

國立臺灣大學牙醫專業學院臨床牙醫學研究所



博士論文

Graduate Institute of Clinical Dentistry

School of Dentistry

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

低劑量骨成形蛋白二及其短鏈胜肽於人工植體周圍

齒槽骨再生試驗

Effects of Low Dose RhBMP-2 and 73–92-residue
BMP-2 Peptide on Peri-implant Ridge Augmentation

趙悅伶

Yueh-Ling Chao

指導教授：林立德 博士

Advisor: Li-Deh Lin, Ph.D.

中華民國 109 年 12 月

December, 2020

國立臺灣大學博士學位論文

口試委員會審定書

低劑量骨成形蛋白二及其短鏈胜肽於人工植體周圍

齒槽骨再生試驗

Effects of low dose rhBMP-2 and 73-92-residue

BMP-2 peptide on peri-implant ridge augmentation

本論文係趙悅伶君 (F97422008) 在國立臺灣大學臨床牙醫研究所完成之博士學位論文，於民國 109 年 12 月 11 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

林三弘 (指導教授)

程亮

陳致慧

江俊斌

章皓

中文摘要




人工植牙乃重建缺牙區的主流之一，临床上常遇到齒槽骨缺損不足的病人而無法直接置放人工植體，需要進行額外手術來增加骨量。大範圍骨缺損及植體周圍骨缺損在如今仍是一項困難的挑戰。本研究旨在測試以人工合成骨塊加入骨成形蛋白二或其抗原決定位之短鏈胜肽，修復植體周圍大範圍骨缺損的潛力及效益。

研究分為兩個單元。第一單元的主要目的在建立實驗犬下顎骨之植體周圍臨界骨缺損模型，以此模型測試人工合成骨塊是否能作為良好的支架以及骨成形蛋白二之載體，並找尋骨成形蛋白二之最低有效劑量，證實此最低有效劑量能成功誘導植體周圍大範圍齒槽骨再生。第二單元的主要目的則在測試位於骨成形蛋白二抗原決定位之短鏈胜肽是否同樣具有誘導齒槽骨再生之功能，將短鏈胜肽之功效及使用劑量和骨成形蛋白二相互比較，期待未來能取代昂貴及有副作用之骨成形蛋白二。

實驗首先建立實驗犬下顎骨之植體周圍臨界骨缺損模型。於米格魯雄性成犬之下顎做出高度四毫米、長度十毫米之齒槽骨缺損，並將人工植體 (ϕ 4.0 x 8.5mm; Brånemark MkIII) 的根部四毫米植入骨缺損中央，冠部四點五毫米則懸空於齒槽骨缺損中。此模型在無介入治療的組別中，於實驗終點無法達成植體周圍骨再生，因此證實為植體周圍之臨界骨缺損模型。

本實驗採用HAp (Hydroxyapatite)/TCP (Tri-calcium Phosphate)/Col (Collagen) 複合骨材當作支架及載體，加入0.02 mg/mL至0.2 mg/mL之骨成形蛋白二，測試其在無再生膜的情況下，於四週及八週癒合期內促進植體周圍骨再生的能力。植體的初級和次級穩定度由植體共振頻率作分析。植體周圍齒槽骨再生的效能則由放射影像、微電腦斷層影像、不脫鈣研磨骨組織切片之螢光骨標記及脫鈣骨組織染色來做分析測定。

實驗結果證實，植體周圍骨再生的能力受到骨成形蛋白二的劑量影響，骨成形



蛋白二的濃度越高則齒槽骨再生的速度越快、新生骨質密度越高、植體穩定度也越好。HAp/TCP/Col 複合骨材加上 0.2 mg/mL 骨成形蛋白二可以誘導顯著優異的齒槽骨再生效能，並在八週內達到大範圍植體周圍骨缺損之完全癒合。因此，我們定義出骨成形蛋白二之最低有效劑量為0.2 mg/mL，較FDA核可之INFUSE Bone Graft低7.5倍。以本研究的實驗模組同時可證實，在HAp/TCP/Col 複合骨材加上 0.2 mg/mL 骨成形蛋白二且不使用再生膜的模式下，齒槽脊增高手術可以和人工植體植入同時進行。

接著我們使用同樣的植體周圍臨界骨缺損模型與相關分析方法，以高於骨成形蛋白二最低有效劑量20至100倍之濃度，來測試骨成形蛋白二抗原決定位之短鏈胜肽是否同樣具有誘導齒槽骨再生的功能。實驗證實 4-20 mg/mL 短鏈胜肽確實具有誘導植體周圍骨再生之能力，但其骨導引再生的效能皆不及 0.2 mg/mL 骨成形蛋白二。20 mg/mL 短鏈胜肽的表現類似於 0.02 mg/mL 骨成形蛋白二的表現。因此推測短鏈胜肽和骨成形蛋白二在質量比1000:1時能達成類似的骨誘導能力。

總結來說，骨成形蛋白二應用於植體周圍齒槽脊增高手術之最低有效劑量為0.2 mg/mL，HAp/TCP/Col 複合骨材加上 0.2 mg/mL 骨成形蛋白二能取代自體骨移植的需求並達成植體周圍大範圍骨再生的困難任務。相信未來研究改良及劑量調整後，骨成形蛋白二抗原決定位之短鏈胜肽有潛力可以作為骨成形蛋白二的替代產品。

關鍵詞：骨成形蛋白二、骨成形蛋白二之短鏈胜肽、人工植體、複合骨材、齒槽骨再生、植體周圍齒槽脊增高手術、臨界骨缺損

研究經費來源：科技部計畫 編號 MOST103-2314-B-002-104-MY2

Abstract



Dental implant therapy has become a standard of care for the treatment of edentulous patients. Sufficient bone height and width is a prerequisite for implant insertion. However, a reduced alveolar ridge contour often occurs after tooth extraction and jeopardizes the long-term survival of dental implants. Various techniques have been attempted to increase the amount of alveolar bone, however, managing large alveolar defects remain difficult tasks. In this study, we combined osteoconductive scaffolds (HAp/TCP/Col) with osteoinductive signals (rhBMP-2 protein/or a synthetic 73–92-residue BMP-2 peptide) aiming to achieve the difficult task of peri-implant bone augmentation without the use of autogenous grafts.

The study was divided into two parts. The aim of the first part was to establish a peri-implant critical size defect model at the mandibles of beagle dogs. The compatibility of the HAp/TCP/Col composite as a scaffold and carrier of rhBMP-2 was assessed using the defect model. Then we search for the lower bound for rhBMP-2 doses that could successfully induce peri-implant bone regeneration. The second part aimed to investigate the bone inductive ability of a synthetic 73–92-residue BMP-2 peptide and compare its efficacy with rhBMP-2, exploring the possibility that BMP-2 peptide could be a substitute for rhBMP-2 in the future as osteogenic molecules.

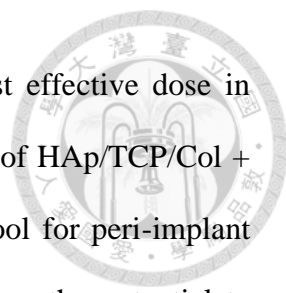
Large saddle-type alveolar defects (10 mm mesiodistally, and 4 mm apicocronally) were surgically created in post-extraction regions of the mandible in beagle dogs. Dental implants were placed into the prepared osteotomies at the center of the defects. Each implant fixture was placed with apical 4 mm of implant inserted into the bone, leaving cervical 4.5 mm exposed to the large through-and-through defects. The blank group without treatment intervention did not show obvious bone growth around the

dental implants throughout the study, so the defect model could be considered a critical-sized defect model.

HAp/TCP/Col composite was used as scaffold and rhBMP-2 carrier. RhBMP-2 at concentrations of 0.02–0.2 mg/mL was applied and tested using the critical-sized peri-implant defect model. After healing for 4 or 8 weeks, bone regeneration and mineralization were assessed through radiography, micro-CT, fluorescence labeling, and histologic analyses. Implant stability was measured through resonance frequency analysis.

It was evident that bone regenerative ability was influenced by rhBMP-2 doses. HAp/TCP/Col with 0.2 mg/mL rhBMP-2 has presented significantly better new bone formation and was able to fulfill the bone repair of large peri-implant defects in 8 weeks. The lower bound for rhBMP-2 dose was then defined at 0.2 mg/mL, which is 7.5 times lower than the commercial INFUSE Bone Graft. Our results also implied that alveolar ridge augmentation could be performed simultaneously with dental implant placement by using HAp/TCP/Col composite combined with 0.2 mg/mL rhBMP-2 without barrier membranes.

The second part of this study was to investigate the osteogenic ability of a synthetic 73–92-residue BMP-2 peptide with the same animal model and similar analyses. The BMP-2 peptide doses were set at 20 to 100 times higher than the 0.2 mg/mL rhBMP-2. Our results demonstrated the BMP-2 peptide at 4–20 mg/mL could facilitate bone regeneration *in vivo*, however, the bone inductive ability was inferior to 0.2 mg/mL rhBMP-2 and the mineralization level did not show a significant difference compared with the control group. The performance of 20 mg/mL BMP-2 peptide was similar to 0.02 mg/mL rhBMP-2, therefore, a mass ratio of 1000:1 was thus suggested for the BMP-2 peptide and rhBMP-2 to achieve similar osteoinductive performance.



In conclusion, 0.2 mg/mL rhBMP-2 was defined as the lowest effective dose in peri-implant bone regeneration. Our results highlight the constructs of HAp/TCP/Col + 0.2 mg/mL rhBMP-2 without barrier membranes as a promising tool for peri-implant ridge augmentation. The synthetic 73–92-residue BMP-2 peptide has the potential to become an alternative to rhBMP-2. Further refinement and dose estimation are required.

Keywords : bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) , BMP-2 peptide, dental implant, composite bone graft, bone regeneration, peri-implant ridge augmentation, critical size defect

Research Fund : This study was supported by the National Ministry of Science and Technology of Taiwan (MOST103-2314-B-002-104-MY2).

目錄



中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
目錄.....	vi
圖次.....	xii
第一單元 低劑量骨成形蛋白二於人工植體周圍齒槽骨再生試驗.....	1
第一章 前言.....	1
第二章 研究背景.....	3
2.1 BMP 的最初發現.....	3
2.2 BMPs 的分離與純化.....	3
2.3 BMP family.....	4
2.4 BMP-2 之抗原決定位及訊息傳遞路線.....	4
2.5 美國食品藥物管理局核可.....	5
2.6 BMP-2 的可能副作用.....	6
2.6.1 腫瘤生成的風險.....	6
2.6.2 異位骨生成.....	7
2.6.3 蝕骨細胞活化、骨質溶解及塌陷.....	8
2.6.4 形成骨囊腫.....	8
2.6.5 發炎反應.....	8
2.7 BMP-2 的載體.....	9
2.8 BMP-2 劑量的考量.....	10
2.8.1 臨床現況.....	10
2.8.2 最低有效劑量仍未知.....	11
2.8.3 嘗試將 rhBMP-2 效能最大化.....	12



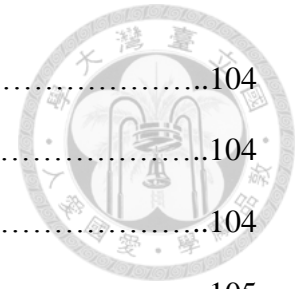
第三章 研究目的.....	12
第四章 研究材料及方法.....	13
4.1 實驗動物.....	13
4.2 人工植體.....	13
4.3 RhBMP-2.....	13
4.4 人工骨塊.....	14
4.5 植體周圍臨界骨缺損之實驗模型建立.....	15
4.6 實驗分組.....	15
4.7 手術方法.....	16
4.7.1 實驗動物麻醉.....	16
4.7.2 拔牙手術.....	16
4.7.3 實驗手術.....	17
4.7.4 術後照顧.....	18
4.8 螢光骨染色標記.....	18
4.8.1 四環素 Tetracycline.....	18
4.8.2 鈣黃綠素 Calcein.....	18
4.8.3 茜素氨羧絡合劑 Alizarin Complexone.....	18
4.9 實驗動物犧牲及標本取得.....	19
4.10 放射線學檢查及其影像分析分法.....	19
4.11 微電腦斷層掃描及其影像分析方法.....	20
4.12 生物力學分析：植體共振頻率分析.....	20
4.13 標本對切.....	21
4.14 不脫鈣之研磨骨組織切片.....	21
4.14.1 樣本脫水.....	21
4.14.2 樣本包埋.....	22



4.14.3	樣本切片.....	22
4.14.4	玻片製備及樣本封片.....	22
4.14.5	樣本玻片修磨及拋光.....	23
4.15	螢光骨染色之顯微分析.....	23
4.15.1	螢光顯微鏡觀察.....	24
4.15.1.1	骨染劑之螢光激發/發射光譜.....	24
4.15.1.2	螢光顯微鏡設定.....	24
4.15.2	螢光染色量化分析.....	25
4.16	脫鈣之骨組織切片.....	25
4.17	統計分析.....	26
第五章	結果.....	27
5.1	實驗模型建立與手術臨床觀察.....	27
5.2	放射線影像分析.....	27
5.2.1	四週之放射線影像分析.....	28
5.2.2	八週之放射線影像分析.....	28
5.2.3	放射線影像之灰值量化分析.....	29
5.3	微電腦斷層影像分析.....	29
5.3.1	微電腦斷層之三度空間表面影像.....	29
5.3.2	微電腦斷層之切面影像.....	30
5.3.3	微電腦斷層之新生骨質密度量化分析.....	31
5.4	植體共振頻率分析.....	31
5.5	骨染劑之螢光激發/發射光譜測定.....	32
5.6	不脫鈣之研磨骨組織切片.....	32
5.6.1	四週之螢光顯微影像.....	33
5.6.2	八週之螢光顯微影像.....	33

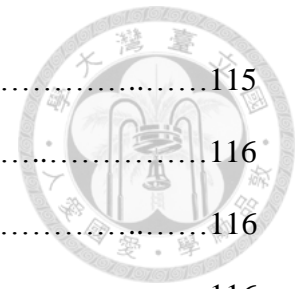


5.6.3	螢光顯微影像之植體螺紋放大檢視.....	34
5.6.4	螢光顯微影像之螢光面積量化分析.....	34
5.7	脫鈣之骨組織切片.....	35
5.7.1	近遠心切面全景.....	35
5.7.2	局部放大顯微圖.....	36
5.7.3	植體螺紋處放大顯微圖.....	37
第六章	討論.....	38
6.1	實驗動物的選擇.....	38
6.2	植體周圍臨界骨缺損模型之建立.....	39
6.3	放射影像及微電腦斷層影像分析.....	39
6.4	植體共振頻率分析.....	40
6.5	螢光骨染色分析.....	41
6.6	RhBMP-2 的安全性與使用劑量.....	42
6.7	RhBMP-2 載體.....	42
6.8	植體表面處理的影響.....	43
6.9	研究限制與展望.....	43
第七章	結論.....	44
第二單元	骨成形蛋白二抗原決定位之短鏈胜肽於人工植體周圍齒槽骨再生試驗.....	100
第一章	前言.....	100
第二章	研究材料及方法.....	103
2.1	實驗動物.....	103
2.2	人工植體.....	103
2.3	RhBMP-2.....	103



2.4	73-92-residue BMP-2 peptide.....	104
2.5	人工骨塊.....	104
2.6	植體周圍臨界骨缺損之實驗模型建立.....	104
2.7	實驗分組.....	105
2.8	手術方法.....	105
2.9	螢光骨染色標記.....	107
2.10	實驗動物犧牲及標本取得.....	108
2.11	放射線學檢查及其影像分析方法.....	108
2.12	微電腦斷層掃描及其影像分析方法.....	108
2.13	生物力學分析：植體共振頻率分析.....	109
2.14	標本對切.....	109
2.15	不脫鈣之研磨骨組織切片.....	109
2.16	螢光骨染色之顯微分析.....	112
2.16.1	螢光顯微鏡觀察.....	112
2.16.2	螢光染色量化分析.....	112
2.17	脫鈣之骨組織切片.....	112
2.18	統計分析.....	112
第三章	結果.....	113
3.1	手術臨床觀察.....	113
3.2	放射線影像分析.....	113
3.2.1	四週之放射線影像分析.....	113
3.2.2	八週之放射線影像分析.....	114
3.3	微電腦斷層影像分析.....	114
3.3.1	微電腦斷層之近遠心切面影像.....	114
3.3.2	微電腦斷層之頰舌側切面影像.....	115

3.4	植體共振頻率分析.....	115
3.5	不脫鈣之研磨骨組織切片.....	116
3.5.1	螢光顯微圖之近遠心切面影像.....	116
3.5.2	螢光顯微圖之植體螺紋放大影像.....	116
3.5.3	顯微螢光量化分析.....	117
3.6	脫鈣之骨組織切片.....	117
第四章	討論.....	118
第五章	結論.....	121
總結	131
參考文獻	132



圖次



第一單元 低劑量骨成形蛋白二於人工植體周圍齒槽骨再生試驗

圖 1：實驗模型示意圖.....	45
圖 2：實驗手術時間軸.....	45
圖 3：實驗動物拔牙癒合後之左下顎頰側觀.....	46
圖 4：實驗動物拔牙癒合後之左下顎咬合面觀.....	46
圖 5：翻開骨膜皮瓣之頰側觀.....	47
圖 6：翻開骨膜皮瓣之咬合面觀.....	47
圖 7：臨界骨缺損，頰側觀.....	48
圖 8：臨界骨缺損，咬合面觀.....	48
圖 9：植體周圍臨界骨缺損模型.....	49
圖 10：置放 HAp/TCP/Col 複合骨材，頰側觀.....	49
圖 11：置放 HAp/TCP/Col 複合骨材，咬合面觀.....	50
圖 12：傷口一級縫合之頰側觀.....	50
圖 13：動物犧牲卸下之下顎骨.....	51
圖 14：四週負控制組之放射線影像.....	52
圖 15：八週負控制組之放射線影像.....	52
圖 16：四週控制組之放射線影像.....	53
圖 17：八週控制組之放射線影像.....	53
圖 18：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像.....	54
圖 19：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像.....	54
圖 20：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像.....	55
圖 21：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像.....	55

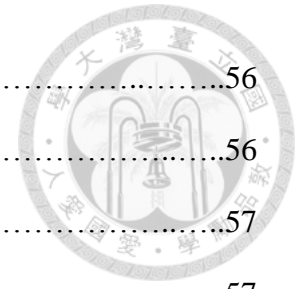


圖 22：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像.....	56
圖 23：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像.....	56
圖 24：放射線影像灰質量化之興趣區間.....	57
圖 25：放射線影像之灰值量化分析.....	57
圖 26：四週負控制組之微電腦斷層三度空間表面影像.....	58
圖 27：八週負控制組之微電腦斷層三度空間表面影像.....	58
圖 28：四週控制組之微電腦斷層三度空間表面影像.....	59
圖 29：八週控制組之微電腦斷層三度空間表面影像.....	59
圖 30：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像.....	60
圖 31：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像.....	60
圖 32：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像.....	61
圖 33：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像.....	61
圖 34：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像.....	62
圖 35：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像.....	62
圖 36：微電腦斷層新生骨質密度量化之興趣區間.....	63
圖 37：微電腦斷層之新生骨質密度量化分析.....	63
圖 38：四週負控制組之微電腦斷層切面影像.....	64
圖 39：八週負控制組之微電腦斷層切面影像.....	64
圖 40：四週控制組之微電腦斷層切面影像.....	65
圖 41：八週控制組之微電腦斷層切面影像.....	65
圖 42：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像.....	66
圖 43：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像.....	66
圖 44：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像.....	67
圖 45：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像.....	67
圖 46：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像.....	68

圖 47：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像.....	68
圖 48：植體共振頻率分析.....	69
圖 49：四環黴素(Tetracycline)螢光激發與發散波長.....	69
圖 50：鈣黃綠素(Calcein)螢光激發與發散波長.....	70
圖 51：茜素氨羧絡合劑(Alizarin Complexone)螢光激發與發散波長.....	70
圖 52：三種螢光激發與發散波長.....	71
圖 53：牙髓腔二級牙本質之螢光反應.....	71
圖 54：四週負控制組之螢光顯微影像.....	72
圖 55：八週負控制組之螢光顯微影像.....	72
圖 56：四週控制組之螢光顯微影像.....	73
圖 57：八週控制組之螢光顯微影像.....	73
圖 58：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像.....	74
圖 59：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像.....	74
圖 60：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像.....	75
圖 61：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像.....	75
圖 62：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像.....	76
圖 63：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像.....	76
圖 64：螢光顯微影像於人工植體上半部裸露區之放大檢視.....	77
圖 65：螢光面積量化分析之興趣區間.....	78
圖 66：螢光顯微影像第一個興趣區間之螢光面積量化分析.....	78
圖 67：螢光顯微影像第一個興趣區間之螢光面積量化分析.....	79
圖 68：四週負控制組之 MT 染色.....	80
圖 69：八週負控制組之 MT 染色.....	81
圖 70：四週控制組之 MT 染色.....	82
圖 71：八週控制組之 MT 染色.....	83



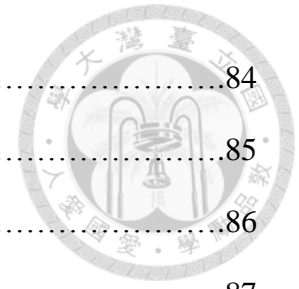
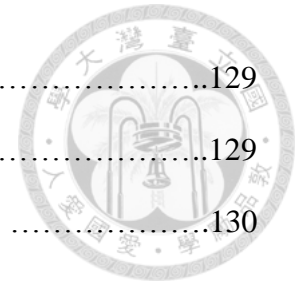


圖 72：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色.....	84
圖 73：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色.....	85
圖 74：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色.....	86
圖 75：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色.....	87
圖 76：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色.....	88
圖 77：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色.....	89
圖 78：四週負控制組之 HE 染色.....	90
圖 79：八週負控制組之 HE 染色.....	91
圖 80：四週控制組之 HE 染色.....	92
圖 81：八週控制組之 HE 染色.....	93
圖 82：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色.....	94
圖 83：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色.....	95
圖 84：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色.....	96
圖 85：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色.....	97
圖 86：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色.....	98
圖 87：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色.....	99

第二單元 骨成形蛋白二抗原決定位之短鏈胜肽於人工植體周圍齒槽骨再生試驗

圖 1：植體周圍臨界骨缺損模型.....	122
圖 2：根尖 X 光放射線影像.....	123
圖 3：微電腦斷層影像，近遠心切面.....	124
圖 4：微電腦斷層影像，頰舌側切面.....	125
圖 5：植體共振頻率分析.....	126
圖 6：螢光顯微影像，近遠心切面.....	127
圖 7：螢光顯微影像於人工植體上半部裸露區之放大檢視.....	128

圖 8：螢光面積量化分析之興趣區間.....	129
圖 9：螢光顯微影像之螢光面積量化分析.....	129
圖 10：脫鈣組織切片之馬森三色染色 (Masson's trichrome stain)	130



第一單元

低劑量骨成形蛋白二於人工植體周圍齒槽骨再生試驗



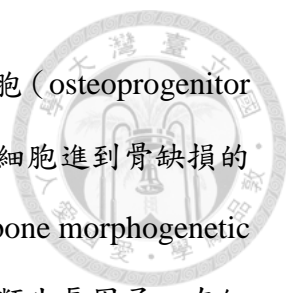
第一章 前言

人工植牙乃重建缺牙區的主流之一，足夠的齒槽骨高度及寬度是植牙成功的先決條件。臨床上常遇到病患因牙周病、長期缺牙、創傷或腫瘤切除而使得齒槽骨缺損不足，或是因骨質密度不好、骨質重塑能力差而讓植牙重建變得十分棘手。隨著技術發展，我們希望可以縮短植體骨整合的時間、可以修復植體周圍的骨缺損、也期待能在骨量不足的區域進行植牙重建。

多種材料被研發用來進行齒槽骨再生手術，像是自體骨 (autogenous bone)、人造骨 (synthetic bone)、同種異體骨 (allograft) 或是異種骨 (xenograft)。面對大範圍骨缺損的情況，最廣為認同及應用的手術乃合併自體骨移植及使用再生膜 (barrier membrane) 之引導骨再生手術 (guided bone regeneration)。

自體骨移植是促進有效骨再生的黃金準則；然而，可取自體骨的供體部位 (donor site) 有限且病患須有第二個手術區域，增加了病患痛楚也使手術複雜度增加。為了解決使用自體骨的缺點，各種人造骨被研發製造出來，並評估其替代自體骨移植的可能性[1]。這些人造骨可以當作良好的支架 (scaffolds) 提供新生骨質生長的空間；可惜的是，人造骨缺少了自體骨所擁有的骨誘導性 (osteinductivity)，因此評估測試的結果並不理想，尤其是在大範圍骨缺損或是垂直骨缺損等臨床難症。


近來新的研究趨勢嘗試將骨誘導活性因子 (osteoinductive molecules) 加入骨傳導支架 (osteoconductive scaffolds)，希望藉此增加骨再生的潛力。這些骨誘導活性



蛋白可以誘發間質幹細胞 (mesenchymal stem cells) 及骨前驅細胞 (osteoprogenitor cells) 分化成為成骨細胞 (osteoblasts)，且可以吸引特定骨形成細胞進到骨缺損的區域。其中，表現最為亮眼的骨誘導活性因子乃骨成形蛋白二 (bone morphogenetic protein-2; BMP-2)。Bone morphogenetic proteins (BMPs) 是一類生長因子，在細胞分化、增生及軟骨硬骨形成都扮演著重要的腳色[2]。其中，BMP-2 是整個 BMP 家族中最具有骨誘導能力的因子[3]。諸多研究曾經證實 BMP-2 在骨科及牙科手術中有優異的骨誘導再生能力，而在牙科的應用包含了上顎竇提升術及拔牙窩洞齒槽脊保存術[4, 5]。

多種生物材料都曾被研發作為 rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein) 的載體，而目前美國食品藥物管理局唯一核可的產品是由可吸收膠原蛋白海綿 (absorbable collagen sponge) 加入 1.5 mg/mL rhBMP-2[6]。可惜的是，膠原蛋白海綿幾乎不具有機械強度，無法滿足牙科補骨手術需要維持空間的要求[7]。許多控制釋放的載體系統也被研發出來，希望能夠使 rhBMP-2 的骨導引效用最佳化，然而要將這些新的生物材料應用在臨床仍有很長的距離。因此，本研究嘗試採用已進入臨床的 hydroxyapatite (HAp) / β -tricalcium phosphate (TCP) /collagen (Col) 複合骨材作為 rhBMP-2 的載體以及空間維持的支架，期待研究成果能和臨床應用有更好的銜接。

許多動物及人體試驗採用不同的 rhBMP-2 濃度作為骨誘導因子，而牙科應用的最佳 rhBMP-2 劑量仍然未知。美國食品藥物管理局核可的 INFUSE Bone Graft 劑量為 1.5 mg/mL rhBMP-2。根據一個 phase II 臨床試驗，上顎竇提升術採用 0.75 或 1.5 mg/mL rhBMP-2 並無明顯差異[8]。然而，在拔牙區域進行齒槽脊保存手術的試驗中，卻發現成效和 rhBMP-2 存在劑量效應關係 (dose-effect relationship) [9]。我們需要謹慎看待的是，rhBMP-2 劑量若高於某個理想界線後可能會導致副作用的產生、昂貴的經濟成本，也可能對骨質增生產生反向影響並延遲新生骨質發育成熟[10]。



因此，本研究採用低於市售濃度 7.5 至 75 倍之 rhBMP-2，測試其在不使用再生膜的情況下，於四週及八週癒合期內促進植體周圍骨再生的能力，期待能找到 rhBMP-2 之最低有效劑量，並證實此最低有效劑量能成功誘導植體周圍大範圍齒槽骨再生。

第二章 研究背景

2.1 BMP 的最初發現

1889 年，Senn 發現脫鈣的骨頭可以誘導骨髓炎的骨缺損癒合[11]。Levander 從 1934 年開始進行一系列研究，證實將骨萃取物植入肌肉會產生異位骨頭生成[12]。1938 年，Levander 表示植入物周圍的間質組織(mesenchymal tissue)是骨頭再生的關鍵物質。1945 年，Lacroix 將這個關鍵物質稱作”osteogenin”；他將 osteogenin 注射到兔子的大腿肌肉，誘導生成出具有長骨結構的 osteoma[13]。1965 年，Urist 將脫鈣的骨頭植入兔子和老鼠的肌肉裡，發現會有自體誘導(autoinduction)而新生的骨頭和軟骨；自體誘導(autoinduction)的假說在這時候被發表，認為某些誘導細胞會產生誘導物質，使得被誘導的細胞分化成為硬骨前驅細胞(osteoprogenitor cell)或軟骨前驅細胞(chondroprogenitor cell)[14]。Urist 於 1971 年將這個誘導物質命名為 bone morphogenetic proteins[15]。1972 年，BMPs 被證實可誘導 fibroblast-chondroblast-osteoblast transformation 以及後續的 endochondral ossification，奠定未來臨床應用的潛力[16]。

2.2 BMPs 的分離與純化

由於脫鈣的骨組織無法溶解，使得 BMPs 的純化增加了難度。Sampath 和 Reddi

克服了困難並且做出了粗製的 BMPs，成功複製了異位骨生成的功效。1988 年，BMP-1、BMP-2、BMP-2B (現稱為 BMP-4)以及 BMP-3 (osteogenin)被成功分離及定序[17]。接著，其餘的 BMPs 陸續被分離，功能也被逐漸被分析出來[18]。

人類 BMPs 的 DNA 序列經由 DNA probe 定序出來，並且拼接到病毒載體(viral expression vector)中，如此即可大量製造 BMPs[19]，rhBMP (recombinant human bone morphogenetic protein)因此問世。如今所使用的 BMP 都是藉由這樣的重組技術生產，避免了可能的感染或是過敏反應。

2.3 BMP family

Reddi 發現由於 BMPs 經由胰蛋白酶分解形成的肽段，其胺基酸序列和 TGF- β 1 屬同源，因此 BMPs 被歸類為 TGF- β superfamily 的一員[20]。

BMPs 依序列相似度以及功能被區分為四個 subfamilies：

1st group – BMP-2 及 BMP-4

這兩者有 80% 同源(homology)，主要差在胺基酸末端的區域，BMP-2 有一個 heparin-binding domain。

2nd group – BMP-3 及 BMP-3B (GDF10)

也被稱為 osteogenin

3rd group – BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8a 及 BMP-8b

4th group – GDF5、GDF6 及 GDF7 (cartilage-derived morphogenetic protein 1, 2, and 3)

2.4 BMP-2 之抗原決定位(epitope)及訊息傳遞路線

BMP-2 先形成二聚體(dimers)再連接細胞膜上的 BMP receptors type I & II 來啟動後續活性反應。BMP-2 具有兩個抗原決定位(epitopes)：wrist epitope 及 knuckle epitope。目前認為 wrist epitope 會連接上 BMP receptor IA，而 knuckle epitope 會連


接上 BMP receptor type II[21-23]。然而，BMP-2 實際的受體連接區域 (receptor-binding region)仍未完全釐清。

典型的 BMP 訊息傳遞路線 (canonical BMP signaling transduction)是當 BMPs 接上 BMP 第一型或第二型受器 (BMP receptor types I and II)，再經由 receptor-regulated R-Smad (通常是 Smad 1, 5, and 8)的磷酸化來作調控[24]。磷酸化的 R-Smads 和 Co-Smad (通常是 Smad 4)形成異二聚體(heterodimer)並進入細胞核來調控基因轉錄[25]。此外，BMP-2 還會誘導成骨細胞(osteoblast)中的骨形成轉錄因子 runt-related transcription factor 2 (Runx2)並誘發骨形成的程序[26]。

除了上述的典型路徑，BMP-2 對細胞的影響其實是非常多元的。BMP-2 會活化 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)的訊息傳遞，並且導致脂肪新生分化(adipogenesis differentiation)及脂肪形成[27]。BMP-2 還會誘發多種 inflammatory cytokines 及 chemokines，包括 interleukins (ILs)及 tumor necrosis factor (TNF)- α [28]。除此之外，BMP-2 會藉由 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)活化蝕骨細胞[29]。由此可知，BMP-2 對於脂肪形成、發炎反應以及蝕骨細胞活化皆有不同的影響力，可能在臨床應用上會導致一些相對應的副作用。

2.5 美國食品藥物管理局核可

INFUSE Bone Graft (Medtronic Spinal and Biologics, Memphis, TN) 是目前唯一得到美國 FDA 核可的 recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP2)產品。INFUSE Bone Graft 的組成是由可吸收膠原蛋白海綿載體(absorbable collagen sponge carrier)加入 1.5 mg/mL rhBMP-2。它分別在 2002、2004 及 2007 年得到美國 FDA 核可使用在椎體間融合術(interbody spinal fusion)、開放性脛骨骨折(open tibial fractures)、上顎竇提升術(sinus augmentation)及拔牙後齒槽脊增加術(alveolar ridge augmentation for extraction sockets)[30]。INFUSE 受到 FDA 認可的憑證是來自一個



450 位病人的前瞻性隨機對照試驗。這個試驗比較脛骨骨折病人接受傳統治療或合併加入 rhBMP-2 (0.75 mg/mL or 1.5 mg/mL with absorbable collagen sponges), 在術後 12 個月內需要再次進行手術的比例。試驗結果發現接受傳統手術的病人只有 54% 不需要二次手術治療, 而合併接受 1.5 mg/mL rhBMP-2 的病人則有 74% 不需二次手術。效果與 rhBMP-2 劑量呈現正相關, 此試驗要高濃度 1.5 mg/mL rhBMP-2 才與控制組達到顯著差異[31]。

2.6 BMP-2 的可能副作用

雖然許多研究使用 BMP-2 得到不錯的結果, 但仍有一些臨床應用的效果存在歧異。與 rhBMP-2 有關的副作用逐漸浮現並開始受到重視[32]。

2.6.1 腫瘤生成 (Tumorigenesis) 的風險

由於 BMPs 是具有多效性的生長因子, 它掌控調節細胞分裂的過程, 在癌症的發展有一定的影響力, 因此 BMPs 導致腫瘤的可能性不容小覷。惡性腫瘤骨轉移的目的地, 最常見的就是脊椎, 這使得外科醫師在治療原發或轉移性脊椎病兆時必須特別小心。FDA 就有排除 rhBMP-2 使用在有癌症病史的病人身上。

BMP-2 若超過正常生理濃度往往會影響多種腫瘤細胞的發展, 像是攝護腺、乳房、肋膜、骨頭及口腔黏膜[33-36]。雖然不同器官各有差異, 但大部分的腫瘤都伴隨著 BMP-2 表現上升, 且 BMP-2 的上升表現常跟腫瘤細胞增生、侵襲及較差的臨床預後具有關聯性[37]。

從基礎生物研究來看, 乳癌[34, 38]、肺癌[39]、胰臟癌[40]及口腔鱗狀細胞癌[41]的細胞皆有較高的 BMP ligand 表現。BMP-2 會促使乳癌[42]、肺炎[39]及胰臟癌[40]細胞分裂增生。BMP-2 也可能經由活化 Tenascin-W101 及增加 CCL5 表現導致攝護腺癌[43]、肺癌[44]、口腔鱗狀細胞癌[41]及乳癌[42]的侵襲性上升。異常的 BMP signaling 被證實跟乳癌和攝護腺癌的骨轉移有重要關係[34, 43]。在這些生物基礎

下，的確需要懷疑及關注 BMP-2 在人體內致癌的可能性。然而，少數研究持相反意見：BMP 的拮抗體 DAND5 會誘發肺轉移之乳癌細胞[45]；過度表現 type II BMP receptor 反而有腫瘤抑制的效果[46]。因此，BMP-2 和癌症的相關性仍無定論。

從臨床試驗來看，一個多中心臨床隨機對照試驗探討對於腰椎退化性病變而進行腰椎間骨融合手術(posterolateral fusions)的病人，是否因為接受高劑量 BMP-2 而有較高的惡性腫瘤發生率；結果發現相較於單純使用自體骨移植的病人，使用高劑量 40mg BMP-2 (off-label use)的病人有顯著較高的癌症發生率[47]。然而，許多其他臨床試驗無法證實 BMP-2 和癌症有關聯性[48-51]。2013 年有一個超過 4600 位病人的大型研究指出，將 BMP 應用在 lumbar fusion 的手術會顯著增加病患產生良性腫瘤，而非惡性腫瘤[48]。這類的臨床試驗往往追蹤病患的時間不夠長，以致無法證實或反證 BMP-2 和致癌的相關性。一個回溯研究檢視超過 46 萬接受脊椎融合術的病人，平均有 2.9 年的追蹤時間，發現有使用 BMP-2 的病人反而有較低的癌症風險[52]。因此，到目前為止最大的臨床研究尚無法證實 BMP-2 與致癌的關聯性。

2.6.2 異位骨生成 (Ectopic bone formation)

BMP-2 滲漏到植入區域外面常常導致異位骨生成的副作用。在進行椎體間融合術(interbody fusion)時，手術醫師將浸有 BMP-2 液體的膠原蛋白海綿置入椎體間融合器(cage)的當下很容易造成 BMP-2 液體滲漏到它處，導致後續的異位骨生成及神經壓迫。當 BMP-2 使用在脊椎手術時，約有六倍異位骨生成的風險；電腦斷層顯示使用 BMP-2 的病人有 70.1%產生異位骨生成，而未使用 BMP-2 的病人僅有 12.8%[32]。BMP-2 滲漏到硬膜外腔造成的異位骨生成可能導致神經根壓迫，術後約有 14%神經根炎的發生率(控制組僅有 3%)[53]。由於目前合法的 BMP-2 載體僅有膠原蛋白海綿，手術醫師只能著重在精準放置海綿的位置、避免沖洗手術區域、避免在植入處使用抽吸裝置以及避免擠壓到吸有 BMP-2 液體的海綿。



2.6.3 蝕骨細胞活化(osteoclast activation)、骨質溶解(osteolysis)及塌陷(subsidence)

骨質溶解及塌陷是脊椎手術的嚴重副作用，在 BMP-2 介入脊椎相關手術後，此副作用有升高的趨勢。BMP-2 在海綿骨會增加蝕骨細胞的活性[54]。在一個 anterior lumbar inter-body fusion (ALIF)手術的隨機對照試驗，發現使用 BMP-2 的組別有顯著較高的併發症：椎間盤間隙塌陷、大的蝕骨囊腫、植入物位移鬆脫及骨塌陷。[54]


2.6.4 形成骨囊腫 (Bone cyst)

有一個假說認為間質幹細胞(MSCs)的命運受到 RUNX2 和 PPARg 的拮抗調控。[55] PPARg 藉由抑制 RUNX2 來促進脂肪生成及抑制骨生成。雖然 BMP-2 顯著增加了骨頭增生的體積，但新生骨頭曾被指出骨質密度不佳。有研究發現 BMP-2 刺激的新生骨頭有較大的骨小樑間隙及散布的脂肪堆積，導致骨囊腫的產生。[56]

2.6.5 發炎反應

BMP-2 在臨床造成的副作用有很大一部分跟發炎反應有關。輕微的發炎反應像是血清腫(seroma)的生成；也有像頸椎腫脹等等嚴重且可能致死的反應。2008 年，美國 FDA 就有發布頸椎腫脹造成死亡的警告。

血清腫(seroma)的生成是 BMP-2 很常見的副作用，通常在術後一週內產生[57]。Rihn 的團隊發現大約有 1.2% 使用 rhBMP-2 的病人會生成 lumbar seroma[53]。血清腫(seroma)的生成在臨床上往往沒有徵兆，直到它因為體積效應擠壓到周圍組織，導致病人疼痛或是感覺異常[58]。Robin 的團隊曾發表一個在頸椎使用 BMP-2 導致血清腫生成的案例，病人因為雙側上肢的感覺異常才檢查出血清腫的存在，症狀在血清腫引流後改善；這些血清腫被驗出含有高濃度的發炎細胞激素，包括 IL-6、IL-8 及 TNF- α [59]。



神經根炎(radiculitis)的副作用也在 BMP-2 治療的族群中增加，尤其是在後側腰椎椎體間融合術 (posterior lumbar interbody fusion, PLIF) 及經椎間孔椎間融合術 (transforaminal interbody fusion, TLIF)的發生率最高[60]。Rihn 的團隊表示接受 BMP-2 治療的病人約有 14% 導致神經根炎，而控制組只有 3%[53]。這個神經根炎的狀況和異位骨生長造成的神經根壓迫是沒有相關的，推測應為 BMP-2 導致神經根的發炎反應造成的結果。

頸椎腫脹是最令人擔心且可能致命的發炎反應副作用。2006 年，Smucker 團隊首先提出 BMP-2 導致頸椎發炎的副作用，並報導了六例死亡案件[61]。截至 2008 年，美國 FDA 已經收到 38 個在適應症之外使用 BMP-2 於頸椎導致死亡的案例；這些病人的頸部和喉嚨組織腫脹、壓迫到氣管，使得吞嚥、呼吸及說話困難[62]。此後，BMP-2 不被建議使用在頸椎融合手術及兒童的脊椎融合手術。

2.7 BMP-2 的載體

各種天然或人造載體不斷被研發測試中，最合適的載體仍然是個未知數。目前約略有四大類載體：1.天然聚合物(natural-origin polymers) 2.無機材料(inorganic materials) 3.合成可吸收聚合物(synthetic biodegradable polymers) 4.複合材(composites) [63]。可吸收的膠原蛋白海綿是目前唯一被 FDA 核可使用在人體身上的 BMP-2 載體。

天然聚合物包括了膠原蛋白海綿、玻尿酸(hyaluronic acid; HA)及甲殼素(chitosan; CH)。相較於膠原蛋白海綿，玻尿酸載體被認為可以有較好的 BMP-2 持有能力[64]，且在大鼠的下顎骨缺損有較佳的骨生成[65]。甲殼素當 BMP-2 載體也能在大鼠下顎骨的臨界性骨缺損(critical sized defect)促進骨頭新生[66]。Wikesjo 團隊曾經在實驗犬的下顎做出鞍形骨缺損(saddle-type defects)，測試可吸收膠原蛋白海綿(ACS)加入 rhBMP-2 在有 GBR(guided bone regeneration)裝置或無 GBR 裝置的情況下重建齒槽骨的能力；實驗結果發現 rhBMP-2/ACS 在有無 GBR 裝置的情況



下皆能於三個月後成功促進齒槽骨再生，但是 GBR 裝置使得傷口破裂及形成血清腫(seroma)的狀況增加許多[67]。

無機的 BMP-2 載體包括了氫氧基磷灰石(hydroxyapatite; HAp)、磷酸鈣鹽類骨水泥(calcium phosphate cements; CPCs)、陶瓷及生物活性玻璃(bioactive glasses; BGs)。孔洞性的氫氧基磷灰石(porous HAp)和 BMP-2 有著高親和力，且 HAp 吸收降解得慢，因此被認為不是一個良好的控制釋放載體(controlled release carrier)[68]。磷酸鈣鹽類骨水泥所需的 BMPs 劑量較小，即可和其他載體有類似效能[69]。生物活性玻璃則被發現可以增加 BMP 的效用且促進成骨細胞分化[70]。

合成的可吸收聚合物由於沒有免疫原性(immunogenicity)，也沒有傳染疾病的疑慮，因此也被認為是 BMP-2 載體的合適選擇。最常見的合成可吸收聚合物包括聚乳酸(polylactic acid; PLA)、聚乙醇酸(polyglycolide; PLG)及這兩者的共聚物 PLGA[63]。PLA、PGA 以及 PLGA 作為 BMP-2 載體已經在動物模組成功修復多種骨頭缺損，包括大鼠的下顎骨缺損以及實驗犬的牙周缺損、上顎裂(maxillary alveolar cleft)及截斷的尺骨缺損(segmental ulnar long-bone defects)[71-74]。

複合材料來自上述各種材料的組合。如同前面所述，單獨的 HAp 並不是一個理想的 BMP-2 載體；然而若將 HAp、磷酸鈣(tricalcium phosphates; TCP)和膠原蛋白一起製成複合材料來當作 BMP-2 的載體，則可以增加 BMP-2 的局部藥物作用以及促進原位骨頭生長(orthotopic bone formation)[75, 76]。

總結來說，多種材料都可能適合當作 BMP-2 的載體，但哪個才是最佳載體目前仍然沒有定論。

2.8 BMP-2 劑量的考量

2.8.1 臨床現況

1997 年，rhBMP-2 第一次用在人體上顎竇提升術所使用的劑量是每個病人 1.77~3.4 mg[77]。長骨缺損治療的臨床試驗使用了 10~12 mg 的 rhBMP-2[78]。直



到如今，病患所接受的 rhBMP-2 劑量有很大的差異，端看個別病人的情況以及用在何種術式[79]。

然而在目前的臨床治療，並未努力尋求 rhBMP-2 可能使用的最低劑量；相反的，醫師常常依照病人骨缺損的大小而置放一個或是多個 INFUSE Bone Graft。其實，只要把 INFUSE 海綿切成小塊，或是用手擠壓海綿將 rhBMP-2 溶液擠掉一些，臨床醫師很容易就可以使用更少的 rhBMP-2 總量。這種減量的作法說不定是可行的，因為 rhBMP-2 的骨再生效應似乎和 rhBMP-2 局部給予的濃度相關，而非給予的總量[80]。

現今臨床使用的 rhBMP-2 劑量(INFUSE Bone Graft；1.5 mg/mL)大致上是基於 Govender 團隊的脛骨骨折臨床試驗，這個試驗顯示 rhBMP-2 劑量越高，病患需要二次手術的機會就下降，且傷口感染率及病患疼痛也顯著下降[31]。

2.8.2 最低有效劑量仍未知

由於 BMP-2 導致的副作用和其劑量有關聯，因此有研究團隊開始試著尋找治療所需的最低劑量。

長骨治療在臨床上是使用約略 12 mg 的 rhBMP-2，且以病患平均體重 75 公斤來換算的話，則在 300 g 的大鼠實驗中，相對應的劑量是 50 μg 。研究團隊使用 50 μg 的 rhBMP-2，在 7 到 14 天之內讓大鼠 5 mm critical-sized femoral defect 成功癒合完成，而控制組在同樣的時間內無法讓 1 mm 的骨缺損癒合[81]。同個團隊接著使用十分之一的低劑量，發現 5 μg 的 rhBMP-2 也能成功讓大鼠 5 mm critical-sized femoral defect 成功癒合[82]。

另一個 Yasko 的團隊則是發現，11 μg 的 rhBMP-2 可以讓大鼠 5 mm 的骨缺損產生軟骨內成骨(endochondral bone formation)及斷端缺口連接(gap bridging)；若將劑量減少到 1.4 μg rhBMP-2 則無法讓這個臨界骨缺損癒合[83]。這些動物實驗證實了 rhBMP-2 誘導骨頭癒合的效果受到 rhBMP-2 劑量影響，而最佳劑量仍然是個未



知數。

2.8.3 嘗試將 rhBMP-2 效能最大化

除了探索 rhBMP-2 的最低有效劑量，研究團隊們也積極研發新的策略，希望能把 rhBMP-2 的效能最大化。人類骨頭的原始 BMP 生理濃度在每公斤皮質骨中只有 1–2 μg ，但目前臨床上使用的 rhBMP-2 劑量遠超過這個生理濃度。為何需要這麼高劑量才能達到臨床所需成功率，仍然未知[78]。


現今唯一核可的 rhBMP-2 載體是可吸收膠原蛋白，而這個載體支架需要使用相對高劑量的 rhBMP-2。會需要使用高劑量 rhBMP-2 的原因可能是由於 rhBMP-2 會擴散到手術區域周邊、膠原蛋白載體缺少控制釋放藥物的功能(controlled-release)而會在短時間內單次大量釋放 rhBMP-2 (single burst release)且 rhBMP-2 的半衰期短(short biological half-life)。

有個大鼠的研究發現 1 μg rhBMP-2 若使用膠原蛋白海綿當作載體，可以使六成的大鼠在 12 週內讓 8 mm 臨界股骨缺損成功癒合；但若是使用另一種 mesh/alginate 載體系統，卻可以達到 100%的癒合率[84]。由此凸顯了藥物載體可能占有的重要性。

如今，很多研究在研發新的 rhBMP-2 藥物載體，以期使用最低劑量達到 rhBMP-2 最大的效能。

第三章 研究目的

- 一、 建立實驗犬下顎骨之植體周圍臨界骨缺損模型(peri-implant critical-sized defect model)。
- 二、 測試以 HAp (Hydroxyapatite)/TCP (Tri-calcium Phosphate)/Col (Collagen) 複

- 
- 合骨材當作支架(scaffold)，進行植體周圍大範圍補骨手術之可行性。
- 三、 測試 HAp/TCP/Col 複合骨材作為 rhBMP-2 載體的可行性。
 - 四、 測試低濃度 rhBMP-2 促進植體周圍骨頭再生的效能，尋找能達成植體周圍骨再生的 rhBMP-2 最低有效劑量。

第四章 研究材料及方法

4.1 實驗動物

實驗採用小型米格魯(beagle dog)雄性成犬，年紀介於 2~3 歲，體重介於 9~12 公斤。由於米格魯性情溫和，其下顎骨的型態與骨頭代謝的模式皆與人體相似，因此十分適合當作牙科手術的大型實驗動物。實驗犬飼養於台大醫學院實驗動物中心的獨立籠子裡，手術後餵食軟飼料，由我們、動物中心人員及獸醫師共同照護。實驗犬的選擇、管理以及實驗手術流程皆符合台大醫學院實驗動物中心的管理規範，動物實驗計畫申請表暨同意書編號為 20130492。台大醫學院實驗動物中心乃是取得 AAALAC International (The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) 國際認證的單位。

4.2 人工植體

本實驗採用的人工植體為 Brånemark MkIII system (Nobel Biocare, Zürich, Switzerland)，直徑 4 mm、長度 8.5mm，表面處理為 TiUnite (porous-oxide surface-modified implants)。

4.3 RhBMP-2

實驗使用的 rhBMP-2 購買自 GenScript Biotech 公司 (Piscataway, NJ, USA)。



RhBMP-2共含有115個胺基酸，序列如下：

MQAKHKQRKR LKSSCKRHPL YVDFSDVGWN DWIVAPPGYH
AFYCHGECPF PLADHLNSTN HAIVQTLVNS VNSKIPKACC
VPTELSAISM LYLDENEKVV LKNYQDMVVE GCGCR

GenScript的製程使用*E. Coli*，所產出的rhBMP-2是由兩個上述115胺基酸所組成的非糖基化多肽鏈(non-glycosylated polypeptide chains)經由雙硫鍵相接，形成同型二聚體(homodimer)，總分子量為26,018 Da。純度經由SEC-HPLC及SDS-PAGE分析達95%以上。

乾粉使用20 mM 醋酸 (HAc, acetic acid) 還原，再以PBS (phosphate buffered solution)調配至1 mg/ml，分裝儲存於攝氏負八十度冰箱。手術前再以PBS調配至實驗所需濃度，置於冰桶備用。

4.4 人工骨塊

實驗採用的人工骨塊是和康生物科技的齧即安膠原蛋白骨科填補物 (GingivAid® Collagen Bone Graft)。齧即安膠原蛋白骨科填補物是一個人工合成的複合性骨填料，可避免經人或動物所傳染的疾病。齧即安的組成為88%生物陶瓷(60%氫氧基磷灰石及40%β型三鈣磷酸鹽)及12%由牛筋高度純化的第一型膠原蛋白，其中陶瓷顆粒為直徑0.5–1 mm的不規則顆粒。齧即安模擬人體海綿骨的骨基質結構及化學組成，對於骨質新生提供了良好的骨引導性，且具有很好的生物相容性。齧即安在本文後續簡稱為 HAp(hydroxyapatite)/TCP(tricalcium phosphate)/Col(collage)複合骨材。

在實驗手術中，人工骨塊以15號手術刀片切割成符合齒槽骨缺損的大小，並使用3 mm twist drill在正中間鑽一個洞，這個洞提供套住人工植體的空間。



4.5 植體周圍臨界骨缺損之實驗模型建立

首先在犬隻的雙側上下顎拔除第一至第四小白齒和第一大白齒，經過10週的癒合期，可在實驗犬的左下與右下兩側各產生近遠心距離約5公分的無牙脊（圖3）。

本實驗設定的臨界骨缺損（Critical Size Defect, CSD）大小為近遠心10毫米及高度4毫米，而寬度則介於6–8毫米，寬度因缺牙區前後位置不同而有所變異。在每個骨缺損的正中央，植入長度8.5毫米之人工植體，其中根側4毫米植入齒槽骨中，而冠側的4.5毫米則是裸露於骨缺損中（圖9）。

每個骨缺損之間至少相隔5毫米，下顎單側至多可設計三個臨界骨缺損、植入三支人工植體（圖1），一隻實驗犬至多可設計六個臨界骨缺損（六支植體）。由於本實驗的主要目的之一，是要尋找能達成植體周圍骨再生的rhBMP-2最低濃度（最小劑量），因此每個臨界骨缺損所接受的rhBMP-2劑量必須精準掌控。為了避免不同骨缺損之rhBMP-2在同一個手術皮瓣下擴散而互相影響，因此每個臨界骨缺損都是各自獨立分別的皮瓣手術（圖5–12）。為了盡量減少實驗犬的使用數量，每隻實驗犬最多能設計六個臨界骨缺損，然而實驗犬的下顎骨空間有限，同一象限的三個骨缺損若是同時進行手術，則兩兩相鄰的皮瓣必定重疊；因此，相鄰的兩個骨缺損被設計在不同的時間點接受手術（四週/八週），如此可讓我們取得兩個時間點的數據結果，也能讓相鄰的兩個皮瓣不會重疊。

在第一次的手術中，手術位置擇於下顎其中一側的近心及遠心之骨缺損，和另一側中間之骨缺損；相隔四週後進行第二次手術，此時第一次的手術皮瓣已完全癒合，因此手術位置是在原側的中間骨缺損，和另一側近心及遠心之骨缺損。第二次手術後四週，實驗犬犧牲，可得到三個八週之骨標本及三個四週之骨標本。

4.6 實驗分組

一、負控制組：又稱為sham surgery。骨缺損內不加任何材料，只有人工植體的上半部裸露在骨缺損中。



二、 控制組：骨缺損內置放HAp/TCP/Col複合骨材。

三、 實驗組一：

骨缺損內置放HAp/TCP/Col複合骨材 + 5 μg rhBMP-2 (0.02 mg/mL, 250 μl)

四、 實驗組二：

骨缺損內置放HAp/TCP/Col複合骨材 + 20 μg rhBMP-2 (0.08 mg/mL, 250 μl)

五、 實驗組三：

骨缺損內置放HAp/TCP/Col複合骨材 + 50 μg rhBMP-2 (0.2 mg/mL, 250 μl)

◇ 每組別皆有兩個觀察時間點：四週及八週癒合期

◇ 每組別/每個癒合期的樣本量 (sample size) = 5 個植體周圍臨界骨缺損

4.7 手術方法

4.7.1 實驗動物麻醉

誘導全身麻醉的藥劑配製為：Zoletil 50 (0.2ml/kg; Virbac, Carros, France) 2 毫升加上Rompun (Bayer, Leverkusen, Germany) 0.2毫升。實驗犬隻先以皮下注射一劑上述藥劑，等待5-10分鐘，使其進入全身麻醉的階段，再於手術區域施打 1.8 毫升含有 1:100,000 腎上腺素的 XYLESTESIN-A (3M ESPE, Seefeld, Germany) 來進行局部麻醉，阻斷該區域的神經傳導及加強手術部位止血作用。

4.7.2 拔牙手術

實驗犬的左側及右側分別於兩次手術進行拔牙，讓實驗犬能有單側咀嚼進食。手術前禁食 8 小時以上，待全身麻醉完成後，進行例行性消毒及鋪單。接著施行口內局部麻醉。由於實驗犬的牙根很長且角度分岔較大，故先以高速手機將牙齒切割、分離不同牙根，再使用拔牙挺和拔牙鉗以無創傷的方式拔牙，盡量保留頰及舌側齒槽骨的完整。上下顎四顆小白齒 (P1、P2、P3、P4) 及第一大白齒 (M1) 皆拔除後，清潔拔牙窩洞，放置可吸收明膠海綿 (absorbable gelatin sponge, Gelfoam,

Pfizer) 以利止血及傷口癒合，並以可吸收縫線 (polyglycolic acid, Safil, B Braun) 以八字法縫合傷口。術後即刻注射抗生素 (Clincin) 與止痛針劑 (Rimadyl, Pfizer)，並於清醒後給予軟食。10 週後，待傷口及齒槽骨完全癒合，才進行實驗手術。

4.7.3 實驗手術

實驗犬完成全身麻醉後，將前肢的毛皮剃除，並在前肢放置靜脈留置針，IV 給予術前抗生素 Augmentin，並於手術期間靜脈給予台大五號 (台灣大塚製藥, TAITA No.5 injection) 及葡萄糖補充液 (Vitagen, 50%, 20 mL)。

實驗動物以側躺姿勢進行手術，於手術區域注入局部麻醉劑後，在預定位置進行牙齦切開及骨膜皮瓣 (periosteal flap) 翻開，皮瓣設計為半月形 (Semilunar flap design)，皮瓣範圍盡量小且切線必須位於預定骨缺損之外圍 (圖 5)。接著在裸露的齒槽骨上測量及標記臨界骨缺損的邊界，以電動骨鋸進行齒槽骨切割，切割的範圍為近遠心距離 10 毫米、高度從齒槽脊往下 4 毫米 (圖 7)。

切割完成後，移除切割下來之游離自體骨塊，使用 Twist drills 在骨缺損正中央進行人工植體之床位鑽修，並植入人工植體 fixture (ϕ 4.0 x 8.5mm; TiUnite, Brånemark MkIII system, Nobel Biocare, Zürich, Switzerland)。人工植體的根部 4 毫米沒入齒槽骨，而冠部 4.5 毫米則是裸露於骨缺損中 (圖 9)。此時，植體周圍臨界骨缺損模型已準備好。

接著，使用 15 號手術刀片將 HAp/TCP/Col 複合骨材切割成符合骨缺損的大小，並以 3 mm twist drill 在複合骨材的正中央鑽出一個孔洞。實驗組依照不同組別將不同濃度劑量之 rhBMP-2 溶液加至 HAp/TCP/Col 複合骨材，待溶液被複合骨材完全吸收後，小心將複合骨材放置到骨缺損內，中央的孔洞套住裸露的人工植體 (圖 10-11)。控制組之 HAp/TCP/Col 複合骨材不添加任何溶液，直接放置到骨缺損內。負控制組則是不放置 HAp/TCP/Col 複合骨材，也不放置任何東西。

骨膜皮瓣分為兩層縫合。骨膜先使用可吸收縫線 5-0 dextron 進行縫合，外層牙

齧使用不可吸收縫線 4-0 及 5-0 Nylon 進行完全縫合 (primary closure)。縫合傷口力求做到不滲血，按壓也無液體滲出 (圖 12)。



4.7.4 術後照顧

實驗犬術後給予軟食。術後三天內給予肌肉注射抗生素 clincin 及口服止痛藥 Rimadyl (Carprofen)，每日觀察傷口，並於一週後拆線。

4.8 螢光骨染色標記 (Polychromatic Fluorescence Labeling)

4.8.1 四環素 Tetracycline (20 mg/kg; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

- 配置：以生理食鹽水調配 tetracycline 粉末，由於 tetracycline 於 pH=7 時無法溶解，因此必須使溶液維持在 pH=6.0–6.5 之間。避光儲存於 4°C。
- 施打：於第一次植牙手術時以皮下注射方式施打
- 螢光：黃色

4.8.2 鈣黃綠素 Calcein (10 mg/kg; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

- 配置：以 1.4% isotonic sodium bicarbonate (NaHCO₃) 來調配 calcein 粉末，調配濃度為 10 mg/mL，調配完成後 pH 值約為 7.7。在以碳酸氫鈉溶液調配的過程中會產生 CO₂ 氣體，因此 vortex 震動溶解的過程中，必須反覆打開蓋子排氣。避光儲存於 4°C。
- 施打：於第一次植牙手術後滿三週時，以皮下注射方式施打
- 螢光：綠色

4.8.3 茜素羧絡合劑 Alizarin Complexone (20 mg/kg; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

- 配置：以 1.4% isotonic sodium bicarbonate (NaHCO₃) 來調配粉末，調

配濃度為 15–30 mg/mL，調配完成後 pH 值約為 7.1–7.7。在以碳酸氫鈉溶液調配的過程中會產生 CO₂ 氣體，因此 vortex 震動溶解的過程中，必須反覆打開蓋子排氣。避光儲存於 4°C。

- 施打：於第一次植牙手術後滿六週時，以皮下注射方式施打
- 螢光：紅色

4.9 實驗動物犧牲及標本取得

4.9.1 動物之犧牲手術

依據國立台灣大學醫學院實驗動物中心之施行動物犧牲指南與農委會動物保護法規範下進行實驗動物的犧牲。

4.9.2 標本取得

在實驗犬之兩側嘴角，以 22 號刀片向臉頰遠心處劃開，以取得較佳視野及手術空間。從下顎門牙區切開唇側前庭，往兩側後牙區延伸至下顎升支（mandibular ramus）處，以剝離唇頰側之臉頰、黏膜及肌肉組織；由舌側前庭處劃開，同樣往兩側遠心處延伸至翼突下顎縫（pterygomandibular raphe），剝離舌側黏膜、舌頭及口底肌肉組織。以手動骨鋸沿著兩側支下顎骨角（mandibular angle）和下顎升支處之間的假想連線做切割，將下顎骨完全分離出來，並以 15 號手術刀片去除多餘的軟組織（圖 13）。小心定位六組下顎骨骨缺損及植體位置，並使用電動骨鋸將各組標本切下，依序放置於裝有福馬林液體的組織盒保存。

4.10 放射線學檢查及其影像分析法（Radiographic Analysis）

將實驗標本從福馬林浸泡溶液中取出，去除骨缺損以下至下顎骨底界邊緣之軟

組織，使用數位底片和 X 光機(Dentsply Sirona, York, PA, USA)以 0.16 秒、70 keV、距離標本 30 公分之照射條件平行照射 X 光。數位底片讀片機將原始資料以 dicom 原始檔匯出後，使用 ImageJ 影像分析軟體 (NIH, Bethesda, MD, USA) 進行分析。

在人工植體兩側、骨缺損的正中間，我們選取了兩個 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 的範圍當作興趣區間(areas of interest; AOIs)(圖 24)。AOIs 內的平均灰值(gray values)以 ImageJ 影像分析軟體計算出來，並在各組間進行統計分析比較(圖 25)。

4.11 微電腦斷層掃描及其影像分析方法 (Micro-CT Analysis)

為了取得三度空間的影像資訊，實驗標本使用 Skycan-1176 微電腦斷層掃描儀器 (Bruker microCT, Kontich, Belgium) 進行照射，照射參數為 90 kV、278 μA 以及 35 μm -voxel 解析度。

在三度空間的影像重組完成後，各組別三度空間表面影像顯示在圖 26–35，此圖示可以看到將軟組織去除之後的硬組織顯像及新生骨質的表面質地。接著，使用 DataViewer 軟體 (Bruker microCT, Kontich, Belgium) 將植體的近遠心及頰舌側切面展示出來(圖 38–47)，頰舌側切面可用來評估垂直新生骨質之頰舌側厚度。

CTAn 分析軟體 (Bruker microCT, Kontich, Belgium) 則被用來進行後續影像量化分析，並設定了閾值(threshold)除去植體散射及 HAp/TCP 陶瓷顆粒造成的影響。在人工植體兩側、骨缺損的正中央，選取了兩個長方立方 $2 \text{ (mesio-distal)} \times 2 \text{ (coronal-apical)} \times 4 \text{ (bucco-lingual)} \text{ mm}^3$ 的範圍當作興趣區間 (volumes of interest; VOIs)(圖 36)。VOIs 內的新生骨質密度 (Bone volume density = Bone volume (BV) / Total Volume (TV)) 以軟體分析計算出來，並在各組間進行統計分析比較(圖 37)。

4.12 生物力學分析：植體共振頻率分析 (Resonance Frequency Analysis)



實驗標本在完成 X 光及微電腦斷層掃描之後，小心將人工植體 cover screw 正上方的牙齦以 15 號手術刀片切開，旋轉取下 cover screw，並將一個帶有磁鐵的金屬 SmartPeg 鎖到植體上，使用頻率分析儀 (Osstell, Columbia, MD, USA) 測量植體的共振頻率，所得之 ISQ (Implant Stability Quotient) 數值記錄下來並於各組間比較分析 (圖 48)。測量完畢後，將 SmartPeg 移除，並將 cover screw 鎖回植體上。

4.13 標本對切

使用封口膜 (Parafilm M Laboratory Film, USA) 將實驗標本包覆作為保護，在標本之封口膜上黏著兩隻平行植體長軸的金屬線作為平行切面之參考，接著使用聚甲基丙烯酸甲酯 (Tempron, GC Dental, Japan) 將樣本固定在慢速精密切割機 (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) 的載板上，固定時務必將植體長軸平行於載板平面。

待 Tempron 樹脂硬化後，將載板鎖上慢速精密切割機，使用直徑 127 mm、厚 0.4 mm 的鑽石刀片 (Series 15HC) 將植體以近遠心的方向、平行植體長軸對半切。對切後的樣本小心移除 Parafilm 及樹脂，浸泡回福馬林溶液儲存。

4.14 不脫鈣之研磨骨組織切片 (Undecalcified Ground Sections)

4.14.1 樣本脫水

每個組別的樣本分別取出標本對切後的其中一半，將這一半標本依序放入 70%、80%、90%、95%、100% 酒精溶液中做序列性脫水，每種不同濃度的酒精浸泡時間皆達八小時以上以確保完整脫水。



4.14.2 樣本包埋

包埋盒塗上分離劑後晾乾，將對半切且完成脫水的樣本切面朝下放入包埋盒中，樣本若太大無法平放，則先以牙科低速手機將樣本不重要的區域做修磨，使樣本對半切之切面能完全平貼於包埋盒底部。接著將包埋盒連同樣本放進真空包埋機 (Cast N'Vac 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) 抽氣 5 分鐘，讓樣本中的酒精得以完全揮發。

包埋材使用的是環氧樹脂 epoxy resin (Epothin, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA)，以容積比「樹脂：硬化劑=7：2」的比例做調配，緩慢攪拌均勻後，置入真空包埋機抽氣 5 分鐘。由於真空包埋機能將內部空間抽真空而達到負一大氣壓，如此可以減少包埋時所產生的氣泡。將調配好的環氧樹脂沿著包埋盒邊緣小心倒入含有樣本的包埋盒中，直到完全覆蓋樣本且達包埋盒口高度，再次置入真空包埋機抽氣 5 分鐘，讓樣本中氣泡量減至最少。

包埋好的樣本連同包埋盒置入恆溫箱 (TU-400D Orbital Shaking Incubator, Yih Der, Taiwan)，溫度設定 42°C，避光靜置不搖晃超過 24 小時，至環氧樹脂完全聚合硬化。

4.14.3 樣本切片

環氧樹脂樣本硬化後從包埋盒脫模，使用鋸片機 (Saw microtome; Leica SP1600, Nussloch, Germany) 將非樣本那一端多餘不規則的樹脂切除，使樣本達到上下兩平面完整平行之圓柱狀。接著，樣本端表面樹脂以每次 100 μm 的厚度做修整，直到樣本植體金屬面完整呈現。再以每次 400 μm 厚度為設定做樣本切片，每塊樣本可切下二至三片樣本薄片。經過完整清洗後，樣本薄片夾在兩個玻片中，再以金屬夾夾住固定，以避免樣本薄片乾燥後捲曲。

4.14.4 玻片製備及樣本封片



首先要準備標準研磨玻片。使用精密薄片切割研磨機 (PetroThin, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) 將空白玻片的其中一面修磨粗糙，並且修磨玻片至統一厚度 1150 μm ，以利後續掌控樣本磨片之厚度。

接著配置環氧樹脂 epoxy resin (Epothin, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA)，以容積比「樹脂：硬化劑=5：2」的比例做調配，緩慢攪拌均勻後，置入真空包埋機抽氣 5 分鐘以減少氣泡。使用探針沾取調配好的環氧樹脂，放到標準研磨玻片的粗糙面上當作黏著劑，小心去除氣泡後，選取植體切面最大的樣本薄片（最靠近植體正中切面），最大切面朝下，將薄片壓到玻片的環氧樹脂上。樣本玻片上下使用塑膠玻璃紙作為隔離後，將其置入手動壓平器 (Olympus) 重壓，使黏著劑盡量薄且平均，等待 24 小時至環氧樹脂完全硬化。

4.14.5 樣本玻片修磨及拋光

樣本封片完成後，樣本含玻片的總厚度略厚於 1550 μm (樣本切片 400 μm + 標準研磨玻片 1150 μm + 黏著層)。將樣本玻片置入精密薄片切割研磨機 (PetroThin, Buehler, Lake Bluff, IL, USA)，從原先厚度以每次 5 μm 的厚度做修磨，直至樣本玻片總厚度 1350 μm ，此時樣本厚度為 200 μm (1350 μm - 1150 μm)。

修磨後的樣本玻片使用凡士林固定於研磨拋光機 (Minimet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) 的載板上，拋光碗中放置專用砂紙 (CarbiMet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA)，從粗到細，並加入少量蒸餾水作為介質，設定儀器力量 3 牛頓、速度 50 RPM、時間 60 秒作為初步拋光。

初步拋光後，在將拋光碗中砂紙置換成更為細緻的拋光絨布 (MicroCloth, Buehler, Lake Bluff, IL, USA)，設定儀器力量 3 牛頓、速度 50 RPM、時間 30 秒做細緻拋光。樣本之最終厚度為 30 μm 。

4.15 螢光骨染色之顯微分析



4.15.1 螢光顯微鏡觀察

4.15.1.1 骨染劑之螢光激發/發射光譜 (*Fluorescence excitation and emission*)

配置實驗手術中注射用之骨染劑，置於螢光光譜儀 (Hitachi F-4500 Fluorescence Spectrophotometer) 中測定染劑之激發 (Excitation; Ex) 與發射 (Emission; Em) 波長。測定過程中將手術使用之染劑濃度稀釋 50 倍，以減少自吸收的問題。使用染劑廠商給的建議激發波長去掃描發射波長，取得此激發波段的發射波長。再以逆向方式，使用已取得發射波長回推測試激發波長。最終以取得的激發波段去測試最終發射波段。由此來回檢驗後，便可得到實驗藥品正確的激發與發射波長，並依據此波長去選擇螢光顯微鏡的濾片。

4.15.1.2 螢光顯微鏡設定

修磨及打亮後最終厚度為 30 μm 之樣本玻片，置於正立共軛焦顯微鏡 (Carl Zeiss LSM880, White Plains, NY, USA) 觀察。透過先前光譜儀測得四環黴素 (Tetracycline; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 的最佳激發波長為 396 nm，發射波長為 536 nm；我們選擇市售可取得最接近測試波長的濾片，設定螢光顯微鏡激發波長為 405 nm，收光波長為 500~550 nm。鈣黃綠素 (Calcein; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 從光譜儀測得激發波長 486 nm，發射波長 509 nm；螢光顯微鏡設定為激發波長 488 nm，收光波長 500~550 nm。茜素氨羧絡合劑 (Alizarin complexone; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 從光譜儀測得激發波長 605 nm，發射波長 666 nm；螢光顯微鏡設定激發波長 561 nm，收光波長 650 nm 以上。

設定好各染劑之螢光波長濾片後，首先觀察標本中含有牙根的部位。牙髓腔的牙本質沈積由外到內的顏色應與螢光骨染劑注射順序相符 (圖 53)，由此來判定骨染劑螢光波長之正確性。建立好螢光顯微鏡之濾片模組後，將所有標本玻

片進行全片掃描。掃描檔案輸出成 LSM 檔，再透過軟體 ZEN 2011 (Blue edition, Carl Zeiss Microscopy) 輸出成 TIFF、8 BIT 檔案。



4.15.2 螢光染色量化分析

由於螢光顯微鏡全片掃描分析後，發現四環黴素 (Tetracycline) 所染上的組織特异性 (specificity) 不佳，在多處軟組織及背景皆有螢光產生，因此將四環黴素 (Tetracycline) 的黃色螢光剔除於量化分析。量化分析僅計算鈣黃綠素 (Calcein) 的綠色螢光及茜素氨羧絡合劑 (Alizarin Complexone) 的紅色螢光。

第一個興趣區間 (areas of interest; AOIs) 的選擇和 X 光量化分析是相同的，在人工植體兩側、骨缺損的正中間，選取了兩個 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 的範圍當作興趣區間。第二個興趣區間則是植體冠側裸露部分的植體螺紋間空間 (inter-thread area) (圖 65)。興趣區間內的綠色及紅色螢光面積比例 (紅綠螢光總和面積/興趣區間總面積)，以 ImageJ 影像分析軟體 (NIH, Bethesda, MD, USA) 計算出來，並在各組間進行統計分析比較 (圖 66-67)。

4.16 脫鈣之骨組織切片

每組樣本對半切的其中一半已在前面製作成非脫鈣之骨組織磨片，另一半則是用作脫鈣之骨組織切片。樣本使用 EDTA 及 dilute hydrochloric acid (Thermo Scientific TBD-1 Decalcifier, Kalamazoo, MI, USA) 進行脫鈣。脫鈣完成後，小心以探針將植體撥離取下，避免碰觸首要觀察重點之植體周圍組織。

將標本以清水放流沖洗 30 分鐘後，依序放入下列溶液中進行序列性脫水及石蠟浸潤：(1) 70% EtOH：8 小時；(2) 80% EtOH：4 小時；(3) 90% EtOH：4 小時；(4) 95% EtOH 第一次：4 小時；(5) 95% EtOH 第二次：4 小時；(6) 100% EtOH 第一次：2 小時；(7) 100% EtOH 第二次：2 小時；(8) 100% EtOH 第三次：2 小時；

(9) xylene 第一次：50 分鐘；(10) xylene 第二次：50 分鐘；(11) 石蠟 (paraffin) 70°C 第一次：3 小時；(12) 石蠟 (paraffin) 70°C 第二次：1 小時。

包埋製程是將透蠟組織與 50°C~60°C 溶化的石蠟一起放入容器中，接著立即以冷水冷卻以形成蠟塊。將包埋完成的標本以石蠟組織切片機切成 4 μm 厚的組織切片，再以切片烘片機乾燥 24 小時。

由於後續要進行組織染色觀察，而染劑溶於水卻不溶於蠟，因此切片要經脫蠟覆水過程才得以進行染色。此時切片很薄、體積小，所需脫蠟覆水的時間也較短。先使用二甲苯來脫蠟 5~10 分鐘，再依序以 100%、95%、90%、80%、75% 的酒精浸泡 3-5 分鐘以除去二甲苯，最後放入蒸餾水中 3 分鐘，完成脫蠟覆水的步驟。

最後進行切片染色。每組樣本皆製備了兩片以上的組織切片，其中一片進行蘇木精-伊紅染色 (hematoxylin and eosin stain；H&E stain)，另一片則進行馬森三色染色法 (Masson's trichrome stain；MT stain)。所有組別的組織染色皆使用數位顯微鏡 (Pannoramic 250 Flash III, 3DHisTech, Budapest, Hungary) 觀察及拍照。

4.17 統計分析

我們使用曼-惠特尼 U 檢驗 (Mann-Whitney U test) 來比較各組別中四週及八週的區別。我們使用弗里德曼檢驗 (Friedman test) 及單因子多樣本中位數差異檢定 (Kruskal-Wallis test) 合併多重比較之邦費羅尼校正 (Bonferroni correction) 來比較五個組別之間的差異性。調整 P 值 (adjusted *p* value) 小於 0.05 被視為統計顯著。所有統計皆使用統計軟體 SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. IBM Corp. Armonk, NY, USA) 作分析。



第五章 結果

5.1 實驗模型建立與手術臨床觀察

本實驗第一次嘗試採用此植體周圍臨界骨缺損實驗模型，在過程中遇到許多困難。有些實驗犬術後不願意吃軟食，咀嚼乾飼料易將傷口咬破，因此模組變更將上顎對咬牙也進行拔除。實驗犬術後難以餵食口服藥物，強制餵食的過程易拉扯到手術傷口，因此術後抗生素改為針劑注射；而由於針劑止痛藥會造成犬隻胃潰瘍出血等副作用，因此止痛藥視犬隻反應與進食狀況仍維持口服給予。

初始嘗試的皮瓣設計(flap design)是從無牙脊正上方切開(mid-crestal incision)且無垂直切口(vertical incision)，然而臨界骨缺損的範圍很大，此皮瓣設計常發生術後併發症。在負控制組(blank)，縫合後的皮瓣切口大部分是懸空無支撐的，僅正中間有人工植體單點撐住，因此部分手術傷口在癒合完全後，會有封口螺帽(cover screw)露出。在控制組及實驗組，縫合後的皮瓣切口是位於HAp/TCP/Col複合骨材正上方，在癒合的過程中偶有傷口裂開、HAp/TCP顆粒從縫合處跑出來，癒合後也有部分組別會有封口螺帽(cover screw)露出的情形。因此，經過多次反復試驗與改良後，將皮瓣設計改為半月形(semilunar flap design)，皮瓣範圍盡量小且切線必須位於預定骨缺損之外圍，也就是縫合後的皮瓣切口必須位於齒槽骨上，而非懸空或位於人工骨材上方；縫合改為內外雙層縫合，密不透水。本實驗後續的分析與統計計算皆採用實驗模組改良後、皮瓣完整癒合無併發症之實驗樣本。

5.2 放射線影像分析



5.2.1 四週之放射線影像分析

負控制組 (blank) 在癒合四週後的根尖 X 光片仍可清楚看到骨缺損的切線邊界，植體懸空的周圍無新生骨頭，僅在骨缺損的切緣有些微不明顯的骨質生長跡象。而植體下半段植入齒槽骨的部分則呈現不錯的骨整合 (圖 14)。

控制組 (只放 HAp/TCP/Col 複合骨材) 也可清楚看到骨缺損的切線邊界，骨缺損的空間中充滿了邊界清晰的 HAp/TCP 顆粒，植體懸空的周圍並無明顯新生骨質，僅在骨缺損的底部切緣有少許的骨質新生。植體下半段植入齒槽骨的部分也呈現不錯的骨整合 (圖 16)。

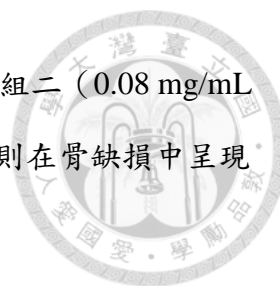
在三個不同劑量之 rhBMP-2 實驗組中都可以看到骨缺損的切線邊界變得模糊，HAp/TCP 顆粒的邊界也較不清楚，骨缺損中的射線不透性 (radiopacity) 增加，骨缺損及植體懸空的周圍皆有骨質新生的跡象。植體下半段植入齒槽骨的部分呈現良好的骨整合 (圖 18、20、22)。

5.2.2 八週之放射線影像分析

負控制組 (blank) 在癒合八週後的根尖 X 光片可看到骨缺損的切線邊界從直角變得圓潤，骨缺損之底部邊角有少量骨質新生，而骨缺損之兩側上緣則有骨質吸收。植體懸空的周圍無新生骨頭，植體下半段植入齒槽骨的部分維持完整的骨整合 (圖 15)。

控制組 (HAp/TCP/Col) 可看到骨缺損的部分切線邊界仍十分明顯，骨缺損的空間仍有不少清晰的 HAp/TCP 顆粒，HAp/TCP 顆粒的數量相較四週來說已有減少。骨缺損之底部邊角有少量骨質新生，然而骨缺損中央及植體懸空的周圍並無明顯可見之新生骨頭。植體下半段植入齒槽骨的部分仍維持完整的骨整合 (圖 17)。

在三個不同劑量之 rhBMP-2 實驗組中已幾乎看不見骨缺損的切線邊界，鮮少可辨識的 HAp/TCP 顆粒。骨缺損中的射線不透性 (radiopacity) 明顯增加，骨缺損及植體懸空的周圍皆有大量新生骨質充滿。實驗組一 (0.02 mg/mL rhBMP-2) (圖



19) 只剩下植體中段旁有些微放射透明 (radiolucency)，而實驗組二 (0.08 mg/mL rhBMP-2) (圖 21) 及實驗組三 (0.2 mg/mL rhBMP-2) (圖 23) 則在骨缺損中呈現完全骨癒合及植體骨整合。

5.2.3 放射線影像之灰值量化分析

在根尖 X 光片之人工植體兩側、骨缺損的正中間，選取了兩個 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 的範圍當作興趣區間 (areas of interest; AOIs) (圖 24)。AOIs 內的平均灰值 (grey values) 在各組間進行統計分析比較。

在四週癒合期，可見到控制組和三個 rhBMP-2 實驗組皆有頗高的灰值 (grey value)，控制組和實驗組之間並無明顯區別。負控制組則有很低的灰值，實驗組二 (0.08 mg/mL rhBMP-2) 及實驗組三 (0.2 mg/mL rhBMP-2) 的灰值皆顯著大於負控制組 (adjusted $p < 0.05$ 及 0.01) (圖 25)。

在八週癒合期，負控制組保持很低的灰值，三個 rhBMP-2 實驗組則有很高的灰值。除了實驗組二 (0.08 mg/mL rhBMP-2) 及實驗組三 (0.2 mg/mL rhBMP-2) 的灰值皆顯著大於負控制組外 (adjusted $p < 0.01$)，實驗組三 (0.2 mg/mL rhBMP-2) 的灰值顯著大於控制組 (adjusted $p < 0.05$) (圖 25)。

將各組之間的四週和八週癒合期相比較，可發現控制組從四週到八週的灰值有顯著下降 (adjusted $p < 0.05$)。實驗組三 (0.2 mg/mL rhBMP-2) 從四週到八週的灰值則是顯著上升 (adjusted $p < 0.05$)。

5.3 微電腦斷層影像分析

5.3.1 微電腦斷層之三度空間表面影像

圖 26–35 展示了將軟組織顯像去除之後的硬組織顯像。負控制組在四週 (圖 26) 還清楚保有臨界骨缺損的型態，近遠心兩側的骨缺損邊界初步出現齒槽骨垂直吸



收，人工植體垂直裸露在骨缺損中央，沒有看到明顯骨質新生的跡象。負控制組在八週（圖 27）可在骨缺損的底部邊界看到少量的骨質新生，近遠心兩側的骨缺損牆已經明顯吸收、降低高度了。

控制組在四週（圖 28）有滿滿的 HAp/TCP 顆粒佔據整個骨缺損的空間。在八週（圖 29）HAp/TCP 顆粒減少，沒有看到明顯的新生骨質，骨缺損的空間顯得空曠，骨缺損的型態依舊清晰可見，近遠心兩側的骨缺損邊界初步出現齒槽骨垂直吸收。

三個實驗組在四週的時候（圖 30、32、34）留存的 HAp/TCP 顆粒較控制組為少。實驗組三（0.2 mg/mL rhBMP-2）（圖 34）已可看到礦化的新生骨頭開始佔據骨缺損的空間。

在八週時，三個實驗組皆有非常明顯的新生硬骨遍布整個骨缺損的空間。實驗組一（0.02 mg/mL rhBMP-2）（圖 31）及實驗組二（0.08 mg/mL rhBMP-2）（圖 33）仍存有少量的 HAp/TCP 顆粒，實驗組三（0.2 mg/mL rhBMP-2）（圖 35）則幾乎沒有留存的 HAp/TCP 顆粒。實驗組一（0.02 mg/mL rhBMP-2）（圖 31）在骨缺損範圍新生的骨頭表面仍未塑形（remodeling）完成，呈現粗糙狀；實驗組二（0.08 mg/mL rhBMP-2）（圖 33）及實驗組三（0.2 mg/mL rhBMP-2）（圖 35）則在骨缺損處呈現光滑緻密的新生皮質骨，齒槽骨的原始型態也達到完美重建，骨缺損中原先裸露的人工植體已完全被新生骨頭包覆。

5.3.2 微電腦斷層之切面影像

圖 38–47 展示了微電腦斷層之近遠心及頰舌側切面影像。由於我們後續的組織切片是以近心到遠心的方向做切割，因此頰舌側新生之骨頭厚度可由此切面影像作為評估。

負控制組無論在四週（圖 38）或八週（圖 39），其人工植體的上半部皆維持裸露在齒槽骨上方，頰舌側皆未有新生骨頭包覆。控制組在四週（圖 40）可看到頰



舌側有許多 HAp/TCP 顆粒，此時並無新生骨質的跡象；在八週(圖 41)其 HAp/TCP 顆粒減少許多，骨缺損底部似乎有些微新生骨質，而人工植體的上半部仍未有骨質包覆。

三個實驗組在四週(圖 42、44、46)時，即在裸露植體的頰舌側有低礦化度的新生骨質出現，此時 HAp/TCP 顆粒仍然可分辨。在八週(圖 43、45、47)時，三個實驗組皆有非常明顯的頰舌側骨質垂直增生，原先裸露的人工植體皆被新生骨頭所包覆，且新生的骨頭厚度十分充足。

5.3.3 微電腦斷層之新生骨質密度量化分析

各組別在骨缺損正中央的新生骨質密度 (new bone density) 展示在圖 37。由於使用 CTAn 軟體 (Bruker microCT, Kontich, Belgium) 設定了閾值 (threshold) 除去植體散射及 HAp/TCP 陶瓷顆粒造成的影響，我們可看到控制組之新生骨質密度的相對值明顯比放射線影像之灰質分析來得低；三個實驗組也更符合劑量效應關係 (dose-dependent effect)，無論在四週或八週，rhBMP-2 劑量越高則新生骨質密度也越高。實驗組三 (0.2 mg/mL rhBMP-2) 在八週時，其新生骨質密度顯著大於控制組 (adjusted $p < 0.05$)。三個實驗組從四週到八週皆有顯著增加的新生骨質密度 (adjusted $p < 0.05$)。

5.4 植體共振頻率分析 (Resonance Frequency Analysis)

由於台灣只能取得骨架較小的小型米格魯實驗犬，在手術切出一個臨界骨缺損後，剩餘的齒槽骨高度往往只有約略 2 mm，手術將人工植體的根部沒入 4 mm，實際上只有 2 mm 有骨頭支撐，最根部的 2 mm 懸空在下齒槽神經 (inferior alveolar nerve) 的空間中，因此植體無法達到初級穩定度 (primary stability)，術後立即測試之 ISQ (Implant Stability Quotient) 數值皆小於 40。

在四週的癒合期(圖 48)，三個 rhBMP-2 實驗組的 ISQ 皆已超過 75；實驗組一(0.02 mg/mL rhBMP-2)和實驗組二(0.08 mg/mL rhBMP-2)的 ISQ 顯著高於負控制組(adjusted $p < 0.05$ & 0.01)。從四週到八週，控制組及三個實驗組皆有顯著增加的 ISQ 數值(adjusted $p < 0.05$)。

在八週的癒合期(圖 48)，三個 rhBMP-2 實驗組的 ISQ 皆已超過 85。實驗組二(0.08 mg/mL rhBMP-2)及實驗組三(0.2 mg/mL rhBMP-2)的 ISQ 顯著高於負控制組(adjusted $p < 0.05$ & 0.01)。只有實驗組三(0.2 mg/mL rhBMP-2)的 ISQ 顯著高於控制組(adjusted $p < 0.05$)。

5.5 骨染劑之螢光激發/發射光譜 (Fluorescence excitation and emission) 測定

圖 49–52 展示由螢光光譜儀所測定出三種骨染劑的激發 (excitation) 與發射 (emission) 波長。以此測定的結果選擇之螢光顯微鏡濾片，成功在顯微鏡下觀察到黃色、綠色及紅色螢光。圖 53 為樣本之牙根切面，由於二級牙本質是由外向內沈積，觀察牙髓腔外層齒質由外圈往內圈的螢光依序為黃色、綠色及紅色螢光的牙本質沈積線條，符合手術中的給藥順序「Tetracycline(黃)→Calcein(綠)→Alizarin complexone(紅)」。

5.6 不脫鈣之研磨骨組織切片 (Undecalcified Ground Sections)

圖 54–64 展示不脫鈣之研磨骨組織切片在螢光顯微鏡下的圖像。由於四環黴素 (tetracycline) 所染上的組織特異性 (specificity) 不佳，在多處軟組織及背景皆有螢光產生，因此將四環黴素 (tetracycline) 的黃色螢光剔除於圖像展示及量化分析。

圖 54–63 為各組樣本近心往遠心方向切割之切面。不同顏色的螢光代表不同時間點所產生的新生骨質鈣化：綠色螢光代表第一次手術後三週的骨生成，紅色螢

光代表第一次手術後六週（第二次手術後兩週）的骨生成，黃色區域乃為綠色和紅色螢光重疊區域而形成。

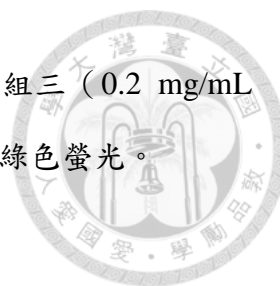


5.6.1 四週之螢光顯微影像

圖 54、56、58、60、62 為四週各組的顯微螢光圖。由於是四週的組別，是第二次手術才建立的臨界骨缺損模型，因此綠色螢光僅存在骨缺損以外、原始齒槽骨的位置，反映了生理性骨質重塑 (bone remodeling)。負控制組 (圖 54) 及控制組 (圖 56) 皆在骨缺損邊界處有少許的紅色螢光往骨缺損的方向延伸，其中負控制組在底部邊界處的新生骨質略優於控制組。實驗組一 (0.02 mg/mL rhBMP-2) (圖 58) 和實驗組二 (0.08 mg/mL rhBMP-2) (圖 60) 的紅色螢光已開始往骨缺損中央及植體延伸，且隱約可見微弱的紅色螢光佈滿整個骨缺損的空間。實驗組三 (0.2 mg/mL rhBMP-2) (圖 62) 則可見到訊號明顯的紅色螢光延伸至骨缺損的中央、至植體表面，並往上到植體平台 (implant platform) 的高度。

5.6.2 八週之螢光顯微影像

圖 55、57、59、61、63 為八週各組的顯微螢光圖。負控制組 (圖 55) 在骨缺損底部兩側邊界處有部分紅綠相間的新生骨頭，使得直角的骨缺損邊界變成圓弧形，而裸露的植體兩側及骨缺損中心並無新生骨質。控制組 (圖 57) 骨缺損邊界仍舊明顯，底部兩側邊界處的骨質新生不如負控制組，但已有少部分紅色螢光開始往骨缺損的中心增長。八週的三個 rhBMP-2 實驗組顯現了明顯優勢，所有骨缺損的空間皆有紅色或綠色的螢光分布，高度皆達到植體平台 (implant platform)，甚至有超過原始齒槽骨的高度。實驗組一 (0.02 mg/mL rhBMP-2) (圖 59) 的骨缺損空間幾乎全是紅色螢光，新生骨質的密度似海綿骨。實驗組二 (0.08 mg/mL rhBMP-2) (圖 61) 的骨缺損空間除了紅色螢光，有近四成的綠色螢光，且新生骨質密度較實驗組一為高，更可看到綠色螢光除了從倒門字型的三個骨缺損邊界往



中心延伸，還有綠色螢光是從骨膜的方向起始往下延伸。實驗組三（0.2 mg/mL rhBMP-2）（圖 63）則明顯看到骨缺損的空間幾乎充斥高密度的綠色螢光。

5.6.3 螢光顯微影像之植體螺紋放大檢視

圖 64 是將人工植體上半部裸露於骨缺損的部位放大檢視，白色虛線是骨缺損底部的界線，虛線以上的是新生的骨質。負控制組無論在四週或八週，在骨缺損底部僅有不到半個螺紋高度的骨增生。控制組在四週也僅有不到半個螺紋高度的骨增生，八週則有 1-1.5 個螺紋高度的骨質新生。實驗組一（0.02 mg/mL rhBMP-2）於四週在植體螺紋邊隱約可見微弱的紅色螢光，高度已達第一個螺紋，顯示新生骨質已在植體周圍開始初步礦化；八週時，明顯的紅色螢光往上增長至植體平台高度，植體螺紋表面也明顯看到紅色螢光的新生骨質貼附。實驗組二（0.08 mg/mL rhBMP-2）在四週的表現略優於實驗組一，除了整體骨缺損空間皆隱約可見微弱的紅色螢光，還有從底部往上增長近一個螺紋高度的明顯紅色螢光；八週的表現則明顯優於實驗組一，除了明顯的紅色螢光外，高密度的綠色螢光從骨缺損的底界往上增長，也從冠側骨膜由上往下增長，而植體螺紋間的空间（inter-thread area）也有超過一半被新生骨質充滿。實驗組三（0.2 mg/mL rhBMP-2）在四週及八週皆明顯優於所有組別，四週時紅色螢光的新生骨質已到達植體平台高度，且分布於植體螺紋間區域；八週時，高密度的綠色螢光及少量紅色螢光充滿整個骨缺損的空間，也充滿了植體螺紋間的空间，增長高度達到植體平台，新生骨質密度已超越原始齒槽骨的密度。

5.6.4 螢光顯微影像之螢光面積量化分析

圖 65 顯示顯微螢光量化分析的區域，第一個興趣區間（areas of interest; AOIs）在人工植體兩側、骨缺損的正中間，選取了兩個 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 的範圍當作興趣區間；第二個興趣區間則是植體冠側裸露部分的植體螺紋間空间（inter-thread area）。第

一個興趣區間的螢光量化分析結果顯示在圖 66，實驗組二(0.08 mg/mL rhBMP-2)及實驗組三(0.2 mg/mL rhBMP-2)在兩個時間點皆相較於負控制組有顯著較高的螢光面積比例，而只有實驗組三(0.2 mg/mL rhBMP-2)在四週及八週有顯著優於控制組(adjusted $p < 0.01$)。第二個興趣區間的螢光量化分析結果顯示在圖 67，無論在四週或八週，皆只有實驗組三(0.2 mg/mL rhBMP-2)相較於負控制組及控制組有顯著較高的螢光面積比例(adjusted $p < 0.01$)。

5.7 脫鈣之骨組織切片

圖 68–87 顯示脫鈣骨組織切片在光學顯微鏡下之圖像。圖 68–77 為馬森三色染色法(Masson's trichrome stain, MT stain)，圖 78–87 為蘇木精-伊紅染色(hematoxylin and eosin stain, H&E stain)。從整體看來，相較於非脫鈣骨組織磨片之螢光染色來說，脫鈣之骨組織切片染色所看到的新生骨質多了許多。在很多非脫鈣磨片未看到螢光顯色或是非常微弱的螢光顯色區域，在脫鈣組織已有顯而易見的骨染色顯色。再者，所有顯微圖像皆未觀察到炎症細胞浸潤(inflammatory cell infiltration)，由此可證本實驗採用的 HAp/TCP/Col 複合骨材以及 rhBMP-2 皆具有良好的生物相容性(biocompatibility)。

5.7.1 近遠心切面全景

圖 68–87 (上) 為臨界骨缺損近心至遠心切面的全景顯微圖像。負控制組未能維持骨缺損的空間，牙齦組織已往下佔據大部分的骨缺損區域，而在骨缺損底部兩側邊界處的骨質新生雖然量少，但十分快速且緻密。

控制組雖然在骨缺損底部兩側的骨質新生較負控制組為差，但其四週及八週皆良好維持了骨缺損的空間與高度，在八週仍可看到多量清楚的 HAp/TCP 骨粉顆粒，且有少許新生骨頭往骨缺損中央生長。

四週的實驗組明顯比非脫鈣磨片的螢光顯微圖看到更多的新生骨質。三個實驗組皆有散布在整個骨缺損空間的新生骨質，新生骨質的高度也都已達到植體平台高度，rhBMP-2 濃度越高的組別有越高的新生骨質密度及越少的殘留 HAp/TCP 顆粒。實驗組一（0.02 mg/mL rhBMP-2）及實驗組二（0.08 mg/mL rhBMP-2）皆為新生海綿骨（spongy bone），實驗組三（0.2 mg/mL rhBMP-2）則有一部分已形成新生的緻密骨（compact bone）。

八週的實驗組可看到新生骨質密度顯著增加，實驗組一（0.02 mg/mL rhBMP-2）及實驗組二（0.08 mg/mL rhBMP-2）的骨小樑（trabeculae）變粗變密；實驗組三（0.2 mg/mL rhBMP-2）的整體骨缺損區域則已長滿非常緻密的皮質骨組織，較原始齒槽骨之密度為佳。

5.7.2 局部放大顯微圖

圖 68-77（下）為圖 68-77（上）黃色方塊區域的放大顯示圖。圖 68（下）顯示四週負控制組之骨缺損底部邊界，最下方為偏紅且緻密的原始齒槽骨，上方則是以藍色為主、膠原蛋白排列仍較凌亂的新生骨質，新生骨質的孔隙中可看到新生血管與周邊排列之成骨細胞（osteoblast）。圖 69（下）顯示八週負控制組之底部新生骨質與牙齦軟組織的交界，新生骨質較四週時更為緻密了，但膠原蛋白排列仍凌亂。

圖 70（下）顯示四週控制組之骨缺損中央，有不少 HAp/TCP 顆粒（標示為 G）被多核巨細胞（multinucleated giant cells, 黑色箭頭標示）所包圍，而 HAp/TCP 顆粒之間已開始有少量不明顯的骨質新生。圖 71（下）顯示八週控制組之骨缺損近底界區域，仍有不少殘存之 HAp/TCP 顆粒（標示為 G）及多核巨細胞（multinucleated giant cells, 黑色箭頭標示），新生骨質則較四週為多。

實驗組一（0.02 mg/mL rhBMP-2）（圖 72）及實驗組二（0.08 mg/mL rhBMP-2）（圖 74）的四週放大顯示圖可看到骨缺損中央新生的骨小樑（trabeculae）、骨小樑

外圍滿滿環繞的活性成骨細胞 (active osteoblast) 以及新生血管。實驗組三 (0.2 mg/mL rhBMP-2) 的四週放大顯示圖 (圖 76) 則呈現骨缺損中央新生的成熟骨組織，緻密且有骨元 (osteon) 結構 (黃色虛線圓圈所標示)。

實驗組一 (0.02 mg/mL rhBMP-2) 的八週放大顯示圖 (圖 73) 可看到在骨缺損頂端、植體平台的高度，已有緻密骨 (compact bone) 的生成，黃色箭頭標註骨元 (osteon) 的結構。實驗組二 (0.08 mg/mL rhBMP-2) 的八週放大顯示圖 (圖 75) 則是比四週更粗壯的骨小樑 (trabeculae) 及更為成熟的新生骨組織。實驗組三 (0.2 mg/mL rhBMP-2) 的八週放大顯示圖 (圖 77) 則呈現骨缺損中央滿滿的新生緻密骨 (compact bone) 及多個骨元 (osteon) 結構 (黃色箭頭)。

5.7.3 植體螺紋處放大顯微圖

圖 78-87 (下) 為圖 78-87 (上) 植體上半部裸露區域的螺紋放大顯微圖。圖 78-79 (下) 可見負控制組在四週或八週，其植體螺紋旁完全由軟組織所充滿。

控制組在四週及八週 (圖 78-79 下) 的植體螺紋旁都可觀察到尚未降解的 HAp/TCP 顆粒，以及成群包圍 HAp/TCP 顆粒之多核巨細胞 (multinucleated giant cells, 黑色箭頭標示)。植體螺紋間空間 (inter-thread area) 未觀察到新生骨質。

實驗組一 (0.02 mg/mL rhBMP-2) 在四週 (圖 82 下) 已有新生骨質進入植體螺紋間空間且貼覆著植體表面生長，雖新生骨密度不高，但新生骨質在骨缺損內增生的高度已達植體第一個螺紋以上。八週 (圖 83 下) 則可看到植體周圍的新生骨密度明顯增加，且冠側 (coronal side) 比根側 (apical side) 的新生骨密度為高，植體第一個螺紋之螺紋間空間已被新生骨質充滿，較第二第三個螺紋間空間的骨密度為高。

實驗組二 (0.08 mg/mL rhBMP-2) 於四週植體周圍 (圖 84 下) 已可見新生骨之骨小樑，高度也高於植體第一個螺紋，唯植體螺紋間空間尚未有明顯新生骨質。八週 (圖 85 下) 時，植體螺紋間空間已有大量新生骨質增生，骨質密度顯著增加

且趨成熟，已有骨髓 (bone marrow; 標示為 BM) 組織。

實驗組三 (0.2 mg/mL rhBMP-2) 於四週植體周圍 (圖 86 下) 已有高密度之新生骨質，植體螺紋間空間也可見新生骨長入，且有大量活性成骨細胞 (active osteoblast) 排列其中，可見骨質新生仍然旺盛進行中。八週的顯微圖 (圖 87 下) 則看到植體周圍及所有植體螺紋間空間皆被新生緻密骨 (compact bone) 充滿，可分辨多個骨元 (osteon) 結構 (黃色虛線) 及血管等組織。

第六章 討論

本實驗的主要目的是要建立一個實驗犬之植體周圍臨界骨缺損模型 (peri-implant critical-sized defect model)，利用這個動物模型來測試以 HAp (Hydroxyapatite)/TCP (Tri-calcium Phosphate)/Col (Collagen) 複合骨材當作支架 (scaffold) 及 rhBMP-2 載體，進行植體周圍大範圍補骨手術之可行性，並且測試低濃度 rhBMP-2 促進植體周圍骨頭再生的效能，尋找能達成植體周圍骨再生之 rhBMP-2 最低有效劑量。實驗結果成功建立了實驗犬下顎骨之植體周圍臨界骨缺損模型，並證實了 HAp/TCP/Col 複合骨材加上 rhBMP-2 生長因子在植體周圍大範圍補骨有優異的表現，且低濃度 0.2 mg/mL rhBMP-2 的劑量足以在八週內達成植體周圍大範圍骨再生。

6.1 實驗動物的選擇

不同物種在成骨作用中所需的 BMP-2 濃度明顯不同。非人類靈長類動物在骨質生成時所需的 BMP-2 比齧齒動物高得多 [120]。由於本研究的主要目的之一是要找尋能達成植體周圍骨再生的 rhBMP-2 最低有效劑量，因此選用和人類有相似骨

骨骼結構及骨骼代謝之米格魯獵犬作為實驗動物，以期得到和人類相似的結果。

即使在同一個物種，各種手術所需的 rhBMP-2 劑量也不盡相同。舉例來說，將前側腰椎椎體間融合術（anterior lumbar interbody fusion）成功誘導骨癒合的 rhBMP-2 劑量用在後側位脊椎卻無法成功，後側位脊椎融合術（posterolateral fusion）所需的 rhBMP-2 劑量更高[85]。由於目前研究 rhBMP-2 應用於各種牙科術式的相關論文大多使用米格魯獵犬作為實驗模型，因此本研究採用米格魯獵犬模組將能和其他研究有較好的相互比較分析。


6.2 植體周圍臨界骨缺損模型之建立

實驗最初嘗試的手術模型是參考其他動物實驗的文獻，從無牙脊正上方切開（mid-crestal incision）且無垂直切口（vertical incision）的皮瓣設計（flap design），同一個象限的三個骨缺損同時進行，因此三個骨缺損模型位於同一個大皮瓣之下。然而此作法易有術後併發症，皮瓣在癒合過程常發生裂口（dehiscence），尤以負控制組及控制組的發生率較高。另一方面，本實驗的主要目的之一是要找尋可以達成植體周圍大範圍骨再生的最低 rhBMP-2 劑量，而 rhBMP-2 若在同一個大皮瓣下方擴散（diffusion），則各組別所給予的 rhBMP-2 劑量將會互相影響而產生誤差。

在多次試誤與修正後，手術皮瓣設計改用半月形（semilunar flap design），皮瓣切線必須位於預定骨缺損之外圍。每個骨缺損的皮瓣皆為獨立的，因此各組別之間不會有 rhBMP-2 擴散而造成疑慮。改良之手術模型的成功率高，本實驗的分析與統計計算皆採用實驗模組改良後、皮瓣完整癒合無併發症的實驗樣本。

6.3 放射影像及微電腦斷層影像分析

各組別之實驗結果首先進行放射影像分析。經根尖 X 光影像的人工判讀，三個加有 rhBMP-2 的實驗組無論在四週或八週皆有較好的骨質新生；然而，只有實驗組三（0.2 mg/mL rhBMP-2）在八週時的灰值（grey value）顯著大於控制組（adjusted



$p < 0.05$)。由於實驗所使用的 rhBMP-2 載體為 HAp/TCP/Col 複合骨材，內含的 HAp/TCP 顆粒具有放射不透性 (radiopacity)，未降解的 HAp/TCP 顆粒可能造成放射影像分析的干擾，使得四週的控制組有較高的灰值。隨著術後時間增加，HAp/TCP 顆粒持續降解，控制組從四週到八週的灰值呈現顯著降低 (adjusted $p < 0.05$)，由此可見 HAp/TCP 顆粒所造成的影響。


為了減少 HAp/TCP 顆粒的影響，我們在微電腦斷層影像分析設定了一個閾值 (threshold) 將 HAp/TCP 顆粒排除，留下新生骨組織做量化分析。量化結果發現，rhBMP-2 實驗組呈現較明顯之劑量依賴性趨勢 (dose-dependent trend)，也就是 rhBMP-2 劑量越高則新生骨組織的骨密度就越高。相較於 X 光放射影像分析，微電腦斷層影像分析之劑量依賴性和後續組織量化分析的結果更為相似。

在八週的 rhBMP-2 實驗組中，微電腦斷層分析之新生骨質的密度介於 42.72 至 58.45。從一個分析大體下顎骨密度的研究發現，人類下顎骨的平均骨密度為 27.28 ± 10.19 。由此可見，本實驗的三個低濃度 rhBMP-2 實驗組在八週的時間內，皆可誘導生成優於下顎骨密度之新生骨質[86]。

6.4 植體共振頻率分析

人工植體的次級穩定度 (secondary implant stability) 是由植體表面的骨頭生成及骨重塑 (remodeling) 來達成[87]。我們使用共振頻率分析 (resonance frequency analysis) 來評估實驗後的植體次級穩定度。文獻指出 Brånemark 植體在骨整合後會達到 65-75 的 ISQ (Implant Stability Quotient) 值[88]。

本實驗的所有 rhBMP-2 實驗組皆在四週的癒合期就已達到高於 75 的 ISQ 值，超過 Brånemark 植體在骨整合之後的平均 ISQ 值。雖然從組織切片可看到四週的實驗組尚未完成臨界骨缺損的骨質新生，但已經生成的部分新生骨質可能已有功能，且植體下半部植入齒槽骨的部分也可能因為 rhBMP-2 而加速骨重塑 (remodeling)，進而提升 ISQ 值。



在八週癒合期，實驗組三(0.2 mg/mL rhBMP-2)的 ISQ 顯著高於控制組(adjusted $p < 0.05$)。這顯著較高的 ISQ 值，代表著 0.2 mg/mL rhBMP-2 的劑量有利於較早達成較佳的植體次級穩定度 (secondary implant stability)，也意味著達到較好的植體骨整合 (implant osseointegration) [89]。

6.5 螢光骨染色分析

本實驗使用序列螢光骨染色 (sequential fluorochrome labeling) 來評估骨再生的速度與模式。鈣黃綠素 (Calcein) 在第一次手術後三週施打，在螢光顯微鏡下呈現綠色，顯示的是較早期新生的骨質；茜素氨羧絡合劑 (Alizarin Complexone) 在第一次手術後六週施打，在螢光顯微鏡下呈現紅色，顯示的是較晚期新生的骨質。在八週的實驗組中，rhBMP-2 濃度越高的組別呈現越多綠色螢光的新生骨質，以此證實了 rhBMP-2 的濃度越高則骨質新生的時間點越早。此螢光骨染色分析再次證明了 rhBMP-2 促進骨新生及礦化是有劑量依賴性 (dose-dependent) 的。

值得注意的是，我們在圖 61 可以看到較早期生成的綠色螢光新生骨質從骨膜 (periosteum) 往下生長。這是一個有趣的現象。雖然現今的主流「引導骨再生手術 (guided bone regeneration)」例行性的使用再生膜 (barrier membrane)，在本實驗模組並未使用再生膜。一方面是為了排除不同種類之再生膜可能造成的混擾因子 (confounding factor)，另一方面是希望藉由骨膜達到更佳的骨再生效率。

有研究指出骨膜具有很好的再生能力[90]，而 BMP-2 可能是骨膜介入骨折修復過程中的主要控制因子[91]。雖然現今骨引導再生手術的原則是要使用再生膜來阻隔軟組織入侵骨缺損空間[92]，但已有部分研究指出，若使用 rhBMP-2 合併再生膜會導致手術傷口高失敗率以及阻礙骨缺損的骨質新生[67, 71, 93, 94]。本實驗結果驗證了，使用 rhBMP-2 在植體周圍骨缺損的補骨手術中，來自骨膜(periosteum) 的骨再生佔有一席重要的地位。本實驗因此建議，在臨床使用 rhBMP-2 於齒槽骨再生的手術中，應該考慮讓骨膜發揮其效用，在骨膜完整的情況下不使用再生膜，

以達到最佳治療效果。



6.6 RhBMP-2 的安全性與使用劑量


在臨床使用生物因子最需要考量的是安全性。隨著臨床手術使用 rhBMP-2 的案例越來越多，許多副作用也慢慢浮現出來，像是異位骨生長、術後發炎及破骨細胞活化等等[95, 96]。在上顎竇提升術及拔牙後齒槽骨保存術的牙科應用中，臨床遇到的副作用包括可逆性的水腫、疼痛、感覺喪失、紅斑以及產生 rhBMP-2 或牛第一型膠原蛋白之抗體[4]。RhBMP-2 劑量可能是導致這些副作用的關鍵因素之一。因此，研究應當致力於界定 rhBMP-2 劑量的上限及下限，期待在這個劑量範圍內能成功達成骨癒合的目的，同時避免可能的副作用產生。

在本實驗的植體周圍臨界骨缺損模型中，rhBMP-2 於 0.2 mg/mL 的劑量下成功在八週完成植體周圍大範圍骨再生癒合，且統計上顯著優於控制組。本實驗界定出的劑量低於目前市售 INFUSE Bone Graft 產品的 1.5 mg/mL，也低於多數臨床前及臨床試驗所使用的劑量。

6.7 RhBMP-2 載體

多種材料都曾被研發當作 rhBMP-2 的載體，包括天然聚合物、人造聚合物、陶瓷以及複合材。雖然目前唯一被美國 FDA 核可的載體只有可吸收膠原蛋白海綿 (ACS)，但 rhBMP-2 的最佳載體為何仍然沒有定論。

在骨折治療的研究中，比較使用 ACS 或是 HAp/Collagen 當作 rhBMP-2 的載體，發現使用 HAp/Collagen 當作 rhBMP-2 載體的骨折癒合率 (fusion rate) 較高[97]。然而，在上顎竇提升手術的研究發現，rhBMP-2/ACS 中加入陶瓷顆粒並沒有顯著效益[98]。在齒槽骨增高手術 (alveolar ridge augmentation) 中，rhBMP-2/ACS 因為沒有機械強度而無法達到理想的骨再生，必須併用骨引導再生裝置 (GBR device) 來維持骨再生的空間[7, 99]。



本實驗使用 HAp/TCP/Col 當作 rhBMP-2 載體，在不使用骨引導再生裝置 (GBR device) 的情況下，仍然能在齒槽骨增高手術 (alveolar ridge augmentation) 中達到理想的大範圍骨再生。因此，將陶瓷顆粒 (HAp/TCP particles) 合併 ACS 作為 rhBMP-2 載體，在齒槽脊增高手術 (alveolar ridge augmentation) 是有助益的。

其它使用 ACS 作為 rhBMP-2 載體的相關研究中，常有血清腫生成 (seroma formation) 的副作用[67, 94]。本實驗使用 HAp/TCP/Col 當作 rhBMP-2 載體並無觀察到血清腫的產生。

6.8 植體表面處理的影響

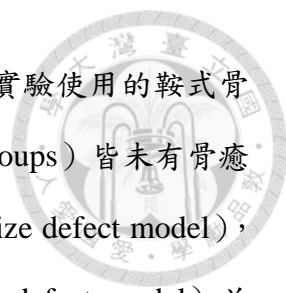
已有越來越多證據顯示，植體的表面處理會影響植體骨整合 (osseointegration) 的過程[100]。各種表面處理的植體都曾被用作 rhBMP-2 促進骨再生的研究，研究結果並不一致[10, 101, 102]。由於每個研究的實驗設計及使用之生物材料有很大的差異性，這些研究結果無法互相比較分析。因此，植體的表面處理在 rhBMP-2 促進骨再生的過程中佔有什麼樣的地位，目前仍是未知。

6.9 研究限制與展望

本實驗有許多限制存在。首先，實驗採用犬隻作為大型實驗動物，雖然實驗犬的骨質成分和型態跟人類十分相似，但犬類動物擁有較高的骨代謝速率 (bone turnover rate) 及較強的癒合能力[103]。因此，我們刻意選用較短的癒合期 (四週及八週)，而非其他研究常見的三至六個月，來篩選 rhBMP-2 的最佳劑量。

再者，本實驗未評估骨癒合後的植體功能負荷 (functional loading)。在 2003 年 Jovanovic 研究團隊就已評估過 rhBMP-2 誘導生成的新生骨質對於長期植體功能負荷的影響，該研究證實 rhBMP-2 所誘導生成的骨質是足以成功讓植體長期受力、負荷咬合功能的[94]。因此本實驗並未做這部分的評估。

本實驗所採用的鞍式骨缺損模型 (saddle-type defect model) 經常被用來測試骨



再生手術中使用的各類再生膜以及生物因子添加[104-106]。本實驗使用的鞍式骨缺損模型範圍很大，且在實驗完成的時程內負控制組 (blank groups) 皆未有骨癒合，因此本實驗使用的模組可證實為臨界骨缺損模型 (critical size defect model)，適合用來進行骨再生試驗。然而，鞍式骨缺損模型 (saddle-type defect model) 並不會真正出現在病人身上，無法全然代表臨床環境，未來研究可以考慮使用更符合臨床情況的慢性骨缺損模型 (chronic defect model) 來驗證本實驗的結果。

第七章 結論

- 一、本實驗建立的實驗犬下顎骨之骨缺損模型已證實為植體周圍臨界骨缺損模型 (peri-implant critical-sized defect model)，適合用來進行骨再生試驗。
- 二、HAp (Hydroxyapatite)/TCP (Tri-calcium Phosphate)/Col (Collagen) 複合骨材適合當作支架 (scaffold)，進行植體周圍大範圍補骨手術。
- 三、HAp/TCP/Col 複合骨材適合作為 rhBMP-2 載體，用於植體周圍之齒槽脊增高手術 (alveolar ridge augmentation)。
- 四、能達成植體周圍骨再生的 rhBMP-2 最低濃度 (最小劑量) 為 0.2 mg/mL。
- 五、在不使用再生膜的情況下，HAp/TCP/Col 複合骨材加上 0.2 mg/mL rhBMP-2 的組合可以在人工植體植入的當下，同時進行大範圍齒槽脊增高手術 (alveolar ridge augmentation)。

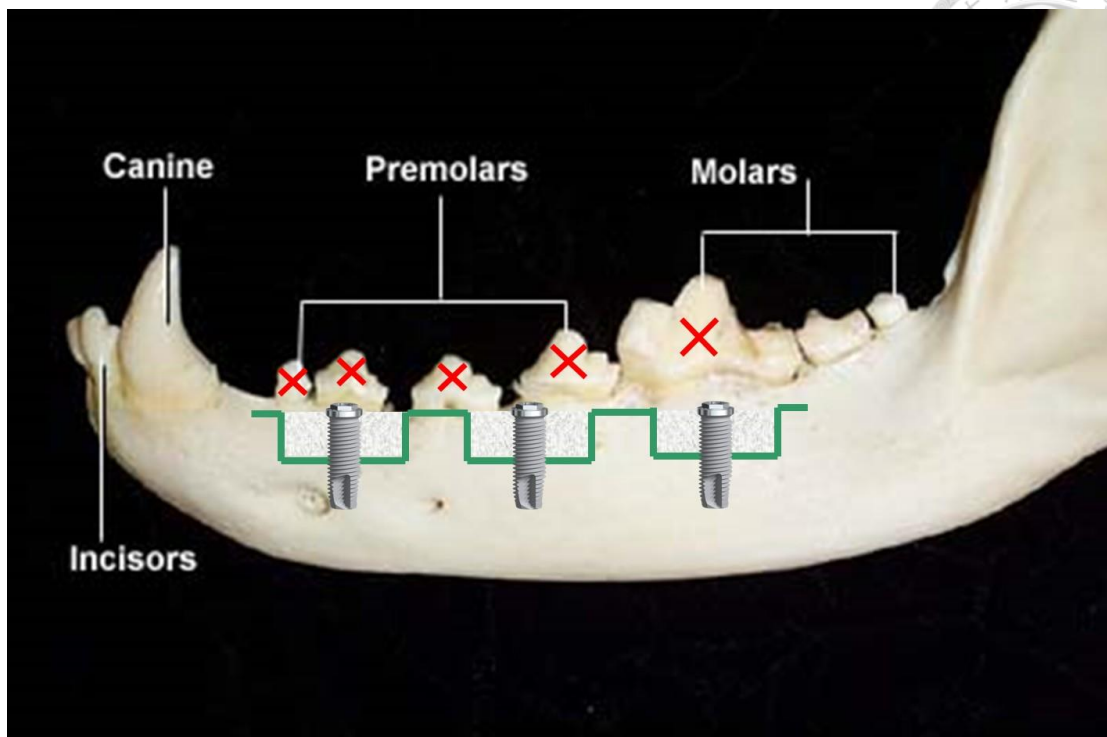


圖 1：實驗模型示意圖。實驗犬下顎兩側之四顆小白齒及第一大白齒拔除，癒合後兩側無牙脊分別可設計至多三個臨界骨缺損模型。

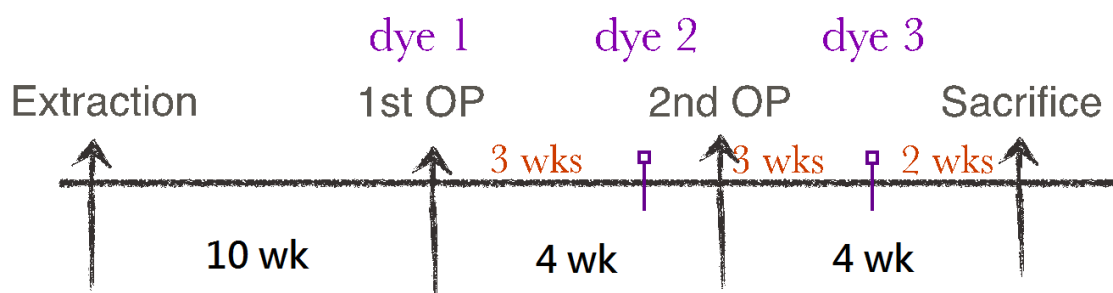


圖 2：實驗手術時間軸。實驗犬於拔牙後十週進行第一次手術，四週後進行第二次手術，再四週後實驗犬犧牲。三個螢光骨染劑分別於第一次手術當天、第一次手術後三週及第一次手術後六週單次施打於皮下。



圖 3：實驗犬拔牙癒合後之左下顎側觀。拔牙傷口癒合後，可在實驗犬雙側下顎得到近遠心距離約略 5 公分的無牙脊。

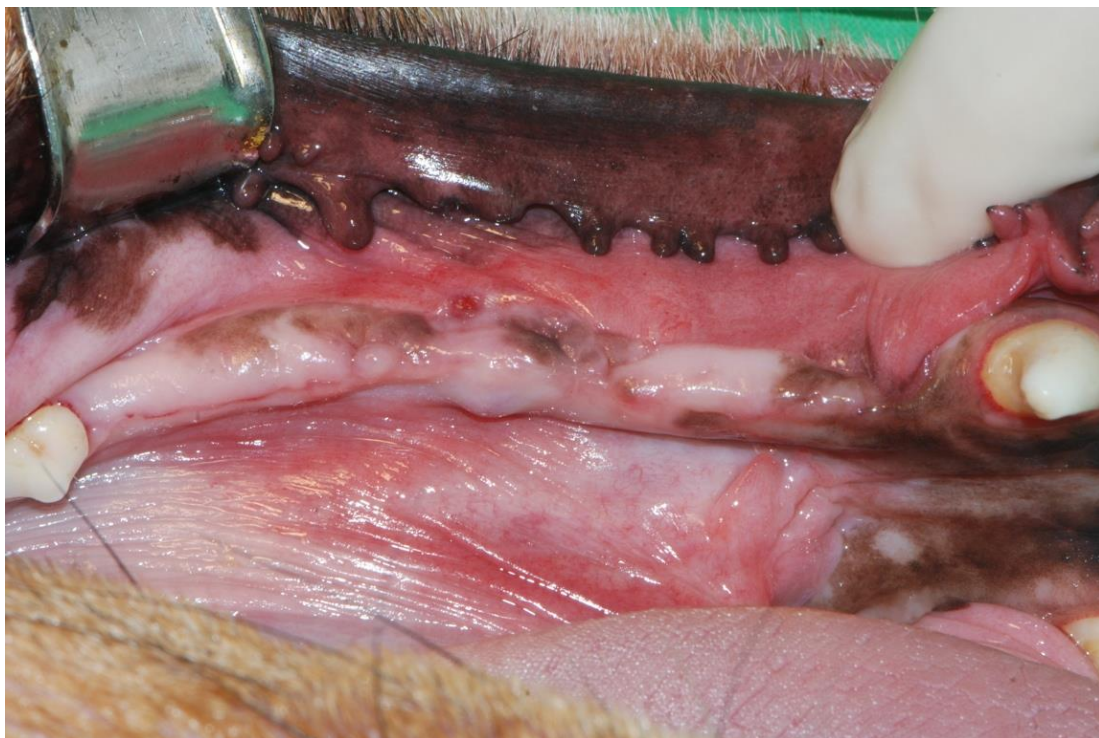


圖 4：實驗犬拔牙癒合後之左下顎咬合面觀。近遠心距離約略 5 公分的無牙脊。



圖 5：翻開骨膜皮瓣之頰側觀。皮瓣設計採用 semilunar flap。

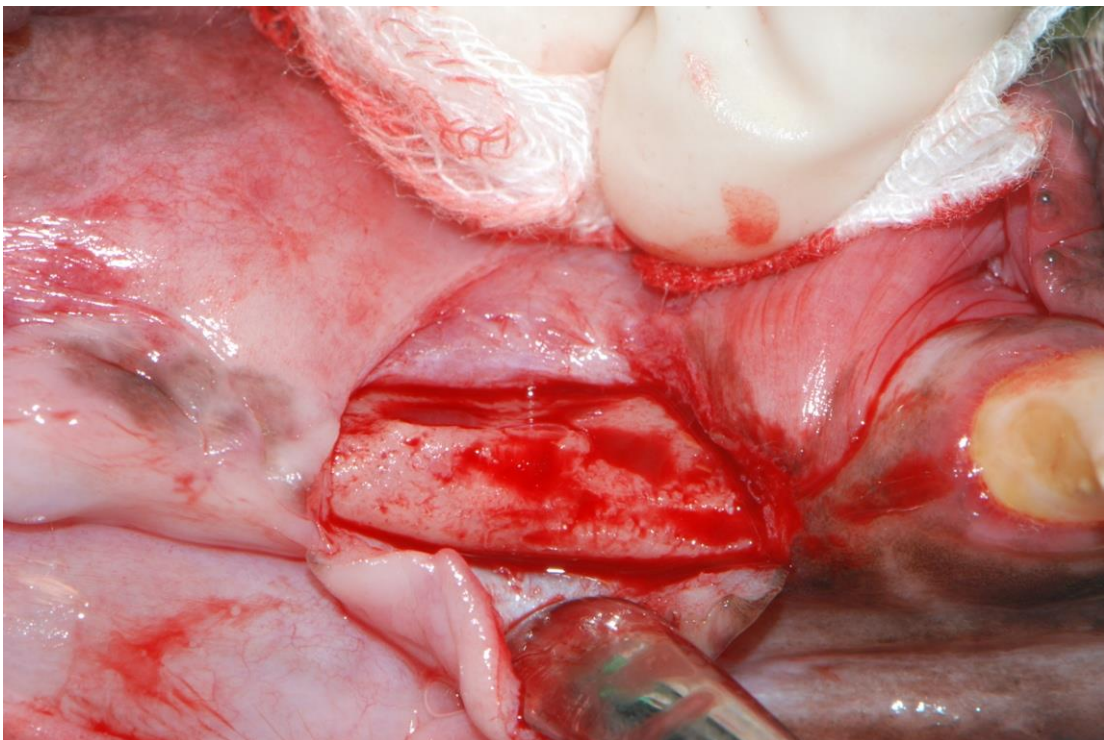


圖 6：翻開骨膜皮瓣之咬合面觀。

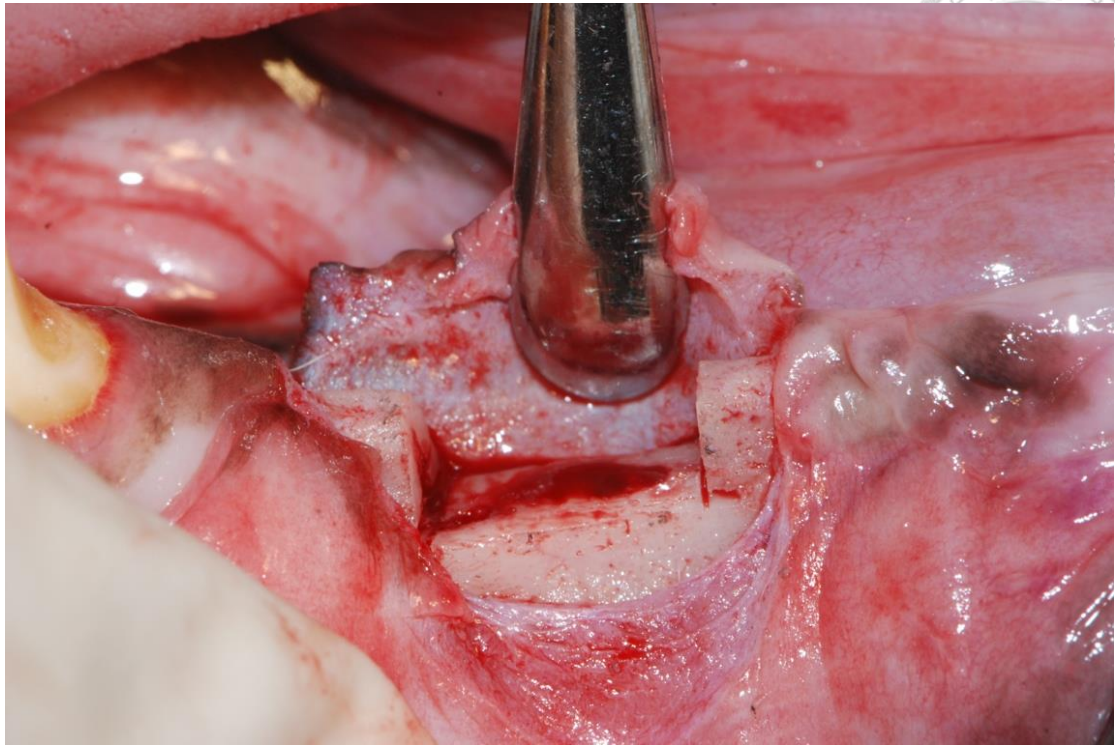


圖 7：臨界骨缺損，頰側觀。以電動骨鋸切出近遠心 10 mm、垂直深度 4 mm 且頰舌側貫穿之臨界骨缺損。

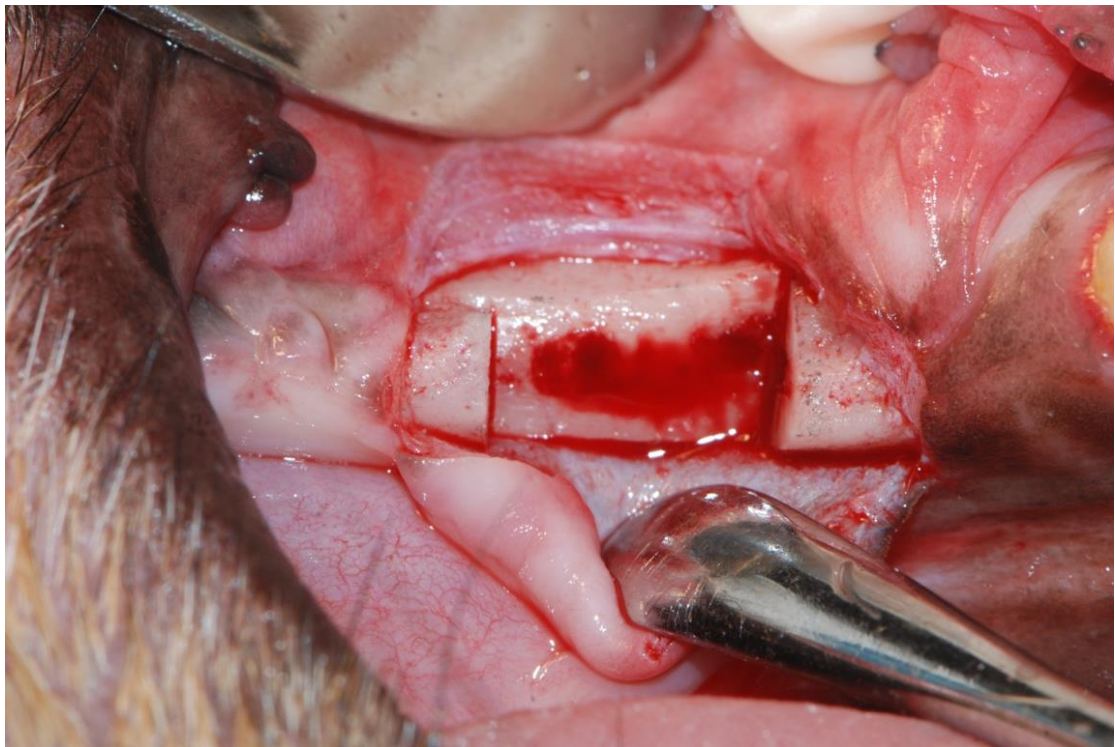


圖 8：臨界骨缺損，咬合面觀。臨界骨缺損之頰舌側寬度在不同位置會略有差異。

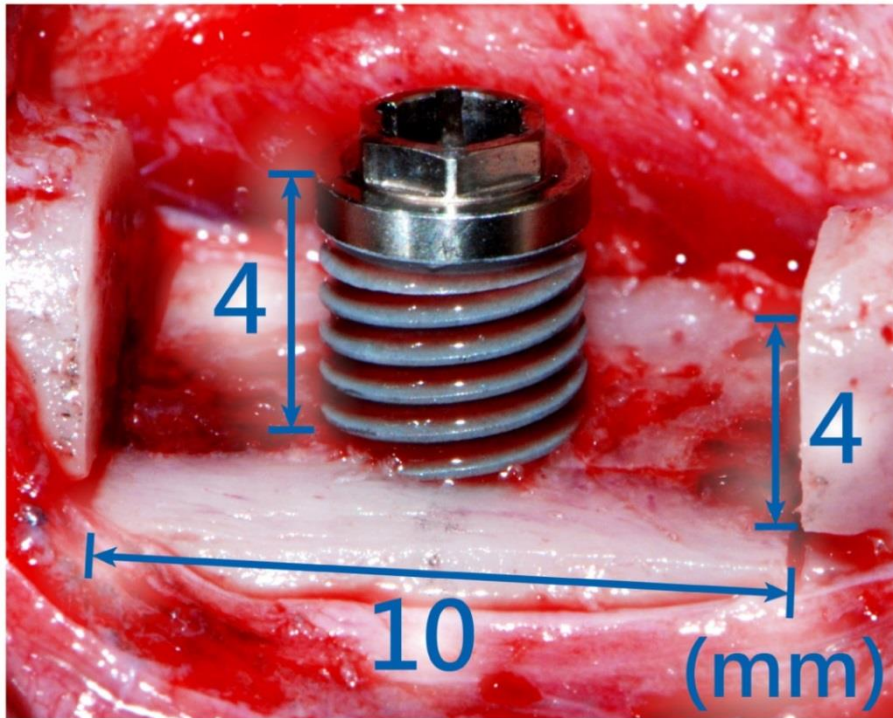
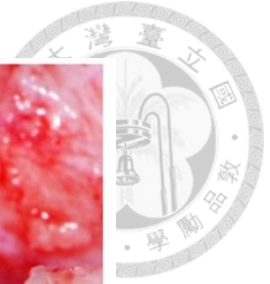


圖 9：植體周圍臨界骨缺損模型。人工植體植入骨缺損區正中央，其中 apical 4 mm 植入齒槽骨，而 cervical 4.5 mm (至 platform 為 4 mm) 裸露在骨缺損中。



圖 10：置放 HAp/TCP/Col 複合骨材，頰側觀。將複合骨材或加有不同劑量 rhBMP-2 之複合骨材置入骨缺損，高度齊平植體 platform level 及兩側齒槽脊。

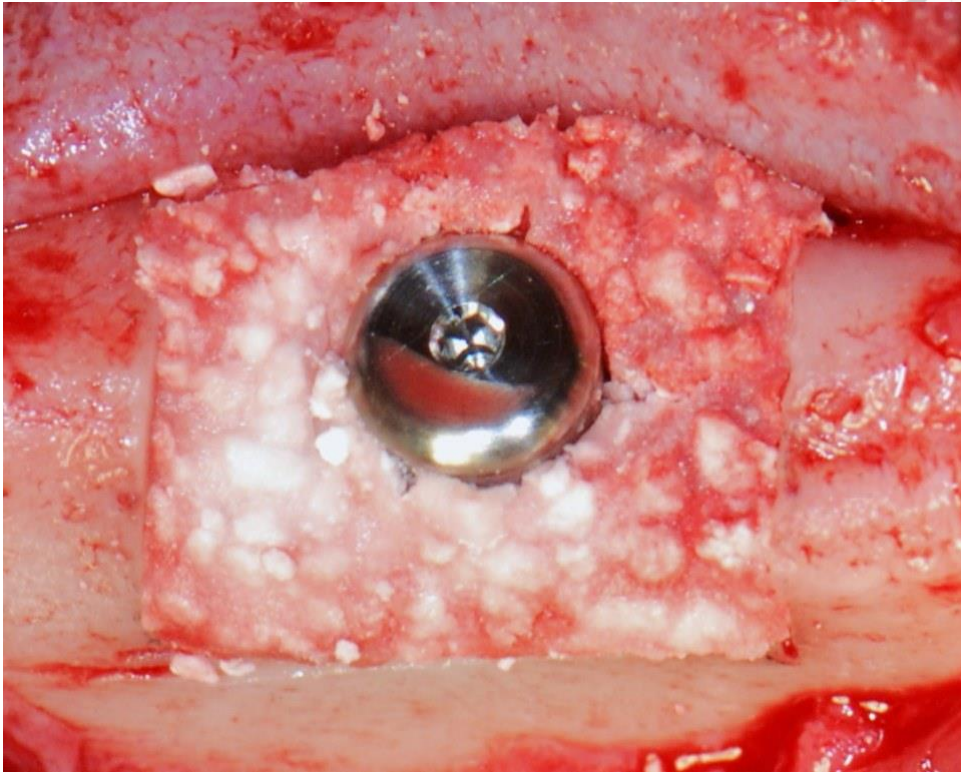


圖 11：置放 HAp/TCP/Col 複合骨材，咬合面觀。複合骨材的正中央預先鑽孔，套住人工植體。

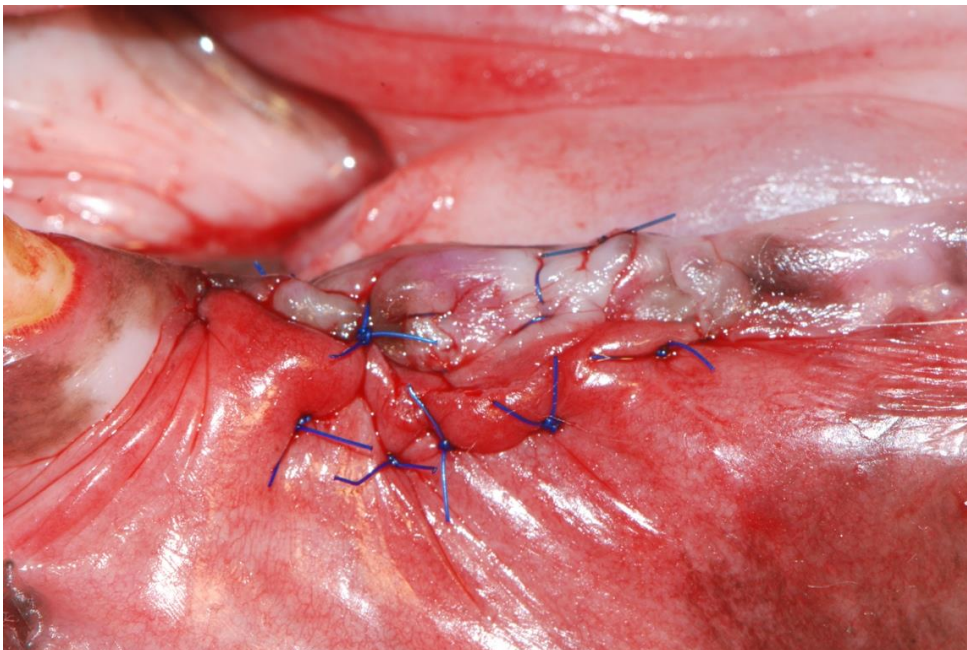


圖 12：傷口一級縫合之頰側觀。內層骨膜以可吸收縫線 5-0 dexon 進行縫合，外層牙齦使用不可吸收縫線 4-0 及 5-0 Nylon 進行 primary closure。



圖 13：動物犧牲卸下之下顎骨。皮瓣完整癒合，隱約可見左右各三個人工植體。

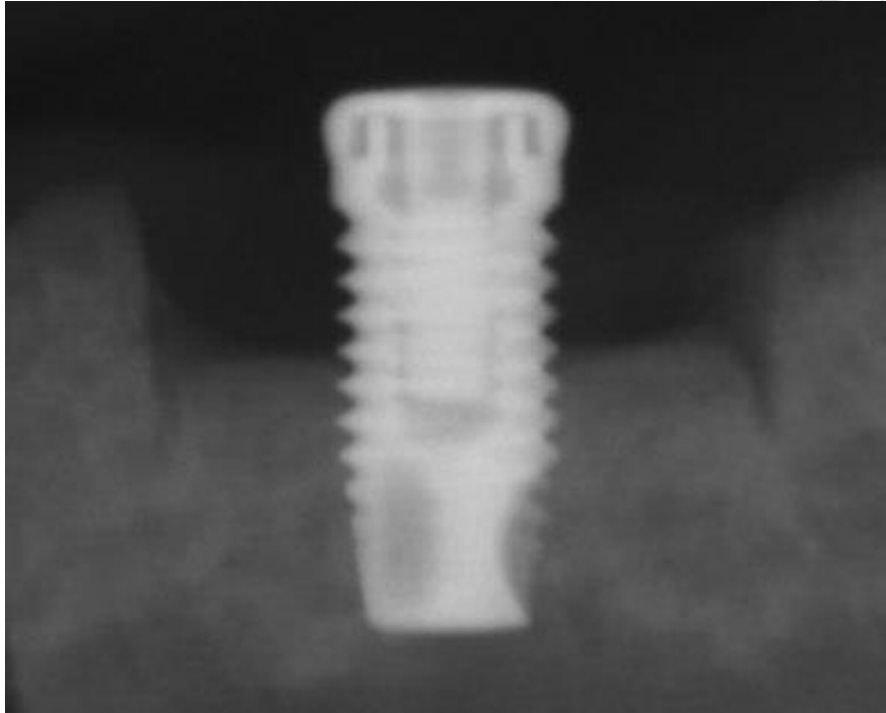


圖 14：四週負控制組之放射線影像。可清楚看到骨缺損的切線邊界，在骨缺損底部兩側邊界有些微骨質生長，植體懸空的周圍無新生骨質。

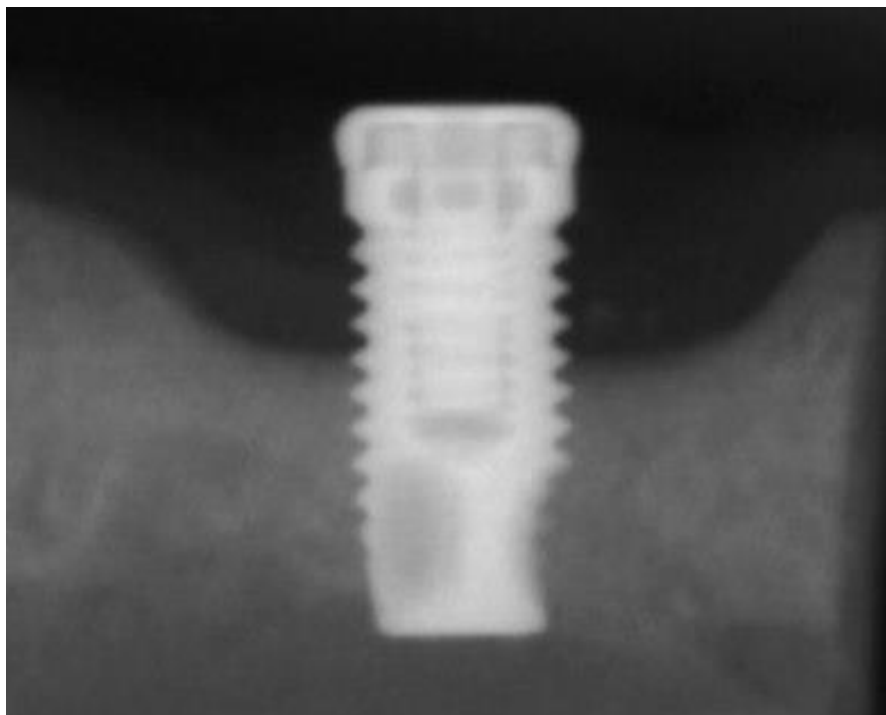


圖 15：八週負控制組之放射線影像。骨缺損的切線邊界從直角變得圓潤，底部兩側有少量骨質新生，植體懸空的周圍無新生骨質。

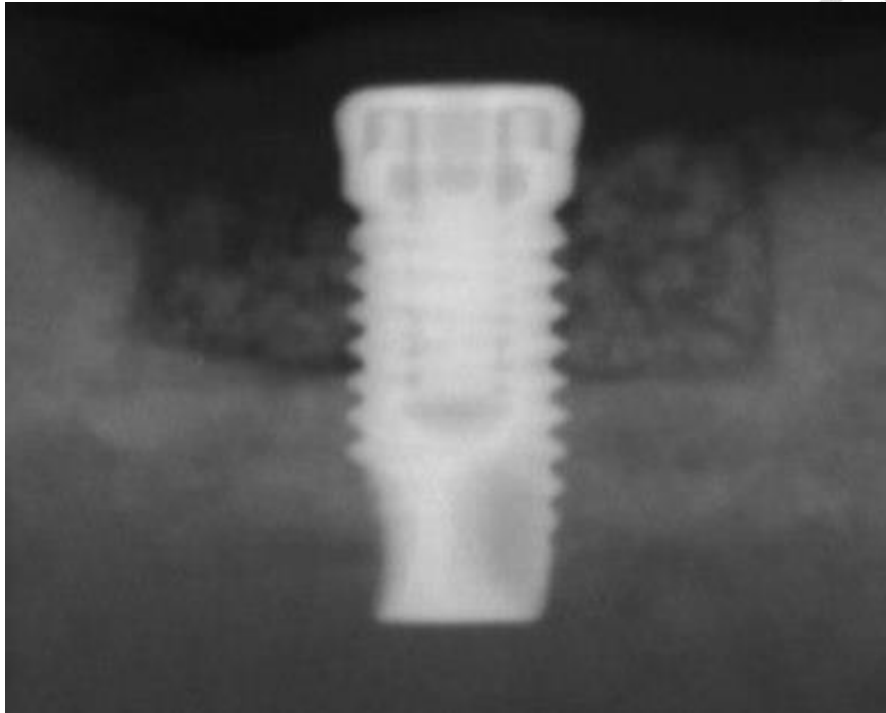


圖 16：四週控制組之放射線影像。可清楚看到骨缺損的切線邊界，骨缺損的空間中充滿了邊界清晰的 HAp/TCP 顆粒，植體懸空的周圍並無明顯新生骨質。

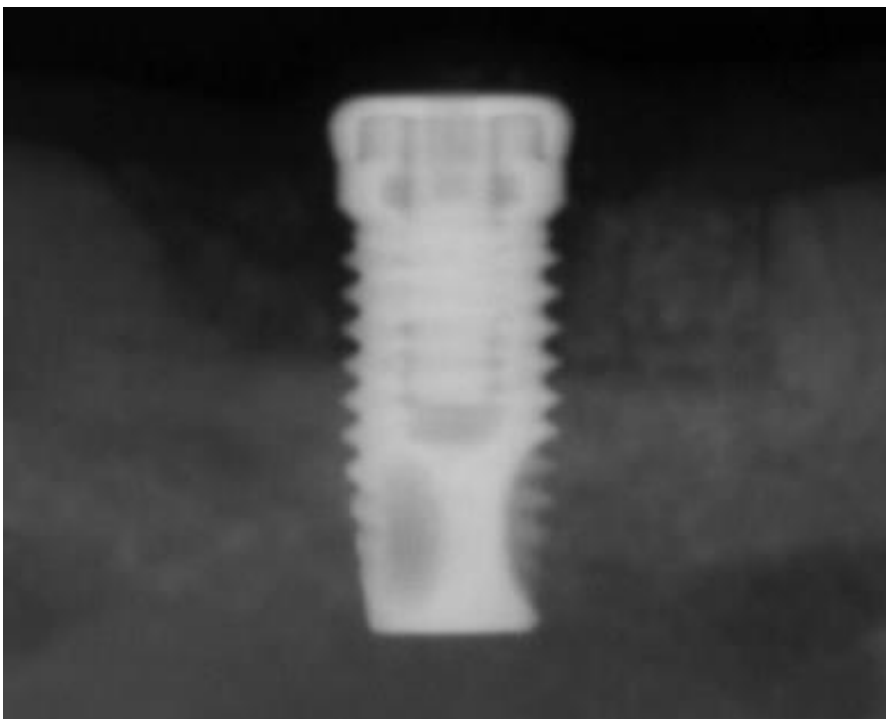


圖 17：八週控制組之放射線影像。骨缺損的邊界及 HAp/TCP 顆粒仍可分辨，HAp/TCP 顆粒較四週少。植體懸空的周圍仍無明顯新生骨質。

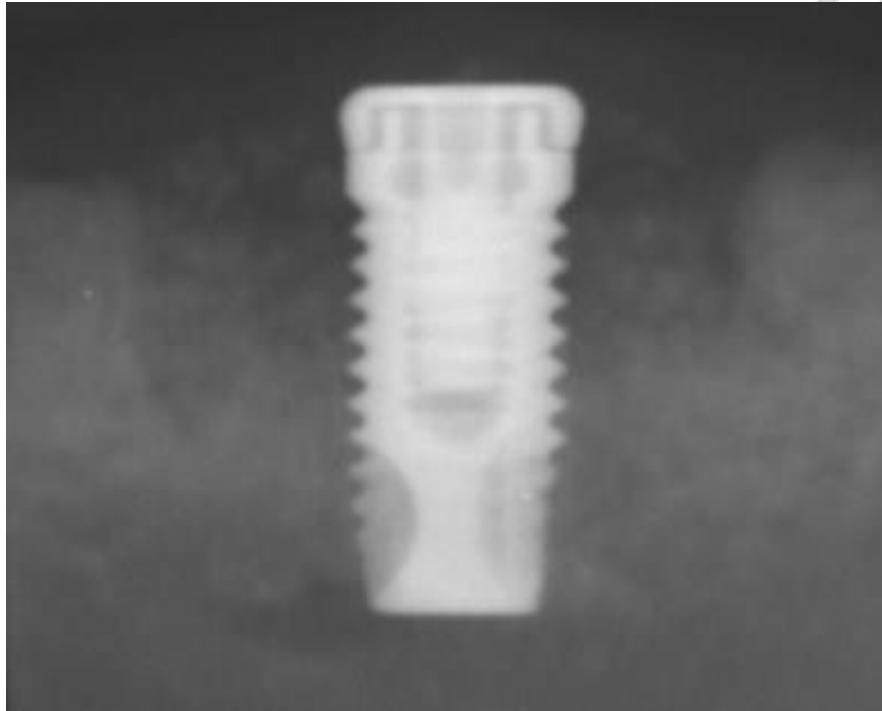


圖 18：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像。骨缺損的切線邊界及 HAp/TCP 顆粒變得模糊， radiopacity 增加。

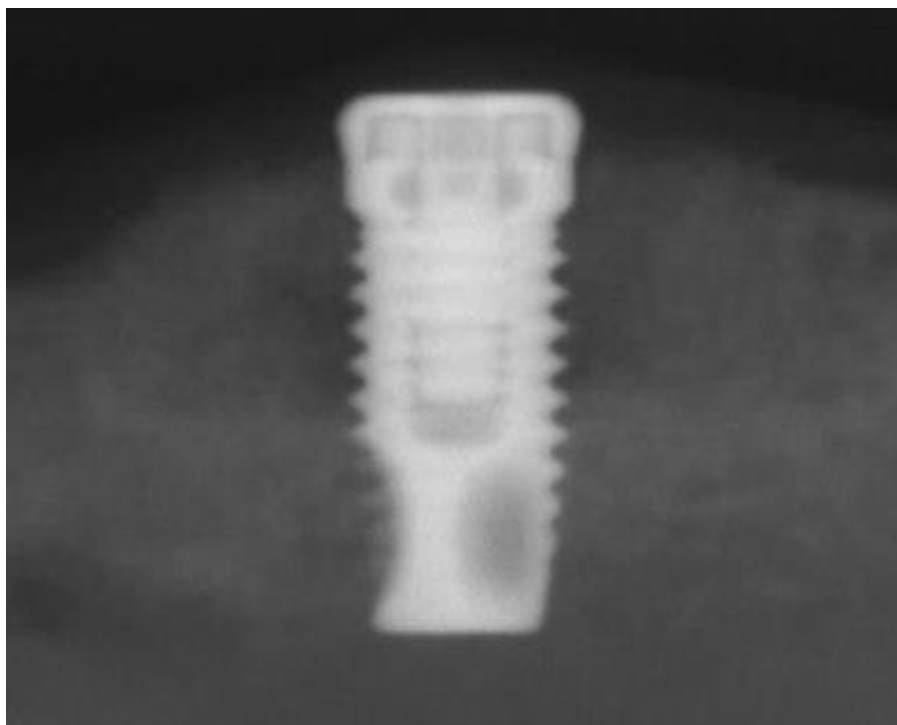


圖 19：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像。骨缺損中有明顯新生骨質，只剩下植體中段旁有些微 radiolucency。

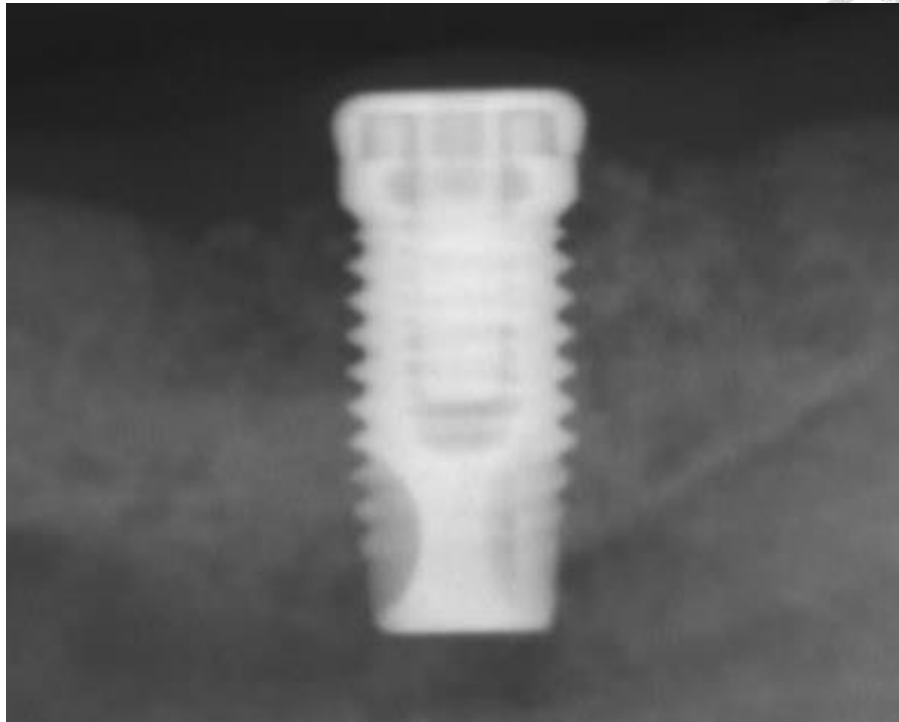


圖 20：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像。骨缺損的切線邊界及 HAp/TCP 顆粒變得模糊，骨缺損及植體懸空周圍皆有骨質新生的跡象。

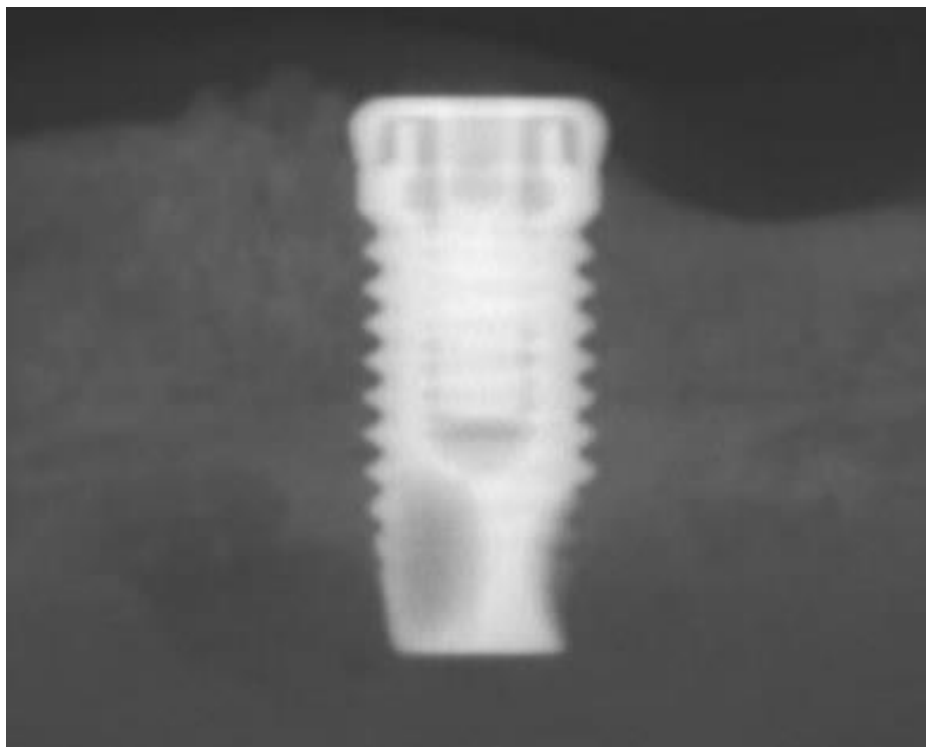


圖 21：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像。骨缺損及植體懸空周圍皆有大量新生骨質，呈現良好骨癒合及植體骨整合。

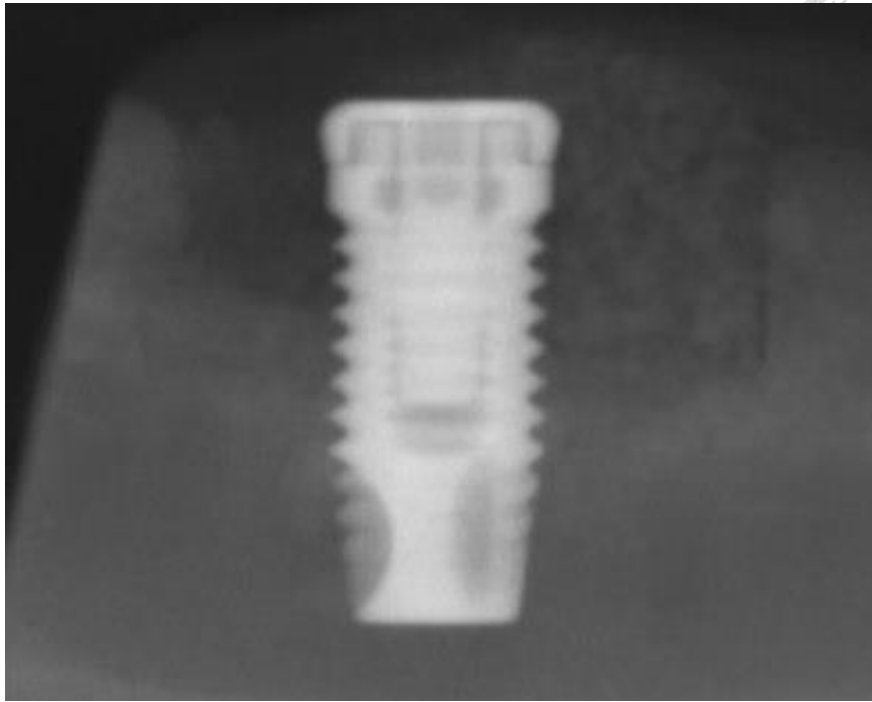


圖 22：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像。骨缺損中央及植體懸空周圍已有部分被明顯新生骨質充滿。

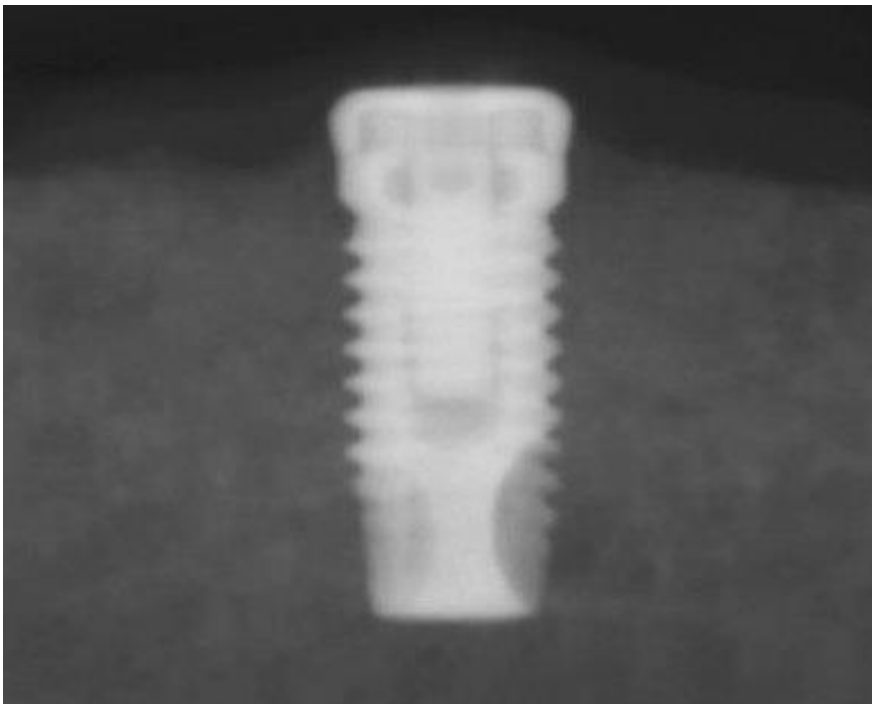


圖 23：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之放射線影像。骨缺損及植體懸空周圍被緻密新生骨質完全充滿，呈現完全骨癒合及植體骨整合。

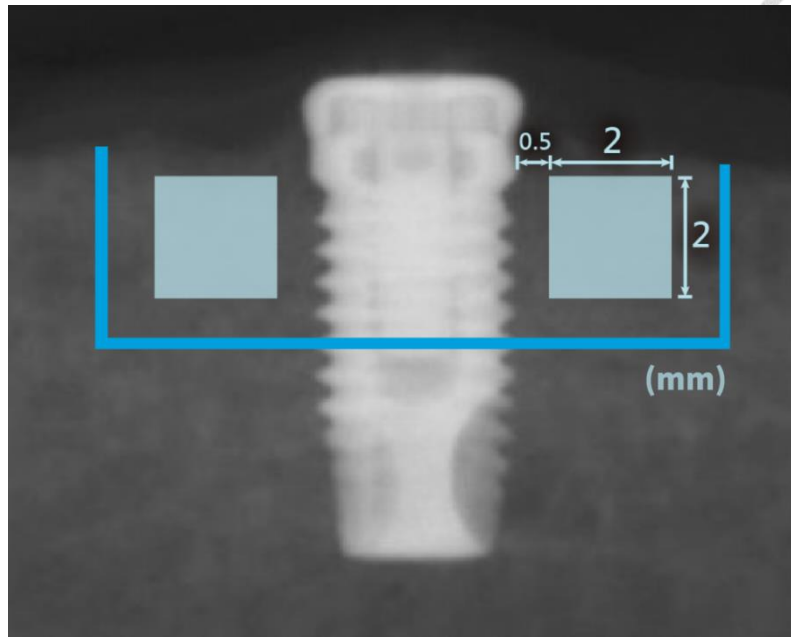


圖 24：放射線影像灰質量化之興趣區間。在人工植體兩側、骨缺損的正中間，選取了兩個 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 的範圍當作興趣區間。

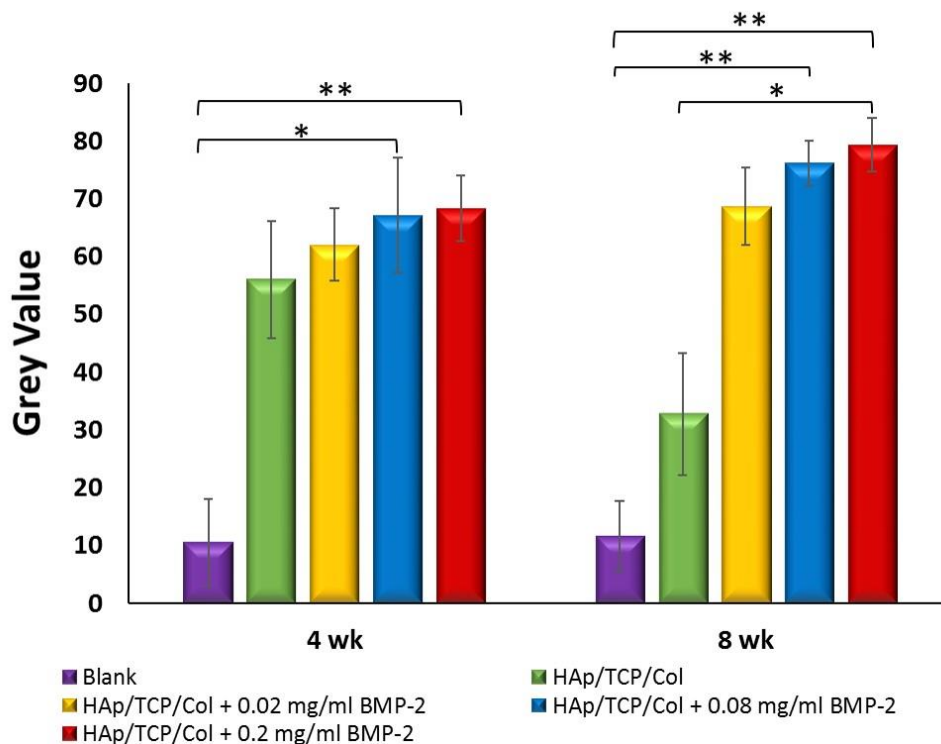


圖 25：放射線影像之灰值量化分析。在八週癒合期，0.2 mg/mL rhBMP-2 組別的灰值顯著大於控制組。控制組從四週到八週的灰值有顯著下降 (adjusted $p < 0.05$)。

*adjusted $p < 0.05$, **adjusted $p < 0.01$ 。

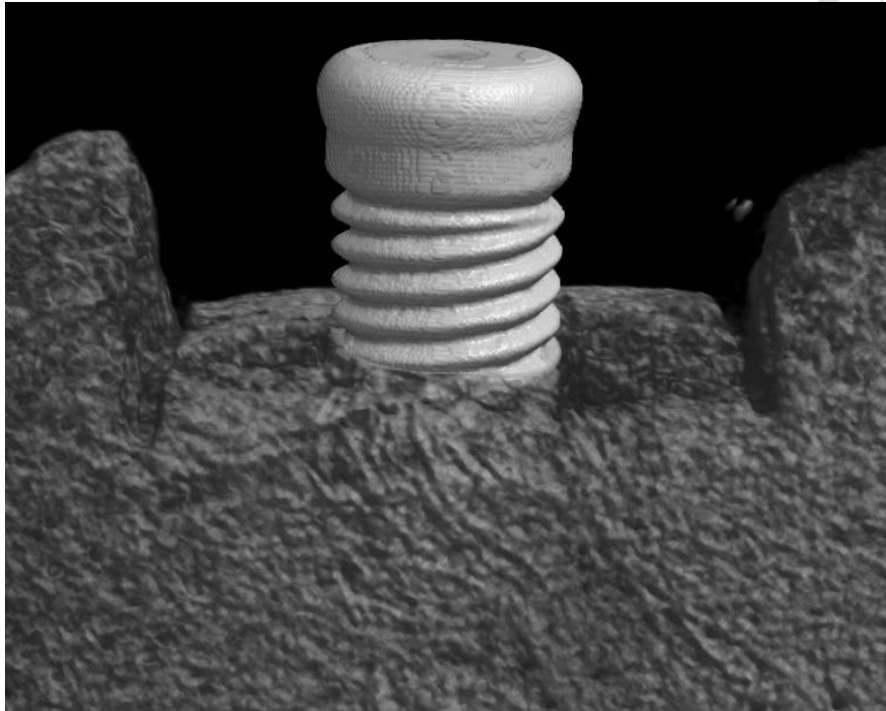


圖 26：四週負控制組之微電腦斷層三度空間表面影像。近遠心之骨缺損邊界初步出現垂直吸收，人工植體垂直裸露於骨缺損中央，沒有明顯骨質新生。

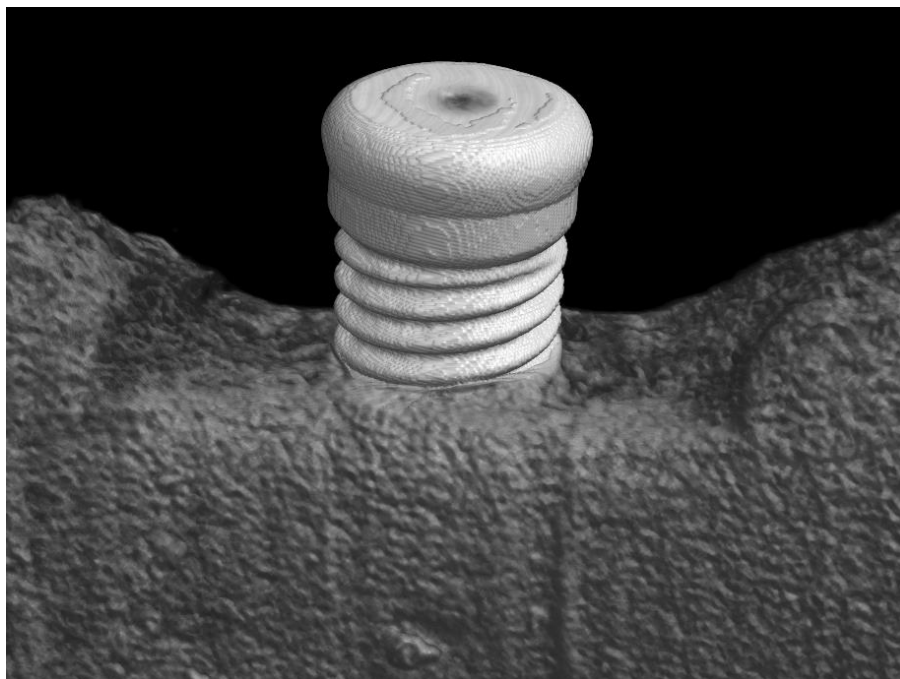


圖 27：八週負控制組之微電腦斷層三度空間表面影像。骨缺損的底部兩側有少量骨質新生，近遠心的骨缺損牆已明顯降低高度。

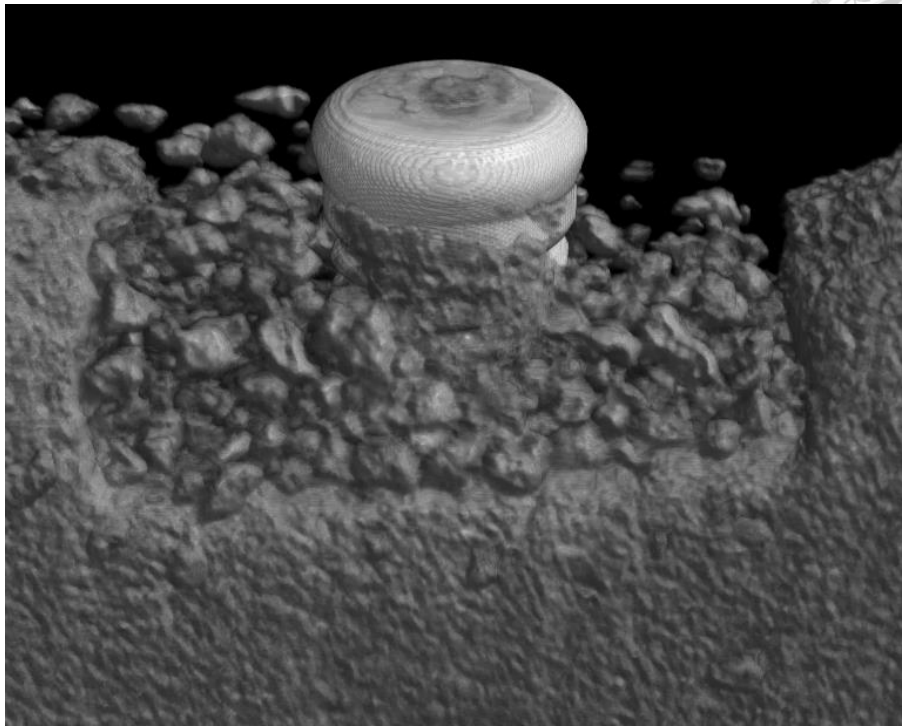


圖 28：四週控制組之微電腦斷層三度空間表面影像。大量 HAp/TCP 顆粒佔據骨缺損空間。

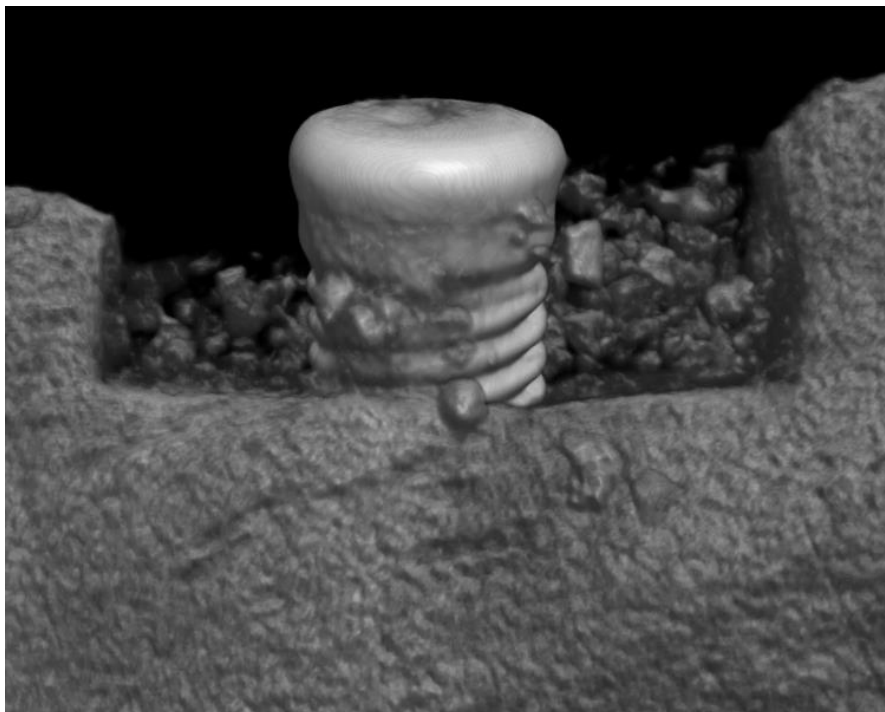


圖 29：八週控制組之微電腦斷層三度空間表面影像。HAp/TCP 顆粒減少，骨缺損的型態依舊清晰可見，沒有看到明顯的新生骨質。

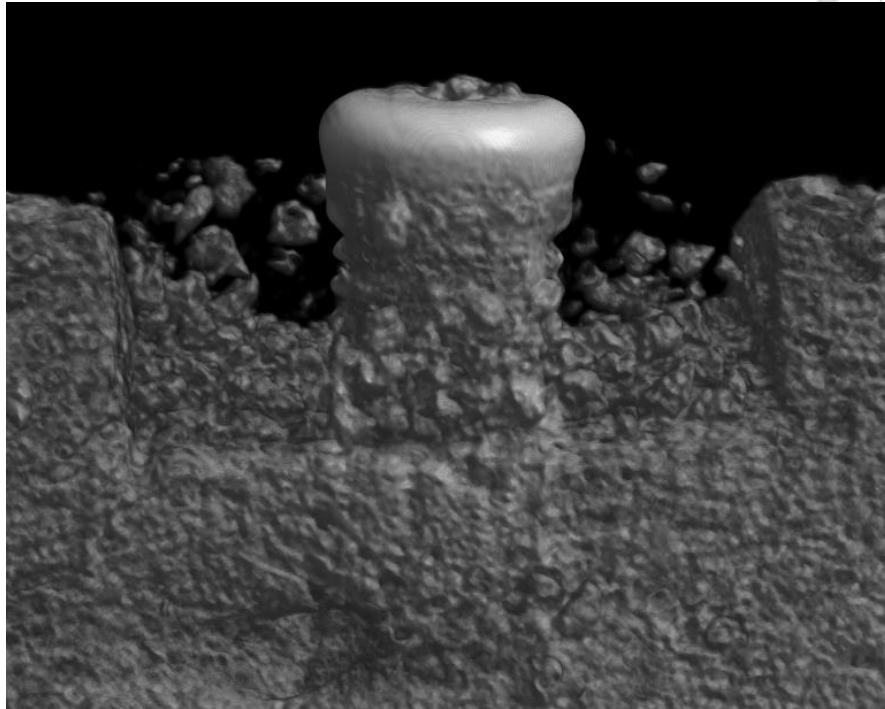
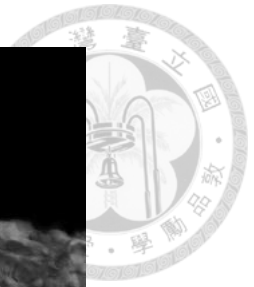


圖 30：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像。HAp/TCP 顆粒較控制組少。

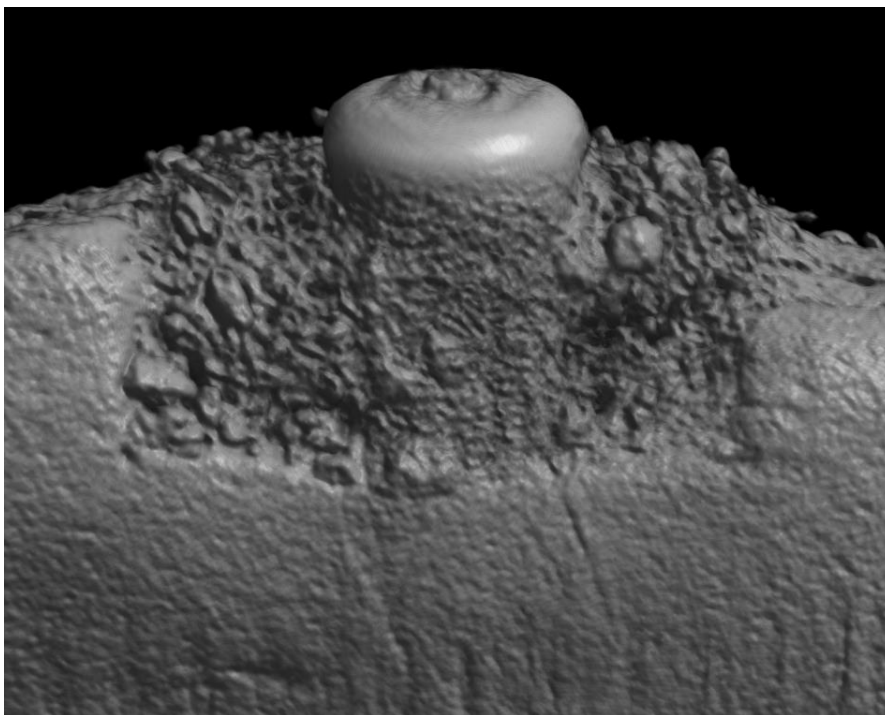


圖 31：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像。僅剩少量的 HAp/TCP 顆粒，骨缺損空間已被新生骨質充滿，新生骨表面仍未塑形完成、呈現粗糙狀。

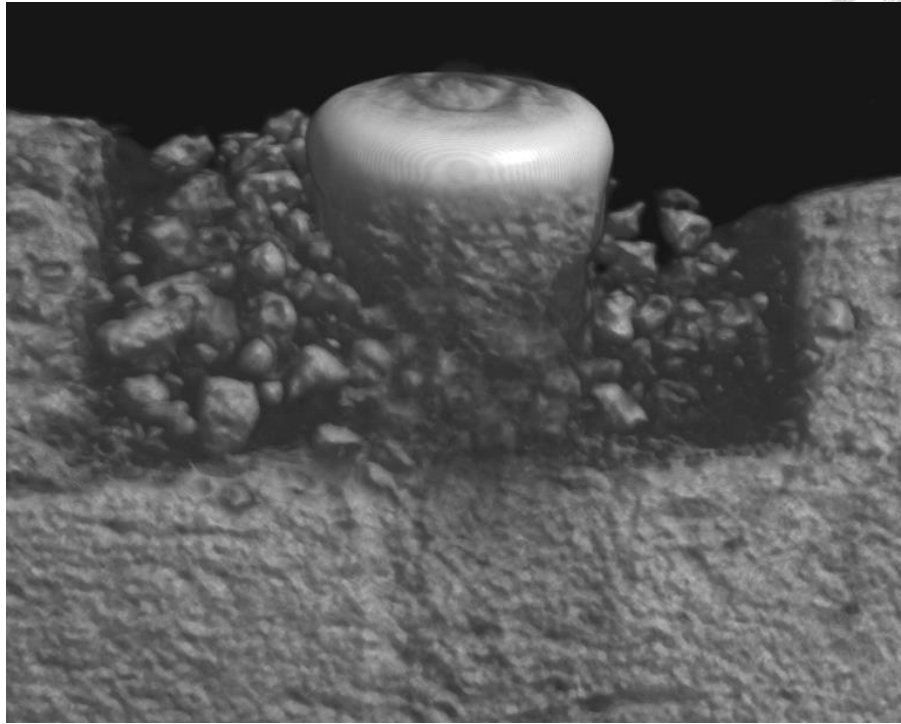


圖 32：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像。在 HAp/TCP 顆粒之間初步出現新生骨質。

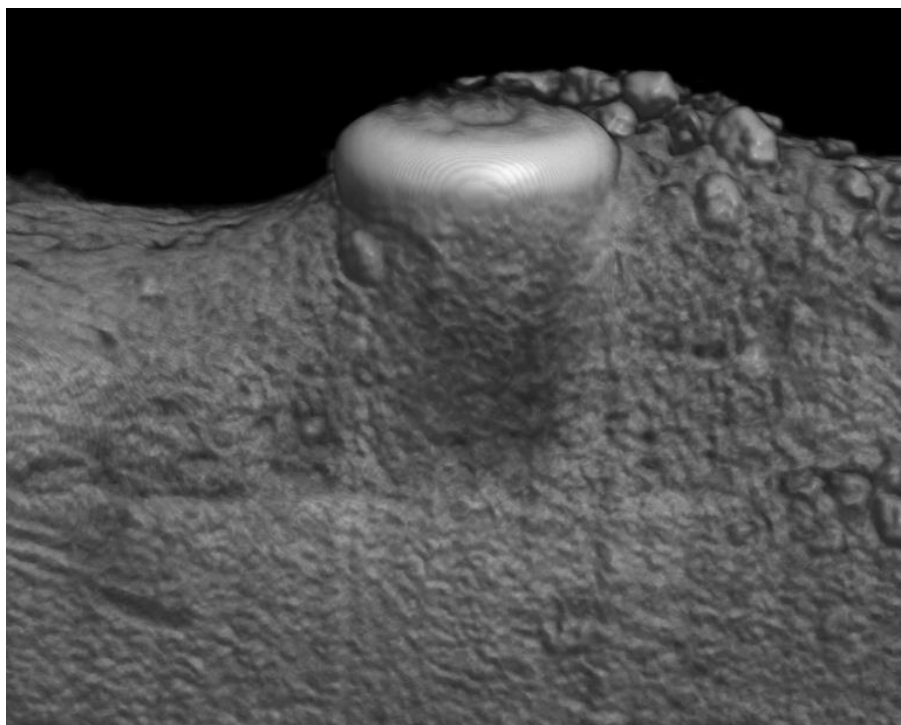


圖 33：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像。僅剩少量的 HAp/TCP 顆粒，骨缺損空間已被新生骨質完全充滿，新生骨表面光滑緻密。

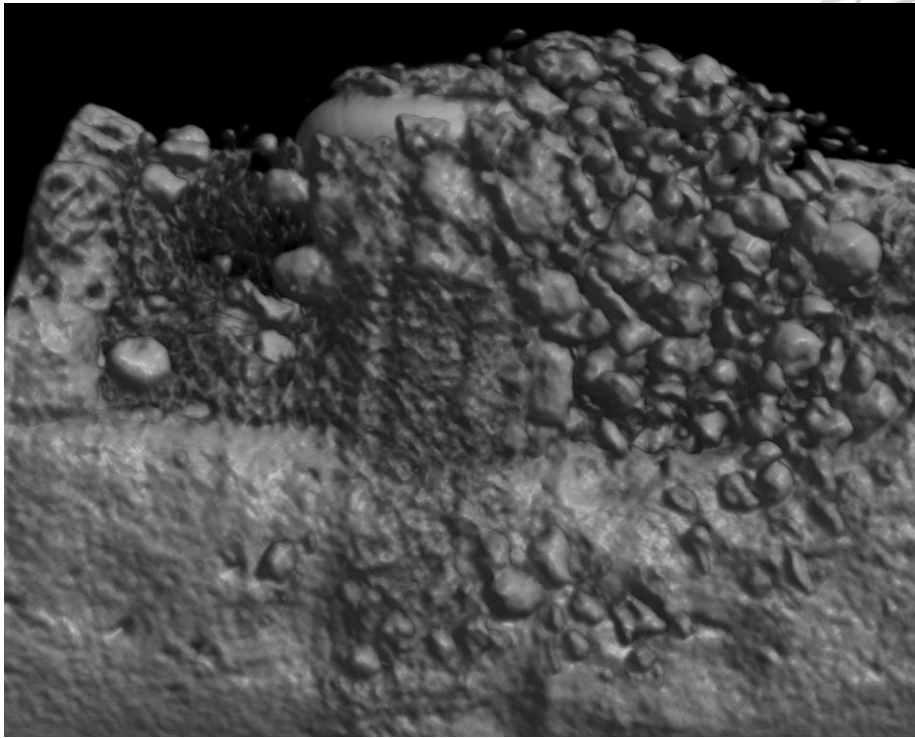


圖 34：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像。明顯礦化的新生骨質開始佔據骨缺損的空間。

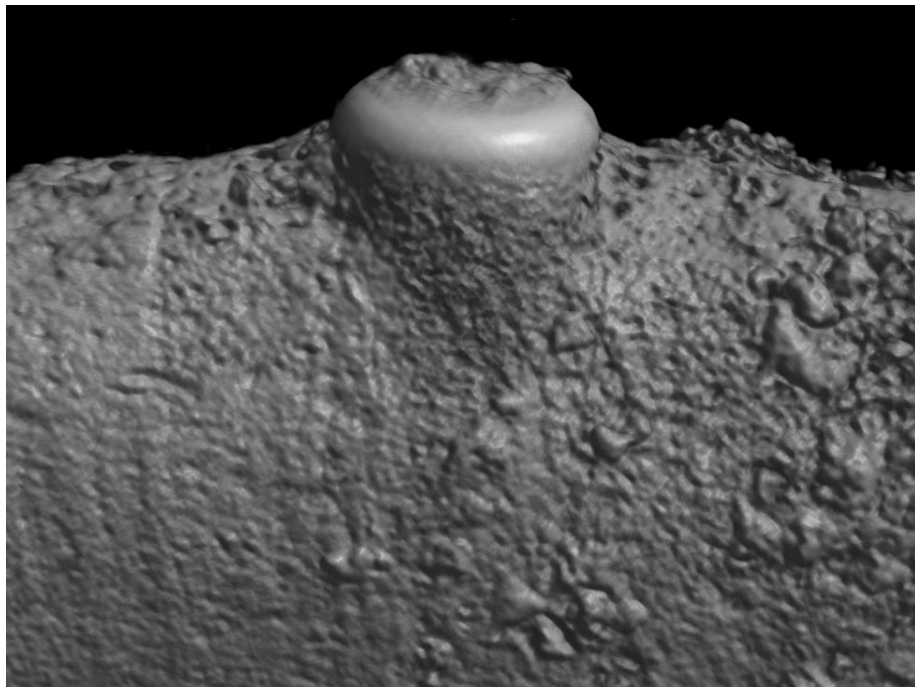


圖 35：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層三度空間表面影像。骨缺損呈現光滑緻密的新生皮質骨，齒槽骨的原始型態也達到完美重建。

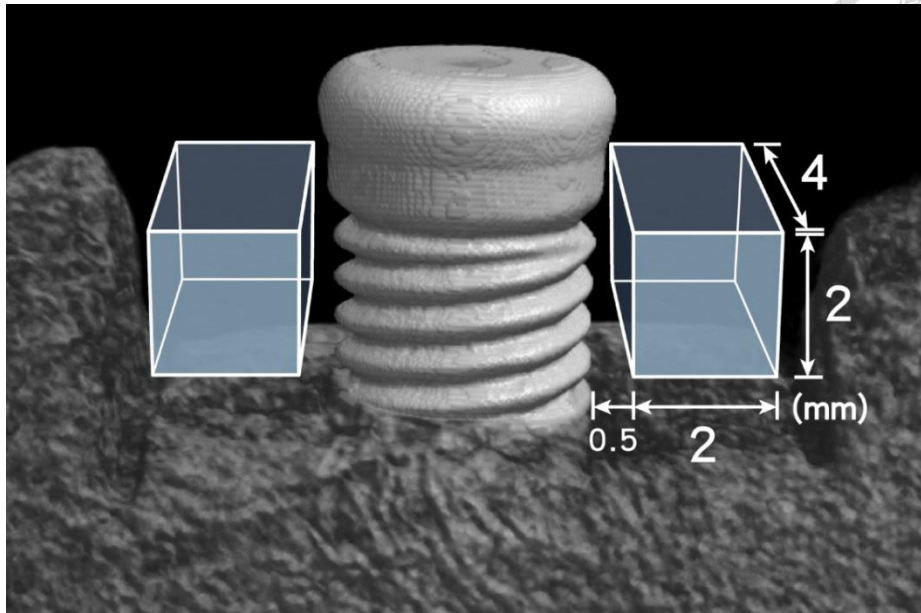


圖 36：微電腦斷層新生骨質密度量化之興趣區間。在人工植體兩側、骨缺損的正中央，選取兩個 $2 \times 2 \times 4 \text{ mm}^3$ 的範圍當作興趣區間。

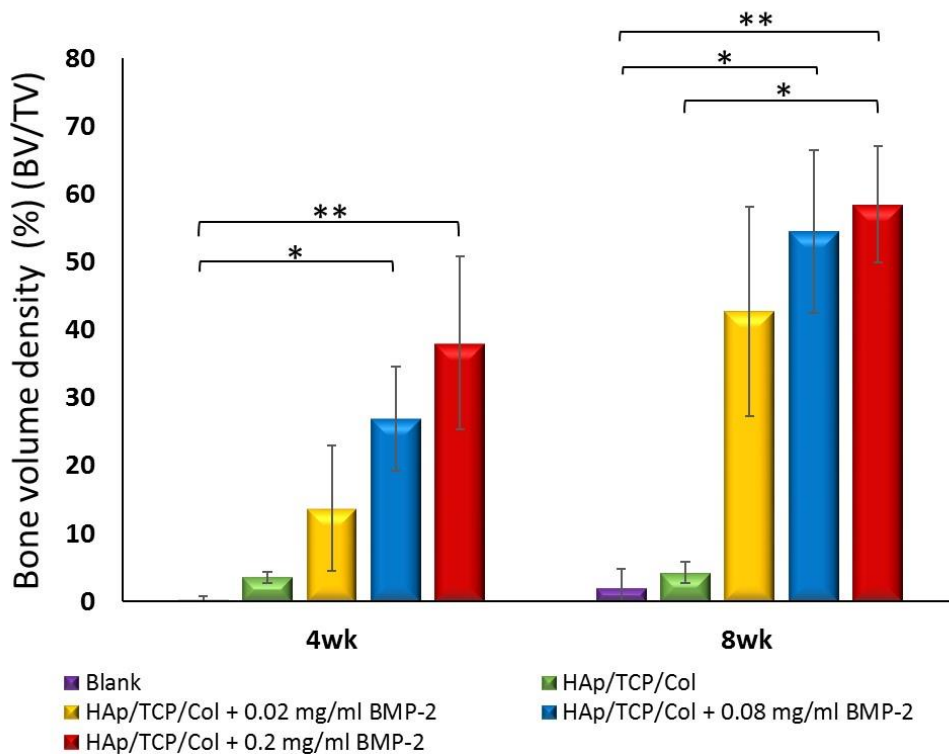


圖 37：微電腦斷層之新生骨質密度量化分析。實驗組三（0.2 mg/mL rhBMP-2）在八週時，其新生骨質密度顯著大於控制組（adjusted $p < 0.05$ ）。

*adjusted $p < 0.05$; **adjusted $p < 0.01$

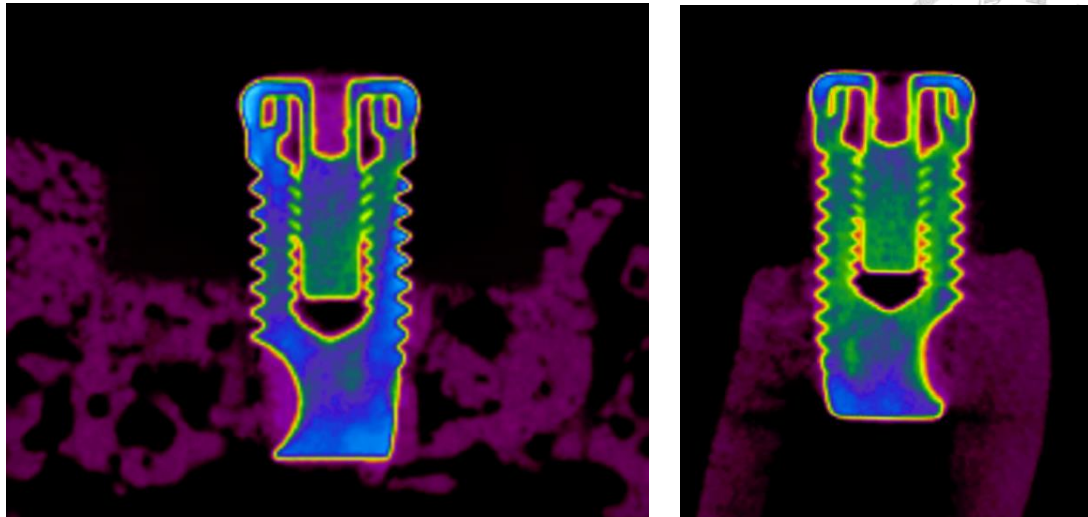


圖 38：四週負控制組之微電腦斷層切面影像。(左) 近遠心切面 (右) 頰舌側切面
 類似原始骨缺損型態，近遠心之骨缺損邊界初步出現垂直吸收，人工植體垂直裸露於骨缺損中央、未有新生骨質包覆。

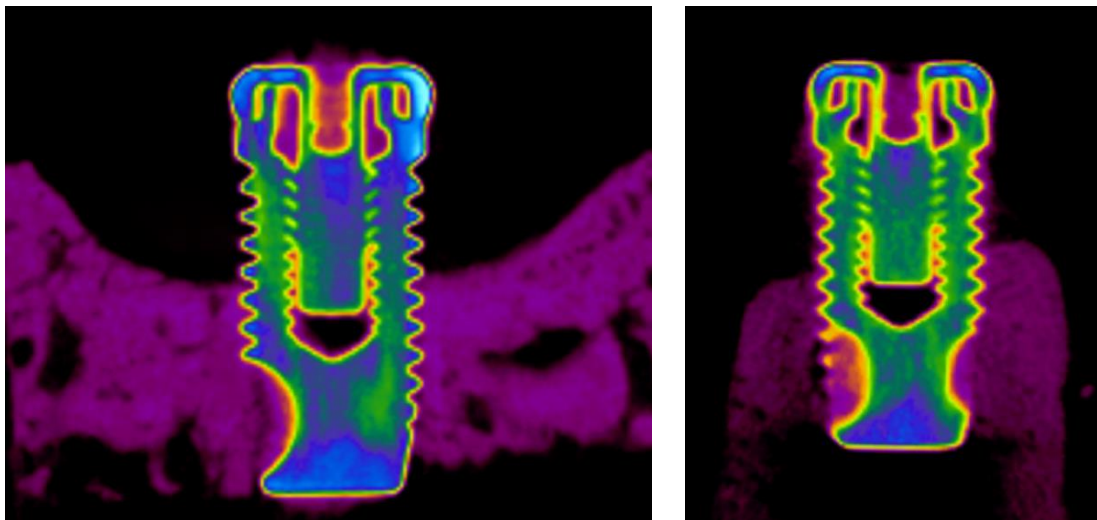


圖 39：八週負控制組之微電腦斷層切面影像。(左) 近遠心切面 (右) 頰舌側切面
 骨缺損的底部兩側有部分骨質新生，近遠心的骨缺損牆已明顯降低高度且變得圓潤。人工植體無新生骨質包覆。

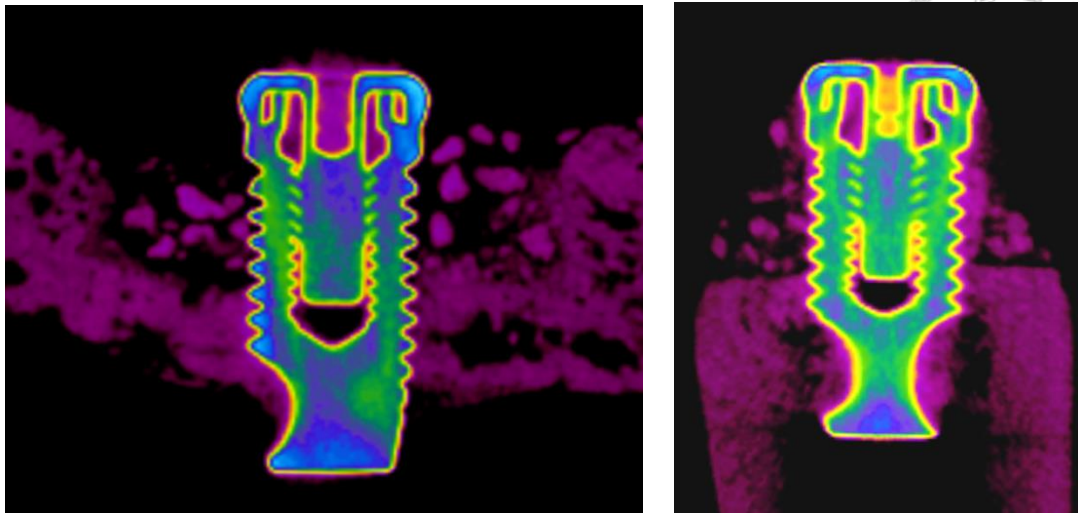


圖 40：四週控制組之微電腦斷層切面影像。(左) 近遠心切面 (右) 頰舌側切面
骨缺損及植體的頰舌側有許多 HAp/TCP 顆粒，此時並無明顯新生骨質。

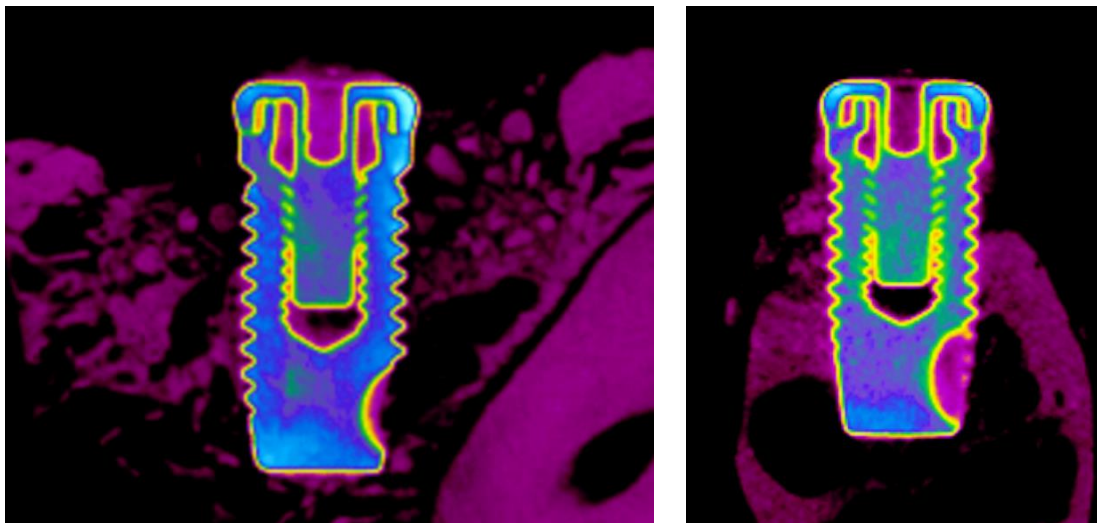


圖 41：八週控制組之微電腦斷層切面影像。(左) 近遠心切面 (右) 頰舌側切面
HAp/TCP 顆粒減少，骨缺損底部似乎有些微新生骨質，而人工植體的上半部仍未
有骨質包覆。

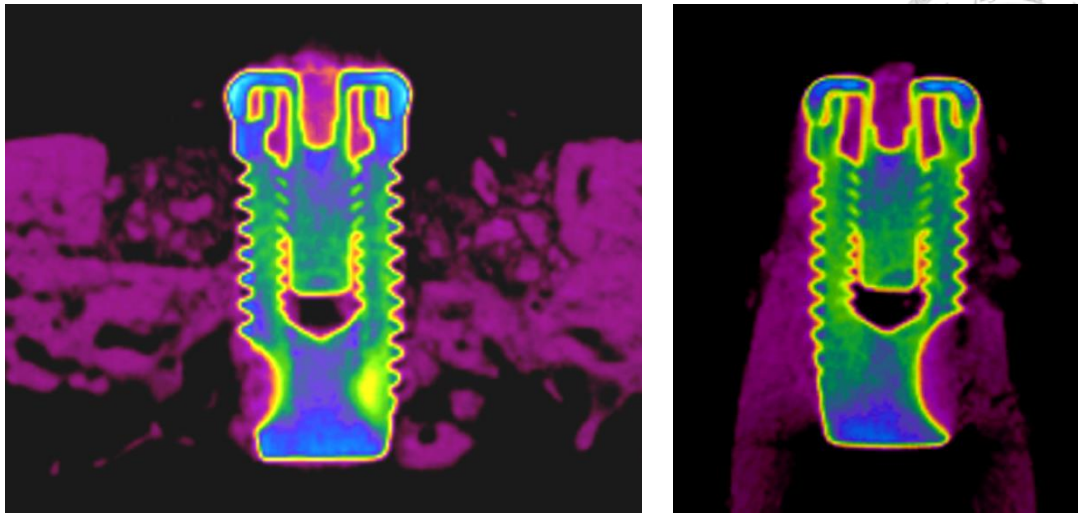


圖 42：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像。(左) 近遠心切面 (右) 頰舌側切面 HAp/TCP 顆粒仍然可分辨，骨缺損區域及裸露植體的頰舌側有低礦化度的新生骨質出現。

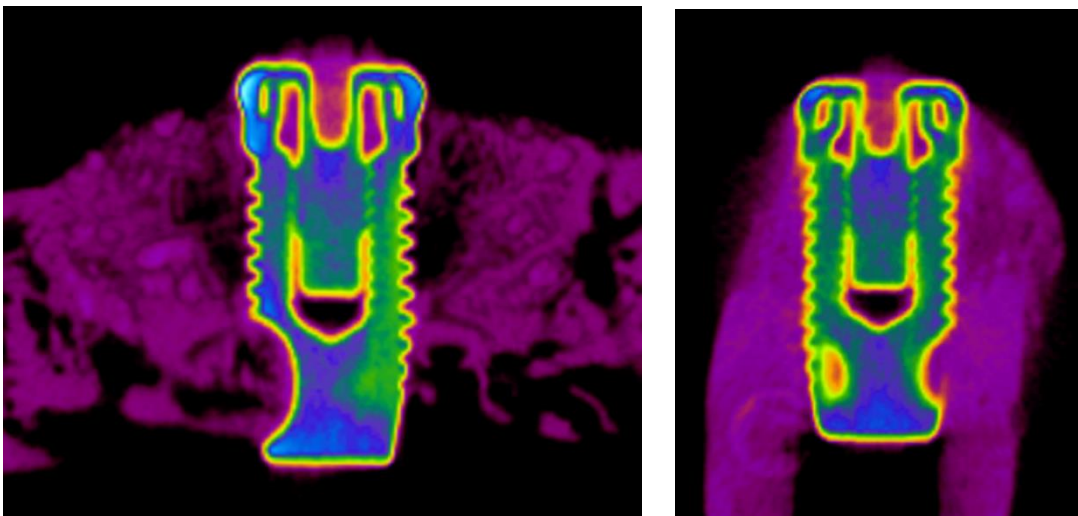


圖 43：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像。(左) 近遠心切面 (右) 頰舌側切面 僅有少許 HAp/TCP 顆粒殘留。骨缺損區域及裸露植體的頰舌側有明顯新生骨質，僅剩植體裸露區的近遠心側有部分 radiolucency。

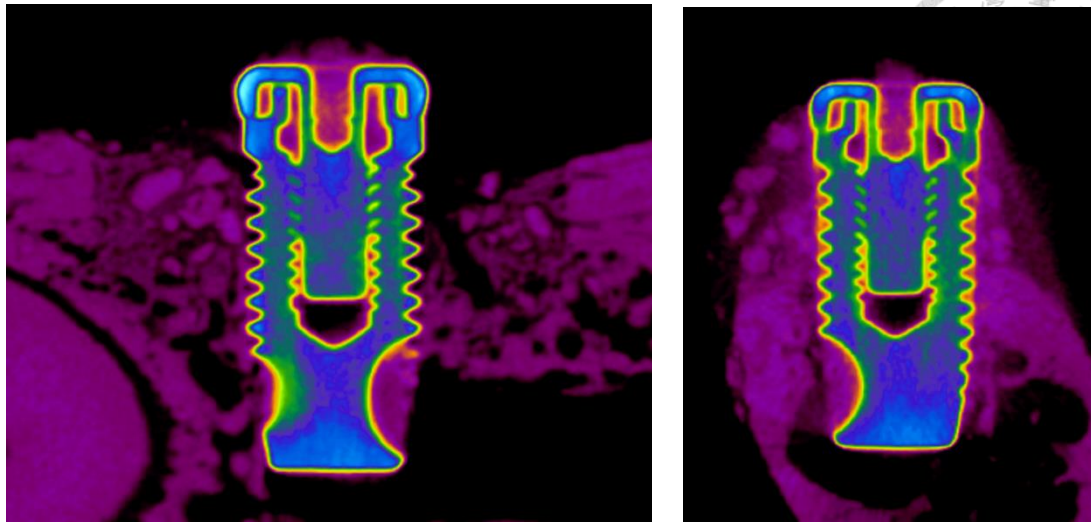


圖 44：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像。(左) 近遠心切面 (右) 頰舌側切面 HAp/TCP 顆粒仍可分辨，骨缺損區域及裸露植體的頰舌側有新生骨質生成。

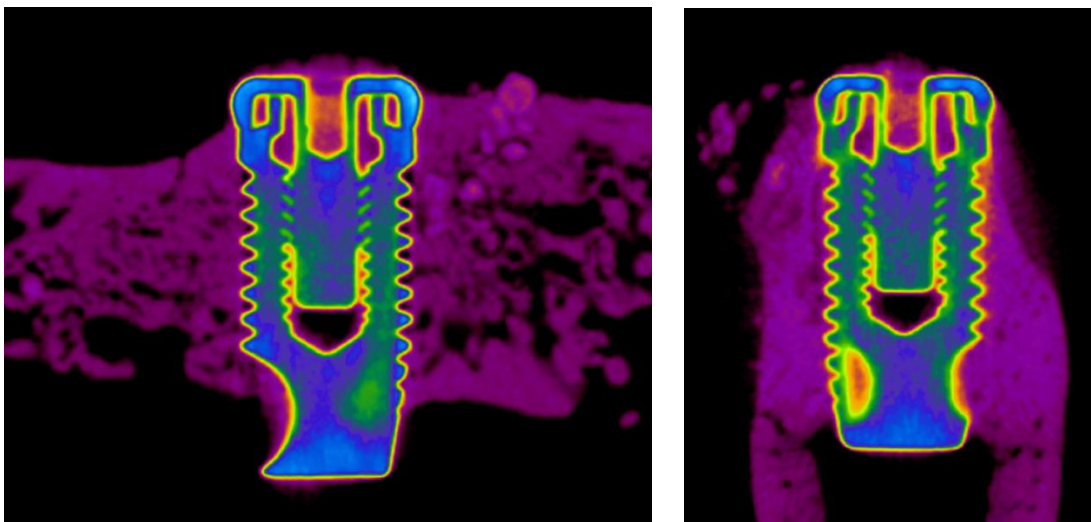


圖 45：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像。(左) 近遠心切面 (右) 頰舌側切面 HAp/TCP 顆粒已幾乎分解完成，骨缺損區域及植體的頰舌側有大量新生骨質，植體裸露區被新生骨頭完全包覆。

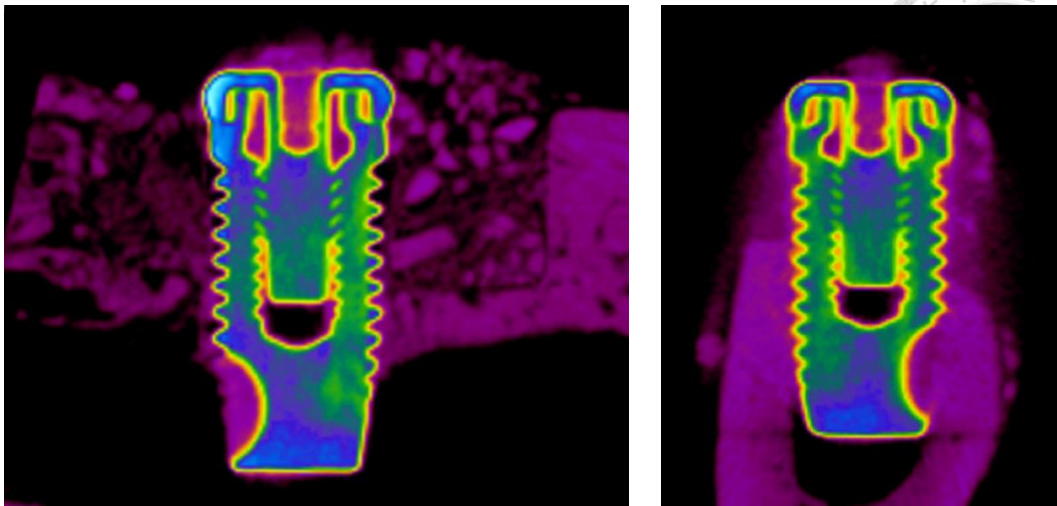


圖 46：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像。(左) 近遠心切面 (右) 頰舌側切面 HAp/TCP 顆粒較少，骨缺損區域及裸露植體的頰舌側有明顯新生骨質生成，新生骨質已開始包覆植體。

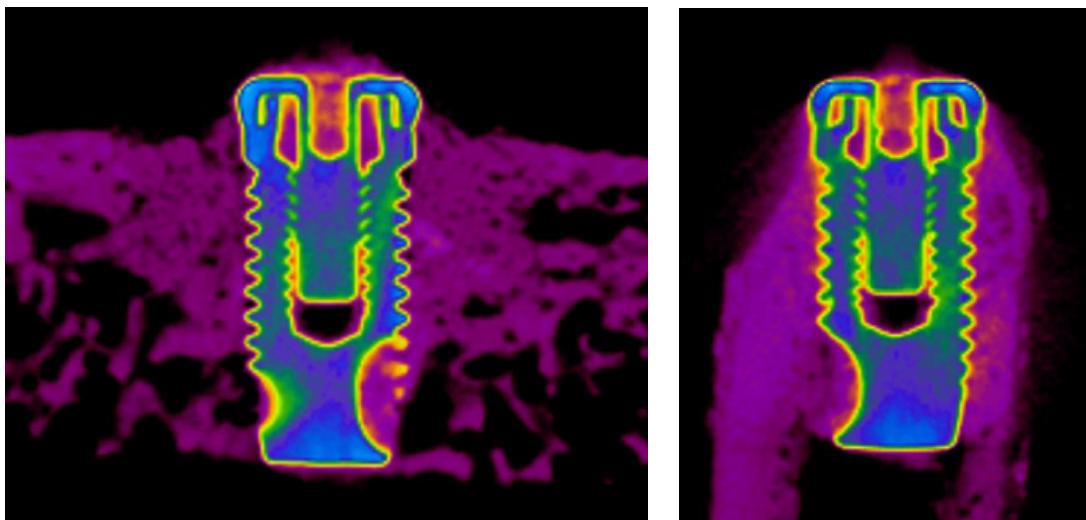


圖 47：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之微電腦斷層切面影像。(左) 近遠心切面 (右) 頰舌側切面 無殘存 HAp/TCP 顆粒，骨缺損已被高密度新生骨質充滿、呈現完全癒合。

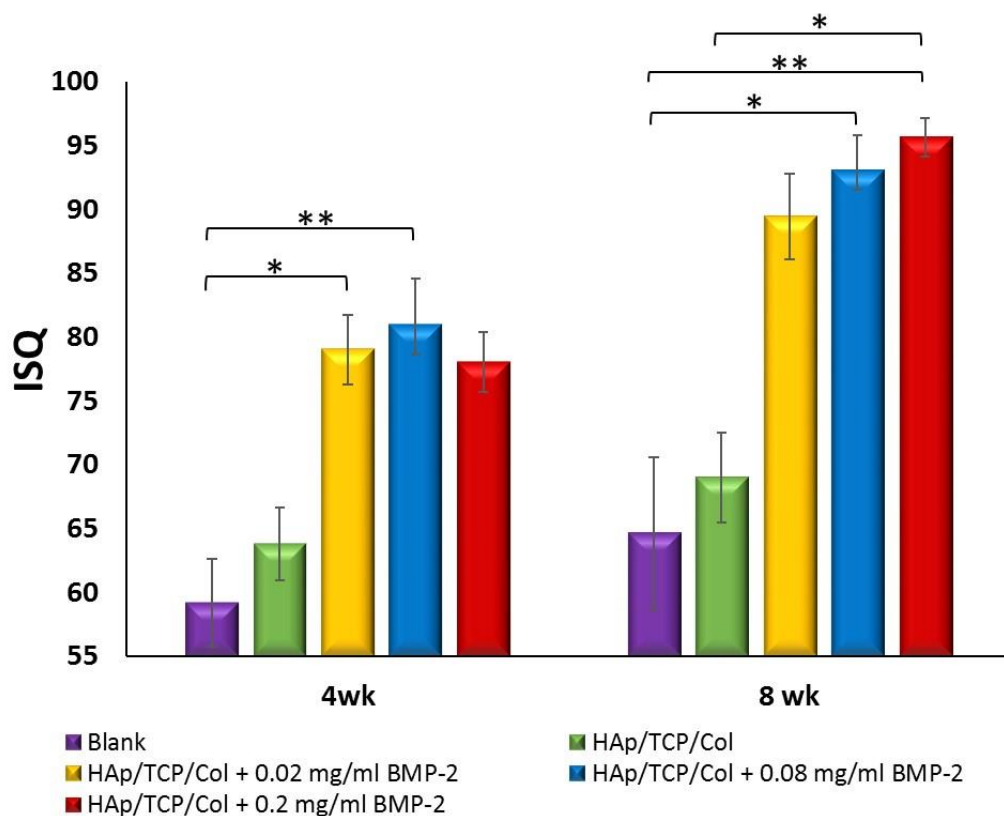


圖 48：植體共振頻率分析。三個 rhBMP-2 組別在四週的 ISQ 值皆已超過 75，在八週則皆已超過 85。只有 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別的 ISQ 在八週顯著高於控制組 (adjusted $p < 0.05$)。 *adjusted $p < 0.05$; **adjusted $p < 0.01$

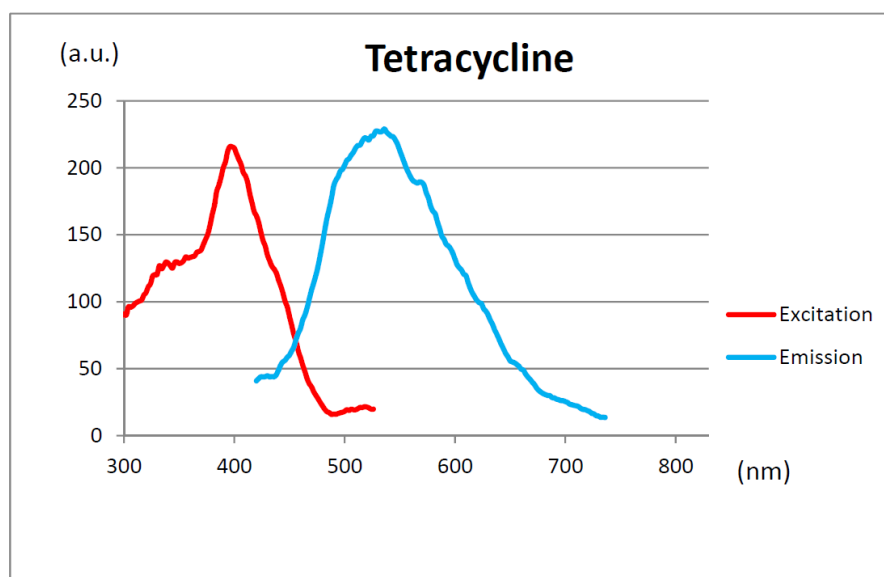


圖 49：四環黴素(Tetracycline)螢光激發與發散波長。

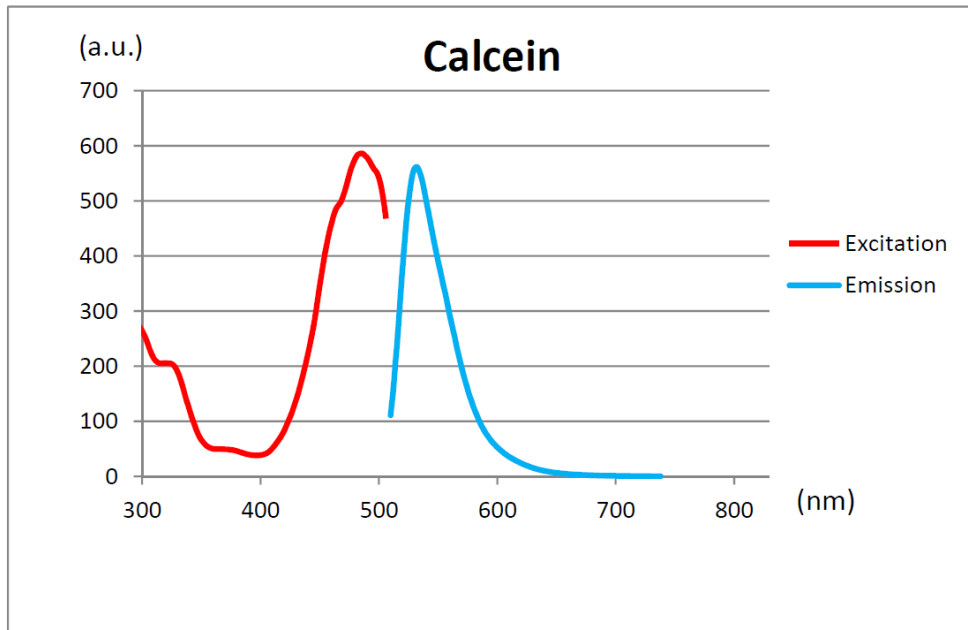


圖 50：鈣黃綠素(Calcein)螢光激發與發散波長。

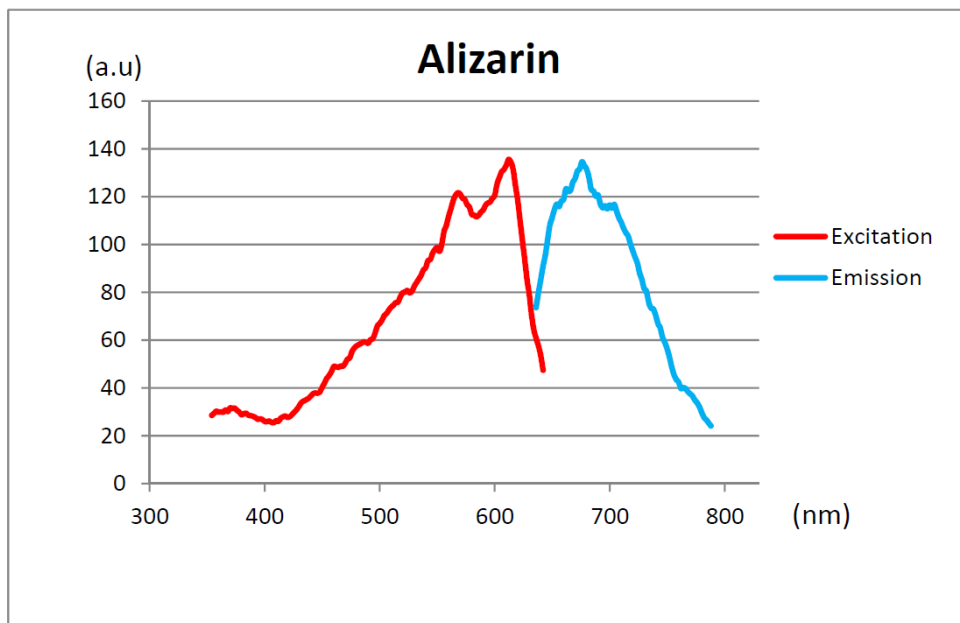


圖 51：茜素羧酸絡合劑(Alizarin Complexone)螢光激發與發散波長。

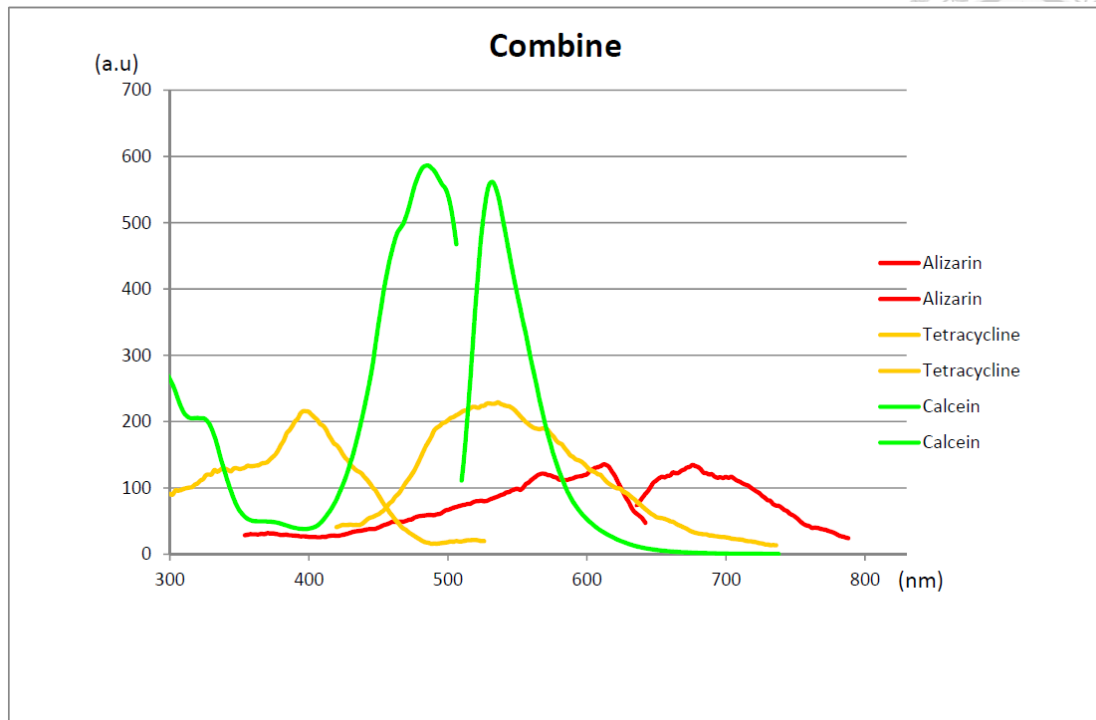


圖 52：三種螢光激發與發散波長。

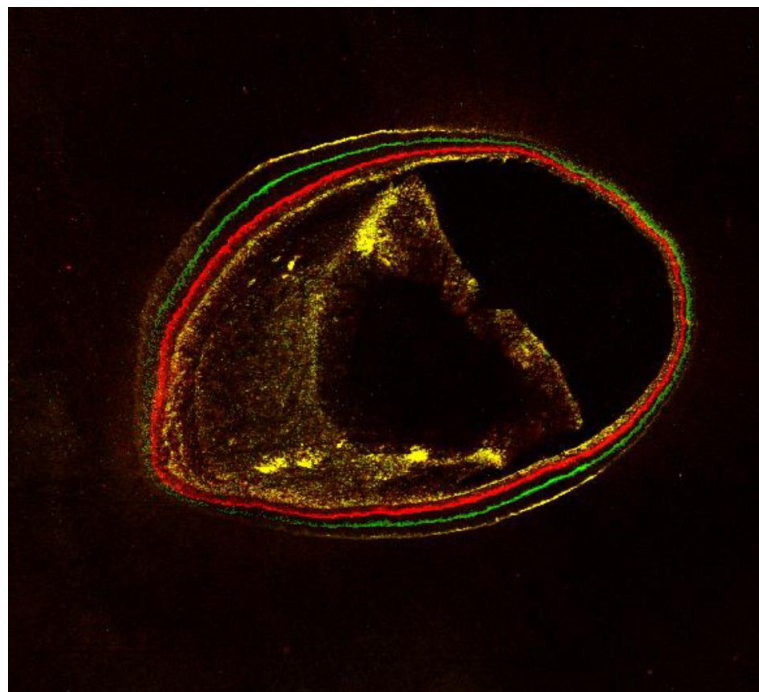


圖 53：牙髓腔二級牙本質之螢光反應。牙髓腔外層齒質由外圈往內圈的螢光依序為黃色、綠色及紅色螢光的牙本質沈積線條，符合手術中的給藥順序。

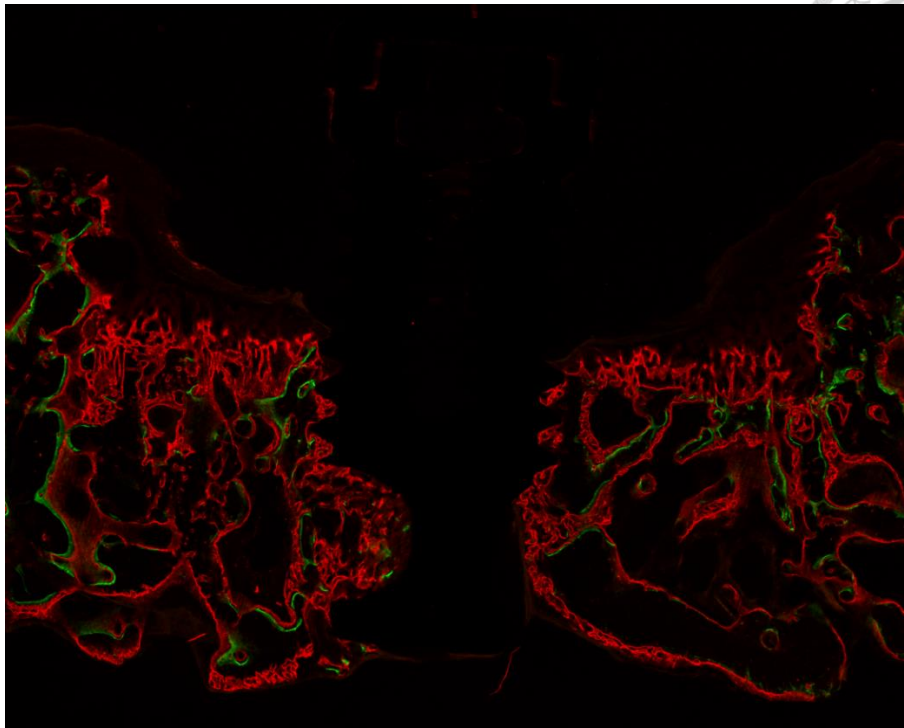


圖 54：四週負控制組之螢光顯微影像。骨缺損區域未有螢光反應。

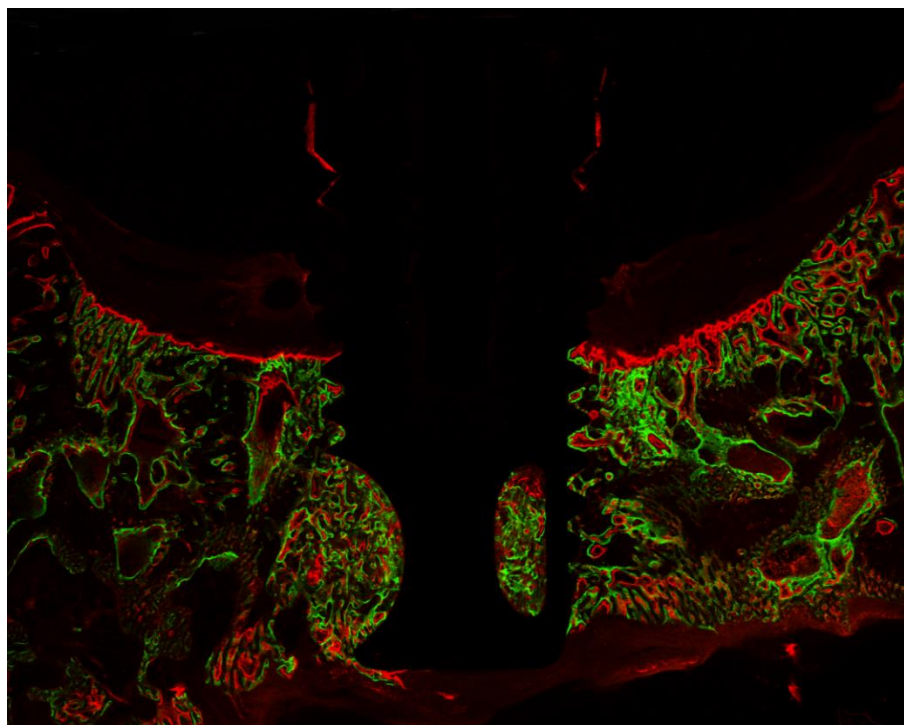


圖 55：八週負控制組之螢光顯微影像。骨缺損底部兩側有部分綠色及少量紅色螢光的新生骨質，裸露植體周圍未有螢光反應。

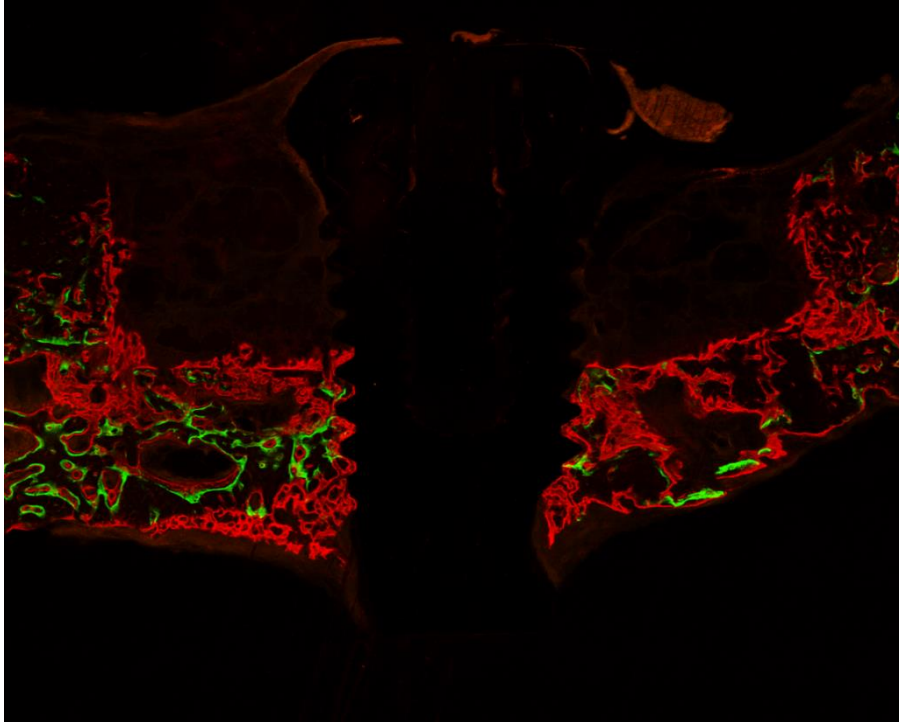


圖 56：四週控制組之螢光顯微影像。骨缺損區域未有明顯螢光反應。

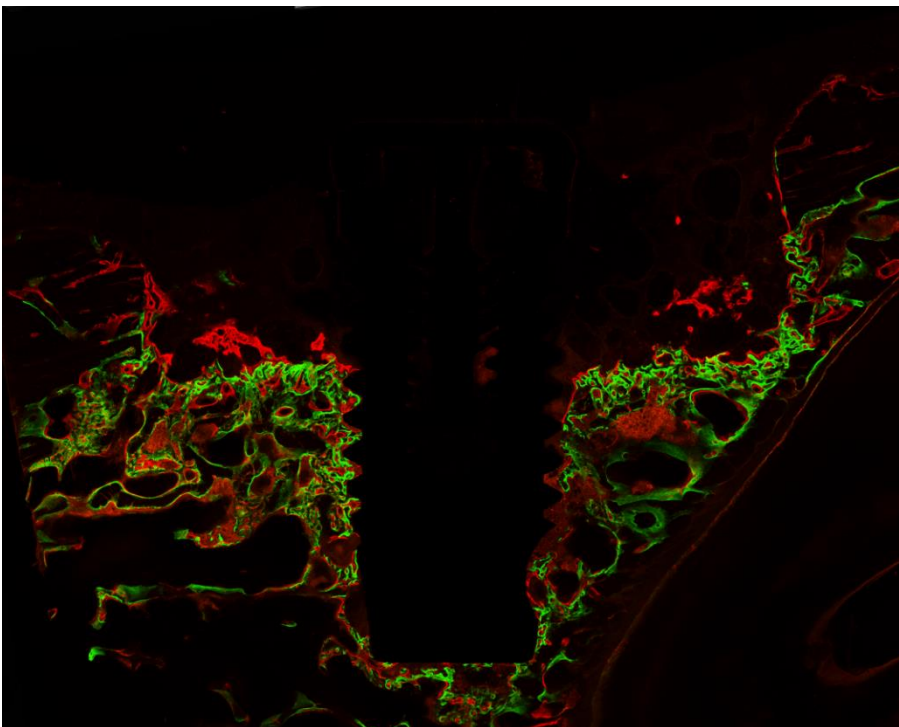


圖 57：八週控制組之螢光顯微影像。已有少量紅色螢光之新生骨質往骨缺損中心生長，植體裸露區周圍無螢光反應。

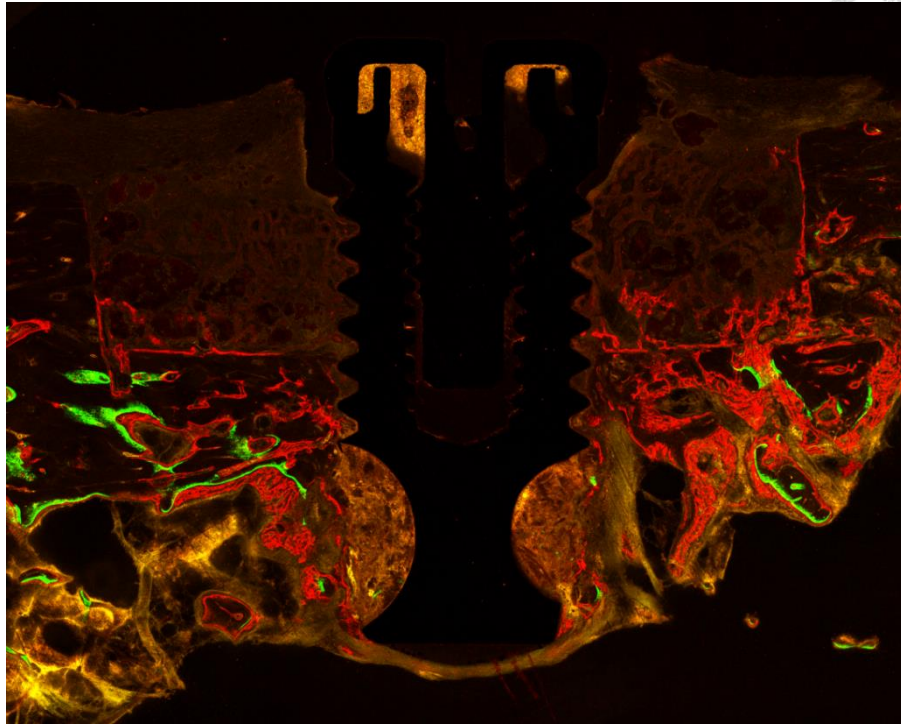


圖 58：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像。微弱的紅色螢光已開始往骨缺損中央及植體延伸。

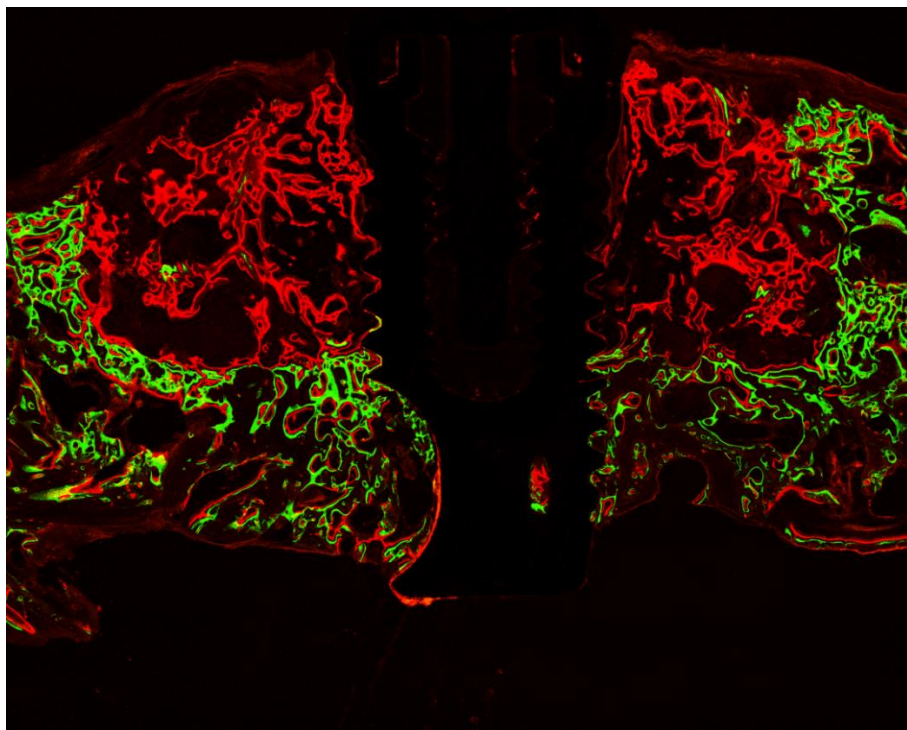


圖 59：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像。骨缺損空間充滿紅色螢光，新生骨質的密度似海綿骨。

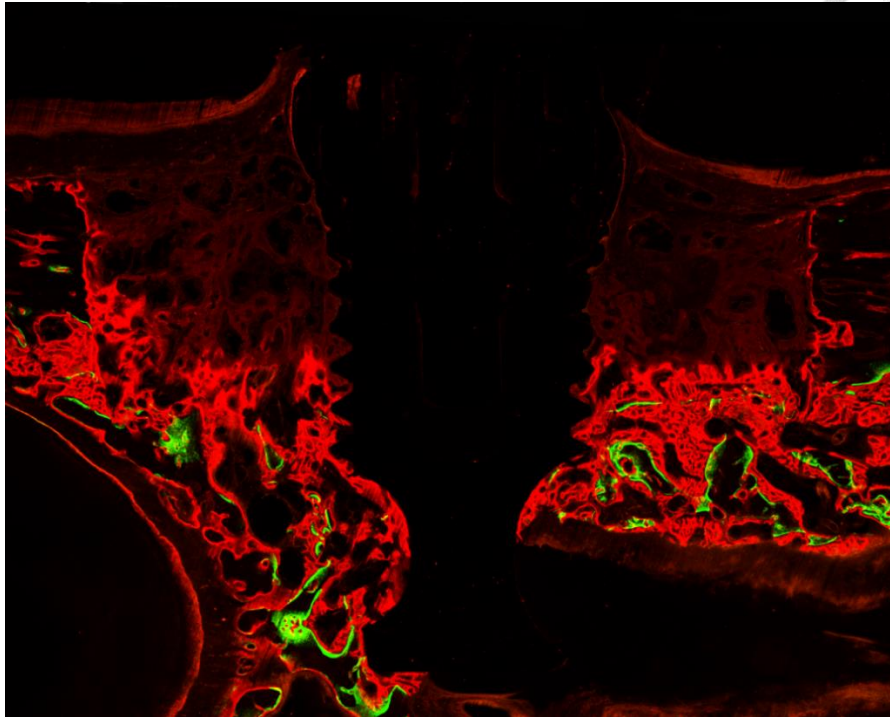


圖 60：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像。骨缺損邊界處有明顯紅色螢光，而微弱的紅色螢光佈滿整個骨缺損的空間。

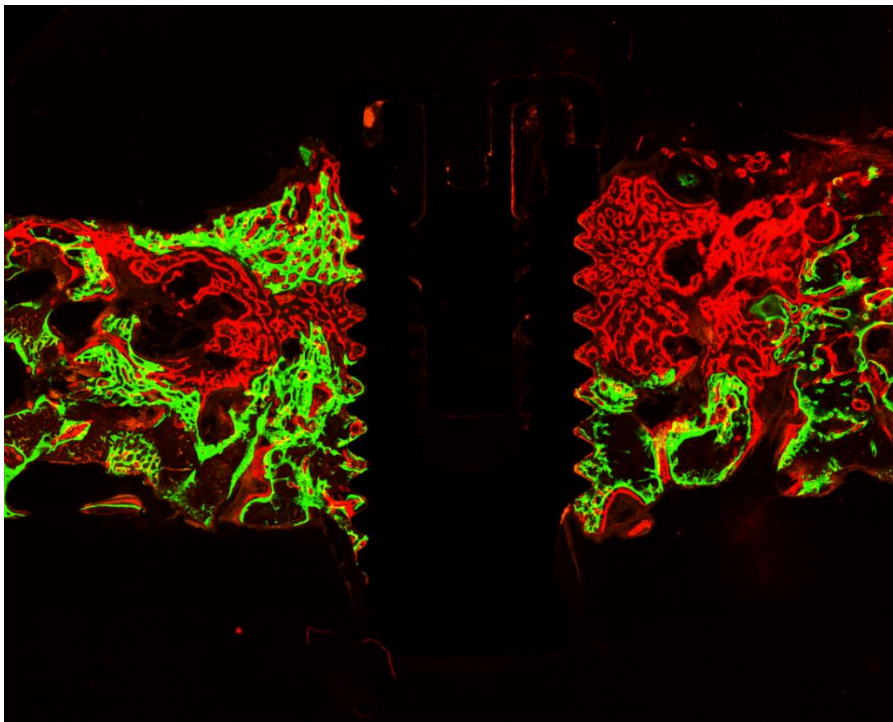


圖 61：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像。骨缺損空間充滿紅色及綠色螢光，新生骨質密度較 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別為高，可看到較早生成之綠色螢光從骨膜的方向起始往下延伸。

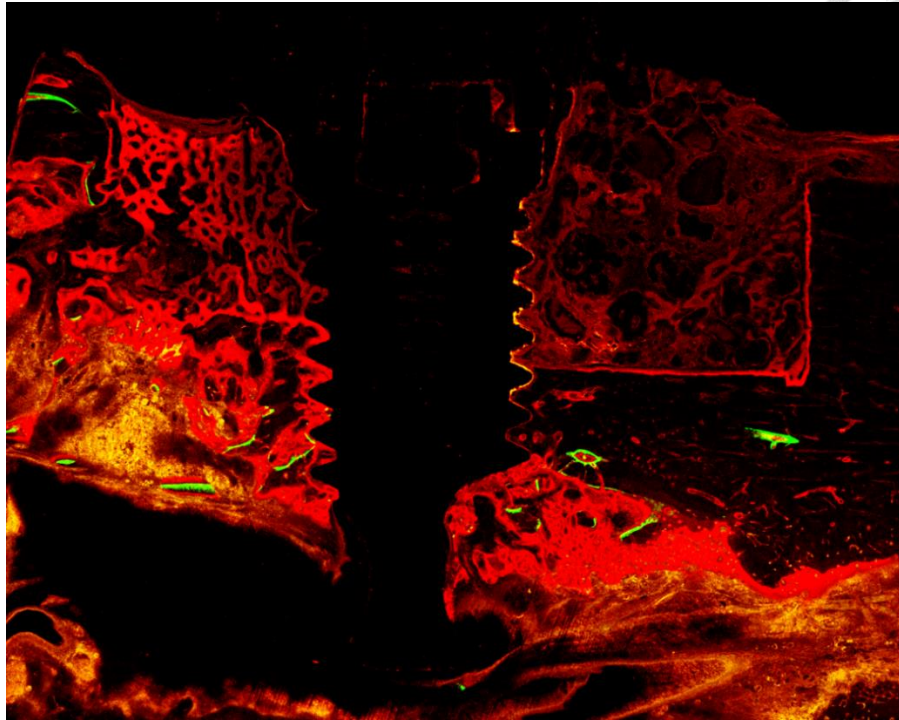


圖 62：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像。明顯的紅色螢光延伸至骨缺損的中央、至植體表面，並往上到植體平台高度。

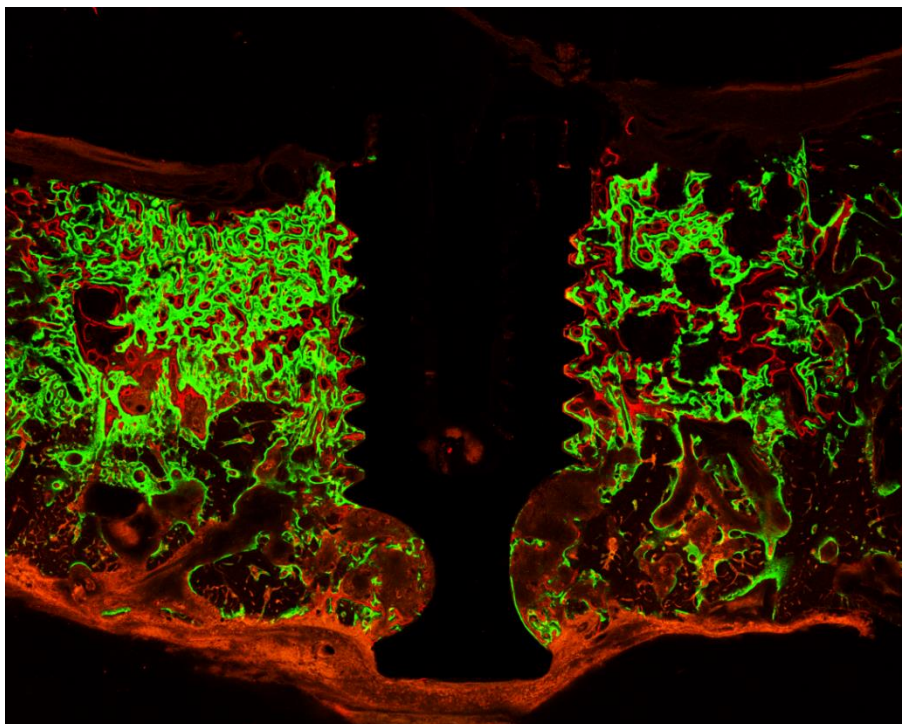


圖 63：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之螢光顯微影像。骨缺損空間充斥高密度之綠色螢光。

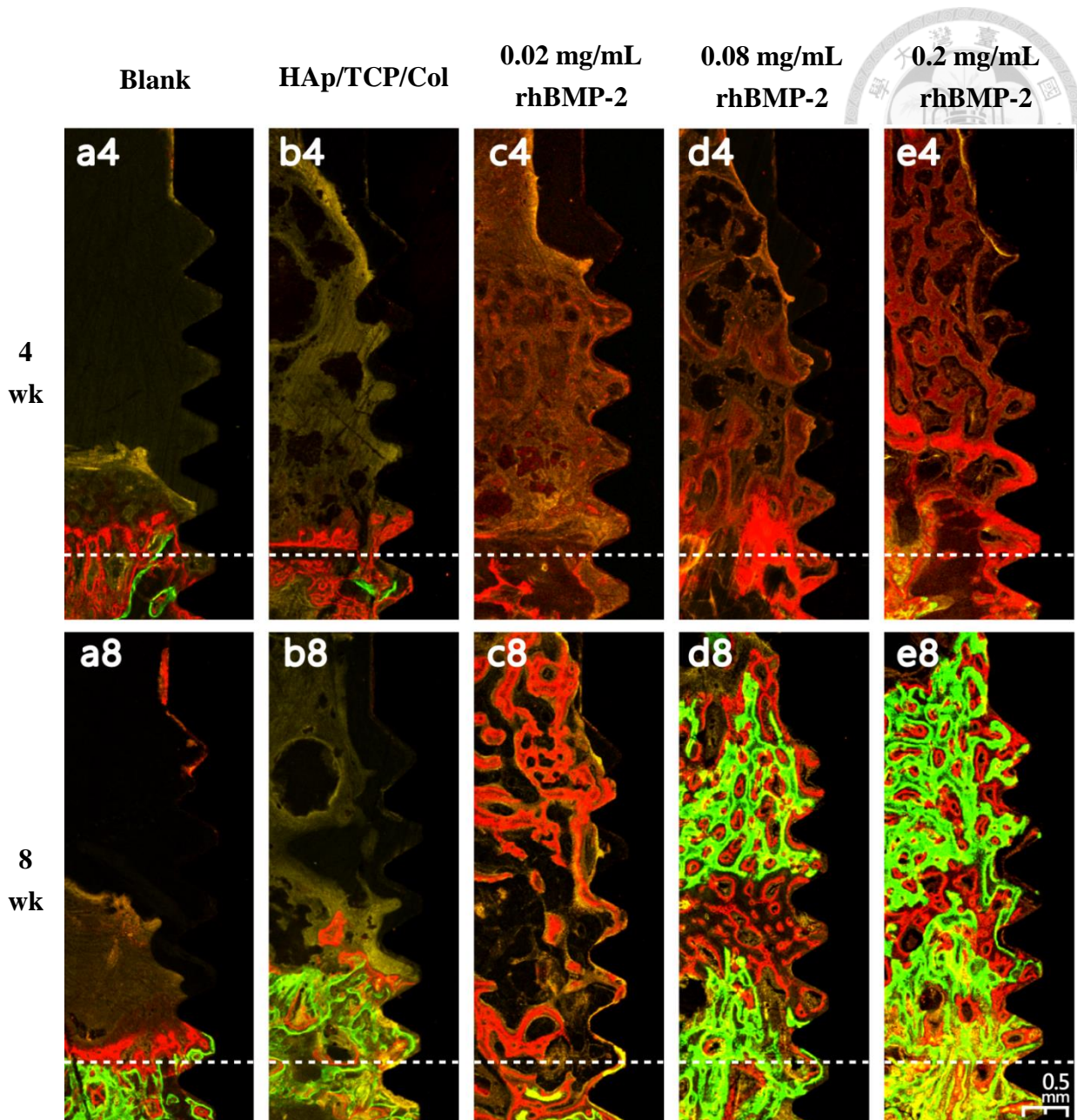


圖 64：螢光顯微影像於人工植體上半部裸露區之放大檢視。負控制組在四週及八週僅有不到半個螺紋高度的骨增生。控制組在八週則有 1-1.5 個螺紋高度的骨質新生。三個實驗組在四週即有紅色螢光包覆植體裸露區，rhBMP-2 劑量越高則螢光越強。八週時，三個實驗組皆有明顯新生骨質包覆至植體平台高度，0.02 mg/mL rhBMP-2 組別以紅色螢光為主，0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之新生骨質密度增加、且有超過一半的綠色螢光，0.2 mg/mL rhBMP-2 則是以綠色螢光為主的高密度新生骨質。虛線：齒槽骨缺損之底界

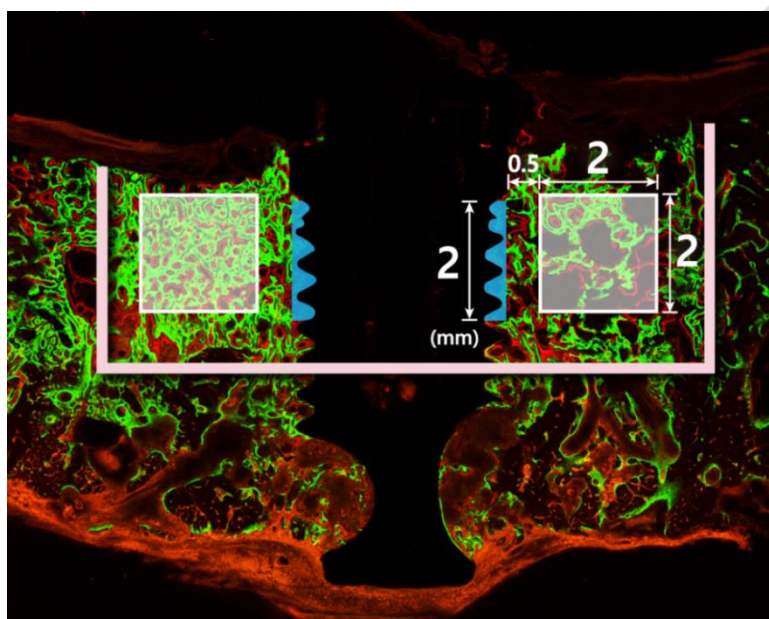
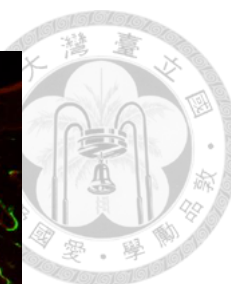


圖 65：螢光面積量化分析之興趣區間。第一個興趣區間乃位於骨缺損中心之 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 白色正方形。第二個興趣區間為植體冠側裸露區的植體螺紋間空間，以藍色標示。

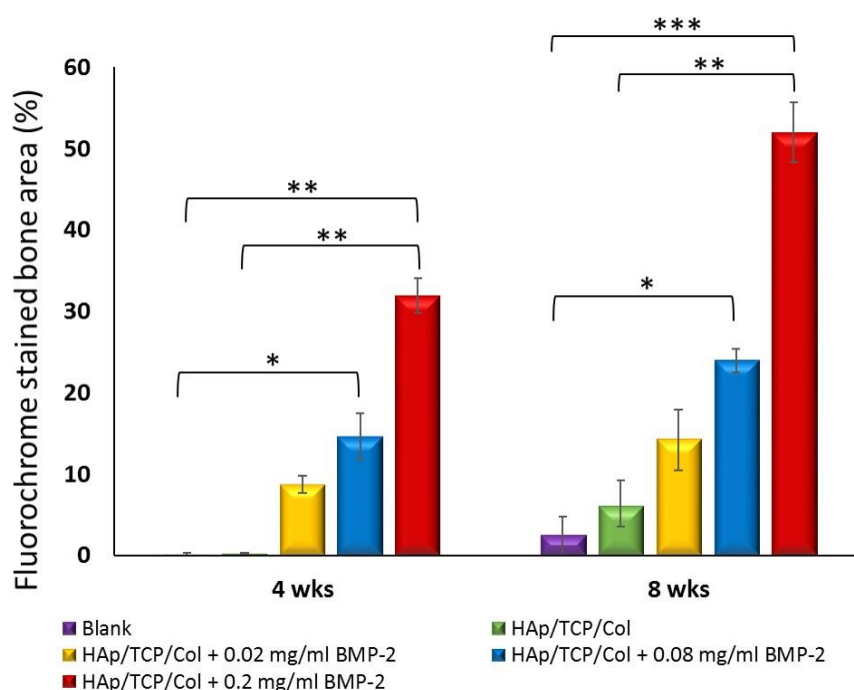


圖 66：螢光顯微影像第一個興趣區間之螢光面積量化分析。0.2 mg/mL rhBMP-2 組別在四週及八週有顯著高於控制組之螢光面積比例 (adjusted $p < 0.01$)。

*adjusted $p < 0.05$; **adjusted $p < 0.01$

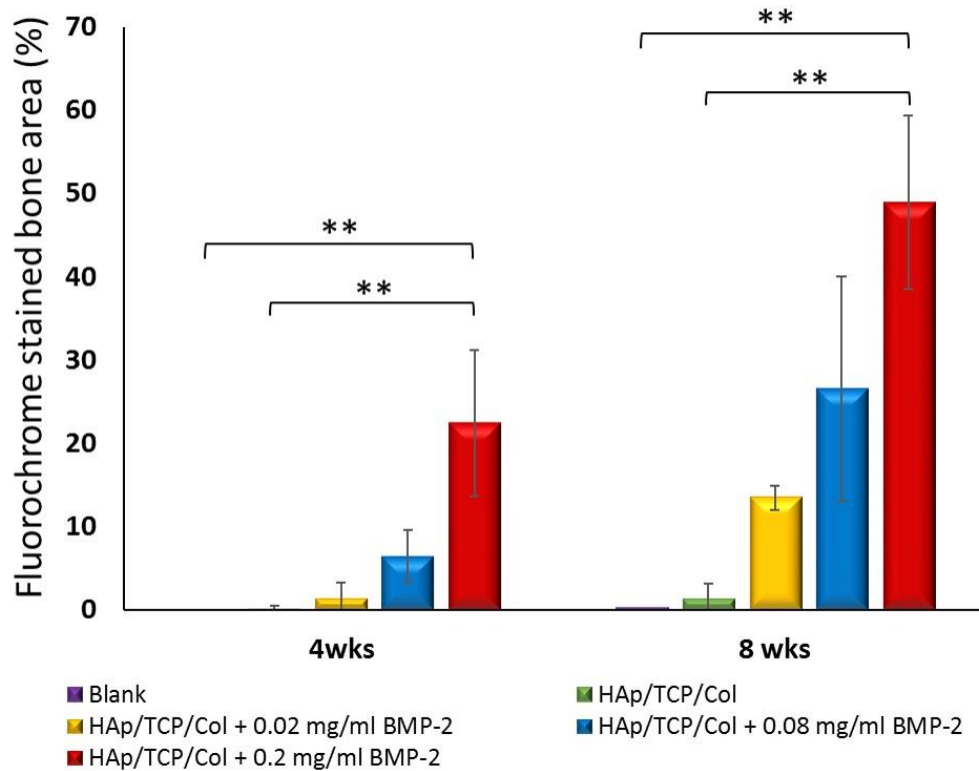


圖 67：螢光顯微影像第二個興趣區間之螢光面積量化分析。

無論在四週或八週，皆只有實驗組三（0.2 mg/mL rhBMP-2）相較於負控制組及控制組有顯著較高的螢光面積比例（adjusted $p < 0.01$ ）。

**adjusted $p < 0.01$

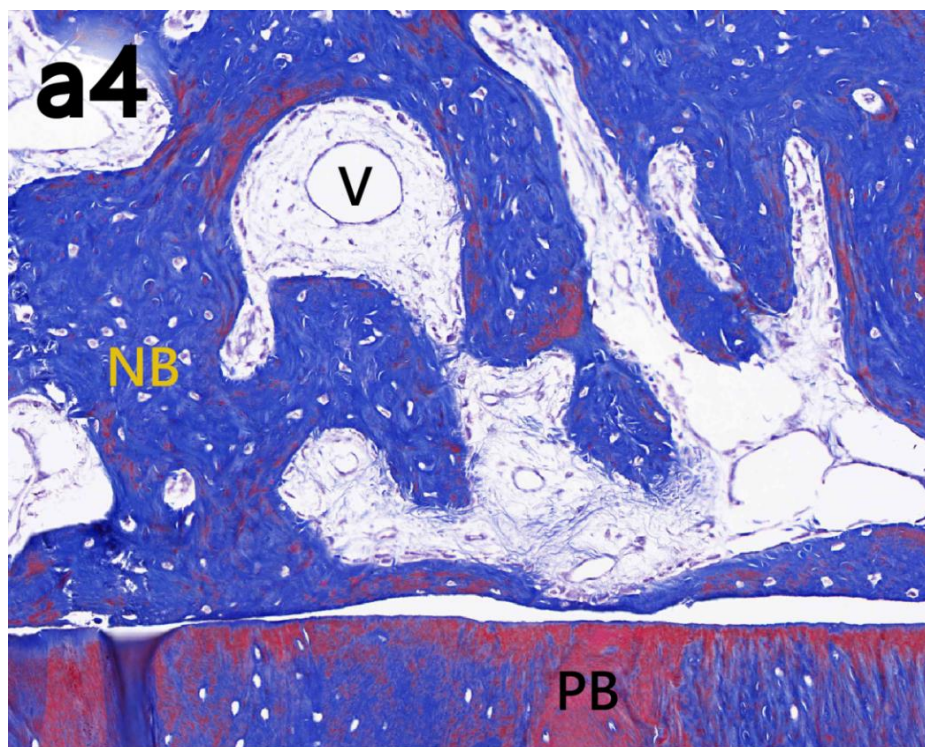
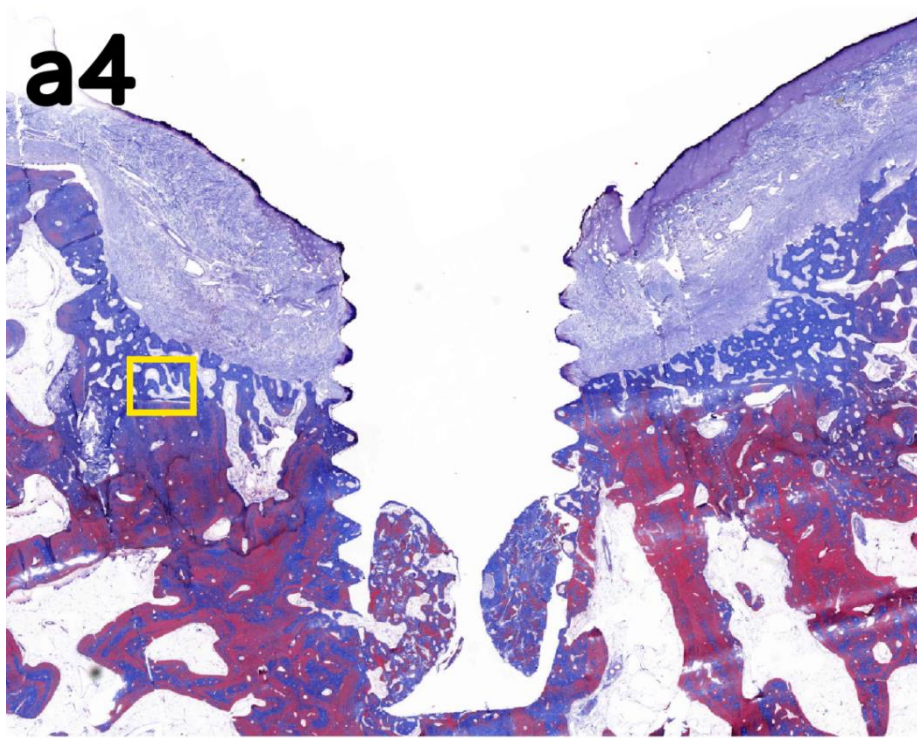
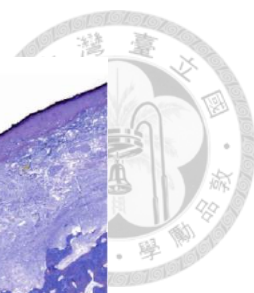


圖 68：四週負控制組之 MT 染色。（上）近遠心切面（下）黃色方格放大圖
軟組織已往下佔據大部分的骨缺損區域及植體裸露區周圍，骨缺損底部兩側邊界
有少量新生骨質。V：vessel；NB：new bone；PB：pre-existing bone

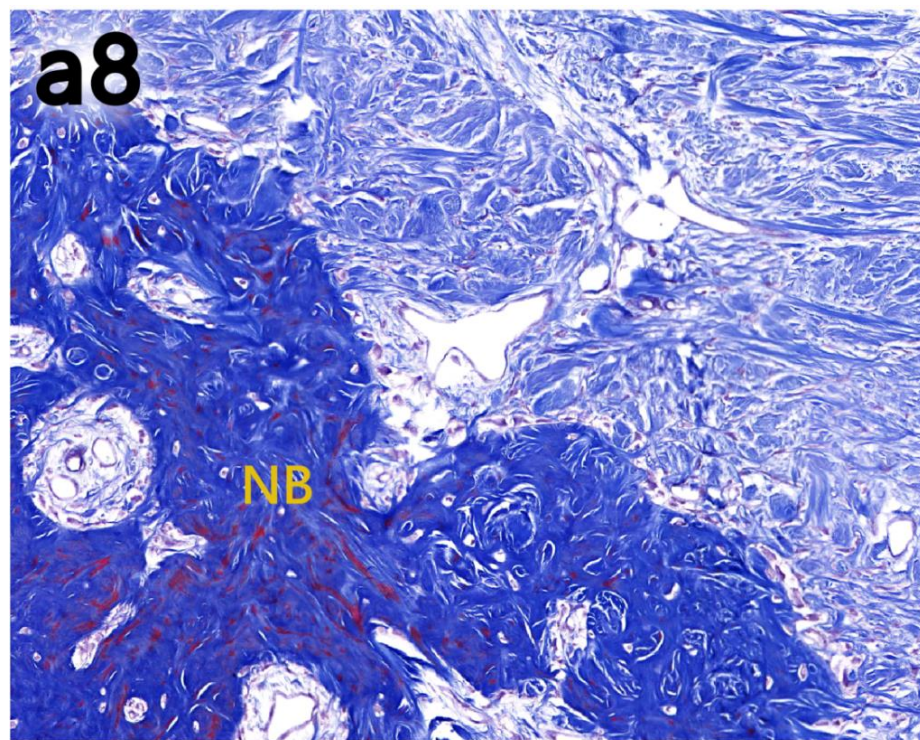
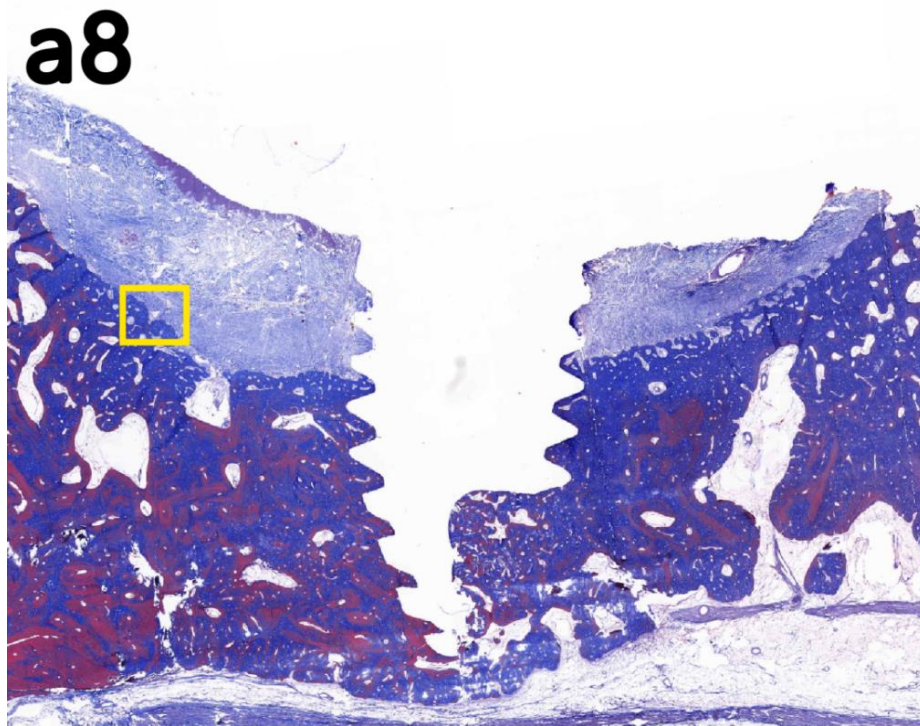


圖 69：八週負控制組之 MT 染色。（上）近遠心切面（下）黃色方格放大圖
骨缺損邊界變得圓潤，軟組織往下佔據大部分的骨缺損區域，植體裸露區周圍被
軟組織包覆。NB：new bone

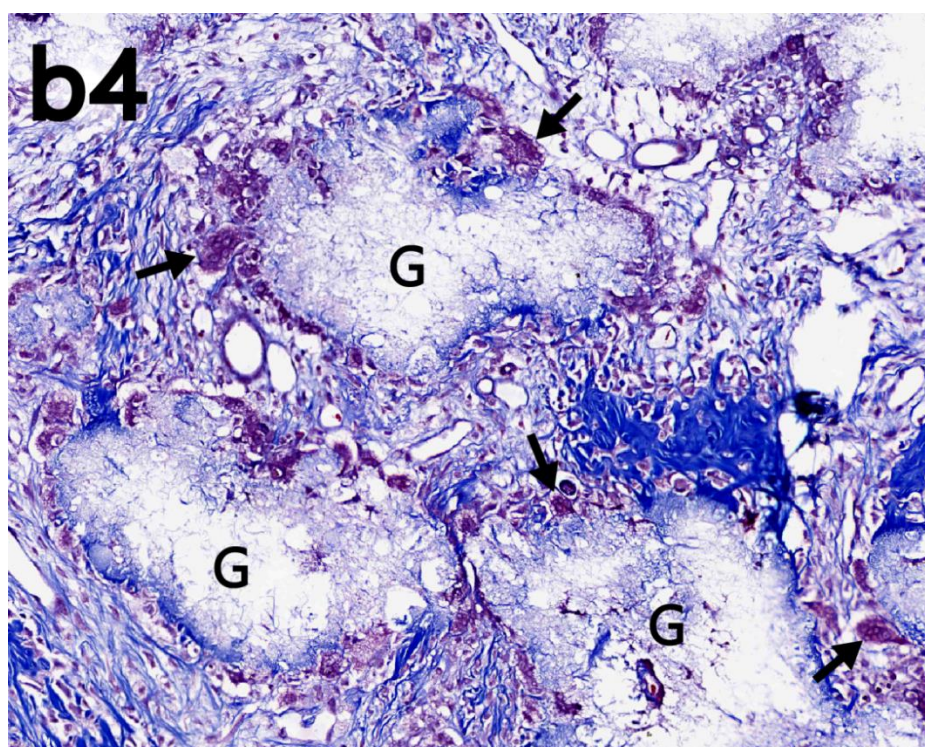
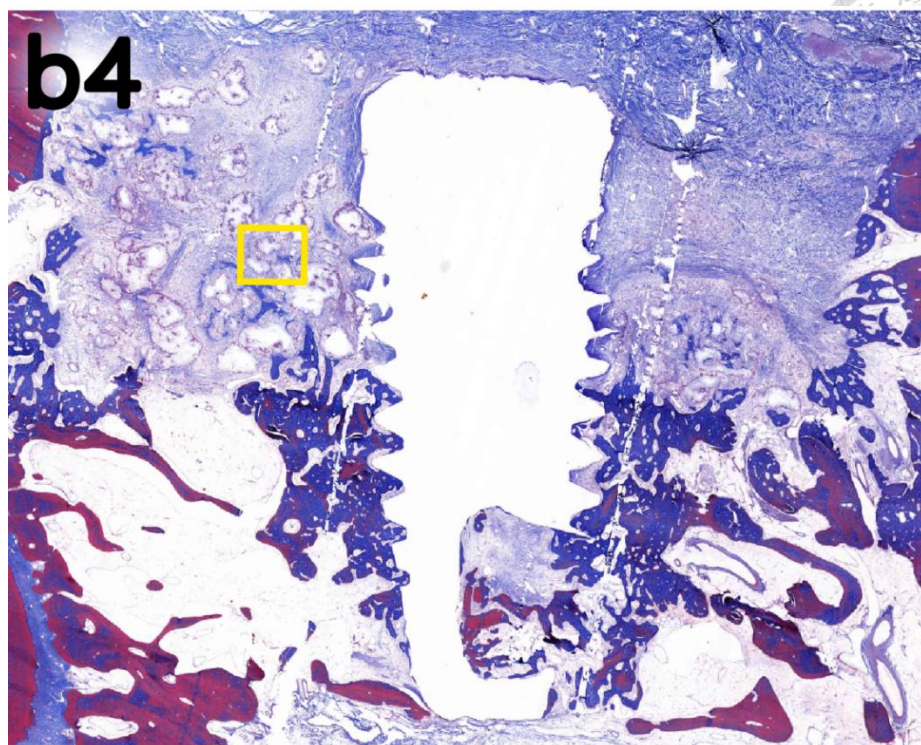


圖 70：四週控制組之 MT 染色。（上）近遠心切面（下）黃色方格放大圖
骨缺損的空間與高度被良好維持，骨缺損中央有不少 HAp/TCP 顆粒（標示為 G）
被 multinucleated giant cells（黑色箭頭）所包圍。

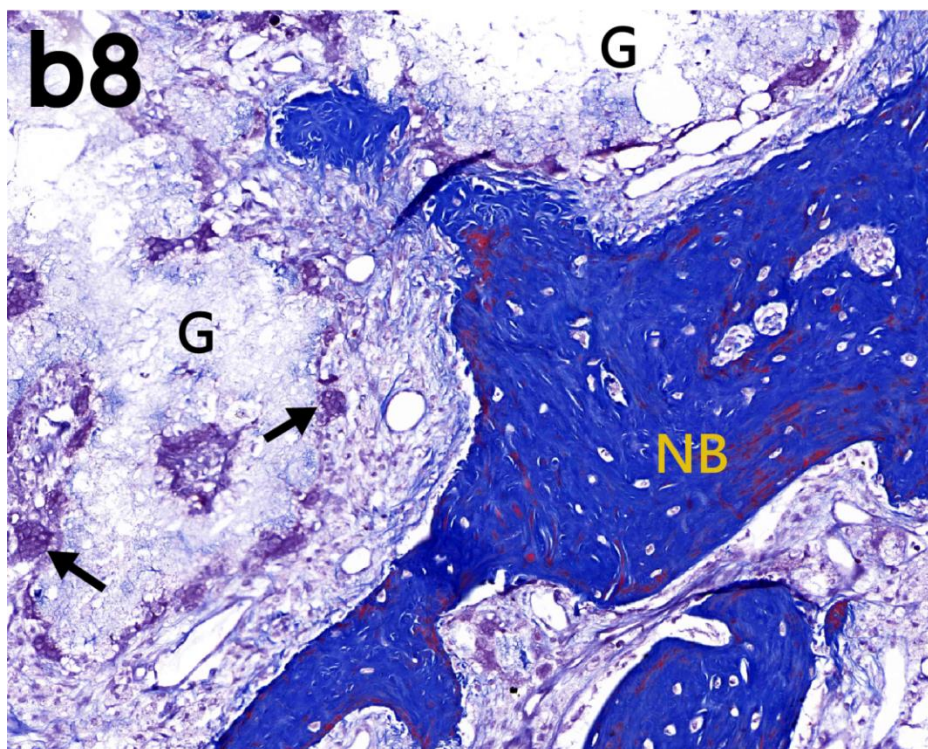
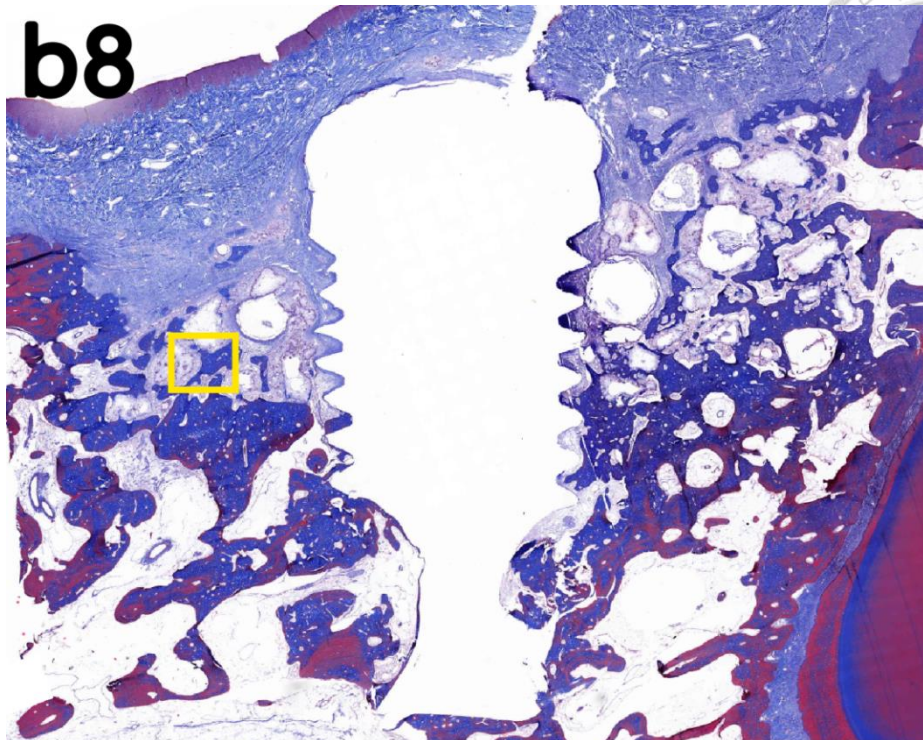


圖 71：八週控制組之 MT 染色。（上）近遠心切面（下）黃色方格放大圖
仍有多量的 HAp/TCP 顆粒殘留，少許新生骨質往骨缺損中央生長。G：granule；
NB：new bone；Arrow：multinucleated giant cell

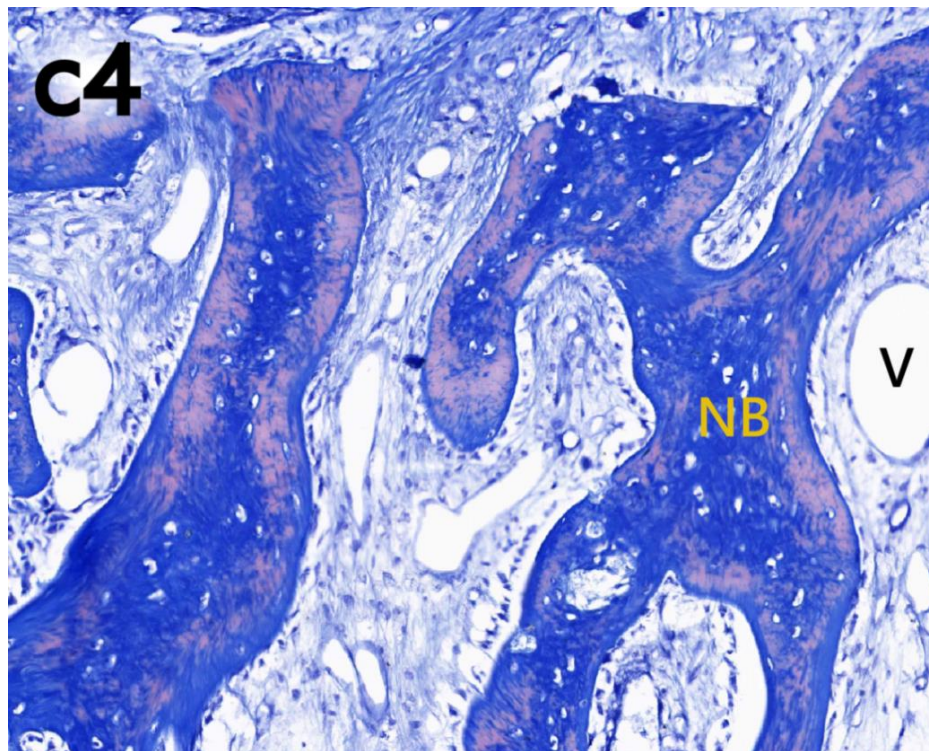
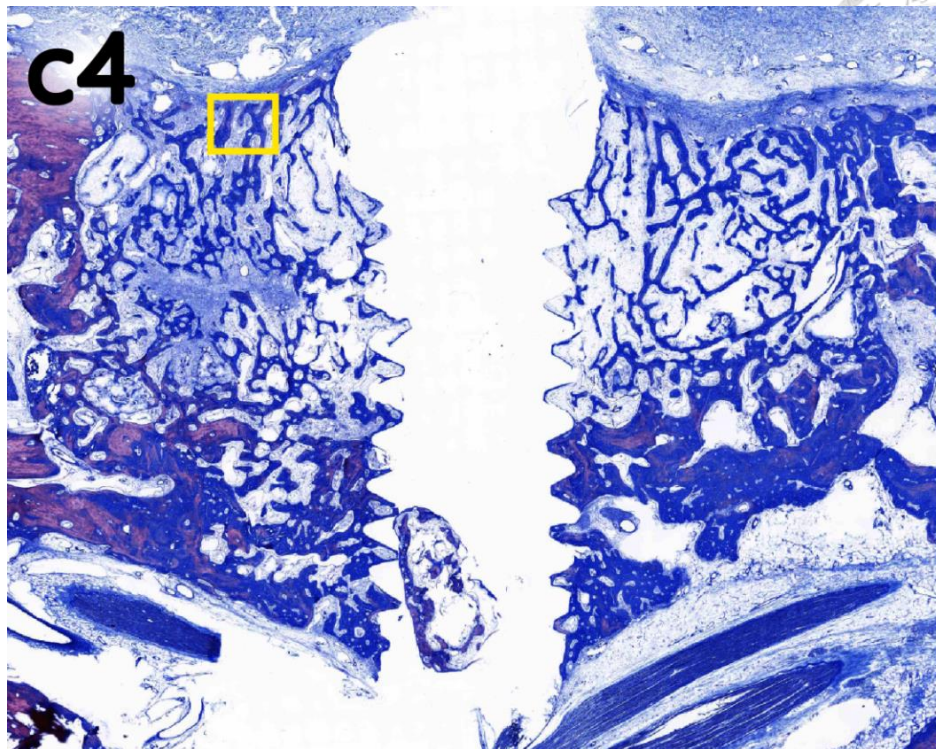
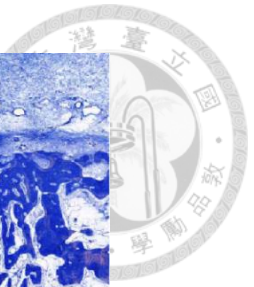


圖 72：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色。(上) 近遠心切面 (下) 黃色方格放大圖 新生的 thin trabeculae 遍布整個骨缺損區域，高度到達植體平台、往中心到達植體表面。NB：new bone

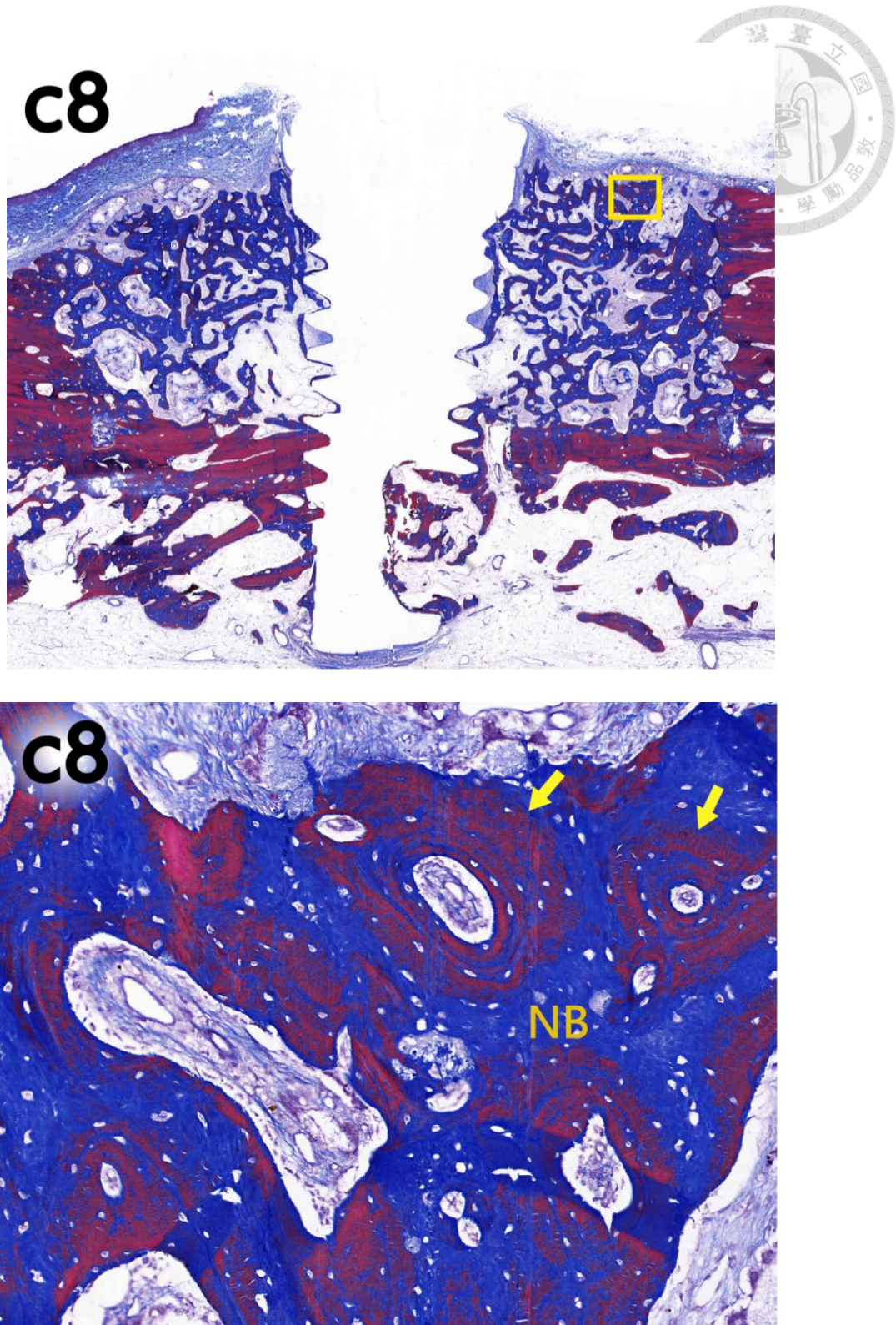


圖 73：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色。（上）近遠心切面（下）黃色方格放大圖 新生骨質遍布骨缺損區域，骨膜下方已有成熟之 osteon 結構。

NB：new bone；Yellow arrow：osteon

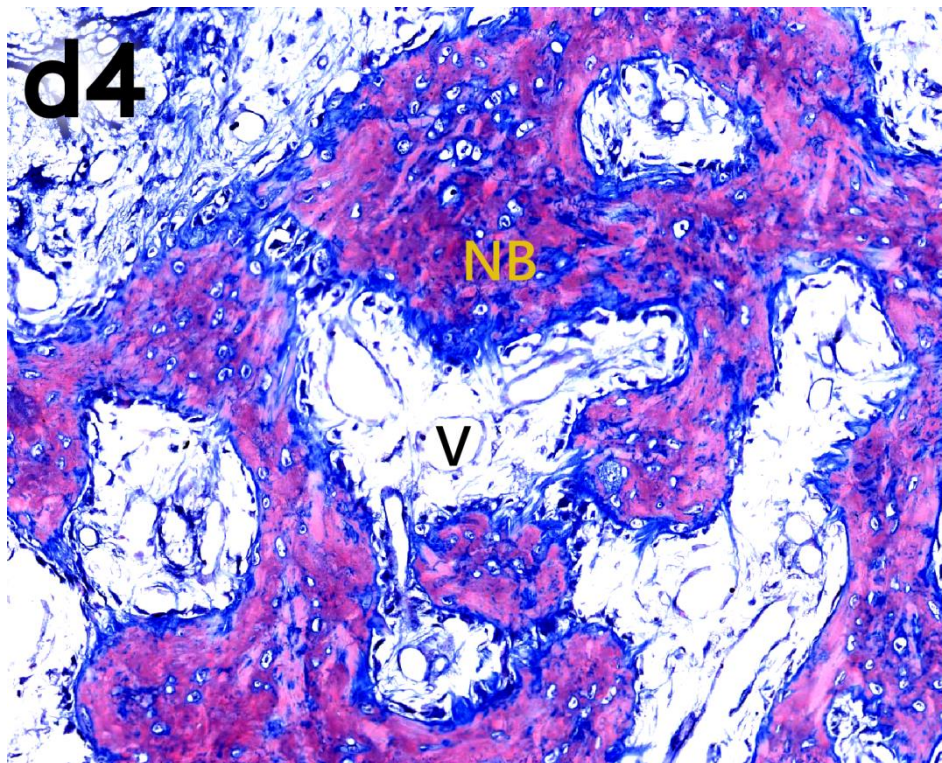
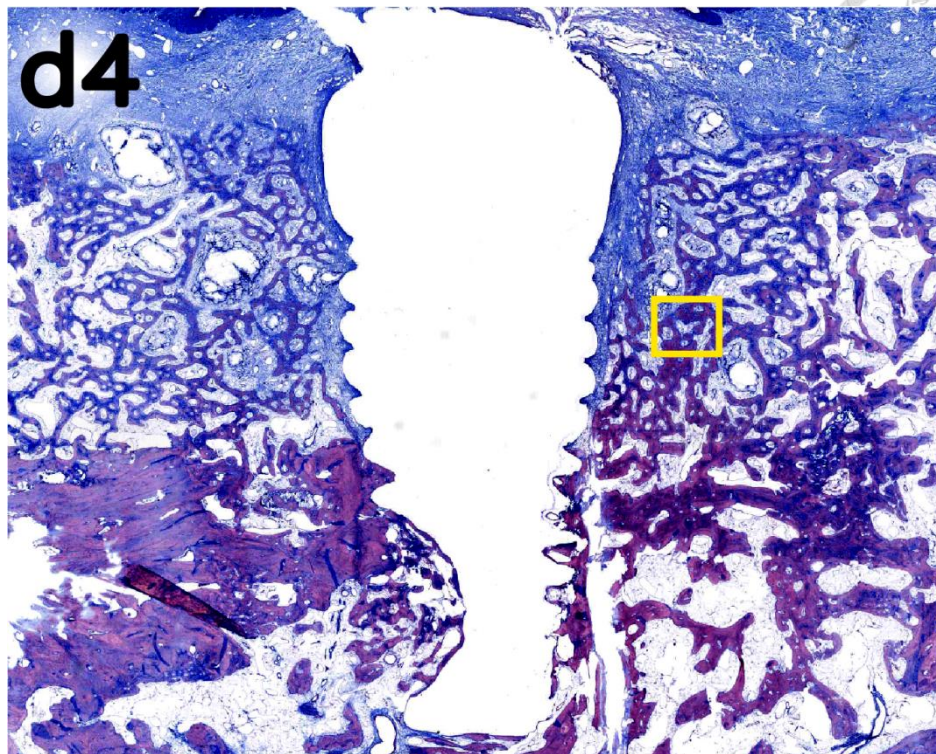


圖 74：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色。（上）近遠心切面（下）黃色方格放大圖 新生骨質遍布骨缺損區域，骨小梁密度高於 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別。放大圖可見許多 active osteoblasts。 V：vessel；NB：new bone

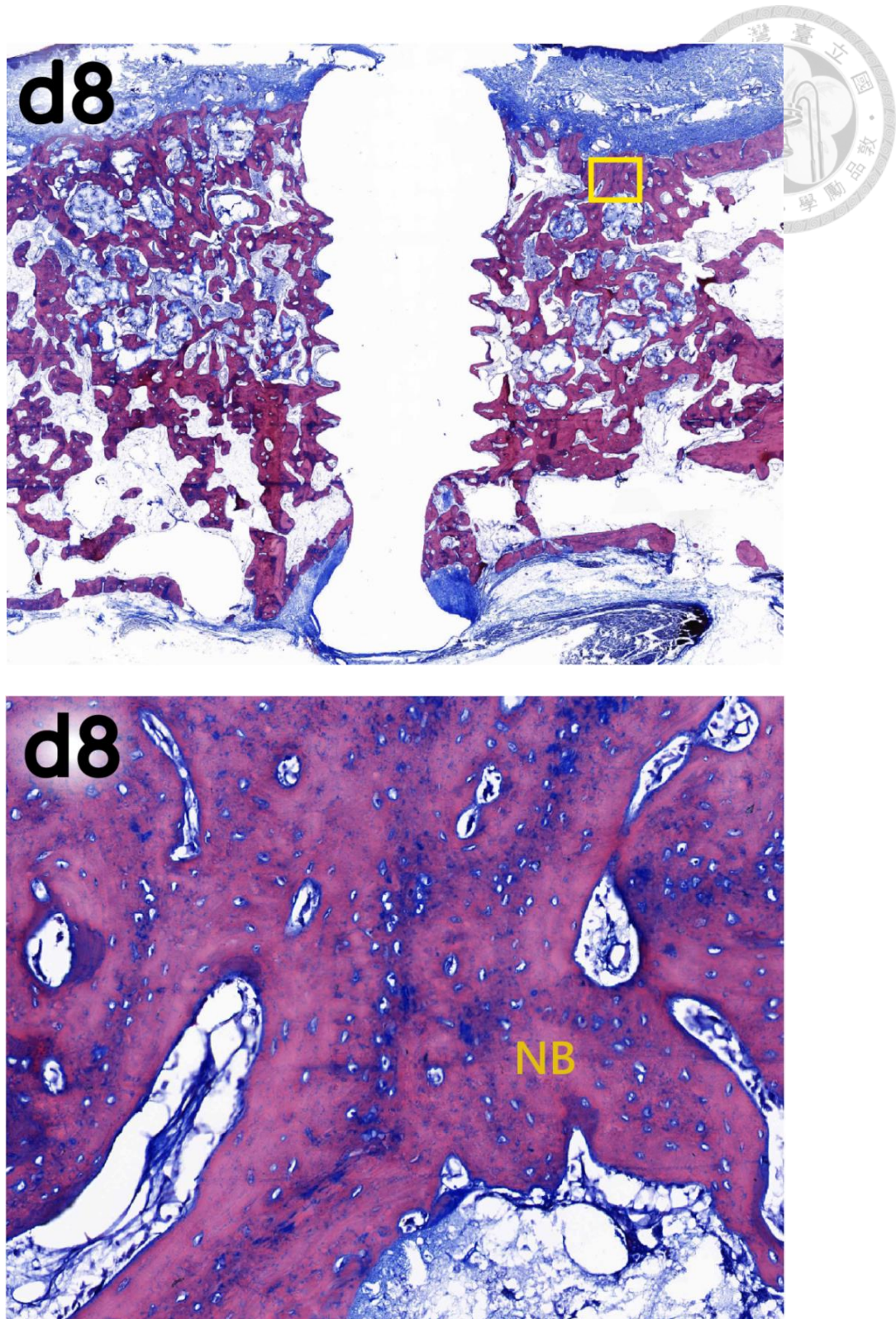


圖 75：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色。（上）近遠心切面（下）黃色方格放大圖 新生骨質遍布骨缺損區域及貼附植體表面，高度超越植體平台，骨質密度較四週更高。NB：new bone

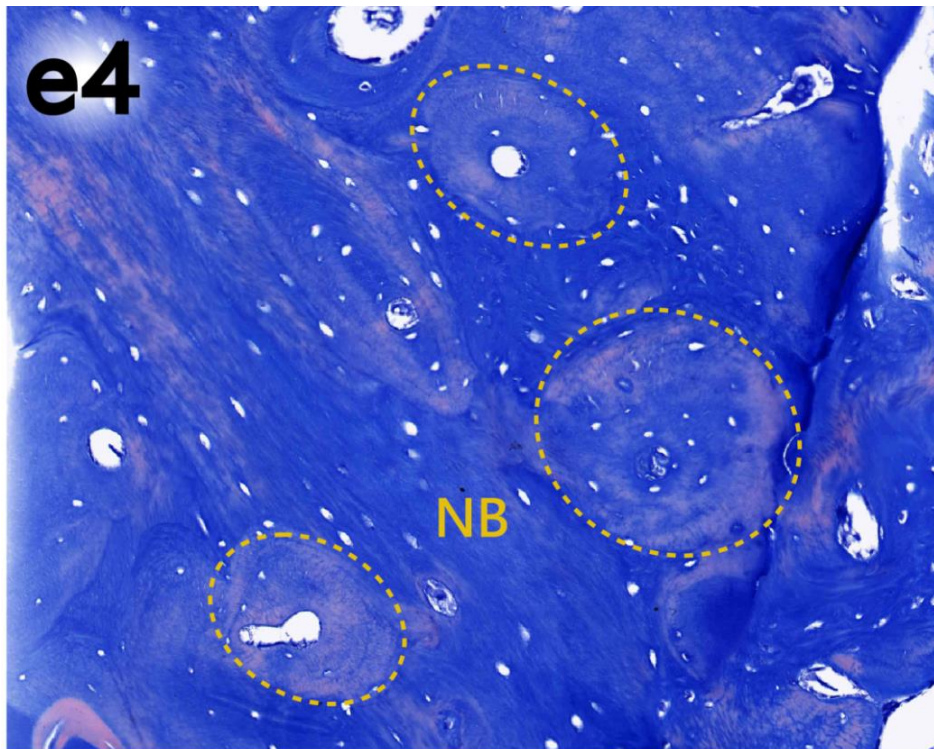
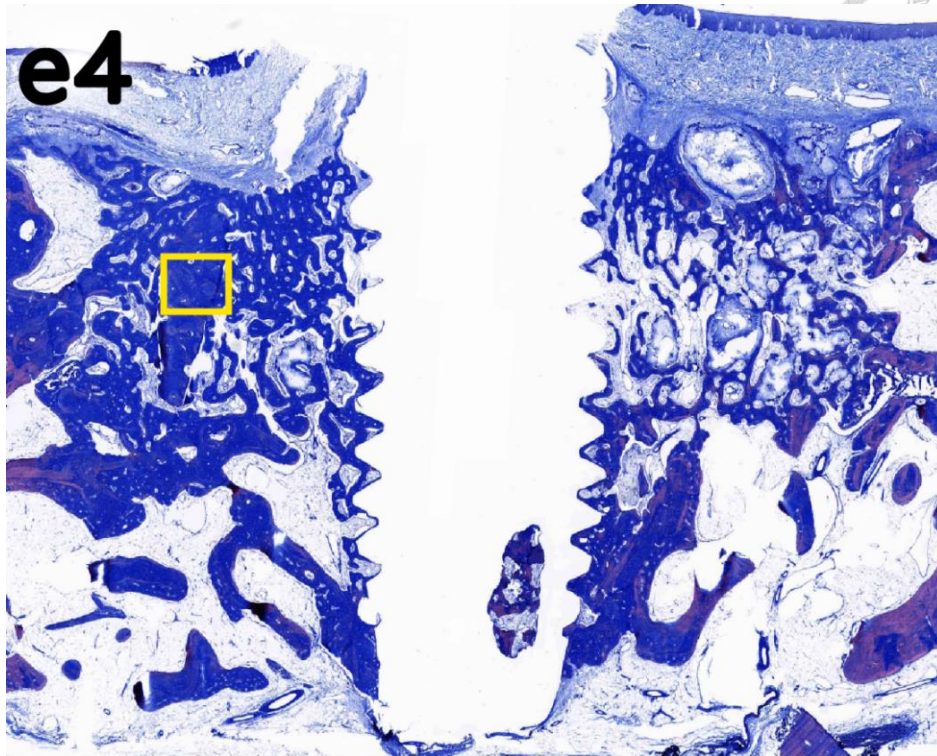
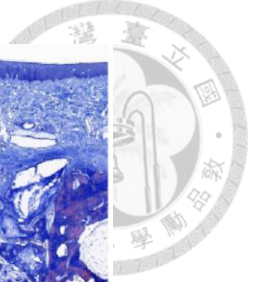


圖 76：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色。(上) 近遠心切面 (下) 黃色方格放大圖 新生骨組織遍布骨缺損區域，且貼附至植體表面，骨缺損中央出現緻密骨組織。NB：new bone；Yellow circle：osteon

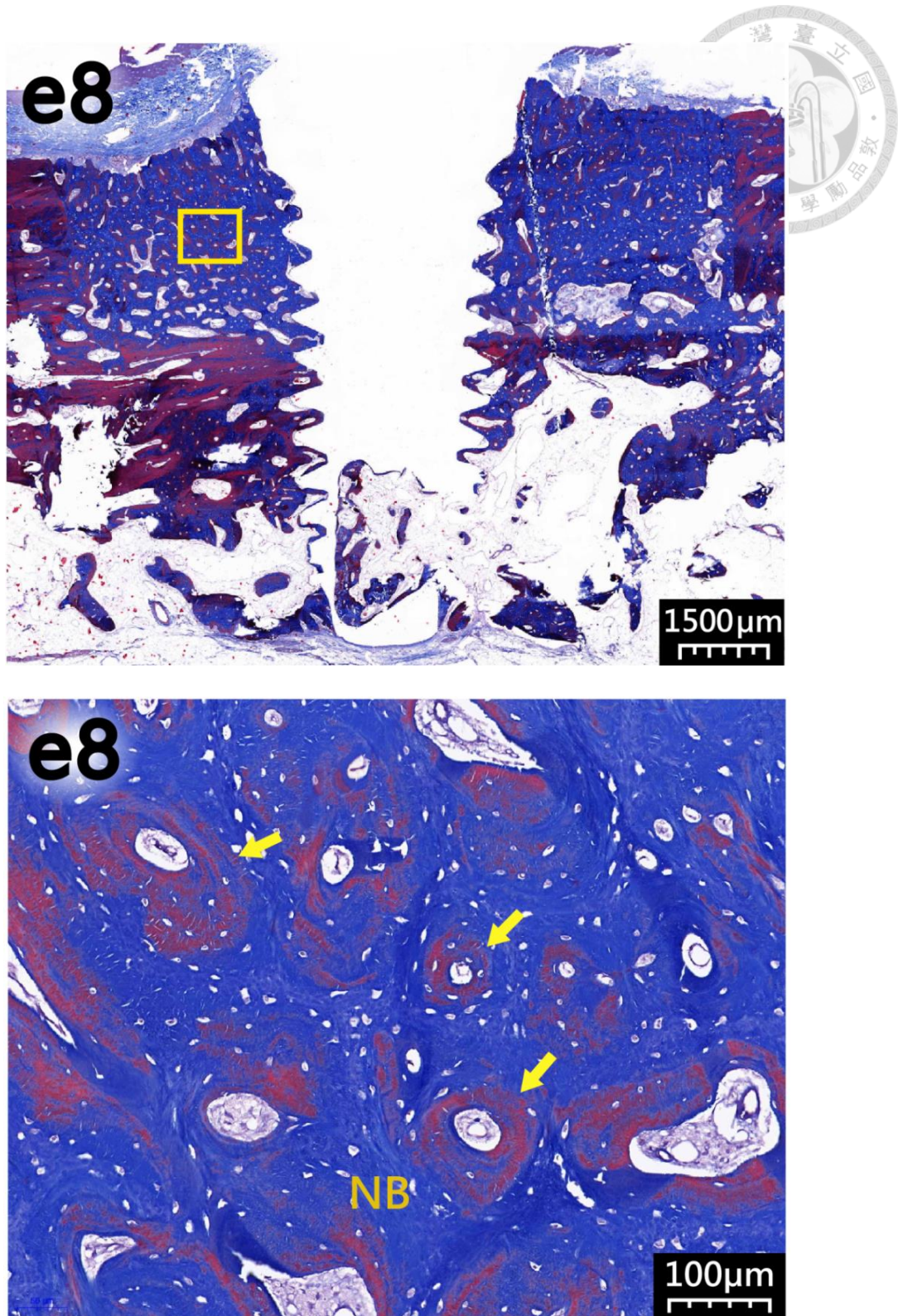


圖 77：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之 MT 染色。(上) 近遠心切面 (下) 黃色方格放大圖 整體骨缺損區域及植體螺紋間皆長滿非常緻密的皮質骨組織，放大圖可見多個骨元 (osteon) 結構。NB：new bone；Yellow arrow：osteon

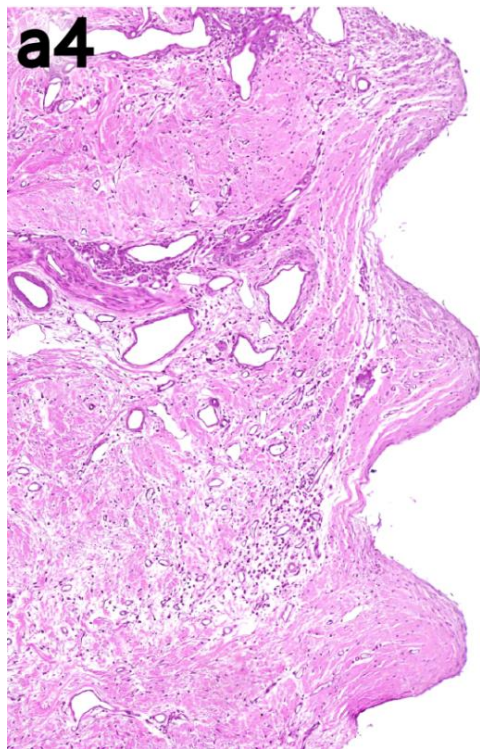
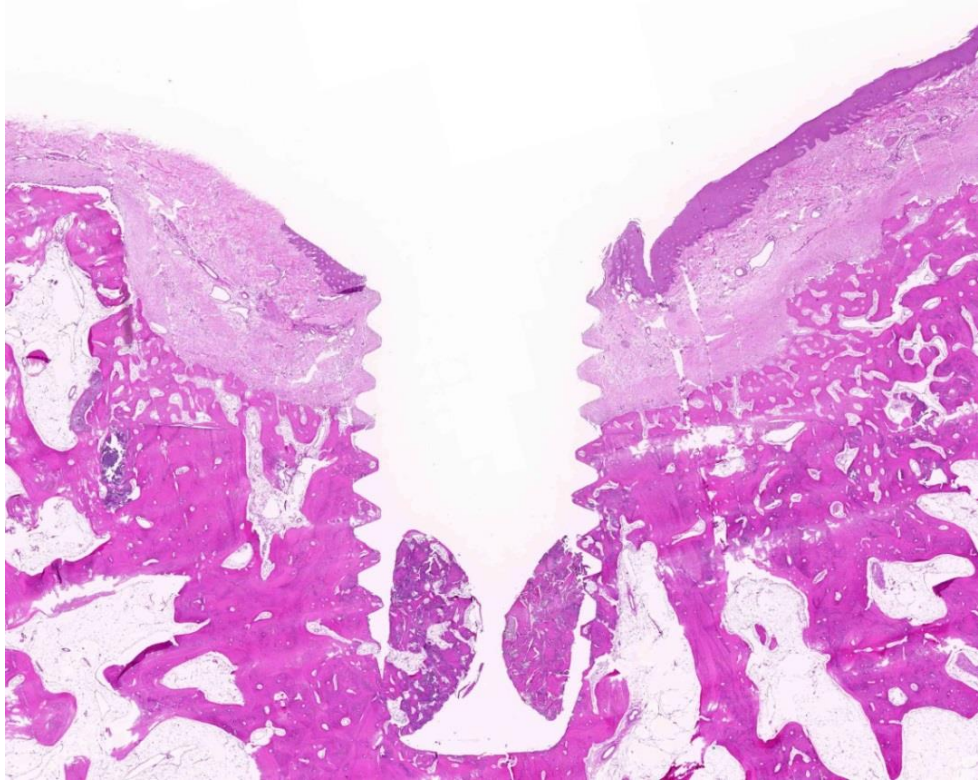


圖 78：四週負控制組之 HE 染色。（上）近遠心切面（下）植體上半部裸露區之螺紋放大圖 植體裸露區完全由軟組織包覆。

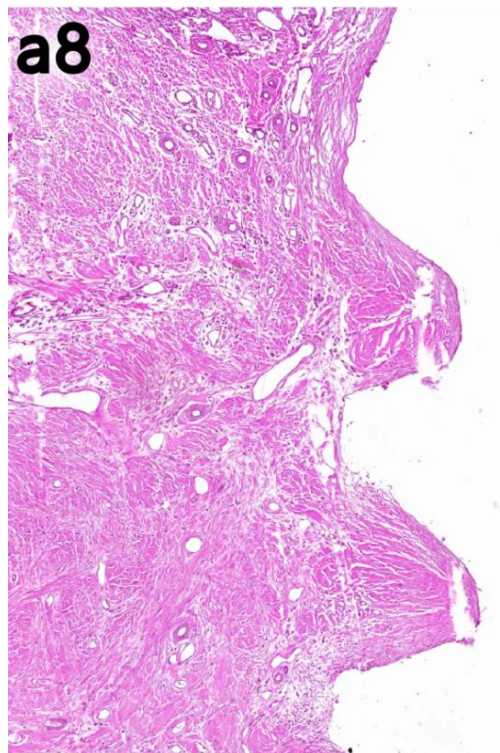
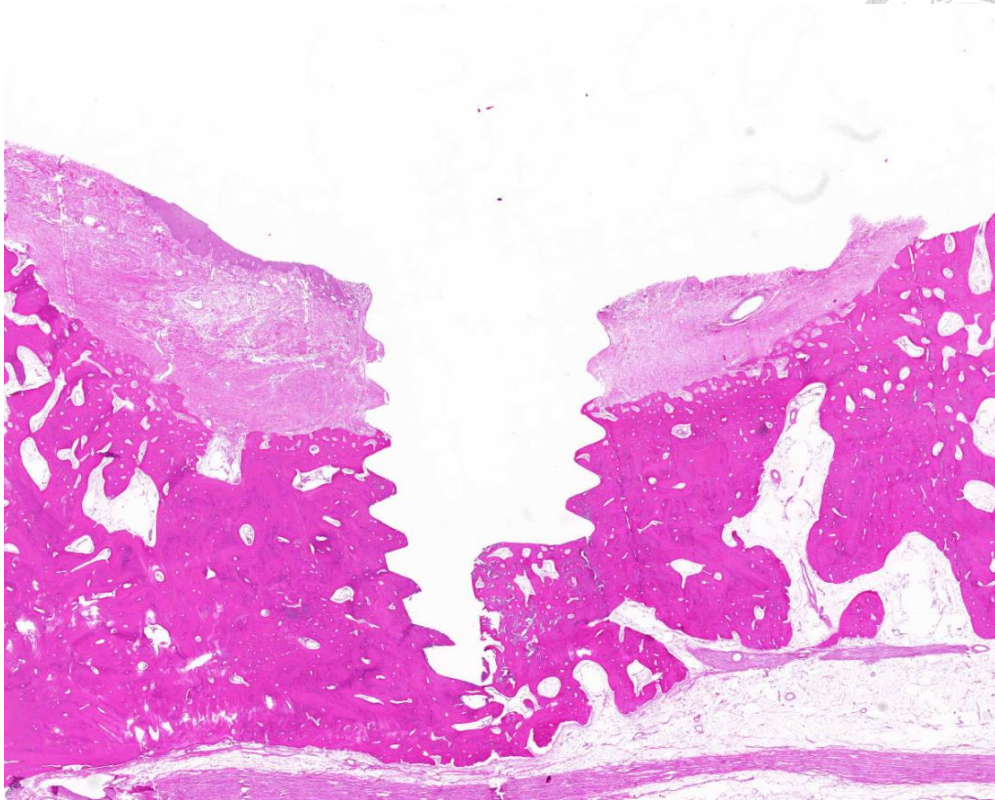


圖 79：八週負控制組之 HE 染色。（上）近遠心切面（下）植體上半部裸露區之螺紋放大圖 植體裸露區完全由軟組織包覆。

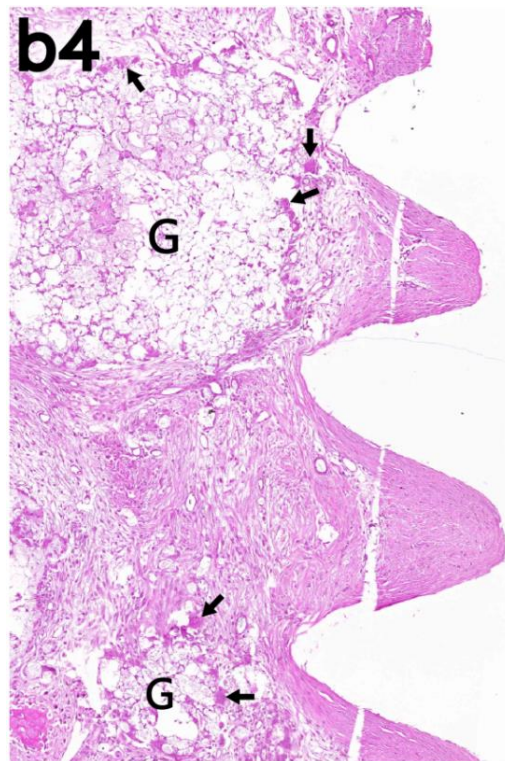


圖 80：四週控制組之 HE 染色。（上）近遠心切面（下）植體上半部裸露區之螺紋放大圖 植體裸露區之 inter-thread area 未觀察到新生骨質。 G：granule； Arrow：multinucleated giant cell

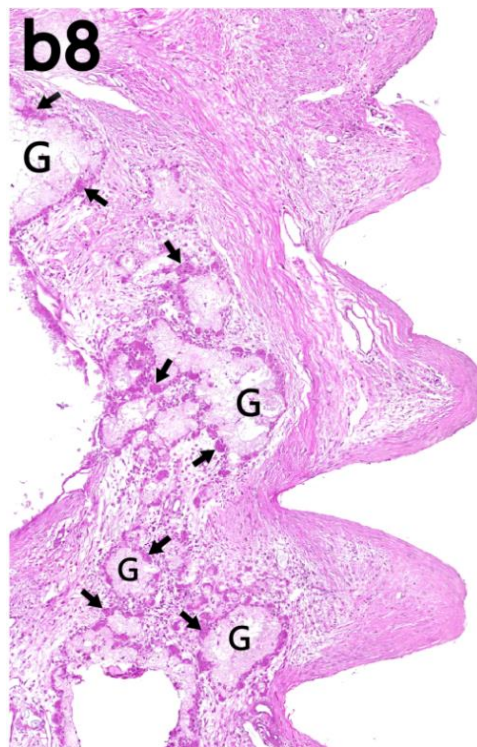
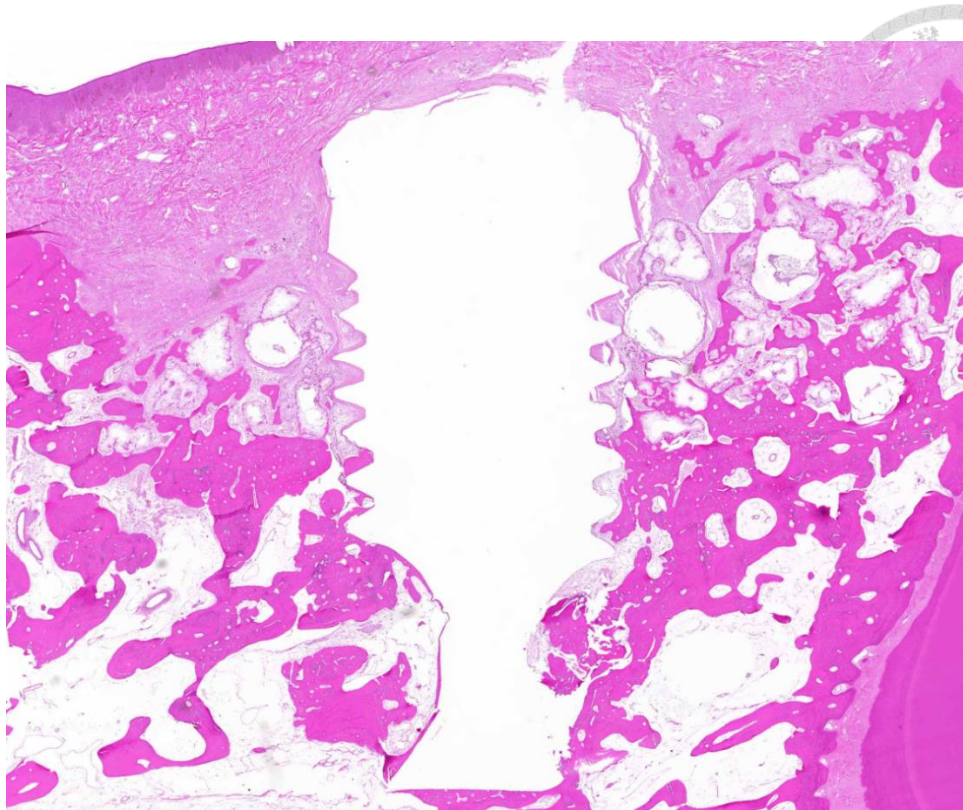


圖 81：八週控制組之 HE 染色。（上）近遠心切面（下）植體上半部裸露區之螺紋放大圖 植體裸露區之 inter-thread area 未觀察到新生骨質。 G：granule； Arrow：multinucleated giant cell

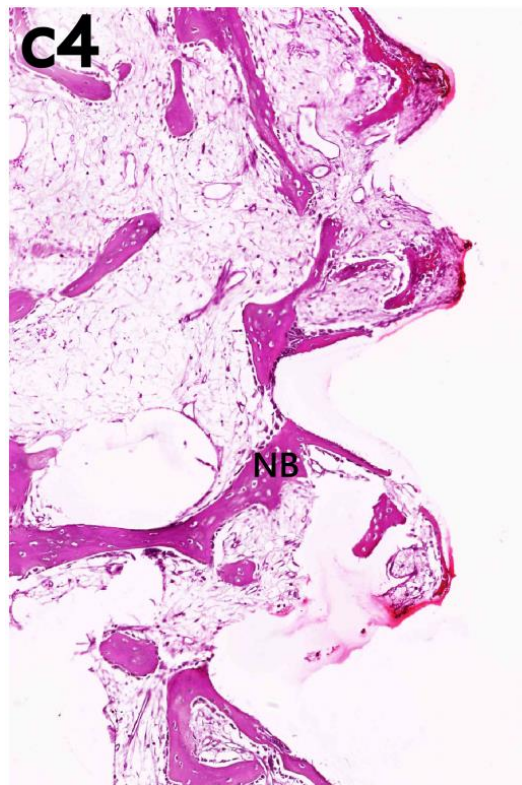
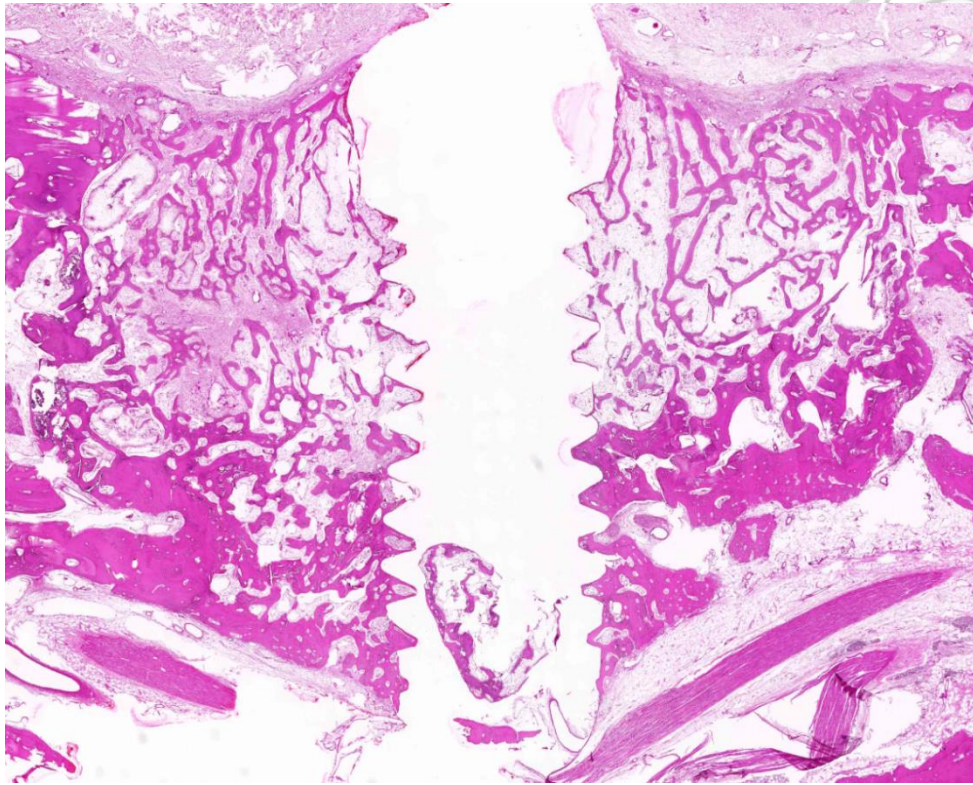


圖 82：四週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色。（上）近遠心切面（下）植體上半部裸露區之螺紋放大圖 新生骨質初步貼附至植體表面。NB：new bone

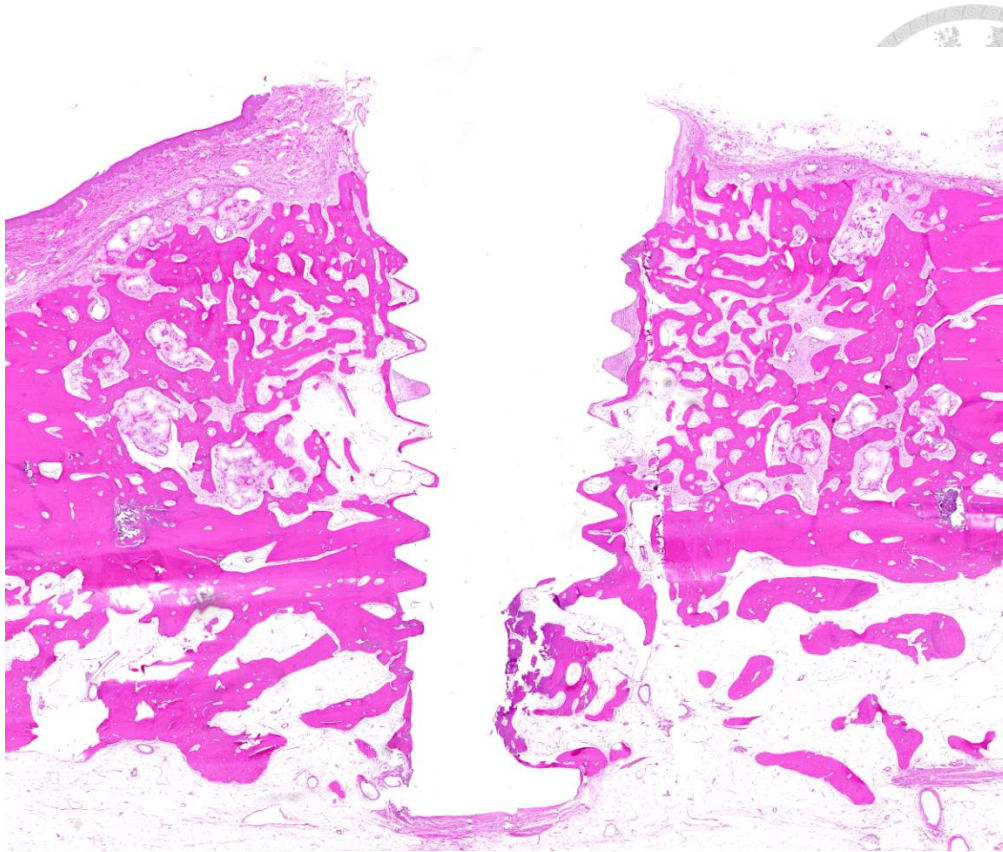


圖 83：八週 0.02 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色。（上）近遠心切面（下）植體上半部裸露區之螺紋放大圖 植體螺紋間空間有明顯新生骨質，密度較四週高許多。

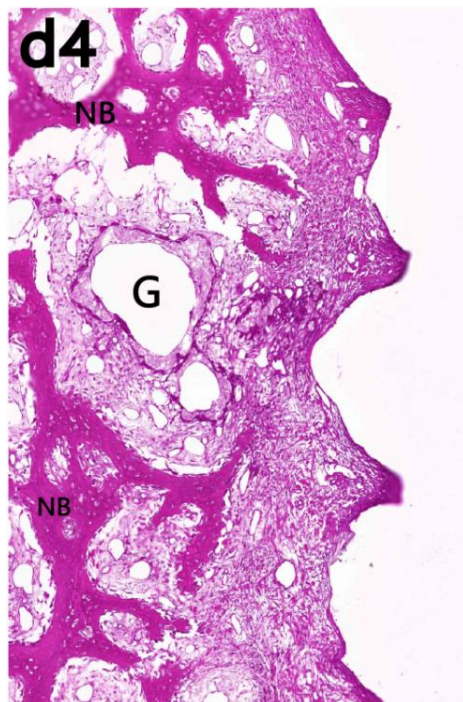
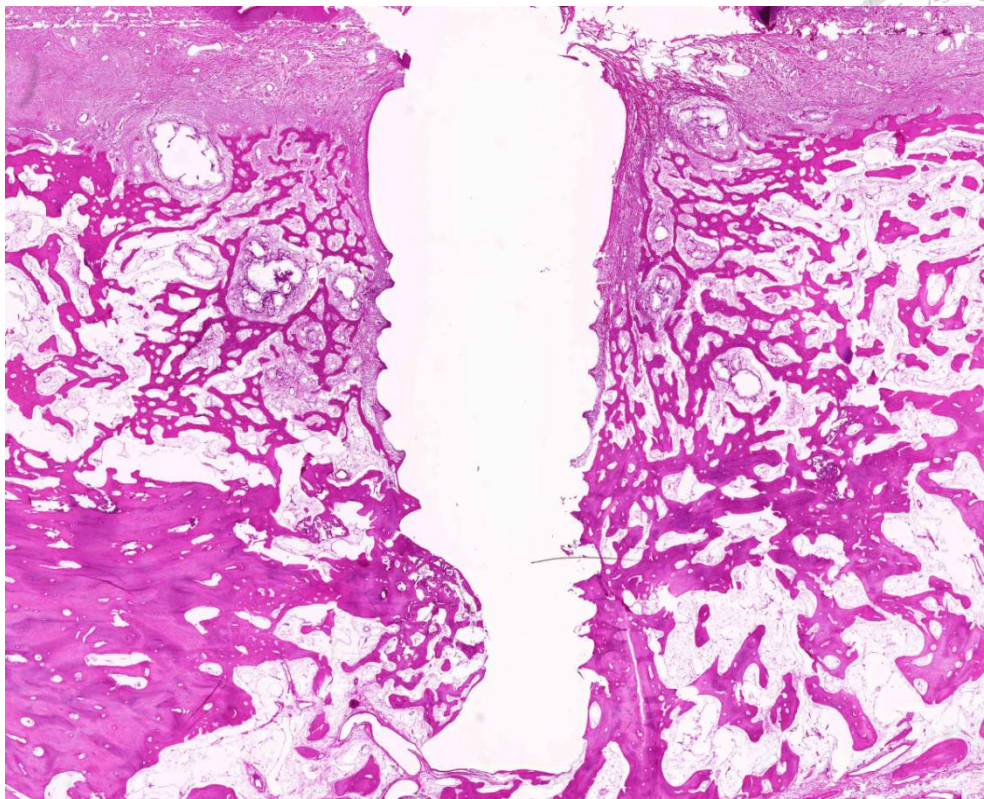


圖 84：四週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色。（上）近遠心切面（下）植體上半部裸露區之螺紋放大圖 植體周圍有新生骨小梁，新生骨質尚未貼附植體表面。 G：granule；NB：new bone

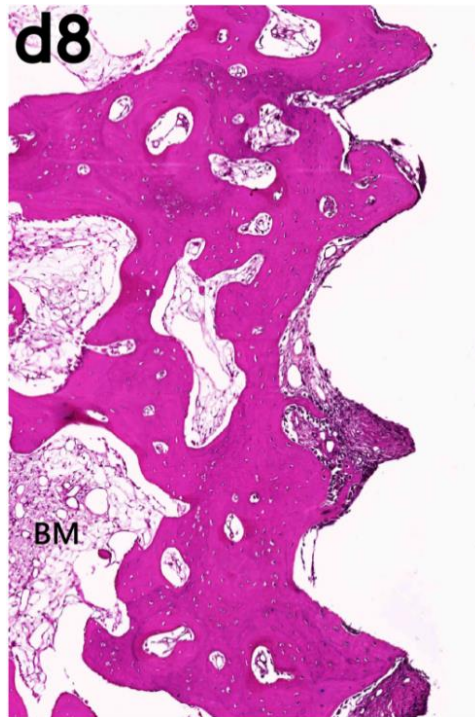
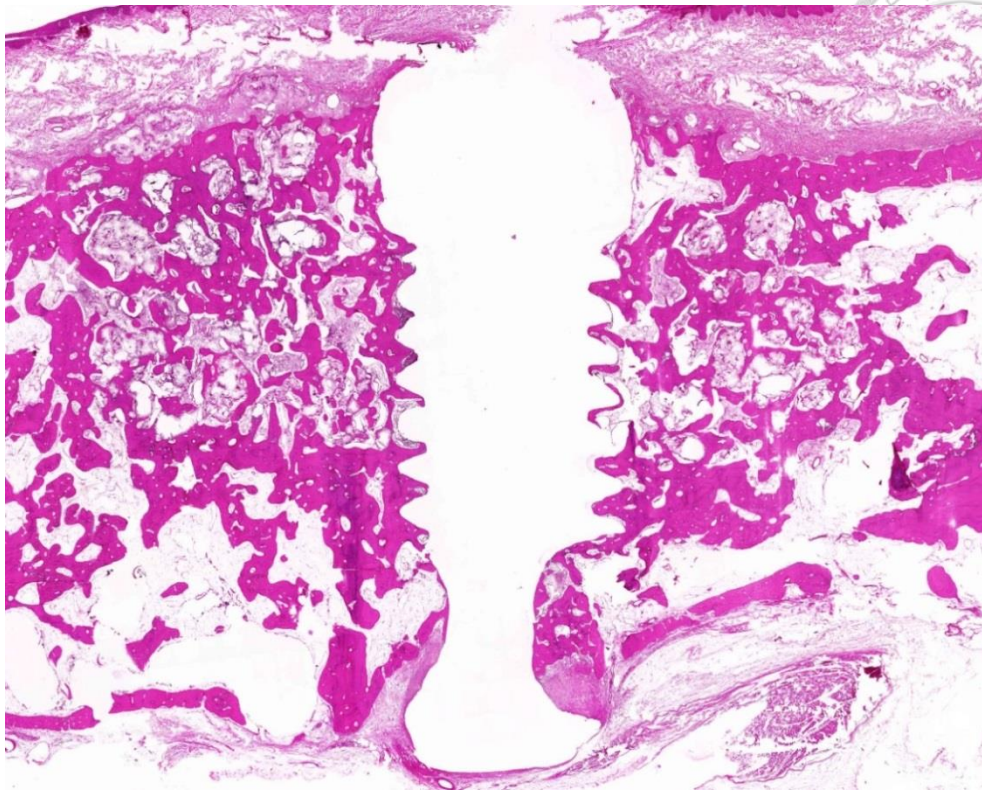


圖 85：八週 0.08 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色。(上)近遠心切面 (下)植體上半部裸露區之螺紋放大圖 植體螺紋間空間有高密度新生骨質。BM：bone marrow

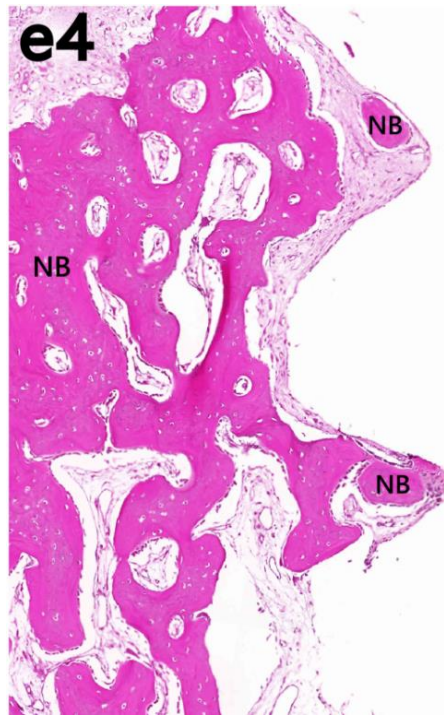
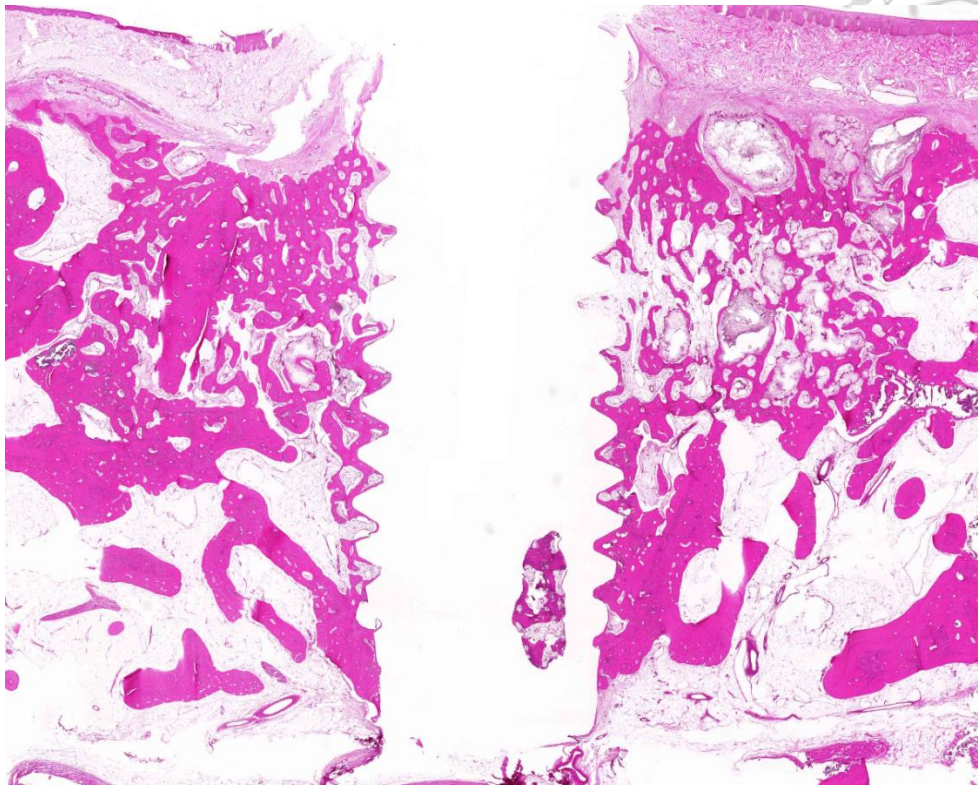


圖 86：四週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色。(上) 近遠心切面 (下) 植體上半部裸露區之螺紋放大圖 植體周圍有大量新生骨質，已長入植體螺紋間空間並貼附植體表面，且有大量 active osteoblasts 排列其中。 NB：new bone

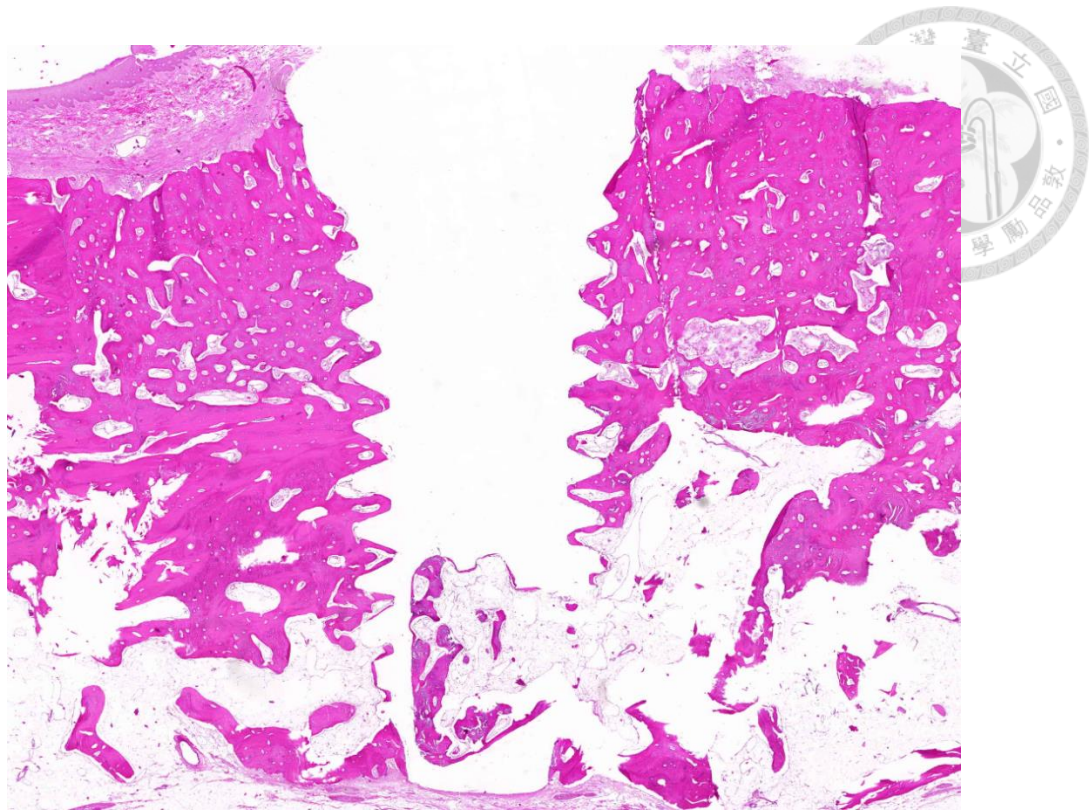


圖 87：八週 0.2 mg/mL rhBMP-2 組別之 HE 染色。(上) 近遠心切面 (下) 植體上半部裸露區之螺紋放大圖 植體周圍及螺紋間空間皆被新生緻密骨充滿，可分辨多個 osteon 結構。 V：vessel；Yellow circle：osteon



第二單元

骨成形蛋白二抗原決定位之短鏈胜肽於人工植體周圍齒槽骨 再生試驗


第一章 前言

臨床常遇到齒槽骨缺損不足的病患，需要藉由齒槽骨補骨手術才有機會進行植牙重建。新的趨勢嘗試將骨誘導活性因子 (osteoinductive molecules) 加入骨組織工程 (bone engineering) 裡，希望藉此增加骨再生的潛力，而 rhBMP-2 乃是目前表現最優異的骨誘導活性因子。

上一篇研究證實了 HAP (Hydroxyapatite) /TCP (Tri-calcium Phosphate) /Col (Collagen) 複合骨材加上 0.2 mg/mL rhBMP-2 的組合可以在人工植體植入的當下，同時進行大範圍齒槽脊增高手術 (alveolar ridge augmentation)，且在八週的時間內達成植體周圍臨界骨缺損完全癒合。然而，rhBMP-2 有一些缺點，像是製造費用高昂、蛋白水解的不穩定性 (proteolytic instability) 及可能產生骨質溶解 (osteolysis)、異位骨增生 (ectopic bone formation) 等等的多重生理副作用。因此，新的研發方向期待可以發展出短的模擬胜肽 (mimetic peptides)，用來取代原始的整個 rhBMP-2 蛋白並保有骨誘導生長的能力。

BMP-2 有兩個抗原決定位 (epitope)：knuckle epitope 及 wrist epitope。Wrist epitope 被認為會連接上 BMP receptor IA，而 knuckle epitope 被認為會接上 BMP receptor type II。然而，準確的 BMP-2 受體結合部位 (receptor-binding region) 尚待研究闡明。

當 BMP-2 接上 BMP receptor type II 後，BMP receptor type II 在細胞質那一側的



細胞質域 (cytoplasmic domain) 會將 BMP receptor type I 磷酸化。被磷酸化的 BMP receptor type I 接著將 Smad1 給磷酸化，這個 Smad1 就是 BMP-2 在細胞質中訊息傳遞的主要分子[107]。被磷酸化的 Smad1 進入到細胞核中，控制多組基因來促進成骨細胞分化 (osteoblastic differentiation) [108]。分化的成骨細胞會有升高的鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase; ALP) 活性，並分泌包含骨鈣素 (osteocalcin) 和礦物質的骨基質 (bone matrix)，促進骨質增生[109]。當 BMP 接上 BMP receptor 後，也可以經由另一個不含 Smad (Smad-independent cascades) 的途徑傳遞訊號，而是經由 p38 MAP kinase 來做訊息傳遞[110]。

2003 年，Saito 的團隊合成了多個位於 knuckle epitope 的胜肽，發現其中一段對應於 BMP-2 第 73–92 個胺基酸殘基 (amino acid residue) 的胜肽最具有活性。這段胜肽被稱為 BMP-2 peptide P4 或是 73–92-residue BMP-2 peptide，序列為 KIPKASSVPTELSAISTLYL，可以使得鼠類多能間充質細胞株 (murine multipotent mesenchymal cell line) 的鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase; ALP) 活性上升。這個 73–92-residue BMP-2 peptide 還能抑制 rhBMP-2 結合到 BMP receptors type IA 及 type II，代表 73–92-residue BMP-2 peptide 可以跟 rhBMP-2 競爭結合至 BMP 受器。Saito 團隊將 73–92-residue BMP-2 peptide 共價鍵結至海藻酸鹽膠 (alginate gel) 並植入大鼠的小腿後肌 (calf muscle)，發現可以表現骨鈣素 (osteocalcin) 的 mRNA 並且誘導異位鈣化 (ectopic calcification)；從 X 射線繞射儀 (X-ray diffraction; XRD) 分析這個異位鈣化組織，發現其成分和大鼠脛骨 (tibia) 是相同的，且主要峰值 (peak) 歸位於羥基磷灰石 (hydroxyapatite)。這些結果都顯示出 73–92-residue BMP-2 peptide 可能是 BMP-2 上的其中一個受體鍵結部位 (receptor-binding sites)，並且能夠刺激骨前驅細胞 (bone precursor cells) 誘導鈣化產生[111]。

Kim 的團隊用基因工程的方式將 73–92-residue BMP-2 peptide 接上以蛋白質為主體的生物材料 (protein-based biomaterial)，發現它可以活化並加速間質幹細胞的骨分化，使得種植在此材料上的間質幹細胞有上升的鹼性磷酸酶 (alkaline

phosphatase; ALP) 活性、增加的鈣化物沉積並有多種骨質相關的基因表現[112]。當 73–92-residue BMP-2 peptide 以共價鍵結到三度空間的海藻酸水膠 (alginate hydrogel) 上，它可以讓鼠類間質幹細胞啟動 Smad 訊息傳遞、增加骨橋蛋白 (osteopontin) 生成及促進礦物質沉積[113]。

BMP-2 peptide P4 (也就是 73–92-residue BMP-2 peptide) 被嘗試修飾為 P24 (S[PO₄]KIPKASSVPTELSAISTLYLDDD)，多了磷酸化的絲胺酸 (Serine) 及三個天門冬胺酸 (Aspartic acid)，仍是一個線性結構的小分子。將 P24 加入以 nano-hydroxyapatite/collagen/poly (L-lactic acid) (nHAC/PLLA) 為基底的載體，發現可以顯著促進大鼠頭蓋骨的骨缺損癒合，和 rhBMP-2 加入此基底所產生的效果類似[114]。另一團隊將 P24 鍵結上硫醇化的幾丁聚糖 (thiolated chitosan, chitosan-4-thiobutylamidine (CS-TBA))，再將鍵結好的 CS-P24 和 HA 結合成為 CS-P24/HA scaffolds，發現這個支架 (scaffold) 可以有效促進大鼠頭蓋骨的骨缺損癒合[115]。

BMP-2 peptide P4 (73–92-residue BMP-2 peptide) 也被嘗試修飾為 P28 (S[PO₄]DDDDDDDKIPKASSVPTELSAISTLYL)。在體外實驗證實了 P28 可以促進 MC3T3-E1 細胞株的增生、集中及骨分化。在體內實驗中，將 P28 加入一個複合骨材 nanohydroxyapatite/collagen/poly (l-lactide) (nHAC/PLA) 可以促進兔子股骨髁 (femoral condyle) 骨缺損的癒合[116]。

到目前為止，只有非常少量的體內實驗測試 BMP-2 peptides 促進骨癒合的能力，且尚未有任何研究測試過 BMP-2 peptides 在齒槽骨再生及人工植體骨整合的表現。因此，本實驗的主要目的是要測試 73–92-residue BMP-2 peptide 以 HAp/TCP/Col 複合骨材當作載體，是否有能力修復植體周圍之臨界齒槽骨缺損。本實驗評估不同濃度劑量之 73–92-residue BMP-2 peptide 促進齒槽骨再生及植體骨整合的能力，並和 rhBMP-2 的表現相互比較。



第二章 研究材料及方法

2.1 實驗動物

實驗採用小型米格魯 (beagle dog) 雄性成犬，年紀介於 2~3 歲，體重介於 9~12 公斤。由於米格魯性情溫和，其下顎骨的型態與骨頭代謝的模式皆與人體相似，因此十分適合當作牙科手術的大型實驗動物。實驗犬飼養於台大醫學院實驗動物中心的獨立籠子裡，手術後餵食軟飼料，由我們、動物中心人員及獸醫師共同照護。實驗犬的選擇、管理以及實驗手術流程皆符合台大醫學院實驗動物中心的管理規範，動物實驗計畫申請表暨同意書編號為 20130492。

2.2 人工植體

本實驗採用的人工植體為 Brånemark MkIII system (Nobel Biocare, Zürich, Switzerland)，直徑 4 mm、長度 8.5 mm，表面處理為 TiUnite (porous-oxide surface-modified implants)。

2.3 RhBMP-2

實驗使用的 rhBMP-2 購買自 GenScript Biotech 公司 (Piscataway, NJ, USA)。GenScript 的製程使用 *E. Coli*，所產出的 rhBMP-2 是由兩個上述 115 胺基酸所組成的非醣基化多肽鏈 (non-glycosylated polypeptide chains) 經由雙硫鍵相接，形成同型二聚體 (homodimer)，總分子量為 26,018 Da。純度經由 SEC-HPLC 及 SDS-PAGE 分析達 95% 以上。

乾粉是使用 20 mM 醋酸 (HAc, acetic acid) 還原，再以 PBS (phosphate buffered solution) 調配至 1 mg/ml，分裝儲存於攝氏負八十度冰箱。手術前再以 PBS 調配至實驗所需濃度，置於冰桶備用。



2.4 73–92-residue BMP-2 peptide

對應於BMP-2第73–92個胺基酸殘基 (amino acid residue) 的胜肽 (N→C: KIPKA SSVPT ELSAI STLYL) 是由Mission Biotech co. (Taipei, Taiwan) 所生成製造，純度達95%。胜肽序列中顯示粗體字的，是和人體BMP-2 (hBMP-2) 有所不同的胺基酸殘基：C78→S、C79→S、M89→T。乾粉於實驗前以ddH₂O還原並調配成所需濃度。

2.5 人工骨塊

實驗採用的人工骨塊是和康生物科技的齦即安膠原蛋白骨科填補物 (GingivAid Collagen Bone Graft)。齦即安的組成為88%生物陶瓷(60%氫氧基磷灰石及40%β型三鈣磷酸鹽)及12%由牛筋高度純化的第一型膠原蛋白，其中陶瓷顆粒為直徑為0.5-1 mm的不規則顆粒。在實驗手術中，人工骨塊以15號手術刀片切割成符合齒槽骨缺損的大小，並使用3 mm twist drill在正中間鑽一個洞，這個洞提供套住人工植體的空間。

2.6 植體周圍臨界骨缺損之實驗模型

首先在犬隻的雙側上下顎拔除第一至第四小白齒和第一大白齒，經過至少8–10週的癒合期，可在實驗犬的左下與右下兩側各產生近遠心距離約4–5公分的無牙脊。

本實驗設定的臨界骨缺損 (Critical Size Defect, CSD) 大小為近遠心10毫米及高度4毫米，而寬度則介於6–8毫米，因缺牙區前後位置不同而有所變異。在每個骨缺損的正中央，植入長度8.5毫米之人工植體，其中根側4毫米植入齒槽骨中，而冠側的4.5毫米則是裸露於骨缺損中。

在第一次的手術中，手術位置擇於下顎其中一側的近心及遠心之骨缺損，和另一側中間之骨缺損；相隔四週後進行第二次手術，此時第一次的手術皮瓣已完全

癒合，因此手術位置是在原側的中間骨缺損，和另一側的近心及遠心之骨缺損。第二次手術後四週，實驗犬犧牲，可得到三組八週的骨標本及三組四週之骨標本。



2.7 實驗分組

- 一、 控制組： 骨缺損內置放HAp/TCP/Col複合骨材
 - 二、 實驗組一： 骨缺損內置放HAp/TCP/Col複合骨材 + 1 mg BMP-2 peptide (4 mg/mL, 250 μ l)
 - 三、 實驗組二： 骨缺損內置放HAp/TCP/Col複合骨材 + 5 mg BMP-2 peptide (20 mg/mL, 250 μ l)
 - 四、 實驗組三： 骨缺損內置放HAp/TCP/Col複合骨材 + 50 μ g rhBMP-2 (0.2 mg/mL, 250 μ l)
- ◇ 每組別皆有兩個觀察時間點：四週及八週癒合期
 - ◇ 每組別/每個癒合期的樣本量 (sample size) = 3 個植體周圍臨界骨缺損

2.8 手術方法

2.8.1 實驗動物麻醉

誘導全身麻醉的藥劑配製為：Zoletil 50 (0.2ml/kg; Virbac, Carros, France) 2毫升加上Rompun (Bayer, Leverkusen, Germany) 0.2毫升。實驗犬隻先以皮下注射一劑上述藥劑，等待5-10分鐘，使其進入全身麻醉的階段，再於手術區域施打 1.8 毫升含有 1:100,000 腎上腺素的 XYLESTESIN-A (3M ESPE, Seefeld, Germany) 來進行局部麻醉，阻斷該區域的神經傳導及加強手術部位止血作用。

2.8.2 拔牙手術

實驗犬的左側及右側分別於兩次手術進行拔牙，讓實驗犬能有單側咀嚼進食。手術前禁食8小時以上，待全身麻醉完成後，進行例行性消毒及鋪單。接著施行口

內局部麻醉。由於實驗犬的牙根很長且角度分岔較大，故先以高速手機將牙齒切割、分離不同牙根，再使用拔牙挺和拔牙鉗以無創傷的方式拔牙，盡量保留頰及舌側齒槽骨的完整。上下顎四顆小白齒（P1、P2、P3、P4）及第一大白齒（M1）皆拔除後，清潔拔牙窩洞，放置可吸收明膠海綿（absorbable gelatin sponge, Gelfoam, Pfizer）以利止血及傷口癒合，並以可吸收縫線（polyglycolic acid, Safil®, B Braun）以八字法縫合傷口。術後即刻注射抗生素（Clincin）與止痛針劑（Rimadyl, Pfizer），並於清醒後給予軟食。10週後，待傷口及齒槽骨完全癒合，才進行實驗手術。

2.8.3 實驗手術

實驗犬完成全身麻醉後，將前肢的毛皮剃除，並在前肢放置靜脈留置針，IV給予術前抗生素Augmentin，並於手術期間靜脈給予台大五號（台灣大塚製藥, TAITA No.5 injection）及葡萄糖補充液（Vitagen, 50%, 20 mL）。

實驗動物以側躺姿勢進行手術，於手術區域注入局部麻醉劑後，在預定位置進行牙齦切開及骨膜皮瓣（periosteal flap）翻開，皮瓣設計為半月形（Semilunar flap design），皮瓣範圍盡量小且切線必須位於預定骨缺損之外圍。接著在裸露的齒槽骨上測量及標記臨界骨缺損的邊界，以電動骨鋸進行齒槽骨切割，切割的範圍為近遠心距離 10 毫米、高度從齒槽脊往下 4 毫米（圖 1A）。

切割完成後，移除切割下來之游離自體骨塊，使用 Twist drills 在骨缺損正中央進行人工植體之床位鑽修，並植入人工植體 fixture（ ϕ 4.0 x 8.5mm; TiUnite, Brånemark MkIII system, Nobel Biocare, Zürich, Switzerland）。人工植體的根部 4 毫米沒入齒槽骨，而冠部 4.5 毫米則是裸露於骨缺損中（圖 1B）。此時，植體周圍臨界骨缺損模型已準備好。

接著，使用 15 號手術刀片將 HAp/TCP/Col 複合骨材切割成符合骨缺損的大小，並以 3 mm twist drill 在 HAp/TCP/Col 複合骨材的正中央鑽出一個孔洞。實驗組依照不同組別將不同濃度劑量之 rhBMP-2 溶液加至 HAp/TCP/Col 複合骨材，待溶液

完全吸收後，小心將複合骨材放置到骨缺損內，中央的孔洞套住裸露的人工植體（圖 1CD）。控制組之 HAp/TCP/Col 複合骨材不添加任何溶液，直接放置到骨缺損內。負控制組則是不放置 HAp/TCP/Col 複合骨材，也不放置任何東西。

骨膜皮瓣分為兩層縫合。骨膜先使用可吸收縫線 5-0 dextron 進行縫合，外層牙齦使用不可吸收縫線 4-0 及 5-0 Nylon 進行完全縫合（primary closure）。縫合傷口力求做到不滲血，按壓也無液體滲出。

2.8.4 術後照顧

實驗犬術後給予軟食。術後三天內給予 IM 注射抗生素 clincin 及口服止痛藥 Rimadyl (Carprofen)，每日觀察傷口，並於一週後拆線。

2.9 螢光骨染色標記 (Polychromatic Fluorescence Labeling)

2.9.1 鈣黃綠素 Calcein (10 mg/kg; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

- 配置：以 1.4% isotonic sodium bicarbonate (NaHCO₃) 來調配 calcein 粉末，調配濃度為 10mg/mL，調配完成後 pH 值約為 7.7。在以碳酸氫鈉溶液調配的過程中會產生 CO₂ 氣體，因此 vortex 震動溶解的過程中，必須反覆打開蓋子排氣。避光儲存於 4°C。
- 施打：於第一次植牙手術後滿三週時，以皮下注射方式施打
- 螢光：綠色

2.9.2 茜素氨羧絡合劑 Alizarin Complexone (20 mg/kg; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

- 配置：以 1.4% isotonic sodium bicarbonate (NaHCO₃) 來調配粉末，調配濃度為 15–30 mg/mL，調配完成後 pH 值約為 7.1–7.7。在以碳酸氫鈉溶液調配的過程中會產生 CO₂ 氣體，因此 vortex 震動溶解的過程中，必須反覆打開蓋子排氣。避光儲存於 4°C。

- 施打：於第一次植牙手術後滿六週時，以皮下注射方式施打
- 螢光：紅色



2.10 實驗動物犧牲及標本取得

2.10.1 動物之犧牲手術

依據國立台灣大學醫學院實驗動物中心之施行動物犧牲指南與農委會動物保護法規範下進行實驗動物的犧牲。

2.10.2 標本取得

在實驗犬之兩側嘴角，以 22 號刀片向臉頰遠心處劃開，以取得較佳視野及手術空間。從下顎門牙區切開唇側前庭，往兩側後牙區延伸至下顎升支（mandibular ramus）處，以剝離唇頰側之臉頰、黏膜及肌肉組織；由舌側前庭處劃開，同樣往兩側遠心處延伸至翼突下顎縫（pterygomandibular raphe），剝離舌側黏膜、舌頭及口底肌肉組織。以手動骨鋸沿著兩側支下顎骨角（mandibular angle）和下顎升支處之間的假想連線做切割，將下顎骨完全分離出來，並以 15 號手術刀片去除多餘的軟組織。小心定位六組下顎骨骨缺損及植體位置，並使用電動骨鋸將各組標本切下，依序放置於裝有福馬林液體的組織盒保存。

2.11 放射線學檢查及其影像分析方法（Radiographic Analysis）

將實驗標本從福馬林浸泡溶液中取出，去除骨缺損以下至下顎骨底界邊緣之軟組織，使用數位底片和 X 光機(Dentsply Sirona, York, PA, USA)以 0.16 秒、70keV、距離標本 30 公分之照射條件平行照射 X 光。

2.12 微電腦斷層掃描及其影像分析方法（Micro-CT Analysis）

為了取得三度空間的影像資訊，實驗標本使用 Skycan-1176 微電腦斷層掃描儀

器 (Bruker microCT, Kontich, Belgium) 進行照射，照射參數為 90 kV、278 μ A 以及 35 μ m-voxel 解析度。在三度空間的影像重組完成後，使用 DataViewer 軟體 (Bruker microCT, Kontich, Belgium) 將植體的近遠心及頰舌側切面展示出來。

2.13 生物力學分析：植體共振頻率分析 (Resonance Frequency Analysis)

實驗標本在完成 X 光及微電腦斷層掃描之後，小心將人工植體 cover screw 正上方的牙齦以 15 號手術刀片切開，旋轉取下 cover screw，並將一個帶有磁鐵的金屬 SmartPeg 鎖到植體上，使用頻率分析儀 (Osstell, Columbia, MD, USA) 測量植體的共振頻率，所得之 ISQ (Implant Stability Quotient) 數值記錄下來並於各組間比較分析。測量完畢後，將 SmartPeg 移除，並將 cover screw 鎖回植體上。

2.14 標本對切

使用封口膜 (Parafilm M Laboratory Film, USA) 將實驗標本包覆作為保護，在標本之封口膜上黏著兩隻平行植體長軸的金屬線作為平行切面之參考，接著使用聚甲基丙烯酸甲酯 (Tempron, GC Dental, Japan) 將樣本固定在慢速精密切割機 (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) 的載板上，固定時務必將植體長軸平行於載板平面。

待 Tempron 樹脂硬化後，將載板鎖上慢速精密切割機，使用直徑 127 mm、厚 0.4 mm 的鑽石刀片 (Series 15HC) 將植體以近遠心的方向、平行植體長軸對半切。對切後的樣本小心移除 Parafilm 及樹脂，浸泡回福馬林溶液儲存。

2.15 不脫鈣之研磨骨組織切片 (Undecalcified Ground Sections)

2.15.1 樣本脫水

每個組別的樣本分別取出標本對切後的其中一半，將這一半標本依序放入 70%、80%、90%、95%、100% 酒精溶液中做序列性脫水，每種不同濃度的酒精浸泡時間



皆達八小時以上以確保完整脫水。

2.15.2 樣本包埋

包埋盒塗上分離劑後晾乾，將對半切且完成脫水的樣本切面朝下放入包埋盒中，樣本若太大無法平放，則先以牙科低速手機將樣本不重要的區域做修磨，使樣本對半切之切面能完全平貼於包埋盒底部。接著將包埋盒連同樣本放進真空包埋機 (Cast N'Vac 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) 抽氣 5 分鐘，讓樣本中的酒精得以完全揮發。

包埋材使用的是環氧樹脂 epoxy resin (Epothin, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA)，以容積比「樹脂：硬化劑=7：2」的比例做調配，緩慢攪拌均勻後，置入真空包埋機抽氣 5 分鐘。由於真空包埋機能將內部空間抽真空而達到負一大氣壓，如此可以減少包埋時所產生的氣泡。將調配好的環氧樹脂沿著包埋盒邊緣小心倒入含有樣本的包埋盒中，直到完全覆蓋樣本且達包埋盒口高度，再次置入真空包埋機抽氣 5 分鐘，讓樣本中氣泡量減至最少。

包埋好的樣本連同包埋盒置入恆溫箱 (TU-400D Orbital Shaking Incubator, Yih Der, Taiwan)，溫度設定 42°C，避光靜置不搖晃超過 24 小時，至環氧樹脂完全聚合硬化。

2.15.3 樣本切片

環氧樹脂樣本硬化後從包埋盒脫模，使用鋸片機 (Saw microtome; Leica SP1600, Nussloch, Germany) 將非樣本那一端多餘不規則的樹脂切除，使樣本達到上下兩平面完整平行之圓柱狀。接著，樣本端表面樹脂以每次 100 μm 的厚度做修整，直到樣本植體金屬面完整呈現。再以每次 400 μm 厚度為設定做樣本切片，每塊樣本可切下二至三片樣本薄片。經過完整清洗後，樣本薄片夾在兩個玻片中，再以金屬夾夾住固定，以避免樣本薄片乾燥後捲曲。



2.15.4 玻片製備及樣本封片

首先要準備標準研磨玻片。使用精密薄片切割研磨機 (PetroThin, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) 將空白玻片的其中一面修磨粗糙，並且修磨玻片至統一厚度 1150 μm ，以利後續掌控樣本磨片之厚度。

接著配置環氧樹脂 epoxy resin (Epothin, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA)，以容積比「樹脂：硬化劑=5：2」的比例做調配，緩慢攪拌均勻後，置入真空包埋機抽氣 5 分鐘以減少氣泡。使用探針沾取調配好的環氧樹脂，放到標準研磨玻片的粗糙面上當作黏著劑，小心去除氣泡後，選取植體切面最大的樣本薄片（最靠近植體正中切面），最大切面朝下，將薄片壓到玻片的環氧樹脂上。樣本玻片上下使用塑膠玻璃紙作為隔離後，將其置入手動壓平器 (Olympus) 重壓，使黏著劑盡量薄且平均，等待 24 小時至環氧樹脂完全硬化。

2.15.5 樣本玻片修磨及拋光

樣本封片完成後，樣本含玻片的總厚度略厚於 1550 μm (樣本切片 400 μm + 標準研磨玻片 1150 μm + 黏著層)。將樣本玻片置入精密薄片切割研磨機 (PetroThin, Buehler, Lake Bluff, IL, USA)，從原先厚度以每次 5 μm 的厚度做修磨，直至樣本玻片總厚度 1350 μm ，此時樣本厚度為 200 μm (1350 μm - 1150 μm)。

修磨後的樣本玻片使用凡士林固定於研磨拋光機 (Minimet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) 的載板上，拋光碗中放置專用砂紙 (CarbiMet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA)，從粗到細，並加入少量蒸餾水作為介質，設定儀器力量 3 牛頓、速度 50 RPM、時間 60 秒作為初步拋光。

初步拋光後，在將拋光碗中砂紙置換成更為細緻的拋光絨布 (MicroCloth, Buehler, Lake Bluff, IL, USA)，設定儀器力量 3 牛頓、速度 50 RPM、時間 30 秒做細緻拋光。樣本之最終厚度為 30 μm 。



2.16 螢光骨染色之顯微分析

2.16.1 螢光顯微鏡觀察

修磨及打亮後最終厚度為 30 μm 之樣本玻片，置於正立共軛焦顯微鏡 (Carl Zeiss LSM880, White Plains, NY, USA) 觀察，並將所有標本玻片進行全片掃描。掃描檔案輸出成 LSM 檔，再透過軟體 ZEN 2011 (Blue edition, Carl Zeiss Microscopy) 輸出成 TIFF、8 BIT 檔案。

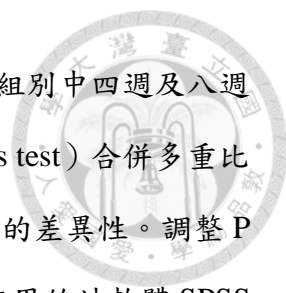
2.16.2 螢光染色量化分析

在人工植體兩側、骨缺損的正中間，選取了兩個 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 的範圍當作興趣區間 (areas of interest; AOIs) (圖 8)。興趣區間內的綠色及紅色螢光面積比例 (紅綠螢光總和面積/興趣區間總面積)，以 ImageJ 影像分析軟體 (NIH, Bethesda, MD, USA) 計算出來，並在各組間進行統計分析比較。

2.17 脫鈣之骨組織切片

每組樣本對半切後的其中一半已在前面製作成非脫鈣之骨組織磨片，另一半則是用作脫鈣之骨組織切片。樣本使用 EDTA 及 dilute hydrochloric acid (Thermo Scientific TBD-1 Decalcifier, Kalamazoo, MI, USA) 進行脫鈣。脫鈣完成後，小心以探針將植體撥離取下，避免碰觸首要觀察重點之植體周圍組織。接著進行組織序列性脫水、石蠟浸潤、石蠟包埋。將包埋完成的標本以石蠟組織切片機切成 4 μm 厚的組織切片，乾燥後進行馬森三色染色法 (Masson's trichrome stain; MT stain)。所有組別的組織染色皆使用數位顯微鏡 (Pannoramic 250 Flash III, 3DHisTech, Budapest, Hungary) 觀察及拍照。

2.18 統計分析



我們使用曼-惠特尼 U 檢驗 (Mann-Whitney U test) 來比較各組別中四週及八週的區別。我們使用單因子多樣本中位數差異檢定 (Kruskal-Wallis test) 合併多重比較之邦費羅尼校正 (Bonferroni correction) 來比較四個組別之間的差異性。調整 P 值 (adjusted *p* value) 小於 0.05 被視為統計顯著。所有統計皆使用統計軟體 SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. IBM Corp. Armonk, NY, USA) 作分析。

第三章 結果

3.1 手術臨床觀察

實驗模組採用上一篇實驗改良後的手術皮瓣設計，在實驗的時程內未出現明顯併發症。

3.2 放射線影像分析

3.2.1 四週之放射線影像分析

控制組 (圖 2, a4) 可清楚看到骨缺損的切線邊界，骨缺損的空間中充滿了邊界清晰的 HAp/TCP 顆粒，植體懸空的周圍並無明顯新生骨質，僅在骨缺損的切緣有少量的骨質新生。

4 mg/mL peptide 組別 (圖 2, b4) 也能看到清楚的骨缺損切線邊界及清晰的 HAp/TCP 顆粒。整體骨缺損的範圍仍十分豐滿未塌陷，但未能判斷是否有新生骨質。20 mg/mL peptide 組別 (圖 2, c4) 也能判斷出骨缺損的切線邊界，HAp/TCP 顆粒已經稍微不明顯，骨缺損的兩側邊界處已有些許射線不透性 (radiopacity) 的增加。

RhBMP-2 組別 (圖 2, d4) 則是難以分辨骨缺損邊界，整體已有明顯射線不透性 (radiopacity) 的增加，植體懸空的周圍有明顯新生骨質增生。



各組別在四週癒合期，植體下半段植入齒槽骨的部分皆已呈現不錯的骨整合。

3.2.2 八週之放射線影像分析

控制組 (HAp/TCP/Col 骨塊) (圖 2, a8) 可看到骨缺損的部分切線邊界仍十分明顯，骨缺損的空間仍有不少清晰的 HAp/TCP 顆粒。骨缺損之底部和側邊有少量骨質新生，然而骨缺損中央及植體懸空的周圍並無明顯可見之新生骨頭。

Peptide 組別只能隱約看到骨缺損之邊界，HAp/TCP 顆粒已不明顯，整體骨缺損區域已有明顯射線不透性 (radiopacity) 的增加，且植體懸空的周圍也有明顯新生骨質增生。20 mg/mL peptide 組別 (圖 2, c8) 的射線不透性 (radiopacity) 較 4 mg/mL peptide 組別 (圖 2, b8) 為高。

RhBMP-2 組別 (圖 2, d8) 則在骨缺損中顯現完全骨癒合及植體骨整合。已完全無法分辨骨缺損之邊界，也無可分辨之 HAp/TCP 顆粒。骨缺損及植體螺紋間的區域皆呈現高密度新生骨質。

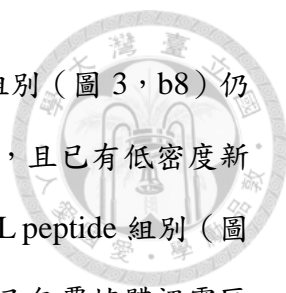
各組別在八週癒合期，植體下半段植入齒槽骨的部分皆維持良好的骨整合。

3.3 微電腦斷層影像分析

3.3.1 微電腦斷層之近遠心切面影像

圖 3 展示了微電腦斷層之近遠心切面影像。在四週癒合期，控制組 (圖 3, a4) 及 4 mg/mL peptide 組別 (圖 3, b4) 皆可看到多量且明顯的 HAp/TCP 顆粒，唯 4 mg/mL peptide 組別的 HAp/TCP 分布撐起了骨缺損的空間，且骨缺損切緣處已有少量新生骨質。20 mg/mL peptide 組別 (圖 3, c4) 的 HAp/TCP 顆粒明顯減少，可見到低密度新生骨質從骨缺損切緣以及頂端骨膜處往骨缺損中心生長。RhBMP-2 組別 (圖 3, d4) 則可見少量 HAp/TCP 顆粒，整體骨缺損空間已被新生骨質充滿，此時皮質骨尚未成熟。

在八週癒合期，控制組 (圖 3, a8) 的 HAp/TCP 顆粒減少，骨缺損切緣處有少



量新生骨質，植體裸露區域仍無新生骨包覆。4 mg/mL peptide 組別（圖 3，b8）仍可見些許未降解之 HAp/TCP 顆粒，骨缺損空間被良好的維持住，且已有低密度新生骨質散布在整體缺損空間內並延伸至裸露的植體旁。20 mg/mL peptide 組別（圖 3，c8）已幾乎沒有未降解之 HAp/TCP 顆粒，明顯的新生骨質已包覆植體裸露區域且高度達到植體平台，皮質骨尚未成熟。RhBMP-2 組別（圖 3，d8）則無任何未降解之 HAp/TCP 顆粒，骨缺損空間已完全癒合，可見高密度新生骨質及成熟之皮質骨。

3.3.2 微電腦斷層之頰舌側切面影像

圖 4 展示了微電腦斷層之頰舌側切面影像。由於我們後續的組織切片是以近心到遠心的方向做切割，因此頰舌側新生的骨頭厚度可由此影像作為評估。

控制組在四週（圖 4，a4）及八週（圖 4，a8）可看到頰舌側有許多 HAp/TCP 顆粒，骨缺損的底界清晰，四週未有明顯新生骨質的跡象，八週則有些微上升之射線不透性（radiopacity）。

Peptide 組別在四週（圖 4，b4、c4）即可看到頰舌側有低密度新生骨質增生。在八週癒合期（圖 4，b8、c8），新生骨質密度增加且往上增生包覆至植體平台處，骨缺損的底界已難以分辨。

RhBMP-2 組別則早在四週（圖 4，d4）癒合期就無法分辨骨缺損底界且幾乎恢復齒槽骨原形，八週（圖 4，d8）則達到完全骨癒合。

3.4 植體共振頻率分析（Resonance Frequency Analysis）

由於植體在本實驗模組無法達到良好的初級穩定度（primary stability），術後立即測試之 ISQ（Implant Stability Quotient）數值皆小於 40。

在四週的癒合期，兩個 peptide 組別及 rhBMP-2 組別的 ISQ 皆已超過 65，唯有 rhBMP-2 組別的 ISQ 顯著高於控制組（adjusted $p < 0.05$ ）。在八週的癒合期，



兩個 peptide 組別及 rhBMP-2 組別的 ISQ 皆已超過 75；但仍然只有 rhBMP-2 組別的 ISQ 顯著高於控制組 (adjusted $p < 0.05$) (圖 5)。

3.5 不脫鈣之研磨骨組織切片 (Undecalcified Ground Sections)

圖 6-7 展示不脫鈣之研磨骨組織切片在螢光顯微鏡下的圖像。綠色螢光代表第一次手術後三週的骨生成，紅色螢光代表第一次手術後六週 (第二次手術後兩週) 的骨生成，黃色區域乃為綠色和紅色螢光重疊區域而形成。

3.5.1 螢光顯微圖之近遠心切面影像

圖 6 為各組樣本近心往遠心方向切割之切面。在四週癒合期，可見控制組 (圖 6, a4) 之骨缺損區域幾乎沒有螢光顯像；4 mg/mL peptide 組別 (圖 6, b4) 在骨缺損邊界處有少量紅色螢光；20 mg/mL peptide 組別 (圖 6, c4) 在骨缺損邊界處有明顯紅色螢光，而在整體骨缺損區域散布著非常微弱之紅色螢光；rhBMP-2 組別 (圖 6, d4) 則有明顯之紅色螢光分布在整個骨缺損及植體裸露區域，往上到達植體平台高度。

在八週癒合期，控制組 (圖 6, a8) 開始有少量紅色螢光分布在骨缺損底界，而裸露植體周圍仍無螢光顯示；4 mg/mL peptide 組別 (圖 6, b8) 可見到綠色螢光分布在骨缺損邊界及上方骨膜處，微弱的紅色螢光則散布在整體骨缺損區域並延伸至植體表面；20 mg/mL peptide 組別 (圖 6, c8) 的綠色螢光分布已往骨缺損中心移動，整體螢光密度較 4 mg/mL peptide 組別為高；rhBMP-2 組別 (圖 6, d8) 之骨缺損區域則由大部分綠色螢光所充滿，螢光密度高且亮度強，新生骨質的密度已明顯高於周邊原始齒槽骨之密度。

3.5.2 螢光顯微圖之植體螺紋放大影像

圖 7 是將人工植體上半部裸露於骨缺損的部位放大檢視，白色虛線是骨缺損底



部的界線，虛線以上的是新生的骨質。

控制組無論在四週（圖 7，a4）或八週（圖 7，a8）癒合期皆只有不到一個螺紋高度的骨質新生。4 mg/mL peptide 組別在四週（圖 7，b4）僅有類似控制組的表現；八週（圖 7，b8）則可見微弱的紅色螢光往上延伸至植體平台高度，且植體表面也有明顯紅色螢光貼附。20 mg/mL peptide 組別在四週（圖 7，c4）即有微弱之紅色螢光往上延伸至植體平台高度；八週（圖 7，c8）則遍布明顯紅色螢光及少量綠色螢光，植體螺紋間區域也有明顯螢光顯示。RhBMP-2 組別則在四週（圖 7，d4）就有明顯紅色螢光充滿整個植體周圍區域至植體平台高度；八週時（圖 7，d8），植體周邊已被高密度之綠色及紅色螢光充滿，植體螺紋間區域也有高密度螢光顯示。

3.5.3 顯微螢光量化分析

圖 8 顯示顯微螢光量化分析的區域，在人工植體兩側、骨缺損的正中間，選取了兩個 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 的範圍當作興趣區間（areas of interest；AOIs）。

圖 9 顯示興趣區間的螢光量化分析結果。雖然 peptide 組別在兩個癒合期皆高於控制組的螢光面積分布，但僅有 rhBMP-2 組別分別在兩個癒合期有顯著優於控制組之螢光面積比例（adjusted $p < 0.05$ ）。

3.6 脫鈣之骨組織切片

圖 10 是脫鈣骨組織切片經馬森三色染色法（Masson's trichrome stain, MT stain）在光學顯微鏡下之圖像。顯示區域為植體上半部裸露處之螺紋放大顯微圖。

控制組無論在四週（圖 10，a4）或八週（圖 10，a8）癒合期，皆有明顯未降解之 HAp/TCP 顆粒，顆粒旁包圍著多核巨細胞（multinucleated giant cells），植體螺紋間區域被結締組織所充滿，視野所及未觀察到新生骨質。

4 mg/mL peptide 組別在四週（圖 10，b4）即有少量新生骨質貼附在植體表面、



在 HAp/TCP 顆粒外圍及在上端骨膜邊界，所觀察到的新生骨質較螢光顯微影像為多。八週癒合期（圖 10，b8）則可見到明顯新生骨質貼附植體表面生長，雖密度不高，但高度已達植體平台。

20 mg/mL peptide 組別在四週（圖 10，c4）的新生骨質較 4 mg/mL peptide 組別稍多，可觀察到包圍 HAp/TCP 顆粒的多核巨細胞（multinucleated giant cells）及新生骨質表面活化的成骨細胞（osteoblasts）。八週癒合期（圖 10，c8）則有更高密度的新生骨質增生，螺紋間區域也有部分被充滿。

RhBMP-2 組別則在四週（圖 10，d4）即有遍布之新生骨小樑（trabeculae），骨小樑外圍滿滿環繞的活性成骨細胞（active osteoblast）以及新生血管。八週（圖 10，d8）則看到植體周圍及所有植體螺紋間空間皆被緻密的新生骨質所充滿。

所有顯微圖像皆未觀察到炎性細胞浸潤（inflammatory cell infiltration），由此可證本實驗採用的 HAp/TCP/Col 複合骨材、73-92-residue BMP-2 peptide 以及 rhBMP-2 皆具有良好的生物相容性（biocompatibility）。

第四章 討論

本實驗主要在探討不同濃度劑量之 73-92-residue BMP-2 peptide 促進齒槽骨再生及植體骨整合的能力。實驗結果顯示，4-20 mg/mL 的 BMP-2 peptide 以 HAp/TCP/Col 複合骨材當作載體可以在實驗犬之體內模型促進骨質新生，雖然在八週的時間內未能讓植體周圍之臨界骨缺損模型達到完全骨癒合，且其鈣化程度未顯著優於控制組，但從組織切片仍可看出 BMP-2 peptide 促進植體周圍骨再生的潛力。


在我們前一篇研究已經證實了本實驗所採用的植體周圍骨缺損是一個臨界骨缺損模型（critical size defect model），並且低濃度的 0.2 mg/mL rhBMP-2 足以在八週內達成完全骨癒合以及優秀的植體骨整合。為了測試短鏈 73-92-residue BMP-2

peptide 是否有機會取代 rhBMP2 來促進快速骨質新生，我們採用同一個動物模型來檢視 BMP-2 peptide 的骨誘導能力，並試著釐清合適的劑量。

從放射線學影像來看，20 mg/mL peptide 在四週的癒合期稍微優於控制組，但表現卻遠差於 0.2 mg/mL rhBMP-2。兩個劑量的 peptide 組別（4 及 20 mg/mL）在八週癒合期則皆有明顯優於控制組的表現。植體穩定度的評估也有類似的結果。雖然只有 rhBMP-2 組別有顯著優於控制組的植體穩定度 ($p < 0.05$)，但兩個劑量的 peptide 組別也早在四週癒合期就達到 Brånemark 植體的臨床標準。根據研究，Brånemark 植體在完成骨整合後會達到 ISQ 65–75[88]。

未脫鈣組織磨片的螢光顯微圖展示了各組別的礦化程度以及鈣化的時間點。在八週癒合期，4 mg/mL peptide 組別可以看到少量的紅色螢光呈網狀遍布整個骨缺損區域，並延伸到植體旁的空間以及植體平台的高度；綠色螢光則幾乎分布在骨缺損的邊界附近，少量從頂端骨膜處開始往下延伸。前一篇研究證實了骨膜對於 rhBMP-2 誘導骨質新生佔有重要地位，而在 BMP-2 peptide 似乎有類似的狀況。在八週癒合期的 20 mg/mL peptide 組別，其螢光強度和分布的面積都較 4 mg/mL peptide 組別為大，已經有部分綠色螢光往骨缺損的中心分布，說明了較高劑量的 BMP-2 peptide 可以誘導更快很好的骨質新生。雖然兩個 peptide 組別在興趣區域 AOI 的螢光分布面積量化後並未顯著優於控制組，但從螢光顯微圖已可以明顯看到 peptide 誘導骨質新生的優勢。而 rhBMP-2 組別無論是在四週或八週，皆有顯著優於控制組的螢光分布面積 ($p < 0.05$)，且其在八週的螢光多為綠色，證實了 rhBMP-2 組別可以在最快的速度內誘導最豐富的骨質新生。類似的結果在脫鈣組織切片的馬森三色染色 (Masson's trichrome stain, MT stain) 中再次得到證實；RhBMP-2 以及 BMP-2 peptide 都有能力誘導骨質新生及重塑，也能誘導巨噬細胞聚集 (macrophage recruitment) 來加速 HAp/TCP 顆粒的降解。

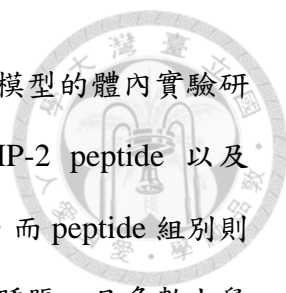
骨誘導因子的濃度是其能否成功誘導骨生長的關鍵因素。BMP-2 蛋白擁有多個受體結合位點 (receptor binding sites)，參與了多種功能之訊息傳導。而短鏈 73–



92-residue BMP-2 peptide 只是 BMP-2 蛋白的其中一個受體結合位點 (receptor binding sites)，因此 73–92-residue BMP-2 peptide 的活性本就預期會比 BMP-2 蛋白來得低。在之前的研究中，都使用高劑量的 73–92-residue BMP-2 peptide 來和 BMP-2 蛋白互相比較。Cai 的團隊在體外研究發現 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 73–92-residue BMP-2 peptide 的生物反應表現和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BMP-2 類似[117]。而在一個動物實驗中，使用兔子橈骨 20 mm 長的骨折骨缺損模型，發現若使用 α -TCP scaffolds 植入 5 mg 的 73–92-residue BMP-2 peptide，其促進骨癒合的功能類似於 α -TCP scaffolds 植入 5–35 μg rhBMP-2[118]。另個動物實驗使用大鼠的頭蓋骨缺損模型，發現 3 mg 的 BMP-2 peptide P24 和 1 μg 的 rhBMP-2 有類似的骨誘導能力[114]。BMP-2 peptide 的另一個修飾型 P28 則是在體外及體內研究都顯示和 BMP-2 在質量比 (mass ratio) 1000:1 時有相似的骨誘導能力[116]。

我們前一篇研究指出低劑量的 0.2 mg/mL rhBMP-2 可以在八週內達到植體周圍臨界骨缺損的完全癒合。本篇實驗採用了前述 rhBMP-2 (0.2 mg/mL) 的 20 倍及 100 倍之劑量 (4 and 20 mg/mL)，來測試 73–92-residue BMP-2 peptide 的骨誘導活性。初步結果顯示 4 mg/mL 及 20 mg/mL BMP-2 peptide 之骨誘導能力皆低於 0.2 mg/mL rhBMP-2。若將本篇實驗所量化的骨缺損中心之螢光面積 (代表新生骨鈣化程度) 和前一篇實驗結果相比較，可以發現 20 mg/mL BMP-2 peptide 的表現類似於 0.02 mg/mL rhBMP-2。因此，就本篇及上篇實驗的結果，推測 73–92-residue BMP-2 peptide 和 rhBMP-2 在質量比 (mass ratio) 1000:1 時能達成類似的骨誘導能力。

RhBMP-2 除了生產及銷售費用十分高昂，它也牽涉到多種生物活性及多種副作用，因此興起了研發短鏈 BMP-2 peptide 來當作替代品的念頭。RhBMP-2 可能誘發術後發炎反應、破骨細胞主導之骨吸收、異位骨生長及不適當之脂肪增生[95]。其它副作用還包括了可能威脅生命的頸椎腫脹、異位骨生長造成的神經擠壓及腫瘤生成。隨著 rhBMP-2 的應用越來越多，所產生副作用也逐漸被完整蒐集紀錄；



然而，BMP-2 peptide 可能的副作用卻仍然未知。一個使用大鼠模型的體內實驗研究報告比較了 73-92-residue BMP-2 peptide、修飾型 E7-BMP-2 peptide 以及 rhBMP-2 的骨誘導能力，發現副作用皆發生在 rhBMP-2 的組別，而 peptide 組別則沒有產生副作用。半數接受 rhBMP-2 治療的大鼠產生了顯著的腫脹，且多數大鼠甚至產生了類似白內障的病灶（cataract-like lesions）導致失明[119]。在本篇及上篇實驗中，無論是 73-92-residue BMP-2 peptide 或是 rhBMP-2 組別皆未觀察到任何副作用的產生；然而，我們實驗最長的觀察期只到八週，潛在副作用可能尚未產生、或尚未能引發注意。

到目前為止，只有很少數的體內研究探討 BMP-2 peptides 的骨誘導能力，而 BMP-2 peptides 在植體周圍促進齒槽骨再生的表現仍無任何研究報告。本篇實驗的初步結果顯示 73-92-residue BMP-2 peptide 有潛力可以促進植體周圍之齒槽骨再生。然而，本實驗的樣本量較少，且 BMP-2 peptide 組別的新生骨鈣化程度量化結果並未顯著優於控制組，因此建議未來的研究採用目前 peptide 劑量的十倍並增加樣本量，來進一步證實 73-92-residue BMP-2 peptide 在植體周圍齒槽骨增高手術中的骨引導再生能力。再者，由於 BMP-2 peptides 是以高劑量在投入體內，未來也需要以長期研究來觀察可能的副作用產生。後續研究方向包括了 BMP-2 peptides 的胜肽修飾、藥物輸送系統的改良、劑量精確計算以及藥物毒性分析，讓 BMP-2 peptide 有潛力取代 rhBMP-2 並應用在臨床植體及齒槽骨增高手術中。

第五章 結論

以 HAp/TCP/Col 複合骨材當作 73-92-residue BMP-2 peptide 的載體可以促進植體周圍之齒槽骨再生。雖然量化結果並未顯著，經過未來研究改良及劑量調整後，73-92-residue BMP-2 peptide 仍有潛力可以作為 rhBMP-2 的替代產品。

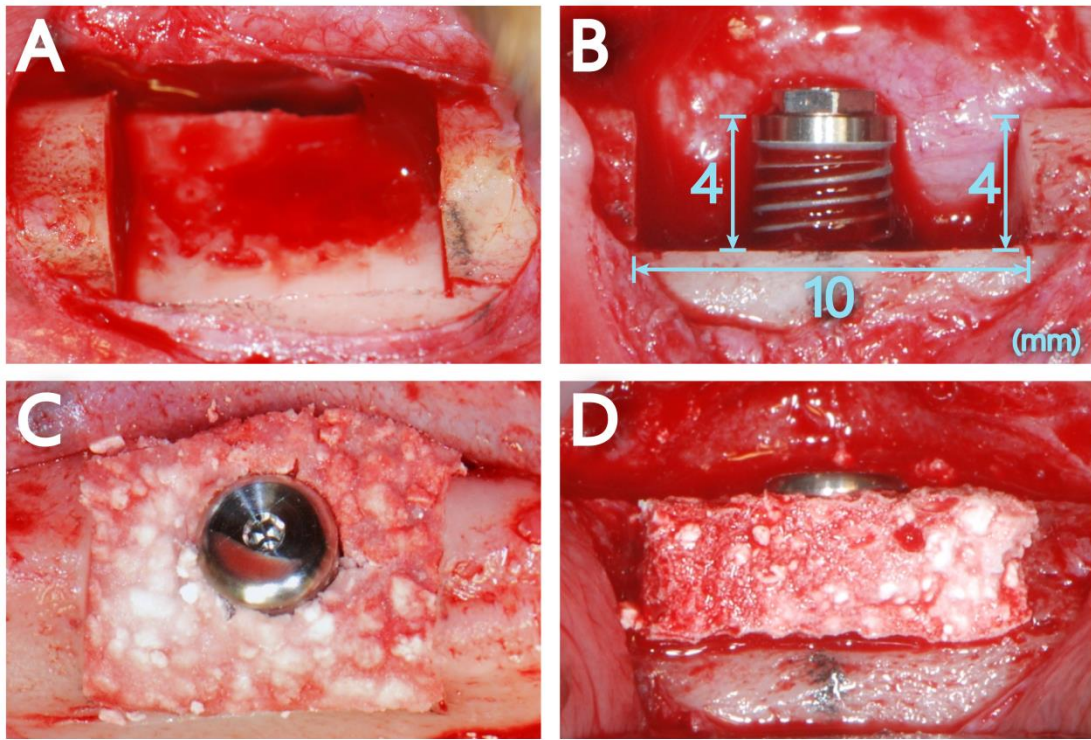


圖 1：植體周圍臨界骨缺損模型

- (A) 骨缺損之咬合面觀
- (B) 人工植體之下半部植入骨缺損區正中央，上半部裸露於骨缺損中
- (C) 置入 HAp/TCP/Col 複合骨材之咬合面觀
- (D) 置入 HAp/TCP/Col 複合骨材之頰側觀

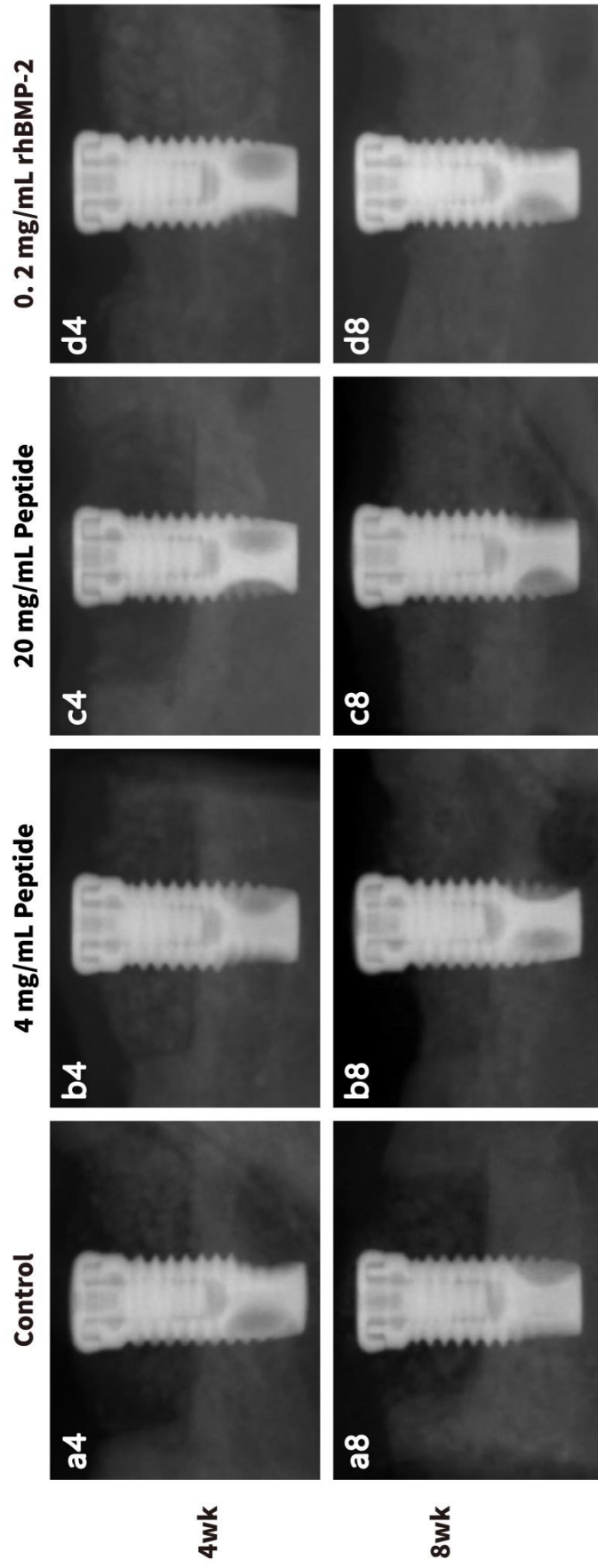


圖 2：根尖 X 光放射線影像

RhBMP-2 組別在四週即有明顯 radiopacity 增加，在八週已達到完全骨癒合。控制組及 peptide 組別在四週時仍可分辨明顯的骨缺損邊界及 HAp/TCP 顆粒。八週時，兩個 peptide 組別皆有明顯增加的 radiopacity，骨缺損邊界及 HAp/TCP 顆粒變得模糊；控制組僅在骨缺損邊界有少量骨增生。



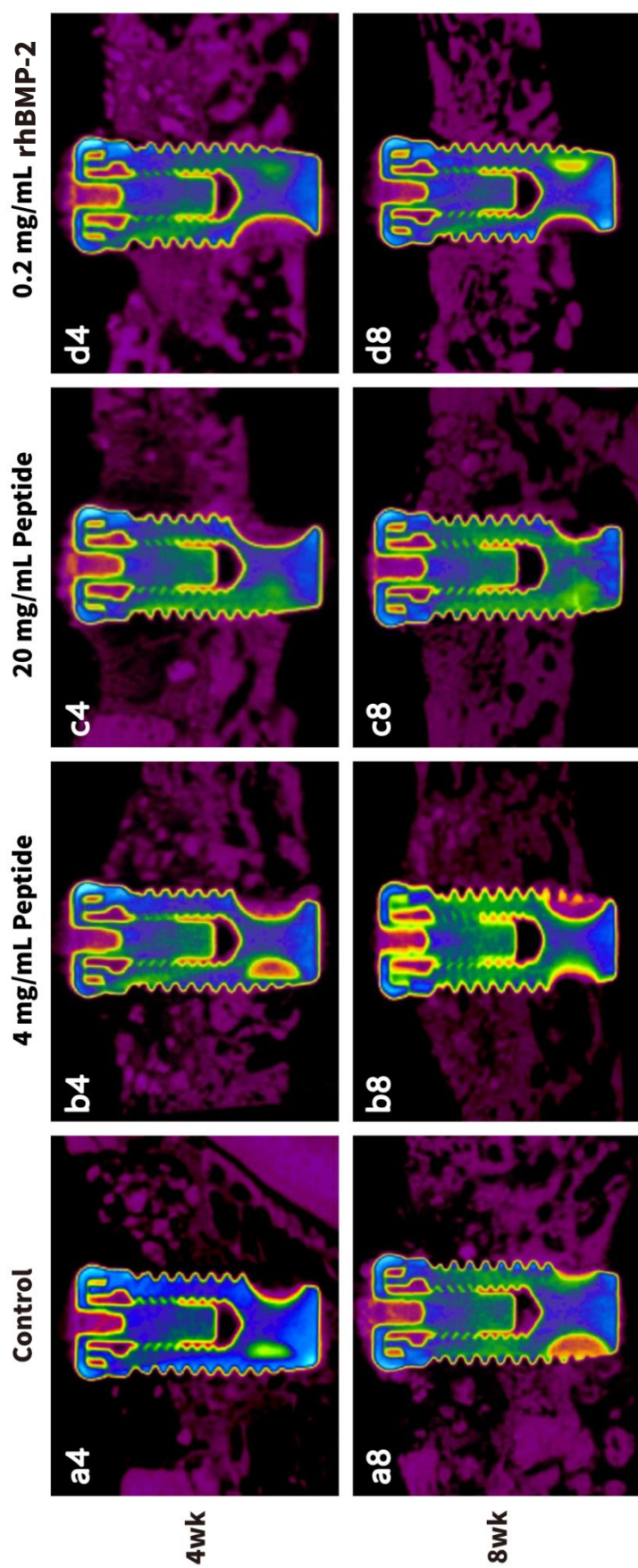


圖 3：微電腦斷層影像，近遠心切面

控制組僅在八週癒合期有很少量的骨增生。20 mg/mL peptide 組別在四週可看到部分骨質新生，而兩個 peptide 組別在八週皆有明顯骨再生。RhBMP-2 組別在四週即有大量骨增生，在八週則呈現緻密骨癒合。



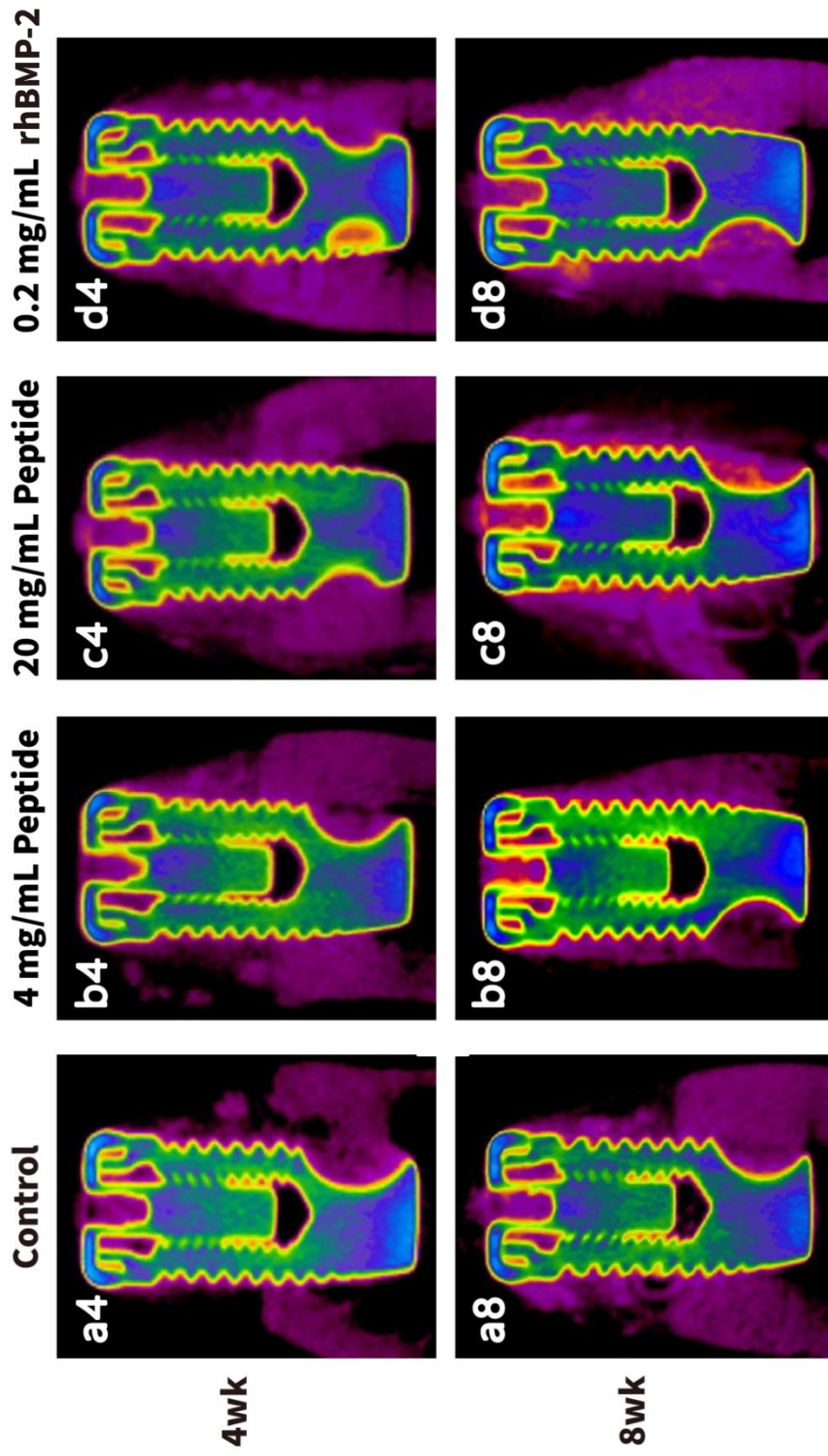


圖 4：微電腦斷層影像，頰舌側切面

控制組在兩個癒合期，人工植體的頰舌側皆無明顯骨增生。20 mg/mL peptide 組別在四週可看到植體頰舌側有部分骨質新生，而兩個 peptide 組別在八週皆有明顯骨再生。RhBMP-2 組別在兩個癒合期，植體的頰舌側皆有明顯新生骨質包覆。



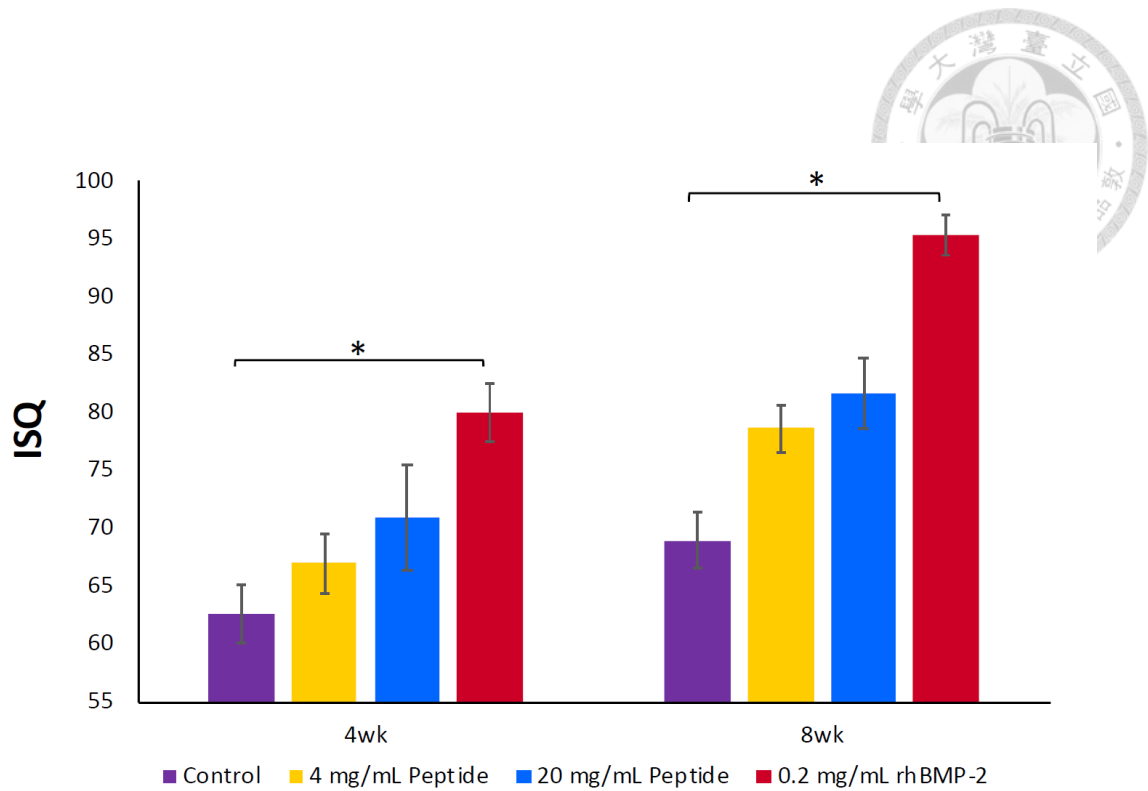


圖 5：植體共振頻率分析 (Resonance Frequency Analysis)

在四週的癒合期，兩個 peptide 組別及 rhBMP-2 組別的 ISQ 皆已超過 65，唯只有 rhBMP-2 組別的 ISQ 顯著高於控制組 (adjusted $p < 0.05$)。在八週的癒合期，兩個 peptide 組別及 rhBMP-2 組別的 ISQ 皆已超過 75；但仍然只有 rhBMP-2 組別的 ISQ 顯著高於控制組 (adjusted $p < 0.05$)。 *adjusted $p < 0.05$

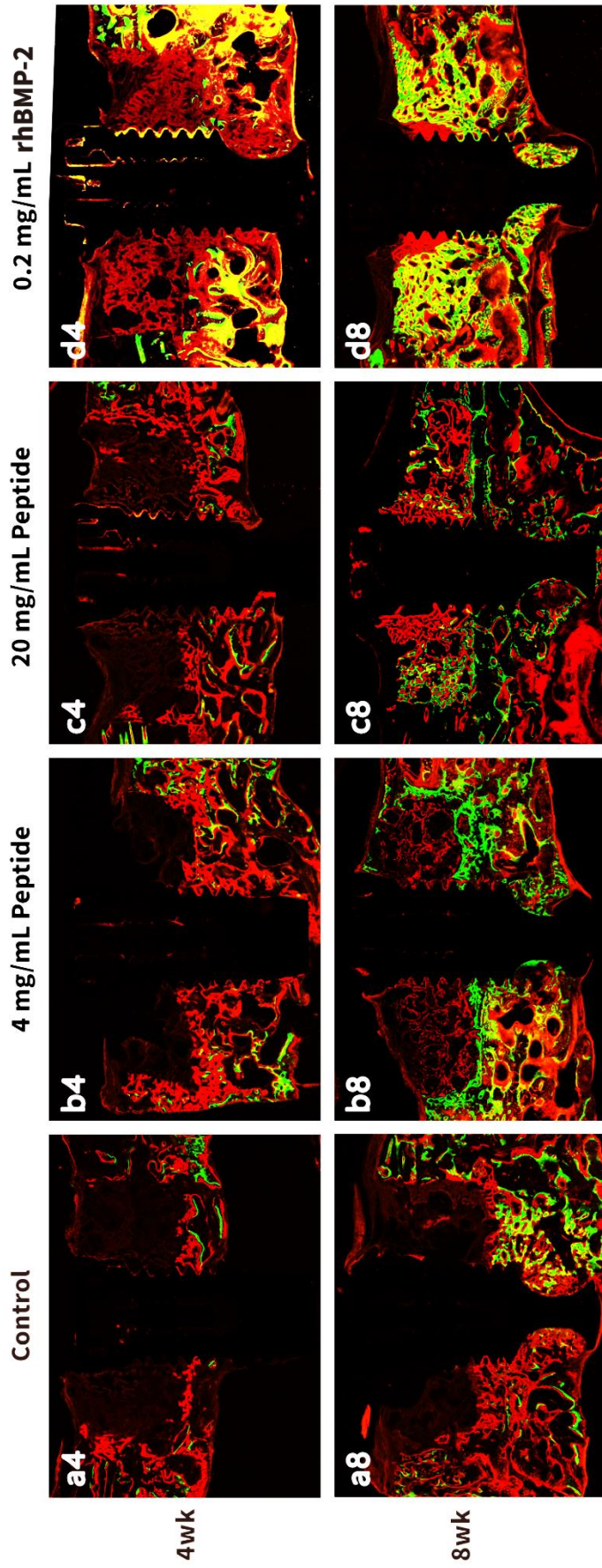


圖 6：螢光顯微影像，近遠心切面

控制組在四週及八週癒合期，骨缺損區域幾乎沒有螢光顯像。四週時，4 mg/mL peptide 組別僅在骨缺損邊界處有少量紅色螢光；20 mg/mL peptide 組別在整體骨缺損區域散布非常微弱之紅色螢光；rhBMP-2 組別則有明顯遍布之紅色螢光。八週時，4 mg/mL peptide 組別有微弱的紅色螢光散布骨缺損區域；20 mg/mL peptide 組別有密度較高的紅綠相間螢光；rhBMP-2 組別則由大部分為綠色之高密度螢光所充滿。



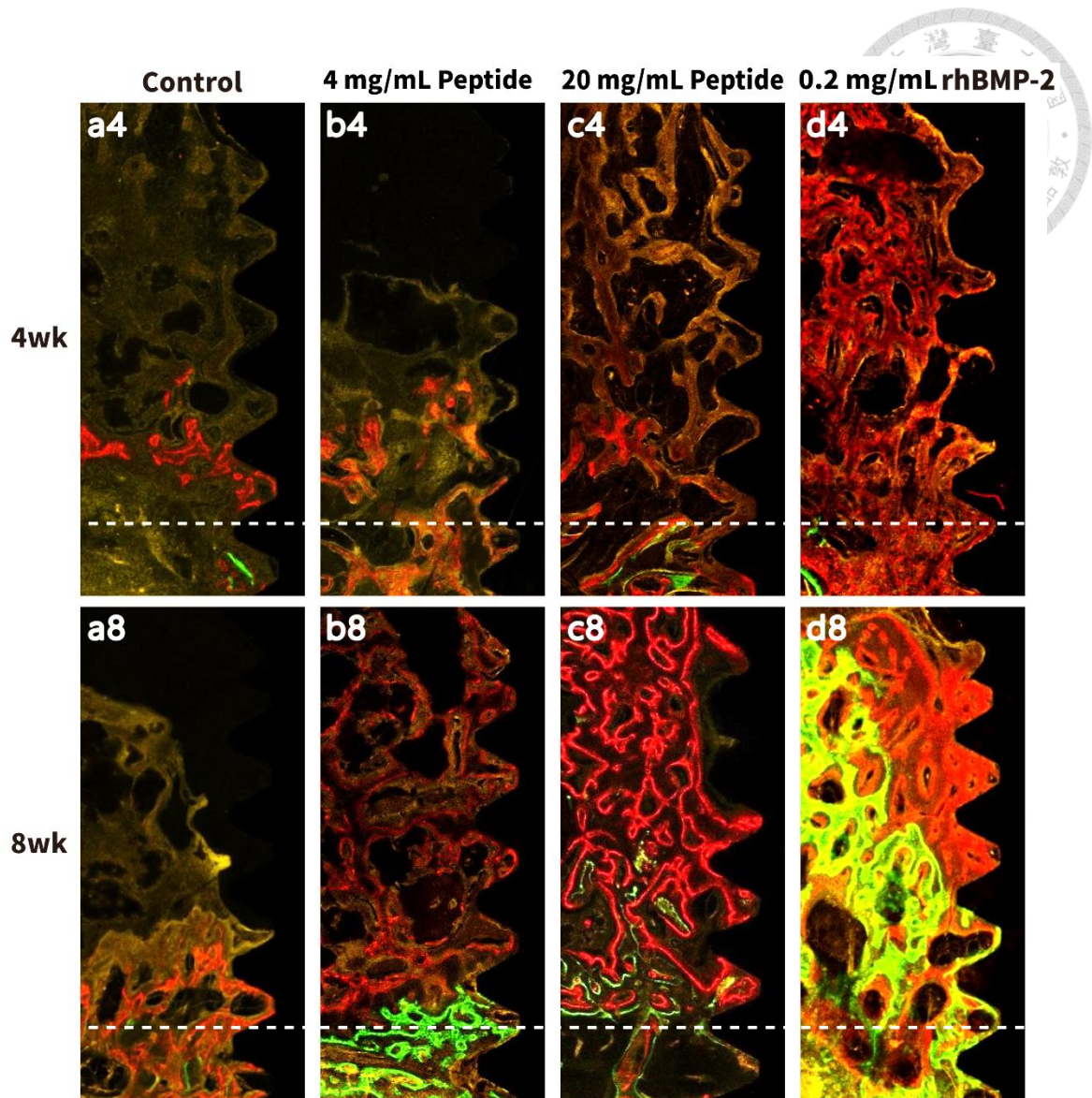


圖 7：螢光顯微影像於人工植體上半部裸露區之放大檢視

控制組無論在四週或八週皆只有不到一個螺紋高度的骨質新生。4 mg/mL peptide 組別在四週僅有類似控制組的表現；八週則可見微弱的紅色螢光貼附植體表面並往上延伸至植體平台高度。20 mg/mL peptide 組別在四週有微弱之紅色螢光往上延伸至植體平台高度；八週則遍布明顯紅色螢光及少量綠色螢光。RhBMP-2 組別在四週即有明顯紅色螢光充滿植體周圍至平台高度；八週時，植體周邊及螺紋間區域已被高密度之紅綠螢光充滿。

虛線：齒槽骨缺損之底界

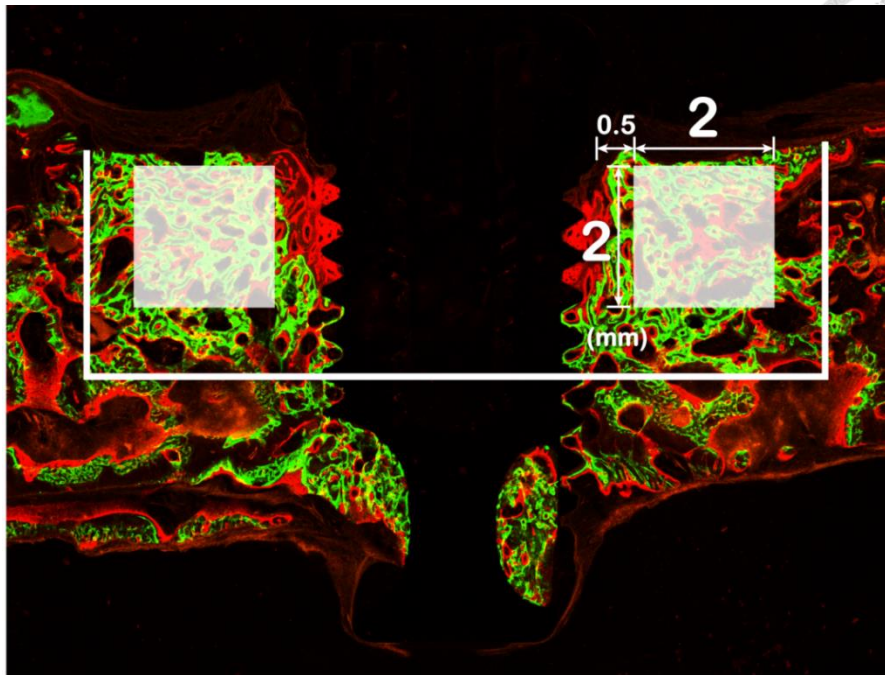


圖 8：螢光面積量化分析之興趣區間

在人工植體兩側、骨缺損的正中間，選取了兩個 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 的範圍當作興趣區間。

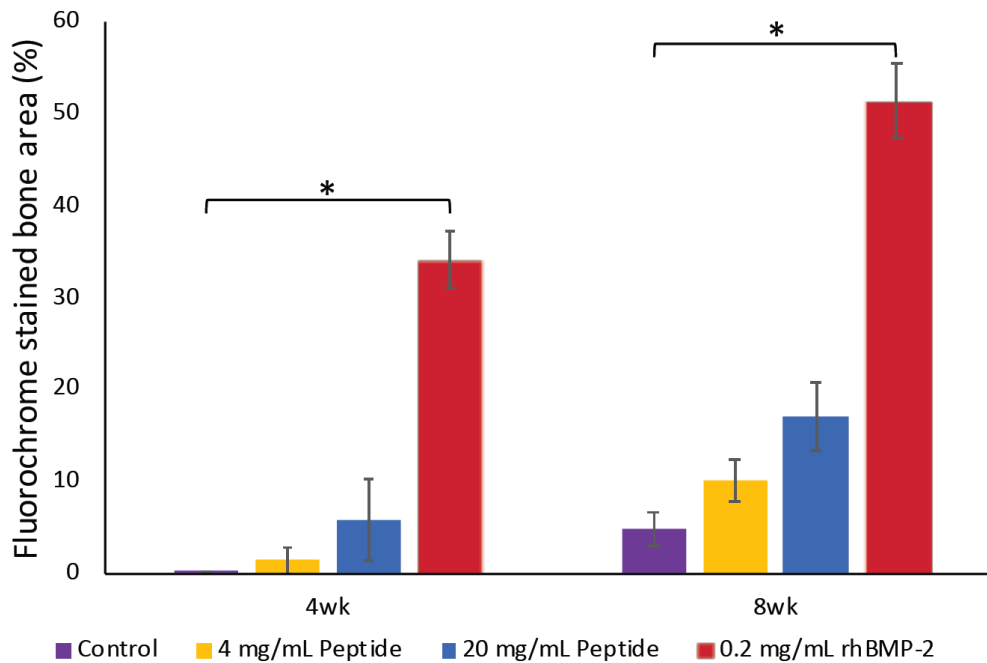


圖 9：螢光顯微影像之螢光面積量化分析

雖然 peptide 組別在兩個癒合期皆有高於控制組的螢光面積分布，但僅有 rhBMP-2 組別在兩個癒合期有顯著優於控制組之螢光面積比例 (*adjusted $p < 0.05$)。

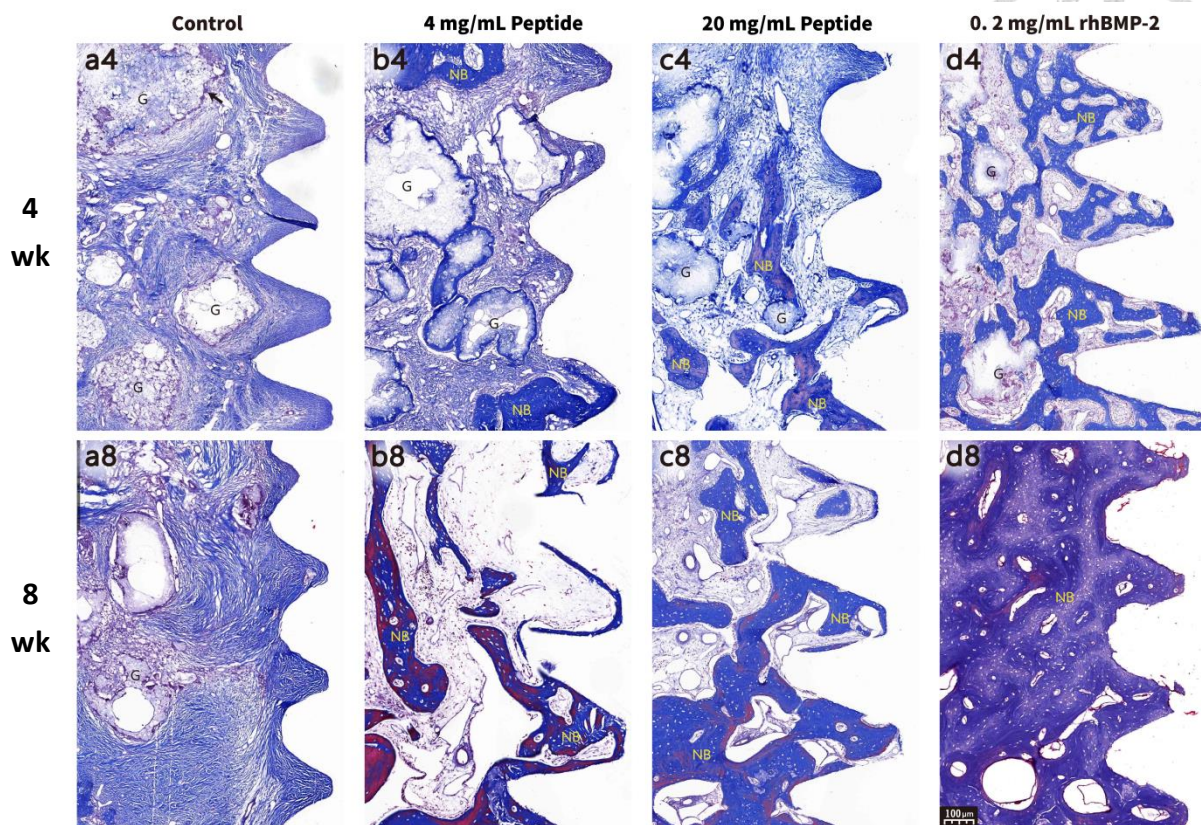


圖 10：脫鈣組織切片之馬森三色染色 (Masson's trichrome stain)。
植體上半部裸露區之螺紋放大圖

控制組在兩個癒合期皆有未降解之 HAp/TCP 顆粒，旁邊包圍著 multinucleated giant cells，植體螺紋間區域被軟組織所充滿，未觀察到新生骨質。4 mg/mL peptide 組別於四週有少量新生骨質貼附在植體表面、HAp/TCP 顆粒外圍及上方骨膜邊界；八週則有明顯新生骨質貼附植體表面生長。20 mg/mL peptide 組別在四週的新生骨質較 4 mg/mL peptide 組別稍多；八週有更高密度的骨質新生，螺紋間區域也部分被充滿。RhBMP-2 組別在四週即有遍布之新生骨小樑；八週則看到植體周圍及所有螺紋間空間皆被緻密的新生骨質所充滿。各組顯微圖像皆未觀察到炎性細胞浸潤。

NB : new bone

G : undegraded granule

總結



為了克服臨床上大範圍骨缺損及植體周圍骨缺損之困難挑戰，本研究旨在測試以人工合成骨塊加入骨成形蛋白二或其抗原決定位之短鏈胜肽修復植體周圍大範圍骨缺損的潛力及效益，並找尋其誘導骨質新生之最低有效劑量。可以得到以下結論：

- 一、本實驗建立之實驗犬模型證實為植體周圍臨界骨缺損模型（peri-implant critical-sized defect model），適合用來進行植體周圍骨再生試驗。
- 二、HAp（Hydroxyapatite）/TCP（Tri-calcium Phosphate）/Col（Collagen）複合骨材適合作為支架（scaffold）以及 rhBMP-2 或 73-92-residue BMP-2 peptide 之載體（carrier），用於植體周圍之大範圍齒槽脊增高手術（alveolar ridge augmentation）。
- 三、RhBMP-2 及 73-92-residue BMP-2 peptide 皆具有誘導齒槽骨再生之功能。推測 73-92-residue BMP-2 peptide 和 rhBMP-2 在質量比 1000:1 時能達成類似的骨誘導能力。
- 四、達成植體周圍骨再生之 rhBMP-2 最低有效劑量為 0.2 mg/mL，此劑量低於 FDA 核可之市售濃度 7.5 倍。73-92-residue BMP-2 peptide 之最低有效劑量尚待進一步研究。
- 五、HAp/TCP/Col 加上 0.2 mg/mL rhBMP-2 的組合能取代自體骨移植的需求，並在不使用再生膜的情況下，可於人工植體植入的當下同時進行大範圍齒槽脊增高手術。

總結來說，低劑量 0.2 mg/mL 骨成形蛋白二可以達成植體周圍大範圍骨再生之困難任務。未來研究改良及劑量調整後，骨成形蛋白二抗原決定位之短鏈胜肽有潛力可以作為骨成形蛋白二之替代產品。

參考文獻



1. Buser, D., et al., *Evaluation of filling materials in membrane--protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs*. Clin Oral Implants Res, 1998. **9**(3): p. 137-50.
2. Wozney, J.M., *The bone morphogenetic protein family and osteogenesis*. Mol Reprod Dev, 1992. **32**(2): p. 160-7.
3. Poon, B., et al., *Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls*. J Pharm Pharmacol, 2016. **68**(2): p. 139-47.
4. Freitas, R.M., et al., *Alveolar ridge and maxillary sinus augmentation using rhBMP-2: a systematic review*. Clin Implant Dent Relat Res, 2015. **17 Suppl 1**: p. e192-201.
5. Moslemi, N., et al., *Outcomes of Alveolar Ridge Preservation With Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: A Systematic Review*. Implant Dent, 2018. **27**(3): p. 351-362.
6. Haidar, Z.S., R.C. Hamdy, and M. Tabrizian, *Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery*. Biotechnol Lett, 2009. **31**(12): p. 1817-24.
7. Wikesjo, U.M., et al., *rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration*. Clin Oral Implants Res, 2004. **15**(2): p. 194-204.
8. Boyne, P.J., et al., *De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation*. J Oral Maxillofac Surg, 2005. **63**(12): p. 1693-707.
9. Fiorellini, J.P., et al., *Randomized study evaluating recombinant human bone*

morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. J Periodontol, 2005. **76**(4): p. 605-13.

10. Wikesjo, U.M., et al., *Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations*. J Clin Periodontol, 2008. **35**(11): p. 1001-10.

11. Senn, N., *On the Healing of Aseptic Bone Cavities by Implantation of Antiseptic Decalcified Bone*. Ann Surg, 1889. **10**(5): p. 352-68.

12. Levander, G., *Tissue induction*. Nature, 1945. **155**: p. 148-49.

13. Lacroix, P., *Recent investigation on the growth of bone*. Nature, 1945. **156**: p. 576.

14. Urist, M.R., *Bone: formation by autoinduction*. Science, 1965. **150**(3698): p. 893-9.

15. Urist, M.R. and B.S. Strates, *Bone morphogenetic protein*. J Dent Res, 1971. **50**(6): p. 1392-406.

16. Reddi, A.H. and C. Huggins, *Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(6): p. 1601-5.

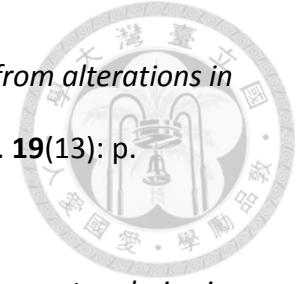
17. Wozney, J.M., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242**(4885): p. 1528-34.

18. Lee, M.B., *Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction. A review*. J Clin Periodontol, 1997. **24**(6): p. 355-65.

19. Israel, D.I., et al., *Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells*. Growth Factors, 1992. **7**(2): p. 139-50.

20. Reddi, A.H., *Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens*. Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**(1): p. 11-20.

21. Kirsch, T., W. Sebald, and M.K. Dreyer, *Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(6): p. 492-6.



22. Kirsch, T., J. Nickel, and W. Sebald, *BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II*. EMBO J, 2000. **19**(13): p. 3314-24.
23. Knaus, P. and W. Sebald, *Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGFbeta superfamily*. Biol Chem, 2001. **382**(8): p. 1189-95.
24. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
25. ten Dijke, P., et al., *Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors*. Mol Cell Endocrinol, 2003. **211**(1-2): p. 105-13.
26. Lee, K.S., et al., *Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(23): p. 8783-92.
27. Liu, J., et al., *Insulin-like growth factor-1 and bone morphogenetic protein-2 jointly mediate prostaglandin E2-induced adipogenic differentiation of rat tendon stem cells*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85469.
28. Suda, T., et al., *Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families*. Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 345-57.
29. Okamoto, M., et al., *Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development*. J Bone Miner Res, 2006. **21**(7): p. 1022-33.
30. McKay, W.F., S.M. Peckham, and J.M. Badura, *A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft)*. Int Orthop, 2007. **31**(6): p. 729-34.
31. Govender, S., et al., *Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for*

treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. J Bone Joint Surg Am, 2002. **84**(12): p. 2123-34.

32. Carragee, E.J., E.L. Hurwitz, and B.K. Weiner, *A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned.* Spine J, 2011. **11**(6): p. 471-91.

33. Ye, L., et al., *Bone morphogenetic proteins and their receptor signaling in prostate cancer.* Histol Histopathol, 2007. **22**(10): p. 1129-47.

34. Ye, L., S.M. Bokobza, and W.G. Jiang, *Bone morphogenetic proteins in development and progression of breast cancer and therapeutic potential (review).* Int J Mol Med, 2009. **24**(5): p. 591-7.

35. Yoshikawa, H., et al., *Bone morphogenetic proteins in bone tumors.* J Orthop Sci, 2004. **9**(3): p. 334-40.

36. Jin, Y., et al., *Overexpression of BMP-2/4, -5 and BMPR-IA associated with malignancy of oral epithelium.* Oral Oncol, 2001. **37**(3): p. 225-33.

37. Epstein, N.E., *Basic science and spine literature document bone morphogenetic protein increases cancer risk.* Surg Neurol Int, 2014. **5**(Suppl 15): p. S552-60.

38. Alarmo, E.L. and A. Kallioniemi, *Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumorigenesis?* Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(2): p. R123-39.

39. Langenfeld, E.M., Y. Kong, and J. Langenfeld, *Bone morphogenetic protein 2 stimulation of tumor growth involves the activation of Smad-1/5.* Oncogene, 2006. **25**(5): p. 685-92.

40. Kleeff, J., et al., *Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo.* Gastroenterology, 1999. **116**(5): p. 1202-16.

41. Kim, M.J., et al., *BMP-2 promotes oral squamous carcinoma cell invasion by*



- inducing CCL5 release. PLoS One, 2014. 9(10): p. e108170.*
42. Jin, H., et al., *BMP2 promotes migration and invasion of breast cancer cells via cytoskeletal reorganization and adhesion decrease: an AFM investigation. Appl Microbiol Biotechnol, 2012. 93(4): p. 1715-23.*
43. Feeley, B.T., et al., *Influence of BMPs on the formation of osteoblastic lesions in metastatic prostate cancer. J Bone Miner Res, 2005. 20(12): p. 2189-99.*
44. Langenfeld, E.M., et al., *The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. Carcinogenesis, 2003. 24(9): p. 1445-54.*
45. Gao, H., et al., *The BMP inhibitor Coco reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites. Cell, 2012. 150(4): p. 764-79.*
46. Owens, P., et al., *Disruption of bone morphogenetic protein receptor 2 (BMP2) in mammary tumors promotes metastases through cell autonomous and paracrine mediators. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(8): p. 2814-9.*
47. Carragee, E.J., et al., *Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. J Bone Joint Surg Am, 2013. 95(17): p. 1537-45.*
48. Lad, S.P., et al., *Cancer after spinal fusion: the role of bone morphogenetic protein. Neurosurgery, 2013. 73(3): p. 440-9.*
49. Cooper, G.S. and T.D. Kou, *Risk of cancer after lumbar fusion surgery with recombinant human bone morphogenic protein-2 (rh-BMP-2). Spine (Phila Pa 1976), 2013. 38(21): p. 1862-8.*
50. Veeravagu, A., et al., *The use of bone morphogenetic protein in thoracolumbar spine procedures: analysis of the MarketScan longitudinal database. Spine J, 2014. 14(12): p. 2929-37.*
51. Mines, D., et al., *Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and*

pancreatic cancer: a retrospective cohort study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2011.

20(2): p. 111-8.

52. Kelly, M.P., et al., *Cancer risk from bone morphogenetic protein exposure in spinal arthrodesis.* *J Bone Joint Surg Am*, 2014. **96**(17): p. 1417-22.

53. Rihn, J.A., et al., *Complications associated with single-level transforaminal lumbar interbody fusion.* *Spine J*, 2009. **9**(8): p. 623-9.

54. Burkus, J.K., H.S. Sandhu, and M.F. Gornet, *Influence of rhBMP-2 on the healing patterns associated with allograft interbody constructs in comparison with autograft.* *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006. **31**(7): p. 775-81.

55. Zhang, X., et al., *The roles of bone morphogenetic proteins and their signaling in the osteogenesis of adipose-derived stem cells.* *Tissue Eng Part B Rev*, 2014. **20**(1): p. 84-92.

56. James, A.W., et al., *Perivascular stem cells: a prospectively purified mesenchymal stem cell population for bone tissue engineering.* *Stem Cells Transl Med*, 2012. **1**(6): p. 510-9.

57. Shahlaie, K. and K.D. Kim, *Occipitocervical fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2: adverse effects due to tissue swelling and seroma.* *Spine (Phila Pa 1976)*, 2008. **33**(21): p. 2361-6.

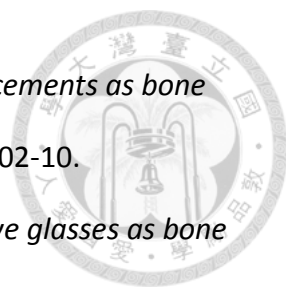
58. Benglis, D., M.Y. Wang, and A.D. Levi, *A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery.* *Neurosurgery*, 2008. **62**(5 Suppl 2): p. ONS423-31; discussion ONS431.

59. Robin, B.N., et al., *Cytokine-mediated inflammatory reaction following posterior cervical decompression and fusion associated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: a case study.* *Spine (Phila Pa 1976)*, 2010. **35**(23): p. E1350-4.

60. Mindea, S.A., P. Shih, and J.K. Song, *Recombinant human bone morphogenetic*



- protein-2-induced radiculitis in elective minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusions: a series review. Spine (Phila Pa 1976), 2009. 34(14): p. 1480-4; discussion 1485.*
61. Smucker, J.D., et al., *Increased swelling complications associated with off-label usage of rhBMP-2 in the anterior cervical spine. Spine (Phila Pa 1976), 2006. 31(24): p. 2813-9.*
62. Epstein, N.E., *Complications due to the use of BMP/INFUSE in spine surgery: The evidence continues to mount. Surg Neurol Int, 2013. 4(Suppl 5): p. S343-52.*
63. Haidar, Z.S., R.C. Hamdy, and M. Tabrizian, *Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. Biotechnol Lett, 2009. 31(12): p. 1825-35.*
64. Kim, H.D. and R.F. Valentini, *Retention and activity of BMP-2 in hyaluronic acid-based scaffolds in vitro. J Biomed Mater Res, 2002. 59(3): p. 573-84.*
65. Arosarena, O.A. and W.L. Collins, *Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. Otolaryngol Head Neck Surg, 2005. 132(4): p. 592-7.*
66. Issa, J.P., et al., *Bone repair in rat mandible by rhBMP-2 associated with two carriers. Micron, 2008. 39(4): p. 373-9.*
67. Jovanovic, S.A., et al., *Bone reconstruction following implantation of rhBMP-2 and guided bone regeneration in canine alveolar ridge defects. Clin Oral Implants Res, 2007. 18(2): p. 224-30.*
68. Noshi, T., et al., *Recombinant human bone morphogenetic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites. Artif Organs, 2001. 25(3): p. 201-8.*

- 
69. Ginebra, M.P., T. Traykova, and J.A. Planell, *Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review*. J Control Release, 2006. **113**(2): p. 102-10.
70. Valimaki, V.V. and H.T. Aro, *Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute*. Scand J Surg, 2006. **95**(2): p. 95-102.
71. Zellin, G. and A. Linde, *Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects*. J Biomed Mater Res, 1997. **35**(2): p. 181-90.
72. Sigurdsson, T.J., et al., *Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carriers*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1996. **16**(6): p. 524-37.
73. Mayer, M., et al., *Maxillary alveolar cleft repair in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a polymer carrier*. Plast Reconstr Surg, 1996. **98**(2): p. 247-59.
74. Itoh, T., et al., *Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs*. J Vet Med Sci, 1998. **60**(4): p. 451-8.
75. Schopper, C., et al., *Bone regeneration using a naturally grown HA/TCP carrier loaded with rh BMP-2 is independent of barrier-membrane effects*. J Biomed Mater Res A, 2008. **85**(4): p. 954-63.
76. Kim, S.S., S.J. Gwak, and B.S. Kim, *Orthotopic bone formation by implantation of apatite-coated poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite particulates and bone morphogenetic protein-2*. J Biomed Mater Res A, 2008. **87**(1): p. 245-53.
77. Boyne, P.J., et al., *A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1997. **17**(1): p. 11-25.
78. Jones, A.L., et al., *Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical*

defects. *A randomized, controlled trial.* J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(7): p. 1431-41.

79. Campana, V., et al., *Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice.* J Mater Sci Mater Med, 2014. **25**(10): p. 2445-61.

80. Suh, D.Y., et al., *Delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 using a compression-resistant matrix in posterolateral spine fusion in the rabbit and in the non-human primate.* Spine (Phila Pa 1976), 2002. **27**(4): p. 353-60.

81. Mehta, M., et al., *A 5-mm femoral defect in female but not in male rats leads to a reproducible atrophic non-union.* Arch Orthop Trauma Surg, 2011. **131**(1): p. 121-9.

82. Schmidt-Bleek, K., et al., *BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm-shift.* Cytokine Growth Factor Rev, 2016. **27**: p. 141-8.

83. Yasko, A.W., et al., *The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats.* J Bone Joint Surg Am, 1992. **74**(5): p. 659-70.

84. Boerckel, J.D., et al., *Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration.* Biomaterials, 2011. **32**(22): p. 5241-51.

85. Boden, S.D., et al., *Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies.* Spine (Phila Pa 1976), 2002. **27**(23): p. 2662-73.

86. Kim, Y.J. and J. Henkin, *Micro-computed tomography assessment of human alveolar bone: bone density and three-dimensional micro-architecture.* Clin Implant Dent Relat Res, 2015. **17**(2): p. 307-13.

87. Meredith, N., *Assessment of implant stability as a prognostic determinant.* Int J Prosthodont, 1998. **11**(5): p. 491-501.

88. Sennerby, L. and N. Meredith, *Implant stability measurements using resonance*



frequency analysis: biological and biomechanical aspects and clinical implications.

Periodontol 2000, 2008. **47**: p. 51-66.

89. Veltri, M., O. Gonzalez-Martin, and U.C. Belser, *Influence of simulated bone-implant contact and implant diameter on secondary stability: a resonance frequency in vitro study.* Clin Oral Implants Res, 2014. **25**(8): p. 899-904.
90. Lin, Z., et al., *Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration.* J Dent Res, 2014. **93**(2): p. 109-16.
91. Tsuji, K., et al., *BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing.* Nat Genet, 2006. **38**(12): p. 1424-9.
92. Omar, O., et al., *Barrier membranes: More than the barrier effect?* J Clin Periodontol, 2019. **46 Suppl 21**: p. 103-123.
93. Cochran, D.L., et al., *Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants.* J Periodontol, 1999. **70**(2): p. 139-50.
94. Jovanovic, S.A., et al., *Long-term functional loading of dental implants in rhBMP-2 induced bone. A histologic study in the canine ridge augmentation model.* Clin Oral Implants Res, 2003. **14**(6): p. 793-803.
95. James, A.W., et al., *A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2.* Tissue Eng Part B Rev, 2016. **22**(4): p. 284-97.
96. Zara, J.N., et al., *High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo.* Tissue Eng Part A, 2011. **17**(9-10): p. 1389-99.
97. Wei, X., et al., *Augmentation of fracture healing by hydroxyapatite/collagen paste and bone morphogenetic protein-2 evaluated using a rat femur osteotomy model.* J Orthop Res, 2018. **36**(1): p. 129-137.
98. Susin, C., et al., *Sinus augmentation using rhBMP-2/ACS in a mini-pig model:*

Influence of an adjunctive ceramic bone biomaterial. J Clin Periodontol, 2018. **45**(8): p. 1005-1013.

99. Wikesjo, U.M., et al., *Space-providing expanded polytetrafluoroethylene devices define alveolar augmentation at dental implants induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2 in an absorbable collagen sponge carrier.* Clin Implant Dent Relat Res, 2003. **5**(2): p. 112-23.

100. Bosshardt, D.D., V. Chappuis, and D. Buser, *Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions.* Periodontol 2000, 2017. **73**(1): p. 22-40.

101. Jung, U.W., et al., *The efficacy of BMP-2 preloaded on bone substitute or hydrogel for bone regeneration at peri-implant defects in dogs.* Clin Oral Implants Res, 2015. **26**(12): p. 1456-65.

102. Thoma, D.S., et al., *Localized bone regeneration around dental implants using recombinant bone morphogenetic protein-2 and platelet-derived growth factor-BB in the canine.* Clin Oral Implants Res, 2017. **28**(11): p. 1334-1341.

103. Wancket, L.M., *Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses.* Vet Pathol, 2015. **52**(5): p. 842-50.

104. Buser, D., et al., *Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible.* Int J Oral Maxillofac Implants, 1995. **10**(6): p. 666-81.

105. Schenk, R.K., et al., *Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible.* Int J Oral Maxillofac Implants, 1994. **9**(1): p. 13-29.

106. Weng, D., et al., *The effects of recombinant human growth/differentiation factor-5*



- (*rhGDF-5*) on bone regeneration around titanium dental implants in barrier membrane-protected defects: a pilot study in the mandible of beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2009. **24**(1): p. 31-7.
107. Hoodless, P.A., et al., *MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways*. *Cell*, 1996. **85**(4): p. 489-500.
108. Fujii, M., et al., *Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(11): p. 3801-13.
109. Hay, E., et al., *Effects of bone morphogenetic protein-2 on human neonatal calvaria cell differentiation*. *J Cell Biochem*, 1999. **72**(1): p. 81-93.
110. Iwasaki, S., et al., *Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(37): p. 26503-10.
111. Saito, A., et al., *Activation of osteo-progenitor cells by a novel synthetic peptide derived from the bone morphogenetic protein-2 knuckle epitope*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1651**(1-2): p. 60-7.
112. Kim, Y., J.N. Renner, and J.C. Liu, *Incorporating the BMP-2 peptide in genetically-engineered biomaterials accelerates osteogenic differentiation*. *Biomater Sci*, 2014. **2**(8): p. 1110-1119.
113. Madl, C.M., et al., *Presentation of BMP-2 mimicking peptides in 3D hydrogels directs cell fate commitment in osteoblasts and mesenchymal stem cells*. *Biomacromolecules*, 2014. **15**(2): p. 445-55.
114. Li, J., et al., *Repair of rat cranial bone defects with nHAC/PLLA and BMP-2-related peptide or rhBMP-2*. *J Orthop Res*, 2011. **29**(11): p. 1745-52.
115. Chen, Y., et al., *Zero-order controlled release of BMP2-derived peptide P24 from*



the chitosan scaffold by chemical grafting modification technique for promotion of osteogenesis in vitro and enhancement of bone repair in vivo. Theranostics, 2017. 7(5): p. 1072-1087.

116. Sun, T., et al., *Evaluation of osteogenic inductivity of a novel BMP2-mimicking peptide P28 and P28-containing bone composite. J Biomed Mater Res A, 2018. 106(1): p. 210-220.*

117. Cai, Y., et al., *Accelerated bone growth in vitro by the conjugation of BMP2 peptide with hydroxyapatite on titanium alloy. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. 116: p. 681-6.*

118. Saito, A., et al., *Repair of 20-mm long rabbit radial bone defects using BMP-derived peptide combined with an alpha-tricalcium phosphate scaffold. J Biomed Mater Res A, 2006. 77(4): p. 700-6.*

119. Bain, J.L., et al., *Enhancement of the Regenerative Potential of Anorganic Bovine Bone Graft Utilizing a Polyglutamate-Modified BMP2 Peptide with Improved Binding to Calcium-Containing Materials. Tissue Eng Part A, 2015. 21(17-18): p. 2426-36.*

120. Bagaria, V. and Prasada, V, *Bone morphogenetic protein: current state of field at the road ahead. J.Orthopaedics 2005;2(4)e3*