

[文章编号] 1000-1182(2008)01-0023-04

缓释骨形态发生蛋白-2的壳聚糖温敏凝胶 促进牙周组织再生的实验研究

马志伟¹, 张勇杰², 吴织芬¹, 王荣³, 朱浩¹, 李媛², 许杰¹, 刘青¹

(1.第四军医大学口腔医院 牙周黏膜病科; 2.第四军医大学口腔医学院 组织工程实验中心;

3.第四军医大学口腔医院 药剂科, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 观察自制的加载重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)的壳聚糖温敏凝胶修复牙周组织缺损的效果。方法 选取3只健康雄性杂种犬制备前磨牙区人工 度根分叉区组织缺损模型, 随机分为空白对照组、空白凝胶组及载药凝胶组, 术中先严密缝合组织瓣, 然后对空白凝胶组及载药凝胶组区域分别注射先期配制并消毒好的空白凝胶和载药凝胶, 术后8周取材行大体及组织学观察。结果 载药凝胶组出现明显的牙周组织再生, 而空白对照组和空白凝胶组仅有少量的牙周组织再生。载药凝胶组与空白对照组及空白凝胶组均有统计学差异($P<0.05$), 空白对照组和空白凝胶组相比, 没有统计学差异。结论 载rhBMP-2的壳聚糖温敏凝胶可有效促进牙周组织再生, 同时简化手术操作, 是一项有潜力的牙周组织再生手段。

[关键词] 牙周组织再生; 温敏凝胶; 壳聚糖; 骨形态发生蛋白-2

[中图分类号] R452 **[文献标识码]** A

A study on the effect of the chitosan thermosensitive hydrogel loading recombinant human bone morphogenetic protein-2 on repairing periodontal defects MA Zhi-wei¹, ZHANG Yong-jie², WU Zhi-fen¹, WANG Rong³, ZHU Hao¹, LI Yuan², XU Jie¹, LIU Qing¹. (1. Dept. of Periodontology and Mucosal Diseases, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China; 2. Central Laboratory for Tissue Engineering, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China; 3. Dept. of Pharmacology, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China)

[Abstract] Objective To observe the effect of the chitosan thermosensitive hydrogel loading recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2) on repairing periodontal defects. Methods To prepare artificial furcation defects model in the posterior area in 3 healthy male dogs, and then to inject chitosan thermosensitive hydrogel loading of rhBMP-2 after fast suturing tissue flap. The groups filled with nothing or filled only with chitosan thermosensitive hydrogel were the controls. The dogs were sacrificed after 8 weeks and the periodontal regeneration was observed histologically. Results The histological observation showed that the chitosan thermosensitive hydrogel loading rhBMP-2 group achieved apparent periodontal tissue regeneration occupying the majority of the defects and the control groups got only a small amount of periodontal tissue regeneration. Conclusion The chitosan thermosensitive hydrogel loading rhBMP-2 can effectively promote the periodontal tissue regeneration, while simplifying the surgical operation. It might be a potential means for periodontal regeneration.

[Key words] periodontal regeneration; thermosensitive hydrogel; chitosan; bone morphogenetic protein-2

牙周组织再生是口腔科学研究的热点和难点问题。通过近20年来的研究, 重建牙周支持组织的技术有了重要的发展, 但也有很多的不足^[1]。该领域

的研究成果之一就是认识到生长因子的应用在牙周组织再生中发挥着重要作用^[2-3]。但是, 外源性生长因子易流失、易失活, 难以长期高效释放, 因此在目前的实际应用中, 外源性生长因子的治疗效果尚不理想。如能利用合适载体负载目标生长因子, 发挥生长因子的应用潜能, 则应用外源性生长因子有望成为实现牙周组织再生的最贴近临床的有效手段。

[收稿日期] 2007-09-26; [修回日期] 2007-12-24

[基金项目] 陕西省科学技术研究发展计划基金资助项目(2006K14-G3)

[作者简介] 马志伟(1973-), 男, 山西人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 吴织芬, Tel: 029-84776093

壳聚糖温敏凝胶系统是一种使用方便、有望在多个领域应用的优异的载药系统,近年来受到高度关注^[4-7]。其主要成分是天然高分子材料壳聚糖,室温条件下该系统呈生理中性的溶液,当温度升高到37℃时,该系统可以迅速发生相转变,成为半固态的水凝胶。该载体材料已经被研究用于关节修复、肿瘤治疗、长效镇痛等。但能否用于牙周组织再生治疗以及如何用于牙周组织再生治疗都属于研究空白。本研究在前期实验中已经成功制备该温敏凝胶并加载重组人骨形态发生蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2),发现载药凝胶在37℃条件下可形成不流动的固体凝胶,并能有效缓释rhBMP-2在1个月以上。在此基础上,本实验通过动物实验,探索该系统应用于牙周组织再生的方法和效果。

1 材料和方法

1.1 材料

壳聚糖、β-甘油磷酸钠(Sigma-Aldrich公司,美国), rhBMP-2(R&D Systems公司,美国), sp1600型硬组织切片机(Leica公司,德国), 显微镜用测微尺(上海第三光学仪器厂)。

1.2 制备壳聚糖温敏凝胶系统

参考文献[3]的制备方法和文献[8]的消毒方法,将0.4 g壳聚糖加入到16 mL浓度为0.1 mol/L乙酸溶液中,持续搅拌2 h。将壳聚糖溶液在高压灭菌器内消毒10 min(121℃)后,置无菌操作间内备用。将1.12 g β-甘油磷酸钠溶解于4 mL双蒸水中,在无菌操作间内过滤(0.2 μm)除菌。将消毒过的两种溶液冰浴15 min,然后将β-甘油磷酸钠溶液逐滴加入到壳聚糖溶液中,并持续搅拌10 min。获得的溶液壳聚糖质量浓度为2%, β-甘油磷酸钠质量浓度为5.6%,溶液最终pH为7.15。将获得的溶液平分成两部分(各10 mL),其中一部分滴加1 μg rhBMP-2,并搅拌1 min。将两部分溶液分别吸入注射器中并密封,4℃下保存,备用。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 选取由第四军医大学西京医院实验动物中心提供的1~2岁健康雄性杂种犬3只,随机分为载药凝胶组、空白凝胶组及空白对照组。在每只犬上下颌两侧4个区中随机选用3个区的第二、三前磨牙为实验牙进行实验。

1.3.2 动物手术过程 将1~2岁的健康雄性杂种犬以每千克体重肌注0.1~0.15 mL 846合剂麻醉、固定、消毒、铺巾后,翻开龈瓣。制备前磨牙区人工度根分叉区组织缺损模型,即用涡轮机裂钻磨除

实验牙颊侧根分叉部位的牙槽骨,暴露根分叉区,再水平向舌侧磨去根分叉区内的牙槽骨4 mm,垂直向磨去根分叉区牙槽骨约5 mm,制备根分叉区人工牙周组织缺损,用细裂钻在缺损区根面上作平齐于牙槽嵴的切迹,作为组织学观察的标志点。在去骨过程中用无菌生理盐水冲洗并冷却去骨区。刮除切迹以上暴露根面的牙周膜和牙骨质,并作根面平整,清理、冲洗去骨区。随即用改良垂直褥式法严密缝合龈瓣。然后根据随机分组结果相应地注射载药凝胶、空白凝胶或不作处置。所有动物术后连续3 d肌注青霉素80万单位以预防感染,术后1周进流食,之后改为半流食。

1.3.3 动物处死取材及组织学测量 术后8周时于麻醉状态下对实验犬进行颈动脉插管,体积分数为4%多聚甲醛灌注固定,取上下颌骨,按分段分段切取实验牙及牙槽骨,大体观察及照相后,制备近远中向10 mm厚的牙及牙周组织块。不脱钙塑料包埋,sp1600型硬组织切片机制备10 μm厚的切片,骨粉染色及改良丽春红三色法染色,光镜下观察新生牙槽骨、新生牙骨质和新生牙周膜的生长情况^[9]。选根分叉中央的3张切片进行组织学测量(显微镜用测微尺)。组织学测量指标包括:1)骨缺损高度(defect height, DH):根分叉顶至根方切迹底间距离;2)新生牙槽骨高度:根方切迹底至新生牙槽骨冠方顶间距离;3)新生牙骨质高度:根方切迹底至新生牙骨质冠方顶间距离;4)新生结缔组织附着:根方切迹底至根分叉新生结缔组织顶的附着高度。

2 结果

2.1 壳聚糖温敏凝胶及载药凝胶系统的制备

载药壳聚糖温敏凝胶溶液透明,在37℃孵箱内可于8 min左右形成稳定的凝胶,呈淡乳白色,凝胶形态良好。

2.2 动物实验结果

2.2.1 一般情况 因为放置载体材料的环节非常简便,使得手术过程相对顺利。各组动物术后行为无明显异常。术后8周处死动物时,动物健康状况良好,实验牙部位均未见明显的牙石和软垢,牙龈缘稍有充血肿胀,探诊深度约2 mm,探诊有出血,但不严重,个别牙位出现2 mm左右的牙龈退缩。

2.2.2 大体观察结果 在载药凝胶组可见再生牙槽骨基本长满缺损区域,新生骨的骨质相对疏松,与周围原有骨质分界明显(图1A)。空白凝胶组缺损区仅有少量牙槽骨再生(图1B),空白对照组的缺损区仅有少量牙槽骨再生,个别区域还有骨破坏(图1C)。

2.2.3 组织学观察及测量结果 术后8周时,光镜

下进行组织学观察可见载药凝胶组大部分实验牙的新生牙槽骨几乎充满根分叉区，其新生牙骨质也覆盖根分叉的大部分区域，未见骨粘连和根吸收等不

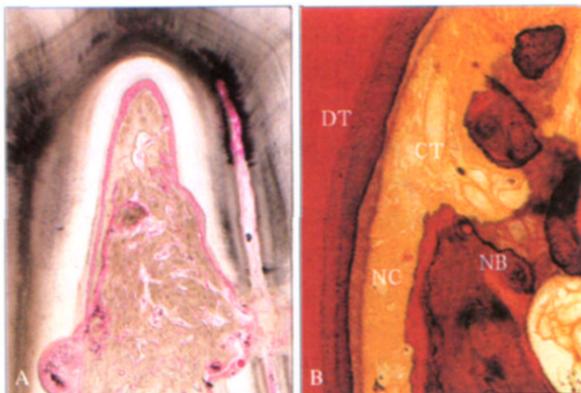
良愈合(图2)。空白凝胶组和空白对照组仅有少量牙槽骨、牙骨质新生。新生牙槽骨基质含量高，矿化程度较低(图3)。



A: 载药凝胶组; B: 空白凝胶组; C: 空白对照组

图1 术后8周时, 实验动物牙周组织再生情况的大体观察

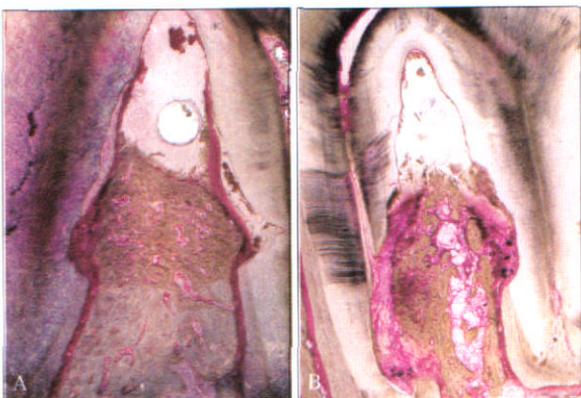
Fig 1 The general image of the periodontal regeneration after 8 weeks



A: 骨粉染色 $\times 10$; B: 改良丽春红三色法染色 $\times 40$; DT: 牙本质; CT: 新生结缔组织附着; NC: 新生牙骨质; NB: 新生牙槽骨

图2 术后8周, 载药凝胶组实验动物牙周组织的再生情况

Fig 2 The histological image of the periodontal regeneration after 8 weeks in the experimental group



A: 空白凝胶组; B: 空白对照组

图3 术后8周, 空白凝胶组与空白对照组实验动物牙周组织的再生情况 骨粉染色 $\times 10$

Fig 3 The histological image of the periodontal regeneration after 8 weeks in the control group and the blank group bone dust $\times 10$

各组新生牙周组织的量化比较见表1。从对骨缺损高度、新生牙槽骨高度、新生牙骨质高度及新生结缔组织附着等指标的组织学测量结果可见: 3组间骨缺损高度的差异无统计学意义($P>0.05$), 而在载药凝胶组中新生牙槽骨高度、新生牙骨质高度及新生结缔组织附着的测量结果明显高于空白凝胶组($P<0.05$)以及空白对照组($P<0.05$), 空白凝胶组和空白对照组之间各项指标的差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 各组牙周组织再生情况的组织学测量结果 mm, $\bar{x} \pm s$

Tab 1 The results of new periodontal regeneration measurement (mm, $\bar{x} \pm s$)

分组	骨缺损高度	新生牙槽骨高度	新生牙骨质高度	新生结缔组织附着
载药凝胶组	4.98 \pm 0.16	4.78 \pm 0.13	4.79 \pm 0.13	4.83 \pm 0.12
空白凝胶组	4.95 \pm 0.23	2.10 \pm 0.17	1.87 \pm 0.16	2.60 \pm 0.15
空白对照组	5.11 \pm 0.19	1.95 \pm 0.15	1.79 \pm 0.13	2.52 \pm 0.27

3 讨论

本实验中, 载药壳聚糖温敏凝胶的使用在简化手术操作的同时还获得了比较理想的牙周组织再生, 初步说明加载rhBMP-2的壳聚糖温敏凝胶可以比较有效的用于一定条件下的牙周组织缺损修复。因为壳聚糖温敏凝胶具有保存条件下是溶液状态但是植入体内可以原位凝固的特点, 因此可以通过注射的方式将其放置于需要的部位。牙周组织缺损大多不规则, 而溶液状态的凝胶可以方便的充盈到缺损的各个角落。凝胶固化后, 提供空间维持以及缓释活性因子的作用。壳聚糖温敏凝胶是生物可降解的, 且降解产物无毒副作用, 因此无须二次手术取出植入材料。

空白凝胶组没有出现理想的牙周组织再生,提示壳聚糖温敏凝胶系统本身并不具备明显的促进牙周组织再生的能力,但空白凝胶的使用并未使牙周组织再生的结果比空白对照组更差,从另一方面验证了壳聚糖温敏凝胶较好的组织相容性。

载药凝胶组使用加载生长因子rhBMP-2的壳聚糖温敏凝胶,前期的体外实验证实,这种加载rhBMP-2的壳聚糖温敏凝胶可以获得rhBMP-2的长效缓释。rhBMP-2具有很强的促进牙周膜细胞增殖和DNA合成、升高牙周膜细胞碱性磷酸酶活性、诱导牙周组织中未分化间充质细胞分化为成牙骨质细胞和成骨细胞的能力。

Kobayashi等^[10]研究证实rhBMP-2能促进人牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLCs)的增殖和胶原合成,提高其碱性磷酸酶活性,并促进人PDLCs成骨样表型的表达。应用动物实验证实rhBMP-2用于牙周缺损修复可明显促进牙槽骨、牙骨质及牙周膜的再生^[11-13]。研究表明,应用骨形态发生蛋白复合适当的支架材料可以获得更多的牙周组织再生^[11-13]。本实验结果显示,应用加载rhBMP-2的壳聚糖温敏凝胶获得了比较充分的牙周组织再生。本实验所用rhBMP-2的剂量是在前期实验的基础上选定的。在本实验基础上,进一步扩大样本并测定量效关系是急需进行的。

本实验结果是基于在根分叉区人工制备的牙周组织缺损,与临床实际的牙周缺损情况有很大差异,为证实加载rhBMP-2的壳聚糖温敏凝胶促进牙周组织再生的效果,还须进一步在其他牙周组织缺损模型中考察其效果。

本实验中观察到实验牙区域仍有牙周炎症存在,这无疑会对牙周组织再生带来不利影响,设想在壳聚糖温敏凝胶缓释rhBMP-2的同时也缓释抗生素,有望控制术后感染的并发症,有利于牙周组织再生。本实验结果表明自制的加载rhBMP-2(质量浓度为100 ng/mL)的壳聚糖温敏凝胶可有效促进根分叉区牙周组织再生,同时简化手术操作,是一项有潜力的牙周组织再生手段,值得在临床上全面的推广。

致谢: 本研究的组织切片、染色部分得到了第四军医大学西京医院骨科研究所吕荣老师的大力帮助,在此表示感谢。骨粉染色是西京医院骨科研究所自主技术。

[参考文献]

- [1] Alpiste Illueca FM, Buitrago Vera P, de Grado Cabanilles P, et al. Periodontal regeneration in clinical practice[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2006, 11(4): E382-E392.
- [2] Kaiger D, Cirelli JA, Giannobile WV. Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2006, 3(5): 647-662.
- [3] Ripamonti U, Renton L. Bone morphogenetic proteins and the induction of periodontal tissue regeneration[J]. Periodontol, 2000, 2006, 41: 73-87.
- [4] Chenite A, Chaput C, Wang D, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ[J]. Biomaterials, 2000, 21(21): 2155-2161.
- [5] Berger J, Reist M, Chenite A, et al. Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application[J]. Int J Pharm, 2005, 288(2): 197-206.
- [6] Molinaro G, Leroux JC, Damas J, et al. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: An in vivo experimental approach to injectable biomaterials[J]. Biomaterials, 2002, 23(13): 2717-2722.
- [7] Ruel-Gariepy E, Shive M, Bichara A, et al. A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2004, 57(1): 53-63.
- [8] Jarry C, Chaput C, Chenite A, et al. Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels[J]. J Biomed Mater Res, 2001, 58(1): 127-135.
- [9] 王东胜, 路正刚. 塑料包埋技术在口腔硬组织切片中的应用研究[J]. 现代口腔医学杂志, 2003, 17(3): 256-257.
WANG Dong-sheng, LU Zheng-gang. Application of plastic embedding technique in the research of oral hard tissue and dental implant[J]. J Modern Stomatol, 2003, 17(3): 256-257.
- [10] Kobayashi M, Takiguchi T, Suzuki R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament[J]. J Dent Res, 1999, 78(10): 1624-1633.
- [11] Wikesjo UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, et al. Periodontal repair in dogs: Effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment[J]. J Clin Periodontol, 1999, 26(6): 392-400.
- [12] King GN, King N, Cruchley AT, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects[J]. J Dent Res, 1997, 76(8): 1460-1470.
- [13] 鲁红, 吴织芬, 田宇. 细胞—支架构建方式的牙周组织工程实验研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2004, 39(3): 189-192.
LU Hong, WU Zhi-fen, TIAN Yu. A study on the effects of cells and scaffolds tissue engineering on the periodontal regeneration[J]. Chin J Stomatol, 2004, 39(3): 189-192.

(本文编辑 王 晴)