

# 骨组织工程天然衍生细胞外基质材料\*

何创龙\*\* 王远亮 杨立华 张 军 夏烈文

(重庆大学生物工程学院教育部生物力学与组织工程重点实验室 重庆 400044)

**摘要** 细胞外基质材料的开发是骨组织工程的重要组成部分,目前,在骨组织工程中应用较多的基质材料可分为天然衍生材料、人工合成材料以及这两种材料的复合材料。介绍了各种天然衍生骨材料如煅烧骨、脱钙骨基质、脱蛋白骨基质、重组异种骨基质和天然高分子材料如胶原、纤维蛋白、几丁质、藻酸盐及其衍生物以及珊瑚衍生骨在骨组织工程中的应用,展望了骨组织工程细胞外基质材料的未来发展方向,认为未来的理想基质材料应该是集各种材料的优点于一身,能够充分适应体内各种生理环境并能采用智能化的加工方式进行大批量生产的生物仿生材料。

**关键词** 骨组织工程 细胞外基质材料 天然骨衍生材料 天然高分子 珊瑚骨

骨缺损是临床上一直困扰人们的重要课题,几个世纪以来,人们尝试了各种不同的修复材料,利用组织工程学原理解决临床骨折、骨缺损及关节融合等治疗问题已成为骨科研究的一个热点,其中,寻找理想的细胞外基质材料或载体材料是组织工程顺利发展的关键。

理想的基质材料应达到以下要求:良好的生物相容性和生物降解性;无免疫原性或低免疫原性;具有骨传导性和骨诱导性;有一定的机械耐受性,可对抗外力,并在骨缺损区起支架作用;易于塑形,可根据需要加工成各种形状和大小,植入体内后的一定时间内仍可保持其形状,从而使新形成的组织具有一定的外形;具有良好的三维结构和高孔隙率,有利于细胞和各种生长因子的植入和黏附<sup>[1]</sup>。

目前,用于骨组织工程的基质材料主要包括人工合成材料、天然衍生材料和复合材料。人工材料包括无机材料和高分子材料,天然衍生材料包括天然骨衍生材料和天然高分子材料以及天然珊瑚骨衍生材料,本文主要介绍天然衍生材料在骨组织工程中的应用和特点。

## 1 天然骨衍生材料

天然骨具有优异的性能,其中动物骨来源丰富、

价格低廉,应用各种处理技术制作的同种异体或异种骨可作为骨组织工程的基质材料,如煅烧骨、脱钙骨或脱矿骨基质、脱蛋白骨、重组异种骨等。这些材料经高温煅烧、冻干、脱脂、脱蛋白和脱钙等处理后,抗原性大大降低,同时保留其特有的天然网状结构和骨矿支架,有利于细胞黏附、分化和成骨,其无机成分主要是羟基磷灰石,与人骨的天然成分相同,因而具有较好的生物相容性。不同种属的动物之间的骨组织结构具有高度同源性,使得异种骨植入后,很容易被宿主骨细胞取代而降解,可满足骨组织工程对基质材料生物降解性的要求。

用来作为异种骨基质材料的动物骨主要有牛骨、猪骨、鹿骨、绵羊骨等,其中猪骨和牛骨原料易得,是研究最多的异种骨材料,尤其是牛骨的尺寸和力学性能更符合移植骨的要求。

### 1.1 煅烧骨

煅烧骨(sintered bone)是多孔状的白色材料,主要成分是高纯度的羟基磷灰石(HA),钙磷原子数量比为1:1.67,接近于人骨钙磷比值。微观结构上具有原骨的骨小梁、小梁间隙及骨内管腔系统,并具有一定的孔隙率和孔道结构。由于高温煅烧时去除了胶原等有机成分,所以煅烧骨的力学强度较低,脆性较大,不能承重,只能作为充填材料。虽然具有较强的传导成骨能力,但它不具备诱导成骨功能,临床上通常与胶原或骨形态发生蛋白(BMP)复合,以提高强度或成骨能力。

煅烧骨中的羟基磷灰石与宿主骨的骨矿成分

收稿日期:2003-03-25 修回日期:2003-05-19

\* 国家自然科学基金(30270395, 19872080)和教育部基金资助

\*\* 电子信箱:qcldxhe@163.com

具有类似的晶相结构,其生物活性与煅烧温度成反比,温度越高,物质的结晶度越高,降解率越差。Katoh等<sup>[2]</sup>曾经用1100℃煅烧牛密质骨做载体,发现其很难降解。通过在煅烧时加入其它物质可以改变煅烧骨的晶相结构,提高降解率。Lin等<sup>[3]</sup>将小牛松质骨骨块浸入到不同浓度的焦磷酸钠溶液中,高温烧结时,骨块中的羟基磷灰石与焦磷酸钠反应转变成磷酸三钙( $\beta$ -TCP),通过控制焦磷酸钠溶液的浓度,可以获得不同组成的TCP/HAP两相生物陶瓷,由于 $\beta$ -TCP具有良好的降解率,因而提高了煅烧骨的降解能力和生物活性。

许多学者对煅烧骨加BMP的成骨诱导实验进行了系统研究,董玉峰等<sup>[4]</sup>采用自制天然多孔煅烧骨结合BMP进行了诱导成骨的动物实验研究,发现术后56天骨缺损处已有大量新生骨痂充填修复,术后84天骨皮质成熟,髓腔再通,骨缺损消失,表明活性煅烧骨有良好的骨缺损修复能力。

## 1.2 骨基质材料

骨基质中的有机物主要是胶原纤维,约占有机成分的90%以上,其余为氨基多糖、非胶原蛋白、肽类及脂类,其中包括多种特异性生物活性物质。例如骨连接素(osteonection)、骨钙化素(osteocalcin)、骨形态发生蛋白(BMP)和骨骼连接因子(SCF)等。这些都是促进骨生长所必须的活性物质,因此利用天然骨基质作为骨组织工程基质材料是人们一直追求的目标。

异种骨由于含有很多有机成分,其中很多酸性蛋白具有免疫原性,植入人体后能够诱发免疫排斥反应,因此,去除异种骨的抗原性物质并保留其诱导成骨能力是异种骨研究首要解决的问题。通过脱钙、脱蛋白、深低温冷冻、煮沸、射线辐照等方法均能减小或消除其抗原性。

### 1.2.1 脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)

将异种骨进行酸处理,脱去矿物质后留有非胶原蛋白、骨生长因子及胶原的复合物,即成为脱钙骨基质。它可以制成粉末、颗粒、小块或凝胶等多种形式,均易于塑型。DBM有一定的力学强度,通常在内固定下或与其它材料并用时进行骨缺损修复。由于保留了骨基质中的生物活性蛋白成分,DBM仍然有一定的抗原性。

自从Urist<sup>[5]</sup>在1965年首次提出脱钙骨基质具有成骨诱导能力以来,脱钙骨基质的研究在理论和临床两个方面都获得了广泛的进展。

由于脱钙骨基质中含有骨形态发生蛋白(BMP),它能与骨基质内的胶原紧密结合,可诱导间充质细胞分化为软骨细胞及成骨细胞,最终形成软骨组织和骨组织,所以脱钙骨基质具有较强的诱导成骨能力。不同的临床实验多次证明了这种效果。Russell等<sup>[6]</sup>对21项使用DBM进行骨缺损修复的研究结果进行了评价,证明80%以上的研究都获得了满意的效果。Tiedeman等<sup>[7]</sup>使用DBM加上自体骨髓对39例骨不连、关节损伤和急性骨折的病例进行了研究,发现骨的连接率达77%,排除实验前具有骨不连史的病人,连接率高达90%。

DBM的加工方式对其成骨能力有很大的影响,Cheung等<sup>[8]</sup>对两种产自美国的商业化DBM(Grafton和Orthoblast)的临床效果进行了研究,通过X线摄片和临床评价,发现13例使用Grafton的移植成功率为69%,而15例使用Orthoblast的移植成功率则为100%,主要原因是这两种DBM的骨诱导能力的差异,Grafton是人骨经粉碎、脱钙、水洗和酒精浸泡等处理,最终与甘油混合而形成的胶状体,主要包括一些不溶性的胶原和其它蛋白质;而Orthoblast则由DBM与具有热力学可逆性的泊洛沙姆(poloxamer)结合形成,在温度较低时,泊洛沙姆能溶于水形成溶胶,在体内由于较高的温度能够形成黏性凝胶,有利于DBM和生长因子的缓慢释放,提高了骨的诱导能力。表明在基质材料中引入缓释机制是十分有利的。

1973年,Urist<sup>[9]</sup>对异种脱钙骨进行化学处理,首次制备了异种骨基质明胶(DBG),并研究了DBG的骨诱导机制。1981年Iwata等<sup>[10]</sup>将骨基质明胶用于临床骨缺损的修复。刘纬等<sup>[11]</sup>研究了BMG的免疫原性,认为细胞成分是骨的主要抗原来源,异种骨的抗原性主要存在于骨细胞和哈弗氏管内皮成分上,在脱钙的同时能破坏骨组织的部分免疫原性。

很多学者认为,由于脱钙能将成骨诱导因子释放出来,使脱钙骨能更快地被新骨替代,所以部分脱钙骨比不脱钙骨有更强的骨诱导能力<sup>[12]</sup>。而对异体骨进行脱脂或深低温冷冻干燥,可以除去脂肪、细胞膜脂蛋白等特殊细胞表面抗原,降低其免疫原性,并增强了骨的成骨能力。因此,人们将深低温冷冻处理、脱脂处理和脱钙相结合,提出了使用部分脱钙骨作为骨替代材料的设想。

### 1.2.2 脱蛋白骨基质(deproteinized bone matrix)

早在1937年Orell就首次将脱蛋白骨应用于临床,

该方法称为 Os Purum 法, 将异种骨除去软组织后用 KOH 去结缔组织, 随后用丙酮脱脂, 在盐溶液中脱蛋白。在此后的几十年里, 出现了 Kiel 骨、Oswestry 骨和 Anorganic 骨等多种脱蛋白骨, 在这些处理方法中, 通常使用  $\text{NaClO}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和乙二胺等化学试剂来破坏胶原和其它蛋白质。

胡永康等<sup>[13]</sup>将四种不同的脱蛋白骨植入 Wistar 大鼠的肌袋内, 并进行组织学和力学性能比较, 发现 Kiel 骨具有较好的力学强度和组织相容性, 是较理想的基质材料; 而 Oswestry 骨虽具有较好的组织相容性, 但力学性能较差。丁真奇等<sup>[14]</sup>比较了复合脱蛋白牛松质骨和自体红骨髓移植治疗长骨新鲜骨折的疗效, 认为该方法能够减少手术时间和取骨时产生的并发症。

1.2.3 组合异种骨基质 (constituted bone xenograft, RBX) 脱蛋白骨基质的抗原性很弱, 来源丰富, 具有理想的天然多孔结构。但缺乏诱导成骨的能力。单纯的 BMP、生长因子和胶原等活性物质的结构强度又偏低。若将两类成分复合, 就能够获得既有成骨活性, 又有良好的孔隙结构和力学性能的基质材料。罗卓荆等<sup>[15]</sup>将牛松质骨块经过系统的去抗原处理, 然后将二者重新组合成块形重组异种骨, 修复犬桡骨骨干及骨膜缺损, 术后 6 个月进行组织学和形态学观察, 在新生骨形成、改建、成熟的同时 RBX 被破骨细胞分解、吸收, 最终被新骨所替代, 具有较强的骨再生能力。

## 2 天然高分子衍生材料

天然高分子衍生材料包括胶原 (collagen)、纤维蛋白 (fibrin)、几丁质 (chitin) 和藻酸盐 (alginates) 等。这些聚合物生物相容性好, 具有细胞识别信号, 利于细胞黏附、增殖和分化, 但也存在很多缺点, 如很难进行大规模生产、不同批号的产品质量差异较大、材料的机械强度和降解速度很难控制等。

### 2.1 胶原材料

胶原 (collagen) 是哺乳动物体内结缔组织的主要成分之一, 构成人体 30% 以上的蛋白质, 目前已知的胶原有近 20 种。主要分为五大类, 骨基质中的胶原主要是 I 型胶原。由于有规整的螺旋结构, 胶原的免疫原性较温和。

胶原不仅为细胞提供支持保护作用, 而且与细胞的黏附、生长、表型表达均有密切关系。I 型胶原

还对矿物沉积有重要的诱导作用。人们很早就认识到 I 型胶原在骨基质和骨修复材料方面的巨大潜力, 早在 1956 年 Erhmann 等<sup>[16]</sup>就对细胞和组织移植在胶原和玻璃上的生长行为进行了比较, 认为胶原基质可以调节细胞对激素和生长因子的反应, 促进细胞生长。Lynch 等<sup>[17]</sup>比较了鼠颅骨成骨细胞在 I 型胶原膜和塑料上的增殖、分化和生长情况, 发现 I 型胶原虽然抑制了成骨细胞的增殖, 但却能促进其分化, 加速基质的均匀矿化, 并维持成骨细胞表型。Rocha 等<sup>[18]</sup>用含碱金属和碱土金属的盐溶液处理牛心包膜, 获得了一种荷负电海绵状的胶原基质, 用于修复 Wistar 大鼠胫骨骨折, 证明该胶原材料具有较低的免疫原性和较好的骨传导性能。Fujimura 等<sup>[19]</sup>采用去端肽胶原作为重组人骨形态发生蛋白 (rhBMP-2) 的载体, 植入 Wistar 大鼠的腿部肌肉中, 获得了较好的成骨效果。

很多作者从分子生物学角度研究了 I 型胶原与成骨细胞的结合机理。Mizuno 等<sup>[20, 21]</sup>采用由四周龄 Wistar 大鼠腿骨分离的骨髓干细胞, 分别在 I、II、III 和 V 型胶原凝胶基质中进行体外培养, 随后植入裸鼠皮下, 发现在 I 型胶原存在时骨髓基质细胞可定向分化为成骨细胞, 并最终形成新生骨组织, 而另外三种胶原基质上则未出现类似现象。作者指出 I 型胶原的天冬氨酸-甘氨酸-谷氨酸-丙氨酸 (Asp-Gly-Glu-Ala, DGEA) 多肽序列是一种特异性的细胞黏附域, 能够与成骨细胞膜表面的  $\alpha_2\beta_1$  整合素受体作用, 促进细胞黏附, 介导细胞外信号进入细胞, 激活细胞内外的各种信号传递通路, 影响细胞的分化与生长。采用与整合素  $\alpha$  亚基作用的抗  $\alpha_2$  整合素抗体可以阻断整合素与胶原的黏附, 从而抑制成骨细胞表型的表达。

### 2.2 纤维蛋白

纤维蛋白 (fibrin) 是血液在正常状态下凝固的终产物, 具有抗原性低、降解吸收性好、促进血管化和骨传导等优良特性。在其单体中加入凝血酶可形成具有立体网状结构的纤维蛋白凝胶, 调节凝血酶的含量可以控制凝胶的塑型。纤维蛋白凝胶可通过释放  $\beta$  转化因子和血小板衍生长因子等来促进细胞黏附、增殖并分泌细胞外基质, 其中的纤维蛋白稳定因子 XIII 对附着在网状结构上的间充质干细胞有很强的亲合能力, 能够促进这些细胞的增殖和分化。

1940 年, Young 等<sup>[22]</sup>首次报道了将纤维蛋白用作外周神经修复的缝合材料。随后, 很多学者将其作为实验和临床上各种生长因子和种子细胞的基质材料, 表明纤维蛋白的存在能够吸引宿主间充质细胞向缺损区迁移, 并促进这些细胞的增殖和分化; 其良好的天然网状结构促进了血管增生, 并为未分化的间质细胞迁入和新生血管的长入提供了良好支架, 增加了生长因子和靶细胞的作用面积。Gurevich 等<sup>[23]</sup>采用纤维蛋白可生物降解微珠(FBM)分离鼠骨髓细胞中的间充质祖细胞, 发现募集的细胞在体外可以诱导分化为具有成骨表型的岛状细胞群, 并分泌矿化的细胞外基质; 体内实验也表明附着在 FBM 上的骨髓细胞具有良好的成骨性能。Yamada 等<sup>[24]</sup>采用纤维蛋白作为载体材料复合间充质干细胞和  $\beta$  磷酸三钙( $\beta$ -TCP), 注射入老鼠皮下, 8 周后观察到有致密的骨组织生成, 成骨区未发现软骨, 属于膜内成骨。

纤维蛋白凝胶也存在天然材料的共同缺点, 如缺乏机械强度、大量获取困难、降解时间难以控制等, 故也难以单独作为组织工程基质材料。

### 2.3 几丁质及其衍生物

几丁质(chitin), 是一种广泛存在于昆虫、甲壳类动物外壳及真菌细胞壁中的天然多糖, 最早由法国科学家 Braconnot 从蘑菇中分离得到。据估计, 地球上几丁质的年产量约为  $10 \sim 100 \times 10^9$  t, 是仅次于纤维素的第二大天然资源<sup>[25]</sup>。

几丁质经脱乙酰化反应变成壳聚糖(chitosan)。壳聚糖可溶于酸性溶液, 根据溶液的浓度变化分子链构型也发生改变, 其力学性能与溶液的状态密切相关。由于分子内含有很多氨基和羟基, 很容易对其进行化学和物理改性。

壳聚糖及其衍生物具有良好的生物相容性和生物可降解性。壳聚糖在体内各种酶的作用下降解成 N-乙酰氨基葡萄糖和氨基葡萄糖等低聚糖, 且降解产物在体内不积累, 因而无免疫原性。在临床上, 壳聚糖及其衍生物具有止血、抗凝以及促进创面愈合等功能, 已经被广泛应用在医学和组织工程的各个领域。在骨组织工程方面, 可以作为骨缺损的填充材料以及软骨和骨组织工程支架材料。侯春林等<sup>[25]</sup>采用由蚕蛹几丁质膜管复合 BMP 修复兔桡骨骨折, 术后 2 周, 植入侧出现纤维结缔组织和新生血管, 新骨中可见成骨细胞、骨细胞, 前软骨细胞和软骨细胞, 成骨方式为膜内成骨和软骨内成

骨并存。术后 4~6 周, 可见交联骨和板层骨形成, 同时膜管部分降解, 表面出现新骨。术后 8 周, 出现大量成熟的板层骨, 骨小梁粗大并分布均匀, 骨髓组织产生。而单纯使用 BMP 的对照组在新骨生成速度和生成量上均不理想, 表明几丁质和 BMP 材料能诱导和增加植骨区新骨形成, 促进骨缺损修复。Zhao 等<sup>[26]</sup>通过相分离技术制得羟基磷灰石/壳聚糖-凝胶复合支架, 并移植鼠颅骨成骨细胞, 发现成骨细胞能够很好地黏附在支架上并进行分化和增殖, 分泌 I 型胶原和蛋白多糖, 最终形成骨组织。

### 2.4 藻酸盐

藻酸盐(alginates)是从褐藻中分离出的一种阴离子型多糖, 是由 D-甘露糖醛酸(D-mannuronic acid)和 L-古洛糖酸(L-guluronic acid)组成的共聚物。各种阳离子可与其侧链上的羧基进行络合反应形成水凝胶。藻酸盐的性质与甘露糖醛酸和古洛糖酸的含量有关系, 较高的甘露糖醛酸具有免疫激活性, 而较高的古洛糖酸则具有免疫抑制活性。

藻酸盐很早就被用于药物的添加剂、伤口敷料和止血剂。近年来, 随着研究的深入, 已经被越来越多地用于骨组织工程上。其中的藻酸钙水凝胶具有较好的可塑性, 通过改变钙离子的浓度和藻酸盐单体成分的含量, 可以制成不同孔隙结构和力学性能的水凝胶。在体内可以经酶解而崩裂, 终产物对人体无毒害作用。具有较好的生物相容性和一定的生物降解性。

Fragonas 等<sup>[27]</sup>采用 0.75% 的藻酸钙凝胶复合软骨细胞修复新西兰大白兔关节软骨损伤, 发现一个月时在移植区出现很多单一的软骨细胞, 在骨组织和植入物的边界形成软骨状组织, 从亚软骨组织募集的细胞沿移植表面平行分布, 2 个月后, 损伤部位已完全修复。Ueyama 等<sup>[28]</sup>使用藻酸盐凝胶膜作为骨再生的引导膜修复 Wistar 大鼠胫骨骨折, 首先用藻酸钠填充骨折处, 然后再滴入不同浓度的氯化钙溶液, 生成的藻酸钙凝胶能够紧密附着在骨折表面形成骨再生的引导膜。作者发现膜的厚度随藻酸钠的浓度增加而增大, 在藻酸钠的浓度大于 1% 时, 氯化钙的浓度越大形成的膜越厚, 但当藻酸钠的浓度小于 1%, 膜厚与氯化钙的浓度无关。并且膜的张力强度也随藻酸钠的浓度增加而增大。由于引导膜的生成防止了结缔组织进入骨折区, 骨折愈合良好, 经过 8 周的观察, 骨折区已被再生的新骨完全替代, 而未用藻酸盐填充的对照组, 由于

结缔组织和肌肉组织的侵入形成了骨不连。不同浓度的凝胶膜对新骨再生的效果不同,作者建议采用1%的藻酸钠和3%的氯化钙溶液生成的藻酸盐膜最适合作为骨再生的引导膜。

藻酸盐凝胶作为组织工程的细胞外基质材料,具有承载细胞量大,细胞的生存状态与体内接近等优点。但藻酸盐仍存在体内降解过程难以控制、组成成分不稳定等缺点,且在体内由于淋巴细胞和炎症细胞的刺激和诱导通常会发生纤维化反应,导致植入体内的细胞功能丧失。

### 3 珊瑚骨衍生材料

珊瑚是一种海生无脊椎动物的骨骼,其主要成分99%为碳酸钙,与无机骨的成分和形态结构极为相似。经生物化学处理后的珊瑚骨具有高度连通的三维多孔结构,植入机体后,在破骨细胞内的碳酸酐酶的作用下,逐渐被分解为 $\text{Ca}^{2+}$ 和碳酸,通过参与血液中离子交换最终被完全吸收。具有可生物降解、生物相容性好和无明显免疫原性等特点,能够作为组织工程的支架材料。常用作载体材料的珊瑚种类有:滨珊瑚(*porites*),角孔珊瑚(*goniopora*),角蜂巢珊瑚(*favites*),叶状珊瑚(*lobophyllia*),石芝珊瑚(*fungia*),鹿角珊瑚(*acropora*)等,产地主要分布在加勒比海、红海、非洲东部、澳大利亚海和中国海南岛等地的海滨<sup>[29]</sup>。

珊瑚骨本身脆性大,无骨诱导作用,降解速度过快,单独使用效果并不理想。对其理化性能以及生物学特性进行改良,可提高其对骨组织的修复能力。临床上多采用由珊瑚骨转化的HA及其复合BMP、生长因子、胶原等材料。Ma等<sup>[30]</sup>采用带血管蒂自体股薄肌包裹由珊瑚、I型胶原和rhBMP-2组成的复合材料植入Sprague Dawley大鼠体内,3周后观察到有新骨生成,没有明显的免疫反应发生,表明珊瑚骨和胶原可作为BMP的优良载体。

### 4 展望

从骨组织工程细胞外基质材料的选取、设计和加工角度来看,以下几个方面的问题在以后的研究中是值得关注的。

(1)通过改性和修饰改进材料对细胞的亲和性细胞必须与材料发生适当的黏附,才能在材料上铺展、分化和增殖。黏附过程是由材料与一些生物活性分子相互作用而引起的,可以通过细胞膜上的受

体来进行调节,这些受体能特异性地识别材料表面的黏附分子,一些细胞外基质蛋白能够被细胞膜上的受体特异性地识别,当一些生物材料在体内吸附这类蛋白时,细胞就以这类蛋白为介导,黏附于材料表面,进行生长、分化、迁移和增殖。影响材料对细胞黏附的主要因素有:材料的表面成分、结构和形貌;材料的亲(疏)水性;材料的表面能和表面电荷等。可以通过改性和修饰等物理化学方法改变材料的细胞黏附性能。如引入胺基、羧基、羟基等基团可以提高材料的亲水性,在材料表面引入活性多肽可以增加细胞的亲和性。

(2)在基质材料引入缓释系统。生长因子是一类经细胞自分泌或旁分泌产生的活性信号多肽,能通过细胞表面的受体刺激细胞的增殖和迁移,调节细胞生长和表型。生长因子在体内含量甚微,研究表明,微克级甚至皮克级都可发挥明显的作用,将药物缓释系统引入基质材料中,可将各种生长因子缓慢、持续地释放,有利于细胞的生长和分化。

(3)发展天然材料和合成材料的复合材料。现有骨组织工程细胞外基质材料都有各自的优缺点。天然衍生材料作为骨组织工程的支架材料,具有生物相容性好,能够形成与人骨类似的多孔结构,其降解产物易于被吸收而不产生炎症反应等优点,但也存在着力学性能差、难以加工成形、降解率与成骨的速率不协调等问题。人工合成可降解聚合物材料,其组成成分、分子量、机械性能、降解速度等都能预先设计和控制,也容易塑型和构建多孔三维结构,但很多材料的降解产物会使体内酸度过高,容易诱发炎症反应。另外,由于缺乏细胞识别信号,该类材料对细胞亲和力弱,不利于细胞黏附。针对这些材料的优缺点,通过复合的方法取长补短是现阶段骨组织工程基质材料研究的必然选择。

(4)在材料中引入刺激细胞生长的力电机制。在体内,几乎所有的细胞都受到应力的作用,研究表明,应力可改变细胞的行为,如导致细胞骨架的重组而改变细胞的形状;改变生长因子和激素的分泌而调节细胞的生长。电刺激也可以改变各种生长因子和激素的分泌,增加细胞液中的钙离子浓度,进而激活相应的蛋白激酶,通过磷酸化等反应改变细胞内的信号通路,调节细胞的增殖和生长。因此,在组织工程基质材料的设计中引入刺激细胞生长的力电机制是很有必要的。Ingber<sup>[31]</sup>已经在这方面进行了初步尝试,他们按照张力完整性

(tensegrity) 的概念设计了三维支架, 使整个支架结构分布一致并能平衡机械应力, 连接支架骨架的壁、层或支撑等相互构成三角形、五角形或六角形, 每一构件都能承受张拉或压缩。

(5) 发展基于各种材料的智能化成型技术。骨组织工程的最终目的是将其产品应用于临床, 因此, 作为支架的细胞外基质材料必须加工成合适的多孔形状, 现行的加工方法都存在着很多缺点, 如需要使用高毒性的溶剂和溶剂挥发时间长; 加工过程劳动强度大; 高分子基质中残留粒子; 不同批次的产品质量不统一等。这些都影响了组织工程的研究和其产品在临床上的应用。

最近一种称为快速成形(rapid prototyping, RP) 的智能化加工技术已经在该领域获得了快速的发展, 该技术是基于离散和堆积原理, 通过对 CT 或磁共振扫描人体获得的影像进行层面处理构造出三维模型, 然后进行分层切片, 最终通过 STL 格式文件传输到快速成型机进行加工, 经过热熔、切割等手段, 形成各截面轮廓, 并逐步叠加成三维立体零件。这种方法可以根据不同病人的要求量身定做, 具有快速和柔性化的特点, 因而在组织工程支架加工方面具有极大的优势。清华大学颜永年等<sup>[32]</sup> 采用纳米晶 HA- 胶原复合材料以及骨生长因子为成形原料, 以多喷头快速喷射成形技术制备出一种非均质、多孔的人工骨, 用于兔桡骨缺损的修复, 与人在很多方面高度相似, 该方法被认为是最有希望的骨组织工程材料的成形方法; Landers 等<sup>[33]</sup> 采用一种称为 3D 绘图(3D plotting) 的快速成形技术制备凝胶多孔支架, 采用琼脂和凝胶为原料, 该方法为纤维蛋白、胶原等组织工程支架的快速成形创造了条件; Ang 等<sup>[34]</sup> 采用类似的加工方法, 加工出的壳聚糖- HA 多孔支架, 具有较好的孔隙率和生物相容性, 适合细胞的黏附和增殖。可以预见, 随着该技术的不断发展和成熟, 必将大大推动长期困扰骨组织工程发展的支架加工问题的最终解决。

总之, 虽然骨组织工程细胞外基质材料的研究已经取得了相当大的进展, 但是与骨组织工程对材料的要求相比, 这方面的工作仍然任重道远, 可以想象, 未来的新型基质材料应该是能够博取各种材料的优点并取长补短, 能够充分适应体内各种生理环境并能采用智能化的加工方式进行大批量生产的仿生材料。

## 参考文献

- [1] Brekke J H, Toth J M. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J Biomed Mater Res*, 1998, 43: 380~398
- [2] Katoh T, Sato K, Kawamura M. Osteogenesis in sintered bone combined with bovine bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*, 1993, 287:266~ 275
- [3] Lin F H, Liao C J, Chen K S, et al. Preparation of a biphasic porous bioceramic by heating bovine cancellous bone with  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  addition. *Biomaterials*, 1999, 20(5): 475~ 484
- [4] 董玉峰, 侯希敏, 刘永辉. 天然多孔活性煅烧骨的制备及动物实验研究. *中国矫形外科杂志*, 1997, 4(4): 315~ 316
- [5] Urist M R. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965, 150(698):893~ 899
- [6] Russell J L, Block J E. Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: impact of processing techniques and study methodology. *Orthopaedics*, 1999, 22: 524~ 531
- [7] Tiedeman J J, Garvin K L, Kile T A, et al. The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopaedics*, 1995, 18:1153~ 1158
- [8] Cheung S, Westerheide K, Ziran B. Efficacy of contained metaphyseal and periarticular defects treated with two different demineralized bone matrix allografts. *Int Orthop*, 2003, 27(1): 56~ 59
- [9] Urist M R. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70: 3511~ 3521
- [10] Iwata H, Hanamura H, Kaneko M, et al. Chemosterilized autolyzed antigen extracted allogeneic (AAA) bone matrix gelatin for repair of defects from excision of Benign bone tumours. A preliminary report. *Clin Orthop*, 1981, 154:150~ 155
- [11] 刘伟, 胡蕴玉, 陆裕朴, 等. 异种植骨抗原性的免疫组织化学实验研究. *中华骨科杂志*, 1989, 9(1): 53~ 54
- [12] Zhang Q, Counu O, Delloye C H. Ethylene oxide dose not extinguish the osteoinductive capacity of demineralized bone. *Acta Orthop Scand*, 1997, 68: 104~ 108
- [13] 胡永康, 安洪, 曹木珍. 四种脱蛋白骨组织学和生物力学比较研究. *中华创伤杂志*, 1998, 14(5): 277~ 279
- [14] 丁真奇, 练克俭, 康两奇, 等. 应用复合脱蛋白骨移植治疗新鲜长骨骨折——一种前瞻性临床比较研究. *骨与关节损伤杂志*, 1999, 14(6): 370~ 372
- [15] 罗卓荆, 胡蕴玉, 王茜. 块形重组异种骨修复犬桡骨骨缺损. *中华骨科杂志*, 1998, 18(6): 363~ 366
- [16] Ehrmann R L, Gey G O. The growth of cells on a transparent gel reconstituted rat tail collagen. *J Natl Acad Sci*, 1956, 16: 1375~ 1403
- [17] Lynd M P, Stein J L, Stein G S, et al. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res*, 1995, 216(1):35~ 45
- [18] Rocha L B, Coissis C, Rosi M A. Biocompatibility of anionic

- collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials*, 2002, 23: 449~ 456
- [19] Fujimura K, Bessho K, Kusumoto K, et al. Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelopeptide type I collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 208(1): 316~ 322
- [20] Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, et al. Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels *in vivo*. *Bone*, 1997, 20(2): 101~ 107
- [21] Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki. Type I collagen Induced osteoblastic differentiation of bone marrow cells mediated by collagen  $\alpha_2\beta_1$  integrin interaction. *J Cell Physiol*, 2000, 184: 207~ 213
- [22] Young J Z, Medawar P B. Fibrin suture of peripheral nerve. *Lancet*, 1940, 239: 126~ 128
- [23] Gurevich O, Vexler A, Marx G, et al. Fibrin microbeads for isolating and growing bone marrow-derived progenitor cells capable of forming bone tissue. *Tissue Eng*, 2002; 8(4): 661~ 672
- [24] Yamada Y, Seong B J, Ozawa R, et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Cranio maxillofac Surg*, 2003, 31(1): 27~ 33
- [25] 侯春林, 顾其胜. 几丁质与医学. 上海: 上海科学技术出版社, 2001. 125~ 129
- [26] Zhao F, Yin Y J, Lu W W, et al. Preparation and histological evaluation of biomimetic three dimensional hydroxy apatite/chitosan gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials*, 2002, 23: 3227~ 3234
- [27] Fragonas E, Valente M, Mucelli M P, et al. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*, 2002, 21: 795~ 801
- [28] Ueyama Y, Ishikawa, Mano T, et al. Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. *Biomaterials*, 2002, 23: 2027~ 2033
- [29] Demers C, Hamdy C R, Corsi K, et al. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review. *Biomed Mater Eng*, 2002, 12(1): 15~ 35
- [30] Ma Q, Mao T Q, Liu B L, et al. Vascular osteomuscular autograft prefabrication using coral, type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2000, 38: 561~ 564
- [31] Ingber D E. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Ann Rev Physiol*, 1997, 59: 575~ 599
- [32] 颜永年, 崔福斋, 张人佶, 等. 人工骨的快速成形制造. *材料导报*, 2000, 14(2): 11~ 13
- [33] Landers R, Hübner U, Schmelzeisen R, et al. Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials*, 2002, 23: 4437~ 4447
- [34] Ang T H, Sultana F S A, Huttmacher D W, et al. Fabrication of 3D chitosan hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system. *Materials Science and Engineering C*, 2002: 35~ 42

## Recent Advances in Natural Derived Extracellular Matrix Materials in Bone Tissue Engineering

He Chuanglong Wang Yuanliang Yang Lihua Zhang Jun Xia Liewen  
(Chongqing University Bioengineering College and National Key Laboratory on Biomechanics & Tissue Engineering  
under the State Education Ministry of China Chongqing 400044)

**Abstract** The extracellular matrix materials or scaffolds play an important role in bone tissue engineering. Currently, The scaffold materials commonly used in bone tissue engineering can be divided into natural derived materials, synthetic materials and their composited materials. The application and advancement of various natural bone derived materials including sintered bone, demineralized bone matrix, deproteinized bone matrix, reconstituted xenograft bone matrix and natural polymers including collagen, fibrin, chitin, alginates and their derivatives as well as coral were reviewed. In addition, the future development direction of extracellular matrix materials for bone tissue engineering was discussed. Finally, it was directed that the ideal scaffold materials in future should be a kind of biomimetic materials which have the advantageous of all kinds of available materials, and completely adapt to the physiological environment *in vivo*, furthermore, can be fabricated in a large scale by smart manufacture approach.

**Key words** Bone tissue engineering Extracellular matrix Natural bone derived materials Natural polymers Coral