一种新的备洞方法及其自体骨移植物制备的技术要点

A novel drilling procedure and subsequent bone autograft preparation: A technical note

Eduardo Anitua, Carmen Carda, Isabel Andia

原载 Int J Oral Maxillofac Implants 2007;22:138-145

吴茴 译 林野 校

摘要 **目的** 介绍一种新的种植备洞系统,外科医师可以通过应用该系统,并配合使用富含生长因子的血浆(plasma rich in growth factors, PRGF),得到自体生活的骨组织来进行骨移植。

材料和方法 分别运用传统的和新的备洞系统收集10位患者的骨组织,并应用光镜和电镜来分析。另收集43名志愿者的血液样本,制备成为PRGF,定量分析其中所含的血小板数量、生长因子浓度(胰岛素生长因子1、转移生长因子1、血小板衍化生长因子-1、血管内皮生长因子、肝细胞生长因子以及内皮生长因子)。最后有一例病例报道。

结果 显微镜结果显示,使用低转速备洞方法获得的骨碎片,所有样本中的骨结构和细胞都被保留了下来。而使用传统方法获得的样本则没有如上特性。TGF-β(55.27±16.23ng/ml), PDGF-AB(27.96±12.13ng/ml), VEGF(421.09±399.0pg/ml), EGF(455.49±210.04pg/ml), HGF(605.70±269.20pg/ml)的平均值显示与血小板计数(590,000±197,000/μl;$P<.05$)有显著相关性。

讨论和结论 新的备洞系统是以生物学标准为基础的。该方法可以减少对术区组织的损伤,并且可以获得新鲜的骨组织,联合应用富含生长因子的血浆能够在随后的骨组织移植中使用。该新方法具有能够促进骨组织愈合的可能性,但还需要在临床实验中进一步论证。

一个成功的种植治疗方法的产生通常是在外科领域中引进某些新概念的结果。众所周知,种植治疗的成功取决于若干生物和机械因素。当外科技术注意到每一个细节时,则手术的侵犯范围就仅限于骨再生的术区了。

目前使用的种植技术以1,000到1,500rpm的转速备洞。在这种情况下,备洞时对种植区域周围组织产生的机械性损伤和热损伤可能对种植体窝洞的初始状态造成破坏。

而且,骨细胞基质中的内源性因素可能也会遭到破坏,而这些因素在骨组织再生和骨结合产生过程中至关重要。由此自体富血小板血凝块作为延伸的步骤,在口腔颌面外科及其它医药领域中被广泛应用。作者的实验室发明了一种提取富生长因子血浆(PRGF)的

译者 北京大学口腔医学院
北京海淀区中关村南大街22号 100081

系统,并且有关益处已在某些领域中有过文献报道,如口腔种植学科、关节和正颌外科等。使用 PRGF 可以加速拔牙后及种植体周围的骨组织愈合。另一个好处就是它可以将骨移植物的颗粒粘接在一起。

本文的目的是要介绍一种新的备洞技术,该技术可以使种植体周围的宿主骨保持最佳的生物学状态。另外,该过程中收集的骨通过光镜和电镜证实为生活骨。这点非常重要,因为在临床上自体骨可作为骨组织缺损的充填物。通过该方法收集骨比其他方法更简便,并且在骨缺损修复中可以提供粘接力和信号蛋白。

材料和方法

步骤

本文中使用的备洞工具及初始的备洞方法均来自于西班牙的生物技术研究所(正在申请专利中)。备洞步骤必须与备洞区域的特性相适应,因此皮质骨层我们使用非常锋利的钻以 800rpm 的速度备洞。在该过程中,需要使用血清冲洗。在接下来的步骤中,将制备出种植体植入的整个洞形,并且尽可能的保留宿主组织的生物学特性。为了达到此目的,我们使用了各种形状和尺寸的钻头(如图 1)。该过程中不用冲洗,并且使用低转速(20 到 80rpm)。最后,钻头上的骨被直接收集起来。麻花钻的刃上有一个存留设计(即有深的沟槽),这样它就可以保存并随后取得切割下的骨组织。备洞压力应有所控制;当沉积的骨呈现抗性时,应弃去。

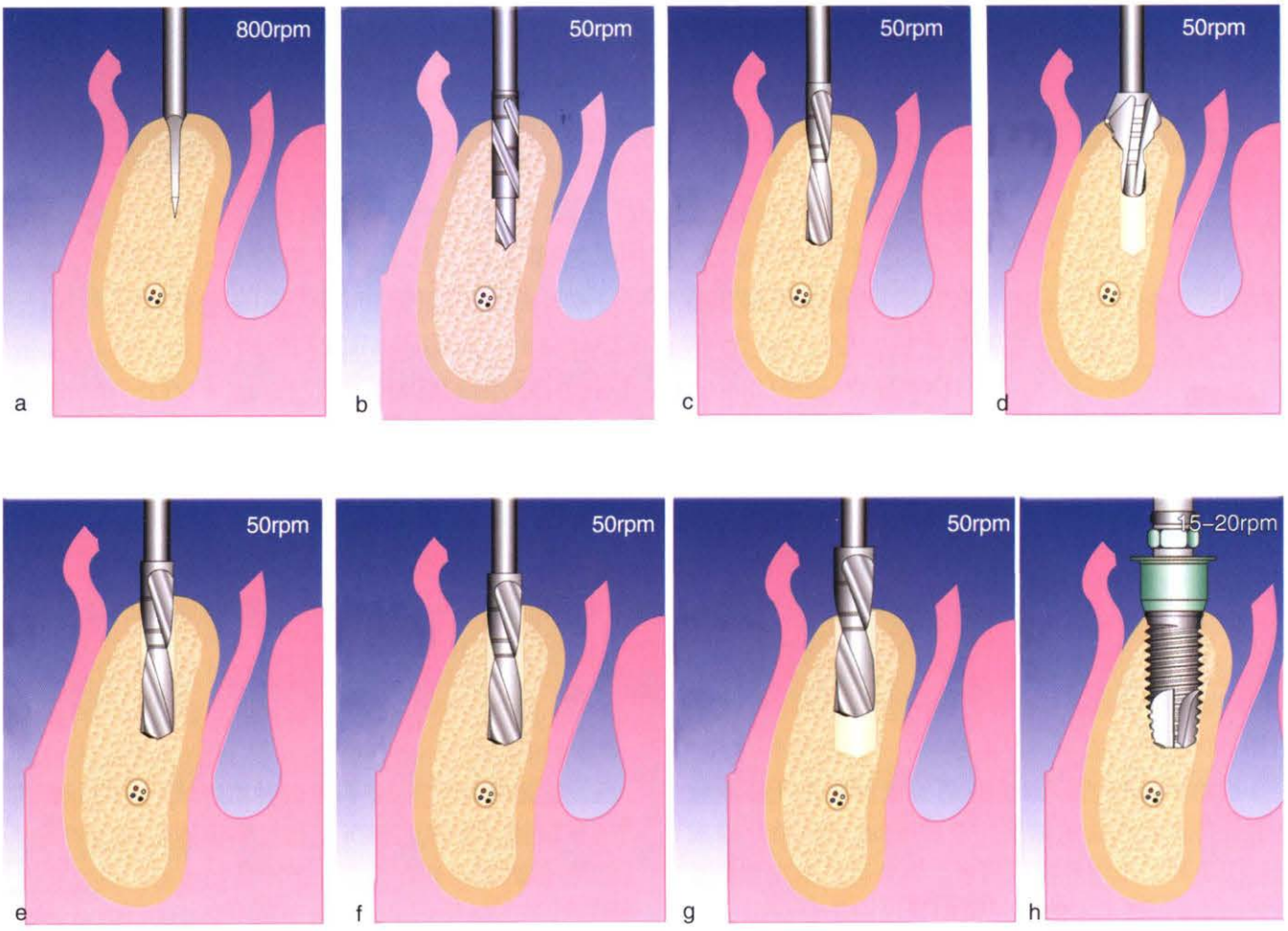

图 1 一种新的备洞方法可以保留种植体周围的组织。(a)初始钻的钻头非常锋利。它将以 800rpm 的钻速在有冲洗的条件下备洞。(b 到 d)先锋钻(b),平头钻(d),以及不同直径的(2.5 到 3.8)麻花钻(c,e 到 g)。除了初始钻以外,所有的钻都在无冲洗条件下以 50rpm 的速度备洞。(h)用 15 到 20rpm 的转速无水条件下送入种植体。

自体骨移植物的制备。当每次钻头从备洞窝中移开时，另一个工具将麻花钻上的组织取下。这些组织被放于用玻璃或类似的无菌容器中。由此组织就被直接收集了下来，而未用到吸引或过滤装置或其它的外加工具。通过将骨颗粒与 PRGF 混合即获得复合的移植物。提取 PRGF 时，通过静脉穿刺获得末梢血液（至少 10ml），直接加入 3.8%(wt/vol)的柠檬酸钠(体积比 1：9)。然后将其在室温下以 460g 的力离心 8 分钟，这样位于红细胞上层的血清将被收集并放于玻璃盘中，该血清中并不包含血小板层。将氯化钙加入剩余血液中，并向正在形成的血凝块中加入骨颗粒（如图 2a 和 2b）。混合物用于拔牙后的牙槽窝或种植体周围骨缺损处。

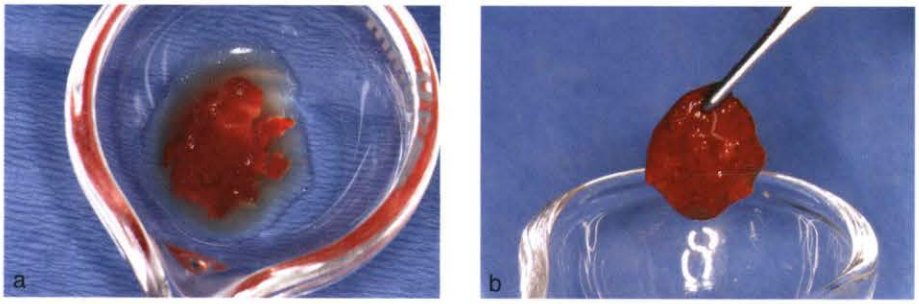

图 2a 和 2b　低速备洞时获得的骨的碎颗粒制备成自体骨移植物。

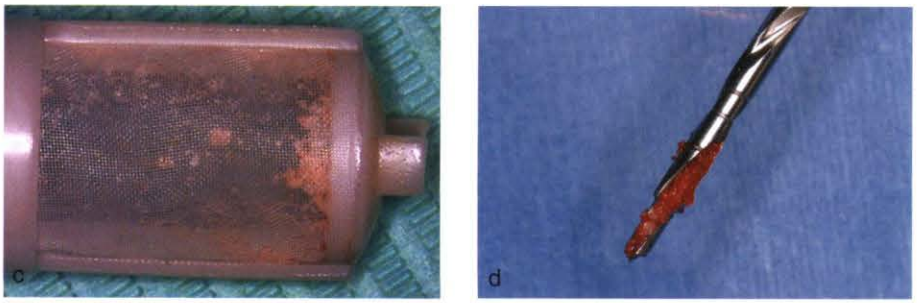

图 2c 和 2d　使用 2 种方法获得的骨碎片：(c)传统备洞方法获得的；(d)低速备洞方法下获得的。

为了获得纤维蛋白膜，将上层的血清转移到玻璃碗中。加入氯化钙，然后在 37℃的条件下保存 20 到 25 分钟；凝块即收缩形成碗状的纤维蛋白膜。

备洞温度

使用猪的下颌骨来提供皮质骨。使用两种先锋钻(1.8/2.5mm)和 2.5mm 直径的麻花钻，并使用传统的口腔机动手柄（W&H，Burmoos，澳大利亚）。备洞深度达 10mm 时，测量上述钻头尖端的温度。首先，使用盐水条件下使用非常锋利的钻针以 800rpm 速度备洞。然后，使用麻花钻以 50rpm 的速度扩展洞形。使用数字测温仪（Carlo Gavazzi PAN 133 Oregon Scientific，Tualatin，OR)来记录每个钻针尖端的温度。共备洞 10 处，并由此算得每根钻针的平均温度。

评价收集到的骨

本实验有十位患者参加，均有知情同意书。分别在每个病人口腔内的相对的区域使用高速和低速的备洞步骤。在左侧区域，使用传统的备洞方法，转速 1200rpm 并且盐水冲洗。用带有筛子的吸引器械收集所有的骨颗粒(图 2c)。另一个吸引器用来控干血液和唾液。收集获得的组织分成两组分别用来做光镜分析和超微结构的分析。右侧口腔区域则使用低速备洞步骤。骨颗粒使用上述特殊设计的钻头来收集(图 2d)，同样也分成两组。

利用双盲法来检测样本。收集到的骨颗粒浸泡在 10%的福尔马林中，并用硝石酸来脱钙。石蜡包埋后，切片并使用 HE 染色及用于传统显微镜检的三色 Masson's 染色。

用于超微结构观察的骨样本取下后立即在 4℃下用 2.5%戊二醛(Fluka，Buchs，瑞士)浸泡 4 小时，然后用

EDTA 脱钙。该样本随后与 1%四氧化锇混合 2 小时，然后用一系列更强的丙酮溶液冲洗并脱水。用 Epon812 树脂(TAAB, Berkshire, 英国)包埋组织块。甲苯胺蓝染色后使用连有数码相机的显微镜观察评价标本；被选择的区域则由电子显微镜来观察分析。使用金刚钻刀和 Reichert 超薄切片机(Danaher/Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)来切出超薄切片，并用醋酸铀铣和柠檬酸铅进行反衬。染色的片断用 JEM-1010 透射电镜(JEOL, Tokyo,日本)观察。

血小板计数及 PRGF 中生长因子的水平

共有 43 名志愿者参加，年龄在 20 到 72 岁之间(28 位女性，15 位男性；平均年龄 42±16 岁)，每位志愿者都给予知情同意书。之后，每位志愿者抽取 10ml 血液。按上述方法提取 PRGF。分别对刚抽得的血液和凝固前的 PRGF 进行白细胞和血小板计数 (ABX Diagnostics Micros 60, Montpellier, 法国)。PRGF 上清液中的血小板衍生生长因子 AB(PDGF-AB)，转移生长因子-β1 (TGF-β1)，胰岛素样生长因子-1(IGF-1)，血管内皮生长因子(VEGF)，肝细胞生长因子(HGF)，表皮生长因子(EGF)等都用 ELISA(R&D, Minneapolis, MN)的方法计数。

病例研究

本实验中选取一例病例并加以图示来阐述该种技术的成功。

统计分析

统计的数值用平均值±标准差来表示。皮而森相关性用来检验血小板数量与分泌的 PDGF, TGF-β1, VEGF, HGF, EGF 之间的关系。可信区间 $P<0.5$ (Statgraphics Plus, Statpoint, Herndon, VA)。

结果

钻针温度

50rpm 转速无盐水条件下备洞，钻头并不产生过热现象；先锋钻和麻花钻的温度分别为 28.1±1.9℃(n=10)和 27.5±0.9℃(n=10)。

收集到的骨组织的评价

通过传统方法收集到的骨组织光镜下的分析结果如图 3a 和 3b。尽管能够看到保存了部分的小梁结构，但是骨细胞陷窝是空的，并且没有发现生活细胞。相反，通过低速备洞方法获得的组织颗粒保存了骨结构，包括良好的小梁结构，骨细胞、成骨细胞、和内衬细胞都可以见到(图 3c 到 3f)。另外，这些组织片断的超微结构分析显示保留下来的内衬和骨细胞(图 3h)可以协助组织再生过程。

由于患者不同及口内取骨区域不同，可观察到皮质骨与松质骨的不同比例。

血小板计数与 PRGF 中生长因子的水平

全血的血小板计数范围为 153,000 到 359,000 个/μl，所有测得的值均在正常范围内。富含血小板的血浆其血小板计数增加，从原来的 212,000(标准差 53)增加到 590,000(标准差 197)个/μl。白细胞数低于计算仪可探测到的最低范围。EGV，VEGF 和 HGF 的平均值分别为 455.49±210.04pg/ml, 421.09±399pg/ml 以及 605.70±269.20pg/ml。IGF-1，PDGF-AB, TGF-β1 的平均值明显高；它们分别达到了 88.62±38.36ng/ml, 27.96±12.13ng/ml 和 55.27±16.23ng/ml。另外，TGF-β1 (r=0.8028), PDGF-AB (r=0.7174), EGF (r=0.5748), VEGF(r=0.3654)和 HGF(r=0.4009)与血小板计数有显著相关性($P<0.5$)。PDGF 与 TGF-β1、VEGF 有显著正相关($P<0.05$)。

临床应用

病例报道

一位 46 岁男性患者，上颌左侧中切牙纵裂，要求治疗。该患牙被拔除，并植入直径 4.5mm 长 13mm 的种植体(BTI 种植体系统)。种植体的 3 个螺纹暴露。随后，整个区域使用通过低速备洞方法获得的自体骨与 PRGF 混合后的混合物覆盖。之后又使用 PRGF 制备过程中提取的纤维蛋白膜覆盖(图 4a 到 4c)。4 个月后，使用 Osstell 仪器(骨结合诊断仪，Goteborg, 瑞士)测量种植的稳定性，测得值为 72。最后完成永久修复(图 4d 到 4f)。

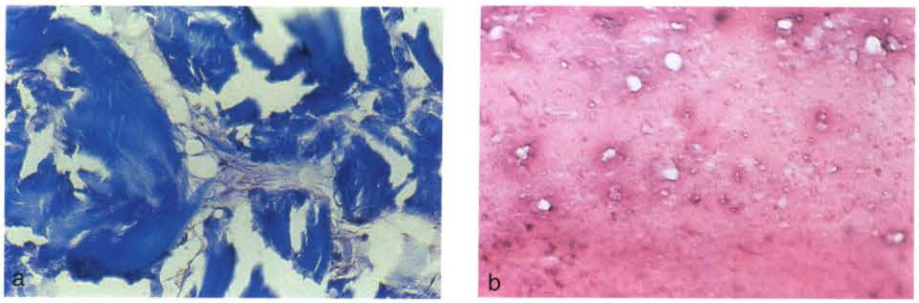

图 3a 和 3b 高速备洞后收集的骨颗粒:(a)小梁骨(Mason trichrome; 初始放大率 ×10);(b)密质骨 (H&E; 初始放大率 ×10)。

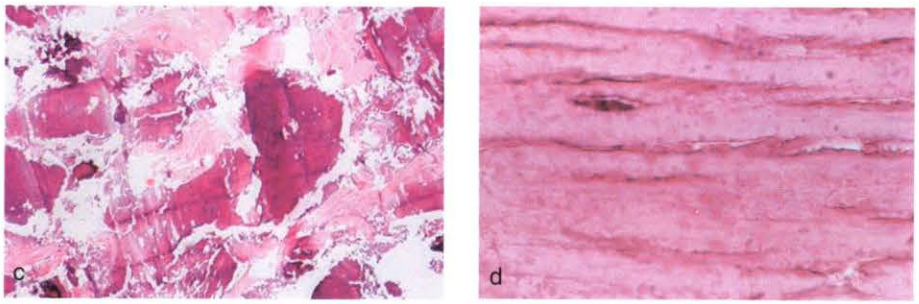

图 3c 和 3d (c)光镜下,低速备洞所获得的松质骨和密质骨的图像 (HE 染色;初始放大率×10)。(d) 一骨细胞周围被矿化的基质包绕(HE 染色;初始放大率×60)。

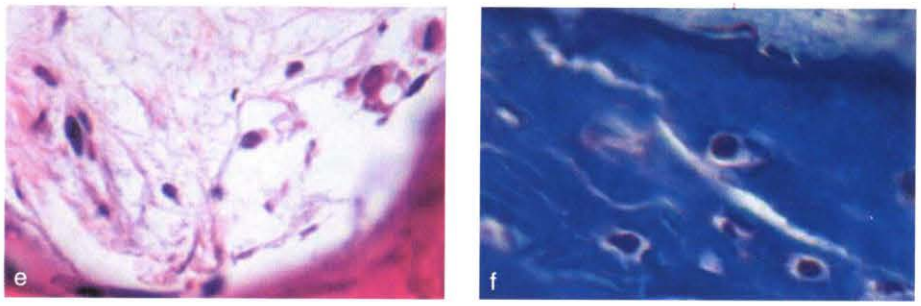

图 3e 和 3f (e)低速备洞下收集到的人类骨组织光镜下图像, 显示表面的细胞(箭头所指)可能是衬细胞和骨原细胞(HE 染色;初始放大率×60)。(f) 骨基质中的骨细胞(Mason trichrome; 初始放大率×60)。

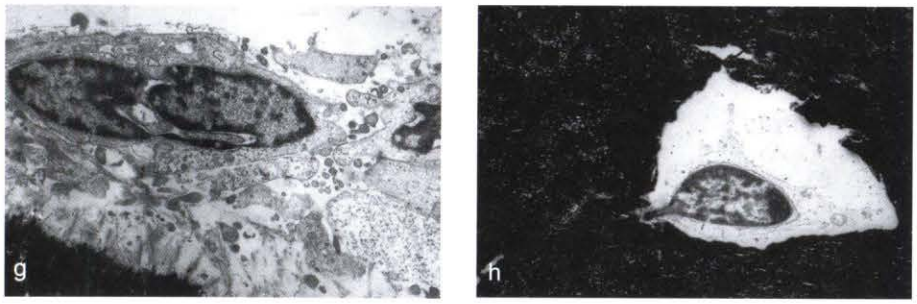

图 3g 和 3h 低速备洞下获得的骨颗粒的超微结构。电镜图像显示(g)人类骨细胞保存良好,无论是细胞表面(衬细胞及骨原细胞)和(h)骨陷窝中发现的骨细胞(初始放大率×5,000)。

图 3 传统方法及低速备洞方法所获得的人的骨颗粒的光镜及超微结构的照片。

讨论

本文中提出的备洞的方法可以作为传统备洞方法之外的另一种选择。它提供了一种在外科备洞时获得自体骨的方法,减少了需要从第二术区获取骨组织的可能性。一旦皮质骨层被非常锋利的钻制备后,往下的骨组织将变得疏松并且更富含细胞。因此,使用本文所介绍的方法,低速无盐水冲洗的条件是可行的。事实上, 低速备洞可以使由此获得的组织的质量更好,就像光镜和超微结构分析结果显示的那样 (图 3),并且能使牙槽嵴顶的骨组织处于更好的生物学状态。

传统的备洞方式中避免产生热损伤的唯一方法是将盐水打到钻头上以防止钻头与周围组织过热。现在已有学者在研究产热过程中钻速的作用以改进盐水输送系统。但是,盐水也会冲走信号蛋白和其他的可溶

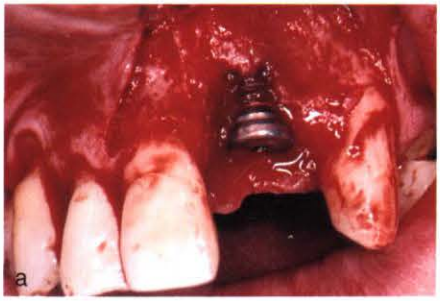
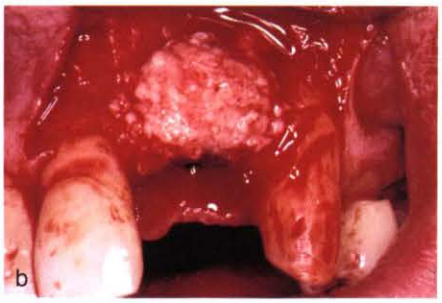

图 4a 到 4c (a) 骨折的并发症,即种植体的 3 个螺纹被暴露。骨再生区域做了如下处理;(b)骨缺损区域填满了混合 PRGF 的自体骨颗粒,(c)整个区域由 PRGF 提取过程中获得的胶原膜覆盖。

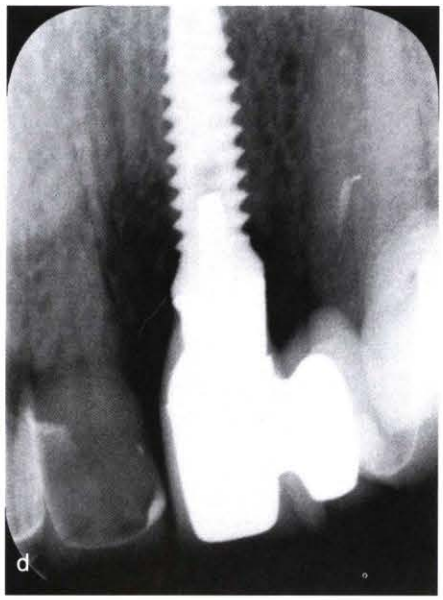

图 4d 到 4f (d)4 个月后种植体周围骨再生区域的根尖片影像。(e)软组织再生以及(f)最后非常满意的美学修复效果。

性物质,而这些物质在骨再生过程中有着重要的作用。大量冲洗会冲走和分解在骨细胞外基质中的具有骨引导作用的信号蛋白,如骨形成蛋白,生长因子,以及因钻针的使用而合成的物质。这些信号蛋白特异的生理学功能就是向周围细胞传递信息,因此使它们可以对微环境的变化产生反应。某些这样的蛋白与细胞外基质绑定,而当钻针与基质接触时,这些联结就会被破坏。而且这些信号蛋白是低分子量可溶的,盐水冲洗作用下很容易将其溶解并冲走,从而使组织损失掉原来用于自我修复的天然资源。

尽管备洞以后宿主组织的生物学特性不能由任何方法直接测得,实验取得的颗粒经分析显示它们仍然含有生活骨;也许本实验的证据可以外推至整个牙槽嵴。而且,低速备洞可以改进获得组织的质量,所获得的颗粒也更大。因为在完成相同备洞量时,高速备洞比低速备洞完成了更多的旋转圈数,所以高速备洞把组织切割的更碎。

几位学者通过几种不同的商业取骨器获得骨颗粒并比较它们中所含骨成分的不同。取骨器设计的不同,同样也会影响收集到的组织的形态和性质。在收集过程中会因取骨器中存留少量口水而使微生物出现。但是,当低速备洞时,在钻头中存留的组织非常易于收集并且少有口水污染。

本实验中局部使用骨移植颗粒时还配合使用 PRGF。PRGF 被激活后,就与骨移植物混合,随后形成的富血

小板基质将骨颗粒聚拢，使其更易于被使用。被激活后的血小板分泌出大量的蛋白质，这将会对愈合过程产生影响，例如肝细胞和成骨细胞的趋化性和有丝分裂作用、血管化、骨基质的形成和胶原的合成。一旦PRGF被激活，富血小板纤维蛋白基质就会释放大量的生长因子和蛋白，而这些生长因子和蛋白在骨组织愈合和移植物重建过程中有很重要的作用，包括TGF-β1、PDGF、IGF、骨形成蛋白、血小板反应素、骨钙素和骨粘连蛋白。

而且，体内体外实验均证实一些传递因子可以促进新生血管形成。尽管形成血管似乎主要与VEGF和HGF有关，其它生长因子，如TGF-β1等，是与它们的调节有关的。如果想要达到良好的骨组织修复重建，移植物内长入血管是非常重要的。曾经有几位学者描述过PRP作为骨移植物增强剂与自体骨、冻干骨和骨替代品联合应用时的作用；关于PRP的益处有争议的方面是其适合的情况以及不同的提取方法。关于生长因子之间的相互作用及它们在PRP中活性的进一步的知识需要被了解以确定血小板含量和/或不同因子之间最合适的比率。由于变量的数量和它们之间潜在的关系，很难定出一个单一的血小板数目的标准。而且，一些额外的因素，如血凝块激活因子的种类、纤维膜内血小板的分布、所含的白细胞以及纤维膜放入的时间等都可能会对其生物学性质产生重大的影响。因此，每种PRP的性质及其应用都应该被准确的描述。PRGF含有将近600×10³个/ml的血小板，并由额外加入的氯化钙激活。激活作用模拟生理性凝结，并且可以释放更大量的生长因子，而这些生长因子可能对组织的修复和伤口愈合起着重要的作用。而且，它还能消除免疫反应，与应用外源性凝血酶的方法比较，可减小传染疾病的风险。最终，白细胞的出现有着重要的意义，因为它们会对异质性物质产生作用，从而产生额外的细胞因子和白细胞介素。PRGF并不含有嗜中性粒细胞或其它白细胞；因此它可以减轻免疫反应，使其成为更安全更有效的产物。

嗜中性粒细胞的缺失是尤其重要的，因为它将表达基质降解酶，如基质金属蛋白酶-8(MMP-8)和MMP-9，并且释放反应性氧类，可能会损害周围的细胞。

由自体骨和PRGF混合而成的骨移植的使用将会对骨移植区的骨再生产生很大的好处。但是，骨再生的关键因素还有待明确以指导制备出更好的骨移植物。