

骨结合过程中种植体周血管时空分布的观测研究

高思勇¹ 郭彦君² 陈晖璐³ 邓飞龙¹ 宫革² 王天璐¹

¹中山大学附属口腔医院, 光华口腔医学院, 广东省口腔医学重点实验室, 广东省口腔疾病临床医学研究中心, 广州 510055; ²四川大学华西口腔医院, 口腔疾病研究国家重点实验室, 国家口腔疾病临床研究中心, 成都 610041; ³南方医科大学口腔医院(口腔医学院)牙周种植科, 广州 510280

通信作者: 王天璐, Email: wangtlu3@mail.sysu.edu.cn

【摘要】目的 探讨构建一种观测小鼠股骨种植体周围骨血管的改良方法, 并分析局部血管在种植体周围骨愈合过程中时空变化规律。**方法** 对C57BL/6小鼠双侧股骨进行血管阻射剂灌注, 并应用显微计算机断层扫描(Micro-CT)技术对种植体周围血管进行扫描, 定量分析三维血管结构与分布的相关参数。其中左侧股骨干骺端在灌注前作种植体骨结合模型(灌注实验组), 右侧股骨干骺端未行手术(空白对照组)。同步术后观察时间点1、3、7和14 d, 采用组织学检测作为Micro-CT结合血管灌注改良观测方法的验证(组织学对照组)。通过空白对照组排除各时间点样本原始血管的差异, 采用单因素方差分析结合Turkey's法对灌注实验组进行各时间点之间种植体周围血管数据参数的比较。**结果** 通过采用推出种植体的脱钙骨组织样本、筛选扫描重建参数的改良Micro-CT结合血管灌注方法, 发现相较于空白对照组, 灌注实验组种植体周围血管的血管总体积、血管体积分数及血管管径在术后7 d均较术后1、3和14 d有统计学差异。其中, 术后7 d的血管体积($F=14.340, P_{1,d}<0.001, P_{3,d}=0.001$)、血管体积分数($F=16.230, P_{1,d}<0.001, P_{3,d}<0.001$)、血管管径($F=9.427, P_{1,d}=0.006, P_{3,d}=0.002$)显著高于术后1、3 d; 术后7 d的血管分支数量显著高于术后1 d($F=4.723, P=0.019$); 但术后14 d植体周围组织血管结构参数相较于术后7 d出现显著下降, 其中血管体积分数下降了58%($F=16.230, P=0.006$), 血管平均管径下降了35%($F=9.427, P=0.041$)。组织学对照组与灌注实验组观察结果趋势一致。**结论** 改良Micro-CT扫描重建结合血管灌注方法为观测种植体周围血管时空分布提供一种低成本可靠的途径; 种植体骨结合过程中种植体周围血管经历先增加再衰退的过程, 在术后1周的高峰期可形成侧支循环围绕种植体。

【关键词】 骨再生; 血管; 再生; X线显微体层摄影术

基金项目: 国家自然科学基金(81571008); 广东省基础与应用基础研究基金(2019A1515110024); 广州市科技计划(2023A04J2163)

引用著录格式: 高思勇, 郭彦君, 陈晖璐, 等. 骨结合过程中种植体周血管时空分布的观测研究[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2024, 18(1): 22-29.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2024.01.004

Spatio-temporal imaging and assessment of neovascularization in implant osseointegration via micro-computed tomography

Gao Siyong¹, Guo Yanjun², Chen Huilu³, Deng Feilong¹, Gong Ping², Wang Tianlu¹

¹Hospital of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangdong Provincial Clinical Research Center of Oral Diseases, Guangzhou 510055, China; ²State Key Laboratory of Oral Disease & National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; ³Department of Periodontics and Implantology, Stomatological Hospital, School of Stomatology, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: Wang Tianlu, Email: wangtlu3@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 Objectives To establish an evaluation model for peri-implant vasculature in the mouse

femur in order to analyze spatio-temporal dynamics of vasculature around implants using a feasible and reliable method. **Methods** C57BL/6 mouse femurs were performed vascular perfusion with radiopaque agents and then scanned by Micro-CT with particular scanning and reconstruction parameters to image and quantify angiogenesis around implants in the distal ends. The left femurs were assigned to the perfusion experiment group with transcortical defects ($\Phi 1$ mm) for implant placement, while the right femurs were assigned to the negative control group without implant surgery. Mice were sacrificed on Day 1, 3, 7 and 14 post-surgery. Histological examination was performed simultaneously for comparison as the positive control group. The baseline was confirmed not significant by comparisons between varied timepoints within the negative control group. The vascular parameters in the perfusion experiment group were analyzed by using One - Way ANOVA and the Turkey's test ($P < 0.05$). **Results** We proposed a modified method by managing decalcified samples with implants pushed-out before Micro-CT scanning and setting up low-pass Gaussian filter σ value and threshold. In contrast to the negative control group, there was significant difference between the peri-implant vasculature on Day 7 and the counterpart on Day 1 and Day 3 post-surgery. The peri-implant vasculature on Day 7 displayed higher vascular volume ($F = 14.340, P_{1,d} < 0.001, P_{3,d} = 0.001$), vascular volume fraction ($F = 16.230, P_{1,d} < 0.001, P_{3,d} < 0.001$) and vessel thickness ($F = 9.427, P_{1,d} = 0.006, P_{3,d} = 0.002$) compared with those on Day 1 and 3. The number of vessel branches was also larger on Day 7 compared with that on Day 1 ($F = 4.723, P = 0.019$). Meanwhile, peri-implant vasculature decreased significantly from Day 7 to Day 14 with a reduction of 58% on the vascular volume fraction ($F = 16.230, P = 0.006$) and 35% on the average vessel thickness ($F = 9.427, P = 0.041$). The histological observation was in accordance with the outcomes above. **Conclusions** We proposed a feasible and low-cost Micro-CT modified method for observing and quantitating three-dimensional dynamics of angiogenesis around implant. The dynamic variation of peri-implant vasculature was observed, that is, the vasculature first increased together with vasodilated and then decreased. At its peak, the branch grew into collateral vessels around titanium implants within 7 days post-surgery.

【Key words】 Bone regeneration; Blood vessels; Regeneration; X-ray microtomography

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81571008); Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2019A1515110024); Science and Technology Planning Project of Guangzhou(2023A04J2163)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2024.01.004

血管再生在钛种植体骨结合过程中发挥着至关重要的作用^[1-2]。目前二维组织学检测依然是研究骨内血管的常用方法^[3-4]。但其局限于二维观察不能反映出血管的连续性结构和空间分布,同时由于需要复杂的侵入、破坏性的操作,观察目标为离体样本,且不可重复使用。然而,越来越多研究指出,骨内血管网的三维空间结构与骨生理、病理进程密切相关^[5]。干细胞谱系和信号通路调节也可能受到血管与骨组织的三维交互作用的重要影响^[6]。因此,种植体周围血管化的过程需要扩展到时空层面分析^[7]。超分辨率电子显微镜也可一定程度上实现骨内血管的三维重建,但应用中受到光学透明度、样本制备技术成本高以及观测视野局限的限制^[8]。

近年来,显微计算机断层扫描(micro-computed tomography, Micro-CT)结合阻射剂造影(如Microfil[®])技术已经成为一种观察微观血管结构的强大技术,应用于缺血损伤再灌注、骨折愈合和骨组织发育和骨再生生物材料模型中,实现血管再生的可视化和定量

测量^[9-12]。然而,由于钛种植体周围存在金属伪影干扰,目前尚无在种植体周围血管再生观察的相关技术实施遵循指南。与此同时,现有研究少见对血管分支空间结构的定量分析。因此,本研究旨在通过改良Micro-CT应用方法,对种植体周围血管三维结构的时空变化规律进行观测,并采用组织学同步验证。

材料与方法

一、主要试剂与仪器

青霉素、Microfil[®](MV122, Flowtech, 美国)、含肝素钠(100 U/mL)的0.9%氯化钠溶液、4%多聚甲醛、抗CD31抗体(Abcam, 美国)等。高压蒸汽灭菌锅(SANYO, 日本)、电子天平(Sturorius, 美国)、-80℃低温冰箱(SANYO, 日本)、Micro-CT扫描机(SCANCO50, 瑞士)及重建分析站等。持针器和线剪等的外科手术器械盒、6-0缝线、低速手机、球钻、口腔用种植机(Osstem, 韩国)、恒速台式微量注射泵、Nikon Eclipse 80i显微镜(Nikon, 日本)、梯度脱

水机和石蜡切片包埋机等。

二、钛种植体

圆柱体钛合金种植体由四川大学国家生物材料工程研究中心制备提供,经过大颗粒酸蚀喷砂(sandblasted, large-grit, acid-etched, SLA)表面处理,无螺纹,直径1.0 mm、长度2.0 mm,经高压及紫外线消毒。

三、实验动物

8周龄雄性C57BL/6野生型小鼠采购自中山大学实验动物中心[SYXK(粤)2016-0112]。动物饲养条件及手术干预措施均已通过中山大学实验动物中心伦理委员会审核批准(SYSU-IACUC-2019-B1128)。

四、动物实验

1. 实验动物分组方法:随机数字表法选取16只小鼠,拟行全身血管灌注观察局部血管分布与结构,其中左侧股骨在灌注前行种植体植入手术(灌注实验组);右侧股骨在灌注前无手术干预(空白对照组)。以上实验动物分为4个种植术后观察时间点,每个时间点4只:(1)术后1 d;(2)术后3 d;(3)术后7 d;(4)术后14 d。同步另取4只小鼠,双侧股骨进行种植体植入,再以传统组织学方法观察血管分布及结构,作为组织学对照组。

2. 小鼠股骨远中端种植手术:本研究对灌注实验组和组织学对照组采用已多次报道的小鼠股骨种植模型^[13]。具体步骤如下:(1)经腹腔注射10%水合氯醛无菌溶液(0.3 mL/100 g)使小鼠麻醉;(2)将小鼠股骨远中端约1 cm²术区范围备皮,仰卧位固定,消毒术区。刀片在膝关节外侧作抵骨面的纵行切口,长约0.5 cm,钝性分离软组织,暴露股骨干骺端;(3)在与股骨远中关节头侧面垂直的方向,使用慢机和直径1.0 mm的球钻在远中端作一双面骨皮质联通的骨缺损,球钻备孔同期助手用0.9%氯化钠溶液持续冲洗冷却球钻;(4)使用有齿镊将钛种植体插入种植床中,确定初始稳固性并保证种植体在双层皮质骨可暴露;(5)在确认术区无显著异常后,使用6-0丝线分层复位缝合肌肉及表面皮肤,已达到一期愈合;(6)手术当天记录为第0天,术后每日观察小鼠伤口愈合情况和行动能力(图1)。

3. 血管阻射剂灌注实验:参考文献报道的小鼠全身灌注方法^[14],对灌注实验组和空白对照组小鼠进行血管阻射剂灌注,为血管造影准备标本。具体步骤如下:(1)使用腹腔注射麻醉后,小鼠仰卧位固定,由剑突软骨向肋骨下缘作一纵行皮肤切口分离表面

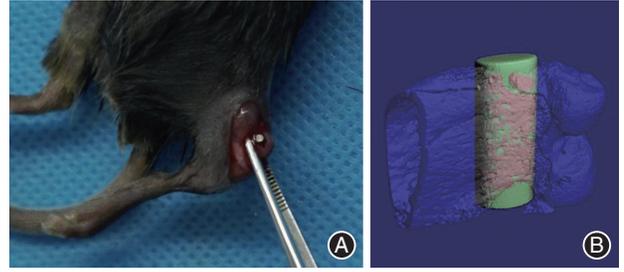


图1 C57BL/6野生型小鼠股骨干骺端钛棒植入 A:钛棒植入手术; B:植入手术后钛棒在股骨中位置示意图(粉色为钛棒与骨接触面积)。

皮肤,然后沿左右肋下缘向上作U型开口,翻开肋骨架,暴露心脏;(2)将连接注射泵的静脉注射针穿透左心室,然后剪开右心耳,体循环血液由右心耳处溢出,同时开启注射泵置换血液,依次灌注肝素化0.9%氯化钠溶液、4%多聚甲醛、阻射剂,每种灌注溶液用量10 mL,推注液体速率设置为2 mL/min;(3)根据小鼠尾巴摆动及四肢、肝脏颜色变化(Microfil®-MV122为黄色液体)确认灌注成功;(4)样本动物在4℃储存过夜后解剖获取股骨样本,股骨样本随后进行固定和10%乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙后,准备扫描(图2)。

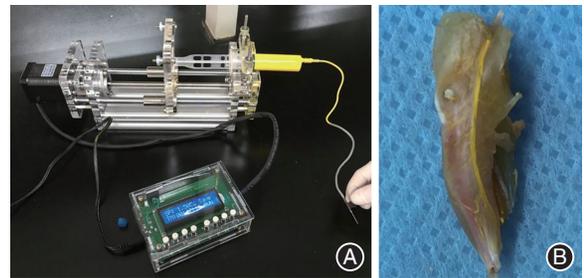


图2 C57BL/6野生型小鼠血管灌注准备与取样结果 A:血管灌注注射泵及Microfil®阻射剂(黄色); B:灌注后C57BL/6野生型小鼠股骨及周围软组织取样,可观察到钛棒位置及阻射剂分布。

五、检测方法

1. Micro-CT扫描成像:采用高分辨率Micro-CT对标本中脉管系统成像。扫描仪设置体素分辨率设置为高(5 μm)。先将未脱钙和脱钙标本直接进行扫描(按照种植体标本推荐参数设置为90 kV/200 μA),分别用于骨和血管的分析;再将含种植体的脱钙标本中的钛棒用探针沿钛棒长轴方向推出后扫描(按照常规组织样本推荐参数设置90 kV/88 μA),用于血管的分析。

2. Micro-CT结果定量分析:连续断层照片采用Feldkamp等改良的锥形束滤波反投影算法重建原始数据。使用低通Gaussian滤镜去除噪影,对X射线断层照片进行整体阈值处理和分割重建。随后以

直线距离变化方法的组织学分析应用于3D图像分析,量化骨结构和血管结构及分布参数。其中,分别检验同一样本的不同参数设置结果:根据文献报道 Gaussian 滤波的降噪参数 $\sigma=0.5$ 或 1.0 (support=1),血管分析阈值以X射线衰减分布设置为峰值75或80。然后,通过比对重建图像和Scanco Evaluation视图中的血管信号连续显影的方法,选取出统一的降噪和阈值参数。

含种植体样本的感兴趣区域(volume of interest, VOI)设置为松质骨内以种植体轴向为中心线、种植体表面以外 $300\ \mu\text{m}$ 半径的圆柱体区域,并定义为种植体周围区域。空白对照样本的VOI设置为干骨骺段。应用Scanco Evaluation软件和Bone J软件(Fiji)进行下列血管参数定量分析:(1)血管体积(VV):种植体周围血管阻射剂总体积;(2)血管体积分数(VVF):血管体积与种植体周围观测体积的比值;(3)血管直径(Ves. Th):阻射血管的平均直径,采用软件算法生成;(4)血管分支数量(Br. N)和(5)血管分支平均长度(Br. L):阻射血管的分支节点数量和平均长度,采用Fiji软件Bone J“Analyze skeleton”插件功能完成三维分支参数定量分析^[15]。

3. 苏木素-伊红染色:对组织学对照组小鼠股骨组织样本用10% EDTA脱钙4~6周,经过75%~100%乙醇的梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋;蜡块进行 $5\ \mu\text{m}$ 厚度切片, $42\ ^\circ\text{C}$ 温水展片,防脱载玻片捞片, $55\ ^\circ\text{C}$ 恒温箱中烘烤,然后置于二甲苯中脱蜡,浓度梯度乙醇水化;苏木素染色3 min、流水冲洗15 min返蓝、伊红染色3 min、75%乙醇溶液冲洗5 s后甩干、自然风干后中性树胶封片,正置显微镜下观察拔牙窝黏膜覆盖、肉芽组织生长及骨形成情况。

4. 免疫组织化学染色和计数:为观察种植体周围血管分布特征,对术后1、3、7和14 d获取的组织学对照组小鼠股骨标本的石蜡切片进行血管标记物CD31的免疫组织化学染色。具体为:将上述脱蜡水化后切片在3%过氧化氢溶液中避光放置20 min,封闭内源性过氧化物酶,微波炉法抗原修复;牛血清封闭,室温孵育20 min,CD31抗体孵育(一抗浓度:1:500) $37\ ^\circ\text{C}$ 1 h然后 $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜;次日, $37\ ^\circ\text{C}$ 复温,孵育二抗PBS洗后,滴加辣根过氧化物酶标记的链亲和素, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育30 min;滴加新鲜配制DAB显色液,镜下观察显色后自来水终止显色;苏木精复染细胞核,1%盐酸乙醇分色,水洗;0.6%氨水返蓝,水洗;脱水、透明、封片。

六、统计学处理方法

使用GraphPad Prism v6.0软件进行统计学分析。采用Bartlett检验确认各时间点数据之间的方差齐性,空白对照组、灌注实验组各自采用单因素方差分析结合Turkey's法进行各时间点之间种植体周围血管数据参数的两两比较。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、小鼠股骨内血管造影结果

经过Micro-CT重建空白对照组小鼠脱钙后股骨,其远中1/2段的主要血管分布如图3,由骨干部分的主要营养血管和干骺端与骨骺端的丰富血管网构成。空白对照组内,4个观察时间点之间的小鼠股骨干骨骺段(对侧种植体植入区域)相关血管参数之间差异均无统计学意义($P>0.05$),表明不同时间点分组的动物在种植干预前种植体植入区域血管分布差异无统计学意义。

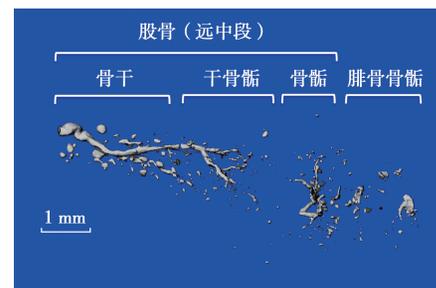


图3 显微计算机断层扫描(Micro-CT)显示小鼠股骨(远中1/2段)内主要血管分布 股骨远中段可依次区分为骨干、干骨骺、骨骺3段,其中干骨骺段为本实验钛种植体植入区域。

二、种植体周围组织扫描伪影干扰

实验灌注组小鼠样本中种植体金属伪影会对Micro-CT成像结果产生干扰(图4)。对未脱钙及脱钙种植体标本扫描后成像见图4A、4D,阈值识别骨组织和血管组织见图4B、4E。图4C、4F显示钛种植体金属表面伪影在阈值范围内均无法彻底去除,即会对种植体周围组织结构识别造成干扰。后续实验采用将钛种植体沿种植体长轴由探针轻轻推出脱钙股骨组织,定义为VOI,见图5。

三、降噪参数和阈值对血管重建的影响

随Gaussian滤波降噪参数 σ 增加,识别血管数目减少,血管连续性降低,但准确性增加(图6);随阈值升高,平均血管管径减小,其他血管成像的变化与降噪参数 σ 一致(图7)。

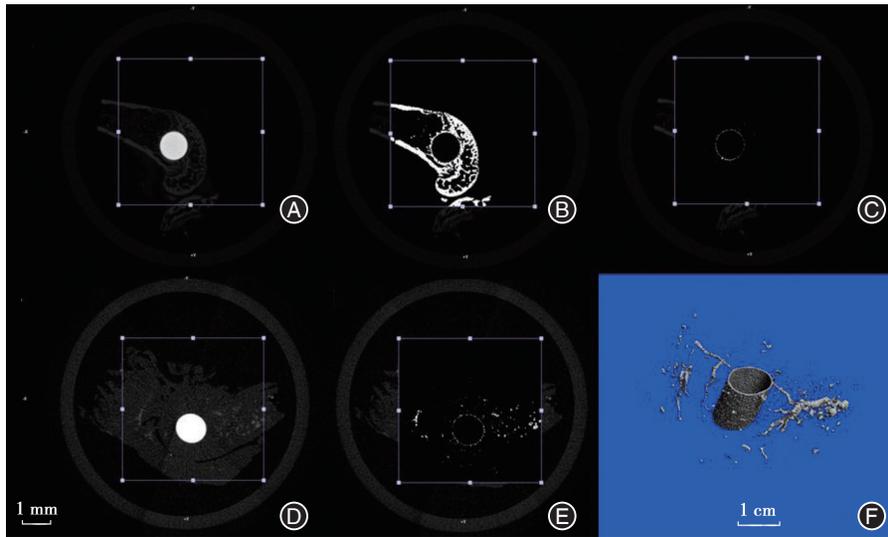


图4 骨内钛种植体金属伪影对显微计算机断层扫描(Micro-CT)成像小鼠股骨种植体周围血管结构的结果产生干扰 A:含钛种植体的不脱钙股骨标本扫描后成像;B:按照骨阈值定义后成像;C:阈值设置为0时,钛种植体边缘依然成像,验证金属伪影在全阈值域存在;D:含钛种植体的脱钙灌注标本扫描后成像;E:经血管阻射剂阈值定义成像;F:重建显示伪影形成钛种植体金属管状,并引起植体周围噪点。

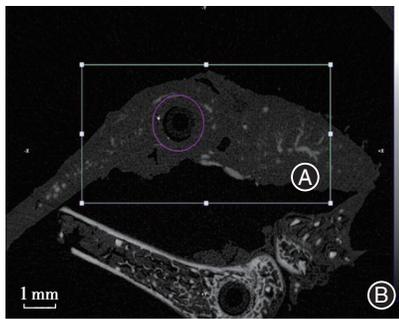


图5 小鼠股骨脱钙与未脱钙的钛种植体周围组织扫描分析界面设置 A:脱钙完成的C57BL/6小鼠股骨组织,可见血管造影成像,紫色圈标示定量分析区域,该区域被定义为种植体周围组织的感兴趣区域(VOI);B:未脱钙的C57BL/6小鼠股骨组织,高密度影像为血管或骨组织成像。

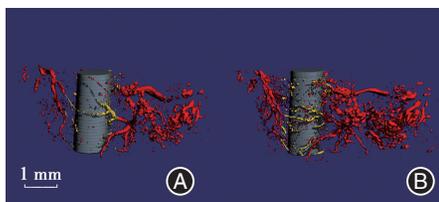


图6 不同Gaussian滤镜降噪参数对显微计算机断层扫描(Micro-CT)小鼠血管重建图像的影响 A: $\sigma=1, support=1$;B: $\sigma=0.5, support=1$ 。

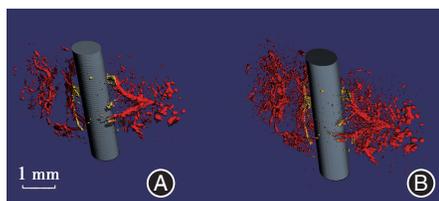


图7 不同阈值对显微计算机断层扫描(Micro-CT)小鼠血管重建图像的影响 A:阈值设置80;B:阈值设置75。

四、种植体周围血管动态变化

Micro-CT重建灌注实验组种植体周围血管和髓血窦(图8)显示,术后1 d干骺端端脉管系统显著减少,伴随血管壁通透性可能发生变化。术后3 d,该区域出现更多的新脉管系统,在种植体周围观察到新生侧支循环血管,且管径尺寸增加。术后7 d,种植体周围血管环绕趋势更明显且管径尺寸显著增加。术后14 d可见种植体周围组织内呈更微细的血管结构和更散在的分布,表明血管在区域内发生衰退。

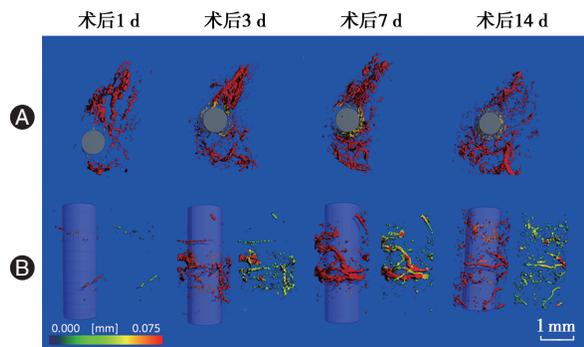


图8 显微计算机断层扫描(Micro-CT)定量分析灌注实验组小鼠不同时间点的种植体周围血管参数示意图 A:灌注实验组股骨植入钛棒的干骺端血管重建图;B:种植体周围组织(300 μm)血管重建图及彩色管径分布图。

进一步,对C57BL/6小鼠的种植体周围脉管系统的血管参数进行Micro-CT定量分析(表1、图9)。结果显示,各组样本观测的种植体周围目标区域体积无差异,除血管分支长度外,多数血管相关参数的变化趋势呈现为,术后7 d内先显著增加而后在

表1 灌注实验组小鼠各时间点股骨内种植体周围血管相关参数的定量结果比较($\bar{x} \pm s$)

时间点	样本量	总组织体积 TV(mm ³)	血管总体积 VV(mm ³)	血管体积分数 VVF(%)	血管平均管径 VesTh(μm^{-1})	分支数量 Br.N	分支平均长度 Br.L(μm)
术后1 d	4	4.00±0.27	0.005±0.004	0.14±0.12	37±12	106±75	10.3±3.1
术后3 d	4	3.85±0.28	0.001±0.009	0.39±0.24	31±9	154±90	13.3±4.3
术后7 d	4	4.36±0.28	0.063±0.020	1.53±0.36	70±14	303±90	14.5±1.6
术后14 d	4	4.15±0.27	0.026±0.016	0.64±0.40	46±9	154±55	10.2±2.1
F值		2.504	14.340	16.230	9.427	4.723	2.184
P值		0.109	<0.001	<0.001	0.002	0.021	0.143

注:单因素方差分析比较术后各时间点血管相关参数。

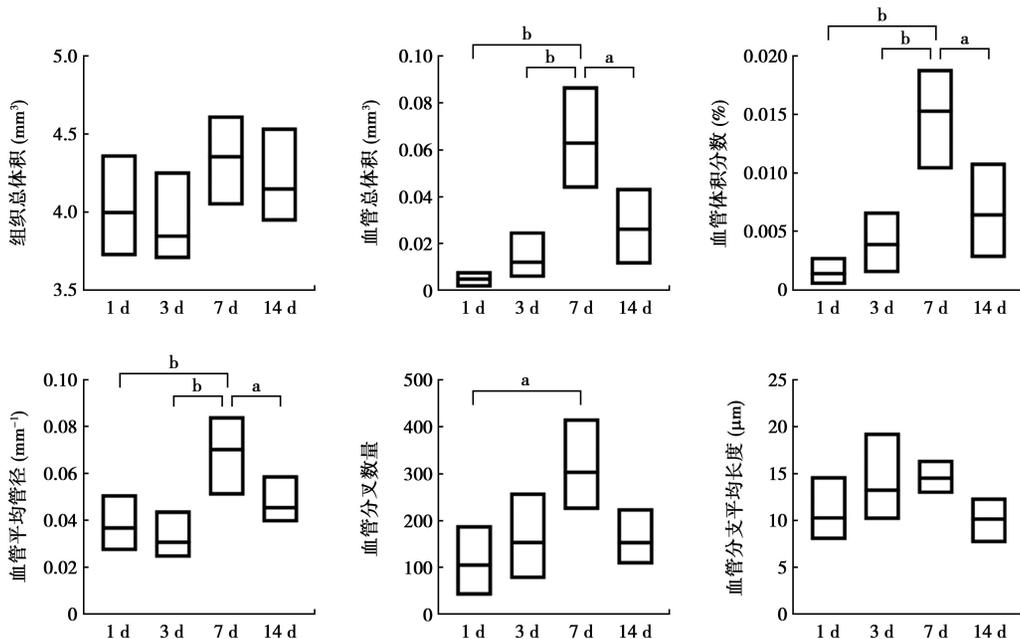


图9 显微计算机断层扫描(Micro-CT)定量分析小鼠灌注实验组术后不同时间点股骨内种植体周围血管参数比较统计图(* $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$)

术后14 d内下降。其中,血管总体积、血管体积分数以及血管管径在术后7 d均较术后1、3、14 d差异有统计学意义。

与术后1和3 d相比较,术后7 d血管体积分别增加了约11.6、4.3倍($F = 14.340, P_{1d} < 0.001, P_{3d} = 0.001$),血管体积分数增加了9.9、2.9倍($F = 16.230, P_{1d} < 0.001, P_{3d} < 0.001$),管径增加了0.9倍和1.2倍($F = 9.427, P_{1d} = 0.006, P_{3d} = 0.002$)。而血管分支数量在术后7 d仅与术后1 d差异有统计学意义,相较于术后1 d,术后7 d的血管分支数量增加了2.9倍($F = 4.723, P = 0.019$)。而术后14 d,上述种植体周围组织血管结构参数相较于术后7 d出现显著下降,其中血管体积分数下降了58%($F = 16.230, P = 0.006$),血管平均管径下降了35%($F = 9.427, P = 0.041$)。

组织学对照组苏木精-伊红染色及CD31免疫组化结果(图10)显示:C57BL/6小鼠在术后1 d种植体周围局部软骨增生;术后3 d种植体周围可观察

到机化结缔组织,种植体和骨组织之间存在较为丰富血管;术后7 d种植体周围显示较多密集血管分布在骨髓腔间隙;而在术后14 d时种植体周围骨沉积量增加,CD31阳性细胞数量下降。

讨论

骨组织内血管的三维空间结构、分布与功能对骨的生长修复至关重要。然而对于骨内血管相关研究尚缺乏足够证据,专注骨内种植体周围血管时空研究则更少见,并缺乏方法指南^[16-18]。本部分实验旨在通过改良血管灌注结合重建的方法,构建骨内种植体周围组织血管观测模型,并在此基础上观察血管结构和分布的变化规律。

回顾文献可得小鼠股骨内血管主要由骨干段的营养血管、骨骺与干骺端的血管网以及骨膜血管构成^[19]。该结果与本实验建模观察到骨内血管分布一致。文献报道干骨骺端血管分布丰富,且该区

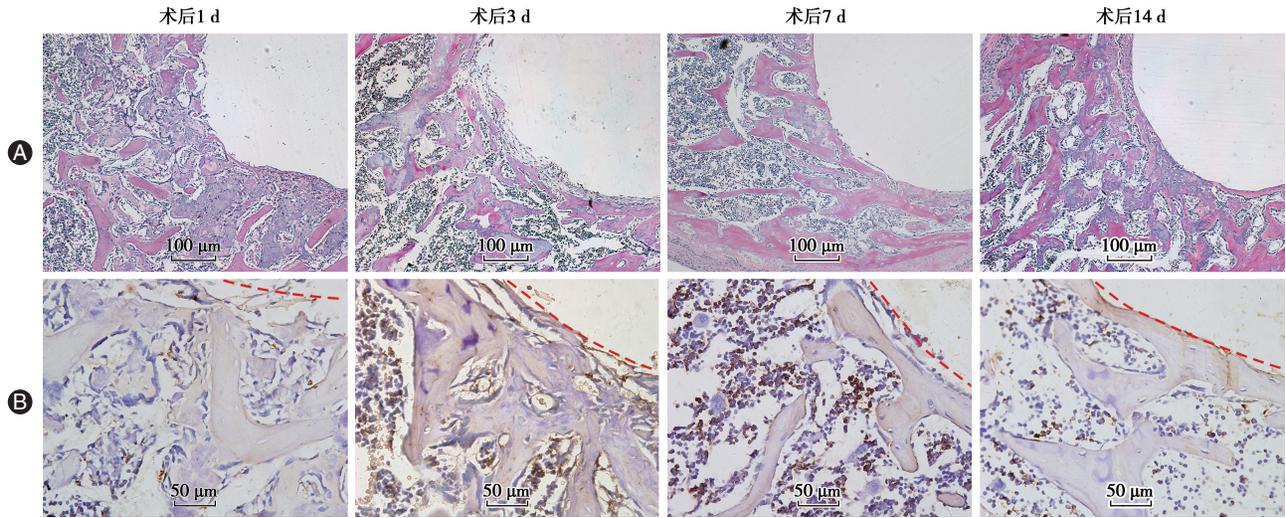


图10 不同时间点小鼠种植体周围骨组织苏木精-伊红染色及CD31免疫组织化学染色结果 A:种植体周围骨组织苏木精-伊红染色;B:种植体周围骨组织CD31免疫组化染色(红色虚线标记原种植体边缘)。

域多为与成骨关联密切的H型血管,并在血流变化过程中发生显著形态变化^[20],提示干骨骺端是观察血流对骨内血管作用的关键区域。因此,本实验将小鼠股骨远中干骨骺端(生长骨板近心侧)设定为骨内种植体血管观测模型。

本研究旨在观测种植体周围血管结构,分别从扫描、重建和分析阶段提出改良。首先,扫描阶段对金属种植体伪影进行评价。实验发现,种植体金属伪影不能通过调节扫描分析参数排除对组织观察的干扰,因此改良方法在血管标本扫描前移除种植体。这也说明,当骨标本(通常不经过脱钙步骤)直接扫描重建分析时,有必要采用硬组织切片等补充种植体骨结合界面的准确观察。其次,重建阶段,即在用灰度值区分不同结构过程中探究主要变量(阈值和降噪参数)的适宜值。阈值范围定义了将图像体素分割成背景(低于阈值范围)或保留体素在分割对象的一部分(高于阈值范围)的灰度值。在较低阈值下,二维层析图上较小血管仍将作为分割对象的一部分,但较大血管的管径会增加,因为围绕他们的部分填充像素将保留在图像中。反之,为了提高血管识别的准确性,应该使用更高的阈值,相应导致小血管的省略。因此,阈值的确立存在一种权衡,当使用全局阈值时,必须在选择最佳阈值时小心谨慎。由结果得出,随阈值提高,识别血管数目、血管连接性等参数下降。本实验将血管阈值统一为80。Gaussian滤镜降噪参数 σ 是Micro-CT分析去除噪影干扰的主要影响因素,进而影响本实验血管结构的定量结果。结果显示,随

σ 数值增加,噪点减少,识别血管准确性增加,但相应识别小血管数目减少,血管结构连续性降低。最后,在分析阶段,除了常用血管参数外,本研究引入三维空间的血管分支参数,即分支数量和分支长度,完善血管的空间结构阐述,从而为进一步研究血管与骨组织的三维交互作用、探究其影响下的干细胞谱系和信号通路调节提供结果支持^[6]。

在种植体周围血管观察模型建立的基础上,本实验对C57BL/6小鼠种植体周围血管随时间变化过程进行观察和定量分析。Micro-CT结果表明,不同时间点的空白对照侧股骨干骨骺段血管无显著差异。在种植手术股骨端,种植体周围血管经历手术截断供血显著减少,而后出现较多新生血管和环绕种植体表面的侧支循环趋势,3 d内即出现血管扩张的向心性血流恢复,7 d新生血管形成成熟的侧支循环,后又在14 d内衰退,区域内出现矿化沉积。传统组织学与Micro-CT相结合,既可以验证Micro-CT,也可以验证样本中的不同组织类型^[6]。本实验中免疫组化染色观察趋势与Micro-CT结果一致,且与既往文献报道骨修复过程中血管先在骨缺损区域增多,而后在骨再生基本完成后减退一致^[16]。该结果提示,骨再生早期由血管变化引导,包括血管新生并伴随血管扩张和分支拓展。值得注意的是,血管围绕种植体表面形成的侧支循环的结构,提示骨结合过程本质可能是骨组织内异物的炎症反应,与近年来“骨结合是对种植体的骨免疫响应”研究观点一致^[21]。

综上所述,本研究改良Micro-CT扫描重建结合血管灌注方法,可为观测种植体周围骨血管时空分布

提供一种低成本且可靠的途径;并证实种植体骨结合过程中种植体周围血管经历先增加再衰退的过程,在术后1周的高峰期可形成侧支循环围绕种植体,为进一步探究骨结合进程及其本质提供基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 高思勇:数据整理、统计学分析、论文撰写;郭彦君、陈晖璐:实验操作;邓飞龙:论文修改;宫萃:研究指导、经费支持;王天璐:实验操作、数据整理、论文撰写、研究指导、经费支持

参 考 文 献

- [1] Lu W, Zhou CH, Ma Y, et al. Improved osseointegration of strontium-modified titanium implants by regulating angiogenesis and macrophage polarization [J]. *Biomater Sci*, 2022, 10(9): 2198-2214. DOI: 10.1039/d1bm01488a.
- [2] He Y, Wang W, Lin SH, et al. Fabrication of a bio-instructive scaffold conferred with a favorable microenvironment allowing for superior implant osseointegration and accelerated in situ vascularized bone regeneration via type H vessel formation [J]. *Bioact Mater*, 2021, 12(9): 491-507. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.07.030.
- [3] Hu X, Wang L, Xiang G, et al. Angiogenesis impairment by the NADPH oxidase-triggered oxidative stress at the bone-implant interface: Critical mechanisms and therapeutic targets for implant failure under hyperglycemic conditions in diabetes [J]. *Acta Biomater*, 2018, 73: 470-487. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.04.008.
- [4] Kleczek P, Jaworek-Korjakowska J, Gorgon M. A novel method for tissue segmentation in high-resolution H&E-stained histopathological whole-slide images [J]. *Comput Med Imaging Graph*, 2020, 79: 101686. DOI: 10.1016/j.compmedimag.2019.101686.
- [5] Kerckhofs G, Stegen S, van Gastel N, et al. Simultaneous three-dimensional visualization of mineralized and soft skeletal tissues by a novel microCT contrast agent with polyoxometalate structure [J]. *Biomaterials*, 2018, 159: 1-12. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.12.016.
- [6] Núñez JA, Goring A, Hesse E, et al. Simultaneous visualization of calcified bone microstructure and intracortical vasculature using synchrotron X-ray phase contrast-enhanced tomography [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13289. DOI: 10.1038/s41598-017-13632-5.
- [7] Yi Y, Men Y, Jing D, et al. 3-dimensional visualization of implant-tissue interface with the polyethylene glycol associated solvent system tissue clearing method [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(3): e12578. DOI: 10.1111/cpr.12578.
- [8] Rawson SD, Maksimcuka J, Withers PJ, et al. X-ray computed tomography in life sciences [J]. *BMC Biol*, 2020, 18(1): 21. DOI: 10.1186/s12915-020-0753-2.
- [9] Chen L, Zhang RY, Xie J, et al. STAT3 activation by catalpol promotes osteogenesis-angiogenesis coupling, thus accelerating osteoporotic bone repair [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 108. DOI: 10.1186/s13287-021-02178-z.
- [10] Redenski I, Guo S, Machour M, et al. Microcomputed tomography-based analysis of neovascularization within bioengineered vascularized tissues [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2022, 8(1): 232-241. DOI: 10.1021/acsbomaterials.1c01401.
- [11] Duvall CL, Taylor WB, Weiss D, et al. Quantitative microcomputed tomography analysis of collateral vessel development after ischemic injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(1): H302-H310. DOI: 10.1152/ajpheart.00928.2003.
- [12] Tongpob Y, Xia S, Wyrwoll C, et al. Quantitative characterization of rodent fetoplacental vasculature morphology in micro-computed tomography images [J]. *Comput Methods Programs Biomed*, 2019, 179: 104984. DOI: 10.1016/j.cmpb.2019.104984.
- [13] Wang T, Guo YJ, Yuan Y, et al. Deficiency of α calcitonin-related peptide impairs peri-implant angiogenesis and osseointegration via suppressive vasodilative activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(1): 139-145. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.027.
- [14] Palladino A, Pizzoleo C, Mavaro I, et al. A combined morphometric approach to feature mouse kidney vasculature [J]. *Ann Anat*, 2021, 237: 151727. DOI: 10.1016/j.aanat.2021.151727.
- [15] Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(7): 676-682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- [16] Huang CH, Ness VP, Yang X, et al. Spatiotemporal analyses of osteogenesis and angiogenesis via intravital imaging in cranial bone defect repair [J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(7): 1217-1230. DOI: 10.1002/jbmr.2460.
- [17] Udagawa A, Sato S, Hasuike A, et al. Micro-CT observation of angiogenesis in bone regeneration [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2013, 24(7): 787-792. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2012.02458.x.
- [18] Saghiri MA, Asaturian A, Garcia-Godoy F, et al. The role of angiogenesis in implant dentistry part I: Review of titanium alloys, surface characteristics and treatments [J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2016, 21(4): e514-e525. DOI: 10.4317/medoral.21199.
- [19] Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki L, et al. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning [J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(3): 291-302. DOI: 10.1007/s10456-017-9541-1.
- [20] Ramasamy SK, Kusumbe AP, Schiller M. Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13601. DOI: 10.1038/ncomms13601.
- [21] Albrektsson T, Tengvall P, Amengual L, et al. Osteoimmune regulation underlies oral implant osseointegration and its perturbation [J]. *Front Immunol*, 2023, 24(13): 1056914. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1056914.

(收稿日期:2023-02-15)

(本文编辑:王媛)