论著

文章编号:1000-5404(2005)15-1558-03

SP在失神经下颌骨骨痂中的表达及意义

何海涛,谭颖徽,王建华,张 纲 (第三军医大学新桥医院口腔科,重庆 400037)

提 要: 目的 通过观察P物质(substance P, SP)在失下牙槽神经下颌骨骨折骨痂中的表达,探讨感觉神经对颌骨骨折愈合的影响。**方法** 选用中国大白兔32只,分为实验组(失下牙槽神经下颌骨骨折)和对照组(单纯下颌骨骨折),分别在术后第7、14、21、28天处死动物,用免疫组化、HE染色检测SP在新生骨痂中的表达,并观察骨痂愈合方式。**结果** 失神经骨折组在各个时期较单纯骨折组大量纤维组织增生明显,编织骨成熟度较低,骨性骨痂在新生骨痂中比例明显偏低;骨痂中SP着色明显浅于对照组,晚期两组染色都变深。**结论** 感觉神经参与了早期骨修复和晚期的改建,神经损伤后影响骨痂形成的质量,神经参与骨折愈合的调控与SP相关。

关键词: P物质;下颌骨骨折;失下牙槽神经;骨折愈合

中图法分类号: Q516; R745.1; R782.4 **文献标识码**: A

Subtance P expression in mandibular callus after section

HE Hai-tao, TAN Ying-hui, WANG Jian-hua, ZHANG Gang (Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effect of sensory nerve on mandibular fracture through detecting the expression of SP in mandibular callus after inferior alveolar nerve (IAN) section. **Methods** Thirty-two Chinese rabbits were divided into two groups. All rabbits suffered from a standardized fracture in the left mandibula, and half of them underwent IAN section. The callus were stained by hematoxylin and immunochemistry to observe the expression of SP in callus and fracture healing process. **Results** There were a larger quantity of fibrous callus formation, relatively immatured woven bone callus, lower proportion between immatured bone callus and new bone callus and less immunoreactive substance P in the group with IAN section than in the group with intact IAN at day 7, 14, 21, 28 after operation. Strong immunoreaction of substance P occurred mainly in bone marrow on day 28 postoperatively in both groups. **Conclusion** Sensory nerve may involve in the process of callus formation at early stage and bone remodeling at late stage so that sensory nerve injury influences the quantity and quality of new callus formation. It seems that neural involvement in bone healing is related to the local concentration of SP in the callus.

Key words: subtance P; mandibular fracture; inferior alveolar nerve section; fracture healing

随着创伤修复学理论的进一步深入,创伤后修复受细胞因子、激素及神经肽等多因素的网络调控已经逐渐为大家所接受。感觉神经肽作为一种重要的神经调控性物质影响着骨折的愈合已在临床及实验中得到证实,但包括感觉神经肽在内的各因素间的相互作用以及对骨折修复的启动、联动等具体调节机制目前仍然不清楚。近几年研究表明,P物质(substance P, SP)作为一种重要神经肽参与了软组织创伤和骨折的修复和重建,其影响骨折愈合的机制及与其它调节因子间的相互作用正成为目前创伤修复学研究的热点。本实验通过建立失下牙槽神经下颌骨骨折的动物模型,检测新生骨痂中SP表达的变化对感觉神经参与骨折愈合及其可能机制作进一步探索。

基金项目:教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(教外习留[2004]527号),第三军医大学科研基金资助项目(XG200364)
Supported by the Starting Funds for Personnel Returning from Overseas of Ministry of Education ([2004]527) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University(XG200364)

作者简介:何海涛(1974-),男,四川省南充市人,硕士研究生,医师,主要从事颌面部创伤与修复方面的研究。电话:(023)68774801,E-mail:Jack_paul223@sina.com

通讯作者:谭颖徽,电话:(023)68755632, E-mail:tanyh1962@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-03-30;**修回日期**:2005-05-11

1　材料与方法

1.1　主要试剂

P 物质(SP)抗体购于 Sigma 公司，SABC 免疫组化试剂盒购于博士德生物有限公司。

1.2　方法

1.2.1　动物分组模型　　中国大白兔购于第三军医大学新桥医院实验动物中心，共 32 只，体质量 1.90 ~ 2.10 kg，雌雄各半，随机分为 2 组，失神经下颌骨骨折组(实验组)和单纯骨折组(对照组)各 16 只。

1.2.2　模型的建立　　肌肉注射速眠新麻醉满意后，在无菌条件下于下颌骨左侧下缘作切口，暴露下颌骨下缘及嚼肌，在距下颌切迹上后方约 1.5 cm 处(下颌孔投影处)去除骨皮质暴露下颌管及下牙槽神经，实验组切断神经约 6 mm，对照组不切断神经；然后用牙科电钻(3 000 r/min)在下颌切迹前方约 1.5 cm 处作 1 mm × 5 mm 大小全层骨缺损。实验组和对照组均置于相同条件下饲养。

1.2.3　骨标本的制取及石蜡切片制作　　在术后第 7、14、21、28 天在活体上快速(约 5 min)切取 3 mm × 3 mm × 6 mm 标本，4% 多聚甲醛固定、10% EDTA(pH = 7.2)脱钙，经脱水、透明、包埋后石蜡切片。石蜡切片用于免疫组化染色(SABC 法)及 HE 染色，检测 SP 在骨痂中的表达，观察骨痂的愈合方式。

1.2.4　免疫组化染色结果判定标准　　+：染色淡黄色；++：染色深黄色；+++：染色褐色。

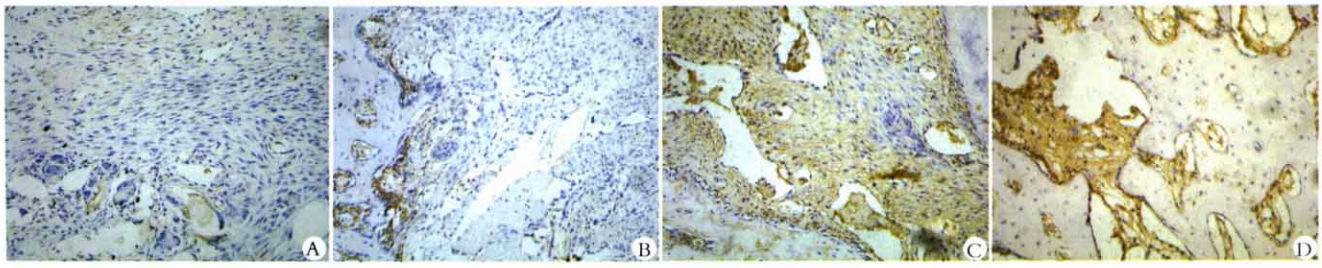
2　结果

2.1　组织学变化

术后第 7 天，失神经骨折组大量纤维组织增生，有少量编织骨形成，成熟度不高，保留神经骨折组纤维组织增生活跃，有较多的编织骨形成。术后第 14 天，失神经骨折组仍有较多的纤维组织及编织骨形成，较 7 d 组成熟，保留神经骨折组编织骨进一步增多、成熟度增高，较同期失神经骨折组明显成熟，纤维组织相对较少；在术后 21、28 d，失神经骨折组编织骨进一步增多、成熟，但纤维组织也较多，到 28 d 仍有较多纤维组织，保留神经骨折组编织骨进一步增多逐渐成熟接近正常骨痂，成熟度及骨性骨痂在新生骨痂中的比例明显高于同期失神经骨折组，纤维组织很少。

2.2　P 物质在新生骨痂中的表达

术后第 7 天，失神经骨折组 SP 在细胞间质中散在点状分布，染色(+)，保留神经骨折组 SP 在细胞间质中呈灶性分布，染色(++)；术后第 14 天，失神经骨折组 SP 染色分布稀疏，染色(- ~ +)，保留神经骨折组较广泛分布疏松结缔组织内，染色(++ ~ +++)(图 1A、B)；术后第 21 天，失神经骨折组 SP 广泛分布于细胞间质，染色逐渐加深(+ ~ ++)，保留神经骨折组 SP 染色广泛分布于疏松结缔组织，染色稍变浅(+ ~ ++)；术后第 28 天，失神经骨折组及保留神经骨折组 SP 染色都逐渐加深，但保留神经组(+++)强于失神经组(++)(图 1C、D)。



A: 14th day after operation in experimental group; B: 14th day after operation in control group; C: 28th day after operation in experimental group; D: 28th day after operation in control group

图 1　SP 免疫组化染色　(SABC × 200)

Fig 1　SP expression in bone callus　(SABC × 200)

3　讨论

骨折修复和改建是成骨细胞和破骨细胞协同作用的结果，受多种细胞因子、激素和神经肽等多因素的网络调控。研究表明：分布在骨膜、干骺端、骨髓等骨代谢活跃区的感觉神经参与了骨创伤的修复和改建。Hukkanen 等[1]切断大鼠的坐骨神经后发现神经损伤组的骨痂量较单纯骨折组多，生物力学强度差。Onuoha[2]对各种骨折患者 24 h 内血循环中 SP 和 CGRP 水平进行检测，发现其较正常对照组明显增高，提示一个完整初级感觉神经系统对于炎症和创伤修复的启动具有十分重要的作用，其感觉功能的丧失将会延迟愈合。我们在实验中发现：去下牙槽神经骨折组纤维组织增生明显活跃，但新生骨痂成熟度明显低于单纯骨折组骨痂，在骨折愈合中后期尤其明显，21、28 d 神经损伤组仍可见较多纤维组织增生，骨性骨痂比例明显同期低于单纯骨折组。这些结果进一步证实感觉神经参与了骨折愈合，神经损伤制约着骨修复的进度和和骨痂形成的质量，其作用机制可能与其分泌的神经肽有关。Goto 等[3]发现成骨细胞和破骨细胞膜上或细胞质内存在多种神经肽受体；体外实验表明 SP 在培养状态下能刺激成骨细胞或破骨细胞活性[4,5]。但由于感觉神

经肽在骨组织内种类较多,在不同区域的含量、分布的差异和多种不同的病理生理作用,以及与其它因子在骨折愈合不同阶段相互协同/抑制作用的复杂性,决定了神经参与骨折愈合的调控方式、途径的复杂性。在这个复杂的调控系统中,包括感觉神经肽在内的各因子在骨折愈合的启动、联动过程中的相互作用及其作用机制有待于进一步探索。

Vandevska-Radunovic 在大鼠出生后 7、14、21 d 用免疫组化染色检测磨牙及其支持组织内 CGRP 受体和 NK1,发现这些受体阳性细胞的数目随着牙冠和牙根的发育进展不断增加,提示神经肽参与了牙的发育,并且可能是通过受体水平的提高来实现的[6]。Chole 等[7]发现中耳内骨改建可能是受神经调控的,并呈 SP 依赖性。Kingery[8]发现切断单侧坐骨神经可导致双侧后肢干骺端等骨代谢活跃区骨密度降低,神经损伤侧较明显,给予 NK1 抗体可加剧这一变化。因此,SP 作为一种重要的感觉神经肽,对于骨折的修复和改建起着重要作用。本实验显示:失神经下颌骨骨折组早期 SP 在骨痂中含量明显较少,这与失神经后 SP 的分泌明显减少有关,21 d 后逐渐增多可能是神经的再生并长入骨痂中有关;在各个时期 SP 在新生骨痂中含量较单纯骨折组明显较少,致使成骨细胞和破骨细胞活性降低,成熟骨明显较少,但由于骨折局部 SP 较少导致缺血缺氧加重,刺激大量纤维组织形成而使骨痂量较多;单纯骨折组早中期 SP 分泌增加与 PDGF 在骨痂中表达增加类似,这是否提示 SP 与 PDGF 在刺激成骨和破骨细胞活性是否具有协同作用,这还有待于进一步证实。单纯骨折组后期 SP 的增加可能与 SP 参与骨改建有关。Madsen 等[9]在切除大鼠同侧坐骨神经和股神经的胫骨骨折的晚期的骨痂中发现神经损伤组较单纯骨折组 SP 含量明显减少,但比对侧未骨折肢体 SP 含量增多 20%,分析分析这些 SP 来源于新生的神经,并分析晚期 SP 的增多可能与骨折后期骨改建有关。本实验也得出类似的结果:术后第 28 天两组骨痂中 SP 染色较明显增强,主要分布于骨髓腔内。进一步研究表明:在大鼠胫骨骨缺损中新生骨痂内在中晚期发现有神经长入,并推测这些后长入的神经与后期骨的改建有关[10]。但骨折愈合晚期 SP 末梢释放的诱导机制及在骨改建启动、联动及调控机制仍然不清楚。我们知道:PDGF 在调节骨改建和破骨细胞形成和功能也发挥着关键作用,在骨折修复中还可能存在双向调节作用,SP 作为一种神经性调控物质在影响骨折愈合的过程中与 PDGF 是否具有协同或抑制作用也有待作进一步探索。

目前,神经影响着骨折的修复和改建已经得到证实,并且很可能是通过分泌的神经肽而参与调控的。SP 作为一种重要的神经肽,参与了骨折的修复和重建,除了通过调节创伤局部血流量影响骨折的修复外,还可直接作用与成骨细胞和破骨细胞膜上受体而影响其活性[3~5],但是其具体机制仍不清楚。近年研究表明 SP 还可通过上调修复细胞内生长因子或其受体 mRNA 的表达而增强修复细胞活性,促进机体组织愈合[11]。因此,SP 作为创伤修复一种重要的神经性调控性物质,在生长因子、细胞因子、激素等参与骨折愈合的网络调控中所充当的角色及其具体机制仍需作进一步探索。

参考文献:

[1] Hukkanen M, Konttinen Y T, Santavirta S, *et al*. Effect of sciatic nerve section on neural ingrowth into the rat tibial fracture callus[J]. Clin Orthop, 1995, (311): 247-257.

[2] Onuoha G N. Circulating sensory peptide levels within 24 h of human bone fracture[J]. Peptides, 2001, 22(7): 1107-1110.

[3] Goto T, Yamaza T, Kido M A, *et al*. Light-and electron-microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone[J]. Cell Tissue Res, 1998, 293(1): 87-93.

[4] Shih C, Bernard G W. Neurogenic substance P stimulates osteogenesis *in vitro*[J]. Peptides, 1997, 18(2): 323-326.

[5] Mori T, Ogata T, Okumura H, *et al*. Substance P regulates the function of rabbit cultured osteoclast; increase of intracellular free calcium concentration and enhancement of bone resorption[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 262(2): 418-422.

[6] Vandevska Radunovic V, Fristad I, Wimalawansa S J, *et al*. CGRP1 and NK1 receptors in postnatal, developing rat dental tissues[J]. Eur J Oral Sci, 2003, 111(6): 497-507.

[7] Chole R A, Tinling S P. Adaptive bone modeling in the middle ear is substance-P dependent[J]. Am J Otol, 1998, 19(4): 521-524.

[8] Kingery W S, Offley S C, Gou T Z, *et al*. A substance P receptor (NK1) antagonist enhances the widespread osteoporotic effects of sciatic nerve section[J]. Bone, 2003, 33(6): 927-936.

[9] Madsen J E, Hukkanen M, Aune A K, *et al*. Fracture healing and callus innervation after peripheral nerve resection in rats[J]. Clin Orthop, 1998, (351): 230-240.

[10] Madsen J E, Hukkanen M, Aspenberg P, *et al*. Time-dependent sensory nerve ingrowth into a bone conduction chamber[J]. Acta Orthop Scand, 2000, 71(1): 74-79.

[11] Rameshwar P, Poddar A, Zhu G, *et al*. Receptor induction regulates the synergistic effects of substance P with IL-1 and platelet-derived growth factor on the proliferation of bone marrow fibroblasts[J]. J Immunol, 1997, 158(7): 3417-3424.

(编辑 薛国文)