

# 骨形态发生蛋白复合胶原释放系统的研究进展

张泉综述 邓飞龙审校

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院种植科 广州 510055)

**[摘要]** 骨形态发生蛋白(BMP)是一种具有诱导新骨形成能力的生物活性分子,它与各种生物材料复合构成的各种释放系统用于临床的骨修复。目前,BMP复合胶原释放系统的建立和应用备受业界的关注,其中BMP与胶原的结合方式更是重中之重。本文就BMP复合胶原常用的胶原材料、BMP与胶原之间的结合方式等研究进展作一综述。

**[关键词]** 骨形态发生蛋白; 胶原; 释放系统

**[中图分类号]** R 783.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.02.032

**Research progress on release system of bone morphogenetic protein and collagen** Zhang Quan, Deng Feilong. (Dept. of Implantation, Hospital of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

**[Abstract]** Bone morphogenetic protein(BMP) is a kind of bioactive molecules with the ability to induce new bone formation, combined with a variety of biological materials to create various delivery systems for clinical bone repair. The establishment and application of the release system of BMP and collagen is the focus of current research, among which the binding mode of BMP and collagen is the most important. In this paper, the commonly used collagen materials of the release system of BMP and collagen as well as the binding mode of BMP and collagen are reviewed.

**[Key words]** bone morphogenetic protein; collagen; release system

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)属于转化生长因子超家族成员,迄今已经分离和纯化出了17种BMP<sup>[1]</sup>。关于BMP在骨骼发育和修复中的作用,已有众多的研究<sup>[2-3]</sup>。大多数BMP在骨形成和骨折愈合中起着重要的作用,其中BMP-2、4、7、9可能是最有力的间充质细胞向成骨细胞分化的诱导剂。

BMP-7又被称为成骨蛋白-1,一些研究<sup>[4-5]</sup>证实其可增强新骨的形成。在体外,少量的BMP即可诱导细胞反应,当其被植入体内时,因其半衰期短且极易受到蛋白水解酶的作用而迅速地变性和降解,经常发生不充分的和不适当的组织再生<sup>[6]</sup>;所以,BMP的应用需要结合相应的载体,以构成适当的释放系统<sup>[7-8]</sup>,从而实现BMP的持续性释放。

可作为BMP释放系统的载体材料较多,主要

的有如下4种<sup>[9]</sup>。1)天然的高分子材料:胶原、藻酸盐和脱乙酰壳多糖等;2)无机材料:磷酸钙、生物活性玻璃、羟磷灰石、玻璃酸、磷酸三钙、陶瓷和硫酸钙等;3)合成的高分子材料:聚乳酸、聚乙醇酸等;4)复合物:胶原复合羟磷灰石等。

胶原是支持组织和结缔组织的主要成分,既有良好的生物相容性,与细胞的亲和力高,可刺激细胞的分化和增殖;还有良好的生物降解性,植入体内后可降解为对人体无害的短肽和氨基酸,通过新陈代谢排除体外,或者成为组建细胞的原料。因此,胶原作为BMP的缓释载体备受医学、材料学和生物医学工程领域的广泛重视。

目前,胶原是应用范围最广使用时间最长的BMP单一载体或复合载体的组成成分<sup>[1]</sup>。

## 1 BMP复合胶原释放系统的胶原材料

作为BMP的有机载体,各种胶原制品均经过了广泛的试验。胶原已经被制成粉末、胶原膜以及可吸收的胶原海绵和水溶液<sup>[10]</sup>。当下,研究最多的作为BMP载体的胶原材料主要为脱钙骨基质

[收稿日期] 2011-05-20; [修回日期] 2011-11-28

[基金项目] 广东省科技计划基金资助项目(2010B031100007)

[作者简介] 张泉(1984—),男,山东人,硕士

[通讯作者] 邓飞龙, Tel: 020-83862537

(demineralized bone matrix, DBM)、可吸收胶原海绵( absorbable collagen sponge, ACS)和胶原膜。

### 1.1 脱钙骨基质

DBM 是一种来自骨松质的胶原支架, 主要成分是不含 BMP 的 I 型胶原蛋白。DBM 在结构和成分上类似于人骨组织, 故适于骨组织的再生。DBM 已被用于治疗长骨缺损和颅骨临界大小的骨缺损以及间充质细胞成骨分化的研究中。

在 BMP 的研究中, DBM 被用作载体以试验 BMP 诱导成骨的效力<sup>[11-12]</sup>。在一项长骨缺损愈合的动物试验中, 将重组人 BMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2) 和羊无活力的 DBM 复合物植入成年绵羊临界大小的制版稳定的中股骨部分缺损中<sup>[11]</sup>, X 线片上可以查见植入复合物组新骨形成较为明显, 而空白组或仅植入无活力的 DBM 组仅仅产生了少量的新骨。在其后 1 年的随访调查<sup>[12]</sup>中发现, 植入相同 rhBMP-2 复合物的羊股骨缺损显示出正常的愈合顺序, 引起横跨缺损的新的骨密质形成和毗邻骨髓腔的再通。

### 1.2 可吸收胶原海绵

ACS 最初被批准用于止血, 其制造涉及牛跟腱胶原蛋白的分散、低压冻干、化学交联和灭菌。ACS 可作为 BMP 的载体和新骨形成的支架。BMP 与 ACS 的复合有利于 BMP-ACS 复合物的手术植入和 BMP 在治疗部位的存留。

近年来, 动物和临床研究<sup>[13-16]</sup>对 ACS 作为 BMP 的载体进行了评价。在 27 只犬的桡骨临界大小的缺损模型中, Sciadini 等<sup>[13]</sup>比较了不同剂量的 rhBMP-2-ACS 复合物与犬自身骨移植功效的差异: 经 rhBMP-2 处理的缺损与单独经 ACS 处理的缺损或犬自身骨移植相比较, 显现出更好的愈合效果; 然而, 最重要的证据来自设计良好的临床试验。Govender 等<sup>[14]</sup>对低剂量(0.75 g·L<sup>-1</sup>)和高剂量(1.5 g·L<sup>-1</sup>)rhBMP-2-ACS 复合物的成骨效果进行了临床评价: 在术后 12 个月, 高剂量组患者相对于对照组愈合明显加快, 侵入性的干涉更少和假关节的发生率更低。对于需要行上颌窦提升的患者, rhBMP-2-ACS 复合物成功地与骨结合的牙种植体的植入和功能负载诱导出足够的骨组织<sup>[15]</sup>。Herford 等<sup>[16]</sup>在对 14 例患者的回顾性研究中发现, 在使用 rhBMP-2-ACS 复合物而没有同时使用植骨材料的临界大小的下颌骨缺损部位, 骨再生良好。

### 1.3 胶原膜

胶原膜是一种可吸收的生物膜, 具有高度的生物相容性。口腔种植引导骨再生手术中使用的 Bio-Gide 膜是一种可吸收的双层胶原膜, 即致密层和多孔层由高纯度的天然 I 型胶原和 II 型胶原蛋白(猪源化)构成。与软组织接触的致密层有良好的细胞隔离功能, 可阻止结缔组织长入膜保护区; 与骨缺损部位接触的多孔层由松散分布的胶原纤维组成, 起着稳定血凝块的作用并使骨细胞可以与膜结合。单纯应用 Bio-Gide 膜也有些许不足, 而将 BMP 与胶原膜相复合, 既阻止了软组织的长入, 又增加了局部促骨生长因子的水平; 既可加速骨愈合, 又可在一定程度上弥补胶原膜吸收速度过快的不足<sup>[17]</sup>。

## 2 BMP 与胶原的结合方式

探讨 BMP 与胶原载体的结合方式, 旨在提高 BMP 与 DBM 结合力的研究<sup>[18]</sup>越来越多。因为, BMP-2 与载体结合力的大小决定载体的携带量、释放速度和释放时间, 结合力太小, 起不了载体作用, 导致携带量太少或释放太早, 不能保证长时间的持续缓慢的释放; 所以, 学者们在保持 BMP 活性的前提下, 尝试包括物理吸附、静电吸附、共价结合和抗原抗体结合等方式来加强载体与 BMP 的结合。

### 2.1 物理结合方式

2.1.1 物理吸附 即将 BMP 粉末溶于某种溶液中, 继而将 DBM、胶原膜或胶原海绵浸润其中, BMP 就吸附到胶原膜或胶原海绵上。物理吸附操作简单, 目前的研究和应用最多; 但物理吸附结合力较低, 植入体内后 BMP 被迅速地释放出来, 故早期骨缺损部位的质量分数较高, 难以持续地释放 BMP, 作用时间较短; 而且在晚期, 骨缺损部位的质量分数又较低。

Hollinger 等<sup>[19]</sup>将 35 μg 的 rhBMP-2 与一种 ACS 通过物理吸附的方式结合到一起, 然后将 hBMP-2 与 ACS 复合物、兔自身骨和 ACS 植入新西兰大白兔桡骨临界大小的骨缺损中, 以比较三者修复骨缺损的效果。研究结果显示: rhBMP-2 与 ACS 复合物具有较高的效力和生物安全性, 到第 8 周时, 复合物组与兔自身骨组和 ACS 组相比较, 明显地促进了新骨的形成。

袁继龙等<sup>[20]</sup>将 rhBMP-2 溶于尿素溶液中, 再将一块胶原膜浸于其中, 制备 rhBMP-2 与胶原膜

的复合物，以探讨 rhBMP-2 与胶原膜复合后的生物可吸收性和促骨生成膜对修复下颌骨缺损引导骨再生愈合过程的作用及其机制，结果同样呈阳性，与前人的研究结果一致。

2.1.2 静电吸附 即根据 BMP 与胶原等电点的不同，制成带不同电荷的溶液，通过正负电荷之间的吸引力将 BMP 结合到胶原载体上。由于其范德华力或静电作用力较弱，故这种结合方式同样结合力较低<sup>[20]</sup>，其释放动力学与物理吸附的结合方式基本相同。

### 2.2 化学结合方式

即通过某种方式构建强化学键并将 BMP 共价结合到胶原载体上，譬如，胶原结合区(collagen-binding domain, CBD)与胶原之间共价结合<sup>[21]</sup>或肝素与 BMP 分子中的肝素结合区之间的共价结合<sup>[22]</sup>等。这种结合方式与单纯的物理结合方式相比较，结合力较高而且较持久。随着胶原材料的降解，BMP 被缓慢地释放出来，可在骨缺损部位较持续地保持一定的作用质量分数，可明显地降低 BMP 的质量分数，从而避免过高剂量可能引起的不良反应。此外，BMP 仍保持其原有的生物活性。

2.2.1 胶原结合区 Chen等<sup>[21]</sup>通过组织工程的方法将一个 CBD 结合到天然 BMP-2 的 N-末端上，然后再将带有 CBD 的 BMP-2 与 DBM 特异性地结合。细胞培养试验显示，与天然的 BMP-2 相比较，该重组的 BMP-2 的生物活性并没有明显的降低，胶原支架可以更有效地保留 BMP-2。动物试验证实，该 BMP-2 复合 DBM 释放系统，显示出一个更好的骨诱导效应。

2.2.2 交联肝素 Lin 等<sup>[22]</sup>采用1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺酯交联剂将肝素交联到 DBM 上，然后再将 DBM 与 BMP-2 复合，通过肝素与 BMP-2 分子中的肝素结合区之间的共价键实现 BMP-2 与 DBM 的特异性结合，结果不但 BMP-2 与 DBM 的结合力增加，而且 DBM 的力学性能也大大提高。由此可见，BMP-2 与 DBM 复合物可增强成骨，可用于骨缺损的修复。

### 2.3 免疫结合方式

即将抗原和抗体分别结合到 BMP 和胶原上，通过抗原抗体的特异性结合，实现 BMP 与胶原载体的特异性结合。这种结合方式的优点类似于化学结合方式，具有更高的结合力和可控制的 BMP

释放动力学。Zhao等<sup>[23]</sup>用蛋白质生物交联剂 sulfo-SMCC [sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate, SMCC]和2-亚氨基四氢噻吩盐酸盐(traut)试剂将单克隆的组氨酸抗体交联到 DBM 胶原支架上，通过基因重组技术将组氨酸重组到 BMP-2 上，然后通过抗原抗体的特异性结合使 BMP-2 与 DBM 结合在一起。与物理吸附相比较，交联抗体的 DBM 呈现出较 BMP-2 更高的结合力和可控制的释放动力学，而且 BMP-2 对 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞的成骨活性和体内的异位骨诱导能力增强。

## 3 展望

关于 BMP 释放系统，未来的重点是研究可注射方式的理想释放系统，从而可经皮注射而不再需要切开翻瓣的外科手术过程。这些可注射的方式包括各种样式的玻璃酸凝胶、磷酸三钙和胶原为基础的释放系统，聚 N-异丙基丙烯酰胺聚合物和聚乙二醇为基础的水凝胶。

释放 BMP 的另外一个方式是基因治疗，它可通过包含基因修饰细胞的系统实现，或者通过将编码 BMP 的 DNA 导入到具有骨传导性的支架上实现，例如胶原海绵；但是，基因治疗的许多问题还有待进一步研究，特别是基因治疗的安全性和可靠性问题。骨的形成通常需经过一个过渡性的软骨形成阶段，骨再生的相同因素可能有利于软骨的修复。软骨不具备自我修复性能，而用 BMP 复合胶原进行软骨再生是一个亟待期待的临床目标。

## 4 参考文献

- [1] Bessa PC, Casal M, Reis RL. The road from the laboratory to the clinic, part (basic concepts)[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2008, 2(1) :1-13.
- [2] Jung RE, Weber FE, Thoma DS, et al. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate[J]. Clin Oral Implants Res, 2008, 19(2) : 188-195.
- [3] Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Khademhosseini A, et al. Bone regeneration through controlled release of bone morphogenetic protein-2 from 3-D tissue engineered nano-scaffold[J]. J Control Release, 2007, 117(3) 380-386.
- [4] Hamdy RC, Amako M, Beckman L, et al. Effects of osteogenic protein-1 on distraction osteogenesis in rabbits

- [J]. Bone, 2003, 33(2) 248-255.
- [5] Vaccaro AR, Whang PG, Patel T, et al. The safety and efficacy of OP-1(rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis :Minimum 4-year follow-up of a pilot study[J]. Spine J, 2008, 8(3) :457-465.
- [6] Engstrand T, Veltheim R, Arnander C, et al. A novel biodegradable delivery system for bone morphogenetic protein-2[J]. Plast Reconstr Surg, 2008, 121(6) :1920-1928.
- [7] Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A :Current challenges in BMP delivery[J]. Biotechnol Lett, 2009, 31(12) :1817-1824.
- [8] Calori GM, Donati D, Di Bella C, et al. Bone morphogenetic proteins and tissue engineering :Future directions [J]. Injury, 2009, 40(Suppl 3) S67-S76.
- [9] Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B :Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering[J]. Biotechnol Lett, 2009, 31(12) :1825-1835.
- [10] Issa JP, Bentley MV, Iyomasa MM, et al. Sustained release carriers used to delivery bone morphogenetic proteins in the bone healing process[J]. Anat Histol Embryol, 2008, 37(3) :181-187.
- [11] Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, et al. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein[J]. Clin Orthop Relat Res, 1993(293) 317-326.
- [12] Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, et al. Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2[J]. Clin Orthop Relat Res, 1995 (318) 222-230.
- [13] Sciadini MF, Johnson KD. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model[J]. J Orthop Res, 2000, 18(2) 289-302.
- [14] Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures :A prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients[J]. J Bone Joint Surg Am, 2002, 84(12) 2123-2134.
- [15] Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, et al. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2005, 63(12) :1693-1707.
- [16] Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2008, 66(4) :616-624.
- [17] Jung RE, Windisch SI, Eggenschwiler AM, et al. A randomized-controlled clinical trial evaluating clinical and radiological outcomes after 3 and 5 years of dental implants placed in bone regenerated by means of GBR techniques with or without the addition of BMP-2[J]. Clin Oral Implants Res, 2009, 20(7) :660-666.
- [18] 何绮芬, 邓飞龙. 骨形态发生蛋白-2释放系统的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2009, 36(6) :694-697.
- [19] Hollinger JO, Schmitt JM, Buck DC, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration[J]. J Biomed Mater Res, 1998, 43(4) :356-364.
- [20] 袁继龙, 柳大烈, 吴景泉, 等. 重组人骨形态发生蛋白2与胶原膜复合引导骨再生的特性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(6) :1001-1004.
- [21] Chen B, Lin H, Wang J, et al. Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2[J]. Biomaterials, 2007, 28(6) :1027-1035.
- [22] Lin H, Zhao Y, Sun W, et al. The effect of crosslinking heparin to demineralized bone matrix on mechanical strength and specific binding to human bone morphogenetic protein-2[J]. Biomaterials, 2008, 29(9) :1189-1197.
- [23] Zhao Y, Zhang J, Wang X, et al. The osteogenic effect of bone morphogenetic protein-2 on the collagen scaffold conjugated with antibodies[J]. J Control Release, 2010, 141(1) 30-37.

(本文编辑 刘世平)

### 《华西口腔医学杂志》再次被评选为中国精品科技期刊

2011年12月2日获悉,精品科技期刊服务与保障系统项目组、中国科学技术信息研究所经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价,由教育部主管、四川大学主办的《华西口腔医学杂志》再次被评选为2011年度中国精品科技期刊。

《华西口腔医学杂志》编辑部