文章编号:1000-5404(2005)16-1660-03

论著

双相接种技术构建组织工程骨的异位成骨观察

秦 辉,许建中,王序全,何清义,罗 飞,朱 灏,尹芝华 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 评价双相接种技术体外构建的组织工程骨在体内的成骨潜力和这种体外构建策略的可行性。**方法** 8只山羊抽取自体骨髓体外扩增、定向成骨诱导,再分别采用静置接种法和双相接种法将羊骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)与脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)复合,复合培养5 d;将这两种方法构建的组织工程骨分别植入羊的背部肌袋内,同时植入单纯DBM作为阴性对照;术后2、8周取标本,进行大体观察、组织学染色检查和免疫组织化学检测。**结果** 双相接种技术体外复合MSCs与DBM构建组织工程骨,细胞在支架上体外生长情况优于普通方法,植入山羊肌肉内术后2周观察到异位成骨,并随时间延长成骨量增加,其组织学半定量评分术后2周为(2.46±0.32)、8周为(4.13±0.42),明显优于普通方法的术后2周(1.96±0.21)、8周(3.66±0.37)($P<0.01$)。植入后的组织工程骨材料边缘均可检测到BrdU标记阳性的细胞。单纯DBM植入未见成骨表现,亦无BrdU标记阳性的细胞。**结论** 双相接种技术有利于组织工程骨在体内的成骨,是一种值得推广的组织工程骨体外构建技术。

关键词:组织工程;双相接种技术;异位成骨

中图法分类号:R318.08;R322.71;R329.2 **文献标识码**:A

Ectopic bone formation of tissue engineering bone constructed with diphasic seeding technique

QIN Hui, XU Jian-zhong, WANG Xu-qian, HE Qing-yi, LUO Fei, ZHU Hao, YIN Zhi-hua (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the potential of ectopia osteogeny by tissue engineering bone fabricated by diphasic seeding technique and its feasibility. **Methods** Mesenchymal stem cells (MSCs) were drawn from 8 goat bone marrow, amplified and induced to differentiated into osteoblasts, then seeded onto demineralized bone matrix (DBM) by normal seeding technique and diphasic seeding technique respectively, and co-cultured for 5 d *in vitro*. The two kinds of tissue engineering bone and DBM as negative control were implanted into musclar pouch in goat back separately. At week 2 and 8 postoperatively, the effectiveness of bone formation was assessed by means of gross, histological and immunohistologial observations. **Results** MSCs grew better in DBM network fabricated by diphasic seeding technique than by normal seeding technique. In 2 weeks after implantation new osteogenesis was detected in MSCs-DBM groups and increased in a time-dependent manner. The tissue score of osteogenesis in diphasic seeding group was (2.46±0.32) in 2 weeks and (4.13±0.42) in 8 weeks, which was higher than in normal seeding group [(1.96±0.21) in 2 weeks, (3.66±0.37) at 8 weeks] ($P<0.01$). The cells marked by BrdU were observed in tissue engineering bone, while none was detected in DBM alone group in which there was no new bone formation. **Conclusion** Diphasic seeding technique is more favorable than normal seeding method, which can facilitated the bone formation by tissue engineering bone *in vivo*.

Key words: tissue engineering; diphasic seeding technique; ectopic bone formation

组织工程骨立足于成为能替代自体骨且来源不受限的移植材料,展现出诱人的前景,但其中的一个关键技术——体外构建,仍是目前的一个难题和研究热点。作者曾研究证实双相接种技术体外复合种子细胞和支架材料可以明显提高细胞的利用率[1],本实验中采用双相接种技术复合山羊自体间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)和同种异体脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)复合、埋植于山羊的背部肌袋内,观

基金项目:国家高技术研究发展计划资助重大攻关课题("863"计划)(2003-AA205020),重庆市科学技术重点攻关项目(2003-13-6)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020) and the Foundation for the Key Sci & Tech Research Project of Chongqing (2003-13-6)

作者简介:秦 辉(1965-),男,四川省成都市人,硕士,副主任医师,主要从事组织工程技术和创伤外科方面的研究。电话:(028)68062128,E-mail: q999h@sohu.com

通讯作者:许建中,电话:(023)68754164,E-mail: xjzslw@hotmail.com

收稿日期:2005-01-30;**修回日期**:2005-06-24

察该体外构建技术对组织工程骨体内成骨的影响。

1　材料与方法

1.1　DBM 的制备

参照本中心制定的工艺流程，取新鲜健康山羊椎体松质骨加工成 1 cm × 1 cm × 0.2 cm 大小，经脱脂、脱钙、去抗原制成 DBM，冻干后 ^{60}Co 消毒，－70 ℃保存 3 个月。使用时将 DBM 在 DMEM/F12 液中浸泡 48 h，再用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 液浸泡 12 h，吸干水分备用。

1.2　MSCs 的分离、培养

11 ~ 13 月龄的健康中国山羊 8 只（第三军医大学实验动物中心提供），体质量 19 ~ 23 kg，均为雌性，于山羊髂后上棘处穿刺抽取骨髓，使用密度为 1.073 kg/L 的 Percoll 液（Phamacia 公司）梯度离心，分离收集单个核细胞，体外单层培养。原代培养液为 DMEM/F12 液含 15% 优质胎牛血清（Hyclone 公司），传代培养液的胎牛血清浓度改为 10%，成骨诱导培养液采用传代培养液加地塞米松（10^{-8} mol/L）、β-甘油磷酸钠（10 mmol/L）和维生素 C（50 mg/L），均于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱内孵育。第 2 代细胞采用成骨诱导培养液培养，试剂购自 Sigma 公司。第 2 代细胞消化接种前 3 d 移入含 0.2% 5-溴脱氧尿嘧啶（BrdU，北京中山公司）的无血清 DMEM 培养基（200 μl BrdU/100 ml DMEM）中，37 ℃、5% CO_2 饱和湿度条件下培养 1 h 标记细胞，再按下面方法与 DBM 复合。

1.3　细胞-支架材料复合

1.3.1　静置接种法（normal seeding method）　将上述标记好的细胞制成 4×10^6/ml 浓度的细胞悬液，滴入备用的 DBM 中，充分渗入后，在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下静置 5 h，再加入成骨诱导培养液继续培养 5 d。

1.3.2　双向接种法（diphasic seeding method）　上述细胞的一半同时与医用生物蛋白胶（fibrin glue，FG，广州倍特生物技术有限公司提供）主体胶配成 4×10^6/ml 浓度的细胞悬液，滴入备用的 DBM 中，浸透为止，喷洒等量的催化剂，5 min 后继续用成骨诱导培养液体外培养 5 d。

1.4　手术方法

将实验山羊肌注速眠新（0.15 ml/kg）麻醉后，于背部做 6 处肌袋，随机分配为 A、B、C 3 组，每组在每个动物各做两个埋植点，分别植入用自体细胞双向接种法（A 组）、静置接种法构建的组织工程骨（B 组），单纯植入 DBM（C 组）作为空白对照，每处植入物均为 1 cm^3。

1.5　大体观察和组织学检查

术后 2、8 周各取 4 只羊的标本，大体观察后将标本以 10% 甲醛固定 72 h，8% EDTA 脱钙（2 ~ 3 d 更换脱钙液），酒精逐级脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，切片，行 HE 染色，每 1 组织块连续做 6 张切片，光镜下观察，按文献报道的组织学评分标准[2]作半定量分析。同时，采用免疫组织化学 SABC 法检测修复组织细胞中 BrdU 的表达以鉴定新生骨组织的细胞来源。

1.6　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，Microsoft Excel 软件处理，组间比较用双样本配对 t 检验。

2　结果

2.1　相差显微镜观察

原代 MSCs 体外培养 5 ~ 6 d 呈现集落样生长，形态为长梭形及多角形；9 ~ 12 d 长满单层。经传代的细胞细胞形态更加单一，4 ~ 6 d 即可铺满瓶底。

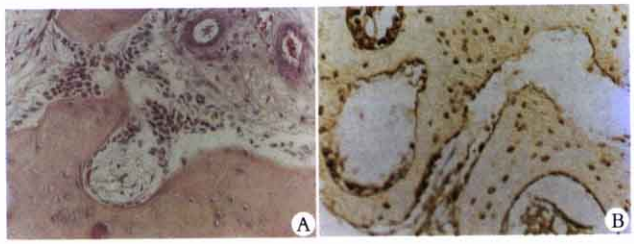
MSCs 与 DBM 复合后培养 20 h 观察，双相接种法体外构建组较静置接种法的细胞更多，分布更均匀。随培养时间的延长，材料上的细胞均逐渐增多，细胞形态也逐渐转变为成纤维细胞样外观，横跨桥接较小的 DBM 孔洞或在较大的孔边缘呈弦月状张开。培养 5 d 后双相接种法组细胞分泌较多基质将 DBM 的网孔铺满，而静置接种法组的细胞数量和分泌的基质明显更稀疏。

2.2　大体观察

肌袋内埋植 2 周后，各组材料表面均为纤维组织包裹，较易剥脱，周围组织轻度反应性水肿；8 周时可见结缔组织相材料内浸润生长，二者结合紧密，DBM 形状已经不完整，但细胞支架复合体组织块更硬，表面可见少量骨痂样组织；单纯 DBM 组吸收更明显、无成骨表现。

2.3　组织学观察

术后 2 周，肌袋内埋植材料表面、孔隙内为肉芽组织浸润，微血管形成，可见淋巴细胞、多核细胞散布其间。A 组和 B 组的材料表面有 BrdU 标记阳性的细胞成群排列，形态与成骨细胞相似，同时可见软骨样细胞和新生胶原（图 1）；而 C 组无 BrdU 标记阳性细胞，未见软骨样细胞和新生胶原（图 2）。



A：Osteoblast-like and chondrocyte-like cells appeared to the surface of DBM combined with much fibrovascular tissue（HE × 100）；B：BrdU labeled cells（Immunohistochemistry × 100）

图 1　DBM-MSCs 植入肌袋内 2 周

Fig 1　DBM-MSCs were implanted into musclar pouch in goat back for 2 weeks

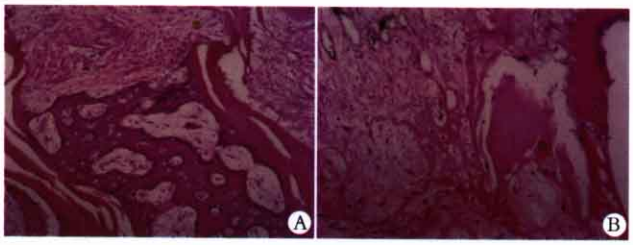


图 2　DBM 单独植入肌袋内 2 周（SABC × 100）

Fig 2　DBM alone was implanted into musclar pouch in goat back for 2 weeks and BrdU labeling cells were not seen（SABC × 100）

术后 8 周，A 组和 B 组材料被少量吸收，周围纤维组织包裹，仍见少量淋巴细胞、多核细胞浸润，材料表面内可见破骨细胞聚集，BrdU 标记阳性细胞减少，有软骨岛和编织骨出现，可

见髓腔形成;C 组材料吸收更明显,仍然无 BrdU 标记阳性细胞、软骨样细胞和新生胶原(图 3)。



A: DBM was absorbed partly and consistent bone formation was observed in groups A and B(HE×100); B: No bone formation in group C(HE×100)

图3 各组术后 8 周组织学观察 (HE×100)

Fig 3 The two kinds of tissue engineering bone and DBM implanted into musclar pouch in goat back for 8 weeks (HE×100)

A、B 两组的细胞支架复合体植入动物背部肌肉内 2 周和 8 周均观察到了异位成骨,两组间组织学半定量分析评分存在显著差异($P<0.01$),两个时间点 A 组均明显高于 B 组;C 组植入物组织块内未见软骨或骨组织生成(表 1)。

表1 术后 2 周和 8 周 3 组的组织学的半定量分析评分($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Semi-quantitative evaluation of postoperative tissue at week 2 and 8 in three groups ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Postoperation	Group A	Group B	Group C
2 weeks	2.46±0.32*	1.96±0.21	0
8 weeks	4.13±0.42*	3.66±0.37	0

*: $P<0.01$, *vs* group B

3 讨论

骨组织工程研究在多个方面均取得了令人振奋的研究成果,并已在临床得到初步应用,被认为是组织工程中最具有前途和可行性的领域之一[3]。

组织工程骨的体外构建是这一技术用于临床必须解决的关键问题之一。支架材料必须荷载足够数量的种子细胞才能保证所构建的组织工程骨在体内成骨,由于种子细胞来源有限,组织工程技术的临床应用需要二者的高效复合。普通方法在种子细胞与固体支架复合时大量脱落,而且不能即时将足够数量的细胞附和到支架材料上,限制了其运用范围。凝胶类基质材料能以液态的方式与种子细胞均匀混合,在特定条件下固化,使种子细胞在其中呈稳定的三维均相分布,并允许种子细胞在其中增殖分化、形成相应的组织结构[4,5]。但凝胶类材料却无法满足负重骨段缺损等情况对材料的力学要求,且降解太快。利用双相接种技术,不但可以发挥凝胶材料的高粘性,即时完成种子细胞的早期贴附,避免了常规方法难以克服的种子脱落、浪费,而且还能够兼有固体材料的优点,具备一定的力学性能和与组织形成相匹配的降解速率[1,6]。但是,尚少见深入的研究报道双相接种技术所构建的骨组织工程在体内的成骨能力,有必要做进一步的实验观察。

诱导后的 MSCs 与 DBM 复合后植入肌袋内 2 周后观察到软骨内成骨的表现,骨样组织中的成骨的细胞 BrdU 染色阳性。由于 BrdU 能在细胞周期的 S 期专一地掺入 DNA,可以较准确的标记来源细胞[7],说明以 MSCs 和 DBM 构建的组织工程骨具有自身成骨能力,成骨的细胞来源于植入的种子细胞。

我们对比双相接种技术和普通方法体外复合 MSCs 与 DBM 构建组织工程骨,发现前者细胞在支架上体外生长情况更优,植入山羊肌肉内术的异位成骨组织学半定量评分术后 2 周达到(2.46±0.32)、8 周为(4.13±0.42),而普通方法的术后 2 周仅为(1.96±0.21)、8 周(3.66±0.37),两者有显著的统计学区别($P<0.01$)。体内实验的结果说明双相接种技术较普通方法具有明显优越性。

本实验采用山羊肌肉内异位成骨的动物模型,为免疫功能完全的大型哺乳类动物,实验条件更接近临床;而且异位成骨结果排除了正位骨化中受体骨髓和骨膜等成骨的假阳性结果,容易解释新骨形成的细胞来源,研究结果更为真实可信[2]。既往的研究已证实 DBM 具有骨诱导作用,能够在小鼠皮下或肌袋内异位成骨,但在大动物异位成骨实验中,结果往往不满意。本实验在山羊背部肌袋内埋置的 DBM 均未能形成骨样组织,说明各种动物的成骨能力存在差异,山羊等大动物可能需要更强的成骨信号,或者是高等动物对异位成骨有抑制作用,也说明种子细胞对其成骨的决定行作用。

综上所述,利用双相接种技术体外构建组织工程骨,方法简便,能够促进体内成骨,是一种值得推广的体外构建策略。

参考文献:

[1] 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.

[2] 杨志明, 李彦林, 解慧琪, 等. 生物衍生骨复合成骨细胞体内异位成骨研究[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(8): 475-478.

[3] 裴国献, 金 丹. 骨组织工程研究进展[J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6(1): 38-42.

[4] Passaretti D, Silverman R P, Huang W, *et al*. Cultured chondrocytes produce injectable tissue-engineered cartilage in hydrogel polymer[J]. Tissue Eng, 2001, 7(6): 805-815.

[5] 崔 赓, 胡蕴玉, 雷 伟, 等. 可注射型骨修复材料对兔 MSCs 增殖及分化的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(1): 45-49.

[6] 周 强, 李起鸿, 戴 刚, 等. 关节软骨细胞三维支架双相接种体外生成软骨组织的观察[J]. 中华骨科杂志, 2002, 22(6): 372-376.

[7] Han H C, Ku D N, Vito R P. Arterial wall adaptation under elevated longitudinal stretch in organ culture[J]. Ann Biomed Eng, 2003, 31(4): 403-411.

(编辑 王 红)