

· 基础研究 ·

# 新西兰大白兔骨膜下组织工程骨异位成骨的实验研究

周强<sup>1,2</sup>, 汪洋<sup>3</sup>, 虞杰<sup>2</sup>, 余迎浩<sup>2</sup>

(1. 上海中医药大学附属普陀医院骨科, 上海 200062; 2. 舟山市中医骨伤联合医院骨科; 3. 复旦大学上海医学院解剖与组织胚胎学系)

**【摘要】 目的:**利用新西兰大白兔骨髓基质干细胞构建组织工程骨, 研究其在股骨骨膜下异位成骨的可行性。**方法:**选取 3 月龄的清洁级雌性新西兰大白兔, 体重 3 kg, 取其骨髓基质干细胞诱导为成骨干细胞, 扩增后接种到 β-磷酸三钙生物陶瓷颗粒中, 构建的组织工程骨种植到股骨骨膜下, 3 个月后实验动物血管内灌注凝胶墨汁, 通过光学显微镜直接检测组织工程骨的血供和成骨结果。**结果:**16 个标本中的 12 个植入的组织工程骨颗粒均良好固定在骨膜下并被骨膜包围, 组织工程骨中有大量血管和新生骨形成, 骨组织结构相对紊乱, 不同于正常骨组织结构排列规则, 血管分布均匀。4 例取材时发现植入物游离于骨膜外, 大部分材料被吸收, 残留植入物体积明显小于骨膜下成骨, 未见明显的骨组织形成, 血供情况欠佳。股骨骨膜下组织工程骨颗粒 80% 贴附牢固, 成骨良好, 新骨内有大量血管长入。**结论:**组织工程骨可以在骨膜下获得良好的异位成骨。

**【关键词】** 组织工程; 骨膜; 干细胞; 动物, 实验

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.10.011

**Experimental study of ectopic bone formation of engineered bone constructs under the periosteum of New-Zealand rabbits** ZHOU Qiang\*, WANG Yang, YU Jie, YU Ying-hao. \*Department of Orthopaedics, Affiliated Putuo Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

**ABSTRACT Objective:** To study the feasibility of ectopic bone formation for engineered bone constructs with bone marrow stromal cells (BMSCs). **Methods:** BMSCs were obtained from 3-month female New-Zealand rabbits with weight of 3 kg, induced to osteogenic cell, were expanded by culture and then seeded into the porous β-tricalcium phosphate (β-TCP) particles. Engineered bone constructs were implanted under the periosteum of rabbit femur. Samples were retrieved and examined after 3 months. Blood vessels and osteoblast were examined through optical microscope. **Results:** Twelve implanted engineered bone particles of 16 samples were fixed well under periosteum and rounded by periosteum. There were a lot of vessels and new bone in engineered bone. The structure of bone was disorder; the vessels arranged equally. Four cases found implanted bone freed outside of periosteum, lots of implanted material were absorbed, the volume of residual was less than osteogenesis, and lack of blood vessel. 80% engineered bone constructs attached to the femur under the periosteum very well, osteogenesis was fine and vessels were grown into new bone. **Conclusion:** Engineered bone can obtained good ectopic bone under the periosteum.

**KEYWORDS** Tissue engineering; Periosteum; Stem cells; Animals, laboratory

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(10): 838-840 www.zggszz.com

目前组织工程骨修复骨缺损的大多数研究集中将构建的组织工程骨直接填充在骨缺损的部位, 由于直接构建的组织工程骨不能克服生物力学上的缺陷, 而且临床上骨缺损部位的氧供应和营养物缺乏, 常见的组织工程骨很难在将来临床应用上获得满意的成骨效应<sup>[1]</sup>。本实验将组织工程骨种植到骨膜下和血管周边, 探讨异位成骨的可行性。

## 1 材料与方法

**1.1 成骨干细胞培养** 取实验用 3 月龄 3 kg 重的雌性清洁级新西兰大白兔 1 只 (中科院上海分院实

验动物中心提供), 采用 1% 戊巴比妥钠 0.3 ml/kg 静脉麻醉后静脉注射空气处死, 严格消毒后取出股骨和部分髂骨, 用 500 U/ml 肝素抗凝的 DMEM 完全培养液冲洗股骨髓腔和髂骨松质骨, 混匀后 1 000 r/min 离心 15 min 弃上清, 加培养基计数后接种。37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养, 3 d 后半量换液, 以后每 2~3 d 后全量换液 1 次。待细胞汇合成单层后用 0.25% 胰蛋白酶消化, 计数, 用 DMEM 条件培养基传代培养, 3 d 换液 1 次。DMEM 培养基、肝素、抗坏血酸、地塞米松、β-甘油磷酸钠、胰蛋白酶购自 Sigma 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司。β-磷酸三钙生物陶瓷由上海贝奥路生物材料有限公司提供。

通讯作者: 周强 E-mail: zhouqiang619@yahoo.com.cn

**1.2 组织工程骨的构建** 成骨干细胞培养 2 周后浓度达  $10^7$  个/ml, 将细胞混悬液滴加到  $8\text{ mm} \times 6\text{ mm} \times 6\text{ mm}$  的  $\beta$ -磷酸三钙生物陶瓷柱状体支架, 部分支架在其正中纵向开槽, 槽宽约 2 mm。完全浸润后继续滴加细胞混悬液浸没支架, 按原条件培养 3 d 后待用。

**1.3 动物模型制备** 将 8 只清洁级新西兰大白兔 1% 戊巴比妥钠 0.3 ml/kg 静脉麻醉后严格消毒, 作双侧股骨外侧切口, 暴露骨膜后纵向切开作骨膜下剥离, 将组织工程骨置于骨膜下 (见图 1), 逐层缝合骨膜外的其他软组织, 术后未予以抗生素, 继续饲养实验动物 3 个月。

**1.4 检测与观察方法** 术后 3 个月实验大白兔 1% 戊巴比妥钠 0.3 ml/kg 静脉麻醉, 打开胸腔暴露心脏, 从左心房插入灌注针, 滴入 500 U/ml 肝素生理盐水, 同时剪开下腔静脉, 观察灌注至静脉回流液清亮透明为止 (灌注量约 500 ml)。从腹主动脉灌注凝胶墨汁至双下肢皮肤变黑, 下腔静脉有凝胶墨汁回流为止。结扎诸血管、取材, 取材范围为双股骨、周边骨膜和少量软组织, 置入 4% 的甲醛溶液中固定 3 d,

用聚酯液包裹固化 7 d, 在包裹组织工程骨的部位作纵向切开, 不作任何染色, 直接切片, 置于 Leica DMIRB 光学显微镜下观察分析。

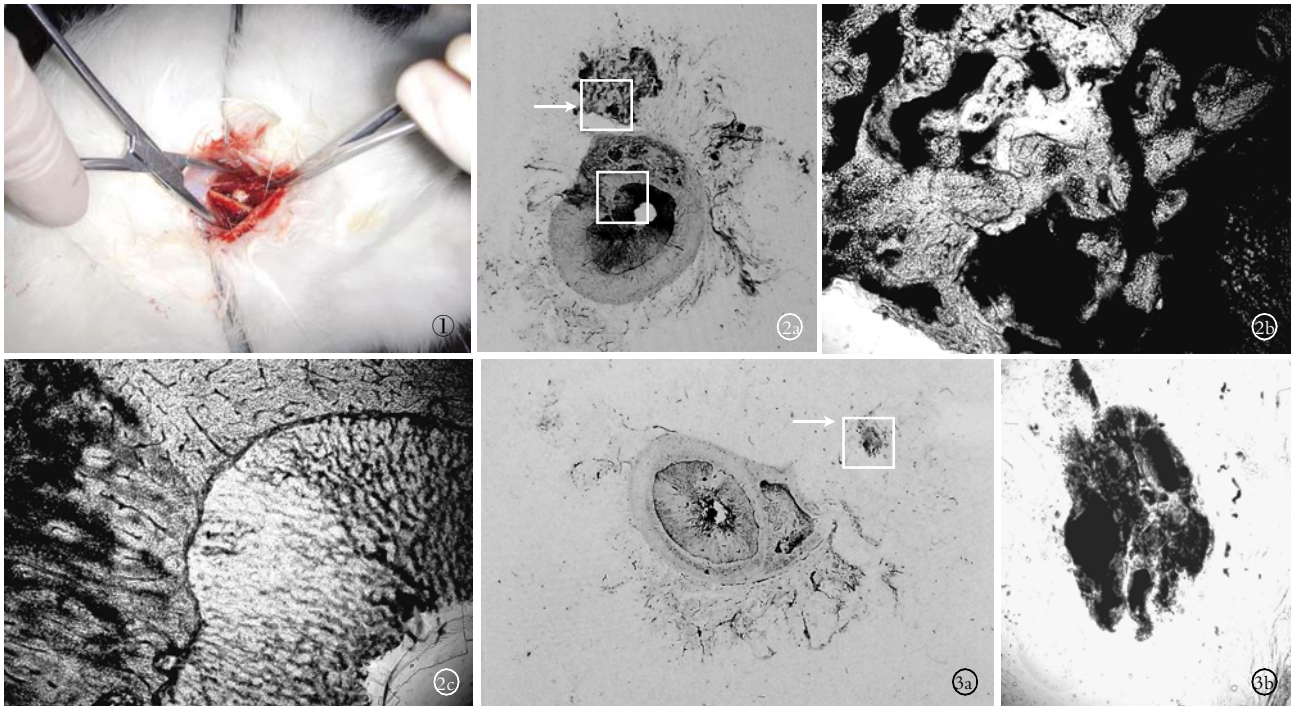
## 2 结果

**2.1 模型** 所有实验动物术后 2~4 h 内苏醒, 并能站立进食。术后伤口 I 期愈合, 进食正常, 至取材日无异常表现。

**2.2 骨膜下组织工程骨异位成骨的组织学观察** 16 个标本中的 12 个植入的组织工程骨颗粒均良好固定在骨膜下并被骨膜包围 (图 2a 箭头所示), 组织工程骨中有大量血管和新生骨形成, 骨组织结构相对紊乱 (图 2b), 不同于正常骨组织结构排列规则, 血管分布均匀 (图 2c)。4 例取材时发现植入物游离于骨膜外, 大部分材料被吸收, 残留植入物体积明显小于骨膜下成骨 (图 3a 箭头所示), 未见明显的骨组织形成, 血供情况欠佳 (图 3b)。

## 3 讨论

骨缺损导致的骨不连和延迟愈合是骨科临床上常见的棘手疾病, 骨和骨替代物的移植在骨缺损的治疗方面是不可缺少的。自体骨来源有限, 供区有创



**图 1** 股骨骨膜下植入组织工程骨 **图 2** 骨膜下成骨组织工程骨贴附牢固 (箭头所示,  $2 \times 50$ ), 3 个月可见组织工程骨内有大量新生骨形成 ( $2 \times 100$ ), 新生骨内布满被墨汁灌注的线状血管, 组织工程骨新生骨的骨组织排列紊乱, 正常股骨皮质骨的骨组织排列规则, 网状和线状血管分布均匀 ( $2 \times 100$ ) **图 3** 骨膜下成骨组织工程骨脱离骨膜, 3 个月可见组织工程骨形态不完整 (箭头所示,  $3 \times 50$ ), 局部血管长入少, 无明显的新生骨形成 ( $3 \times 100$ )

**Fig. 1** The engineered bone construct was implanted under the femoral periosteum of rabbit **Fig. 2** engineered bone construct attached to the femur under the periosteum very well (arrow point at the place,  $2 \times 50$ ), 3 months later plenty new bone was formed ( $2 \times 100$ ), linear blood vessels filled by black ink scattered the new bone, and the osseous tissue arranged in disorder, while the normal rabbit femur has the regular osseous tissue and blood vessels arrangement ( $2 \times 100$ ) **Fig. 3** Engineered bone construct which had not attached to the femur had a fragmentary structure 3 months later (arrow point at the place,  $3 \times 50$ ), less blood vessels were found and no evident new bone was found ( $3 \times 100$ )

伤,异体骨的移植有过敏反应且有传播疾病的危险,人工合成骨成骨诱导作用欠佳,脆性和可塑性差,这些移植物临床应用常常受限制,构建组织工程骨有望成功解决该难题。

组织工程骨修复骨缺损已有成功报道,自体骨髓基质干细胞是具有多向分化潜能的细胞,来源丰富,采集创伤小,且无抗原性,易于在体外培养诱导为成骨干细胞,又称骨祖细胞,是组织工程骨理想的种子细胞。近期的研究焦点主要在诱导过程和生物填充材料的选择、改进方面。通过改变培养基的营养成份和添加各种诱导因子,大大增加了成骨干细胞的扩增数量和成骨活性<sup>[2]</sup>,生物填充材料的改进则增加了成骨干细胞的附着力和生物相容性<sup>[3]</sup>。

在细胞基础上组织工程骨的多年研究证明,利用干细胞和多孔支架构建组织工程骨有望替代自体骨进行骨移植。虽然将组织工程骨应用到骨缺损的模型方面有大量成骨成功的报道,但由于临床上骨缺损部位的氧供应和营养物的缺乏,除非有很强的成骨因素诱导,常见的组织工程骨很难在临床上获得满意的成骨效应。

为了促进组织工程骨修复骨缺损,常常需要在骨缺损部位添加 BMP 系列、Osterix/Sp7<sup>[4]</sup>等因子。临床上骨缺损部位软组织条件多欠佳,依靠外源性输入或基因转染等方法在一定程度上可以促进成骨,毕竟成本高、可行性受限制。异位成骨可以挑选合适成骨的部位,获得一定量的自体骨组织后再用于骨缺损的修复,可能该方法更适合临床应用。Lin 等<sup>[5]</sup>将含骨髓基质干细胞的多孔磷酸钙植入到裸鼠皮下,可以获得较好的异位成骨。Torigoe 等<sup>[6]</sup>为了提高干细胞成骨活性,利用骨髓基质干细胞和多孔磷酸三钙构建组织工程骨,改变不同的培养诱导条件,将其种植于短尾猴的背部筋膜中,获得了良好的成骨效应。为了挑选更好的异位成骨位置,Li 等<sup>[7]</sup>将组织工程骨植入山羊筋膜和横突上,发现横突周边成骨效果最好,可能与局部血供良好、有一定量的骨膜有关。上述研究发现给异位的组织工程骨提供良好的血供、促成骨生长因子可以提高异位成骨的效率,说明在良好的成骨环境下,组织工程骨可以在合适的非骨折部位形成大量可供移植的异位成骨材料。

本次实验结合临床可行性选用骨膜下异位成骨动物模型,该方法操作简短,不脱钙切片可以清楚显示骨膜对组织工程骨的固定、新生骨的血供丰富和

新生骨组织内部的骨性结构的排列等特征。

在诸多可供选择的异位成骨植入点中,骨膜的成骨优势要明显优于其他部位。在没有牵张力和压应力的情况下,骨膜本身就具有成骨活性<sup>[8]</sup>,可以提供骨修复需要的多种生长因子,而且骨膜剥离操作方便,局部血供良好,是异位成骨的良好植入选择点。本实验进一步证明异位成骨可在合适的非骨折部位形成大量的可供移植的“二期组织工程骨”,其组织学和生物力学特性可能优于原来的“一期组织工程骨”<sup>[9]</sup>,为骨缺损修复提供新的优质植骨材料。

参考文献

- [1] Kruyta MC, Dherta WJ, Oner FC et al. Analysis of ectopic and orthotopic bone formation in cell-based tissue-engineered constructs in goats[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(10): 1798-1805.
- [2] 曾建春, 樊粤光, 刘建仁, 等. 肉苁蓉含药血清诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的实验研究[J]. *中国骨伤*, 2010, 23(8): 606-608.  
Zeng JC, Fan YG, Liu JR, et al. Experimental study of directional differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) to osteoblasts guided by serum containing cistanche deserticola[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2010, 23(8): 606-608. Chinese with abstract in English.
- [3] 许少刚, 赵建宁, 杨书丰, 等. 成骨细胞在生物活性玻璃与 TGF-β 复合生物支架上培养的实验研究[J]. *中国骨伤*, 2007, 20(5): 295-297.  
Xu SG, Zhao JN, Yang SF, et al. Experimental research of the growth of rabbit osteoblast on the composite BG/TGF-β material scaffolds [J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2007, 20(5): 295-297. Chinese with abstract in English.
- [4] Kaback LA, Soung do Y, Naik A, et al. Drissi H. Osterix/Sp7 regulates mesenchymal stem cell mediated endochondral ossification [J]. *J Cell Physiol*, 2008, 214(1): 173-182.
- [5] Lin Y, Wang T, Wu L, et al. Ectopic and in situ bone formation of adipose tissue-derived stromal cells in biphasic calcium phosphate nanocomposite[J]. *J Biomed Mater Res*, 2007, 81(4): 900-910.
- [6] Torigoe I, Sotome S, Tsuchiya A, et al. Bone regeneration with autologous plasma, bone marrow stromal cells, and porous beta-tricalcium phosphate in nonhuman primates[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(7): 1489-1499.
- [7] Li J, Habibovic P, Yuan H, et al. Biological performance in goats of a porous titanium alloy-biphasic calcium phosphate composite[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(29): 4209-4218.
- [8] Kawase T, Okuda K, Kogami H, et al. Characterization of human cultured periosteal sheets expressing bone-forming potential: in vitro and in vivo animal studies[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2009, 3(3): 218-229.
- [9] Cheng MH, Brey EM, Allori AC, et al. Periosteum-guided prefabrication of vascularized bone of clinical shape and volume[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2009, 124(3): 787-795.

(收稿日期:2011-02-25 本文编辑:王玉蔓)