

# 骨组织工程研究进展

## Progress of bone tissue engineering

金黎明 刘万顺 韩宝芹 刘晨光 刘伟治

JIN Liming, LIU Wanshun, HAN Baoqin, LIU Chenguang, LIU Weizhi

【关键词】 组织工程; 成骨细胞 【Key words】 Tissue engineering; Osteoblasts

组织工程学是一门应用工程学和生命科学的原理和方法,以载体结合被分离细胞,并在宿主体内降解释放细胞,形成新的有功能组织的科学。其基本方法是:取少量自体组织,在体外分离、培养细胞,将一定量的培养细胞种植到具有一定空间结构的三维支架上,再将此细胞-支架复合物植入体内或在体外继续培养,通过细胞的生长繁殖、相互粘附、分泌细胞外基质,形成具有一定结构和功能的组织和器官。近年来应用骨组织工程临床治疗骨缺损成为目前研究的热点。这不仅可以减少自身骨移植的供区损伤,也可避免同种异体移植供体来源有限和不可避免的免疫排斥反应。目前骨组织工程的研究主要包括:①种子细胞的体外培养;②细胞种植基质材料的研究开发;③组织培养中各种因子的调控作用。

### 1 种子细胞的来源

体外培养种子细胞是组织工程学的关键一环,成骨细胞是骨组织工程的种子细胞。理想的细胞来源应具备下列特点:①取材容易,对机体的损伤小;②在体外培养中易定向分化为成骨细胞和具有较强的传代繁殖力;③植入机体后能适应受区的环境并保持成骨活性。当前成骨细胞主要有以下几个来源:

1.1 骨<sup>[1-3]</sup> 目前较多使用的是胚胎骨或新生骨。利用骨作为来源获得的细胞在体外较易定向分化为成骨细胞,且具

有生长迅速,传代繁殖快的优点。但此法会对患者造成手术损伤且供源有限。

1.2 骨外膜 骨外膜分为内外两层。其中内层含有较多骨祖细胞和成骨细胞。骨外膜来源的成骨细胞作为种子细胞应用于临床治疗骨缺损全过程均已实现<sup>[4-7]</sup>。此种方法获得的细胞具有很强的繁殖分化能力,但也同样存在着对机体造成新的较明显创伤的缺点。

1.3 骨髓<sup>[8-11]</sup> 骨髓分造血和基质两大系统,其成骨能力来源于基质。骨髓基质细胞称作成纤维细胞集落形成单位,具有多向分化潜能,可分化为成骨系细胞、成纤维系细胞、脂肪细胞和造血系细胞。在诱导因子作用下,可使其向成骨系细胞分化。骨髓具有取材方便、对供体损伤小、有流动性和可经皮注射等优点。体外培养细胞具有较强床上已取得良好疗效。

1.4 骨外组织<sup>[12-14]</sup> 起源于胚胎时期间充质的骨外部位的骨祖细胞,即可诱导性骨祖细胞,在诱导因子的持续作用下,可维持其成骨的功能,这就解释了异位骨化现象。有研究发现毛细血管周细胞<sup>[12]</sup>、成纤维细胞<sup>[13]</sup>、毛细血管系统的内皮细胞或网状内皮细胞<sup>[14]</sup>都可在体外培养条件下向成骨细胞定向分化。这种方法取材容易,对人体的创伤较小,体外培养传代繁殖能力较强,提供了一条新的成骨细胞的来源。但由于定向分化为成骨细胞及适应受区环境的能力较低,限制了其应用。

成骨细胞的这四种来源,在作为种子细胞方面各有优势,

青岛海洋大学海洋生命学院,山东 青岛 266003  
基金项目: 863 计划资助项目(2001AA625050)

57: 619-623.

14 Itonaga I, Sabokbar A, Murray DW, et al. Effect of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand on osteoclast formation by arthroplasty membrane derived macrophages. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59: 26-31.

15 Donatella G, Elisabetta C, Lucia S, et al. Bone cement extracts modulate the osteoprotegerin/osteoprotegerinligand expression in MG63 osteoblast like cells. *Biomaterials*, 2002, 23: 2359-2365.

16 Shanbhag AS, Macaulay W, Stefanovic-Racic M, et al. Nitric oxide release by macrophages in response to particulate wear debris. *J Biomed Mater Res*, 1998, 41: 497-503.

17 Hukkanen M, Corbett SA, Platts LA, et al. Nitric oxide in the local host reaction to total hip replacement. *Clin Orthop*, 1998, 52: 53-65.

18 Li TF, Santavirta S, Virtanen I, et al. Increased expression of EMM-

PRIN in the tissue around loosened hip prostheses. *Acta Orthop Scand*, 1999, 70: 446-451.

19 Imai S, Konttinen YT, Jumppanen M, et al. High levels of expression of collagenase 3(MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign body reaction. *J Bone Joint Surg(Br)*, 1998, 80: 701-710.

20 Takei I, Takagi M, Santavirta S, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in joint fluid of the patients with loose artificial hip joints. *J Biomed Mater Res*, 1999, 45: 175-183.

21 Nawrocki B, Polette M, Burette H, et al. Expression of gelatinase A and its activator MT1-MMP in the inflammatory periprosthetic response to polyethylene. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 288-294.

(收稿: 2002-09-04 编辑: 李为农)

其中骨髓由于取材方便,对机体损伤小而具有更广阔的应用前景。值得一提的是,骨髓基质细胞具有多种分化潜能,应注意培养条件的选择,保证其向成骨细胞分化。

还有学者认为,构建组织工程化人工骨应以成骨细胞为中心,在组成成份上包括破骨细胞、血管内皮细胞及类似人体骨骼的有机、无机成份,为成骨细胞提供正常的细胞社会学环境,并含有最佳组合的生长因子缓释系统,促进成骨细胞快速增殖,发挥最佳成骨能力<sup>[15]</sup>。

## 2 细胞种植基质材料

细胞种植基质材料是目前限制骨组织工程在临床应用的一个重要原因。理想的细胞种植基质材料应具备以下五个条件:①能提供良好的细胞界面,利于细胞粘附、增殖。②良好的组织相容性,无论材料本身还是其降解产物都不能产生炎症和毒性反应。③可降解性,完成支架作用后应能降解并被吸收,降解性能应根据移植细胞的类型进行调整。④具有三维立体多孔结构,多孔率应达 90% 以上,以利于提供细胞生长空间。⑤可塑性和一定的机械强度,可加工成各种形状,移植后能保持原形状<sup>[16-18]</sup>。

目前,用于骨组织工程细胞种植基质材料有两大类,一类是天然细胞种植基质材料;另一类为人工合成细胞种植基质材料。

### 2.1 天然细胞种植基质材料

**2.1.1 胶原** 胶原主要分五类,骨组织中主要为 I 型胶原。Mizuno 等<sup>[19]</sup>将 I 型胶原用作骨髓基质细胞的培养基质,发现骨髓基质细胞可定向分化为成骨细胞,最终形成含骨髓成份的新生骨组织,成骨过程中无软骨生成。

I 型胶原虽然因含特定的细胞识别信号(如某些氨基酸序列)而利于成骨细胞增殖分化,但它缺乏一定的机械强度,难以单独用作成骨细胞培养基质材料,可作为良好的材料包埋和添加剂。

**2.1.2 甲壳素及其衍生物** 甲壳素亦称甲壳质、凡丁质,是自然界中仅次于纤维素的天然多糖,其脱乙酰化产物称为甲壳胺或壳聚糖。Klokkevold 等<sup>[20]</sup>研究发现壳聚糖有促进前成骨细胞分化,加速骨形成的作用。但有研究发现在壳聚糖钉周围炎症反应较明显<sup>[21]</sup>。也就是说,一般认为壳聚糖有较好的生物相容性大都是在将其制成膜材料、线材料和药物载体的研究中发现的。当材料的几何形状变化时可能损害与它接触的细胞和组织,因此有人认为壳聚糖不适合作为体内埋植材料。

**2.1.3 珊瑚** 生物珊瑚因具有类似无机骨的微孔结构和组成成份(碳酸钙)而引起广泛注意,用于临床治疗骨缺损已有十多年。它具有多孔性和高孔隙率,有一定的机械强度和可塑性,良好的生物降解性,来源丰富。

此外,天然的细胞外基质还有纤维蛋白<sup>[22]</sup>、藻酸盐<sup>[23]</sup>、脱钙骨及经物理、化学及高温处理的动物骨等。

### 2.2 人工合成细胞种植基质材料

**2.2.1 无机材料** 目前应用较为广泛的无机材料为羟基磷灰石(HA)<sup>[3,5,24,25]</sup>。Iyoda 等<sup>[3]</sup>将分离培养的兔骨髓成骨细胞与 HA 联合移植于自体尺骨 6 mm 的缺损处,13 周后经 X 线和组织学检查证实缺损已完全修复。HA 虽有较好的生物

相容性,但其塑形难、脆性大,应用受到了很大限制。

其它的无机材料还有钙磷陶瓷<sup>[9]</sup>、珊瑚转化的羟基磷灰石(CHAp)<sup>[26]</sup>、生物活性玻璃陶瓷(BGC)、磷酸三钙(TCP)、磷酸钾钠钙等。

**2.2.2 有机高分子材料** 有机高分子材料中聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)及其共聚物(PLGA)应用最为广泛。其在组织工程中应用的主要结构形式有纤维支架、多孔泡沫以及管状结构等。这些结构形式在骨组织工程实验研究中都显示出良好的成骨效应<sup>[4,6,7,27]</sup>。

Breitbart 等<sup>[4]</sup>将 PGA 无纺纤维支架制成直径 15 mm,厚 2 mm 的圆盘状,复合体外培养的兔骨髓成骨细胞,植入修复兔颅骨直径为 15 mm 的全层骨缺损。12 周后缺损区大量骨生成,完全修复骨缺损。Vacanti 等<sup>[7]</sup>将分离培养的骨髓成骨细胞吸附于 PGA 联合移植于裸鼠颅骨圆形缺损区,术后 3 周缺损区形成软骨,9、12 周时缺损已被新生骨组织完全修复。Pudacher 等<sup>[6]</sup>用牛的肩胛骨骨膜作为细胞来源,以 PLGA 为载体,植入裸鼠股骨的人工骨缺损处。12 周后,便可见大块骨形成,且骨组织中有骨髓形成,软骨只少许残余,聚合物基本上被吸收。

针对 PLGA 亲水性差、细胞吸附能力弱的缺点, Mikos 等<sup>[28]</sup>通过乙醇和水两步预湿的方法,有效地解决了支架预湿的问题。Zheng 等<sup>[29]</sup>通过在聚合物表面引入化学官能团的方法增加亲水性,有望在组织工程中得到应用。

PGA 和 PLA 降解后酸性代谢产物会降低聚合物周围 pH 值,从而影响细胞和组织的生长。Agrawal 等<sup>[30]</sup>将碱性物质如碳酸钙、碳酸氢钠、羟基磷灰石引入聚合物中,可缓解 pH 下降,有助于防止无菌性炎症的发生。

尽管 PLA、PGA 和 PLGA 有诸如良好的生物相容性、可降解性可吸收性、材料的吸收率可以通过共聚单位的相关比例来控制等优点,且已有许多改进,但仍存在着费用昂贵、降解率低、可塑性不令人满意的缺点。

其它的用来作为细胞种植基质材料有机高分子材料还有聚丁酸、聚偶磷氮、聚酸酐、聚乙二醇、聚尿酸等。

天然材料生物相容性好,具有细胞识别信号,利于细胞粘附增殖;人工材料缺乏细胞信号,但具有天然材料所不足的可以大规模生产、可以设计和控制结构、机械性能和降解时间等优点。加上各种基质材料单独使用时能力有限,今后应加强复合性基质材料的研制<sup>[31]</sup>。

### 3 培养环境

组织工程骨形成的质量与细胞培养密切相关,因此建立一定标准化的可重复的培养系统是很必要的。许多研究发现生长因子对成骨细胞分化增殖有重要调节作用,如 BMP、TGF- $\beta$ 、bFGF、IGF、PDGF 等。它们不仅可单独作用,相互之间也存在着密切的关系。应当深入研究生长因子的作用,以便得到生长更好的成骨细胞。

目前大多数实验都是在静力培养条件下进行的,与人体内情况有差异,生物反应器和灌注培养系统的先后出现,改善了细胞、组织在体外培养的条件,有助于模拟体内环境,获得营养、排除代谢产物和物质交换,促进组织工程产品实现商品化<sup>[32]</sup>。

#### 4 应用前景及展望

将骨组织工程应用于临床具有取材容易,对机体损伤小,可以大量制作的优点,应用前景良好。近几年需深入研究的问题有:①深入进行基质材料和种子细胞的研究和开发,寻找更理想的细胞来源和基质材料;②继续完善动物实验规范,保证实验证据确实可靠;③培养环境的研究:深入探讨细胞因子和环境因素对成骨细胞作用的影响,建立一个标准化、可重复的培养系统。

#### 参考文献

- Ricco V, Ragione FD, Marrone G, et al. Cultures of human embryonic osteoblasts. A new method in vitro biocompatibility studies. *Clin Orthop*, 1994, 308(1): 73-78.
- Castoldi M, Pistone M, Caruso C, et al. Osteoblastic cells from rat long bone. II: Adhesion to substrata and integrin expression in primary and propagated cultures. *Cell Biol Int*, 1997, 21(1): 7-16.
- Iyoda KI, Miura T, Nogami H, et al. Repair of bone defect with cultured chondrocytes bond to hydroxyapatite. *Clin Orthop*, 1993, 288: 287.
- Breitbart S, Graride DA, Keler R. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg*, 1998, 101(3): 567-574.
- Nakahara H, Goklberg VM, Caplan AI, et al. Culture expanded preosteal derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics. *In Vivo Clin Orthop*, 1992, 276(3): 291-298.
- Puelacher WC, Vancanti JP, Ferraro NF, et al. Femoral shaft reconstruction using tissue engineered growth of bone. *Oral Maxillofac Surg*, 1996, 25: 223-228.
- Vacanti CA, Vacanti JP. Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches. *Otolary Clin North Am*, 1994, 27(1): 263-276.
- Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop*, 1995, 313: 8-18.
- Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI, et al. The osteogenic potential of culture expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vitro in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop*, 1991, 262: 298.
- 卢丙仓, 刘宝林, 冯至华, 等. 人骨髓成骨细胞培养法的改良及其体外成骨能力. *第四军医大学学报*, 1999, 20(11): 81-83.
- Matin I, Pederia RF, Vaniak NG, et al. In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone like tissues. *J Orthop Res*, 1998, 16: 181-187.
- Brighton CT, Lorch DG, Kupcha R, et al. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop*, 1992, 275(2): 287-299.
- Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, et al. Bone morphogenetic protein 2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Dev Biol*, 1994, 127(6): 1755-1766.
- Burwell RG. Osteogenesis in cancellous bone graft: Considered in terms of cellular changes, basic mechanisms and the perspective of growth control and its possible aderrations. *Clin Orthop*, 1965, 40(1): 35.
- 余希杰, 杨志明, 马骏荣. 成骨细胞的细胞社会学特性. *中国修复重建外科杂志*, 1998, 12(6): 350-354.
- Freed LE, Vunjak Novskovic G, Biron RJ, et al. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology*, 1994, 12(7): 689-693.
- Kim BS, Moonney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 1998, 16(5): 224-230.
- Ishaug Riley SL, Crane GM, Gurlek A, et al. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *J Biomed Mater Res*, 1997, 36(1): 1-8.
- Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, et al. Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo. *Bone*, 1997, 20(2): 101-107.
- Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, et al. Osteogenesis enhances by chitosan (poly N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *J Periodontol*, 1996, 67(11): 1170.
- 张建湘, 汤健, 徐斌, 等. 壳聚糖钉固定兔胫骨近端截骨的实验研究. *生物医学工程杂志*, 1998, 15(2): 179-182.
- Sims CD, Butler PE, Cao YL, et al. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg*, 1998, 101(6): 1580-1585.
- Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, et al. De novo cartilage generation using calcium alginate chondrocyte constructs. *Plast Reconstr Surg*, 1996, 97(1): 168-178.
- Nunes CR, Simake SJ, Sachdeva R, et al. Long-term in growth and apposition of porous hydroxyapatite implants. *J Biomed Mater Res*, 1997, 36(4): 560-563.
- Ayers RA, Simake SJ, Nunes CR, et al. Long-term bone in growth and residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans. *J Oral Maxillofac Surg*, 1998, 56(11): 1297.
- 吴凡, 杨维东, 雷德林, 等. 成骨细胞接种于珊瑚-羟基磷灰石构建骨组织的研究. *解放军医学杂志*, 2001, 26(4): 246-247.
- Ishaug SL, Crane GM, Gulerk A, et al. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *J Biomed Mater Res*, 1997, 36(1): 1-8.
- Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, et al. Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(LD-lactic co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials*, 1994, 15(1): 55-58.
- Zheng J, Northrup SR, Hornsby PJ, et al. Modification of materials formed from poly(L-lactic acid) to enable covalent binding of biopolymers: Application to high density three dimensional cell culture in foams with attached collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998, 34(9): 679-684.
- Agrawal CM, Athanasion KA. Technique to control PH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. *J Biomed Mater Res*, 1997, 38(2): 105-114.
- 马秦, 毛天球, 刘宝林, 等. 生物珊瑚、胶原和 rhBMP-2 合成人工骨修复兔下颌骨缺损的实验研究. *实用口腔医学杂志*, 1998, 14(1): 24-26.
- 杨维东, 毛天球. 口腔颌面骨替代材料与骨组织工程. *实用口腔医学杂志*, 1999, 15(6): 469-471.

(收稿: 2002-08-08 编辑: 李为农)