

脱蛋白骨构建骨组织工程支架的研究现状[△]

杨武斌^{1*},王平^{2#},师彬^{3,4}(1.山东中医药大学药学院,济南 250355;2.山东省中医药研究院,济南 250014;3.山东省医学科学院附属医院,济南 250003;4.中国中医科学院望京医院,北京 100102)

中图分类号 R318.08;R687 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0853-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.30

摘要 目的:为脱蛋白骨用作骨组织工程支架材料及其临床应用提供参考。方法:同时以“脱蛋白骨”或“Deproteinization bone”等为关键词,应用计算机检索中国知网全文期刊数据库、万方数据库、维普中文科技期刊数据库等1997—2013年的有关文献,从脱蛋白骨的生物特性、制备、应用、生物相容性、生物安全性等方面进行系统的综述。结果与结论:脱蛋白骨是对天然骨经过处理制成的衍生材料,常用制备方法有Os-westry骨制作法、Kiel骨制作法、氯仿甲醇磷酸盐过氧化氢乙醇法、过氧化氢-乙醚法等。目前可用于骨缺损的移植修复、诱导血管的发生、促进股骨头的修复等。其具有天然网状孔隙系统类似人体骨组织,具有良好的生物相容性、传导成骨作用和生物安全性,可作为骨组织工程的支架材料。

关键词 脱蛋白骨;骨组织工程;生物相容性;生物安全性;文献综述

随着骨组织工程研究的不断深入,组织工程支架材料的研究重点正逐渐转移到寻找类似人体骨组织的天然结构和性能的材料上来。自体骨移植被认为是修复骨缺损的最佳选择,但其不可避免地会带来一定的并发症,增加手术创伤及患者的痛苦,同时还存在供骨来源等问题,由此促使人们不断探索新的骨移植替代材料。各国学者已就具有生物活性的骨关节缺损替代材料进行了比较深入的研究,其中对脱蛋白骨(Deproproteinized bone, DPB)的研究已日趋成熟,制备这类材料的研究思路主要是对天然骨进行处理制成衍生材料。目前,生物衍生骨材料在国外已有产品问世,如Kiel骨、Os-westry骨、Bio-Oss骨等,并在临床应用中取得了很好的效果^[1]。这类DPB可用于组织工程,治疗股骨头坏死以及修复骨缺损等多种临床疾病,现已成为研究的热点。本文对近年来DPB构建骨组织工程支架的研究综述如下。

1 资料来源与方法

同时以“脱蛋白骨”或“Deproteinization bone”等为关键词,应用计算机检索中国知网全文期刊数据库、万方数据库、维普中文科技期刊数据库和PubMed数据库中1997—2013年的相关文章,共有288篇文献与DPB有关,排除内容重复和缺乏原创性的文献,保留有效文献30篇。从DPB的生物特性、制备、应用、生物相容性、生物安全性等方面对有效文献进行分析。

2 生物特性

细胞外支架材料是构建工程化组织的关键,天然材料由于具有良好的生物相容性等优点一直被重视。骨是一种天然材料,脱蛋白后制成DPB,生物相容性较好,无致瘤性,植入体

[△]基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81273776);山东省科技发展计划(No.2012G0021846);青年科技明星计划专项项目(No.20120142)

*硕士研究生。研究方向:中药药理。E-mail: yangwubinhome@163.com

#通信作者:副研究员,硕士。研究方向:中药药理。E-mail: wangpingjinan@163.com

内可缓慢降解,降解产物无毒性,具有正常骨的三维立体结构,适合细胞生长,其孔径大小适合,利于细胞跨越。但是DPB硬脆性较大,缺乏所需的力学强度^[2]。骨组织工程中所需要的许多载体均为类似于骨小梁的松质骨,而DPB的立体空间结构与正常骨并无大的差别,并且具有羟基磷灰石和胶原融合交错构成的大小不等、相互交通、开放的孔隙和网状支架^[3]。Hamed E等^[4]通过对牛的股骨进行一系列理化处理制成DPB,并对其进行力学性能测定,得出DPB支架材料的理化性质符合理想骨组织工程支架材料的要求。

3 制备

目前常用制备DPB的方法有Os-westry骨制作法、Kiel骨制作法、氯仿甲醇磷酸盐过氧化氢乙醇法(下简称乙醇法)、过氧化氢-乙醚法(下简称乙醚法)等。这4种方法制备的DPB的免疫原性和生物力学性能不同:以Os-westry骨制作法制作的DPB生物相容性最好,但力学性能最差;乙醇法制作的DPB力学性能好,但炎症反应较重;Kiel骨制作法和乙醚法制作的DPB生物相容性和力学性能都较好^[5-6]。本文重点介绍乙醚法和在上述传统方法的脱蛋白工艺上进行改进后的改良法。

3.1 乙醚法

乙醚法制作的DPB在体外可作为较理想的骨组织工程支架材料,与Os-westry骨制作法和乙醇法制作的DPB相比,乙醚法制作的DPB有更好的机械强度,更适合作为骨移植材料。在乙醚法制作DPB的过程中,主要是乙醚循环脱脂,过氧化氢脱蛋白。此法制成的脱蛋白骨材料,生物相容性较好,但生物力学性能亦随之下降,所以在具体制作工艺中,控制好脱脂和脱蛋白的时间至关重要^[7]。党洪胜等^[8]采用乙醚法制备DPB,观察胎兔成骨细胞在DPB支架上的黏附行为,并对其力学性能进行分析,结果显示成骨细胞在DPB表面及孔隙内表面均可贴附生长,保留其力学性能,有望成为一种骨移植材料。

3.2 改良法

改良法主要是在传统制备方法中的脱蛋白工艺上作了改

进,以尽量保留胶原蛋白,去除非胶原蛋白、肽类、脂类及细胞等,在降低抗原性的同时保留力学强度。DPB作为异体或异种骨,其免疫原性难以彻底消除。改良法采用不同理化方法处理制作的生物衍生骨材料DPB,其免疫原性进一步降低,而且表面的胶原纤维暴露更有利于细胞的早期黏附^[9]。刘日光等^[10]制作的DPB是在结合Os-westry骨制作法与乙醇法的基础上加以改进,采用冻干技术去抗原,用盐酸进行表面脱钙,使其抗原性明显减弱或消除,从而使DPB具有良好的生物相容性,进而达到修复骨缺损的目的。简月奎等^[11]通过实验组采用改良法制备DPB,减少过氧化氢的作用时间,针对性地加入蛋白酶进行脱蛋白。用实验组与自体骨组修复山羊的长骨缺损,结果实验组与自体骨组的作用相当,可作为骨移植材料应用于临床。

4 应用

DPB具有天然的密集微孔系统,与软材料相比有更好的机械强度,更适合作为理想的骨移植材料^[12]。DPB十分接近人体正常骨网状结构,是骨发生细胞附着的有效三维支架,其不但可促进成骨细胞的分化和胞外基质的合成,而且易为受体破骨细胞接近清除,从而诱导骨的发生^[13]。在骨组织工程研究中DPB能够作为细胞移植与引导新骨生长的支架材料^[14]。

4.1 骨缺损的移植修复

组织工程骨的构建是骨组织工程技术中的关键环节,其构建形式主要分体内构建和体外构建。体内构建是将种子细胞和支架材料复合后即刻植入体内,体外构建则是将种子细胞与支架材料在体外复合培养,形成一种活的组织材料,再移植入体内。为使异种骨能较好地被受体所接受,采用免疫原性较低的DPB,从而使异种骨具有良好的生物相容性,进而达到修复骨缺损的目的。有研究表明,DPB可作为支架适用于大段长骨缺损的修复^[15-16]。Zhu XQ等^[17]采用酸性成纤维细胞因子复合DPB修复兔的早期股骨头坏死,结果骨小梁交界处有大量成骨细胞,同时存在少量破骨细胞可能参与骨塑形,骨陷窝可见成熟骨细胞。因此DPB移植具有引导骨再生的效果^[18]。

4.2 诱导血管的发生,促进股骨头的修复

DPB的密集微孔系统,极有利于新生毛细血管的长入与间质细胞的迁入,从而诱导骨的发生,可以修复股骨头缺血性坏死。有研究用DPB-血管内皮生长因子(VEGF)复合物植入兔的坏死股骨头能诱导血管的发生,促进早期坏死股骨头的修复,并且与现有的治疗方法进行比较,显示DPB-VEGF复合物可增加骨形成,促进股骨头缺血性坏死的修复^[19]。还有酸性成纤维细胞因子(Acidic fibroblast growth factor, AFGF)复合部分DPB(Partially deproteinised bone, PDPB)对实验动物早期股骨头缺血性坏死血管再生也具有良好的促进作用^[20-21]。龚跃昆等^[22]采用碱性成纤维细胞生长因子复合DPB对新西兰兔的股骨头缺损进行修复,病理学观察及图像分析显示,8周左右股骨头缺损区的组织血管生成明显。所以,DPB治疗股骨头坏死方面还是具备一定的潜能和优势的,可达到移植体与受体早期骨性愈合,最终成为受体自身组织。

5 生物相容性

在组织工程研究中,生物相容性是衡量所选择材料是否

适合用作细胞外基质材料的主要标准之一。研究发现,不同方法处理后的同种异体骨的免疫原性与骨诱导能力有所不同,新鲜骨、骨基质明胶和脱钙骨基质进行同种异体移植时均可诱发一定程度的免疫排斥反应,其免疫原性与骨诱导能力呈负相关^[23]。研究骨移植材料生物相容性常用的方法是体外细胞培养法,且材料与细胞体外复合培养可直接观察细胞与生物材料复合生长的情况,利于了解细胞与材料相互作用的生物学反应,有助于组织工程支架材料的挑选。陈长青等^[24]研究了DPB复合皮质骨来源成骨细胞修复兔桡骨临界骨缺损的效果,结果DPB复合皮质骨来源成骨细胞可以高效修复兔桡骨临界骨缺损,可作为理想的修复骨缺损的骨组织工程支架材料。

曹凯等^[25]采用乙醚法制作的DPB支架材料,成骨细胞与DPB支架材料体外复合培养后第7天可见连接成片生长的成骨细胞,成骨细胞在DPB支架材料上能有效地黏附、增殖生长,DPB与成骨细胞有良好的生物相容性。Han X等^[26]将骨髓间充质干细胞和部分脱蛋白骨在体外进行组织工程骨移植,结果骨髓间充质干细胞接种密度为 $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 时在DPB外表面及孔隙内表面均可黏附生长,增殖、分化良好。

6 生物安全性

由于骨组织新材料不断涌现,材料植入体内的部位及使用目的日趋繁杂,材料毒性作用的强弱以及材料与机体反应的复杂性等因素,决定了生物材料本身的生物安全性至关重要。Liu L等^[27]通过急性和亚急性毒性试验、溶血试验、热原试验、皮内试验、肌肉植入试验、细胞毒性试验评价了DPB的生物安全性,结果表明DPB无明显毒性、溶血、致热作用,也未见产生皮肤红肿现象、肌肉植入后炎症反应及细胞毒作用。孙革等^[28]制作的DPB,对其结构、组成及生物安全性进行分析,发现其免疫原性较弱、毒性低,人骨髓间充质干细胞接种于载体后生长分化良好。由此可见,DPB具有良好的生物安全性,符合组织工程支架材料的需求。

7 结语

DPB作为细胞和因子的载体,一直是骨组织工程研究的重点,由于DPB保留了原始骨组织的天然密集微孔网架结构,在理化特性上与正常骨基本一致而受到高度重视。DPB的免疫原性虽然较弱,但本身还存在力学强度低、成骨能力差和潜在的免疫原性等缺点,限制了其临床上的应用。有必要对DPB的制作方法进行改进以获得低免疫原性、高强度和高成骨能力的DPB材料,满足临床的需要。采用生物酶或温和的脱蛋白剂替代强氧化剂处理异种骨基质,在去除或减小免疫原性的同时,可同时保持天然骨的骨矿成分和部分有机胶原结构,以增加移植骨的整体力学强度,并保留适当的成骨性能。近年来,基于组织工程学、材料科学和分子生物学等多学科、多领域的交叉融合,DPB构建的骨组织工程支架得到快速发展。如何优化设计,实现骨移植材料的快速整合,是需解决的首要问题。骨移植材料发展的方向将是大幅提高理化修饰水平,致力于实现生物仿生化、特性优化、降解-再生同步化^[29-30]。

参考文献

- [1] Long B, Dan L, Jian L, *et al.* Evaluation of a novel reconstituted bone xenograft using processed bovine cancellous

- bone in combination with purified bovine bone morphogenetic protein[J]. *Xenotransplantation*, 2012, 19(2): 122.
- [2] 石玲玲, 丁真奇, 康两期, 等. 异种脱蛋白皮质骨管复合组织工程骨修复大段骨缺损的实验研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2010, 25(9): 800.
- [3] 张立峰, 李琪佳. 骨基质载体材料的生物学特点及其临床应用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(34): 6 397.
- [4] Hamed E, Novitskaya E, Li J, *et al*. Elastic moduli of untreated, demineralized and deproteinized cortical bone: validation of a theoretical model of bone as an interpenetrating composite material[J]. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8(3): 1 080.
- [5] Tadjoedin ES, de Lange GL, Bronckers AL, *et al*. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases[J]. *J Clin Periodontol*, 2003, 30(3): 261.
- [6] Torroni A. Engineered bone grafts and bone flaps for maxillofacial defects: state of the art[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2009, 67(5): 1 121.
- [7] 曹凯, 舒勇, 韩智敏, 等. 过氧化氢-乙醚法制备脱蛋白骨的理化性质研究[J]. 江西医学院学报, 2008, 48(1): 5.
- [8] 党洪胜, 赵猛, 严永祥, 等. 胎兔成骨细胞与复合肝细胞生长因子/异种脱蛋白松质骨的体外培养[J]. 中南大学学报: 医学版, 2007, 33(4): 359.
- [9] 简月奎, 田晓滨, 赵筑川, 等. 改良法制备异种脱蛋白骨复合重组人骨形态发生蛋白支架材料修复长骨大段骨缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(27): 5 219.
- [10] 刘日光, 杨述华, 尹培荣, 等. 自制脱蛋白骨与骨髓基质细胞的生物相容性研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6(11): 1 265.
- [11] 简月奎, 田晓滨, 赵筑川, 等. 异种脱蛋白骨修复长骨大段骨缺损实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(18): 1 746.
- [12] 陈长青, 尹小锋, 练克俭, 等. 成骨细胞复合异种脱蛋白骨进行腰椎后外侧融合[J]. 脊柱外科杂志, 2011, 9(1): 51.
- [13] Jensen T, Schou S, Svendsen PA, *et al*. Volumetric changes of the graft after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios: a radiographic study in minipigs[J]. *Clinical Oral Implants Research*, 2012, 23(8): 902.
- [14] 刘顺振, 侯玉东. 骨组织工程支架材料的研究进展及临床应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(42): 7 911.
- [15] Jian YK, Tian XB, Li B, *et al*. Properties of deproteinized bone for reparation of big segmental defect in long bone [J]. *Chin J Traumatol*, 2008, 11(3): 152.
- [16] Kim SH, Song JE, Lee D, *et al*. Demineralized bone particle impregnated poly (l-lactide-co-glycolide) scaffold for application in tissue-engineered intervertebral discs[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2012, 23(17): 2 153.
- [17] Zhu XQ, Guo H, Ge BF. Acidic fibroblast growth factor combined with partially deproteinized bone in repair of early-stage avascular necrosis of the femoral head in rabbits[J]. *J Clin Rehab Tis Engi Res*, 2011, 15(4): 757.
- [18] Hänseler P, Jung UW, Jung RE, *et al*. Analysis of hydrolyzable polyethylene glycol hydrogels and deproteinized bone mineral as delivery systems for glycosylated and non-glycosylated bone morphogenetic protein-2[J]. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8(1): 116.
- [19] Cao K, Huang W, An H, *et al*. Deproteinized bone with VEGF gene transfer to facilitate the repair of early avascular necrosis of femoral head of rabbit[J]. *Chin J Traumatol*, 2009, 12(5): 269.
- [20] 李晓辉, 龚跃昆, 宋跃明, 等. 碱性成纤维细胞生长因子复合部分脱蛋白骨增强兔股骨头骨缺损修复作用的研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2005, 19(3): 183.
- [21] 常宏, 蒋绍艳, 史玉朋, 等. 丹参注射液诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的研究[J]. 中国药房, 2008, 19(30): 2 323.
- [22] 龚跃昆, 李晓辉, 李世和, 等. bFGF/PDPB 促进兔股骨头缺损再血管化的实验研究[J]. 云南医药, 2003, 24(6): 435.
- [23] 缪旭东, 裴国献, 闫乔生, 等. 同种异体脱蛋白骨复合纤维蛋白胶体内构建骨组织工程骨[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(16): 2 869.
- [24] 陈长青, 程高建, 练克俭, 等. 异种脱蛋白骨复合成骨细胞修复兔桡骨骨缺损的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(4): 732.
- [25] 曹凯, 范伟, 安洪, 等. 脱蛋白骨为支架材料的体外细胞相容性特点[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(35): 6 938.
- [26] Han X, Liu L, Wang F, *et al*. Reconstruction of tissue-engineered bone with bone marrow mesenchymal stem cells and partially deproteinized bone in vitro[J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36(11): 1 049.
- [27] Liu L, Tang KL, Yang L, *et al*. Study of biological safety of scaffold material with heterologous deproteinized bone [J]. *Chin J Traumatol*, 2006, 9(4): 234.
- [28] 孙革, 高春阳, 周斌. 异种脱蛋白松质骨作为支架材料的性能分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(29): 5 719.
- [29] 宋会平, 王志强. 骨移植的过去、现在和未来[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(5): 513.
- [30] Zhang ZY, Huang AW, Fan JJ, *et al*. The potential use of allogeneic platelet-rich plasma for large bone defect treatment: immunogenicity and defect healing efficacy[J]. *Cell Transplantation*, 2013, 22(1): 175.

(收稿日期: 2013-06-19 修回日期: 2013-09-02)