

甲壳素及其衍生物用于骨缺损修复的研究进展

周红波综述 朱智敏审校

(四川大学华西口腔医院修复科 成都 610041)

[摘要] 颌面部骨缺损造成的畸形与功能障碍主要通过骨移植来修复,寻求理想的骨缺损修复材料是相关研究的热点。甲壳素是天然高分子化合物,具有独特的分子结构和优越的生物学特性,有望成为理想的骨修复材料。本文就目前国内外对甲壳素及其衍生物应用于骨缺损修复方面的主要研究及进展作一综述。

[关键词] 骨缺损; 甲壳素; 填充修复; 骨组织工程

[中图分类号] R 318.08 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.01.023

Research progress on chitin and its derivatives in repair of bone defect ZHOU Hong-bo, ZHU Zhi-min.
(Dept. of Prosthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] At the present, the main approach to repair the maxillary and facial malformation and dysfunction caused by bone defect is bone graft. Many researches focus on seeking for an ideal repair material. Chitin and its derivatives are a kind of native polymer. They have the potential to be an ideal repair material because of their special molecular structure and excellent biological characteristics. In this article, the recent studies on the application of chitin and its derivatives for repair of bone defect are reviewed.

[Key words] bone defect; chitin; filling repair; bone tissue engineering

颌面部的骨缺损由外伤和肿瘤切除等多种原因造成,常造成颌面部的畸形和功能障碍,目前主要通过骨移植进行修复。移植骨按来源可大致分为自体骨、同种异体骨、异种骨和人工骨替代材料。自体骨移植骨源有限,并会给患者造成新的创伤和痛苦,异体骨和异种骨诱导活性差,同时存在免疫排异反应等问题。甲壳素又名甲壳质、几丁质、甲壳胺,广泛存在于甲壳类动物、昆虫和霉菌中。1894年,F.Hoppe Seiler 将用浓碱处理后得到的脱乙酰基产物命名为壳聚糖,它是甲壳素最重要的衍生物之一^[1]。作为天然高分子化合物,甲壳素和壳聚糖具有独特的分子结构和良好的生物学特性,有望成为理想的骨修复材料。本文就目前国内外对甲壳素及其衍生物应用于骨缺损修复方面的主要研究及进展作一综述。

1 甲壳素及其衍生物用于骨缺损修复的生物学基础

1.1 甲壳素和壳聚糖的结构和性质

甲壳素和壳聚糖分别是由 2-乙酰氨基-2-脱

氧葡萄糖和2-氨基-2-脱氧葡萄糖通过 β -1,4糖苷键连接而成的直链多糖。甲壳素相对分子质量可达 10^6 ,不溶于水、稀酸、稀碱、乙醇等溶剂。壳聚糖中氨基多糖的含量称为脱乙酰度,根据甲壳素来源和不同的脱乙酰方式,壳聚糖的脱乙酰度在 30%~95%之间不等,相对分子质量介于 $(3\sim 10)\times 10^5$ 之间。壳聚糖几乎不溶解在 pH 大于 7 的水溶液中,但分子中的游离氨基使其带正电荷,它易溶于 pH 小于 6 的有机酸和无机酸溶液中。甲壳素和壳聚糖在不同条件下可以被加工成纤维、片状、凝胶、膜、纳米粒子和微球等多种形状^[2-3]。

1.2 生物学特性

1.2.1 可降解与吸收性 用甲壳素和壳聚糖所制成的生物材料进入人体后,其分子中的 β -1,4糖苷键会被体内的许多酶系如溶菌酶、水解酶等断裂、分解为低分子壳寡糖,最终降解为对人体无毒的 N-乙酰氨基葡萄糖和氨基葡萄糖。这 2 种单糖能被人体完全吸收,然后进行一系列化学反应,一部分以 CO_2 的形式由呼吸道排出体外,另一部分则以糖蛋白的形式被人体所利用^[4-5]。目前,甲壳素制成的可吸收手术缝线已被广泛用于临床。

1.2.2 生物相容性与安全性 Aspden 等^[6]对壳聚糖进行了一系列的动物毒性实验,结果表明:壳聚

[收稿日期] 2010-03-23; [修回日期] 2010-11-24

[作者简介] 周红波(1985—),男,湖南人,博士

[通讯作者] 朱智敏, Tel: 028-85502141

糖具有很好的生物相容性和安全性,其在体内的降解产物 N-乙酰氨基葡萄糖和氨基葡萄糖对人体无毒,无溶血性、刺激性、热源性和致突变性^[4]。

1.3 生物活性

1.3.1 抗微生物活性 国内外学者都报道过壳聚糖的抗微生物作用,他们通过实验证明了壳聚糖及其衍生物的抑菌活性,但其抗菌机制还没有得到统一的认识。有学者认为:壳聚糖的分子中有带正电的铵根,铵根与细菌带负电荷的细胞膜之间的静电作用使细菌细胞壁和细胞膜上的负电荷分布不均,从而影响了细胞壁和细胞膜的功能。水溶性壳聚糖还可能穿过损伤的细胞壁进入细菌细胞内,并吸附细胞内带负电的细胞质,扰乱细菌的正常代谢^[7-8]。

1.3.2 肿瘤抑制作用 大量的实验研究表明:壳聚糖不仅在抗肿瘤药物的研究应用中具有很大价值,其本身也具有一定的抗肿瘤活性。Maeda等^[9]对荷移植性 S180 肉瘤的小鼠使用水溶性低相对分子质量的壳聚糖后发现:壳聚糖具有抗肿瘤活性,且相对分子质量越低,其抗肿瘤活性越强。但Qin等^[10]则认为:相对分子质量是影响水溶性壳聚糖抗肿瘤活性的重要因素,高相对分子质量的壳聚糖抑瘤活性更强。Gumińska等^[11]通过体外实验提出:壳聚糖通过抑制糖酵解,减少细胞的葡萄糖摄取和 ATP 水平从而发挥抑瘤的作用。Hasegawa等^[12]通过WST-1比色分析和细胞计数证实了壳聚糖能够抑制膀胱癌细胞的生长,同时观察到肿瘤细胞 DNA 发生裂解和 caspase-3 活性的增加,推测可能与促进肿瘤的细胞凋亡有关。也有学者认为:壳聚糖抑制肿瘤细胞与其增强了免疫细胞的活性有关。由此可见:壳聚糖具有一定的抑制肿瘤生长的作用,但是其作用机制尚不清楚。

1.3.3 促进止血及伤口愈合 将壳聚糖制成膜作为表层与多孔海绵状的底层一起覆盖在伤口处,能促进止血和组织愈合。组织学检查表明:壳聚糖加快了伤口处的上皮增生速度,同时促进真皮层胶原的沉积。这可能是由于壳聚糖膜能有效控制水分蒸发,有良好的氧气透过性,能促进组织液引流,同时其抗菌活性又能抑制外界微生物的侵袭^[13]。由于抑制了纤维素的生成,壳聚糖敷料还能减少瘢痕的形成^[14]。

1.4 缓释作用

由于分子中含有活性基团和带有净正电荷,壳聚糖可以通过化学交联、静电吸附等方式把药

物和多种生物活性物质如生长因子等包裹起来,并在表面形成一层半透膜,使药物和生长因子释放的时候要克服大分子骨架的阻碍,延长药物和生长因子的释放时间而达到缓释的目的。不同脱乙酰度、黏滞度的甲壳素缓释效果有所不同。一般来说,低脱乙酰度、高黏滞度的壳聚糖具有更好的缓释作用^[6,15]。

可降解性与吸收、生物相容性,是甲壳素及其衍生物用于医药领域的生物学基础,而其独特的理化特性、抗微生物活性、促进伤口愈合及缓释效应等特性是其能成为骨缺损修复材料的优势所在。

2 甲壳素及其衍生物应用于骨缺损修复

天然骨组织由无机成分和有机成分共同组成,甲壳素作为一种有机成分和其他无机材料复合后更能接近骨修复的要求。

2.1 羟磷灰石/壳聚糖复合材料填充骨缺损

单一的羟磷灰石脆性较大,很难对不同的缺损进行塑形。杨军等^[16]在颗粒型羟磷灰石中加入壳聚糖填充修复家犬下颌骨缺损时发现:复合材料能任意成形,手术时便于操作取量,术后无材料泄露。石国华等^[17]用壳聚糖/羟磷灰石纳米复合材料修复家兔下颌骨缺损,结果表明:壳聚糖/羟磷灰石纳米聚合物孔隙率高、孔径小、可塑性强,具备良好的生物相容性和骨引导能力,与骨组织形成直接的、牢固的骨性结合,移植 10 周便可完全修复骨缺损。

2.2 磷酸钙类骨水泥/壳聚糖复合填充材料

普通磷酸钙骨水泥韧性不够、固化时间过长、降解速度较慢、抗压强度低,而且在体内成形前易受外力作用使其松散、脱落。Takagi等^[18]用磷酸钙骨水泥粉末和壳聚糖溶液制成的复合材料稳定性明显比传统磷酸钙骨水泥好,混合后立即放入水中也不分散,并能够在 10 min 内凝固,其机械强度在模拟体液中不会下降。Leroux等^[19]研究表明:在磷酸钙骨水泥中加入壳聚糖等多种辅料时可提高可注射性和压缩强度。Ding^[20]研究证明:壳聚糖和磷酸钙复合物可有效提高骨水泥内部孔隙率,有利于血管的长入,并在一定程度上提高了初始抗压强度,足以用于骨组织修复。

3 骨组织工程方面的应用研究

组织工程骨是一种人工制备的含有活体细胞

的骨替代材料,它能形成新的功能性骨组织,为骨缺损修复开辟了新的途径。利用骨组织工程原理修复骨缺损成为创伤骨科的一个研究方向^[4]。甲壳素和壳聚糖分子结构类似于人体骨组织细胞外基质中的糖胺多糖,不但容易塑形,而且其可降解与吸收性为成骨细胞的长入提供了空隙,还能促进多种组织细胞的黏附和增殖,其缓释作用有利于生长因子的释放。这些独特的理化特性和生物学活性使其在骨组织工程方面具有很大的应用前景。目前,主要有壳聚糖与羟磷灰石、磷酸三钙、聚乳酸、明胶、胶原等复合得到的三维支架用于骨组织工程的报道。

3.1 复合钙磷类支架

Cheng等^[21]将纳米羟磷灰石和壳聚糖制备成复合膜,复合膜表面粗糙多微孔,适合骨髓基质细胞黏附、爬行和生长。Oliveira等^[22]制成新型的羟磷灰石/壳聚糖双层支架,2层材料之间结合良好,压缩性能优良。羟磷灰石层和壳聚糖层分别有合适的空隙率和孔径大小,空隙分布均匀。山羊骨髓基质细胞能分别贴附到支架2层,并增殖和分化为成软骨细胞和成骨细胞。Xu等^[23]将壳聚糖和水溶性甘露醇掺入到磷酸钙骨水泥中制成的多孔支架能够快速凝结,其弯曲强度增强至原来的3~4倍,小鼠成骨细胞株细胞能在其上沿孔隙贴附、扩散和增殖,具有成骨活性。

3.2 复合聚酯类支架

聚酯类材料如聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸-乙醇酸共聚物、聚羟基丁酸酯等是目前组织工程研究和应用较多的合成高分子材料;但其降解产物均呈酸性,会加速支架材料的降解,造成力学强度的迅速衰减。酸性产物还可引起无菌性炎症,使材料周围纤维包膜加厚,与正常组织完全隔离。另外合成高分子材料活性位点较少,影响细胞的贴附迁移^[24]。利用壳聚糖的碱性和带正电性可改善材料的生物相容性和降解性能。如Jiang等^[25]用热压烧结的方法制备壳聚糖/聚乳酸-乙醇酸共聚物微球支架,通过改变烧结温度和烧结时间可以控制孔隙大小和空隙率以及压缩强度。小鼠成骨细胞株体外培养在复合支架上比在聚乳酸-乙醇酸共聚物支架上贴附生长更好,壳聚糖的存在增强了成骨细胞的碱性磷酸酶活性,提高了碱性磷酸酶、骨桥蛋白、骨涎蛋白基因的表达。

3.3 载生物因子的壳聚糖支架

组织工程研究涉及到各种生物因子,这些因

子对不同类型组织的再生起着重要的作用。外源性生物因子植入后很快随体液扩散或被降解,不能在局部保持有效浓度。甲壳素及其衍生物的缓释作用,可使外源性因子在较长时间内保持有效浓度。如Park等^[26]将包含有血小板衍生生长因子的壳聚糖海绵状支架植入鼠的颅骨缺损处,表现出了较强的骨再生能力。缺损处能形成较多的骨组织并能较快地钙化,逐渐被新形成的骨取代。

4 小结与展望

甲壳素及其衍生物是一种资源丰富、生物学性能优良的材料,其活性基团、内在抗菌活性和良好的赋形性等特性以及与动物体内糖胺多糖相似的结构,使其在骨缺损填充修复、骨组织工程支架方面有着重要的研究意义,显示出了巨大的应用前景。甲壳素及其衍生物体内的降解机制尚未完全清楚,有待进一步深入研究。甲壳素及其衍生物机械性能差,溶解性能差,限制了它的应用,因此进一步研究甲壳素及其衍生物的化学改性以及制备新的甲壳素的复合材料,可大大拓宽甲壳素及其衍生物在骨缺损修复方面的应用范围。壳聚糖促进成骨细胞的增殖与分化的具体机制,如何控制壳聚糖的降解以及如何将壳聚糖基质支架材料与成骨细胞复合成为能修复骨缺损的复合材料,这些问题均有待进一步深入研究。

5 参考文献

- [1] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京:化学工业出版社, 2003:1-4.
- [2] Harish Prashanth KV, Tharanathan RN. Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential—an overview[J]. Trends Food Sci Tech, 2007, 18(3):117-131.
- [3] VandeVord PJ, Matthew HW, DeSilva SP, et al. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 59(3):585-590.
- [4] Kim IY, Seo SJ, Moon HS, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications[J]. Biotechnol Adv, 2008, 26(1):1-21.
- [5] 徐政, 顾其胜, 侯春林. 实用生物医用材料学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005:127-128.
- [6] Aspden TJ, Mason JD, Jones NS, et al. Chitosan as a nasal delivery system: The effect of chitosan solutions on *in vitro* and *in vivo* mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers[J]. J Pharm Sci, 1997, 86(4):509-513.
- [7] Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor[J]. Carbohydr

Polym, 2001, 44(1) :71-76.

[8] No HK, Park NY, Lee SH, et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights[J]. Int J Food Microbiol, 2002, 74(1/2) : 65-72.

[9] Maeda Y, Kimura Y. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice[J]. J Nutr, 2004, 134(4) :945-950.

[10] Qin C, Du Y, Xiao L, et al. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity[J]. Int J Biol Macromol, 2002, 31(1/2/3) :111-117.

[11] Gumińska M, Ignacak J, Wójcik E. *In vitro* inhibitory effect of chitosan and its degradation products on energy metabolism in Ehrlich ascites tumour cells(EAT)[J]. Pol J Pharmacol, 1996, 48(5) :495-501.

[12] Hasegawa M, Yagi K, Iwakawa S, et al. Chitosan induces apoptosis via caspase-3 activation in bladder tumor cells [J]. Jpn J Cancer Res, 2001, 92(4) :459-466.

[13] Mi FL, Shyu SS, Wu YB, et al. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing[J]. Biomaterials, 2001, 22(2) : 165-173.

[14] Lloyd LL, Kennedy JF, Methacanon P, et al. Carbohydrate polymers as wound management aids[J]. Carbohydr Polym, 1998, 37(3) :315-322.

[15] Prabakaran M, Mano JF. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems[J]. Drug Deliv, 2005, 12(1) :41-57.

[16] 杨军, 陈治清. 壳聚糖-羟基磷灰石复合材料修复骨缺损的实验研究[J]. 口腔医学纵横, 1992, 8(1) :5-8.

[17] 石国华, 丁诚, 龚连生, 等. 壳聚糖/羟基磷灰石纳米复合材料修复骨缺损研究[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(19) :2322-2325, 2329.

[18] Takagi S, Chow LC, Hirayama S, et al. Properties of elastomeric calcium phosphate cement-chitosan composites [J]. Dent Mater, 2003, 19(8) :797-804.

[19] Leroux L, Hatim Z, Frèche M, et al. Effects of various adjuvants(lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement[J]. Bone, 1999, 25(2 Suppl) :31S-34S.

[20] Ding SJ. Biodegradation behavior of chitosan/calcium phosphate composites [J]. J Non-Cryst Solids, 2007, 353(24/25) :2367-2373.

[21] Cheng XM, Li YB, Zuo Y, et al. Properties and *in vitro* biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration[J]. Mater Sci Eng C, 2009, 29(1) :29-35.

[22] Oliveira JM, Rodrigues MT, Silva SS, et al. Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications : Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells[J]. Biomaterials, 2006, 27(36) :6123-6137.

[23] Xu HH, Simon CG Jr. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: Mechanical properties and biocompatibility[J]. Biomaterials, 2005, 26(12) :1337-1348.

[24] Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering[J]. Chem Eng Res Des, 2007, 85(7) :1051-1064.

[25] Jiang T, Abdel-Fattah WI, Laurencin CT. *In vitro* evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2006, 27(28) :4894-4903.

[26] Park YJ, Lee YM, Park SN, et al. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration[J]. Biomaterials, 2000, 21(2) :153-159.

(本文编辑 李彩)

(上接第82页)

tween traditional 2-dimensional cephalometry and a 3-dimensional approach on human dry skulls[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2004, 126(4) :397-409.

[28] Swennen GR, Barth EL, Eulzer C, et al. The use of a new 3D splint and double CT scan procedure to obtain an accurate anatomic virtual augmented model of the skull [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2007, 36(2) :146-152.

[29] 郭宏铭, 周洁珉, 白玉兴. 传统模型与三维数字化模型在平整牙弓间隙分析中的比较研究[J]. 现代口腔医学杂志, 2007, 21(3) :241-244.

[30] Zilberman O, Huggare JA, Parikakis KA. Evaluation of the validity of tooth size and arch width measurements using conventional and three-dimensional virtual orthodontic models[J]. Angle Orthod, 2003, 73(3) :301-306.

[31] Ayoub AF, Xiao Y, Khambay B, et al. Towards building a photo-realistic virtual human face for craniomaxillofacial diagnosis and treatment planning[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2007, 36(5) :423-428.

[32] Rangel FA, Maal TJ, Bergé SJ, et al. Integration of digital dental casts in 3-dimensional facial photographs[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2008, 134(6) :820-826.

(本文编辑 王晴)