口腔医学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000878

低强度超声对大鼠牙槽骨改建过程中血管内皮生长因子表达的影响

杨　梅[1],向学熔[1],叶　国[3],潘兰兰[3],范小平[2],晏　莺[1]

(重庆医科大学附属口腔医院 1. 牙周科;2. 正畸科;3. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室、重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室,重庆　401147)

【摘　要】**目的**:探讨低强度脉冲超声(low-intensity pulsed ultrasound,LIPUS)对大鼠正畸牙移动过程中牙槽骨改建中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达的影响。**方法**:健康 6~8 周雄性 SD 大鼠 30 只,采用左右对照实验,分为单纯加力组(对照组)以及 LIPUS+加力组(实验组),两组各又完全随机分为 1、3、5、7、14 d 5 个亚组,每组 6 只大鼠。建立正畸牙移动动物模型,每只大鼠实验侧加力后第 2 天行 LIPUS 刺激(频率 1.5 MHz、强度 30 mW/cm^2、脉冲宽度 200 μs、重复频率 1 kHz),20 min/(次·d),对照侧行不开功率的假刺激,于相应时间点处死实验鼠取上颌第一磨牙及周围牙槽骨用于免疫组织化学染色和 TRAP 染色。**结果**:免疫组织化学染色结果显示实验组 VEGF 的表达均高于对照组,其差异具有统计学意义(P=0.000);TRAP 染色结果显示:实验组压力侧破骨细胞数均高于对照组,差异具有统计学意义(P=0.000)。**结论**:LIPUS 能有效促进牙槽骨改建过程中 VEGF 和破骨细胞的表达,其可能通过增加 VEGF 的表达促进正畸牙移动过程中的牙槽骨改建。

【关键词】低强度脉冲超声;牙槽骨改建;血管内皮生长因子;破骨细胞

【中图分类号】R332;R454.3;R783.5　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-10-19

Change of VEGF in alveolar bone remodeling stimulated by low-intensity pulsed ultrasound

Yang Mei[1], Xiang Xuerong[1], Ye Guo[3], Pan Lanlan[3], Fan Xiaoping[2], Yan Ying[1]

(1. Department of Periodontics; 2. Department of Orthodontics; 3. Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education; Stomatological Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect of low-intensity pulsed ultrasound(LIPUS) therapy on the change of vascular endothelial growth factor(VEGF) in the process of the alveolar bone remodeling. ***Methods***: Thirty male sprague-dawley(SD) rats were randomly divided into orthodontics group(control group) and LIPUS+orthodontics group(experimental group). From the second day following animal models of orthodontic teeth movement, the right maxillary took LIPUS(frequency 1.5 MHz, intensity 30 mW/cm^2, pulsewidth 200 μs, repetition frequency 1 kHz) by 20 minutes per day, and the left maxillary took sham LIPUS treatment. The samples were collected on the 1st day, 3rd day, 5th day, 7th day and 14th day respectively. Immunohistochemistry and TRAP staining at each time point were performed to evaluate the effects of LIPUS on the change of VEGF and osteoclasts in the process of the alveolar bone remodeling. ***Results***: The expressions of VEGF in the experimental groups were significantly higher than those in the control groups(P=0.000) and the numbers of osteoclast in the experimental groups were significantly higher than those in the control groups (P=0.000). ***Conclusion***: LIPUS can effectively increase the expression of VEGF to promote alveolar bone remodeling.

【Key words】low-intensity pulsed ultrasound; alveolar bone remodeling; vascular endothelial growth factor; osteoclast

作者介绍:杨　梅,Email:929350489@qq.com,
研究方向:牙槽骨改建和再生的研究。

通信作者:向学熔,Email:cqzxfxp@sina.com。

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(编号:cstc2014jcyjA10055);2013 年重庆高校创新团队建设计划资助项目(编号:2013)。重庆市渝北区科技计划资助项目(编号:2015(社)10 号);重庆市渝北区科委资助项目(编号:渝北财教[2011]32号)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160314.0907.002.html (2016-03-14)

为了缩短成人正畸治疗的周期，加速正畸牙移动成为近年的研究热点。低强度脉冲超声（low-intensity pulsed ultrasound，LIPUS）是一种非侵入性机械能，可在生物组织内传播并促进细胞因子的表达[1]。近年来，由于 LIPUS 无创、安全、价廉、使用方便等优点受到广大研究者关注，大量研究表明 LIPUS 能有效促进各种骨折的愈合，并已用于临床治疗[2-3]。由于牙槽骨改建过程与骨折愈合过程相似，也有学者研究表明 LIPUS 能促进牙槽骨改建，进而加速正畸牙移动[4]，但目前对 LIPUS 促进牙槽骨改建的潜在机制的研究有限。研究表明，骨改建与血管形成是密不可分的，血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）是一种重要的促血管生成因子，由成骨细胞、淋巴细胞和巨噬细胞等分泌，其具有促进血管形成、增加血管通透性、诱导骨形成以及改变细胞外基质等生物学效应[5]。近年研究发现，VEGF 不仅与生理或病理过程中的血管新生有关，在骨组织的改建过程中也起重要作用[6]。本研究拟通过构建正畸牙移动动物模型，检测 LIPUS 对正畸牙移动过程中牙槽骨改建中 VEGF 及破骨细胞表达的影响，探讨 LIPUS 促进牙槽骨改建可能的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与分组 健康清洁级 sprague-dawley（SD）大鼠，雄性，6~8 周龄，体质量（200 ± 20）g（由重庆医科大学实验动物中心提供，本研究得到作者所在单位实验动物伦理委员会的审查批准（SYXK（渝）2012-0001））。本实验采用大鼠上颌左右对照实验，30 只实验大鼠分为单纯加力组（对照组）以及 LIPUS+加力组（实验组），其各又随机分为 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d 5 个亚组，每组 6 只大鼠。

1.1.2 主要试剂与设备 10%水合氯醛（由重庆医科大学附属儿童医院提供）；便携式慢机、尖头金刚砂车针（由重庆医科大学附属口腔医院晶美义齿加工中心提供），正畸用结扎丝（0.2 mm）、镍钛拉簧（0.008 mm × 9.000 mm，浙江普特医疗器械有限公司）、测力计，低强度脉冲超声仪（频率 1.5 MHz、强度 30 mW/cm²、脉冲宽度 200 μs、重复频率 1 kHz，重庆医科大学超声影像研究所研制），鼠板（自制），正置荧光显微镜（Olympus BX41，日本），VEGF 一抗（Abcam 生物实验材料有限公司），兔二抗（中杉生物实验材料有限公司），DAB 显色试剂盒（碧云天生物实验材料有限公司），TRAP 染色试剂盒（Sigma 公司，美国）。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 大鼠行 10%水合氯醛（3~5 mL/kg）腹腔注射全麻，待其进入平稳麻醉状态后，将其固定于鼠板上，用便携式慢机和尖头金刚砂针在大鼠上颌双侧切牙的远中轴角、唇面、舌面以及第一磨牙近中面与轴角平齐龈缘处分别磨出约 0.2 mm 浅凹。镍钛拉簧均在口外进行长度测量及力量校对后备用，拉伸后长度一致，并在口内再次进行力值测量，保证其准确性。用 0.2 mm 结扎丝将拉簧固定于第一磨牙及同侧切牙已磨好的沟内，两侧同时加力 50 g，以切牙为支抗拉第一磨牙向近中移动。

1.2.2 超声的刺激 实验鼠于加力后第 2 天开始 LIPUS 刺激，LIPUS 参数为频率 1.5 MHz、强度 30 mW/cm²、脉冲宽度 200 μs、重复频率 1 kHz，恒定不变，LIPUS 工作头涂抹耦合剂，将其紧贴实验侧第一磨牙腭侧对应粘膜，保持探头稳定，20 min/（次·d）。对照侧以同样的方式行不开功率的假刺激。

1.2.3 标本的制取 分别于超声刺激后第 1、3、5、7、14 d 分批处死实验大鼠，每组 6 只，快速取下第一磨牙及周围牙槽骨后立即放入 4%多聚甲醛中固定 24 h，流水冲净，放入 10% EDTA 溶液中于 4 ℃冰箱里常规脱钙，每 2 d 换 1 次 EDTA 溶液，直到大头针能无阻力穿过标本，大约共 45~50 d，常规脱水、包埋。

1.2.4 免疫组织化学染色、TRAP 染色及观察 沿磨牙长轴行近远中向连续切片，每张厚度 5 μm，可以观察到牙根冠方的近中区域牙周膜受压，形成压力侧；牙根冠方的远中区域牙周膜被牵张，形成张力侧。切片行常规免疫组织化学染色和抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）染色。取染色后的切片用正置荧光显微镜在 400 倍镜下观察每张切片牙周膜中的 VEGF 表达情况（VEGF 的免疫组织化学染色以细胞浆内分布有棕黄色者确定染色阳性）和破骨细胞的表达情况（TRAP 染色以细胞红染且细胞核大于 3 个者为阳性细胞），并采集图像。从每张切片的染色阳性区域各随机选取 3 个 400 倍视野用 image-proplus 6.0 图像分析软件对切片进行半定量分析，检测各组免疫组织化学染色标本的平均光密度值，并将免疫组织化学染色切片各组的结果分别与 PBS 代替一抗的空白对照进行对比观察；TRAP 染色切片行压力侧破骨细胞计数分析。

1.3 统计学分析

所有实验数据采用 SAS 9.3 统计分析软件进行处理，所得数值均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，数据比较采用裂区设计方差分析，检验水准为 α=0.05。

2 结 果

2.1 LIPUS 刺激对 VEGF 表达的影响

免疫组织化学染色显示，染色越深，其平均光密度值越大。细胞浆内分布有棕黄色者确定为 VEGF 表达阳性细胞，

VEGF主要表达在血管内皮细胞(图 1)。实验数据统计结果显示:①分组效应具有统计学差异,说明压力侧实验组的 VEGF 表达强于对照组;张力侧实验组的 VEGF 表达也强于对照组,且差异具有统计学意义;②时间效应具有统计学差异,LIPUS 刺激后第 1、3、5、7 天压力侧和张力侧 VEGF 的表达逐渐增加,到第 7 天达到高峰,第 14 天 VEGF 的表达有所降低;③压力侧和张力侧的组间 × 时间效应均无统计学差异,说明分组和时间无交互效应(表 1)。

2.2 LIPUS 刺激对压力侧破骨细胞数的影响

镜下 400 倍观察 TRAP 染色结果显示破骨细胞被染成酒红色,多核、体积较大,主要位于压力侧牙槽骨骨吸收陷窝表面(图 2)。实验数据统计结果显示:①分组效应具有统计学差异,说明实验组破骨细胞的表达多于对照组,且差异具有统计学意义;②时间效应具有统计学差异,LIPUS 刺激后第 1、3、5、7 天压力侧破骨细胞数逐渐增加,第 7 天达到高峰,第 14 天明显降低;③组间 × 时间效应无统计学差异,说明分组和时间无交互效应(表 2)。

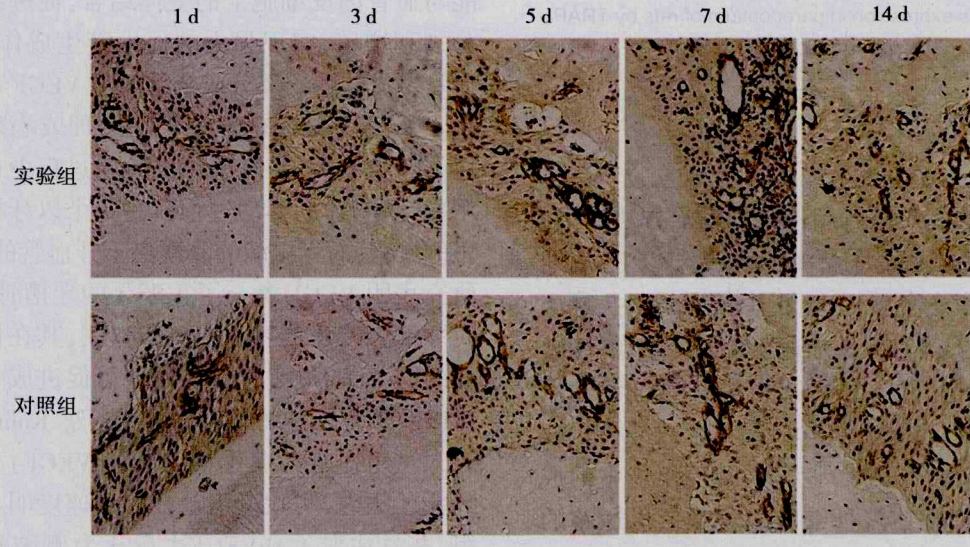


图 1 不同组牙周膜中 VEGF 免疫组织化学染色观察（SP,400 ×）

Fig.1 VEGF expression in parodontium of rats by immunohistochemistry (SP,400 ×)

表 1 不同组别牙周膜中 VEGF 免疫组织化学染色平均光密度比较（$\bar{x} \pm s$,n=6）

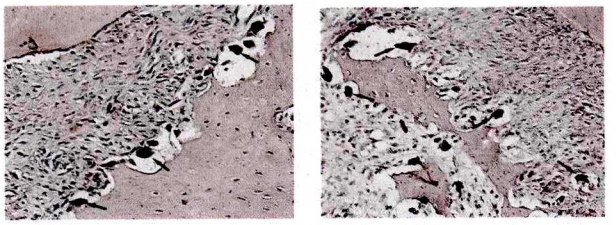
Tab.1 MOD of VEGF in parodontium of rats by immunohistochemistry ($\bar{x} \pm s$,n=6)

	组别	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d
压力侧	实验组	0.041 ± 0.001	0.074 ± 0.001	0.099 ± 0.001	0.149 ± 0.001	0.120 ± 0.002
	对照组	0.040 ± 0.001	0.073 ± 0.001	0.097 ± 0.001	0.147 ± 0.001	0.118 ± 0.001
	组间	F=30.220	P=0.000			
	时间	F=1 2804.600	P=0.000			
	组间 × 时间	F=0.520	P=0.720			
张力侧	实验组	0.041 ± 0.002	0.073 ± 0.001	0.098 ± 0.001	0.148 ± 0.001	0.119 ± 0.001
	对照组	0.039 ± 0.001	0.073 ± 0.001	0.097 ± 0.001	0.146 ± 0.001	0.118 ± 0.001
	组间	F=29.080	P=0.000			
	时间	F=20 007.600	P=0.000			
	组间 × 时间	F=1.200	P=0.327			

表 2 不同组别压力侧 TRAP 染色破骨细胞数比较（单位:个,$\bar{x} \pm s$,n=6）

Tab.2 The number of osteoclast in pressure side of rats parodontium by TRAP ($\bar{x} \pm s$,n=6)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d
实验组	2.000 ± 0.632	5.500 ± 1.378	8.333 ± 1.033	12.500 ± 1.049	4.667 ± 0.816
对照组	1.500 ± 0.548	4.000 ± 1.265	6.833 ± 0.753	10.000 ± 0.894	3.333 ± 1.033
组间	F=35.200	P=0.000			
时间	F=175.440	P=0.000			
组间 × 时间	F=1.650	P=0.180			



A. 实验组第 5 天压力侧　　B. 实验组第 7 天压力侧

注：箭头所示为破骨细胞

图 2　不同组压力侧牙周膜中 TRAP 染色观察（TRAP，400×）

Fig.2　Osteoclasts expression in parodontium of rats by TRAP (TRAP，400×)

3　讨　论

错颌畸形的成年患者用传统的矫治方法，牙齿移动速度一般为 1 mm/月，治疗时间 2 年以上，周期过长大大增加了患者牙根吸收、患牙周病以及龋病的风险[7]。如何安全有效地加速正畸牙的移动、缩短疗程，一直是国内外研究的热点。正畸牙的移动过程实质是其牙周组织的改建过程，其中以牙槽骨改建为主。当正畸力作用于牙齿时，牙周组织中的成骨细胞与破骨细胞在多种细胞因子和信号通路的调节下进行牙槽骨改建[8]，其中压力侧出现牙槽骨吸收，张力侧出现牙槽骨再生，从而实现牙齿移位。因此，促进牙槽骨改建的方法便能加速正畸牙移动，缩短治疗周期。目前已有大量学者研究报道了促进牙槽骨改建的方法如基因疗法、骨皮质切开[9]、低强度激光[10]以及 LIPUS[4]等。以上方法中，LIPUS 由于其无创、安全、价廉、使用方便且在正畸治疗过程中促进正畸牙牙根吸收的修复[11]等优点受到口腔医学界广大学者关注，Xue 等[4]学者用 LIPUS 刺激大鼠正畸牙动物模型的上颌，研究表明相同时间内，LIPUS 刺激组牙齿移动较对照组快，且研究表明 LIPUS 可能通过影响 BMP-2的表达促进牙槽骨改建。本课题组前期研究表明，LIPUS 可通过影响COX-2 和 PGE2 的表达促进牙槽骨改建、加快正畸牙移动，但牙槽骨改建的过程是一个十分复杂的过程，本课题组对 LIPUS 加快正畸牙移动的潜在机制做了进一步研究。

LIPUS的生物学效应包括热效应和非热效应，研究表明 LIPUS 强度在 1~50 mW/cm² 范围内产热微弱，不会引起组织损伤或变性，但其作为一种机械刺激可影响细胞因子的表达，从而促进组织伤口愈合和骨改建[12]。肖惟雄等学者[13]在 LIPUS 对骨治疗的生物学机制的综述中谈到 LIPUS 可通过影响骨改建过程中的细胞因子影响骨折的愈合，包括 VEGF、BMPs 以及转化生长因子等。国外有学者用 LIPUS 辐照延迟性愈合骨折患者或骨折动物模型，均发现 LIPUS 可通过增加 VEGF 的表达促进骨折愈合[14-15]。

VEGF 是一种特异性促进血管生长的因子，其能与血管内皮细胞上的受体结合，促进细胞的有丝分裂和增殖，实现强大的促血管生成作用，其它促血管生成的因子部分或全部通过 VEGF 起作用[16-17]。近年研究发现，VEGF 不仅与生理或病理过程中的血管新生有关，在骨组织的改建过程中也起重要作用[6]。正畸牙的移动过程就是一个以牙槽骨改建为主的过程，而骨组织的改建离不开血管的形成，大量研究表明 VEGF 参与了正畸牙的牙槽骨改建过程，对牙槽骨改建具有双向调节作用，其在促进血管生成的同时，通过旁分泌作用也可促进成骨细胞的成骨以及破骨细胞的骨吸收作用[5,17]。Kohno 等[18]学者将人重组血管内皮生长因子(rhVEGF)注入大鼠正畸牙牙龈内，实验组正畸牙移动速度明显快于对照组，并且注射了 rhVEGF大鼠压力侧破骨细胞数明显增加。结果提示 rhVEGF 可通过促进破骨细胞的表达加快压力侧牙槽骨的吸收速度，进而促进正畸牙的移动速率。

基于国内外大量学者的研究成果提示 LIPUS 对骨改建的影响、血管化对骨改建的重要作用以及 LIPUS 对 VEGF 在骨折愈合过程中的表达的影响，本实验推测 LIPUS 能通过影响 VEGF 的表达促进牙槽骨的改建。本实验通过 LIPUS 刺激大鼠正畸加力模型，通过观察 VEGF 免疫组织化学染色以及破骨细胞 TRAP 染色来探讨 LIPUS 促进牙槽骨改建可能的潜在机制。查阅相关文献，由于大鼠口腔较小，其它实验为了可操作性，基本上均是通过口外刺激实验鼠正畸牙，但是超声波在穿过外皮软组织和毛发的传播过程中会有衰减，易引起误差。本实验根据大鼠的口腔大小研制了超声仪的作用探头，直接将探头伸入大鼠口内，通过口内粘膜刺激实验牙的牙槽骨，这样大大减少了超声波传播过程中的衰减，一定程度上提高了实验的精确性。整个实验过程中，实验鼠自由摄食水，精神状态佳。每天用 LIPUS 刺激实验组正畸牙并检查或重置加力装置，避免因加力装置移位或脱落引起的实验误差。

VEGF免疫组织化学染色结果显示，随着时间的增加，牙周膜中 VEGF 的表达先增加后降低，第 7 天达到高峰。实验组 VEGF 的表达明显高于对照组，差异具有统计学意义。本实验结果提示，VEGF 参与了正畸牙移动过程中的牙槽骨改建，并且 LIPUS 对牙槽骨改建过程中 VEGF 的表达具有促进作用。有研究表明缺氧是诱导 VEGF 表达的一个关键性因素，暴露于缺氧的环境下，VEGFmRNA 可迅速增加表达，促进 VEGF 的表达，从而促进血管的生成，以改善缺氧[17]。实验组和对照组 VEGF 的表达在第 1 天便开始增多，相同组内，压力侧 VEGF 的表达均多于张力侧，这可能是由于正畸牙移动过程中压力侧血管受压导致的缺血缺氧引起的。但差异是否具有统计学意义，这还需扩大样本量进一步实验，探讨其差异性。

所有组压力侧 TRAP 染色结果显示，压力侧的牙槽骨表面第 1 天便有少量破骨细胞产生，但牙槽骨表面无明显吸收。随着时间的增加，第 3、5、7 天牙槽骨表面的破骨细胞量增多，牙槽骨表面出现骨吸收陷窝，第 14 天明显减少，实验组较对照组多，差异具有统计学意义，其变化规律与 VEGF 免疫组织化学染色变化规律一致。有文献报道显示，外源性和内源性的 VEGF 均能促进牙槽骨改建过程中破骨细胞的生成，进而促进牙槽骨改建[18]。本实验结果也显示，VEGF 表达增加的同时，破骨细胞的数量也相继增加，这与其他学者的研究结果一致。

综上所述，牙周组织在受到正畸力刺激下的改建是一个非常复杂的过程，通过多种因子和信号通路的相互调节实现的。VEGF 是重要的促血管生长因子，同时对骨改建具有重要作用，本实验结果显示 LIPUS 刺激组 VEGF 的表达以及破骨细胞数均大于对照组，提示 LIPUS 可能通过促进 VEGF 的表达加快牙槽骨改建，为 LIPUS 促进正畸牙移动的可能潜在机制提供实验基础，为后期 LIPUS 应用于临床提供了实验依据。但是牙槽骨改建过程是个十分复杂的过程，为了更完善阐明 LIPUS 促进牙槽骨改建的潜在机制，尚还需大量实验进一步研究。

参 考 文 献

[1] Xie LK, Wangrangsimakul K, Suttapreyasri S, et al. A preliminary study of the effect of low intensity pulsed ultrasound on new bone formation during mandibular distraction osteogenesis in rabbits[J]. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2011, 40(7): 730-736.

[2] Dudda M, Hauser J, Muhr G, et al. Low-intensity pulsed ultrasound as a useful adjuvant during distraction osteogenesis: a prospective, randomized controlled trial[J]. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 2011, 71(5): 1376-1380.

[3] Pomini KT, Andreo JC, Rodrigues AC, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on bone regeneration biochemical and radiologic analyses[J]. Journal of Ultrasound in Medicine, 2014, 33(4): 713-717.

[4] Xue H, Zheng J, Cui Z, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates tooth movement via activation of the BMP-2 signaling pathway[J]. Plos One, 2013, 8(7): e68926.

[5] 刘蓉艳，李 娜，李金源，等. VEGF 对牙周组织改建影响的研究进展[J]. 中外医疗，2011，30(10)：186.

[6] 管晓燕，徐宇红，彭彩刚，等. VEGF 促进大鼠正畸牙牙周组织改建的研究[J]. 遵义医学院学报，2009，32(6)：562-566.

[7] Chung SEV, Tompson B, Gong SG. The effect of light emitting diode phototherapy on rate of orthodontic tooth movement: a split mouth, controlled clinical trial[J]. Journal of Orthodontics, 2015, 42(4): 274-283.

[8] Hasegawa M, Adachi T, Takano-Yamamoto T. Computer simulation of orthodontic tooth movement using CT image-based voxel finite element models with the level set method[J]. Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, 2015[Epub ahead of print].

[9] Iglesias Linares A, Moreno Fernandez AM, Yañez Vico R, et al. The use of gene therapy vs. corticotomy surgery in accelerating orthodontic tooth movement[J]. Orthodontics & Craniofacial Research, 2011, 14(3): 138-148.

[10] Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, et al. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL[J]. Orthodontics & Craniofacial Research, 2008, 11(3): 143-155.

[11] 刘志峰，徐 娟，鄂玲玲，等. 低强度脉冲超声促进大鼠正畸性牙根吸收的修复[J]. 中华口腔正畸学杂志，2011，18(2)：110-112.

[12] 李明星，郑 杰，闫福华. 促进牵引成骨新骨形成的物理方法研究进展[J]. 口腔医学研究，2008，24(3)：347-349.

[13] 肖惟雄，班兆阳，朱智敏. 低强度脉冲超声在骨治疗中的生物学机制[J]. 国际口腔医学杂志，2013，40(4)：557-560.

[14] Lu H, Qin L, Cheung W, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerated bone-tendon junction healing through regulation of vascular endothelial growth factor expression and cartilage formation[J]. Ultrasound in Medicine & Biology, 2008, 34(8): 1248-1260.

[15] Rutten S, Nolte PA, Korstjens CM, et al. Low-intensity pulsed ultrasound increases bone volume, osteoid thickness and mineral apposition rate in the area of fracture healing in patients with a delayed union of the osteotomized fibula[J]. Bone, 2008, 43(2): 348-354.

[16] 李 艳，施泽宏，尹宁北，等. 上颌骨内置式持续等张缝牵引成骨机制的实验研究[J]. 中国美容医学，2010，19(6)：852-856.

[17] 吴纪程，兰泽栋，张端强. 血管内皮生长因子及其成骨作用 [J]. 广东牙病防治，2007，15(4)：186-188.

[18] Kohno S, Kaku M, Tsutsui K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement[J]. Journal of Dental Research, 2003, 82(3): 177-182.

（责任编辑：张辉洁）