

邻牙移入对组织工程骨修复的牙槽突裂区骨改建的影响

金灿, 陈振琦, 吴军

(上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院 口腔正畸科,
上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011)

[摘要] 目的: 研究利用 3D 打印的支架材料制作组织工程骨并植入大鼠牙槽突裂区, 邻牙受正畸力向植骨区移动对植入骨改建的生物学影响。方法: 选取 12 只 8 周龄 SD 大鼠, 制备双侧上颌牙槽突裂标准动物模型。利用 3D 打印的组织工程支架材料与大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)体外共培养后, 作为植入材料, 植入动物体内。术后 8 周处死 3 只大鼠取材, H-E 染色评价成骨, 并行单侧植骨区邻牙加力移入, 非加力侧为对照组。在加力 1、3、7 d 后分别处死 3 只大鼠取材, 采用实时荧光定量 PCR 技术(RT-PCR)检测成骨相关基因 Runx2、OCN 和 VEGF 的表达, 应用 SPSS19.0 软件包对实验组和对照组的基因表达样本均数进行 *t* 检验。结果: H-E 染色显示, 手术区骨组织成熟, 成骨良好。RT-PCR 显示, Runx2 呈现早期到中期增高, 而到晚期再降低的趋势; OCN 的表达在早期到中期无显著变化, 到晚期升高明显; VEGF 表达在加力早期到中期再到晚期呈现逐渐降低的趋势; 而早、中、晚期实验组的各项成骨相关基因表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。结论: 3D 打印支架材料构建的组织工程骨可以很好地替代自体骨移植, 以达到良好的成骨效果。正畸手段使邻牙移入植骨区, 可以有效促进术区成骨, 并且诱导成骨细胞及破骨细胞进行骨改建。

[关键词] 牙槽突裂; 3D 打印; 组织工程; RT-PCR; 骨改建

[中图分类号] R782.1

[文献标志码] A

DOI: 10.19438/j.cjoms.2017.04.007

Bone remolding after adjacent tooth moving into alveolar cleft site repaired by tissue-engineered bone graft JIN Can, CHEN Zhen-qi, WU Jun. (Department of Orthodontics, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Key Laboratory of Stomatology. Shanghai 200011, China)

[Abstract] PURPOSE: To study the biological effects of orthodontic tooth movement into surgical site on bone remodeling after bone graft. **METHODS:** Twelve SD rats were used as experimental animals. Critical size defects (CSD) were established on maxillary alveolar bone in SPF SD rats (8-week-old, 200±20g). 3D printed polycaprolactone scaffolds and rat bone marrow mesenchymal stem cells were co-cultured in vitro and then were used to be grafted into CSDs as substitution of autogenous bone. Eight weeks after surgery, 3 rats were sacrificed to take samples. H-E staining was used to evaluate the osteogenesis. Meanwhile, orthodontic devices were used to move adjacent teeth into surgical area in one side, the other side was used as control. Three SD rats were sacrificed respectively 1, 3 and 7 days after treatment. Real-time PCR was used to detect the expression of OPN, Trap, Runx2, Rank1, OCN and VEGF between the experimental group and control group. SPSS 19.0 software package was used for statistical analysis. **RESULTS:** H-E staining revealed abundant bone regeneration and osseous tissue was mature. RT-PCR showed that OCN expressed highest in late stage but had no significant difference between early stage and middle stage; expression of Runx2 rose from early stage to middle stage and declined to late stage; VEGF expression progressively decreased from early stage to late stage; expressions of each gene in the experimental group were significantly higher than the control group ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Tissue-engineered bone employing 3D printed scaffold can successfully substitute for autogenous bone to regenerate new bone. Using orthodontic method to move adjacent tooth into surgical area can promote bone regeneration, induce osteoblast and osteoclast to remodel bone biological structure.

[Key words] Alveolar cleft; 3D printing; Tissue engineering; RT-PCR; Bone remodeling

China J Oral Maxillofac Surg, 2017, 15(4):320-323.

[收稿日期] 2016-11-10; [修回日期] 2017-01-24

[作者简介] 金灿 (1992-), 女, 在读硕士研究生, E-mail: jincan0101@qq.com

[通信作者] 陈振琦, E-mail: orthochen@yeah.com;

吴军, E-mail: wujunwr@aliyun.com。* 共同通信作者

©2017 年版权归《中国口腔颌面外科杂志》编辑部所有

约75%的唇腭裂患者伴有牙槽突裂^[1],表现为牙槽突骨质缺损、牙弓完整性丧失、牙列拥挤、口鼻瘘以及由于鼻翼基底部缺乏骨组织支持而出现的鼻翼塌陷、面部不对称等症状^[2],这种畸形表现对于患者的生理及心理均有不利影响,故牙槽突裂修复是唇腭裂序列治疗中必不可少的一步。目前,牙槽突裂手术修复的金标准为自体骨移植^[3-4],但是自体骨移植不仅有植骨区吸收且供区骨量不足的缺点,还存在供区创伤、疼痛、感染、感觉异常、功能受损等不足^[5]。

组织工程因其摒弃传统外科“以创伤修复创伤”的理念,转而开启“支架+干细胞+生长因子”的新型治疗模式而得到大量关注^[6],针对骨组织的研究更多,包括长骨的大段骨缺损^[7]、承载重要器官的颅骨缺损^[8],还有行使功能时环境复杂的牙槽突缺损^[9]。3D打印作为一种新兴技术,通过层层相叠的打印技术辅以电脑设计和加工,可以根据缺损的形态做出高度匹配的支架。由于牙槽突在口内的功能环境复杂,应力多元化,材料性能良好且尽可能契合原本裂隙的植入体是最适宜的,并且3D打印还可以精确到在微米级上控制孔隙的大小及微结构等^[10]。

目前,关于组织工程骨修复牙槽突裂的研究已经从单纯动物体内实验上升到临床实验。早在2012年,Pradel等^[11]就应用组织工程骨成功修复了牙槽突裂。本实验通过已建立的SD大鼠标准牙槽突裂模型,选用3D打印的聚乙烯内酯支架构建组织工程骨并移植入裂隙区,待植骨区稳定后移入邻牙,从成骨相关基因表达入手,探讨正畸牙移入植骨区对骨改建是否具有促进作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠12只,8周龄,体重(200±10)g,由上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物中心提供。饲养于23℃、56%湿度的SPF级动物实验室,12h-12h间隔照明,自由取食消毒颗粒状饲料和消毒饮水。

1.2 方法

1.2.1 双侧牙槽突裂模型制备 10%水合氯醛(0.4 mL/100 g)腹腔注射麻醉。在大鼠双侧上颌第一磨牙近中作一与牙弓形态契合的弧形切口,拔除双侧上颌第一磨牙,分离拔牙创及切口周围软组织,用拉钩暴露术区,用慢速手机(Saeshin Strong 204,

德国)扩大拔牙创至形成一3 mm×3 mm×4 mm的箱状缺损^[12-13]。在裂隙区填满骨蜡(上海三友医疗器械有限公司)直至与周围骨组织齐平,用5-0丝线紧密缝合裂隙双侧黏膜,以干棉卷稍作按压,至无活动性出血。

1.2.2 组织工程骨体外构建 将3D打印的聚乳酸(PLA)-羟基磷灰石(HA)复合支架(上海交通大学医学院附属第九人民医院3D打印技术临床转化研发中心)裁剪成3 mm×3 mm×4 mm大小,75%乙醇浸泡24 h,用PBS清洗备用。贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)。取4周龄SD大鼠,颈椎脱臼处死,75%乙醇全身浸泡消毒10 min。无菌条件下取股骨及胫骨,PBS清洗3次。剪去股骨和胫骨的骨骺端,露出骨髓腔,用添加青、链霉素和10%FBS(胎牛血清)的L-DMEM培养基冲出骨髓,反复吹打;将冲出的骨髓制成单细胞悬液,1000 r/min离心5 min,弃上清,重悬后以1×10⁶/L的细胞浓度接种于25 cm²培养瓶中,置于培养箱中。接种后48 h首次换液,以后每4 d换液1次,倒置相差显微镜下观察细胞生长。待原代培养的细胞相互融合、覆盖瓶底达到80%以上时,用0.25%胰蛋白酶消化细胞并吹打,使之成为单细胞悬液,按1:3传代,接种,倒置相差显微镜下观察细胞形态及生长特点。对传至第3代的细胞进行计数,并以5×10⁴个/mL的密度制成细胞悬液,在24孔板内与3D打印的PLA-HA复合支架材料共培养。

1.2.3 牙槽突裂植骨术 造裂术后8周,大鼠腹腔注射10%水合氯醛。麻醉后,打开上颌双侧裂隙,将细胞-支架复合物植入双侧裂隙中,填塞至与裂隙两侧牙槽骨高度一致,用5-0丝线紧密缝合黏膜,确认止血^[14]。

1.2.4 术后邻牙正畸加力 植骨术后8周,大鼠腹腔注射10%水合氯醛。麻醉后,用慢速手机在大鼠上颌两中切牙的唇舌面及远中面牙颈部磨出一深约0.5 mm的槽沟。使用直径0.2 mm的结扎丝,将镍钛拉簧固定于大鼠切牙和右侧上颌第二磨牙之间。以上颌切牙作为支抗牙,使用流体树脂光固化粘结固定,用100 g的正畸轻力将上颌右侧第二磨牙向植骨区移动^[15],左侧不作处理,作为对照组。

1.2.5 H-E染色 植骨术后8周,腹腔注射过量10%水合氯醛处死3只大鼠,剥离上颌骨组织,辅以

生理盐水冲洗降温,用慢速手机截取小块牙槽骨组织,包括移植组织和邻近磨牙,浸入 4%多聚甲醛(PFA)中固定。24 h 后浸入 12.5%乙二胺四乙酸(EDTA)中脱钙处理,每 2 d 更换一次新鲜 EDTA 溶液,直至探针刺入骨组织无阻力感,石蜡包埋。沿矢状向将标本切片为 5 μm 厚,行 H-E 染色。

1.2.6 实时荧光定量 PCR(RT-PCR) 9 只大鼠分为 3 组,每组 3 只,分别在正畸加力 1、3、7 d 后,以过量 10%水合氯醛腹腔注射麻醉处死。在生理盐水冲洗降温下,用慢速手机截取双侧牙槽骨块,包括移植组织和邻近磨牙且体积一致。组织块尽快浸入装有 Trizol 的 EP 管中,放入 -80°C 液氮中保存,以防组织块中的 RNA 分解^[16]。用组织匀浆机打碎骨组织块,使用 RNA 试剂盒(Qiagen,德国)提取 RNA,以用分光光度仪检测 RNA 纯度及浓度, -80°C 保存备用。PrimeScript RT 试剂盒(Takara,日本)反转录为 cDNA 后,进行实时荧光定量 PCR 检测,检测基因包括 Runx2、OCN 和 VEGF。细胞骨架蛋白 β -actin 用作 mRNA 的参照因子。所有引物序列由 Pubmed 查得,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成检验。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件包对数据进行两样本均数 t 检验, $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 大体观察

大鼠健康状况良好,植骨术后 7 d,口内软组织完全愈合,未见移植组织暴露,无炎症表现。术后 8 周,植骨区坚实。

2.2 H-E 染色结果

H-E 染色可见少量破骨细胞,骨组织较为成熟,骨细胞排列较为整齐,骨改建基本停止(图 1)。

2.3 RT-PCR 结果

提取 RNA 的 A260/280 均在 1.8~2.0 之间,符合纯度要求。Runx2、OCN 和 VEGF 在实验组和对照组的表达均有显著差异,3 种因子在早、中、晚期 3 个阶段的表达水平见图 2。

早期 Runx2 表达在实验组和对照组无显著差异($P>0.05$),到中期实验组显著上升;而到了晚期,对照组上升,实验组下降明显($P<0.05$)。OCN 早期实验组高于对照组约 2 倍,中期 2 组均无明显变化,到晚期对照组依旧没有显著变化,而实验组大幅度

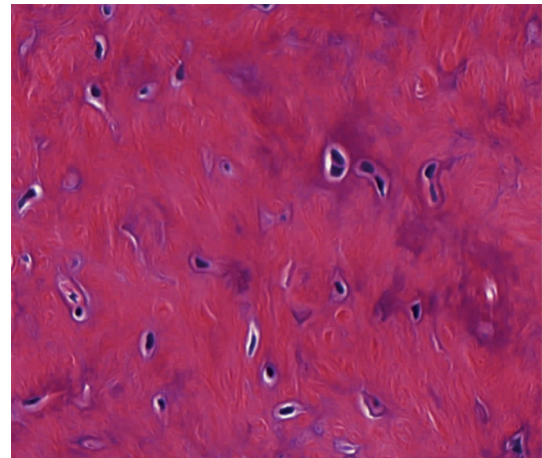


图 1.植骨术后 8 周植骨区骨组织

Figure 1. Bone tissue in alveolar cleft area 8 weeks after bone grafting

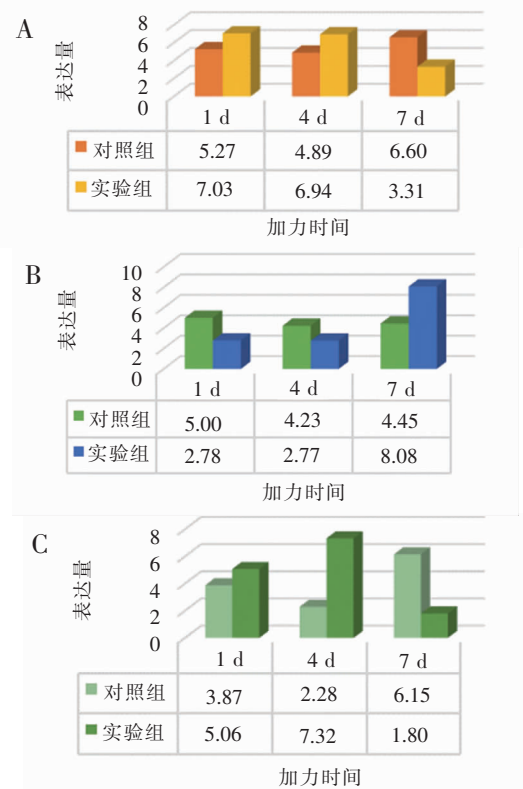


图 2. VEGF(A)、OCN(B)及 Runx2(C)的表达

Figure 2. Expression of VEGF (A), OCN (B) and Runx2 (C)

上升($P<0.05$)。VEGF 在早、中、晚期对照组无显著变化,而实验组早期显著高于对照组($P<0.05$),之后逐渐降低。

3 讨论

我们前期的研究表明:①使用骨蜡填塞裂隙区,可以成功建立模拟牙槽突裂的大鼠模型,并显著提高模型的稳定性;②植骨术后 8 周,牙移动对植骨区的功能性刺激可以显著抑制植骨区骨吸收;③正畸

牙移入可以促进植入骨的骨重建,诱导破骨和成骨过程^[17]。提示在成骨稳定的情况下进行邻牙移入,可以很好地模拟临床上牙槽突裂患者行植骨术后、正畸力移动牙的实际情况,为研究正畸力刺激是否促进骨改建提供依据。本实验植骨术后大鼠伤口愈合良好,术区骨面坚实,大体观察和切片观察均显示成骨良好,表明针对缺损的形态,应用3D打印技术制作组织工程支架并与干细胞共培养,可以成功代替自体骨,以修复牙槽突裂。

Runx2是成骨相关的特异转录因子,决定了BMSCs向成骨细胞的分化,并且促进软骨细胞的成熟和软骨血管化,对骨组织的形成和重建起着重要作用^[18]。实验组在施力早期与对照组无显著差异,中期实验组表达量上升,约为对照组的3倍,施力末期对照组表达量有所上升而实验组表达量显著下降,显示在正畸力的刺激下,植骨区干细胞向成骨细胞等成熟细胞系的分化显著快于未施力组。OCN是成骨细胞合成和分泌的一种高度特异性成骨分化蛋白,是构成成骨基质的成分之一,也是骨组织中最丰富的非胶原蛋白,与羟基磷灰石晶体的形态相关。OCN的表达是成骨细胞分化成熟进入矿化期的主要指征之一,被认为是成骨细胞分化成熟的晚期标志。本实验结果显示,施力早、中期2组无显著差异,而到晚期,实验组显著高于对照组,提示在晚期,实验组成骨细胞的成熟度高于对照组且矿化程度高。VEGF是最有效的促血管生长因子,是血细胞表型的重要标志物,其促进成骨的机制为刺激血管形成,随着血管进入骨髓区域,为骨缺损区输送大量生长因子和成骨细胞的始祖细胞。同时,VEGF还能直接作用于种子干细胞或骨细胞,促进新骨形成^[19]。本实验结果显示,实验组在早、中期VEGF表达量较对照组高,但晚期对照组显著高于实验组,提示在正畸力的刺激下,成骨管作用可能提早发生,更早地促进新骨生成。

综上所述,对于唇腭裂患者而言,植骨术后的功能刺激可以促进骨改建,使患者尽早恢复完整的牙槽突并行使正常生理功能。3D打印作为新兴热门技术,具有精准的形态重塑和微观可调控的材料性能,在未来牙槽突裂修复中有着良好前景,值得深入研究。

利益冲突声明:无。

[参考文献]

[1] Cho-Lee GY, García-Díez EM, Nunes RA, et al. Review of

secondary alveolar cleft repair [J]. *Ann Maxillofac Surg*, 2013, 3(1): 46–50.

- [2] Bergland O, Semb G, Abyholm FE. Elimination of the residual alveolar clefts by secondary bone grafting and subsequent orthodontic treatment [J]. *Cleft Palate J*, 1986, 23(3): 175–205.
- [3] Erverdi N, Usumez S, Solak A, et al. Noncompliance open-bite treatment with zygomatic anchorage [J]. *Angle Orthod*, 2007, 77(6): 986–990.
- [4] Umemori M, Sugawara J, Mitani H, et al. Skeletal anchorage system for open-bite correction [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 1999, 115(2): 166–174.
- [5] Kuroda S, Katayama A, Takano-Yamamoto T. Severe anterior open-bite case treated using titanium screw anchorage [J]. *Angle Orthod*, 2004, 74(4): 558–567.
- [6] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering [J]. *Science*, 1993, 260(5110): 920–926.
- [7] Vorys GC, Bai H, Chandhanayingyong C, et al. Optimal internal fixation of anatomically shaped synthetic bone grafts for massive segmental defects of long bones [J]. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 2015, 30(10): 1114–1118.
- [8] Vo TN, Ekenseair AK, Spicer PP, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of self-mineralization and biocompatibility of injectable, dual-gelling hydrogels for bone tissue engineering [J]. *J Control Release*, 2015, 205(1): 25–34.
- [9] Huang J, Tian B, Chu F, et al. Rapid maxillary expansion in alveolar cleft repaired with a tissue-engineered bone in a canine model [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2015, 48(1): 86–99.
- [10] Lee KW, Wang S, Lu L, et al. Fabrication and characterization of poly(propylene fumarate) scaffolds with controlled pore structures using 3-dimensional printing and injection molding [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(10): 2801–2811.
- [11] Pradel W, Lauer G. Tissue-engineered bone grafts for osteoplasty in patients with cleft alveolus [J]. *Ann Anat*, 2012, 194(6): 545–548.
- [12] 许悦, 陈振琦, 吴军, 等. 唇腭裂合并的单侧牙槽突裂大鼠模型的建立和稳定性研究 [J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2010, 30(9): 1111–1114.
- [13] Kawamoto T, Motohashi N, Kitamura A, et al. A histological study on experimental tooth movement into bone induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in beagle dogs [J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2002, 39(4): 439–448.
- [14] 李壬娟, 许悦, 陈振琦, 等. 不同时机牙移动对SD大鼠牙槽突裂植骨区骨改建的影响 [J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2012, 10(2): 96–100.
- [15] 孙健, 陈振琦. 正畸牙移入对牙槽突裂植骨区骨改建的生物学影响[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2014, 12(2): 116–120.
- [16] Mason DJ, Hillam RA, Skerry TM. Constitutive *in vivo* mRNA expression by osteocytes of beta-actin, osteocalcin, connexin-43, IGF-I, c-fos and c-jun, but not TNF-alpha nor tartrate-resistant acid phosphatase [J]. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(3): 350–357.
- [17] Sun J, Xu Y, Chen Z. Establishment of a rat model for alveolar cleft with bone wax [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2015, 73(4): 733.e1–10.
- [18] Chen FM, Sun HH, Lu H, et al. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(27): 6320–6344.
- [19] Anderson EM, Kwee BJ, Lewin SA, et al. Local delivery of VEGF and SDF enhances endothelial progenitor cell recruitment and resultant recovery from ischemia [J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(7–8): 1217–1227.