

# 荧光标记拔牙创口骨愈合过程中矿化沉积速度的研究

李晓红 朱晓姝 赵献银 苏兴宇

**摘要：**目的 研究骨质疏松及雌激素替代治疗对拔牙创骨愈合的影响。方法 选用 12 周龄雌性 SD 大鼠 随机分为假手术对照组和实验组 实验组行双侧卵巢切除术 对照组行假去势手术。术后 8 周将实验组随机分为骨质疏松组(OP)和雌激素治疗组 同时拔除所有大鼠左侧上颌第 1 磨牙。磨牙拔除术后 7、30、60 天分 3 批处死大鼠。上颌拔牙创口处制作不脱钙切片 行组织学及荧光观察。结果 拔牙后 7 天时 3 组荧光表现基本相似 拔牙后 30 天及 60 天骨质疏松组拔牙创骨矿沉积率明显低于假手术对照组及雌激素治疗组 雌激素治疗组骨矿沉积率低于假手术对照组。结论 OP 对拔牙后早期的新骨形成骨的矿化影响不大 但在拔牙创愈合中晚期可明显减少拔牙创新骨矿化。雌激素应用可明显减缓 OP 对拔牙创内新骨骨矿化的影响。

**关键词：**骨质疏松症；拔牙创；雌激素；骨标记组织学

**The effect of estrogen on bone wound healing of extracted sockets in osteoporotic rats : fluorescence labeling observation** LI Xiaohong , ZHU Xiaoshu , ZHAO Xianyin , et al. Plantation Center of Stomatology Hospital , Xi'an Jiaotong University , Xi'an 710004 ,China

**Abstract : Objective** To investigate the effect of estrogen on bone wound healing progress of extracted sockets in postmenopausal osteoporosis cases. **Methods** 12-week-old female SD rats were divided into two groups. Ovariectomy was performed on experimental group while control group received sham-operation. Eight weeks after surgery we divided the experimental group into osteoporosis group and estrogen therapy group. At the same time all the left maxillary molar teeth were extracted. The rats were killed on the 7th 30th and 60th day respectively after extracted surgery. Undecalcified sections of first molar extraction area were examined histologically to clarify the changes of new bone around the first molar extraction area by fluorescence observation. **Result** The changes by the fluorescence observation among three groups had no obvious difference on the 7th day. While on the 30th day and on the 60th day , the MAR was better in control group than in estrogen group and the OP group was the lowest. **Conclusion** OP has little influence on the mineral appositional rate during the earlier period of bone wound healing around the extracted sockets. OP can obviously decrease MAR during the middle and late period of bone wound healing.

**Key words :** Osteoporosis ; Extracted socket ; Bone labeling ; Estrogen

骨质疏松是否会影响成年大鼠拔牙创愈合过程中新骨的矿化过程 ,以及雌激素的替代治疗是否会对产生一定的影响 ,此项研究报道甚少。本实验旨在通过对拔牙创新骨的矿化过程进行观察以对此进行阐述。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

将大鼠随机分为假手术对照组和实验组 全麻下切除实验组大鼠双侧卵巢 假手术对照组切除卵巢周围等体积脂肪组织 将实验组随机分为骨质疏松(OP)组和雌激素治疗组 每组各 15 只大鼠。雌激素治疗组皮下注射苯甲酸雌二醇 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  3 天注射 1 次。

### 1.2 实验方法

去势后 8 周 ,进行下颌骨骨组织形态计量学测量 ,证明实验组造模成功后 ,即行各组大鼠左侧上颌第 1 磨牙拔除术。拔除术后 7、30 和 60 天时分别每组各取 5 只大白鼠给予口服四环素( Sigma 公司美国 ) ,剂量为每日 25 mg/kg ,连续服用 3 天 ,相隔 7 天后分别再次给予皮下注射钙黄绿素 ,每日 15  $\mu$ g/kg 连续注射 2 天。第 2 次注射钙黄绿素( Sigma 公司美国 )后 48 h 乙醚过量麻醉处死。取大鼠拔牙创口侧上颌骨 ,剔净软组织后 ,分别置入 80% 的乙醇液中 ,放置固定 1 周。梯度乙醇脱水 ,甲基丙烯酸树脂包埋 ,硬组织切片机( Leica ,SM 2500 E )于第 1 磨牙拔牙创口处以冠状切面( 颊、舌方向 )切成约 8 微米厚的切片。

1.3 观察方法

荧光显微镜下 ,用紫外光观察切片 ,并拍摄照片。

1.4 骨组织形态计量学测量

用 Leica 550 m 自动图像分析系统测量照片上黄色荧光标记线外缘与绿色荧光标记线外缘之间的最大距离。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 12.0 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 去势后大鼠体重和骨形态计量学指标观察结果( 见表 2-1 和表 2-2 )

表 2-1 造模 8 周时假手术对照组及模型组体重变化(  $\bar{x} \pm s$  单位 :g )

组别	造模时	动物数( 只 )	造模 8 周时	动物数( 只 )
假手术对照组	198.7 $\pm$ 13.5	25	259.0 $\pm$ 14.1	23
实验组	200.3 $\pm$ 13.7	40	311.3 $\pm$ 15.6**	37

注 :与假手术对照组比较 , \*  $P < 0.05$  ;与假手术对照组比较 , \*\*  $P < 0.01$

从表 2-1 中可以看出 ,造模 8 周时模型组平均体重较假手术对照组平均体重明显增加 ,统计学上差异有显著性。

表 2-2 造模 8 周时假手术对照组及模型组骨形态计量学变化(  $\bar{x} \pm s$   $\mu$ m , % )

组别	骨小梁宽度	骨小梁间距	骨小梁面积/视野面积百分比
假手术对照组	75.23 $\pm$ 22.03	139.17 $\pm$ 11.2	19.6 $\pm$ 4.2
实验组	61.57 $\pm$ 21.03*	231.17 $\pm$ 58.6*	15.3 $\pm$ 2.3

注 :与假手术对照组比较 , \*  $P < 0.05$  ;与假手术对照组比较 , \*\*  $P < 0.01$

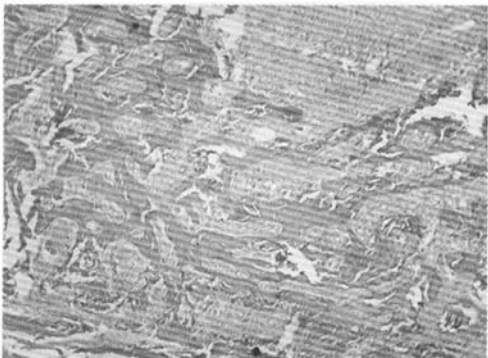
从表 2-1、2-2 及图 2-1 可见实验组骨小梁宽度明显低于假手术对照组 ,骨小梁间距明显大于假手术对照组 ,两组间差异有显著性 ;实验组骨小梁面积 /视野面积百分比假手术对照组要低 ,但两组之间差异无统计学意义。

2.2 荧光显微镜下大鼠上颌拔牙创口骨矿化沉积率的结果( 见图 2-2、2-2、2-4 及表 2-3 )

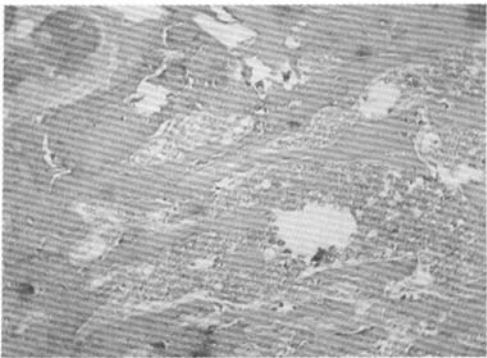
镜下可见绿色背景上有亮黄及亮绿两条荧光标记带 ,标记主要为平行线式排列 ,靠近骨内侧亮黄色荧光标记带是四环素荧光标记线 ,靠近新生骨为亮绿色荧光标记带是钙黄绿素荧光标记线。从亮黄荧光带内侧到亮绿荧光带外侧之间为标记期间形成的新骨。两条标记带则标记在服药期间骨矿化沉积情况。

取各组拔牙创口处新生骨小梁 ,每组各取 5 处拍摄照片。用计算机图像处理系统测量照片上荧光标记带间距 ,计算各组各时间点骨矿沉积率( 骨矿沉积率 = 两条荧光标记线之间距离 / 标记间隔时间 )。结果见表 2-3。

从表 2-3 可以看出在拔牙后 7 天各组拔牙窗口处骨矿沉积率差异无显著性。拔牙后 30 天、60 天时 ,拔牙创口处骨矿沉积率假手术对照组 > 雌激素治疗组 > OP 组 ,统计学上雌激素治疗组和假手术对



假手术对照组 HE 10 $\times$



实验组 HE 10 $\times$

图 2-1 去势后 8 周 ,假手术对照组与实验组下颌骨组织切片光镜下结果

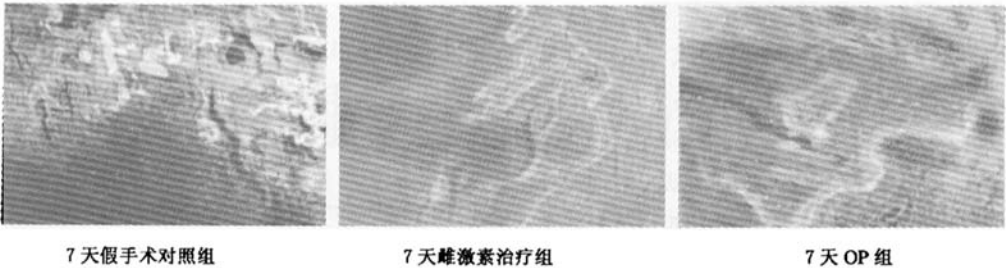


图 2-2 7 天组荧光染色显微镜下观察的结果

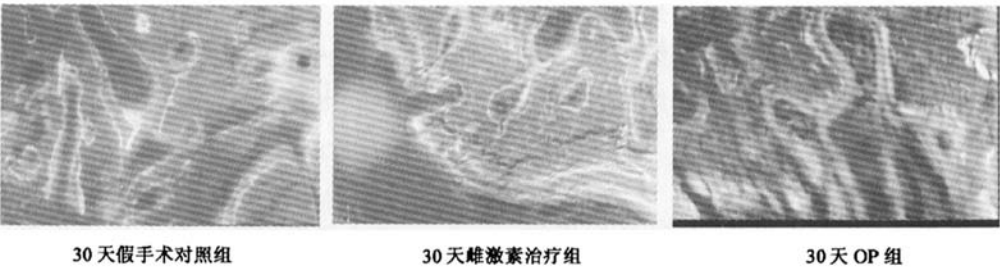


图 2-3 30 天组荧光染色显微镜下观察的结果

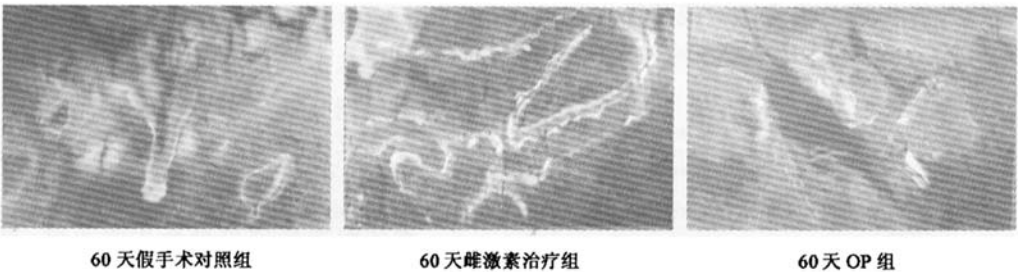


图 2-4 60 天组荧光染色显微镜下观察的结果

照组骨矿沉积率与 OP 组差异有显著性。

表 2-3 各组大鼠不同时间上颌拔牙创口骨矿化沉积率(象素/天)

组别	7 d	30 d	60 d
假手术对照组	1.60	1.43 <sup>*</sup>	1.21 <sup>*</sup>
OP 组	1.67	0.98 <sup>*▲</sup>	0.77 <sup>*▲</sup>
雌激素治疗组	1.59	1.21 <sup>▲</sup>	1.13 <sup>▲</sup>

注 :各时间点同种符号间表明有显著性差异 ,与 OP 组相比<sup>\*</sup>  $P < 0.01$  ,与 OP 组相比<sup>▲</sup>  $P < 0.05$

3 讨论

大鼠模型在 80 年代就被美国 FDA 规定为治疗妇女绝经后骨质疏松症的临床前研究模型。骨质疏松模型复制成功现在公认的诊断标准为骨形态学指标的变化。本实验观察到大鼠摘除卵巢后 ,体重较假手术对照组明显增加。有研究认为去势后体重增加可以在某种程度上弥补血清中雌激素的水平 ,因此去势会导致雌性大鼠体重明显增加<sup>[1]</sup>。同时骨形

态学结果表明 造模组颌骨骨小梁宽度变窄 ,数量减少 ,小梁间距变宽 ,骨小梁占视野面积比降低 ,髓腔加大 ,破骨细胞增多等 ,肯定了骨质疏松所发生的活跃的骨吸收与骨形成。另外骨计量学结果显示造模组的骨小梁宽度、骨小梁占视野百分比比较假手术对照组降低 ,骨小梁间距较假手术对照组增宽。这些都说明本实验绝经后高转换型骨质疏松动物模型复制成功。

成骨细胞合成并分泌骨的有机成分后 ,在一定条件下无机盐有秩序地沉积于其上 ,使钙和磷形成羟基磷灰石 ,再与有机质相螯合形成螯合物 ,形成为正常骨质的过程 ,称之为骨基质的矿化过程。

荧光标记是一种钙结合标记 ,标记的发生率和标记间距离的组织形态学分析是确定骨生长的有效方法 ,四环素沉积的关键取决于吸收量、成骨活性及血流量 ,所以在拔牙创愈合牙槽嵴改建的研究中可以用此法是评估成骨活性、成骨量。钙黄绿素标记

骨的原理与四环素相同,钙黄绿素与骨矿化第一阶段的无定形磷酸钙结合后在荧光显微镜下表现为亮绿色的荧光标记带<sup>[2]</sup>。本实验结果发现在不同的时间,各组大鼠拔牙创骨矿沉积速度不同。以拔牙后 7 天在 3 个时间组中的骨矿沉积率最大。表明在拔牙后 7 天时有最大的骨形成活力。同时可见拔牙后 7 天时 OP 组骨矿沉积率较雌激素治疗组和假手术对照组稍大,但统计学上 3 组间差异无显著性。究其原因可能是由于大鼠去势和局部伤害都加速了骨的翻转,并增加了骨的形成<sup>[3-5]</sup>。这种局部组织伤害可加速骨翻转并已被 Frost 命名为“局部加速环境”。Buchanan 等<sup>[6]</sup>利用同位素标记技术,研究发现狗的上颌拔牙创临近区域,平均的 BMD 是增加的。此外 Shimizu 等<sup>[7]</sup>在对老龄大鼠去势造模成功后,进行上颌磨牙拔除后发现:去势在拔牙窝愈合早期刺激骨形成。而雌激素治疗组由于使用雌激素治疗,使 OP 状态下的骨形成率少量降低,所以其骨矿沉积率略低于 OP 组,但两者之间差异并无显著性。

本次实验的研究还发现:各组大鼠的拔牙创口的骨矿沉积率,拔牙后 30 天的要较拔牙后 60 天的骨矿沉积率要大,同时在这两个时间点,假手术对照组的骨矿化率要较 OP 组要大,统计学检验前者的骨矿化沉积率与 OP 组差异有显著性。拔牙后 30 天、60 天时,雌激素治疗组拔牙创骨矿沉积率与假手术对照组接近,但统计学检验与 OP 组差异有显著性。究其原因笔者认为有以下几点:①在 OP 组大鼠,骨形成与骨吸收均增加,而骨吸收大于骨形成。大量的骨形成标记被破骨细胞吸收导致骨矿沉积率的降低。Turner 等<sup>[8]</sup>报道了去势大鼠四环素标记骨的快速骨的吸收,影响了他们测量骨形成率。因此 OP 组骨矿沉积率明显较低。②雌激素组的骨矿沉积速率介于 OP 组与假手术对照组之间,其原因可能是由于雌激素是抑制骨吸收的药物,但其同时也轻微抑制骨形成<sup>[8]</sup>;其降低骨吸收,但只能使 OP 状态得到部分缓解,并不能增加骨的矿化。有学者观察四环素标记的骨标本,其骨再塑状况显示,服用雌激素者骨吸收表面减少,但类骨质及矿化表面减少,骨形成率降低 2/3<sup>[9]</sup>。

以上研究结果表明,大鼠去势可影响拔牙创周

围及新生骨的骨矿沉积率;去势时间的不同对拔牙创口的骨矿沉积率影响不同;雌激素的应用可明显增加 OP 大鼠拔牙创愈合中晚期拔牙创口的骨矿沉积率。

## 4 结论

OP 对大鼠拔牙创的愈合有很大的影响,其对拔牙后早期的新骨形成骨的矿化影响不大,但在拔牙创愈合中、晚期可明显减少拔牙创新骨的矿化。雌激素的应用可明显减缓 OP 对拔牙创内新骨骨矿化的影响。雌激素应用对拔牙创愈合早期骨形成的影响不大,但在拔牙创愈合中晚期可增加 OP 大鼠的新骨骨矿化沉积率。

## 【参考文献】

- [1] 郭世 罗先正,邱贵兴,等. 骨质疏松-基础与临床. 天津:天津科学技术出版社,2001.
- [2] Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, et al. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. J Periodontol Res, 2002, 37(2):161-165.
- [3] Tanaka S, Shimizu M, Debari K. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. Anat Rec, 2001, 263(2):203-212.
- [4] Elsubeihi ES, Heersche JN. Quantitative assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. J Arch Oral Biol, 2004, 49(5):401-412.
- [5] Sato D. Socket healing after rat mandibular incisor extraction. Kokubyo Gakkai Zasshi, 2005, 73(1):98-105.
- [6] Buchanan M, Sandhu HS, Anderson C. Changes in bone mineralization pattern: a response to local stimulus in maxilla and mandible of dogs. Histo Histopath, 1988, 3:331-336.
- [7] Shimizu M, Sasaki T, Ishihara A, et al. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. J Electron Microsc (Tokyo), 1998, 47(5):517-526.
- [8] Turner RT, Evans GL, Wakley GK. Mechanism of action of estrogen on cancellous bone balance in tibiae of ovariectomized growing rats: inhibition of indices of formation and resorption. J Bone Min Res, 1993, 8:359-366.
- [9] Liu Jianli. Progress of estrogen research and therapy for prevention of osteoporosis. Basic medical science and clinics, 1998, 18(6):407-441.

(收稿日期:2007-03-09)