

• 专题研究 •

骨组织工程的研究现状与展望

崔福斋 廖素三 张伟 冯庆玲

[关键词] 骨组织工程;信号分子;仿生;综述

中图分类号:R318.17 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2002)05-0279-04

自 19 世纪以来,骨移植术一直致力于修复由于创伤、肿瘤、感染所造成的大范围骨缺损,以恢复肢体功能。自体骨移植是目前最常采用的疗法,但供体的有限性限制了其应用,而且增加了患者的痛苦。异体骨不存在供体缺乏的问题,但具有抗原性,特别是在植体较大时,常因剧烈的免疫排斥反应导致植入失败。目前,临床上也在广泛使用各种以金属、陶瓷或高分子制造的人工骨替代材料,但这些材料在生物相容性、生物活性、生物可降解性及与宿主骨的力学匹配性、使用寿命等方面都有各自的缺点。更重要的是,无论是可实现骨整合的钛植体,还是能与骨实现化学键合的生物活性材料,都是基于“爬行替代”的机制实现新骨的生长,成骨量有限,在大范围缺损的情况下,成骨往往仅限于植体边缘区域,难以实现缺损的修复和再生。迄今为止,大范围骨缺损的医治仍未有效解决。

1 骨组织工程概况

融汇材料科学、生物技术和生命科学的最新进展而诞生的新兴交叉学科——组织工程^[1],为解决众多临床医学难题提供了希望。一般来说,骨组织工程包含 3 个关键要素:信号分子(骨生长因子、骨诱导因子)、基体材料、靶细胞。基体材料一方面作为信号分子或细胞的载体,将其运送至缺损位置,另一方面提供新骨生长的支架。骨诱导因子的靶细胞通常指血管周围游走的、未分化的间充质细胞,其具有多向分化的特性,在骨诱导因子的作用下,将不可逆的向软骨细胞、骨细胞的方向分化,满足修复大范围缺损的需要。骨生长因子则可以刺激成骨性细胞的有丝分裂,形成大量新骨。这种成骨的方式称为“诱导成骨”。骨组织工程的基本出发点是以“诱导成骨”的方式而不是单纯以“爬行替代”的方式实现骨的修复和再生。利用骨组织工程的原理与技术诱导成骨性细胞的分化与增殖,并生成活体骨组织用于骨的修复和再生,有望促进外科修复大范围骨缺损的进步。近几年来,骨组织工程的应用研究已经在矫形外科、口腔外科及颅面外科等多

个领域蓬勃展开^[2]。组织工程骨有望成为最早实现的组织工程产品^[3,4]。

2 基体材料

1972 年,Reddi 等人完成了一个很重要的实验,他们发现从脱钙骨基质中提取的具有骨诱导能力,但本身失活的信号分子必须与适当的载体材料重组才可以恢复骨诱导活性。他们采用的载体材料是胶原性骨基质,其主要成分为交联的 I 型胶原^[5]。1984 年,Urist 等人采用 β -磷酸三钙作为诱导因子的载体植入肌肉,发现新骨产量比单纯植入诱导因子高出 12 倍^[6]。这些实验揭示了基体材料对于信号分子作用的高效发挥具有重要影响。

目前对于基体材料的研究从人工或天然材料,发展到复合材料,发挥各自的长处,在实现细胞载体的前提下提高信号分子的有效性。

人工合成的聚合物基体材料有聚交酯(聚左旋乙交酯及乙交酯和丙交酯的共聚物)、PEO/PBT 共聚物,目前已经通过美国 FDA 的批准,许可作为植入物。载体材料多为多孔框架,而不是目前使用的可降解的骨固定物、手术缝合线。通过调整分子量、选择不同聚合方式及成型手段可以调节并控制材料的力学性能、降解速度,以满足不同的临床要求。聚交酯类骨折内固定材料目前国外已有商品,但其强度有限,还只能用于非承重骨。Ishaug 等从 1996 年开始研究作为多孔框架的基体材料与成骨性细胞的结合状况,因为其疏水性的表面不太利于细胞贴壁,必须在表面改性后,成骨细胞才能在三维的框架进行正常的贴壁和生长^[7]。

以羟基磷灰石(hydroxylapatite, HA)为代表的磷酸钙盐陶瓷是广泛应用的骨替代材料之一^[8,9],它们都具有优异的骨传导性能,可不同程度地整合入宿主骨。HA 对骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)具有较强的亲和性,采用吸附了 BMP 的多孔 HA,植入成年狒狒的颅盖骨缺损部位,可迅速诱导骨的分化形成^[10]。HA 的弱点在于脆性较大,而且纯 HA 不易被吸收,这限制了其在承重部位的应用,目前主要用于颅面外科及牙科等领域。

天然的基体材料有去抗原的天然异种骨、珊瑚和胶原。异种骨来源广泛,但移植后会发生剧烈的免疫

作者单位:100084 北京市,清华大学材料科学与工程研究院生物材料室。作者简介:崔福斋(1947-),男,教授,研究方向为生物材料与组织工程。

排斥反应。采用化学处理方法去除异种骨中致抗原的组元,而保留抗原性极微甚至无抗原性的胶原基质和骨矿,同时最大限度地保持骨矿的微结构特征,可以获得良好的骨组织工程基体材料。对牛松质骨进行处理得到的无抗原性支架,保持了天然的多孔结构、骨矿和部分胶原基质。然后与从牛皮质骨中提取并纯化的 BMP 复合,制成的重组异种骨显示了较高的骨诱导能力^[11]。

理想的骨组织工程材料应当满足下述几个要求:植入体内不引起免疫排斥反应,手术中易于修整,在必要时材料本身可提供机械支持,植入物应能以相对较低剂量的诱导因子引起最优的成骨活动,可促使血管及间充质细胞迅速侵入材料并与吸附在其上的诱导因子接触。此外,在新骨的生长过程中,材料应逐渐被改建和吸收,最终从植入部位消失。

3 骨组织工程材料的仿生设计与制备

骨是具有复杂分级结构的天然生物复合材料,其组元经过精巧的组装而获得优异的性能。在研究了包括骨在内多种生物硬组织的成分、结构及性能的基础上,人们对生物矿化过程有了一些认识。利用其中所包含的基本原理,材料科学家们已经开始以仿生策略设计与制造具有优异性能的结构和功能材料。对骨来说,其强度和韧性最佳匹配的综合力学性能,与有机和无机组元的微结构特征及在分子水平上的独特组装密不可分。骨中的有机基质模板 I 型胶原,限定了矿物晶体形核的位置和生长空间,而含量极微的某些非胶原性蛋白如骨涎蛋白则可作为形核的引物并规范矿物的取向^[12],这使得骨中具有磷灰石结构的矿物相晶体大部分处在原胶原分子的间隙区,尺寸在纳米量级,晶体 c 轴择优取向平行于胶原纤维。骨中各组元的形成及组装是在细胞的调控下完成的,而这些组元及由它们构成的复杂结构反过来又会影响细胞的活动和功能。模仿天然骨的成分及结构特征制造的骨替代材料,可为细胞提供与天然骨相类似的微环境,因而有望成为优异的骨组织工程载体材料^[12]。

纳米相 HA 和胶原的复合材料(nano hydroxylapatite / collagen, nHAC)正是基于仿生的观念制成的骨替代材料^[13-15]。本实验组采用提纯并去抗原的 I 型胶原为模板,在钙-磷盐溶液中调制矿化而获得的复合材料,矿物相为含有碳酸根的 HA,晶粒度低,晶体尺寸在纳米量级,且与胶原自组装为仿天然骨的分级结构。体外细胞培养实验证明,材料具有生物降解性。小鼠腹腔巨噬细胞介导的过程包括吞噬和胞外降解机制,这些单核吞噬细胞可在材料表面造成吸收陷窝,并表现出类似破骨细胞的某些形貌特征,如在细胞与材料接触的表面出现了类似刷状缘的结构,这些现象表明

材料的特定结构影响了细胞的功能。将材料植入兔股骨骨髓腔中,材料表面有新骨形成,同时材料逐渐被吸收。这种复合材料应用于骨组织工程的初步结果令人满意。作为 BMP 的载体,植入 15 mm 兔尺骨节段性缺损,经 2 个半月,缺损愈合并且新骨改建成板层骨;作为细胞的载体,利用组织培养技术,可得到具有三维多孔结构的成骨细胞-nHAC 复合体,成骨细胞贴附于矿化的胶原基质上并合成纤维状细胞外基质。胶原基的复合材料是目前研究的热点,因为胶原分子的模板功能对天然生物矿化有重要的作用。

1989 年,Okazaki 等制成成分与结晶度同骨矿相似的碳酸磷灰石,与胶原溶液混合并经紫外线照射处理使胶原交联制成复合材料,在大鼠皮下植入实验中显示了良好的生物相容性^[16]。1991 年和 1993 年,Czernuszka 的研究组采用脱钙骨基质或 I 型胶原为模板在过饱和磷酸钙溶液中诱发晶体生长,获得多孔 HA-胶原或 DCPD-胶原复合材料,其中矿物相的重量百分比为 9.1%—13.1%,矿化后胶原基质的拉伸强度可增加 40%^[17,18]。1993 年,Hirota 等将胶原溶液、磷酸和氢氧化钙悬浊液混合并将沉淀物在 200 MPa, 40°C 的条件下加工制成 HA-胶原复合材料,表观密度为 1.75 g/cm³,具有良好的可切削性,但强度较低,压缩强度仅为 6.5 MPa,杨氏模量为 2 GPa^[19]。1994 年和 1995 年,Brown 等利用 CaHPO₄ 和 Ca₄(PO₄)₂O 之间的水泥型反应在明胶或胶原存在下合成出 HA-明胶或 HA-胶原复合材料,并证明反应过程中的 pH 变化、放热及离子强度变化均在生理范围内,研究者认为这些材料作为骨水泥是可行的^[20,21]。1996 年,Doi 等报道,将胶原基质交替在碱性磷酸酶和卵黄高磷蛋白溶液与 β -甘油磷酸钙溶液中孵育,使得矿物相沉积于胶原纤维上,2—4 周后得到磷灰石-胶原复合材料,在大鼠皮下植入实验中显示了良好的相容性和可降解性^[22]。1997 年,Scotchford 等制备了胶原-PVA 复合材料薄膜,通过细胞试验证明其具有良好的生物相容性^[23]。1998 年,Wang 等将 HA 与胶原制成微球,与成骨细胞共同培养,发现采用仿生比例 65:35 的 HA 和胶原制成的微球可以作为骨缺损的填料^[24]。2000 年,Gibson 研究了成纤维细胞在胶原/粘多糖多孔框架里的对微拉力(nN)的反应,模拟伤口愈合与缺损修复的实际情况^[25]。Hartgerink 等通过研究多肽自组装的纳米纤维的矿化行为,得到类似的有择优取向的周期结构^[26],以此来突破传统的成分仿生的材料,为制备更加理想的组织工程材料打下了坚实的基础。

4 信号分子和靶细胞

具有骨诱导能力的信号分子是称为骨形态发生蛋白(BMP)的一族蛋白质^[26-29],而它们又是另一超家族

——生长和分化因子的成员。这个生长和分化因子的超家族包括激活靶和抑制靶、转移生长因子 β (TGF- β)、生长和分化因子以及软骨衍生性形态发生蛋白^[30-31]。BMP 家族的成员对细胞的迁移、增殖、分化和基质合成具有多种作用。迄今为止,已经克隆出 13 种 BMP 的序列。大量动物模型的实验表明,基因重组的人 BMP-2 至 BMP-8(其中 BMP-7 和 BMP-8 又分别称为 OP-1 和 OP-2),与胶原性基质结合后均能诱导异位成骨。诱导形成的小骨片外部为皮质,内部为小梁骨及骨髓,组织反应过程与胚胎骨的发育很类似^[32]。目前,大量的研究工作对于天然及重组的人 BMP 修复骨缺损的有效性和安全性已经提供了充分的证据。对基因重组的人 BMP,国外已能够批量化生产。信号分子需要与适宜的基体材料复合,运输至骨缺损部位,在局部范围内发生作用,通过诸如缓慢释放等机制而发挥最优效能。这里,载体材料具有重要的意义。

目前所研究的信号分子多为重组的人骨形态发生蛋白(rhBMP-2)和重组的人转移生长因子 β (rhTGF- β_2)。细胞培养基本上采用骨髓基质干细胞或由其发展而成的成骨细胞系。而对于传统的静态培养技术的改进是采用了动态培养系统,来实现较大尺寸的载体材料与细胞的组合^[33]。Qiu 等人采用特制的旋转式培养器,在适宜转速下,使骨髓细胞在粒径为 300—350 μm 的生物活性玻璃微粒表面上生长,并向成骨细胞方向分化。Widmer 等人则用注射的方法,将成骨细胞悬液注入柱状多孔 PLGA 植体,研究表明细胞均匀分布于三维支架中,存活状态良好^[34]。最后值得一提的是 Lieberman 等人的工作,他们将基因疗法与骨组织工程结合,利用转基因技术使一种鼠基质细胞系具有了分泌 rhBMP-2 的能力,然后使细胞与 PLGA-HAP 复合载体材料组装,并在肌袋模型实验中观察到了异位成骨^[35]。

5 展望

骨移植的临床应用广泛分布于矫形、口腔及颅面外科等多个领域,在应用数量上骨移植已经成为仅次于输血的人体组织移植。据美国的统计,其国内每年涉及骨置换的外科治疗超过 100 万人次。我国的这一数字估计也在数 10 万以上,而且,随着人们生活水平的提高和保健意识的增强,这一数字还将逐年增加。因此,骨组织工程未来的临床应用前景是极为广阔的,相关产品也将具有可观的市场需求。

骨组织工程未来仍将从 3 个方面不断深入。

首先,在诱导因子的基础研究领域尚有一些问题需要解决。目前,大量实验已证明重组的人 BMP-2、BMP-4 和 OP-1(BMP-7)均能单独诱发异位软骨内成骨。但若干研究表明,在骨骼发育过程中,BMP 家族

的不同成员作用于骨骼的不同部位。例如,缺少生物活性 BMP-5 的基因突变鼠表现出颅骨较大、胸骨畸形、缺少第 13 根肋骨以及缺少侧向的椎突等症状^[36]。这说明,临床医疗实践必须组合使用多种 BMP 因子。今后的工作应当对 BMP 家族各成员的结构与活性的关系进行深入探索,对不同 BMP 分子的组合效果进行细致考察。而将基因重组技术引入不但可以实现生长因子的批量生产,还可以用来达成生长因子有效缓释的技术,用组织工程的方法来治疗基因缺陷导致的疾病。

其次,寻找适宜的基体材料及探索信号分子、细胞和载体的组装模式,在今后较长时间内仍将是极为活跃的研究内容^[37]。单纯的注射模式效率低,达不到修复大范围缺损的目的。具体对于基体材料而言,还要注重载体力学性能与降解速度的匹配,及对载体结构的设计和表面修饰,以期提高生物活性的研究。

最后,在细胞试验、低等动物实验的基础上,应逐步采用与人类亲缘关系较近的灵长目动物进行实验,为大规模的临床实验准备条件。

[参考文献]

- [1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering [J]. Science, 1993, 260:920—926.
- [2] Stock UA, Vacanti JP. Tissue Engineering: Current State and Prospects [J]. Ann Rev Med, 2001, 52:443—451.
- [3] Kiberstis P, Smith O, Norman C. Bone health in the balance [J]. Science, 2000, 289:1497.
- [4] Robert F. Tissue engineers build new bone [J]. Science, 2000, 289:1498—1500.
- [5] Reddi AH, Huggins CB. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1972, 69:1601—1605.
- [6] Urist MR. Bone: Formation by autoinduction [J]. Science, 1965, 150:893—899.
- [7] Ishaug SL, et al. Osteoblast migration on poly(α -hydroxy esters) [J]. Biotech Bioeng, 1996, 50:443—451.
- [8] Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics [J]. Clin Orthop Rel Res, 1981, 157:259—278.
- [9] Hench LL, Wilson J. Surface-active biomaterials [J]. Science, 1984, 226:630—636.
- [10] Ripamonti U, Duneas N. Tissue engineering of bone by osteoinductive biomaterials [J]. MRS Bulletin, 1996, 21(11):36—39.
- [11] 刘玮, 胡蕴玉, 陆裕朴, 等. 重组异种骨的研制及其生物活性分析 [J]. 中华医学杂志, 1991, 71(7):378—380.
- [12] 崔福斋, 冯庆玲. 生物材料学 [M]. 北京: 科学出版社, 1996. 87—96.
- [13] Du C, Cui FZ, Feng QL, et al. Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity

- [J]. J Biomed Mater Res, 1998, 42: 540—548.
- [14] Du C, Cui FZ, Zhang W, et al. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 50: 518—527.
- [15] Du C, Cui FZ, Zhu XD, et al. Three-dimensional nano HAP/collagen matrix loading osteogenic cells in organ culture [J]. J Biomed Mater Res, 1999, 44: 407—415.
- [16] Okazaki M, Ohmae H, Hino T. Insolubilization of apatite collagen composites by UV irradiation[J]. Biomaterials, 1989, 10: 564—568.
- [17] Mathers NJ, Czernuszka JT. Growth of hydroxyapatite on type I collagen[J]. J Mater Sci Lett, 1991, 10: 992—993.
- [18] Clarke KL, Graves SE, Wong AT-C, et al. Investigation into the formation and mechanical properties of a bioactive material based on collagen and calcium phosphate [J]. J Mater Sci Mater Med, 1993, 4: 107—110.
- [19] Hirota K, Nishihara K, Tanaka H. Pressure sintering of apatite collagen composite [J]. Biomed Mater Eng, 1993, 3: 147—151.
- [20] Ten Huisen KS, Brown PW. The formation of hydroxyapatite gelatin composites at 38° C [J]. J Biomed Mater Res, 1994, 28: 27—33.
- [21] Ten Huisen KS, Martin RI, Klimkiewicz M, et al. Formation and properties of a synthetic bone composite: hydroxyapatite-collagen [J]. J Biomed Mater Res, 1995, 29: 803—810.
- [22] Doi Y, Horiguchi T, Moriwaki Y, et al. Formation of apatite-collagen complexes[J]. J Biomed Mater Res, 1996, 31: 43—49.
- [23] Scotchford CA, Cascone MG, Downes S, et al. Osteoblast responses to collagen-PVA bioartificial polymers in vitro: the effects of crosslinking method and collagen content[J]. Biomaterials, 1998, 19: 1—11.
- [24] Hsu FY, Chueh SC, Wang YJ. Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth [J]. Biomaterials, 1999, 20: 1931—1936.
- [25] Freyman TM, Yannas IV, Yokoo R, et al. Fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix[J]. Biomaterials, 2001, 22: 2883—2891.
- [26] Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SM. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers[J]. Science, 2001, 294: 1684—1687.
- [27] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities[J]. Science, 1988, 242: 1526—1534.
- [28] Luyten PF, Cunningham NS, Ma S, et al. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein differentiating bone differentiation[J]. J Biol Chem, 1989, 264: 13377—13380.
- [29] Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. Identification of transforming growth factor β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 9843—9847.
- [30] Ozkaynak E, Schneegelsberg PNJ, Jin DF, et al. Osteogenic protein-2: A new member of the transforming growth factor β superfamily expressed in early embryogenesis[J]. J Biol Chem, 1992, 267: 25220—25227.
- [31] Reddi AH. Bone and cartilage differentiation[J]. Curr Opin Genet Dev, 1994, 4: 737—744.
- [32] Pulpura S, Kohn J. Trends in the development of biodegradable polymers for medical applications[J]. J Biomater Appl, 1992, 6: 216—250.
- [33] Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Culture of organized cell communities[J]. Adv Drug Delivery Rev, 1998, 33: 15—30.
- [34] Marchant RE. New Orleans: Trans of 23rd Annual Meeting of the Society For Biomaterials[C], 1997.
- [35] Laurencin CT, Attawia MA, Lu LQ, et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration[J]. Biomaterials, 2001, 22: 1271—1277.
- [36] Kierkerherd CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins[J]. Adv Drug Delivery Rev, 2000, 43: 65—92.
- [37] Vacanti CA. The impact of biomaterials research on tissue engineering[J]. MRS Bulletin, 2001, 26: 798—799.