

· 论 著 ·

EPCs 促血管化组织工程骨修复大段骨缺损的早期组织学评价*

吴雪晖, 谢肇, 罗飞, 许建中[△], 曾玲, 孙东

(第三军医大学西南医院骨科, 重庆 400038)

摘要:目的 评价血管内皮祖细胞(EPCs)促血管化组织工程骨修复大段骨缺损的早期组织学结果。方法 将来源于自体骨髓的 EPCs 与经成骨诱导的骨髓间充质干细胞(BMSCs)及脱钙骨基质(DBM)共同构建的促血管化组织工程骨修复兔桡骨大段骨缺损,通过光镜、扫描电镜、透射电镜等方法观察术后 2、4 周时骨缺损区的组织学改变。结果 实验组(EPCs+BMSCs+DBM)软骨细胞和成骨细胞数量更多,功能更活跃,骨小梁更成熟,并可见较多梭形的血管内皮细胞,新生血管更丰富。结论 EPCs 促血管化组织工程骨能在骨愈合早期促进新生血管形成,并进一步促进成骨,加速骨愈合。

关键词:血管内皮祖细胞;组织工程骨;骨缺损;组织学

中图分类号:R683;R329-33

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2009)22-2839-02

A histologic evaluation on vascularization of tissue engineering bone induced by endothelial progenitor cells (EPCs) for repairing large segmental defects in early period of bone healing*

WU Xue-hui, XIE Zhao, LUO Fei, et al.

(Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the histologic evaluation on vascularization of tissue engineering bone induced by endothelial progenitor cells (EPCs) for repairing large segmental defects in early period of bone healing. **Methods** Vascularization promoting tissue engineering bone constructed by EPCs derived from autogenous marrow, bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) and demineralized bone matrix (DBM) were jointly applied to repair large segmental defects in rabbit radius; the histologic changes of defect areas were observed with light microscope, scanning electron microscope and transmission electron microscope etc. 2 weeks and 4 weeks postoperatively. **Results** There were more chondrocytes and osteoblasts with more active functions in experimental group (EPCs+BMSCs+DBM) and the bone trabecula was more mature; multiple spindle-shaped vascular endothelial cells could be observed and there were much more new blood vessels. **Conclusion** Vascularization of tissue engineering bone induced by EPCs can promote the neovascularization in early period of bone healing, and to further promote osteogenesis and speed up bone healing.

Key words: endothelial progenitor cells; tissue engineering bone; bone defect; histology

大段骨缺损的治疗是目前骨科领域尚未完全解决的一个疑难问题。骨组织工程技术的发展,为解决这一难题提供了良好的前景。而大段组织工程骨植入骨缺损区后如何尽快完成血管化、重建局部血供,并进一步促进成骨是当前研究的重点。本实验利用血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的促血管生成作用,观察促血管化组织工程骨作用于大段骨缺损区后的早期组织学改变。

1 材料与方 法

1.1 材料 D-Hanks 液,DMEM/F12 培养基,15%胎牛血清, Percoll 分离液(美国, Hyclone), 脱钙骨基质(decalcified bone matrix, DBM), 成骨诱导培养基(第三军医大学西南医院骨科实验室), 纤维连接素(Fibronectin)、EGM-2 培养基及 Singlequot 组合添加剂(美国, Combrex), KYKY-EM3200 扫描电镜(北京, 中科科技技术发展有限公司), TECNAI 10 透射电镜(荷兰, 飞利浦)等。

1.2 方法

1.2.1 脱钙骨基质(DBM)的制备 取新鲜牛胫骨平台处松

质骨,切割成 10mm×3mm×3mm 大小的骨颗粒。3mmol/L NaNO₃ 溶液浸泡,1:1 等体积比的氯仿/甲醛室温下脱脂,0.6 M 盐酸脱钙,蒸馏水泡洗至 pH 达 6.0 以上。2.0~2.5Mrad (15~30kGy)⁹⁰Co γ 射线照射灭菌。置-80℃超低温冷冻箱内保存。

1.2.2 骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)的传代培养及成骨诱导 抽取兔双侧髂骨骨髓 4mL, 20℃, 400×g 离心 20min, 吸取中间乳白色云雾状有核细胞层,加入 D-Hanks 液 20mL, 200×g 离心 5min, 获得单个核细胞并将其加入 DMEM / F12 原代培养液中,以 2×10⁵/cm² 的细胞密度接种,加入含 15%胎牛血清的完全培养基 5mL, 置 37℃, 体积百分比为 5% CO₂ 饱和湿度孵箱内孵育。待细胞集落大部分融合后,按 1×10⁴/cm² 的细胞密度接种入新的 250mL 培养瓶中继续传代。从第 3 代开始,更换成骨诱导培养基,6d 后用质量百分比为 0.3%胰酶消化,200×g 离心

* 基金项目:重庆市科委自然科学基金计划资助项目(CSTC, 2007BB5044)。 [△] 通讯作者,电话:023-68754164; E-mail: spine@mail. tmu. com. cn.

5min,收集沉淀,加入 1mL 成骨诱导液,制成细胞浓度为 2×10^6 /mL 单细胞悬液,即可上架构建组织工程骨。

1.2.3 EPCs 的培养 在 BMSCs 进行成骨诱导的同时,再次抽取同一只动物双侧髂骨骨髓,获得单个核细胞,加入含 Singlequot 组合添加剂的 EGM-2 完全培养液 4mL,制成细胞悬液。将细胞接种于事先包被了 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 纤维连接蛋白的培养瓶中,加入 EGM-2 完全培养液 5mL。37℃,体积百分比 5% CO_2 饱和湿度培养。6d 后细胞集落大部分融合,用质量百分比 0.3% 胰酶消化, $200 \times \text{g}$ 离心 5min,收集沉淀,加入 1mL EBM-2 培养基,制成细胞浓度为 2×10^6 /mL 单细胞悬液,即可与经成骨诱导的 BMSCs 一起上架构建组织工程骨。

1.2.4 实验动物及分组 健康 4~5 月龄成年新西兰大耳白兔 32 只(第三军医大学西南医院动物实验中心),随机分为 3 组,利用同一只动物双侧前肢进行自身对照。实验组为 EPCs 促血管化组织工程骨(EPCs+BMSCs+DBM),自身对照组不含 EPCs(BMSCs+DBM),阴性对照组为单纯 DBM。3% 戊巴比妥钠(1mL/kg)耳缘静脉麻醉后,骨剪截取桡骨中段 12~15mm 长骨,造成大段骨缺损(20%),置入与缺损部位同体积的组织工程骨或单纯 DBM,术后肢体无需固定。

1.3 组织学观察指标

1.3.1 光镜观察 术后 3d 及 2、4 周取骨缺损区标本,常规固定,脱钙,切片,HE 染色,普通光学显微镜下观察。

1.3.2 扫描电镜观察 术后 2 周取骨缺损区标本,常规固定,脱钙,钨酸染色包埋,扫描电镜下观察组织工程骨植入动物体内后 DBM 支架表面细胞的黏附情况。

1.3.3 透射电镜观察 术后 3d 及 2、4 周取骨缺损区标本,常规固定,脱钙,钨酸染色包埋,透射电镜下观察细胞超微结构。

2 结 果

2.1 组织学光镜 术后 3d 镜下可见移植骨的支架结构,支架间隙内见纤维素、红细胞及少量炎细胞浸润。实验组骨支架表面及支架间隙可见圆形细胞,符合经成骨诱导的 BMSCs 细胞形态;还可见梭形细胞,符合 EPCs 形态。自身对照组骨支架表面及支架间隙可见圆形细胞,未见梭形细胞。阴性对照组未见上述两种细胞。术后 2 周实验组原始骨痂开始形成,新生骨小梁中有较多软骨细胞,形成软骨岛,骨小梁表面可见成骨细胞(插页 III 图 7a)。自身对照组,也可见上述表现,但软骨细胞及成骨细胞数量较实验组少,增生活跃程度弱于实验组(插页 III 图 7b)。阴性对照组骨小梁疏松,成骨细胞小,不活跃,未见软骨细胞(插页 III 图 7c)。术后 4 周实验组骨小梁较 2 周时更成熟,成骨细胞数量多,肥胖,可见骨陷窝,骨小梁间隙内见丰富的血管和梭形的血管内皮细胞。自身对照组骨小梁不如实验组成熟,小梁表面有大量丰富的成骨细胞,可见软骨及少量骨陷窝,骨小梁间隙内可见数量较少的血管和内皮细胞。阴性对照组骨小梁表面有少量成骨细胞,小梁间隙内炎细胞浸润,软骨形成,成骨较差。

2.2 组织学扫描电镜 实验组可见大量类圆形细胞布满支架表面(插页 III 图 8a),自身对照组也可见类似圆形细胞,但数量相对较少(插页 III 图 8b),阴性对照组细胞数量极少(插页 III 图 8c)。

2.3 组织学透射电镜 术后 3d 实验组和自身对照组可见移

植骨支架及附着于其表面的成骨细胞;阴性对照组支架材料有溶解吸收现象,见较多吞噬细胞。术后 2 周实验组和自身对照组均见原始骨痂形成,早期骨基质内有胶原、纤维母细胞沉积,成骨细胞功能活跃,粗面内质网丰富,新生骨周围可见骨支架被溶解吸收后残留碎片,实验组成骨更为活跃。阴性对照组可见支架及吞噬细胞,部分支架溶解,未见成骨细胞。术后 4 周实验组和自身对照组均可见大量粗面内质网非常丰富,功能活跃的成骨细胞,并可见一些散在的骨细胞,实验组数量更多,功能更活跃;新生骨组织中除胶原组织外,还可见钙盐沉积,实验组胶原排列更整齐,钙盐沉积更多(插页 III 图 9a、b)。阴性对照组可见成骨细胞,功能不活跃,胶原排列不整齐,有少量钙盐沉积(插页 III 图 9c)。

3 讨 论

骨缺损的修复必须依赖于血管和骨细胞之间建立密切的空间和时间联系。血管化是骨愈合过程中最基本的环节,它将成为骨细胞、前体细胞、相关信号分子、营养物质及其他参与骨发生与修复的细胞大量携带到局部微环境中,并带走局部新陈代谢产生的废物及坏死分解产物,维持局部为一个动态的微环境^[1]。应用大块组织工程骨修复大段骨缺损时,组织工程骨的早期血管化问题目前尚未得到很好的解决,支架内血供不充分的种子细胞会由于无效的氧气、营养元素和代谢产物等物质转运而缺血坏死,从而导致修复失败^[2]。因此,组织工程骨,特别是大段组织工程骨植入骨缺损区后如何尽快完成血管化,重建局部血供,是当前研究的重点^[3]。Asahara 等^[4]报道在成人外周血中分离出一种 $\text{CD}34^+$ 的单个核细胞,体外培养能分化成纺锤样的贴壁细胞,表达内皮细胞家族的特异性抗原,在动物实验中参与新生血管的形成。因此认为这种 $\text{CD}34^+$ 细胞即为 EPCs。随着日益成熟的分离和扩增技术,EPCs 可以较容易地从外周血或骨髓中获得。因 EPCs 体外培养时分化较快,所以体内实验多在早期应用^[5]。Niagara 等^[6]采用 VEGF 和 Ang-1 双重基因转染的自体 EPCs 与 BMSCs 混合培养,使 EPCs 能迅速转化为血管内皮细胞,分泌促血管生长因子,并促使 BMSCs 向内皮细胞分化,从而促进组织工程骨的早期血管化。随后的研究中^[7],EPCs 被越来越多地应用于临床缺血性疾病、血管创伤愈合的治疗中。

本实验从动物自体骨髓中分离出单个核细胞,经诱导 6d 后获得 EPCs,与经成骨诱导的 BMSCs 一起种植于支架材料上,构建促血管化组织工程骨修复兔桡骨大段骨缺损^[8],通过组织学方法观察骨缺损区早期血管化及成骨效果。结果表明,体内诱导成骨的过程表现为典型的软骨内成骨。术后早期(2~4 周),实验组较对照组表现出更强的成骨能力;新生骨小梁更加成熟,其中可见大量的软骨细胞和粗面内质网非常丰富,功能活跃的成骨细胞,骨小梁间隙内见丰富的血管和梭形的血管内皮细胞,骨基质内有排列更整齐的胶原、纤维母细胞和更多的钙盐沉积,4 周时还可见一些散在的骨细胞。2 周时扫描电镜观察到实验组的 DBM 支架表面有大量类圆形细胞,虽然无法确定这些细胞的具体类型,但很可能是成骨细胞、成软骨细胞等再生功能活跃的细胞。实验结果提示 EPCs 进入动物体内后,逐渐分化为成熟的血管内皮细胞,直接参与血管新生;同时分泌 VEGF 等细胞生长因子,通过自分泌(下转第 2843 页)

碍)、肺水肿及肺不张、肾功能衰竭等。这些损伤往往不能被核磁共振或 CT 所发现,其机制仍未得到阐明,这需要从细胞和基因水平进行研究。作者建立兔 CPB,旨在为 CPB 术后多脏器损伤,尤其脑损伤病理生理及其保护机制研究提供经济、适用的动物模型。

目前 CPB 动物模型主要选用犬、猪、羊等大型动物^[1-3],而兔模型报道较少。兔 CPB 模型大多采用腹主动脉灌注及右心房插管引流,操作繁琐,容易出血,且影响心脏复跳,成功率低^[4]。基于此,本实验比较建立了兔经胸和非经胸两种 CPB 模型,发现非经胸 CPB 模型操作简单,不易出血,且心脏不停跳,冠脉循环存在,有利于心肌保护;不开胸,减少了肺损伤。因而,建模成功率高(93.3%)。

本实验采用体外插管法建立兔非经胸 CPB 模型,创伤小,操作相对简单,关键步骤是心房-腔静脉引流。如果颈静脉插管方向不正确或用力不当或插管过深,可导致引流管穿破腔静脉或心脏从而导致实验失败。避免此类失误在于熟悉心脏位置和腔静脉走向,而且操作手法要轻柔。另外,转流开始适当调整引流管深度和方向,使腔房引流完全,这从动脉波形得到证实,如果引流不充分,则动脉波形仍为搏动性,血压不降甚至升高,此时为部分 CPB;如果引流充分,则为完全 CPB,虽然有心脏搏动,但动脉波形近乎直线,动脉压迅速降低。而心房-腔静脉引流充分的先决条件是选好引流管,于洋等^[5]认为所选引流管内径不得小于 4mm,本实验发现,有的兔虽然体重较重,其颈内静脉内径可能较小,因此,本实验把引流管内径定为 3.5~5.0mm,并间隔 0.5mm 制作一根引流管,根据术中情况选择合适的导管。CPB 转流时,转流量一定,但转速可因泵管内径、血泵型号的不同而产生较大差异。因此,转流量不能看

血泵显示的流量,应事先认真地测定泵管每转流量,根据转速计算流量,调整转速。另外,CPB 刚开始时,转速一定要控制好,避免过快排空右心房血液,致灌-引失衡,导致发生不可逆转的并发症。其他,如兔的体质量小,应尽量减少预充量,本实验婴儿膜肺的预充量仅 75mL。CPB 管道应尽可能的细、短。术中应根据 MAP、CVP 等监测指标及时调整灌注流量,必要时给予升压药维持循环稳定。

总之,兔非经胸 CPB 可模拟临床 CPB,模型建立可靠,同经胸 CPB 模型相比,其对血流动力学的干扰较小,不开胸,操作简便且建模所需时间短,成功率高,经济可行,并可以长期存活,因而更适用于 CPB 术后多脏器损伤,尤其脑损伤病理生理及其保护机制的基础研究。

参考文献:

- [1] 赵赞,胡克俭,杨改生,等.犬的体外循环模型建立和管理[J].中国体外循环杂志,2004,4:217.
- [2] 邢建洲,杨辰垣,于君,等.猪体外循环模型用于脑保护研究[J].医学研究生学报,2002,4:312.
- [3] 周成斌,庄建,陈奇梅,等.胎羊心脏转流模型的建立[J].中华实验外科杂志,2003,20:852.
- [4] Kim WG, Moon HJ, Won TH, et al. Rabbit model of cardiopulmonary bypass[J]. Perfusion, 1999, 14(2):101.
- [5] 于洋,叶明,夏求明.兔体外循环模型的建立[J].中国胸心血管外科临床杂志,2003,2:151.

(收稿日期:2009-05-29 修回日期:2009-06-20)

(上接第 2840 页)

泌和旁分泌效应促进血管新生,在缺血组织中表现为血管趋向成熟,毛细血管和动脉密度增高;从而促进组织工程骨的血管化,使组织工程骨植入体内后迅速建立良好的血供,并在成骨的早期促进骨缺损区的成骨细胞及成软骨细胞增殖、分化,加快软骨岛的形成和钙盐的沉积,有利于骨愈合。组织学观察证实,复合了 EPCs 的组织工程骨能完成早期血管化,在骨愈合的早期提高了组织工程骨的成骨活性,有效地促进了大段骨缺损的修复重建。同时,EPCs 和 BMSCs 均来自于同一动物的骨髓,无免疫排斥的问题,为临床应用提供了实验基础。

参考文献:

- [1] Stahl A, Wu X, Wenger A, et al. Endothelial progenitor cell sprouting in spheroid cultures is resistant to inhibition by osteoblasts: a model for bone replacement grafts [J]. FEBS Lett, 2005, 579(24):5338.
- [2] Mastrogiacomo M, Corsi A, Francioso E, et al. Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate [J]. Tissue Eng, 2006, 12(5):1261.
- [3] Andreas HZ. Tissue engineering of angiogenesis with autologous endothelial progenitor cells [J]. Curr Opin Bio-

tech, 2004, 15(5):424.

- [4] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science, 1997, 275(5302):964.
- [5] Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, et al. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2004, 33(1):60.
- [6] Niagara MI, Haider HK, Ye L, et al. Autologous skeletal myoblasts transduced with a new adenoviral bicistronic vector for treatment of hind limb ischemia [J]. Vas Surg, 2004, 40(4):774.
- [7] Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, et al. CD34⁻/CD133⁺/VEGFR-2⁺ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities [J]. Cir Res, 2006, 98(3):20.
- [8] 吴雪晖,谢肇,许建中,等.放射性骨显像在组织工程骨修复骨缺损实验中的应用. [J]. 重庆医学, 2007, 36(9):777.

(收稿日期:2009-09-18)