

类骨质羟磷灰石和自体骨修复兔下颌骨 临界性骨缺损的研究

张卫群^{1,2} 王宜人² 巢永烈²

(1. 山东大学附属省立医院 口腔种植科, 山东 济南 250021;

2. 四川大学华西口腔医院 口腔修复科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨类骨质羟磷灰石(SBR)的生物相容性,并探讨该替代材料和自体骨混合修复骨缺损的生物学特性。方法 选用新西兰大白兔,在实验动物双侧下颌骨内侧形成10 mm×10 mm×2 mm大小的临界性缺损,左侧骨缺损按照1:1比例植入SBR和自体骨,右侧骨缺损内分别植入自体骨或缺如,术后2、4、8周取标本,进行大体标本、X线、组织学和Masson新三色染色法的形态学分析。结果 生物替代物具有良好的生物相容性,与自体骨混合能有效地促进骨缺损的修复愈合。骨髓细胞很容易在该材料表面黏附,自体骨的加入更有利于新骨长入材料的孔隙中,分化增殖,形成骨基质,并钙化成熟。结论 SBR是一种良好的骨替代材料,自体骨的加入更有利于早期成骨和替代材料的自我改建的完成。

[关键词] 临界性骨缺损; 类骨质羟磷灰石; 生物相容性; 自体骨

[中图分类号] R 782.3 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.02.003

Experimental study on the reconstruction of mandibular defects with sinboneHT bone replacement in rabbits ZHANG Wei-qun^{1,2}, WANG Yi-ren², CHAO Yong-lie². (1. Dept. of Oral Implantology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China; 2. Dept. of Prosthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** After sinboneHT bone replacement (SBR) was implanted in animals, to evaluate the biocompatibility of SBR and compounded in autogenetic bone in the proportion of one to one in order to prepare for the clinical applications in the future. **Methods** Bone defects of 10 mm×10 mm×2 mm was made at the mandibular of rabbits, then SBR with different granule diameter and autogenetic bone was compounded in the proportion of being applied in the left defects, while autogenetic bone was implanted in the right defects and nothing was used in the right reformed defects. Animals were sacrificed at 2, 4 and 8 weeks respectively. The biologic capacity was evaluated with anatomy, X-rays studies and histology. **Results** SBR has better biocompatibility, which can effectively accelerate the reconstruction of bone defects and help the new bone by being compounded with autogenetic bone. It provides the appropriate scaffold or template which would allow cellular infiltration, attachment and multiplication. **Conclusion** SBR is a kind of bone substitute material with good biocompatibility. SBR compounded with self-bone has a better regeneration function.

[Key words] critical size defect; sinboneHT bone replacement; biocompatibility; autogenetic bone

由于先天性畸形、外伤、肿瘤及炎症等原因造成的口腔颌面部骨缺损的修复,一直困扰着口腔修复医师。由于自体骨来源有限,以及收集自体骨所带来的一系列并发症等原因,对骨替代材料的研究成为学者们一直追踪的热点。类骨质羟磷灰石是由

羟磷灰石(hydroapatite, HA)与磷酸三钙(tricalcium phosphate, TCP)复合构建的一种复合材料,本文采用的类骨质羟磷灰石(sinboneHT bone replacement, SBR)是HA/TCP以6:4的比例合成的双相钙磷生物陶瓷,具有70%的高空隙率和平均粒径为500 μm的特点,易于组织长入、降解以及利于细胞黏附。关于类骨质羟磷灰石替代天然骨组织材料的研究很多,但其作为类骨质羟磷灰石替代材料仍有不足之处,即骨组织改建时间长,尤其是需要即刻或早期负重

[收稿日期] 2009-05-07; [修回日期] 2009-09-09

[作者简介] 张卫群(1970—),女,浙江人,副主任医师,博士

[通讯作者] 巢永烈, Tel: 028-85501441

受到限制^[1],为此很多学者在该类替代材料中引入骨髓基质干细胞,从而更快地修复骨缺损^[1]。本实验拟用SBR生骨替代材料和自体骨混合来探讨骨缺损的修复效果,采用临界性骨缺损(critical size defect, CSD)动物模型进行检测,为临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

SBR(台湾瑞安大药厂股份有限公司,粒度分别为0.5~1.0 μm), IX70倒置相差显微镜(Olympus公司,日本),注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司)。

1.2 下颌骨临界性骨缺损^[2-3]模型的建立

选取由四川大学华西动物实验中心提供的新西兰雄性大白兔12只,体重为2.0~2.3 kg。将12只新西兰雄性大白兔随机分为2、4、8周3组。实验动物称重后,采用846肌肉注射麻醉,脱毛备皮,于左下颌骨内侧做一长约1.5 cm切口,切开皮肤肌肉,显露下颌骨内侧面,用剥离子去除表面的骨膜,慢速裂钻滴水降温下切割,去除骨质,深度约为2 mm,扩大缺损,形成一个10 mm×10 mm×2 mm的临界性骨缺损,生理盐水冲洗,SBR和自体骨按照1:1植入左侧骨缺损处,严密分层缝合肌肉皮肤,包扎伤口。右侧手术方法同左侧,但植入自体骨或是缺如(其中2周组、4周组和8周组中1只实验动物右侧为植入自体骨;另外3只右侧植入物缺如,为骨缺如组)。术后给予实验动物普鲁卡因青霉素20万单位肌肉注射,每天2次,共5 d。常规条件下喂养观察。

1.3 观察指标

在手术后第2、4、8周,采用耳缘静脉空气栓塞法处死动物,取下缺损区植入物连同周围骨质、骨膜,修整标本,生理盐水冲洗,4%多聚甲醛固定,拍X线片。然后将部分标本用乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙,石蜡切片,然后行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)及Masson新三色染色;倒置相差显微镜下观察并拍片。

2 结果

2.1 大体标本的观察结果

标本固定后去除软组织,用探针探查骨缺损区。2周时,自体骨组和SBR组的骨缺损区均已被松散的纤维组织填满,均有皮肤与皮下组织粘连,炎症反应明显。

4周时,自体骨组和SBR组的骨缺损区已被致密的纤维组织填满,缺损边缘已与自体骨牢固愈合。

8周时,自体骨组和SBR组的骨缺损区新生组织与周围组织结合紧密,没有明显颜色的差别。骨缺如组的骨缺损区有大量的纤维组织充填,缺损四周均变光滑,类似软骨。

2.2 X线检查结果

2周时,自体骨组和SBR组可见材料的阻射影像,与正常骨组织界限清楚,密度均低于正常的骨组织;骨缺如组低密度影像区明显。

4周时,SBR组材料植入区密度升高,与正常骨组织的界限模糊;自体骨组密度阻射影像接近正常骨;骨缺如组低密度区明显。

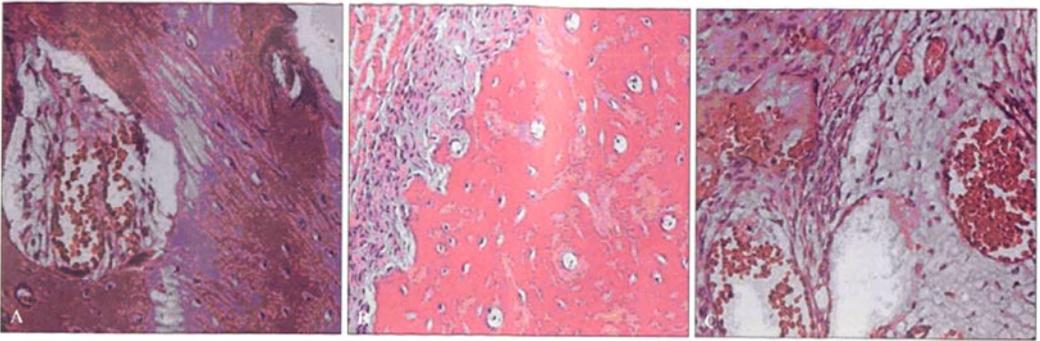
8周时,SBR组缺损区密度与正常骨组织接近,缺损区内部有清晰的骨小梁,与正常骨组织的界限消失;自体骨组缺损区新骨界限不清,骨小梁明显,且密度接近正常骨组织;骨缺如组在缺损边缘可见区域性密度增高影像,但缺损中心部位密度较低。

2.3 组织学观察结果

2周时,SBR组和自体骨组有大量的成骨细胞长入材料之间的空隙,细胞呈多角形,胞核大而清晰,染色较浅,功能活跃;有的材料孔隙内也可见成骨细胞成簇生长,细胞有多个突起附着于材料表面;成骨细胞之间充满红染的骨基质,在材料与骨组织交界处,大量骨基质将成骨细胞包埋其中;除成骨细胞外,还有少量梭形的成纤维细胞、红细胞和胞核深染的炎症细胞散在。Masson染色可见,2组均有新形成的绿染骨基质,其中自体骨组骨基质绿染更多一些。骨缺如组可见大量梭形的成纤维细胞长入空隙之间,及大量的炎症细胞和交界处少量的成骨细胞,并分泌少量的骨基质,Masson染色呈淡绿色。

4周时,SBR组和自体骨组材料有部分溶解,成骨细胞分泌大量骨基质,包埋其中,形成骨陷窝,看不到成纤维细胞和炎症细胞。Masson染色可见绿色的骨基质,间或有少量红染的骨基质,其中自体骨组开始出现淡红染色带。

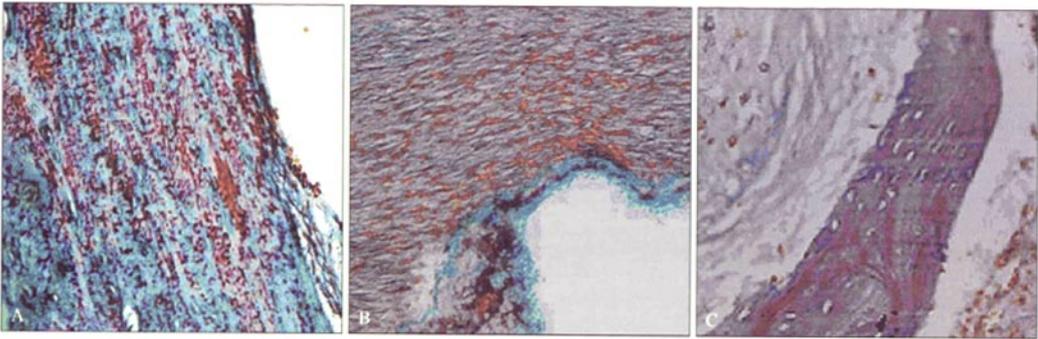
8周时,SBR组和自体骨组出现了大量新生骨小梁,有的骨小梁之间形成骨髓腔,骨髓腔内有成骨细胞、间充质细胞、淋巴细胞和少量的红细胞。Masson染色结果可见骨小梁为淡绿色,有的骨质钙化明显,染色为淡红色。骨缺如组可见缺损区有少量新生的骨小梁形成,主要为纤维结缔组织(图1、2)。



A: SBR组; B: 自体骨组; C: 骨缺如组。

图 1 术后8周3组的观察结果 HE × 40

Fig 1 The results of three groups after 8 weeks HE × 40



A: SBR组; B: 自体骨组; C: 骨缺如组。

图 2 术后8周3组的观察结果 Masson × 40

Fig 2 The results of three groups after 8 weeks Masson × 40

3 讨论

3.1 临界性骨缺损的建立意义

CSD包括皮质骨和松质骨全层缺损,通常状态下是自体不能完全修复^[2-3]。CSD建模的目的是为排除自体骨自行修复的可能,检测骨替代材料(bone repair materials, BRMs)在体内的修复效果^[4]。本实验的骨缺如组第8周仍可见大量的结缔组织,说明所建缺损为CSD。

3.2 骨缺损建立的选取部位

通常骨的形成方式分为3种,即膜内成骨、软骨内成骨和混合型成骨。膜内成骨由间充质直接成骨,如头盖骨、面颅骨等。软骨内成骨是在软骨模型的基础上成骨,即在软骨雏形形成后,软骨被破坏,再被化为骨组织,如四肢躯干骨(除锁骨以外)。混合型成骨是成骨(锁骨和下颌骨)先为膜内成骨,然后又出现软骨内成骨^[5-9]。由于口腔颌面缺损重建涉及到颅面部各部位,即同时涉及到膜内成骨和软骨内成骨。而下颌骨重建正好为混合成骨类型。实验中选取兔下颌骨切嵴部位作为手术区,正是考虑到各部位的成骨类型不同,更能准确反应骨替代材

料对颌骨缺损修复的影响。

3.3 骨缺损修复材料的选择

常用骨缺损修复材料有自体骨移植、人工骨替代等^[7-9]。自体骨由于其良好的生物相容性一直作为修复材料的金标准。由于自体骨取材需要开辟第二手术区,创伤大,手术感染机率增加,取材量有限,多数患者不愿意接受,使该方法受到一定限制。而人工骨材料来源广泛,无须开辟第二手术区,使用方便,被患者和临床医生所接纳。常用的人工骨替代材料有HA、生物活性玻璃陶瓷(bioactive glass-ceramic, BGC)、TCP、HA/TCP双相钙磷陶瓷和牛脱蛋白骨^[7-9]等。

3.4 SBR与自体骨混合后的修复评价

本实验选取的生物替代物SBR是一种骨质羟磷灰石材料,具有天然骨组织结构,在形成完整骨骼后可获得良好的抗力性。粒度有0.5~1.0 μm、0.25~0.5 μm。化学式为Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂。材料内部孔系相互连接,利于成骨细胞的早期附着、迁入和骨基质的沉积。类骨质羟磷灰石材料在组织内的改建需要一定时间,大约3~6个月才能达到良好的生物力学性能,而对于需要早期或即刻负重的修复就

难以满足要求。骨髓间充质干细胞以及脱蛋白松质骨的引入有利于骨组织的修复改建^[1,10]。但骨髓间充质干细胞的培养需要一定的实验条件和技术,而自体松质骨来源相对简单,新鲜的松质骨内含有丰富的成骨细胞因子,如转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1、TGF- β 2和骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)等。因此,将自体松质骨引入骨替代材料中会利于骨组织的改建。

本实验发现,早期2种粒度的SBR组均有成骨细胞长入材料之间的空隙及材料的内部孔隙,并有少量的成纤维细胞和炎症细胞,随着时间延长,成骨细胞分泌骨基质并包埋其中,形成骨陷窝,出现板层骨;骨小梁比较成熟,出现整齐的同心圆状的哈佛系统,新生骨髓腔数量较多,基本具备了骨组织的正常结构。提示SBR有良好的生物相容性和可降解性,不同粒度组之间未见明显形态学差异。Masson主要应用于胶原染色,成熟骨组织中的胶原着鲜红色,而幼稚骨组织中的胶原主要着绿色。故采用这种染色方法可以清楚地看到新骨的形成情况。SBR组2周时材料之间充满成骨细胞,细胞周围有少量淡绿色的骨基质,材料与骨组织交界处的骨基质较多;4周时,开始出现少量红染的骨基质;8周时,大部分骨小梁为绿色,表明骨小梁钙化成熟。与自体骨组相比,镜下骨基质没有明显差距。实验结果提示SBR作为骨支架材料,能有效地促进骨缺损的修复愈合。自体骨的加入,缺损区成骨提前。该材料在骨修复后期被正常骨组织替代改建,提示其具有较好的可降解性、骨引导和骨再生作用,是一种有前景的骨修复替代材料,而且自体骨的加入,更有利于缺损处的早期成骨修复。骨愈合的另一个关键评价指标是力学性能^[11]。骨缺损修复后能否在一定时间内达到基本力学要求,无疑是检测修复效果的重要评判标准。尽管本实验未做相关力学检测,但有学者在单独用类似牛脱蛋白修复兔桡骨缺损时发现,16周后修复的骨缺损已经达到正常骨相近的力学性能^[12]。提示本实验材料与自体骨混合修复下颌骨临界性骨缺损后,随着时间延长,骨骼的改建最终可以达到正常的生物力学特性。

致谢:感谢四川大学华西动物实验中心的大力支持和协作。

[参考文献]

[1] Kon E, Muraglia A, Corsi A, et al. Autologous bone marrow

stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones[J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 49(3):328-337.

- [2] 陈钢,赵士杰.用于评价骨修复材料的临界性骨缺损[J].*国外医学口腔医学分册*, 2001, 28(2):71-73.
CHEN Gang, ZHAO Shi-jie. Study on bone regeneration in critical bone defects[J]. *Foreign Medical Sciences (Stomatology)*, 2001, 28(2):71-73.
- [3] 李祖兵,余世斌,东耀峻,等.下颌骨缺损重建植入材料的回顾性研究[J].*实用口腔医学杂志*, 2003, 19(1):37-39.
LI Zu-bing, YU Shi-bin, DONG Yao-jun, et al. Retrospective study on the materials used in the reconstruction of mandibular defects[J]. *J Pract Stomatol*, 2003, 19(1):37-39.
- [4] Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2000, (371):10-27.
- [5] 刘宝林.肿瘤术后颌骨缺损的功能重建[J].*中华口腔医学杂志*, 2003, 18(1):9-11.
LIU Bao-lin. Functional implantation reconstruction of acquired jaw defects after tumor resection[J]. *Chin J Stomatol*, 2003, 18(1):9-11.
- [6] Duda M, Pajak J. The issue of bioresorption of the Bio-Oss xenogeneic bone substitute in bone defects[J]. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med*, 2004, 59(1):269-277.
- [7] Jensen SS, Yeo A, Dard M, et al. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2007, 18(6):752-760.
- [8] Oest ME, Dupont KM, Kong HJ, et al. Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects[J]. *J Orthop Res*, 2007, 25(7):941-950.
- [9] Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics[J]. *J Artif Organs*, 2005, 8(3):131-136.
- [10] 丁真奇,练克俭,康两奇,等.脱蛋白牛松质骨复合骨髓在脊柱后外侧融合术中的应用[J].*中国骨伤*, 2001, 14(2):69-70.
DING Zhen-qi, LIAN Ke-jian, KANG Liang-qi, et al. Deproteinized bovine cancellous composite bone graft for posterolateral spinal fusion[J]. *Chin J Orthopaedics Traumatology*, 2001, 14(2):69-70.
- [11] Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, et al. A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 78(1):139-147.
- [12] 孟纯阳,安洪,蒋电明,等.网孔纳米羟基磷灰石聚酰胺人工骨修复兔桡骨缺损[J].*中华创伤杂志*, 2005, 21(3):187-191.
MENG Chun-yang, AN Hong, JIANG Dian-ming, et al. Repair of bone defect with porous composite of nano-hydroxyapatite and polyamide[J]. *Chin J Trauma*, 2005, 21(3):187-191.

(本文编辑 王晴)