文章编号:1000-5404(2010)07-0661-04

论著

一种组织工程骨修复兔股骨头坏死模型的效果评价

彭吾训[1],王 蕾[2],邓 进[1],李彦林[3],龚跃昆[3],李世和[3] (550004 贵阳,贵阳医学院附属医院急诊创伤外科[1];550004 贵阳,贵州省疾病预防控制中心职业病防治研究所[2];650031 昆明,昆明医学院第一附属医院骨科[3])

[摘要] **目的** 观察双相陶瓷生物骨(biphasic ceramic biologic bone,BCBB)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)、骨髓基质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)复合培养形成的组织工程骨修复股骨头坏死(femoral head necrosis,FHN)模型病灶清除区缺损,评价该组织工程骨修复FHN的效果。**方法** 取32只新西兰成年大白兔共64侧股骨头,微波灭活建立股骨头坏死模型,按随机数字表法分为4组,每组16侧。A组:空白对照组;B组:植入BCBB/BMP/bFGF;C组:植入BCBB/BMP/bFGF/MSCs;D组:植入自体松质骨。术后2、4、8、12周分批处死动物,每组每次处死4只。行股骨头大体及解剖观察、X线摄片、组织学观察、钙含量及钙磷比检测、血管免疫组织化学染色。**结果** ①股骨头大体及解剖观察:A组8周和12周各有一侧股骨头塌陷;B组2周时纤维结缔组织生长活跃;C、D组12周时植骨区与宿主骨界限不清。②X线评分:12周时,B、C、D组优于A组($P<0.05$),但B、C、D组间无统计学差异($P>0.05$)。③组织学新骨形成面积比较:4、8、12周时C组优于B组($P<0.05$),C、D组间无统计学差异($P>0.05$)。④X射线能谱分析:2、4、8周时B、C组钙含量及钙磷比显著大于D组($P<0.05$)。⑤2、4周和8周时,B、C组血管面积大于A、D组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 组织工程骨BCBB/BMP/bFGF/MSCs对兔股骨头坏死的修复效果优于BCBB/BMP/bFGF,与自体松质骨移植相当。

[关键词] 股骨头坏死;双相陶瓷生物骨;碱性成纤维细胞生长因子;骨形态发生蛋白;骨髓基质干细胞
[中图法分类号] R318.08; R681.805; R-332 **[文献标志码]** A

A tissue engineering bone to repair femoral head necrosis

Peng Wuxun[1], Wang Lei[2], Deng Jin[1], Li Yanlin[3], Gong Yuekun[3], Li Shihe[3] ([1]Department of Emergency and Trauma Surgery, Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province, 550004; [2]Institute of Occupational Medicine, Guizhou Center for Disease Control and Prevention, Guiyang, Guizhou Province, 550004; [3]Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming, Yunnan Province, 650032, China)

[Abstract] Objective To explore the efficacy of a tissue engineering bone composed of biphasic ceramic biologic bone (BCBB), bone morphogenetic protein (BMP), basic fibroblast growth factor (bFGF) and mesenchymal stem cells (MSCs) in the repairing of necrotic areas of the femoral head. Methods The femoral head necrosis model of 64 femoral head in 32 rabbits was induced by microwave heating and then randomly divided into 4 groups, which were respectively implanted with nothing (group A), with BCBB/BMP/bFGF (group B), with BCBB/BMP/bFGF/MSCs (group C) and with cancellous bone autograft (group D). The specimens were harvested separately at the end of 2, 4, 8 and 12 weeks after operation. Four femoral heads were taken off at each interval in every group. A series of examinations were carried out including of gross anatomic observation, X-ray, histology, the calcium content and the ratio of calcium and phosphorus, and blood vessel immunohistochemical staining. Results (1) Gross anatomic observation: In group A, one femoral head collapsed at the end of 8 and 12 weeks respectively. In group B, granulation and fibrillar tissue began to proliferate actively by the end of 2 weeks. The boundary between the grafting substance and the post bone was unclear in group C and group D by the end of 12 weeks. (2) X-ray: At the 12th week, X-ray grade point indicated that group B, C, D was superior to group A ($P<0.05$), and among group B, C, and D, the difference was not significant ($P>0.05$). (3) Histology: New bone area comparison by the end of 4, 8 and 12 weeks showed Group C was superior to group B ($P<0.05$), and the difference between group C and D was

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字20072104)
[通信作者] 王 蕾,电话:(0851)6810212,E-mail:misswanglei@163.com

not significant ($P>0.05$). (4) Energy dispersion analysis X-ray (EDAX): The calcium content and the ratio of calcium and phosphorus in group B and group C was higher than that of group D at the 2nd, 4th, and 8th weeks ($P<0.05$). (5) At the 2nd, 4th and 8th week, the area of new blood vessel in group B and C was more than that of group A and D, and the difference was obvious ($P<0.05$). **Conclusion** The tissue engineering bone (BCBB/BMP/bFGF/MSCs) is superior to BCBB/BMP/bFGF, and comparable to cancellous bone autograft in repairing rabbit femoral head necrosis.

[Key words] femoral head necrosis; biphasic ceramic biologic bone; basic fibroblast growth factor; bone morphogenetic protein; mesenchymal stem cells

Supported by the Project of Science and Technology Foundation of Guizhou Province (J20072104). Corresponding author: Wang Lei, Tel: 86-851-6810212, E-mail: misswanglei@163.com

股骨头坏死(femoral head necrosis,FHN)的治疗一直是国内外的一大难题。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)具有高效诱导成骨活性。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)能够促进BMP诱导成骨,而且是一促血管生长因子[1]。本研究采用猪椎骨为原料制备双相陶瓷生物骨(biphasic ceramic biologic bone,BCBB),将BMP和bFGF复合到BCBB支架上,并与骨髓基质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)联合培养,并移植修复微波灭活建立的兔FHN模型,评价该组织工程骨BCBB/BMP/bFGF/MSCs对FHN的修复能力,探索应用组织工程的原理和技术治疗FHN的新方法。

1 材料与方法

1.1 组织工程骨(BCBB/BMP/bFGF/MSCs)的制备

参照臧继传等[2]的方法制备BCBB,以Ⅰ型胶原修饰BCBB。将10 mg/ml的BMP-2和1 500 IU/μl的bFGF按比例与BCBB复合,用约1×10^7浓度为1×10^6/ml的第3代兔MSCs与BCBB/BMP/bFGF复合培养,制备组织工程骨BCBB/BMP/bFGF/MSCs[3]。

1.2 实验动物及分组

新西兰成年大白兔32只(来源于昆明医学院实验动物研究中心),雌雄不限,平均体质量2.9 kg(2.7~3.5 kg),以灭活温度55 ℃和灭活时间10 min建立兔双侧FHN模型[4]。将32只兔64侧股骨头随机分为4组,每组16侧股骨头。A组:空白对照;B组:植入双相陶瓷生物活性骨(BCBB/BMP/bFGF);C组:植入组织工程骨(BCBB/BMP/bFGF/MSCs);D组:植入自体松质骨(髂骨)。

1.3 植入手术

造模后8周,按造模时的手术入路,刮除股骨头50%左右松质骨,A组为空白对照,其余各组分别植入体积均为0.5 cm^3不同材料。在同一只兔的两侧股骨头均为空白对照或均植入相同材料。所有动物术前30 min肌注庆大霉素4万IU/只,术后每天肌注4万IU/只,连用3 d。

1.4 取材及观察指标

分别于术后2、4、8周和12周采用静脉空气栓塞分批处死动物,每个时间点每组取材4侧股骨头,进行大体标本观察、X线摄片、组织切片HE染色、钙含量及钙磷比检测等。

1.4.1 大体及解剖观察 取材后观察股骨头表面情况及有无塌陷、变形。沿股骨头冠状面剖开,肉眼观察股骨头缺损区修复情况。

1.4.2 X线摄片及评价 取材后进行X线摄片,统一摄片条件为60 kV、50 mA、0.12 s。对X线片上股骨头缺损区修复情况的进行评估,评估标准:分为优、良、中、差4个等级,对应分值为4、3、2、1分。新骨充填少于缺损的25%为差;新骨充填了缺损的25%~75%为中;新骨充填了缺损的76%~95%为良;正常密度骨充填了缺损的95%以上为优[5]。

1.4.3 组织切片检测及组织形态计量分析 标本制成5 μm厚切片,HE染色,光镜下观察。对每个时间点的每个标本随机选取1张切片,在每张切片的植骨区(或空白组的缺损区)随机选取3个100倍视野,采用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文报告分析系统进行图像分析,测算新骨形成面积百分比。新骨形成面积百分比=新骨面积/统计场面积×100%。

1.4.4 钙含量及钙磷比检测 将2、4、8、12周时取材的兔股骨头标本沿冠状面剖开,其中一半采用XL-30扫描电子显微镜能谱分析仪测定原缺损区和股骨头正常松质骨区的钙含量和钙磷比。另一半用于组织切片检测。

1.4.5 血管免疫组织化学染色及图像分析 采用CD34单克隆抗体(购自迈新试剂公司)对2、4、8周每个股骨头的组织切片进行免疫组化染色。常规石蜡切片厚4 μm,按常规ABC法进行免疫组化染色。阳性染色表现为棕黄色,定位于血管内皮细胞细胞质,以已知的阳性组织切片为阳性对照。每个股骨头随机选取1张免疫组化染色切片,在每张切片的原缺损区随机选取3个100倍视野,采用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文报告分析系统测定血管面积百分比。

血管面积百分比=血管面积/统计场面积×100%。

1.5 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 动物情况

所有动物无死亡,术后当天开始进食,伤口无炎症反应,Ⅰ期愈合。

2.2 股骨头大体解剖观察

A组在8、12周各有一侧股骨头塌陷。B组2周时纤维结缔组织生长活跃,8、12周时大量新骨形成。C组4周时有类骨组织长入材料孔隙内,8周时大量新骨形成,12周时骨密度及骨结构接近正常。D组12周时骨密度及骨结构接近宿主骨。

2.3 X线片结果

2.3.1 X线片观察 A组8周和12周时缺损仍然存在。B组12周时骨移植区密度与宿主骨相当,与宿主骨界限仍然存在(图1A)。C组2周时骨移植区呈高密度影,与宿主骨界限清晰可见(图1B),8周时骨移植区密度低于宿主骨,与宿主骨界限模糊,12周时骨移植区密度与宿主骨相当,与宿主骨界限不清(图1C)。D组4周时骨移植区密度低于宿主骨,与宿主骨界限模糊(图1D),8周和12周时骨移植区密度与宿主骨相当,与宿主骨界限不清。



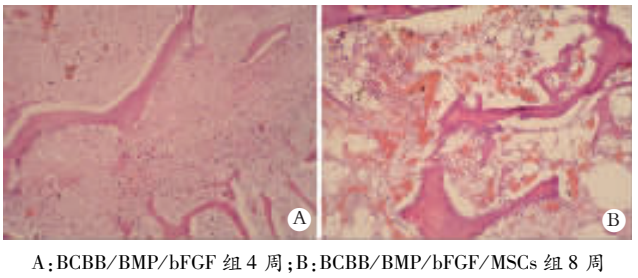
A:BCBB/BMP/bFGF组12周;B:BCBB/BMP/bFGF/MSCs组2周;C:BCBB/BMP/bFGF/MSCs组12周;D:自体松质骨组4周

图1 各组术后X线片观察

2.3.2 X线片评分 2周时,各组骨形成量少、密度不一,连续性不存在。X线评分结果显示,各组间无显著性差异($P>0.05$)。4、8、12周时,D组评分分别为(2.50±0.58)、(3.25±0.50)、(3.75±0.50),均大于C组(2.00±0.82)、(3.00±0.82)、(3.50±0.58),但C、D组间比较无统计学差异($P>0.05$)。

2.4 组织切片检测结果

2.4.1 组织切片观察 A组12周时缺损区只有少量类骨组织形成。B组4周时纤维组织和类骨组织长入BCBB孔隙内,成骨前体细胞和成骨细胞较少(图2A)。12周时骨改建正在进行,BCBB吸收不全,股骨头软骨层软骨细胞丰富,软骨基质均匀。C组4周时有类骨组织长入材料孔隙内,成骨前体细胞和成骨细胞较多,未见炎症细胞。8周时大量新骨以爬行替代方式形成,与围骨界限模糊,新生血管多,BCBB吸收不全(图2B)。12周植骨区与宿主骨界限不清,在骨移植区与宿主骨之间可见连续骨小梁通过,BCBB吸收不全,股骨头软骨层软骨细胞丰富,软骨基质均匀。D组12周时骨改建已基本完成,股骨头软骨层软骨细胞丰富,软骨基质均匀。



A:BCBB/BMP/bFGF组4周;B:BCBB/BMP/bFGF/MSCs组8周

图2 各组术后骨组织病理学观察 (HE ×100)

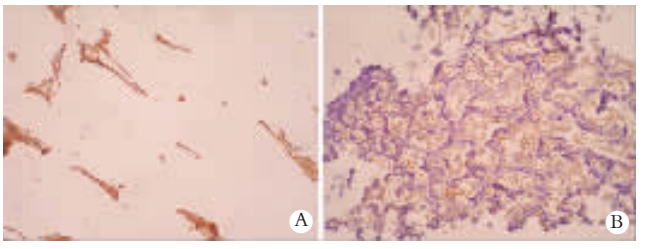
2.4.2 组织切片新骨形成面积图像分析结果 2周时各组均无新骨形成。4、8周和12周时新骨形成面积百分比,A组均为0,B组分别为(4.63±2.48)%、(8.52±1.77)%、(22.41±2.13)%,C组分别为(7.41±1.84)%、(13.36±2.11)%、(38.56±2.66)%,D组分别为(7.67±2.15)%、(13.61±2.40)%、(39.75±2.92)%,各时间点比较,C、D组间无统计学差异($P>0.05$),但C、D组大于A、B组,且具有统计学差异($P<0.05$)。

2.4.3 X射线能谱钙含量及钙磷比检测

2.4.3.1 钙含量 2、4、8周时,B组钙含量(35.55±6.89)%、(36.51±5.52)%、(41.32±4.59)%与C组钙含量(37.32±4.18)%、(32.40±3.09)%、(41.18±2.78)%,B、C组钙含量无显著差异($P>0.05$),B、C组各时间点均大于D组钙含量(24.18±2.89)%、(20.26±2.96)%、(31.58±4.23)%,与D组间比较具有统计学差异($P<0.05$)。

2.4.3.2 钙磷比 2、4、8周时,B组钙磷比(1.40±0.02)、(1.36±0.03)、(1.74±0.04)与C组钙磷比(1.45±0.04)、(1.33±0.03)、(1.74±0.06),B、C组钙磷比无统计学差异($P>0.05$),各时间点均大于D组钙磷比(1.13±0.04)、(1.26±0.05)、(1.33±0.04),与D组间比较具有统计学差异($P<0.05$)。

2.4.4 血管免疫组织化学染色及图像分析结果 2、4周和8周血管免疫组织化学染色:A组血管最少(图3A),D组次之,B、C组较多,吻合成网(图3B)。2、4和8周血管面积图像分析显示:B组(17.47±2.12)、(19.89±1.90)、(20.47±1.98),C组(19.88±2.11)、(21.40±2.41)、(21.95±1.74)间比较无统计学意义($P>0.05$);但B、C组与A组(2.69±0.64)、(4.58±0.90)、(4.54±0.59)、D组(10.24±1.47)、(14.17±2.91)、(14.93±3.31)比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。



A:空白对照组;B:BCBB/BMP/bFGF/MSCs组

图3 各组术后8周股骨头血管免疫组化观察 (ABC ×100)

3 讨论

FHN患者大多数为中青年,行人工关节置换术后远期效果并不令人满意。因此,人们更关注保留股骨头的疗法。保留股骨头的手术治疗方法有单纯髓腔减压、髓腔减压加单纯骨移植术、髓腔减压加血管束植入或带血管骨移植术、截骨术等。但仍没有一种满意的术式被广泛接受[6]。随着组织工程学的发展,应用骨组织工程技术修复FHN有可能成为改善FHN疗效的一个突破口。组织工程技术包括三要素:种子细胞、支架材料及生长因子。运用自体MSCs修复人FHN,在促进新骨形成方面效果良好,但缺乏有效支撑,不能防止股骨头塌陷[7]。用自体骨瓣移植来加强股骨头软

骨下骨的支撑,手术难度大、并发症多[8]。生长因子可以促进成骨细胞增殖、加速血管形成。但运用于人FHN治疗研究的只有BMP[9]。龚跃昆等[5]用bFGF/BMP复合脱钙骨基质修复犬股骨头缺损坏死模型。但生长因子缺乏足够数量的靶细胞,脱钙骨基质的支撑强度不足。虽然运用组织工程技术修复FHN的实验很多,但运用种子细胞、支架材料、2种生长因子构建完全意义的组织工程骨修复FHN的动物研究,少见报道。故本研究构建组织工程骨BCBB/BMP/bFGF/MSCs,修复FHN模型。

MSCs是目前骨组织工程最有临床应用前景的种子细胞[10]。BMP和bFGF是近来研究得较深入的两种骨生长因子。BMP能够诱导未分化MSCs向软骨母细胞和骨母细胞分化[11],bFGF对已分化的MSCs具有促增殖作用[1]。故本研究制备BCBB,以Ⅰ型胶原修饰BCBB,将BMP和bFGF按比例与BCBB复合,然后与MSCs复合培养,制备组织工程骨BCBB/BMP/bFGF/MSCs[3],并以该组织工程骨修复兔FHN模型。

本实验制备的支架材料BCBB用猪椎骨煅烧而成,具有天然网孔系统和一定强度,由79%羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)和17%磷酸三钙(tricalcium phosphate, TCP)组成,HA的含量影响其降解速度[2]。2、4、8周时B组、C组钙含量及钙磷比大于D组,与D组间比较具有显著性差异。同样,组织学检查显示,B组和C组12周时BCBB吸收降解不完全,而D组8周时自体骨移植已完全吸收,表明BCBB较自体松质骨吸收缓慢。假如BCBB移植不在股骨头这样的承重部位,可以增加TCP的含量从而加快材料降解速度。

BMP能够诱导未分化MSCs向软骨母细胞和骨母细胞分化[11],bFGF对已分化的MSCs具有促增殖作用[1]。4、8、12周时B组与C组间新骨形成面积比较具有统计学差异,表明MSCs在体外经过BMP和bFGF诱导分化和增殖,植入体内后高密度的MSCs促进了新骨形成(C组),成骨效果优于BMP和bFGF单纯在体内诱导MSCs分化和增殖(B组),组织工程骨BCBB/BMP/bFGF/MSCs修复该股骨头坏死模型的成骨效果优于双相陶瓷生物活性骨BCBB/BMP/bFGF。

bFGF不但对MSCs具有促增殖作用,而且是一强大的血管生成因子[1,12]。本研究中2、4周和8周血管面积显示:B、C组间比较无统计学意义($P>0.05$);但B、C组大于A、D组,差异具有统计学意义($P<0.05$),表明bFGF的促血管生成作用。bFGF促进血管生成的同时,可以加快骨修复的爬行替代,带来骨髓基质干细胞,加速新骨形成,促进FHN修复。

自体骨移植被誉为骨移植金标准[6,13]。本研究4、8、12周时,X线评分结果显示C组、D组间无统计学差异,同样2、4、8、12周时C、D组间新骨形成面积比较无统计学差异,表明组织工程骨BCBB/BMP/bFGF/MSCs(C组)促进FHN修复中的成骨潜能与自体骨移植相当。假如其安全性得到进一步证实,则有望在临床FHN修复中被应用。

总之,该研究构建组织工程骨BCBB/BMP/bFGF/MSCs,并移植修复微波灭活建立的兔FHN模型,评价该组织工程骨对FHN的修复能力,研究结果表明,该组织工程骨修复FHN模型时成骨效果优于BCBB/BMP/bFGF,与自体骨移植相当。该研究的不足之处在于缺乏细胞免疫和体液免疫等方面观察,假如其安全性得到进一步探讨,则有望为临床上成人FHN的治疗提供一种有效的思路。

参考文献:

[1] Liu Y, Cai S, Shu X Z, *et al*. Release of basic fibroblast growth factor from a crosslinked glycosaminoglycan hydrogel promotes wound healing [J]. Wound Repair Regen, 2007, 15(2): 245-251.

[2] 臧继传,修晓光, 曹斌,等. 两种仿生双相陶瓷生物骨的异位成骨作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(1): 45-47.

[3] 彭吾训, 王蕾, 李彦林, 等. 双相陶瓷生物活性骨的制备及其细胞相容性研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2008, 16(19): 1496-1498.

[4] 彭吾训, 王蕾, 邓进,等. 微波灭活建立兔股骨头坏死模型:最适宜灭活温度和作用时间的筛选[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(2): 390-393.

[5] 龚跃昆,彭吾训,李彪,等. bFGF/BMP/AACB复合物修复犬股骨头缺损坏死模型的实验研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2006, 8(3): 248-251.

[6] Wen Q, Ma L, Chen Y P, *et al*. Treatment of avascular necrosis of the femoral head by hepatocyte growth factor-transgenic bone marrow stromal stem cells[J]. Gene Ther, 2008, 15(23): 1523-1535.

[7] 杨晓凤, 王红梅, 许忆峰,等. 干细胞移植改善股骨头坏死缺血状态122例临床观察[J]. 中华外科杂志, 2007, 45(20): 1428-1431.

[8] 刘春亮. 带肌蒂骨瓣移植治疗成人股骨头缺血性坏死疗效观察[J]. 山东医药, 2008, 48(30): 50-51.

[9] 李海清, 王大伟, 张长青, 等. 吻合血管游离腓骨移植结合BMP治疗股骨头坏死[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2008, 23(12): 1012-1014.

[10] 刘杰,吴雪晖,罗飞,等. 自体间充质干细胞构建组织工程骨修复人长骨缺损的临床观察[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(9): 851-854.

[11] Lim T Y, Wang W, Shi Z, *et al*. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation on titanium with surface-grafted chitosan and immobilized bone morphogenetic protein-2 [J]. J Mater Sci Mater Med, 2009, 20(1): 1-10.

[12] Ullmark G, Sundgren K, Milbrink J, *et al*. Osteonecrosis following resurfacing arthroplasty[J]. Acta Orthop, 2009, 80(6): 670-674.

[13] Yilmaz C, Golpinar A, Yilmaz N, *et al*. Comparison of bony healing and cartilage degeneration following strut grafting and trapdoor procedures in an ovine mode[J]. Orthopedics, 2008, 31(7): 656.

(**收稿**:2009-10-05;**修回**:2009-11-10)

(编辑 王小寒)