

犬上颌窦底黏膜骨原细胞的培养和成骨性能的研究

荣 琼, 朱双喜, 陈松龄*, 黄代营, 李 祥
(中山大学附属第一医院口腔科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】研究犬上颌窦底黏膜骨原细胞的成骨性能。【方法】取 Beagle 犬上颌窦底黏膜, 显微镜下观察其组织学形态。分离培养犬上颌窦底黏膜骨原细胞。流式细胞术检测一代细胞的表面抗原 CD44、CD146 和 CD34。一代细胞经成骨诱导培养用于研究其体外成骨性能。诱导 3 d、7 d 和 12 d 时分别检测其碱性磷酸酶活性, 对照组细胞用基础培养基培养。诱导 16 d 时, 进行 BMP-2 免疫组化染色, 对照组细胞经基础培养基培养。Western blot 检测诱导 0 d、7 d 和 16 d 时 BMP-2 的表达。诱导 28 d 时, 茜素红染色和 Von Kossa 染色观察钙结节形成情况。二代细胞成骨诱导培养 7 d, 与 Bio-Oss 复合后, 植入裸鼠背部皮下, 观察体内成骨情况, 对照组植入 Bio-Oss 颗粒。【结果】犬上颌窦底黏膜由上皮层、固有层、黏膜下层和骨膜层组成, 黏膜下层富含毛细血管。流式细胞术检测显示 CD44 和 CD146 阳性, CD34 阴性。在 3 d、7 d 和 12 d 时, 培养细胞碱性磷酸酶活性逐渐升高, 成骨诱导培养细胞高于基础培养细胞。16 d 时, 与基础培养基中细胞相比, 经成骨诱导的细胞 BMP-2 表达增强。Western blot 检测发现诱导 0 d、7 d 和 16 d 时 BMP-2 的表达明显, 且逐渐升高。诱导培养 28 d 时, 可矿化形成明显的钙结节。细胞与 Bio-Oss 复合物植入裸鼠皮下可观察到成骨现象, 对照组没有成骨表现。【结论】与犬上颌窦底黏膜相同, 犬上颌窦底黏膜含有骨原细胞, 具有成骨能力。

关键词: 上颌窦底黏膜; 骨原细胞; 成骨; 动物

中图分类号: R782.13

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)03-0378-09

Osteogenic Property of Osteoprogenitor Cells from Canine Maxillary Sinus Floor Mucosa

RONG Qiong, ZHU Shuang-xi, CHEN Song-ling*, HUANG Dai-ying, LI Xiang

(Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the osteogenesis property of osteoprogenitor cells in canine maxillary sinus floor mucosa. 【Methods】 Beagle maxillary sinus mucosa was obtained and the histological morphology was observed under microscope. Osteoprogenitor cells were harvested from canine maxillary sinus floor mucosa, then cultured. Cellular surface antigens of CD44, CD146, and CD34 at passage one were determined by flow cytometry. Cells at passage one were cultured in osteogenic inductive medium to investigate the osteogenesis property in vitro. Alkaline phosphatase activity was tested at day 3, 7, and 12 after induction, respectively. Cells in the control group were cultured in basal medium. Immunohistochemistry stain of BMP-2 was performed at day 16 after induction, and cells in the control group were cultured in basal medium. The protein expression level of BMP-2 at 0 d, 7 d, and 16 d after induction were tested by Western blot analysis. When induction for 28 d, alizarin red staining and Von Kossa staining were used to observe the formation of mineralized nodules. After being cultured in osteogenic inductive medium for 7 days, cells of passage two were composited with Bio-Oss, implanted into the back of nude mouse subcutaneously to observe the bone formation ability in vivo. And Bio-Oss particles were implanted in control group. 【Results】 The canine maxillary sinus floor mucosa was composed of epithelial layer, lamina propria, submucosa and periosteum. The submucosa was rich of capillaries. Flow cytometry detection showed CD44 and CD146 were positive, CD34 was negative. At day 3, 7, and 12, alkaline phosphatase activity increased gradually, and that of cells cultured in osteogenic inductive medium was higher than in basal medium. Compared with in basal medium, BMP-2 protein expression enhanced when cells were cultured in osteogenic inductive medium. The protein expression level of BMP-2, which determined by Western blot, was evident and increased step by step at 0 d, 7 d, and 16 d after induction. Obvious mineralized

收稿日期: 2011-10-10

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B010200008); 广东省自然科学基金博士科研启动基金(S201140002559)

作者简介: 荣琼, 博士生, E-mail: rq1225@163.com; * 通信作者: 陈松龄, 教授, 博士生导师, E-mail: chensongling1@gmail.com

nodules formed when cultured in inductive medium for 28 d. Bone formation behavior was observed after implantation of cells and Bio-Oss composite in nude mouse subcutaneously, no bone formation in control group. 【Conclusion】 Just the same as that of humans, canine maxillary sinus floor mucosa contains osteoprogenitor cells, which possess the ability of osteogenesis.

Key words: maxillary sinus floor mucosa; osteoprogenitor cells; bone formation; animal

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2013,34(3):378-386]

上颌窦底提升术是解决上颌后牙区骨量不足牙种植的有效方法^[1-2],最初是通过在分离的窦底黏膜和下方牙槽骨之间植入骨粉后,在骨粉的引导作用下于上颌窦内形成新骨。但是,近年来,有研究发现上颌窦底提升不植骨同期牙种植也能形成新骨,并且新骨是从上颌窦底黏膜生长而来^[3-4]。这引起了学者们对上颌窦底提升成骨的深入思考,成骨细胞究竟是来源于下方牙槽骨还是上颌窦底黏膜,抑或是二者兼有之。然而,由于临床上模型建立和标本获取困难,只能依靠建立动物模型来探索上颌窦底提升成骨过程中成骨细胞来源的问题。本研究通过分离培养犬上颌窦底黏膜骨原细胞,并观察其体内外成骨能力,为上颌窦底黏膜成骨现象提供生物学基础,同时,为建立合理的上颌窦底提升动物模型提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

健康1~2周岁Beagle犬[高要市康达实验动物科技有限公司,SCXK(粤)2009-6679];5~6周龄雄性SPF级BALB/c裸鼠[广东省医学实验动物中心,SCXK(粤)2011-4342]。胎牛血清(Gibco公司);中性蛋白酶(Roche公司);II型胶原酶(Gibco公司); α -MEM基础培养基(广州威佳公司)含胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素、2 mmol/L L-谷氨酰胺; α -MEM成骨诱导培养基(广州威佳公司)含 α -MEM基础培养基、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 mg/L维生素C、 10^{-7} mol/L地塞米松;碱性磷酸酶测试盒(南京建成公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天公司);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的大鼠抗犬CD44单克隆抗体(Biologend公司);藻红素(phycoerythrin, PE)标记的小鼠抗犬CD146单克隆抗体(eBioscience公司);PE标记的小鼠抗犬CD34单克隆抗体(Biologend公司);茜素红S;Von Kossa染色试剂

盒(上海杰美基因公司);兔抗犬BMP-2多克隆抗体(北京博奥森公司);羊抗兔IgG-HRP(武汉博士德公司);DAB试剂盒(北京中杉金桥公司);Bio-Oss骨粉(Geistlich公司)。

1.2 犬上颌窦底黏膜组织学观察

按本课题组已报道的手术方法取Beagle犬上颌窦底黏膜(图1)^[5]。40 g/L多聚甲醛溶液固定,梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片,HE染色。

1.3 犬上颌窦底黏膜骨原细胞的分离培养

将无菌条件下获得的Beagle犬上颌窦底黏膜用含双抗的PBS反复冲洗,剪成大小约3 mm \times 3 mm的组织块,中性蛋白酶37 $^{\circ}$ C下消化1 h,分离去除黏膜上皮层,再修剪去除大部分黏膜下层,剪碎剩余组织,150 U/mL II型胶原酶消化2 h(37 $^{\circ}$ C摇床,120 r/min)。1000 r/min($r = 16$ cm)离心5 min,弃上清,PBS洗涤离心后用 α -MEM基础培养基重悬细胞,按 1×10^5 个/孔接种于6孔板中,置于37 $^{\circ}$ C,体积分数5% CO₂培养箱培养。24 h后换液,弃去未贴壁的细胞,以后3 d换液一次。细胞汇合达80%左右用胰酶消化,1:3传代扩增培养。显微镜下观察细胞形态。

1.4 犬上颌窦底黏膜骨原细胞的鉴定

取对数生长期的一代细胞,胰酶消化后,PBS洗涤2次,制成单细胞悬液,分别取 1×10^6 个细胞,加入100 μ L FITC标记的抗CD44(10 μ L)、PE标记的抗CD146(0.125 μ g)、CD34(0.25 μ g)抗体,4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min后在流式细胞仪上上样分析。

1.5 碱性磷酸酶活性检测

生长活力旺盛的一代细胞以 1×10^4 个/孔接种于12孔板中,24 h后换液,随机选取6孔用 α -MEM成骨诱导培养基培养,剩余6孔继续用 α -MEM基础培养基培养。诱导后第3、7、12天随机取一块12孔板,PBS洗3遍,每孔分别加入Triton X-100 0.2 mL,4 $^{\circ}$ C裂解过夜(12 h),按碱性磷酸酶试剂盒说明书进行操作,每样本设置3个复孔,在酶标仪510 nm波长下检测各孔的OD值。同时用BCA法测定各样本的蛋白浓度。计算各时间点碱

性磷酸酶的浓度。

1.6 免疫组化法检测培养细胞 BMP-2 蛋白的表达

取生长良好的一代细胞接种于 6 孔板中,并用基础培养基、成骨诱导培养基分别培养,于诱导后第 16 天进行免疫组化检测。多聚甲醛液 4℃下固定 20 min, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; Triton X-100 作用 15 min, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; H₂O₂ 孵育 15 min, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; 羊血清 37℃下封闭 20 min; 兔抗犬 BMP-2 多克隆抗体 4℃下孵育过夜,次日 37℃复温 45 min, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; 羊抗兔 IgG-HRP 37℃孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; DAB 显色, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; 苏木素复染。用 PBS 替代一抗设立空白对照,其余步骤不变。拍照。

1.7 Western blot 检测 BMP-2 蛋白

生长活力旺盛的一代细胞经成骨诱导培养后,将诱导前、诱导 7 d 和 14 d 的细胞充分裂解, 12 000 ×g 于 4℃离心 5 min, 提取上清蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。用 5×上样缓冲液调整蛋白浓度至适宜范围, 99℃煮沸 5 min, 在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 每孔上样量为 20 μL, 内参蛋白为 GAPDH。半干法电转移至 PVDF 膜上, 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 以免抗犬 BMP-2 多克隆抗体(稀释比例 1:400) 作为一抗, 4℃孵育过夜, 羊抗兔 IgG-HRP(稀释比例 1:500) 作为二抗, 室温孵育 1 h, 增强化学发光法显影, Alpha Innotech 凝胶成像系统获取图像。结果用 BMP-2 与内参 GAPDH 的蛋白条带灰度值比值表示。

1.8 培养细胞成骨诱导钙结节检测

生长活力旺盛的一代细胞接种于 6 孔板中, α-MEM 成骨诱导培养基培养, 诱导培养 28 d, 拍照。茜素红染色: 多聚甲醛液固定 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 茜素红(pH 7.2)染色 10 min, PBS 漂洗后拍照。Von Kossa 染色: 按照试剂盒染色说明书操作, 拍照。

1.9 Bio-Oss 骨粉复合细胞裸鼠体内异位成骨研究

BALB/c 裸鼠于无菌条件下常规饲养。将成骨诱导培养 7 d 的二代细胞 0.1 mL (4 × 10⁶ 个) 与 40 mg Bio-Oss 在 37℃的摇床(20 r/min)中复合 1 h。水合氯醛按 430 mg/kg 腹腔注射麻醉裸鼠, 将复合有细胞的 Bio-Oss 骨粉移植入背部皮下, 缝合。对照组为未复合细胞的 Bio-Oss 骨粉。各组 12

只, 术后 20、40 d 各组分别处死 6 只, 取出成形的移植块, 多聚甲醛液固定, 硝酸脱钙 2 h, 石蜡包埋, HE 染色, 拍照。

1.10 统计方法

以上实验用不同的 Beagle 犬来源标本至少重复 3 次。采用 SPSS 17.0 软件进行统计, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。碱性磷酸酶活性检测中两组间均数的比较采用 *t* 检验。不同时间点 BMP-2 相对蛋白浓度均数比较采用单因素方差分析, 均数间差别多重比较采用 LSD 法。P < 0.05, 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 犬上颌窦底黏膜的组织学表现

犬上颌窦底黏膜完整, 由 4 层组织构成, 依次分别是窦腔侧的假复层纤毛柱状上皮、固有层、黏膜下层和紧贴上颌窦底骨壁的骨膜层。黏膜下层富含血管、黏液腺(图 2A)。骨膜层可见丰富的成纤维细胞样骨原细胞(图 2B)。

2.2 细胞的形态学观察

原代培养 24 h 可见少量细胞贴壁, 单个散在分布, 呈多角形或梭形。4 d 可见多个大小不等的克隆, 细胞快速增殖。7 d 细胞融合成片, 分布不均, 以多角形为主, 细胞生长密集处呈长梭形(图 3A)。8 ~ 10 d 第一次传代, 传代后细胞增殖较快, 细胞呈多角形, 可见长的突起, 细胞核大, 核仁明显(图 3B)。4 d 后可第 2 次传代。

2.3 流式细胞表型分析

流式细胞仪结果显示第一代犬上颌窦底黏膜来源细胞表达间充质来源骨原细胞表面标志物 CD44(69.6%)、CD146(52.4%), 而几乎不表达造血来源干细胞表面标志物 CD34(2.3%; 图 4)。

2.4 碱性磷酸酶活性检测

基础培养基组和成骨诱导培养基组细胞在 3、7 和 12 d 碱性磷酸酶活性逐渐升高, 并且, 成骨诱导培养基培养的细胞碱性磷酸酶活性高于基础培养基培养的细胞。3 d 时, 两组碱性磷酸酶活性差异没有统计学意义, 7 和 12 d 时, 两组碱性磷酸酶活性差异有统计学意义(表 1, 图 5)。

2.5 培养细胞 BMP-2 蛋白的表达

经成骨诱导培养的犬上颌窦底黏膜来源细胞胞浆中强表达 BMP-2 蛋白(图 6A), 基础培养基培养

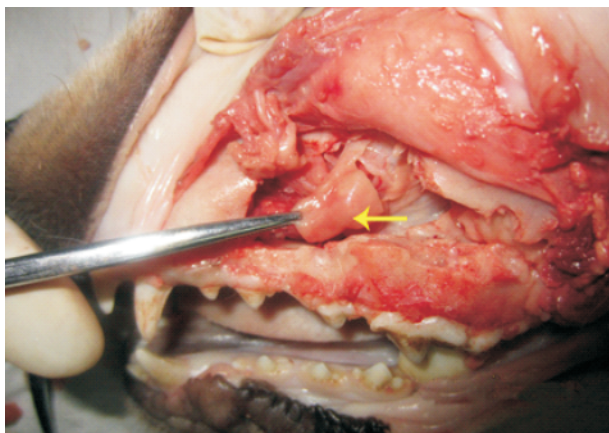


图 1 犬上颌窦底黏膜取材

Fig.1 Obtaining of canine maxillary sinus floor mucosa

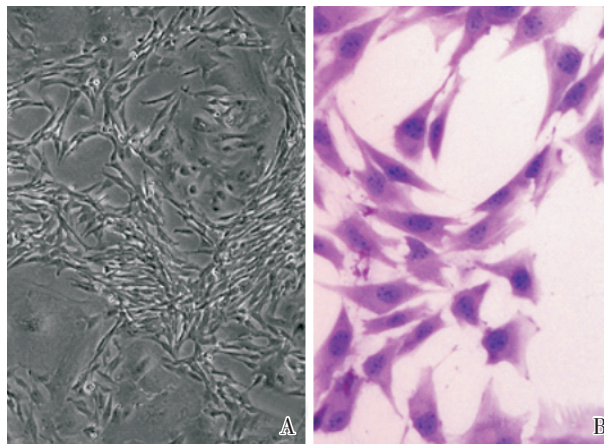


图 3 犬上颌窦底黏膜培养细胞形态

Fig.3 Morphology of cultured cells from canine maxillary sinus floor mucosa

A: Primary cells, original magnification $\times 50$; B: P₁ cells, original magnification $\times 200$, HE staining.

的犬上颌窦底黏膜来源细胞极少细胞胞浆中弱表达 BMP-2 蛋白(图 6B), 空白对照不表达(图 6C)。

2.6 Western blot 检测 BMP-2 蛋白结果

经成骨诱导培养 0 d、7 d 和 16 d 后, BMP-2 蛋白表达明显, 表达量逐渐增强, 16 d 时表达量最

高(图 7)。并且, 7 d 和 0 d、16 d 和 7 d 比较, BMP-2 蛋白相对表达量差异均有统计学意义(图 8)。

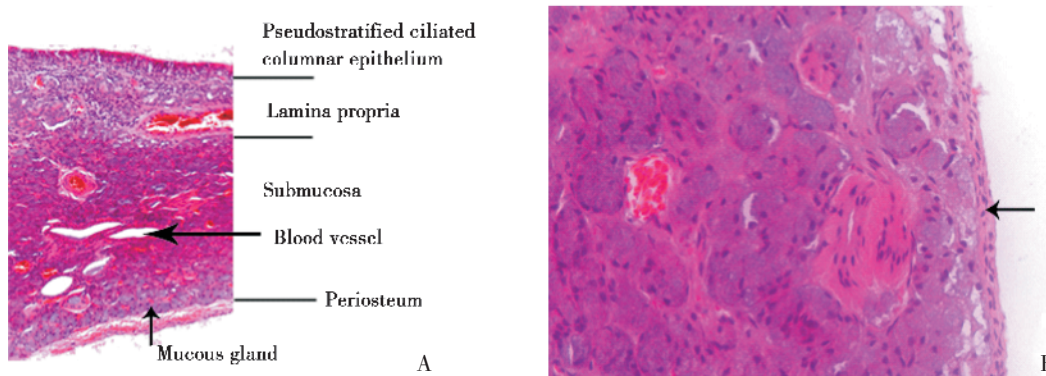


图 2 犬上颌窦底黏膜的组织学形态

Fig.2 Histology manifestation of canine maxillary sinus floor mucosa

A: Original magnification $\times 200$, HE staining; B: Periosteum layer (arrow) contains a large number of osteoprogenitor cells, original magnification $\times 400$, HE staining.

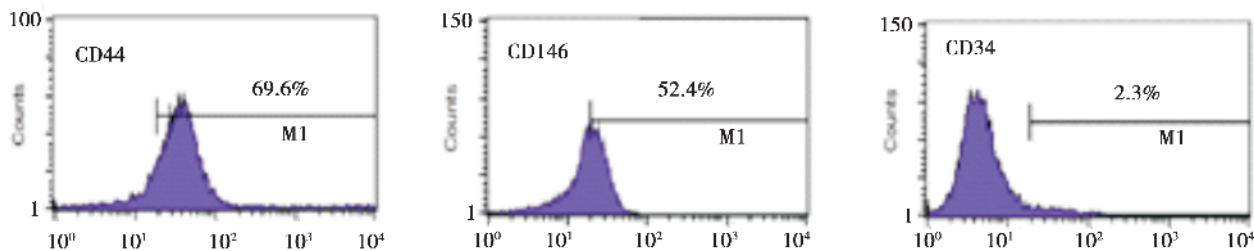


图 4 一代犬上颌窦底黏膜来源细胞表型的流式细胞术分析

Fig.4 Phenotype analysis of cells at passage one from canine maxillary sinus floor mucosa by flow cytometry

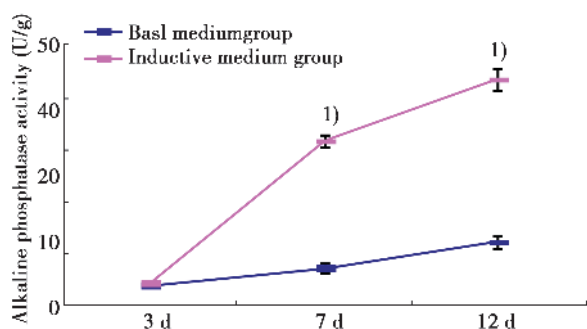


图 5 碱性磷酸酶活性比较

Fig.5 Comparison of alkaline phosphatase activity

1) $P < 0.01$ in comparison to alkaline phosphatase in basal medium group.

2.7 培养细胞钙结节形成情况

细胞在成骨诱导培养基中培养 28 d, 见细胞簇中间的细胞变为矮立方形, 排列紧密, 细胞簇中央有黑色沉淀物形成(图 9A), 茜素红染色可见红色的散在的钙结节形成(图 9B), Von Kossa 染色也可见到嗜银染的棕色钙结节(图 9C)。

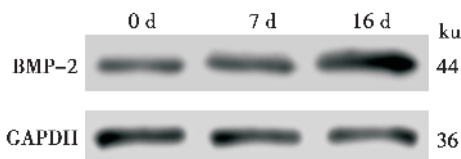


图 7 成骨诱导培养后 BMP-2 蛋白的表达

Fig.7 Expression of BMP-2 protein after osteogenic induction

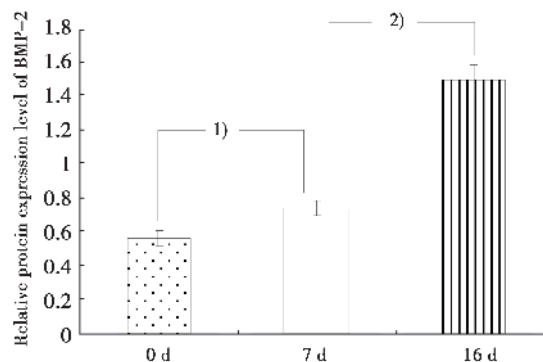


图 8 成骨诱导培养后 BMP-2 蛋白相对表达量比较

Fig.8 Comparison of relative BMP-2 protein expression level after osteogenic induction

1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ in comparison.

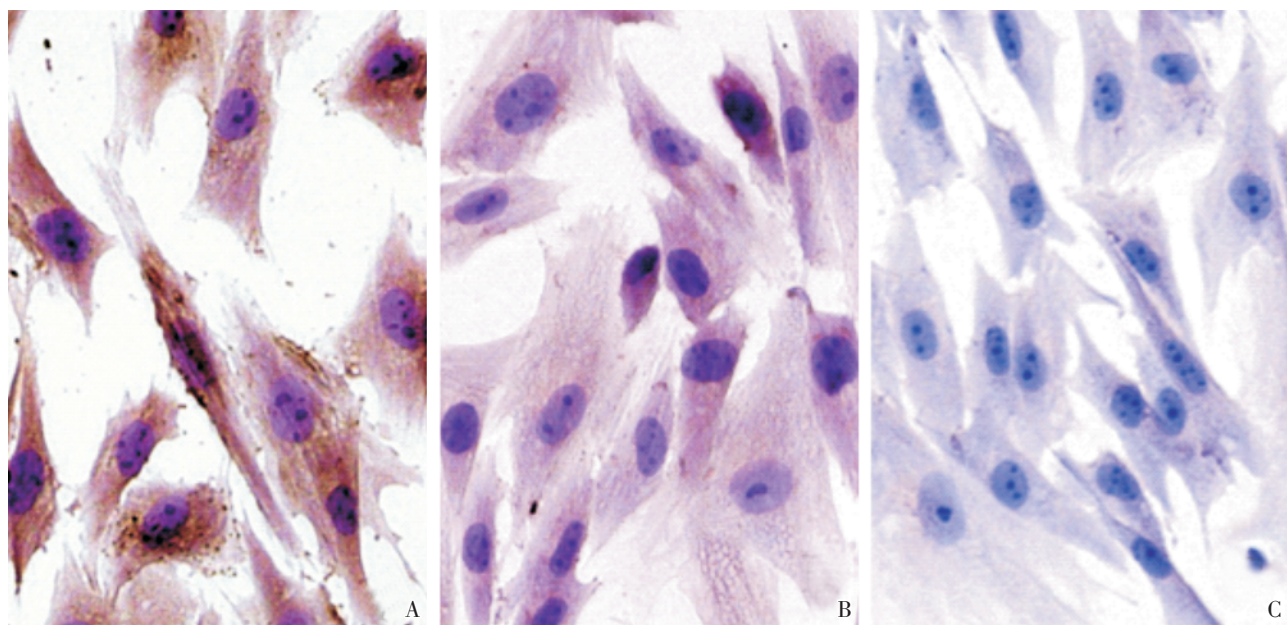


图 6 犬上颌窦底黏膜来源细胞 BMP-2 蛋白的表达

Fig.6 Expression of BMP-2 protein in cells from canine maxillary sinus floor mucosa

A: Dark brown BMP-2 protein was observed in cytoplasm of cells after cultured in inductive medium for 16 d, original magnification $\times 200$; B: Light brown BMP-2 protein was noted in the cytoplasm of a minority cells when cultured in basal medium, original magnification $\times 200$; C: No BMP-2 protein was found in negative control cells, original magnification $\times 200$.

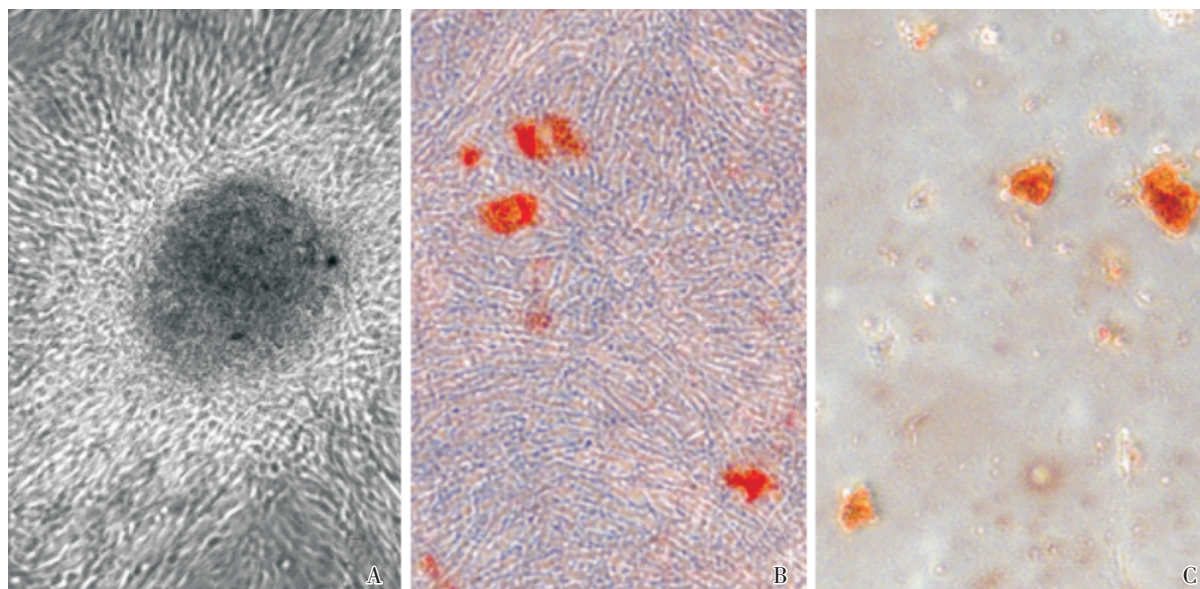


图9 成骨诱导培养细胞钙结节形成

Fig.9 Formation of mineralized nodules in cells after osteogenic induction

A: Typical osteogenic cluster was found after osteogenic induction for 28 d, original magnification $\times 50$; B: Alizarin red staining demonstrated mineralized nodules formed, original magnification $\times 50$; C: Calcified nodules were dyed brown by Von Kossa staining, original magnification $\times 50$.

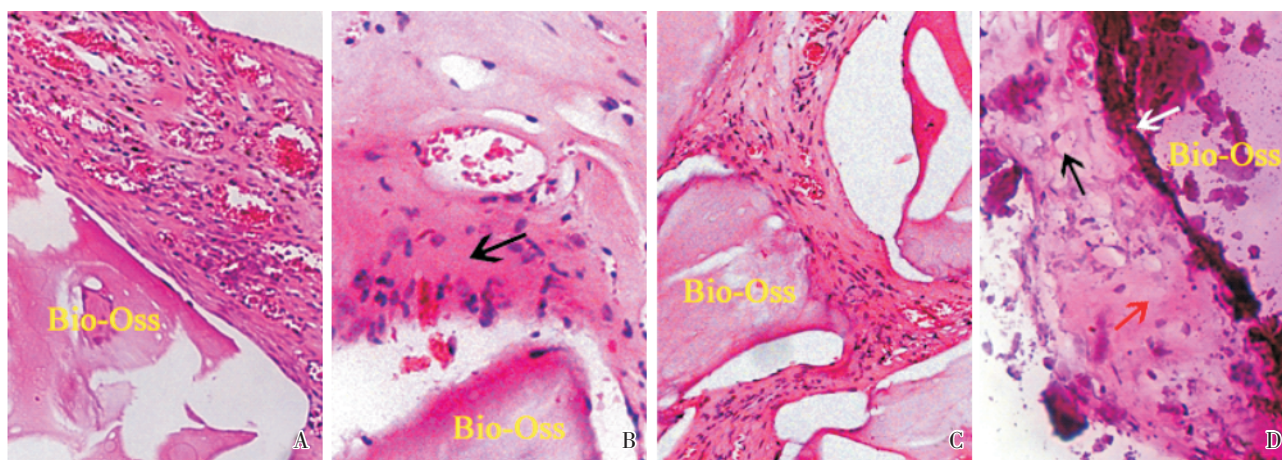


图10 Bio-Oss 骨粉植入裸鼠皮下的成骨情况

Fig.10 Bone formation situations after Bio-Oss implanted in nude mouse subcutaneously

A: In control group, Bio-Oss was encompassed by fibrous tissue, with a large number of newly formed capillaries and some inflammatory cells interspersed, after implanted 20 days, original magnification $\times 200$; B: When composited with cultured cells, dark red stained area of collagen (arrow) was observed at the border of Bio-Oss, a number of osteoprogenitor cells were found in this area, and many capillaries were seen at day 20, original magnification $\times 400$; C: At day 40, Bio-Oss was surrounded by mature fibrous tissue, and the capillaries were rare in control group, original magnification $\times 200$; D: Chondroid tissue (red arrow) was observed at the rim of Bio-Oss, with early cartilage lacunas (dark arrow) appeared apparently, and maroon stained calcium salt (white arrow) was obviously observed at the junction of Bio-Oss and the chondroid tissue in experimental group after implanted 40 days, original magnification $\times 400$.

2.8 Bio-Oss 骨粉复合细胞裸鼠皮下异位成骨情况

植入 20 d 时,单纯骨粉组 Bio-Oss 颗粒被纤维组织包裹,内含大量毛细血管,未见骨原细胞和胶原合成(图 10A);骨粉复合细胞组可见骨粉周围有红色深染的胶原合成区,胶原合成区内见大量骨原细胞,胶原合成区周围有大量毛细血管形成(图 10B)。植入 40 d 时,单纯骨粉组 Bio-Oss 颗粒仍由纤维组织包裹,毛细血管减少,未见明显钙盐沉积(图 10C);骨粉复合细胞组可见骨粉周围有软骨样组织形成,中间有早期骨陷窝轮廓,但尚未形成成熟的骨陷窝,软骨样组织和 Bio-Oss 交界处钙盐沉积明显(图 10D)。

3 讨 论

3.1 上颌窦底黏膜成骨

上颌窦底提升成骨的理论基础是引导骨组织再生^[3,6-10],如典型的侧壁开窗式上颌窦底提升术即利用骨板复位或生物屏障膜覆盖颊侧骨窗维持植骨材料支持的提升空间,并借此阻挡增殖较快的上皮细胞和成纤维细胞的长入,保证增殖速度较慢的成骨细胞和血管的生长。那么,上颌窦底黏膜作为维持空间顶部的组织结构在成骨过程中至少起到了屏障膜的作用。

近年来,在上颌窦底提升同期牙种植中,有学者发现新骨是从上颌窦底黏膜向种植体表面生长^[3-4]。再结合既往的临床现象,如上颌窦内囊肿摘除或牙拔出后,不植入移植物的情况下,也可在上颌窦内观察到骨形成^[11-12];上颌窦底外提升的患者术后感染、化脓,经积极抗感染和手术清创、骨粉再植后发现,数月后骨粉上方出现“圆屋顶形”高密度影^[13],学者们推测上颌窦底黏膜在窦底提升成骨中似乎不止是起屏障膜的作用,可能具有积极的成骨作用,但这些推测缺乏理论依据。近年来,Srouji 等^[14]从人上颌窦底黏膜中分离出骨原细胞,并在体内外证实了其成骨能力,这为上颌窦底黏膜成骨提供了分子生物学依据。之后,Srouji 等^[15]用人上颌窦底黏膜在裸鼠皮下模拟上颌窦底提升,发现也能形成新骨,进一步确定了上颌窦底黏膜确实具有成骨能力。

本研究首次从犬上颌窦底黏膜中分离培养出骨原细胞并进行了鉴定,发现其间充质来源骨原

细胞表面标志物 CD44 和 CD146 表达呈阳性,而造血源性干细胞表面标志物 CD34 表达呈阴性,在体外可诱导产生钙结节,在裸鼠体内有异位成骨的能力,这与 Srouji 等^[14]的研究结果相同。本研究不仅证实了犬的上颌窦底黏膜与人的一样具有成骨能力,同时也进一步支持了上颌窦底黏膜具有成骨性能这一推测,提示在上颌窦底提升的动物研究和临床应用,如何认识和利用上颌窦底黏膜骨原细胞的成骨性能,提高上颌窦底提升空间的成骨效果,是值得进一步研究和探索的重要课题。

骨原细胞包括定向性和诱导性^[16],定向性骨原细胞可在基础培养基中分化为成骨细胞,存在于骨髓和骨膜中,诱导性骨原细胞经成骨诱导培养后分化为成骨细胞,存在于所有结缔组织和骨髓中。Graziano 等^[17]发现人上颌窦底黏膜骨原细胞在基础培养基中也有成骨能力,可见,上颌窦底黏膜确实含有定向骨原细胞。我们发现分离培养的上颌窦底黏膜骨原细胞在基础培养基中也有一定的碱性磷酸酶活性,并表达 BMP-2 蛋白,这再次证实了 Graziano 等^[17]的发现。而经成骨诱导后碱性磷酸酶活性升高,更多的骨原细胞表达 BMP-2 蛋白且表达量明显,并出现明显的钙结节,这表明上颌窦底黏膜含有定向性和诱导性骨原细胞。定向性骨原细胞可能来源于上颌窦底黏膜的骨膜层,非定向性骨原细胞可能来源于丰富的毛细血管壁,甚至是其他结缔组织。

3.2 犬上颌窦底提升的动物模型

上颌窦底提升术在临床上的成功应用和普遍推广,使该技术成为目前研究的热点,其中上颌窦底提升空间的成骨效果则一直是学者们关心的重要问题。众多研究表明,建立合理的动物模型是解决这一问题关键的第一步。综合以往上颌窦底提升成骨研究的资料,可以发现多数研究者建立合理的动物模型来模拟人的上颌窦底提升至少考虑动物应具备以下条件:上颌窦体积合适;上颌窦底提升后的空间能植入适量的骨移植材料;上颌窦底的牙槽骨类似松质骨,即为三类或四类骨^[18];上颌窦底黏膜组织学形态与人的类似;上颌窦底黏膜具成骨性能。

犬作为上颌窦底提升的动物模型已被国内外学者采用^[9,19],本课题组前期也成功建立了犬上颌窦底内/外提升同期牙种植的模式^[5,20]。但是鉴于 Wetzel 等^[21]在用 Beagle 犬行上颌窦底提升牙种植

时观察到其上颌窦内不含黏膜,并且没有气化,据此有学者持相反的意见,认为犬并不适合作为上颌窦底提升的动物模型^[22-23]。虽然他们没有否认犬的上颌窦体积合适,窦底提升后能植入一定量的骨移植材料,以及犬的上颌骨骨质为四类骨^[24-25]。

Srouji 等^[14]报告了人上颌窦底黏膜是由假复层纤毛柱状上皮、固有层和骨膜层组成,固有层下方富含毛细血管。本研究观察到分离的犬上颌窦底黏膜完整,由假复层纤毛柱状上皮、固有层、黏膜下层和骨膜层组成,黏膜下层含有大量的毛细血管。可见,犬上颌窦底黏膜的组织学结构与人的相似。Wetzel 等^[21]提出的犬上颌窦腔没有气化,不含有黏膜,可能是因为种植体植入了颊侧眶下神经管内,而没有进入上颌窦内。本课题组前期在建立犬上颌窦底外提升同期牙种植模型时,发现犬眶下神经管位于上颌窦颊侧,必须先打开眶下神经管,结扎神经血管束后才能到达上颌窦颊侧骨壁,开窗后便能见到上颌窦黏膜侧壁,同时,上颌窦黏膜随呼吸运动有节律地扩大缩小^[5]。不难发现,犬不仅含有气化的上颌窦,而且上颌窦内衬黏膜,窦底黏膜的组织学结构也与人的相似。

我们认为在建立上颌窦底提升成骨研究的动物模型时,除了组织学结构之外,更应该着重考虑上颌窦底黏膜的生物学性能。因为上颌窦底提升后窦底空间成骨细胞不仅来源于窦壁骨质^[26-27],也可能来自窦底黏膜的骨原细胞^[3-4,11-13,15],所以,上颌窦底黏膜含有骨原细胞是建立合理动物模型不可忽视的前提。本实验的结果表明犬上颌窦底黏膜含有骨原细胞,且具有成骨能力,为犬作为上颌窦底提升的合理动物模型提供了细胞学和分子生物学依据。

3.3 结 论

与人上颌窦底黏膜相同,犬上颌窦底黏膜含有骨原细胞,具有成骨能力。

参考文献:

- [1] Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone[J]. *J Oral Surg*, 1980, 38(8): 613-616.
- [2] Tatum H Jr. Maxillary and sinus implant reconstructions [J]. *Dent Clin North Am*, 1986, 30(2): 207-229.
- [3] Palma VC, Magro-Filho O, de Oliveria JA, et al. Bone reformation and implant integration following maxillary sinus membrane elevation: an experimental study in primates [J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2006, 8(1): 11-24.
- [4] Cricchio G, Palma VC, Faria PE, et al. Histological findings following the use of a space-making device for bone reformation and implant integration in the maxillary sinus of primates [J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2009, 11(Suppl 1): e14-22.
- [5] 李祥,朱双喜,黄代营,等.上颌窦外提升及同期牙种植动物模型的建立 [J]. *中国口腔种植学杂志*, 2010, 15(4): 165-167.
- Li X, Zhu SX, Huang DY, et al. Establishment of maxillary sinus lift and the animal model of dental implant [J]. *Chin J Oral Implant*, 2010, 15(4): 165-167.
- [6] Lundgren S, Andersson S, Gualini F, et al. Bone reformation with sinus membrane elevation: a new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation [J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2004, 6(3): 165-173.
- [7] Hatano N, Sennerby L, Lundgren S. Maxillary sinus augmentation using sinus membrane elevation and peripheral venous blood for implant-supported rehabilitation of the atrophic posterior maxilla: case series [J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2007, 9(3): 150-155.
- [8] Thor A, Sennerby L, Hirsch JM, et al. Bone formation at the maxillary sinus floor following simultaneous elevation of the mucosal lining and implant installation without graft material: an evaluation of 20 patients treated with 44 Astra Tech implants [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2007, 65(7 Suppl 1): 64-72.
- [9] Sul SH, Choi BH, Li J, et al. Effects of sinus membrane elevation on bone formation around implants placed in the maxillary sinus cavity: an experimental study [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2008, 105(6): 684-687.
- [10] Jeong SM, Choi BH, Li J, et al. A retrospective study of the effects of sinus membrane elevation on bone formation around implants placed in the maxillary sinus cavity [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009, 107(3): 364-368.
- [11] Lundgren S, Andersson S, Sennerby L. Spontaneous bone formation in the maxillary sinus after removal of a cyst: coincidence or consequence? [J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2003, 5(2): 78-81.

- [12] Jung YS, Chung SW, Nam W, et al. Spontaneous bone formation on the maxillary sinus floor in association with an extraction socket [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2007, 36 (7): 656-657.
- [13] Mahler D, Levin L, Zigdon H, et al. The "dome phenomenon" associated with maxillary sinus augmentation [J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2009, 11(Suppl 1): e46-51.
- [14] Srouji S, Kizhner T, Ben David D, et al. The Schneiderian membrane contains osteoprogenitor cells: in vivo and in vitro study [J]. *Calcif Tissue Int*, 2009, 84(2): 138-145.
- [15] Srouji S, Ben-David D, Lotan R, et al. The innate osteogenic potential of the maxillary sinus (Schneiderian) membrane: an ectopic tissue transplant model simulating sinus lifting [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2010, 39(8): 793-801.
- [16] Reddi AH. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. Maureen Owen revisited [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1995, Apr (313): 115-119.
- [17] Graziano A, Benedetti L, Massei G, et al. Bone production by human maxillary sinus mucosa cells [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(9): 3278-3281.
- [18] Summers RB. Sinus floor elevation with osteotomes [J]. *J Esthet Dent*, 1998, 10(3): 164-171.
- [19] Jiang XQ, Wang SY, Zhao J, et al. Sequential fluorescent labeling observation of maxillary sinus augmentation by a tissue-engineered bone complex in canine model [J]. *Int J Oral Sci*, 2009, 1(1): 39-46.
- [20] 陈松龄, 黄代营, 周苗, 等. 冲顶式上颌窦提升植骨牙种植动物模型的建立 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(6): 549-553.
Chen SL, Huang DY, Zhou M, et al. Chong promote and establish bone implant in animal models of type of maxillary sinus top [J]. *J Sun Yat-sen Uni: Med Sci*, 2004, 25(6): 549-553.
- [21] Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG. Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs [J]. *Clin Oral Implants Res*, 1995, 6(3): 155-163.
- [22] Estaca E, Cabezas J, Uson J, et al. Maxillary sinus-floor elevation: an animal model [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2008, 19(10): 1044-1048.
- [23] Stelzle F, Benner KU. An animal model for sinus floor elevation with great elevation heights. Macroscopic, microscopic, radiological and micro-CT analysis: ex vivo [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2010, 21(12): 1370-1378.
- [24] Schimandle JH, Boden SD. Spine update: The use of animal models to study spinal fusion [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1994, 19(17): 1998-2006.
- [25] Lopez-Nino J, Garcia-Caballero L, Gonzalez-Mosquera A, et al. Lamb ex vivo model for training in maxillary sinus floor elevation surgery: a comparative study with human standards [J]. *J Periodontol*, 2012, 83(3): 354-361.
- [26] Lundgren AK, Lundgren D, Hammerle CH, et al. Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation: An experimental study in the rabbit skull bone [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2000, 11(2): 99-106.
- [27] Slotte C, Lundgren D. Impact of cortical perforations of contiguous donor bone in a guided bone augmentation procedure: an experimental study in the rabbit skull [J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2002, 4(1): 1-10.

(编辑 王晓鹰)