

小牛皮胶原对新骨形成影响的定量组织学研究

罗 磊 毛祖彝 李声伟 彭泽勋

摘要 将小牛皮胶原植入 10 只成年狗颌骨内,在不同时段取标本进行组织学光镜检测和定量分析。结果显示,此材料组织相容性良好,不影响新骨形成,材料与骨组织间无纤维被囊形成,与新骨直接结合,材料最后在机体内大部分降解,为宿主新生骨组织替代,表明小牛皮胶原是一种良好的组织修复材料。

关键词 牛胶原 组织相容性 组织学

将材料长期植入动物体内以研究、分析其组织相容性是评价生物医学材料生物相容性的一项重要内容¹。它能客观反映植入材料与组织间的关系,机体与植入材料是否相容。其实验模式与临床实际应用状态更为接近。本研究目的在于观察自制小牛皮胶原植入动物机体后的组织学反应及其与宿主组织结合情况。

1 材料和方法

1.1 材料

华西医科大学口腔医学院研制的小牛皮胶原,消毒、冻干后呈白色海绵状。

10 条杂种狗,年龄 2~ 2.5 岁,体重 10~ 15 kg,雌、雄各半,华西医科大学动物中心购入后适应性饲养 1 周。

1.2 方法

按自身同期对照研究的设计原则,在狗两侧下颌角各作一 1.5 cm × 1.5 cm 全层骨缺损,一侧植入胶原,对侧作空白对照。在术后 1, 2, 3, 4, 5, 6 周, 3, 4, 5, 6 月各处死实验动物 1 只,连续、动态观察牛胶原对骨缺损的修复作用。

动物处死后,先做肉眼大体观察,再将标本用金钢砂片在距骨缺损缘 0.5 cm 正常骨组织上切下,常规切片,HE 染色作组织光镜观察。采用四川大学研制的 M IAS-300 型图像分析仪测量材料-骨界面及缺损内的新骨面积,做定量组织学分析。

2 结 果

2.1 肉眼大体观察

所有动物术区无红肿、化脓,无材料溢漏,手术创口一期愈合。标本中胶原材料无移位,4 周前,实验组缺损区内组织较对照组结实致密,后渐趋一

致。

2.2 光镜观察

实验组胶原植入早期,在缺损缘与材料交界区,炎症反应明显,其中主要为中性粒细胞,少许淋巴细胞,无异物巨细胞,随术后时间延长,此炎症反应渐减轻,至术后 4 周,炎细胞极少,且多为淋巴细胞,术后 6 周时,炎症反应已消失,局部无炎细胞。在炎症反应减轻过程中,大量成纤维细胞和血管组织不断增加。

胶原的吸收降解随新骨组织的不断增加而加快,术后 1~ 2 周,虽有新骨生长,但胶原降解不明显,随时间推移,胶原不断减少,后为骨组织代替,6 周时缺损内只有极少量的胶原成分,最后全部为骨组织所占据,但在骨小梁间隙中似仍可见余留之胶原成分。

新骨的形成始于术后第 2 周(图 1),早期新骨幼稚,骨形成是由缺损边缘即正常宿主骨缘开始,表现为细胞成分多,细胞体积大,胞核大,胞浆深染,骨小梁紊乱。在新骨形成过程中,可见新骨是在胶原逐渐吸收过程中向材料中伸展,且可见软骨成骨形式(图 2)。术后 4 月,可见形成的新骨已在缺损中央处汇合。在后期,缺损边缘较早形成的骨组织已改建成较成熟的层板状骨,而中央区的新骨仍处于改建期,骨小梁紊乱,排列不规则。镜下可见,在骨形成的各个时期,材料周围无任何形式的纤维间隔,材料与新骨间及材料与基骨间结合良好,后期随胶原成分不断吸收,缺损最后完全为新骨占据

(图3)。

对照组术后初期, 主要反应为炎症反应, 炎细胞浸润, 血管充血反应明显, 无异物巨细胞出现。术后5周左右, 炎症反应渐减轻直至消退。纤维血管组织不断长入缺损中, 且不断增加。在此基础上, 先于缺损边缘(即正常骨缘)出现新骨。早期新骨表现为细胞成分多, 细胞核较大, 染色深, 呈旺盛的成骨趋势。术后4~6月, 新骨生长加快, 不断增加, 但其中中央部分缺损始终存在, 新骨不能完全占据缺损, 中央部分遗留的间隙由纤维组织占据。

2.3 定量组织学研究

实验组和对照组新骨定量分析结果见附表。结果表明, 在实验组和对照组间以及总的各时间段, 实验组新骨量大于对照组, 表明有显著性差异。

附表 实验组对照组新骨量方差分析结果

| 项目 | Partial SS | DF | MS | F | P |
|-----|------------|----|---------|--------|--------|
| 两组间 | 75.26 | 1 | 75.26 | 12.79 | < 0.05 |
| 时间段 | 18793.95 | 9 | 2088.22 | 354.80 | < 0.05 |
| 误差 | 288.39 | 49 | 5.89 | | |
| 合计 | 1915.61 | 59 | 324.71 | | |

3 讨论

机体组织学反应, 是评价医用材料生物特性的重要指标。Hench^{2,3} 研究后认为, 机体对植入材料的反应变化大致可分为4种类型: 有毒材料植入后, 周围组织死亡。无毒、可溶解的材料植入, 周围组织替代植入品。无毒、无生物活性材料植入, 则被厚薄不等的纤维被囊包绕。无毒、有生物活性的材料植入, 材料与组织间形成组织界面结合。第4类反应则是植入材料在机体中的理想反应。

本研究中, 胶原植入早期, 局部出现明显出血和炎症浸润, 此与对照组反应一致。随时间推移, 炎症反应和出血逐渐减轻, 主要呈现为成纤维细胞、纤维血管组织、骨基质的增加和明显的成骨反应。炎症反应为手术创伤所致。光镜下可见先为大量中性粒细胞、淋巴细胞浸润, 后渐出现较多的成纤维细胞和成骨细胞, 无异物巨细胞和组织细胞坏死

溶解。故认为此为创伤性无菌炎症反应而非机体排斥反应⁴。

随时间推移, 炎症反应渐减轻, 最后消失, 而出现大量成骨细胞和成纤维细胞, 并有网状血管长入。新骨的形成首先出现在骨缺损边缘, 即骨、材料界面处, 由骨创缘渐向中心生长。实验组和对照组皆在第2周时在骨缘处发现有网状骨基质形成, 二者新骨生长速度和量区别不大, 说明胶原对缺损处新骨生长无不良影响。而在4月时, 胶原组在骨缺损处即观察到新骨生长在中央汇合, 但空白对照组的骨缺损, 其中央部分始终未能被新骨修复而由结缔组织占据。实验组和对照组新骨的定量统计分析表明, 二者新骨量有显著性差异($P < 0.05$), 实验组大于对照组。从测量数据看, 骨量增加的差异主要发生在6周前, 而6周后二者差异不明显, 说明胶原对骨生长有一定的促进或引导作用。

植入材料与骨缺损边缘和新骨组织的界面结合形式是衡量其优劣的重要指标^{5,6}。本实验中, 通过光镜观察, 在整个修复过程中, 胶原纤维与骨组织间无任何形式的纤维被囊出现, 胶原在吸收前与新骨和原骨缺损缘完整结合在一起。修复中, 新生骨先沉积在胶原材料上, 再进一步骨化向中央发展, 此与对照组修复过程和趋势一致。表明胶原不影响骨愈合, 不影响新骨形成, 具有良好的组织相容性。

4 参考文献

- 1 ISO. Biological Evaluation of Dental Materials Technical Report, 1984
- 2 Hench LL. Surface-active biomaterials. *Sciences*, 1984, 226: 630
- 3 Hench LL. *Biomaterials Sciences*, 1980, 208: 826
- 4 Delustro F, Smith ST, Sundsmo J. Reaction to injectable collagen: results in animal models and clinical use. *Plast Reconstr Surg*, 1987, 79(4): 581
- 5 中国药品生物制品检定所等. 北京: 生物材料和制品的生物学评价标准, 1994
- 6 陈安玉主编. 口腔种植学. 成都: 四川科学技术出版社, 1991: 213

(1996-09-24 收稿)

(下转第83页)

胞的毒性。其作用和优越性已在国际上得到认可, 国际标准化组织 (ISO) 于 1984 年明确规定了对牙科生物材料须行体外细胞毒性试验, 作为生物材料筛选的一个重要部分²。美国国家标准协会 (ANSI) 和美国牙科医师协会等组织也先后提出类似标准, 现已成为国际上公认的生物材料检测标准。

许多研究表明体外细胞培养检测材料毒性的结果和在体内植入实验结果相一致的, 而细胞毒性检测与组织相容性检测二种方法是既互相独立, 又互为补充的。它不仅可检测材料的细胞毒性, 也是考察材料与细胞组织相容性的重要手段⁴。

进行细胞毒性检测时, 材料大致有三种形式: 微粒状或粉末状; 块状; 材料溶液或浸提液。本实验选用材料溶液, 而阳性和阴性对照则采用浸提液。

在本实验中, 阴性对照细胞贴壁生长良好, 形态正常, 对细胞生长无毒性; 阳性对照组细胞生长不佳, 有悬浮死细胞, 圆缩率达 58.8%, 且出现明显的细胞生长抑制, 说明实验符合评价标准的规定。小牛皮胶原溶液与细胞接触后, 细胞形态正常,

贴壁生长良好, 细胞圆缩率为 1% ~ 2%, 较阴性对照还低; 据 ISO 标准, 属无毒范围。而细胞增殖试验中, 7 d 计数, 小牛皮胶原组增殖率为 137.2%, 较阴性对照为高, 表明有一定的细胞生长促进作用。

本实验通过对小牛皮胶原在细胞毒性试验中对细胞生长静态 (形态) 和动态 (增殖率) 的作用评价, 表明本小牛皮胶原无细胞毒性, 细胞相容性良好。

4 参考文献

- 1 A l p a s l a n C, A l p a s l a n G, O y g u r T. Bone reaction to subperiosteally implanted hydroxylapatite collagen / glycosaminoglycans and coral in the guinea pig. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1994, 77(4): 335
- 2 ISO. *Biological Evaluation of Dental Materials Technical Report* 1984
- 3 中国药品生物制品检定所等. *生物材料和制品的生物学评价标准*, 1994
- 4 Pizzoferrato A. Biocompatibility testing of prosthetic implant materials by cell cultures. *Biomaterials*, 1995, 6: 346

(1996-09-24 收稿)

Cellular Compatibility Study of Ox Collagen with Fibroblast Cells

Luo Lei, Mao Zuyi, Li Shengwei, et al

Department of Oral Surgery, College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

The cell culture method was used to evaluate the cytotoxicity of ox collagen for clinical use. Direct method was chosen to examine the shape and growth of cells. Results showed that the cell shape was normal and the growth was well. The cytotoxicity of ox collagen conformed to the standards made by International Organization for Standardization (ISO). This study demonstrated that ox collagen doesn't restrain the growth of cells and has good biocompatibility.

Key words: collagen cytotoxicity growth of cell

(上接第 81 页)

Histologic Study for Effects of Ox Collagen in Forming of New Bone with Quantitative Method in Animal Models

Luo Lei, Mao Zuyi, Li Shengwei, et al

Department of Oral Surgery, College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

In this study, collagen was implanted into mandibular defects of 10 dogs. After operations, the samples were examined with microscope and quantitative method at 10 periods. Results showed that collagen did not affect bone growth and new bone grew into collagen directly. There was no fibrous capsule between collagen and new bone. Eventually, majority of collagen was resorbed and replaced by bone tissue. It was concluded that collagen has a good histocompatibility.

Key words: collagen histocompatibility histology