译文

表面多孔圆柱状种植体与表面粗糙螺纹种植体的体内成骨和体外变形链球菌粘附研究

In Vivo Osteogenesis and In Vitro Streptococcus mutans Adherence: Porous-Surfaced Cylindrical Implants vs Rough-Surfaced Threaded Implants

Renata Falchete do Prado Luis Gustavo Oliveira de Vasconcellos, Luana Marotta Reis de Vasconcellos, Carlos Alberto Alves Cairo, Daniel de Oliveira Leite, Alessandra dos Santos, Antônio Olavo Cardoso Jorge, Rogério de Lima Romeiro, Ivan Balducci, Yasmin Rodarte Carvalho

原载　Int J ORAL MAXILLOFAC IMPLANTS 2013.28(6): 1630-1638.（英文）

李佳润　译　　滕　伟　审

摘　要

目的：分析和比较市售的粗糙表面螺纹种植体与多孔圆柱种植体在兔模型愈合的不同时期骨沉积情况。此外，研究种植体表面形态对变形链球菌粘附的影响。**材料与方法**：采用粉末冶金技术的新方法，制备有致密核心和多孔表面的钛种植体，以增加种植体骨结合率（BIC）。15 只兔中，植入 60 个种植体。在每只兔子右、左侧胫骨各植入两个实验组和对照组种植体。实验组采用敲击就位，对照组自螺纹就位。术后 4 周、8 周和 12 周处死动物，脱钙处理，检测种植体骨接触率。此外，在 16 个种植体（8 个实验组，8 个对照组）表面培养变形链球菌，评价细菌粘附情况。分别进行方差分析和 t 检验。**结果**：两组组织学均显示种植体－骨界面紧密接触，无软组织介入。多孔圆柱型种植体 BIC（72.41%±9.47%）高于粗糙螺旋种植体（61.23%±14.12%）（P=0.013），而变形链球菌粘附情况无显著差异（P=0.351）。愈合 4 周时，两组间差距更明显（P=0.029）。两组间 BIC 在整个实验周期无显著性差异（P=0.333），但 BIC 随时间延长而提高。**结论**：在本研究条件，结果显示：新型种植体增加了 BIC，且未增加变形链球菌粘附。

译者单位　中山大学光华口腔医学院 · 附属口腔医院修复科 · 广东省口腔医学重点实验室
广东省广州市越秀区陵园西路 56 号　510055

1　引言

商业纯钛 (Ti) 和钛合金因表面氧化物具有良好生物相容性，耐腐蚀性，高强度，低密度等优点，作为植入体广泛应用于医学领域。钛是一种生物惰性材料，运用多种表面处理方法如氧化钛酸蚀、喷砂、氟化处理、等离子体喷涂 (TPS) 等，以改善其生物活性和增加表面粗糙度。先前的研究已经证明，表面改性可促进骨细胞应答，缩短愈合时间。

口腔种植体常采用的粗糙表面和螺纹设计，其具有较好的可预测性和成功率。为了促进骨整合，随着多孔钛表面制备技术日益进步，学者研制了新型种植体。由于在三维空间中有更多的表面嵌合结构，多孔表面有利于种植体固位，减少种植体脱落。由于种植体表面的多孔结构是相互连接的，增殖的骨组织可进入中央的孔道。此外，多孔结构还促进广泛的血管化，加快骨再生，获得良好的骨整合。

大多数多孔金属涂层都是由烧结钛珠、网或纤维，或者通过等离子喷涂钛颗粒方式制得的。然而，这些方式制备的钛表面在致密核心和多孔涂层之间存在空隙。作者先前的研究中制备出了一种新型多孔钛种植体。新型种植体以粉末冶金一步法制得致密的核心和多孔的表面。该方法制得的多孔层和核心间无空隙，减少了多孔涂层的脱落问题。

然而，经表面修饰的粗糙或多孔钛可因软组织密闭不良或骨组织破坏等因素，暴露于口腔环境，使口腔微生物附着，形成三维结构的细菌群落，即生物膜。

在种植失败的病因中，感染是最严重、最具破坏性的与生物材料相关的并发症。

种植体表面成分、形貌、疏水性、电荷、显微结构和硬度均会影响细菌粘附。理想种植体应该表现为成骨细胞的大量附着且细菌极少附着。细菌的粘附与细菌种类、细菌与种植体表面间是否有口腔内液体，以及种植体的理化特性质征有关。

本研究的目的是评估和比较市售的粗糙螺纹种植体与新型多孔圆柱种植体表面骨生成情况，同时分析种植体设计和表面形貌对变形链球菌粘附的影响。

2　材料与方法

2.1　实验组种植体制备

30 个圆柱形 (4×6mm) 有致密核心与多孔表面的纯钛种植体（实验组，图 1）。这些种植体通过一步粉末冶金法，用专门的不锈钢模具制得。原料中的纯钛粉 (纯度≥ 99.5%，粒径≤ 8mm) 在巴西航空航天研究所航天技术总指挥部材料部，经氢化脱氢法（HDDH）制得。纯钛粉和有机添加剂 (尿素) 混合，尿素作为空间保持剂，形成 177 μ m 到 250 μ m 的孔隙。计算钛粉与空间保持剂的重量比，烧结得到孔隙率为 40% 的致密样本。首先将钛与尿素混合物置入不锈钢模具，300 MPa 冷等静压，然后热处理 (EDG 1800 furnace)，400℃， 2 小时，去除尿素。在真空烧结炉 (10^{-4}Pa)，1200℃，1 小时，10^{-7} 托 (Astro) 中烧结。

在植入前，多孔表面钛种植体 (图 1) 在含 1%

图 1　大体比较 (左) 实验组多孔表面含完整致密核心种植体与 (右) 对照组粗糙螺旋状种植体。

(v/v)洗涤剂的蒸馏水(dH_2O)中超声清洗 30 分钟，然后用 dH_2O 冲洗 3 次。清洗后，种植体放入在可消毒的袋中（Cristofoli Biosseguranca），用高压蒸汽锅(Cristofoli Biosseguranca)121℃消毒 15 分钟。

2.2 对照组种植体

30 个(3.75×7mm)粗面螺纹钛种植体(De Bortoli-ACE Materiais Odontologi cos)作为对照组(见图 1)。

2.3 表面特征

对 10 个实验组种植体用扫描电镜（SEM）(LEO 435 VPI)进行金相分析。100 倍镜下观察孔的形态、相互连接、拓扑形貌以及多孔间界面和致密核心，观察是否存在裂痕。此外，采用图像工具 v3.0 软件(UTH SCSA)分析孔面积(μm^2)和孔隙率(%)。种植体被分成 5 个部分，每个部分采集 3 个图像，每个样本共采集 15 个图像。

用 S8PPenther(Mahr)表面光度仪测量了 10 个对照组种植体的平均表面粗糙度(Ra)。同时也用 SEM 放大 100 倍观察其表面粗糙形态。

2.4 手术过程

本研究由圣保罗多斯坎波斯牙学院伦理研究委员会批准，UNESP(021/2005)。本研究采用 15 只 4 到 6 月龄、体重在 3.5-4.0kg 之间的雄性新西兰白兔。实验动物由圣保罗多斯坎波斯牙学院动物中心提供。实验动物分别独立养于笼中，随时饲以商业饲料(Coelhil R，Socil)和水。手术前称重，以 13mg/kg 量，肌内注射 2% 的盐酸 2-(2,6-二甲基苯胺)-5.6 二氢-4-氢-1.3-噻嗪(Rompun,Bayer)、镇痛药、镇静剂和肌肉松弛剂的混合水溶液和 33mg/kg 氯胺酮(Dopalen,Agibrands do Brazil)。全麻，无菌操作。在兔双侧胫骨近端植入 4 个钛种植体。右胫骨植入两个对照组种植体，左胫骨植入两个实验组种植体。备皮、消毒后，胫骨内侧行 3 厘米皮肤直线切口，分离筋膜，缓慢地小心地用电钻(AEU707Av2，Aseptico)制备种植窝。首先，大量的盐水冲洗，用直径为 2mm 的先导钻机，转速 1200 rpm 钻孔。然后，用圆柱形钻头逐渐再增大 0.5mm 直径。植入前 盐水冲洗种植窝，去除骨屑。人工敲击植入实验组种植体，对照组种植体以螺纹旋入，固定在皮质骨上。用单尼龙 4-0 手术线分层缝合肌肉组织和皮肤(Johnson and Johnson)。术后给予 1.35 ml/kg 抗生素(Pentabiotico，Fort Dodge Saúde Animal)。每天观察实验兔子并发症或不良反应。植入后第 4 周、8 周和 12 周，肌注过量麻药处死动物，（n=5）。

2.5 组织学和形态学检测

处死动物后，锐性分离胫骨，去除种植体表面多余的骨组织和/或软组织。包含种植体的骨块立即用 10% 福尔马林固定，逐级脱水，甲基丙烯酸甲酯基树脂包埋。聚合后，用切割硬组织的金刚石刀(Labcut 1010，Extec)沿种植体长轴，切割厚约 700μm 包埋块，并将三个切片厚度减小至约 50μm。甲苯胺蓝染色，分析骨重建、种植体骨界面和在孔或螺纹内的骨整合和骨形成。光学显微镜(Axioplan 2，Carls Zeiss)下观察，未见纤维界面。

组织形态学分析仅限于种植体表面与骨组织相连接的界面。对种植体-骨接触率(BIC)进行线性分析。BIC 是指种植体骨接触面积占种植体表面的比例。新生骨量是通过盲检近远中 100 倍图像得到的。采用 Zeiss Axiophot 2 显微镜获得图像，电脑(Samsung)中采用 ImageJ v1.31 (National Institutes of Health)计算 BIC%。每个种植体的六个图像（近远中两组，每组 3 张图像）进行了 BIC 百分率分析，它是指从种植体表面所有可以成骨的面积减去 BIC 区域。

2.6 形态学统计分析

汇总统计量包含组均值(±标准差)。以动物个体作为分析单位。推断统计量为对方差进行重复测量(RM ANOVA)(种植体类型和愈合时间)。种植体类型(实验组和对照组）作为组内因素，愈合时间（4、8、12 周）作为组外因素。响应变量为组织滴定法测得的新生骨量（%）。采用 Tukey 检验对实验条件下的不同均值进行多重比较。所有试验的显著性水平定为 5%。上述所有统计分析借助 Statistix v8.0(Analytic Software)完成。

2.7 微生物检验

每组 8 个种植体进行微生物定植评估。将标准变异链球菌(ATCC 35688)菌株接种在脑心浸液(BHI)琼脂培养基上，分光光度法检测 10^6 cells/ml 的标细菌准悬浮液。检测波长 530nm，光密度为

0.620(分光光度计 B582 Micronal)。

种植体分别置于无菌 24 孔板中。向接种有 0.1ml 变异链球菌标准悬液的每孔中加入 2ml 含蔗糖培养基。密封培养皿，在 37℃含 5% 二氧化碳的密闭的容器中培养 24 小时。

取出种植体，在试管中用无菌生理盐水冲洗 1 分钟，重复三次。随后，置于装有 10ml 盐水 (NaCl 0.85%) 的离心管中，灭菌，以 50 瓦马力，超声 30 秒 (Sonopuls HD2070，Biosystems)，去除附着细菌。将得到的悬浮液稀释至 10^{-1}、10^{-2} 倍，分两组接种至含 BHI 的传代培养基。37℃，5% 二氧化碳条件下培养 48 小时后，计数菌落数在 30 到 300 间的平板数并确定上面的每毫升菌落数 (CFU/ml) (CP-600,Phoenix Industriae Comercio de Equipamentos Cientificos)。CFU/ml 数据转换为对数形式，再进行 t 检验。对于所有统计学分析，1 型误差小于或等于 0.05 的概率具有统计学差异具有显著性。检测一式两份，重复两次。

3　结果

15 只兔子无死亡，处死时种植体稳定性良好。最常见的并发症是手术创伤引发的皮下血肿，但无需切开引流，所有兔子在处死前状况良好。

3.1　表面特征

实验组种植体表面见多孔结构围绕致密核心。钛表面不同结构间未见线性裂痕 (图 2)。金相分析显示平均孔径为 294.87±10.25 μm，孔隙度约为 40%。图像表明，钛颗粒烧结良好且多孔表面与致密核心结合紧密。多孔结构表现出不同孔隙类型，微纳米级孔隙相互连通 (图 3)。观察到一些由于在钛粉烧结过程中体积收缩导致的小的、孤立的气孔，与大的孔相互连接，这有利于新骨长入和体液运输。

对照组种植体 Ra 为 3.16±0.664 μm。图 4 为粗糙表面的 SEM 图像。观察到形状和大小不规则的浅洼坑。

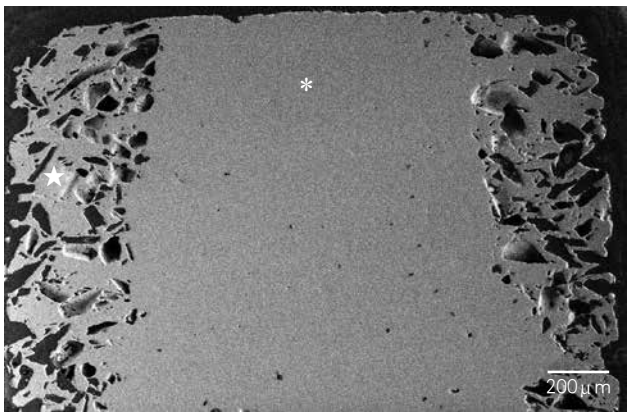

图 2　实验组 SEM 图像。* 表示致密核，★表示多孔表面

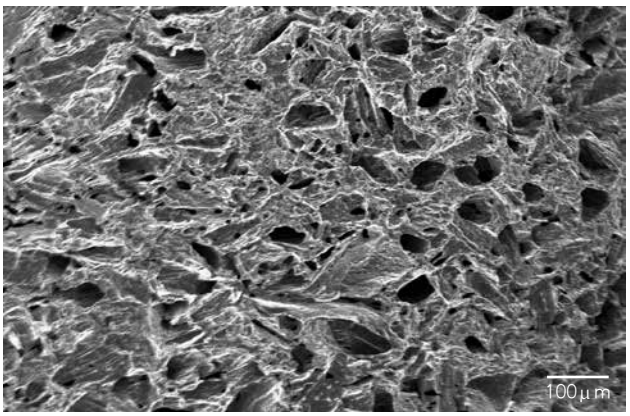

图 3　实验组多孔表面的 SEM 图像

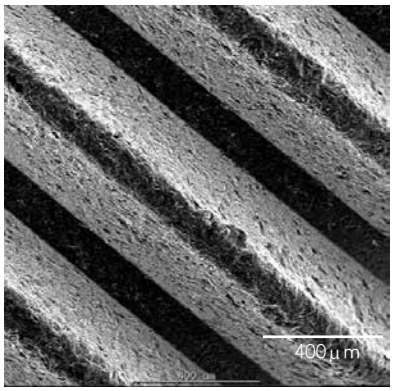

图 4　对照组粗糙表面的 SEM 图像

3.2　组织学分析

显微镜下见样品长骨的横截面，植入部位的胫骨壁为密质骨。这种密质骨含大量的哈弗系统，它是由一个中央孔道和周围的同心骨片形成的。

在胫骨中央可见高细胞度的骨髓，见炎性多核和单核细胞浸润。这些特征表明，骨再生和骨重塑属于正常情况。

无论何种类型种植体，均可见种植体周围新骨形成以及骨整合。图像显示无软组织介入。4 周和 8 周处死的兔子骨重建明显，新旧骨皮质之间可见边界（图 5）。

4 周时，新骨尚未成熟，内腔有大量骨细胞，成骨细胞排列在新形成的骨小梁周围。同时也观察到提示破骨细胞的巨细胞和由骨样物质形成的脆弱的骨小梁。

实验组观察到骨组织向孔内的增殖（图 6），其细胞含量高，可见大量骨陷窝；然而，在一些样本中，孔隙并没有完全被骨组织填满。在 8 周和 12 周时，在离致密核心最近的中心孔内可以观察到骨组织（图 7）。此外，实验组表面可见骨桥形成，这表明多孔表面刺激成骨。

对照组观察到螺纹处骨增殖，而种植体与新骨的接触面积差距显著。4 周时边界处可见颗粒状骨，8 到 12 周时骨组织基本长满间隙（图 8）。

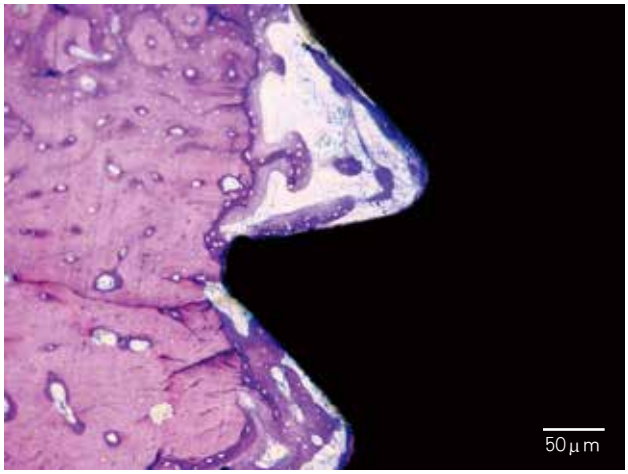

图 5　对照组 4 周时，新骨与旧骨骨皮质间边界的显微照片（甲苯胺蓝染色）。黑色区域表示种植体

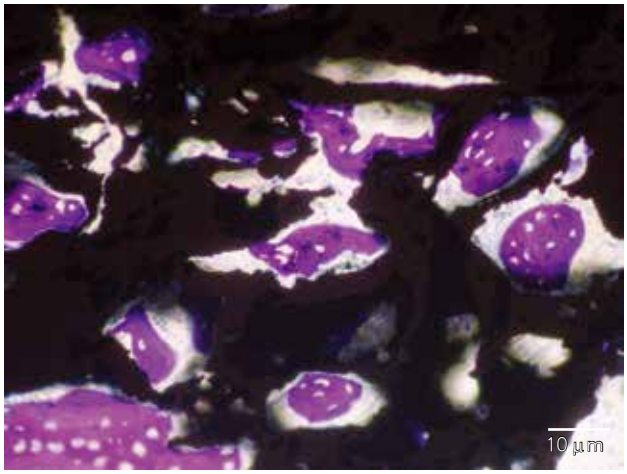

图 6　实验组 4 周时显微照片（甲苯胺蓝染色）显示骨组织未完全填充的中心孔。黑色区域表示种植体

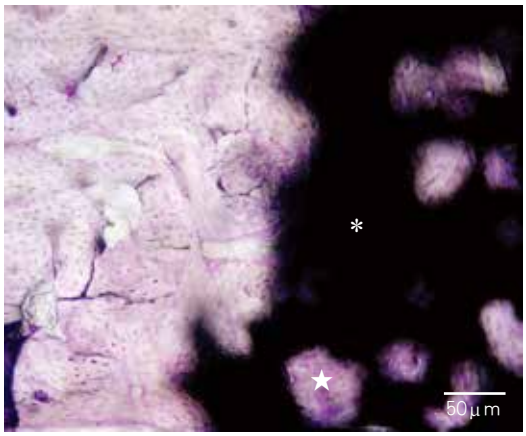

图 7　实验组 12 周时显微图像可见种植体表面中央孔内长满骨组织（甲苯胺蓝染色）。* 表示种植体，★表示长满骨组织的孔

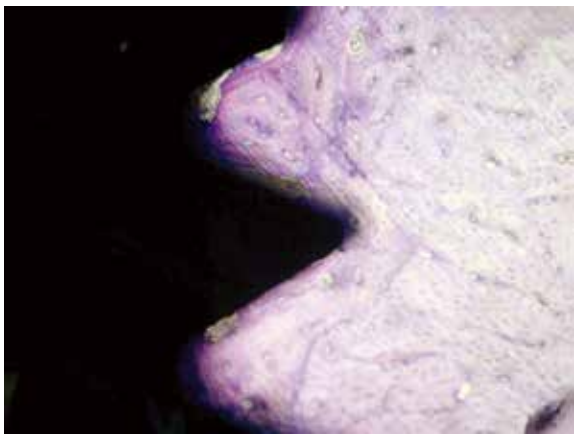

图 8　12 周时，骨组织与螺纹交界的显微照片（甲苯胺蓝染色）。黑色区域表示种植体

表 1　4,8,12 周组织系统学分析 BIC（%）结果（平均值 ± 标准差）

种植体	愈合时间（周）			
	4	8	12	All
实验组	74.36±13.92[A]	79.85±07.01[A]	63.03±13.28[AB]	72.41±09.47[A]
对照组	50.15±20.00[B]	65.81±11.96[AB]	67.72±10.42[AB]	61.23±14.12[B]

相同字母表示无统计学差异。

3.3　新生骨组织系统学分析

RM ANOVA 显示，种植体类型有显著性影响 ($F_{df(1,12)}$=8.38;P=0.013<0.05) 且交互效应显著 ($F_{df(2,12)}$=4.80;P=0.029<0.05)。组织形态学分析的结果如表 1 所示。实验组 BIC(72.41%±9.47%) 明显高于对照组 (61.23%±14.12%)。植入 8 到 12 周后两组 BIC 轻微减少。植入 4 周时，种植体类型的影响较明显。

3.4　微生物检测分析

对照组和实验组的 CFU/mL (log10) 的平均数如图 9 所示。两组均可见变形链球菌菌落，且组间无统计学差异 (P=0.351)

4　讨论

之前有研究表明，粗糙的种植体表面比光滑的表面更有利于提高骨结合。最近的一些研究已经证明了多孔表面在增强植入体表面的骨传导性能方面的优势。

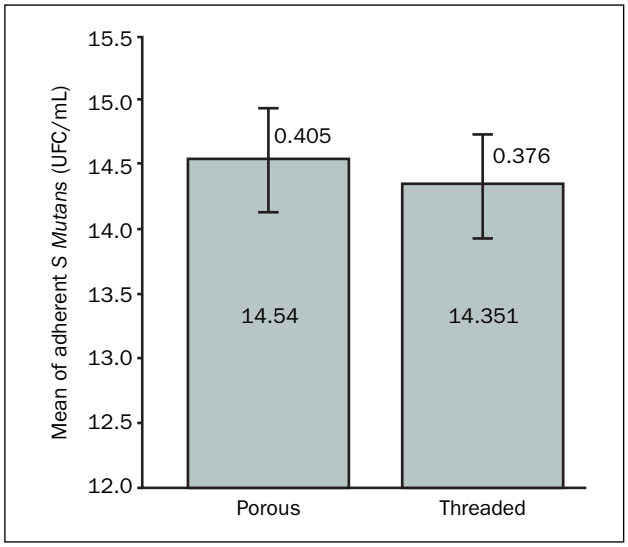

图 9　实验组与对照组 UFC/ml 平均值与标准差

本研究使用的新型种植体，有别于现今的标准模型，该新型种植体多孔表面与致密的核心相结合。多孔表面使用的特制的基体，采用一步粉末冶金技术制备。这种新型种植体与市售的种植体相比，有更大的 BIC，进而加速了成骨。组间统计学差异由此而来。处死时两组间无统计学差异，12 周时两组 BIC 都显著增加，这表明随着时间的推移，成骨增加。两种种植体表面，变形链球菌粘附情况相似的。因此，作者认为新种植体对口腔微生物无干扰。

此前也有关于多孔表面种植体的研究，但它们致密核心与多孔涂层之间存在间隙。本课题组研制的新型种植体，采用一步粉末冶金法制得多孔表面及致密核心，两者间无缝隙。

多孔表面的目的是增强种植体的稳固性。在多孔表面上，骨形成发生在孔内以及孔周，促进了骨形成。这可能是由于这种表面结构为骨组织的形成提供了一个更有利的环境。数据显示，有 40% 的孔径在 300 μm 左右。这表明多孔结构作为骨引导介质，可增加新生骨的数量，这与大多数报道一致。

多孔表面与骨组织间机械嵌合能显著抵抗界面处的拉应力和剪切应力的作用。由于表面结构增加了种植体与骨的接触面积，多孔表面种植体有效地促进骨融合。由于骨与种植体表面的紧密结合，螺纹种植体骨融合紧密。虽然骨－螺纹接触可抵抗轴向位移和摩擦力，但剪切力和拉应力作用于种植体－骨界面，导致了骨丧失。

像钛这样的金属比骨组织硬得多，所以钛种植体会承担不成比例的载荷。周围的骨组织出于压力保护机制，发生了骨吸收。多孔结构内的骨组织是原始骨与钛表面核心之间重要的过渡区域，这有助于避免骨丧失。在光滑或粗糙的表面上，没有观察到多孔结构与骨之间的机械性锁结。此外，种植体表面特征的变化会影响种植体周围边缘骨水平。与螺纹种植体相比，多孔表面的种植体因为不发生骨嵴丧失，边缘骨组织，呈现出不同形态。螺纹种植

体会导致较严重的骨嵴丧失，这可能是因为与螺纹末端接触的骨组织受较大应力。相比之下，种植体多孔表面的骨组织扩散到相互连接的孔隙内部，形成一个复杂的网络，利于应力分散，防止处过度负荷。过度负荷是导致骨吸收的一个可能因素。多孔种植体表面与骨三维嵌合，界面间力有效传递，使其周围应力分布更均匀。

先前较多研究集中于增强种植体与骨组织、软组织的结合。然而，临床上需要种植体表面抵抗致病菌生物膜以取得种植成功。材料表面改性具有重要的临床意义。种植体表面微生物定植与骨结合程度紧密相关。有趣的是，本研究中，虽然实验组表现出了更好的 BIC，但两组表面变形链球菌数量无显著差异，即细菌的数量没有受到种植体表面形态的影响。但是不同的种植体表面，菌斑形成初期表现出了选择性吸附。在口内硬组织中，放线菌和链球菌是最先定植的细菌，为其他细菌提供了适宜的环境。菌斑的形成会引起种植体周围炎。微生物的附着是感染过程中的第一步，对定植和入侵十分重要。

变形杆菌的粘附与表面自由能的改变有关。当种植体浸于唾液或血清等口腔液体时，细菌粘附与表面能量变化无关联。因此是其他机制在粘附过程中发挥作用。对于菌斑形成，表面粗糙度比表面自由能更重要。细菌在不同钛表面的最初粘附主要受表面粗糙度的影响，而非表面自由能。减少表面粗糙度抑制了最初的微生物粘附，而增加表面粗糙度会促进微生物粘附，导致种植体周围炎。粗糙度大的螺纹种植体 Ra(5.30 μ m) 表面细菌附着多，细菌定植情况与对照组相似。然而，两者的微生物定植均在可接受范围内。

即刻负荷和骨量不足在临床上较为常见，这激起了学者们对提高短期、长期稳定性和促进骨结合相关研究的兴趣。本研究用一步法粉末冶金术，制备多孔表面与致密核心相结合的钛种植体并研究其性能。本研究中新型种植体的结构是独特的，有别于骨科和牙科使用的标准材料，可以为骨量不足、骨密度不理想等问题提供解决方法。然而，该种植体仍需在临床实践中进一步完善。

5 结论

本研究结果表明，实验组种植体可促进成骨，且与对照组相比对变形链球菌粘附无影响。因此，这种新型种植体，作为多孔生物材料，发展前景可观。

6 致谢

本研究得到了巴西圣保罗研究基金会(FAPESP)2005/03709-4 支持。感谢 DeBortoli-ACE Materiais 提供螺纹种植体。并在此声明本研究与上述组织无相关的利益冲突。