

组织工程骨修复山羊负重骨大段骨缺损的长期观察

陈滨¹,裴国献¹,王珂²,唐光辉¹(¹南方医科大学南方医院创伤骨科,广东广州 510515;²解放军 153 中心医院骨科,河南郑州 450042)

摘要:目的 探讨组织工程骨修复山羊大段负重骨缺损的长期效果及所用支架材料珊瑚羟基磷灰石的体内最终转归情况。**方法** 中国青山羊 15 只,制备单侧胫骨 2 cm 的骨膜与骨缺损,缺损内植入组织工程骨(珊瑚羟基磷灰石+经诱导分化的骨髓基质干细胞)。术后早期行 ECT、X 线、组织学等手段检测,评价骨缺损修复情况。远期在术后 6、12、18、24 月行 X 线及组织学检查,评价骨缺损修复情况及珊瑚羟基磷灰石的体内转归。**结果** 早期 ECT 显示在术后 2 个月内骨再生和再血管化进展顺利,X 线和组织学显示术后组织工程骨成骨呈渐进性和偏心性;远期 X 线和组织学显示组织工程骨与山羊胫骨牢固愈合,并开始塑形且出现髓腔再通,珊瑚羟基磷灰石在体内逐渐成为骨基质的组成成分,自身架构消失。**结论** 组织工程骨可以完全修复山羊大段负重骨缺损,形成正常骨组织并发挥功能;珊瑚羟基磷灰石最终被降解转化成骨基质。

关键词:骨组织工程;山羊;胫骨/损伤;骨缺损;珊瑚羟基磷灰石;骨髓基质干细胞

中图分类号:R687.3;R318.17 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)06-0770-04

Long-term observation of large weight-bearing bone defect in goats repaired with tissue engineering technique

CHEN Bin¹, PEI Guo-xian¹, WANG Ke², TANG Guang-hui¹

¹Department of Orthopedics and Traumatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Orthopedics, 153 Hospital of PLA, Zhengzhou 450042, China

Abstract: Objective To observe the long-term effect of tissue engineering-based repair of large weight-bearing bone defect in goats, and the final outcome of the scaffold material coral hydroxyapatite (CHAP) *in vivo*. **Methods** Fifteen Chinese goats were subjected to operations to induce a 2-cm left tibial diaphyseal defect, which was filled subsequently with CHAP and bone marrow stromal stem cells (BMSCs). The repaired defects were evaluated by ECT, X-ray and histology in the early stage and at 6, 12, 18, and 24 months postoperatively. **Results** ECT showed good bone regeneration and revascularization within 2 months postoperatively. X-ray and histology displayed eccentric and gradual bone regeneration in the early stage, and the tissue-engineered bone graft was firmly healed with the goat tibia. X-ray and histological examination at 6, 12, 18, 24 months postoperatively revealed moulding of the new bones and medullary cavity recanalization, and the structure of CHAP disappeared and gradually integrated into the new bones. **Conclusions** Tissue-engineered bone is capable of total repair of large bone defect in goats by forming normal functional new bones. CHAP can be eventually degraded completely and become the component of the newly generated bones.

Key words: tissue engineering bone; goat; tibia/injury; bone defect; coral hydroxyapatite; bone marrow stromal stem cell

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^[1-3]。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山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

收稿日期:2005-10-11

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)(2003AA205010);广州市重大攻关课题

Supported by National 863 Program (2003AA205010) and Key Science Research Project of Guangzhou

作者简介:陈滨(1973-),男,在读博士研究生,主治医师、讲师,研究方向:骨组织工程、创伤骨科

通讯作者:裴国献,教授,博士生导师

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,加培养基记数后接种。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,记数,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AO七孔窄动力加压钢板,除第4孔外,其余孔螺丝钉固定。环形剥离胫骨中段骨膜,于钢板第3、5孔之间,线锯断胫骨,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,显露骨骸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。

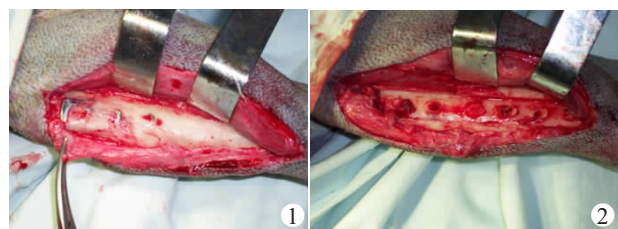


图1 术后12个月取钢板时大量骨痂包裹钢板

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的连接,达到了理想的塑形(图 4、5)。

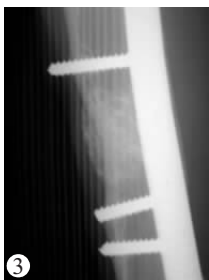


图 3 术后 12 个月 X 线显示骨皮质连续 CHAP 高密度影逐渐消失

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。

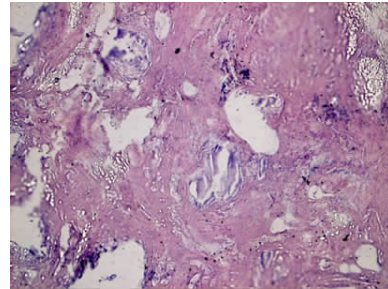


图 6 术后 12 个月组织学照片可见 CHAP 构架消失,散在崩解颗粒

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^[6-10]。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^[13-15],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,周末生,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.
-
- (上接 769 页)
- [8] Sacco RL, Kargman DE, Gu Q, et al. Race-ethnicity and determinants of intracranial atherosclerotic cerebral infarction [J]. Stroke, 1995, 26(1): 14-20.
 - [9] Nishimaru K, McHenry LC, Toole JF. Cerebral angiographic and clinical differences in carotid system transient ischemic attacks between American Caucasian and Japanese patients [J]. Stroke, 1984, 15(1): 56-9.
 - [10] Mori T, Mori K. Percutaneous transluminal cerebral angioplasty: serial angiographic follow-up after successful dilatation [J]. Neuroradiology, 1997, 39(2): 111-6.
 - [11] Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis[J]. N Engl J Med, 1998, 339(20): 1415-25.
 - [12] Gur AY, Bornstein NM. Cerebral vasomotor reactivity of bilateral severe carotid stenosis: is stroke unavoidable [J]? Eur J Neurol, 2006, 13(2): 183-6.
 - [13] Caplan LR, Wong KS, Gao S, et al. Is hypoperfusion an important cause of strokes? If so, how [J]? Cerebrovasc Dis, 2006, 21(3): 145-53.
 - [14] Wood EH, Correll JW. Atheromatous ulceration in major neck vessels as a cause of cerebral embolism [J]. Acta Radiol Diagn (Stockh), 1969, 9: 520-36.
 - [15] Fisher M, Blumenfeld AM, Smith TW. The importance of carotid artery plaque disruption and hemorrhage [J]. Arch Neurol, 1987, 44(10): 1086-9.
 - [16] Eliasziw M, Streifler JY, Fox AJ, et al. Significance of plaque ulceration in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis [J]. Stroke, 1994, 25(2): 304-8.
 - [17] Orlandi G, Parenti G, Bertolucci A, et al. Carotid plaque features on angiography and asymptomatic cerebral microembolism [J]. Acta Neurol Scand, 1997, 96(3): 183-6.
 - [18] Lammie GA, Sandercock PA, Dennis MS. Recently occluded intracranial and extracranial carotid arteries. Relevance of the unstable atherosclerotic plaque [J]. Stroke, 1999, 30(7): 1319-25.
 - [19] Ambrose JA, Winters SL, Arora RR, et al. Angiographic evolution of coronary artery morphology in unstable angina [J]. J Am Coll Cardiol, 1986, 7(3): 472-8.
 - [20] Tambasco M, Steinman DA. Path-dependent hemodynamics of the stenosed carotid bifurcation [J]. Ann Biomed Eng, 2003, 31(9): 1054-65.