

钛网应用于即刻种植骨缺损骨再生的实验研究

王晨辰 刘向辉 孙卫革 尹伟 程义成 张磊

摘要 目的 通过动物实验观察钛网联合引导骨组织再生技术(GBR)在不同植体即刻种植周围骨缺损骨再生过程中的实际成骨效果。方法 6只成年健康比格犬,拔除双侧下颌2、3、4前磨牙,一侧植入韩国DIO植体4枚,另一侧植入ITI植体4枚。每颗植体周围制作垂直-水平联合型骨缺损,8枚植体按照处理方法不同分为4组:对照组、GBR组、钛网+骨粉组、钛网+GBR组。6个月后处死实验犬,通过直观测量、硬组织切片和新生骨形成率比较各组骨再生效果。结果 酸蚀喷砂(SLA)表面的植体周围骨再生各项指标均明显优于可吸收研磨介质(RBM)表面;组间相比差异均有统计学意义($P < 0.05$),钛网+GBR组骨再生效果最佳,GBR组和钛网+骨粉组次之,对照组最差,其中GBR组和钛网+骨粉组差异无统计学意义。结论 SLA表面处理方法有利于即刻种植周围骨缺损的骨整合;钛网联合GBR技术作为一种即刻种植周围骨缺损骨再生的新方法,效果稳定可靠。

关键词 钛网;即刻种植;垂直-水平联合型骨缺损;引导骨

组织再生技术

中图分类号 R 782.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0814-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.008

传统观点认为,拔牙后3~6个月行牙种植体植入术^[1-2]。为了缩短患者缺牙的时间,拔牙后即刻种植近年来被临床广泛采用,由于拔牙后牙槽窝的形态难以与种植体外形相匹配,加上拔牙过程中造成的牙槽窝骨壁缺损对种植体早期稳定及远期效果均有不利的影响,因而探索一种使种植区骨缺损骨再生的方法成为国内外口腔种植医生关注的热点。引导骨组织再生技术(guided bone regeneration technique, GBR)因操作简单、效果稳定被广泛使用,但在垂直-水平联合型环状骨缺损时,植骨材料常发生移位吸收导致成骨效果差,而钛网能够为骨缺损区提供稳定的空间维持效果。该实验通过构建犬种植体周围骨缺损动物模型,观察并对比不同方法^[3]处理后骨再生效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年清洁型比格犬6只,雄性,由南京市浦口区莱芙养殖场提供,南京军区总医

2017-02-05 接收

基金项目:2014年度南京军区医学科技创新课题面上项目(编号:14MS045)

作者单位:安徽医科大学解放军八一临床学院口腔科,南京 210002

作者简介:王晨辰,男,硕士研究生;

刘向辉,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: njbyliuxh864234@sina.com

Homocysteine induces mitochondrial dysfunction in Caco-2 cells

Yang Qing, Yuan Jingjing, Shi Hai, et al

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University,

The Key Laboratory of Digestive Disease of Anhui Province, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of homocysteine (Hcy) on the growth of Caco-2 cells and the changes of mitochondrial function. **Methods** Caco-2 cells were cultured and treated with Hcy in different concentrations (0, 10, 25, 50, 100, 500, 1 000 $\mu\text{mol/L}$) and different times (3, 6, 12, 24 h). MTT method and LDH activity were examined to understand the change of cell growth viability. MDA, SOD, SDH, GSH-Px, ATPase and mitochondrial swelling degree were detected to understand the changes of mitochondrial function. **Results** After treatment with Hcy, the viability of Caco-2 cells were significantly inhibited with a dose and time dependent manner. Compared with the control group, the levels of LDH, MDA, SOD, GSH-Px increased significantly, and the levels of SDH and ATPase decreased. Compared to the normal control group, experimental groups mitochondria swelling degree was not decreased significantly. **Conclusion** Hcy has a significant inhibitory effect on the mitochondrial function of Caco-2 cells in a dose- and time-dependent manner.

Key words homocysteine; inflammatory bowel disease; mitochondria; oxidative stress; intestinal permeability

院比较医学中心负责饲养, 14 ~ 16 (15 ± 1) 个月, (19 ± 1) kg, 全身及口腔无疾病, 普通环境下饲养, 自由饮水, 环境温度 19 ~ 22 °C, 湿度 50% ~ 60%。

1.2 实验器材与药品 韩国 DIO 种植体 (3.8 mm × 10 mm) (韩国 DIO 种植器械公司); 瑞士 ITI 种植体 (3.8 mm × 10 mm) (瑞士士卓曼公司); Bio-Oss 骨粉 (瑞士盖氏制药有限公司); 吉特瑞胶原修复膜 (GTR 膜, 福建省博特生物科技有限公司); 钛网 (韩国奥齿泰种植器械公司); 盐酸赛拉嗪注射液 (吉林敦化圣达动物药品有限公司); 丙泊酚 (武汉省乐泰医药有限公司); 地西洋/硫酸阿托品 (天津金耀药业有限公司); 莱卡硬组织切片机 (北京大学口腔医院提供)。

1.3 实验方法

1.3.1 骨缺损模型的建立 所有比格犬分笼适应性饲养两周, 按 0.1 ml/kg 肌肉注射盐酸赛拉嗪注射液进行全麻, 辅助阿托品及地西洋保证麻醉效果, 术中丙泊酚控制麻醉深度。固定实验犬四肢, 取侧卧位, 常规铺巾消毒, 必兰麻口内术区浸润麻醉。拔除双侧下颌 2、3、4 前磨牙, 清理拔牙窝。分别以同侧第一磨牙近中牙槽嵴边缘为参考, 利用慢速直机配小球钻及小骨凿制作骨缺损模型, 均匀磨除一定骨皮质, 去骨精度以千万游标卡尺测定, 使种植区牙槽嵴垂直高度均匀降低 4 mm, 牙槽窝边缘距种植体表面 2 mm, 磨平创缘锐利骨尖, 术中持续给予大量生理盐水冲洗降温, 避免骨组织坏死, 见图 1。

1.3.2 分组处理骨缺损 在制作好的骨缺损模型上, 选择合适位点制备种植窝, 一侧即刻植入韩国 DIO 种植体 4 枚 (3.8 mm × 10 mm), 该种植体表面为酸式喷砂 (sand blast large grit and acidetched, SLA); 另一侧植入瑞士 ITI 种植体 4 枚 (3.8 mm × 10 mm), 该种植体表面为可吸收研磨介质 (resorbable blast media, RBM) 为了保证初期稳定性, 所有种植体植入扭矩均控制在 35 ~ 55 N·cm, 旋紧闭合螺丝, 使骨缺损底部

到种植体顶端距离相同, 用电子游标卡尺及牙周探针测量骨缺损垂直深度 (defect depth, DD) 值及水平宽度 (defect width, DW) 值, 记为基线数据^[4]。根据实验设计不同方法对每侧 4 枚种植体进行处理: 对照组 (骨缺损区不做任何处理)、GBR 组 (Bio-oss 骨粉 + GTR 膜)、钛网 + 骨粉组 (骨缺损区固定钛网 + GTR 膜)、钛网 + GBR 组 (Bio-oss 骨粉 + 钛网 + GTR 膜)。为避免钛网及种植体暴露, 潜行分离颊舌侧黏骨膜瓣, 术区减张褥式缝合。术中青霉素静脉滴注 (80 万 U/d), 术后肌注青霉素 (80 万 U/d) 预防感染。饲以软食, 10 d 后拆除缝线, 见图 2。

1.4 统计学处理 6 个月后处死实验犬。制备下颌骨标本, 通过大体观察、直观测量、硬组织切片及新生骨形成率指标来观察骨缺损处骨修复的效果。采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理, 所有计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 直观测量数据采用单因素方差分析, 新生骨形成率采用 χ^2 检验, 检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大体观察与直观测量 所有实验犬术后均健康存活, 口腔卫生良好, 牙龈无红肿、溃烂, 未见钛网及种植体暴露, 所有种植体均稳定无脱落。基线时每个种植体周围骨缺损区直观测量所得数据组间比较差异无统计学意义。经过 6 个月骨再生后, 显示酸蚀喷砂 (sand blast large grit and acidetched, SLA) 组有大量新骨形成, 未见剩余骨粉, 新骨外形良好, 骨再生效果明显优于可吸收研磨介质 (resorbable blast media, RBM) 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同种植体不同处理方法之间, 每一种处理方法与对照组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中 GBR 组与钛网 + 骨粉组之间差异无统计学意义, 骨再生效果: 钛网 + GBR 组 > GBR 组 > 钛网 + 骨粉组 > 对照组。见表 1、2。



图 1 骨缺损模型的建立

A: 比格犬麻醉; B: 拔除双侧下颌前磨牙; C: 制备骨缺损模型

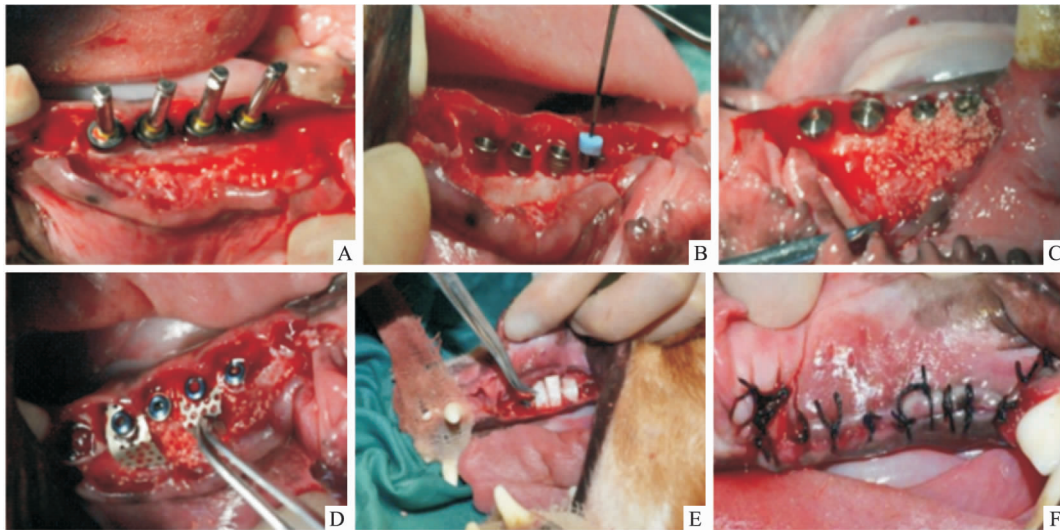


图2 分组处理骨缺损

A: 每侧四枚植体; B: 骨缺损指标测量; C: Bio-oss 骨粉充填; D: 钛网固定; E: GTR 膜覆盖; F: 严密缝合

表1 ITI 植体直观测量各项骨缺损指标值 (mm $n=6 \bar{x} \pm s$)

SLA	对照组		GBR 组		钛网 + 骨粉组		钛网 + GBR 组		F 值
	基线期	6 个月	基线期	6 个月	基线期	6 个月	基线期	6 个月	
DD 值	3.95 ± 0.15	3.76 ± 0.17	3.93 ± 0.17	2.83 ± 0.18*	3.87 ± 0.13	2.63 ± 0.12*	3.92 ± 0.18	0.99 ± 0.13*#	17.39
DW 值	1.98 ± 0.04	1.82 ± 0.09	1.99 ± 0.08	1.02 ± 0.05*	1.95 ± 0.11	0.95 ± 0.07*	1.96 ± 0.10	0.24 ± 0.08*#	6.18

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 GBR 组比较: # $P < 0.05$

表2 DIO 植体直观测量各项骨缺损指标值 (mm $n=6 \bar{x} \pm s$)

RBM	对照组		GBR 组		钛网 + 骨粉组		钛网 + GBR 组		F 值
	基线期	6 个月	基线期	6 个月	基线期	6 个月	基线期	6 个月	
DD 值	4.01 ± 0.16	3.95 ± 0.24	3.91 ± 0.21	2.96 ± 0.21*	3.85 ± 0.35	2.83 ± 0.25*	3.94 ± 0.15	1.35 ± 0.18*#	16.47
DW 值	2.02 ± 0.05	1.93 ± 0.11	1.99 ± 0.06	1.24 ± 0.13*	1.96 ± 0.21	1.05 ± 0.12*	1.88 ± 0.24	0.61 ± 0.21*#	5.96

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 GBR 组比较: # $P < 0.05$

2.2 组织学观察制备 带种植体下颌骨标本, 置于 10% 甲醛溶液固定, 梯度乙醇脱水, 甲基丙烯酸甲酯包埋, 制作带种植体骨组织磨片, 亚甲基蓝染色, 光学显微镜下观察, 可见钛网 + GBR 组: 种植体颈部表面大量新骨沉积, 原植体冠方与牙槽窝骨壁之间的间隙消失, 缺损区水平骨高度明显恢复, 植体表面与新生骨形成牢固骨整合, 缺损区全部被新骨充填, 骨小梁排列整齐有序, 未见剩余骨粉颗粒, 未见结缔组织长入。GBR 组及钛网 + 骨粉组之间无明显差异: 两组植体表面均有部分新骨生成, 可见少量成骨细胞, 但较钛网 + GBR 组有明显减少, 植体颈部与骨组织间隙仍清晰可见, 骨缺损区根方小部分地区可见新骨形成, 无明显骨小梁结构, 其余缺损区有大量纤维结缔组织长入。对照组: 未见成骨细胞, 缺损区几乎未见新骨形成, 可见大量纤维结缔组织长入。

见图 3。

2.3 新生骨形成率 测出各植体周围骨缺损高度值和新生骨高度, 根据公式计算出新生骨形成率, 经比较发现各组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 钛网 + GBR 组新生骨形成率最高。由表 3 与表 4 可见, SLA 组不同方法处理后新生骨形成率均明显优于 RBM 组。

表3 ITI 植体骨再生后新生骨形成率 ($n=6 \bar{x} \pm s$)

SLA 组	骨缺损高度 (mm)	新生骨高度 (mm)	新生骨形成率 (%)
对照	4.02 ± 0.23	0.15 ± 0.03	4.21
钛网 + 骨粉	3.98 ± 0.31	1.56 ± 0.41*	39.21
GBR	3.99 ± 0.15	1.82 ± 0.33*	46.34
钛网 + GBR	4.05 ± 0.14	3.68 ± 0.28*#	91.24

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与钛网 + 骨粉组和 GBR 组比较: # $P < 0.05$

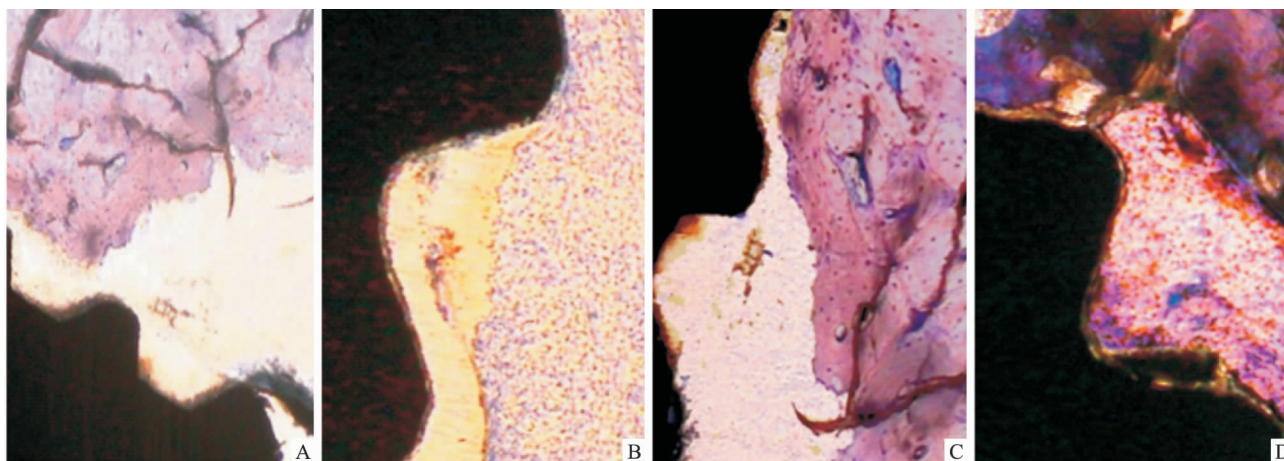


图3 骨缺损处处理后6个月骨再生情况 亚甲基蓝染色×40
A:对照组;B:GBR组;C:钛网+骨粉组;D:钛网+GBR组

表4 DIO植体骨再生后新生骨生成率(n=6 $\bar{x} \pm s$)

RBM组	骨缺损高度 (mm)	新生骨高度 (mm)	新生骨形成率 (%)
对照组	4.05 ± 0.37	0.05 ± 0.06	1.24
钛网+骨粉组	4.01 ± 0.42	0.99 ± 0.27*	25.34
GBR组	3.89 ± 0.51	1.05 ± 0.16*	27.75
钛网+GBR组	3.96 ± 0.24	2.66 ± 0.43*#	67.16

与对照组比较: * P < 0.05; 与钛网+骨粉组和GBR组比较: # P < 0.05

3 讨论

3.1 即刻种植骨缺损动物模型的建立 利用动物模型研究即刻种植周围骨缺损^[5]骨再生的过程,进而为临床实践提供依据。成年犬牙槽骨较宽,骨质致密,且内部骨小梁结构^[6]与人类牙槽骨最为接近,其中Beagle犬是建立实验性种植体周围骨缺损动物模型的理想对象^[7]。实验性动物模型是在实验动物口腔内拔牙原位或者身体其他部位按照实验设计人为制造出符合临床实际的骨缺损动物模型。目前临床上因牙周病拔除松动患牙并在缺牙区行即刻种植术的患者占据了即刻种植总病例的50%以上,而牙周病患者失牙后剩余牙槽嵴垂直高度和水平宽度往往严重不足^[8]。拔除比格犬双侧下颌前磨牙后降低待种植区牙槽嵴垂直高度及水平宽度,成功建立了符合临床实际的种植体周围垂直-水平联合型骨缺损动物模型。

3.2 钛网在即刻种植骨缺损骨再生中的促进作用 充足的骨量及良好的骨质是保证种植体获得良好的初期稳定性及远期修复效果的必然条件。有研究^[9]证实当种植区出现了垂直-水平联合型骨缺

损时采用常规的骨增量方法骨再生效果很差。常用的可吸收性屏障膜因为缺乏自成形能力而难以提供有效的成骨空间,且术后可能因唇颊肌的运动发生折叠、脱落,造成植骨材料移位吸收,进而影响成骨效果。而钛网自身具有一定的强度和可塑性,可以提供稳定的成骨空间,同时可以塑造新生骨的轮廓外形。有研究^[10]表明钛网表面光滑且多细小空隙,有利于两侧骨质之间血液循环,促进骨再生及植体与骨的结合。使用钛网作为屏障膜,垂直向及水平向骨增量可以达到10mm,研究^[11]表明患者长期使用钛网其骨吸收量明显小于未使用钛网者。Maiorana et al^[12]于2011年证实钛网可以单独用于水平骨缺损或垂直型骨缺损的骨修复手术,同时对于垂直-水平联合型骨缺损的骨再生也有明显的促进作用。有报道^[13]称钛网的应用可以使骨缺损处骨再生的成功率提高50%。骨再生6个月后可见骨缺损处大量新骨形成,未见Bio-Oss骨粉颗粒剩余。

3.3 不同表面处理技术对即刻种植骨缺损骨再生的影响 近年来,有研究者对植体表面理化性能进行了大量的研究,显示粗糙的表面比光滑钛表面更有利于骨整合^[14]。常见的表面处理方式包括SLA表面、RBM表面。RBM表面处理方式则是在特定的压力、气流条件下将碳酸钙陶瓷材料喷涂在种植体表面,使表面粗糙无规则,提高骨整合率。但是这种处理方法往往会残留一些喷涂颗粒,在植体植入患者体内之后释放出来,影响骨整合甚至造成不必要的感染。因此有研究者提出对喷涂过的表面进行酸蚀,经过酸蚀的钛植体表面清洁无污染,且形貌均匀一致,其骨整合有效表面积较大,有利于骨缺损处

的骨再生^[15]。

参考文献

[1] Freitas Júnior A C , Goiato M C , Pellizzer E P , et al. Aesthetic approach in single immediate implant—supported restoration [J]. *J Craniofac Surg* 2010 , 21(3) :792 – 6.

[2] Koh R U , Rudek I , Wang H L , et al. Immediate implant placement: positives and negatives [J]. *Implant Dent* 2010 , 19(2) :98 – 108.

[3] 尹 伟 , 刘向辉 , 孙卫革 等. 比格犬种植体周围炎骨缺损模型的建立 [J]. *医学研究生学报* 2016 , 29(1) :34 – 9.

[4] 尹 伟 , 刘向辉 , 孙卫革 等. 不同方法进行种周炎骨重建的对比研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2016 , 51(9) :1364 – 8.

[5] 马 莹 , 何慧宇 , 胡 杨. 即刻种植骨界面结合的 beagle 犬动物模型的建立 [J]. *新疆医科大学学报* 2009 , 32(4) :412 – 4.

[6] 王 磊 , 黄远亮 , 潘可凤. 实验性种植体周围骨缺损动物模型的建立 [J]. *中国组织工程研究与临床康复* 2009 , 13(33) :6561 – 4.

[7] 黄元瑾 , 章锦才 , 刘曙光 等. 种植体周围的骨缺损 beagle 犬动物模型的建立 [J]. *广东医学* 2010 , 31(18) :2340 – 2.

[8] Gentleman E , Fredholm Y C , Jell G , et al. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts *in vitro* [J]. *Biomaterials* 2010 , 31(14) :3949 – 56.

[9] Becker W , Becker B , Handlesman M , et al. Guided bone regen-

eration for implants placed into extraction sockets: a study in dogs [J]. *J Periodontol* ,1991 , 62(11) :703 – 9.

[10] Ricci L , Perrotti V , Ravera L , et al. Rehabilitation of deficient-alveolar ridges using titanium grids before and simultaneously with implant placement: a systematic review [J]. *J Periodontol* , 2013 , 84(9) :1234 – 42.

[11] Torres J , Tamimi F , Alkhraisat M H , et al. Platelet-rich plasma may prevent titanium-mesh exposure in alveolar ridge augmentation with anorganic bovine bone [J]. *J Clin Periodontol* , 2010 , 37(10) :943 – 51.

[12] Maiorana C , Santoro F , Rabagliati M , et al. Evaluation of the use of iliac cancellous bone and anorganic bovine bone in the reconstruction of the atrophic maxilla with titanium mesh: a clinical and histologic investigation [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants* , 2011 , 16(3) :427 – 32.

[13] Khojasteh A , Morad G , Behnia H. Clinical importance of recipient site characteristics for vertical ridge augmentation: a systematic review of literature and proposal of a classification [J]. *J Oral Implantol* , 2013 , 39(3) :386 – 98.

[14] 左 杨 , 夏 荣 , 屠姗姗 等. 纯钛种植体表面的纳米改性研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2013 , 48(10) :1214 – 6.

[15] 刘 阳 , 赵宝红. 种植体表面改性方法的研究进展 [J]. *中国实用口腔科杂志* 2010 , 3(6) :373 – 5.

The experimental study of titanium mesh applied to bone regeneration in immediate implant bone defect

Wang Chenchen , Liu Xianghui , Sun Weige , et al

(Dept of Stomatology , The PLA 81st Hospital of Anhui Medical University , Nanjing 210002)

Abstract Objective To observe the effect of titanium mesh combined with guided bone regeneration technique (GBR) technique in the bone regeneration of immediate implantation of bone defect around titanium mesh. **Methods** 6 healthy adult beagle dogs were 2 , 3 , 4 mandibular premolars , DIO implant was implanted into one side of South Korea 4 , the other side of the implantation of ITI implants 4. Each implant making combined vertical horizontal bone defect , 48 implants according to the different treatment methods were divided into four groups: control group , GBR group , titanium mesh bone and titanium mesh group + GBR group. After 6 months , the experimental dogs were sacrificed and the effect of bone regeneration was compared between the two groups by visual measurement , hard tissue section and new bone formation rate. **Results** Sandblasting etching (SLA) peri implant bone regeneration indicators were significantly better than the absorption of grinding medium surface treatment group (RBM) surface treatment group; group compared to find differences between the groups were statistically significant ($P < 0.05$) , titanium mesh group + GBR bone regeneration effect is the best , GBR group and titanium mesh bone meal + group the control group is the worst , there was no significant difference between GBR group and titanium mesh + bone meal group. **Conclusion** The SLA surface treatment method is beneficial to the immediate implantation of bone defect around bone; titanium mesh combined with GBR technology as a new method of immediate implantation of bone defect around bone defect , the effect is stable and reliable.

Key words titanium mesh; immediate implant; vertical and horizontal joint bone defect; guided bone regeneration technique