

## 低强度脉冲超声对去势大鼠种植体

## 早期骨整合的影响 标题宋体二号字,不加粗

吴雪林<sup>1</sup>,何浩<sup>1</sup>,黄浩原<sup>1</sup>,陈科屹<sup>1</sup>,刘柳<sup>1</sup>,牟雁东<sup>2</sup>

(1.四川省中西医结合医院口腔科,四川 成都 610041;2.四川省医学科学院·四川省人民医院口腔科,四川 成都 610072)

不同单位用1,2标注;同一单位不同科室作者,先写单位,之后以a、b标注科室 小五号字

摘要小五号字

**【摘要】**目的 探讨不同强度的低强度脉冲超声对去势大鼠股骨种植早期骨整合的影响。**方法** 40 只经双侧卵巢切除术后 12 周的雌性 SD 大鼠,于双侧股骨干髓端植入柱状钛合金种植体,分为两组,每组各 20 只。术后 2 天开始对右侧股骨种植体周围分别进行 30 mW/cm<sup>2</sup>和 80 mW/cm<sup>2</sup>强度的低强度脉冲超声照射,作为试验侧,每天 1 次,每次 20 分钟,左侧股骨进行空照射作为自身对照侧。术后第 4、8 周分批处死动物,每批 20 只 每组 10 只,获取双侧股骨标本,进行 Micro-CT 扫描及三维重建和生物力学性能检测。**结果** 与对照侧相比,试验侧股骨种植体的骨整合相关参数均有所增加。4 周时不同照射强度的试验侧之间,骨整合相关参数的增加率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。8 周时 80 mW/cm<sup>2</sup>的照射强度显示出更好的生物学效应( $P < 0.05$ )。**结论** 低强度脉冲超声可加快去势大鼠股骨种植体骨整合的形成,有利于种植体初期稳定性的改善。较高强度的低强度脉冲超声更有利于种植体的长期维护。

**【关键词】** 低强度脉冲超声;种植体;骨整合 两个关键词之间用分号**【中图分类号】** R782.12**【文献标志码】** A**【文章编号】** 1672-6170(2014)03-0025-05

完善中图分类号,网上查

关键词3~5个

英文标题:小四号字,加粗

**Effect of different intensity of low-intensity pulsed ultrasound on early osseointegration of implants in femurs of ovariectomized rats** WU Xue-lin<sup>1</sup>, HE Hao<sup>1</sup>, HUANG Hao-yuan<sup>1</sup>, CHEN Ke-yi<sup>1</sup>, LIU Liu<sup>1</sup>, MU Yan-dong<sup>2</sup> (1. Department of Stomatology, Sichuan Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Chengdu 610041, China; 2. Department of Stomatology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610041, China) “单位,城市,邮编,中国”

**【Corresponding author】** MU Yan-dong 注意勿遗漏此处通讯作者标注

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of low-intensity pulsed ultrasound on early osseointegration of implants in femurs of ovariectomized (OVX) rats. **Methods** Forty OVX rats accepted an implant insertion in the bilateral femurs after 12 weeks of bilateral ovariectomy. The animals were randomly divided into two groups. After two days of implantation, the right femurs of one group started receiving the stimulus of low-intensity pulsed ultrasound once a day and twenty minutes at a time with 30mW/cm<sup>2</sup> intensity, while another group with 80mW/cm<sup>2</sup> intensity. After 4 and 8 weeks of implantation, ten rats of each group were sacrificed and their femurs were retrieved for Micro-CT analysis and biomechanical test. **Results** The right side revealed improved osseointegration compared to the left side. The increase rate was no difference between the two groups at four weeks, but the 80mW/cm<sup>2</sup> intensity group is better at eight weeks. **Conclusion** These results demonstrate that low-intensity pulsed ultrasound could enhance the early osseointegration of implants in OVX rat's femurs, and suggest the feasibility of using low-intensity pulsed ultrasound to improve early stabilization and long-term results of implant in poor bones.

**【Key words】** Low-intensity pulsed ultrasound; Implant; Osseointegration

目前修改版本无需分栏!!!

现代口腔种植技术因其较高的临床成功率,已成为目前修复牙列缺损、缺失首选的治疗手段。种植体能否与骨组织形成良好的骨整合(osseointegration)及其形成的快慢、新生骨组织的质和量是影响种植体初期稳定性和远期效果的重要因素。目前临床常用的各类种植系统大多通过喷砂-酸蚀(sand-blasted and acid-etched, SLA)的表面处理<sup>[1]</sup>来达到促进种植体骨整合的目的,各种骨增量手术和骨挤压术也能一定程度上改善骨量不足或骨质不佳的情况。但对于骨质疏松症(osteoporosis)患者,这些手

段都略显不足。骨质疏松症尽管不是进行种植手术的绝对禁忌证,但与正常人群相比,骨组织更易流失,使得远期效果无法保证,更易出现种植体松动和失败<sup>[2]</sup>。骨质疏松症常见于老年人,老年人同时也是牙列缺损、缺失的高发人群。有效提高骨质疏松症患者的种植成功率,具有较高的临床应用价值。低强度脉冲超声(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)是一种非侵入性的物理刺激,已被应用于骨科临床多年。大量研究证实 LIPUS 可明显缩短骨折愈合时间,对骨不连、骨质疏松症等均有改善作用<sup>[3]</sup>,而且其促进成骨的效果不会受纯钛及其合金种植体的影响,因此,将 LIPUS 应用于促进种植体骨整合被认为是安全可行的。本研究以去势雌性 SD 大鼠为骨质疏松症模型,双侧股骨植入柱状钛合金种植体,采用不同强度的 LIPUS 刺激单侧股骨,

首次出现的英文缩写需在文中表明中文(英文全称,英文缩写)

**【基金项目】**四川省科技厅应用基础项目(编号:2010JY0045)

**【通讯作者简介】**牟雁东,女,博士后,主任医师,硕士研究生导师。中华医学会口腔修复专业委员会委员,四川省医学会口腔种植专委会副主任委员、口腔修复专委会常委四川省医学会口腔专委会委员。研究方向:口腔种植修复。

参考文献上标,遇序号连续时,用“~”连接起讫序号,如[1]、[2,3]、[1~3]

并与对侧股骨进行自身对照,通过显微计算机断层扫描技术(micro computed tomography, Micro-CT)扫描及三维重建和生物力学性能检测,评价不同强度的 LIPUS 对种植体早期骨整合的影响,以期为骨质疏松症患者种植体初期稳定性和远期效果的改善提供一定的试验依据。

## 1 资料与方法 一级标题、二级标题黑体五号字

### 1.1 一般资料

本研究于 2013 年 1~6 月在四川大学口腔疾病研究国家重点实验室完成,所采用的柱状钛合金(Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V)种植体由四川大学国家生物材料工程研究中心提供,表面无螺纹,直径为 1.0 mm,长度为 12 mm,经 240、360 及 600 目砂纸逐级打磨,75 μm TiO<sub>2</sub> 颗粒喷砂,丙酮、乙醇、去离子水 45 °C 超声清洗各 30 min 后,干燥备用。取 3 月龄雌性 SD 大鼠 40 只,体重 250~300 g,在 25 °C、55% 湿度,12 小时白昼交替条件下以标准实验大鼠饲料和自来水隔离饲养。

### 1.2 方法

SD 大鼠行双侧卵巢切除术后 12 周,称重后以 75 mg/kg 的氯胺酮行腹腔注射麻醉。消毒双侧股骨远端皮肤后切开,剥离至骨膜,以直径 1.0 mm 的钻针沿股骨长轴备洞至骨髓腔,缓慢旋入种植体至骨平面下后严密缝合并依次编号,术后 3 天给予抗生素和止痛剂。术后 2 天将 1~40 个编号随机分成两组,按编号抓取实验动物,每组 20 只,分别给予右侧股骨 LIPUS 照射(超声波生物学效应试验加载装置,四川盛华众合医疗器械有限公司,专利申请号 201110004818.7),强度 30 和 80 mW/cm<sup>2</sup>; 占空比 20%; 工作频率 1 MHz; 重复频率 1 kHz; 刺激时间 1 次/天,20 分钟/次)。左侧股骨空照射。术后第 4、8 周分批处死动物,每批 20 只,每组 10 只,分离双侧股骨,尽量剥离软组织,生理盐水中保存。

### 1.3 实验标本的 Micro-CT 扫描及三维重建

使用微焦点 CT 系统(μ-CT 80 scanner Scano Medical, Basserdorf, 瑞士; 电压 70 kV, 电流 114 μA, 层厚 0.1 mm, 积分时间 700 ms)对获取的标本(n=10)进行扫描。三维重建使用图像分割多阈值法,设定体素为 10 μm,骨组织的衰减系数为 1.64/cm,以区分其它组织<sup>[4]</sup>。以距离种植体表面向外 250 μm,距离生长板向下 2~12 mm 的空间范围为感兴趣区域(Volume of interest, VOI)。区域提取后,盲法计算骨体积分数(BV/TV); 骨组织在 VOI 中所占的比例,用以评价种植体周围骨量; 骨小梁厚度(Tb. Th); 在 VOI 中骨小梁的平均厚度; 骨小梁数量(Tb. N); 在 VOI 中单位长轴长度内骨组织与其它组织的交点数量; 骨小梁分离度(Tb. Sp)。并以与种植体直接接触的所有体素中骨组织所占的比例标定骨结合率(OI%)。增加率=(试验侧数据/对照侧数据-1)×

100%,再求每组 20 个增加率的均数和标准差。

### 1.4 实验标本的生物力学分析

标本(n=10)经 Micro-CT 扫描后,磨除部分干垢端骨组织暴露种植体末端,以自凝树脂固定标本,使种植体长轴与通用材料测试系统(Instron 5566, Norwood, 美国)的测试臂长轴一致。测试臂以 1 mm/min 的速度加载,通过位移/压力比计算最大推出力和最终剪切强度。

### 1.5 统计学方法

使用 SPSS 13.0 统计学软件包进行数据处理,计量资料以均数±标准差表示,采用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Micro-CT 扫描及三维重建的形态学测量分析

Micro-CT 的三维横断面和冠状面图像显示了种植体周围骨组织、骨小梁和种植体-骨界面的情况,见图 1~8。试验侧种植体第 4 周、第 8 周 Micro-CT 各参数比较见表 1、表 2。相对于对照侧,试验侧的各项骨整合参数均有所增加(P<0.05); 4 周时 30 mW/cm<sup>2</sup> 组与 80 mW/cm<sup>2</sup> 组试验侧增加率差异无统计学意义(P>0.05); 8 周时 80 mW/cm<sup>2</sup> 组增加率大于 30 mW/cm<sup>2</sup> 组,差异有统计学意义(P<0.05)。

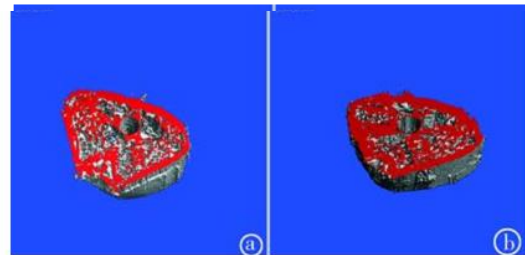


图 1 30 mW/cm<sup>2</sup> 组第 4 周试验标本生长板下 4 mm 横断面的三维重建图像(×20) a: 对照侧; b: 实验侧

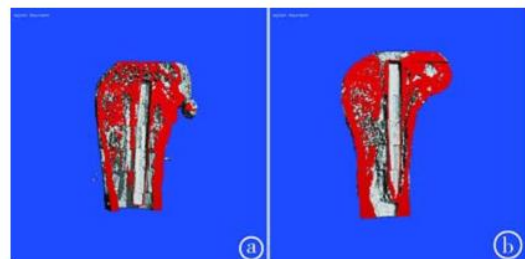


图 2 30 mW/cm<sup>2</sup> 组第 4 周试验标本冠状面三维重建图像(×20) a: 对照侧; b: 实验侧 图题小五黑体, 如多张图片, a、b...标注, 完善小标题

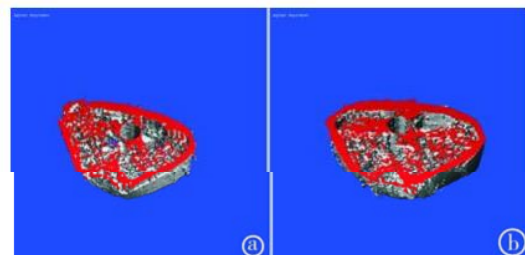


图 3 80 mW/cm<sup>2</sup> 组第 4 周试验标本生长板下 4 mm 横断面的三维重建图像(×20) a: 对照侧; b: 实验侧

表格需采用标准word表格，三线表，原则上分组为行，即最左列为组别

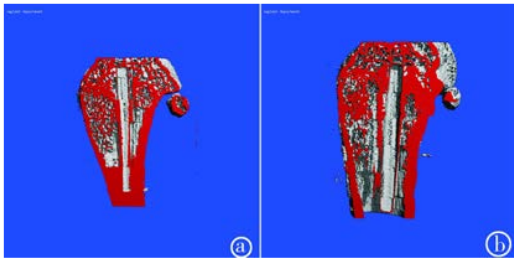


图 4 80 mW/cm<sup>2</sup> 组第 4 周试验标本冠状面三维重建图像(×20)a: 对照侧;b: 实验侧

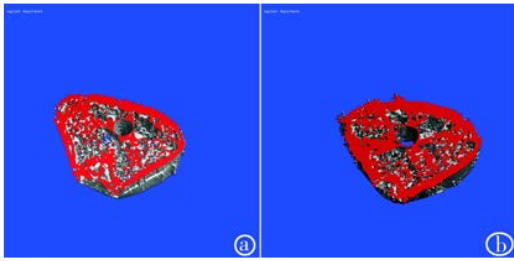


图 5 30 mW/cm<sup>2</sup> 组第 8 周试验标本生长板下 4 mm 横断面的三维重建图像(×20)a: 对照侧;b: 实验侧

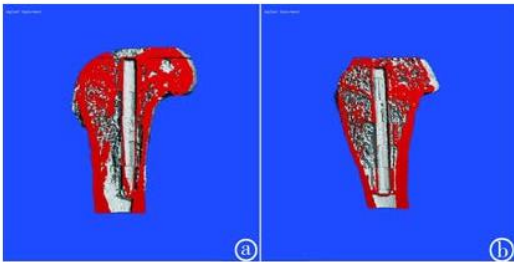


图 6 30 mW/cm<sup>2</sup> 组第 8 周试验标本冠状面三维重建图像(×20)a: 对照侧;b: 实验侧

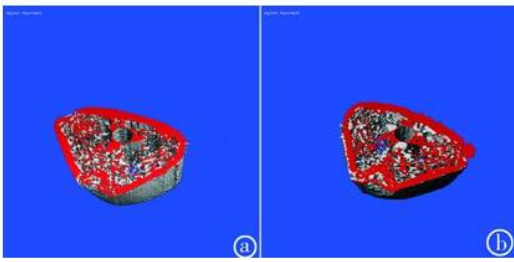


图 7 80 mW/cm<sup>2</sup> 组第 8 周试验标本生长板下 4 mm 横断面的三维重建图像(×20)a: 对照侧;b: 实验侧

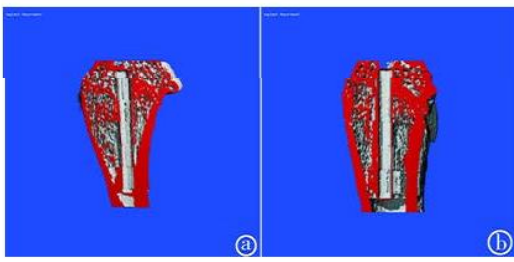


图 8 80 mW/cm<sup>2</sup> 组第 8 周试验标本冠状面三维重建图像(×20)a: 对照侧;b: 实验侧

表 1 试验侧种植体第 4 周的 Micro-CT 参数及相对于对照侧的增加率

参数	30 mW/cm <sup>2</sup> 组		80 mW/cm <sup>2</sup> 组	
	数据	增加率(%)	数据	增加率(%)
BV/TV(%)	16.7±2.9	11.3±2.25	15.7±4.3	11.7±1.55
Tb. N(mm <sup>-1</sup> )	2.92±0.22	31.2±2.33	3.38±0.27	33.1±5.23
Tb. Th(μm)	36.7±2.9	14.7±2.75	36.5±4.6	15.3±4.63
OI%	28.5±2.5	14.9±0.68	28.6±2.7	16.4±1.35

注意表格单位的标注，同类数据小数点后位数需统一

表 2 试验侧种植体第 8 周的 Micro-CT 参数及相对于对照侧的增加率

参数	30 mW/cm <sup>2</sup> 组		80 mW/cm <sup>2</sup> 组	
	数据	增加率(%)	数据	增加率(%)
BV/TV(%)	26.2±3.5	16.1±4.66	28.5±1.3	23.9±4.55*
Tb. N(mm <sup>-1</sup> )	2.31±0.28	34.9±3.05	2.42±0.29	50.4±2.33*
Tb. Th(μm)	69.7±2.8	13.9±2.41	69.5±3.3	17.4±1.76*
%OI	42.5±4.5	11.3±0.51	42.9±5.3	18.9±1.76*

\* 与 30 mW/cm<sup>2</sup> 组比较, P < 0.05

2.2 生物力学分析 种植体的最大推出力和最终剪切强度体现了种植体骨整合的生物力学性能,见表 3、表 4。相对于对照侧,试验侧的各项骨整合参数均有所增加(P < 0.05);4 周时 30 mW/cm<sup>2</sup> 组与 80 mW/cm<sup>2</sup> 组试验侧相对于对照侧的增加率差异无统计学意义(P > 0.05);8 周时 80 mW/cm<sup>2</sup> 组增加率大于 30 mW/cm<sup>2</sup> 组,差异有统计学意义(P < 0.05)。表格中若简单组间数据比较,需列出统计量及 P 值;若多组数据比较,需以\*号等标注差异性,并在表格下方备注

表 3 试验侧种植体第 4 周的生物力学参数及相对于对照侧的增加率

参数	30 mW/cm <sup>2</sup> 组		80 mW/cm <sup>2</sup> 组	
	数据	增加率(%)	数据	增加率(%)
最大推出力(N)	14.4±2.5	2.9±0.51	12.8±2.7	3.2±0.68
最终剪切强度(N/mm <sup>2</sup> )	1.21±0.11	13.1±4.21	1.24±0.14	17.0±1.22

表 4 试验侧种植体第 8 周的生物力学参数及相对于对照侧的增加率

参数	30 mW/cm <sup>2</sup> 组		80 mW/cm <sup>2</sup> 组	
	数据	增加率(%)	数据	增加率(%)
最大推出力(N)	28.5±3.5	8.3±0.66	28.2±4.9	13.7±1.76*
最终剪切强度(N/mm <sup>2</sup> )	2.42±0.24	14.2±7.80	2.64±0.57	23.9±7.01*

\* 与 30 mW/cm<sup>2</sup> 组比较, P < 0.05

### 3 讨论

3.1 种植体周围骨小梁情况 种植体周围骨小梁情况是衡量种植体周围骨质的重要指标。在骨折愈合过程中,骨小梁数量越多、厚度越大,其成骨活动越活跃。而在正常生理条件下,骨小梁数量越多、厚度越大,骨质越佳<sup>[5]</sup>。相对于对照侧,试验侧的骨小梁数量和厚度均有所增加,说明 LIPUS 照射可

以促进成骨活动的活跃。第 4 周时,不同强度试验侧之间相对于对照侧的增加率无统计学差异,提示 LIPUS 对成骨活动的促进作用具有饱和性,30 mW/cm<sup>2</sup> 的照射强度已经可以达到效果。而第 8 周时,80 mW/cm<sup>2</sup> 照射强度的试验侧表现出更好的骨整合状态,提示较高强度的 LIPUS 在成骨活动趋于稳定的时期或许具有更佳的生物学效应。与骨小梁情况对应,骨体积分数、骨结合率、最大推出力和最终剪切强度给出了类似的结果。

**3.2 LIPUS 的生物学效应** 超声是一种经皮传递的非侵入性物理刺激,自 1960s 起就被广泛应用于外科、眼科、癌症治疗及理疗等领域<sup>[6]</sup>。目前 LIPUS 应用于骨科临床辅助治疗骨折愈合多年,并有较好的临床效果<sup>[7,8]</sup>。种植体植入颌骨后,早期骨整合的过程与骨折的愈合过程类似,大致可分为炎症期、骨修复期、骨改建期,LIPUS 在这 3 个时期均能发挥作用<sup>[9]</sup>。Nakao 等<sup>[10]</sup>认为 LIPUS 通过抑制白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 的分泌,减少成骨细胞向破骨细胞转化,从而减少种植体植入后的骨丧失。Gleizal 等<sup>[11]</sup>的研究也给出了相同的观点,提示 LIPUS 有利于种植体的长期维护,提高成功率。

LIPUS 是强度低于 100 mW/cm<sup>2</sup> 超声波,其作用于生物体的主要效应是空化效应,即声波穿透组织引起液体中的微气核空化泡发生共振,当声压达到一定值时气泡发生生长和崩溃的动力学过程,可促进各类成骨细胞增殖、分化、分泌细胞外基质,继而矿化形成骨组织。就这一作用方式而言,LIPUS 更类似一种机械刺激<sup>[12]</sup>。LIPUS 不仅具有促进骨量增加的潜能,还可引起骨小梁的改建。2011 年 Xie 等<sup>[13]</sup>的研究证实 LIPUS 可诱导新生骨痂内的骨小梁沿应力轴的方向排列,更接近正常骨组织;同时还可以通过促进 I、II 型胶原的合成来加速骨折愈合<sup>[3]</sup>。

**3.3 LIPUS 强度的选择** 目前就成软骨和成骨的相关研究而言,强度从 30 mW/cm<sup>2</sup> 到 770 mW/cm<sup>2</sup> 的 LIPUS 均被研究过,采用较多的参数设置是使用的 SAFHS<sup>®</sup> (Exogen, USA) 系统,强度为 30 mW/cm<sup>2</sup>。Choi 课题组<sup>[14]</sup>使用的 Noblelife<sup>®</sup> 系统 (Duplogen, Suwon, Korea),强度为 200 ~ 300 mW/cm<sup>2</sup>,为持续非脉冲的工作模式。我国的部分研究者使用过 30、50、60 mW/cm<sup>2</sup> 等强度,且报道集中于研究促缺损区成骨、牵张成骨、种植体骨整合、骨折愈合等成骨方向。不同强度超声引起的热效应和空化效应不同,生物学效应当然也不同,以往研究还证明超声 50mW/cm<sup>2</sup> 的强度跨度能观察到有差别现象,所以我们选择了 30 mW/cm<sup>2</sup> 和 80 mW/cm<sup>2</sup> 两种强度,

而其它参数均参考以往研究,希望能保持可比性。

#### 4 结论

LIPUS 作为一种安全、非侵入的治疗手段,在促进骨组织愈合方面的作用不容忽视。本研究的结果初步显示 30mW/cm<sup>2</sup> 的 LIPUS 照射即可达到促进早期骨整合的目的,而 80 mW/cm<sup>2</sup> 的照射更有利于种植体的长期维护。若能进一步探明 LIPUS 促进骨组织愈合的作用机制,其在加快种植体骨整合、缩短治疗周期、维持骨质疏松症患者骨量方面的应用则会更有价值。

参考文献标题:小五,黑体,标点符号全部采用英文格式  
 请加引本刊文献 【参考文献】  
 作者如为三位以下,全部列出;超过三位的,以“等”、“et al”表示

- [1] Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration [J]. Dent Mater, 2007, 23(7): 844-54. 年,卷(期):页码.
- [2] Shibli JA, Aguiar KC, Melo L, et al. Histological comparison between implants retrieved from patients with and without osteoporosis [J]. Int J Oral Maxillofac Surg 2008, 37: 321-327.
- [3] Claes L, Willie B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2007, 93(1-3): 384-398.
- [4] Gabet Y, Müller R, Levy J, et al. Parathyroid hormone 1-34 enhances titanium implant anchorage in low-density trabecular bone: a correlative micro-computed tomographic and biomechanical analysis [J]. Bone, 2006, 39(2): 276-282.
- [5] Wang H, Ji B, Liu XS, et al. Analysis of microstructural and mechanical alterations of trabecular bone in a simulated three-dimensional remodeling process [J]. Journal of Biomechanics, 2012, 45(14): 2417-2425.
- [6] Liu YJ, Huang H. Development and Application of Modern Ultrasound Medicine [J]. Chinese Medical Equipment Journal, 2010, 31(12): 1-3.
- [7] Martin I, Smith T, Wendt D. Bioreactor-based roadmap for the translation of tissue engineering strategies into clinical products [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(9): 495-502.
- [8] Aaron RK, Ciombor DM, Wang S, et al. Clinical biophysics: The promotion of skeletal repair by physical forces [J]. Annals of the New York Academy of Science, 2006, 1068(1): 513-531.
- [9] Woo DG, Ko CY, Kim HS, et al. Evaluation of the potential clinical application of low intensity ultrasound stimulation for preventing osteoporotic bone fracture [J]. Ann Biomed Eng, 2010, 38(7): 2438-2446.
- [10] Nakao J, Fujii T, Kusuyama J, et al. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits LPS-induced inflammatory responses of osteoblasts through TLR4-MyD88 dissociation [J]. Bone, 2014, 58: 17-25.
- [11] Gleizal A, Ferreira S, Lavandier B, et al. The impact of low intensity pulsed ultrasound on mouse skull bone osteoblast cultures [J]. Rev Stomatol Chir Maxillofac, 2010, 111(5-6): 280.
- [12] Cheung WH, Chin WC, Qin L, et al. Low intensity pulsed ultrasound enhances fracture healing in both ovariectomy-induced osteoporotic and age-matched normal bones [J]. Journal of Orthopaedic Research, 2012, 30(1): 129-136.
- [13] Xie LK, Wangrangsimakul K, Suttapreyasri S, et al. A preliminary study of the effect of low intensity pulsed ultrasound on new bone formation during mandibular distraction osteogenesis in rabbits [J]. International journal of oral and maxillofacial surgery, 2011, 40(7): 730-736.