



评述

骨蛋白提取物: 新一代基于脱钙骨基质的骨修复材料

周治宇^①, 邹立津^②, 李海声^③, Cody Büngrer^③, 邹学农^{①*}^① 中山大学附属第一医院脊柱外科, 骨科研究所, 广州 510080;^② 南昌大学第一附属医院烧伤外科, 南昌 330031;^③ Orthopaedic Research Laboratory/Department of Orthopaedic Surgery, Aarhus University Hospital, Aarhus 8000, Denmark

* 联系人, E-mail: zxnong@hotmail.com

收稿日期: 2011-05-27; 接受日期: 2012-06-25

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB619105)、国家自然科学基金(批准号: u0732001, 30571892, 81071512)和 Fabrikant Mads Clausens 基金资助项目

摘要 骨蛋白提取物是新一代基于脱钙骨基质骨的修复材料. 本文综述了脱钙骨基质骨修复材料及新一代产品骨蛋白提取物的特性. 骨蛋白提取物具有骨传导、骨诱导及骨发生的能力. 动物实验和临床研究均表明, 这种新型脱钙骨基质骨修复材料具有较强的成骨能力. 骨蛋白提取物具有良好的生物相容性, 将成为较为理想的骨修复材料.

关键词骨蛋白提取物
脱钙骨基质
自体骨移植
骨发生

随着现代医学的发展, 大部分骨科疾病均可得到有效的治疗, 然而许多骨科手术会因发生骨不连而导致失败. 自体骨移植一直是治疗骨不连的金标准^[1~5], 但与获取自体骨直接相关的并发症, 如神经血管损伤^[6]、深部组织感染、出血、腹膜穿孔、泌尿系损伤^[7,8]及供区疼痛^[9~15]时有发生^[10,16]. 目前, 临床上有多种骨移植材料: 珊瑚羟基磷灰石、磷酸钙、硫酸钙及纳米胶原-羟基磷灰石复合材料等, 但这些材料中没有一种同时具备理想骨移植材料的 3 个基本特点: 骨诱导、骨传导及骨发生能力.

脱钙骨基质骨修复材料(demineralized bone matrix, DBM)具有骨诱导、骨传导及骨发生能力(联合细胞应用)^[17~24], 当联合应用内固定材料及骨髓间充质干细胞时, 这种骨修复材料能提供理想的微环境促进骨形成. 19 世纪末, Senn^[25]率先报道了用小牛脱

钙骨基质在狗的模型中成功治疗长骨及颅骨缺损, 以及人的股骨和胫骨缺损^[20]. 1965 年, Urist^[26]证实了 DBM 的骨诱导特性, 并发现骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs), Katz 等人^[18]进一步阐明了它的骨诱导机制.

虽然 DBM 的骨修复效果良好, 但目前在临床上难以大规模应用. 首先, 缺乏足够的异体骨来源^[27]; 其次, 更重要的是异体骨的使用存在医学伦理问题. 幸运的是, DBM 没有种属特异性. 骨蛋白提取物(bone protein extracts, BPE)作为新一代 DBM 应运而生. 2007 年, 第一种商业化 BPE 得到美国食品药品监督管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)批准, 同时可以联合 PEEK 椎间融合器在欧洲进入临床使用. 本文对 BPE 的生物学特性及其临床应用情况进行了综述.

1 骨蛋白提取物的生物学特性

骨蛋白提取物是从长骨皮质骨提取的新一代 DBM^[28], 是一种白色略带浅黄、类似棉花状的胶原基质冻干产物, 含有 I 型胶原及其他难溶性蛋白, 如转化生长因子(transfer growth factor, TGF)等.

1.1 BPE 提取

BPE 来源于动物长骨的细胞外基质(如肱骨干、桡骨、掌骨、股骨、胫骨、腓骨、趾骨). 虽然第一种商业化 BPE 来源于马, 但早期提取的 BPE 均来源于牛骨. 由于疯牛病的原因, 来源于牛骨的 BPE 难以在临床上推广, 因此现在已无来源于牛骨的 BPE^[29].

BPE 的提取是一个精细而复杂的过程. 所有用于提取 BPE 的动物, 其遗传背景、成长过程均需进行检测与记录^[30]. BPE 的提取过程如下: 将动物皮质骨去除软组织及骨髓后粉碎^[29], 在 2~7℃ 下放入丙酮内脱脂 3 次, 每次 60 min; 3~10℃ 下, 0.6 N 的盐酸脱钙 4 次, 每次 60 min; 三蒸水中漂洗; 15~20℃ 下, 三羟甲基甲胺、乙二胺四乙酸、盐酸缓冲液配置的 4 mol/L 盐酸胍(pH 6.9)中分离蛋白 3 次, 前 2 次每次 12.5 h, 最后一次 250 min; 用 3 k 分子量超滤纯化蛋白, 冷冻干燥成棉花状的终产物^[31,32](图 1).

与常规 DBM 制备不同, BPE 的提取有以下特点:

(i) 动物来源明确; (ii) 提取过程设置、观察严密;

(iii) 具有两步脱钙过程, 分别包含盐酸和乙二胺四乙酸^[26,33,34]; (iv) 经冷冻干燥获得终产物. 这些独特的提取过程赋予 BPE 具有常规 DBM 所不具备的生物学特点.

1.2 BPE 成分分析

虽然 DBM 在 19 世纪末就开始应用, 1965 年就已证实其具备较强的成骨能力, 但是真正研究其如何成骨却是从 1975 年 Urist 发现骨形成蛋白开始. Wildemann 等人^[35]比较了 3 种不同的商业化 DBM, 由于制备及灭菌过程不同, 这些 DBM 中不溶性蛋白的含量和成分不同, 但 BMP-2 的含量均较高. Honsawek 等人^[36]定量比较了人骨来源的 DBM 中的 BMP-4, 在裸鼠体内研究发现其异位成骨能力与 BMP-4 的含量成正比. Bae 等人^[37]比较了几种商业化 DBM, 发现其均含有 BMP-2, BMP-7 和 BMP-4, 但浓度不同. 因此, 提取方法是影响 BMPs 含量最主要的原因. Pietrzak 等人^[21]也进行了类似研究, 发现 BMP-4 在这些 DBM 中含量最少. Nienhuijs 等人^[32]用 ELISA 及质谱分析证实, BPE 含有 BMP-2, BMP-3 和 BMP-7, 但未经 Western blotting 证实, 另证实 BMP-2 在 BPE 中的含量是 DBM 中含量的 100 倍. 虽然目前经证实存在于 BPE 中的 BMP 仅有 3 种, 但随着技术的进步, 相信会在 BPE 发现更多种类的 BMP.

除 BMP 外, TGF 超家族中的 TGF- β 也在骨再生

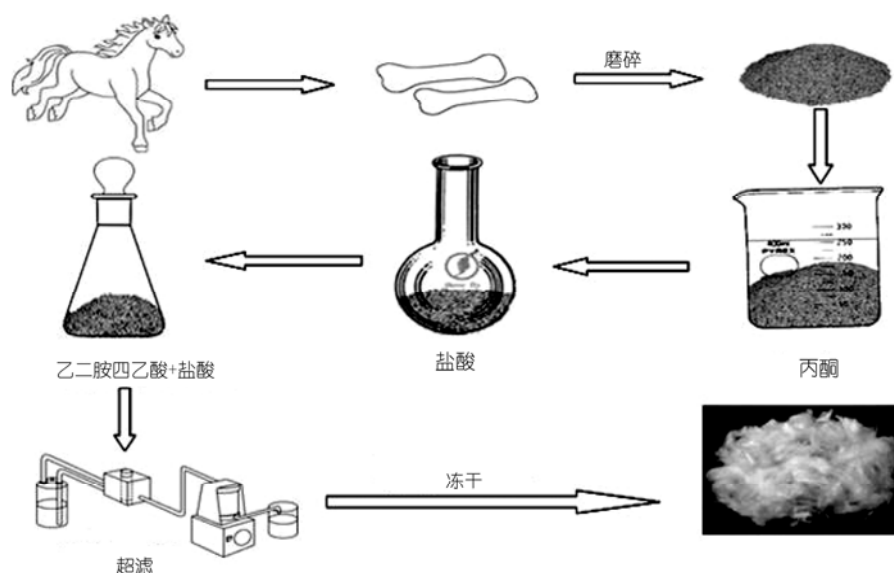


图 1 骨蛋白提取物的生产过程

中发挥重要作用. 在 DBM 和 BPE 中均已检测到多种 TGF- β . Carrington 等人^[38]证实经乙二胺四乙酸-盐酸胍脱钙的 DBM 含有 TGF- β , 而经盐酸胍提取的则不含有 TGF- β . Wildemann 等人^[35]证实了 3 种商业化的 DBM 中均含有 TGF- β 1, 但是含量较低. Katz 等人^[18]经定量研究证实, 人类来源的 DBM 中 TGF- β 1 的含量与成骨能力具有弱相关关系. 但 TGF- β 1 仅是促成骨因素之一, DBM 中含有更多的促成骨作用的因素. Nienhuijs 等人^[32]应用质谱分析及 Western blotting 方法, 证实 BPE 中含有 TGF- β 1 和 TGF- β 2, 而其中 TGF- β 1 含量是 DBM 中含量的 200 倍.

在 BPE 中还发现了一些微量蛋白, 如胰岛素样生长因子-1 等^[32], 这些难溶性蛋白赋予 BPE 骨诱导能力. 但若缺乏骨传导环境, 这些因子将难以发挥作用. 存在于 BPE 中的 I 型胶原可作为骨传导媒介. Bachra^[39]早期研究证实, 这些骨胶原比鼠尾胶原更容易发生钙沉积. Hanson 和 Eyre^[40]也发现, 人骨 I 型胶原特有的空间构象有利于胶原矿化. 虽然没有专门文献报道 BPE 中 I 型胶原的含量, 但 FDA 记录 BPE 中含有 I 型胶原.

因此, BPE 是一种胶原复合物, 主要含有 I 型胶原及数种难溶性蛋白, 如 BMP-2, BMP-3, BMP-7, TGF β -1, TGF β -2, 胰岛素样生长因子-1 及其他未知蛋白. 这些有效成分赋予 BPE 骨传导、骨诱导能力. 与其他单一成分成骨因子相比, BPE 具有以下优势: (i) 动物骨来源丰富, 动物的健康情况可以连续监测并记录在案, 这就使 BPE 可以大规模生产, 并保证产品安全有效; (ii) 大部分单一成分成骨因子只在较高浓度下发挥作用, 而且不同病人的量效关系难以控制, 现已有数篇文献报道了 BMP 导致异位成骨的副作用^[41-43]; (iii) 除了自体骨移植, 只有 DBM 及其新一代产品 BPE 能提供理想的成骨微环境.

1.3 生物活性

理想的骨修复材料应该具备骨诱导、骨传导及骨发生的能力^[44]. 现有的骨修复材料中, 只有自体骨具备这 3 种能力. 然而, BPE 依靠其强大的骨传导、骨诱导能力, 如果辅以干细胞, 将具备理想的骨修复材料的特点.

骨诱导能力是指骨修复材料能够募集干细胞并促进其向成骨细胞分化, 促成骨^[44]. 早在干细胞的理念尚未在骨科领域成熟时, Urist^[26]就已证实 DBM

能募集 3 种细胞到骨缺损区域并认为其中一种细胞为骨祖细胞. Li 等人^[45]在猪腰椎前路融合实验中发现, BPE 具有与自体骨移植相同的新骨形成能力. BPE 优良的成骨能力可能是其募集的椎体中间充质细胞成骨分化的结果, 该假设已在 Walboomers 和 Jansen^[46]的实验中被证实. 进一步研究表明, BPE 有利于血管快速长入, 成骨细胞随之归巢, 从而加速膜内成骨^[47]. Kuvat 等人^[48]进行了 BPE 与 DBM 联合植入治疗面颅骨缺损的研究, 从临床和病理两方面均证实其具有良好的成骨作用.

骨传导能力是指骨修复材料能提供生物相容性支架, 促成骨细胞接触、黏附、增殖、分化, 便于新骨在支架上形成. I 型胶原富含 Arg-Gly-Asp 短肽, 是理想的骨传导材料. 很多研究证实, 在整合素与成骨细胞黏附的表面基层之间, Arg-Gly-Asp 短肽起中介作用以引导成骨细胞黏附在 I 型胶原支架上^[49-51]. DBM 中的胶原也被证实具有骨传导作用^[39]. Hanson 与 Eyre^[40]从分子水平描述了骨胶原, 尤其是 I 型胶原的交联空间构象不同于其他组织, 其更有利于胶原矿化. BPE 是一种 I 型胶原联合其他不溶性蛋白的冻干产物, 因此具有较强的骨传导能力.

骨发生能力是指骨修复材料应包含不同分化程度的成骨细胞, 可在骨缺损部位合成新的骨基质, 继而形成新骨^[24,44]. 现在临床上应用的骨修复材料只有自体骨具有骨诱导能力. 严格来讲, BPE 也不具有骨诱导能力, 然而若将 DBM 与干细胞联合植入, 则具有良好的骨修复效果, 使其具有骨诱导能力. Becerra 等人^[52]研究发现, 将 DBM 与骨髓间充质细胞联合移植, 则后者可分化为成骨细胞, 而单纯移植骨髓间充质细胞则其分化为成纤维细胞、平滑肌细胞, 甚至上皮化, 形成上皮细胞. 很多研究证实, DBM 与干细胞联合移植的骨诱导能力远远大于 DBM 或干细胞单独应用^[53-60]. 体外培养证实, BPE 能促使干细胞增殖及向前成骨细胞分化^[61]. BPE 与干细胞联合应用的体内研究尚未见报道.

1.4 与干细胞相互作用

与 DBM 相似, BPE 亦能促使干细胞增殖、分化. Kasten 等人^[62]将骨髓间充质干细胞分别接种于无钙羟基磷灰石、 β -磷酸三钙和 DBM, 通过接种效率及骨钙素的表达证实 DBM 能够为骨髓间充质干细胞提供良好的细胞基质, 其效果远胜于合成材料. 其他研

究也得到了相似的结论^[62-65]. Woo 等人^[61]在不同浓度 BPE 包被的培养板中培养永生化人骨髓间充质干细胞, 发现 BPE 能促进永生化人骨髓间充质干细胞分化, 而在促进增殖方面作用有限. El-Sabban 等人^[66]也证实, BPE 能促进骨髓间充质干细胞成骨分化.

具有骨诱导和部分骨发生能力的 BPE 能促进干细胞增殖以及成骨分化, 促进新骨形成. 这种作用不仅对干细胞有效, 对其他细胞, 如 L-929 成纤维细胞和肌肉来源的 C2C12 同样有效^[67,68], 但 BPE 的这种作用尚无体内相关研究报道.

1.5 与其他骨修复材料共同作用

BPE 无力学支撑作用, 因此需要辅助的支撑材料. 这种支撑材料不仅帮助限定植入物的形状, 限制 BPE 在特定区域发挥作用^[69], 而且可以减少 BPE 的用量. 虽然不像 BMP 有多项异位骨化发生的报道^[41-43,70], 但仍然不宜单独应用 BPE 治疗骨缺损, 因为这样不仅造成了骨修复材料的浪费, 而且无法排除由于剂量过大而发生异位骨化的可能性. 由于来源于天然材料, BPE 已被证实具有良好的组织相容性.

除了具有良好的生物相容性, 许多研究还证实 BPE 与其他材料在促进新骨形成方面具有协同作用. 在狗的骨缺损实验中, 单独应用 β -磷酸三钙引起纤维组织包裹植入材料, 阻止材料降解和新骨形成. 而 β -磷酸三钙与 BPE 合用则避免了这种阻挡作用, 形成了双倍的新骨^[71]. 有研究报道了 BPE 与羟甲基化纤维素的协同作用, 无论是凝胶还是冻干的 3%羟甲基化纤维素都为 BPE 提供了良好的支撑作用^[28,69]. 当然, 不能期望 BPE 在任何环境中都能发挥良好的作用. 当 BPE 与胶原-羟基磷灰石复合物支架联合应用时, 在体外形成大块可重塑的骨组织^[72]; 但当与来自马肌腱的合成胶原-羟基磷灰石支架联合应用进行体内实验时, 发现其在局部可引起炎症反应, 妨碍了 BPE 骨诱导作用的发挥^[73]. 这是查到的第一篇关于 BPE 的负面报道.

虽然已有多项研究报道了 BPE 的支撑材料, 但在临床上如何选择仍然没有定论, 需要围绕这方面进一步开展基础及临床试验研究.

1.6 BPE 的成骨机制

骨修复是一个复杂、有序而又多阶段重叠的过程. 虽然多种因素可以促进成骨, 但成骨机制以及这些

因素如何相互作用仍然是个谜. Zou 等人^[74]首先对不同骨修复材料的体内成骨机制进行了深入研究, 将 BPE、人重组 BMP-2 及自体骨分别注入脊柱融合器, 移植于家猪脊柱前路融合模型的腰椎间隙, 应用基因表达芯片分析发现, 不同的基因、不同的信号通路参与不同材料在不同时间点的骨修复过程. 人重组 BMP-2 通过上调不同细胞因子, 如前列腺素过氧化物合成酶-2、胰岛素样生长因子结合蛋白-2、血管内皮生长因子、趋化因子等, 诱导了膜内成骨. 而 BPE 则通过上调软骨分化相关的基因形成了软骨内成骨, 与自体骨成骨过程一致.

因此, 与其他骨软骨修复材料不同, BPE 能提供良好的骨修复微环境. 由于组织微环境的复杂性, 目前尚未完全模拟生物微环境来建立一个人工组织微环境, 而短时间内构建人工骨组织微环境也是不可能的. 单一因素, 如人重组 BMP-2 可以促进成骨, 但不是自然条件下的成骨. 综上所述, 来源于天然骨组织的 BPE 是更好的选择.

1.7 生物相容性

骨组织具有低免疫性的特点. 因此, 异体骨移植至今还有一定的应用价值, 尤其是冻干骨^[75-77]. BPE 也具有低免疫性的特点, 体外研究已经证实 BPE 具有良好的细胞相容性, 人间充质干细胞能够在 BPE 存在的环境中黏附、增殖、分化为成骨细胞^[73]. 虽然目前 BPE 来源于牛或马, 但在动物实验和临床应用中均表现出良好的生物相容性(表 1). BPE 还能与钛合金融合良好, 在这种无机物表面诱导骨形成^[45,46,83-85], 因此这种材料不但能促进骨形成, 还可以通过与植入材料良好的相容性促进间充质干细胞在其表面成骨, 增加植入材料的稳定性.

2 动物研究

大量动物研究已经证实, DBM 具有良好的骨修复能力. Urist^[26]的早期研究利用 200 只兔子的 DBM 在多种动物实验中取得了良好的骨修复效果. 许多动物实验也证实, BPE 同样具有良好的骨修复能力^[46,69,72,85,86].

2.1 脊柱融合

虽然在多种动物模型中已证实传统的 DBM 能够促进脊柱融合^[87-90], 但至今鲜有研究报道其效果优

于自体骨或可以完全取代自体骨^[91]. 当然也没有明显证据表明, BPE 具有这个能力. 但 BPE 在脊柱融合的一系列动物实验中得到了比较理想的结果. Li 等

人^[45,92,93]建立了猪的脊柱前路融合动物模型(图 2), 其融合率与临床接近. 通过 X 射线、微计算机断层扫描技术(micro computed tomography, micro-CT)及组

表 1 实验动物中骨蛋白提取物的组织反应

作者	刊名	动物(n)	观察时间(周)	评价
Baas 等人 ^[78]	<i>J Biomed Mater Res A</i>	狗(9)	4	无并发症
Ding 等人 ^[79]	<i>J Biomed Mater Res B Appl Biomater</i>	羊(8)	9	一只羊的一条后退瘫痪, 与骨蛋白提取物无关
Jensen 等人 ^[28]	<i>Open Orthop J</i>	羊(6)	16	无并发症
Nienhuijs 等人 ^[29]	<i>J Biomed Mater Res B Appl Biomaterials</i>	羊(6)	9	局部肿胀 2 周
Nienhuijs 等人 ^[73]	<i>Tissue Eng Part A</i>	大鼠(18)	12	局部皮肤红肿, 动物健康
Foldager 等人 ^[80]	<i>Bone</i>	猪(12)	8	一只猪感染
Zou 等人 ^[74]	<i>Biomaterials</i>	猪(18)	8	没有评论
Baas 等人 ^[71]	<i>Acta Orthop</i>	狗(10)	4	一只狗术后骨折
Foldager 等人 ^[81]	<i>Spine</i>	猪(18)	8	一只感染
Li 等人 ^[82]	<i>J Biomed Mater Res B Appl Biomater</i>	猪(10)	12	没有评论
Li 等人 ^[83]	<i>Spine</i>	猪(12)	12	无并发症
Baas 等人 ^[84]	<i>Acta Orthop</i>	狗(16)	4	无并发症
Nienhuijs 等人 ^[85]	<i>Biomaterials</i>	大鼠(18)	12	麻醉致死一只
Li 等人 ^[45]	<i>Spine</i>	猪(12)	12	2 只排除, 一只为腹壁感染; 一只因术后疼痛活动不良
Walboomers 与 Jansen ^[46]	<i>Biomaterials</i>	大鼠(18)	12	所有动物健康

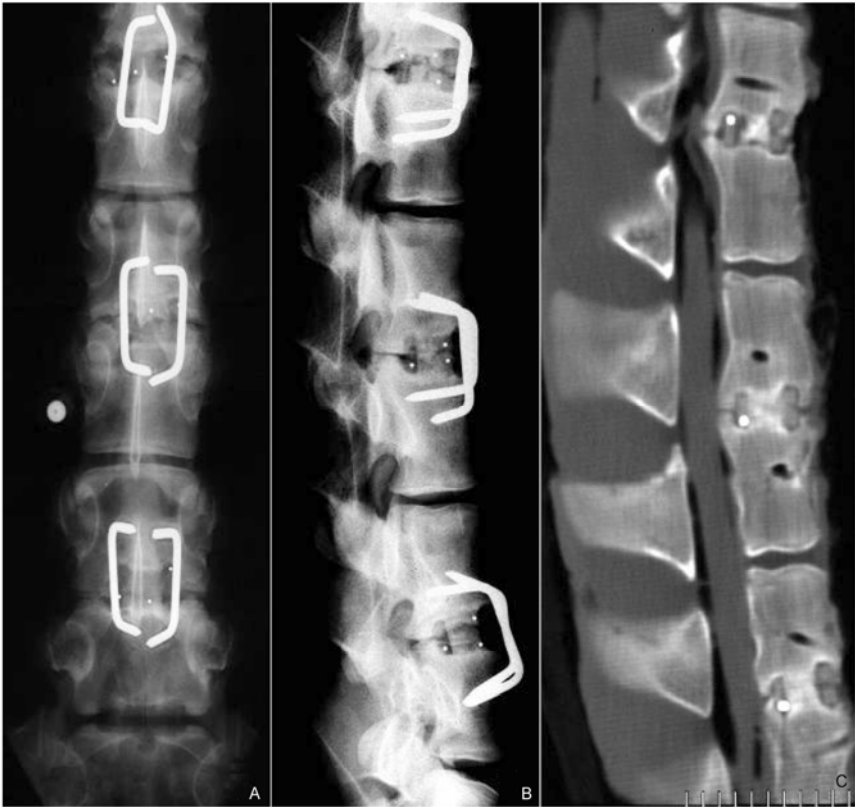


图 2 猪脊柱前路融合模型中应用骨蛋白提取物的 X 射线平片(A 和 B)和 3D 重建图片(C)

织学检查表明, 在动物模型中, 术后 12 周 BPE 的脊柱融合率与自体髂骨的融合率接近(图 3 和 4)^[45,79,82]. 有文献^[81]报道, 采用正电子发射计算机断层扫描技术评价了不同材料骨修复的特点(图 5). 其他研究人员对于不同骨修复材料的基因表达和信号通路分析等进行了对比研究, 发现 BPE 的骨修复特点与自体骨移植类似^[74,80].

2.2 骨缺损

迄今为止, 尚无 BPE 修复大面积骨缺损的报道,

主要原因可能是缺乏一种良好的支撑材料. 但已见 BPE 修复骨缺损的动物实验的陆续报道. Kloss 与 Schlegel 等人^[94,95]应用 BPE 修复猪额骨缺损, 26 周后与自体骨的修复效果接近. Schlegel 等人^[96]也获得了相似的结果. Huffer 等人^[30]在羊的长骨建立了 5 mm 直径的骨缺损模型, BPE 与自体骨的修复效果类似, 远优于 β -磷酸三钙. Jensen 等人^[28]在羊的肱骨和颅骨缺损实验中也取得了相似的结果.

综上所述, BPE 可较好地修复骨缺损, 如果辅以良好的支撑材料, 便可用于大面积骨缺损的修复^[73].

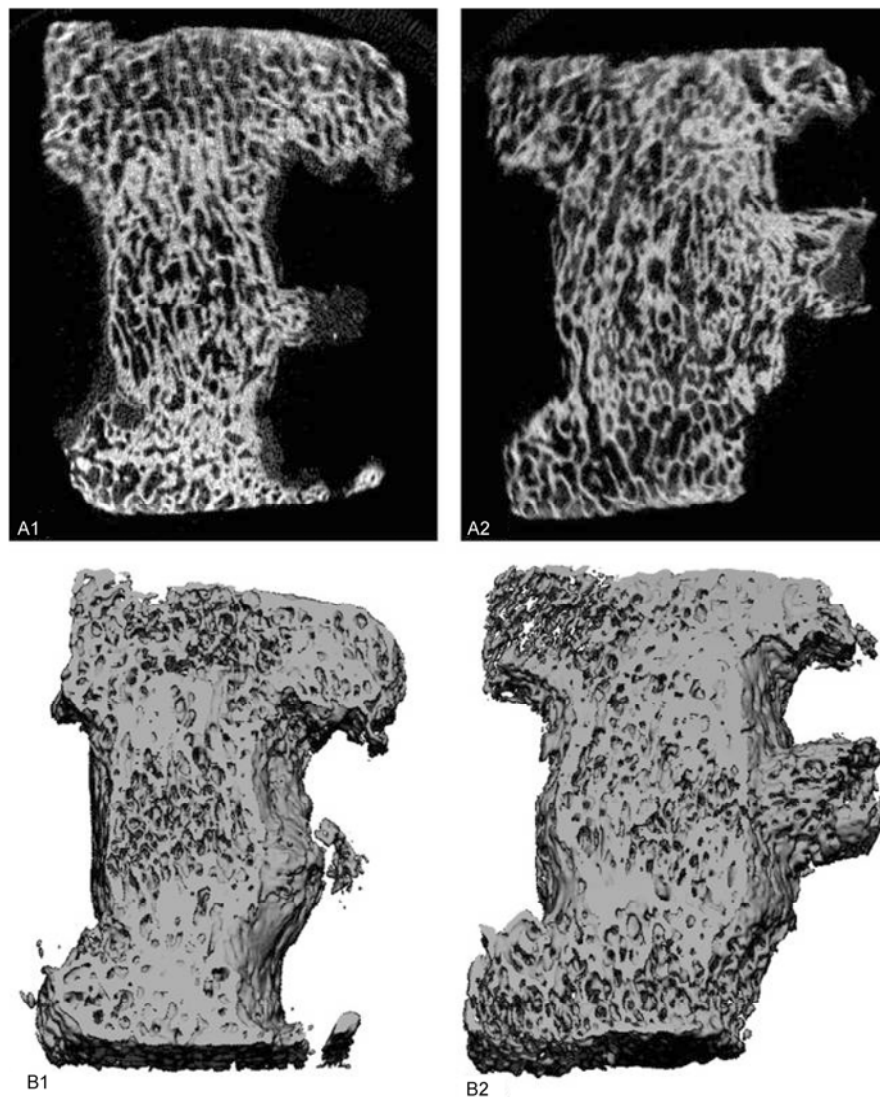


图 3 猪腰椎前路脊柱融合模型的 micro-CT 影像^[45]

已经去除金属融合器保留完整大块新骨, 骨蛋白提取物组(A1)及自体骨移植组(A2)均获得了骨性融合, A1 和 A2 为 2D 图像, B1 和 B2 为 3D 重建图像. 图像获得 Wolters Kluwer Health 许可

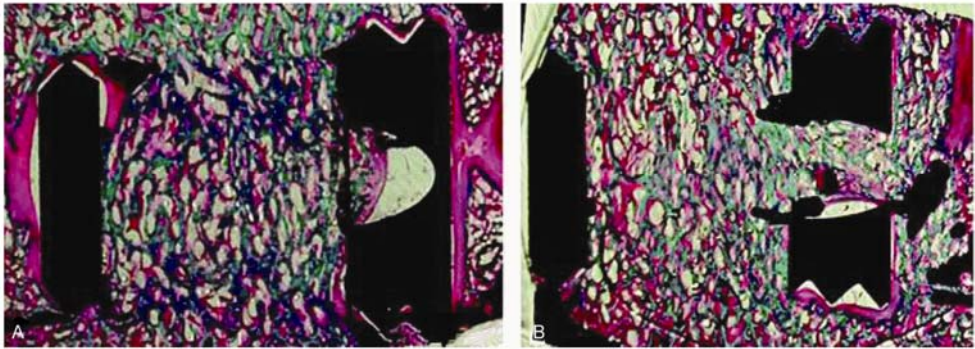


图 4 12 号猪腰椎前路脊柱融合术后 3 个月的组织图片^[45]

自体骨(A)和骨蛋白提取物(B)均提示组织学骨性融合, 骨小梁与力学方向垂直(品红亮蓝染色, 放大 1.25 倍). 图像获得 Wolters Kluwer Health 许可

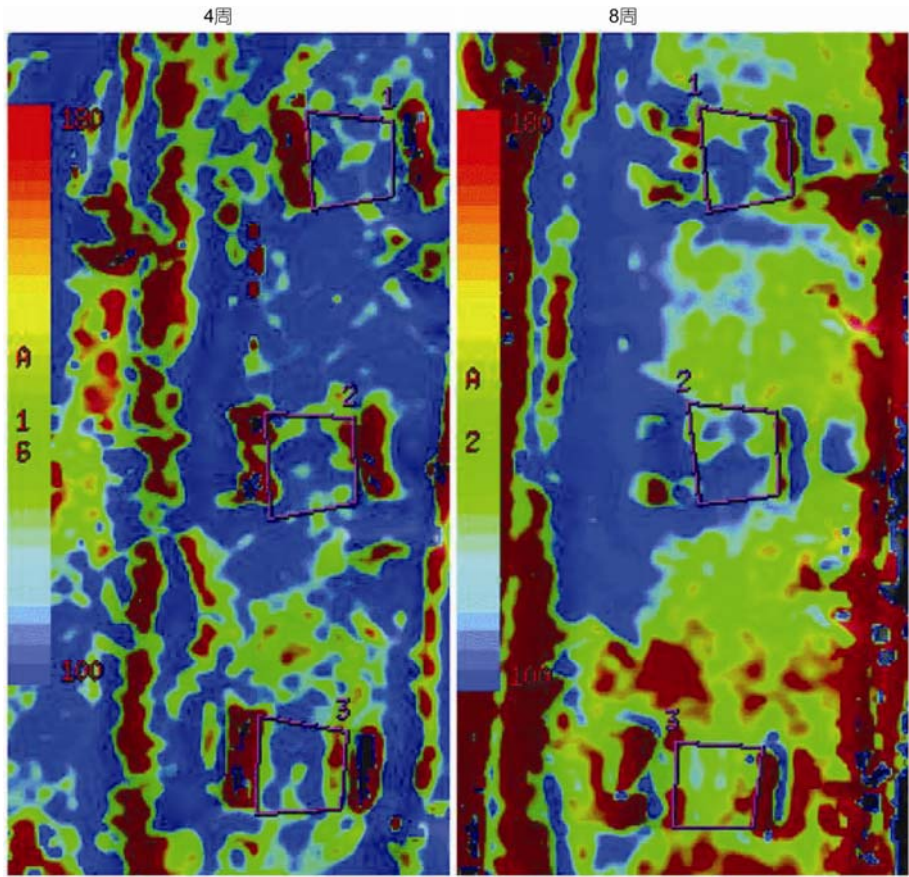


图 5 猪模型 T2 map 图像^[81]

1: 自体骨; 2: 骨蛋白提取物; 3: INFUSE. 图像获得 Wolters Kluwer Health 许可

2.3 关节翻修

通常情况下, 初次关节置换无需植骨或仅需少量植骨, 即可从截除的骨中获取. 但是, 关节置换后

的翻修却需要大量植骨, 且所植入的骨修复材料必须与新的假体相融合. 其中, 自体骨移植是最佳选择, 然而, 其植骨量很难满足翻修手术所需. Baas 等

人^[71,84,97]研究了 BPE 与植入材料的相容性, 设计了多孔钛合金植入材料, 并将这种钛合金与多种骨修复材料联合植入狗的肱骨, 通过力学测试和组织学观察发现, BPE 能增加植入物的机械稳定性, 减少了纤维组织的形成, 增加了新骨组织与多孔钛合金之间的锚定. 以上研究表明, BPE 可为关节翻修提供足量的骨修复材料.

总之, BPE 可在不同手术部位、手术方式中应用, 上述动物实验为其临床应用提供了基础资料. 进一步研究应集中在以下几方面: (i) 为 BPE 设计一个良好的支撑材料; (ii) 体内研究 BPE 对干细胞的成骨诱导作用; (iii) 结合适当的支撑材料, 在不同的时间点注入骨缺损部位; (iv) 结合抗生素、抗结核药治疗骨髓炎、骨结核等.

3 临床应用

尽管 20 世纪初 DBM 即开始在临床上应用, 但近年来仅有少数产品获得 FDA 的临床应用批文. 如何选择 DBM 的原材料一直备受争议. 显而易见, 动物骨与人类异体骨是 DBM 的两种来源. 理论上人体骨更好, 但其供体有限且缺乏有效手段避免一些疾病的传播^[98]. 因此, 在实际研究应用中动物骨得到了广泛认可. 在这种情况下, BPE 应运而生.

2002 年, Bertagnoli^[99]首次报道了 BPE 的临床应用. 将 BPE 联合碳纤维融合器进行脊柱融合术, 其融合率达 98.6%, 高于自体髂骨移植手术. 目前, 尚未见 BPE 应用于长骨缺损及关节翻修手术的报道.

在颌面手术中, BPE 已被用于修复骨缺损. Rupprecht 等人^[100]采用 BPE 治疗下颌骨缺损, 与自体髂骨比较, BPE 能加速骨修复, 尤其在骨愈合的初期阶段. 与抗生素联合应用既可治疗骨缺损, 又可杀灭局部感染的微生物以治疗骨髓炎. Kuvat 等人^[48]在口腔手术(污染区域)中应用 BPE 取得了成功. 值得一提

的是, 这个报道不仅有影像学资料, 还有病理学证据. Camargo 等人^[101]也获得了类似的结果. 虽然只有少量报道, 但也可见 BPE 由于其强大的骨修复能力, 将具备较好的临床应用前景.

4 前景

生物材料是能够设计和生产的物质, 可单独构成一个复杂的系统, 或成为一个系统的一部分; 能够直接或者通过与活体进行融合的方式参与人类或动物疾病的诊断、治疗等^[102]. BPE 是一种典型的生物材料, 因为这种材料能为骨修复提供一个良好的生物微环境, 而这种微环境是目前科学技术所不能创建的. 由于其所具有的特性, BPE 可能成为一种富有前景的骨修复材料. 对于 BPE 的应用, 本文给予以下建议:

(i) 联合其他骨修复材料或/和干细胞是 BPE 广泛应用的基础和前提;

(ii) 脊柱融合: 在前路融合中的应用已经证实其效果良好, 而在后路、后外侧融合中的应用效果需进一步的动物实验及临床前试验证实;

(iii) 骨缺损: 设计与制备一种良好的支撑材料; 在骨修复的不同阶段微创注射 BPE 开展体内研究; 联合应用抗生素、抗结核药治疗骨髓炎、骨结核;

(iv) 关节翻修: 在不同关节假体材料中应用以检测其相容性; 关节周围的骨修复效果需经进一步的动物实验证实.

5 结论

由于其独特而精细的提取过程, 骨蛋白提取物成为一种新型脱钙骨基质的骨修复材料. 其通过为骨修复提供良好的组织微环境而具有较强的骨修复能力, 将可能成为一种较为理想的骨修复材料.

参考文献

- 1 Boyan B D, Ranly D M, McMillan J, et al. Osteoinductive ability of human allograft formulations. *J Periodontol*, 2006, 77: 1555–1563
- 2 Maus U, Andereya S, Gravius S, et al. How to store autologous bone graft perioperatively: an *in vitro* study. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2008, 128: 1007–1011
- 3 Krut M C, van Gaalen S M, Oner F C, et al. Bone tissue engineering and spinal fusion: the potential of hybrid constructs by combining osteoprogenitor cells and scaffolds. *Biomaterials*, 2004, 25: 1463–1473
- 4 Wiltfang J, Kloss F R, Kessler P, et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone

- substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res*, 2004, 15: 187–193
- 5 Heneghan H M, McCabe J P. Use of autologous bone graft in anterior cervical decompression: morbidity & quality of life analysis. *BMC Musculoskelet Disord*, 2009, 10: 158
- 6 Catinella F P, De Laria G A, De Wald R L. False aneurysm of the superior gluteal artery. A complication of iliac crest bone grafting. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1990, 15: 1360–1362
- 7 Escalas F, DeWald R L. Combined traumatic arteriovenous fistula and ureteral injury: a complication of iliac bone-grafting. *J Bone Joint Surg Am*, 1977, 59: 270–271
- 8 Kurz L T, Garfin S R, Booth R J. Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1989, 14: 1324–1331
- 9 Summers B N, Eisenstein S M. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br*, 1989, 71: 677–680
- 10 Goulet J A, Senunas L E, DeSilva G L, et al. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. *Clin Orthop Relat Res*, 1997, 339: 76–81
- 11 Fernyhough J C, Schimandle J J, Weigel M C, et al. Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1992, 17: 1474–1480
- 12 Arribas-Garcia I, Alcalá-Galiano A, Garcia A F, et al. Fracture of the anterior iliac crest following monocortical bone graft harvest in bisphosphonate-related mandibular pathological fracture: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009, 107: e12–e14
- 13 Al-Sayyad M J, Abdulmajeed T M. Fracture of the anterior iliac crest following autogenous bone grafting. *Saudi Med J*, 2006, 27: 254–258
- 14 Cohn B T, Krackow K A. Fracture of the iliac crest following bone grafting. A case report. *Orthopedics*, 1988, 11: 473–474
- 15 Friend K D, Koval K J, Mirovsky Y, et al. Fracture of the iliac crest following bone grafting: a case report and literature review. *Bull Hosp Jt Dis*, 1995, 54: 49–51
- 16 Keller E E, Triplett W W. Iliac bone grafting: review of 160 consecutive cases. *J Oral Maxillofac Surg*, 1987, 45: 11–14
- 17 Zhukauskas R, Dodds R A, Hartill C, et al. Histological and radiographic evaluations of demineralized bone matrix and coralline hydroxyapatite in the rabbit tibia. *J Biomater Appl*, 2010, 24: 639–656
- 18 Katz J M, Nataraj C, Jaw R, et al. Demineralized bone matrix as an osteoinductive biomaterial and *in vitro* predictors of its biological potential. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, 89: 127–134
- 19 Wang J C, Alanay A, Mark D, et al. A comparison of commercially available demineralized bone matrix for spinal fusion. *Eur Spine J*, 2007, 16: 1233–1240
- 20 Chen W J, Zhang F, Mustain W C, et al. Prefabrication of vascularized bone flap by demineralized bone matrix. *J Craniofac Surg*, 2007, 18: 43–48
- 21 Pietrzak W S, Woodell-May J, McDonald N. Assay of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 in human demineralized bone matrix. *J Craniofac Surg*, 2006, 17: 84–90
- 22 Sundar S, Pendegrass C J, Blunn G W. Tendon bone healing can be enhanced by demineralized bone matrix: a functional and histological study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, 88: 115–122
- 23 Liu G, Li Y, Sun J, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of osteogenesis of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on partially demineralized bone matrix. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16: 971–982
- 24 Price C T, Connolly J F, Carantzas A C, et al. Comparison of bone grafts for posterior spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2003, 28: 793–798
- 25 Senn N. Senn on the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Ann Surg*, 1889, 5: 352–368
- 26 Urist M R. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965, 150: 893–899
- 27 Block J E, Poser J. Does xenogeneic demineralized bone matrix have clinical utility as a bone graft substitute? *Med Hypotheses*, 1995, 45: 27–32
- 28 Jensen J, Foldager C B, Jakobsen T V, et al. Use of carboxymethyl cellulose and collagen carrier with equine bone lyophilisate suggests late onset bone regenerative effect in a humerus drill defect—a pilot study in six sheep. *Open Orthop J*, 2010, 4: 181–187
- 29 Nienhuijs M E, Walboomers X F, Briest A, et al. Healing of bone defects in the goat mandible, using COLLOSS E and beta-tricalciumphosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010, 92: 517–524
- 30 Huffer W E, Benedict J J, Turner A S, et al. Repair of sheep long bone cortical defects filled with COLLOSS, COLLOSS E, OSSAPLAST, and fresh iliac crest autograft. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007, 82: 460–470

- 31 Termine J D, Belcourt A B, Conn K M, et al. Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. *J Biol Chem*, 1981, 256: 10403–10408
- 32 Nienhuijs M E, Poulsen K, van der Zande M, et al. Analytical assessment of the osteoinductive material COLLOSSE. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, 89: 300–305
- 33 Delmas P D, Tracy R P, Riggs B L, et al. Identification of the noncollagenous proteins of bovine bone by two-dimensional gel electrophoresis. *Calcif Tissue Int*, 1984, 36: 308–316
- 34 Wildemann B, Kadow-Romacker A, Pruss A, et al. Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods. *Cell Tissue Bank*, 2007, 8: 107–114
- 35 Wildemann B, Kadow-Romacker A, Haas N P, et al. Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 81: 437–442
- 36 Honsawek S, Powers R M, Wolfinbarger L. Extractable bone morphogenetic protein and correlation with induced new bone formation in an *in vivo* assay in the athymic mouse model. *Cell Tissue Bank*, 2005, 6: 13–23
- 37 Bae H W, Zhao L, Kanim L E, et al. Intervariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006, 31: 1299–1306, discussion 1307–1308
- 38 Carrington J L, Roberts A B, Flanders K C, et al. Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor beta during endochondral bone development. *J Cell Biol*, 1988, 107: 1969–1975
- 39 Bachra B N. Calcification *in vitro* of demineralized bone matrix. Electron microscopic and chemical aspects. *Calcif Tissue Res*, 1972, 8: 287–303
- 40 Hanson D A, Eyre D R. Molecular site specificity of pyridinoline and pyrrole cross-links in type I collagen of human bone. *J Biol Chem*, 1996, 271: 26508–26516
- 41 Deutsch H. High-dose bone morphogenetic protein-induced ectopic abdomen bone growth. *Spine J*, 2010, 10: e1–e4
- 42 Boraiah S, Paul O, Hawkes D, et al. Complications of recombinant human BMP-2 for treating complex tibial plateau fractures: a preliminary report. *Clin Orthop Relat Res*, 2009, 467: 3257–3262
- 43 Brower R S, Vickroy N M. A case of psoas ossification from the use of BMP-2 for posterolateral fusion at L4-L5. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2008, 33: E653–E655
- 44 Lee K J, Roper J G, Wang J C. Demineralized bone matrix and spinal arthrodesis. *Spine J*, 2005, 5: 217S–223S
- 45 Li H, Zou X, Woo C, et al. Experimental anterior lumbar interbody fusion with an osteoinductive bovine bone collagen extract. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30: 890–896
- 46 Walboomers X F, Jansen J A. Bone tissue induction, using a COLLOSS-filled titanium fibre mesh-scaffolding material. *Biomaterials*, 2005, 26: 4779–4785
- 47 Huffer W E, Benedict J J, Rettenmaier R, et al. Osteoinduction with COLLOSS, COLLOSS E, and GFm. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 585: 87–100
- 48 Kuvat S V, Cizmeci O, Bicer A, et al. Improving bony stability in maxillofacial surgery: use of osteogenetic materials in patients with profound (> or =5 mm) maxillary advancement, a clinical study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2009, 62: 639–645
- 49 Rodrigues C V, Serricella P, Linhares A B, et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2003, 24: 4987–4997
- 50 Grzesik W J, Robey P G. Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 1994, 9: 487–496
- 51 Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 2000, 21: 667–681
- 52 Becerra J, Andrades J A, Ertl D C, et al. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells *in vitro*: effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res*, 1996, 11: 1703–1714
- 53 Vilalta M, Jorgensen C, Degano I R, et al. Dual luciferase labelling for non-invasive bioluminescence imaging of mesenchymal stromal cell chondrogenic differentiation in demineralized bone matrix scaffolds. *Biomaterials*, 2009, 30: 4986–4995
- 54 Liu G, Sun J, Li Y, et al. Evaluation of partially demineralized osteoporotic cancellous bone matrix combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering: an *in vitro* and *in vivo* study. *Calcif Tissue Int*, 2008, 83: 176–185
- 55 Gurevitch O, Kurkalli B G, Prigozhina T, et al. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. *Stem Cells*, 2003, 21: 588–597
- 56 Muschler G F, Matsukura Y, Nitto H, et al. Selective retention of bone marrow-derived cells to enhance spinal fusion. *Clin Orthop Relat Res*, 2005, 432: 242–251

- 57 Ouyang H W, Cao T, Zou X H, et al. Mesenchymal stem cell sheets revitalize nonviable dense grafts: implications for repair of large-bone and tendon defects. *Transplantation*, 2006, 82: 170–174
- 58 Tsiridis E, Ali Z, Bhalla A, et al. *In vitro* and *in vivo* optimization of impaction allografting by demineralization and addition of rh-OP-1. *J Orthop Res*, 2007, 25: 1425–1437
- 59 Liu G, Shu C, Cui L, et al. Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 2008, 56: 209–215
- 60 Breitbart E A, Meade S, Azad V, et al. Mesenchymal stem cells accelerate bone allograft incorporation in the presence of diabetes mellitus. *J Orthop Res*, 2010, 28: 942–949
- 61 Woo C, Li H, Baatrup A, et al. Effects of bone protein extract on human mesenchymal stem cells proliferation and differentiation. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 79: 552–556
- 62 Kasten P, Luginbuhl R, van Griensven M, et al. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials*, 2003, 24: 2593–2603
- 63 Kruglyakov P V, Sokolova I B, Zin’Kova N N, et al. The influence of mesenchymal stem cells on bone tissue regeneration upon implantation of demineralized bone matrix. *Tsitologiya*, 2005, 47: 466–477
- 64 Kruglyakov P V, Sokolova I B, Zin’Kova N N, et al. Effect of mesenchymal stem cells on rejection of xenogenic bone transplant. *Bull Exp Biol Med*, 2006, 142: 534–537
- 65 Honsawek S, Dhitiseith D, Phupong V. Effects of demineralized bone matrix on proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord. *J Med Assoc Thai*, 2006, 89: S189–S195
- 66 El-Sabban M E, El-Khoury H, Hamdan-Khalil R, et al. Xenogenic bone matrix extracts induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med*, 2007, 2: 383–390
- 67 Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, et al. *In vitro* osteoinduction of demineralized bone. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1998, 26: 309–315
- 68 Peel S A, Hu Z M, Clokie C M. In search of the ideal bone morphogenetic protein delivery system: *in vitro* studies on demineralized bone matrix, purified, and recombinant bone morphogenetic protein. *J Craniofac Surg*, 2003, 14: 284–291
- 69 Li H, Springer M, Zou X, et al. Ectopic bone induction by equine bone protein extract. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 585: 393–402
- 70 Joseph V, Rampersaud Y R. Heterotopic bone formation with the use of rhBMP2 in posterior minimal access interbody fusion: a CT analysis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2007, 32: 2885–2890
- 71 Baas J, Elmengaard B, Bechtold J, et al. Ceramic bone graft substitute with equine bone protein extract is comparable to allograft in terms of implant fixation: a study in dogs. *Acta Orthop*, 2008, 79: 841–850
- 72 Lode A, Bernhardt A, Kroonen K, et al. Development of a mechanically stable support for the osteoinductive biomaterial COLLOSS E. *J Tissue Eng Regen Med*, 2009, 3: 149–152
- 73 Nienhuijs M E, Walboomers X F, Gelinsky M, et al. The evaluation of mineralized collagen as a carrier for the osteoinductive material COLLOSS® E, *in vivo*. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17: 1683–1690
- 74 Zou X, Zou L, Foldager C, et al. Different mechanisms of spinal fusion using equine bone protein extract, rhBMP-2 and autograft during the process of anterior lumbar interbody fusion. *Biomaterials*, 2009, 30: 991–1004
- 75 Khan M T, Stockley I, Ibbotson C. Allograft bone transplantation: a Sheffield experience. *Ann R Coll Surg Engl*, 1998, 80: 150–153
- 76 Donati D, Colangeli M, Colangeli S, et al. Allograft-prosthetic composite in the proximal tibia after bone tumor resection. *Clin Orthop Relat Res*, 2008, 466: 459–465
- 77 Yoshida Y, Osaka S, Mankin H J. Hemipelvic allograft reconstruction after periacetabular bone tumor resection. *J Orthop Sci*, 2000, 5: 198–204
- 78 Baas J, Jakobsen T, Elmengaard B, et al. The effect of adding an equine bone matrix protein lyophilisate on fixation and osseointegration of HA-coated Ti implants. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100: 188–194
- 79 Ding M, Rojskjaer J, Cheng L, et al. The effects of a novel-reinforced bone substitute and Colloss® E on bone defect healing in sheep. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012, 100B: 1826–1835
- 80 Foldager C, Bendtsen M, Nygaard J V, et al. Differences in early osteogenesis and bone micro-architecture in anterior lumbar interbody fusion with rhBMP-2, equine bone protein extract, and autograft. *Bone*, 2009, 45: 267–273
- 81 Foldager C, Bendtsen M, Zou X, et al. ISSLS prize winner: positron emission tomography and magnetic resonance imaging for monitoring interbody fusion with equine bone protein extract, recombinant human bone morphogenetic protein-2, and autograft. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2008, 33: 2683–2690

- 82 Li H, Zou X, Woo C, et al. Experimental lumbar spine fusion with novel tantalum-coated carbon fiber implant. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007, 81: 194–200
- 83 Li H, Zou X, Springer M, et al. Instrumented anterior lumbar interbody fusion with equine bone protein extract. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2007, 32: E126–E129
- 84 Baas J, Lamberg A, Jensen T B, et al. The bovine bone protein lyophilisate Colloss improves fixation of allografted implants—an experimental study in dogs. *Acta Orthop*, 2006, 77: 791–798
- 85 Nienhuijs M E, Walboomers X F, Merckx M A, et al. Bone-like tissue formation using an equine COLLOSS E-filled titanium scaffolding material. *Biomaterials*, 2006, 27: 3109–3114
- 86 van der Zande M, Walboomers X F, Briest A, et al. The effect of combined application of TGFbeta-1, BMP-2, and COLLOSS E on the development of bone marrow derived osteoblast-like cells *in vitro*. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 86: 788–795
- 87 Alanay A, Wang J C, Shamie A N, et al. A novel application of high-dose (50kGy) gamma irradiation for demineralized bone matrix: effects on fusion rate in a rat spinal fusion model. *Spine J*, 2008, 8: 789–795
- 88 Dodds R A, York-Ely A M, Zhukauskas R, et al. Biomechanical and radiographic comparison of demineralized bone matrix, and a coralline hydroxyapatite in a rabbit spinal fusion model. *J Biomater Appl*, 2010, 25: 195–215
- 89 Urrutia J, Thumm N, Apablaza D, et al. Autograft versus allograft with or without demineralized bone matrix in posterolateral lumbar fusion in rabbits. Laboratory investigation. *J Neurosurg Spine*, 2008, 9: 84–89
- 90 Lee Y P, Jo M, Luna M, et al. The efficacy of different commercially available demineralized bone matrix substances in an athymic rat model. *J Spinal Disord Tech*, 2005, 18: 439–444
- 91 Qiu Q Q, Shih M S, Stock K, et al. Evaluation of DBM/AM composite as a graft substitute for posterolateral lumbar fusion. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007, 82: 239–245
- 92 Li H, Zou X, Laursen M, et al. The influence of intervertebral disc tissue on anterior spinal interbody fusion: an experimental study on pigs. *Eur Spine J*, 2002, 11: 476–481
- 93 Li H, Zou X, Xue Q, et al. Anterior lumbar interbody fusion with carbon fiber cage loaded with bioceramics and platelet-rich plasma. An experimental study on pigs. *Eur Spine J*, 2004, 13: 354–358
- 94 Kloss F R, Schlegel K A, Felszeghy E, et al. Applying an osteoinductive protein complex for regeneration of osseous defects. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2004, 8: 12–17
- 95 Schlegel K A, Kloss F R, Kessler P, et al. Bone conditioning to enhance implant osseointegration: an experimental study in pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2003, 18: 505–511
- 96 Schlegel K A, Thorwarth M, Plesinac A, et al. Expression of bone matrix proteins during the osseous healing of topical conditioned implants: an experimental study. *Clin Oral Implants Res*, 2006, 17: 666–672
- 97 Baas J. Adjuvant therapies of bone graft around non-cemented experimental orthopedic implants stereological methods and experiments in dogs. *Acta Orthop Suppl*, 2008, 79: 1–43
- 98 Swenson C L, Arnoczky S P. Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: *in vitro* and *in vivo* experimental studies. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85A: 323–332
- 99 Bertagnoli R. Osteoinductive bone regeneration substance Colloss in spinal fusion. *Eur Spine J*, 2002, 11: 189–190
- 100 Rupprecht S, Petrovic L, Burchhardt B, et al. Antibiotic-containing collagen for the treatment of bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007, 83: 314–319
- 101 Camargo P M, Wolinsky L E, Burgess A V, et al. Bovine-derived bone protein extract in the treatment of mandibular Class II furcations. *Compend Contin Educ Dent*, 2002, 23: 1023–1028, 1030, passim 1032, quiz 1042
- 102 Williams D F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 2009, 30: 5897–5909