

骨组织工程支架材料：脱矿骨基质

陈海霞，谢志刚(昆明医科大学附属口腔医院，云南省昆明市 650031)

文章亮点：

1 此问题已知的信息：脱矿骨基质是一种经盐酸脱矿、消毒、冻干等处理的动物骨或人类骨，它是脱矿后的骨基质成分，保留了骨质本身的多孔网状结构。目前大量研究证实，脱矿骨基质具有骨诱导活性，因此，脱矿骨基质材料具有骨诱导性和骨传导性双重特性。

2 文章增加的新信息：脱矿骨基质作为一种生物类支架材料，既可以自身释放骨形态发生蛋白及生长因子，又可以负载多种外源性物质，通过控释使受体受到成骨的生物学刺激，因其优势受到众多学者的青睐，成为近年来研究的热点。

3 临床应用的意义：无论是同种异体脱矿骨还是异种脱矿骨基质，都存在优缺点。即便如此，脱矿骨基质作为天然生物支架材料在临床应用上仍具备其无可比拟的优势。骨移植材料的安全性和有效性是核心内容，每种组合都有其独特的配比、不同的消毒方法和储存条件，而关系到生物安全性的消毒及保持材料性能的生物活性是亟待解决的问题，这些问题的解决，将对脱矿骨基质复合外源性物质治疗骨缺损带来长足的进步。

关键词：

生物材料；骨生物材料；脱矿骨基质；支架材料；生长因子；骨髓间充质干细胞；抗生素

主题词：

生物相容性材料；骨基质；干细胞；组织工程；支架(骨科)

摘要

背景：脱矿骨基质是目前研究较多的具备骨诱导及骨引导的生物支架材料之一。

目的：总结脱矿骨基质作为骨组织工程支架材料的研究进展，并展望其发展趋势。

方法：由第一作者检索 1965 年 1 月至 2013 年 5 月 PubMed 数据库、中国生物医学数据库、万方数据库及 FMJS 数据库有关脱矿骨基质及其作为骨组织工程支架材料的相关文献。英文检索词为“Demineralized Bone Matrix, Scaffold material, Growth factor, Cells, drugs”，中文检索词为“脱矿骨基质，支架材料，生长因子，细胞，药物”，根据纳入标准排除重复性研究，保留 34 篇密切相关文献进行归纳总结。

结果与结论：骨组织工程支架材料是组成组织工程骨的主体，而脱矿骨基质既具备骨诱导性又具备骨引导性，可为骨组织细胞的修复提供空间，又可与生物活性因子、活细胞、抗生素等在体外构建成复合体，植入骨内促进骨缺损的愈合。但这一技术也面临着脱矿骨基质与各种物质的配比、消毒、保存成骨活性及抗原性的消除等问题，充分了解脱矿骨基质作为骨组织工程支架的研究，可为其服务于临床提供理论依据。

陈海霞，谢志刚. 骨组织工程支架材料：脱矿骨基质[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(3):426-431.

Demineralized bone matrix as a bone tissue engineering scaffold material

Chen Hai-xia, Xie Zhi-gang (Department of Implantation and Prosthodontics, Affiliated Stomatological Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Demineralized bone matrix as bone tissue engineering biological scaffold material is more researched currently, which has osteoinductive and osteoconductive.

OBJECTIVE: To summarize the development of demineralized bone matrix as bone tissue engineering scaffold material and to prospect its trend.

METHODS: The relative literatures addressing demineralized bone matrix as bone tissue engineering scaffold material published between January 1965 and May 2013 in PubMed database, Chinese Biomedical Database, Wanfang Database and FMJS database were searched by the first author. The key words were “demineralized bone matrix, scaffold material, growth factor, cells, drugs” in English and Chinese. According to the inclusion criteria, repetitive researches were excluded, and finally 34 articles were included.

RESULTS AND CONCLUSION: Scaffold material is the key composition of tissue engineered bone, and only demineralized bone matrix has both osteoinductive and osteoconductive properties which cannot only provide space for bone repair, but also can be combined with bioactive factors, living cells, antibiotics *in vitro* to construct bone graft thereby promoting healing of bone defects. However, this technique is also facing some problems to be solved such as the ratio of demineralized bone matrix and various substances, disinfection, preservation of osteogenetic activity and antigenicity elimination. Sufficiently understanding demineralized bone matrix as bone tissue engineering scaffold can provide a theoretical basis for its clinical service.

陈海霞，女，1987 年生，山东省德州市人，汉族，昆明医科大学在读硕士，主要从事口腔种植修复专业。

通讯作者：谢志刚，副教授，昆明医科大学附属口腔医院口腔种植修复科，云南省昆明市 650031

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.03.016

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)03-00426-06

稿件接受: 2013-10-05

Chen Hai-xia, Studying for master's degree, Department of Implantation and Prosthodontics, Affiliated Stomatological Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Corresponding author: Xie Zhi-gang, Associate professor, Department of Implantation and Prosthodontics, Affiliated Stomatological Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Accepted: 2013-10-05

Subject headings: biocompatible materials; bone matrix; stem cells; tissue engineering; braces

Chen HX, Xie ZG. Demineralized bone matrix as a bone tissue engineering scaffold material. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(3):426-431.

0 引言 Introduction

因创伤、肿瘤或骨病等原因造成的骨缺损、骨不连和骨髓炎患者越来越多, 需要骨移植材料的患者也越来越多。同时, 随着种植技术的日渐成熟, 骨增量技术在种植修复中的应用越来越广泛, 对骨替代材料的研究也越来越多。骨移植是人类几个世纪以来不断深入研究和探索的重要课题, 骨移植后骨生成主要是通过骨传导和骨诱导这两种作用实现的, 找到能充分诱导新骨形成的骨移植材料成为近年来研究的热点。

由于外伤、肿瘤、炎症、先天畸形等原因造成牙列缺损后, 缺牙区牙槽骨常伴有过度吸收, 致种植区骨量不足, 临床医生须选择合适的骨替代品重建牙槽骨缺损。通过手术取自体骨进行修复是骨移植的“金标准”, 但会对供骨区造成一定程度的损伤。骨组织工程学为骨缺损的治疗提供了一种可供选择的新方法, 骨组织工程支架材料是构建组织工程骨的主要组成部分, 在体内, 组织基质作为细胞的三维支架为细胞提供该组织所特有的微结构和微环境, 并储备足量的水、营养物质、细胞因子和生长因子, 以维持细胞的生存, 发挥其功能。在骨组织工程中为恢复受损伤组织的功能或促使组织再生, 需要一个模板或支架作为其增殖和细胞外基质沉积的临时基质, 为术后新骨长入创造条件, 直至损伤骨组织完全恢复或再生; 这种支架还可成为新骨组织血管化的模板, 释放复合于其中的生长因子、药物等, 从而主动参与再生过程。按照来源支架材料可分为人工合成支架材料(如高分子有机物、生物陶瓷等)和天然支架材料(如珊瑚羟基磷灰石, 脱矿骨基质等)。人工合成支架材料及珊瑚羟基磷灰石等材料只具备骨引导性, 而脱矿骨基质作为一种生物类支架材料, 既可以自身释放骨形态发生蛋白及生长因子, 又可以负载各种外源性物质, 通过控释使受区受到成骨的生物学刺激, 因其优势受到众多学者的青睐, 成为近年来研究的热点。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

检索人及检索时间: 第一作者在2013年5月完成检索。

检索文献时限: 1965年1月至2013年5月。

检索数据库: PubMed数据库、中国生物医学数据库、万方数据库及FMJS数据库。

检索词: 英文检索词为“Demineralized Bone Matrix, Scaffold material, Growth factor, Cells, drug”, 中文检索词为“脱矿骨基质, 支架材料, 生长因子, 细胞, 药物”。

检索文献类型: 所有文献类型。

检索文献量: 共检索149篇文献。

1.2 入选标准 ①与脱矿骨基质骨诱导相关的文献。②脱矿骨基质作为支架材料与生物活性因子、种子细胞、药物等进行体外构建的文献。

1.3 质量评估 初检149篇, 纳入34篇符合标准且无重复研究的文献。

1.4 数据的提取 13篇介绍脱矿骨基质骨诱导相关的文献, 21篇研究脱矿骨基质体外负载外源性物质修复骨缺损的文献。

2 结果 Results

脱矿骨基质作为一种生物类支架材料, 既可以自身释放骨形态发生蛋白及生长因子, 又可以负载多种外源性物质, 通过控释使受区受到成骨的生物学刺激, 因其优势受到众多学者的青睐, 成为近年来研究的热点。脱矿骨基质是一种经盐酸脱矿、消毒、冻干等处理的动物骨或人类骨, 它是脱矿后的骨基质成分, 保留了骨质本身的多孔网状结构。目前大量研究证实, 脱矿骨基质具有骨诱导活性, 因此, 脱矿骨基质材料具有骨诱导性和骨传导性双重特性^[1-4]。有学者利用其优势将脱矿骨基质与其他人工合成材料以一定比例混合制备成复合支架材料以发挥各自优势更好的修复骨缺损, 刘晓明等^[5]通过超临界二氧化碳合成法将脱矿骨基质与聚乳酸以一定比例合成, 发现当脱矿骨基质与聚乳酸质量比为 6/4 时, 材料的抗压强度及弹性模量达到了 108.72 MPa 及 13.82 MPa, 孔隙在 200-400 μm 之间, 孔隙率达 79.71%, 细胞毒性评价 0 级或 1 级, 基本达到组织工程支架材料的基本要求。徐伟俊等^[6]研究发现将脱矿骨基质与海藻酸钠以质量比 7:3 混合时材料可塑性强, 不易离散, 与小鼠成纤维细胞共培养检测发现 2, 4, 7 d 的细胞增殖率均高于 90%, 细胞毒性级别 1 级。

2.1 脱矿骨基质自身含有生物活性物质并向植入床释放, 具有骨诱导性 骨诱导性是指诱导未分化间充质细胞经过形态发生期而分化为骨系细胞, 进而形成骨或软骨的特性。

脱矿骨基质通过外科手术的方式植入或注射入骨缺损区, 可作为骨充填物并同时刺激新骨形成, 修复骨缺损。早在 20 世纪 70 年代, Urist 等^[7-9]就发现脱矿骨基质可以在肌肉组织中异位成骨, 并存在促进新骨形成和骨再生的骨形成蛋白。Pietrzak 等^[10]对 20 例经筛选的符合美国食品和药品监督管理局检测标准的人来源脱矿骨基质进行了测量, 得出每克脱矿骨基质中含骨形态发

生蛋白 2 约 21.4 ng, 骨形态发生蛋白 4 约 5.45 ng, 骨形态发生蛋白 7 约 84.1 ng。有学者将人尸体来源含血管基质成分的脂肪细胞接种于脱矿骨基质上, 发现骨髓间充质干细胞被筛选保留下来, 且通过酶联免疫吸附法检测到骨形态发生蛋白 2、骨形态发生蛋白 7 的存在^[11], 间接说明了脱矿骨基质具有骨诱导潜能。Wildemann 等^[12]对 3 种不同厂家生产的人脱矿骨基质产品中成骨相关的生长因子进行测定, 胰岛素样生长因子 1 含量为 22 ng/g, 转化生长因子 β 含量为 18 ng/g, 血管内皮生长因子含量为 1.9 ng/g。有学者将羟基磷灰石、脱矿骨基质/羟基磷灰石作为两组分别植入裸鼠肌袋模型中, 碱性磷酸酶检测发现脱矿骨基质/羟基磷灰石组明显高于羟基磷灰石组, Micro CT 及形态学观察发现脱矿骨基质/羟基磷灰石组肌袋内形成矿化组织, 而羟基磷灰石组则未发现^[13]。

以上实验研究均表明, 脱矿骨基质自身含有生物活性物质, 虽然作用机制尚处于研究阶段仍未明确, 但脱矿骨基质可诱导异位成骨已得到证实。

2.2 脱矿骨基质作为骨组织工程支架材料复合外源性物质修复骨缺损

2.2.1 脱矿骨基质具备理想的骨组织工程支架材料应具备的基本条件 适度的降解率、多孔的三维立体结构(孔隙率约达 80%)、良好的生物相容性及一定的生物活性。

李强等^[14]通过体外观察脱矿骨基质发现其完全降解需 10-12 周, 其孔隙率约为 77.15%, 且与骨髓间充质干细胞平均黏附率达到 71.25%。唐少锋等^[15]扫描电镜观察脱矿骨基质发现其表面不满大小不等的孔隙且各孔隙相互交通, 与脂肪干细胞复合培养 2 周后发现增殖的细胞及分泌的胞外基质几乎将孔隙全部充填。Kirk 等^[4]证实脱矿骨基质有极高的孔隙率, 将鼠成骨细胞与之共培养可检测到细胞大量增殖。

2.2.2 脱矿骨基质可以作为载体与活细胞、生物活性因子、小分子药物、转基因制剂等多种物质复合后植入骨缺损区

脱矿骨基质作为活细胞的载体, 二者于体外复合后植入骨缺损区: 组建组织工程化骨常用的种子细胞有间充质干细胞、成骨细胞、脂肪干细胞、成纤维细胞、胚胎干细胞、基因修饰细胞等, 这类具有多向分化潜能的细胞已具备较成熟的分离增殖培养技术, 可大批量生产, 负载于脱矿骨基质可快速有效地作用于骨缺损区。由于间充质干细胞已被证明具有免疫调节功能^[16], 这种技术的取材有望不只局限于自体宿主细胞, 有可能扩展到异种细胞源。将骨髓源性多能成体祖细胞与同种异体脱矿骨基质共培养, 检测到骨髓源性多能成体祖细胞在脱矿骨基质上表达碱性磷酸酶, 分泌细胞外基质, 并且有钙等矿物质的沉积; 同时将其植入到鼠肌袋模型中, 组织切

片发现异位成骨现象^[17]。例如有研究观察人脱细胞骨复合经诱导骨髓基质细胞的实验效果, 观察细胞的黏附和生长情况, 并对其成骨活性进行检测。实验用过氧化氢和乙醚去除人髌骨块内的结缔组织和细胞成分, 消毒后制备人脱细胞骨。取材活体或新鲜尸体的骨髓行骨髓基质细胞培养, 细胞纯化后加入 β -甘油酸钠, 地塞米松和抗坏血酸等向成骨方向诱导, 并进行对照培养。通过碱性磷酸酶和骨钙素检测来确定骨髓基质细胞的增殖和分化情况, 将诱导的骨髓基质细胞浓缩后复合到制备好的脱细胞骨块内进行培养, 8 d 后通过光镜和电镜等形态学观察, 以及生化指标检测来确定细胞的成骨活性。结果显示: ①人髌骨块细胞清除干净, 骨基质保存良好。②诱导 8 d 后的骨髓基质细胞碱性磷酸酶和骨钙素含量明显高于对照组[诱导后骨髓基质细胞: (181.54 ± 40.01) nkat/L. (7.2 ± 1.3) μ g/L. 对照组: 无法测到。 $P < 0.05$]. ③骨髓基质细胞在人脱细胞骨支架内附着紧密, 生长良好。表明人脱细胞骨复合经诱导的骨髓基质细胞在体外具有有效的成骨功能, 是一种较为理想的骨组织工程材料。也有学者将脂肪干细胞接种于脱矿骨基质进行体外及体内培养, 体外培养发现细胞黏附在脱矿骨基质上增殖并表达成骨标记物, 在小鼠体内异位成骨的量比单独用脱矿骨基质成骨量多 30%^[18]。Pradel 等^[19]对比脱矿骨基质负载成骨细胞组成的组织工程骨移植材料与自体髌骨移植两种方法在儿童牙槽突修补术后 6 个月的成骨效果发现, 二者在骨量及成功率上无显著性差别, 说明组织工程骨有可能取代作为金标准的自体骨移植。

近年来基因治疗与骨组织工程技术结合, 将转染有生长因子基因的种子细胞-基因修饰种子细胞接种于支架材料, 可使种子细胞表达内源性生长因子, 刺激植骨区细胞向骨细胞方向转化, 促进新骨形成。Castro-Govea 等^[20]将腺病毒载体介导的骨形态发生蛋白 2 基因转染到间充质干细胞, 与脱矿骨基质复合进行体外及犬下颌牵张成骨模型体内成骨观察, 体外观察发现转染组诱导形成成骨细胞的数量和矿化的细胞外基质多于对照组(未转染间充质干细胞+脱矿骨基质组); 10 周后, 通过对犬下颌解剖学和形态学观察显示转染组骨改建和形成更为成熟, 且无炎症反应。Lieberman 等^[21]也曾将 ad-BMP2 转染到骨髓基质细胞并与脱矿骨基质复合, 对裸鼠股骨缺损的修复效果远远优于单纯脱矿骨基质组。

脱矿骨基质与生物活性因子复合向受区缓释并诱导骨形成: 在骨折愈合过程中有多种生物活性因子表达, 这种表达具有相对固定的空间和时间分布, 各种生物活性因子相互作用, 共同调节骨愈合过程。参与调节骨愈合的生物活性因子有许多, 如骨形态发生蛋白、转化生长因子 β 、成纤维生长因子、血小板衍生生长因子和胰岛素

样生长因子等, 它们在整个骨愈合期间均有表达^[22]。

临床前期和临床应用结果表明, 外源性生物活性因子用于骨折延迟连接或骨不连有良好效果。Francis 等^[23]通过对 55 例牙槽突裂患者分别用脱矿骨基质复合骨形态发生蛋白对比自体髂骨移植后平均 21 个月的追踪回顾研究, 发现用骨形态发生蛋白/脱矿骨基质修复牙槽突裂的成功率为 97.2%, 而自体髂骨修复的成功率为 84.2%, 脱矿骨基质复合骨形态发生蛋白有望成为修复骨缺损的一种可供选择的方法。有研究比较脱钙骨基质复合牛骨形态发生蛋白和单纯脱钙骨基质修复节段性骨缺损的能力。实验选取 32 只新西兰大白兔, 采用桡骨 15 mm 节段性骨缺损模型, 随机分为 2 组, A 组植入自体脱钙骨基质与牛骨形态发生蛋白(10 mg)复合材料, B 组植入自体脱钙骨基质。术后 4, 8, 12, 16 周进行放射学检查、病理组织学检查和计算机图像分析新生骨面积。X 射线和组织学检查显示自体脱钙骨基质与牛骨形态发生蛋白复合材料组的新骨生成、修复骨缺损能力优于自体脱钙骨基质组, 组织切片的计算机图像分析提示脱钙骨基质+牛骨形态发生蛋白组修复新骨面积大于脱钙骨基质组, 两者之间差异有显著性意义(4, 8, 12 周 $P < 0.05$; 16 周 $P < 0.01$)。表明自体脱钙骨基质复合牛骨形态发生蛋白材料通过骨诱导和骨传导两种方式修复骨缺损, 其修复骨缺损的能力要优于单纯脱钙骨基质材料, 是一种较为理想, 具有高效成骨活性的植骨材料。转化生长因子 $\beta 1$ 联合脱矿骨基质修复犬胫骨开放性骨折模型, 术后第 5 周骨缺损处大量骨痂形成, X 射线显示转化生长因子 $\beta 1$ /脱矿骨基质组再生骨的结构、密度优于脱矿骨基质组, 组织学检查发现大量破骨细胞及间充质细胞^[24]。

血小板衍生生长因子主要作用是促进成骨细胞 DNA 合成和复制, 加速骨组织形成, 它由 2 条肽链形成 3 种二聚体结构: 血小板衍生生长因子 AA、血小板衍生生长因子 BB、血小板衍生生长因子 AB, 其中血小板衍生生长因子 BB 生物学功能最强。一种 rhPDGF-BB 与脱矿骨基质共价结合的注射型组织工程骨, 在植入小鼠背部皮下后可显著增加血管密度和新骨形成^[25]。也有报道将脱矿骨基质与富血小板血浆复合, 利用其中富含各种生物活性因子的特点, 促进矿化过程, 加速骨缺损的愈合^[26]。

Nel-like type 1 molecule(Nell-1)蛋白是近年来被发现具有成骨效能的生物活性因子, 它与脱矿骨基质骨泥配比复合植入鼠脊椎损伤动物模型, 与单纯脱矿骨基质骨泥组相比脊椎融合显著, 形成大量新骨^[27]。脱矿骨基质- Nell-1 也能促进羊脊椎融合, 且表现出比对照组更快的融合及更高的矿化密度^[28]。

脱矿骨基质负载抗生素等小分子药物植入骨缺损处: 在整形外科手术中, 一些传统的常规药物如抗生素、镇痛

药和抗炎药可与脱矿骨基质以各种剂型混合, 植入受区, 使局部药物达到高浓度, 同时利用脱矿骨基质缓释作用起到药效持久的作用。

虽然外科手术中应用混有抗生素的脱矿骨基质有一段时间, 但近年来才开始系统的研究脱矿骨基质作为抗生素药物缓释系统用以减少骨缺损手术的感染风险。Saraf 等^[29]建立兔股骨远端干骺端皮质下缺损并感染金黄色葡萄球菌模型, 将浸有万古霉素的脱矿骨基质植入骨缺损区, 发现其能有效对抗感染并促进骨缺损的愈合。Lewis 等^[30]将脱矿骨基质充分浸染庆大霉素, 体外检测其释放浓度, 发现可维持临床有效药物浓度至少 13 d, 将其植入裸鼠肌袋观察 28 d, 发现并未影响其异位成骨能力。

也有其他小分子药物如他汀类药物、二膦酸盐等, 与脱矿骨基质充分浸染后用于骨缺损修复的报道。他汀类药物因其多种药理作用及生物活性已被用于骨质疏松的治疗。在啮齿类动物颅骨缺损模型中, 应用脱矿骨基质结合他汀类药物可诱导形成新骨^[31]。二膦酸盐是一大类小分子制剂的代表, 因它对破骨细胞的抑制、促进成骨细胞的增殖被临床上用于治疗骨质疏松。但它较低口服生物利用度和使用后可能引起的严重的系统性并发症(如下颌和踝关节骨坏死), 使得给药途径和剂量控制成为关注的重点。脱矿骨基质浸润二膦酸盐局部给药已有报道^[32-33], 但这些研究对于该材料在受区的改建和对受区骨形成方面的结论并不一致, 仍存在争议。

脱矿骨基质复合转基因制剂: 随着基因层面技术的发展, 脱矿骨基质结合转基因制剂治疗骨缺损展现出极好的前景, 将含有 Nell-1 基因片段编码的腺病毒按一定配比与脱矿骨基质复合植入鼠脊椎损伤模型, 术后 6 周组织形态学结果发现 Nell-1 腺病毒-脱矿骨基质组比对照组(LacZ 腺病毒组)形成的骨质更成熟, 质量更高^[34]。

3 讨论 Discussion

脱矿骨基质具备作为组织工程骨支架材料应具备的骨诱导性和骨传导性, 脱矿骨基质既可释放内源性生物活性因子, 也可复合多种外源性物质如蛋白质、细胞、药物及转基因制剂等, 这种组合可以刺激受区骨改建和骨形成。例如有研究探讨应用脱矿管状骨基质支架复合骨髓基质成骨细胞在动物体内构建组织工程骨的方法。实验体外培养的新西兰兔骨髓基质细胞, 经地塞米松诱导后, 与藻酸钙凝胶混合, 置入长 1.0-1.5 cm, 管径 0.2-0.5 cm 的脱矿管状骨基质内, 以自体细胞移植方式, 将脱矿管状骨基质/骨髓基质成骨细胞复合物异位植入新西兰兔皮下组织, 分别于 4, 8 周取材进行大体观察及 X 射线检查。结果显示, 4 周时可见复合物中有类骨组织和新骨形成, X 射线片显示呈点状阻射影, 8 周时, 新生骨组织类似正常成熟骨组织, 呈板层结构, 细胞椭

圆形, 位于陷窝中, 排列规律, X射线片显示呈均一阻射影, 对照组仅有少量类骨组织形成。表明脱矿管状骨基质为骨髓基质成骨细胞提供了外部支架, 藻酸钙为骨髓基质成骨细胞提供了三维的立体载体结构。细胞在其中生长, 分泌细胞外基质, 最终形成新生骨组织。

另有研究观察以自体骨髓来源成骨细胞为种子细胞、异体脱钙骨为支架材料所构建的组织工程骨修复兔颌骨缺损的成骨能力及其效果。实验运用组织工程方法, 将20只新西兰白兔自体骨髓来源成骨细胞于体外分离培养增殖后接种于异体脱钙骨, 复合培养构建组织工程骨, 随机植于一侧颌骨缺损区, 另一侧骨缺损区植入单纯异体脱钙骨作为对照。术后分别于2, 4, 8, 12周各处死5只动物取材, 通过大体、影像学和组织学观察骨形成情况; 对X射线片进行计算机图像分析, 计算并比较实验侧与对照侧骨缺损区的相对骨密度值。结果显示, 大体观可见对照侧新骨生长滞后于实验侧, 12周时实验侧骨缺损区已完全由新骨所修复, 而对照侧仍有小部分缺损区域未得到修复。影像学观察可见2周时实验侧与对照侧缺损区均为透光区, 但实验侧密度稍高且缺损边缘有少量骨痂影。4周时实验侧缺损区的边缘及中央区域出现骨痂影像, 8周时骨痂影像面积增大密度增高, 至12周时缺损区已充满骨痂影。对照侧4周时缺损边缘区出现点状骨痂影, 8周时逐渐汇合成片状, 至12周时其密度增高, 但远离植骨床的小部分区域仍为放射透光区。实验侧与对照侧缺损区各时间段的相对骨密度值具有显著的统计学差异($P < 0.05$)。组织学观察可见实验侧2周时在新骨由植骨床长入移植骨的同时, 移植骨的中央区域出现新生的骨组织, 4周到8周阶段中央区的新生骨由编织骨向板层骨发展, 至12周时新生骨与宿主骨相似。在对照侧成骨方式以“爬行替代”为主, 在新骨形成的过程中可见新生骨与脱钙骨之间有大量的纤维组织长入。证明以自体骨髓来源成骨细胞为种子细胞、异体脱钙骨为支架材料所构建的组织工程骨具有骨生成、骨传导和骨诱导三重功能, 其成骨能力及成骨质量显著强于单纯脱钙骨, 是修复颌骨缺损的理想骨移植材料。

无论是同种异体脱钙骨还是异种脱钙骨基质, 都存在优缺点。异体骨具有人工合成材料难以比拟的良好天然结构、机械强度和孔隙率, 但异体骨来源相对有限, 且存在传播疾病的潜在危险性, 但目前仍为广泛应用的生物材料。相比之下, 异种骨无异体骨的上述局限性, 其来源广泛, 且因骨组织结构在不同属动物间存在高度同源性, 其骨小梁、小梁间隙、孔隙率、骨内管腔系统及骨盐支架的三维结构有利于组织细胞黏附、生长, 并为细胞外基质分泌提供宽大的内部空间及表面积, 加之其无机成分主要是羟基磷灰石, 与人骨成分相同, 因此异种骨结构植入人体后易被宿主组织细胞接近而发生

爬行替代及生物降解, 应当是较为理想的载体材料。然而, 未经处理得异种骨会引起强烈的排斥反应, 因而长期未能成功应用于临床。传统的处理异种骨的方法均未能取得满意效果, 有些方法过于温和, 不足以消除其抗原性, 有些方法又太剧烈, 在消除抗原的同时也破坏了成骨活性因子, 因为抗原性和诱导性具有共同的物质基础-蛋白质。即便如此, 脱钙骨基质作为天然生物支架材料在临床应用上仍具备其无可比拟的优势。骨移植材料的安全性和有效性是核心内容, 每种组合都有其独特的配比、不同的消毒方法和储存条件, 而关系到生物安全性的消毒及保持材料性能的生物活性是亟待解决的问题, 这些问题的解决, 将对脱钙骨基质复合外源性物质治疗骨缺损带来长足的进步。

作者贡献: 第一作者查阅文献, 搜集资料并成文, 第二作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 脱钙骨基质-是一种经盐酸脱钙、消毒、冻干等处理的动物骨或人类骨, 它是脱钙后的骨基质成分, 保留了骨质本身的多孔网状结构。目前大量研究证实, 脱钙骨基质具有骨诱导活性, 因此, 脱钙骨基质材料具有骨诱导性和骨传导性双重特性。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Bramfeldt H, Sabra G, Centis V, et al. Scaffold vascularization: a challenge for three-dimensional tissue engineering. *Curr Med Chem*. 2010; 17(33):3944-3967.
- [2] Wang Y, Huang YC, Gertzman AA, et al. Endogenous Regeneration of Critical-Size Chondral Defects in Immunocompromised Rat Xiphoid Cartilage Using Decellularized Human Bone Matrix Scaffolds. *Tissue Engineering Part A*. 2012; 18(21-22):2332-2342.
- [3] Schwartz Z, Hyzy SL, Moore MA, et al. Osteoinductivity of demineralized bone matrix is independent of donor bisphosphonate use. *J Bone Joint Surg Am*. 2011; 93(24): 2278-2286.
- [4] Kirk JF, Ritter G, Waters C, et al. Osteoconductivity and osteoinductivity of NanoFUSE® DBM. *Cell and Tissue Banking*. 2012; 14(1):33-44.
- [5] 刘晓明, 李宝兴, 张育敏, 等. 超临界流体技术制备脱钙骨基质/聚乳酸复合材料及相关性能[J]. *解剖学杂志*, 2012, 35(1):86-89.
- [6] 徐伟俊, 李宝兴, 张育敏, 等. 可塑型脱钙骨基质/海藻酸钠复合材料的制备及细胞相容性[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(29): 5433-5436.
- [7] Van de Putte KA, Urist MR. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop Relat Res*. 1965; 43:257-270.
- [8] Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*. 1971; 50(6): 1392-1406.

- [9] Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* (New York, NY). 1965; 150(3698):893.
- [10] Pietrzak WS, Woodell-May J, McDonald N. Assay of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 in human demineralized bone matrix. *J Craniofac Surg*. 2006; 17(1):84-90.
- [11] Shi Y, Nliedzinsk JR, Samaniego A, et al. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18(13-14):1313-1321.
- [12] Wildemann B, Kadow-Romacker A, Haas NP, et al. Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations. *J Biomed Mater Res A*. 2007; 81(2):437-442.
- [13] Lee JH, Lee K M, Baek HR, et al. Combined effects of porous hydroxyapatite and demineralized bone matrix on bone induction: in vitro and in vivo study using a nude rat model. *Biomed Mater*. 2011; 6(1):015008.
- [14] 李强, 孙正义, 严冬雪, 等. 脱钙骨基质材料的生物学表现: 降解性能、孔隙率及其黏附性能特征[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(31):6121-6124.
- [15] 唐少锋, 李朝翠, 刘承杏. 天然可降解脱钙骨基质材料复合脂肪干细胞的三维培养[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(12):2101-2105.
- [16] Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2011; 164(1):1-8.
- [17] Supronowicz P, Gill E, Trujillo A, et al. Multipotent adult progenitor cell-loaded demineralized bone matrix for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013; doi:10.1002/term.1706. [Epub ahead of print]
- [18] Supronowicz P, Gill E, Trujillo A, et al. Human adipose-derived side population stem cells cultured on demineralized bone matrix for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2011; 17(5-6):789-798.
- [19] Pradel W, Lauer G. Tissue-engineered bone grafts for osteoplasty in patients with cleft alveolus. *Ann Anat*. 2012; 194(6):545-548.
- [20] Castro-Govea Y, Cervantes-Kardasch VH, Borrego-Soto G, et al. Human bone morphogenetic protein 2-transduced mesenchymal stem cells improve bone regeneration in a model of mandible distraction surgery. *J Craniofac Surg*. 2012; 23(2):392-396.
- [21] Lieberman JR, Le LQ, Wu L, et al. Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents. *J Orthop Res*. 1998; 16(3):330-339.
- [22] 胡蕴玉. 现代骨科基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [23] Francis CS, Mobin SS, Lypka MA, et al. rhBMP-2 with a demineralized bone matrix scaffold versus autologous iliac crest bone graft for alveolar cleft reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2013; 131(5):1107-1115.
- [24] Servin-Trujillo MA, Reyes-Esparza JA, Garrido-Farina G, et al. Use of a graft of demineralized bone matrix along with TGF-beta1 leads to an early bone repair in dogs. *J Vet Med Sci*. 2011; 73(9):1151-1161.
- [25] Chen L, He Z, Chen B, et al. Direct chemical cross-linking of platelet-derived growth factor-BB to the demineralized bone matrix improves cellularization and vascularization. *Biomacromolecules*. 2009; 10(12):3193-3198.
- [26] 倪明, 唐佩福, 王岩, 等. 富血小板血浆和脱钙骨基质促进牵拉成骨矿化过程的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25(6):662.
- [27] Li W, Lee M, Whang J, et al. Delivery of lyophilized Nell-1 in a rat spinal fusion model. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16(9):2861-2870.
- [28] Siu RK, Lu SS, Li W, et al. Nell-1 protein promotes bone formation in a sheep spinal fusion model. *Tissue Eng Part A*. 2011; 17(7-8):1123-1135.
- [29] Saraf SK, Yadav A, Nagwani S, et al. Decal bone matrix as a local antibiotic delivery vehicle in a MRSA-infected bone model: An experimental study. *Indian J Orthop*. 2010; 44(3):246-251.
- [30] Lewis CS, Supronowicz PR, Zhukauskas RM, et al. Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix. *Cell Tissue Bank*. 2012; 13(1):119-127.
- [31] Lima CE, Calixto JC, Anbinder AL. Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. *Braz Oral Res*. 2011; 25(1):42-48.
- [32] Baas J, Elmengaard B, Jensen TB, et al. The effect of pretreating morselized allograft bone with rhBMP-2 and/or pamidronate on the fixation of porous Ti and HA-coated implants. *Biomaterials*. 2008; 29(19):2915-2922.
- [33] Jakobsen T, Baas J, Bechtold JE, et al. Soaking morselized allograft in bisphosphonate can impair implant fixation. *Clin Orthop Relat Res*. 2007; 463:195-201.
- [34] Lu SS, Zhang X, Soo C, et al. The osteoinductive properties of Nell-1 in a rat spinal fusion model. *Spine J*. 2007; 7(1):50-60.