

# 纳米羟基磷灰石复合胶原膜的组织学评估\*

李文浩<sup>1</sup>, 张敏<sup>2</sup>, 刘静明<sup>1</sup>

## Histological evaluation of nano-hydroxyapatite/collagen membranes

Li Wen-hao<sup>1</sup>, Zhang Min<sup>2</sup>, Liu Jing-ming<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Early used guided bone regeneration membrane composed of collagen, polylactic acid and other single components has gradually revealed its defects in the efficiency of osteogenesis, while guided bone regeneration membrane composed of collagen, polylactic acid and other absorbable materials as the carriers, in combination with hydroxyapatite, fibroblast growth factor, bone morphogenetic protein, has become a focus of the study.

**OBJECTIVE:** To evaluate the absorption and tissue reaction of nano-hydroxyapatite/collagen (nHAC) membrane for guided bone regeneration.

**METHODS:** Three kinds of guided bone regeneration membranes (nHAC, polylactic acid-polyglycolic acid, collagen) were implanted under the dorsal skin of the rats, which were respectively sacrificed on 10, 20, 30 and 45 days after implantation. Using hematoxylin-eosin staining, the specimens were assessed histologically for the quantity and quality of tissues surrounding the membranes, interface quality and degradation rate, the tissue reaction and degradation of three kinds of membranes were evaluated.

**RESULTS AND CONCLUSION:** There were scattered lymphocytes, but no macrophages in nHAC membrane. The surface of nHAC had some crystal calcium phosphates and the area decreased along with the time prolonging. The collagen membrane exhibited slight tissue reaction and completely degraded at 45 days. The polylactic acid-polyglycolic acid membrane infiltration increased and markedly wrapped up with tissues. The nHAC membrane has good biocompatibility and biodegradability *in vitro*, which meets the criterion of guided bone regeneration.

Li WH, Zhang M, Liu JM. Histological evaluation of nano-hydroxyapatite/collagen membranes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(42): 7835-7838. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

<sup>1</sup>Department of Stomatology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China; <sup>2</sup>Department of Prosthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Li Wen-hao★, Master, Attending physician, Department of Stomatology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China  
lwh1209@163.com

Received: 2010-05-31  
Accepted: 2010-07-26

### 摘要

**背景:** 初期使用的胶原、聚乳酸等单组分诱导骨再生膜在诱导成骨的效率方面已逐渐暴露其缺陷, 于是以胶原、聚乳酸等可吸收材料为载体, 羟基磷灰石、纤维生长因子、骨形成蛋白等为填料的诱导骨再生膜成为国内外研究的重点。

**目的:** 观察纳米羟基磷灰石复合胶原膜组织反应对诱导骨再生的适用性。

**方法:** 将聚丙烯交酯乙交酯膜、胶原膜、纳米羟基磷灰石复合胶原膜光滑面和粗糙面分别植入大鼠皮下, 于 10, 20, 30, 45 d 取出, 采用苏木精-伊红染色法, 依照纤维包膜定量、定性、界面定性和降解率等进行组织学评分, 研究 3 种膜的组织反应和降解情况。

**结果与结论:** 纳米羟基磷灰石复合胶原膜在各个观察时间均有散在的淋巴细胞, 但未见明显的巨噬细胞。随着时间的延长, 膜逐渐变小, 钙化物随着植入时间的延长而增加。胶原膜组织反应轻微, 45 d 几乎完全降解。聚丙烯交酯乙交酯膜浸润增多, 纤维包裹明显。结果提示纳米羟基磷灰石复合胶原膜具有良好的生物相容性和适度的降解性, 适合引导骨组织再生的需要。

**关键词:** 引导骨组织再生; 纳米羟基磷灰石复合胶原膜; 组织学评估; 生物降解; 聚丙烯交酯乙交酯

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.42.011

李文浩, 张敏, 刘静明. 纳米羟基磷灰石复合胶原膜的组织学评估[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(42):7835-7838. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

<sup>1</sup>首都医科大学附属同仁医院口腔科, 北京市 100730; <sup>2</sup>四川大学华西口腔医院修复科, 四川省成都市 610041

李文浩★, 男, 1977 年生, 四川省成都市人, 汉族, 2004 年四川大学华西口腔医学院修复科, 四川省成都市 610041 主治医师, 主要从事修复及种植方面的研究。  
lwh1209@163.com

中图分类号:R318  
文献标识码:B  
文章编号:1673-8225  
(2010)42-07835-04

收稿日期:2010-05-31  
修回日期:2010-07-26  
(20100531019/M·Y)

## 0 引言

目前诱导骨再生 (guided bone regeneration, GBR) 膜广泛应用于牙周和种植手术的骨缺损区。通过膜的物理屏障功能, 保护骨创及血凝块; 创造一个相对封闭的骨组织再生空间, 对抗软组织表面压力; 阻止上皮和结缔组织长入骨创; 诱导成骨活动; 增强成骨区骨密度; 保证正常的体液循环和营养供给, 对抗炎症反应, 为组织愈合提供生理平台<sup>[1-3]</sup>。

初期使用的胶原、聚乳酸等单组分 GBR 膜

在诱导成骨的效率方面逐渐暴露其缺陷, 于是以胶原、聚乳酸等可吸收材料为载体, 羟基磷灰石、纤维生长因子、骨形成蛋白等为填料的 GBR 膜成为国内外研究的重点。由于纳米材料具有表面效应、小尺寸效应及量子效应等独特的性能, 纳米级羟基磷灰石粒子较普通的羟基磷灰石具有更强的生物活性, 国内外尚没有成熟的以纳米级羟基磷灰石为填料的复合膜。

实验建立皮下植入纳米级羟基磷灰石/胶原 (nano-hydroxyapatite/collagen, nHAC) 膜的大鼠动物模型, 利用组织切片的方法, 对 nHAC 膜进行生物材料的组织反应评分, 并与胶原膜

(collagen, COL)、聚丙交酯乙交酯膜 (poly(dl-lactide-co-glycolic acid)s, PLGA) 进行比较, 为国产引导骨组织再生膜的临床应用提供生物学实验数据。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2004-02/04在四川大学实验动物中心及华西口腔医学病理科完成。

**材料:**

**植入材料:** nHAC 膜由清华大学生物材料系以仿生策略合成的纳米级羟基磷灰石和胶原纤维为主要成分制备, 采用胶态晶体法自引发体系, 利用胶原溶液的自组装特性, 使纳米团簇组装成胶状晶体, 具有二维或三维的超晶格, 天然骨特有的纳米级层状周期结构, 正面结构较为均一, 孔径5~55 μm, 反面较为粗糙, 有若干突起, 孔径10~75 μm, 其间有大量nHA晶体。

胶原膜(BME-10X型, 中国医学科学院、中国协和医科大学生物医学工程研究所); PLGA膜(清华大学提供)。

以上材料制成直径约6 mm的圆膜片, γ射线消毒(0.6×10<sup>4</sup> Gy, 6 min)备用。

**实验动物:** 3月龄SD大鼠20只, 体质量300 g左右, 雌雄不限, 由四川大学实验动物中心提供并喂养。实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求<sup>[4]</sup>。

**实验方法:**

**膜材料植入方法:** SD大鼠肌注速眠新(1.5 mL/kg; 长春军事医学科学院)全身麻醉, 以脊柱为轴3 cm×5 cm备皮、消毒, 沿脊柱纵向切开皮肤20 mm长, 至皮下组织, 向左上、左下、右下、右上做潜行钝性分离, 形成4个潜行通路, 宽8 mm, 长20 mm, 每只动物埋植nHAC膜光滑面、nHAC膜粗糙面、PLGA膜、胶原膜4种材料各1片, 间距至少20 mm, 然后在钝分离的通道上加缝一针, 加以固定。

n-HAC膜光滑、粗糙面分别以贴进肌肉为准, PLGA、胶原膜无正反面随机放置。埋植后全层缝合皮肤, 大鼠分笼喂养, 自由进食饮水。自然昼夜采光, 室温18~26 °C, 每日早晚喂食, 隔日换水, 湿度50%左右。术后3 d肌注青霉素1 000 U/d。

**标本处理:** 20只大鼠随机分成4组, 分别于术后10, 20, 30, 45 d注射过量速眠新处死。将实验材料及其周围组织以体积分数为10%甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切片, 厚度5 μm, 苏木精-伊红染色, 光镜观察。

**结果判定:** 参考Jansen等<sup>[5]</sup>在Biomaterial的组织评测标准, 同时为了提高实验准确性, 排除植入部位的感染因素, 建立如下的组织反应评分标准。

### 组织反应评分标准:

分值	纤维包膜定量	纤维包膜定性	接触材料的组织界面定性	降解率
4	1~4 层纤维	包膜是纤维, 成熟的低密度组织, 像非炎症区的结缔组织和脂肪组织	没有异物巨嗜细胞和淋巴细胞	降解 > 65% 或分解成 20 个以上的碎片
3	5~9 层纤维	包膜是纤维, 是非成熟的, 有纤维和胶原	散在的淋巴和异物巨嗜细胞	35% < 降解 < 65% 或分解成 11~20 个的碎片
2	10~30 层纤维	包膜是颗粒的, 实性的。有免疫和纤维细胞	具有一层淋巴和异物巨嗜细胞	降解 < 35% 或分解成 2~10 个碎片
1	大于 30 层纤维	包裹大量的免疫细胞, 只有一点或不明显的结缔组织	大量的淋巴和异物巨嗜细胞	完全不降解
0	纤维层数多无法统计	反应强烈无法评估	反应强烈无法观测和评估	

**主要观察指标:** 观察纤维包膜的层数和组成, 接触材料的组织界面反应和埋入材料的形态变化。

**设计、实施、评估者:** 实验参考Jansen JA的方法, 由作者设计并收集资料, 病理科采用双盲法制作标本和评估。

**统计学分析:** 不同材料在不同时间的组织反应评分, 采用多因素方差分析检验, 当P < 0.05时差异有显著性意义。所有统计处理均在SPSS 10.0软件上进行。

## 2 结果

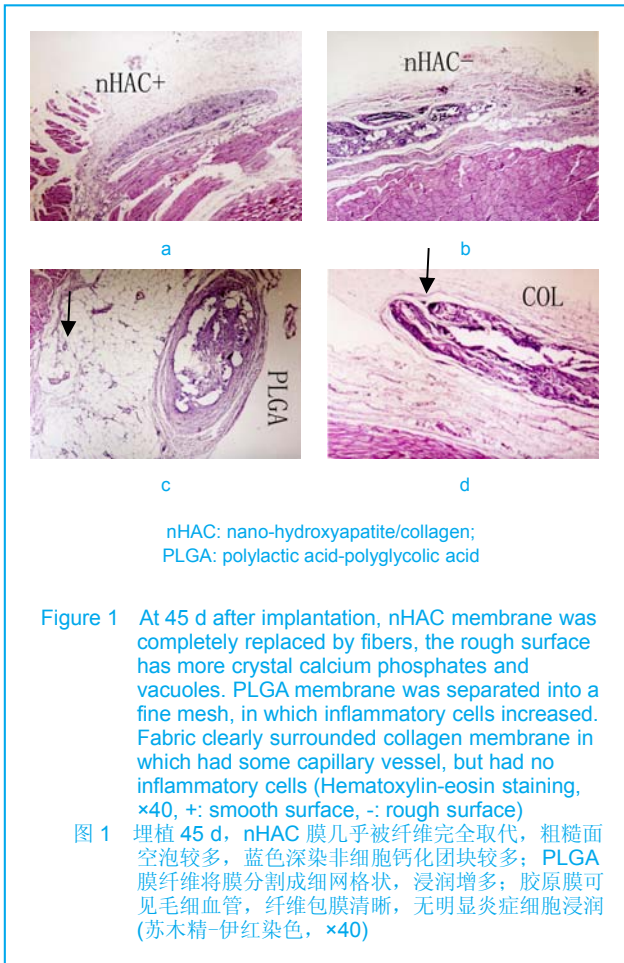
**2.1 实验动物数量分析** 20只大鼠全部进入结果分析中, 中途无脱落。

**2.2 组织反应描述**

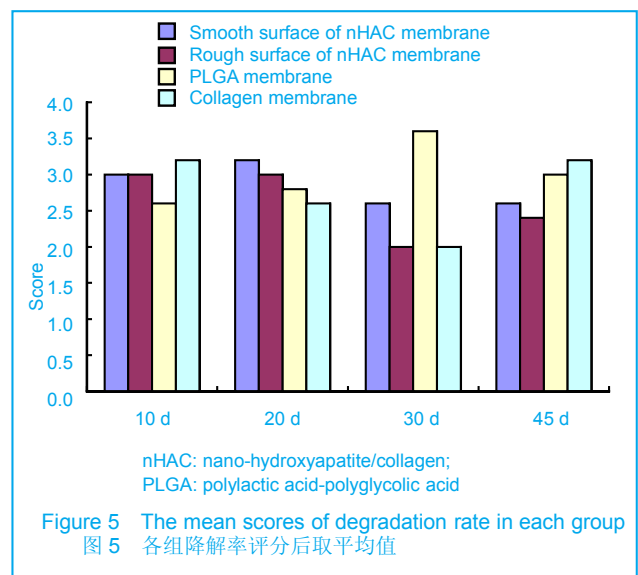
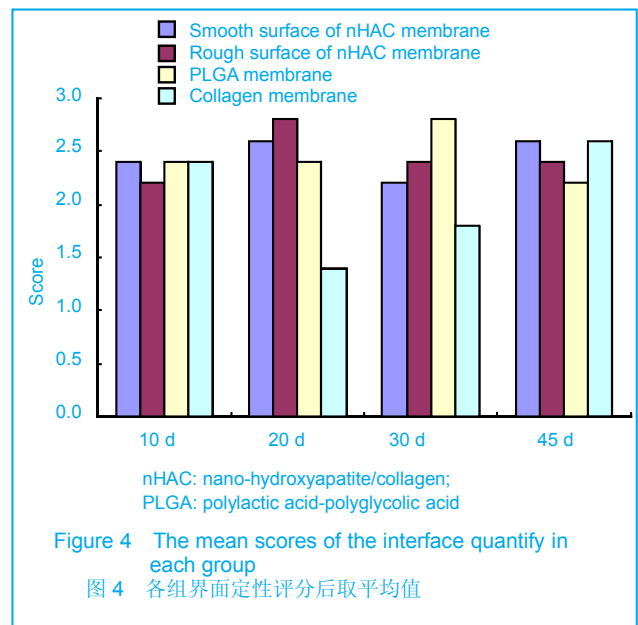
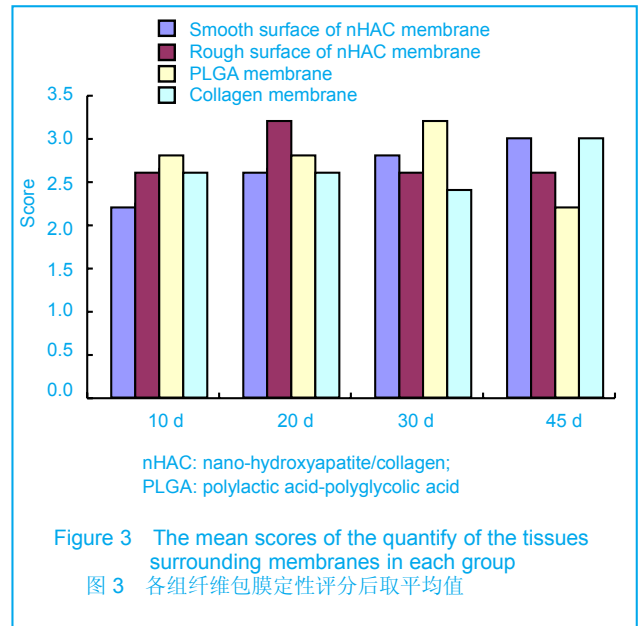
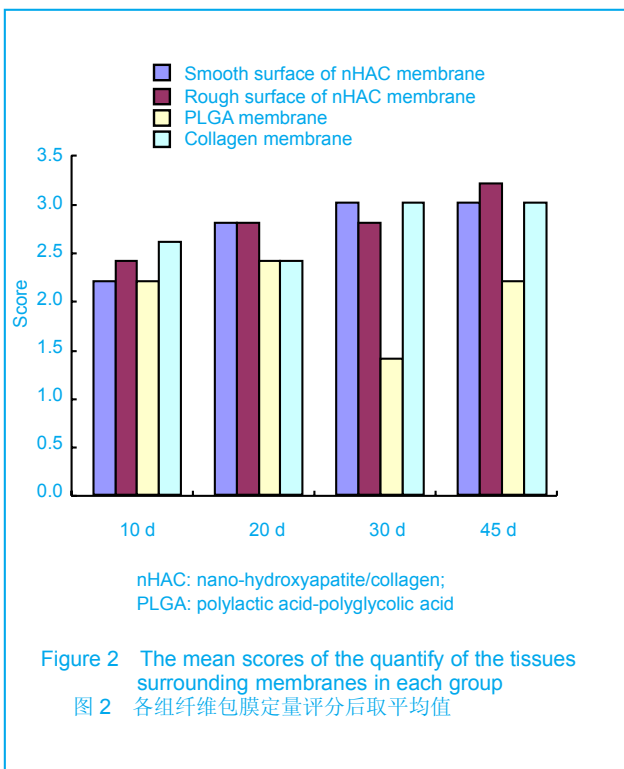
**国产nHAC膜:** 降解速度较慢。在45 d后, 只有部分断裂, 膜的形态依然可见。在各观测时期, 可见散在的淋巴细胞和中性粒细胞, 未见明显的异物巨嗜细胞。随着时间的延长, 炎性细胞浸润带逐渐变薄, 纤维包膜变稀, nHAC膜光滑面与肌肉接触的组织反应较粗糙面大。在膜内和边缘有蓝色深染非细胞团块钙化物随着时间的延长逐渐增大。见图1a,b。

**胶原膜:** 组织反应轻微, 45 d几乎完全降解。见图1c。

**PLGA膜:** 浸润增多, 纤维包裹明显, 组织反应大。见图1d。



2.3 组织反应评分 各组依照纤维包膜定量、定性、界面定性和降解率进行组织反应评分, 见图2~5。





在SPSS10.0软件上采用多因素方差分析检验, 在同一时期, 不同材料的组织反应, 差异具有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。在不同时期, 不同材料的组织反应, 差异也具有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。nHAC膜相对胶原膜和PLGA膜组织反应轻微。

### 3 讨论

胶原具有良好的生物相容性, 在诱导骨再生中广泛使用。其可以引导纤维原细胞聚集形成早期的伤口覆盖, 促进止血, 有利于血块的稳定和伤口的愈合, 形成胶原支架增加皮瓣厚度, 维持一定的空间形态, 保护血块, 屏蔽不想要的组织和细胞(上皮细胞和结缔组织), 促进骨形成蛋白的分泌<sup>[6]</sup>。Bunyaratavej等<sup>[7]</sup>认为孔径大于2  $\mu\text{m}$ 的胶原, 可以调控白细胞长入, 控制材料内感染。同时孔径多, 表面积大, 成骨细胞和特异性结合位点(精氨酸、甘氨酸)就多; 表面具有的负电荷可以吸引成骨细胞, 改变细胞的新陈代谢, 提高细胞活力, 形成蛋白多糖的聚集, 促进细胞外基质的表达和骨形成因子的释放, 促进成骨细胞黏附和扩散, 提高成骨效率<sup>[8-11]</sup>。

本实验采用胶原作为nHAC膜的载体, 孔径5~75  $\mu\text{m}$ , 满足孔径大于2  $\mu\text{m}$ 的要求。在植入早期, 纤维包膜定量反应和胶原膜无明显区别, 有少量的淋巴细胞和中型粒细胞浸润, 纤维包裹层数较多, 与胶原在植入初期的降解速度较快有关, 但是与同期的PLGA膜相比, 组织反应还是比较温和的。到了后期, 纤维包膜定量反应和胶原膜相近, 甚至更小。主要是由于胶原降解产物主要以短肽和氨基酸(天冬酰胺酸、谷胺酸盐)为主, 其降解和吸收的过程中, 产生的酸和产物可诱发周围组织轻微的炎症反应和多核巨细胞聚集<sup>[12]</sup>。羟基磷灰石在水和体液中, 可以游离OH<sup>-</sup>, 使局部pH值升高, 可以中和胶原降解产生的酸, 提高膜表面的pH值, 降低周围组织的炎症反应。

实验中, nHAC膜在30 d只有部分降解, 依然保持膜的形态, 在45 d破损, 可见大量残渣, 苏木精-伊红染色发现膜的形态还在, 而胶原膜在45 d基本完全降解。羟基磷灰石起到关键作用。羟基磷灰石可以和胶原以共价键结合, 形成网状结构, 延缓降解速度, 并且在表面构成屏障, 降解受到物理屏障的作用, 吸收减慢<sup>[13]</sup>, 说明nHAC膜满足GBR的要求。

本实验采用清华大学生物材料系以仿生策略合成的nHAC膜, 其表面的nHAC尺寸小, 表面积大, 表面能高, 因而具有很高活性<sup>[14]</sup>。实验观察, 在动物体内边缘有微小的蓝色深染, 为钙化团块。随着体内植入时间的延长, 钙化团块增多增大。nHAC膜表面凹凸不平, 形成的网状结构可以引导骨细胞的黏附和聚集, 成骨细胞受体分泌物附着在含有精氨酸、甘氨酸、天冬氨酸序列的I型胶原, 或在体内吸收和分泌精氨酸、甘氨酸、天冬

氨酸, 在肌动蛋白的影响下, 改变细胞形态和功能, 调整DNA表达, 增强细胞的黏附<sup>[15-16]</sup>。nHCA明显促进成骨细胞的表达和代谢物的分泌, 促进钙离子的聚集和碱性磷酸酶的活性, 成为钙离子聚集的引核, 提高成骨细胞的黏附, 爬行生长<sup>[17-19]</sup>。同时nHAC本身含有OH<sup>-</sup>, 降解时局部呈碱性, 加速钙离子的聚集。

国产纳米级羟基磷灰石复合胶原膜具有良好的生物相容性和适度的降解性, 其网状气孔样结构有利于成骨细胞的黏附、成骨功能及局部钙化, 适合引导骨组织再生的需要。同时其表面结构不均一, 孔隙并不均匀, 会影响材料的性能, 纳米级尺度和颗粒表面形态的深度难以控制, 有待加工工艺的改善和提高。

### 4 参考文献

- [1] Kay SA, Lynch LW, Marxer M, et al. Guide bone regeneration integration of a resorbable membrane and a bone graft material [J]. *Practical periodontics and Aesthetic Dentistry*. 1997;9(2):185-194.
- [2] Buser D, Dula K, Hirt HP, et al. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996;54(4):420-432.
- [3] Cosyn J, De Bruyn H. Guided bone regeneration: general survey. *Rev Belge Med Dent*. 2009;64(4):160-172.
- [4] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals. 1988-10-31. 国家科委. 实验动物管理条例. 1988-10-31.
- [5] Jansen JA, de Ruijter JE, Janssen PT, et al. Histological evaluation of a biodegradable Polyactive/hydroxyapatite membrane. *Biomaterials*. 1995;16(11):819-827.
- [6] Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;(371):10-27.
- [7] Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol*. 2001;72(2):215-229.
- [8] Schropp L, Kostopoulos L, Wenzel A. Bone healing following immediate versus delayed placement of titanium implants into extraction sockets: a prospective clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18(2):189-199.
- [9] Flemming RG, Murphy C J, Abrams GA, et al. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*. 1999;20(6):573-588.
- [10] Gelinsky M, Welzel PB, Simon P, et al. Porous three dimensional scaffolds made of mineralised collagen Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone. *Chemical Engineering Journal*. 2008;137:84-96.
- [11] Behring J, Junker R, Walboomers XF, et al. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology*. 2008;96(1):1-11.
- [12] Hutmacher D, Hürzeler MB, Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11(5):667-678.
- [13] Wu TJ, Huang HH, Lan CW, et al. Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2004;25(4):651-658.
- [14] Liao S, Xu G, Wang W, et al. Self-assembly of nano-hydroxyapatite on multi-walled carbon nanotubes. *Acta Biomater*. 2007;3(5):669-675.
- [15] Rodrigues CV, Serricella P, Linhares AB, et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24(27):4987-4997.
- [16] Liu H, Zhang L, Li J, et al. Physicochemical and Biological Properties of Nano-hydroxyapatite-Reinforced Aliphatic Polyurethanes Membranes. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2010. [Epub ahead of print]
- [17] Cheng XM, Li YB, Zuo Y, et al. Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration. *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29(1):29-35.
- [18] Schönmeier BH, Wong AK, Li S, et al. Treatment of hydroxyapatite scaffolds with fibronectin and fetal calf serum increases osteoblast adhesion and proliferation in vitro. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(3):751-762.
- [19] Dawson JI, Wahl DA, Lanham SA, et al. Development of specific collagen scaffolds to support the osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2008;29(21):3105-3116.