

[文章编号] 1000-1182(2011)05-0542-04

BME-10X型胶原/羟磷灰石人工骨引导比格犬牙周组织再生的实验研究

陈斌¹ 吴文蕾¹ 张其清² 黄晓峰³ 陈湘华³

(1.南京大学医学院附属口腔医院 牙周科, 南京 210008;

2.中国医学科学院生物医学工程研究所, 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192;

3.南京大学医学院附属口腔医院 病理科, 南京 210008)

[摘要] 目的 评估BME-10X型胶原/羟磷灰石人工骨引导比格犬牙周组织再生的能力。方法 选取18月龄雄性比格犬4只, 进行牙周基础治疗。基础治疗结束1周后, 选取下颌第3、4前磨牙, 同颌对侧同名牙随机纳入实验组或者对照组, 制造牙周缺损, 实验组植入BME-10X型胶原/羟磷灰石人工骨, 对照组不植入任何材料。术后12周处死动物, 进行组织病理学分析。结果 与对照组相比, 实验组获得了较多的组织再生, 实验组和对照组新生牙槽骨的高度分别为(3.01±0.14)、(1.32±0.11) mm, 二者间差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组和对照组新生牙周膜组织的高度分别为(3.12±0.19)、(1.35±0.12) mm, 二者间差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组和对照组新生牙骨质的高度分别为(3.30±0.15)、(2.70±0.12) mm, 二者间差异无统计学意义($P>0.05$)。新生牙周组织的牙周膜纤维深入到新生的骨组织和牙骨质中, 其结构特征与生理状态时的结构特征无明显差异。结论 BME-10X型胶原/羟磷灰石人工骨材料有较强的诱导牙周组织再生的能力。

[关键词] 牙周病; 组织再生; 胶原/羟磷灰石人工骨

[中图分类号] R 781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.05.024

Experimental study on the potential role of BME-10X collagen/hydroxyapatite bone graft in periodontal tissue regeneration of beagle Chen Bin¹, Wu Wenlei¹, Zhang Qiqing², Huang Xiaofeng³, Chen Xianghua³. (1. Dept. of Periodontology, Institute and Hospital of Stomatology, Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China; 2. Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences; Tianjin Medical Material Key Laboratory, Tianjin 300192, China; 3. Dept. of Pathology, Institute and Hospital of Stomatology, Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the potential role of BME-10X collagen/hydroxyapatite(HA) bone graft in periodontal tissue regeneration. **Methods** Four 18 months old male beagles in the experiment were treated with non-surgical periodontal therapy. At the sites of mandibular 3rd and 4th premolars at the time of dogs were treated with non-surgical periodontal therapy one week later, the teeth with the same name in the same jaw were selected to the experimental group(T group) or the control group(C group) at random. The defects in T group were filled with BME-10X collagen/HA bone graft while the defects in C group were filled with nothing. The dogs were sacrificed in twelve weeks and analyzed by histopathology. **Results** The defects in T group got more tissue regeneration compared with the defects in C group. The height of new bone(NB) was (3.01±0.14) mm in T group versus (1.32±0.11) mm in C group($P<0.05$). The height of new periodontal ligament(NP) was (3.12±0.19) mm in T group versus (1.35±0.12) mm in C group($P<0.05$). The height of new cementum(NC) was (3.30±0.15) mm in T group versus (2.70±0.12) mm in C group($P>0.05$). The new tissue guided by the bone graft was the same as the normal tissue in histopathology analysis. **Conclusion** The results of the study suggest that BME-10X collagen/HA bone graft is a good bone graft for periodontal tissue regeneration.

[Key words] periodontal disease; tissue regeneration; collagen/hydroxyapatite bone grafts

[收稿日期] 2010-12-17; [修回日期] 2011-07-22
[基金项目] 南京市医学科学技术发展专项基金资助项目(重点项目)(ZKX07022)
[作者简介] 陈斌(1984—), 女, 河南人, 住院医师, 硕士
[通讯作者] 吴文蕾, Tel: 025-83620206

牙周病是一种发病率非常高的慢性感染性疾病。传统的牙周治疗很难获得牙周组织尤其是牙槽骨的再生。因此, 不能有效改善患牙的松动度, 而且也不能改善由于支持组织丧失导致的食物嵌塞、牙本质

敏感和美观问题^[1]。牙周再生性手术的兴起,为牙周组织再生提供了可能性。骨修复材料是牙周再生性手术中的重要部分^[2]。尽管目前有多种骨修复材料,但是这些材料都存在着或多或少的缺点,因此,开发新的价格低廉、制作方便且修复效果好的骨修复材料是非常有必要的^[2]。

本实验采用的BME-10X型胶原/羟磷灰石人工骨由中国医学科学院生物医学工程研究所提供,该材料采用天然胶原和羟磷灰石为主要原料制备,结合了二者的优良性能,克服了单纯胶原抗压强度不足的缺点,又弥补了羟磷灰石颗粒不宜成形、易溢出弥散的缺点,高度模拟人体自然骨的组成成分及各成分比例^[3]。BME-10X型胶原/羟磷灰石人工骨具有良好的骨传导能力、生物相容性和骨诱导活性^[3-5]。由于影像学结果显示的愈合并不一定伴随组织学的愈合,因此,本实验采用组织病理学的方法,研究该材料对比格犬牙周破坏的修复效果,进一步研究BME-10X型胶原/羟磷灰石人工骨是否可促进骨组织的真正再生,为该材料的进一步临床应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 比格犬牙周缺损模型的建立

选取18月龄雄性比格犬4只,体重14~15 kg,全身健康,牙龈无红肿,无牙周袋。在实验环境中适应1周后,氯胺酮诱导麻醉,进行牙周基础治疗,以保证实验基线的一致。牙周基础治疗结束后1周,在下颌前磨牙区翻瓣、去骨,在颊侧制造缺损,缺损大小为高5 mm、深3.5 mm,宽度以暴露牙根的颊侧面为准,刮除暴露牙根表面的牙周膜,用刮治器去除部分牙骨质,在缺损底部的牙根表面,用直径为1 mm的小球钻磨出深约0.5 mm的刻痕,作为组织缺损位置的标记。搔刮骨面,使缺损区充满新鲜血液,按实验分组进行不同的治疗。

1.2 实验分组及治疗措施

实验分为2组,分别为实验组(T组)和对照组(C组)。每只实验动物取下颌第3、4前磨牙作为实验对象。随机将一颗牙纳入实验组,它的同颌对侧同名牙纳入对照组,以保证实验设计为自身同颌同名牙对照。分组确定后,依据分组情况,实验组在骨缺损部位植入BME-10X型胶原/羟磷灰石人工骨材料,将材料与新鲜血液充分接触混合,龈瓣复位并缝合;对照组在缺损区充满新鲜血液后,龈瓣复位并缝合。术后3 d连续肌注庆大霉素8万U,每日1次。

1.3 组织病理学分析

术后12周处死动物,4%中性多聚甲醛颈动脉灌注固定,截取其下颌骨,将标本沿颊舌向片切成约

2 mm厚的组织块,常规固定,10%乙二胺四乙酸(e-thylenediamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙,常规脱水,浸蜡,包埋,切片,切片方向为颊舌向。常规苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,封片。光镜下观察并测量新生牙骨质(new cementum, NC)、新生牙槽骨(new bone, NB)及新生牙周膜组织(new periodontal ligament, NP)的生成情况。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行分析,用配对样本均数*t*检验分析2组新生组织量的差异,并计算*P*值。

2 结果

2.1 牙周基础治疗后牙周状况及模型建立后的情况

牙周基础治疗后1周,所有动物牙周状况良好,牙龈无红肿,未探及牙周袋(图1A),翻瓣术后也未见牙槽骨缺损(图1B),说明实验开始时基线一致。模型建立后,两侧组织缺损是对称的(图2)。虽然2颗前磨牙在暴露颊侧根面后形成的缺损宽度不一致,但是由于两侧缺损对称,且本实验采用同颌同名牙对照,保证了实验基线的一致性。



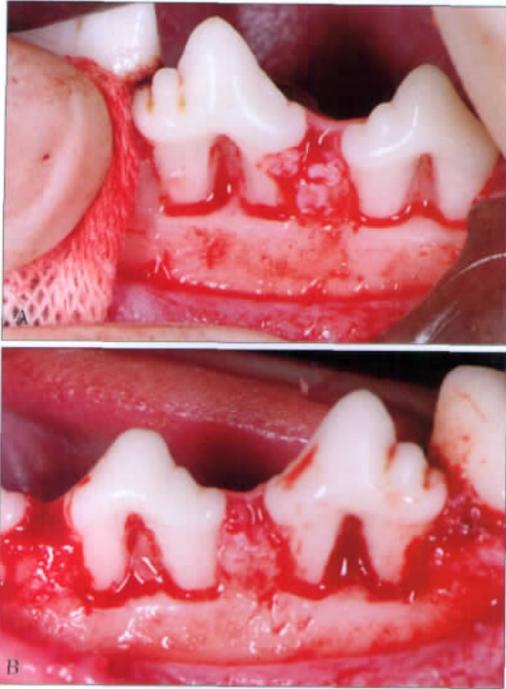
A: 牙龈状况; B: 牙槽骨状况。

图1 牙周基础治疗后1周的牙周健康状况

Fig 1 The periodontal status after non-surgical periodontal therapy 1 week later

2.2 植骨术后的牙周组织状况

植骨后,术区牙龈轻度红肿,未见术区有植骨材料暴露或者溢出,无脓液。术后2周,部分缝线松脱,但是牙龈组织已基本恢复正常,无明显红肿(图3),提示该材料具有良好的生物相容性。



A: 右侧; B: 左侧。

图2 牙周缺损模型建立后, 两侧缺损对称

Fig 2 Two sides were symmetrical after periodontal defect founded

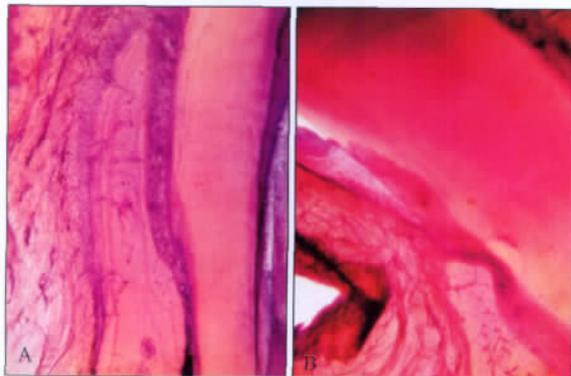


图3 植骨术后2周的牙龈状况

Fig 3 The gum status after bone filling for 2 weeks

2.3 组织病理学分析结果

与C组相比, T组有较多的牙周组织再生, 具体表现为: 有较多的NB、NP和NC形成(图4)。



A: T组; B: C组。

图4 2组牙周组织再生情况的组织病理学比较 HE ×40

Fig 4 The pathological comparison between the 2 groups on periodontal regeneration HE ×40

T组部分牙槽骨已经转变为成熟骨组织; C组有较多的NC, 仅有少量NB和NP。这些新生组织结构特点与天然牙周组织结构特点无明显不同(图5)。NB呈均质状, 含有较多细胞, 胞核大; NP内含较多的细胞团, 细胞较小, 核大, 横纤维的走向初步形成, 一端深入牙槽骨, 一端深入牙骨质; NC含较多的细胞, 与原有牙骨质之间有明显的嗜碱性界限, 部分NC呈层状排列(图5)。

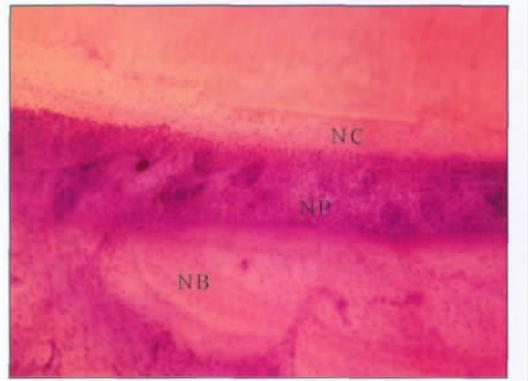


图5 T组新生牙周组织 HE ×100

Fig 5 The new periodontal tissue of T group HE ×100

2.4 组织测量学结果

T组NB、NP、NC的测量结果分别为(3.01±0.14)、(3.12±0.19)、(3.30±0.15) mm; C组NB、NP、NC的测量结果分别为(1.32±0.11)、(1.35±0.12)、(2.70±0.12) mm。T组和C组NB和NP间的差异有统计学意义(P<0.05), NC间的差异无统计学意义(P>0.05)。

3 讨论

牙周病治疗的最终目标是恢复正常牙周组织的结构关系和功能, 但是, 现有的牙周治疗方法尚无法使大部分病例的牙周组织得到完全或理想的恢复^[1]。骨移植是一种较好的诱导牙周组织再生的方法, 有望获得较为理想的牙周组织再生^[2]。目前, 用于骨移植的材料主要包括: 新鲜自体骨、同种异体骨和人工骨材料。新鲜自体骨虽是最理想的植骨材料, 但其来源有限, 不仅增加手术创伤, 且会造成供骨区的多种并发症。同种异体骨来源相对充足, 但其存在排异反应及传播疾病(如艾滋病、肝炎)的可能。因此, 研究和开发理想的人工骨材料具有非常重要的意义。

目前广泛使用的人工骨材料主要是陶瓷基质的材料, 包括磷酸钙(主要是磷酸三钙和羟磷灰石)、硫酸钙和生物玻璃^[6]。这些材料可以达到较好的骨整合, 具有较好的生物相容性^[7]。本实验所采用的BME-10X型胶原/羟磷灰石人工骨, 前期的实验证实其有良好的生物相容性^[3-5]。本实验的结果也显示: 该材料植入后, 术区无不良反应, 牙龈无明显红肿, 无溢脓,

未见材料排出,进一步证实了该材料具有良好的生物相容性。

组织病理学检测是评估组织再生效果的金标准^[2]。本实验采用组织病理学的方法评估牙周组织的再生,结果表明T组有较多的牙周组织再生,具体表现为:有较多的NB、NP及NC形成。NB呈均质状,骨小梁较少,排列稍显混乱。新生牙周膜纤维的走向初步成型,一端深入牙槽骨,一端深入牙骨质,为新生组织行使功能提供了良好的生理基础;牙周膜中部细胞体积较小,核大,浓染,提示其处于功能活跃期;另外,部分牙周膜细胞形成细胞团块,提示牙周膜尚处于改建之中。NC含有较多的牙骨质细胞,与原有牙骨质之间有嗜碱性界限形成,部分牙骨质呈层状排列,提示该种情况下的牙槽骨新生可能呈层状进行。

本研究中T组和C组的NB高度分别为(3.01±0.14)、(1.32±0.11) mm($P<0.05$)。Kwon等^[8]在比格犬下颌前磨牙上制造高5 mm、宽4 mm的骨内袋,然后给予人重组生长/分化因子-5(recombinant human growth/differentiation factor-5, rhGDF-5)/微粒型β-磷酸三钙(β-tricalcium phosphate, β-TCP),结果显示:使用rhGDF-5/β-TCP组的新生牙槽骨再生高度为(3.08±0.74) mm,与本研究NB的高度接近。但是,该研究除了人工骨材料外,同时使用了细胞因子rhGDF-5,如果单独使用β-TCP人工骨材料,其再生效果可能会较同时使用rhGDF-5差。Shirakata等^[9]在比格犬的下颌前磨牙上制造5 mm×5 mm×4 mm的骨下缺损,然后分别给予单纯翻瓣术、磷酸钙黏固剂,结果显示:2组的新生牙槽骨高度分别为(1.95±0.80)、(3.58±0.79) mm,与本研究基本接近。另外,Shirakata等^[9]的研究中,植入人工骨材料组比单纯翻瓣组的NB多1.63 mm,本实验该差值为1.69 mm,说明本研究采用的材料诱导骨再生的效果可能与磷酸钙黏固剂的骨诱导效果类似。但是,本研究采用的材料具有较

好的可操作性,塑形方便,具有更好的研发价值。

[参考文献]

- [1] Villar CC, Cochran DL. Regeneration of periodontal tissues: Guided tissue regeneration[J]. Dent Clin North Am, 2010, 54(1): 73-92.
- [2] Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL. Regeneration of periodontal tissue: Bone replacement grafts[J]. Dent Clin North Am, 2010, 54(1): 55-71.
- [3] Liu L, Zhang L, Ren B, et al. Preparation and characterization of collagen-hydroxyapatite composite used for bone tissue engineering scaffold[J]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2003, 31(4): 435-448.
- [4] 张其清, 张立海, 刘玲蓉, 等. 两种人工骨的构建及其在体内诱导成骨能力的比较[J]. 中国医学科学院学报, 2003, 25(1): 17-21.
Zhang Qiqing, Zhang Lihai, Liu Lingrong, et al. The construction of two kinds of artificial bone and the comparison of their osteogenesis capability *in vivo*[J]. Acta Acad Med Sin, 2003, 25(1): 17-21.
- [5] 何森, 张其清. 羟基磷灰石/胶原人工骨在创伤后骨缺损修复中的初步研究[J]. 生物医学工程与临床, 2008, 12(1): 56-60.
He Sen, Zhang Qiqing. The primary study on hydroxyapatite/collagen in bone defects caused by trauma[J]. Biomed Eng Clin Med, 2008, 12(1): 56-60.
- [6] Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes[J]. Expert Rev Med Devices, 2006, 3(1): 49-57.
- [7] Boccacini AR, Blaker JJ. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds[J]. Expert Rev Med Devices, 2005, 2(3): 303-317.
- [8] Kwon HR, Wikesjö UM, Park JC, et al. Growth/differentiation factor-5 significantly enhances periodontal wound healing/regeneration compared with platelet-derived growth factor-BB in dogs [J]. J Clin Periodontol, 2010, 37(8): 739-746.
- [9] Shirakata Y, Yoshimoto T, Goto H, et al. Favorable periodontal healing of 1-wall infrabony defects after application of calcium phosphate cement wall alone or in combination with enamel matrix derivative: A pilot study with canine mandibles[J]. J Periodontol, 2007, 78(5): 889-898.

(本文编辑 胡兴戎)

2012年第17届华南国际口腔医疗技术研讨会征文通知

第17届华南国际口腔医疗技术研讨会将于2012年3月7—9日在广州中国进出口商品交易会琶洲展馆举办,特向全国口腔医学界特别是临床第一线的专家征集讲座题目和内容。题目范围:口腔医学所有分支学科。选题要求:先进性、实用性、科学性。演讲时间1 h。应征稿(或提纲)请于2011年9月30日前通过电子邮件发送至dentalvisit@ste.cn,同时请附上投稿者的单位、地址、技术职称、联系方式。入选通知时间:组委会收到讲稿后,将请学术顾问评阅以确定采用与否,并于2011年10月31日前回复应征者。来稿处理办法:凡投稿者将获得纪念品1份;录用者将被邀请到学术专场演讲,差旅费和演讲酬金由组委会支付,并发给纪念牌。华南国际口腔展有权将来稿公布以供学习交流。

华南国际口腔展