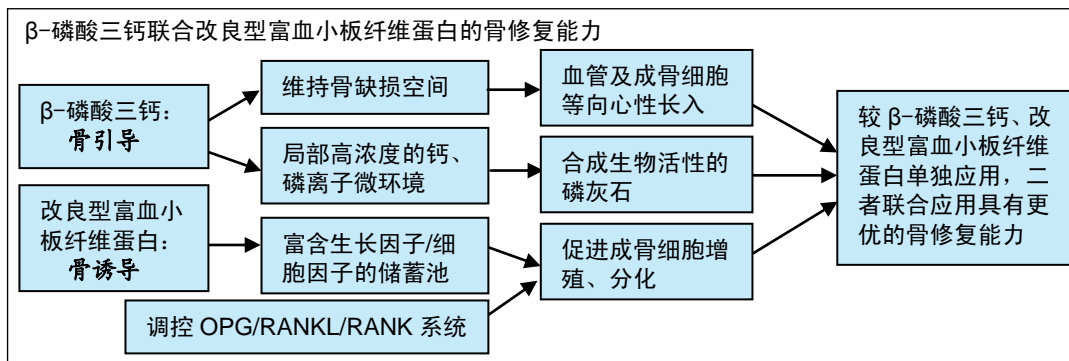


β -磷酸三钙复合改良型富血小板纤维蛋白促成骨： 影像学及免疫组织化学分析

郑锐^{1,2}, 谢静¹, 芦帅³, 孙勇^{1,2} (¹西南医科大学口腔医学院, 四川省泸州市 646000; ²四川口腔医院, 四川省成都市 610031; ³解放军成都军区机关医院口腔科, 四川省成都市 610031)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1611 ORCID: 0000-0002-5292-2088(郑锐)

文章快速阅读:



郑锐, 女, 1991年生, 四川省绵阳市人, 汉族, 西南医科大学在读硕士, 医师, 主要从事口腔种植义齿的基础与临床的研究。

通讯作者: 孙勇, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 西南医科大学口腔医学院, 四川省泸州市 646000; 四川口腔医院, 四川省成都市 610031

文献标识码:A

稿件接受: 2018-10-13



文题释义:

骨引导: 骨缺损周围的成骨细胞和破骨细胞为终末分化的细胞, 无迁徙能力。当缺损大小超过临界值时, 即临界性骨缺损, 必须利用骨替代材料维持骨缺损处的空间, 引导血管原细胞和骨原细胞向多孔的材料表面迁移、长入, 同时骨替代材料逐步降解, 最后全部由新生骨替换。

骨诱导: 在相关骨诱导因子如骨形成蛋白的作用下, 诱导骨缺损区的间充质细胞、成纤维细胞等向成骨细胞分化, 从而有利于新生骨组织形成。因此, 实现骨诱导需要具备3个基本要素: 可溶性骨诱导信号; 能对骨形成诱导信号作出反应的细胞; 富含并释放生长因子和细胞的载体。

摘要

背景: 目前研究证明多种骨替代材料与血液衍生物联合应用均具有更好的成骨作用。现阶段国内外均未见关于 β -磷酸三钙与改良型富血小板纤维蛋白复合应用于骨缺损修复的相关报道。

目的: 观察 β -磷酸三钙复合改良型富血小板纤维蛋白用于骨缺损修复的成骨特点及效果。

方法: 将39只日本大耳兔随机分为4组, 均在兔双侧后股骨髁外侧面制备6.0 mm×8.0 mm的柱状临界性骨缺损, 改良型富血小板纤维蛋白组($n=12$)骨缺损中填入兔自体改良型富血小板纤维蛋白碎屑, β -磷酸三钙组($n=12$)填入 β -磷酸三钙颗粒, 复合组($n=12$)填入 β -磷酸三钙颗粒与兔自体改良型富血小板纤维蛋白碎屑的等质量混合物, 空白组($n=3$)不填入任何材料。术后1, 2, 3个月获取完整股骨段, 拍摄X射线片后进行破骨细胞分化因子、骨保护素蛋白免疫组织化学分析。

结果与结论: ①X射线显示随着时间的推移, 改良型富血小板纤维蛋白组圆形透射影从边缘向中心密度逐渐增高, β -磷酸三钙组和复合组圆形阻射影从边缘向中心密度逐渐降低, 最后密度都接近周围天然骨或者与周围天然骨一致; ②免疫组织化学显示, 4组均有破骨细胞分化因子、骨保护素蛋白阳性表达, 相同时间点下破骨细胞分化因子与骨保护素蛋白表达的平均吸光度值比较为: 复合组> β -磷酸三钙组>改良型富血小板纤维蛋白组>空白组(P 均<0.05); ③结果表明, β -磷酸三钙与改良型富血小板纤维蛋白复合应用时的成骨效果优于二者单独应用。

关键词:

骨科材料; 改良型富血小板纤维蛋白; β -磷酸三钙; 临界性骨缺损; 骨再生; 生物材料

主题词:

磷酸钙类; 骨再生; 骨保护素; 组织工程

中图分类号: R459.9; R318.08

基金资助:

军事口腔医学国家重点实验室项目(2016KB01), 项目负责人: 孙勇

Zheng Rui, Master candidate, Physician, School of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Sichuan Stomatological Hospital, Chengdu 610031, Sichuan Province, China

Corresponding author: Sun Yong, Professor, Chief physician, Master's supervisor, School of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Sichuan Stomatological Hospital, Chengdu 610031, Sichuan Province, China

Beta-tricalcium phosphate combined with advanced platelet-rich fibrin contributes to bone regeneration: X-ray and immunohistochemical analysis

Zheng Rui^{1,2}, Xie Jing¹, Lu Shuai³, Sun Yong^{1,2} (¹School of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; ²Sichuan Stomatological Hospital, Chengdu 610031, Sichuan Province, China; ³Department of Stomatology, Institutional Hospital of the Chengdu Military Region, Chengdu 610031, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: It has been proved that various bone substitute materials combined with blood derivatives contribute to osteogenesis. At present, no relevant reports have been reported on the combination of β -tricalcium phosphate (β -TCP) combined with advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) in the repair of bone defects.

OBJECTIVE: To observe the characteristics and effects of β -TCP combined with A-PRF for repair of bone defects.

METHODS: Thirty-nine Japanese big ear rabbits (provided by the Chengdu Dashuo Experimental Animal Center in China) were randomly divided into A-PRF group ($n=12$), β -TCP group ($n=12$), composite group ($n=12$), and blank control group ($n=3$). A 6.0 mm \times 8.0 mm cylindrical critical bone defect was made on the lateral femoral condyle of each side of hind legs of each rabbit and filled in with different materials in corresponding groups, respectively. No implantation was done in the blank control group. The whole femur of each rat was taken at 1, 2 and 3 months after implantation, and X-ray films were taken as well as receptor activator nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin immunohistochemical analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Over time, X-ray films showed high-density shadow in the bone defect area in the A-PRF group, and there was a centripetal growth trend from the edge of bone defect to the center, while in the β -TCP group and composite group, there was a centripetal decrease trend from the edge to the center of the bone defect, and finally the density was close to natural bone or consistent to the surrounding bone tissues. (2) Receptor activator nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin immunohistochemical analysis showed a positive expression in all the groups. The order of the mean absorbance value in the four groups was as follows: the composite group > β -TCP group > A-PRF group > blank group, all of which were statistically significant ($P < 0.05$). To conclude, β -TCP combined with A-PRF has a better osteogenic effect than individual use.

Subject headings: Calcium Phosphates; Bone Regeneration; Osteoprotegerin; Tissue Engineering

Funding: the National Key Laboratory Project for Military Stomatology, No. 2016KB01 (to SY)

0 引言 Introduction

由于种植义齿具有功能良好、美观、方便、不损伤邻牙等优点，在临床上应用广泛且受到患者的一致好评。但临床上常见由于拔牙、牙周炎、长期佩戴活动义齿等原因导致的骨量不足，影响种植体的植入。为了为种植创造条件，各种骨增量技术应运而生，显著拓宽了种植修复的适应证。在各种骨增量技术创造的额外空间中，都需要植入骨替代材料来促进成骨。临床常用的骨替代材料包括自体骨、同种异体骨、异种骨和人工合成植骨材料等^[1]。已有不少研究证明，不同的骨替代材料与血液衍生物联合应用具有更好的成骨作用^[2-4]。 β -磷酸三钙属于无机源性骨替代材料，具有高度的生物相容性，避免了免疫反应和传播疾病的风险^[5]，可在机体内缓慢降解，引导骨缺损区的成骨细胞、血管内皮细胞爬行与增殖，分化促进骨组织形成。改良型富血小板纤维蛋白是用受植者自身血液离心制成的生物活性材料，安全度高，患者接受度高，且富含高浓度的血小板、白细胞及各种生长因子^[6]，对软硬组织的再生均有促进作用^[7]。实验将 β -磷酸三钙和改良型富血小板纤维蛋白复合应用于兔股骨髁临界性骨缺损，通过X射线影像学和组织化学观察骨修复效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年6至12月在成都达硕实验动物中心、四川省里来生物科技有限公司完成。

1.3 材料

实验动物: 雌性日本大耳兔39只，体质量3.0-3.5 kg，由成都达硕实验动物中心提供并饲养，动物许可证号：SYXK(川)2014-189，术前观察1周，确认健康无疾病。实验过程中所有处置符合动物福利要求。

实验主要试剂及仪器: 3%戊巴比妥钠(Sigma Merck); 80 \times 10⁴ U青霉素钠(瑞阳制药有限公司，中国山东); β -磷酸三钙骨替代材料(奥林巴斯泰尔茂生物材料株

式会社，日本); GTR胶原膜(博特生物科技有限公司，中国福建); Rankl兔多克隆抗体(1:500, BS-0747R, BIOS ANTIBODIES); 骨保护素兔多克隆抗体(1:500, BS-0431R, BIOS ANTIBODIES); DAB试剂盒(DA1010, Solarbio); 山羊抗兔工作液(SP-9001, ZSGB-BIO); 改良型富血小板纤维蛋白不抗凝真空离心管(VACUETTE); 富血小板纤维蛋白工具盒(法国, Process, Nice); 离心机(TDZ4-WS台式低速离心机); 种植机(Surgic 4 XT Plus, NSK); 图像分析软件Image-Pro Plus 6.0; 牙片机(BLX-8, FALCON); 口腔数字化影像系统(DS630, 西诺德)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验动物分组 采用随机数表法将39只实验兔分4组，分别为改良型富血小板纤维蛋白组($n=12$)、 β -磷酸三钙组($n=12$)、复合组($n=12$)、空白组($n=3$)。

1.4.2 改良型富血小板纤维蛋白的制备 术前，取改良型富血小板纤维蛋白组、复合组兔，采集耳中动脉全血各8 mL，置于改良型富血小板纤维蛋白不抗凝真空离心管中，放入台式低速离心机中，在2 000 r/min离心24 min^[8]，获得兔改良型富血小板纤维蛋白，使用富血小板纤维蛋白专用工具盒压制成膜，剪碎备用。

1.4.3 临界性骨缺损模型的建立与分组干预 改良型富血小板纤维蛋白制备完成后，取4组兔，称质量，采用3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)行静脉注射麻醉，略弯曲实验兔后肢膝关节，在股骨髁外侧做一直线切口，逐层分离皮肤及软组织，暴露股骨髁外侧面，设置种植机转速为1 000 r/min，用取骨钻制备6.0 mm \times 8.0 mm的柱形骨缺损，全程伴有冷冻生理盐水冲洗降温。改良型富血小板纤维蛋白组骨缺损中填入兔自体改良型富血小板纤维蛋白碎屑， β -磷酸三钙组填入 β -磷酸三钙颗粒，复合组填入质量等比混合均匀的兔自体改良型富血小板纤维蛋白碎屑与 β -磷酸三钙颗粒，空白组不填入任何材料。所有骨缺损表面覆盖一张GTR膜，膜的边缘至少盖过缺损边缘2 mm，关闭创口。按上述步骤，

对实验兔另一侧后肢进行相同操作。术后常规护理, 肌肉注射 80×10^4 U青霉素钠, 3次/d, 连续3 d。

1.5 主要观察指标

骨缺损区影像学观察: 术后1, 2, 3个月, 空白组每个时间点随机选1只兔处死, 其余3组每个时间点随机取4只兔处死, 获取完整股骨段, 分离去净周围组织, 置入塑料器皿中, 由同一人拍摄X射线影像图片。

免疫组织化学分析: 拍摄完X射线片后, 仅取骨缺损处标本, 制备组织切片, 进行破骨细胞分化因子/骨保护素免疫组织化学分析, 利用Image-Pro Plus 6.0系统分析平均吸光度值。

1.6 统计学分析 使用SPSS 17.0 软件对平均吸光度值进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 结果表示为 $\bar{x} \pm s$, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 39只兔均进入结果分析。

2.2 大体观察结果 各个取材时间点, 所有兔术区未见明显红肿、积液, 未发生病理性骨折, 伤口愈合良好, 无充填材料漏出, 打开伤口后未见GTR膜移位。

2.3 影像学观察结果 见图1。

改良型富血小板纤维蛋白组: 术后1个月时, 骨缺损边缘锐利, 清晰可见类圆形黑色低密度影, 较同期空白组范围有所减小, 周围可见天然骨的骨小梁; 术后2个月时, 中央可见低密度影区域, 形状不规则, 边缘模糊, 骨缺损区边缘隐约可见新旧骨之间的移行线; 术后3个月时, 可见明显高密度影, 中央可见部分密度较低影像, 新生骨与周围天然骨互相移行, 移行线模糊不易见。

β -磷酸三钙组: 术后1个月时, 骨缺损区呈圆形高密度影, 边界较清晰, 且明显高于周围天然骨; 术后2个月时, 密度逐渐降低, 边界变得模糊, 形状不规则, 向中心缩小; 术后3个月时, 密度降低到与周围天然骨密度相似, 新生骨小梁与周围天然骨小梁互相移行。

复合组: 术后1个月时, 骨缺损区亦呈圆形高密度影, 但低于同时段的 β -磷酸三钙组, 稍高于周围天然骨, 边界尚清; 术后2个月时, 骨缺损区密度已接近周围天然骨密度; 术后3个月时, 缺损区的密度则与周围天然骨密度基本一致, 密度均匀, 新旧骨组织完全融为一体, 无法分辨。

空白组: 术后1个月时, 骨缺损区可见边界清晰的低密度黑色透射影, 随着时间渐进, 边界逐渐模糊, 透射区域减小, 但至整个实验周期结束, 仍可见轮廓可辨的低密度区域。

2.4 破骨细胞分化因子与骨保护素蛋白免疫组织化学分析结果 破骨细胞分化因子、骨保护素蛋白免疫组织化学阳性结果为黄色或黄棕色, 阴性结果为无色, 4组均有破骨细胞分化因子、骨保护素蛋白阳性表达, 见图2。

实验主要采用吸光度法进行检测, 吸光度值与蛋白表达强弱呈正相关。经统计分析后得出, 在同一时间点, 4组间破骨细胞分化因子、骨保护素蛋白平均吸光度值大小关系均为: 复合组 $>$ β -磷酸三钙组 $>$ 改良型富血小板纤维蛋

白组 $>$ 空白组, 以上组间比较差异均有显著性意义($P < 0.05$), 见表1, 2。同一实验组在不同时间节点比较发现: 随着时间推移, 改良型富血小板纤维蛋白组、 β -磷酸三钙组和复合组破骨细胞分化因子蛋白表达逐渐增强($P < 0.05$), 术后1个月时, 破骨细胞分化因子蛋白表达强于骨保护素蛋白; 至2个月时, 破骨细胞分化因子与骨保护素蛋白表达基本持平。3组骨保护素蛋白表达均呈现出先增加后减弱的趋势, 术后2个月时, 骨保护素蛋白表达最强。在实验周期内, 空白组破骨细胞分化因子蛋白表达持续缓慢增强, 骨保护素蛋白表达基本保持平稳, 有轻微的减弱。

改良型富血小板纤维蛋白组、 β -磷酸三钙组、复合组破骨细胞分化因子/骨保护素比值在术后1-3个月先减小再增大, 空白组破骨细胞分化因子/骨保护素比值则先增大再减小, 见表3。

表1 术后不同时间点各组新生骨组织破骨细胞分化因子蛋白平均吸光度值的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Mean absorbance value of receptor activator nuclear factor kappa B ligand in new bone tissues at different postoperative time points

组别	术后1个月	术后2个月	术后3个月
改良型富血小板纤维蛋白组	0.320 \pm 0.009 ^a	0.327 \pm 0.011 ^a	0.343 \pm 0.009 ^a
β -磷酸三钙组	0.334 \pm 0.006 ^{ab}	0.338 \pm 0.009 ^{ab}	0.357 \pm 0.009 ^{ab}
复合组	0.343 \pm 0.016 ^{abc}	0.357 \pm 0.009 ^{abc}	0.365 \pm 0.009 ^{abc}
空白组	0.302 \pm 0.010	0.319 \pm 0.006	0.324 \pm 0.015

表注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与改良型富血小板纤维蛋白组比较, ^b $P < 0.05$; 与 β -磷酸三钙组比较, ^c $P < 0.05$ 。

表2 术后不同时间点各组新生骨组织骨保护素蛋白平均吸光度值的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Mean absorbance value of osteoprotegerin in new bone tissues at different postoperative time points

组别	术后1个月	术后2个月	术后3个月
改良型富血小板纤维蛋白组	0.316 \pm 0.008 ^a	0.329 \pm 0.009 ^a	0.324 \pm 0.011 ^a
β -磷酸三钙组	0.328 \pm 0.009 ^{ab}	0.339 \pm 0.014 ^{ab}	0.335 \pm 0.013 ^{ab}
复合组	0.334 \pm 0.007 ^{abc}	0.359 \pm 0.009 ^{abc}	0.343 \pm 0.026 ^{abc}
空白组	0.302 \pm 0.002	0.298 \pm 0.005	0.296 \pm 0.006

表注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与改良型富血小板纤维蛋白组比较, ^b $P < 0.05$; 与 β -磷酸三钙组比较, ^c $P < 0.05$ 。

表3 术后不同时间点各组新生骨组织破骨细胞分化因子/骨保护素的吸光度比值 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 3 Ratio of the absorbance value of receptor activator nuclear factor kappa B ligand to osteoprotegerin in new bone tissues at different postoperative time points

组别	术后1个月	术后2个月	术后3个月
改良型富血小板纤维蛋白组	1.030 \pm 0.047	1.027 \pm 0.035	1.031 \pm 0.077
β -磷酸三钙组	1.038 \pm 0.023	1.025 \pm 0.058	1.066 \pm 0.044
复合组	1.060 \pm 0.054	1.053 \pm 0.042	1.068 \pm 0.065
空白组	1.000 \pm 0.031	1.071 \pm 0.038 ^a	1.040 \pm 0.058

表注: 与同组术后1个月相比, ^a $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

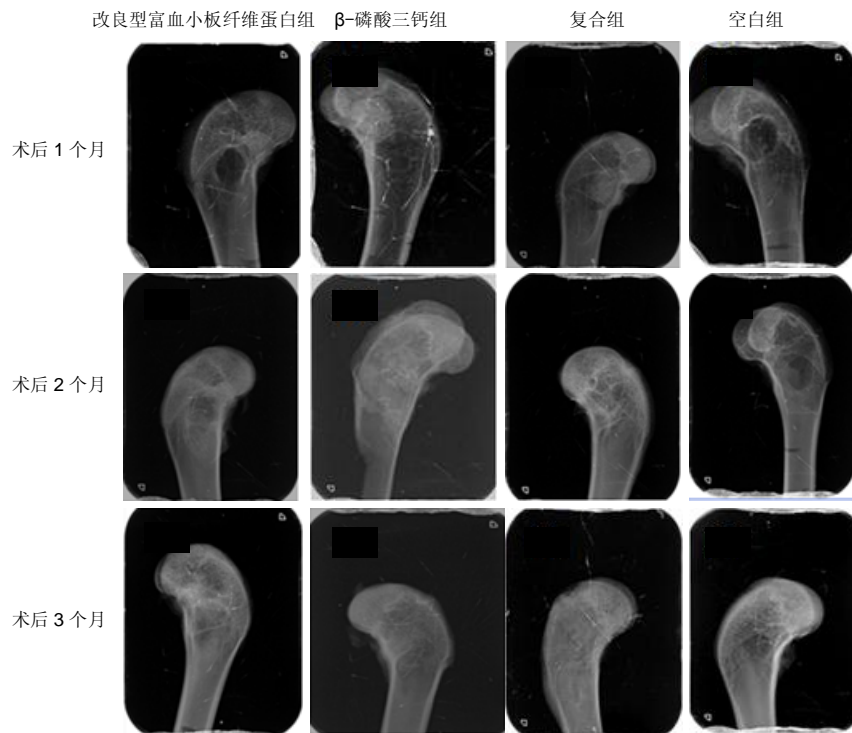
Schmitz等^[9]在1986年首次提出临界性骨缺损的概念,是指在无治疗状态下不能自行愈合的最小骨缺损。临界性骨缺损的大小在不同动物不同类型的骨组织上都有所不同^[10],所以,选取实验动物制造出符合条件的临界性骨缺损是研究骨修复材料修复效果的基本要求^[11-12]。此次实验制备的日本大耳兔股骨髁部6.0 mm×8.0 mm的柱形骨缺损,在整个实验周期内,经过X射线观察及破骨细胞分化因子/骨保护素蛋白免疫组织化学分析空白组的表现,证明成功制备出了临界性骨缺损,排除了机体自身修复能力对修复材料的影响。

改良型富血小板纤维蛋白和β-磷酸三钙分别具有骨诱导性和骨引导性。骨引导是利用骨替代材料维持骨缺损处的空间,引导前体成骨细胞和成骨细胞在多孔的材料表面迁移、长入,同时骨替代材料逐步降解,最后全部由新生骨替换;骨诱导则主要是在相关骨诱导因子如骨形成蛋白的作用下,诱导骨缺损区的间充质细胞、成纤维细胞等向成骨细胞分化,从而有利于新生骨组织形成^[13]。改良型富血小板纤维蛋白是由Ghanaati等^[14]发现的第4代自体血液制品,电镜下观察显示其呈疏松的三维立体结构,其中网络了大量血小板、白细胞、生长因子及细胞因子,包括转化生长因子β、白细胞介素4、血小板衍生生长因子、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子等^[15],这些成分共同形成一个具有高度生物活性的储蓄池,持续缓慢地释放活性因子,利于成骨细胞增殖、分化,促进骨组织修复^[16]。但随着改良型富血小板纤维蛋白中纤维蛋白的降解,其三维结构会逐渐崩塌,对骨缺损区的空间维持能力有限。有学者观察到,改良型富血小板纤维蛋白在人工唾液中17 d即完全降解^[17],在体内4周就液化,最长8周就完全降解^[18],故不建议将其用作骨替代材料单独应用于引导骨组织再生术中。此次实验中,改良型富血小板纤维蛋白组的成骨效果仅优于空白组而低于β-磷酸三钙组和复合组,可以支持此观点。β-磷酸三钙是一种人工合成的无机源性骨替代材料,形状不规则,颗粒之间可形成许多交通的孔隙通道,其表面还具有多孔性,孔隙直径10-500 μm,在扫描电镜下还可观察到孔隙在内部相互连接,相互交通^[19],这些通道和孔隙都利于血管的生成长入^[20],以及前体成骨细胞、成骨细胞等细胞在材料表面及其内部的迁移、增殖、分化。β-磷酸三钙在体内降解速率较慢,与其表面的构造、含孔率及植入物种有关。有学者在人体胫骨骨缺损中观察到,表面含孔率为75%的β-磷酸三钙在6个月时完全降解并被骨组织替代,而含孔率为60%的β-磷酸三钙在6个月时仍有1/3体积的材料尚未降解^[21]。实验中也观察到术后3个月时,仍有较多的未降解材料。此次实验结果观察到β-磷酸三钙组的促成骨效果较改良型富血小板纤维蛋白组更好,可能是由于β-磷酸三钙能更好地维持骨缺损区空间,在体内的降解速度与骨再生速度相适应,而改良型富血小板纤维蛋白虽具有大量诱导因子,但降解速度快于骨再生速度。复合物成骨效果最好,可能为:β-磷酸三钙提供细胞爬行的支架,改良型富血小板纤维蛋白提供诱导细胞增殖分化的

生长因子、细胞因子,是骨诱导和骨引导共同作用的体现。

X射线对骨组织成像效果好,结合数字化影像系统可直观观察到不同时期的骨质密度和骨量变化^[22]。此次实验中,改良型富血小板纤维蛋白组和空白组在早期表现为骨缺损区密度低于周围天然骨的黑色透射影像,而β-磷酸三钙组和复合组在早期表现为骨缺损区密度高于周围天然骨的白色阻射影像,分析认为:实验初期骨缺损区新生骨尚少,X射线成像特征主要取决于缺损区充填材料的性质;改良型富血小板纤维蛋白属于血液浓缩产物,与空白组中的天然血凝块相似,对X射线无阻射性,所以表现为黑色透射影;β-磷酸三钙的主要成分磷酸钙是一种无机源性骨支架材料,在X射线片中呈高密度影像。而后,随着新生骨组织的不断形成、改建、成熟,改良型富血小板纤维蛋白组的圆形透射影从边缘向中心密度逐渐增高,β-磷酸三钙组和复合组的圆形阻射影从边缘向中心密度逐渐降低,最后密度都接近周围天然骨密度或者与周围天然骨密度一致,说明新生骨组织的生长模式具有向心性。这种向心性生长模式可能是由于血管从缺损周围长入,缺损外围首先得到充足的血液循环供细胞新陈代谢,有利于骨组织的形成^[23]。

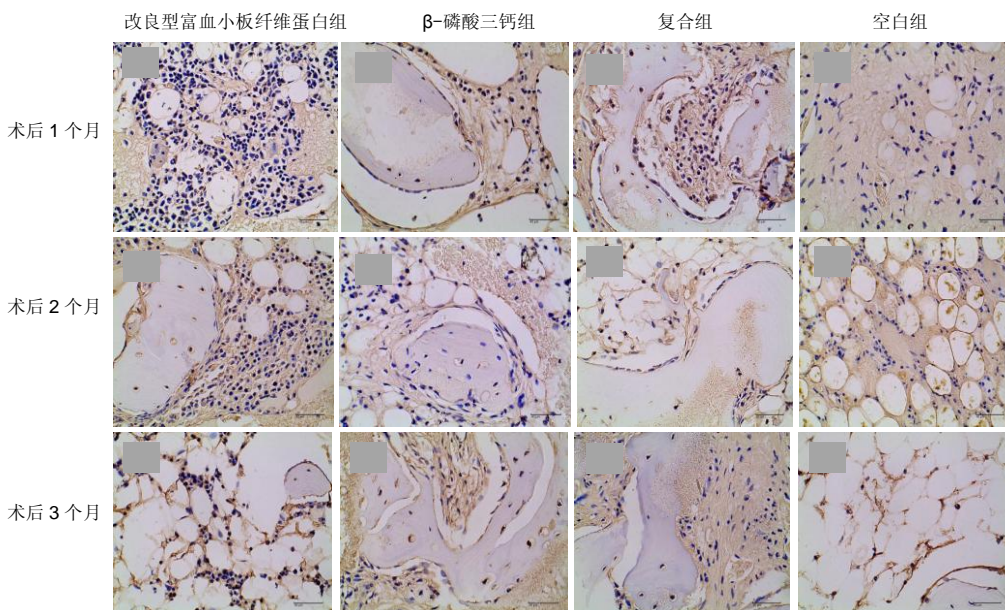
骨骼的改建贯穿于人的一生,改建过程包括成骨细胞介导的骨形成和破骨细胞介导的骨吸收,成骨细胞和破骨细胞是骨代谢中的直接执行体,二者受体内众多循环激素和细胞因子的调控。近来发现的骨保护素/破骨细胞分化因子/核因子κB受体活化因子系统,与成骨细胞和破骨细胞的相互作用息息相关,由隶属于肿瘤坏死因子超家族的骨保护素、破骨细胞分化因子和核因子κB受体活化因子3个细胞因子组成。核因子κB受体活化因子是破骨细胞分化因子的唯一受体,当破骨细胞分化因子与破骨前体细胞上的核因子κB受体活化因子结合后,可将信号传导入破骨前体细胞,通过级联扩增反应活化破骨细胞,引起骨质疏松^[24]。骨保护素的主要作用是抑制破骨细胞的形成和活性,诱导破骨细胞凋亡,增加骨密度^[25]。Nelson等^[26]比较了破骨细胞分化因子-破骨细胞分化因子和骨保护素-破骨细胞分化因子的晶体结构,发现骨保护素与破骨细胞分化因子的结合亲和力是核因子κB受体活化因子与破骨细胞分化因子结合亲和力的500倍,骨保护素可竞争性结合破骨细胞分化因子,阻止破骨细胞分化因子与核因子κB受体活化因子的结合,抑制破骨细胞分化因子的活性。破骨细胞分化因子-核因子κB受体活化因子-骨保护素轴是维持骨代谢动态平衡的关键,破骨细胞分化因子、骨保护素的表达还受到许多细胞因子和生长因子的调控,如白细胞介素4及13、转化生长因子β、白细胞介素1β、肿瘤坏死因子α等保护性细胞因子能上调骨保护素^[27-28],前列腺素E2和糖皮质激素则下调骨保护素^[28]。破骨细胞分化因子负性调控因子有白细胞介素2、4、10及干扰素等,正性调控因子有白细胞介素1、3、6、7及肿瘤坏死因子等^[29],但大多数细胞因子缺乏对破骨细胞的直接刺激,而是作用于成骨细胞,使之分泌破骨细胞分化因子,激活破骨前体细胞和破骨细胞^[30],同时成骨细胞也会分泌骨保护素,避免过度骨吸收。此次实验中观察到,改良型富血小板纤维蛋白和β-磷酸三钙都



图注: 随着时间的推移, 改良型富血小板纤维蛋白组圆形透射影从边缘向中心密度逐渐增高, β -磷酸三钙组和复合组圆形阻射影从边缘向中心密度逐渐降低, 最后密度都接近周围天然骨或者与周围天然骨一致; 空白组术后3个月时仍可见轮廓可辨的低密度区域。

图1 术后不同时间点各组兔股骨髁缺损部位X射线检查

Figure 1 X-ray observation of femoral condyle defect in each group at different time after surgery



图注: 4组均有破骨细胞分化因子、骨保护素蛋白阳性表达。

图2 术后不同时间点各组兔股骨髁缺损部位破骨细胞分化因子/骨保护素蛋白表达(IHC, $\times 100$)

Figure 2 Expression of receptor activator nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin in femoral condyle defect (immunohistochemical staining, $\times 100$)

能促进成骨细胞表达骨保护素和破骨细胞分化因子, 且两者联合效果更佳。在同一实验组内观察到随时间延长, 改良型富血小板纤维蛋白组、 β -磷酸三钙组、复合组破骨细胞分化因子、骨保护素蛋白的表达趋势相似, 术后1个月时破骨细胞分化因子蛋白表达较骨保护素蛋白多, 破骨细胞分化因子/骨保护素比值较大, 说明在骨形成早期手术创伤可能使局部的组胺、前列腺素2等炎症因子增多, 同时改良型富血小板纤维蛋白释放了大量的细胞因子, 如白细胞介素1、白细胞介素4、肿瘤坏死因子、血小板衍生生长因子、转化生长因子 β 等上调破骨细胞分化因子, 破骨细胞分化因子得以与核因子 κ B受体活化因子结合, 促使破骨细胞增殖、成熟, 以骨吸收活动为主。术后2个月, 改良型富小

板纤维蛋白逐渐降解, β -磷酸三钙继续持续释放出大量钙、磷离子, 局部高浓度的钙、磷离子在材料表面最终合成生物性的磷灰石, 使新生骨组织与 β -磷酸三钙形成紧密的直接结合^[31]。同时成骨细胞、骨髓基质细胞骨保护素蛋白表达逐渐增多与破骨细胞分化因子蛋白基本持平, 破骨细胞分化因子/骨保护素比值有所减小, 说明此时破骨细胞活性被抑制, 以新骨形成为主。术后3个月时, 破骨细胞分化因子表达继续增强, 但是骨保护素蛋白表达减弱, 此时破骨细胞分化因子蛋白表达明显多于骨保护素蛋白, 破骨细胞分化因子/骨保护素比值又增大, 说明进入新生骨组织的改建阶段。但可能由于样本量有限, 同一组内不同时间点的破骨细胞分化因子/骨保护素比值差异无统计学意义。

综上,改良型富血小板纤维蛋白、 β -磷酸三钙均能促进骨组织的再生,但是二者联合应用,可互为补充,发挥更强大的骨修复能力,值得进一步的临床应用观察。此次研究仍存在一定的缺陷,如样本量不足、观察时间较短及未观察到缺损区血管新生情况,需要进一步的研究和探讨。

致谢:感谢原单位解放军成都军区机关医院、成都达硕实验动物中心、四川省里来生物科技有限公司的各位老师和同事对研究提供的指导和帮助。

作者贡献:郑锐、谢静、孙勇、芦帅进行实验设计,郑锐、谢静进行实验操作、资料搜集,郑锐成文并对文章负责,孙勇教授为文章的通讯作者。

经费支持:该文章接受了“军事口腔医学国家重点实验室项目(2016KB01)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题:实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

写作指南:该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重:文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审:文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明:该统计学方法已经西南医科大学统计学专家审核。

文章版权:文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] 胡文军,朱清恺,马威.植骨材料在口腔种植中的应用概况及进展[J].中国实用口腔杂志,2018,11(1):17-23.

[2] Jeon IS, Heo MS, Han KH, et al. Vertical ridge augmentation with simultaneous implant placement using β -TCP and PRP: A report of two cases. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol*. 2013;25(3):226-231.

[3] Sager M, Ferrari D, Wieland M, et al. Immunohistochemical characterization of wound healing at two different bone graft substitutes. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(5):657-666.

[4] Luo T, Zhang W, Shi B, et al. Enhanced bone regeneration around dental implant with bone morphogenetic protein 2 gene and vascular endothelial growth factor protein delivery. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(4):467-473.

[5] 宋乔健.口腔颌面部骨组织缺损修复材料的研究进展[J].临床医药文献电子杂志,2017,4(25):175-177.

[6] Walsh W, Vizesi F, Michael D, et al. Beta -TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials*.2008;29(3): 266-271.

[7] 孙佳佳,王熙. A-PRF诱导软硬组织再生的研究[J].现代口腔医学杂志, 2018, 32(2):115-117.

[8] 毛俊丽,孙勇,赵峰,等.兔PRF、A-PRF制备方法的筛选[J].西南国防医药, 2016,26(6):593-596.

[9] Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986; (205): 299-308.

[10] 周芳,李静,余磊,等.兔髁骨临界骨缺损模型的制备[J].中国组织工程研究, 2011,15(50):9385-9388.

[11] Patel ZS, Young S, Tabata Y, et al. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*. 2008;43(5):931-940.

[12] Kargozar S, Lotfiakhshaiesh N, Ai J, et al. Osteogenic Evaluation of Stem Cell-Seeded Bioactive Glasses Containing Strontium and Cobalt in a Critical Size Defect in Rabbit Femur: Conference of the European Society for Biomaterials[C]. Conference: 28th ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS (ESB), At ATHENS - GREECE Megaron Athens International Conference Centre, 2017.

[13] 李阳.牙龈成纤维细胞成骨能力的体外及体内研究[D].天津:天津医科大学, 2017.

[14] Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by mean of inflammatory cells. *J Oral Implantol*. 2014;40(6):679-689.

[15] Kobayashi E, Flückiger L, Fujiokakobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*. 2016;20(9):2353-2360.

[16] Masuki H, Okudera T, Watanebe T, et al. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent*.2016;2(1):19.

[17] 何婷婷.两种富血小板纤维蛋白的降解特性研究[D].泸州:西南医科大学, 2017.

[18] 焦志立,谢晓玲,付冬梅,等.改良型富血小板纤维蛋白在兔颅骨诱导成骨中的组织学观察[J].中国组织工程研究, 2017,21(14):2208-2214.

[19] Gao P, Zhang H, Liu Y, et al. Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering in vivo. *Sci Rep*. 2016;6:23367.

[20] Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am*. 1999;30(4):591-598.

[21] Tanaka T, Kumagai Y, Chazono M, et al. A novel evaluation system to monitor bone formation and β -tricalcium phosphate resorption in opening wedge high tibial osteotomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015; 23(7):2007-2011.

[22] Meijer HJ, Steen WH, Bosman F. Standardized radiographs of the alveolar crest around implants in the mandible. *J Prosthet Dent*. 1992;68:318-321.

[23] 于威,李建军.去抗原牛松质骨支架复合骨形态发生蛋白2基因在骨缺损修复过程中的血管化反应[J].中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(23): 4559-4562.

[24] Grzibovskis M, Pilmane M, Urtane I. Today's understanding about bone aging. *Stomatologija*.2010;12(4): 99-104.

[25] Yu T, Pan H, Hu Y, et al. Autologous platelet-rich plasma induces bone formation of tissue-engineered bone with bone marrow mesenchymal stem cells on beta-tricalcium phosphate ceramics. *J Orthop Surg Res*. 2017;12(1):178.

[26] Nelson C, Warren J, Wang MH, et al. RANKL Employs Distinct Binding Modes to Engage RANK and the Osteoprotegerin Decoy Receptor. *Structure*. 2012; 20(11):1971-1982.

[27] Stein NC, Kreutzmann C, Zimmermann SP, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 stimulate the osteoclast inhibitor osteoprotegerin by human endothelial cells through the STAT6 pathway. *J Bone Miner Res*. 2008;23(5):750-758.

[28] Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008;29(2):155-192.

[29] Nakashima T, Takayanagi H. Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *J Clin Immunol*. 2009;29(5):555-567.

[30] Zhou L, Liu Q, Yang ML, et al. Dihydroartemisinin, an Anti-Malaria drug, suppresses estrogen deficiency - induced osteoporosis, osteoclast formation, and RANKL- Induced signaling pathways. *J Bone Miner Res*. 2016;31(5):964-974.

[31] J Rieu J, Goeruiot P. Ceramic composites for Biomedical applications. *Clin Mater*.1993;12:211-217.