

文章编号 1006-8147(2017)05-0394-04

论 著

## 机械加载促进骨质疏松大鼠种植体骨结合的实验研究

张云龙<sup>1,2</sup>, 王 健<sup>2</sup>, 陈 刚<sup>2</sup>, 王钊楠<sup>1</sup>, 刘大全<sup>1</sup>, 李心乐<sup>1</sup>, 张 平<sup>1</sup>

(1. 天津医科大学人体解剖与组织胚胎学系, 天津 300070; 2. 天津医科大学口腔医学院口腔颌面外科, 天津 300070)

**摘要** 目的: 利用骨质疏松实验动物模型, 探讨机械加载促进种植体周围骨结合的效能。方法: 12只SD雌性大鼠(12周龄)卵巢切除建立绝经后骨质疏松动物模型(OVX), 另12只动物设为对照。4周后所有动物均于双侧股骨中段植入直径1.5 mm, 长度4.5 mm的纯钛种植体。按术式分别随机分组如下: 假手术组(sham)、假手术膝关节加载治疗组(sham+loading)、OVX模型组(OVX)和OVX膝关节加载治疗组(OVX+loading)( $n=6$ )。种植术后第2天对双侧膝关节进行机械加载刺激(5 N, 10 Hz, 3 min/侧, 共6 min/d, 加载5 d, 休息2 d, 往复循环4周)。通过卵巢切除前和机械加载后测量的骨密度(BMD)和骨矿化度(BMC)、生物力学测试对治疗效果进行评估。结果: Sham+loading组与sham组相比, 膝关节机械加载显著改善BMD和BMC( $P<0.001$ )。OVX+loading组与OVX对照组相比, 膝关节机械加载明显增加BMD和BMC( $P<0.001$ )。生物力学测试表明, Sham+loading组与sham组相比, 膝关节机械加载显著改善种植体最大推出力( $P<0.001$ )。OVX+loading组与OVX对照组相比, 膝关节机械加载明显增加种植体最大推出力( $P<0.001$ )。结论: 机械加载显著改善了骨质疏松动物的骨密度, 促进骨质疏松大鼠种植体周围的骨结合。该研究对口腔临床种植修复开辟了新思路。

**关键词** 机械加载; 骨质疏松; 骨结合; 骨密度; 生物力学

中图分类号 R78

文献标志码 A

## Knee loading promotes osteointegration in osteoporosis rats

ZHANG Yun-long<sup>1,2</sup>, WANG Jian<sup>2</sup>, CHEN Gang<sup>2</sup>, WANG Zhao-nan<sup>1</sup>, LIU Da-quan<sup>1</sup>, LI Xin-le<sup>1</sup>, ZHANG Ping<sup>1</sup>

(1. Department of Anatomy and Histology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To investigate whether mechanical loadings can promote osteointegration for dental implant. **Methods:** Twenty four female Sprague Dawley rats (12 weeks of age) were randomly assigned to 4 groups: sham operated control group (sham), knee loading treated sham operated group (sham+loading), ovariectomized group (OVX), and knee loading treated ovariectomized group (OVX+ loading) ( $n=6$  for each group). Four weeks after ovariectomy or sham operation, these rats received secondary surgical intervention to insert the titanium implant (1.5 mm in diameter, 4.5 mm in length) into the bilateral femoral diaphysis. Knee loading was applied since the second postoperative day after implantation. The loading frequency was 10 Hz, and the loading force was 5 N. Loadings were applied for 6 mins per day for five consecutive days per week on bilateral knee joint for 4 weeks. The animals' bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were measured by pDEXA before surgery and sacrifice. The femora then were evaluated by mechanical test. **Results:** Images with pDEXA revealed that BMD and BMC in the loaded OVX group were significantly increased compared with OVX group (both  $P<0.001$ ). Mechanical test showed that maximum pullout force of the femora were significantly increased by knee loading ( $P<0.001$ ). **Conclusion:** This study demonstrated that knee loading could accelerate osteointegration by the implant in the femoral midshaft in osteoporosis SD rats. Mechanical loading could become a potential therapeutic model for dental implants in osteoporosis patients.

**Key words** knee loading; osteoporosis; osteointegration; bone mineral density; mechanical test

决定种植牙修复成功的关键因素之一就是种植体骨结合, 这包括了骨创伤和骨再生两个基本过程<sup>[1]</sup>。骨质疏松, 以骨量减少及骨组织微结构退化性变为主要病理特征, 是降低骨再生质量的不利

因素<sup>[2-4]</sup>。随着我国人口老龄化趋势, 老年人特别是绝经后女性作为骨质疏松的易患人群, 在临床种植义齿修复患者中越来越多见。而牙槽骨又是易罹患骨质疏松的部位之一。长期以来, 对于种植体骨结合的长期稳定性, 骨质疏松都被认为是一个潜在的危险因素<sup>[5]</sup>。但骨质疏松状态下, 种植体周围的骨结合是否一定会受到破坏, 并因此成为种植体植入的绝对禁忌证, 还存在明显争议<sup>[6-9]</sup>。近年来, 课题组已对应用关节机械加载等现代康复技术促进骨生长<sup>[10-11]</sup>

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (81572100, 81601863); 天津市应用基础与前沿技术研究计划重点项目 (14JCZDJC36500)

作者简介 张云龙 (1990-), 男, 硕士在读, 研究方向: 种植体骨结合的研究; 通信作者: 张平, E-mail: pizhang2008@163.com; 陈刚, E-mail: doctorchen@live.cn。

和加速骨损伤的修复<sup>[12-13]</sup>进行了报道。机械加载还能够在骨关节炎动物模型上有效的抑制骨吸收<sup>[14]</sup>。此外机械加载还能通过刺激血管生成而促进骨损伤的愈合治疗股骨头坏死<sup>[15]</sup>。本课题在前期研究成果基础上,进一步提出机械加载可能促进种植体的骨结合的假想。在本研究中采用大鼠骨质疏松实验动物模型,研究探讨机械加载促进种植体骨结合的可靠性及其效能。

## 1 材料和方法

1.1 主要仪器 美国诺兰公司双能 X 线骨密度仪(pDEXA,XR-600 NORLAND)。美国 Instron 3367 万能力学测试机。

1.2 实验动物 24 只雌性 Sprague Dawley (SD)大鼠,12 周龄,体质量 270~300 g,由解放军军事医学科学院实验动物中心提供。随机分成 4 组:假手术组(sham)、假手术膝关节加载治疗组(sham+loading)、去卵巢模型组(OVX)和 OVX 膝关节加载治疗组(OVX+loading)( $n=6$ )。所有实验过程均严格遵守天津医科大学实验动物管理规定,并且经过天津医科大学伦理委员会批准。

1.3 动物模型的建立 12 只雌性 SD 大鼠,2.5%异氟烷吸入麻醉,俯卧位固定于手术台上,常规备皮、消毒、铺巾,沿背部中线做一个 1.5 cm 切口,沿皮下层向右侧游离解剖,分离白色脂肪组织,暴露粉红色卵巢后与周围脂肪一起剪除,将子宫送回腹腔中。同法切除左侧卵巢。止血,冲洗后,再逐层缝合肌肉、皮下组织、皮肤。所有的动物术后连续 3 d、每天 2 次预防性给予抗生素(恩诺沙星,5  $\mu\text{g/g}$ )。

1.4 种植体植入 卵巢去势术后 4 周,24 只雌性 SD 大鼠,2.5%异氟烷吸入麻醉下,在大腿前面做一个 2.5 cm 切口,分离肌肉,暴露股骨骨面。于股骨前面中段垂直于骨长轴,种植机以转速 20 000 r/s,生理盐水持续降温下,0.3 mm 级差制备双侧皮质孔洞,挤压植入直径 1.5 mm,长度 4.5 mm 的纯钛种植体。完全缝合关闭伤口。所有的动物术后连续 3 d,每天两次预防性给予抗生素(恩诺沙星,5  $\mu\text{g/g}$ )。

1.5 机械加载 种植体植入术后第 2 天,2.5%异氟烷吸入诱导麻醉后进行机械加载。机械加载点位于膝关节,加载力由外侧向内侧的方向施加到大鼠膝关节,加载频率为 10 Hz,力度为 5 N,3 min/侧,共 6 min/d,加载 5 d,休息 2 d,往复循环 4 周(图 1)。

1.6 标本获取 实验动物以 10%水合氯醛腹腔过量注射处死,取材双侧股骨,放置于 4%的福尔马林溶液固定 48 h,然后将标本包裹在润湿生理盐水的纱布,之后置于-20  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。



图 1 大鼠膝关节机械加载治疗图示

Fig 1 Knee loading treatment in rats

## 1.7 实验室检测

1.7.1 骨密度测量 采用美国诺兰公司双能 X 线骨密度仪。2.5%异氟烷吸入麻醉,大鼠俯卧位于测量中心,在卵巢切除前和机械加载后分别测量股骨中段种植体周围骨密度(BMD)和骨矿化度(BMC),并且记录相应的数值。

1.7.2 生物力学测试 将股骨在常温下解冻,置于 Instron 3367 万能力学测试机的配件上,加载速度 1 mm/min,匀速加载,记录载荷-变形曲线,计算最大推出力值(图 2)。



图 2 生物力学测试

Fig 2 Mechanical test

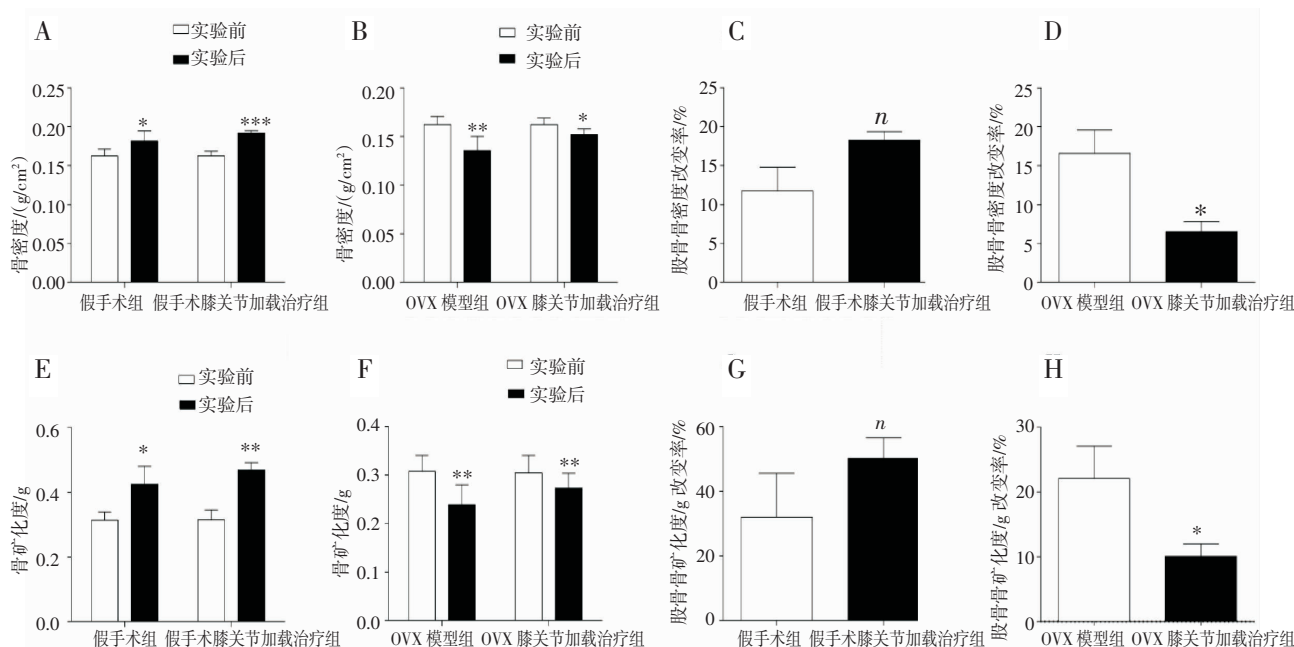
1.8 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,组间比较运用单因素方差分析。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。 $*P<0.05$ , $**P<0.01$ , $***P<0.001$  分别表示差异具有统计学意义。相关参数变化例如骨密度值= $[\text{L}-\text{O}]/\text{O} \times 100\%$ ,L=“机械加载后”和 O=“卵巢切除前”。

## 2 结果

2.1 机械加载对骨密度的影响 实验期间,在卵巢切除手术前(实验前)和机械加载后(实验后)分别检测 BMD 和 BMC。在 sham 组中,实验后 BMD 比实验前 BMD 升高( $P<0.05$ ),实验后 BMC 比实验前

BMC 也显著性升高 ( $P<0.05$ )。在 sham+loading 组中,实验后 BMD 比实验前 BMD 明显增加,有统计学差异( $P<0.001$ ),而实验后 BMC 比实验前 BMC 明显升高( $P<0.01$ ),说明机械加载促进骨密度和骨矿化度的增加。在 OVX 组中,实验后 BMD 比实验前 BMD 明显降低( $P<0.01$ ),同时实验后 BMC 比实验

前 BMC 明显降低( $P<0.01$ ),说明卵巢切除以后骨密度和骨矿化度会降低,表明 OVX 建模成功。Sham+loading 组与 sham 组相比,膝关节机械加载显著改善 BMD 和 BMC (均  $P<0.001$ )。OVX+loading 组与 OVX 对照组相比,膝关节机械加载显著增加 BMD 和 BMC (均  $P<0.001$ ) (图 3)。

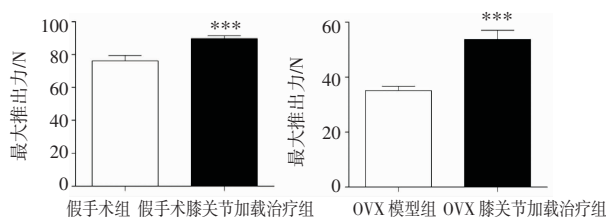


\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

图 3 实验前后股骨骨密度和骨矿化度

Fig 3 The bone mineral density and bone mineral content of rats femora before and after the experiment

2.2 机械加载对最大推出力的影响 种植体最大推出力的结果在 sham 组、sham+loading 组、OVX 模型组和 OVX+loading 组分别是 ( $76.226\pm1.377$ ), ( $89.691\pm0.777$ ), ( $35.113\pm0.656$ ), ( $53.704\pm1.393$ ) N。Sham+loading 组与 sham 组相比,膝关节机械加载显著改善种植体最大推出力 ( $P<0.001$ )。OVX+loading 组与 OVX 对照组相比,膝关节机械加载明显增加种植体最大推出力 ( $P<0.001$ ) (图 4)。



\*\*\* $P<0.001$

图 4 种植体的最大推出力

Fig 4 The maximum pullout force of the implant

### 3 讨论

随着社会经济的发展,老龄化社会的加速,越来越多的老年人由于牙齿的缺失,将寻求种植牙的修复。骨质疏松症延缓骨折愈合和早期种植体周围的骨组织骨结合,是种植牙成功的主要障碍之一。目前认为,多种运动方式可以改善这种状况,例如游泳、跑步、爬山、瑜伽、太极等。因而,运动作为物理康复疗法已经证明可以促进骨量的增加,非药物治疗方法可以有效阻止骨量的减少。在本实验前期的研究中,机械加载已经应用到一些动物模型上。骨形态研究的结果表明,膝关节加载刺激骨形成<sup>[12]</sup>。笔者还发现,膝关节加载加速胫骨和股骨颈手术伤口的愈合<sup>[10-11]</sup>。膝关节加载机制被认为是改变股骨骨髓腔内的压力。压力也激活股骨和胫骨的骨代谢相关基因<sup>[16-17]</sup>。本实验前期研究中,膝关节加载也诱导骨形成和增强股骨颈的骨愈合<sup>[13]</sup>。而本研究结果进一步证实了作者建立在前期研究基础上的假想,即机械加载可以促进种植体周围的骨组织改建,明确地



提升局部的骨质量。

本实验采用SD雌性大鼠,通过采用双侧卵巢切除,建立骨质疏松模型;通过运动与康复的角度观察机械加载对骨质疏松大鼠种植体周围骨组织的骨结合的影响。此研究结果初步显示 sham+loading 组与 sham 组相比,膝关节机械加载显著增加 BMD 和 BMC( $P<0.001$ )。同时,OVX+loading 组与 OVX 对照组相比,膝关节机械加载显著改善 BMD 和 BMC( $P<0.001$ )。以上 4 组结果说明机械加载会促进骨密度和骨矿化度的增加,证明机械加载是有效的。另外,Sham+loading 组与 sham 组相比,膝关节机械加载显著改善种植体最大推出力( $P<0.001$ )。OVX+loading 组与 OVX 对照组相比,膝关节机械加载显著改善种植体最大推出力( $P<0.001$ )。以上结果同样证明了机械加载促进了种植体的骨结合。

牙槽骨是容易罹患骨质疏松的部位之一。临床治疗中发现,在 IV 类骨质条件下植入种植体,经过无干扰的 3~6 月愈合期,种植体周围骨仍然出现不同程度的吸收。临床回顾性研究认为,骨质疏松条件下种植体周围骨有延期愈合风险,在分子水平研究亦得到证实。药物替代治疗是当前骨质疏松主要的治疗手段,但长期应用雌激素有增加绝经妇女的子宫内膜癌、乳腺癌和心血管疾病发病的危险性,使得临床医师在应用雌激素治疗骨质疏松时仍然十分谨慎。

本实验研究结果提示,通过机械加载,有望在临床上为骨质疏松患者种植牙提供新的优化治疗策略。膝关节加载可作为一个有效的促进骨结合的非药物治疗方法。该方法不但效能高,而且避免了化学药物治疗带来的一系列副作用。本研究中的实验对象大鼠体型较小,为便于实施与检测,采用股骨为实验部位。为了深入探讨机械加载促进种植体骨结合的机制,下一步应该采用较大的实验动物,并应用于颌骨部位,以使模拟生物力学条件更接近人类。

#### 参考文献:

- [1] Bischof M, Nedir R, Szmukler-Moncler S, et al. Implant stability measurement of delayed and immediately loaded implants during healing[J]. Clin Oral Implants Res, 2004,15(5):529
- [2] Shiraki M, Kuroda T, Miyakawa N, et al. Design of a pragmatic approach to evaluate the effectiveness of concurrent treatment for the prevention of osteoporotic fractures: rationale, aims and organization of a Japanese Osteoporosis Intervention Trial (JOINT) initiated by the Research Group of Adequate Treatment of Osteoporosis (A-TOP)[J]. J Bone Miner Metab, 2011,29(1):37
- [3] Vescini F, Grimaldi F. PTH 1-84: bone rebuilding as a target for the therapy of severe osteoporosis[J]. Clin Cases Miner Bone Metab, 2012, 9(1):31
- [4] van Den Bergh J P, van Geel T A, Geusens P P. Osteoporosis, frailty and fracture: implications for case finding and therapy[J]. Nat Rev Rheumatol, 2012,8(3):163
- [5] Zeng X, He H, Zhang L, et al. A potential therapeutic approach to overload-induced bone loss around implant: parathyroid hormone (PTH)[J]. Med Hypotheses, 2011,77(5):701
- [6] Yin G, Chen J, Wei S, et al. Adenoviral vector-mediated overexpression of osteoprotegerin accelerates osteointegration of Titanium implants in ovariectomized rats[J]. Gene Ther, 2015,22(8): 636
- [7] Carvalho C M, Carvalho L F, Costa L J, et al. Titanium implants: a removal torque study in osteopenic rabbits[J]. Indian J Dent Res, 2010,21(3):349
- [8] Tsolaki I N, Madianos P N, Vrotsos J A, et al. Outcomes of dental implants in osteoporotic patients. A literature review[J]. J Prosthodont, 2009, 18: 309
- [9] Dvorak G, Amhart C, Heuberger S, et al. Peri-implantitis and late implant failures in postmenopausal women: a cross-sectional study[J]. J Clin Periodontol, 2011,38(10):950
- [10] Zhang P, Yokota H. Knee loading stimulates healing of mouse bone wounds in a femur neck[J]. Bone, 2011,49(4):867
- [11] Zhang P, Sun Q W, Turner C H, et al. Knee loading accelerates bone healing in mice[J]. J Bone Mine Res, 2007,22(12):1979
- [12] Zhang P, Tanaka S M, Jiang H, et al. Diaphyseal bone formation in murine tibiae in response to knee loading[J]. J Appl Physiol, 2006, 100(5):1452
- [13] Zhang P, Tanaka S M, Sun Q, et al. Frequency-dependent enhancement of bone formation in murine tibiae and femora with knee loading[J]. J Bone Miner Metab, 2007,25(6):383
- [14] Li X, Yang J, Liu D, et al. Knee loading inhibits osteoclast lineage in a mouse model of osteoarthritis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24668
- [15] Liu D Q, Li X L, Li J, et al. Knee loading protects against osteonecrosis of the femoral head by enhancing vessel remodeling and bone healing[J]. Bone, 2015,81:620
- [16] Zhang P, Turner C H, Yokota H. Joint loading-driven bone formation and signaling pathways predicted from genome-wide expression profiles[J]. Bone, 2009,44(5):989
- [17] Zhang P, Su M, Liu Y, et al. Knee loading dynamically alters intramedullary pressure in mouse femora[J]. Bone, 2007,40(2):538

(2017-01-03 收稿)