

文章编号: 0258-7025(2005)05-0723-06

强激光束边缘对单层皮肤成纤维细胞的光生物调节作用

黄 平^{1,2}, 刘承宜^{1,2*}, 徐晓阳¹, 角建瓴⁴, 朱 玲^{1,3}, 李 竹¹, 刘颂豪²
(华南师范大学¹ 激光运动医学实验室,² 信息光电子科技学院,³ 生命科学院, 广东 广州 510631)
⁴暨南大学医学院, 广东 广州 510630

摘要 用单层人类正常皮肤成纤维细胞(HSFs)作为细胞模型,研究高强度激光束边缘低强度激光的光生物调节作用。分别用 1064 nm 和 532 nm 脉冲激光对 24 组培养的 HSFs 单层细胞进行照射。研究发现,高脉冲能量的照射导致较低存活率和较大的损伤半径。对接受 1064 nm 照射的 HSFs,100 mJ 照射组和 150 mJ 照射组在照射 24 h 和 48 h 后检测发现显著促进增殖;而对 532 nm 照射的 HSFs,100 mJ 照射组在照射 24 h 和 48 h 后检测发现受到显著抑制增殖。这些结果表明,高强度激光束边缘低强度激光存在光生物调节作用,这可能是影响外科激光的长期效应的重要因素。

关键词 医用光学与生物技术;光生物调节作用;成纤维细胞

中图分类号 Q631; Q253 **文献标识码** A

Photobiomodulation Action of the Marginal Irradiation of High Intensity KTP Laser Irradiations on Monolayer Skin Fibroblasts

HUANG Ping^{1,2}, LIU Cheng-yi^{1,2}, XU Xiao-yang¹, JIAO Jian-ling⁴,
ZHU Ling^{1,3}, LI Zhu¹, LIU Shong-hao²

¹ Laboratory of Laser Sports Medicine, College of Sports Science,
² School for Information and Optoelectronic Science and Engineering,
³ College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China
⁴ Medical College, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510630, China

Abstract In this study, cultured monolayer normal human skin fibroblasts (HSFs) were irradiated with the fundamental (1064 nm) and the second harmonics (532 nm) waves of Q-switched Nd:YAG laser beams, to study the photobiomodulation of marginal irradiation of high intensity laser beam. For each laser beam, the power output ranged from 0.2~1 W in pulsed mode, and the irradiation time was fixed at 20 s. Cell proliferation was performed by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay immediately after laser treatment 24 hours and 48 hours, respectively. It was found that high pulse energy irradiation results in small survival rate and large damage radius, and HSFs proliferation was significantly promoted after 24 hours/48 hours 1064 nm laser treatment with 100 mJ and 150 mJ pulse energy, but significantly inhibited after 24 hours/48 hours 532 nm laser treatment with 100 mJ pulse energy. These results indicate that there is the photobiomodulation for marginal irradiation of high intensity laser beam, which might play an important role in the long term effects of laser surgery.

Key words mechanical optics and biotechnology; photobiomodulation; fibroblasts

收稿日期: 2004-04-30; 收到修改稿日期: 2004-05-20

基金项目: 美国激光医学会 2002 年度暑期资助项目、国家自然科学基金(60478048, 60178003 和 6027812)、广东省自然科学基金重点项目(20011480)和一般项目(20031526)、激光技术国家实验室开放基金和广东省“千百十工程”优秀人才培养基金(Q02087)资助项目。

作者简介: 黄 平(1979—),男,华南师范大学激光运动医学实验室硕士研究生,主要从事低强度激光对生物细胞效应的研究。E-mail: kenneth_wong@163.com

* 通信联系人。E-mail: liutcy@scnu.edu.cn

1 引 言

激光外科是发展得最快的激光医学分支之一, 由于临床和商业的推动, 各种波段的激光器相继投入使用, 使人们开始从各种角度考虑激光器的选择, 尤其是激光外科的副效应^[1]。心肌血管重建术(TMLR)是用于解决心肌缺血症的一种外科手术。心肌血管重建术通道的长期效应研究表明, 用红外激光打孔, 若干星期后通道最终被堵塞^[2,3], 而用 KTP 倍频激光^[4]或紫外光(320~400 nm)的激光^[5]打孔可以得到较长的畅通时间或较高的畅通率。

强激光可以损伤生物组织。在心肌血管重建术中, 受损组织附近的成纤维细胞将迁移到受损区域, 然后增殖, 分泌出大量胶原以组织修复。心肌血管重建术通道有可能被胶原纤维或粒状组织所堵塞^[2~5]。人们通常用培养的单层细胞来研究细胞向受损坏死细胞留下的空间迁移的规律^[6]。K. Ohtera 等^[6]发现, 接触抑制的解除不是细胞迁移的唯一原因, 还应包括细胞间的信号传递。因此, 可以认为强激光除了损伤生物组织留下细胞迁移的空间外, 其边缘对没有损伤的细胞还应该具有光生物调节作用^[7]。为讨论方便, 将强激光边缘的光生物调节作用称为强激光生物调节作用。强激光的损伤效应是即刻的, 但其光生物调节作用却需要一定的时间。因此, 可以认为强激光生物调节作用是决定外科激光长期效应的主要原因^[7]。

关于低强度激光的光生物调节作用研究已经获得相当的进展^[8~12]。尽管生物组织中迅速衰减的强激光的边缘强度很低, 但很少有人注意到强激光生物调节作用。最近, T. Ninomiya 等^[13]用动物模型研究了不同脉冲能量的 Q 开关 YAG 激光对老鼠大腿骨形成的影响。本文选用人类皮肤成纤维细胞(HSFs)单层作为细胞模型, 比较高强度 Nd:YAG 激光(近红外)和 KTP 倍频激光(绿光)照射的光生物调节效应。

2 材料和方法

2.1 细胞培养

原代 HSFs 购自中山大学医学院。培养环境为 37 °C 和 CO₂ 的体积分数为 5% 的空气。培养基为添加了 1.9 × 10⁻⁴ mol/L 的青霉素和 6.8 × 10⁻⁵ mol/L 的双氢链霉素, 含体积比 10% 小牛血清的 DMEM(Gibco BRL, Grand Island, NY)。每隔三天传一次代, 胰酶(Gibco BRL)质量浓度为 1.25 mg/L。所用的细胞均为第 4 到第 8 代。先将

HSFs 以密度为 1 × 10⁴ (个/孔) 接种到 96 孔板(Greiner, Germany), 然后培养 24 h 让细胞贴壁, 以备光照实验。光照前, 每孔的培养基均被吸光; 其后, 重新加入培养基。细胞被分为三大组: 即时检测组在光照后立刻加入四甲基偶氮唑盐(MTT)进行检测存活率。24 h 检测组和 48 h 检测组分别再继续培养 24 h 和 48 h, 然后进行增殖率检测。

2.2 激光照射

使用 Nd:YAG 调 Q 激光器(BT-200; 广州激光技术与应用研究所生产)产生基频脉冲光(1064 nm)和倍频脉冲光(532 nm)。用能量计(J25LP-1; Molelectron Detector, Inc. Portland, USA)测量聚焦后的激光能量。照射时, 调整激光束和培养板孔同心, 照射距离为 2 mm, 激光束半径固定为 0.8 mm。对于每种波长, 脉冲能量分别为 100 mJ, 150 mJ, 200 mJ, 250 mJ, 照射频率为 5 Hz, 照射时间都固定在 20 s。

2.3 激光照射后 HSFs 细胞活性和增殖检测

使用 MTT 比色法对激光照射后进行细胞活性检测。其过程如下: 光照后, 立即加入含有 0.5 g/L (1.2 × 10⁻³ mol/L) MTT 的培养基 0.2 mL, 孵育 3 h。然后吸光培养基, 加入 0.2 mL/孔 DMSO 以溶解蓝色结晶。用酶标仪(Model 550; BIO-RAD, Japan)测量蓝色溶液的吸光度(OD_{490 nm}), 该吸光度正比于细胞数量。根据吸光度, 计算出激光照射后细胞的即时存活率。

增殖检测在光照后 24 h 和 48 h 进行, 所有的操作都相同, 但数据处理有所不同。

2.4 计算方法

2.4.1 高强度激光边缘的激光剂量

为了将强激光边缘的生物调节作用与普通低强度激光的生物调节作用研究结果进行定量比较, 必须计算一个高强度激光损伤半径以外部分的平均剂量。仿照对激光束光强的定义, 将损伤半径 r_d 到光强为损伤半径处光强的 $1/e^2$ 处 r_{1/e^2} 之间的脉冲剂量求平均, 定义为对细胞产生光生物调节作用的激光边缘的平均剂量(AD)为

$$AD = \frac{w(z)^2 [D(r_d) - D(r_{1/e^2})]}{2(r_{1/e^2}^2 - r_d^2)}, \quad (1)$$

式中 $D(r)$ 为距离中心 r 处的总剂量; $w(z)$ 为激光束的半径, 为 0.8 mm。

2.4.2 存活率和损伤半径

96 孔细胞培养板的孔面积是 32 mm²。假设光照前细胞均匀贴壁, 光照后造成的损伤区域近似为半径为 r_d 的圆形, 即时存活率 SR 为

$$SR = \frac{OD_{laser}}{OD_{cont}} \times 100\% = \frac{32 - r_d^2 \pi}{32} \times 100\%, \quad (2)$$

式中 OD_{laser} 和 OD_{cont} 分别为光照后立即测量的照射组和空白组的吸光度。根据即时存活率 SR 可以计算损伤半径。

2.4.3 增殖率

增殖率可以用相对吸光度比 RAV 来表示:

$$RAV = \frac{OD_{24\text{ h}/48\text{ h laser}}}{OD_{24\text{ h}/48\text{ h cont}} \times SR, \quad (3)$$

式中 $OD_{24\text{ h}/48\text{ h laser}}$ 和 $OD_{24\text{ h}/48\text{ h cont}}$ 分别表示光照后 24 h/48 h 照射组和空白组的吸光度。方程分母需乘以该照射组对应的 SR 值。原因是当光照完成后, 照射组的部分细胞受损, 其基本细胞数目比空白组少, 因此应该对方程分母做出以上修正。

计算结果用 SPSS 软件进行统计分析。使用配对 t 检验分析计算出来的 SR 和 RAV 。当 $P < 0.05$ 的时候, 认为结果有显著差异。

3 结 果

3.1 形态学

用相差显微镜以放大 100 倍观察 HSFs 在光照后 0 h 和 24 h 的形态改变。同时, 分别对两种不同波长照射中的 100 mJ 脉冲能量照射组的细胞进行显微拍照(见图 1)。(a), (b) 分别是 1064 nm 和 532 nm 激光照射后立即拍摄的照片。图中黑点为培养板的焦痕, 从图中看出, 两者的损伤区域相差不

大; (c), (d) 为 1064 nm 和 532 nm 激光照射后 24 h 拍摄的照片。此时 (c) 的损伤区域已经比较模糊, 但 (d) 的损伤区域仍然能够分辨。

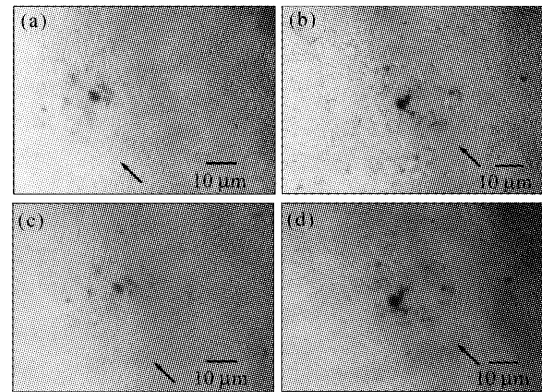


图 1 细胞形态图(放大倍数为 100×, 箭头指示损伤区域边缘)

Fig.1 Morphology of cultured human skin fibroblasts (HSFs) observed by phase contrast microscope with 100 times original magnification

3.2 即时存活率和损伤半径

各组细胞的即时存活率和损伤半径见表 1。无论是 1064 nm 照射还是 532 nm 照射, 即时存活率(损伤半径)都随着脉冲能量增加而降低(增加)。而在相同参量的条件下, 1064 nm 照射组的即时存活率(损伤半径)比 532 nm 照射组的低。

表 1 照射 1064 nm/532 nm 激光后各组细胞的即时存活率和损伤半径

Table 1 Acute survival rate and radius of cell damage immediately after 1064 nm or 532 nm laser irradiation

Group	Pulse energy /mJ	Survival rate /%	Radius of cellular damage /mm
IR1/G1	100	88.21±2.10/89.54±2.13	1.11±0.14/1.03±0.14
IR2/G2	150	84.17±2.67/85.63±3.21	1.27±0.16/1.21±0.20
IR3/G3	200	79.36±2.86/81.95±2.90	1.45±0.17/1.36±0.18
IR4/G4	250	73.70±3.01/77.63±2.01	1.64±0.17/1.51±0.16

Notes: IR represented 1064nm laser illuminated groups and G represented 532 nm laser illuminate groups. Data were represented as mean ±SD. Decreases of the survival rates in all groups were statistical significant ($P < 0.05$).

表 2 各组细胞在其各自损伤半径 r_d 处受到的剂量 Dr_d 和各自受到的平均剂量 AD

Table 2 Dose on the border of damage zone (Dr_d) and average dose on survival HSFs (AD)

Group	Pulse energy /mJ	Radius of cellular damage /mm	$Dr_d / (\times 10^3 \text{ J/m}^2)$	$AD / (\times 10^3 \text{ J/m}^2)$
IR1/G1	100	1.11/1.03	22.79/36.32	10.17/15.90
IR2/G2	150	1.27/1.21	9.71/15.45	4.20/6.68
IR3/G3	200	1.45/1.36	2.80/6.17	1.18/2.62
IR4/G4	250	1.64/1.51	0.55/2.01	0.23/0.86

3.3 激光束光强分布

表 2 列出了接受 5 Hz 激光照射的细胞, 在照射

期间其各自损伤半径 r_d 处受到的剂量 Dr_d 和各自受到的平均剂量 AD 。结果显示, Dr_d 和 AD 都随着

脉冲能量的增加而减少,而且强激光的边缘很弱,与产生对成纤维细胞的光生物调节作用的低强度激光的剂量^[8,14]相当。

3.4 光照后 24 h 和 48 h 细胞增殖率

图 2 展示了根据方程(3)计算出照射 24 h 和 48 h 后,各组细胞的增殖率。从图 2(a),(b)可以看出,1064 nm 激光照射后 24 h,100 mJ/脉冲组和

150 mJ/脉冲组的细胞显著增殖 ($P < 0.05$); 而 532 nm 激光照射后 24 h,100 mJ/脉冲组的细胞显著抑制 ($P < 0.05$)。其他各组和对照组相比有差异但不明显。光照 48 h 后,各组结果与 24 h 的结果相同[图 2(c),(d)],但 1064 nm 照射组与空白组的差异增大,而 532 nm 照射组与空白组的差异减少。

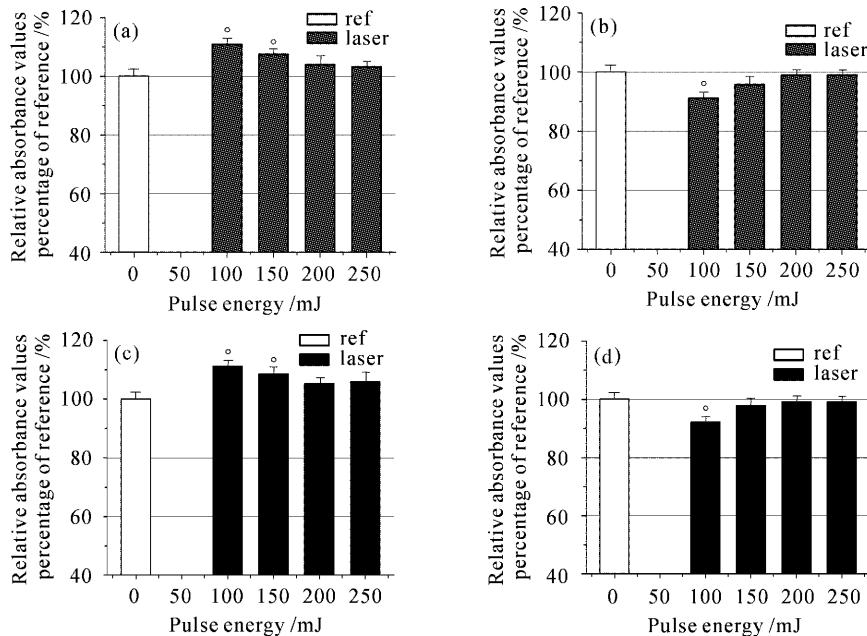


图 2 细胞增殖率。1064 nm 激光(a)和 532 nm 激光(b)照射后 24 h 细胞增殖率; 1064 nm 激光(c)和 532 nm 激光(d)照射后 48 h 细胞增殖率

Fig. 2 Relative absorbance value percentage (RAV). After 24 h irradiation (a) with 1064 nm irradiation (b) with 532 nm irradiation, after 48 h irradiation (c) with 1064 nm irradiation and (d) with 532 nm irradiation

4 讨 论

4.1 光调节作用

关于低强度激光的光生物调节作用研究已经获得相当的进展^[8~12]。研究表明,近红外激光($10^2 \sim 10^4 \text{ J/m}^2$)照射促使成纤维细胞增殖^[8,14],绿光照射(在 10^5 J/m^2 附近)抑制成纤维细胞增殖^[8]。

实验结果表明,在 1064 nm 激光照射后 24 h/48 h,100 mJ/脉冲(IR1)和 150 mJ/脉冲(IR2)两组 HSFs 显著增殖;在 532 nm 激光照射后 24 h/48 h,100 mJ/脉冲组(G1) HSFs 显著抑制。为了与低强度激光的光生物调节作用进行定量比较,计算了细胞存活区域被照射的高强度激光边缘的平均剂量,IR1,IR2 和 G1 组分别为 $1.02 \times 10^4 \text{ J/m}^2$, $4.20 \times 10^3 \text{ J/m}^2$ 和 $1.59 \times 10^4 \text{ J/m}^2$ 。显然,使成纤维细胞显著增殖的高强度红外激光边缘的平均剂量与相应的低强度红外激光剂量是相当的,使成纤维

细胞显著抑制的高强度绿激光边缘的平均剂量与相应的低强度绿激光剂量也是相当的。这种定量比较说明,无论是低强度激光还是高强度激光的边缘部分,只要剂量相当,就会产生相同的光生物调节作用。因此,只要计算出强激光边缘的平均剂量,就可以利用光生物调节作用的生物信息模型(BIMP)^[11]来讨论强激光的生物调节作用。

生物信息模型把单色光分为暖色和冷色:红外、红、橙和黄等为暖色,紫外、紫、蓝和绿等为冷色。该模型认为,不同颜色的光有不同的生物信号功能。在同一剂量段,暖色和冷色具有相反的生物信号,而剂量段的界定,取决于细胞的种类和光源的波长。对于成纤维细胞,根据生物信息模型可以得到以下规律:

BIMP 1 (剂量段 1):

暖色光抑制增殖,冷色光促进增殖。

BIMP 2 (剂量段 2):

暖色光促进增殖,冷色光抑制增殖。

$BIMP(2n) = BIMP 2$, $BIMP(2n+1) = BIMP 1$,
 $n = 1, 2, 3, \dots$

近红外激光(暖色光)在剂量段 2($10^2 \sim 10^4$ J/m²)照射促使成纤维细胞增殖^[8,14], BIMP 2 成立。绿光在剂量段 2(10^5 J/m² 附近), 抑制成纤维细胞增值^[8], BIMP 2 也成立。实验结果表明: 增殖组受到红外激光照射, 抑制组受到绿光照射, 它们受到的强激光边缘的平均剂量都在剂量段 2。实验结果和生物信息模型预言相符。

4.2 心肌血管重建术中可能存在光生物调节效应

占心脏细胞总数 2/3 的成纤维细胞在心肌血管重建术中起着非常重要的作用。各种成纤维细胞高度同源, 在胶原蛋白合成等损伤修复方面具有相似的生理特性。Mark 等^[15]曾用皮肤成纤维细胞模型探讨高密度脂蛋白对成纤维细胞胶原代谢的影响, 其背景涉及到冠状动脉粥样硬化。因此, 本文的细胞模型研究对于讨论心肌血管重建术有一定的参考价值。

P. E. Fisher 等^[3]发现心肌血管重建术术后通道闭合过程与伤口愈合相似, 在成孔数日内, 通道附近出现了大量的成纤维细胞。它们分泌出胶原, 引起通道口径收缩, 最终通道闭合。R. I. Hardy 等^[2]比较了用 CO₂ 激光进行的心肌血管重建术和用皮下注射器针头对心壁穿孔两种心肌血管重建术, 发现用两种方法得到的通道最终都会闭合, 但是前者闭合时间比后者的要长。他们将这种现象归因于: 1) 热损伤区的组织阻碍了诸如成纤维细胞等损伤修复所需细胞的迁移; 2) 激光成孔和针刺成孔相比, 前者形成的通道附近组织中的淋巴细胞和巨噬细胞含量过少。淋巴细胞可以活化巨噬细胞, 而后者可以分泌趋化因子和生长因子, 引导成纤维细胞向伤口迁移和增殖; 3) 血小板也可以分泌生长因子, 刺激成纤维增殖和加快胶原合成。而在激光成孔的通道中, 血小板聚集较少。这可能也是激光成孔比针刺成孔堵塞时间较长的一个原因。

这些事实表明通道周围的成纤维细胞的增殖在通道闭合中起到关键的作用。我们的研究结果表明, 高强度激光照射也能产生光生物调节效应, 刺激或抑制成纤维细胞增殖。那么在心肌血管重建术中, 光生物调节效应同样也有可能起作用。

P. Whittaker 等^[5]采用两个剂量的紫外激光打孔, 发现高剂量组的隧道开放率高于低剂量组, 高剂

量组的疤痕比低剂量组窄, 开放隧道的胶原纤维与隧道轴心线平行, 封闭隧道的胶原纤维与隧道轴心线垂直。根据生物信息模型, 低剂量的紫外光促进成纤维细胞胶原合成。如果隧道边缘的成纤维细胞太多, 使胶原纤维合成顺利进行的最佳方式就是胶原纤维与隧道轴心线垂直。如果成纤维细胞较少, 胶原纤维就可以采用与轴心线平行的方式。高剂量的紫外光抑制成纤维细胞胶原合成, 但离隧道轴心线更远处的激光剂量仍然是低剂量。因此, 如果高剂量组的激光束宽与低剂量组相同, 那么高剂量组隧道保持开放的机会就比低剂量组大。

5 结 论

分别用 1064 nm 和 532 nm 脉冲激光对 24 组培养的 HSFs 单层细胞进行照射。研究发现, 高脉冲能量的照射导致较低存活率和较大的损伤半径。对接受 1064 nm 激光照射的 HSFs, 100 mJ 照射组和 150 mJ 照射组在照射 24 h 和 48 h 后检测发现显著促进增殖; 而对 532 nm 激光照射的 HSFs, 100 mJ 照射组在照射 24 h 和 48 h 后检测发现增殖受到显著抑制。这些结果表明, 高强度激光束边缘低强度激光存在光生物调节作用。

致谢 感谢暨南大学附属医院激光科的技术支持; 感谢李康英主任和谢光辉医生的热情帮助和悉心指导。

参 考 文 献

- 1 Tina. S. Alster. Clinical and histologic evaluation of six erbium :YAG lasers for cutaneous resurfacing [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1999, **24**: 87~92
- 2 Roger Ian Hardy, Kevin E. Bove, Frederick W. James *et al.*. A histologic study of laser-induced transmural channels [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1987, **6**(6): 563~573
- 3 Peter E. Fisher, Takushi Khomoto, Carolyn M. DeRosa *et al.*. Histologic analysis of transmural channels: comparison of CO₂ and holmium : YAG lasers [J]. *Ann. Throac. Surg.*, 1997, **64**(2): 466~472
- 4 Jiang Juquan, Cao Linsheng, Zeng Qitang *et al.*. Laser channel changes after transmural laser revascularization with frequency-double Nd : YAG laser in canine with acute myocardial infarction [J]. *Chin. J. Laser Med. Surg.*, 2003, **12**(2): 80~83
蒋桔泉, 曹林生, 曾秋棠等. 急性心肌梗死区 KTP 激光心肌血运重建术激光孔道演变规律的实验研究 [J]. *中国激光医学杂志*, 2003, **12**(2): 80~83
- 5 Peter Whittaker, Kalin Spariosu, Zonh-zen Ho. Success of transmural laser revascularization is determined by the amount and organization of scar tissue produced in response to initial injury: results of ultraviolet laser treatment [J]. *Lasers*

- Surg. Med.*, 1999, **24**(4): 253~260
- 6 Kozo Ohtera, Zongping P. Luo, Paulus J. J. Couvreur *et al.*. Cell motility in a new single-cell wound model [J]. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 2001, **37**(7): 414~418
 - 7 Timon Cheng-yi. Liu, Yan Li, Xiong-wei Cai *et al.*. Interaction of UV with cells in laser surgery [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2002, **S14**: 128
 - 8 Tiina Karu. *The Science of Low-Power Laser Therapy* [M]. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers, 1998
 - 9 Jan Tunér, Lars Hode. *Low Level Laser Therapy* [M]. Graengesberg: Prima Books in Sweden AB, 1999
 - 10 Li Yanling, Jiao Jianling, Liu Chengyi *et al.*. Effects of He-Ne laser irradiation combined with salvia miltiorrhiza injection on the respiratory burst of bovine neutrophils [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(3): 381~384
李艳玲,角建筑,刘承宜等. He-Ne 激光与丹参注射液联用对牛中性粒细胞呼吸爆发的影响 [J]. *中国激光*, 2004, **31**(3): 381~384
 - 11 Timon Cheng-Yi Liu, Jianling Jiao, Rui Duan *et al.*. Membrane mechanism of low intensity photobiomodulation on a Cell [M]. IN: Simunovic Z (ED). *Lasers in Medicine, Surgery and Dentistry*. Croatia: European Medical Laser Association. 2003. 83~105
 - 12 Li Yan, Jiao Jianling, Liu Chengyi *et al.*. Effects of ketamine in combination with 468. 7 mJ/cm² He-Ne laser irradiation on proliferation in human skin fibroblasts [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(4): 509~512
李 燕,角建筑,刘承宜等. 氯胺酮对低强度 He-Ne 激光照射促人正常皮肤成纤维细胞增殖作用的影响 [J]. *中国激光*, 2004, **31**(4): 509~512
 - 13 Tadashi Ninomiya, Yunichi Miyamoto, Taku Ito *et al.*. High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphyseal trabecular bone in rat femur [J]. *J. Bone. Miner. Metab.*, 2003, **21**(2): 67~73
 - 14 Matthias Kreisler, Ann B. Christoffers, Haitham Al-Haj *et al.*. Effect of low-level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblast [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2002, **30**: 365~369
 - 15 Mark. A. Deeg, Rosario F. Bowen, John F. Oram *et al.*. High density lipoproteins stimulate mitogen-activated protein kinases in human skin fibroblasts [J]. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997, **17**: 1667~1674