

阿仑膦酸钠促进兔快速下颌骨牵张成骨的作用机制

叶芝魁, 张志明, 崔琳娜, 蒋校文

https://doi.org/10.12307/2024.414

投稿日期: 2023-05-13

采用日期: 2023-07-04

修回日期: 2023-08-03

在线日期: 2023-08-10

中图分类号:

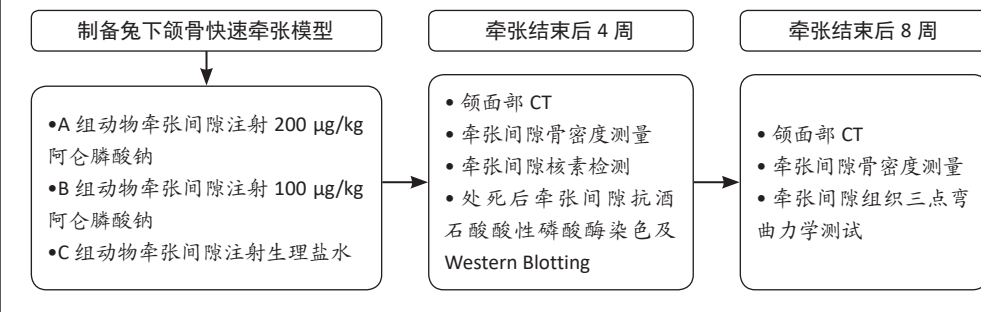
R459.9; R318; R782.23

文章编号:

2095-4344(2024)23-03642-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 局部应用阿仑膦酸钠对兔下颌骨快速牵张成骨的作用及机制



文题释义:

快速牵张成骨: 牵张成骨是一种内源性骨组织工程, 亦常被用于成骨及骨发育的研究。牵张成骨分为: ①手术期: 完成截骨及安放牵张器; ②滞留期: 使牵张间隙形成骨痂, 一般为5-7 d; ③牵张期: 按照一定的频率和速度缓慢延长牵张间隙; ④固定期: 牵张结束后至拆除牵张器, 目的促进牵张新生骨质矿化改建已达到足够临床强度。啮齿类动物下颌骨成骨生长较快, 常利用短滞留期和快速牵张速率来建立成骨不良的牵张模型。

阿仑膦酸钠: 属于第3代双膦酸盐类药物, 可抑制破骨、改善矿化程度、提高骨强度, 预防骨质疏松, 有效降低椎体、髌骨和其他部位的骨折风险, 也是唯一有效降低全身各部位骨折风险的药物。

摘要

背景: 有研究发现局部应用阿仑膦酸钠能够促进成骨, 但少见其在牵张成骨过程中的尝试及探讨。

目的: 观察阿仑膦酸钠对快速兔下颌骨牵张成骨的促进作用并探讨其机制。

方法: 36只新西兰雄性白兔在经过3 d的滞留期后以1.5 mm/12 h(3 d)的牵张速率进行快速牵张, 随后实验动物被随机分为A、B和C组, 每组12只。在固定期第1, 3和7天, A组动物牵张间隙注射200 μg/kg阿仑膦酸钠, B组动物牵张间隙注射100 μg/kg阿仑膦酸钠, C组动物作为对照组。在固定期第4, 8周, 进行CT和双能量X射线骨密度测量。在第4周完成核素扫描后处死部分动物收集标本进行Western Blotting及抗酒石酸酸性磷酸酶染色; 在第8周处死剩余动物后进行三点弯曲力学试验。

结果与结论: ①CT结果发现B组兔牵张间隙新生骨质明显优于A、C组; ②在第4周时B组的骨密度计数为(0.092±0.010) g/cm², 是A组的1.26倍(P < 0.001)、C组的1.28倍(P < 0.001); 在第8周时B组的骨密度为(0.175±0.029) g/cm², 是A组的1.38倍(P < 0.001)、C组的1.45倍(P < 0.001); ③抗酒石酸酸性磷酸酶染色发现C组切片破骨样细胞计数是A组的2.83倍(P < 0.001)、B组的2.21倍(P < 0.001); ④C组牵张间隙核素浓度高于A、B组; ⑤Western Blotting结果发现B组成骨信号蛋白Runx2表达明显强于A、C组; ⑥B组牵张间隙的最大力学负载(158.48±23.21) N是A组的1.26倍(P=0.007)、C组的1.31倍(P=0.003); ⑦结果表明低浓度阿仑膦酸钠可能通过抑制破骨信号来促进兔下颌骨快速牵张成骨。

关键词: 牵张成骨; 阿仑膦酸钠; 兔; 下颌骨; 抗酒石酸酸性磷酸酶; 破骨细胞

Mechanism by which alendronate promotes rapid mandibular distraction osteogenesis in rabbits

Ye Zhikui, Zhang Zhimin, Cui Linna, Jiang Xiaowen

Department of Stomatology, the First People's Hospital of Chenzhou City, School of Stomatology, South Medical University & Institute of Translation Medicine, University of South China, Chenzhou 423000, Hunan Province, China

Ye Zhikui, Master candidate, Attending physician, Department of Stomatology, the First People's Hospital of Chenzhou City, School of Stomatology, South Medical University & Institute of Translation Medicine, University of South China, Chenzhou 423000, Hunan Province, China

Corresponding author: Jiang Xiaowen, MD, Chief physician, Department of Stomatology, the First People's Hospital of Chenzhou City, School of Stomatology, South Medical University & Institute of Translation Medicine, University of South China, Chenzhou 423000, Hunan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Some studies have found that local application of alendronate can promote osteogenesis, but less is reported on the process of distraction osteogenesis.

南方医科大学口腔医学院附属郴州市第一人民医院口腔科 & 南华大学转化研究所, 湖南省郴州市 423000

第一作者: 叶芝魁, 男, 1991年生, 湖南省郴州市人, 汉族, 在读硕士, 主治医师, 主要从事牵张成骨的机制研究。

通讯作者: 蒋校文, 博士, 主任医师, 南方医科大学口腔医学院附属郴州市第一人民医院口腔科 & 南华大学转化研究所, 湖南省郴州市 423000
https://orcid.org/0009-0000-7298-8040(叶芝魁)

基金资助: 湖南省自然科学基金(2018JJ2015, 2022JJ30090), 项目负责人: 蒋校文; 郴州市第一人民医院科研项目(2022YJ-13, 2021B011, 2022KJ-018), 项目负责人: 蒋校文

引用本文: 叶芝魁, 张志明, 崔琳娜, 蒋校文. 阿仑膦酸钠促进兔快速下颌骨牵张成骨的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(23):3642-3647.



OBJECTIVE: To observe the promoting effect of alendronate on rapid mandibular distraction in a rabbit model and explore its possible mechanism.

METHODS: Thirty-six male New Zealand white rabbits were randomly divided into groups A, B and C ($n=12$ per group) after operation and rapid distraction (3-day delay period followed by 3-day distraction at 1.5 mm/12 hours). At the 1st, 3rd and 7th days of the consolidation period, animal were injected with 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ alendronate in group A and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ alendronate in group B, while those in group C were treated as controls. CT scanning and dual energy X-ray bone mineral density measurement were performed at 4 and 8 weeks of the consolidation period. After the radionuclide scanning was completed at the 4th week, several animals were sacrificed and the samples were collected for western blot assay and tartrate resistant acid phosphatase staining. A three-point bending test was performed after the animals were sacrificed at the 8th week.

RESULTS AND CONCLUSION: CT results showed that bone formation in the distraction space of group B was significantly better than that in groups A and C. At the 4th week, the bone mineral density in group B was (0.092 ± 0.010) g/cm^2 , which was 1.26 times higher than that in group A ($P < 0.001$) and 1.28 times higher than that in group C ($P < 0.001$). At the 8th week, the bone mineral density in group B was (0.175 ± 0.029) g/cm^2 , which was 1.38 times higher than that in group A ($P < 0.001$) and 1.45 times higher than that in group C ($P < 0.001$). Tartrate resistant acid phosphatase staining showed that the number of osteoclast-like cells in group C were 2.83 times more than that in group A ($P < 0.001$) and 2.21 times more than that in group B ($P < 0.001$). The radionuclide intensity was higher in group C than in groups A and B. Western blot assay results showed that the expression of Runx2 was significantly stronger in group B than in groups A and C. The maximum biomechanical load in group B was (158.48 ± 23.21) N, which was 1.26 times higher than that in group A ($P=0.007$) and 1.31 times higher than that in group C ($P=0.003$). To conclude, the low concentration of alendronate may promote rapid distraction osteogenesis of the rabbit mandible by inhibiting osteoclast signals.

Key words: distraction osteogenesis; alendronate; rabbit; mandible; tartrate resistant acid phosphatase; osteoclast

Funding: Natural Science Foundation of Hunan Province, Nos. 2018JJ2015 and 2022JJ30090 (to JXW); Science Research Project of the First People's Hospital of Chenzhou City, Nos. 2022YJ-13, 2021B011 and 2022KJ-018 (to JXW)

How to cite this article: YE ZK, ZHANG ZM, CUI LN, JIANG XW. Mechanism by which alendronate promotes rapid mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(23):3642-3647.

0 引言 Introduction

阿仑膦酸钠属于第3代双膦酸盐类药物,可抑制破骨、改善矿化程度、提高骨强度,预防骨质疏松,有效降低椎体、髌骨和其他部位的骨折危险,也是唯一有效降低全身各部位骨折风险的药物^[1]。虽然长期大量应用双膦酸盐可能会导致颌骨坏死,但控制好剂量及疗程仍有可能安全使用,口腔学者也在牙周病、种植体及根管的治疗中探讨其利用价值^[2]。为了探讨其作为促进牵张成骨药物的可能性,此次实验设计利用兔下颌骨快速牵张模型作为研究平台,探讨局部应用阿仑膦酸钠促进牵张成骨的可能性及机制。

牵张成骨作为口腔颌面外科及整形外科治疗先/后天畸形缺损等常用的一种内源性骨组织工程技术,在临床上具有明显优势,但其治疗周期长、相对并发症较多等不足限制其临床广泛推广^[3]。牵张成骨的过程十分复杂,目前其具体的分子生物学机制尚未完全阐明^[4],因此探明机械牵张刺激如何转化为细胞成骨信号的具体机制才可能最终将这项技术广泛应用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验,组间比较采用ANOVA检验。

1.2 时间及地点 实验于2021年1-9月在南华大学转化研究所动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选用36只成年雄性新西兰白兔,体质量3.0-4.0 kg,由南华大学转化研究所动物实验中心提供,许可证号:SYXK(湘)2020-0002。所有动物均单笼饲养2周以适应环境后进行手术。该研究中严格遵循动物伦理原则及外科无菌操作原则,得到郴州市第一人民医院伦理委员会批准(伦理批件号:20211020H)。

1.3.2 主要试剂及仪器 盐酸氯胺酮(20 mg/kg,浙江九旭药业,中国);甲苯噻嗪(5 mg/kg,青岛捷世康药业,中国);阿仑膦酸钠(河北岩峰药业,中国);锝(^{99m}Tc)亚甲基二膦酸盐(河北岩峰药业,中国);EDTA(成都川弘生物,中国);

抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)孵育液(Sigma-Aldrich,德国);BCA蛋白定量试剂盒(Thermo,美国);核因子 κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κB ligand, RANKL)一抗(Bioss,中国);GAPDH一抗(Abcam,英国);血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)一抗(Bioss,中国);TRAP一抗(Abcam,英国);Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)一抗(Abcam,英国)。

兔下颌骨钛合金牵张器(自制);计算机断层扫描仪(CT)(Siemens,德国);双能量X射线骨密度吸收检测仪(Lunar iDXATM,德国);核素扫描仪(Skylight, Philips,荷兰);电子万能材料试验机(Instron,美国);BCA蛋白定量试剂盒(Thermo,美国)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组 36只新西兰兔按随机数字表法随机分为A、B、C组,每组12只。

1.4.2 牵张手术和干预方案 所有实验程序的麻醉均通过耳缘静脉注射盐酸氯胺酮和甲苯噻嗪进行。

所有实验动物在标准动物实验手术室全麻后经过严格备皮消毒后,按之前手术方式进行^[5-6],沿右下颌下缘做3 cm的纵向切口,分层切开颈阔肌及骨膜,钝性分离暴露右侧下颌骨,根据下颌骨形态对自制兔下颌骨钛合金牵张器预成型后,使用钛钉(直径2 mm \times 长8 mm)固定,然后在第一前磨牙和颊孔之间用裂钻全层截断下颌骨,注意截骨时盐水冲洗降温和保护舌侧骨膜的完整性,旋转牵张螺杆,牵开间隙后将暴露的切牙牙髓及被截断的切牙牙根去除,冲洗止血后旋紧螺杆,分层缝合。

牵张成骨分为4个连续阶段:①手术期:完成截骨及安放牵张器;②滞留期:使牵张间隙形成骨痂,一般为5-7 d;③牵张期:按照一定的频率和速度缓慢牵张延长牵张间隙;④固定期:牵张结束后至拆除牵张器,目的促进牵张新生骨质矿化改建已达到足够强度。此次实验拟建立成骨不良牵张模型故加快了牵张速率、缩短了滞留期,滞留期为3 d,并以

1.5 mm/12 h/3 d 的牵张策略建立快速牵张成骨不良的模型。在固定期第 1, 3 和 7 天, A 组动物牵张间隙注射 200 μg/kg 阿仑膦酸钠 (溶解于 0.5 mL 生理盐水), B 组动物牵张间隙注射 100 μg/kg 阿仑膦酸钠 (溶解于 0.5 mL 生理盐水), C 组动物注射等体积生理盐水。

均等部分, 甲醛固定后上部分用 14.5%EDTA 溶液室温下脱钙 14–21 d, 制备 4 μm 厚组织切片行苏木精–伊红及 TRAP 染色; 下部分立即存储于液氮中用于 Western Blotting 检测。第 8 周过量麻醉处死剩余动物后, 在牵张间隙新生骨质外 0.5 cm 处截断标本并冷冻用于三点弯曲力学测试。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	建立兔下颌骨快速牵张成骨模型用于研究阿仑膦酸钠的促成骨作用
研究问题借鉴已有标准动物模型造模	沿右下颌下缘做 3 cm 的纵向切口, 分层切开颈阔肌及骨膜, 钝性分离暴露右侧下颌骨, 根据下颌骨形态对自制兔下颌骨钛合金牵张器预成型后, 使用钛钉 (直径 2 mm×长 8 mm) 固定, 然后在第一前磨牙和颞孔之间用裂钻全层截断下颌骨, 注意截骨时盐水冲洗降温和保护舌侧骨膜的完整性, 旋转牵张螺杆, 牵开间隙后将暴露的切牙牙髓及被截断的切牙牙根尖去除, 冲洗止血后旋紧螺杆, 分层缝合。滞留期为 3 d, 并以 1.5 mm/12 h/3 d 的牵张策略建立快速牵张成骨不良的模型 ^[5-6]
研究问题需要改进动物模型造模方法及意义	通过控制滞留期和提高牵张速率控制牵张间隙成骨条件
选择动物的条件	成年雄性新西兰白兔, 体质量 3.0–4.0 kg
模型与所研究疾病的关系	利用牵张成骨动物模型为平台, 研究阿仑膦酸钠能否促进成骨病的关系
动物来源及品系	雄性新西兰白兔由南华大学转化研究所动物实验中心提供并饲养
造模技术描述	利用短滞留期和快速牵张速率制备成骨不良牵张模型
动物数量及分组方法	36 只兔按照随机数字表法随机分为 3 组, 每组 12 只
造模成功评价指标	牵张器能够有效延长下颌骨并维持稳定
造模后实验观察指标	CT, 核素, 骨密度, Western Blotting, 力学测试
造模后动物处理	过量麻醉剂处死后进行下一步检测
伦理委员会批准	实验方案由郴州市第一人民医院伦理委员会批准 (批准号: 20211020H)
造模过程中动物不良反应	外科手术伤口可能出现感染; 牵张成功后动物出现明显的下颌偏斜, 前牙明显伸长, 可能出现创伤性溃疡

1.5.3 苏木精–伊红组织切片染色及 TRAP 染色及计数 石蜡切片常规脱蜡至水, 常规进行苏木精–伊红染色, 封固。再制切片装入染色盒 37 °C 水浴 15 min 后加入现配 TRAP 孵育液 (Sigma-Aldrich, 德国) 避光浸染 60 min, 双蒸水充分洗涤, 苏木精复染细胞核。在 TRAP 染色切片低倍镜下先找寻新生骨组织结构, 再换高倍镜 (×400) 随机选择 10 个视野进行 TRAP 阳性染色细胞计数, 每个视野不重叠。

1.5.4 Western Blotting 检验 液氮条件下磨碎牵张间隙组织, 裂解后得到总蛋白, 以牛血清为标准品, 利用 BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo, 美国) 建立标准曲线, 计算总蛋白浓度, 取总蛋白 20 μg 行 SDS-PAGE 电泳, 转 PVDF 膜, 脱脂奶粉封闭后分别一抗 [RANKL(1 : 500), GAPDH(1 : 1 000), VEGF(1 : 750), TRAP(1 : 500), Runx2(1 : 750)] 孵育过夜后二抗 37 °C 孵育 1 h。最后置于自动成像仪暗匣中加显影液, 计算机扫描收集图像。GAPDH 作为内参。利用 Image J 软件对目标蛋白条带灰度值进行测量数据, 除以内参灰度值作为其相对蛋白含量。

1.5.5 生物力学测试 标本复室温后使用电子万能材料试验机对复温后 8 周牵张间隙组织施以 1 kN 负载 (5 mm/min) 进行三点弯曲试验, 直到牵张区之间出现断裂为止。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件 (SPSS, 美国) 对实验数据进行统计学分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差 (ANOVA) 分析和检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。此文统计学方法得到郴州市第一人民医院生物统计学专家审核。

1.5 主要观察指标 见表 1。

表 1 | 牵张成骨模型兔术后监测项目
Table 1 | Postoperative monitoring items in the rabbit model of distraction osteogenesis

时间	CT	骨密度	核素	抗酒石酸酸性磷酸酶染色	Western Blotting	三点弯曲试验
牵张后第 4 周	✓	✓				
牵张后第 4 周随机处死 6 只			✓	✓	✓	
牵张后第 8 周	✓	✓				
处死剩余 6 只						✓

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析及大体观察 36 只兔均耐受整个手术过程并完成实验。通过快速牵张, 3 组动物右侧下颌骨均被有效延长并出现明显偏颌, 左下切牙出现明显过度伸长 (图 1), 手术切口未出现感染等不良反应。局部注射阿仑膦酸钠未出现全身及局部不良反应。

2.2 CT 检查结果 重建后 CT 图像显示牵张器固定牢固 (图 2), 能够有效维持牵张间隙稳定。牵张后第 4 周, 3 组牵张间隙骨质不连续, B 组牵张间隙新生骨质较为明显。牵张后第 8 周, B 组牵张间隙模糊可见, 由桥接的骨松质填充, 上下端骨皮质已完全桥接; 而 A、C 组牵张间隙仍清晰可辨, 上下端骨皮质及骨松质在正中没有完全桥接。

2.3 骨密度测量结果 在第 4 周时, B 组的骨密度计数为 (0.092±0.010) g/cm², 是 A 组的 1.26 倍 ($P < 0.001$)、C 组的 1.28 倍 ($P < 0.001$)。在第 8 周时, B 组的骨密度为 (0.175±0.029) g/cm², 是 A 组的 1.38 倍 ($P < 0.001$)、C 组的 1.45 倍 ($P < 0.001$)。见表 2。

1.5.1 CT、骨密度和核素检查 在固定期第 4 周随机选择 6 只动物通过耳缘静脉注射得 (^{99m}Tc^m) 亚甲基二膦酸盐 (7.4 MBq/kg)。麻醉成功后将兔仰卧位于扫描平台上, 对其颌面部进行 CT 扫描 (120 kV, 100 mA), 并通过计算机软件重建图像。随后将动物置于双能量 X 射线骨密度测量仪扫描区检测牵张区域 (0.9 cm) 骨密度, 最后待核素显影剂注射 3 h 后将动物置于核素扫描仪上以收集牵张间隙的核素信号。

1.5.2 组织标本的收集和处理 核素扫描后过量麻醉处死动物, 迅速解剖出牵张间隙骨质, 沿下颌骨体长轴水平分为两

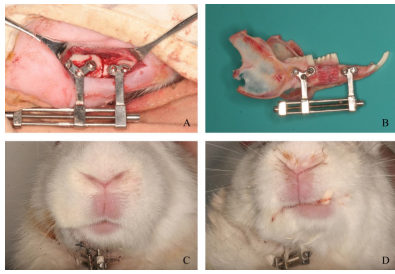


图 1 | 兔牵张手术及牵张前后兔正面图片
Figure 1 | The representative pictures of distraction surgery in rabbits and the front side view of rabbits before and after distraction

图注：图 A 为手术完成图像；B 为牵张结束后 4 周处死兔解剖下颌骨标本；C 为兔牵张开始前正面观；D 为兔牵张结束后正面观

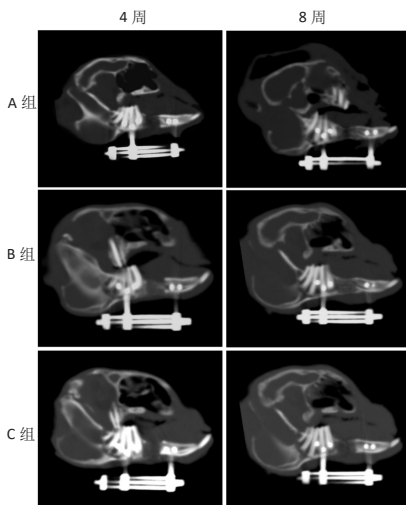


图 2 | 各组兔牵张结束后第 4、8 周牵张间隙 CT 重建图像
Figure 2 | CT remodeling images of the distraction gap at 4 and 8 weeks after the end of distraction in rabbits

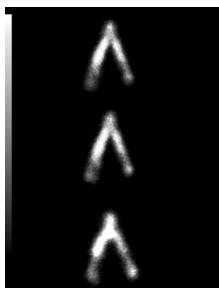
图注：在固定期第 1、3 和 7 天，A、B 组牵张间隙注射 200、100 μg/kg 阿仑膦酸钠（溶解于 0.5 mL 生理盐水），C 组注射等体积生理盐水

表 2 | 第 4 周和第 8 周各组兔牵张间隙骨矿密度比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$, g/cm²)
Table 2 | The bone mineral density of the distraction gap at 4 and 8 weeks after the distraction

时间	A 组	B 组	C 组
4 周	0.073±0.004 ^a	0.092±0.010	0.072±0.044 ^a
8 周	0.126±0.018 ^a	0.175±0.029	0.121±0.026 ^a

表注：在固定期第 1、3 和 7 天，A、B 组牵张间隙注射 200、100 μg/kg 阿仑膦酸钠（溶解于 0.5 mL 生理盐水），C 组注射等体积生理盐水。与 B 组相比，^a $P < 0.05$

2.4 核素显像结果 通过核素显像 (图 3) 发现右侧下颌骨牵张间隙出现明显核浓集，C 组牵张间隙核浓集强度高于 A 和 B 组。

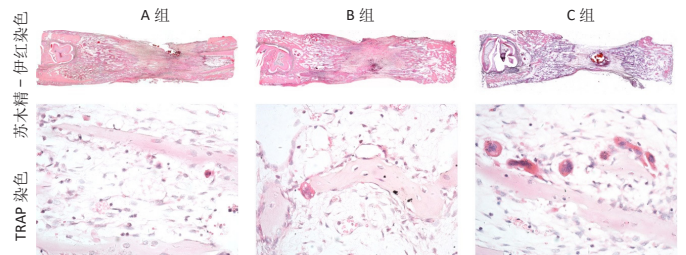


图注：在固定期第 1、3 和 7 天，A、B 组牵张间隙注射 200、100 μg/kg 阿仑膦酸钠（溶解于 0.5 mL 生理盐水），C 组注射等体积生理盐水
图 3 | 牵张结束后 4 周重建下颌骨核素图像

Figure 3 | The reconstructed radionuclide pictures of the lengthened mandibles at 4 weeks after distraction

2.5 TRAP 染色结果 在牵张间隙组织切片苏木精 - 伊红染色中发现，A、C 组牵张间隙组织有囊性变，牵张间隙中央为成纤维结缔组织充填；B 组牵张间隙中央可见分散的骨岛形成，两侧截骨断端均可见较多排列较为规律骨小梁形成。

TRAP 染色中发现 (图 4)，A、B 组切片中可以观察骨小梁周围少量 TRAP 阳性染色多核巨细胞，骨小梁周围仍可以看到较为规则排列的成骨细胞；C 组切片中可以看到较多 TRAP 阳性染色多核巨细胞，形态不规则，骨小梁周围成骨细胞排列不规则。通过高倍镜视野 TRAP 阳性细胞计数发现 C 组 TRAP 阳性染色细胞明显高于 A、B 组，差异有显著性意义 ($P < 0.001$)，A 组和 B 组间细胞计数无统计学差异 ($P=0.135$)。见表 3。



图注：在固定期第 1、3 和 7 天，A、B 组牵张间隙注射 200、100 μg/kg 阿仑膦酸钠（溶解于 0.5 mL 生理盐水），C 组注射等体积生理盐水
图 4 | 牵张结束后 4 周牵张间隙组织切片苏木精 - 伊红染色 (x5) 及抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色 (x400)

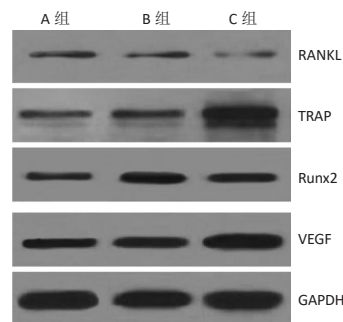
Figure 4 | Hematoxylin-eosin (x5) and tartrate resistant acid phosphatase staining (x400) of the distraction gap at 4 weeks after distraction

表 3 | 各组兔牵张结束后 4 周牵张间隙抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 阳性细胞计数 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$, 个 / 高倍视野)
Table 3 | The TRAP positive cell counting in each group at 4 weeks after the finishing of distraction

组别	TRAP 阳性细胞计数
A 组	2.17±1.45 ^a
B 组	2.78±1.89 ^a
C 组	6.15±3.43

表注：在固定期第 1、3 和 7 天，A、B 组牵张间隙注射 200、100 μg/kg 阿仑膦酸钠（溶解于 0.5 mL 生理盐水），C 组注射等体积生理盐水。与 C 组相比，^a $P < 0.05$

2.6 Western Blotting 结果 第 4 周牵张间隙组织间隙电泳结果发现 (图 5)，A、B 组 RANKL 表达强度弱于 C 组；C 组 TRAP 表达最强；Runx2 表达在 B 组强于 A、C 组；VEGF 表达在 C 组强于 A、B 组。



图注：在固定期第 1、3 和 7 天，A、B 组牵张间隙注射 200、100 μg/kg 阿仑膦酸钠（溶解于 0.5 mL 生理盐水），C 组注射等体积生理盐水。RANKL 为核因子 κB 受体活化因子配体，TRAP 为抗酒石酸酸性磷酸酶，Runx2 为 Runt 相关转录因子 2，VEGF 为血管内皮生长因子

图 5 | 牵张结束 4 周后牵张间隙 Western Blotting 结果
Figure 5 | Western blot results of the distraction gap at 4 weeks after distraction

通过 Image J 软件对蛋白条带灰度值分析发现 (表 4)，RANKL 相对含量在 A 组中最高 ($P < 0.001$)，TRAP 相对含量在 C 组中最高 ($P < 0.001$)，Runx2 相对含量在 B 组中最高 ($P < 0.001$)，VEGF 相对含量在 C 组中最高 ($P < 0.001$)。

表 4 | 各组兔牵张结束 4 周后牵张间隙 Western Blotting 条带灰度值结果 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 | The gray value analysis of the western blot results of the distraction gap at 4 weeks after distraction

指标	A 组	B 组	C 组
核因子 κ B 受体活化因子配体	0.743 \pm 0.034 ^a	0.620 \pm 0.018 ^a	0.395 \pm 0.044
抗酒石酸酸性磷酸酶	0.238 \pm 0.034 ^a	0.408 \pm 0.041 ^a	0.975 \pm 0.044
Runt 相关转录因子 2	0.540 \pm 0.036 ^a	0.908 \pm 0.041 ^a	0.721 \pm 0.051
血管内皮生长因子	0.589 \pm 0.032 ^a	0.738 \pm 0.027 ^a	1.073 \pm 0.041

表注: 在固定期第 1, 3 和 7 天, A、B 组牵张间隙注射 200, 100 μ g/kg 阿仑膦酸钠 (溶解于 0.5 mL 生理盐水), C 组注射等体积生理盐水。与 C 组相比, ^a $P < 0.05$

2.7 三点弯曲试验结果 三点弯曲试验表明, 在第 8 周 B 组牵张间隙的最大负载 (158.48 \pm 23.21) N 是 A 组的 1.26 倍 ($P=0.007$)、C 组的 1.31 倍 ($P=0.003$), 见表 5。

表 5 | 各组兔牵张结束 8 周后牵张间隙组织力学测试结果 ($\bar{x} \pm s, n=12, N$)
Table 5 | The biomechanical results of the distraction gap at 8 weeks after distraction

组别	最大力学负载
A 组	126.01 \pm 13.63 ^a
B 组	158.48 \pm 23.21
C 组	135.09 \pm 24.16 ^a

表注: 在固定期第 1, 3 和 7 天, A、B 组牵张间隙注射 200, 100 μ g/kg 阿仑膦酸钠 (溶解于 0.5 mL 生理盐水), C 组注射等体积生理盐水。与 B 组相比, ^a $P < 0.05$

3 讨论 Discussion

牵张成骨一直是整形外科和口腔颌面外科的有效增骨方式, 有明显的优势, 也有不少不足。牵张成骨本身是一种不同于骨折和胚胎骨发育的成骨方式, 其细胞及动物模型亦广泛用于成骨的机制研究。兔下颌骨牵张模型因为动物温顺易操作、牵张间隙组织量较多等优点一直是牵张成骨的较好模型。实验中发现快速牵张模型 (1.5 mm/12 h) 的组织切片中发现较多多核巨细胞 TRAP 染色阳性, 说明过快的牵张机械刺激可能激活了破骨信号, 导致破骨活动增加、成骨减少。

阿仑膦酸钠是首个获得美国食品药品监督管理局批准用于治疗骨质疏松的第 3 代氨基双膦酸盐骨吸收抑制剂药物。研究发现其能够通过以下方式促进成骨, 减少骨转化: ①抑制破骨: 直接或间接作用于破骨细胞, 抑制其生物活性并促进其凋亡。它通过抑制甲羟戊酸信号途径中法尼基焦磷酸合成酶, 阻碍小 GTP 酶等蛋白的异戊二烯化, 发挥对破骨细胞募集、分化、生成的调控^[7]。阿仑膦酸钠处理后 TRAP 活性也显著下调, 其运动黏附性能以及分化成熟过程均受到严重抑制, 并出现凋亡^[8]。②调节成骨: 在体外培养成骨细胞系时, 加入双膦酸盐能促进成骨细胞的增殖, 刺激成骨细胞系的分化, 并增强骨基质矿化^[9]。双膦酸盐也可通过上调骨保护素/RANKL 的表达比率来影响成骨细胞的生理功能^[7], 其还被证明能刺激成骨细胞及其祖细胞的增殖, 增强碱性磷酸酶活性、矿物质形成、骨形态发生蛋白 2、胶原酶 3、骨钙素和破骨细胞抑制因子的表达^[10]。

在血液循环中双膦酸盐基本上以原形存在, 在体内能够快速被吸收, 在骨骼吸收过程中从羟基磷灰石上解吸, 并

被破骨细胞吸收, 但也可以再次被骨骼吸收或在循环中释放, 主要分布在骨活动较为活跃的部位, 可在骨组织中停留数年之久^[11]。研究发现双膦酸盐全身应用 (口服或是静脉给药) 仍存在着胃肠道并发症、肌肉骨骼痛及颌骨坏死等并发症^[3]。因牵张成骨过程是短时间, 不需要长期维持, 因而此次实验通过局部间断给药试图提高局部利用率及减少全身不良反应。实验结果发现, 通过局部阿仑膦酸钠处理, 4 周牵张间隙组织切片 TRAP 阳性染色多核巨细胞明显减少, 结合 Western Blotting 结果发现 RANKL 及 TRAP 阳性表达明显减弱。核素结果同样提示 A、B 组牵张间隙骨代谢活动明显弱于 C 组。上述结果说明阿仑膦酸钠可能在牵张间隙抑制了破骨信号, 减少了破骨细胞的形成。实验中提示 B 组 Runx2 表达最强, A 组表达较弱, 说明高浓度的阿仑膦酸钠局部处理反而抑制了成骨活性; 而 C 组 VEGF 表达最强, 说明破骨信号被激活后需要大量的血管生成来输送和形成多核巨细胞, 这也与 STRESING 等^[12]发现阿仑膦酸钠治疗减少血管内皮生长因子的生成相一致。第 8 周的影像学结合力学测试说明 B 组成骨效果明显优于 A 和 C 组, 说明低浓度阿仑膦酸钠的间断短期处理能够有效促进快速牵张成骨模型的长期成骨效果, 这与国外学者在兔下颌骨牵张模型使用唑来膦酸盐、在兔胫骨牵张模型使用阿仑膦酸钠获得了相类似的结果^[13-14]。唑来膦酸盐亦属于第 3 代二膦酸盐, 主要为注射剂型, 在临床上研究认为在减缓女性骨质疏松方面^[15], 其成本效益优于口服剂型的阿仑膦酸钠。在牵张动物实验中亦是全身静脉使用^[13], 证实其能够促进成骨。在此次实验中考虑到全身应用的不良反应, 选取了局部应用, 两者在牵张成骨方面的优劣需要更多的动物实验验证比较。

此次实验仍有一些不足: 没有选取更多浓度阿仑膦酸钠进行多分组实验以探寻具体适宜的浓度; 观察时间较短, 没有能够观察其远期效果; 由于兔种属的限制, 生化抗体较少, 因此对破骨信号的研究不是十分全面, 可考虑后期在鼠类体内及体外模型中进一步验证阿仑膦酸钠对牵张成骨过程中破骨信号的影响。

双膦酸盐作为化学性颌骨骨髓炎的主要致病因素^[16], 一直被临床医生所忌惮。目前有学者在体外实验中发现局部小剂量阿仑膦酸钠的短期干预^[17-21], 能够抑制牙周病牙槽骨吸收、增加口腔种植体稳定性、促进骨缺损修复和加速正畸移动速度。同时有研究发现高剂量、长期使用的双膦酸盐会抑制骨形成和成骨活性^[22-23], 因而此次实验选用较小剂量间断短期局部给药, 不仅能够促进成骨, 而且减少了不良反应。大多数口腔治疗项目如种植、正畸及牵张成骨等需要外界干预促进成骨的时间段较短, 因此在严格控制用药量和疗程、监控不良反应的前提下也许可以考虑作为临床上牵张成骨患者的辅助用药, 特别是扩大牵张成骨在成骨不良患者中的手术适应证, 但这仍需要大量的试验来验证。

致谢: 感谢郭海鹏、廖国志、何天航和何晋豪在实验中给予的帮助。

作者贡献: 叶芝魁负责实验设计及文章撰写, 叶芝魁、张志明、崔琳娜负责实验实施, 蒋校文负责评估。

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。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了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。

4 参考文献 References

- [1] YUAN F, PENG W, YANG C, et al. Teriparatide versus bisphosphonates for treatment of postmenopausal osteoporosis: A meta-analysis. *Int J Surg*. 2019;66:1-11.
- [2] 谢淑娟, 潘卫红. 双磷酸盐在口腔医学方面的研究进展 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2011,27(1):53-55.
- [3] HOPPER RA, ETTINGER RE, PURNELL CA, et al. Thirty Years Later: What Has Craniofacial Distraction Osteogenesis Surgery Replaced? *Plast Reconstr Surg*. 2020;145(6):1073e-1088e.
- [4] SAHOO NK, ISSAR Y, THAKRAL A. Mandibular Distraction Osteogenesis. *J Craniofac Surg*. 2019;30(8):e743-e746.
- [5] 蒋校文, 黄华庆, 陈金勇, 等. 骨膜蛋白促进兔下颌骨快速牵张成骨的实验研究 [J]. *口腔疾病防治*, 2019,27(9):551-556.
- [6] 蒋校文, 张翼, 范晓升, 等. 杜仲醇提取物对兔下颌牵张成骨的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2015,19(42):6725-6729.
- [7] TORRES-HUERTA A, CHAN TG, WHITE AJP, et al. Molecular recognition of bisphosphonate-based drugs by di-zinc receptors in aqueous solution and on gold nanoparticles. *Dalton Trans*. 2020;49(18):5939-5948.
- [8] 付福建, 郑周海, 史晓红, 等. 双磷酸盐诱导破骨细胞凋亡的作用机理研究 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2019,38(10):4726-4731.
- [9] THAVORNUTIKARN B, WRIGHT PFA, FELTIS B, et al. Bisphosphonate activation of crystallized bioglass scaffolds for enhanced bone formation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;104:109937.
- [10] APOSTU D, LUCACIU O, MESTER A, et al. Cannabinoids and bone regeneration. *Drug Metab Rev*. 2019;51(1):65-75.
- [11] CREMERS S, DRAKE MT, EBETINO FH, et al. Pharmacology of bisphosphonates. *Br J Clin Pharmacol*. 2019;85(6):1052-1062.
- [12] STRESING V, FOURNIER PG, BELLAHCÈNE A, et al. Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. *Bone*. 2011;48(2):259-266.
- [13] PAMPU AA, DOLANMAZ D, TÜZ HH, et al. Experimental evaluation of the effects of zoledronic acid on regenerate bone formation and osteoporosis in mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006;64(8):1232-1236.
- [14] OMI H, KUSUMI T, KIJIMA H, et al. Locally administered low-dose alendronate increases bone mineral density during distraction osteogenesis in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br*. 2007;89:984-988.
- [15] YOU R, ZHANG Y, WU DB, et al. Cost-Effectiveness of Zoledronic Acid Versus Oral Alendronate for Postmenopausal Osteoporotic Women in China. *Front Pharmacol*. 2020;30:11:456.
- [16] ENDO Y, FUNAYAMA H, YAMAGUCHI K, et al. Basic Studies on the Mechanism, Prevention, and Treatment of Osteonecrosis of the Jaw Induced by Bisphosphonates. *Yakugaku Zasshi*. 2020;140(1):63-79.
- [17] CUNHA VV, SILVA PGB, LEMOS JVM, et al. Evaluation of a collagen matrix in a mandible defect in rats submitted to the use of bisphosphonates. *Acta Cir Bras*. 2020;35(10):e202001005.
- [18] 施健, 张健. 不同质量浓度阿仑膦酸钠干预牙槽骨吸收模型兔牙周组织破骨细胞分化因子和骨保护素的表达 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011,15(20):68-71.
- [19] 李向宇, 赵刚. 阿仑膦酸钠对大鼠正畸牙移动后保持阶段牙周组织中 Osterix 表达的影响 [J]. *微量元素与健康研究*, 2019,36(5):4-6.
- [20] KOEHNE T, KAHL-NIEKE B, AMLING M, et al. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates interferes with orthodontically induced midpalatal suture expansion in mice. *Clin Oral Invest*. 2018;22(6):2345-2351.
- [21] CUAIRAN C, CAMPBELL PM, KONTOGIORGOS E, et al. Local application of zoledronate enhances miniscrew implant stability in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2014;145(6):737-749.
- [22] HU JH, DING M, SOBALLE K, et al. Effects of short-term alendronate treatment on the three-dimensional microstructural, physical and mechanical properties of dog trabecular bone. *Bone*. 2002;31(5):591-597.
- [23] ZHANG C, ZHU J, JIA J, et al. Long-term pretreatment with alendronate inhibits calvarial defect healing in an osteoporotic rat model. *J Bone Miner Metab*. 2021;39(6):925-933.

(责任编辑: WL, GD, ZN, LWJ)