



组织工程骨修复山羊负重骨大段骨缺损的长期观察

组织工程骨在大动物体内的构建已经成为该技术临床应用的前奏,并且已经在山羊、犬及猕猴体内获得成功,在我们的实验中也获得了同样的成功[1][2][3]。但由于大动物体内实验耗时耗力,而且大动物的长期饲养过程中的较高死亡率使得代价非常大,因此多数实验只是在相对较短的时间范围内完成,没有能够观察组织工程骨在体内的长期转归。我们在早期实验的基础上总结饲养经验,增加了较大的投入,完成了对组织工程骨在羊体内长期构建的观察,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

1.1.1 动物 实验用健康中国青山羊15只(由南方医科大学实验动物中心提供),12月龄,体质量14.5~15.5 kg。早期实验组为9只,时间点为2、4、8周,每个时间点3只动物,分别进行ECT、X线及组织学检查。长期观察组时间点设为6、12、18、24月,进行X线检查,其中12及24月行组织学检查。

1.1.2 动物饲养 所有山羊全部半封闭圈养,由专人负责,饲养场所面积足够,使山羊可以自由活动,隔天清理圈舍,精饲料喂养。手术后给予3 d抗生素治疗。发现山羊有食欲下降、活动减少、皮肤病变及时予以处理。

1.2 组织工程骨的体内植入

1.2.1 细胞培养 双侧髂骨处备皮后严格无菌条件下16号骨穿针穿刺抽取红骨髓10 ml,混入DMEM完全培养基,500 U/ml肝素溶液抗凝,混匀后1000 r/min离心15 min后弃上清,过100目滤网,加培养基计数后接种。37 ℃、5%CO₂孵箱培养,3 d后半量换液,以后2~3 d全量换液1次。待细胞汇合成单层后0.25%胰蛋白酶消化,计数,用DMEM条件培养基(含10%胎牛血清、50 μg/ml抗坏血酸、10⁻⁸ mol/L地塞米松、10⁻³ mol/L β-甘油磷酸钠)传代培养,常规3 d换液1次。培养2周后107/ml骨髓基质干细胞(BMSC)接种到珊瑚羟基磷灰石(CHAP)上。CHAP购自北京意华健公司,规格为10 mm×10 mm×20 mm,孔径200~300 μm,空隙率>85%。接种时将细胞悬液滴加到材料上,刚好能浸润并有少量渗漏。37 ℃、5% CO₂孵箱中培养4~6 h,条件培养基沿培养皿边缘加入完全覆盖材料,继续培养72 h后植入骨缺损。

1.2.2 动物模型的制备 左侧后肢前外侧弧形切开皮肤,沿胫前肌与胫骨间隙分开进入。于胫骨外侧放置已塑形好的A0七孔窄动力加压钢板,除第4孔外,其余孔螺丝钉固定。环行剥离胫骨中段骨膜,于钢板第3、5孔之间,线锯锯断胫骨,切除该段对应的骨膜,造成2 cm缺性骨与骨膜缺损。然后将CHAP/BMSC复合体植入物嵌入骨缺损。

1.3 检测方法

1.3.1 ECT检查 山羊速麻安0.05 ml/kg静脉麻醉后,将其俯卧于木架上,四肢固定,探头距双胫骨10 cm。经小腿浅静脉注入⁹⁹Tcm-MDP(185 MBq/10 kg) 4 h后检查,以1帧/5 min采集一幅静态图像,能峰140 keV,窗宽20%,矩阵512×512,缩放1.0。影像处理:以术侧缺损区1 cm×2 cm大小的矩形为感兴趣区

(ROI)，镜像法取健侧感兴趣区。使用感兴趣区计数，计算T/NT比值(术侧ROI单位像素的计数(每pixel)/健侧ROI单位像素的计数(每pixel))进行定量测定，以进行对比分析。

1.3.2 X线检查 肌肉注射速麻安0.05 ml/kg麻醉后固定，条件：电压55 kV，电流55 mA，曝光时间0.3 s，焦距90 cm。所有X光片用光密度仪做光密度测定，为消除每次拍片显影剂条件等的不同，每张片测定骨缺损中央与相邻软组织的光密度，骨缺损光密度与软组织光密度的比值做比较。

1.3.3 组织学检查 早期每个时间点取3只动物骨缺损相应部位组织活检，长期观察于术后12个月取钢板时取局部组织活检。取钢板时按原切口进入，显露骨骼后将钢板周围骨痂凿下活检然后取出钢板，24月时再次活检。HE染色：体积分数10%中性福尔马林固定，常规酸性脱钙液脱钙，酒精逐级脱水，二甲苯透明，HE染色。观察骨缺损修复成骨情况。

2 结果

2.1 一般情况

15只动物术后4、8、12周3个时间点因为需行其他检测必须处死取标本，获得比较完整的早期观察资料。术后4个月肺部感染死亡1只，局部切口感染、长期换药不愈淘汰1只，术后12月取钢板，需要取大量局部骨组织活检并进行其他检测处死1只。长期观察山羊随着时间延长体质量逐渐增加，术后18个月增加约为术前1倍，术侧下肢同比例生长，行动自如，无跛行。

2.2 大体观察

术后4周时可形成材料与骨断端的骨连接，CHAP表面有骨样组织生成，8~12周骨缺损渐被充填，材料表面可见有较多骨痂突出并向中央集中，并基本包裹材料，原CHAP表面的腔隙已被充填。术后12月取钢板时可见钢板被大量骨痂包裹，骨缺损处已被接近正常骨质填充并牢固连接，钢板取出较为吃力，钢板对侧遗留少量未被完全包裹的CHAP，其余骨面已经接近正常(图1、2)，钢板取出后胫骨稳定无异常活动，山羊术后即可负重活动。术后24月骨缺损已被理想修复，可以看到十分满意的骨塑形，除局部能看到少量CHAP的残余白色痕迹，其余外观接近正常骨质。



图1 术后12个月取钢板时大量骨痂包裹钢板

Fig.1 Plenty of bony calluses encapsulating the plate 12 months after operation



图2 钢板取出后可见骨缺损修复满意

Fig.2 Satisfactory repair of the bone defect after plate removal

2.3 ECT结果

早期ECT结果显示术侧ROI计数及T/NT比值随时间延长呈明显递增趋势，组织工程骨内成骨活动和再血管化进程逐渐增加[4]。

2.4 X线结果

术后4、8、12周肉眼观察，随着时间的延长CHAP纹理紊乱、界限不清、密度增高、骨断段骨折线模糊。组织工程骨通过光密度的测量得到的结果即按成骨量大小是随着时间的延长光密度值逐渐增加，各时间点有明显差异。因所植入CHAP X片上密度大于羊胫骨密度，所以X片上局部密度比正常胫骨密度差距逐渐增大。但观察到术后12个月时，组织工程骨局部光密度开始呈下降趋势，逐渐表现为X线上密度逐渐接近正常胫骨密度。尤其是组织工程骨髓腔部位的密度下降明显，甚至低于正常皮质骨密度，且CHAP规律性的纹理已经完全消失、结构紊乱、散在条形纹、密度不一，而组织工程骨逐渐形成较明显的皮质骨，并与正常皮质骨相连续，弧度和厚度接近正常皮质骨(图3)。至术后24月，X线显示完全性的骨缺损修复：出现了髓腔再通，并且骨皮质成更加规则连续，达到了理想的塑形(图4、5)。

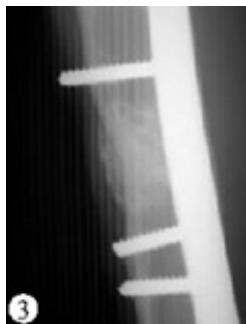


图3 术后12个月X线显示骨皮质连续CHAP高密度影逐渐消失

Fig.3 Contiguous cortical bone and gradually disappeared high density of CHAP on X-ray film 12 months after operation



图4 术后24个月正位X线显示髓腔再通

Fig.4 Medullary cavity recanalization on X-ray film (anterior-posterior view) 24 months after operation



图5 术后24个月侧位X线

Fig.5 X-ray film (lateral view) 24 months after operation

2.5 组织学检查

早期HE染色不同层面切片上可见随时间增长，新生骨组织渐沿CHAP构架基础向中心推移，新生骨组织长入材料内部空隙，并沿材料构架逐步爬行，材料少量吸收，可见数量不同的血管断面。除了有两端向中心成骨以外，表现出更明显的纵轴各周边向中心成骨。12月时不同层面切片显示各层面成骨范围已经趋于一致，没有明显差异，镜下可见较为成熟的骨基质，与早期明显不一样的是CHAP的基本构架结构已经消失，成骨已经不再是沿其多孔构架蔓延而是类似自然骨结构，但可见散在的崩解的CHAP颗粒(图6)。24月时结果与之类似，值得注意的是崩解的CHAP颗粒数量更加稀少。

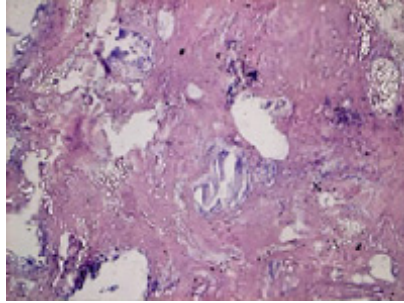


图6 术后12个月组织学照片可见CHAP构架消失，散在崩解颗粒

Fig.6 Histological examination showing disappearance of CHAP structure and scattered disintegrated particles 12 months after operation (Original magnification: $\times 100$)

3 讨论

组织工程技术最令人感兴趣的是能够依靠生物材料和种子细胞在体内经过一段时间改性最终完全替代原有功能组织，形成新的具有正常功能包括代谢、特有生物活性的组织器官[5]。很多实验已经部分证实了这一点，尤其是在功能相对简单的器官和骨的研究上成果最多，目前已在临床应用或接近临床应用[6][7][8][9][10]。本实验通过组织工程骨在山羊体内的构建，早期通过ECT、X线及组织学检查发现组织工程骨随着实验周期的延长，显示出明显旺盛的成骨能力，同时也显示出良好的再血管化进程。长期大体观察发现原有的负重骨骨缺损已经完全修复，外观基本接近正常；组织学检查发现局部骨组织成熟，有正常皮质骨结构，CHAP的自身架构消失；X线结果表明骨皮质连续光滑，原有CHAP高密度影消失，髓腔再通；山羊术后2年体质量增加1倍，术侧下肢同比例生长，行动自如，无跛行。这些结果表明原有的骨缺损已经被完全修复，组织工程骨最终完全替代了正常骨组织形态和功能，并持续行使着正常骨组织的作用。经过长期观察，组织工程骨在体内已经完全构建成功。

CHAP的主要成分是羟基磷灰石，生物羟基磷灰石属于生物活性陶瓷，化学成分及结构与骨质中无机盐极为相似，其组成中含有能够通过人体正常的新陈代谢途径进行置换的钙、磷等元素，还含有能与人体组织发生键合的羟基(-OH)基团。表面同人体组织可通过键的结合达到完全的亲和，形成骨性界面结合，属化学结合。CHAP具有与骨组织相似的化学成分、晶体结构、摩擦系数、比重、导热性及绝对强度[11][12]。CHAP作为骨组织工程常用的生物材料支架，最大的不足就是其体内降解的速度较慢[13][14][15]，但在我们的实验中发现对其降解速度有利的证据。在早期的X线片上组织工程骨表现出随着时间的增长，成骨量逐渐增加，由于CHAP的密度大于正常皮质骨密度，而且CHAP在早期没有明显的降解，所以X线片上表现出较为均匀一致的高密度区。在远期的观察中，可以看出组织工程骨局部光密度开始呈下降趋势。尤其是组织工程骨髓腔部位的密度下降明显，且CHAP规律性的纹理已经完全消失、结构紊乱、散在条形纹、密度不一，并且已经有髓腔再通的现象。组织学结果显示术后2年后局部骨组织中CHAP的架构完全消失，甚至CHAP的残留颗粒都已经非常少，说明CHAP大部分已经降解或者成为组成新生骨组织的无机成分。这些结果都说明CHAP在体内长期植入后可以大

部分被降解，作为骨组织工程的生物材料支架有着较好的生物学表现。

参考文献：

- [1]陈 滨, 裴国献, 王 珂 等. 大动物体内促组织工程骨成骨及血管化手段的研究[J]. 中国医学科学院学报, 2003, 25(1): 26-31.
- [2]何 川, 邓廉夫, 周来生, 等. 自体成骨细胞--nBGC复合物修复犬胫骨骨缺损[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(15): 1047-9.
- [3]阳富春, 杨志明, 李秀群, 等. 组织工程化骨修复猕猴长段骨缺损的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17(5): 406-10.
- [4]陈 滨, 裴国献, 王 珂, 等. 山羊胫骨大段骨缺损的组织工程骨修复及放射性核素显像监测[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(11): 966-9.
- Chen B, Pei GX, Wang K, et al. Repair of tibial defect with tissue-engineered bone graft and radionuclide bone imaging in goats[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(11):966-9.
- [5]Loye C. Bone grafts using tissue engineering[J]. Bull Mem Acad R Med Belg, 2001, 156(729): 418-21.
- [6]Chistolini P, Ruspantini I, Bianco P, et al. Biomechanical evaluation of cell-loaded and cell free hydroxyapatite implants for the reconstruction of segmental bone defects[J]. J Mater Sci Mater Med, 1999, 10: 739-43.
- [7]Quarto R, Kutepv SM, Kon E, et al. Repair of large bone defects by autologous human bone marrow stromal cells[J]. Tissue Eng, 2000, 6(6): 669-73.
- [8]Yanaga H, Udoh Y, Yamauchi T, et al. Cry preserved cultured epidermal allografts achieved early closure of wounds and reduced scar formation in deep partial thickness burn wounds (DDB) and split thickness skin donor sites of pediatric patients[J]. Burns, 2001, 27(7): 689-98.
- [9]De SK, Reis ED, Kerstein D. Wound treatment with human skin equivalent[J]. J Am Podiatr Med Assoc, 2002, 92(1): 19-23.
- [10]Vacanti CA, Bonassar LJ, Vancanti MP, et al. Replantation of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone[J]. N Engl J Med, 2001, 344(20): 1511-4.
- [11]Rodriguez-lorenzo LM, Vallet-Regi M, Ferreira JM, et al. Hydroxyapatite ceramic bodies with tailored mechanical properties for different applications[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 60(1): 159-66.
- [12]Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, et al. Degradation characteristics of α and β tri-calcium-phosphate (TCP) in mini pigs[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 60(1): 115-21.
- [13]Thomson RC, Yaszemski MJ, Powers JM, et al. Hydroxyapatite fiber reinforced poly(α -hydroxyester) foams for bone regeneration[J]. Biomaterials, 1998, 19(21): 1935-9.
- [14]Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2000, 21(23): 2347-59.
- [15]Bakos D, Soldan M, Hernandez-Fuentes I. Hydroxyapatite collagen hyaluronic acid composite[J]. Biomaterials, 1999, 20(2): 191-5.