

# 含种植体硬组织骨计量学不脱钙塑料包埋技术\*

郭泽鸿 容明灯 朱安棣 周磊

广东省口腔医院, 南方医科大学附属口腔医院 (广州 510280)

**【摘要】**目的 探讨含种植体硬组织骨计量学研究采用不脱钙塑料包埋技术的运用技巧与优点。方法 选取含钛种植体骨组织块, 采用甲基丙烯酸甲酯进行塑料包埋, 包埋后经 Leica SP1600硬组织切片机切锯成 200 μm 厚切片, 手工磨至 70 μm, 染色后进行观察。结果 制成切片在显微镜下观察钛种植体与骨组织界面, 可见到界面及其周围骨组织矿化过程, 种植体骨结合良好, 其周围新骨荧光双色标记间距为 (9.4 ± 0.61) μm。结论 塑料包埋技术适用于不脱钙硬组织包埋, 制作含金属硬组织切片, 可以广泛应用于含金属硬组织的组织形态学研究和口腔种植体的骨整合界面研究。

**【关键词】** 塑料包埋 组织形态学 种植体 骨整合 骨计量学

种植体植入材料研究通常需要通过制作含金属骨组织切片, 观察植入金属与组织的界面的结合情况。由于生物体硬组织中含有大量无机钙盐, 坚硬易碎, 制作切片时金属与组织容易脱离, 导致切片制作失败。常规骨组织切片制作一般有脱钙法和不脱钙法, 由于脱钙后组织软化及骨组织细微结构改变, 影响含金属-骨组织界面的观察, 所以含金属硬组织一般采用不脱钙塑料包埋。本实验采用甲基丙烯酸甲酯 (MMA) 进行塑料包埋, 通过 Leica SP1600硬组织切片机制作切片观察, 探讨采用甲基丙烯酸甲酯对含种植体硬组织进行塑料包埋的应用方法及优点。

## 1 材料与方法

1.1 不脱钙带金属骨块切片制作方法 选取含金属种植体的新西兰兔胫骨组织, 动物处死前第 13 和 14 天连续两天皮下注射四环素, 处死前第 3 和第 4 天皮下注射钙黄绿素, 进行双色荧光标记。根据标本大小切割成大小为 1.0 cm × 1.0 cm × 1.2 cm 的组织块, 将含种植体骨标本置于 10% 福尔马林液在 4℃ 下固定 24 h 备用。也可以先采用甲醛、甲醇和蒸馏水以 1:1:1.5 (V/V) 的比例混合后进行血管灌注固定再采取骨标本<sup>[1]</sup>。本研究采用前者方法。

1.2 脱水与浸泡 固定后标本先采用不同浓度梯度的酒精进行脱水<sup>[2]</sup>, 再以三氯甲烷进行浸泡。脱水后将标本置于浸泡液中浸泡, 浸泡液需当天新鲜配制, 浸泡过程均在 4℃ 中进行。浸泡液中甲基丙烯酸甲酯与邻苯二甲酸二丁酯按表 1 方法<sup>[3]</sup>配制。依次浸泡标本各 2 d, 每天抽真空 2 h。

1.3 包埋聚合 配制包埋剂方法<sup>[4]</sup> 去除成品甲基丙烯酸甲酯中的阻聚剂, 将 1:1 成品甲基丙烯酸甲酯和 5% 的氢氧化钠加入分液漏斗, 充分震荡, 静止分层

表 1 浸泡流程

浸泡液	成分	配制含量	磁力搅拌时间
浸泡液	甲基丙烯酸甲酯	95 ml	2h
	邻苯二甲酸二丁酯	5 ml	
浸泡液	甲基丙烯酸甲酯	95 ml	4 h
	邻苯二甲酸二丁酯	5 ml	
	过氧化苯甲酰	1.5 g	
浸泡液	甲基丙烯酸甲酯	95 ml	4 h
	邻苯二甲酸二丁酯	5 ml	
	过氧化苯甲酰	4.5 g	

后漏弃下层液体, 反复 3 次, 再用蒸馏水以同样方法洗 3 次, 去除液体中氢氧化钠。然后往分液漏斗加无水氯化钙, 震荡混合数分钟, 吸除水份, 滤纸过滤去除氯化钙。上层滤液收集于瓶中, 在 -4℃ 冰箱中保存备用。取去除阻聚剂的甲基丙烯酸甲酯 (单体) 95 ml, 邻苯二甲酸二丁酯 5 ml, 无水过氧化苯甲酰 4.0 g 放入宽口耐热塑料瓶中, 放入磁力转子, 置于热水杯中水浴恒温加热, 恒温保持在 50℃, 置于磁力搅拌器搅拌 2 h。注意液体温度不要过高, 观察液体状态, 出现气泡应该采取降温措施, 可浸于冷水中不断搅拌, 或加入凉的单体。煮过后待液体完全降温, 贴上标签置于 -4℃ 冰箱中保存备用。将备好的标本置于底平、壁薄、干洁和大小适宜的玻璃瓶内, 并标记编号。加入包埋剂后盖上胶盖, 在胶盖插上针头以便排气。继而连续抽真空 2 h, 置于 37℃ 水浴恒温箱 2~3 d, 取出包埋组织块即可做切片。

1.4 切片制作 包埋后塑料部分均匀透明, 可以清楚地观察到塑料内样本, 定位简单方便, 也可通过 X 线定位。将定位好的标本固定在 Leica SP1600 硬组织切片机的圆形样本紧固装置上进行锯切, 切成厚度大约为 200~250 μm 左右, 然后采用碳化硅耐水砂将薄片依次从 500 目、800 目、1 000 目磨至 1 200 目, 磨片后切片厚度磨至 70 μm 左右, 经亚甲基蓝-酸性品红染色<sup>[1]</sup>后显微镜观察。

\* 广东省科技三项经费计划项目 (编号: 2006B19901006; 2006B35801001)

通讯作者。电话: 020 - 84233801; 传真: 020 - 84433177; E-mail: Zho668@263.net

1.5 统计学方法 计量数据采用 t 检验。

2 结果

2.1 含种植体硬组织骨不脱钙塑料包埋结果 含金属骨组织被塑料坚实均匀包埋,塑料为透明状,可以直接透过塑料层清晰观察包埋物,切锯定位简单准确。制成磨片厚薄均匀,约 70 μm,染色效果较好。切片中骨组织与金界面清楚,磨片过程金属无脱落。显微镜下观察骨质的矿化程度、金属种植体与骨组织机械锁结,骨组织与金属的接触面积等如图 1,2。

2.2 四环素 - 钙黄绿素双色荧光标记示踪观察 近种植体处可见四环素条带粗大荧光强度较强,钙黄绿素条带与四环素条带间隔较大。荧光显微镜下可清晰观察骨 - 种植体界面的骨质生长过程,如图 3 所示,新骨先沉积于种植体表面再向外生长,说明种植体具有很好的生物相容性和骨传导性。通过测量荧光带可以计算其矿化速率如表 2,两组间差异具有统计学意义 (P < 0.01),说明靠近种植体区新骨矿化较快。

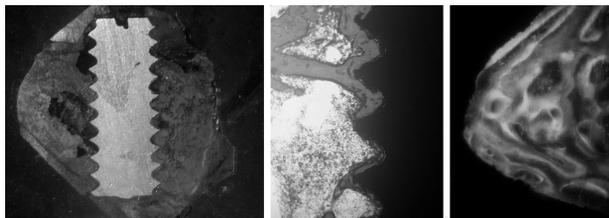


图 1 切片中骨组织与金属界面 (低倍镜下染色后磨片) 图 2 切片中骨组织与金属界面 (5 × 10 倍光镜下) 图 3 四环素 - 钙黄绿素双色荧光标记示踪观察骨 - 种植体界面的骨质生长 (20 × 10 倍荧光镜下)

表 2 四环素 - 钙黄绿素双色荧光标记平均间距及其平均矿化速率骨计量学比较  $\bar{x} \pm s$

新骨位置	间隔时间 (d)	双色荧光 标间距 (μm)	平均矿化 速率 (μm/d)
近种植体区	10	9.4 ± 0.61	0.94 ± 0.11
远种植体区	10	5.8 ± 0.65	0.58 ± 0.14

3 讨论

随着包埋材料、切片机和特殊切割系统的发展,制作不脱钙组织切片的技术已经逐渐成熟。DONATH 等<sup>[5]</sup>首先描述了采用 EXAKT 切磨系统,制作不脱钙含金属骨切片的切磨技术,把乙二醇甲基丙烯酸酯 (GMA) 作为包埋介质,使异丁烯酸和甲基丙烯酸发生聚合反应,并成功完成塑料包埋,但是反应中酶的活性和蛋白的抗原性都发生了变化。随着新一代甲基丙烯酸甲酯 (MMA) 的出现,包埋反应允许在较低温度进行聚合,聚合温度可以低于 20。低温反应,能保持了酶的活性和蛋白的抗原性,使免疫组织化学研究成为了可能<sup>[6]</sup>。MMA 还用于骨髓活检样本包埋,包埋后骨髓组织形态学结构保存完好,且免疫细胞化学检测可靠,能够证明药物治疗后骨髓细胞的再生。

由于采用甲基丙烯酸甲酯包埋制作不脱钙骨切片,能够较好的保持组织的酶活性、蛋白质抗原性和骨组织的细微结构,尤其是能成功配合重型切片机制作不脱钙含金属种植体骨组织切片,塑料包埋技术也被越来越广泛地应用于含金属硬组织的组织形态学研究。

实验配制包埋液过程中,我们发现水浴加热温度不宜过高,当温度达 80 左右时,包埋液出现不稳定,降温不及时,塑料过度反应容易发酵形成泡沫,安全温度应稳定在 50 左右。室温放置包埋液不宜超过 24 h,否则聚合反应散温不充分会形成泡沫塑料。包埋聚合时,如果样本需要作免疫组织化学研究,反应温度应该在较低的温度中进行,保护酶的活性和蛋白的抗原性。采用 Leica SP1600 硬组织切片机切锯含金属标本,速度不宜过快,冷却要充分,厚度应大于 100 μm,否则切片容易卷曲。根据需要,磨片可以磨至 10 μm 以便观察细微结构,切片如果含金属则不宜低于 30 μm,否则容易破坏金属 - 骨界面。

通过切片观察我们发现种植体具有良好的生物相容性和骨引导性,种植体骨界面形成种植体 - 骨结合。通过四环素 - 钙黄绿素双色荧光标记发现,近种植体区荧光条带间隔比远种植体区较宽,说明近种植体位置骨改建比远离种植体区骨改建活跃,新骨形成较多。从荧光示踪还发现骨组织从种植体表面开始向其周围生长,说明该种植体具有十分良好的骨引导作用。

采用甲基丙烯酸甲酯塑料包埋技术对含金属硬组织进行包埋,包埋液充分渗透进入骨组织,聚合塑化后透明坚硬,制作切片过程金属与组织结合良好,不易脱离。能解决含金属硬组织不脱钙切片的制作,此方法可以广泛应用于硬组织的组织形态学研究和口腔种植体 - 骨整合界面的研究。

参考文献

- [1] MANIATOPOULOS C, RODRIGUEZ A, DEPORTER D A, et al An improved method for preparing histological sections of metallic implants[J]. Jnt J Oral Maxillofac Implants, 1986, 1(1): 31 - 37.
- [2] 李青南. 骨质疏松实验动物研究 - 骨组织形态计量学 [M]. 四川大学出版社, 2001: 30.
- [3] 王东胜. 带种植体骨磨片制作方法的改进 [J]. 口腔颌面修复学杂志, 2006, 7(3): 169 - 170.
- [4] 吴哲, 马冬丽, 洪丽华, 等. 不脱钙的牙齿骨骼塑料包埋制片技术及方法探讨 [J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(6): 564 - 465.
- [5] DONATH K, BREUNER G A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues The Sage - Schliiff (sawing and grinding) technique [J]. J Oral Pathol, 1982, 11: 318 - 326.
- [6] YANG R, DAVIES C M, ARCHER C W, et al Immunohistochemistry of matrix markers in technovit 9100 new embedded undecalcified bone sections [J]. Eur Cell Mat, 2003, 6: 57 - 71.

(收稿日期: 2007 - 09 - 20 编辑: 王冰)