

低能量激光治疗对骨缺损动物模型的影响

李秋实¹ 周延民^{2*} 陈英新¹ 柳淑杰¹ 王战鑫¹ 董树君¹ 司 熙³

¹吉林大学口腔医学院 VIP 综合科, 吉林 长春 130021
²吉林大学口腔医学院种植科, 吉林 长春 130021
³海南医学院附属医院口腔科, 海南 海口 570102

摘要 建立了大鼠骨缺损模型, 评价了低能量激光治疗处理后骨缺损处的组织学改变。制造大鼠单侧的股骨圆形骨缺损, 根据低能量激光治疗照射方法的不同随机分为 3 组: 多次照射组, 单次照射组, 对照组。其中两个照射组对应的总剂量相同。术后 15 d 和 30 d 分别处死每组动物, 取材后进行 HE 染色, 在光镜下分析炎症和骨组织的形成和质量。结果显示实验组 15 d 和 30 d 时的炎症评分明显低于对照组, 骨形成评分明显高于对照组, 而 2 个实验组并无明显区别。研究发现适宜剂量的低能量激光治疗可以减轻动物模型实验性骨缺损处的炎症并促进新骨形成。多次照射和单次照射比较并无不同。

关键词 医用光学; 低能量激光治疗; 骨缺损; 骨形成; 动物模型

中图分类号 Q631; R783.4 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201138.1104004

Effect of Low Level Laser Therapy on Bone Defect of an Animal Model

Li Qiushi¹ Zhou Yanmin² Chen Yingxin¹ Liu Shujie¹ Wang Zhanxin¹
Dong Shujun¹ Si Xi³

¹VIP Department, School of Stomatology, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China

²Department of Implant, School of Stomatology, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China

³Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570102, China

Abstract The histological changes of bone defect sites created surgically in rat femur treated by low level laser therapy (LLLTT) are evaluated. Thirty rats are randomly divided into 3 groups according to different methods of laser irradiation: multi-irradiated group, single-irradiated group and control group with no irradiation. The total doses of both of the irradiation groups are the same. A round bone defect is created on the femur of each rat. The rats are killed on the 15th day and the 30th day after the surgery. The results show that after drawing materials and HE staining, the inflammation and bone formation of each group are analyzed under an optical microscope. The inflammation scores of irradiated groups are lower than those of control group with significant difference, meanwhile, the bone formation scores of irradiated groups are higher than those of control group with significant difference. However, there is no significant difference between the two irradiation groups. It is concluded from the study that LLLTT with proper dose may alleviate inflammation and promote bone formation. There is no difference between multi-irradiated group and single-irradiated group.

Key words medical optics; low level laser therapy; bone defect; bone formation; animal model

OCIS codes 170.1850; 170.1610

1 引 言

随着种植义齿的成功率越来越高, 种植修复的应用范围和修复效果正逐步超越传统修复, 在口腔

修复学中的影响日益广泛。然而, 仍有一些因素制约了口腔种植学的进一步发展, 如种植术后骨愈合期相对于传统修复来讲周期较长, 临床常见的骨缺

收稿日期: 2011-06-29; 收到修改稿日期: 2011-08-21

作者简介: 李秋实(1981—), 女, 博士, 主治医师, 主要从事低能量激光治疗促进种植体周围成骨方面的研究。

E-mail: qiushili_jlu@126.com

* 通信联系人。E-mail: zhouym62@126.com

损限制了种植义齿的应用范围等。现已知骨小梁对物理因素刺激非常敏感,适当范围的物理因素刺激既可以促进骨愈合,又可以辅助骨移植进而提高骨缺损修复的效果。各种物理因素刺激如电磁刺激、加压治疗、超声、低能量激光治疗(LLLT)等是否能促进骨愈合是近年来学者们研究的热点。

低能量激光也称低强度激光、低功率激光,相应的治疗方法称 LLLT,对生物组织不会造成不可逆性损伤,可以产生光生物调节效应^[1],近年来被广泛研究及应用于再生医学领域,具有无创性、操作简便、价格低等优点。现有研究认为 LLLT 的光生物调节效应可以调节免疫系统,促进伤口愈合和组织修复^[2,3],减轻疼痛,其机制可能为生物细胞内的光子接收器吸收光子能量后改变线粒体的氧化还原状态,从而加速跨膜物质转运,活化某些重要的细胞跨膜信号传递。多个关于 LLLT 促进动物模型实验性骨缺损的研究都证实了 LLLT 可以促进骨缺损周围区域的骨修复,但是由于每个实验的研究方法和照射参数不同,结果之间很难进行比较^[4,5]。此外,也有研究认为 LLLT 不能促进体内实验的骨修复^[6]。本实验的激光参数参照了以往关于联合应用 LLLT 和植入生物材料对骨再生的作用的相关文献^[7~9]。国外多项研究证实 LLLT 可以促进动物模型的实验性骨缺损周围区域的骨修复,Kazem 等^[10]研究发现 LLLT 对骨折愈合过程有促进作用。此外,Pires-Oliveira 等^[11]研究了 LLLT 对骨质疏松的大鼠骨修复的作用,发现 LLLT 促进了骨质疏松处骨折的愈合过程,特别是在早期效果明显。Javadieh 等^[12]研究了 LLLT 对链脲霉素诱导的糖尿病鼠的局部胫骨截骨的愈合作用,结果发现 LLLT 促进了实验组糖尿病鼠的骨修复,与对照组相比,有更高的抗弯刚度和最大受力。但目前只有少数人将其应用到口腔种植领域。国内尚无相关研究。本实验利用 LLLT 照射大鼠股骨实验性骨缺损处,观察 LLLT 处理后骨缺损处的炎症、新骨形成等组织学改变,为 LLLT 应用于口腔种植领域提供实验基础。

2 材料和方法

30 只 SPF 级 Wistar 大鼠由吉林大学实验动物中心提供,10 周龄,体重 300~400 g。将其随机分成 3 组:实验组 1(L1),实验组 2(L2),对照组(C)。每个实验组按取材时间不同又分为 2 组:15 d 观察组(15dL1, 15dL2, 15dC),30 d 观察组(30dL1,

30dL2,30dC)。

麻醉固定大鼠,单侧股骨区中段处备皮、消毒,在股骨中点处对称地做一个长约 2 cm 的纵向切口,剥离软组织和肌肉,充分暴露胫骨骨干区,采用直径为 1.6 mm 的牙科裂钻在切口 midpoint 处钻一直径为 1.6 mm,深度为 2 mm 的圆形骨缺损,同时采用冷生理盐水降温以减少骨坏死。然后进行激光照射。照射结束后,伤口分层缝合。术后立即肌肉注射青霉素(30 万单位/只),连续注射 3d。

本实验采用的 GaAlAs 低能量半导体激光器由中国科学院长春光学精密机械与物理研究所研制,波长 808 nm,连续输出。光纤探头直径 0.4 mm,光纤长度 60 cm。激光器经光纤输出后功率为 4 mW。垂直照射于股骨长度的中点,即切口的 1/2 处。照射距离为 2 cm,照射面积为 0.08 cm²,完全覆盖圆形骨缺损。L1 为多次照射组,在术后的第 1 天,第 2 天,第 3 天分别对照射点进行激光照射。每天照射时间为 5 min,照射剂量为 10 J·cm⁻²,共计 30 J·cm⁻²。L2 为单次照射组,在术后的第 1 d 对照射点进行激光照射。第 1 天照射时间为 15 min,照射剂量为 30 J·cm⁻²,第 2 天、第 3 天未处理。两组对应的总剂量均为 30 J·cm⁻²。C 组不进行激光照射。

分别在手术后 15 d 和 30 d 处死 5 只大鼠,取材后固定、脱钙、石蜡包埋、切片,然后进行 HE 染色,在光镜下分析炎症和骨组织的形成和质量。根据以往研究^[13,14],制定组织学评分标准。炎症评分标准如下:1 分,没有炎症细胞;2 分,适量的炎症细胞;3 分,大量的炎症细胞。骨组织的形成和质量评分标准如下:1 分,新形成的结缔组织(含有毛细血管、成纤维细胞、巨噬细胞、新形成的胶原纤维)充填了缺损区域,结缔组织较疏松;2 分,密集结缔组织包含有大量分化的细胞和有序的纤维;3 分,新骨形成,其中结缔组织分化形成骨基质或骨单位;4 分,出现骨组织。

采用 SPSS 15.0 统计软件对实验数据进行了分析,各组比值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的显著性检验用方差分析法,两组间差异的显著性检验用 *P* 检验。*P*<0.05 为有统计学差异。

3 实验结果

HE 染色显示了三个组 LLLT 处理后的修复过程。各组均未出现病理改变,如巨细胞、骨吸收等。

对照组:15 d 时,标本呈现中到重度炎症。可以观察到无序的结缔组织,并含有血细胞、成纤维细

胞、巨噬细胞、退化细胞的薄纤维网状结构。30 d 时,标本均呈现轻微的炎症。大部分伤口被致密的

结缔组织充填,内含大量分化且分层排列的成骨细胞。其显微图像如图 1 所示。

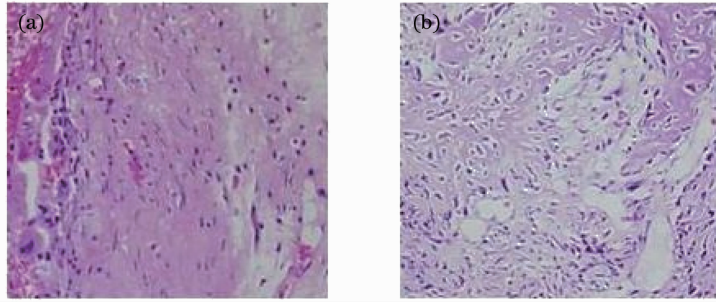


图 1 对照组(a) 15 d 和(b) 30 d 脱钙切片 HE 染色(100 倍)

Fig. 1 HE staining for decalcified sections of control group on the 15th day (a) and the 30th day (b) (100×)

照射组:15 d 时,标本均呈现轻微的炎症。可见密集的结缔组织充填骨缺损。有大量分化的成纤维细胞和成骨细胞产生胶原纤维,内有骨细胞。

30 d 时,大部分标本没有炎症。缺损处被不定形的骨基质充填,大部分标本都有新骨生成。其显微图像如图 2 和图 3 所示。

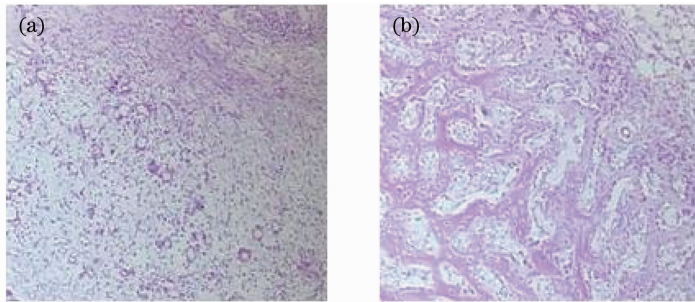


图 2 L1 组(a) 15 d 和(b) 30 d 脱钙切片 HE 染色(100 倍)

Fig. 2 HE staining for decalcified sections of L1 group on the 15th day (a) and the 30th (b) day (100×)

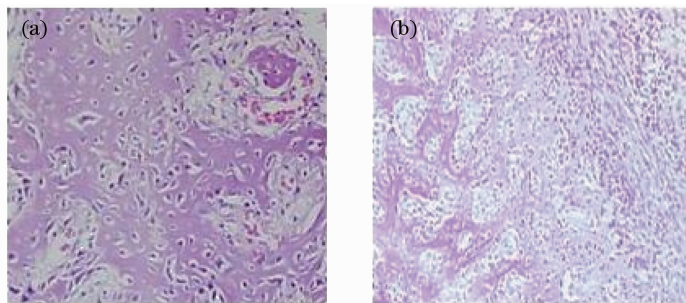


图 3 L2 组(a)15 d 和(b) 30 d 脱钙切片 HE 染色(100 倍)

Fig. 3 HE staining for decalcified sections of L2 group on the 15th day (a) and the 30th day (b) (100×)

根据本实验的评分标准,分别给各组每只动物进行评分。统计学分析结果显示,L1、L2 组的炎症评分明显低于对照组,有显著性差异($P < 0.05$),见图 4。L1、L2 组的骨形成评分明显高于对照组,有显著性差异($P < 0.05$),见图 5。L1、L2 组之间没有显著性差异($P > 0.05$)。

成评分明显高于对照组,有显著性差异($P < 0.05$)。这说明 LLLT 可能促进骨缺损的愈合并减轻炎症。这与以往的研究结果相符。

有报道比较了 GaAlAs 半导体激光器单次和多次照射对组织修复的作用,发现多次照射比单次照射产生了更好的效果^[15]。有学者认为早期的重复照射可以维持骨再生的活性,对骨再生更有效^[16]。本实验采用了单次和多次照射,目的是比较两种方法的照射效果是否有区别,为临床应用提供依据。结果并未发现两种照射方法产生的效果有区别,未

4 讨 论

实验结果显示,L1、L2 组的炎症评分明显低于对照组,有显著性差异($P < 0.05$)。L1、L2 的骨形

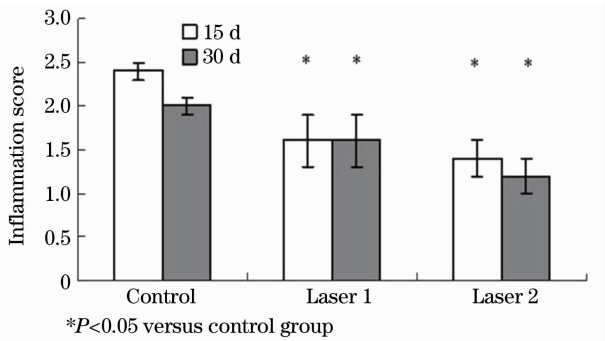


图 4 在不同时期对照组和实验组的炎症评分的比较

Fig. 4 Inflammation score comparison between control and laser groups at different periods

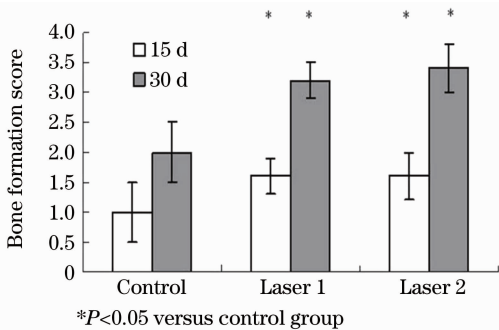


图 5 在不同时期对照组和实验组的骨形成评分的比较

Fig. 5 Bone formation score comparison between control and laser groups at different periods

能证实相同剂量作用下多次照射比单次照射更有效。关于不同照射方式对生物组织的影响还有待于进一步研究。

虽然本实验证实了 LLLT 对骨缺损修复具有促进作用,但不是所有研究都支持 LLLT 的正性作用。Gordjestani 等^[6] 在一项关于红外线和骨代谢的初步研究中证明,照射组和对照组的骨缺损其骨代谢速度相同。他们保守地将结果解释为实验动物数量受限。此外,该实验采用了内部对照而未考虑到 LLLT 系统效应的影响,这也可能是照射组和对照组实验结果未能产生显著区别的原因。

5 结 论

本实验的结果证实了 LLLT 可以促进动物模型骨缺损区域的骨修复,说明了 LLLT 在涉及骨修复的学科如口腔种植学中可能得到临床应用,如在种植术后早期进行 LLLT,可以加快种植体周围骨形成的速度,促进骨整合,缩短骨愈合期。也可与骨移植材料联合应用,以加快修复大面积骨缺损。由于 LLLT 操作简便,价格较低,进而也可以减少早期行动不便的患者及出院后的患者在健康护理方面

的花费。但是,本实验只是讨论了 LLLT 在临床使用的可能性,对于人体的照射剂量和合适的照射时机需要更多的实验研究来探索。

参 考 文 献

- Liu Chengyi, Zhu Ling, Duan Rui *et al.*. Phenomena and mechanism of laser irradiation or monochromatic light induced extraocular phototransduction [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(9): 2251~2256
刘承宜,朱玲,段锐等.激光或单色光引起非视觉细胞信号转导的现象与机理[J].中国激光,2009,36(9):2251~2256
- Wang Zhe, Xia Lei, Gong Kai *et al.*. Positive effect of low power laser irradiation on neuron regeneration after acute spinal cord injury[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(11): 3084~3088
王哲,夏雷,龚凯等.激光照射对急性脊髓损伤后脊髓再生的促进作用[J].中国激光,2009,36(11):3084~3088
- Pan Zhenhua, Li Yingxin, Wang Xing *et al.*. Effects of low-level laser therapy on cutaneous wound healings with three doses[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(2): 599~604
潘振华,李迎新,王兴等.3种剂量弱激光对大鼠皮肤创伤愈合的影响[J].中国激光,2010,37(2):599~604
- R. A. Nicola, V. Jorgetti, J. Rigau *et al.*. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study[J]. *Lasers Med. Sci.*, 2003, **18**(2): 89~94
- O. Barushka, T. Yaakobi, U. Oron. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia [J]. *Bone*, 1995, **16**(1): 47~55
- M. Gordjestani, L. Dermaut, H. Thierens. Infrared laser and bone metabolism: a pilot study[J]. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 1994, **23**(1): 54~56
- M. E. Gerbi, A. M. Marques, L. M. Ramalho *et al.*. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenic proteins: an *in vivo* study in a rodent model [J]. *Photomed. Laser Surg.*, 2008, **26**(1): 55~60
- R. V. da Silva, J. A. Camilli. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser [J]. *J. Craniofac. Surg.*, 2006, **17**(2): 297~301
- J. B. Weber, A. L. Pinheiro, M. G. de Oliveira *et al.*. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft[J]. *Photomed. Laser Surg.*, 2006, **24**(1): 38~44
- Shakouri S. Kazem, J. Soleimanpour, Y. Salekzamani *et al.*. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process [J]. *Lasers Med. Sci.*, 2010, **25**(1): 73~77
- D. A. Pires-Oliveira, R. F. Oliveira, S. U. Amadei *et al.*. Laser 904 nm action on bone repair in rats with osteoporosis[J]. *Osteoporos Int.*, 2010, **21**(12): 2109~2114
- F. Javadieh, M. Bayat, S. Abdi *et al.*. The effects of infrared low-level laser therapy on healing of partial osteotomy of tibia in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Photomed. Laser Surg.*, 2009, **27**(4): 641~646
- M. Khadra, N. Kasem, H. R. Haanaes *et al.*. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy[J]. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2004, **97**(6): 693~700
- H. Pretel, R. F. Lizarelli, L. T. Ramalho. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats[J]. *Lasers Surg. Med.*, 2007, **39**(10): 788~796
- G. Y. Ng, D. T. Fung, M. C. Leung *et al.*. Ultrastructural comparison of medial collateral ligament repair after single or multiple applications of GaAlAs laser in rats[J]. *Lasers Surg. Med.*, 2004, **35**(4): 317~323
- N. P. Schneider, M. Soudry, M. Remusat *et al.*. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts[J]. *Quintessence Int.*, 1989, **20**(12): 887~893