

胶原-羟基磷灰石-硫酸软骨素-骨形态发生蛋白 骨修复材料的性质评估

王 浩,张里程,石 涛,熊 琦,唐佩福[△]

(中国人民解放军总医院骨科,北京 100853)

[摘 要] **目的:**评估以胶原、羟基磷灰石、硫酸软骨素等 3 种天然骨骼基本成分构建成的三维多孔骨修复材料的理化性能和体内生物学性能,观察其作为骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)载体的效果。**方法:**以胶原、羟基磷灰石、硫酸软骨素及 BMP-2 为原料,通过化学交联和冷冻干燥的方法构建具有一定三维结构的骨修复材料。通过 HE 染色、扫描电镜观察材料的结构性能;通过表面能谱、X 线衍射观察材料的理化性能;将骨髓基质干细胞(marrow stromal cells, MSCs)种植在材料表面,观察 MSCs 在材料表面的粘附、增生和分化;将该复合材料种植在大鼠体内,观察材料在体内的降解和异位成骨情况。**结果:**骨修复材料在植入局部保持完整的支架结构,具有利于细胞粘附和增殖的多孔结构。通过肌肉埋植,在异位诱导形成了骨组织,并且随着骨组织的形成,支架逐渐降解吸收。**结论:**胶原-羟基磷灰石-硫酸软骨素-骨形态发生蛋白是具有良好的生物相容性和骨诱导特性的骨修复材料。

[关键词] 骨代用品;胶原;羟基磷灰石;软骨素硫酸盐类;骨形态发生蛋白质类

[中图分类号] R318.17 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2011)05-0730-05

doi:10.3969/j.issn.1671-167X.2011.05.019

Properties evaluation of collagen-hydroxyapatite-chondroitin sulfate-bone morphogenetic protein bone substitute material

WANG Hao, ZHANG Li-cheng, SHI Tao, XIONG Qi, TANG Pei-fu[△]

(Department of Orthopaedics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China)

ABSTRACT Objective: To construct a new 3D porous bone substitute material with collagen, hydroxyapatite and chondroitin sulfate, which has the main components of nature bone and the cell growth factor BMP-2 with bone inductive ability. **Methods:** Collagen-hydroxyapatite-chondroitin sulfate scaffolds were prepared by chemical cross linking and freeze-drying, and bone morphogenetic protein (BMP) was incorporated into the scaffolds by adsorption. The bone substitute material was investigated by HE analysis, scanning electron microscope (SEM), electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA), and X-ray diffraction (XRD). Rat mesenchymal stem cells (MSCs) were seeded into the scaffolds and cultured to form cell/scaffold (CS) constructs *in vitro*. The ectopic osteoinduction of the scaffolds were evaluated *in vivo*. **Results:** The bone substitute material had a porous 3D structure facilitating cells growing into it. Implanted into the muscle, the scaffolds were degraded with the forming of new bone. **Conclusion:** Our Findings indicate that the bone substitute material has good biocompatibility and its attachment to CS could improve the adhesion and differentiation of cells.

KEY WORDS Bone substitutes; Collagen; Hydroxyapatite; Chondroitin sulfates; Bone morphogenetic proteins

随着骨诱导学说的提出和发展,具有良好组织相容性和骨诱导能力的骨修复材料的研究逐渐成为当前骨组织工程学研究的重点。理想的骨修复材料应满足以下几个要求:(1)良好的生物相容性和生物降解性,其在体内的降解产物对人体无害;(2)具有骨传导性,利于细胞粘附和增殖;(3)具有骨诱导性能,能使间充质干细胞向成骨细胞分化;(4)具有一定的强度,能对抗一定的外力;(5)易于塑形,可

根据需要加工成各种形状和大小。而 Urist 对骨形成蛋白(又称骨形态发生蛋白, bone morphogenetic protein, BMP)的分离和活性验证使这一目标成为可能^[1]。本研究将以天然骨骼的 3 种基本成分——胶原、羟基磷灰石、硫酸软骨素,复合构建成三维多孔支架体系,再吸附以具有骨诱导活性的细胞因子 BMP-2,形成骨修复材料。通过体外细胞种植和体内异位成骨,观察其生物相容性和骨诱导能力,并结

[△]Corresponding author's e-mail, pftang301@126.com

网络出版时间:2011-9-20 15:27:05 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20110920.1527.005.html>

合一系列的理化性能实验对其组成和结构进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究采用的胶原是胃蛋白酶消化法提取的牛肌腱混合型胶原^[2],羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)选用龙马牌医用羟基磷灰石微粒。

EDC-CS 交联液:40% (质量分数)的乙醇溶液,其中含有 50 mmol/L 的 MES(2-吗啉乙烷磺酸),24 mmol/L 的 EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺),5 mmol/L 的 NHS(N-羟基丁二酰亚胺)和 2% (质量分数)的硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS, Sigma 公司)。

1.2 复合支架的制备

称取羟基磷灰石粉末 0.6 g 数份,再称取数份 29.4 g 固含量为 1.02% (质量分数)的胶原分散液,在胶原分散液中加入 30.6 g 0.2 mol/L 的丙二酸溶液,4 °C 下恒速搅拌,在搅拌的条件下加入羟基磷灰石颗粒,共搅拌 2 h,即得到 1:2 胶原-羟基磷灰石分散液。将上述胶原-羟基磷灰石分散液 60 g 分别倒入 100 mm 培养皿中,冷冻干燥得到未交联的胶原-羟基磷灰石骨修复材料支架。

将干重为 50 mg 的胶原-羟基磷灰石支架浸泡于含 20 mL 50 mmol/L MES 的 40% 乙醇中 30 min,然后将支架浸泡在 20 mL EDC-CS 交联液中,室温下交联 4 h。将此支架在 0.1 mol/L 的 Na₂HPO₄ 中清洗 1 h,1 mol/L 的 NaCl 中清洗 2 h,2 mol/L 的 NaCl 中清洗 1 d,最后用双蒸水清洗 10 次,冷冻干燥机中 2 次冻干^[3-4]。

称取 BMP-2(Sigma)1 mg,溶于 4 mol/L 盐酸胍 10 mL,0 °C 下静置 30 min,形成浓度为 0.01% (质量分数)的 BMP-2 盐酸胍溶液。将胶原-羟基磷灰石-硫酸软骨素骨修复材料支架裁剪为 0.5 cm × 0.5 cm 大小,各取 10 片浸没于反应液中,0 °C 下静置 60 min。取出骨修复材料,于超净工作台中快速风干,环氧乙烷灭菌。

1.3 理化性能表征

1.3.1 HE 染色 取骨修复材料样品,经石蜡包埋,切片,脱蜡入水,蒸馏水洗,Harris 苏木素染色 5 min,蒸馏水洗,盐酸酒精分色数秒,氨水反蓝,蒸馏水洗,伊红染色 1 min,蒸馏水洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,加拿大树胶封片。在 Olympus 显微镜下观察样品的小梁结构和羟基磷灰石分布情况。

1.3.2 扫描电镜观察 取骨修复材料样品,表面

镀金后,用 HITACHIS-3500N 扫描电镜观察样品的空间结构,根据放大倍数,估算每个样品的平均孔径。

1.3.3 化学分析用电子能谱分析(electron spectroscopy for chemical analysis, ESCA) 分别取骨修复材料样品少量,通过 PHI5300 表面能谱 ESCA 系统对材料表面组分进行分析,考察样品表面原子比例情况。

1.3.4 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)分析 分别称取少量的骨修复材料、纯胶原及羟基磷灰石样品,用 RINT2000 Wide angle goniometer 对样品进行 X 射线衍射分析。X 射线选用 Cu K- α 1/40 kV/100 mA,扫描模式选用 continuous,扫描速度为 8 deg/min,扫描范围为 3 ~ 80 deg。

1.4 生物学检测

1.4.1 体外细胞种植 从 6 周龄 Waster 大鼠四肢中提取骨髓基质干细胞(marrow stromal cells, MSCs)。用 10% (质量分数)胎牛血清的 DMEM 培养调整细胞悬液浓度为 1×10^6 /mL,置于 CO₂ 温箱中培养,24 h 后换液,4 ~ 5 d 后消化传代^[5-6]。取处于指数生长期的 3 ~ 4 代骨髓基质干细胞,消化,离心,计数,调整细胞浓度至 1.0×10^6 个细胞/mL。在放有骨修复材料的 24 孔板中,分别加入 MSCs 悬液各 0.1 mL,再加入培养液 0.9 mL,37 °C,5% (体积分数)CO₂ 下培养,每 2 天更换一次培养液。分别于第 2 天和第 8 天取培养中种植有细胞的骨修复材料样品,于戊二醛中固定 2 h,饿酸中固定 1 h,乙醇梯度脱水,临界点干燥;离子镀膜;采用 HITACHI S-3500N 扫描电镜进行观察。在培养过程中,分别于 2 d、4 d、6 d、8 d 收集两个孔中骨修复材料上的 MSCs,移入细胞计数板,显微镜下计数细胞,绘制细胞生长曲线。

1.4.2 体内埋植 雄性 Wistar 大鼠共 12 只(2 月龄),分为 6 组,每组 2 只。将骨修复材料样品分别植入同一大鼠两侧臀部肌肉,缝合肌肉,用外科缝线缝合皮肤切口,碘酒消毒,放回笼中继续喂养。分别在植入后的 3、6、12 天及 4、5、7 周以脱颈法处死大鼠,每次 1 组,小心切取样品周围 0.5 ~ 1.0 cm 处的肌肉组织,置于 10% (质量分数)甲醛溶液中固定,作石蜡包埋,切片,HE 染色观察。

2 结果

2.1 HE 染色

用 EDC 交联的胶原-羟基磷灰石-硫酸软骨素骨

修复材料的 HE 染色照片见图 1。从图中可以看出,胶原-羟基磷灰石骨修复材料支架中的胶原呈规则网状结构,羟基磷灰石粉末均匀分散于胶原纤维中,呈深蓝黑色染。

2.2 扫描电镜

图 2 所示的是经过 EDC 交联的胶原-羟基磷灰石-硫酸软骨素骨修复材料的扫描电镜照片。孔径范围位于 100 μm 左右。实验证实这一孔径范围有利于细胞的粘附和增殖。

2.3 ESCA 分析

通过表面能谱 ESCA 的分析,可以给出骨修复材料表面的原子组成。图 3 是实验得到的 Ca、O、P、C、S 这 5 种元素在骨修复材料表面的原子数目比。

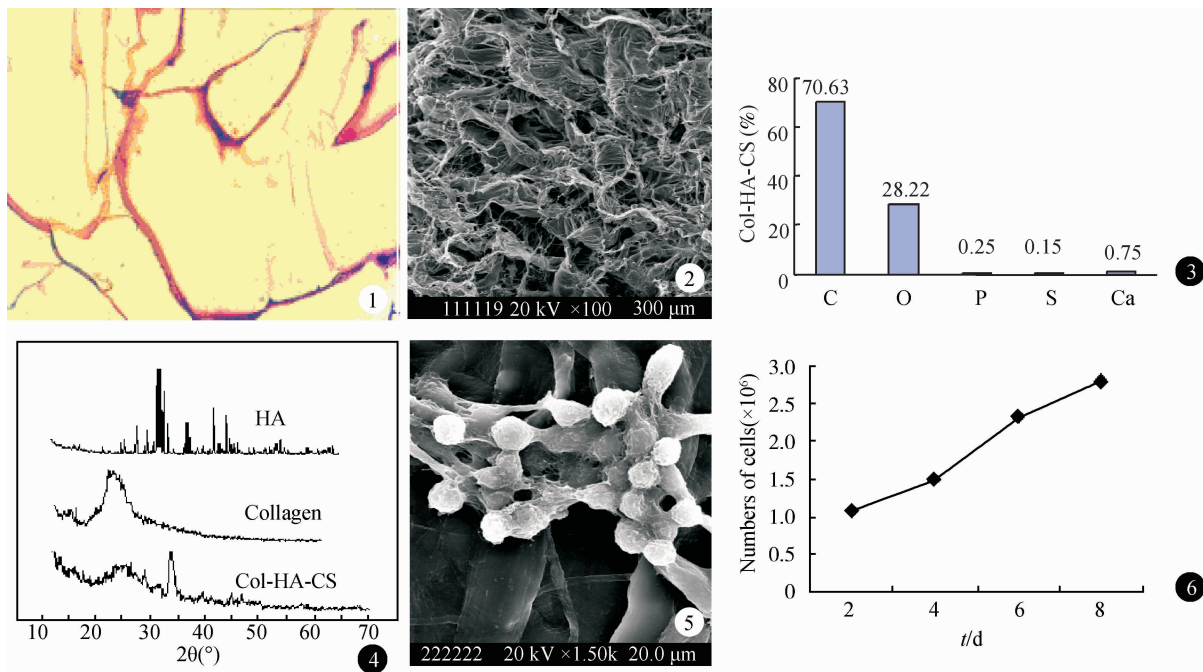
2.4 XRD 分析

分别对羟基磷灰石粉末、纯胶原及复合骨修复材料进行 XRD 分析,从图 4 的实验结果可以看出,在骨修复材料的相应位置均出现了相应的

羟基磷灰石结晶峰和胶原的弥散峰,说明羟基磷灰石和胶原在复合骨修复材料中仍保持其原有的结晶特性。由于复合材料中成分的互相影响,在复合材料中羟基磷灰石粉末的结晶峰及胶原弥散峰相对于纯羟基磷灰石粉末的结晶峰、纯胶原弥散峰有所位移。

2.5 生物学性能分析

2.5.1 体外 MSCs 种植 为了考察骨修复材料的生物相容性,体外提取培养 MSCs,种植在多孔的骨修复材料支架上,记数法考察生长曲线,并通过扫描电镜观察细胞在支架上的生长状态。细胞在骨修复材料上能够粘附生长,并分泌细胞外基质沉淀于细胞周围。图 5 为细胞在支架上生长 8 d 时的形态,可以看出培养 8 d 后,细胞数量增多,细胞分泌细胞外基质,并在支架与细胞和细胞之间形成连接。图 6 给出了 MSCs 在骨修复材料中的生长曲线,随着时间的增加,细胞不断增殖。



Col-HA-CS, collagen-chondroitin sulfate.

图 1 胶原-羟基磷灰石-硫酸软骨素骨修复材料的 HE 染色 ($\times 250$) 图 2 骨修复材料的扫描电镜 ($\times 100$) 图 3 骨修复材料 ESCA 分析

图 4 骨修复材料的 XRD 分析 图 5 MSCs 在骨修复材料上体外培养 SEM ($\times 1500$) 图 6 MSCs 在骨修复材料上的生长曲线

Figure 1 HE of the bone substitute material ($\times 250$)

Figure 2 SEM of the bone substitute material ($\times 100$)

Figure 3 The ESCA analyses of bone substitute materials

Figure 4 XRD of the materials and bone substitute material

Figure 5 SEM of MSCs cultured in bone substitute material ($\times 1500$)

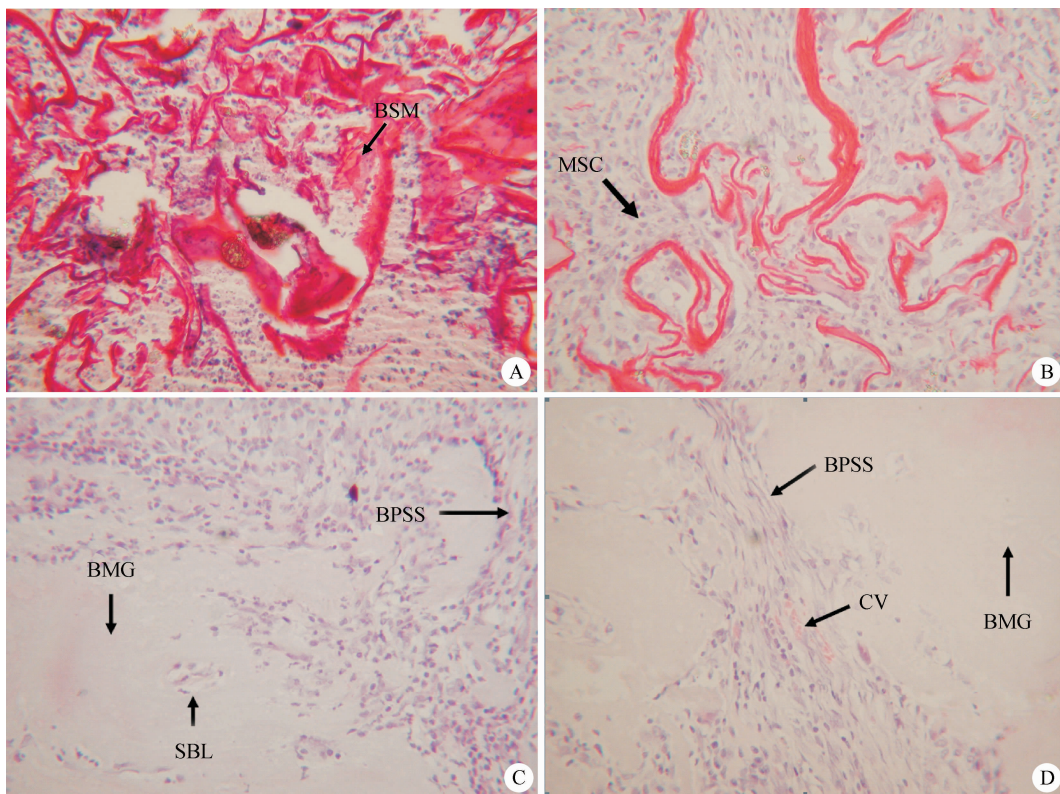
Figure 6 Analysis of growth curve of MSCs on the bone substitute material

2.5.2 体内埋植 为了进一步考察骨修复材料与机体间的作用,本研究将灭菌的骨修复材料埋植在大鼠臀部肌肉,通过 HE 染色观察骨修复材料体内诱导成骨的效果,同时考察不同时间的组织学反应,从而进一步考察其生物相容性及生物降解性能。骨

修复材料在大鼠肌肉内种植的第 1 周引起较重的炎症反应,骨修复材料形态完整,未发现成骨迹象(图 7A);在第 2 周末,骨修复材料开始部分崩解,炎症反应有所减轻,骨修复材料附近可见类似间充质干细胞在局部聚集(图 7B);第 5 周末,可见骨基质凝

胶的形成,骨基质凝胶中出现早期钙化的征象,在骨细胞周围,凝胶样物质封闭形成类骨陷窝和骨板样结构,骨修复材料支架完全崩解(图7C);第6周末,骨基质凝胶中钙化沉淀增多,形成类骨板样结构,骨

单位钙化区间出现毛细血管(图7D)。实验表明吸附有骨形态发生蛋白的骨修复材料具有诱导干细胞向成骨细胞分化的特性,并形成具有毛细血管结构的骨组织。



A, 1 week; B, 2 weeks; C, 5 weeks; D, 6 weeks. BSM, bone substitute material; MSC, mesenchymal stem cells; SBL, similar bone lacuna; BPSS, bone plate sample structure; BMG, bone matrix gelatum; CV, capillary vessel.

图7 骨修复材料体内埋植 HE 染色观察 ($\times 100$)

Figure 7 HE of the *in vivo* implanted bone substitute material ($\times 100$)

3 讨论

骨基质主要由有机质和无机质组成。有机质中包括胶原纤维和无定形基质,其中胶原纤维约占有机质的95%。骨组织中绝大多数细胞都粘附在胶原表面生长,同时胶原也维持着骨组织的韧性,扫描电镜下可见骨基质中的胶原纤维分支连结成网状。无定形基质为中性和酸性黏多糖,其中以嗜碱性的4-硫酸软骨素和6-硫酸软骨素为主,它们可促进细胞粘附,提高骨组织的强度和韧性。骨的无机盐是由磷酸钙形成的亚微沉淀物构成,与无机盐 HAP [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] 非常相近。在骨组织中,骨胶原纤维的抗压性和弹性较差,而 HAP 结晶则脆性较大,易碎裂,当两者以特定的结构结合在一起时,骨组织即拥有独特的强度和韧性^[7-8]。之前已有文献报道类似本实验的胶原-羟基磷灰石-硫酸软骨素三维多孔支架的制备^[9],而本研究采用物理混合和化学结合的方法构建

了与天然骨具有类似成分的胶原-羟基磷灰石-硫酸软骨素三维多孔支架,与其报道的制备方法不同,同时本实验还复合骨形态发生蛋白,制备了具有骨传导和诱导性的骨修复材料^[5,10]。

通过 HE 染色、透射电镜和扫描电镜观察,考察了复合骨修复材料的微观结构,结果表明胶原材料具有很好的纤维结构,羟基磷灰石和硫酸软骨素均匀地分散在胶原纤维间。经过胶原原液的提纯、溶胀、交联等处理及羟基磷灰石的添加,胶原的完整纤维结构均未受到破坏,仍能保持其天然生物活性的基础结构^[11]。

从表面能谱的分析结果得到 Ca 和 P 元素的比值为3,与羟基磷灰石的 Ca/P (约 1.67) 差别较大。这可能是由于羟基磷灰石大部分被包裹在胶原纤维内,ESCA 分析的是表面成分,因此不能准确地反映出整体 Ca/P 的比例。

通过体外 MSCs 在骨修复材料支架上的培养,

将细胞的增值倾向定性,证明细胞在骨修复材料上能够粘附生长,分泌细胞外基质沉淀于细胞周围,具有良好的生长状态,说明该骨修复材料具有较好的生物相容性。

骨修复材料研究的最终目的是通过骨修复材料,使宿主的血管和细胞进入植骨块形成新骨,随后移植骨被降解吸收并逐渐被新骨替代,故评价骨修复材料生物学性能最主要的指标应是其体内诱导新骨形成的能力,即诱导间充质干细胞趋化、分化成骨细胞,诱导成骨细胞在局部分泌矿化基质以及 I 型胶原蛋白的能力。本研究运用文献[12]的方法,将骨修复材料种植于大鼠腿部肌肉,通过 HE 染色观察其在体内诱导成骨的情况。

在第 1 周末,骨修复材料保持较完整的结构,植入物边缘有较重的炎性浸润,无细胞外基质沉淀物出现。在第 1 周,骨修复材料中 BMP 的释放第 1 次出现高峰,并诱导间充质干细胞向骨修复材料局部趋化、增殖。间充质干细胞是一种类似骨髓基质干细胞的多能干细胞,在一定条件下它可以定向分化为成骨细胞。实验已经证实,BMP-2 对这种干细胞有促进增殖、诱导分化和趋化作用。由第 1 周的 HE 染色结果可知,当骨修复材料植入肌肉后,BMP-2 从骨修复材料中缓慢释放出来并作用于局部肌肉中的间充质干细胞,使其发生趋化作用,向骨修复材料处迁移并在迁移过程中增殖。

在第 2 周,骨修复材料附近间充质干细胞密集出现,胶原-羟基磷灰石-硫酸软骨素骨修复材料成骨细胞周围有少量嗜碱性染色的细胞外基质出现,骨修复材料周围的炎性浸润有所减轻;骨修复材料离散出现降解的早期征象。在这一周内,由于 BMP-2 的诱导分化作用,间充质干细胞大量向成骨细胞分化。在骨修复材料周围,成骨细胞开始少量产生细胞外基质。另外,在骨修复材料植入后第 2 周仍然有炎症反应存在,原因可能是:(1)在分离提纯胶原时胶原蛋白结构中的末端肽未能切除干净,植入后引起较重的炎症反应;(2)在胶原蛋白中含有未能纯化的杂蛋白。

从第 5 周起,骨修复材料基本崩解成小片状,同时成骨细胞分泌大量的细胞外基质,聚集成片状嗜碱性染色区;在骨修复材料的嗜碱性染色区内出现成骨细胞分化;大量细胞外基质的分泌和骨细胞的

出现说明新骨形成过程的开始,而这一过程正好与骨修复材料的降解相衔接,从而实现了由自体形成的新骨替代植入物这一骨修复材料的最终目的。

第 6 周,骨修复材料支架基本完全崩解;在骨修复材料的骨基质凝胶中形成了类骨板结构,同时还存在有骨细胞和骨陷窝,在骨形成区之间有血管化。骨基质凝胶的钙化、骨板的形成和血管化标志着新骨的构建完成。

综上所述,胶原-羟基磷灰石-硫酸软骨素骨修复材料具有与天然骨类似的组成和微观结构,适于细胞粘附生长,生物相容性好,通过和骨形态发生蛋白结合,具有骨诱导活性,可以进一步用于骨组织的修复。

参考文献

- [1] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2529-2543.
- [2] Yang HY, Zhang QQ. Preparation and characterization of collagen-GAGs bioactive materials for tissue engineering [J]. *J Mater Sci Technol*, 2001, 17(5): 495-500.
- [3] Pieper JS, Hafmans T, Veerkamp JH, et al. Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects [J]. *Biomaterials*, 1999, 20(6): 847-858.
- [4] Zhang L, Hu M, Li Y, et al. Study on modification of collagen with chondroitin sulfate on the microcosmic level [J]. *Artif Cell Blood Sub Immobil Biotechnol*, 2005, 33(2): 215-226.
- [5] Suan LI, Genevieve MC, Michael JM, et al. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds [J]. *J Biomed Mater Res*, 1997, 36(1): 17-28.
- [6] Martin I, Shastri VP, Padera RF, et al. Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams [J]. *J Biomed Mater Res*, 2001, 55(2): 229-235.
- [7] Burg KL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(23): 2347-2359.
- [8] Itoh S, Kikuchi M, Takakuda K, et al. The biocompatibility and osteoconductive activity of a novel hydroxyapatite/collagen composite biomaterial, and its function as a carrier of rhBMP-2 [J]. *J Biomed Mater Res*, 2001, 54(3): 445-453.
- [9] Moldovan L, Craciunescu O, Oprita E, et al. Collagen-chondroitin sulfate-hydroxyapatite porous composites: preparation, characterization and *in vitro* biocompatibility testing [J]. *Room Biotechnol Lett*, 2009, 14(3): 4459-4466.
- [10] Sena LA, Martins VA, Dille J, et al. SEM and TEM characterization of hydroxyapatite synthesized on collagen matrices [J]. *Acta Microscopica*, 2003, 12(6): 45-46.
- [11] Du C, Cui FZ, Zhu XD, et al. Three-dimensional nano-Hap/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44(4): 407-415.
- [12] Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials [J]. *Tissue Eng*, 2000, 6(4): 351-359.

(2011-06-30 收稿)
(本 文 编 辑 : 赵 波)