

复合牛骨形成蛋白多孔中空种植体成骨效应的研究

廖湘凌 陈绍维 李声伟 田卫东 张 杰

【摘要】 目的 利用激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)观察牛骨形成蛋白复合种植体成骨效应。方法 将天然提取的牛骨形成蛋白(bBMP)与多孔中空钛种植体相复合形成人工复合种植体,植入狗下颌骨,并设同等规格的实心柱状钛种植体及不复合 bBMP 的多孔中空柱状钛种植体植入狗下颌骨为对照组。应用三色荧光标记 LSCM 观察复合种植体周围骨整合情况。结果 实验组复合种植体在各时期成骨能力和成骨量均明显优于对照组。结论 复合种植体可诱导早期、大量、较持久的成骨;LSCM 对种植体周围成骨行为进行观察是一种准确、有效的手段。

【关键词】 激光扫描共聚焦显微镜; 骨形成蛋白; 种植体; 骨整合

Behavior of Bone Formation around the Porous-hollow Cylindrical Titanium Implant Composed of Bone Morphogenetic Protein

LIAO Xiangling^{*}, CHEN Shaowei, LI Shengwei, et al. (^{*} Department of Stomatology, Luhe Hospital, Beijing 101100, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to observe the behavior of bone formation around the titanium-hollow porous cylinder implant composed of bovine bone morphogenetic protein(bBMP). **Methods** Porous-hollow cylinder titanium implant composed of bBMP was implanted into mandible of dogs. Multiple fluorescent was labeled at different times and then LSCM was used to observe the newly formed bone around the complex implant. **Results** The newly formed bone around the complex implant in experimental group was more obvious than that in other groups. **Conclusion** Earlier, longer and more new-bone formation can be induced by porous-hollow cylinder titanium implant composed of bBMP, and LSCM is an effective method to observe new bone formation around implant.

【Key words】 laser scanning confocal microscope; bone morphogenetic protein; implant; osseointegration

近年来国内外关于种植体的研究重点已逐渐转向多种生物材料的复合应用。目前亟待解决的问题是如何选择理想的生物活性材料及其载体,因为只有具备高度成骨能力的生物活性材料和良好缓释功能的载体以一定方式相结合才能最大限度地发挥各自的功能,有效地促进骨生长,提高牙种植体的稳定性。笔者将天然提取的牛骨形成蛋白(bovine bone morphogenetic protein, bBMP)与多孔中空钛种植体相复合形成复合种植体,植入狗下颌骨,通过激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)观察复合种植体周围骨整合情况,为其临床应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 多孔中空柱状钛种植体的制作

多孔中空柱状钛种植体由四川大学华西口腔医学院口腔重点实验室设计、研制。将纯钛棒加工成长 6.5 mm,直径 3.0 mm 的中空柱状种植体,侧面有 12 个小孔,对称分布,底面 1 个小孔,相互贯通,孔直径均为 1.0 mm。经表面处理及反复超声清洗,高温高压消毒后备用。

1.2 复合种植体的制作

bBMP 由四川大学华西口腔医学院口腔重点实验室提取、纯化,并证实其实生物学活性后,将 bBMP 通过多孔中空柱状种植体底面的小孔加入,形成实验组复合种植体(B 组),每个种植体复合 bBMP 5 mg。对照组采用同等规格的实心柱状钛种植体(A 组)及不复合 bBMP 的多孔中空柱状钛种植体(C 组)。

1.3 三色荧光标记激光扫描共聚焦显微镜观察

选用健康杂种狗(由四川大学华西动物实验中心提供)5 只,随机分为 5 组,每组 1 只。每组动物分别植入 A、B、C 组的种植体 2 枚。按照表 1 时间投放荧光标记物及处死动物,标记物的剂量为:荧光素钠 3 mg/kg,二甲酚橙 90 mg/kg 静脉内

本课题为四川省科委重点科研项目基金资助项目(编号 C96002)

作者单位:101100 北京市通州区潞河医院口腔科(廖湘凌),中山大学附属二院口腔颌面外科(陈绍维),四川大学华西口腔医院口腔颌面外科(李声伟,田卫东),四川大学华西临床医学院电镜室(张杰)

给药,四环素 30 mg/kg 肌肉内注射。动物处死后,将种植体连同周围组织完整取出,制成不脱钙组织切片,采用四川大学华西医院病理科 MRC1024ES 型多光子激光扫描共聚焦显微镜进行观察、测量,用氦/氩离子混合激光管作为光源,异硫氰酸或四甲基异硫氰酸罗丹明滤光块,图像分辨率为 512 ×512 (像素)。

表 1 荧光物质标记时间(d)

Tab 1 Time of fluorescence labeling (d)

组别	标记时间			动物处死时间
	二甲酚橙(红)	荧光素钠(绿)	四环素(黄)	
1	3	7(1)	14(2)	21(3)
2	14(2)	21(3)	28(4)	35(5)
3	28(4)	42(6)	56(8)	63(9)
4	56(8)	84(12)	112(16)	119(17)
5	112(16)	140(20)	168(24)	175(25)

注:括号内为术后周数

2 结 果

在 LSCM 下,荧光素钠发绿色荧光,二甲酚橙和四环素分别发射红色和黄色荧光。植入 2 周后,B 组种植体界面近宿主骨侧可见少许点、线状红色荧光,绿色、黄色荧光呈条带状相连续,各荧光带间无明显间距,红色荧光强度较弱,黄色荧光明亮,种植体表面见少许团状黄色荧光(图 1);孔中为不规则的散在黄色荧光;在界面外髓腔侧骨组织的某些部位,可见呈环状的三色荧光分布,黄色荧光强度较大。两个对照组荧光沉积少,未见线状荧光。

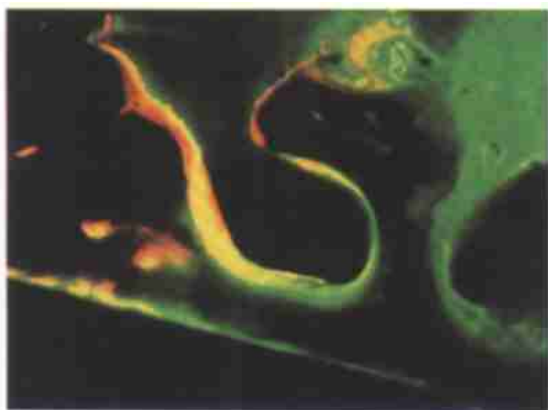


图 1 复合 bBMP 种植体植入 2 周后,界面见点、线状红色荧光,绿、黄色荧光呈短线状,黄色荧光较强 LSCM ×200

Fig 1 Two weeks later in experimental groups, some punctate and linear red fluorescent labels showed and some green or yellow fluorescent labels on the surface appeared, but the yellow were more obvious LSCM ×200

植入 4 周后,B 组种植体皮质骨界面见三色荧光

呈线状沉积,红、绿、黄色荧光沿着宿主骨表面向种植体方向依次排列(图 2),其排列顺序与荧光标记物注入体内的时间顺序一致,此部位显示平行排列的线状荧光,红色荧光带与宿主骨皮质表面紧密接触,绿色荧光带与红色相邻,种植体表面的黄色荧光最为明显。而在种植体底部髓质界面,新骨形成由种植体表面向骨髓进行,从种植体底部表面到骨髓,三条荧光带的排列依次为:红、绿、黄。孔中黄色荧光多而明亮,呈团状或片状沉积,夹杂红、绿色荧光。对照组近宿主骨侧有少量点片状红色和绿色荧光,黄色荧光呈不连续短条状或环状,较为杂乱,C 组孔中有小片状黄色荧光。

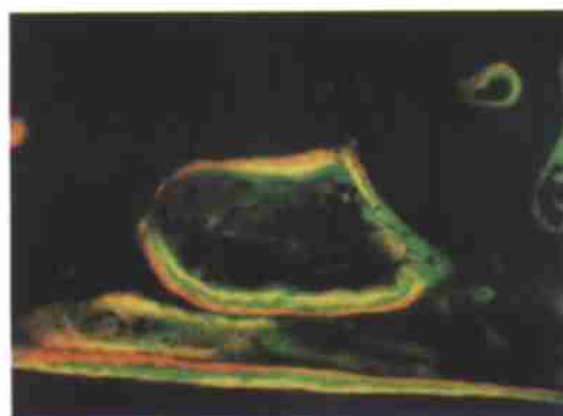


图 2 复合 bBMP 种植体植入 4 周后,皮质骨界面见三色荧光依次呈线状平行排列 LSCM ×200

Fig 2 Four weeks later in experimental groups, linear three fluorescent labels showed orderly and parallel on the surface of cortex bone LSCM ×200

植入 8 周后,B 组种植体界面呈平行排列的连续的长线状三色荧光,其顺序与 4 周时相同,红色和绿色荧光带之间距离较宽,在界面邻近区域可见较多三色环形荧光标记的管腔状结构(图 3)。孔中有较明显的荧光沉积,为片状、块状分布。对照组界面荧光较 9 周时明显,但不连续,呈散在短线状或片状,较为稀疏、凌乱,荧光沉积带之间距离较窄,C 组孔中有绿色、黄色片状荧光,少量红色荧光,较 B 组稀疏,荧光强度也较低,界限不清,与孔壁接触不紧密。

植入 16,24 周后,各组种植体表面仍可见三色荧光标记带,但其排列较不规则(图 4),与种植体表面接触的有绿色荧光,也可见红色或黄色荧光,无一定规律;红色荧光带较清晰,而绿色和黄色荧光带之间重叠、交叉较多,荧光强度也较植入早期减低;孔中荧光沉积多而均匀,并向中间延伸与对侧相连,以红、绿色为主,荧光强度均较低。

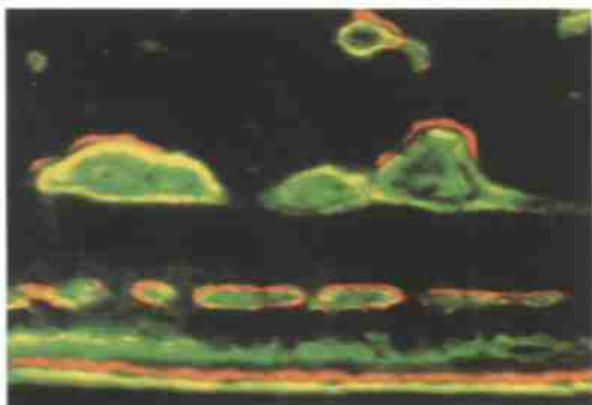


图3 复合 bBMP 种植体植入 8 周后,界面呈线状三色荧光,并可见较多三色环形荧光标记的管腔状结构 LSCM $\times 200$

Fig 3 Eight weeks later in experimental groups, three fluorescent lines near the interface and some tube-like substance with fluorescent labeling showed LSCM $\times 200$

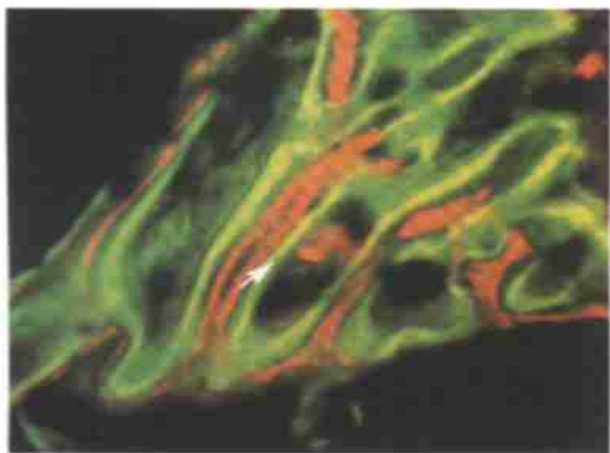


图4 复合 bBMP 种植体植入 24 周后,种植体表面见排列较不规则的三色荧光带,部分重叠、交叉 LSCM $\times 200$

Fig 4 Twenty-four weeks later in experimental groups, three fluorescent belts irregularly lined on the surface of implants and some part lapped LSCM $\times 200$

3 讨 论

近年来,多色荧光素标记技术受到重视,它克服了单一药物标记存在的图像轮廓不清、颜色对比差的缺点,不仅可作为确认新骨形成的一种定性方法,而且因其颜色对比清晰,可通过不同荧光强弱、荧光标记线距离的变化,得到多项骨动力学与骨形态学指标。除四环素外,国外学者^{1,2}多用钙黄素(calcein)和茜草素红(alizarin red)作为多色荧光标记物,但二者均为染料类荧光剂,毒副作用较大,尤其是后者,过大剂量使用对骨形成有阻碍作用,影响实验结果,故在本实验中选用四环素、荧光素钠(sodium fluorescein)和二甲酚橙(xylenol orange)作为荧光标记物,结果表

明,这 3 种药物代谢快、毒性低,不引起机体的不良反应,标记方法简单,结果可靠。

将 LSCM 用于观察种植体-骨界面的荧光标记,国内尚未见报道。LSCM 是 80 年代初研制成功的一种高光敏度、高分辨率的新型生物学仪器。激光可以透射生物学组织(0.5~1 mm 厚度)而不损坏样品,所以在厚切片的光学样品上能观察到完整的细胞或组织内部的结构。本实验利用 LSCM 这一优点,对不脱钙组织切片(厚约 50~70 μm)进行观察,显示新骨形成部位,并通过其荧光强弱、荧光标记线之间距离的大小来考察骨的生长代谢状况。

用 LSCM 和荧光显微镜作对比观察,发现在荧光显微镜下无明显三色荧光显示,红色荧光甚少或缺如,且荧光标记线模糊,而在 LSCM 下,可清楚显示红、绿、黄 3 种荧光,并呈一定规律性地排列。可以看出,由于 LSCM 的应用,多色荧光素标记显示出不可替代的优越性。

本实验中,复合 bBMP 组在早期即可见有荧光沉积,相对于光镜下的组织学变化提前近 1 周;其荧光强度、荧光标记线之间的距离直观地反映了新骨形成量和新骨形成速度;荧光标记线排列顺序反映了界面骨沉积方向。

荧光标记线依荧光物质标记时间顺序在种植体骨界面平行排列,表明其新骨在种植体表面的沉积是一个连续进行的过程;在不同部位,这种顺序排列又有所不同,在皮质骨,从种植体表面向宿主骨方向依次为黄、绿、红色荧光,而在髓质骨,其顺序相反,表明界面骨沉积是以两种不同的方向进行的:在皮质骨,由宿主骨侧向种植体表面沉积,而在髓质骨则相反,由种植体表面向宿主骨方向沉积。

在复合 bBMP 组,2~4 周时荧光带间距较宽,黄色荧光明显,紧邻种植体表面,而 6~8 周荧光带间距较窄,说明复合 bBMP 组植入后 4 周内,骨形成较为活跃,4 周时即可见种植体与骨直接接触,6 周后骨形成则较为缓慢。而在此期间,对照组界面及孔洞内荧光沉积少,在一些部位可见排列无顺序的荧光标记带,并可见荧光带之间相互交叉、重叠,可能由于此处新骨形成缓慢,骨沉积是以骨形成和骨吸收不断交替的方式进行的,因此,当种植体表面荧光素钠标记的新骨被吸收,二甲酚橙标记的新骨则可在同一部位沉积,同样四环素标记的新骨也可以同样的方式沉积于种植体表面。通过 LSCM 观察,可以认为,种植体-骨界面存在连续或间断骨沉积这两种不同的方式以及两种不同的沉积方向³。

实验中还发现,在 2 周时,B 组种植体髓腔侧界面外的骨组织内可见一些散在分布的黄色荧光标记,表明 bBMP 为骨髓细胞分化为成骨细胞提供了良好的环境,促进了早期成骨。骨髓的基质细胞中存在着两种类型的成骨前体细胞:定向性成骨前体细胞(determined osteoprogenitor cells,DOPC)和诱导性成骨前体细胞(induced osteoprogenitor cells,IOPC),前者存在于骨髓基质表面,其行为类似于干细胞,不需要诱导因子,自身具有定向分化为骨组织的能力,而后者广泛存在于骨外器官组织中,只有在诱导因子作用下才能分化成骨,故一般认为 IOPC 实际上是具有分化能力的间充质细胞⁴。分析认为,bBMP 通过对 IOPC 的诱导作用,使其早期分化为成骨细胞,进而形成骨组织。这也可以解释光镜下所观察到的种植体底部早期即形成紧密的骨性结合,一方面是由于种植体植

入时此部位本身间隙较小,另一方面就是 bBMP 对骨髓中 IOPC 的诱导成骨作用。

参考文献

- 1 Mendes M, Pritzker KP. Optimizing multiple fluorochrome bone histodynamic markers. Bone, 1993,14(3):537-543
- 2 Boyde A, Wolfe LA, Maly M, et al. Vital confocal microscopy in bone. Scanning, 1995,17(2):72-85
- 3 Iyama S, Takeshita F, Ayukawa Y, et al. A study of the regional distribution of bone formed around hydroxyapatite implants in the tibiae of streptozotocin-induced diabetic rats using multiple fluorescent labeling and confocal laser scanning microscopy. J Periodontol, 1997,68(12):1169-1175
- 4 Wlodarski KH. Properties and origin of osteoblasts. Clin Orthop, 1990,252:276-293

(2002-01-31 收稿,2003-06-16 修回)

(本文编辑 王 晴)

(上接第 427 页)

骨愈合的先决条件。当然,大量外骨痂的形成和骨折愈合过程中的膜性成骨和软骨内成骨方式,也说明 PDS 线内固定不具备骨折断端间轴向加压的能力及压电效应,属于继发性骨折愈合方式⁵。此可吸收骨折内固定线系初期研究,将来可利用压模成型制成 PDS 接骨板以进一步研究其作为内固定物的可行性。

3.2 PDS 的体内降解

PDS 的生物降解是指该聚合物在生物体内因水解发生分子链断裂,由高分子量的大分子转变成低分子量的小分子的过程,而其吸收是指该材料从植入部位消失的程度。本实验根据高聚物机械强度与其分子量正相关的原理,通过对 PDS 线拉伸强度的丧失来间接反映其相对分子质量的衰减,通过 PDS 线占位面积的变化来反映其吸收程度。由图 5 所示的结果可以看出,PDS 线拉伸强度丧失量最快是在术后 4~6 周,而此时正是骨愈合过程中需要加强功能锻炼及应力刺激的时候,由于 PDS 体内降解的同步性,该材料作为骨折内固定物将有利于传导新生骨,从而刺激新骨生长。实验结果还表明,PDS 占位面积在 8 周前变化不大,8 周后不但表现占位孔明显减小,还

表现为孔壁的塌陷,说明此时 PDS 线不但有强度的明显丧失,更有降解碎片的大量吸收,这种现象与同类聚合物聚乳酸、聚乙醇酸的降解吸收过程有相似之处,是由于大分子中非晶态部分先水解,而晶体部分分子链后断裂的原因。实验观察 12 周,PDS 尚未完全吸收,其吸收的具体时间的测定,尚需用¹⁴C 或³H 标记进行骨内埋植实验才能得出准确结论。

参考文献

- 1 陈希哲,杨连甲.下颌骨骨折动物模型制作改进方法.华西口腔医学杂志,2001,19(6):404-405
- 2 陈希哲,斯方杰.可吸收手术缝线研究进展.国外医学创伤与外科基本问题分册,1995,16(4):204-206
- 3 陈希哲,王永海.可吸收骨折内固定物及其在颌面外科的应用.国外医学口腔医学分册,1995,22(2):65-69
- 4 Sarmiento A, Schaeffer JF, Beckerman L, et al. Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing. J Bone Joint Surg (Am),1977,59(2):369-375
- 5 张 益.下颌骨骨折治疗.北京:北京医科大学协和医科大学联合出版社,1993:27-37

(2002-09-27 收稿,2003-06-18 修回)

(本文编辑 王 晴)