

## 壳聚糖/亚磷酸壳聚糖海绵复合人脐带间充质干细胞构建组织工程骨修复骨缺损的实验研究

吕振京,孙国栋,焦延鹏,周长忍,林永新,李志忠\*

(暨南大学附属第一医院,广州华侨医院骨科,广东 广州 510632)

**[摘要]** **目的:** 探索壳聚糖/亚磷酸壳聚糖海绵复合人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUMSCs)构建的组织工程骨植入动物骨缺损处的成骨能力。**方法:** 体外构建组织工程骨;健康新西兰大白兔构造骨缺损模型兔后随机分为 3 组,即 A:组织工程骨植入组;B:支架材料植入组;C:空白对照组,于术后 4、8、12 周取骨缺损标本,进行大体标本、影像学、组织学观察成骨情况。**结果:** 术后 12 周,3 种检测手段均发现 A 组新生骨已经完全将骨缺损填充,并有部分皮质骨将骨缺损两端连接。B 组虽有部分骨痂形成,但无连续骨质。C 组术后仅有少量骨痂形成。A 组成骨能力明显强于 B、C 组。**结论:** 本实验构建的组织工程骨能修复大段的骨缺损,具有良好的成骨能力,可以作为骨移植的替代材料。

**[关键词]** 壳聚糖/亚磷酸壳聚糖海绵;人脐带间充质干细胞;组织工程骨;骨缺损

**[中图分类号]** R329.26

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)10-1361-05

## Experimental study on repairing bone defects using tissue engineered bone of chitosan/phosphonic chitosan sponge combined with human umbilical cord mesenchymal stem cells

LÜ Zhen-jing, SUN Guo-dong, JIAO Ting-peng, ZHOU Chang-ren, LIN Yong-xin, LI Zhi-zhong\*

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of tissue engineered bone of the chitosan/phosphonic chitosan sponge combined with human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUMSCs) on repairing bone defects. **Methods:** First, The tissue engineered bone was constructed *in vitro*; Second, New Zealand rabbit model with bone defect were divided into groups A, B, and C. The complex sponge was implanted into bone defects in group A; cell scaffold composites were implanted in group B; and group C was as control. The defective bone specimen was collected at 4th, 8th, 12th week after implantation surgery. The gross and histological changes and the imaging of bone specimen were observed. **Results:** After 12 weeks, new bone have completely filled the bone defects in group A. Moreover, bone stump have been connected by some cortical bone. While part of porosis can be found in group B, but no continuous sclerotin was observed. Only little porosis can be found in group C. **Conclusion:** The tissue engineered bone by combining the HUMSCs with chitosan/phosphonic chitosan sponge has the potential of osteogenic ability in rabbit, and can become material substitution for bone transplantation.

**[Key words]** chitosan/phosphonic chitosan; HUMSCs; tissue engineered bone; bone defect

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(10): 1361-1365]

长期以来骨缺损的治疗问题成为骨科界在临床上常见并难以解决的课题。近年迅速发展的组织工程学为骨缺损的治疗提供了一个新的突破<sup>[1]</sup>。

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年科学基金资助(50903039); 高等学校博士学科点专项科研基金(20094401120006); 广东省卫生厅科研基金资助(A2010036); 广东省自然科学基金博士科研启动基金资助项目(9451063201002459)

\*通讯作者, E-mail: lizhizhong1@medmail.com.cn

Klokkevold 等<sup>[2]</sup>研究发现壳聚糖具有促进前成骨细胞分化,加速骨形成的作用。Manjubala 等<sup>[3]</sup>发现矿化的壳聚糖骨架为细胞的生存聚合提供了适宜的环境,表明壳聚糖生物矿化骨架在骨组织工程中是细胞接触和迁移的适宜基质。本实验采用组织工程的方法,探索以壳聚糖/亚磷酸壳聚糖海绵作为支架材料,以人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUMSCs) 作为种子细胞构

建组织工程骨,将构建的组织工程骨植入动物骨缺损处,观察其原位成骨能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康新西兰大白兔 54 只(普通级),雌雄不限,月龄 5~6 个月,体重 2.3~3.0 kg,平均 2.6 kg,由广东省动物实验中心提供。

红外光谱仪(Bruker 公司,德国);真空冷冻干燥机(上海市试剂仪器总厂);石蜡组织切片机(Leica 公司,德国);青霉素钠(华北制药有限公司);安尔碘(上海利康消毒高科技有限公司);分析纯(天津化学试剂一厂)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 组织工程骨体外构建

人脐带 MSCs 细胞培养与扩增由暨南大学医学院完成;壳聚糖/亚磷酸壳聚糖海绵复合材料由暨南大学理工学院完成。体外组织工程骨构建<sup>[4-5]</sup>:将成形材料置于 6 孔培养板上,浸于完全培养基中预湿 1 h;将第 3 代人脐带 MSCs 细胞用 0.25%胰酶消化,制成  $10^6$  个/ml 的细胞悬液。

采用沉淀法接种细胞。将 200  $\mu$ l 细胞悬液滴于材料上,将 6 孔板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中,接种 3 h 后,加成骨诱导液(100 ml/L FBS、DMEM、 $10^{-7}$  mol/L DEX、35.22 mg/L AA 和 10 mmol/L  $\beta$ -GP) 淹没整个材料。每 3 d 换液 1 次,体外培养 7 d 后用于体内实验。

#### 1.2.2 动物分组

采用兔股骨髁骨缺损模型来检测组织工程骨原位修复骨缺损的能力。采用完全随机设计的实验方法。分组情况如下:A 组:骨缺损模型组织工程骨植入组 18 只;B 组:骨缺损模型支架材料植入组 18 只;C 组:骨缺损对照组 18 只。

#### 1.2.3 手术操作

麻醉及术前准备:所有动物称重,术前肌注青霉素 40 万单位,用 3%戊巴比妥钠按 30 mg/kg 剂量耳缘静脉注射麻醉。然后取俯卧位,左下肢备皮,消毒铺巾。手术步骤:于左侧股骨远端做纵行 2 cm 切口,逐层切开,剥离股骨髁部肌肉。沿髌骨外侧切开发关节囊,向内侧脱位髌骨,屈膝显露股骨髁。在股骨髁外侧最宽大处制作 0.6 cm  $\times$  1.0 cm 的骨缺损,冲净,干纱布填塞止血。

A 组在骨缺损处植入组织工程骨;B 组植入单纯壳聚糖/亚磷酸壳聚糖支架材料;C 组不植入材料。充分止血,依次缝合深筋膜及皮肤。手术后动物

注意保暖直至麻醉苏醒。

#### 1.2.4 术前术后处理及动物饲养

实验动物均分笼喂养,术前术后 3 d 每日肌注青霉素 40 万单位,伤口用 5%碘伏消毒。术后不固定肢体,允许动物在笼内自由活动。

#### 1.2.5 标本取材时间和方法

术后分别于 4、8、12 周进行取材,每组分别取 6 只,取材前送影像科做 X 线片观察成骨情况,耳缘静脉空气栓塞致死,膝正中切口进入,横断髌韧带,切开发关节囊,上翻髌骨,暴露股骨下端,剔除股骨下端附着的软组织,于股骨髁上部横行锯断,完整取出标本,骨缺损修复情况拍照。

### 1.3 观察项目及检测指标

#### 1.3.1 术后实验动物的观察

大体外观:术后每日观察动物的精神状态、全身反应、活动和切口愈合情况;大体解剖观察:术后 4、8、12 周取材后解剖左股骨髁部,观察骨缺损处的局部骨痂形成、骨断端愈合情况。

#### 1.3.2 X 线检查

术后 4、8、12 周拍摄动物左下肢正侧位 X 线片观察成骨情况。

#### 1.3.3 标本固定即脱钙

组织标本在 4%中性缓冲多聚甲醛液固定 48 h 后,置入饱和的 EDTA-Na 溶液中脱钙,每隔 3 d 换液 1 次,定期用针刺法检查脱钙情况,发现脱钙完全后及时终止脱钙。

#### 1.3.4 HE 染色

通过乙醇逐级脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,片厚约 5  $\mu$ m,HE 染色观察。

## 2 结果

### 2.1 术中、术后动物一般情况

所有动物麻醉清醒后基本可站立,但不愿活动,精神差。术后第 1 天活动少、进食减少,兔耳无发热,大小便基本正常。术后 2、3 d 活动渐增多,进食及精神情况好。伤口无红肿、渗出等感染迹象,伤口均为 I 期愈合,缝线自行脱落。取材时关节囊愈合好,髌骨无脱位。

### 2.2 术后大体形态学观察

#### 2.2.1 术后 4 周

A 组:大体标本可见缺损由白色、半透明样组织所填充,表面稍不光整,弹性较好,周围软组织无异常反应;B 组:大体标本内可见移植植物填充在骨缺损内,材料与骨界面清晰可见,周围软组织无异常反

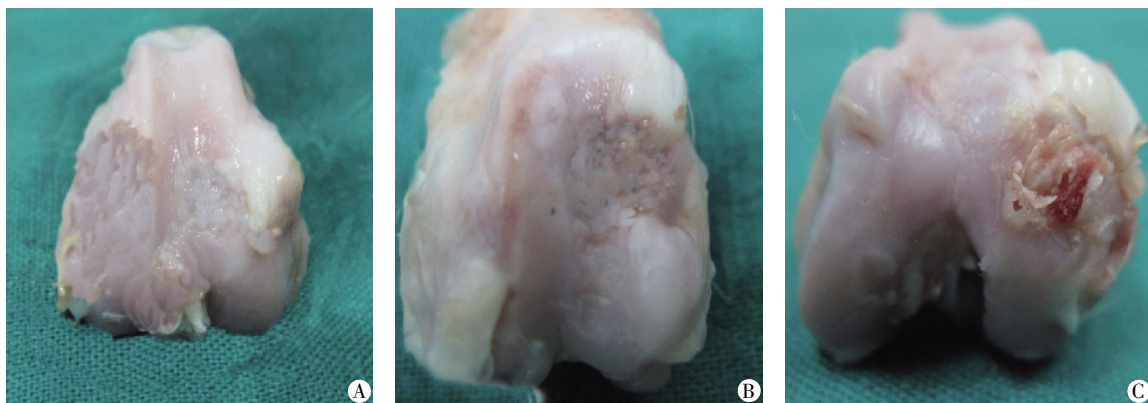
应;C 组:大体标本的缺损内凹陷,有少量肉芽爬行填充,周围软组织充血较明显。

### 2.2.2 术后 8 周

A 组:大体标本可见材料部分被降解吸收,与骨端形成紧密的纤维连接,有少量骨痂形成;B 组大体标本内可见缺损局部凹陷,大部分区域由类纤维样组织填充;C 组:大体标本内可见缺损明显,与周围组织界线清楚。

### 2.2.3 术后 12 周

A 组:大体标本可见缺损部位新骨明显增多,材料完全骨化,骨膜连接,肉眼见其形态基本与正常股骨一致,质地较硬;B 组:大体标本可见缺损部位材料与骨交界处有大量骨痂形成,但质地较正常骨组织稍差;C 组大体标本可见骨缺损部位有少量骨痂生成,但没有形成骨性连接,大部分区域仍为纤维组织充填,质地较软(图 1)。



A:组织工程骨植入组;B:支架材料植入组;C:空白对照组。

图 1 术后 12 周骨缺损处大体图

Figure 1 The gross observaiton of bone specimens at 12th week after operation

## 2.3 影像学检查

### 2.3.1 术后 4 周

A 组:手术部位有少量骨痂形成;B 组:未见明显骨痂形成;C 组:未见明显的骨痂形成。

### 2.3.2 术后 8 周

A 组:可见骨缺损内部有散在点状高密度影,有骨痂形成,但无连续骨质;B 组:可见手术部位有少量骨痂形成;C 组:未见明显的骨痂形成。

### 2.3.3 术后 12 周

A 组:可见新生骨已经完全将骨缺损填充,并可见有部分皮质骨将骨缺损两端连接;B 组:可见手术部位有部分骨痂形成,但无连续骨质;C 组:有少量骨痂形成(图 2)。

## 2.4 标本组织形态学表现

### 2.4.1 术后 4 周

A 组:由大量新生骨组织填充缺损区域,与周围骨交界处结合尚不紧密,仍可见轻微的裂隙填充材料仍然未能完全降解,部分残留于缺损区内;B 组:



A:组织工程骨植入组;B:支架材料植入组;C:空白对照组。

图 2 术后 12 周骨缺损处 X 线表现

Figure 2 The X ray irradiation results of bone specimens at 12th week after operation

支架材料周围大量多核巨大细胞,未见有骨组织形成;C组:缺损表面凹陷,缺损内填充组织细胞为梭形纤维样细胞,排列混乱,未见骨组织形成。

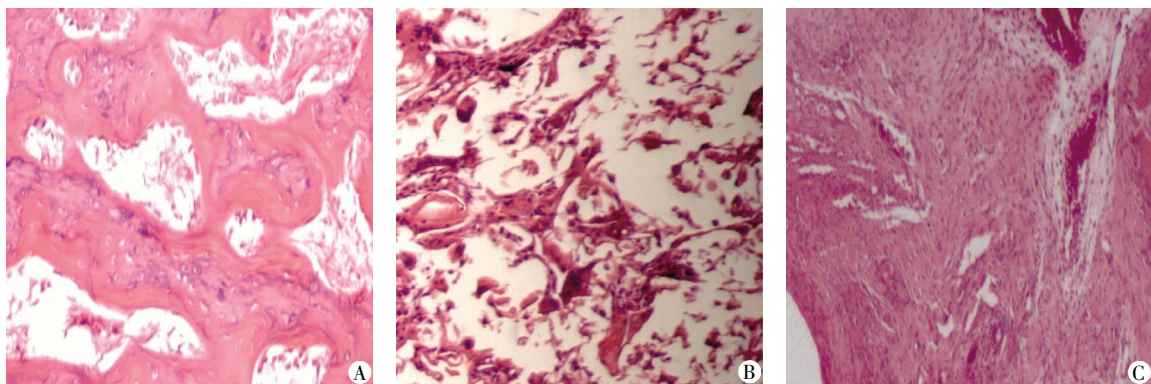
#### 2.4.2 术后8周

A组:可见缺损填充完全,与周围骨交界处结合紧密,已无裂隙可见,已形成正常的骨小梁结构,骨髓腔内原有移植材料已大部分被吸收;B组:可见缺损区存在大量填充材料,损伤界面有大量肉芽组织形成及炎细胞浸润,边缘可见少量新生骨细胞从残端沿填充材料表面向缺损区爬入;C组:见缺损表面凹陷,缺损内填充组织细胞为梭形纤维样细胞,排

列混乱,未见骨组织形成。

#### 2.4.3 术后12周

A组:可见有散在的编织骨岛形成,其中有结缔组织长入,结缔组织内可见血管,并见有散在的淋巴细胞浸润,与两侧组织无明显分界;B组:可见样品植入区为圆形空腔,高倍镜下可见部分残留的壳聚糖支架网络,未见有细胞及类骨质。材料周围有薄层的纤维组织囊包裹,其中可见新生的毛细血管长入,结缔组织中可见淋巴细胞浸润;C组见缺损表面凹陷,缺损内填充组织细胞为梭形纤维样细胞,排列混乱,未见骨组织形成(图3)。



A:组织工程骨植入组;B:支架材料植入组;C:空白对照组。

图3 术后12周骨缺损处组织学表现(HE,×40)

Figure 3 The histological observation result of bone specimens at 12th week after operation

### 3 讨论

骨缺损在骨肿瘤、创伤等疾病中较为常见,故骨缺损的修复和重建是骨科的基本问题。目前,临床上应用的骨缺损替代物包括自体骨、同种异体骨和异种骨。自体皮质松质骨是目前最好的骨移植材料,优点是不存在自体免疫排斥反应,但自体骨在获取和应用方面存在诸多不利和限制因素。比如取自体髂骨不仅需要进行额外的手术操作,而且取骨手术相关并发症的发生率可达到30%左右<sup>[6]</sup>,同时获取骨量不足也是一个明显的限制因素。同种异体/异种骨虽然能够克服自体移植骨量有限、须牺牲正常骨组织的缺点,但也存在明显的缺陷比如由于患者自身免疫组织的排斥反应,移植骨常常因被排斥而导致手术失败。骨生成能力低,被吸收率高,血管化的程度差。

随着近年组织工程的兴起和发展,人们开始用组织工程的原理和技术,形成组织工程化人工骨,满足临床上对骨移植材料的需求。利用组织工程学方法和手段修复骨缺损是一种全新的治疗模式。采用

骨组织工程技术来修复骨缺损与其他骨移植(自体骨、异体骨和异种骨移植)相比有以下优点:①不受供体来源的限制;②无抗原性或抗原性甚微;③人工材料的形状、大小可以根据实际需要进行更精确的设计与塑型;④含有成骨前体细胞,具有更优越的成骨活性,可缩短骨缺损的修复时间并使骨缺损的修复质量提高。

各种单一材料均难以完全满足骨组织工程的需要,因此需要通过合适的方法将两种或多种类型的材料组合起来,在性能上取长补短,相互结合,以得到具备更佳性能的复合支架材料<sup>[7-9]</sup>。理想的骨缺损修复材料应当同时具备骨生成性、骨诱导性和骨传导性等条件。骨生成性是指修复材料中含有能够成骨的细胞。骨传导性是指作为支架使宿主细胞长入和新骨沉积。骨诱导性是指刺激诱导具有成骨潜能的间充质干细胞分化为成骨细胞。

在组织工程研究中,支架材料是指能与组织活体细胞结合并能植入生物体的材料,它是构建了骨组织工程的最基本构架,与其附着生长的种子细胞共同构成三维空间细胞/材料复合体<sup>[10]</sup>。支架材料在



控制构建工程化组织的结构和机械性能方面发挥着重要作用,不仅起到连接和支持细胞、组织的作用,还可以影响细胞的形态、表型,控制细胞的增殖、分化,调节细胞的运动等<sup>[11-12]</sup>。壳聚糖是一种天然可降解多糖,生物相容性好,塑形容易,已广泛应用于组织工程研究<sup>[13]</sup>。HUMSCs 是一种多潜能干细胞,来源广泛、取材方便、生物性能稳定、免疫原性低,在骨组织工程领域具有广阔的应用前景。目前很多实验均证实 HUMSCs 的成骨分化。如扎拉嘎胡等<sup>[14]</sup>证实 HUMSCs 能够定向分化为成骨细胞。曲志国等<sup>[15]</sup>证实 HUMSCs 具有体外诱导成骨及体内移植修复骨缺损作用。

本实验采用壳聚糖/亚磷酸壳聚糖海绵作为支架材料与 HUMSCs 复合构建组织工程骨。通过组织学检测发现 A 组成骨能力明显强于 B、C 组,因为 A 组含有经过成骨诱导的 HUMSCs,内含活细胞是组织工程技术与传统治疗手段最根本的区别,也是该技术最大的优势所在。因此其具有良好的成骨性能。新骨形成和成骨量显著高于其他各组,而且随着新骨的形成、成熟,载体支架逐渐被分解、吸收,并由新生骨替代。同时 A 组可见纤维囊包裹和淋巴细胞浸润,说明机体对植入外来物产生免疫排斥反应。但这些排斥反应似乎并没有明显地影响组织工程骨的体内成骨过程。

从 X 线动态观察结果看,A 组术后 4 周骨缺损部位有少量骨痂形成。术后 8 周骨缺损内部有骨痂形成,但无连续骨质。术后 12 周可见新生骨已经完全将骨缺损填充,并可见有部分皮质骨将骨缺损两端连接;B 组术后 12 周虽有部分骨痂形成,但无连续骨质;C 组术后 12 周仅有少量骨痂形成。通过这个过程可以看出 A 组的成骨效果要明显优于 B、C 组。单纯壳聚糖/亚磷酸壳聚糖海绵有骨传导性,仅能在边缘成骨。

因此,本实验所构建的组织工程骨具有明确的生物学活性,它在动物体内能修复大段的骨缺损,是一种良好的骨移植替代材料,具有显著的临床应用价值。

#### [参考文献]

- [1] Song K, Rao N, Chen M, et al. construction of adeno-associated virus system for human bone morphogenetic protein 7 gene [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Sciences), 2008, 28(1): 17-21
- [2] Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, et al. Osteo-

genesis enhanced by chitosan (poly-N-acetylglucosaminoglycan). in vitro [J]. J Periodontol, 1996, 67(11): 1170-1175

- [3] Manjubala I, Scheler S, Bossert J, et al. Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique [J]. Acta Biomaterialia, 2006, 2(1): 75-84
- [4] 孙国栋,李志忠,王晶,等. 人脐带间充质干细胞的分离培养及向成骨成脂分化的实验研究[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2010, 31(2): 143-147
- [5] 孙国栋,李志忠,焦廷鹏,等. 壳聚糖/亚磷酸化壳聚糖复合海绵复合人脐带间充质干细胞用于异位成骨的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(12): 1493-1498
- [6] Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites [J]. J Orthop Trauma, 1989, 3(3): 192-195
- [7] Kizuki T, Ohgaki M, Ichinose S, et al. Specific response of osteoblast-like cells on hydroxyapatite layer containing serum protein [J]. J Mater Sci Mater Med, 2006, 17(9): 859-867
- [8] Chesnutt BM, Yuan Y, Buddington K, et al. Composite chitosan/nano-hydroxyapatite scaffolds induce osteocalcin production by osteoblasts in vitro and support bone formation in vivo [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(9): 2571-2579
- [9] 施咏毅,王根林,杨惠林,等. 多孔型丝素蛋白/羟基磷灰石复合脂肪间充质干细胞修复兔股骨缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(8): 1341-1344
- [10] Wang X, Wenk E, Zhang X, et al. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering [J]. J Control Release, 2009, 134(2): 81-90
- [11] Hodgkinson T, Yuan XF, Bayat A. Adult stem cells in tissue engineering [J]. Expert Rev Med Devices, 2009, 6(6): 621-640
- [12] Cordonnier T, Layrolle P, Gaillard J, et al. 3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering [J]. J Mater Sci Mater Med, 2010, 21(3): 981-987
- [13] 史德海,蔡道章,周长忍,等. 壳聚糖与型胶原复合制作组织工程软骨支架及其性能研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2005, 19(4): 278-282
- [14] 扎拉嘎胡,陈莉,兰晓霞,等. 脐带间充质干细胞向成骨细胞分化的潜能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(40): 7439-7442
- [15] 曲志国,野向阳,林辉,等. 人脐带间充质干细胞诱导成骨及治疗骨缺损 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(45): 8503-8507