

现代骨组织修复材料 及其评价

廖晓玲 等 著



科学出版社

014031937

R687.3

03

现代骨组织修复材料及其评价

廖晓玲 等 著



科学出版社

北京



北航

C1719971

R 687.3
03

758180710

内 容 简 介

现代骨组织修复材料是一类重要的生物组织工程材料,其评价技术已成为当代生物材料发展的关键。本书根据作者科研团队的研究基础及成果,着重介绍了现代骨组织修复材料的种类、制备、结构、组织诱导性、测试技术以及应用。全书共8章:第1章生物材料与骨组织修复;第2章纳米磷酸钙生物陶瓷材料;第3章碳生物医用材料;第4章软骨重建生物材料;第5章生物材料生物相容性评价;第6章蛋白吸附评价;第7章共聚焦显微镜技术;第8章 FRET 活细胞分子信号检测技术。

本书可供从事骨组织修复材料及评价技术研究的科技人员参考,也可作为高等院校材料学、组织工程、生物医学等专业教师和研究生的教学用书。

图书在版编目(CIP)数据

现代骨组织修复材料及其评价/廖晓玲等著. —北京:科学出版社,2013
ISBN 978-7-03-040064-2

I. ①现… II. ①廖… III. ①生物材料-应用-骨损伤-修复术-研究
IV. ①R687.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 045506 号

责任编辑:余 丁 张艳芬 高慧元 / 责任校对:桂伟利
责任印制:张 倩 / 封面设计:蓝 正

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014年3月第 一 版 开本:720×1000 1/16

2014年3月第一次印刷 印张:15

字数:289 000

定价:70.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

创伤、肿瘤、感染以及老龄化等造成的骨组织缺损严重威胁着人类健康。过去几十年间,随着材料科学与技术的迅速发展,生物材料领域衍生出了一系列骨修复、移植替代品。其中,具有骨组织诱导功能的生物材料已经成为当代生物材料研究领域的重点和前沿课题,在临床应用方面极具潜力,而对生物材料进行生物相容性以及组织诱导评价则是生物材料能否进入临床研究的关键环节。近年来,国内从事骨修复材料及其评价的单位和人员与日俱增,但目前这方面的专著还比较缺乏。为了适应当前骨修复材料研究及其评价快速发展的形势,满足众多科研人员以及高校师生了解、认识骨修复材料及其评价技术最新技术的需求,自 2010 年起作者开始本书的写作。

本书着重介绍了现代骨组织修复材料的种类、制备、结构、组织诱导性、测试技术以及应用。全书分 8 章:第 1 章阐述骨细胞生理学及其再生过程以及生物支架材料的理化特性对骨细胞功能的影响;第 2 章介绍钙磷陶瓷生物材料及其硬骨修复;第 3 章介绍碳及其复合生物材料的骨修复研究情况;第 4 章介绍软骨重建生物材料;第 5 章介绍生物材料生物相容性评价方法的种类及应用;第 6 章介绍生物材料蛋白吸附的重要作用及评价方法;第 7 章介绍共聚焦显微镜技术的原理以及在生物学评价中的应用;第 8 章介绍 FRET 活细胞分子信号检测技术。

参与本书写作的还有李波、徐文峰、张玲等,在此表示由衷的感谢。特别感谢 973 计划(No: 2011CB606200)合作项目、国家自然科学基金面上项目(No: 31271014)、国家自然科学基金青年基金(No: 81101154)、重庆市科委自然科学基金重点项目(No: CSTC2012JJB0097)以及重庆科技学院科技处的大力支持,并感谢美国 UCSD 王英晓教授以及大连理工大学刘波教授的帮助。

限于作者水平,书中难免有不足之处,恳请读者批评指正。

目 录

前言

第 1 章 生物材料与骨组织修复	1
1.1 引言	1
1.2 骨细胞及其骨修复	1
1.2.1 骨组织及其细胞组成	1
1.2.2 骨的吸收、形成与修复的生理过程	2
1.2.3 间充质干细胞	3
1.2.4 骨组织工程中的生物材料	4
1.2.5 三代骨修复材料	5
1.2.6 骨组织工程中的间充质干细胞	6
1.3 物理/机械环境对骨细胞功能的影响	7
1.3.1 孔隙度与孔尺寸对支架的影响	7
1.3.2 支架表面物理性质的影响	8
1.3.3 环境机械性质的影响	9
1.3.4 应力负荷的影响	10
1.4 总结与展望	11
参考文献	11
第 2 章 纳米磷酸钙生物陶瓷材料	18
2.1 纳米磷酸钙粉体制备工艺及影响因素	18
2.1.1 干法合成	19
2.1.2 水热合成法	19
2.1.3 湿法合成	21
2.1.4 小结	25
2.2 纳米磷酸钙骨组织工程支架材料	26
2.2.1 单相纳米磷酸钙支架材料	26
2.2.2 双相纳米磷酸钙复合支架材料	28
2.2.3 纳米磷酸钙/聚合物复合支架材料	28
2.2.4 纳米磷酸钙基骨组织工程支架材料发展趋势	31
2.3 纳米磷酸钙骨组织工程支架材料生物学效应	32
2.3.1 纳米骨组织工程支架材料对蛋白吸附的影响	33

2.3.2 纳米骨组织工程支架材料对细胞的影响	34
2.3.3 纳米骨组织工程支架材料的生物学风险	39
2.4 小结	39
参考文献	40
第3章 碳生物医用材料	48
3.1 碳/碳复合材料简介	48
3.1.1 碳/碳复合材料的研究历史及应用现状	48
3.1.2 碳/碳材料的微观结构	50
3.2 碳生物医用材料	54
3.3 碳纤维及其复合生物材料	58
3.3.1 多孔碳纤维增强聚乳酸与壳聚糖的复合生物材料	59
3.3.2 碳纤维分散效果分析	60
3.3.3 冷冻温度对多孔支架形态与孔隙率的影响	60
3.3.4 支架的细胞相容性评价	64
3.3.5 结论	66
参考文献	66
第4章 软骨重建生物材料	73
4.1 关节软骨的结构与功能	73
4.1.1 关节软骨的板层结构	73
4.1.2 软骨细胞与细胞外基质	74
4.1.3 关节软骨的生物力学性能	76
4.2 关节软骨损伤与临床修复	76
4.3 组织工程化软骨重建	77
4.3.1 软骨组织工程的基本原理	77
4.3.2 软骨重建生物材料的仿生设计	80
4.3.3 软骨支架材料的生物性能	85
参考文献	91
第5章 生物材料生物相容性评价	99
5.1 生物材料生物相容性评价发展趋势	99
5.1.1 材料反应	100
5.1.2 宿主反应	101
5.2 传统的生物相容性评价	101
5.2.1 细胞毒性	102
5.2.2 致敏	102
5.2.3 刺激	102

5.2.4 皮内反应	103
5.2.5 全身毒性(急性)	103
5.2.6 亚慢性毒性(亚急性毒性)	103
5.2.7 遗传毒性	103
5.2.8 植入	104
5.2.9 血液相容性	104
5.3 分子生物学在生物相容性评价中的应用	108
5.3.1 研究模型	109
5.3.2 主要方法	109
5.3.3 分子生物学在生物相容性评价中的应用	115
5.4 小结	120
参考文献	120
第6章 蛋白吸附评价	123
6.1 与骨形成有关的蛋白质	123
6.1.1 纤维连接蛋白	123
6.1.2 玻璃体结合蛋白	125
6.1.3 骨生长因子	126
6.2 蛋白吸附的研究方法	132
6.2.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳	133
6.2.2 质谱分析	134
6.2.3 X射线光电子能谱	134
6.2.4 椭偏法	135
6.2.5 原子力显微镜	136
6.2.6 石英晶体微天平	137
6.3 生物材料蛋白吸附研究进展	138
6.3.1 蛋白质结构及性质与蛋白吸附	139
6.3.2 生物材料表面特性与蛋白吸附	142
6.3.3 蛋白和基体材料的相互作用	143
6.3.4 纳米生物材料对蛋白特异性吸附	144
6.4 小结	146
参考文献	146
第7章 共聚焦显微镜技术	157
7.1 基本原理和主要部件	157
7.2 操纵步骤及注意事项	163
7.3 组织重建中的主要应用	164

7.3.1 材料的细胞相容性检测	164
7.3.2 重建细胞-材料 3D 结构	167
7.3.3 体内组织重建的荧光成像	169
7.4 全内反射荧光显微术检测膜蛋白运动	170
7.4.1 全内反射荧光显微术技术	171
7.4.2 活细胞中生物单分子探测	173
7.4.3 荧光探针及标记方法	173
7.4.4 质膜蛋白质复合物组学研究	176
7.4.5 质膜蛋白质复合物图像研究	177
参考文献	180
第 8 章 FRET 活细胞分子信号检测技术	187
8.1 简介	187
8.2 荧光蛋白	188
8.2.1 野生型 GFP	188
8.2.2 野生型 GFP 衍生物及其他的短波长荧光蛋白	188
8.2.3 DsRed 及其衍生物,以及其他具有相对较长波长的荧光蛋白	191
8.2.4 光激活/光转化荧光蛋白	193
8.2.5 环化后序列改变荧光蛋白	196
8.2.6 其他的荧光蛋白	197
8.3 依赖荧光蛋白的影像技术	198
8.3.1 荧光共振能量转移技术	198
8.3.2 荧光寿命成像显微术	200
8.3.3 检测分子运动的显微技术	200
8.3.4 生色辅助光失活	202
8.4 生物力学研究中用荧光蛋白作为标记分子	202
8.4.1 细胞器的定位和形态变化	203
8.4.2 监测细胞骨架的动态变化	204
8.4.3 胞内信号分子的动态示踪	204
8.4.4 监测基因表达	207
8.5 FRET 的应用研究	207
8.5.1 生物力学中的信号时空定量	208
8.5.2 光脱色荧光恢复在力学生物学研究中的应用	211
8.6 荧光蛋白在力学生物学研究 3D 环境中的应用	211
8.7 结论和展望	212
参考文献	213

第 1 章 生物材料与骨组织修复

1.1 引言

骨骼是脊椎动物的重要结构，由 60% 的羟基磷灰石（hydroxyapatite, HA）、10% 的水和 30% 的胶原蛋白构成，在提供运动机械支撑、保护重要器官以及调节钙、磷代谢中起到重要作用。以上功能的持续完成需要健康的骨系统^[1]，然而在世界范围内，许多人存在着骨质缺损现象。其诱因多种多样，包括外科创伤、肿瘤、骨疾病、先天缺陷和老龄化等，这些问题占据了骨科（orthopedics）临床病例中的绝大多数。因此，骨修复已成为临床治疗相关研究中的焦点。

骨修复方面的最新进展显示，以组织工程的支架材料与细胞联合培养的杂化结构（hybrid cell-material structures for tissue engineering）为微创外科手术提供了一种独特的自我修复技术。这些杂化结构中的细胞来源于患者本身的干细胞（大部分来源于骨髓），在体外仿生环境下进行增殖并分化成不同细胞，再生出新的骨组织，而支架材料自身随着新骨的再生而降解^[2]。新的骨组织再生过程由骨细胞调控，而骨细胞的功能变化又严格受微环境（包括生化试剂、支架材料理化特性和生物力学等刺激）的影响^[3,4]。

基于此，本章主要介绍骨组织在再生及修复过程中，不同机械/物理微环境下对骨细胞生理机能的影响，包括骨组织的细胞构成、骨增生或修复过程的生理机制以及骨组织工程中生物材料的发展与要求。同时，从生物支架材料的理化特性对骨细胞功能影响的角度上，阐述骨细胞生理学及其再生过程，显示细胞对机械环境诱因的响应。在本章的最后，简要描述了当代骨组织再生研究中的最新进展与未来研究方向中尚待解决的问题。

1.2 骨细胞及其骨修复

1.2.1 骨组织及其细胞组成

骨结构包含了不同来源的细胞^[4]。骨的多细胞结构由从内到外的四部分组成：骨髓、骨内膜、多孔矿化骨组织（porous mineralized osseous tissue）和骨膜（沿着骨外表面的膜），如图 1.1 所示。

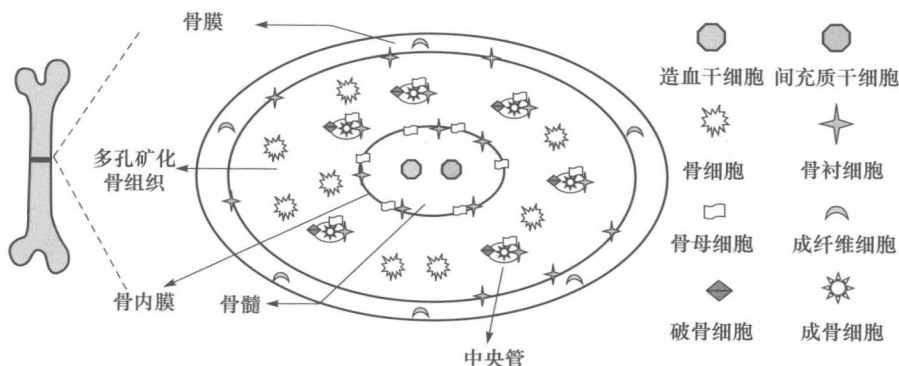


图 1.1 骨骼多细胞结构的简单示意图 (不包括血管和神经组织)

骨髓中存在造血干细胞 (HSCs) 和间充质干细胞 (MSCs)。骨内膜位于骨髓腔和骨松质网的壁上, 包括成骨细胞 (分泌基质和矿化的特定细胞) 和破骨细胞 (主要职能是骨吸收) 的祖细胞。在骨组织存在着丰富的矿化骨基质和五种细胞: ①骨母细胞 (osteoprogenitor), 包括成骨细胞和破骨细胞的祖细胞 (progenitor); ②成骨细胞; ③骨细胞 (osteocytes), 成骨细胞的衍生物; ④破骨细胞; ⑤骨衬细胞 (bone-lining cells), 不活跃的成骨细胞, 可以被机械刺激重新激活^[5,6]。其中, 骨细胞和骨衬细胞最为丰富。骨细胞位于骨基质内的空隙中, 而骨衬细胞则覆盖在骨表面^[4,6,7]。另外三种细胞则位于松质骨的骨小梁表面 (trabecular surface) 或密质骨骨组织中的中央管 (Haversian canal) 表面。骨膜和骨内膜在骨的形成、生长和重建中有着重要作用。

1.2.2 骨的吸收、形成与修复的生理过程

根据 Albright 的代谢平衡原理^[8], 人类的骨组织结构依赖于骨吸收与骨重建之间的动态平衡。这两个过程受骨动态平衡的调控, 时时刻刻发生在骨组织不同位置, 吸收掉旧骨更换为新骨^[8,9]。骨吸收与骨重建间的不平衡会导致某些骨疾病的发生, 如骨质疏松症 (OP) 和骨关节炎 (OA)^[4,10,11]。

成骨细胞形成新骨后, 成熟的破骨细胞将再吸收旧骨。这种动态平衡下再吸收和再重建过程的耦合贯穿了骨的全部寿命。例如, 每年成熟的骨连续重塑的比率达 10% 左右^[9,12]。因此, 骨组织工程中的理想支架材料需要使类似的再吸收/再生过程得以重现。

在骨修复过程中, 由骨髓造血干细胞分化成新破骨细胞的祖细胞或原破骨细胞祖细胞, 通过循环系统进入愈合位点 (healing site) 并彼此融合成为成熟的破骨细胞。其间, 骨髓间充质干细胞回游到愈合位点, 分化成软骨细胞 (生成软骨) 和成骨细胞。骨骼有缺陷的部分被破骨细胞介导的再吸收隔离, 并被分泌的

新骨基质代替，随后成骨细胞使其矿化。新的骨组织由矿化的骨细胞和骨衬细胞保护^[4,9,12]。同时，破骨细胞也可调控成骨细胞前体细胞的分化、造血干细胞的转移以及炎症、肿瘤过程中细胞因子的分泌。

受损骨组织的重建过程如图 1.2 所示，其中包含了多个彼此协调的阶段^[12-15]。

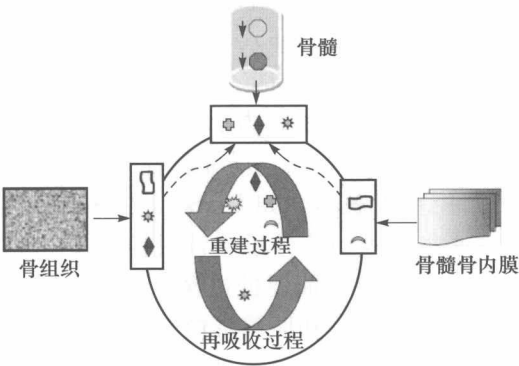


图 1.2 受损骨组织的重建过程（不包括血管化过程）

(1) 骨膜的再生。骨膜内的纤维母细胞（fibroblasts）开始分裂以产生足够的细胞形成新骨膜，闭合受损缺口的表面。

(2) 再吸收过程。骨髓中的 HSCs 分化成破骨细胞前体细胞进入循环系统移动到受损部位，并且在骨组织、骨膜和骨内膜中骨母细胞的作用下，彼此混合成成熟的破骨细胞^[12]。成熟的破骨细胞是多核的、类似巨噬细胞的细胞，在成骨细胞的影响下可以启动受损骨骼边缘钙化基质碎片的再吸收过程。

(3) 重建过程。破骨细胞再吸收之后，MSCs 和骨母细胞受到刺激从而向治愈位点移动并且分化成软骨细胞和成骨细胞以形成新的骨组织。新的骨组织由软骨类骨质基质（cartilage osteoid matrices）构成，之后则会被矿化的成熟骨细胞代替。新形成的骨组织通常称为“纤维骨”（woven bone），仍需要不断重复再吸收及重建过程才能形成成熟的骨组织。

再生过程涉及多种细胞，包括 HSCs、MSCs、骨母细胞、破骨细胞、成骨细胞、骨细胞和纤维母细胞，它们都源自骨髓、骨组织、骨膜和骨内膜。

1.2.3 间充质干细胞

MSCs 是衍生自任何组织间质起源的前体细胞，既可以分化（产生可以执行特定功能的成熟子细胞）又可以自我更新（维持并充满干细胞库（stem cell pool）），在发育期的组织构建中发挥着重要作用。有时，它们也会保留到成年期以支持短寿命细胞的持续更换和受损后子细胞的再产生^[16-19]。因为 MSCs 是能

够自我更新以及能够分化成不同组织（骨、软骨、肌肉、皮肤和结缔组织）的多功能细胞，所以在骨组织工程中占据了核心地位。这些功能为临床提供了治愈大量骨疾病的新疗法。

近期有研究从细胞分子生物水平上描述了控制 MSCs 分化的机制。这些研究已经确认细胞外的生物化学刺激能调控 MSCs 的分化与活性^[4,9,12,20-22]，这些生物化学刺激包括激素、细胞因子（如骨形态发生蛋白（BMPs）、 β 转化生长因子家族、血管内皮生长因子（VEGF）、胰岛素样生长因子-I（IGF-I）、成纤维细胞生长因子（FGFs）、IL-1 受体拮抗蛋白（IRAP）、白细胞介素-4（IL-4）、血小板源性生长因子（PDGF）和生物力学刺激^[15]。胞内信号分子 [如 LMP-1、细胞信号转导分子 Smad 1、5 和 8、局部黏着斑激酶（FAK）、钙离子] 也能通过激活转录因子调控基因表达，如 Runx2、鼠短尾突变体表型 Brachyury 或者硫氧化物 Sox-9，这些信号调控分子能针对性地促进 MSCs 分化^[23-25]。有实验显示电刺激可以调控钙振荡从而促进包含 MSCs 在内的骨生成，扁平细胞和扩散细胞通过 RhoA 的活化作用和肌球蛋白张力的上调进行骨生成，然而圆形细胞则是通过抑制 RhoA 来变成脂肪细胞^[26]。在转录水平上，转录因子 Sox-9 是软骨形成的必要物质，而 Runx2 则是成骨细胞分化和出现 Wnt 信号将软骨细胞转化为成骨细胞的必要因素^[9]。因此，对这些细胞信号通路的研究将为设计模仿自然组织形成的骨修复治疗方法提供基础^[20,23]。

1.2.4 骨组织工程中的生物材料

尽管小规模骨折可以轻易自我修复，但大规模骨折（粉碎性骨折、骨质疏松和软骨质组织）难以依靠再生和重构自我修复^[20]。这种情况通常需要通过手术向受损位置植入移植骨或人造材料^[27]。据统计，仅在美国每年就有超过 200 万次手术需要骨替代品，并且这种需求还在持续上涨中。预计至 2030 年，首次全髋关节置换术将增长 174%，首次全膝关节置换术将增长 673%。类似统计并不包括骨科植入物使用寿命（10~15 年）引起的维修，而这种维修的需求也在稳定增长中^[20]。毫无疑问，临床需求的增加需要大量骨移植物，这将在全世界范围内带来巨大的社会经济影响。

传统的骨修复手术包括自体移植术（取自患者髂骨）和同种异体移植（取自尸体上的骨骼）^[28]。目前为止，自身移植因其稳定的结构和天然的成骨能力一直被认为是受损骨再建的黄金法则^[29,30]。尽管自体移植和同种异体移植已相当成功，但它们也有着严重的局限，如供体骨组织的来源受限、无法预测的排异及感染等^[2,28]。特别是临床上治疗大范围骨质缺损需要的自体移植物，大约有 40% 的患者无法获得^[31]。所以，临床上迫切需要更可靠、更丰富的骨替代物以替换或修复受损骨骼。

1.2.5 三代骨修复材料

过去几十年间,随着材料科学与技术的迅速发展,生物材料领域衍生出了一系列的骨修复、移植替代品。目前,仅在德国就有超过 100 种的骨治疗修复材料^[30]。在 20~21 世纪,骨治疗修复材料经过长足的发展,经历了三代材料的更替^[32,33]:第一代生物惰性(bioinert)材料;第二代生物活性和生物可降解(bioactive and biodegradable)材料;第三代细胞及基因激活(cell-and gene-activating)材料(在分子水平上刺激特定的分子反应而产生的材料,一旦植入将刺激机体自身修复)。表 1.1 简要介绍了这三代材料^[20,26,32-35]。

表 1.1 三代骨修复生物材料

不同代生物材料	时间	特征	组成
第一代	1960~1970 年	生物惰性	金属: 不锈钢、铁及铁合金 陶瓷: 铝、氧化锆 聚合物: 硅橡胶、聚乙烯、丙烯酸树脂、聚氨酯、聚丙烯、聚甲基丙烯酸甲酯
第二代	1980~2000 年	生物活性 生物可降解	金属: 在金属材料表面的生物活性物质涂层, 包括羟基磷灰石、生物玻璃 陶瓷: 生物玻璃、磷酸钙、羟基磷灰石 聚合物: 聚乳酸、聚乙交酯、聚二氧六环酮、壳聚糖
第三代	2000 年以后	生物活性 生物可降解 生长因子、细胞激活	支架材料、细胞及活性因子的混合体

在 20 世纪六七十年代诞生的第一代材料仅是为了得到一种毒性低的材料,在人体毒性最小的情况下能匹配被替换组织的物理性质(如力学性质)即可^[32]。1980 年,在美国有 200 万~300 万由惰性生物材料做成的假体被植入患者身体,可延续患者 5~25 年的生命,提高生存质量^[32,36]。在 20 世纪 90 年代中叶,第二代生物活性材料,包括羟基磷灰石微粒(hydroxyapatite particles)在内的生物活性复合材料开始在骨修复与骨替代中发挥重要作用^[34-36]。尽管上述第一、二代骨材料替代品已经在临床上成功应用于受损骨的修复与替代,但二者无法对生理或生物化学刺激产生响应,从某种程度上局限了它们的应用。对于大部分第一、二代生物材料来说,主骨与植入骨间的不协调会导致应力遮挡效应,植入物的表面性能抑制新组织的再生进而引起植入物与主骨间结合的松散,这已经成为骨科植入失败的主要原因。因此,需要新办法来进一步改善骨组织的修复与再生。

最近 10 年中, 第三代细胞及基因激活材料 (也称为骨组织工程材料) 已被制成细胞外基质支架, 使骨祖细胞能在体外基质支架上增殖分化, 在植入患者身体前更好地模仿活体中周围组织情况^[34]。骨组织工程能通过诱导骨细胞黏着和增殖来刺激活体内新骨组织的再生, 由此产生了比传统方法更有效的方式并且在治疗骨质缺损方面已经获得认可^[34,28]。迄今为止, 骨组织工程中最先进的一种方法是向患者体内移植细胞与材料结合的杂交复合物, 杂交复合细胞、3D 多孔支架和生物活性因子以形成完整的骨移植替代物。这种杂交复合结构物正是典型的第三代细胞及基因激活的材料 (图 1.3)^[2,28,37,38]。用微创手术向病变或受伤位置植入细胞-生物支架材料杂化结构物后, 从分子水平上刺激细胞的特定响应, 激活特定基因表达以调控骨再生, 逐渐形成新组织逐步代替缺失的骨骼^[38-40]。基于此, 新型骨修复疗法可以简短定义为“诱导机体固有的修复机能来自我修复”^[12,39]。

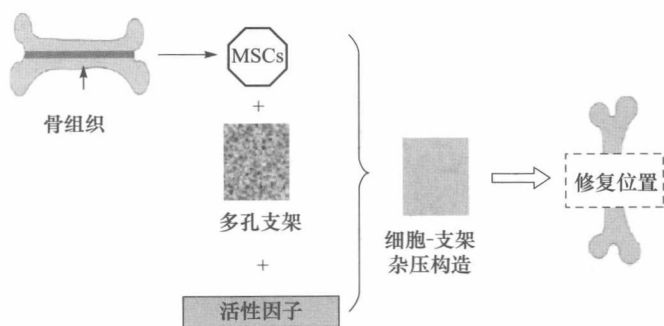


图 1.3 骨组织工程简单示意图

总体说来, 新一代骨修复方法使用的生物材料, 要求具备可分解、无毒、可再吸收并且有合适的力学、表面结构等物理特性。

骨髓中的 MSCs 与转录因子和生长因子一同被移植到三维多孔支架材料上, 细胞持续分化生长为杂交细胞-支架结构。成熟后, 杂交细胞-支架结构移植入患者受伤部位。

1.2.6 骨组织工程中的间充质干细胞

骨组织工程和再生通常涉及分离及体外培养 MSCs 和随后向受损位置的移植。通常, MSCs 从患者自身 (包括骨髓基质、肌肉、皮肤、脂肪和牙龈) 获得, 这样避免了免疫并发症的发生。人们已经能从骨髓中分离得到 MSCs, 将之应用到骨、软骨和韧带的修复中^[23,41-43]。1991 年, Caplan 第一次提出“自体同源干细胞的分离、有丝分裂扩张和定向位点递送可控制骨组织的快速特定修复”

的观点^[44]。2001年,Quarto等第一次在临床上成功使用自体骨髓间质细胞修复大规模骨质缺损^[43]。2004年,Schimming率先在移植手术三个月后,成功地利用成骨细胞得到骨膜形成板层骨^[45]。

骨组织再生的最终目标是高效形成新骨。因此,生物支架材料可诱导的表达系统尤为重要,因为它们能直接调控破骨、成骨细胞的增殖和分化^[40,46-49]。1965年早期,Urist首先提出,骨组织包含某种特殊的生长因子对异位上的骨形成起到诱导作用^[50]。1974年,他发现了BMPs。BMPs能与细胞外受体结合,最终促进基因表达和MSCs分化成骨细胞^[51]。随后,出现了用于诱导特异细胞的专门混合添加剂。例如,包含转化生长因子 β 、ITS+Premix和地塞米松(dexamethasone)的软骨形成混合物能诱导MSC形成软骨^[35,52]。最近有研究将MSCs与人工基底膜混合后播种在3D编制的聚乙烯支架上,在双向灌注介质的生物反应器中培养。21d联合培养后,MSCs与紧密编制的PLC支架成功形成了具有与正常关节软骨机械性能类似功能的组织软骨^[53]。

为了进一步增强MSCs的生长与分化,采用基因工程方法通过病毒载体或无病毒的载体使靶基因在MSCs中编码功能蛋白质^[20,54]。MSCs除了在组织工程中起到成骨功能,在再生医学的某些成功案例中也被用做传送机械力的生物激活作用和抑制免疫力分子^[23,55,56]。这为进一步研究MSCs的分子调控和临床应用提供了更多指导,但是生物化学和物理环境对MSCs的分化与功能调控有着怎样的影响仍需进一步研究。

1.3 物理/机械环境对骨细胞功能的影响

再生骨组织工程中,MSCs首先离开原本的位置并迁移到它们嫁接、分化的目标位点上^[57]。这种骨形成过程很大程度上受到环境物理/机械性质的影响。因此,分化过程的分析必须考虑到物理/机械环境。目前,MSCs分化过程中涉及的根本机理尚不清楚^[58]。

1.3.1 孔隙度与孔尺寸对支架的影响

支架材料可以支撑细胞,控制细胞形状以引导其分化,可以看做是临时的细胞合成外基质,支架对骨再生的组织工程同样重要。

3D骨组织工程支架旨在模拟活体环境的特征^[37]。骨细胞可以在多孔支架上迁移、代谢、血管化,因此对骨组织形成极为有利^[59]。此外,表面多孔的支架还会促进植入生物材料与人体微环境间的相互作用^[60]。支架上更高的孔隙度和孔尺寸将增强这种相互作用,因此骨细胞得以在体内更好地生长。但是,同时这种多孔性也会减弱其机械性质。因此,支架的设计必须要与人体组织的机械性质相匹

配^[60-62]。对不同个体和个体的不同部位,骨骼都存在着差异性。因此,针对个体的最优化修复尤为重要。目前已经得到活体内孔隙度和孔尺寸的最优化范围,孔隙度是25%~94%,而孔尺寸是6~900 μm 。结果显示,更高的孔隙度(>80%)和200~400 μm 的孔直径最利于骨组织再生^[63-66]。早期研究只考虑到迁移和运输对细胞大小的要求,支架的最小孔尺寸大概为100 μm ^[67],随后有研究发现200 μm 的孔尺寸能增强新骨的形成和血管化^[68]。Karageorgiou等进一步确定,小孔径对骨生成前的软骨形成更有利,大孔径则会促进骨生成的血管化^[60]。

进一步研究仍需对不同支架的成骨结果进行系统分析,更好地得到孔隙度和孔尺寸对成骨的影响^[60]。

1.3.2 支架表面物理性质的影响

植入物表面直接接触活体组织,因此,近几年来这方面的研究也相继展开。现有骨科植入物的表面缺少合适的细胞黏着(细胞与植入物表面间的生化联系和蛋白质相互作用)及植入组织集成(植入物和周围活体组织间的黏合)。这些都是导致临床并发症和骨科植入物寿命缩短的主要原因,尚需要进一步改进^[69]。

众所周知,细胞外基质的化学特性能够调节细胞功能,但3D支架上基质的物理性质也对调节植入物周围骨细胞的生物力学反应至关重要^[58,70]。MSCs可以通过感知其周围环境的粗糙度、硬度和质地来决定分化方向^[58]。也有一些研究显示,细胞与基质间的相互作用很大程度上受到基质表面粗糙度和形状的影响^[69,71-73]。表1.2列出了表面固有性质对蛋白质吸附过程以及细胞与微环境间相互作用的影响,特别是表面能(surface energy)、物理化学性质和粗糙度的影响。表面性质也对细胞黏着、蛋白质重新排布和细胞体外基质的蛋白聚糖有影响。

材料表面的粗糙度根据程度可以分为以下几类:宏观粗糙度(100 μm ~毫米级)、微观粗糙度(100nm~100 μm)和纳米粗糙度(nanometer roughness)(<100nm)。宏观粗糙度对细胞没有重要影响,也不抑制细胞的附着和分布。然而微观粗糙度的影响存在争议:在某些情况下,粗糙度为微米级的表面促进了植入物表面的矿化和蛋白分布,有利于植入物周围骨组织的生长,但在另一些情况下则会抑制周围组织的生长^[69-75]。不同形状的表面结构(如椎体、单向皱纹、细槽和圆孔等)可能是产生以上不同结果的原因之一。纳米级粗糙度有利于成骨细胞的响应,包括初始细胞附着、增殖和分化特征的表达^[69,76]。这个结果正好与骨结构事实相符合。因为骨本身是表面为纳米粗糙度的结构,主要由90%的胶原蛋白合成物和羟基磷灰石晶体基质组成,其中,胶原蛋白合成物由成骨细胞形成的长300nm、直径为0.5nm的线纤维组成^[77],羟基磷灰石晶体基质包含了

2~5nm 厚、20~80nm 长的六边形单元^[78]。基于此，关于纳米级表面前沿研究的目标正是用纳米技术复制骨的天然表面结构^[73,76,79]。未来的研究方向将集中在分子、原子水平上细胞基质间的相互作用，为细胞超微结构研究打下基础^[72,80]。

表 1.2 材料表面对骨细胞的影响

对象	结果	参考来源
表面系数	表面系数影响骨细胞增殖过程	Sa 等 ^[70]
表面自由能	对细胞附着和增殖来说，表面自由能是比表面粗糙度能重要的特征	
湿润度	① 人类成纤维细胞因湿润而增加； ② 湿润度是细胞附着和骨整合成功的基本要求； ③ 增加生物材料表面的湿润度或亲水性能增加蛋白质吸附和细胞繁殖	
晶粒取向 (晶体结构)	钛板基质的晶粒取向比钛棒的更利于前骨细胞的附着和增殖	
表面粗糙度	① 表面粗糙度能促进人类下颌骨细胞的增殖和分化。然而，将表面粗糙度增加到 300 μm 与 63~90 μm 时的细胞附着程度相同；	Mustafa 等 ^[80]
	② 类成骨细胞的形态不受工艺参数的影响，但细胞增殖在一定程度上与表面粗糙度有关；光滑表面 ($R_a<0.5\text{mm}$) 用于显微组织，有纹理的表面 ($R_a>0.5\text{mm}$) 通常用于骨组织，在所有的培养系统中，在光滑表面上的增殖效果要明显差于有纹理表面的效果	Hacking 等 ^[74]
表面形状	① 表面上黏合剂有无比率的改变能控制细胞扩散；约束基质上细胞的形状和大小能影响内源性蛋白质合成率和细胞表型的维持； ② 增加纳米级条纹宽度能增强成骨细胞的附着和扩散	Puckett 等 ^[69]

1.3.3 环境机械性质的影响

研究表明，细胞外基质的机械性质会影响细胞的增殖、迁移和分化^[23,58,81-83]。Engler 等发现 MSCs 分化受二维基板基质硬度的调控，而在培养过程的第一周添加可溶性诱导因子会改变这种现象，几周后再添加则不能，仅受硬度调控^[58]，在 3D 凝胶上培养 MSCs 有同样的结论^[83]。Kong 等对基板硬度对基因导入与表达的影响进行了研究，研究中利用荧光共振能量转移技术 (FRET) 检测细胞与基质间的相互作用^[84]，FRET 是一种被广泛应用于分析、显示特定分子间相互作用和细胞内外活动的影像技术^[84-86]。结果表明，高硬度的基质促进 pDNA 固化物的内吞作用及其向核内的运输，增强了细胞增殖。同样，增强基质硬度也会促进固化物中 pDNA 的减少，增强细胞产生牵引力的能力，缩短细胞