

脱钙牙本质基质及其复合物整复 节段性骨缺损的 X 线 及新骨钙磷动态变化研究

李文 岑远坤 廖运茂 陈 铀 李成林

摘要 采用完全随机同期对照方法,对家兔桡骨节段性缺损动物模型,分别植入自制脱钙牙本质基质(DDM)、生物活性玻璃陶瓷(BGC)与脱钙牙本质基质复合物、脱钙骨基质(DBM)整复骨缺损,行X线观察及新骨钙磷元素动态变化的测定。结果显示:用DDM整复的骨缺损区在术后各程期的X线表现与DBM相似,第8周时新旧骨界线消失,髓腔再通;而DDM加BGC的骨整复区在第8周时虽然骨断端新旧骨的界线消失,但新骨的X线表现仍为一阻射团块;空白对照侧在术后8~12周X线表现为骨断端成锥形,断端间无骨性愈合。新骨X线能谱分析结果显示,DDM和DBM组内各程期Ca/P值有显著性差异($P < 0.01$);除DDM及DBM第12周时的Ca/P值外,3种材料各程期新骨Ca/P原子个数比与正常骨相比有显著性差异($P < 0.01$)。

关键词 牙本质 骨生成 骨形成蛋白 X线检查 钙 磷

目前,整复外科领域十分重视对骨替代材料的研制,传统的自体骨移植技术因其稳定的临床效果而得到广泛应用,但由于需要开辟第二术野及发生术后并发症等原因,致使学者们寻求其他骨代用品或骨缺损整复技术,如骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)的发现及其复合物的临床应用,引导骨再生(guided bone regeneration, GBR)技术等^{1~5}。本研究采用自制脱钙牙本质基质(decalcified dentin matrix, DDM)、脱钙骨基质(decalcified bone matrix, DBM)、DDM与生物活性玻璃陶瓷(bioactive glass ceramics, BGC)的复合物整复家兔桡骨节段性骨缺损,术后不同程期摄X线片观察新骨生长情况,并用X线能谱技术对新骨的Ca, P元素的动态变化进行微区定量测定,为临床应用DDM及DDM加BGC提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料、分组及实验方法

见参考文献6。

1.2 X线摄片

X线摄片时用自制的家兔专用固定板,使家兔的双前肢分开至60~80°,并标注好左右两侧,每次均由相同人员操作固定,摄片及冲洗由华西医科大学附属口腔医院放射科同一医生操作,使用国产400mA X线机, X线照射条件为40 kV, 6 mA s 球管窗口距样本垂直距离40 cm, X线

中心通过家兔双前肢角平分线,每次使用相同的显影、定影条件。

1.3 扫描电镜X线能谱仪Ca, P测量

标本制备及测试方法见参考文献7。将用2.5%戊二醛固定的标本在-4℃液氮中冷冻断裂形成自然断面,经生理盐水和0.1 mol/L PBS反复冲洗,再置入0.1 mol/L PBS中,超声波清洗10 min,酒精梯度脱水,乙醚置换酒精,冷冻干燥,真空中喷碳、喷金后, X线能谱仪(AMRAY 1845 FE场发射扫描电镜)测定新骨各个微区Ca, P元素含量,结果以Ca, P元素的原子数的百分含量表示,测定数据的校正及结果均由机载计算机自动完成。同法将实验中切除的桡骨中段制成扫描电镜标本,用作正常骨Ca, P原子个数比的对照。结果经方差齐性分析后,采用 q 检验(Newman Keuls法)比较每种材料新骨形成区各程期(2, 4, 8, 12周)的差异;采用 q' 检验(Dunnett法)比较新骨形成各程期Ca/P原子个数比与正常Ca/P值的差异以及3种材料各程期间的差异。

2 结 果

2.1 X线观察结果

术后即刻X线片显示,植入DDM侧断端整齐,骨缺损区X线透射,仅可见少数细微X线阻射影,其阻射程度明显低于皮质骨(图1);植入DBM

作者单位:610041 华西医科大学口腔医学院(李文,岑远坤,廖运茂,陈铀),武汉市中医院(李成林)

侧几乎未见阻射影; 植入DDM 加BGC 侧可见大量 X 线阻射颗粒充填于骨缺损区域(图 2); 空白对照侧骨缺损区 X 线透射(图 1)。

术后 1 周, 植入 DDM 侧仍可见整齐的断端, 断端间 X 线阻射影明显增加, 但未与断端相连续; 植入 DBM 侧断端间亦可见 X 线阻射增加, 且密度较植入 DDM 侧均匀; 植入 DDM 加 BGC 侧无明显变化; 空白对照侧也无明显变化。

术后 2 周, 植入 DDM 侧断端间 X 线阻射影呈块状, 与断端分界模糊不清; 植入 DBM 侧可见中央钙化增多, X 线阻射更为明显; 植入 DDM 加 BGC 侧变化仍不明显, 少部分样本 (9/24) 可见植入物周围有明显的新骨形成, 表现为原来松散的 BGC 颗粒间界线模糊, BGC 颗粒外侧有线状 X 线阻射影; 空白侧有少量线状 X 线阻射影。

术后 3 周, 植入 DDM 侧材料整复区新骨与骨断端融合, 外侧皮质骨厚度不均; 植入 DBM 侧与植入 DDM 侧相似; 植入 DDM 加 BGC 侧与 2 周时相比, 材料外侧有更多的 X 线阻射影; 空白对照侧断端开始变钝。

术后 4 周, 植入 DDM 侧新骨虽与断端连续, 但髓腔并不相通, 新骨外侧皮质较 3 周时厚度更为均匀; 植入 DBM 侧与植入 DDM 侧类似, 但新骨段

的 X 线阻射较植入 DDM 侧稍弱; 植入 DDM 加 BGC 侧与 3 周时相比无明显变化; 空白侧骨断端变圆钝。

术后 8 周, 植入 DDM 侧新骨皮质与原骨相连续, X 线阻射基本一致, 髓腔再通, 但髓腔内壁多不光滑(图 3~ 5); 植入 DBM 侧皮质骨形成的量与表面连续性与植入 DDM 侧相似(图 3); 植入 DDM 加 BGC 侧皮质骨基本连续, 块状影的 X 线阻射较 4 周时强, 外侧皮质骨较光滑, 但髓腔未通(图 4); 空白侧未形成骨连接, 骨断端呈锥形, 断端髓腔封闭(图 5)。

术后 12 周, 植入 DDM 及 DBM 侧新骨进一步改建; 植入 DDM 加 BGC 侧髓腔位置有少量 X 线透射影; 空白侧与 8 周时相比, 无明显变化。

2.2 扫描电镜 X 线能谱 Ca/P 原子个数比测定

扫描电镜 X 线能谱 Ca/P 原子个数比测定结果见表 1。统计分析表明: 经 *q* 检验, DDM 或 DBM 组内各程期 Ca/P 原子个数比有显著性差异 ($P < 0.01$), BGC 加 DDM 整复区新骨在第 2, 4 周间, 第 2, 8 周间, 第 2, 12 周间以及第 4, 12 周间值有显著性差异 ($P < 0.01$); 除 DDM 和 DBM 的 12 周值外, 3 种材料各组值与正常骨组值间 *q* 检验有显著性差异 ($P < 0.01$)。

表 1 3 种材料植入后各程期新骨 Ca/P 原子个数比均数值($\bar{x} \pm s$)

植入材料	植 入 时 间(周)			
	2	4	8	12
DDM	0.529 ± 0.047	1.321 ± 0.059	1.410 ± 0.032	1.639 ± 0.056
DBM	0.523 ± 0.071	1.301 ± 0.063	1.420 ± 0.041	1.643 ± 0.037
DDM + BGC	2.036 ± 0.092	1.900 ± 0.039	1.839 ± 0.030	1.770 ± 0.061

注 Ca/P 原子个数比 = $\frac{\text{Ca 原子个数的百分含量}}{\text{P 原子个数的百分含量}}$, 正常骨 Ca/P 原子个数比 1.639 ± 0.064

3 讨 论

3.1 Ca, P 原子个数比与成骨的关系

在新骨的形成和改建过程中, Ca, P 含量不断变化, 直至与正常骨组织中的 Ca, P 含量接近或一致。因为正常骨中磷酸钙盐的成分相对恒定, 因而可以用 Ca/P 原子个数比作为衡量新骨形成和改建过程中 Ca, P 动态变化的指标, 这与某些学者⁷ 用 Ca, P 元素的质量百分比与正常骨中 Ca, P 值相比较方法的基本原理是一致的, 结果是等价的。本实

验将正常桡骨多个样本的平均值作为家兔正常骨 Ca/P 原子个数比的标准对照值, 各材料各程期多个样本微区测量均值为实验值。统计分析结果表明, 随着时间的增加, DDM 或 DBM 组新骨中的 Ca/P 原子个数比由低向高接近正常值, 12 周时, 与正常骨已无统计学上的差异; DDM 加 BGC 组虽然与正常骨 Ca/P 值有统计学差别, 但是趋向正常骨的 Ca/P 值。这表明, 3 种植入材料均使骨缺损段的整复向着正常骨的方向发展。

3.2 髓腔再通的理论和临床意义

桡骨是一种管状骨,其结构是生物进化的结果,也是功能性改建的结果。严格地说,骨缺损的整复或自然愈合只有当新骨形成并改建至未损伤前骨的质量时才能称为完全愈合,但临床上常以能否负重行使功能等指标诊断其是否为临床愈合,而不考察髓腔再通指标。综合本实验的X线观察及相关实验的组织学观察结果,术后8周,DDM及DBM植入区新骨可以达到髓腔再通,而DDM加BGC植入区新骨未达到髓腔再通。作者认为,其原因在于DDM或DBM中的成分容易被吸收改建,而BGC较慢的降解速度妨碍了新骨改建的进行。有的研究⁵表明,骨形成蛋白钙磷陶瓷复合物中的钙磷陶瓷除作为BMP的载体外,在新骨形成早期可以使新骨具有较高的机械强度,而新骨改建期钙磷陶瓷的影响是负面的。本实验同时也表明,DDM加BGC整复区的新骨虽然难以达到髓腔再通,但骨性愈合是肯定的,作者认为不应妨碍DDM加BGC的临床应用,尤其是对临床骨缺损的充填。但是,当DDM加BGC作为牙槽嵴增高材料或联合用于种植临床时,由于BGC被新骨包裹而且不能完全吸收改建,因此,在DDM加BGC整复区植入种植体的临床效果可能较种植体完全植入正常骨组织差。因而选用一种比BGC更易降解的钙磷陶瓷材料与DDM进行复合植入可能具有更好的临床效果,但需进一步实验证实。

本实验表明,当节段性骨缺损达到一定长度时,骨创将不能自行愈合即产生骨不连,而植入成

骨材料或其复合物后,这种骨缺损可以达到完全愈合,而且有可能改建到正常骨的质量;从而为临床整复外科或口腔种植提供了一种新的手段。DDM加BGC复合物的应用,不但节约了DDM,同时亦为DDM的诱导成骨提供了成骨支架,增加了新骨形成早期的机械强度,随着可吸收的BGC的成分和制作工艺的改进,BGC同诱导材料的复合物有望得到广泛的临床应用。

(本文图见中心插页11)

4 参考文献

- 1 王大章,费伟,刘松筠,等.高生物诱导活性复合人工骨整复骨缺损的实验研究.华西口腔医学杂志,1996,15:3
- 2 Urist MR, Silveiman BF, Buring K, et al. The induction principle. Clin Orthop, 1967, 53: 243
- 3 Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, et al. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. J Bone Joint Surg, 1995, 77-A: 734
- 4 杨连甲,金岩,孙庆妹,等.骨形成蛋白(BMP)的实验研究.实用口腔医学杂志,1987,3:78
- 5 Yaszenski MJ, Payne RG, Hayes WC, et al. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. Biomaterials, 1996, 17: 175
- 6 岑远坤,李文,廖运茂,等.脱钙牙基质及其复合物整复节段性骨缺损的组织学观察.华西口腔医学杂志,1998,16:263
- 7 朱宜,汪裕萍,陈文雄.扫描电镜图像的形成处理和显微分析.北京:北京大学出版社,1991:282~355

(1998-01-16收稿)

X-ray Observation and Ca/P Quantitative Analysis of Decalcified Dentin Matrix and Its Composite in Reconstruction of Segmental Bone Defect

Li Wen, Cen Yuankun, Liao Yunmao, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Li Chenglin

Wuhan Chinese Medicine Hospital

Abstract

A model of segmental bone defect in radius of rabbit was employed, and DDM, DBM and DDM + BGC were implanted in the left and right defect regions of 48 New Zealand rabbits respectively. The samples were sacrificed in 1, 2, 3, 4, 8, 12 weeks after operation, then X-ray examination and electromicroscopic Ca/P atom amount ratio measurement were performed. The results showed that DDM group and DBM group presented a completely medullary reconstruction while DDM + BGC group did not demonstrate reconstruction of medullary cavity 8 weeks postoperatively. The three kinds of materials showed the good reconstruction capacities of bone defect, and Ca/P analysis was also in cooperation with the X-ray observations.

Key words: dentin osteogenesis bone morphogenetic protein X-ray examination Ca P