

PPC/PBS复合生物膜的屏障功能及其对兔胫骨骨缺损模型的促成骨作用

田野, 石晓璐, 翟少博, 刘洋, 杨征, 吴毓川, 储顺礼
(吉林大学口腔医院种植科, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 探讨聚碳酸酯1, 2-丙二酯(PPC)/聚丁二酸丁二醇酯(PBS)复合生物膜在兔胫骨骨缺损模型中的空间支撑能力及其对成骨效果的影响, 阐明其屏障功能的可靠性和体内促成骨作用。**方法:** 制备PPC/PBS和PPC/PBS/I型胶原(Col-I)(PPC/PBS/Co)复合生物膜。选用18只日本大耳白兔, 于兔每侧胫骨制备2处骨缺损, 随机选择6只兔于骨缺损处放置PPC/PBS复合生物膜, 术后4、8和12周各处死2只兔, 扫描电子显微镜(SEM)观察兔骨缺损区PPC/PBS复合生物膜表面微观结构。实验分为空白对照组、PPC/PBS复合生物膜组、BME-10X胶原膜组和PPC/PBS/Co复合生物膜组, 分别行手术将上述生物膜放置于兔相应骨缺损处, 空白对照组兔不放置复合生物膜, 于术后2、4、8和12周时分别处死3只兔, 采用软X线检测各组兔骨缺损区再生骨组织灰度值, 荧光标记后采用激光共聚焦显微镜观察各组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度, 采用HE染色和改良Gomori三色染色法观察各组兔骨缺损区再生骨组织病理形态表现, 免疫组织化学染色法检测各组兔骨缺损区再生骨组织中骨形态发生蛋白2(BMP-2)和骨桥蛋白(OPN)蛋白表达水平。**结果:** 大体观察, PPC/PBS复合生物膜紧密覆盖于骨缺损区, 未见移位及塌陷。SEM观察, PPC/PBS复合生物膜多孔面随时间延长表面出现微孔结构并数量增多, 而光滑面基本未形成微孔样结构。软X线检测, 各组兔骨缺损区再生骨组织灰度值均随时间延长而升高, 12周时PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区再生骨组织灰度值明显高于其他各组($P<0.05$)。共聚焦显微镜观察, 4、8和12周时PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度与空白对照组相近; 与PPC/PBS复合生物膜组和BME-10X胶原膜组比较, 4周时PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度升高($P<0.05$), 8和12周时PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度降低($P<0.05$)。HE染色和改良Gomori染色, 与PPC/PBS复合生物膜组和BME-10X胶原膜组比较, 2和4周时PPC/PBS/Co复合生物膜组和空白对照组兔骨缺损区形成新骨的速度较快, 在12周时骨缺损区形成的层板状骨矿化程度较高。免疫组织化学染色, 2和4周时, 与空白对照组、PPC/PBS复合生物膜组和BME-10X胶原膜组比较, PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区再生骨组织中BMP-2和OPN蛋白表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与空白对照组和PPC/PBS复合生物膜组比较, BME-10X胶原膜组兔骨缺损区再生骨组织中BMP-2和OPN蛋白表达水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:** PPC/PBS复合生物膜具有较好的空间支撑能力, 物理屏障功能可靠, 且PPC/PBS/Co复合生物膜具有良好的体内促成骨作用。

[关键词] 引导骨再生; 复合生物膜; 聚碳酸酯1,2-丙二酯; 聚丁二酸丁二醇酯; 骨缺损

[中图分类号] R783.1 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-09-28

[基金项目] 吉林省科技厅省重点项目(20230203065SF); 吉林省教育厅科研项目(JJKH20231291KJ)

[作者简介] 田野(1998-), 男, 安徽省阜阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事口腔种植区水平骨增量方面的研究。

[通信作者] 储顺礼, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师(E-mail: chusl@jlu.edu.cn)

Barrier function of PPC/PBS composite biofilm and its osteogenetic effect on tibial bone defect models of rabbits

TIAN Ye, SHI Xiaolu, ZHAI Shaobo, LIU Yang, YANG Zheng, WU Yuchuan, CHU Shunli
(Department of Prosthodontics, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To explore the spatial support capacity and its influence in osteogenic effect of composite biofilm based on poly(propylene carbonate) (PPC) /poly(butylene succinate) (PBS) in rabbit tibial bone defect models, and to clarify its barrier functional reliability and osteogenetic effect *in vivo*. **Methods:** The composite biofilms of PPC/PBS and PPC/PBS/collegen type I (Col-I)(PPC/PBS/Co) were prepared. Eighteen Japanese big-ear rabbits were selected and two bone defects were prepared on each side of the tibia of the rabbits. Six rabbits were randomly selected to place PPC/PBS composite biofilm on the bone defects, 2 rabbits were executed at 2, 4, 8 and 12 weeks after operation, and the surface microstructures of PPC/PBS composite biofilm in the rabbit bone defect area were observed by scanning electron microscope (SEM). The experiment was divided into blank control group, PPC/PBS composite biofilm group, BME-10X collagen membrane group, and PPC/PBS/Co composite biofilm group. The above biofilms were placed on the corresponding bone defects of rabbits by operation, while no biofilm was placed in the rabbits in blank control group. Three rabbits were killed at 2, 4, 8 and 12 weeks after operation respectively, and the gray values of regenerated bone in the bone defect areas of the rabbits in varrous groups were detected by soft X-ray; the fluorescence intensities of regenerated bone tissue in the bone defect areas of the rabbits in various groups were observed by laser scanning confocal microscope after fluorescence labeling. The pathomorphology of regenerated bone tissue in the bone defect areas of the rabbits in various groups were observed by HE staining and modified Gomori staining, and the expression levels of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and osteopontin (OPN) in the regenerated bone tissue in bone defect areas of the rabbits in various groups were detected by immunohistochemical staining. **Results:** In general, the PPC/PBS composite biofilm was tightly covered in the bone defect area without displacement and collapse. The SEM results showed that the porous surface of PPC/PBS composite biofilm appeared micropore structure and the number of micropores was increased with the prolongation of time, while the smooth surface of biofilm basically did not form the micropore-like structure. The results of soft X-ray detection showed that the gray values of regenerated bone tissue in bone defect areas of the rabbits in various groups were increased with the prolongation of time, and the gray value of regenerated bone tissue in bone defect areas of the rabbits in PPC/PBS/Co composite biofilm group was significantly higher than those in other groups ($P<0.05$). The confocal microscope results showed that the fluorescence intensity of regenerated bone tissue in bone defect areas of the rabbits in PPC/PBS/Co composite biofilm group was similar to those in blank control group at 4, 8, and 12 weeks; compared with PPC/PBS composite biofilm group and BME-10X collagen membrane group, the fluorescence intensity of regenerated bone tissue in bone defect areas of the rabbits in PPC/PB/Co composite biofilm group at 4 weeks was increased ($P<0.05$), and the fluorescence intensity of regenerated bone tissue in bone defect areas of the rabbits at 8 and 12 weeks were decreased ($P<0.05$). The results of HE staining and modified Gomori staining showed that compared with PPC/PBS composite biofilm group and BME-10X collagen membrane group, the new bone formed faster in PPC/PBS/Co composite biofilm group and blank control group at 2 and 4 weeks, and the lamellar bone mineralization was higher at 12 weeks. The immunohistochemical staining results showed that compared with blank control group, PPC/PBS composite biofilm group and BME-10X collagen membrane group, the expression levels of BMP-2 and

OPN proteins in the regenerated bone tissue in bone defect areas of the rabbits in PPC/PBS/Co composite biofilm group at 2 and 4 weeks were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with blank control group and PPC/PBS composite biofilm group, the expression levels of BMP-2 and OPN proteins in the regenerated bone tissue in bone defect areas of the rabbits in BME-10X collagen membrane group were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** PPC/PBS composite biofilm has excellent spatial support capacity and reliable physical barrier function. The PPC/PBS/Co composite biofilm has a good effect in guiding bone regeneration *in vivo*.

KEYWORDS Guided bone regeneration; Composite biofilm; Poly (propylene carbonate); Poly (butylene succinate); Bone defect

种植义齿被誉为人类的第三副牙齿,因其类似真牙的舒适感和美观成为牙列缺损及牙列缺失修复的首选治疗手段。但一部分缺牙患者因牙槽骨骨量不足或颌骨缺损无法进行种植修复,限制了种植修复技术的开展,常需骨移植术和(或)引导骨再生术(guided bone regeneration, GBR)来解决。目前,GBR是国内外骨缺损再生修复的研究热点之一,其原理是利用生物膜的物理屏障功能将骨缺损区与周围组织隔离,创造一个相对封闭的组织环境,从而使特定组织的再生功能得到最大程度的发挥^[1-2],其中生物膜的屏障功能和生物活性至关重要。目前,临床应用的生物膜仍存在问题^[3-4],如不可吸收性膜易引起软组织瓣裂开、膜暴露和感染,可吸收性生物膜硬度不足易塌陷、降解过早与成骨速率不匹配和价格昂贵等,难以满足临床需求。因此,研发具备良好可塑性、空间维持能力和生物活性的新型复合生物膜具有重要的临床意义,也是目前GBR技术的研究热点。理想的GBR生物膜应具有一定的强度、韧性和生物活性。有学者^[5-7]曾将骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和I型胶原(collagen type I, Col-I)等加入到生物膜中,使GBR生物膜具有一定的生物活性,目前此类研究多处于基础研究阶段,并且生长因子的添加提高了生物膜成本。组织中的Col-I以胶原纤维形式发挥作用,不仅可作为支持物赋予组织张力,而且与细胞生长、细胞分化、细胞增生、组织损伤修复、炎症反应、组织硬化和纤维化等均有密切关联^[8]。然而,关于Col-I复合生物膜的体内研究国内外少有报道。为了提高本课题组在前期研究中制备的聚碳酸酯1, 2-丙二酯/聚丁二酸丁二醇酯[poly(propylene carbonate)/poly(butylene succinate), PPC/PBS]复合生物膜的生物活性,现将Col-I

与PPC/PBS生物膜相复合,制备新型PPC/PBS/Col-I(Co)复合生物膜,通过建立兔胫骨骨缺损动物模型,评价新型PPC/PBS/Co复合生物膜的屏障功能和体内促成骨作用,为其后续研究和临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 日本大耳白兔18只,雌雄不限,4月龄,体质量2.5~3.0 kg,由吉林大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK-(吉)2008-0005。PPC(数均分子量 $4.3 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) (内蒙古自治区蒙西高新技术集团公司),PBS(数均分子量 $1.03 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) (日本Showa公司),氯仿(天津新通精细化工有限公司),氘代氯仿(上海默克化工技术有限公司),Col-I(吉林大学口腔医院牙周病科马宁副教授惠赠),BME-10X胶原膜(福建省博特生物科技有限公司),兔抗人BMP-2多克隆抗体(武汉博士德生物工程公司),兔抗人骨桥蛋白(osteopontin, OPN)抗体和兔抗人Col-I蛋白抗体(北京博奥森生物技术有限公司),SP超敏试剂盒和DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)。真空冷冻干燥机(ALPHA1-2型,吉林大学酶工程实验室提供),场发射环境扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(XL30型,美国FEI公司),多功能电子拉伸实验机(Zwick/Z010型,德国Zwick公司),GIOTTO钨靶软X线机(意大利IMS公司),共聚焦荧光显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 PPC/PBS/Co复合生物膜制备和表面形态及微观结构观察 在前期实验中,将PPC与PBS材料按比例混合,通过盐析法制备出PPC/PBS复合生物膜,将其剪切成小片(1.7 cm×1.7 cm),75%酒精浸泡2 h,蒸馏水清洗,常温干燥1周,

真空干燥 24 h 待用。配制 Col-I 溶液: Col-I 称质量, 加入 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸溶液中 (pH3.2), 得到最终质量浓度为 $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Col-I-乙酸溶液, 待用。将干燥后的 PPC/PBS 复合生物膜放入冻干盒中, 用加样器吸取上述 Col-I-乙酸溶液, 每孔滴加 $800 \mu\text{L}$, 用封口膜覆盖冰盒, -20°C 冰箱预冻 4 h, 转到冻干机中真空冷冻干燥 24 h, 制成冻干 PPC/PBS/Co 复合生物膜。观察冻干后 PPC/PBS/Co 复合生物膜表面形态, 采用 SEM 观察其表面微观结构, 计算平均孔径, 检测 5 个标本, 取平均值。平均孔径计算方法: 在 105 倍视野下每个标本选取 5 个 $400 \mu\text{m}\times 400 \mu\text{m}$ 大小区域, 检测每个区域中所有孔数目和孔径, 区域内所有孔径之和除以孔数目之和得到平均孔径。

1.3 兔胫骨骨缺损模型建立 选用 18 只日本长耳大白兔, 速眠新及灭菌注射用水 1:1 混合, 按 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量于兔臀部肌内注射麻醉。仰卧位固定, 术区剪毛消毒。在兔胫骨近心端前缘骨嵴区切开皮肤及皮下层, 直达骨嵴, 钝性分离骨膜, 暴露骨面, 采用涡轮机 ($800 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 在胫骨外侧制备 $0.6 \text{ cm}\times 0.6 \text{ cm}$ 方形骨缺损, 深达骨髓腔, 术中用生理盐水冷却。每侧制备 2 处缺损, 每只兔共 4 个缺损。术后每日 1 次 $200\,000 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ 青霉素肌注, 连续给药 3 d。

1.4 SEM 观察术后不同时间点兔骨缺损区 PPC/PBS 复合生物膜表面微观结构 随机选择 6 只兔, 于骨缺损区覆盖 PPC/PBS 复合生物膜, 分层缝合, 观察并记录兔的生存情况及创口愈合情况。分别于 4、8 和 12 周时处死 2 只兔, 截取双侧后肢胫骨近心端, 两端超过骨缺损区。肉眼观察标本后, 取出生物膜, 梯度脱水, 表面喷金, SEM 观察 PPC/PBS 复合生物膜光滑面和多孔面微观结构。

1.5 动物分组和处理 对剩余 12 只兔的每个骨缺损区分别进行不同分组处理。① PPC/PBS 复合生物膜组: 将 PPC/PBS 复合生物膜置于兔右后肢上缺损处; ② PPC/PBS/Co 复合生物膜组: 将 PPC/PBS/Co 复合生物膜置于兔右后肢下缺损处; ③ BME-10X 胶原膜组: 将 BME-10X 胶原膜置于兔左后肢上缺损处; ④ 空白对照组: 兔左后肢下缺损处未加任何生物膜, 直接分层缝合。观察各组兔的生存情况及术后创口愈合情况, 术后 2、4、8 和 12 周各处死 3 只兔, 截取双侧后肢胫骨近心端且两端超过骨缺损区, 进行后续实验。

1.6 软 X 线检测各组兔骨缺损区再生骨灰度值 将 2、4、8 和 12 周各组兔骨缺损区的胫骨标本用硅橡胶印模材料固定于一次性托盘内, 钼靶软 X 线机拍摄, 拍摄参数: 32 kV , $14 \text{ mA}\cdot\text{s}^{-1}$ 。存储图像数据, 导入 Image-Pro Plus 软件, 计算骨缺损区再生骨灰度值。

1.7 激光共聚焦显微镜观察各组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度 实验结束前 10 d 和前 3 d 分别对各组兔进行 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 四环素肌内注射, 标记缺损区再生新骨。处死各组兔后, 获取骨缺损区组织块标本, 用硬组织切片机切成厚 1.5 mm 小块状标本, 采用激光共聚焦显微镜单一绿色荧光通道, 激发波长 488 nm , 观察 4、8 和 12 周时各组兔骨缺损区再生骨组织所形成的绿色荧光强度。

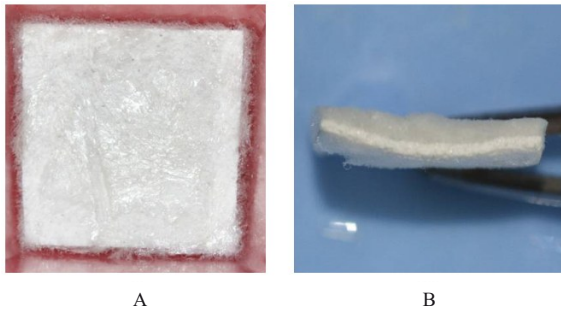
1.8 HE 染色和改良 Gomori 染色观察各组兔骨缺损区再生骨组织病理形态表现 各组兔骨缺损区 $1.5 \text{ mm}\times 1.5 \text{ mm}$ 小块状标本放入包埋盒, 甲酸氯化铝脱钙 7 d, 梯度脱水, 常规石蜡包埋, 制备 $5 \mu\text{m}$ 石蜡切片。行常规 HE 染色和改良 Gomori 染色, 光镜下观察各组兔骨缺损区再生骨组织病理形态表现。

1.9 免疫组织化学染色法检测各组兔骨缺损区再生骨组织中 BMP-2 和 OPN 蛋白表达水平 取 2 和 4 周各组兔骨缺损区标本进行 BMP-2 和 OPN 免疫组织化学染色, 步骤按照试剂盒说明书进行, 采用 Image-Pro Plus 软件计算各组兔骨缺损区再生骨组织 BMP-2 和 OPN 染色阳性面积, 以其代表蛋白表达水平。

1.10 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。各组兔骨缺损区再生骨灰度值、荧光强度、BMP-2 和 OPN 蛋白表达水平经正态性检验均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间样本均数比较采用两独立样本 t 检验, 多组间样本均数采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 SNK- q 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

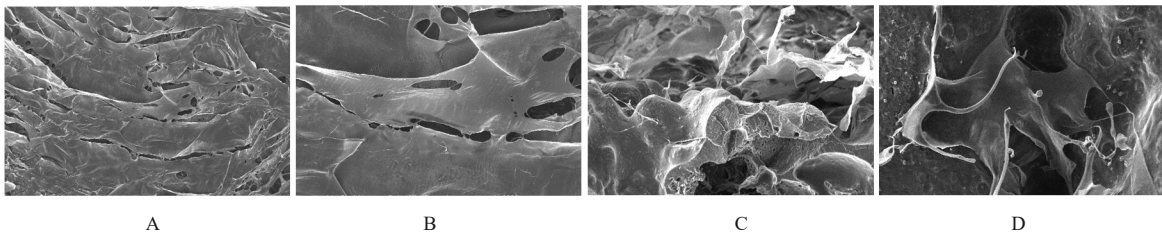
2.1 PPC/PBS/Co 复合生物膜的制备和表面结构 PPC/PBS/Co 生物膜经冻干后, 可见 Col-I 呈海绵状, 附着在 PPC/PBS 复合生物膜多孔面, 并伸入至孔结构内部, 侧面观 Col-I 和 PPC/PBS 复合生物膜界限不清。见图 1。SEM 观察: PPC/PBS/Co 复合生物膜中 Col-I 纤维呈薄片样彼此相连, 相连处形成网孔, 平均孔径约 $220 \mu\text{m}$, 网孔相互连通, 断面见 Col-I 纤维伸入生物膜孔隙内部。见图 2。



A: Composite biofilm in freeze-drying box; B: Side view of composite biofilm.

图1 PPC/PBS/Co复合生物膜表面大体形态表现
Fig. 1 Gross morphology of surface of PPC/PBS/Co composite biofilm

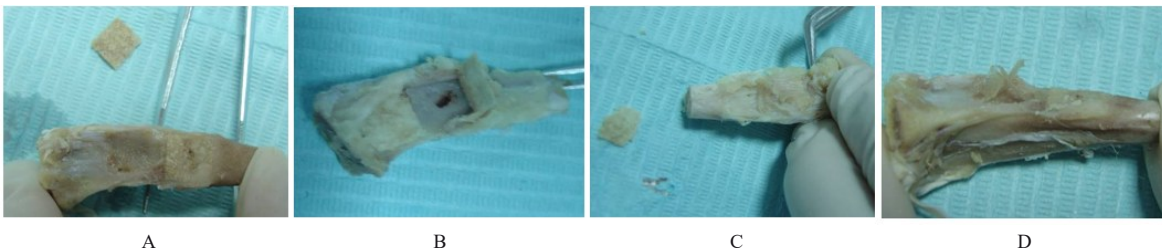
2.2 术后不同时间点兔骨缺损区PPC/PBS复合生物膜大体和微观形态 大体观察: 术后兔双后肢有轻度肿胀, 生长状态良好。取材时肉眼可见各创口均愈合良好, 表面组织完整, 未见感染、破溃和分泌物。骨外膜结构完整, 紧缚于PPC/PBS复合生物膜表面, 生物膜覆盖于骨缺损区, 未见移位及塌陷现象; 4周时, 生物膜能完整取出; 8周时, 骨外膜与生物膜结合十分紧密(尤其是周边处), 生物膜难以整片取出, 再生骨表面见有新生的骨膜。见图3。SEM观察: PPC/PBS复合生物膜多孔面表面出现微孔, 并且随时间延长微孔数目增多; 光滑面在4周内未见明显变化, 自4周开始表面出现极小颗粒脱落形成的外观, 但基本未形成微孔样结构。见图4。



A: Superficial view ($\times 30$); B: Superficial view ($\times 100$); C: Sectional view ($\times 100$); D: Col-I in pores ($\times 200$).

图2 PPC/PBS/Co复合生物膜表面微观结构表现

Fig. 2 Microstructure of surface of PPC/PBS/Co composite biofilm



A: Specimen covered with biofilm; B: No soft tissue growth in defect area of membrane cover; C: Biofilm difficult to be removed completely in 8 weeks; D: Neonatal periosteum in surface of regenerated bone.

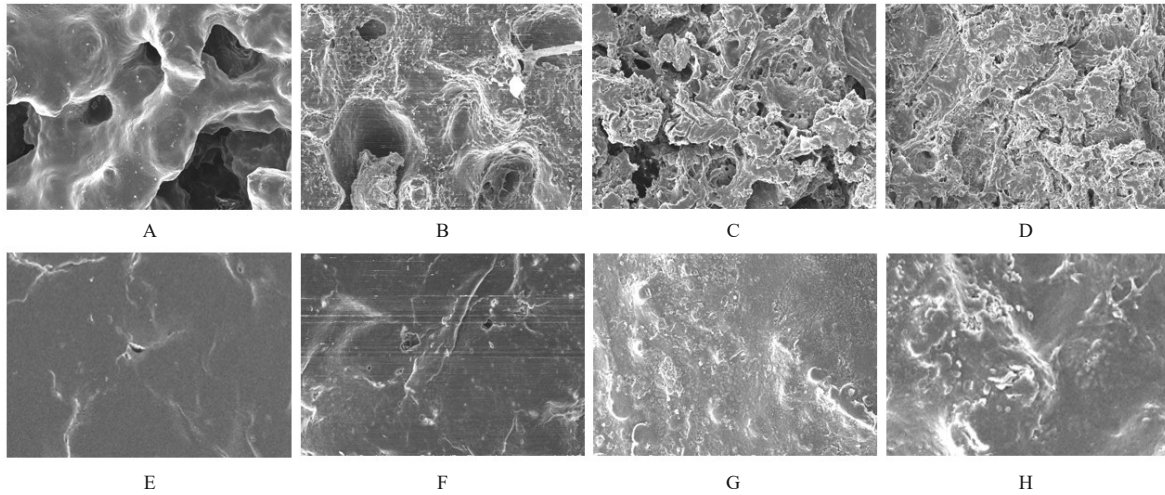
图3 术后不同时间点兔骨缺损区PPC/PBS复合生物膜标本大体形态表现

Fig. 3 Gross morphology of PPC/PBS composite biofilm specimen in rabbit bone defect area at different time points after operation

2.3 各组兔术后大体观察和骨缺损区再生骨灰度值 术后各组兔双后肢有轻度肿胀, 生长状态良好。取材时肉眼可见各组兔创口均愈合良好, 表面组织完整, 未见感染、破溃和分泌物。软X线检测结果显示: PPC/PBS复合生物膜组和BME-10X胶原膜组兔骨缺损区再生骨灰度值随时间延长而逐渐升高, 空白对照组和PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区再生骨灰度值4周后呈现明显升高趋势。2、4和8周时, 与PPC/PBS复合生物膜组和BME-10X胶

原膜组比较, PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区再生骨灰度值升高 ($P < 0.05$); 12周时, 与空白对照组、PPC/PBS复合生物膜组和BME-10X胶原膜组比较, PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区再生骨灰度值升高 ($P < 0.05$)。见表1。

2.4 各组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度 与空白对照组比较, 不同时间点PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 12周时, 空白对照组和



A—D: Porous surface; E—H: Smooth surface; A, E: 0 week; B, F: 4 weeks; C, G: 8 weeks; D, H: 12 weeks.

图4 术后不同时间点兔骨缺损区PPC/PBS复合生物膜微观形态表现(SEM, ×200)

Fig. 4 Micromorphology of PPC/PBS composite biofilm in rabbit bone defect area at different time points after operation (SEM, ×200)

表1 不同时间点各组兔骨缺损区再生骨灰度值

Tab. 1 Gray values of regenerated bone in bone defect areas of rabbits in various groups at different time points (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	Gray value			
	(week) 2	4	8	12
Blank control	1 698.00±369.90	2 035.00±201.75	2 838.00±119.40	4 121.50±119.72
PPC/PBS composite biofilm	1 163.28±542.04	1 890.80±394.54	2 600.00±130.00 [#]	4 183.50±29.18 [#]
BME-10X collagen membrane	1 124.80±356.24	1 816.67±217.15	2 161.25±108.06	3 664.67±108.17
PPC/PBS/Co composite biofilm	1 674.00±437.97 ^{△#}	2 147.00±360.17 ^{△#}	2 776.33±138.82 ^{△#}	4 552.50±120.00 ^{△#}

^{*}P<0.05 compared with blank control group; [△]P<0.05 compared with PPC/PBS composite biofilm group; [#]P<0.05 compared with BME-10X collagen membrane group.

PPC/PBS/Co 复合生物膜组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度极低。4周时, 与空白对照组比较, PPC/PBS 复合生物膜组和 BME-10X 胶原膜组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度降低 (P<0.05); 与 PPC/PBS 复合生物膜组和 BME-10X 胶原膜组比较, PPC/PBS/Co 复合生物膜组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度升高 (P<0.05)。8和12周时, 与空白对照组比较, PPC/PBS 复合生物膜组和 BME-10X 胶原膜组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度升高 (P<0.05); 与 PPC/PBS 复合生物膜组和 BME-10X 胶原膜组比较, PPC/PBS/Co 复合生物膜组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度降低 (P<0.05)。见图5和表2。

2.5 各组兔骨缺损区再生骨组织病理形态表现

HE染色: 随时间延长, 各组兔骨缺损区均可见新生骨小梁, 其中空白对照组和 PPC/PBS/Co 复合生物膜组兔骨缺损区形成的骨小梁较多, 且较早形成层板状骨。2周时, 各组兔骨缺损区形成的骨

小梁周边无明显炎性细胞聚集, 骨小梁内有骨细胞, 周边有成骨细胞围绕; 12周时, 各组兔骨缺损区均已形成致密的层板状骨, 骨陷窝明显, 骨基质成熟。改良 Gomori 染色: 随时间延长, 各组兔骨缺损区骨小梁逐渐形成, 与 PPC/PBS 复合生物膜组和 BME-10X 胶原膜组比较, 空白对照组和 PPC/PBS/Co 复合生物膜组兔骨缺损区骨小梁形成速度较快, 数量较多, 形成层板状骨较早, 矿化程度更高。见图6和7。

2.6 各组兔骨缺损区再生骨组织中 BMP-2 和 OPN 蛋白表达水平

2和4周时, 与空白对照组、PPC/PBS 复合生物膜组和 BME-10X 胶原膜组比较, PPC/PBS/Co 复合生物膜组兔骨缺损区再生骨组织中 BMP-2 和 OPN 蛋白表达水平均升高 (P<0.05 或 P<0.01); 与空白对照组和 PPC/PBS 复合生物膜组比较, BME-10X 胶原膜组兔骨缺损区再生骨组织中 BMP-2 和 OPN 蛋白表达水平均降低

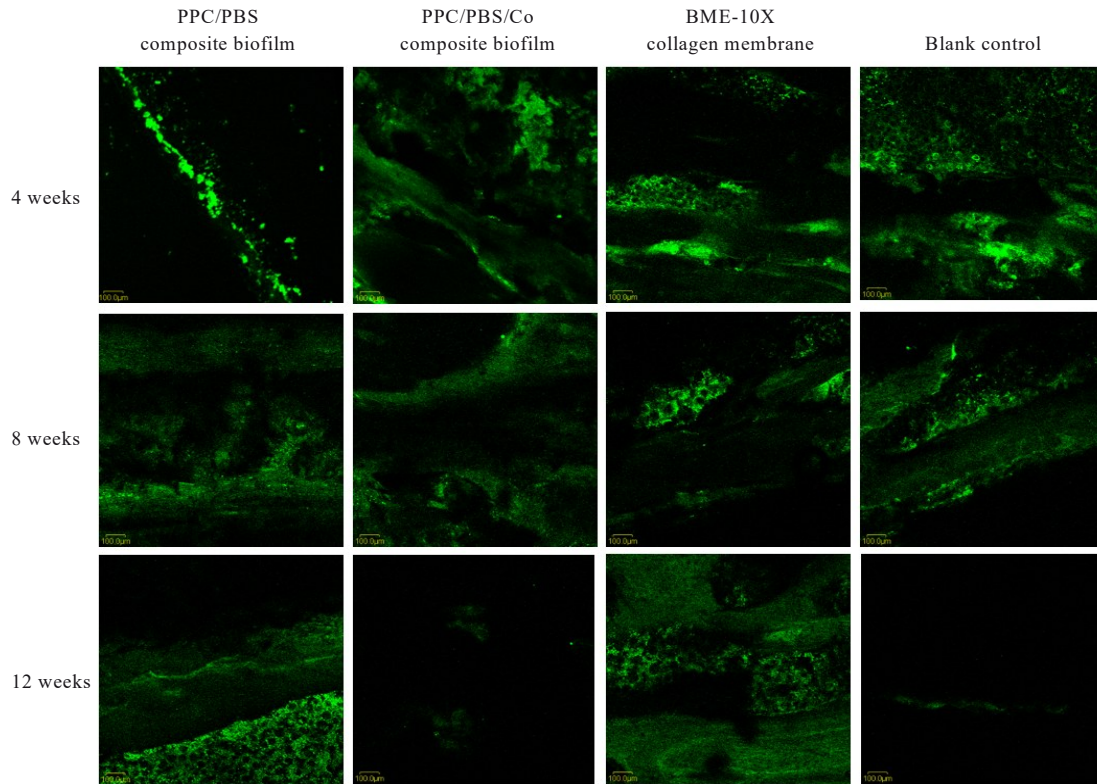


图5 激光共聚焦显微镜观察不同时间点各组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度($\times 40$)

Fig. 5 Fluorescence intensities of regenerated bone in bone tissue defect areas of rabbits in various groups at different time points ($\times 40$)

表2 不同时间点各组兔骨缺损区再生骨组织荧光强度

Tab. 2 Fluorescence intensities of regenerated bone tissue in bone defect areas of rabbits in various groups at different time points ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Fluorescence intensity		
	(week) 4	8	12
Blank control	25 608.67 \pm 619.50	22 252.00 \pm 1 263.00	2 531.00 \pm 127.00
PPC/PBS composite biofilm	13 720.00 \pm 1 350.65*	28 219.00 \pm 1 411.00*	12 078.00 \pm 604.00*
BME-10X collagen membrane	14 677.67 \pm 733.50*	33 514.00 \pm 1 676.00*	19 940.00 \pm 997.00*
PPC/PBS/Co composite biofilm	24 000.00 \pm 1 200.00 $\Delta^{\#}$	21 042.00 \pm 1 052.00 $\Delta^{\#}$	2 673.67 \pm 234.07 $\Delta^{\#}$

* $P < 0.05$ compared with blank control group; $\Delta P < 0.05$ compared with PPC/PBS composite biofilm group; $\#P < 0.05$ compared with BME-10X collagen membrane group.

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表3。

3 讨论

本研究采用冻干法制备 PPC/PBS/Co 复合生物膜不破坏 Col-I 结构, 不引起胶原变性, 很好地保存了其活性; 冻干后的 Col-I 呈海绵状附着在 PPC/PBS 复合生物膜多孔面, 该海绵样结构与人体松质骨结构类似, 可作为支架应用于人体, 具有仿生学意义。本研究中 SEM 观察结果显示: Col-I 纤维呈薄片样彼此相连, 形成平均孔径约 220 μm

的相互连通的孔道, 孔孔相通的三维多孔网状结构孔隙率高, 不仅利于骨缺损区细胞代谢和物质交换, 也利于材料的生物降解并可提高其生物相容性。在 PPC/PBS 生物膜上复合 Col-I 也利用了胶原的骨支架作用和骨诱导作用。研究^[9]表明: 骨骼中超过 90% 的有机质为 Col-I 蛋白, 其发挥作用的主要方式是形成和保持骨架的完整性。Col-I 支架还可募集细胞因子, 使缺损区组织再生因子水平升高, 利于引导骨再生^[10]。此外, Col-I 还有信号分子作用, 能调控细胞生长、分化和增殖。成骨细胞

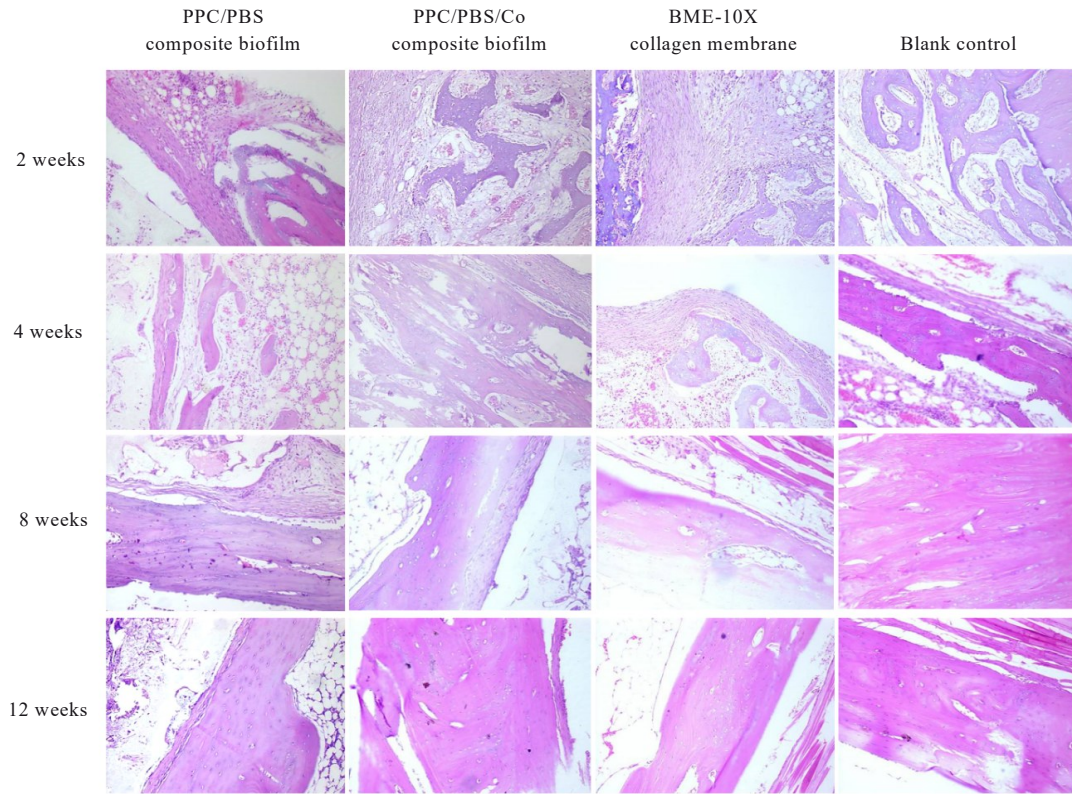


图6 不同时间点各组兔骨缺损区再生骨组织HE染色结果(×100)

Fig. 6 Results of HE staining of regenerated bone tissue in bone defect areas of rabbits in various groups (×100)

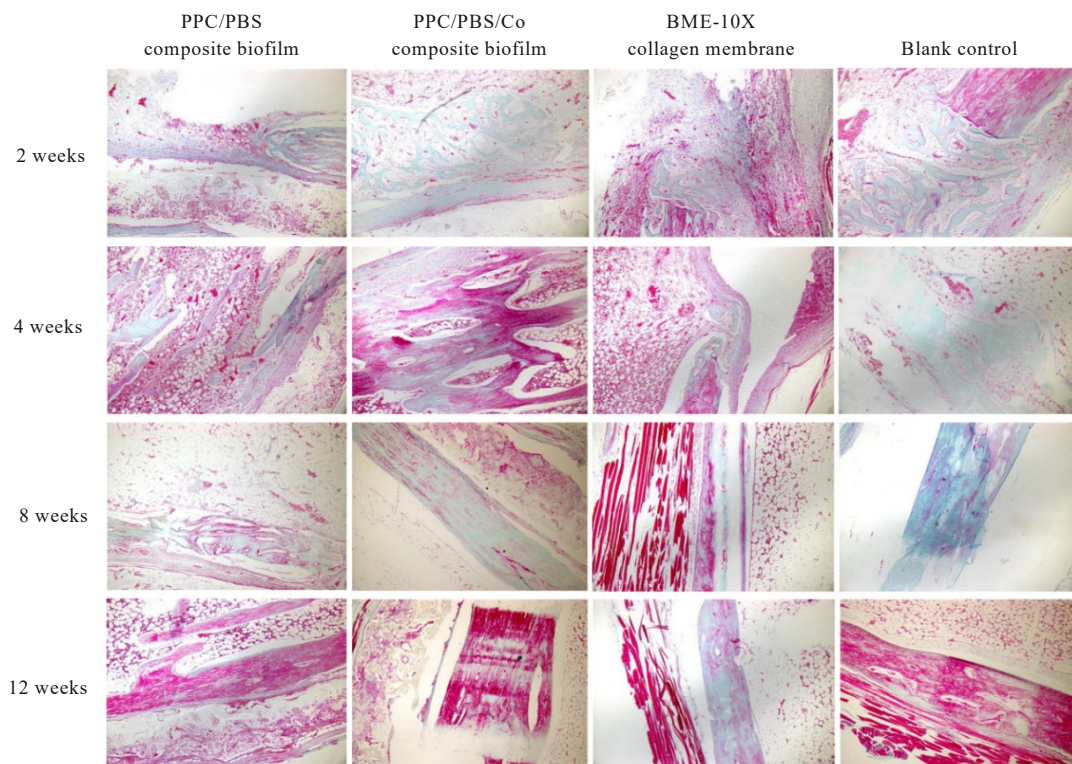


图7 不同时间点各组兔骨缺损区再生骨组织改良Gomori染色结果(×40)

Fig. 7 Results of modified Gomori staining of regenerated bone tissue in bone defect areas of rabbits in various groups (×40)

直径约为 20 μm ^[11], 远小于生物膜平均孔径, 故 PPC/PBS/Co 复合生物膜的多孔网状结构有利于细胞长入, 可促进细胞在生物膜上附着和繁殖。

本研究结果显示: 在兔胫骨前嵴处作一直达骨面切口后, 胫骨干骺端前外侧骨膜可完整剥离, 视

野清晰, 故选择于胫骨前外侧制备骨缺损, 分层缝合后, 生物膜不会随兔运动发生位置变化, 骨缺损模型十分稳定; 此外, 本研究中兔术区创口小, 术后恢复快, 可降低术后感染等并发症风险, 减少实验误差, 保证了结果的可靠性。

表3 不同时间点各组兔骨缺损区再生骨组织中BMP-2和OPN蛋白表达水平

Tab. 3 Expression levels of BMP-2 and OPN proteins in regenerated bone tissue in bone defect areas of rabbits in various groups at different time points ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	BMP-2 protein		OPN protein	
	(week) 2	4	2	4
Blank control	53.596 \pm 2.680	80.978 \pm 4.049	44.353 \pm 2.218	42.249 \pm 2.112
PPC/PBS composite biofilm	42.503 \pm 2.125	69.348 \pm 3.467	27.633 \pm 1.382	50.841 \pm 2.542
BME-10X collagen membrane	0.000 \pm 0.000 ^{*Δ}	22.787 \pm 1.139 ^{*Δ}	17.440 \pm 0.872 ^{*Δ}	35.833 \pm 1.792 ^{*Δ}
PPC/PBS/Co composite biofilm	99.288 \pm 5.215 ^{*Δ#}	168.271 \pm 8.414 ^{*Δ#}	57.961 \pm 2.898 ^{*Δ#}	74.972 \pm 3.749 ^{*Δ#}

* $P<0.01$ compared with blank control group; $\Delta P<0.05$ compared with PPC/PBS composite biofilm group; # $P<0.05$ compared with BME-10X collagen membrane group.

生物膜的屏障功能是GBR技术成功的重要保障^[12]。一般认为生物膜在体内保存时间至少为3个月, 也有学者认为其保存时间应与骨生理周期相符甚至更长, 从而保证成骨细胞分化、增殖和上皮细胞成熟^[13]。本研究结果显示: 取材时可见兔术区骨外膜结构完整, 生物膜覆盖于骨缺损区, 未见移位和塌陷; 8周时, 骨外膜与生物膜周边结合十分紧密, 难以整片取出, 新生骨表面可见新生骨膜; SEM观察, PPC/PBS复合生物膜光滑面的物理屏障功能可维持3个月以上, 物理屏障功能可靠, 而多孔面随时间延长逐渐出现微孔, 但生物膜整体空间变化很小。材料降解出现的微孔可被骨缺损区成骨细胞、基质和血管等成骨性成分占据, 便于促进硬组织再生, 保证骨质量。

理想的GBR生物膜除物理屏障功能外, 还应具备生物活性, 如骨传导性和骨诱导性等。本研究中兔骨缺损位于胫骨近心端, 其骨再生方式主要是膜内成骨, 参与成骨作用的细胞主要位于骨膜内和骨髓腔, 结果显示: PPC/PBS复合生物膜组和PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区生物膜未发生明显降解, 故参与成骨作用的细胞主要来源于骨髓腔; BME-10X胶原膜初期未发生降解, 其参与成骨作用的细胞主要来源于骨髓腔, 而后期逐渐降解, 骨膜也逐渐参与成骨作用; 空白对照组兔在整个观察时相内均有来源于骨膜和骨髓腔的细胞参与成骨, 成骨速度最快, 在促成骨作用方面PPC/PBS/Co

复合生物膜组与空白对照组比较无明显差异, 可能与PPC/PBS/Co复合生物膜上的Col-I有关。

本研究结果显示: 术后初期空白对照组和PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区骨小梁形成较快, 钙盐沉积较早, 而PPC/PBS复合生物膜组和BME-10X胶原膜组新生骨小梁较少, 矿化程度较低; 随时间延长, 各组兔骨缺损区骨小梁彼此联接形成网状, 逐渐形成层板状骨, 矿化程度逐渐增强; 至12周时, 空白对照组和PPC/PBS/Co复合生物膜组兔骨缺损区层板状骨矿化程度较高, 几乎形成完全矿化的骨基质; PPC/PBS复合生物膜组兔骨缺损区矿化程度较低, 而BME-10X胶原膜组兔骨缺损区矿化程度最低, 未形成完全矿化的骨基质, 表明PPC/PBS复合生物膜和PPC/PBS/Co复合生物膜具有一定的生物学活性, 在促骨再生方面可以与自体骨膜相媲美, 尤其是含有Col-I的PPC/PBS/Co复合生物膜, 其术后初期骨小梁形成及钙盐沉积速度更快, 骨再生效果更佳。

本研究结果显示: 兔骨缺损区成骨速度差异主要表现在术后初期, 因此选择术后2和4周兔骨缺损区标本进行BMP-2和OPN染色, 探讨成骨速度差异的机制。成骨细胞通过分泌BMP-2和OPN等活性成分发挥成骨功能。BMP-2由成骨细胞产生, 主要与骨基质结合, 可诱导未分化的间充质干细胞分化形成软骨和新生骨, 并诱导成骨细胞的前体细胞分化为成骨细胞, 在骨形态发生蛋白(bone

morphogenetic protein, BMP) 家族中其骨诱导活性最强并且能单独异位诱导成骨^[14]。OPN是骨组织中主要非胶原蛋白, 由成骨细胞合成和分泌, 参与调节骨基质的形成和矿化^[15]。本研究中BMP-2和OPN免疫组织化学染色结果表明: PPC/PBS/Co复合生物膜促成骨作用明显, 可能与Col-I诱导BMP-2蛋白表达水平升高有关; PPC/PBS复合生物膜和PPC/PBS/Co复合生物膜的促成骨作用与OPN蛋白表达水平有着密切关联, 尤其是PPC/PBS/Co复合生物膜, 主要原因可能是Col-I可引导钙盐沉积矿化, 而钙盐能促进OPN分泌, 从而调节骨基质的形成和矿化。与BME-10X胶原膜比较, 本研究制备的PPC/PBS/Co复合生物膜因多孔样结构更适于成骨细胞的贴附生长, 表现出更明显的促成骨作用。

综上所述, 通过冻干法制备的PPC/PBS/Co复合生物膜多孔化效果良好, 具有可靠的物理屏障功能和明显的体内促成骨作用。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

田野和石晓璐参与文献检索、实验设计和论文撰写, 田野参与数据收集和分析, 石晓璐、翟少博、刘洋、杨征和吴毓川参与论文结果分析和讨论, 储顺礼参与论文写作指导和论文审校。

[参考文献]

- [1] ALLAN B, RUAN R, LANDAO-BASSONGA E, et al. Collagen membrane for guided bone regeneration in dental and orthopedic applications[J]. *Tissue Eng Part A*, 2021, 27(5/6): 372-381.
- [2] KOFINA V, MONFAREDZADEH M, RAWAL S Y, et al. Patient-reported outcomes following guided bone regeneration: correlation with clinical parameters[J]. *J Dent*, 2023, 136: 104605.
- [3] SANZ-SÁNCHEZ I, SANZ-MARTÍN I, ORTIZ-VIGÓN A, et al. Complications in bone-grafting procedures: classification and management [J]. *Periodontol 2000*, 2022, 88(1): 86-102.
- [4] XIE Y, LI S H, ZHANG T X, et al. Titanium mesh for bone augmentation in oral implantology: current application and progress[J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12(1): 37.
- [5] JUNG N, PARK J, PARK S H, et al. Improving bone formation by guided bone regeneration using a collagen membrane with rhBMP-2: a novel concept[J]. *J Funct Biomater*, 2023, 14(3): 170.
- [6] MERAW S J, REEVE C M, LOHSE C M, et al. Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement[J]. *J Periodontol*, 2000, 71(1): 8-13.
- [7] KU J K, UM I W, JUN M K, et al. Dentin-derived-barrier membrane in guided bone regeneration: a case report[J]. *Materials*, 2021, 14(9): 2166.
- [8] LINDNER C, ALKILDANI S, STOJANOVIC S, et al. *In vivo* biocompatibility analysis of a novel barrier membrane based on bovine dermis-derived collagen for guided bone regeneration (GBR) [J]. *Membranes*, 2022, 12(4): 378.
- [9] VERMA N K, KAR A K, SINGH A, et al. Control release of adenosine potentiate osteogenic differentiation within a bone integrative EGCG-g-NOCC/collagen composite scaffold toward guided bone regeneration in a critical-sized calvarial defect [J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22(7): 3069-3083.
- [10] ARPITHA M, TEWARI S, SANGWAN, et al. Efficacy of mixture of injectable-platelet-rich fibrin and type-1 collagen particles on the closure of through-and-through periapical bone defects: a randomized controlled trial[J]. *Int Endod J*, 2023, 56(10): 1197-1211.
- [11] 闵少雄, 靳安民, 童斌辉, 等. 不同孔径的PDLLA/HA填充材料修复长骨缺损实验研究[J]. *骨与关节损伤杂志*, 2003, 18(8): 542-545.
- [12] JUNG O, HESSE B, STOJANOVIC S, et al. Biocompatibility analyses of HF-passivated magnesium screws for guided bone regeneration (GBR) [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12567.
- [13] KIM K, SU Y C, KUCINE A J, et al. Guided bone regeneration using barrier membrane in dental applications[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2023, 9(10): 5457-5478.
- [14] NIU H Y, MA Y F, WU G Y, et al. Multicellularity-interweaved bone regeneration of BMP-2-loaded scaffold with orchestrated kinetics of resorption and osteogenesis[J]. *Biomaterials*, 2019, 216: 119216.
- [15] ULLAH I, HUSSAIN Z, ULLAH S, et al. An osteogenic, antibacterial, and anti-inflammatory nanocomposite hydrogel platform to accelerate bone reconstruction[J]. *J Mater Chem B*, 2023, 11(25): 5830-5845.