DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.025
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0553-03

论著

新型组织工程化人工骨的体外初步构建

段小军[1],杨 柳[1],石宗利[2],周 强[1] ([1]第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038;[2]兰州铁道学院复合材料研究所,兰州 730070)

提 要:目的 应用组织工程学技术,体外初步构建有活性的人工骨。方法 培养、诱导人间充质干细胞向成骨细胞表型转化,制备性能优越的支架材料,将细胞与材料复合构建人工骨,在体外培养一定时间后,扫描电镜观察组织工程化骨的微观结构和消化细胞行碱性磷酸酶染色。结果 L-聚乳酸、聚磷酸钙纤维、Ⅰ型胶原按一定的方法可构建出新型的骨组织工程复合支架材料,诱导后的间充质干细胞可在材料内良好贴附生长,维持成骨细胞表型。结论 本实验为骨组织工程学的进一步研究与应用提供了新的材料和方法。

关键词:组织工程;骨;支架材料;间充质干细胞
中图法分类号:R318.08;R322.71 文献标识码:A

Primary construction of tissue-engineered artificial bone regeneration *in vitro*

DUAN Xiao-jun, YANG Liu, SHI Zong-li, ZHOU Qiang (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct bioactive artificial bone *in vitro* with tissue-engineering techniques. Methods After human mesenchymal stem cellS (MSCS) were isolated from a health male volunteer and subcultured after purification, they were induced to differentiate into osteoblasts. Scaffold composites of superior properties were prepared and then the differentiated cells were implanted on them to construct artificial bone. After the cell-scaffold complex was cultured *in vitro*, the ultrastructure of the scaffold was observed with scaning electron microscopy and the expression of alkaline phosphatase (ALK) in the scaffold was studied with Gomori staining. Results Poly-L-lactic acid (PLLA), calcium polyphosphate fiber (CPPf) and collagen Ⅰ employed to produce the novel scaffold composites for tissue-engineering bone. Induced MSCs were well adherent to the novel scaffold composites and maintained the phenotype of osteoblast. Conclusion This experiment provides new biosynthetic materials and methods for tissue-engineered bone.

Key words: tissue engineering; bone; scaffold composite; mesenchymal stem cells

因创伤或骨病所致骨缺损在骨科临床十分常见,现有治疗手段均存在某些缺陷,组织工程学技术为骨缺损修复提供了新的途径。本实验旨在用间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)、新型支架材料,在体外初步构建组织工程化人工骨,从而为该技术的基础研究或临床应用提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM培养基、RPMI1640培养基、胎牛血清(Hyclone公司,美国),地塞米松、β-甘油磷酸钠、维生素C、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(EDTA)、Ⅰ型胶原(Sigma公司,美国),淋巴细胞分离液(天津TBD公司),L-聚乳酸(中科院化学所高分子合成室提供),聚磷酸钙纤维(兰州铁道学院复合材料研究所合成),三氯甲烷(上海化学试剂厂),氯化钠(北京化工厂)。

1.2 方法

1.2.1 人MSCs的培养 参照文献[1]的方法在无菌条件下,从健康40岁男性志愿者髂后上棘处用骨穿针穿刺,用内含1 ml肝素钠生理盐水(1 200 U/ml)的20 ml注射器抽出骨髓9 ml,去针头后注入含10 ml DMEM培养基的培养瓶中,混匀后带入实验室。将细胞悬液沿管壁缓慢加入含20 ml淋巴细胞分离液的离心管中,进行梯度离心(2 000 r/min×20 min),然后缓慢吸取中间交界面细胞悬液至另一离心管,用15 ml DMEM培养基洗涤1次(1 500 r/min×5 min),加入DMEM完全培养基(含10%胎牛血清、青霉素钠100 U/ml、链霉素100 U/ml),以2×10^5/cm^2的密度接种于培养瓶,48 h首次半量换液,以后每3 d全量换液。待细胞长至瓶底90%面积时,进行消化传代。吸出培养液,D-Hank液洗涤2次,0.25%胰蛋白酶+0.01%EDTA消化3~5 min,加入含血清培养液,离心后去上清液,加入DMEM完全培养基吹打计数,以1×10^4/cm^2的密度传代培养。孵箱内培养条件:37 ℃、5%CO_2的空气、饱和湿度。

1.2.2 人MSCs的成骨诱导 将第2代细胞消化后以1×10^4/cm^2的密度传代培养。48 h后全量换液,加入条件培养液(含RPMI1640培养基、10%胎牛血清、青霉素钠100 U/ml、链霉素100 U/ml、地塞米松10^{-8} mol/L、β-甘油磷酸钠10 mmol/L、维生素C 50 mg/L)[2]。每2 d换液。

1.2.3 支架材料的制备 参照Freed[3]熔铸颗粒沥取法。在超净条件下,将氯化钠颗粒(直径300~450 μm)3.860 g、聚磷酸钙纤维(长度10 mm、直径15 μm)0.483 g、牛Ⅰ型胶原0.010 g掺入含L-聚乳酸(平均分子量1.0×10^5)0.262 g的三氯甲烷溶液中,充分混匀;用预制模具熔铸成型;37 ℃三氯甲烷挥发48 h,期间适时脱模;干燥器内真空抽提溶剂;双蒸水反复萃取样品

基金项目:全军"十五"医药卫生科研基金资助重点项目(01Z072);重庆市重点科技攻关基金资助项目(2000-08-55)
作者简介:段小军(1972-),男,四川省渠县人,硕士研究生,医师,主要从事骨组织工程学方面的研究。电话:(023)68754000-73076
通信作者:杨 柳,E-mail:jointsurgery@mail.tmmu.com.cn,电话:(023)65317146
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中氯化钠颗粒；室温下自然干燥 24 h，干燥器内真空干燥 48 h，经冻干机处理 24 h，纸塑包装密封，环氧乙烷消毒，最后保存于真空干燥器内。材料呈白色多孔状，直径 11 mm，厚 4 mm，见图 1。参照 Zhang[4] 液体置换方法，测得支架材料密度 0.15 g/cm^3，孔隙率 90.1%。

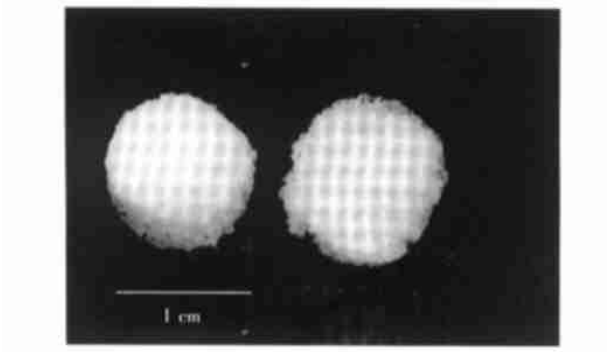


图 1 新型支架材料的外观

Fig 1 Gross observation of the novel scaffold composites with PLLA, CPPf and collage Ⅰ

1.2.4 人工骨的初步构建 取出支架材料，用 RPMI1640 培养基、RPMI1640 含血清培养液浸泡后，无菌脱脂棉吸干液体待用。将诱导培养 7 d 的细胞消化后，调整细胞悬液密度为 7×10^6/ml[5]，处理后的支架材料浸入此细胞悬液中 4 h，小心取出细胞-材料复合体，置于 6 孔培养板，每孔加入 RPMI1640 完全培养基 4 ml，48 h 后将复合体移入培养瓶培养，每 2 d 用条件培养液换液。

1.2.5 观察与检测 (1)倒置显微镜观察。(2)与支架材料复合前后的细胞碱性磷酸酶(ALP)染色：①取少量诱导后的细胞悬液，以 4×10^4/cm^2 的密度接种于 24 孔板(内含预处理的小玻片)，24 h 后取出用 PBS 缓冲液漂洗，95%酒精固定 15 min，采用钙钴法(Gomori 法)染色，阳性细胞呈棕色。②取出体外培养 7 d 的人工骨，用 D-Hank 液漂洗 1 次，置于 30 ml 离心管中，加入 6 ml 消化液(0.25%胰蛋白酶+0.01%EDTA)，适当吹打，5～10 min 后加入含血清培养液终止消化，振荡后静止 3 min，吸出液体后离心(1 000 r/min×5 min)，以 4×10^4/cm^2 的密度接种于 24 孔板(内含预处理的小玻片)，24 h 后取出同前处理。随机计数 8 个高倍视野阳性细胞数。比较种子细胞与支架材料复合前后的 ALP 阳性率。(3)扫描电镜观察：取出体外培养 7 d 的人工骨，用 3%的戊二醛固定 24 h 后，锐刀剖开，酒精系列脱水，醋酸异戊酯置换，真空干燥，表面喷金，扫描电子显微镜观察其内部微观结构。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察

原代及传代培养的人 MSC_S 多呈条索状，少数呈多角形，个别呈不规则形，有长的细胞突起，胞核明显，甚至可见 1～2 个核仁。原代培养 12～13 d 长满瓶底，传代培养 6～7 d 长满瓶底。MSC_S 经诱导后，多角形、不规则形细胞增多，体积变大，含较多胞浆颗粒。在细胞—材料复合体周边部分，可见较多细胞呈圆形贴附于材料上，中央部分光线较弱，仅见材料网状结构。

2.2 ALP 染色

诱导后的 MSC_S 阳性细胞数 55%±8%，从支架材料上消化下来的细胞阳性细胞数 52%±6%，t 检验，$P>0.05$，两组阳性率无显著性差异，见图 2。



图 2 诱导后人 MSC_S ALP 染色 (Gomori×100)

Fig 2 Expression of ALP in induced human MSCs (Gomori×100)

2.3 扫描电镜观察

支架材料由较直的聚磷酸钙纤维、丝状Ⅰ型胶原和网状 L-聚乳酸构成，含大量空隙，微孔相互贯通，微孔直径 300～450 μm，见图 3。在材料表面有大量细胞贴附生长，呈圆球形，并有不规则突起，部分区域细胞堆积，见图 4。

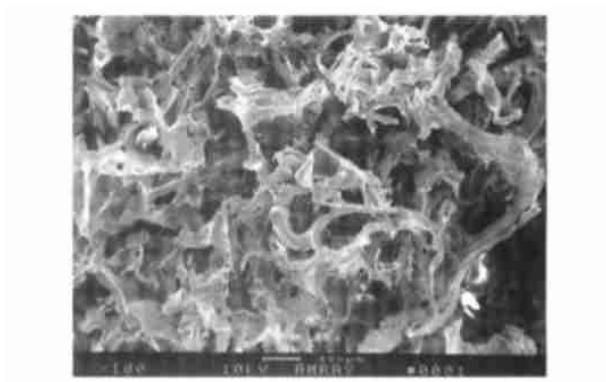


图 3 新型支架材料的扫描电镜观察 (SEM×100)

Fig 3 Observation of the novel scaffold composites with PLLA, CPPf and collage Ⅰ (SEM×100)

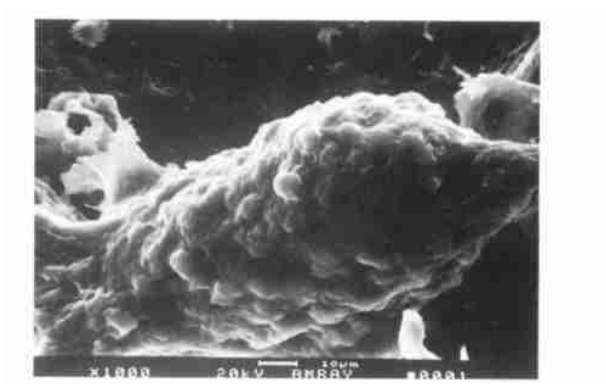


图 4 组织工程化骨微观结构的扫描电镜观察 (SEM×1 000)

Fig 4 Ultrastructure of the novel scaffold composites with PLLA, CPPf and collage Ⅰ (SEM×1 000)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

骨组织工程学是是一门以细胞生物学、分子生物学、生物材料学和临床医学等学科为基础的交叉学科, 主要包括种子细胞、生长因子、支架材料、三维培养、人工骨修复骨缺损等方面的研究。目前研究进展较快, 各领域均有收获。

MSCs 具有: 取材容易, 对机体损伤小; 体外培养时增殖力强、易稳定表达成骨细胞表型; 植入体内后能耐受机体免疫, 继续产生成骨活动; 无致瘤性等特点, 为骨组织工程的较好种子细胞[6]。

理想的支架材料应具备: ①良好的组织相容性; ②多孔的立体结构; ③性能较佳的材料微环境; ④可控的材料降解率; ⑤一定的机械性能; ⑥易于加工[7]。来源有两类: 人工合成的高分子材料和天然材料。目前人工材料包括: 羟基磷灰石(HA), 磷酸三钙(TCP), L-聚乳酸(Poly-L-lactic acid, PLLA), 聚羟基乙酸(PGA), 聚磷酸钙纤维(Calcium polyphosphate fiber, CPPf)等。由于各单一材料存在明显的缺点, 因此近年来组织工程支架材料研制中产生了一个新方法, 即应用复合材料的原理方法, 将两种或两种以上具有互补特性的生物材料, 按一定比例与方式组合, 以期构造出能够满足要求的新型复合材料。

我们以磷酸钙或磷酸二氢钙为主要原料, 添加适量稳定剂、阻降剂, 用熔融拉丝法获得 CPP 纤维, 并测试了该物质的力学性能、降解性能、毒理学性能和生物相容性[8]。降解材料 PLLA 的酯键可在体内水解, 通过控制聚合物的分子量及其组成, 降解速度可在几周至几年的范围内调控, 降解产物乳酸进一步代谢后可完全排出体外。Ⅰ型胶原有明显的促种子细胞粘附作用。将 L-聚乳酸、聚磷酸钙纤维、Ⅰ型胶原按一定的方法构建出新型的复合支架材料, 其性能较单一材料更优越。我们在既往研究的基础上, 成功的进行 MSCs 体外培养、大量扩增, 并诱导为成骨细胞表型; 本实验初步证实, 诱导后的种子细胞可在新型复合支架材料上良好贴附生长, 体外构建的组织块具有合理的微孔直径, 较高的孔隙率等特性, 基本满足骨组织工程的要求。该材料在提高抗压缩强度和可控降解方面还要进一步研究。总之, 本实验采用的组织工程化骨体外初步构建方法, 可为骨组织工程学技术的进一步研究和应用提供新的材料与方法。

参考文献:

[1] Majumdar M K, Thiede M A, Mosca J D, *et al*. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells[J]. J Cell Physiol, 1998, 176(1): 57－66.

[2] Peter S J, Lichun Lu, Kim D J, *et al*. Marrow stromal osteoblast function on a poly(propylene fumarate)/β-tricalcium phosphate biodegradable orthopaedic composite[J]. Biomaterials, 2000, 21(12): 1 207－1 213.

[3] Freed L E, Marquis J C, Nohria A, *et al*. Neocartilage formation in vitro and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers[J]. J Biomed Mater Res, 1993, 27(1): 11－23.

[4] Zhang P Y, Ma P X. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 45(4): 285－293.

[5] Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder S P. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect[J]. Tissue Eng, 1997, 3(2): 173－185.

[6] 杨　柳, 段小军. 骨组织工程学中种子细胞研究的前沿问题[J]. 中国临床康复, 2002, 6(4): 532－533.

[7] Freed L E, Vanjak-Novokovic L, Biron R J, *et al*. Biodegradable polymrscaffolds for tissue engineering[J]. Biotechnology, 1994, 12(7): 689－693.

[8] 石宗利, 戴　刚. 一种新型骨组织工程材料-CPP 纤维的制备和性能[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2001, 37(2): 47－51.

(编辑　王　红)

(上接 552 页)

1 次, 下一周期前复查 B 超。21～28 d 为一周期, 2～3 周期后评价疗效。

疗效判定标准: 所有患者均经 CT 或 B 超检查判定治疗效果。其中完全缓解(CR): 所能看到的病变完全消失至少 4 周; 部分缓解(PR): 肿瘤大小缩小 50% 以上至少 4 周; 无变化(NC): 4 周内病情稳定, 肿瘤大小无明显变化; 病变进展(PD): 新病灶出现或原有病灶增长 25%以上; CR+PR 为有效。

2　结果

2～3 周期后评价疗效, 有效 30 例(53.5%); 无效 26 例(46.5%); 本组有效率为 53.5%。共有 3 例出现腹痛, 经对症治疗后缓解, 未出现腹腔内感染, 无肠粘连、肠梗阻等并发症。

3　讨论

胃癌患者出现腹膜和腹腔淋巴结转移, 经外周静脉或者动脉导管途径给药很难使化疗药物在腹腔内获得较高的浓度[1]。腹腔内直接注入化疗药物可以使肿瘤直接浸泡于化疗药物中, 可明显提高杀伤肿瘤效果。文献[2, 3]报道腹腔内给药较静脉或动脉给药可明显提高腹膜、腹腔内淋巴结及肿瘤内药物浓度, 其清除率仅为全身化疗的 1/10 并能在较长时间内维持较高的药物浓度; 腹腔内注入化疗药物, 药物通过腹膜吸收进入门静脉, 有利于预防肿瘤的肝转移。文献[4]报道用 FAP 方案单纯静脉化疗有效率为 37%～41%, 本组有效率为 53.5%, 疗效较高。DDP 为消化道反应较重的化疗药物, 腹腔给药较静脉或动脉给药副反应明显减轻。5-Fu 为细胞周期特异性药物, 疗效与时间成正比, 采用分次给药可提高疗效。地塞米松可有效地预防腹膜炎及后期肠粘连的发生, 本组病例使用地塞米松后未发生严重副反应。腹腔、静脉双路化疗可提高疗效, 不失为一种治疗晚期胃癌较好方法。

关键词: 胃肿瘤; 腹膜转移; 腹腔化疗; 静脉化疗
中图法分类号: R735.205　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 刘　熠, 王　红, 李延红. 进展期胃癌术后热灌注 FAM 方案腹腔化疗临率观察[J]. 中国肿瘤临床, 2000, 10(27): 797－798.

[2] 王　娟. 进展期胃癌围手术期腹腔化疗[J]. 中国肿瘤临床与康复, 1997, 4(2): 92.

[3] 卿三华, 周正端, 齐德林, 等. 大剂量大容量 5-氟尿嘧啶腹腔化疗治疗消化系统恶性肿瘤[J]. 普外临床, 1995, 10(1): 54－55.

[4] Sugarbaker P H. Intraperitoneal chemotherapy for treatment and prevention of peritoneal carcinomatosis and carcomatosis[J]. Dis Colon Rectum, 1994, 37(2): 115－118.

(编辑　谢义霞)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net