

自体髂骨与胶原-羟基磷灰石复合重组人骨形成蛋白2修复大鼠单侧腭裂

沈悦, 马海英, 张彦升, 王娟, 时炳正(沧州市人民医院口腔分院, 河北省沧州市 061001)

文章亮点:

- 1 羟基磷灰石是一种非常具有代表性的陶瓷类植骨材料, 被广泛应用于临床, 具有良好的骨传导和骨诱导能力, 但其生物力学功能比较差, 如抗疲劳差、压缩强度低、骨吸收较差, 很难被骨组织代替, 植入后多会出现疏松、迁移、破坏等现象。为解决羟基磷灰石的物理学性能, 大多数研究聚焦将羟基磷灰石与纳米材料组织成复合体, 其中羟基磷灰石与胶原复合体更为常见。
- 2 大量研究证实重组人骨形成蛋白2是一种多功能生长因子, 属于转化生长因子 β 家族中的一员, 可以促进骨的形成及损伤的修复。
- 3 实验观察复合生物材料胶原-羟基磷灰石复合重组人骨形成蛋白2促进骨愈合的效果, 发现胶原-羟基磷灰石复合重组人骨形成蛋白2复合生物材料植骨方式较自体植骨方式更有优势。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 单侧完全性腭裂; 自体髂骨植骨; 复合生物材料植骨; 羟基磷灰石; 重组人骨形成蛋白2

主题词:

腭裂; 羟基磷灰石类; 骨形态发生蛋白质类

基金资助:

河北省科技支撑计划项目(1213078ZD): 单侧完全性唇腭裂患者上颌骨矫正后稳定性分析及治疗程序研究

摘要

背景: 已有研究证实胶原-羟基磷灰石复合重组人骨形成蛋白2植骨效果较好, 然而尚未有文献报道此复合材料与自体骨移植效果的对比评价。

目的: 检测自体髂骨移植与胶原-羟基磷灰石复合重组人骨形成蛋白2植骨在单侧完全性腭裂大鼠模型中的愈合效果。

方法: 首先建立32只SD大鼠单侧完全性腭裂模型, 随机均分为两组, 对照组于裂隙处移植自体髂骨, 实验组移植胶原-羟基磷灰石复合重组人骨形成蛋白2生物材料, 于移植后的第1, 2, 3, 4周, 检测血清中碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶活性、新生上腭骨骨密度、成骨细胞特异性标志物骨钙素、骨保护素、核心结合因子及破骨细胞特异性标志物破骨细胞分化因子等基因的表达。

结果与结论: 随着时间的推移, 碱性磷酸酶活性逐渐升高, 抗酒石酸酸性磷酸酶活性逐渐降低, 实验组碱性磷酸酶活性始终高于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 抗酒石酸酸性磷酸酶活性始终低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$); 骨密度逐渐增高, 实验组始终高于对照组($P < 0.01$); 骨钙素、骨保护素、核心结合因子基因水平逐渐上升, 实验组始终高于对照组; 破骨细胞分化因子逐渐降低, 实验组始终低于对照组。表明胶原-羟基磷灰石复合重组人骨形成蛋白2复合生物材料植骨方式较自体植骨方式更有优势。

沈悦, 马海英, 张彦升, 王娟, 时炳正. 自体髂骨与胶原-羟基磷灰石复合重组人骨形成蛋白2修复大鼠单侧腭裂[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(3):410-415.

Autogenous iliac bone versus collagen/hydroxyapatite/recombinant human bone morphogenetic protein-2 composite material for repair of unilateral cleft palate in rats

Shen Yue, Ma Hai-ying, Zhang Yan-sheng, Wang Juan, Shi Bing-zheng (Dental Branch of Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: It has been demonstrated that the effect of collagen/hydroxyapatite/recombinant human bone morphogenetic protein-2 composite graft is good, but there is no comparative analysis of this composite graft and autologous bone graft.

OBJECTIVE: To detect the healing effect of autologous bone graft versus collagen/hydroxyapatite/recombinant human bone morphogenetic protein-2 composite graft in a rat model of unilateral complete cleft palate.

METHODS: Firstly, we established the artificial unilateral complete cleft palate models in 32 Sprague-Dawley rats, and then the established animal models were randomly divided into control group and experimental group. The autologous iliac bone was transplanted into the fissures of control group, and the experimental group received collagen/hydroxyapatite/recombinant human bone morphogenetic protein-2 composite graft. After that, the activities of serum alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase, bone mineral densities in the neonatal palate, expressions of osteocalcin, osteoprotegerin, core binding factor, and osteoclast differentiation

沈悦, 男, 1980年生, 河北省沧州市人, 河北医科大学口腔医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事固定矫正治疗、功能矫形治疗, 牙体、颌面部三维结构形态对牙齿排列影响等方面的研究。

通讯作者: 张彦升, 主治医师, 沧州市人民医院口腔分院, 河北省沧州市 061001

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.03.015
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2015)03-00410-06
稿件接受: 2014-12-15

Shen Yue, Master, Attending physician, Dental Branch of Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000, Hebei Province, China

Corresponding author: Zhang Yan-sheng, Attending physician, Dental Branch of Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000, Hebei Province, China

Accepted: 2014-12-15

factor were detected at 1, 2, 3, 4 weeks after treatment.

RESULTS AND CONCLUSION: Over time, the alkaline phosphatase activity increased gradually, while tartrate-resistant acid phosphatase activity decreased. Compared with the control group, the alkaline phosphatase activity was always higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$) but the tartrate-resistant acid phosphatase activity was lower in the experimental group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the bone mineral density increased in both groups, but it was always higher in the experimental group than the control group ($P < 0.01$). The expression levels of osteocalcin, osteoprotegerin, and core-binding factor gene gradually rose in both groups, but they were always higher in the experimental group than the control group; in contrast, the expression of osteoclast differentiation factor was decreased in both groups, and it was lower in the experimental group than the control group. These findings indicate that the collagen/hydroxyapatite/recombinant human bone morphogenetic protein-2 composite graft has more advantages compared with bone autograft.

Subject headings: Cleft Palate; Hydroxyapatites; Bone Morphogenetic Proteins

Funding: the Science and Technology Supporting Plan of Hebei Province, No. 1213078ZD

Shen Y, Ma HY, Zhang YS, Wang J, Shi BZ. Autogenous iliac bone versus collagen/hydroxyapatite/recombinant human bone morphogenetic protein-2 composite material for repair of unilateral cleft palate in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(3):410-415.

0 引言 Introduction

在胚胎发育期由于受到环境或遗传因素的影响, 腭部不能融合或不能完全融合, 形成腭裂^[1], 至今在国内外尚未见统一的腭裂分类方法。根据硬腭和软腭部的骨质、黏膜、肌层的张开程度和部位, 多采纳下列的临床分类方法: 软腭裂, 仅软腭张开, 有时仅限于腭垂, 不分左右, 一般不伴唇裂, 临床上以女性比较多见; 不完全性腭裂, 亦称部分腭裂, 软腭完全张开伴有部分硬腭裂, 有时伴发单侧不完全唇裂, 但牙槽突常完整, 本型也无左右之分; 单侧完全性腭裂, 裂隙自腭垂至切牙孔完全裂开, 斜向外侧直抵牙槽突, 与牙槽裂相连, 健侧裂隙缘与鼻中隔相连, 牙槽突裂有时裂隙消失仅存裂缝, 有时裂隙很宽, 常伴发同侧唇裂; 双侧完全性腭裂, 常与双侧唇裂同时发生, 裂隙在前颌骨部分, 各向两侧斜裂, 直达牙槽突, 鼻中隔、前颌突及前唇部分孤立于中央。由于单侧完全性腭裂和双侧完全性腭裂伴有牙槽突裂, 此两类患者面部畸形更为严重复杂, 对患者口腔功能、颜面美观和心理健康均有较严重影响。本实验用SD大鼠制造单侧完全性腭裂模型, 对牙槽突裂的植骨效果进行研究。

随着唇腭裂治疗技术的不断进步, 牙槽突植骨合并正畸治疗已成为唇腭裂序列治疗的一部分^[2], 而且其中牙槽突植骨成为后期正畸治疗的坚实基础^[3]。目前常用的牙槽突裂植骨方式包括自体骨移植、异体骨移植及生物材料移植等。当前大多数医生仍将自体骨移植作为修复牙槽突裂最常用的植骨方式^[4], 认为自体骨移植抗感染能力强, 血管化速度快, 排斥反应几乎为零, 然而考虑自体骨移植不仅使供区并发感染、疼痛等症状^[5-7], 有时由于受区骨需求量的增加, 患者自身骨无法满足需求^[3-8]。有研究证实自体骨植骨后骨愈合率并不是很高, 并且骨吸收率较高。

近年来国内外学者逐渐将注意力转移到对人工材料植骨方式的研究, 尤其复合生物材料, 证明后期效果较之前单纯的生物支架材料有很大提高^[9-11]。羟基磷灰石是一种非常具有代表性的陶瓷类植骨材料, 而且被广泛应用于临床,

其化学分子式为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 无论化学组成还是其本身的晶体结构都与人体骨骼相接近, 羟基磷灰石中的 Ca^{2+} 可与羟基氨基酸、蛋白质、有机酸等物质发生交换, 与骨组织结合, 促进骨愈合^[12]。一般来说, 植骨材料要具有良好的生物相容性、生物力学及良好的骨诱导、骨传导、骨生成能力。虽然羟基磷灰石具有良好的骨传导和骨诱导能力, 但羟基磷灰石生物力学功能比较差, 如抗疲劳差、压缩强度低、骨吸收较差, 很难被骨组织代替, 植入后多会出现疏松、迁移、破坏等现象^[13]。为解决羟基磷灰石的物理学性能, 大多数研究聚焦将羟基磷灰石与纳米材料组织成复合体, 其中羟基磷灰石与胶原复合体更为常见^[14-16]。大量研究证实重组人骨形成蛋白2是一种多功能生长因子, 属于转化生长因子 β 家族中的一员, 可以促进骨的形成及损伤的修复^[16-17]。骨形成蛋白诱导成骨是一个非常复杂的、连续性过程, 而且其骨诱导作用在有相应载体的情况下才会激发。大量研究证明以胶原-羟基磷灰石为支架, 复合重组人骨形成蛋白2因子, 将更利于骨组织的愈合。大量基础与临床研究结果显示胶原-羟基磷灰石复合重组人骨形成蛋白2能够有效修复骨缺损, 促进成骨细胞的黏附、生长、分化, 促进骨组织的生长^[18-19]。本实验探讨复合生物材料胶原-羟基磷灰石复合重组人骨形成蛋白2良好的愈合效果, 并与传统的自体植骨方式进行比较, 指导今后临床植骨式的选择。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2012年6月至2014年6月在河北医科大学口腔医院河北省口腔医学重点实验室完成。

材料:

实验动物: 3周龄健康雄性SD大鼠, 体质量55-70 g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 许可证号: CXI-(冀)2008-1-004, 同等条件下饲养, 室温保持在23℃左右, 相对湿度达到52%, 12 h间隔照明条件。

自体髂骨与复合材料修复大鼠腭裂对比实验的试剂及仪器:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|------------------------------------|-------------------------------|
| 胶原-羟基磷灰石(胶原骨粉)、重组人骨形成蛋白2 因子 | scienCell |
| 甲醇、体积分数 95%乙醇 | 上海国药集团化学试剂有限公司 |
| RNA 反转录试剂盒、Real-time PCR 实时荧光定量试剂盒 | 美国 TaKaRa 公司 |
| 引物 | 上海生物工程有限公司 |
| PBS 粉剂 | 武汉博士德生物工程有限公司 |
| 抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂盒 | 碧云天 |
| 低速离心机、低温高速离心机 | Eppendorf Centrifuge 5702, 德国 |
| 实时定量 PCR 仪 7500 | 澳大利亚 Corbett Life Science 公司 |
| 721 分光光度仪、双能 X 射线骨密度仪 | DEXA, Norland, XR-36 |

实验方法:

建立单侧完全性腭裂动物模型, 确定腭裂标准缺损宽度:

取24只雄性SD大鼠, 其中正常对照组3只, 实验组21只, 相同条件下饲养1周, 4周龄时使用外科手术法在实验组大鼠腭部形成长度基本一致(约7.0 mm), 宽度分别为(0.9±0.1), (1.1±0.1), (1.3±0.1) mm的人造单侧完全性腭裂, 每宽度7只大鼠。手术时, 用10%水合氯醛腹腔麻醉实验组SD大鼠, 注射剂量为0.3 mL/kg。麻药生效后将大鼠固定于消毒实验台上备皮消毒, 确定人造腭裂范围: 使用黑色细标记笔向后起自软硬腭交界处, 沿硬腭中线向前止于7.0 mm处, 同时确保牙槽突裂的不同宽度, 准确标记术区范围。完整去除术区腭部黏骨膜, 低速状态下逐步磨除术区内的硬腭骨板, 形成口鼻腔组织洞穿缺损, 在裂隙处固定无菌塑料护板, 护板在术前制作完成, 尺寸与手术设定SD大鼠腭裂大小相对应。术后SD大鼠自然苏醒。抗生素预防腭裂处伤口感染。术后12周处死所有大鼠, 观察裂隙组织闭合情况, 统计剩余SD大鼠状态, 确定标准缺损的宽度。

不同植骨方式修复单侧完全性腭裂: 取32只雄性SD大鼠, 随机均分为实验组与对照组, 10%水合氯醛腹腔麻醉SD大鼠, 注射剂量为0.3 mL/kg, 根据上述实验方法确定的标准缺损宽度, 建立相应长宽的单侧完全性腭裂模型。对照组首先取髂嵴前处骨组织, 随即将适量的髂骨组织定植于上腭缺损处; 实验组事先准备胶原骨粉及重组人骨形成蛋白2因子, 术中制备胶原骨粉搭载重组人骨形成蛋白2复合物, 其成分组成为: 60%羟基磷灰石、30%胶原10%水, 在人造腭裂完成后, 向胶原骨粉中加入重组人骨形成蛋白2, 剂量约为250 µg/g, 混合均匀成骨泥状, 即刻将此复合材料填满腭裂区, 确保两组填充效果的一致性。固定塑料护板观察1周任其自然脱落。术后3 d内, 肌注青霉素4 U/d, 用以预防腭裂处伤口感染。每周内定期观察, 防止术区感染, 流质饮食1周。

主要观察指标: 分别于植骨后1, 2, 3, 4周随机处死两组大鼠各4只, 进行以下检测。

碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶活性检测: 采取眼球摘除法取血, 放于37 °C水浴箱中30 min加速凝固, 置于离心机中3 000 r/min离心20 min, 取上清, 分别利用试剂盒检测碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶的活力。

双能X射线测量新生骨质密度: 利用骨密度测量仪测定术区新生腭骨骨密度, 通过计算机系统软件测量每只大鼠新生腭骨骨密度值, 取平均值, 以g/cm³表示。

实时定量PCR检测特异性基因含量: 提取两种植骨后腭裂新生骨的mRNA, 将所提取的总RNA, 按照总RNA量约2.0 µg, 以20 µL体系进行反转录, 反转录为cDNA。然后于7500 real-time PCR仪上进行实时定量PCR检测, 检测新生骨质中成骨细胞与破骨细胞的特异性标志物的基因水平, 反应序列如下:

PCR反应序列:

| 引物 | 上游引物 | 下游引物 |
|----------|---|--|
| 骨钙素 | 5'- CTC ACT CTG CTG GCC CTG -3' | 5'-CCG TAG ATG CGT TTG TAG GC-3' |
| 骨保护素 | 5'-TGA TGA GTG TGT GTA TTG CAG C -3' | 5'-CCC AGG CAA ACT GTC CAC CAA -3' |
| 核心结合因子 | 5'-GCA GTT CCC AAG CAT TTC AT-3' | 5'-GGT GTA AGT AAA GGT GGC TGG A-3' |
| 破骨细胞分化因子 | 5'-AGC CTT TCA AGG GGC CGT GC-3' | 5'-GGG CCA CAT CGA GCC ACG AA-3' |

统计学分析: 选用SPSS 15.0 统计软件包进行数据处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用SNK检验; $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 确定人工腭裂SD大鼠模型的标准缺损宽度 术后12周大体标本观察结果显示, 正常对照组3只大鼠均健康活泼; 0.9 mm组大鼠腭裂宽度有部分变窄, 7只均健康活泼; 1.1 mm组大鼠腭裂宽度增宽且有1只实验动物死亡; 1.3 mm组腭裂均有增宽趋势, 死亡个数增加为3只, 因此以长7.0 mm、宽1.1 mm的单侧完全性腭裂SD大鼠模型最为稳定, 1.1 mm可作为标准缺损宽度。

2.2 血液中碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶活性变化趋势 血液中碱性磷酸酶活性随着骨愈合时间的推移逐渐增加, 第2周时, 两组碱性磷酸酶活性均已接近最高水平, 实验组较对照组碱性磷酸酶活性升高速度更快($P < 0.01$), 维持水平较高。破骨细胞标志物抗酒石酸酸性磷酸酶的活性随着骨愈合时间的推移逐渐降低, 在第1周时, 实验组低于对照组($P < 0.05$), 且至第4周时, 实验组下降较对照组下降明显($P < 0.05$), 见表1。

2.3 新生上腭部骨密度值 腭裂处新生骨组织在1-4周内骨密度逐渐变大, 实验组骨密度增长速度较对照组更加明

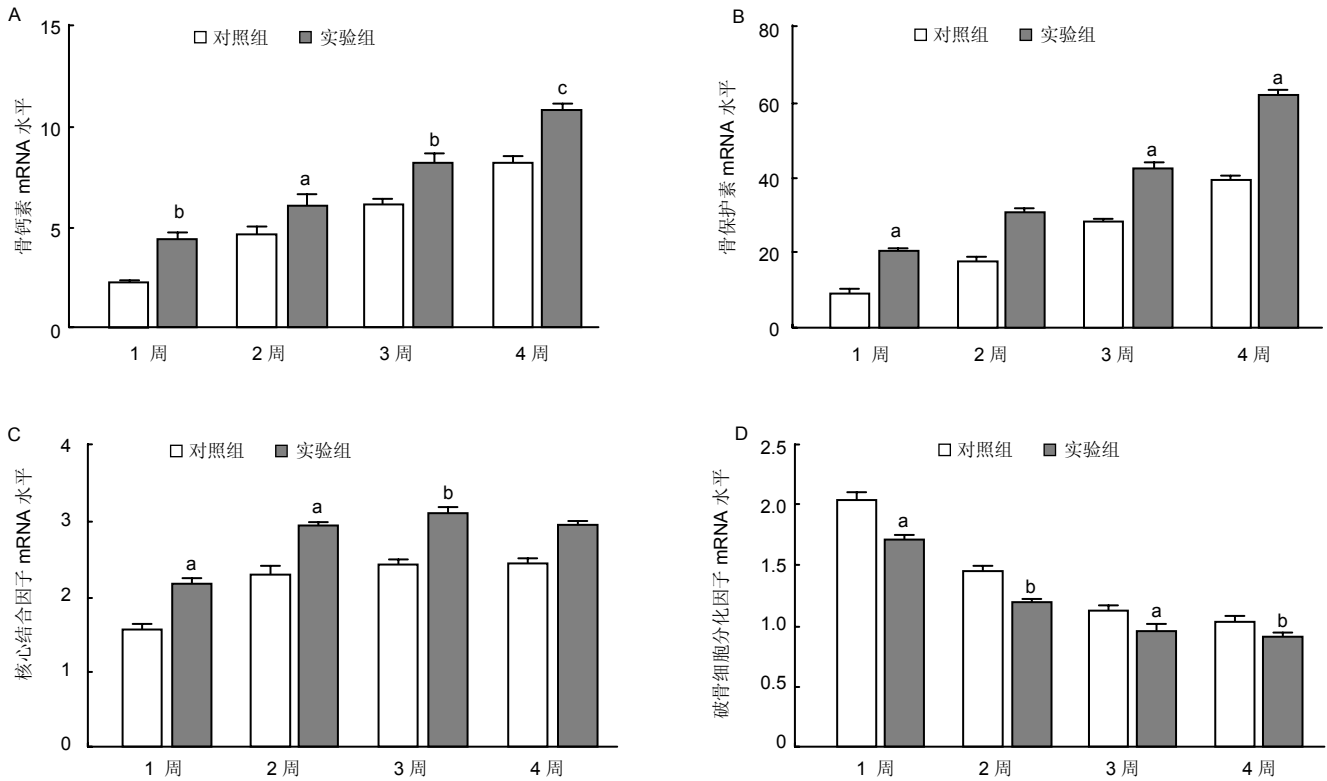


图2 成骨细胞标志物及破骨细胞标志物在实验组与对照组骨愈合过程中的变化趋势

Figure 2 The variation trend of osteoblast markers and osteoclast markers in the process of bone healing

图注: 图中A为成骨细胞标志物骨钙素; B为成骨细胞标志物骨保护素; C为成骨细胞标志物核心结合因子; D为破骨细胞标志物破骨细胞分化因子。与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ 。

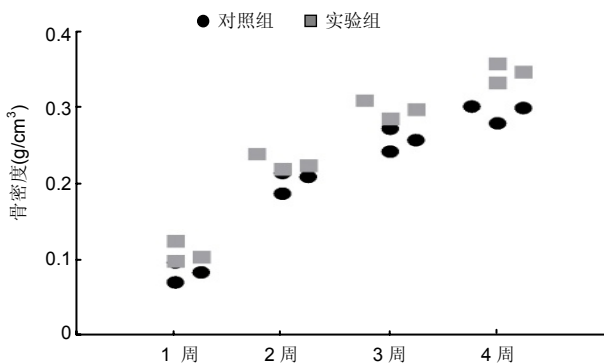


图1 术后不同时间点实验组与对照组新生骨密度测量值

Figure 1 The newborn bone density measurements at different time points after operation

图注: 腭裂处新生骨组织在1-4周内骨密度逐渐变大, 实验组骨密度增长速度较对照组更加明显。

显; 第4周时, 实验组骨密度值为(0.355±0.014) g/cm³, 对照组为(0.298±0.011) g/cm³, 两组比较差异有显著性意义($P < 0.01$), 见图1。

2.4 成骨细胞与破骨细胞标志物在基因水平的变化趋势

骨愈合过程中, 成骨细胞特异性标志物骨钙素、骨保护素、核心结合因子基因水平随时间增长呈明显上升趋势, 且实验组较对照组各基因水平高; 第4周时, 实验组骨钙素 mRNA 含量约为对照组的1.25倍($P < 0.001$), 标志物骨保护素 mRNA 含量约为对照组的1.5倍($P < 0.05$), 核心结合

表1 骨质愈合过程中实验组与对照组血清中碱性磷酸酶活性与抗酒石酸酸性磷酸酶活性值的变化 (x±s, U/L)

Table 1 The changes in activities of serum alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase in bone healing

| 检测指标 | | 对照组 | 实验组 | P |
|-------------|----|-------------|-------------|--------|
| 碱性磷酸酶活性 | 1周 | 65.43±1.31 | 75.81±2.23 | < 0.05 |
| | 2周 | 100.25±2.22 | 130.38±1.56 | < 0.01 |
| | 3周 | 103.31±1.53 | 136.93±2.33 | < 0.01 |
| | 4周 | 109.62±2.09 | 140.19±1.51 | < 0.05 |
| 抗酒石酸酸性磷酸酶活性 | 1周 | 11.83±1.23 | 10.06±1.33 | < 0.05 |
| | 2周 | 9.88±2.54 | 7.25±1.97 | < 0.01 |
| | 3周 | 7.93±1.36 | 5.35±1.86 | < 0.05 |
| | 4周 | 5.98±1.17 | 3.28±1.10 | < 0.01 |

因子的mRNA水平是对照组的1.2倍, 但差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图2A-C。

破骨细胞特异性标志物破骨细胞分化因子在骨愈合过程中呈降低趋势, 见图2D所示, 实验组破骨细胞分化因子含量始终较对照组低($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

本实验利用外科手术方法制造人工单侧完全性腭裂SD大鼠模型具有明显的优势。大量研究结果证实, 外科手术较药物致畸所建的先天性腭裂模型具有更高的可重复性、一致性和实用性, 经济、可靠^[20]。药物致畸的先天性腭裂模型因为周期长、费用高、胚胎期易流产, 而且很难

获得标准一致甚至符合条件的腭裂模型^[21], 因此现已很少使用。同样, 本实验选取SD大鼠作为实验对象较其他大型动物(如犬等)观察周期短, 操作方便, 可以进行大样本实验, 降低实验误差, 而且小鼠口腔太小, 腭板骨壁薄弱, 也不适宜作为实验对象^[22-25]。大鼠腭裂模型标准缺损的确定也很关键。Schmitz等^[26]明确了骨缺损动物模型的要求: 在特定种属的动物和特定骨上, 所造的骨缺损最小且终生不会自愈, 即标准缺损。因此, 本实验以标准缺损为标准, 在利用外科手术方式制造腭裂模型时观察12周, 即骨组织生长已大体稳定时, 将对大鼠模型损伤最小、裂隙宽度保持最好的模型长宽确定为标准缺损。

对于腭裂植骨目前国内外已有很多研究, 包括自体骨移植、异体骨移植等, 异体骨移植也包括同种异体骨移植、生物材料移植、组织工程学等。公认的自体骨移植成活率最高, 无排斥反应, 预后最好, 然而自体骨移植创伤大, 术后活动不方便, 加大感染概率, 增加患者痛苦^[27]。目前国内多数学者着重于复合生物材料植骨, 已有研究证实胶原-羟基磷灰石复合重组人骨形成蛋白2术后排斥反应几乎为零, 预后好, 无骨质吸收^[11]。骨形成蛋白早在1965年由Urist^[28]发现, 可以促进未分化的间充质细胞转化成骨组织或软骨组织。从分子学上来看, 骨形成蛋白是由一个二硫化物键及两个单体结合而成的一种二聚体分子, 属于酸性糖蛋白的一种, 具有很强的扩散性, 并且富含谷氨酸, 与羟基磷灰石有着较高的亲和力, 这也可能是其在骨修复中起到重大作用的根本原因^[29]。近年来胶原-羟基磷灰石复合重组骨形成蛋白2修复骨缺损在临床上的应用已成为研究热点, 并取得了满意的预后效果。然而目前尚未有明确报道复合生物材料胶原-羟基磷灰石复合重组骨形成蛋白2在修复单侧完全性腭裂模型时的后期效果与自体植骨修复的对比评价。本实验就以此为切入点, 在大鼠模型上研究自体骨移植与生物复合材料的植骨效果, 并进行综合评价, 证明复合生物材料植骨方式较自体植骨方式更加有优势, 在今后的临床与科研中更有前景, 然而其具体机制尚需进一步研究。

多年以来, 国内外学者借助组织学、组织化学、组织形态计量学、生物力学等手段对骨创愈合进行了大量实验观察, 对骨创愈合机制也进行了广泛探讨^[30-31]。双能X射线骨密度测量仪稳定性高, 扫描时间短, 射剂量低, 可去除软组织对测量的影响, 目前仍是临床上测量骨密度的金标准。Micro-CT测定骨密度精确度及灵敏度较高, 然而其放射剂量较大, 重复不高, 准确度低, 价格昂贵, 临床上应用测量骨密度较少^[32], 因此, 综合考虑, 提高实验与临床的一致性, 本实验利用双能X线仪测量新生腭骨的骨密度。由于基因技术的发展应用, 人们对骨创愈合的认识已从细胞生物学向分子生物学水平深化, 并随着分子生物学的不断发展, 已认识到骨创愈合与多种生长因子有关, 除内分泌、代谢因子等全身因子外, 骨创局部尚有大量的生长因

子, 对骨创愈合起着重要的调节作用^[33-34], 如碱性磷酸酶、骨钙素、骨保护素等因子活性改变是骨组织代谢的重要标志, 抗酒石酸性磷酸酶、破骨细胞分化因子等则代表了破骨细胞的活性^[35-39]。本实验通过检测各种因子的活性及表达基因量来评估成骨细胞与破骨细胞的活动趋势, 证明了骨愈合的发展过程中成骨细胞活性大于破骨细胞, 而且破骨细胞在骨愈合过程中也发挥着重要作用^[40]。本实验从另一个角度证明了一种检测骨愈合的方式方法, 较之前的检测方式更加精确, 为今后的基础及临床研究提供思路。

致谢: 衷心感谢赵世俊院长的谆谆教诲、悉心指导和无私帮助, 感谢张彦升、马海英、王娟、时炳正等同事在课题完成过程中给予的无私帮助和指导。

作者贡献: 沈悦为项目负责人, 负责实验设计、实施及成文, 马海英负责实验实施, 张彦升负责实验实施、资料收集、审核, 王娟负责资料收集, 时炳正负责实验实施、资料收集, 沈悦对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。

学术术语: 羟基磷灰石-是一种非常具有代表性的陶瓷类植骨材料, 而且被广泛应用于临床, 其化学分子式为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 无论化学组成还是其本身的晶体结构都与人体骨骼相接近, 羟基磷灰石中的 Ca^{2+} 可与羟基氨基酸、蛋白质、有机酸等物质发生交换, 与骨组织结合, 促进骨愈合; 其具有良好的骨传导和骨诱导能力, 但生物力学功能比较差, 如抗疲劳差、压缩强度低、骨吸收较差, 很难被骨组织代替, 植入后多会出现疏松、迁移、破坏等现象。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Gritti-Linde A. Molecular control of secondary palate development. *Dev Biol.* 2007;301(2):309-326.
- [2] Philips BJ. Parameters for Evaluation and Treatment of Patients with Cleft Lip/Palate or the Craniofacial Anomalies. *American cleft palate-craniofacial association*, 1993:14.
- [3] Bergland O, Semb G, Abyholm F. Elimination of the residual alveolar clefts by secondary bone grafting and subsequent orthodontic treatment. *Cleft Palate J.* 1986;23:175-205.
- [4] 陈仁吉. 唇腭裂患者牙槽突裂骨缺损修复材料的现状及发展方向[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2012, 5(6):340-345.
- [5] 庄飏, 马莲. 骨形成蛋白在不同年龄唇腭裂患者髂骨中的表达[J]. *北京口腔医学*, 2007, 15(6):316-318.
- [6] Rawashdeh MA, Telfah H. Secondary alveolar bone grafting: the dilemma of donor site selection and morbidity. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008;46(8):665-670.
- [7] De Riu G, Meloni SM, Raho MT, et al. Delayed iliac abscess as an unusual complication of an iliac bone graft in an orthognathic case. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 37(12): 1156-1158.
- [8] Bajaj AK, Wongworawat AA, Punjabi A. Management of alveolar clefts. *J Craniofac Surg.* 2003;14(6):840-846.

- [9] 王刚,张文云.人工骨修复牙槽骨缺损的研究进展[J].西南国防医学,2014,24(4):455-456.
- [10] Fu YC,Nie H,Ho ML,et al.Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/Hap composite scaffolds loaded with BMP-2.Biotechnol Bioeng.2008;99(4):996-1006.
- [11] 曲志强,何慕舜,曾月东,等.骨形态发生蛋白与骨缺损的修复[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(2):345-348.
- [12] Bonner M,Ward IM,McGregor W,et al. Hydroxyapatite/polypropylene composite: a novel bone substitute material.J Mater Sci Lett.2001;20(22):2049-2051.
- [13] Itoh S,Kikuchi M,Takakuda K.The biocompatibility and osteoconductive activity of a novel hydroxyapatite/collagen composite biomaterial, and its function as a carrier of rhBMP-2.J Biomed Mater Res.2001;54(3):445-453.
- [14] Hu Q,Li B,Wang M,et al.Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture.Biomaterials. 2004;25(5):779-785.
- [15] Pan Y,Xiong D,Gao F.Viscoelastic behavior of nano-hydroxyapatite reinforced poly(vinyl alcohol) gel biocomposites as an articular cartilage.J Mater Sci Mater Med.2008;19(5):1963-1969.
- [16] 王学江,李元宝.羟基磷灰石纳米针晶与聚酰胺仿生复合材料研究[J].高科技通讯,2001,11(5):1-5.
- [17] 李毅,孟国林,刘建,等.MPC骨水泥纤维蛋白胶复合BMP人工骨支架材料对山羊松质骨缺损的修复[J].科学技术与工程, 2008, 8(6):1414-1418.
- [18] 陈鹏,刘冰.活性纳米羟基磷灰石复合胶原/聚乳酸材料修复颅骨极限缺损的实验研究[J].中国修复重建外科杂志, 2007,21(11): 1191-1195.
- [19] 刘鹏.纳米羟基磷灰石-胶原-重组人骨形成蛋白-2复合支架的制备及细胞相容性[D].山西医科大学,2012:1-35.
- [20] Siegel MI,Mooney MP.Appropriate animal models for craniofacial biology. Cleft Palate J.1990;27(1):18-25.
- [21] Bardach J,Kelly KM.Does interference with mucoperiosteum and palatal bone affect maxillofacial surgery? Plast Reconstr Surg.1991;88(3):545-548.
- [22] Wang YJ,Tong YQ,Dai Q,et al.The influence of autogenous bone graft in cleft palate on maxillary growth: an experiment study in rats.Shanghai Kou Qiang Yi Xue.2005;14(1):37-41.
- [23] Kudoh A.Effects of hyperbaric oxygen treatment on healing of maxillary distraction osteogenesis in beagle dogs. Kokubyo Gakkai Zasshi. 2008;75(1):55-64.
- [24] Djasim UM,Hekking-Weijma JM,Wolvius EB,et al.Rabbits as a model for research into craniofacial distraction osteogenesis.Br J Oral Maxillofac Surg. 2008;46(8):620-624.
- [25] 黄洪章,傅豫川,刘恭奇,等.腭成形术对人工腭裂大鼠上颌牙列发育影响的研究[J].口腔医学纵横杂志,1995,11(3):139-140.
- [26] Schmitz JP,Hollinger JO.The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions.Clin Orthop Relat Res.1986;205:299-308.
- [27] 余小明,金鑫,田锬,等.植入成品骨诱导活性材料修复腭裂骨缺损:随机对照3个月后腭部CT扫描三维重建[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(42):8225-8228.
- [28] Urist MR.Bone: formation by autoinduction. Science. 1965; 150(698):893-899.
- [29] 赵星,王愉思,何畔.骨形态发生蛋白最新研究及应用[J].医学信息,2014,28(3):538.
- [30] 石冰.唇腭裂修复外科学[M].成都:四川大学出版社,2004:388-405.
- [31] Boyarskiy S,Choi HJ,Park K.Evaluation of alveolar bone support of the permanent canine in cleft and noncleft patients. Cleft Palate Craniofac J. 2006;43(6):678-682.
- [32] 李希.双能量X线骨密度仪(DEXA)与螺旋QCT对骨密度检查之比较[J].医疗设备信息,2000,15(1):54-55.
- [33] Prall WC,Haasters F.Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation. Biochem Biophys Res Commun.2013;440:617-622.
- [34] Peichl P,Griesmacher A,Muller MM,et al.Serum osteocalcin and urinary crosslaps are suitable markers of bone in response to short term hormone replacement therapy. Gynecol Endocrinol.2000;145:374-381.
- [35] Takayanagi H,Kim S,Matsuo K,et al.RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos dependent induction of interferon- β . Nature.Nature.2002;416:744-774.
- [36] Chen GQ,Deng CX,Ping Y.TGF-B and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation.Int J Biol Sci. 2012;8(2):272-288.
- [37] 罗涛,刘天涛,郭吕华,等.基因活化的仿生生物材料促进骨再生的实验研究[J].医学信息,2014,22(8):110-111
- [38] Valverde P,Tu Q,Chen J.BSP and RANKL induce osteoclastogenesis and bone resorption synergistically.J Bone Miner Res.2005;20(9):1669-1679.
- [39] Miyamoto T.Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. Keio J Med.2011;60(4):101-105.
- [40] Van der plas A,Nijweide PJ.Cell-cell interaction in the osteogenic compartment of bone.Bone.1988;9(2):107-111.