译文

应用明胶衍生物和重组人血小板衍生生长因子-BB 复合物的酶促水凝胶促进大鼠胫骨缺损的骨再生

Bone Regeneration of Tibial Defects in Rats with Enzymatic Hydrogelation of Gelatin Derivative and Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB Complex

Daisuke K, Yoichiro O, Yasunori A, Shinji S, Koei K, Kiyoshi K

原载　Int J Oral Maxillofac Implants, 2013, 28:1377-1385.（英文）

周鹏飞[1]　吕晶露[2]　译　　林敏魁[1]　闫福华[2]　审

摘　要

目的：评估以含有酚羟基基团的明胶衍生物（gelatin—Ph）作为一种运输载体，负载重组人血小板衍生生长因子 —BB（rhPDGF—BB）用于促进骨再生的性能。**材料和方法：**通过分析 gelatin—Ph 凝胶或胶原蛋白中生长因子释放曲线，来评估 gelatin—Ph 作为载体的性能。选用大鼠骨髓基质细胞（RBMCs）进行体外实验，研究 gelatin—Ph 的生物相容性（即细胞在明胶中的生存率、形态以及增殖情况）。为了研究 gelatin—Ph 凝胶和 rhPDGF—BB 复合物对骨形成的影响，以该复合物修复鼠胫骨缺损后，制作不脱钙标本切片，并进行组织学分析。**结果：**在前 30d 内，几乎检测不到从 gelatin—Ph 凝胶释放出的 rhPDGF—BB，但是在试验第 31 天添加蛋白酶诱导后，能够检测到释放出的 rhPDGF—BB。RBMCs 在凝胶中的生存率及其在胶板上的形态和增殖情况在两组之间无明显差异。组织学分析表明，在实验第 2 周和第 4 周时，这种复合物对骨形成和矿化均有促进作用。**结论：**这些结果提示 gelatin—Ph 凝胶可以作为一种理想的载体，以 gelatin—Ph 负载 rhPDGF—BB 进行局部给药能够促进骨形成。

关键词　骨再生，药物释放系统，生长因子，水凝胶，重组人血小板衍生生长因子 —BB

译者单位　[1] 福建医科大学附属口腔医院
福建省福州市鼓楼区杨桥中路 246 号　350002
[2] 南京大学医学院附属口腔医院
南京市玄武区中央路 30 号　210008

1 引言

骨再生是一个新兴生物医学领域，特别是在牙周治疗和牙种植方面。多种生物材料，如自体骨移植物或异体骨移植物以及膜技术已经被用于促进牙周围及拔牙窝的骨再生。自体骨移植物是一种理想的基质材料，可以提供成骨细胞，骨诱导性支架和生物活性分子（Misch 等，1995）。然而，自体骨来源稀缺，并且可能造成供区损伤，因此需要一种替代材料。在老年人或者合并其他疾病的患者中，这种需求更为强烈。

最近，应用信号分子在局部骨缺损处促进骨形成，已经成为越来越热门的领域。一些动物实验和临床试验的结果显示，多种生长因子有利于局部骨形成（Ogawa 等，2001）。重组人血小板衍生生长因子 -BB（rhPDGF-BB）（GEM215，Osteo-health）是一种重组的生长因子，已经被美国食品药品监督管理局批准使用，并且已经有用于骨再生治疗的商品化产品面世。用它结合骨替代支架来重建丧失的牙周组织和受损的牙槽嵴的疗效已经在临床得到了广泛验证（Lynch 等，2006）。

对药物释放系统（DDS）而言，在愈合或再生过程中维持局部充足的药物浓度是很重要的（Tabata 等，2003）。目前，商品化的 rhPDGF-BB 是和 β- 磷酸三钙（β-TCP）联合使用的。虽然二者联合使用能够成功地在牙槽嵴重建、上颌窦提升术和牙周组织再生等临床应用中诱导骨形成，但是先前的研究表明 rhPDGF-BB 从 β-TCP 颗粒中释放的速度较快，并且释放后生化性质没有改变（Young，2009）。因此，需要予以高浓度的 rhPDGF-BB，或者追加用量，治疗费用会相对昂贵。从治疗方法和成本—效率需要来看，应该开发一种更有效的方法。迄今为止，有许多种材料被用作药物载体（Kimoto 等，1998）。明胶（胶原蛋白部分水解得到的一种天然聚合物）由于其在体内环境中具有良好的生物降解性和生物相容性，被普遍用于医药领域（Ikada 等，1998）。

2009 年，学者发现明胶衍生物被过氧化物酶催化反应后具有凝胶的性质，并且报道了明胶和盐酸酪胺可以通过碳二亚胺介导明胶的羧基和酪胺的氨基缩合反应，从而结合在一起（Sakai，2009）。据此，首先要合成含有酚羟基（Ph）基团的明胶粉末（gelatin-Ph），然后通过添加辣根过氧化物酶（HRP）和 H_2O_2 溶液到 gelatin-Ph 溶液中，就可以得到 gelatin-Ph 凝胶。这种凝胶化过程比其他传统的凝胶化过程的毒性更低（Lee 等，2001）。之前的研究也表明这种载体在体外（鼠成纤维细胞 L929）和体内（皮肤组织）具有良好的生物相容性，对周围组织的机械刺激性低。基于这些研究的数据，该载体材料在骨再生治疗中可能有较好的应用前景，但是对 gelatin-Ph 作为载体的性能研究，比如生长因子在凝胶中存留的时间，其携带某一具体的生长因子对组织再生的促进作用，还未见文献报道。

本研究的目的是评价 gelatin-Ph 在体外作为载体负载 rhPDGF-BB 的能力，并通过组织学和骨计量学检测，观察其在体内促进骨再生的效果。

2 材料和方法

需要用到如下材料：带负电荷明胶（来源于牛皮肤的 B 型明胶，225 Bloom）和盐酸酪胺（购自 Sigma Aldrich）。1- 乙基 -3-(3- 二甲基）碳二亚胺盐酸盐（EDC）（购自 Peptide Institute）。HRP（170U/mg）和 N- 羟基磺酸琥珀酰亚胺（NHS）（购自 Wako）。质量百分浓度（w/w）为 30% 的 H_2O_2 水溶液（购自 Kanto Chemicals）。重组人 PDGF-BB（rhPDGF-BB）（购自 Pepro Tech）。用于测定 rhPDGF-BB 释放水平的酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（即用型 PDGF-BB 免疫检测）（购自 R&D Systems）。SD 大鼠（购自 Kyudo）。用于细胞培养的 α-MEM 培养基和胎牛血清（购自 Gibco）。用于检测细胞活性的荧光双染色试剂盒（Cellstain）（购自 Dojindo）。

2.1 明胶

本研究中，按之前介绍的方法（Sakai，2009）制备含有 Ph 基团的明胶衍生物（gelatin-Ph）。简单来说，首先将带负电荷的明胶溶解于 50 mmol/L 吗啉乙磺酸(MES)水溶液(pH 6.0)。之后，依次加入盐酸酪胺、NHS 和 EDC 并在 25℃搅拌 12h。每 100ml MES 水溶液中明胶、盐酸酪胺、NHS 和 EDC 的含量分别是 2g、1g、0.22g 和 0.74g。然后用去离子水对该溶液进行透析，并采用冷冻真空干燥法获得 gelatin-Ph 粉末，该明胶粉末中 Ph 基团的浓度为 1.247×10^{-4}mol Ph/g。gelatin-Ph 水凝胶的制备过程如下：先将质量—体积浓度（w/v）为 3.0% 的 gelatin-Ph 粉末溶解于磷酸盐缓

冲液（PBS，pH 7.4）中，然后加入 10U/ml 的 HRP 充分混匀，最后再加入 5mmol/L H_2O_2 溶液进行凝胶化反应。这种合成的 gelatin–Ph 水凝胶性质比较稳定，即使加热到 37℃也不会发生凝胶—溶胶转变。

2.2　生长因子存留曲线的比较

为了研究生长因子在 gelatin–Ph 胶中的存留情况，首先将 160ng rhPDGF–BB 加到含 HRP 的 gelatin–Ph 溶液（40μl）中。然后加入 H_2O_2 溶液进行凝胶反应后，生成含有 rhPDGF–BB 的 gelatin–Ph 水凝胶。将该复合物浸入 10ml PBS，每 2 天换液，ELISA 法测定浸泡液中 rhPDGF–BB 的释放水平。在第 30 天，将 PBS 更换为 10ml 含木瓜蛋白酶（浓度为 5mg/ml）的 PBS，这种蛋白酶可以促进凝胶降解。另外，为了评价该载体材料中生长因子的存留性能，同时以胶原蛋白（AC）这种传统的载体进行对照实验，ELISA 法测定 rhPDGF–BB 的释放水平，进行对比评价。每个样本均进行重复检测，结果用平均值表示。

2.3　细胞培养

本文中采用的动物研究实验方案得到九州大学动物研究委员会批准。如前所述，按照相关文献中的操作流程（Ogino 等，2005），在无菌条件下从 4 周的雄性 SD 大鼠的胫骨中分离大鼠骨髓基质细胞（RBMCs）。去除胫骨两侧骺端，用注射器吸取 α–MEM 培养基冲洗骨髓腔，收集冲洗液（骨髓）。离心后，弃上清，以含 15% FBS 的 α–MEM 培养基重悬细胞。按每毫升 2.0×10^6 个的密度将细胞接种于培养板中孵育培养。每 48 小时更换培养基，直至细胞融合成片。

2.4　体外细胞亲和性评价

为了评价凝胶化过程对 RBMCs 活力的影响，将 gelatin–Ph 溶液和经胰蛋白酶消化后的 RBMCs（密度为每毫升 2.0×10^5 个）与 HRP 和 H_2O_2 混合。将该混合物倒入到 24 孔板的各孔中。培养 12h 后，收集各孔凝胶，并按照荧光双重染色试剂盒（Cellstain）的说明书对其进行染色，从而评估细胞活力。检测试剂包括钙黄绿素 AM 和碘化丙啶溶液，分别能够对活细胞和死细胞染色。将准备好的细胞悬液与检测试剂混合，于 37℃环境孵育 15min 后，在荧光显微镜下观察。随机选取 5 个荧光显微镜视野区域，每个区域至少包含 150 个细胞，分别对活细胞（染成绿色，图 1a）和死细胞（染成红色，图 1b）进行计数（和），从而评价凝胶包被对细胞活性的影响。对每个样本的计数操作均重复 3 次（即每个样本选择 15 个区域），结果用平均值表示。

2.5　体内骨形成的效果

选用 40 只 10 周龄的雄性 SD 大鼠。以盐酸氯胺酮进行全身麻醉和局部麻醉，切开皮肤并暴露出两侧胫骨干骺端的内侧面。按照相关文献所述的操作流程（Ayukawa，2009），使用牙钻（配合生理盐水冲洗）在鼠胫骨上制备约 2mm×5mm 大小的人工骨缺损。为了比较不同处理对缺损处骨形成过程的影响，对照组和实验组的大鼠（每组 5 只，即 10 个骨缺损位点）按照如下方式进行分组处理：①无其他处理（只进行骨缺损造模，D 组）；②仅予以 gelatin–Ph 凝胶（40μl，G 组）；③仅予以 rhPDGF–BB 溶液（40ng/μl，即每个缺损

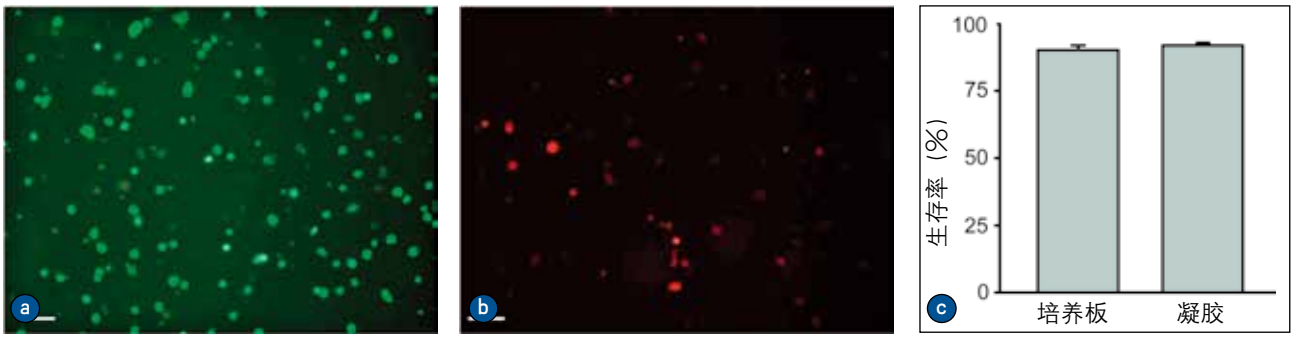


图 1　RBMCs 在 gelatin–Ph 凝胶中或者塑料培养板上培养 12h 后。a. 活细胞荧光显微图像（标尺 =50μm）；b. 死细胞荧光显微图像（标尺 =50μm）；c.RBMCs 在培养板上和 gelatin–Ph 凝胶中的生存率比较，没有观察到显著差异

1.6μg，P 组）；④予以 gelatin–Ph 凝胶和 rhPDGF–BB 复合物（40ng/μl，每个缺损 1.6μg，GP 组）。制备 gelatin–Ph 凝胶和 rhPDGF–BB 复合物时，首先将 gelatin–Ph 溶液、rhPDGF–BB 以及 HRP 等度混合，然后加入 H_2O_2 溶液进行凝胶反应。制备好的骨缺损模型以无菌生理盐水冲洗后，按照各组处理条件，分别单独注入 gelatin–Ph 凝胶、rhPDGF–BB 溶液或者 gelatin–Ph 凝胶和 rhPDGF–BB 复合物，随后缝合切口。2 周或 4 周后，对实验动物实施安乐死，并制取骨缺损处组织标本。去尽胫骨表面软组织，将其置于由 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液（pH7.4）稀释配成的 5% 戊二醛和 4% 多聚甲醛固定液中进行固定。固定好后，将标本置于梯度乙醇中（50% ～ 100%）进行脱水，并以甲基丙烯酸甲酯进行包埋。对脱钙后骨组织进行切片时，应平行于胫骨（含有骨缺损模型的）长轴。使用 Masson 三色法对组织切片进行染色，并在光镜下拍摄图像。

2.6　组织形态学测量

对每个骨缺损位点的标本切片均进行组织形态学分析。缺损的边界即手术制备的骨壁。按照图 2 描述的方法计算每个缺损区域的新骨生成率，具体面积计量操作采用 ImageJ 1.62（US National Institutes of Health）软件进行。

2.7　统计分析

所有数据均表示为平均值 ± 标准差（SD）。采用 Student t 检验对比分析凝胶化过程对细胞生存率的影响。采用 Bonferonni 校正的多重比较法对各组别中标本的组织学测量数据进行统计分析（$P<0.05$）。

3　结果

3.1　gelatin–Ph 和 AC 中的 rhPDGF–BB 呈连续性释放

如图 3 所示，rhPDGF–BB 从 gelatin–Ph 凝胶和 AC 中连续性地释放。Gelatin–Ph 能够较好地携载 rhPDGF–BB，而 AC 中的 rhPDGF–BB 则在前 4d 中就很快地扩散流失了。在第 31 天加入木瓜蛋白酶后，gelatin–Ph 中释放出大量的 rhPDGF–BB，AC 中也释放出较高水平的 rhPDGF–BB，但是远不及 gelatin–Ph 中的释放量。

3.2　体外培养的细胞在 gelatin–Ph 凝胶化过程中的亲和性水平

细胞亲和性实验可以通过染色法区别活细胞（绿色）和死细胞（红色）（图 1a 和 1b）。培养在 gelatin–Ph 凝胶中或培养板上的 RBMCs，其生存率分别为 92.2%±0.68% 和 90.4%±1.65%（图 1c）。两者没有显著性差异。

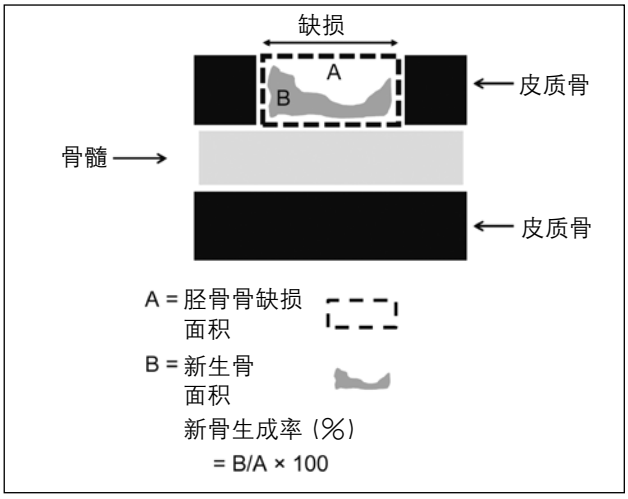


图 2　新骨生成率计算方法

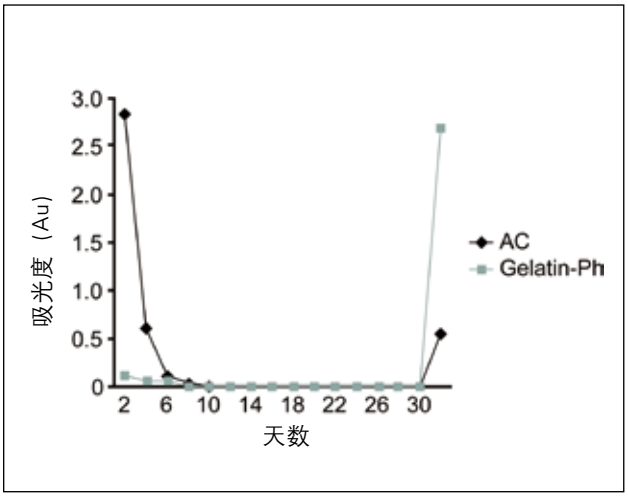


图 3　gelatin–Ph 凝胶和 AC 中的 rhPDGF–BB 释放至 PBS 溶液中的时间—浓度曲线（共 31d）。rhPDGF–BB 的释放量由 ELISA 来测定

RBMCs 接种在 gelatin–Ph 胶板或培养板后，均贴壁良好，4h 后伸展（图 4a 和 4d）。接种 24h 后，RBMCs 的数量逐渐增多（图 4b 和 4e）；96h 后，两组细胞都已经长满汇合（图 4c 和 4f）。但是，gelatin–Ph 胶板上的细胞伸展形态似乎比培养板上的细胞更多样。

3.3　骨缺损的组织学观察结果

D 组：在 D 组实验 2 周后所取的标本中，90% 的标本骨缺损区域内新生骨尚未完全形成。在原有的骨壁相邻处和髓腔内可观察到新生骨。这些新生骨区域基本被染成红色的类骨质所占据（图 5a）。在实验 4 周后所取的标本中，有 40% 的标本在骨缺损处可见不完全的骨再生，同时，有 60% 的标本新生骨质已展现出连续性，但是仍比原胫骨的骨质薄弱（图 5b）。就骨质而言，被红染的新生骨尚未完全矿化。

G 组：G 组实验 2 周或 4 周后，组织学检查结果与 D 组类似。在第 2 周，90% 的标本骨缺损区域内新生骨尚未完全形成，并且大多数新生骨均为类骨质，与 D 组结果相似（图 5c）。而在第 4 周时，50% 的标本新生骨质已展现出连续性，此时所有标本中的新生骨均由类骨质和矿化骨共同组成（图 5d）。在部分标本还可见残余的 gelatin–Ph 凝胶（图 5e）。

P 组：P 组以可溶性的 rhPDGF–BB 进行处理，但是没有促进更多的新生骨形成，与 D 组和 G 组的组织学检查结果相似。在第 2 周，70% 标本骨再生尚未完成（图 5f）；30% 标本的骨缺损已完全修复。本组的再生水平稍高于 D 组和 G 组。在第 4 周，60% 标本的骨缺损充满新生骨（图 5g）。该结果与 D 组和 G 组相似，并且三个组的新生骨质量没有显著差异。

GP 组：相比其他组，GP 组骨形成水平更高。在第 2 周，60% 的标本骨缺损处已完全修复（图 5h）。新生骨的结构比其他三组更厚，但是矿化程度仍不明显。在第 4 周，大多数标本的骨缺损均被新生骨完全充满并且矿化程度增强，但是新生骨的结构仍然比原先胫骨薄弱（图 5i）。与 G 组相似，在该组标本中也可见残余的 gelatin–Ph 凝胶（图 5j）。

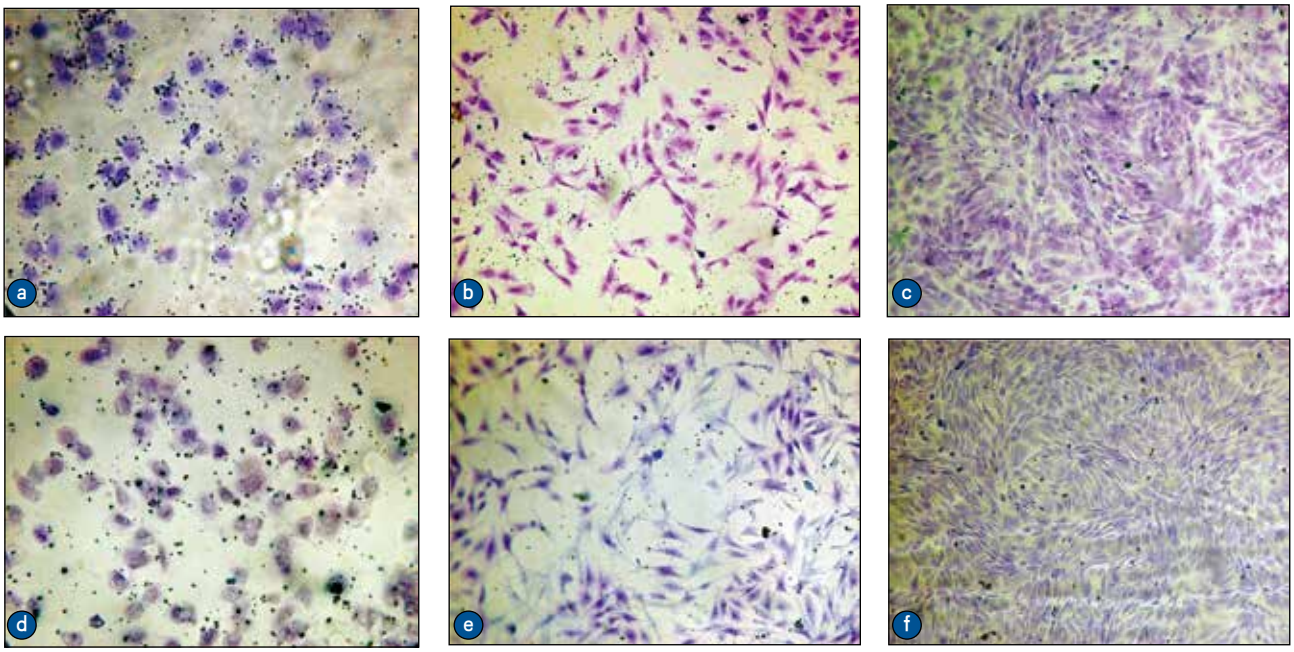


图 4　RBMCs 培养于凝胶上（a）4h、(b）24h、(c）96h，以及在培养板上（d）4h、(e）24h、(f）96h 的显微照片（甲苯胺蓝染色，标尺 =100 μm）

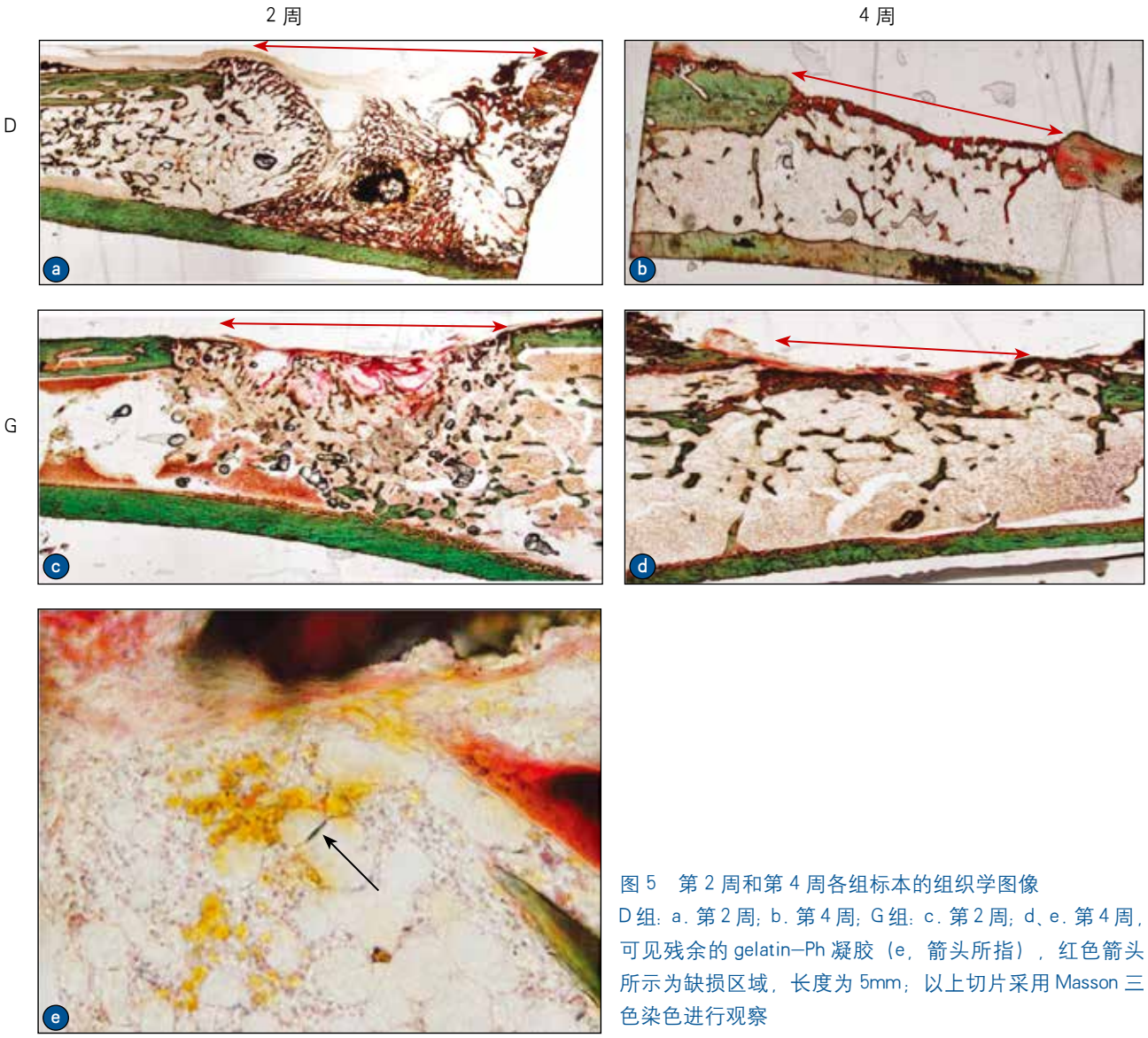


图 5　第 2 周和第 4 周各组标本的组织学图像
D 组：a. 第 2 周；b. 第 4 周；G 组：c. 第 2 周；d、e. 第 4 周，可见残余的 gelatin—Ph 凝胶（e，箭头所指），红色箭头所示为缺损区域，长度为 5mm；以上切片采用 Masson 三色染色进行观察

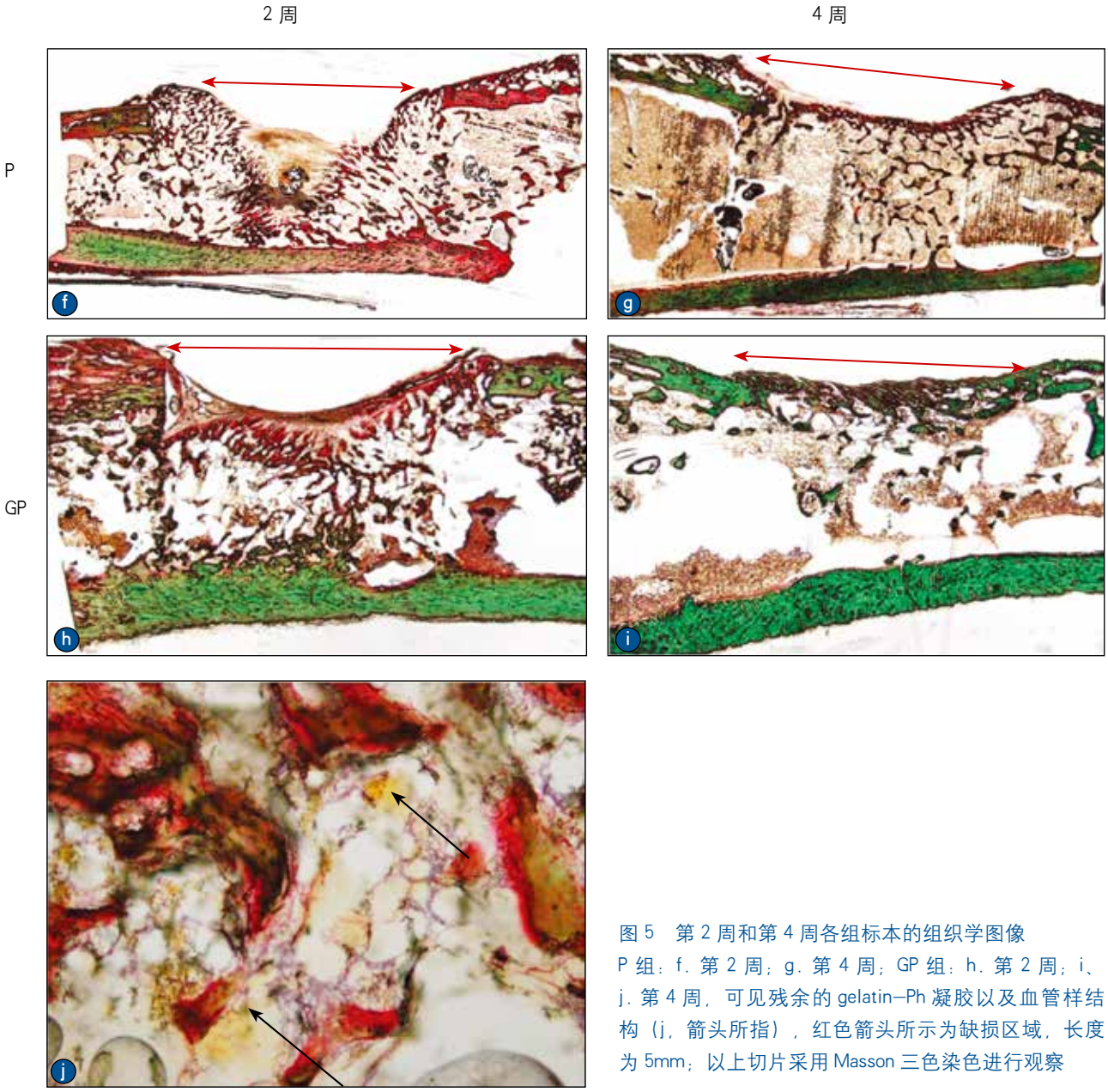
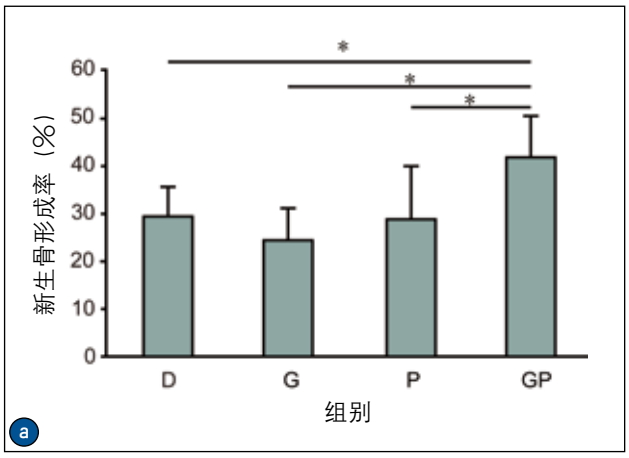


图 5　第 2 周和第 4 周各组标本的组织学图像
P 组：f. 第 2 周；g. 第 4 周；GP 组：h. 第 2 周；i、j. 第 4 周，可见残余的 gelatin–Ph 凝胶以及血管样结构（j，箭头所指），红色箭头所示为缺损区域，长度为 5mm；以上切片采用 Masson 三色染色进行观察

3.4　组织形态学分析

图 6a 和 6b 分别显示了第 2 周和第 4 周各组骨缺损区域中的新生骨形成率，在表 1 中对其进行了汇总。组织形态学分析结果显示，在第 2 周和第 4 周时，GP 组的骨缺损区域新生骨形成量显著高于其他各组（$P<0.05$），而在 D 组、G 组和 P 组之间，新骨形成量没有显著性差异。



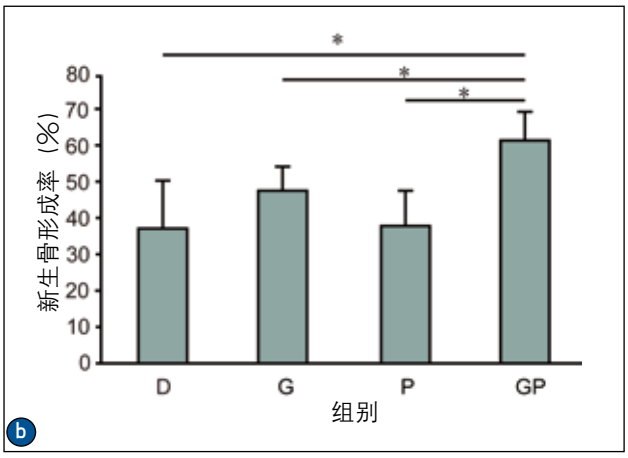


图 6　胫骨缺损区域内的新生骨形成率的结果。GP 组在（a）第 2 周和（b）第 4 周的新生骨形成率与其他各组相比，差异具有统计学意义（采用 Bonferroni 多重比较检验，*P<0.05）

表 1　新骨形成率［平均值 ± 标准差（%），n=10/ 组］

观察时间	D 组	G 组	P 组	GP 组
第 2 周	29.6 ± 5.8	24.2 ± 6.7	29.1 ± 10.8	42.0 ± 8.4
第 4 周	37.1 ± 12.9	47.7 ± 6.8	38.0 ± 9.9	61.4 ± 8.3

4　讨论

得益于重组技术的快速发展以及细胞因子和生长因子大规模生产的可行性，最近，某些生长因子的应用逐渐被纳为许多组织工程治疗策略。首先，rhPDGF-BB 具有促进牙周组织再生的作用，并且已经广泛应用于牙周治疗和种植手术中（Lynch 等，2006）。联合 rhPDGF-BB 与 β-TCP 基质的骨修复材料已经面世。然而，先前的研究显示 rhPDGF-BB 从 β-TCP 中释放的速度很快，当材料被植入鼠模型 72h 后，rhPDGF 蛋白几乎全部释放（Young，2009）。为了维持有效的 rhPDGF-BB 治疗浓度，不得不提高给药剂量或者增加给药次数。如此，该生物材料的使用成本将大大提高，应用价值也随之降低。水凝胶因其良好的生物相容性和对周围组织机械刺激较低等特性，作为一种良好的载体被广泛地使用（Ikada 等，1998），但是在临床应用中，必须要经过交联反应才能得到凝胶体。戊二醛和碳二亚胺是化学交联反应中常用的催化剂。然而该过程往往会导致生长因子生物活性减低。本课题组于 2009 年首次报道了一种携带 Ph 基团的改良凝胶材料（gelatin-Ph），并详述了其材料学特点，如凝胶化时间以及对于哺乳动物细胞的生物相容性等（Sakai，2009）。通过这些分析研究，我们论证了 gelatin-Ph 作为 DDS（药物释放系统）的应用前景。基于这些研究背景，本实验将 gelatin-Ph 凝胶作为 rhPDGF-BB 的载体，并进一步研究这种复合材料在体内、体外对骨再生的作用。

就生长因子的存留时效而言，作为对照载体的 AC 在实验前 4 天时，其中的 rhPDGF-BB 就已经大量释放，而 gelatin-Ph 凝胶却能在实验全程中稳定地携载 rhPDGF-BB。即使浸泡于 PBS 中，gelatin-Ph 明胶仍然能够保持 rhPDGF-BB 不流失，这得益于该材料的电荷特点。rhPDGF-BB 表面携带正电荷，而 gelatin-Ph 的前体是携带负电荷的可生物降解聚合物。从理论上来说，rhPDGF-BB 能够与该聚合物发生静电结合，从而保证 rhPDGF-BB 机械固定于 gelatin-Ph 凝胶上（Tabata，2003）。本研究中，直到加入蛋白酶使胶体降解时才检测到释放的 rhPDGF-BB。该现象提示：可以通过在指定位点注射血清蛋白酶启动原位凝胶的降解过程，从而介导特异位点生长因子的释放。因此载体材料的药物释放曲线可能与其降解效率相关。

本研究在体外实验中分析了氧化物酶催化的凝胶化反应对胶体生物安全性的影响以及该材料本身的生

物相容性。通常，为了避免凝胶溶解，需要通过使用戊二醛和碳化二亚胺进行化学交联反应，但是这些化学物质不仅会抑制细胞活性，还会影响原位凝胶化过程（Lee 等，2001）。相反，本实验的研究对象——gelatin-Ph，是通过过氧化酶启动凝胶化过程，因此毒性较低，并且整个凝胶化过程只需 10s。基于以上生物学特点，该凝胶材料可能在原位凝胶化和 DDS 等多种生物医学领域中得到广泛应用。

在体内试验中，植入了 gelatin-Ph 凝胶和 rhPDGF-BB 复合物后，缺损处的骨形成量显著提高，而单独予以 gelatin-Ph 凝胶或 rhPDGF-BB 的 G 组和 P 组，缺损处的骨形成率与无处理的 D 组无显著差异。这些结果提示：gelatin-Ph 凝胶和 rhPDGF-BB 复合物对胫骨缺损处的骨再生过程确实有促进作用。而单独使用 gelatin-Ph 或 rhPDGF-BB 溶液无此促进作用。我们通过组织学观察发现，以上两组的骨形成水平与 D 组相似，因此，就这两种材料本身而言，他们对天然的骨形成过程并没有不良影响。这些研究结果也表明，gelatin-Ph 凝胶本身以及其凝胶化过程在体内环境均具有良好的生物安全性。虽然在体外条件下，gelatin-Ph 凝胶直到降解后才能释放 rhPDGF-BB，但在体内环境中，gelatin-Ph 凝胶在实验第 2 周和第 4 周均有发生了降解，并可见残余胶体。该药物缓释系统的生长因子释放曲线主要取决于凝胶的降解曲线。在此之前，也有类似的体内试验以化学交联凝胶作为载体，研究分析了其释放曲线的特点。在体内环境中，rhPDGF-BB 可快速地从 β-TCP 中释放（Young，2009），但水凝胶能持续、可控地释放生长因子，并且该缓释速率可以通过调节材料的含水量和凝胶交联程度进行控制。虽然本研究没有直观显示在体内环境中 rhPDGF-BB 从 gelatin-Ph 释放的过程，但研究结果提示：凝胶分子在静电作用下可以牢固地结合蛋白质分子，这为长期缓释生长因子提供了可能，因此该材料可作为理想的 DDS 载体。该携载性能远胜于 β-TCP，应用价值更大。此外，本研究还通过 Masson 三色染色法对所有标本的骨矿化程度进行对比分析，从而研究各处理组中新生骨的质量。gelatin-Ph 凝胶和 rhPDGF-BB 复合物能够促进骨矿化。导致这种促进过程的可能机制同样可能刺激新生血管形成（Yamamoto 等，2003）。本研究中，在 GP 组中观察到新生血管形成（图 5j），后者可能是骨矿化过程的调控关键。

在本研究中，rhPDGF-BB 的给药剂量（0.04 μg/μl）比之前的研究和目前临床应用的给药剂量范围（大约 0.3 ~ 1.0 μg/μl）更低（Nevins 等，2005）。然而，以 gelatin-Ph 凝胶和 rhPDGF-BB 复合物处理 4 周后，该组所有标本中都观察到了完全的骨愈合。这归功于良好的给药载体——gelatin-Ph 凝胶。尽管还应当全面地评估其他复合材料的性能以及不同 rhPDGF-BB 给药剂量的作用效果，但从目前的研究结果已经可以看出该复合材料的效能。

除了具备良好的生物相容性，并能稳定地结合生长因子，该凝胶材料的低成本特点以及凝胶制备易控制的特性都有利于临床应用。当负载了 rhPDGF-BB 的 gelatin-Ph 材料处在凝胶化的过程中时，它能够顺利地被注射到结构复杂的治疗位点中。尽管在临床应用前还需要对其进行更深入的研究，gelatin-Ph 凝胶和 rhPDGF-BB 复合物未来很可能会成为牙周再生和种植治疗中移植材料或膜材料的替代选择。

5 结论

本研究首次对 gelatin-Ph 凝胶这种酶促交联凝胶化材料作为 DDS 载体的效能进行全面评价，并着重探讨了该材料的生长因子携载性能和生物相容性。而且，gelatin-Ph 凝胶和 rhPDGF-BB 复合物的应用能够在降低 rhPDGF-BB 给药剂量的前提下，促进大鼠胫骨缺损处的骨形成。接下来需要进行更深入的研究来分析以上结果，特别是探究凝胶和生长因子的最佳剂量，为今后临床应用打下基础。

6 致谢

本文作者之间没有利益冲突。