

## 纤维蛋白胶和异种无机骨构建复合支架材料与种子细胞的复合

武汉<sup>1,2</sup>, 张春秋<sup>3</sup>, 尹飞<sup>2</sup>, 章培标<sup>4</sup>, 刘景臣<sup>2</sup>, 李玉新<sup>1</sup>, <sup>1</sup>东北师范大学遗传与细胞研究所博士后流动站, 吉林省长春市 130032; <sup>2</sup>吉林大学中日联谊医院骨科, 吉林省长春市 130033; <sup>3</sup>吉林大学机械科学与工程学院工程力学系, 吉林省长春市 130032; <sup>4</sup>中国科学院长春应用化学研究所, 吉林省长春市 130032

武汉, 男, 1967年生, 吉林省通化县人, 汉族, 2003年吉林大学毕业, 博士, 副教授, 主要从事创伤修复与骨组织工程的研究。mdwuhan@163.com

国家自然科学基金资助项目(30570451)

收稿日期: 2006-05-15 修回日期: 2006-08-30 (06-50-5-4144/S·X)

### 摘要

目的: 应用纤维蛋白胶、异种无机骨构建骨组织工程复合支架材料, 立体培养兔骨髓基质细胞, 探讨这种复合支架材料对种子细胞的黏附作用。

方法: 实验于2005-01/2006-04在吉林大学中日联谊医院卫生部创伤骨科研究室、吉林大学机械科学与工程学院工程力学系、东北师范大学遗传与细胞研究所合作完成。牛松质骨经去脂去蛋白等无机化处理与纤维蛋白胶复合制成复合骨支架材料; 将兔骨髓基质细胞作为种子细胞进行传代培养, 收集后在与纤维蛋白胶、异种无机骨构成的复合支架中进行立体培养, 采用相差显微镜、透射电子显微镜、苏木精-伊红染色等手段观察骨髓基质细胞在纤维蛋白胶中的生长状况。

结果: ①相差显微镜下观察自无机骨孔隙中见骨髓基质细胞均匀混合于纤维蛋白胶中。②细胞培养4周骨髓基质细胞形成密集立体网状。③透射电子显微镜见在复合支架中培养1个月的1个基质细胞局部有细突起, 胞质内可见线粒体, 核糖体, 粗面内质网。

结论: 在纤维蛋白胶与异种无机骨构建的复合支架中骨髓基质细胞具有良好活性, 可迅速扩增生长, 提示这种支架材料具有适合种子细胞生长的环境。

关键词: 纤维蛋白; 支架; 组织工程

### Combination between the scaffolds combined with fibrin glue and xenogeneic inorganic bone and seed cells

Wu Han<sup>1, 2</sup>, Zhang Chun-qiu<sup>3</sup>, Yin Fei<sup>2</sup>, Zhang Pei-biao<sup>4</sup>, Liu Jing-chen<sup>2</sup>, Li Yu-xin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Postdoctoral Station of Department of Genetics and Cell, Northeast Normal University, Changchun 130032, Jilin Province, China; <sup>2</sup>Department of Orthopaedic of China-Japan Union Hospital, <sup>3</sup>Department of Mechanical Engineering, College of Mechanical Engineering, Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province, China; <sup>4</sup>Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130032, Jilin Province, China

Wu Han, Doctor, Associate professor, Postdoctoral Station of Department of Genetics and Cell, Northeast Normal University, Changchun 130032, Jilin Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570451

### Abstract

**AIM:** To construct bone combined scaffolds in bone tissue engineering with fibrin glue and xenogeneic inorganic bone and perform three-dimensional culture of rabbit marrow stroma cells (MSCs) as well as probe into the adhesion effect of the scaffold on seed cells.

**METHODS:** The experiment was co-conducted by the Department of Orthopedics and Trauma of

China-Japan Union Hospital and the Department of Mechanical Engineering, College of Mechanical Engineering of Jilin University and the Department of Genetics and Cell of Northeast Normal University between January 2005 and April 2006. The bovine cancellous bone (BCB) was dealt with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaOH and alcohol to prepare inorganic bone. After that the BCB was combined with the fibrin glue to make combined scaffolds. Rabbit MSCs were cultured in vitro and transfer, and the MSCs were collected for three-dimension culture with fibrin glue and combined scaffold made of xenogeneic inorganic bone. The cell growth in fibrin glue was examined by HE staining, phase-contrast microscope and transmission electron microscope.

**RESULTS:** ① Observation under the phase contrast microscope showed that the MSCs could be seen evenly mixed with the fibrin glue from inorganic bone gaps. ② At the 4<sup>th</sup> week of culture, the MSCs formed into dense stereo-net. ③ It could be found under the transmission electron microscope that there were micro-protrusion in local stroma cells at one month after the culture, and mitochondria as well as ribosome were found in the cytoplasm with rough endoplasmic reticulum.

**CONCLUSION:** The MSCs in scaffold combined by fibrin glue and xenogeneic inorganic bone are better in activity, and they can rapidly proliferate, which indicate that this kind of scaffold fits for the growth of seed cells.

**热点资讯:** 目前新的骨替代产品材料的孔径、孔隙率和生物降解性能、生物相容性等方面还存在诸多问题。有的骨诱导活性好但机械强度差,有的机械强度好但缺乏骨诱导活性,寻找理想的骨移植替代材料目前仍是骨科领域的热门课题和难题之一,开发两者兼具的理想骨组织工程材料具有重要意义。

**创新要点:** 异种骨具有一定机械强度,但生物活性差;纤维蛋白胶纤维蛋白是一种低抗原的生物大分子材料,植入体内易于降解,可塑性良好,具有合适的孔隙,适合细胞生长,能解决细胞的黏附问题,可作为细胞培养支架材料。去抗原牛松质骨经处理降低了抗原性,复合骨髓基质细胞则具有了诱导成骨活性。骨髓基质细胞/纤维蛋白胶/去抗原牛松质骨复合体形成了既有一定机械强度,又有成骨活性的双支架异种组织工程骨,是一种较好的骨移植材料。

**同行评价:** 论文选题属组织工程骨的热门研究课题,作者尝试应用纤维蛋白胶、异种无机骨构建组织工程骨复合支架,研究结果显示该复合支架异种组织工程骨既具有良好的成骨活性,又具有一定的机械强度,也解决了种子细胞与支架材料不易黏附的问题。论文学术水平较高,是对组织工程骨支架材料研究的有益的探索。

## 0 引言

组织工程骨的研究作为目前的热门研究课题,在国内外方兴未艾。可供选择的组织工程种子细胞及载体多种多样,但目前种子细胞的黏附问题尚未能得到很好解决,种子细胞与载体的复合一直是众多专家学者探讨的课题。作者采用纤维蛋白胶与异种无机骨复合,拟克服单一支架的缺点,构建一种具有较多优越性的复合支架,并拟解决种子细胞与支架材料黏附的问题,本文是该项组织工程骨研究的系列结果之一。

### 1 材料和方法

设计: 对照实验。

单位: 东北师范大学遗传与细胞研究所、吉林大学中日联谊医院骨科卫生部创伤骨科研究室、吉林大学机械科学与工程学院工程力学系。

材料: 实验于2005—01/2006—04在东北师范大学遗传与细胞研究所、吉林大学中日联谊医院卫生部创伤骨科研究室、吉林大学机械科学与工程学院工程力学系合作完成。实验动物: 1个月龄雄性新西兰大耳白兔1只,体质量0.25 kg,由吉林大学实验动物中心提供(许可证号10-1028)。牛松质骨由市售牛骨制取。纤维蛋白原、凝血酶(广州倍绣生物公司)、DMEM培养液(美国GIBICO公司)、胎牛血清(北京血清制剂厂)、胰酶、CO<sub>2</sub>培养箱、超净工作台、离心机、6孔无菌培养板、50 mL培养瓶、3 mL Ependoff管, LKB-III型超薄切片机(瑞典), JEM-1200EX型透射电子显微镜(日本)。

设计、实施、评估者: 实验由东北师范大学遗传与细胞研究所、吉林大学中日联谊医院骨科专家组评估,第一作者负责设计实施。

方法:

异种无机骨的制备: 取市售新鲜小牛股骨髌部松质骨切成0.5 cm×0.5 cm×0.8 cm 大小的条形块,蒸馏水反复去除表面有机成分后,再用氢氧化钠、丙酮、无水乙醇、30% 过氧化氢进行脱脂、脱蛋白处理变成无机骨(图1),用无菌蒸馏水反复冲洗干净,室温下浸泡透析

备用。

图1 异种无机骨

复合支架的制备：将处理好的牛松质骨块分别置于6孔无菌培养板，浸没于纤维蛋白原中，按纤维蛋白胶的制备比例混入凝血酶（图2）<sup>[1]</sup>，复合支架制备成功。

图2 复合支架

骨髓基质细胞培养：取1个月龄新西兰大耳白兔股骨骨髓，制成单细胞悬液。于含体积分数为0.15胎牛血清的DMEM培养液中培养。待骨髓基质细胞长满培养瓶，进行消化、传代。传至第3代共6瓶，以0.25%胰酶消化10~15 min，用DMEM中止消化，分别装入4个3 mL Ependoff管，1.5 mL/个，离心，去上清，将4个管中细胞合并于1个50 mL培养瓶中加入DMEM培养液10 mL混匀，计数骨髓基质细胞，浓度为 $1.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。

细胞与支架复合培养：兔骨髓基质细胞以 $1.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度与纤维蛋白胶和异种无机骨复合，置6孔培养板中继续培养，隔日换液，相差显微镜下逐日观察细胞在复合支架中的生长状况，数码相机镜头下直接摄片。

电镜观察：取培养4周的含骨髓基质细胞的复合支架组织经2.5%戊二醛前固定，1%锇酸后固定，4%乙二胺四乙酸二钠脱钙4周，乙醇系列脱水，Epon812环氧树脂包埋，LKB-III型超薄切片机（瑞典）半薄切片定位后做超薄切片，醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色，JEM-1200EX型透射电子显微镜（日本）观察骨髓基质细胞生长状况并摄片。

主要观察指标：①复合支架的制备结果。②相差显微镜、透射电子显微镜观察细胞与支架复合培养状况。

## 2 结果

2.1 相差显微镜观察细胞在复合支架中的生长状况 复合后立即在相差显微镜下观察，自无机骨孔隙中见骨髓基质细胞均匀混合于纤维蛋白胶中。培养36 h可见复合支架无机骨孔隙中部分细胞伸出伪足（图3），表现出其生长活性。培养2周在无机骨的空隙中可见细胞密集生长，细胞数逐日增多，逐渐互相接触形成条索状。细胞培养4周骨髓基质细胞形成密集网状（图4）。

图3 培养36h复合支架无机骨孔隙中部分细胞伸出伪足

图4 细胞培养4周骨髓基质细胞形成密集网状

2.2 透射电子显微镜观察细胞在复合支架中的超微结构 培养1个月的一个基质细胞031684X30K细胞局部（细胞有细突起，胞质内可见线粒体，核糖体，粗面内质网），各细胞器结构正常，说明细胞具有良好活性（图5）。

图5 培养1个月的基质细胞

## 3 讨论

骨组织再生需要三个基本生物学元素的相互作用：细胞、生长和分化作用因子、细胞外基质支架<sup>[2]</sup>。种子细胞依赖于细胞外基质的存在才能发挥作用。支架材料不仅影响种子细胞的生物学特性和培养效率，而且决定移植后能否与受体很好结合。因此，细胞支架材料（载体）的选择是骨组织工研究的关键环节之一。细胞支架材料应具备以下的特点：①良好的组织相容性：维持骨种子细胞的形态和表型，并促进细胞的黏附和增殖，诱导骨组织形成。②良好的生物降解性：材料的降解速率必须与植入的种子细胞再生骨的速率相匹配。③具有三维立体多孔结构：支架可制备成至少达90%孔性结构并具有一定的坚韧性，能在一定应力下维持原有的三维立体结构等。④可塑性和一定的机械强度。⑤良好的材料—细胞界面：利于细胞黏附、增殖，激活细胞特异基因表达<sup>[3]</sup>。虽然目前国内外学者已经探讨研究了多种天然和人工材料，但完全符合上述要求的材料并不多见。还存在很多有待解决的问题：①支架材料的降解率与成骨速度不协调。②材料的机械强度很难与降解速率相匹配。③材料在体内仍会引起一些炎症反应及免疫反应。④材料的表面活性差，影响种子细胞的黏附，分布和功能发挥等<sup>[1, 4]</sup>。

种子细胞必须与材料发生适当的黏附，才能进行迁移、分化和增殖。种子细胞的黏附问题是令学者们头痛的问题，秦廷武等<sup>[5]</sup>曾综述认为，细胞对材料的黏附特性不仅取决于材料本身，包括材料及其表面性质、表面修饰、表面形态、净电荷、孔隙率及降解速率，而且与细胞表面的分子表达及其材料的相互作用有关。无论在体外，还是体内，直接也是最先与组织细胞相接触并发生作用的是材料表面，因此细胞与材料表面的黏附相当重要，而且黏附特性的差异

还将影响细胞的增殖、分化等一系列反应。细胞与材料的黏附不仅可以为组织工程研究筛选出适于细胞发挥生理功能的胞外基质材料,而且为研究细胞与胞外基质相互作用的分子机制提供重要的手段。国内学者罗卓荆、胡蕴玉等<sup>[6-8]</sup>对异种无机骨进行了大量的研究,使其复合多种生长因子制成新型植骨材料,取得了可喜的成果。国外Sanchez等, Duda等也对无机骨的应用进行了深入研究<sup>[9-11]</sup>,在作者的前文中,已经证实了骨髓基质细胞在纤维蛋白胶中培养具有良好活性<sup>[1, 12, 13]</sup>。纤维蛋白胶具有可塑性和细胞可黏附性、合适的孔隙结构,是细胞培养的良好载体,还可促进细胞增值,但机械强度差<sup>[14-17]</sup>;异种骨虽有机械强度,但骨诱导活性差,且细胞不易黏附,二者结合则可克服各自的缺点,可使之成为较理想的组织工程骨支架材料。

实验中,通过相差显微镜可观察到,异种无机骨的孔隙中兔骨髓基质细胞均匀混合于纤维蛋白胶中生长,经过1个月的培养,细胞逐渐增多,进而融合成网状。骨髓基质细胞作为种子细胞在纤维蛋白胶中立体培养能够活跃生长<sup>[18-20]</sup>,在与异种骨复合后的支架材料中也能够良好生长。透射电镜结果显示种子细胞形态功能良好,也证实这种复合支架有利于骨髓基质细胞的生长。实验结果说明种子细胞在双(复合)支架载体中可以良好增殖分化,这种支架材料具有适合种子细胞生长的环境。双(复合)支架异种组织工程骨既具有良好的成骨活性,又具有一定机械强度,克服了其他人造材料二者不能兼顾的缺点,也解决了种子细胞与支架材料不易黏附的问题。随后作者以此种方法进行治疗兔骨缺损的实验研究,取得了较好的疗效。

应用纤维蛋白胶、异种无机骨构建的组织工程骨复合支架,是一种新的尝试,为组织工程骨支架材料的研究应用进行了有益的探索。实验给我们带来提示,单一的支架材料往往具有一些自身难以克服的缺点,研制应用能够取长补短的复合支架材料则能够克服这些缺点,是支架材料的一条新途径。

#### 4 参考文献

- 1 武汉,谷长跃,张春秋,等.兔骨髓基质细胞在纤维蛋白胶中立体培养[J].中国临床康复,2005,9(42):14-16
- 2 Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. Clin Orthop 1999; (367 Suppl):S68-83
- 3 Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials 2000;21(24):2529-2543
- 4 陶凯,刘晓燕.骨组织工程的研究和应用进展[J].中国实用整形美容外科杂志,2004,15(5):259-261
- 5 秦廷武,杨志明,蔡绍哲,等.组织工程中细胞与材料的粘附作用[J].中国修复重建外科杂志,1999,13(1):31-33
- 6 罗卓荆,胡蕴玉.牛松质骨力学强度与去抗原处理时限的相关性实验[J].第四军医大学学报,1996,17(6):534
- 7 罗卓荆,胡蕴玉,王茜,等.30% H2O2浸渍对牛松质骨力学特性的影响[J].中华骨科杂志,1997,17(11):714
- 8 袁志,胡蕴玉,马平,等.新型植骨材料—复合rhBMP2的异种骨的实验研究[J].现代康复,2000,4(10):17-18
- 9 Sanchez AR, Eckert SE, Sheridan PJ, et al. Influence of platelet-rich plasma added to xenogeneic bone grafts on bone mineral density associated with dental implants. Int J Oral Maxillofac Implants 2005;20(4):526-532
- 10 Duda M, Pajak J. The issue of bioresorption of the Bio-Oss xenogeneic bone substitute in bone defects. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska 2004;59(1):269-277
- 11 Zunino JH, Bengochea M, Johnston J, et al. Immunologic and osteogenic properties of xenogeneic and allogeneic demineralized bone transplants. Cell Tissue Bank 2004;5(3):141-148
- 12 傅捷,祝云利,吴海山,等.兔关节软骨细胞在纤维蛋白胶中体外培养[J].第二军医大学学报,2000,21(7):76
- 13 Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. Plast Reconstr Surg 2001;108(6):1713-1726
- 14 Perka C, Schultz O, Spitzer RS, et al. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in

rabbits. *Biomaterials* 2000;21(11):1145-1153

15 祝云利, 付捷, 缪志和. 人半月板纤维软骨细胞在纤维蛋白胶中体外培养[J]. *中国矫形外科杂志*, 2001, 8 (8) :597

16 Wechselberger G, Bauer T, Meirer R, et al. Muscle prelamination with urothelial cell cultures via fibrin glue in rats. *Tissue Eng* 2001;7(2):153-159

17 Becker JC, Beckbauer M, Domschke W, et al. Fibrin glue, healing of gastric mucosal injury, and expression of growth factors: results from a human in vivo study. *Gastrointest Endosc* 2005;61(4):560-567

18 Spitzer RS, Perka C, Lindenhayn K, et al. Matrix engineering for osteogenic differentiation of rabbit periosteal cells using alpha-tricalcium phosphate particles in a three-dimensional fibrin culture. *J Biomed Mater Res* 2002;59(4):690-696

19 Perka C, Arnold U, Spitzer RS, et al. The use of fibrin beads for tissue engineering and subsequential transplantation. *Tissue Eng* 2001;7(3): 359-361

20 Segura-Castillo JL, Aguirre-Camacho H, Gonzalez-Ojeda A, et al. Reduction of bone resorption by the application of fibrin glue in the reconstruction of the alveolar cleft. *J Craniofac Surg* 2005;16(1):105-112

---

***Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research***

地址: 沈阳1200邮政信箱 邮编: 110004 传真: +8602423388105

投稿邮箱:kf23385083@sina.com kf22838105@sina.com kf22838106@sina.com kf22854097@sina.com

咨询电话: +86 24 23384352 +86 24 23389106 +86 24 23388105