



经过或未经过高压氧处理的种植体在放射线处理后的大鼠胫骨中骨整合现象的实验研究

Osseointegration of Implants in Irradiated Bone With and Without Hyperbaric Oxygen Treatment: An Experimental Study in Rat Tibiae

Jan Nyberg, Sven Hertzman, Borje Svensson, CariNa B. Johansson

原载 INT ORAL MAXILIOFAC IMPLANTS 2013, 28:739-746. (英文)

曾维铭 译

摘要

研究目的: 高压氧 (Hyperbaric oxygen, HBO) 疗法被推荐用来增强放射线照射后骨中种植体的骨整合。本研究旨在进一步探讨高压氧对放射线照射后骨组织中种植体的骨整合的影响。**材料与方法:** 本研究为 16 只大鼠的体内实验研究。对每一只大鼠的一只后腿进行 20Gy 的单组外部放射线照射, 而另一只后腿作为非放射线照射的控制。照射三天后, 在每个胫骨结节中都植入种植体。将大鼠分为两组: 非高压氧处理组 (组 1) 和高压氧处理组 (组 2)。在照射五周后, 进行扭矩测试。将带有周围组织的种植体制备为未脱钙的硬组织切片和磨片, 随后对骨-种植体接触区域 (bone-to-implant contact, BIC) 和骨区域 (bone area, BA) 进行组织形态学观察。再生的骨组织也用双能 X 线骨密度检测法进行测量。**结果:** 非高压氧处理组大鼠 (组 1) 与高压氧处理组的大鼠 (组 2) 相比, 在所有被调查的参数中, 未接受放射线照射组被证明值更高, 但没有统计学意义。但是, 骨区域的平均值照射侧明显高于非照射对照侧。**结论:** 在本研究中, 高压氧治疗对在接受放射线照射的骨中种植体的骨整合无显著影响。

关键词

骨; 口腔种植; 高压氧治疗; 骨整合; 放疗

1 引言

在头颈部区域接受癌症治疗的患者中, 放疗

是常见的治疗手段。除影响肿瘤细胞外, 放疗还会影响黏膜和骨等健康组织。放疗后的相关问题, 如骨和软组织的愈合紊乱, 是十分严重的。普遍认为, 受放射线损伤的骨组织, 其特征是低细胞活性、低血管性和组织缺氧, 可能会出现伤口愈合

译者单位 广东省广州市越秀区中山二路 74 号中山大学北校区

问题和随之而来的组织降解,如伤口不愈合和放射性骨坏死。此外,放疗后的骨组织在手术创伤和感染后愈合能力受损。据报道,接受放疗患者的口腔种植体失败率高于未经放疗的患者。例如,Roumanas 等人报告了 40% 的差异,Granstrom 等人观察到了 52% 的差异。在 Nyberg 等人对大鼠进行的一项研究中,在单次剂量为 20Gy 后观察到了显著的骨整合紊乱。

改善放疗对骨的负面影响的辅助治疗是有限的。高压氧疗法在 1973 年被提出来增强放射线照射后的骨组织的愈合。这种疗法已被证明可以改善临床结果,并且已被用于预防和治疗。然而,尽管一些临床研究已经证实了高压氧疗法的积极作用,但其他研究则认为它的效果不确定或根本没有效果。一项家兔实验研究表明,高压氧疗法对放疗后骨组织的形成和成熟均有影响。因此,高压氧治疗对于放疗后的骨组织中骨整合的研究结果一直存在争议。

本研究的目的是:(1)放射线照射对钛种植体骨整合的影响;(2)高压氧治疗对钛种植体在放射线照射过的骨中骨整合的影响。

2 材料和方法

2.1 研究设计

瑞典哥德堡大学的动物伦理委员会批准了这项研究。在这个实验性的大鼠体内研究中,大鼠的一只后腿接受放射线照射,而另一只则作为不进行照射的对照组。照射 3d 后将种植体植入每个胫骨结节。然后将大鼠分成两组。一组(组 1)对照组不接受高压氧治疗,而另一组(组 2)接受高压氧治疗。照射后五周,处死大鼠,并进行生物特征测试。将四组进行比较:非高压氧非照射组(组 1nr),非高压氧照射组(组 1r),高压氧非照射组(组 2nr),高压氧照射组(组 2r)。

2.2 实验动物

研究开始时使用了 16 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠(来自 Charles River 实验室),平均年龄为 14 周,平均体重为 423 克。在整个研究过程中,每只鼠的体重都在选定的时间内进行了登记。其中一只大鼠没有从麻醉中苏醒;因此,15 只大鼠被纳入研究。

每个笼子养两只或三只大鼠。每只大鼠都接受着标准的啮齿动物颗粒饮食和不限量供应水,并被

允许在手术后自由移动。

2.3 麻醉方法

每只大鼠都通过腹腔注射芬太尼、氟阿尼酮与咪达唑仑的混合物进行麻醉。大鼠在放射线照射后 5 周用过量的戊巴比妥腹腔注射处死。

2.4 照射方法

一次对两只麻醉后的大鼠进行放射线照射,植体植入前 3 天,将大鼠仰卧位放置在辐射台上。每只大鼠接受由直线加速器(VARIA NClinac600CDA)发出 4mV 光子辐射而形成的外部单剂量 20Gy 的辐射,并在每只大鼠的一条后腿上放置一个直径 1.0cm 的组织等效补偿膜。照射场大小为 5×5cm,等中心设置,与放射源的距离为 99cm。不接受照射的腿被很好地保持在辐射场之外,并作为对照组。场边缘和对照组的腿之间的距离 >5cm,使得该腿接受了 <3% 的规定剂量。

2.5 种植体植入

照射三天后,麻醉大鼠。后腿剃毛,用 70% 乙醇-碘溶液清洗。在每条后腿的内侧切开皮肤和筋膜层,轻轻地剥离骨膜层。每个骨位点都有一个特定的低速(不超过 800 转/分)钻孔序列,从小的球钻开始,逐步进展为直径较大的钻,并且全程用 0.9% 生理盐水进行深度冷却。两种螺纹 OsseoSpeed 型种植体(即经过与 OsseoSpeed 种植体类似的表面处理;n=60),外径为 2.2mm、长度为 3.2mm(Astra Tech),被植入胫骨平台下约 5mm 的每个胫骨结节之中,这些种植体中心之间的距离约为 5mm。近端种植体被植入至骨皮质上方可见一根螺纹的水平;这些种植体将会进行扭矩测试。远端种植体将用于组织形态学的比较。分层关闭创口:5-0 可吸收缝线缝合筋膜(Vicryl, Ethon, Johnson&Johnson),4-0 可吸收缝线缝合皮肤(Monocryl, Ethon, Johnson&Johnson)。两只腿以同样的手术方式处理。

2.6 高压氧治疗

种植体植入后三天,将大鼠分为两组。将组 2 的大鼠(n=8)放置于 75L 压力室(Goteborgs Dykriteknik)中,在 2.80kPa 绝对压力下接受纯氧治疗,每天 2 次,每次 2h,2 次治疗之间间隔

6h, 持续 5d。因此, 每只大鼠都接受了 10 次治疗。每一次治疗开始时都进行一次 10min 的连续加压直至 2.8 个大气压。压力保持恒定 100min, 然后减压 10min。用流速为 0.6L/min 的氧气进行恒定通风以消除产生的二氧化碳。将组 1 的大鼠 ($n=7$) 放置在条件相同的腔室中, 但在正常压力下呼吸空气, 并且时间设置与高压氧处理的大鼠完全相同。大鼠在腔室内期间是完全清醒的 (未接受镇静或麻醉处理)。

2.7 扭矩测试

骨与种植体的整合即骨整合的效果, 可用扭矩测试实验进行测量。用牛顿测力计测量从骨床上放松种植体所需的力, 正如 Johansson 等人详细描述的那样。

2.8 骨标本的制备

将大鼠后腿解剖并浸泡在 4% 中性甲醛固定液中, 然后进行放射学检查。随后分离得到每个种植体及其周围骨组织, 并进一步浸泡在 4% 中性甲醛固定液中 1 周。之后, 将样品在乙醇 (70% 至 100% 乙醇) 中脱水。在稀释的树脂中进行预渗透, 最后嵌入纯树脂 (Technovit7200VLC, Kulzer), 并在紫外光下固化。所有样品都根据 Donath 和 Breuner 以及 Johansson 和 Morberg 的方法用 Exakt 切割和磨削系统 (Exakt) 进一步处理为未脱钙的硬组织切片 (厚度 15 μm)。切片用甲苯胺蓝和焦绿素 G 混合染料进行染色。

2.9 组织形态学和组织学分析

根据 Johansson 的定义, 测量了骨与种植体接触 (BIC) 和骨区 (BA)。计算 BIC 和 BA, 并且以占所研究的种植体表面的长度和螺纹之间的总面积的百分数来表示。种植体周围的所有螺纹都是用一种半自动计算机化的方法测量的, 它与光学显微镜偶联在一起 (Leitz Microvid) 并连接到个人计算机上。在量化期间, 每个螺纹区域被放大以适应视野 (ROI), 这些可在显微镜的目镜里直接进行操作。每个种植体中的两个骨皮质上和三个骨髓螺纹的结果被用于不同组之间的计算和比较。也对每组中所有螺纹的结果之和进行了比较。同一个观察者以单盲的方式进行了所有的测量。用光学显微镜 (Leitz Aristoplan) 进行组织学检查。

2.10 双能 X 线骨密度检测

采用双能 X 线骨密度法 (NorlandpD EXA Sabre) 对骨矿物质含量 (Bone Mineral Content, BMC) 和骨矿物质密度 (Bone Mineral Density, BMD) 进行体外测量。使用 Sabre Research 软件 (3.6 版)。高分辨率扫描, 设置行间距为 0.02cm。将骨切片置于一层 10mm 厚的 70% 乙醇中进行测量。进行测量的区域 (平均为 0.097 cm^2) 位于胫骨近端有海绵骨的区域的增长板下面 1mm 的中央区域。

2.11 统计学分析

采用 Wilcoxon 符号秩检验对同一动物进行配对比较。使用 Mann-Whitney U 检验在组 1 和组 2 之间进行比较。对所有的组的两个骨皮质上的螺纹、三个骨髓内螺纹和所有螺纹进行了统计学比较。两种测试的置信度均被设置为 95% ($P<0.05$ 被认为是具有统计学意义)。计算了平均值 \pm 平均值的标准误。

3 结果

3.1 实验动物

所有大鼠的初始平均体重为 423g, 5 周后终止时, 平均体重为 497g。动物的体重逐渐增加, 在整个研究过程中, 组 1 大鼠和组 2 大鼠的体重之间的差异约为 2%。组 1 大鼠体重增加 16%, 而组 2 大鼠体重增加 18%。接受放射线照射的腿 (组 1r 和组 2r) 未出现任何有皮肤坏死或感染的迹象, 并且两组无差异。然而, 照射和非照射组之间存在差异; 前者有大量脱毛, 而后者似乎正常。解剖后, 所有种植体都很容易定位。

3.2 放射学发现

测量 X 线片确认了种植体的位置。没有看到未整合的迹象, 即在后续试验中所有种植体似乎都被整合到骨组织中。

3.3 扭矩测试结果

扭矩测试值如表 1 所示。未经高压氧处理的大鼠 (组 1nr 和组 1r) 植入的种植体的 RTQ 值高于高压氧处理的大鼠 (组 2nr 和组 2r) 的值之和, 但差异无统计学意义。所有在照射骨中的种植体 (组 1r 和组 2r) 的 RTQ 平均值为 8N·cm, 而所有在未照射骨中的种植体 (组 1nr 和组 2nr) 的平

表1 扭矩测试 (RTQ) 值 (单位: N·cm)

	平均值	范围	平均值标准误
组 1nr	22	14-30	1.8
组 1r	8	3-25	3.0
组 2nr	20	15-28	1.5
组 2r	8	2-18	2.0

均值为 21N·cm, 与高压氧治疗无关。在非高压氧疗法组 (组 1) ($P=0.018$) 和高压氧疗法组 (组 2) ($P=0.025$) 中, 未经过放射线照射和经过放射线照射的两组之间具有统计学差异。然而, 在未经过放射线照射 ($P=0.281$) 和经过放射线照射 ($P=0.955$) 的两组内, 非高压氧 (组 1) 和高压氧 (组 2) 组之间没有观察到差异。

3.4 组织形态学观察结果

骨种植体接触 (BIC) 值。表 2 提供了 BIC 测量结果。非高压氧治疗组和高压氧治疗组的 BIC 平

表2 骨种植体接触 (BIC) 值 (%)

区域 / 组别	平均值	范围	平均值标准误
皮质			
组 1nr	59	31-92	7.3
组 1r	25	5-42	4.3
组 2nr	54	30-84	7.1
组 2r	26	1-45	5.1
骨髓			
组 1nr	62	42-95	7.6
组 1r	47	0.6-78	11.1
组 2nr	62	37-80	5.1
组 2r	40	12-72	7.5
所有螺纹			
组 1nr	61	38-94	7.2
组 1r	38	9-59	7.6
组 2nr	59	34-82	5.7
组 2r	30	13-46	4.6

均百分比无统计学差异。在组 1 中, 当比较非照射侧与照射侧的骨皮质螺纹时, 观察到显著的差异 ($P=0.018$)。对于第 2 组, 骨皮质螺纹也发现了显著差异 ($P=0.012$)。在骨髓腔区的螺纹之间没有观察到显著的差异, 无论组别。组 1 和组 2 在照射的部分和非照射的部分都没有发现差异。将两组的所有螺纹都纳入考虑, 未照射组的腿 BIC 值明显高于照射组的腿 (第 1 组: $P=0.018$; 第二组: $P=0.012$)。

骨区域 (BA) 值。BA 结果如表 3 所示。在两个组中, 骨皮质上螺纹的 BA 在未照射组中显示出比照射组更高的值, 尽管差异不显著。对于三条骨髓中的螺纹来说, 照射组比未照射组有着更高的 BA 百分比。组 1 有统计学意义 ($P=0.018$), 组 2 没有统计学意义 ($P=0.161$)。

3.5 组织学观察

未照射组骨组织, 无论组别, 在螺纹区域观察到重塑的骨组织, 并且在骨组织之间观察到了明确的分界线。在组 1 经常见到骨重塑腔, 一侧有着骨

表3 骨区域 (BA) 值 (%)

区域 / 组别	平均值	范围	平均值标准误
皮质			
组 1nr	60	32-83	6.3
组 1r	44	32-67	4.6
组 2nr	50	22-81	7.8
组 2r	43	15-68	6.2
骨髓			
组 1nr	23	13-35	2.6
组 1r	55	30-76	7.1
组 2nr	27	13-45	3.7
组 2r	44	20-71	7.0
所有螺纹			
组 1nr	38	26-53	3.6
组 1r	50	37-61	4.1
组 2nr	36	22-59	4.5
组 2r	44	23-59	4.3

样边缘和一层深染的立方形成骨细胞，而另一侧有一些出现腐蚀的骨表面（图1）。在组2中，这些区域似乎有染色更浅的、更圆的成骨细胞。在骨髓中很容易识别出巨核细胞，而在不同的骨髓区域偶尔可以观察到紫色染色的带有颗粒的细胞（图1）。

在螺纹区域，与非照射组相比，照射骨的切片的观察图片（不分组别）不论区域显示出更多的不规则的（无规律的）骨组织（图2）。以不规则的纤维组织为主，不规则的胶原明显处于多数（图3）。在接受放射线的一侧，骨内形成的大部分空洞没有表现出大量的骨形成边缘，即在这些区域只能观察到少量的成骨细胞边缘（图3）。在更高的放大率下，在组2r中，其中一些腔洞被大而不清晰的细胞占据，包括浅染和深染，但检测不出骨样层（图4）。这种细胞可能参与骨重塑，因为可以观察到相邻的骨表面正在被吸收（图4）

与对照组轻染、成骨细胞成圆形、骨组织呈现正常外观即带有细胞核的骨细胞和骨具有更多结构

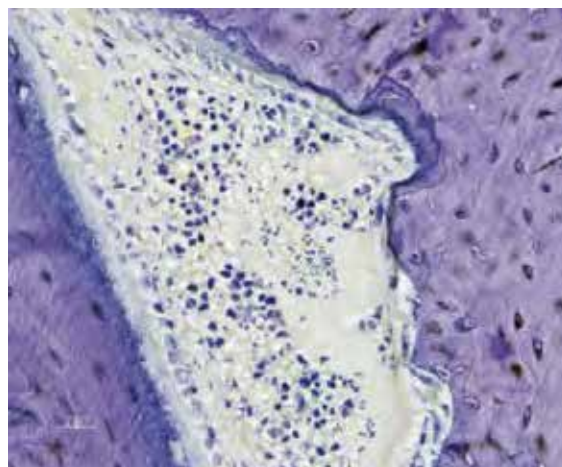


图1 组1nr样本。骨重塑腔显示活跃的骨形成（在左边）与尺寸相似的成骨细胞在骨样本上。对面显示“锐利边缘”骨表面和可能被拉长了的破骨细胞样细胞。骨髓腔含嗜酸性粒细胞（紫色）。标尺=20 μm。

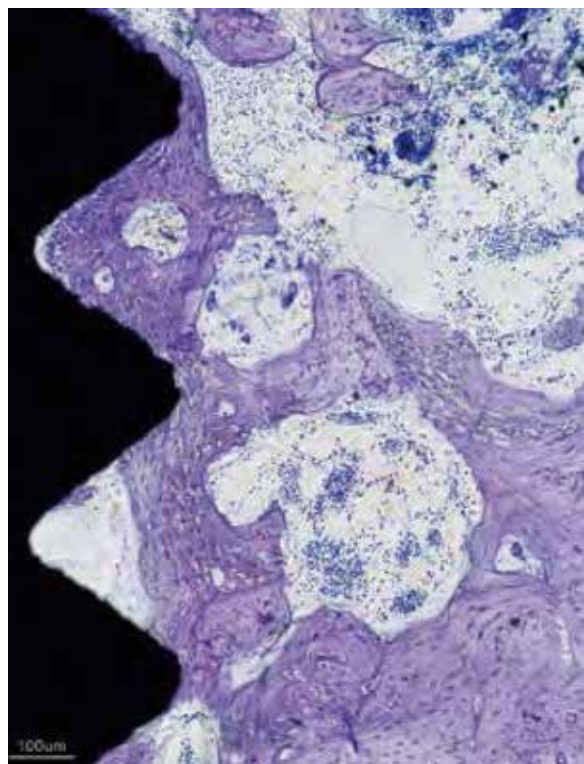


图2 组1r样本。照射后的骨在骨内显示出更多的不规则的结构，这可能是最初钻孔过程中的残留物。然而，在骨表面没有识别出破骨细胞。标尺=50 μm。

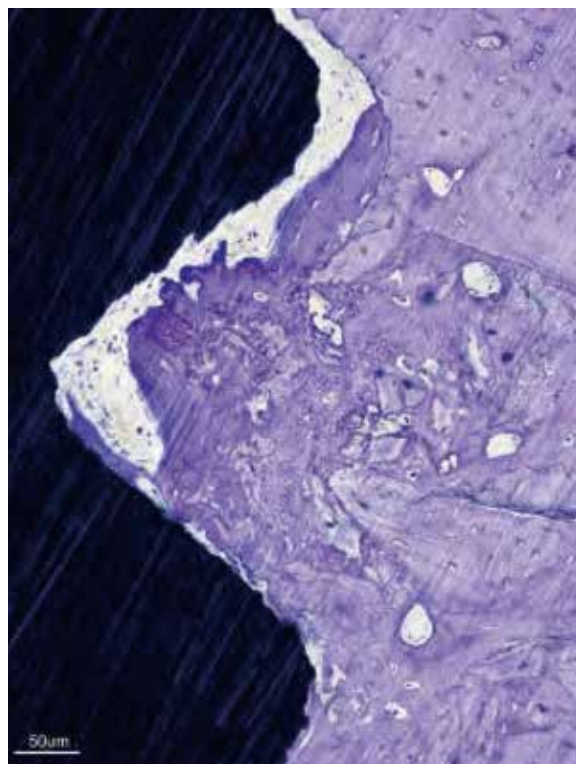


图3 不考虑高压氧治疗，照射骨显示较不规则的骨结构，其中一些与种植体密切接触（即BIC）。标尺=100 μm。

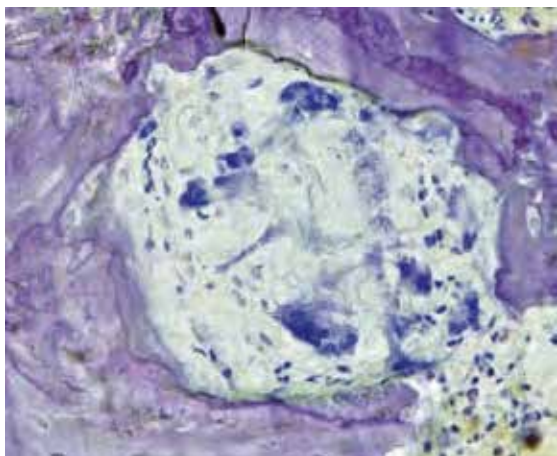


图4 组2r样本。一个明显的吸收样腔。大的、蓝染的细胞是异常的破骨细胞样细胞。然而，一些骨表面似乎正在进行吸收。标尺=20 μm。

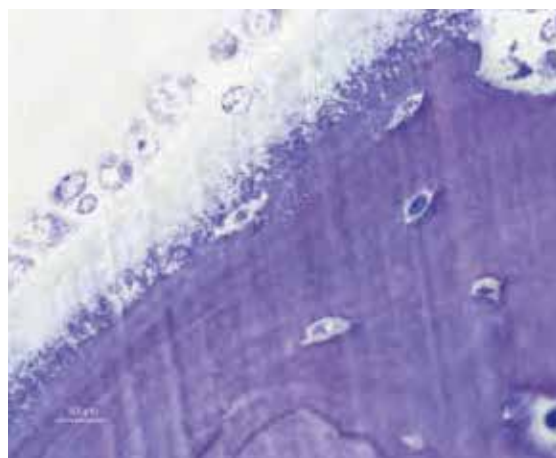


图6 组2nr标本。更高放大率的骨形成部位。注意染色的成骨细胞，它们有时在骨样本上成两排。标尺=10 μm。

化(图6)相比,经过照射的高压氧处理组样本(2r组)上的骨表面表现出较少的结构化、更多的异常成骨细胞(图5)。

3.6 双能X-线吸收法发现结果

得到的双能X-线吸收法(DEXA)数据见表4。非高压氧处理的动物(组1)比高压氧处理的组(组2)显示更高的骨矿物质含量(BMC)。然而,在这两组中,未照射侧与照射侧相比,显示出更高的骨矿物质密度(BMD)和骨矿物质含量(BMC)。在组2中的非照射侧与照射侧的之间在骨矿物质密度(BMD) ($P=0.012$)和骨矿物质含量(BMC)

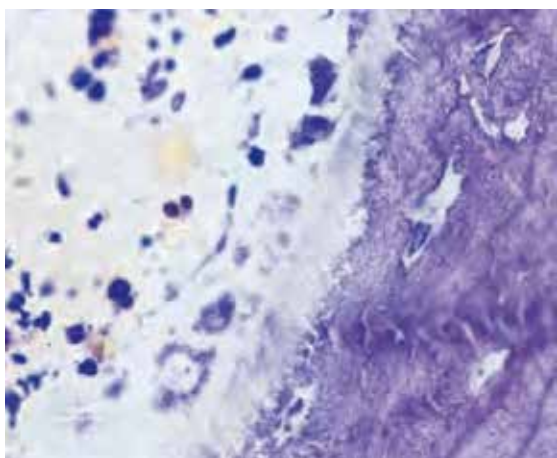


图5 组2r样本。无论是否进行高压氧治疗,与对照组相比,在照射样本上,骨样本不那么明显,而且成骨细胞更不规则。标尺=10 μm。

表4 双能X-线吸收法(DEXA)结果

	BMD (g/cm ²)	BMC (g)
组1nr	0.307	0.031
组1r	0.273	0.028
组2nr	0.292	0.029
组2r	0.240	0.024

($P=0.018$)方面都观察到了显著的统计学差异。组1没有发现统计学差异。

4 讨论

高压氧疗法已被用于增强种植体在放射线照射后骨组织中的骨整合。然而,本实验研究的结果并不支持这种临床实践。照射骨和非照射骨之间在骨形成和骨整合方面发现了差异。但是,高压氧对这两个群体都没有影响。在那些辅助运用高压氧疗法治疗放射后骨组织中种植体骨整合取得良好的结果的研究中,存在其他可能影响结果的因素。

高压氧治疗后的较低频率的软组织愈合问题和感染可能是影响种植体发病率的因素。对骨形成细胞的放射损伤也可能影响临床结果,即使这一效应在本研究中没有得到证实。在本研究中使用单一剂量的照射,而在临床情况下看会采用分次治疗。然而,由于实际和伦理的原因,单剂量辐照在动物实验中是首选的。本研究采用了与先前研究相同的照射方案,并且在照射和种植体植入之间存在着较

短的时间间隔。在临床实践上,对于正在接受放疗和需要口腔或颌面部重建治疗来提高生活质量的病人来说,缩短治疗时间是很重要的。大剂量照射引起的骨形态和生物力学改变是在放疗后考虑种植修复时外科医生关注的主要问题。

连续5天每天给予两次高压氧治疗,来缩短整体治疗时间。这种治疗方案也被其他人在大鼠研究中使用。Chen等人,由于动物数量有限没有在他们的研究中进行统计学分析,他们认为,“高压氧治疗部分改善了照射骨中骨小梁的形成,加速了非照射骨中的骨重塑,并且在照射骨和非照射骨中都改善了[羟基磷灰石]-骨接触”。Sheikh等人表明氧峰在90min治疗结束时出现,并且持续约1h。他们发现随着高压氧治疗的进行,血管内皮生长因子水平显著升高,但伤口乳酸水平保持不变。他们得出结论:血管内皮生长因子的产生部分解释了高压氧的血管生成作用,但组织中的缺氧不是伤口中血管内皮生长因子产生的必要条件。

在本研究中,组1和组2之间没有发现显著的统计学差异。在本研究中使用的高压氧方案与临床情况不可进行比较,临床情况强调术前和术后高压氧治疗。因此,这项动物研究的结果不能外推到人类身上。需要进一步调查以确定是否一个更长的高压氧治疗或愈合时间将导致不同的发现,即使高压氧的影响在临床和实验中均是难以测量的。RTQ数据和骨种植体接触(BIC)数据显示了骨整合的相似之处,即照射骨中的种植体比未照射骨中的种植体骨整合差。另一方面,骨区域(BA)的结果显示与未经照射组相比,照射组在骨髓腔区形成更多的骨,而在皮质区不是。在一项Johnson等人的关于兔子的研究中也观察到了类似的发现;即,一些照射的松质骨样本比非照射样本表现出更高的骨矿物质含量(BMC)。这些观察结果的原因尚未完全了解,据作者来说,需要进一步研究。

在先前的一项研究中,在用20Gy照射的骨中评估骨种植体接触(BIC)时,报告了骨整合受损现象。与照射样本相比,非照射对照样本在皮质区域显示了更高的骨种植体接触(BIC)和骨区域(BA)百分比。当考虑骨皮质层之上螺纹时,这些结果与本研究一致。在Ornell等人的研究中,对接受不同辐射剂量的大鼠进行了生物力学试验。与未经照射的骨相比,接受20Gy的研究组显示,生物力学强度降低。

体内实验模型如本研究中使用的模型的一个可

能的缺点,是未经照射的后腿可能受到辐射引起的骨骼反应的影响。

本研究中的大鼠在研究开始时的平均年龄为14周,实验周期为5周。5周的实验周期因为它可能会消除由高压氧治疗引起的潜在差异而显得过长了。大鼠的年龄和实验时间的确定是因为之前的一项具有类似种植体设计的大鼠研究(没有辐射并且没有高压氧治疗)作为室内基线研究进行(Sarve等人,未公布数据)而确定的。在那项研究中,骨种植体接触(BIC)和骨区域(BA)值较低,但与本研究在非照射组的发现非常相似。

在有辐射损伤的骨组织的小动物中,双能X线骨密度测量法不是常用的测量方法。尽管双能X-线吸收法(DEXA)只是一种近似方法,但在非照射骨和照射骨之间在骨矿物质密度(BMD)和骨矿物质含量(BMC)上观察到了差异,但高压氧治疗未见明显差异,这与本研究中使用的其他分析方法得到的结果一致。

尽管以前的实验研究涉及到不同的物种、工具和技术设计,但高压氧并没有显示出对动物骨骼的愈合有任何深远的影响。然而,在Johnsson等人的一项研究中,在对照射和未照射兔骨扭矩测试时,高压氧被证明有效果,尽管不显著。在骨形成的研究中,例如,在有或没有高压氧时使用骨收获室模型和牵张成骨,也指出高压氧改善了实验结果。在Clark等人的一项使用包括牵张成骨在内的方案研究骨形成的兔子研究中,在4周的实验周期中,骨密度测量中高压氧没有深远影响。在Chen等人的一项使用其他组织形态计量学参数的研究中,高压氧稍微改善了照射大鼠骨小梁的形成。

由于研究设计不同,目前的结果很难与其他各种实验研究进行比较。也许最不一致和未校准的因素是它的动物本身。因此,需要进一步的研究来增加对高压氧对照射骨中种植体骨整合的影响的知识和理解。这在临床上是非常重要的,因为有照射受损骨的患者可能受益于早期种植体植入,以提高生活质量;此外,口腔种植治疗可能是这种类型患者的唯一修复选择。拥有新增和补充技术的进一步的研究正在进行当中。

5 结论

本研究未显示经高压氧治疗后种植体骨整合增强。在5周的实验周期内高压氧似乎没有损害或增强放置在大鼠骨中的种植体的骨整合。