·基础研究·

Bio-Oss骨复合富血小板纤维蛋白修复兔牙周骨缺损

扫码阅读电子版

张悦[1] 董红宾[2] 张玮[1] 袁媛[1] 周洋[1] 郭涛[1]
[1]新疆医科大学第五附属医院口腔科,乌鲁木齐 830000;[2]新疆医科大学第一附属医院口腔修复科,乌鲁木齐 830054
通信作者:郭涛,Email:835771078@qq.com

【摘要】 目的 探讨组织工程骨Bio-Oss骨复合富血小板纤维蛋白(PRF)修复牙周骨缺损中骨形成蛋白2(BMP-2)、骨保护素(OPG)和核因子κB受体活化因子配体(RANKL)的表达及意义。**方法** 3月龄雄性新西兰大白兔36只,采用随机数表法分为4组,每组9只,制备单侧牙周骨缺损模型,于骨缺损处分别植入Bio-Oss骨(Bio-Oss组)、PRF(PRF组)和Bio-Oss/PRF复合物(Bio-Oss/PRF组),以未植入任何材料者作为空白对照。术后4、8和12周处死动物,行大体观察、Masson染色及BMP-2、OPG、RANKL免疫组化观察,并对其表达进行析因设计的方差分析。**结果** Masson染色结果显示,Bio-Oss/PRF组术后8周时见部分成熟骨,12周见骨板形成,骨成熟度较高。析因分析显示Bio-Oss组在4、8和12周时BMP-2表达量逐渐增高,差异有统计学意义($F=51.30$,$P<0.001$);OPG表达量随时间延长先升高后减低,差异有统计学意义($F=167.03$,$P<0.001$);RANKL表达量随时间延长逐渐减低,差异有统计学意义($F=5.39$,$P=0.046$)。PRF组在4、8和12周时BMP-2表达量无统计学意义($F=0.68$,$P=0.544$);OPG和RANKL表达量随时间延长逐渐减低,差异有统计学意义($F_{OPG}=1070.93$,$P_{OPG}<0.001$;$F_{RANKL}=2306.15$,$P_{RANKL}<0.001$)。Bio-Oss/PRF组在4、8和12周时BMP-2、OPG和RANKL表达量逐渐降低,差异有统计学意义($F_{BMP-2}=13.29$,$P_{BMP-2}<0.001$;$F_{OPG}=237.91$,$P_{OPG}<0.001$;$F_{RANKL}=132.48$,$P_{RANKL}<0.001$)。空白对照组在4、8和12周时BMP-2和OPG表达量先升高后减低,差异有统计学意义($F_{BMP-2}=88.33$,$P_{BMP-2}<0.001$;$F_{OPG}=30.06$,$P_{OPG}<0.001$),RANKL表达量随时间推移逐渐减低,差异有统计学意义($F=56.52$,$P<0.001$)。**结论** Bio-Oss骨复合PRF应用可促进成骨以修复牙周骨缺损。

【关键词】 富血小板纤维蛋白; 骨形成蛋白2; 骨保护素; 核因子κB受体活化因子配体; Bio-Oss骨; 牙周骨缺损

基金项目:国家自然科学基金(81660177)

引用著录格式:张悦,董红宾,张玮,等. Bio-Oss骨复合富血小板纤维蛋白修复兔牙周骨缺损[J/CD]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2020,14(5):280-287.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.05.002

Repair of rabbit periodontal bone defect with Bio-Oss bone combined with platelet-rich fibrin

Zhang Yue[1], Dong Hongbin[2], Zhang Wei[1], Yuan Yuan[1], Zhou Yang[1], Guo Tao[1]
[1]Department of Stomatology, Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; [2]Department of Stomatology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China
Corresponding author: Guo Tao, Email: 835771078@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of tissue-engineered bone Bio-Oss bone combined with platelet-rich fibrin (PRF) on repairing periodontal bone defects by examining the expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), osteoprotegerin (OPG) and nuclear factor κB receptor activator ligand (RANKL). **Methods** A total of 36 three-month-old male New Zealand white rabbits were divided into four groups by random number table method, i.e., Bio-Oss group, PRF group, Bio-Oss/PRF group and

blank control group. For each group, there were nine rabbits. Unilateral periodontal was prepared. In the bone defect model, Bio-Oss bone, PRF and Bio-Oss/PRF composite were implanted in the bone defect, respectively, and the one without any material was used as a blank control. The animals were sacrificed at 4, 8 and 12 weeks after the operation. Gross observation, Masson staining and immunohistochemical observation of BMP-2, OPG, RANKL were performed, and the expression of the animals was analyzed by factorial design. **Results** Masson staining results showed that in the Bio-Oss/PRF group, some mature bones were observed at 8 weeks after surgery, and bone plates were formed at 12 weeks, with a high bone maturity. Factorial analysis showed that the expression of BMP-2 in the Bio-Oss group gradually increased at 4, 8 and 12 weeks, and the difference was statistically significant ($F=51.30, P<0.001$); the expression of OPG first rose then descended, and the difference was statistically significant ($F=167.03, P<0.001$); the expression of RANKL gradually decreased with time, and the difference was statistically significant ($F=5.39, P=0.046$). The expression of BMP-2 in the PRF group at 4, 8 and 12 weeks was not statistically significant ($F=0.68, P=0.544$); the expression of OPG and RANKL decreased gradually over time, and the difference was statistically significant ($F_{OPG}=1070.93$, $P_{OPG}<0.001$; $F_{RANKL}=2306.15$, $P_{RANKL}<0.001$). The expression of BMP-2, OPG and RANKL in the Bio-Oss/PRF group gradually decreased at 4, 8 and 12 weeks, and the difference was statistically significant ($F_{BMP-2}=13.29, P_{BMP-2}<0.001$; $F_{OPG}=237.91, P_{OPG}<0.01$; $F_{RANKL}=132.48, P_{RANKL}<0.001$). In the blank control group, the expression of BMP-2 and OPG increased first and then decreased at 4, 8 and 12 weeks, and the difference was statistically significant ($F_{BMP-2}=88.33, P_{BMP-2}<0.001$; $F_{OPG}=30.06, P_{OPG}<0.001$), while the expression of RANKL gradually decreased over time, and the difference was statistically significant ($F=56.52, P<0.001$). **Conclusion** The application of Bio-Oss bone composite PRF may promote osteogenesis and repair periodontal bone defects.

【Key words】 Platelet-rich fibrin; Bone morphogenetic protein 2; Osteoprotegerin; Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand; Bio-Oss bone; Periodontal bone defect

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81660177)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.05.002

牙周炎是口腔科的常见病和多发病,其发病率逐渐增高。牙周炎病理改变是牙周袋内有大量炎性渗出物,沟内上皮出现糜烂,结合上皮向根方增殖,延伸,形成深牙周袋,出现活跃的破骨细胞性骨吸收陷窝,导致牙周骨缺损,最终牙齿松动和脱落。因此,为寻求新的治疗方案,组织工程骨应运而生,其支架材料更是近几年来的研究热点。而临床上常用的支架材料有Bio-Oss骨和富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin,PRF)。PRF由自体外周血液离心而成,无外源添加物,没有免疫原性,组织相容性无可比拟,既能充当生物支架,利于细胞的黏附和增殖分化,又含有较多的细胞因子,使成骨细胞的增殖和分泌功能维持在活跃状态。而Bio-Oss骨的颗粒状常常应用于充填性移植,有一定的骨引导性。本实验采用Bio-Oss骨、PRF及Bio-Oss骨复合PRF修复骨缺损的体内实验研究,来探讨Bio-Oss骨复合PRF材料能够能否更高效的成骨,为临床运用探寻新的方法。

材料与方法

一、主要试剂、仪器

高速低温离心机(Ep-pendorf,德国),PYRO高温微波锻烧炉(Milestone,意大利),Bio-Oss骨粉(GeistlishSohne AG,瑞士),马松(Masson)三色法染色试剂盒(上海博谷生物科技有限公司),小鼠抗兔骨形成蛋白2(bone morphogenetic protein 2,BMP-2)、大鼠抗兔一抗骨保护素(osteoprotegerin,OPG)、核因子κB受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappaB ligand,RANKL,武汉博士德生物工程有限公司),兔二步法试剂盒、DAB显色剂、抗体稀释液、进口羊血清工作液(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

二、实验方法

1. 富血小板纤维蛋白的制备:参照本课题组董红宾等[1]实验方法,经过新疆医科大学伦理委员会批准(编号:IACUC-20150917004),抽取兔的耳缘动

脉自体血10 mL迅速放入离心管中,离心管采用无菌且不添加任何抗凝或者促凝剂。放入离心机中,400 ×*g*离心10 min,离心后的血液会分为3层,取出后放置在无菌纱布上,吸收上层多余的血清层,去掉下面的血细胞层,中间层PRF凝胶就制备成功,将PRF制成膜状覆盖在牙根表面。本研究均采用术前取血,手术同时制备PRF。用无菌的眼科剪将PRF剪成小块与Bio-Oss骨粉等体积混合,制成Bio-Oss骨/PRF混合物植入实验组骨缺损。

2. 动物模型的制备及其分组:新疆医科大学动物实验中心提供健康3月龄的雄性新西兰大白兔36只[实验动物合格证号:SYXK(新)2015-0001],普通级,体质量2.2 ~ 2.5 kg,动物按体重大小编号,采用随机数字表法分为Bio-Oss组、PRF组、Bio-Oss/PRF组和空白对照组,每组9只。术后4、8、12周观察。

3. 兔牙周骨缺损模型的建立:大白兔术前24 h禁食,术前10~20 min肌注阿托品0.03~0.05 mg/kg,速眠新0.1 mL/kg,常规固定,消毒和铺巾,在兔前牙颊舌侧浸润麻醉,注射含1∶100 000肾上腺素的2%利多卡因溶液2 mL。拔除单侧下前牙,在拔牙区近中面牙槽骨制备人工牙周组织缺损,0.9%氯化钠溶液冷却状态下用慢速球钻沿牙颈部水平环形去除近中面唇侧牙糟骨3 mm,制备的缺损高度从釉牙骨质界到骨缘约5 mm,根面用刮治器去除残留的牙周膜及表面牙骨质。根据兔下颌骨的解剖特点,在近中面舌侧留有1 mm薄层骨壁相连,否则下颌骨容易骨折(图1)。Bio-Oss组、PRF组和Bio-Oss/PRF组在缺损处植入相应的骨材料,在植入材料周围及表面封生物胶充当生物膜屏障,龈瓣对位缝合;空白对照组只做手术但不植入任何材料,直接缝合。术后肌注青霉素40×10^4 U/次,1次/天,连续3 d,预防术后感染。

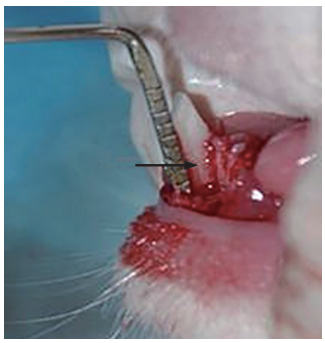

图1 兔下前牙牙周骨缺损模型建立 箭头所示为兔下前牙牙周骨缺损模型建立中,保留在近中面舌侧留有1 mm薄层骨壁相连,防止下颌骨折断

4. 取材及标本处理:术后第4、8、12周每组分别取3只大白兔处死,立即取术区牙齿及牙周组织块,于4%甲醛溶液固定、10%乙二胺四乙酸(EDTA)溶液完全脱钙,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,由牙远中向近中颊舌向5 μm切片,取颊侧组织连续切片。

三、主要观察指标

1. 大体观察:术后密切观察动物伤口愈合、牙龈(色、形、质、牙周袋)及材料暴露情况。

2. Masson染色:以Masson染色试剂盒按说明书的要求对各组兔子术后切片进行染色,以红染的面积大小观察骨缺损修复中骨质的成熟程度,红染面积越大说明骨成熟度越高。以胶原纤维的呈色来评价其在不同时期的表达量,胶原纤维被染成红色的数量多,表示Ⅰ型胶原表达量高。

3. 免疫组化观察:使用BMP-2、OPG和RANKL试剂盒,测量术后4、8、12周表达量。图片采集和分析:以LEICA DM 3000采集图像,每次测量前均用同一切片的空白处先矫正,再重新调节光源,以达到不同标本测量方法相同。采用Image-Pro Plus 6.0进行计数,通过测量得出每张切片100倍镜下的累积光密度(integrated optical density,IOD)值(累积光密度=面积×密度),光密度校正后,阳性面积与阳性平均光密度的乘积,每张切片测量3个不同视野,求平均值。

四、统计学处理方法

采用SPSS 17.0软件进行统计学处理,对BMP-2、OPG、RANKL的表达进行分析各组间进行方差齐性检验,方差齐,采用析因分析,方差不齐,采用非参数分析。多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用LSD检验,检验水准$\alpha=0.05$。

结 果

一、大体观察结果

所有试验兔术后愈合良好,牙周植入材料无暴露,牙龈无红肿,无牙周袋和脓肿形成,牙龈附着愈合良好,龈沟深度不超过1 mm。

二、Masson染色情况

1. Bio-Oss组:术后4周大片蓝染骨胶原,期间夹杂着少量新生粉红色骨,可见未降解材料;术后8周时可见新生粉红色骨,红染比例增多,红色的胶原开始相互交通,骨改建正在形成。术后12周时可见团块状红染的成熟骨,仍可见未降解材料周围结缔组织包裹(图2A)。

2. PRF组:同A组相似,从4周开始随着时间推移,红染区明显变多红色逐渐加深,8周和12周时见成熟的骨陷窝形成,向周围延伸形成致密板层状骨质(图2B)。

3. Bio-Oss/PRF组:较A组和B组红染区域出现较早,且面积较大,4周即可见新生血管,新生粉红色胶原增多,成骨细胞活跃。8周骨质逐渐连接成片,骨改建正在进行,可见部分鲜红色成熟骨的形成,骨成熟度明显优于其他3组。12周时成熟骨板形成,骨质较厚,红色的胶原纤维呈网状连成一片,且可见哈佛系统形成(图2C)。

4. 空白对照组:术后4周拔牙窝血管扩张充血,可见大量炎细胞,结缔组织较多,新生骨质红染少;术后8周时可见少量新生粉红色骨,夹杂纤维结缔组织,但新生骨面积、颜色不及其他各组;术后12周时新生骨趋向成熟蓝红相间,可见新生血管,骨改建在进行(图2D)。

三、免疫组化结果

BMP-2、OPG和RANKL主要在细胞质中表达,阳性表达时细胞质被染成棕黄色。

1. Bio-Oss组:12周时BMP-2阳性表达(图3A),8周OPG阳性表达(图4A),4、8和12周时RANKL阳性表达,可见细胞质被染成棕黄色的细胞,细胞排列疏松,大量炎细胞浸润(图5A)。其余时间均为阴性表达。

2. PRF组:8和12周时BMP-2阳性表达,随着时间推移可见褐色的细胞增多(图3B)。4周时见OPG阳性表达(图4B),随着时间推移,8和12周阳性表达区域逐渐缩小。4周时RANKL阳性表达,可见细胞质被染成棕黄色的细胞(图5B)。8和12周为阴性表达,视野中见蓝色细胞紧密排列。

3. Bio-Oss/PRF组:3个指标阳性表达较多,分别是:BMP-2在4、8和12周都有阳性表达,见棕色的细胞分布视野中(图3C)。OPG在4周时强阳性表达,棕色区域非常明显,视野中大面积的棕色细胞,整齐排列在骨小梁和支架材料之间(图4C)。8和12周时表达量逐渐缩小,见蓝色的细胞颗粒分布。RANKL与OPG相似,4周强阳性表达(图5C),随着时间推移表达逐渐减弱,至12周时阴性表达。

4. 空白对照组:BMP-2在4、8和12周时阳性表达(图3D)。OPG在8周时见阳性表达(图4D)。RANKL在4周阳性表达时(图5D),3个指标中的强阳性表达也只看到少数的褐色细胞,面积和数量并不多,其余时间点均为阴性表达。

四、各组骨形成蛋白2、骨保护素和核因子κB受体活化因子配体表达量比较

由表1可知,Bio-Oss组、Bio-Oss/PRF组、空白对照组内不同时间段BMP-2值差异有统计学意义,PRF组各时间点表达量差异无统计学意义,其中Bio-Oss组4周<8周<12周、Bio-Oss/PRF组4>周8周>12周、空白对照组4周<12周<8周;各时间段下不同组间BMP-2值差异有统计学意义,其中4周空白对照组<Bio-Oss组、PRF组<Bio-Oss/PRF组,8周Bio-Oss/PRF组、Bio-Oss组>空白对照组、PRF组,12周PRF组、空白对照组<Bio-Oss/PRF组<Bio-Oss组。

由表2可知,各组内不同时间段OPG值差异有统计学意义,其中Bio-Oss组4周和12周<8周,PRF组4周>8周>12周,Bio-Oss/PRF组4周>8周>12周,空白对照组4周和12周<8周;各时间段下不同组间OPG值差异有统计学意义,其中4周Bio-Oss组和空白对照组<PRF组<Bio-Oss/PRF组,8周Bio-Oss/PRF组>Bio-Oss组、空白对照组>PRF组;12周Bio-Oss/PRF组>空白对照组>Bio-Oss组和PRF组。

由表3可知,各组内不同时间段RANKL值差异

表1 骨形成蛋白-2(BMP-2)在不同骨材料修复牙周骨缺损中表达的累积光密度(IOD)值($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	4周	8周	12周	F值	P值
Bio-Oss组	9	$10\,244^{a}\pm300^{b}$	$155\,831^{b}\pm338^{b}$	$21\,724^{c}\pm223^{c}$	51.30	0.000
PRF组	9	9930 ± 733^{b}	$10\,171\pm338^{a}$	$10\,698\pm119^{a}$	0.68	0.544
Bio-Oss/PRF组	9	$21\,721^{c}\pm884^{c}$	$16\,021^{b}\pm291^{b}$	$14\,123^{a}\pm117^{b}$	13.29	0.006
空白对照组	9	$1046^{a}\pm59^{a}$	$13\,030^{c}\pm190^{a}$	$8807^{b}\pm440^{a}$	88.33	0.000
F值		610.56	5.19	49.50		
P值		0.000	0.028	0.000		

注:同行数据肩标小写字母不同表示差异有统计学意义($P<0.05$);均值后字母表示各组内不同时间段的差异,标准差后字母表示不同时间下各组间的差异

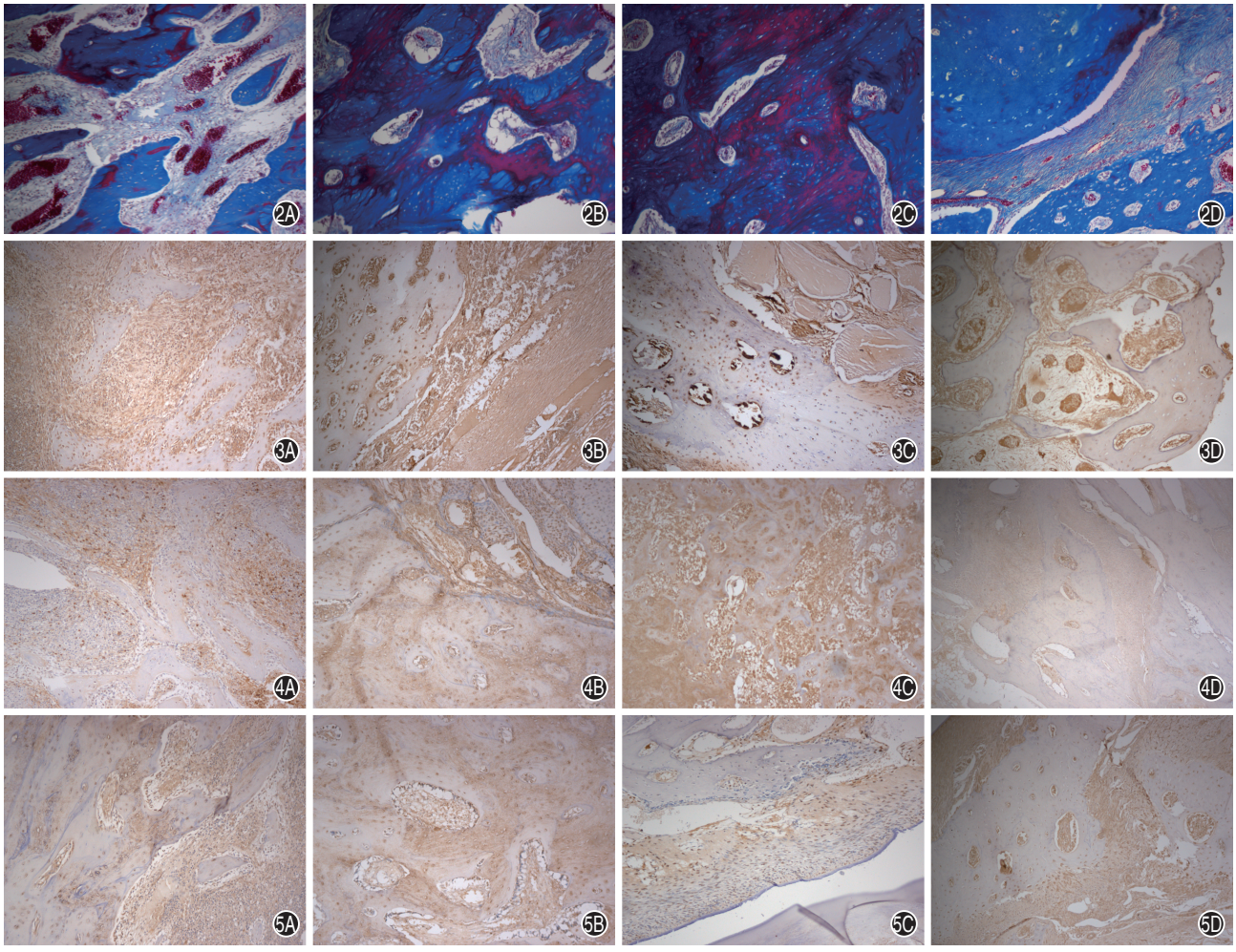

图2 不同骨材料修复牙周骨缺损中Masson染色结果(低倍放大) 2A:Bio-Oss组8周;2B:富血小板纤维蛋白(PRF)组8周;2C:Bio-Oss/PRF组12周;D:空白对照组8周 **图3** 骨形成蛋白2(BMP-2)在不同骨材料修复牙周骨缺损中免疫组化染色结果(低倍放大) 3A:Bio-Oss组12周;3B:PRF组8周;3C:Bio-Oss/PRF组8周;3D:空白对照组8周 **图4** 骨保护素(OPG)在不同骨材料修复牙周骨缺损中免疫组化染色结果(低倍放大) 4A:Bio-Oss组8周;4B:PRF组4周;4C:Bio-Oss/PRF组4周;4D:空白对照组8周 **图5** 核因子κB受体活化因子配体(RANKL)在不同骨材料修复牙周骨缺损中免疫组化染色结果(低倍放大) 5A:Bio-Oss组8周;5B:PRF组4周;5C:Bio-Oss/PRF组4周;5D:空白对照组4周

表2 骨保护素(OPG)在不同骨材料修复牙周骨缺损中表达的累积光密度(IOD)值($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	4周	8周	12周	*F*值	*P*值
Bio-Oss组	9	$547^{a}\pm17^{a}$	$13\,937^{b}\pm576^{b}$	$2368^{a}\pm17^{a}$	167.03	0.000
PRF组	9	$27\,571^{c}\pm13^{b}$	$8954^{b}\pm59^{a}$	$577^{a}\pm77^{a}$	1070.93	0.000
Bio-Oss/PRF组	9	$89\,801^{c}\pm737^{c}$	$53\,487^{b}\pm174^{c}$	$11\,057^{a}\pm123^{c}$	237.91	0.000
空白对照组	9	$7525^{a}\pm62^{a}$	$15\,878^{b}\pm146^{b}$	$5500^{a}\pm26^{b}$	30.06	0.001
*F*值		354.27	862.66	23.98		
*P*值		0.000	0.000	0.000		

注:同行数据肩标小写字母不同表示差异有统计学意义($P<0.05$);均值后字母表示各组内不同时间段的差异,标准差后字母表示不同时间下各组间的差异

有统计学意义,其中Bio-Oss组组4周和8周>12周,PRF组4周>8周>12周,Bio-Oss/PRF组4周>8周和12周,空白对照组4周>8周>12周;各时间段下不同组间RANKL值差异有统计学意义,其中4周Bio-Oss/PRF组>PRF组、Bio-Oss组>空白对照组,8周Bio-Oss组>空白对照组>PRF组和Bio-Oss/PRF组,12周Bio-Oss组>Bio-Oss/PRF组>PRF组和空白对照组。

表3 核因子κB受体活化因子配体(RANKL)在不同骨材料修复牙周骨缺损中表达的累积光密度(IOD)值($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	4周	8周	12周	*F*值	*P*值
Bio-Oss组	9	$30\,250^{b}\pm119^{b}$	$22\,297^{b}\pm55^{c}$	$19\,220^{a}\pm48^{c}$	5.39	0.046
PRF组	9	$26\,550^{c}\pm80^{b}$	$6860^{b}\pm26^{b}$	$476^{a}\pm100^{a}$	2306.15	0.000
Bio-Oss/PRF组	9	$52\,660^{b}\pm642^{c}$	$8178^{a}\pm12^{b}$	$6216^{a}\pm22^{b}$	132.48	0.000
空白对照组	9	$16\,475^{c}\pm26^{a}$	$12\,814^{b}\pm17^{a}$	$1730^{a}\pm89^{a}$	56.52	0.000
*F*值		56.26	17.13	32.49		
*P*值		0.000	0.001	0.000		

注:同行数据肩标小写字母不同表示差异有统计学意义($P<0.05$);均值后字母表示各组内不同时间段的差异,标准差后字母表示不同时间下各组间的差异

讨　论

牙周病的治疗中,骨缺损的修复仍然是临床研究的热点难点之一。骨组织中主要成分是胶原、基质粘多糖、钙化物,骨中的胶原是Ⅰ型胶原,在成熟骨的Masson染色,Ⅰ型胶原表现为鲜红色,Ⅱ型胶原表现为绿色,因此在新生骨逐渐成熟时和软骨钙化的过程中有胶原类型的逐渐转变,从而导致了红绿相间现象。

同时,Masson染色可以通过细胞周围绿染区域的大小,观察骨细胞和成骨细胞的活动状况。用红染的程度评价骨成熟度是直观的方法[2]。

所以,Masson能很好的体现3种材料应用后骨形成的过程,更好的评价成骨的效果。

本实验中,为了降低干扰,在牙周骨缺损的造模中,4组大白兔均刮去牙周膜和表面的牙骨质,去除了牙骨质中埋入的牙周膜纤维,且牙周膜中包含成纤维细胞、成骨细胞、破骨细胞等,故而将其全部刮出。这样建立的骨缺损模型更具有代表性和说服力。本研究验结果发现,Bio-Oss/PRF组在4周时可见部分新生的血管,在PRF组中也能见到,但Bio-Oss组未见到,可能是PRF中的纤维蛋白的分子结构与天然的血凝块相似,是一个三分子结构,其中包含了大量血小板及少量白细胞等细胞成分,同时网罗了各种细胞因子和循环分子,它们的组成可以促进新生血管的形成[3]。8周时骨质连接成片,骨改建正在进行,可见部分鲜红色成熟骨形成,骨成熟度明显优于其他3组。PRF的纤维蛋白呈立体网状结构,能够支撑起一定的空间,从而增大生长因子与细胞的接触面积,又能作为支架为细胞的迁移、增殖、分化提供场所,促进干细胞分化为成骨细胞,沉积骨质,加速成骨过程。这种做法可能会优于单纯填塞无机骨颗粒[4],比如实验中Bio-Oss组。而Bio-Oss组也有自身的优缺点,Bio-Oss骨粉为牛骨经过处理完全去掉骨内的有机成分,但又保持了骨质的天然空隙和机械强度[5],植入人体内不会发生免疫排斥反应[6]。可以用来恢复牙槽骨的高度和宽度不足,是临床种植术中较常用的骨替代物[7]。骨粉的缺点是降解缓慢,同样,Bio-Oss骨组在12周时可以看见为降解的材料。也有报道种植术后9年仍能检测到未吸收的骨粉[8]。那么,理想的组织工程骨的支架材料降解速率最好与新生骨的生成率尽可能接近[9],这样才能维持骨的高度和宽度,排除支架材料对成骨的影响,这对组织工程骨的成功效率尤为重要。所以,本实验取Bio-Oss骨和PRF复合材料,希望能利用两者的优点提高成骨效率,实验中12周时成熟骨板形成,骨质较厚,红色的胶原纤维呈网状连成一片,且可见哈佛系统形成。而单纯的Bio-Oss骨、PRF组并未观察到上述结果。但是,Bio-Oss骨和PRF以何种比例混合能达到最大化的利用率仍然是未来研究的主题。

BMP具有强大的成骨活性,其中BMP-2是成骨能力最强的BMP蛋白之一,已经被证实是骨形成关键的调节因子,它可以诱导骨髓间充质细胞在体内外分化为骨和软骨组织。本实验利用3种材料进行动物体内实验,发现每组都有BMP-2的表达,但是在Bio-Oss骨复合PRF组中4周时BMP-2的表达量高于其余3组,可能是复合材料中PRF内富含多种细胞因子,这些细胞因子中,包含与组织修复特别是成骨相关的重要生长因子:例如转化生长因子(transforming growth factor-β1,TGF-β1)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor-AB,PDGF-AB)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)以及胰岛素样生长因子Ⅰ(insulin-like growth factor-Ⅰ,IGF-Ⅰ)等等,这些细胞因子可以参与调控与组织修复相关细胞的增殖、分化以及凋亡。这些细胞因子各司其职的同时互相协作、互相调控,构成一个联系紧密的组织修复调节系统[10]。

而PRF其内的纤维蛋白结构呈立体网状,形成的凝胶较为疏松,具有较大的孔隙及良好的弹性。使得营养成分及氧气可以轻松的弥散至细胞周围,促进骨髓干细胞分化为成骨细胞,沉积骨质[11],本实验中Bio-Oss骨粉也可以很好的附着在PRF上面,充当更加坚固的支架材料,这也大大减少了生长因子的流失,加强其生物学功能。但是,随着时间推移表达量有所降低,有研究者发现PRF中的生长因子可释放28 d左右[12],是否也说明PRF在28 d左右胶体状态的PRF被吸收降解?这时的支架还能否为成骨提供足够的物理空间就有待探究?所以,本实验利用Bio-Oss骨粉的特点,以希望在PRF在降解后,为成骨提供空间支撑,从而提高成骨效率。随着时间推移到12周时Bio-Oss/PRF组BMP-2表达量逐渐降低,可能与新生骨开始成熟和矿化有关。而Bio-Oss组从4周开始BMP-2的表达量才逐渐增高,但是与Bio-Oss/PRF组中BMP-2在4周时表达量还有差距,说明成骨效率稍微较慢,新生的骨从成熟到钙化还需要一段时间。

1997年,Simonet等[13]首先分离出一种分泌蛋白,具有阻止破骨细胞分化,防止骨组织丢失的作用,取名为OPG。OPG是一种分泌型糖蛋白,其mRNA在肝、心、皮肤、脑、脊髓和成骨细胞中均有表达。OPG是肿瘤坏死因子超家族成员,它主要通过抑制破骨细胞的分化,抑制成熟破骨细胞的骨吸收活性,从而诱导其凋亡。在明显促进成骨细胞样细胞增殖、成熟和分化的同时,又能激发更高的成骨活性[14]。

RANKL是另一种骨代谢因子,它是通过破骨细胞与相应受体结合后发挥效应,有助于破骨细胞的形成和分化,阻止破骨细胞凋亡,促进骨吸收。而且RANKL可以将成熟破骨细胞的活性提高数倍[15]。其结合过程是:RANKL与破骨细胞表面核因子κB受体活化因子(receptor activator of nuclear factor kappaB,RANK)结合,可促进破骨细胞分化成熟,而OPG是RANKL的假性受体,可与RANK竞争性的结合RANKL,以削弱破骨细胞分化成熟能力和功能活性,这不仅抑制了RANKL对破骨细胞的促进作用,也使其他促骨吸收因子失去作用,从而限制破骨细胞活跃所导致的过度骨吸收[16]。因此,RANK-RANKL-OPG是骨细胞分化诱导的关键。

本研究发现,4组中OPG的含量和RANKL在下降,其原因可能是因为OPG升高可竞争性的结合RANKL,所以观测到的RANKL含量逐渐降低。有研究发现,在慢性牙周炎牙槽骨吸收处肉芽组织和龈沟液中RANKL的表达较高,OPG表达相对较低,RANKL/OPG的含量比值升高,而OPG在非牙周炎组织中表达明显高于牙周炎组织。RANKL的mRNA在牙周炎进展期的表达最高,主要表达于炎细胞和其周围增生的上皮细胞[17]。由此可见,在牙周炎中RANKL/OPG含量比值升高是牙槽骨吸收的关键因素。

本研究还观察到,Bio-Oss骨组中OPG的含量在在4周时处于低表达状态,在8周时出现峰值,随后表达量降低,这一现象提示单纯使用Bio-Oss骨在术后前期可能处于炎性期,细胞因子的活动性没有达到峰值,骨诱导性低。

而PRF具有良好的骨诱导性,在即刻种植中有研究发现:将PRF用于辅助上颌窦提升,术后随访中的影像学显示,上颌窦骨密度和骨增量良好。这一点也在动物试验中同样被证实。PRF具有促进成骨的细胞学机制与细胞外信号调节激酶的磷酸化增强,RANK的活化与OPG和RANKL的表达以及碱性磷酸酶活性增强密切相关[18-19]。实验中也发现,Bio-Oss/PRF组中OPG在4周时的表达量比其余组的总和还要高,RANKL含量也是类似,说明Bio-Oss/PRF在成骨的效率上远远高出其余各组。Bio-Oss保留成骨空间,PRF提供大量的生长因子,两者结合保证有充足的时间让间充质细胞分化为成骨细胞占据成骨空间,并完成骨质形成过程。也是相较于其余各组的优势所在。

本实验通过比较制造骨缺损同期植入Bio-Oss骨、PRF、Bio-Oss/PRF和空白对照组在术后4、8和12周以大体观察,Masson染色和BMP-2、OPG和RANKL来探究成骨效果,Bio-Oss/PRF组成骨效果优于其余各组,但是在Bio-Oss骨和PRF以何种比例混合,以及成骨机制上有待更进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] 董红宾,张悦,张琴,等. PRF复合组织工程骨修复牙周骨缺损中基因的表达及意义[J]. 口腔医学, 2017,37(11):969-975. DOI:10.13591/j.cnki.kqyx.2017.11.003.

[2] 郭建刚,赵然,侯桂英,等. 骨组织成分与Masson三色染色反应的关系分析[J]. 中医正骨, 2001,13(11):5-6. DOI:10.3969/j.issn.1001-6015.2001.11.002.

[3] Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the

cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane[J]. Platelets, 2018,29(2):171-184. DOI:10.1080/09537104.2017.1293812.

[4] 林雨彤,韩筱堃,赵辉,等. 富血小板纤维蛋白在口腔医学中的应用进展[J]. 大连医科大学学报, 2019,41(3):268-271,279. DOI:10.11724/jdmu.2019.03.16.

[5] 刘超,周正国,孔庆海. Bio-Oss和邻近自体碎骨移植在牙种植术中的应用[J]. 徐州医学院学报, 2005,25(4):333-335. DOI:10.3969/j.issn.1000-2065.2005.04.021.

[6] 李勇,程如玉,彭学生,等. 富自体浓缩生长因子联合Bio-Oss骨粉在颌骨囊肿中的疗效研究[J]. 中华全科医学, 2018,16(7):1113-1115. DOI:10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000307.

[7] 潘凌峰,张景奎,王嘉涵,等. 自体牙本质颗粒联合富血小板血浆对引导骨再生治疗牙周骨缺损的效果分析[J]. 中华全科医学, 2020,18(2):239-242. DOI:10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.001000.

[8] D′Addazio G, Artese L, Traini T, et al. Immunohistochemical study of osteopontin in oral squamous cell carcinoma allied to fractal dimension[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2018, 32(4):1033-1038.

[9] Gentili C, Torre M, Cancedda R. Tissue engineering approaches in skeletal pediatric disorders[J]. Eur J Pediatr Surg, 2014, 24(3):263-269. DOI:10.1055/s-0034-1382777.

[10] Holderfield MT, Hughes CC. Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis[J]. Circ Res, 2008,102(6):637-652. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.107.167171.

[11] 雷利红. 改良富血小板纤维蛋白与浓缩生长因子促牙周组织修复再生作用的比较研究[D]. 杭州:浙江大学, 2018.

[12] Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Inchingolo F, et al. Selecting a relevant in vitro cell model for testing and comparing the effects of a Choukroun platelet-rich fibrin (PRF) membrane and a platelet-rich plasma (PRF) gel: Tricks and traps[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010, 110(4):411-413. DOI:10.1016/j.tripleo.2010.05.055.

[13] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel seereted Protein Involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997,89(2):309-319. DOI:10.1016/S0092-8674(00)80209-3.

[14] Lacey DL, Tan HL, Lu J, et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoc lastsurvival in vitro and vivo[J]. Am J Pathol, 2000,157(2):435-448. DOI:10.1016/S0002-9440(10)64556-7.

[15] 武志贤,曹伟靖,田莹,等. 替硝唑片联合超声波龈下刮治及根面平整治疗慢性牙周炎[J]. 中国临床研究, 2019,32(10):1400-1403. DOI:10.13429/j.cnki.cjcr.2019.10.024.

[16] 周恬,吴凯,黎敏,等. 白细胞介素17和牙周膜成纤维细胞在体外诱导破骨样细胞生成中的作用[J].中国组织工程研究, 2019,23(11):1680-1686. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1136.

[17] 高鑫,曾融生. 骨保护素在口腔领域的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2019,46(3):316-319. DOI:10.7518/gjkq.2019021.

[18] Wohlfahrt JC, Evensen BJ, Zeza B, et al. A novel non-surgical method for mild peri-implantitis- a multicenter consecutive case series[J]. Int J Implant Dent, 2017, 3(1): 38. DOI: 10.1186/s40729-017-0098-y.

[19] Khammissa RA, Feller L, Meyerov R, et al. Peri-implant mucositis and peri-implantitis: clinical and histopathological characteristics and treatment[J]. SADJ, 2012,67(3):122,124-126.

(收稿日期:2020-06-13)

(本文编辑:王嫚)