

骨组织工程研究进展

李娟,戴文达,董健

(复旦大学附属中山医院骨科,上海 200032)

【摘要】 组织工程学是应用生命科学和工程学的原理及技术,构建、培育活组织,研制生物替代物,以修复或重建组织器官的结构,维持或改善功能的一门新兴学科。目前组织工程学研究的主要问题是:①种子细胞的体内、体外培养;②支架材料的研究与开发;③种子细胞与基质材料相互作用的调控等。骨创伤、肿瘤和炎症等导致的骨缺损是目前骨科临床的常见病和难治病,惟一的方法是通过骨移植进行修复。利用骨组织工程培养的人工骨不仅可修复大面积的骨缺损,而且可按需塑形及大量制备,是一种理想的创伤修复及功能重建的材料。

【关键词】 骨; 组织工程; 细胞骨架; 综述文献

Progresses in bone tissue engineering LI Juan, DAI Wen-da, DONG Jian. Department of Orthopaedic Surgery, Zhongshan Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China

ABSTRACT Bone tissue engineering plays an important role in tissue engineering. It typically uses an osteoblasts, artificial extracellular matrix (scaffold), and osteoinductive factors which promote cell attachment, differentiation, and mineralized bone formation. So it contains three problems at least: osteoblasts culture in vivo and in vitro, scaffold studies and regulation factors. Bone defect caused by trauma, tumor and inflammation is a frequent and formidable problem in clinical orthopedics. It appears that artificial bone produced by bone tissue engineering can save the problem well. With the development of tissue engineering, bone tissue engineering is developing rapidly. However, seldom experiments are on human body, and fewer productions of bone tissue engineering are used in clinic.

Key words Bones; Tissue engineering; Cytoskeleton; Review literature

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(11):880-882 www.zggszz.com

骨创伤、肿瘤和炎症等导致的骨缺损是目前骨科临床的常见病和难治病,惟一的方法是通过骨移植进行修复。骨移植材料根据来源大致可分为自体骨、异体骨、异种骨和人工骨材料。自体骨移植的取骨手术增加患者创伤,取骨量有限,不能满足植骨需求;异体骨和异种骨均存在排异,前者存在交叉感染问题,后者排异反应尤为剧烈,经脱钙、煅烧等处理后有益的活性物质又会破坏殆尽,限制了临床使用。利用骨组织工程培养的人工骨不仅可修复大面积的骨缺损,而且可按需塑形及大量制备,是一种理想的创伤修复及功能重建的材料,本文就目前骨组织工程学的研究现状作一综述。

1 种子细胞

成骨细胞是骨组织工程的关键细胞,其在骨基质矿化过程中逐渐被包埋于骨陷窝中,成为骨细胞。人工骨的最终归宿是被成骨细胞形成的自然骨所替代,因而成骨细胞的分离培养、扩增以及功能调控是骨组织研究的关键步骤。骨组织工程中成骨细胞的组织来源主要有骨膜、骨髓和骨外组织。

1.1 骨膜细胞 骨膜内成骨细胞含量丰富,体外培养容易成活,生长增值旺盛,是骨组织工程中较理想的种子细胞^[1],其成骨能力高于骨髓 MSCs 和牙槽骨细胞^[2]。Park 等^[3]利用人下颌骨骨膜细胞成功诱导分化为成骨细胞,并且早期大量表达 ALP,后期则降钙素的表达占优势,矿化结节量增长呈时间

依赖性,说明下颌骨骨膜细胞可以作为种子细胞修复颌面部骨缺损。但是骨膜细胞来源有限,且取材不方便,可造成新的创伤,限制了其运用。

1.2 骨髓间充质干细胞 MSCs 是一种多能性细胞,在某些物质的诱导下可分化为成骨细胞。因此,提取 MSCs 经体外扩增、诱导分化,使其成为成骨细胞的方法也可用于骨组织工程。使用最多、分离较容易的为骨髓 MSCs。实验证实^[4]人胚胎骨髓 MSCs 的增殖能力明显强于成人骨髓 MSCs,但利用人胚胎骨髓 MSCs 涉及伦理和来源问题,所以现在很多研究仍着眼于成体骨髓来源的 MSCs。以往认为细胞培养液中的黏附细胞才是 MSCs,但 Wan 等^[5]将患者骨髓 MSCs 在培养瓶中培养,将培养液中非黏附细胞离心后所得细胞再次培养,发现这些非黏附细胞与原骨髓 MSCs 在体外及大鼠体内有相似的增殖及分化能力。利用这种方法能较大提高种子细胞的利用效率。有学者^[6]利用 hBMP-2 重组质粒转染兔骨髓 MSCs 后种植于异种骨支架,证实 BMP-2 基因可导入细胞且稳定表达基因产物促进自身增殖分化,转染后细胞在支架材料上贴附生长良好。

1.3 骨外组织 近年来在皮肤、脂肪、肌肉等组织和外周血中均分离出具有成骨潜能的细胞,这些细胞在诱导因子的作用下能定向分化为成骨细胞。下面就几种常用骨外组织来源

的种子细胞作一分述。

1.3.1 外周血单核细胞 利用外周血作为种子细胞的来源不但对供体侵袭小,造血系统还可以源源不断地提供造血细胞。实验证实外周血中亦含有少量的 MSCs,且细胞表型与骨髓 MSCs 相似,均表达 CD44、CD106、 α -SMA,不表达与造血系相关的 CD14、CD34 和 CD45^[7]。但 Chim 等^[8]首次以人外周血 CD14(+)的单核细胞作为种子细胞,同样观察到种子细胞向成骨细胞分化,将其植入鼠颅骨缺损处,6 周后观察到缺损处有新骨生长。因此外周血单核细胞可以作为骨组织工程种子细胞。

1.3.2 脂肪干细胞 除骨髓 MSCs 外,脂肪组织来源的干细胞-脂肪干细胞(Adipose-derived stem cells, ASCs)也显示出了多向分化能力,可向成骨细胞、软骨细胞及脂肪细胞分化^[9],受到越来越多研究者的关注。Dudas 等^[10]将兔 ASCs 经 BMP-2 诱导后移植于自身颅骨缺损处,发现其对颅骨缺损的修复能力高于未诱导组,与自体骨移植组无明显统计学差异。但 ASCs 在脂肪组织中含量较低,提取及分离较为困难,脂肪组织来源有限,离广泛运用尚有一定距离。

1.3.3 胚胎干细胞 胚胎干细胞是指由胚胎内细胞团或原始生殖细胞分离出来的多潜能细胞系,具有发育全能性、分裂增殖能力强等特点,从理论上讲是骨组织工程最佳的种子细胞,但获得细胞不易,运用人胚胎干细胞涉及伦理问题,因此当前并未广泛运用。Tielens 等^[11]将小鼠胚胎干细胞培养于添加了白血病抑制因子的可降解大孔微载体上,14 d 后细胞仍保持多向分化潜能,将培养了 7~14 d 的胚胎干细胞种植于分化培养基上,2 周后观察到成骨性分化。胚胎干细胞来源有限,获得相对困难,细胞的保存尤为重要。Harrison 等^[12]比较不同聚 alpha-羟基酯支架对未分化状态的小鼠胚胎干细胞的保存能力,通过观察存活细胞数和 Oct-4 免疫反应性,发现聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(PLGA)支架能更好地保存未分化细胞,且经 0.1 mol/L 氢氧化钾表面处理的所有聚 alpha-羟基酯类支架上存活细胞数均增加。

2 支架材料

组织工程支架材料是指能与组织活体细胞结合并能植入生物体的材料,它是组织工程化组织的最基本构架。骨组织工程中支架材料的选择非常重要,它影响细胞培养的效率、移植后的组织反应以及修复效果等诸多方面。用于骨组织工程的支架材料有天然和人工合成两大类。天然的指胶原、明胶、纤维蛋白凝块等,人工合成的有生物陶瓷类如羟基磷灰石(HA)、磷酸三钙(TCP),高分子聚合物如聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)等。复合材料可以发挥不同材料的优势,弥补单一材料的不足,是一种比较理想的支架材料,现在已成为研究热点之一。有作者通过对聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(PLGA)改性,在分子链中引入具有良好生物相容性和亲水性的聚乙二醇(PEG)链段和含有多个功能位点的天冬氨酸(ASP),合成 PLGA-[ASP-PEG]三嵌段多元共聚物支架材料,能更好地诱导 MSCs 的黏附和增殖,并能较好地保持细胞的形态,对成骨分化无明显影响^[13]。Li 等^[14]将甲壳素纤维加入 HA/胶原/PLLA (nHACP)复合材料中,发现复合支架的抗压能力提高了 4 倍,人骨髓 MSCs 培养显示该复合支架具有更好的细

胞相容性。

在组织工程中,支架是种子细胞增殖、分化及与有机体相互作用的场所,以往的支架往往只提供了供种子细胞发挥作用的场所,且在体外已完成基本塑型。现在越来越多的支架不仅提供这样的场所,还复合了调控细胞增殖分化的各种因素,具有更好的“按需塑型”能力,本文现暂且称其为新型支架材料。复合缓释系统的支架材料近来受到不少研究者的关注。有学者证实^[15]复合 BMP-2 缓释系统 PLGA 支架能延长细胞内信号转导蛋白的作用,增强细胞的生长和分化。可注射材料能通过注射、关节镜注入等侵袭性小的方式植入体内,为骨组织工程支架材料的发展和组织工程骨的临床运用提供了另一途径。有学者^[16]合成了一种可注射型聚氨基甲酸酯,该材料制成的薄膜不但有良好的亲水性、表面性质及细胞相容性,其机械强度和弹性优于很多可注射的骨水泥和植入物,培养 7 d 以上仍可增加人初级成骨细胞的细胞活性及促进细胞的增殖。该材料还可与 beta-TCP 制成复合材料,提高支架材料的机械性能、表面亲水性、细胞活性及增殖能力。

3 调控因素

3.1 诱导成骨因子 已经发现有多种细胞因子对成骨过程具有重要的调节作用,可以诱导成骨、促进细胞增殖和胶原合成、促进成骨和血管生长以及在骨吸收重建方面发挥作用,因此在构建组织工程骨时对成骨因子合理使用或调控成骨因子的适时适量表达十分重要。这些成骨因子包括骨形态发生蛋白(BMP)、转化生长因子- β (TGF- β)、成纤维细胞生长因子(FGF)等。

BMP 的作用无种属特异性,具有跨种诱导成骨能力。目前认为 BMP 是骨组织工程中促进成骨作用非常重要的一种,但 BMP 的用量和诱导成骨的时间在不同种属动物间差异较大,且有明显的剂量依赖性。BMP 在骨组织中含量极少,且在体内扩散快,容易被蛋白酶分解,因而不能在局部发挥持续刺激和诱导成骨作用,诱导活性难以得到充分发挥。Zakhary 等^[17]在兔下颌骨缺损处单次局部注射 rhBMP-7,7 周后经 X 线检查和骨密度分析,发现实验组的成骨密度高于对照组,说明 rhBMP-7 对骨的形成有促进作用,并且单次局部注射途径给药可以在局部产生较高浓度的刺激,简单方便,可作为一种较理想的给药方式。

在研究体内成骨诱导因子的同时,一些原先被认为与骨形成作用无关的药物也被发现具有诱导成骨能力。Benoit 等^[18]实验显示他汀类药物氟伐地汀在体外对人骨髓 MSCs 的 CBFA1、ALP 和 COL1 基因表达有促进作用,还增加了 BMP-2 的表达。FK506 是一种临床常用的免疫抑制剂,董健等^[19]证实 FK506 能促进大鼠 MSCs 增殖、成骨细胞分化,明显诱导钙化结节形成,显著提高 ALP 活性和骨钙素 mRNA 的表达。FK506 还与地塞米松具有协同成骨诱导作用,并且 FK506 的诱导分化能力并不与其浓度成正比。

3.2 应力环境 人体内几乎所有的细胞都会受到生物力学因素的影响,如剪应力、拉(压)应力、剪应变、拉(压)应变等。力学刺激会影响成骨细胞的代谢、基因表达、形态、表型、生长因子分泌等,导致细胞生物学行为发生改变,这是最近引起注意的一个影响因素。

早期有作者采用可对细胞产生周期性张力和拉力的特制培养皿培养骨髓 MSCs, 与不受力培养的细胞相比, ALP 活性、骨钙蛋白水平、DNA 含量、细胞干重均明显升高^[20]。但 Nishikawa 等^[21] 观察到了不同结果, 他们将大鼠的骨髓 MSCs 置于 3D 回转器上培养, 以使种子细胞受到多向的重力影响, 观察细胞的分化与增殖情况, 发现实验组与对照组细胞的分布和数量无明显差别, 但实验组 ALP 的表达和细胞外基质量低于静置培养对照组; 植入大鼠皮下 8 周后, 实验组新生骨量少于对照组。体内骨组织除受到重力作用外, 组织间液流动产生的流体切应力也对细胞的分化产生影响^[22], 产生的效应与流体切应力的脉冲频率及作用时间有关^[23]。以上说明生物力学因素对骨形成过程的影响可能与作用力的方向、频率、作用时间、大小等方面均有关, 具体对应关系需待进一步研究。

4 展望

组织工程是目前医学科学发展的前沿学科, 涉及多个医学领域, 有着广阔的发展前景, 是当前研究热点之一。但目前研究多限于动物实验, 国内外尚未见大量临床病例报道^[24-25]。阻碍组织工程发展和临床应用的主要因素至少包括两点: ①对调控组织的功能化培养的特定物理—生物化学因素知之还甚少; ②高昂的生产成本和缺乏商业化的功能性组织工程产品。但是相信通过多学科、多专业的协作, 骨组织工程必将取得突破性进展。

参考文献

[1] 张永先, 汤继文, 刘晓阳, 等. 骨膜源性成骨细胞的分离培养及鉴定. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(18): 1268-1270.
 [2] Zhu SJ, Choi BH, Huh JY, et al. A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006, 101 (2): 166-169.
 [3] Park BW, Hah YS, Kim DR, et al. Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. Arch Oral Biol, 2007, 52(10): 983-989.
 [4] 孙晓春, 许文荣, 许化溪, 等. 不同来源的人间质干细胞分离与基本生物学特性研究. 江苏大学学报, 2005, 15(5): 369-372.
 [5] Wan C, He Q, McCaigue M, et al. Nonadherent cell population of human marrow culture is a complementary source of mesenchymal stem cells (MSCs). J Orthop Res, 2006, 24 (1): 21-28.
 [6] 卜丽莎, 李建军, 韩东, 等. 重组 PcDNA3112hBMP22 转染骨髓基质干细胞及复合异种骨支架体外构建组织工程骨. 中国骨伤, 2004, 17(8): 449-451.
 [7] 曹聪, 董英海, 董宇启, 等. 人血源性间充质干细胞培养与体外成骨研究. 中国修复重建外科杂志, 2005, 19(8): 642-647.
 [8] Chim H, Schantz JT. Human circulating peripheral blood mononuclear cells for calvarial bone tissue engineering. Plast Reconstr Surg, 2006, 117(2): 468-478.
 [9] 刘云松, 周永胜, 谭建国, 等. 脂肪组织是骨、软骨、软组织缺损组织工程再生的理想干细胞来源. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(3): 217-224.
 [10] Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, et al. The osteogenic potential of

adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. Ann Plast Surg, 2006, 56 (5): 543-548.
 [11] Tielens S, Declercq H, Gorski T, et al. Gelatin-based microcarriers as embryonic stem cell delivery system in bone tissue engineering: an in-vitro study. Biomacromolecules, 2007, 8(3): 825-832.
 [12] Harrison J, Pattanawong S, Forsythe JS, et al. Colonization and maintenance of murine embryonic stem cells on poly (alpha-hydroxy esters). Biomaterials, 2004, 25(20): 4963-4970.
 [13] 段智霞, 郑启新, 郭晓东, 等. PLGA-[ASP-PEG]三嵌段基质材料对骨髓间充质干细胞黏附增殖及诱导成骨分化的研究. 中国骨伤, 2008, 21(4): 282-284.
 [14] Li X, Feng Q, Wang W, et al. Chemical characteristics and cytocompatibility of collagen-based scaffold reinforced by chitin fibers for bone tissue engineering. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2006, 77(2): 219-226.
 [15] 侯锐, 毛天球, 杨耀武, 等. 复合支架材料构建组织工程骨修复兔颅骨缺损. 中华创伤杂志, 2005, 21(9): 702-706.
 [16] Bonzani IC, Adhikari R, Houshyar S, et al. Synthesis of two-component injectable polyurethanes for bone tissue engineering. Biomaterials, 2007, 28(3): 423-433.
 [17] Zakhary K, Motakis D, Hamdy RH, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein 7 on bone density during distraction osteogenesis of the rabbit mandible. J Otolaryngol, 2005, 34(6): 407-414.
 [18] Benoit DS, Nuttelman CR, Collins SD, et al. Synthesis and characterization of a fluvastatin-releasing hydrogel delivery system to modulate hMSC differentiation and function for bone regeneration. Biomaterials, 2006, 27(36): 6102-6110.
 [19] 董健, 方涛林, 孙源, 等. FK506 对骨髓间充质干细胞体外成骨活性的诱导. 中华创伤杂志, 2006, 22(11): 775-778.
 [20] Yoshikawa T, Ohgushi H, Akahane M, et al. Analysis of gene expression in osteogenic cultured marrow hydroxyapatite construct implanted at ectopic sites; a comparison with the osteogenic ability of cancellous bone. J Biomed Mater Res, 1998, 41(4): 568-573.
 [21] Nishikawa M, Ohgushi H, Tamai N, et al. The effect of simulated microgravity by three-dimensional clinostat on bone tissue engineering. Cell Transplant, 2005, 14(10): 829-835.
 [22] Knippenberg M, Helder MN, Doulabi BZ, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. Tissue Eng, 2005, 11(11-12): 1780-1788.
 [23] Kreke MR, Sharp LA, Lee YW, et al. Effect of intermittent shear stress on mechanotransductive signaling and osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. Tissue Eng Part A, 2008, 14(4): 529-537.
 [24] Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, et al. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. Biomaterials, 2006, 27(17): 3163-3167.
 [25] 归来, 余东, 张智勇. 快速成形技术基本原理及其在颅颌面外科临床中的应用. 中国临床康复, 2006, 10(1): 103-105.

(收稿日期: 2008-06-25 本文编辑: 王玉蔓)