects of low energy laser on tooth movement and remodeling of alveolar bone in rabbits [J]. *West China Journal of Stomatology*, 2001, **19**(5):290~293
孙新华,朱宪春,徐成伟等. 弱激光照射对兔牙移动速度及骨改建影响的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2001, **19**(5):290~293