

多孔 β -TCP 用于构建长骨组织的实验研究

祝 联 袁 捷 王 敏 陈付国 周广东 崔 磊 刘 伟 曹谊林*

(上海第二医科大学附属第九人民医院整形外科 上海市组织工程中心, 上海 200011)

摘 要 探索新型的多孔 β -磷酸三钙(β -TCP)作为组织工程骨支架材料的应用效果。分别应用单纯 β -TCP(对照组)和骨髓间质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs) β -TCP 复合物(实验组)修复狗尺骨 2cm 的骨缺损, 术后通过 X 光片、核素扫描、大体观察和组织学观察判断长骨骨缺损的修复效果。X 片观察 3 月时, 实验组尺骨缺损由内植物较好的桥接, 内植物边缘模糊, 管腔及内植物与缺损断端之间有新生骨形成, 对照组尺骨缺损处的内植物明显变形, 出现密度不均的裂解颗粒, 其与缺损断端连接处有新生骨形成。6 月时, 实验组尺骨缺损被伴有骨髓腔的新生骨连接, 有皮质骨形成, 对照组尺骨缺损被高密度影连接, 没有骨髓腔和明显皮质骨形成, 尺骨远端直径明显细于实验组。核素扫描的延迟相骨显像: 1 月和 2 月时两组之间有显著性差异, 3 月时两组之间无显著性差异。大体观察 3 月时可见, 对照组尺骨直径明显小于实验组, 实验组的骨缺损处新生骨的体积明显大于对照组, 对照组的内植物周围有纤维组织紧密包裹, 难于分离。6 月时可见, 实验组新生骨色泽红白相间, 明显已被塑形, 对照组新生骨体积、形状不完整。HE 观察 3 月时, 实验组 β -TCP 的孔隙中, 可见新生骨在表面贴附生长, 对照组 β -TCP 的孔隙中有类骨质形成, 充填着大量核深染的巨核细胞和毛细血管。6 月时, 两侧的 β -TCP 都完全消失, 都有新生骨形成, 但对对照组新生骨量和骨结构明显差于实验组。复合骨髓基质干细胞的多孔 β -TCP 能够修复长骨骨缺损。

关键词 支架材料, 多孔 β -TCP, 骨髓基质干细胞, 细胞培养, 组织工程

中图分类号 Q318.08 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0561-07

数十年来, 钙磷陶瓷一直是广泛应用的骨替代材料, 具有良好的生物相容性和传导成骨的作用^[1,2], 但由于降解速率很慢, 它们只能在骨缺损局部与新骨混合掺杂, 因而常用的钙磷陶瓷并不完全符合骨组织工程支架材料的基本要求。本研究采用法国地中海大学研制的一种可完全降解的多孔 β -磷酸三钙(β -TCP)陶瓷材料复合骨髓基质干细胞构建的组织工程化骨, 修复狗尺骨标准缺损, 探讨该种 β -TCP 对长骨缺损的修复效果及其潜在的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 狗骨髓基质干细胞的获取、诱导与分化培养

麻醉成功后, 18 号骨穿针于股骨大粗隆处穿刺, 抽取骨髓 5mL, 置于肝素化的注射器中。加入含有地塞米松(10^{-8} mol/L, Sigma) β -磷酸甘油钠(10mmol/L, Sigma)和抗坏血酸(50 μ mol/L, Sigma)的

DMEM 成骨条件培养液, 制成细胞悬液, 按 1×10^6 / cm^2 有核细胞的密度接种于培养皿, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的孵育箱培养。5d 后首次换液, 使用 DMEM 成骨条件培养液继续培养, 以后每 3 天换液 1 次。细胞生长汇合时, 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化, 进行细胞传代, 继续培养扩增传至二代细胞, 备用。

1.2 多孔 β -TCP 陶瓷材料及与细胞的复合

多孔 β -TCP 陶瓷材料制备成 20mm \times (内径 5mm、外径 8mm) 的圆筒状(图 1)和 3mm \times 3mm \times 3mm 的立方体, 超声清洗, 高压蒸汽消毒后备用。用 DMEM 成骨条件培养液将第二代骨髓基质干细胞制成 20×10^6 / mL 的细胞悬液, 注射器滴入多孔 β -TCP, 确保多孔 β -TCP 被细胞悬液浸匀, 且不渗漏, 静置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的孵育箱中 4h 后, 加入 DMEM 成骨条件培养液培养。立方体的 β -TCP-BMSCs 复合物培养 7d 后断面行扫描电镜观察。

收稿日期 2003-11-17, 修回日期 2004-02-24。

基金项目: 国家 973 组织工程基本科学问题基金资助(No. G1999054304); 国家 863 组织工程化骨的构建技术与产品开发基金资助(No. 2002AA20511)。

* 通讯作者。Tel 86-21-63138341 ext 5107; Fax 86-21-63078128; E-mail: cjh@caecy.ac.cn 中国科学微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>



图 1 多孔 β -TCP
Fig.1 Porous β -TCP

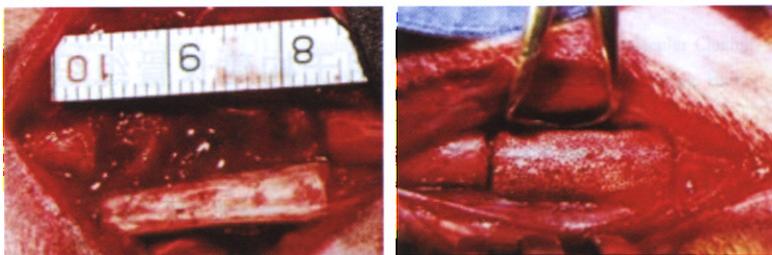


图 2 骨缺损模型的制作及回植物的放置
Fig.2 Model of bone defect and place of implant

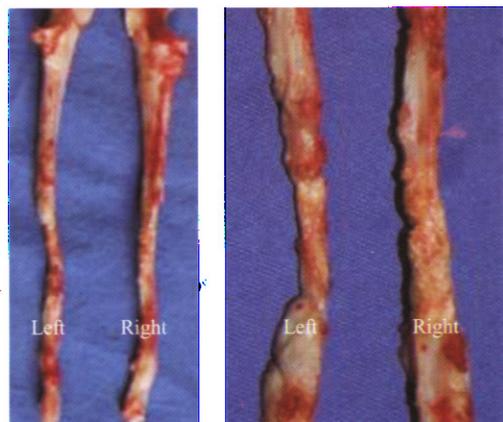


图 4 3月时的大体观察
Fig.4 Gross observation at 3 months



图 5 6月时的大体观察
Fig.5 Gross observation at 6 months



图 6 X片观察
Fig.6 Observation of X-rays

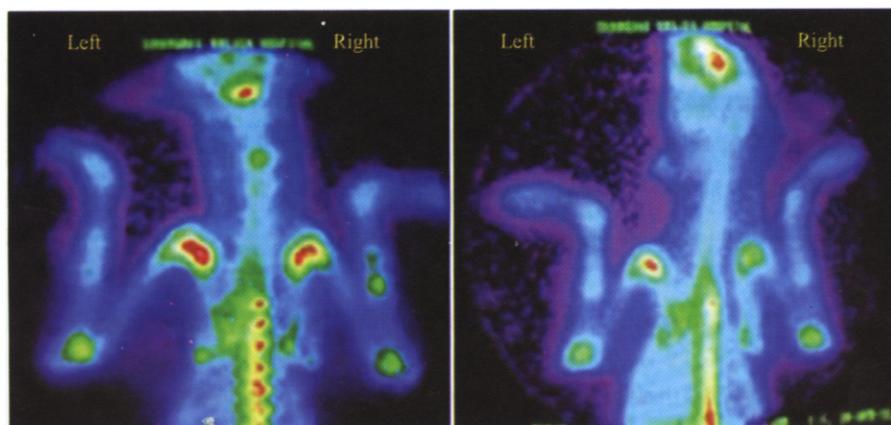


图 7 核素扫描延迟相的骨显像
Fig.7 Appearing of bone in the development pattern through radionuclide

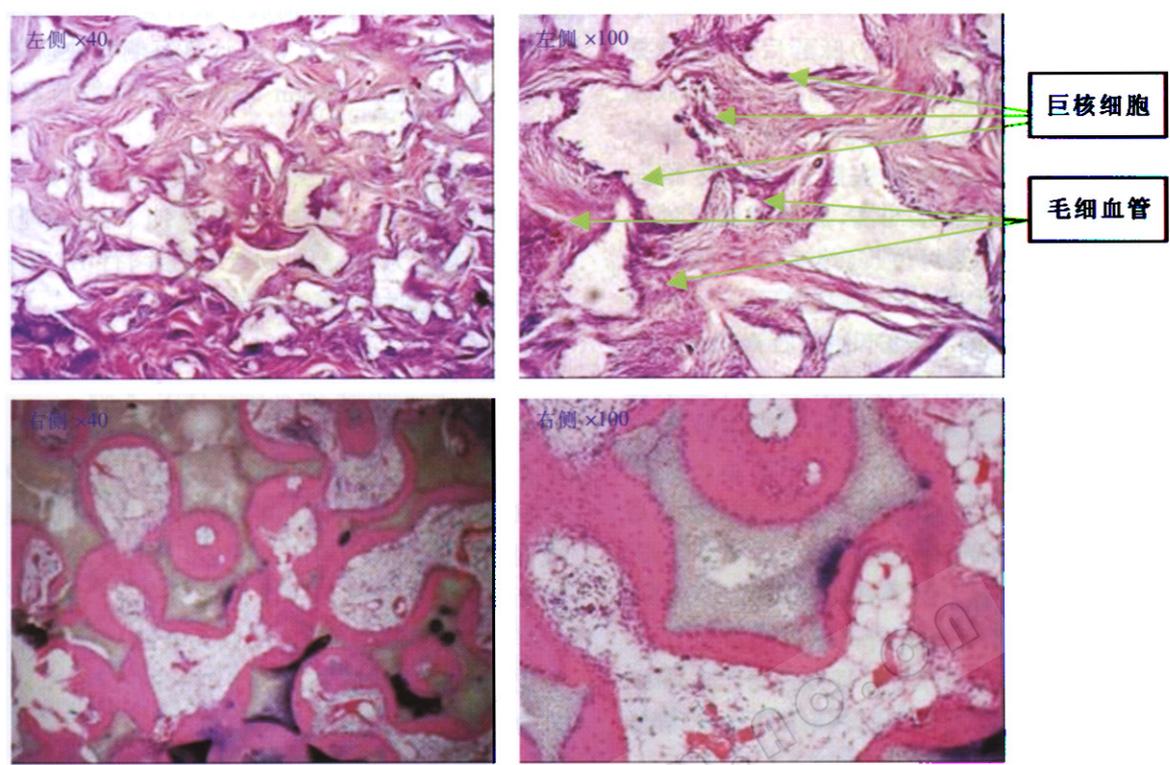


图9 3月时 HE 的表现

Fig.9 HE observation at 3 months

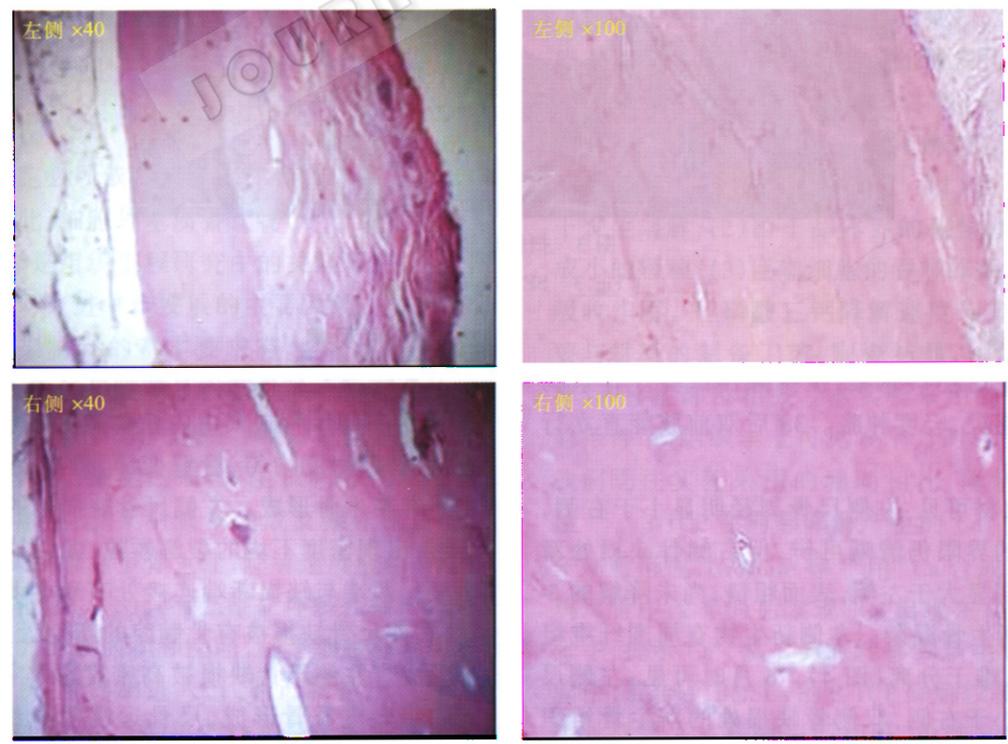


图10 6月时 HE 的表现

Fig.10 HE observation at 6 months

1.3 回植手术过程

8 只成年杂种狗,雌雄不限,体重 14~21kg,平均 17.5kg,肌注氯氨酮(20mg/kg)麻醉后,颈静脉置管静滴,抗生素中抗炎。狗先左侧卧位,右前肢术区备皮,常规消毒、铺巾。沿尺骨嵴切开皮肤、皮下组织,肌间隙暴露尺骨。线锯去除尺骨中段 20mm 的骨皮质和骨膜,生理盐水冲洗,放置圆筒状的 β -TCP-BMSCs 复合物,确保对位、对线良好后(图 2),紧密缝合周围软组织。同法处理左侧尺骨,内植物为单纯的圆筒状 β -TCP。术后不使用石膏固定。狗放回笼内,常规饲养,隔日起青霉素 80 万单位肌注(2 次 \times 3d)。

1.4 观察指标

1.4.1 大体观察 术后观察动物一般情况。处死后观察内植物的成骨和局部反应。

1.4.2 X 片观察 术后 3 月、6 月摄双侧尺骨正位 X 片,观察骨缺损处新骨形成和骨连接情况。

1.4.3 核素扫描 术后 3 月内,每月进行 ^{99m}Tc -MDP 骨显像。检查前 2h,狗氯氨酮肌注麻醉后经股静脉

注射 ^{99m}Tc -MDP18MBq/kg,采用 Sopa media DS7 SPECT 仪,狗俯卧位双前肢平放行延迟相骨显像,采集矩阵 256 \times 256,放大 1.0,计算每侧骨缺损处放射性聚集数 T(ROI) (Region of interest) 计数与双侧 NT 的 T/NT 比值。

1.4.4 组织学观察 3 月和 6 月时,随机各取一只狗的两根尺骨标本经脱钙、浸蜡、透明、石蜡包埋后,连续切片,厚度为 5 μm ,制成组织切片,行 HE 染色,观察新骨形成和材料降解情况。

2 结果

2.1 扫描电镜观察

β -TCP 的孔隙呈圆球形,大小均一,孔径 500 μm ,孔隙率为 75%,圆孔间由 100 μm 的交通孔相接,形成网络样的空间结构。BMSCs- β -TCP 复合物培养 7d 后断面可见骨髓基质干细胞充分伸展,似成纤维细胞样形态,贴附在 β -TCP 的圆孔表面,一些细胞和其分泌的细胞外基质充填于 β -TCP 的孔隙中,占据着部分空间,但没有完全填满(图 3)。

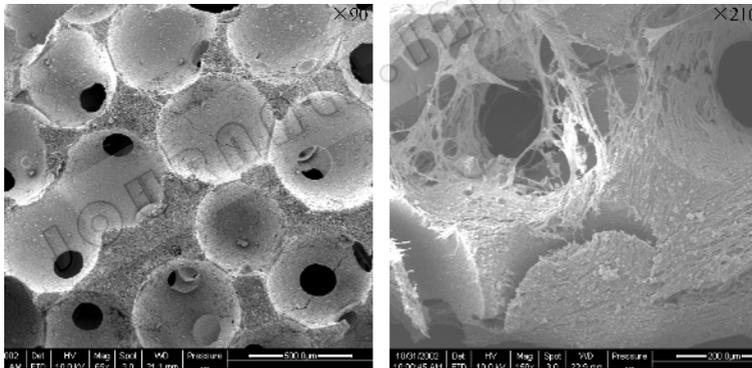


图 3 扫描电镜观察

Fig.3 SEM observation

2.2 大体观察

一只狗术后伤口感染,被排除出试验。其余狗术后伤口无感染,轻度肿胀。3d 后双前肢能直立行走。

3 月时取材可见:左侧尺骨周径明显小于右侧,双侧骨缺损的界限仍清晰可辨,但右侧骨缺损处新生物体积明显大于左侧,表面粗糙,尚未降解的 β -TCP 微粒与新生骨混杂。左侧新生物有周围纤维组织紧密包裹,难于分离(图 4)。6 月时可见:左侧尺骨周径依然小于右侧,双侧骨缺损处的新生骨组织与周围界限都完全消失,右侧新生骨色泽红白相间,明显已被塑形,与尺骨形状相适应。左侧新生骨体积小于右侧,形状不完整,表面仍有软骨痂(图 5)。

2.3 X 片观察

术后当天左右侧尺骨缺损处 X 影像完全相同。3 月时:右侧尺骨缺损由内植物较好的桥接,内植物边缘模糊,密度均匀,管壁变薄,管腔及与缺损断端之间有新生骨形成。左侧尺骨缺损处的内植物明显变形,出现密度不均的裂解颗粒,尤以缺损处中部为明显。两端与缺损断端连接处有新生骨形成。6 月时,右侧尺骨缺损被有骨髓腔的新生骨连接,有皮质骨形成。左侧尺骨缺损被高密度影连接,没有骨髓腔和明显皮质骨形成,尺骨远端明显细于右侧(图 6)。

2.4 放射性同位素测定

核素扫描的延迟相骨显像见图 7。每组 3 个时
 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

间点的 T/NT 比值见图 8, 1 月和 2 月时两组之间有显著性差异 ($P < 0.05$), 3 月时两组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

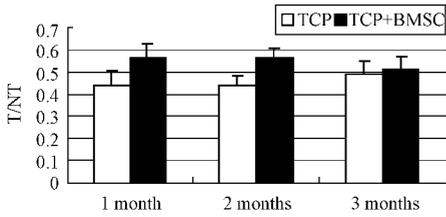


图 8 核素扫描的延迟相 T/NT 值

Fig. 8 T/NT value in the development pattern through radionuclide

2.5 组织学检查

术后 3 月时: 右侧 β -TCP 没有完全降解, 呈细颗粒状分布, 仍保持原有的孔隙结构, 可见新生骨在 β -TCP 孔表面贴附生长, β -TCP 孔隙中充填大量的成骨细胞和网状细胞。左侧 β -TCP 也没有完全降解, 但降解程度似比右侧明显。 β -TCP 孔表面成骨细胞有序排列, 可见有类骨质形成。孔隙中充填着大量核深染的巨核细胞和大量的毛细血管(图 9), 与骨缺损断端相连的 β -TCP 孔隙中可见与右侧相似的组织学表现。术后 6 月时: 两侧的 β -TCP 都完全消失, 都有新生骨形成, 但左侧新生骨量和骨结构明显差于右侧(图 10)。

3 讨论

种子细胞必须依赖于细胞外基质的存在才能发挥功能。因此, 细胞外基质替代物(种子细胞的支架材料)的选择是组织工程研究中的关键环节, 也是限制组织工程研究进一步发展的主要因素。理想的骨组织工程支架材料的基本要求有^[1,3-6] (1)良好的生物相容性: 除满足无毒、无致畸等一般要求外, 还要利于骨种子细胞粘附、增殖, 降解产物对细胞无不利影响, 要有利于细胞的贴附、生长和分化。(2)良好的生物降解性: 支架材料在完成支架作用后应能完全降解, 从而有利于骨重建, 降解速度应与骨组织形成速度相适应。(3)具有三维立体多孔结构: 该结构可提供宽大的表面积和空间, 利于细胞粘附生长, 细胞基质沉积, 营养物进入, 代谢产物排出, 也有利于血管和神经长入。(4)可塑性和一定的机械强度: 支架材料具有良好的可塑性, 可预制成一定形状。具有一定的机械强度, 为新生组织提供力学支撑作用。(5)良好的骨传导性和骨诱导性: 支持骨细胞生

长和功能分化的表面化学性质与微结构, 利于骨细胞爬行; 可与活性蛋白如 BMP 等复合, 共同诱导骨的发生。

目前在既往的骨移植材料基础上, 骨组织工程研究应用的材料主要有^[1,6] (1)生物陶瓷类材料: 羟基磷灰石(HA)、生物活性玻璃陶瓷(BGC)、磷酸三钙(TCP)、双相钙磷陶瓷(HA/TCP, CHA)等。(2)天然细胞外基质材料: 脱钙骨基质、胶原、珊瑚、藻酸盐等。(3)聚合物类材料: 聚乳酸(PGA)、聚乙醇酸(PLA)、聚羟丁酸(PHB)等。(4)复合类材料: 由以上单一材料互相组合形成。在目前, 以上哪一类材料都各有优缺点, 不能完全满足骨支架材料的基本要求。

磷酸三钙的主要成分与人骨的无机成分相似, Ca/P 比率为 1.5, 在大于 800℃ 的高温烧结自然冷却的条件下, 表现为 β -磷酸三钙结构。 β -磷酸三钙具有骨传导作用, 作为骨移植的替代材料已取得良好效果^[7,8], 传统 β -TCP 的多孔结构是由 β -TCP 粉末与可去除的奈烷高温烧结而成, 其产生的空隙率为 35%, 孔径为 100~300 μm , 孔间连接不完全, 导致细胞不能均匀地与其在体外复合, 因而不是一种最理想的骨组织工程的支架材料。换用甲丙烯酸甲脂聚合物做产孔剂, 使得 β -TCP 的空隙率达到 75%, 孔径为 500 μm , 孔间连接率达到 100%^[8]。本实验中的扫描电镜和组织学观察证明了此种多孔 β -TCP 良好的细胞亲和性和组织相容性。

β -TCP 在体内可以完全降解, 这已被大量实验证实, 降解的机理可能有^[9-11] (1)在机体酸碱环境下发生溶解 (2)由于晶体界的化学侵蚀, 物理分裂成小的颗粒 (3)巨噬细胞的吞噬作用及其分泌的酶吸收作用。但磷酸三钙降解速度却有很大差异, 主要与材料的制备工艺、陶瓷结晶、密度(孔径、孔隙率)和移植部位相关。本实验采用的 β -TCP 在本实验条件下, 组织学上可见 6 个月时已完全降解。与我们既往实验采用的珊瑚相比, 降解速度明显减慢^[12]。 β -TCP 在局部降解产生的 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 有利于新骨形成, Gregoire 等^[13]用 ^{45}Ca 合成的 β -TCP 植入鸡尺骨中, 2 个月后发现 ^{45}Ca 出现在 β -TCP 周围的新骨中, 提示 Ca^{2+} 从 β -TCP 转移到新生骨中。在本实验中, 复合了 BMSCs 的 β -TCP 降解较缓慢, 可能与新生骨覆盖了其孔隙表面相关, 单纯 β -TCP 的孔隙中充填了大量肉芽组织和巨噬细胞, 故降解速度相对较快。但有人认为在新骨形成过程中, 成骨活动和破骨活动的进程是相随的, 破骨细胞会加速材料的

分解^[14,15],故而复合了 BMSCs 的 β -TCP 降解应该快于单纯 β -TCP。

在放射性核素骨显像检查中,^{99m}Tc-MDP 通过被骨的无机物(羟基磷灰石)吸附,以及与未成熟的有机物(胶原)结合,从而浓集于新骨形成部位。如果骨代谢功能旺盛,局部血液供应丰富,则摄取的^{99m}Tc-MDP增多,局部放射性计数增加^[16,17]。这对判定组织工程化骨血液供应及血管重建后组织工程化骨的成活、新骨形成代谢情况等均有很好的实用价值及意义。本实验中的^{99m}Tc-MDP 骨显像表明,复合 BMSCs 的 β -TCP 具有较强的成骨能力和血运重建能力,在植入尺骨骨缺损后的前 2 月内,为^{99m}Tc-MDP 摄取高峰期,与单纯 β -TCP 有显著性差异。但在 3 月时两组之间无差异。这可能与 β -TCP 材料自身具有“骨爬行替代”成骨作用相关,3 月时,骨缺损处的成骨细胞以及周围的间充质细胞,已移行到 β -TCP 中,发挥成骨的功能,并且肉芽组织也已长进 β -TCP 中。另外,复合 BMSCs 的 β -TCP 在 2 月内是成骨和血管重建高峰期,3 月以后速度已减慢。虽然^{99m}Tc-MDP 骨显像的特异性低,但较 X 片可以较早地了解观察骨缺损处的骨代谢、血运情况,较直观、可靠。与组织学观察相比更有连接性,且不损耗动物。

Marcus^[3]等认为由于珊瑚在体内 3 个月肯定完全降解吸收,临床应用宜选择降解时间稍长的支架材料,这尚要进行很多的研究和临床试验^[13]。本研究对 β -TCP 复合 BMSCs 构建的组织工程化骨修复长骨缺损进行了初步的探索,证明多孔 β -TCP 能很好地复合骨髓基质干细胞,为这种多孔 β -TCP 的深入研究打下基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] James EF , Charles NC , George FM . Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering . *Orthop Clin North Am* 2000 **31**(3) :357 - 374
- [2] Bobby KB , Vilsa VP , David SB . Calcium sulfate- and calcium phosphate- based bone substitutes . *Orthopedic Clinics of North America* , 1999 **30**(4) :615 - 623
- [3] Marcus FS , John MD , Kenneth DJ . Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model . *Journal of Orthopaedic Research* , 1997 , **15**(1) :844 - 857
- [4] Bruder SP , Baltimore KH , Kraus DVM *et al.* . The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects . *JBJS* , 1998 , **80A**(7) :985 - 999
- [5] Boyan BD , Hummert TW , Dean DD *et al.* . Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response . *Biomaterials* , 1996 **17**(2) : :137 - 146
- [6] Dietmar WH . Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage . *Biomaterials* 2000 **21**(9) :2529 - 2543
- [7] Yuan H , Yang Z , De Bruij JD *et al.* . Material-dependent bone induction by calcium phosphate ceramics : a 2.5-year study in dog . *Biomaterials* , 2001 **22**(19) :2617 - 2623
- [8] Jianxi Lu , Michel D , Jacques D *et al.* . The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone . *J Biomed Mater Res* , 2002 **63**(4) :408 - 412
- [9] Braye F , Irigaray JL , Kallor E *et al.* . Resorption kinetics of osseous substitute : natural coral and synthetic hydroxyapatite . *Biomaterials* , 1996 **17**(13) :1345 - 1350
- [10] Sun JS , Tsuang YH , Yao CH *et al.* . Effects of calcium phosphate bio-ceramics on skeletal muscle cells . *J Biomed Mater Res* , 1997 , **34**(4) :227 - 233
- [11] Frankenburg EP , Goldstein SA , Bauer TW *et al.* . Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement . *JBJS(Am)* , 1998 **80**(8) :1112 - 1124
- [12] Zhu I(祝联) , Cui I(崔磊) , Wang M(王敏) *et al.* . Experimental study of composite of coral and mesenchymal stem cells to repair femoral defect . *Chin J Orthop(中华骨科杂志)* 2003 **23**(8) :483 - 488
- [13] Gregoire M , Orly I , Menanteau J . The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities : an *in vitro* approach . *J Biomed Mater Res* , 1990 , **24**(2) :165 - 177
- [14] Damien CJ , Ricci JL , Christel P *et al.* . Formation of calcium-phosphate rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes . *Calif Tissue Int* , 1994 **55**(2) :515 - 158
- [15] Perry CR . Bone repair techniques , bone graft , and bone graft substitutes . *Clin Orthop* , 1999 **360**(3) :71 - 86
- [16] Nutton RW , Fitzgerald RH , Brown MI *et al.* . Dynamic radioisotope bone imaging as a noninvasive indicator of canine tibial blood flow . *J Orthop Res* , 1984 **2**(1) :67 - 74
- [17] Genant HK . Bone-seeking radionuclides : an *in vivo* study of factors affecting skeletal uptake . *Radiology* , 1979 **113**(6) :373 - 375

Experimental Study of Porous TCP to Generate Tissue-engineered Long Bone

ZHU Lian YUAN Jie WANG Min CHEN Fu-Guo ZHOU Guang-Dong CUI Lei LIU Wei CAO Yi-Lin*

(*Department of Plastic & Reconstructive Surgery, 9th People's Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai Tissue Engineering Center, Shanghai 200011, China*)

Abstract To study bone-forming of a new kind of porous β -TCP as the scaffold for tissue-engineering, defects at the mid-portion of the left and right ulna were created in dog, the defects were repaired with β -TCP cylinder coated with BMSCs, and β -TCP cylinders alone as control. X-rays showed the defects were better bridged by the replant with obscure edge and new bone formed in the canal and at the interface in experimental group after three month of operation, whereas in control group, the replants were obviously deformed into dissociated granule with unequal density with only little new bone formed at the interface. After six month, the defects were bridged by new bone with osteodermtous cavum medullare ossium, but in control group, the defects were bridged by high density in radiography without osteodermtous cavum medullare ossium, the diameter of the ular was obviously less than experimental group. There were significant differences between both groups at month one and two in the development pattern through radionuclide observation. By gross, the diameter of ular was smaller in control group than in experimental at month three, and the replants in control group was difficult to detach from the fibroid tissue around it, but in experimental group, there was much more new bone formation, and the surface was rough for the compound of new bone and β -TCP undegraded completely. The new bone in experiment had been obviously remodeled at month six, but at this moment, the new bone was of infirmity in volume and form. HE staining of three months demonstrated new bone adhered to the surface on the core of β -TCP in experimental group, but in control group, at the same place, osteoid was observed with much megacayocytes and capillaries. At month six β -TCP disappeared completely with new bone formed in both groups, but the volume and structure of the bone was better in experimental group than in control group. From this study it is concluded that the porous β -TCP can be combined with BMSCs, and the combination could generate new bone to repair long bone defect.

Key words scaffold, β -tricalciumphosphate, tissue engineering, cell culture, bone marrow stromal cells

Received: 11-17-2003

This work was supported by Grants from 973 Project (No. G1999054304) and 863 Project (No. 2002AA20511).

* Corresponding author. Tel: 86-21-63138341 ext 5107; Fax: 86-21-53078128; E-mail: yilincao@yahoo.com