

氦氖激光照射对大鼠实验性牙移动牙周组织中 环氧化酶-2 表达的影响

侯 旭¹ 孙秀梅¹ 张 超¹ 顾梦婕¹ 张晓英² 孙新华¹

(¹吉林大学口腔医院正畸科, 吉林 长春 130021)

(²吉林大学口腔医院理疗科, 吉林 长春 130021)

摘要 为探讨氦氖激光局部照射调控正畸牙移动过程中血管改建的机制,应用波长为 632.8 nm,激光功率为 20 mW 的氦氖激光照射实验性牙移动大鼠的牙周组织,进而对牙周组织切片进行环氧化酶-2(COX-2)免疫组织化学染色。图像分析结果显示压力区加力 3、5、7 d 组照射侧牙周组织 COX-2 表达明显高于对照侧,14 d 后照射侧与对照侧差异无统计学意义;张力区加力 1、3、5、7 d 组照射侧 COX-2 表达均明显高于对照侧,差异有统计学意义。结果表明氦氖激光照射能增强实验性牙移动大鼠牙周组织中 COX-2 的表达,参与促进正畸牙移动血管改建的进程。

关键词 医用光学;牙移动;环氧化酶-2;氦氖激光;牙周组织;免疫组化

中图分类号 R781.4 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201239.1204001

Effect of He-Ne Laser Irradiation on Cyclooxygenase-2 Expression in Periodontium of Experimental Tooth Movement in Rats

Hou Xu¹ Sun Xiumei¹ Zhang Chao¹ Gu Mengjie¹ Zhang Xiaoying² Sun Xinhua¹

(¹Department of Orthodontic, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun, Jilin 130041, China)

(²Department of Physiotherapy, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun, Jilin 130041, China)

Abstract To investigate blood vessel remodeling in the process of He-Ne laser irradiation on periodontium of experimental tooth movement, a He-Ne laser with wavelength of 632.8 nm and power of 20 mW is used to irradiate the periodontium of experimental tooth movement in rats. Periodontal slice is treated by cyclooxygenase-2 (COX-2) immunohistochemistry dyeing and the results are obtained by image analysis. The results show that the COX-2 expression in periodontium with forced time of 3, 5, 7 d are significantly higher in experimental side than that of control side in the pressure region. While in the tension region, the COX-2 expression in periodontium with forced time of 1, 3, 5, 7 d are significantly higher in experimental side than that of control side. The results indicate that He-Ne laser can increase COX-2 expression in periodontium during the tooth movement in rats, thus probably enhance the vascularization of tooth movement.

Key words medical optics; tooth movement; cyclooxygenase-2; He-Ne laser; periodontium; immunohistochemistry

OCIS codes 170.1850; 170.1610

1 引 言

激光是一种电磁波,它具有波长一致,方向一致以及偏振一致等特性。自从 1960 年 Maiman 设计制造了第一台激光器以来,人们利用激光的特性开

发出不同的光学仪器应用于临床治疗的诸多方面^[1]。激光主要有热效应、光化效应、压强效应和电磁场效应。临床应用的低能量激光,又称弱激光,利用了激光的生物刺激效应。已有的研究报道显示

收稿日期: 2012-07-11; **收到修改稿日期**: 2012-08-08

作者简介: 侯 旭(1980—),女,硕士研究生,主治医师,主要从事牙移动骨组织改建方面的研究。

E-mail: houxu_112@126.com

导师简介: 孙新华(1954—),女,本科,教授,主要从事牙齿移动生物学方面的研究。

E-mail: xinhuasun8@163.com(通信联系人)

这种光能的生物刺激效应在损伤愈合、细胞再生、组织修复、减轻疼痛以及改善血液循环等方面均能起到较好的辅助治疗效果^[2]。

正畸牙齿移动的生物学基础是牙周组织的血管改建和牙槽骨的骨组织改建,血管改建出现在骨改建的早期。血管改建过程受众多生物学因素、局部因素和细胞因子的调节。近年来,许多研究表明环氧化酶-2(COX-2)与血管形成密切相关^[3]。低能量激光的生物刺激效应主要表现在对生物大分子物质如蛋白质和核酸等产生影响。环氧化酶-2是一种与机体血管形成有密切关系的蛋白质物质,本文拟通过观察氦氖激光局部照射对实验性牙移动大鼠牙周组织中 COX-2 表达的影响,探讨氦氖激光局部照射对促进正畸牙移动过程中牙周组织血管改建的作用,为低能量激光的临床应用提供进一步的理论依据。

2 材料与方 法

2.1 主要仪器与试剂

激光器:He-Ne 激光治疗仪(HN GSQ 21 型);测力计:国产 IL21 型正畸电测力计(西北工业大学与秦都口腔医院联合研制);羊抗 COX-2 多克隆抗体(Santa cruz 产品编号:sc-1746);免疫组织化学染色试剂盒(美国 ZYMED 公司 SP 试剂盒 产品编号:sp-9003);防脱片多聚赖氨酸(福州迈新公司 产品编号:GLU-0040)。

2.2 动物模型与标本制备

30 只雄性 Wistar 大鼠,8 周龄,体重(0.25 ± 0.02)kg,由吉林大学动物实验中心提供,实验动物合格证号:2011-000-5。随机分为 6 组,每组 5 只,各组加力时间分别为 1、3、5、7、14、21 d。各组动物采用自身对照,右侧为 He-Ne 激光照射侧,左侧为对照侧。速眠新麻醉剂按每千克体重 0.2 mL 肌肉注射麻醉。用直径 0.20 mm 不锈钢结扎丝在双侧上颌中切牙与上颌第一磨牙之间各栓结一根 NiTi 螺旋弹簧,30 g 力牵引上颌第一磨牙向近中移动,如图 1 所示。He-Ne 激光波长为 632.8 nm,激光功率为 20 mW。大鼠右侧正对上颌第一恒磨牙颊部皮肤常规备皮,He-Ne 激光照射该区域,该区域距离光源 100 cm,光斑直径为 1.0 cm,每次照射 10 min。加力组在正畸装置建立后当天开始照射,除 1 d 和 3 d 组分别照射 1 次和 3 次外,其余各组连续照射 5 次,每天 1 次。加力各组大鼠按所设计天数经质量分数为 4%(下同)的多聚甲醛心脏灌注处死。取双

侧上颌骨组织块,修整出包括上颌第一磨牙及其周围牙槽骨组织,移入 4% 多聚甲醛固定液于 4 ℃ 冰箱过夜。采用乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙,酒精脱水,石蜡包埋处理。制作以上颌第一磨牙为中心的、近远中方向的组织切片,切片厚约 4~5 μm。

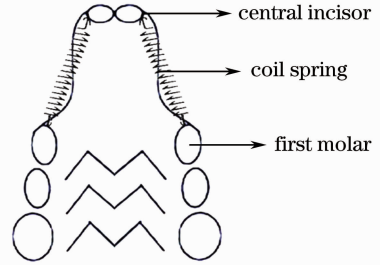


图 1 大鼠上颌实验装置咬合面观
Fig.1 Occlusal surface of the rat maxillary experimental device

2.3 常规 HE 染色及免疫组织化学染色

切片进行常规 HE 染色,用于组织定位。采用美国 ZYMED 公司的 SP 试剂盒进行 COX-2 免疫组织化学染色。阴性对照采用 PBS 液代替一抗,其余步骤相同。

2.4 图像分析及统计学处理

每个 COX-2 免疫组织化学染色标本选取 3 张完整切片,在每张切片的压力区和张力区分别随机选取 5 个视野进行检测分析,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区域的灰度值。具体操作为在低倍镜下寻找视野后,调至 200 倍,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 × 阳性强度灰度值。大鼠牙周组织 COX-2 的灰度积分以均数 ± 标准差(X ± SD)表示,应用统计学分析软件 SPSS 10.0 进行两样本均数比较检验。

3 结 果

由表 1 可知压力区加力 1 d 时,照射侧与对照侧牙周组织中 COX-2 的表达差异不显著。加力 3~7 d 时,照射侧表达量明显高于对照侧(P < 0.05);峰值出现在加力后第 5 天。张力区 COX-2 表达在加力 1~7 d 时照射侧均高于对照侧(P < 0.05);峰值出现在加力后第 7 天。

由图 2 可见,牙周膜血管内皮细胞胞浆内表达 COX-2,沿牙槽骨边缘排列的成骨细胞内也表达 COX-2。由图 3 可见,牙周膜成纤维细胞及多核破

骨细胞表达 COX-2。

表1 照射侧与对照侧的压力区及张力区牙周组织中 COX-2 阳性反应的灰度积分比较(X±SD)

Table 1 Comparison of the gray scale integral of COX-2 positive reaction in pressure and tension region of periodontium of both irradiating side and control side (X±SD)

| Forced time /d | COX-2 expression in the pressure region | | COX-2 expression in the tension region | |
|----------------|-----------------------------------------|--------------|----------------------------------------|--------------|
| | Experimental side | Control side | Experimental side | Control side |
| 1 | 132.78±4.91 | 134.03±2.48 | 129.66±4.25 * | 124.54±2.43 |
| 3 | 155.88±6.39 * | 149.83±7.29 | 148.17±6.13 * | 138.89±3.81 |
| 5 | 173.36±5.20 * | 164.63±3.31 | 157.76±7.13 * | 148.24±5.72 |
| 7 | 155.95±5.42 * | 148.53±2.99 | 168.48±6.74 * | 159.82±5.64 |
| 14 | 136.99±4.79 | 135.26±5.39 | 152.92±3.10 | 151.93±2.51 |
| 21 | 134.90±3.58 | 132.73±4.70 | 136.52±2.31 | 135.59±2.23 |

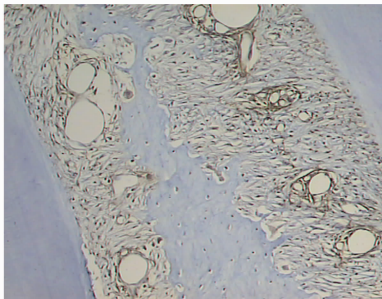
* $P < 0.05$ 

图2 He-Ne 激光照射组牙周组织中 COX-2 免疫组织化学染色, 200×

Fig. 2 Immunohistochemistry dyeing of COX-2 in periodontium in He-Ne laser irradiation group, 200×

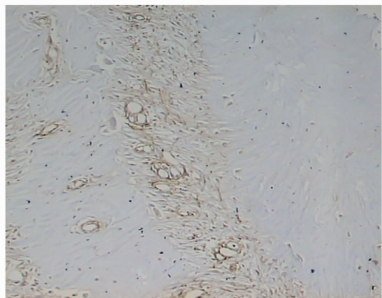


图3 张力区牙周膜中 COX-2 免疫组织化学染色, 200×

Fig. 3 Immunohistochemistry dyeing of COX-2 in the tension side of He-Ne laser irradiation group, 200×

4 讨 论

牙周组织血管改建发生在牙齿受正畸力的早期,在力的作用下血管改建活跃,并且改建过程贯穿于牙齿移动的始终,研究参与血管改建过程的细胞因子、蛋白质、酶及其影响因素有助于进一步阐述正畸牙移动的生理学基础。近年来学者在对肿瘤以及组织损伤修复等方面的研究发现,COX-2 与血管的发生密切相关^[3]。环氧化酶(COX)是前列腺素(PGs)合成的限速酶,它将花生四烯酸代谢成各种

前列腺素产物,后者参与维持机体的各种生理和病理过程。目前证实环氧化酶有两种同工酶,COX-1 和 COX-2。COX-1 是一种结构性酶,在多数正常组织中表达。而 COX-2 是一种诱导型酶,在多数情况下不表达或低表达,只有在炎症,损伤,应激或修复情况下才高表达。COX-2 催化合成前列腺素,后者可以直接或间接刺激血管生成^[4]。以往报道 COX-2 表达于内质网和核膜上,尤其以核膜上居多。本文采用免疫组织化学方法可以直观地观察到 COX-2 表达于各种参与牙齿移动的功能细胞中。从图 1 可知,牙周膜成纤维细胞,血管内皮细胞,成骨细胞,破骨细胞的胞浆和细胞核附近呈现棕黄色深染区域,这些深染区域即为 COX-2 集中表达的部位。COX-2 表达于核膜上有利于将应激信息快速传导至细胞核内,进而激发一系列催化反应。在大鼠正畸牙移动过程中牙周组织 COX-2 的表达变化与加力时间呈一定的规律性。无论照射侧还是对照侧,压力区 COX-2 的表达随加力时间延长而呈现增强趋势,到加力第 5 天明显达到高峰,随后表达开始逐渐下降。而张力区牙周组织中 COX-2 的表达高峰缓慢出现在加力后的第 7 天,随后表达下降。这符合付春茂等^[5]研究实验性牙移动过程中血管内皮生长因子-2 表达的时间趋势。该结果间接证明了 COX-2 的变化规律与血管相关因子变化规律趋于相同。细胞因子、内毒素、白介素、炎症因子、肿瘤诱导剂等均可以刺激 COX-2 产生^[6]。牙齿受正畸力后,压力区迅速表现出缺血缺氧情况,由此引起的白介素以及其他炎症因子水平均会上调,刺激该区域的新生血管内皮细胞以及成纤维细胞等表达 COX-2 增多。而张力侧则表现为 COX-2 表达情况缓慢上升,到了加力后第 7 天才达到高峰。其原因可能是牙周膜细胞以及成骨细胞对于牵张应力的反应较

为迟缓,且细胞数量在加力后第7天也达到高峰。牵张侧牙周膜内毛细血管口径变粗,炎症因子浓度呈现缓慢升高趋势。另外,Sato等^[7]认为COX-2参与骨形成早期的活动,并且与成骨细胞的成熟有关。正畸牙移动实质上是对骨细胞施加压应力和拉应力后的组织反应,最近,人们发现骨细胞受机械性损伤后产生COX-2,而COX-2可能与后期骨形成有关^[8,9]。

低能量激光治疗利用了激光的光学生物刺激效应。国内贺庆丽等^[10]研究发现只有当激光光子波长位于551.2~820.3 nm之间时,才有明显的医疗作用。而氦氖激光波长为632.8 nm,其光子能量为1.96 eV,是低能量激光治疗中比较常用的类型。当组织或细胞吸收了波长为632.8 nm的氦氖激光后,光子提供的能量将引起生物分子中原子的价电子跃迁,从基态跃迁至相应的激发态,光能转化为生物能,从而提高体内生物酶以及其他生物大分子的活性。这种光能还可以修复因病理因素造成的蛋白质副键的改变,但是不会损伤蛋白质的一级结构,也因此不会引起组织和细胞的不可逆性损伤^[11]。基于以上优点,本实验选择生物刺激效应好,生物安全性高,不产生副作用的氦氖激光进行研究。低能量激光照射能够引起细胞内的光化学效应,刺激细胞核内DNA、RNA合成从而促进细胞增殖和分化^[12]。Kreisler等^[13]发现体外培养的牙周膜细胞接受低能量激光照射24、48、72 h后均比对照组的增殖能力强。Choi等^[14]用波长为810 nm的半导体激光处理体外培养的人牙周膜细胞,也发现了低能量激光促进细胞增殖以及分化的效应。国内李燕等^[15]发现氦氖激光能够促进人正常皮肤成纤维细胞增殖,潘振华等^[16]在应用620 nm波长的弱激光照射大鼠背部皮肤创口时发现照射测比为照射测新生血管生成旺盛并且呈现一定范围的剂量依赖性。另外,低能量激光照射能够增加局部破骨细胞数量及促进其活性^[17]。细胞染色质吸收了激光能量后,通过增加ATP合成来增加细胞的能量^[18]。由于破骨细胞是多核细胞,具有较多的染色质和高活性,所以本破骨细胞对于低能量激光的反应比较快速,本实验结果与Wang等^[12]研究的低能量激光照射能够促进破骨细胞分化和活性相符合。李秋实等^[19]认为弱激光照射能够促进大鼠骨缺损愈合过程中成骨细胞及成纤维细胞的生成。Shibata等^[18]认为COX-2参与骨形成早期的活动,并且与成骨细胞的成熟有关。本研究结果显示骨小梁边缘的成骨细胞

表达COX-2,与以上研究相符。由此分析,低能量激光照射促进COX-2表达的途径之一可能是促进了破骨细胞、成骨细胞、成纤维细胞以及血管内皮细胞的增殖,而这些细胞正是表达COX-2的主体细胞群。

5 结 论

本实验结果表明,COX-2参与正畸牙移动,低能量激光照射能够增强牙移动过程中牙周组织的COX-2表达,调控牙移动过程中牙周组织的血管改建,为今后临床中低能量激光的应用提供了实验基础。

参 考 文 献

- 1 E. Mester. The biomedical effect of laser application[J]. *Laser Surg. Med.*, 1985, **5**: 31239
- 2 G. Arun Maiya, P. Kumar, L. Rao. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser-irradiation on diabetic wound healing dynamics[J]. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2005, **23**(2): 187~190
- 3 M. Ogawa, J. Suzuki, Y. Hirata *et al.*. A critical role of COX-2 in the progression of neointimal formation after wire injury in mice[J]. *Expert Opin Ther Targets.*, 2009, **13**(5): 505~511
- 4 E. P. Chen, E. M. Smyth. COX-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer[J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2011, **96**(1-4): 14~20
- 5 Fu Chunmao, Sun Xinhua. Effects of He-Ne laser irradiation on vascular endothelial cell growth factor-2 expression in periodontium of tooth movement in rabbits[J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(1): 156~160
付春茂, 孙新华. 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[J]. *中国激光*, 2008, **35**(1): 156~160
- 6 K. S. Chun, R. Langenbach. A proposed COX-2 and PGE(2) receptor interaction in UV-exposed mouse skin [J]. *Mol. Carcinog.*, 2007, **46**(8): 699~704
- 7 Y. Sato, N. Arai, A. Negishi *et al.*. Expression of cyclooxygenase genes and involvement of endogenous prostaglandin during osteogenesis in the rat tibial bone marrow cavity[J]. *J. Med. Dent. Sci.*, 1997, **44**(4): 81~92
- 8 J. Li, D. B. Burr, C. H. Turner. Suppression of prostaglandin synthesis with NS-398 has different effects on endocortical and periosteal bone formation induced by mechanical loading [J]. *Calcif Tissue Int.*, 2002, **70**(4): 320~329
- 9 M. R. Forwood. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo[J]. *J. Bone Miner Res.*, 1996, **11**(11): 1688~1693
- 10 He Qingli, He Jian, Zhang Zhengxi. A physics model of biology enzyme activity rising by low level laser[J]. *Laser Journal*, 2004, **25**(4): 53~54
贺庆丽, 贺 健, 张镇西. 弱激光提高生物酶活性的一种物理模型[J]. *激光杂志*, 2004, **25**(4): 53~54
- 11 F. Lin, S. F. Josephs, D. T. Alexandrescu *et al.*. Lasers, stem cells, and COPD[J]. *J. Transl Med.*, 2010, **8**(1): 16
- 12 W. Wang, A. Bergh, J. E. Damber. Increased expression of CCAAT/enhancer-binding protein beta in proliferative inflammatory atrophy of the prostate: relation with the expression of COX-2, the androgen receptor, and presence of

- focal chronic inflammation [J]. *Prostate*, 2007, **67** (11): 1238~1246
- 13 M. Kreisler, A. B. Christoffers, B. Willershausen *et al.*. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study[J]. *J. Clin. Periodontol.*, 2003, **30**(4): 353~358
- 14 E. J. Choi, J. Y. Yim, K. T. Koo *et al.*. Biological effects of a semiconductor diode laser on human periodontal ligament fibroblasts[J]. *J. Periodontal Implant SCI.*, 2010, **40** (3): 105~110
- 15 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 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
- 16 Pan Zhenhua, Li Yinxin, Wang Xing *et al.*. Effects of low-level laser therapy on cutaneous wound healings with three doses[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(2): 509~603
- 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): 509~603
- 17 L. Brosseau, V. Robinson, G. Wells *et al.*. Low level laser therapy (Classes III) for treating osteoarthritis [J]. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2007, (1): CD002046
- 18 M. Shibata, I. Kodani, M. Osaki *et al.*. Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance[J]. *Oral Oncol.*, 2005, **41**(3): 304~312
- 19 Li Qiushi, Zhou Yanmin, Chen Yinxin *et al.*. Effect of low level laser therapy on bone defect of an animal model[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(11): 1104004
- 李秋实, 周延民, 陈英新 等. 低能量激光治疗对骨缺损动物模型的影响[J]. *中国激光*, 2011, **38**(11): 1104004

栏目编辑: 韩 峰