论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0888-04

脱钙骨基质支架构建组织工程骨的实验研究

刘 杰,许建中,王序全,罗 飞 (第三军医大学西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 以同种异体骨脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)为支架材料,复合体外诱导培养的人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs),构建组织工程骨并通过裸鼠皮下异位成骨实验及裸鼠皮下致瘤性实验验证其成骨效果及安全性。**方法** 贴壁法培养hMSCs,体外诱导培养扩增,以 1.857×10^6/ml 的密度与DBM复合构建组织工程骨,体外培养,并在扫描电镜下观察细胞与材料复合情况,进行组织学观察。同时进行了裸鼠皮下异位成骨实验。**结果** 细胞与支架复合后3 d,细胞与DBM表面及孔隙可实现良好复合;复合后5 d,扫描电镜观察到细胞基质分泌旺盛,充满支架孔隙。裸鼠皮下成骨实验证明其成骨效果良好。**结论** 以本实验中使用的细胞培养方法扩增、诱导分化的种子细胞生物安全性好,自制的DBM具有良好的生物相容性,可为种子细胞生长提供较好的三维空间,按照标准化工艺流程制备的组织工程骨安全、有效。

关键词:骨髓间充质干细胞;脱钙骨基质;组织工程骨

中图法分类号:R318.08; R318.17 **文献标识码**:A

Tissue-engineered bone constructed with demineralized bone matrix scaffold: an experimental study

LIU Jie, XU Jian-zhong, WANG Xu-quan, LUO Fei (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the tissue-engineered bone with the allogenic demineralized bone matrix (DBM) as the scaffold material and the *in vitro* cultured human mesenchymal stem cells (hMSCs) and to evaluate the geosteogenesis efficacy and safety by implantation of tissue-engineered bone in nude mice subcutaneously. **Methods** After cultured and amplified, hMSCs were combined with DBM at the density of 1.857×10^6/ml to construct the tissue-engineered bone. The hMSCs and DBM combination was cultured *in vitro* for 3, 5, 7 d and tested for biocompatibility under scanning electron microscope and each sample was implanted into 36 nude mice subcutaneously, DBM as the control. The culture suspension of the hMSCs and DBM combination was injected into another 4 nude mice to observe the oncogenesis. Specimens were harvested after 4, 8, 12 weeks for histological observation. **Results** At day 3 of culture, hMSCs and DBM combined well and at day 5, the cell matrix was productive and full of the scaffold. The osteocytes were found inside in the scaffold in the experimental groups, while no osteocytes in the control groups. **Conclusion** The DBM has good biocompatibility, providing good three-dimension space for hMSCs. It is safe and successful to construct the tissue-engineered bone by the method we introduced.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; demineralized bone matrix; tissue-engineered bone

随着组织工程技术的不断发展,应用骨组织工程技术为缺少自体骨源的儿童患者或自体骨植骨失败的成年患者的骨缺损治疗制备充足理想的骨修复材料具有着良好的临床应用前景[1]。本研究参考Maddox等[2]介绍的新技术自制DBM作为支架材料,复合体外诱导培养的hMSCs,植入裸鼠皮下,以检测该组织工程化骨的异位成骨能力。以期为脱钙骨基质骨支架构建的组织工程化骨同期修复临床骨缺损的治疗提供进一步的疗效观察及安全性评价。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(2003AA205002)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (2003AA205002)

作者简介:刘 杰(1978-),男,山东省青岛市人,硕士研究生,医师,主要从事骨科临床、组织工程方面的研究。电话:(023)65398433,E-mail:wutianlaoshi.student@sina.com

通讯作者:许建中,电话:(023)68754164,E-mail: spine @mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-02-05;**修回日期**:2005-04-18

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 CO_2 恒温细胞培养箱(美国Forma公司),SW-CT-2F型超净工作台(苏州净化设备厂)倒置相差显微镜(日本OLYMPUS公司),AMRAY 1830-D4扫描电子显微镜(AMRAY,

美国），流式细胞仪（Becton Dickinson，USA），BA61 型电子天平（德国 Sartorius 公司）。

1.1.2　主要试剂　　DMEM/F12 培养基（Hyclone，美国），优等胎牛血清（Hyclone，美国），Percoll 液（Sigma 公司，美国），胰蛋白酶（Hyclone，美国），D-Hank 氏液（Hyclone，美国），二甲基亚砜（Sigma 公司，美国），β-甘油磷酸钠（Sigma 公司，美国），地塞米松（Sigma 公司，美国），VitC（Sigma 公司，美国）。

1.1.3　支架材料　　自制同种异体骨脱钙骨基质（DBM）。

1.1.4　实验动物　　BALB/c 裸鼠 40 只（SPF 级 6 周龄，雌雄参半）。

1.2　方法

1.2.1　hMSCs 的分离与培养　　无菌条件下各抽取 1 周内 27 例志愿者的两侧髂后上棘骨髓 20 ml，将采集到的抗凝骨髓与 20 ml DMEM/F12 培养液充分混匀，用 1.073 g/ml Percoll 液分离，DMEM/F12 培养液洗涤后计数有核细胞，以 $5 \times 10^5/cm^2$ 密度接种于 100 ml 培养瓶，置 37 ℃，5% CO_2 饱和湿度孵箱内常规培养，2 d 后半量换液，4 d 后全量换液，弃去大量的悬浮细胞，以后隔日换液。待细胞融合成单层后，传代培养，细胞计数达到满意数量级后留取部分细胞冻存，并准备诱导培养。

1.2.2　hMSCs 的鉴定　　随机抽取 1 瓶传代细胞在流式细胞仪下行 hMSCs 表面标志物鉴定，可见样本细胞 CD44 呈阳性表达，CD45 呈阴性表达。符合 CD105、CD166、CD29 和 CD44 呈阳性表达及 CD14、CD34 和 CD45 阴性表达的特点[3]。

1.2.3　hMSCs 的冻存　　取第 2 代细胞 1×10^6/ml，加入二甲基亚砜（浓度为 10%）和优等胎牛血清（浓度为 20%），吹匀放入冻存管，按 4 ℃ 3 h、－20 ℃ 3 h、－70 ℃ 12 h 的顺序逐步降温冻存，最后放入液氮中冻存，或使用程序降温仪进行冻存。

1.2.4　hMSCs 的成骨诱导培养　　本实验采用 Arinzeh 等[4] 描述的成骨诱导方法，消化第 2 代 hMSCs 以 $1 \times 10^4/cm^2$ 的密度接种于容积为 250 ml 培养瓶，用含有 β-甘油磷酸钠、维生素 C、地塞米松的成骨诱导培养基（含 10% 优等胎牛血清），每 2～3 天根据培养基颜色及细胞生长情况及时换液。

1.2.5　支架材料的预处理　　细胞进行诱导分化的同时开始对 DBM 支架进行预处理。称取约 0.2 g DBM 支架材料（体积约 4 mm × 4 mm × 4 mm）共 108 块，以 DMEM/F12 培养液浸泡，以调节其 pH 值至 7.2 后可供上架使用。

1.2.6　组织工程骨的构建　　取培养 3 代以内的细胞，用 0.25% 胰酶消化，含 10% 优等胎牛血清的 DMEM/F12 培养液洗涤 2 次，然后以无血清培养基悬浮至终浓度 1.857×10^6/ml，接种到已处理好的 DBM 支架材料中，使材料刚好被细胞悬液湿润，而液体不流出。构建好的组织工程骨在六孔板中共培养 7 d，期间见组织工程骨代谢旺盛，隔日换液时在保证严格无菌的条件下将构建的骨块翻面，使细胞更均匀地分布于支架材料中。

1.3　组织工程骨体外培养及扫描电镜检测

制备的组织工程骨继续在诱导培养液中培养且于上架后 3、5 d 及 7 d 后取材，相差显微镜下观察细胞与材料贴附情况。用戊二醛固定，临界点干燥，镀金后用扫描电镜观察材料与细胞贴附情况。

1.4　裸鼠皮下植入实验及组织学检查

36 只 BALB/c 裸鼠（雌雄参半，上海实验动物中心提供），体质量（16 ± 1）g。乙醚吸入麻醉下常规消毒，在其背部两侧上下各做一小切口。分别在裸鼠的左上、左下及右上方的皮下植入以志愿者自体细胞构建的组织工程化骨，右下方植入 DBM 支架作对照。每 4 只裸鼠（雌雄参半）皮下相同部位植入同一志愿者自体细胞构建的组织工程化骨，饲养 4、8、12 周后取材，常规 HE 染色观察。4 只裸鼠（雌雄参半）分别于背部皮下注射与植入骨内已复合成骨的等量细胞悬液（悬液由组织工程骨植入裸鼠皮下前的培养液和同步诱导分化的等量细胞组成，注射细胞量 = 1.857×10^6 个/只，以观察其有无致瘤情况。

2　结果

2.1　倒置相差显微镜下观察细胞

原代分离 48 h 后的间充质干细胞较牢靠贴附于玻璃培养瓶底，见图 1A。96 h 后形成明显的细胞集落，见图 1B。8d 后铺满瓶底 85%，达到细胞传代的要求，见图 1C。诱导分化后的细胞行钙结节茜素红染色提示诱导后得到的细胞符合成骨细胞的特点。

2.2　扫描电镜下观察支架材料及组织工程骨

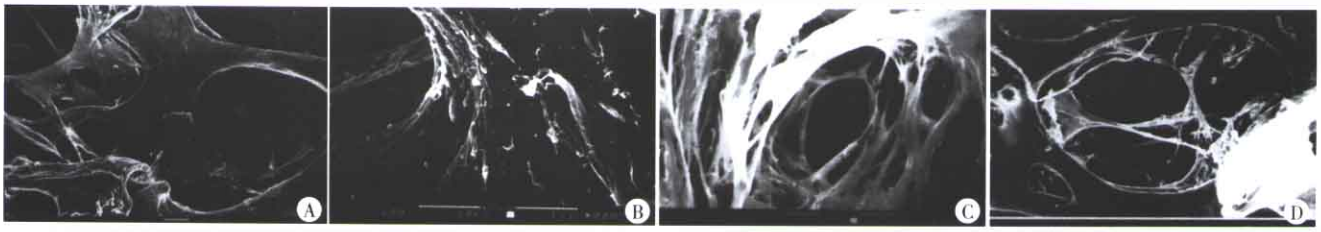
本实验使用的 DBM 孔径大小介于 200～500 μm，孔隙率较高[5]，见图 2A。复合后 3 d，向成骨细胞诱导的骨髓间充质干细胞在 DBM 支架网孔内表面贴壁生长，呈成纤维细胞形态生长，显示了良好的组织相容性，见图 2B。复合后 5 d，扫描电镜观察到细胞基质分泌旺盛，几乎充满支架孔隙，见图 2C。复合后 7 d，见基质分泌依然旺盛，但较第 5 天差别不大，见图 2D。



A：48 h；B：96 h；C：8 d

图 1　倒置相差显微镜下原代分离 48、96 h、8 d 后的细胞形态学观察茜素红染色结果　（IPCM × 40）

Fig 1　Cellular morphology of hMSCs at different time points in the primary culture under inverted phase contrast microscope　（IPCM × 40）



A: DBM control; B: At day 3 of combined culture of DMB and hMSCs (arrow in B); C: At day 5 of combined culture of DMB and hMSCs (arrow in C); D: At day 7 of combined culture of DMB and hMSCs (arrow in D)

图2 扫描电镜下空白DBM支架及细胞上架3、5、7 d后的复合情况观察 (SEM×600)

Fig 2 Combined culture of DMB and hMSCs at different time points (SEM×600)

2.3 裸鼠实验结果

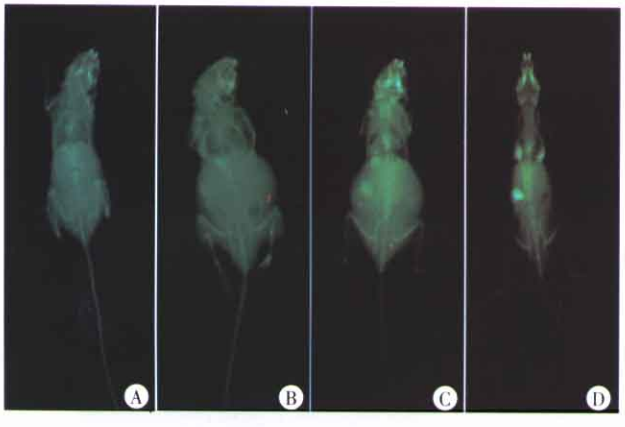
皮下植入组织块组实验动物除一例植入组织工程骨的雄性因麻醉过量死亡外无一死亡,皮下植入部位伤口无感染,植入物无排出。术后4周HE染色见植入组织工程骨及DBM空白支架部位均无明显的炎症反应及新骨形成,见图3A。术后8周植入DBM空白支架部位无新骨形成,植入组织工程骨部位有部分新生骨形成,见图3B。术后12周植入的DBM已完全吸收,植入组织工程骨部位取材可见成熟骨组织,见图3C。细胞悬液注射组裸鼠生活情况良好,注射部位未见溃疡、肿瘤样物发生,注射后3个月处死2只取其肺、心、肾、肝脏组织行大体观察及病理切片检查未见瘤样组织形成;余下的2只于6月龄时正常死亡,体重分别由注射悬液前的17、15.5 g增加至26、24 g。切取其肺、心、肾、肝脏组织行病理切片检查结果同前,皮下成骨实验裸鼠行X线检查结果与组织学检查一致,植骨后3个月的裸鼠可见明显成骨。见图4。



A: 1 month; B: 2 months; C: 3 months

图3 裸鼠皮下植骨术后1、2、3个月的组织学观察 (HE×40)

Fig 3 The histological results of tissue-engineered bone at 1,2,3 months after implantation into the nude mice subcutaneously (HE×40)



A: Pre-implantation; B: 1 month post-implantation; C: 2 months post-implantation; D: 3 months post-implantation

图4 裸鼠背部皮下成骨的放射学观察

Fig 4 X ray of the tissue-engineered bone in the nude mice

3 讨论

各种原因所致的骨缺损在临床上十分常见,骨修复材料需求量巨大,目前尚缺乏来源丰富的理想骨修复材料。自体骨移植虽然是目前植骨材料的金标准[6],但对于缺少自体骨源的儿童患者或自体骨植骨失败的成年患者的治疗一直是个难题,骨组织工程以其微创的治疗方式和良好的治疗效果得到了越来越多研究者的重视[7]。骨组织工程的基本方法是利用从患者自身抽取的少量骨髓通过分离、培养的同时对其进行扩增、诱导而得的种子细胞,接种于可吸收的生物材料中形成细胞-支架复合物,植入体内,随着支架材料的降解,种子细胞持续增殖分化,分泌基质并释放细胞因子,加速骨缺损的修复[8]。本实验选用人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)作为

构建组织工程骨的种子细胞，不仅因其来源丰富，采集方便，容易在体外培养、诱导、扩增，具有良好的成骨细胞分化潜能和成骨活性，而且应用自体的 hMSCs 作为同源细胞治疗，还具有细胞与支架材料的亲和性较好的优点[9]，此点也在本实验所包括的一系列细胞组织学定性染色和 hMSCs 与自制的 DBM 支架材料的良好复合中得到验证。在组织工程骨支架材料研究方面，从细胞相容性、组织相容性、理化性能和生物安全性等方面考虑，同种异体 DBM 的加工工艺成熟简便；具有极低的免疫原性、良好的细胞及组织相容性[8]的同时还具有消毒后保持其骨诱导能力的特性[10]；本身亦具有一定力学强度，通过改变脱钙率可以调节其力学强度，以适应临床不同植骨部位的需要[7]；通过采集前病原学检测和相应的加工处理，可以保证其具有较好的生物安全性；Kasten 等[11]对部分脱钙的羟基磷灰石(CDHA)、β-磷酸三钙(β-TCP)以及脱钙骨基质(DBM)从种子细胞的粘附率、长入支架内部的数量、增殖和分化效率等方面做过比较，结果证明 DBM 为三者中最优选择。DBM 为一种经典的修复骨缺损的天然材料，乳白色、成型，其结构、轮廓都能维持原来骨的形态。经生物安全性监测，该材料符合国际标准化组织 ISO 的规定。来源于人的 DBM 天然网孔符合人体正常生理要求[5]，且材料可以随着成骨的进展逐步降解吸收，降解过程中并不产生对成骨有害的酸性代谢产物，使得 hMSCs 可以在材料内表面迅速贴壁、稳步扩增，本实验通过在裸鼠皮下异位成骨的研究，成功地说明了 DBM 不仅可以为 hMSCs 或是成骨细胞提供理想的三维立体支架，其良好的组织相容性和无细胞毒性使其成为骨组织工程种子细胞较为理想的支架材料之一。体外构建过程中显示，细胞上架后 7 d 与上架后 5 d 基质分泌情况类似，故在动物实验中选择了体外构建后 5 d 为时间点，主要是为了在达到满足成骨要求的同时既尽可能的减少了体外培养的时间，降低组织工程骨污染或细胞受损的几率，又节省了组织培养的人力物力，为今后以 DBM 与 hMSCs 复合构建的组织工程骨的产业化完善其实验室操作的标准化规程积累经验。另外，本实验同时还以裸鼠皮下注射细胞悬液的方法一定程度上验证了诱导上架细胞的安全性。本实验以 DBM 为支架材料，复合体外诱导培养的 hMSCs 成功地构建了组织工程骨，并在裸鼠异位成骨试验中取得了良好的效果，综合其微创的优点，可望使依本实验方法构建的组织工程骨成为临床骨缺损修复与自体骨同等理想的替代材料。

参考文献：

[1] Levenberg S, Langer R. Advances in tissue engineering[J]. Curr Top Dev Biol, 2004, 61: 113 - 134.

[2] Maddox E, Zhan M, Mundy G R, *et al*. Optimizing human demineralized bone matrix for clinical application[J]. Tissue Eng, 2000, 6 (4): 441 - 448.

[3] Boiret N, Rapatel C, Veyrat Masson R, *et al*. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow [J]. Exp Hematol, 2005, 33(2): 219 - 225.

[4] Arinzeh T L, Peter S J, Archambault M P, *et al*. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85-A (10): 1927 - 1935.

[5] Han B, Tang B, Nimni M E. Quantitative and sensitive *in vitro* assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix[J]. J Orthop Res, 2003, 21(4): 648 - 654.

[6] Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A, *et al*. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells[J]. Transfus Apheresis Sci, 2004, 30(2): 169 - 174.

[7] Mauney J R, Jaquiery C, Volloch V, *et al*. *In vitro* and *in vivo* evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering[J]. Biomaterials, 2005, 26(16): 3173 - 3185.

[8] Burg K J, Porter S, Kellam J F. Biomaterial developments for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2000, 21(23): 2347 - 2359.

[9] Zipori D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair[J]. Blood Cells Mol Dis, 2004, 33(3): 211 - 215.

[10] Ferreira S D, Dernell W S, Powers B E, *et al*. Effect of gas-plasma sterilization on the osteoinductive capacity of demineralized bone matrix[J]. Clin Orthop, 2001, (388): 233 - 239.

[11] Kasten P, Luginbuhl R, van Griensven M, *et al*. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, β-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix[J]. Biomaterials, 2003, 24(15): 2593 - 2603.

（编辑　王　红）

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法（即从小数点算起，向左向右每 3 位分 1 节，节间留出一定空隙），废除千分撇分节法（如 2,431 改为 2 431）。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部