

新型组织工程化骨材料植入动物体内的成血管效应**

王 微¹, 米 雷², 侯光辉¹, 王剑龙¹

Vascularization on new tissue-engineered bone repair materials implanted into animals *in vivo*

Wang Wei¹, Mi Lei², Hou Guang-hui¹, Wang Jian-long¹

Abstract

BACKGROUND: The research of bone tissue engineering achieved success based on growth factors, seed cells, vector scaffold, it demonstrates the better future of bone tissues reconstruction. However, clinical application is often not ideal. One of most important reason is that the absence of cell dependent disorder caused by vascular network of engineering bone graft.

OBJECTIVE: To observe the vascularization on new tissue-engineered bone repair materials implanted into radial defect of New Zealand rabbits.

METHODS: Balloon compression was prepared by the polylactic acid-polyglycolic acid copolymer (PLGA)/basic fibroblast growth factor (bFGF), then mixed with calcium phosphate cement (CPC), and combined with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) cultured *in vitro* to prepare new tissue-engineered bone repair materials. A total of 60 adult New Zealand rabbits were used to establish animal experimental models of radial defect and randomly divided into two groups: Group A served as the experimental group which was transplanted with the new tissue-engineered bone repair materials. Group B served as the control group, which was transplanted with the mixed materials of composite BMSCs of PLGA and CPC. At 4, 8, 12 weeks after operation, the angiopoiesis at each period was observed by tissue cell morphology, nuclide bone scan and other methods.

RESULTS AND CONCLUSION: The results of histological observation under light microscope and nuclide bone scan showed experimental group was better than control group in vascularization. The results demonstrated that new tissue-engineered bone repair materials constructed by the PLGA-bFGF/CPC combined with BMSCs have a better vascularization *in vivo*.

Wang W, Mi L, Hou GH, Wang JL. Vascularization on new tissue-engineered bone repair materials implanted into animals *in vivo*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(34): 6285-6288.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 以生长因子、种子细胞、载体支架为基础的骨组织工程研究取得的成功, 向人们展示了再造骨组织器官的美好前景, 然而在临床应用方面往往效果不理想。其中很重要一个原因是组织工程骨很大程度上受制于移植血管网缺乏造成的细胞供养障碍而导致失败。

目的: 新型组织工程骨修复材料植入新西兰兔桡骨缺损处观察其成血管作用。

方法: 将聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物包裹碱性成纤维细胞生长因子制备成微球囊, 然后与磷酸钙骨水泥混合, 并与体外培养的同种异体骨髓间充质干细胞共培养制备新型组织工程骨修复材料。60 只成年新西兰兔建立 15 mm 桡骨缺损模型后随机分成 2 组, 实验组植入新型组织工程骨修复材料, 对照组植入复合骨髓间充质干细胞的聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物与磷酸钙骨水泥的混合材料。于术后 4、8、12 周, 通过组织细胞形态学观察、核素骨扫描等手段, 观察各个时期血管形成情况。

结果与结论: 光镜下组织形态学观察结果及核素骨扫描结果示血管化程度是实验组优于对照组。结果显示聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物-成纤维细胞生长因子/磷酸钙骨水泥材料复合骨髓间充质干细胞构建的新型组织工程骨修复材料在动物体内有较好的成血管效果。

关键词: 聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物; 碱性成纤维细胞生长因子; 骨髓间充质干细胞; 组织工程化骨; 血管化

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.34.004

王微, 米雷, 侯光辉, 王剑龙. 新型组织工程化骨材料植入动物体内的成血管效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(34):6285-6288. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

以生长因子、种子细胞、载体支架为基础的骨组织工程研究取得的成功, 向人们展示了再造骨组织器官的美好前景, 然而在临床应用方面往往效果不理想。其中很重要一个原因是组织工程骨很大程度上受制于移植血管网缺乏造成的细胞供养障碍。应用大块组织工程骨修复大段骨缺损时, 其核心部位往往发生缺血性坏死导致修复失败, 其主要原因在于未能很好解决组织工程骨的再血管化问题^[1-2]。

碱性成纤维细胞因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是人体内发现的最为有效的血管形成因子之一, bFGF在刺激毛细血管内皮细胞迁移和增殖的同时^[3-4], 促使毛细血管向断端及移植物中长入, 提供营养、运送钙质, 并使断端骨痂和骨移植物中血管重建时限提前, 从而促进需要血供的软骨性成骨, 加速软骨痂的成熟和骨化^[5-6]。

课题组将聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(poly-lactic acid-polyglycolic acid copolymer, PLGA)包裹bFGF制备成微球囊, 并与磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)复合

¹Department of Orthopaedics, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, Hunan Province, China; ²Department of Orthopaedics, Second People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410013, Hunan Province, China

Wang Wei★, Master, Department of Orthopaedics, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, Hunan Province, China
wrtty-006@163.com

Correspondence to: Wang Jian-long, Associate professor, Master's supervisor, Department of Orthopaedics, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, Hunan Province, China
wangjl1972@sina.com.cn

Supported by: the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 09JJ3068*

Received: 2011-02-05
Accepted: 2011-03-25

¹ 中南大学湘雅三医院骨科, 湖南省长沙市 410013; ² 湖南省第二人民医院骨科, 湖南省长沙市 410013

王微★, 男, 1983年生, 陕西省西安市人, 汉族, 2011年中南大学湘雅三医院毕业, 硕士。
wptyy-006@163.com

通讯作者: 王剑龙, 副教授, 硕士生导师, 中南大学湘雅三医院骨科, 湖南省长沙市 410013
wangjl1972@sina.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)34-06285-04

收稿日期: 2011-02-05
修回日期: 2011-03-25 (20100821009/M·L)

成支架材料, 然后再将骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)覆盖在支架材料表面, 构建组织工程化骨, 植入实验动物体内, 实验观察其是否有较好的促血管化效果。

1 材料和方法

设计: 随机区组设计。

时间及地点: 于2010-04/08在中南大学湘雅三医院动物实验中心与中心实验室完成。

材料:

实验动物: 健康成年新西兰兔60只, 雌雄不限, 体质量1.5~3.0 kg, 平均体质量2.0 kg。由中南大学实验动物学部提供, 采用完全随机法分成2组, 每组30只。

主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM 培养基(低糖) bFGF	Gibco 公司, 美国 暨南大学医药生物技术研究 开发中心惠赠
PLGA(50 : 50) CPC	山东岱盟生物科技有限公司 上海瑞邦生物材料有限公司
XDS-1B 倒置显微镜	上海长方光学仪器有限公司

实验方法:

bFGF-PLGA微球的制备: 采用一种改进的相分离法^[7]。0.22 g PLGA溶解于5 g CH₂Cl₂, 1 000 r/min搅拌。将1 μg bFGF冻干粉分散加入于3 mL上述含PLGA的二氯甲烷溶液中。将此固体和液体的混合物在搅拌下逐渐倒入10 mL硅油中, 形成均匀的乳液后, 将此乳液在搅拌下倒入200 mL的正己烷液体中, 过滤后装入真空中真空冷冻干燥过夜。筛分并保存于-20 °C冰箱备用^[8]。

bFGF-PLGA/CPC支架材料的制备: 按质量比为7 : 3的比例分别称取CPC粉末和bFGF-PLGA (50 : 50)微球, 混合均匀, 以质量(g)/体积(mL)比为3 : 1加入固化液, 搅拌成糊状后填入模具, 挤压成型, 室温下静置15 min, 放入Ringer's液中浸泡3 d后风干制成。⁶⁰Co源下进行辐照灭菌, 辐照剂量为2.5 × 10⁴ Gy, 辐照时间为1 h, 封装, 备用。同样方法制成CPC/PLGA对照材料。

分离、培养BMSCs: 用含2 000 U/mL肝素的生理盐水湿润5 mL注射器内壁。动物经戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉后, 无菌条件下以20 mL注射器针头自兔髂嵴处刺入髂骨骨髓腔,

5 mL注射器内吸入含1 000 U/mL肝素的生理盐水1 mL, 以注射器抽吸双侧骨髓共5 mL, 抽吸的骨髓与肝素盐水及时混匀。铺在等量的密度为1.037 g/cm³的Percoll分离液上, 低速离心1 000 r/min×5 min, 弃上清液, 制成单细胞悬液, 血球计数板计数, 5×10⁸ L⁻¹浓度接种于25 cm²培养瓶, 加入培养基至5~8 mL。置37 °C、体积分数为5%的CO₂、饱和湿度孵箱内孵育, 24 h后半量换液, 72 h后全量换液, 以后每2 d或3 d全量换液1次, 倒置显微镜逐日观察。0.25%胰酶消化原代细胞(3 min), 以1×10⁸ L⁻¹按1 : 2比例传代接种培养^[9]。

组织工程化骨制取: 取第3代对数生长期的BMSCs覆盖于bFGF-PLGA/CPC支架材料表面, 经过培养、固定, 应用临界点干燥仪、液态CO₂干燥制得组织工程化骨。

组织工程化骨植入动物体内实验: 取60只新西兰兔, 建立右桡骨15 mm缺损模型, 实验组植入组织工程化骨; 对照组植入复合BMSCs的PLGA/CPC材料。

检测方法:

组织细胞形态观察: 分别在植入4, 8, 12周采用静脉空气栓塞法处死动物各5只, 于手术侧前肢以骨痂为中心部分, 包括上下端各1.0 cm处取出标本, 剔除筋膜, 肌肉及肌腱, 保留骨痂, 作为实验标本, 经甲醛固定、脱钙、系列脱水、石蜡包埋、切片后作苏木精-伊红染色, 光镜观察, 并通过单人盲法按照Lane-Sandhu组织学评分法计分^[10]。

发射型计算机断层成像术(emission computed tomography, ECT)检查: 术后4, 8, 12周取动物各5只, 植入材料对侧耳缘静脉弹丸式注射⁹⁹Tc^m-MDP(5 MBq/kg), 置于单光子核素扫描仪上行血液灌注显像, 将实验侧前臂感兴趣区与同侧上臂同样大小感兴趣区的同位素计数相比作为ECT检查的指标, 进行定量测量。

统计学分析: 实验结果采用配对比较的t检验, α取0.05以决定是否显著性意义。所有数据采用SPSS 11.5系统处理。

2 结果

2.1 动物的一般情况 所有实验动物术后2~4 h苏醒, 并能站立进食。术后进食正常, 伤口无红肿、渗出、化脓等炎性反应, 均达到I期愈合。术后1周内跛行, 2周后可基本自由活动, 均存活至完成试验。

2.2 组织形态学观察

实验组: 术后4周, 移植物可见有大量的新生血管、间充质细胞及少量的炎性细胞及散在的成骨细胞和成软骨细胞, 见图1。8周时可见新生血管进一步增多, 见图2。

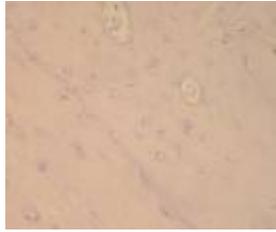


Figure 1 Microscopic observation of graft showed a lot of new blood vessels, scattered osteoblasts, chondrocytes in the experimental group at 4 wk after operation (Hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

图1 实验组兔术后4周移植物显微观察可见大量新生血管, 散在成骨细胞, 成软骨细胞(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

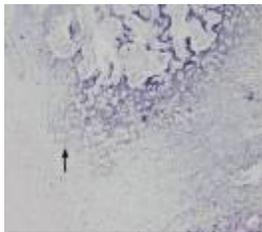


Figure 2 Microscopic observation of graft showed new blood vessels continue to grow in the experimental group at 8 wk after operation (Hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

图2 实验组兔术后8周移植物显微观察可见新生血管继续增多(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

对照组: 术后4周, 移植物内可见有间充质细胞及大量的炎性细胞浸润, 偶有新生血管, 见图3。8周时新生血管增多, 但明显较实验组少, 仍可见较多的炎性细胞, 见图4。

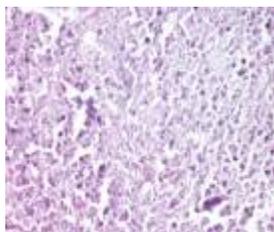


Figure 3 Microscopic observation of graft showed new blood vessels in control group were less than the same period of the experimental group at 4 wk after operation (Hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

图3 对照组兔术后4周移植物显微观察可见新生血管较同时期实验组少(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

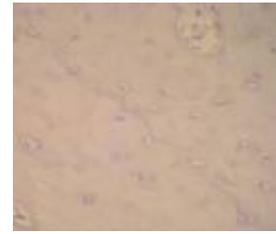


Figure 4 Microscopic observation of graft showed blood vessels continue to increase in control group and slower than the same period of the experimental group at 8 wk after operation (Hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

图4 对照组兔术后8周移植物显微观察可见血管继续增加, 较实验组同时期慢(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

Lane-Sandhu组织学评分法评分后经统计学分析: 实验组Lane-Sandhu组织学评分显著高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。实验组术后12周与术后8周和4周比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 对照组术后各时间点评分比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 两组术后不同时间点 Lane-Sandhu 组织学评分结果
Table 1 Lane-Sandhu results of histological score of the two groups at different time points after operation

Group	Lane-Sandhu results of histological score of the two groups at different time points after operation ($\bar{x} \pm s, n=5$)		
	4 wk	8 wk	12 wk
Experimental	2.60 \pm 1.10 ^a	6.00 \pm 1.41 ^a	10.60 \pm 1.10 ^{ab}
Control	1.00 \pm 0.45	3.60 \pm 1.10	9.00 \pm 1.41

^a $P < 0.05$, vs. control group; ^b $P < 0.05$, at 4 and 8 wk after operation

2.3 ECT检查结果 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP注入后3 h, 约一半显像剂沉积于骨骼, 余经肾脏排泄。骨骼、肾及膀胱显像清楚, 骨软组织对比度清晰, 各组均可见大关节及肌腱附着处有对称性放射性增高区。各组随着时间延长, T/NT呈递增趋势, 但8~12周增幅趋缓, 且各时间点实验组>对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。实验组术后12周与术后8周和4周比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 对照组术后各时间点评分比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表2。

表2 两组术后不同时间点 T/NT 平均计数
Table 2 T/NT average count at different time of two groups after operation

Group	T/NT average count at different time of two groups after operation ($\bar{x} \pm s, n=5$)		
	4 wk	8 wk	12 wk
Experimental	1.36 \pm 0.02 ^a	2.81 \pm 0.05 ^a	5.37 \pm 0.04 ^{ab}
Control	1.15 \pm 0.02	1.35 \pm 0.02	3.28 \pm 0.03

^a $P < 0.05$, vs. control group; ^b $P < 0.05$, at 4 and 8 wk after operation

3 讨论

实验运用光镜方法观察到组织工程骨移植后的再

血管化过程: 术后4周, 实验组血管形成较对照组多; 8周时, 两组血管化及成骨速度均加快, 差距逐渐缩小, 骨组织开始排列密集, 但新生骨小梁生长杂乱无章, 组织学上见到其多呈方向紊乱的粗大、多分支的断面, 实验组血管在部分区域已形成网状吻合, 此时为快速血管化阶段; 12周时, 血管化及成骨进一步发展成熟, 实验组移植骨大部分为新骨所代替, 粗大的血管数量增多。上述过程可能与以下机制有关: 同种异体种子细胞抗原的存在、早期炎性排斥反应产生的细胞因子导致组织工程骨及周围组织坏死, 在一定程度上抑制了早期血管化; 随着炎性排斥反应的减退, 宿主组织血管化反应的加强, 新生血管开始向移植体内长入, 材料中复合的BMSCs, 可分泌VEGF等相关因子, 促进其血管化进程^[11-12], 同时在本研究中, 组织工程骨内支架材料吸收和新骨形成旺盛, 在血管周围尤为明显。机制可能为随着PLGA的降解, 支架材料表面的bFGF-PLGA微球首先发挥作用, 吸引体内的其他生长因子向骨缺损区迁移, 随着支架材料的进一步降解, 材料内部的微球逐渐与体内的液体环境相接触, 导致了更多PLGA材料降解, 从而使更多的bFGF释放到缺损区周围发挥作用^[13-15]。支架材料复合BMSCs植入体内后, 其血管化方式可能主要是自体软组织内毛细血管束伴随纤维肉芽组织长入移植体内^[16-17]。

实验病理检查及ECT检查结果显示, 两组移植骨中央部位血管化均较边缘慢, 这是因为修复长段骨缺损的材料较大, 依靠周围组织血管长入, 需要一定时间。说明局部软组织条件将影响其快速血管化, 从而影响新骨形成。本实验结果表明, 体内诱导成骨的过程表现为典型的软骨内成骨。术后12周实验组骨小梁更趋于成熟, 骨板排列整齐, 骨单位及髓腔形成更早。另外, 血管化程度与新骨形成的数量呈正相关: 正是由于血管组织的大量增生侵入, 材料的再血管化, 使随之增生并侵入材料的骨髓间充质干细胞在良好的血运环境中诱导因子的作用下分化为成骨细胞, 并进而产生新生骨组织, 表明血管化在骨移植或移植替代物修复骨缺损效果方面所起的重要作用。

4 参考文献

[1] Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science*. 2002;295(5557): 1009-1014.

[2] Clarke SA, Hoskins NL, Jordan GR, et al. Healing of an ulnar defect using a proprietary TCP bone graft substitute, JAX, in association with autologous osteogenic cells and growth factors. *Bone*. 2007;40(4):939-947.

[3] Liu PY, Wang XT, Xin KQ, et al. Application of AAV2-mediated bFGF gene therapy on survival of ischemic flaps: effects of timing of gene transfer. *Ann Plast Surg*. 2009;62(1):87-91.

[4] Hu DJ, Xie Y, Li CC, et al. *Xinxueguan Kangfu Zazhi*. 2010;19(3): 251-254.
胡大军, 谢勇, 李传昶, 等. 单核细胞趋化因子1、碱性成纤维细胞因子与冠脉侧支循环的关系[J]. *心血管康复杂志*, 2010, 19(3): 251-254.

[5] Nakajima F, Nakajima A, Ogasawara A, et al. Effects of a single percutaneous injection of basic fibroblast growth factor on the healing of a closed femoral shaft fracture in the rat. *Calcif Tissue Int*. 2007;81(2):132-138.

[6] Yuan Q, Kubo T, Doi K, et al. Effect of combined application of bFGF and inorganic polyphosphate on bioactivities of osteoblasts and initial bone regeneration. *Acta Biomater*. 2009;5(5):1716-1724.

[7] Wang N, Wu XS. A novel approach to stabilization of protein drugs in poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres using agarose hydrogel. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998;166(1): 1-14.

[8] Tabata Y, Ikada Y. Synthesis of gelatin microspheres containing interferon. *Pharm Res*. 1989;6(5):422-427.

[9] Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, et al. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med*. 2005;9(1):72-84.

[10] Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*. 1987;18(2):213-225.

[11] Nie SP, Jiang JQ, Liu XQ, et al. *Zhonghua Laonian Xinxueguanbing Zazhi*. 2006;8(2):119-121.
聂绍平, 蒋桔泉, 刘小青, 等. 心肌内控制释放碱性成纤维细胞生长因子促进血管再生与侧支重构[J]. *中华老年心血管病杂志*, 2006, 8(2): 119-121.

[12] Han D, Li JJ, Sun HB, et al. *Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi*. 2007; 15(9):698-701.
韩冬, 李建军, 孙鸿斌, 等. 骨形态发生蛋白-2腺病毒表达载体在成骨过程中与血管内皮细胞生长因子关系[J]. *中国矫形外科杂志*, 2007, 15(9): 698-701.

[13] Jabbarzadeh E, Starnes T, Khan YM, et al. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(32):11099-11104.

[14] Dahl SL, Rhim C, Song YC, et al. Mechanical properties and compositions of tissue engineered and native arteries. *Ann Biomed Eng*. 2007;35(3):348-355.

[15] Liu GF. *Zhongwai Yixue Yanjiu*. 2010;8(14):127-128.
刘国芳. 碱性成纤维细胞因子的应用及前景[J]. *中外医学研究*, 2010, 8(14):127-128.

[16] Tan HB, Yang L, Duan XJ, et al. *Chongqing Yixue*. 2007;36(6):499-501.
谭洪波, 杨柳, 段小军, 等. 骨组织工程支架体外血管化初步研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(6):499-501.

[17] Freeman I, Cohen S. The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization. *Biomaterials*. 2009;30(11):2122-2131.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 湖南省自然科学基金(09JJ3068)。

作者贡献: 实验设计为王微、王剑龙, 实验实施为王微、米雷、侯光辉, 实验评估为张克祥, 资料收集为王微。王微成文, 王剑龙审校, 王微对文章负责。

致谢: 感谢中南大学药学院丁燕飞老师在微球制作过程中所给予的指导和帮助。感谢广州暨南大学医药生物技术研究开发中心黄亚东主任、项琪博士、王倩师妹在实验微球检测方面给予的无私指导和帮助。感谢中南大学湘雅三医院核医学科石光清主任及全体工作人员在课题研究给予的指导和帮助。感谢湘雅三医院中心实验室向红老师在课题研究中给予的指导和帮助。

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。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性: 检索万方数据库, 检索时间 2010-10-20, 关键词: 聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物, 碱性成纤维细胞生长因子, 骨髓间充质干细胞, 组织工程化骨, 血管化, 文章具有一定创新性。本实验针对目前组织工程骨移植治疗骨缺损过程中存在的问题, 即组织工程骨血管化的问题, 又根据目前得到众多学者证实具有促血管化作用的一些因子, 制备一种新型复合材料组织工程化骨, 并研究其成血管化的作用, 有望为治疗骨缺损提供一种较理想的组织工程骨支架材料。