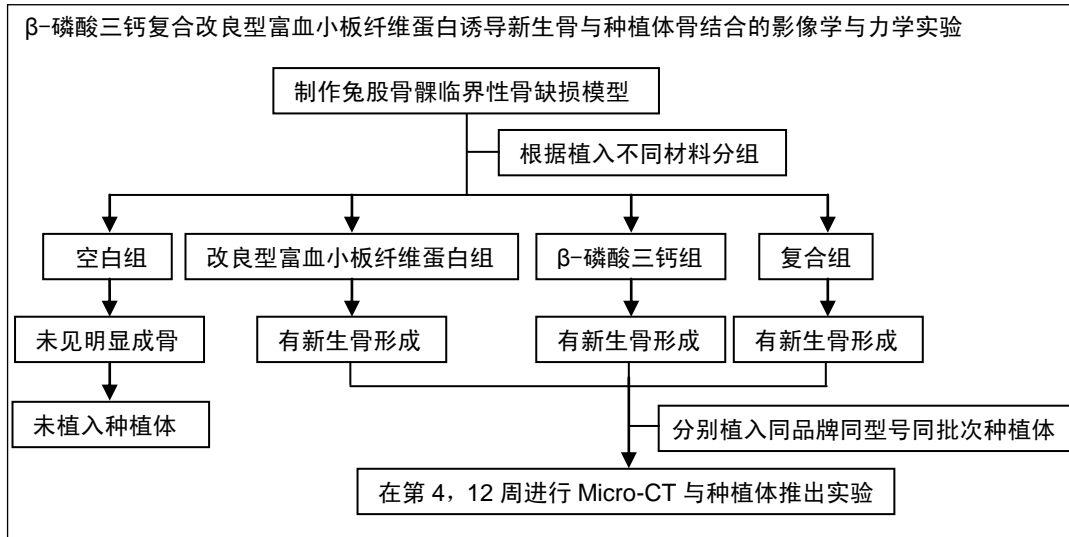


改良型富血小板纤维蛋白复合 $\beta$ -磷酸三钙诱导的新生骨整合

刘丹<sup>1,2</sup>, 闵昌琴<sup>3</sup>, 芦帅<sup>4</sup>, 陈跃<sup>5</sup>, 孙勇<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>西南医科大学附属口腔医院, 四川省泸州市 646000; <sup>2</sup>四川口腔医院, 四川省成都市 610031; <sup>3</sup>成都市温江区人民医院, 四川省成都市 611130; <sup>4</sup>成都市军区机关医院, 四川省成都市 610031; <sup>5</sup>西南医科大学附属口腔医院核医学科, 四川省泸州市 646000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1538 ORCID: 0000-0002-2647-6395(刘丹)

文章快速阅读:



刘丹, 女, 1994年生, 四川省资阳市人, 汉族, 西南医科大学在读硕士, 主要从事种植修复的基础与临床研究。

通讯作者: 孙勇, 教授, 硕士生导师, 西南医科大学附属口腔医院, 四川省泸州市 646000; 四川口腔医院, 四川省成都市 610031

文献标识码:A

稿件接受: 2018-09-23



#### 文题释义:

**改良型富血小板纤维蛋白:** 是一种在富血小板纤维蛋白基础上进行改进的自体来源血液材料, 条索较为粗大, 白细胞及单能干细胞数目较富血小板纤维蛋白增加, 特别是嗜中性粒细胞增多, 可释放更多凝血因子及中性粒细胞趋化因子等, 更有利于预防感染; 在改良型富血小板纤维蛋白降解过程中, 血小板被激活, 其 $\alpha$ 脱颗粒可释放多种生长因子, 如骨形成蛋白、血小板衍生因子 AB、转化生长因子 $\beta$ 、胰岛素增长因子、白细胞介素 4 等, 促进软组织愈合和骨缺损的修复。

**骨整合:** 是指正常的改建骨与种植体表面形成稳定的直接接触, 种植体承受的负载通过直接接触周围骨组织的途径均匀分散到骨组织中。

#### 摘要

**背景:** 前期兔临界性骨缺损修复实验显示,  $\beta$ -磷酸三钙与改良型富血小板纤维蛋白复合材料可诱导新生骨形成, 促进骨组织的修复, 效果优于单独使用  $\beta$ -磷酸三钙或改良型富血小板纤维蛋白。

**目的:** 进一步探索  $\beta$ -磷酸三钙与改良型富血小板纤维蛋白复合材料引导的新生骨与种植体骨整合性能。

**方法:** 取 18 只日本大耳兔(成都达硕生物科技有限公司提供), 建立双侧股骨髁部骨缺损模型(直径 6 mm、深度 10 mm), 随机分 3 组:  $\beta$ -磷酸三钙组将  $\beta$ -磷酸三钙材料填入骨缺损处, 改良型富血小板纤维蛋白组将改良型富血小板纤维蛋白填入骨缺损处, 复合组将质量比为 1:1 的  $\beta$ -磷酸三钙与改良型富血小板纤维蛋白混匀, 填入骨缺损处; 材料植入后 3 个月, 植入 DIO 种植体, 种植体植入后第 4、12 周获取带种植体的新生骨标本, 进行 Micro-CT 及种植体推出实验, 检测骨结合界面质量与推出最大荷载值。

**结果与结论:** ①Micro-CT 检测显示, 随着时间的延长, 各组新生骨量逐渐增加, 并且复合组植入后第 4、12 周的新生骨量多于  $\beta$ -磷酸三钙组、改良型富血小板纤维蛋白组( $P < 0.05$ ); ②种植体推出实验显示, 随着时间的延长, 各组最大推出力增加, 并且复合组植入后第 4、12 周的最大推出力高于  $\beta$ -磷酸三钙组、改良型富血小板纤维蛋白组( $P < 0.05$ ); ③结果表明相对于单独应用,  $\beta$ -磷酸三钙与改良型富血小板纤维蛋白复合材料可优化新骨与种植体的结合。

#### 关键词:

改良型富血小板纤维蛋白;  $\beta$ -磷酸三钙; 种植体骨结合; 推出最大荷载; 新生骨整合

#### 主题词:

纤维蛋白; 磷酸钙类; 牙种植体; 骨结合; 组织工程

中图分类号: R459.9; R318.19

#### 基金资助:

军事口腔国家重点实验室开放课题(2016KB01), 项目负责人: 孙勇

Liu Dan, Master candidate, Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Sichuan Hospital of Stomatology, Chengdu 610031, Sichuan Province, China

Corresponding author: Sun Yong, Professor, Master's supervisor, Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Sichuan Hospital of Stomatology, Chengdu 610031, Sichuan Province, China

## Osseointegration induced by beta-tricalcium phosphate loaded with advanced platelet-rich fibrin

Liu Dan<sup>1,2</sup>, Min Changqin<sup>3</sup>, Lu Shuai<sup>4</sup>, Chen Yue<sup>5</sup>, Sun Yong<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; <sup>2</sup>Sichuan Hospital of Stomatology, Chengdu 610031, Sichuan Province, China; <sup>3</sup>Chengdu Wenjiang District People's Hospital, Chengdu 611130, Sichuan Province, China; <sup>4</sup>Institutional Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu 610031, Sichuan Province, China; <sup>5</sup>Department of Nuclear Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Preliminary studies have shown that  $\beta$ -tricalcium phosphate loaded with advanced platelet-rich fibrin can induce bone formation and promote bone repair, which is better than  $\beta$ -tricalcium phosphate or advanced platelet-rich fibrin alone.

**OBJECTIVE:** To further explore the osseointegration properties of newly formed bone induced by  $\beta$ -tricalcium phosphate loaded with advanced platelet-rich fibrin.

**METHODS:** Eighteen Japanese rabbits provided by Chengdu Dashuo Biotechnology Co., Ltd. in China were used for establishing the bilateral femoral condyle defect models (6 mm in diameter and 10 mm in depth). There were three groups implanted with advanced platelet-rich fibrin,  $\beta$ -tricalcium phosphate or  $\beta$ -tricalcium phosphate loaded with advanced platelet-rich fibrin (mass ratio 1:1) composite, respectively. At 3 months after implantation, the DIO implant was implanted. The newly bone samples with the implants were then obtained to perform micro-CT and push-out test of implants at 4 and 12 weeks. The osteogenic properties and maximum load of the implant-bone interface were detected.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Micro-CT findings revealed that the amount of newly formed bone in each group was increased with time, which was significantly higher in the combined group than the other two groups at 4 and 12 weeks after implantation ( $P < 0.05$ ). Results from the push-out test of implants showed that as time went on, the maximum push strength of each group was increased, which was significantly higher in the combined group than in the other two groups at 4 and 12 weeks after implantation ( $P < 0.05$ ). In summary, the combined strength of the implant-bone interface of  $\beta$ -tricalcium phosphate loaded with advanced platelet-rich fibrin is superior to that of advanced platelet-rich fibrin or  $\beta$ -tricalcium phosphate.

**Subject headings:** Fibrin; Calcium Phosphates; Dental Implants; Synostosis; Tissue Engineering

**Funding:** the Open Project of the State Key Laboratory of Military Stomatology, No. 2016KB01 (to SY)

## 0 引言 Introduction

瑞典学者Branemark教授于20世纪60年代提出种植体骨整合的概念<sup>[1]</sup>,为口腔种植学研究发展奠定了牢固的生物学基础。如今口腔种植发展迅速,其适应证范围也随着骨增量技术等迅速发展而扩大<sup>[2]</sup>。临床上大量患者存在种植区域骨量不足,而引导骨再生技术是临床常用的骨增量技术<sup>[3]</sup>,合适的人工骨替代材料与生物膜既是引导骨再生技术基础研究的重点也是临床发展的必然选择<sup>[4-5]</sup>。引导骨再生技术引导新生骨形成的临床效果已获大量研究的肯定<sup>[6]</sup>,而其引导的新生骨与种植体的良好结合是种植体负载与长期稳定性的关键。 $\beta$ -磷酸三钙是一种生物陶瓷类骨支架材料,具有良好的骨引导性与生物可降解性<sup>[7]</sup>。改良型富血小板纤维蛋白由Ghanaati于2014年提出,主要有较高含量的相关生长因子<sup>[8]</sup>,如血小板衍生因子AB、转化生长因子 $\beta$ 、胰岛素样生长因子。课题组前期研究发现,2 000 r/min离心24 min制备的兔改良型富血小板纤维蛋白,与采用标准离心方法制备的人血液改良型富血小板纤维蛋白最为相近;兔临界性骨缺损修复实验显示, $\beta$ -磷酸三钙与改良型富血小板纤维蛋白的复合材料对骨组织修复、新生骨形成有明显促进作用,优于单独使用 $\beta$ -磷酸三钙或改良型富血小板纤维蛋白<sup>[9]</sup>。此次实验将研究 $\beta$ -磷酸三钙与改良型富血小板纤维蛋白单独使用或联合使用成骨后,与种植体的骨结合情况,为两种材料的复合使用及诱导形成的新生骨与种植体骨结合界面情况提供一定的实验依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组对比观察动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年5至12月在西南医科大学口腔医学院实验室完成。

### 1.3 材料

**实验动物:** 8-12周龄雌性日本大耳兔21只,体质量2.5-3.5 kg,由成都达硕生物科技有限公司提供,动物使用许可证号:SYXK(川)2014-189。

**实验主要药品与仪器:**  $\beta$ -磷酸三钙(奥林巴斯泰尔茂生物材料株式会社,日本);改良型富血小板纤维蛋白真空玻璃采血管(10 mL, VACUETTE, 奥地利);改良型富血小板纤维蛋白工具盒(Process, Nice, 法国);种植体、愈合帽、工具盒( $\Phi 3.8$  mm $\times$ 10 mm, DIO, 韩国);世新打磨机(strong 90, 碧豪斯, 中国广州);动物活体断层扫描仪及分析软件 $\mu$ CT V6.1(SIEMENS Inveon MM, 德国);万力学试验机(科普WDW-300H)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 改良型富血小板纤维蛋白膜的制备 按照课题小组前期实验所得出的最佳兔改良型富血小板纤维蛋白膜参数离心标准流程制备<sup>[10]</sup>。术前实验兔禁食12 h,将其固定于兔盒中,采血侧耳朵局部剃毛后,5%聚维酮碘伏消毒,采集5 mL静脉血于改良型富血小板纤维蛋白无菌真空玻璃采血管中(空泡管,无任何添加剂),立即转移至台式离心机转筒中配平,25  $^{\circ}$ C室温条件下2 000 r/min离心24 min。静置5 min后,用专用改良型富血小板纤维蛋白工具盒内专用镊子移出中部改良型富血小板纤维蛋白凝块,置于工具盒内,利用专用压板自身重力压制改良型富血小板纤维蛋白凝块后,即得到标准实验兔自体改良型富血小板纤维蛋白膜,备用。

1.4.2 制备兔股骨髁临界性骨缺损模型 随机挑选3只实验兔,用中空取骨钻在双侧股骨髁制备直径6 mm、深度10 mm的松质骨缺损,缺损制备后不填入任何材料,作为空白组。取18只实验兔,用中空取骨钻在双侧股骨髁制备

直径6 mm、深度10 mm的松质骨缺损, 随机分为3组, 每组6只: β-磷酸三钙组将β-磷酸三钙材料填入骨缺损处, 改良型富血小板纤维蛋白组将自体改良型富血小板纤维蛋白填入骨缺损处, 复合组将质量比为1:1的β-磷酸三钙与自体改良型富血小板纤维蛋白混匀, 填入骨缺损处。GTR膜覆盖缺损区至缺损外缘1 mm。在缺损近、远端1.5 mm处骨面上, 旋入定位钛钉2个。3个月后, 在定位钉连线的中点(即新生骨中心)备洞后, 手动植入Φ3.8 mm×10 mm DIO种植体, 上愈合帽。

1.4.3 标本处理 种植体植入后第4, 12周时, 每组每个时间点处死3只实验兔, 采用中空取骨钻于兔股骨髁部以种植体为中心, 取下带种植体的新生骨标本, 直径为6 mm、深度10 mm。取下标本后, 将种植体底端垂直于种植体长轴方向磨平, 放入40 g/L多聚甲醛溶液中, -20 °C下密封保存。

### 1.5 主要观察指标

**新生骨与种植体骨整合界面Micro-CT检测:** 通过调整将种植体周围0.5 mm的范围作为Micro-CT分析的感兴趣区域, 观察感兴趣区域内的成骨情况, 检测分析具体指标包括骨小梁体积/组织体积、骨小梁厚度、骨小梁间隙和骨小梁数目。

**种植体推出实验:** 将种植体底部悬空, 力学试验机的顶冲头以1 mm/min的恒定速度垂直愈合基台加压, 观察推出过程, 记录种植体的最大推出载荷值(N)。

1.6 统计学分析 应用SPSS 17.0分析软件进行随机设计单因素方差分析(one-way ANOVA), 判断Levene方差齐性后, 组间比较用SNK-q和LSD检验; α=0.05。

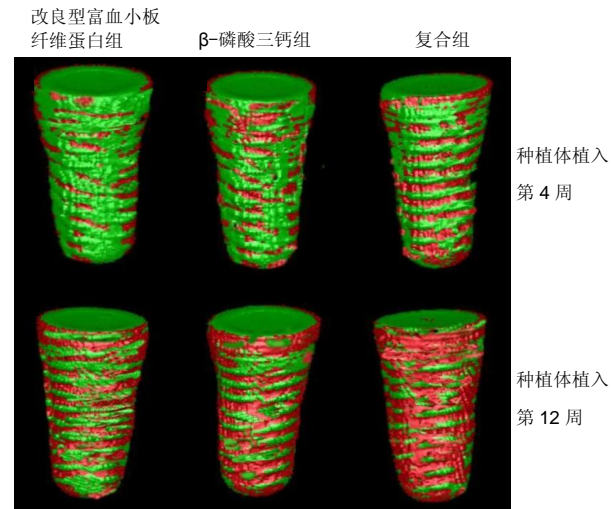
## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 空白组3只兔双侧股骨髁骨缺损未见修复, 说明临界性骨缺损造模成功; 18只双侧股骨髁

骨缺损植入材料实验兔均存活, 全部进入结果分析。

### 2.2 新生骨与种植体骨整合界面Micro-CT分析

2.2.1 三维重建图像 见图1。

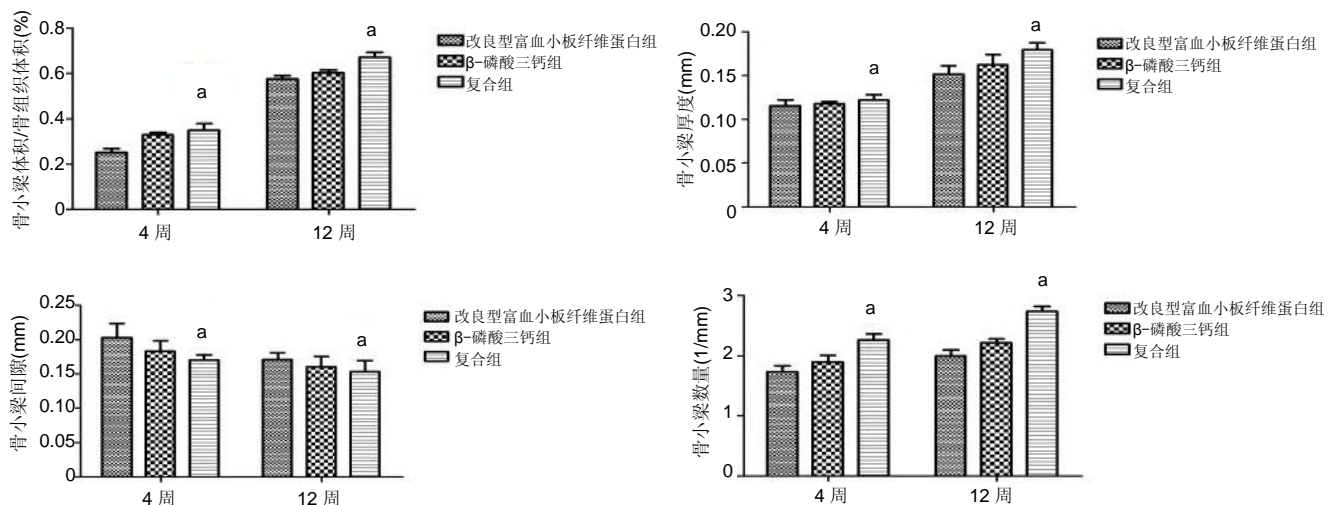


图注: 种植体植入4第周时, 各组均可见种植体骨结合, 新生骨散布于种植体表面, 骨小梁稀疏且数目较少; 植入第12周时, 各组种植体表面紧密结合的新生骨呈网织状包绕种植体, 骨小梁排列紧密且数目显著增多。

图1 种植体植入后不同时间点的Micro-CT种植体-骨结合重建图像  
Figure 1 Micro-CT reconstruction of implant-bone at different time points after implantation

三维重建中, 将种植体设置为绿色, 骨组织为红色, 便于更加直观地进行观察分析。种植体植入第4周时, 各组均可见种植体骨结合, 新生骨散布于种植体表面, 骨小梁稀疏且数目较少; 植入第12周时, 各组种植体表面紧密结合的新生骨呈网织状包绕种植体, 骨小梁排列紧密且数目显著增多。

2.2.2 感兴趣区域骨计量学统计学分析 见图2。



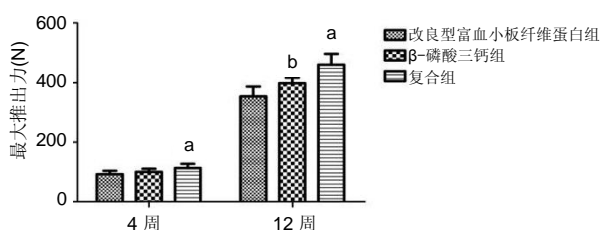
图注: 同一时间点, 与改良型富血小板纤维蛋白组、β-磷酸三钙组比较, <sup>a</sup>P < 0.05。

图2 种植体植入后不同时间点各组种植体周围感兴趣区域骨计量学指标变化

Figure 2 Changes of bone indexes in the regions of interest surrounding the implant of each group at different time points after implantation

利用Micro CT专用软件可对感兴趣区域的骨小梁体积/组织体积、骨小梁平均厚度、骨小梁间隙、骨小梁数目进行评估。骨小梁体积/组织体积与骨形成总量呈正相关, 值越大提示新骨形成量越多; 骨小梁平均厚度、骨小梁间隙和骨小梁数目与新生骨的致密程度相关: 骨质疏松时, 骨小梁平均厚度、骨小梁数目值减小, 而骨小梁间隙增大, 反之亦然。各组组内种植体植入12周时的骨体积分数较4周时均明显提高, 随时间延长, 骨替代材料成骨效果更佳。同一时间点, 复合组的各指标均显著优于其余两组。

**2.3 种植体推出实验结果** 种植体植入第4, 12周时各组种植体推出的最大力值分析, 见图3。种植体植入第4, 12周时, 复合组最大推出力显著高于其他两组( $P < 0.05$ ), 反映出复合组种植体与周围新生骨的骨整合强。



图注: 同一时间点, 与改良型富血小板纤维蛋白组、 $\beta$ -磷酸三钙组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 同一时间点, 与改良型富血小板纤维蛋白组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图3 生物力学检测各组种植体推出实验最大力值

Figure 3 Maximum strength value in the push-out test of implants in each group

### 3 讨论 Discussion

Hoshino等<sup>[11]</sup>将在有限的观察期间内且动物在无其他影响因素下, 自身修复能力不能发生自行愈合的骨缺损定义为临界性骨缺损。兔股骨髁部提供制造骨缺损的空间较大, 适合建立骨缺损模型, 奠定了实验科学性、可行性的基础。此次实验阴性对照组缺损区边缘仅见少量成骨, 中央为纤维结缔组织, 骨缺损区未发生自行愈合, 验证了实验选择兔股骨髁端直径6 mm<sup>[12]</sup>、深度10 mm大小的骨缺损, 符合临界性骨缺损的要求<sup>[13-16]</sup>, 通过该模型观察骨结合具有科学性及可行性。在实验操作过程中, 利用同一直径环形中空取骨钳制取骨缺损及定位钉设计, 可增加后期种植手术操作及取材的精准性, 减少人为误差, 增强各组之间的可比性, 加大实验的重复性和科学性。临床通常于引导骨再生完成6个月后进行种植体植入, 大量实验验证了兔临界性骨缺损区引导骨再生术12周后新生骨支持植入种植体的可行性和科学性<sup>[16-17]</sup>。兔股骨髁有丰富的血运与骨松质, 利于新生骨的生长成熟<sup>[13]</sup>, 且兔的生命周期明显短于人类, 遂此次实验选择引导骨再生后12周植入种植体是科学可行的。

随着骨整合研究不断深入, 其检测方法也不断改进, 比如脱钙切片、硬组织切片、Micro-CT、透射电镜及力学实验等。实验此阶段研究对于骨结合进行初步探索, 考虑到临床上患者进行种植后评价骨结合最常进行的影像学检查, 因此实验在众多检测方法中选择了与临床最贴近且当

前较为准确、评价较高的Micro-CT检查及较直观、简便常用的力学推出实验。选择了临床上早期负载(4周)和常规负载(12周)的2个时间点来进行种植体骨结合界面的Micro-CT检测与推出实验。其中Micro-CT可在不破坏标本的情况下获得内部详细的三维结构信息, 将感兴趣区域的新生骨及其与种植体的结合情况直观反映出来, 是目前研究种植体骨结合处微观结构的最佳方法<sup>[18-19]</sup>。Goldberg等<sup>[20]</sup>使用Micro-CT能清晰客观地观察到骨标本的微观结构, 并且明确其在纵向研究中具有一定的优势。有研究表明选用21-40  $\mu\text{m}$ 的分辨率扫描体格中型(兔)动物骨标本能清晰明了其内部的细微结构<sup>[21]</sup>, 此次实验采用了19  $\mu\text{m}$ 分辨率, 更进一步减少细微结构的丢失, 完全能满足骨小梁形态的表达。

大量研究报道种植体表面与骨组织之间骨结合率最常见是在50%-70%<sup>[22]</sup>, 均可负载行使正常咀嚼功能。从此次实验Micro-CT分析可知, 种植体植入第12周时, 复合组种植体周围形成的新生骨量最多, 骨体积分数平均值达67.1%;  $\beta$ -磷酸三钙组次之, 为60.2%; 改良型富血小板纤维蛋白组形成的新生骨量最少, 为57.5%, 均相对于第4周种植体周围骨组织明显增加, 并且都达到负载行使正常咀嚼功能的水平。种植体推出实验对评价种植体-骨结合的结合强度虽然不是唯一的方法, 但确实是最常用、简便、直观的力学检测手段。推出实验操作简便且推出过程由力学试验机完成, 最大限度排除了操作者所导致的人为误差。很多学者进行种植体的推出或拉出实验得到了比较满意的效果<sup>[23-24]</sup>, 并同期通过检测种植体周围骨组织的细微结构, 发现推出力与种植体周围结合的新生骨骨体积及骨质量呈正相关<sup>[25]</sup>。研究通过测定3组材料诱导骨中植入种植体后推出力的大小可以直观反映种植体与骨组织的结合情况, 从材料的力学角度分析, 种植体推出实验检测的是种植体骨结合界面抵抗剪切力强度, 推出力越大种植体与骨组织结合越牢固, 其稳定性越好。此次实验各组的诱导新生骨在第12周时均能与种植体形成良好的稳定骨结合, 最大推出力均高于第4周, 与Micro-CT检测骨微观结构的密度值结果一致; 第4周时提示早期种植体周围的诱导骨组织量较少, 骨小梁尚不成熟。因此临床骨量明显不足, 二期手术植入种植体的患者, 应根据情况适当延缓种植体负载时间, 利于引导骨再生术后新生骨与种植体结合的长期稳定性。此次实验所有样本均植入同一型号植体, 骨结合性能差异与种植体表面新生骨密切相关, 可推知复合组诱导新生骨的能力较其余两组更强。

从生理学角度而言, 种植体植入体内后其表面立即吸附周围环境中的血液及蛋白质, 周围的炎性细胞也会在种植体表面分泌一些基质蛋白, 共同参与形成20-40 nm糖蛋白膜, 构成生物大分子层, 有利于成骨细胞的黏附。随着微环境中钙、磷离子的介入, 在生长因子协助下, 大量新生血管不断形成提供营养, 成骨细胞增殖、分化, 产生大量的分泌钙基质, 矿化成骨, 不断的形成骨沉积, 与种植体形成紧密的骨性结合<sup>[26-27]</sup>。种植体植入第4周时, 改良型富血小板纤维蛋白组与 $\beta$ -磷酸三钙组的最大推出力相差较

小,而在第12周时,改良型富血小板纤维蛋白组与 $\beta$ -磷酸三钙组的最大推出力比较差异存在统计学意义。从骨小梁平均厚度来看,种植体植入第4周时,改良型富血小板纤维蛋白组新生骨生长状况及骨结合情况与 $\beta$ -磷酸三钙组较为相似;而第12周时, $\beta$ -磷酸三钙组新生骨生长与骨结合均优于改良型富血小板纤维蛋白组。说明在创口愈合的初期,改良型富血小板纤维蛋白起到较为关键的作用。改良型富血小板纤维蛋白条索较为粗大,白细胞及单能干细胞数目较富血小板纤维蛋白增加,特别是嗜中性粒细胞增多,可释放更多凝血因子及中性粒细胞趋化因子等,有利于预防感染;在改良型富血小板纤维蛋白降解过程中, $\alpha$ 颗粒型的血小板被激活,其降解过程中所释放的生长因子,骨形成蛋白(骨形成蛋白2、骨形成蛋白7)、血小板衍生因子AB、转化生长因子 $\beta$ 、胰岛素增长因子、白细胞介素4等<sup>[28]</sup>,可促进软组织愈合和骨缺损的修复。随着时间延长,改良型富血小板纤维蛋白在体内逐渐被蛋白酶降解、吸收,其释放的生长因子及白细胞浓度降低,诱导骨形成速度减慢,难以获得与其余2组相当的新生骨与骨结合强度。

根据 $\beta$ -磷酸三钙的可吸收特性推测,种植体植入后第4周时仍有不少的 $\beta$ -磷酸三钙颗粒存在于种植体周围,种植体周围骨组织正处于活跃的改建阶段,破骨细胞不断的进行骨吸收来改建宿主骨,成骨细胞分泌骨基质形成新骨的体积及骨小梁数目较少,未形成稳定的骨结合;第12周时骨改建基本完成,骨小梁显著增多且逐渐成熟,与种植体表面形成紧密的骨结合<sup>[29-30]</sup>。Del等<sup>[31]</sup>通过对比复合血小板衍生生长因子BB的 $\beta$ -磷酸三钙和 $\beta$ -磷酸三钙的成骨效果发现,单纯植入 $\beta$ -磷酸三钙材料后2-4周的骨缺损修复出现抑制, $\beta$ -磷酸三钙降解速率缓慢,影响了骨形成速度;而植入复合了生长因子血小板衍生生长因子BB的 $\beta$ -磷酸三钙后,成骨能力持续增强,骨缺损修复未出现抑制,说明了血小板衍生生长因子BB复合 $\beta$ -磷酸三钙后可克服单纯植入 $\beta$ -磷酸三钙材料在修复骨缺损方面的不足。改良型富血小板纤维蛋白膜具有高黏弹性的膜性特点,利于细胞的黏附,降解过程中所释放的生长因子可诱导骨髓基质细胞等的骨向分化与成骨细胞的附着、增殖和分化。其中骨形成蛋白2是诱导骨组织异位成骨重要成分,可诱导成熟的间叶干细胞不断分化为成骨细胞,加速促进骨形成。血管内皮生长因子可促进骨组织毛细血管的形成,为骨再生及代谢提供有利的微环境。 $\beta$ -磷酸三钙弥补了改良型富血小板纤维蛋白物理机械性能的缺点,形成类似松质骨的多孔结构支架,可增大与周围血液接触的表面积,便于营养物质的运输及细胞的爬行长入。从 $\beta$ -磷酸三钙本身的化学性质而言,它属于碱性物质,在偏碱性环境中其降解速率受到抑制<sup>[32]</sup>,而改良型富血小板纤维蛋白所释放的白细胞介素4等具有免疫调节作用,促进机体对 $\beta$ -磷酸三钙的降解,降低创口炎症发生的可能性。一方面, $\beta$ -磷酸三钙以生物性磷灰石的形式提供了框架和空间,协同各种骨生长因子和骨细胞;另一方面,降解后的Ca、P离子能应用于新骨的矿化过程<sup>[33]</sup>,共同协助促进成骨,抑制骨吸收。此次实验在一定程度上证实 $\beta$ -磷酸三钙与改良型富血小板纤维蛋

白复合材料相比单一使用2种材料能更有效促进种植体周围新骨的形成,骨整合能力佳。 $\beta$ -磷酸三钙与改良型富血小板纤维蛋白的比例选择采用质量比,是因为颗粒状骨替代材料与富血小板纤维蛋白的体积均不稳定,而此次实验探索性选择质量比1:1取得了较好的成骨效果。实验将进一步研究探索复合组骨结合效果更佳的微观机制以及不同比例的两种材料混合的效果比较,进行更为丰富多层次的检测,如组织切片观察、分子生物学检测等,为临床使用提供更确切的依据。

**作者贡献:** 刘丹、闵昌琴进行实验设计,实验实施为刘丹、闵昌琴、陈跃,实验评估为芦帅,资料收集为闵昌琴,刘丹成文,孙勇审核。

**经费支持:** 该文章接受了“军事口腔国家重点实验室开放课题(2016KB01)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

**生物统计学声明:** 该文统计学方法已经由西南医科大学统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. J Prosthet Dent. 1983;50(50):399-410.
- [2] Elnayef B, Monje A, Gargallo-Albiol J, et al. Vertical Ridge Augmentation in the Atrophic Mandible: A Systematic Review and Meta-Analysis. Int J Oral Maxillofac Implants. 2017;32(2):291-312.
- [3] 马士卿,张旭,孙迎春,等. 引导骨组织再生膜的研究进展[J]. 口腔医学研究,2016,32(3):308-310.
- [4] Masoudi Rad M, Nouri Khorasani S, Ghasemi-Mobarakeh L, et al. Fabrication and characterization of two-layered nanofibrous membrane for guided bone and tissue regeneration application. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;80:75-87.
- [5] Arunjaroenusuk S, Panmekiate S, Pimkhaokham A. The Stability of Augmented Bone Between Two Different Membranes Used for Guided Bone Regeneration Simultaneous with Dental Implant Placement in the Esthetic Zone. Int J Oral Maxillofac Implants. 2018;33(1):206-216.

- [6] Benic GI, Bernasconi M, Jung RE, et al. Clinical and radiographic intra-subject comparison of implants placed with or without guided bone regeneration: 15-year results. *J Clin Periodontol*. 2017;44(3):315-325.
- [7] 陈卓凡, 刘泉, Matinlinna JP. 口腔种植中磷酸钙类骨替代材料的应用(英文)[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2016, 26(1):1-12.
- [8] Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol*. 2014;40(6):679-689.
- [9] 焦志立, 谢晓玲, 付冬梅, 等. 改良型富血小板纤维蛋白在兔颅骨诱导成骨中的组织学观察[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(14):2208-2214.
- [10] 毛俊丽, 孙勇, 赵峰, 等. 兔PRF、A-PRF制备方法的筛选[J]. *西南国防医药*, 2016, 26(6):593-596.
- [11] Hoshino A, Hanada S, Yamada H, et al. Mycobacterium tuberculosis escapes from the phagosomes of infected human osteoclasts reprograms osteoclast development via dysregulation of cytokines and chemokines. *Pathog Dis*. 2014;70(1):28-39.
- [12] 何通文, 徐庚池, 韩耀辉, 等. 构建兔颅顶骨临界骨缺损模型: 确立颅顶临界骨缺损的参考值[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(18):2789-2794.
- [13] 韦从云. 重组人骨形成蛋白-2结合胶原骨粉/无胶原骨粉在兔股骨远端标准骨缺损模型中成骨效能的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [14] 邓威, 郑欣, 谌业帅, 等. 3D打印多孔钛材料修复兔股骨髁骨缺损的实验研究[J]. *实验动物与比较医学*, 2017, 37(4):266-272.
- [15] 刘伟, 陈杰, 胡开进, 等. 负载CGRP及SP的明胶缓释微球用于修复兔骨质疏松模型骨缺损的研究[J]. *口腔医学研究*, 2016, 32(3):228-233.
- [16] Walsh WR, Oliver RA, Christou C, et al. Critical Size Bone Defect Healing Using Collagen-Calcium Phosphate Bone Graft Materials. *PLoS One*. 2017;12(1):e0168883.
- [17] 焦志立, 谢晓玲, 付冬梅, 等. 改良型富血小板纤维蛋白在兔颅骨诱导成骨中的组织学观察[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(14):2208-2214.
- [18] Jacobsson M, Tjellström A, Thomsen P, et al. Integration of titanium implants in irradiated bone. Histologic and clinical study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1988;97(4 Pt 1):337-340.
- [19] He T, Cao C, Xu Z, et al. A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model. *Sci Rep*. 2017;7(1):16270.
- [20] Goldberg M, Marchadier A, Vidal C, et al. Differential effects of fibromodulin deficiency on mouse mandibular bones and teeth: a micro-CT time course study. *Cells Tissues Organs*. 2011;194(2-4):205-210.
- [21] 王军, 毕龙, 白建萍, 等. 显微CT与组织切片技术在骨形态计量研究中的比较[J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(5):381-384.
- [22] Abduljabbar T, Kellesarian SV, Vohra F, et al. Effect of Growth Hormone Supplementation on Osseointegration: A Systematic Review and Meta-analyses. *Implant Dent*. 2017;26(4):613-620.
- [23] Pan W, Wei Y, Zhou L, et al. Comparative in vivo study of injectable biomaterials combined with BMP for enhancing tendon graft osteointegration for anterior cruciate ligament reconstruction. *J Orthop Res*. 2011;29(7):1015-1021.
- [24] 王程越, 赵远, 杨曼, 等. 组织工程化骨修复兔下颌骨缺损同期种植体植入的实验研究[J]. *口腔医学*, 2016, 36(1):12-17.
- [25] Degidi M, Dapirle G, Piattelli A, et al. Development of a New Implant Primary Stability Parameter: Insertion Torque Revisited. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013;15(5):637-644.
- [26] Öncü E, Bayram B, Kantarci A, et al. Positive effect of platelet rich fibrin on osseointegration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016;21(5):e601-607.
- [27] 邵磊, 赵宝红. 钛种植体骨结合界面组织学研究进展[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2014, 7(7):440-445.
- [28] Masuki H, Okudera T, Watanebe T, et al. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent*. 2016;2(1):19.
- [29] Thuaksuban N, Pannak R, Boonyaphiphat P, et al. In vivo biocompatibility and degradation of novel Polycaprolactone-Biphasic Calcium phosphate scaffolds used as a bone substitute. *Biomed Mater Eng*. 2018;29(2):253-267.
- [30] Matsuki K, Sugaya H, Takahashi N, et al. Degradation of Cylindrical Poly-Lactic Co-Glycolide/Beta-Tricalcium Phosphate Biocomposite Anchors After Arthroscopic Bankart Repair: A Prospective Study. *Orthopedics*. 2018;41(3):e348-e353.
- [31] Del RC, Rodríguez-Évora M, Reyes R, et al. BMP-2, PDGF-BB, and bone marrow mesenchymal cells in a macroporous  $\beta$ -TCP scaffold for critical-size bone defect repair in rats. *Biomed Mater*. 2015;10(4):45008.
- [32] 尚文博. 锰掺杂 $\beta$ -磷酸三钙多孔仿骨材料性能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [33] 周骁, 钱玉芬. 组织工程骨修复骨缺损的稳定性: 材料降解与新骨形成[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(12):1938-1942.