

颊、腭粘膜移植修复硬腭裸露骨面的组织学观察

王志勇 石冰 鲁大为 宋庆高

摘要 目的:研究硬腭裸露骨面和应用颊、腭粘膜移植覆盖裸露骨创面后的组织学愈合过程。方法:选用32只日本大白兔,随机分为正常对照组、裸露骨面组、颊粘膜移植组、腭粘膜移植组。裸露骨面组,用外科手术形成一恒定大小的矩形裸露骨面;颊、腭粘膜移植组,则在裸露骨面的基础上,分别用相同面积的颊、腭粘膜移植覆盖裸露骨面。术后定期处死动物,切取硬腭制作组织学切片,观察不同处理措施的腭部组织学愈合过程。结果:裸露骨面组,术后2周出现致密纤维结缔组织;术后4周,软组织与骨组织之间出现 Sharpey s 纤维,并存在至观察期结束。采用颊、腭粘膜移植组,结缔组织较疏松,无 Sharpey s 纤维形成,组织结构类似于正常组织。结论:采用颊、腭粘膜移植修复硬腭裸露骨面,可有效地阻止 Sharpey s 纤维形成。

关键词 唇腭裂 颊粘膜 腭粘膜 裸露骨面 组织学

A Histological Study on Healing Process of Palatal Wound with Denuded Bone Restored with Transplanted Buccal or Palatal Mucosa

Wang Zhiyong

Nanjing Stomatologic Hospital, Nanjing

Shi Bing, Lu Dawei, Song Qinggao

West China College of Stomatology, Sichuan University

Abstract

Objective: The purpose of this study was to observe the healing process of palate wound with denuded bone restored with transplanted buccal or palatal mucosa and to elucidate the mechanism of maxillary growth inhibition following palate repair. **Methods:** 32 Japan white rabbits, 5 weeks old, were selected as the subjects for this study. They were divided into 4 groups at random. The rabbits in group I was the control without receiving any treatment. The rabbits in group II, III, IV was surgically denuded the bone of palate, and afterwards, the rabbits in group II were not received further restoration, but rabbits in group III and IV were restored with transplanted buccal and palatal mucosa respectively. From 2 to 14 weeks after surgery, at regular intervals, palatal wounds were observed by using a light microscope. Histological changes were also compared among different groups. **Results:** It was found in group II that dense connective tissue was formed 2 weeks after the surgery, and Sharpey's fibers was formed between the scar and bone tissue 4 weeks after the surgery. However, no Sharpey's fiber was found in group III and group IV, and in the latter two groups, the histological character of tissue was similar to that of the control. **Conclusion:** Prevention of the attachment of Sharpey's fibers to the palatal bone could be effectively accomplished by covering the denuded palatal bone with the transplanted buccal or palatal mucosa.

Key words: cleft palate and lip buccal mucosa palatal mucosa denuded bone histology

本课题为高等学校优秀教师教学和科研奖励基金(1999)和霍英东青年教师基金(编号71040)资助项目

作者单位:210008 南京市口腔医院(王志勇现为四川大学华西口腔医学院博士研究生),四川大学华西口腔医学院(石冰、鲁大为、宋庆高)

大量的临床与动物实验研究表明^{1~4},腭裂修补手术后腭部遗留的裸露骨面是抑制上颌骨生长发育的直接原因。裸露骨面的瘢痕组织,由于缺少大血管和弹力纤维,胶原纤维呈横向走行并通过 Sharpey s 纤维附着于硬腭骨上,而且粘骨膜与牙周

韧带相延续,因此在收缩时,对牙弓产生向内的牵张力,从而导致了面中份骨的发育不足。为了避免或减轻腭裂手术后裸露骨面直接愈合对上颌骨生长的抑制作用,国外学者试用过多种生物和人工材料来修复腭裂术后遗留的裸露骨面,但无一获得成功。本研究设计了用自体口腔颊、腭粘膜即刻移植修复硬腭裸露骨面的新方法,并对其移植后的组织学愈合过程进行了观察,以期探索腭裂术后继发畸形的防治方法提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物的选择与分组

32 只出生后 5 周的纯种日本大耳白幼兔,体重 0.5 ~ 0.6 kg,均为雌性。将实验动物随机分为 4 组。正常对照组:8 只,腭粘骨膜未经任何处理。裸露骨面组:8 只,于左侧腭粘骨膜,用外科方法切除腭粘骨膜,形成恒定大小的裸露骨面,约 5 mm × 40 mm。颊粘膜移植组:8 只,在裸露骨面的手术基础上,再取同侧颊粘膜,行游离移植,覆盖创面。腭粘膜移植组:8 只,在裸露骨面的手术基础上,将切除的腭粘骨膜,修剪去骨膜后原位移植覆盖骨面。

1.2 动物的麻醉、体位与手术方法

动物取仰卧位,用 5% 水合氯醛,按每公斤体重 3 ml 行腹腔内注射,保持开口位。常规消毒后,开始手术。

裸露骨面组:在硬腭左侧作矩形切口,长 × 宽为 5 mm × 40 mm。切口内侧距腭中缝 1 mm,外侧距龈缘 2 mm,后界达第一磨牙远中缘水平,前界至侧切牙远中缘水平。切口深达骨面,全层切除腭粘骨膜。创面填碘仿纱条止血。

颊粘膜移植组:在硬腭右侧,按照裸露骨面组的手术方法形成 5 mm × 40 mm 的裸露骨面。切取同侧颊囊区相同面积的颊粘膜,移植至裸露硬腭骨面,缝合创缘,加压固定。

腭粘膜移植组:在右侧硬腭,依照裸露骨面组手术方法形成创面。将切取的腭粘骨膜修剪去骨膜,再原位缝合,覆盖裸露骨面,适当加压固定。

正常对照组:选择 8 只幼兔,其左侧腭部不作任何处理,用于观察正常组织结构。

1.3 观察期及动物处理方法

分别于术后 2、3、4、6、8、10、12、14 周处死每组动物 1 只。切取硬腭部分,固定于 10% 福尔马林液,24 ~ 72 h。

1.4 组织学标本的制备与观察方法

标本经固定后,于蚁酸和枸橼酸钠混合液中脱钙 7 ~ 10 d。梯度酒精脱水,石蜡包埋。取冠状面作连续切片,行嗜银染色、类骨质染色⁵ 和常规 HE 染色。光镜观察。

2 结果

正常对照组:硬腭覆盖着复层鳞状上皮,表层

为均匀一致的角化层。上皮钉突明显。固有层较厚,胶原纤维粗大,排列紧密呈网状,粘膜下层结缔组织疏松,厚薄均匀,可见矢状走行的血管神经束,深层骨膜纤维呈横走向,见图 1。

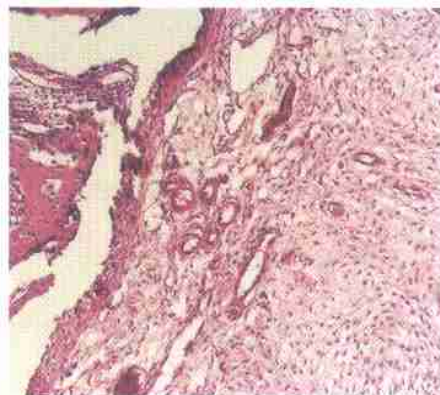


图 1 正常对照组粘骨膜的组织学观察 HE × 100

Fig 1 Histological observation of mucoperiosteum in control group HE × 100

较幼小的 9 周龄兔,其骨膜层较厚,成骨细胞增生活跃,骨表面可见大量新骨形成,类骨质层较厚。较大的 13 周龄兔,其骨膜层变薄,细胞主要为休止成骨细胞,很少见新骨,几乎看不到类骨质。

裸露骨面组:术后 2 周,硬腭裸露区为复层鳞状上皮覆盖,但其表层无角化,上皮钉突不明显。表皮深面的结缔组织较薄,为由大量胶原纤维构成的瘢痕组织。纤维排列成横向走行,其间充满增生的成纤维细胞。骨表面可见成骨细胞增生,类骨质不规则地分布于骨表面。术后 3 周,成纤维细胞开始减少,其余结构无明显变化。术后 4 周,可见瘢痕组织中有许多粗胶原纤维贯穿入骨,称之为 Sharpey s 纤维,见图 2。牙周韧带的纤维延伸至瘢痕组织中,与其中胶原纤维相延续。术后 6 周,上皮表层不全角化,但上皮钉突不明显。成纤维细胞明显减少。仍可见新生骨及类骨质层和 Sharpey s 纤维。术后 8 周至术后 10 周,瘢痕组织中纤维成分明显减少,类骨质层逐渐变薄至消失。术后 12 ~ 14 周,上皮钉突出现,无类骨质层。胶原纤维少,始终可见 Sharpey s 纤维。

腭粘膜移植组:术后 2 周,硬腭表面覆盖完整的角化层鳞状上皮,上皮钉突明显。表皮深层结缔组织厚度基本一致。术区瘢痕组织中胶原纤维数量较正常组织胶原纤维多,但较裸露骨面组的胶原纤维含量少。骨面粗糙,有新骨形成,类骨质层较

厚。术后 3 周,骨面较平整,成纤维细胞开始减少。术后 4 周,类骨质层变薄,胶原纤维横行走向并平行于骨面,未见纤维贯穿入骨。术后 6 周,仍可见薄层类骨质,位于骨表面的胶原纤维平行贴附于其上,未见贯穿入骨的 Sharpey s 纤维,见图 3。术后 12 周,类骨质层不明显。术后 14 周,除术区结缔组织较正常组织致密外,余结构类似正常组织。



图 2 裸露骨面修复过程的组织学观察 类骨质染色 ×40
Fig 2 Histological observation of hard palate in bone-denuded group osteoid staining ×40



图 3 腭粘膜移植后硬腭裸露骨面修复过程的组织学观察 类骨质染色 ×40
Fig 3 A histological observation of hard palate in palatal-mucous-implanted group osteoid staining ×40

颊粘膜移植组:术后 2 周,术区被覆无角化复层鳞状上皮,上皮钉突明显。表皮下方为大量增生的成纤维细胞和粗大的胶原纤维构成的质地致密的瘢痕组织。胶原纤维横行走向。骨表面类骨质增厚,并可见新骨形成,术后 3 周成纤维细胞减少。术后 4 周,上皮表层角化明显,术区较致密的瘢痕结缔组织中,未见穿入骨的 Sharpey s 纤维,见图 4。术后 6 周,成纤维细胞明显减少。术后 8 周,结缔

组织中纤维成分明显减少。术后 12 周,仍有新骨形成,但未见明显类骨质。术后 14 周,除结缔组织较致密外,组织结构基本类似于正常组织。

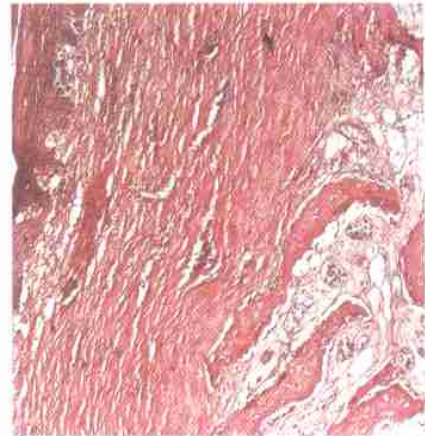


图 4 颊粘膜移植后硬腭裸露骨面修复过程的组织学观察 嗜银染色 ×40
Fig 4 A histological observation of hard palate in buccal mucous-implanted group silver staining ×40

3 讨 论

选择纯种兔作为本研究的动物模型,是因为不同种属动物的组织愈合过程具有高度的一致性⁶。Bardach 等⁷ 也认为兔与狗相比,其人工形成的唇腭裂隙所致的颅面生长异常并无不同。另外,兔的生长周期短,较为经济,体形较大而便于手术操作,使之更适合作为研究唇腭裂的动物模型。

本实验并没有采用人工制造骨性裂隙的方法,而是采用了非裂隙模型,这是因为人类腭裂的修复通常是通过手术移动腭粘骨膜瓣的方法而完成的,而并非是用骨外科方法实现的。另外,在关于腭裂修复术后上颌骨生长发育方面的研究中,多因素的干扰往往导致结果的不一致。笔者采用非裂模型的研究方法,尽量地去除了其他因素的干扰,将是否有骨面裸露提升为主要的影响因素,从而提高了结论的说服力。

在实验中发现,仅含有粘膜上皮细胞的颊、腭粘膜细胞长在硬腭裸露骨面上可以较好地发生愈合,这可能是因为腭部血供丰富,从周围软组织创面渗出的血浆足以保证要求成活条件并不特别高的粘膜细胞得以成活。虽然从切片观察到有些粘膜细胞片的愈合并不完全,但它的存在为周围软组织创缘粘膜细胞的迅速爬行覆盖裸露骨面,抑制成纤维细胞过度增生创造了条件。

本实验结果显示,在裸露骨面上形成的瘢痕组织中,胶原纤维含量丰富,结缔组织致密,形成的 Sharpey s 纤维自术后 4 周开始,一直持续存在至观察期的结束。这一结果与 Wijdeveld 等³ 和 Gma 等⁴ 的报告一致。然而,采用颊、腭粘膜移植修复裸露创面,其愈合过程则不同。纤维成分较少,瘢痕结缔组织相对疏松。更重要的是,在整个观察期内,并未发现 Sharpey s 纤维的存在。愈合后的组织结构相类似于正常对照组的腭部。瘢痕组织通过 Sharpey s 纤维牢固地附着于骨上,其长期作用是腭裂术后上颌骨生长发育受限的重要原因之一^{3,4}。在裸露骨面的不同组织愈合过程表明,采用颊或腭粘膜移植修复裸露骨面能有效地阻止 Sharpey s 纤维的形成,减少瘢痕组织的量。

移植物能减少瘢痕组织的形成⁸,也有学者认为,移植物的结缔组织基质的完整性能有效地防止产生过多的纤维细胞。本实验结果证明,移植物下方组织中的成纤维细胞含量较裸露骨面组少,并确实能减少瘢痕的形成,减轻瘢痕的收缩作用。然而,上颌骨生长受限的关键除与瘢痕形成的量有关外,更重要的是瘢痕组织中 Sharpey s 纤维对骨的附着。通过 Sharpey s 纤维,瘢痕组织牢固地附着于硬腭的骨组织上,因而改变了张力沿整个腭粘骨膜的分散配布,使上颌受到向内的持续的张力,最终导致上颌骨生长受限³。因此,防治上颌骨生长受限的关键在于防止瘢痕组织对骨面的附着。本研究

发现兔自体颊、腭粘膜的移植能阻断裸露骨面瘢痕愈合组织中的 Sharpey s 纤维的形成。这一组织学观察结果提示的自体颊、腭粘膜移植修复裸露骨面可以达到防治腭裂修补术后继发上颌骨生长发育受限的目的,因此具有一定的可行性。

参考文献

- 1 Kremenak CR, Huffaman WC, Olin WH. Growth of maxillae after palatal surgery. *Cleft Palate J*, 1970, 7(7): 716 ~ 719
- 2 Ross RB. Treatment variable affecting facial growth in complete unilateral cleft lip and palate (part I): Treatment affecting growth. *Cleft Palate J*, 1987, 24(1): 5 ~ 23
- 3 Wijdeveld MCMM, Maltha JC, Grugging EM, et al. A histological study of tissue response to simulated cleft palate surgery at different ages in beagle dogs. *Arch Oral Boil*, 1991, 36(11): 837 ~ 843
- 4 Gma H, Sunakawa H, Arakaki K, et al. A histological study on healing process of palate wound with bone denudation. *J Jpn Cleft Palate Assoc*, 1998, 23(3): 214 ~ 225
- 5 Rails ZA, Rails HM. A simple method for demonstration of osteoid in paraffin section. *Med Lab Technol*, 1975, 32(3): 203 ~ 231
- 6 Siegel MI, Mooney MP. Appropriate animal models for craniofacial biology. *Cleft Palate J*, 1990, 27(1): 18 ~ 25
- 7 Bardach J, Kelly KM. Dose interference with mucoperiosteum and palatal bone affect maxillofacial surgery. *Plast Reconstr Surg*, 1991, 88(4): 545 ~ 548
- 8 Rudolph R. Inhibition of myofibroblast by skin graft. *Plast Reconstr Surg*, 1979, 63(4): 473 ~ 480

(2001-12-19 收稿, 2002-05-15 修回)

(本文编辑 王 晴)

(上接第 325 页)

列腺素 E₂ 及胶原酶等参与 TMJ 的病理改变;还通过抑制感觉神经肽 P 物质等的分泌,调节病理状态下关节的痛觉传导及痛觉过敏⁶。综上所述,本实验结果表明 NPY 阳性纤维广泛分布于大鼠 TMJ 并参与 TMJ 疾病的发生与发展;为探讨神经因素在 TMJ 疾病中的作用机制提供了形态学依据。

参考文献

- 1 Larsson J. Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal in synoial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 1991, 20(5): 326 ~ 331
- 2 Holmlund A, Ekblom A, Hansson P, et al. Concentration of neuropeptides: Substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synoial fluid of the human temporomandibular joint. *Int J Oral*

Maxillofac Surg, 1991, 20(4): 228 ~ 232

- 3 Ichikawa H, Wakisaka S, Matsuo S, et al. Peptidergic innervation of the temporomandibular disk in the rat. *Experientia*, 1989, 45(3): 303 ~ 304
- 4 Kido MA, Kondo T, Ayasaka N, et al. The peripheral distribution of trigeminal nerve fibres in the rat temporomandibular joint studied by an anterograde axonal transport method with wheat germ agglutinin horseradish peroxidase. *Arch Oral Biol*, 1991, 36(5): 397 ~ 400
- 5 Appelgren A, Appelgren B, Briksson S. Neuropeptides in temporomandibular joint with rheumatoid arthritis: A study. *Scand J Dent Res*, 1991, 99(6): 519 ~ 522
- 6 Sigvard K. The influence of neuropeptides, serotonin and interleukin 1 on temporomandibular joint pain and inflammation. *J Oral Maxillofac Surg*, 1998, 56(3): 189 ~ 191

(2000-05-17 收稿, 2002-05-05 修回)

(本文编辑 王 晴)