

· 论 著 ·

骨形成蛋白-2 在上颌骨快速牵引骨愈合中的作用*

姚玉胜¹, 王程越², 王桂君^{3△}

(1. 辽宁医学院附属第二医院口腔颌面外科, 辽宁锦州 121000; 2. 辽宁省锦州市中心医院修复科, 辽宁锦州 121000; 3. 辽宁医学院药理学系, 辽宁锦州 121000)

摘要:目的 探索上颌骨经缝牵引中(当弹性牵引力大于 800 g)加入重组人骨形成蛋白-2(rhBMP-2)对新骨形成的影响。方法 将 36 只健康杂种犬随机分为 5 个组,即对照组、400 g 组、600 g 组、800 g 组及 800 g+ rhBMP-2 组(联合组)。术后 1~8 周处死动物,行 X 线检测及免疫组织化学染色检测。结果 各牵引组上颌骨成功前徙,以 600 g 组效果明显[(25.3±5.2)mm]。800 g 组在 2 周内牵引速度快,4 周后明显减慢[(12.1±2.3)mm],但在注射 rhBMP-2 后得以改善[(24.2±3.4)mm]。BMP-2、BMP-4、BMP-7 阳性染色主要定位于成骨细胞细胞质中,BMP-7 在注射 rhBMP-2 后光密度值明显增强。CT 检测各牵引组腭骨水平板骨密度值明显减低,以 800 g 组最为显著[(317.8±185.5)HU],而在注射 rhBMP-2 后骨密度值明显增强[(1 158.0±93.0)HU]。结论 骨缝牵引前移上颌骨能在微创早期延长骨长度;rhBMP-2 可以有效促进骨形成并在调节 rhBMP-7 活性方面起到一定作用。

关键词:骨整合;牵引术;骨生成;重组人骨形成蛋白-2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.15.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)15-1692-04

Effect of bone morphogenetic protein-2 on bone healing in supramaxillary fast traction*

Yao Yusheng¹, Wang Chengyue², Wang Guijun^{3△}

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Second Affiliated Hospital, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Department of Prosthodontics, Jinzhou Central Hospital, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 3. Department of Pharmacy, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of adding recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2) on the bone regeneration in sutural supramaxillary distraction osteogenesis(elasticity traction force > 800 g). **Methods** 36 healthy hybrid dogs were randomly divided into 5 groups, control, 400 g, 600 g, 800 g and 800 g+ rhBMP-2(combined) groups, and killed in post-operative 1-8 weeks for X-ray examination and immunohistology staining. **Results** Supramaxilla was successfully moved forward in the various traction groups, especially in the 600 g group(25.3±5.2)mm. The traction speed in the 800 g group was fast within 2 weeks and significantly slowed after 4 weeks(12.1±2.3)mm, which was improved after injection of rhBMP-2[(24.2±3.4)mm]. Immunohistochemical staining showed that the positive staining of BMP-2, BMP-4 and BMP-7 was evident in osteoblast plasma. After injection of rhBMP-2, the light density value in BMP-7 was obviously enhanced. The CT examinations showed that the bone density values in jawbone horizontal plate was significantly decreased, especially in the 800 g group[(317.8±185.5)HU], but after injection of rhBMP-2, which was significantly enhanced[(1 158.0±93.0)HU]. **Conclusion** Sutural traction for advancing supramaxilla can extend the bone length at the early stage of microtrauma. RhBMP-2 may play certain role in the bone formation and the regulation of the activity of BMP-7.

Key words:osseointegration; traction; osteogenesis; recombinant human bone morphogenetic protein-2

作为一种创伤小、出血少的治疗骨缺损及畸形新技术,经骨缝牵引成骨术已引起各科医生的重视^[1]。Liu 等^[2]以兔为实验对象发现,重组人骨形成蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)对骨缝及周围组织的改建有较明显促进作用。范伟等^[3]也认为 BMP-2 单独应用即有较强的诱导成骨活性。为继续探索快速弹性牵引中骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)对扩张骨缝作用,本研究建立了犬腭横缝牵引模型,探讨当牵引力大于 800 g 后加入缓释 rhBMP-2 对骨质改建的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物:选取 4~5 个月健康杂种犬 36 只,体重(3.72±1.35)kg,由辽宁医学院动物中心提供。牵引器:由不锈钢滑道和作用距离为 30 mm(初始作用力为 400、600、800 g)的形状镍钛记忆合金组成,由北京有色金属研究所提供。内水相:rhBMP-2 10 mg 加入适量盐酸胍溶液溶解后,取 100 μL

与少量牛血清清蛋白混匀形成,由解放军军事医学科学院提供;油相:聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA),由山东医疗器械研究所提供;外水相:含 1% PVA 聚乙烯醇、0.5% 吐温-20,由北京化学试剂公司提供。纤维蛋白胶(fibrin sealant, FS),由杭州普济公司提供;兔抗鼠 BMP-2、BMP-4、BMP-7 多克隆抗体,由博士德公司提供;生物素化山羊抗兔 IgG,由博士德公司提供。

1.2 方法

1.2.1 rhBMP-2 缓释胶囊制作 将初乳与 10 mL 外水相经 800 r/min 离心 4 h,过滤,蒸馏水洗涤,真空冻干,形成 rhBMP-2/PLGA 缓释微球,4~8 ℃ 保存。实验时分别将缓释微球与 FS 的主体胶和粉剂相溶,制成主体胶混悬液和催化剂溶液。二者按 1:1 比例通过双管注射器于术后 5 d 注入牵引区附近黏膜下。

1.2.2 实验动物分组及手术操作 将 36 只健康杂种犬随机

* 基金项目:辽宁省教育厅及辽宁医学院博士启动基金资助项目(L2010281)。作者简介:姚玉胜(1970~),副主任医师,博士研究生,主要从事牵引成骨研究。△ 通讯作者, Tel:(0416)4197472; E-mail:wgj-april@163.com。

分为对照组($n=4$)和实验组(32)只,实验组又分为 400 g 组($n=8$)、600 g 组($n=8$)、800 g 组($n=8$)、800 g+ rhBMP-2 组(联合组)($n=8$)。实验组采用 3%戊巴比妥钠(0.1 mg/kg)静脉注射麻醉,术前 15 min 阿托品 0.01 mg/kg 肌肉注射,先截除尖牙牙冠后行根管治疗。无菌条件下在硬腭中线纵行 6 cm 切口,剥离子翻瓣,找到腭横缝后,电钻钻孔将滑道后板用微型螺钉固定于腭横缝后缘。在腭横缝前测量相应位置后钻孔,分别固定 400、600、800 g 镍钛合金丝及滑杆。镍钛合金固定于腭横缝两侧,通过滑道限制牵引丝扩张方向,可以将两侧骨板按预定轨迹相背移动。牵引 5 d 后通过双管注射器将 rhBMP-2/PLGA 缓释微球与 FS 注入联合组动物的牵引区黏膜下。对照组不处理。术后肌肉注射青霉素 40 万 μ , 共 4 d。每周拍 X 线片,以确定上颌骨位移及牵引器固定情况。

1.2.3 标本采集及制作 术后 1、2、4、8 周以过量麻醉药处死各实验组动物 2 只,对照组 1 只。先行头颅 CT 横断扫描,扫描区间自外耳道至尖牙区。解剖腭骨剔除软组织后,组织块固定于 10%中性甲醛中,5.5%乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙 3 周,脱水、包埋。免疫组织化学染色 60 $^{\circ}$ C 烤片过夜,一抗采用兔抗鼠 BMP-2、BMP-4、BMP-7 多克隆抗体,二抗为生物素化山羊抗兔 IgG。按说明书完成免疫组织化学染色,PBS 代替一抗作阴性对照。

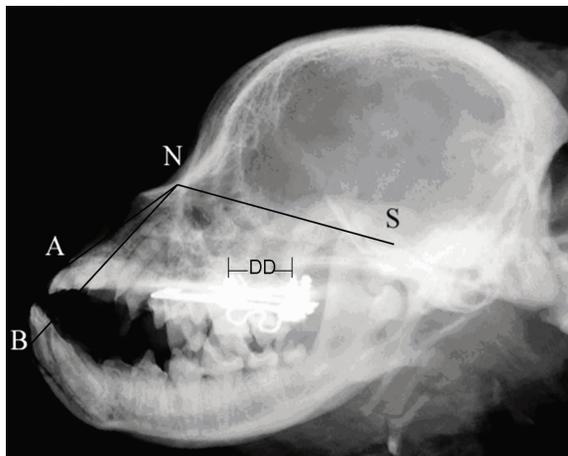
1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床观察 术中 800 g 组 1 只犬死亡,给予补充,余均健康,牵引器固定完好。各组术后颅底上牙槽座角(\angle SNA)自 131 $^{\circ}$ 增大至 140 $^{\circ} \pm 4^{\circ}$ (表 1)。颅底下牙槽座角(\angle SNB)无明显变化,维持在 128 $^{\circ}$ 左右,各标志点见图 1、2。为排除其他影响因素,解剖颅骨标本后按 Yao 等^[4]颅骨各标志点以游标卡尺(E0512)测量(图 3),结果显示实验组上颌成功前徙,以 600 g 及联合组明显(表 2)。头颅 CT 扫描显示,各牵引组腭骨水平板均变薄,骨密度显著下降,以 800 g 组(图 4)明显,在注射 rh-BMP-2 后(图 5)明显改善,见表 3。

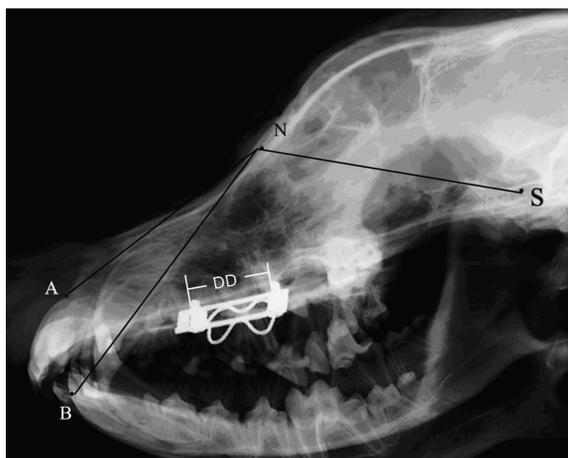
2.2 免疫组织化学染色结果 BMP-2(图 6)、BMP-4(图 7)、BMP-7(图 8)阳性染色主要定位于成骨细胞、成纤维细胞及骨细胞细胞质中,细胞以形态学鉴定,其中成骨细胞染色较深。

经 Image pro plus 软件的 intensity 校正及测量过滤分析,BMP-2、BMP-4 的累积光密度值(integrated optical density, IOD)值在 2 周内达到峰值,之后逐渐下降至正常水平。BMP-7 则处于低表达状态,但 800 g 在注射 rhBMP-2 后有所增强,见表 4~6。



S: 蝶鞍中心; N: 鼻根点; A: 上牙槽座点; B: 下牙槽座点。

图 1 400 g 组牵引 2 周头影测量及各标志点



S: 蝶鞍中心; N: 鼻根点; A: 上牙槽座点; B: 下牙槽座点。

图 2 600 g 组牵引 2 周头影测量及各标志点

表 1 各组 \angle SNA、 \angle SNB 测量结果比较($\bar{x} \pm s, ^{\circ}$)

组别	n	1 周		2 周		4 周		8 周	
		\angle SNA	\angle SNB						
对照组	4	131.0 \pm 1.0	128.0 \pm 1.0						
400 g 组	8	133.0 \pm 3.0	127.0 \pm 2.0	135.0 \pm 4.0	127.0 \pm 2.0	136.0 \pm 4.0	127.0 \pm 2.0	136.0 \pm 3.0	127.0 \pm 2.0
600 g 组	8	134.0 \pm 3.0	129.0 \pm 1.0	136.0 \pm 3.0	129.0 \pm 2.0	138.0 \pm 4.0	129.0 \pm 3.0	139.0 \pm 4.0	129.0 \pm 2.0
800 g 组	8	135.0 \pm 4.0	129.0 \pm 1.0	138.0 \pm 5.0	129.0 \pm 1.0	135.0 \pm 4.0	129.0 \pm 2.0	132.0 \pm 2.0	129.0 \pm 2.0
联合组	8	135.0 \pm 3.0	128.0 \pm 1.0	138.0 \pm 3.0	128.0 \pm 1.0	139.0 \pm 4.0	128.0 \pm 1.0	140.0 \pm 4.0	128.0 \pm 1.0

表 2 各组上颌骨前移结果比较($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)

组别	n	OI	OC	DD	t	P
对照组	4	1.0 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	—	—	—
400 g 组	8	16.6 \pm 2.8	16.1 \pm 2.8	17.8 \pm 4.0	0.42	<0.05
600 g 组	8	25.3 \pm 5.2	19.5 \pm 3.3	22.9 \pm 5.2	1.21	<0.05
800 g 组	8	12.1 \pm 2.3	12.5 \pm 4.9	12.5 \pm 2.4	1.46	>0.05
联合组	8	24.2 \pm 3.4	23.8 \pm 4.6	23.8 \pm 4.2	1.28	<0.05

OI: 枕髁中点与中切牙颈部中点距离; OC: 枕髁中点与尖牙颈部中点距离; DD: 腭横缝两侧固定螺钉间距离; —: 此项无数据。

表 3 CT 检测各组腭骨水平板骨密度值比较($\bar{x}\pm s$,HU)

时间	对照组(n=4)	400 g 组(n=8)	600 g 组(n=8)	800 g 组(n=8)	联合组(n=8)
第 1 周	1 235.6±96.0	881.5±81.9	724.7±99.0	294.3±240.7*	892.9±86.6
第 2 周	1 255.7±109.3	929.4±103.3	715.8±84.9	317.8±185.5*	1 001.8±95.4
第 4 周	1 260.9±88.3	911.9±71.6	759.6±90.9	349.0±181.0*	1 060.7±79.1
第 8 周	1 235.1±100.2	930.9±75.4	839.0±92.0	377.9±160.0*	1 158.0±93.0

*: $P < 0.05$, 与对照组同时间比较。



I: 切牙颈缘中点; C: 尖牙颈缘中点; D: 固定螺钉中点; O: 枕髁中点。

图 3 牵引器固定位置及各标志点



图 4 800 g 组牵引 8 周后腭骨水平板密度图像

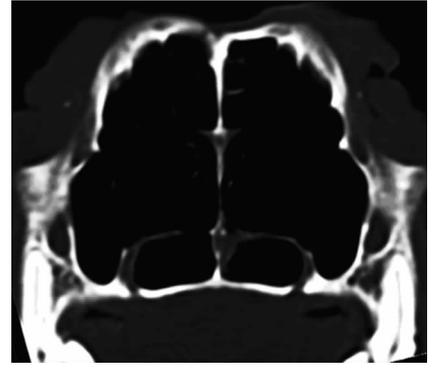


图 5 联合组(8 周)腭骨水平板骨密度图像

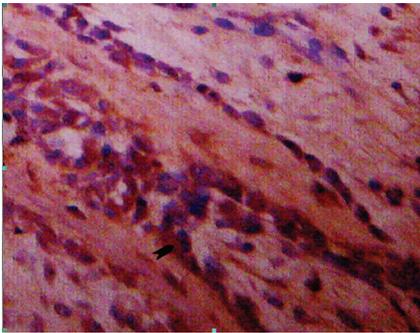


图 6 400 g 组牵引 2 周时 BMP-2 细胞形态(箭头示成骨细胞, ×200)

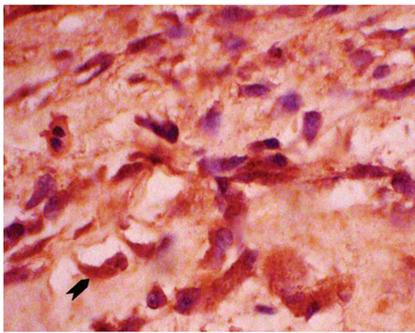


图 7 600 g 组牵引 4 周时 BMP-4 细胞形态(箭头示成纤维细胞, ×400)

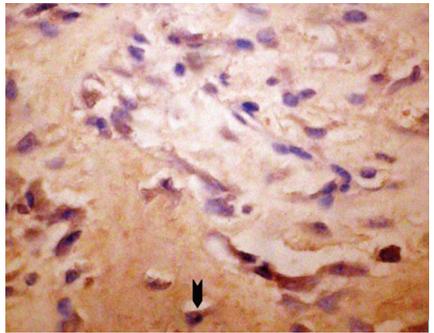


图 8 800 g 组牵引 8 周时 BMP-7 细胞形态(箭头示骨细胞, ×200)

表 4 各组免疫组织化学染色 BMP-2 IOD 值结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	1 周	2 周	4 周	8 周
对照组	4	19 867.0±1 725.0	20 390.0±1 842.0	19 231.0±1 845.0	18 725.0±2 027.0
400 g 组	8	24 055.0±2 827.0	32 917.0±2 164.0	21 803.0±2 908.0	19 316.0±1 308.0
600 g 组	8	35 100.0±2 069.0*	61 119.0±3 182.0*	29 507.0±2 508.0	20 135.0±2 128.0
800 g 组	8	36 463.0±3 159.0*	81 604.0±3 425.0*	20 457.0±2 217.0	17 076.0±2 015.0
联合组	8	62 337.0±3 274.0*	99 038.0±4 825.0*	38 546.0±3 275.0*	32 082.0±2 541.0

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 5 各组免疫组织化学染色 BMP-4 IOD 值结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	1 周	2 周	4 周	8 周
对照组	4	17 684.0±1 513.0	18 346.0±2 026.0	17 432.0±1 736.0	18 925.0±2 342.0
400 g 组	8	24 045.0±2 168.0	31 806.0±2 049.0	21 937.0±3 725.0	20 715.0±2 457.0
600 g 组	8	35 009.0±3 046.0*	61 008.0±2 684.0*	30 782.0±2 557.0	21 483.0±2 506.0
800 g 组	8	38 451.0±3 846.0*	81 572.0±2 973.0*	20 663.0±1 976.0	17 626.0±1 685.0
联合组	8	77 832.0±4 145.0*	43 479.0±3 016.0*	29 845.0±2 160.0	21 974.0±2 827.0

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 6 各组免疫组织化学染色 BMP-7 IOD 值结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	1 周	2 周	4 周	8 周
对照组	4	27 341.0±3 127.0	24 586.0±2 826.0	25 573.0±1 957.0	24 989.0±2 108.0
400 g 组	8	11 327.0±2 150.0	15 395.0±1 957.0	21 145.0±2 052.0	26 703.0±1 827.0
600 g 组	8	12 598.0±1 846.0	18 668.0±2 017.0	21 478.0±2 072.0	28 167.0±1 974.0
800 g 组	8	13 415.0±1 268.0	17 167.0±2 249.0	15 786.0±1 618.0	24 816.0±1 853.0
联合组	8	23 740.0±1 827.0	26 179.0±2 035.0	27 103.0±2 639.0	25 704.0±1 893.0

3 讨 论

牵引成骨术已广泛应用于颅颌面畸形治疗,尤其是颌骨畸形较重,正颌手术无法达到预期效果的患者。缺点是存在截骨创伤及较长治疗期,这对患者均有一定心理上影响^[5-6]。21 世纪初,有研究先后提出采用经骨缝牵引修复颌骨畸形的观点,无需截骨,创伤减小,在临床上也取得了较好的治疗效果^[7-9]。本实验根据前期成果^[10],利用镍钛合金形状记忆特性制作“M”形牵引丝,通过滑道后板及滑杆固定于腭横缝两侧,以限制牵引丝扩张方向,使上颌骨按预定轨迹相背移动,自行扩张骨缝。手术植入牵引器仅需 10~20 min,操作简化。各标志点测量结果显示,颅底∠SNA 随牵引逐渐增大,颅底∠SNB 没有改变。说明新研制牵引器能有效前移上颌骨复合体,没有扭转颌骨等不良结果。但骨缝牵引仍有牵引成骨缺点即治疗周期长,往往需要 6 个月甚至 1 年以上固定期。为缩短治疗期,本研究试用 3 种不同牵引力,期望找到最佳力值,即可快速扩张骨缝,又不致因力值过大造成对骨缝不可复性损伤。实验中发现牵引力越大,上颌骨前移越明显,但超过 800 g 后上颌骨前期前徙虽然较快,后期明显减慢。CT 检测也显示 800 g 组骨密度值降低明显(317.8±185.5)HU,因此,本研究认为,当牵引力大于 800 g 后对生长期犬骨缝有一定损伤,甚至影响其后期生长发育。为达到快速牵引目的,在采用 800 g 牵引力同时加入 rhBMP-2,以改善因机械力过大对骨缝及周围组织的负面影响。结果表明,∠SNA 并未因采用 800 g 力而减小,上颌骨平均前徙距离也超过 600 g,平均骨密度值也明显增高。说明 rhBMP-2 在促进骨形成,修复因过大牵引力对骨缝组织损伤方面起到重要作用。

机械牵引力可以刺激和保持骨组织再生与生长,在这个过程中各种生长因子起到至关重要作用,其中 BMP 是公认的最重要调节因子之一^[11-12]。免疫组织化学染色显示 BMP-2、BMP-4 阳性染色主要定位在成骨细胞、成纤维细胞及骨细胞细胞质中,于牵引 2 周内达到峰值,以 800 g 组增高明显。说明牵引力与 BMP-2、BMP-4 的活性相关,牵引力越大,活性越强。同时也说明这些细胞的 BMP-2、BMP-4 受体在整个牵引期处于活跃状态。2 周后 IOD 值则急剧下降,可能是弹性牵引力已大幅下降,如需继续延长骨长度,则需要更换牵引器。BMP-7 染色一直处于低表达状态,在注射 rhBMP-2 后表达明显增强。说明 rhBMP-2 不仅可单独促进骨质改建,而且有调节 BMP-7 表达的作用。

骨质改建是一个精确平衡过程,控制或改变任一因素皆有可能导致骨量的增加^[13]。针对经骨缝牵引成骨治疗周期长的缺点,本研究选择了力值较大的 800 g 牵引力以加快牵引进程,同时注入促进骨质生成的 rhBMP-2,以对抗机械力过大造成骨缝损伤,实验结果理想。

genesis versus osteotomy distraction osteogenesis[J]. J Craniofac Surg,2012,23(2):464-471.

[2] Liu SS,Opperman LA,Buschang PH. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on midsagittal sutural bone formation during expansion[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop,2009,136(6):768. e1-8.

[3] 范伟,张弓,安洪,等. hBMP2 和 hVEGF165 双基因修饰组织工程骨的构建及检测[J]. 重庆医学,2010,39(24):3317-3319.

[4] Yao Y,Wang G,Wang Z,et al. Synergistic enhancement of new bone formation by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and osteoprotegerin in trans-sutural distraction osteogenesis:a pilot study in dogs[J]. J Oral Maxillofac Surg,2011,69(11):e446-455.

[5] 王兴,伊彪,梁成,等. 内置式颌骨牵引器的研制及临床研究[J]. 中华口腔医学杂志,2002,37(2):145-147.

[6] Marchac AC,Arnaud E. Cranium and midface distraction osteogenesis:current practices, Controversies, and future applications[J]. J Craniofac Surg,2012,23(1):235-238.

[7] Mccarthy JG. Sutural expansion osteogenesis for management of the Bony-Tissue defect in cleft palate repair:experimental studies in Dogs[J]. Plast Reconstr Surg,2000,105(6):2026-2027.

[8] Graewe FR,Morkel JA,Hartzenberg HB,et al. Midface distraction without osteotomies in an infant with upper respiratory obstruction[J]. J Craniofac Surg,2008,19(6):1603-1607.

[9] Park DH,Yoon SH. The trans-sutural distraction osteogenesis for 22 cases of craniosynostosis;a new,easy,safe, and efficient method in craniosynostosis surgery[J]. Pediatr Neurosurg,2011,47(3):167-175.

[10] 姚玉胜,柳春明,常世民,等. 生长期犬上颌骨缝牵张的实验研究[J]. 口腔颌面修复学杂志,2008,34(2):81-84.

[11] Yang JH,Kim HJ,Kim SE,et al. The effect of bone morphogenic protein-2-coated tri-calcium phosphate/hydroxyapatite on new bone formation in a rat model of femoral distraction osteogenesis[J]. Cytotherapy,2012,14(3):315-326.

[12] 刘道华,夏德林. 细胞生长因子诱导骨髓基质干细胞成骨的研究进展[J]. 重庆医学,2010,39(2):244-246.

[13] Fang TD,Salim A,Xia W,et al. Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis[J]. J Bone Miner Res,2005,20(7):1114-1124.

参考文献:

[1] Liu C,Liu C,Gao Q,et al. Transsutural distraction osteo-