

[文章编号] 1000-1182(2008)05-0490-04

型胶原在去下牙槽神经支配 下颌骨骨折愈合中的表达

张 伟¹, 刘麒麟¹, 于子莹¹, 王为民², 孙 宾¹

(1. 吉林大学口腔医院 口腔颌面外科, 吉林 长春 130041;

2. 吉林油田总医院 口腔科, 吉林 松原 138006)

[摘要] 目的 建立稳定性下牙槽神经损伤骨折模型, 探讨下牙槽神经对下颌骨骨折骨痂中 型胶原表达的影响。方法 选用大耳白兔, 游离双侧下牙槽神经, 右侧保留, 左侧切断, 在此基础上制作2 mm×5 mm的骨折模型, 应用苏木精-伊红、变色酸2R-亮绿染色、原位杂交染色检测下颌骨骨折愈合情况及愈合过程中 型胶原的表达情况。结果 正常下牙槽神经支配的下颌骨顺利完成骨折愈合, 神经离断后骨折愈合延迟。 型胶原原位杂交染色表明在第1、2周保留神经侧较神经离断侧 型胶原mRNA明显, 差异有统计学意义($P<0.05$); 在第3、4周, 两侧之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 下牙槽神经对下颌骨愈合有调节作用, 可影响 型胶原mRNA的早期表达。

[关键词] 下牙槽神经; 下颌骨骨折; 型胶原; 原位杂交

[中图分类号] R782.4 **[文献标识码]** A

The expression of collagen during mandibular fracture healing with the inferior alveolar nerve mutilated
ZHANG Wei¹, LIU Qi-lin¹, YU Zi-ying¹, WANG Wei-min², SUN Bin¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital, Jilin University, Changchun 130041, China; 2. Dept. of Stomatology, Jilin Oil Field General Hospital, Songyuan 138006, China)

[Abstract] **Objective** To establish a stable mandibular fracture model with inferior alveolar nerve(IAN) mutilated for exploring the IAN influence to the expression of collagen during mandibular fracture. **Methods** Japanese white rabbits were selected and IAN was liberated. The right was leaven as it is and the left was cut off, then 2 mm×5 mm fracture model was made, and HE staining and chromotropic acid 2R-bright green staining and in situ hybridization of collagen mRNA were made to detect mandibular fracture healing and collagen mRNA expression. **Results** Fracture healing was smooth in IAN conserved side, but delayed in the IAN mutilated side. Collagen in situ hybridization showed that at one week and two weeks after surgery there were obvious differences between the two sides($P<0.05$), but no difference at three weeks after surgery and four weeks($P>0.05$). **Conclusion** The IAN could regulate mandibular fracture healing, and influence collagen mRNA earlier expression.

[Key words] inferior alveolar nerve; mandibular fracture; collagen; in situ hybridization

随着人们对骨折愈合机制研究的不断深入, 感觉神经对骨折愈合的调节作用逐渐成为创伤修复学研究的热点, 并已经证实感觉神经末梢可以通过局部释放感觉神经肽调节骨折愈合。下牙槽神经损伤是下颌骨骨折的常见并发症, 神经损伤后不仅影响感觉功能, 也会影响骨折愈合的进程。有学者研究表明感觉神经损伤影响骨痂的量和力学强度^[1-2], 但

具体机制还不明确。本实验建立下牙槽神经损伤的骨折模型, 探讨下牙槽神经在调节下颌骨骨折愈合过程中对 型胶原表达的影响, 分析感觉神经影响骨折骨痂的量和力学强度的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水(北京鼎国生物技术有限责任公司), 型胶原原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 自行配制的0.1 mol/L PBS缓冲液(pH为7.2~7.4)、4%多

[收稿日期] 2008-01-10; [修回日期] 2008-03-25

[作者简介] 张 伟(1961-), 男, 吉林人, 副教授, 博士

[通讯作者] 张 伟, Tel: 0431-88796024

聚甲醛固定液、10%EDTA慢脱钙剂。

1.2 方法

选取由吉林大学动物实验室提供的3月龄日本大耳白兔24只,体重2.3~2.7 kg,雌雄不限。速眠新全麻,剂量标准为0.2 mL/kg,陆醒宁备用,全麻成功后,显露下颌骨升支舌侧面,用大白砂钻头涡轮手机自下颌孔向正中联合稍后方沿下颌管走行方向打开舌侧皮质骨,显露、游离下牙槽神经,右侧(保留神经侧)保留,左侧(神经离断侧)切断后撕脱,近心端结扎,约在角前切迹前1 cm处用直手机制作2 mm×5 mm的骨折模型,制作过程中用盐水冷却,大量生理盐水冲洗后,右侧还纳神经,放入青霉素粉20万单位,缝合。肌注青霉素20万单位,0.2 mL/kg陆醒宁复苏后,放回笼中饲养。环境温度为(21±1)℃,湿度为(60±5)%。将实验动物随机分成4组,每组6只,分别在术后1、2、3、4周用含DEPC(能灭活RNase)的4%多聚甲醛溶液行颈动脉灌注并断头处死,去除头部皮毛后浸泡于含DEPC的4%多聚甲醛溶液中,24 h后取骨折段约2 cm×1.5 cm大小备用,标本常规行苏木精-伊红染色,并行变色酸2R-亮绿染色,按型胶原原位杂交试剂盒提供的步骤进行型胶原原位杂交染色。探针序列为:5'-GCCGCTACTACCGGGCAGATGACGCCAA-CGTGGTC-3';5'-CTGAGCCAGCAGATTGAGAA-CATCAAGAGCCCCGA-3'。细胞胞浆中出现棕黄色颗粒者为型胶原原位杂交染色阳性,用PBS代替一抗,为阴性。正常组织中骨细胞的胞浆为较淡的棕黄色或不显色。

1.3 统计学方法

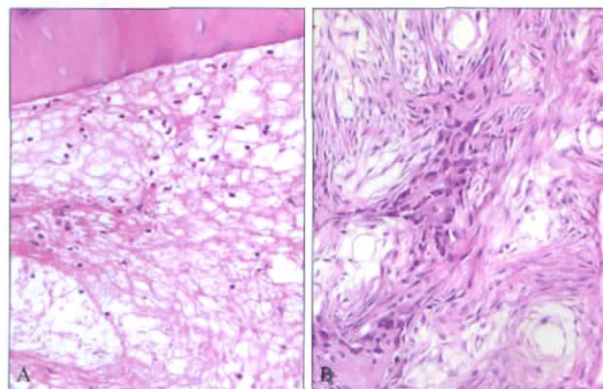
应用Image-Pro Plus 5.0图像分析系统分别测定型胶原不同时相表达的平均积分吸光度值,每张切片采用相同视野(×400)、相同光强度进行观察,随机选取3个视野,取其平均值,每组6张切片。采用SPSS 11.5统计软件分析数据,各组间的两两比较采用配对t检验方法进行统计分析。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色结果

在术后第1周神经离断侧骨折裂隙内主要由纤维网架结构充填,其间散在大量的炎性细胞和红细胞,炎性细胞主要为多形核白细胞,并有少量的巨噬细胞;保留神经侧骨折裂隙内主要由成纤维细胞充填,毛细血管密集,形成新鲜的肉芽,并可见在成纤维细胞簇集的部位有少量的骨基质沉积(图1)。术后第2周神经离断侧骨折间隙为纤维组织填充,可见大量成纤维细胞,无明显的成骨活动,裂隙边

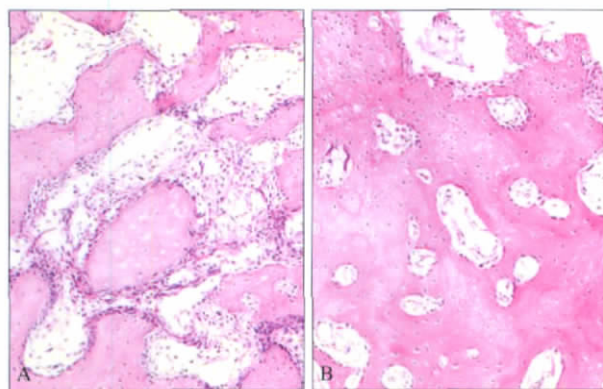
缘可见成团的软骨细胞;保留神经侧已无肉芽组织,膜内成骨及软骨内成骨活跃,可见部分骨小梁出现。术后第3周神经离断侧缺损两侧缘出现新生骨小梁和成骨细胞,但中央部位仍为大量成纤维细胞;保留神经侧两端有新生骨小梁向中间延伸,有明显类骨及成骨细胞,软骨组织逐渐由骨组织代替。术后第4周神经离断侧可见大量的外骨痂形成,骨小梁疏松,在骨小梁的周围仍可见部分成纤维细胞,骨折裂隙内仍有纤维性骨痂;保留神经侧骨折裂隙均为骨性骨痂填充,骨折断端联合,髓腔再生,哈弗系统形成(图2)。



A: 神经离断侧; B: 保留神经侧

图1 术后第1周,神经离断侧和保留神经侧的观察结果 HE ×200

Fig 1 Observing results of inferior alveolar nerve mutilated side and inferior alveolar nerve conserved side one week after surgery HE ×200



A: 神经离断侧; B: 保留神经侧

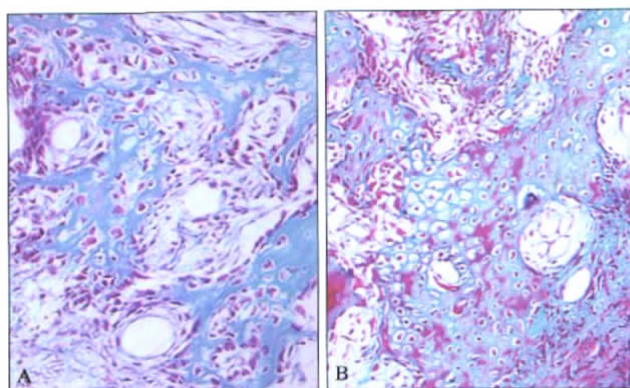
图2 术后第4周,神经离断侧和保留神经侧的观察结果 HE ×100

Fig 2 Observing results of inferior alveolar nerve mutilated side and inferior alveolar nerve conserved side four weeks after surgery HE ×100

2.2 变色酸2R-亮绿染色结果

在术后第1周神经离断侧骨折裂隙内主要由纤维网架结构充填,未见有骨基质形成;保留神经侧骨折裂隙内有局灶性骨基质沉积。术后第2周神经离断侧骨折间隙内出现少量散在的红染骨基质;保

留神经侧红染的骨基质遍布于骨折裂隙内(图3)。术后第3、4周时保留神经侧骨基质逐渐成熟;神经离断侧骨折间隙内也出现大量的成熟骨,但仍有大量的纤维成分。



A: 神经离断侧; B: 保留神经侧

图3 术后第2周,神经离断侧和保留神经侧的观察结果 变
色酸2R-亮绿染色 $\times 200$

Fig 3 Observing results of inferior alveolar nerve mutilated side
and inferior alveolar nerve conserved side two weeks after
surgery chromotropic acid 2R-bright green staining
 $\times 200$

2.3 型胶原原位杂交结果

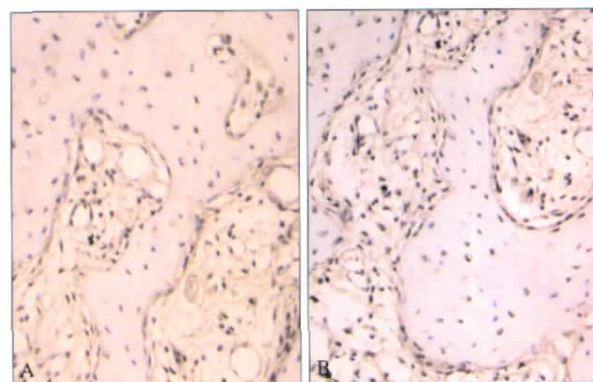
神经离断侧术后第1周骨折裂隙由纤维蛋白网充填, 型胶原mRNA表达极少或没有。术后第2周,骨折裂隙为纤维组织充填,开始出现 型胶原mRNA的表达,表达量较少而分散,主要为成纤维细胞表达阳性(图4)。第3周, 型胶原mRNA表达的量进一步增加,在新生骨小梁周边的成骨细胞及成骨细胞周边的成纤维细胞呈中度表达,骨折断端两侧缘骨小梁周边的成骨细胞及成纤维细胞呈弱表达,骨小梁内骨细胞表达少。第4周,成骨细胞及骨细胞弱表达,骨小梁周边的成纤维细胞仍少量表达 型胶原mRNA。

保留神经侧在术后第1周成纤维细胞仅有少量的表达。术后第2周出现大量的 型胶原mRNA表达,膜内骨化新生骨小梁内新生骨细胞、骨小梁周边的成骨细胞及成骨细胞周边的成纤维细胞强表达

型胶原mRNA,在软骨内成骨区中也可以观察有少量 型胶原mRNA表达(图4)。术后第3周,在软骨内骨化的区域,成骨细胞和骨细胞均出现 型胶原mRNA表达,膜内成骨区 型胶原mRNA表达主要集中在骨小梁间的成纤维细胞中,骨小梁周边成骨细胞中的表达开始减弱,骨小梁内骨细胞呈弱表达。术后第4周,骨断端联合,髓腔再生,在少量未成熟区域的骨细胞、成骨细胞少量表达 型胶原。

术后第1、2、3、4周,保留神经侧 型胶原原

位杂交染色图像的积分吸光度值分别为 $3\,796\pm 994.80$ 、 $10\,628\pm 2\,177.96$ 、 $8\,053\pm 2\,926.50$ 、 $6\,931\pm 817.96$;神经离断侧 型胶原原位杂交染色图像的积分吸光度值分别为 $1\,051\pm 300.59$ 、 $7\,054\pm 2\,172.13$ 、 $9\,433\pm 2\,268.69$ 、 $7\,638\pm 983.64$ 。第1、2周,保留神经侧较神经离断侧 型胶原mRNA明显,二者间差异有统计学意义($P<0.05$),在第3、4周,二者间 型胶原mRNA差异无统计学意义($P>0.05$)。



A: 神经离断侧; B: 保留神经侧

图4 术后第2周,神经离断侧和保留神经侧的观察结果 原
位杂交 $\times 200$

Fig 4 Observing results of inferior alveolar nerve mutilated side
and inferior alveolar nerve conserved side two weeks after
surgery in situ hybridization $\times 200$

3 讨论

骨由全身性和局部因子不断的改建和调整,许多研究已经证实骨的新陈代谢受神经系统的影响^[3]。同样神经系统在骨折的愈合过程中也发挥调节作用。Madsen等^[4]建立了闭合性骨折行髓内钉固定的稳定骨折模型,研究股神经和坐骨神经切除术后对骨折愈合和骨折骨痂神经分布的影响,结果神经切断组骨折骨痂的体积较大,但力学性质较差,表明神经损伤致使组织组分和结构缺陷。本实验通过苏木精-伊红及变色酸2R-亮绿染色法证实下牙槽神经离断性损伤对骨折愈合的影响与Madsen等^[4]的结果基本一致,表现为出现明显的外骨痂,骨痂愈合缓慢,在第4周时仍有大量的纤维组织残留。与此相反,保留神经侧骨折愈合顺利的完成血肿形成、血肿机化、骨痂形成、骨痂改建的全过程,没有明显的外骨痂形成,胶原纤维逐渐趋于层状规律性排列,部分区域哈弗系统已经形成。近几年来,神经离断造成骨折骨痂体积大、力学性质差、组织结构缺陷已经基本达成共识。但就其产生的原因还存在不同的看法。

感觉神经影响骨折愈合的矿化进程可能是通过影响骨基质的产生介导的。胶原是细胞外最丰富的

基质蛋白,它在维持纤维连接组织的结构及功能上起重要作用。骨骼有机成分的90%由胶原组成,骨基质中主要为Ⅰ型和Ⅱ型胶原,软骨基质中主要为Ⅱ型胶原^[5]。Ⅱ型胶原是骨组织中的主要胶原,测定胶原合成是检测骨形成的主要生物学指标,刺激骨痂内胶原合成能加速骨的愈合过程。本实验通过原位杂交的方法检测骨折愈合过程中Ⅱ型胶原mRNA的表达情况,结果证实Ⅱ型胶原mRNA在保留神经侧和神经离断侧均有表达,其表达细胞主要是成骨细胞、成纤维细胞,并且这种强的表达在保留神经侧出现较早,第2周为高峰期,在第4周时趋于终止。在神经离断侧出现延迟,呈中、弱表达并可持续至第4周,提示神经离断侧骨折愈合缓慢,与组织学观察到的情况相吻合。由此猜测保留神经可能通过某种机制改变Ⅱ型胶原mRNA的早期表达。有研究表明感觉神经可以通过局部释放感觉神经肽激活骨细胞表面的受体,从而改变骨细胞的活性^[6]。Suzue等^[7]研究表明,失神经抑制的骨祖细胞对胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor, IGF-1)有促有丝分裂反应。本实验观察到保留神经侧骨生成细胞明显较神经离断侧多而密集,细胞密集区Ⅱ型胶原mRNA表达明显增强。骨折后第1、2周,保留神经侧和神经离断侧之间Ⅱ型胶原mRNA表达的差异可能单纯由成骨细胞增加所引起,也可能由于感觉神经激活了成骨细胞、成纤维细胞及骨细胞表达Ⅱ型胶原mRNA的某种机制。

另一方面,感觉神经也可能通过影响骨基质的矿化率影响骨折愈合。Madsen等^[4]用锶⁸⁵结合率测量表明神经切断并不影响骨折骨痂的矿化,与神经损伤侧骨折骨痂的矿化率较对照组低10%的结论不尽一致。因为坐骨神经及股神经为混合神经,用于去神经创伤位点的股神经及坐骨神经横断术也会通过

损害肌力改变愈合组织的力学环境。下牙槽神经(分出下颌舌骨肌神经远端部分)为感觉神经,两者神经成分的差别也提示应该进行下牙槽神经对下颌骨骨折骨痂矿化率方面的研究。本实验结果发现下牙槽神经在调节下颌骨骨折愈合的过程中,促进Ⅱ型胶原mRNA的早期表达,可能据此影响骨折骨痂的量和力学强度,但是具体机制还有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Madsen JE, Aune AK, Falch JA, et al. Neural involvement in post-traumatic osteopenia: An experimental study in the rat[J]. Bone, 1996, 18(5): 411-416.
- [2] Kingery WS, Offley SC, Guo TZ, et al. A substance P receptor (NK1) antagonist enhances the widespread osteoporotic effects of sciatic nerve section[J]. Bone, 2003, 33(6): 927-936.
- [3] Kontinen Y, Imai S, Suda A. Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling. State of the art[J]. Acta Orthop Scand, 1996, 67(6): 632-639.
- [4] Madsen JE, Hukkanen M, Aune AK, et al. Fracture healing and callus innervation after peripheral nerve resection in rats[J]. Clin Orthop Relat Res, 1998, (351): 230-240.
- [5] 张益, 孙勇刚. 颌骨坚固内固定[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2003: 29-34.
ZHANG Yi, SUN Yong-gang. Rigid internal fixation of jaw bones [M]. Beijing: Medical Publication Bureau of Beijing University, 2003: 29-34.
- [6] Lundberg P, Lerner UH. Expression and regulatory role of receptors for vasoactive intestinal peptide in bone cells[J]. Microsc Res Tech, 2002, 58(2): 98-103.
- [7] Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, et al. Ubiquitin ligase Cbl-b downregulates bone formation through suppression of IGF-I signaling in osteoblasts during denervation[J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(5): 722-734.

(本文编辑 王 晴)

《现代口腔烤瓷铸造支架修复学》内容提要

《现代口腔烤瓷铸造支架修复学》在第1版的基础上修订而成,全面、系统地介绍了口腔烤瓷修复和铸造支架式义齿修复的基础理论、临床应用和技术室制作技术,并以独特的笔触叙述了口腔现代修复中最受欢迎的个性修复、仿生修复技术和口腔修复色彩学、口腔修复美学及其基础训练。在口腔金属烤瓷修复内容中,对牙体缺损的金属烤瓷全冠、金属烤瓷桩冠、牙列缺损的金属烤瓷固定桥、金属烤瓷固定活动联合修复体、种植义齿的金属烤瓷修复体及铸造支架式可摘局部义齿等都进行了全面、细致的介绍。本书理论精辟,资料翔实,图文并茂,实用性强,全面反映了目前国内外在这一专业领域的新理论、新概念、新方法和新技术,是一本理论结合实践的修复学专著,第1版曾获解放军图书奖和全国优秀科技图书奖。可供各级口腔修复科医师、技师、口腔修复专业师生、义齿制作技术人员阅读参考。

人民军医出版社