

异种去蛋白松质骨复合骨髓间充质干细胞修复骨缺损的组织学变化★

王浩^{1,2}, 宋东兴², 王伟²

Histological changes of bone marrow mesenchymal stem cells combined with heterogeneous deproteinized cancellous bone in repair of bone defects

Wang Hao^{1,2}, Wei Dong-xing², Wang Wei²

Abstract

BACKGROUND: Nowadays, there are so many studies on manmade scaffold combined with cells for repair of bone defects. However, the restoration effects are not ideal because of the manmade scaffold lacking the nature structure of bone.

OBJECTIVE: To inoculate the bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in the deproteinized cancellous bone in order to repair segmental femoral defects of rats and evaluate the composite application prospect by restoration effects *in vivo*.

METHODS: BMSCs were isolated, cultured, proliferated and marked by BrdU *in vitro*. At the same time bovine deproteinized cancellous bone was prepared, and then combined with the marked cells *in vitro*. The bone defect models (5 mm in length) were created at the bilateral femur in rats and divided into three groups. The defects were implanted by BMSCs combined with deproteinized cancellous bone, deproteinized cancellous bone, and BMSCs respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: The BrdU expressed in all cells of each group, and the expression was decreased as time went on. X-ray scores and hematoxylin-eosin stained histological scores showed that the osteogenic effect of the composite group was better than those of the other groups. Collagen protein-Ⅰ expression in the composite group was obviously increased as time went on and was stronger than the other groups. The osteogenesis ability of the composite of BMSCs and heterogeneous deproteinized cancellous bone is stronger than simple scaffolds. BMSCs have the osteogenesis ability, but they cannot repair segmental bone defects.

Wang H, Wei DX, Wang W. Histological changes of bone marrow mesenchymal stem cells combined with heterogeneous deproteinized cancellous bone in repair of bone defects. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(51):9509-9512. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前应用各种人造支架复合细胞修复骨缺损研究很多, 但是各种人造支架都没有骨的天然结构, 所以修复效果不够理想。

目的: 将大鼠骨髓间充质干细胞接种到异种去蛋白松质骨上, 移植修复大鼠股骨节段性缺损, 以体内修复效果来评价复合应用前景。

方法: 分离培养大鼠骨髓间充质干细胞并进行扩增, 用 BrdU 体外进行标记。同时制备牛去蛋白松质骨, 在体外与标记后的细胞复合。制备大鼠双侧股骨中段 5 mm 缺损模型, 实验分成 3 组, 缺损处分别移植骨髓间充质干细胞/去蛋白松质骨复合体、单纯去蛋白松质骨及单纯骨髓间充质干细胞。

结果与结论: BrdU 免疫染色结果显示, 在每组细胞均呈阳性表达, 但随着移植时间的延长而减弱。X 射线放射学评分及苏木精-伊红染色组织学评分结果显示, 各时间段复合体组成骨效果均好于其他组。复合体组 I 型胶原蛋白表达随着时间的延长有明显增强, 强于其他组。提示骨髓间充质干细胞复合异种去蛋白松质骨的成骨能力明显强于单纯的支架修复能力, 单纯的骨髓间充质干细胞虽然有成骨能力, 但不能修复节段性骨缺损。

关键词: 松质骨; 骨缺损; 骨髓间充质干细胞; 支架; 修复

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.51.003

王浩, 宋东兴, 王伟. 异种去蛋白松质骨复合骨髓间充质干细胞修复骨缺损的组织学变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(51):9509-9512. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

自体骨移植被认为是修复骨缺损最理想的方法, 但供体来源问题限制了其应用^[1]。组织工程技术提出干细胞复合载体材料, 如胶原、脱钙骨基质、壳聚糖、藻酸盐几丁质, 羟基磷灰石、磷酸三钙、聚乳酸、聚羟基乙酸等^[2-5]。人们在长期实践中发现异体的松质骨来源丰富, 如能在异体动物体内成骨并修复骨缺损将为临床治疗带来极大的便利。因此本实验用骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem

cells, BMSCs)与去蛋白松质骨复合培养, 构建复合体修复大鼠桡骨节段性缺损, 检测对骨缺损的修复效果。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2009-03/2010-12在辽宁医学院中心实验室完成。

材料: 4周龄健康雄性SD大鼠10只, 体重120~140 g, 用于分离培养BMSCs; 另取8周龄清洁级SD大鼠62只, 体重200~250 g,

¹Department of Orthopedics, the Fifth Clinical Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China;
²Department of Orthopedics, Jinzhou Central Hospital, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Wang Hao★, Studying for master's degree, Associate chief physician, Department of Orthopedics, the Fifth Clinical Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; Department of Orthopedics, Jinzhou Central Hospital, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China
wanghou@126.com

Received: 2011-06-04
Accepted: 2011-07-27

¹ 辽宁医学院第五临床医院骨科, 辽宁省锦州市 121000; ² 锦州市中心医院骨科, 辽宁省锦州市 121000

王浩★, 男, 1973年生, 辽宁省锦州市人, 汉族, 在读硕士, 副主任医师, 主要从事骨损失与修复的研究。
wanghou@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)51-09509-04

收稿日期: 2011-06-04
修回日期: 2011-07-27
(20110307019/G · L)

雌雄不限, 用于体内实验。动物由中国医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SYXK(辽)2008-0005。实验过程中对动物处置方法符合动物伦理学要求。

试剂与材料: 胎牛血清、低糖DMEM(海克龙公司); I型胶原抗体、BrdU生物素标记抗体、S-ABC试剂盒(北京中杉公司)。

方法:

牛去蛋白松质骨制备: 采用脱钙, 脱脂和脱蛋白的方法制备牛去蛋白松质骨, 具体参照Urist^[6]的方法制备。

BMSCs的培养与标记: 取4周龄SD大鼠, 参照Yao等^[7]的实验方法进行原代培养。取第3代培养72 h的BMSCs, 吸除旧培养液, 用PBS冲洗2次, 加入BrdU终浓度为10 μmol/L的完全L-DMEM培养基继续培养72 h。

BMSCs/去蛋白松质骨复合体构建: 取BrdU标记的第3代BMSCs, 洗掉残余的BrdU。以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种到去蛋白松质骨(5.0 mm×1.5 mm×1.5 mm)材料上, 体外培养7 d, 制备成BMSCs/去蛋白松质骨复合体。

大鼠桡骨骨缺损模型的制备及实验分组: 10%水合氯醛腹腔麻醉后(3 mL/kg), 无菌暴露双侧桡骨中段按照长骨缺损临界值制成5 mm节段性缺损^[8], 实验过程中测量其桡骨中段直径为(2.0±0.5) mm。实验按随机数字表法分为3组: ①复合体组: 缺损处移植BMSCs/去蛋白松质骨复合体。②去蛋白松质骨组: 缺损处移植单纯去蛋白松质骨。③BMSCs组: 缺损处移植单纯BMSCs。均不做内外固定, 逐层缝合伤口。移植后每日观察动物情况并肌注 $2 \times 10^4 \text{ U}$ 庆大霉素, 连续3 d。

移植后大体观察与X射线检测: 移植后观察动物的饮食与活动状态以及伤口的愈合情况。于移植后第2, 4, 8周各时间点各组取6只大鼠, 骨缺损区正位行X射线拍片并按照Lane等^[9]标准进行结果分析。

组织学观察: 处死大鼠, 修复区域通过大体观察, 然后固定、脱钙、脱水、制成石蜡切片, 厚度为8 μm, 苏木精-伊红染色, 观察各组材料植入后新骨形成情况, 并按Nilsson等^[10]组织学评分标准对各组标本进行评分。

免疫组织化学染色: 取上述2, 4, 8周各时间点的组织切片。免疫组化两部法检测BrdU染色结果和I型胶原蛋白表达情况。

主要观察指标: ①移植后动物大体观察结果。②移植区X射线片评分。③修复区域组织学评分。④修复区域组织化学检测结果。

统计学分析: 第一作者为统计学处理者, 应用SPSS 13.0统计软件包进行数据处理, 多个平均数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 q 检验比较, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 共有62只大鼠进行移植实

验, 其中移植后死亡5只, 另有3只状态不好, 最后54只大鼠纳入结果分析。

2.2 移植后动物一般状态观察 动物于术后2 h完全清醒, 术肢活动受限, 饮食明显减少。1 d后术肢跛行减轻, 饮食稍有增加。伤口无红肿、渗出现象; 1周后术肢跛行消失, 伤口均I期愈合, 饮食及活动完全恢复正常。

2.3 移植后骨缺损区X射线片评分 复合体组: 2周桡骨缺损处略见骨痂形成, 影像呈薄云雾状, 4周缺损区两端可见明显的新生骨痂, 8周整个缺损区均可见新生骨痂且新骨密度增高, 形成明显骨缺损区的桥接。去蛋白松质骨组: 2周骨缺损区无明显变化, 4周仅在两断端有少量的云雾状骨痂形成, 8周骨缺损区骨痂形成增多, 但仍未出现桥接, 并可见两端有骨质硬化现象。BMSCs组: 2, 4周骨缺损处未见骨性修复, 8周可见两断端有骨质硬化现象。放射学评分结果显示, 各组均随着时间延长成骨不断增加, 复合体组与其他各组成骨差异均有显著性意义($P < 0.01$), 见表1。

表1 各组移植后骨缺损区放射学评分比较
Table 1 Radiology score comparison of the bone defect areas in each group after operation ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	Time after operation		
	2 wk	4 wk	8 wk
Composite	4.51±0.37	6.57±0.32	9.22±0.43
Deproteinized cancellous bone	2.20±0.25 ^a	3.23±0.17 ^a	5.36±0.35 ^a
Bone marrow mesenchymal stem cells	1.62±0.15 ^a	2.10±0.11 ^a	2.61±0.19 ^a

^a $P < 0.01$, vs. composite group

2.4 移植后骨缺损区组织学评分 2周时各组组织内均可见充血水肿、大量的淋巴细胞与中性粒细胞浸润等明显的炎症反应现象。复合体组大部分BMSCs还未向成骨细胞转化, 仍呈成纤维样细胞, 在材料网孔中生长, 复合体组与材料相接处有少量的成骨样细胞出现(图1a); 去蛋白松质骨组可见网孔中的炎性细胞。4周: 复合体组移植体内开始有新生微血管生成, 材料部分已经降解, 材料空隙内可见新生的类骨质形成, 类骨质内存在大量的成骨细胞, 细胞肥大, 细胞排列紧密, 并出现骨陷窝, 炎症反应明显减轻(图1b); 去蛋白松质骨组材料中也出现类骨质, 但成骨性细胞数量较少, 且未见骨陷窝; 而BMSCs组缺损处除有结缔组织长入外, 没有明显的成骨痕迹。8周: 材料大部分已完全降解, 几乎看不到炎症反应复合体组可见大量的编织骨样组织, 形成小梁样结构, 含有大量的成骨细胞、骨细胞, 已经形成板层骨样结构(图1c); 去蛋白松质骨组部分出现小梁样结构, 但大部分仍是纤维组织; BMSCs组缺损处几乎全部被纤维组织填充, 缺损处仍无成骨组织。组织学

评分结果显示, 复合体组均好于其他各组($P < 0.01$), 见表2。

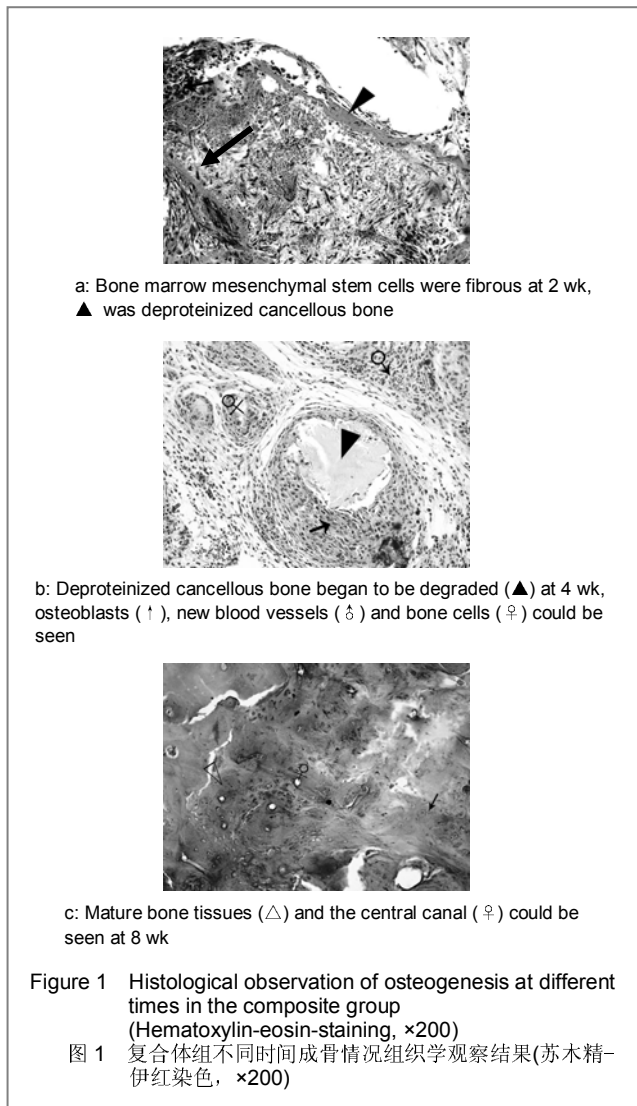


表2 各组移植后骨缺损修复组织学评分比较
Table 2 Histological score comparison of the bone defects in each group after operation ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

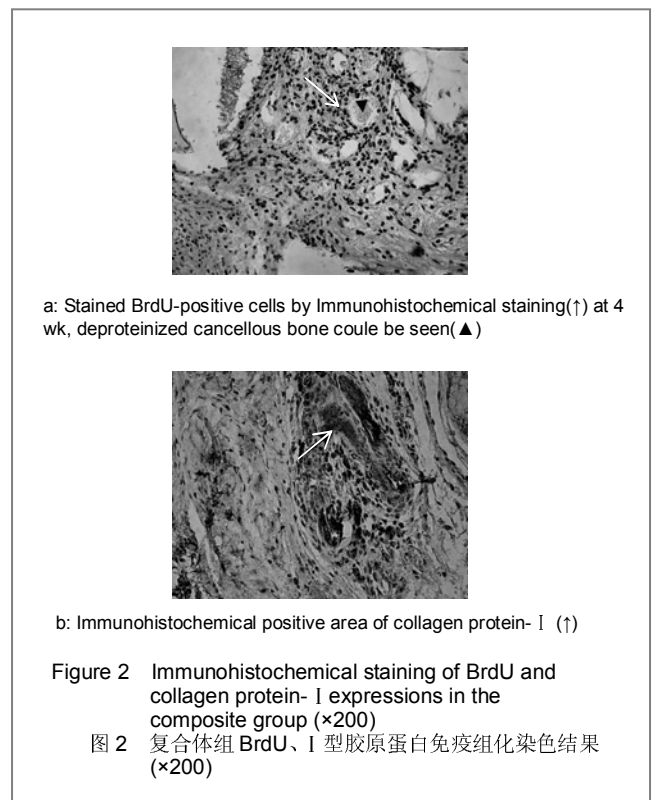
Group	Time after operation		
	2 wk	4 wk	8 wk
Composite	1.73 $\pm$ 0.16	2.66 $\pm$ 0.17	3.71 $\pm$ 0.30
Deproteinized cancellous bone	0.31 $\pm$ 0.06 ^a	0.87 $\pm$ 0.08 ^a	1.26 $\pm$ 0.12 ^a
Bone marrow mesenchymal stem cells	0.22 $\pm$ 0.06 ^a	0.43 $\pm$ 0.06 ^a	0.77 $\pm$ 0.07 ^a

^a $P < 0.01$, vs. composite group

2.5 BrdU免疫组织化学检测结果 复合体组: 2, 4, 8周BrdU免疫组化染色可见去蛋白松质骨周围存在大量细胞核呈棕黄色的细胞(图2a), 但随着时间的延长阳性细胞数量有所减少。去蛋白松质骨组呈阴性。BMSCs组2周时可见大量阳性细胞, 4周时阳性细胞明显减少, 但是在两端附近阳性细胞数明显多于缺损处, 8周时

几乎看不到阳性细胞表达。

2.6 I型胶原蛋白的免疫组织化学染色结果 2周: 复合体组部分区域可见一些细胞胞浆内出现棕黄色的颗粒; 去蛋白松质骨组、BMSCs组均呈阴性。4周: 复合体组阳性细胞数量增多, 部分区域基质内出现均一棕黄色区域; 去蛋白松质骨组、BMSCs组可见少量的阳性细胞。8周: 复合体组可见大量的阳性基质区域(图2b); 去蛋白松质骨组阳性细胞有所增多, 但没有成片的基质区域; BMSCs组两端附近阳性细胞数明显多于缺损处。



3 讨论

骨组织工程的研究就是把具有成骨能力的种子细胞接种到生物相容性良好、有利于种子细胞黏附生长, 可在体内降解的生物支架材料, 并且移植到体内可完成修复作用。一些实验结果显示, BMSCs和一些人工生物合成的支架材料复合有较强的成骨能力, 可以修复骨组织缺损^[11-12]。然而人工合成的材料毕竟和骨组织自身的结构有所差异, 导致修复的效果不能够完全符合组织康复标准。本实验结合临床上多年来对于骨折骨损伤的修复经验, 采用了去蛋白牛松质骨这一天然材料对大鼠桡骨缺损进行了修复, 体内实验结果表明, 所有移植实验组均没有出现明显的移植排斥反应。从修复效果上看: 对骨缺损修复效果复合体组最好, 去蛋白松质骨组次之, BMSCs组最差。这说明单纯的BMSCs虽然有成

骨能力,但在缺乏支架材料桥接的情况下不能完全修复大块的节段性骨缺损,这一结论与Kneser等^[13]报道一致;单纯的去蛋白松质骨虽然可以修复骨缺损,但是效果还没有复合干细胞的复合体修复效果好,这说明BMSCs发挥了在体内迅速分化成成骨细胞并发挥成骨作用。Canter等^[14]实验结果也证实,复合体对骨缺损的修复效果比单纯的细胞支架材料好^[15-16]。本实验各组免疫反应不明显,移植后的动物并未有因为局部炎症和排斥反应而出现死亡的情况。分析原因可能有以下两方面:虽然牛的松质骨对于老鼠来说属于异物,但是当去除了有机蛋白成分后,其抗原性显著减弱;另外同时BMSCs胞膜表面缺乏MHC表达,对机体的免疫系统有逃避作用^[17]。故此移植体对于局部和全身局部免疫排斥反应有很好的减轻效应。

由于实验中骨缺损的长度较大且局部的原始BMSCs数量较少,单纯的支架材料无法在短时间内满足成骨需要,造成成骨与材料的吸收速率失调。BMSCs/去蛋白松质骨复合体引入了大量的外源性的干细胞且在短时间内可分化出大量的成骨性细胞,三维载体材料可以为植入细胞提供并保持一个生长的空间微环境,促使细胞的增殖分化,从而加速对缺损的重建^[18]。Yamasaki等^[19]通过实验证实新生骨组织是由工程化骨中的种子细胞形成的。本实验使用BrdU对种子细胞进行移植前标记,其结果也证实成骨细胞大部分来源于移植复合体中的BMSCs。这说明种子细胞在复合体成骨过程中起到了重要作用。

本实验采用的是由松质骨完全脱钙、脱脂、脱蛋白制成的,由于它是天然衍生骨材料,具有天然的微观结构,以及良好的细胞相容性。合适的孔径与孔隙率才能使细胞良好的在其中生长,三维立体网架结构具有开放的孔隙和高度的孔隙间连接,能够为成骨性细胞的黏附、增殖、生长和功能的发挥提供一个最佳的微环境,同时也能够为新骨组织的形成提供空间和支架^[20]。载体中较高数量的成骨性细胞,可以有效地促进细胞与细胞间连接。去蛋白松质骨主要成分为I型胶原。随着诱导成骨作用的发挥和骨传到作用地完成,去蛋白松质骨植入体内4周后逐渐开始被降解吸收,8周后可被完全吸收,且吸收的速率与新骨形成的过程协调,降解的产物为氨基酸,有利于细胞的生长^[21]。

4 参考文献

- [1] Tanner KE, Dalby MJ. Special issue on bone tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010;224(12):i-iv.
- [2] Tanner KE. Bioactive composites for bone tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010;224(12):1359-1372.
- [3] Douglas T, Liu Q, Humpe A, et al. Novel ceramic bone replacement material CeraBall seeded with human mesenchymal stem cells. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(3):262-267.

- [4] Hamada K, Hirose M, Yamashita T, et al. Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold. *J Biomed Mater Res A*. 2008;84(1):128-136.
- [5] Cho MH, Kim KS, Ahn HH, et al. Chitosan gel as an in situ-forming scaffold for rat bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(6):1099-1108.
- [6] Urist MR. Bone formation by auto induction. *Science*. 1965; 150(698):893-899.
- [7] Yao J, Radin S, Reilly G, et al. Solution-mediated effect of bioactive glass in poly (lactic-coglycolic acid)-bioactive glass composites on osteogenesis of marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A*. 2005;75(4):794-801.
- [8] Hemmann A, Gastl R, Liebau S, et al. Efficient generation of neural stem cell-like adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci*. 2004;117:4411-4422.
- [9] Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin of North Am*. 1987;18(2):213-225.
- [10] Nilsson O, Urist MR, Dawson EG, et al. Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *Bone Joint Surg*. 1986;68:35.
- [11] Bodde EW, Spauwen PH, Mikos AG, et al. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *Biomed Mater Res A*. 2008; 85(1):206-217.
- [12] Wang L, Fan H, Zhang ZY, et al. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized β -tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010; 31(36): 9452-9461.
- [13] Kneser U, Stangenberg L, Ohnolz J, et al. Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model. *Cell Mol Med*. 2006;3(10):695-707.
- [14] Canter HI, Vargel I, Mavili ME. Reconstruction of mandibular defects using autografts combined with demineralized bone matrix and cancellous allograft. *J Craniofac Surg*. 2007;18(1): 95-100.
- [15] Liu G, Sun J, Li Y, et al. Evaluation of partially demineralized osteoporotic cancellous bone matrix combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering: an in vitro and in vivo study. *Calcif Tissue Int*. 2008;83(3):176-185.
- [16] Isaksson H, Tolvanen V, Finnilä MA, et al. Long-term voluntary exercise of male mice induces more beneficial effects on cancellous and cortical bone than on the collagenous matrix. *Exp Gerontol*. 2009;44(11):708-717.
- [17] Løken S, Jakobsen RB, Arøen A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells in a hyaluronan scaffold for treatment of an osteochondral defect in a rabbit model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2008;16(10):896-903.
- [18] Zioupos P, Cook R, Coats AM. Bone quality issues: an matrix properties in OP cancellous bone. *Stud Health Technol Inform*. 2008;133:238-245.
- [19] Yamasaki T, Deie M, Shinomiya R, et al. Transplantation of meniscus regenerated by tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. *Artif Organs*. 2008; 32(7):519-524.
- [20] Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, et al. A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. *Biomaterials*. 2009;30(5):763-769.
- [21] Xu C, Su P, Wang Y, et al. A novel biomimetic composite scaffold hybridized with mesenchymal stem cells in repair of rat bone defects models. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95(2):495-503.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 本实验设计和实施为第一作者,评估为第二作者。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物处置方法符合动物伦理学要求。

本文创新性: 去蛋白松质骨具有天然骨的结构,是细胞最好的支架,以去蛋白松质骨作为支架联合细胞移植使得细胞在最理想的空间支架中生长无疑是理想的方式,实验中也验证了该方式的可行性和效果。