

# 骨质疏松状态下钛种植体周围骨形成的动态观察

刘娜 陈丽丽

**[摘要]** 目的 观察骨质疏松大鼠股骨干骺端钛种植体周围的骨形成过程。方法 卵巢切除12周后,于大鼠股骨干骺端植入粗化处理的纯钛种植体。于6周和12周时取含钛种植体的股骨分别行组织学检测、扫描电镜分析和生物力学测试,并比较两个时间点内各项指标的差别。结果 荧光标记显示钛种植体周围骨形成始于其邻近区域,并向外国生长,同时向内生长。向外生长的速度( $0.91 \mu\text{m}/\text{d}$ )大于向内生长的速度( $0.75 \mu\text{m}/\text{d}$ ),差异有统计学意义( $t=-2.27, P<0.05$ )。从6周到12周,骨-钛种植体接触率(BIC)增加,相对骨面积(BA)下降,差异均有统计学意义( $t$ 分别为 $-5.40, 2.79, P$ 均 $<0.05$ )。扫描电镜分析显示6周时钛种植体与周围骨在部分区域存在间隙,12周时这种间隙很少出现。生物力学测试发现12周时的推出力值明显大于6周时的力值,差异有统计学意义( $t=9.07, P<0.05$ )。结论 骨质疏松状态下钛种植体周围骨形成始于其邻近区域,而非钛种植体表面,随后向外和向内两个方向生长,向外生长的速度大于向内生长的速度。

**[关键词]** 骨整合; 骨质疏松; 钛种植体; 距离成骨; 接触成骨

**Observation of dynamic peri-implant bone formation in status of osteoporosis** LIU Na, CHEN Lili. Department of Neurology, Xiasha Hospital District, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310018, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the peri-implant bone formation process of femoral metaphysis in the rats with osteoporosis. **Methods** Twelve weeks after bilateral ovariectomy, sandblasted and acid-etched titanium implants were longitudinally inserted into femoral metaphysis of ovariectomized (OVX) rats. After 6 weeks and 12 weeks, distal femora were retrieved and subjected to histological observation, scanning electron microscope (SEM) analysis and biomechanical test, and the indexes of two time points were compared. **Results** Fluorescence labeling revealed that peri-implant bone formation originated from the area adjacent to implants and grew towards outside and inside. The outside speed ( $0.91 \mu\text{m}$  per day) was significantly faster than the inside speed ( $0.75 \mu\text{m}$  per day) ( $t=-2.27, P<0.05$ ). From 6 weeks to 12 weeks, the bone-to-implant contact (BIC) was increasing while bone area ratio (BA) was decreasing ( $t=-5.40, 2.79, P<0.05$ ). SEM showed that the gap was existed between implants and the surround bone after 6 weeks of implantation, but it was rarely to found in 12-week specimens. Biomechanical test showed that the maximum load was significantly higher in 12-week specimens than that in 6-week specimens ( $t=9.07, P<0.05$ ). **Conclusion** Peri-implant bone formation originated from the adjacent areas of implants, but not from implant surface in osteoporotic femoral metaphysis. Then, it grew towards outside and inside, and the outside speed was faster than the inside speed.

**[Key words]** osseointegration; osteoporosis; implants; distance osteogenesis; contact osteogenesis

钛种植体广泛应用于牙缺失修复、骨折固定和关节置换等医学领域中,并取得了满意的临床效果。通过多年的研究,目前对正常骨质中骨整合过程已经有较深入的了解。大量的研究亦已证实通过

钛种植体表面处理技术的改善以及药物对机体的干预,在骨质疏松状态下钛种植体仍能取得理想的整合效果<sup>[1,2]</sup>。然而对骨质疏松条件下的钛种植体骨整合过程所知甚少。在该种条件欠佳的骨质中,骨整合过程是否与正常条件下一致尚值得探讨。本次研究探索了骨质疏松状态下钛种植体周围的骨形成过程。现报道如下。

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2017.02.003

作者单位:310018 浙江杭州,浙江大学医学院附属邵逸夫医院下沙院区、杭州市下沙医院神经内科

## 1 资料与方法

1.1 钛种植体的处理 本次实验于2014年9月至2015年8月实施,实验中柱状纯钛种植体由四川大学国家生物医学材料工程技术研究中心提供,直径为1.1 mm、长度为12 mm。参照文献[3]的表面清洁处理方法处理钛种植体。

1.2 钛种植体的表征 涂层制备完成之后,分别对两种涂层材料的理化特性进行检测。分别在3个样本上随机选择3个不同的区域,采用扫描电镜观察钛种植体涂层的表面形貌。

1.3 骨质疏松动物模型的建立 选取3月龄清洁级雌性SD大鼠32只(由四川大学华西实验动物中心提供),体重大约为200~220 g,自由饮水、定时摄食。动物饲养在可控的环境中,温度为25℃,湿度为55%。新购入的动物预饲养一周,使其适应饲养环境。然后进行双侧卵巢摘除术:采用盐酸氯胺酮75 mg/kg和盐酸甲苯噻嗪5 mg/kg腹腔内注射麻醉,于背部正中作长约2 cm的皮肤切口;皮下潜行分离之后,于脊柱侧方约1 cm处垂直切开腹外斜肌暴露腹腔;于腹后壁的脂肪组织中仔细寻找卵巢及输卵管,完全摘除双侧卵巢,结扎止血,依次缝合肌肉和皮肤。

1.4 钛种植体植入手术 双侧卵巢切除术12周之后,在大鼠股骨干骺端行钛种植体植入手术,左右各植入一颗。在动物麻醉、皮肤准备和消毒处理之后,于双侧膝关节内侧做长约2 cm的皮肤切口;保持胫骨屈曲状态,切开膝关节内侧肌肉和关节囊,将髌骨和背伸肌肉组织翻到外侧,暴露股骨的膝关节面;之后用直径为1.2 mm的慢速钻头于股骨的髌间切迹处打孔,经过股骨远端的干骺端达骨髓腔,钻孔时用无菌0.9%氯化钠注射液持续冷却;之后将准备好的钛种植体沿此通道轻轻插入股骨干骺端及骨髓腔内,直到钛种植体末端位于关节面以上为止;复位髌骨和背伸肌肉组织,分层缝合<sup>①</sup>。术后3 d给予注射用青霉素钠40万U/kg以预防感染。

1.5 荧光标记 分别于钛种植体植入后第21天时皮下注射盐酸四环素30 mg/kg,第35天时注射钙黄绿素15 mg/kg。术后6周时,处死动物,将含钛种植体的股骨干骺端在70%的酒精中固定7 d。乙醇梯度脱水后,用甲基丙烯酸甲酯包埋,在流水冷却之下,使用硬组织切片机沿垂直于钛种植体长轴的方向在骺板以上制作200 μm厚的切片,然后磨片至约40 μm厚,最后在荧光显微镜下观察并计算骨矿质沉积率(mineral apposition rate, MAR)。

1.6 不脱钙组织学检测 分别于钛种植体植入6周和12周后,取股骨样本并即刻固定于4%多聚甲醛中,共固定10 d,流水冲洗后在乙醇中梯度脱水,标本用甲基丙烯酸甲酯包埋,制备非脱钙的硬组织切片。切片以苦味酸-酸性品红和甲苯胺蓝染色。选择骺板上约2 mm处的切片行组织形态定量学检测。感兴趣区选定在钛种植体表面向外延伸100 μm的环形区域。采用图像分析软件Image Pro-plus 6.0对显微图像进行相对骨面积(bone area ratio, BA)和骨-钛种植体接触率(bone-to-implant contact, BIC)的定量分析。BA是指感兴趣区内骨组织的面积所占总面积的百分比,BIC则是指界面上骨和钛种植体直接接触的长度占钛种植体周长的百分比。

1.7 扫描电镜分析 6周和12周的股骨标本固定、脱水及包埋后,用硬组织切片机沿垂直于钛种植体长轴的方向在骺板以上制作0.5 mm厚的切片。样本溅射喷金后,用扫描电镜检测钛种植体与周围骨接触状况。

1.8 生物力学分析 将股骨远心端骨骺分离去掉,暴露钛种植体长约2.5 mm,在万能力学试验机上加载垂直向力量使钛种植体移动。加载速度为1 mm/min,匀速加载,记录载荷-位移曲线。根据此曲线获得使钛种植体移动的最大力值。

1.9 统计学方法 采用SPSS 16.0进行统计分析。计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。计量资料比较采用 $t$ 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 钛种植体的表面形态见封二图1

由封二图1可见,钛种植体涂层形貌总体上均匀一致,表面可见窝状和裂隙状凹陷,窝状形态从不足1微米至数微米不等。

2.2 新骨向钛种植体外围生长宽度 向外围生长的骨宽度MAR为0.91 μm/d,向内生长的骨宽度MAR为0.75 μm/d,前者约是后者的1.21倍,差异有统计学意义( $t = -2.27, P < 0.05$ )。

### 2.3 不脱钙组织形态学分析见封二图2

由封二图2可见,与12周样本比较,6周时钛种植体周围的骨量较多,但在多数区域周围骨与钛种植体间存在间隙,且周围骨不连续。12周样本中周围骨骨量较少,也存在不连续骨带,但周围骨与钛种植体间的间隙较少。6周时BA和BIC分别为(27.12 ± 2.62)%和(31.34 ± 3.48)%,12周时BA和BIC分别为(23.40 ± 3.28)%和(41.21 ± 4.64)%,从钛种植体植

入后6周到12周BA下降,而BIC增加,差异均有统计学意义( $t$ 分别=2.79、-5.40, $P$ 均 $<0.05$ )。

#### 2.4 钛种植体及周围结构的扫描电镜特点见封二图3

由封二图3可见,6周样本中,在多数区域钛种植体与周围骨之间存在间隙,这些间隙在数微米至数十微米不等,而在12周样本中,这种间隙较少出现。

#### 2.5 荧光标记的动态骨形成见封二图4

由封二图4可见,在大部分区域新骨从钛种植体邻近区域(而非钛种植体表面)向外围生长,同时也向钛种植体表面生长。

2.6 生物力学检测 6周组最大推出力为22.2 N,12周组为37.5 N,后者是前者的1.69倍,差异有统计学意义( $t=9.07$ , $P<0.05$ )。

### 3 讨论

目前钛种植体周围骨形成包括两种生物型:接触成骨和距离成骨。前者从机体骨表面向钛种植体生长,主要出现于钛种植体周围有骨组织存在的区域;后者源于骨髓的骨生成细胞附着至钛种植体表面,进而分泌骨基质,新骨逐渐由钛种植体表面向外围扩展,主要见于钛种植体接触骨髓的区域或骨改建区<sup>[7,8]</sup>。然而在骨质疏松状态下,由于骨表现为持续而缓慢的骨量丧失伴随骨组织的显微结构退化,炎症因子增加,成骨细胞及破骨细胞的生物学行为也随之变化,成骨细胞对机体系统或局部营养因子反应功能下降<sup>[9]</sup>。所有这些改变最终可能影响钛种植体骨整合<sup>[10]</sup>。

本次研究荧光标记显示钛种植体周围骨形成始于其邻近区域,并向外围生长,同时向内生长。向外生长的速度大于向内生长的速度( $P<0.05$ )。可见本次研究中在多数区域钛种植体周围骨的生长部位在钛种植体附近区域,而非钛种植体表面。随后骨形成从起始处向两个相反方向推进,这种生长方式在以往的研究中未见报道,是一种新的成骨方式。本次研究显示在骨质疏松状态下钛种植体周围骨生成方式不同于以往研究结论。原因可能是以往研究是在正常动物体内观察钛种植体周围骨形成,而不是在骨质疏松状态下观察的。

本次研究结果显示,从6周到12周,BIC增加,BA下降( $P$ 均 $<0.05$ )。扫描电镜分析显示,6周时在部分区域钛种植体与周围骨存在间隙,12周时这种间隙很少出现。生物力学测试发现,12周时的推出力值明显大于6周时的力值( $P<0.05$ )。在正常机体内,钛种植体植入后5~7 d开始出现明显的骨形成<sup>[5,6]</sup>。6周的

样本很多区域在电镜下并未实现骨与钛种植体的直接接触(骨整合),而是存在数微米至数十微米的间隙,而这样窄的间隙在光学显微镜下不容易分辨,从而误认为是骨整合。而12周的样本中这样的间隙较少存在,推测随着钛种植体周围骨向钛种植体表面生长,进一步改善了骨整合。因此,虽然钛种植体周围骨向内生长的速度小于向外生长的速度,但前者在促进骨整合进而增加钛种植体的生物学稳定性方面可能更加重要。生物力学方面的结果也支持这一推测,与6周时相比,12周时钛种植体推出力值明显增大( $P<0.05$ )。

综上,骨质疏松状态下钛种植体周围骨形成始于其邻近区域,而非钛种植体表面,随后骨向外和向内两个方向生长,向外生长的速度大于向内生长的速度。随着骨形成和骨改建,BIC逐渐增加,而BA有所下降。由于本次研究仅选择了钛种植体植入后6周和12周两个时间点进行观察分析骨质疏松状态下钛种植体周围骨形成动态,时间点偏少,如果能增加观察监测点,将能更好地揭示骨形成过程。同时增加时间点后选用不同的荧光色素标记,可以进一步明确在不同时间段骨生长方向。

#### 参考文献

- 1 Yang G, Song L, Guo C, et al. Bone responses to simvastatin-loaded porous implant surfaces in an ovariectomized model[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2012, 27(2):369-374.
- 2 Almagro MI, Roman-Blas JA, Bellido M, et al. PTH[1-34] enhances bone response around titanium implants in a rabbit model of osteoporosis[J]. Clin Oral Implants Res, 2013, 24(9):1027-1034.
- 3 Cacchioli A, Ravanetti F, Bagno A, et al. Human vitronectin-derived peptide covalently grafted onto titanium surface improves osteogenic activity: A pilot in vivo study on rabbits[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(10):2917-2926.
- 4 Gao Y, Zou S, Liu X, et al. The effect of surface immobilized bisphosphonates on the fixation of hydroxyapatite-coated titanium implants in ovariectomized rats[J]. Biomaterials, 2009, 30(9):1790-1796.
- 5 Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, et al. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants[J]. Clin Oral Implants Res, 2003, 14(3):251-262.
- 6 Colnot C, Romero DM, Huang S, et al. Molecular analysis of healing at a bone-implant interface[J]. J Dent Res,



- Am J Ophthalmol, 2014, 157(6):1144-1150.
- 12 Lindholm J. Problems in Interpretation of the short ACTH test: an update and historical notes[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2015, 123(8):441-445.
- 13 Tobias JD. Etomidate in pediatric anesthesia: Where are we now? [J]. Saudi J Anesth, 2015, 9(4):451-456.
- 14 邵忠新. 依托咪酯乳剂靶控输注全麻复合硬膜外麻醉对

老年人肾上腺皮质功能的影响[D]. 吉林: 延边大学, 2012.

15 张永洪, 夏氢, 何伟. 依托咪酯靶控输注联合表面麻醉用于老年白内障患者超声乳化手术的临床研究[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(14):1613-1616.

(收稿日期 2016-08-18)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第 131 页)

- 2007, 86(9):862-867.
- 7 Marco F, Milena F, Gianluca G, et al. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis[J]. Micron, 2005, 36(7-8):630-644.
- 8 Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing[J]. J Dent Educ, 2003, 67(8):932-949.
- 9 García-Moreno C, Catalán MP, Ortiz A, et al. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women[J].

Bone, 2004, 35(1):170-177.

- 10 Duarte PM, César Neto JB, Gonçalves PF, et al. Estrogen deficiency affects bone healing around titanium implants: A histometric study in rats[J]. Implant Dent, 2003, 12(4):340-346.

(收稿日期 2016-04-23)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第 139 页)

环甲膜穿刺用于FOB经鼻清醒插管比传统盲探法更能提高阻滞效果,也避免了盲探环甲膜穿刺引起的气道黏膜划伤、颈部血肿、气胸,甚至纵隔气肿,降低了气道损伤并发症发生。

#### 参考文献

- 1 Hopkins PM. Ultrasound guidance as a gold standard in regional anaesthesia[J]. Br J Anaesth, 2007, 99(1):299-301.
- 2 滕永杰, 李军, 上官王宁, 等. 利多卡因雾化吸入用于纤维支气管镜引导清醒气管插管患者的效果观察[J]. 临床麻醉学杂志, 2011, 27(4):346-348.
- 3 陈辉, 许丽双, 杨庆. 喉上神经阻滞复合芬太尼和咪达唑仑用于经鼻纤维支气管镜清醒气管插管的效果[J]. 中国内镜杂志, 2008, 14(10):1029-1031.
- 4 Fulling PD, Roberts JT. Fiberoptic intubation[J]. Int Anesthesiol Clin, 2000, 38(3):189-217.
- 5 Elliott DS, Baker PA, Scott MR, et al. Accuracy of surface landmark identification for cannula cricothyroidotomy [J]. Anaesthesia, 2010, 65(9):889-894.
- 6 Lamb A, Zhang J, Hung O, et al. Accuracy of identifying the cricothyroid membrane by anesthesia trainees and staff in a Canadian institution[J]. Can J Anaesth, 2015, 62(5):495-

503.

- 7 Stopar-Pintaric T, Vlassakov K, Azman J. The thyrohyoid membrane as a target for ultrasonography-guided block of internal branch of superior laryngeal nerve[J]. J Clin Anesth, 2015, 27(7):548-552.
- 8 Barbe N, Martin P, Pascai J, et al. Locating the cricothyroid membrane in learning phase: value of ultrasonography? [J]. Ann Fr Anesth Reanim, 2014, 33(3):163-166.
- 9 Nagashima M, Kunisawa T, Takahata O, et al. Dexmedetomidine infusion for sedation during awake intubation[J]. Masui, 2008, 57(6):731-734.
- 10 Chu KS, Wang FY, Hsu HT, et al. The effectiveness of dexmedetomidine infusion for sedating oral cancer patients undergoing awake fiberoptic nasal intubation[J]. Eur J Anaesthesiol, 2010, 27(1):36-40.
- 11 Takahashi H, Suzuki T, Onisi T, et al. Anesthesia induction for patients with cervical spinal disease [J]. Masui, 2009, 58(3):337-341.
- 12 张伟, 张加强, 孟凡民, 等. 不同负荷剂量右旋美托咪定对成人清醒气管插管的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(11):1075-1077.

(收稿日期 2016-12-26)

(本文编辑 蔡华波)