

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.16.005 [http://www.crter.org]
杨川博, 何惠宇, 崔杰, 马文渊, 杨楠. 骨髓基质干细胞复合煅烧骨的皮下成骨[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(16):2883-2890.

骨髓基质干细胞复合煅烧骨的皮下成骨***

杨川博, 何惠宇, 崔杰, 马文渊, 杨楠

新疆医科大学第一附属医院口腔修复科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

文章亮点:

- 1 对煅烧骨的煅烧温度进行多次试验, 发现在 950 °C 时的煅烧骨形态比较理想。
- 2 煅烧骨具有良好的生物相容性、骨传导性及机械承载能力。
- 3 在材料及实验动物方面, 大型动物羊的骨髓基质干细胞报道较少。实验选用当地的阿勒泰大尾羊, 具有耐粗饲、善跋涉、抗严寒、体质坚实及适应性能力强等优点, 且价格相对低廉, 动物来源较广。
- 4 经高温煅烧后的松质骨材料, 具有良好的生物相容性和生物安全性, 可作为骨髓基质干细胞的良好载体, 复合后植入体内能够诱导新生骨组织形成, 可作为骨缺损组织工程修复的支架材料。

关键词:

生物材料; 组织工程骨材料; 煅烧骨; 骨髓基质干细胞; 骨缺损; 皮下成骨; 植入; Balb/c 裸鼠; 骨髓来源干细胞; 骨组织工程; 国家自然科学基金

摘要

背景: 研究证明骨髓基质干细胞与煅烧骨支架材料结合后可形成组织工程化骨, 但在动物体内的生物相容性及皮下诱导成骨的能力国内报道较少。

目的: 观察骨髓基质细胞复合异种煅烧骨植入 BALB/c 裸鼠背部皮下的成骨性能及煅烧骨材料作为组织工程骨支架材料的可行性。

方法: 选用经脱脂及脱蛋白处理后高温煅烧形成的骨支架材料与梯度密度离心法分离培养至第 3 代的羊骨髓基质干细胞构建细胞-煅烧骨复合物植入 BALB/c 裸鼠背部皮下, 选同期对侧背部皮下植入单纯煅烧骨为对照组。

结果与结论: 煅烧后的松质骨块为白垩色, 表面呈蜂窝状多孔结构, 保留了天然松质骨的多孔状空间结构。骨小梁结构完整, 孔隙相互连通。骨髓基质干细胞接种到煅烧骨后 24 h 可见大量细胞黏附于支架上, 7 d 后细胞分泌大量细胞外基质, 细胞与基质分界不清, 细胞能在材料上良好地黏附、增殖与生长, 细胞活性未受到支架材料的影响。植入 4 周后, 两组均可见煅烧骨边缘出现少量残片, 细胞-煅烧骨复合物组煅烧骨孔隙周边可发现骨细胞, 对照组煅烧骨表面可见纤维结缔组织包绕。植入后 8 周, 两组均可见到煅烧骨部分降解为片状类骨质, 周围有成纤维细胞包绕, 排列紧密, 形态多样, 细胞-煅烧骨复合物组煅烧骨孔隙内可见煅烧骨表面有排列成行的成骨细胞, 孔隙间有散在淋巴细胞浸润。对照组标本可见孔隙内有大量结缔组织长入, 未见明显成骨迹象。结果说明, 经高温煅烧后的松质骨材料, 具有良好的生物相容性和生物安全性, 可作为骨髓基质干细胞的良好载体, 复合后植入体内能够诱导新生骨组织形成, 可作为骨缺损组织工程修复的支架材料。

杨川博★, 男, 1986 年生, 汉族, 新疆维吾尔自治区博乐市人, 新疆医科大学在读硕士, 现就职于新疆医科大学第一附属医院口腔修复科。
yangchuanbo111@163.com

通讯作者: 何惠宇, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 新疆医科大学第一附属医院口腔修复科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054
hehuiyu02@sina.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)16-02883-08

收稿日期: 2012-11-24
修回日期: 2012-12-13
(20121116001/WJ·W)

Subcutaneous osteogenesis by bone marrow stromal cells combined with sintered bone

Yang Chuan-bo, He Hui-yu, Cui Jie, Ma Wen-yuan, Yang Nan

Department of Prosthodontics, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054
Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yang Chuan-bo★, Studying for master's degree, Department of Prosthodontics, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
 yangchuanbo111@163.com.

Corresponding author: He Hui-yu, Professor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Prosthodontics, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
 hehuiyu02@sina.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81060088*; the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2011211A073*; the Major Scientific Research Plan of University in Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. XJEDU2009I22*

Received: 2012-11-24
 Accepted: 2012-12-13

Abstract

BACKGROUND: It has proved that the bone marrow stromal cells and sintered bone support material combination can form tissue-engineered bone, but relevant studies on its biocompatibility in animals and subcutaneous osteogenesis ability are less reported in China.

OBJECTIVE: To observe the osteogenesis capacity of marrow stromal stem cells combined with sintered bone implanted into Balb/c nude mouse back subcutaneously and to explore the feasibility of sintered bone as a scaffold for tissue-engineered bone.

METHODS: Sintered bone scaffold materials were prepared using defatted and deproteinized processing and high-temperature calcinations. Then the sintered bone was combined with passage 3 sheep bone marrow stromal stem cells cultured using density gradient centrifugation method to be implanted subcutaneously into the back of BALB/c nude mice. Simple sintered bone that was subcutaneously implanted into the contralateral back of BALB/c nude mice served as control group.

RESULTS AND CONCLUSION: After calcinations, sintered cancellous bone block colored chalks and the surface displayed a honeycomb porous structure, maintaining the porous structure of the natural cancellous bone. Bone trabecular structure was of integrity, and pores were mutually interconnected. After bone marrow stromal stem cells were inoculated to the calcined bone, there were a lot of cells adherent to the scaffold within 24 hours, and a large amount of extracellular matrix at 7 days. The boundary between cells and extracellular matrix was unclear, and the cells could grow and proliferate well on the scaffold, suggesting that the cell viability was not influenced by the scaffold. Four weeks after implantation, a few of fragments were visible at the edge of sintered bone in the two groups. Bone cells could be seen around the pores of sintered bone in the combination group, while fibrous connective tissue enveloped the sintered bone in the control group. Eight weeks later, the sintered bone partially degraded into osteoid sheets surrounded by fibroblasts that arranged closely and was diverse in shape. In the combination group, osteoblasts arranged in line on the surface of sintered bone and infiltrated lymphocytes were scattered among the pores. In the control group, a great amount of connective tissues grew into the pores, but there was no osteogenesis. These findings indicate that the sintered cancellous bone block pose better biocompatibility and biological safety, which can be a better scaffold for bone marrow stromal stem cells. The composite of bone marrow stromal stem cells and sintered bone has a good ability to induce new bone formation and the sintered bone can be used as scaffold materials for tissue engineering repair of bone defects.

Key Words: biomaterials; tissue-engineered bone materials; sintered bone; bone marrow stromal stem cells; bone defects; subcutaneous osteogenesis; implantation; Balb/c nude mice; bone marrow-derived stem cells; bone tissue engineering; National Natural Science Foundation of China

Yang CB, He HY, Cui J, Ma WY, Yang N. Subcutaneous osteogenesis by bone marrow stromal cells combined with sintered bone. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(16): 2883-2890.

0 引言

口腔中因炎症、外伤等因素引起的病损可导致牙周膜、牙骨质及牙槽骨组织受损,除损伤牙周软组织外,还可造成骨组织吸收、破坏^[1]。目前临床上对于牙槽骨及牙周骨组织缺损的修复方法主要是通过植骨治疗(自体骨、异体骨及人工骨替代材料)来填补骨缺损区域而完成的。但通过大量的临床应用中发现这些单一的植骨材料都存在着各自的优点和不足^[2-3],不能达到理想的修复骨缺损的效果。

近几年随着医学的发展,各学科之间的相互促进,推动了组织工程技术在医学领域的应用,而组织工程骨的研究与应用也成为当前各学科之间的研究热点。在构建组织工程骨中支架材料的研究与种子细胞的获取具有重要的作用。理想的支架材料具有良好的生物相容性和降解性、有良好的力学性能和三维立体多孔结构^[4]。对于种子细胞而言,当前大量研究显示骨髓中含有丰富的间充质细胞,尤其是骨祖细胞(如骨髓基质干细胞),它能分化为成骨细胞、软骨细胞与脂肪细胞等而被视为理想的细胞来源^[5-7]。

煅烧骨作为支架材料的研究与应用一直深受国内外学者的关注^[8]。所谓的煅烧骨材料是

指骨组织的松质骨部分经脱脂脱蛋白处理后高温煅烧而得到的。其主要成分是高纯度的羟基磷灰石[Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]，与人类骨组织的成分及结构相近。

本次实验选用的煅烧骨原材料是成年阿勒泰大尾羊脊椎骨的松质骨，去除了表面的骨皮质部分。在制作加工方面，通过不断的改进加工流程，最终研究并发现运用物理联合化学的方法可提高煅烧骨支架材料的质量。所得到的煅烧骨材料保持了良好的理化特性，孔隙内杂质较少，并且煅烧后的材料保留了原有自然骨组织的连续多孔结构，呈三维多孔网状，具有孔径大(137.4–538.7 μm)、孔隙率高[(66.10±1.32)%]等优点，广泛存在的微孔其大小和形状更有利于细胞的黏附与增殖，对于细胞营养成分的渗入和细胞代谢产物的排出更为通畅。

实验通过动物体内试验进一步探索煅烧骨材料作为组织工程骨支架材料的安全性和可行性。实验设计选用羊骨髓基质干细胞与煅烧骨支架材料复合构建形成组织工程化骨，通过植入BALB/c裸鼠背部皮下，于单纯植入煅烧骨材料进行对比。观察骨髓基质细胞在煅烧骨材料上的黏附、生长与增殖情况及煅烧骨材料在动物体内的降解情况，了解骨髓基质干细胞在BALB/c裸鼠皮下诱导骨生成的能力及支架材料的降解情况，从而为骨组织缺损的修复治疗及骨组织工程支架材料的选择提供实验依据，为后期实验顺利开展奠定基础。

1 材料和方法

设计：随机对照动物实验。

时间及地点：实验于2011年10月至2012年4月在新疆医学动物模型研究重点实验室SPF实验室完成。

材料

实验动物：3月龄雄性阿勒泰大尾羊1只，体质量15 kg，用于抽取羊骨髓细胞。6月龄雄性BALB/c裸鼠10只，体质量25–30 g。

实验动物均由新疆医科大学第一附属医院实验动物中心提供，其中BALB/c裸鼠属SPF级。实验动物机构许可证号：SYXK(新)2010-0001。

实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[9]。

骨髓基质干细胞复合煅烧骨移植的主要仪器：

Main instruments:

仪器	来源
PYRO 高温微波煅烧炉	Milestone, 意大利
5200 型双频超声清洗机	宁波新芝生物科技股份有限公司
光学显微镜	上海光学仪器厂
EOL-JSM-6390LV 扫描电子显微镜	日本电子株式会社
DMEM 培养基和胎牛血清	Gibco, 美国
ZHJH-1214C 型超净工作台	上海同舸工贸有限公司
CO ₂ 培养箱	HERA cell 240, 德国
电热恒温水浴锅	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
高温高压灭菌锅	SANYO 公司, 日本

实验方法：

煅烧骨支架的制作：课题组前期以对煅烧骨的制作进行大量的研究，研制出了较为科学的制作工艺^[10]。选用健康成年羊脊椎骨，去除表面骨皮质后切成0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm的立方体(体积分数30% H₂O₂浸泡12 h脱蛋白；1：1甲醇/氯仿浸泡12 h脱脂，处理重复3次)^[11–12]，超声震荡仪清洗；干燥后浸泡在0.09 mol/L焦磷酸钠[Na₄P₂O₇·10H₂O]溶液中，70℃恒温水浴锅温浴12 h。取出骨块干燥。设置PYRO高温微波煅烧炉程序，以10℃/min缓慢升温，期间持续通氧气，当炉内煅烧温度达到950℃时，维持3 h。待煅烧完成后⁶⁰Co消毒封装备用。

羊骨髓基质干细胞的培养：实验选取3月龄阿勒泰大尾羊，在髂骨处用18号骨穿针做髓腔穿刺，直到有明显落空感后，用20 mL注射器(内含肝素)抽取骨髓10 mL，超净台内100目滤网过滤除菌，抽吸过滤后的骨髓5 mL与D-Hank's液以1：1的比例充分混匀，缓慢沿管壁加入到含有等量体积淋巴细胞分离液的离心管中，以2 000 r/min离心20 min，吸取中间乳白色云雾状有核细胞层，加入D-Hank's液5 mL反复吹打漂洗，1 500 r/min离心10 min，弃上清，在沉淀中加入DMEM/F12培养液2 mL，反复吹打制成单细胞悬液，接种于25 mL培养瓶，置于37℃，体积分数为5% CO₂饱和湿度孵箱内孵育，4 d后第1次全量换液，弃去大量的悬浮细胞，每隔3 d换液1次。待细胞融合成单层后用质量浓度2.0 g/L胰蛋白酶消化法培养，至第3代细胞融合成单层后收集备用^[13]。

细胞-煅烧骨复合物的构建及微结构观察：无菌条件下将准备好的煅烧骨材料置于6孔板中，加入适量DMEM/F12培养液预湿12 h，将培养液吸干弃去。调整

细胞悬液浓度为 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$, 超净台内向每块支架缓慢滴加细胞悬液 $100 \mu\text{L}$, 置于 37°C 、体积分数为 $5\% \text{CO}_2$ 饱和湿度孵箱内孵育。培养2 h后将6孔板取出, 超净台内沿6孔板壁缓慢加入DMEM/F12培养液 3 mL , 放入培养箱中培养。倒置相差显微镜观察材料周围和孔隙内细胞形态、生长情况, 在复合培养后第7天扫描电子显微镜观察细胞在材料表面的黏附、生长、增殖和基质分泌情况^[8]。

细胞-煅烧骨复合物植入裸鼠背部皮下: 以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度移植构建细胞-支架复合物, 并将复合物回植于裸鼠背部皮下。所有操作均在SPF级动物房的超净工作台内进行。BALB/c裸鼠称质量后采用氯胺酮腹腔注射麻醉($10 \mu\text{L/g}$)。待动物完全麻醉后在背部皮下选取4个切口, 分别位于中线两侧。左右随机对照, 一侧植入单纯煅烧骨材料, 另一侧植入复合物。植入材料后, 严密缝合皮肤, 闭合创面, 1周后拆线。分组信息见表1。

表 1 BALB/c 裸鼠背部皮下材料植入分组及取材时间

Table 1 Subcutaneous implant materials and collecting time

组别	取材时间 (周)	裸鼠数量 (只)	植入材料	植入物数量
第1组	2	3	左侧: 煅烧骨	12
			右侧: 煅烧骨-细胞复合物	
第2组	4	3	左侧: 煅烧骨	12
			右侧: 煅烧骨-细胞复合物	
第3组	8	3	左侧: 煅烧骨	12
			右侧: 煅烧骨-细胞复合物	

主要观察指标: 液体置换法测定煅烧骨孔隙率; 电子扫描电镜观察煅烧骨超微结构; 扫描电镜观察骨髓基质干细胞与煅烧骨的细胞相容性; 植入后2, 4, 8周将背部实验部位用体积分数 4% 甲醛固定、 $10\% \text{EDTA}$ 脱钙后, 常规石蜡包埋, 苏木精-伊红染色切片观察成骨及支架降解情况。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 全部BALB/c裸鼠无感染, 均存活, 背部创面愈合良好, 无红肿、化脓等现象, 1周后创口自然愈合。植入物牢固嵌合在背部皮下, 未见脱落、移位。最终所有动物均进入结果分析。

2.2 煅烧骨性能 温度在 950°C 时煅烧后的松质骨块为白垩色, 表面呈蜂窝状多孔结构, 保留了天然松质骨

的多孔状空间, 孔径与天然松质骨相似。通过甘油液体置换法测定煅烧骨孔隙率为 $(66.10 \pm 1.32)\%$ 。

扫描电镜下观察见骨小梁结构完整, 孔隙相互连通, 孔径范围为 $137.44\text{--}538.72 \mu\text{m}$, 孔隙内未见杂质影像, 各孔隙间可见广泛交通, 大孔壁上可见大量微孔存在, 孔壁表面粗糙, 形貌为小梁状和山嵴状。见图1。

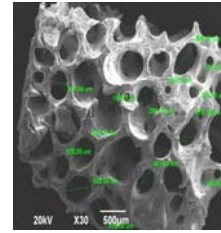
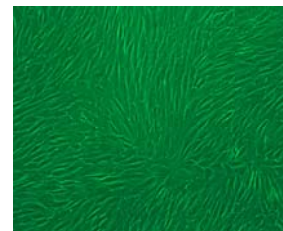


图 1 煅烧骨扫描电镜下可见孔隙大小较为均匀, 保留了天然松质骨的多孔状空间结构, 各孔隙间存在广泛交通 ($\times 30$)

Figure 1 Sintered bone under scanning electron microscopy was relatively uniform in pore size, retained the porous structure of natural cancellous bone, and the pores were interconnected ($\times 30$)

2.3 培养的羊骨髓基质干细胞及细胞-支架复合物形态 刚开始接种的细胞呈球形悬浮于培养液中。第2天部分细胞贴壁, 细胞变成椭圆形。第4天更换培养液时, 可见贴壁的细胞大小不一致, 呈短梭形、多角形及不规则状。第7天细胞数量陡增, 汇集达培养瓶底 80% , 细胞呈长梭形, 漩涡生长。第10天细胞呈片状融合, 长满培养瓶。对干细胞的鉴定及检测, 课题组成员唐晓雪等通过Von Kossa染色为阳性而得以证实^[13]。传代接种 24 h 内贴壁, 逐渐伸展为长梭形, 胞体较原代略大。传代第6天左右即可长满培养瓶底。传至第3代时细胞形态无明显改变, 形态比较均一, 生长旺盛。见图2。

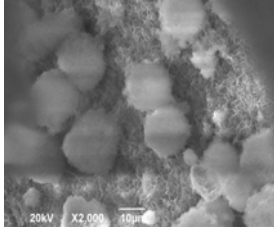


注: 细胞形态均匀且生长旺盛。

图 2 第3代羊骨髓基质干细胞形态(倒置相差显微镜, $\times 100$)

Figure 2 Morphology of passage 3 sheep bone marrow stromal stem cell (Inverted phase contrast microscope, $\times 100$)

细胞-支架复合物培养7 d后, 在低倍镜下可见大量的骨髓基质干细胞贴附于材料孔隙中增殖生长, 细胞生长密集。在高倍镜下可见细胞分界不清, 细胞相互融合成片状, 细胞与材料结合较紧密, 有大量胶原分泌。见图3。

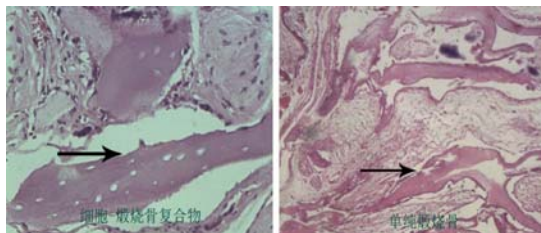


注: 细胞生长密集, 相互融合成片状, 细胞与材料结合较紧密, 有大量胶原分泌。

图3 培养7天扫描电镜观察可见羊骨髓基质干细胞贴附于材料内表面增殖生长情况($\times 2\ 000$)

Figure 3 Proliferation of sheep bone marrow stromal stem cells adherent to the surface of sintered bone scaffold at 7 d of culture under scanning electron microscope ($\times 2\ 000$)

2.4 苏木精-伊红染色结果 分别于植入后2, 4, 8周各处死3只裸鼠, 取出植入材料部位。体积分数4%甲醛固定3 d、10%EDTA脱钙液脱钙2周后, 常规石蜡包埋, 制作苏木精-伊红染色切片, 光镜下观察。植入后2周, 对照组在材料的周围既可见少量纤维结缔组织出现, 同时可见到较多的炎症细胞, 而细胞-支架复合物组在材料的周围有明显的软骨样组织形成, 炎性细胞较少, 两组的煅烧骨降解均不明显, 见图4。



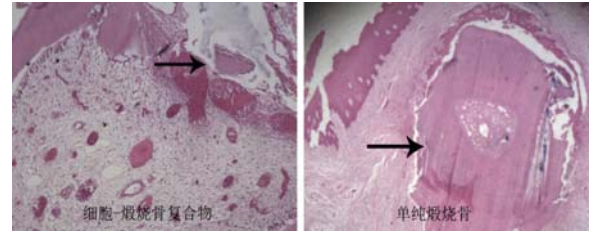
A: 细胞-煅烧骨复合物 B: 单纯煅烧骨

注: 图A, B中箭头所示为材料边缘均被纤维结缔组织包绕, 而材料也未见降解。

图4 植入后2周时两组煅烧骨的组织学表现(苏木精-伊红染色, $\times 10$)

Figure 4 Histological changes of sintered bone in the two groups after 2 wk of implantation (Hematoxylin-eosin staining, $\times 10$)

植入后4周, 单纯材料纤维结缔组织形成较2周时增多, 并呈现包绕状。复合体组材料的周围可见少量类骨组织形成, 并可见煅烧骨边缘出现崩解现象, 见图5。



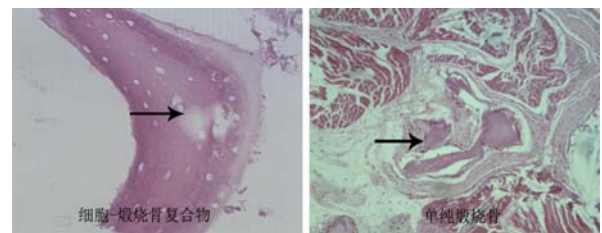
A: 细胞-煅烧骨复合物 B: 单纯煅烧骨

注: 图A箭头所示为煅烧骨孔隙中细胞堆积, 有少量的软骨细胞和骨母细胞出现, 图B箭头所示为煅烧骨表面大量的纤维组织包绕, 材料边缘有少量煅烧骨残片。

图5 材料植入后4周时两组煅烧骨组织学表现(苏木精-伊红染色, $\times 10$)

Figure 5 Histological changes of sintered bone in the two groups after 4 wk of implantation (Hematoxylin-eosin staining, $\times 10$)

植入后8周, 复合物组形成骨数量明显多于对照组, 且可见煅烧骨崩解现象更加明显, 见图6。



A: 细胞-煅烧骨复合物 B: 单纯煅烧骨

注: 图A中箭头所示为煅烧骨孔隙内有较多新生骨样组织围绕; 图B中箭头所示为煅烧骨组织未见成骨迹象, 材料边缘残片增多, 未见降解。

图6 材料植入后8周时两组煅烧骨组织学表现(苏木精-伊红染色, $\times 10$)。

Figure 6 Histological changes of sintered bone in the two groups after 8 wk of implantation (Hematoxylin-eosin staining, $\times 10$)

3 讨论

口腔中因多种原因而导致的颌骨及牙槽骨缺损病人较为常见。目前临床当中骨缺损常用的治疗方法是通过植骨治疗来完成的,其原理是通过植骨材料来填补骨缺损区域。所以,植骨材料的研究与应用也一直是口腔医学界探讨的一大重点。目前临床中较为常用的骨移植材料主要包括自体骨移植、异体/异种骨移植和人工合成的骨代用品移植等^[14]。其中自体骨的成骨效果最为理想且避免了个体之间的排斥反应,是评价植骨材料性能的金标准,但在实际应用中受到了缺损区域大小及二次创伤的限制;其次异体骨在使用过程中也一直受到了个体间的排斥反应干扰的影响,且价格较为昂贵。

近几年人工合成的骨移植材料在中国应用广泛,具有良好的修复骨缺损的能力,但昂贵的价格使不少患者难以接受。组织工程技术的出现使得这一局面有所改善,通过较为廉价的骨移植材料来修复缺损骨组织是其优势所在。而在组织工程骨支架材料的研究中煅烧骨移植物的研究受到不少学者关注,其最主要的优点就是来源广泛,易于制取,价格便宜等^[15-17]。煅烧骨材料经高温煅烧后,可以彻底消除其抗原性,避免了免疫排斥反应的产生,且生物相容性较好^[18-20]。对于组织工程技术的研 究,最终目的是要应用于临床当,但要确保煅烧骨材料在临床应用中的有效性和安全性还需要大量的实验研究来证实^[21]。早期国内学者许永华等通过对煅烧骨进行了研究,将煅烧骨与成骨细胞复合后植入动物体内,发现成骨细胞能够存活并诱导产生软骨组织和骨组织^[22]。

本次实验通过对煅烧骨制作过程的不断改进,显著提高了煅烧骨的质量。经950 °C高温煅烧后的骨支架材料保留了松质骨的孔隙结构,孔隙率高(66.10±1.32%),孔径在137.4-538.7 μm之间,具有正常骨组织的骨小梁、小梁间隙及骨内管腔系统结构,保留了原有自然骨的连续多孔状态。课题组前期许慧芬等对煅烧骨材料的研究证明,通过物理联合化学的方法可以提高煅烧骨的细胞相容性等^[8]。得到的煅烧骨孔隙内杂质较少,有利于细胞的黏附、生长和增殖。孔隙间广泛分布的微孔及其形状,使细胞营养成分的渗入和细胞代谢产物的排出相适宜。更加有利于细胞调节因子的黏附、肉芽组织和新骨组织细胞的长入及骨软骨分化形成,利于引导新骨形成。

实验选用地产成年阿勒泰大尾羊的骨髓基质干细胞为种子细胞,通过体外全骨髓贴壁法培养发现,所获得的骨髓基质干细胞具有贴壁早、增殖快、活力旺盛等特性,并能稳定传代培养,易定向分化为成骨细胞^[23]。课题组许慧芬等^[8]通过实验研究发现骨髓基质细胞采用浓度为10⁷数量级与煅烧骨材料构建的复合物,细胞能广泛的附着在材料孔隙内壁周围,密集生长,细胞之间相互融合成片状,细胞与材料的结合力较为牢固^[24-25]。证实煅烧骨的生物相容性较好,可供骨髓基质细胞黏附生长。

在动物选择方面,实验选用BALB/c裸鼠背部皮下作为研究对象主要考虑到以下问题,首先BALB/c裸鼠背部皮肤表面没有粗大坚硬的毛发,避开对实验的干扰,使实验结果更为准确^[26]。其次动物背部可以排除应力刺激对煅烧骨降解而产生的干扰^[27]。刘喜民等^[28]国内学者的实验研究也证实了明胶类的骨支架材料在作为细胞的载体及支架骨材料作用时,其降解速度快,硬度差而不能很好的发挥支撑作用,应当将实验部位设计在应力集中区域之外。

在检测结果当中,通过对组织病理学观察发现,煅烧骨材料在植入BALB/c裸鼠背部皮下后可见孔隙内很快被纤维组织充满。在第2周时,细胞-煅烧骨复合物组未见到成骨迹象,周围只是大量的纤维组织包绕。随着实验时间的延长,直到第8周时才显现出成骨迹象,煅烧骨材料周边可见类骨母细胞,提示了新生骨组织的形成。而对照组则未见成骨迹象,其周边也未见降解残片出现。实验结果证实,骨髓基质干细胞在体内发挥了迅速分化成成骨细胞并引导成骨的作用,与Canter等^[29]的研究结果相一致。除此之外,通过实验也发现了煅烧骨材料在降解能力方面的不足。理想的组织工程骨支架材料除了具备一定的支架结构能力,还应当具有一定的降解性能,使得骨支架降解的速度与新骨生成的速度一致。而本次实验煅烧骨材料虽然具备了良好的支架结构能力,但在降解速度方面颇显不足。实验发现煅烧骨-细胞复合物在裸鼠背部皮下4周末时就有成骨迹象,但仍未见煅烧骨降解,直到8周末时才可见煅烧骨边缘出现少量崩解的残片,提示了煅烧骨的降解速度与新生骨生成的速度不匹配,煅烧骨的降解需要更长的时间来完成。

基于上述实验分析,可以认为来源丰富、经济成本较低的煅烧骨材料具有稳定的生物安全性,可作为种子细胞的良好载体。在BALB/c裸鼠背部皮下植入试验中发

现, 4周时可有成骨迹象, 初步证实了通过煅烧骨支架材料与骨髓基质干细胞复合后形成的组织工程化骨具有一定的骨传导和诱导成骨作用, 其成骨能力明显强于单纯的煅烧骨支架材料。为应用组织工程技术修复口腔颌骨及牙槽骨缺损的研究提供了一个有意义的例证。对于煅烧骨材料降解性能的研究, 未来仍需进一步实验来证实。

致谢: 感谢导师何惠宇教授对研究方向的确立及实验过程中的细心指导, 感谢新疆医科大学第一附属医院动物实验中心姜涛主任的协助以及本课题组徐慧芬, 唐小雪, 马文渊等的大力帮助才得以顺利完成实验。

基金资助: 国家自然科学基金项目(81060088), 课题名称: 三维打印构建组织工程化牙槽骨的实验研究; 自治区自然科学基金项目(2011211A073), 课题名称: 荧光蛋白标记的组织工程骨修复颌骨缺损及其成骨能力的观测研究。新疆维吾尔自治区高校科研计划重点项目(XJEDU2009I22), 课题名称: bFGF 转染的骨髓间充质干细胞复合异种煅烧骨修复颌骨缺损的实验研究。

作者贡献: 杨川博进行实验设计、实施、资料收集、成文及结果评估, 崔杰、马文渊、杨楠和何惠宇对文章审校, 杨川博对文章负责。

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。

伦理要求: 对动物处置符合新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会的动物伦理学标准, 审批号: A-20101020017。

文章概要:

文章要点: 煅烧骨作为组织工程骨支架材料的可行性; 煅烧骨与种子细胞的生物相容性; 煅烧骨的降解能力。

关键信息: 煅烧骨的制作过程; 骨髓基质细胞的培养; 组织工程骨的构建。

研究的创新之处与不足: 实验选用羊的松质骨作为煅烧骨材料, 在国内没有报道。煅烧温度为 950 °C, 与以往文献报道的不同。在材料的降解能力方面有所不足, 为课题后期研究方向。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

[1] Zhang X, Yao Y, Liu YF. Linchuang Kouqiang Yixue Zazhi. 2010; 26(5):292-294.
张渐, 姚遥, 刘迎飞. 牙周炎致骨缺损的植骨治疗[J]. 临床口腔医学杂志, 2010, 26(5):292-294.

[2] Tian ZF, Qin SJ, Wang RF, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(15):2801-2805.
田志逢, 秦书俭, 王瑞芳, 等. 骨髓间充质干细胞复合异种骨基质明胶修复大鼠桡骨缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(15):2801-2805.

[3] Feng QL, Cui FZ, Zhang W. Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao. 2002;24(2):124-128.
冯庆玲, 崔福斋, 张伟. 纳米羟基磷灰石/胶原骨修复材料[J]. 中国医学科学院报, 2002, 24(2):124-128.

[4] Yang CB, He HY. Zhongguo Shiyong Kouqiangke Zazhi. 2012;3(5):182-185.
杨川博, 何惠宇. 牙槽骨缺损修复治疗新进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2012, 3(5):182-185.

[5] Li G, Gao CY, Jin LJ. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(12):2217-2221.
李罡, 高春阳, 金莲锦. 异种脱蛋白松质骨支架与经诱导骨髓间充质干细胞的生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(12):2217-2221.

[6] Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. Biol Blood Marrow Transplant. 2005;11(5):389-398.

[7] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005; 105(4):1815-1822.

[8] Xu HF, He HY, Tang XX, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2012;16(6):958-962.
许慧芬, 何惠宇, 唐小雪, 等. 物理联合化学或化学方法处理去抗原异种松质骨支架与骨髓间充质干细胞的细胞相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2012, 16(6):958-962.

[9] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.

[10] Cui J, He HY, Urumqi: Xinjiang Yike Daxue. 2011.
崔杰, 何惠宇. 去抗原异种松质骨支架材料的制备及性能研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2011.

[11] Erdemli O, Captug O, Bilgili H, et al. In vitro and in vivo evaluation of the effects of demineralized bone matrix or calcium sulfate addition to polycaprolactone-bioglass composites. J Mater Sci Mater Med. 2010;21(1):295-308.

[12] Jhn K, Braunstein V, Furlong PI, et al. A rapid method for the generation of uniform acellular bone explants. J Orthop Surg Res. 2010;10(5):28-32.

[13] Tang XX, He HY, Xu HF. Effects of two separation methods on biological characteristics of sheep bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(49):9137-9140.

[14] Liu BY, Ma XH, Li NY. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(41):8055-8058.
刘斌钰, 马晓红, 李宁毅, 等. 煅烧骨的生物相容性及细胞相容性评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(41):8055-8058.

[15] Mastrogiacom OM, Muraglia A, Komlev V, et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. Orthod Craniofac Res. 2005;8(4):277-284.

[16] Erdemli O, Captug O, Bilgili H, et al. In vitro and in vivo evaluation of the effects of demineralized bone matrix or calcium sulfate addition to polycaprolactone-bioglass composites. J Mater Sci Mater Med. 2010;21(1): 295-308.

- [17] Jähn K, Braunstein V, Furlong PI, et al. A rapid method for the generation of uniform acellular bone explants. *J Orthop Surg Res.* 2010;10(5):28-32.
- [18] Chen LQ, Li NY, Liu BY, et al. *Shanghai Kouqiang Yixue.* 2007; 16(3):255-258.
陈立强, 李宁毅, 刘斌钰, 等. 犬脱钙骨基质复合骨髓间充质干细胞的体外培养[J]. *上海口腔医学*, 2007, 16(3):255-258
- [19] Li NY, Chen LQ, Chen T, et al. *Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi.* 2007;25(4):408-411.
李宁毅, 陈立强, 陈涛, 等. 富血小板血浆与带血管肌筋膜在组织工程骨血管化中的作用[J]. *华西口腔医学杂志*, 2007, 25(4): 408-411.
- [20] Wilson CE, Kruyt MC, de Bruijn JD, et al. A new in vivo screening model for posterior spinal bone formation: comparison of ten calcium phosphate ceramic material treatments. *Biomaterials.* 2006;27(3):302-314.
- [21] Miks AG, Temenoff JS. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electron J Biotechnol.* 2000;3(2):114-119.
- [22] Xu YH, Shi XQ, Hu YY. *Disi Junyi Daxue Xuebao.* 2002; 23(3): 223-226.
许永华, 施新猷, 胡蕴玉, 同种异体成骨细胞-煅烧骨复合物动物体内植入[J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23(3):223-226.
- [23] Zhou X, Zuo ZH, Cao YL. *Zhonghua Shoushuxue Zazhi.* 2006; 10(4):316-332.
周晓, 左朝晖, 曹谊林. 组织工程骨修复骨缺损的研究进展[J]. *中华手术学杂志*, 2006, 10(4):316-332.
- [24] Kruyt M, De Bruijn J, Rouwkema J, et al. Analysis of the dynamics of bone formation, effect of cell seeding density, and potential of allogeneic cells in cell-based bone tissue engineering in goats. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(6): 1081-1088.
- [25] van Gaalen SM, de Bruijn JD, Wilson CE, et al. Relating cell proliferation to in vivo bone formation in porous Ca/P scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92A(1):303.
- [26] Han XS, Tan YJ, Huang YL. *Shanghai Kouqiang Yixue.* 2010;12(19):641-646.
韩雪松, 谭鸾君, 黄远亮, 等. Beagle犬骨髓基质细胞复合A-PCPC裸鼠皮下成骨的实验研究[J]. *上海口腔医学*, 2010, 12(19): 641-646.
- [27] Yuan J, Wang M. *Zhongguo Kouqiang Hemian Waikie Zazhi.* 2005;3(3):207-211.
袁捷, 殷德民, 王敏, 等. 犬骨髓基质干细胞复合珊瑚羟基磷灰石皮下成骨的实验研究[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2005, 3(3): 207-211.
- [28] Liu XM, Tian ZF, Zhang XZ. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2012;16(25):4566-4570.
刘喜民, 田志逢, 张小玲, 等. 骨基质明胶/煅烧骨基质重组人工骨对骨髓间充质干细胞成骨潜能的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(25):4566-4570.
- [29] 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.



● 关于临床注册

SCI 数据库收录的外科杂志对临床试验注册的要求^③

● *Journal Of Vascular Surgery* (《血管外科学杂志》), SCI 收录杂志, ISSN: 0741-5214, 2012 年影响因子 3.153。主要发表基础及临床研究, 病例报告, 技术说明, 血管成像, 给编辑的信/ 回复, 特约稿件等类型稿件。

对临床注册的要求: 2004年, 国际医学期刊编辑委员会(ICMJE)建议将临床试验进行临床试验注册作为日后出版的一项必备条件。《血管外科学杂志》遵守国际医学期刊编

辑委员会(ICMJE)的每一项政策, 要求所有含有对照组的前瞻性临床试验药进行临床试验预注册。

此外, 杂志还要求所有商业赞助的临床试验, 包括 I 期和 II 期试验, 进行临床试验预注册。杂志不要求标准临床治疗的回顾性研究以及摘要进行临床试验注册。2007年7月1日后, 要求符合以上标准的文章必须在试验招募第一个病人之前进行临床试验注册。注册试验必须

提供北美临床试验注册中心分配的唯一研究注册号。

● *Journal of Bone and Joint*

Surgery-American Volume (《骨与关节外科学杂志-美国卷》), SCI 收录杂志, ISSN: 0021-9355, 2012年影响因子3.272。主要发表研究原著, 综述等类型稿件。

对临床注册的要求: 所有临床试验文章在提交稿件之前必须在公开的临床试验注册平台上进行临床试验注册。