文章编号:1000-5404(2005)16-1625-03

专家论坛

# 骨组织工程的研究与开发进展

# Advances in research and exploitation of bone tissue engineering

许建中 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

组织工程经典的概念是指在可生物降解的支架材料上接种活细胞,用以植入体内完成组织修复与功能替代。这一概念自1987年正式提出后,迅速发展成为一个多学科交叉的新兴学科,其研究内容已从早期的理论探索进展到了应用基础研究和产品的开发阶段。国外已有组织工程皮肤和软骨产品上市,组织工程骨的研究也已进入临床验证阶段,以产业化为目标的研发工作最终有望彻底解决骨缺损修复的临床难题,本课题组在国家"863"计划等科研经费的支持下进行了骨组织工程种子细胞、构建方法、生物反应器、动物试验和临床验证等方面的系列研究,现结合国内外组织工程骨的研究与开发进展谈谈个人的观点。

## 1 种子细胞

### 1.1 骨膜和骨组织来源的成骨细胞

成骨细胞取自骨膜深面的生发层或松质骨,具有很强成骨能力,与生物材料复合有继续生长分化及形成新骨的能力,在动物和临床实验中都已取得成功[1]。由于成骨细胞体外扩增相对困难,异体应用存在一定免疫原性,其应用前景受到一定限制。

### 1.2 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)

理论上ESCs能分化成人体的各种细胞,可能为不同种类的组织工程提供相应的种子细胞,是研究热点之一。ESCs取自于人早期胚胎,其研究和应用存在伦理道德方面的争议。最近,美国政府重新开始资助中断了数年的ESCs研究项目,我国也同意可将14 d以内的人类胚胎可用于实验研究[2],ESCs的应用前景变得光明起来。但目前在技术上仍难以获得纯化的ESCs,其分化方向也难以控制,动物实验还发现ESCs回植体内后易形成畸胎瘤,这使得ESCs距临床应用还有一段艰难的路程。

### 1.3 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)

MSCs具有强大的增殖潜能和良好的成骨分化潜能,来源方便,通过骨髓穿刺就可以获得足量MSCs,避免了伦理学问题,其分离、培养和体外向成骨系的定向分化技术已经成熟,MSCs已成为目前比较理想的骨组织工程种子细胞。尽管MSCs缺乏特征表型,目前尚无统一的鉴定标准,但仍没有阻止MSCs的临床应用。目前国内外正在开展的组织工程临床试验多采用患者自体MSCs[3,4],从采集患者骨髓标本到完成组织工程骨构建约需要20余天时间,这段时间主要用于种子细胞的扩增,通过新型生物反应器、微载体培养技术、脉冲电磁场、生长因子等手段促进细胞的体外增殖已取得一定进展,在本专题中有相关报道,不再赘述。

尽管自体MSCs用于个体化治疗已经取得了较满意的动物试验和初步临床试验结果,但这种个体化的生产模式制约了其产业化推广,建立异体种子细胞库是从根本上解决这个问题的捷径。研究表明未分化及已分化为成骨细胞的MSCs均不表达MHC-Ⅱ和共刺激分子CD40、CD40L、B7-1,B7-2[5];体外实验显示MSCs具有一定免疫抑制作用,能显著抑制体外混合淋巴细胞增殖反应,且能抑制由分裂素、刀豆素以及异体抗原引起的淋巴细胞增殖反应[6];体内实验证明MSCs能在异体内较长时间存活并发挥免疫抑制作用,临床上已开始用输入异体MSCs来减轻异体造血干细胞(HSCs)移植后发生的移植物抗宿主反应(GVHD)[7];延长异体皮肤移植存活时间的效果与临床应用的免疫抑制剂-环孢霉素A相当[8];异体MSCs输注到宿主体内后在宿主体内长期存活,并具有多器官归巢能力和可塑性[9,10]。其免疫调节机制尚不甚清楚,但可能与下列途径相关:下调异体免疫细胞如树突状细胞、未激活的和效应T细胞以及NK细胞的活性,降低免疫反应[11];抑制T细胞表面CD25和CD38的表达,从而抑制其活化增殖[12];影响抗原提呈细胞的成熟而使T细胞无反应等[13]。异体MSCs构建的组织工程骨治疗狗大段缺损的实验已经取得了成功,初步证实了异体组织工程骨向临床过渡的可行性[14]。另外,本课题组观察了不同年龄供者的MSCs的增殖和成骨分化潜能,发现越年轻的供者其MSCs的增殖分化潜力越强[15]。由此可以推断从人胚胎中获取的MSCs将最有希望成为免疫排斥弱、增殖和传代能力强的种子细胞。

建立MSCs标准细胞系除了要求细胞低免疫原性、无致病因子、无致瘤性外,还要延长其生命期,实现长期连续传代并保持未分化状态。细胞的端粒长度是决定细胞的生命期的重要因素,延长端粒长度,就有可能逆转细胞老化及凋亡。通过基因修饰有可能增强端粒酶活性能实现MSCs的永生化,并保持自我更新和多向分化潜能[16],但如何保证安全有效的表达调控是基因修饰方面研究普遍存在的难题。旨在强化MSCs的成骨作用等目的的其它基因转移技术距离临床应用更加遥远。

## 2 支架材料

优良的骨组织工程支架材料,应具备:良好的细胞和组织相容性、可控的生物降解性、适宜的力学强度、特定的三维外形、优化的内部三维孔隙结构,即具有适宜的孔隙率、孔隙连通度和不同孔径孔隙的三维分布。尽管目前有各式各样的支架材料在使用,但迄今为止尚缺同时满足上述条件的理想支架材

作者简介:许建中(1962-),男,辽宁省大连市人,博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事组织工程和脊柱外科方面的研究。电话:(023)68754164, E-mail: xjzslw@hotmail.com

收稿日期:2005-01-30;修回日期:2005-06-24

料。这些材料可以分为以下几类：

### 2.1 人工合成生物大分子材料

以聚乳酸(polylactic acid, PLA)、聚乙酸(polyglycolic acid, PGA)、PGA-PLA 共聚物等为代表的高分子材料，其优点包括：可降解性，良好的细胞相容性、容易塑形。但也有两个共同的缺陷：酸性降解产物和细胞组织相容性欠佳。目前该类材料的研究集中于材料的改性、表面修饰和复合不同材料以克服上述两个缺陷。

### 2.2 人工合成无机材料

主要为钙盐，以羟基磷灰石(HA)、磷酸三钙(TCP)等为代表，它们都有较好的骨传导作用和生物相容性，复合细胞后具有体内成骨能力。但是其主要缺点是降解时间难以调控，不利于新生骨的改建；且其制备工艺难以保证孔隙连通率。

### 2.3 天然生物衍生材料

天然材料的优点主要在于细胞组织相容性及孔隙结构方面。

2.3.1 胶原、藻酸盐、纤维蛋白支架　因力学强度差、降解速度快等缺陷，单独应用成骨能力不强，与 TCP、HA 等材料复合后有利于细胞的粘附并能吸附周围的生长因子，可以取得良好的成骨效果。其中Ⅰ型胶原是骨有机质组成的主要成分，被证实能促进 MSCs 成骨诱导分化而备受重视。

2.3.2 珊瑚　主要成分为碳酸钙，骨传导作用较好，在高孔隙率状况下仍能保持一定的机械强度，优于大多数人工制备的多孔材料。但是也存在降解困难、不易加工的缺点。

2.3.3 骨衍生材料　由同种异体、异种骨经不同方法处理所得，具有最接近修复区域的三维孔隙结构和适当降解速率，材料表面利于细胞粘附，具有骨传导性和骨诱导性。存在的主要问题包括：潜在的致病危险和来源相对紧张。天然骨衍生材料是目前组织工程临床和动物试验中最常用的支架材料[1,3,4]。其中，同种异体脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)制备工艺成熟，免疫原性极低，具有良好的细胞组织相容性，并在体内易于改建，通过不同的脱钙率可以调节其力学强度，以适应不同的需要；通过采集前的病原学检测和相应的加工处理，可保证其生物安全性，DBM 作为同种异体骨移植材料在国内外均已广泛应用于临床。本课题组改良制备工艺生产的 DBM 组织工程支架已向国家食品药品监督管理局申请了注册产品标准，明年将有可能成为产品上市。

## 3 组织构建

具备了适宜的种子细胞和生物支架材料以后，如何使种子细胞和支架材料高效率复合并在体外进一步成熟是亟需关注的新问题。除了前述的支架材料改性和表面修饰外，接种技术的改进和生物反应器的应用越来越受到重视。

### 3.1 接种技术

支架材料必须接种足够数量的种子细胞才能保证所构建组织的成骨活性，常规的静置接种法细胞与支架粘附效率低，提高接种密度种子细胞上架效率将进一步降低，上架细胞数量不再显著增加。目前的研究主要集中在两方面：一方面在于支架材料的表面修饰；另一方面在于改进接种的方法。利用本课题组的专利技术“双相接种构建工程化组织法凝胶双相接种法”可取得较高的接种效率[17]，本专题中有两篇文章分别介绍其体内、外实验结果。

与现有的观点相反，最近也有学者设想经体外扩增获得足量的种子细胞或直接术中抽取患者骨髓分离获得种子细胞后，术中直接将细胞注入到支架材料中，立即放置到体内环境下继续生长，最终修复组织缺损，该思路对组织工程临床推广非常有利，但是尚缺乏足够的证据证明其优越性。

### 3.2 生物反应器

组织工程医疗产品走向产业化制备的进程中，为了降低专业人员的工作量，维持产品质量的稳定性，专业制造设备也在同期开发，这类设备名称各异，暂且统称为生物反应器。其主要思路是营造近似于机体的生理环境，并维持其空间和时间上的稳定，同时允许施加特定的人为干扰因素，以实现细胞和组织生产的自动化、规模化。模拟生理环境主要是通过安装的各种传感器监测温度、营养物质、氧和二氧化碳、代谢废物水平，并通过培养液的循环灌注或自动更换等方式予以调节，从而维持环境的稳定。需要施加的人为干扰因素根据需要而不同，最基本因素是控制流体作用力到一定大小。适当大小和类型的流体作用力能促进物质交换和细胞、组织的生长、分化和分泌基质，但是过高的流体剪切力会对细胞造成不可逆转的损伤。本课题组既往实验观察表明特定参数的脉冲电磁场刺激对 MSCs 的增殖和向成骨细胞分化有一定促进作用[18]，这一研究成果已被应用到本课题小组正在试制的专利设备-循环和生理应力模拟工程化组织三维培养装置，本专题中也有文章具体介绍。

### 3.3 组织的血管化

血管化是组织修复过程中的基本环节，体外构建的组织工程骨尤其是大体积组织工程骨块植入体内后必须迅速建立充分的血供，为种子细胞的生存和发展提供营养。目前，促进组织工程骨体内血管化的研究很多，常见的有：包裹血管束法、肌肉包埋预构建带血管蒂法、血管蒂筋膜包裹法、复合血管内皮细胞等，但都存在增加额外创伤、受术区条件限制较大、增加手术难度等不足，难以在临床应用中推广。除此之外，利于血管化的支架材料三维结构改良和促血管生成生物活性因子的缓/控释技术方面的研究也具有良好的临床应用前景。

## 4 临床应用

组织工程骨的体内实验研究经历了从无免疫能力动物到小型哺乳动物、再到大型哺乳动物体的阶段，现在其有效性、安全性越来越多被证实，其基本技术相对成熟。由于文化政策以及病员资源等原因，国内在组织工程骨的临床研究方面具备相当优越的条件，研究水平已步入世界前列。

由于政策法规等原因的限制，国外只有零星的组织工程骨临床病例报道。德国 BioSeed® 公司生产的组织工程骨产品 Oral Bone 利用患者下颌骨膜细胞，在自体血清中培养 6 周，将自体细胞包埋在可降解的基质材料织物中形成三维骨组织，用以加固和重建上颌骨。国内，上海第二医科大学将成骨诱导的自体 MSCs 与部分脱钙骨复合构建的组织工程骨用于修复颅骨和颌面骨缺损 11 例取得良好疗效[3]。四川大学应用异体骨膜来源的成骨细胞复合生物衍生骨支架构建组织工程骨对 52 例病人多个部位的骨缺损、骨不愈合进行了修复，证实组织工程骨

有良好的成骨能力，未发现明显排斥反应[1]。还进行了自体 MSCs 复合同种异体生物衍生骨支架构建的组织工程骨与自体髂骨游离移植修复四肢骨缺损各 26 例的临床试验，认为两者的治疗效果无显著差异[4]。本课题组用自体 MSCs 复合异体 DBM 构建的组织工程骨在 26 例缺乏自体骨来源的四肢长骨缺损患者的临床试验中也取得满意疗效，相信国内尚有大量由于随访时间和病例数的缘故尚未报道的病例。

国内的组织工程骨临床试验已经积累了相当的经验，在继续深入研究的同时应注重产业化开发，争取早日用优质的组织工程产品造福患者。除了继续在建立标准种子细胞库、发展新型支架材料、研制专用生物反应器、完善生物安全性检测、提高临床研究质量、产品的保存运输、产品制备的标准化等方向深入研究外，还应在现有的技术手段基础上致力相关产品的开发与推广。相信不久的将来就会涌现出一批组织工程骨相关医疗产品并造福于广大骨缺损患者。

**关键词**：组织工程；骨缺损；临床应用；开发

**中图法分类号**：R318　　**文献标识码**：A

## 参考文献：

[1] 杨志明，黄富国，秦廷武，等. 生物衍生组织工程骨植骨的初步临床应用[J]. 中国修复重建外科杂志，2002，16(5)：311－314.

[2] 中国国家人类基因组南方研究中心伦理委员会. 人类胚胎干细胞研究的伦理准则(建议稿)[J]. 医学与哲学，2003，24(2)：19－21.

[3] 柴　岗，张　艳，刘　伟，等. 组织工程骨在颅颌面骨缺损临床修复中的应用[J]. 中华医学杂志，2003，83(19)：1676－1681.

[4] 沈　兵，谢富林，谢清芳，等. 自体髂骨与组织工程骨植骨的临床应用对比研究[J]. 中国修复重建外科杂志，2002，16(6)：429－431.

[5] Niemeyer P, Seckinger A, Simank H G, *et al*. Allogenic transplantation of human mesenchymal stem cells for tissue engineering purposes: an *in vitro* study[J]. Orthopade, 2004, 33(12): 1346－1353.

[6] Djouad F, Plence P, Bony C, *et al*. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals[J]. Blood, 2003, 102(10): 3837－3844.

[7] Lazarus H M, Koc O N, Devine S M, *et al*. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2005, 11(5): 389－398.

[8] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, *et al*. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*[J]. Exp Hematol, 2002, 30(1): 42－48.

[9] Deng W, Han Q, Liao L, *et al*. Long-term distribution of adult stem cells in different tissues after transplantation[J]. Stem Cell and Cellular Therapy, 2003, 1(1): 62－65.

[10] Devine S M, Cobbs C, Jennings M, *et al*. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates[J]. Blood, 2003, 101(8): 2999－3001.

[11] Aggarwal S, Pittenger M F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses[J]. Blood, 2005, 105(4): 1815－1822.

[12] Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C, *et al*. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes[J]. Scand J Immunol, 2004, 60(3): 307－315.

[13] Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, *et al*. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness[J]. Blood, 2005, 105(5): 2214－2219.

[14] 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.

[15] 朱　灏，许建中，周　强，等. 不同年龄人骨髓间充质干细胞体外增殖及成骨分化的研究[J]. 中国矫形外科杂志，2004，12(10)：759－761.

[16] Abdallah B M, Haack Sorensen M, Burns J S, *et al*. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite of extensive proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(3): 527－538.

[17] 秦　辉，许建中，周　强，等. 两种构建方法对组织工程骨种子细胞粘附和增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(11)：990－992.

[18] 赵　敏，许建中，周　强，等. 脉冲电磁场促进人骨髓间充质干细胞成骨的研究[J]. 中国矫形外科杂志，2004，12(6)：439－443.

(编辑　王　红)

## 关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如：公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称，1995 年不能写成 95 年或 95 年；1953－1958 年不能写成 1953－58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用“:”分隔的形式。如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2　计数和计量(整数、小数、分数、百分数、均数)包括序数、编号　　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法，不用“千分撇”，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙(如 2,431 改为 2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数“0”多，5 位以上的数字，可以用“万”“亿”表示，但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示，例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部