

天然生物活性陶瓷珍珠层在骨组织 修复中的应用

童银洪^{1,2}, 张刚生³, 陈敬中¹

(1. 中国地质大学, 湖北 武汉 430074; 2. 湛江海洋大学 珍珠有限公司, 广东 湛江 524025;
3. 广西大学 广西, 南宁 530004)

摘要:珍珠层是一种天然的纳米生物陶瓷材料, 一直是生物矿物材料学者研究的焦点。本文根据国外文献有关利用珍珠层作为骨植入材料的研究报道, 就珍珠层的生物相容性和可降解性, 及其所具有的骨诱导和骨传导作用的动物临床实验结果, 进行了综合分析和论述。认为珍珠层是一种很有前途的骨植入材料, 提出了今后研究的方向。

关键词:珍珠层; 生物陶瓷; 骨组织修复材料

中图分类号: P578.6⁺1; P579 文献标识码: A 文章编号: 1000-6524(2006)04-0345-04

The application of nacre, a type of natural bioactive ceramic, in bone tissue reconstruction

TONG Yin-hong^{1,2}, ZHANG Gang-sheng³ and CHEN Jing-zhong¹

(1. China University of Geosciences, Wuhan 430074, China; 2. Pearl Co. Ltd. of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 3. Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Recent advances in nacre used as bone implant are reviewed in this paper. The experiments show that nacre, a type of natural nano-bioceramic material, when used as bone implant for reconstruction of bone defects, is not only biocompatible and biodegradable, but also osteoconductive and osteoinductive. It is likely that nacre will become a good candidate for bone graft substitution in future.

Key words: nacre; bioceramics; bone reconstruction material

珍珠层(nacre)是软体动物硬壳中普遍发育的结构单元, 它由纳米级文石小板片(粒径约厚0.4~2 μm, 直径3~10 μm)和少量有机质(质量分数为1%~5%)呈叠瓦状堆垛而成。普遍认为, 有机质含多种蛋白质(包括糖蛋白和粘蛋白等)蛋白因子和几丁质。法国科学家Lopez等(1992)首次研究证实珍珠层具有诱导造骨细胞活化成骨的作用, 其后相关的研究证实珍珠层是一种新型的可降解生物活性材料, 它不仅具很好的生物相容性, 而且同时具骨诱导和骨传导作用, 与现有的临床所用的各种骨植入材料相比具有无比的优越性, 是一种很有前途的骨植入材料。

1 珍珠层的生物相容性

自从Lopez等(1992)首次在体外证实珍珠层具有诱导造骨细胞活化成骨的作用后, 目前已在人及不同动物体内的位置进行了不同时间的植入实验(表1), 结果表明, 大珠母贝 *Pinctada maxima* (Jameson) 珍珠层与生物骨组织有很好的相容性, 无任何炎症或异物反应, 珍珠层-骨界面无任何炎症细胞。珠母贝 *Pinctada Margaritifera* (Linnaeus) 珍珠层粉末样品在植入鼠背部肌肉1~8周时有排异反应, 16周后消失, 但

收稿日期: 2005-10-25; 修订日期: 2006-03-31

基金项目: 广东省重大科技兴海项目(B20000208B01)

作者简介: 童银洪(1966-), 男, 国家珠宝质检师, 博士研究生, 研究方向为生物矿物材料, E-mail: tongyh@21cn.com。

表 1 珍珠层植入材料的生物体内植入位置

Table 1 In vivo implantation positions in bone tissue of nacre implant

植入材料	植入位置	实验时间	文献
大珠母贝珍珠层(粉末)+自身静脉血	人齿槽脊骨	6个月	Atlan <i>et al.</i> , 1997
大珠母贝珍珠层(块体)	羊股骨	3个月	Delattre <i>et al.</i> , 1997
大珠母贝珍珠层(粉末)+自身静脉血	羊上部腰椎	1~12周	Lamghari <i>et al.</i> , 1999
大珠母贝珍珠层(块体)	羊大腿骨骨髓处	3~10个月	Lamghari <i>et al.</i> , 2001
珠母贝淡水珍珠层(粉末)+自身静脉血	老鼠背部肌肉, 股骨	1~16周	Atlan <i>et al.</i> , 1999
珠母贝珍珠层(块体)	鼠股骨	4~56天	Liao <i>et al.</i> , 2000
			Liao <i>et al.</i> , 2002

在植入鼠股骨时无排异反应(Liao *et al.*, 2000)。在使用块体珍珠层用作承重部位的骨植入材料时,在长达 10 个月的实验中,无任何临床问题,珍珠层未变形、移位(Atlan *et al.*, 1999)。因此珍珠层不仅是很好的生物相容材料,块体珍珠层还可用作骨承重部位的骨植入材料。

2 珍珠层的生物降解性

珍珠层粉末样品在骨组织修复时是生物可降解材料,所有的体内植入实验均观察到珍珠层粉末样品的降解(Atlan *et al.*, 1997; Delattre *et al.*, 1997; Lamghari *et al.*, 1999, 2001; Liao *et al.*, 2000),材料降解后所留下的空间被新成骨所替代,只是不同实验中所观察到的降解速度各不相同,如 Liao 等(2000)在珍珠层植入两周后, Lamghari 等(2001)在 8 周后观察到珍珠层溶解,并逐渐被新成骨所代替。对块状珍珠层植入材料 *Pinctada maxima*(Jameson)珍珠层块体在植入 10 个月,未明显观察到珍珠层的生物降解(Atlan *et al.*, 1999)而 *Pinctada Margaritifera*(Linnaeus)珍珠层在植入 28 天后,观察到块体珍珠层的逐步溶解,但溶解速度很慢。关于珍珠层的生物降解机制, Liao 等(2002)认为珍珠层植入材料溶解主要是生理化学溶解,巨噬细胞及多核巨细胞(MNG)很可能参与了溶解过程,但破骨细胞与造骨细胞未参与珍珠层的降解。相对而言块体珍珠层植入体较珍珠层粉的降解速度较慢。有关详细的珍珠层植入材料绝对降解速率及降解机制尚待进一步工作。

3 珍珠层-骨界面特征

目前所有的骨植入实验中,无论是珍珠层粉末样品还是块体样品,在植入一定时间后,均表现不同程度的骨键接,即珍珠层与新成骨直接连接,珍珠层-骨界面之间无任何软组织层。但不同作者所观察到的形成珍珠层-骨键接的时间各不相同,如珍珠层植入骨组织后, Lamghari 等在 12 周、Atlan 等在 3 个月、Liao 等在 1 周后即可明显观察到珍珠层与新成骨形成骨键接(Atlan *et al.*, 1997, 1999; Delattre *et al.*, 1997; Lamghari *et al.*, 1999, 2001)。珍珠层-骨界面的详细研究表

明,当珍珠层植入到骨的实验空洞时,首先是在珍珠层与主骨的界面处有大量的活性细胞包围珍珠层,接着是有血管生成及毛细血管侵入并开始界面处形成新成骨(植入约 1 周后),与此同时,珍珠层开始向心地溶解。近珍珠层一侧,珍珠层变成一些彼此分离的珍珠层小岛状,各珍珠层小岛由新成骨连接,近新成骨一侧,珍珠层溶解后留下的空间逐渐被新成骨所替代,导致新成骨中含有珍珠层中未被降解的有机质。显微 X 射线照相及研究表明,新成骨表面由类骨质覆盖(Atlan *et al.*, 1997; Lamghari *et al.*, 2001),其边界有肥大的造骨细胞排列,沿珍珠层-骨界面,新成骨的形成顺序是先形成非成熟的编织骨,然后逐渐过渡到小梁骨,最后形成成熟的板片骨,与骨的正常生长顺序非常相似。

Atlan 等(1999)认为珍珠层-骨键接主要是机械锁合作用,珍珠层与骨界面之间无任何连续的中间层, Liao 等(2000)认为珍珠层-骨界面是通过一层富磷的中间层(很可能是磷酸钙层)连接的。珍珠层-骨键接机制目前研究处于初步阶段。

4 珍珠层的骨传导及骨诱导作用

在骨缺损治疗和研究中,存在着两种促进骨再生机制,即骨诱导和骨传导。骨诱导理论认为骨缺损达到一定程度,骨断端的成骨细胞本身已不能使骨缺损完全以骨组织形式愈合,而需要诱导周围组织中的其他细胞转化为骨细胞来填补缺损,骨传导再生理论认为骨缺损达到一定程度后造成的骨不连接是由周围软组织细胞的抢先侵入,影响了骨断端成骨细胞的再生,因此,需用一机械性隔膜把骨与周围软组织隔开,阻挡周围软组织细胞的入侵,从而促进骨性愈合。

体内实验表明,珍珠层具很好的骨传导作用,珍珠层无论是粉末样品还是块状样品,在植入不同动物的不同位置的骨组织中,均能在很短的时间内引导骨的形成,且在围绕植入体周围新成骨中的类骨质表面有丰满的造骨细胞排列,表明新成骨具有连续的生骨能力(Atlan *et al.*, 1997, 1999; Delattre *et al.*, 1997; Lamghari *et al.*, 1999, 2001; Liao *et al.*, 2000, 2002)。

Pinctada Margaritifera(Linnaeus)珍珠层的骨诱导作用是非常明显的。Atlan 等(1999)认为珍珠层和骨组织具有同源成分,其中可能含有某种刺激骨组织的信号递质。Almcida

等(2001)认为珍珠层具有骨诱导作用,并利用珍珠层能诱导异位骨形成,建立了一种成纤维细胞模型体系。Lopez等(1992)、Slive等(1992)通过体外实验表明,人的造骨细胞与珍珠层一起培养时,可诱导造骨细胞繁殖增生并产生一完整的骨形成序列,并推测珍珠层有机基质中含化学信号,该化学信号能在生理介质中释放并能活化造骨细胞,该信号分子可能代表了珍珠层和骨组织的同源组分。

Mouries等(2002)系统研究了珍珠层中水溶性有机质(SM)对3类哺乳动物中有生骨潜力的细胞生物活性的影响,结果表明:对成纤维细胞(MRC5,来自人胎儿的肺)、SM增加碱性磷酸酶(ALP)活性且抑制细胞繁殖,SM与地塞米松(Dex)促骨生长蛋白(BMP-2)作用相同,均刺激MRC5的ALP活性,与细胞分化成造骨细胞的表现型相一致;对骨髓基质细胞(来自鼠股骨)SM显著增加ALP活性,刺激繁殖及分化成成骨细胞谱系,效果与Dex相似;对造骨细胞(来自鼠颅骨)SM大大增其细胞质中的控制细胞调亡基因(BCL-2)的含量,延长了成熟造骨细胞的寿命且有抗细胞调亡的作用,与Moutahir-belqasmi等(2001)实验结果相同。因此Mouries等(2002)认为非脊椎动物中壳形成的矿化作用与哺乳动物中生骨过程两者可能含相同的信号路径,且被相类似的蛋白质域所控制。目前,有关珍珠层中诱导骨形成作用的信号分子的详细特征尚无报道,也尚未从珍珠层中分离出该类信号分子。

对*Pinctada Margaritifera*(Linnaeus)珍珠层,其骨传导作用是明显的,但未观察到骨的诱导作用(Liao *et al.*, 2000)因此不同种类动物珍珠层植入体对骨缺损的修复机理是不相同的,可能主要是其中有机质的种类和性质不同所致,详细的机理目前尚无研究报道。

5 讨论及结论

理想的植入修复材料应具有良好的生物相容性,具有足够的强度,能有效充当新骨形成的支架,具骨诱导和骨传导作用进而能有效促进骨形成,并能在体内逐渐发生生物降解,被骨组织替代,以达到完全修复的目的。目前临床上常用的生物活性骨植入修复材料有自体骨、异体骨、人工生物陶瓷(如磷酸三钙和羟基磷灰石陶瓷等)及天然生物材料珊瑚等,它们均具有其各自的优缺点,离理想的骨替代材料尚有一段距离。

众所周知,自体骨移植是取自身的骨头填充骨缺损部位,长期临床使用表明其治疗效果是肯定的,但取材来源有限,另外这种以“创伤治创伤”的治疗方法会造成患者二次手术的痛苦。异体骨也已在临床上使用,解决了自体骨部分来源问题,但异体骨存在不同程度的抗原性,会引起机体免疫排斥反应,且异体骨无法克服潜在的病原传播危险。

为解决上述问题,人们合成了各种各样的骨替代材料,其中人工合成的羟基磷灰石陶瓷及磷酸三钙陶瓷由于与人体组织有良好的生物相容性,在临床上已得到了广泛的应用,但

单纯的羟基磷灰石因不易塑造各种复杂的形状限制了其应用,磷酸三钙陶瓷是一种可降解的生物活性材料,但其降解速度与骨形成速度不一致,且降解速度难以控制。另一类常用的骨替代材料为纯天然材料,其中珊瑚已经在临床上取得应用(梁荣奇,2001)。珊瑚来源广泛,是一种生物相容性良好的骨替代材料,应用前景广阔。但珊瑚骨本身脆性大,同磷酸三钙一样,珊瑚在体内降解速度过快,往往在骨组织修复未完成时便完全降解。另外珊瑚及人工生物陶瓷骨植入材料均没有骨诱导作用,一般需添加一些骨髓或诱导刺激因子来增加材料的骨诱导作用。

珍珠层用作骨植入材料的体内及体外实验表明,其生物相容性好,同时具骨诱导和骨传导作用,又是可生物降解的材料。另外由于其具很好的力学性能,不仅可用于非承重部位的骨组织修复,还可用于承重部位的骨组织修复,再加上珍珠层材料来源丰富(自然界约数万种软体动物能分泌珍珠层),加工简单(只需简单消毒处理,不需添加任何诱导组分),因此与现有的生物材料相比,它是一种理想的骨缺损修复材料。

单一成分的材料由于难以同时满足生物相容性、成骨能力、降解速度、机械强度等诸多方面的要求,其应用范围十分局限。值得关注的是,国内刘金标等(2004)开展了珍珠层/聚乳酸重组人工骨修复动物骨缺损的实验研究。选择马氏珠母贝[*Pinctada martensii*(Dunker)]珍珠层(nacre)和聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)两种生物相容性材料,利用“模压增强法”将两者结合,制备出一种新型骨替代材料——珍珠层-聚乳酸重组人工骨(nacre/poly-lactic acid composite artificial bone, NPCB)。聚乳酸是由丙交酯单体在一定条件下聚合而成的高分子聚合物,是最早获得美国食品和药物管理署(FDA)认可而用于临床的有机高分子材料之一(Hollinger *et al.*, 1996),被广泛用作可吸收内固定器、药物缓释载体、软骨和骨缺损修复材料等。聚乳酸可以在体内进行完全的生物降解,其降解产物可进入人体的正常途径并最终转化为CO₂和水,此外,聚乳酸能溶于有机溶剂,具有较好的机械强度和热塑性能。

珍珠层是天然的无机材料,聚乳酸是合成的有机材料,将两者材料组合在一起,达到材料间优势互补的目的。利用聚乳酸良好的机械强度和热塑性能,可以赋予NPCB适宜的机械强度,并可根据需要任意塑形。另一方面,珍珠层不仅可以改善聚乳酸亲水性不足的缺陷,而且因其碳酸钙成分是一种弱碱性的物质,理论上可以中和聚乳酸的酸性降解产物,从而避免或减轻该产物积聚所致的无菌性炎症,促进间充质细胞的聚集、增殖,提高NPCB的安全性。实验证明,该材料的孔隙率、孔径、机械强度等均符合人工骨材料的要求,同时具有一定的促进细胞贴附、增殖作用,并能在生理盐水中发生降解。NPCB具有良好的生物相容性和骨传导能力,可以在体内逐渐发生生物降解。

珍珠层和聚乳酸不仅生物相容性良好,而且来源丰富,具有较大的开发潜力,是今后人体实验和临床研究的重点材料。需要指出的是,NPCB所采用的珍珠层粉末,其粒径为80

μm 文石晶体和有机质没有完全解离。今后应采用现代纳米技术,实现珍珠层粉的纳米化,将文石晶体与有机质完全解离,发挥纳米颗粒所具有的高比表面积和高活性等特点,使珍珠层中有效成分更直接、均匀地与植入细胞发生作用。纳米珍珠层粉的骨修复作用应引起研究者的高度重视。

目前,国外仅开展了大珠母贝和珠母贝两种软体动物的珍珠层的骨植入实验,国内仅开展了马氏珠母贝珍珠层/聚乳酸复合材料的植入实验。其他常见珠母贝,如企鹅珍珠贝〔*Ptereria penguin*(Reding)〕、三角帆蚌〔*Hyriopsis cumingii* (Lea)〕等珍珠层未曾使用。据作者多年研究,不同母贝珍珠层在矿物组成、晶体结构和有机成分等方面是有所差异的,在骨修复机理上是否相同,有待进一步实验来证明。国内外植入实验大多限于羊、鼠和兔等动物,人体植入实验尚未进行。总之,珍珠层植入材料真正投放市场可能还有较长时间,但其美好的应用前景已初露端倪。

References

- Almeida M J, Pereira I, Milet C, *et al.* 2001. Comparative effects of nacre water-soluble matrix and dexamethasone on the alkaline phosphatase activity of MRC-5 fibroblasts [J]. *J Biomed Mater Res.* 57 (2): 306~312.
- Atlan G, Balmain N and Berland S, *et al.* 1997. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. [J]. *C R Acad Sci Paris, Life Sci.* 320: 253~258.
- Atlan G, Delattre O and Berland S, *et al.* 1999. Interface between bone and nacre implants in sheep [J]. *Biomaterials*, 20: 1 017~1 022.
- Delattre O, Catonne Y and Berland S, *et al.* 1997. Use of mother of pearl as a bone substitute- experimental study in sheep [J]. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 7: 143~147.
- Hollinger Jo, Brekkej, Gruskin E, *et al.* 1996. Role of bone substitutes [J]. *Clin Orthop*, 32(4): 55~65.
- Lamghari M, Almeida M J, Hute B H, *et al.* 1999. Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: in vivo and in vitro studies [J]. *Bone*, 25(2): 91S~94S(supplement).
- Lamghari M, Berland S, Laurent A, *et al.* 2001. Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep [J]. *Biomaterials*, 22: 555~562.
- Liang Rongqi. 2001. Status of research on natural coral as a bone substitute material dental materials and ceives [J]. 10(1): 31~33(in Chinese).
- Liao H, Mutvei H, Hammarström L, *et al.* 2002. Tissue responses to nacreous implants in rat femur: an in situ hybridization and histochemical study [J]. *Biomaterials*, 23: 2 693~2 701.
- Liao H, Mutvei H, Sjöström M, *et al.* 2000. Tissue responses to natural aragonite(*Margaritifera* shell)implants in vivo [J]. *Biomaterials*, 21: 457~468.
- Liu Jinbiao, Lian Wei, Chen Jianting, *et al.* 2004. Diaphyseal defect repair with nacre/polyactic acid composite artificial bone in rabbits [J]. *J First Mil Med Univ.* 24(9): 1 029~1 033(in Chinese with English abstract).
- Lopez E, Vidal B, Berland S, *et al.* 1992. Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained in vitro [J]. *Tissue cell*, 24(5): 667~679.
- Mouries L P, Almeida M J and Milet C, *et al.* 2002. Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk *Pinctada maxima* in three mammalian cell types: fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts [J]. *CBP part B*, 132: 217~229.
- Moutahir-belqasmi F, Balmain N, Lieberher M, *et al.* 2001. Effect of water soluble extract of nacre (*Pinctada maxima*) on alkaline phosphatase activity and Bcl-2 expression in primary cultured osteoblasts from neonatal rat calvaria [J]. *J Mater Sci: Mater in Medicine*, 12 (1): 1~6.
- Slive C, Lopez E, Vidal B, *et al.* 1992. Nacre initiates biomineralization by human osteoblasts maintained in vitro [J]. *Calcif Tissue Int*, 51 (5): 363~369.

附中文参考文献

- 梁荣奇. 2001. 珊瑚人工骨的研究进展 [J]. *口腔材料器械杂志*, 10 (1): 31~33.
- 刘金标, 廉 维, 陈建庭, 等. 2004. 珍珠层/聚乳酸重组人工骨修复动物骨干缺损的实验研究 [J]. *第一军医大学学报*, 24(9): 1 029~1 033