本文引用:余丽,刘旭倩.类人胶原蛋白在骨组织再生修复中的应用进展[J].新乡医学院学报,2019,36(3):291-294.

DOI:10.7683/xxyxb.2019.03.022.

【综述】

类人胶原蛋白在骨组织再生修复中的应用进展

余丽,刘旭倩

(西南医科大学附属口腔医院 西南医科大学口腔颌面部重建与再生实验室,四川 泸州 646000)

摘要: 随着骨退行性疾病发病率的升高,在骨再生修复中对于生物相容性良好的人造骨的应用需求也迅速增加。胶原蛋白作为支架材料为组织工程种子细胞的生长和增殖提供了生长环境,然而,胶原蛋白在骨再生修复中的应用还存在许多缺陷,经过改良后获得的类人胶原蛋白克服了胶原蛋白产生免疫反应、病毒传播风险等缺点,因其具有良好的生物相容性、水溶性、可加工性、低免疫原性、无病毒传播风险等,逐渐成为骨再生修复的理想生物支架材料之一,为组织工程新型支架材料的研究和开发提供了新方法、新方向。

关键词: 组织工程;类人胶原蛋白;骨组织;再生;修复

中图分类号: R318.08 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2019)03-0291-04

随着社会的发展和生活方式的改变,由创伤、疾病等造成的骨退行性疾病的发病率急速升高^[1],在骨再生修复中,对于生物相容性良好的人造骨的应用需求也迅速增加。目前,针对骨退行性疾病的治疗方案主要包括自体骨移植、同种异体骨移植、人造骨移植和骨组织工程(bone tissue engineering, BTE)技术。自体骨移植是骨诱导和骨形成的理想方式,但需要二次手术,且供体部位可能出现炎症反应;而同种异体骨移植可能会发生疾病传播和免疫反应^[2]。目前,人造骨移植技术虽然是临床常用的替代治疗方法,并取得了显著效果,但对于机体来说,该方法是无生命异物的植入,与机体功能可能不符。组织工程骨的主要优势在于其自体细胞来源的低感染性和低致癌率。BTE的3大要素为支架材料、种子细胞和细胞因子^[3-5],BTE在3大要素共同作用下实现人体受损组织器官的修复和功能重建^[6]。胶原蛋白是动物细胞合成的一种生物大分子蛋白质,相对分子量为97 000 000,在骨的有机质中达90%以上,胶原蛋白在骨损伤后的再生修复中起决定性作用,胶原蛋白作为支架材料为组织再生提供模板,为种子细胞提供一定的生长环境,对细胞的黏附、生长、迁移和分化过程产生重要影响,并引导新生骨组织形成^[7-9]。由于胶原蛋白力学性能差,在含水时难以塑形,无法支撑组织重建,导致支架崩解;同时,胶

原蛋白降解速度快、有病毒传播风险的缺点,限制了其在组织工程中的应用^[10]。类人胶原蛋白(human-like collagen, HLC)是将动物来源的胶原蛋白 mRNA 反转录成 cDNA,经酶切后的一段基因重组于大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)内,经过高密度发酵、分离、复性等工艺形成的高分子生物蛋白^[11]。相比胶原蛋白,HLC具有更好的生物相容性、水溶性、可加工性、低免疫原性,且无病毒传播风险^[12],该材料已成功应用于血管支架^[13-16]、人造骨^[11,17-18]和皮肤组织^[19]。本文对HLC在BTE中作为支架材料参与骨组织再生修复的应用进展进行综述。

1 理想 BTE 支架材料的特点

理想的 BTE 支架材料主要包含以下几个特点:(1)良好的生物相容性:可促进细胞黏附、增殖和分化,促生长因子形成,为组织再生提供最佳的生长环境^[20];(2)低免疫原性:支架材料在植入人体后不出现排斥反应,植入部位无炎症表现^[12];(3)理想的孔隙率:理想的支架材料为细胞生长提供合适的孔隙^[7],支架材料的多孔结构可促进细胞与新宿主组织之间的浸润性和生物活性交换,以诱导新骨形成;(4)良好的生物降解性^[21]:支架材料及其降解产物均无细胞毒性,且降解速度与细胞增殖速度匹配^[12];(5)无病毒传播风险^[22];(6)具有3D支架空间结构,为细胞生长提供结构支撑和模板^[7];(7)骨生成、骨传导和骨诱导性^[23-24]。植入材料提供一种生物刺激,通过整合宿主骨与移植材料而促进成骨细胞的黏附和生长,引导骨形成。BTE通过模拟骨修复的自然过程,在预期骨修复部位调控成骨细胞、生物支架、生物活性物质等来促进新骨形成,从而使

DOI:10.7683/xxyxb.2019.03.022

收稿日期:2018-04-14

基金项目:四川省医学会基金科研项目(编号:S17073);西南医科大学校级科研项目(编号:2017-ZRQN-083)。

作者简介:余丽(1992-),女,四川都江堰人,硕士研究生在读,主要从事组织工程和牙周黏膜疾病的研究。

通信作者:刘旭倩(1985-),女,山东淄博人,博士,副教授,研究方向:组织工程的研究和口腔黏膜病机制的研究;E-mail:liuxuqiankokky@126.com。

新骨组织发挥机械运动和维持新陈代谢的作用^[1]。

2 HLC 在 BTE 中的优势、局限性及解决策略

2.1 HLC 在 BTE 中的优势

2.1.1 良好的生物相容性 HLC 植入人体后不出现炎症反应,能耐受人体各系统的作用而保持相对稳定,为细胞的生长提供良好的微环境,且无毒、不致畸,能安全用于人体^[25];此外,HLC 的酸碱度值为 6.5~7.5,呈中性,不会破坏人体的酸碱平衡。

2.1.2 可加工性 HLC 通过疏水键折叠组装成三螺旋结构,胶原分子键相互聚合成网状,形成富有弹性、机械性能良好的骨架结构;由于 HLC 的热降解温度始于 250 °C^[2],故 HLC 具有分子量和生物特性保持不变的可加工性^[26]。

2.1.3 理想的孔隙率和孔径 研究表明,支架材料的孔隙率是组织再生的关键因素,而支架材料的多孔结构为细胞提供生长的微环境;孔径太小会导致营养物质、代谢废物的输送障碍;而孔径太大可影响支架材料的结构和机械性能,减小黏附在支架上的细胞数量,导致骨修复不理想^[11,27]。

2.1.4 水溶性 HLC 是由重组技术产生的水溶性蛋白,与其他生物材料结合时具有良好的润湿性和渗透性,可促进细胞黏附。有研究表明,有机溶剂处理生物材料需要 1 a 或更长时间才能完全吸收,而水溶性支架材料吸收时间一般不超过 6 个月^[28]。

2.1.5 无病毒传播隐患 生物材料的蛋白活性成分是通过基因工程实现的,常被内毒素污染^[29];而 HLC 是反转录生成 cDNA,经酶切后重组于 *E. coli* 内,经过发酵、分离、复性、纯化工艺形成的高分子生物蛋白,弥补了胶原蛋白病毒隐患的缺点。

2.1.6 低免疫原性 HLC 是由胶原蛋白(已知序列胶原蛋白部分基因)经基因筛选及修饰后构建的,摒弃了容易引起免疫反应的色氨酸等氨基酸残基并进行特定的序列重复,因此,在进入人体后其免疫排斥反应大大减少^[22]。

2.2 HLC 在 BTE 中的局限性及解决策略

2.2.1 低生物力学强度 HLC 的生物力学强度较低,基于 HLC 修复的新骨机械强度较差,容易产生骨愈合不良甚至二次骨折;在骨再生修复中,植入物的生物力学强度应与周围组织的机械强度相匹配^[30],以使植入物在进入受植部位后能够与周围组织形成良好的骨整合,保证骨发挥其正常的支持、运动、负重等功能。ZHENG 等^[31]研究发现,以 HLC 作为有机相,以羟基磷灰石(hydroxyapatite, HAp)为无机相,天然的京尼平作为交联剂,通过水热法制备新型生物可降解 HLC/HAp 多孔骨支架材料,且细

胞学和生物力学实验表明,以 HLC 为基础的支架材料具有良好的生物力学强度、可控的生物降解速度和亲水性。

2.2.2 不可控的生物降解速度 骨修复材料置入后需要有可控的生物降解速度^[32];生物材料逐渐降解的同时,成骨细胞不断增殖,从而达到修复骨缺损的目的。在实际应用中,HLC 常联合其他天然生物材料、人工合成高分子材料等用于骨再生修复,使 HLC 在保证自身生物特性不变的情况下实现可控的生物降解速度。微生物转谷氨酰胺酶(microbial transglutaminase, MTGase)是一种在温和条件下具有高比活性和反应速率的无毒交联剂,ZHAO 等^[33]研究发现,HLC 可通过与 MTGase 交联产生 MTGase/HLC(MTGH)水凝胶支架,且 MTGase 以浓度依赖方式参与 MTGH 水凝胶支架的降解行为,而体外细胞黏附和生物相容性的实验结果表明,40 U·g⁻¹ MTGase 制备的 MTGH 水凝胶支架更适合细胞黏附并具有最低的毒性。

3 HLC 联合其他生物材料用于骨组织再生修复的现状

3.1 HLC 联合纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite, n-HAp)修复骨缺损

n-HAp 是人体骨天然的主要组成部分,是引导骨再生修复的理想生物材料;交联技术可以增加支架的机械强度,化学交联剂如碳化二亚胺或戊二醛的高细胞毒性影响了支架材料的生物相容性^[34-35],因此,需要使用天然无细胞毒性的交联剂,橄榄苦苷即是其中一种。橄榄苦苷抗氧化能力强,可减少自由基产生,有助于骨吸收和诱导骨形成,对骨质流失起保护作用。有研究显示,橄榄苦苷可预防大鼠炎症性骨质减少^[36]。FAN 等^[2]通过橄榄苦苷交联制造的 HLC/n-HAp 复合支架保留了 HLC 的生物学特性和 n-HAp 的力学性能和骨传导性,与未交联的支架材料相比,复合支架具有良好的机械性能,同时可增强细胞的黏附和增殖。

3.2 HLC 联合 n-HAp 和聚乳酸修复骨缺损 吕玉明等^[18]在研究由自体内皮细胞、成骨细胞和新型生物可吸收 n-HAp/重组类人胶原蛋白(recombinant human-like collagen, RHLC)/聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)(n-HAp/RHLC/PLA)组成的组织工程支架材料增强犬的骨再生和修复股骨头缺损实验中发现,n-HAp/RHLC/PLA 支架材料组骨缺损区在骨修复后 3 个月时可见缺损区基底有大量类骨质和新生骨小梁形成,在骨小梁边缘存在较多的成骨细胞,修复区血管丰富,成骨反应由基底向中心部推进;6 个月时充填区骨小梁成熟明显,可见有编织骨形成;缺

损区中央偶见碎裂的支架材料;新骨形成量和成骨细胞数由基底部向外周递减,骨小梁的成熟度也由基底向外周递减,且随着新骨形成,n-HAp/RHLC/PLA 支架逐渐降解吸收;而对照组新生骨组织形成较少。ZHOU 等^[24]研究表明,n-HAp/RHLC/PLA 支架材料是骨再生的理想生物支架材料。

4 小结

骨是人体器官的重要组成部分,探索组织相容性良好的骨修复材料对骨组织工程研究具有重要意义。HLC 具有良好的生物相容性,可以安全用于人体,尚未发现有术后免疫反应的报道。目前,HLC 支架材料已成功用于血管支架^[13-16]、人造骨^[11,17]和皮肤组织^[19]等医学组织工程领域。然而,由于 HLC 较低的生物力学强度和不可控的降解速度,研究者们常将 HLC 联合其他生物材料制备组织工程生物支架,如 HLC/n-HAp 支架材料、HLC/壳聚糖支架材料等,这些支架材料在保留了 HLC 良好的生物学特性的基础上,又克服了 HLC 生物力学强度低和降解速度不可控的缺点。虽然通过反转录方式获得的 HLC 支架材料在骨再生修复研究中取得了一些进展,但还有很多问题亟须解决,如在大面积骨缺损的环境下 HLC 如何有效实现骨的缺损修复与功能重建、HLC 支架材料能否应用于更广泛的医学领域等。相信随着医学科学技术水平的提高和研究者对基因重组蛋白的进一步认识,以 HLC 为基础合成的复合型骨支架材料必将成为骨再生修复的应用热点,为组织工程新型支架材料的研究和开发提供新方法、新方向。

参考文献:

- [1] MORN N, KAPUSETTI G. Piezoelectric material-A promising approach for bone and cartilage regeneration[J]. *Med Hypotheses*, 2017, 108(10):10-16.
- [2] FAN H, HUI J, DUAN Z, et al. Novel scaffolds fabricated using oleuropein for bone tissue engineering[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014, 65:24-32.
- [3] STEPHENSON M K, FARRIS A L, GRAYSON W L. Recent advances in tissue engineering strategies for the treatment of joint damage[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2017, 19(8):44-82.
- [4] KADKHODA Z, RAFIEI S C, AZIZI B, et al. Assessment of surface markers derived from human periodontal ligament stem cells: an *in vitro* study[J]. *J Dent (Tehran)*, 2016, 13(5):325-332.
- [5] NIE L, YANG X, DUAN L, et al. The healing of alveolar bone defects with novel bio-implants composed of Ad-BMP9-transfected rDFCs and CHA scaffolds[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):63-73.
- [6] SHADJOU N, HASANZADEH M. Bone tissue engineering using silica-based mesoporous nanobiomaterials: recent progress [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 55(10):401-409.
- [7] VIJAYAVENKATARAMAN S, SHUO Z, FUH J, et al. Design of three-dimensional scaffolds with tunable matrix stiffness for directing stem cell lineage specification: an *in silico* study [J]. *Bioengineering (Basel)*, 2017, 4(3):66-76.
- [8] LIU X, WANG J, DONG F, et al. Cytocompatibility and biologic characteristics of synthetic scaffold materials of rabbit acellular vascular matrix combining with human-like collagen I [J]. *J Biomater Appl*, 2017, 32(4):463-471.
- [9] AN B, ABBONANTE V, YIGIT S, et al. Definition of the native and denatured type II collagen binding site for fibronectin using a recombinant collagen system [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(8):4941-4951.
- [10] TANG Y, YANG X, HANG B, et al. Efficient production of hydroxylated human-like collagen via the co-expression of three key genes in *Escherichia coli* origami (DE3) [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 178(7):1458-1470.
- [11] JIA L, DUAN Z, FAN D, et al. Human-like collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds for the culture of chondrocytes [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33(2):727-734.
- [12] JIANG X, WANG Y, FAN D, et al. A novel human-like collagen hemostatic sponge with uniform morphology, good biodegradability and biocompatibility [J]. *J Biomater Appl*, 2017, 31(8):1099-1107.
- [13] LIU X, WANG J, DONG F, et al. Study of composite vascular scaffold combining with differentiated VSMC- and VEC-like cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biomater Appl*, 2017, 32(2):219-229.
- [14] LIU X, WANG J, DONG F, et al. Human gingival fibroblasts induced and differentiated into vascular endothelial-like cells [J]. *Dev Growth Differ*, 2016, 58(9):702-713.
- [15] LIU X, WANG J, DONG F, et al. Induced differentiation of human gingival fibroblasts into VSMC-like cells [J]. *Differentiation*, 2017, 95(1):1-9.
- [16] EDWARDS S S, ZAVALA G, PRIETO C P, et al. Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in dermal regeneration [J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(4):851-866.
- [17] WANG Y, CUI F Z, HU K, et al. Bone regeneration by using scaffold based on mineralized recombinant collagen [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008, 86(1):29-35.
- [18] 吕玉明. 混合负载内皮细胞与成骨细胞的 nHA/RHLC/PLA 复合支架材料修复犬股骨头缺损的观察 [J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(17):1335-1340.
- [19] HU K, CUI F, LV Q, et al. Preparation of fibroin/recombinant human-like collagen scaffold to promote fibroblasts compatibility [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 84(2):483-490.
- [20] SHPICHKA A, KOROLEVA A, KUZNETSOVA D, et al. Fabrication and handling of 3D scaffolds based on polymers and decellularized tissues [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 10(35):71-81.
- [21] MOURINO V, BOCCACCINI A R. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds [J]. *J R Soc Interface*, 2010, 7(43):209-227.
- [22] LUO Y, ZHANG T, FAN D, et al. Enhancing human-like collagen accumulation by deleting the major glucose transporter ptsG in recombinant *Escherichia coli* BL21 [J]. *Biotechnol Appl Biochem*,

- 2014,61(2):237-247.
- [23] DAI Y, SHEN T, MA L, *et al.* Regeneration of osteochondral defects *in vivo* by a cell-free cylindrical poly (lactide-co-glycolide) scaffold with a radially oriented microstructure [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 12(3):1647-1661.
- [24] ZHOU J, GUO X, ZHENG Q, *et al.* Improving osteogenesis of three-dimensional porous scaffold based on mineralized recombinant human-like collagen via mussel-inspired polydopamine and effective immobilization of BMP-2-derived peptide [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 152(17):124-132.
- [25] YUAN Y, SHI X, GAN Z, *et al.* Modification of porous PLGA microspheres by poly-L-lysine for use as tissue engineering scaffolds [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 161(17):162-168.
- [26] LU Q, HUANG Y, LI M, *et al.* Silk fibroin electrogelation mechanisms [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(6):2394-2400.
- [27] ZHU C, FAN D, WANG Y. Human-like collagen/hyaluronic acid 3D scaffolds for vascular tissue engineering [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 34(14):393-401.
- [28] WANG Y, RUDYM D D, WALSH A, *et al.* *In vivo* degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(24/25):3415-3428.
- [29] UNGER R E, PETERS K, SARTORIS A, *et al.* Human endothelial cell-based assay for endotoxin as sensitive as the conventional limulus amoebocyte lysate assay [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(10):3180-3187.
- [30] LIMA P A, RESENDE C X, SOARES G D, *et al.* Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33(6):3389-3395.
- [31] ZHENG X, HUI J, LI H, *et al.* Fabrication of novel biodegradable porous bone scaffolds based on amphiphilic hydroxyapatite nanorods [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 75(17):699-705.
- [32] ENTEKHABI E, HAGHBIN N M, MOZTARZADEH F, *et al.* Design and manufacture of neural tissue engineering scaffolds using hyaluronic acid and polycaprolactone nanofibers with controlled porosity [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 69(6):380-387.
- [33] ZHAO L, LI X, ZHAO J, *et al.* A novel smart injectable hydrogel prepared by microbial transglutaminase and human-like collagen: its characterization and biocompatibility [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 68(11):317-326.
- [34] CATLIN N R, WILLSON C J, STOUT M, *et al.* Evaluation of the respiratory tract toxicity of ortho-phthalaldehyde, a proposed alternative for the chemical disinfectant glutaraldehyde [J]. *Inhal Toxicol*, 2017, 29(9):414-427.
- [35] CHEN L, ZHU C, FAN D, *et al.* A human-like collagen/chitosan electrospun nanofibrous scaffold from aqueous solution: electrospun mechanism and biocompatibility [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 99(3):395-409.
- [36] PUEL C, QUINTIN A, AGALIAS A, *et al.* Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomized rat [J]. *Br J Nutr*, 2004, 92(1):119-127.

(本文编辑:杨博)

《新乡医学院学报》2019年征订启事

《新乡医学院学报》(Journal of Xinxiang Medical University)创刊于1984年,是新乡医学院主管主办、国内外公开发行的综合性医学学术期刊。国际标准连续出版物号:ISSN 1004-7239,国内统一连续出版物号:CN 41-1186/R。现为月刊,每月5日出版,大16开本,每期100页。本刊设有专家论坛、专题报告、国家自然科学基金专题评述、基础研究、临床研究、综述等栏目。编辑部对来稿审理及时并严格执行“三审制”,对国家级、省部级科研基金项目资助的研究性论文优先发表。

本刊为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、中国精品科技期刊、中国高校优秀科技期刊、河南省一级期刊,目前被《中国学术期刊(光盘版)全文检索数据库》、《万方数据-数字化期刊群》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、英国《公共卫生数据库》(Global Health)、《中国学术期刊文摘》、《中国医学文摘》、《中国药学文摘》等国内外权威性数据库、文摘期刊收录,标志着在本刊发表的论文将有机会被国内外著名检索系统收录,这对提高作者知名度及论文的影响力不无裨益。欢迎国内外医药工作者踊跃投稿。欢迎广大订户前往当地邮局订阅,邮发代号:36-145,每期定价10.00元,全年120.00元。编辑部地址:河南省新乡市金穗大道东段新乡医学院学报编辑部,邮政编码:453003。电话:0373-3029086,传真:0373-3831371,网址:www.xxyxyxb.com, E-mail:xxyxyxb@163.com。

本刊编辑部