

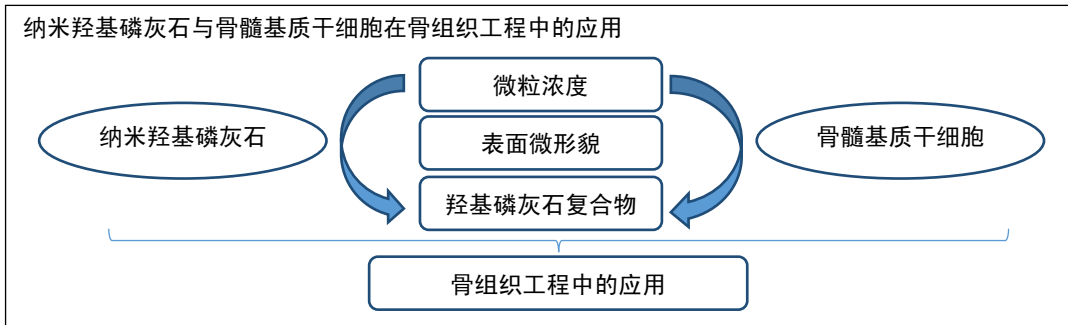
骨髓基质干细胞与纳米羟基磷灰石的相互作用

李璐¹, 舒静媛¹, 郑丽霞², 崔颖颖¹, 牛月月¹, 王倩¹, 王青山¹(¹滨州医学院附属医院儿童口腔科, 山东省滨州市 256603; ²聊城市复退军人医院口腔科, 山东省聊城市 252000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0693

ORCID: 0000-0002-1692-5468(李璐)

文章快速阅读:



李璐, 女, 1992年生, 滨州医学院在读硕士, 主要从事儿童口腔医学研究。

通讯作者: 王青山, 硕士, 教授, 滨州医学院附属医院儿童口腔科, 山东省滨州市 256603

文献标识码:A

稿件接受: 2018-09-06



文题释义:

表面微形貌: 纳米羟基磷灰石表面微形貌的研究重点主要是材料表面微观几何结构, 包括晶粒尺寸、纳米尺寸孔隙结构、表面粗糙度及特殊表面区域等。多孔羟基磷灰石支架的孔隙结构、化学成分和表面形貌是其骨诱导活性的关键因素。支架表面微形貌通过空间尺度效应对细胞的黏附、铺展、迁徙、增殖、分化及凋亡等产生直接影响。

骨组织工程: 是以生物基质材料、种子细胞、细胞因子为基本原料, 将干细胞在体外培养扩增后种植于基质材料上(该基质材料能为细胞提供一定的生存空间), 经培养增殖后植入生物体骨缺损处, 在缺损处继续生长增殖并分泌细胞外基质, 随着生物材料的降解, 最终由新生的骨组织全部或部分取代基质材料, 以修复骨缺损。

摘要

背景: 纳米级羟基磷灰石作为一种生物活性材料, 以其优良的生物学性能受到广泛的关注, 其对骨髓基质干细胞增殖、分化、矿化、细胞毒性等作用, 是影响其成骨性能的重要因素, 也是目前骨组织工程领域研究的一个热点问题。

目的: 探讨纳米羟基磷灰石对骨髓基质干细胞的作用, 为组织工程化骨的深入研究提供指导。

方法: 由第一作者检索 2006-01-01 至 2018-07-26 PubMed、CNKI、维普、万方和谷歌学术数据库相关文章, 英文检索词为“hydroxyapatite, nano-hydroxyapatite, biological matrix material, bone marrow stromal stem cells, osteogenic activity, biocompatibility, cytotoxicity, bone defect, bone tissue engineering, tissue engineered bone”; 中文检索词为“羟基磷灰石、纳米羟基磷灰石、生物基质材料、骨髓基质干细胞、成骨活性、生物相容性、细胞毒性、骨缺损、骨组织工程、组织工程化骨”, 共选取 66 篇文献进行综述。

结果与结论: 大量研究表明, 纳米羟基磷灰石及其复合材料与骨髓基质干细胞具有良好的亲和性、黏附性和生物相容性, 能诱导骨髓基质干细胞的增殖和分化, 是一种较为理想的骨缺损修复材料, 可广泛应用于骨缺损的修复和种植体的表面改性, 能够促进新骨早期形成, 并增强种植体与骨组织之间的结合强度; 纳米羟基磷灰石复合材料还被用于研制生物型人工韧带、引导性骨组织再生膜材料和治疗股骨头坏死等。对纳米羟基磷灰石与骨髓基质干细胞相互作用的深入研究, 必将推动组织工程化骨的研究进展和临床应用。

关键词:

骨髓基质干细胞; 纳米羟基磷灰石; 成骨分化; 骨缺损; 骨组织工程; 生物学活性; 细胞相容性; 细胞毒性; 山东省自然科学基金

主题词:

羟基磷灰石类; 骨髓; 间质干细胞; 组织工程

中图分类号: R459.9; R394.2

基金资助:

山东省自然科学基金项目(ZR2018LH010), 项目负责人: 王青山; 山东省医药卫生科技发展计划(2013WS0308), 项目负责人: 王青山

缩略语:

纳米羟基磷灰石: nanograde hydroxyapatite, nHA; 骨髓基质干细胞: bone marrow stromal stem cells, BMSCs

Li Lu, Master candidate, Department of Pediatric Stomatology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China

Corresponding author: Wang Qingshan, Master, Professor, Department of Pediatric Stomatology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China

Interactions between bone marrow stromal stem cells and nano-hydroxyapatite

Li Lu¹, Shu Jingyuan¹, Zheng Lixia², Cui Yingying¹, Niu Yueyue¹, Wang Qian¹, Wang Qingshan¹ (¹Department of Pediatric Stomatology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China;

²Department of Stomatology, Liaocheng Retired Soldier Hospital, Liaocheng 252000, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: As a kind of bioactive material, nano-hydroxyapatite has received extensive attention for its excellent biological performance. Its effect on the proliferation, differentiation, mineralization and cytotoxicity of bone marrow stromal stem cells is an important factor affecting its osteogenesis performance, and it is also a current hot topic in the field of bone tissue engineering.

OBJECTIVE: To explore and analyze the effect of nano-hydroxyapatite on bone marrow stromal stem cells and to provide guidance for further study of tissue engineered bone.

METHODS: Relevant literature published from January 1, 2006 to July 26, 2018 was retrieved by the first author in PubMed, CNKI, VIP, WanFang and Google Scholar. The keywords were "hydroxyapatite, nano-hydroxyapatite, biological matrix material, bone marrow stromal stem cells, osteogenic activity, biocompatibility, cytotoxicity, bone defect, bone tissue engineering, tissue engineered bone" in English and Chinese, respectively. Sixty-six eligible articles were finally reviewed.

RESULTS AND CONCLUSION: A large number of studies have shown that the nano-hydroxyapatite and its composite materials with bone marrow stromal stem cells have good affinity, adhesion and biocompatibility, and can induce the proliferation and differentiation of bone marrow stromal stem cells. Nano-hydroxyapatite is an ideal material for bone defect repair, which can be widely used in bone defect repair and surface modification of implants, thereby promoting early new bone formation and strengthening the binding between implants and bone tissues. Nano-hydroxyapatite composite materials are also used to develop biological artificial ligaments and guided bone tissue regeneration membrane materials as well as to treat femoral head necrosis. Further investigations on the interaction between nano-hydroxyapatite and bone marrow stromal stem cells will certainly promote the research progress and clinical application of tissue-engineered bone.

Subject headings: Hydroxyapatites; Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. ZR2018LH010 (to WQS); the Medical and Health Technological Development Plan of Shandong Province, No. 2013WS0308 (to WQS)

0 引言 Introduction

随着组织工程研究的深入发展,组织工程化骨在先天性疾病、畸形、骨坏死、肿瘤、骨质疏松、创伤、感染等多种原因导致的骨缺损修复中逐渐成为首选。骨组织工程是以生物基质材料、种子细胞、细胞因子为基本原料^[1],将干细胞在体外培养扩增后种植于基质材料上(该基质材料能为细胞提供一定的生存空间),经培养增殖后植入生物体骨缺损处,在缺损处继续生长增殖并分泌细胞外基质,随着生物材料的降解,最终由新生的骨组织全部或部分取代基质材料,以修复骨缺损。大多数研究表明,理想的生物基质材料要求具有良好的生物相容性、骨诱导性、骨传导活性、可生物降解、合适的力学强度、开放多孔性、可塑性、便于细胞组织长入及物质代谢等特性。研究证明,人工合成的羟基磷灰石晶体结构与天然骨组织的无机成分相似,与人体细胞膜表层多糖和蛋白质以氢键结合,无细胞毒性、不致畸,具有高度的生物相容性和优良的成骨活性^[2]。对纳米材料进行探究发现,纳米材料中的粒子直径在三维空间中至少有一维处于纳米尺寸范围(1-100 nm)。由于纳米粒子特殊的结构尺寸,使得它在体积效应、表面效应、量子尺寸效应、宏观量子隧道效应等方面有独特的特性^[3-7]。相较于羟基磷灰石,纳米级羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite, nHA)具有更优良的生物学活性,目前已被广泛应用于临床多个领域。但nHA结晶程度和结构稳定性比自然骨组织中羟基磷灰石高,植入体内后不易降解^[8],脆性较大,限制了其作为较大骨缺损修复的应用^[9]。鉴于此,很多学者对nHA进行表面修饰、改性以及与其他材料复合后作为生物基质材料。

骨组织工程中种子细胞是其另一关键环节,目前首选的种子细胞是间充质干细胞,它是Caplan在前期研究理论的基础上提出来的命名^[10],其可以从骨髓、脐带、脂肪或其他组织中分离出来,并可在体外诱导分化成

骨、软骨、脂肪等一群细胞,常用的有骨髓基质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSCs)、脂肪源干细胞、胚胎干细胞等^[11],BMSCs由于其自我更新、多向分化潜能,以及易于获得及体外扩增能力强的特点,成为组织工程理想的种子细胞,具有广阔的应用前景^[12-13]。文章对近几年关于羟基磷灰石及其复合生物基质材料对BMSCs的影响进行综述,为其在骨缺损修复中的研究和应用提供帮助。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 应用计算机检索2006-01-01至2018-07-26 PubMed、CNKI、维普、万方和谷歌学术数据库相关文献,英文检索词为“hydroxyapatite, nano-hydroxyapatite, biological matrix material, bone marrow stromal stem cells, osteogenic activity, biocompatibility, cytotoxicity, bone defect, bone tissue engineering, tissue engineered bone”。中文检索词为“羟基磷灰石、纳米羟基磷灰石、生物基质材料、骨髓基质干细胞、成骨活性、生物相容性、细胞毒性、骨缺损、骨组织工程、组织工程化骨”,以近10年发表文献为主,个别文献追溯到10年前。

1.2 入选标准 纳入标准:①具有原创性,论点论据可靠的文献;②观点明确,分析全面的文献;③文献主体内容与此课题联系紧密的文献。排除标准:重复研究、时间久远的文献。

1.3 资料提取与文献质量评估 共检索到相关文献1 200余篇,通过阅读摘要初步筛选,排除与文章相关性不大的文献及重复研究,共选取66篇文献进行综述。

2 文献证据综合提炼 Literature synthesis and extraction

2.1 nHA结构、性质及制备方法 天然骨组织为无机相

(主要是羟基磷灰石)和有机相(主要是I型胶原纤维)的矿化复合物,在骨组织矿化过程中,纳米尺寸的羟基磷灰石晶体以层状形式周期性沉积于胶原纤维间隙间,这种层次结构使天然骨组织具有优异强度及韧性^[14]。人工合成的nHA($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)晶体结构与骨组织中的无机成分类似,晶体属六方晶系,结构为六棱柱体,其晶胞特征为 $a_1=a_2=0.943\ 2\ \text{nm}$, $c=0.688\ 1\ \text{nm}$, a 轴互成 120° 夹角, a 轴与 c 轴垂直^[15]。从羟基磷灰石晶体结构来看, Ca^{2+} 容易与阳离子发生交换, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Sr^{2+} , OH^- 易与阴离子交换并被吸附,除此之外还可与蛋白质、有机酸等发生反应。这种离子交换反应可改变羟基磷灰石晶体生长习性,从而改变羟基磷灰石机械性能^[16]。因此,大量学者对nHA及复合物进行研究。大量的实验研究表明nHA有优良的生物学活性及骨诱导性、骨传导性,是一种较为理想的骨缺损修复材料,能够广泛应用于骨缺损的修复、种植体表面改性、研制生物型人工韧带、引导骨组织再生膜材料和治疗股骨头坏死等方面。

nHA的制备方法主要有沉淀法、水热法、溶胶-凝胶法、超声合成法、微乳液法、固相反应法等^[17],见表1。

表1 纳米羟基磷灰石主要制备方法及其特点

主要制备方法	制备方法的特点	
湿法	沉淀法	简单易行,制作过程污染少,产物纯度高,是制备羟基磷灰石首选方法之一。
	水热法	操作简单,但对设备要求较高,产物结晶度高,纯度高,形态、尺寸可控。
	溶胶-凝胶法	制备所需材料价格较贵,带有毒性的有机溶剂等因素影响该方法的应用。
	超声波合成法	产物粒度小,活性高,反应机制需进一步探究。
	微乳液法	简单易行,可制备出大小均一的纳米羟基磷灰石。
干法	高温固相合成法	产物尺寸大,有杂质,粉末可烧结性较差。
	微波固相合成法	简单易行,易形成晶型较好的羟基磷灰石。

尹美林等^[18]采用化学沉淀方法制备nHA,并对其表征,扫描电镜下见羟基磷灰石为针状晶体,结晶程度好,粒径分布均匀。

2.2 BMSCs生物学特性 20世纪60年代Friedenstein等在骨髓细胞培养中发现一群成纤维样、贴壁生长与造血干细胞不同的细胞,其主要来源于中胚层,在骨髓、肌肉、外周血以及结缔组织中均有存在,以骨髓和脐血中含量最为丰富。研究发现其具有较强的自我更新、多向分化潜能,可在不同的诱导条件下分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞等多种细胞。徐俊昌等^[19]在体外分离培养BMSCs并对其表面标志物、多向分化特性进行鉴定,结果显示BMSCs表面表达CD105、CD166、CD29,成骨诱导分化后,胞体变宽,钙结节茜素红染色、碱性磷酸酶染色为阳性,成软骨分化3周后阿利辛染色阳性,成脂肪诱导后细胞胞浆内出现脂肪小体。

2.3 nHA及其复合材料对BMSCs的影响

2.3.1 nHA微粒浓度对BMSCs的影响 Liu等^[20]研究了不同浓度nHA微粒对BMSCs增殖分化的影响,结果显示,当nHA微粒浓度 $<20\ \mu\text{g}/10^4$ 个细胞时,nHA颗粒可促进BMSCs的增殖,但差异无显著性意义,nHA微粒浓度为 $20\ \mu\text{g}/10^4$ 个细胞时,可显著促进BMSCs的增殖,nHA微粒浓度大于 $20\ \mu\text{g}/10^4$ 个细胞时,可显著抑制BMSCs的增殖;在无血清培养条件下,nHA浓度为 $20\ \mu\text{g}/10^4$ 个细胞时,没有促进BMSCs增殖的作用,而浓度大于 $20\ \mu\text{g}/10^4$ 个细胞时,nHA微粒显著抑制BMSCs的增殖;在成骨诱导培养液中,nHA微粒浓度 $<20\ \mu\text{g}/10^4$ 个细胞时,对BMSCs矿化无显著促进作用,随着微粒浓度的增加,其对BMSCs成骨分化的促进作用逐渐增强,呈浓度依从性关系,但当浓度大于 $20\ \mu\text{g}/10^4$ 个细胞时,其对BMSCs矿化促进作用随微粒浓度的增加而逐渐减弱。研究发现,羟基磷灰石生物毒性受颗粒直径、接触剂量和接触方式的影响^[21]。Remya等^[22]将不同质量浓度nHA(10, 50, 100, 500, 1 000 mg/L)与BMSCs相互作用,结果显示,暴露在高质量浓度(1 000 mg/L)nHA溶液中悬浮细胞出现纺锤形改变和颗粒状细胞质的变化,随着nHA质量浓度的增加,细胞形态出现极其不规则状,细胞扩散模式受限制;通过检测线粒体活动对细胞生存能力进行评估,结果表明,低质量浓度中的细胞生存能力与对照组无显著差异,高质量浓度中的细胞存活率约60%;对细胞氧化应激进行检测发现,高质量浓度nHA溶液中细胞皱褶变化高,而早期细胞凋亡则出现在nHA较低的质量浓度中。nHA微粒甚至更高的质量浓度只改变了细胞形态,并不诱导细胞凋亡。

nHA在复合材料中所占比例同样对BMSCs有明显影响。Zhu等^[23]以含体积分数为10%胎牛血清的DMEM完全培养基为阴性实验对照组,以0.64%质量浓度苯酚为阳性实验对照组,将BMSCs与材料浸提液共同培养为实验组,观察第3, 5, 7天培养的BMSCs相对生长情况。结果显示,实验组细胞吸光度值显著增加,BMSCs的相对生长高于对照组和阴性组。在纳米羟基磷灰石/聚乙交酯-丙交酯(nanograde hydroxyapatite/poly lactic-co-glycolic acid, nHA/PLGA)复合支架材料中,当nHA/PLGA复合体积比为50/50时,BMSCs在黏附性、增殖率、成骨分化等方面均优于其他比例,表明合适比例的nHA在生物活性及骨传导方面扮演者重要的角色^[24]。谭羽莹等^[25]观察改性PLGA/HA复合材料与BMSCs体外培养后的细胞活性及生物相容性,MTT比色法检测在不同浓度PLGA/HA浸提液(10%, 30%, 50%, 80%)中BMSCs的增殖情况,观察材料表面细胞的黏附性及细胞形态,结果显示,高浓度材料浸提液(50%, 80%)对BMSCs的体外增殖呈负影响,但CTS均

在1级，符合安全评价标准；实验还表明，BMSCs能够黏附并伸展形成伪足固定于支架材料表面，部分细胞已融合成细胞层，可见细胞外基质。

2.3.2 nHA支架材料表面微形貌对BMSCs的影响 生物材料表面状态及物理结构对生物性能有较大的影响，天然骨组织中的羟基磷灰石以数十纳米的晶体形式存在，而正是这些数十纳米晶体的有序排列构成了骨组织的力学属性。nHA表面与细胞相互作用，其化学成分和表面形貌强烈影响着细胞的生存、附着、迁移分化和增殖^[26]。周琰春等^[27]采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)为添加剂，在水相体系中制备了形貌均匀的nHA粉末，以无CTAB添加剂的普通羟基磷灰石粉末为对照，分别制备成羟基磷灰石膜并对其物相进行表征，nHA粉末外貌呈球形，为多晶状态，分散好，大小均匀，具有较好的浸润性及亲水性。普通羟基磷灰石粉末外貌呈条棒状，单晶态，浸润性及亲水性不及nHA。将分离培养后的BMSCs在两种基质上复合，观察BMSCs增殖、分化状况，结果证明，nHA基质表面细胞数量显著高于普通羟基磷灰石基质，而且能获得更高的碱性磷酸酶、骨钙素表达，说明羟基磷灰石支架材料表面微形貌的构建对BMSCs增殖、分化具有明显影响，见图1，2。

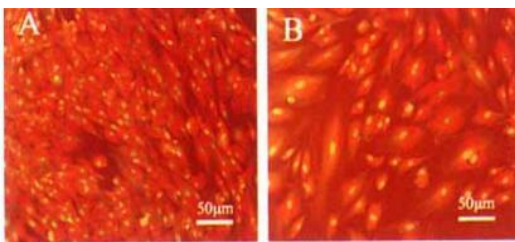
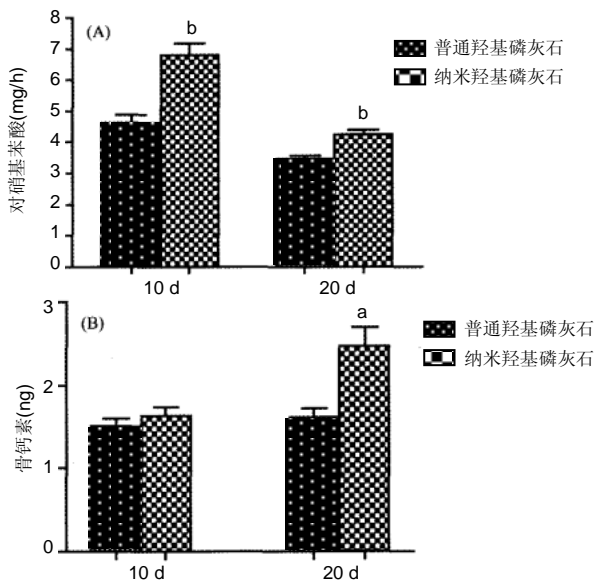


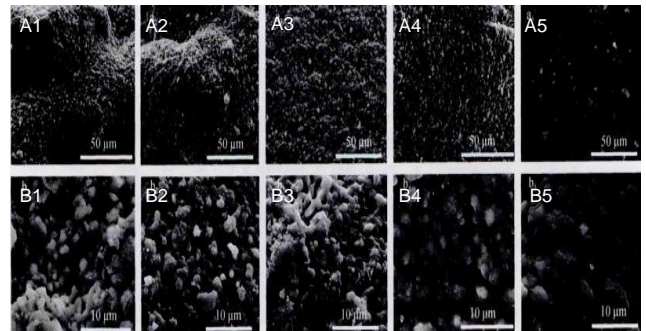
图1 生长在纳米羟基磷灰石(A)、普通羟基磷灰石(B)基质上的骨髓基质干细胞^[27]



图注：与普通羟基磷灰石比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。

图2 骨髓基质干细胞在纳米羟基磷灰石、普通羟基磷灰石基质上的碱性磷酸酶(A)、骨钙素(B)表达^[27]

智伟等^[28]通过调节溶胶-凝胶体系中羟基磷灰石粉末和甲壳素的质量比，制备出具有不同表面微形貌的羟基磷灰石球形颗粒。研究表明，羟基磷灰石所占比例越高，其孔隙率越高，在羟基磷灰石/甲壳素为4/1和20/1时(以HA₄、HA₂₀表示)，BMSCs与其共培养后，球形颗粒表面均可见有大量均匀矿化层覆盖，且覆盖于HA₄球形颗粒表面的晶片尺寸普遍大于HA₂₀。而在羟基磷灰石/甲壳素为35/1(HA₃₅)的致密光滑球形表面，只有局部区域观察到少量絮状矿化物覆盖，说明更高微孔率和粗糙度的羟基磷灰石球形颗粒表面具有更好的形成类骨磷灰石的能力，见图3。



图注：A1、B1：羟基磷灰石/甲壳素比例为4/1(HA₄)；A2、B2：羟基磷灰石/甲壳素比例为10/1(HA₁₀)；A3、B3：羟基磷灰石/甲壳素比例为20/1(HA₂₀)；A4、B4：羟基磷灰石/甲壳素比例为30/1(HA₃₀)；A5、B5：羟基磷灰石/甲壳素比例为35/1(HA₃₅)。

图3 不同羟基磷灰石/甲壳素比例制备羟基磷灰石球形颗粒表面扫描电镜照片^[28]

智伟等^[28]的研究结果证实，不同微形貌对干细胞分化程度的影响明显不同，微米级皱褶、微孔隙率较高的粗糙表面，具有引导干细胞铺展和增殖的作用，微孔隙率低的平滑表面则具有引导干细胞轴向延伸及骨向分化的趋势。

2.3.3 nHA复合材料对BMSCs的影响 羟基磷灰石作为骨组织工程中细胞载体基质材料，其良好的生物相容性、骨传导性、骨诱导活性已被肯定，但其脆性大、韧性差、降解速率较慢等缺点也是显而易见的，因此学者们利用材料间互补的特性，将其与一种或一种以上的材料按不同比例进行复合，充分发挥各组分的性能，以期达到理想基质材料的要求，并就其生物学性能进行研究，为组织工程化骨在临床应用提供依据。研究发现，粗糙钛表面纳米掺锶羟基磷灰石涂层可促进BMSCs成骨分化，并能使周围新骨早期形成^[29]。郭凌云等^[30]对快速原型制作纳米羟基磷灰石/聚乙内酯三维支架的细胞相容性进行研究，结果显示，BMSCs与支架复合培养后增殖情况良好，碱性磷酸酶活性明显高于对照组。Fu等^[31]将BMSCs与掺锶羟基磷灰石涂层体外复合培养，检测BMSCs黏附性，发现细胞在其表面的增殖活性明显高于对照组，并表现出良好的细胞分布形态，有大量的多晶形细胞质桥并随时间推移细胞质桥变厚，用

荧光肌动蛋白染色分析细胞骨架结构,与对照组相比可显示出清晰明确的应力纤维和微丝,定量反转录聚合酶链反应显示调控BMSCs增殖、黏附的基因高表达,实验表明该涂层可显著提高细胞活力、黏附力。以壳聚糖/nHA作为支架材料与鼠BMSCs体外复合培养,观察该支架材料对BMSCs生物学影响,结果显示,BMSCs染色后镜下见胞内有大量钙质沉积,碱性磷酸酶活性、I型胶原表达量、骨桥蛋白表达量明显高于对照组^[32]。史月华等^[33]研究掺镁羟基磷灰石涂层与纯羟基磷灰石涂层对种植体骨结合的影响,结果发现,在种植术后的早期,与纯羟基磷灰石相比,掺镁羟基磷灰石涂层具有更好的骨结合特性。BMSCs在表面置换的珊瑚羟基磷灰石内的黏附、增殖、分化效果也明显较好^[34]。

薛震等^[35]将nHA/壳聚糖/半水硫酸钙作为复合支架材料与BMSCs体外联合培养,发现BMSCs在材料表面攀附性生长,细胞生长旺盛,增殖分化活跃。BMSCs与nHA/聚乙烯内酯三维支架复合培养后,细胞在支架孔隙内以指数方式生长,增殖良好,细胞双极突起呈梭形,并分泌大量细胞外基质^[36]。宋华等^[37]将载有BMSCs的nHA支架植入大鼠胫骨缺损模型处,术后12周可见模型缺损处全被新生骨痂覆盖,nHA大部分降解,由骨样组织大量形成骨小梁结构,并高表达I型胶原纤维,与羟基磷灰石/BMSCs复合支架相比较,纳米级复合支架修复骨缺损效果更强。李昂等^[38]对nHA/聚酰胺66细胞毒性进行研究,发现经骨向诱导后BMSCs在nHA/聚酰胺66支架上黏附、增殖良好,碱性磷酸酶表达增强、活性较高并骨向分化,表明nHA/聚酰胺66支架有良好的生物相容性、无细胞毒性,可以作为支架材料修复骨缺损。王立新等^[39]对nHA/细菌纤维素复合组织工程支架的细胞毒性进行研究,证明该材料无急性全身毒性、无致敏性、无热源反应、无溶血反应,BMSCs在材料表面生长、增殖及黏附良好。

2.4 nHA与BMSCs在骨组织工程中的应用 nHA对BMSCs促进成骨的作用已经得到大量研究者的证实,而且已有很多研究成果应用于临床,其研究和应用范围从骨缺损的修复扩展到口腔种植体的改进^[40]、人工韧带^[31]、引导性骨组织再生膜^[41]、股骨头坏死及骨质疏松症的治疗^[42]、肌骨瓣的转移^[43]、携带药物^[44]、治疗癌症等^[45]。层出不穷的nHA复合材料的研究,使其性能得以进一步提升,如槲皮素交联改性nHA支架后,能更好地促进BMSCs的生长、增殖、向成骨细胞的分化和矿化^[46];由于锶化学结构与钙离子相似,羟基磷灰石中部分钙离子被锶取代,能增强材料的可溶性,对成骨细胞的分化及矿化有明显促进作用^[31];增韧的二氧化锆羟基磷灰石复合材料,其兼具羟基磷灰石相容性和二氧化锆对材料的增韧作用^[47]。从nHA复合一种材料与BMSCs的研究到逐步复合两种材料或多种材料^[48],从与天然有

机高分子复合到与合成有机高分子复合^[49-51],以及无机非金属材料复合、与金属材料的复合^[52-54],再到不同属性材料的三元或多元复合^[55],二维空间^[56]、三维空间结构改建^[57],两相或多相等多层结构的研制^[58]、或设计出梯度支架^[59],或是动态灌注生物反应系统^[60],再适当加入各种细胞因子^[61],亦可应用3D打印技术以及设计成可注射的材料等^[62-63],逐步模拟天然骨的体内环境。

优化骨组织工程种子细胞和改善细胞生存环境,也是提升BMSCs成骨活性的有效手段。如李毅等^[64]探讨不同基因对BMSCs成骨活性的影响,结果显示,骨形态发生蛋白2、碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子165基因转染后的BMSCs增殖能力有不同程度提高,细胞内碱性磷酸酶活性明显上调,骨形态发生蛋白2、碱性成纤维细胞生长因子转染组骨钙素水平升高,成骨活性增强;周航宇等^[65]研究显示骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子165双基因转染BMSCs诱导成骨能力更强。模拟体内环境添加各种细胞因子,能够提高BMSCs成骨活性及增殖能力^[66]。

3 总结和展望 Conclusions and prospects

国内外的研究已经证明nHA及其复合材料对BMSCs具有显著的促进增殖和成骨作用,为组织工程化骨的研发及临床应用提供了实验依据,且部分研究成果已经应用于临床。但迄今为止,符合组织工程支架材料要求的理想的组织工程化产品还有许多问题需要探索 and 解决,组织工程化骨的构建至今尚无突破性的进展。未来组织工程支架材料的发展趋势是制备更为理想的生物基质材料,如何改善nHA的生物相容性、骨诱导活性、适度的可降解性、合适的人体力学性能、可塑性易加工性、便于细胞组织长入及物质代谢等特性将是未来研究的重点;利用基因转染和转基因技术促进细胞因子在种子细胞内的表达,该转染细胞在nHA的诱导下将更加有助于组织工程的构建。相信这些新技术的发展和运用,必将对组织工程化骨在骨缺损和种植修复中的应用产生深远影响。

作者贡献: 该综述设计为王青山、李璐,实施为李璐、郑丽霞、牛月月、王倩、舒静媛、崔颖颖,评估为王青山,资料收集为李璐、郑丽霞、王青山。

经费支持: 该文章接受了“山东省自然科学基金(ZR2018LH010)”、“山东省医药卫生科技发展计划(2013WS0308)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 李强,王建武,党建军,等.三维骨组织工程复合体修复兔股骨头坏死的实验研[J].陕西医药杂志,2017,12(3):275-277.
- [2] Kalita SJ, Bhardwaj A, Bhatt HA. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. *Materials Science & Engineering C*. 2007;27(3):441-449.
- [3] Goldner G, Pötter R. Radiotherapy in lymph node-positive prostate cancer patients - a potential cure? Single institutional experience regarding outcome and side effects. *Front Radiat Ther Oncol*. 2008;41:68-76.
- [4] 刘芳.纳米材料的结构与性质[J].光谱实验室, 2011,28(2):735-738.
- [5] 赵玉岭.纳米材料性质及应用[J].煤炭技术,2009,28(8):149-151.
- [6] 朱婧.纳米材料在医学影像上的应用[D].苏州:苏州大学:2016.
- [7] Yang YC, Chao KS, Lin CP, et al. Oxaliplatin regulates DNA repair responding to ionizing radiation and enhances radiosensitivity of human cervical cancer cells. *Int J Gynecol Cancer*. 2009;19(4):782-786.
- [8] Braux J, Velard F, Guillaume C, et al. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation. *Acta Biomater*. 2011;7(6):2593-2603.
- [9] 鹿鸣.碳纤维增强纳米羟基磷灰石/聚酰胺66复合材料力学性能和组织相容性研究[D].北京:中国人民解放军总医院,2015.
- [10] 陈津.间充质(干)细胞的定义变迁[J/CD].中华细胞与干细胞杂志(电子版),2017,7(4):247-250.
- [11] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
- [12] Dulchavsky D, Gao X, Liu YB, et al. Bone marrow-derived stromal cells (BMSCs) interact with fibroblasts in accelerating wound healing. *J Invest Surg*. 2008;21(5):270-279.
- [13] Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther*. 2008;15(10):711-715.
- [14] Liu Y, Luo D, Wang T. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small*. 2016;12(34):4611-4632.
- [15] 刘飏,李仕群,张宁,等.微量元素对羟基磷灰石晶体结构的影响[J].济南大学学报,2006,20(3):193-194.
- [16] 陈德敏.生物陶瓷材料[J].口腔材料器械杂志, 2007,15(2):94-100.
- [17] 庞晓峰,曾红娟.纳米羟基磷灰石粉体的生物活性的研究[J].材料工程,2009,4:14-17,22.
- [18] 尹美林,赵善科,郑岩,等.羟基磷灰石纳米晶体的制备、表征及补钙效能研究[J].化学试剂,2018,40(3),212-216.
- [19] 徐俊昌,吴涛,吴桂华,等.人骨髓基质干细胞体外培养和生物学特性鉴定[J].中国现代医学杂志,2009,19(7):999-1002.
- [20] Liu Y, Wang G, Cai Y, et al. In vitro effects of nanophase hydroxyapatite particles on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2009;90(4):1083-1091.
- [21] Tomoaia G, Pop LB, Petean I, et al. Significance of Surface Structure on Orthopedic Materials. *Materiale Plastice*. 2012;49(1):48-54.
- [22] Remya NS, Syama S, Gayathri V, et al. An in vitro study on the interaction of hydroxyapatite nanoparticles and bone marrow mesenchymal stem cells for assessing the toxicological behaviour. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;117:389-397.
- [23] Zhu W, Guo D, Chen Y, et al. Cytocompatibility of PLA/Nano-HA composites for interface fixation. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016;44(4):1122-1126.
- [24] He S, Lin KF, Sun Z, et al. Effects of Nano-hydroxyapatite/Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) Microsphere-Based Composite Scaffolds on Repair of Bone Defects: Evaluating the Role of Nano-hydroxyapatite Content. *Artif Organs*. 2016;40(7):E128-135.
- [25] 谭羽莹,张舵,李玉新,等.改性纳米羟基磷灰石/PLGA同骨髓基质干细胞复合后相关生物学评价[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(25):4619-4622.
- [26] Abdel-Gawad EI, Awwad SA. Biocompatibility of intravenous nano hydroxyapatite in male rats. *Gawad*. 2010;8(9):60-68.
- [27] 周琰春,蔡玉荣,刘丽,等.球形羟基磷灰石纳米颗粒的可控合成及其对间充质干细胞生长分化的影响[J].无机化学学报, 2007,23(8):1335-1340.
- [28] 智伟,匙峰,李金雨,等.羟基磷灰石球形颗粒表面微型结构构建及其对干细胞生物学行为的调控[J].无机材料学报, 2017,32(3):319-325.
- [29] 杨华伟,陈凯,尚光伟,等.粗糙钛表面纳米掺锶羟基磷灰石涂层对BMSCs成骨分化的影响[J].同济大学学报,2015,36(1):13-17.
- [30] 郭凌云,张劲娥,袁建兵,等.快速原型技术制备Nano-HA/PCL支架与犬骨髓基质干细胞体外复合研究[J].口腔颌面外科杂志, 2015,25(1):34-38.
- [31] Fu DL, Jiang QH, He FM, et al. Adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells on porous titanium surfaces with strontium-doped hydroxyapatite coating. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017;18(9):778-788.
- [32] 乔瑞红,王东,孙海钰,等.骨髓基质干细胞与负载去细胞基质的壳聚糖/纳米羟基磷灰石复合微球联合培养的生物相容性研究[J].中华创伤骨科杂志,2014,16(8):710-714.
- [33] 史月华,骨志远,郑园娜,等.掺镁羟基磷灰石涂层对种植体骨结合的影响[J].口腔医学,2014,34(4):249-252.
- [34] 付昆,孟志斌,邵增务,等.人骨髓基质干细胞与表面置换珊瑚羟基磷灰石培养的定向诱导分化[J].颈腰痛杂志, 2008,29(6):519-522.
- [35] 薛震,牛丽媛,安刚,等.纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙为可注射骨组织工程支架材料的可行性[J].中国组织工程研究, 2015,19(8):1169-1164.
- [36] 李家峰,徐金霞,管海虹,等.纳米羟基磷灰石/聚己内酯复合大鼠骨髓间充质干细胞的生物相容性[J].中国组织工程研究, 2012,16(38):7042-7046.
- [37] 宋华,任向前,未东兴.纳米羟基磷灰石对缺损骨再生的影响[J].中国组织工程研究,2015,19(8):1155-1159.
- [38] 李昂,王晓宇,李泽成,等.人骨髓基质干细胞与支架材料纳米羟基磷灰石/聚酰胺66的生物相容性研究[J].中华创伤骨科杂志, 2016,18(3):241-246.

- [39] 王立新,袁峰,万怡灶,等.纳米羟基磷灰石/细菌纤维素复合组织工程支架的细胞毒性和生物相容性[J].中国组织工程研究, 2014, 18(47):7615-7620.
- [40] 李善昌,孔祥盼,李德超.纳米羟基磷灰石修复种植体周围骨缺损的实验研究[J].口腔医学研究,2008,24(5):537-539.
- [41] 王晓敏,李海坤,李旭东,等.胶原-羟基磷灰石复合骨组织引导再生性膜的细胞相容性实验研究[J].世界科技研究与发展, 2011, 33(6):1060-1062.
- [42] 刘彪,李运峰,胡静.含锶羟基磷灰石对骨质疏松症大鼠的影响[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(5):524-530.
- [43] 徐学武,郭铁芳,韩雪峰,等.预制作生物工程性肌骨瓣的实验研究[J].哈尔滨医科大学学报,2007,41(4):327-332.
- [44] 徐勇,安良,曾丹林,等.羟基磷灰石纳米带作为蛋白药物载体的研究[J].功能材料,2018,49(3):03124-03129,03135.
- [45] 韩丽丽,张慧慧,马惠芳,等.纳米羟基磷灰石对暖巢癌细胞株的抑制作用研究[J].新医学,2017,48(11):775-778.
- [46] Gupta SK, Kumar R, Mishra NC. Influence of quercetin and nanohydroxyapatite modifications of decellularized goat-lung scaffold for bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;71:919-928.
- [47] 唐月军.纳米增韧(HA-ZrO₂)生物复合多孔陶瓷的制备及其颌骨缺损修复实验研究[D].上海:第二军医大学,2006.
- [48] Lai GJ, Shalumon KT, Chen JP. Response of human mesenchymal stem cells to intrafibrillar nanohydroxyapatite content and extrafibrillar nanohydroxyapatite in biomimetic chitosan/silk fibroin/nanohydroxyapatite nanofibrous membrane scaffolds. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:567-584.
- [49] Luo Y, Lode A, Wu C, et al. Alginate/nanohydroxyapatite scaffolds with designed core/shell structures fabricated by 3D plotting and in situ mineralization for bone tissue engineering. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(12):6541-6549.
- [50] Zhu W, Guo D, Chen Y, et al. Cytocompatibility of PLA/Nano-HA composites for interface fixation. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;44(4):1122-1126.
- [51] Yang W, Both SK, Zuo Y, et al. Biological evaluation of porous aliphatic polyurethane/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(7):2251-2259.
- [52] Reddy S, Wasnik S, Guha A, et al. Evaluation of nano-biphasic calcium phosphate ceramics for bone tissue engineering applications: in vitro and preliminary in vivo studies. *J Biomater Appl.* 2013;27(5):565-575.
- [53] Yang HW, Lin MH, Xu YZ, et al. Osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells on strontium-substituted nano-hydroxyapatite coated roughened titanium surfaces. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(1):257-264.
- [54] Johnson I, Wang SM, Silken C, et al. A systemic study on key parameters affecting nanocomposite coatings on magnesium substrates. *Acta Biomater.* 2016;36:332-349.
- [55] Minardi S, Corradetti B, Taraballi F, et al. Evaluation of the osteoinductive potential of a bio-inspired scaffold mimicking the osteogenic niche for bone augmentation. *Biomaterials.* 2015;62:128-137.
- [56] Morelli S, Salerno S, Holopainen J, et al. Osteogenic and osteoclastogenic differentiation of co-cultured cells in polylactic acid-nanohydroxyapatite fiber scaffolds. *J Biotechnol.* 2015;204:53-62.
- [57] Garai S, Sinha A. Biomimetic nanocomposites of carboxymethyl cellulose-hydroxyapatite: novel three dimensional load bearing bone grafts. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;115:182-190.
- [58] Shalumon KT, Lai GJ, Chen CH, et al. Modulation of Bone-Specific Tissue Regeneration by Incorporating Bone Morphogenetic Protein and Controlling the Shell Thickness of Silk Fibroin/Chitosan/Nanohydroxyapatite Core-Shell Nanofibrous Membranes. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015; 7(38):21170-21181.
- [59] Zhou C, Deng C, Chen X, et al. Mechanical and biological properties of the micro-/nano-grain functionally graded hydroxyapatite bioceramics for bone tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;48:1-11.
- [60] Qian X, Yuan F, Zhimin Z, et al. Dynamic perfusion bioreactor system for 3D culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells on nanohydroxyapatite/polyamide 66 scaffold in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(6):893-901.
- [61] Qin J, Zhong Z, Ma J. Biomimetic synthesis of hybrid hydroxyapatite nanoparticles using nanogel template for controlled release of bovine serum albumin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;62:377-383.
- [62] Zhang M, Wang D, Yin R. Histocompatibility of nano-hydroxyapatite/poly-co-glycolic acid tissue engineering bone modified by mesenchymal stem cells with vascular endothelial growth factor. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2015; 95(37):3061-3065.
- [63] Bodakhe S, Verma S, Garkhal K, et al. Injectable photocrosslinkable nanocomposite based on poly(glycerol sebacate) fumarate and hydroxyapatite: development, biocompatibility and bone regeneration in a rat calvarial bone defect model. *Nanomedicine (Lond).* 2013;8(11):1777-1795.
- [64] 李毅,陈槐卿,成敏,等.不同基因转染对骨髓基质干细胞成骨活性的影响[J].生物医学工程杂志,2016,23(1):153-158.
- [65] 周航宇,夏德林,甘生远,等.骨形态蛋白2和血管内皮生长因子165双基因转染骨髓基质干细胞的异位诱导成骨能力[J].中国组织工程研究,2017,21(9):1334-1339.
- [66] 史素琴,潘研,岳新,等.Egr-1通过上调NDRG1诱导骨髓间充质干细胞成骨分化[J].重庆医学,2017,46(4):442-445.