

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.028.html>

◇技术与方法◇

## 掺锶透钙磷石骨水泥修复家兔牙槽骨缺损的研究

周秋娟<sup>1</sup> 梁永强<sup>1</sup> 李淑静<sup>1</sup> 闫玉婷<sup>2</sup> 李忻畅<sup>3</sup> 廖囡囡<sup>1</sup> 彭宏峰<sup>1</sup> 徐艳丽<sup>1</sup> 戚孟春<sup>4</sup>

**摘要** 应用掺锶 5% 透钙磷石骨水泥修复家兔下颌牙槽骨缺损 观察骨保护素(OPG)在缺损区的表达情况 探讨掺锶透钙磷石骨水泥作为骨缺损修复材料的可行性。健康家兔 18 只 随机分为 3 组 在家兔双侧下颌牙槽骨制作骨缺损 空白对照组缺损处不植入任何材料 透钙磷石组植入透钙磷石骨水泥 掺锶 5% 透钙磷石组植入掺锶 5% 透钙磷石骨水泥。术后每组动物分别于 4、8 周各处死 3 只 通过大体观察、CBCT、免疫组化等方法观察骨缺损的修复情况。CBCT 结果显示掺锶 5% 透钙磷石组骨缺损 8 周时已基本修复 透钙磷石组骨缺损部分修复 空白对照组未完成骨缺损修复。免疫组化结果显示 4 周时 OPG 表达最高 8 周时减弱。4 周和 8 周时 3 组组间比较 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在兔下颌牙槽骨缺损修复中 掺锶 5% 透钙磷石成骨效果显著 能有效缩短术后的康复时间 可作修复骨缺损的材料。

**关键词** 牙槽骨缺损; 掺锶透钙磷石; 骨保护素

**中图分类号** R 782.13

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)04-0589-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.028

透钙磷石是以二水磷酸氢钙为主要原料的水化产物 具有较好的生物相容性和骨传导性。但因其固化时间短 降解吸收速率过快 成骨效果很难展现出来。锶(Sr)是存在于人体内的微量元素 参与骨的代谢 促进成骨的同时又能抑制骨吸收<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明掺锶羟基磷灰石比羟基磷灰石更能促进成骨细胞的增殖与黏附 掺入锶之后羟基磷灰石具有更好的生物相容性。该实验尝试将低浓度的锶掺入透钙磷石骨水泥 以期提高其修复骨缺损的能力 缩短骨水泥修复下颌牙槽骨缺损的时间。

2016-12-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81270965)

作者单位: 华北理工大学口腔医学院<sup>1</sup> 正畸科、<sup>4</sup> 颌面外科 唐山 063000

<sup>2</sup> 遵化市人民医院正畸科 遵化 064200

<sup>3</sup> 保定市第一中心医院口腔一科 保定 071000

作者简介: 周秋娟 女 硕士研究生;

梁永强 男 博士 副教授 副主任医师 硕士生导师 责任作者 E-mail: lych810@foxmail.com

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物和分组** 雌性家兔(华北理工大学实验动物中心提供) 18 只 2.5 kg 左右 随机分为 3 组 每组 6 只 分别为空白对照组、透钙磷石组、掺锶 5% 透钙磷石组。所有实验操作遵循实验动物伦理委员和管理委员会规定。

**1.2 主要试剂** 磷酸氢钙二水合物(98.0% 分析纯)、碳酸钙(99.0% 分析纯) 购自北京百灵威科技有限公司; 磷酸二氢钙(92.0% 分析纯)、焦磷酸钠(98.0% 分析纯) 购自天津光复精细化工有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 骨水泥样品的制备** 将磷酸氢钙二水合物和碳酸钙以 2:1 摩尔比混合均匀 在 1 000 °C 马弗炉中烧结 12 h 制备  $\beta$ -TCP<sup>[4]</sup>。按 Sr/(Sr + Ca) 摩尔比为 0.5% 的比例 在  $\beta$ -TCP、磷酸二氢钙、焦磷酸钠混合粉末中加入氯化锶 在研钵中研磨均匀 按一定固液比与 1 mol/L 乙醇酸溶液混合 调拌成糊状 装入  $\phi$  10 mm、高 10 mm 柱状模具 然后放入 37 °C 恒温箱中 待材料固化后取出。动物实验前紫外线消毒备用。

**1.3.2 骨缺损的制备及骨水泥的植入** 10% 水合氯醛 3 ml/kg 经耳缘静脉注射麻醉 取侧卧位 备皮 消毒 铺无菌洞巾。沿下颌骨上缘口角后 10 mm 处的皮肤作一长约 15 mm 切口 然后分离肌层充分暴露下颌牙槽骨门齿远端无牙区 游离颞神经 分离骨膜 在颞孔前 1 mm 处用齿科涡轮机球钻制备长 10 mm、宽 4 mm、深 3 mm 的骨缺损 同时用无菌生理盐水冲洗<sup>[5]</sup>。将消毒好的水泥块置于缺损处 分层缝合。术后肌注青霉素 3 d。

**1.3.3 观察指标** 术后观察兔子苏醒后活动、进食进水情况 以及有无感染。于 4、8 周处死每组动物各 3 只 将离体标本固定于 4% 多聚甲醛溶液中 48 h 拍摄 CBCT 观察骨缺损修复情况; 然后用 10% EDTA 脱钙 8 周 石蜡包埋 切片。免疫组化观察骨保护素(osteoprotegerin, OPG) 的表达情况。用 Im-

age-Pro Plus 6.0 软件分析得出各组的平均光密度 (mean optical density, MOD) 值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件分析数据, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大体观察及 CBCT 结果 家兔基本于术后 30 min 苏醒, 苏醒后活动、进食进水量略少, 1 d 后基本恢复正常。术区无化脓等感染。4 周时, 空白对照组缺损区形成的骨痂不明显, 透钙磷石组植入物周围可见纤维性骨痂, 掺锶 5% 透钙磷石组缺损区纤维性骨痂较透钙磷石组多。CBCT 显示空白对照组缺损区边缘仍较规则; 透钙磷石组植入物部分溶解, 边缘不规则, 与骨缺损边缘交界模糊; 掺锶 5% 透钙磷石组植入物大部分溶解, 被松质骨替代。见图 1。

8 周时, 空白对照组缺损区为凹坑状, 断端不连续; 透钙磷石组缺损区见较多骨痂, 骨表面不光滑,

缺损区稍凹于周围正常骨组织; 掺锶 5% 透钙磷石组缺损已基本修复, 表面骨组织光滑、连续。CBCT 显示空白对照组缺损周边有一薄层密质骨影像, CBCT 动态显示骨质不连续; 透钙磷石组植入物溶解吸收, 缺损区可见高密度骨组织影像, 但未完全修复; 掺锶 5% 透钙磷石组缺损区影像类似周围骨组织, 骨小梁清晰可见, 皮质骨连续。见图 2。

2.2 免疫组化结果分析 免疫组化染色结果判断: OPG 阳性表达主要为细胞质着色, 根据染色强度判定, 强阳性表达为深棕色, 阳性表达为黄色, 阴性表达则不着色。OPG 阳性表达时胞质和胞膜均为深棕色。4 周时, 3 组 OPG 均有较高表达, 掺锶 5% 透钙磷石组阳性表达高于空白对照组、透钙磷石组, 呈强阳性染色, 见图 3。8 周时, OPG 表达相对于 4 周时有所下降, 掺锶 5% 透钙磷石组阳性表达仍为最高, 见图 4。

2.3 各组 OPG 表达的 MOD 值比较 单因素方法分析结果显示不同时间组内比较差异有统计学意义



图 1 4 周时 3 组 CBCT 结果

A: 空白对照组; B: 透钙磷石组; C: 掺锶 5% 透钙磷石组



图 2 8 周时 3 组 CBCT 结果

A: 空白对照组; B: 透钙磷石组; C: 掺锶 5% 透钙磷石组

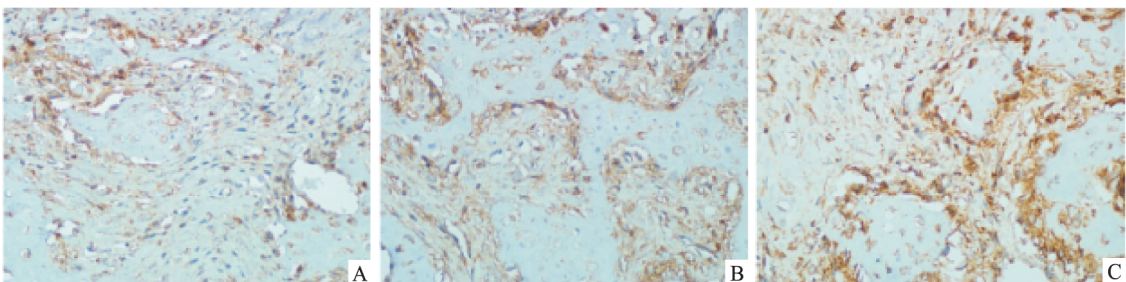


图 3 4 周时 3 组 OPG 的表达情况 ×200

A: 空白对照组; B: 透钙磷石组; C: 掺锶 5% 透钙磷石组

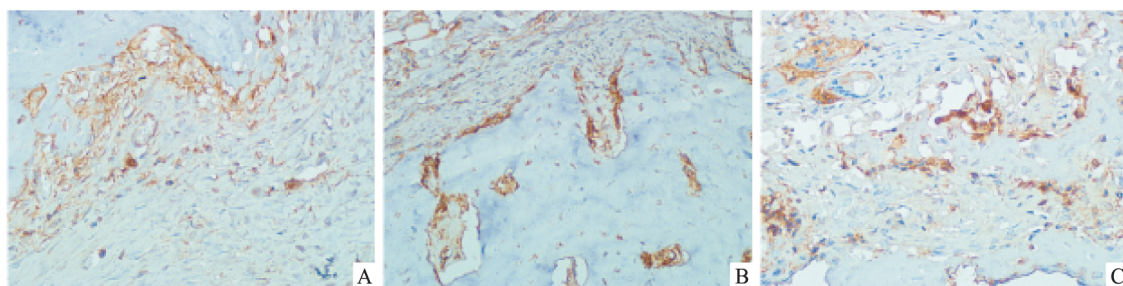


图4 8周时3组 OPG 的表达情况 ×200

A: 空白对照组; B: 透钙磷石组; C: 掺锶 5% 透钙磷石组

表1 各组 OPG 阳性表达部位 MOD 值的比较 ( $n=6 \bar{x} \pm s$ )

项目	空白对照组	透钙磷石组	掺锶 5% 透钙磷石组	F 值	P 值
4 周	0.153 5 ± 0.060 0	0.170 7 ± 0.038 8*	0.198 5 ± 0.048 9* #	123.996	<0.001
8 周	0.065 2 ± 0.005 5	0.093 8 ± 0.004 9*	0.140 3 ± 0.005 3* #	315.112	<0.001

与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与透钙磷石组比较: #  $P < 0.05$ 

( $P < 0.05$ )。4 周和 8 周时 3 组之间分别进行组间两两比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 3 讨论

透钙磷石是磷酸钙类骨水泥的一种, 近年来备受研究者关注, 相较于其他磷酸钙类骨水泥如羟基磷灰石, 透钙磷石相容性更好。但由于其降解吸收速度过快, 往往未完成骨缺损的修复就已完全吸收, 极大程度上限制了在临床上的应用。锶和钙属于同族元素, 锶参与人体骨代谢, 是人体内一种必需的微量元素, 具有促进成骨和抑制骨吸收的双重作用<sup>[6]</sup>。文臣娟等<sup>[7]</sup>的体外细胞实验以及前期的钛种植体表面涂层实验<sup>[8]</sup>显示透钙磷石具有良好的生物活性, 对成骨细胞的分裂分化有良好的诱导作用, 掺入锶之后能明显增强这一作用。有关掺锶羟基磷灰石的体外细胞研究<sup>[9-10]</sup>显示, 掺入低浓度的锶之后, 羟基磷灰石并无细胞毒性, 并且掺入锶之后还能在一定程度上改变其生物相容性。本实验将锶离子掺入透钙磷石骨水泥中, 在一定程度上增强了透钙磷石修复骨缺损的能力。4 周时, 掺锶 5% 透钙磷石组骨水泥大部分被松质骨替代, 掺锶透钙磷石表现出良好的骨修复能力。CBCT 显示透钙磷石组的骨水泥部分溶解, 而掺锶 5% 透钙磷石组的骨水泥已基本完全溶解, 原因可能是虽然锶的化学结构和物理性质与钙相似, 但锶离子半径大于钙离子的半径, 掺入锶之后透钙磷石原有的晶格发生畸变<sup>[11-12]</sup>, 所以溶解度提高。而随着骨水泥中透钙磷

石的溶解, 逐步释放锶离子, 使其发挥成骨作用。8 周时, 掺锶 5% 透钙磷石组的骨缺损基本完全修复, 而透钙磷石组缺损区仍凹于正常组织, 未完成骨缺损的修复, 表明掺锶透钙磷石比透钙磷石修复骨缺损的能力强, 锶的掺入促进了透钙磷石的成骨作用。

OPG 是成骨细胞分泌的一种糖蛋白, 能促进成骨细胞样细胞分化为成熟的骨细胞。也是破骨细胞成熟分化过程中的关键因子, 又叫破骨细胞形成抑制因子, 其可抑制破骨细胞的形成和分化, 并可影响成熟破骨细胞的骨吸收活性从而导致其凋亡<sup>[13-15]</sup>。4 周时各组 OPG 的表达最高, 促使成纤维细胞和成骨细胞增殖活跃, 形成纤维性骨痂包裹缺损区; 8 周时新骨趋于成熟, 成骨细胞活动减少, 纤维骨痂转变为骨性骨痂的量随之减少, 此时 OPG 的表达水平逐渐降低, 刺激骨细胞增殖分化的作用明显降低。4 周和 8 周时透钙磷石组和掺锶 5% 透钙磷石组 OPG 表达均高于空白对照组, 表明透钙磷石和掺锶 5% 透钙磷石促进了成骨细胞的增殖分化, 具有良好的诱导成骨的性能; 掺锶 5% 透钙磷石组 OPG 高于透钙磷石组, OPG 表达水平的升高, 促进了成骨细胞的复制和活性, 从而加快了新骨的形成, 使掺锶 5% 透钙磷石组更早地完成了骨缺损的修复。

掺锶 5% 透钙磷石骨水泥具有良好的生物相容性和骨传导性, 锶的掺入促进了 OPG 的表达, 成骨作用显著, 能有效缩短术后的康复时间。且制备过程简单, 操作时间符合临床需要。作为修复缺损的材料, 具有广泛的应用前景, 对临床应用有一定的借

鉴和参考价值。

### 参考文献

- [1] Choudhary S, Halbout P, Alander C, et al. Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(7): 1002-10.
- [2] 梁永强, 胡敏. 掺锶复合材料对骨形成影响的研究进展[J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2014, 12(1): 37-40.
- [3] Fonseca J E. Rebalancing bone turnover in favour of formation with strontium ranelate: implications for bone strength [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47(4): 17-9.
- [4] 杨迪诚, 钟建, 刘涛, 等. 透钙磷石骨水泥制备及其载药性能[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(3): 427-33.
- [5] 鄂玲玲, 王东胜, 师占平, 等. 一种新型的兔牙槽骨缺损模型的建立[J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2011, 9(3): 137-40.
- [6] 徐卫华, 梁永强. 掺锶骨修复材料的研究进展[J]. *临床合理用药*, 2015, 8(1): 174-6.
- [7] 文臣娟, 梁永强, 赵坚, 等. 透钙磷石涂层浸提液掺锶对 MC3T3-E1 细胞 VEGF、 $\beta$ FGF 和 Runt2 的影响[J]. *现代口腔医学杂志*, 2015, 29(1): 30-3.
- [8] Liang Y, Li H, Xu J, et al. Morphology, composition, and bioactivity of strontium-doped brushite coatings deposited on titanium implants via electrochemical deposition [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 9952-62.
- [9] 王海霞, 岳进. 梯度掺锶羟基磷灰石骨水泥的体外细胞生物学性能[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(47): 8149-54.
- [10] 李志宏, 武继民, 黄妹杰, 等. 掺锶羟基磷灰石的制备与性能研究[J]. *无机材料学报*, 2011, 26(1): 49-54.
- [11] Okayama S, Akao M, Nakamura S, et al. The mechanical properties and solubility of strontium-substituted hydroxyapatite [J]. *Biomater Eng*, 1991, 1(1): 11-7.
- [12] 廖大鹏, 周正炎, 顾云峰, 等. 锶磷灰石修复下颌骨缺损的实验研究[J]. *上海口腔医学*, 2000, 9(2): 73-5.
- [13] Cao J J, Wronski T J, Iwaniec U, et al. Aging increases stromal/osteoblastic cell-induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(9): 1659-68.
- [14] Pivonka P, Zimak J, Smith D W, et al. Model structure and control of bone remodeling: a theoretical study [J]. *Bone*, 2008, 43(2): 249-63.
- [15] 郭元, 谌伦杰, 骆旭东. 骨保护素的研究进展[J]. *河北北方学院学报(自然科学版)*, 2012, 28(5): 101-6.

## Study of repairing bone defect with strontium-containing brushite in rabbits alveolar bone

Zhou Qiujuan, Liang Yongqiang, Li Shujing, et al

(Dept of Orthodontics, College of Stomatology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

**Abstract** To explore the feasibility of 5% strontium-containing brushite bone cement used as a bone defect repair material in a rabbit mandibular alveolar bone defect model. 18 healthy rabbits were randomly divided into three groups. Rabbits were defected in bilateral mandibular, and the defect of blank control group without any implantation, brushite group and 5% strontium-doped brushite group were implanted brushite and 5% strontium-doped brushite respectively. The animals of each group were killed at 4, 8 weeks after operation, observing the renovation of the defect by gross observation, CBCT and immunohistochemistry. The results of CBCT indicated that the defect of 5% strontium-doped brushite group have been basically repaired at 8 weeks, partial defect of brushite group repaired, but blank control group unfinished the renovation of bone defects. Immunohistochemistry showed that the expression of OPG was highest at 4 weeks and decreased at 8 weeks. At 4 weeks and 8 weeks comparison between the three groups, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The osteogenic effect of 5% strontium-doped brushite cement is viable in the renovation of rabbit alveolar bone defects, which can shorten the recovery time, and might be used as a material for repairing bone defect.

**Key words** bone defect; strontium-containing brushite; osteoprotegerin