文章编号：1000-5404(2008)13-1215-04

专家述评

骨组织工程产品发展的现状与展望

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）

自 1987 年“组织工程”概念被提出以来，这一材料学、细胞生物学以及工程学等多学科交叉的新兴学科得到了迅猛的发展。其“通过将活细胞接种于生物支架材料后再植入体内以实现修复和替代缺损组织”的理念已经在骨、软骨和皮肤等组织修复重建方面取得了显著的效果，并且国外已有软骨和皮肤的相关产品问世。对于骨组织工程而言，目前仍主要停留在基础研究层面，规模化成熟的临床应用尚未得以实现。国内上海第二医科大学通过将自体的间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）成骨诱导后接种于部分脱钙骨构建组织工程骨用于修复颅骨和颌面骨缺损，取得了良好效果[1]；四川大学用异体骨膜来源的成骨细胞复合生物支架构建组织工程骨治疗多个部位的骨缺损和骨不连，也获得了较好的修复重建效果[2]。本课题组在国家“863”计划滚动资助下，致力于研究解决长骨骨干大段骨缺损的修复重建问题，目前已经取得了初步的成果[3]。现结合国内外的骨组织工程的发展现状，谈一点我们在这方面工作的体会。

1　制备适用于临床的骨组织工程产品的迫切性

严重创伤、肿瘤切除、骨感染等原因所致的骨缺损十分常见，而脊柱融合、人工假体置换等对骨移植材料的需求量也非常巨大。自体骨移植是目前临床治疗骨缺损较有效的方法，但来源有限且会造成供区新的创伤，对患者造成新的生理和心理创伤；珊瑚、β-TCP 或高分子材料等人工替代材料分别在生物相容性、生物活性、生物降解性以及与宿主骨的力学匹配性等方面存在短期内难以克服的不足，单独使用暂且很难成为主流的治疗手段[4,5]。目前，同种异体骨以较好的骨传导性成为目前临床上最主要的骨移植材料[6]，在欧美国家其用量仅次于血液，成为使用量第二大的移植组织。我国在骨组织库建设方面也取得了可喜的进步，目前已经建立起包括本单位在内的规范性骨组织库近 10 个。

但是，为了降低异体骨的免疫原性，在处理过程中除去了细胞成分因而丧失了直接成骨活性，导致成骨能力下降及较高的骨不连发生率。近年来，组织工程学通过种子细胞体外扩增并复合于支架材料构建有生物活性的骨移植物，弥补了单纯异体骨无直接成骨活性的不足。在大型哺乳动物实验已经取得了良好的修复重建效果[4,5]。目前，包括本单位在内的数家单位也已成功将自体细胞来源的组织工程骨初步应用于临床。我们通过应用自体 MSCs 接种于同种异体脱钙骨基质材料上构建组织工程骨修复长骨骨干缺损，取得了较好的疗效。但是，如要满足临床的各种需求尚有一些问题迫切需要解决。

2　制约骨组织工程产品规模化应用的瓶颈

目前，组织工程骨修复骨缺损无论是大型哺乳动物实验，还是临床少量的“个体化”应用，都取得了令人振奋的结果[1-5]，已经成为修复重建骨缺损有希望的治疗策略之一。但是，作为组织工程三大要素的种子细胞、支架材料和构建技术仍然存在各种问题。在目前的情况下难以满足骨组织工程产品规模化应用的要求，成为制约其广泛应用的瓶颈。

2.1　种子细胞

种子细胞作为组织工程的活性成分的主要来源，对于组织工程产品的修复重建效果的好坏起着举足轻重的作用。规模化骨组织工程产品对于种子细胞具有两点要求：一是具有优良的增殖和分化潜能，利于大量扩增和诱导分化为成骨细胞；二是移植到宿主体内不引起移植排斥反应和致瘤。目前，应用于骨组织工程的种子细胞主要有以下 3 类：胚胎干细胞、成体干细胞以及成骨细胞。这 3 类细胞又可根据供者不同，分为自体来源和同种异体来源两种。目前用于骨组织工程研究的胚胎干细胞均为同种异体来源的，其具有很高的增殖潜能，体外可近乎无限扩增，可以很好满足骨组织工程对于种子细胞数量的需求；但是，如何有效的将

作者简介：许建中，男，辽宁省大连市人，博士，主任医师，教授，博士生导师，担任全军骨科专业委员会副主任委员，重庆市骨科学会副主任委员，承担“十五”、“十一五”国家“863”计划重大专项在内的重大科研项目十余项，获重庆市科技进步奖一等奖、军队科技进步奖二等奖、军队医疗成果奖二等奖各 1 项，获得专利 4 项。主要从事脊柱外科与骨组织工程方面的研究，参编十余部专著，撰写论文数 10 篇，其中 SCI 收录的论著 9 篇，单篇最高影响因子 3.7。电话：(023)68754164，E-mail：spine@tmmu.com.edu

收稿日期：2008-05-06；修回日期：2008-05-30

其诱导分化为骨组织工程需要的成骨细胞,目前还有大量的问题需要解决和探索。此外,其体内移植后的免疫排斥反应和致瘤性也不容忽视[7,8]。成体干细胞主要是 MSCs,有骨髓来源的、脂肪来源的和脐血来源的等。骨髓来源的细胞研究和应用的最早,成骨效果较好,因而被视为"金标准"[9]。其余来源的 MSCs,由于近年来刚被分离和研究,具体结果还有待进一步的观察和比较。所有的成体干细胞均为来源于成熟组织内的限定干细胞,因而其增殖和分化潜能是有限的,随着年龄的增加而逐渐降低[10-13]。这就决定了其数量扩增必然存在一定的限度,难以满足作为规模化生产的骨组织工程产品的需要。此外,同种异体来源的 MSCs 免疫原性不可忽视,虽然亦有报道阐述其免疫原性低并可能具有一定的免疫调节功能[14,15],以及少量的动物应用研究报道[16],但其最终效果的评价还有待长期观察和相关基础研究的跟进。自体来源的 MSCs 虽然免疫问题不必考虑,但是高年龄是限制其应用的一个因素。而且,自体来源的 MSCs 作为种子细胞决定了组织工程骨的个体化制备模式。这就要求各应用单位必须配备专用净化场所、专业构建和培养设备以及经过专业培训的技术人员。因此,在中、小医院推广这一技术存在一定的难度。自体来源的成骨细胞由于获取细胞困难很少应用;异体来源的成骨细胞作为种子细胞的相关研究近年来数量也减少,主要是因为免疫原性问题和体外扩增较其他类型细胞明显受限。

2.2 支架材料

优良的骨组织工程支架材料应当具有适当的孔径、孔隙率和孔隙连同率[17]以及与再生骨组织相匹配的降解速度和一定的骨诱导特性,如要修复负重骨骨缺损,还必须具有一定的机械强度来满足骨传导的需要。从目前的各种生物支架材料的特性来看,单独的一种材料均无法满足上述的要求。生物来源的异体脱钙骨基质,孔隙和骨诱导特性虽然较好,但是机械强度很低;人工合成的高聚物,如 PLGA 等,不具有骨诱导作用,机械强度偏低;生物陶瓷类材料疲劳强度低、脆性大、抗折及抗冲击性远不能满足高负荷人工骨的机械强度要求;珊瑚类材料机械强度差、体内降解缓慢。因此,支架材料的研发近年来一直是组织工程学领域的研究热点。

2.3 组织构建技术

组织构建技术对于组织工程骨产品移植体内后存活情况和成骨能力的强弱具有重要的影响。常规的构建方法主要是将种子细胞滴加到支架材料上,完全依靠支架材料的孔隙的物理作用将细胞滞留于材料中,然后在培养液中孵育。这种方法细胞接种率低,体外培养时易于脱落,由于黏附的细胞数量有限且细胞分布不均,移植体内后成骨活性显著降低。而且,组织构建过程中细胞的体外扩增以及构建物的体外孵育成熟需要 20~30 d 的周期,增加了患者的等待时间,与我们期望建立的"随取随用"的规模化产品的目标还有一定的距离。此外,对于大段的骨缺损,构建的组织工程骨中心部位血供受限,易于发生营养障碍;复杂骨折常常骨缺损和感染并发,此时单纯的组织工程骨移植很有可能会因为局部感染无法控制而引发移植物感染,进而导致移植失败。

此外,骨组织工程产品如要满足规模化制备和应用,相应产品的储存和运输也是相当重要的,这直接关系到产品的生物活性的保存和修复重建的效果。

3 解决途径的探索与展望

3.1 种子细胞

目前常用的种子细胞主要存在扩增能力和免疫原性无法协调统一的问题。扩增能力强的细胞免疫原性高;无免疫原性的细胞增殖扩增能力又欠缺。因此,解决问题的根源之一在于寻找二者可以协调统一的细胞来源,建立起稳定的种子细胞库,最终为组织工程骨的产业化进程铺平道路。

为了解决自体来源的种子细胞体外扩增时间长、患者需要长时间等待的问题,应用同种异体细胞是一种可行的方法。但是,这样就涉及了如何解决异物移植后免疫原性的问题。移植物进入体内引起宿主的免疫反应主要是通过一系列信号识别和攻击异己的方式引起的。改变移植细胞的性状,让宿主无法识别或是阻断识别信号的传递从而达到免疫耐受是当前一部分学者采取的技术策略。CTLA4-Ig(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-Ig)是一种融合免疫球蛋白,可以选择性地阻断 CD28 与 B7 的信号传导通路,导致 T 细胞免疫失能,诱导对特异性抗原的免疫耐受。代飞等[18]将 CTLA4-Ig 基因导入异体 MSCs 中,体外可以显著抑制共培养的淋巴细胞反应,扩增后构建组织工程骨异体移植后可以异位成骨。同时,一部分研究者仍希望使用患者自身的细胞,他们分别通过将 OCT4、NANOG、SOX2 和 LIN28 4 种基因[19]或是 OCT3/4、SOX2、C-MYC 和 KLF4[20] 4 种基因联合转入到人的体细胞中获得了类似于胚胎干细胞的多能干细胞,以此来增强自体细胞的增殖和分化能力,满足治疗需要。但是,这种方法目前还存在诸多风险,使用的逆转率病毒可使基因变异而引发肿瘤。因此运用于临床还有一

定距离。此外,研究者也在探索着其他组织来源的细胞在骨组织工程产品中的应用可能[21]。

本课题组前期进行了不同品系的小型猪之间的组织工程骨交叉移植实验研究,不同个体均可见不同程度的免疫排斥反应[22,23]。然而可喜的是在贵州小型香猪和广西巴马猪胫骨部位的组织工程骨交叉移植结果显示,移植物可以较好的修复骨缺损,其结果令人振奋。由于目前免疫排斥反应的程度缺乏一个可参照的界限,所以异体的组织工程骨是否存在像异体骨一样被临床可以接受的免疫原性尚待进一步探讨;且如何将异体组织工程骨修复骨缺损过渡到临床应用研究以证实其疗效。这些均是组织工程骨产业化过程中的重大课题,如可实现将是组织工程骨研发过程中里程碑式的跨越。

3.2　支架材料

目前,虽然单一支架存在各种问题,难以达到理想的标准。但是,多种支架材料复合使用可以互补长短,有利于更好的发挥各自的优点。Ramay 等[24] 将羟基磷灰石和 β-TCP 复合制备负重骨的支架,其相应的机械强度得到显著增强,可以达到松质骨需要的最高的压缩强度,其相应的黏附性也提高了 70%,原有的孔隙率也很好的得到保留。Maquet 等[25] 将 α-羟酸聚合物与生物活性玻璃按照一定比例混合制备骨组织工程支架,合成物的降解速率可以通过调节两种成分的比例来实现与骨组织再生速度一致,而且生物活性玻璃的骨诱导活性得以保留。因此,多种材料的复合使用可能将是以后的发展方向。

3.3　组织构建技术

对于常规构建技术的革新显著地促进了骨组织工程的发展,增强了产品的修复重建效果。周强等[26,27] 发明了凝胶双相接种技术,通过骨胶原的黏附特性将种子细胞牢固黏附于支架材料上,接种率几乎达 100%,接种后再通过胶原的收缩,产生孔隙为营养物质的传送提供通道。通过这种技术构建的组织工程骨可以显著加速体外成熟过程,缩短构建时间。为了实现组织工程骨的“随取随用”,我们课题组在已有的异体脱钙骨基质支架材料的基础上,通过多聚-L-赖氨酸对其进行表面修饰后制成富集基质材料,应用网孔筛滤和电荷吸附的原理将细胞富集在材料上,然后用于修复骨缺损。前期的异位成骨实验显示了同常规的构建技术构建的组织工程骨相似的成骨效果,与国内外其他研究取得的结果近似[28],但修复长节段骨缺损的效果还有待进一步实验观察。

将缓释技术同组织工程骨复合,可以为目前临床上骨缺损并发感染和大段骨缺损中心部位营养供给问题的解决提供新的策略,也将拓宽组织工程骨的应用范围。目前,我们课题组设计了“抗感染组织工程骨”和“促血管化组织工程骨”,就是通过研制的藻酸盐缓释微球,分别缓释万古霉素和血管内皮细胞生长因子(VEGF)来实现移植局部的抗感染和促进内皮细胞生长,使新生血管及早长入移植物中心,满足营养供给[29-32]。通过这种策略修复山羊股骨 20% 大段骨缺损时,复合 VEGF 缓释微球的组织工程骨可以显著的缩短和提高骨修复的时间和质量;而附加万古霉素缓释微球的组织工程骨在不影响骨缺损重建的前提下,还可以在移植局部实现有效的抗生素缓释,满足局部抗感染需求。

3.4　产品储存和运输

骨组织工程产品储存和运输的重点就是种子细胞的保存和运输。如何在保存和运输过程中保持细胞的生物活性,以便实现到达目的地后可以快速地用于骨缺损的修复重建这是我们关注的焦点。国内外已有报道,分别通过脱水与再水化[33] 以及深低温保存[34] 的方法对细胞进行保存和运输,虽然取得了一定的进展,但是储存的时间比较有限,所需设备比较复杂,用于修复骨缺损的最终效果还有待观察。

针对目前骨组织工程产品难以储存和运输的现状,基于骨形态蛋白修复骨缺损良好的效果[35] 以及我们长期对于骨组织工程研究的基础,我们提出一个假设:组织工程骨中的种子细胞的主要功能是分泌大量促进骨愈合的基质和细胞因子成分,而这些物质均为蛋白质,而组织工程骨可能主要是依赖这些蛋白质发挥作用的。因而我们提出一个概念“功能蛋白质骨组织工程”(bone tissue engineering based on functional proteins)。我们先将细胞接种于支架上,体外孵育成熟后经过深低温冻干,细胞脱水而亡,而细胞分泌的基质和因子得以保留,包装后只要按照蛋白制品的保存和运输方法即可实现冻干后产品的保存和运输,方法简便。我们已将相关产品用于异位成骨实验,效果良好,可比拟常规构建的组织工程骨;用于修复长骨骨干缺损的效果还有待进一步观察。

总之,骨缺损的临床需求是骨组织工程不断前进的原动力。密切关注临床需求的特点,在已有的技术和理论的前提下,发展新型支架材料、研制专用的组织工程构建的生物反应器、建立规范的医疗产品质量标准等应当是当前我们从事骨组织工程研究和应用的相关人员关注和努力的目标和方向。相信在不久的将来会涌现出一批组织工程骨相关医疗产品造福于广大患者。

关键词：骨组织工程 生物材料 骨缺损
中图法分类号：R318.17 文献标识码：A

参考文献：

[1] 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.
[2] 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.
[3] Xu J, Wang X, Liu J, *et al*. A Pilot Study on the Clinical Research of TEB Repairing Long Bone Defects[J]. Tissue Eng, 2006, 12(4): 1125.
[4] Viateau V, Guillemin G, Bousson V, *et al*. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep[J]. J Orthop Res, 2007, 25(6): 741-749.
[5] Liu G, Zhao L, Zhang W, *et al*. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate[J]. J Mater Sci Mater Med, 2008, 19(6): 2367-2376.
[6] Stevenson S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts[J]. Clin Orthop Relat Res, 1998, (355 Suppl): S239-S246.
[7] Karp J M, Ferreira L S, Khademhosseini A, *et al*. Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro[J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 835-843.
[8] Hyslop L A, Armstrong L, Stojkovic M, *et al*. Human embryonic stem cells: biology and clinical implications[J]. Expert Rev Mol Med, 2005, 7(19): 1-21.
[9] Shimko D A, Burks C A, Dee K C, *et al*. Comparison of in vitro mineralization by murine embryonic and adult stem cells cultured in an osteogenic medium[J]. Tissue Eng, 2004, 10(9-10): 1386-1398.
[10] Mueller S M, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges[J]. J Cell Biochem, 2001, 82(4): 583-590.
[11] Stenderup K, Justesen J, Clausen C, *et al*. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells[J]. Bone, 2003, 33(6): 919-926.
[12] 朱 灏,许建中,周 强,等.人骨髓间充质干细胞体外增殖及成骨分化的增龄变化[J].第三军医大学学报,2005,27(1):59-62.
[13] 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.
[14] Aggarwal S, Pittenger M F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses[J]. Blood, 2005, 105(4): 1815-1822.
[15] 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.
[16] Xie H, Yang F, Deng L, *et al*. The performance of a bone-derived scaffold material in the repair of critical bone defects in a rhesus monkey model[J]. Biomaterials, 2007, 28(22): 3314-3324.
[17] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis[J]. Biomaterials, 2005, 26(27): 5474-5491.
[18] Dai F, Shi D, He W, *et al*. hCTLA4-gene modified human bone marrow derived mesenchymal stem cells as allogeneic seed cells in bone tissue engineering[J]. Tissue Eng, 2006, 12(9): 2583-2590.
[19] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, *et al*. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318(5858): 1917-1920.
[20] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al*. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. Cell, 2007, 131(5): 861-872.
[21] Baksh D, Yao R, Tuan R S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow[J]. Stem Cells, 2007, 25(6): 1384-1392.
[22] 郭书权,许建中,梁文杰,等.异基因组织工程骨修复猪胫骨缺损术后外周血T淋巴细胞亚群的检测[J].免疫学杂志,2007,23(1):66-69.
[23] 梁文杰,吴雪晖,谢肇,等.猪骨髓间充质干细胞成骨分化后SLA的表达及免疫原性研究[J].免疫学杂志,2007,23(3):298-301,305.
[24] Ramay H R, Zhang M. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2004, 25(21): 5171-5180.
[25] Maquet V, Boccaccini A R, Pravata L, *et al*. Porous poly (alpha-hydroxyacid)/Bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. I: Preparation and *in vitro* characterisation[J]. Biomaterials, 2004, 25(18): 4185-4194.
[26] 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.
[27] 吕仁发,周 强,许建中,等.种子细胞双相接种技术促进组织工程骨体外成熟的研究[J].中华创伤杂志,2006,22(4):291-295.
[28] 干耀恺,戴鲂戎,张 蒲,等.应用富集骨髓干细胞技术治疗骨缺损[J].中华骨科杂志,2006,26(11):721-727.
[29] 侯天勇,吴雪晖,许建中,等.纤维蛋白凝胶包裹的万古霉素藻酸盐微球的制备与优选[J].中华创伤杂志,2008,24(6):470-474.
[30] 侯天勇,许建中,李 强,等.山羊骨组织内抗生素缓释模型的建立及评估[J].中华实验外科杂志,2007,24(12):1575-1577.
[31] 侯天勇,许建中,吴雪晖,等.藻酸盐微球的制备及其对共培养的MSCs的影响[J].第三军医大学学报,2006,29(3):199-202.
[32] 温立升,何清义,许建中,等.血管内皮细胞生长因子-海藻酸钙缓/控释微球的制备及其对人脐静脉血管内皮细胞增殖的影响[J].中华创伤杂志,2006,22(9):669-673.
[33] Gordon S L, Oppenheimer S R, Mackay A M, *et al*. Recovery of human mesenchymal stem cells following dehydration and rehydration[J]. Cryobiology, 2001, 43(2): 182-187.
[34] Kotobuki N, Hirose M, Machida H, *et al*. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells[J]. Tissue Eng, 2005, 11(5-6): 663-673.
[35] Wozney J M, Seeherman H J. Protein-based tissue engineering in bone and cartilage repair[J]. Curr Opin Biotechnol, 2004, 15(5): 392-398.

（编辑 王 红）