译文

比较 3 种加工方法及组成不同的人工移植材料的体内研究

In Vivo Comparative Investigation of Three Synthetic Graft Materials with Varying Compositions Processed Using Different Methods

Hyun-Chang Lim, Kyeong-Taek Kim,Jung-Seok Lee, Ui-Won Jung, Seong-Ho Choi

原载　Int J Oral Maxillofac Implants. 2015, 30(6): 1280-1286.（英文）

黎艳珊　译　　滕　伟　审

摘　要

研究目的：本次研究旨在比较加工方法及组成不同的双磷酸钙（biphasic calcium phosphates，BCP）的骨引导的能力和骨愈合的模式。**材料和方法：**10 只雄性新西兰白兔，每只兔子颅顶有 4 个 8mm 环形缺损，每个缺损代表一个组别：对照组，实验组：BCP1，70%HA（羟基磷灰石），30%β－TCP（β－三磷酸钙）；BCP2，30%HA，70%β－TCP；BCP3，20%HA，80%β－TCP。兔子在第 2 周（n=5）或第 8 周（n=5）在处死后进行组织学及组织计量学分析。**结果：**在双磷酸钙（BCP）组的骨增量远大于对照组（$P < 0.05$）。第 2 周或第 8 周新骨形成量无明显差异。在第 2 周，BCP3 组的双磷酸钙的吸收作用远大于 BCP1 和 BCP2 组，然而在第 8 周，BCP2 和 BCP3 的这种差别变得不明显。BCP 组间新骨形成的模式和材料的吸收有明显差异。在 BCP1 组中，新骨在剩余颗粒中呈线性排列；在 BCP2 组中，可观察到丝状伪足状新骨形成；在 BCP3 组中，可见分散在剩余颗粒中的胶原蛋白片段及颗粒表面的裂隙状不规则新骨形成。**结论：**在本研究中，特定的 HA、β－TCP 比例对新骨形成和空间的保持无明显影响。而组间观察到的骨愈合模式的差别可归因于加工方法不同所导致的双磷酸钙（BCPs）的物理化学属性的差异。

关键词　骨再生；骨替代物；双磷酸钙

译者单位　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 号中山大学附属口腔医院　510000

1　引言

如今，微创的概念越来越被重视，而微创是指操作中实现患者的疼痛和不适感的最小化。因此，在现代医疗中，尽管自体骨有很高的成骨潜力，但已逐渐被弃用。很多人开始研究不同种的人工骨移植材料。市面上很多的移植材料都是基于磷钙陶瓷，这不仅是因为其与人类骨组织有良好的生物相容性，也因为其结构和组成上的相似而被认为与人类骨组织同源。临床前期实验及临床实验都已经证实磷钙陶瓷具有有效的骨引导能力。

双磷酸钙（BCP）是其中一个被报道的最多的钙磷陶瓷材料。它的两个组成成分，羟基磷灰石（HA）、β－磷酸三钙（β－TCP），有着截然不同的骨吸收特性。HA 具有缓慢的骨吸收特性，增强了空间维持能力，但限制了新骨形成的空间，而β－TCP 有快速骨吸收特性，提供了新骨形成所需的空间，但缺乏空间稳定性。因此，他们的联合使用能够弥补对方的短处。

在牙科领域，市场上可获得 HA、β－TCP 比例及加工方式不同的 BCP，其中应用最多的为 HA、β－TCP 比例约为 60:40 的 BCP，因该种比例的 BCP 已在很多缺损模型中表现出杰出的的骨再生能力。然而，最佳的 HA、β－TCP 比例尚无定论。不同的 HA、β－TCP 比例（如 70:30,30:70,20:80，10:90）的 BCP 都有被报道具备作为骨移植材料的潜力。这些比例的双磷酸钙已被成功应用在颅骨缺损、牙槽骨水平型骨吸收及上颌窦填充中。

具多孔结构的 BCP 有很多的优点，比如说可控的渗透性、低密度性、增大的表面积，最重要的是允许新形成的组织向孔内生长的能力。具体来说，BCP 的微观和宏观结构以及化学特性（如孔隙率、孔隙直径、表面构型、立体结构、活泼的表面特性、湿润度）被证实能够影响它的活动，如骨形成、分解以及与生长因子的结合。这些特性很大一部分由加工方式所决定，然而临床上常常忽视这一点。

如今，组成以及加工方式不同的 BCP 在临床上被广泛应用。然而它们的适应证相互重叠，这可能会导致临床医生的困惑。它们可能会影响骨愈合的模式，因此应该有各自严格的适应症。所以，在标准的动物模型中比较评价市面上的 BCP 是有意义的。本研究旨在兔子颅顶缺陷模型中比较加工方式及组成不同的 BCP 的骨引导能力以及骨愈合模式的差异。

2　材料与方法

2.1　实验材料

本研究使用了以下的 BCP（Genoss 公司），特性见表 1：

- BCP1（骨单位 1）：70%HA，30% β－TCP
- BCP2（骨单位 2）：30%HA，70% β－TCP
- BCP3（骨单位 3）：20%HA，80% β－TCP

2.2　实验动物

10 只新西兰成年白兔（2.5 ～ 3.5kg），所有动物均由延世医学中心的动物饲养和使用委员会提供（代码：2012－0030）。

2.3　手术方式

所有动物均由盐酸氯胺酮（Ketalar，韩国）及甲苯噻嗪（Rompun，韩国）混合物进行基础麻醉。术区术前备皮及聚维酮碘消毒，而后用 2% 利多卡因（Huons 公司）局部麻醉。在颅顶中沿中线切开，全层皮瓣分离，环踞钻钻出 4 个直径为 8mm 的环形缺损，期间生理盐水冲洗降温。其中 3 个环形缺损充满不同 BCP 材料，而第 4 个（对照组）不放置材料（见图 1）。皮瓣复位，可吸收线缝合。所有动物于术后第 2 周（n=5）或术后第 8 周（n=5）处死。

2.4　组织处理

取出术区，用 10% 福尔马林溶液浸泡缺损区域

表 1　本研究中使用的 BCP 特性

组别	HA／β－TCP	孔隙直径（μm）	孔隙率（%）	加工方式
BCP1	70:30	300 ～ 500	77	复制的方式加工 HA 支架，而后在外包裹 β－TCP
BCP2	30:70	250	70	牺牲模板方式
BCP3	80:20	200 ～ 400	80	直接泡沫法

BCP= 双磷酸钙；HA ＝ 羟基磷灰石；β－TCP ＝ β－ 磷酸三钙

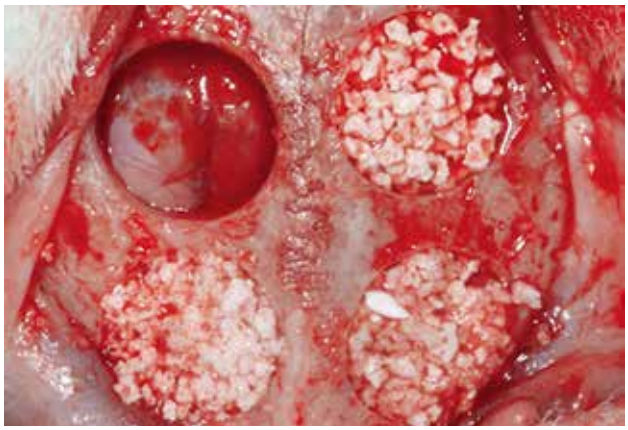


图 1　术中照相。用环踞钻钻出 4 个直径为 8 mm 缺损，而后随机放入对照组，BCP1，BCP2，BCP3 组

10d，5% 甲酸脱钙 14d，而后用石蜡固定。沿颅顶环形缺损中心每 5 μm 厚冠状切下，切片用 Masson 三色染色法染色。

2.5　组织学及组织计量学分析

组织切片用带相机（Leica DC300F，Leica Microsystems）的双筒显微镜（Leica DM LB，Leica Microsystems）观察。采用自动图片分析系统（Image–Pro Plus，Media Cybernetics）进行组织计量学分析，分析区域如下：总扩增区、新形成的矿化区、剩余材料区。

2.6　数据处理

采用 SPSS20.0 分析数据，以平均值 ± 标准差（SD 值）表示组织计量学数据，正态检验验证标准化程度。重复测量分析组织愈合期的组间差异，Bonferroni 校正法进行重复事后检验。第 2 周及第 8 周愈合情况使用独立 t 检验分析，当 $P < 0.05$ 时数据具有统计学意义。

3　结果

3.1　临床结果

所有实验动物均未发现术后并发症，取出术区时未视及炎症及感染。

3.2　组织学结果

第 2 周：对照组的缺损中可见大量扁平疏松组织，边缘可见少量新骨形成。而 BCP 组的缺损中见大量新骨形成，充满缺损。BCP 组新骨由边缘开始形成，且在许多样本中可观察到，新骨形成多聚集在某个边缘。在 3 个 BCP 组中，新骨形成的模式是截然不同的。BCP1 组颗粒表面可见线性新骨形成。BCP2 及 BCP3 组颗粒表面及其之间均可见新骨形成（图 2）。BCP2 组中可见丝状伪足状新骨向颗粒延伸，而 BCP3 组中可见雪花状胶原蛋白散在于骨块间（图 3）。BCP3 相对其余两组表现出一个更加独特的成骨模式：在颗粒表面可见大量裂隙状不规则新骨形成。

第 8 周：对照组的缺损边缘观察到形成的新骨增多，偶可见骨岛形成，但缺损仍呈凹陷状。而 BCP 组中，各区域（包括缺损边缘及中央）均可见大量新骨形成。在部分样本中，颗粒表面及其之间所形成的新骨将缺损边缘相连接起来。BCP3 组骨髓形成多于其余 BCP 组。BCP2、3 组比 BCP1 组的骨形成更趋向于向颗粒中央延伸。其中，BCP3 组中可见大量朝向颗粒中央的半球状新骨（图 4）。

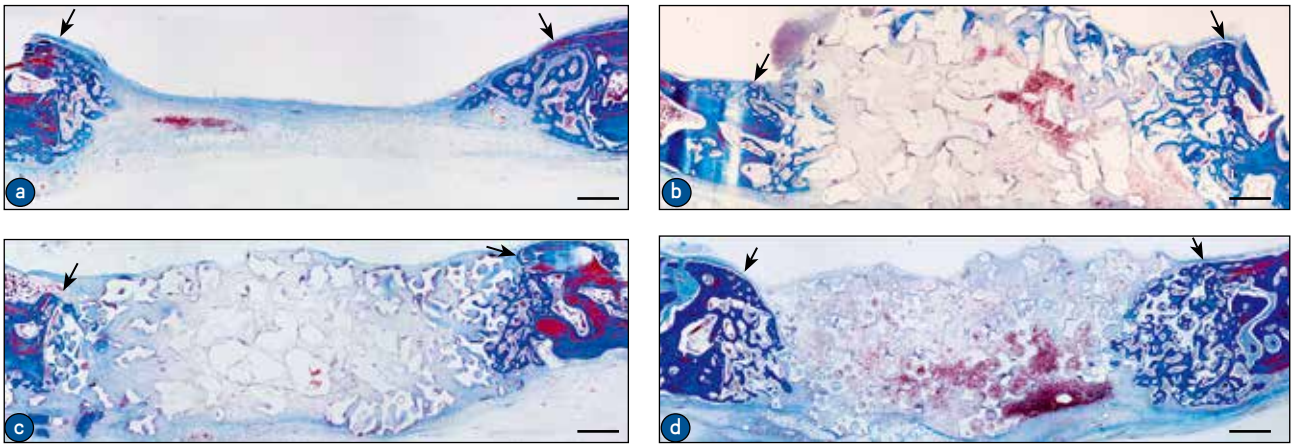


图 2　术后第 2 周组织学观察结果。a. 对照组；b.BCP1；c.BCP2；d.BCP3。黑箭头：缺损边缘（Masson 三色染色法，比例尺 =500 μm）

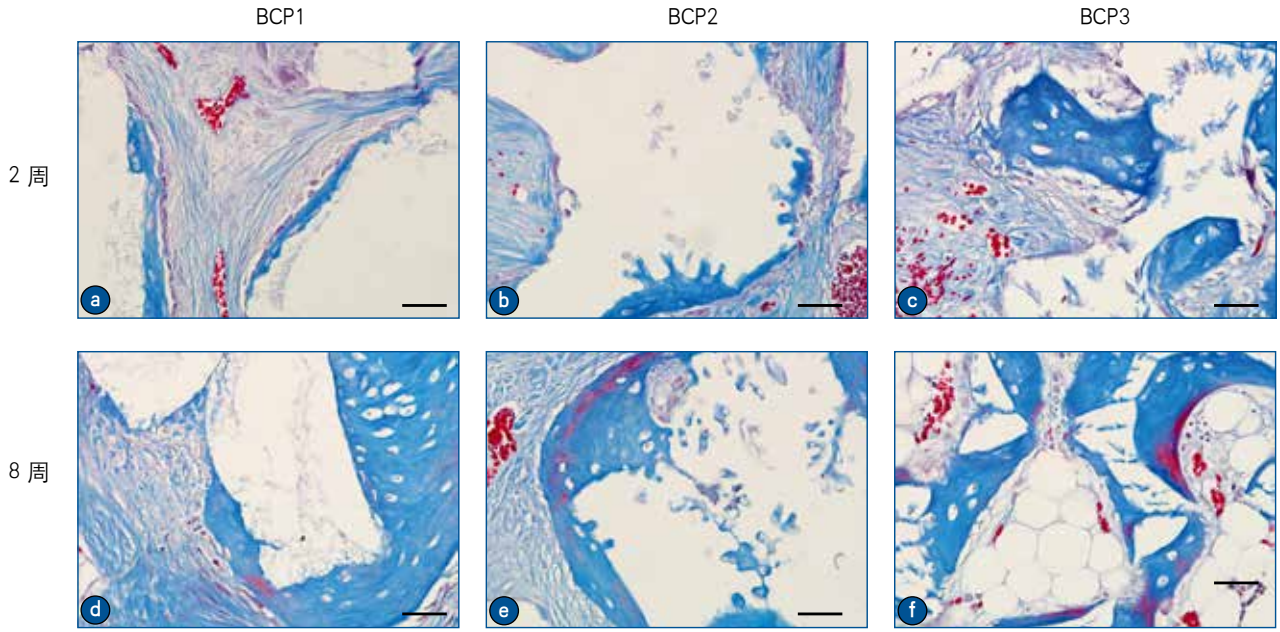


图 3　BCP 颗粒周围的高度放大视野。a. 第 2 周时 BCP1 组；b. 第 2 周时 BCP2 组；c. 第 2 周时 BCP3 组；d. 第 8 周时 BCP1 组；e. 第 8 周时 BCP2 组；f. 第 8 周时 BCP3 组（Masson 三色染色法，比例尺 =50 μm）

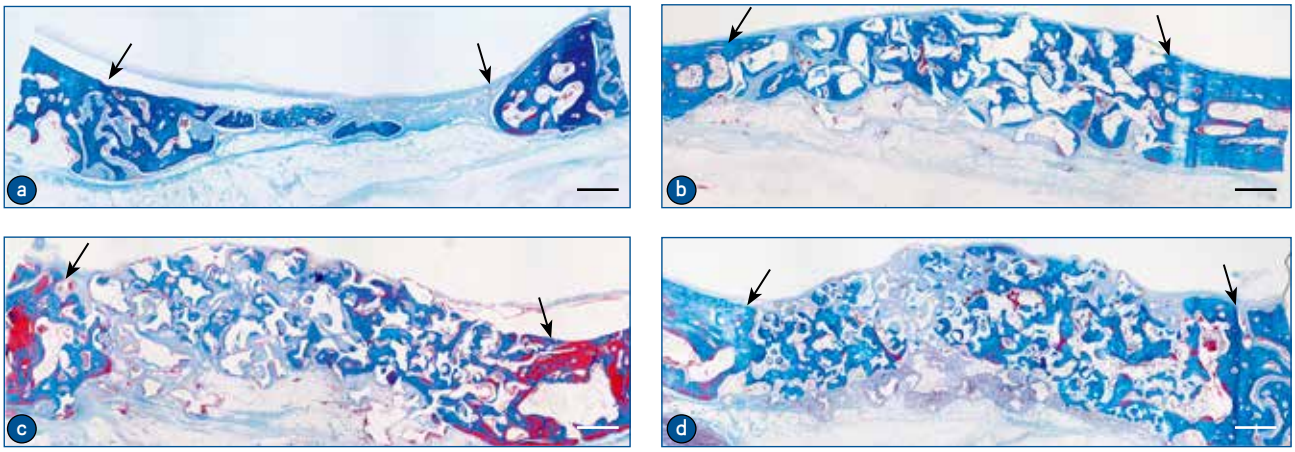


图 4　术后第 8 周组织学观察结果。a. 对照组；b.BCP1；c.BCP2；d.BCP3。黑箭头：缺损边缘（Masson 三色染 色法，比例尺 =500 μm）

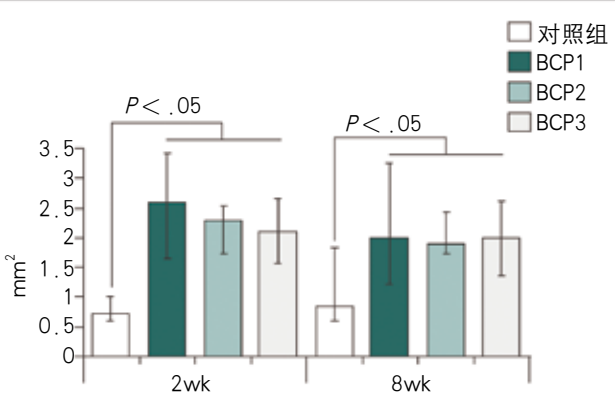
BCP2 组中可见大量细丝状新骨伸入颗粒中心，基本同第 2 周（图 3）。BCP1 组颗粒比 BCP2、3 组更大更光滑。而 BCP3 组颗粒比 BCP2 组的更小更分散。

3.3　组织计量学结果

在第 2 周和第 8 周，BCP 组的总扩增区远大于对照组，且组间无明显差异（图 5）（第 2 周：BCP1：0.22±0.06　mm²，BCP2：0.18±0.07 mm²，BCP3:0.14±0.05mm²；第 8 周：BCP1：0.35±0.16　mm²，BCP2：0.32±0.09mm²，BCP3:0.37±0.16mm²）。随时间推移，BCP2、BCP 3 组新形成的矿化区较 BCP1 组增加更加明显（图 6）。在第 2 周，BCP1 组与 BCP3 组，BCP2 组与 BCP3 组在剩余材料区差异明显。在第 8 周，BCP1 组与 BCP2 组，BCP1 与 BCP3 组在剩余材料区存在明显差异（图 7）。

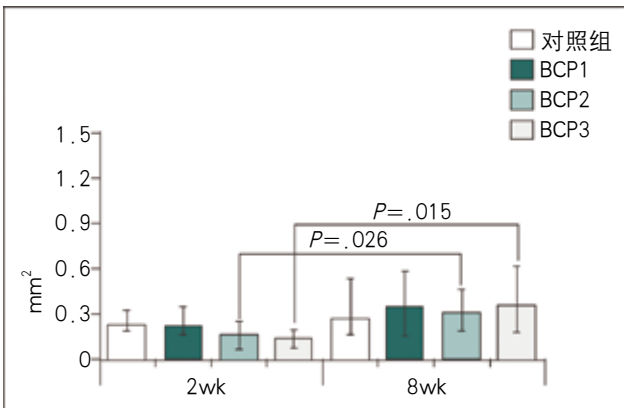
4　讨论

在口腔领域中，BCP 被认为是一种有应用前景



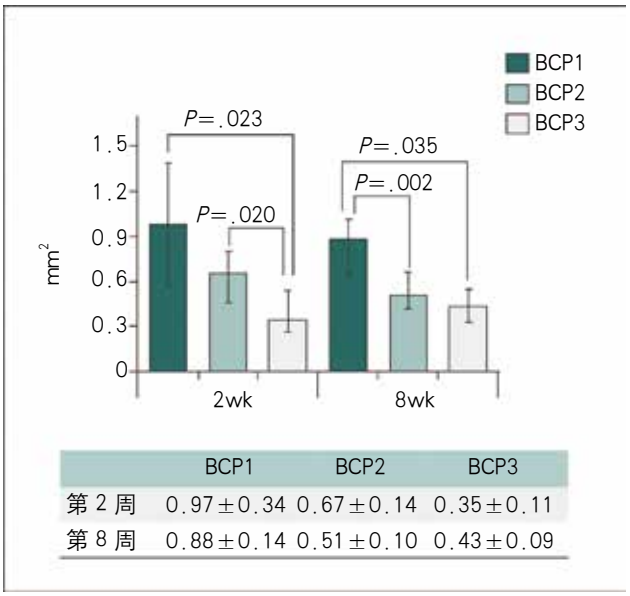
	对照组	BCP1	BCP2	BCP3
第 2 周	0.75±0.17	2.59±0.75	2.30±0.33	2.11±0.46
第 8 周	0.87±0.53	1.98±0.78	1.91±0.33	2.03±0.47

图 5　总扩增区的组织计量学结果（平均值 ± 标准差）



	对照组	BCP1	BCP2	BCP3
第 2 周	0.24±0.05	0.22±0.06	0.18±0.07	0.14±0.05
第 8 周	0.28±0.15	0.35±0.16	0.32±0.09	0.37±0.16

图 6　新形成的矿化区的组织计量学结果（平均值 ± 标准差）



	BCP1	BCP2	BCP3
第 2 周	0.97±0.34	0.67±0.14	0.35±0.11
第 8 周	0.88±0.14	0.51±0.10	0.43±0.09

图 7　剩余材料区的组织计量学结果（平均值 ± 标准差）

的人工骨材料。不同种的 BCP 在不同临床情况下被应用。因此，因 HA/β-TCP 所导致的活性差异及因加工方式不同所导致的愈合特点需进一步确认。本研究在标准动物模型中进行了 3 种不同 BCP 的比较研究。组织学及组织计量学结果证实了所有 BCP 均展示出一种类似的空间维持能力及骨形成潜能。然而，其骨形成的模式及材料的吸收模式是不同的。

大小精确的缺损对于精确评估骨替代品是十分必要的。然而，在兔颅顶上形成大小精确的缺损是很难的，因为它们不允许不同材料在某一时间点的对比，并且会增加所需的实验动物数量。Sohn 等通过建立一个合适的兔子颅顶模型观察了不同大小缺损的愈合情况，证实了 4 个直径 8mm 的缺损适用于评价不同材料的早期愈合（第 2 周或第 4 周）及晚期愈合（第 8 周）情况。基于该研究，本研究采用第 2 周及第 8 周的愈合情况分别代表早期愈合和晚期愈合情况。

BCP 中 HA 和 β-TCP 的相对比例是决定 BCP 吸收中的一个主要因素。高的 β-TCP 比例加速了 BCP 的吸收并可能会减弱新骨的稳定性。然而，在本研究中，高 β-TCP 比例的组别未表现出其对维持成骨空间的不利影响。这或许提示了少量 HA 对于维持成骨空间是足够的。在本研究中，HA 浓度为 20% 和 60% 的组别在第 8 周表现出类似的空间维持能力。因此，用于维持成骨空间的 HA 的浓度应是较低的，但该推论应通过增加缺损大小不同的组别以进一步证实。

含高 β-TCP 比例的的 BCP 有高的成骨潜能的观点已被普遍接受，因此，高 β-TCP 比例的的 BCP 在生产中被广泛应用。然而，没有确切的证据证明高 β-TCP 比例的的 BCP 新骨形成量更多。

Jensen 等报道了在迷你猪的下颌骨缺损中，β－TCP 占 80% 的 BCP 的成骨量与自体骨相似。然而，在其他研究（包括本研究）中，含高 β－TCP 比例的的 BCP 组的成骨量与含低 β－TCP 比例的相似。

在本研究中，不论 HA 与 β－TCP 比例，材料吸收主要在早期阶段进展较快，而后减缓。Yang 等人报道 20:80 和 60:40 的 HA：β－TCP 比例在第 2 周及第 8 周的剩余颗粒的情况无明显差异。据此推测，BCP 遵循早期快速吸收然后慢速吸收的模式，而这有可能是因为 β－TCP。然而，新骨形成的比例或许与材料吸收的比例不一致。与理论不同的是，早期的材料吸收没有与新骨形成所匹配，或许是因为 β－TCP 的不可预见性。

组织计量学上，在第 2 周时，BCP2 及 BCP3 组较 BCP1 组颗粒间空间可促进更多的骨形成，但在第 8 周时无明显差异。这或许是因为在早期愈合阶段，β－TCP 溶解，颗粒间空间内钙离子浓度的快速上升。这个现象或许通过三维摄像技术如微观 CT 能更好的观察。

BCP 的物理化学特性主要是由加工方式所决定，并对体内的生物学行为有重要的影响。已经证实了如宏观孔隙率、微孔隙率、孔径等的物理特性应当达到一定的标准。骨的向内生长需 BCP 达到约 60% 的孔隙率及约 100 μm 的孔径。增加微孔隙率增大了接触面积及影响了蛋白的附着。化学特性如表面特性和润湿性也十分重要，因其影响了细胞的吸附和活性。一个亲水的界面对细胞的早期吸附、增殖及细胞骨架的建立尤为重要，而一个极化的表面能增强上述行为。BCP2 组中可见伪足状的新骨形成，BCP3 组中可见雪花样胶原形成。这些表现可能提示了 BCP 特性的影响。进一步来说，BCP3 组颗粒表面可见裂隙状骨形成，而 BCP1 组中更多见线性新骨形成，也可能是 BCP 特性所致。然而，本研究中不同的 HA－β－TCP 比例可能导致了不同的孔貌进而导致不同的表面特性。因此，更多关于特定的物理化学特性的体内实验是有必要进一步完善的。

在本研究中，BCP3 组中骨髓量有所增加。Yip 等将不同种的 BCP 植入兔子颅顶直径为 6mm 的缺损中，并观察到在第 3 及第 6 个月的愈合中，HA：β－TCP 比例为 60:40 组别的骨髓量比 10:90 的要高。

在本研究中，BCP2、BCP 3 组的未矿化区比 BCP1 组大，Lambert 等推测纤维血管组织的增加平衡了来源于上颌窦的压力，但未矿化组织的作用尚不清楚。不同的缺损模型比如骨开裂模型尚待进一步研究。

组织学结果显示，新骨形成量集中在一侧的缺损边缘。本研究中的缺损在颅顶冠向切下的，这样的缺损有一侧是靠近矢状缝的。在老鼠的颅顶缺陷中，利用影像学上差异及微观 CT 来观察血管形成情况，观察到新血管形成，而后可见骨逐渐充满矢状缝。这不仅解释了本研究中新骨形成较多出现在靠近矢状缝一侧，还提示了在其他没有说明具体取材方向的研究中观察到的不同区域新骨形成量不同的原因。

本研究比较了 3 种加工方式及组成不同的 BCP。理论上来说，含有较高 β－TCP 比例的的 BCP 组新骨形成量应是最多，且其结构可能是不稳定的。然而，本研究中 3 个 BCP 组愈合期所观察到的空间维持能力和骨引导能力是相当的。但 3 个 BCP 组的骨形成及材料吸收模式有明显差异，这可能是加工方式不同而导致的物理化学性质上的差异所导致的。

5 结论

在本研究中，市面上 3 种不同的 BCP 证实具有类似的空间维持能力及成骨能力。不同的 HA－β－TCP 比例在该模型中不是一个主要的影响新骨形成的因素。然而，加工方式及组成不同所导致的 BCP 物理化学特性的不同或许会导致不同的愈合模式。

6 鸣谢

这项研究是由韩国健康保健部门 R&D 计划、健康部、福利及家庭事务机构及韩国政府所资助（A101578）。作者与本研究无利益纠纷。