

· 研究原著 ·

文章编号:1000-2790(2005)06-0532-05

## 珍珠层人工骨复合成骨细胞修复兔桡骨缺损的成骨作用

唐焕章<sup>1,2</sup>, 陈建庭<sup>2</sup>, 金大地<sup>2</sup>, 杨春露<sup>2</sup>, 谭小云<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 南京军区福州总医院骨科, 福建 福州 350025, <sup>2</sup> 南方医科大学南方医院脊柱骨病科, 广东 广州 510515)

### Osteogenesis of nacre/PDLLA artificial bone combined with osteoblasts in repairing rabbit radius segmental defect

TANG Huan-Zhang<sup>1,2</sup>, CHEN Jian-Ting<sup>2</sup>, JIN Da-Di<sup>2</sup>, YANG Chun-Lu<sup>2</sup>, TAN Xiao-Yun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedics, Fuzhou General Hospital, Nanjing Command, Fuzhou 350025, China, <sup>2</sup>Department of Orthopaedics, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China

**【Abstract】** AIM: To survey the osteogenic effect of Nacre/PDLLA (N/P) artificial bone combined with allogeneic osteoblasts in repairing rabbit radius segmental defect and to explore its application as scaffold material of bone tissue engineering. METHODS: The allogeneic osteoblasts, seeded onto N/P artificial bone, were co-cultured *in vitro* for one week and then were implanted into the rabbit radii segmental defect sites of the New Zealand white rabbits. The defects of 15 mm long were produced on the bilateral radii of 18 adult rabbits by surgery. The PDLLA alone artificial bone combined with allograft osteoblasts and the N/P artificial bone without osteoblasts served as control. The repairing effect was evaluated at 4, 8 and 12 weeks post-operation respectively by gross observation, radiograph examination and histological examination. RESULTS: In experimental group, with N/P artificial bone, masses of lamellar bone formed 8 weeks post-operation, and the radii segmental defects were fully bridged by the new bone tissue with sequence bone cortex and partly connected medullary cavities 12 weeks post-operation, which was confirmed by X-ray and histological examination. Part of the N/P artificial bone became powder through degradation and it was evident around the new bone tissue. But in control group with PDLLA artificial bone combined with osteoblasts, less new bone mass formed. In PDLLA artificial bone materials, less lamellar bone and more osteoid tissue formed 8 weeks post-operation. Bulks of PDLLA artificial bone were degraded. After 12 weeks, the bone defects were bridged by sequence and narrow new bone tissue, but medullary cavities were blurry.

PDLLA artificial bone completely degraded. In another control group with N/P artificial bone without osteoblasts, masses of new bone tissue formed at the joint of material and host bone, but less new bone formed in materials after 12 weeks. In inducing new bone formation, the artificial bone with osteoblasts was more effective than the material without osteoblasts. CONCLUSION: N/P artificial bone combined with allogeneic osteoblasts has better osteogenesis than PDLLA artificial bone with osteoblasts and N/P artificial bone without osteoblasts, which can effectively repair rabbit radius critical-size defect. N/P artificial bone can be used as an optimal scaffold material of bone tissue engineering.

**【Keywords】** nacre; PDLLA; tissue engineering; radius; osteoblasts; osteogenesis; braces

**【摘要】** 目的: 观察珍珠层/消旋聚乳酸(N/P)人工骨复合同种异体成骨细胞(OBs)修复兔桡骨节段性骨缺损的成骨能力, 研究其作为骨组织工程支架材料的可行性。方法: 手术造成15 mm 桡骨缺损模型, 将体外培养的同种异体新西兰白兔OBs 分别种植到N/P人工骨和消旋聚乳酸(PDLLA)人工骨材料上。以复合OBs的N/P人工骨为实验组, 以复合OBs的PDLLA人工骨和未复合OBs的N/P人工骨作对照组, 移植修复兔桡骨缺损。分别于植入后4, 8, 12 wk取材, 经大体观察、X线、组织学检测, 观察细胞-材料复合物修复兔桡骨节段性骨缺损的效果。结果: 复合OBs的N/P人工骨修复兔桡骨缺损术后8 wk材料中形成大片板层骨, 12 wk骨痂桥接缺损, 骨皮质连续, 部分髓腔再通, 珍珠层材料降解成粉末状, 新骨周围材料降解明显; 复合OBs的PDLLA组术后8 wk时形成部分板层骨, 但以类骨质多见, 材料已大部分降解, 12 wk已完全降解, 骨痂与断端界限消失, 骨痂呈连续的窄条状修复骨缺损, 但骨髓腔轮廓不清, 骨痂形成的数量较实验组明显减少; 未复合OBs的N/P组12 wk时仅在材料与宿主骨两断端连接部有片状成熟新骨形成, 但在材料中央处有少许成骨。N/P人工骨材料亦部分降解成粉末状, 但降解速度慢于实验组。结论: 珍珠层人工骨复合OBs能很好地修复兔桡骨临界性骨缺损, 是一种良好的骨组织工程支架材料。

**【关键词】** 珍珠层; 消旋聚乳酸; 组织工程; 桡骨; 成骨细胞; 骨生成; 支架(骨科)

**【中图分类号】** R318 **【文献标识码】** A

### 0 引言

由创伤、感染、肿瘤及先天性因素引起的四肢长骨节段性骨缺损的修复是矫形外科及材料学科所面临的难题之一。其治疗方法较多, 有游离的和带血管的自体骨、异体骨、异种骨、生物材料和组织工程骨移

收稿日期:2004-07-07; 修回日期:2004-11-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271321)

通讯作者:陈建庭. Tel. (020)61641725 Email. chenjt99@sina.com

作者简介:唐焕章(1968-), 男(汉族), 安徽省歙县人. 硕士, 主治医师. Tel. (0591)83725439. Email. tanghuanzhang@sina.com

植.但由于自体骨来源有限,异体骨、异种骨有传播疾病、免疫排斥反应之虞,单用人工骨因骨诱导活性不足或缺乏,临床应用均受到很大限制.组织工程骨移植是骨修复重建的热点和难点,代表未来骨缺损修复的发展方向.生物衍生成骨材料——珍珠层骨诱导作用不肯定,在体内主要借助骨传导方式,通过“爬行替代”作用成骨.为加快成骨速度,改善成骨效果,我们采用珍珠层人工骨复合同种异体(osteoblasts,OBs)修复新西兰白兔桡骨节段性骨缺损,观察其疗效.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 珍珠层粉(中国科学院南海海洋研究所),消旋聚乳酸(荷兰PURAC公司),DMEM培养基(美国Gibco),胎牛血清(杭州四季青生物公司),RM2135型超薄切片机(德国Leica公司),KXO-15R型X线机(日本Toshiba公司),新西兰白兔(南方医科大学南方医院动物研究所).

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组** 新西兰大白兔18只,均为雄性,体质量2.0~2.5 kg,所有实验动物共36只前肢,随机分为3组,复合OBs的N/P组为实验组,复合OBs的PDLLA组和未复合OBs的N/P组为对照组.每组12只前肢,按4,8,12 wk 3个时间点随机分组,每个时间点4只前肢.

**1.2.2 动物模型制作及手术方法** 所有动物手术均由同一组人员完成.25 g/L戊巴比妥钠1 mg/kg自耳缘静脉麻醉.仰卧位,双侧前肢备皮,常规消毒后铺巾.取前内侧作一约3 cm的纵切口,逐层分离显露桡骨,切开并切除骨膜,于桡骨中1/3旋前园肌止点以远截骨,用刻度尺测量后,制成1.5 cm的骨缺损模型.游离周围软组织并包绕尺骨以分隔尺桡骨.将两断端向两侧牵引,于断端间嵌入植骨材料.逐层缝合肌筋膜及皮肤.手术肢体不作外固定.麻醉苏醒后动物分笼常规饲养.

**1.2.3 N/P和PDLLA人工骨材料的制备** 珍珠层、PDLLA与氯化钠质量比1:1:2,珍珠层与氯化钠颗粒均过80~100目的网筛,其中氯化钠为致孔剂.应用有机溶剂注模盐浸技术加工成15 mm×3 mm×3 mm柱状人工骨材料N/P,其孔径为150~200 μm,孔隙率为50%<sup>[13]</sup>.单独用PDLLA,与氯化钠按质量比1:1,同上方法制得PDLLA柱状人工骨材料作对照组.干燥后经环氧乙烷熏蒸消毒,备用.

**1.2.4 OBs的分离培养** 无菌操作下取5 wk龄健康新西兰白兔髌骨,切除其内外表面骨膜及软骨,Hanks液冲洗,分别加2.5 g/L胰蛋白酶和2 g/L

I型胶原酶消化,1000 r/min离心10 min,收集滤液,在37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱内培养.5 d更换培养液,待细胞融合成单层后,胰酶消化,分瓶传代.在倒置显微镜下观察培养的成骨细胞形态,行瑞氏染色和碱性磷酸酶染色,进行OBs表型鉴定.

**1.2.5 OBs与材料体外复合培养及移植** 将传至第3代的OBs悬液以5×10<sup>8</sup>/L的密度分别接种至6孔培养板中的N/P和PDLLA两种材料上.每片材料接种50 μL细胞悬液,在37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱内复合培养2 h后,再加DMEM培养液和胎牛血清,继续培养.1 wk后将OBs与材料复合体移植入兔桡骨缺损断端之间.

### 1.3 标本采集和处理

**1.3.1 一般观察** 观察动物饮食、活动及伤口情况.

**1.3.2 X线检查** 术后当天及术后4,8,12 wk行兔尺桡骨X线摄片,摄片条件:电压40 kV,电流50 mA,曝光时间0.2 s,自动洗片机冲洗胶片.观察各组骨缺损修复情况.

**1.3.3 大体标本检查** 分别于术后4,8,12 wk处死动物,取出材料修复的桡骨,观察各组缺损修复及材料降解情况.

**1.3.4 组织学检查** 分别于术后4,8,12 wk取材,依次用40 g/L多聚甲醛4℃下固定24 h,乙醇梯度脱水,正丁醇透明,石蜡包埋、沿桡骨纵轴切片,厚5 μm,常规松节油脱蜡至水,HE染色.

## 2 结果

**2.1 一般情况** 全部动物术后均顺利成活,麻醉清醒后恢复正常饮食,术后切口均无渗出、流脓等现象,10 d后切口愈合.术后4 wk患肢即可负重行走,6 wk后患肢行动自如.

**2.2 影像学检查** 3组术后骨缺损处移植的人工骨材料均未发生移位、断裂.实验组术后当天可见桡骨截骨面整齐,移植的人工骨材料柱状结构清晰;术后4 wk桡骨断端交界处模糊不清,骨缺损处密度稍降低,可见浅淡的新骨阴影;8 wk骨缺损处密度增加,新骨阴影明显;12 wk骨痂与断端界限消失,骨皮质连续,部分髓腔再通(Fig 1).复合OBs的PDLLA对照组术后PDLLA材料不显影,但易清楚看到新骨形成:4 wk骨缺损处断端有少许新骨阴影;8 wk骨痂形成增多;12 wk可见连续的窄条状骨痂桥接缺损,但骨髓腔轮廓不清,骨痂形成的数量较实验组明显减少(Fig 2).未复合OBs的N/P对照组术后4 wk骨缺损处密度降低,8 wk密度影逐渐增高,12 wk密度增高明显,有成骨发生(Fig 3).

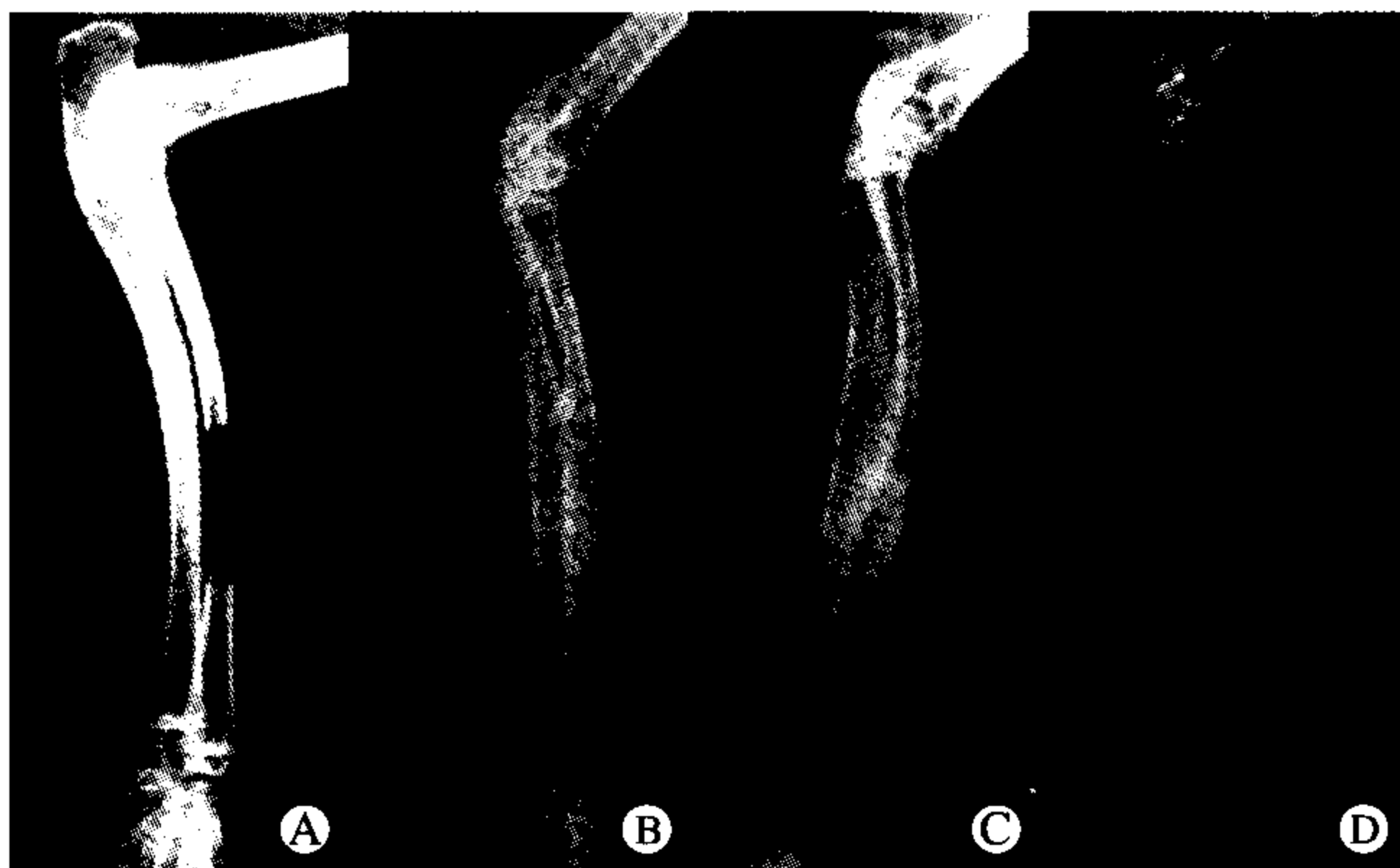


Fig 1 X-ray radiograph of defective radius after immediately (A), 4(B), 8(C) and 12(D) weeks post-operation in experimental group

图1 实验组术后当天(A), 4(B), 8(C)和 12(D)wk 桡骨缺损 X 线照片

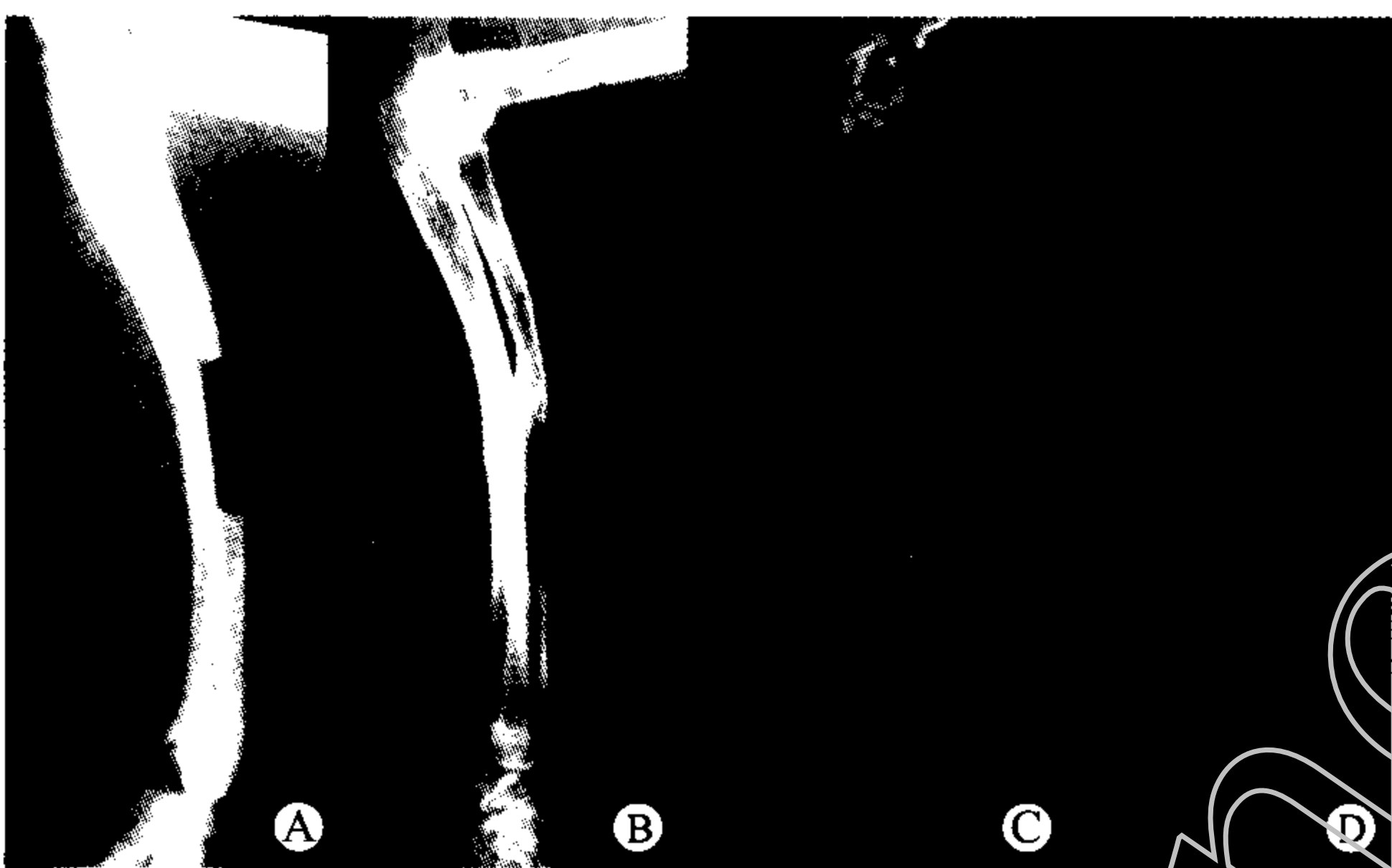


Fig 2 X-ray radiograph of defective radius after immediately (A), 4(B), 8(C) and 12(D) weeks post-operation in control group of PDLLA combined OBs

图2 复合 OBs 的 PDLLA 对照组术后当天(A), 4(B), 8(C)和 12(D)wk 桡骨缺损 X 线照片

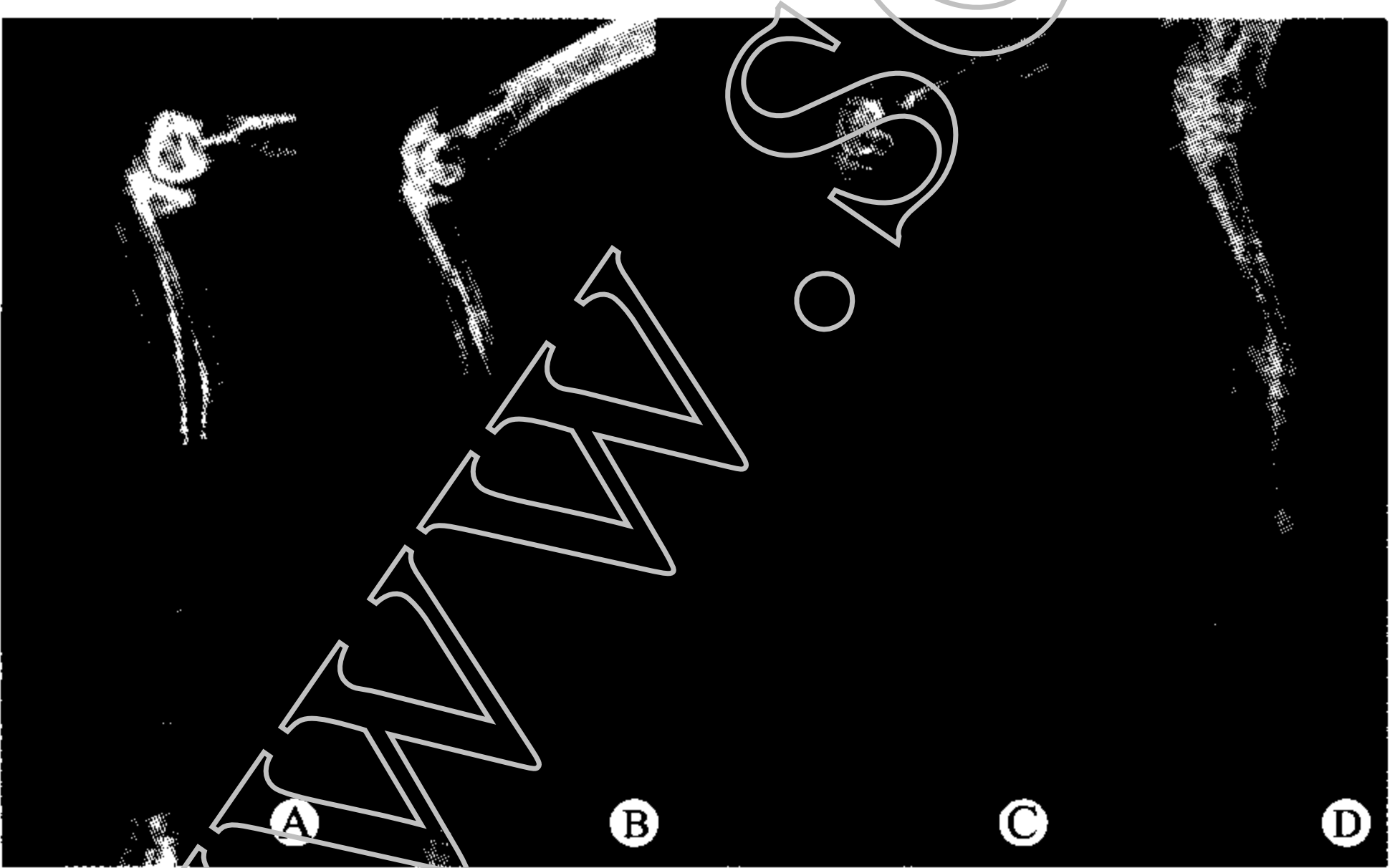


Fig 3 X-ray radiograph of defective radius after immediately (A), 4(B), 8(C) and 12(D) weeks post-operation in control group of N/P

图3 未复合 OBs 的 N/P 对照组术后当天(A), 4(B), 8(C)和 12(D)wk 桡骨缺损 X 线照片

**2.3 大体标本检查** 术后 4, 8, 12 wk 时均可见纤维结缔组织包裹材料表面, 有小血管长入。随时间点延长, 材料表面纤维结缔组织增加, 材料渐降解。实验组 4 wk 时骨缺损断端相接处可折断。至 8, 12 wk 时骨缺损修复处及断端交界部位有明显骨连结, 均不易折断。切开软组织包膜, 可见部分材料已降解成粉末状, 易脱落。复合 OBs 的 PDLLA 对照组 4 wk 时骨缺损处凹陷变细, 但有少许成骨, 骨痂呈细窄条状连接, 12 wk 时骨缺损处 PDLLA 材料完全降解, 成骨增加不明显, 和实验组相比易折断。未复合 OBs 的 N/P 对照组随时间点延长, 连接部强度渐增, 折断处多发生在材料中央。材料降解较实验组慢。

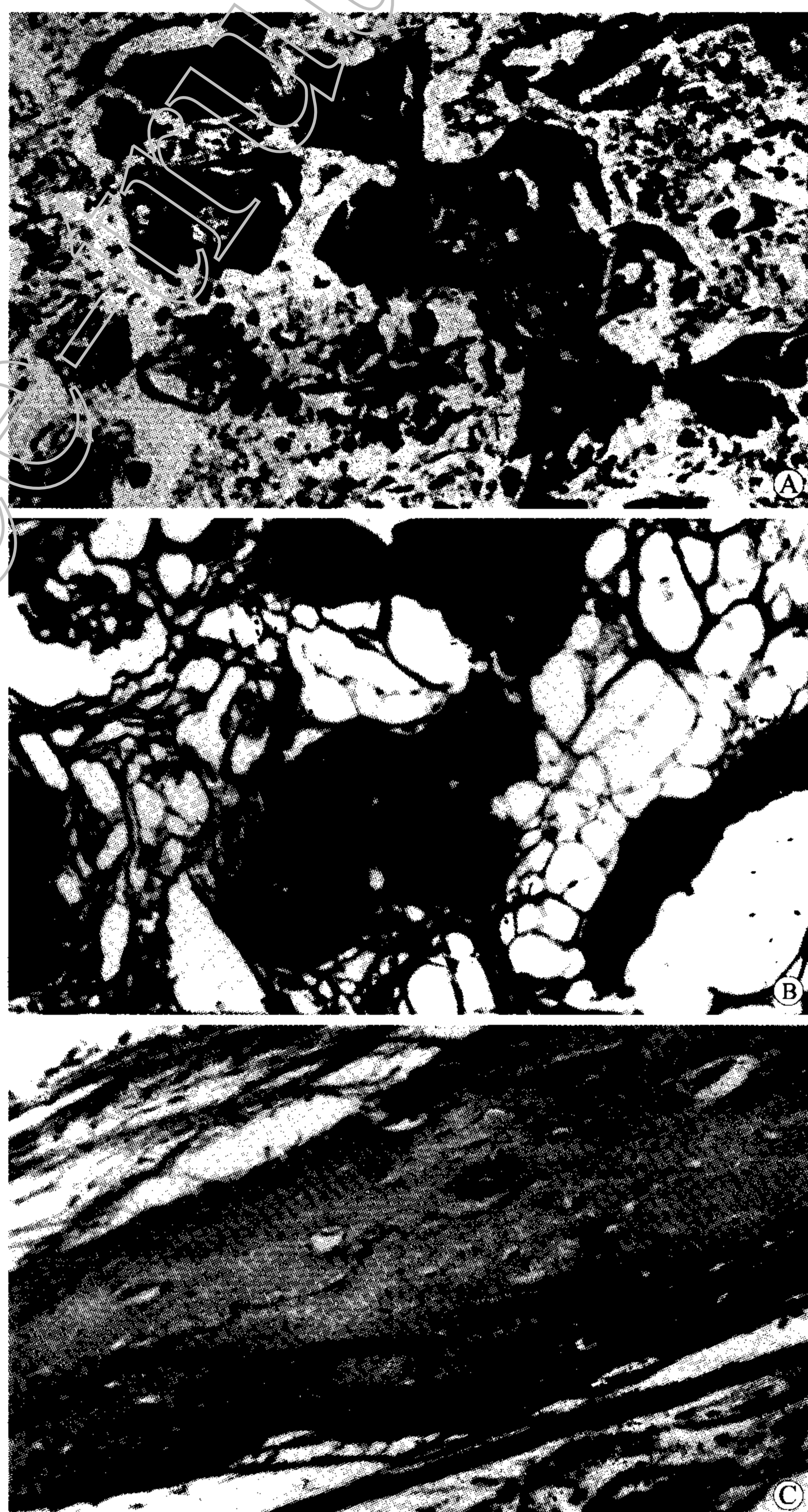


Fig 4 Histological examination of defective radius after 4(A), 8(B) and 12(C) weeks post-operation in experimental group HE  $\times 100$

图4 实验组桡骨缺损术后 4(A), 8(B)和 12(C)wk 组织学观察

**2.4 组织学检查** 实验组术后 4 wk 时材料部分降解,材料孔隙中形成多片状类骨质,材料周围有纤维组织生长;8 wk 材料孔隙中小梁骨形成增多,可见大块不规则板层样骨,有明显骨陷窝和骨髓腔形成. 12 wk 连续的新生骨组织形成. 新骨周围材料降解明显,呈粉末状(经固定、脱钙、脱水、切片等处理后粉末状材料丢失明显,但仍有少许残留)(Fig 4). 复合 OBs 的 PDLLA 对照组术后 4 wk 时 PDLLA 材料明显降解,有小片状类骨质形成;8 wk 材料经降解已所剩无几,材料中已部分形成板层骨,但编织骨仍较多;12 wk 可见成熟的块状、岛状骨组织形成,连续性差,周围有较多纤维组织长入,材料已不可见(Fig 5).

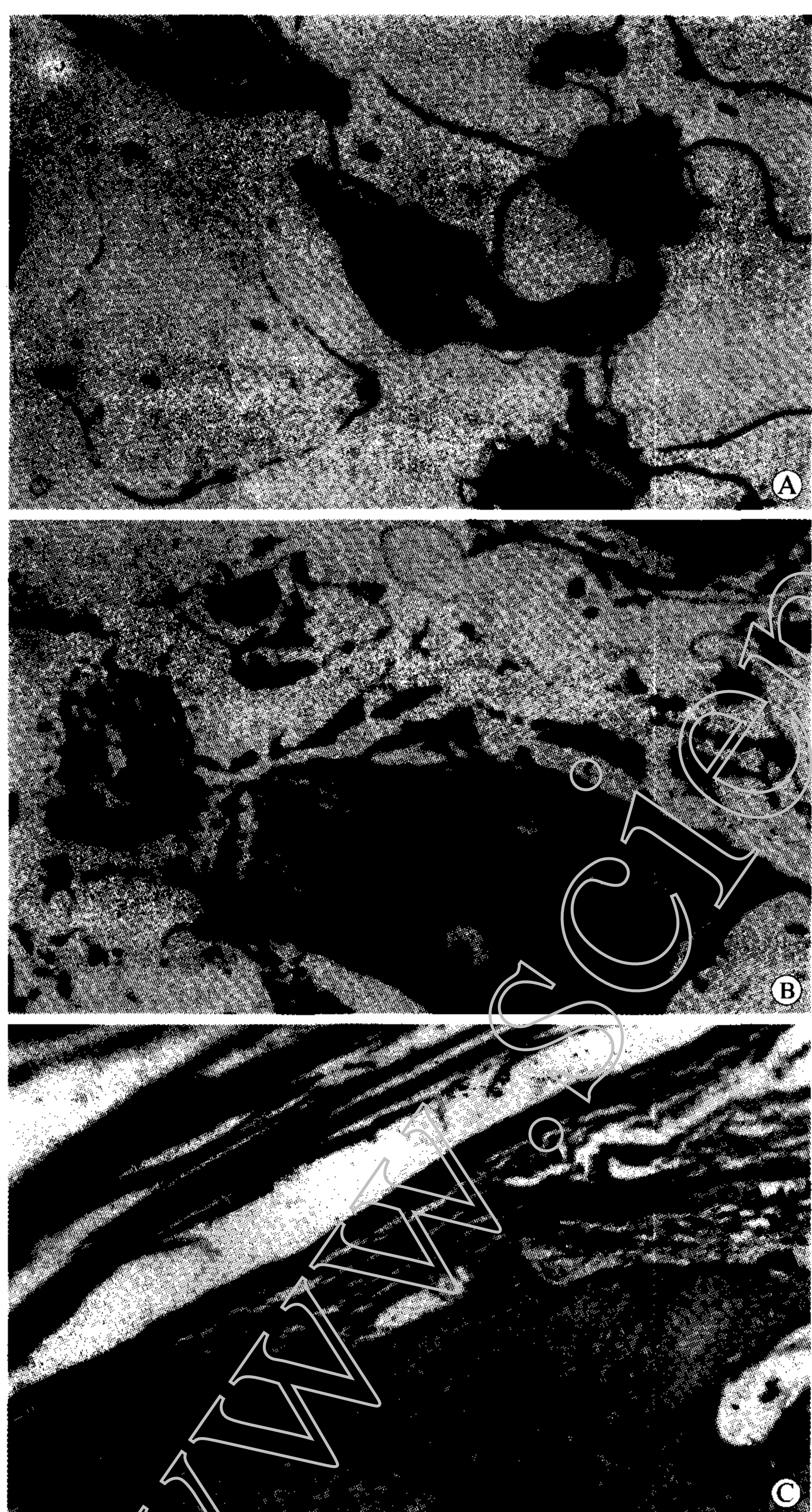


Fig 5 Histological examination of defective radius after 4(A), 8(B) and 12(C) weeks post-operation in control group of PDLLA combined OBs HE  $\times 100$   
图 5 复合 OBs 的 PDLLA 对照组桡骨缺损术后 4(A), 8(B) 和 12(C) wk 组织学观察

未复合 OBs 的 N/P 对照组 4 wk 时可见少许纤维组织生长;8 wk 时邻近宿主骨材料中有少许编织骨形成. 12 wk 时在宿主骨邻近的材料中形成少许成熟的块状骨组织,但在材料中央处成骨较少(Fig 6). 珍珠层材料亦降解成粉末状,但可见成骨少的部位材料降解也少.

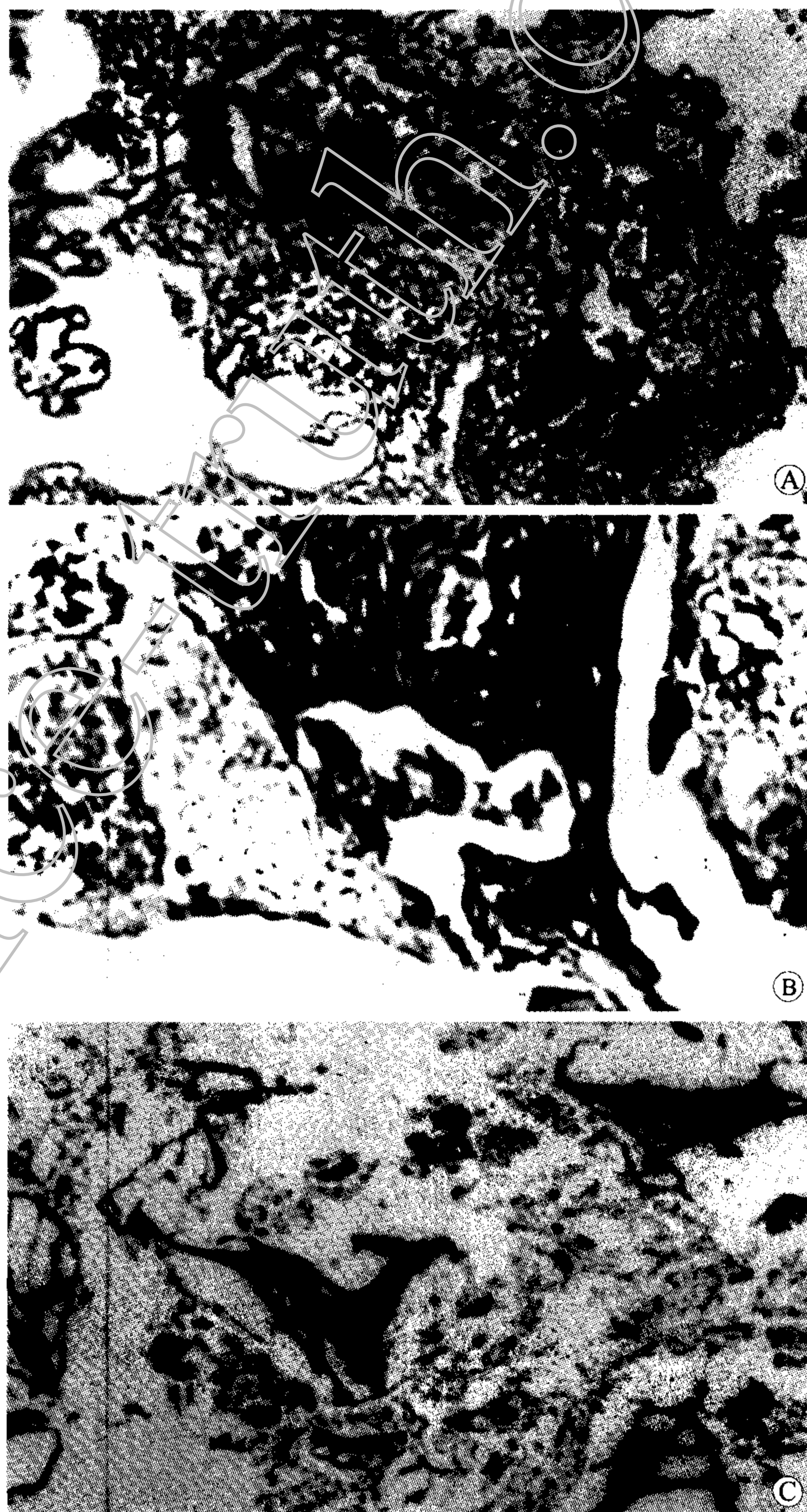


Fig 6 Histological examination of defective radius after 4(A), 8(B) and 12(C) weeks post-operation in control group of N/P HE  $\times 100$

图 6 未复合 OBs 的 N/P 对照组桡骨缺损术后 4(A), 8(B) 和 12(C) wk 组织学观察

### 3 讨论

目前组织工程骨多采用人工合成骨作为支架材料,而天然生物衍生材料很少用作携带 OBs 植入体内的支架. 珍珠层是海洋生物——软体动物双壳类珍

珠贝科或蚌科动物的贝壳内层,其组成成分主要为文石型碳酸钙,并含有少量有机质和微量金属元素,具有良好的生物相容性、可降解性、骨传导性和成骨特性.这与珍珠层粉水溶性有机质中含有一些细胞识别信号分子(如某些特定的氨基酸序列)密切相关<sup>[2,3]</sup>.高分子材料消旋聚乳酸(poly-DL-lactide, PDLA)为人工合成的无定形、非晶态材料,亲水性差,没有天然材料所包含的许多生物信息,但其可塑性高,具有降解快,易成形的特点,与珍珠层粉复合,弥补了其不易成形之不足.我们利用珍珠层良好的成骨特性制成的多孔材料 N/P 复合人工骨,为 OBs 生存提供生长的三维空间和足够的内外表面积,有利于细胞悬液浸入和黏附,获得足够营养物质,进行气体交换,排出代谢产物,使细胞按预制形态的三维空间生长,最终形成骨组织.实验组 8 wk 时组织学可见大量新生小梁骨,为不规则的板层状骨;而未复合细胞的对照组靠近宿主骨处成骨明显,材料中央成骨较少,材料降解也较周边慢.复合 OBs 的 PDLA 组 8 wk 时也有板层状骨形成,但成骨量少.实验组 12 wk 新生的成熟骨组织桥接缺损,使兔桡骨 15 mm 骨缺损得到完全修复,比单独用珍珠层人工骨成骨作用明显加速,后者 12 wk 时仅形成块状板层骨,且数量较少;复合 OBs 的 PDLA 组 12 wk 时通过块状、岛状新骨连接骨缺损,其中充满纤维组织,修复效果差.

有关珍珠层的骨诱导作用,国外研究结果不一致,尚无明确结论,但珍珠层骨传导作用已肯定<sup>[4-7]</sup>.在我们前期用 N/P 复合人工骨融合犬脊柱横突的研究及本实验研究中均未观察到来自我国海南的马氏珍珠贝珍珠层的骨诱导作用,而人工骨与宿主骨交界部位无明显纤维结缔组织长入,界面空间有利于邻近宿主骨内间充质细胞通过 N/P 复合人工骨发挥爬行替代作用,通过骨传导作用成骨. N/P 人工骨复合 OBs 后缺损修复速度明显加快,主要是由于移植的 OBs,可能分泌某些骨生长因子,有利于细胞外基质形成和骨组织的长入,增强成骨能力,促进骨生成作用.且天然生物活性材料珍珠层有机质中包含某些信号分子,对移植的 OBs 具有刺激作用,能促进生长因子的合成与分泌,加速人工骨的骨生成作用.而 PDLA 对照组虽然复合了 OBs,但由于 PDLA 材料的降解速度快于成骨速度,因此成骨量仍少.实验中未复合 OBs 的 N/P 组也能成骨,且靠近宿主骨较近

的部位成骨较多,材料中央离宿主骨较远的部位成骨较少,这与珍珠层有机质中包含的某些细胞识别信号分子对宿主骨的刺激作用有关.在我们前期实验中,珍珠层人工骨与 OBs 在体外复合培养,可见珍珠层人工骨对 OBs 具有明显趋化作用,OBs 向珍珠层材料趋向爬行生长,并能形成大而多的钙化结节,在人工骨表面产生钙盐结晶<sup>[8]</sup>,证明马氏珍珠贝的珍珠层有机质中也包含某些细胞识别信号,这些信号分子刺激骨折断端骨生长因子(如 BMP, PDGF, TGF 等)集聚,促进宿主骨的间充质细胞分化为 OBs 和软骨母细胞,通过人工骨爬行替代,最终发生骨传导作用.

### 【参考文献】

- [1] 刘金标,陈建庭.珍珠层/聚乳酸重组人工骨的研制及其相关性检测[J].第一军医大学学报,2002;22(3):236-238.  
Liu JB, Chen JT. Development of artificial bone made from nacre and polylactic acid and property assessment[J]. *J First Mil Med Univ*, 2002;22(3):236-238.
- [2] Rousseau M, Mouries LP, Almeida MJ, et al. The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2003;135(1):1-7.
- [3] Mouries LP, Almeida MJ, Milet C, et al. Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk *Pinctada maxima* in three mammalian cell types: Fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2002;132(1):217-229.
- [4] Lopez E, Vidal B, Berland S, et al. Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained *in vitro* [J]. *Tissue Cell*, 1992;24(5):667-679.
- [5] Silve C, Lopez E, Vidal B, et al. Nacre initiates biomineralization by human osteoblasts maintained *in vitro* [J]. *Calcif Tissue Int*, 1992;51(5):363-369.
- [6] Atlan G, Delattre O, Berland S, et al. Interface between bone and nacre implants in sheep [J]. *Biomaterials*, 1999;20(11):1017-1022.
- [7] Lamghari M, Almeida MJ, Berland S, et al. Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: *In vivo* and *in vitro* studies [J]. *Bone*, 1999;25(2 Suppl):91S-94S.
- [8] 吴一民,陈建庭,孙炜,等.珍珠层人工骨促进成骨细胞的体外成骨能力[J].中国矫形外科杂志,2003;11:217-219.  
Wu YM, Chen JT, Sun W, et al. Osteogenic ability of osteoblast promoted by nacre composite artificial bone *in vitro* [J]. *Orthop J Chin*, 2003;11:217-219.

编辑 何扬举