

可注射式纳米羟基磷灰石复合支架与骨髓间充质干细胞修复兔桡骨骨缺损

薛震¹, 牛丽媛², 安刚³, 郭亚山³, 吕松岑¹(哈尔滨医科大学附属第二医院, ¹骨科四病房, ³急诊创伤病房, 黑龙江省哈尔滨市 150086; ²哈尔滨工业大学校医院, 黑龙江省哈尔滨市 150086)

文章亮点:

1 可注射性纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙复合材料是通过仿生学原理制备的一种新型植骨材料, 它克服了单一材料的缺点, 综合了3种材料的长处, 特别是加入了骨髓间充质干细胞后, 成为了名副其实的“活的”组织工程骨, 它在保持可注射性的同时提高了成骨能力和降解能力, 是一种较理想的组织工程骨。

2 实验采用纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙三维复合支架材料结合骨髓间充质干细胞修复兔桡骨骨缺损, 证实了复合支架良好的生物相容性、骨诱导性和成骨作用, 并发现其降解速度与正常骨组织再生修复速度一致。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 纳米羟基磷灰石; 壳聚糖; 半水硫酸钙; 骨髓间充质干细胞; 骨缺损

主题词:

组织工程; 羟基磷灰石类; 壳聚糖

基金资助:

黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511202)

摘要

背景: 前期实验构建的可注射性纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙三维复合支架材料具有良好的理化性质。

目的: 评估可注射性纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙复合骨髓间充质干细胞修复兔桡骨骨缺损的效果。

方法: 在18只新西兰白兔双侧桡骨中段建立长10 mm的节段性缺损, 将注射性纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙/骨髓间充质干细胞复合材料植入一侧骨缺损, 作为实验组; 另一侧植入单纯羟基磷灰石材料, 作为对照组, 于植入第4, 8, 12周末分别行大体、X射线检查与组织学观察。

结果与结论: 植入第12周末, 实验组骨缺损完全修复, 桡骨形状基本恢复到术前形态, 可见由两断端向中间有少许的骨髓腔再通, 缺损区影像与正常骨组织已无区别, 可见大量新生板层骨组织, 哈佛氏系统形成, 原缺损区被新生板层骨组织填充, 骨组织相互连续, 骨髓腔相通; 对照组骨缺损未完全愈合, 有部分骨皮质缺损, 骨密度影略低于正常骨组织, 部分骨髓腔再通, 可见少量板层样骨组织形成, 纤维组织填充。结果表明可注射式纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙人工骨复合骨髓间充质干细胞可促进骨缺损的修复。

薛震, 牛丽媛, 安刚, 郭亚山, 吕松岑. 可注射式纳米羟基磷灰石复合支架与骨髓间充质干细胞修复兔桡骨骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(3):378-383.

Repairing rabbit's radial bone defects using injectable nano-hydroxyapatite composite scaffold co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells

Xue Zhen¹, Niu Li-yuan², An Gang³, Guo Ya-shan³, Lv Song-cen¹ (¹The Fourth Ward, Department of Orthopedic Surgery, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China; ²Affiliated Hospital of Harbin Institute of Technology, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China; ³Department of Emergency Trauma, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Nano-hydroxyapatite/chitosan/calcium sulphate hemihydrate (nHA/CS/CSH) composite scaffold constructed in preliminary experiments has good physical and chemical properties.

OBJECTIVE: To explore the effects of injectable nHA/CS/CSH scaffold co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells (nHA/CS/CSH/BMSCs) for repairing rabbit's radial bone defects.

METHODS: Bone defects with the length of 10 mm were created on the middle of the bilateral radial bones of 18 New Zealand white rabbits. The defects were filled with the nHA/CS/CSH/BMSCs composite as treatment group, while the others were filled with HA as controls. The ability of repairing bone defects was evaluated by gross, X-ray and histopathological observation at 4, 8, 12 weeks after implantation.

RESULTS AND CONCLUSION: At the end of 12 weeks after implantation, in the treatment group, bone defects were completely repaired, the radial bone showed normal morphology, the bone marrow cavity was recanalized a little from both ends toward the middle, images in the defect area had no difference from normal bone tissues, a large amount of new lamellar bone tissues were visible, the Harvard's system formed, the original defects were filled with newborn lamellar bone tissues, bone tissues were interconnected, and the bone marrow

薛震, 男, 1976年生, 辽宁省兴城市人, 汉族, 2004年哈尔滨医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨组织工程方面的研究。

通讯作者: 牛丽媛, 副主任医师, 哈尔滨工业大学校医院, 黑龙江省哈尔滨市 150086

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.03.09
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)03-00378-06

稿件接受: 2014-12-16

Xue Zhen, Master, Attending physician, the Fourth Ward, Department of Orthopedic Surgery, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Niu Li-yuan, Associate chief physician, Affiliated Hospital of Harbin Institute of Technology, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Accepted: 2014-12-16

cavities was interlinked; in the control group, bone defect was repaired partly, the bone mineral density was lower than that of the normal bone tissue, the bone marrow cavities were recanalized partially, and a few of new lamellar bone tissues, accompanied with connective tissues growing into the defects. The nHA/CS/CSH/BMSCs is effective for the repair of bone defects.

Subject headings: Tissue Engineering; Hydroxyapatites; Chitosan

Funding: the Science and Technology Research Project of Heilongjiang Provincial Education Department, No. 12511202

Xue Z, Niu LY, An G, Guo YS, Lv SC. Repairing rabbit's radial bone defects using injectable nano-hydroxyapatite composite scaffold co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(3):378-383.

0 引言 Introduction

在骨科临床上因创伤、感染、肿瘤切除等原因导致的骨缺损和骨不连非常常见,也是不容易解决的问题,尤其是大段骨缺损与骨不连的修复长期困扰着骨科医生,因为其不能靠骨自我愈合来完成修复,临床上通常需要骨移植来治疗。目前临床上治疗骨缺损的方法以自体或同种异体骨移植应用较为广泛^[1-2],但是这两种方法都有一些无法避免的局限性^[3]:自体骨移植有很多缺陷,比如自体骨来源少、术中出血及术后取骨区疼痛等并发症;同种异体骨的供应相对充足,能够提供成骨的支架并具有骨诱导作用,但是同种异体骨可能传播疾病和发生免疫排斥反应,限制了其临床应用。

作为骨组织工程的种子细胞,骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)的成骨能力很强。随着研究的深入,骨髓间充质干细胞的三维培养技术取得了飞速发展。以前传统的培养模式是二维培养模式,这种方法培养的细胞分化和增殖效果不够理想。Nuttelman等^[4]比较成骨细胞在二维和三维培养体系中的优劣,发现三维培养体系中的成骨细胞增殖和分化效果优于二维培养体系。Li等^[5]比较在动态和静态三维培养体系中培养骨髓间充质干细胞的差异,发现动态三维可降解材料上的鼠骨髓间充质干细胞在增殖分化和细胞间质矿物化方面优于静态培养。近年来,三维细胞培养体系能够最大程度地发挥细胞功能,保持细胞旺盛的活性,有效分离培育需要的功能细胞,为骨髓间充质干细胞在体外培养提供了一种崭新的模式。

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)是一种常用的修复材料,它的生物相容性和免疫原性很好,而纳米级羟基磷灰石(nano-sized hydroxyapatite, n-HA)的晶体尺径与人体骨矿中无机盐的大小差不多,其骨修复效果更为理想。羟基磷灰石的体内降解时间较长且塑型性能很差,难以注射使用^[6]。传统的固态组织工程骨不能满足不规则骨缺损修复的需求,液态的细胞和生长因子难以在其中均匀分布,可注射性骨替代修复材料的研制和应用逐渐受到人们的重视并成为重要的方向^[7]。硫酸钙的历史悠久,成骨效果佳,并且在注射性和吸收性方面都令人满意。研究者把普通的硫酸钙通过半水结晶化改造成半水硫酸钙(calcium sulphate hemihydrate, CSH),使得它在力学性能和成骨

效果等方面有所提高。但半水硫酸钙的缺陷是吸收速度明显大于新骨的形成速度^[8],使其临床应用受到限制。近些年来,人们发现由半水硫酸钙与羟基磷灰石组合而成的复合材料是一个值得探索的方向。纳米羟基磷灰石/半水硫酸钙复合材料可综合两种物质的性能优势,获得协同的成骨活性,是一种理想的注射式骨修复材料,它克服了单纯硫酸钙强度不足和降解速度太快,单纯羟基磷灰石塑型性差和降解困难的缺点。另一方面,以前的人工骨材料需要在体外塑形后再植入需要的地方,这样就不能百分之百的修复骨缺损,而纳米羟基磷灰石/半水硫酸钙复合物属于可注射型骨移植替代物,可以注射植入且不需要提前塑型,可完全充填骨缺损的空间,在体内可迅速转化为具有多个微孔结构的支架材料并发挥作用。

骨基质包扩无机成分和有机成分,那么构建支架材料的人工骨也需要具备这两种基本成分。有研究发现有机材料壳聚糖的成分与糖胺多糖结构相似^[9],具有无毒、无刺激、无热原反应、无免疫原性、无致突变及致死性等特点^[10],但单一壳聚糖的缺陷是亲水性和力学性能差,降解时间不好控制。

可注射性纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙复合材料是通过仿生学原理制备的一种新型植骨材料,它克服了单一材料的缺点,综合了3种材料的长处,特别是加入了骨髓间充质干细胞后,成为了名副其实的“活的”组织工程骨,它在保持可注射性的同时提高了成骨能力和降解能力,是一种较理想的组织工程骨。本实验将可注射性纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙支架复合骨髓间充质干细胞用于兔桡骨骨缺损的修复治疗,运用影像学水平、病理组织水平等途径探讨其成骨作用及降解机制,观察其修复骨缺损的能力,为临床修复骨缺损寻找一种理想的人工骨材料提供相应的理论和实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2012年6至12月在哈尔滨医科大学附属第二医院完成。

材料: 胎牛血清和DMEM培养液购自美国HyClone公司;羟基磷灰石和半水硫酸钙由哈尔滨工业大学材料学院

提供;壳聚糖购自上海国药公司;扫描电镜购自日本Olympus公司。其余试剂及仪器均由哈尔滨医科大学第二医院实验中心提供。

实验动物:健康成年新西兰大白兔19只,雌雄不拘,体质量2.0-2.5 kg,由哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供,实验动物许可证号:SYXK(黑)2006-033。实验选用开放系统实验室,室温,自然光,相对湿度为40%左右。实验经哈尔滨医科大学实验动物伦理委员会审议批准。

实验方法:

骨髓间充质干细胞的获取与传代培养:根据文献进行细胞培养^[11],按照密度梯度离心法培养兔骨髓间充质干细胞。取1只健康成年的新西兰大白兔,体质量2.3 kg,麻醉后在无菌操作下,用16号骨穿针接10 mL注射器从胫骨结节外侧穿刺,抽取骨髓液3-5 mL,再添加300 U肝素进行抗凝。与淋巴细胞分离液混合,进行2 600 r/min、900 r/min密度梯度离心后,吸取上层细胞层800 r/min离心6 min,弃上清后加入含体积分数12%胎牛血清的DMEM培养基,接种于50 mL培养瓶内,37 °C、体积分数5%CO₂、饱和湿度条件下培养。第3天后首次半量换液,将未贴壁的细胞弃掉,以后每3-5 d全量换液1次。当细胞汇合成单层后,以0.25%胰蛋白酶消化,即得到原代骨髓间充质干细胞悬液,细胞数目大概为2×10⁵个,当细胞生长至80%融合时传代培养。取传代的第3代细胞进行后续实验。骨髓间充质干细胞表面标志的鉴定,采用免疫细胞化学方法检测CD29、CD34和CD44抗原表达。

细胞与材料复合:实验中所用壳聚糖为液态材料,纳米羟基磷灰石/半水硫酸钙复合材料为固态材料,将20 mL壳聚糖、10 g纳米羟基磷灰石/半水硫酸钙在无菌条件混匀制成纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙凝胶,环氧乙烷消毒。将第3代骨髓间充质干细胞制成细胞悬液,取5.0-6.0 mL细胞悬液与纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙凝胶振荡复合7 min,然后塑形为长10 mm、宽10 mm、高10 mm的正方体,加入适量培养基,置于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱孵育2 h备用。

动物模型的建立及处理:取新西兰大白兔18只,以20%乌拉坦(5 mL/kg)静脉麻醉,麻醉成功后将兔俯卧位,置于动物实验台上,四肢外展固定,消毒、铺巾后取双前肢正中切口,逐层切开显露桡骨,剥开骨膜,于双侧桡骨各制成10 mm节段性骨缺损,其中左前肢桡骨缺损处植入纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙/骨髓间充质干细胞复合材料,作为实验组;右前肢桡骨缺损处植入单纯羟基磷灰石材料,作为对照组,然后逐层缝合切口,均不行内外固定,术后给予青霉素 40×10⁴ U/d,肌注连续3 d。

于术后4, 8, 12周各组分别行大体标本观察、X射线检查、组织学分析及电镜检查,判断该材料治疗骨缺损的效果。

主要检测指标:

大体形态观察:术后观察动物切口有无异常,术后4,

8, 12周分批处死6只兔,取出双侧桡骨缺损部位的标本,观察其大体形态,有无骨愈合的表现。

放射线观察:术后4, 8, 12周时行X射线检查,对比双侧桡骨影像,观察骨缺损区骨痂形成情况,采用Lane-Sandhu X射线评分标准进行评分:①骨形成:无骨形成为0分,骨形成占缺损25%为1分,骨形成占缺损50%为2分,骨形成占缺损75%为3分,骨形成充满缺损区为4分。②与骨连接情况:骨折线清晰为0分,骨折线部分存在为1分,骨折线消失为2分。③骨塑型情况:未见塑型为0分,髓腔形成为2分,皮质骨塑型为4分。

组织形态学分析:术后4, 8, 12周时取兔双侧桡骨缺损部位标本,包括正常骨端0.3 cm范围,用体积分数10%甲醛固定、脱钙、脱水及石蜡包埋,然后行Massons三色法染色,光学显微镜下观察骨组织愈合情况。

扫描电镜观察:术后4, 8, 12周时取兔双侧桡骨缺损部位标本,包括正常骨端0.3 cm,用2%戊二醛预固定,CO₂临界点干燥,喷金,扫描电子显微镜观察宿主骨与材料的界面结合情况和人工骨材料的降解情况。

统计学分析:采用SPSS 11.3统计软件对所得数据进行数据分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 大体观察

实验组:术后4周时,人工骨与自体骨结合密切,正常骨组织与人工骨之间的界限清晰;术后8周时,人工骨与自体骨之间界限模糊,桡骨未完全修复到术前情况;术后12周时,人工骨完全修复骨缺损,桡骨基本恢复到术前情况。

对照组:术后4周时,人工骨与自体骨结合较为紧密,纤维组织长入人工骨中;术后8周时,人工骨与骨组织界限较为模糊;术后12周时,桡骨缺损未完全修复,骨皮质部分缺损,其中大量纤维组织填充。

2.2 X射线检查 实验组术后4周时可见缺损区人工骨材料填充的地方有较明显的钙化影,术后8周时钙化影明显加重,术后12周时骨折端之间少许髓腔再通,骨缺损区完全修复(图1A)。

对照组术后4周时可见人工骨材料有部分小的钙化影,整体的形态模糊;术后8周时钙化影明显升高,但比正常骨组织的密度低,形态较前清晰;术后12周钙化影略低于正常骨组织,有一部分骨髓腔再通,骨缺损未完全修复(图1B)。

Lane-Sandhu X射线评分结果表明,实验组术后4, 8, 12周骨缺损愈合效果明显优于对照组($P < 0.05$),见表1。

2.3 组织学观察 实验组术后第4周时人工骨与自体骨交界处有新生的骨小梁,但骨小梁排列较为紊乱;第8周,交界处出现大量排列整齐的新生骨小梁,并出现了少量板层骨组织;第12周时,哈佛氏系统形成,出现大量新生板层骨组织,骨缺损区被新生板层骨组织替代,人工骨材料逐

渐消失, 骨髓腔再通(图2a)。

对照组第4周时纤维组织长入人工骨材料, 可见少许淋巴细胞浸润, 自体骨边缘可见少量的新生骨小梁; 8周时见新生骨小梁形成, 但未见板层骨组织出现; 12周时少量板层样骨组织形成, 纤维组织填充, 人工骨血管化、骨化进程都较实验组滞后(图2b)。

2.4 电镜观察 实验组第4周时材料与新生骨结合非常紧密, 交界面尚清晰; 8周时材料与新生骨结合紧密, 周围大量新生骨痂形成, 可见尚未吸收的材料结晶(图3A); 第12周时材料基本降解, 大量新生骨小梁排列不规则出现并连接成片(图3B)。

3 讨论 Discussion

目前临床上治疗骨缺损和骨缺损的修复, 是骨科常见的一个难题, 传统做法是以自体骨或同种异体骨移植。自体骨移植安全性高, 有良好的骨诱导性, 因而被认为是骨缺损修复的金标准^[12-13], 但采骨量有限、术后供区疼痛等制约了其普遍应用; 同种异体骨移植虽然克服了自体骨的一些缺点, 但却有引发免疫排斥反应、传播疾病的危险^[14]。早在20世纪美国就发明一种可注射性人工骨材料(MIIG), 修复了良性占位术后骨缺损, 取得了明显的临床效果^[15]。随着骨组织工程的不断进步, 研究者又发现并探索了可注射性骨修复材料的基本原理, 并且初步制作成功, 其原理是将可注射性骨修复材料与种子细胞复合后注入骨缺损部位, 以实现骨缺损的有效修复。本实验主要探讨了可注射性骨修复复合材料的可行性, 种子细胞的选择及复合材料修复骨缺损等问题。

3.1 骨修复支架材料 一种支架材料的有效性取决于它的生物相容性和生物降解性。目前组织工程技术中的骨支架材料多由一种材料制成, 缺点是只具备单相的生物学和机械特性, 所以单一材料已经不能满足这一要求, 因此复合材料的构建是目前的研究方向。

前期实验发现, 羟基磷灰石的优点是生物相容性良好、免疫原性低和成骨活性佳, 但其缺点是塑型性能较差、体内降解较慢^[6]。普通微米级的羟基磷灰石存在不少缺陷, 实验应用的是纳米级羟基磷灰石, 其晶体尺寸与天然骨结构接近, 具有更好的理化及生物学性能, 基于纳米晶体独特的表、界面效应, 期望获得更佳的治疗效果。

医用半水硫酸钙是由高纯度基础物质用特殊工艺制造的, 是一种良好的骨引导材料, 可以注射使用, 晶体结构的大小和形状稳定均一, 但它的缺点是降解速度过快。目前国外学者已发现将纳米羟基磷灰石与半水硫酸钙复合可改善单一羟基磷灰石材料注射性能不佳的缺点^[16]。

将纳米羟基磷灰石与半水硫酸钙复合成为一种新的人工骨材料, 通过一定的调节措施可使其吸收速度与新骨发生保持一致, 能获得全新的理化和生物学性能, 从而具有更佳的治疗效果。还有研究发现, 纳米羟基磷灰石/半水硫

酸钙降解速度已基本接近正常骨的愈合时间^[17-20]。

纳米羟基磷灰石/半水硫酸钙复合人工骨支架材料具有良好的生物相容性、可降解性及生物活性^[21], 是非常理想的组织工程骨材料。本实验中将有机质壳聚糖加入到无机质纳米羟基磷灰石/半水硫酸钙中后, 纳米羟基磷灰石/半水硫酸钙分散在壳聚糖形成的多孔网状结构中, 且具有一定的生物力学强度, 从而模仿制作出天然骨质结构的人工骨, 并且是一种新型有机/无机复合的可注射性骨修复材料。它在保持可注射性的同时, 提高了成骨能力和降解能力, 是一种较理想的组织工程骨。本实验将纳米羟基磷灰石、半水硫酸钙、壳聚糖3者巧妙地复合, 显然可以使3种材料相互补充不足, 综合3者的优点, 克服各自缺点, 使得骨缺损修复的效果达到最佳。

实验中所制备的纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙支架材料为三维立体结构, 孔径50-200 μm , 具有良好的理化性质。实验中选择兔桡骨制作长度1.0 cm的骨缺损模型, 制作了不保留骨膜的全段骨缺损, 排除了骨膜的成骨作用, 这使得实验模型真实可靠。实验组兔切口未出现红肿、流脓、渗液等排斥反应发生, 说明复合材料没有发生异物排斥反应, 具有良好的生物相容性。在X射线检查中实验组人工骨钙化影逐渐加深, 形态逐渐变得规则, 边缘逐渐变得清晰; 到12周时已与正常骨组织影像学基本一样, 说明复合材料具有良好的成骨作用。而对照组中相应时间点钙化影明显低于实验组, 成骨性能较差。这可能是因为在实验组加入骨髓间充质干细胞后, 为诱导成骨提供了大量的细胞因子。

在组织学检测中, 在12周时实验组人工骨材料基本降解, 骨小梁的数量明显多于对照组, 新生板层骨组织也很多。而对照组中在12周时骨小梁和新生板层骨组织很少, 新生板层骨组织和哈佛氏系统骨组织等典型的骨组织基本结构很少, 并且残留很多羟基磷灰石, 说明单一羟基磷灰石材料的降解速度较慢, 成骨效果不如复合材料。电镜发现在第8周时纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙/骨髓间充质干细胞材料与新生骨结合紧密, 周围大量新生骨痂形成, 第12周时材料基本降解, 大量新生骨小梁连接成片, 说明材料的降解和骨修复的进行是基本同步的。

3.2 种子细胞的选择 要构建细胞-支架复合体, 首先必须考虑种子细胞的选择问题^[22-23]。目前对理想种子细胞的要求有以下几点: ①来源广泛, 培养方便。②体外培养具有良好的增殖能力。③具有定向分化的能力。1988年Maniopoulos等^[24]首次报道了骨髓来源间充质干细胞在体外可形成钙化的骨样组织, 证实了骨髓间充质干细胞在体外可以成骨。研究者对不同来源间充质干细胞进行研究, 发现骨髓间充质干细胞的增殖分化能力最强^[25]。骨髓间充质干细胞具备多向分化潜能, 增殖能力快速, 可定向分化成软骨细胞和骨细胞^[26-27], 临床应用前景十分广阔, 因此在本实验中被作为种子细胞。

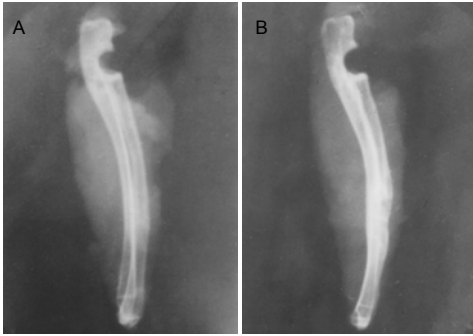


图1 实验组对照组术后12周X射线检查

Figure 1 X-ray examination in the treatment and control groups at 12 weeks after implantation

图注: 图中A为实验组, B为对照组。实验组骨缺损已修复, 对照组骨缺损为不完全修复。

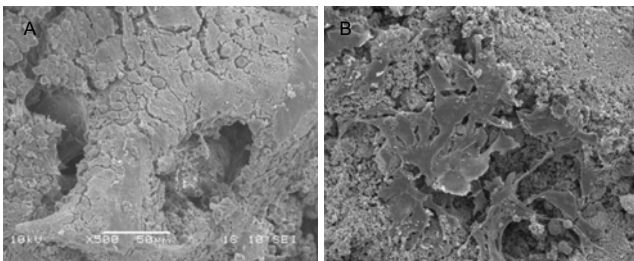


图3 扫描电镜观察实验组术后12周人工骨与宿主骨的界面键合($\times 500$)
Figure 3 The bonding between the nHA/CS/CSH/BMSCs and host bone tissues at 12 weeks after implantation under scanning electron microscope ($\times 500$)

图注: 由图A可见, 宿主骨与纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙/骨髓间充质干细胞材料结合紧密, 可见尚未吸收的纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙材料结晶; 由图B可见, 纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙/骨髓间充质干细胞材料基本降解, 大量新生骨小梁排列不规则出现。

本实验中联合应用密度梯度离心法及贴壁筛选法分离和培养细胞, 去除了骨髓中的大量脂肪组织和红细胞, 再通过单层细胞培养, 剔除了白细胞和其他悬浮细胞, 使获得的骨髓间充质干细胞尽可能为同源细胞, 提高了细胞纯度。

3.3 骨缺损修复作用的实现 纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙/骨髓间充质干细胞复合材料具备了良好的骨传导活性、成骨活性及骨诱导作用, 同时在其修复骨缺损过程中其降解时间基本与新生骨的形成时间相匹配。

本实验表明可注射性纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙/骨髓间充质干细胞复合材料对骨缺损的修复作用主要是通过以下几方面实现的: ①良好的成骨作用。纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙/骨髓间充质干细胞复合材料降解释放出的钙离子和磷酸根离子, 在骨缺损区域内创造了有利于成骨的微环境, 释放出的钙离子可以参与骨基质的矿化, 加速基质的矿化, 更有利于促进新骨的形成。复合材料中包含的骨髓间充质干细胞能分泌多种的成骨因子, 从而进一步促进了成骨细胞的生长、分化和增殖。②良好的骨传导作用。本实验所用的可注射纳米羟基磷灰石/

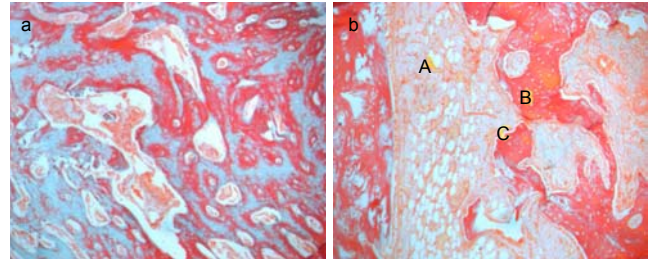


图2 实验组与对照组术后12周时组织学观察结果(Masson's三色染色, $\times 400$)

Figure 2 Histological observation of the treatment and control groups at 12 weeks after implantation (Masson's trichrome staining, $\times 400$)

图注: 图中a为实验组, 材料降解, 原缺损区被新生板层骨组织填充; b为对照组, 少量板层样骨组织形成, 纤维组织填充, 人工骨血管化、骨化进程都较实验组滞后。A指示残留的材料, B指示新生骨, C指示边界区域。

表1 实验组与对照组 Lane-SandhuX射线评分评估骨形成及塑形情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 X-ray evaluation of bone formation and molding conditions in Lane-Sandhu way

组别	术后4周	术后8周	术后12周
实验组	4.150 \pm 0.621	8.040 \pm 0.778	10.250 \pm 0.966
对照组	2.890 \pm 0.663	5.770 \pm 0.844	8.770 \pm 0.977
P	< 0.05	< 0.05	< 0.05

壳聚糖/半水硫酸钙/骨髓间充质干细胞复合材料具有与天然松质骨类似的三维微孔网络结构, 孔径范围达50–200 μm , 孔隙率达80%左右。实验4周时, 实验发现已有新生骨小梁长入材料中, 材料内有大量新生血管组织生成, 说明纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙复合材料在骨修复过程中为宿主骨长入提供了支架, 不仅使成骨细胞的长入成为可能, 同时也有利于骨组织中新生血管形成, 进一步促进了成骨细胞的生长和分化成熟。③良好的骨诱导作用。研究表明纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙复合材料不但可为复合的骨髓间充质干细胞起到良好的支架作用, 也能刺激宿主多功能骨髓间充质干细胞诱导分化为成骨细胞和成软骨细胞, 从而促进迅速成骨。④良好的生物相容性和可降解性。纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙/骨髓间充质干细胞复合材料植入动物体内不会产生排斥反应, 说明具有良好的生物相容性, 并且材料可以有效降解, 使组织细胞长入载体, 显示出了该材料的降解时间与新骨的形成时间一致。

通过实验发现可注射性纳米羟基磷灰石/壳聚糖/半水硫酸钙/骨髓间充质干细胞复合材料在修复兔桡骨骨缺损的过程中, 不仅具备良好的骨传导作用和骨诱导作用, 同时还具有生物相容性好、降解活性良好、制做容易、易于塑形和改造、临床可操作性能好的特点, 成功修复了兔桡骨骨缺损, 是一种理想的骨组织修复材料, 具有良好的应用前景。

作者贡献: 薛震进行实验设计, 实验实施为安刚, 实验评估为郭亚山, 资料收集为牛丽媛, 薛震成文, 吕松岑审校, 薛震对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合相关动物伦理学标准条例, 实验经哈尔滨医科大学实验动物伦理委员会审议批准。

学术术语: 羟基磷灰石-又称羟磷灰石, 碱式磷酸钙, 是钙磷灰石的自然矿物化, 它是由两部分组成的: 羟基与磷灰石。OH-基能被氟化物、氯化物和碳酸根离子代替, 生成氟基磷灰石或氯基磷灰石, 其中的钙离子可以被多种金属离子通过发生离子交换反应代替, 形成对应金属离子的M磷灰石(M代表取代钙离子的金属离子)。羟基磷灰石是脊椎动物骨骼和牙齿的主要无机组成成分, 人的牙釉质中羟基磷灰石的含量约96%, 骨头中也约占到69%。羟基磷灰石具有优良的生物相容性和生物活性, 并可作为一种骨骼或牙齿的诱导因子, 在口腔保健领域中对牙齿具有较好的再矿化、脱敏及美白作用。

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] Nandi SK, Kundu B, Ghosh SK, et al. Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat. *J Vet Sci*. 2007; 9(2): 183-191.
- [2] Yuan J, Cui L, Zhang WJ, et al. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β -tricalcium phosphate. *Biomaterial*. 2007; 28(6): 1005-1013.
- [3] Nishida J, Shimamura T. Methods of reconstruction for bone defects after tumor excision: a review of alternatives. *Med Sci Monit*. 2008; 14 (8): 107-113.
- [4] Nuttelman CR, Tripodi MC, Anseth KS. In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells photoencapsulated in PEG hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 68(4): 773-782.
- [5] Li X, Li D, Wang L, et al. Development of rotating perfusion bioreactor system and application for bone tissue engineering. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2007; 24(1): 66-70.
- [6] Walsh WR, Chapman-Shath PJ, Cain S, et al. A resorbable porous ceramic composite bone graft substitute in a rabbit metaphyseal defect model. *J Orthop Res*. 2003; 21: 655-661.
- [7] Gauthier O, Biox D, Grimandi G, et al. A new injectable calcium phosphate biomaterial for immediate bone filling of extraction sockets. *J Periodontol*. 1999; 70(4): 375-383.
- [8] Kelly CM, Wilkins RM, Gitelis S, et al. The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. *Clin Orthop*. 2001; 382: 42-50.
- [9] Cabañas MV, Rodríguez-Lorenzo LM, Vallet-Regí M. Setting behavior and in vitro bioactivity of hydroxyapatite/calcium sulfate cements. *Chem Mater*. 2002; 14: 3550-3555.
- [10] Shigeru S, Tomihisa K, Tomoyuki S. Osteogenic response of rabbit tibia to hydroxyapatite particle-Plaster of Paris mixture. *Biomaterials*. 1998; 19: 1895-1900.
- [11] 武海军, 银和平, 李树文, 等. 密度梯度离心和贴壁筛选法分离培养兔骨髓间充质干细胞的形态学观察[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2012, 6(22): 7261-7265.
- [12] Brandoff JF, Silber JS, Vaccaro AR. Contemporary alternatives to synthetic bone grafts for spine surgery. *J Orthop Am*. 2008; 37(3): 410-414.
- [13] Maier S, Pelin I, Bulacovschi V. Study on an injectable biomimetic hydroxyapatite-atelocollagen composite. *Rev Med Chi Soc Med Nat Iasi*. 2007; 111(4): 1079-1083.
- [14] Drosse I, Volkmer E, Capanna R, et al. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury*. 2008; 39(2): 9-20.
- [15] Cynthia MK, Ross MW. Treatment of benign bone lesions with an injectable calcium sulfate based bone graft substitute. *Orthopedics*. 2004; 27(1): 119-122.
- [16] Frame JW. Ridge augmentation using solid and porous hydroxyapatite particles with and without autogenous bone or plaster. *J Oral Maxillofac Surg*. 1987; 45: 771-777.
- [17] 葛亮, 苟三怀, 杨四川, 等. 注射式复合纳米人工骨的生物相容性和降解性能的实验研究[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27(10): 1121-1126.
- [18] Dominique J, Reza S, David V, et al. Schaeffer Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomaterialia*. 2006; 2(3): 313-320.
- [19] Wang A, Ao Q, Cao W, et al. Porous chitosan tubular scaffolds with knitted outer wall and controllable inner structure for nerve tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 79(1): 36-46.
- [20] Manjubala I, Scheler S, BSSERT J, et al. Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique. *Acta Biomater*. 2006; 2(1): 75-84.
- [21] 张民, 王建生, 卫小春, 等. 不同配方可注射性羟基磷灰石E硫酸钙骨替代材料的性能分析[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(10): 69-71.
- [22] Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2014; 100(1 Suppl): S107-112.
- [23] Tobita M, Mizuno H. Adipose-derived stem cells and periodontal tissue engineering. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013; 28(6): e487-493.
- [24] Maniopoulos C, Scdek J, Meleher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone of young adult rats. *Cell Tissue Res*. 1988; 254(2): 317-330.
- [25] 杨志明, 余希杰, 解慧琪, 等. 不同来源成骨细胞生物特性的比较研究[J]. *中华创伤杂志*, 2001, 17(1): 10-13.
- [26] 尹战海, 韩建, 刘森, 等. 骨髓间充质干细胞复合骨基质明胶构建组织工程化软骨[J]. *中华骨科杂志*, 2005, 25(12): 170-175.
- [27] 杨强, 彭江, 卢氏璧, 等. 组织工程骨软骨复合体修复犬膝关节负重区骨软骨缺损的实验研究[J]. *中华骨科杂志*, 2009, 29(5): 480-486.