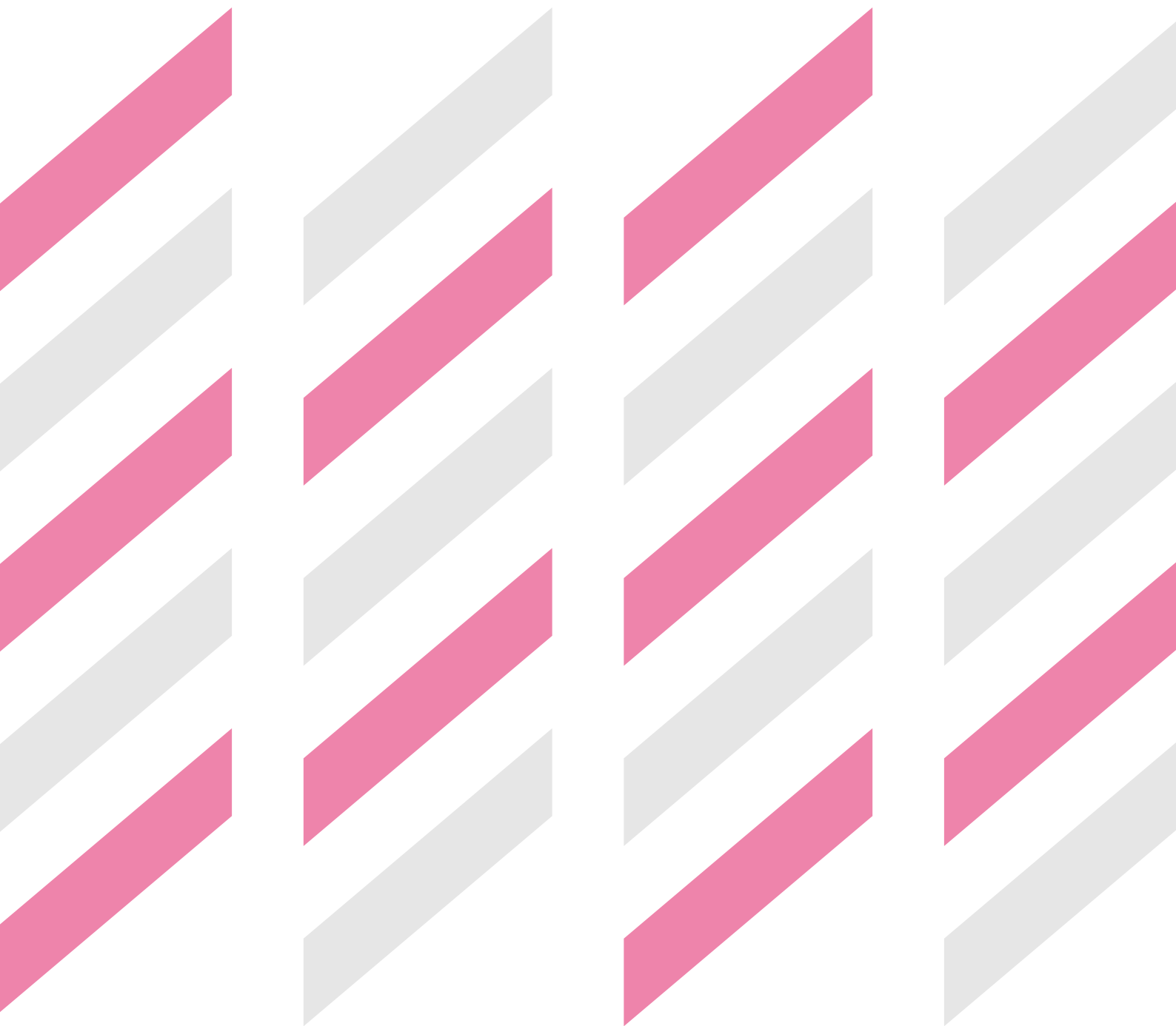


UV 临床论著

UV照射的生物学稳定性及有效性的相关论



目录

- | | | | |
|----|--|----|--|
| 04 | 通过光化处理实现较高骨-种植体结合率以
减少种植体周围应力：三维有限元分析
High Bone-Implant Contact Achieved
by Photofunctionalization to Reduce
Periimplant Stress: A Three-
Dimensional Finite Element Analysis | 12 | 自发成形纳米结构紫外线照射钛种植体的体内
骨反应：关于家兔的实验研究
The In Vivo Bone Response of
Ultraviolet-Irradiated Titanium
Implants Modified with Spontaneously
Formed Nanostructures: An
Experimental Study in Rabbits |
| 22 | 紫外光化功能对矫正微型骨钉生物学性能和
支抗能力的影响
Effect of UV Photofunctionalization on
Biologic and Anchoring Capability of
Orthodontic Miniscrews | 36 | 钛种植体紫外线光化功能
Ultraviolet Photofunctionalization of
Titanium Implants |

临床论著

01



通过光化处理实现较高骨-种植体结合率 以减少种植体周围应力：三维有限元分析

Tetsuo Ohyama博士(牙科博士)*、Tendo Uchida博士(牙科博士)[†]、Norio Shibuya博士(牙科博士)[†]、Shinya Nakabayashi博士(牙科博士)[‡]、Tomohiko Ishigami博士(牙科博士)[§]、Takahiro Ogawa博士(牙科博士)^{||}

有限元分析 (FEA) 在有效和精确地分析牙种植体周围的机械应力的分布方面发挥了重要作用。已经证明有限元分析在设计作为承重装置种植体的宏观形态以及帮助在植入治疗期间建立假体设计方面是有价值

*日本东京日本大学松户齿学部义齿口腔修复科临床副教授。

[†]日本东京日本大学松户齿学部义齿口腔修复科研究生。

[‡]日本东京日本大学松户齿学部义齿口腔修复科助理教授。

[§]日本东京日本大学松户齿学部义齿口腔修复科教授。

^{||}加州大学洛杉矶分校牙科学院 高级口腔修复学、生物材料和医院牙科部温特劳布重建生物技术中心 骨与植入科学实验室 (LBIS) 教授。

如需转载请联系: Takahiro Ogawa博士 (牙科博士), 加州大学洛杉矶分校牙科学院 高级口腔修复学、生物材料和医院牙科部温特劳布重建生物技术中心 骨与植入科学实验室 (LBIS)

地址: 10833 Le Conte Avenue (B3-081 CHS), Box 951668, Los Angeles, CA 90095-1668,

电话: 1-310-825-0727,

传真: 1-310-825-6345,

电子邮箱: togawa@dentistry.ucla.edu

ISSN 1056-6163/13/02201-102

《种植牙医学》

第22卷第1期

©Lippincott Williams & Wilkins 2013年版权所有

DOI:10.1097/ID.0b013e31827b9415

©Lippincott Williams & Wilkins版权所有。未经许可, 不得翻印。

目的: 最近一项研究表明, 对钛种植体进行紫外线处理 (光化处理) 能够实现更高水平的骨结合。其中原理是建立98.2%的骨-种植体结合率 (BIC), 而不是未经处理种植体周围53.0%的BIC。该研究主要研究BIC增加是否会影响种植体的机械应力以及其影响方式。

材料与方法: 基于光化处理报告, 对BIC不同 (53.0%和98.2%) 的种植体进行三维有限元分析。还测试了不同长度的种植体 (7、10和13mm)。

结果: 将种植体长度从7毫米增加到13毫米时, 垂直载荷下的种植体周围应力水平仅减少15%, 而将BIC从53.0%增加到98.2%时, 垂直载荷下的种植体周围应力水平减少量达50%。因此, 种植体为7毫米和BIC为

98.2%时, 种植体周围应力甚至低于种植体为13毫米和BIC为53.0%时的应力。BIC为98.2%时, 种植体上均未出现当BIC为53.0%时所有长度种植体周围观察到的高应力区域, 即使是7mm的种植体上也未出现。在倾斜载荷作用下也获得了类似的结果。

结论: 这项研究表明, 若将BIC从53.0%增加到98.2% (可通过光化处理实现) 比使用更长的种植体能更有效地改善种植体周围应力的分布和扩散, 提供了一种可抵消应力诱发种植体边缘骨吸收的潜在新策略。 (《种植牙医学》2013年; 22:102-108)

关键词: 有限元分析、光化处理、骨-种植体结合、短种植体、紫外光

的。尤其是, 因为种植体颈部周围的应力/应变不利于骨吸收, 可能导致牙龈退缩、种植体感染, 最终植入无效, 如何评估种植体颈部 (牙槽骨顶部/牙槽骨边缘区域周围的种植体顶部) 周围的应力/应变特征已得到研究人员的广泛关注¹⁻¹¹。

到目前为止, 对牙种植体进行有限元分析是在假设骨-种植体结合率 (BIC) 为100%的情况下进行的^{12,13}, 尽管BIC的大小随着牙齿表面化学性质和形状的不同而显著变化 (如

文献中所述BIC变化范围为45±16%¹⁴和40%至70%^{15,16}, 远低于理想的100%)。鉴于有限元分析结果在很大程度上取决于应力转移和扩散的条件。令人惊讶的是, 在进行种植体研究时, 有限元分析建模过程中却很少关注BIC的大小。

近期有关钛光化处理的发现结果已经显著提高了对骨结合的理解, 从而使骨结合增强达到了前所未有的程度^{17,18}。光化处理原理是用紫外光对钛表面进行处理, 并且已证明光化处

理对所有测试的表面形貌都有效¹⁹。经紫外线处理的钛表面具有超亲水性、正电性和无碳等特点，而未经处理的钛表面具有疏水性、电负性，并且会被碳氢化合物严重污染^{17,20,21}。经紫外线处理的微粗糙种植体在动物模型中达到接近百分之百（98.2%）的BIC，而未经处理具有相应表面种植体的BIC仅能达到53.0%¹⁷。在第2周愈合早期阶段，经紫外线处理的种植体比未经处理的种植体产生的种植体支抗强度高3倍以上。愈合第8周时，未经处理的种植体周围才达到这种程度的骨结合，表明紫外线处理在加速骨结合过程方面具有治疗价值¹⁷。然而，经紫外光化处理处理的种植体周围机械应力的性质对长期预后的可能影响尚不清楚。

尽管牙种植体的成功率和存活率已经高于90%，但仍不断²²⁻²⁹报告存在一个严重的问题，即牙种植体周围的边缘骨吸收，包括周围组织的不良反应，迄今为止尚未得到解决。控制施加在牙种植体上应力的临床手术存在局限性。事实上，不可避免的一点是：在牙种植体发挥功能的第一年，牙种植体边缘骨吸收达1毫米，在随后的几年中每年增加0.1毫米的额外渐进性吸收^{30,31}。如果最近在接近完全骨结合方面的进展显著改善了牙种植体周围机械应力的扩散和分布，那么至少从生物力学角度来看此进展可以帮助解决该问题。测试了以下三个假设：（1）BIC增加到几乎100%会显著降低植入后应力的大小和集中应力的作用面积；（2）当牙种植体相对较短时，这样的效果会特别明显；（3）在减少植入后应力方面，增加BIC比增加牙种植体长度更有效。根据光化处理种植体报告可知，使用不同长度的种植体（7、10和13 mm），以及不同的BIC（53.0%和98.2%）在三维FEA模型中分析了种植体周围应力，反映了目前可用的牙种植体产品的状况。据我们所知，本

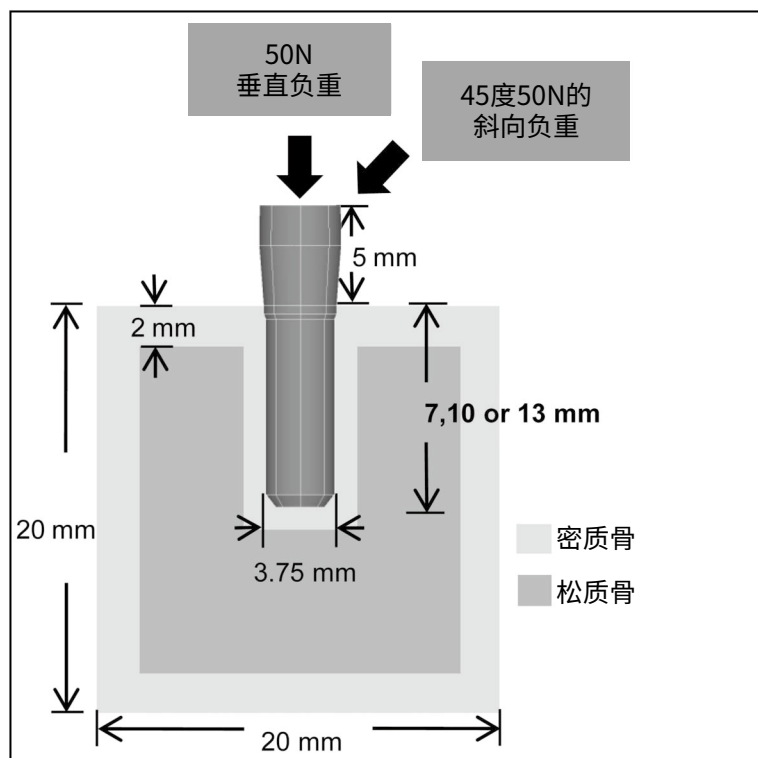


图1 研究中使用的有限元分析（FEA）模型设计，包括钛种植体、基台、皮质骨和松质骨。种植体长度变化（7、10或13 mm），可表示“短长度”和“常规长度”的商业种植体。在基台顶部施加垂直和倾斜的（45度）载荷。

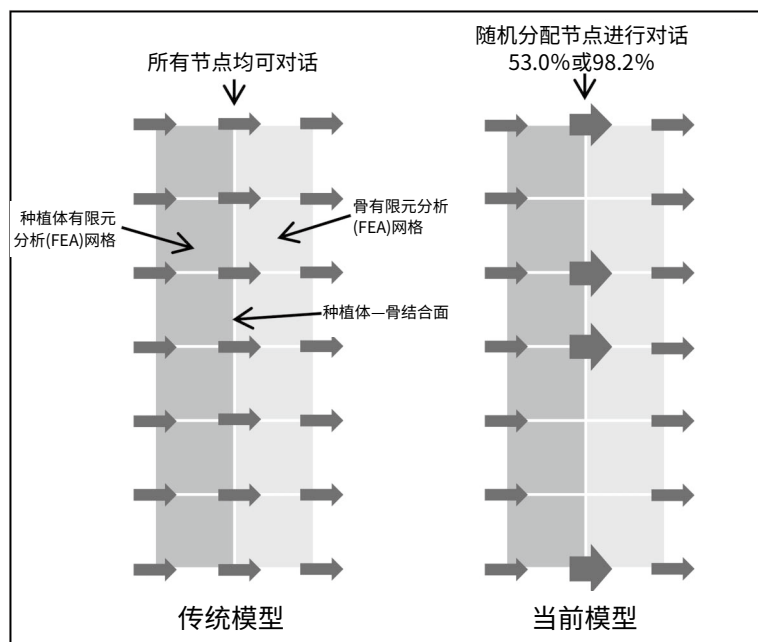


图2 有限元建模中的负重传递策略。为了在种植体-骨结合面处实现不同的负重传递效率，随机分配主动和被动转移节点以对应于BIC为53.0%和98.2%这两种情况中的每一种。为每种BIC执行了十项不同的任务。注意，文献中所述传统建模中，负重转移效率固定为100%（所有节点皆对话）。

研究是第一个针对种植体周围应力强度和分布的FEA研究。本研究不依赖于骨结合完美这一不太可能的假设，而依赖于根据体内研究的测量数据来区分骨结合程度。

材料与方法

有限元模型

三维有限元 (FE) 模型由种植体、基台和皮质骨和松质骨组成。设计了一种非锥形圆柱形种植体，其宽度和长度通常可反映商业种植体的尺寸 (图1)。种植体的直径固定为3.75mm，而种植体长度却有所变化 (7、10或13mm)，可表示“短长度”和“常规长度”的种植体。有些研究报告声称，即使在骨髓中微粗糙表面周围的骨组织也像皮质骨一样坚硬和坚硬。根据这些研究报告，种植体周围的骨具有皮质特性^{32,33}。然后将模型导入FE软件 (宾夕法尼亚州卡农斯堡的ANSYS公司生产的ANSYS Mechanical Rel.12.1)。模型网格在骨—种植体结合面含有4309 (种植体7mm)、5269 (种植体为10mm) 和6569 (种植体13mm) 个节点。对于7 mm的种植体，骨区域包括18,954个元素和34,086个节点，对于10 mm的种植体，骨区域包含19,567个元素和35,439个节点，对于13 mm的种植体，骨区域包含20,188个元素和37,011个节点。边界条件设定为固定在皮质骨下边界，皮质骨下边界区域中的节点不允许出现任何移动。认为模型中使用的所有材料都是各向同性的、均匀的以及线性弹性的。皮质骨的杨氏模量和泊松比分别为 1.04×10^4 MPa和0.33，松质骨的杨氏模量和泊松比分别为83.3 MPa和0.33，钛种植体的杨氏模量和泊松比分别为 1.10×10^5 MPa和0.33。为这些材料分配的属性与文献中的属性相同或相似^{7,12,13,34,35}。

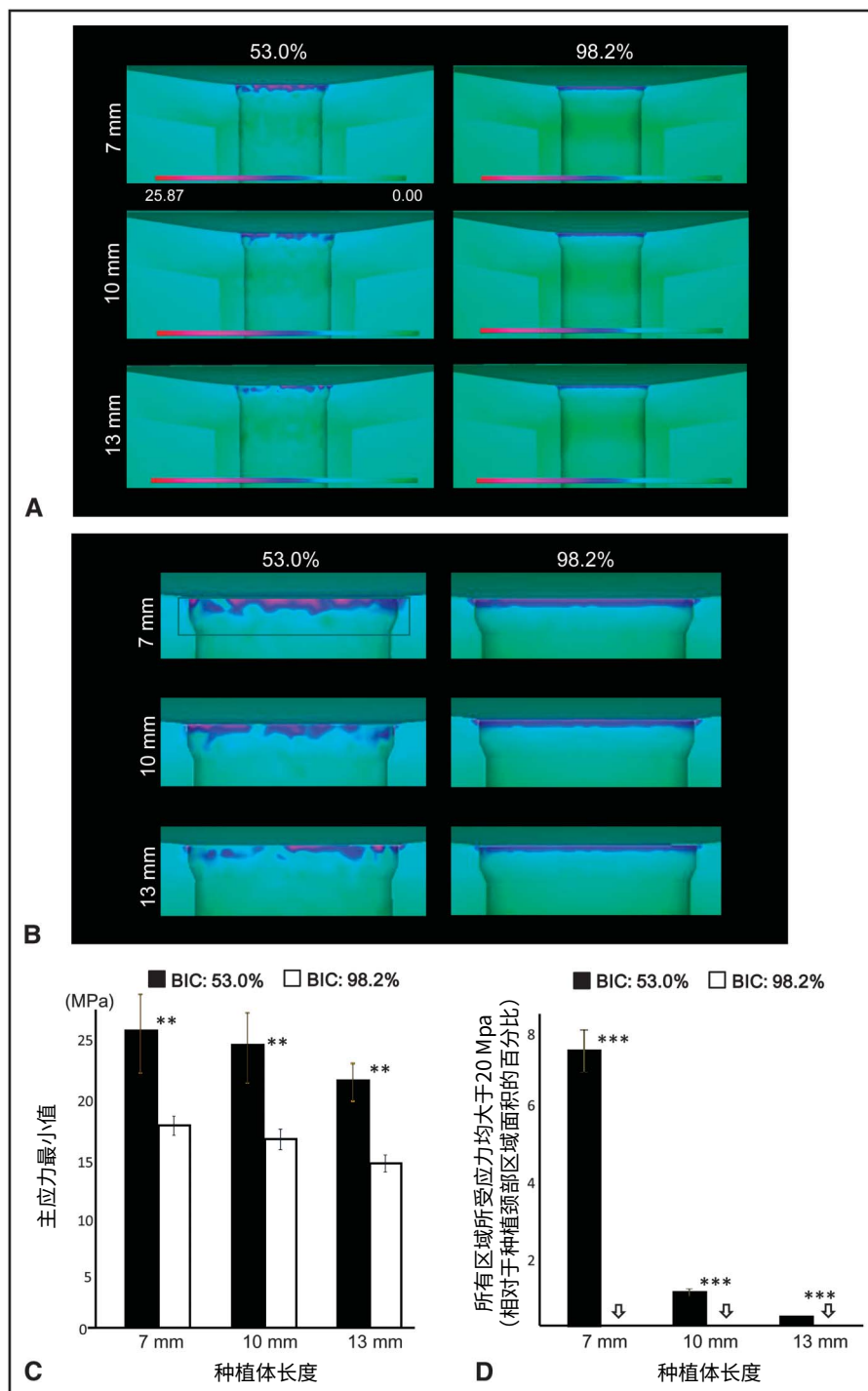


图3 垂直负重作用下种植体周围骨的应力分布和大小。在低倍率下 (A) 的最小主应力 (范式等效应力) 和聚焦于种植体颈部区域的高倍率下 (B) 最小主应力的计数图。粉红色和红色代表最大应力作用的地方。C、种植体长度分别为7、10和13 mm且BIC大小分别为53.05%和98.2%时，平均最大应力计算为种植体周围骨骼的最小主应力。D，高应力的平均面积。在种植体颈部周围的指定区域内，所受应力>20 MPa的区域计算结果以百分比表示 (在图B中表示为矩形)。箭头表示0。对于图 (C) 和 (D)，数据以平均值±SD表示 (n=10)。BIC为53.0%和98.2%的种植体之间的差异为：** P < 0.01；*** P < 0.001。最小主应力值的计算结果最初以负数表示，但在简单的正/负转换之后，这些图片和直方图 (以兆帕为单位) 中最小主应力值以正数表示。

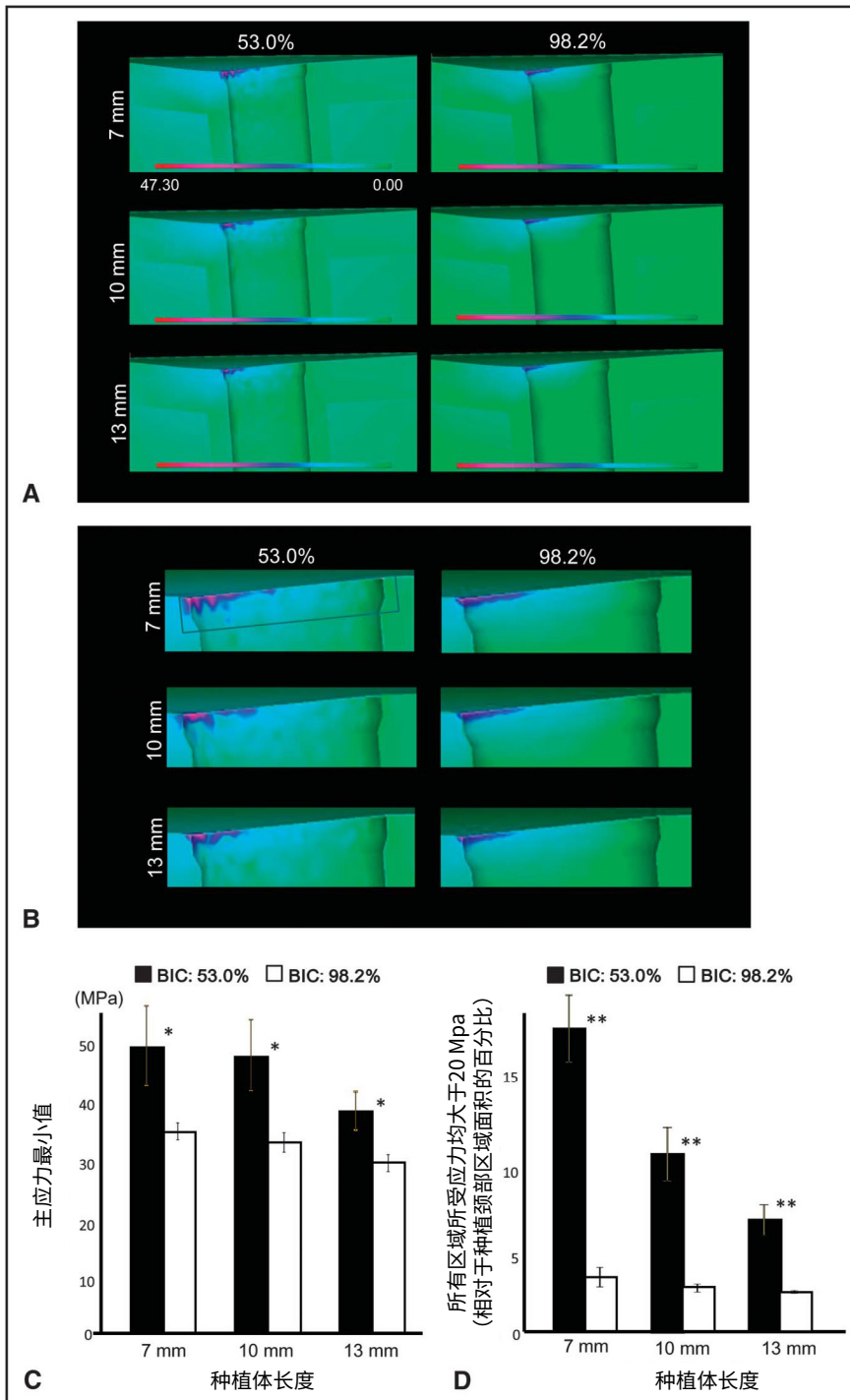


图4 倾斜负重下种植体周围骨的应力分布和大小。在低倍率下 (A) 的最小主应力 (范式等效应力) 和聚焦于种植体颈部区域的高倍率下 (B) 最小主应力的计数图。粉红色和红色代表最大应力作用的地方。(C) 种植体长度分别为7、10和13 mm且BIC大小分别为53.05%和98.2%时, 平均最大应力计算为种植体周围骨骼的最小主应力。(D) 高应力的平均面积。在种植体颈部周围的指定区域内, 所受应力>20MPa的区域计算结果以百分比表示 (在图B中表示为矩形)。对于图 (C) 和 (D), 数据以平均值±SD表示 (n=10)。BIC为53.0%和98.2%的种植体之间的差异为: **P<0.05; **P<0.01。最小主应力值的计算结果最初以负数表示, 但在简单的正/负转换之后, 这些图片和直方图 (以兆帕为单位) 中最小主应力值以正数表示。

种植体—骨结合面以及负重条件

通过控制种植体—骨结合面处的应力传递节点的数量, BIC大小会出现变化 (53.0%或98.2%)。在进行10次有限元分析 (FEA) 试验期间, 随机分配主动转移节点 (图2)。在模拟负重条件下对单个种植体进行有限元分析 (FEA), 通过基台垂直施加或倾斜 (45度) 施加50 N的负重 (图2)。获得骨中应力场的原象和最小主应力或范式等效应力 (以兆帕为单位) 的值, 分别用于评估机械应力扩散/分布以及大小。

统计分析

随机分配十个应力传递节点, 便可对该FE模型进行统计分析。使用双向AN-OVA检查BIC大小和种植体长度对最小主应力和高应力区域的影响。必要时, 使用事后Bonferroni测试进行个体比较; 认为P<0.05时具有统计学意义。

结果

垂直负重作用下的应力分布

种植体—骨结合面处和周围骨组织中的应力分布见FEA图 (图3、A和B)。无论BIC大小如何, 种植体颈部周围种植体—骨结合面处的应力都较高。然而, BIC为53.0%的种植体周围的应力比BIC为98.2%的种植体更大和拉伸性更强、更加不均匀和不规则。对于BIC为53.0%的较短种植体, 应力集中显著增加。

最小主应力评估结果显示, BIC为53.0%的种植体的应力水平显著高于BIC为98.2%的种植体 (P<0.05; 图3以及C)。无论BIC大小如何, 种植体长度对应力 (P<0.05) 也有显著影响, 7 mm的种植体的应力最大。值得注意的是, BIC的影响大于种植体长度的影响。与7 mm的种植体相比, 13 mm种植体的应力水平

仅降低15%，而当BIC从53.0%增加到98.2%时，应力水平降低了50%。因此，种植体为7毫米和BIC为98.2%时，种植体周围应力低于种植体为13毫米和BIC为53.0%时的应力（ $P < 0.05$ ）。

根据有限元分析（FEA）图像分析计算面积百分比，侧重于种植体颈部区域（如图3，B所示）。大于20.0 MPa的应力区域占BIC为53.0%的7 mm种植体颈部区域的7.6%，而在BIC为98.2%的7mm种植体周围此数值降低至0%（图3，D）。对于BIC为53.0%的10mm和13mm种植体，仍然可能出现这种应力强度。同样，当BIC为98.2%时，在这些长度的种植体周围没有出现高应力区域。

倾斜负重作用下的应力分布

在有限元分析（FEA）图上倾斜力对侧上的种植体颈部区域周围出现应力集中（图4，A和B）。对于较短的种植体，应力更大，特别是当BIC为53.0%时更是如此。相比BIC为53.0%的种植体，BIC为98.2%种植体的应力集中面积明显更小，并且扩散更平滑，与种植体长度无关。

如垂直载荷作用下的结果所示，最小主应力评估结果表明BIC为98.2%种植体的应力水平显著低于BIC为53.0%的种植体（ $P < 0.05$ ；图4，C）。就BIC变化造成的差异而言，7 mm种植体（约30%）大于13 mm种植体（约20%）。与垂直载荷作用下的结果类似，在确定应力水平时，不同BIC的影响大于植入物长度的影响。将种植体长度从7毫米增加到13毫米时，应力强度降低15%至20%，但当BIC从53.0%增加至98.2%时，应力水平降低约30%。结果，施加在BIC为98.2%的7mm种植体上的应力小于BIC为53%的13mm种植体上的应力（ $P < 0.05$ ）。大于20.0 MPa的应力区域占BIC为53.0%的7 mm种植体颈部区域的17.5%，

而在BIC为98.2%的7mm种植体周围此数值仅为3.8%（ $p < 0.05$ ）。同样，对于长度为10mm和13 mm的种植体而言，与BIC为53.0%时相比，BIC为98.2%时这种高应力区域面积显著减少（ $P < 0.05$ ）。对于较短种植体，BIC增加导致高应力区域面积的减少更为明显。

骨结合率为98.2%的7 mm种植体的高应力区域面积明显小于骨结合率为53.0%的13 mm种植体（ $p < 0.05$ ）。将种植体长度从7毫米增加到13毫米时，高应力区域面积降低40%至60%，而但当BIC从53.0%增加至98.2%时，高应力区域面积降低量为70%至80%。

讨论

本研究考察了不同BIC和种植体长度对植入物周围机械应力分布和强度的影响，重点测试BIC高达98.2%时的情况，可通过最近发现的光化处理来实现如此高的BIC。本研究结果表明，相对于种植体长度变化时，BIC大小变化时，应力波动更大。

倾斜载荷作用下高应力区域（所施加应力 > 20.0 MPa的区域）的面积比垂直载荷作用下更大。在这两种负重条件下，将BIC从98.2%改为53.0%时，高应力区域面积明显降低。在垂直载荷作用下，当BIC为98.2%时，即使在7 mm的种植体周围也无高应力区域。在倾斜载荷作用下，当BIC为98.2%时，7 mm种植体颈部的高应力区域所占百分数降至4.0%以下，而当BIC为53.0%时，种植体长度不变时，这一数值超过17%。此外，令人惊讶的是，我们获得了支持本文前言中提出的假设3的结果。BIC增加的影响始终大于植入物长度增加的影响。将种植体长度从7毫米增加到13毫米时，垂直载荷下的种植体周围应力水平仅减少15%，

而将BIC从53.0%增加到98.2%时，垂直载荷下的种植体周围应力水平减少量达50%（虽然这些参数（植入物长度和BIC）的时间变化具有可比性）。此外，当增加BIC时，种植体颈部周围的高应力区域面积降低量也大于增加种植体长度时的降低量，重新验证了该假设的正确性。尽管如此，目前的研究结果并非旨在排除增加种植体长度在减少种植体周围应力方面的有效性，同时增加种植体长度和提高BIC能够协同地减少应力，这一点在本研究中也得到了证实。

目前的结果表明，如高应力区域研究发现结果所示，对于长度更短的种植体而言，增加BIC的优势更为显著，这一点可为假设2提供支持。在垂直载荷作用下，将BIC从53.0%增加到98.2%对于10和13 mm种植体可能不具意义（图3，D），因为此类种植体本身的高应力区域面积就比较低。同时这种情况下适度拉伸的高应力区域完全消失，这与7毫米的种植体形成鲜明对比。在倾斜载荷作用下，相比13 mm的种植体（减少60%），7 mm种植体高应力区域面积减少量也更大（减少80%）。

临床上已经证明使用通常称为短种植体的10mm或更短的种植体³⁶⁻³⁸时，种植成功率或存活率将降低。文献中有限元分析（FEA）结果多次表明种植时间越长，牙槽骨顶部周围产生的应变力越小^{1,4,7,39}。这与目前表明当BIC为53.0%时，与7mm和10mm植入物相比，13mm植入物的所有应力参数降低量都更大的结果一致。根据不利生物力学特性确定风险的种植体长度阈值可能为10 mm。更重要的是，当BIC为98.2%时，对于任何长度的种植体而言，本研究中评估的所有参数，如最小主应力和高应力区域面积，都低于当BIC为53.0%时13 mm种植体的所有这些参数。曾有一项动物研究提出使用光化处理使得BIC达到98.2%时，使用短种植体具

有优势⁴⁰。本研究表明,经过光化处理,将种植体长度减少40%后的骨结合强度与未经光化处理的标准长度种植体的骨结合强度相当,这表明紫外光化功能具有克服由种植体长度明显减少导致骨结合出现缺陷的潜力。总之,当与光化功能一起使用时,当前这些发现结果可以为短种植体作为更可靠治疗选择的潜在用途提供生物力学支持,并且这些发现结果证明临床研究应对这一点予以确定。

当前结果可能与临床问题相关的另一方面在于对种植体颈部周围边缘骨吸收造成的负面影响。尽管文献中尚未确定引发骨吸收的应力阈值,但种植体颈部周围某一水平的应力可能通过激活骨质母细胞的形成使得出现骨脊吸收⁴¹⁻⁴³。通过超过适当骨重建⁴⁴的机械信号来诱导骨吸收的应力水平尚不可知,并且该研究并未直接提出或确定应力控制的预防范围。然而,如果种植体周围组织管理的目标是使种植体周围的机械应力最小化,那么使用能够接近百分百水平BIC经光化处理的种植体可能会是一种有效的策略。

结论

这项有限元分析(FEA)研究表明,若当BIC等于98.2%时(可通过光化处理实现)比使用更长的种植体能更有效地改善种植体周围应力的分布和扩散,提供了一种可抵消应力诱发种植体边缘骨吸收的潜在新策略。此外,目前数据可在生物力学上合理解释为何具有最高水平的骨结合种植体可以克服种植体长度缩短导致承载能力受损的缺陷。

披露

作者声称不对于文章中列出的产

品或信息持有直接或间接的财务利益。

致谢

本研究得到了日本大学松户齿学局局部佐藤基金会的支持(2010年,2011年)。

参考文献

- Petrie CS, Williams JL等人种植体设计的比较评估:直径、长度和锥度对牙槽嵴应变的影响.三维有限元分析.临床口腔种植研究.2005;16:486-494.
- Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I等人.关于种植体和牙周组织的实验问题.关于比格犬的研究.临床口腔种植研究.1992;3:9-16.
- Quirynen M, Naert I, van Steenberghe D等人.种植体设计和过载对Branemark系统中的边缘骨吸收和种植体成功造成影响.临床口腔种植研究.1992;3:104-111.
- Baggi L, Cappelloni I, Di Girolamo M等人.种植体直径和长度对与牙槽骨几何学参数相关的骨结合种植体应力分布的影响:三维有限元分析.口腔修复学杂志.2008;100:422-431.
- Kitamura E, Stegaroiu R, Nomura S等人.骨结合种植体边缘骨吸收的生物力学特性:基于三维有限元分析的考虑因素.临床口腔种植研究.2004;15:401-412.
- Kitamura E, Stegaroiu R, Nomura S等人.边缘骨吸收对种植体周围应力的影响—三维有限元分析.口腔修复杂志.2005;32:279-286.
- Kitamura E, Stegaroiu R, Nomura S等人.种植体设计和骨质量对种植体周围骨应力/应变分布的影响:三维有限元分析.口腔与上颌面植入国际杂志2003;18:357-368.
- Yoon KH, Kim SG, Lee JH等人.关于垂直骨吸收后与骨结合种植体的应力水平和分布变化的三维有限元分析.种植牙医学.2011;20:354-359.
- Schrotenboer J, Tsao YP, Kinariwala V等人.平台切换对种植体嵴骨应力的影响:有限元分析.种植牙医学.2009;18:260-269.
- Ormianer Z, Ben Amar A, Duda M等人.骨骼中1件和2件式种植体系统的应力和应变模式:三维有限元分析.种植牙医学.2012;21:39-45.
- Inglam S, Suebnukarn S, Tharanon W等人.种植体质量和边缘骨吸收对上颌骨移植窝

种植体的影响:有限元分析研究.医学和生物工程与计算.2010;48:681-689.

- Naini RB, Nokar S, Borghei H等人.在完全缺失的下颌骨中倾斜或平行种植体的位置?三维有限元分析.口腔与上颌面植入国际杂志2011;26:776-781.
- Gomes EA, Barao VA, Rocha EP等人.金属陶瓷或全陶瓷上层结构材料对单个种植体支持人工假体应力分布的影响:三维有限元分析.口腔与上颌面植入国际杂志2011;26:1202-1209.
- Weinlaender M, Kenney EB, Lekovic V等人.三种骨内牙种植体周围骨沉积的骨组织形态计量学.口腔与上颌面植入国际杂志1992;7:491-496.
- Ogawa T, Nishimura I.与细胞外基质基因表达调控相关的旋转种植体和酸蚀种植体的不同骨结合概述.口腔与上颌面植入国际杂志2003;18:200-210.
- De Maezta MA, Bracerias I, Alava JI等人.用CO离子修饰的钛种植体表面骨结合的改进:比格犬比较性组织形态学研究.口腔与上颌面植入国际杂志.2008;37:441-447.
- Aita H, Hori N, Takeuchi M等.钛紫外光化对骨结合的影响.生物材料.2009;30:1015-1025.
- Hori N, Ueno T, Suzuki T等.用以修复随年龄降低的钛生物活性的紫外光处理方式.口腔与上颌面植入国际杂志2010;25:49-62.
- Suzuki T, Hori N, Att W等.紫外线处理抑制钛的生物活性随时间降低.组织工程A部分2009;15:3679-3688.
- Hori N, Ueno T, Minamikawa H等.蛋白质吸附对UV光化钛的静电控制.生物材料学报.2010;6:4175-4180.
- Att W, Hori N, Takeuchi M等.钛骨传导性随时间降低:植入材料生物老化的启示.生物材料.2009;30:5352-5363.
- Klinge B, Meyle J.种植体的软组织结合.第2工作组共识报告.临床口腔种植研究.2006;17(suppl 2):93-96.
- Levin L, Hertzberg R, Har-Nes S等人.受当前和过去吸烟习惯影响的单个牙种植体周围的长期边缘骨吸收.种植牙医学.2008;17:422-429.
- Nitzan D, Mamlider A, Levin L等人.吸烟对边缘骨吸收的影响.口腔与上颌面植入国际杂志2005;20:605-609.
- Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Valmaseda-Castellon E等人.68名进行了5至9年随访的患者所植入217个表面经机械处理种植体的长期边缘骨吸收:一项回顾性研究.口腔与上颌面植入国际杂志2012;27:1163-1169.
- Prithviraj DR, Gupta V, Muley N等人.一件式植入物:植入时间、手术技术、负重方案和边缘骨吸收. J Prosthodont [印刷版的电

- 子版] 2012年9月17日.17,2012.doi:10.1111/j.1532-849X.2012.00928.x.
27. Fu JH, Hsu YT, Wang HL.确定咬合过载以及如何处理咬合过载以避免植入物周围出现边缘骨吸收.欧洲口腔种植学杂志.2012;5(suppl):S91-S103
 28. Elsyad MA, Al-Mahdy YF, Fouad MM.与常规和即刻负重的、支撑球固位的下颌覆盖义齿两个种植体相邻的边缘骨吸收:一项为期3年的随机临床试验.临床口腔种植研究.2012; 23:496-503.
 29. Pikner SS, Grondahl K, Branemark. 牙种植体周围“高级”边缘骨吸收的影像学分析.临床种植牙科及相关研究.2009;11:120-133.
 30. Adell R, Lekholm U, Rockler B等人. 骨结合钛固定装置的边缘组织反应 (I) .一项为期3年的纵向前瞻性研究.口腔与上颌面植入国际杂志.1986;15:39-52.
 31. Quirynen M, Naert I, van Steenberghe D等人. 支撑部分桥梁骨结合固定装置的牙周方面.一项长达6年的回顾性研究.临床牙周病学杂志.1992; 19:118-126.
 32. Butz F, Aita H, Wang CJ等人. 较硬和较僵硬的骨质与粗糙的钛结合.牙科研究杂志 2006; 85:560-565.
 33. Takeuchi K, Saruwatari L, Nakamura HK等人. 增强的粗糙钛表面成骨细胞矿化组织的内在生物力学特性.生物医学材料研究杂志, A辑2005;72A:296-305.
 34. Fazi G, Tellini S, Vangi D等人. 下颌固定修复体不同种植体构型的三维有限元分析.口腔与上颌面植入国际杂志2011;26:752-759.
 35. Silva GC, Mendonca JA, Lopes LR等人. 由四个或六个种植体支撑的人工种植体的应力模式:三维有限元分析.口腔与上颌面植入国际杂志2010;25:239-246.
 36. Romeo E, Chiapasco M, Ghisolfi M等人. 口腔种植体治疗部分无牙颌的长期临床疗效.用于单牙修复的ITI牙种植体系统前瞻性研究的七年寿命表分析.临床口腔种植研究.2002;13:133-143.
 37. das Neves FD, Fones D, Bernardes SR等人. 短种植体 - 纵向研究分析.口腔与上颌面植入国际杂志2006;21:86-93.
 38. Telleman G, Raghoobar GM, Vissink A等人. 对部分无牙颌患者所植入的短 (<10 mm) 牙种植体预后的系统评价.临床牙周病学杂志.2011;38:667- 676.
 39. Himmlova L, Dostalova T, Kacovsky A等人. 种植体长度和直径对应力分布的影响:有限元分析.口腔修复学杂志.2004;91:20-25.
 40. Ueno T, Yamada M, Hori N等人. 钛紫外光活化对大鼠模型骨结合的影响.口腔与上颌面植入国际杂志2010;25:287-294.
 41. Wiskott HW, Belser UC.光滑钛表面缺乏整合:基于周围骨骼中产生应变的工作假设.临床口腔种植研究.1999;10:429-444.
 42. Cho ES, Lee KS, Son YO等人. 压迫机械力通过激活c-Fms介导的信号传导增强骨髓巨噬细胞的破骨细胞生成.细胞生物化学杂志.2010;111:1260-1269.
 43. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y等人. 机械应力下牙周韧带细胞通过前因腺素E2合成的核因子 κ B配体上调受体激活剂诱导破骨细胞生成.骨骼和矿物质研究杂志.2002;17:210-220.
 44. Roshan-Ghias A, Lambers FM, Gholam-Rezaee M等人. 体内负载通过影响骨形成和骨吸收速率来增加支架的机械性质.骨研究.2011;49:1357- 1364.

临床论著

02

自发成形纳米结构紫外线照射钛种植体的 体内骨反应：关于家兔的实验研究

Jianwei Shen博士(牙科博士)¹/Jianhu Liu医学博士(牙科博士)²/Xiaoyi Chen博士(牙科博士)³/
Xiaoxiang Wang博士⁴/Fuming He医学博士(牙科博士)⁵/Huiming Wang博士(牙科博士)⁶

目的：玻璃蚀刻法与水溶液储存相结合可诱导钛表面上自发形成纳米结构，但怀疑纳米结构演变的同时会出现生物降解。本研究旨在研究紫外线（UV）辐射是否能有效解决这一问题并进一步提高生物活性。**材料与方法：**本研究中分析了五组钛种植体（SLAnew、SLAold、modSLA、UV-SLA和UV-modSLA）的表面特征及其体内骨响应。用接触角测量结果、扫描电子显微镜和X射线光子光谱评估表面特征。总共将160个种植体（每组32个）插入40只家兔的胫骨干骺端和股骨髓中。在3周和6周后，对家兔实施安乐死，进行旋出扭矩实验和组织形态学分析。**结果：**在贮水表面观察到出现自发形成的纳米结构，直径大小约为15nm，并且随着纳米结构的演变，不可避免地出现了碳氢化合物污染。UV辐射有效地消除了伴随纳米结构演变的烃污染。UV-modSLA种植体的旋出扭矩实验值最高，并且经UV照射的种植体的骨与种植体接触面积和骨面积更高。**结论：**紫外线照射可以有效地消除伴随纳米结构演变的碳氢化合物污染，并进一步增强骨结合。纳米结构和紫外线处理在增强钛和骨之间的接口处强度方面具有综合效果，而紫外光化功能对组织学和组织形态学性能的影响明显更大。

《口腔与上颌面植入国际杂志》. 2016;31:776-784. doi:10.11607/jomi.4309

关键词：生物老化、碳氢化合物污染、骨结合、自发形成的纳米结构、紫外光化功能

¹中国杭州浙江大学医学院附属口腔医院口腔种植科医师。

²中国杭州浙江大学附属医院口腔科医师

³中国杭州浙江大学医学院附属口腔医院口腔种植科研究生。

⁴中国杭州浙江大学材料科学与工程学系教授。

⁵中国杭州浙江大学医学院附属口腔医院口腔种植科教授。

通讯信息：

中国杭州浙江大学医学院附属口腔医院口腔种植科

Fuming He博士或Huiming Wang博士

邮编310006。传真：+86 0571 87217218

电子邮件：hfm@zju.edu.cn或hmwang1960@hotmail.com

©2016, Quintessence Publishing Co Inc.

为使骨-钛结合更快更稳固，过去二十年内已对钛种植体表面进行了集中研究¹⁻⁴。最近纳米结构技术的发展有望为支架和种植体材料提供新颖、生物性质优化的表面⁵⁻⁷。由于引入纳米级材料表面而产生的更紧密互锁效果可以增强生物材料和覆盖生物组织之间的界面强度。此外，已经证明通过改进细胞附着力、改善细胞增殖、分化并且增大种植体周围骨形成的速度和体积等方法应用纳米技术有助于改善钛种植体性能⁶⁻¹¹。

将纳米颗粒沉积到钛表面上是给予钛种植体纳米结构最常用的方法之一。已有报告称可对金属界限清晰的纳米级拓扑结构进行控制^{6,7}，纳米结节可以在二氧化钛（TiO₂）化学沉积期间自动附着于特定条件下的微结构钛表面上。与表面微观形貌的功能相比，这些微纳米混合钛表面已显示出可显著提高生物活性和骨传导性的功能⁶。

将玻璃蚀刻法与水溶液储存相结合,诱导钛表面自发形成纳米结构是最近报告的另一种可给予钛种植体纳米特征的方法¹²。在无任何其他附加装置或复杂技术的情况下,将玻璃蚀刻法与水溶液储存相结合可使最外层氧化钛层重组成界限清晰的纳米结构¹²。此外,随后的生物力学研究¹³表明,这些纳米结构的存在对骨结合有积极影响。然而,自发形成纳米结构的演化过程需要将近2周或更长时间才能完成¹²。众所周知,经过加工后,钛表面的生物学特性出现了与时间有关的降解,导致骨结合能力显著降低^{14,15}。这种现象定义为钛的生物老化,并且此现象应与碳氢化合物的渐近性污染有关^{14,16,17}。尽管水溶液储存可能有助于防止进一步污染钛表面并减轻生物老化¹⁷,但目前还不清楚在纳米结构演变的同时是否不会出现不可避免的生物降解。

最近,有研究发现,在临床上紫外线(UV)光化功能^{16,18-20}可用于克服生物老化甚至提高钛表面的生物相容性;光化功能具有出色的疗效和前所未有的传输机理。已老化的钛表面可以通过紫外线处理回收,并且经处理后,此类钛表面的生物活性(比如蛋白质吸附和成骨细胞附着、增殖、分化和矿化,以及体内骨结合的能力)比刚制备钛表面的生物活性更好^{16,18-21}。紫外线处理可将钛基材从疏水性转化为超亲水性,并通过TiO₂介导的光催化作用去除碳氢化合物污染物以及紫外线直接分解来清洁二氧化钛表面^{19,21}。此外,经紫外线(UV)处理的钛表面具有独特的静电状态(正电性),这一点可能成为决定钛生物活性的关键因素^{22,23}。

因此,由于自发形成纳米结构的演化过程中将不可避免地出现生物老化,所以提出了这样一种假设:UV光化功能可进一步有效地增强钛表面与这些自发形成的纳米结构之间的生物活性。本研究旨在研究(1)储存于液体中的钛纳米结构的演变过程中是否存在生物老化;(2)自发形成的纳米结构和紫外线照射对家兔模型中钛表面特征和骨结合过程的各自效应和组合效应。

材料与方法

钛样品制备

本研究所用商用纯钛板(10.0×10.0×1.5mm)和螺旋状纯钛种植体(外径为4.0mm;长径为8mm)供应商为浙江广慈医疗器械有限公司。将钛样品分成五组,以便进行进一

步的制备:

- A组SLAnew:用大刚玉粗砂喷砂,放入稀释的0.11 mol/L HF以及0.09 mol/L HNO₃溶液中于室温下处理10分钟,然后用5.80 mol/L的HCl和8.96 mol/L的H₂SO₄混合溶液于80℃下酸蚀刻30分钟。最后,将样品放在dH₂O中超声清洗并在无菌环境中用氮气流干燥。立即将配置好的钛样品用于实验。
- B组:SLAold:接受与SLAnew相同制备工艺的处理,然后将这些样品置于密封容器中并在暗室中储存4周待其充分老化,随后才能用于实验。
- C组:modSLA:接受与SLAnew相同制备工艺的处理,然后立即将这些样品储存于dH₂O中,储存4周,待纳米结构演变完成。选择dH₂O作为存储介质旨在规避异源离子的影响。
- D组:UV-SLA:使用15W杀菌灯(Toshiba),将4周龄SLA样品在外界条件中室温下用UV照射24小时,随后用于实验。杀菌灯光照强度:约0.1mW/cm²(λ=360±20nm)和2mW/cm²(λ=250±20nm)。
- E组UV-modSLA:将4周龄的modSLA样品在氮气流中吹干,并使用15W杀菌灯将其在外界条件中室温下用UV照射24小时,随后用于实验。

表面性质

进行接触角测量,确定亲水性或疏水性程度。借助视频接触角系统(SL200B, Solon Tech)并在室温下使用超纯水作为润湿剂,根据液滴法计算静态接触角。无需任何处理,便可对干燥样品进行评估,而储存在dH₂O中的样品需在氮气流中吹干后方可进行测量。

用扫描电子显微镜(SEM; SU70, Hitachi)检查钛样品的表面形态。选择在高度真空条件下加速电压为20.0kV的二次电子模式进行分析,并且在50k和100k的倍率下拍摄高分辨率SEM图像。

在高真空条件下通过X射线光电光谱(XPS; Kratos AXIS ULTRADLD)检查不同钛表面的化学组成。用半球形电子能量分析仪分析在150W(15kV, 10mA)条件下由单色Al Kα射线辐射产生的光电子。在出射角度为90度时记录主要特征峰(Ti2p, O1s, C1s和N1s)的全扫描谱和更高分辨率窄区扫描的结果。在284.8eV条件下,通过C1s(碳氢化合物C-C, C-H)调节结合能。使用仪器数据系统中包含的软件和原子灵敏度因子计算钛表面元素的原子百分比。



图1 种植体在家兔胫骨干骺端和股骨髓中的位置。

动物实验与外科手术

本研究中的动物实验获得了中国杭州浙江大学实验动物管理和使用委员会的批准。将四十只体重为3.0至3.5kg的成年新西兰白雄兔随机分成5组，每组均将植入种植体。总共将160个种植体（每组32个）插入家兔的胫骨干骺端和股骨髓中（图1）。用SuMianXin II（0.1至0.2mL/kg：由中国长春军事兽医研究所生产）对动物进行肌肉内（肌肉注射）麻醉，并将含有1.0mL 5%利多卡因的局部麻醉剂注射至手术区域当中。在每块胫骨和股骨上钻一个孔，并使用粘有大量盐水的钻头将孔直径扩大为4.0mm。然后，用手将种植体轻轻拧到位，直到植入物颈部与皮质骨表面齐平。如图1所示，插入股骨髓的种植体是为旋出扭矩实验专门定制的，并且将胫骨中的种植体用于组织形态学分析。手术后，分层闭合手术部位，并且动物需接受3天的抗生素治疗（青霉素，400,000 U/d）。将动物关在单独的笼子中，并且手术后立即使它们完全负重。第3和第6周时，注射过量的SuMianXin II（2.0mL，肌肉注射）对家兔实施安乐死（每个时间点对每组四只兔子实施安乐死）。

旋出扭矩测量值

进行旋出扭矩实验，评估骨结合强度。旋出扭矩值（RTV）（单位为：牛顿—厘米（Ncm））

可反映种植体和骨组织之间的界面剪切强度。使用便携式数字扭矩计（B系统数字扭转辐射反射镜BS30；生产商为：宁波一诺科学仪器有限公司）测量旋出扭矩值峰值。之前已经报告了旋出扭矩实验的详细程序。²⁴并且旋出扭矩实验由一位经验丰富的人员进行。记录所有旋转开始扭矩值和扭矩峰值。

组织学和组织形态学分析

整体移除包含种植体的胫骨干骺端，并且之前已经对详细的组织学处理工艺进行了说明。^{25,26}使用白炽光显微镜（尼康）观察组织学行为、观察对象包括包括种植体周围骨形成、非层板骨和板层骨、纤维血管组织和骨髓。一位经验丰富检查员戴上口罩，使用光学显微镜和基于PC的图像分析系统（Image-Pro PlusR，生产商为：Media Cybernetics公司）进行组织形态学分析。沿着螺旋纹测量骨-种植体结合率（BIC），并测量充满骨质的骨钉纹路之间的面积百分比。BIC测量结果表示为与种植体表面直接接触骨长度的百分比。骨面积（BA）测量结果表示为位于松质骨内的骨钉纹路骨面积的百分比。

统计分析

整个数据分析过程中，数据表示为平均值±标准偏差（SD）。使用单因素方差分析（ANOVA）分析同一时间点不同家兔组的数据； $P<0.05$ 时，数据具有统计学意义， $P<0.01$ 时，数据具有高度统计学意义。所有统计分析均使用SPSS软件（第19.0版；SPSS）。

结果

钛样品表面特征

接触角测量结果显示，在暗室中干燥4周（SLAold）后的样品表面具有疏水性，接触角大于100度，而新制备样品（SLAnew）、储存在水中样品（mod-SLA，UV-modSLA）和经UV处理样品（UVSLA，UV-modSLA）皆具有超亲水性，接触角接近0度（表1）。

SEM观察结果表明样品具有两种不同的表面形貌（图2）。储存在dH₂O（modSLA，UV-modSLA）中钛样品最外表面出现较厚点状纳米颗粒。与之前Wennerberg等人研究中报告的大小约

表1 五组家兔接触角和SEM测量结果总结表

样品	存储介质	紫外光处理	亲水性	纳米结构
SLAnew	-	否	超亲水	否
SLAold	空气	否	疏水	否
modSLA	dH ₂ O	否	超亲水	是
UV-SLA	空气	是	超亲水	否
UV-modSLA	dH ₂ O	是	超亲水	是

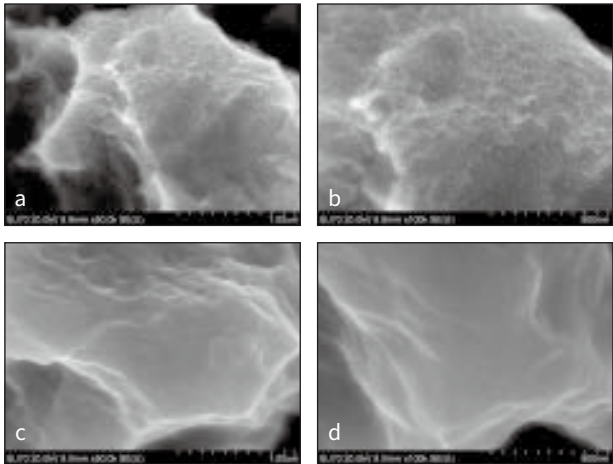


图2 (a) 50k倍率和 (b) 100k倍率下拍摄的储存于水中样品的SEM图像, 以及 (c) 50k倍率和 (d) 100k倍率下拍摄的存储于空气中样品或新鲜样品的SEM图像。

为 $10 \times 30 \text{ nm}^2$ 的针状纳米结构不同, 12本研究中观察到的纳米颗粒呈颗粒状并且分布密集, 直径约为15nm。然而, 在干燥样品表面 (SLAold, UV-SLA) 或新制备样品表面 (SLAnew) 未观察到纳米结构。接触角和SEM测量结果总结见表1。

XPS检测的主要化学元素组成见表2, 碳水平如图3所示。与刚制备的SLAnew样品 (16.8%) 相比, SLAold (32.9%) 和modSLA (21.7%) 的碳水平出现不同程度的上升。然而, 当用紫外线照射经处理后已储存4周的样品时, 尽管将样品储存在空气 (10.4%) 或水 (11.4%) 中, 碳水平还是出现了下降甚至低于SLAnew。五组家兔的C 1s和O 1s XPS光谱如图4所示。根据文献可知, 17 O 1s光谱分解成三个峰, 如图4所示。在530.3eV条件下, 主峰

表2 XPS检测出的归一化 (总和等于100%) 元素原子浓度。

样品	O (%)	Ti (%)	C (%)	N (%)
SLAnew	54.8 ± 2.2	26.4 ± 1.2	16.8 ± 1.3	1.0 ± 0.2
SLAold	48.4 ± 2.0	17.6 ± 1.1	32.9 ± 1.8	1.1 ± 0.2
modSLA	53.4 ± 1.9	24.0 ± 1.3	21.7 ± 1.5	0.9 ± 0.3
UV-SLA	63.4 ± 2.3	25.2 ± 1.4	10.4 ± 1.2	1.0 ± 0.1
UV-modSLA	62.8 ± 2.7	24.5 ± 1.6	11.4 ± 1.5	1.3 ± 0.4

每组三个独立样品的平均值±SD值如表所示。

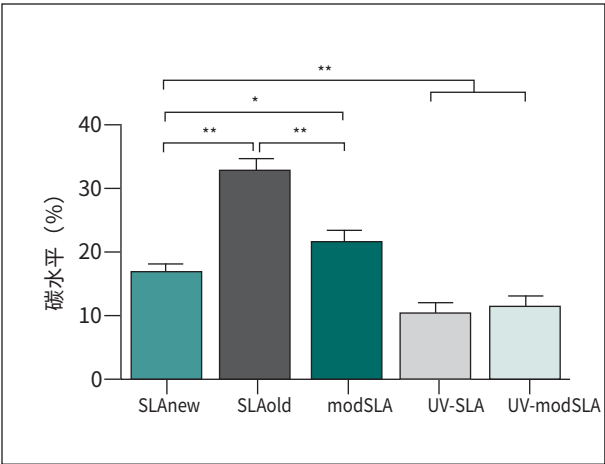


图3 XPS检测出的碳归一化原子浓度 (%)。n=3; *P<0.05, **P<0.01

表示TiO₂中的O 1s。在531.3eV条件下, 第二个峰表示Ti-OH中的O 1s, 而在532.3 eV条件下, 第三个峰对应于C = O和O-C = O。此结果表明, 紫外光处理可有效消除钛表面的碳氢化合物污染, 同时增加羟基。将钛保存于dH₂O可能有助于减轻空气中碳氢化合物对钛表面的进一步污染。

外壳手术和旋出扭矩值 (RTV) 测量值

外科手术后, 所有家兔均未死亡并且术后恢复速度迅速。在整个测试期间, 所有家兔看上去都很健康。所有家兔手术部位愈合期间或愈合之后均未出现手术部位感染的迹象。进行旋出扭矩测量时, 所有种植体在反向扭矩作用下反应稳定, 在反向扭矩撤除后会突然松开。第3周和第6周时五组旋出扭

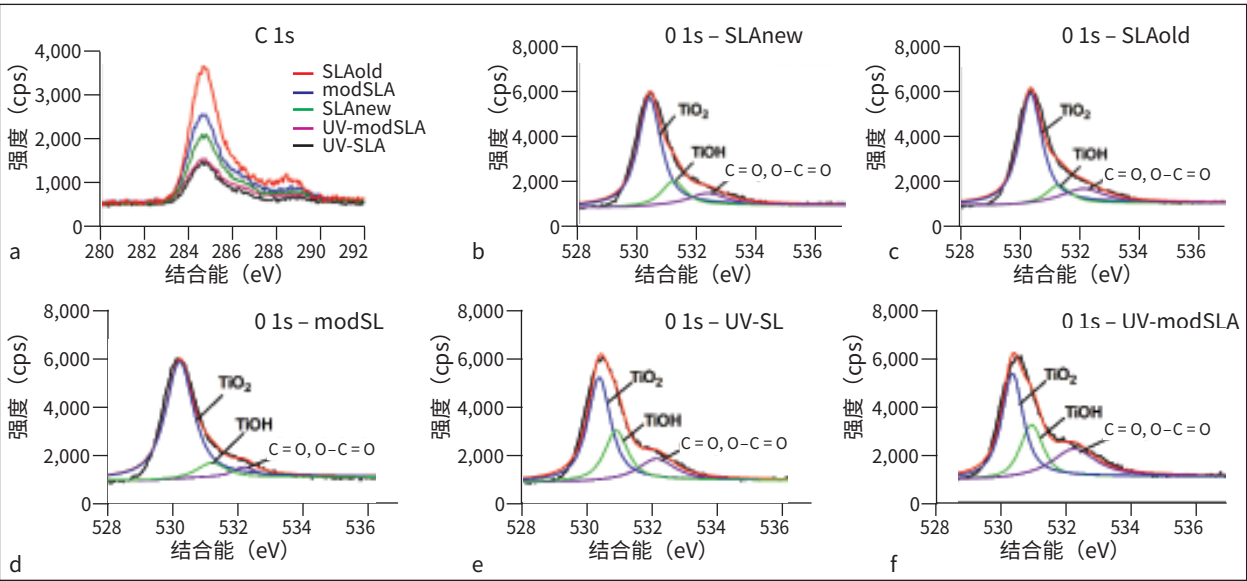


图4 五组表面 (a) C 1s和 (b至f) O 1的高分辨率XPS光谱。

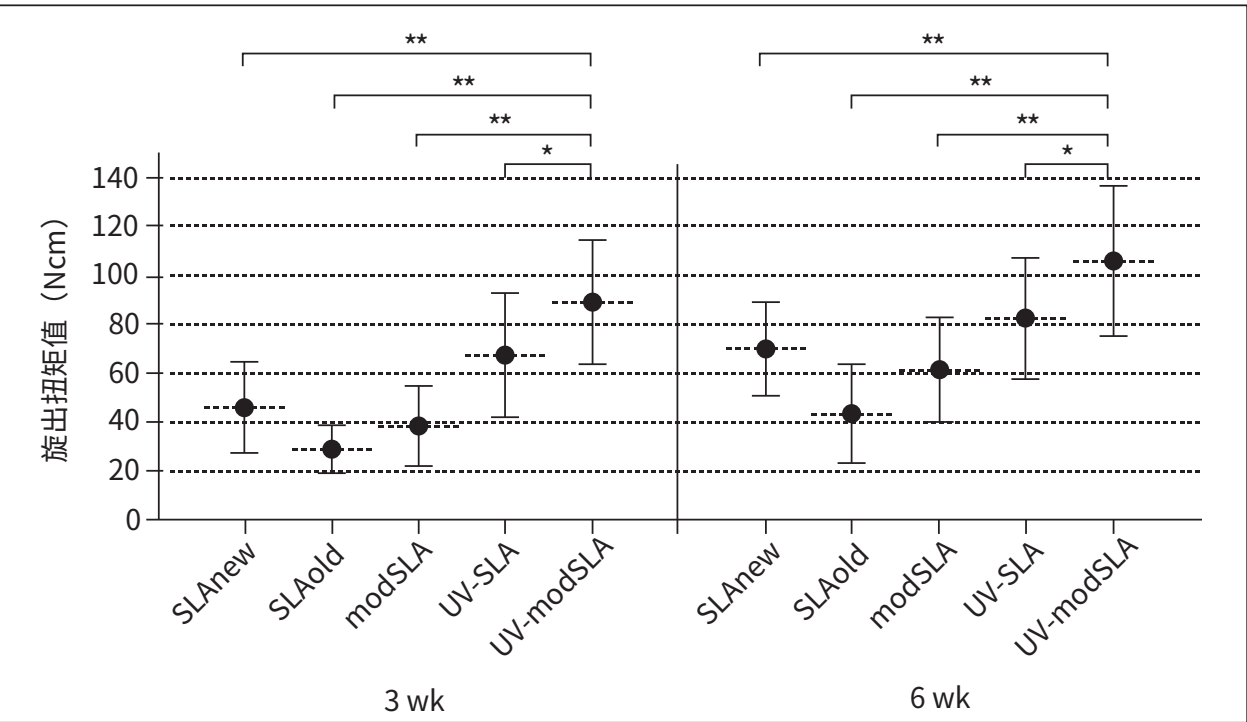


图5 3周和6周时, 五组旋出扭矩 (Ncm) 的平均值和SD值。n=8; *P<0.05, **P<0.01。

矩值 (RTV) 峰值的平均值和SD如图5所示。3周和6周时, UV-modSLA种植体的RTV最大, 与UV-SLA的差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 并且与其他三

组的差异具有高度统计学意义 ($P<0.01$)。未经UV处理的三组 (SLAnew、SLAold、modSLA) 之间未发现统计学差异。

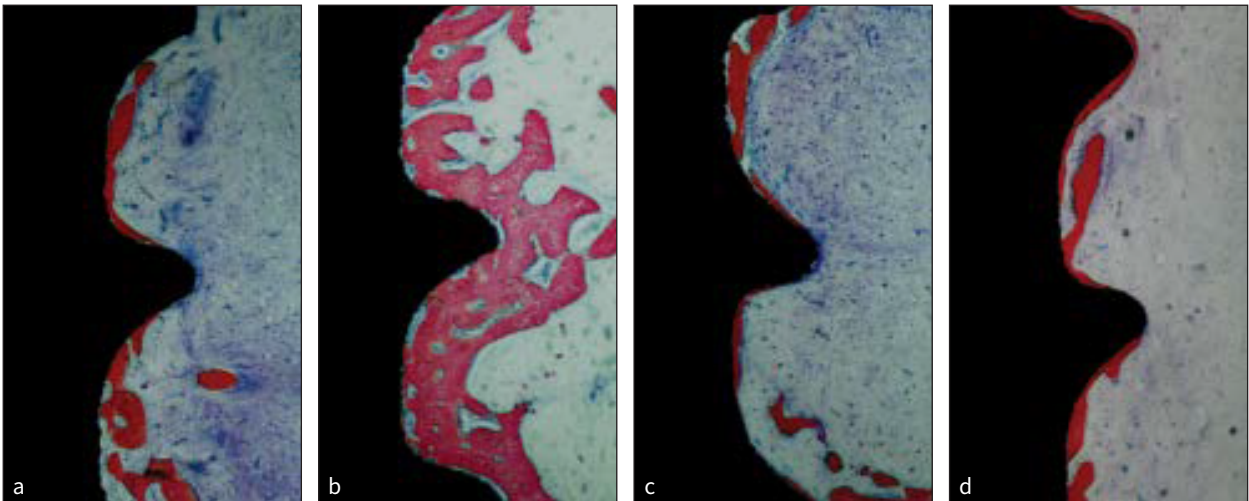


图6 植入后3周，(a) 未经紫外线处理和(b) 经紫外线处理(UV-SLA和UV-modSLA)种植体的光学显微照片；植入后6周，(c) 未经紫外线处理和(d) 经紫外线处理种植体的光学显微照片。原始倍率×40。

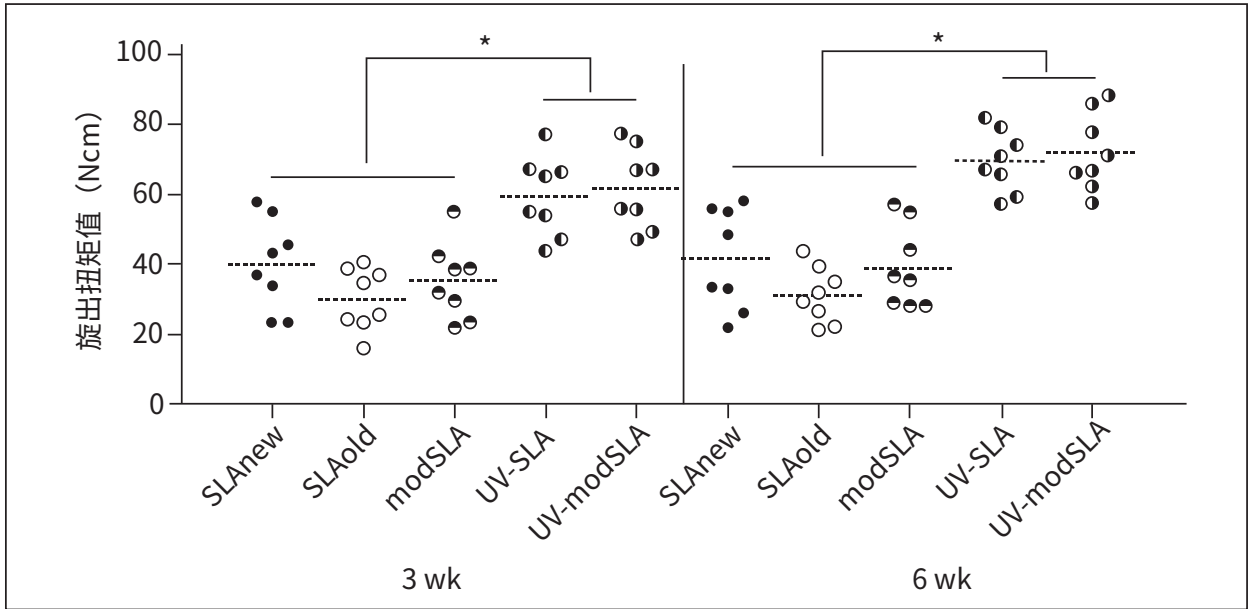


图7 第3周和第6周时，五组BIC百分比的零散分布以及平均值。

组织学和组织形态学分析

植入后3周和6周，从组织学上讲，所有五组种植体均与周围骨直接接触，且骨和种植体结合面处未出现炎症迹象。手术部位愈合3周后，非常有趣的是，经紫外线照射(UV-SLA和UV-modSLA)种植体周围的骨小梁和骨基质比其他种植体周围多得多(如图6a和6b所示)。手术部位愈合6周后，种

植体周围零散骨骼消失，从皮质骨中经骨传导形成新骨骼。如图6c和6d所示，经紫外线处理种植体表面新形成的骨骼比未经紫外线处理种植体表面形成的新骨骼更加致密和连续。

组织形态学结果对应于组织学发现结果。五组钛种植体的BIC和骨面积(BA)如图7和8所示。经紫外线照射组在3周和6周时BIC和骨面积(BA)上

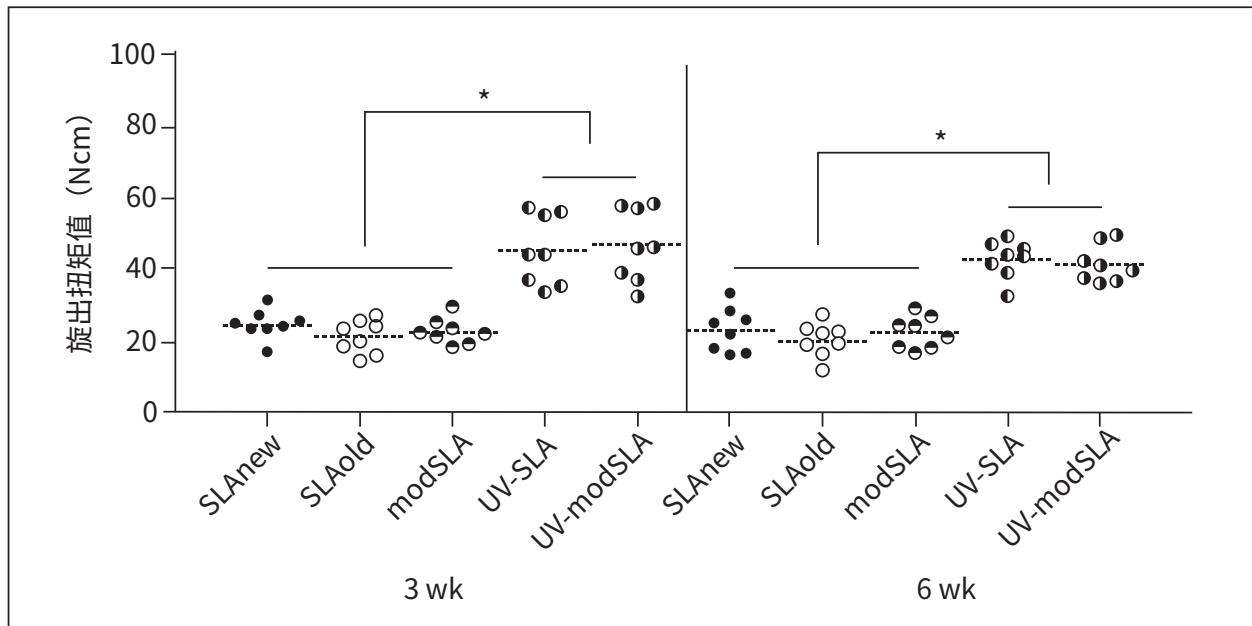


图8 第3周和第6周时，五组松质骨骨钉纹路内骨面积的零散分布以及平均值。

升，上身量具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨论

本研究依据是最近报告的关于将玻璃蚀刻法与水溶液储存相结合，诱导钛表面自发形成纳米结构的技术¹²。由于自发形成纳米结构的演化过程需要耗费将近2周或更长时间，作者怀疑纳米结构演变的同时伴随着不可避免的生物降解，紫外线照射处理可以解决生物降解这个问题并进一步提高生物活性。本文中对五组样品 (SLAnew、SLAold、modSLA、UV-SLA和UV-modSLA) 的表面特征和骨结合程度进行了分析，以证明此假设。

在本研究开始阶段制备不同的钛表面并检测其表面特征。除SLAold表面外，实验前储存于水中或经UV照射处理的样品表面都是超亲水性表面。然而，尽管曾有多次研究报告称保持钛表面的亲水性对增加骨原细胞的附着性、扩散性和增殖能力具有积极作用，但尚未发现可直接证明材料的亲水性对材料生物活性或骨传导性至关重要的证据^{14,18,19}。

在对这五组钛种植体表面进行处理时，两组使用dH₂O作为钛存储介质 (modSLA, UV-modSLA) 的最外层表面上形成了纳米颗粒 (图2)。Wennerberg等人的研究中也报告了这种现象¹²；储存于液体中的SLA表面上也出现了纳米结构，并且证明结合玻璃蚀刻法与水溶液储存有助于形成纳米结构。本研究中的纳米粒子形状和大小在 (直径为15纳米，颗粒状) 和Wennerberg等人出版刊物 (10×30nm²，针状) 中纳米粒子的形状和大小略有不同，这可能与钛的纯度有关。关于纳米结构的出现存在这样一种可能假设：由于玻璃蚀刻形成的氢化物层充当了成核中心²⁷，并且水解离吸附对于引导钛 (Ti) 扩散起到了关键作用¹²。

钛的生物老化应该与碳氢化合物的渐进性污染有关^{14,16,17}。为了证明纳米结构演变的同时是否伴随着碳氢化合物的渐进性污染，使用XPS检测样品表面上的化学成分。从XPS测量值可以看出，与刚制备的SLAnew样品 (16.8%) 相比，SLAold (32.9%) 和modSLA (21.7%) 的碳水平出现不同程度的上升。这种现象是由于大气中碳氢化合物的污染造成的，并且将钛保存于dH₂O中可能有助于

减轻钛表面的进一步污染。尽管将钛保存于dH₂O中减轻了污染,但钛表面烃含量仍然出现了渐进性变化。然而,紫外线照射可以有效地清除碳氢化合物,使其碳浓度达到比新制备钛表面更低的水平,同时增加钛表面上的羟基含量。在经紫外线辐射处理时,二氧化钛(TiO₂)会产生电子空穴对,生成羟基自由基和氧自由基,将碳氢化合物分解成H₂O和CO₂²⁸。因此,本研究中两个经紫外线处理过种植体组钛表面碳含量最低。对于结合碳氢化合物去除功能和增强蛋白质和细胞吸引力特征的机制,需进行进一步的研究。所测试的蛋白质和成骨细胞带负电荷。当通过紫外光处理去除覆盖在TiO₂表面上的碳氢化合物时,Ti⁴⁺位点暴露。这可能会促进蛋白质、细胞和这些阳离子位点之间的相互作用^{22,23}。

3周和6周时,UV-modSLA种植体的RTV最大,与UV-SLA的差异具有统计学意义,并且与modSLA的差异具有高度统计学意义。这些数据说明了以下两点:(1)最外表面上存在自发形成纳米结构的钛种植体可有助于增强钛和骨之间的接口强度;(2)紫外线照射处理可进一步有效地提高用出现自发形成纳米结构的钛表面体内骨结合的能力。曾有生物力学研究分别证明了自发形成的纳米结构¹³和紫外线光化功能的效应^{29,30},本研究首次对纳米结构和紫外线光化功能对于解决纳米结构演化过程中可疑生物老化的综合效应进行了研究。如图5所示,尽管不存在统计学差异,但表面具有纳米结构的modSLA种植体的平均旋出扭矩值(RTV)比表面无纳米结构的SLAnew种植体更低。造成这种现象的原因可能是modSLA种植体表面在储存期间出现了生物老化,从而抵消了纳米结构的效应。此结果还与根据XPS测量结果可知的modSLA表面烃的渐进性变化相对应。

组织学和组织形态学分析结果表明紫外线光化功能对体内骨结合具有显性效应。3周时,经紫外线照射处理的种植体周围的骨小梁和骨基质增多,并且6周时,经紫外线照射处理的种植体表面新形成的骨骼更加致密和连续。本研究中紫外线照射处理效果与Aita等人¹⁹先前进行的研究一致。Aita等人的研究指出对钛进行紫外线预处理大大提高了其骨传导能力,其中原因与用紫外线催化逐步去除TiO₂表面的碳氢化合物有关。该研究表明对钛进行光化作用能够以更快的速度实现更完整的骨-钛结合。尽管Ogawa等人⁷报告,通过化学沉积TiO₂形成的纳米结构对骨整合和再生具有促进作用,但纳米结构的影响在该研究的组织学和组织形态学分析中并无统计

学意义。本研究结果可归因于两个原因。一方面,储存期间,纳米结构演变的同时,modSLA种植体表面出现了生物老化,这抵消了纳米结构的影响。另一方面,本研究中,紫外线照射处理的效果比自发形成的纳米结构对组织学和组织形态学表现的影响要大得多。

结论

本研究对五组钛种植体(SLAnew、SLAold、modSLA、UV-SLA和UV-modSLA)的表面特征和骨结合进行了研究,旨在证明自发形成纳米结构的演变过程是否伴随着不可避免的生物变性以及紫外线光化功能是否有利于进一步增强骨结合。本研究主要发现如下:(1)贮水表面出现自发形成的纳米结构,直径大小约为15nm,并且随着纳米结构的演变,不可避免地出现了碳氢化合物污染;(2)紫外线照射处理可有效消除纳米结构演变过程中出现的碳氢化合物污染,并可进一步促进骨结合;(3)尽管紫外线光化功能对组织学和组织形态学性能的影响更大,纳米结构和紫外线处理可以增强钛与骨接口处结合强度。

致谢

本研究得到了国家自然科学基金委员会(批准号:81272157)和浙江省公益性技术应用研究计划(2015C33161)的资助。作者未指出任何与本研究相关的利益冲突。

参考文献

1. Wennerberg A, Albrektsson T. 钛表面形貌对骨结合的影响:系统评价临床口腔种植研究. 2009;20(suppl 4):172-184.
2. Gittens RA, McLachlan T, Olivares-Navarrete R等. 微米/亚微米级表面粗糙度和纳米级特征对细胞增殖和分化的联合作用. 生物材料2011;32:3395-3403.
3. Kam KR, Walsh LA, Bock SM等. 纳米形貌对调节蛋白质吸附功能和纤维化反应的影响. 组织工程A部分2014;20:130-138.
4. Mendonga G, Mendonga DB, Simoes LG等. 种植体表面纳米级特征对成骨细胞特异性基因表达的影响. 生物材料2009;30:4053-4062.
5. Tsukimura N, Yamada M, Iwasa F等. 紫外光化功能和微纳米复合形貌对钛的生物性能的协同作用. 生物材料2011; 32: 4358-4368.

6. Kubo K, Tsukimura N, Iwasa F等. 微米级至纳米级层次模型中TiO₂纳米结构上的细胞行为.生物材料2009;30:5319-5329.
7. Ogawa T, Saruwatari L, Takeuchi K, Aita H, Ohno N. 通过构建钛纳米结节进行骨结合和骨再生.牙科研究杂志2008;87:751-756.
8. Mendonga G, Mendonga DB, Simoes LG等. 纳米结构氧化铝涂层的种植体表面: 对体内成骨细胞相关基因表达以及骨-种植体结合率的影响.口腔与上颌面植入国际杂志 2009;24:205-215.
9. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE等. 离散磷酸钙纳米晶对骨与钛表面结合的影响.生物材料2007;28:4748-4755.
10. Zhang W, Li Z, Huang Q等. 混合微/纳米棒修饰钛种植体表面形貌对大鼠骨髓间充质干细胞粘附性能和成骨分化的影响.国际纳米医学杂志2013;8:257-265.
11. Sul YT.TiO₂纳米管在对急性变螺旋形钛种植体微结构表面上的电化学生长行为、表面性质和体内骨响应.国际纳米医学杂志2010;5:87-100.
12. Wennerberg A, Svanborg LM, Berner S, Andersson M. 钛表面上自发形成纳米结构.临床口腔种植研究2013;24:203-209.
13. Wennerberg A, Jimbo R, Stubinger S, Obrecht M, Dard M, Berner S. 纳米结构和亲水性对骨结合的影响: 关于家兔胫骨的生物力学研究.临床口腔种植研究2014;25:1041-1050.
14. Att W, Hori N, Takeuchi M等. 钛骨传导性随时间降低: 植入材料生物老化的启示.生物材料2009; 30: 5352-5363.
15. Hori N, Att W, Ueno T等人. 与年龄相关的钛蛋白质吸附能力的降低.牙科研究杂志 2009;88:663-667.
16. Att W, Ogawa T. 种植体表面生物老化及其紫外线治疗修复: 骨结合的全新理解.口腔与上颌面植入国际杂志2012;27:753-761.
17. Li S, Ni J, Liu X等. 通过紫外线照射改性喷砂和酸蚀钛表面的表面特性和生物相容性:体外研究.生物医学材料研究杂志, B辑: 应用生物材料 2012;100:1587-1598.
18. Att W, Hori N, Iwasa F, Yamada M, Ueno T, Ogawa T. 紫外光化功能对钛和铬钴合金的时间相关生物活性的影响.生物材料2009;30:4268-4276.
19. Aita H, Hori N, Takeuchi M等. 钛紫外光化对骨结合的影响.生物材料 2009;30:1015-1025.
20. Aita H, Att W, Ueno T等. 紫外光介导的钛光化功能促进人间充质干细胞的迁移、附着、增殖和分化.生物材料学报2009;5:3247-3257.
21. Suzuki T, Hori N, Att W等. 紫外线处理抑制钛的生物活性随时间降低.组织工程A部分2009; 15: 3679-3688.
22. Iwasa F, Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Yamada M, Ogawa T. 通过静电机制提高成骨细胞对UV光化钛的附着力.生物材料.2010;31:2717- 2727.
23. Hori N, Ueno T, Minamikawa H等. 蛋白质吸附对UV光化钛的静电控制.生物材料学报2010; 6: 4175-4180.
24. He F, Yang G, Wang X, Zhao S.电化学沉积纳米羟基磷灰石对喷砂/双酸蚀刻钛种植体骨结合的影响.口腔与上颌面植入国际杂志 2009;24:790-799.
25. He FM, Yang GL, Li YN, Wang XX, Zhao SF.对经喷砂, 双酸蚀刻和H₂O₂/HCl处理的钛种植体的早期骨反应:关于家兔的实验研究.口腔与上颌面植入国际杂志2009;38:677-681.
26. Jiang QH, Liu L, Peel S, Yang GL, Zhao SF, He FM.多层BMP-2基因涂层多孔钛种植体表面的骨反应.临床口腔种植研究2013;24:853-861.
27. Szmukler-Moncler S, Bischof M, Nedir R, Ermrich M.酸浸蚀商用纯钛和钛合金种植体的氢化钛和氢气浓度:关于五类种植体系统的对比分析.临床口腔种植研究2010;21:944-950.
28. Linsebigler AL, Lu G, Yates JT Jr. 对TiO₂表面的光催化作用:原则、机制和选定的结果.化学评论 1995;95:735-758.
29. Hirakawa Y, Jimbo R, Shibata Y, Watanabe I, Wennerberg A, Sawase T. 加速光诱导亲水钛种植体上的骨形成:关于犬下颌骨的实验研究.临床口腔种植研究2013;24(suppl A100):139-144.
30. Jimbo R, Ono D, Hirakawa Y, Odatsu T, Tanaka T, Sawase T. 加速光致亲水性促进骨结合的功能:一项关于动物的研究.临床种植牙科及相关研究2011;13:79-85.

临床论著

03

紫外光化功能对矫正微型骨钉生物学性能和支抗能力的影响

Masako Tabuchi博士(牙科博士)¹/Takayuki Ikeda博士(牙科博士)²/Makoto Hirota博士(牙科博士)²/Kaori Nakagawa博士(牙科博士)²/Wonhee Park博士(牙科博士)²/Ken Miyazawa博士(牙科博士)³/Shigemi Goto博士(牙科博士)³/Takahiro Ogawa博士(牙科博士)⁴

目的：用紫外线处理钛种植体（经处理后立即使用），或用光化功能处理钛种植体，可提高种植体的生物学特性和临床性能，这一方法正获得广泛支持。本研究旨在检查光化功能对矫正微型骨钉的生物学性能和机械支抗能力的影响。**材料与方法：**将未经处理的和经光化作用处理的Ti-6Al-4V矫正微型骨钉植入大鼠股骨中。在植入前，立即采用一个照射装置用紫外光对微型骨钉进行12分钟的光化功能作用处理。手术部位愈合3周后，横向推动微型骨钉，测量微型骨钉应对倾翻力的抵抗力。还使用扫描电子显微镜和能量色散光谱法评估微型骨钉周围形成组织的形态和化学性质。分别在经过和没有经过光化功能处理的Ti-6Al-4V盘上培养来源于大鼠骨髓的成骨细胞。对附着于盘上的成骨细胞数量和成骨细胞行为、碱性磷酸酶活性和矿化能力进行评估。结果：光化功能将盘和骨钉表面从疏水性转变为超亲水性。体内生物力学测试表明，当受到侧向倾翻力时，未经光化处理骨钉的位移比经光化处理骨钉的位移大1.5至1.7倍。经光化功能处理的微型骨钉周围发现强健的骨形成，且钙元素峰和磷元素峰较强，而未经光化功能处理的微型骨钉周围组织看起来很薄并且没有明显的钙峰。经光化功能处理的Ti-6Al-4V盘上，成骨细胞附着量、初始扩散速度、粘附和骨形成表达的表达显著增加。**结论：**体内和体外结果综合一致地表明，光化功能提高了Ti-6Al-4V的生物活性，增强了矫正微型骨钉的支抗能力。《口腔与上颌面植入国际杂志》2015;30:868-879. doi:10.11607/jomi.3994

关键词：生物老化、骨-种植体结合；亲水性；钛合金；骨结合

¹美国加利福尼亚 洛杉矶 加州大学洛杉矶分校牙科学院 高级口腔修复科 温特劳布重建生物技术中心 访问学者；日本名古屋市爱知学院大学牙科学院正畸科副教授。

²美国加利福尼亚 洛杉矶 加州大学洛杉矶分校牙科学院 高级口腔修复科 温特劳布重建生物技术中心 访问学者。

³日本名古屋市爱知学院大学牙科学院正畸科教授。

⁴美国 加利福尼亚 洛杉矶 加州大学洛杉矶分校牙科学院 高级口腔修复科 温特劳布重建生物技术中心 教授。

通讯信息：

Takahiro Ogawa教授：

地址：The Weintraub Center for Reconstructive Biotechnology, Division of Advanced Prosthodontics, UCLA School of Dentistry, 10833 Le Conte Avenue (B3-081 CHS), Box 951668, Los Angeles, CA 90095-1668, USA.

传真：+1-310-825-6345.

电子邮箱：togawa@dentistry.ucla.edu

©2015, Quintessence Publishing Co Inc.

矫正微型骨钉对现代正畸治疗产生了相当大的影响，不仅为具有支抗要求的病例提供了新支抗钉源，而且还可用于应力管理和控制¹。然而，正畸微型螺钉仍然存在局限性并需要改进。微型骨钉的总成功率为75%至85%，普遍认可的平均成功率低于90%²⁻⁵，短于8mm的微型骨钉的成功率则仅为72%。²报告称下颌微型骨钉的成功率低于上颌微型骨钉^{2,3}，即刻负重或早期负重可能造成不良结果⁶。

矫正微型骨钉在临床上的使用还存在疑问。一方面，矫正微型骨钉需经机械固定，才能提供足够的支抗和可预测的力控制。另一方面，矫正治疗结束后需轻松移出。这些要求将矫正微型骨钉与种植牙区分开来，且这些要求通常具有永久性，会对提高骨钉临床性能的方法产生影响。表面粗糙度会增

强种植体支抗强度和钛 (Ti) 基种植体周围的骨覆盖度^{7,8}, 其中矫正微型骨钉⁹, 骨-钛联锁增强导致移除非常困难。更宽、更长的微型骨钉可能提供更好的支抗, 但骨钉放置的可用空间非常有限^{2,10}。此外, 更宽、更长的骨钉可能抵消微型骨钉对于种植牙的优势, 即, 放置简单创伤小, 造成邻近牙齿受损的可能性小。

Ti种植体UV处理也叫光化, 可在不改变表面形态的情况下改善种植体表面的物理化学性质^{11,12}。在光化功能中, Ti材料表面在使用前立即采用UV光调节。光化功能能移除Ti表面聚集的碳氢化合物, 继而产生亲水性¹³⁻¹⁵, 光化结束后, Ti表面从负电性变为正电性^{16,17}。物理化学变化能提高成骨细胞在Ti表面的粘附、扩散、增殖和促成骨表型转化, 进而显著提高BIC和体内骨-种植体结合强度¹¹⁻¹⁵。临床研究已经证明, 种植牙获得稳定性的概率已经提高, 可实现的支抗水平也已经提高¹⁸⁻²⁰。因此, 光化功能可缩短愈合时间, 为治疗难度大的骨环境提供新的治疗方案, 还可以提高种植牙的长期可靠性。近期的动物和人类研究也表明, 光化功能可提高种植体边缘骨的结构质量, 这表明该方案还可以提高种植体周围的健康和美观度^{18,21}, 并延长支抗钉使用寿命。为支持该论点, 最近的一项生物力学建模研究发现, 光化功能提高BIC后, 能优化种植体应力分布和扩散, 显著减少种植体颈部的机械应力²²。这些研究大部分是在具有粗糙表面形态的商用纯Ti上进行的, 比如喷砂酸蚀表面, 因为目前大多数的牙种植体都是这种类型。

作者假设光化功能将提高矫正微型骨钉支抗。测试这一假设难度较大, 因为矫正微型骨钉是由钛合金制成的, 具有相对光滑的表面形态 (经过机器加工), 直径和长度比牙种植体小得多。本研究的目标是确定 (1) 光化功能对Ti-6Al-4V合金培养的成骨细胞的行为和功能是否有积极的影响, (2) 光化后的Ti-6Al-4V微型骨钉是否增强了对骨头侧向力的抵抗性。

材料与方法

钛合金样本及表面特性

长6mm、直径1.4mm的矫正微型骨钉从Jeil Medical (韩国首尔) 购得, 用于体内实验。在体外实验中, Ti-6Al-4V样品加工成圆盘状 (直径为20mm; 厚度1.5mm)。微型骨钉按接收时的状态

使用, 不做修改。在实验前, 盘状样本被储存在黑暗的环境中8周, 以便充分老化和达到与年龄相关的生物活性标准^{14,23-25}。用扫描电子显微镜 (SEM, JSM-5900LV, Joel) 和能量色散X射线谱 (EDX) 分别检查观察其表面形态和化学性质。评估表面的亲水性或疏水性, 方法是: 测量接触角度, 在圆盘表面扩散10μL水, 定性观察微型骨钉表面1μL水滴的流体力学现象, 以及微型骨钉在水中的浮力。在细胞培养研究中, 植入或使用前通过光电元件 (TheraBeam Super Osseo, Ushio) 用紫外光对种植体处理12分钟, 进行光化。

成骨细胞培养

根据先前的报告²⁶, 从8周雄性斯普拉格-道利 (SD) 大鼠中提取的骨髓 (BM) 细胞置于MEM改良培养基 (αMEM) 中, 该培养基包含青霉素G钠 (10000U/mL)、硫酸链霉素 (10000mg/mL) 和两性霉素B (25mg/mL)。细胞在潮湿的空气 (95%空气, 5%二氧化碳, 37°C) 下培养。融合80%时, 用0.25% trypsin-1 mM EDTA-4Na分离, 接着按 2×10^4 细胞/cm²的密度种于Ti片上。培养基每3天更新一次。

细胞粘附分析

采用四唑盐 (WST-1) 比色法 (WST-1, 罗氏应用科学部) 分别测量培养3小时和24小时后, Ti合金圆盘上附着的成骨细胞数量, 以分析该圆盘吸附细胞的能力。培养孔在100μL WST-1试剂中培养4小时 (37°C)。采用酶联免疫吸附测定读取器 (ELISA, 420nm) 测量生成的甲瓞数量。甲瓞数量被认为与表示细胞代谢活动总量的细胞数量有关。

成骨细胞形态和扩散行为

采用共聚焦激光扫描显微镜检测Ti合金圆盘上培养的成骨细胞的扩散、粘附行为和细胞骨架重组。培养3小时和24小时后, 细胞放置于10%福尔马林中, 并用荧光染料罗丹明鬼笔环肽 (肌动蛋白丝, 红色; 分子探针) 染色。为观察细胞内表达和粘着斑蛋白 (局部粘附蛋白) 位置, 在用抗小鼠二抗 (共轭异硫氰酸荧光素标记, Abcam) 培养后, 细胞还额外在抗粘着斑蛋白单克隆抗体 (Abcam) 中进行培养。采用图像分析软件 (ImageJ, 国立卫生研究院) 量化细胞面积、周长和弗雷特直径, 以及肌动蛋白和粘着斑蛋白的细胞内表达水平。

细胞密度和增殖分析

培养第二天,采用WST-1分析法(见上文)量化增殖的细胞密度。DNA合成期间,采用溴化去氧尿苷(BrdU)测量细胞增殖量。培养第2天,往培养孔中加入100 μ L BrdU溶液(100mmol/L,罗氏应用科学部),培养10小时。细胞胰蛋白酶化和DNA变性之后,用与过氧化物酶共轭的抗BrdU抗体培养90分钟,并与四甲基联苯胺反应显色。采用ELISA酶标仪测量吸光度(波长370nm处)。

碱性磷酸酶(ALP)活性

培养第7天,采用图像和比色法为基础的分析方法检测成骨细胞ALP活性。图像分析中,培养的细胞经汉克斯(Hanks)液清洗两次,接着在37 $^{\circ}$ C的条件下用包含萘酚AS-MX磷酸盐(0.9mmol/L)和固红TR(1.8mmol/L)的三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液(120mmol/L, pH 8.4)培养30分钟。染色图像上ALP-阳性区域面积在图像分析软件(ImageJ)中按[(染色面积)/总盘面积] $\times$ 100]计算,按百分数形式表达。在比色法中,细胞用重蒸馏水清洗,接着添加250 μ L对磷酸对硝基苯酯(LabAssay ATP,和光纯药工业),在37 $^{\circ}$ C下培育15分钟。ALP活性以通过酶催化反应释放出的硝基酚的量来评估,利用一台ELISA酶标仪在405nm波长处测量。

矿化分析

细胞的矿化能力通过比色检测沉积钙来测量。第14天,用磷酸盐缓冲溶液冲洗培养物,在1ml的0.5mol/L盐酸溶液中培育,轻微摇晃,培养一夜。将该溶液在碱性介质(钙结合缓冲剂, Sigma)中与邻甲酚酞络合剂混合产生一种红色的钙-甲酚酞氨络合物。利用一台ELISA酶标仪在575nm波长处测量显色强度。

手术

根据Choi等人27的研究,微型骨钉放置于大鼠的股骨,皮质骨顶部骨钉周围设有间隙。大鼠吸入吸入1%-2%异氟烷的进行麻醉。刮去腿毛并用10%聚维酮碘溶液擦洗后,小心切开皮肤和肌肉,将股骨的末梢部分暴露出来。选择末梢股骨的平台表面,放置微型骨钉。用2.4mm圆钻在微型骨钉在距离股骨远端边缘9mm处钻孔,骨钉周围保持0.5mm间隙(图1a)。股骨各侧交替放置一未经处理的对照微型骨钉和一光化后的微型骨钉。将微

型骨钉旋紧至洞内,直到螺纹低于骨表面。未处理骨钉的平均力偶矩为 2.31 ± 0.19 Ncm,光化骨钉为 2.14 ± 0.19 Ncm;两组未发现统计上的显著差异。用可吸收的缝合线缝合肌肉和皮肤。美国加州大学洛杉矶分校动物研究委员会批准了该方案,所有的实验都按照美国农业部动物研究的指南进行。

微型骨钉支抗生物力学测试

为评估微型骨钉的支抗能力,修改大鼠股骨模型中的种植体生物力学测试来测量微型骨钉的抗侧向倾翻力。创建该生物力学测试,并确定该测试敏感性高、特异性强,可测量骨-种植体的结合强度。8,28愈合3周后,采集包含微型骨钉的股骨,并嵌入自动聚合树脂中(嵌入至螺纹顶部表面);即,微型骨钉的长轴垂直对齐(图1b)。树脂聚合后,将树脂块垂直放置在力学性能试验机(Instron 5544机电测试系统,英斯特朗工程公司)上,以便微型骨钉的长轴可水平对齐(图1c)。设有2000N称重传感器的推杆向下移动,以1mm/min十字头速度对微型骨钉进行侧向施压(图1c)。按60Hz数据采样率记录测试杆上的负重和放置位置。持续负重,直到杆移动0.7mm,彻底覆盖微型骨钉周围间隙。

微型骨钉/组织复合体形态和元素分析

愈合3周时,小心暴露微型骨钉和周围组织,并置于水中搅拌浸润1小时,接着在真空条件下烘干。用碳溅射的方式涂层后,样本用SEM检测。用EDX分析组织残余与微型骨钉-组织接触面的元素成分。

统计分析

除细胞形态计量(n=9)外,体外培养研究采用了3份独立的样本(n=3)。在6只大鼠(n=6)身上进行微型骨钉生物力学测试。采用双因素方差分析法(ANO-VA)测试光化功能的作用,以及微型骨钉发生位移时的负重。作用显著时,采用事后Bonferroni分析进一步确定各压力下,未经处理的对照骨钉和光化骨钉之间差异的显著性;P<0.05认为差异显著。

结果

Ti合金样本表面特性

Ti-6Al-4V圆盘低倍SEM成像显示,表面形态相对光滑,有车床特有的同心痕迹,和加工过的Ti表

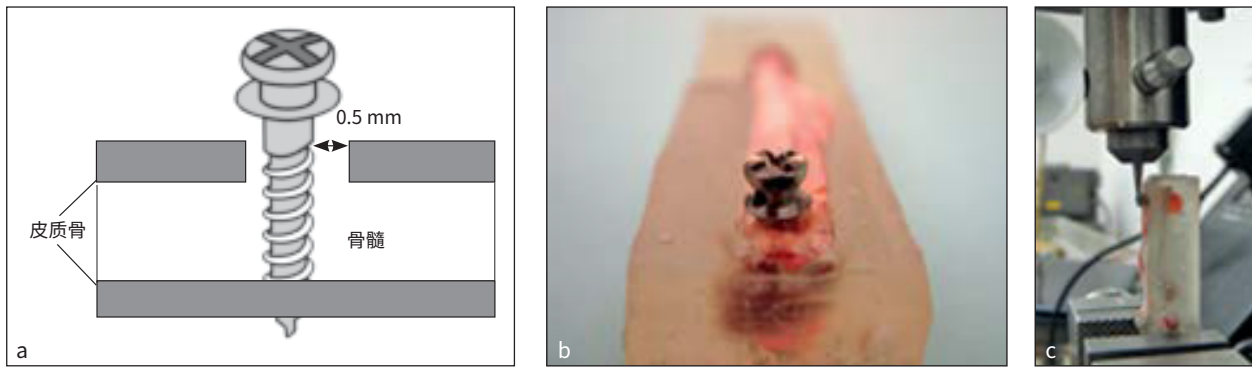


图1 微型骨钉放置和生物力学测试实验步骤。(a) 放置矫正微型骨钉至鼠股骨示意图。(b) 带微型骨钉股骨(骨钉种植3周后取出,接着嵌入丙烯酸块)。(c) 微型骨钉承受侧向倾翻力以评估支抗。

面特性类似(图2a)。高倍成像(超微米水平)显示平行标记、擦伤和划伤的表面形态(图2b)。EDX光谱确定Ti-6Al-4V合金中有预期的Ti、Al和V(图2c)。和圆盘类似(图2e),SEM显示微型骨钉的形态与Ti合金片相似,低倍镜下可见同心痕迹(图2d),高倍镜下可见加工过的表面形态。EDX证实,合金片与微型骨钉的化学成分相似(图2f)。

光化前后表面疏水/亲水变化

光化前后Ti合金片上重蒸馏水(10mL)的图像见图3a。水滴在未经处理的表面上保持半球形,接触角约为80至85度,表明该表面是疏水。相反,经UV处理后光化表面上的水滴立即扩散。水的接触角小于10度,说明光化表面亲水,因此水的扩散面积要大得多。微型骨钉也进行了亲水和疏水测试;小水滴(1 μ L)在未经处理的微型骨钉表面保持球形,而在光化后的表面上迅速扩散(图3b)。手术期间,钻孔位置的血液与骨钉接触后,立即在骨钉表面扩散,可以明显地观察到光化后微型骨钉的亲血转变(图3c)。相反,未处理微型骨钉未插入部分则无血液。

初始细胞粘附

培养3小时和24小时后,附着于光化Ti合金表面

的成骨细胞数量明显大于未处理表面(图4a)。光化表面附着细胞数量的增加在共聚焦显微镜下得到了证实(图4b)。

成骨细胞的扩散和粘附行为

罗丹明鬼笔环肽染色的成骨细胞的共聚焦显微镜图像表明,培养3小时后,光化处理的表面的细胞比未处理表面的细胞更大(图5a)。此时,光化处理表面的大部分细胞随着细胞突起开始延伸,胞质开始增大,则未处理表面的大部分细胞依然保持紧凑的圆形。光化处理表面培养的细胞的细胞质内有粘着斑蛋白表达,并在边缘聚集,尤其是在细胞质早期突起位置。

培养24小时后,未经处理和光化处理的表面上的细胞甚至比3小时的状态更大。然而,光化处理表面上的细胞扩散面积更大,细胞突起更多。光化处理表面培养的细胞表达的粘着斑蛋白更显著,该表达位于细胞突起的尖端。在光化处理表面上,细胞面积的细胞形态学参数和密度计参数、周长、弗雷特直径、肌动蛋白和粘着斑蛋白的表达水平均显著高于未处理表面培养的细胞,这证实了定性观察结果(图5b)。

细胞增殖活性和功能表型

通过评估培养第2天的细胞密度来评估增殖的

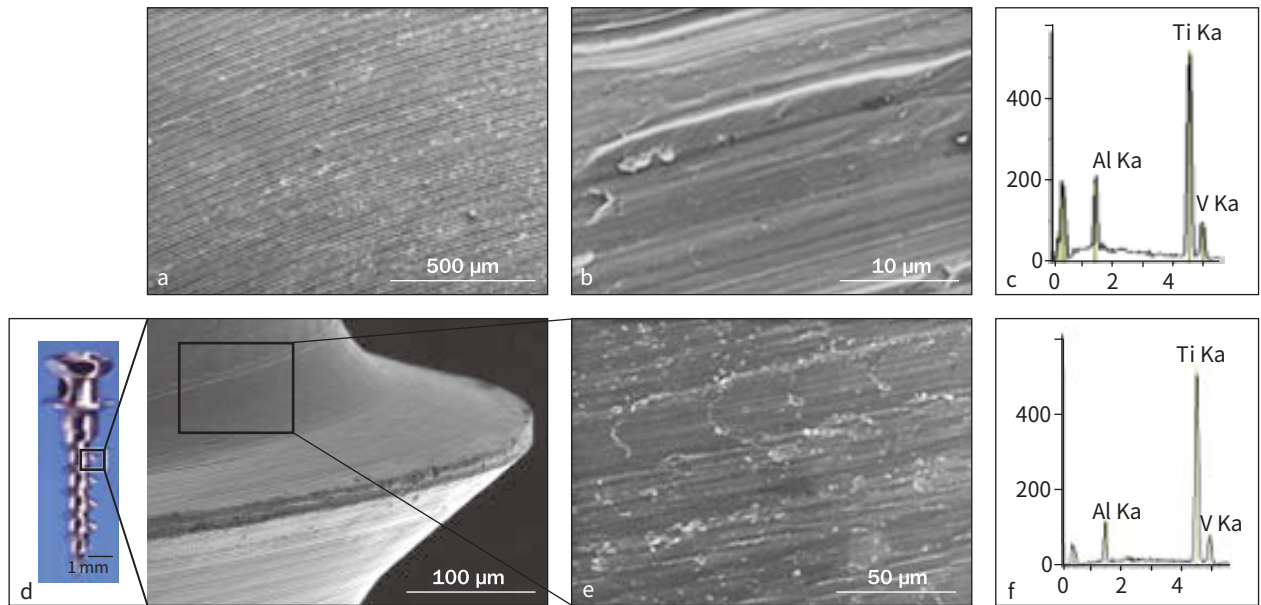


图2 本研究钛合金Ti-6Al-4V的表面形态特征。(a, b) 细胞培养研究用Ti-6Al-4V SEM图像(原放大倍数, a: $\times 500$; b: $\times 5000$)。Ti-6Al-4V片(c)和微型骨钉(f)化学成分EDX分析。(d, e) 体内研究用Ti-6Al-4V矫正骨钉SEM图像(原放大倍数, d: $\times 70$; e: $\times 3000$)。

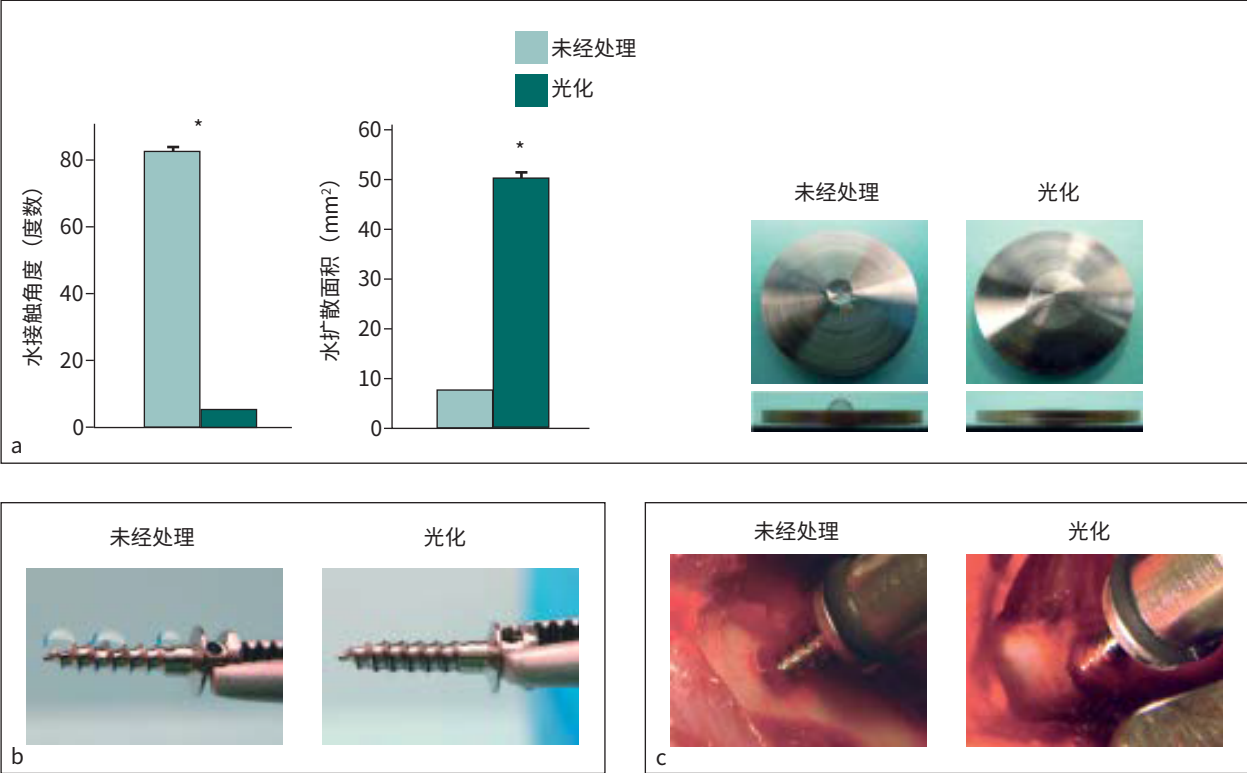


图3 光化功能引起的亲水性转化。(a) Ti-6Al-4V片上重蒸馏水(10 μ L, ddH₂O)顶部和侧面视图, 以及计算接触角度和ddH₂O扩散面积。数据为平均值 $\pm$ SE (n=3)。*P<0.001。(b) 未处理和光化后Ti-6Al-4V矫正微型骨钉上ddH₂O(1 μ L)图像。(c) 光化后微型骨钉从"疏血"转变为"亲血"。微型骨钉放置在鼠股骨钻孔位置。注意未处理和光化种植体在血流动力学上的显著差异; 光化骨钉与血液接触后, 血液立即沿着螺纹流动, 而未处理螺钉未插入部分均无血液。

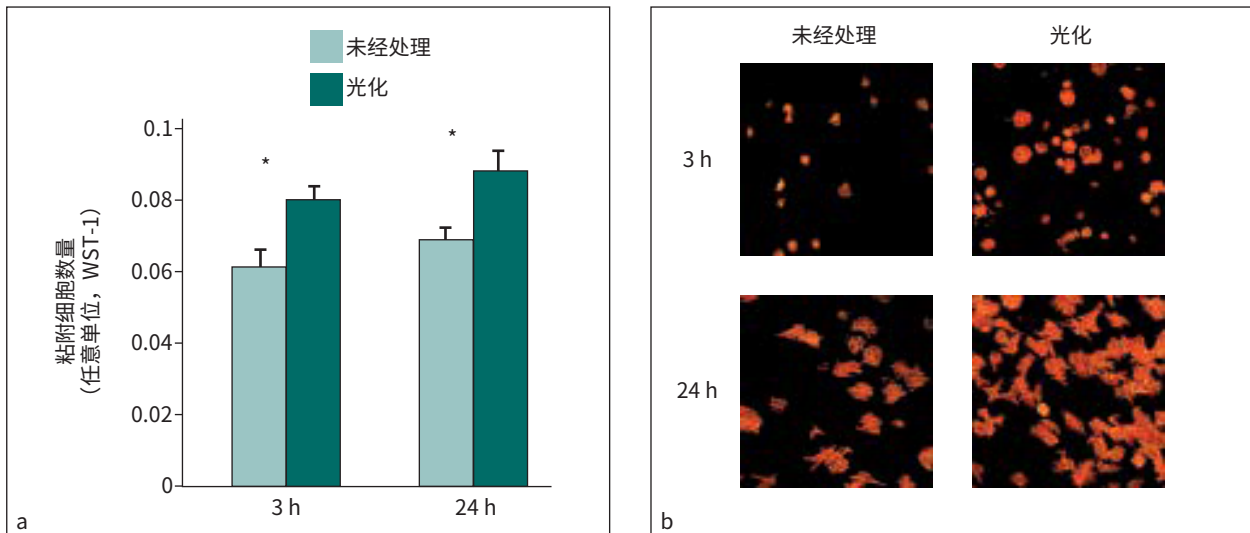


图4 Ti-6Al-4V表面（光化和未光化处理表面）粘附成骨细胞。（a）培养3小时和24小时后，用WST-1比色法测定的粘附细胞数。细胞数量以甲瓞量（任意单位）来评估，甲瓞量代表细胞代谢活动的总量，被认为与细胞数量有关。* $P < 0.05$ 。（b）未处理和光化处理后表面培养3小时和24小时后，成骨细胞的低放大倍数共聚焦显微镜图像，该图像证实了WST-1结果。

细胞数量（图6a）。光化处理表面的细胞数量多于未处理表面。掺入BrdU评估增殖数量，增值数量除以细胞数量等于增殖率。光化处理表面的增殖率略高，但差距并不显著（图6b）。光化处理表面的ALP阳性面积要大80%，这一点在化学ALP活性分析中得到了证实（图7a和7b）。光化处理表面成骨细胞培养物中的钙沉积量也显著增加（图7c）。

骨内微型骨钉的支抗强度

侧翻测试中未处理和光化处理微型骨钉典型负重-位移曲线见图8a。光化处理种植体的斜率始终小于未处理种植体，表明在相同负重情况下，光化处理后的骨钉移动较小，支抗更大。根据荷载-位移曲线绘制微型骨钉位移与负重的柱状图（图8b）。

负重对骨钉的位移有显著影响（双因素ANOVA， $P < 0.01$ ）；即，负重越大，位移越大。光化功能的影响也显著（双因素ANOVA， $P < 0.01$ ）；除了负重最大（40N）外，光化处理骨钉位移均较小，经Bonferroni事后对比表明，从5N加载负重到35N期间，未处理和光化处理螺钉存在显著差异。

未处理骨钉的位移是光化处理骨钉的1.5~1.7倍。例如，负重为30N时，未处理骨钉位移大约0.55mm，而光化处理骨钉仅移动0.35mm。

微型骨钉-组织界面形态和化学成分

从间隙（上皮层）、BM和皮质区（下皮质，从顶部至底部）拍摄的代表性的微型骨钉图像见图9a至9f。未处理微型骨钉周围经手术创建的间隙（图9a中点状虚线间的区域）还存在散乱分布的间隙，无骨组织填充（星型图案）。对比，光化处理微型骨钉的全部间隙几乎被骨头填充（图9d）。光化微型骨钉周围再生出完整且连续的骨组织（图9d中箭头表示），剩余间隙少。未经处理的微型骨钉BM区表面有生物组织（图9b），经高倍成像（图9b中红圈部分）确认有组织形成，或存在与裸露微型骨钉表面形态不同的残余组织（图9g）。该组织经EDX分析发现，Ca/Ti比值为1.76，Ca/P比值为0.34。大部分BM仍保持筛状结构，未形成新的组织（图9b中星号）相反，BM区光化处理微型骨钉表面几乎完全被新组织所覆盖。代表区域（图9e红圈部分）经



图6 培养第2天，未处理和光化处理Ti-6Al-4V表面成骨细胞密度（a）和增殖（b）。采用WST-1比色法评估细胞密度。 $*P<0.001$ ；n.s.=不显著。

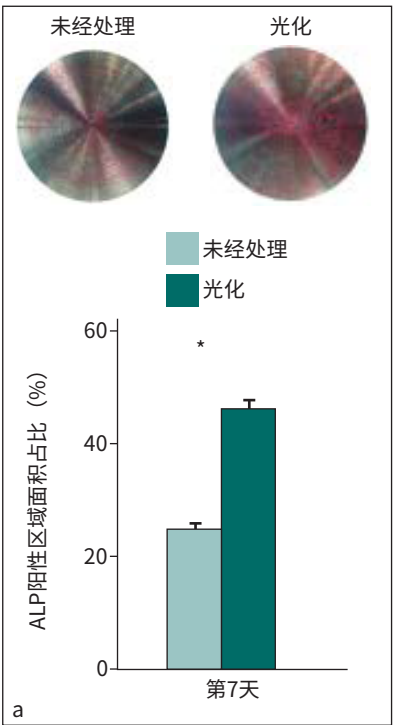
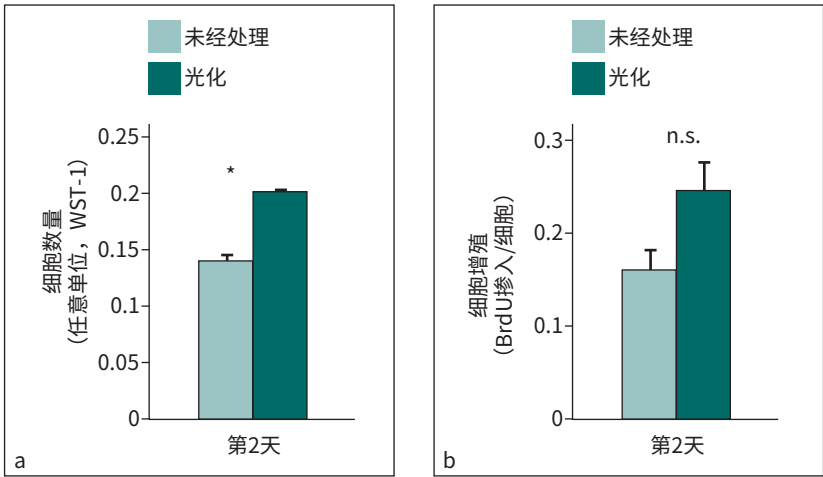
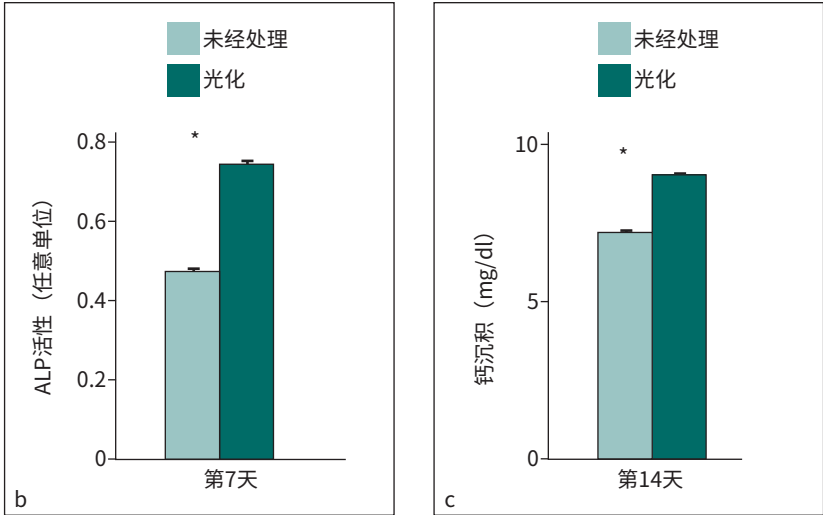


图7 培养第2天，未处理和光化处理Ti-6Al-4V表面成骨细胞密度（a）和增殖（b）。采用WST-1比色法评估细胞密度。 $*P<0.001$ ；n.s.=不显著。



EDX分析发现Ca/Ti比值为10.00，Ca/P比值为1.56（图9h）。从骨髓区生成的骨头和骨膜区生成的骨头疑似在光化处理骨钉附近会合（图9e和9f箭头所指），而该种形式的会合未在未处理微型骨钉附近发现，且皮质骨和BM区的分界线清晰可见（图9c星号）。

讨论

作者在此处首次表示，光化功能可增加Ti合金矫正微型骨钉的负重承受能力。一般在相同侧翻力的情况下，光化处理后骨钉的位移将减少30%至40%。负重后，抗侧翻力立即增强，效果明显。

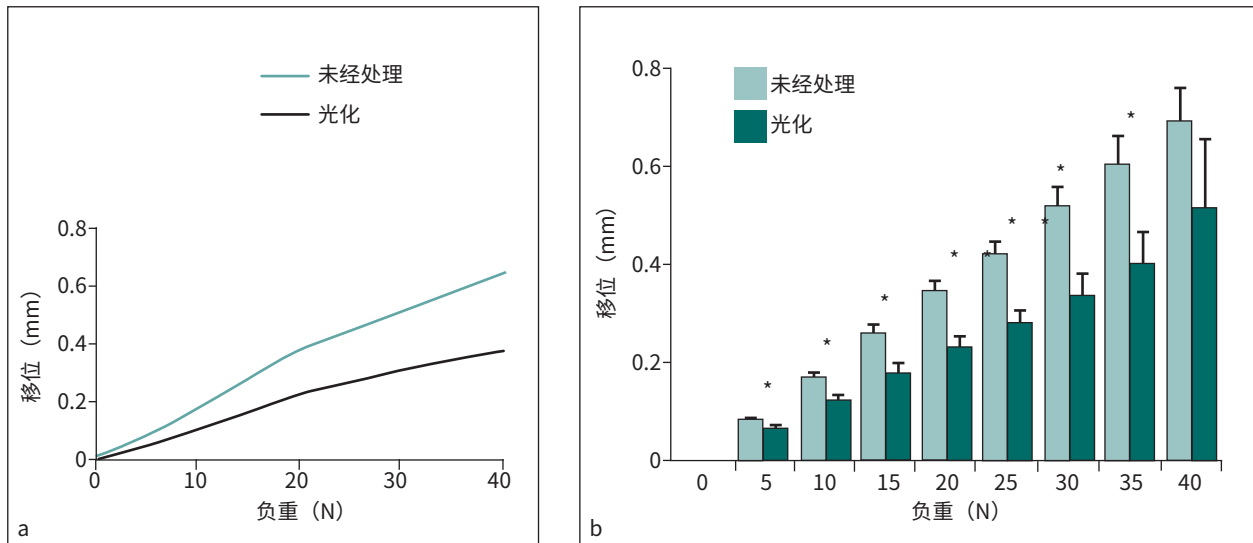


图8 未处理和光化处理矫正微型骨钉支抗强度。(a) 承受侧翻力时未处理和光化处理微型骨钉的代表负重-位移曲线。(b) 各负重作用下微型骨钉的水平位移量; * $P<0.05$; ** $P<0.01$

例如, 5N时, 未处理和光化处理骨钉的位移分别为0.085和0.060mm, 10N时则分别为0.170和0.120mm。这表明光化功能不仅在整个间隙区域, 更是在骨钉接触面或表面临近区域对骨头形成有显著影响。通过矫正支抗钉立即增强支撑结构的抗力可能比增加断裂强度更重要, 该结果具有临床意义。

微型骨钉周围观察到不同模式的骨形态发生, 可用于解释光化功能对支抗的好处。光化处理微型骨钉周围生成更多骨头, 速度更快。早先已进行种植体形态和元素分析, 可有效评估骨-种植体接触面的组织性质和行为⁸。需要谨慎解读该结果, 因为可能存在人为技术因素对该方法的影响, 包含但不限于组织损伤、变形和样本制备期间的分离。特别地, 由于样本是通过人工区分骨钉/组织复合体的方法制备而成, 因此很难确定骨钉表面组织代表残余组织的初始表面或受损表面。鉴于这些技术限制和测试定性性质, 未处理和光化处理骨钉在界面形态和化学成分间存在显著差异。检测SEM图像发现, 光化处理螺钉周围骨的数量、连续性和密度均增强。EDX光谱进一步表明, 光化处理骨钉周围骨头

有足够厚度和质量, 几乎可完全覆盖Ti表面。相比之下, 未处理骨钉周围骨头未覆盖Ti信号, 且Ca/P比值表明组织矿化差。这些结果表明, 未处理骨钉周围骨形成的体积和程度较低、容易脱落、质量较差, 或同时存在多种此类情况。

报告称, 表面形态相对光滑的经过加工的Ti表面至少应形成某种程度的纤维组织⁷, 这一点与当前结果一致, 即未处理骨钉周围界面组织的Ca信号很低或几乎没有。在微粗糙形态的酸蚀种植体中, 光化功能显著降低了种植体与骨之间的软组织干扰, 并增加BIC¹³。鉴于光化功能提高了矫正微型骨钉周围的骨头质量 (见SEM和EDX结果), 因此在各种加工表面的形貌特征情况下, 光化功能都可能增强其性能, 延长其寿命 (如承载设备)。

体内体外实验结果互补。体外研究表明, 光化功能有效提高Ti-6Al-4V的生物学能力。对于光化处理的Ti-6Al-4V上培养的成骨细胞, 其粘附、扩散、粘附蛋白和细胞骨架蛋白表达等初始行为均增强。这些初始行为对于决定成骨细胞功能表型表达的时间和数量非常重要, 实际可能提高如ALP活性和矿化等性能。体内光化处理微型骨钉周围骨生成活

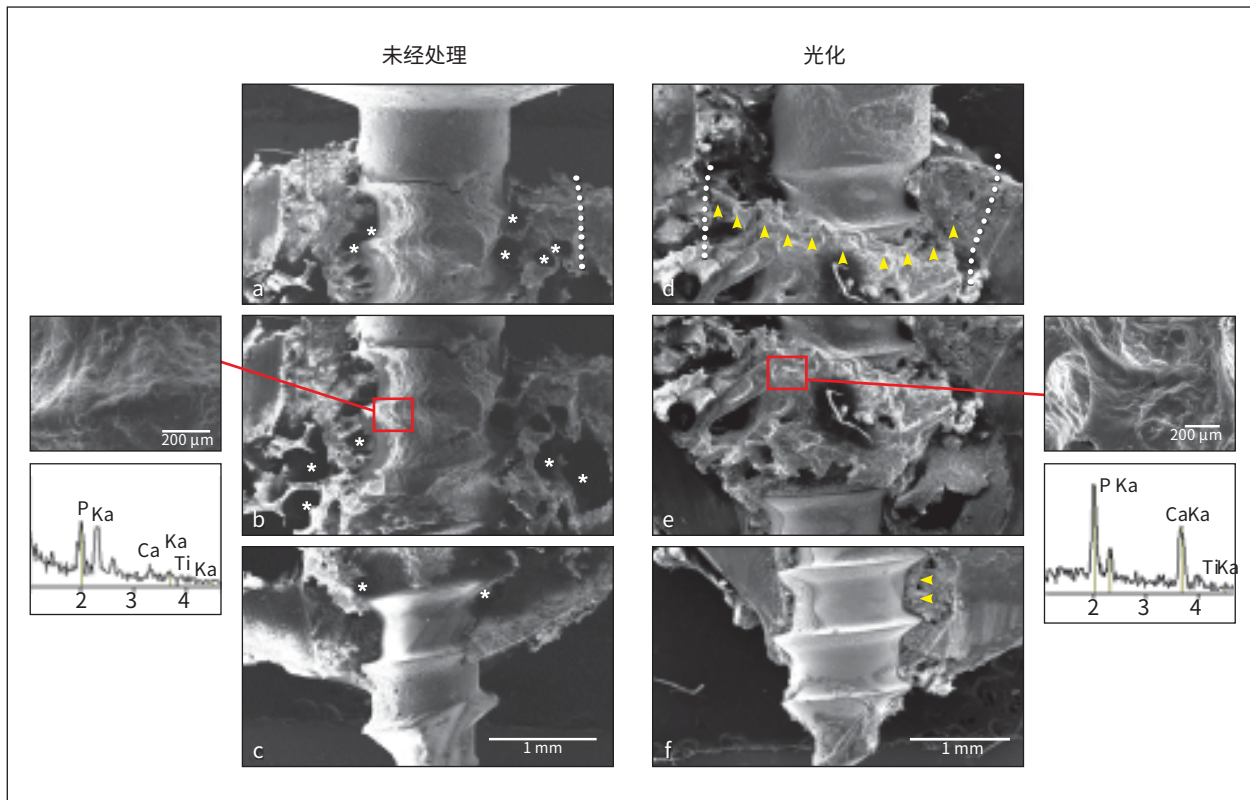


图9 愈合3周时取出的微型骨钉的SEM图像和EDX图像。比较未处理和光化处理微型骨钉（a至f）。还显示了骨钉表面残余生物组织的放大图像（g和h），以及从各区域获取的EDX光谱。从光谱计算得出的Ca/Ti和Ca/P比值也可见。

跃，可以假设是这些细胞行为功能引起的结果。

本研究是在动物模型中进行的，该模型代表了相对具有挑战性的宿主骨微环境。实际情况下，用作矫正支抗钉的骨头的数量和质量可能有变化。与种植牙不同，矫正微型骨钉不用于水下环境（龈下和空载）；无论何时负重，先实现初期稳定性是成功的先决条件。为模拟初期稳定性需求和后续骨生成、重建所需的具有挑战性的局部环境，当前研究根据Choi等人的方法，采用了单皮质支持模型，并在微型骨钉颈区附近创建了间隙²⁷。从微型骨钉尖端（与皮质骨结合）获取的初期稳定性足以在安置期间保持骨钉稳定。事实上，骨钉安置正确，如SEM图像所示，未处理和光化处理种植体均形成不同程度的骨头。尽管此处使用的一次性断裂模型表面光化功能有效果，但建议比较未处理和光化处理骨钉

之间对即刻和延时持续负重的机械抗力。作者认为未来研究的结果为改进负重方案、增加矫正治疗方案，或开发新技术（探索微型骨钉支抗加速和增强的好处）提供了机会。

最后，光化功能除了可以提高骨-钛结合，人们还知道可用于克服Ti生物老化^{12,14}。Ti生物老化是一种新发现的现象，当Ti与大气接触时，Ti的骨传导性会随着时间的降低^{23,29}。尽管Ti表面经处理后立即具有超亲水性，但随着时间的推移，它们会失去亲水性并聚集碳氢化合物²³，导致生物活性和骨传导性较安装时降低²³。因此，骨传导退化与表面性质随时间发生的变化紧密相关。光化功能可重塑这些表面性质^{11,12,14}；更重要的是，它将骨传导性提高到与新制备的Ti相当、甚至更高的水平^{15,25}。作者在此处表示，光化功能能有效恢复Ti-6Al-4V合金（包括

在自体牙内)的亲水性,提高其生物性能,成为第一个被证实可克服矫正微型骨钉生物老化的措施。如前所述,矫正微型骨钉不需要骨结合,最终必须被移出。光化功能通过促进骨钉周围骨头生成以提供更多的抗侧力,但不增加骨钉表面和骨之间因表面形态变化而引起的机械连锁。尽管还需要进一步研究确定临床的可行性和有效性,当前研究结果采用光化功能促进矫正治疗提供了新的方案、理由和概念证明。

结论

本研究探讨UV处理(或光化功能)对矫正微型骨钉支抗能力的影响。使用前,立即采用UV光对骨钉内Ti-6Al-4V合金片进行光化12分钟。Ti-6Al-4V表面经光化后,由疏水性变成了超亲水性。体内生物力学实验表明,微型骨钉经光化处理后,在相同侧翻力情况下,位移减少30%至40%。支抗增强与依附、初始扩散行为、粘附增强以及光化处理Ti-6Al-4V圆盘上培养的成骨细胞的功能表型表达有关。这些结果综合一致地表明,光化功能提高了Ti-6Al-4V的生物活性,增强了矫正骨钉的支抗能力。考虑到光化功能不会改变骨钉的表面形态,这些数据提供了一种新的方案,在不依赖骨钉表面-骨头机械连锁的情况下,有效和方便地改进矫正支抗钉。该技术在临床口腔正畸学的应用还需要进一步研究。

致谢

该工作得到了日本东京Ushio的部分支持。作者未指出任何与本研究相关的利益冲突。

参考文献

1. Leung MT, Lee TC, Rabie AB, Wong RW.微型骨钉和微型骨板在畸齿矫正学中的应用.口腔与上颌面植入国际杂志, 2008, 66:1461-1466
2. Crismani AG, Bertl MH, Celar AG, Bantleon HP, Burstone CJ.微型骨钉在矫正治疗中的应用: 查阅和分析已发表临床试验.美国正牙学与牙面矫形学杂志, 2010, 137: 108-113.
3. Lim HJ, Eun CS, Cho JH, Lee KH, Hwang HS.矫正治疗中微型骨钉初始稳定性的相关因素.美国正牙学与牙面矫形学杂志, 2009, 136:236-242.
4. Tsui WK, Chua HD, Cheung LK.矫正应用中的骨头支抗系统: 系统评价口腔与上颌面植入国际杂志, 2012, 41:1427-1438.
5. Schatzle M, Mannchen R, Zwahlen M, Lang NP.矫正临时支抗装置的成功和失败率: 系统评价临床口腔种植研究, 2009, 20:1351-1359
6. Chen YJ, Chang HH, Lin HY, Lai EH, Hung HC, Yao CC.矫正支抗中微型骨钉和微型骨板的稳定性: 492套临时支抗装置的使用体会.临床口腔种植研究, 2008, 19:1188-1196.
7. Ogawa T, Nishimura I. 与细胞外基质基因表达调控相关的旋转种植体和酸蚀种植体的不同骨结合概述.口腔与上颌面植入国际杂志2003;18:200-210.
8. Ogawa T, Ozawa S, Shih JH,等. 大鼠体内不同表面形貌骨植入体的生物力学评估.牙科研究杂志, 2000, 79:1857-1863.
9. Chang CS, Lee TM, Chang CH, Liu JK.表面微粗糙处理对矫正支抗钉用微型骨钉的影响.临床口腔种植研究, 2009, 20:1178-1184
10. Morarend C, Qian F, Marshall SD, 等.骨钉直径在矫正骨骼支抗中影响美国正牙学与牙面矫形学杂志, 2009, 136:224-229.
11. Ogawa T. 钛种植体紫外线光化功能.口腔与上颌面植入国际杂志, 2014, 29:e95-102.
12. Att W, Ogawa T. 种植体表面生物老化及其紫外线治疗修复: 骨结合的全新理解.口腔与上颌面植入国际杂志2012;27:753-761.
13. Aita H, Hori N, Takeuchi M等. 钛紫外光化对骨结合的影响.生物材料 2009;30:1015-1025.
14. Lee JH, Ogawa T.钛种植体的生物老化.种植牙医学2012; 21: 415-421.
15. Suzuki T, Hori N, Att W等. 紫外线处理抑制钛的生物活性随时间降低.组织工程A部分, 2009, 15:3679-3688
16. Hori N, Ueno T, Minamikawa H等. 蛋白质吸附对UV光化钛的静电控制.生物材料学报2010; 6: 4175-4180.
17. Iwasa F, Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Yamada M, Ogawa T. 通过静电机制提高成骨细胞对UV光化钛的附着力.生物材料, 2010, 31:2717-2727.
18. Funato A, Ogawa T. 光化种植牙: 一组骨缺损病例系列研究.口腔与上颌面植入国际杂志, 2013, 28:1589-1601.
19. Funato A, Yamada M, Ogawa T. 光化种植牙的成功率、愈合时间和稳定性.口腔与上颌面植入国际杂志 2013;28:1261-1271.
20. Suzuki S, Kobayashi H, Ogawa T. 光化种植体植入后的植入稳定性变化和骨结合速度.种植牙医学 2013;22:481-490.
21. Pyo SW, Park YB, Moon HS, Lee JH, Ogawa T.光化功能提高骨-种植体结合率、界面骨生成活力、边缘骨密封和种植体移除扭力值: 犬下颚骨研究.种植牙医学, 2013, 22:666-675.
22. Ohyama T, Uchida T, Shibuya N, Nakabayashi S, Ishigami T, Ogawa T. 通过光化功能实现高骨-种植体结合率减少种植体周围压力: 三维有限元分析.种植牙医学2013; 22: 102-108.
23. Att W, Hori N, Takeuchi M等. 钛骨传导性随时间降低: 植入材料生物老化的启示.生物材料2009; 30: 5352-5363.
24. Att W, Hori N, Iwasa F, Yamada M, Ueno T, Ogawa T. 紫外光化功能对钛和铬合金的时间相关生物活性的影响.生物材料 2009; 30:4268-4276.
25. Hori N, Ueno T, Suzuki T, 等. 紫外线处理恢复钛生物活性.口腔与上颌面植入国际杂志, 2010, 25:49-62.
26. Saruwatari L, Aita H, Butz F, 等. 与聚苯乙烯相比, 钛上成骨细胞生成的矿化组织更硬、更抗分层, 且具有独特微结构和超微结构.骨骼和矿物质研究杂志, 2005, 20:2002-2016.
27. Choi JY, Lee HJ, Jang JU, Yeo IS.在兔胫骨模型中, 比较早期骨

- 反应中生物活性氟化物改性种植体表面和生物惰性阳极氧化种植体表面.种植牙医学, 2012, 21:124-128.
28. Ozawa S, Ogawa T, Iida K, 等.卵巢切除术影响早期骨-种植体结合: 组织形态学、生物力学和分子分析.骨杂志, 2002, 30:137-143.
29. Hori N, Att W, Ueno T等人. 与年龄相关的钛蛋白质吸附能力的降低.牙科研究杂志 2009;88:663-667.

临床论著

04

钛种植体紫外线光化功能

Takahiro Ogawa博士(牙科博士)¹

面对对种植治疗日益增长的需求和随之而来的挑战，需要具有更好生物功能的种植体表面。本文综述了近年来有关钛紫外线（UV）光化功能体外研究的进展。UV光化功能是指经过UV处理后钛表面发生改变的一种整体现象，其中包括物化特性改变和生物性能增强。在动物模型中，与未经处理的对照种植体相比，经UV处理的钛种植体周围的骨形态发生明显改善，骨头快速彻底结合，骨-种植体结合率几乎达到100%，而未处理的种植体中低于55%。一系列体外研究表明，从动物和人体中提取的骨原细胞经UV处理后，粘附力、保留率、和后续功能级联大大增强。UV处理改变了钛表面性质（疏水至超亲水），不可避免地移除了受污染的碳氢化合物。经过uv处理的钛表面也表现出独特的静电状态，在不借助离子和有机桥梁的情况下，直接充当细胞引诱剂，由此一直视作生物惰性材料的钛便具有了一种新的物理化学功能。UV处理简单，成本低，已被证明对所有测试钛表面有效。这些数据表明，UV光化功能是一种新型有效的措施，可以提高种植体治疗在牙科和骨科的应用。未来的研究将注重在临床研究中验证这些成果。《口腔与上颌面植入国际杂志》，2014，29:e95-e102. doi: 10.11607/jomi.te47

关键词：生物活性，生物老化，骨-钛结合，碳氢化合物，骨结合、超亲水性，紫外线处理

¹美国加州大学洛杉矶分校牙科学院 生物材料和医院牙科系 高级口腔修复学部 简和杰里•温特劳布重建生物技术中心 骨与植入科学实验室教授兼主任。

通讯信息：

Takahiro Ogawa博士，

UCLA School of Dentistry, 10833 Le Conte Avenue (B3-081 CHS), Box 951668, Los Angeles, CA 90095-1668, USA. 传真：+310-825-6345.

电子邮箱：togawa@dentistry.ucla.edu

通过种植牙修复缺失的牙齿对口腔健康有很大的影响；与传统可摘义齿相比，咀嚼功能^{1,2}、说话³和生活质量⁴均有提高。然而，尽管现代种植体治疗和科技突飞猛进，但由于存在多种风险因素，种植体应用仍受到限制，其中包括寄主骨质⁵、量不足，全身状况和^{6,7}年龄^{8,9}。种植体与骨结合愈合时间延长（3至8个月），也限制了应用。在美国，10%的成年人和三分之一的65岁以上的成年人完全没有牙齿^{10,11}。尽管老龄化社会的需求越来越大，只有2%到5%的潜在患者采用了种植牙治疗¹²。

矫正治疗存在的挑战不容忽视，原因在于在探索提高种植体生物性能时，牙科种植体和骨科种植体之间联系密切，互有帮助。骨质疏松性骨折和关节退行性改变比较常见。在美国，仅骨质疏松性骨折的年支出就估计达138亿美元¹³，每年进行50多万例髋关节和膝关节重建手术。尽管钛种植体在此类

©2014, Quintessence Publishing Co Inc.

e95 《口腔与上颌面植入国际杂志》

©2014, QUINTESSENCE PUBLISHING CO, INC. 本文件仅限个人使用。未经出版者书面许可，不得以任何形式复制、传播任何内容。

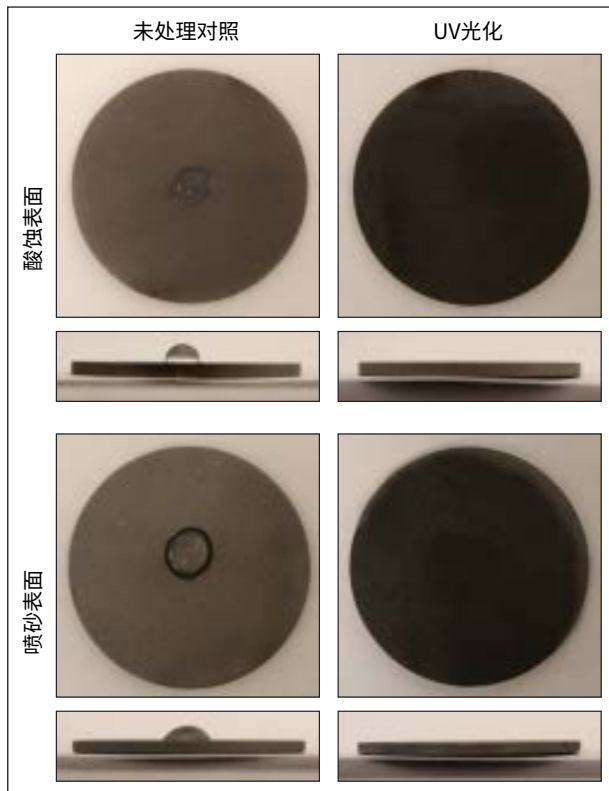


图1 经UV处理后钛表面从疏水至亲水的转化。UV处理前后，酸蚀喷砂钛片上10 μ L水珠的顶部和侧面图像。

手术中可用作骨内支抗钉，但种植牙的治疗和生物需求存在差异。该类区域发生的骨折通常不允许对种植体进行术后骨钉（如夹板固定），且由于引力和日常活动（行走），种植体安装后便立即持续承受荷载。此类患者的宿主骨的代谢潜能早已收到损害，这一点在骨质疏松和老年患者身上得以体现。与可摘义齿方案不同，种植体失效后大部分骨科患者可选择的治疗备选方案有限，且骨科种植体治疗后的并发症可能包括残疾¹⁴和长期依赖性¹⁵。因此，快速稳健地实现骨结合一直是一个挑战¹⁶⁻¹⁸。

种植体支抗成功取决于钛表面（无软/结缔组织干预）直接沉积的骨量。当前的牙科和骨科钛种植体开发以该理念为基础，因此叫做“骨结合种植体”。然而，被骨覆盖的种植体总面积依然为45% $\pm$ 16%¹⁹或50%至75%²⁰⁻²²——远低于理想情况下的100%BIC。大多数种植体失效的原因是骨-种植体结合面结合不全，或发生早期或晚期变化²³⁻²⁵。一

个关键的问题是，种植体全部周围缺乏骨组织形成的原因未知。

近期有报告称UV介导光化功能可用于钛表面改性，以提高生物性能；它具有疗效显著、机制独特和实施简单的特点^{26,27}。在动物模型中²⁶，经UV处理后种植体愈合初期的体内骨结合生物力学强度比未处理种植体大三倍，BIC几乎为100%，相比之下未经处理种植体低于55%²⁶。经证明，UV处理在测试期间对所有表面形态均有效果^{26,28-32}。该技术不改变现有表面形貌、粗糙度或其他种植体的形态特征，因此使用该方法后，表面形态不会改变。本文综述了近年来有关钛种植体UV光化功能的体内外研究成果。

UV光化功能定义

UV光化功能是指经过UV处理后钛表面发生改变的一种整体现象，其中包括物化特性改变和生物性能增强^{26,27,31,33-35}。

老化后的钛表面具有疏水性（即表面处理后1个月以上）；即水的接触角大于60度，大部分表面都接近甚至超过90度。如图1和早先广泛报道所示，钛的所有表面形态都具有疏水性^{28,29,31,35-37}。水滴在这些表面上不会扩散，且以半球形的方式停驻。非常有趣的是，经UV处理后，这些表面对水具有明显的可湿性，接触角为0度，称为超亲水性（图1）。在密度为0.1mW/cm²（ $\lambda=360\pm20$ nm）和2mW/cm²（ $\lambda=250\pm20$ nm）的情况下经UV处理48小时后，获取具有超亲水性表面，如图1所示。

另一个显著的变化是表面的化学成分。与大气接触后钛表面实际上变成了二氧化钛。在表面处理和储存期间，大气和周围环境中的羰基（尤其是碳氢化合物）不可避免地在钛表面上持续聚集，形成一层含碳微粒^{26,28,37-40}。目前使用的钛种植体也受到碳氢化合物的污染⁴¹⁻⁴⁶。据了解，表面碳的含量会随着表面的年龄而变化，报道称可上升到占表面原子成分约60%到75%⁴⁵。UV处理可以清理这些被碳污染的钛表面，将碳含量降低到20%以下^{26,28}。

UV光化功能体内作用

在体内将种植体与骨固定是一个重要变量，反映出种植体承重的临床能力。鼠模型中的生物力学

图2 UV处理后种植体周围骨生成增加的证据。这些组织学图像显示了鼠股骨模型中，种植2周后经UV处理和未经处理种植体周围的组织（戈德纳三色染色）。

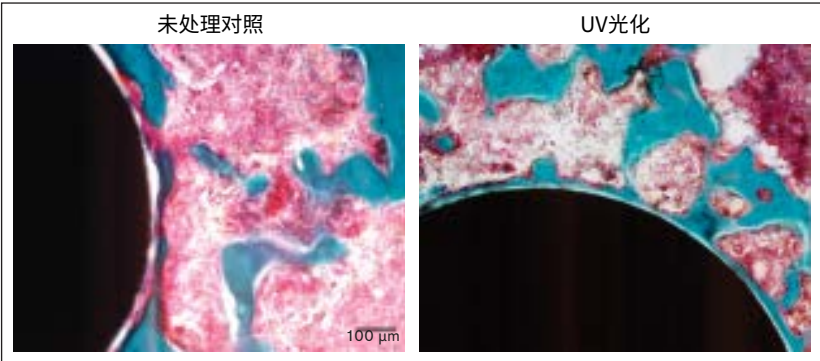
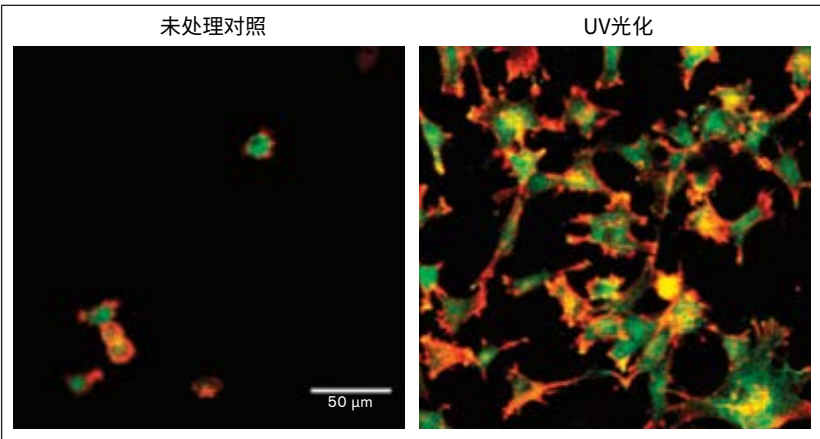


图3 UV光化处理后成骨细胞粘附和扩散增强证据。经UV处理和未经处理酸蚀钛片上培养3小时时，骨髓源成骨细胞的共聚焦激光显微图像如图所示。细胞经罗丹明鬼笔环肽和粘着斑蛋白抗体染色，以确定细胞骨架肌动蛋白丝（红色）和粘着斑蛋白（一种局部粘附蛋白，绿色）。



测试帮助制定了大量文件。UV处理和酸蚀钛种植体与未经处理的对照种植体相比，愈合初期（2周）的骨结合强度要大3倍²⁶。UV处理后种植体愈合2周时的骨结合水平等同于未经处理种植体中愈合8周时的水平，表明UV处理可能将骨结合速度提升至4倍²⁶。此外，UV还能提高喷砂种植体的骨结合强度（2.5倍）^{28,29}。

如图2所示，UV处理后种植体的骨形态有明显差别。UV处理后的种植体周围广泛形成新骨，几乎无软组织干预，而未处理的种植体周围的骨组织是散乱分布，仅某些区域存在²⁶。鼠模型中愈合初期（2周），UV处理后种植体的BIC达72%，比未经处理的种植体高2.5倍。第4周时，UV处理后种植体的BIC为98.2%，而未经处理种植体仅为53%。仅UV处理后，愈合初期和末期种植体周围骨量也提高约2倍²⁶。值得注意的是，愈合末期UV光化功能作用依

然持续存在，这一点与其他表面改性技术不同，表面UV光化功能不仅能加速骨结合，更能提高结合水平。UV处理表面新骨和种植体表面的软组织干预低于1%，相比之下，未经处理种植体则为21%²⁶。

UV光化功能对骨结合的作用已在具有挑战性的宿主环境中进行研究，以模拟临床环境。其中一项研究旨在确定UV处理是否可以充分加快骨结合过程，克服短种植体的局限性⁴⁷。短种植体创伤小，手术风险小，术后出现并发症的可能性也降低。且短种植体还可以避免种植前种植位点进行其他手术，如窦提升和骨增量手术，由此降低治疗费用。制备了2mm（常规）和1.2mm（短型）长的酸蚀钛种植体用于动物模型⁴⁷。愈合4周和8周时，常规种植体的骨结合强度分别大80%和100%，由此表明短种植体的支抗能力下降。然而，UV处理后短种植体在愈合期间内的骨结合强度显著提升。愈合2周时，经

UV处理短种植体的骨结合强度要比未经处理常规长度种植体大100%。在愈合后期（第4周和第8周），UV处理短种植体的骨结合强度等于未经处理常规长度的种植体。由上文可得，UV光化功能显著提高BIC和骨量可能从理论上解释了如何克服短种植体的缺点。这些结果表明，UV光化功能克服了动物模型中40%短种植体的不足，值得进一步的临床研究。

在间隙愈合模型中测试了另一个骨结合的非理想情形⁴⁸。在现代种植牙科中，在无骨支持的情况下实现种植体愈合是一个挑战，这一点在新鲜的拔牙窝中种植体发生的位移和同期引导骨生成的情形中得到了体现。将UV处理与未处理钛种植体置于鼠股骨中，且分别于自身皮质骨接触（接触愈合）和不接触（间隙愈合）⁴⁸。间隙愈合模型的骨结合强度为接触愈合模型的三分之一。然而，UV处理的种植体置于间隙愈合模型，其骨结合强度等于接触愈合模型中的未处理种植体。微计算机断层扫描分析显示，在间隙愈合模型中，经UV处理后的种植体周围的骨量比未经处理的种植体周围大两到三倍⁴⁸。经UV处理和未经处理的种植体周围的骨生成活性差别明显。UV光化处理后种植体周围的骨生成具有连续的特点，即新骨在种植体接触面开始形成，大部分新生骨组织则位于种植体表面临近区域，而未处理种植体周围的骨生成距离较远，骨生成发生于种植体表面外部，造成接触面无骨生成。

UV光化功能体内作用

应将体外和体内研究结果相互联系，以阐明隐藏的生物过程和机制。文献中表明的UV处理对钛表面的体外作用包括（1）蛋白质吸收增加，（2）骨原细胞粘附增强，（3）细胞停留多，（4）细胞扩散增强，（5）细胞增殖强，（6）成骨分化增强。

生物材料和细胞间的关系最初取决于细胞和材料表面吸收的蛋白质之间的相互作用。钛种植体表面吸收蛋白质并非例外；对细胞粘附和后续扩散、增殖和其他细胞作用起着非常重要的作用。在一系列研究中对不同表面形貌（加工、喷砂、酸蚀和纳米特性）进行了测试，以确定UV处理后是否有提高。UV处理后钛表面在培养6小时期间吸收的白蛋白和纤维蛋白量比未处理表面多80%至300%^{35,36}。UV处理和未处理表面蛋白质吸收能力之间的显著差异即使在24小时后也未有减弱^{26,33,35}，表明UV效果可能超过细胞-钛相互作用初期。

对未处理和UV处理钛表面培养基中的骨原/成骨细胞的行为和反应进行了对比。已研究不同种表面形貌，包括但不限于酸蚀、喷砂、加工和纳米特性表面。培养一定时间后，UV处理表面粘附的成骨细胞数量大幅超过未处理表面（培养3小时和24小时后，分别为3至5倍和2至3倍）^{26,27,32}。培养基典型示例见图3，图中可见UV处理表面粘附和扩散的细胞数量明显更多。

种植体表面骨原细胞沉降的程度和性质。例如，细胞粘附或扩散不成功（造成细胞悬浮和呈圆形），几乎不会诱导成骨表型，或甚至不会诱导其分化^{49,50}。进一步来说，考虑到种植体材料会受到功能负重，引起结合面出现机械应力、物理运动和摩擦，骨原细胞的初始沉降和停留便十分重要⁵¹⁻⁵³。钛表面上培养3小时和24小时后骨原细胞通过振动力进行机械分离，或通过胰蛋白酶处理进行酶促分离。27分离程序结束后，UV处理后钛表面通过剩余细胞百分数评估得到的细胞停留数明显大于未处理表面（培养3小时，超过110%至120%，培养24小时，超过50%至60%）。UV处理表面细胞停留数增加可能是由于细胞加速沉降和粘附力增大²⁷。培养初期，UV处理表面成骨细胞更大，伴细长细胞质突起（丝状伪足和板状伪足）和细胞骨架形成增加^{27,36}。图中还可看出粘着斑蛋白（局部粘附蛋白）表达更高，表面UV处理表面细胞沉降更快更稳固²⁷。这些独特的细胞行为示例可见图3。UV处理表面细胞独特的行为可能带来其他加快和有效诱发种植体周围骨生成的生物特点，尤其是在即刻负重和初期负重的情况下。

骨原细胞的增殖和分化分别决定了骨生成的数量和速度。UV处理表面²⁶增殖速率（按细胞数量标准化）提高20%至50%，这一结论对UV处理表面细胞培养后期数量增长、初期细胞粘附增大的发现提供了支持²⁶。通过多种分析检测成骨分化率。UV处理表面培养的细胞中，其生物标志物水平（如碱性磷酸酶活性和钙离子沉积）和成骨基因表达持续大于未处理表面^{26,28,32,35,54}。这些体外效果通过从动物和人体中提取的成骨细胞、骨膜源骨原细胞得到了确认^{29,35,36,48}。

UV光化功能机理

表面发现的理化因子与生物能力之间最显著的联系是碳污染物的作用^{26,37}。还发现了钛表面碳元素

图4 二氧化钛表面UV光化功能中静电相互作用建议机理图解说明：UV介导，钛表面从生物惰性转换为生物活性。

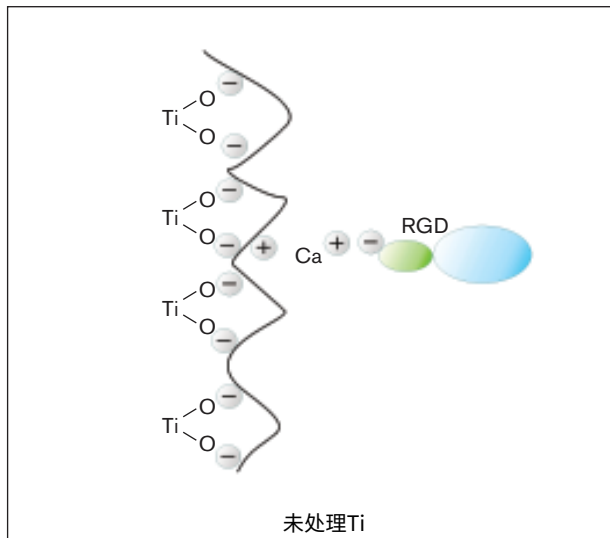


图4a 未处理二氧化钛 (TiO₂) 表面与离子、蛋白质 (绿色) 和细胞 (蓝色) 的静电相互作用。已知普通的TiO₂表面带负电。蛋白质和细胞也带负电。因此，表面仅在二价阳离子 (如Ca²⁺) 的帮助下吸引蛋白质，通过RGD (即精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)-整合素相互作用吸引细胞。迁移和粘附成骨细胞的生物化学方案仅有一种。

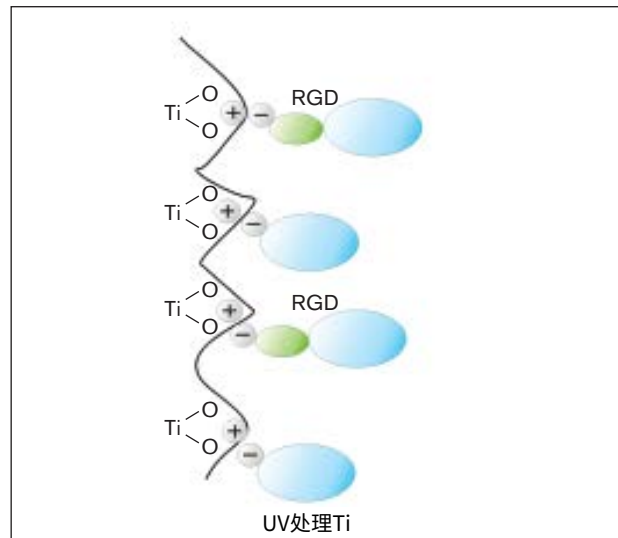


图4b 直接与UV处理后的TiO₂表面 (有细胞, 蓝色) 产生静电作用。UV处理后的钛表面充满了由蛋白质 (绿色) RGD序列组成的细胞吸引端粒, 或该表面为带正电荷的TiO₂表面, 在没有二价阳离子 (Ca²⁺) 的情况下直接用作细胞化学吸引因子。带负电荷的蛋白质直接被吸引到带正电荷的TiO₂表面。带负电荷的细胞也直接被吸引到带正电荷的TiO₂表面。

量和成骨细胞吸附力之间的逆相关关系。通过X射线光电子能谱对酸蚀钛表面进行化学分析。UV处理前, 钛表面因烃污染物形成大量的原子碳。随着钛的老化, 碳的原子百分数升高至55%以上^{26,37}。UV处理后, 碳百分数降低至20%以下, 随处理时间而定²⁶。通过最小均方近似发现, 成骨细胞粘附率随着UV介导逐步除碳呈指数上升²⁶, 表明表面碳对骨结合能力有显著的抑制效果。

有趣的是, 水的接触角与成骨细胞粘附率无关, 尽管高亲水性似乎对细胞粘附率有积极效果^{26,35}。生物材料表面亲水性对生物活性的决定作用还有待争议。表面越亲水, 材料的生物相容性就越好不是一个普遍法则。例如, 在特定条件下, 亲水钛表面粘附的细胞就比疏水钛表面少⁵⁵。亲水性提高后, 聚乙烯 (聚甲基丙烯酸十二酯) 促进NIH3T3纤维原细胞粘附和增殖⁵⁶, 而亲水性提高后的聚羟基脂肪酸则降低了增殖性⁵⁷。涂有磷酸钙的生物膜亲水性提高, 有助于增强成骨细胞增殖性⁵⁸。相比之下, 聚合物支架材料疏水性越高, 越能促进骨生成⁵⁹。

尽管疏水性到亲水性的变化时UV光化期间的伴随现象, 但尚无充分证据表明亲水性程度和骨结合能力之间存在因果关系。

钛具有良好的抗腐蚀性能, 因此一直被用作生物惰性可种植材料^{60,61}。钛表面、生物分子和细胞具有生物惰性性质, 似乎三者之间并无直接的相互作用。事实上, 人们普遍认为, 钛表面需要离子桥 (特别是二价阳离子) 才能吸引必要的蛋白质和细胞⁶⁰⁻⁶², 如图4所示。然而, 如前文所述, UV处理后的钛表面会主动吸引骨结合必要的蛋白质和细胞。不仅如此, 最近的研究发现UV处理的钛表面可以直接用作细胞引诱剂, 因为它们改善了静电状态, 不再需要离子桥^{27,31,33}。未经UV处理钛表面和处理后钛表面的静电差异见图4。这些已知的事实和新发现说服作者将UV处理的钛表面重新定义为一个生物活性表面, 以区别已知的生物惰性钛表面^{31-34,37}。随着骨结合水平显著提高 (几乎100%) ——UV处理后生物活性钛表面周围新诱发的生物现象可定义为超骨结合^{31,33,34,54}。

结论和展望观点理

在动物模型中研究发现，UV处理的钛种植体周围诱发的骨形态发生显著提高，使得骨结合快速且完善，BIC几乎达到100%。一系列的体外研究表明，从动物和人体提取的骨原细胞的吸引力和后续的功能级联显著提高。UV处理简单，成本低，已被证明对所有测试钛表面有效。

这些数据表明，UV光化功能是一种新型有效的措施，可以完善当前种植体治疗，并满足牙科和骨科中不断增长的需求。未来的研究将注重在临床分析中验证当前和未来的研究成果。

参考文献

- Geertman ME, Boerrigter EM, Van't Hof MA, 等.种植体保留的下颌覆盖义齿与义齿完整咀嚼能力的双中心临床研究.社区牙科和口腔流行病学杂志, 1996, 24:79-84.
- van Kampen FM, van der Bilt A, Cune MS, Fontijn-Tekamp FA, Bosman F.种植体支持式覆盖义齿的咀嚼功能.牙科研究杂志, 2004, 83:708-711.
- Heydecke G, McFarland DH, Feine JS, Lund JP.上颌骨种植修复体后的说话功能: 清晰发音概率.牙科研究杂志, 2004, 83:236-240.
- Melas F, Marcenies W, Wright PS.口腔健康对种植体固位覆盖义齿患者和传统全口义齿患者日常生活的影响.口腔与上颌面植入国际杂志, 2001, 16:700-712.
- van Steenberghe D, Jacobs R, Desnyder M, Maffei G, Quirynen M.植入至基台阶段局部和内生性患者相关因素对植入失败的相对影响.临床口腔种植研究, 2002, 13:617-622.
- Ozawa S, Ogawa T, Iida K, 等.卵巢切除术影响早期骨-种植体结合: 组织形态学、生物力学和分子研究.骨杂志, 2002, 30:137-143.
- Nevens ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP.实验性糖尿病骨内种植体周围创面愈合.口腔与上颌面植入国际杂志, 1998,13: 620-629.
- Zhang H, Lewis CG, Aronow MS, Gronowicz GA.患者年龄对人体成骨细胞对体内Ti-6Al-4V种植体反应的影响.骨科研究杂志, 2004, 22:30-38.
- Takeshita F, Murai K, Ayukawa Y, Suetsugu T.通过光学显微镜、SEM和图形处理, 分析老化对插入雌鼠胫骨中钛种植体的影响.生物医学材料研究杂志, 1997, 34:1-8.
- Nowjack-Raymer RE, Sheiham A.美国成人中缺齿、饮食和营养的关系.牙科研究杂志, 2003, 82: 123-126.
- Doundoulakis JH, Eckert SE, Lindquist CC, Jeffcoat MK.种植体支持的覆盖义齿代替下颌全口义齿.美国牙科协会杂志, 2003, 134: 1455-1458.
- 年度工业报告.美国种植牙市场.执行摘要.种植牙医学, 2003, 12:108-111.
- Ray NF, Chan JK, Thamer M, Melton LJ III.1995年美国骨质疏松性骨折治疗用医药费用: 美国国家骨质疏松症基金会的报告.骨骼和矿物质研究杂志, 1997, 12:24-35.
- Campion EW, Jette AM, Cleary PD, Harris BA.髓骨折: 住院过程、并发症和费用的回顾性研究.普通内科学杂志, 1987, 2:78-82.
- Guccione AA, Fagerson TL, Anderson JJ.髓关节骨折后急性照护期间恢复功能独立性.物理治疗杂志, 1996, 76:818-826.
- LeGeros RZ, Craig RG.影响骨重建的方案: 骨结合.骨骼和矿物质研究杂志, 1993, 8 (补刊2): S583-S596.
- Puleo DA, Nanci A.理解和控制骨头-种植体结合面.生物材料, 1999, 20:2311-2321.
- Pilliar RM.非骨水泥型种植体固定——提高可靠性.北美矫形科临床, 2005, 36:113-119.
- Weinlaender M, Kenney EB, Lekovic V, Beumer J III, Moy PK, Lewis S. 三种骨内种植牙周围骨沉积的骨组织形态计量学.口腔与上颌面植入国际杂志1992;7:491-496.
- Berglundh T, Abrahamsson I, Albohy JP, Lindhe J. 具氟化物改性表面的种植体的骨愈合: 一项犬类实验性研究.临床口腔种植研究 2007;18:147-152.
- Ogawa T, Nishimura I. 与细胞外基质基因表达调控相关的旋转种植体和酸蚀种植体的不同骨结合概述.口腔与上颌面植入国际杂志, 2003, 18:200-210.
- De Maezta MA, Braceris I, Alava JI, Gay-Escoda C. CO离子修饰后钛种植体表面的骨结合改善: 比格尔犬的比较组织形态学研究.口腔与上颌面植入国际杂志, 2008, 37:441-447.
- Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL.种植牙植入失败率及相关风险因素.口腔与上颌面植入国际杂志2005;20:569-577.
- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. 四种骨结合口腔种植系统的失效模式.材料科学杂志: 医学材料1997;8:843-847.
- Chuang SK, Wei LJ, Douglass CW, Dodson TB.种植牙植入失败的风险因素: 一种用于分析聚类失效时间观察结果的策略.牙科研究杂志, 2002, 81: 572-577.
- Aita H, Hori N, Takeuchi M等. 钛紫外光化对骨结合的影响.生物材料 2009;30:1015-1025.
- Iwasa F, Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Yamada M, Ogawa T. 通过静电机制提高成骨细胞对UV光化钛的附着力. 生物材料 2010; 31: 2717-2727.
- Att W, Hori N, Iwasa F, Yamada M, Ueno T, Ogawa T. 紫外光化功能对钛和铬钴合金的时间相关生物活性的影响.生物材料 2009;30:4268-4276.
- Suzuki T, Hori N, Att W等. 紫外线处理抑制钛的生物活性随时间降低.组织工程A部分2009; 15: 3679-3688.
- Ueno T, Yamada M, Suzuki T, 等. 在间隙愈合模型中使用UV光化钛增强骨-钛结合概述.生物材料, 2010, 31:1546-1557.
- Iwasa F, Tsukimura N, Sugita Y, 等. TiO₂微纳米结构表面可减缓UV光化钛生物老化.国际纳米医学杂志 2011;6:1327-1341.
- Tsukimura N, Yamada M, Iwasa F等. 紫外光化功能和微纳米复合形貌对钛的生物性能的协同作用.生物材料, 2011, 32: 4358-4368.
- Hori N, Ueno T, Minamikawa H等. 蛋白质吸附对UV光化钛的静电控制.生物材料学报2010; 6: 4175-4180.
- Ogawa T. TiO₂光化实现钛骨最佳结合.收录于: Anpo M和Anpo M (编辑).环境友好型良性光催化剂.纽约: 施普林格, 2010:699-713.
- Hori N, Ueno T, Suzuki T等. 用以修复随年龄降低的钛生物活性的紫外光处理方式.口腔与上颌面植入国际杂志2010;25:49-

- 62.
36. Aita H, Att W, Ueno T等. 紫外光介导的钛光化功能促进人间充质干细胞的迁移、附着、增殖和分化.生物材料学报2009;5:3247-3257.
37. Att W, Hori N, Takeuchi M等. 钛骨传导性随时间降低: 植入材料生物老化的启示.生物材料2009; 30:5352-5363.
38. Kasemo B, Lausmaa J. 生物材料和种植体表面: 研究清洁、污染和预备程序的作用. 生物医学材料研究期刊1988; 22: 145-158.
39. Kilpadi DV, Lemons JE, Liu J, Raikar GN, Weimer JJ, Vohra Y. 纯钛种植体表面的清洗和热处理效果. 口腔与上颌面植入国际杂志2000; 15: 219-230.
40. Serro AP, Saramago B. 灭菌对不同生物模型流体培养诱导的钛种植体矿化的影响. 生物材料2003; 24: 4749-4760.
41. Buser D, Broggini N, Wieland M等. 进行化学改性的、经喷砂酸蚀处理的钛表面骨黏附程度加强. 牙科研究杂志, 2004, 83:529-533.
42. Massaro C, Rotolo P, De Riccardis F等. 市售钛牙种植体表面特性的对比研究.第一部分: 化学成分.材料科学杂志: 医学材料2002; 13: 535-548.
43. Takeuchi M, Sakamoto K, Martra G, Coluccia S, Anpo M. TiO₂光催化剂表面光诱导超亲水性机制.物理化学杂志B, 2005, 109: 15422-15428.
44. Kikuchi L, Park JY, Victor C, Davies JE.血小板与钙磷酸盐涂层表面的相互作用.生物材料2005; 26: 5285-5295.
45. Morra M, Cassinelli C, Bruzzone G等. 钛牙种植体表面形貌变化的表面化学效应: 1.表面分析.口腔与上颌面植入国际杂志2003; 18: 40-45.
46. Pae A, Kim SS, Kim HS, Woo YH.经转化、喷砂和阳极化处理的钛表面的成骨样细胞黏附力和增殖.口腔与上颌面植入国际杂志2011; 26:475-481.
47. Ueno T, Yamada M, Hori N, Suzuki T, Ogawa T. 钛紫外光活化对大鼠模型骨结合的影响.口腔与上颌面植入国际杂志2010;25:287-294.
48. Ueno T, Yamada M, Suzuki T, 等. 在间隙愈合模型中使用UV光化钛增强骨-钛结合概述.生物材料, 2010, 31:1546-1557.
49. Luo Y, Shoichet MS.用于指导三维结构培养中细胞生长和迁移的对光不稳定水凝胶.自然材料, 2004, 3: 249-253.
50. Benya PD, Shaffer JD.去分化软骨细胞培养在琼脂糖胶中时再次表达分化胶原表型.细胞, 1982, 30:215-224.
51. Wang C, Gong Y, Zhong Y, Yao Y, Su K, Wang DA.成骨模型水凝胶/微载体系统中支抗依赖性细胞行为的控制.生物材料, 2009, 30:2259-2269.
52. Ruoslahti E, Reed JC.支抗依赖、整合素和细胞凋亡.细胞, 1994, 77:477-478.
53. Grigoriou V, Shapiro IM, Cavalcanti-Adam EA, Composto RJ, Ducheyne P, Adams CS.成骨样细胞的凋亡和存活由表面粘附力调节.生物化学杂志, 2005, 280:1733-1739.
54. Hori N, Iwasa F, Tsukimura N等. 紫外光化功能对钛和铬钴合金的时间相关生物活性的影响.生物材料学报 2011;7:3679-3691.
55. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M等. 高表面能增强对钛基质显微结构细胞应答.生物医学材料研究杂志, A辑2005; 74: 49-58.
56. He B, Wan Y, Bei J, Wang S.高分子量功能化聚乙烯(聚甲基丙烯酸十二酯)的合成和细胞亲和力.生物材料, 2004, 25:5239-5247.
57. Wang YW, Wu Q, Chen GQ.通过透明质酸涂层增强亲水性的微生物合成聚羟基脂肪酸酯可减少鼠成纤维细胞的生长.生物材料, 2003, 24: 4621-4629.
58. Ber S, Torun Kose G, Hasirci V.有图案胶原蛋白膜片上的骨组织工程.体外研究.生物材料, 2005, 26:1977-1986.
59. Jansen EJ, Sladek RE, Bahar H等. 疏水性作为骨组织工程中聚合物支架材料的设计标准.生物材料2005; 26: 4423-4431.
60. Klinger A, Steinberg D, Kohavi D, Sela MN.人白蛋白对钛的体外吸附机理.生物医学材料研究杂志, 1997, 36:387-392.
61. Ellingsen JE.蛋白质吸附TiO₂的机理研究.生物材料1991; 12: 593-596.
62. Steinberg D, Klinger A, Kohavi D, Sela MN.人唾液蛋白对钛粉的吸附.I. 人唾液蛋白的吸附.生物材料1995; 16: 1339-1343.

