

# 修复临界节段性骨缺损:组织工程骨支架形态及对种子细胞负载有效性的影响

曾宪利<sup>1</sup>, 杨春露<sup>2</sup> (1沈阳医学院附属中心医院, 辽宁省手外科组织工程实验室, 辽宁省沈阳市 110024; <sup>2</sup>武警辽宁省总队医院骨科, 辽宁省沈阳市 110034)

## 文章亮点:

- 1 此问题的已知信息: 目前针对接种种子细胞有效程度或种子细胞数量和活性的检测多是通过间接方法来佐证。
- 2 文章增加的新信息: 种子细胞在支架表面的有效负载是解决工程骨修复大段骨缺损问题的一种思路, 支架本身越薄越有利于材料在体内的吸收, 适宜细胞负载的支架形状可能是重要的保障。
- 3 临床应用的意义: 文章论述了大段工程骨的形态、形状适宜种子细胞的有效负载, 并能保持细胞的生物活性, 对修复大段骨缺损必定会提供理论支撑。

## 关键词:

组织构建; 骨组织工程; 骨缺损; 人工骨构建; 支架; 形态; 种子细胞; 接种; 数量

## 主题词:

组织工程; 生物力学; 支架; 生物形态

## 基金资助:

辽宁省手外科组织工程实验室建设项目(201104523); 辽宁省科技厅自然科学基金(201102217); 沈阳医学院优秀人才基金(20081024)

## 摘要

**背景:** 针对修复临界节段性骨缺损组织工程骨仍处在研究阶段, 理想的构建方法较少。

**目的:** 回顾分析骨组织工程支架材料、构建形态以及对种子细胞负载影响的基础与应用研究, 以寻求适合种子细胞能够大量有效负载于特殊形态的工程骨支架, 可能为修复节段性骨缺损的骨组织工程研究提供一个新思路。

**方法:** 由第一作者检索 1994 至 2013 年 PubMed 数据库以及万方数据库相关组织工程人工骨构建方法研究的文献, 并进行系统整理、总结和分析。

**结果与结论:** 共检索到文献 379 篇, 其中中文文献 161 篇, 英文文献 218 篇, 按照纳入和排除标准进行筛选, 共纳入 53 篇。通过认真阅读及分析, 结果表明: 临界节段性骨缺损重建所需要的骨组织工程支架体积较大, 需要负载的种子细胞数量巨大, 如果没有适宜的供细胞附着的形态和形状, 就达不到有活性植入物的要求, 所植入材料无疑类似单纯人工骨, 不能起到组织工程骨的作用。能够使种子细胞有效负载于工程骨支架材料上并保持活性是用于临床的第一步, 所以负载有生物活性种子细胞数量的多少将是成功与否的重要保障。针对接种种子细胞有效程度或种子细胞数量和活性的检测多是通过间接方法佐证接种的有效性。有些培养种子细胞和接种的模式虽然可以保障接种的细胞数量, 但接种后真正负载在支架上细胞的具体数量未知, 其活性未检测。将工程骨支架制成特殊形状、形态便于种子细胞的有效接种和增殖, 保持一定的生物力学性能, 诱导成骨的发生, 并通过简便、直接的方法检测负载于支架材料上种子细胞的数量和活性是十分重要的。

曾宪利, 杨春露. 修复临界节段性骨缺损: 组织工程骨支架形态及对种子细胞负载有效性的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(29):4717-4723.

## Repairing critical-size segmental defects: morphology of tissue engineering bone scaffolds and its effects on cell loading

Zeng Xian-li<sup>1</sup>, Yang Chun-lu<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Tissue Engineering Laboratory of Hand Surgery of Liaoning Province, Center Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Department of Orthopedics, General Hospital of Armed Police Corps in Liaoning Province, Shenyang 110034, Liaoning Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Tissue engineering bone application for repairing critical-size segmental defects is still in research stage. The ideal construction methods have not yet been found.

**OBJECTIVE:** To review the research literatures on tissue engineering bone scaffold material, its shape and effect on the loading of seeding cells, seek appropriate engineered bone scaffolds which are capable of loading a large number of cells effectively and probably, and provide a new way of repairing segmental bone defects.

**METHODS:** The first author performed a data retrieval of PubMed and Wanfang databases from 1994 to 2013, to search the articles addressing the construction method of tissue engineering bone scaffold, and reviewed the literatures systematically.

**RESULTS AND CONCLUSION:** A total of 379 references were retrieved, including 161 articles in Chinese and

曾宪利, 男, 1967 年生, 辽宁省本溪市人, 汉族, 2007 年南方医科大学毕业, 博士, 主任医师, 副教授, 主要从事组织工程骨的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.29.022  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318  
文献标识码:A  
文章编号:2095-4344  
(2014)29-04717-07  
稿件接受: 2014-04-16

Zeng Xian-li, M.D., Chief physician, Associate professor, Tissue Engineering Laboratory of Hand Surgery of Liaoning Province, Center Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China

Accepted: 2014-04-16

218 articles in English. According to the inclusion and exclusion criteria, 53 articles were finally involved in the analysis. The analysis results indicated that, the needed volume of bone tissue engineering scaffolds for critical-sized section bone defect reconstruction is big, which needs to load a huge number of seed cells. If there is no suitable forms and shapes for cell adhesion, the property of so-called engineered bone is similar to pure artificial bone implants. The effective load of seed cells on engineering bone scaffold material and keeping the activity is the first step in clinical practice, as well as the important guarantee for loading bioactive seed cells. Hence, a more simple and accurate detection method for loading cell quantity is needed. Looking into the retrieved content, effective load cell quantity and its bioactivity are detected by indirect methods, supporting the effectiveness of cell seeding. Some methods can guarantee the cell quantity and seeding pattern, the real load is unknown as well as the activity. Fabricating engineering bone scaffold into special form and shape are easy to effective seeding, proliferation and maintaining the biomechanical performance, inducing osteogenesis, and finally detecting the load cell quantity and activity on the scaffold through the simple and direct method.

**Subject headings:** tissue engineering; biomechanics; stents; organism forms

**Funding:** a grant from Tissue Engineering Laboratory of Hand Surgery of Liaoning Province, No. 201104523; Natural Science and Technology Fund of Liaoning Province, No. 201102217; Excellent Talents Fund of Shenyang Medical College, No. 20081024

Zeng XL, Yang CL. Repairing critical-size segmental defects: morphology of tissue engineering bone scaffolds and its effects on cell loading. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(29):4717-4723.

## 0 引言 Introduction

骨缺损是临床常见疾病, 尤其是临界节段性骨缺损, 其难治性亟待解决, 由于结构上相对单一, 使得骨组织工程的研究进展得到广泛关注, 力求有所突破<sup>[1]</sup>。在解决瓶颈问题的探索中, 既往的研究多集中在工程骨支架材料的选用以及材料形态的构建上, 针对种子细胞能否大量有效接种于支架上的研究较少。设计出不仅具有骨的生物性能而且适合大量细胞负载和保持细胞活性的骨支架材料可能成为骨组织工程研究的一个突破口。

文章目的在于总结并讨论特殊形态和形状的工程骨支架对负载种子细胞数量和活性的影响。

## 1 资料和方法 Data and methods

**1.1 资料来源** 由第一作者检索1994至2013年PubMed数据库以及万方数据库, 英文检索词为“scaffold, shape, seed, critical-size, defect”, 中文检索词为“骨组织工程, 形状, 接种, 骨缺损”。

**1.2 入选标准** ①具有原创性, 论点论据可靠的构建一定形状组织工程骨支架修复骨缺损进展类文章。②观点明确, 分析用于修复临界节段性骨缺损组织工程骨支架的构建方法类文章。③文献主题内容与种子细胞负载后其有效性检测联系紧密的文章。

**1.3 文献质量评估** 共检索到相关文献379篇, 其中中文文献161篇, 英文文献218篇, 按入选标准筛选, 并排除非组织工程骨的研究、非临界节段性骨缺损的研究和重复研究, 最终共纳入53篇文献<sup>[1-53]</sup>。纳入的文献包括组织工程骨形态和形状的构建、种子细胞的接种、细胞接种后效果的评价等内容。

**1.4 数据的提取** 研究内容由2人独立提取并通过讨论解决分歧。记录侧重与工程骨形态、形状的构建以及对种子细胞接种有效性评价方面相关的信息。

## 2 文献证据综合提炼 Comprehensive evaluation of literatures

**2.1 纳入资料基本概况** 纳入的文献包括证实接种于大段骨缺损骨支架材料上的种子细胞有效程度的文章10篇<sup>[1-10]</sup>, 探讨种子细胞体外接种于工程骨支架不同模式下结果的文章5篇<sup>[11-15]</sup>, 探讨适宜有活性种子细胞负载的支架材料构建及制作方法的35篇<sup>[16-50]</sup>, 说明细胞接种表现的文章3篇<sup>[51-53]</sup>。以此为依据对用于修复临界节段性骨缺损工程骨支架形态、形状对细胞接种有效性的影响进行了归纳和总结。

### 2.2 纳入资料的研究结果特征

**2.2.1 接种于骨支架材料上的种子细胞有效程度的证实** 临界节段性骨缺损的重建一直是临床面临的挑战, 需要多次手术来恢复受损区的结构与功能, 为了克服这一缺陷, 使用生物可降解的骨组织工程支架将提供适宜的治疗途径。骨组织工程是构建具有生物活性的修复骨缺损的植入物, 而保持这种生物活性的主要成分是种子细胞, 其能够达到有效数量将是发挥预想成骨的关键所在。如果支架材料所负载的细胞数量很少, 达不到发挥正常生理作用, 所植入材料无疑类似单纯人工骨的作用。能够使种子细胞有效负载于工程骨支架材料上并保持活性是用于临床治疗的第一步, 所负载有生物活性种子细胞数量的多少将是成功与否的重要保障。由此, 这就要求负载种子细胞数量的检测手段更要简便、准确和科学。

目前针对接种种子细胞有效程度或种子细胞数量和活性的检测多是通过间接方法来佐证。李涛等<sup>[2]</sup>将成骨诱导细胞与血管内皮细胞按比例接种于5 mm×5 mm×3 mm珊瑚羟基磷灰石上, 通过检测实验组与对照组碱性磷酸酶、骨钙素含量以及新生骨的成熟程度来说明种子细胞负载于支架的有效程度。朱肖奇等<sup>[3]</sup>将成骨诱导的骨髓间充质干细胞接种于经骨脱钙处理后的20 mm×5 mm×

5 mm大小同种异体骨块上, 然后植入动物骨缺损处, 通过I型胶原、碱性磷酸酶含量及新骨形成等情况阐述处理结果。贾伟佳等<sup>[4]</sup>使用微量移液器均匀接种种子细胞于10 mm×3 mm×3 mm生物活性玻璃支架上, 后植入动物骨缺损处, 通过成骨情况的评价说明种子细胞与支架的相互作用。程晓兵等<sup>[5]</sup>将来源于实验动物四肢长骨的骨髓基质细胞接种于多孔 $\beta$ -磷酸三钙圆盘状支架(直径15 mm, 厚约1.5 mm)材料上。通过扫描电镜观察材料上细胞生长情况, 通过紫外线490 nm波长吸光值及碱性磷酸酶检测观察细胞增殖情况及活性。隋杰等<sup>[6]</sup>将人脐带间充质干细胞滴加于10 mm×5 mm多孔聚乳酸支架上, 植入动物肌肉内, 通过检测观察成骨情况, 推断接种的有效程度。王明海等<sup>[7]</sup>将种子细胞接种于用可注射纳米相羟基磷灰石胶原复合材料制成片层状白色固体材料上, 共同培养。通过MTT法及碱性磷酸酶活性检测观察细胞增殖及活性。徐卫袁等<sup>[8]</sup>将骨髓间充质干细胞悬液按一定密度接种于由多孔丝素蛋白修剪成的载牛骨形态发生蛋白的20 mm×10 mm×5 mm长方体支架上, 植于L<sub>5-6</sub>棘突间, 通过影像学、组织学检测到的成骨情况说明工程骨的有效程度。上述实验基本上都是通过扫描电镜、影像学、组织学以及骨钙素和碱性磷酸酶的检查等方法所得到的结果间接说明种子细胞负载于支架上的有效程度, 方法并不直接, 没有证实接种于支架材料上的种子细胞具体数量, 而且没有说明采用何种办法能使接种的细胞有效地留在支架上而不流失。

有些培养种子细胞和接种的模式可以保障接种的细胞数量。张蓉等<sup>[9]</sup>取四肢长骨干骺端剪碎冲洗之细胞为种子细胞, 经传代培养直至培养皿底形成半透明乳白色薄膜样物。用此膜包裹长30 mm、外径5 mm、内径2 mm的管状珊瑚支架体外构建工程骨。通过染色可见细胞能够移行至材料表面并保持活性。文中没有对种子细胞为何种细胞进行定性, 最终有多少细胞处于具有生物活性状态并不知晓, 而且此种种子细胞的提取方式在实际应用中受到极大的限制。姚超等<sup>[10]</sup>将骨髓基质干细胞成骨诱导后培养成膜片复合到聚乳酸3 cm×1 cm×1 cm长方体支架表面, 植入骨缺损处, 通过组织学检测观察成骨情况。但接种细胞具体数量未知, 其活性未检测。

### 2.2.2 种子细胞体外接种于工程骨支架不同模式下结果的探讨

如何使种子细胞高效接种于支架材料并实现快速增殖是组织工程骨体外研究的关键环节。目前常用的接种方式是静态接种培养、持续负压吸引、旋转式培养、灌注培养等。其中静态培养方法应用历史最久, 应用范围最广, 简单、经济, 对培养环境及设备要求较低, 适于绝大多数细胞的体外培养, 尤其是对大尺寸工程骨支架。但静态培养、持续负压培养系统存在着营养物质分布不均匀、培养细胞数量有限等缺点, 旋转式培养不适于较大的支架材料, 灌注培养虽然避免了上述不利之处, 但就接种于支

架上的有效细胞数量仍在探索中。李洪鹏等<sup>[11]</sup>认为由于重力及营养供应的因素, 对细胞支架复合物进行静止性三维培养的过程中, 发现细胞多聚集到支架材料的底部和表面, 材料内部黏附的细胞数量很少。

生理状态下骨骼组织在应力负荷作用下产生形变, 推动组织间隙液在骨陷窝及骨小管这个网络系统内流动。这种间隙液的流动对于骨骼组织营养物质的转运及代谢产物的排出具有重要意义。这种间隙液的流动也产生了对骨骼细胞的流体剪切力, 此剪切力是骨骼细胞感受的主要应力刺激, 对于刺激骨骼细胞增殖、分化及维持正常生理功能具有重要作用。由此, 动力性培养相对于静态培养在维持骨组织工程中种子细胞正常功能的发挥方面具有理论优势。通过实验发现在早期(第8天)灌注培养促进了支架材料内细胞的增殖, 而第16天, 实验组和对照组的细胞数无显著差别, 但其钙盐的沉积却大大增加。认为大量基质的沉积将支架的孔隙堵塞后影响了营养物质的传输, 从而影响了细胞的增殖。另外, 动力性三维培养可以促进种子细胞在支架材料中的均匀分布。王林等<sup>[12]</sup>利用自行研发的光固化快速成型间接制造方法设计并制备可控管道结构支架。为端面直径14.5 mm, 长11.2, 内部管道直径300-500  $\mu$ m圆柱状支架, 将其夹固在旋转式生物反应器培养容器内, 旋转培养, 与静态接种组对照。通过MTT法检测两组细胞增殖情况, 结果显示实验组优于对照组。但该吸光度值可反映支架材料对负载细胞的毒性, 并不能直接说明两组所负载细胞数量上的差异。Schliephake等<sup>[13]</sup>利用碳酸钙矿化胶原支架接种人松质骨细胞, 静态和动态培养14 d, 植入裸鼠臀肌中6周, 通过组织学检测和骨钙素、血管内皮生长因子表达检测证实成骨量明显高于对照组, 但静态和动态培养两组之间无差异, 均无成骨迹象。骨钙蛋白表达上有差异, 血管内皮细胞生长因子表达无差异。Gardel等<sup>[14]</sup>认为组织工程与再生医学对于新骨再生的策略包括自体 and 异体间充质干细胞与三维支架材料的复合, 在体外合适培养环境下制成组织替代物。这种方法对于目前所使用的自体或异体骨移植面临的限制和风险十分重要。

然而, 在三维支架上培养的骨原细胞面临很多瓶颈问题, 比如, 营养和氧的有效转运和代谢物的排除。灌注生物发生器能够提供动力环境, 对营养成分的供给和废物的排除大有帮助。然而, 决定是否作为组织替代物取决于生物相容性、稳定性和安全性, 需要得到体内、体外实验证实。体外实验结果不能推断体内情况, 因此在应用于临床前往往需要进行动物实验。Cheng等<sup>[15]</sup>通过对比在壳聚糖/ $\beta$ 磷酸三钙支架材料上采用双面、单面和符合I型胶原单面三种接种兔骨髓间充质干细胞的方法, 发现双面接种方法提高了种子细胞体外的数量和分布, 增加体内骨形成的质量和速度。

目前, 对于采用何种接种方式其有效程度不一, 只有

找到最适宜的方法才能最终解决组织工程骨生物活力问题。

**2.2.3 有活性种子细胞负载的支架材料构建及制作方法** 组织工程骨支架材料形状、构建模式根据不同需要差别很大, 承重部位的材料对于支架材料的强度、载荷能力要求较高。长管状骨(股骨、胫骨)的工程骨材料常被制成圆柱状或圆筒形, 从而既能够负载种子细胞, 同时又能够具有足够的机械强度; 而非承重部位的骨缺损如某些骨肿瘤瘤腔填塞或脊柱手术的后路融合等人工骨材料可制成颗粒状; 另外一种人工骨为可注射式材料, 通常由2种或多种有机/无机材料混合制成, 多应用于浅表性、囊性的骨缺损修复以及椎体成形、骨质疏松等疾病的治疗, 可注射式人工骨材料往往也可以与骨形态发生蛋白等生长因子复合, 以增强其成骨效应。解决临床上长段或大面积骨缺损一直是临床的一个难题, 组织工程骨的研究最有前景和希望的研究方向之一, 而理想的组织工程骨需要合适的种子细胞与最佳支架材料的完美结合<sup>[16]</sup>, 为此, 诸多研究进行了尝试。

**多孔支架孔径大小对细胞负载的影响:** 多孔支架材料用于组织工程骨研究和试验一直得到广泛认可, 其孔隙率、通孔率以及孔径大小的适宜程度越来越被重视, 并作为主要方向予以验证。虽然组织工程支架的三维多孔结构被认为是有益于促进足够的营养供应, 有利于骨生成, 但支架的孔隙往往由于骨内生而使养分供应受到限制。设计采用快速成型和凝胶注模方法构建通孔率较高的 $\beta$ -磷酸三钙工程骨支架, 通过控制孔隙率构建预想的支架<sup>[17]</sup>。Jones等<sup>[18]</sup>通过对所制作的不同大小孔径的工程骨支架材料的研究发现孔径大于100  $\mu\text{m}$ 的支架成骨明显。Seitz等<sup>[19]</sup>报道了定制拥有完全互通管道三维多孔陶瓷支架的骨替物, 其部分内部通道尺寸下降至450  $\mu\text{m}$ 和厚度下降至330  $\mu\text{m}$ 。Sobral等<sup>[20]</sup>认为由于能够制作预订形状和孔隙互通结构的工程骨支架材料使得快速成型技术应用极具价值, 然而在实际应用中由于其种子细胞接种的低效性和不均匀性使得该技术应用受到很大限制, 主要是由于孔隙设计的不合理和低效接种方式。通过制作孔隙大小递减的支架增强细胞效率并控制细胞生存的空间结构, 将淀粉与聚己内酯混合, 将三维支架设计成孔隙大小呈递减模式, 潮湿条件下对支架的力学性能进行动态力学分析和传统的压缩试验, 之后进行扫描电镜检查 and 微CT断层扫描检查。将成骨样细胞接种于支架上, 研究细胞接种效能和接种的显域分布。在静态环境下细胞接种的效率比孔径均匀的支架提高一倍余, 横断面荧光图像显示细胞分布更加均匀。Roohani-Esfahani等<sup>[21]</sup>将一种合成材料(锶-锌晶石)制成85%孔隙率、500  $\mu\text{m}$ 大小孔隙、有一定抗压强度和压缩模量的陶瓷支架, 复合人骨细胞后植入兔桡骨临界缺损处, 证实材料能诱导新骨形成。从材料角度说明支架性能, 没有说明接种于支架材料上的种子细胞数量。

**支架材料表明的特殊处理对细胞负载的影响:** 对基础支架材料表面予以有利于种子细胞复合的涂层, 从一定角度对细胞的有效接种、体外增殖和材料降解裨益较大。Nair等<sup>[22]</sup>使用羟基磷灰石涂层三相陶瓷工程骨支架修复山羊股骨节段性20 mm骨缺损, 通过影像学、CT、组织学、组织形态学、扫描电镜和电感耦合等离子光谱等检测证实, 复合种子细胞的支架和裸支架组均获得成骨效果, 前者成骨量更明显、更成熟。Lickorish等<sup>[23]</sup>认为骨组织工程策略是基于多孔支架材料作为支持宿主细胞和/或提供的种子细胞内生长。应用表面涂磷酸钙矿物层的大孔聚合物, 植入动物股骨缺损处进行体内评价。发现该涂层能减少纤维组织的包裹, 生物降解性能良好。Smith等<sup>[24]</sup>模拟皮质骨形状, 使用一层很薄的镁AZ31卷成中空的圆柱形支架, 表面涂有不同数量的钙-磷, 接种骨髓间充质干细胞后植入兔尺骨临界骨缺损, 证实部分成骨。

自体 and 异体骨作为工程骨支架如能有效接种种子细胞也能获得较好的成骨效果。Li等<sup>[25]</sup>通过使用固态自由形状的构建技术, 按照所需的大小和形状制作聚己酸内酯(PCL)笼支架, 内装满取自自体成骨碎片粒子, 植入兔板层骨缺损处, 与髂骨移植对照。血清骨钙素和胶原蛋白I型交联c端肽(CTX)测定表明有活跃的骨重塑发生。植入10周后的生物力学测试表明髂骨和混合支架组可以恢复正常水平的机械性能。虽然可以避免髂骨移植手术, 但所植入的成骨碎片能否有效的获得也是一个必须面临的问题。Xie等<sup>[26]</sup>将冷藏人骨块通过理化方法脱钙、去蛋白, 接种自体骨髓间充质干细胞桥接一侧25 mm猕猴桡骨缺损, 空白人骨作为对照植入另一侧。植入后不同时间点检测成骨标记物、影像学、组织学情况以及免疫排斥情况, 证实两组成骨良好, 但工程骨组愈合时间短, 成骨量多。

**工程骨的血管化对细胞负载的影响:** 组织工程骨的血管化有利于接种的种子细胞的营养供给, 对成骨起到重要的作用。Viateau等<sup>[27]</sup>将自体间充质干细胞接种于珊瑚颗粒植入绵羊长骨临界骨缺损, 用预制血管膜包裹, 对照组植入自体骨。术后6个月, 通过影响指标和组织学指标检测, 两组成骨情况无差异。Bae等<sup>[28]</sup>选择三维聚乙内酯支架, 内部相通蜂窝多孔结构, 提供血管内生管道和成骨引导通路, 利用三相骨形态发生蛋白连续释放, 获得很好的血管再生和成骨。

**新方法构建的骨支架对细胞负载的探讨:** 3D打印技术和纳米材料应用于工程骨研究是一项较新的研究方向, 实验效果是可喜的。Warnke等<sup>[29]</sup>认为羟基磷灰石(HAP)和磷酸三钙(TCP)是两个非常常见的陶瓷材料的骨替代品。然而, 两种支架材料很难制成适合骨缺损大小的准确尺寸。一般制成块状或柱状, 不能为个人定制完美匹配的支架。使用计算机辅助3D打印技术(一种新兴的快速成型技术)将原材料羟基磷灰石和磷酸三钙粉一层一层地打印而后一起烧结。如此制作的支架具有精确的尺寸和内部孔隙

大小等特征。可以根据个体病人数据并通过计算机辅助设计(CAD)技术制作支架的外形和内部结构。将人成骨细胞作为种子细胞接种于3D打印支架上通过扫描电子显微镜和染色后荧光显微镜对细胞的生物相容性进行评估,通过检测荧光蛋白二醋酸盐、碘化丙啶和MTT对细胞活力进行评估,证实羟基磷灰石支架上的细胞比磷酸三钙支架多,羟基磷灰石支架上的细胞活性优于磷酸三钙支架。进一步提出在3D打印的支架内部整合管道以有利于血管和神经生长。Howk等<sup>[30]</sup>提出优化蛋白质和生长因子的载体,支持骨正常负载,使新骨再生。完善现有的固体自由形态支架设计,增加支架的孔隙率,维持原型设计的力度。使用计算机辅助设计软件设计,然后通过有限元分析获得理论上极限抗压强度。每个支架设计由喷墨打印快速原型制造机器将聚(丙烯酰胺)/磷酸三钙(PPF/TCP)浇铸在石蜡模具上,测试单轴压缩负荷,进行理论和实验值的极限抗压强度和强度系数的比较。结果显示部分支架增加了46%孔隙率和27%极限抗压强度。Ferreira等<sup>[31]</sup>认为自体骨移植仍然是修复复杂较大骨缺损首选。然而,移植数量的限制和供区并发症使得临床亟需骨替代物。复合骨诱导材料和三维细胞增殖的组织工程骨被推到前台。通过复合骨诱导材料二氧化钛和羟基磷灰石-明胶纳米成分大孔细胞生长支架修复颅面骨缺损,证实其成骨的潜能。Buschmann等<sup>[32]</sup>认为由于可控的物理和生物特性使得纳米材料越来越多地被制作成组织工程骨用于修复临界尺寸的骨缺损。通过基于聚乳酸和磷酸钙纳米颗粒的复合支架接种人脂肪干细胞体内体外实验证实了成骨诱导和血管化的特点。

**构建特殊形态、形状骨支架对细胞负载的影响:**通过各种技术将工程骨支架制成特殊形状、形态便于种子细胞的有效接种、增殖,保持一定的生物力学性能,诱导成骨的发生,一直是联合研究的重要目的。虽然目前还没有得到令人满意的突破性进展,但必将为解决临床难题获得可靠的依据。Harley等<sup>[33]</sup>描述了一种液相合成方法,制作多孔、分层的支架,一面模仿关节软骨的成分和结构,另一面模仿软骨下骨。这种渐进性的分层设计可以插入到软骨下骨骨缺损的地方,不需要缝合,黏合或固定,具有相通的多孔结构覆盖整个骨软骨缺损区。此外,骨和软骨成分的细微差异能使这些分层的支架具有压缩变形能力,能模拟正常关节的功能。Rumpler等<sup>[34]</sup>认为组织的形成取决于无数的细胞之间的生化信号;此外,物理参数也表现出对单细胞水平的显著影响。目前,还没有定量解释几何形状如何影响组织生长,这对于骨折愈合和组织工程的意义重大。研究表明,人工三维支架的凹槽几何特性明显影响组织成骨的增长速度。Razi等<sup>[35]</sup>结合激光烧结技术制作网格状钛移植预期成为治疗临界尺寸骨缺损替代物,支架具有高度相通的大孔隙和可调机械性能的特点,通过有限元分析网状结构组合证实该结构具有很强的载负能力,孔隙

的增多并不影响植入物内部张力。Guda等<sup>[36]</sup>将模拟皮质和松质骨双层羟基磷灰石支架材料植入修复兔桡骨缺损,通过微CT评估发现总的骨和支架体积比缺损组明显增大,但比自体骨移植组不足。其和自体骨移植组的抗弯韧性、矿物资的绝对密度以及钙磷比明显大于缺损组。Vaquette等<sup>[37]</sup>采用热致相分离结合静电纺丝技术制作三维多层复合支架,所构建支架由电纺膜构成,而且厚度不限。对静态和动态情况下的机械特性进行评估,多层复合支架仅有部分单独通过热致相分离技术构建的聚己内酯支架的压缩性能,但拉力试验证实其远胜于单独构建,突出了静电纺丝的作用。Papenburg等<sup>[38]</sup>提出制作磊叠多层多孔微通道板片三维支架,多层板片内孔有助于营养和信号物资的弥散。此外,每层所接种的细胞分布均匀,每层的数据的检查也很容易。在聚乳酸板片上接种小鼠成肌细胞前细胞培养,动态环境下体外培养每层细胞增值情况比静态环境下有优势。

合适的支架材料能够为种子细胞提供一个利于附着、增殖并发挥生物学功能的载体<sup>[39-50]</sup>,同时又能够为某些特定区域的骨缺损修复提供良好的力学支撑,为骨组织修复和重建奠定基础。

### 3 讨论 Discussion

研制理想的组织工程骨一直是解决临床上长段或大面积骨缺损等临床难题最有前景和希望的研究方向之一,而理想的组织人工骨需要合适的种子细胞与支架材料的完美结合。通过众多学者以及临床科研工作者的多年不懈努力,大家也逐步认识到,组织工程骨和其他学科的组织工程研究一样,也是一个庞大的系统工程。从种子细胞、材料选择、材料制作及构建、细胞与材料复合、细胞、材料与生长因子等促成骨因素的结合,以及组织工程骨动物体内成骨等诸多环节一直是组织工程研究者关注的热点。尤其是种子细胞能否大量有效地接种于支架材料上更是需要重点解决的研究方向。

对于长段骨缺损,组织工程骨研究所选支架多为多孔状且通孔率良好,植入体内后便于营养成分的流动供给。从理论上讲确实有一定优势,但由于工程骨的体积较大,在接种种子细胞时多采用静态接种法,种子细胞很容易穿过支架孔隙流失至培养皿底,很难有效地附着在支架表面,造成实际接种的细胞数量远远低于理论值,甚至没有,即使接种的细胞有少量附着,它的活性如何又很难得到保证。种子细胞接种数量上的不可靠将直接影响实验结果<sup>[51-53]</sup>。

工程骨支架形状的设计多是仿生的,符合骨生长生物力学要求。对于较大的三维支架接种种子细胞多采用静态接种法,但就其接种种子细胞数量和效果评价的文章很少,而种子细胞在支架上附着的数量以及活性是成骨数量和效果优劣却是一个极为重要的因素。作者对工

程骨支架形状的不同会直接影响种子细胞接种的数量及有效性进行了构想,认为种子细胞在支架表面的有效停留是解决问题的一种思路,同时支架本身越薄越有利于材料在体内的吸收。拟设计支架表面呈瓦楞状,两个最大面呈相同结构,凹槽分布均匀,当多片支架叠合在一起是,两片支架四周和相邻面间有数个较大的孔隙和凹槽相通,能起到营养通道作用,而且由于凹槽纵横交错,营养的分布比较均匀。由于周边空隙较大,相比那些多孔支架上的小孔隙比较不易堵塞。瓦楞状工程骨呈薄片状,可以根据缺损骨的形态进行适量的叠加,理论上可以保证力学上的有效强度,而且在量上也达到可控,对于材料的吸收也能起到多孔支架的效果。在今后的研究中,作者拟自制瓦楞状工程骨支架并与其它几种的不同形状支架材料进行负载细胞数量及活性等的研究对比,希望为组织工程骨的进一步研究提供新的理论依据,但对该方法的实效性还有待证实。

**作者贡献:** 文章资料收集由曾宪利和杨春露完成,成文由第一作者完成,文章责任人为曾宪利,杨春露参与审校。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理批准:** 没有与相关伦理道德冲突的内容。

**学术术语:** 临界骨缺损—将动物体内终身不能自行修复的最小骨缺损定义为临界骨缺损,其骨缺损处仅为纤维性愈合,而不能达到骨性愈合。

**作者声明:** 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] 曹谊林,高庆新.软骨、骨组织工程的现状与趋势[J].中华创伤杂志,2001,17(1):7-9.
- [2] 李涛,洪敏,唐天骊.1,25-(OH)2VitD3促进组织工程骨的血管化和骨化[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(11):2001-2005.
- [3] 朱肖奇,贺用礼,马雪峰,等.生物衍生骨与骨髓间充质干细胞复合修复兔桡骨大段缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(3):417-422.
- [4] 贾祎佳,刘强,卢向东,等.转碱性成纤维细胞生长因子基因组织工程骨修复兔骨缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(8):1365-1368.
- [5] 程晓兵,马秦,侯锐,等.三维多孔 $\beta$ -磷酸三钙支架与骨髓基质细胞构建组织工程骨的生物相容性及显微形态学观察[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(9):1640-1643.
- [6] 隋杰,李志忠,孙国栋,等.聚左旋乳酸多孔支架复合人脐带间充质干细胞的异位成骨[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(12):2120-2124.
- [7] 王明海,冯庆玲,董有海,等.可注射纳米组织工程骨的生物相容性[J].中华实验外科杂志,2009,26(3):346-348.
- [8] 徐卫袁,朱贤,孔峰,等.丝素蛋白/牛骨形态发生蛋白及骨髓间充质干细胞复合新型组织工程骨脊柱融合的生物力学实验[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(27):5201-5208.
- [9] 张蓉,郭增良,王荣耀,等.基于细胞膜片技术构建组织工程骨的实验研究[J].中国美容医学,2012,21(8):121-122.
- [10] 姚超,李宁毅,刘凤芝,等.骨髓基质干细胞片层复合聚乳酸羟基乙酸支架构建组织工程骨[J].中华医学美容美容杂志,2013,19(2):118-121.
- [11] 李洪鹏,徐建中.动力性三维培养大尺寸组织工程骨的方法学研究[J].中国临床康复,2004,8(35):8066-8067.
- [12] 王林,王臻,李祥,等.旋转式动态三维培养结合可控管道结构支架体外节段性骨的构建[J].中华医学杂志,2007,87(3):200-203.
- [13] Schliephake H, Zghoul N, Jäger V, et al. Effect of seeding technique and scaffold material on bone formation in tissue-engineered constructs. J Biomed Mater Res A. 2009; 90(2):429-437.
- [14] Gardel LS, Serra LA, Reis RL, et al. Use of perfusion bioreactors and large animal models for long bone tissue engineering. Tissue Eng Part B Rev. 2014;20(2):126-146.
- [15] Cheng G, Chen X, Li Z, et al. Comparison of three inoculation methods for bone tissue engineering. Int J Oral Maxillofac Implants. 2012;27(6):1340-1350.
- [16] Crowley C, Wong JM, Fisher DM, et al. A systematic review on preclinical and clinical studies on the use of scaffolds for bone repair in skeletal defects. Curr Stem Cell Res Ther. 2013;8(3):243-252.
- [17] Li X, Bian W, Li D, et al. Fabrication of porous beta-tricalcium phosphate with microchannel and customized geometry based on gel-casting and rapid prototyping. Proc Inst Mech Eng H. 2011;225(3):315-323.
- [18] Jones AC, Arns CH, Sheppard AP, et al. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. Biomaterials. 2007;28(15):2491-2504.
- [19] Seitz H, Rieder W, Irsen S, et al. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005;74(2):782-788.
- [20] Sobral JM, Caridade SG, Sousa RA, et al. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. Acta Biomater. 2011;7(3):1009-1018.
- [21] Roohani-Esfahani SI, Dunstan CR, et al. Unique microstructural design of ceramic scaffolds for bone regeneration under load. Acta Biomater. 2013;9(6):7014-7024.
- [22] Nair MB, Varma HK, Menon KV, et al. Tissue regeneration and repair of goat segmental femur defect with bioactive triphasic ceramic-coated hydroxyapatite scaffold. J Biomed Mater Res A. 2009;91(3):855-865.
- [23] Lickorish D, Guan L, Davies JE. A three-phase, fully resorbable, polyester/calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering: Evolution of scaffold design. Biomaterials. 2007;28(8):1495-1502.
- [24] Smith MR, Atkinson P, White D, et al. Design and assessment of a wrapped cylindrical Ca-P AZ31 Mg alloy for critical-size ulna defect repair. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012;100(1):206-216.
- [25] Li LJ, Liu N, Shi JG, et al. Osteogenic scaffolds for bone reconstruction. Biores Open Access. 2012;1(3):137-144.
- [26] Xie H, Yang F, Deng L, et al. The performance of a bone-derived scaffold material in the repair of critical bone defects in a rhesus monkey model. Biomaterials. 2007; 28(22):3314-3324.
- [27] Viateau V, Guillemain G, Bousson V, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. J Orthop Res. 2007;25(6):741-749.



- [28] Bae JH, Song HR, Kim HJ, et al. Discontinuous release of bone morphogenetic protein-2 loaded within interconnected pores of honeycomb-like polycaprolactone scaffold promotes bone healing in a large bone defect of rabbit ulna. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(19-20):2389-2397.
- [29] Warnke PH, Seitz H, Warnke F, et al. Ceramic scaffolds produced by computer-assisted 3D printing and sintering: characterization and biocompatibility investigations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;93(1):212-217.
- [30] Howk D, Chu TM. Design variables for mechanical properties of bone tissue scaffolds. *Biomed Sci Instrum*. 2006;42:278-283.
- [31] Ferreira JR, Padilla R, Urkasemsin G, et al. Titanium-enriched hydroxyapatite-gelatin scaffolds with osteogenically differentiated progenitor cell aggregates for calvaria bone regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(15-16):1803-1816.
- [32] Buschmann J, Härter L, Gao S, et al. Tissue engineered bone grafts based on biomimetic nanocomposite PLGA/amorphous calcium phosphate scaffold and human adipose-derived stem cells. *Injury*. 2012;43(10):1689-1697.
- [33] Harley BA, Lynn AK, Wissner-Gross Z, et al. Design of a multiphase osteochondral scaffold III: Fabrication of layered scaffolds with continuous interfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2010;92(3):1078-1093.
- [34] Rumpler M, Woesz A, Dunlop JW, et al. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *J R Soc Interface*. 2008;5(27):1173-1180.
- [35] Razi H, Checa S, Schaser KD, et al. Shaping scaffold structures in rapid manufacturing implants: a modeling approach toward mechano-biologically optimized configurations for large bone defect. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(7):1736-1745.
- [36] Guda T, Walker JA, Pollot BE, et al. In vivo performance of bilayer hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration in the rabbit radius. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(3):647-656.
- [37] Vaquette C, Cooper-White J. A simple method for fabricating 3-D multilayered composite scaffolds. *Acta Biomater*. 2013;9(1):4599-4608.
- [38] Papenburg BJ, Liu J, Higuera GA, et al. Development and analysis of multi-layer scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30(31):6228-6239.
- [39] Skoog SA, Nguyen AK, Kumar G, et al. Two-photon polymerization of 3-D zirconium oxide hybrid scaffolds for long-term stem cell growth. *Biointerphases*. 2014;9(2):029014.
- [40] Fan H, Hui J, Duan Z, et al. Novel scaffolds fabricated using oleuropein for bone tissue engineering. *Biomed Res Int*. 2014;2014: 652432.
- [41] Kim BR, Nguyen LT, Min YK, et al. In vitro and in vivo studies of BMP-2 loaded PCL-Gelatin-BCP electrospun scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2014.
- [42] Li D, Sun H, Jiang L, et al. Enhanced biocompatibility of PLGA nanofibers with gelatin/nano-hydroxyapatite bone biomimetics incorporation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(12):9402-9410.
- [43] Kim H, Che L, Ha Y, et al. Mechanically-reinforced electrospun composite silk fibroin nanofibers containing hydroxyapatite nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;40:324-335.
- [44] Gaharwar AK, Mukundan S, Karaca E, et al. Nanoclay-enriched poly( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun scaffolds for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2014.
- [45] Privalova A, Markvicheva E, Sevrin C, et al. Biodegradable polyester-based microcarriers with modified surface tailored for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2014.
- [46] Alizadeh A, Moztarzadeh F, Ostad SN, et al. Synthesis of calcium phosphate-zirconia scaffold and human endometrial adult stem cells for bone tissue engineering. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2014.
- [47] Shin YM, Jo SY, Park JS, et al. Synergistic Effect of Dual-Functionalized Fibrous Scaffold with BCP and RGD Containing Peptide for Improved Osteogenic Differentiation. *Macromol Biosci*. 2014.
- [48] Effects of fibrinogen concentration on fibrin glue and bone powder scaffolds in bone regeneration. Kim BS, Sung HM, You HK, et al. *J Biosci Bioeng*. 2014 .
- [49] Hou T, Li Z, Luo F, et al. A composite demineralized bone matrix--self assembling peptide scaffold for enhancing cell and growth factor activity in bone marrow. *Biomaterials*. 2014;35(22):5689-5699.
- [50] Zong C, Qian X, Tang Z, et al. Biocompatibility and bone-repairing effects: comparison between porous poly-lactic-co-glycolic acid and nano-hydroxyapatite/poly (lactic acid) scaffolds. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(6):1091-1104.
- [51] 杨春露, 陈建庭, 金大地, 等. 珍珠层水溶性提取物对人骨髓基质细胞成骨性分化的诱导作用[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2007,25(2): 190-193.
- [52] 曾宪利, 裴国献, 金丹, 等. 血管化组织工程骨修复猕猴胫骨缺损模型的建立及初步观察[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2005,7(4):353-357.
- [53] 杨春露, 赵勇, 陈建庭. 骨髓基质细胞-成骨细胞复合培养体系的建立[J]. *中国组织工程研究*, 2013,17(6):980-984.