

文章编号: 0258-7025(2008)01-0156-05

氦氖激光照射对兔正畸牙周组织中 血管内皮细胞生长因子受体-2 表达的影响

付春茂 孙新华

(吉林大学口腔医学院, 吉林 长春 130041)

摘要 为深入研究氦氖激光照射对促进实验性牙移动牙周组织血管改建的作用机制,应用波长 632.8 nm,功率 20 mW 的氦氖激光照射实验性牙移动兔牙周组织,通过免疫组化染色与图像分析观察分析实验结果。结果表明弱激光照射侧血管内皮细胞生长因子(VEGF)受体-2 的表达,无论在压力区还是张力区均较对照侧出现得早,峰值高,持续的时间长。停止照射后,照射侧血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达水平仍高于对照侧,提示停止弱激光照射后这种生物刺激作用仍能持续。表明弱激光照射能有效促进血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达,促进正畸牙周组织的血管化与骨改建。

关键词 医用光学与生物技术;正畸牙齿移动;免疫组化;血管内皮细胞生长因子受体-2;氦氖激光

中图分类号 TN 249;R 783.5 **文献标识码** A

Effects of He-Ne Laser Irradiation on Vascular Endothelial Cell Growth Factor R-2 Expression in Periodontium of Tooth Movement in Rabbits

Fu Chunmao Sun Xinhua

(Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun, Jilin 130041, China)

Abstract To study the mechanism of helium neon laser promoting blood vessel rebuilds in periodontium of rabbits experimental tooth movement in rabbits, He-Ne laser with the wavelength of 632.8 nm and power of 20 mW was used to irradiate periodontium of experimental tooth movement of rabbits. The result was analysed by immunohistochemistry dyeing and image analysis. The experiment show that the vascular endothelial cell growth factor (VEGF) R-2 expression where the low level laser irradiation, regardless of comparison in the pressure zone or the tension area, appears earlier, have higher peak power and longer time than it does in side irradiating. After stopping the irradiation, the expression level of the irradiation side of the VEGFR-2 is still higher than the comparison side. It shows that the biologic effect still continue after stopping the low level laser irradiation. The result indicates that the low level laser irradiation can promote the VEGFR-2 expression effectively, thus promotes the vascularization of orthodontic dental capsule and the rebuilding of bone.

Key words medical optics and biotechnology; orthodontic tooth movement; immunohistochemistry; vascular endothelial cell growth factor R-2; He-Ne laser

1 引 言

弱激光照射生物组织,具有消炎、止痛、扩张血管、加快血流,促进血管新生、肉芽生长,使受伤细胞和组织修复或愈合等作用。这种既不会使生物组织受到损伤,又能促进病灶组织恢复正常的的作用称为

生物刺激作用。这是弱激光照射正畸牙周组织产生组织变化的基础。

血管内皮细胞生长因子(VEGF)有多种生物功能,特别表现在影响血管的通透性方面^[1]。最近的研究显示血管内皮细胞生长因子不仅在成骨细胞和

收稿日期:2007-06-27;收到修改稿日期:2007-09-10

基金项目:吉林大学创新基金(02129)资助项目。

作者简介:付春茂(1972—),男,浙江人,博士研究生,主要从事正畸黏接材料的研究与应用。E-mail:fuchunmao@126.com

导师简介:孙新华(1954—),女,辽宁人,教授,主任医师,博士生导师,主要从事口腔正畸牙齿移动的生物学研究。

E-mail:xinhuasun8@163.com

破骨细胞内有表达,而且可以直接影响成骨细胞和破骨细胞的分化与产生^[2,3]。血管内皮细胞生长因子必须与其受体结合后才能发挥其生物学效应,因此研究血管内皮细胞生长因子受体显得更有意义。实验通过兔实验性牙移动牙周组织中 He-Ne 激光照射对正畸牙移动过程中血管内皮细胞生长因子受体-2 表达的影响,探讨氦氛激光照射对促进实验性牙移动牙周组织血管改建的作用机制。

2 实验材料和方法

健康日本大耳白兔 35 只,不计雌雄,体重 1.5 ± 0.2 kg,由中国人民解放军军需大学动物部提供。兔抗血管内皮细胞生长因子受体-2 多克隆抗体,由武汉博士德生物工程有限公司提供(产品编号 BM-0864)。即用型免疫组化 ABC(抗生物素-生物素-过氧化酶复合物)试剂盒,由武汉博士德生物工程有限公司提供(产品编号 SA-1022)。酶底物显色剂 3,3'-二氨基联苯胺,由福州迈新公司提供(产品编号 DAB-0031)。防脱片剂多聚-L-赖氨酸,由福州迈新公司提供(产品编号 GLU-0040)。

实验动物分笼喂养,自由饮水。室温控制在 25℃左右。随机分成 7 组:未加力组,加力 1 天组,3 天组,5 天组,7 天组、14 天组及加力 21 天组,每组 5 只。加力组各组动物采用自身对照,右侧为激光照射侧,左侧非激光照射侧作为对照侧。

对加力组动物分别在兔左右上颌切牙和第一磨牙间置镍钛螺簧,以免上颌切牙为支抗牙,0.08 N 力拉上颌第一磨牙向近中移动。

实验动物右侧颊部备皮,进行 He-Ne 激光的局部照射,照射部位为上颌第一磨牙区。He-Ne 激光波长为 632.8 nm,激光功率为 20 mW,照射距离 50 cm,光斑直径 3.0 cm,照射时间 15 min,能量密度 2.5 J/cm^2 。除 1 天,3 天组分别照射 1 次,3 次外,其余各组连续照射 5 次,每天 1 次。

未加力组动物于喂养一周后,加力组动物分别于 1,3,5,7,14,21 天用体积分数为 4%多聚甲醛经颈总动脉灌注后处死。切取上颌骨组织(上颌磨牙区及其周围牙槽骨组织),将标本固定于多聚甲醛液中。固定 48 h 后用质量分数为 19%乙二胺四乙酸脱钙。每 3 天更换一次脱钙液,并经常振动标本瓶。脱钙后流水冲洗标本 15 min,然后将标本用体积分数为 75%,85%,95%,100%乙醇对组织逐级脱水 2 次,每次 12 h。再将标本放入二甲苯中,至组织块透亮。然后立即将标本浸入蜡缸,每次 2 h,共

4 h。再将蜡熔至液状,倒入包埋框,将标本用镊子夹入包埋框,放好。沿磨牙长轴进行近远中向连续切片,每张厚约 5 μm 。

采用抗生物素-生物素-过氧化酶复合物技术(ABC)免疫组织化学方法进行染色。将切片标本放入二甲苯中两次,每次 20 min,再分别在体积分数为 100%,90%,80%的乙醇中浸泡 20 min;体积分数为 3% H_2O_2 室温孵育 115 min;浓度为 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗 3 次,每次 5 min;滴加复合消化工作液(济南贝西公司)覆盖组织室温孵育 20 min;浓度为 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗 3 次,每次 5 min,抗原冷修复液(武汉博士德生物工程有限公司)室温修复 15 min,浓度为 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液再冲洗 3 次;山羊血清封闭液室温孵育 15 min;滴加兔抗血管内皮细胞生长因子受体-2 多克隆抗体中 I 抗 37℃湿盒孵育 2 h,浓度为 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗 3 次;山羊血清封闭液室温孵育 15 min,浓度为 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗 3 次;滴加兔抗血管内皮细胞生长因子受体-2 多克隆抗体中 II 抗 37℃湿盒孵育 50 min,浓度为 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗 3 次;滴加高敏的抗生物素-生物素-过氧化酶复合物,37℃湿盒孵育 50 min,浓度为 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗 3 次;3,3'-二氨基联苯胺发色;复染、脱水、封片、镜下观察。

每个血管内皮细胞生长因子受体-2 免疫组化染色标本随机选取 3 张切片,光学显微镜下对比观察未加力组、照射侧和对照侧的血管内皮细胞生长因子受体-2 免疫组化染色的分布、变化规律及在牙周组织中的表达。每张切片的压力区和张力区分别随机选取 5 个视野检测分析,实验检测结果经计算机图像分析系统处理,计算各切片阳性反应的灰度积分。具体操作为在低倍镜下寻找视野后,调至 400 \times ,自动控制装置随机选取 5 个视野测量阳性产物面积及阳性产物强度灰度值。然后将上述数值转化成灰度积分:灰度积分=阳性产物面积/测量面积 \times 阳性强度灰度值。

全部数据用均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示,统计学处理应用 SPSS 10.0 for windows 软件包进行两样本均数比较 t 检验,并绘制图表。

3 结果

由表 1 和图 1 可知在受正畸力后 1 天时,牙周组织压力区照射侧血管内皮细胞生长因子受体-2

表达明显低于对照侧 ($P < 0.05$), 而在 3~5 天时, 照射侧高于对照侧 ($P < 0.05$)。高峰期均出现在牙齿受力后第 5 天。

由表 2 和图 2 可知在正畸加力后不同天数时, 张力区牙周组织在对照侧与照射侧血管内皮细胞生

长因子受体-2 表达的变化规律是相似的, 高峰期均出现在牙齿受力后第 14 天。统计学结果表明, 张力区血管内皮细胞生长因子受体-2 表达在加力 3~7 天时照射侧高于对照侧 ($P < 0.05$)。

表 1 照射侧与对照侧压力区牙周组织血管内皮细胞生长因子受体-2 阳性反应的灰度积分比较 ($\bar{X} \pm SD$)

Table 1 Comparison of the gray scale integral of VEGFR-2 positive reaction in pressure zone between irradiating side and controlling side ($\bar{X} \pm SD$)

Group /d	Irradiated side	Control side	T value	P value
1	143.73 ± 4.17*	148.65 ± 4.35*	-1.635	<0.05
3	168.78 ± 6.72*	162.94 ± 5.97*	1.299	<0.05
5	172.16 ± 7.94*	164.12 ± 5.18*	1.696	<0.05
7	158.65 ± 6.61	145.29 ± 4.80*	3.267	<0.05
14	137.59 ± 7.38	135.77 ± 6.29	0.375	
21	136.96 ± 6.01	136.68 ± 5.76	0.195	

Normal periodontal tissues VEGFR-2 positive reaction gray scale integral; 133.51 ± 7.25, *, $P < 0.05$.

表 2 照射侧与对照侧张力区牙周组织血管内皮细胞生长因子受体-2 阳性反应的灰度积分比较 ($\bar{X} \pm SD$)

Table 2 Comparison of the gray scale integral of VEGFR-2 positive reaction in tension zone between irradiating side and controlling side ($\bar{X} \pm SD$)

Group /d	Irradiated side	Control side	T value	P value
1	138.13 ± 5.55	134.16 ± 4.78	1.084	
3	154.74 ± 4.13*	143.49 ± 6.35*	2.972	<0.05
5	159.03 ± 8.54*	149.05 ± 6.75*	1.835	<0.05
7	162.17 ± 6.12*	151.53 ± 6.90*	2.875	<0.05
14	169.67 ± 11.32	163.86 ± 5.16	1.095	
21	146.11 ± 13.27	143.28 ± 3.59	0.793	

Normal periodontal tissues VEGFR-2 positive reaction gray scale integral; 133.51 ± 7.25, *, $P < 0.05$.

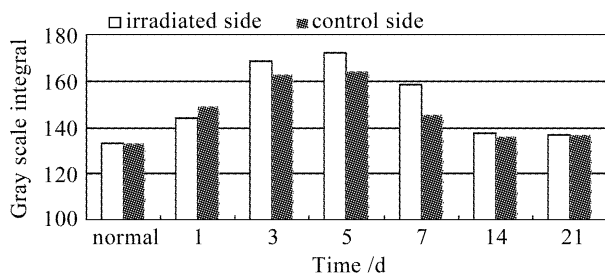


图 1 照射侧与对照侧牙周组织压力区血管内皮细胞生长因子受体-2 阳性反应的灰度积分比较

Fig. 1 Comparison of the gray scale integral of VEGFR-2 positive reaction between irradiating side and control side in the pressure zone

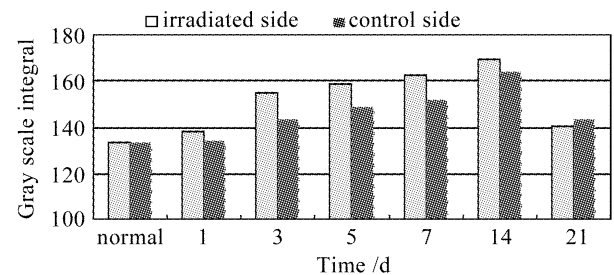


图 2 照射侧与对照侧牙周组织张力区血管内皮细胞生长因子受体-2 阳性反应的灰度积分比较

Fig. 2 Comparison of the gray scale integral of VEGFR-2 positive reaction between irradiating side and control side in the tension zone

4 讨 论

在正畸力作用下, 伴随牙齿移动出现的是牙周组织的损伤与修复过程, 这种损伤与修复在压力侧与张力侧均可发生。温和而持续的矫治力作用于牙体后, 牙周膜一侧受牵引, 另一侧受压迫, 牙周膜的代谢发生改变, 在压力侧牙周膜组织受挤压而紧缩,

牙周间隙变窄, 局部组织产生缺血缺氧。研究表明缺氧是血管内皮细胞生长因子最主要的“诱导剂”, 缺氧对血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达起重要调节作用^[1]。体内缺氧间接上调血管内皮细胞生长因子受体-2 基因表达, 这可能是由缺氧组织释放的一种尚不确定的旁分泌因子所致^[2]。缺氧时人脐

静脉内皮细胞中血管内皮细胞生长因子水平上升, 而血管内皮细胞生长因子受体-2 仍保持稳定甚至有所下降。这说明可能存在某种转录后调节机制, 这种调节机制并不依赖于血管内皮细胞生长因子受体-2 基因的启动子^[3]。另有研究显示, 这种转录后调节机制可引起血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达上调^[4]。这可能是缺氧时旁分泌因子和转录后调节的共同作用, 促进体内血管内皮细胞生长因子受体-2 表达上调。出现不同结果的原因尚未明确, 但有一点是明确的, 低氧可促进血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达增强^[5]。

弱激光的能量既不会使生物组织受到损伤, 又能促进病灶组织恢复正常^[6,7]。其产生的生物刺激效应主要影响细胞的生化与代谢过程, 促进基因的转导, 不会引起基因结构的改变^[8,9]。波长为 632.8 nm 的低强度氦氖激光不论是光子直接作用于脱氧核糖核酸(局部组织吸收) 或是间接作用于脱氧核糖核酸(血液的吸收), 光子所提供的能量使维持碱基配对的氢键离断, 解开脱氧核糖核酸双链, 促进以母链脱氧核糖核酸为模板的脱氧核糖核酸复制过程^[10]。光子所提供的能量还有利于保证各类参加脱氧核糖核酸复制的酶的活性^[11,12]。弱激光照射可以使牙槽骨组织中的破骨细胞数目增多, 增多的多核破骨细胞大多围绕在牙周膜的血管周围^[13]。弱激光照射可以纠正牙周膜内血液循环暂时受阻的现象, 使血流通畅, 可改善血液循环, 加速兔第一磨牙移动速度^[14]。

加力组照射侧与对照侧的比较显示了弱激光照射对正畸牙周组织中血管内皮细胞生长因子受体-2 表达变化的影响。未加力组切片显示牙周膜纤维排列规则, 牙槽骨表面平整, 在胶原纤维束之间有疏松的结缔组织围绕着神经和血管, 未见明显的成骨和破骨迹象, 血管内皮细胞生长因子受体-2 无明显表达。在加力组压力区, 加力 1 天组对照侧压力区, 牙周膜受压严重变窄, 血管管腔受压变窄。而照射侧压力区经弱激光照射后牙周膜血管扩张未见明显闭塞。由于弱激光的生物刺激效应具有消炎、扩张血管, 可使受伤细胞或组织修复及愈合等作用, 因而压力区牙周组织缺血缺氧的状态能得到缓解。在加力第 1 天对照侧压力区由于缺血缺氧及血管内皮细胞生长因子表达的升高致血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达迅速升高, 照射侧弱激光照射缓解了缺血缺氧的状态, 照射侧压力区血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达无明显变化, 因此加力后第 1 天照

射侧较对照侧压力区血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达低 ($P < 0.05$)。加力第 3 天对照侧压力区牙周间隙进一步变窄, 透明样变性区增大, 邻近的骨吸收陷窝增大、加深。照射侧较对照侧压力区血管狭窄不明显, 血管新生活跃, 血管内皮细胞生长因子受体-2 表达明显升高 ($P < 0.05$)。加力第 5 天对照侧压力区透明样变性区缩小, 邻近骨吸收增大; 照射侧较对照侧血管内皮细胞生长因子受体-2 表达仍明显升高 ($P < 0.05$)。从第 7 天开始伴随着毛细血管的大量新生, 压力区组织内的缺血缺氧进一步缓解。形态学上可以观察到压力区组织血管化作用在第 7 天最为典型, 血管数目明显增多, 尤以照射侧更为显著。由于局部组织恢复供血和供氧及血管内皮细胞生长因子的降低^[15], 血管内皮细胞生长因子受体-2 水平迅速降低, 但照射侧和对照侧无明显差异。这种反应持续到第 21 天。

在张力区加力第 1 天照射侧与对照侧张力区牙周间隙变宽, 牙周膜中纤维排列疏松, 细胞成分增多, 可见大量扩张充血的血管, 血管内皮细胞生长因子受体-2 表达无明显差异。在实验第 3 天, 张力区牙周间隙进一步增宽, 牙周膜中血管扩张, 牙槽骨表面可见活跃的成骨细胞和新骨沉积; 照射侧血管内皮细胞生长因子受体-2 表达明显高于对照侧。这是由于张力区不存在明显的缺血缺氧状况, 血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达主要是血管内皮细胞生长因子和缺氧等因子的调节。由于弱激光具有生物刺激效应, 可增强各种酶的活性, 影响细胞膜的通透性, 当牙周组织吸收激光能量后将光能转化为组织的内能。有实验已表明血管内皮细胞生长因子的表达在第 3 天时照射侧较对照侧变化明显, 该因子直接调控血管内皮细胞生长因子受体-2 表达发生相应变化。弱激光照射可增加成纤维细胞数目, 加快血管的新生和新生细胞的繁殖过程。新生的血管内皮细胞以自分泌和旁分泌的形式表达血管内皮细胞生长因子, 因而在加力第 3 天, 5 天, 7 天, 照射侧较对照侧压力区血管内皮细胞生长因子受体-2 表达差异有显著性 ($P < 0.05$)。实验还可以观察到在第 21 天无论压力区还是张力区, 照射侧血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达水平仍不低于对照侧, 提示停止弱激光照射后这种作用仍能持续。

5 结 论

研究结果表明弱激光照射侧血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达, 无论在压力区还是张力区均较

对照侧出现得早,峰值高,持续的时间长。研究证实了弱激光照射能有效促进血管内皮细胞生长因子受体-2 的表达,从而促进正畸牙周组织的血管化与骨改建。

参 考 文 献

- 1 James W. Schroeder Jr., Jeffrey C. Rastatter, David L. Walner. Effect of vascular endothelial growth factor on laryngeal wound healing in rabbits [J]. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 2007, **137**(3):465~470
- 2 J. Tombran-Tink, C. J. Barnstable. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors; possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone [J]. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2004, **316**(2):573~579
- 3 Shaomian Yao, Dawen Liu, Fanghui Pan *et al.*. Effect of vascular endothelial growth factor on RANK gene expression in osteoclast precursors and on osteoclastogenesis [J]. *Archives of Oral Biology.*, 2006, **51**(7):596~602
- 4 Zong-Mei Bian, Susan G. Elner, Victor M. Elner. Regulation of VEGF mRNA expression and protein secretion by TGF-2 in human retinal pigment epithelial cells [J]. *Experimental Eye Research*, 2007, **84**(5):812~822
- 5 Susana Constantino Rosa Santos, Cláudia Miguel, Inés Domingues *et al.*. VEGF and VEGFR-2 (KDR) internalization is required for endothelial recovery during wound healing [J]. *Experimental Cell Research*, 2007, **313**(8):1561~1574
- 6 Fidi Schwartz, Chaya Brodie, Elana Appel *et al.*. Effect of helium/neon laser irradiation on nerve growth factor synthesis and secretion in skeletal muscle cultures [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2002, **66**(3):195~200
- 7 Yang Yudong, Liang Yong. Investigation of biostimulation mechanism with low energy laser [J]. *Applied Laser*, 2003, **23**(4):251~254
杨玉东,梁 勇. 低功率激光的生物刺激作用机理及研究[J]. *应用激光*, 2003, **23**(4):251~254
- 8 Qiao Xiaoyan, Li Gang, He Bingjun *et al.*. Effects of low level laser irradiation on delayed rectifier potassium current in neuron membrane [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(9):1288~1293
乔晓艳,李 刚,贺秉军等. 弱激光对神经细胞膜延迟整流钾通道电流特性的影响[J]. *中国激光*, 2006, **33**(9):1288~1293
- 9 Li Yan, Jiao Jianling, Liu Chengyi *et al.*. Recent advance of effects of low intensity laser irradiation on cells [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2003, **12**(1):67~70
李 燕,角建瓴,刘承宜等. 低强度激光对离体细胞效应的若干新进展[J]. *激光生物学报*, 2003, **12**(1):67~70
- 10 Murat Gulsoy, Gokmen Hursit Ozer, Ozguncem Bozkulak *et al.*. The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro [J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2006, **82**(3):199~202
- 11 Yang Xiaohong, Liu Chengyi, Liu Shaojie *et al.*. Photobiomodulation on chondrocyte proliferation; in vitro evaluation [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(12):1692~1698
杨小红,刘承宜,刘少杰等. 软骨细胞光生物调节作用的体外实验[J]. *中国激光*, 2006, **33**(12):1692~1698
- 12 Aneta Koceva-Chyla, Boguslawa Wieclawska, Zofia Jozwiak *et al.*. Combined effect of low-power laser irradiation and anthraquinone anticancer drug aclarubicin on survival of immortalized cells; Comparison with mitoxantrone [J]. *Cell Biol. Int.*, 2006, **30**(8):645~652
- 13 Y. S. Lin, M. H. Huang, C. Y. Chai. Effects of helium-neon laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2006, **14**(4):377~383
- 14 Sun Xinhua, Wang Xu, Zhang Xiaoying. Effect of He-Ne laser irradiation on the blood vessel remodeling of orthodontic periodontal tissue of rabbit [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(12):1543~1546
孙新华,王 旭,张晓英. He-Ne 激光对兔正畸牙周组织血管改建影响的实验研究[J]. *中国激光*, 2004, **31**(12):1543~1546
- 15 Sun Xinhua, Wang Min, Zhang Xiaoying. Effects of He-Ne laser irradiation on VEGF expression in periodontium of tooth movement in rabbits [J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2004, **30**(6):931~934
孙新华,王 敏,张晓英. 氦氖激光照射对兔实验性牙移动牙周组织 VEGF 表达的影响[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2004, **30**(6):931~934