

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.12.002

文章编号: 1005-8982(2018)12-0012-05

不同抗菌涂层对种植体周围炎 骨吸收影响的动物研究

王晓婧, 乔梦婷

(1. 北京大学第三医院 口腔科, 北京 100091; 2. 中国医科大学航空总医院
口腔修复科, 北京 100012)

摘要: 目的 通过动物体内实验评估钛种植体表面不同的抗菌涂层对种植体周围炎的影响。**方法** 30枚纯钛棒随机分为3组并进行相应处理: 银电沉积处理(Ti-Ag), 硅烷化处理(Ti-Si), 未进行处理(Ti)。将30颗种植体随机植入5只比格犬下颌前磨牙区(每只6颗种植体), 并进行种植体颈部结扎并引入牙周致病菌, 诱导实验性种植体周围炎。种植体周围炎诱导2个月后, 对比格犬进行临床和影像学检查, 包括临床指标检测(菌斑指数、改良龈沟出血指数、探诊深度、牙龈指数、种植体松动度)、X射线检查、组织学分析, 并进行定量分析。**结果** 种植体周围炎诱导2个月后, Ti-Ag和Ti-Si组种植体周围黏膜有轻到中度水肿, 叩诊声音清脆, 无松动; Ti组种植体周围黏膜明显水肿, 甚至出现破溃、脓液溢出, 叩诊声音浑浊, 个别种植体临床可见松动。Ti-Ag和Ti-Si组各临床检查指标优于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而Ti-Ag和Ti-Si组各检验指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。X射线结果显示, Ti-Ag和Ti-Si组种植体周围骨无吸收, 骨密度均匀致密; 对照组周围牙槽骨呈垂直吸收, 种植体与骨组织间可见透射状影像, 其骨吸收量小于Ti-Ag和Ti-Si组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。组织学染色见Ti-Ag和Ti-Si组较对照组具有更好的骨结合, 骨-种植体接触率小于对照组($P < 0.05$)。**结论** Ti-Ag和Ti-Si抗菌涂层表面处理可以减少种植体周围炎引起的骨吸收。

关键词: 抗菌涂层; 钛种植体; 种植体周围炎; 骨吸收

中图分类号: R783.6

文献标识码: A

Animal experimental study on effect of different antibacterial coatings on absorption of peri-implant inflammation

Xiao-jing Wang, Meng-ting Qiao

(1. Department of Stomatology, Peking University Third Hospital, Beijing 100091, China; 2. Department of Prosthodontics, General Hospital of China Aviation, China Medical University, Beijing 100012, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-inflammatory effect of different antibacterial material coated on dental implants in animal model of peri-implant inflammation. **Methods** A total of 30 titanium rods were randomly divided into 3 groups based on material coated on the rod surface: silver electrodeposition (Ti-Ag group), silanization treatment (Ti-Si group) and non-coated rods (control group). Six dental implants were inserted in the mandibular premolar sites of beagle dog ($n = 5$). Peri-implantitis was initiated by ligation at neck of the implant for 2 months. Identification of peri-implantitis was achieved by plaque index, modified sulcus bleeding index, probing depth, gingival index, mobility of implant, X-ray examination and histological analysis. **Results** Control group showed mucosa with severe edema (even ulcer or fester), dull percussion and implant loosening, which were significantly alleviated in both Ti-Ag and Ti-Si group. Clinical indexes mentioned above suggested that animals in Ti-Ag and Ti-Si

收稿日期: 2017-05-19

group experienced better recovery when compared with control group. No obvious dramatic difference was founded between Ti-Ag group and Ti-Si group ($P > 0.05$). X-ray showed no obvious bone resorption around implants in both Ti-Ag and Ti-Si groups while dogs in control group showed obvious vertical absorption of alveolar bone around implant indicated by obvious transmission between bone and implants. Histological staining indicated significantly improved osseointegration in Ti-Ag and Ti-Si groups compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Antibacterial Ti-Ag and Ti-Si coated rods reduce local inflammation and bone resorption in peri-implantitis.

Keywords: antibacterial coating; titanium implant; peri-implantitis; bone resorption

种植体周围炎是一种累及种植体周围软组织的慢性炎症性疾病, 主要特征是探诊出血以及渐进性的种植体周围骨吸收水平^[1]。如果未能及时治疗, 种植体周围炎可能会形成种植体周袋, 进而种植体松动, 甚至脱落, 最终导致种植失败。据报道, 种植体的周围炎的发生率大概是 10% ~ 45%^[2]。种植体周围炎的治疗原则是去除菌斑, 控制感染, 目前常规使用的治疗方法包括局部清创、药物或手术治疗等不能彻底预防和控制种植体周围炎的发生, 因此种植体周围炎仍然是长期困扰临床种植医生的术后并发症之一^[3]。

细菌生物膜在种植体周围炎的发生、发展中起决定性作用, 实际上, 种植体周围炎与牙周炎龈下菌斑的菌群类似^[4]。近年来, 许多学者开始关注并试图寻找一种合适的种植体表面涂料具有抑制种植体表面细菌定植的能力^[5-6]。银及其化合物具有良好的杀菌、消炎性能, 通过破坏 DNA 结构从而广谱抑制革兰阳性菌和革兰阴性菌的生长, 适当剂量下未观察到无细胞毒性^[7-8]。硅烷偶联剂由于其无毒性、无污染、适用范围广泛、对有机涂层黏结性能优异等优点逐步受到国内外学者的关注, 目前已经发现在体外实验中钛表面进行硅烷化处理可以减少细菌黏附和生物膜的形成^[9]。本实验拟采用未处理的 Ti 种植体、Ti-Ag 种植体 (镀银处理)、Ti-Si 种植体 (表面硅烷膜) 观察在体内不同的抗菌涂层对种植体周围炎骨吸收的影响。

1 材料与方法

1.1 种植体表面涂层制取与检测

30 枚圆柱状医用级纯钛棒 (直径 3.5 mm, 长度 8 mm) (购自格瑞集团宝鸡分公司), 随机分为 3 组。Ti-Ag 组: 银电沉积处理; Ti-Si 组: 硅烷化处理; Ti 组: 未进行处理 (对照组)。镀银处理主要是利用电化学沉积 (electrochemically deposition) 的阴极沉积法, 通过还原硝酸银制得纳米银胶体溶液, 通过电沉积在纯钛表面制备纳米亚晶状银的涂层材料。硅烷化处理首先对纯钛表面进行碱洗处理, 再通过 KH-550 硅烷偶

联剂进行硅烷化改性处理从而在表面构建过渡层^[10]。

1.2 动物准备与手术过程

雄性 Beagle 纯种犬 30 只, 2 岁龄, 牙周健康, 体重 10 ~ 13 kg (购自陕西省西安市迪乐普比格犬实验动物中心基地), 确认所有动物下颌骨无明显异常, 无明显咬合创伤, 无病毒或真菌感染, 无系统性疾病。种植体植入过程大致如下: 术前禁食 12 h 后肢肌内注射 30 g/L 戊巴比妥钠 (1 ml/kg) 全身麻醉, 消毒固定, 拔除下颌双侧前磨牙并保护牙槽窝周围骨壁的完整性, 翻瓣并随机植入 6 枚种植体, 初期稳定性 35 Nm。共植入 30 枚种植体, 其中 10 枚 Ti-Ag 种植体, 10 枚 Ti-Si 种植体, 10 枚 Ti 种植体 (对照组)。缝合创口, 并用 4-0 丝线在种植体颈部进行结扎, 压入龈沟内, 并高糖软食喂养诱导种植体周围炎模型。

1.3 临床指标检测

种植体周围炎诱导 2 个月后, 检测临床指标检测包括菌斑指数 (plaque index, PI), 改良龈沟出血指数 (modified sulcus bleeding index, mSBI), 探诊深度 (probing depth, PD), 牙龈指数 (Gingival index, GI), 种植体松动度 (mobility, MOB)^[11-12]。

临床指标评价标准。① PI: 0 为无菌斑; 1: 探针尖轻划过种植体表面可见菌斑; 2: 肉眼可见菌斑; 3: 大量软垢。② mSBI: 探诊种植体周围软组织边缘发现: 0 为没有出血点, 1 为可见个别出血点, 2 为软组织边缘呈线状出血, 3 重度出血或自发出血。③ PD: 以 0.2 N 的力 (约 20 g) 探测龈缘到牙周袋底的距离 (mm)。④ GI: 0 为正常牙龈; 1 为牙龈略有水肿, 探针不出血; 2 为牙龈水肿, 探针探之出血; 3 自发出血或溃疡形成。⑤ MOB: 按照 Periotest 动度仪说明书操作, 手柄垂直于种植体颊舌向放置, 数值范围 -8 ~ 50, 其中 -8 ~ +9 为生理动度, 数值越大松动度越大。

1.4 影像学检查

术后种植体周围炎诱导 2 个月后, 对所有种植体拍摄根尖 X 射线片, 观察种植体周围的骨质情况。使

用图像分析软件 (Image J), 以种植体基台水平作为参考点进行校准, 测量每个种植体的骨吸收水平并取平均值。

1.5 抗拔实验 (pull-out test)

制取生物力学实验标本: 修整种植体周围牙槽骨, 使种植体高出骨面 2 mm, 使用自凝塑料包埋种植体-骨块, 置于微机控制电子万能力学实验机上 (CMT4000, 位移分辨率 $0.03 \mu\text{m}$), 以 1 mm/min 速度拉出测试, 记录种植体开始松动时的最大载荷值, 并计算种植体-骨界面结合强度值 (σ), 计算公式为 $\sigma = P / (\pi dh)$, 其中 P 为种植体开始松动时的最大载荷值 (N); d 为种植体的直径 (mm); h 为种植体在骨内的长度 (mm)。

1.6 组织学分析

制备种植体-骨标本的组织切片, 大致步骤如下: 4% 多聚甲醛固定, 酒精脱水, 二甲苯透明, 渗透液浸泡, 包埋, 聚合, 置入 -20°C 冰箱冷冻后切片, 进行 Goldner's Trichrome 染色^[13]。

倒置相差显微镜下观察组织切片, 放大 100 倍拍照。使用图像分析软件 (Image J) 进行定量分析, 计算

骨-种植体接触率 (Bone-Implant Contact, BIC%) = 骨组织直接接触的种植体表面积 / 种植体可利用的表面积 $\times 100\%$ 。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 两两比较用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 种植体的临床检查情况

种植体周围炎诱导 2 个月后, 所有实验犬身体及精神状态良好, 进食正常。口内可见所有种植体均在原位, 无一脱落。Ti-Ag 和 Ti-Si 组仅可见种植体周围黏膜有轻到中度水肿, 叩诊声音清脆, 无松动; 对照组种植体周围黏膜水肿, 甚至出现破溃、脓液溢出, 叩诊声音浑浊, 个别种植体临床可见松动。

对口内各个种植体进行临床指标检测, 结果可见 Ti-Ag 和 Ti-Si 组各检查指标 (PI、mSBI、PD、GI、MOB) 优于对照组, 差异有统计学意义, 而 Ti-Ag 和 Ti-Si 组间各检验指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组临床指标检测结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PI	mSBI	PD/mm	GI	MOB
Ti-Ag 组	$1.923 \pm 0.531^\dagger$	$1.314 \pm 0.223^\dagger$	$3.653 \pm 0.362^\dagger$	$1.303 \pm 0.409^\dagger$	$-1.881 \pm 0.577^\dagger$
Ti-Si 组	$1.918 \pm 0.472^\dagger$	$1.295 \pm 0.230^\dagger$	$3.301 \pm 0.360^\dagger$	$1.351 \pm 0.427^\dagger$	$-1.746 \pm 0.463^\dagger$
对照组	2.928 ± 0.463	2.780 ± 0.332	4.598 ± 0.411	2.760 ± 0.310	5.653 ± 0.441
F 值	10.713	12.563	6.428	12.423	15.968
P 值	0.004	0.001	0.023	0.001	0.001

注: \dagger 与对照组比较, $P < 0.05$

2.2 X 射线检查结果及定量分析

种植体周围炎诱导 2 个月后, 可见 Ti-Ag 和 Ti-Si 组种植体周围骨密度无吸收, 骨密度均匀致密; 而对照组 X 射线结果显示周围牙槽骨呈垂直吸收, 种植体与骨组织间可见透射状影像, 见图 1。对 X 射线结果进行定量分析, 结果可见对照组的骨吸收量小于 Ti-Ag 和 Ti-Si 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 两实验组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 Pull-out test 结果

通过 pull-out test 测量各组种植体-骨界面结合强度结果见表 3。经统计分析显示, Ti-Ag 和 Ti-Si 组的种植体-骨界面结合强度值分别为 (2.460 ± 0.577)

和 (2.772 ± 0.613) MPa, 两者之间的种植体-骨结合强度差异无统计学意义, 而对照组 (1.841 ± 0.542 MPa) 的种植体-骨结合强度却低于其余两组 ($P < 0.01$)。

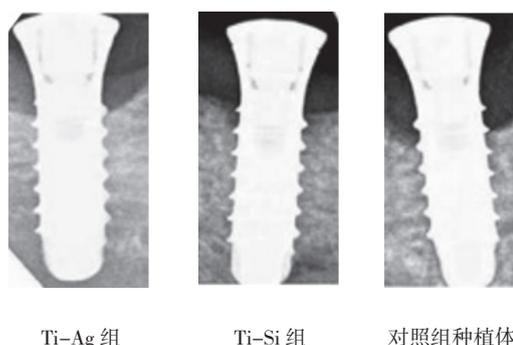


图 1 3 组种植体 X 射线结果

表 2 各组 X 射线骨吸收量的比较 (mm, $\bar{x} \pm s$)

组别	骨吸收量	F 值	P 值
Ti-Ag	1.943 ± 0.302 [†]	7.572	0.018
Ti-Si	1.867 ± 0.234 [†]		
对照组	3.129 ± 0.461		

注: † 与对照组比较, $P < 0.05$

表 3 各组种植体-骨界面结合强度值的比较 (MPa, $\bar{x} \pm s$)

组别	种植体-骨界面结合强度	F 值	P 值
Ti-Ag	2.460 ± 0.577 [†]	9.884	0.006
Ti-Si	2.772 ± 0.613 [†]		
对照组	1.841 ± 0.542		

注: † 与对照组比较, $P < 0.01$

2.4 组织学结果

种植体周围炎诱导 2 个月后, 制备种植体-骨标本的组织切片, Goldner's Trichrome 染色结果见图 2。可见 Ti-Ag 和 Ti-Si 组较对照组具有更好的骨结合, 种植体周围被骨组织紧密包绕, 而对照组与周围骨组织结合较差, 可见大量纤维结缔组织充斥。

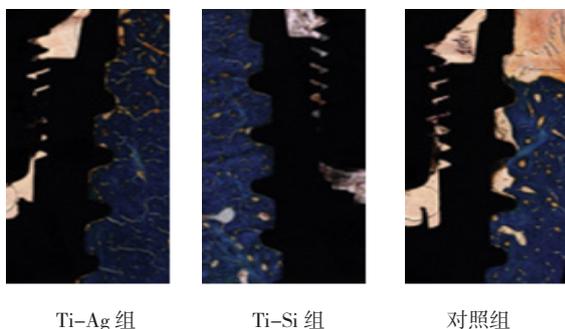


图 2 种植体-骨结合界面
(Goldner's Trichrome 染色 × 20)

通过组织形态学测量并计算 BIC, 可见 Ti-Ag 和 Ti-Si 组的 BIC 为 (64.713 ± 3.644)% 和 (58.511 ± 3.502)%, 两者差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而对照组 (30.657 ± 4.297)% 的 BIC 低于其余两组 ($P < 0.01$), 见表 4。

表 4 各组组织学切片骨吸收量的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	骨吸收量	F 值	P 值
Ti-Ag	64.713 ± 3.644 [†]	13.082	0.001
Ti-Si	58.511 ± 3.502 [†]		
对照组	30.657 ± 4.297		

注: † 与对照组比较, $P < 0.01$

3 讨论

自 1966 年 Branmark 教授揭示骨整合理论至今 40 余年间, 种植修复已成为治疗牙列缺损最常用的修复手段之一。种植牙具有与正常牙相似的结构, 可利用人工牙根进行上部支持, 具有咀嚼效率高、舒适美观以及无需损伤邻牙等多种优点^[14-15]。虽然据报道钛种植体的 10 年成功率已达 90% ~ 95%^[16], 但随着种植手术适应证的不断扩展和人们口腔要求的不断提高, 种植术后感染仍是口腔临床医生与研究学者不得不面对的重要问题。

有研究表明, 口腔内细菌黏附聚集在种植体表面, 并形成龈下菌斑是术后种植体周围感染的重要原因^[17-18]。由于种植体与骨之间没有牙周膜的保护, 导致种植体周围炎症迅速发展, 种植体和周围骨的结合遭到破坏, 造成持续的骨丧失并影响新骨的形成, 治疗不及时或不当可能会导致种植体脱落, 进而导致种植治疗的失败。传统的治疗方法是局部使用抗生素(如盐酸米诺环素、甲硝唑等), 但往往会出现药物持续时间难以控制、抗生素耐药性或者患者难以配合等问题。因此, 种植体抗菌涂层的出现赋予了钛种植体表面抗菌性能, 为抑制细菌生物膜、预防种植术后感染提供新的思路。

种植体涂层通过改变种植体表面微观形态和化学性质在种植体-骨结合过程中扮演了重要的角色。研究发现多种表面改性方法(如喷砂、酸蚀、碱热法、注入或高能辐射技术等)都能提高种植体稳定性和长期成功率^[19-20], 而抗菌特性的研究尚在初步阶段。本实验选择具有广谱抗菌效果的镀银涂层和新型表面处理工艺的硅烷膜涂层, 观察这两者在体内对种植体周围炎骨吸收的影响。前期有文献报道镀银处理与硅烷膜处理种植体在体外均能减少口腔生物膜的形成, 但体内对种植体周围炎骨吸收的影响尚不明确^[9, 21]。在本实验中, 未进行表面处理的纯钛种植体在丝线结扎 2 个月后出现一系列种植体周围炎的症状, 包括种植体周围黏膜水肿, 甚至破溃溢脓, 部分种植体出现松动。而 Ti-Ag 和 Ti-Si 组种植体术后愈合良好, 黏膜轻度水肿, 未见松动, 组织学染色可见种植体周围组织紧密包绕。由此可以判断, 两种抗菌涂层可以预防并改善种植术后早期感染所致炎症。并且 Ti-Ag 和 Ti-Si 组种植体临床检查指标优于对照组, X 射线拍摄、Pull-out 实验和组织学染色同样也得到了一致的结果, 可见 Ti-Ag 和 Ti-Si 组的骨结合力优于对照组。

虽然镀银材料的抗菌性能广为受到认可，但其可能的毒性问题仍然需要得到重视：研究发现当释放出的银离子质量分数较大时，出现明显的细胞毒性^[22-23]。因此，本课题组下一步拟检测载银抗菌涂层植入体内后银离子的释放与溶解情况。另一方面，硅烷分子是具有两种不同的反应性基团的特殊分子，将金属钛通过硅烷分子的活性氨基基团与生物骨组织连接起来，同时还改善材料的生物相容性，从单纯的机械锁合转变形成良好的钛-组织界面^[24]，可见硅烷膜是一种极有前途的种植体抗菌涂层。

综上所述，Ti-Ag 和 Ti-Si 抗菌涂层表面处理均可以减少种植体周围炎引起的骨吸收，对术后早期感染的预防效果好，具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] ALGRAFFEE H, BORUMANDI F, CASCARINI L. Peri-implantitis[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2012, 50(8): 689-694.
- [2] de WAAL Y C, van WINKELHOFF A J, MEIJER H J, et al. Differences in peri-implant conditions between fully and partially edentulous subjects: a systematic review[J]. J Clin Periodontol, 2013, 40(3): 266-286.
- [3] BERGLUNDH T, ZITZMANN N U, DONATI M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions[J]. J Clin Periodontol, 2011, 38(S11): 188-202.
- [4] 贡晶觉, 焦婷. 抗菌剂治疗种植体周围炎的研究进展[J]. 口腔医学, 2016, 36(5): 462-466.
- [5] 翁升欣, 赵旭, 关岳锋, 等. 口腔种植体抗菌涂层材料研究进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2016, 9(1): 49-53.
- [6] 张玉梅. 浅谈钛种植体抗菌涂层[J]. 口腔材料器械杂志, 2012, 21(2): 61-64.
- [7] 冯玉霞, 邱宜农. 钛种植体表面载银抗菌涂层研究进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2015, 8(12): 747-750.
- [8] FIELDING G A, ROY M, BANDYOPADHYAY A, et al. Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings[J]. Acta Biomater, 2012, 8(8): 3144-3152.
- [9] GODOY-GALLARDO M, GUILLEM-MARTI J, SEVILLA P, et al. Anhydride-functional silane immobilized onto titanium surfaces induces osteoblast cell differentiation and reduces bacterial adhesion and biofilm formation[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 59(2): 524-532.
- [10] 古丽巴努·依马木, 徐国强, 迪丽努尔·阿吉, 等. 硅烷偶联剂对纯钛表面改性及细胞相容性的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(12): 1864-1869.
- [11] 任慧芳, 高勃, 程义成, 等. 钛种植体表面新型抗菌涂层预防种植术后早期感染的动物实验研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2014, 30(3): 143-146.
- [12] 段妍, 李德华, 马威. 35 例种植体周围炎临床治疗效果观察[J]. 临床口腔医学杂志, 2010, 26(3): 164-166.
- [13] MANRESA C, BOSCH M, MANZANARES M C, et al. A new standardized-automatic method for bone-to-implant contact histomorphometric analysis based on backscattered scanning electron microscopy images[J]. Clin Oral Implants Res, 2014, 25(6): 702-706.
- [14] 侯丽萍, 李二红. 口腔种植牙修复牙列缺损的临床疗效分析[J]. 中国口腔种植学杂志, 2014, 19(4): 190-191.
- [15] 郭吕华, 王丽萍, 刘江峰, 等. 短种植体在上颌后牙区的临床应用[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(17): 88-90.
- [16] SIMONIS P, DUFOUR T, TENENBAUM H. Long-term implant survival and success: a 10-16-year follow-up of non-submerged dental implants[J]. Clin Oral Implants Res, 2010, 21(7): 772-777.
- [17] 郝宇飞, 何东宁. 种植体周围感染危险因素的研究进展[J]. 中国当代医药, 2016, 23(1): 17-19.
- [18] 刘中林, 彭澜, 王晖, 等. 盐酸米诺环素软膏在种植体周围感染中的应用效果及对炎症反应的控制作用研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(6): 1363-1365.
- [19] 王方辉, 张姗姗, 舒静媛, 等. 纯钛种植体表面改性对骨结合的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(52): 8491-8497.
- [20] 李旭东, 胡静. 种植体表面改性方案研究进展[J]. 临床口腔医学杂志, 2015, 31(10): 633-635.
- [21] GODOY-GALLARDO M, RODRIGUEZ-HERNANDEZ A G, DELGADO L M, et al. Silver deposition on titanium surface by electrochemical anodizing process reduces bacterial adhesion of Streptococcus sanguinis and Lactobacillus salivarius[J]. Clin Oral Implants Res, 2015, 26(10): 1170-1179.
- [22] TSUKAMOTO M, MIYAMOTO H, ANDO Y, et al. Acute and subacute toxicity in vivo of thermal-sprayed silver containing hydroxyapatite coating in rat tibia[J]. Biomed Res Int, 2014(2014): 902343.
- [23] 冯玉霞, 邱宜农. 钛种植体表面载银抗菌涂层研究进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2015, 8(12): 747-750.
- [24] 宁成云, 刘绪建, 郑华德, 等. 硅烷偶联剂对纯钛表面改性的研究[J]. 稀有金属材料与工程, 2009, 38(11): 2017-2019.

(王荣兵 编辑)