



磷酸钙涂层 - 阳极氧化钛表面对早期骨反应的影响

Effects of a Calcium Phosphate-Coated and Anodized Titanium Surface on Early Bone Response

Jung-Woo Koh, Young-Sung Kim, Jae-Ho Yang, In-Sung Yeo

原载 INT J ORAL MAXILLOFAC IMPLANTS 2013.28(3):790-797. (英文)

黄明娣 译 滕伟 审

摘要

目的: 本研究的目的是评价磷酸钙 (CaPO₄) 涂层 - 阳极氧化钛表面在体外和体内的有效性。**材料和方法:** 光滑表面作为阴性对照组, 喷砂 / 酸蚀表面和阳极氧化表面作为阳性对照组, 磷酸钙涂层 - 阳极氧化 (CaPO₄-coated and anodized, CPA) 表面为实验组。场发射扫描电子显微镜, 能量色散谱, 激光共聚焦扫描显微镜进行表面特性分析。在体外, 测定碱性磷酸酶活性评价成骨分化。在体内, 收集来自六只兔子 2 周和 4 周的标本, 用骨 - 植体接触 (bone-to-implant contact, BIC) 比值和骨面积 (bone area, BA) 来分析骨反应。**结果:** 光滑对照组的平均高度偏差 (S_a) 和表面积比值 (S_{dr}) 的均值和标准偏差分别为 0.32 ± 0.03 μm 和 3.6% ± 1.5%, 喷砂酸蚀组为 1.36 ± 0.11 μm 和 56.7% ± 16.1%, 阳极氧化组为 0.68 ± 0.02 μm 和 50.9% ± 2.9%, CPA 组为 0.67 ± 0.11 μm 和 50.0% ± 16.9%。各组在 7 和 14 天的碱性磷酸酶活性无显著差异。在体内实验中, 2 周后, CPA 组表现出的 BIC 比值显著高于阴性对照组, 阳极氧化组和 CPA 组表现出的 BA 值显著高于其他组。在 4 周, 各组之间的 BIC 比值和 BA 值无统计学差异。**结论:** 一个磷酸钙 (CaPO₄) 涂层 - 阳极氧化表面可以促进骨 - 种植体界面快速形成骨结合并在植体表面有更多的骨形成。

关键词

磷酸钙, 牙种植体, 骨结合, 氧化, 表面性能

1 引言

虽然光滑表面的种植体提供了成功的结果, 但

建立种植体周围快速及丰富的骨形成的想法, 在牙科植入物表面性能领域吸引了越来越多的关注。上颌后牙区因骨质量差需要植入种植体的情况常见, 并且对种植体成功有不利的影响, 此时, 改性表面的种植体更受青睐。^{1,2} 在以往的研究中, 对比

译者单位 中山大学附属口腔医院
广州市陵园西路 56 号 510060

于光滑表面, 改性后的种植体表面已表现出更快的骨反应和更高的成功率。³⁻⁷

表面改性的各种方法已被用来改变原来的表面形貌、化学, 或者两者均改变。⁸ 这些方法包括喷砂酸蚀、阳极氧化、等离子喷涂羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA) 涂层和磷酸钙 (CaPO₄) 涂层。^{3,9-12} 在一些临床研究中, 喷砂、酸蚀和阳极氧化处理的表面显示出较高的存活率。¹³⁻¹⁵ 等离子喷涂的羟基磷灰石涂层种植体也显示出良好的效果, 但已被报道存在几个问题, 包括颗粒的磨损和厚涂层的剥离。^{9,16-22}

表面形貌是影响骨结合的最重要因素。种植体的表面粗糙度程度根据平均高度偏差 (S_a) 值通常分为四类: 光滑 (0 至 0.4 μm), 微粗糙 (0.5 至 1.0 μm), 中度粗糙 (1.0 to 2.0 μm), 粗糙 (>2.0 μm)。²³ 据 Wennerberg 课题组报道, 适度粗糙表面比光滑或粗糙的表面产生更强的骨反应。⁶

种植体表面的化学性质也被认为是重要的, 因为表面层的化学成分可能会影响体内不同的反应, 如反应性骨形成。蛋白质与种植体表面的结合, 以及随后的细胞反应可能是由水和各种离子连续交换的影响。^{24,25} 对种植体表面的化学改性, 已经尝试使用氢氧化钠和热处理, 注入钙离子、或含有磷、硫、钙、镁离子阳极氧化的电解质。^{5,26-29}

据 LeGeros 报道, CaPO₄ 可能在表面形成骨磷灰石样状矿物或碳酸羟基磷灰石, 它可以促进细胞的功能, 从而形成强大的骨-磷酸钙界面, 该界面具有骨传导性, 而且能使骨形态发生蛋白结合在一起并发挥骨诱导性。³⁰ 临床上酸蚀表面含有薄 CaPO₄ 涂层的种植体比仅有酸蚀的表面能产生更强的骨反应。^{11,31} 因此, 对比于仅有阳极氧化表面而然, 期望薄的 CaPO₄ 涂层和阳极氧化表面的结合能产生一个优越的骨反应。不幸的是, 很少有研究报道 CaPO₄ 涂层-阳极氧化表面的优势。

因此本研究的目的是比较喷砂/酸蚀的 CaPO₄ 涂层-阳极氧化相结合的表面和仅有阳极氧化表面在体外和体内的效应差异。本研究的零假设是, 无论是在体外还是体内试验, CaPO₄ 涂层-阳极氧化表面不会与其他表面有显著差异。

2 材料和方法

2.1 研究设计

本研究所用四种不同表面处理的种植体如下: 光滑表面 (turned, T)、喷砂/酸蚀表面 (sandblasted/acid-etched, SAE), 阳极氧化表

面 (anodized, A) 和 CaPO₄ 涂层-阳极氧化 (CPA) 表面。T 组作为阴性对照, SAE 和 A 组作为阳性对照组, CPA 组为实验组。每组包括 11 个钛片和六组螺旋式种植体。每组的 11 个钛片中, 五片用于表面特性测试, 其他六块钛片用于碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 测定。六组螺旋式种植体 (总 n=24) 被植入在六只兔子 (即每只兔植入各组的一枚种植体), 每个胫骨植入两个, 每只兔子中种植体的位置使用 2×2 拉丁方的方法随机分配。术后 2 周处死一半, 其余 4 周后处死。

2.2 种植体的制备

使用 24 个商业纯钛 (4 级) 螺旋式种植体 (Dentium), 直径 3.5mm 和长度 8mm。24 个钛 (级) 片也是直径为 10mm, 厚度为 1mm (Dentium)。无表面处理的 6 个种植体和 11 个片用作阴性对照。其他每个组 (两个阳性对照组和一个实验组) 包括表面改性处理后的 6 个种植体和 11 个片。

2.3 表面改性

对于 SAE 表面组, 钛表面为喷砂氧化铝 (Al₂O₃) 颗粒并超声清洗和干燥。喷砂后样品在盐酸溶液中进行进一步酸蚀。最后, 样品进行清洗, 超声波清洗, 干燥。

对于 A 组, 样品在脉冲直流电场下频率为 660Hz 的水溶液电解质进行阳极氧化。电解质溶液制备如下, 将 0.15 mol/L 醋酸钙水合物 (Ca(CH₃COO)₂ × H₂O) 和 0.02mol/L 甘油磷酸钙 (CaC₃H₇O₆P) 溶解于去离子水中。阳极氧化在 270 V 冷水浴下进行 3 分钟。氧化层的厚度约为 2 μm。

制备 CPA 的表面时, 钛表面和 A 组样品表面进行一样的阳极氧化处理。CaPO₄ 组的薄膜 (厚度约为 300nm) 是用电子束在表面上沉积形成的。通过在 1000° C 烧结混合羟基磷灰石 (Alfa Aesar, Johnson Matthey) 和氧化钙 (Sigma Aldrich) 2 小时制备电子束沉积的 CaPO₄ 蒸发剂。最后, 表面 350° C 热处理 1 小时。

2.4 表面表征

使用场发射扫描电子显微镜 (field emission scanning electron microscopy, FE-SEM) 观察每组的两片钛片整体表面 (S-4700, Hitachi)。在每个钛片上随机选取四个区域进行 FE-SEM。然后, 获得 FE-SEM 图像的同时, 用能谱仪 (energy

dispersive spectroscopy,EDS) (EX220, Horiba) 分析表面成分和元素含量。从每组中取3片钛片评估表面粗糙度。两个粗糙度参数, Sa 和表面积比值 (S_{dr}), 用共聚焦激光扫描显微镜 (confocal laser scanning microscopy, CLSM) (LSM 5-Pascal, Carl Zeiss) 测定。在每一个钛片上, 四个随机选取的 $450 \times 450 \mu\text{m}$ 平方的区域进行分析。

2.5 碱性磷酸酶的测定

从每个组中选取六个钛片检测碱性磷酸酶活性。含 5×10^3 前成骨细胞的细胞悬液 (MC3T3/E1) 接种到钛片, 置于24孔板培养。细胞在 37°C 、5% 二氧化碳中孵育。然后细胞用磷酸盐缓冲盐水清洗, 用胰蛋白酶-乙二胺四乙酸溶液消化。1200 rpm 离心7分钟后, 细胞沉淀用磷酸盐缓冲溶液洗涤, $200 \mu\text{L}$ 的 ALP 缓冲液轻柔重悬。离心后, 采用对硝基苯磷酸为底物, 对细胞裂解液进行比色测定测定 ALP 活性。 37°C 反应30分钟, 0.05-N 氢氧化钠终止反应。在 405nm 处用分光光度计对生成的对硝基苯酚进行测量, 与对硝基苯酚标准溶液制备的标准曲线进行比较。使用 Bio-Rad 蛋白测定法测定蛋白质浓度, 进而对酶活性归一化。测量7天和14天的 ALP 活性。

2.6 动物外科手术

这项研究是由韩国汉城国立首尔大学动物研究委员会批准。所有的动物实验在国立首尔大学实验动物资源研究所的指导方针一致 (批准号 SNU-111103-2)。这项研究中, 使用六只雄性新西兰白兔 (8至10个月大, 2.5至3.5公斤)。四个植入物分别植入每只兔子 (每个胫骨植入两个, 每组各一只)。植入物的位置使用 2×2 拉丁方设计。

肌肉注射 1515mg/kg 噻环乙胺/麻醉 (舒泰50, 维克韩国) 和甲苯噻嗪 5mg/kg (隆朋、拜耳韩国) 麻醉兔子。术前去皮, 在胫骨近端区域的皮肤用聚维酮碘擦拭。术前抗生素 (头孢) 肌肉注射。局部麻醉, 2% 利多卡因 1.8ml 注入每个手术部位。皮肤切开, 暴露后每个胫骨, 骨膜分离。在胫骨近端内侧平面低速 (800转) 钻入一个2毫米的圆棒。钻孔依次扩大, 以达到最终直径为3.2毫米。植入物仅穿透第一皮质层。骨膜、筋膜铬肠线缝合, 皮肤丝线缝合。每只兔子术后每天肌注 0.06 克卡那霉素, 持续3天。

2.7 组织形态学

愈合2周和4周后, 静脉注射过量的氯化钾

麻醉和处死兔子。暴露胫骨, 植体与相邻骨头整块切除。标本立即固定在4%中性甲醛, 准备嵌入在光固化树脂 (Technovit 7200 VLC, Kulzer)。由 Donath 和 Breuner 所描述的方法基础上, 使用艾卡特系统制备脱钙切片 (Exakt)。³² 标本厚度约 $50 \mu\text{m}$, 并进行苏木精-伊红染色。通过检查标本光镜下组织学进行评价 (Olympus BX, Olympus)。使用连接到一个光显微镜的图像分析软件 (Kappa PS30C Imagebase, Kappa Optronics) 计算从骨皮质开始的四个连续螺纹的骨-植体接触 (BIC) 比值和骨面积 (BA)。

2.8 统计分析

对被测表面粗糙度参数和碱性磷酸酶测定结果的平均值采用单因素方差分析和 Tukey 事后检验组间是否存在差异。同时使用单因素方差分析和 Tukey 事后检验来确定 BIC 和 BA 是否具有显著差异。P 值小于 0.05 被认为有统计学意义。

3 结果

3.1 表征和 ALP 检测

图1显示了研究表面的 FE-SEM 图像。T 组表现出平行的加工槽, 这是由制造仪器制造的。SAE 组钛片显示由喷砂和酸蚀过程产生的不规则小坑。众多的大孔中伸出非常多的开放孔洞, 分布在钛片上。CPA 组的表面有开放的孔洞, 是由阳极氧化过程产生。高倍镜下观察, 然而发现有一薄层 CaPO_4 , 这在 A 组的钛片上并未发现。

EDS 分析仅对 T 组和 SAE 组仅检测到钛。在 A 组和 CPA 组均检测到氧, 钛, 钙, 磷和磷。表1总结了各组种植体表面的元素含量。

对 S_a 值, T 组的均值和标准差 (standard deviations, SDs) $0.32 \pm 0.03 \mu\text{m}$, SAE 组为 $1.36 \pm 0.11 \mu\text{m}$, A 组为 $0.68 \pm 0.02 \mu\text{m}$, CPA 组为 $0.67 \pm 0.11 \mu\text{m}$ 。对于 S_{dr} 来说, T 组的均值和标准差 SDs 为 $3.6\% \pm 1.5\%$, SAE 组为 $56.7\% \pm 16.1\%$, A 组为 $50.9\% \pm 2.9\%$, CPA 组为 $50\% \pm 16.9\%$ 。SAE 组在所有研究的表面中具有最粗糙的表面 ($P < 0.001$)。A 组合 CPA 组对比于阴性对照组的表面, 展示出了显著的更粗糙的表面 ($P = 0.003$)。 S_{dr} 值分析表明, 实验组钛片的表面积显著大于阴性对照组的钛片 ($P = 0.002$)。图2显示了所观察表面的激光共聚焦显微镜图像。各组间7天和14天产生的 ALP 并无显著差异 (图3)。

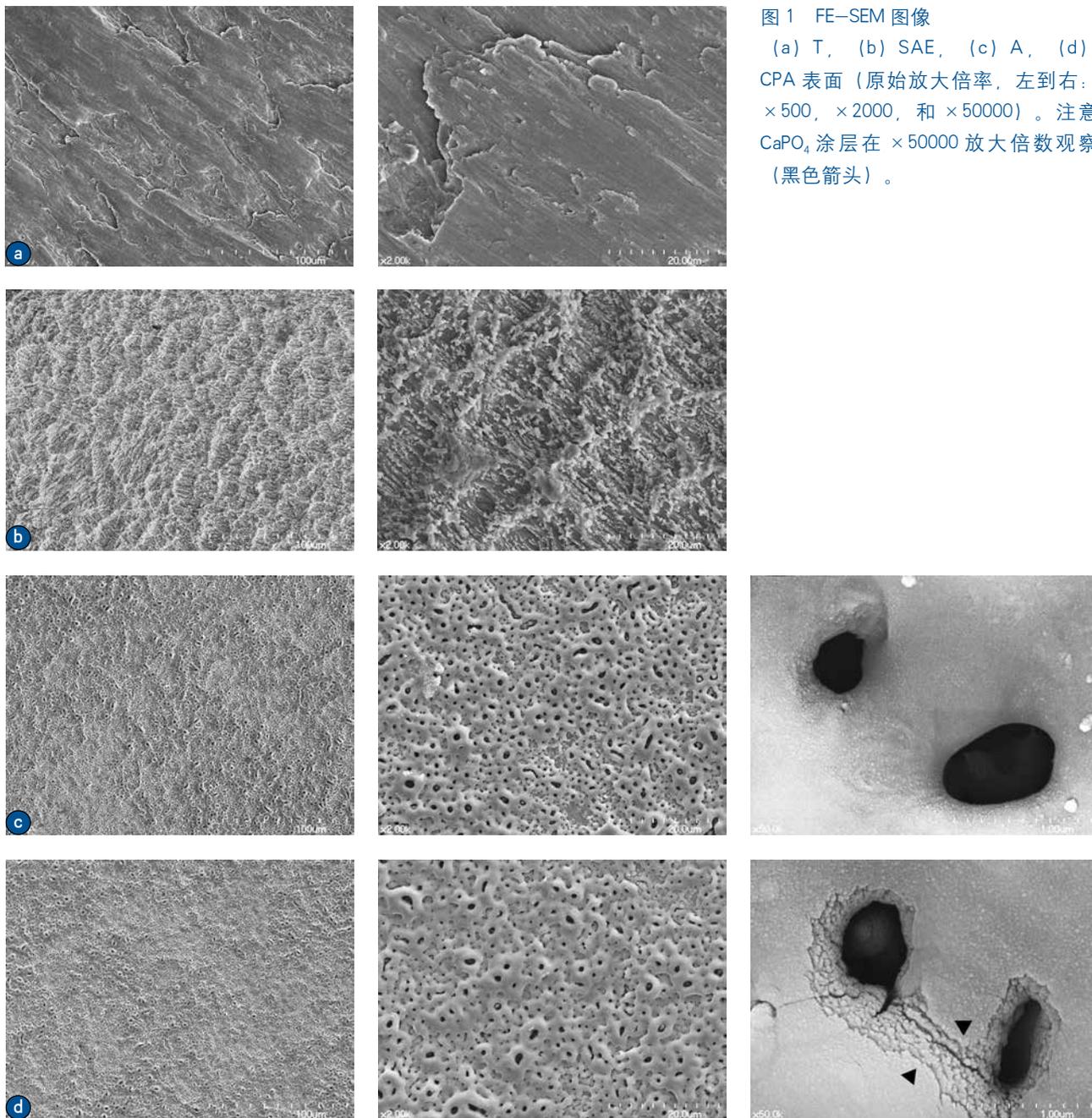


图1 FE-SEM 图像
 (a) T, (b) SAE, (c) A, (d) CPA 表面 (原始放大倍率, 左到右: $\times 500$, $\times 2000$, 和 $\times 50000$)。注意 CaPO_4 涂层在 $\times 50000$ 放大倍数观察 (黑色箭头)。

表1 钛片表面 EDS 所见的元素含量 (原子百分比)

元素	T	SAE	A	CPA
钛	100%	100%	$39.6\% \pm 2.8\%$	$17.0\% \pm 1.1\%$
钙	—	—	$6.0\% \pm 0.7\%$	$20.3\% \pm 1.9\%$
磷	—	—	$4.6\% \pm 0.4\%$	$7.9\% \pm 0.9\%$
氧	—	—	$49.8\% \pm 3.6\%$	$54.8\% \pm 2.0\%$

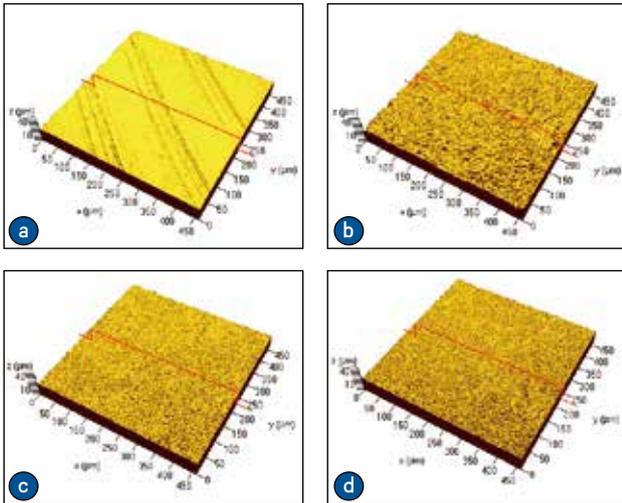


图2 (a) T, (b) SAE, (c) A 和 (d) CPA 表面的 CLSM 图像。T 组表面光滑, 加工时产生一些浅沟槽。SAE 表面比其他任何表面明显更粗糙。

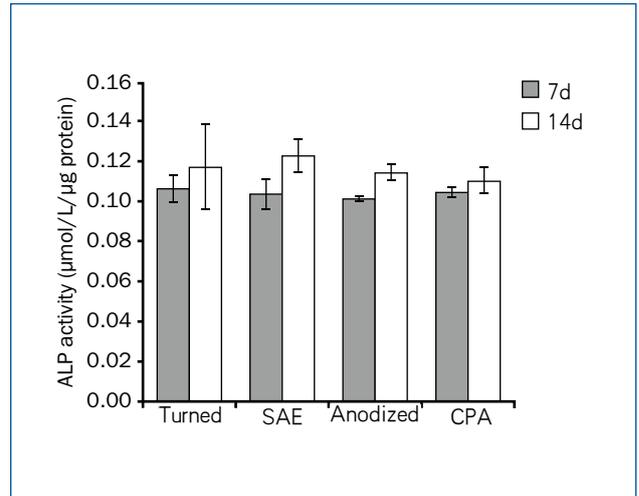


图3 培养7天和14天后测得的每个实验组表面的前成骨细胞 ALP 活性。组间差异无统计学意义。

3.2 体内观察

在愈合期没有并发症或植入物失败。移植后2周, 所有标本在光镜下可见明显的大量松质骨挨着

植入物表面骨髓区域(图4)。植入4周后, 新形成的皮质骨锚定于植入物表面(图5)。在所有标本里未观察到炎症反应。

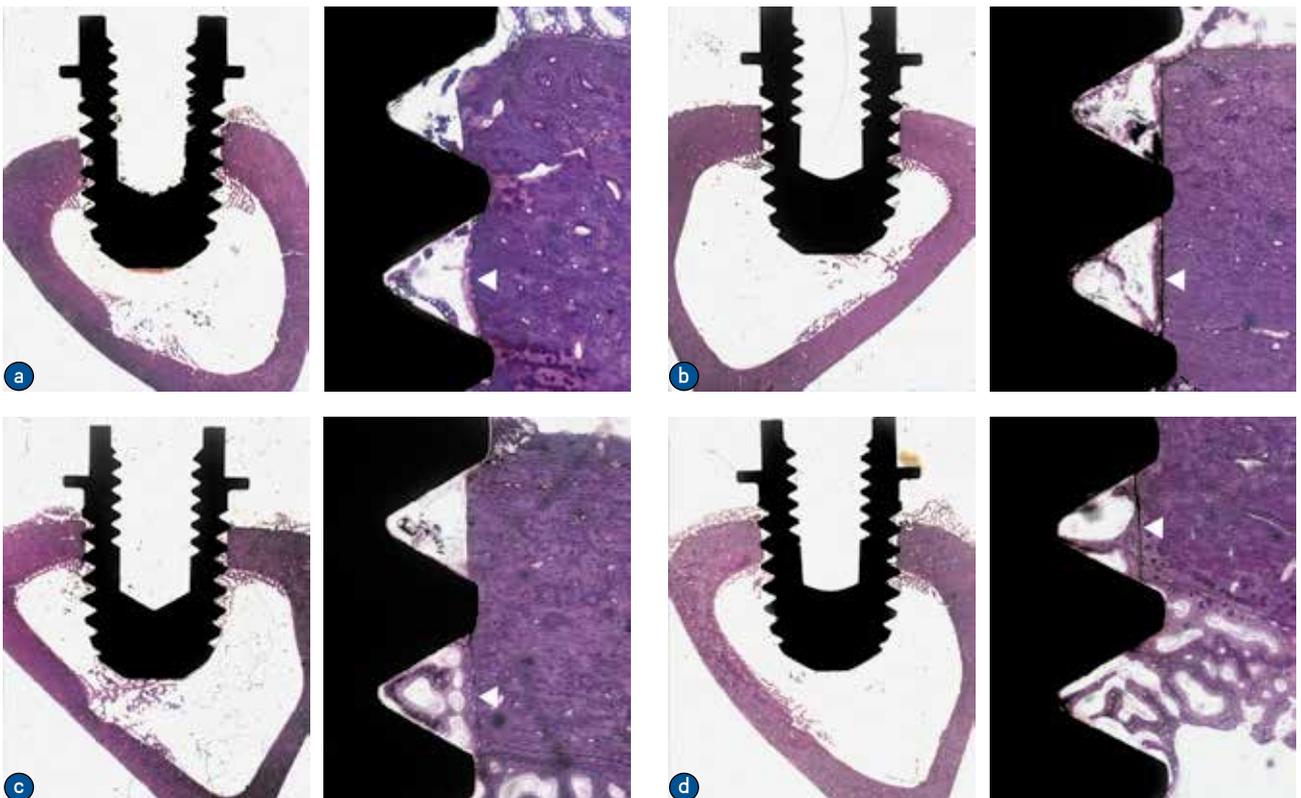


图4 光镜下观察兔胫骨上各组 (a) T、(b) SAE、(c) A 和 (d) CPA 植入体的周围(放大倍率 $\times 12.5 \times 100$)。植入后2周处死动物。新形成的未成熟骨与现有皮质骨之间的边界可以清楚地看到(白色箭头)。

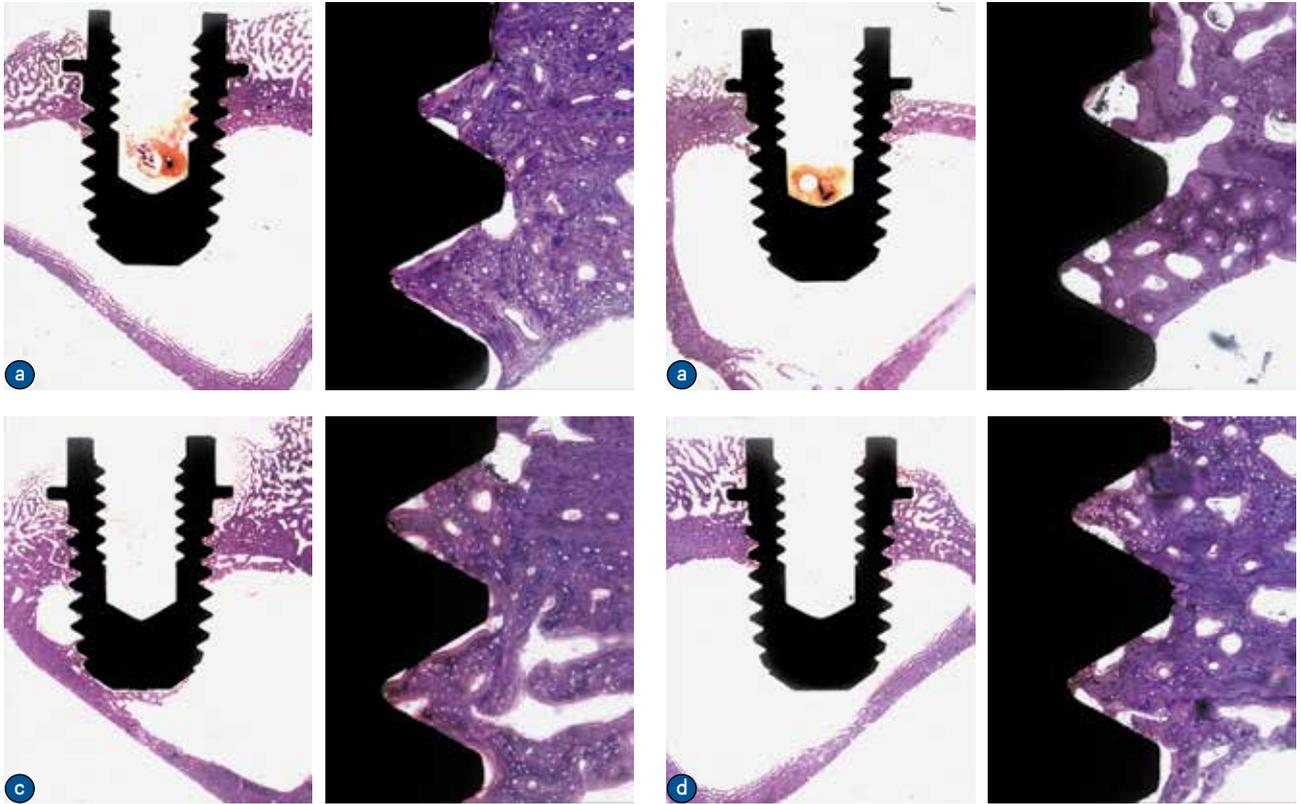


图5 光镜下观察兔胫骨上各组 (a) T、(b) SAE、(c) A 和 (d) CPA 植入体的周围 (放大倍率 $\times 12.5 \times 100$)。植入后4周处死动物。成熟的皮质骨与种植体表面接触。

2周后, T组的BIC平均值和标准差分别为 $14.0\% \pm 5.7\%$, SAE组为 $24.2\% \pm 5.9\%$, A组为 $25.4\% \pm 6.1\%$ 为, CPA组为 $35.4\% \pm 4.2\%$ (图6)。CPA组表现出的BIC比显著高于T组 ($P=0.006$)。虽然SAE组、A组和CPA组之间的BIC没有明显的差异, 但CPA组拥有最高的平均值, 而SAE组和A组表现出比T组较高的平均值。4周后, T组的平均值和SDs为 $31.1\% \pm 14.7\%$, SAE组为 $53.6\% \pm 15.8\%$, A组为 $48.4\% \pm 9.9\%$, CPA组为 $53.7\% \pm 10.9\%$, 组间无显著性差异 ($P > 0.05$) (图6)。

2周后, T组BA的平均值和标准差为 $30.3\% \pm 4.7\%$, SAE组为 $34.4\% \pm 4.3\%$, A组为 $47.2\% \pm 6.7\%$, CPA组为 $48.8\% \pm 6.6\%$, 而4周后, 分别为 $39.4\% \pm 9.2\%$ 、 $56.3\% \pm 4.5\%$ 、 $52\% \pm 8.0\%$, 以及 $50.1\% \pm 24.7\%$ (图7)。2周后, A和CPA组比其他组表现出明显较高的BA值 ($P=0.009$)。然而植体植入后四周, 各实验组表面BA值之间没有显著差异。

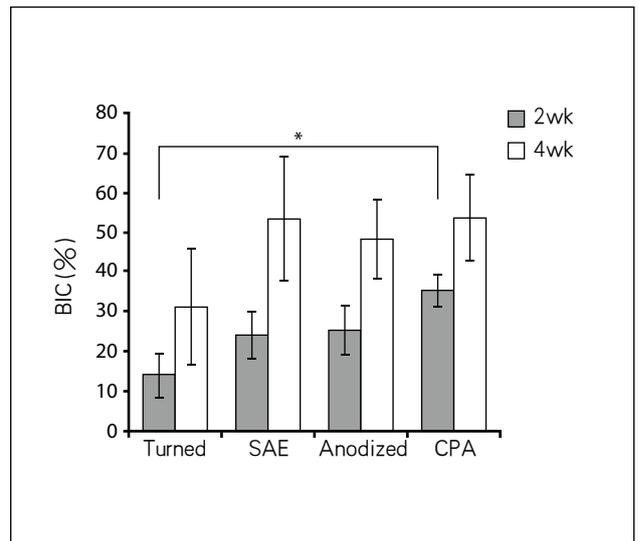


图6 实验植体愈合2周和4周后的BIC (平均值和标准差) $*P < 0.05$ 。

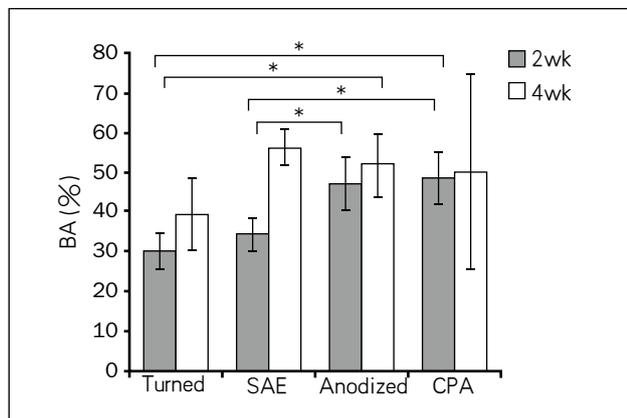


图7 实验植体愈合2周和4周后的BA (平均值和标准差)
* $P < 0.05$ 。

4 讨论

植体表面的骨响应由表面形貌、表面化学、化合物成分和在体内环境这些因素影响。⁸ 在这项研究中, 磷酸钙涂层-阳极氧化表面与光滑表面、SAE表面和阳极氧化表面对比, 包括从表面形貌、表面化学以及在体外和体内反应的角度比较。

表面改性的结果如下, 在光滑的表面(T组, $S_a=0.32 \pm 0.03 \mu\text{m}$), 两种微粗糙表面(A组和CPA组, 分别为 $S_a=0.68 \pm 0.02 \mu\text{m}$, $S_a=0.67 \mu\text{m} \pm 0.11 \mu\text{m}$), 适度的粗糙表面(SAE组, $S_a=1.36 \pm 0.11 \mu\text{m}$)。其中SAE组表面粗糙度似乎对于骨结合是最理想的。²³ 然而, 从表面骨接触面积(S_{dr})的角度来看, 表面改性组间无显著性差异。^{12,33}

磷酸钙生物材料, 类似于骨盐, 已知其能促进细胞功能, 并且生成明显的骨-磷酸钙界面。此外, 磷酸钙本身具有结合骨形成蛋白的骨传导和骨诱导性能。³⁰ 因此, 磷酸钙涂层使种植体表面更具生物活性。²³ Orsini课题组将磷酸钙颗粒作为一种双向酸蚀表面的添加剂从而促进骨结合, 结果对比于空白表面, 产生了高两倍的平均BIC值。¹¹ 在目前的研究中, 阳极表面被视为磷酸钙涂层额外的目标, 因为此微粗糙表面似乎可以改善种植体的骨反应。出于同样的原因, SAE表面作为阳性对照, 因为它表现出适度的粗糙度。正如预期的那样, 对比于A组, CPA表面增强骨-植体的接触。然而, 观察到的增强程度并未如奥尔西尼课题组研究结果般明显。

虽然EDS分析发现在阳极表面有钙和磷化合物, 但这些都是来自电解质, 并且和磷酸钙涂层的

化学结构和结晶度不同。⁵ 此外, 对比于CPA表面, 阳极氧化组表面的钙和磷的化合物更少。化学结构、结晶度和磷酸钙成分似乎对种植体与骨的亲和作用有影响, 但这种亲和性的实际机制是未知的。²³

在体外, 研究表面的ALP活性没有明显差异, 而ALP活性被用来评价成骨细胞的分化性能。³⁴ 以往的一个研究有类似的结果, 其结论是表面粗糙度对大鼠骨髓细胞分化的影响还不清楚。³⁵ 另一项研究不同表面粗糙度HA片也没有发现任何显著差异。³⁶ 然而, 最近的研究表明, 相比光滑钛表面($R_a=0.2 \mu\text{m}$), 在SAE表面较高的碱性磷酸酶活性(平均高度偏差 $[R_a]=3.2 \mu\text{m}$), 虽然它的SAE表面比那些用于本研究用表面的更粗糙($R_a=1.36 \mu\text{m}$)。³⁷ 另外的一个使用成骨样细胞株MG63的实验表明, 较粗糙的喷砂及阳极化表面比光滑表面表现出更强的ALP活性。³⁸ 可见单独表面粗糙度对前成骨细胞细胞ALP活性无显著影响。然而, 体内在CPA表面发现了最强的骨-植入体的相互作用, 这与体外试验结果不一致。故许多变量包括表面粗糙度、化学和细胞类型, 似乎都与成骨细胞的分化相关。

本研究的平均BIC值表明改性表面(SAE、A和CPA组)产生了优于T组的早期骨反应。这些体内的实验结果与以往的实验结果一致。^{5,7,39} 此外, 植体植入2周后, CPA组比其他实验组的表明具有显著更高的BIC和BA百分比, 这表明CPA组在螺纹空间, 具有更快速、更足量的骨生成。4周时, 组间无显著性差异, 毕竟这可能是一个小样本的结果。然而并没有证据来反驳这些发现。有几个研究探索磷酸钙涂层-阳极氧化表面, 一个研究涉及类似的表面, 研究人员应用成纤维细胞生长因子, 另一个没有进行生物测试, 第三个表现出类似的结果。⁴⁰⁻⁴²

5 结论

磷酸钙涂层-阳极氧化表面可在种植体-骨界面产生更快的骨结合, 并在种植体表面附近形成更多的骨。此外可以推测, 植入表面改性方法的结合, 如磷酸钙涂层-阳极氧化表面的结合, 可能对骨-植入体的反应产生有利的影响。然而, 需要进一步的临床研究来证实这一假说。

6 鸣谢

本实验属于由教育部资助的韩国国家研究基金会的基础科学研究项目——科学与技术(编号2011-0007662)。本研究作者间无利益冲突。