

富含血小板血浆和 rhBMP-2 复合物诱导兔下颌骨再生的实验

蔡华雄¹, 宋洁文¹, 赵小鹏¹, 阮毅¹, 郑美华¹, 李海刚²
(中山大学附属第二医院 1. 口腔科, 2. 病理科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】研究自体富含血小板血浆 (PRP) 和人重组骨形成蛋白 (rhBMP-2) 对下颌骨组织形成的促进作用。【方法】成年新西兰白兔 45 只, 随机分为 3 组, 每组 15 只, 选择右侧下颌骨为实验侧、左侧下颌骨为对照侧。A 组右侧下颌骨缺损区放置明胶海绵和 PRP, B 组右侧下颌骨缺损区放置明胶海绵和 rhBMP-2, C 组右侧下颌骨缺损区放置明胶海绵、PRP 和 rhBMP-2, 各组左侧下颌骨缺损区只放置明胶海绵。分别于术后 2、4、8 周各取 5 只兔子进行放射性核素 ^{99m}Tc-MDP 骨显像、X 线片和组织学切片检查。【结果】A 组动物右侧放射性核素计数在术后 2、4 周时明显高于左侧 (< 0.05); B 组动物右侧放射性核素计数在第 4 周时高于左侧 (< 0.05), 而在第 2、8 周时低于左侧 (< 0.05); C 组动物右侧放射性核素计数在第 2、4 周时均高于左侧 (< 0.05), 在第 8 周时两侧没有明显差别 (> 0.05)。【结论】PRP 单独或与 rhBMP-2 复合均能促进下颌骨组织的生长。

关键词: 富含血小板血浆; 骨形成蛋白; 骨再生

中图分类号: R782.13

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)04-0430-04

Effects of Platelet-rich Plasma in Combination with rhBMP-2 on Bone Healing of Mandibular Defects in Rabbits

CAI Hua-xiong¹, SONG Jie-wen¹, ZHAO Xiao-peng¹, RUAN Yi¹, ZHENG Mei-hua¹, LI Hai-gang²
(1. Department of Stomatology, 2. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 An animal study was carried out to investigate the influence of platelet-rich plasma (PRP) and recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the bone regeneration of mandibular defects in rabbits. 【Methods】 Forty-five New Zealand white rabbits were divided randomly into 3 groups: A, B, and C. All animals underwent general anesthesia and two 8 mm × 6 mm × 2 mm defects were drilled bilaterally in the mandibular bone. The right side defects were chosen as the experimental sides and implantation of glutin sponge with PRP was done in group A, rhBMP-2 in group B, and PRP and rhBMP-2 in group C, respectively. The left sides of defects were chosen as control side in which only the glutin sponge was implanted. The animals were killed after 2, 4, and 8 weeks. The specimens were observed by ^{99m}Tc-MDP bone scanning, X-ray and histological examination. The results were compared between the experimental group and control group. 【Results】 At 2 and 4 weeks after surgery, the amount of ^{99m}Tc-MDP on the right side was significantly higher than that on the left side in group A. In group B, the amount of ^{99m}Tc-MDP of the right side was significantly higher than that on the left side at 4 weeks after surgery, but was significantly lower than that on the left side at 2 and 8 weeks after surgery. In group C, the amount of ^{99m}Tc-MDP on the right side was significantly higher than that on the left side at 2 and 4 weeks after surgery, and there was no significantly difference between the two sides at 8 weeks after surgery. 【Conclusion】 This study shows that the PRP alone or combine with rhBMP-2 can improve the generation of mandibular bone.

Key words: platelet-rich plasma (PRP); bone morphogenetic protein (BMP); bone regeneration

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):430-433]

收稿日期 2006-05-06

基金项目 广州市科技局科技攻关项目 (2002Z3-E0411)

作者简介 蔡华雄 (1965-), 男, 广东汕头人, 硕士, 副主任医师, 课题负责人

关于牙槽骨的移植,主要是选择植骨材料的问题。随着医学的不断发展,人们已经发现了众多可供移植的材料,如羟基磷灰石/脱矿骨复合物、医学组织工程材料支架等^[1,2],但至今为止尚未找到一种既安全、经济,又有理想效果的牙槽骨植骨材料。本实验通过同位素骨显影技术观察自体富含血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)及人重组骨形成蛋白(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)对兔下颌骨缺损区骨组织代谢的影响,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

45只健康成年新西兰白兔(南方医院实验动物中心提供)雌雄不限,体质量2.0~2.5 kg,分笼饲养。人重组骨形成蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2),由广州威佳科技有限公司提供。自体富含血小板血浆(PRP),手术前制备。以明胶海绵作为PRP及rhBMP-2的载体。

1.2 PRP的制备

0.03 g/L戊巴比妥钠(0.03 g/kg)腹腔注射麻醉,从兔耳中央动脉抽取5 mL自体血,装在预先放有0.5 mL复方枸橼酸钠抗凝剂的10 mL离心管中,参照Landeserg法^[3]进行PRP提取:将新鲜血分两次离心,第一次离心 $200 \times g \times 10 \text{ min}$,吸管吸取全部上清液至交界面下3 mm,移至另一离心管,平衡后再次离心 $200 \times g \times 10 \text{ min}$,此时离心管中液体分为两层,吸取约3/4上清液弃掉,摇匀剩余液体,即为PRP,摇匀,备用。经检测,离心前血小板计数为 $336 \times 10^9/L$,离心后血小板计数为 $1\,498 \times 10^9/L$,离心后的血小板浓度是离心前的450%左右。制作过程严格无菌操作。

1.3 手术与分组

健康成年新西兰白兔45只,随机分为A、B、C3组,每组15只。每只兔在双侧下颌骨体部,即近犬齿、前臼齿根尖处建立骨缺损区,右侧为实验侧,其中A组放置PRP和明胶海绵,B组放置rhBMP-2和明胶海绵,C组放置PRP、rhBMP-2和明胶海绵;左侧为对照侧,均只放置明胶海绵。

1.4 实验方法

0.03 g/L戊巴比妥钠按0.03 g/kg腹腔注射麻醉,生效后在手术区局部注射0.02 g/L利多卡因。

常规备皮、消毒、铺巾。沿下颌骨下缘作平行切口,长度为3~4 cm,分层切开皮肤、皮下组织,暴露下颌骨下缘及下颌骨颊面,用裂钻在下颌骨体部颊侧中下1/3处制备缺损区,长、宽、深分别为8 mm \times 6 mm \times 2 mm,手术时使用生理盐水降温,术后使用庆大霉素注射液冲洗防止感染。缺损区制备后,兔子右侧:A组以明胶海绵加PRP填塞,B组以明胶海绵加rhBMP-2填塞,C组以明胶海绵加PRP及rhBMP-2填塞;左侧均以明胶海绵填塞。严密缝合伤口,分笼饲养。术后给予青霉素肌注预防感染,剂量为40万U/次,每天一次,持续3 d。

1.5 观察指标

1.5.1 放射性核素骨显像 各组分别在术后第2、4、8周时随机抽取5只大白兔,由耳缘静脉注射 $962 \text{ MBq } ^{99m}\text{Tc-MDP}$,3 h后在全麻状态下将大白兔仰卧固定,取其下颌骨正面及双侧摄取相的静态骨显像。在双侧缺损区取约10 mm \times 8 mm的面积作为感兴趣区(region of interest, ROI),使用高分辨准直器照相机(Millennium MG)进行骨显像,计算机软件分别计算每个ROI的平均放射性计数,并以下颌颌部正中同样面积的平均放射性计数比值相比较。为减少误差,测量时每个ROI的放射性平均计数重复测量5次,取平均值。在实验过程中对核医学医师采用单盲法。

1.5.2 X线片检查 经过核素检查后的大白兔,使用血管内注射空气法处死,取标本照X光照片,观察缺损区内新骨形成情况。

1.5.3 组织学观察 上述标本经100 mL/L福尔马林固定,50 mL/L硝酸脱钙,系列脱水,石蜡包埋,连续切片,HE染色,光镜观察。

1.6 统计分析

采用配对t检验,SPSS 11.5进行统计分析。

2 结果

2.1 $^{99m}\text{Tc-MDP}$ 骨显像

A组动物实验侧放射性计数在第2、4周时明显高于对照侧(< 0.05),而8周时放射性计数与对照侧相比无显著性差别(> 0.05);B组动物实验侧放射性计数在第2、8周时低于对照侧(< 0.05),而第4周时高于对照侧(< 0.05);C组动物实验侧放射性计数在第2、4周时随着时间的推移明显增高,且明显高于对照组(< 0.05),到第8周时放射性计数明显降低,但与对照组相比无显著性差别(> 0.05 ,表1)。

表 1 各组动物颌骨缺损区放射性计数比值

Table 1 The ratio of ^{99m}Tc -MDP bone scanning counting on mandibular bones in all groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	n	2- week		4- week		8- week	
		Right	Left	Right	Left	Right	Left
A	5	1.84 \pm 0.15 ¹⁾	1.61 \pm 0.14	1.88 \pm 0.18 ¹⁾	1.68 \pm 0.14	1.72 \pm 0.10	1.74 \pm 0.05
B	5	1.55 \pm 0.15 ¹⁾	1.76 \pm 0.12	1.75 \pm 0.14 ¹⁾	1.61 \pm 0.10	1.47 \pm 0.13 ¹⁾	1.55 \pm 0.15
C	5	1.70 \pm 0.10 ¹⁾	1.57 \pm 0.09	1.80 \pm 0.12 ¹⁾	1.67 \pm 0.13	1.62 \pm 0.12	1.53 \pm 0.09

2- week: 2 weeks after surgery; 4- week: 4 weeks after surgery; 8- week: 8 weeks after surgery; Right: the right side of mandibular bones; Left: the left side of mandibular bones; 1) Compared with control: < 0.05

2.2 X 线检查结果

所有结果显示, 兔子下颌骨缺损区在术后 2 周时清晰可见, 到术后 4 周时, 缺损区已经有骨组织生长, 术后 8 周时, 缺损区基本消失, 骨组织恢复良好, 各组之间、实验侧与对照侧之间没有明显差别(图 1)。

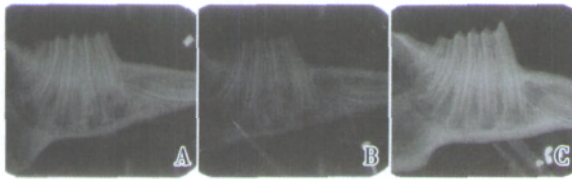


图 1 下颌骨缺损区

Fig.1 Mandibular bones of experimental side

A: 2 weeks after surgery; B: 4 weeks after surgery; C: 8 weeks after surgery

2.3 组织学观察

A 组和 C 组动物在术后 2 周时, 实验侧骨组织呈迷路样增长, 骨陷窝清晰可见, 纤维组织比对照侧少, 骨母细胞较多, 部分为正方形, 此时骨小梁排列仍不规则; 8 周时, 实验侧和对照侧骨组织密度接近, 实验侧骨细胞胞核大而黑, 可见粘合线。B 组动物在术后 2、4 周时, 实验侧和对照侧均可见较多的纤维组织, 骨细胞的增殖较 A、C 组少; 8 周时骨组织基本成熟, 两侧差别较小(图 2)。

3 讨论

PRP 技术是以患者自体血为原料, 通过梯度密度离心的方法获得富含血小板的血浆, 再单独或联合其他生物材料注入硬组织缺损或软组织创伤处, 从而修补缺损, 诱导生长, 加速局部创伤的愈合并提高愈合质量。其作用的发挥有赖于 PRP 中浓缩血小板脱颗粒后产生的各类高浓度生长因子以及纤维蛋白原所形成的纤维网状支架^[4]。PRP

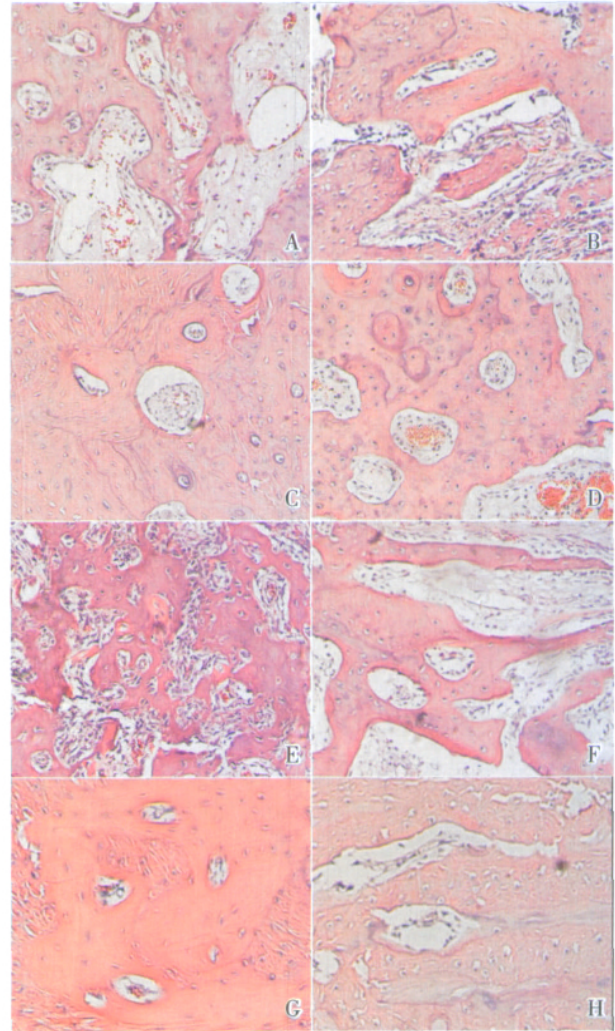


图 2 术后两组组织学观察

Fig.2 Histology of two groups after surgery

A-B: group A, 4 weeks; C-D: group A, 8 weeks; E-F: group C, 4 weeks; G-H: group C, 8 weeks; Left: experimental side; Right: control side; (HE $\times 100$)

中主要的生长因子是转移生长因子- (transforming growth factor- , TGF-)、血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、类胰岛素生长因子 (insulin-like growth factor,

IGF)等^[5,6]。Belli等^[7]在人颌骨囊肿摘除术后骨缺损区植入自体 PRP 和羟基磷灰石颗粒复合物,发现该复合物有促进骨增长和组织愈合的作用。Goto等^[8]在移植 PRP 和成骨细胞复合物到 SCID 小鼠的皮下的实验中发现,PRP 在体外能提高碱性磷酸酶的活性,促进矿化颗粒的形成,在体内能促进成骨细胞的分化。Gerard等^[9]在狗的下颌骨缺损区植入自体骨和 PRP,对照组只植入自体骨,组织学观察发现术后 1-2 个月实验组移植骨数量明显减少,新骨数量明显增加,有统计学差异,但该现象到 3-6 个月时消失,两组统计学无差异。本实验从组织学观察中发现,兔下颌骨缺损区在加入 PRP 及明胶海绵后,在第 2、4 周时,骨细胞形成的活跃程度要明显高于只加入明胶海绵的对照侧,到 8 周时,两侧的骨小梁密度又趋于一致。

但是,也有学者在研究 PRP 的过程中发现不同的结果。Weibrich等^[10]将 PRP 应用于体外培养成骨细胞,结果发现,加入适当浓度的 PRP 可以促进细胞的生长,但 PRP 的浓度过高,反而会轻度抑制细胞生长。Wiltfang等^[11]将 PRP 分别复合自体骨、磷酸三钙颗粒、小牛骨后植入小型猪前额骨缺损区,结果发现 PRP 在早期能促进自体骨的再生,而对异种骨及骨代替品没有作用。Aghaloo等^[12]用自体骨加 PRP 修复兔颅骨 8 mm 的缺损,通过对比,认为加入 PRP 并未明显促进骨的生成。

Carlson^[13]撰文提出应用 PRP+BMP 是 21 世纪颌骨移植的新方向。但是,在 PRP 复合 rhBMP-2 后,对骨组织增长的作用方面,研究的并不多。Jung等^[14]研究 PRP 及成品纤维蛋白复合 rhBMP-2 后对新西兰白兔骨再生的影响,发现单独使用 PRP 或成品纤维蛋白时,新骨形成与空白对照组相比虽然有所增加,但无显著性差异,而复合 rhBMP-2 后,两组对骨组织的增殖作用均明显增强,和对照组相比有显著性差异,不过 PRP 组和成品纤维蛋白组之间差异不明显。本实验得到类似结果。

骨组织对放射性核素的摄取量主要取决于局部骨组织的血流量,因此可根据植骨区放射性浓聚程度判断移植骨的血供重建和成骨活性。本实验的核素检查结果发现,单纯使用 PRP 时,第 2、4 周的放射性计数高于对照组,与组织学观察显示的结果一致。

应用自体富含血小板血浆促进牙槽骨再生的研究,国外已见的报道主要是关于 PRP 与其它骨

移植材料一起植入牙槽骨并促进牙槽骨的形成方面的研究,由于需使用其它的植骨材料(如羟基磷灰石、生物活性玻璃、珊瑚、胶原、去抗原的异体骨等)作为载体,仍不可避免受载体材料所存在的缺点的局限。Park等^[15]则使用聚氨基葡萄糖海绵为血小板来源生长因子(PDGF-BB)的载体植入牙周骨组织缺损区,取得良好的刺激骨组织再生的效果,而同为生物材料的 BMP 与 PRP 混合后植入骨腔,能否更快地促进牙槽骨的形成,则鲜有报道。本实验将 PRP 与 rhBMP-2 复合在明胶海绵上,结果表明,在第 2、4 周时,放射性核素的聚集明显高于对照组,到 8 周时,核素计数明显下降,提示此时骨组织已经接近成熟。

在所有的 X 光照片中,实验侧与对照侧的对比不明显,可能是由于骨缺损区太小,骨组织的变化在 X 光片上难以显示明显的差别,所以对于本实验来说,X 线观察不是一个理想的指标。

参考文献:

- [1] 陈松龄,王大章,冉 炜,等.羟基磷灰石/脱矿骨复合物增高牙槽骨的实验研究[J].中山大学学报:医学科学版,2000,21(4):280-283.
- [2] 冉 炜,郭 冰,李 轶,等.可降解骨组织工程支架材料修复下颌骨缺损的实验研究[J].中山大学学报:医学科学版,2004,25(3S):18-20.
- [3] LANDESBURG R, ROY M, GLICKMAN R S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2000, 58: 297-300.
- [4] GARG A K, GARGENESE D, PEACE I. Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy[J]. Dent Implantol Update, 2000, 11(6): 41-44.
- [5] MARX R E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP[J]. Implant Dent, 2001, 10(4): 225-228.
- [6] WEIBRICH G, KLEIS W K, HAFNER G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2002, 17(2):184-190.
- [7] BELLI E, LONGO B, BALESTRA F M. Autogenous platelet-rich plasma in combination with bovine-derived hydroxyapatite xenograft for treatment of a cystic lesion

(下转第 438 页 to page 438)

HPDLC的增殖,调节细胞周期,促进 DNA 合成前期(S期)的 HPDLC 进入 DNA 合成期。尤为重要的是,本研究将 HPDLC 接种于复合支架后,在一定条件下细胞可以在支架内存活和增殖,而且含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架内的细胞存活和增殖数量明显高于不含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架,在两周内效果都非常明显,说明含 bFGF 因子壳聚糖- 型胶原复合支架对 HPDLC 生长和增殖具有促进作用。

参考文献:

- [1] 涂小丽,刘宏伟. 骨髓基质细胞- 牙根- 珊瑚羟基磷灰石复合体内再植的初步观察 [J]. 实用口腔学杂志, 2006, 22(1): 45- 47.
- [2] ZHANG Y, CHENG X, WANG J, et al. Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-beta1 DNA for periodontal tissue engineering [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 344(1): 362- 369.
- [3] 刘涛,耿发云,杨萍,等. 引导组织再生术治疗度根分叉病变的临床研究 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2004, 25(S1):216- 218.
- [4] 李容林,李春阳,张伟. 壳聚糖与 型胶原制备组织工程复合支架材料的扫描电镜研究 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2006, 27(5):557- 561.
- [5] ZHANG R, MA P X. Poly (alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone - tissue engineering I Preparation and morphology [J]. J Biomed Mater Res, 1999, 44 (4): 446- 455.
- [6] INOUE M, LEGEROS R Z, HOFFMAN C, et al. Effect of enamel matrix proteins on the phenotype expression of periodontal ligament cells cultured on dental materials [J]. J Biomed Mater Res, 2004, 69(1): 172- 179.
- [7] 姚子昂,吴海歌,韩宝芹,等. 不同脱乙酰度对壳聚糖膜与角膜基质细胞相容性的影响 [J]. 生物医学工程杂志, 2006, 23(4): 800- 804.
- [8] 刘良明,田昆仑,范小青,等. 异丁基壳聚糖多功能敷料的生物安全性 [J]. 中国海洋药物, 2005, 24(5): 39- 42.
- [9] LIAO S, WANG W, UO M, et al. A three-layered nano - carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration [J]. Biomaterials, 2005, 26(36): 7564- 7571.
- [10] NAKAHARA T, NAKAMURA T, KOBAYASHI E, et al. Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane [J]. Tissue Eng, 2003, 9(1): 153- 162.
- [11] SAE-LIM V, ONG WY, LI Z, et al. The effect of basic fibroblast growth factor on delayed-replanted monkey teeth [J]. J Periodontol, 2004, 75(12):1570- 1578.

(编辑 王晓鹰)

(上接第 433 页 from page 433)

- [8] GOTO H, MATSUYAMA T, MIYAMOTO M, et al. Platelet - plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation [J]. J Periodontal Res, 2006, 41(5):455- 462.
- [9] GERARD D, GARLSON E R, GOTCHER J E, et al. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2006, 64(3):443- 451.
- [10] WEIBRICH G, GNOTH S H, OTTO M, et al. Growth stimulation of human osteoblast-like cells by thrombocyte concentrates in vitro [J]. Mund Kiefer Gesichtschir, 2002, 6(3):168- 174.
- [11] WILTFANG J, KLOSS F R, KESSLER P, et al. Effects of platelet- rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment [J]. Clin Oral Implants Res, 2004, 15(2): 187- 193.
- [12] AGHALOO T L, MOY P K, FREYMILLER E G. Investigation of platelet- rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2002, 60(10): 1176- 1181.
- [13] CARLSON E R. Bone grafting the jaws in the 21st century: the use on platelet- rich plasma and bone morphogenetic protein [J]. Alpha Omegan, 2000, 93(3): 26- 30.
- [14] JUNG R E, SCHMOEKEL H G, ZWAHLEN R, et al. Platelet- rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein- 2 [J]. Clin Oral Implants Res, 2005, 16(6): 676- 682.
- [15] PARK Y J, LEE Y M, PARK S N, et al. Platelet derived growth factor releasing chitosan spong for periodontal bone regeneration [J]. Biomaterials, 2000, 21(2): 153- 159.

(编辑 王晓鹰)