

## β-磷酸三钙预构中心血管化人工骨的实验研究

王思明<sup>1</sup>, 阚娜<sup>1</sup>, 张磊<sup>2</sup>, 徐慧高<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>连云港市第二人民医院口腔科, 江苏 连云港 222023; <sup>2</sup>南京市口腔医院病理科, 江苏 南京 210008)

**[摘要]** 目的: 观察 β-磷酸三钙构建中心血管化人工骨的效果, 探索人工骨血管化机制及血管植入的可行性。方法: 将兔的腰背动脉解剖分离形成血管束, 实验组将血管束植入人工骨侧槽内, 并用自体微小颗粒骨填满, 埋入背阔肌肌袋内, 对侧不植入血管作为对照。术后 4、8、12 周行螺旋 CT、X 线和组织学检查。结果: 实验组人工骨形成类似滋养孔的结构, 有大量新生血管自中央向四周生长, 4 周时开始出现新生骨, 12 周新生骨更趋于成熟。对照组有血管自周围长入, 新生骨少且不成熟。术后 4 周, 实验组和对照组 CT 值、X 线及组织学评分比较, 差异无统计学意义; 术后 8、12 周, 实验组和对照组 CT 值、X 线及组织学评分比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 血管植入人工骨可显著促进人工骨血管化, 该方法可作为构建血管化骨模型。

**[关键词]** 组织工程; 血管束; 血管化; 预成骨

**[中图分类号]** R687.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)01-0058-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170112

## An experimental study on the central vascularized artificial bone with beta tricalcium phosphate

Wang Siming<sup>1</sup>, Kan Na<sup>1</sup>, Zhang Lei<sup>2</sup>, Xu Huigao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Stomatology, the Second People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222023; <sup>2</sup>Department of Pathology, Nanjing Stomatological Hospital, Nanjing 210008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of construction of the central vascularized artificial bone with β-tricalcium phosphate and explore the mechanism of vascularization in artificial bone for its further clinical application. **Methods:** We built a model by implanting the selected New Zealand rabbits lumbar dorsal artery side channel of the β-tricalcium phosphate, filled with the autologous tiny bone particles, and flushed the latissimus dorsi muscle bag. Pure artificial bone was put into every rabbit's latissimus dorsi muscle bag as the control group. The samples were taken out for spiral CT, X-ray, and histology after 4, 8, and 12 weeks. **Results:** The site where the implanted vascular bundles appeared like foramen nutriens, the blood vessels were abundant, which emerged from deep tissue of the artificial bone were evident on the surface specimen, the central vascularized tricalcium phosphate were filled with new-born vessels at 4-8 weeks. Newly formed bone appeared after 4 weeks and was more mature at 12 weeks. There were only a few new-born vessels in control. Four weeks postoperatively, there were no significant differences on CT, X-ray, and histological grading between the experimental group and the control group ( $P > 0.05$ ); 8, 12 weeks postoperatively, the difference was significant on CT, X-ray, and histological grading between the experimental group and the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Putting an artery into central axis of the artificial bone and implanting the artificial bone into rabbit's latissimus dorsi muscle can notably improve vascularization of artificial bone. This method can be used to build model of vascularized bone.

**[Key words]** tissue engineering; vascular bundle; vascularization; prefabricated bone

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(01):0058-0061]

现今组织工程技术主要应用在无血管的组织或者无附加血管供应的组织中, 面对较大缺损的病例, 只依靠血管的扩散生长并不能满足对营养的需求, 大的组织块难以获得充足的氧气和营养供应,

因此组织工程中就出现了需要血管化的问题。本研究旨在探索一种血管化人工骨构建方法。先期异位构建血管化人工骨, 达到内生性供血, 为下一步移植修复骨缺损提供一个新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

成年健康新西兰白兔 18 只, 体重 2.5~3.0 kg, 雌雄不限。由蚌埠医学院动物实验中心提供。圆柱状生物活性陶瓷  $\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -TCP 武汉华威生物材料有限公司)。体积密度 $\leq 2.00 \text{ g/cm}^3$ , 气孔率 $\geq 40\%$ , 气孔孔径: 10~1 000  $\mu\text{m}$ 。抗体为美国 Neo-Markers 公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 材料制备

将长 10 mm 直径 7 mm 的圆柱状生物活性陶瓷  $\beta$ -TCP 作为基质材料, 并沿纵轴一侧用金刚砂车针制备出宽度和深度约 2~3 mm 的沟槽, 同时取一块约 5.0x5.0 mm 髂骨牙科钻磨削成直径 50~100  $\mu\text{m}$  颗粒骨备用。

#### 1.2.2 模型制作

18 只兔 36 侧背阔肌右侧为实验组(中心性血管化组), 左侧为对照组(非血管化组)。实验组于背阔肌深层肌膜下分离并形成肌袋, 解剖腰背动脉, 并游离出长约 5 cm 一段, 将腰背动脉穿过人工骨侧槽, 自体微小颗粒骨填入人工骨侧槽剩余间隙, 并要保证血流通畅。对照组仅将自体微小颗粒骨填入人工骨侧槽后埋入肌袋, 分层缝合伤口。术后 4、8、12 周采集标本进行观察。

#### 1.2.3 螺旋 CT 扫描

参数: 层距 1 mm, 层厚 1 mm, 扫描电压 120 kV 电流 100 mA, 在标本冠状位和矢状位片内选取兴趣区(region of interesting, ROI)测量 CT 值, 选取 3 处, 取其平均值为此标本的 CT 值。

#### 1.2.4 X 线观察

观察人工骨吸收、新骨形成。每次摄片的条件保持相同。对所有 X 线片依据 Lane-Sandhu X 线评分标准进行评分(表 1)。拍摄条件: 电压 55 kV, 电流 55 mA, 曝光时间 0.2 s, 焦距 80 cm。

#### 1.2.5 组织学观察

常规病理取材, 脱钙脱水处理, 石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察人工骨内血管再生和骨生长情况, 并依据 Lane-Sandhu 组织学评分标准进行评分(表 2); 同时进行免疫组织化学 CD34 标记(采用 S-P 法)。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS11.5 软件处理, 结果采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 两组间比较采用配对  $t$  检验, 以  $P\leq 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 Lane-Sandhu X 线评分标准

Table 1 Lane-Sandhu X-ray criteria

	项目	评分(分)
骨形成	无骨形成	0
	骨形成占缺损 25%	1
	骨形成占缺损 50%	2
	骨形成占缺损 75%	3
骨连接	骨折线清楚	0
	骨折线部分存在	2
	骨折线消失	4
骨塑形	未见塑形	0
	骨髓腔形成	2
	皮质骨塑形	4

表 2 Lane-Sandhu 组织学评分法

Table 2 Lane-Sandhu histologic grading method

	项目	评分(分)
骨连接	无连接	0
	纤维连接	1
	骨与类骨连接	2
	骨连接	3
松质骨	骨干完全再生	4
	无骨细胞活性	0
	新骨早期聚集	1
	有活性的新骨聚集	2
	松质骨正在改造	3
皮质骨	松质骨完全改造	4
	无皮质骨生长	0
	皮质骨生长的早期	1
	皮质骨正在形成	2
	大部分被改造	3
	完全骨形成	4

## 2 结果

### 2.1 螺旋 CT 值分析

对各个时间段所测得 CT 值表明, 随时间推移, 实验组所测得标本的 CT 值逐渐升高, 说明标本矿物质含量逐渐增加, 而对照组所测 CT 值不高, 且随时间推移升高不明显, 8~12 周时, 两组间差异有统计学意义( $P<0.05$ , 表 3)。

表 3 不同时期各组 CT 值比较

Table 3 Comparison of CT value between groups of different periods (HU,  $\bar{x}\pm s$ )

时间	实验组	对照组	P 值
4 周	682.30 $\pm$ 84.27	586.09 $\pm$ 93.22	0.052
8 周	969.25 $\pm$ 144.32	618.57 $\pm$ 113.23	0.029
12 周	1 179.65 $\pm$ 133.06	698.93 $\pm$ 96.77	0.001

### 2.2 术后各组 X 线及组织学评分

随着时间的延长, 各组 X 线及组织学评分逐渐

升高,8~12 周升高明显,其中实验组升高更明显,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,表 4)。

### 2.3 组织学观察

术后各时间点实验组可见新骨形成。术后 4 周实验组人工骨形成类似滋养孔的结构,人工骨孔隙内可见血管长入,小血管增生活跃(图 1A),新生毛细血管基本充满全层,并且在视野内无论外周还是中心分布比较均匀,并开始出现新生骨(图 1B),对照组仅人工骨表层有少量血管分布,基本无血管侵入。术后 8 周时,实验组人工骨表

层和间隙内血管网更加丰富,血管延伸长而多,血管结构较成熟,管腔清晰可见,并可见新骨形成(图 1C、D);对照组人工骨间隙内充满肉芽组织,以纤维结缔组织为主,少量血管伴行,有血管由表层侵入,实验组和对照组血管化达高峰;12 周时实验组人工骨孔隙内毛细血管网结构已基本构成,中心血管无退化,实验组新骨形成良好的皮质骨和骨髓组织(图 1E),对照组新骨形成少且较稀疏,孔隙边缘出现环形的空白区,人工骨材料出现部分吸收(图 1F)。

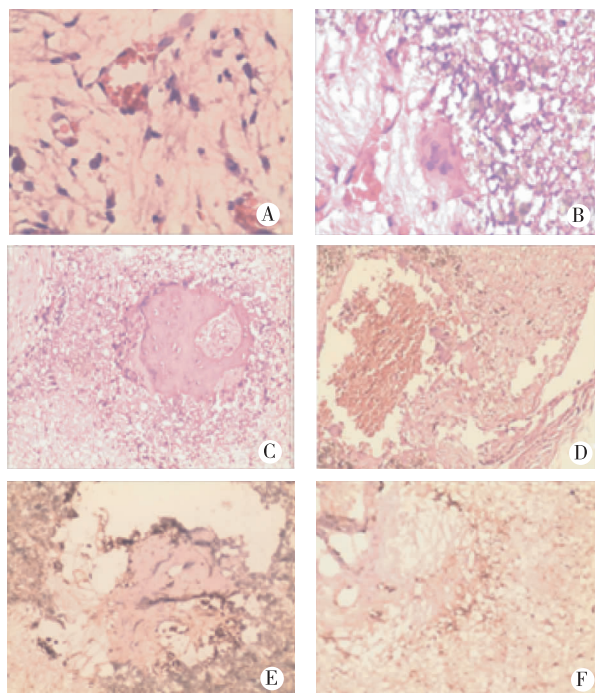
表 4 术后各组 X 线及组织学评分

Table 4 Score of X-ray and histologic of each group

( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

时间	实验组		对照组	
	X 线评分	组织学评分	X 线评分	组织学评分
4 周	0.33±0.01	1.67±0.13	0	1.33±0.17
8 周	3.33±0.12	2.00±0.11	2.01±0.14*	1.67±0.12*
12 周	6.67±0.18	6.66±0.15	4.67±0.22*	3.00±0.23*

与实验组比较,\* $P<0.05$ 。



A: 实验组 4 周新生血管丰富(HE,  $\times 400$ ); B: 实验组 4 周时开始出现新生骨(HE,  $\times 400$ ); C: 实验组 8 周有新骨形成(HE,  $\times 100$ ); D: 对照组 8 周新骨形成较少(HE,  $\times 100$ ); E: 实验组 12 周新骨趋于成熟,人工骨材料出现吸收(CD34 免疫组化,  $\times 100$ ); F: 对照组新骨形成少且较稀疏,人工骨材料出现部分吸收(CD34 免疫组化,  $\times 100$ )。

图 1 术后组织学观察结果

Figure 1 Histological observations after operation

### 3 讨论

骨组织工程的血管化是近年来越来越受关注

的问题,是解决大块骨组织的一个瓶颈。早期临床采用显微外科技术将带血管蒂的自体骨用于修复骨缺损,随着组织工程技术的发展,出现了几种血管化人工骨构建方法:血管蒂筋膜包裹人工骨和复合生长因子构建血管化人工骨的应用<sup>[1-2]</sup>,被认为是修复较大面积骨缺损的好方法,但这些方法有来源部位局限,对显微外科技术要求过高及移植后不易成活等不足,结合王永刚等<sup>[3]</sup>的研究,本实验设想将自体血管植入制备好的人工骨侧槽后并以自体微小颗粒骨填入人工骨剩余间隙,以促进新生骨组织生长,异位构建中心血管化人工骨。

异位构建中心性血管化人工骨过程中理想的人工骨替代材料必须要有生物相容性、可吸收性、利于血管化及迅速被新生组织替代的孔隙率。目前已出现了一系列的天然或人工合成的生物材料,例如钙磷盐陶瓷,包括羟基磷灰石和磷酸三钙。它们都具有良好的生物相容性,而本实验中  $\beta$ -磷酸三钙的钙磷比为 1.5:1,其生物相容性好且可吸收,具有高度的孔隙率( $\geq 40\%$ ),具有良好的生物降解性,同时具有的良好骨引导作用,能促进成骨细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞爬行长入;其生物降解性又能确保及时被吸收保证新骨组织良好生长,并已在临床得到应用<sup>[4]</sup>。

研究认为,骨诱导性材料植入体内后,与所处环境体液中各种物质相互识别,吸收内源性生长因子,诱导体内的间充质细胞向骨前体细胞转化,最



终形成异位骨<sup>[5]</sup>。自体微小颗粒骨是一种带有局部成骨微环境的种子细胞<sup>[6]</sup>,具有异位成骨、释放骨形态生长因子和血管生长因子作用<sup>[7]</sup>。本实验通过组织学切片分析,术后 4 周即开始出现成骨现象,12 周左右有成熟的骨小梁出现,新生骨更趋于成熟。在同一切片中可以同时看到骨的不同成熟阶段和多个成骨中心并存,除周边的成骨,还有中央部位的多中心成骨,说明材料内呈多中心成骨,这种多中心成骨主要是由人工骨中央植入的血管束促发的。在孔隙内成骨的同时,孔隙的周边部分人工骨出现吸收现象,在高倍镜下可见多核的破骨细胞活动。说明在新骨形成同时,人工骨材料出现吸收,呈现边新生边吸收现象。随着植入时间的延长,各组 X 线及组织学评分逐渐升高,8~12 周升高明显,其中实验组升高更明显,实验组在一开始就显示出了比对照组更明显的旺盛的成骨能力和血管化程度,说明实验组有明显的促进  $\beta$ -磷酸三钙体内血管化作用。这种实验结果可以解释为:血管束植入多孔的磷酸三钙,可出现血管新生<sup>[8]</sup>,而富含多种促血管生长因子的自体微小颗粒骨可以明显提高血管新生的速度及数量;同时丰富的动静脉血管网络又为自体微小颗粒骨提供了充足养分,并及时带走代谢废物,使其能更快向材料内部生长迁移并加速其成骨作用,两种作用相辅相成、互相促进,加速了材料内部血管化,增强了成骨效能。因此,血管化是组织工程移植体或构建体内存活的基础<sup>[9]</sup>。

从本实验的结果看, $\beta$ -磷酸三钙具有良好的成骨活性,实验组新骨形成良好的皮质骨和骨髓组织,对各个时间段所测得 CT 值表明随时间推移,实验组所测得标本的 CT 值逐渐升高,说明标本矿物质含量逐渐增加。但要完全形成和自体骨结构一致的血管化骨需要多长时间尚需进一步研究。

以往的组织工程异位成骨研究大多是通过加入外源性的骨生长因子使组织工程构建物具有骨诱导性<sup>[10]</sup>。虽然生长因子的加入可增强构建体异位新骨生成的能力,但生长因子在体内的生物学表现却在很大程度上受到构建物载体性能的影响,具有不可控性,加之体外复杂的实验室程序,使得这一繁杂过程费时、费力、费钱。而本实验通过使用具有骨诱导性的  $\beta$ -磷酸三钙作为支架结合自体微小颗粒骨,再植入自体血管,使得异位构建中心性血管化骨避免了以上的种种不便,而具有切实可行的临床应用前景。Kokemueller 等<sup>[11]</sup>研究发现将自体血管束植入材料中央更有利于新生血管的形成,并推测血管束植入后是通过增加骨缺损局部血管内皮生

长因子的释放来促进新生血管再生的。

本研究是对常规组织工程骨构建技术的进一步深化,为血管化组织工程骨的体内构建提供了一种新思路和可行技术方案,为异位构建大块血管化骨提供了可能。

#### [参考文献]

- [1] Zheng JK, Huynh HD, Umikawa M, et al. Angiopoietin-like protein 3 supports the activity of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche[J]. *Blood*, 2011, 117(2): 470-479
- [2] Yang Q, Ye ZY, Zhang JX, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and vascular endothelial growth factor protein in gastric carcinoma and its relationship to its pathological features and prognosis[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010, 293(12):2012-2019
- [3] 王永刚,裴国献. 血管束植入在组织工程骨血管化构建中的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2007, 32(1):26-28
- [4] 陈仁吉,丁 雯,穆 玥,等.  $\beta$ -磷酸三钙用于牙槽嵴裂骨缺损修复的临床研究 [J]. *北京口腔医学*, 2012, 20(3):154-157
- [5] Yun PY, Kim YK, Jeong KI, et al. Influence of bone morphogenetic biphasic Calcium phosphate graft:two pilot studies in animal bony defect model[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2014, 42(8):1909-1917
- [6] 姬 焯,闫景龙,徐公平,等.微包裹优化制备及复合自体微小颗粒骨异位成骨的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2007, 21(11):1184-1190
- [7] 武明鑫,张志鹏,刘玉田,等.微小颗粒骨自体异位成骨过程中 BMP-2、TGF- $\beta$ 1 的表达[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2005, 15(11):690-693
- [8] 王 强,郑培惠,张东升,等. CS/ $\beta$ -TCP/rhBMP-2 复合因子加血管束修复兔下颌骨缺损的实验研究[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2012, 10(3):188-192
- [9] Kanczler JM, Oreffo R. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone [J]. *Eur Cell Mater*, 2008, 15:100-114
- [10] Kroese-Deutman HC, Ruhe PQ, Spauwen PH, et al. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous Calcium phosphate cement implants inserted at an ectopic site in rabbits[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(10):1131-1138
- [11] Kokemueller H, Spalthoff S, Nolff M, et al. Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular Reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2010, 39(4):379-387

[收稿日期] 2015-06-09