

胶原蛋白/BMP 复合材料的制备和成骨性能研究

谈伟强¹, 徐靖宏¹, 刘友山¹, 林 军², 王慧明²

1 浙江大学医学院附属第一医院整形外科, 杭州 310003

2 浙江大学医学院附属第一医院口腔科, 杭州 310003

摘 要: 以胶原膜(含 87.5 mg I 型胶原蛋白)为载体, 复合 3.5 mg rhBMP-2(人基因重组骨形成蛋白-2), 制备胶原蛋白/BMP 复合材料。复合材料首先在兔背阔肌中埋置, 预构新生骨组织, 并采用 ALP 染色、Von Kossa 染色和 HE 染色等观察复合材料的成骨过程和组织形态。然后将形成的新骨组织游离移植修复自体下颌骨体部洞穿性缺损; 并设以胶原为载体的 rhBMP-2 复合骨修复材料直接修复为对照组, 骨缺损不修复组为空白组。采用 X 线、抗压强度、硬组织切片、四环素荧光染色、骨形态计量检查, 观察复合材料修复骨缺损的质量和效果。结果表明, 胶原蛋白/BMP 复合材料在兔背阔肌中 4~6 周成骨, 胶原材料于 3~5 周降解; 成骨过程为以软骨成骨为主的方式, 新骨形态为编织骨, 可见明显的微血管分布; 游离移植修复自体下颌骨缺损, 6 周缺损区为骨性愈合, 与对照组在抗压强度($P=0.041$)、新骨量($P=0.034$)均有显著性差异。胶原蛋白/BMP 复合材料在骨骼肌中形成的新生骨组织可作为供骨修复一定范围的骨缺损。

关键词: 胶原蛋白, 骨形态发生蛋白-2, 异位成骨, 骨缺损

Preparation and Osteoinduction Capacity of Collagen/Bone Morphogenetic Protein Composites

Weiqliang Tan¹, Jinghong Xu¹, Youshan Liu¹, Jun Lin², and Huiming Wang²

1 Department of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

2 Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

Abstract: Collagen/bone morphogenetic protein composites were prepared with collagen type I sponge and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). The composites were implanted into Latissimus dorsi muscles pouches of rabbits. Samples were studied with ALP staining, Von Kossa staining, HE staining, toluidine blue staining and CD31 histochemical labeling of microvessel. Bony samples were then used to repair mandibular defect. The effects were evaluated by X-ray, compressive strength, economyacin fluorescence labeling, HE staining, toluidine blue staining and bone quantity analysis. Bone formation induced by collagen/BMP composites was found as woven bone between 4 and 6 weeks; cartilaginous osteogenesis was the main type of bone formation; microvessels could be seen in the bony tissues; and the bone defects were healed completely 6 weeks after operation. Bone formation induced by collagen/BMP composites in the muscles can be used as a donor to repair the bone defect.

Keywords: collagen, bone morphogenetic protein-2, BMP-2, bone defect, ectopic bone formation

Received: May 15, 2007; Accepted: July 3, 2007

Supported by: the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, Ministry of Education (2000) and the Out-standing Youth Foundation of Zhejiang Province Medicine and Hygiene (No. 2000QN001).

Corresponding author: Jinghong Xu. Tel: +86-571-87236355; Fax: 86-571-87236628; E-mail: tanweixxx@163.com

国家教育部回国人员基金资助(2000 年); 浙江省医药青年优秀人材基金资助(No. 2000QN001)。

骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)是唯一一类能够启动成骨分化,并作用于成骨整个过程的细胞因子。BMP-2 是第一个在体内实验中证明具有诱骨活性的 BMP 分子,并且可作为诱骨的充分条件,即在只有单独 BMP-2 存在的情况下即可诱导软骨和骨组织的形成^[1],并作用于成骨的全过程。rhBMP-2(recombinant human BMP-2, 人基因重组骨形成蛋白-2)与小分子量 PLGA(聚乳酸与聚羟乙酸的共聚物)混合形成共聚物,植入小鼠的小腿肌肉 3 周后有新骨形成^[2]。Woo 等^[3]将 BMP-2 与 PLGA 微粒混合,发现该复合材料是有效的 BMP-2 运载和持续释放系统。Yamamoto 等^[4]用戊二醛和明胶形成水凝胶与 BMP-2 混合物形成可控的释放系统,结果表明该复合材料较纯注射 BMP-2 的成骨能力强。Maeda 等^[5]用胶原构建了一个圆柱型的 hBMP-2 可控的释放载体,称微球(minipellet,MP),结果表明 MP 是一个有效的 rhBMP-2 控释系统。Yang 等^[6]利用多孔的能生物降解的 PLA(聚乳酸)在特殊条件下包入 BMP-2 形成胶囊支架,结果显示在三维支架上胶囊释放 BMP-2 促进人骨原细胞粘附、转移、扩充和分化,皮下植入后促进骨的形成。

应用 rhBMP-2 修复骨缺损的常用方法是将含有 rhBMP-2 的复合材料直接填充于缺损部位,这种体内原位成骨的方式是利用了材料的骨传导性和生长因子的骨诱导性,在骨缺损区诱导骨原细胞成骨,以新生的骨组织最终替代复合材料。Dalkyz^[7]认为,这种人工骨材料填充的修复方式仅限于调动骨创区固有的潜在修复能力,依靠边缘渐进性的骨传导、骨引导及骨诱导形成新骨。而具有自体骨骨小梁结构的移植物(如新鲜的自体骨)进行骨缺损修复时,是以一种多中心矿化成骨的生物结合方式,快速有效达到成骨。

本研究以胶原膜为载体,复合人基因重组骨形成蛋白-2(recombinant human BMP-2, rhBMP-2),制备胶原蛋白/BMP 复合材料,应用该复合材料在兔背阔肌内预制异位骨组织,获得类似于自体组织的供骨,修复下颌骨缺损,研究其成骨性能。这不仅为获得供骨提供了新的来源,也为预构含骨的肌皮瓣,用以修复骨和皮肤软组织复合缺损提供了新的供区和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

型胶原蛋白胶原膜,通过有限胃蛋白酶水解、盐析沉淀法从牛肌腱中提取,5 cm × 5 cm × 0.5 cm,含 87.5 mg I 型胶原蛋白,购于上海其胜生物制剂有限公司。rhBMP-2,基因工程重组(大肠杆菌),分子量 12000,购于军事医学科学院基础研究所生化研究室。骨优导®,为 rhBmp-2 胶原载体冻干剂,含量 1 mg/100 mg,购于华东制药集团基因研究所,作为骨修复材料,已被国家药品监督管理局批准进入临床研究。

1.2 实验动物

新西兰白兔 28 只,4~6 周龄,体重 2.0~2.5 kg,雌雄不限。随机分成实验组、对照组和空白组,实验组 12 只,对照组 10 只,空白组 6 只。

1.3 胶原蛋白/BMP 复合材料的制备

将 rhBMP-2 3.5 mg 加入 10 mL 生理盐水制成悬液,以 5 cm × 5 cm × 0.5 cm 胶原膜吸附悬液,预制为直径为 0.8 cm 的球形,冻干形成胶原蛋白/BMP 复合材料。

1.4 异位成骨

取兔背部中下段近中线皮肤切口,在背阔肌深层肌膜下分离间隙,将复合载体材料置入,缝合肌层并包裹形成肌袋。分别于 2、4、6 周进行 X 线摄影,标本取材后进行 ALP、Von Kossa、CD31 免疫组化血管标记及组织学观察。

1.5 修复自体下颌骨缺损实验

实验组 6 周取材获预制新骨组织后,在该兔一侧下颌骨体部磨牙区剥离骨膜和咬肌附着点,以电钻造成直径 0.8 cm 洞穿性缺损,将所获新生骨组织致密地填入缺损区,缝合皮肤。

对照组、空白组与实验组所造缺损均一致,对照组以产品推荐修复剂量填入骨优导 200mg 修复;空白组的缺损不予以修复。

1.6 检测指标

各组均于术后 6 周取材,取材前 3 周及 3 天分别以四环素腹腔注射(50 mg/kg)。实验组、对照组部分标本及空白组标本进行 X 线、50%硝酸液脱钙后 HE 染色观察及四环素荧光新骨染色。

生物力学检测:标本以 Shimadzu(岛津) AG-20ka/a 多功能生物力学仪,对缺损修复区进行抗压

强度检查(压扁试验),以 SPSS 8.0 统计软件包分析实验组和对照组差异。

不脱钙硬组织切片:其余标本以丙酮液固定,浸透(BPO 1 g 溶于 MMA 100 mL,真空干燥),包埋(BPO+MMA, 80℃调成糊状),Leica 锯式切片机 100~200 μm 切片,甲苯胺蓝(Toluidine blue, TB)染色观察。

新生骨计量:取各甲苯胺蓝染色硬组织切片,以 Olympus HA-2 CCD 读取图像,平均选定 4~6 视野/张,采用 Leica Qwin (Ver1.0)骨形态分析软件进行新骨面积计量,以 SPSS 8.0 统计软件分析各组差异。

2 结果

2.1 胶原蛋白/BMP 复合材料

本研究所用的胶原膜(5 cm \times 5 cm \times 0.5 cm)和制备完成的胶原蛋白/BMP 复合材料(球形复合材料的直径为 0.8 cm)见图 1。

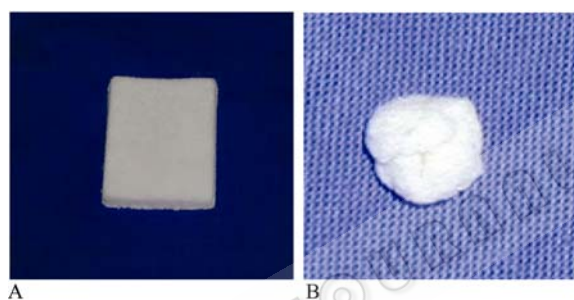


图 1 胶原膜和胶原蛋白/BMP 复合材料的大体观
Fig. 1 The collagen sponge and the prepared collagen/BMP composite of 0.8 cm in diameter
A: the collagen sponge (5cm \times 5cm \times 0.5cm); B: the prepared collagen/BMP composite of 0.8 cm in diameter

2.2 新生骨的观察

2.2.1 ALP 染色

2 周、4 周标本呈+++ ,表明有较强的成骨活性;6 周时为++ ,成骨活性开始减弱。

2.2.2 Von kossa 染色

2 周时标本呈+ ,4 周为++ ,6 周为+++ ,表明标本基质钙化逐渐增强。

2.2.3 影像学检查

2 周时摄片未见背部有成骨阴影;4 周时,在背部相应区域可见高密度成骨阴影;6 周时,钙化阴影密度增高,与骨骼密度基本一致。

2.2.4 大体观察

取材时,大体观见 2 周时复合材料与周围骨骼肌组织轻度粘连,标本质软,呈灰白圆形,体积略大于原载体材料;4 周时,标本质地变硬,体积增大,呈灰白色或淡红色,与周围肌肉组织粘连,表面可见微小血管分布(图 2A);6 周时,标本体积轻度缩小,质地变硬(图 2B)。

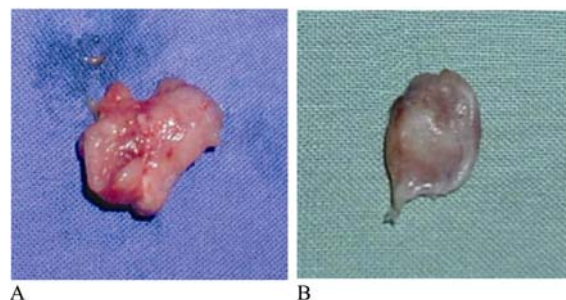


图 2 复合材料的大体观
Fig. 2 The gross appearance of the composites
A: the fourth week; B: the sixth week

2.2.5 HE 及甲苯胺蓝染色

标本脱钙 HE 染色和不脱钙甲苯胺蓝染色的组织学观察均显示,2 周时材料开始降解,大量类骨质出现,同时伴少量软骨形成,细胞成分不明确;4 周时,材料基本降解,类骨质钙化,软骨组织基本消失,形成编织骨形态(图 3A);6 周时,大量编织骨形成,形态完整,可见骨髓腔结构(图 3B)。

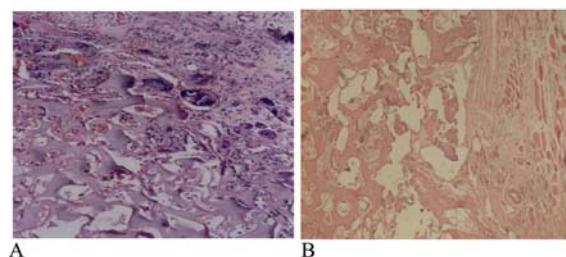


图 3 复合材料的组织学观察(HE, 40 \times)
Fig. 3 Histological image of the composites (HE, 40 \times)
A: the fourth week; B: the sixth week

2.2.6 CD31 免疫组化微血管标记

可见 2 周时标本即形成微血管,表明组织中已出现血管化现象(图 4)。

2.3 修复下颌骨缺损的观察

2.3.1 影像学检查

6 周取材后,对标本进行 X 线检查。实验组缺损

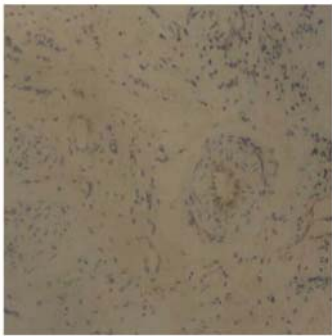


图 4 CD31 免疫组化微血管标记(40×)

Fig. 4 The CD31 immunohistochemical image of the composites at the second week (40 ×)

修复区域呈高密度阴影, 与边界无明显间隙(图 5A); 对照组缺损修复区域钙化明显, 但与边界尚存间隙(图 5B); 空白组缺损区域钙化阴影较小, 以低密度阴影为主(图 5C)。

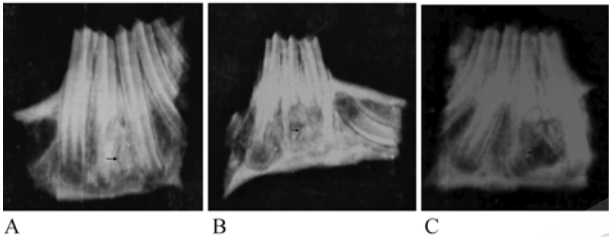


图 5 影像学观察(HE, 40×)

Fig. 5 Observation of X-rays

A: experimental group; B: contrast group; C: blank group

2.3.2 生物力学检测

实验组和对照组缺损修复区域抗压强度结果见表 1, 实验组在修复的生物力学性能上优于对照组, 有显著性差异($P=0.041$)。

表 1 缺损修复区的抗压强度

Table 1 The compressive strength of repairing area

	Cases	Compressive strength (MPa)
Experimental	5	11.18 ±43.26
Contrast	5	3.51 ±6.44

$P = 0.041$

2.3.3 四环素荧光染色

实验组骨缺损修复区域可见荧光着色带较宽, 表明新骨生成较多(图 6A); 对照组荧光着色带明显窄于实验组(图 6B); 空白组荧光着色极少(图 7C)。

2.3.4 大体观察

6 周取材时, 大体观见实验组下颌骨缺损修复

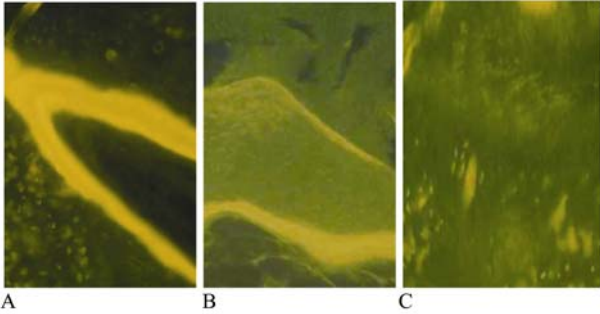


图 6 缺损修复区的四环素荧光染色观察

Fig. 6 Observation of Tetracycline fluorescence staining in the repairing area

A: experimental group; B: contrast group; C: blank group

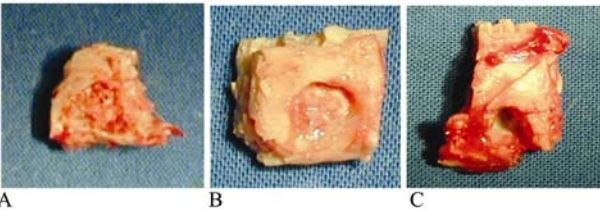


图 7 缺损修复区的大体观察

Fig. 7 The gross appearance of the repairing area

A: experimental group; B: contrast group; C: blank group

部位基本骨化, 与边界结合紧密(图 7A); 对照组大部分骨化, 但表明轻度凹陷、粗糙(图 7B); 空白组骨修复区尚残留缺损, 表面凹陷, 质地柔软(图 7C)。

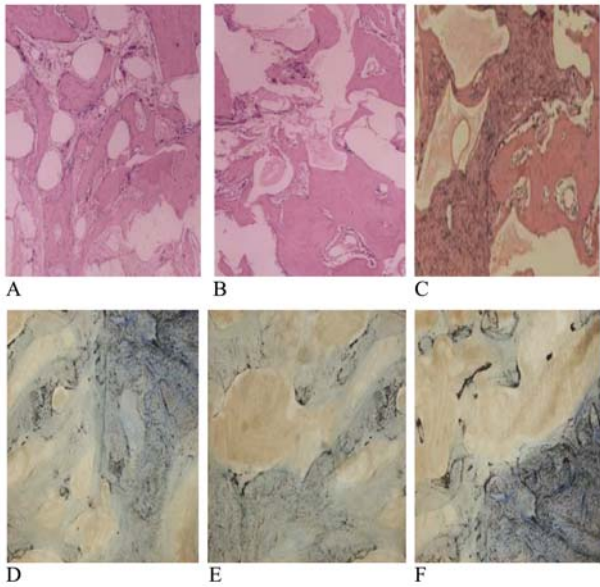


图 8 缺损修复区的组织学观察(40×)

Fig. 8 Histological image of the bone defect area (40 ×)

A: experimental group, HE; B: contrast group, HE; C: blank group, HE; D: experimental group, TB; E: contrast group, TB; F: blank group, TB

2.3.5 HE 及甲苯胺蓝染色

标本脱钙 HE 染色和不脱钙甲苯胺蓝染色的组织学观察均显示, 实验组骨缺损修复区域大量新骨形成, 骨小梁结构完整, 呈编织骨形态, 与宿主骨边界自然连续, 结合紧密, 缺损中央新生骨渐融合成片(图 8A, 图 8D); 对照组缺损修复区域材料已降解, 出现新生编织骨组织, 与宿主骨边界结合尚紧密, 但缺损中央骨量较少(图 8B, 图 8E); 空白组骨缺损内新生骨较少, 宿主骨边界增厚(图 8C, 图 8F)。

2.3.6 新生骨形态计量

实验组和对照组骨缺损区域修复后, 新生骨计量结果表明, 实验组修复后缺损部位新骨生成多于对照组, 有显著性差异(实验组/对照组 $P=0.034$, 对照组/空白组 $P=0.014$), 见表 2。

表 2 新生骨计量
Table 2 The calculation of newly formed bone

	Cases	New bone(mm ²)
Experimental	5	0.801 ± 0.036
Contrast	5	0.448 ± 0.060
Blank	5	0.079 ± 0.010

Experimental/Contrast $P = 0.034$

Contrast/Blank $P = 0.014$

3 讨论

胶原蛋白是动物组织的一种结构蛋白, 属天然有机高分子化合物, 约占动物体蛋白总量的 1/3。天然成熟的胶原蛋白是由三股多肽链作螺旋状缠绕而成的绳索状分子, 分子量约为 300 kD。而从生物体内提取出来的胶原蛋白, 由于酶解作用, 失去了原有的三股螺旋结构, 故也称变性胶原, 能够溶于酸性介质。胶原作为一种重要的生物材料, 已经广泛地应用于生物医学和药理学领域^[8-11]。近期的研究结果证实, 胶原和以胶原蛋白为主的复合材料在创伤修复, 作为贴壁细胞培养的微载体, 及药物控制释放系统提高药物的长效性方面, 均取得满意的效果; 尤其在作为药物载体脂质体的包覆基质, 减少网状内皮系统对脂质体的吞噬作用方面, 效果比较明显。胶原蛋白/BMP 复合材料采用胶原作为 rhBMP-2 的载体, 制备简易且具有稳定的异位成骨的诱导性。胶原是骨基质的主要有机成分。I 型胶原与 BMP 复合可延缓 BMP 释放, 令其维持较长的作

用, 早期即被用作异位成骨中 BMPs 的主要载体材料^[12]。研究还表明, I 型胶原自身尚有一定的骨诱导作用, 可降低 BMP 的诱导剂量^[13]。经配制的胶原在生理条件下呈半流动的胶体态, 常以冻干的形式复合 BMP。为减少材料的流失, 目前多采用胶原海绵或胶原膜以吸附的方式复合 BMP。

对于不能自愈的骨缺损, 目前的修复方法很多, 治疗机制都是利用局部业已存在的骨原细胞及周围的间充质干细胞的增殖分化, 促使宿主骨获得一定程度的再生^[14]。但这种再生能力是有限的。对于下颌骨的缺损临床上仍以自体骨移植、各种人工骨材料充填及膜引导再生术为主。其中新鲜的自体骨移植在各种修复方法中效果最佳, 目前仍是修复骨缺损的金标准^[15]。主要原因在于: 其天然的骨小梁结构具有的骨传导性是其它骨替代材料所无法比拟, 可为新骨形成提供绝好的成骨支架; 同时其表面还含有活性细胞成分和 BMPs 等骨诱导活性成分, 促进宿主的骨质细胞和间充质干细胞增殖和分化, 侵入支架, 最终形成新骨而取代移植骨。

然而, 自体骨的来源是有限的, 获得供骨会造成供区的损伤和牺牲。应用 rhBMP-2 复合载体, 可以在骨骼肌中诱导出异位的新生骨组织。这是由于骨骼肌中含具有成骨潜能的间充质干细胞, 在 BMP-2 的诱导下, 通过细胞的分化、增殖、基质矿化, 可以形成新生骨组织。诱导形成的骨组织具有自体松质骨的形态结构, 并能通过新生骨组织中的微血管获得与骨骼肌的血运联系^[16,17], 可为修复骨缺损提供生物学性能类似于自体组织的供骨。

rhBMP-2 复合多种载体均有优良的成骨性能, 但以往的研究多集中于其体外诱导成骨, 体内异位成骨, 以及含有 rhBMP-2 的复合材料直接填充于骨缺损部位等方面^[11-15]。而以这种生长因子 + 支架材料的简易成骨方式所构建的骨组织修复骨缺损的效果如何, 却很少见于报道。

修复自体下颌骨缺损实验的对照组所采用的骨诱导即是以胶原为载体的 rhBMP-2 复合材料。实验组是以 rhBMP-2/胶原复合载体在自体异位诱导形成的骨组织, 填充修复同样的缺损。结果表明, 修复 6 周后, 空白组除缺损边缘有极少量的新骨外, 修复区内基本为纤维结缔组织所占据, 没有一例有自发性骨再生迹象; 对照组在根据产品的推荐剂量填充

骨缺损后, 可以达到一定的修复效果; 但实验组在预成骨组织阶段的 4~6 周时, 即可通过直接膜内成骨及部分软骨化骨的方式, 在预制支架的基础上形成与松质骨形态接近的骨小梁结构, 并富含细胞成分; 移植修复骨缺损后, 在修复区的新骨数量和修复后的机械强度上都优于对照组。显然, 这种修复效果上的差异是修复方式上的不同所造成的。可能的原因不外乎: 其一, 移植物的结构不同, 异位所形成的新骨组织具有自体编织骨的形态, 骨传导性优于复合材料的直接充填; 其二, 局部成骨环境的不同, 骨骼肌血运丰富, 不仅为成骨提供充足的氧合营养物质和大量的具有成骨分化潜能的间充质细胞, 使 BMP 的作用能充分发挥, 从而造就了骨组织移植后, 骨基质得以矿化的良好环境。

综上所述, 应用胶原蛋白/BMP 复合材料在兔背阔肌内预制的异位骨组织, 具有成为供骨来源的潜力。可修复兔自体下颌骨小范围缺损, 其修复效果优于 rhBMP-2 与胶原蛋白复合材料的直接填充修复。

REFERENCES

- [1] Łukaszewicz E, Chrzanowska M, Jerysz A, Chelmońska B. Attempts on freezing the Greylag (*Anser anser* L.) gander semen. *Anim Reprod Sci*, 2004, **80**(1-2): 163-173.
- [2] Bessho K, Carnes DL, Cavin R, Ong JL. Experimental studies on bone induction using low-molecular-weight poly (DL-lactide-co-glycolide) as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res*, 2002, **61**(1): 61-65.
- [3] Woo BH, Fink BF, Page R, Schrier JA, Jo YW, Jiang G, DeLuca M, Vasconez HC, DeLuca PP. Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm Res*, 2001, **18**(12): 1747-1753.
- [4] Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials*, 2003, **24**(24): 4375-4383.
- [5] Maeda H, Sano A, Fujioka K. Profile of rhBMP-2 release from collagen minipellet and induction of ectopic bone formation. *Drug Dev Ind Pharm*, 2004, **30**(5): 473-480.
- [6] Yang XB, Whitaker MJ, Sebald W, Clarke N, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo RO. Human osteoprogenitor bone formation using encapsulated bone morphogenetic protein 2 in porous polymer scaffolds. *Tissue Eng*, 2004, **10**(7-8): 1037-1045.
- [7] Dalkýz M, Ozcan A, Yapar M, Gökyay N, Yüncü M. Evaluation of the effects of different biomaterials on bone defects. *Implant Dent*, 2000, **9**(3): 226-235.
- [8] Zhang X, Fan X, Gao X, Bai H, Li Y. Observation of collagen assembly process by using atomic force microscopy. *Acta Polym Sin*, 2006, (8): 959-963.
- [9] Barbani N, Cascone MG, Giusti P, Lazzeri L, Polacco G, Pizzirani G. Bioartificial materials based on collagen: 2. Mixtures of soluble collagen and poly(vinylalcohol) cross-linked with gaseous glutaraldehyde. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1995, **7**(6): 471-484.
- [10] Fonseca MJ, Alsina MA, Reig F. Coating liposomes with collagen (Mr 50,000) increases uptake into liver. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1279**(2): 259-265.
- [11] Shi X, Wu S, Sun C. A study on collagen association state in aqueous solution using fluorescence probe. *Acta Polym Sin*, 1998, (4): 406-411.
- [12] Nakagawa T, Tagawa T. Ultrastructural study of direct bone formation induced by BMPs-collagen complex implanted into an ectopic site. *Oral Dis*, 2000, **6**(3): 172-179.
- [13] Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2000, **29**(1): 62-66.
- [14] Betz RR. Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics*, 2002, **25**(5 Suppl): s561-570.
- [15] Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop*, 2000, (371): 10-27.
- [16] Nakagawa T, Tagawa T. Ultrastructural study of direct bone formation induced by BMPs-collagen complex implanted into an ectopic site. *Oral Dis*, 2000, **6**(3): 172-179.
- [17] Vehof JW, Takita H, Kuboki Y, Spauwen PH, Jansen JA. Histological characterization of the early stages of bone morphogenetic protein-induced osteogenesis. *J Biomed Mater Res*, 2002, **61**(3): 440-449.