

DOI:10.16781/j.0258-879x.2021.05.0519

· 论 著 ·

高压氧联合碱性成纤维细胞生长因子对煅烧牛骨修复大鼠骨缺损的作用及其与骨保护素、CD34表达的关系

陈铁楼^{1*}, 张新海^{1*}, 王世锋², 许兵³, 陈骏¹, 马丽婷¹, 方以群², 刘进¹

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院全军口腔中心牙周科, 上海 200081
2. 海军军医大学(第二军医大学)海军特色医学中心潜水与高压医学研究室, 上海 200433
3. 同济大学化学科学与工程学院普通化学教研室, 上海 200092

[摘要] **目的** 研究高压氧(HBO)联合碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对天然煅烧牛骨(CBB)修复骨缺损的作用,并初步探讨该作用与骨保护素(OPG)、CD34表达变化的关系。**方法** 32只SD大鼠随机分为两组,一组接受HBO治疗(HBO组, $n=16$),另一组不接受HBO治疗(NHBO组, $n=16$)。在大鼠左右侧顶骨处制作骨缺损,一侧移植CBB(CBB组)或CBB联合bFGF(CBBbF组),另一侧不移植作为对照(Con组)。HBO组接受2周HBO暴露,在术后4、8、12周时分别处死大鼠,通过影像学及组织学观察大鼠的骨缺损愈合情况,通过免疫组织化学染色观察骨缺损修复组织中OPG和CD34的表达情况。**结果** 术后12周时,HBO-CBB组和HBO-CBBbF组、NHBO-CBB组和NHBO-CBBbF组大鼠骨缺损区骨密度(BD)分别大于HBO-Con组和NHBO-Con组,HBO-CBBbF组BD大于其他各组(P 均 <0.01)。术后12周时,HBO-CBB组和HBO-CBBbF组、NHBO-CBB组和NHBO-CBBbF组新骨形成面积百分比分别大于HBO-Con组和NHBO-Con组(P 均 <0.01),血管数量分别多于HBO-Con组和NHBO-Con组。术后各时间点HBO-CBBbF组、HBO-CBB组和NHBO-CBBbF组血管数量均多于NHBO-CBB组。术后各时间点HBO-CBBbF组、HBO-CBB组和NHBO-CBBbF组OPG和CD34表达水平较NHBO-CBB组、HBO-Con组和NHBO-Con组升高($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** CBB对骨缺损修复有促进作用,bFGF可增加骨缺损修复中骨再生和血管数量,HBO对bFGF联合CBB修复骨缺损有协同作用,其机制与促进OPG和CD34表达有关。

[关键词] 高压氧;煅烧牛骨;碱性成纤维细胞生长因子;骨再生;CD34抗原;骨保护素

[中图分类号] R 651.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2021)05-0519-08

Effect of hyperbaric oxygen combined with basic fibroblast growth factor on bone defect repair with calcined bovine bone in rats and its relationship with the expression of osteoprotegerin and CD34

CHEN Tie-lou^{1*}, ZHANG Xin-hai^{1*}, WANG Shi-feng², XU Bing³, CHEN Jun¹, MA Li-ting¹, FANG Yi-qun², LIU Jin¹

1. Department of Periodontal, Oral Center of PLA, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200081, China
2. Department of Diving and Hyperbaric Medical Research, Naval Special Medical Center, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
3. Department of General Chemistry, School of Chemical Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) combined with basic fibroblast growth factor (bFGF) on bone defect repair with natural calcined bovine bone (CBB), and to explore its relationship with the expression of osteoprotegerin (OPG) and CD34. **Methods** A total of 32 SD rats were randomly divided into two groups: HBO and non-HBO (NHBO) groups ($n=16$ in each group). Bone defects were made on the left and right sides of the top of the skull. CBB (CBB group) or CBB combined with bFGF (CBBbF group) were implanted on one side and non-implanted on the other side (control [Con] group). HBO group received HBO exposure for 2 weeks, and the rats were sacrificed at 4, 8 and 12 weeks after operation. The healing of bone defect was observed by radiographic and histological observation, and the expression of OPG and CD34 was evaluated by immunohistochemistry. **Results** The bone densities (BDs) of bone

[收稿日期] 2020-06-27 **[接受日期]** 2020-09-27

[基金项目] 解放军总后勤部面上项目(CHJ13J035),上海市卫生和计划生育委员会科研课题(20134418). Supported by General Program of Logistics Department of PLA (CHJ13J035) and Scientific Research Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (20134418).

[作者简介] 陈铁楼, 硕士, 教授, 主任医师, 博士生导师.

*通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-81867179, E-mail: chentielou2010@163.com; Tel: 021-81867171, E-mail: uc Zhang01@163.com

defect areas of the rats were significantly higher in the HBO-CBB, HBO-CBBbF, NHBO-CBB and NHBO-CBBbF groups than in the HBO-Con and NHBO-Con groups at 12 weeks after operation, and the HBO-CBBbF group has the highest BD (all $P < 0.01$). The percentages of new bone formation areas were significantly higher in the HBO-CBB, HBO-CBBbF, NHBO-CBB and NHBO-CBBbF groups than in the HBO-Con and NHBO-Con groups (all $P < 0.01$), and the blood vessel numbers were significantly larger in the HBO-CBBbF, HBO-CBB, NHBO-CBB and NHBO-CBBbF groups than in the HBO-Con and NHBO-Con groups at 12 weeks after operation. The blood vessel numbers were significantly larger in the HBO-CBBbF, HBO-CBB and NHBO-CBBbF groups than in the NHBO-CBB group at each time point after operation. The expression of OPG and CD34 was significantly higher in the HBO-CBBbF, HBO-CBB and NHBO-CBBbF groups than in the NHBO-CBB, HBO-Con and NHBO-Con groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** CBB can promote bone defect repair and bFGF can increase bone regeneration and blood vessel number. HBO has synergistic effect on bFGF combined with CBB in repairing bone defects, and the effect is closely related to the promotion of OPG and CD34 expression.

[**Key words**] hyperbaric oxygenation; calcined bovine bone; basic fibroblast growth factor; bone regeneration; CD34 antigen; osteoprotegerin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(5): 519-526]

骨缺损是常见临床病症,颌面部骨缺损直接影响咀嚼功能和美观。骨移植是修复骨缺损的重要方法,自体骨取材受限,异种骨移植材料因来源广而备受青睐。天然煅烧牛骨(calcined bovine bone, CBB)是从牛骨中提取的具有骨引导性的物质,其多孔结构为新骨长入提供了支架,是骨缺损修复的良好材料,研究发现国产CBB修复材料对骨缺损修复有一定作用^[1]。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)可诱导多种细胞增殖与分化,对骨再生和骨缺损修复有促进作用^[2]。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)可改善牙龈微循环,抑制实验性牙周炎症因子产生,促进骨再生^[3]。骨保护素(osteoprotegerin, OPG)可抑制NF- κ B受体活化因子配体的激活,刺激破骨细胞分化;成骨细胞还可通过分泌OPG抑制破骨细胞的产生,在骨改建中起促进作用^[4]。有研究用粒细胞集落刺激因子动员从外周血单核细胞中分离的CD34⁺细胞治疗严重肢体缺血患者,结果显示出良好的疗效,提示CD34参与了缺血组织的愈合^[5]。本研究观察了HBO联合bFGF对CBB修复骨缺损的作用,并初步探讨其与OPG、CD34表达变化的关系。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器 CBB(商品名:骼瑞;陕西瑞盛生物科技有限公司,生产批号:161202), bFGF(珠海亿胜生物制药有限公司,生产批号:20161208),医用胶原蛋白海绵(无锡贝迪生物工程股份有限公司,生产批号:20171217)。便携式

高速涡轮牙钻机(上海品瑞医疗器械设备有限公司),i-CAT 17-19型CT检测系统(美国KaVo公司),Olympus IX 70型荧光显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。OPG抗体、CD34抗体(武汉博士德生物工程有限公司),GTVisionTM II型免疫组织化学染色试剂盒(广州深达生物制品技术有限公司),DAB显色液[基因科技(上海)股份有限公司],EM UV-6型超薄切片机(德国Leica公司)。

1.2 动物选择与分组 SD大鼠32只[上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016],体重为250~300 g,分笼喂养,自由饮水和摄取饲料。动物随机分为两组:一组接受HBO治疗(HBO组, $n=16$),另一组不接受HBO治疗(NHBO组, $n=16$)。每组根据移植材料不同分为CBB组($n=8$)、CBB联合bFGF组(CBBbF组, $n=8$),设置未移植的自身对照组(Con组, $n=16$)。本课题动物实验通过海军军医大学(第二军医大学)长海医院动物伦理委员会审批。

1.3 颅骨缺损造模、修复与HBO治疗 SD大鼠用3%戊巴比妥钠按1 mL/kg剂量于耳缘静脉注射麻醉,消毒后在顶骨处切开皮肤和肌肉,暴露颅骨,在距离颅骨分界线左右两侧1~2 mm处用便携式高速涡轮牙钻机在滴水降温下切割全层颅骨,形成2个直径为6 mm的圆形双皮质骨缺损(勿损伤脑膜)。一侧骨缺损处移植CBB或移植CBB后覆盖载bFGF胶原蛋白海绵(在6 mm \times 25 mm \times 2 mm胶原蛋白海绵上滴加4 375 U/mL的bFGF 300 μ L,胶原蛋白海绵含bFGF 1 312 U);另一侧骨缺损不移植,用4-0丝线缝合伤口。术后每只动物每天肌内

注射 80 万 U 青霉素, 连续 5 d。HBO 组行 HBO 暴露 2 周 (0.25 MPa, 每次 1 h, 每周 5 次)。

1.4 锥形束 CT 检测大鼠骨缺损区骨密度 (bone density, BD) HBO-CBB、HBO-CBBbF、NHBO-CBB 和 NHBO-CBBbF 组在术后 4 周、8 周时各处死 2 只大鼠, 在术后 12 周时处死剩余 4 只大鼠; HBO-Con、NHBO-Con 组在术后 4 周、8 周时各处死 4 只大鼠, 在术后 12 周时处死剩余 8 只大鼠。取大鼠颅骨标本, 对骨缺损区标本进行锥形束 CT 扫描, 将图像录入计算机, 对手术部位骨缺损区的扫描图像各测定 5 个区域 CT 值, 用以代表 BD, 求 BD 平均值^[6]。

1.5 组织学观察 处死大鼠后取实验部位颅骨标本行锥形束 CT 扫描后, 用 4% 多聚甲醛溶液固定 72 h, 10% EDTA 脱钙 2 个月, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 5 μm 厚度切片, 行 H-E 染色。用 HPILAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统对 H-E 染色切片进行观察, 由同一位观察者对每张切片原缺损区随机选取 3 个 100 倍视野, 测定新骨形成面积。按公式计算, 新骨形成面积百分比 (%) = (新骨形成面积 / 测定区域面积) × 100%^[6]。

1.6 大鼠骨缺损修复组织中 OPG 和 CD34 表达的测定 按 GTVision™ II 型免疫组织化学染色试剂

盒说明书检测大鼠骨缺损修复组织中 OPG 和 CD34 的表达情况, 每个标本取连续的 3 张切片, 所有切片均在同一染色条件下完成。染色呈黄色为阳性, 比较各组染色阳性部位和强度差异。在显微镜 (200×) 下用图像分析系统 (Vectra 多色荧光系统, 美国 Perkin Elmer 公司) 测量阳性染色的光密度值, 每张切片选择 10 个染色阳性视野测定 OPG 和 CD34 含量, 计算其平均值。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用单因素方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠骨缺损区 BD 比较 术后 4、8 和 12 周时 HBO-CBB 组和 HBO-CBBbF 组大鼠骨缺损区 BD 均大于 HBO-Con 组 (P 均 < 0.01), NHBO-CBB 组和 NHBO-CBBbF 组均大于 NHBO-Con 组 (P 均 < 0.01); HBO-CBBbF 组大鼠骨缺损区 BD 大于 HBO-CBB 组、NHBO-CBB 组和 NHBO-CBBbF 组 (P 均 < 0.01); NHBO-CBBbF 组大鼠骨缺损区 BD 大于 NHBO-CBB 组 (P 均 < 0.01)。见表 1。

表 1 术后 4、8、12 周时各组大鼠骨缺损区 BD 比较

Tab 1 Comparison of BDs in bone defect areas of rats in each group at 4, 8 and 12 weeks after operation

Group	4 weeks		8 weeks		12 weeks	
	<i>n</i>	CT value	<i>n</i>	CT value	<i>n</i>	CT value
HBO-Con	20	8.95 ± 1.50	20	135.34 ± 7.43	40	213.63 ± 7.23
HBO-CBB	10	188.65 ± 7.21**	10	495.22 ± 3.66**	20	899.21 ± 7.81**
HBO-CBBbF	10	265.22 ± 9.13**△△▲▲	10	881.64 ± 9.55**△△▲▲	20	1 521.51 ± 3.19**△△▲▲
NHBO-Con	20	0.00 ± 0.00	20	37.65 ± 2.88	40	95.23 ± 5.17
NHBO-CBB	10	120.32 ± 3.56**▲▲	10	359.54 ± 3.90**▲▲	20	498.23 ± 4.12**▲▲
NHBO-CBBbF	10	197.25 ± 5.44**	10	488.34 ± 5.34**	20	815.48 ± 5.67**

** $P < 0.01$ vs HBO-Con group or NHBO-Con group; △△ $P < 0.01$ vs HBO-CBB group or NHBO-CBB group; ▲▲ $P < 0.01$ vs NHBO-CBBbF group. BD: Bone density; CT: Computed tomography; HBO: Hyperbaric oxygen; Con: Control; CBB: Calcined bovine bone; CBBbF: CBB combined with basic fibroblast growth factor; NHBO: Non-hyperbaric oxygen.

2.2 各组大鼠骨缺损愈合和新骨形成情况 H-E 染色结果 (图 1) 显示, 术后 4 周时, HBO-CBB 组、HBO-CBBbF 组、NHBO-CBBbF 组有少许新生骨, 成骨细胞较多, 血管形成明显增多; NHBO-CBB 组新骨形成和血管形成较少。术后 8 周时, HBO-CBB 组、HBO-CBBbF 组、NHBO-CBBbF 组新骨形成和血管数量多于 NHBO-CBB 组, HBO-Con 组和 NHBO-Con 组血管数量较少。术后 12 周时,

HBO-CBB 组、HBO-CBBbF 组和 NHBO-CBBbF 组新骨形成较多, 残留移植物体积减小; HBO-CBBbF 组新骨形成最多, 残留物量最少; NHBO-CBB 组虽有新骨形成, 但结构紊乱; HBO-Con 组和 NHBO-Con 组新骨形成较少; HBO-CBB 组和 HBO-CBBbF 组炎症细胞数量少于其他组; HBO-CBBbF 组和 NHBO-CBBbF 组血管数量多于 HBO-Con 组和 NHBO-Con 组。

由表2可见,术后12周时,HBO-CBB组和HBO-CBBbF组的新骨形成面积百分比均大于HBO-Con组(P 均 <0.01),NHBO-CBB组和NHBO-CBBbF组的新骨形成面积百分比均大

于NHBO-Con组(P 均 <0.01);HBO-CBB组、HBO-CBBbF组和NHBO-CBBbF组新骨形成面积百分比均大于NHBO-CBB组(P 均 <0.01)。

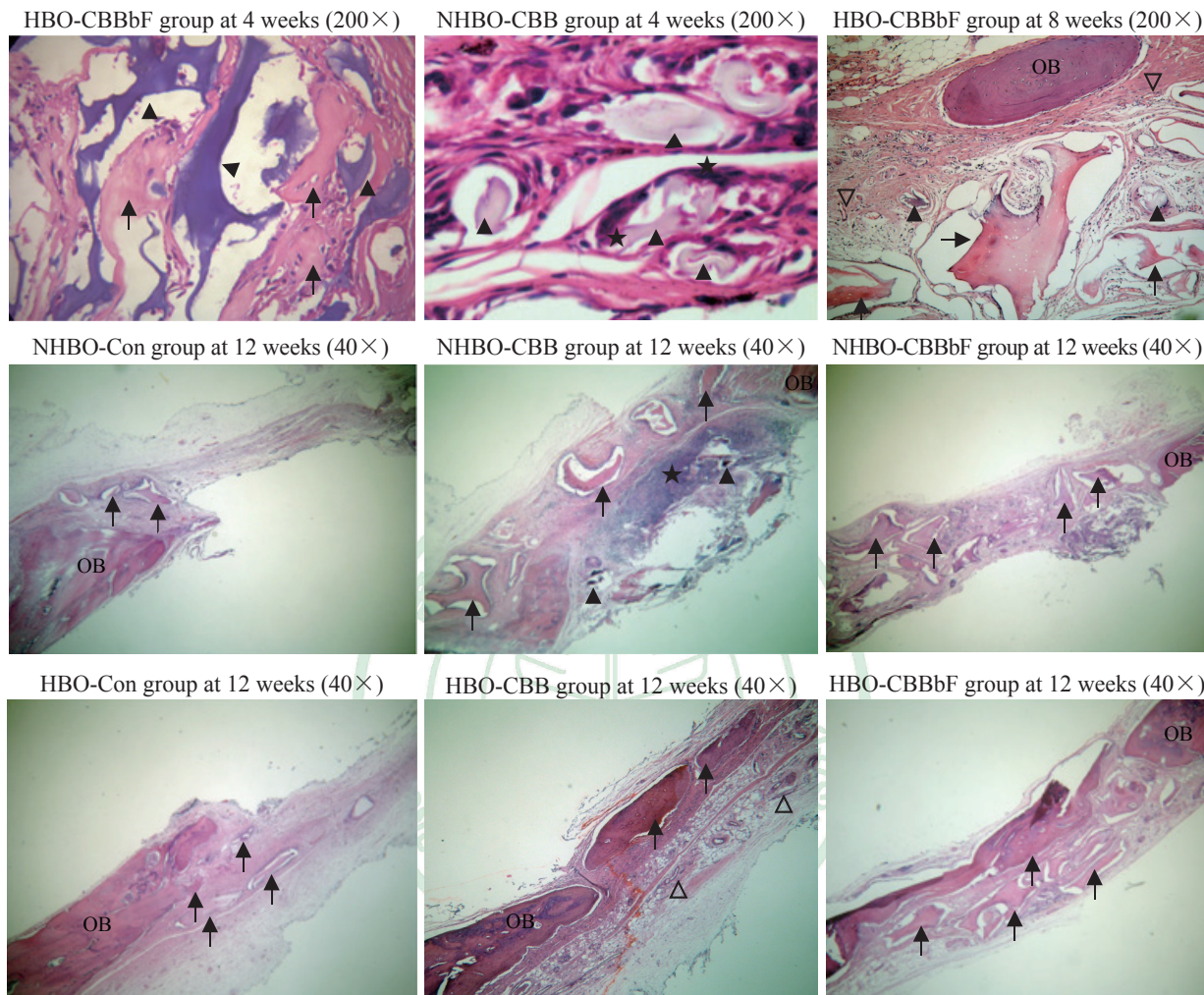


图1 术后大鼠骨缺损修复组织H-E染色光镜观察

Fig 1 H-E staining photomicrographs of bone defect repair tissues of rats after operation

H-E: Hematoxylin-eosin; HBO: Hyperbaric oxygen; CBBbF: CBB combined with basic fibroblast growth factor; NHBO: Non-hyperbaric oxygen; CBB: Calcined bovine bone; Con: Control; OB: Old bone; ▲: Graft; ↑: New bone; ★: Inflammatory cell; ▽: Blood vessel.

表2 术后4、8、12周时各组大鼠新骨形成面积百分比比较

Tab 2 Comparison of the percentages of new bone formation areas of rats in each group at 4, 8 and 12 weeks after operation

Group	n	4 weeks		8 weeks		12 weeks	
		n	New bone formation area	n	New bone formation area	n	New bone formation area
HBO-Con	12	0.00±0.00	12	10.56±4.20	24	14.66±3.53	
HBO-CBB	6	15.18±4.41**	6	46.48±4.36**△△	12	61.32±4.71**△△	
HBO-CBBbF	6	22.16±4.37**△▲	6	65.81±5.66**△△▲▲	12	78.25±2.39**△△▲▲	
NHBO-Con	12	0.00±0.00	12	6.10±3.18	24	8.25±4.33	
NHBO-CBB	6	10.43±3.21**	6	30.35±4.39**	12	41.98±4.25**	
NHBO-CBBbF	6	14.72±4.15**	6	41.84±4.61**△△	12	60.15±3.57**△△	

** $P<0.01$ vs HBO-Con group or NHBO-Con group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs NHBO-CBB group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs NHBO-CBBbF group. HBO: Hyperbaric oxygen; Con: Control; CBB: Calcined bovine bone; CBBbF: CBB combined with basic fibroblast growth factor; NHBO: Non-hyperbaric oxygen.

2.3 各组大鼠骨缺损修复组织中 OPG 和 CD34 表达的特点及水平 免疫组织化学染色结果 (图 2、3) 显示, 在术后 4、8、12 周时, HBO-CBB 组、HBO-CBBbF 组和 NHBO-CBBbF 组大鼠骨缺损修复组织中 OPG 和 CD34 的表达较 NHBO-CBB 组、HBO-Con 组和 NHBO-Con 组增高。术后 12 周时 HBO-CBB 组、HBO-CBBbF 组、NHBO-CBB 组

和 NHBO-CBBbF 组大鼠骨缺损修复组织中 OPG 和 CD34 表达较术后 8 周降低。血管组织 CD34 表达呈强阳性, 新骨和骨髓 CD34 和 OPG 表达呈阳性, 成熟新骨 CD34、OPG 表达呈弱阳性, 陈旧骨 CD34、OPG 表达呈弱阳性或阴性, 移植材料周围 OPG 染色呈阳性。

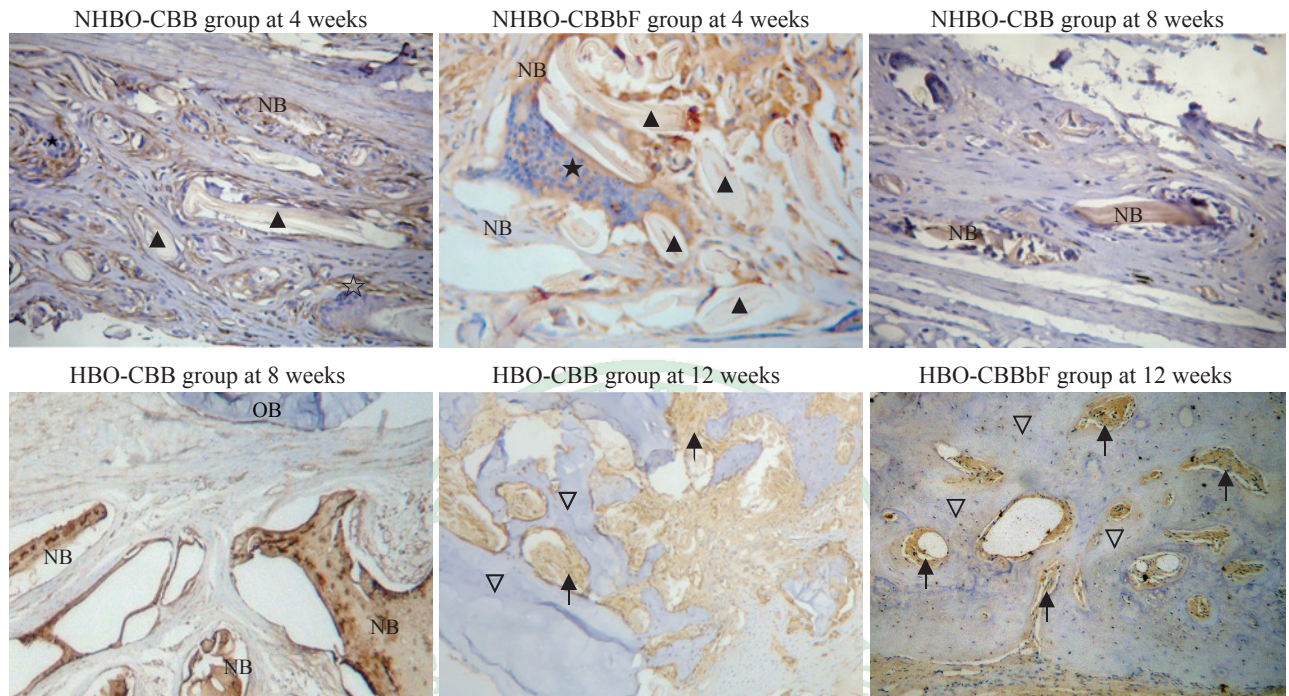


图 2 免疫组织化学染色检测术后大鼠骨缺损修复组织中 OPG 的表达 (200×)

Fig 2 OPG expression in bone defect repair tissues of rats after operation detected by immunohistochemical staining (200×)

OPG: Osteoprotegerin; NHBO: Non-hyperbaric oxygen; CBB: Calcined bovine bone; CBBbF: CBB combined with basic fibroblast growth factor; HBO: Hyperbaric oxygen; NB: New bone; OB: Old bone. ▲: Graft; ★: Inflammatory cell; ∇: Mature new bone; ↑: Bone marrow.

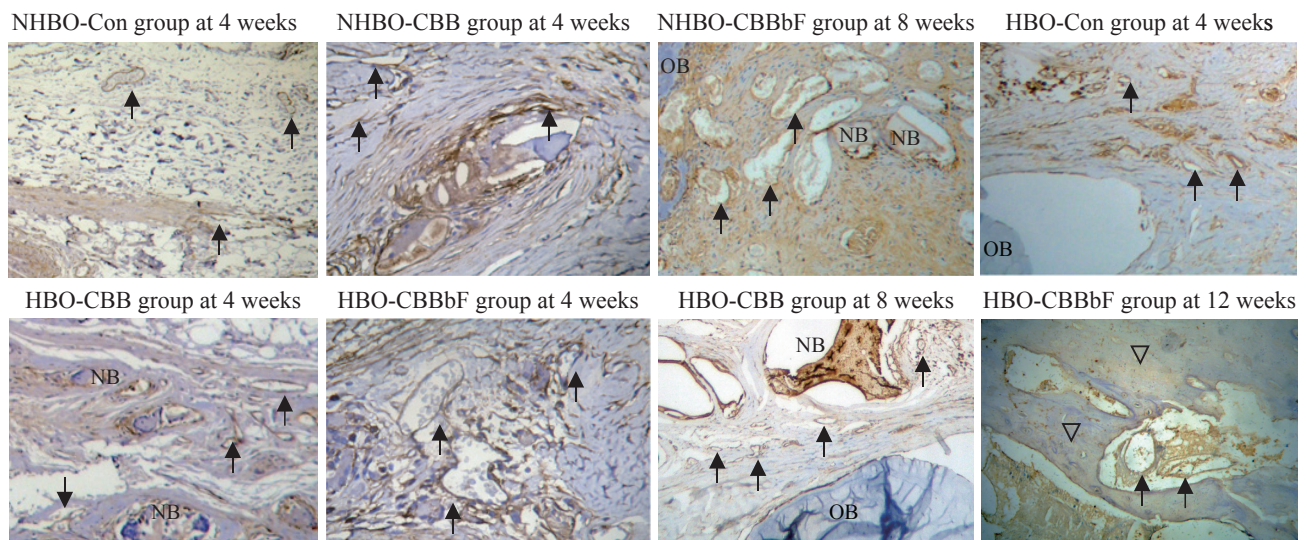


图 3 免疫组织化学染色检测术后大鼠骨缺损修复组织中 CD34 的表达 (200×)

Fig 3 CD34 expression in bone defect repair tissues of rats after operation detected by immunohistochemical staining (200×)

NHBO: Non-hyperbaric oxygen; Con: Control; CBB: Calcined bovine bone; CBBbF: CBB combined with basic fibroblast growth factor; HBO: Hyperbaric oxygen; OB: Old bone; NB: New bone. ↑: Blood vessel; ∇: Mature new bone.

用光密度值反映大鼠骨缺损修复组织中 OPG、CD34 的表达水平发现, 术后 4、8、12 周时, HBO-CBB 组和 HBO-CBBbF 组大鼠骨缺损修复组织中 OPG 和 CD34 的表达水平均较 HBO-Con 组升高 (P 均 <0.01), HBO-CBBbF 组大鼠骨缺损修复组织中 OPG 和 CD34 的表达水平均较 HBO-

CBB 组、NHBO-CBB 组和 NHBO-CBBbF 组升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), NHBO-CBB 组和 NHBO-CBBbF 组大鼠骨缺损修复组织中 OPG、CD34 的表达水平均较 NHBO-Con 组升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 术后 8 周时各组大鼠骨缺损修复组织中 OPG 和 CD34 表达水平高于术后 4 周和术后 12 周时。见表 3、表 4。

表 3 术后 4、8、12 周时各组大鼠骨缺损修复组织中 OPG 光密度值比较

Tab 3 Comparison of absorbance values of OPG in bone defect repair tissues of rats in each group at 4, 8 and 12 weeks after operation

Group	4 weeks		8 weeks		12 weeks	
	<i>n</i>	Absorbance value	<i>n</i>	Absorbance value	<i>n</i>	Absorbance value
HBO-Con	120	0.24 ± 0.07	120	0.41 ± 0.12	240	0.26 ± 0.10
HBO-CBB	60	0.35 ± 0.05**	60	0.57 ± 0.15**	120	0.38 ± 0.13**
HBO-CBBbF	60	0.45 ± 0.10**△△▲	60	0.78 ± 0.10**△△▲	120	0.52 ± 0.07**△△▲
NHBO-Con	120	0.15 ± 0.04	120	0.31 ± 0.08	240	0.19 ± 0.10
NHBO-CBB	60	0.28 ± 0.12**	60	0.45 ± 0.10**	120	0.30 ± 0.10**
NHBO-CBBbF	60	0.34 ± 0.10**	60	0.55 ± 0.11**	120	0.36 ± 0.13**

** $P < 0.01$ vs HBO-Con group or NHBO-Con group; △△ $P < 0.01$ vs HBO-CBB group or NHBO-CBB group; ▲ $P < 0.01$ vs NHBO-CBBbF group. OPG: Osteoprotegerin; HBO: Hyperbaric oxygen; Con: Control; CBB: Calcined bovine bone; CBBbF: CBB combined with basic fibroblast growth factor; NHBO: Non-hyperbaric oxygen.

表 4 术后 4、8、12 周时各组大鼠骨缺损修复组织中 CD34 光密度值比较

Tab 4 Comparison of absorbance values of CD34 in bone defect repair tissues of rats in each group at 4, 8 and 12 weeks after operation

Group	4 weeks		8 weeks		12 weeks	
	<i>n</i>	Absorbance value	<i>n</i>	Absorbance value	<i>n</i>	Absorbance value
HBO-Con	120	0.20 ± 0.04	120	0.39 ± 0.05	240	0.27 ± 0.06
HBO-CBB	60	0.30 ± 0.10**	60	0.53 ± 0.12**	120	0.39 ± 0.10**
HBO-CBBbF	60	0.39 ± 0.12**△△▲	60	0.80 ± 0.15**△△▲	120	0.51 ± 0.12**△△▲
NHBO-Con	120	0.15 ± 0.06	120	0.33 ± 0.05	240	0.22 ± 0.04
NHBO-CBB	60	0.22 ± 0.05*	60	0.43 ± 0.10**	120	0.32 ± 0.10**
NHBO-CBBbF	60	0.29 ± 0.05**	60	0.55 ± 0.10**	120	0.44 ± 0.13**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HBO-Con group or NHBO-Con group; △△ $P < 0.01$ vs HBO-CBB group or NHBO-CBB group; ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ vs NHBO-CBBbF group. HBO: Hyperbaric oxygen; Con: Control; CBB: Calcined bovine bone; CBBbF: CBB combined with basic fibroblast growth factor; NHBO: Non-hyperbaric oxygen.

3 讨论

据报道, 美国每年有 600 例骨折患者, 其中 5% 因骨折愈合欠佳而残疾^[7], 因此探讨骨缺损修复方法有着重要意义。我们既往研究发现, 异种骨移植 Bio-Oss 骨粉和 Bio-Gide 膜联合可促进骨再生, 对牙周骨缺损修复有良好效果^[8]。有研究显示 CBB (骼瑞骨粉) 有良好骨传导性, 可引导新骨形成, 促进骨缺损愈合, 对颅骨和牙槽骨缺损修复有一定作用^[1,9]; CBB 对拔牙后颌骨缺损修复效果达

93% 以上, 在 24 周时能有效保持拔牙后牙槽骨宽度和高度, 其作用与 Bio-Oss 骨移植材料相似^[1]。富血小板纤维蛋白 (platelet rich fibrin, PRF) 可分泌 bFGF 等多种生长因子诱导新骨形成, CBB 联合 PRF 对兔颅骨缺损修复有明显疗效^[6]。

CBB 骨粉是天然牛骨经专利技术脱脂、脱蛋白、低温煅烧制成, 主要成分为羟基磷灰石结晶, 具有天然骨小梁及管腔系统, 保留了天然骨多孔结构, 其较大内表面积适宜细胞因子复合和细胞长入, 生物相容性好。本研究发现, NHBO-CBBbF

组和NHBO-CBB组在术后4、8和12周时BD和新骨形成面积百分比均大于对照组(NHBO-Con组),表明CBB作为支架材料有利于细胞成骨;NHBO-CBB组在12周时骨缺损处有新骨形成,表明CBB用于6 mm颅骨缺损有较好疗效。

胶原具有多孔结构,可在体内降解,提高细胞渗透性,利用胶原作为载体可使bFGF维持于骨缺损处缓慢释放,发挥生物学作用。Nakamura等^[2]发现,bFGF联合胶原支架可促进大鼠水平骨缺损修复和骨再生。我们前期研究结果显示bFGF对大鼠牙周骨缺损修复有显著疗效^[10]。本研究用医用胶原作为bFGF载体观察到NHBO-CBBbF组大鼠在术后4、8和12周时骨缺失区的BD大于NHBO-CBB组,新骨形成面积百分比在术后8周和12周时大于NHBO-CBB组,表明用胶原海绵作为bFGF载体可促进CBB修复骨缺损的疗效。bFGF作用的发挥与其激活下游信号、促进血管再生、增加成骨细胞增殖和分化等有关^[11]。

Yamamoto等^[12]发现在挫伤后3~7 d用HBO暴露可促进血管形成。本实验结果显示,在术后4周时HBO-CBBbF组大鼠骨缺损修复组织中OPG和CD34表达水平高于NHBO-CBBbF组和HBO-CBB组,表明在暴露早期HBO对骨缺损修复组织中OPG和CD34表达有促进作用,HBO联合bFGF的作用更明显。Zhou等^[13]报道,HBO可改善大鼠脊髓损伤后血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)含量,减少缺氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)表达,提高毛细血管密度,促进富血小板血浆对骨缺损的修复作用^[14]。还有研究表明,HBO可刺激体内血管再生干细胞的生长和分化^[15],对幼鼠和成年小鼠骨再生有促进作用^[16]。本研究发现在术后4、8和12周时HBO-CBB和HBO-CBBbF组大鼠骨缺损区BD和新骨形成面积百分比均大于对照组(HBO-Con组),且成骨细胞数量和血管数量增加,HBO-CBBbF组BD和新骨形成面积百分比大于HBO-CBB组,HBO-CBB组和HBO-CBBbF炎症细胞数量减少,表明HBO有骨缺损修复作用,联合bFGF后疗效更好。

Mulawarmanti等^[17]报道,HBO治疗可降低大鼠血清CRP水平,增强糖尿病牙周炎组织中OPG表达,减少破骨细胞数量。研究表明HBO治疗可调

节股骨头坏死患者血清OPG/NF- κ B受体活化因子配体水平,提升血清OPG表达^[18]。Cheung等^[19]报道,HBO可促进脐带血造血干/祖细胞归巢,并影响脐带血CD34⁺细胞分化、增殖和体外迁移。研究还发现HBO可增加碱性磷酸酶活性,促进胶原和Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, *Runx-2*) mRNA表达,加速成骨细胞分化和骨形成^[20]。本研究发现,大鼠颅骨缺损修复后接受HBO治疗或HBO联合bFGF治疗可提高术后4、8和12周时OPG和CD34表达水平,在术后8周时OPG和CD34表达水平增高、血管数量增多,与Oh等^[21]的研究结果一致。本研究表明,CBB对骨缺损修复有一定疗效,HBO暴露可加快bFGF和CBB对骨缺损的修复愈合,其机制与HBO促进OPG和CD34表达有关。

HBO促进骨愈合的机制尚不清楚。研究发现,HBO暴露可增加损伤组织细胞中氧水平,使活性氧分子和活性氮分子增加,通过调控HIF-1 α 等途径促进内皮细胞、巨噬细胞等对VEGF和bFGF的分泌,使组织中生长因子增加,促进新生血管再生^[22]。Sunkari等^[23]发现HBO可激活HIF-1,改善糖尿病小鼠的伤口愈合;HBO还可增加矿化物沉积,并通过增加Runx2表达促进骨缺损处新骨形成,加速骨愈合^[24];促进兔骨缺损区血管生成,使VEGF蛋白表达增加,对骨愈合起正向调控作用^[25]。这些研究结果证明HBO对骨缺损修复的有效性,但HBO如何通过HIF-1调控骨再生尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 崔妮,秦瑞峰,侯锐,丁宇翔,张林林,王晓娟,等.天然煅烧骨修复材料用于拔牙后颌骨缺损修复的多中心临床研究[J].实用口腔医学杂志,2015,31:81-84.
- [2] NAKAMURA S, ITO T, OKAMOTO K, MIMA T, UCHIDA K, SIDDIQUI Y D, et al. Acceleration of bone regeneration of horizontal bone defect in rats using collagen-binding basic fibroblast growth factor combined with collagen scaffolds[J]. J Periodontol, 2019, 90: 1043-1052.
- [3] CHEN T L, XU B, LIU J C, LI S G, LI D Y, GONG G C, et al. Effects of hyperbaric oxygen on aggressive periodontitis and subgingival anaerobes in Chinese patients[J]. J Indian Soc Periodontol, 2012, 16: 492-497.
- [4] CAWLEY K M, BUSTAMANTE-GOMEZ N C, GUHA

- A G, MACLEOD R S, XIONG J, GUBRIJ I, et al. Local production of osteoprotegerin by osteoblasts suppresses bone resorption[J/OL]. *Cell Rep*, 2020, 32: 108052. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108052.
- [5] DONG Z, CHEN B, FU W, WANG Y, GUO D, WEI Z, et al. Transplantation of purified CD34⁺ cells in the treatment of critical limb ischemia[J/OL]. *J Vasc Surg*, 2013, 58: 404-411.e3. DOI: 10.1016/j.jvs.2013.01.037.
- [6] 陈铁楼,张新海,许兵,徐东升,王世峰,秦卫民,等. 富血小板纤维蛋白联合天然煅烧骨对颅骨缺损修复作用研究[J]. *口腔医学*, 2018, 38: 970-975.
- [7] BURCHARDT H. The biology of bone graft repair[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1983(174): 28-42.
- [8] 陈铁楼,刘国勤,赵海军,陈骏,张庆福,张新海,等. 异种骨移植植物Bio-Oss胶原和Bio-Gide膜对牙周骨下袋影响的临床研究[J]. *临床口腔医学杂志*, 2007, 23: 515-517.
- [9] 何越,田智泉,王亮,姚阳,杨鹭,黄文涛,等. 天然煅烧骨修复材料(骼瑞)修复动物骨缺损的有效性研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2015, 31: 167-170.
- [10] 陈铁楼,张新海,秦卫民,王晓曼,江一峰,任正波,等. 天然煅烧骨粉与碱性成纤维细胞生长因子联合对牙周骨缺损修复作用研究[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2018, 11: 224-228.
- [11] SAVCHENKO E, TEKUN G N, BOZA-SERRANO A, RUSS K, BERNIS M, DEIERBERG T, et al. FGF family members differentially regulate maturation and proliferation of stem cell-derived astrocytes[J/OL]. *Sci Rep*, 2019, 9: 9610. DOI: 10.1038/s41598-019-46110-1.
- [12] YAMAMOTO N, OYAZU T, ENOMOTO M, HORIE M, YUASA M, OKAWA A, et al. VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration[J/OL]. *Sci Rep*, 2020, 10: 2744. DOI: 10.1038/s41598-020-59615-x.
- [13] ZHOU Y, LIU X H, QU S D, YANG J, WANG Z W, GAO C J, et al. Hyperbaric oxygen intervention on expression of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in spinal cord injury models in rats[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126: 3897-3903.
- [14] CHEN T L, WANG S F, ZHANG X H, CHEN J, LIU J. Synergistic effects of hyperbaric oxygen combining with platelet rich plasma on bone defects repair: a mini-review[J/OL]. (2020-06-23) [2020-06-25]. *J Dent Oral Disord*, 2020, 6: 1140. <https://austinpublishinggroup.com/dental-disorders/fulltext/jdod-v6-id1140.php>.
- [15] MILOVANOVIC T N, BHOPALE V M, SOROKINA E M, MOORE J S, HUNT T K, HAUER-JENSEN M, et al. Hyperbaric oxygen stimulates vasculogenic stem cell growth and differentiation *in vivo*[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2009, 106: 711-728.
- [16] IZUMINO J, KAKU M, YAMAMOTO T, YASHIMA Y, KAGAWA H, IKEDA K, et al. Effects of hyperbaric oxygen treatment on calvarial bone regeneration in young and adult mice[J/OL]. *Arch Oral Biol*, 2020, 117: 104828. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2020.104828.
- [17] MULAWARMANTI D, PARISIHNI K, WIDYASTUTI W. The impact of hyperbaric oxygen therapy on serum C-reactive protein levels, osteoprotegerin expression, and osteoclast numbers in induced-periodontitis diabetic rats[J]. *Eur J Dent*, 2020, 14: 404-409.
- [18] VEZZANI G, QUARTESAN S, CANCELLARA P, CAMPORESI E, MANGAR D, BERNASEK T, et al. Hyperbaric oxygen therapy modulates serum OPG/RANKL in femoral head necrosis patients[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017, 32: 707-711.
- [19] CHEUNG K Y, BERRY A, LI D, ALJITAWI O S. Hyperbaric oxygen treatment effects on *in vitro* cultured umbilical cord blood CD34⁺ cells[J]. *Cytotherapy*, 2018, 20: 87-94.
- [20] AL HADI H, SMERDON G R, FOX S W. Hyperbaric oxygen therapy accelerates osteoblast differentiation and promotes bone formation[J]. *J Dent*, 2015, 43: 382-388.
- [21] OH S E, HU K S, KIM S. Eight-week healing of grafted calvarial bone defects with hyperbaric oxygen therapy in rats[J]. *J Periodontal Implant Sci*, 2019, 49: 228-236.
- [22] THOM S R. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2011, 127(Suppl 1): 131S-141S.
- [23] SUNKARI V G, LIND F, BOTUSAN I R, KASHIF A, LIU Z J, YLÄ-HERTTUALA S, et al. Hyperbaric oxygen therapy activates hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), which contributes to improved wound healing in diabetic mice[J]. *Wound Repair Regen*, 2015, 23: 98-103.
- [24] ROCHA F S, GOMES MOURA C C, ROCHA RODRIGUES D B, ZANETTA-BARBOSA D, NAKAMURA HIRAKI K R, DECHICHI P. Influence of hyperbaric oxygen on the initial stages of bone healing[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2015, 120: 581-587.
- [25] FOK T C, JAN A, PEEL S A, EVANS A W, CLOKIE C M, SÁNDOR G K. Hyperbaric oxygen results in increased vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression in rabbit calvarial critical-sized defects[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2008, 105: 417-422.