PHBV膜与 PHBV/SGBG 复合材料联合促进骨再生

唐 倩[1], 陈建洪[1], 王 萍[1], 田 词[1], 陈晓峰[2], 吴 刚[2]
(1. 中山大学附属第三医院口腔科, 广东 广州 510630; 2. 华南理工大学材料学研究所, 广东 广州, 510630)

摘 要:【目的】探讨聚羟基丁酸/羟基戊酸共聚酯 (PHBV) 膜与 3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸共聚物/溶胶-凝胶生物活性玻璃 (PHBV/SGBG) 多孔复合材料促进骨再生的能力。【方法】实验共采用 8 只健康杂种犬,每只犬分别于左、右胫骨各制作 2 个直径为 5 mm 的穿通骨髓腔的圆洞形骨缺损区,间隔 2 cm。双侧胫骨共建立 4 个骨缺损模型,将其随机分为四组: A 组,骨缺损内填充柱状 PHBV/SGBG 材料,并在其上方覆盖 PHBV 膜; B 组,骨缺损上方覆盖 PHBV 膜;C 组,骨缺损内填充柱状 PHBV/SGBG 材料;D 组,不放置任何东西。分别于术后 2 、4 、8 、12 周各处死 2 只动物,组织学观察不同实验条件下骨缺损区新骨组织生长情况。【结果】所有植入材料组(A 组、B 组、C 组)均未出现植入物排异反应。其中 A 组术后 2 周时,已有明显的新生骨岛形成;术后 12 周骨缺损区新生成熟骨组织再生。与其它实验组相比,A 组的骨缺损修复最早,新生骨的质量最好,骨结构与周围正常骨基本一致。而空白对照组中, 骨痂修复中可见纤维组织形成, 骨缺损区修复不全。【结论】PHBV 膜覆盖技术和 PHBV/SGBG 复合材料植入技术结合, 具有促进骨缺损区的骨组织修复的协同作用;PHBV 膜和 PHBV/SGBG 复合材料有望成为应用于引导骨组织再生的新一代材料。

关键词: 聚羟基丁酸/羟基戊酸共聚酯; 溶胶-凝胶生物活性玻璃; 复合材料; 骨缺损; 骨生成
中图分类号:R78 **文献标识码**: A **文章编号**:1672-3554(2008)02-0226-04

Ossification in Bone Defects after Treatment with PHBV Membrane and PHBV/SGBG Composite

TANG Qian[1], CHEN Jian-hong[1], WANG Ping[1], TIAN Ci[1], CHEN Xiao-feng[2], WU Gang[2]
(1. Department of Stomatology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 51000, China; 2. Institute of Crystal Materials, South China University of Technology, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】To evaluate the efficiency of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHBV) membrane and 3-bydroxybutyrate-co-3-bydroxyvalerate/sol-gel bioactive glass (PHBV/SGBG) composite for promoting bone regeneration in vivo.【Methods】Eight healthy dogs were used as experimental animals. Bone defects with 5 mm in diameter through marrow were created bilaterally in the tibia of the dogs respectively. Four identical defects in one dog were separated into four groups: group A (treatment with PHBV membrane and PHBV/SGBG composites), group B (treatment with PHBV membrane alone), group C (treatment with PHBV/SGBG composites alone), and group D (empty control). Autos-control was carried out in this study. Two dogs were sacrificed in 2, 4, 8, and 12 weeks after operation, respectively. The repairing effect was assessed by histological observation for the regeneration of osseous tissue.【Results】The clearance of the implants could not be seen in all experimental groups (group A, B, and C) during all implant periods. There were obviously new bone islands in group A at the 2nd week after the implantation, and there was new mature bone regeneration at the 12th week. The bone rehabilitation in group A was the earliest and the best among all the groups, and the new bone architecture was exactly the same as the natural osseous tissue around the defect. While, in group D, the fibrous tissue was observed inside the osteotylus, and the defect achieved insufficient repair.【Conclusion】PHBV membrane produces a synergistic effect to enhance new bone

收稿日期:2007-05-04
基金项目:广东省科技计划项目(2005B30901010); 广东省医学科研基金(A2003049)
作者简介:唐 倩(1968-),女,广东连州人,博士,副主任医师;陈建洪,通讯作者,E-mail: doodooer@126.com

formation in the defect when combined with PHBV/SGBG composite together, these two novel materials may become promising membrane and composite for guided bone regeneration.

Key words: polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHBV); sol-gel bioactive glass (SGBG); composite; bone defect; ossification

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(2):226-229]

骨再生的形状与数量取决于膜下空间的存在及保持,它是骨组织再生最值得注意的问题之一[1]。膜下空间的塌陷、减少会严重妨碍骨再生,因此膜下空间的保持是引导骨组织再生术的关键[2,3]。本研究采用 PHBV [poly (hydroxybutyrate-hydroxyvalerate), PHBV] 膜与 PHBV/SGBG [poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/sol gel bioactive glass, PHBV/SGBG]复合材料联合修复骨缺损,与 PHBV 膜覆盖组、PHBV/SGBG 复合材料植入组以及空白对照组进行比较,评价 PHBV 膜与 PHBV/SGBG 复合材料联合修复骨缺损的效果。

1　材料和方法

1.1　实验材料和动物

PHBV 膜和PHBV/SGBG复合材料由华南理工大学材料学研究所提供,环氧乙烷消毒备用。实验动物为 1 岁左右、体质量 10 ~ 12 kg 的健康杂种家犬 8 只,所有动物实验均在中山大学附属第三医院动物实验中心完成。

1.2　实验方法

选用犬胫骨中段内侧作直径大小为 5 mm 的穿通骨髓腔的洞形缺损[4],于左、右胫骨各制作 2 个洞形骨缺损区,间隔 2 cm,双侧胫骨共建立 4 个大小一致的骨缺损模型,将其随机分为四组:(A) PHBV 膜+ PHBV/SGBG 组,于骨缺损内填充柱状 PHBV/SGBG 材料,并在其上方覆盖 PHBV 膜;(B) PHBV 膜组,于骨缺损上方覆盖 PHBV 膜;(C) PHBV/SGBG 组,于骨缺损内填充柱状 PHBV/SGBG 材料;(D)空白对照组,不放置任何东西。各实验组骨缺损区按分组要求处理,充填的PHBV/SGBG材料完整填入缺损区,所有覆盖的膜材料,边缘均盖过骨缺损区 2 mm,两侧边缘塞入骨膜下固定,将翻起的骨膜瓣复位,盖于 PHBV 膜上。各组处理完毕后,将术区骨膜对位缝合,分层严密缝合皮下组织和皮肤。术后给予青霉素预防感染。分别于术后 2、4、8、12 周各处死动物 2 只,截取双侧胫骨,体积分数 2.5%的戊二醛固定 24 h,摄 X 线片后,将胫骨分切成包括一个骨缺损区在内的大小约为 10 mm × 10 mm × 10 mm 的标本,并从骨缺损区中间剖开标本,一半作病理切片,一半保存备用。

2　结　果

2.1　动物存活结果

术后观察实验动物的饮食、活动及伤口情况,结果全部实验动物于术后第 2 天开始正常进食,术后 1 周切口愈合,无一例出现伤口感染的情况。

2.2　PHBV 膜 + PHBV/SGBG组(A 组)病理结果

术后 2 周,膜下空间维持良好,未见结缔组织长入膜内;光镜下可见致密结缔组织结构的骨膜,其内层与骨断端处可见诱导分化的新生骨组织呈岛状(图 1A),缺损中央植入的材料呈浅粉色的无定型团块,其中出现不规则腔隙,内有血管侵入,大量间充质细胞进入材料间隙内,炎症反应不明显;术后 4 周,肉眼及 X 线检查均可见骨缺损区明显缩小,光镜下植入材料被分解吸收,周围有小梁骨出现,骨缺损区新骨形成量多(图 1B)。术后 8 周,骨缺损区密度明显增强;光镜下见成骨活跃,充满新生骨小梁,整个结构与松质骨相似,充填的材料大部分已降解。术后 12 周,骨缺损区已为成熟骨组织所替代,骨缺损表层皮质骨形成,与周围正常皮质骨融为一体,骨缺损完全愈合(图 1C)。

2.3　PHBV 膜(B 组)病理结果

术后 2 周,膜下空间维持良好,骨缺损表面光滑平整,光镜下见骨缺损区表面覆盖一层致密结缔组织结构的骨膜,但明显增厚,缺损区内间充质细胞增生明显,可见新生类骨基质形成。术后 4 周,骨缺损区表面平整;X 线检查和光镜下均可见骨缺损区内有新骨形成。术后 8 周,骨缺损区内新骨密度增加,光镜下见新生骨骨小梁变粗,融合在一起,腔隙多,细胞成份减少,但不成熟。术后 12 周,骨缺损区表层皮质骨形成,光镜下见皮质骨连

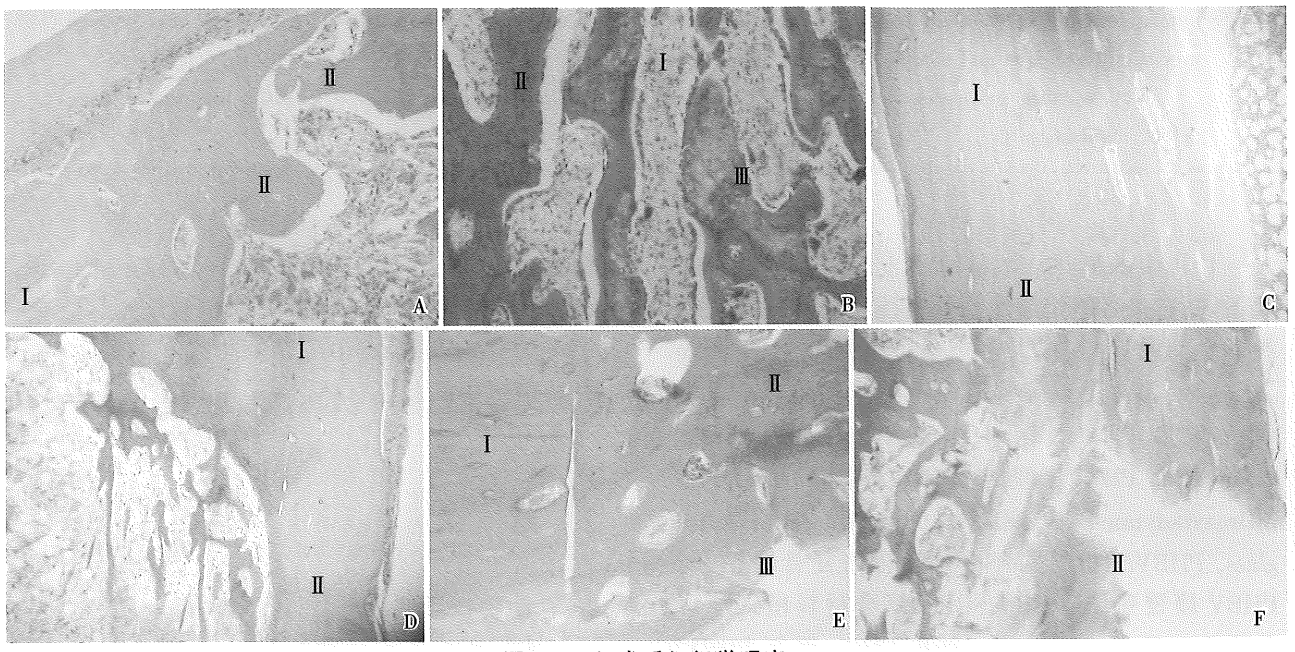


图1 四组术后组织学观察

Fig.1 Histological observation of 4 groups after operation

A: group A at the 2nd week (Ⅰ: normal bone; Ⅱ: newborn bone island; HE,×100); B: group A at the 4th week after operation (Ⅰ: PHBV/SGBG composite degraded obviously; Ⅱ: membrane bone formation; Ⅲ: enchondral bone formation; HE,×400); C: group A at the 12th week after operation (Ⅰ: normal bone; Ⅱ: newborn bone; HE,×40); D: group B at the 12th week after operation (Ⅰ: normal bone; Ⅱ: newborn bone; HE,×40); E: group C at the 12th week after operation (Ⅰ: normal bone; Ⅱ: newborn bone; HE,×40); F: group D at the 12th week after operation (Ⅰ: normal bone; Ⅱ: obviously defect in the newborn bone; Ⅲ: defect in the newborn cortical bone; HE,×40)

续,但中央部分的皮质骨较薄,其下方可见小梁样编织骨,骨改建尚未完成(图1D)。

2.4 PHBV/SGBG组(C组)病理结果

术后2周,骨缺损区表面有少量软组织覆盖;光镜下见大量增殖分裂的软骨细胞,缺损区中央粉红色的无定型充填材料团块中出现不规则腔隙,可见单核巨噬细胞侵润、吞噬植入材料。术后4周,骨缺损边缘有新骨形成,光镜下见缺损区软骨细胞分化,细胞肥大,软骨基质部分钙化,缺损区中央植入的复合材料部分降解。术后8周,骨缺损区表面新骨形成,但略有凹陷,光镜下见骨缺损区表面大量骨样组织出现,为编织骨,骨质致密化;缺损区中央充填的材料大部分已降解,软骨成骨明显,但骨小梁尚稀疏。术后12周,骨缺损区表面有皮质骨形成,但新生成的骨皮质表面有缺损,其中有较多的腔隙存在(图1E)。

2.5 空白组(D组)病理结果

术后2周,骨缺损区表面明显凹陷,可见纤维肉芽组织长入缺损区,光镜下见纤维组织和肌肉组织嵌入骨缺损区,缺损中心可见大量间充质细胞侵润和少量成骨细胞。术后4周,缺损区中央软组织嵌入明显,光镜下见骨缺损区内大量纤维组织增生,其中夹杂少许编织骨组织。术后8周,骨缺损区仍有较大范围的松软区,并有残余洞影,光镜下见骨痂由编织骨与纤维骨痂组成,缺损区底部及缺损边缘有新生骨组织形成。术后12周,骨缺损区仍有软组织嵌入,骨皮质不连续;X线显示骨缺损区骨密度增高,但明显低于其它实验组;光镜下见骨缺损区表面凹陷明显,软组织嵌入部位皮质骨形成不明显(图1F)。

3 讨 论

生物可降解高分子材料的应用是生物医学工程材料的重大进展,其中热塑性聚羟基丁酸/羟基戊酸共聚酯(PHBV)是微生物在不平衡生长条件下贮存于细胞内的一种高分子聚合物,具备良好的生物相容性、完全的生物降解性、独特的压电性,目前研究表明PHBV可用于药物缓释载体、组织工程支架材料、构建心脏生物瓣膜等[5],但尚未见将PHBV作为引导骨再生膜使用的报道。本研究与华南理工大学材料学院生物材料研究所的合

作,首次将 PHBV 制备成引导再生膜材料,并将其新研制的复合骨植入材料 PHBV/SGBG 用于 GBR 术，探讨不同治疗方式下的骨修复效果，评价 PHBV 膜联合 PHBV/SGBG 植入材料促进骨再生的可行性。

结果表明 PHBV 膜复合PHBV/SGBG植入材料组术后 2 周已有明显的新骨组织形成，其骨缺损区的成骨方式包括膜内成骨和软骨成骨两种，PHBV 膜的下方表现为膜内成骨,成骨细胞增殖活跃;植入 PHBV/SGBG 材料的中央可见明显的软骨成骨。术后 12 周,骨缺损区的修复重建基本完成,大体标本见骨缺损区愈合平整，质地和色泽与周围正常骨组织不能区分;X 线显示骨缺损区完全被新生骨组织所充填,发生骨性愈合;光镜下见骨缺损区充填材料已基本被成熟骨组织所替代,骨缺损表层皮质骨形成，与缺损端正常皮质骨融为一体,骨缺损完全修复,新生骨的质量与周围正常骨无明显差异。其骨修复效果不仅明显优于空白对照组，与 PHBV 膜组和植入PHBV/SGBG材料组相比,也表现为新骨生成速度快,新生骨组织的修复质量好、钙化程度高等优点。

PHBV 膜复合PHBV/SGBG植入材料组骨缺损区新骨组织的生长有赖于：①PHBV 膜的引导作用——PHBV 膜在骨缺损早期可有效地保护和稳定膜内血肿的形成，膜内血肿在骨愈合初期可刺激局部生长因子和细胞活性物质的释放，引导成骨细胞从骨内膜、骨断端、骨髓端以及骨外膜向骨缺损区内爬行,形成内骨痂[6];同时膜的机械屏障作用阻止了非成骨性结缔组织细胞和上皮细胞的长入，保证了成骨细胞的优先生长[7]。②PHBV/SGBG植入材料的引导作用——PHBV/SGBG 多孔支架材料的孔隙多并相互联通，具有大量的微孔以及较大的表面积[8],其机械支撑作用,可防止膜中央部位的塌陷，其多孔结构不仅可引导骨母细胞进入材料团块间隙内,并在其表面发生分化,分泌、合成类骨基质[9],而且有利于血液流通和新骨长入,在材料的周边及内部均可诱导新骨生成,并由材料的边缘区逐渐向中心部位生长，逐渐完成传导性成骨[10]。同时 PHBV/SGBG 可通过离子溶出行为,在缺损区内发生一系列钙、磷等元素的离子交换反应和化学沉积，形成富硅凝胶层和类骨碳酸羟基磷灰石,促进新骨的形成[11]。

将 PHBV 膜覆盖技术和 PHBV/SGBG 支架材料植入技术结合，一方面能有效的发挥 PHBV 膜的引导骨组织再生的效能;另一方面,PHBV/SGBG 支架材料的骨引导作用，有助于骨缺损区的骨组织的重建。

参考文献:

[1] von Arx T, Broggini N, Jensen SS, et al. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium [J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2005, 20 (6):843-853.

[2] 邓飞龙,马建元,简裕涛,等. 两种植骨材料促进即刻种植体周骨组织再生效果比较 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(4): 470-472.

[3] 陈松龄,陈　宇,匡代军,等. 超薄钛膜用于牙种植引导骨再生的临床观察 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(2):161-164.

[4] 王新木,刘宝林,董　研,等. 聚四氟乙烯膜和几丁膜引导骨再生的基础实验研究 [J]. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(12): 719-722.

[5] Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials [J]. Biomaterials, 2005, 26(33): 6565-6578.

[6] Nishimura I, Shimizu Y, Ooya K. Effects of cortical bone perforation on experimental guided bone regeneration [J]. Clin Oral Implants Res, 2004, 15(3): 293-300.

[7] Elshahat A, Inoue N, Marti G, et al. Role of guided bone regeneration principle in preventing fibrous healing in distraction osteogenesis at high speed: experimental study in rabbit mandibles [J]. J Craniofac Surg, 2004, 15(6): 916-921.

[8] 任耀彬,郑裕东,王迎军,等. 用于骨组织工程的羟基丁酸-戊酸共聚物/生物活性玻璃复合多孔支架材料 [J]. 高分子材料科学与工程,2003,19(4):196-199.

[9] Skipper LJ, Sowrey FE, Pickup DM, et al. Structural studies of bioactivity in sol-gel-derived glasses by X-ray spectroscopy[J]. J Biomed Mater Res A, 2004, 70(2): 354-360.

[10] 于胜吉,邱贵兴,辛大江,等. 羟基丁酸—戊酸共聚物/生物活性玻璃复合多孔支架材料对骨缺损的修复作用 [J]. 中国医学科学院学报, 2005, 27(2):185-189.

[11] Gil-Albarova J, Garrido-Lahiguera R, Salinas AJ, et al. The in vivo performance of a sol-gel glass and a glass-ceramic in the treatment of limited bone defects [J]. Biomaterials, 2004, 25(19):4639-4645.

(编辑　王晓鹰)