

# 自体颗粒骨磷酸钙骨水泥复合细胞移植的实验研究

杨显声 阎景龙 麻松

**摘要:** 目的 探索应用自体颗粒骨磷酸钙骨水泥复合细胞修复骨缺损的效果。方法 分离、定向诱导和扩增骨髓间充质干细胞 (MSCs), 观察其在体外培养的情况。体外复合自体颗粒骨与磷酸钙骨水泥, 然后复合 MSCs, 并以电镜观察复合物在体外培养的情况。在动物模型中, 以不同的复合物植入大鼠直径 5mm 的颅骨缺损, 并于术后摄 X 线片及进行组织学观察。结果 颗粒骨、CPC 和 MSCs 的复合材料可以修复骨缺损, 效果优于其他实验组, 相比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。结论 颗粒骨、CPC 和 MSCs 的复合材料可以再生骨组织, 可以用于修复骨缺损。

**关键词:** 颗粒骨; 磷酸钙骨水泥; 骨髓间充质干细胞

**Study of transplantation of autogenetic morselized bone with the CPC and MSCs** YANG Xiansheng, YAN Jinglong, MA Song. *Spine and Joint Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China*

**Abstract:** **Objective** To study the efficiency of repairing the bone defect with the compound of autogenous morselized bone, calcium phosphate cement and mesenchymal stem cells. **Methods** MSCs was separated, induced and proliferated *in vitro*. The mixture of morselized bone, CPC and MSCs were cultured and planted to the cranial defects in rats. Histological and X-ray examinations were performed after the operation. **Results** The compound can repair the defect effectively at 4 and 8 weeks and it is significantly than the other experimental groups. ( $p < 0.05$ ) **Conclusions** The compound of morselized bone, CPC and MSCs can be used to repair the defect of bone.

**Key words:** Morselized bone; Calcium phosphate cement; Mesenchymal stem cell

目前, 改善成骨的“金标准”是自体的松质骨移植。近来的研究发现, 自体的松质颗粒骨具有良好的骨诱导活性, 而且在骨科手术中易于获得。但对于某些较大的骨缺损, 自体松质骨的用量受到限制。鉴于磷酸钙骨水泥 (calcium phosphate cement, CPC) 是具有较好的生物降解性的骨植入物材料, 如将自体颗粒骨与磷酸钙骨水泥按比例混合植入骨缺损可能会获得良好的骨愈合。骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是目前倍受关注的具有多向分化潜能的干细胞, 在体内和体外都可在特定的诱导条件下分化成骨、软骨、脂肪、肌肉、神经、肌腱及韧带等组织。MSCs 取材方便, 可在体外大量扩增, 可以与颗粒骨与磷酸钙骨水泥的复合物联合培养作为人工骨移植植物。

## 1 材料和方法

### 1.1 生物材料的体外制备

#### 1.1.1 骨髓间充质干细胞的获取、体外培养

过量麻醉处死 6~9 日龄 Wistar 鼠, 以 75% 酒精浸泡消毒 5 min, 于无菌条件下, 取出双侧股骨。清除骨周软组织后, 剪去骨干两端, 用 DMEM 培养液冲洗骨髓于 10ml 离心管中。迅速将细胞悬液加入 2 倍体积的淋巴细胞分离液, 离心 20 min (2000 r/min)。抽取离心管中间单核细胞层, 以 dHANKs 缓冲液冲洗后离心 (1000 r/min), 倒掉缓冲液, 加入含体积分数为 20% 的胎牛血清的 DMEM 培养液, 培养液中按 Haynesworth 等<sup>[1]</sup>的方法, 加入可诱导成骨的地塞米松 (10~8 mol/L, Sigma),  $\beta$ -磷酸甘油钠 (10 mmol/L, Sigma) 和抗坏血酸 (50  $\mu$ mol/L, Sigma)。100 U/mL 青霉素,

100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素。吹打后以  $4 \times 10^5/\text{ml}$  接种于 50 ml 培养瓶, 置于  $37^\circ\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中。3 d 后全量换液, 以后 2~3 d 换液至细胞长满瓶底面积 70%~80% 时行消化传代。细胞大量增殖, 取第三代传代细胞冻存于液氮中以备复合使用。倒置相差显微镜连续观察体外培养细胞的生长、增殖、基质分泌和细胞形态的变化。

### 1.1.2 磷酸钙骨水泥与自体颗粒骨, MSCs 的复合

取体重 180~250 g, 10~12 周龄 Wistar 鼠 (雌雄不限) 单侧髂骨, 用磨钻磨成颗粒骨。磷酸钙与自体颗粒骨按 2:8, 的比例混合, 塑型为直径 5 mm 厚 1mm 的圆饼状物, 加入适量固化液后于 15 min 内构成块状支架放到 30 ml 离心管内。在支架上滴加  $2 \times 10^5/\text{ml}$  密度的 MSCs 细胞悬液。经过 500~1000 r/min 离心 2 min 后将复合材料置入 24 孔培养板静置培养箱中培养。复合物分别在体外培养的 1、3、5、7 d 后进行扫描电镜观察。部分体外培养的移植材料 24 h 后进行体内移植。

### 1.2 实验动物模型的建立和分组

已取自体颗粒骨的 Wistar 鼠于全麻下暴露颅骨, 于一侧顶骨以磨钻制造直径 5 mm 的颅骨缺损。按编号进行自体颗粒骨复合材料的移植, 填充缺损。术后常规分笼饲养。本实验共分 7 组, 每组 16 只动物, A 组: 自体颗粒骨 + 磷酸钙骨水泥 + MSCs 复合材料组; B 组: 自体颗粒骨 + 磷酸钙骨水泥组; C 组: 自体颗粒骨 + MSCs 组; D 组: 磷酸钙骨水泥 + MSCs 组; E 组: 自体颗粒骨修复组; F 组: 磷酸钙骨水泥组; G 组: 未加填充材料的空白对照组。

### 1.3 颅骨缺损修复效果的检测

#### 1.3.1 大体观察

观察术后各组实验动物的活动, 进食及伤口愈合情况。术后 4, 8 w 将动物处死后观察骨缺损修复情况。

#### 1.3.2 X 线观察

分别于术后第 4, 8 w 进行 X 线检测, 比较各组骨缺损区骨痂生长的情况。对缺损区以及对侧正常骨单位面积的平均灰度值进行测定, 以两者的比值作为缺损区成骨的 X 线平均透光度。

#### 1.3.3 组织学观察

分别于 1、2、4、8 w 取材颅骨缺损区标本, 以 EDTA 脱钙 4 w, 常规 HE 染色, 于显微镜下观察新骨形成情况。免疫组织化学检测血管内皮生长因子 (vessel endothelial growth factor, VEGF) 和血

管内皮黏附因子 (CD31) 两种血管生长的标志物, 作为成骨血管化的指标。

### 1.4 统计学分析

所有数据通过 SPSS 10.0 软件进行处理, 各组实验数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 检验方法为  $q$  检验。

## 2 结果

### 2.1 倒置相差显微镜观察

MSCs 在接种后 5~7 d 贴壁, 细胞 3、4 个集结, 以成纤维细胞集落样方式生长。经多次换液, 14d 时脱落的细胞和红细胞基本消除。细胞生长汇合 80% 时传代 (图 1)。传代后细胞进入快速增殖期, 基质合成、分泌旺盛; 并且细胞逐渐增大, 向多角形转化 (图 2)。

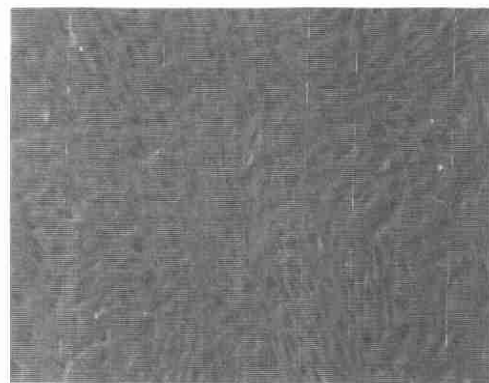


图 1 培养的 MSCs  $\times 100$

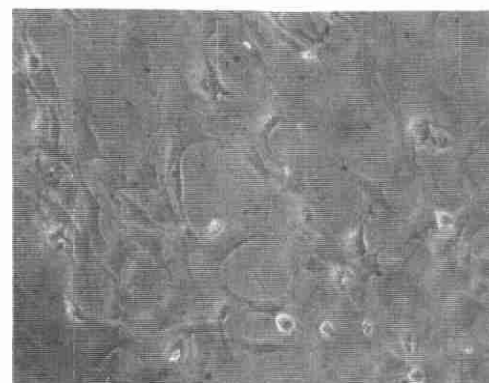


图 2 呈多角形生长的 MSCs  $\times 400$

### 2.2 体外颗粒骨与磷酸钙骨水泥复合 MSCs 的电镜观察结果

颗粒骨与磷酸钙复合 MSCs 后 1 d 在扫描电镜下观察可见圆形、椭圆形的 MSCs 充填于颗粒骨与磷酸钙复合物的孔隙中, 没有充分伸展 (图 3)。第 3 天可见充分伸展, 如成纤维细胞样黏附于颗粒骨与磷酸钙表面的 MSCs (图 4)。第 7 天可见大量的 MSCs 汇聚成片, 细胞及其分泌的大量基质充填于

复合物的孔隙中 (图 5)。

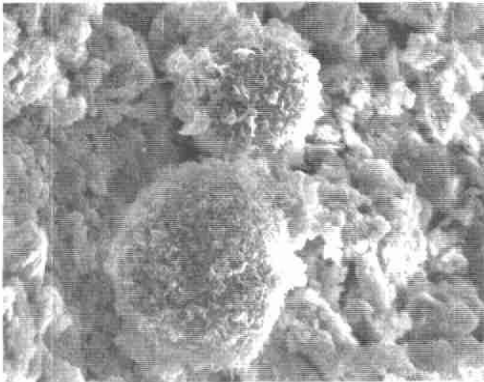


图 3 MSCs ×4000

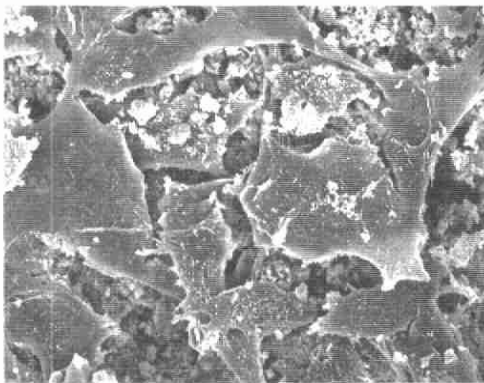


图 4 MSCs ×1000

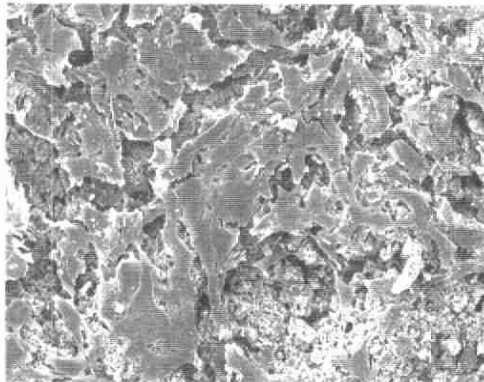


图 5 MSCs ×270

2.3 大体观察

实验大鼠术后伤口愈合良好, 麻醉苏醒后 1 h 自主饮水, 第 2 天自主进食。空白对照组于 4 w 和 8 w 可见颅骨缺损处有纤维结缔组织填充, 未见骨样愈合。颗粒骨磷酸钙骨水泥复合细胞组在 4 w 可见新生骨组织与纤维结缔组织相间, 色泽红润。8 w 可见填充处色泽变白, 质地变硬。

2.4 X 线片观察结果

各实验组在 4、8 w 都可见缺损区密度增高, 有新骨形成, 以 A 组最明显 (图 6)。对照组缺损区未见骨桥形成, 缺损未修复。图像分析显示 A 组与其他实验组及对照组 (图 7) 有显著差异 ( $P<0.05$ ), 成骨数量优于其他组。

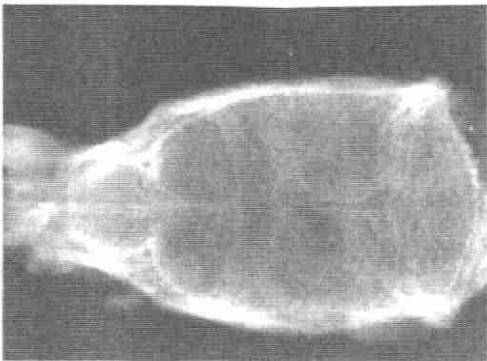


图 6 A 组 X 线照片

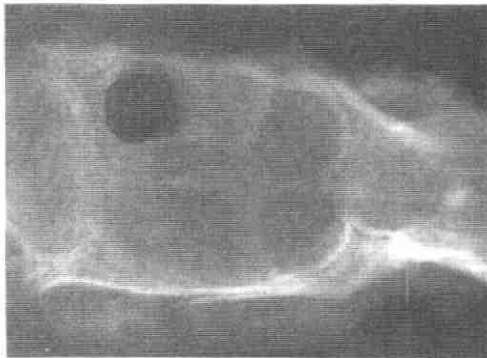


图 7 对照线 X 线照片

表 1 平均透光度测定结果 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=4$ , %)

| 时间  | A 组         | B 组        | C 组        | D 组        | E 组        | F 组        |
|-----|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 4 周 | 63.67±6.12* | 47.38±5.23 | 45.68±4.96 | 37.78±1.27 | 46.35±4.63 | 35.92±1.84 |
| 8 周 | 84.23±5.23* | 69.87±6.47 | 64.57±5.79 | 58.26±4.27 | 64.75±6.58 | 54.47±4.21 |

注: \*  $P<0.05$  Note: \*  $P<0.05$

2.5 组织学观察

2.5.1 HE 染色

单独的颗粒骨移植以及其复合细胞移植可在 4 w 时见到大量的软骨岛形成, 并分泌软骨基质。

颗粒骨磷酸钙骨水泥复合 MSCs 组于 1 w 时已可见软骨形成 (图 8), 4 周时 HE 染色可见软骨岛消失, 颅骨内外板形成, 其间可见板障血管 (图 9)。单独的磷酸钙骨水泥及其复合细胞后在 2 w

时仍无明显的软骨岛形成。

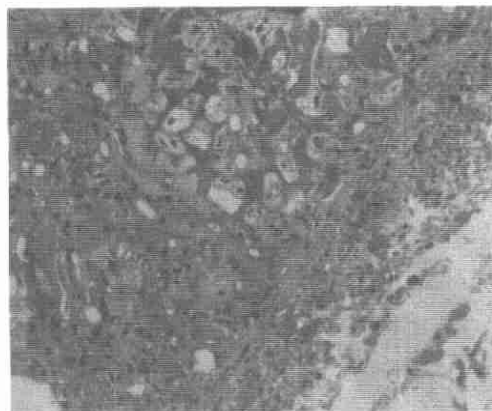


图 8 复合物中形成软骨 (HE×100)

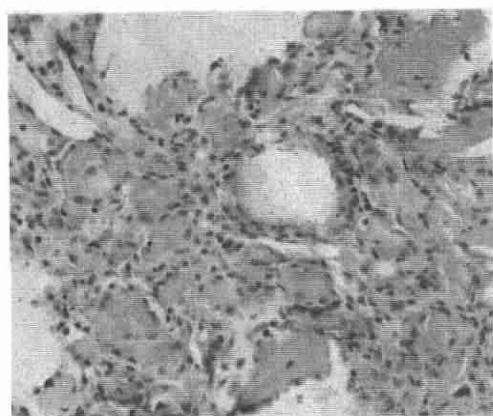


图 9 骨形成 (HE×100)

### 2.5.2 VEGF 和 CD31 的检测

利用 MoticTek Preview 图像采集模块系统对免疫组化片子拍照, 利用 image J 图像分析软件对图片进行量化分析。颗粒骨磷酸钙骨水泥复合 MSCs 组于 1 周时既可见 VEGF (图 10) 和 CD31 (图 11) 阳性表达, 随时间的推移, 表达增加。

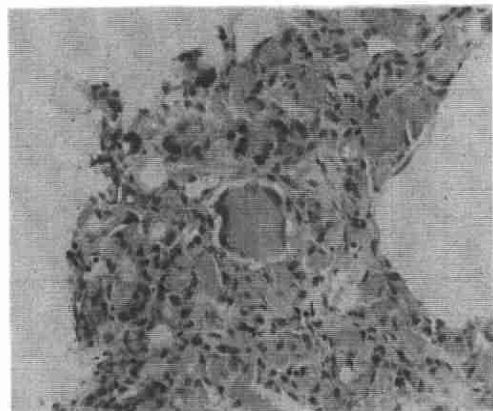


图 10 棕 F 色部分为 VEGF 免疫组化染色



图 11 棕色部分为 CD31 免疫组化染色

## 3 讨论

自体松质骨是临床上最常用的修复骨缺损的移植材料。近年来, 自体颗粒骨移植成为骨缺损修复的研究热点, 它具有取材方便, 生物相容性好以及易于诱导成骨的优点; 但同时又受到自身取骨量的限制以及自身无法塑型所造成的移植时的不便。本实验利用 CPC 作为颗粒骨的补充材料, 同时也增加了颗粒骨的塑型作用。由于 CPC 在凝固后的孔隙约为  $5 \sim 10 \mu\text{m}$ , 所以其由外及内的爬行替代较为缓慢, 在体内被吸收的过程较为缓慢。而松质颗粒骨与 CPC 均匀混合后, 形成多点面的结合。其界面间有大小不规则且相互联通的裂隙。有利于 MSCs 的附着以及加速 CPC 被降解的速度。自体微小颗粒骨与 CPC 混合的比例大约为 4:1, 这是经过预实验确定的比例。在此比例下, 复合物的塑型可达到填充缺损的要求。在体外实验中, 利用扫描电镜观察到 MSCs 可以较快地附着于磷酸钙颗粒骨的复合物表面, 并大量增殖, 分泌基质。在 7 d 左右就覆盖了复合材料的表面。目前, 复合材料的研究成为骨移植研究的重点。大量的研究表明生物活性因子骨形态发生蛋白 BMP 可与生物活性陶瓷, 可吸收高分子聚合物, 无活性脱矿骨基质, 纤维蛋白黏合剂以及带血供肌瓣等载体复合成为良好的骨替代物<sup>[2-7]</sup>。这些材料都是在模仿骨组织的生物特性。颗粒骨自身就可以分泌大量的促成骨的 BMP, bFGF 等细胞因子<sup>[8]</sup>。而 MSCs 可以分泌大量的促进成骨的 BMPs、TGF- $\beta$ , 以及促进血管爬入的 VEGF、FGF-2 等细胞因子, 进一步加速成骨。国内夏景君等<sup>[9]</sup>人的研究表明颗粒

骨与 MSCs 在成骨过程中可以相互协调, 相互促进。尹攀等<sup>[10]</sup>利用颗粒骨与自体骨髓复合移植修复骨缺损获得良好效果。由于颗粒骨具有诱导成骨的作用, 因此当其与 CPC, MSCs 复合后, 一方面可以加速 CPC 的降解和新生骨的爬行替代, 另一方面可以诱导 MSCs 向成骨、成软骨的方向分化, 提高骨量。同时, 颗粒骨自身也是良好的载体, 具有良好的骨传导性 (osteconductivity), 可以作为 MSCs 的载体移植体内。

血管化的问题已被应用于研究骨移植在生物体内的转归过程<sup>[11]</sup>。Brem 等<sup>[12]</sup>的研究表明单纯计数血管的形态学方法有其局限性。在血管形成的早期, 大量的微血管不具有明显的管腔, 因此难以用形态学的方法计数。而 CD31 的免疫标记可以反映早期的血管形成。它可以标记大量的管腔尚未完全形成的血管雏形。VEGF 是促进血管化的生长因子<sup>[13]</sup>。在血管化的早期, 成骨细胞表达的 VEGF 发挥重要的作用。该生长因子对于新骨的形成至关重要。而 MSCs 作为间充质干细胞可以在颗粒骨释放的众多促成骨的细胞因子的作用下向成骨细胞分化成熟。本实验所应用的复合材料在成分方面在一定程度上类似于带有骨髓的骨组织。在骨缺损的部位, 复合材料直接模仿了正常松质骨的形态和功能, 加速了骨缺损的修复。本实验表明在 1~4 w, 移植植物中的 VEGF 大量表达。这表明移植植物良好的血管化性能, 有利于进一步成骨。本研究探讨了颗粒骨与 CPC 复合后联合 MSCs 移植的可行性, 说明其三者相互协同, 在体内成骨过程中相互促进。颗粒骨自身的优势得以保持的同时, CPC 增加了其可塑性和数量。这两者又同时作为 MSCs 的载体和成骨诱导物发挥作用。同时, MSCs 分泌的生物活性因子反作用于颗粒骨。本研究为今后复合移植物的研

究提供了依据。

## 【参 考 文 献】

- [1] Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, et al. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 1992, 13: 81-88.
- [2] Hotz G, Herr G. Bone substitute with osteoinductive biomaterials-current and future clinical applications. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1994, 23: 413-417.
- [3] Suuromen Fu, Schliephake H, Neukam, et al. enhancement of bone ingrowth into a porous hydroxyapatite-matrix using a resorbable poly(lactic acid) membrane. *J Oral Maxillofac Surg*, 1994, 52: 57.
- [4] Cook SD, Wolfe W, Babes G, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induced healing in a canine long bone segmental defect model. *Clin Orthop*, 1994, 301-302.
- [5] Minata, M, Huang BZ, Shibata T, et al. Bone augmentation by rhBMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1999, 28: 232-237.
- [6] Kawasumi M, Urist MR. Human fibrin is a physiologic delivery system for BMP. *Clin Orthop*, 1988, 235-304.
- [7] 裴国献. 组织工程骨组织构建的研究. <http://www.jst-hosp.com.cn/trauma/meeting/1/p227.doc>
- [8] 侯占江, 闫景龙, 付海亮, 等. 微小颗粒骨异位成骨过程中碱性成纤维细胞生长因子的表达. *中华创伤杂志*, 2003, 19: 734-737.
- [9] 夏景君, 闫景龙. 颗粒骨和块状骨对骨髓基质细胞作用的实验研究. *哈尔滨医科大学学报*, 2002, 35: 141-143.
- [10] 尹攀, 闫景龙. 自体微小颗粒骨复合红骨髓修复节段性骨缺损的实验研究. *哈尔滨医科大学学报*, 2002, 36: 448-450.
- [11] Winet H, Hollinger JO, Stevanovic M. Incorporation of poly(lactide-polyglycolide) in a cortical defect; neoangiogenesis and blood supply in a bone chamber. *J Orthop Res*, 1995, 13: 679-689.
- [12] Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst*, 1972, 48: 347-356.
- [13] Thomas KA. Vascular endothelial growth factor. A potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem*, 1996, 271: 603-606.