

新型脱细胞骨基质材料的制备及理化评估***☆◇

杨强^{1,2}, 彭江¹, 夏群², 马信龙², 徐宝山², 郭全义¹, 汪爱媛¹, 赵斌¹, 张莉¹, 许文静¹, 卢世璧¹ ◇

Fabrication and characterization of a novel acellular bone matrix scaffold for bone tissue engineering

Yang Qiang^{1,2}, Peng Jiang¹, Xia Qun¹, Ma Xin-long², Xu Bao-shan², Guo Quan-yi¹, Wang Ai-yuan¹, Zhao Bin¹, Zhang Li¹, Xu Wen-jing¹, Lu Shi-bi¹

Abstract

BACKGROUND: Natural bone acellular cells have many inadequacies.

OBJECTIVE: To fabricate and characterize a novel acellular bone matrix scaffold for bone tissue engineering, and to detect its physical and chemical properties.

METHODS: Bone column was prepared using canine bone cancellous bone from the femoral head, washed with high-pressure water gun, and decellularized using TritonX-100 and sodium deoxycholate. The scaffold was investigated by histological staining, scanning electronic microscope observation, Micro-CT and biomechanical analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: The new bone scaffold showed most of the extracellular matrix components after removal of the cell fragments after decellularization. Scanning electron microscopy and Micro-CT revealed a three-dimensional interconnected porous structure, with the pore diameter and porosity of nature bone. The longitudinal elastic modulus of the new scaffold was (552.56±58.92) MPa, and the intensity was (11.34±3.49) MPa. There was no significant difference between the natural bone and the new scaffold ($P > 0.05$). The new acellular bone matrix scaffold is a good alternative cell-carrier for bone tissue engineering.

Yang Q, Peng J, Xia Q, Ma XL, Xu BS, Guo QY, Wang AY, Zhao B, Zhang L, Xu WJ, Lu SB. Fabrication and characterization of a novel acellular bone matrix scaffold for bone tissue engineering. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(38): 7041-7044. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 传统的结构性天然骨脱细胞的方法存在许多不足之处。

目的: 用新的理化方法对结构性骨块进行脱细胞处理制作新型骨支架材料的可行性,并检测其理化性能。

方法: 以股骨头负重区结构性骨块为原料,高压水枪冲洗,继而利用 Triton-100、脱氧胆酸钠等进行脱细胞等理化处理,制备新型脱细胞骨基质材料,并对支架进行大体、组织学、扫描电镜、Micro-CT 观察、生物力学等相关检测。

结果与结论: 新型脱细胞骨基质材料保留了骨的细胞外基质成分,脱细胞彻底,扫描电镜及 Micro-CT 观察显示支架具备三维多孔网状结构系统,具有天然骨的孔径和孔隙率;生物力学测试脱细胞组支架的弹性模量为(552.56±58.92) MPa,强度为(11.34±3.49) MPa,与新鲜骨的弹性模量及强度比较,差异无显著性意义($P > 0.05$),可作为骨组织工程支架的良好载体。

关键词: 骨; 组织工程; 细胞外基质; 支架; 生物力学

doi: 10.3969/j.issn.1673-8225.2011.38.003

杨强, 彭江, 夏群, 马信龙, 徐宝山, 郭全义, 汪爱媛, 赵斌, 张莉, 许文静, 卢世璧. 新型脱细胞骨基质材料的制备及理化评估[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(38):7041-7044. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

临床上多种原因导致的骨缺损较为常见,骨修复一直是临床上的难题。目前治疗骨缺损的方法仍然以骨移植为主,然而,临床上关于骨移植存在的很多问题尚未有效解决。组织工程学的创立与发展为骨缺损的修复和重建提供了新的思路和方法,成为骨缺损治疗的新的突破点^[1-7]。在骨组织工程的研究中,寻找合适的支架材料是目前研究的热点之一^[8]。骨支架材料主要分为天然衍生材料、人工合成材料和复合材料。

目前,无论是天然材料或者人工合成材料均有不同程度的缺陷,即便是仿生材料也难于同骨

组织的天然结构、生物力学及生物学特性相比较。

天然材料,如脱钙骨基质,抗原性较强,影响成骨,生物力学低,其应用受到限制;完全脱蛋白骨基本上消除了抗原性,但机械轻度差;部分脱蛋白骨(如Kiel骨)具有弱抗原性,机械强度也低于正常结构骨块。经理化方法处理的天然型无机骨,是去除有机成分、具有网状孔隙结构的骨组织替代材料,可以用来修复负重部位的缺损,但因其无诱导成骨活性,且脆性大,不能实现大量诱导成骨的目的。

研究显示,天然衍生材料中的脱细胞基质材料由于经过一系列物理、化学处理,去除了细胞成分,保留了良好的力学特性、生物相容性和生物降解特性,表面和形状有利于细胞的黏附及生长因子的复合,经处理后可避免疾病传

¹Institute of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Department of Spinal Surgery, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

Yang Qiang ☆, Doctor, Attending physician, Institute of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; Department of Spinal Surgery, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China yangqiang1980@126.com

Correspondence to: Lu Shi-bi, Academician, Doctoral supervisor, Institute of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China shibilu301@gmail.com

Correspondence to: Peng Jiang, Associate professor, Institute of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China pengjdx@126.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30930092*, 31000432*; Research Found of Tianjin Health Bureau, No. 09KZ67*

Received: 2011-03-06 Accepted: 2011-04-20

¹解放军总医院全军骨科研究所, 北京市 100853;
²天津市天津医院脊柱科, 天津市 300211

杨强, 男, 1980年生, 山东省青州市人, 汉族, 2008年解放军总医院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事脊柱外科、骨科组织工程研究。
yangqiang198@126.com

通讯作者: 卢世璧, 院士, 博士生导师, 解放军总医院全军骨科研究所, 北京市 100853
shibilu301@gmail.com

并列通讯作者: 彭江, 副教授, 解放军总医院全军骨科研究所, 北京市 100853
pengjdx@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)38-07041-04

收稿日期: 2011-03-06
修回日期: 2011-04-20 (20101126001/D · W)

播和免疫排斥反应, 成为组织工程支架研究的热点^[9-16]。因此, 有理由推测, 经加工而成的脱细胞骨基质(aceller bone matrix, ACBM)作为支架材料在骨组织工程中有广阔的应用前景。

实验用新的理化方法, 对犬股骨头结构性骨块进行脱细胞处理, 以期在去除抗原性的同时, 制备的脱细胞骨基质材料在骨诱导性、生物力学强度等方面更接近于新鲜的结构性骨组织, 满足构建结构性组织工程化骨组织的需要。课题组根据骨科研究所前期研究基础, 创新性制备具有良好的结构和孔隙率并力学特性良好的ACBM材料, 并对其理化性能进行评。

1 材料和方法

设计: 材料学观察试验。

时间及地点: 实验于2008-01/2011-03于解放军总医院骨研所完成。

材料: 健康骨龄成熟普通杂种犬股骨头标本12个, 购自农贸市场。聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、冰醋酸、叠氮钠、氯仿、甲醇、脱氧胆酸钠等均购自北京化学试剂公司。

主要仪器:

主要仪器	来源
FD-1 冷冻干燥机	北京博医康技术公司
S-530 扫描电子显微镜	日本日立公司
Micro-CT	美国 GE 公司
MTS858 Mini Bionix II 力学实验机	美国 MTS 公司

方法:

ACBM支架的制备: 犬股骨头样本的制备: 12个犬股骨头标本用环钻于股骨头正上方沿股骨干方向向下钻取圆柱形骨块, 距上关节软骨面1 mm处截取软骨以及软骨下骨, 获得直径11 mm、高11 mm的圆柱形松质骨柱, 见图1, -80 °C深低温冷冻保存。

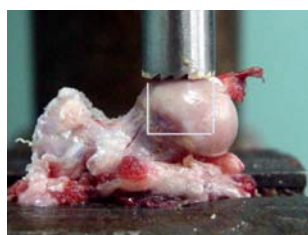


Figure 1 Bone graft harvested from load-bearing site of canine femoral head
图1 从犬股骨头部位负重区取材

ACBM支架的制备: 高压水流冲洗去除新鲜骨支架中的骨髓, 然后行脱细胞处理, 流程如下: ①3 mmol NaNO₃, 4 °C 24 h。②1:1氯仿: 甲醇中室温4 h(质量体积比为30:1)。③3% Triton-100(质量体积比30:1) 12 h。④7%脱氧胆酸钠24 h。⑤重复③、④过程1遍。⑥用去离子水反复冲洗。⑦-80 °C深低温冰箱保存。

ACBM支架的理化性能评估:

大体观察: 观察支架的大体形状以及材料的形态和色泽。

扫描电镜观察: 将支架材料纵形劈开, 表面喷金后用HITACHI S-530扫描电子显微镜观察, 重点观察脱细胞骨支架的形貌。

组织学观察: 甲醛固定, 10%EDTA脱钙, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋, 10 μm切片, 苏木精-伊红染色。光学显微镜下进行支架组织学观察, 重点观察新型理化方法去细胞的效果。

Micro-CT观察: Micro-CT观察脱细胞支架的三维立体结构。将脱细胞骨基质支架与新鲜的犬股骨头样本置于Micro-CT系统的检测试管内, 沿标本的长轴方向扫描, 获取连续的Micro-CT图像。选取兴趣区, 图像高斯滤波后, 选区固定单一域值提取矿化骨小梁的图像信息, 将图像二值化。将获取的二维图像二值化后, 进行三维重建, 用Micro-CT检测系统自带的Microview软件包进行分析, 观察不同层面支架的结构。

生物力学观察: 计算支架的生物力学强度。将脱细胞骨支架与新鲜骨均制备成标准材料力学试件(7 mm×7 mm×7 mm, n=6)。实验前确保加载装置力线垂直于支架表面, 采用直径11 mm的自制压头, 应用 MTS力学测量机, 进行位移控制加载(1 mm/min)力学测试, 得到脱细胞骨支架的弹性模量与刚度, 与同部位的新鲜骨比较。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.0软件包(美国SPSS公司)进行统计学处理, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 统计方法为成组设计资料两均数之间的t检验, P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 大体观察 大体观察见支架呈黄白色多孔网状结构, 见图2。



Figure 2 Acellular bone matrix showed yellow, porous cancellous column
图2 犬脱细胞骨柱大体形态, 呈黄白色多孔网状结构

2.2 扫描电镜观察 脱细胞骨支架材料SEM观察可见具备三维多孔网状结构系统, 见图3。

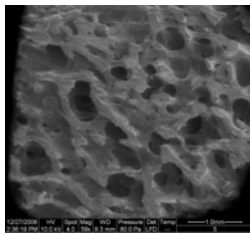


Figure 3 Scanning electron microscope showed the acellular bone structure was porous network
图3 电镜观察脱细胞骨结构, 呈多孔网状

2.3 Micro-CT观察 支架的三维图像呈现三维多孔网状结构, 见图4。支架的二维断层图像显示, 支架中的小梁结构相互连接, 小梁粗细均匀一致, 孔径大小均匀一致, 见图5。

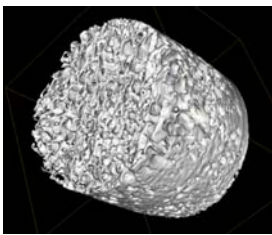
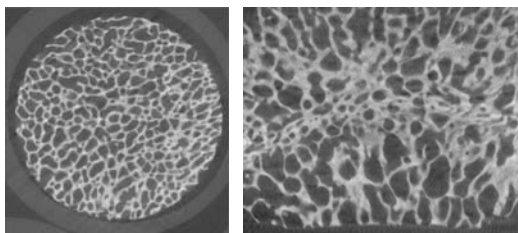


Figure 4 Micro-CT showed a three-dimensional structure of acellular bone scaffold
图4 Micro-CT 显示犬脱细胞骨支架的三维结构



a: Coronal plane b: Sagittal plane

Figure 5 Micro-CT showed a two-dimensional structure of acellular bone scaffold
图5 Micro-CT 显示脱细胞骨支架的二维结构

2.4 组织学观察 组织学观察可见骨支架中细胞去除彻底, 保留了细胞外基质, 见图6。

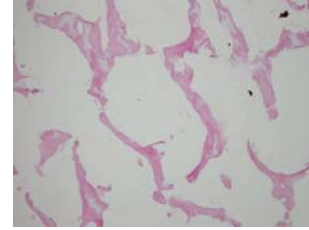


Figure 6 Morphology of the acellular bone scaffold was porous mesh shaped without residual cells (Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)
图6 犬脱细胞骨支架显示支架呈多孔网状, 未见残留细胞(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

2.5 生物力学测试 脱细胞组支架的弹性模量为(552.56 \pm 58.92) MPa, 强度为(11.34 \pm 3.49) MPa。新鲜骨的弹性模量为(576.34 \pm 50.12) MPa, 强度为(12.14 \pm 3.33) MPa。两组之间的弹性模量与强度比较, 差别均无显著性意义($P > 0.05$)。

3 讨论

近年来, 有关新的理化方法制备脱细胞基质材料以及除垢工艺的进展, 为进一步提高脱细胞骨基质材料的制备工艺以及质量提供了新的思路。国内已有ACBM的研究报道, 作者参考文献[17-21]所用脱细胞方法, 采用Triton X-100和脱氧胆酸钠联合脱细胞。Triton X-100是一种作用相当柔和的除垢剂, 在体积分数为0.1%~1.0%时, 溶解其中的蛋白酶、蛋白激酶仍具活性。而脱氧胆酸钠是一种高效的脱细胞去垢剂, 已经用于神经组织以及血管组织的脱细胞研究。本方法在氯仿与甲醇混合液脱脂的基础上, 设计使用Triton X-100与脱氧胆酸钠联合脱细胞, 发挥两者高效脱细胞的优势, 增加脱细胞的效能, 对处理后的支架材料做扫描电镜、孔隙率检测、Micro-CT观察, 组织学观察、生物力学检测, 结果表明支架材料去细胞彻底, 保留了原骨组织的天然孔隙结构, 骨小梁得以保存, 而且具备与新鲜结构性骨块具备相似的生物力学特性, 表明该处理技术能较好的去除异种或异体骨的抗原性物质, 而不影响其理化性能。

由于骨组织的免疫原性的90%来源于骨内的细胞成分, 脱细胞后骨结构中保留的主要成分是胶原和无机物, 所以组织抗原性亦明显降低。虽然组成胶原纤维的氨基酸有一定的抗原性, 但较新鲜骨的免疫原性明显下降, 这将使脱细胞骨能更有效地在体内成活, 有利于被自体骨替代。

本方法成功制备出结构性脱细胞骨支架材料, 为下一步构建可供移植的组织工程骨组织打好了良好的基础。

4 参考文献

- [1] Schumann D, Ekaputra AK, Lam CX, et al. Biomaterials/scaffolds. Design of bioactive, multiphasic PCL/collagen type I and type II-PCL-TCP/collagen composite scaffolds for functional tissue engineering of osteochondral repair tissue by using electrospinning and FDM techniques. *Methods Mol Med.* 2007; 140:101-124.
- [2] El-Ghannam A, Cunningham L Jr, Pienkowski D, et al. Bone engineering of the rabbit ulna. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(8): 1495-1502.
- [3] Meinel L, Betz O, Fajardo R, et al. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone.* 2006;39(4):922-931.
- [4] Ren T, Ren J, Jia X, et al. The bone formation in vitro and mandibular defect repair using PLGA porous scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2005;74(4):562-569.
- [5] Hou R, Chen F, Yang Y, et al. Comparative study between coral-mesenchymal stem cells-rhBMP-2 composite and auto-bone-graft in rabbit critical-sized cranial defect model. *J Biomed Mater Res A.* 2007;80(1):85-93.
- [6] Zhu L, Liu W, Cui L, et al. Tissue-engineered bone repair of goat-femur defects with osteogenically induced bone marrow stromal cells. *Tissue Eng.* 2006;12(3):423-433.
- [7] Wu W, Chen X, Mao T, et al. Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandibula. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2006; 12(4):268-276.
- [8] Binderman I, Yaffe A, Zohar R, et al. Tissue engineering of bone: an ectopic rat model. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011;3:61-68.
- [9] Knight RL, Wilcox HE, Korossis SA, et al. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves. *Proc Inst Mech Eng.* 2008;222(1):129-143.
- [10] Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2007;16(5): 567-574.
- [11] Wang X, Lin P, Yao Q, et al. Development of small-diameter vascular grafts. *World J Surg.* 2007;31(4):682-689.
- [12] Flynn L, Semple JL, Woodhouse KA. Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79(2):359-369.
- [13] Ozeki M, Narita Y, Kagami H, et al. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79(4):771-778.
- [14] Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;27(19):3675-3683.
- [15] Stock UA, Schenke-Layland K. Performance of decellularized xenogeneic tissue in heart valve replacement. *Biomaterials.* 2006; 27(1):1-2.
- [16] Schultheiss D, Gabouev AI, Cebotari S, et al. Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model. *J Urol.* 2005;173(1):276-280.
- [17] Sha D, Jiang YL. Shiyong Meirong Zhengxing Waikē Zazhi. 2000; 11(6):331-334. 沙钢,姜英令.猪长骨脱细胞骨细胞外基质的制备及生物力学、组织学性质的初步检测[J].实用美容整形外科杂志,2000,11(6):331-334.
- [18] Sun XJ, Wang ZG, Zhu PF, et al. *Zhonghua Chuangshang Zazhi.* 2005;21(11):833-837. 孙新君,王正国,朱佩芳,等.脱细胞骨基质材料的特性及生物安全性观察[J].中华创伤杂志,2005,21(11):833-837.
- [19] Sun XJ, Wang ZG, Zhu PF, et al. *Zhonghua Shiyān Waikē Zazhi.* 2005;22(3):287-289. 孙新君,王正国,朱佩芳,等.重组人骨形态发生蛋白2/脱细胞骨基质材料复合移植修复兔骨缺损的研究[J].中华实验外科杂志,2005, 22(3): 287-289.
- [20] Zhang QT, Yu Y, Yang L, et al. *Zhongguo Guzhi Susong Zazhi.* 2004;10(1):35-38. 张旗涛,于有,杨林,等.人脱细胞骨复合骨髓基质细胞成骨活性的实验研究[J].中国骨质疏松杂志,2004,10(1):35-38.
- [21] Zhang QT, Yao M, Yu Y, et al. *Zhonghua Xiaoe Waikē Zazhi.* 2004; 25(2):172-175. 张旗涛,姚猛,于友,等.同种异体脱细胞骨的生物力学性质及其临床应用[J].中华小儿外科杂志,2004,25(2):172-175.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 国家自然科学基金青年基金(31000432), 课题名称: “基于股骨髁 Micro-CT 图像的仿生骨软骨双层支架的研制及动物实验研究”; 国家自然科学基金重点课题资助(30930092), 课题名称: 仿生生物陶瓷支架构建的组织工程骨软骨复合体防止股骨头坏死塌陷的研究; 天津市卫生局科技基金(09KZ67), 课题名称: “骨软骨双层支架联合脂肪干细胞构建组织工程骨软骨复合体”。

作者贡献: 卢世璧、彭江进行实验设计, 实验实施为杨强, 实验评估为彭江、郭全义、张莉、赵斌, 资料收集为, 许文静, 夏群, 马信龙, 徐宝山; 杨强成文, 彭江审校, 卢世璧、彭江对文章负责。

致谢: 清华大学生物陶瓷国家重点实验室在电镜观察上的帮助。

利益冲突: 课题不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: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

本文创新性: 检索 CNKI, PubMed 数据库, 检索时间 2010-06, 检索关键词设定为脱细胞骨; 细胞外基质; 组织工程; Bone, Tissue engineering; Extracellular matrix; Scaffold; Biomechanical properties, 未见完全相似研究。以往研究多通过强酸或强碱等制备脱细胞骨, 不可避免会破坏天然骨的成骨活性, 而本实验通过性质比较温和的 Triton X-100 与脱氧胆酸钠联合脱细胞, 能更好保留其成骨活性。