

Implant 失敗，或骨條件不佳時，怎麼辦？

前言

長久已來，我們都知道當有 injury 發生或組織需要修復時，血小板會封阻傷口，使破裂的血管癒合，發揮止血的功能，而忽略血小板還具備另一重要功能，也就是血小板內蘊含一些物質，經活化而釋放 (degranulate) 後，可以誘發微血管長入，亦可以附著上 mesenchymal stem cells (MSCs，間質幹細胞)，促使其 mitosis，數目增加，同時刺激誘導成 osteogenic precursor cells 產生 osteoid (類骨)，這些物質不但具有左右 thrombus 的 mechanical properties，且對細胞的附著及成長皆有影響，這些物質即是 growth factors (組織生長因子)，儲存於血小板細胞質 α -granules 內，止血過程中，血小板破裂 (lysis)，這些物質跟著釋放出來，所以血小板的角色不單單具有止血 (hemostasis) 和 sealing (封阻傷口) 功能，且能釋放一些物質來誘導 mesenchymal stem cells 分化成 osteogenic precursor cells 促進骨組織再生，加速 connective tissue cells 的分化，stimulate 血管新生，故具有加速軟組織癒合的能力。組織工程的三大原則：細胞、間質 (matrix) 以及組織生長因子，其中組織生長因子，即是居誘導和調控的角色，對細胞的分化、間質之分泌都有決定性的影響。近年來，人工植牙術逐漸普及，病人骨條件不佳是臨床上常遭遇的問題，故如何促進骨再生 (bone regeneration) 和增生 (augmentation) 以改善植牙條件，遂成為日益迫切的需求，雖然許多報告指出不同 grafting materials 如 barrier materials & allograft，在臨

■ 蘇正堯 / 臺北醫學大學牙醫學士

日本國神奈川齒科大學齒學研究所
博士

日本國神奈川齒科大學非常勤講師
前中央研究院生物醫學研究所微循環研究室主持人

國立陽明大學臨床牙醫研究所教授

床上有其可行性 (efficacy)，但皆各有其缺點及不同的適當症。自體骨植體 (autogenous bone graft)，因同時具 osteoinduction 和 osteoconduction 的作用，又能促進 osteogenesis，故長久以來，被視為是最理想的骨移植材，然而因自體骨移植體的取得不易，以及必須有第二次手術才能取得的缺點，學術界一直希望能找到一種可以加速骨再生，同時又可促進軟組織癒合的方法，1991年，Caplan 在其有關 mesenchymal stem cells 的研究中¹，證實了幹細胞的細胞膜上有組織生長因子的 receptors (接受體) 後，掀起了利用生長因子來刺激、誘導幹細胞分化成不同組織或器官的研究熱潮，這些生長因子是 polypeptides (多肽) 具有調控細胞活動如 proliferation, migration and differentiation 的能力，近年來的研究進一步證實生長因子在整個 cell cycle 扮演極重要的角色，可以誘導細胞移動和刺激細胞外基質 (ECM) 的產生。哈佛大學醫學院血液研究中心主任 Dr. Kevy 與 University of Miami, School of Medicine 口腔外科主任 Dr. Marx 和

Dr. Garg 等多年合作^{2,3,9}，發現血小板內的 α -granules 蘊含數量相當多的 growth factors，如 PDGF，TGF- β ，VEGF (血管內皮生長因子)，EGF (外皮生長因子) 等，如以一定劑量的 thrombin 來激發，使之釋放出 growth factors，這些 growth factors 就可以誘導中間質幹細胞、內皮細胞及其他有關細胞發生 mitosis、differentiation、cell replication 來促進骨組織再生與軟組織之癒合，從此開啟了利用富含血小板的血漿 Platelet rich plasma (簡稱 PRP，又稱為 platelet concentrate) 來加速組織癒合的研究，因為 platelet concentrate 來自病人本身，故又稱為 autologous platelet concentrate (APC)。

本文的主要目的是詳細剖析 APC 的理論基礎及發展歷程，為什麼可以在 implant 失敗時補救，同時可以促進骨再生改善骨的條件，以及臨床研究成果。

APC 的理論基礎及發展歷程

如果我們用一種 bone graft 植入生物體內，當作一種 wound healing 及 bone regeneration 的 model，來探討血小板所扮演的角色，不管上述的 bone graft 是 dental implant，或者是填入 maxillary sinus 或大型骨缺損區的 graft，植入時血液中的血小板很自然地就會附著於 graft 上，因 wound healing 的第一個訊息，就是 platelet 的出現，產生 clotting，血小板被激化， α -granules 就會從細胞質中移動而靠近細胞膜，而與 membrane fuse，接著釋放出蘊含於其中的 growth factors。 α -granules 是許多 growth factors 如 PDGF, TGF- β , EGF, VEGF 的儲藏所，但儲存時是處於 "incomplete form" 的狀態，釋出時血小板的細胞膜會加入 histones 及 carbohydrates，使其變為 complete and active proteins，一個小時內，所有的

growth factors 會被全部釋出而附著於 mesenchymal stem cells 和內皮細胞細胞膜上，刺激其發生 mitosis 及分化。graft 植入後的前三天，主要是 PDGF、TGF- β 誘導細胞的複製與分化、新生血管的長入，隨後因為 low O_2 tension, acidity 及 lactate concentration，吞噬細胞 (macrophages) 會驅近 graft site，取代血小板的角色，一直到 revascularization (血管新生)，養分進入，oxygen tension 回到 normal 為止。血管新生約在二至三天就可觀察到，微細血管在七天之內可穿入並包圍 graft，骨基質逐漸沉積而形成 osteoid (類骨)，revascularization 完成後，更多的養分和 oxygen 會使 osteoid 的形成加速，最後發生 mineralization。血管的新生自然亦會使 osteoclasts (破骨細胞) 靠近 graft site，吸收 osteoid (類骨)，而釋放出 bone morphogenetic protein (BMP) 儲存於 osteoid 內。BMP 接著誘導形成更多的新生骨包圍植入的 graft，當 graft 開始有 function 時，骨吸收和骨生成的 remodeling cycle，就會一再的發生，產生 more mineralized bone 以因應 functional loading。

蘊含於血小板內之生長因子

Platelet-derived growth factors (PDGF)

蘊藏於 α -granules 內的血小板由來生長因子 PDGF，共有三種 isomers，分別為 PDGF $\alpha\alpha$ ，PDGF $\beta\beta$ ，PDGF $\alpha\beta$ 。PDGF 可說是 wound healing 過程中不可或缺的生長因子，功能上，PDGF 是屬於 mitogen，也就是當 PDGF 附著於細胞膜的 receptor 時，會使細胞複製，PDGF 不但會促使 mesenchymal stem cells 複製，亦會促使骨形成細胞複製而生成類骨，引導內皮細胞複製而形成新血管的基底膜 (basal lamina)，亦可促使 fibroblasts 複製而製造 collagen。

Transforming growth factors (TGF-s)

迄至目前為止共有五種 TGF- β 的 isoforms 被發現⁴，其中，TGF- β 1 是 TGF- β family 中，唯一儲存於 platelets 內的 isoform，TGF- β 1 佔骨內 TGF- β 的 75-80%，BMP 也是屬於 TGF- β superfamily 的一種。TGF- β 1 不僅可刺激細胞複製，同時亦可促進基質形成 (matrix formation)，被視為是細胞外基質的形成及 degradation 最重要的 regulator (調節者)。

Vascular endothelial growth factors (VEGF)

VEGF 是一種 protein growth factors，主要是刺激內皮細胞 migration and proliferation，誘使 pericytes (血管周皮細胞) 進入 support new blood vessels。

Epithelial growth factors (EGF)

EGF 的主要作用是誘導皮膚的 basal cells 及 mucous membranes 的細胞複製，以及誘導其沈積基底膜的特殊成分。

The mechanism of Growth factor effects on cells (組織生長因子作用於細胞的機轉)

大部分的組織生長因子都可作用在 receptive cells 細胞膜上的兩個 active sites，附著上 receptors 後，組織生長因子會先激化細胞的 signal protein，然後 signal protein 脫離細胞質而進入細胞核觸發一連串的 gene sequence，產生分化 factors，促成 cell 的 mitosis，因為一個被激化的 gene 會產生無數的 messenger RNA 複製體 (copies)，故一個單獨的 growth factor 就會產生相當大的影響。Table 1 列舉血小板釋出之生長因子具備的功能。

Table 1

GROWTH FACTOR PRESENT IN PLATELET CONCENTRATE

PDGF	Chemoattractive to Mesenchymal Stem Cells and endothelial cells Differentiation for fibroblasts and osteoblasts Upregulate effects of other growth factors on cells such as Macrophages
TGF-s	Promote cell mitosis and differentiation for connective tissue and bone. Acts on mesenchymal stem cells, preosteoblasts and fibroblasts.
VEGF	Stimulate angiogenesis, chemoattractive for osteoblasts
EGF	Induce epithelial development and promote angiogenesis.

Clinical Application of Platelet Concentrate (Platelet concentrate 之臨床應用)

1994 年 Tarapongsak et al. 首度使用 autologous fibrin adhesive (AFA) 與 cancellous bone 混合體於 mandibular continuity reconstruction 手術中，他們發現在 33 個 cases 中有 earlier radiographic bone consolidation，探究原因，發現 AFA 提供 osteocompetent cells 一個很好的 conductive matrix 環境，而提昇骨誘導作用。Autologous fibrin adhesive (AFA) 即是經過離心的 PRP 混合 thrombin 形成的 gel，因為 thrombin 不但可以使血漿內的 fibrinogen 轉換成 fibrin，而且也是一種很強的 agonist (活化劑)，可以激化血小板，使 α -granules 破裂而釋出 growth factors。目前，我們就是利用 thrombin 當作一種 clot initiator，使 platelet concentrate 形成

gel，另一方面利用其作為一種活化劑，活化血小板釋出大量組織生長因子的機轉，使形成的 platelet gel 成為生長因子釋放的良好環境，來引導 injury site 周圍的間質幹細胞，促進骨組織再生與軟組織之癒合。

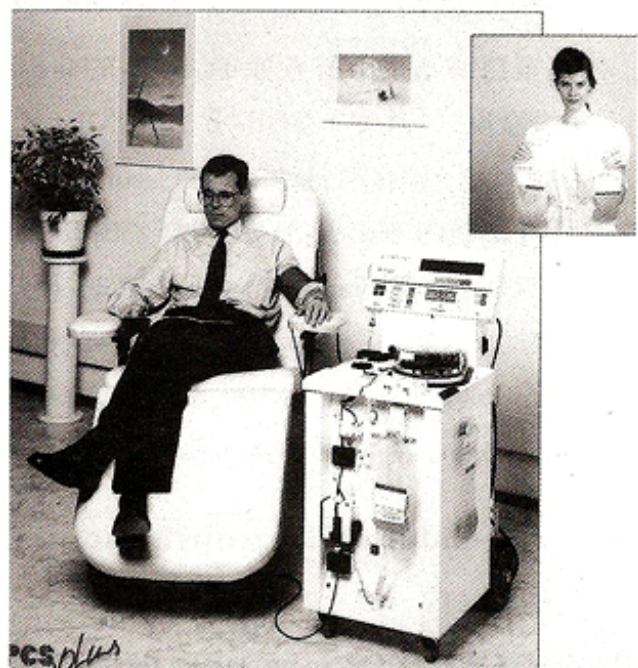
Platelet concentrate 之製備

在手術房內，用來分離 PRP 的方法，一般是採用 cell savor technology，先抽取病人 400ml 的 whole blood (圖 1) 於裝有 citrate phosphate dextrose (CPD) 的血液收集袋內，然後分離成三個部分，分別為 red blood cells (160ml)，"buffy coat" (40ml，即含 platelet 的血漿)，platelet poor plasma (200ml)，除了保留少量 PRP 製作成 AFA 之外，red blood cells 及 PPP 輸回病人體內，然後混合牛血清粹取出的 thrombin (bovine thrombin) 和 PRP，成為 platelet concentrate gel。

在小型醫院或診所內使用的方法是取 45ml -60ml 的 whole blood 放入裝有 7ml ACD 的 syringe 內 (圖 2)，經分段離心之後，得到約全血 10% 的 PRP (圖 3)，因為限於規定，在小型醫院或診所內分離出的 red blood cells 及 PPP 是不能再行 reinfuse 回病人身上的，故皆拋棄不用，分離出的 PRP 依手術房同樣方法利用 thrombin+CaCl₂ 來 activate 成為 platelet concentrate gel，手術之前再混合 bone graft 成為 graft mixed PRP gel。(圖 4)

圖 5 為發生 peri-implantitis 之口內照。圖 6 為 X-ray film，顯示 implant 周圍骨質吸收。圖 7 進行 implant 周圍不良組織之 debridement，用 pH1 citric acid 做 sterilization，然後填入 platelet gel 與 bone graft 混合物。圖 8 為術後 X-ray film。

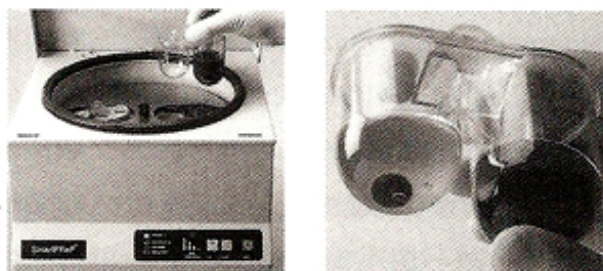
Plasma...and platelets



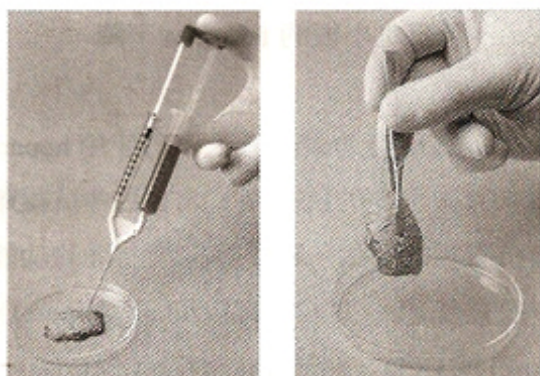
▲ 圖 1



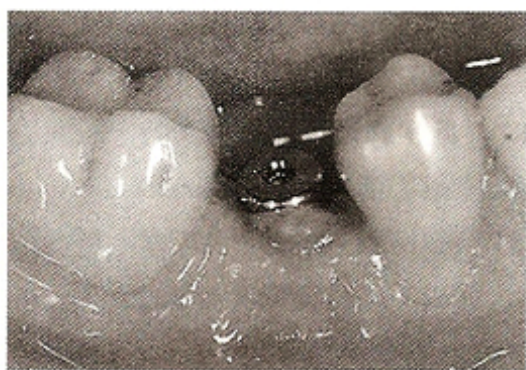
▲ 圖 2



▲ 圖 3



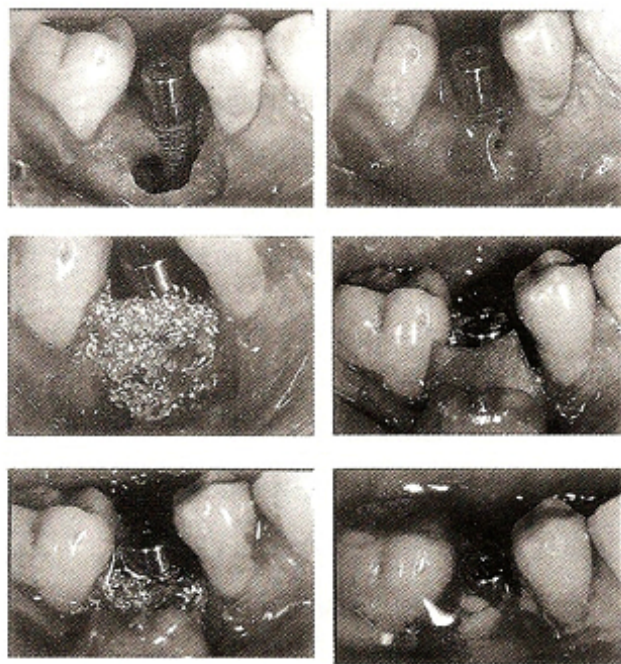
▲ 圖 4



▲ 圖 5



◀ 圖 6



▲ 圖 7



◀ 圖 8

Growth factors 是 platelets 受到活化 (activation) 後所釋放出的 proteins，如果在離心的過程中，platelets 已受損或破裂，則離心後得到的 PRP，很可能發生數目減少或 function 降低，所以很重要的一件事是要確定離心出的 platelet concentration，血小板的 condition 是否完好無缺，也就是離心出的血小板是否與

循環血液中的血小板一樣，是 viable 的。根據 American Association of Blood Banks and FDA requirements，有四種特殊方法可用來 determine 血小板的 viability，其中最常用的是 pH 值和 P-selectin assay，pH 值需大於 6.2，p-selectin 值需小於 20%，血小板才是 viable and functionally active。

PRP 內之血小板數目與生長因子之關係

哈佛大學血液中心主任Dr. Kevy et.al，過去數年來一直從事生長因子(growth factor)的分析研究，證實血小板被激化後，所釋出的生長因子量和血小板量是成正比關係，亦即血小板的數目越高，則釋出的生長因子也相對越多。Table 2 說明了 growth factor level 的增加是與 platelet concentrate 內的血小板數目成正比。

Table 2

Growth Factors (%)		
Mean Increase Over Baseline (n=18)		
Growth Factor	Platelet Count	
	650x 103/ μ l	1300 x 103/ μ l
PDGF-AB	300%	600%
TGF-s	351%	727%
VEGF	180%	428%
EGF	300%	550%

最近的研究結果，更進一步證明，經分段離心之後的血小板量，如不超過一般血液血小板量 (baseline) 之 3.5 倍以上，則所釋出的 growth factors 量，會不足以發揮 control cell migration 和 cell division 的功能。

製備 Platelet concentrate 時需注意之點

如欲使用一般生化實驗室或檢驗室的離心機，來製作 platelet concentrate 時，下列幾點是不得不特別留意的：

1. 實驗室的離心機，一般皆是使用玻璃離心管，這在離心製作 platelet concentrate 是禁忌的，這是因為玻璃製的離心管玻璃表面性質會：

(1) 加速血液凝固

(2) 易使血小板的 function 下降

2. 使用抗凝劑時尤要注意，不可使用 heparin 或 EDTA 之類的抗凝劑，因為這些抗凝劑雖有抗凝結的功用，但不具保護血球的功能。一般是使用 ACD (Anticoagulant Citrate Dextrose) 或 CPD (Citrate Phosphate Dextrose)。
3. 實驗室用離心機固可將血球和血漿分離開，但必須將血漿部分抽取出，另作不同轉速的第二次離心，以分出 PPP 和 PRP，再抽取出 PRP。此步驟難度較高且費時，故使用一般實驗室離心機分離出的 platelet concentrate，血小板數目很不穩定，會因離心機機種，或因人而異，不容易每次皆能達到 Baseline 的 3.5 倍以上。
4. 發表於 1993 年至 1996 年間的四篇論文，分別指出使用 bovine thrombin 可能導致 bovine factor V 和 human factor V 作用，而發生 thrombin time 延長及 clinical postsurgical bleeding⁵⁻⁹，論文發表之時，bovine thrombin 都沒有經過 purification 的特別處理，1997 年之後，由 Jones Pharma, U.S.A 製造的 bovine thrombin 經 chromatographically purification (層析過濾)，目前美國 FDA 是認可使用的。
5. 雖然美國 FDA 認可使用經層析過濾的 bovine thrombin，但畢竟是來自動物的血漿製成的，歐洲與亞洲很多國家仍禁用此種血漿製品。筆者與世界衛生組織顧問，法國知名血漿專家 Dr. Burnouf 經長久一段期間的合作，不斷研發、測試，於今年中已成功製出可以在 8 分鐘內，利用自體的血漿製造出 thrombin 的裝置。現正申請世界專利中，相信不久的將來，可以正式面世加入造福人群的行列。

結論

近年來，生物醫學科技蓬勃發展，人類自體血液內之寶藏—血小板蘊藏之生長因子的發現，給幹細胞的研究帶來了無比的動力，如能善加利用，應用於人體，相信會為人類帶來莫大的福祉。

參考資料

1. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop*. 1991;9(5):641-650.
2. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgess KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone graft. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(6):638-646
3. Marx RE Platelet-Rich Plasma: A Source of Multiple Autologous Growth Factors for Bone Grafts. *Tissue Engineering* Lynch SE Edi. Quintessence, 1999: 71-82,
4. T.Ballock and A.B.Roberts. The role of TGF- β in bone growth and bone repair. "Growth factor" A practical approach. Chap.6 p.85-107 Oxford University press.
5. Rapaport SI, Zivenlin A, Minnow RA, et al. Clinical significance of antibodies to bovine to bovin and human thrombin and factor V after surgical use of bovine thrombin. *Am J Clin Pathol*. 1992;97(1):84-91.
6. Zehnder JL, Leung LLK. Development of antibodies to thrombin factor V with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombin. *Blood*. 1990;76(10): 2011-2016.
7. Nichols WL, Daniels TM, Fisher PK, et al. Antibodies bovine thrombin and cogulation factor V associate with the surgical use of topical bovine thrombin or fibrin "glue": a frequent finding [abstract]. *Blood*. 1993;82:59
8. Christie RJ, Carring L, Alving B. Postoperative bleeding induced by topical bovine thrombin: report of two cases. *Surgery*. 1997;121(6):708-710.
9. R.E. Max. Platelet Concentrate: A strategy for Accelerating and Improving Bone Regeneration. Chap.41 P447-453. 2000 "Bone Engineer-ring". em squared incorporated
10. A. Ryningen and H. Holmsen, Biochemistry of Platelet Activation. "Handbook of Platelet physiology and pharmacology". Gundu H.R. Rao edit. Kluwer Academic publishers, Chap. 9, 1999:188-237
2. Gaston N. King New generative Technologies: Ratioanle and Potential for Periodontal Regenerartion: 2. Growth factors. *Dent Update* 2001: 28:60-65