

胶原基纳米骨修复兔下颌骨缺损的实验研究

张丽军 王影 吴燕丽 齐小良 张洁 韩志峰 朱菲 姚丽 胡雪兰 崔福斋

【摘要】 目的 研究胶原基纳米骨(nHAC)修复下颌骨缺损的效果,以期为临床提供一种理想的骨替代材料。**方法** 在 32 只成年兔双侧下颌骨形成 0.8 mm × 0.6 mm 全层骨膜骨质缺损,每一缺损作为一个实验单位。术后 4、5、6、8、10、11、12 周取材,行大体标本、X 线片、组织学和扫描电镜观察。**结果** nHAC 与 CPC 相比同期成骨量大。8 周时 nHAC 成骨情况尚不如 Bio-Oss。而 12 周时已接近 Bio-Oss 成骨水平。空白缺损则未能修复。**结论** nHAC 生物相容性好,效果较优于 CPC,远期与 Bio-Oss 相似,是一种较为理想的骨替代材料。

【关键词】 胶原基纳米骨;多孔矿化骨;自固化磷酸钙;颌骨缺损;兔

Experimental research of mineralized collagen based composite in repairing mandibular defects in rabbits

ZHANG Lijun, WANG Ying, WU Yangli, et al. Department of Stomatology, Hepingli Hospital, Beijing 100013, China

【Abstract】 Objective To study the effects of mineralized collagen based composite (nHAC) in repairing mandibular defects in rabbits, in order to provide an ideal bone replacement material for clinic. **Methods** 8 mm × 6 mm bilateral mandibular periosteum bone defects were made surgically in 32 Japan adult rabbits. The defects were randomly repaired with nHAC. Bio-Oss and CPC at 4、5、6、8、10、11、12 weeks after surgery, blank control group was stayed. Specimens obtained were evaluated with general observation, X-ray, histological microscopic and semanalysis. **Results** New bone formed and calcified earlier in nHAC and the bone area was greater in the same period than that in CPC. The new bone area in nHAC was still smaller than of Bio-Oss at 8 weeks, while at 12 weeks they had no significant differences. The blank defects were not repaired even in the end. **Conclusion** nHAC had sound biocompatibility. It was better than CPC and can be compared with Bio-Oss 12 weeks after operation. So it can be an ideal alternative for bone replacement.

【Key word】 Collagen based composite (nHAC); Deproteinized bovine bone mineral (Bio-Oss); Calcium phosphate cement (CPC); Mandibular defects; Rabbit

胶原基纳米骨材料是近年来提纯技术大力发展下的产物,已日渐成为生物人工骨材料研究的热点^[1]。胶原基纳米多孔矿化骨是与天然骨近似的矿化胶原基材料,其作为骨组织工程框架材料具有明显的优势。本实验应用胶原基纳米多孔矿化骨(nHAC)与多孔矿化骨(Bio-Oss)和自固化磷酸钙人工骨(CPC)比较,进行动物实验研究,观察两种多孔矿化骨和自固化磷酸钙人工骨修复下颌骨缺损的效果。以期为临床提供一种较理想的价格适中,并在国内能广泛应用的骨组织替代材料。

材料和方法

1. 材料与动物分组

实验材料:选用清华大学材料科学与工程系最新研制、北京益而康生物工程开发中心生产的胶原基纳米骨复合材料(nHAC);多孔矿化骨(Bio-Oss)(Osteohealth Co. 瑞士)购置于美国欧司海司公司;自固化磷酸钙人工骨(CPC),购置于上海瑞帮生物材料有限公司。

实验动物:日本大耳白兔 32 只,雌雄不拘,体重 2.5 ~ 4.0kg,购置于北京市科宇养殖中心。在中日友好临床医学研究所动物室同一环境下分笼饲养。

动物分组:32 只动物随机分成术后 4、5、6、8、10、11、12 周组。4、5、11 周组各处死 2 只,6、8、10、12 周组各处死 5 只;4 只空白对照,在 6、8、10、12 周处

基金项目:首都医学发展科研基金资助项目(首都 TS199811)

作者单位:100013 北京市和平里医院口腔科(张丽军、吴燕丽、齐小良、张洁、韩志峰、朱菲、姚丽、胡雪兰);河北医科大学基础医学病理教研室(王影);清华大学材料科学与工程系(崔福斋)

死取材(2 只麻醉意外死亡剔除)。标本进行大体、X 线、组织学和扫描电镜观察。

2. 方法

手术方法:用氯氨酮 10 mg/kg,加速眠新 0.15 ml/kg 肌注麻醉。常规消毒铺巾,备皮,显露下颌骨下缘。用低速钻滴生理盐水下造成 0.8 mm × 0.6 mm 全层骨膜骨质缺损,左侧下颌骨缺损区均植入 nHAC,右侧下颌骨缺损区分别植入 Bio-Oss 和 CPC,空白对照组留置空白缺损。分层缝合组织,放回笼内饲养。术后均未应用抗生素。

组织学观察:取材后,10%福尔马林固定 72 小时,EDTA 和 15%甲酸脱钙、脱水,石蜡包埋,沿标本最大表面积连续切片,每块标本取切片 4 张 HE 染色,观察骨愈合情况。

扫描电镜观察:取下标本立刻用 2.5%戊二醛固定 72 小时。横断劈开标本,形成自然断裂面,自然干燥。真空离子喷金。扫描电镜日立 S-520 观察,照相。

结 果

1. 大体标本:有 2 只颌下局限脓肿形成,但未形成瘘管,其它动物手术创口均 I 期愈合。术后 4~6 周植入 nHAC 侧的骨缺损与材料之间动度渐消失,8~12 周材料表面有较多骨痂,但仍能区分出植骨区。术后 4~6 周植入 Bio-Oss 侧的材料与骨缺损之间结合较紧密,可见到材料颗粒,8~12 周材料表面有很多骨痂,可见材料与缺损区骨质愈合明显。术后 4~6 周植入 CPC 侧的骨缺损与充填材料可活动,纤维组织包绕,8~10 周有骨痂形成,12 周材料周围有较多骨痂形成,仍能区分植骨区。空白对照组术后 10~12 周大部分为纤维结缔组织充填骨缺损区。

2. X 线观察:nHAC 植入骨缺损区 4~6 周,材料呈现阻射影,能区分出材料与骨缺损的界线。较正常骨密度低。8~10 周材料与骨缺损间隙密度增高,渐模糊,12 周间隙基本消失。Bio-Oss 植入骨缺损区 4~6 周呈类似骨小梁样高密度阻射影,8~12 周植骨区密度接近正常组织。CPC 植入缺损区 4~6 周呈一致性较高的阻射影像,材料与骨缺损间为线形影像,8~12 周骨缺损区仍为密度较高的阻射影像。空白对照术后 10~12 周骨缺损处有较明显的透光影。

3. 组织学观察:nHAC 组:4 周,在材料周围已有纤维组织增生,并伸入到框架材料网孔内,呈条索或小梁状结构,可见部分胶原均质化。6 周,材料周边

纤维组织增生活跃,并呈密集的小梁状穿插到材料的网孔之中,大部分小梁呈均质化(图 1)。8 周纤维组织长入到材料中,并有明显的骨小梁形成,新生骨小梁周边有大量成立方状成骨细胞排列(图 2)。10

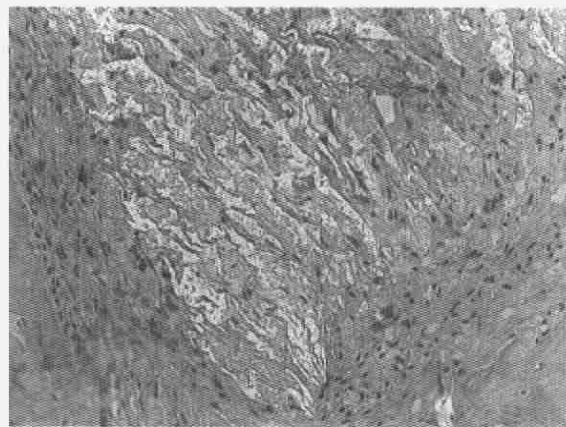


图 1 小梁样结构向材料中长出(HE 染色 40 倍)6 周



图 2 新生骨小梁成骨细胞活跃(HE 染色 400 倍)8 周

~12 周,材料周边与骨板已形成骨性连接。材料大部分降解被纤维组织和新生骨小梁替代。另外在材料周边还可见到软骨成骨过程。Bio-Oss 组:4~8 周大量纤维组织穿插到多孔矿化材料中,并包绕植入材料,在纤维组织与材料之间有明显的新骨形成。10~12 周在材料周围可见破骨细胞,材料缓慢降解被新骨逐渐替代。CPC 组:4~6 周纤维组织长入,分割并包绕着植入材料。8~12 周在材料周围可见新生骨小梁,成骨细胞较丰富,有部分材料被纤维组织和新骨替代。空白对照组:术后 12 周仍可见大量的致密的纤维组织充填缺损区。

4. 扫描电镜观察:nHAC 组:4~6 周胶原纤维密集呈束包绕并长入材料网孔之中,基质中可见均匀的钙颗粒。皮质骨区与材料之间由骨胶原连接,多层的新生骨组织向材料中延伸(图 3、4),钙颗粒周围有排列规则的胶原纤维。8~12 周新生骨组织自宿主骨边缘向 nHAC 中穿插长入(图 5、6),胶原纤维明显增粗,其间钙沉积增多。Bio-Oss 组:4~6 周,可见

密集的排列成束的胶原纤维伸入到材料的微孔内,钙沉积呈串珠样钙小球。8~12 周骨胶原增多,钙盐颗粒沉积明显。CPC 组:4~6 周,胶原纤维紊乱,8~12 周,材料与骨床间胶原纤维和钙盐颗粒沉积增多。以上三种植入材料均与宿主骨界面呈明显的骨结合。

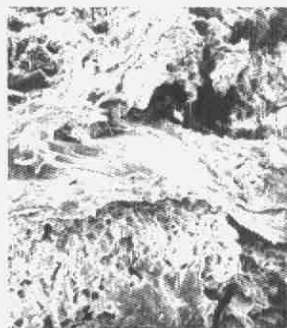


图 3 胶原纤维包裹并长入材料中(4 周)



图 4 多层新生骨向材料中延伸(6 周)

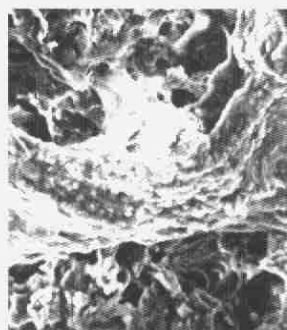


图 5 增粗的胶原纤维束长入材料中(8 周)



图 6 胶原纤维增粗,钙盐沉积增多(10 周)

讨 论

胶原基纳米骨(nHAC),是基于仿生骨观念制成的骨替代材料^[2]。采用提纯并去抗原的 I 型胶原为模板,在钙-磷盐溶液中调制矿化,通过 PH 值的调节来获得复合材料。此材料不仅矿物相为含有碳酸根的 HA,晶粒度低,晶体尺寸在纳米量级。其结构与天然骨中胶原和矿物的组装结构相同^[3]。该矿化胶原基材料的成份比例也与天然骨相似。另外,通过

三维造孔技术,胶原基纳米骨多孔框架材料具有与天然松质骨类似的三维孔洞网络结构,孔径为 50~300 μm 。nHAC 为一种新型的多孔矿化材料,其成功研制解决了仿生骨的制作难题。实验表明,组织切片见骨缺损周边增生的纤维组织向多孔的框架网孔中穿插长入,呈条索或小梁状结构,并有明显的骨小梁形成,新生骨小梁周边有大量的成骨细胞排列,材料周边与骨板已形成骨性连接,植入材料逐步被降解吸收,由纤维组织和新生骨替代。扫描电镜见胶原纤维密集平行排列并汇集成束,基质中可见分布均匀的钙颗粒。新生骨组织自宿主骨边缘向材料中长入与宿主骨界面呈骨性结合。本研究表明:nHAC 和 Bio-Oss 与 CPC 不同,前两者都具有矿化多孔框架系统。这种多孔框架结构能引导增生的纤维组织呈条索或小梁状结构向材料中穿插长入。材料中的多孔框架结构成为了理想的钙盐沉积支架。nHAC 与 Bio-Oss 成骨特点较类似。只是成骨量 8 周以内 nHAC 尚不如 Bio-Oss,而到 12 周时已接近 Bio-Oss 成骨水平,nHAC 与 CPC 相比同期成骨量大。另外,在 nHAC 组中,还见到了软骨成骨现象,故 nHAC 除了本身具有骨引导性外,可能还具有一定的骨诱导性。此种情况需进一步研究。本实验证明了胶原基纳米骨的生物相容性和骨引导性,是一种较为理想的颌骨植入材料。

致谢:感谢中日友好临床医学研究所电镜室和动物室的支持帮助

参 考 文 献

- 1 廖素三,崔福斋,张伟.组织工程中胶原基纳米骨复合材料的研制.中国医学科学院学报,2003,25(1):36-38.
- 2 Du C, Cui FZ, Zhang W, et al. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. J Biomed Mater Res, 2000,50:518-527.
- 3 Weiner S, Wagne HD. The material bone: structure-mechanical function relations. Annu Rev Mater Sci 1998,28:271-298.

(收稿日期:2004-03-19)

(上接第 231 页)

殖、分化及新骨形成,但其具体作用机制尚不明确。本研究结果提示,他汀类药物有望成为预防和治疗骨质疏松症的理想药物。

参 考 文 献

- 1 Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in

vitro and in rodents by statins. Science, 1999,286:1946-1949.

- 2 Mundy GR, Boyce B, Hughes D, et al. The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. Bone, 1995,17:17-75S.
- 3 Harris SE, Bone wald LF, Harris MS, et al. Effects of TGF on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein-2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase and type I collagen mRNA in prolonged cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. J Bone Miner Res, 1994,9:855-863.

(收稿日期:2003-09-01)