

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.10.001

· 专家论坛 ·

# 骨免疫调节机制对种植体骨结合及骨生物材料引导骨再生的影响

陈江<sup>1</sup>, 陈旭晞<sup>2</sup>, 周麟<sup>1</sup>

1. 福建医科大学附属口腔医院种植科, 福建 福州(350002); 2. 福建医科大学口腔医学院, 福建 福州(350002)



**【通信作者简介】** 陈江, 教授, 主任医师, 博士生导师。于2000年被国家留学基金委员会公派赴美国哈佛大学牙学院和塔夫茨大学新英格兰医学中心访问研究。现任福建医科大学口腔医学院及附属口腔医院院长, 兼任中华口腔医学会常务理事、中华口腔医学会口腔种植专业委员会副主任委员、中华口腔医学会口腔肿瘤学组成员、福建省口腔医学会会长、福建省口腔医学会口腔种植专业委员会顾问、中国医师协会口腔医师分会维权组成员、国际口腔种植学会(ITI)专家组成员。国务院政府特殊津贴享受者, 福建省百千万人才工程人选, 福建医科大学学科带头人。主持国家自然科学基金、福建省发改委产业技术开发项目、福建省科技重大科研项目、福建省教育厅重点项目、福建省自然科学基金项目等科研课题10余项, 获福建省科技进步二等奖1项, 福建省医学科技三等奖1项, 新型实用与发明专利三项。主编、主译、参编学术专著6部。

**【摘要】** 随着口腔种植技术和骨生物材料的发展, 种植牙已成为牙列缺损和牙列缺失的首选方案。围绕种植体和骨生物材料的研究主要集中于种植体骨结合和诱导成骨方面, 而忽视了免疫反应在这一过程中的重要作用。近年来在骨生物材料领域, 骨免疫学研究取得了巨大的成就, 其揭示了免疫细胞在调节骨骼动力学方面的重要作用, 展现了骨生物材料免疫调节性能方面的远大研究应用前景。本文首先回顾了种植体的骨结合机制, 并着眼于免疫反应在骨结合和新骨形成过程中的重要作用从而展现了调节免疫反应在这一过程中的重要性。同时基于巨噬细胞高度的可塑性及其在免疫反应中的多重作用, 着重探讨巨噬细胞对成骨、破骨细胞生成过程的重要影响。由此解释了种植体和骨生物材料、免疫系统及骨骼系统间的相互作用, 阐明了骨免疫调节机制在新型种植体、骨生物材料设计和开发中存在的潜在价值。

**【关键词】** 骨免疫调节机制; 口腔种植; 种植体; 骨生物材料; 骨形成; 骨结合; 炎症; 表面改性

**【中图分类号】** R782.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)10-0613-08

**【引用著录格式】** 陈江, 陈旭晞, 周麟. 骨免疫调节机制对种植体骨结合及骨生物材料引导骨再生的影响[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(10): 613-620.

**The effect of the osteoimmunomodulatory mechanism on implant osseointegration and bone biomaterials induced bone regeneration** CHEN Jiang<sup>1</sup>, CHEN Xuxi<sup>2</sup>, ZHOU Lin<sup>1</sup>. 1. Department of Dental Implant, Affiliated Stomatological Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China; 2. School of Stomatology of Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China

Corresponding author: CHEN Jiang, Email: dentistjiang@126.com, Tel: 0086-591-83754882

**【Abstract】** With the development of implant dentistry and biomaterials, dental implants have become the first rehabilitative option proposed for the treatment of missing teeth. Most studies about dental implants and biomaterials currently focus on osteogenesis and the osseointegration of the implant, neglecting the importance of the immune response. In

**【收稿日期】** 2018-03-28; **【修回日期】** 2018-04-18

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81771126); 福建省卫生计生委青年基金项目(2017-2-37)

**【通信作者】** 陈江, 教授, 博士, Email: dentistjiang@126.com, Tel: 0086-591-83754882

recent years, the development of osteoimmunology has been one of the greatest achievements in bone biomaterials; osteoimmunology has revealed the vital role of immune cells in regulating bone dynamics, implying the value of studies on materials with favorable osteoimmunomodulatory properties. This article reviews the integration between bone tissue and implants and summarizes the effects of the immune response during osseointegration and new bone formation to show the importance of regulating the immune response in this process. The effect of macrophages on osteogenesis and osteoclastogenesis is then reviewed due to the high plasticity and multiple roles of macrophages during this process. Accordingly, the interaction between the implants, the immune systems and the skeletal system is explained, showing the potential value of osteoimmunomodulation as a biological principle for developing bone biomaterials and new types of implants.

**【Key words】** Bone immune regulation mechanism; Dental implants; Implant; Bone biomaterial; Bone formation; Inflammation; Surface modification

随着口腔种植技术和骨生物材料的发展,种植牙已成为牙列缺损和牙列缺失的首选治疗方案,而种植体植入后的骨结合与炎症反应是影响种植成功的重要因素。目前对于种植体和骨生物材料的研究主要集中于促进种植体骨结合和诱导成骨作用方面。传统骨生物材料的生物学原理是通过提高种植体表面成骨细胞的黏附、增殖以及成骨相关基因的表达来提高成骨性能。对于该原理的应用在骨生物材料的开发中取得了一定的成功。然而,现行的体外和体内研究之间经常存在着矛盾和分歧,这意味着材料调控成骨过程的潜在机制尚不清楚。宿主免疫反应是种植体植入后的必经阶段,这一反应对种植体的骨结合极为重要,因此忽视免疫反应的重要性是传统研究方向的一个主要缺陷。近年来,骨免疫学的发展已成为骨生物学领域取得的最大成就之一,其揭示了免疫细胞在调节骨骼动力学方面的重要作用。通过研究骨生物材料的免疫调节性,使其调节成骨过程中的免疫反应,创造良好的局部免疫微环境,进而促进种植体周围骨形成和骨结合这一方向非常值得深入研究。

### 1 种植体骨结合的机制回顾

骨生物材料介导成骨过程的机制至少包括3个互相作用的组分:免疫细胞、骨细胞和材料。在种植体植入后,机体首先会对材料产生哺乳动物组织损伤后的普遍反应<sup>[1]</sup>。血液和组织液中的蛋白质,如纤维蛋白原、玻连蛋白、补体和纤连蛋白等会在数秒内粘附于材料表面,形成一个暂时的表面蛋白质基质层<sup>[2]</sup>。随后凝血反应和补体系统被激活,导致血凝块形成和其他细胞群的激活。

在最初血液和材料间相互作用之后,急性炎

症开始发生。炎症过程还包括中性粒细胞或多形核白细胞(polymorphonuclear leukocytes, PMNs)的招募和激活。为了降解材料,PMNs会释放蛋白水解酶和活性氧类(reactive oxygen species, ROS)以侵蚀材料表面<sup>[3]</sup>。在2 d内,种植位点的PMNs迅速消耗、凋亡<sup>[4]</sup>。同时,肥大细胞也积极参与到急性炎症中来,引导释放炎症增强因子和组胺,增强免疫反应<sup>[5]</sup>。

在前一阶段单核细胞受到活化细胞因子的诱导而聚集到种植体周围,并分化成巨噬细胞。此时免疫细胞通过与种植体表面吸附的蛋白质层上存在的特异性蛋白受体链接位点相结合而产生免疫应答<sup>[6]</sup>。巨噬细胞能够吞噬粒径小于5 μm的粒子<sup>[2]</sup>,如果粒径更大,巨噬细胞将在白细胞介素4(interleukin-4, IL-4)和白细胞介素13(interleukin-13, IL-13)的刺激作用下融合形成异物巨细胞(foreign body giant cells, FBGCs)<sup>[7]</sup>。这些巨噬细胞和FBGCs在组织和种植体间相互作用的过程中释放细胞因子,积极调节成骨分化,使种植体表面新骨形成,并包埋种植体。最后,在骨重建阶段,功能负载和机械应变是骨重建的主要原因。骨细胞能将机械应变相关的信号转化为生物化学信号,调节骨形成和破骨细胞生成,在骨重建时期发挥一定的调节作用<sup>[8]</sup>。

另外,异物反应还可能形成纤维包裹。虽然这种纤维包裹可以有效地将种植体与周围环境分离,使其可以安全存在于宿主体内,却无法替代材料的需求。骨替代材料的意义是诱导新骨形成和作为行使功能的骨组织来填补缺损部位。纤维包裹阻止了骨和种植体之间的直接相互作用,使骨细胞无法附着于种植体表面形成新的骨组织。相反,缺损部位将由纤维组织填充,直接导

致骨重建失败。这说明了创造有利于骨再生和骨结合的局部免疫环境的重要性,而通过对骨生物材料的定向修饰来调控免疫反应则可以使这一过程朝骨结合和骨再生的方向发展<sup>[9]</sup>。

## 2 免疫细胞与骨结合

对于骨生物材料在成骨过程中的调节作用来说,免疫反应是一把双刃剑。良好的免疫反应可以创造促进成骨的微环境,而不当的免疫反应则可能导致慢性炎症并在种植体周围形成纤维包裹。骨免疫学旨在了解免疫系统和骨骼系统之间的相互作用。免疫细胞通过释放调节分子,积极参与骨的生理和病理过程,通过影响成骨过程和破骨细胞生成调节骨再生。而免疫细胞功能异常会导致破骨细胞和成骨细胞间的平衡被打破,并导致骨溶解、骨质疏松、骨关节炎和类风湿性关节炎等。免疫细胞在破骨细胞生成和成骨过程中的作用以及可能的分子机制有以下几个方面。

### 2.1 免疫细胞与成骨反应

免疫细胞在成骨过程中起着不可或缺的调控作用。免疫细胞通过他们表达和分泌的各种调控分子,如炎症细胞因子、骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)实现其在成骨调控过程中的双重作用。充分了解免疫细胞及其分泌的细胞因子对于骨形成的影响,将有助于发展免疫调节干预技术,获得理想的骨再生效果。

生理浓度下四种主要炎性细胞因子的综合作用可以诱导矿化基质的产生,分别是肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、 $\gamma$ 干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )以及白细胞介素17(interleukin-17, IL-17)。通过激活核因子 $\kappa$ B(Nuclear Factor- $\kappa$  B, NF- $\kappa$ B)信号通路,一定量的TNF- $\alpha$ 可以增加碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活化和间充质干细胞(mesenchymal stromal cells, MSCs)介导的基质矿化。而预先经过TNF- $\alpha$ 中和抗体处理的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)激活的炎症M1型巨噬细胞条件培养基对ALP的活化作用将会减弱<sup>[10]</sup>。另外,早期敲除抑癌蛋白M(oncostatin M, OSM)将导致新骨形成量的减少<sup>[11]</sup>。然而,在成骨细胞分化过程中也发现TNF- $\alpha$ 通过抑制BMP2的释放和诱导成骨细胞凋亡从而发挥抑制成骨作

用<sup>[12-13]</sup>。研究认为,T淋巴细胞对IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的上调作用也是导致MSCs引起的骨再生失败的原因,且其抑制作用可以被抗炎药阿司匹林消除<sup>[14]</sup>。其潜在机制可能与MSCs中NF- $\kappa$ B刺激有关,这会导致 $\beta$ 连环蛋白降解,从而抑制成骨分化<sup>[15]</sup>。这些推论导出一种假说,认为炎症细胞因子对成骨的影响取决于其剂量和时间,适当的浓度和刺激时机使这些细胞因子诱导成骨,而不当的剂量和时机将导致骨吸收。

### 2.2 免疫细胞和破骨细胞生成

免疫细胞通过3种主要的细胞因子:巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)、NF- $\kappa$ B受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)和骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)调控破骨细胞生成。巨噬细胞是破骨细胞的前体,可以在M-CSF和RANKL的刺激下在骨重建过程中分化为破骨细胞。M-CSF在破骨细胞前体上与其同源受体c-FMS结合,并通过Akt和MAP激酶途径传递信号<sup>[16]</sup>。RANKL在破骨细胞前体表面与RANK结合,通过肿瘤坏死因子受体相关因子6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6)、NF- $\kappa$ B、激活蛋白1(activator protein 1, ap-1)和活化T细胞核因子2(nuclear factor of activated T cells 2, NFAT2)的转导,使调控破骨细胞存活和分化的基因表达上调<sup>[17-18]</sup>。这样RANKL不仅在成骨细胞中表达,还在激活T细胞和中性粒细胞中表达,以维持骨组织中正常的破骨细胞生成。在这一过程中,IL-6可以诱导RANKL的表达,并利用RANKL/RANK-OPG系统诱导间接效应来促进破骨细胞生成和活化<sup>[19]</sup>。IL-6还参与了TNF- $\alpha$ 和IL-1介导的破骨细胞形成过程<sup>[20]</sup>。OSM利用与IL-6相同的受体亚基gp130进行信号传递,并且这两种细胞因子的功能通常相似或者重叠<sup>[21]</sup>。OSM还可以通过成骨细胞刺激RANKL的产生,并根据效应剂量提高破骨细胞生成,这或许与IL-6的协同作用有关<sup>[22]</sup>。与此相反,干扰素 $\gamma$ 促进RANKL/RANK通路的关键中间体TRAF6的降解,从而防止了炎症中大量的骨破坏<sup>[17]</sup>。OPG是RANKL的诱饵受体,阻断RANKL/RANK的相互作用,从而抑制破骨细胞的分化 and 功能<sup>[23-24]</sup>。B细胞是骨髓源性OPG的主要来源<sup>[25-26]</sup>,这表明B细胞是正常生理中破骨细胞发生的主要抑制者之一。另外研究显示T细胞缺陷并敲除CD40和CD40L基因的小鼠会罹患骨质疏松

症<sup>[25]</sup>。这表明T细胞与B细胞共同作用并通过CD40/CD40L协同刺激增加OPG的产生。

免疫细胞与破骨细胞的相互作用在许多骨疾病的病理过程中起着关键作用。顽固和过度的炎症是促炎细胞因子持续释放的结果,最终导致骨重建转化为破骨细胞介导的进行性骨吸收,伴随矿物质和有机成分紊乱,并最终造成骨丧失和功能障碍。

### 2.3 巨噬细胞与骨结合

在所有免疫细胞中,巨噬细胞由于高度可塑性而备受关注,其在骨愈合过程中的多重作用及其高度可塑性,倍受关注。巨噬细胞在炎症和宿主防御中起着中心作用,尤其是在非特异性免疫反应中。基于各自独特的功能性质、表面标记物和诱导因子,巨噬细胞被分为M1和M2表型。其中M2型巨噬细胞包括3个亚种群M2a、M2b和M2c。值得注意的是,这一分类只代表了体内环境的简化,巨噬细胞更可能是表现出M1到M2表型的连续过程中的某一状态,其中有许多尚未确定的激活度<sup>[27]</sup>。这使得M1与M2型巨噬细胞的区分更加困难,因为在某个瞬间巨噬细胞可能同时具有两种表型的某些特征,从而导致根据表面标记物的划分不可靠。因此,依靠表面标记来检测巨噬细胞的数量或许需要多个标准。另外,巨噬细胞还能转化为破骨细胞以吸收骨质,或者融合为作用尚未不明确的多核巨细胞<sup>[28]</sup>。

不同表型的巨噬细胞对成骨过程存在不同程度的影响。经典激活的炎性巨噬细胞M1型分泌许多促炎细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ ),传统观点认为这些细胞因子可以诱导破骨细胞生成并促进破骨活动,从而导致骨吸收。然而最近的一些研究发现M1型巨噬细胞的反应增强了骨生成。Guihard等<sup>[29]</sup>报道称经典激活的炎症M1型巨噬细胞通过OSM诱导MSCs的成骨反应。

与M1型巨噬细胞相比,M2型巨噬细胞在修复反应中后期发挥着更为重要的作用。M2型巨噬细胞的细胞因子释放模式是由M1型巨噬细胞在骨损伤愈合的早期阶段决定的。长时间M1型极化可导致M2型巨噬细胞释放的纤维化增强细胞因子增多,从而导致纤维包裹的形成。相反,高效而及时的M1型巨噬细胞表型转换可以使M2型巨噬细胞释放成骨增强细胞因子并促进新骨形成<sup>[30]</sup>。

巨噬细胞表型是动态而可塑的,其会对环境的变化做出反应,改变表型和生理状态。Spiller

等<sup>[31]</sup>证实巨噬细胞在一定的刺激条件下经过最短3d即可从M2损伤修复型巨噬细胞完全极化为M1促炎型巨噬细胞,反之亦然。这也揭示了他们在骨修复过程中的多重作用。表型转化与刺激信号的类型、浓度和作用时间有关。当受到IL-4刺激时,巨噬细胞转化为促进修复的M2表型;而当加入LPS和免疫复合物的时候,巨噬细胞可以呈现出一种混合的表型,同时具有伤口愈合和调控免疫细胞的特征。目前还不清楚这种表型的改变是来自于原来的巨噬细胞,还是一个新的巨噬细胞群体从免疫细胞循环中迁移到这一位点来代替原来的细胞。另外一直未受到重视的还有种植体表面材料、形状、化学性质和组成对巨噬细胞的影响这一研究领域。研究表明:表面粗糙度具有增加促炎反应的趋势。粗糙表面增加巨噬细胞促炎细胞因子表达<sup>[32]</sup>。

除此之外,大量关于单核/巨噬细胞及其融合成多核巨细胞的行为的信息尚不清楚。研究显示多核巨细胞聚集在种植体表面可能引起生物材料降解和种植失败<sup>[33]</sup>。而许多证据还表明多核巨细胞也可以从M1型极化成M2型,且多核巨细胞跟随巨噬细胞聚集在生物材料表面后,可以表现M2型巨噬细胞标记<sup>[34]</sup>。特别是在骨移植材料周围,多核巨细胞在种植术后多年仍存在于种植位点的骨组织中。并与周围组织血管化水平的迅速增长有关<sup>[35-37]</sup>。近年的研究主要集中于这些多核巨细胞的表面标记及对于其来源的细胞系的分歧<sup>[38]</sup>,更好的理解其在种植体骨结合中的作用需要更进一步的深入的研究。总之,巨噬细胞可以作为评估免疫反应的细胞模型,而其异质性和可塑性也使其成为调节免疫反应的主要靶点。因此巨噬细胞的转化模式及其对成骨过程的影响值得进一步深入研究。

### 3 种植体和骨生物材料表面改性及其免疫调节作用

骨生物材料被宿主免疫系统识别为异物,引起多种定向免疫反应。生物材料的表面性质将是决定其所介导的免疫反应的类型和范围重要因素。

#### 3.1 种植体和骨生物材料的表面性质与形貌对免疫调节的影响

种植体和骨生物材料表面的免疫细胞生物学行为很大程度上取决于材料表面性质,如表面微观结构和润湿性。一般而言,相比亲水材料,疏水

材料往往提高免疫细胞粘附,并导致植入位点局部免疫反应。表面电荷也对免疫反应产生显著影响。人们普遍认为阳离子更能促进炎症反应<sup>[39]</sup>。大多数哺乳动物细胞,包括免疫细胞表面整体存在负电荷<sup>[40]</sup>。阳离子引起的细胞表面负电荷的丢失可能影响正常状态下蛋白质的定位和确认,从而影响信号转导并对生理反应包括炎症反应产生显著影响。生物材料的表面形貌是影响免疫细胞相互作用的又一重要特性。材料表面粗糙度会影响免疫细胞的粘附和扩散,还可以调节巨噬细胞释放炎性细胞因子和趋化因子。

骨是一种由纳米-羟基磷灰石组成的天然纳米结构,周期性地分布在自组装的胶原纤维中,这意味着纳米结构可以有效地调节局部微环境<sup>[41]</sup>。材料表面的纳米形貌可以模拟这些天然的纳米结构,对间充质干细胞的形态学和表型调控具有一定的影响<sup>[42]</sup>。选择性地设计纳米材料是刺激成骨分化的有效措施。除了对成骨分化的直接影响外,高度可调的特性使纳米形貌成为一种很有价值的工具,可以精确调节免疫细胞的骨免疫反应,从而产生可控的免疫环境来调节骨骼动力学。而免疫细胞同样具有高度可塑性,由于这些可调特性和生物仿生性质,材料表面纳米形貌成为了一种非常有价值的,可以精确地控制骨免疫调节,改善骨再生的性质。

### 3.2 种植体和骨生物材料表面的纳米形貌

一系列研究已经证明纳米形貌诱导成骨分化的作用,展现了在骨生物材料中引入纳米改性界面,通过可预测的方式来触发和控制不同系统细胞行为这一技术的价值。纳米形貌包括纳米管、纳米坑、纳米纤维、纳米点、纳米槽、纳米孔等<sup>[43]</sup>。均已应用于调控骨细胞的行为,并在生物物理化学和力学参数得到适当控制的情况下,对增强骨形成产生积极作用。除了直接对骨细胞的影响外,研究还发现了其对免疫细胞的反应,显示出明显的免疫调节作用。不同的骨诱导纳米技术对调节免疫细胞反应的影响及可能的潜在机制是目前的研究热点之一。

**3.2.1 纳米管** 纳米管的形貌表现出良好的功能效应,并已经应用于许多领域。包括凝血、血管形成和药物传递。同时还可以促进骨形成细胞的粘附、扩张和成骨分化,并可以有效促进骨结合,是一种在牙科/骨科应用方面极具发展前途的界面<sup>[43]</sup>。在调节免疫反应方面,研究发现TiO<sub>2</sub>纳米

管能抑制免疫细胞生长和粘附,下调巨噬细胞炎症蛋白-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein, MIP-1 $\beta$ )、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein, MCP-1)、IL-6和IL-8表达<sup>[44]</sup>。另一项关注巨噬细胞系的研究表明,TiO<sub>2</sub>纳米管表面,尤其是80nm直径组能增加巨噬细胞粘附增殖能力,并抑制TNF- $\alpha$ 、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的表达<sup>[45]</sup>。

**3.2.2 纳米坑** 在骨重建和吸收过程中,破骨细胞附着并降解旧骨组织,其特征是在封闭区形成直径40  $\mu$ m的凹坑<sup>[46]</sup>。这表明纳米坑结构在介导成骨过程中的重要性。通过改变纳米坑形貌的各项参数,如直径和深度等,骨形成细胞的行为会受到明显调控并在合适的纳米坑结构下发生成骨分化<sup>[47]</sup>。而与调控骨动力学的研究相比较,纳米坑形貌结构的免疫调节作用非常有限。

**3.2.3 纳米纤维** 随着电纺技术的发展,现在人们可以制造出超细的、连续的纳米纤维。研究发现,基于纳米纤维的支架能显著增强骨再生<sup>[48]</sup>。而关于其在调节免疫反应方面的影响的研究表明,3D水凝胶表面的纳米纤维涂层可以将巨噬细胞的极化状态转化为具有抗炎和促进组织愈合作用的M2型<sup>[49]</sup>。而电纺纳米纤维聚氨酯膜的巨噬细胞反应最为微弱,异物反应温和<sup>[50]</sup>。Saino等<sup>[51]</sup>报告显示,免疫反应可以发生于不同纤维尺寸和排列方式的PLLA支架上。RAW264.7巨噬细胞经过7~24 h的培养后用于活化和表达促炎细胞因子,其活化能力和促炎细胞因子的分泌主要与纤维的直径有关。通过引入合适的纳米纤维结构,可以显著提高生物材料的生物相容性。

**3.2.4 纳米点** 在钛表面制备二氧化钛纳米点的方法已经成功实现并且对MSCs的成骨分化表现出调节作用,其中15 nm点阵大小的效果最为显著<sup>[52]</sup>。这表明利用纳米点来控制种植体表面骨形成细胞的行为,从而应用于骨生物学领域之中是可行的。还有研究报道了纳米点的免疫调节作用。当控制纳米点阵尺寸在10~200 nm时,免疫细胞形态、粘附和增殖都受到相应的调控。Mohiuddin等<sup>[53]</sup>报道在50~100 nm的纳米点阵中,观察到巨噬细胞和泡沫细胞的附着数量增加,而在100~200 nm的点阵中附着数量则减少。通过对黏着斑蛋白和肌动蛋白微丝进行免疫染色发现在小尺寸纳米点阵表面,细胞粘附能力和细胞骨架形成均有增加。同时研究还注意到在尺寸范围为100~200 nm的纳米点阵表面,细胞粘附和细胞骨

架形成延缓,导致促炎基因表达的上调。

**3.2.5 纳米沟槽** 与其他纳米形貌相比,纳米沟槽和微纹理表面可通过一种称为接触诱导的现象对骨形成细胞进行形态诱导。纳米沟槽形貌对黏着斑和吸附蛋白的表达有直接的影响。伴随着丝状伪足的延伸,蛋白与肌动蛋白微丝与纳米沟槽平行<sup>[54]</sup>。纳米沟槽的形貌还能够影响胶原基质的排列,这对于骨基质的形成非常重要<sup>[55]</sup>。在诱导免疫细胞的附着和扩散过程中,纳米沟槽形貌似乎还能减少巨噬细胞的附着和增殖数量。与体内实验的结果一致,生长于纳米沟槽形貌表面的巨噬细胞会上调其炎症细胞因子表达。此外研究还观察到损伤修复相关因子,包括 TGF- $\beta$  和骨桥蛋白表达增强,表明纳米沟槽形貌控制巨噬细胞活化对免疫治疗的影响,从而诱导损伤修复反应<sup>[56]</sup>。

**3.2.6 纳米孔** 近来的研究证实了微米和纳米尺度的多孔结构对增强基质沉积和改善骨形成细胞粘附和分化的影响,揭示了纳米孔界面对成骨的积极作用。免疫细胞的行为可以通过控制纳米孔的大小进行调节,在较大的孔径上(200 nm)巨噬细胞的附着能力较弱,然而与小孔径组(20 nm)相比,大孔径表面附着的巨噬细胞高度活化,其释放促炎细胞因子的能力更强。一项体内研究证实,当与 20 nm 氧化铝纳米孔比较时,200nm 孔组诱导炎症反应能力更强,具有更强的炎症细胞招募能力并产生更多的促炎细胞因子<sup>[57]</sup>。最新的研究进一步表明纳米孔结构和孔径大小可以影响免疫细胞扩散并改变其形状,从而调控自噬通路成分(LC3A/B, beclin-1, Atg3, Atg7, P62)的表达和激活<sup>[58]</sup>,这意味着纳米形貌介导免疫调节可以与细胞形态的改变和自噬的激活有关。

### 3.3 种植体及骨生物材料表面修饰和涂层

近年来的研究关注种植体骨整合的生物学机制。表面修饰和涂层试图模仿人类骨的生化环境和纳米结构,使用包括特定的药物、蛋白质、生长因子等修饰种植体表面,其目标是①通过与骨整合过程的相互作用为种植体提供最佳的稳定性;②改善种植体周围软组织附着;③通过对细菌和免疫细胞附着的影响调节种植体周围免疫环境。控制炎症和促进骨再生。同时近年的研究还关注经改性具备一定免疫调节能力的胶原膜对骨生物材料引导骨再生过程的支持作用<sup>[59]</sup>。多种不同材料交联胶原膜也展示了其所具有的免疫调节性能<sup>[60]</sup>。

#### 3.3.1 生长因子 在骨整合的第一个步骤——止

血过程中,血小板从破损的血管中释放到牙槽骨中,释放特殊的生长因子来开启骨整合的下一步过程—炎症过程。而巨噬细胞是这些生长因子的第二个来源。BMP 第一次被报道于 1965 年,包括至少 18 种 TGF- $\beta$  家族的生长因子。在体内 BMP 由成骨细胞、血小板、内皮细胞释放,积存在骨基质中,并在种植窝预备时释放出来。研究表明,钛片修饰含 BMP2 仿生钙磷灰石涂层可以改善种植体—骨结合,提高新骨形成<sup>[61]</sup>。

**3.3.2 多肽** 这些由短序列氨基酸组成,特殊的具有促进细胞粘附或者抗菌作用的多肽已经被用于设计新型表面种植体。RGD 多肽是细胞外基质蛋白的重要序列,在成骨细胞迁移粘附过程中作为整合素受体的连接位点<sup>[62]</sup>。除此之外,对于抗菌肽涂层的研究也在进行当中。研究发现抗菌肽 WALK11.3 可以通过下调 TLR4 信号通路来减少 LPS 刺激的巨噬细胞释放促炎因子 NO、COX-2、IL-1 $\beta$ 、IL-6、INF- $\beta$  和 TNF- $\alpha$ <sup>[63]</sup>。人工合成的  $\beta$  折叠 AMPs 还能够抑制巨噬细胞编码促炎细胞因子和化学因子的基因表达<sup>[64]</sup>。抗菌肽 PR-39 同时具有抗菌作用和免疫调节作用,能够介导巨噬细胞产生 IL-8 和 TNF- $\alpha$ <sup>[65]</sup>。在唾液中发现的抗菌蛋白 GL13K 能够通过硅烷化的方法稳定地修饰在钛材料表面,且具有良好的生物相容性与杀菌性能<sup>[66]</sup>。

## 4 小结及展望

种植体和骨生物材料与免疫系统相互作用,显著影响免疫细胞和骨细胞的生物学行为,从而决定骨再生和骨结合的结果。未来的研究应该集中于确定对于骨再生和骨结合有利的免疫环境,确定巨噬细胞不同极化状态对免疫调节的影响及其相互转化的意义,以及确定如多核巨细胞等在骨免疫调节机制中发挥的作用及其机制。从而为调控骨免疫反应提供高效的策略,为骨生物材料的表面修饰和设计提供可行的方案,促进种植体植入后的骨结合和骨再生。

### 参考文献

- [1] Brown BN, Badylak SF. Expanded applications, shifting paradigms and an improved understanding of host-biomaterial interactions[J]. Acta Biomater, 2013, 9(2): 4948-4955.
- [2] Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, et al. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials[J]. Biomaterials, 2011, 32(28): 6692 - 6709.

- [3] Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, et al. Neutrophils in the innate immune response[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005, 53(6): 505-517.
- [4] Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials[J]. Semin Immunol, 2008, 20(2): 86-100.
- [5] Tang L, Jennings TA, Eaton JW. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(15): 8841-8846.
- [6] 樊肇, 邹耿森, 陈江. 钛种植体表面纳米改性及其与机体免疫应答[J]. 国际口腔医学杂志, 2014, 41(6): 691-693.
- [7] Hart PH, Bonder CS, Balogh J, et al. Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13[J]. J Leukoc Biol, 1999, 66(4): 575-578.
- [8] Chen Z, Wu C, Yuen J, et al. Influence of osteocytes in the *in vitro* and *in vivo*  $\beta$ -tricalcium phosphate-stimulated osteogenesis[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(8): 2813-2823.
- [9] Ma M, Liu WF, Hill PS, et al. Development of cationic polymer coatings to regulate foreign-body responses[J]. Adv Mater, 2011, 23(24): H189-H194.
- [10] Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, et al. TNF $\alpha$  promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Bone, 2009, 45(2): 367-376.
- [11] Guihard P, Boutet MA, Brounais-Le Royer B, et al. Oncostatin m, an inflammatory cytokine produced by macrophages, supports intramembranous bone healing in a mouse model of tibia injury[J]. Am J Pathol, 2015, 185(3): 765-775.
- [12] Gilbert L, He X, Farmer P, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- $\alpha$ [J]. Endocrinology, 2000, 141(11): 3956-3964.
- [13] Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF therapy, from rationale to standard of care: what lessons has it taught us[J]. J Immunol, 2010, 185(2): 791-794.
- [14] Liu Y, Wang L, Kikuri T, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes *via* IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ [J]. Nat Med, 2011, 17(12): 1594-1601.
- [15] Chang J, Liu F, Lee M, et al. NF- $\kappa$ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting  $\beta$ -catenin degradation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(23): 9469-9474.
- [16] Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, et al. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 and RANKL through regulating MAPK, AKT and Src signaling[J]. Regul Pept, 2010, 162(1-3): 99-108.
- [17] Arron JR, Choi Y. Osteoimmunology - bone versus immune system [J]. Nature, 2000, 408(6812): 535-536.
- [18] Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease[J]. Nat Med, 2007, 13(7): 791-801.
- [19] Meguid MH, Hamad YH, Swilam RS, et al. Relation of interleukin-6 in rheumatoid arthritis patients to systemic bone loss and structural bone damage[J]. Rheumatol Int, 2013, 33(3): 697-703.
- [20] Devlin RD, Reddy SV, Savino R, et al. IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH) $_2$ D $_3$ , on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures[J]. J Bone Miner Res, 1998, 13(3): 393-399.
- [21] Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, et al. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- $\kappa$ B in mouse calvariae[J]. J Immunol, 2002, 169(6): 3353-3362.
- [22] Sims NA, Quinn JM. Osteoimmunology: oncostatin M as a pleiotropic regulator of bone formation and resorption in health and disease[J]. Bonekey Rep, 2014, 3: 527.
- [23] Boyce BF, Xing LP. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin[J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(Suppl 1): 1.
- [24] Wright HL, Mccarthy HS, Middleton J, et al. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease[J]. Curr Rev Musculoskelet Med, 2009, 2(1): 56-64.
- [25] Li Y, Toraldo G, Li A, et al. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo[J]. Blood, 2007, 109(9):3839-3848.
- [26] Pacifici R. The immune system and bone[J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 503(1): 41-53.
- [27] Gordon S, Helming L, Estrada FOM. Alternative activation of macrophages: concepts and prospects[M]// Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases. Springer New York, 2014:59-76.
- [28] Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment[J]. F1000Prime Rep, 2014, 6: 13.
- [29] Guihard P, Danger Y, Brounais B, et al. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling[J]. Stem Cells, 2012, 30(4): 762-772.
- [30] Malekshah AK, Moghaddam AE, Daraka SM. Comparison of conditioned medium and direct co-culture of human granulosa cells on mouse embryo development[J]. Indian J Exp Biol, 2006, 44(3): 189-192.
- [31] Spiller KL, Nassiri S, Witherell CE, et al. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds[J]. Biomaterials, 2015, 37: 194-207.
- [32] Alfarsi MA, Hamlet SM, Ivanovski S. Titanium surface hydrophobicity modulates the human macrophage inflammatory cytokine response[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(1): 60-67.
- [33] Trindade R, Albrektsson T, Wennerberg A. Current concepts for the biological basis of dental implants: foreign body equilibrium and osseointegration dynamics[J]. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2015, 27(2): 175-183.
- [34] Vasconcelos DP, Costa M, Amaral IF, et al. Modulation of the inflammatory response to chitosan through M2 macrophage polarization using pro-resolution mediators[J]. Biomaterials, 2015, 37: 116-123.
- [35] Luo X, Barbieri D, Davison N, et al. Zinc in Calcium phosphate mediates bone induction: *in vitro* and *in vivo* model[J]. Acta Bioma-

- ter, 2014, 10(1): 477-485.
- [36] Bouvet-Gerbettaz S, Boukhechba F, Balaguer T, et al. Adaptive immune response inhibits ectopic mature bone formation induced by BMSCs/BCP/plasma composite in immune-competent mice[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(21-22): 2950-2962.
- [37] Gamblin AL, Brennan MA, Renaud A, et al. Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic Calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(36): 9660-9667.
- [38] Miron RJ, Zohdi H, Fujioka-Kobayashi M, et al. Giant cells around bone biomaterials: Osteoclasts or multi-nucleated giant cells[J]. *Acta Biomater*, 2016, 46: 15-28.
- [39] Dobrovolskaia MA, Mcneil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(8): 469-478.
- [40] Weiss L. The cell periphery[J]. *Int Rev Cytol*, 1969, 26(3789): 63-105.
- [41] Chen X, Wang W, Cheng S, et al. Mimicking bone nanostructure by combining block copolymer self-assembly and 1D crystal nucleation[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(9): 8251-8257.
- [42] Tsimbouri P, Gadegaard N, Burgess K, et al. Nanotopographical effects on mesenchymal stem cell morphology and phenotype[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(2): 380-390.
- [43] Dang Y, Zhang L, Song W, et al. In vivo osseointegration of Ti implants with a strontium-containing nanotubular coating[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 1003-1011.
- [44] Smith BS, Capellato P, Kelley SA, et al. Reduced in vitro immune response on Titania nanotube arrays compared to Titanium surface [J]. *Biomater Sci*, 2013, 1(3): 322-332.
- [45] Lü WL, Wang N, Gao P, et al. Effects of anodic Titanium dioxide nanotubes of different diameters on macrophage secretion and expression of cytokines and chemokines[J]. *Cell Prolif*, 2015, 48(1): 95-104.
- [46] Wilkinson A, Hewitt RN, Mcnamara LE, et al. Biomimetic microtopography to enhance osteogenesis in vitro[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(7): 2919-2925.
- [47] Davison MJ, McMurray RJ, Smith CA, et al. Nanopit-induced osteoprogenitor cell differentiation: the effect of nanopit depth[J]. *J Tissue Eng*, 2016, 7: 2041731416652778.
- [48] Zhang Y, Venugopal JR, El-Turki A, et al. Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(32): 4314-4322.
- [49] Bartneck M, Heffels KH, Pan Y, et al. Inducing healing-like human primary macrophage phenotypes by 3D hydrogel coated nanofibres[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(16): 4136-4146.
- [50] Wang K, Hou WD, Wang X, et al. Overcoming foreign-body reaction through nanotopography: biocompatibility and immunoisolation properties of a nanofibrous membrane[J]. *Biomaterials*, 2016, 102: 249-258.
- [51] Saino E, Focarete ML, Gualandi C, et al. Effect of electrospun fiber diameter and alignment on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(5): 1900-1911.
- [52] Sjöström T, Mcnamara LE, Meek RM, et al. 2D and 3D nanopatterning of Titanium for enhancing osteoinduction of stem cells at implant surfaces[J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2(9): 1285-1293.
- [53] Mohiuddin M, Pan HA, Hung YC, et al. Control of growth and inflammatory response of macrophages and foam cells with nanotopography[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2012, 7(1): 394.
- [54] Fujita S, Ohshima M, Iwata H. Time-lapse observation of cell alignment on nanogrooved patterns[J]. *J R Soc Interface*, 2009, 6 (Suppl 3): S269-S277.
- [55] Zhu B, Lu Q, Yin J, et al. Alignment of osteoblast-like cells and cell-produced collagen matrix induced by nanogrooves[J]. *Tissue Eng*, 2005, 11(5/6): 825-834.
- [56] Lamers E, Walboomers XF, Domanski M, et al. In vitro and in vivo evaluation of the inflammatory response to nanoscale grooved substrates[J]. *Nanomedicine*, 2012, 8(3): 308-317.
- [57] Pujari S, Hoess A, Shen J, et al. Effects of nanoporous alumina on inflammatory cell response[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102 (11): 3773-3780.
- [58] Chen Z, Ni S, Han S, et al. Nanoporous microstructures mediate osteogenesis by modulating the osteo-immune response of macrophages[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(2): 706-718.
- [59] Chu CY, Deng J, Sun XC, et al. Collagen membrane and immune response in guided bone regeneration: recent progress and perspectives[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2017, 23(5): 421-435.
- [60] Chu CY, Deng J, Hou Y, et al. Application of PEG and EGCG modified collagen-base membrane to promote osteoblasts proliferation[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 76: 31-36.
- [61] Ramazanoglu M, Lutz R, Ergun C, et al. The effect of combined delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and recombinant human vascular endothelial growth factor 165 from biomimetic calcium-phosphate-coated implants on osseointegration [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2011, 22(12): 1433-1439.
- [62] Von Wilmsky C, Moest T, Nkenke E, et al. Implants in bone: part I. A current overview about tissue response, surface modifications and future perspectives[J]. *Oral Maxillofac Surg*, 2014, 18 (3): 243-257.
- [63] Shim DW, Heo KH, Kim YK, et al. Anti-inflammatory action of an antimicrobial model peptide that suppresses the TRIF-Dependent signaling pathway via inhibition of Toll-Like receptor 4 endocytosis in Lipopolysaccharide-Stimulated macrophages[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126871.
- [64] Liu Y, Xia X, Xu L, et al. Design of hybrid  $\beta$ -hairpin peptides with enhanced cell specificity and potent anti-inflammatory activity[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(1): 237-250.
- [65] Veldhuizen EJ, Schneider VA, Agustiandari H, et al. Antimicrobial and immunomodulatory activities of PR-39 derived peptides[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95939.
- [66] Zhou L, Lai Y, Huang W, et al. Biofunctionalization of microgroove Titanium surfaces with an antimicrobial peptide to enhance their bactericidal activity and cytocompatibility[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 128: 552-560.

(编辑 罗燕鸿,曾曙光)