

注射型纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合体诱导牙周组织的再生

巴格那^{1,2}, 陈华荣^{1,2}, 李婷^{1,2}, 谢富强¹, 鱼灵会³(¹兰州大学第二医院, 甘肃省兰州市 730000; ²兰州大学口腔医学院, 甘肃省兰州市 730000; ³兰州大学第一医院东岗院区口腔科, 甘肃省兰州市 730000)

文章亮点:

- 1 目前修复牙周组织缺损的治疗手段有很多, 但效果多不理想, 本实验采用组织工程的原理和方法应用于牙周组织, 以探索一种方便有效使牙周组织再生的治疗方法。
- 2 模拟人牙周炎过程制备大鼠实验性牙周缺损模型, 将可注射纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合体应用于大鼠牙周缺损, 观察成骨效果, 可更好地模拟人牙周炎治疗愈合过程。
- 3 实验结果表明可注射性纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合体具有良好的生物相容性, 骨诱导能力强, 使用方便安全, 可显著修复缺损的牙周支持组织。

关键词:

生物材料; 纳米材料; 可注射性; 纳米壳聚糖凝胶; 骨形态发生蛋白2; 牙周组织再生

主题词:

壳聚糖; 凝胶类; 骨形态发生蛋白类

基金资助:

兰州市科技计划项目(2011-2-50); 甘肃省科技支撑计划项目(1011FKCA103)

摘要

背景: 壳聚糖水凝胶具有良好的生物相容性、生物可降解性及抗菌性等特点, 具有促进组织愈合和成骨诱导的作用, 作为支架材料负载生长因子可保证外源生长因子的缓慢高效释放。

目的: 观察可注射性纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合体促进大鼠牙周组织再生的效果。

方法: 将54只Wistar大鼠随机均分为3组, 建立第二磨牙慢性牙周炎模型, 建模成功后, 实验组于第二磨牙牙周内植入可注射性纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合体, 对照组于第二磨牙牙周内植入可注射性纳米壳聚糖凝胶, 空白组牙周内不植入任何药物。术后3, 6, 9周, 进行牙龈出血指数、探诊深度、松动度、X射线片及组织病理学切片观察。

结果与结论: 实验组术后9周的探诊深度、松动度均低于对照组及空白组($P < 0.05$)。术后9周, 实验组牙槽骨高度修复再生至根分叉处, 骨小梁致密, 分布均匀, 可见大量牙骨质样结构、牙周韧带生成, 新生牙槽骨致密且均匀分布在骨缺损区域, 修复效果明显优于对照组及空白组。表明可注射性纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合体具有抗炎和引导牙周组织再生的作用。

巴格那, 陈华荣, 李婷, 谢富强, 鱼灵会. 注射型纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合体诱导牙周组织的再生[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(38):6184-6189.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.38.021

Injectable nano/chitosan/bone morphogenetic protein-2 induces periodontal tissue regeneration

Ba Ge-na^{1,2}, Chen Hua-rong^{1,2}, Li Ting^{1,2}, Xie Fu-qiang¹, Yu Ling-hui³ (¹Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ²School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ³Department of Stomatology, Donggang Branch, First Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Chitosan hydrogel has good biocompatibility, biodegradability and antibacterial property, which can promote tissue healing and induce bone formation. As a scaffold carrying growth factors, it can ensure the efficient and slow release of exogenous growth factors.

OBJECTIVE: To observe the effect of injectable nano/chitosan/bone morphogenetic protein-2 composite to promote periodontal tissue regeneration in rats.

METHODS: Fifty-four Wistar rats were randomized into three groups, and then chronic periodontitis model of the second molar was established. After modeling, injectable nano/chitosan/bone morphogenetic protein-2 composite was implanted into the periodontal tissue of the second molar in the experimental group; injectable nano/chitosan hydrogel was implanted in the control group; and nothing was implanted in the blank group. At 3, 6, 9 weeks after surgery, gingival bleeding index, probing depth, and tooth mobility were detected. X-ray and histopathological observations were carried out.

RESULTS AND CONCLUSION: At 9 weeks after surgery, the probing depth and tooth mobility were both lower

巴格那, 男, 1987年生, 蒙古族, 内蒙古自治区阿拉善市人, 在读硕士, 主要从事牙周组织工程研究。

通讯作者: 谢富强, 教授, 主任医师, 兰州大学第二医院, 甘肃省兰州市 730000

通讯作者: 鱼灵会, 副教授, 主任医师, 兰州大学第一医院东岗院区口腔科, 甘肃省兰州市 730000

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2015)38-06184-06
稿件接受: 2015-07-04
<http://www.crter.org>

Ga Ge-na, Studying for master's degree, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Corresponding author: Xie Fu-qiang, Professor, Chief physician, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Corresponding author: Yu Ling-hui, Associate professor, Chief physician, Department of Stomatology, Donggang Branch, First Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Accepted: 2015-07-04

in the experimental group than the other two groups ($P < 0.05$). In the experimental group, the alveolar bone height was restored at the root bifurcations, bone trabeculae were arranged densely and evenly, the newly formed periodontal ligament and alveolar bone tissues were dense and equally distributed in the bone defect area at 9 weeks after surgery, indicating a better restoration effect than the control and blank groups. These findings suggest that the injectable nano/chitosan/bone morphogenetic protein-2 composite has an anti-inflammatory role and can guide periodontal tissue regeneration.

Subject headings: Chitosan; Gels; Bone Morphogenetic Proteins

Funding: the Science and Technology Plan of Lanzhou City, No. 2011-2-50; the Science and Technology Plan of Gansu Province, No. 1011FKCA103

Ba GN, Chen HR, Li T, Xie FQ, Yu LH. Injectable nano/chitosan/bone morphogenetic protein-2 induces periodontal tissue regeneration. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(38):6184-6189.

0 引言 Introduction

牙周炎是一种由菌斑引起的慢性感染性疾病,可引起牙周支持组织牙槽骨、牙骨质、牙周膜和牙龈的破坏,导致近10%的成年人牙齿松动及牙齿丧失,严重影响中老年人的生活质量^[1]。经过常规治疗后,大多数牙周炎症可得到控制,但炎症破坏的牙周支持组织难以得到修复。近几年随着组织工程学的快速发展,寻找一种新的材料和方法治疗牙周炎逐渐受到学者的广泛关注,对牙周组织工程的研究,既需要生长因子长效发挥作用促进牙周膜细胞的增殖分化,又需要一种生物学性能优异的支架材料支持细胞生长。

壳聚糖作为一种天然衍生多糖类^[2],具有良好的生物活性、生物相容性、生物降解性,无毒、无刺激、无免疫原性、无热源反应、不溶血、无致突变性及可自然降解,以及良好的缓释和控释作用等特点^[3],可以促进伤口愈合和组织修复^[4]。壳聚糖温敏凝胶在人的正常体温下(37 °C)形成半固体凝胶,兼具溶液与凝胶的特点,将其作为注射型凝胶支架更有利于细胞增殖和黏附,且易于操作^[5]。骨形态发生蛋白是一类能在骨骼外异位诱导软骨和骨形成的酸性多肽^[6],目前已有大量文献报道将支架材料和骨形态发生蛋白复合应用于骨组织缺损,获得了较好的成骨诱导性及骨组织修复和重建效果^[7-8]。不同生物载体及复合方式将会影响骨形态发生蛋白2的释放与成骨表达^[10-12]。

本实验采用 β -甘油磷酸钠制备温敏性可注射纳米壳聚糖凝胶,将其作为载体与骨形态发生蛋白2复合,将复合凝胶注射至大鼠牙周缺损处,对比单纯可注射性壳聚糖凝胶和壳聚糖/骨形态发生蛋白2复合凝胶诱导成骨的效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年4月11日在兰州大学生命科学院动物所完成。

1.3 材料

实验动物: 4周龄雄性Wistar大鼠54只,体质量180-200 g,由甘肃中医学院实验动物中心提供,许可证号SCXK 2011-0001。将54只大鼠随机均分为3组,实验组、对照组及空白组。

复合凝胶诱导牙周组织再生实验用试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
纳米壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$)	四川广汉恒宇新材料有限公司
重组人骨形态发生蛋白2	BBI, 加拿大
冰乙酸	分析纯
β -甘油磷酸钠、大肠杆菌标准内毒素	Sigma, 美国
RapidCal-Immuno 脱钙剂	北京中杉金桥
电子天平	塞多利斯, 德国
磁力搅拌器	上海大中分析仪器厂
pH 计	塞多利斯, 德国
振荡搅拌器	金坛市晶玻实验仪器厂
恒温孵箱	江苏金坛市大地自动化仪器厂
牙科 X 射线机	INTR, 芬兰
牙周双头刻度探针	Hu-Friedy
硬组织切片机	Microm, 德国
光学显微镜及照相系统	OLYMPUS, 日本

1.4 实验方法

可注射性温敏纳米壳聚糖凝胶的制备: 根据Hu等^[13]的方法制备可注射性温敏纳米壳聚糖凝胶。

纳米壳聚糖溶液的配制: 量取0.3 g冰醋酸, 配制0.1 mol/L的乙酸溶液备用, 将0.3 g纳米壳聚糖(脱乙酰度 $> 90\%$)加入12 mL上述浓度的乙酸溶液中, 磁力搅拌2 h, 将搅拌均匀的纳米壳聚糖溶液封存于4 °C冰箱过夜, 过夜后置于高压高压灭菌锅中消毒(121 °C, 10 min), 待灭菌后的纳米壳聚糖溶液自然冷却后, 4 °C冰箱封存备用。

β -甘油磷酸钠溶液的配制: 准确称取1.2 g β -甘油磷酸钠溶于无菌纯水, 置振荡搅拌器搅拌, 配制成2.14 mL 质量分数56%的溶液, 0.22 μm 过滤器除菌, 封存后4 °C冰箱备用。

可注射性纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合凝胶的制备: 室温下(25 °C)制备6 mL重组人骨形态发生蛋白2质量浓度为2 mg/L的纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合凝胶体系。先将重组人骨形态发生蛋白2与纳米壳聚糖溶液混合, 在振荡搅拌器上振荡混匀。然后在磁力搅拌条件下, 将

β -甘油磷酸钠缓慢逐滴加入到壳聚糖溶液中, 观察溶液逐渐浑浊后, 继续滴加至溶液清亮状态, 停止滴加, 加入0.1 mmol/L乙酸调节pH至7.2, 4 °C冰箱保存。配制完成后取少量溶液置于37 °C恒温孵箱内, 约6 min后形成凝胶半固体说明配制成功。使用时, 将纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合凝胶溶液注入大鼠牙周缺损处。

牙周炎动物模型制作: 根据Kuhr和瞿凤环等^[14-15]方法制作大鼠慢性牙周炎模型。用10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉, 采用正畸用结扎丝(直径0.2 mm)结扎大鼠左侧上颌第二磨牙牙颈部, 同时在大鼠左侧上颌第二磨牙颊舌侧自龈沟注射2 g/L脂多糖0.1 mL(3次/周, 隔日1次), 4周后根据X射线牙片观察大鼠牙槽骨高度, 确立牙周炎模型: 以牙槽脊顶消失, 牙槽骨吸收达根长1/3为标准。

拆除结扎丝, 冲洗牙周袋, 按实验设计分组注射治疗。实验组和对照组大鼠在牙周袋内分别注射纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合凝胶和可注射性纳米壳聚糖凝胶, 空白对照组不注射任何药物。手术过程中注射针深入到牙周袋底部, 缓慢注射, 边注射边退针, 直到药物溢出龈缘为止, 颊舌侧均要注射, 注射完毕后大鼠开口状态保持6 min, 等待纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合凝胶和可注射性纳米壳聚糖凝胶凝固成胶, 注射3次/周, 注射1周。定期进行临床牙周检查。

于治疗后第3, 6, 9周每组处死大鼠6只, 进行X射线牙片及组织病理学观察。

1.5 主要观察指标

临床检查: 实验过程中对实验牙位每周进行牙周检查并记录参数, 检查指标为: ①牙龈出血指数: 不出血, 游离龈缘无炎症为0; 龈缘无红肿, 探诊出血, 为1; 龈缘发红肿, 探诊出血, 为2; 自发性出血, 牙龈红肿明显, 溃疡, 为3。②探诊深度: 用牙周探针探诊选用牙牙周袋, 每牙选近中颊、颊侧、远中颊3个点测量, 取平均值。③牙松动度: 不松动为0, 轻度松动(颊舌向松动)为1, 中度松动(近远中向松动)为2, 重度松动(垂直向松动)为3。所有参数由同一检查者完成测定。

X射线片: 建模第4周, 全麻下使用牙科X射线机拍摄X射线片(70 kV, 6 mA, 0.05 s), 使磨牙长轴与地面约成35°。X射线片显示: 牙槽骨吸收明显, 达根长1/3, 确定牙周炎形成。治疗后的第3, 6, 9周, 冲洗龈沟, 将上颌骨拍X射线牙片, 观察治疗效果。

组织病理学观察: 心脏灌注处死动物, 取上颌骨标本, 40 g/L多聚甲醛固定24 h, 使用RapidCal·Immuno脱钙液脱钙2周, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 包埋。制备牙齿牙周组织联合切片(厚度4.5 μ m), 常规苏木精-伊红染色, 光镜观察各组术后牙周组织情况。

1.6 统计学分析 所得数据使用 Excel 建立数据库, 使用SPSS 17.0统计学软件进行统计分析。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 54只大鼠均造模成功, 进入结果分析。

2.2 牙周指数观察 空白组、对照组及实验组在建模、术后3, 6, 9周牙周指数检查结果见表1-3。

牙龈出血指数: ①组间比较: 建模后3组间牙龈出血指数比较差异无显著性意义。术后3, 6周, 3组间两两比较差异均无显著性意义。术后9周, 实验组牙龈出血指数低于空白组($P < 0.05$), 其余组间两两比较差异均无显著性意义。②组内比较: 空白组牙龈炎症明显, 组内不同时间点比较差异均无显著性意义。对照组术后9周的牙龈出血指数低于建模后及术后3周($P < 0.01$)。实验组术后9周的牙龈出血指数低于建模后及术后3周($P < 0.01$)。

探诊深度: ①组间比较: 建模后3组间探诊深度比较差异无显著性意义。实验组术后3周的探诊深度低于对照组、空白组($P < 0.05$), 对照组与空白组之间比较差异无显著性意义。术后6, 9周, 实验组探诊深度低于对照组、空白组($P < 0.01$)。②组内比较: 空白组各时间点探诊深度无差异。对照组术后6, 9周的牙周袋探诊深度低于建模后($P < 0.01$), 术后9周探诊深度低于术后3周($P < 0.05$)。实验组术后3周牙周袋探诊深度低于建模后($P < 0.01$), 术后9周牙周袋探诊深度低于术后3, 6周($P < 0.01$)。

松动度: ①组间比较: 建模后及术后3周, 3组间松动度比较差异无显著性意义。实验组术后6周松动度低于空白组($P < 0.05$)。实验组术后9周的松动度低于空白组($P < 0.01$)、对照组($P < 0.05$)。②组内比较: 空白组不同时间点的松动度均无差异。对照组术后9周的松动度低于建模后($P < 0.01$)、术后3周($P < 0.05$), 术后6周的松动度低于建模后($P < 0.05$)。实验组术后3, 6, 9周的松动度低于建模后($P < 0.01$), 术后9周的松动度低于术后3周($P < 0.01$)、术后6周($P < 0.05$)。

2.3 上颌骨X射线观察 空白组明显牙槽骨吸收, 骨吸收均在根中1/3之处, 硬骨板中断, 牙周膜间隙增宽, 术后第3, 6, 9周的牙周组织变化不明显, 牙槽骨密度影像持续低下, 未见明显修复。实验组第3周即可观察到明显骨质修复, 牙周膜间隙减少; 第6周可见到明显牙槽骨修复, 骨密度影近似正常牙槽骨影像, 牙周膜间隙明显缩小, 第9周可见牙槽骨高度修复再生至根分叉处, 骨小梁致密, 分布均匀。对照组术后3, 6周修复缓慢, 到第9周虽然可以见到骨质修复, 但骨质稀疏, 仍可见到明显的牙周膜间隙及根分叉处贯通影像。对照组及空白组骨质修复、牙周膜间隙变化及骨密度改变不及实验组明显(图1)。

2.4 上颌骨标本组织病理学观察 空白组牙周组织周围有大量炎症细胞浸润, 密质骨和固有牙槽骨失去联系, 松质骨缺损处缺如, 周围骨质结构疏松紊乱, 未见到明显骨质形成, 仅少量疏松结缔组织分布, 少量新形成的牙周纤维稀疏紊乱, 排列不规则。术后第6, 9周, 对照组和实验组均有不同程度的牙周组织新附着形成, 实验组可见大量牙骨质样

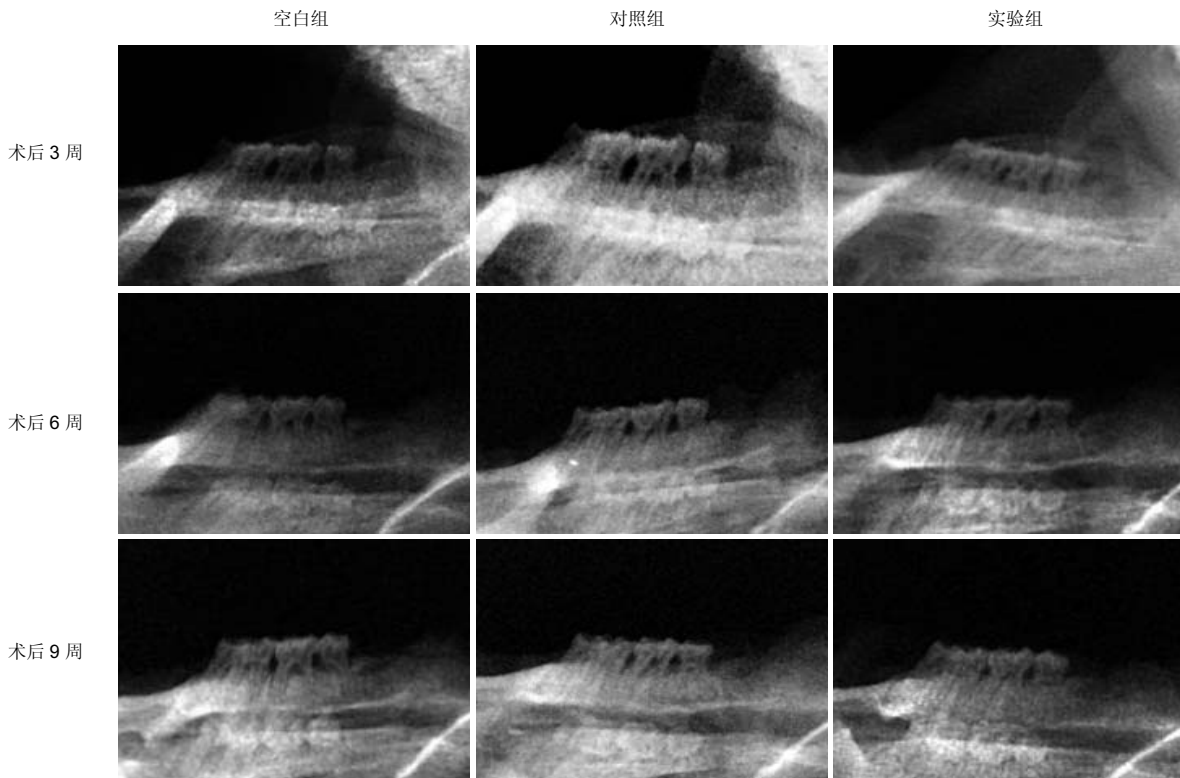


图 1 各组大鼠术后第 3, 6, 9 周的上颌骨标本 X 射线检查结果

Figure 1 X-ray films of the rat's maxilla at 3, 6, 9 weeks after surgery

图注: 对照组及空白组骨质修复、牙周膜间隙变化及骨密度改变不及实验组明显。

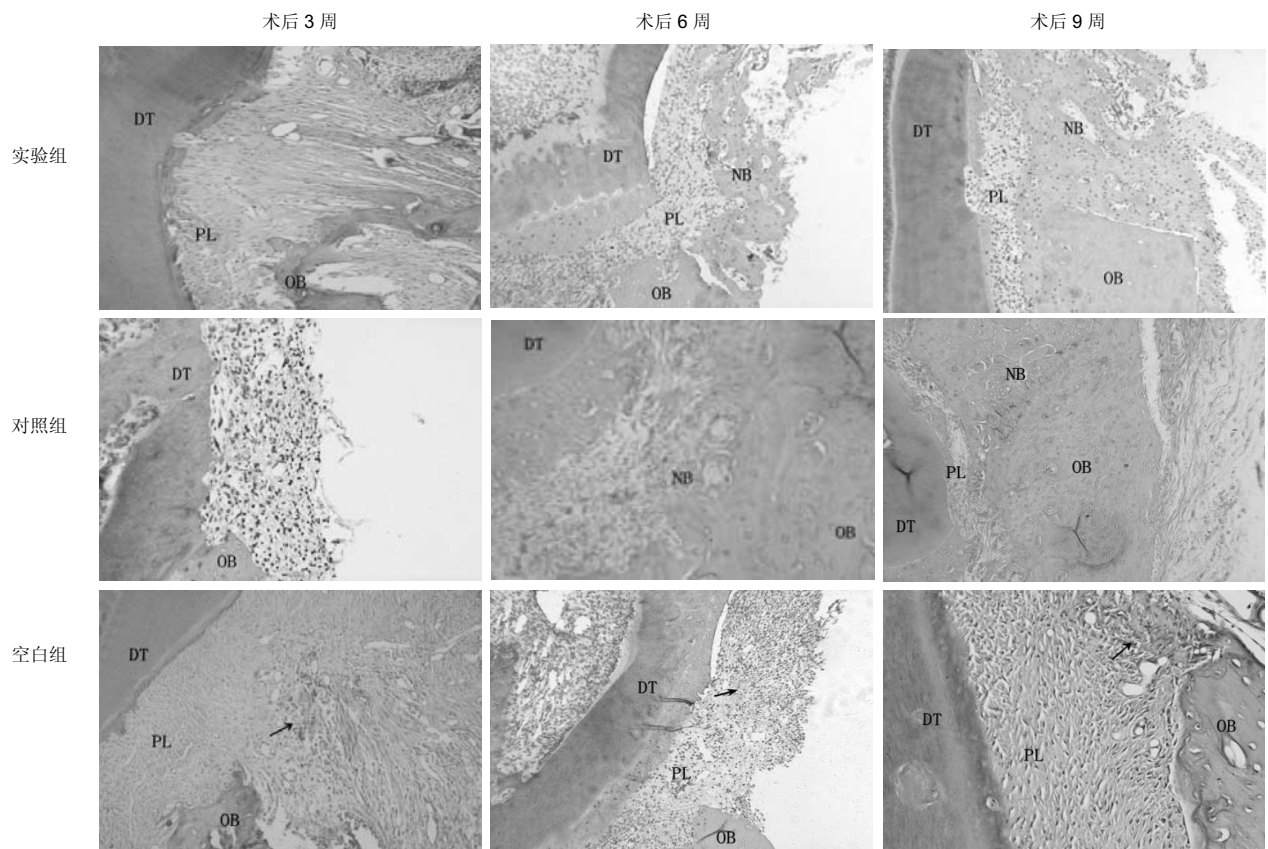


图 2 各组术后第 3, 6, 9 周下颌骨标本组织病理学观察(苏木精-伊红染色, ×40)

Figure 2 Pathologic observation of the rat's mandible at 3, 6, 9 weeks after surgery (hematoxylin-eosin staining, ×40)

图注: OB 为原有牙槽骨, NB 为新生牙槽骨, PL 为牙周膜, DT 为牙本质, 箭头示炎性细胞浸润。

表1 各组大鼠建模后及术后不同时间点牙龈出血指数的比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Gingival bleeding index after modeling and at different time after surgery

时间	实验组	对照组	空白组
建模后	2.33±0.59	2.28±0.46	2.39±0.61
术后3周	2.00±0.63	2.17±0.75	2.33±0.52
术后6周	1.83±0.75	2.00±0.63	2.33±0.52
术后9周	0.83±0.75 ^a	1.00±0.63	2.17±0.75

表注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$ 。

表3 各组大鼠建模后及术后不同时间点松动度的比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Tooth mobility after modeling and at different time after surgery

时间	实验组	对照组	空白组
建模后	2.50±0.51	2.44±0.51	2.56±0.51
术后3周	1.67±0.52	2.00±0.63	2.33±0.52
术后6周	1.17±0.75 ^a	1.67±0.51	2.17±0.41
术后9周	0.33±0.82 ^b	1.33±0.52 ^a	2.17±0.41

表注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

结构、牙周韧带生成, 新生的牙槽骨致密且均匀分布在骨缺损区域; 对照组也有明显的骨质生成, 但较实验组形成的牙骨质较薄, 牙槽骨稀疏且分布不均匀, 结缔组织形成较多; 实验组和对照组新生的牙周纤维致密, 富含血管, 与空白组相较, 周围组织炎症明显减少(图2)。

3 讨论 Discussion

近些年来, 植骨和牙周引导组织再生技术的应用较传统的洁治、根面平整等治疗手段效果更为显著。但牙周引导组织再生膜仅起到屏障作用, 缺少主动诱导成骨和促进生长的作用, 二次手术也会增加损伤, 加大感染概率。因此目前研究主要集中在发展一种可塑成形、抗感染、创伤小的材料, 并能促进和加强诱导成骨效果。

水凝胶作为一种支架材料已被广泛应用于组织工程和再生医学, 通过不同的交联程度或与不同的材料复合, 还可调节其物理化学及生物学性能, 以适应不同组织的功能需求, 从而促进组织的形态发生。壳聚糖具有良好的生物相容性、生物可降解性、抗菌性等特点。它作为保湿剂具有促进组织愈合和成骨诱导的作用, 并且作为支架材料负载生长因子, 可保证外源生长因子的缓慢高效释放。温敏性壳聚糖凝胶系统属于温度敏感性系统, 单纯的壳聚糖溶液在弱酸环境, 保持液体状态, 当pH升高至6.2时则出现白色沉淀, 但弱碱性 β -甘油磷酸钠的加入可保持常温下壳聚糖的液体状态, 便于运输注射和应用, 当温度升高到37℃时壳聚糖可由液体转变为固体^[13], 完成相转变, 如应用于缺损部位则可以根据缺损形态凝固成型, 作为支架结构支持细胞生长及新生组织的形成; 作为载药系统, 温敏性纳米壳聚糖凝胶系统较单纯的壳聚糖具有更好的缓释作用, 药物可以更加长久有效的释放。

表2 各组大鼠建模后及术后不同时间点探诊深度的比较 ($\bar{x}\pm s$, mm)
Table 2 Probing depth after modeling and at different time after surgery

时间	实验组	对照组	空白组
建模后	1.78±0.17	1.71±0.17	1.74±0.12
术后3周	1.48±0.12 ^{ac}	1.67±0.15	1.70±0.17
术后6周	1.27±0.14 ^{ad}	1.50±0.06 ^c	1.68±0.08
术后9周	0.62±0.13 ^{bd}	1.47±0.08 ^c	1.65±0.10

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与空白组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ 。

Chenite等^[16]报道将原代培养的牛软骨细胞载入壳聚糖/ β -甘油磷酸钠, 在体外培养3周后可见功能性基质沉积, 注入骨缺损区后可见骨组织和软骨组织形成, 将自体血混合壳聚糖/ β -甘油磷酸钠制备复合物后, 移植于实验动物的软骨缺损区, 可提高骨髓基质细胞趋化作用、增加修复区血供, 生物相容性好, 无局部不良反应和全身毒副反应。马志伟等^[17]用高速涡轮手机磨制猪牙周缺损模型, 将加载重组人骨形态发生蛋白2和氯己定/ β -环糊精包合物的双缓释壳聚糖温敏凝胶应用于牙周缺损处, 结果表明此缓释系统可有效促进根分叉区牙周组织再生, 控制术区感染。陈玉阳等^[18]将纳米壳聚糖凝胶复合重组人骨形态发生蛋白2系统应用于大鼠颌骨缺损处, 证实该系统有明显促进骨组织再生的作用, 表现出较好的生物安全性。但目前的实验中没有将纳米壳聚糖复合骨形态发生蛋白2应用于牙周缺损处的效果对比, 并且多数实验缺损模型的制备都是人为创伤制备, 在本实验中对比观察纳米壳聚糖和纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合系统的作用效果, 采用结扎丝和脂多糖模拟慢性牙周炎的发展过程, 其愈合过程更符合人牙周炎复杂的生理环境。

骨形态发生蛋白作为一种分子信号, 可明显改变牙周病患牙根面的牙周膜细胞减少且活性较差的状态, 提高牙周膜细胞活性^[19], 提示骨形态发生蛋白对于牙周组织再生和修复具有确实的促进作用^[18], 其中以骨形态发生蛋白2诱导成骨能力最强^[20], 其作为诱导成骨的生长因子, 可刺激牙周组织中未分化的间充质细胞向成骨细胞和成牙骨质细胞分化, 并可促进牙周膜细胞增殖, 升高其碱性磷酸酶活性, 促进固有牙槽骨的形成^[21]。但是同其他生长因子一样, 骨形态发生蛋白2容易被蛋白酶破坏而失活, 局部使用也易流失^[22], 骨形态发生蛋白2通常必须与特别的载体材料复合, 才能充分发挥其生物学作用^[23]。

本实验将具有优良生物性能的纳米壳聚糖作为骨形态发生蛋白2的载体与之复合, 采用注射的方式注入牙周缺损部位, 创伤小, 良好的流动性及温敏性使材料可以随体温按复杂的缺损形态变为半固体, 有利于新生骨组织按着缺损形态分布, 更好地修复缺损部位。纳米壳聚糖温敏凝胶与骨形态发生蛋白2复合后缓慢释放骨形态发生蛋白2, 可协同刺激牙槽骨的再生并可保证骨形态发生蛋白2长期活性和效果。

本课题通过动物实验证实了骨形态发生蛋白2复合凝

胶优异的成骨性能, 与其他实验组相比, 新生牙槽骨致密且分布均匀, 骨小梁粗大, 排列规律, 之中可见小血管分布, 有新生的牙周结缔组织附着在牙槽骨和牙骨质表面, 与治疗前相较可见炎症细胞明显减少。对照组也有大量新生牙槽骨, 但骨密度低于实验组, 形成的结缔组织组织较多。因此本实验得出结论可注射性纳米壳聚糖凝胶具有优异的抗菌控炎作用, 应用于大鼠牙周组织缺损可快速控制牙周炎症反应, 减轻探诊出血、探诊深度, 促进新生牙槽骨、牙骨质生成, 形成新附着。骨形态发生蛋白2作为生长因子可以协同刺激牙周组织修复, 促进牙周炎恢复, 诱导骨质快速形成。因此通过本实验证实可注射性纳米壳聚糖骨形态发生蛋白2复合体作为一种复合材料, 具有良好的抗菌性能、生物相容性能及诱导组织缺损修复性, 使用方便, 操作简单, 适用于复杂牙周缺损, 有望在牙周组织工程领域得到广泛应用。但本实验设计仍有不足之处, 如实验周期短, 不能观察材料远期成骨效果及成骨稳定性; 对实验结果未能进行成骨定量及硬度检测, 虽能从X射线片和组织学切片观察到明显的成骨改变, 但未对新生骨质进行定量定质分析, 缺乏进一步的数据说明, 因此课题组将会在今后的实验中继续研究并改善。

致谢: 感谢兰州大学生命科学院动物所实验室对本实验的支持。

作者贡献: 实验设计为第一作者, 实验实施者为第一、二、三作者, 通讯作者评估实验及审校, 第一作者成文。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 温敏性壳聚糖凝胶系统-属于温度敏感性系统, 单纯的壳聚糖溶液在弱酸环境, 保持液体状态, 当 pH 升高至 6.2 时则出现白色沉淀, 但弱碱性 β -甘油磷酸钠的加入可保持常温下壳聚糖的液体状态, 便于运输注射和应用, 当温度升高到 37℃ 时壳聚糖可由液体转变为固体, 完成相转变, 如应用于缺损部位则可以根据缺损形态凝固成型, 作为支架结构支持细胞生长及新生组织的形成; 作为载药系统, 温敏性纳米壳聚糖凝胶系统较单纯的壳聚糖具有更好的缓释作用, 药物可以更加长久有效的释放。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

4 参考文献 References

- [1] Cheng WC, Huang RY, Chiang CY, et al. Ameliorative effect of quercetin on the destruction caused by experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res.* 2010;45(6): 788-795.
- [2] Huang Y, Onyeri S, Siewe M, et al. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 2005;26(36):7616-7627.
- [3] Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials.* 2003;24(13):2339-2349.
- [4] 徐雄立, 周美华. 含纳米银的明胶/壳聚糖纳米纤维的制备及其抗菌性能研究[J]. *化工新型材料*, 2010, 38(2): 23-25.
- [5] 臧圣齐. 不同比例壳聚糖温敏凝胶生物学性能及促牙周再生的体内外初步研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2012.
- [6] 孙健, 董琦, 谢富强, 等. 骨形态发生蛋白 2 与壳聚糖神经支架复合体修复兔面神经损伤[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(10): 1811-1814.
- [7] Crouzier T, Sailhan F, Becquart P, et al. The performance of rhBMP-2 loaded TCP/HAP porous ceramics with a polyelectrolyte multilayer film coating. *Biomaterials.* 2011; 32(30): 7543-7554.
- [8] Crouzier T, Szapak A, Boudou T, et al. Polysaccharide blend multilayers containing hyaluronan and heparin as a delivery system for rhBMP-2. *Small.* 2010;6(5): 651-662.
- [9] Wang J, Liu X, Jin X, et al. The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds in vitro and in vivo. *Acta Biomaterials.* 2010;6(10): 3856-3863.
- [10] Boerckel J, Kolambkar Y, Dupont K, et al. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials.* 2011;32(22): 5241-5251.
- [11] Kashiwagi K, Tsuji T, Shiba K. Directional rhBMP-2 for functionalization of titanium surfaces. *Biomaterials.* 2009;30(6): 1166-1175.
- [12] Visser R, Arrabal PM, Becerra J, et al. The effect of an rhBMP-2 absorbable collagen sponge-targeted system on bone formation in vivo. *Biomaterials.* 2009;30(11): 2032-2037.
- [13] Hu Q, Li B, Wang M, et al. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials.* 2004;25(5): 779-785.
- [14] Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodont Res.* 2004;39(2): 101-106.
- [15] 瞿凤环. 局部LPS注射法建立牙周炎动物模型及其对牙髓、修复性牙本质的影响[D]. 青岛大学, 2012.
- [16] Chenite A, Chaput C, Wang D, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials.* 2000;21(21): 2155-2161.
- [17] 马志伟, 张勇杰, 吴织芬, 等. 缓释骨形态发生蛋白-2的壳聚糖温敏凝胶促进牙周组织再生的实验研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2008, 26(1): 23-26.
- [18] 陈玉阳, 谢富强, 张赞, 等. 纳米壳聚糖骨形成蛋白水凝胶修复下颌骨缺损实验研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2014, 30(5): 624-628.
- [19] 闫福华, 江俊, 骆凯, 等. hBMP-7基因转染大鼠骨髓基质细胞促进骨质疏松大鼠牙周组织再生的实验研究[J]. *福建医科大学学报* 2011, 45(4): 233-237.
- [20] Pitaru S, Pritzki A, Bar Kana I, et al. Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res.* 2002; 43(2-3): 257-264.
- [21] 谢富强, 孙健, 杨英军, 等. 复方骨形成蛋白生物膜植入牙槽窝的实验研究[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2009, 19(1): 18-22.
- [22] 张赞, 谢富强, 王新, 等. 复合氰基丙烯酸酯-骨形态发生蛋白生物胶预防大鼠牙槽脊萎缩的实验研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2012, 30(6): 584-588.
- [23] 王新, 谢富强, 张赞, 等. 骨形态发生蛋白-氰基丙烯酸酯复合生物胶修复大鼠下颌骨骨缺损的研究[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(43): 7986-7990.