文章编号:1000-5404(2012)17-1715-04

论著

拔牙创愈合过程对邻近微种植体稳定性影响的组织学研究

霍金凤[1],郑雷蕾[1],胡 赟[2],赵志河[3],唐 甜[3],邓 锋[1],卫光曦[1],周阳明[1],张晓歌[3] (401147 重庆,重庆医科大学附属口腔医院,重庆市口腔疾病与生物医学研究中心:正畸科[1],预防与儿童牙病科[2];610041 成都,四川大学华西口腔医院正畸科[3])

[摘要] **目的** 通过拔牙创愈合的生理过程对邻近微种植体-骨界面骨质改建的影响进行研究。**方法** 选取8只健康雄性Beagle犬,按不同愈合时间段(1、3、8、12周)采用完全随机分组方式分成4组,拔除每只Beagle犬下颌第3和第4双尖牙(P3、P4)。实验组微种植体邻近拔牙创区域(P3、P4区域),对照组微种植体位于第2双尖牙(P2)和第1磨牙(M1)区域。分别在植入微种植体后愈合的第1、3、8、12周处死动物。制备去除微种植体脱钙组织切片,对处于不同阶段的种植体-骨界面进行组织学观察。**结果** 第1周,实验组和对照组均表现为明显的炎症性反应。第3周,实验组主要表现为骨吸收,对照组主要表现为骨重建。第8周,实验组和对照组均表现为骨界面基质钙化,骨界面的网状骨已逐渐向板层骨过渡。第12周,实验组和对照组微种植体-骨界面出现钙化的层状骨。**结论** 拔牙创对微种植体周围骨改建进程会产生影响,在植入早期,邻近拔牙创的微种植体-骨界面炎症反应和骨吸收效应明显重于对照组,此期即刻加载风险较大。

[关键词] 微种植体;拔牙创;愈合时间;骨改建
[中图法分类号] R329.441; R782.11; R783.6 [文献标志码] A

Effect of healing process of dental extraction wound on the stability of microscrews implanted nearby: a histopathological study

Huo Jinfeng[1], Zheng Leilei[1], Hu Yun[2], Zhao Zhihe[3], Tang Tian[3], Deng Feng[1], Wei Guangxi[1], Zhou Yangming[1], Zhang Xiaoge[3] ([1]Department of Orthodontics, [2]Department of Preventive and Children Dentistry, Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science, Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 401147; [3]Department of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the effect of the physiological healing process of dental extraction wound on bone structure reconstruction around bone-implant interface. Methods Eight male Beagle dogs were randomly divided into four groups according to different healing time (1, 3, 8 and 12 weeks) after dental extraction. The third and the fourth premolars (P3 and P4) were extracted from each dog. The microscrews were implanted into the adjacent areas of P3 and P4 in the experimental group, and were implanted into the areas of the second premolar (P2) and the first molar (M1) in the control group. The dogs were sacrificed at 1, 3, 8 and 12 weeks, and histomorphological observation was performed at different healing time after implantation. Results At 1 week after implantation, obvious inflammatory reactions were observed at bone-implant interface in both of the experimental group and the control group. New bone was formed on the bone-implant interface of the control group, and bone resorption was detected in the experimental group at 3 weeks after implantation. At 8 weeks after implantation, bone matrix became calcification, and the reticulated bone transformed into lamellar bone at the bone-implant interface in both of the experimental group and the control group. At 12 weeks after implantation, there was obvious bone formation between the threads of the microsrews in both of the experimental group and the control group. Conclusion The healing process after implantation is affected by dental extraction. At the early stage of implantation, the degree of inflammatory reaction and bone absorption at bone-implant interface was more significant in the experimental group than that in the control group, thus increasing the immediate loading risk.

[**Key words**] microscrew; extraction; healing time; bone remolding

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81000463, 10902075), the Special Science Foundation of Doctorial Discipline of High College and Universities of Ministry of Education (20095503120006), the Project of Key Discipline of Medical Science of Chongqing (Orthodontics 2009) and the Science and Technology Research Project of Chongqing Education Committee (kj120329). Corresponding author: Zheng Leilei, E-mail: zheng_lei_lei@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81000463,10902075);教育部"高等学校博士学科点专项科研基金"新教师类基金(20095503120006);重庆市医学重点学科(口腔正畸学2009)项目;重庆市教育委员会科学技术研究项目(kj120329)

[通信作者] 郑雷蕾,E-mail:zheng_lei_lei@163.com

种植体支抗技术是基于骨结合理论的新型正畸支抗技术。Chae[1]认为种植体成功的关键在于形成良好的种植体-骨界面。以往的生物力学研究[2]表明,邻近拔牙创植入的微种植体在无载荷愈合期可以保持稳定性,但拔牙创的早期愈合可能会加重微种植体-骨界面的炎症反应和骨吸收效应。本实验以Beagle犬为实验对象,在其下颌骨邻近拔牙创区域和非拔牙区域植入微种植体,通过光镜观察不同愈合时期微种植体-骨界面的改建的进程,探讨拔牙创愈合的生理过程对邻近微种植体-骨界面骨质改建的影响,为微种植体在临床中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用健康雄性Beagle犬8只(重庆医科大学实验动物中心提供),体质量13~14 kg,年龄为18~20个月。牙体、牙列完整,无龋坏及牙周病,咬合关系正常。Beagle犬均采用笼中特殊饲养的方法,定时、定量摄食,自由饮水。适应性饲养1周后,进行实验。

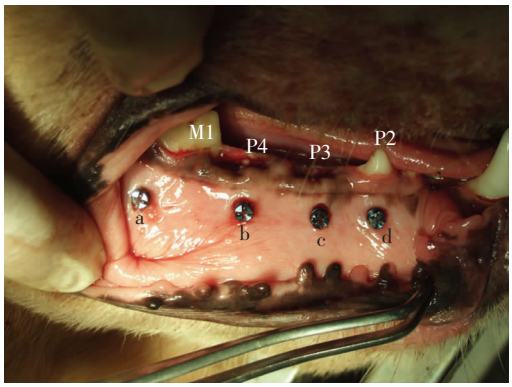
1.2 主要实验材料及试剂

Aarhus microcrew自攻型纯钛微种植钉(直径1.6 mm,螺纹长度6 mm,穿龈部分长度2.5 mm,Medico公司,德国),速眠新Ⅱ(长春农牧大学兽医研究所),氯氨酮、注射用青霉素钠(华北制药),高速涡轮机(CS181,上海器械公司),多聚甲醛液(4%,pH=7)、乙二胺四乙酸(又名EDTA,4%,pH=7)、酒精(70%、90%、95%、100%)、二甲苯、碳酸锂、Weigent苏木精液、伊红溶液、丽春红-品红溶液、苯胺蓝溶液、醋酸溶液(1%)均为昊化化工(上海),常规轮转石蜡切片机(LEICA 2125,德国),光学显微镜(NIKON,日本)。

1.3 建立邻近拔牙创植入正畸微种植体实验动物模型

1.3.1 实验分组 根据植入微种植体后1、3、8、12周将8只Beagle犬按完全随机分组方式分为4组,每组2只,拔除每只Beagle犬下颌第3和第4双尖牙(P3、P4)。实验组微种植体位于邻近拔牙创区域(P3、P4区域),对照组微种植体位于非拔牙创的第2双尖牙(P2)和第1磨牙(M1)区域[2]。

1.3.2 手术过程 实验前1d,拍摄X线片,取下颌牙列印模。灌注石膏模型,结合X线片提示在模型上标记植入点。Beagle犬术前30 min肌注阿托品0.1 mg,以氯胺酮(1 ml/kg)静脉注射行全身麻醉,含肾上腺素2%利多卡因浸润注射术区口腔前庭沟底,减少术区出血和保证麻醉深度。高速涡轮机离断第3、4双尖牙近远中向牙根,分别拔除近远中向牙根后,给予牙槽复位。在Beagle犬口腔植入位置切开粘骨膜,充分暴露颊侧骨质,低速引导钻钻开皮质骨,使用就位器将微种植体植入到位。术后1~5 d给予肌肉注射青霉素(80万U/d)预防感染。微种植体植入后实验犬均摄入半流质饲料,避免硬质食物对微种植体的撞击。实验期间观察Beagle犬活动状况、毛发、体质量、食欲及粪便情况,微种植体植入后牙龈、牙周情况,微种植体松动情况(图1)。实验中所有Beagle犬的处理根据重庆医科大学动物伦理委员会实验协议[2]进行。



M1:第1磨牙;P2:第2双尖牙;P3:第3双尖牙;P4:第4双尖牙;a、d:对照组;b、c:实验组

图1 Beagle犬颌骨区域微种植体组实验动物模型

1.4 制备去除微种植钉的脱钙组织切片

在预定时间处死动物(1、3、8、12周),取下带种植体的下颌骨,用涡轮机将标本修整成10 mm×10 mm×6 mm组织块,要求每个组织块包含1枚种植钉和其周围至少4 mm的骨质,无软组织。用高速涡轮机磨除组织中牙齿的釉质,多聚甲醛液(4%,pH=7)中固定1周。固定后将组织块转移到50倍用磷酸盐缓冲剂缓冲至pH值等于7的15% EDTA(加0.1% DEPC)内,4 ℃脱钙。每7天换液1次。脱钙3个月后,触摸组织块质地变软,呈橡皮样,有弹性时,小心地将种植体旋转取出,并修整组织块至种植体螺纹边缘1 mm处。继续脱钙1个月至脱钙终点。脱钙完成后,按照常规程序进行梯度脱水,石蜡包埋。在Leica 2125型石蜡切片机上将组织块固定,4 μm连续切片,将切片裱于APES涂布的玻片上。

1.5 组织形态学观察

脱钙标本采用HE染色和Masson染色。每张组织学切片同时在利用计算机图像分析系统(Nikon Em1200和ACT-1)在100、200、400倍显微镜下观察界面骨重建过程以及相关细胞形态。

2 结果

2.1 Beagle犬口内情况

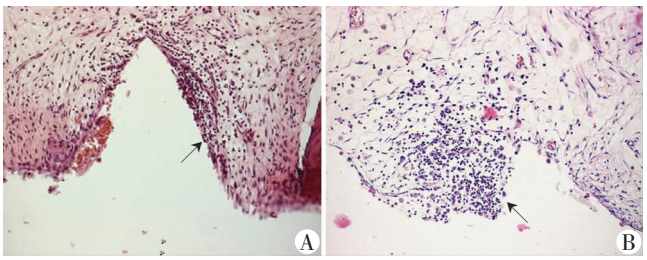
Beagle犬口腔卫生良好,植入微种植体均保持稳定,未见松动脱落,实验组及对照组微种植体周围黏膜颜色正常,未见红肿,无探诊出血。

2.2 微种植体-骨界面的光镜观察

第1周,HE染色显示实验组和对照组微种植体-骨界面均可见微螺钉种植体与颌骨之间有大量中性粒细胞浸润,部分骨小梁中骨细胞变性坏死,周围见大量骨巨细胞反应及肉芽组织。近切割面的骨髓腔内大量纤维样细胞增生,并向凝血块内延伸。凝血块内有大量血管样结构,血管间纤维细胞样的间充质细胞代替红细胞,间杂少量炎症细胞。骨碎屑周围有少量破骨细胞(图2)。

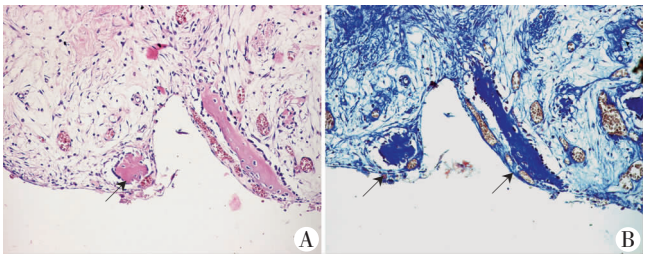
第3周,实验组:HE染色显示骨界面旧骨骨陷窝逐渐消失成无结构样骨组织,旧骨崩解分裂,骨吸收前缘呈"月牙"状,内侧可见矮柱状立方形成骨细胞。Masson染色显示吸收后的界面存在大量纤维结缔组织包绕,可见纤细的骨小梁结构,疏松的新骨由骨面呈"骨岛状"向种植体方向生长,有少量与种植体直接接触的新骨形成,其周边易见(图3)。对照组:骨重建

活跃,Masson 染色可见靠近旧骨的边缘有薄层、成束的胶原纤维环形排列,在靠近种植体界面处相对致密,可见环形处于网状骨阶段的新生骨层,与旧骨界面连接处比较稀疏,成网格状。有粗大的血管腔为新生骨提供营养,新生骨与旧层状骨走向不同,界面清晰。HE 染色可见骨基质中有大量呈立方形的处于分泌活跃期的成骨细胞(图 4)。



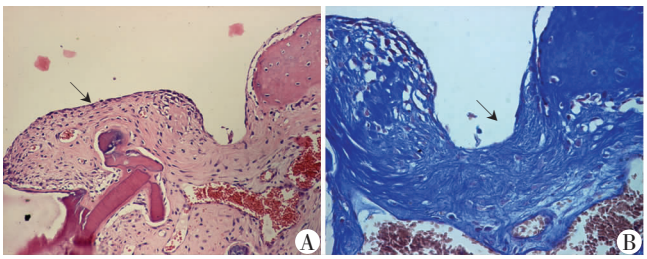
A:实验组;B:对照组;↑:大量中性粒细胞浸润

图 2 Beagle 犬下颌骨微种植体愈合 1 周微种植体-骨界面 HE 染色观察 (×200)



A:HE 染色;B:Masson 染色;↑:有骨岛形成,骨岛边缘有成骨细胞

图 3 Beagle 犬下颌骨微种植体实验组愈合 3 周微种植体-骨界面染色观察 (×200)



A:HE 染色(×100),↑:成骨细胞;B:Masson 染色(×400),↑:胶原纤维及新生骨层

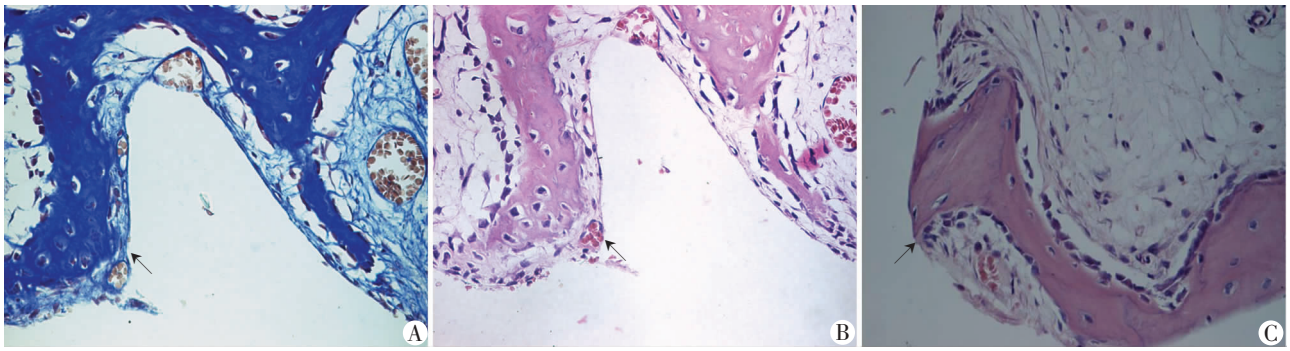
图 4 Beagle 犬下颌骨微种植体对照组愈合 3 周微种植体-骨界面染色观察

第 8 周,HE 和 Masson 染色显示实验组和对照组微种植体-骨界面均见与种植体直接接触的网状骨及少量的成骨细胞,周缘网状骨逐渐向板层骨移行,对照组界面偶见哈佛系统(图 5)。

第 12 周,实验组和对照组微种植体-骨界面出现钙化的层状骨,与旧骨密度相近呈束状排列,致密规则。哈佛系统清晰可辨;骨内膜处骨结构成熟,高度钙化。HE 和 Masson 染色片可见大量成熟板层状骨,钙化程度与旧骨组织接近(图 6)。

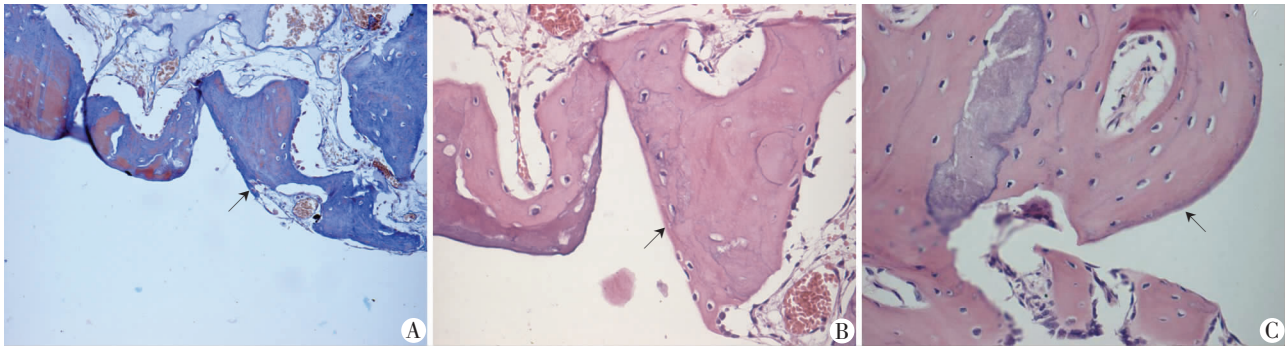
3 讨论

本实验涉及两个创伤过程:拔牙和微种植体的植入,其愈合均属于骨骼创伤愈合。微种植体植入后,拔牙创愈合与界面愈合在组织学表现相关性[3-4],并且这种相关性是受愈合时间影响的[5]。本研究中,微种



A:实验组 Masson 染色;B:实验组 HE 染色;C:对照组 HE 染色;↑:成骨情况

图 5 Beagle 犬下颌骨微种植体愈合 8 周微种植体-骨界面染色观察 (×400)



A:实验组(Masson ×200);B:实验组(HE ×200);C:对照组(HE ×400);↑:钙化层状骨

图 6 Beagle 犬下颌骨微种植体愈合 12 周微种植体-骨界面染色观察

植体植入后1周,实验组和对照组没有明显差异,在微种植体-骨界面表现明显的炎症反应。这可能是因为微种植体在植入后1~2周,植入创面和拔牙创均处于一个机化期,即炎症反应期。植入后第3周,对照组新骨形成的速度和范围都明显大于实验组。拔牙创在此阶段牙槽壁骨小梁增生,进入机化的凝血块中,同时牙槽嵴顶骨质吸收,出现明显的骨萎缩[6-7]。文献报道,局部骨密度的下降可以减慢界面骨形成的速度。这说明拔牙创愈合的生理过程在第3周左右可以明显影响微种植体-骨界面骨改建。植入后第8周,实验组在骨界面的网状骨已逐渐向板层骨过渡。但第3周时光镜下显示实验组骨重建进程迟于对照组,说明在第3~8周这个阶段,实验组骨界面改建比对照组活跃,这也正证明了生物力学检测结果。骨界面改建的活跃程度依赖于成骨细胞的成骨能力,很多因素能影响成骨细胞活性,最主要的是多肽类生长因子,拔牙创的血凝块中存在大量生长因子,可能对邻近的微种植体-骨界面产生影响[8],从而使实验组此阶段的骨改建比较活跃。植入后第12周,实验组与对照组均出现钙化的层状骨。与第8周的切片进行对比可以发现界面的骨组织结构有所消失,骨细胞数量明显减少,是一种骨组织萎缩吸收前期的表现[9]。

种植体植入后,形成了骨与种植体的直接结合,称为骨整合[10]。Roberts等[11]认为种植体完全被新骨包绕并不是推断种植体支抗临床成功的组织学标准,10%的骨整合面积已经可以达到正畸力负载的要求。界面骨的钙化成熟度和结合率影响种植体-骨界面的骨整合情况[12]。组织学研究能直接、客观地反映种植体-骨界面的变化,是一种界面研究的重要手段,一般采取硬组织切片和脱钙组织切片两种方式。获得符合要求的含种植钉硬组织切片存在一定难度,在切片过程中,厚的切片容易获得,但不易染色,或染色后不能辨别细胞的种类。薄的切片染色效果良好,但很容易造成种植钉与骨界面的分离。脱钙组织切片是将骨组织进行充分脱钙后,在尽量不破坏种植体界面组织形态的情况下将种植体取出,然后将标本行脱水透明、石蜡包埋及切片,再染色观察。这种切片厚度一般为5 μm左右,染色效果好,层次清楚。本研究中脱钙时间长达4~6个月,使标本呈橡皮样。排除了在去除种植体的过程中对界面组织产生牵拉破坏,将界面区可能存在的纤维组织随种植体一同取出,造成骨性结合的假象。

创伤愈合是一个十分复杂的过程。创伤不仅使身体局部发生一系列的变化,同时还可以引发不同程度地全身性反应,其中包括多种细胞、细胞因子和细胞外基质之间错综复杂的网络作用与关系,因此它涉及细胞运动、粘附、通讯、增殖和分化等细胞生物学的各个方面。本课题组下一步研究重点为探讨拔牙创愈合的生理过程对邻近微种植体-骨界面骨质改建影响的分子生物学机制。

参考文献:

[1] Chae J M. A new protocol of Tweed-Merrifield directional force technology with microimplant anchorage[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2006, 130(1): 100-109.

[2] 郑雷蕾, 胡赟, 宋锦璘, 等. 犬拔牙创愈合对相邻微种植体最大拉拔力值的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(11): 1106-1109.

[3] Butz F, Ogawa T, Nishimura I. Interfacial shear strength of endosseous implants[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2011, 26(4): 746-751.

[4] Cornelis M A, Vandergugten S, Mahy P, *et al*. Orthodontic loading of titanium miniplates in dogs: microradiographic and histological evaluation[J]. Clin Oral Implants Res, 2008, 19(10): 1054-1062.

[5] Zheng L, Tang T, Deng F, *et al*. The influence of extraction on the stability of implanted titanium microscrews: a biomechanical and histomorphometric study[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2009, 24(2): 267-274.

[6] Weng D, Stock V, Schliephake H. Are socket and ridge preservation techniques at the day of tooth extraction efficient in maintaining the tissues of the alveolar ridge? [J]. Eur J Oral Implantol, 2011, 4(5): 59-66.

[7] Vignoletti F, Matesanz P, Rodrigo D, *et al*. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review[J]. Clin Oral Implants Res, 2012, 23(Suppl 5): 22-38.

[8] Diedrich P, Wehrbein H. Orthodontic retraction into recent and healed extraction sites. A histologic study[J]. J Orofac Orthop, 1997, 58(2): 90-99.

[9] Zhang L, Zhao Z, Li Y, *et al*. Osseointegration of orthodontic microscrews after immediate and early loading[J]. Angle Orthod, 2010, 80(2): 354-360.

[10] Rahal M D, Branemark P I, Osmond D G. Response of bone marrow to titanium implants: osseointegration and the establishment of a bone marrow-titanium interface in mice[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 1993, 8(5): 573-579.

[11] Roberts W E, Helm F R, Marshall K J, *et al*. Rigid endosseous implants for orthodontic and orthopedic anchorage[J]. Angle Orthod, 1989, 59(4): 247-256.

[12] Brisceno C E, Rossouw P E, Carrillo R, *et al*. Healing of the roots and surrounding structures after intentional damage with miniscrew implants[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2009, 135(3): 292-301.

(收稿:2012-03-09;修回:2012-04-12)

(编辑 张 维)