

· 论著 · 基础研究 ·

亲水表面改性的种植体不同时期时的骨结合情况和组织学观察

王凌霄¹ 单兆臣¹ 高振华¹ 宿玉成²¹首都医科大学附属北京口腔医院 100050; ²中国医学科学院北京协和医院口腔种植中心 北京瑞城口腔种植医学研究院 100032

通讯作者: 单兆臣, Email: shanzhch629@163.com, 电话: 010-57099265

【摘要】 目的 观察亲水表面改性处理口腔种植体的骨结合效果。**方法** 4 只比格犬, 随机分为 2 周、4 周、8 周和 12 周组, 于每组犬拔牙 2 个月后的下颌骨中植入 4 颗亲水表面改性处理的口腔种植体, 按照相应时点取材, 测量种植体稳定系数 (Implant stability factor, ISQ)、临界旋出扭矩 (Critical spin out torque, CST)、骨结合率, 并观察不同时期时骨结合的状态和组织学特点。**结果** 种植体植入后 4 周与 2 周相比, ISQ、CST、骨结合率均显著升高; 8 周与 4 周相比, CST、骨结合率均显著升高; 12 周与 8 周相比, 骨结合率显著升高。**结论** 亲水表面改性处理能够促进种植体骨结合。

【关键词】 亲水表面改性; 骨结合; 比格犬**基金项目:** 国家重点研发计划资助 (2016YFC1102604)**Osseointegration and histological observation of chemically modified implants in different phases**Wang Lingxiao¹, Shan Zhaochen¹, Gao Zhenhua¹, Su Yucheng²¹ Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China;² Dental Implant Center, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Citident Implant Training College, BITC, Beijing 100032, China

Corresponding author: Zhaochen Shan, Email: shanzhch629@163.com, Tel: 0086-10-57099265

【Abstract】 Objective To observe the osseointegration effect of hydrophilic surface modified dental implants. **Methods** four beagle dogs were randomly divided into 2week, 4week, 8week and 12 week groups. Four hydrophilic surface modified dental implants were implanted into the mandible of 2 months after tooth extraction in each group. **Results** the ISQ, critical rotation torque and osseointegration rate were significantly increased at 4 weeks compared with 2 weeks; the critical rotation torque and osseointegration rate were significantly increased at 8 weeks compared with 4 weeks; the osseointegration rate was significantly increased at 12 weeks compared with 8 weeks. **Conclusion** Hydrophilic surface modified surface treatment promotes osseointegration of implants.

【Key words】 hydrophilic surface modification; osseointegration; Beagle dog**Fund Program:** National Key R&D Program of China (2016YFC1102604)

随着口腔种植技术的进步与发展, 种植牙逐渐成为缺牙患者首选的治疗方式^[1]。尽管大部分患者在接受口腔种植治疗后, 都能恢复牙齿的咀嚼

和美观等功能, 但是口腔种植失败仍时有发生。广大学者们一直在探索影响口腔种植失败的原因, 寻找提高口腔种植成功率的方法, 并对种植体的



王凌霄

博士生, 研究方向: 口腔颌面外科学和口腔种植研究



单兆臣

博士、主任医师、教授、博士研究生导师, 研究方向: 牙槽外科和口腔种植相关研究

DOI: 10.12337/zgkqzzxx.2021.02.006

收稿日期 2020.11.02 本文编辑 石淑芹, 李翠英

引用本文: 王凌霄, 单兆臣, 高振华, 等. 亲水表面改性的种植体不同时期时的骨结合情况和组织学观察 [J]. 中国口腔种植学杂志, 2021, 26(1): 25-30. DOI: 10.12337/zgkqzzxx.2021.02.006.

表面改性进行了大量深入的基础研究^[2]。有学者发现在钛表面进行喷砂酸蚀 (sandblasted, large-grit, acid-etched, SLA) 后, 可以形成高度接触面积的酸蚀表面, 这种结构形貌可以促进成骨细胞的快速黏附与成骨分化, 促进种植体骨结合^[3]。士卓曼公司在 2006 年研制并开发了活性亲水 SLA 表面种植体, 该种植体采用亲水表面改性处理方法, 在制作时应用与 SLA 相同的初期加工工艺, 从而获得便于骨细胞附着的最佳表面形貌, 随后在氮气环境中制造并且立即用生理盐水进行保存, 以保持亲水改性后极高的表面活性, 避免了与空气接触后的活性丧失, 该表面可快速附着血液与蛋白, 从而加快种植体周围的骨结合^[4]。

目前, 国内常用的口腔种植系统包括 Straumann、Nobel、Zimmer、Ankylos、Bicon 等。近些年来, 由于人们消费能力的增长、种植医生数量的增加以及学术推广力度的提高, 我国种植牙市场正处于快速发展期。然而, 由我国自主研发的种植体品牌在市场中数量较少, 常见如 BLB、CDIC、Wego 等, 而且其结构设计、骨结合稳定性存在一定缺陷, 如有的种植系统缺乏内部抗旋转结构、羟基磷灰石涂层附着稳定性差等, 这些缺点导致其在激烈的市场竞争中仍然处于劣势地位。因此, 国产种植体的研发仍存在重要挑战, 本研究旨在观察亲水表面改性处理下种植体的骨结合效果, 为研究种植体表面改性, 开发国产种植体系统, 促进种植体骨结合提供借鉴。

材料和方法

本项研究所有动物实验方案遵循 ARRIVE 指南和美国国立卫生研究院动物实验指南, 并通过首都医科大学实验动物及实验动物福利委员会伦理审核批准 (批准号: AEEI-2017-104)。

1. 种植体准备: 本研究使用士卓曼 Roxolid 种植体 3.3 mm × 10 mm (瑞士) 16 颗, 所有种植体表面处理使用 SLActive 活性亲水技术。

2. 动物实验: 4 只雌性比格犬 (12 月龄, 体重 10 ± 1.25 kg, 北京芳缘元动物养殖场), 4 只比格犬随机分成 4 组, 分别为 2 周组、4 周组、8 周组、12 周组, 每组 1 只, 于手术前 2 个月在 50 mg/kg 舒泰 50 (法国) 肌注下麻醉, 分别微创拔除比格犬双侧下颌第一至第四前磨牙, 拔牙前

拍摄 CBCT 确定牙根方向、数目和位置, 术后 1~3 d 肌注青霉素, 3 d 半流质饮食, 以后正常饮食, 继续单笼饲养。拔牙后 2 个月在 50 mg/kg 舒泰 50 (法国) 肌注下麻醉, 于比格犬双侧下颌骨分别植入两颗种植体, 种植体植入位点确保距离天然牙大于 1.5 mm, 颊舌侧宽度大于 1 mm, 同侧两种植体间距大于 3 mm, 术后护理同上。

3. 种植体稳定性 (ISQ) 及临界旋出扭矩 (CST) 实验: 在种植体植入后 2 周、4 周、8 周、12 周, 分别肌注浓缩戊巴比妥钠安乐死比格犬, 取出下颌骨并用 10% 福尔马林固定 48 h, 随后使用动度测量仪 (OSStell ISQ, 瑞典哥德堡) 测量种植体的 ISQ, 方法是在种植体上放置动度测量杆, 测量仪探测头确保距离测量杆为 3~5 mm, 于种植体近中、远中、舌侧、颊侧、殆面五个位点, 每个位点重复测量三次取平均值。然后使用扭矩测试仪 (中国计量科学研究所) 测定种植体的 CST, 测量时使用扭矩测试仪固定器固定种植体携带体, 种植体携带体的另一端和种植体连接, 逆时针旋转直至种植体旋出, 读取 CST 值, 所有操作均由同一实验者独立完成。

4. 组织学切片染色及观察:

(1) 取材与处理: 4 只比格犬在种植体植入后 2 周、4 周、8 周和 12 周分别进行安乐死, 取出双侧下颌骨, 用 10% 中性福尔马林固定 48 h 后用锯片机将组织分切成 2~4 mm 厚的骨块, 再固定 48 h。

(2) 树脂浸透与光聚合包埋: 经 50%~100% 乙醇上行梯度脱水, 缓慢乙醇树脂梯度浸透后, 于包埋模具内放入光固化包埋机内, 行二次光聚合完成包埋。包埋时注意种植体长轴的方向应在包埋块的对角线上。包埋后的组织块固定到下载玻片后, 在磨片机上磨到露出组织面后, 将载玻片粘在组织上, 加粘着剂再次光固化 10 min, 然后用组织锯片机将平行载片的一面分离切割成为带载玻片的组织块。

(3) 研磨与抛光: 固定带组织块的载玻片后, 在磨片机上根据测量厚度调定零点, 用 800~4000# 的砂纸进行目标厚度磨片。清洁载片后, 置 3% 的双氧水中摇动浸泡 5 min、自来水和蒸馏水充分冲洗; 然后行组织化学染色 (方法见下面); 清洗、干燥后, 光固化树脂封片、读片。

(4) 染色及结果判定方法如下:

①亚甲基蓝碱性品红染色：切片脱塑后，亚甲基蓝染液60℃水浴染色15 min，吸干、60℃蒸馏水漂洗、自然干燥，加碱性品红染液染色5 min。染色结果判断：成骨细胞为深蓝色，类骨质呈蓝绿色，骨组织呈淡粉色。

②甲苯胺蓝染色：甲苯胺蓝染液配制：染液A(蒸馏水800 ml、四硼酸钠8.0 g、甲苯胺蓝8.0 g，搅拌混合15 min) B液(蒸馏水200 ml和 Pyronin G 2.0 g，搅拌混合15 min) 混合搅拌15 min，过滤后染色用。染色结果判断：新骨为深蓝色，旧骨为浅蓝色。

③ Coldner's 三色法：染色方法：铁苏木素液15 min，充分漂洗18 min；丽春红酸性品红液15 min，1%醋酸液漂洗2次；磷钨酸桔黄染色液8 min，1%醋酸液漂洗2次；亮绿液15 min，1%醋酸液和70%乙醇漂洗3次，脱水封片。染色结果判断：成骨细胞橘黄色，类骨质紫红色，新骨亮蓝色，成熟骨为绿色^[5]。

5. 统计学处理：种植体的 ISQ、CST 和骨结合率比较采用 *t* 检验，预先检验数据是否符合正态分布和方差齐性，自身不同时间点比较采用单因素方差分析，预先用 Levene 检验方差齐性，并采用 LSD 组间两两多重比较，方差不齐的数据采用 Welch 稳健方差分析，并采用 Dunnett's T3 进行组间两两多重比较。在20倍光镜下，利用 Image-Pro Plus 6.0 软件对两组种植体-骨的界面组织形态进行测量分析，测量种植体骨接触的长度和种植体骨内的总长度，测量三次取平均值。根据以下公式：种植体-骨结合率(BIC%)=[种植体骨接触的长度(mm)]/[种植体骨内的总长度(mm)]×100%，计算种植体在不同植入时间点后的骨结合率情况。

结 果

1. 比格犬拔牙前 CBCT：可以观察到比格犬下颌骨共有4颗前磨牙，其中第一前磨牙为单根，第二、三、四前磨牙为双根(图1)。



图1 比格犬拔牙前 CBCT 双下颌第一至第四前磨牙用红色虚线标出

2. 不同时点 ISQ 和 CST 对比：经过对比观

察可见，种植体4周后 ISQ 均可达70%以上，经

过时间轴的纵向对比可见，2周和4周组相比 ISQ 有明显差异，4周后基本无统计学差异(图2)。

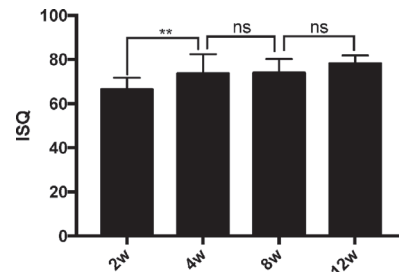


图2 各时间点种植体 ISQ ns 表示无统计学差异，**表示 $P < 0.01$

对种植体标本进行 CST 检测，可见种植体 CST 4周前均在40~60 N，而8周后均达到100 N 左右，差异具有统计学意义，但8周与12周相比无统计学差异(图3)。

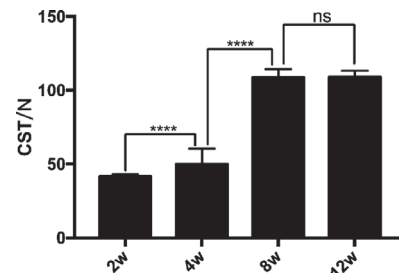


图3 各时间点种植体骨结合 CST ns 表示无统计学差异，****表示 $P < 0.001$

3. 骨结合效果的组织学观察：在2周、4周、8周、12周可以观察到不同时间点种植体周围骨组织的状态(图4)。(1)亚甲基蓝-碱性品红染色：2周时，可见种植体螺纹间距内出现大量骨吸收陷窝，破骨细胞紧贴骨吸收陷窝边缘(图4A)；4周时，种植体骨改建活动持续活跃，并出现深粉红色的新骨；8周后种植体螺纹间新骨和成熟骨界限开始模糊；12周可见大量成熟骨、矿化骨以及含哈弗系统的骨组织(图4B~E)。(2)甲苯胺蓝染色：可以清晰的观察到新旧骨的界限，新骨呈深蓝色，旧骨呈浅蓝色。2周时可见种植体周围原有骨组织出现大量吸收陷窝，和亚甲基蓝-碱性品红染色的表现类似；4周后，在种植体表面出现大量新生骨，新生骨面积占居大部分螺纹间距区；8周后，新旧骨之间的界限逐渐模糊，新骨逐渐成熟；12周后，种植体的新骨基本上都变为成熟骨，并可见有大量哈弗系统的骨组织(图4F~J)。(3) Goldner's 三色染色：在新骨矿化

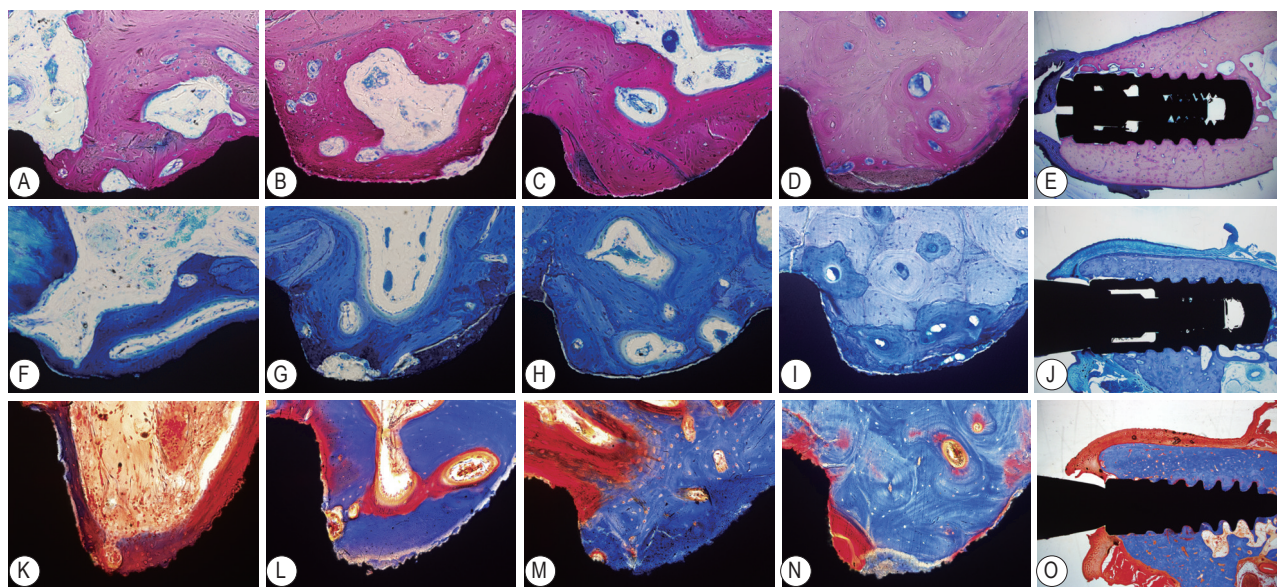


图4 各时间点种植体组织学染色结果 A~E为亚甲基蓝碱性品红染色, 其中A~E: 分别为2周、4周、8周、12周(20倍)及12周(1.25倍)组织学切片; F~J为甲苯胺蓝染色, 其中F~J: 分别为2周、4周、8周、12周(20倍)及12周(1.25倍)组织学切片; K~O为Goldner's三色染色, 其中K~O: 分别为2周、4周、8周、12周(20倍)及12周(1.25倍)组织学切片

的各个阶段, Coldner's三色法对种植体周围成骨细胞、类骨质、矿化骨均有清晰的显色。在2周时, 可见种植体周围的新骨表面聚集大量成骨细胞, 并由破骨细胞产生大量骨吸收陷窝; 4周后, 仍可以见到部分成骨细胞, 同时也可见大量类骨质和更多的新骨; 8周后新骨和成熟骨的界限逐渐模糊; 12周种植体中均发现了矿化骨和更多的成熟骨(图4K~O)。种植体-骨结合率2周到12周逐渐升高, 且各组之间均有统计学差异(图5)。

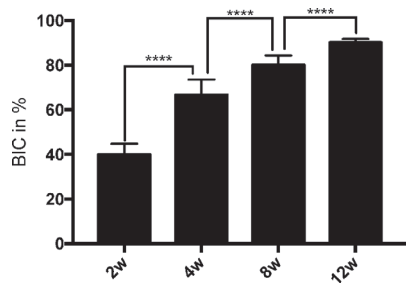


图5 各时间点种植体骨结合率 ****表示 $P < 0.001$

讨 论

目前, 口腔种植领域的学者们正在探索口腔种植骨结合失败的影响因素, 积极寻找能够提高骨结合成功率的方法, 种植体表面改性一直是本领域研究的热点。活性亲水表面改性是一种化

学改性表面处理方式, 这种表面改性的关键是在SLA的基础上, 在氮气环境下对种植体进行封闭式切削, 车床加工后储存在生理盐水环境中, 直到种植体植入前取出, 它的原理在于所有传统钛金属表面因为存在氧化膜所以均具有疏水性, 因此会排斥液体, 而活性亲水表面因为和空气隔绝, 不会形成氧化膜, 能够一直保持亲水的状态, 并能够快速吸附纤维蛋白原和血液, 使成骨细胞、巨噬细胞以及骨改建相关的重要蛋白和因子快速聚集, 从而加快种植体骨结合的进程。目前, 学者们对亲水表面改性这种化学表面改性做了一些探索, 如电化学改性等, 研究表明电化学改性后的纳米级形貌可以调节成骨细胞的增殖、黏附和分化, 使钛表面骨改建活动更加活跃^[6], 相比传统喷砂酸蚀而言, 能够在电化学环境下, 解离纯钛表面致密的氧化层, 形成规则几何形态的纳米级形貌, 张贤俊等在钛螺钉表面通过电化学改性法, 制备了含硅二氧化钛的纳米管层, 能够提高种植体骨结合率^[7]。

在本研究中, 利用比格犬动物模型, 观察活性亲水表面种植体的骨结合效果, 在第4周和第8周发现种植体的ISQ、CST和骨结合率均有了显著的升高。因此, 尽管在临床上, 通常认为在种植体植入后至少8周是理想的最终负荷时机, 但本研究显示亲水表面能够缩短种植体骨结合时间,

并且为种植体植入后8周可以负荷提供一定的理论依据。另外,植入后第8周骨结合率和CST都达到较高水平,说明8周后亲水表面改性种植体的骨结合已经基本完成。另外,ISQ测量结果显示4周和8周差异并不显著,可能的原因是比格犬的下颌骨与人类下颌骨相比,骨皮质更厚,种植体的硬度及弹性模量与比格犬下颌骨更加接近,因此,在犬下颌骨种植体中测量的ISQ值比人类颌骨中种植体的测量值会偏高^[8]。ISQ是反映种植体骨结合坚固度和稳定性的重要指标,由于其无创性和便捷性,在临床中被广泛使用,但其缺点是在检测骨结合不同时期或者不同系统种植体时,难以确定统一的标准^[8]。另外,在本研究中,可见种植体植入后CST 4周时大于2周,8周后大于4周,但12周与8周并无明显统计学差异,而且植入后8周的CST达到100N以上,比4周有了很大的提升,可见种植体植入后前8周的骨改建活动是非常活跃的,而且植入后8周已经基本达到比较稳定的状态,这与ISQ所反映的骨结合情况不完全相同,结合组织学表现,我们推断8周可能是本种植体能够有效负荷的时机,用CST评价种植体的骨结合效果具有高度特异性。Wentasek等研究显示CST在判断种植体骨结合程度方面具有高度特异性,而ISQ值预测骨结合的特异性略低^[9],这与本研究的结果相似。

亲水表面改性后种植体的骨结合过程与传统SLA表面处理的骨结合过程是一致的,均是先进行活跃的骨改建活动,破骨细胞形成骨吸收陷窝,随后新骨形成并出现哈弗系统等成熟骨的特定状态,但亲水表面改性相比传统SLA改性,骨结合的效率更高,表明其在早期愈合阶段骨结合能力强,这也让其适应证更加广泛,能够挑战即刻负荷、GBR、严重骨质疏松、糖尿病等高风险病例^[10-11]。研究表明,全身健康对颌骨骨代谢具有重要影响,并可能影响种植体骨结合^[13]。在颌骨异常微环境下,降低骨结合失败的风险具有重要的研究价值。骨质疏松将导致颌骨骨量和质量的降低,使得骨对种植体的支持和固位能力减弱,骨质疏松患者骨皮质薄、骨小梁稀疏,种植体植入骨内后需要更大的面积来提供成骨细胞的吸附和聚集^[14]。研究表明Ⅱ型糖尿病患者颌骨来源的骨髓间充质干细胞,成骨分化能力差,成骨相关因子如RUNX2、ALP表达量等低于非糖尿病患

者^[15]。另外,学者在研究中发现Ⅱ型糖尿病大鼠种植体骨结合率较正常大鼠低,但是Ⅱ型糖尿病影响种植体骨结合的机制尚不明确。29家临床试验中心的研究数据表明,亲水表面改性能够促进局部血管生成,增加纤维蛋白接触面积和数量,缩短骨结合时间,这也是该种表面处理的种植体能够挑战高难度风险病例的重要原因之一,因此,我们推断在骨质疏松和糖尿病患者的种植治疗中,亲水表面种植体可能对骨结合更加有利^[16]。

目前,我国正成为全球增长最快的种植牙市场之一,但国产种植体的研发仍然任重道远,为了进一步提高国产种植体的骨结合效果,在未来的研究中,我们仍需要进行更深入的探索,亲水种植体系统为国产种植体表面处理的优化提供了重要的参考。

利益冲突 本文作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Yu XL, Chan Y, Zhuang L, et al. Intra-oral single-site comparisons of periodontal and peri-implant microbiota in health and disease[J]. Clin Oral Implants Res, 2019,30(8):760-776. DOI: 10.1111/clr.13459.
- [2] Yoon WJ, Kim SG, Oh JS, et al. Comparative study on the osseointegration of implants in dog mandibles according to the implant surface treatment[J]. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg, 2016,42(6):345-351. DOI: 10.5125/jkaoms.2016.42.6.345.
- [3] Xiao J, Zhou H, Zhao L, et al. The effect of hierarchical micro/nanosurface titanium implant on osseointegration in ovariectomized sheep[J]. Osteoporos Int, 2011,22(6):1907-1913. DOI: 10.1007/s00198-010-1413-0.
- [4] Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, et al. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces[J]. J Biomed Mater Res A, 2006,76(2):323-334. DOI: 10.1002/jbm.a.30518.
- [6] 蔡彦坤, 祁星颖. 种植材料表面纳米级形貌对细胞成骨效应的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2019,35(6):891-894. DOI: 10.3969/j.issn.1001-3733.2019.06.028.
- [7] 张贤俊, 赵锡江. 钛螺钉表面含硅二氧化钛纳米管层的体内成骨性能[J]. 中国组织工程研究, 2021,25(16):2461-2465.
- [9] Wentasek S, Scheller H, Schmidtman I, et al. Sensitivity and Specificity of Stability Criteria for Immediately Loaded Splinted Maxillary Implants[J]. Clin Implant Dent Relat Res, 2015,17 Suppl 2:e542-549. DOI: 10.1111/cid.12283.
- [10] Buser D, Broggini N, Wieland M, et al. Enhanced bone

- apposition to a chemically modified SLA titanium surface[J]. J Dent Res, 2004,83(7):529-533. DOI: 10.1177/154405910408300704.
- [11] Schwarz F, Ferrari D, Herten M, et al. Effects of surface hydrophilicity and microtopography on early stages of soft and hard tissue integration at non-submerged titanium implants: an immunohistochemical study in dogs[J]. J Periodontol, 2007,78(11):2171-2184. DOI: 10.1902/jop.2007.070157.
- [12] 赵宁宁, 田思睿, 张翀, 等. 54 颗种植体早期失败原因分析及影响因素研究[J]. 中国实用口腔科杂志, 2019,12(07):403-408.
- [13] Von Wowern N, Gotfredsen K. Implant-supported overdentures, a prevention of bone loss in edentulous mandibles? A 5-year follow-up study[J]. Clin Oral Implants Res, 2001,12(1):19-25. DOI: 10.1034/j.1600-0501.2001.012001019.x.
- [14] Tsutsumi S, Li YZ, Shi HY, et al. Histological evaluation and surface componential analysis of modified micro-arc oxidation-treated titanium implants[J]. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials., 2008,86(1):162-169.
- [15] 刘长营, 马攀, 耿威, 等. 2 型糖尿病患者牙槽骨骨髓间充质干细胞生物学特性研究[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2019,17(3):135-141. DOI: 10.19749/j.cn.cjgd.1672-2973.2019.03.002.
- [16] Schlegel K A, Prechtel C, Mst T, et al. Osseointegration of SLActive implants in diabetic pigs[J]. Clinical Oral Implants Research, 2013, 24(2): 128-134. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2011.02380.x.



· 名词释义 ·

种植体 - 组织支持式修复体 zhòng zhí tǐ zǔ zhī zhī chí shì xiū fù tǐ
implant-tissue-supported prosthesis

由种植体和修复体下方的软组织联合支持的覆盖义齿, 包括可摘局部和全口义齿。

种植体表面 zhòng zhí tǐ biǎo miàn
implant surface

是指种植体的外表面, 包括宏观表面和微观表面。宏观表面通常是指是否存在螺纹和螺纹设计, 微观表面包括光滑、粗糙、微粗糙、疏水或亲水表面等。

种植体表面处理 zhòng zhí tǐ biǎo miàn chǔ lǐ
surface treatment of implant

对种植体表面进行结构或化学修饰, 以改善其性能。