

# 珍珠层粉复合支架修复骨缺损的生物学性能研究

郑志平, 毛小泉\*

中南大学湘雅医学院附属海口医院. 海南省口腔医学中心口腔种植科, 海口 570208

**摘要:** 骨组织工程中的复合支架研究是当今的热点之一, 珍珠层粉作为一种骨修复替代材料, 具有诱导成骨作用的有机基质以及合适的降解性能。因此珍珠层粉复合支架有望成为理想的骨组织工程修复材料, 现就其生物学性能进行综述。

**关键词:** 骨修复; 珍珠层粉; 复合支架; 组织工程

中图分类号: R687

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.031

## Review on the Biological Properties of Nacre Powder Composite Scaffolds Repairing Bone Defect

ZHENG Zhi-ping, MAO Xiao-quan\*

*Department of Implantology, Affiliated Haikou Hospital of Central South University Xiangya Medical School · Hainan Provincial Stomatology Center, Haikou 570208, China*

**Abstract:** Composite scaffolds are one of the most popular topics in bone tissue regeneration. Nacre powder, as a kind of bone graft substitute material, has excellent osteogenesis effect and ideal degradation performance. Composite scaffolds made of nacre powder might be an ideal repairing material for bone tissue engineering. This article makes a review about biological property of nacre powder composite scaffolds.

**Key words:** bone regeneration; nacre powder; composite scaffolds; tissue engineering

临床中颌面部常因创伤、炎症、肿瘤、先天畸形等造成骨组织缺损, 目前的治疗方式主要是骨组织移植, 包括自体骨、生物衍生骨、人工修复材料。而理想的骨移植材料应同时具有骨诱导性、骨引导性、骨生成和骨改建<sup>[1]</sup>的功能。自体骨因同时具备骨诱导性和骨引导性, 长期以来一直将其作为骨移植材料的“金标准”<sup>[2]</sup>, 但是其来源有限, 且需在自身上取骨, 会再次对患者自身造成损伤, 特别是骨缺损较大时需多处取骨, 导致自体骨移植材料在临床应用上有了地限制; 其他骨移植材料也有一定的缺陷: 部分骨移植材料有可能会引起排异反应<sup>[3-5]</sup>; 受压迫时移位, 影响骨的形成, 故满足不了临床基本要求。尽管目前临床上应用的羟基磷灰石骨移植材料具有优越的生物相容性, 但其在骨移植部位易受压而发生移位, 同时还存在成骨效果不满意的情况, 因此越来越多的骨移植材料转向复合支架的研

究<sup>[6]</sup>, 既保持材料原有的生物学性能, 还增其在植骨部位的稳定性。珍珠层粉复合支架具有良好的生物学性能, 能够诱导骨形成, 是一种有希望的骨移植材料<sup>[7-10]</sup>。

### 1 珍珠层粉

珍珠层粉是一种来源广泛, 成本低廉, 加工方便的材料, 主要来自贝壳珍珠层, 具有良好的生物学性能以及骨诱导性<sup>[11,12]</sup>。1992年法国科学家 Lopez<sup>[13]</sup>首次将其植入人体内发现珍珠层具有骨诱导作用, 之后证明珍珠层粉具有良好的生物学性能和成骨能力<sup>[14]</sup>。

#### 1.1 珍珠层粉的结构

珍珠层粉是来自腹足类软体动物贝壳最内层的结构, 是一种天然的无机-有机复合材料, 内部结构与人体天然骨及其相似。其中无机物含量占95%, 其结构为文石晶体的碳酸钙, 其余则为有机质, 主要包括一些大分子物质以及小分子物质, 而目前已知的无机质主要有多糖、蛋白多糖、甲壳素、酸性蛋白、糖蛋白等<sup>[15]</sup>。其内部的碳酸钙无机晶体与有机基

质交错排列形成一种“砖墙”样结构<sup>[16]</sup>,表现出独有的物理学特性。

## 1.2 珍珠层粉的生物相容性

生物相容性是珍珠层粉成为骨替代材料的前提。目前已知碳酸钙具有良好的生物相容性以及一定的吸附蛋白的能力,珍珠层粉又主要碳酸钙构成,这使得珍珠层粉也具有有良好的生物相容性。目前,在体内体外试验中,众多学者对珍珠层粉的生物相容性进行的大量研究也证实这一观点。在体外实验中,Shen Y<sup>[17]</sup>等将珍珠层粉、珍珠片层和羟基磷灰石对成骨细胞的促进作用进行比较,发现珍珠层粉能促进成骨细胞的增殖,培养5 d后,珍珠层粉表面出现大量细胞外基质,体现了珍珠层粉作为骨移植材料时独特的优势。Hamza S<sup>[18]</sup>等实验观察牛血清白蛋白吸附到珍珠层的表面,显示珍珠层具有较好的牛血清白蛋白黏附作用,表现出良好的细胞相容性。在体内实验中,Liao H<sup>[19]</sup>等将珍珠层植入大鼠股骨内,几周后发现,在股骨部位,新形成的骨覆盖在植入物表面,骨与植入物紧密融合在一起;Rousseau M<sup>[20]</sup>等在羊膝中植入珍珠层粉,没有发生任何滑膜炎,也表现出良好的生物相容性<sup>[21]</sup>。

## 1.3 珍珠层粉的降解性

随着对珍珠层粉的深入研究,部分学者发现此材料虽有着良好的生物相容性,然其降解性能欠佳。而对于骨移植材料,其最终结果是被机体自身骨组织替代,当移植材料降解速率较慢时,机体自体骨生成速率则手阻碍,从而不利于新骨的生成。Berland S<sup>[22]</sup>等将20 mm × 13 mm大小的块状珍珠层植入14只羊股骨内,9个月后发现珍珠层降解有限,且发现珍珠层的生物降解性与多因素有关,比如材料的形状、结构、以及植入区域的细胞环境等。对于珍珠层粉降解速率较缓慢,有学者认为是珍珠层粉的结构及其无机质成分抑制了破骨细胞的活性,也有学者认为是其降解过程主要是生理化学溶解,而破骨细胞并未参与。所以,目前关于珍珠层粉的具体降解机制仍不清楚,需要进一步研究。与此同时,珍珠层粉降解性能的改善也是其应用于临床亟待解决的问题之一。

## 1.4 珍珠层粉的成骨性能

目前,大多数学者认为珍珠层粉的成骨作用机制与其内部所含的有机基质密切相关,现已有研究表明珍珠层粉的有机基质中的大分子物质如蛋白和多糖,以及一些小分子物质有能够促进成骨细胞增

殖和分化的作用。Asvanund P<sup>[23]</sup>等将小于90 μm珍珠层粉植入豚鼠下颌牙槽骨2 × 2 mm缺损处,30 d后,组织切片显示新形成的骨小梁侵占骨缺损部位,60 d后,珍珠层粉全部由新形成的骨组织替代,这表明珍珠层粉具有良好的成骨效果。

虽然上述表明了珍珠层粉有着优良的生物学性能,然而单纯地将珍珠层粉置于骨缺损处,其与目前临床上常用的羟基磷灰石存在一样的不足,即受压发生移位;另外珍珠层粉的降解性能欠佳,这对珍珠层粉的成骨效果也有一定的影响,使得骨移植材料长期存留骨缺损处,而新形成骨量少,故需将珍珠层粉制成具有一定孔隙率及抗压强度的复合支架,同时改善其降解性能以满足临床需求。

## 2 珍珠层粉复合支架的性能

### 2.1 珍珠层粉复合支架的力学性能

珍珠层粉复合支架有着良好的力学性能,李婷<sup>[24]</sup>等采用冷冻干燥法制备了骨形成蛋白2/珍珠层粉/壳聚糖复合支架,制成高8 mm、直径5 mm的圆柱体,通过微力试验机进行压缩性能测试,结果发现,此支架在压缩形变7 mm时未见破坏,其最大压缩应力为3.37 MPa。肖文德<sup>[25]</sup>等制备出纳米珍珠层/聚乳酸支架,再将血小板源性生长因子-BB (Platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB)与纤维蛋白胶混入到支架中制备出复合支架。扫描电镜观察,复合支架的孔径为(303.3 ± 47.0) μm,有利于成骨细胞的种植和生长。孔隙率80.2% ± 0.7%,有利于营养成分的供应与代谢,其抗压强度为(5.1 ± 0.26) MPa,与松质骨的抗压强度相当,有利于支撑骨细胞的生长空间,为骨组织的形成提供保障。

上述实验表明了,珍珠层粉复合支架有着一定的孔径大小,有利于细胞黏附及生长,且利于营养物质输送及废物代谢,复合支架有一定的压缩强度,能满足临床的需要。但上述方法制备出的复合支架的孔隙率能满足临床需求的数值,但未能保证其是有效孔隙率;且每次制备的复合支架的空隙不完全一样,这使得研究会出现一定的误差,未来的研究应该是3D打印珍珠层粉复合支架。

### 2.2 珍珠层粉复合支架的降解性能

珍珠层粉复合支架具有良好的降解性能,肖颖等<sup>[26]</sup>将纳米珍珠层粉复合消旋乳酸制成多微孔结构的圆柱体,植入缺损直径约0.4 cm的犬股骨头内,X射线显示,4周时移植植物与周围组织分界清

晰,12周时分界处变得模糊,证实了外消旋聚乳酸(porous poly-dl-acid, PDLLA)/纳米珍珠层粉复合支架具有可降解性。汤勇智<sup>[27]</sup>等把PDLLA分别与微米珍珠层粉和纳米珍珠层粉制备出直径3.5 mm,厚1 mm的人工骨薄片,后植入雌性大鼠股骨头内,当天X射线检查微米珍珠层组和纳米珍珠层组均为高密度影像,术后2周时,两组高密度影像消失,呈低密度影像,但纳米珍珠层粉组更加低于微米珍珠层粉组,术后两周组织学检查微米珍珠层粉组的珍珠层粉残存量多于纳米珍珠层粉组,表明PDLLA/纳米珍珠层粉复合支架降解性能较PDLLA/微米珍珠层粉复合支架好。此外,李婷<sup>[28]</sup>等研究也表明了珍珠层粉/壳聚糖复合支架有良好的降解性能,其降解速率较适合临床需求。

上述研究证实珍珠层粉复合支架的降解性能,其降解性能与珍珠层粉颗粒的大小反相关,即珍珠层粉颗粒越小,其降解性能越好,在临床上可以通过控制珍珠层粉的粒度调整复合支架的降解速度,使其更能满足临床需求。然而目前主要采用冷冻干燥法制备珍珠层粉复合支架,在这过程中珍珠层粉容易发生团聚,使得支架内部结构呈团块状,致使其降解性能下降。未来可通过3D打印技术,使用大小合适颗粒的珍珠层粉及其与其它原料一定的比例,制出降解性能更佳的珍珠层粉复合支架。

3D打印技术是目前较热的一个研究方向,它是一种高速成型技术,基于计算机三维设计数字模型,在激光的引导下,通过喷墨打印等技术,将粉末状或液体状等生物材料通过逐层打印的方式构建产品的技术。其在骨组织工程支架中具有:1、高精度;2、速度快3、按需构建模型,能满足个性化要求;4、可设定特定孔隙率及交联的结构,按需求制定临床需要的骨组织支架。再次,凡是能与粘结剂结合粉末材料都能使用3D打印技术。故3D打印珍珠层粉复合支架是未来的研究的方向。

### 2.3 珍珠层粉复合支架的成骨性能

珍珠层粉复合支架在促进骨生成方面具有一定的优势,已经证实具有骨诱导性和骨传导性。Drosse<sup>[29]</sup>等将聚左旋乳酸(Poly-L-lactic acid, PLLA)与珍珠层粉混合制备成PLLA/珍珠层粉复合支架,其能够促进间质干细胞增殖和分化。Liu Y<sup>[30]</sup>等通过冷冻干燥方法制备了PLLA/文石型珍珠粉复合支架和PLLA/珍珠层粉复合支架,实验结果表明PLLA/珍珠层粉复合支架能很好地刺激大鼠骨髓间充

质干细胞的增殖和成骨化。陈怡<sup>[31]</sup>等制备醛化白及多糖/羟丙基壳聚糖/纳米珍珠层粉复合支架材料,然后将大鼠双侧下颌磨牙制备的箱形洞,最后将复合支架材料置入大鼠下颌的一侧缺损,另一侧作为空白对照,分别2、4、6、8周处死大鼠,结果发现相同愈合时间的复合支架侧新生骨面积优于对照侧。

珍珠层粉复合支架能有效促进骨生成,为珍珠层粉复合支架在临床中的应用提供了基础。但目前这些研究处于动物实验水平,下一步应进行临床实验研究。

### 2.4 珍珠层粉复合支架的生物相容性

珍珠层粉复合支架也具有有良好的生物相容性,肖文德等<sup>[32,33]</sup>将小鼠成骨细胞MC3T3-E1分别接种至缓释PDGF-BB的纳米珍珠层/聚乳酸/纤维蛋白胶复合支架、纳米珍珠层/聚乳酸复合支架以及聚乳酸支架,然后进行体外培养,结果显示随着培养时间延长,MC3T3-E1细胞在三种支架边缘细胞数逐渐增加,但缓释PDGF-BB的纳米珍珠层/聚乳酸/纤维蛋白胶复合支架组细胞明显多于其余两组;扫描电镜下观察,缓释PDGF-BB的纳米珍珠层/聚乳酸/纤维蛋白胶复合支架组上的细胞呈梭形,且数量多于其它两组,细胞连接也很紧密;用MTT法检测细胞活性,表明MC3T3-E1细胞在缓释PDGF-BB的纳米珍珠层/聚乳酸/纤维蛋白胶复合支架组生长良好,并优于其余两组。说明缓释PDGF-BB的纳米珍珠层/聚乳酸/纤维蛋白胶复合支架具有良好的细胞相容性。庞永志<sup>[34]</sup>等研究也证实了珍珠层粉复合支架在兔体内未发生免疫反应,表现出良好的组织相容性。

上述动物实验及体外实验都显示出珍珠层粉复合支架有着优良的生物相容性,下一步应该进行临床实验研究,观察其在人体实验中的生物相容性。

## 3 总结

珍珠层粉由于具有良好的生物相容性,以及骨传导性和骨诱导性作用,成为有希望代替骨修复的生物材料,但单纯使用珍珠粉修复骨缺损时,其抗压强度不够,所以目前将珍珠层粉与其他生物材料混合制成复合支架。所制得的珍珠层粉复合支架有着一定的力学强度,能够促进骨的生成,且在体内未发现排斥反应,这使得珍珠层粉复合支架成为骨组织工程中最有前景的骨缺损修复材料,但珍珠层粉复合支架的制备及相关性能仍需进一步改善。

## 参考文献

- 1 Scheufler KM, *et al.* Use of bone graft replacement in spinal fusions. *Orthopade*, 2015, 44:146-153.
- 2 Lee HG, *et al.* Volumetric stability of autogenous bone graft with mandibular body bone; cone-beam computed tomography and three-dimensional reconstruction analysis. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*, 2015, 41:232-239.
- 3 Dimitriou R, *et al.* Bone regeneration; current concepts and future directions. *BMC Med*, 2011, 9:66.
- 4 Farré-Guasch E, *et al.* Human maxillary sinus floor elevation as a model for bone regeneration enabling the application of one-step surgical procedures. *Tissue Eng Part B Rev*, 2013, 19:69-82.
- 5 He B, *et al.* Functionalized d-form self-assembling peptide hydrogels for bone regeneration. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10:1379-1388.
- 6 Uskoković V. When  $1 + 1 > 2$ ; Nanostructured composites for hard tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 12:434-451.
- 7 Saiz E, *et al.* Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dent Mater*, 2013, 29:103-15.
- 8 Xiao WD, *et al.* Repair of critical size bone defects with porous poly (D, L-lactide)/nacre nanocomposite hollow scaffold. *Saudi Med J*, 2012, 33:601-607.
- 9 Tang H, *et al.* *In vivo* ectopic osteogenesis of nacre/polylactic acid artificial bone combined with allogenic osteoblasts. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2005, 19:114-117.
- 10 Liu YS, *et al.* *In vitro* degradation of porous PLLA/pearl powder composite scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 38:227-234.
- 11 Lamghari M, *et al.* A model for evaluating injectable bone replacements in the vertebrae of sheep; radiological and histological study. *Biomaterials*, 1999, 20:2107-2114.
- 12 Lamghari M, *et al.* Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep. *Biomaterials*, 2001, 22:555-562.
- 13 Lopez E, *et al.* Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained *in vitro*. *Tissue Cell*, 1992, 24:667-679.
- 14 Hunger PM, *et al.* Platelets self-assemble into porous nacre during freeze casting. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2013, 19:87-93.
- 15 Lee SW, *et al.* Nano-structured biogenic calcite; a thermal and chemical approach to folia in oyster shell. *Micron*, 2008, 39:380-386.
- 16 Li X D, *et al.* Nanoscale structural and mechanical characterization of a natural nanocomposite material; the shell of red abalone. *Nano Letters*, 2004, 4:613-617.
- 17 Shen Y, *et al.* *In vitro* osteogenetic activity of pearl. *Biomaterials*, 2006, 27:281-287.
- 18 Hamza S, *et al.* Physical and chemical characterization of adsorbed protein onto gold electrode functionalized with Tunisian coral and nacre. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33:537-542.
- 19 Liao H, *et al.* Tissue responses to natural aragonite (Margaritifera shell) implants *in vivo*. *Biomaterials*, 2000, 21:457-468.
- 20 Rousseau M, *et al.* Subchondral nacre implant in the articular zone of the sheep's knee; a pilot study. *Biomed Mater Eng*, 2012, 22:227-234.
- 21 Oliveira DV, *et al.* Identification of proteins with potential osteogenic activity present in the water-soluble matrix proteins from *Crassostrea gigas* nacre using a proteomic approach. *Sci World J*, 2012, 2012:765909.
- 22 Berland S, *et al.* Nacre/bone interface changes in durable nacre endosseous implants in sheep. *Biomaterials*, 2005, 26:2767-2773.
- 23 Asvanund P, *et al.* Alveolar bone regeneration by implantation of nacre and B-tricalcium phosphate in guinea pig. *Implant Dent*, 2012, 21:248-253.
- 24 Li T(李婷), *et al.* Preparation and characterization testing of bone morphogenetic protein2/Pearl Powder/Chitosan Porous Scaffolds. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2015, 35:1-6.
- 25 Xiao WD(肖文德), *et al.* Preparation of PDGF-BB releasing nano-nacre/PDLLA/FG composite scaffold. *Orthopedic J China*(中国矫形外科杂志), 2011, 17:943.
- 26 Xiao Y(肖颖), *et al.* Treatment of femoral head necrosis in canine using inductive tissue engineered bone constructed by nano-nacre artificial bone. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*(中国组织工程研究与临床康复), 2010, 14:6271-6275.
- 27 Tang YZ(汤勇智), *et al.* Research of the degradation of nano-nacre powder and the biocompatibility of the nano-nacre composite artificial bone. *Orthopedic J China*(中国矫形外科杂志), 2009, 17:131-134.
- 28 Li T(李婷), *et al.* Preparation and performance testing of nacre powder/chitosan porous scaffolds. *Mater Rev*(材料导报), 2016, 30:38-41.
- 29 Drosse I, *et al.* Tissue engineering for bone defect healing; an update on a multi-component approach. *Injury*, 2008, 39:S9-S20.