



负载BMP的新型组织工程骨的构建及骨缺损修复实验

临床上的各种原因导致的骨缺损的治疗一直未能得到圆满解决。目前临床使用的自体骨与异体骨移植治疗骨缺损方法均有不同程度的缺陷。骨组织工程研究为解决这一问题提供了新的思路。组织工程骨的体外构建可以用种子细胞和包含或不包含细胞因子的支架材料来进行[1]。种子细胞主要是指具有向成骨系分化的干细胞如骨髓基质干细胞(BMSCs);骨形态发生蛋白(BMP)是研究较早的骨生长因子,其诱导成骨的作用已被多次实验所证实。它是唯一能够单独诱导骨组织形成的局部生长因子,在一定条件下,能诱导未分化的间充质细胞向骨系细胞转化,促进骨细胞的生长增殖[2];聚乳酸(PLA)及其与聚羟基乙酸的共聚物(PLGA)是一种生物相容性良好的可降解材料,其降解机制为主链含有不稳定易被水解或酶解的化学键,故目前公认PLA/PLGA是一种良好的可生物降解的控释骨架,且具有支架和缓释的双重作用,本课题前期研究也证明PLGA对BMSCs的形态与增殖、细胞周期、DNA含量及倍体水平均无影响[3]。PLA是最早作为骨、软骨组织工程的支架材料,也是目前运用最广泛的骨组织工程材料[4][5]。本研究探讨以PLGA作为BMP的载体及组织工程骨的支架,并与BMSCs复合构建新型组织工程骨的可行性及修复骨缺损的效果。

1 材料与方法

1.1 动物模型与实验分组

新西兰大白兔27只,体质量2.0~2.5 kg·b.w.,雌雄不限。根据处置条件随机分为实验组、对照组和空白组,每组9只动物。实验组为负载BMP与BMSCs的PLGA,对照组为仅复合BMSCs的PLGA,空白组仅植入PLGA。使用戊巴比妥钠(50 mg/kg·b.w.)经耳缘静脉注射麻醉后,在无菌操作下,在右前臂前内侧作长约3 cm纵形切口,切开皮肤、筋膜,逐层分开肌肉、血管、神经,充分暴露桡骨中段,作1.5 cm的骨缺损,并切除骨膜缺损区骨膜。生理盐水冲洗切口,植入不同组别的植入物,逐层关闭切口,术中及术后均不作固定,动物分笼饲养。

1.2 骨髓采集与细胞培养

按照我实验室已成熟的全骨髓细胞培养方法,于动物骨缺损模型制备前4~6周在无菌条件下以16号骨髓穿刺针自髂嵴处刺入兔髂骨骨髓腔,抽吸双侧骨髓共3 ml,混入DMEM培养基,500 U/ml肝素溶液抗凝,混匀后低速离心(800 r/min)5 min,去除上清液,培养基重悬后过90目滤网接种。于37 °C、5% CO₂孵箱中培养,4 d后半量换液(DMEM完全培养基,15%新生牛血清),以后2~3 d全量换液1次,倒置显微镜逐日观察,待细胞汇合成单层后以0.25%胰蛋白酶消化,计数,传代培养,常规3d换液1次。传至第3代细胞开始用DMEM条件培养基(含15%新生牛血清、50 μg/ml抗坏血酸、10⁻⁸mol/L地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠)换液,备用。

1.3 材料准备及与细胞复合培养

空白PLGA与负载BMP之PLGA材料均由课题合作单位中山大学高分子研究所提供(其中(其中BMP为rhBMP-2,购自北京军事医学科学院),切割成长15 mm、直径约3 mm的圆柱状,经37 °C环氧乙烷熏蒸消毒。依据我们前期的实验方法[3]对消毒后的材料进行处理,浸泡条件培养基后常温干燥。收集培养至第3代的细胞1×

106个与条件培养基混合制成200 μ l细胞悬液，以微量移液器缓慢滴加到干燥后的PLGA表面，静止培养4h后加入条件培养基共同培养3 d后植入动物体内。

1.4 观测内容

1.4.1 动物术后观察 动物术后活动及伤口愈合情况。

1.4.2 X线观察 动物进行麻醉后摄尺桡骨正位片，投照条件统一为40 kV，50 mA，0.2 s，投照距离60 cm。阻射密度以同一照片骨缺损邻近区域相同面积皮质骨密度为100，相同面积照片底色为0来测量骨缺损区阻射密度相对值，同一照片骨缺损区的平均阻射密度取所有可见阻射阴影密度的均值。

1.4.3 大体标本观察 分别在术后4，8，12周各处死3只动物，截取骨缺损区部分尺桡骨，观察植入材料的降解情况、与宿主骨界面结合情况及周围软组织反应。

1.4.4 组织学切片观察 对骨缺损中部组织以10%多聚甲醛固定，10%硝酸进行脱钙后采用石蜡包埋，连续进行横行及纵行切片(厚度5 μ m)，HE染色，光镜下观察。每只动物取3张横行间断切片在100倍光镜下观察新骨形成情况，每张切片随机取5个视野，利用Photoshop6.0软件分析新生骨小梁面积像素值，并计算其在视野总面积像素值的百分比。

1.5 数据处理

采用SPSS10.0统计软件对数据进行统计学处理，同一时间不同组标本骨缺损区的X线阻射密度、组织学切片新生骨小梁面积比数据均比较采用方差分析。

2 结果

2.1 空白PLGA及PLGA与细胞复合生长3 d的扫描电镜形态

在电镜下可见PLGA呈疏松的多孔状，孔径大小不等，且互相连通(图1)；细胞呈不规则形态，胞体变扁平，贴附在材料表面，细胞在材料表面伸出突触，连接成片(图2)。

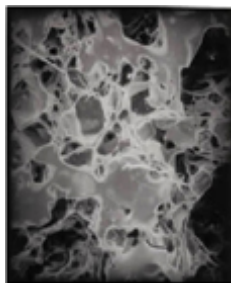


图1 PLGA扫描电镜观察($\times 100$)

Fig.1 Morphology of PLGA material under scanning electron microscope (Original magnification: $\times 100$)

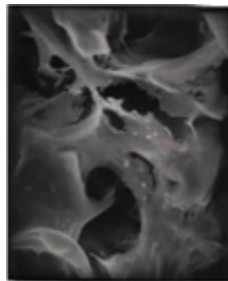


图2 BMSC与PLGA复合培养3d扫描电镜观察($\times 500$)

Fig.2 Morphology of BMSCs under scanning electron microscope on the 3rd day of culture with PLGA material (Original magnification: $\times 500$)

2.2 动物术后观察

对照组1只动物因伤口感染死亡，其余动物术后饮食正常，手术切口无红肿及渗液，一期愈合，皮肤缝线自行脱落。

2.3 X线观察

本实验的X线的成骨特点为实验组与对照组新骨形成为自缺损中心区及两断端同时均匀生长，逐步与两断端融合。空白组未观察到明显成骨现象。术后4周X线显示：空白组可见清晰1.5 cm骨缺损区，说明PLGA无明显X线阻射现象，宿主骨断端清晰；对照组出现不连续的密度较正常骨偏低的骨痂，且较均匀分布在断端及中心区域；实验组在植入材料中心处出现连续性骨痂，且两侧骨痂均匀向中间延伸，宿主骨与植入组织工程骨之间界面模糊(图3)；术后8周X线显示：空白组骨缺损区未见新生骨痂，骨折断端变圆滑；对照组骨缺损靠近尺骨区域出现连续性薄层骨痂；实验组骨缺损区域新生骨皮质连续性恢复，但髓腔不通，且密度明显低于宿主骨(图4)；术后12周X线显示：空白组X线表现与8周时基本相同，对照组缺损区骨痂密度、数量增加，但明显直径低于断端宿主骨；实验组显示组织工程骨与宿主骨之间的骨痂已完全骨化，髓腔贯通，靠近尺骨部分密度尤其增高(图5)。本实验各组不同时相骨缺损修复的X线阻射密度值见表1。

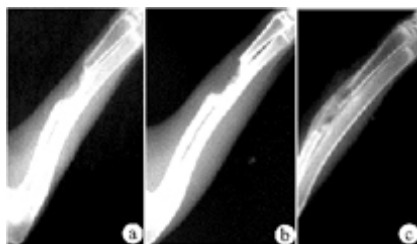


图3 术后4周X线片

Fig. 3 X-ray of the bone defects 4 weeks after operation a: Blank; b: Control; c: Experimental group



图4 术后8周X线片

Fig. 4 X-ray of the bone defects 8 weeks after operation a: Blank; b: Control; c: Experimental group



图5 术后12周X线片

Fig. 5 X-ray of the bone defects 12 weeks after operation a: Blank; b: Control; c: Experimental groups. Arrowheads indicates newly formed bone marrow cavity

表 1 X线分析骨缺损平均阻射密度

Tab.1 Relative values of callus density at the bone defects evaluated by X-ray ($n=3$, $Mean\pm SD$)

Group	Post-operative time (weeks)		
	4	8	12
Blank*	33.81±1.23	37.18±1.44	38.42±3.88
Control*	46.58±1.45	56.80±0.78	68.44±1.53
Experimental*	47.79±1.26	63.89±1.18	78.40±1.24

* $P<0.05$

2.4 大体标本观察

4周大体组织学观察见实验组骨缺损的断端及靠近尺骨侧有较多硬度较高的类骨样组织，对照组骨缺损断端及中段靠近尺骨侧少量类骨质生成，空白组表面有一层较致密的纤维组织膜包裹，植入的PLGA被部分吸收，质地变软。第8周实验组及对照组骨缺损区域出现连续性骨痂，空白组PLGA被大部分吸收，剩余少量纤维结缔组织。第12周实验组骨缺损区已完全修复，未见剩余PLGA，且新生骨直径较邻近宿主骨直径略粗，完全离断后发现髓腔已再通；对照组出现连续性新骨生成，但直径较邻近宿主骨部分纤细；空白组仅发现骨缺损断端少许新生骨，缺损区域被大量结缔组织填充。

2.5 组织学切片观察

第4周实验组PLGA已降解成网状，缺损区内大量软骨细胞生成，含少量骨基质(图6a)，对照组可见较多软骨细胞生成(图6b)，空白组为纤维组织和大量淋巴细胞(图6c)。第8周实验组仅剩余少量网状PLGA，生成大量较成熟的编织骨，可见少许软骨基质(图7a)，对照组成熟骨组织较少，大部分为软骨基质填充(图7b)，空白组主要为纤维组织(图7c)。第12周实验组完全为成熟的骨组织(图8a)，对照组组仍可见部分软骨基质(图8b)，空白组缺损靠近宿主骨区域可见少许软骨细胞及软骨组织，其余部分仍为纤维组织填充(图8c)。三组不同时相骨缺损区新生骨骨组织的图像分析结果见表2。

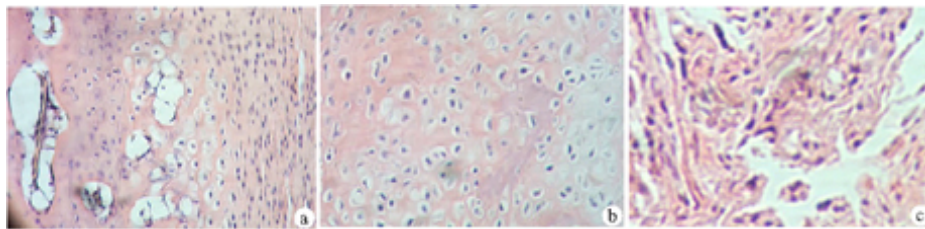


图6 第4周实验组(a)、对照组(b)和空白组(c)组织切片观察

Fig. 6 Typical histological sections of decalcified specimens harvested from the experimental (a), control (b) and blank control (c) groups 4 weeks after operation (HE staining, original magnification: $\times 100$)

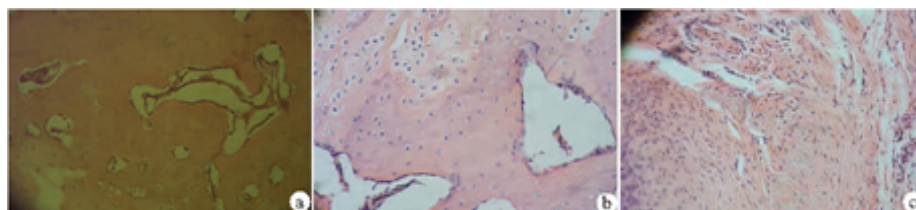


图7 第8周实验组(a)、对照组(b)和空白组(c)组织切片观察

Fig. 7 Typical histological sections of decalcified specimens harvested from the experimental (a), control (b) and blank control (c) groups 8 weeks after operation (HE staining, original magnification: $\times 100$)

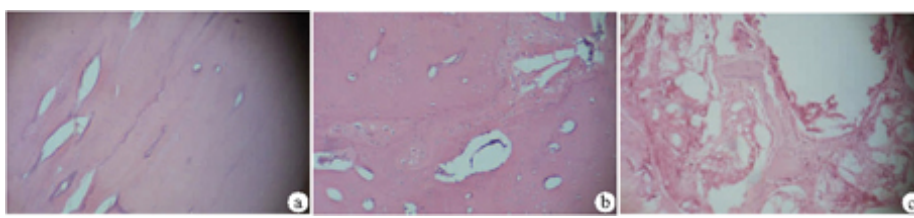


图8 第12周实验组(a)、对照组(b)和空白组(c)组织切片观察

Fig.8 Typical histological sections of decalcified specimens harvested from the experimental (a), control (b) and blank control (c) groups 12 weeks after operation (HE staining, original magnification: $\times 100$)

表 2 新骨小梁占骨缺损区域面积百分比

Tab.2 Percentage area of the new bone formation in the total bone defect area ($n=3$, %, $Mean \pm SD$)

Group	Post-operative time (week)		
	4	8	12
Blank	22.18 \pm 0.23	29.54 \pm 0.44	31.42 \pm 0.48
Control	26.58 \pm 0.45	46.81 \pm 0.56	68.44 \pm 0.53
Experimental	37.97 \pm 0.26	73.49 \pm 0.51	96.67 \pm 0.24

3 讨论

3.1 种子细胞的选择

和其他组织工程研究研究的原理与方法类似，骨组织工程的研究也主要集中在种子细胞、支架材料和骨的构建3个方面。关于种子细胞的选取，目前研究主要集中于BMSCs的研究。BMSCs体外培养在一定的诱导条件下可以大量向成骨细胞分化并形成骨组织[6]，我们实验室早期工作也证实了这一点[7]。尽管有文献报道认为同种异体软骨细胞经过分离培养、传代消化之后抗原性降低，植入体内后可保持其分泌基质的功能[8]，但是考虑到细胞分离和尽量避免植入材料免疫反应，我们仍然选取了自体干细胞与材料复合后移植。植入动物体内在不同时间取材后发现，实验组和对照组动物手术区周围组织反应轻微。空白PLGA组在12周仅在支架与宿主骨的桥接部位形成少量骨样组织，而对照组自4周时即可通过X线和组织切片观察到显著的骨化过程，支架表面与内部均可发现骨样组织，这表明植入的经诱导的BMSCs可能继续成活，增殖，分化发挥成骨活性，并未完全衰亡或被免疫系统消灭。由此可以认为空白PLGA支架修复骨缺损主要是靠“爬行替代”方式成骨，12周空白组骨缺损内仅有大量纤维组织填充，说明这种成骨方式明显不足以完全修复兔桡骨缺损。大体观察和切片观察还发现试验组和对照组的PLGA支架降解速度快于空白组，这有可能是大量经诱导的BMSCs能够在分裂增殖形成新骨组织的同时趋化破骨细胞聚集，从而加速了支架材料的吸收。

3.2 支架材料的制备与负载细胞因子的选择

骨组织工程支架的原料可分为无机类和有机类。尽管无机类材料具有良好的生物相容性、生物降解性和骨传导性[9]，但是这类材料降解极其困难，影响了新生骨的生成和改建；脱钙骨基质作为细胞载体尽管具有细胞相容性好的特点，但是其固有的抗原性仍无法彻底解决。PLGA是一种生物相容性良好的可降解材料，其降解机制为主链含有不稳定易被水解或酶解的化学键，故目前公认PLA/PLGA是一种良好的可生物降解的控释骨架，且具有支架和缓释的双重作用，是较理想的骨组织工程支架材料。为利于细胞生长，组织工程支架材料

要求一定的孔径和孔径率。Robinson等[10]认为支架孔径在200~300 μm有利于骨介导,而孔隙率要求则在能维持一定外形的情况下,应尽可能高而有利于细胞种植。我们选取聚乳酸与聚羟基乙酸的共聚物PLGA制备组织工程支架,该支架采用低热高压法制作,可根据各种试验要求方便地制成各种形状,避免了使用有机溶剂,且易于负载细胞因子,且制备的PLGA支架孔隙率高达95%以上,孔径大小较均匀,为150~200 μm,其中PLA与PGA的摩尔比为75/25[11]。该支架的细胞相容性在前期试验已得到验证。目前认为BMP是骨组织工程中唯一能够单独诱导骨组织形成的局部生长因子[2],PLA及PLGA作为BMP的载体是有效的,可以充分发挥BMP的持续刺激和诱导成骨作用[12][13]。

3.3 新型组织工程骨成骨特点

在PLGA支架制备过程中添加已研成粉末状的BMP,制备成每块含5mgBMP的PLGA支架,并与成骨细胞诱导的BMSCs构建成为新型组织工程骨。利用这种体外构建的组织工程骨进行的骨缺损修复实验取得了满意的效果。本实验采用兔单侧前臂桡骨中断缺损模型,通过尺骨稳定骨缺损端并能保持骨缺损的长度。该组织工程骨同时起到了细胞支架与BMP控释载体作用。且由于BMP是研成粉末混入支架,在体内降解并发生促进成骨的作用之前必须有一个缓慢溶解的过程,从而达到了控制释放BMP的目的。通过对实验组骨缺损各时相标本横切面的组织学切片观察,我们认为新骨的生成是在骨缺损横截面上是均匀生成的,是一种均匀的生长方式。这充分说明不仅是从植入物外表面渗入的自体间充质细胞与BMP作用后成骨,而主要是植入物本身携带的细胞也同时与BMP发生了成骨作用,从而大大加快了骨缺损修复速度;根据局部X线平均阻射密度和切片分析,新生骨痂的数量在靠近尺骨侧明显增加,这是由于靠近尺骨骨膜区域有较多间充质细胞,从而形成更多新生骨。

术后大体观察与标本组织学观察还发现,3组材料植入后在整个试验阶段,除4周时骨缺损区发现少量淋巴细胞浸润之外,未发现急性炎症反应征象。而8周后发现的多核巨细胞,可能是材料脱落下颗粒导致巨噬细胞汇集,本质是一种异物反应,有助于材料降解吸收[14]。与其他组织工程骨实验比较,本研究在12周时实验组动物局部植入物已完全吸收,骨皮质连续性恢复,新生骨已出现了明显的髓腔再通现象,而目前其他单纯的BMP载体修复骨缺损都尚不能达到这一效果[15][16]。

综上所述,实验组骨缺损区的成骨速度和成骨质量显著高于对照组和空白组,对兔桡骨缺损修复效果满意。我们认为,以PLGA作为BMP的载体及组织工程骨的支架,并与BMSCs复合构建的新型组织工程骨是可行的,但仍有一些问题需要继续探讨:(1)如何增强细胞与PLGA支架的贴附能力。这一点在前阶段试验对于空白PLGA的细胞相容性研究中已发现,在支架消毒后、与细胞复合前须经过多次处理,增加了材料污染的可能,在本实验体外构建组织工程骨过程中也不甚满意。目前拟通过增加PLGA表面活性位点并附加多肽链来改善PLGA表面亲水性较差的缺点;(2)尽管根据实验结果我们认为支架负载的细胞参与并有效促进了成骨过程,试验组成骨效果好于已报道的单纯的BMP载体修复骨缺损研究,但有关BMP对支架中负载的BMSCs增殖、分化的作用机理尚不明确,需进一步进行试验研究;(3)检测该负载BMP支架对于BMP控制释放的速度。尽量使BMP释放速度满足生理情况下骨缺损修复过程的需要,制成该支架释放BMP的体外缓释曲线,总结释放规律;(4)寻求支架中最佳的因子浓度与成骨效果的量效关系。在达到理想的骨缺损修复效果的前提下尽量减少添加因子的量;(5)探讨PLGA支架同时负载其他神经或血管生长因子的可能性及多种因子的复合作用对骨缺损修复的影响。

(责任编辑:吴锦雅)

参考文献:

- [1]Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies[J]. Clin Orthop, 1999, (367 Suppl): 68-83.
 - [2]Carl A. Kirker H. Potential application and delivery strategies for bone morphogenetic proteins[J]. Advanced Drug Delivery Rev, 2000, 43(1): 65-92.
 - [3]胡稷杰, 裴国献, 全大萍, 等. 新型聚乳酸-羟基乙酸支架的细胞相容性研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2005, 7(4): 358-62.
- Hu JJ, Pei GX, Quan DP, et al. Cellular compatibility of a new type of polylactic

glycolic acid (PLGA) scaffold[J]. Chin J Orthop Trauma, 2005, 7(4): 358-62.

[4]曹谊林, 商庆新. 软骨、骨组织工程的现状与趋势[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(1): 7-9.

Cao YL, Shang QX. The status quo and tendency of cartilage and bone tissue engineering [J]. Chin J Traumatol, 2001, 17(1): 7-9.

[5]Quirk RA, Chan WC, Davies MC, et al. poly(l-lysine)-GRGDS as abiomimetic surface modifier for poly (lactic acid) [J]. Biomaterials, 2001, 22(8): 865-972.

[6]Chang SL, Yang JW, Rifas L, et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone[J]. Endocrinology, 1994, 134(1): 277-86.

[7]金丹, 裴国献, 王前, 等. 骨髓基质细胞体外培养骨发生潜能及条件研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2000, 8(6): 565-6.

[8]Wakitani S. Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel [J]. Tissue Engineering, 1998, 4(4): 429-44.

[9]Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger D, et al. Effect of surface reaction stage on fibronectin mediated adhesion of osteoblast-like cell to bioactive glass [J]. J Biomed Mater Res, 1998, 40(1): 48-56.

[10]Robinson BP, Hollinger JO, Szachowicz EH, et al. Calvarial bone repair with porous D,L Polylactide [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 1995, (1126): 707-713.

[11]罗丙红, 全大萍, 廖凯荣, 等. 低热-高压法制备PLGA多孔支架及其体外降解研究[J]. 功能高分子学报, 2003, (16)2: 149-55.

Luo BH, Quan DP, Liao KR, et al. Scaffolds with high porosity for tissue engineering fabricated by low heat-high pressure and their degradation in vitro [J]. J Funct Polymers, 2003, (16)2: 149-55.

[12]Agrawal CM, Best J, Heckman JD, et al. Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture nonunions [J]. Biomaterials, 1995, 16(16): 1255-60.

[13]Zellin G, Linde A. Importance of delivery system for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects [J]. J Biomed Mater Res, 1997, 35(2): 181-90.

[14]Piattelli A, Scarano A, Coraggio F, et al. Early tissue reactions to polylactic acid resorbable membranes: a histological and histochemical study in rabbit [J]. Biomaterials, 1998, 19(10): 889-96.

[15]谭祖键, 李起鸿, 许建中, 等. 聚乳酸作为骨形态发生蛋白载体修复骨缺损的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 2000, 20(12): 742-7.

Tan ZJ, Li QH, Xu JZ, et al. An experimental study of bone defects repaired with bone morphogenetic protein using polyactic acid as carrier [J]. Chin J Orthop, 2000, 20(12): 742-7.

[16]Takashi K. Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA-PEG/hydroxyapatite composite [J]. Biomaterials 26 (2005): 73-9.