

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.23.003

交联 I 型胶原复合生物玻璃在兔股骨远端缺损中的成骨作用 *

黄海 栗向东 郭征 石磊 刘冬 王臻^Δ

(空军军医大学第一附属医院骨科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:评价交联度不同的 I 型胶原复合生物玻璃后作为人工骨移植在兔股骨髁部骨缺损中的修复作用,以研究一种成骨性能优秀,降解速度令人满意,且具有可塑性,便于术中使用的新型人工骨移植材料。**方法:**本研究设置实验组及对照组,实验组为交联度 70% 的高交联 I 型胶原复合生物玻璃以及交联度为 45% 的低交联 I 型胶原复合生物玻璃。对照组为普通未交联 I 型胶原复合生物玻璃。于 9 只新西兰大白兔双下肢股骨髁部制备动物骨缺损模型,将随机分组后的三种骨移植材料分别植入股骨髁部骨缺损模型中。术后 6 周取材行组织学分析研究,比较 3 种骨移植材料在骨缺损中的新骨生成率。**结果:**组织学分析结果显示,高交联组的新骨生成率为 5.23 0.87%,其成骨性能显著低于低交联组 13.23 1.13% 以及未交联组的 12.63 0.92% ($P < 0.05$)。而低交联组的新骨生成率与未交联组之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论:**交联度为 45% 的低交联 I 型胶原复合生物玻璃具有更好的成骨能力,作为骨移植材料在临床应用中具有更广阔的发展前景。

关键词:胶原;生物玻璃;骨代用品

中图分类号:R-33;R318.08;R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)23-4413-04

Effect of the Cross Linking Collagen Type I/Bioglass Composite Repair the Distal Femur Defect in Rabbit*

HUANG Hai, LI Xiang-dong, GUO Zheng, SHI Lei, LIU Dong, WANG Zhen^Δ

(Department of Orthopedics, Xijing Hospital, AIR FORCE Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the bone formation of the artificial bone grafts which fabricated by type I collagen with different crosslinking degree composite with bioglass, in the distal femur defect model in rabbits. To develop a new type plastic artificial bone graft with excellent bone formation performance and slow degradation rate. **Methods:** High-cross linking collagen (crosslinking degree 70%) composite with bioglass, Low-cross linking collagen (crosslinking degree 45%) composite with bioglass and Non-cross linking collagen composite with bioglass have been implanted into the lower limbs distal femur defects of 9 New Zealand white rabbits. The samples have been harvested at 6 weeks after the operation. The histological examination has been done to evaluate the new bone formation ratio in bone defect model of the rabbits, which implanted with the three kinds of artificial bone grafts. **Results:** The histological analysis showed that the newly bone formation ratio of the High-cross linking group is 5.23 0.87%, the newly bone formation ratio of the Low-crosslinking group is 13.23 1.13%, the newly bone formation ratio of the Non-crosslinking group is 12.63 0.92%. The rate of new bone formation in the High-cross linking group is significantly lower than that in the Low-crosslinking group and the Non-crosslinking group ($P < 0.05$). However, the newly bone formation ratio there is no statistical difference between in the Low-crosslinking group and the Non-crosslinking group ($P > 0.05$). **Conclusions:** The research revealed that the Low-cross linking collagen possess excellent osteogenic properties, and suitable for composite with bioglass as artificial bone grafts.

Key words: Collagen; Bioglass; Bone substitutes

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R318.08; R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)23-4413-04

前言

创伤及骨病导致的骨质缺损是临床工作中经常要面对的问题,目前已广泛应用的人工骨移植材料由于其生物力学性能、生物活性及骨修复能力尚难完全满足医患双方的需求。因此进一步探寻发展更优秀的人工骨修复材料,一直是组织工程

领域的热点问题^[1-3]。

胶原特别是 I 型胶原是天然骨组织中的重要组成部分,它的存在有助于矿物质的沉积,营养血管的生长以及生长因子的粘附,能够为骨组织生长提供一个良好的环境^[4-6]。然而胶原本身的机械强度差,缺乏足够的结构支撑力,不适合单独作为生物材料修复骨缺损。因此,目前在人工骨移植材料领域,胶原主

* 基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFB1107003)

作者简介:黄海,博士,主要从事人工骨修复材料、骨科数字化技术等实验研究以及四肢、脊柱及骨盆肿瘤切除重建等临床研究

^Δ 通讯作者:王臻,主任医师,教授,博士研究生导师,主要研究方向:四肢、脊柱、骨盆肿瘤的手术及重建技术和恶性骨肿瘤的化疗

(收稿日期:2022-03-28 接受日期:2022-04-31)

要是作为一种复合物与羟基磷灰石,磷酸三钙等骨修复材料复合使用修复骨组织缺损^[7,8]。此外,为了改善胶原自身的机械性能,降低其降解速度,可以通过物理或者化学方法对其交联改性从而提高其机械强度和抗蛋白酶降解的能力^[9]。

生物玻璃是一种具有良好骨传导性和骨刺激作用的人工骨修复材料^[10-12],在临床中已应用多年,并已发展出多种剂型(颗粒型,胶型)。其中胶型(NOVABONE PUUTY)可塑性强,手术中使用便捷,深受临床医生欢迎。但由于其主要成分是降解速度较快的甘油,机械强度严重不足,且无突出的生物活性,因此作为人工骨移植体还是有一定的缺陷^[13,14]。而使用降解速度较慢,生物活性更好的交联胶原复合生物玻璃。可能会发展出一种生物活性更好,机械强度更高的便于临床使用的可塑性生物玻璃人工骨。但是不可忽视的是,生物玻璃本身的成骨能力与其在体内的快速表面反应关系密切,交联后的胶原是否会影响其表面反应的发生,从而影响新骨生成尚不清楚。因此本实验将交联度不同的I型胶原复合生物玻璃种植于兔股骨髁部缺损中,观察术后缺损部位的成骨情况,并对不同交联度的胶原复合生物玻璃的骨修复能力作出评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

1.1.1 实验材料 材料分为实验组和对照组,实验组为高交联I型胶原复合生物玻璃(交联度70%左右),低交联I型胶原复合生物玻璃(交联度45%左右),对照组为未交联的I型胶原复合生物玻璃。3种材料总体为絮状(与血液混合后成胶状可塑形),由胶原包裹颗粒直径1-2 mm的生物玻璃颗粒,均为美国诺邦公司生产提供。

1.1.2 动物与分组 成熟新西兰大白兔9只,2.5-3.0 kg,雌雄不限。购自西安迪乐普生物资源开发有限公司,许可证号SCXK(陕)2006-001。2种实验组材料与1种对照组材料,每种6个,共18个分别随机植入9只兔子的两侧股骨髁部缺损。

1.2 方法

1.2.1 动物实验 实验动物术前24小时禁食,水。肌注陆眠宁0.10~0.15 mL/kg麻醉,于左右膝外侧切开暴露股骨髁部,生理盐水滴注下用磨钻制造直径6 mm,深10 mm的圆柱形骨缺损,按术前制订的材料随机分布表植入相应材料,材料本身为絮状,植入前需与血液混合成胶状,随后塑形植入,缝合切口。观察待苏醒后放入笼中。术后3天内注射庆大霉素。按术前计划于术后6周处死所有动物,取股骨下段,浸入10%中性甲醛缓冲液(pH7.1)固定3~5天。

1.2.2 组织学分析 将固定好的标本置于梯度乙醇(70%, 90%, 100%)脱水,随后依次浸于浸塑液1,浸塑液2,浸塑液3中各10天,聚丙甲酸甲酯包埋。使用Leica SP1600硬组织切片机(西京医院骨科研究所)切片,厚约200 μ m。将切片黏于树脂玻片上,待胶干后使用1500目砂纸磨片,磨至70 μ m左右停止。再用抛光粉抛光切片表面划痕。经Van-Gieson染色:超生洗片2分钟;0.1%甲酸常温浸润2分钟;流水洗片2分钟;20%甲醛常温浸润2小时;流水洗片2分钟;60℃苦味酸浸润8分钟;60℃蒸馏水洗片2分钟;品红常温浸润15分钟;95%乙醇10秒钟。最后光镜(Leica DMLA)观察,采集图像,并做图像分

析(Simple PCI),测定缺损区面积与红色的新生骨面积,计算新骨生成率。

1.2.3 统计学方法 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS13.0软件作SNK-q检验进行多样本均数两两之间的全面比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体情况

所有动物术后一般情况正常,行动无障碍。伤口愈合良好,无红肿,渗出等炎症表现。取材时,缺损周围组织无异常,未见填充材料脱落出来。缺损边缘材料与正常骨组织界限模糊。生长情况良好。

2.2 组织学结果

三种胶原复合生物玻璃人工骨植入兔股骨髁部缺损后,均有新生骨生成(如图1),镜下可见其形态纤细,色泽红嫩,细胞多而杂乱,呈现幼稚骨组织形态。低倍镜下可见低交联组(图1A)与未交联组(图1C)的新生骨分布范围较广泛,均匀,骨缺损中间部位亦可见新骨生成。高倍镜下(图1B、图1D)可见植入材料表面有大量细胞依附生长,骨与材料界面结合较好。图1E可见高交联组的新生骨主要集中于缺损边缘,缺损中心位置少见新骨生成。此外,高交联组视野内可见生物玻璃表面多有胶原组织包绕,少见新生骨贴附生长。分别计算三种材料的成骨率,低交联胶原组平均成骨率为13.23 $\pm$ 1.13%,高交联胶原组平均成骨率为5.23 $\pm$ 0.87%,未交联胶原组平均成骨率为12.63 $\pm$ 0.92%。其中低交联组和未交联组的成骨率较高,高交联组的成骨率较低(如图2)。根据统计结果显示,低交联组和未交联组之间的成骨率差异无统计学意义($P > 0.05$)。低交联组和高交联组之间,未交联组和高交联组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。由此可见,高交联度I型胶原复合生物玻璃种植于缺损后的成骨率显著低于未交联组和低交联组。此外,如图1F所见,高交联组的新生骨仅见于缺损边缘位置,中心仍是黑色的材料和深蓝色的胶原组织。而其中新生骨与材料的结合也不如其他两组。未见材料周围有大量细胞依附的现象。

3 讨论

生物玻璃作为一种人工骨移植体已在临床应用了近20年,具有良好的生物相容性,优秀的骨传导性,以及独特的骨刺激作用。其最初的剂型为颗粒状,使用于面积较大,形状不规则的骨缺损时不方便且材料容易脱落。因此其使用及效果都受到了一定影响。而随后发展而来的Novabone putty是一种主要成分为甘油的胶状材料。Putty在临床手术中可根据骨缺损的形状大小任意塑形,使用方便,深受临床医生欢迎。但是甘油本身降解较快,且不具备突出的生物活性,因而限制了这种胶状修复材料的骨修复性能。因此,生物活性突出,降解速度较甘油慢的胶原作为一种具有一定粘附可塑性的生物活性材料成为了一种新的选择。

胶原是生物体内的一种纤维蛋白,广泛存在于皮肤,软骨,骨,肌腱,血管等处。其具有良好的生物相容性,可完全降解,且免疫原性很低,多年来一直是组织工程领域的研究热点。而在组织工程骨领域,研究主要集中于I型胶原。I型胶原主要存在

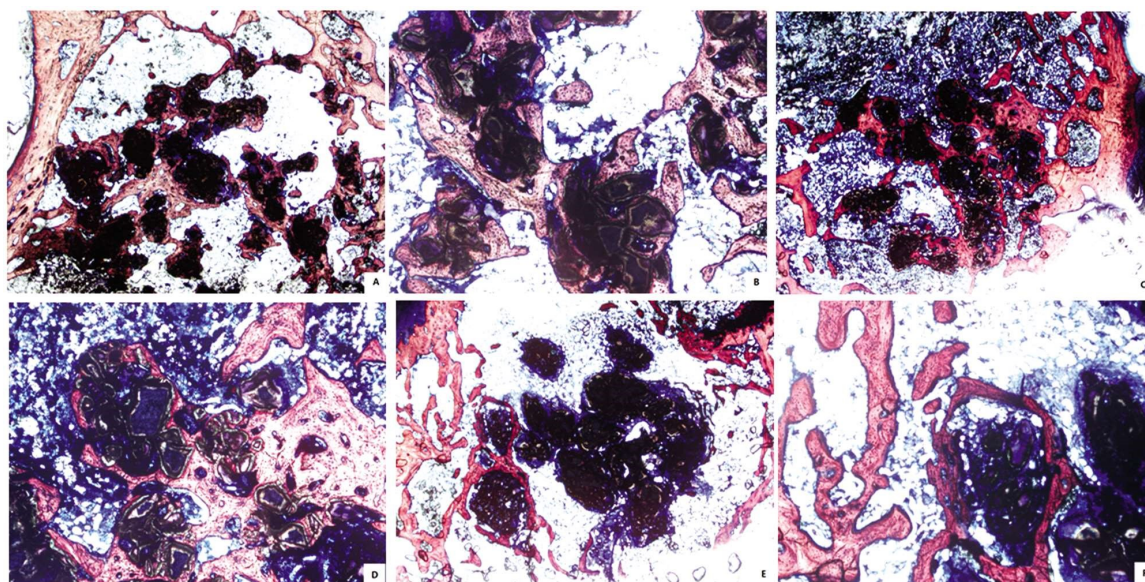


图1 三种胶原-生物玻璃复合物在体内的成骨表现

Fig.1 Osteogenesis performance of the three kinds of Collagen-Bioglass composite in vivo

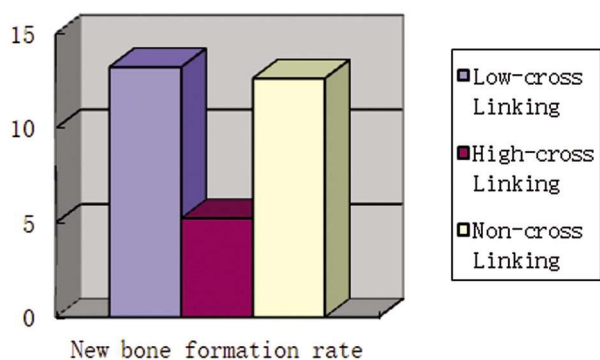


图2 低交联组和未交联组的成骨率显著高于高交联组

Fig.2 The new bone formation rate of Low-crosslinking group and the Non-crosslinking group higher than that of High-cross linking group

于皮肤与骨骼中,与细胞膜有良好的亲和力,有利于骨髓间充质干细胞的粘附、增殖、分化及成骨^[15,16]。对于新骨生成过程中的血管长入和矿化沉积都有积极的作用。鉴于其易降解,机械强度不足的缺点,胶原往往不单独作为骨修复材料使用,而是与羟基磷灰石、生物玻璃等具有骨修复能力的人工骨移植材料复合使用^[17-21]。有研究者^[22]将胶原溶胶与氨基化的生物玻璃按不同比例混合,制备成质量比为 1/2、1/1、2/1 的胶原-生物玻璃复合材料,并分别测试复合材料的力学强度、降解性及生物学活性。研究表明当生物玻璃与胶原的质量比为 1/2 时,复合材料的力学强度更好,结构更稳定,更有利于间充质干细胞的粘附、增殖及分化,表现出更好的生物学性能。然而普通胶原的降解速度过快,复合材料在体内的结构稳定性差,易崩解^[23]。为了控制胶原的降解速度,提高胶原与生物玻璃本身的抗降解能力及机械性能,研究人员通过交联使胶原分子内部和胶原分子间通过共价键结合以提高胶原纤维的张力和稳定性^[24-26]。使其对于胶原酶的分解作用具有一定的屏蔽作用,其抗生物降解能力有了极大的提高。Cha^[27]等人的研究发现,交联胶原与植骨材料复合后,有助于其维持初始形态,复合物早期愈合过程中展现出良好的生物活性。此外,由于胶原酶主要作用于胶原表面,而交联后的胶原膨胀率降低,表面积缩小,其与胶原酶的有效接

触面积显著下降。因此交联胶原相对于普通胶原而言有更高的抗胶原酶能力。

尽管上述研究已经表明生物玻璃复合交联胶原能够有效提高复合物的理化性能。但交联胶原及生物玻璃复合物在修复骨缺损中的实际成骨能力尚未见明确的报道。本次实验制备了深度为 10 mm、直径 6 mm 的兔股骨髁部临界性骨缺损模型,以避免骨缺损自行愈合对材料修复能力的干扰^[28-30]。随后植入交联度不同的 I 型胶原复合生物玻璃,其中交联度为 45% 的低交联 I 型胶原复合生物玻璃以及未交联的 I 型胶原复合生物玻璃的成骨率显著高于交联度为 70% 的高交联 I 型胶原复合生物玻璃。由此可见高交联度的胶原复合生物玻璃成骨性能并不理想。这与生物玻璃本身的作用机制可能相关。有研究表明,生物玻璃的生物性能与其在体液环境中所产生的快速表面反应关系紧密^[31]。当生物玻璃处于体液环境中时,离子交换导致材料表面首先生成富硅相随后产生羟基磷灰石(HCA)层^[32]。其成分结构类似于骨的矿化相,有利于成骨细胞的黏附,增殖,分化^[33-36]。而高交联度的 I 型胶原抗蛋白酶能力增强,早期不易降解。图 1F 可见生物玻璃周围被大量未降解的胶原组织包绕,这可能阻碍了生物玻璃植入骨缺损模型后与周围体液所发生的快速表面反应,影响了生物玻璃表面 HCA 层的形成,不利于成骨细胞的黏附、增殖、分化,最终导致了新骨生成不佳。

本研究证明了高交联度的胶原-生物玻璃复合体尽管可能拥有更好的力学强度及抗降解能力,但由于高交联胶原阻碍了生物玻璃的骨传导作用,因此复合体在体内的实际成骨能力受到了明显的影响。而交联度 45% 的胶原对生物玻璃的快速表面反应无明显影响,且虽然无明显统计学差异,但低交联组的新骨生成率(13.23 1.13%)仍高于未交联组(12.63 0.92%)。由此可见,低交联胶原复合生物玻璃能够在提高复合材料的机械强度和抗蛋白酶能力的基础上,有助于保证复合材料的成骨能力,促进骨缺损的修复。在后续的研究中,我们将依据本次实验结果进一步调整交联胶原-生物玻璃这一复合材料的成分配比,以进一步提高新型复合材料的骨缺损修复能力。

参考文献(References)

- [1] Wang X, Wu X, Xing H, et al. Porous nano-hydroxyapatite/collagen scaffolds loading insulin PLGA particles for Restoration of Critical Size Bone Defect [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9 (13): 11380-11391
- [2] Jones J R, Brauer D S, Hupa L, et al. Bioglass and Bioactive Glasses and Their Impact on Healthcare [J]. International Journal of Applied Glass Science, 2016, 7: 423-434
- [3] Fonseca G, Avelino S, Mello D, et al. Scaffolds of PCL combined to bioglass: synthesis, characterization and biological performance [J]. Journal of Materials Science Materials in Medicine, 2020, 31(5): 41
- [4] Ferreira S A, Young G, Jones J R, et al. Bioglass/carbonate apatite/collagen composite scaffold dissolution products promote human osteoblast differentiation [J]. Materials Science and Engineering C, 2020, 118: 111393
- [5] Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts [J]. Orthop Clin North Am, 1999, 30: 591-598
- [6] 胡康, 张伟. 胶原蛋白作为医用生物材料对缺损组织修复、再生及重建的作用与意义 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 2: 317-322
- [7] 何森, 张其清. 羟基磷灰石 / 胶原人工骨在创伤后骨缺损修复中的初步研究 [J]. 生物医学工程与临床, 2008, 12(1): 56-60
- [8] 李冬梅, 刘新晖, 李庆星. 纳米羟基磷灰石 / 胶原复合材料修复猪下颌骨缺损后血管内皮生长因子的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 26: 4148-4153
- [9] 公维菊, 李国英. 胶原交联改性的研究现状 [J]. 皮革化工, 2007, 24 (5): 21-25
- [10] Saeid K, Francesco B, Sepideh H, et al. Bioactive glasses entering the mainstream [J]. Drug Discovery Today, 2018, 23(10): 1700-1704
- [11] Fiume E, Barberi J, E Vernā, et al. Bioactive Glasses: From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies [J]. J Funct Biomater, 2018, 9(1): 24
- [12] Hu YC, Zhong JP. Osteostimulation of bioglass [J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(19): 2386-2389
- [13] Francesco B, Sepideh H, Saeid K. Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? [J]. J Funct Biomater, 2018, 9(1): 25
- [14] Shahin-Shamsabadi, Alireza, Hashemi, et al. Mechanical, material, and biological study of a PCL/bioactive glass bone scaffold: Importance of viscoelasticity [J]. Materials science & engineering, C. Materials for Biological applications, 2018, 90: 280-288
- [15] 竺鑫晨, 刘俊, 严佳, 等. I 型胶原修饰微球对骨髓间充质干细胞粘附增殖及成骨行为的影响 [J]. 口腔医学, 2020, 40 (4): 16-20
- [16] Efab C, Jhk A, Hwkacd E. Novel bone-mimetic nanohydroxyapatite/collagen porous scaffolds biomimetically mineralized from surface silanized mesoporous nanobioglass/collagen hybrid scaffold: Physicochemical, mechanical and in vivo evaluations [J]. Materials Science and Engineering, 2020, 110: 110660
- [17] Fleming Jr JE, Cornell CN, Muschler GF. Bone cells as matrices in orthopedic tissue engineering [J]. Orthop Clin North Am, 2000, 31: 357-374
- [18] Cao S, Li H, Li K, et al. In vitro mineralization of MC3T3-E1 osteoblast-like cells on collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds coated carbon/carbon composites [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2016, 104(2): 533-543
- [19] Kaczmarek B, Nadolna K, Owczarek A, et al. Properties of scaffolds based on chitosan and collagen with bioglass 45S5 [J]. IET Nanobiotechnology, 2020, 14(9): 830-832
- [20] Jennifer L Moreau, Michael D Weir, Hockin HK Xu. Self-setting collagen-calcium phosphate bone cement: Mechanical and cellular properties [J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 91(2): 605-613
- [21] El-Fiqi A, Lee J H, Lee E J, et al. Collagen hydrogels incorporated with surface-aminated mesoporous nanobioactive glass: Improvement of physicochemical stability and mechanical properties is effective for hard tissue engineering [J]. Acta Biomaterialia, 2013, 9(12): 9508-9521
- [22] Jirawan, Thongbunchoo, Nateetip, et al. Mechanical properties, biological activity and protein controlled release by poly (vinyl alcohol) -bioglass/chitosan-collagen composite scaffolds: A bone tissue engineering applications [J]. Materials science & engineering, C. Materials for Biological applications, 2014, 38: 63-72
- [23] Sionkowska A, Kozłowska J. Properties and modification of porous 3-D collagen/hydroxyapatite composites [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 52(none): 250-259
- [24] 孟永春, 陈晓峰, 南开辉, 等. 胶原 / 生物活性玻璃 / 壳聚糖增强型复合支架 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(21): 3367-3373
- [25] Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, et al. Long-term bio-degradation of cross-linked and non-cross-linked collagen barriers in human guided bone regeneration [J]. Clinical Oral Implants Research, 2010, 19(3): 295-302
- [26] 杨春蓉. 交联对胶原生物学和物理性能的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(3): 521-524
- [27] Cha J K, Joo M J, Yoon S, et al. Sequential healing of onlay bone grafts using combining biomaterials with cross-linked collagen in dogs [J]. Clinical Oral Implants Research, 2017, 28(1): 76
- [28] 徐石柱, 王进, 潘文振, 等. 兔股骨髁间界性骨缺损动物模型制备及临界骨缺损值 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(20): 3191-3195
- [29] Zhang Y, Cui X, Zhao S, et al. Evaluation of Injectable Strontium-Containing Borate Bioactive Glass Cement with Enhanced Osteogenic Capacity in a Critical-Sized Rabbit Femoral Condyle Defect Model [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(4): 2393-403
- [30] 朱立新, 张西兵, 曹延林, 等. 纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖复合支架修复兔股骨髁间界性骨缺损的实验研究 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2012, 14(11): 982-987
- [31] Hench L L, Roki N, Fenn M B. Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration [J]. Journal of Molecular Structure, 2014, 1073: 24-30
- [32] Zhong JP, Greenspan DC. Bioglass surface reactivity: from in vitro to in vivo [J]. Bioceramics, 1998, 11: 415-418
- [33] Matsuda T, Davies JE. The in vitro response of osteoblasts to bioactive glass [J]. Biomaterials, 1987, 8: 275-284
- [34] Lee S, Matsugaki A, Kasuga T, et al. Development of bifunctional oriented bioactive glass/poly (lactic acid) composite scaffolds to control osteoblast alignment and proliferation [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2019, 107(5): 1031-1041
- [35] N Gomez-Cerezo, Casarrubios L, Morales I, et al. Effects of a mesoporous bioactive glass on osteoblasts, osteoclasts and macrophages [J]. J Colloid Interface Sci, 2018, 528: 309-320
- [36] Price N, Bendall SP, Frondoza C, et al. Human osteoblast-like cells (MG63) proliferate on a bioactive glass surface [J]. J Biomed Mater Res, 1997, 37: 394-400