译文

表面改性钛膜和原始钛膜对大鼠颅骨缺损模型引导骨再生的比较研究

Comparison of Guided Bone Regeneration Between Surface–Modified and Pristine Titanium Membranes in a Rat Calvarial Model

Thuy-Duong Thi Nguyen, So-Hee Moon, Tae-Ju Oh, Jung-Jin Seok, Min-Ho Lee, Tae-Sung Bae

原载　The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.2016; 31(3):581-590.（英文）

蓝凯文　译　　滕　伟　审

摘　要

研究目的：本研究的目的是评价经过阳极氧化、循环预矿化、加热处理钛膜（APHTM）的生物活性，采用组织学分析和显微 CT 扫描（Micro–CT）比较 APHTM 和未处理钛膜（NTTM）的引导骨再生能力。**材料与方法：**制备 APHTM 样品并浸泡于模拟体液中 2 天，然后用场发射扫描电子显微镜观察，接着用 X 射线能谱分析钙和磷酸盐的沉淀情况。体内实验中，在大鼠颅骨构造临界尺寸缺损（直径 8mm），用 APHTM 或 NTTM 覆盖处理（每一组 n=14）。在 2 周和 4 周后活检进行组织学检查（n=3）。将骨荧光标记物在第 3 周（茜素红）和第 5 周（钙黄绿素）分别注射入每组三只大鼠，在第 7 周进行组织学分析，第 8 周进行 Micro–CT 扫描（n=5）。**结果：**APHTM 具有较高的生物活性，于模拟体液浸泡 2 天后，APHTM 表面特征性地遍布致密的纳米片状晶体、钙磷浓度增加。在 2 周和 4 周，APHTM 组显示新生骨紧密贴附于膜上，而 NTTM 样品组在膜和新生骨之间形成结缔组织间隔。在荧光分析中也发现了同样的规律。Micro–CT 分析显示，APHTM 组较 NTTM 组骨量低，但骨矿化密度更高（P<0.05）。**结论：**结果表明，用 APH 处理钛膜可促进膜与新成骨之间紧密贴合，从而提高骨再生结构的稳定性。还需要进一步体内和体外实验验证该结论。

译者单位　广东省中山大学光华口腔医学院 · 附属口腔医院
广东省广州市越秀区陵园西路 56 号　510000

1 引言

足量的骨支持对种植体的寿命有至关重要的影响。当牙槽嵴缺损时，种植牙的最佳美学和功能修复是不容易实现的。为了增加萎缩的牙槽嵴，可以在植入前或植入同期进行骨移植。然而，骨移植的局限性在于移植材料的位移和／或塌陷。缺损部位移植材料的固位和稳定对骨再生有至关重要的作用。因此，带有屏障膜的引导骨再生（GBR），通常用于维持空间结构以及阻止软组织增殖侵入。

在目前的屏障膜材料中，钛（Ti）膜是一种不可吸收膜，被认为具有良好的机械性能。相比较高分子聚四氟乙烯膜材料或可吸收膜材料，钛膜可为骨移植材料提供更好的稳定性。然而，钛膜会刺激粘膜，从而导致膜的早期暴露。为了克服这一难题，许多研究对钛膜的厚度、闭孔／穿孔结构、孔径的设计和结构进行优化以提高骨结合。

改变钛表面的几何形状和／或化学组成已被证明能促进骨形成。文献中指出钛表面钙磷（Ca–P）涂层能有效地促进体外培养成骨细胞的活化，增加体内的骨形成。因此，可以假设，采用钙磷（Ca–P）涂层对生物惰性的钛膜进行表面化学改性，将有利于提高生物活性，促进新骨层沉积到 GBR 屏障膜上。在先前的研究中，本文的作者们成功地采用循环预矿化结合阳极氧化和热处理（APH 处理）将钙磷（Ca–P）颗粒有效地沉积入钛氧化物纳米管。在钛种植体植入和正畸微钛种植体时，此改性促进材料的生物相容性，骨结合以及对新骨层的生物结合。

大鼠颅盖骨的临界尺寸缺陷（CSD）被认为是体内评价引导骨再生（GBR）钛膜愈合的方便模型，因为它易于操作、稳定、出现并发症的风险最小。CSD 被认为是无法自愈的最小尺寸的组织缺损。8mm 是公认的大鼠颅骨缺损临界尺寸。大鼠颅骨的 CSD 用于评价骨再生和检验不同种类的可吸收和不可吸收膜的 GBR。最近，Rakhmatia 等用不同厚度和孔径的新式钛网到直接覆盖在大鼠颅骨的 CSD 上，并用 Micro–CT 和组织形态学评估分析骨增量情况。然而，引导骨再生（GBR）钛膜的成骨性能和骨愈合动力学仍未被阐明。此外，钛膜的表面改性对引导骨再生的影响还没有被充分阐明。因此，本研究旨在探讨一种体外 APH 处理的钛膜的生物活性，并通过组织学和 Micro–CT 分析比较 APH 钛膜（APHTM）和未处理的钛膜（NTTM）对于大鼠颅骨模型引导骨再生的结果。

2 材料与方法

2.1 钛膜的制备

钛板（神户钢铁公司）制备直径 10mm，厚度 0.2mm 的闭塞钛膜。在进行表面处理前，经 10 秒酸蚀（混合硝酸／氢氟酸／水比例为 12：7：81 的混合物）处理获得一种新的氧化层，并在乙醇和蒸馏水中超声清洗 10 分钟。钛膜 APH 处理法如前所述。简单地说，在 20V 的甘油溶液中阳极氧化处理 1 小时后形成纳米管阵列。随后，经 20 次循环预矿化装载钙磷颗粒到纳米管－球层上。最后，将样品置于 500℃ 下进行了 2 小时的热处理，稳定已形成结构并清除残留的杂质。

在体内试验前，所有标本都用环氧乙烷气体消毒灭菌。

2.2 生物活性测试

为研究 APHTM 的生物活性，将样品浸泡在 37℃ 模拟体液（SBF）中 2 天。 SBF 溶液具有与人血浆相似的 pH 值和无机离子的浓度，它是用 Hanks 液（H2387，西格玛化工有限公司），混合添加二水氯化钙 0.185g/L，硫酸镁 0.977×10^{-1}g/L，碳酸氢钠 0.350g/L 共同制备的，并用 1N 的盐酸溶液调节 pH 至 7.4。在 SBF 浸泡前后，采用场发射扫描电子显微镜观察（KBSI 全州，S–4700，日立）观察表面微观结构，X 射线能谱仪（Bruker）分析表面微观结构上的钙磷元素浓度。

2.3 体内试验

实验选用 28 只雄性 Sprague Dawley 大鼠（8 周龄，体重 230±20g）。在实验 1 周前，将大鼠置于恒温恒湿动物房适应环境。这项研究是按照《赫尔辛基宣言》的原则进行的。实验伦理批准由韩国全州全北国立大学实验动物中心实验动物护理和使用委员会机构审批通过。

使用肌内注射 50mg/kg 替来他明外加唑拉西泮（舒泰 50，维克实验室）和 15mg/kg 盐酸甲苯噻嗪（隆朋，拜耳）对大鼠进行全身麻醉后，在每个大鼠构建 CSD，以下实验流程由 Spicer 等描述（图 1）。剃除大鼠头颅的毛发，用聚维酮碘消毒擦洗颅顶。对颅顶手术部位附加局部麻醉，使用 0.5mL 1% 利多卡因加肾上腺素（1：100000）减少皮下出血。对颅骨切开正中矢状切口；从额部剥离一皮瓣。

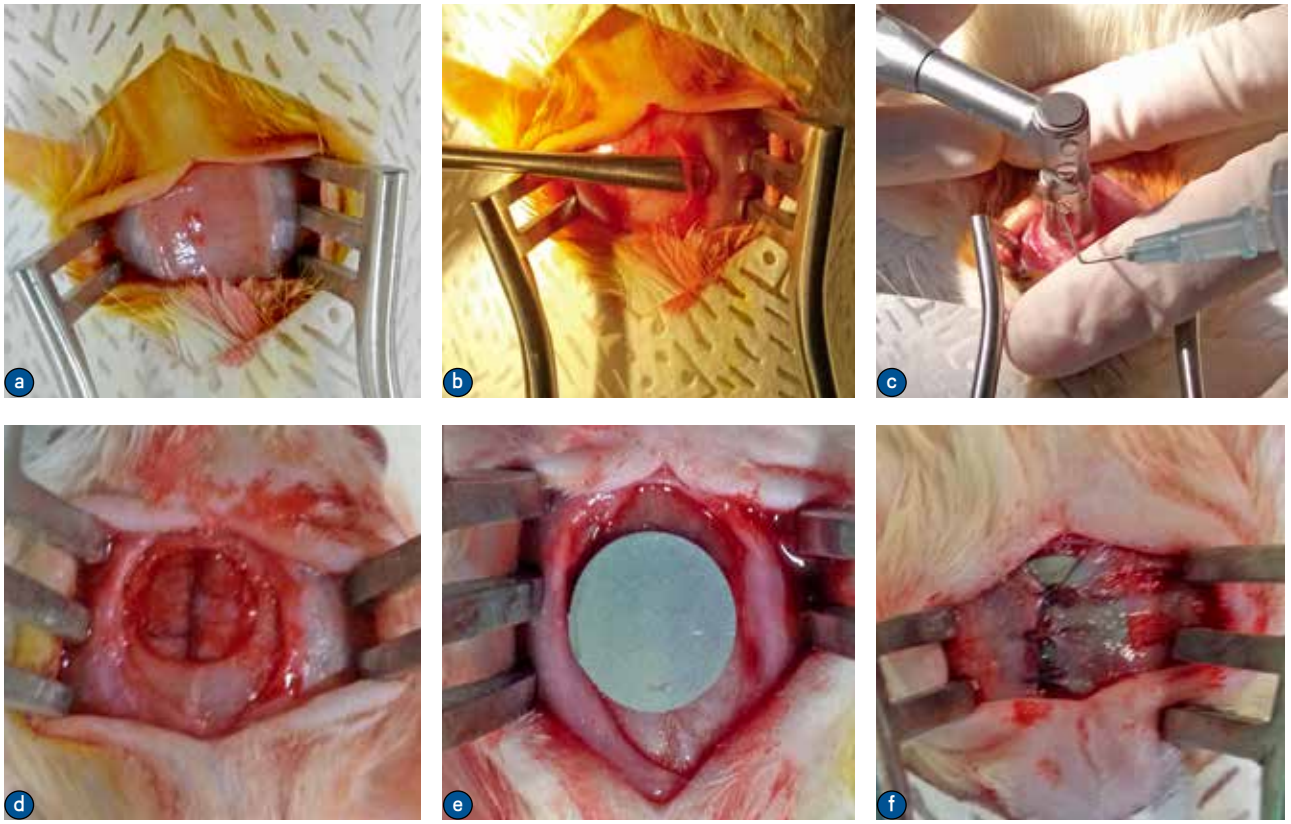

图 1　对大鼠颅骨缺损模型的手术。（a）切开皮肤，（b）骨膜分离，（c）采用环钻车针制备颅骨缺损，（d）颅骨缺损（直径 8mm），（e）钛膜安置，（f）骨膜覆盖于钛膜上

切开骨膜，钝性分离暴露中线两侧颅顶结构。在无菌生理盐水充分冲洗下，立即使用一个连接到根管马达的环钻车针（x-smart、登茨普莱）在矢状缝前枕缝构建一个 8mm 直径 CSD。对缺损的边缘进行评估和清洗，以去除残留的骨碎片或骨碎屑。运用 NTTM 或 APHTM 覆盖颅骨缺损处（每一组 14 个）。膜完全覆盖骨缺损处，并延伸到周围骨边缘至少 1mm。骨膜被替代，NTTM 或 APHTM 覆盖后用生物可吸收丝线缝合（5-0 聚乳酸羟基乙酸 910，Vicryl，Ethicon）。最后，用 4/0 丝线（4/0 黑丝，Ailee）缝合皮肤。为了防止感染，于术后 0，24，48 小时皮下注射抗生素（300μL/kg）（阿米卡星、Samu 溶媒）。于 2，4 和 8 周用过量硫喷妥钠（choongwae 制药）处死大鼠，并进行活检以获得 20mm×20mm 组织块。标本在 10% 中性福尔马林缓冲液中固定 2 天。

2.4　组织学和荧光分析

术后 2 周和 4 周分别对每组三只动物进行组织学分析。用 Villanueva 溶液 (Polysciences) 对固定颅骨块染色，并在梯度乙醇（80%，90%，95%，100%）和 100% 丙酮中脱水（2 天两次）。树脂包埋前，在真空下采用甲基丙烯酸甲酯 (MMA 单体，Yaruki 纯化学品）对样品进行预渗透 2 小时，浸于 35℃ 聚合混合物（MMA 溶液中添加 2% 重量的过氧化苯甲酰）中 3 天，60℃ 下处理 1 天。采用低速金刚砂切割机通过中心点将含有样品的树脂块垂直地切割到钛膜的平面，厚度 0.5mm。最后，将标本研磨至 40μm 厚作硬组织检查。在光学显微镜低倍镜（×10；EZ4D，徕卡）和高倍镜下（×50；DM2500，徕卡）对制备的标本进行观察。

为阐明钛膜下 CSDs 内骨形成动态变化，对每一组的三只大鼠进行连续双荧光标记。使用的荧光标记为茜素氨羧络合剂 (红色) 和钙黄绿素 (绿色)，分别于术后 3 周和 5 周进行皮下注射给药。分别根据大鼠体重进行给药，茜素络合指示剂（Sigma）给药剂量为 1.67mg/kg，钙黄绿素（Sigma）为 1.25mg/kg。在第 7 周进行活检，样本组织学树

脂包埋制备。采用共聚焦激光扫描显微镜（CLSM 510 Meta，蔡司）（×100）评估。茜素红标记在 543nm 下被激发并放射出 505 ～ 530nm 光。钙黄绿素绿色标记在 488nm 下被激发并放射出超过 560nm 的光。

2.5 Micro-CT

采用 Micro-CT（Skyscan 1076）对钛膜－颅骨块进行定量分析。X 射线管的电压和电流分别设置在 100kV 和 100 μ A，曝光时间为 240ms。扫描角旋转 360°，0.6 为间距得到的 X- 射线投影。采用 NRecon 软件（Skyscan）进行图像重建。

我们关注的是被颅骨缺损边界清晰分隔的直径 8mm 圆柱区域，包括在钛膜下组织的总厚度。从扫描平面的图像数据中使用 80 ～ 200 的阈值范围来评价骨组织。用 CTVol 程序（Skyscan）创建三维（3D）图像。此外，在每组 5 只大鼠中，使用 CTAn 软件（Skyscan）由 phantom 计算骨量（BV）和骨矿化密度（BMD）确切值，豪斯菲尔德单位（HU）。

2.6 统计分析

BV 与 BMD 数据被表示为平均数 ± 标准差（SD）。使用 SPSS 软件（版本 12.0，SPSS）进行单因素方差分析和 Tukey post hoc 检验，其差异具有统计学意义 $P < 0.05$。

3 结果

3.1 APHTM 的生物活性

图 2a 为 APHTM 的俯视图，表明膜被均匀钙磷颗粒层完全覆盖。断面图像显示这些谷粒样沉淀部分渗透进入下面的纳米管中，与纳米管阵列形成嵌合（图 2b）。

图 2c 和 2d 显示于 SBF 中浸泡 2 天后 APHTM 表面的生物活性，许多含有致密纳米片状晶体颗粒的球形聚集体遍布整个表面。

X 射线能谱分析 SBF 浸泡前后的结果如表 1 所示。在浸泡 SBF 2 天后，APHTM 表面钙磷沉

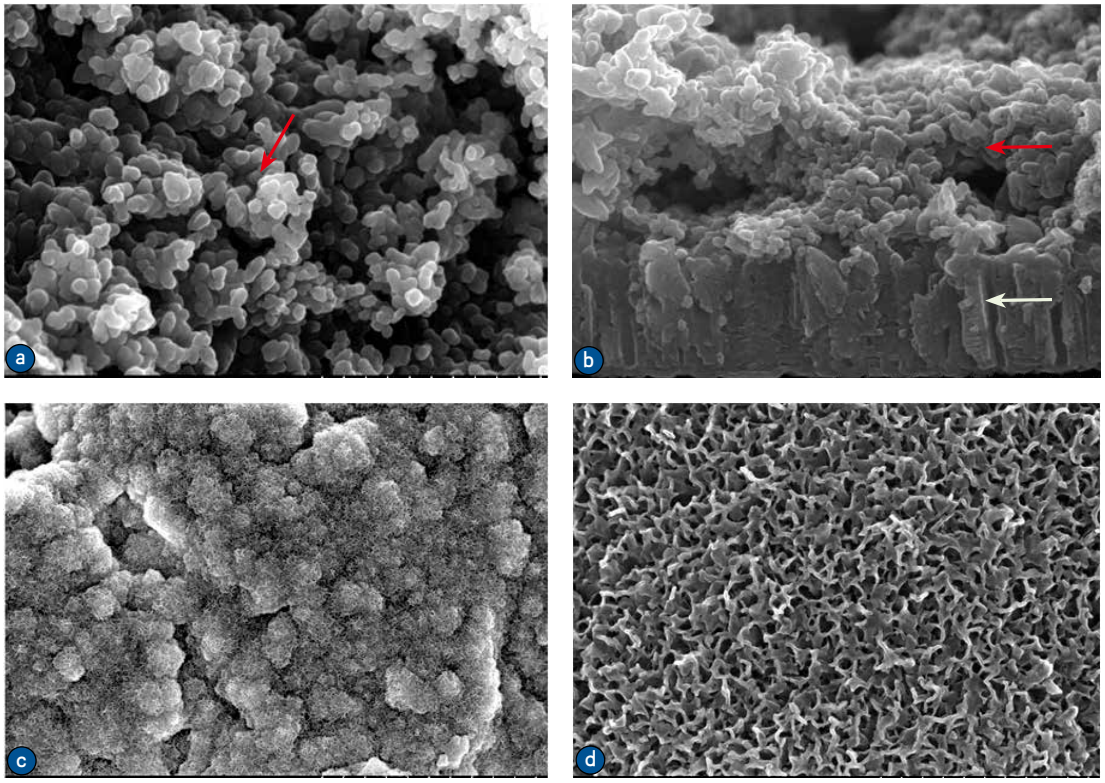

图 2 表面特性分析和 APH 钛膜的生物活性。场发射扫描电子显微镜观察（原始放大 ×50）APH 处理表面呈现由大量钙磷颗粒渗透的纳米管阵列（a，俯视图；b，横截面）。于 SBF 浸泡 2 天后，含有致密的纳米片状晶体的球形聚集体形成遍布整个 APHTM（原始放大 c，×5 和 d，×50）。
白色箭头 = 纳米管阵列；红色箭头 = 谷粒样 Ca-P 沉淀。

表 1　钙磷浓度以及 SBF 浸泡之前和浸泡 2 天后 APHTM 的 Ca ／ P 比 EDS 分析（每组 n ＝ 3）[a]

分组		元素		
		钙（wt%）	磷（wt%）	Ca ／ P 比（at%）
APHTM	SBF 浸泡前	20.91 ± 1.41	9.91 ± 0.81	1.63 ± 0.02
	SBF 浸泡后	30.01 ± 1.21	14.47 ± 0.68	1.61 ± 0.07

a 每组有 3 个样本。浸泡试验后沉淀元素含量增加，提示其较高的生物学活性。
wt %，重量百分比；at %，原子百分比。

积显著增加，而且浸泡后 Ca/P 比保持在 1.6 左右，这与羟基磷灰石 Ca/P 比相近（1.67）。

3.2　第 2 周和第 4 周的组织学分析

图 3 为大鼠颅骨缺损应用不同钛膜 2 周和 4 周

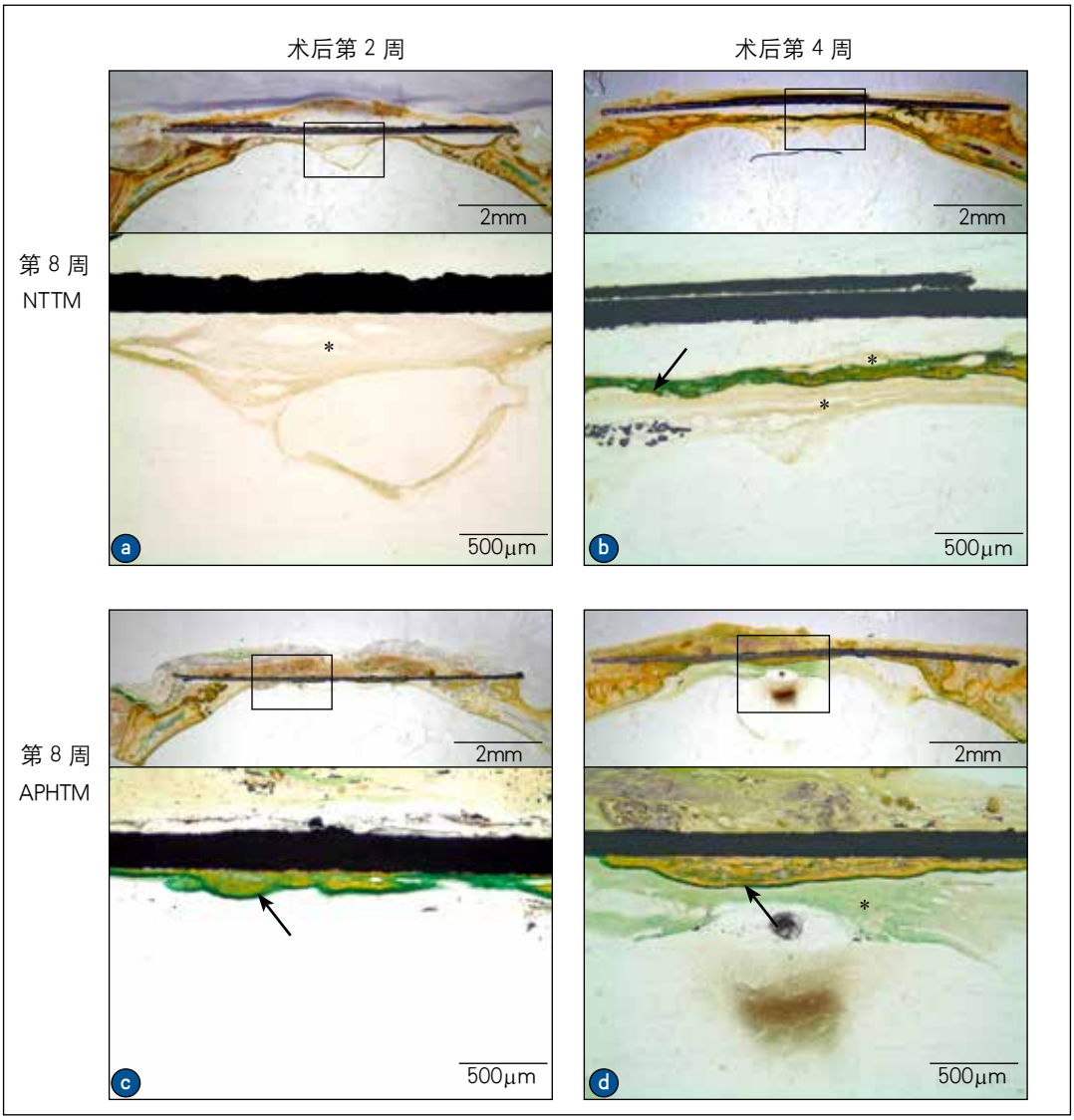

图 3　术后第 2、4 周骨再生情况。通过 NTTM（a，b）以及 APHTM（c，d）中心点的横截面图像（原始放大 ×10 和 ×50，Villanueva 骨染色，树脂包埋）。APHTM 组显示紧密的骨性结合，而 NTTM 组表现出软组织的侵入。星号 ＝ 结缔组织；黑色箭头 ＝ 新生骨组织。

后的组织学图像。

2 周可观察到，部分编织骨与 APHTM 接触，甚至是在中心区。同时，只有在 NTTM 下发现结缔组织。

4 周时，新生骨延伸到 APHTM 下成为薄薄的一层，但没有完全覆盖缺损。NTTM 下也可见一薄骨层，但其不与膜接触。在 NTTM 与薄骨层之间区域，可观察到结缔组织侵入其中。

总之，在初始愈合阶段，APHTM 组表现出膜表面下直接的骨沉积，其随着时间的延长而沿着膜增长。然而，NTTM 组表现出骨的形成与膜的分离，二者间有结缔组织的侵入。

3.3　荧光分析

荧光显微镜下观察连续的荧光条带揭示了不同植入时期的骨形成动态变化。在植入 7 周后，可观察两个荧光标记（茜素，钙黄绿素）（图 4）。如图 4a 和 4d 所示，由于茜素代谢更长一段时间（28 天），茜素标记线亮度减少并出现散射。同时，钙黄绿素标记的骨清晰可见，指示注射后 5 周新骨沉积情况（图 4b 和 4e）。

在合并后的图像中，在一些区域红色和绿色的标签混合在一起，指示新骨层的变形或重塑。相继的荧光染料标记表明钛膜下不断发生骨形成和改建。然而，APHTM 下骨荧光标记的可见性，连续性比 NTTM 的更高。此外，这两个标记与 APHTM 接触比 NTTM 多。

在 APHTM 组，第 3 周的标记（红色）比 5 周的标记（绿色）更加接近钛膜表面，这表明骨形成的顺序。然而可见，第 5 周标记比 3 周标记更加接近 NTTM。因此，APHTM 下的骨形成似乎起源于膜并向外生长。相反地，新骨形成自发地远离 NTTM 并向膜生长。

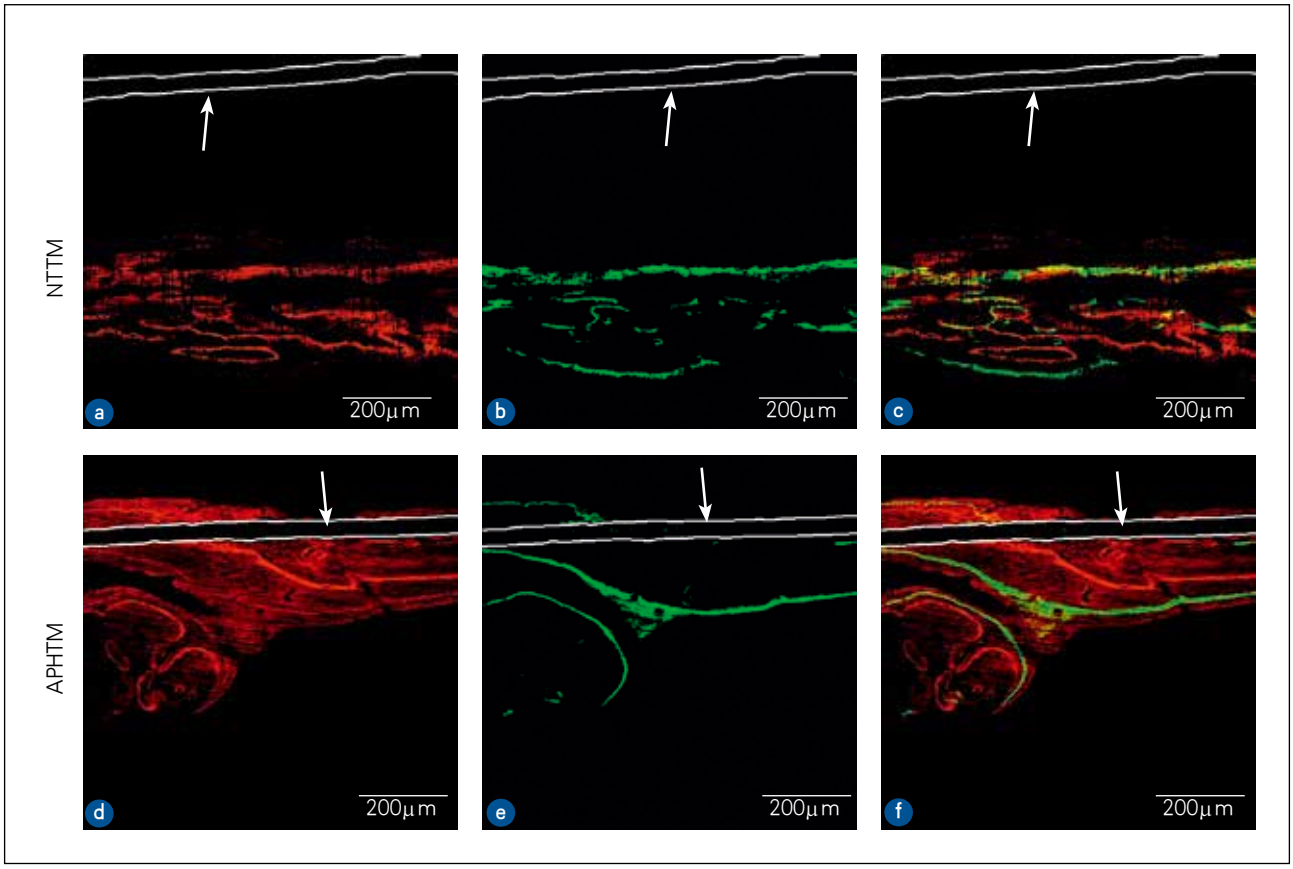

图 4　种植术后 7 周荧光显微照片（原始放大 ×100）。荧光染料分析揭示了术后第 3、5 周 APHTM 和 NTTM 周围的骨形成情况，由茜素标记线（红色）和钙黄绿素标记线（绿色）分别标记。可见这两个标记都与 APHTM 接触，而茜素红与膜更接近，这表明骨再生起源于膜并向外生长。相反，两种荧光标记物都远离 NTTM，并从茜素红到钙黄绿素绿指向钛膜。箭头 = 钛膜。

3.4　Micro-CT 分析

在 8 周使用 Micro-CT 进行组织学评估以研究钛膜下骨再生情况（图 5）。在这个时间点，非处理组和处理组颅骨缺损处的新骨随时间而生长，已完全封闭了缺损处。

正如冠状位图像和三维图像所看到的，APHTM 中新骨层的厚度从外部向中心区降低；同时，NTTM 下新骨层的厚度在整个缺损区都是非常相似的（图 5a、5b、5d、5e）。两组中新生骨层都与钛膜接触；然而，APHTM 组的新生骨层比 NTTM 组的更薄更致密。

Micro-CT 分析后，对每组 5 个活检标本中 3 个进行常规组织学检查。然而，在树脂包埋处理后出现 NTTM 从新骨层剥落，并没有观察到侵入的结缔组织（图 5c）。APHTM 下仍可见新骨层的接触（图 5f）。与 Micro-CT 的观察一致，组织切片证实了 NTTM 下的新骨层为多孔结构，其中含有纤细的骨小梁和大的髓腔；而 APHTM 下的骨层致密，与皮质骨形态相似。

表 2 显示了两组的 BV 和 BMD 的定量数

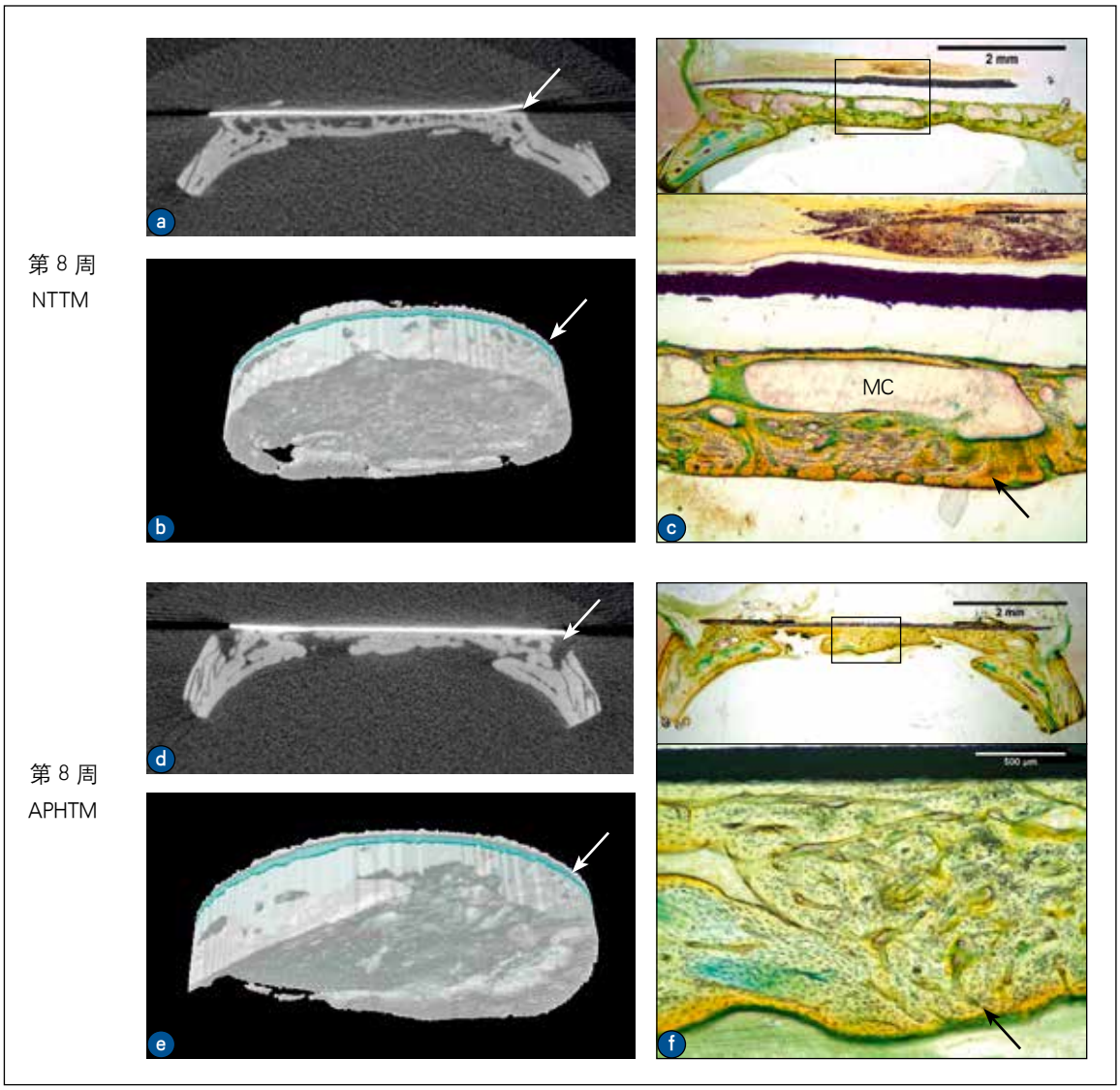

图 5　第 8 周的 NTTM 和 APHTM 缺损愈合情况。(a，d) 通过缺陷的中心点的冠状面图像。(b，e) 临界尺寸颅骨缺损的 3D 重建。(c，f) 通过中心点的组织学图像，放大 ×10 和 ×50（Villanueva 骨染色，树脂包埋）。所有缺损被完全封闭。相比于 NTTM 而言，APHTM 新生骨层更薄更致密。
白色箭头 = 钛膜；黑色箭头 = 新骨组织；MC = 骨髓腔。

表 2　第 8 周钛膜下新骨层的 Micro-CT 分析（n= 5 每组）[a]

Micro-CT 分析	分组		
	NTTM	APHTM	P^*
骨量（mm^3）	27.86 ± 3.3	17.56 ± 3.19	< 0.05
骨矿化密度（g/mm^3）	977.18±78.3	1085.15±46.6	< 0.05

a 从大鼠颅骨缺损的三维 micro-CT 重建阐明骨量和骨矿化密度情况。相比于 NTTM，APHTM 表现出更低的骨量但更高的骨矿化密度。

*P < 0.05 表明组间差异显著。

据。在 8 周，在 APHTM 下修复位点的 BV 值（17.56±3.19mm^3）明显低于 NTTM 下修复位点（27.86±3.3mm^3）（P < 0.05）。然而对于这些修复部位的 BMD 值，APHTM 组（1085.15±46.6g/mm^3）比 NTTM 组（977.18±78.3g/mm^3）更高（P < 0.05）。

4　讨论

本研究的目的是评估 APHTM 的生物活性和体内性能。NTTM 作体内实验的对照。

所有大鼠在术后愈合期间恢复良好，没有任何感染或其他疾病的临床症状。在愈合期间没有膜暴露的记录。与股骨缺损不同，大鼠颅骨模型具有不需要固定来稳定骨架的优点。但在目前的研究中，钛膜上的骨膜仍需缝合以加强屏障膜的稳定性，防止微移动，从而减少纤维组织的生长。此外，骨膜也可促进骨再生，部分原因归功于其为愈合处提供了细胞和血管来源。对目前的研究而言，钛膜覆盖的颅骨骨块易于为组织学观察、Micro-CT 分析、荧光分析取材和制备标本。

本研究首次将表面处理的钛膜作为 GBR 屏障来研究。APH 处理包括对钛膜的阳极氧化，循环预矿化和加热处理。纳米管状结构被钙磷颗粒渗透，这促进羟基磷灰石沉淀，并通过金属化学键结合促进羟基磷灰石与钛的结合。研究中，钛膜上可获得钙磷颗粒的沉淀以及其对氧化钛纳米管阵列的渗透。使用 SBF 浸泡试验后 2 天，APHTM 表面表现出生物活性。这一发现与 Kodama 等的研究结果一致，他们发现交替浸泡于 SBF 中 20 次后羟基磷灰石沉淀加速。

在初始愈合阶段（第 2、4 周），APHTM 形成紧密的骨结合。在 NTTM 和新生骨层之间可见软组织侵入。Rakhmatia 等报道称，用不同厚度和孔径的钛网覆盖 CSD 后，纤维结缔组织侵入骨和钛膜结构之间的间隙。在猴子下颌骨研究中，Weng 等观察到钛网下三分之二的空间充满了骨样组织，三分之一充满软组织。这种结缔组织浸润可能是不同的因素作用导致结果，植入材料和骨组织间不充分的愈合，结缔组织通过屏障小孔向内生长，以及伤口区域的不稳定性等因素。因此，钛网的最初刚性固定对密封封闭缺损，防止软组织侵入十分重要。在愈合早期，APH 表面紧密的骨形成显示再生区域良好的初始稳定性，潜在地促进了愈合后期的骨形成。

骨愈合的动力受钛表面处理影响。尽管初始钛表面的氧化层具有生物相容性，但其仍需要更长的时间才能让成骨细胞粘附。骨愈合早期阶段，钛种植体的表面发生远端成骨，接着是由骨向原始钛种植体的表面逐渐矿化，改建过程需要几周或几年的时间。在具有生物活性的钛表面，接触成骨首先发生在种植体表面上，因为分化的成骨细胞在适当的部位定殖后向外生长。本研究中连续荧光标记揭示了 APHTM 和 NTTM 表面的这些过程。骨形成起源于 APHTM 下，然后向外部空间生长。相比之下，在 NTTM 下骨形成方向相反，新骨首次自发地形成并与钛膜分离，然后向钛膜生长。因此，我们推测 APHTM 促进朝向膜的紧密的骨再生，这有利于骨再生所需空间的维持。

在 8 周进行 Micro-CT 分析时，NTTM 和 APHTM 下都显示缺损区完全封闭，新生骨层和膜的接触。在 NTTM 组，Micro-CT 图像显示新生骨层与钛基部分接触，但在组织学切片中二者却完全脱离。组织学的制备过程可能是造成膜脱离的原因。APHTM 的新骨形成情况在 Micro-CT 和组织学切片中表现一致，这表明，APHTM 可从初始形成骨层中增加稳定性，从而促进骨再生的结构稳定性。

为量化 GBR 的结果，采用无创 Micro-CT 技术可以快速、精确测量骨矿物质含量。Micro-CT 技术对于检测动物体内骨矿物质含量微量变化具有

很高的精度（2.5%）。相比 NTTM，APHTM 呈现更高密度的矿化骨组织和较低的骨容积。此外，在 APHTM 下的新生骨层具有皮质骨的形态，从钛膜向外扩展并与旧骨组织相连，完全封闭缺损处。这种愈合似乎非常稳固，它可以重建骨皮质层，保护内部的移植材料，并防止去除屏障后愈合缺损处的塌陷。NTTM 下则呈现多孔的骨愈合层，其包含纤细的骨小梁和大的骨髓腔，因而骨愈合层对 NTTM 的结合性较弱。这种愈合模式可能有利于膜的回收，但膜下的骨质层可能在此过程中被破坏。

总之，纳米管结构和钙磷颗粒循环沉淀法都可以使羟基磷灰石沉淀在纳米管表面和内部。直接诱导了钛基体上新骨的形成，进一步增强了钛基体与新生骨层的结合。作者前期研究结果显示，经过 APH 处理的种植体有良好的结合性，目前作为 GBR 屏障研究。

Lundgren 等指出，引导骨增量最好的方法是使用一个坚固的封闭屏障。钛膜的硬度被认为是防止 GBR 屏障塌陷的重要因素，从而不需要添加额外材料来维持空间。最近的一项研究表明，100 μm 厚的封闭钛膜比薄膜更能促进广泛的骨形成。在另一项研究中，100 ~ 200 μm 之间一系列厚度的膜被推荐修复骨组织较大的缺损，晚期变形和中等萎缩性改变的选择。在本研究中使用 200 μm 厚度的封闭钛膜，膜下新骨形成良好，没有塌陷或暴露。因此，本研究使用的屏障膜硬度保证了能维持植入空间的形态，防止缺损处的塌陷，获得所需的空间要求。

屏障膜的另一个重要特点是封闭性。封闭的屏障膜可有效避免纤维组织形成，但常常因为隔绝血液供应进入而导致暴露。使用多孔屏障膜有利于骨再生的细胞外营养物质进入。然而，每一个微孔将成为一个“非支持的区域”，新骨需要时间从微孔边缘长入中心，有可能发生大孔径的材料中矿物质沉积不完整。据报道，大孔径的钛膜与骨密度降低有关。相反，带有数量众多小孔径的钛膜有更多的“生长中心”，从而可产生更好质量（更高密度）的骨。在本研究中，为防止软组织侵入和实现 APH 处理钛膜下致密骨形成，只针对封闭钛膜进行了研究。这样的表面处理可在软组织长入前直接诱导屏障上的早期的骨形成，抑制了愈合期间软组织的侵入，减少钛膜暴露的可能。然而仍需要进一步对经表面处理的穿孔膜进行研究来证实这些假设。本研究的局限性也包括每个评估阶段的样本量较少。进一步的大样本研究可以用于证实这些初步的结果，验证经处理的钛膜表面作为一个潜在的 GBR 屏障在口腔种植中的应用。

5　结论

在本研究的局限范围内，我们可以得出结论，经过 APH 处理的钛膜表面具有生物活性，并可促进朝向膜表面的紧密的骨形成，同时新生骨的密度较高。这种表面改性可用于提高 GBR 结构的稳定性。

6　鸣谢

本研究是于 2009 年由全北国立大学科研基金资助。这项工作也获得了由韩国政府出资（MSIP）的韩国国家研究基金会（NRF）的资金支持（No. 2012R1A2A2A01012671）。本文作者之间没有与本研究相关的利益冲突。