·临床研究·

金葡液在兔下颌骨牵张成骨中作用的研究

高晓燕,张志纯
(辽宁医学院附属第二医院,辽宁 锦州 121001)

摘要:目的 利用种植型牵张器增高兔下颌牙槽嵴,观察牵张成骨过程中金葡液的作用,并探讨其可能的作用机制。**方法** 40 只兔建模后随机分为实验组和对照组 2 组,每组 20 只。术后第 8 天开始,实验组局部注射金葡液,对照组不加药。术后不同时间分别行大体观察、X 线观察、组织学观察、免疫组化观察和灰度值测定并进行统计学分析,测定血清钙、磷及碱性磷酸酶(ALP)含量。**结果** 实验组术后不同时间的骨代谢活性、新骨生成和血清钙、磷及 ALP 含量均高于对照组。牵张后 1d、1 周、2 周、四周,实验组和对照组免疫组化染色平均灰度值间差异有统计学意义。**结论** 在兔下颌骨牵张成骨时,局部注射金葡液可以达到良好的骨再生,加速牵张过程中新骨生成,从而缩短骨愈合时间。

关键词: 金葡液;牵张成骨;骨愈合

中图分类号: R322.71 **文献标识码:** B

牵张成骨术(Distraction Osteogenesis,DO)经过一个世纪的发展,现已广泛地用于治疗各种严重的牙颌面畸形,已成为重建颅颌面骨缺损的重要技术手段,具有手术创伤小,不需植骨,周围软组织可同期扩张等优点,但牵张过程持续时间长,手术操作复杂,容易出现骨断端对位不良或在肌肉作用下继发断端移位的情况。如何提高新骨生成速度,加快骨愈合,一直是牵张成骨领域研究的热门话题。金葡液(骨折愈合刺激素)是已在临床应用的促进骨折愈合的药物,本实验建立兔下颌骨牵张成骨模型,在牵张成骨过程中加入金葡液,试图借助金葡液的成骨作用,促进牵张成骨中骨愈合,为临床应用药物促进牵张成骨骨愈合提供使用的方法。

1 材料与方法

1.1 **主要药物** 选用沈阳协和生物制药股份有限公司提供的金葡素注射液,商品名高聚生,批准文号:国药准字 S19990010,执行标准:WS4-(S-004)批号:20091201,规格:2mL/支。

1.2 **实验动物** 选取由辽宁医学院提供的健康日本大耳白兔 40 只,雌雄各半,体重约 2.0+0.25kg,适应性圈养一周后随机分成实验组和对照组两大组,每组又分别随机分成牵张后 1 天、1 周、2 周、4 周组(每组 5 只)。

1.3 **牵张器** 自制圆柱型种植型牵张器,自制圆柱型种植型牵张器包括光滑导针、内部结构和外部结构,材质为 TA2 纯钛[1,2]。光滑导针位于内螺杆的顶端,可以增加骨升段稳定性;内部结构可以升高骨段;外部结构与骨基段紧密固位。

1.4 **动物模型的建立** 用 10% 水合氯醛(3mg/kg)麻醉实验动物后,随机选取一侧下颌骨,3% 硫化钠脱毛、碘伏消毒口腔周围皮肤后,在下颌骨内侧切开皮肤肌肉及骨膜,从颏孔向前与下颌骨上缘平行标出水平截骨线,两端向牙槽嵴标出垂直截骨线,在生理盐水降温下,用慢速裂钻形成 8mm×5mm 骨升段,在骨升段基底侧正中用特制裂钻制备约 2mm 长的针道,与牵张器内部螺杆的光滑导针相吻合,注意保护舌侧骨膜。在下颌骨下缘约相当于颏孔位置定点,用临床标准种植钻头预备种植体窝,直径约 3.54mm,旋入牵张器外部结构至水平截骨线,再旋入牵张器内部螺杆,生理盐水冲洗后,逐层缝合,术后常规肌注庆大霉素 3d 以防感染。

术后经 7d 的间歇期后开始牵张,每次 0.5mm,每天两次,连续牵张 4d。实验组于牵张开始后第 1 天、1 周、2 周、3 周、4 周,在牵张区注射金葡液 0.5mL。对照组不加药,只做牵张对照。两组分别于牵张开始后第 1 天、1 周、2 周、4 周,经耳缘静脉取血 2mL/只后从耳缘静脉注入空气处死,切取牵张区组织块(每次每组 5 只)。

金葡液的注射方法:先旋下牵张器的内部螺杆置于 2% 戊二醛中浸泡 30min,然后将兔全麻后牵张部位消毒铺巾,从内部螺杆的位置注入金葡液 0.5mL,最后再将内部螺杆旋上。

1.5 **统计学处理** 应用 SPSS13.0 软件对数据做 t 检验进行比较,实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,显著性检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 **血清 Ca、P 及 ALP 含量测定** 血清 Ca、P 和 ALP 含量比较,实验组高于对照组,差异有显著性,结果见表 1、2、3。

表 1 两组血清 Ca 含量比较 mmol/L,$\bar{x}\pm s$

时间	n	实验组	对照组
牵张开始后 1 天	5	2.9180±0.0342**	2.5760±0.0195
牵张开始后 1 周	5	3.1080±0.0396**	2.6480±0.0303
牵张开始后 2 周	5	3.1540±0.0134**	2.81±0.04712
牵张开始后 4 周	5	3.2280±0.0084**	2.9600±0.0418

与对照组比较,**:P<0.01。

表 2 两组血清 P 含量比较 mmol/L,$\bar{x}\pm s$

时间	n	实验组	对照组
牵张开始后 1 天	5	1.5800±0.0187**	0.8780±0.0110
牵张开始后 1 周	5	1.7200±0.0245**	0.906±0.0134
牵张开始后 2 周	5	1.9980±0.0642**	1.2980±0.0205
牵张开始后 4 周	5	2.1620±0.0286**	1.4760±0.0167

与对照组比较,**:P<0.01。

收稿日期:2010-11-17

中国知网 https://www.cnki.net

表 3　两组血清 ALP 含量比较 U/L,$\bar{x} \pm s$

时间	n	实验组	对照组
牵张开始后 1 天	5	104.1380 ± 1.0940**	75.0900 ± 1.3864
牵张开始后 1 周	5	113.7560 ± 2.2356**	83.2480 ± 1.5875
牵张开始后 2 周	5	121.5020 ± 1.5405**	92.5180 ± 1.5029
牵张开始后 4 周	5	134.8580 ± 1.2606**	104.2380 ± 1.2072

与对照组比较,**:P < 0.01。

2.2　组织学形态观察

2.2.1　HE 染色结果　牵张末期(牵张后 1 天和 1 周),两组的牵张区都出现了大量的胶原纤维,与牵张方向一致,其中包含成纤维细胞、间充质细胞及成骨细胞,还有一些新生血管及较多的淋巴细胞。在两侧正常骨质与牵张区连接的牵张前沿处,实验组可见大量的新生骨小梁和类骨质,形状纤细,排列致密,而对照组只见少量得新生骨小梁和类骨质。且实验组骨小梁内部的骨细胞丰富,多于对照组。

2.2.2　免疫组化染色结果(染色强度用平均灰度值表示,见表 4)

牵张后 1 天,BMP - 2 在实验组和对照组都呈阳性染色(阳性部位为细胞胞浆中),BMP - 2 在牵张区的梭形细胞和邻近成熟骨的髓腔中呈阳性表达,在牵张前沿新生骨小梁的骨细胞和周围成骨细胞中也呈阳性表达。实验组的染色强于对照组(P < 0.05)。牵张后 1 周和 2 周,实验组和对照组的阳性表达都较牵张后 1 天明显减弱(P < 0.05),BMP - 2 在牵张前沿梭形细胞和成骨细胞中染色很淡,2 周比 1 周更淡,但皮质骨中的骨细胞和骨髓腔中的 BMP - 2 仍呈阳性染色,实验组染色强于对照组(P < 0.05)。牵张后 4 周,在梭形细胞和成骨细胞中染色更淡,骨髓腔和骨细胞中仍呈阳性表达,实验组和对照组见染色强度差异明显(P < 0.05)。

表 4　BMP - 2 在牵张成骨中染色的平均灰度值 $\bar{x} \pm s$

	实验组	对照组
牵张后 1 天	150.3139 ± 0.2925**	160.99805 ± 0.7710
牵张后 1 周	154.5031 ± 0.4907**	165.5362 ± 0.8986
牵张后 2 周	162.5686 ± 0.2341**	173.6363 ± 0.3873
牵张后 4 周	169.6638 ± 0.2376**	179.5487 ± 0.3686

与对照组比较,**:P < 0.01。

3　讨论

骨组织中的无机成分主要是以羟磷灰石晶体的形式存在,其中主要是钙磷酸盐和钙碳酸盐,钙是骨折愈合过程中基质钙化和骨化不可缺少的成分,发生骨折损伤时,机体必须提供大量的钙作用于成骨。血液中钙和磷是相互作用的系统,与骨中钙和磷也维持着动态平衡,即溶骨作用(骨中钙溶解入血)和成骨作用(血中钙盐在骨中沉积)的正常进行时维持血中钙、磷含量稳定的重要环节,其乘积维持一定水平(阈值:Ca × P > 40mg/100mL),超过一定限度,体液中的钙和磷就会在骨的有机质中先形成磷酸钙,再沉积为骨盐。所以血清钙的水平在一定程度上反映了骨代谢的水平,而磷亦是一个辅助观察指标。成骨细胞分化早期主要是 ALP 的表达,ALP 是成骨细胞的标志性酶之一[1],在体外钙化中起关键作用。活跃的成骨细胞内,ALP 活性明显增加,提示 ALP 可能作用于有机磷酸复合物和焦磷酸,使局部磷酸根增多,与血液渗透出来的钙离子结合,达到一定阈值时,类骨质钙化[2],从而启动钙化。血清 ALP 的活力与成骨细胞的数目具有良好的相关性[3],所以认为可以用血清 ALP 反应成骨活性。

BMP 是目前公认的高效骨诱导因子,具有诱导成骨细胞分化和诱导体外成骨能力[4]。而其中最重要的是 BMP - 2。BMP - 2 是具有特殊生物学活性的细胞生长因子,具有多种生理功能,能使未分化的间充质细胞定向分化为成骨细胞并形成骨组织,通过基因重组技术表达的重组人 BMP - 2 可在正位和异位成功地诱导出骨组织[5]。BMP - 2 还能诱导成骨前身细胞分化为成熟的成骨细胞,促进骨形成[6]。

本实验结果显示,实验组和对照组的血清钙、磷和 ALP 的水平及 BMP - 2 染色平均灰度值差异均有显著性意义,充分说明实验组的成骨效果优于对照组,从而证明金葡液在牵张成骨中是有作用的。所以将金葡液用于对牵张成骨的辅助治疗在临床上有着巨大的潜力。但应用金葡液的具体剂量、疗程、方式都需进一步的探讨和验证。

参　考　文　献:

[1] Sutherland MS, Rao LG, Muzaffar SA, et al. Age - dependent expression of osteoblastic phenolypic markers in normal human cutureed long - term in the presence of dexamethasone [J]. Osteoporos Int, 1995, 5(5): 335.

[2] 胡蕴玉. 现代骨科基础与临床 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006. 106 - 112.

[3] 刘侠, 乐以伦. 碱性磷酸酶与钙化 [J]. 中国生物医学工程学报, 1997, 16(1): 70 - 88.

[4] Alam N, St - Arnaud R, Lauzier D, et al. Are endogenous BMPs necessary for bone healing during distraction osteogenesis? [J]. Clin Orthop Relat Res, 2009, 467(12): 3190 - 3198.

[5] LI JF, Zheng QX, Guo XD, et al. Experimental study on ectopic osteogenesis of a BMP2 derived peptide / type Ⅰ collagen compound [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2010, 29(2): 295 - 299.

[6] 周诺, 麦华明, 韦山良, 等. BMP - 2、bFGF 在牵张成骨中的表达及意义 [J]. 口腔医学研究, 2004, 20(5): 465 - 468.

(贾慧艳 编辑)

中国知网 https://www.cnki.net