

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)04-0308-03

胎兔骨髓基质细胞与聚 β -羟基丁酯(PHB)复合物修复骨缺损的实验研究刘丽萍¹, 高卓平¹, 伍锦华², 樊孟耘¹, 艾玉峰², 彭湃²(¹ 西安市第四医院耳鼻喉科, 陕西 西安 710004; ² 第四军医大学西京医院整形外科, 陕西 西安 710033)

Experimental study of BMSC-PHB complex in reconstructing bone defect

LIU Li-Ping¹, GAO Zhuo-Ping¹, WU Jing-Hua², FAN Meng-Yun¹, AI Yu-Feng², PENG Pai²¹Department of Otorhinolaryngology, Xi'an Fourth Municipal Hospital, Xi'an 710004, China; ²Department of Plastic Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To study the bone formation of BMSC-PHB (bone marrow stromal cells-poly- β -hydroxybutyrate) complex in rabbit and to screen out the best possible human tissue-engineered bone. METHODS: BMSC was first cultured on the PHB material surface to form the BMSC-PHB complex and then the complex was implanted into rabbit mandibular bone. PHB materials without BMSC were implanted as control. The bone formation was studied respectively after 4 weeks and 8 weeks by HE staining, electron microscopy and X-ray. RESULTS: Bone formation was found on the surface of PHB after 4 weeks, while no bone formation was found in the control group. CONCLUSION: BMSC-PHB complex is an ideal tissue-engineered bone to reconstruct bone defect.

【Keywords】 bone marrow stromal cells; poly- β -hydroxybutyrate; bone substitutes; biomedical engineering

【摘要】 目的: 研究兔骨髓基质细胞(BMSC)与聚 β -羟基丁酯(PHB)复合物在成兔体内培养后成骨情况, 选出最理想的人工组织工程骨。方法: 将体外培养的骨髓基质细胞种植于 PHB 支架材料上形成复合物, 再植入成兔体内培养, 同时用单纯 PHB 材料植入作对照。分别于 4、8 wk 后照 X 光片, 取材行光镜和扫描电镜观察其成骨情况。结果: PHB 与 BMSC 的复合物在兔体内于 4 wk 后已有骨组织形成, 而对照组的缺损无修复迹象。结论: PHB 与 BMSC 的复合物完全可以做成理想的组织工程人工骨修复骨缺损。

【关键词】 骨髓基质细胞; 聚 β -羟基丁酯; 骨代用品; 生物医学工程

【中图分类号】 R319 **【文献标识码】** A

收稿日期 2004-08-31; 修回日期 2004-10-20

基金项目 陕西省科技项目资助(2002K 10-G)

通讯作者 高卓平. Tel. (029) 87480926 Email. bwd-712@163.com

作者简介 刘丽萍(1966-)女(汉族), 黑龙江省拜泉县人, 主治医师。

Tel. (029) 87480734 Email. bwd-712@163.com

0 引言

聚 β -羟基丁酯(poly- β -hydroxybutyrate, PHB) 因其良好的生物相容性和生物降解性, 可作为理想的骨组织工程材料^[1]。我们选择 PHB 与兔骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSC)的复合物, 移植至成兔下颌骨缺损处, 进行了修复骨缺损实验研究。

1 材料和方法

1.1 材料 PHB(由西北大学、西北工业大学和第四军医大学西京医院整形外科中心联合研制, 纯度达 99.8%, 微孔支架孔径 < 70 μ m, 孔隙率 > 95%), DMEM(Gibco, USA), 小牛血清(杭州四季青生物制品公司), 胰蛋白酶(天象生物制品公司), MTT, I 型胶原, β -甘油磷酸钠, 地塞米松, L-抗坏血酸(Sigma), BB16 型 CO₂ 培养箱(Heraeus, 上海), LG10-3A 低温高速离心机(北京医用离心机厂), 褪毛剂(自配), 速眠新由第四军医大学实验外科提供。

1.2 方法

1.2.1 PHB 支架材料的制备 PHB 微孔支架经 I 型胶原包埋, 冷冻干燥处理, 钴 60 辐射消毒后, 分装 4 瓶中, 每瓶 2 块, 每块约 1.0 cm \times 1.0 cm \times 0.6 cm。

1.2.2 骨髓基质细胞的分离及培养 取出生 3 d 的纯种白兔 1 只(体质量 5.135 g, 由第四军医大学实验动物中心提供)。耳静脉注入空气栓塞致死。用褪毛剂褪去四肢兔毛, 用碘伏消毒四肢皮肤, 铺无菌手术巾, 切开皮肤, 取出四肢骨, 将骨表面软组织去除干净。用 DMEM 液冲洗, 置于含 200 g/L 小牛血清(FBS)的 DMEM 液培养皿中, 以眼科剪将骨质剪碎, 置于 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 饱和湿度条件下培养。隔日换液观察。在原代细胞融合成单层后, 以 2.5 g/L 胰酶消化, 调整密度至 $(0.5 \sim 1) \times 10^7$ /L, 以 1:1 的比例传代, 并改用条件培养液, 含 100 g/L FBS, 10 mmol/L 聚 β -甘油磷酸钠, 10 nmol/L 地塞米松, 50 mg/L L-抗坏血酸。

1.2.3 BMSC 和 PHB 的复合培养 取生长良好的第 4 代 BMSC 2 瓶, 记数后将已浓缩的细胞以 1×10^9 个/L 的密度分别接种于已处理过的 PHB 材料上, 4 h 后加入培养液, 隔日更换培养液, 直至细胞生长铺满时终

止培养。

1.2.4 BMSC 和 PHB 的复合材料植入成兔体内(实验组) 取4只每只体质量 25 kg 纯种白兔,分别在耳静脉注 0.3 mL 速眠新,取得全麻后,将实验兔四肢固定于手术台上。右侧下颌区脱毛备皮。碘伏消毒右下颌区,铺巾。用小弯刀延右下颌缘切开皮肤,长约 2 cm,再切开肌层直达下颌骨骨膜面,切开骨膜,用骨膜剥离器在骨膜下向上剥离,暴露下颌骨。沿下颌缘上 1 mm 处用骨凿凿去 10 mm × 10 mm 骨片,将备好的 PHB 与 BMSC 的复合材料植入缺损区,用丝线将材料固定缝合在周缘骨面。分层缝合肌层,皮肤。

1.2.5 PHB 材料植入成兔体内(对照组) 取4只每只体质量 25 kg 纯种白兔,方法同实验组全麻下在右侧下颌区造 1.0 cm × 1.0 cm 骨性缺损区,将备好的 PHB 材料植入缺损区,用丝线将材料固定缝合在周缘骨面。分层缝合肌层,皮肤。

1.2.6 实验兔的取材 实验组与对照组分别于术后 4 8 wk 各取 1 只,先在放射科照右侧下颌骨 X 光片。后用空气栓塞致死,无菌下取出植入材料,行组织学 HE 染色,Masson 三色染色光镜检查及扫描电镜检查。



A: Experimental group; B: Control group.

Fig 1 Comparison of bone formation between the experimental and control groups under X-ray at week 8

图1 实验组与对照组 8 wk X 光片比较

2 结果

2.1 移植后 X 光片检查 实验组 4 wk 后可见右侧下颌骨移植材料四周及中间孔隙内密度增高,显示骨痂形成。8 wk 时密度增高明显,对照组下颌骨缺损区密度低,无骨修复(Fig 1)。

2.2 光镜检查 实验组 4 wk 后移植物 HE 染色:材料部分降解,可见骨细胞,多核巨细胞,纤维组织和基质。Masson 三色法染色:有明显骨样组织。8 wk 后 HE 染色可见:纤维样骨痂,骨样组织及骨小梁。Masson 三色法染色:骨小梁为大片红色,交织状,红色的骨组织中央见骨髓腔(Fig 2)。对照组术后 4 wk,材料无明显降解,无骨样组织。8 wk 移植物无吸收,无骨样组织(Fig 3)。



Fig 2 Mosson three staining of PHB in the experimental group at week 8

图2 实验组 8 wk Mosson 三色染色

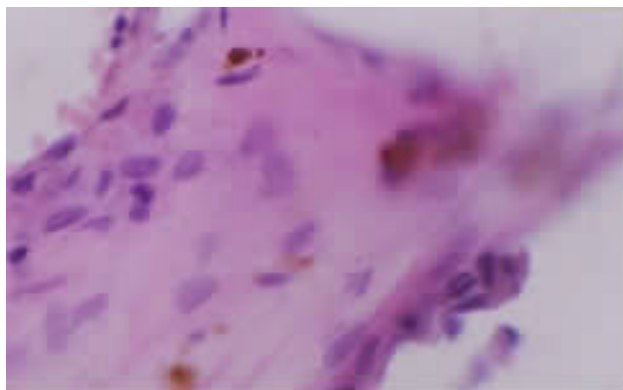


Fig 3 HE staining of PHB in the control group at week 8

图3 对照组 8 wk HE 染色

2.3 扫描电镜检查 实验组 4 wk 后可见材料表面有骨细胞及基质形成,另有少量胶原纤维分散其中。8 wk 时材料表面有骨组织形成,镜下可见到骨小梁结构,小梁粗细不均(Fig 4)。对照组 4 wk 后,材料表面光滑,可见到少量的红细胞及白细胞附着。8 wk 时,材料表面可

见到少许胶原组织 未见明显的细胞成分(Fig 5).

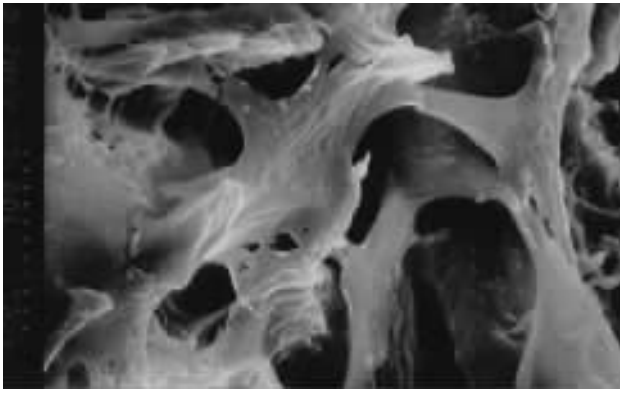


Fig 4 Bone formation in the experimental group under scanning electron microscope at week 8

图4 实验组 8 wk 扫描电镜显示骨组织形成

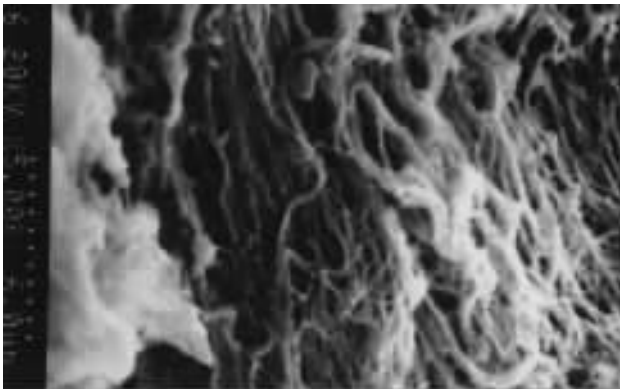


Fig 5 No bone formation in the control group under scanning electron microscope at week 8

图5 对照组 8 wk 扫描电镜显示无骨组织形成

3 讨论

我们的研究表明, PHB 和 BMSC 的复合材料完全可以成为理想的组织工程人工骨修复骨缺损。

3.1 理想的骨组织工程材料 这种材料应具有良好的生物相容性, 良好的生物降解性, 材料最终能被受区的骨组织取代, 易加工成型, 并具有一定的强度, 移植后能保持原状, 材料表面易于细胞粘附且不影响其增殖分化^[1]。PHB 是原核微生物在营养失衡的情况下储存于细胞内的一种高分子聚合物, 兼有天然可降解性材料的特点和人工合成可降解性材料的优点, 其降解产物 β -羟基丁酸为人体血液固有成分, 并可最终经酮醇解为 CO_2 和 H_2O 排出体外^[2]。本实验研究中取出实验组植入兔体内培养的 PHB 材料, 其组织结构上已逐步被骨样组织替代, 但其外形仍能保持原状, 完全能起到修复原缺损的作用。我们在实验初期进行的 PHB 对兔骨髓基质细胞(BMSC)生物学特性

影响的研究中证实: BMSC 可在 PHB 表面贴附生长, 保持其细胞形态, 并随培养时间延长, BMSC 开始分泌细胞外基质^[3]。后期实验中将 BMSC 和 PHB 的复合物植入成兔体内, 4 wk 后光镜下见已有成骨细胞形成, 8 wk 后已有明显的骨小梁形成, 证实 PHB 利于 BMSC 的增殖分化。

3.2 骨组织工程学种子细胞 这一种子细胞应具备下列特点: 取材容易, 对机体损伤小, 在体外培养中易定向分化成骨细胞和具备较强的传代繁殖能力, 植入机体后能适应免疫的环境并保持成骨活性^[4]。目前用于骨组织工程研究的种子细胞多采用骨膜的成骨细胞和骨髓基质干细胞。将骨膜的成骨细胞作为骨组织工程学的种子细胞是目前研究最多的, 而骨髓细胞因其取材方便, 取材后并发症少而轻微, 且骨髓基质干细胞能自动分化为成骨细胞, 也可在诱导物作用下促使其向骨形成方向分化等特点^[5], 已越来越多地被用于种子细胞。现临床上用骨髓注射或复合替代材料用于治疗骨缺损和骨不连已取得良好疗效。军事医学科学院基础医学研究所, 上海组织工程研究与开发中心等单位, 已建立了人成体骨髓基质干细胞分离、纯化及定向分化、诱导的技术体系。不过自体取材局限性大, 尤其是对于老年人, 骨髓干细胞较少, 活性差, 使取材量和体外培养增加了困难。能否用同种异体骨髓细胞作为种子细胞也成为了大家日益关注的焦点。本实验观察到胎兔 BMSC 培养方法简单、快速, 存活能力和增殖能力强。加入地塞米松、 β -甘油磷酸钠及 L-抗坏血酸后 ALP 阳性率明显增加, 细胞的形态趋向单一, 传代后也能获得稳定的细胞系。我们将培养的胎兔 BMSC 与 PHB 复合物植入成兔骨缺损处, 经 X 光片、组织切片、光镜及电镜下检查所见: 实验组较对照组有明显的成骨现象, 而无明显的免疫炎症反应。分析免疫性低的原因是胎体在 3 mo 前成骨活性细胞多, 无造血细胞, 因此胎体 BMSC 免疫性甚低。这些都证实了同种异体胎骨髓干细胞与聚 β -羟基丁酯的复合物完全可作为修复骨缺损的组织工程材料。

【参考文献】

- [1] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials[J]. *Biomaterials*, 2000 21(7): 667-671.
- [2] Wilke A, Orth J, Lomb M *et al.* Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures[J]. *Biomaterials*, 2003 24(2): 301-307.
- [3] Connolly J F, Guse R, Tiedman J *et al.* Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions[J]. *Clin Orthop*, 1991 (266): 259-270.
- [4] Abukawa H, Terai H, Hannouche P *et al.* Formation of a mandibular condyle *in vitro* by tissue engineering[J]. *Oral Maxillofac Surg*, 2003 51(1): 94-100.
- [5] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue and a rotating wall vessel bioreactor[J]. *J Biomed Mater Res* 2002 52(1): 138.

编辑 许昌泰