

## 不同孔径的羟基磷灰石对组织工程骨血管化促进效果的研究

杨国志<sup>1</sup>,张长成<sup>1</sup>,李振武<sup>1</sup>,赵瑞强<sup>2</sup>,刘军廷<sup>3</sup>,尹锐峰<sup>1</sup>,李志安<sup>1</sup>

(1. 河南省南阳市中心医院骨科二病区 473009; 2. 广西医科大学基础医学院, 南宁 530021; 3. 广西医科大学第一附属医院骨科, 南宁 530021)

**[摘要]** **目的** 探讨不同孔径的羟基磷灰石材料对组织工程骨血管化效果的影响。**方法** 采用 Wistar 雄性大鼠, 随机分为 A、B、C 3 组, 分别在其背部皮下植入孔径为 200~300、350~450、500~600  $\mu\text{m}$  的羟基磷灰石生物陶瓷(复合 4  $\mu\text{g}$  骨形态发生蛋白), 大小约 5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 1 mm, 重约 40 mg。分别于植入后第 1、2、3、4 周后处死动物, 取出植入物及周围组织, 采用苏木素-伊红染色组织学观察, 分析局部新生血管化情况。**结果** 3 组不同时间点的血管化面积, 组内比较: A 组第 2、3 周差异有统计学意义、B、C 组不同时间点差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 组间比较: 术后 1 周, 仅 C 组有血管化面积; 术后 2~4 周, B、C 组增加的面积高于 A 组( $P<0.05$ ), C 组可见大量新生血管并形成清晰可见的骨小梁。**结论** 孔径为 500~600  $\mu\text{m}$  的羟基磷灰石生物陶瓷能够更好地促进组织工程骨的血管化。

**[关键词]** 羟基磷灰石类; 新生血管化, 生理性; 组织工程骨; 骨缺损**[中图分类号]** R318.08**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)23-3195-03

## The effect of different pore sized hydroxyapatite for promoting bone vascularization in tissue engineering

Yang Guozhi<sup>1</sup>, Zhang Changcheng<sup>1</sup>, Li Zhenwu<sup>1</sup>, Zhao Ruiqiang<sup>2</sup>, Liu Junting<sup>3</sup>, Yin Rui feng<sup>1</sup>, Li Zhi'an<sup>1</sup>

(1. Department of Orthopedic Ward 2, the Center Hospital of Nanyang City, Nanyang, Henan 473009, China; 2. Basic Medical College of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of different pore sized hydroxyapatite for promoting bone vascularization in tissue engineering. **Methods** Male Wistar rats were randomly divided into three groups, named group A, B and C, which were implanted hydroxyapatite bioceramics compositing 4  $\mu\text{g}$  bone morphogenetic protein with different aperture of 200—300, 350—450, 500—600  $\mu\text{m}$  in the back subcutaneously. The size of each block was 5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 1 mm in a weight about of 40.0 mg. After implantation, the animals were killed and the implants and the surrounding tissue were taken out at the first, second, third and fourth week respectively. HE staining of histological analysis was used to detect the situation of local neovascularization. **Results** There was significant difference between second and third week in group A. Comparing the area of vascularization at different time points in group B and group C, there were significant difference in the comparison of intragroup ( $P<0.05$ ). During the first week after surgery, there was only group C that had the area of vascularization. During the second and fourth week after operation, the area of vascularization in group B and group C were significant higher than group A ( $P<0.05$ ). The C group showed a great deal of newborn blood vessels and clear formation of bone trabeculae. **Conclusion** The hydroxyapatite bioceramics of 500—600  $\mu\text{m}$  could better promote vascularization of tissue engineering in bone.

**[Key words]** hydroxyapatites; neovascularization, physiologic; tissue-engineered bone; bone defect

近年来,羟基磷灰石等组织工程骨替代材料的研究进展已取得较大突破,为修复各种骨组织缺损提供了新的治疗手段。但由于种子细胞的存活范围有限,大面积的骨组织缺损仍然是当今的一大难题<sup>[1]</sup>。主要是由于位于组织工程骨特定解剖部位的种子细胞无法得到充足的血液供应,进而影响了组织工程骨的成骨化。因此,组织工程骨的血管化程度是影响骨缺损修复手术的关键因素之一<sup>[2]</sup>。本研究通过考察不同孔径的复合骨形态发生蛋白的羟基磷灰石生物陶瓷,探讨一种可更好地促进骨血管化的组织工程骨材料,为临床应用提供参考。

## 1 材料与方 法

## 1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar 系雄性大鼠 72 只,15~25 日龄,体质量 50~70 g,由天津赛尔生物技术有限公司提供。

1.1.2 材料和试剂 羟基磷灰石生物陶瓷孔径分别为 200~

300  $\mu\text{m}$ , 350~450  $\mu\text{m}$  和 500~600  $\mu\text{m}$ , 大小约 5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 1 mm, 重约 40 mg, 购自四川大学生物材料工程研究中心。每块羟基磷灰石生物陶瓷复合 4  $\mu\text{g}$  重组人骨形态发生蛋白(BMP-2), 购自上海麦仑生物技术有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 分组处理 取 Wistar 系雄性大鼠, 随机分为 3 组, 每组 24 只。其中, A 组植入孔径为 200~300  $\mu\text{m}$  的羟基磷灰石+4  $\mu\text{g}$  重组人 BMP-2; B 组植入孔径为 350~450  $\mu\text{m}$  的羟基磷灰石+4  $\mu\text{g}$  重组人 BMP-2; C 组植入孔径为 500~600  $\mu\text{m}$  的羟基磷灰石+4  $\mu\text{g}$  重组人 BMP-2, 每块植入物大小均为 5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 1 mm, 重约 40 mg。采用大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(4 mg/100 g)进行麻醉。将大鼠背部朝上固定于夹板上, 剃毛, 用 70% 医用乙醇消毒, 按照上述分组方法, 将复合 BMP-2 的羟基磷灰石生物陶瓷植入大鼠背部皮下, 缝合伤口, 并注射

适量青霉素钠注射液,连续 3 d,预防伤口感染<sup>[3]</sup>。分别于植入后的第 1、2、3、4 周,每周处死 6 只,用过量乙醚处死动物,取出植入物和周围组织,进行 X 线片和组织学分析<sup>[4]</sup>。

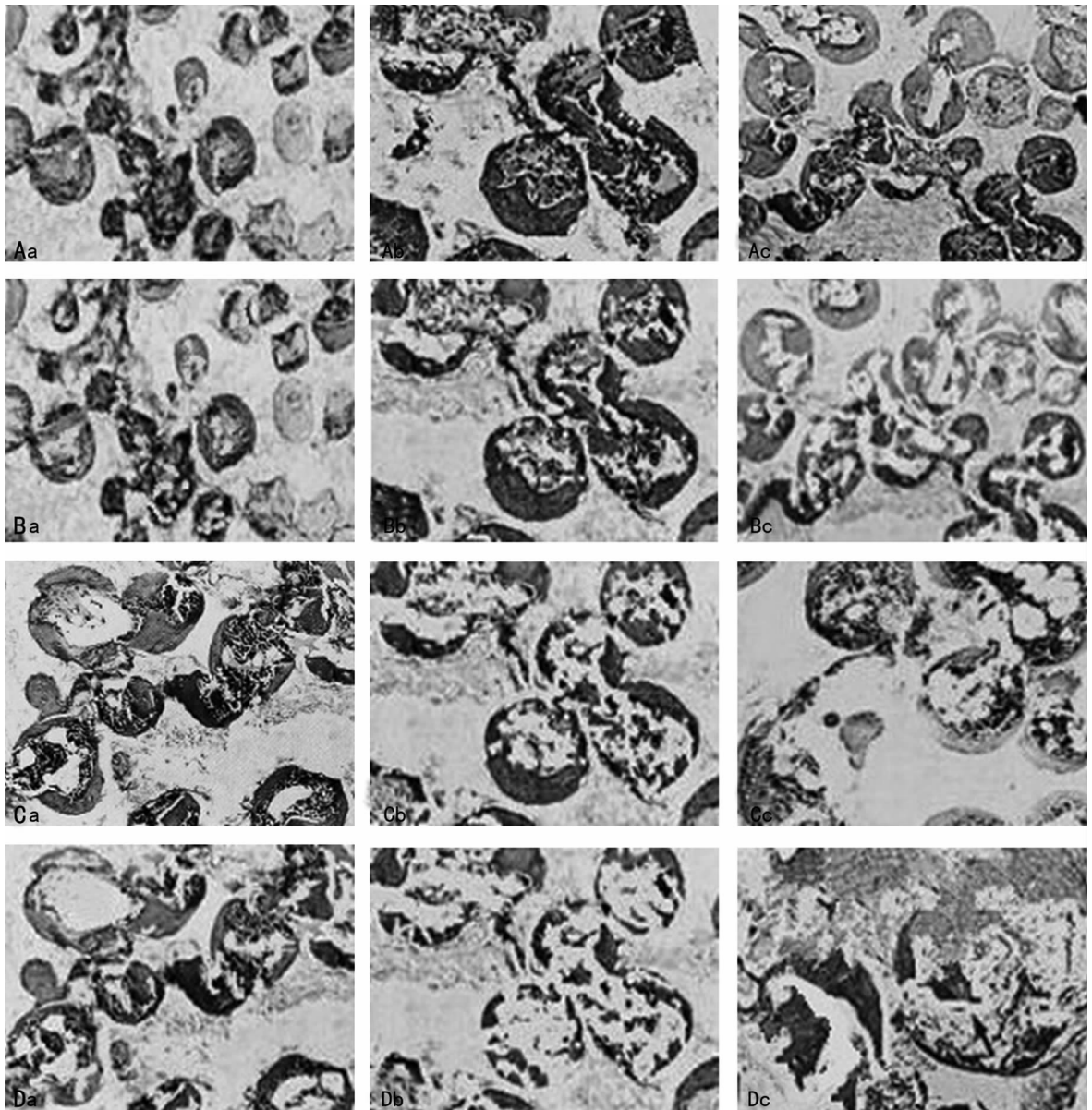
**1.2.2 血管面积图像计量分析<sup>[5]</sup>** 将取出的组织样品,置于 10% 中性甲醛溶液中固定,制备组织切片,厚度约为 4 mm,采用苏木素-伊红(HE)染色,在 100 倍光镜下观察。采用 Image pro plus 5.1 软件进行血管面积图像分析,随机选取 10 个视野,计算视野中血管所占面积。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 进行分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 组织学分析** 大鼠术后无不良反应,伤口无感染、炎性反

应,仅少数大鼠术后 3 d 内出现皮下积液,7 d 后自行消失,不影响最终的实验效果。术后第 1 周,C 组可见有少量纤维结缔组织生成,A、B 组均无纤维结缔组织出现(图 1 Aa~Ac);术后第 2 周,C 组开始出现较多新生毛细血管和骨母细胞,B 组开始出现少量新生血管和大量纤维结缔组织,A 组可见大量结缔组织,未见新生血管(图 1 Ba~Bc);第 3 周,C 组可见大量新生毛细血管和成骨细胞,B 组可见少量新生血管,A 组开始出现少量新生血管、大量纤维结缔组织(图 1 Ca~Cc);第 4 周,C 组可见大量新生血管并形成清晰可见的骨小梁,B 组可见新生血管大量增加并开始出现少量成骨细胞,A 组新生血管量也明显增加,但未发现成骨细胞(图 1 Da~Dc)。



A: 术后第 1 周组织学特征;B: 术后第 2 周组织学特征;C: 术后第 3 周组织学特征;D: 术后第 4 周组织学特征。a: A 组;b: B 组;c: C 组。

图 1 术后第 1~4 周 A、B、C 组组织学特征( $\times 2000$ )

**2.2 血管面积图像计量分析** 组内比较:A 组,术后第 2 周与术后第 3 周血管化面积差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),B、C 组不同时间点差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。组间比较:术后 1 周,仅 C 组有血管化面积,与 A、B 组比较差异有统计学意义

( $P < 0.05$ );术后 2~3 周,B、C 组增加的面积高于 A 组( $P < 0.05$ );术后 4 周,C 组血管化面积略有降低,但仍大于 A、B 组血管化面积,且可见部分骨小梁,另外两组增速也有所下降,组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 3 组羟基磷灰石生物陶瓷的血管化面积比较 ( $n=24, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	血管化面积(%)			
	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周	术后 4 周
A 组	0	0	1.79±0.39 <sup>b</sup>	1.83±0.72
B 组	0	1.36±0.21 <sup>ab</sup>	3.25±0.46 <sup>ab</sup>	3.46±0.53 <sup>ab</sup>
C 组	0.25±0.09 <sup>a</sup>	5.69±0.17 <sup>abc</sup>	6.83±0.32 <sup>abc</sup>	6.72±0.70 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 A 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 不同时间点组内比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 B 组比较。

### 3 讨 论

随着交通工具的迅速发展,因意外事故造成的骨组织损伤已经成为威胁人类生命健康的重大问题之一。现今,利用人工组织工程骨修复骨损伤的临床基础研究已经成为研究热点方向<sup>[6-7]</sup>。随着组织工程骨的应用研究越来越深入,组织工程骨材料的选择和血管再生程度对骨组织损伤,特别是大面积的骨损伤具有十分重要的影响,直接关系到骨损伤部位的愈合效果。组织工程骨血管化程度是保证植入物成活的基本保证,也是骨组织工程的关键技术之一<sup>[8]</sup>。

多孔羟基磷灰石作为一种常用的组织工程骨人工合成生物材料<sup>[8]</sup>,鉴于其与人体骨骼的无机成分十分相近,且具有良好的生物相容性,已被广泛应用于临床骨组织损伤的治疗研究。近年来,在体外构建复合种子细胞的支架材料体系移植到动物体内,对种子细胞在支架材料中附着、分化和成长机制研究越来越多<sup>[9]</sup>。研究表明位于组织工程骨支架 200  $\mu\text{m}$  以上的种子细胞可能无法通过渗透作用从周边组织环境中获取营养成分,只有建立新的血液运营系统,为其提供充足的营养物质,才能满足组织工程骨在体内成骨化的需求<sup>[10]</sup>。

早在 1985 年有人提出孔径范围在 200~600  $\mu\text{m}$  的羟基磷灰石材料具有较好的成骨化作用<sup>[11]</sup>,但羟基磷灰石材料的孔径范围不够精确,材料孔径对组织工程骨成骨化的影响还需要进一步地深入研究。本实验结果显示,随着羟基磷灰石孔径越大,组织工程骨血管化面积越大,越有利于骨组织损伤部位的成骨化。随着羟基磷灰石孔径增大,其血管化面积逐渐增大,骨损伤部位的成骨化效果也越来越好。特别是孔径范围在 500~600  $\mu\text{m}$  内的羟基磷灰石生物陶瓷具有最大的血管化面积和骨组织特征,提示孔径为 500~600  $\mu\text{m}$  的羟基磷灰石生物陶瓷具有最佳的促进骨损伤部位血管化和成骨化的效果,同时也验证了有关文献中报道孔径为 500~600  $\mu\text{m}$  的羟基磷灰石生物陶瓷在动物体内能够在材料内外表面均能形成刚性骨架结构的说法<sup>[12-15]</sup>。推测可能的原因是因为若羟基磷灰石材料孔径过细,则不利于植入细胞的增殖、分化和生长,进而阻碍植入物内部血管的生成,具体生物学机制还需要进一步实验研究证明。所以,建议使用孔径为 500~600  $\mu\text{m}$  的羟基磷灰石生物陶瓷来修复骨组织损伤,能够较好地促进组织工程骨血管化,加快种子细胞的成骨化,最终达到更好治愈骨组织创伤的临床效果。

### 参考文献

[1] 肖仕辉,韦积华,韦庆军. 组织工程骨血管化的研究新进展[J]. 广东医学,2012,33(11):1680-1682.

[2] 史雨林. 组织工程骨血管化的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志,2011,38(2):242-245.

[3] Cyster LA, Grant DM, Howdle SM, et al. The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2005, 26(7): 697-702.

[4] Chen L, Gu Y, Feng Y, et al. Bioactivity of porous biphasic calcium phosphate enhanced by recombinant human bone morphogenetic protein 2/silk fibroin microsphere[J]. J Mater Sci Mater Med, 2014, 25(7): 1709-1719.

[5] Kasten P, Beverungen M, Lorenz H, et al. Comparison of platelet-rich plasma and VEGF-transfected mesenchymal stem cells on vascularization and bone formation in a critical-size bone defect[J]. Cells Tissues Organs, 2012, 196(6): 523-533.

[6] 赵天源,孙红. 骨组织工程支架材料及其血管化的研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(38): 6832-6838.

[7] 王耀一,杨新明,胡振顺,等. 利用显微外科技术促进组织工程骨血管化的研究进展[J]. 实用骨科杂志, 2011, 17(11): 1004-1006.

[8] 岑超德,罗聪. 可降解组织工程骨材料及其血管化研究: 问题与应用前景[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(21): 3391-3397.

[9] Perniconi B, Coletti D, Aulino P, et al. Muscle acellular scaffold as a biomaterial: effects on C2C12 cell differentiation and interaction with the murine host environment[J]. Front Physiol, 2014, 5(5): 354.

[10] 李焰,张建设,董秀华. 组织工程骨的体外预血管化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(33): 6013-6020.

[11] Hao Z, Feng W, Hao T, et al. Study on bone marrow mesenchymal stem cells derived osteoblasts and endothelial cells compound with chitosan/hydroxyapatite scaffold to construct vascularized tissue engineered bone[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2012, 26(4): 489-494.

[12] Sayin E, Baran ET, Hasirci V. Protein-based materials in load-bearing tissue-engineering applications[J]. Regen Med, 2014, 9(5): 687-701.

[13] Yang W, Both SK, Zuo Y, et al. Biological evaluation of porous aliphatic polyurethane/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 4(10): 1002.

[14] Teixeira S, Fernandes H, Leusink A, et al. In vivo evaluation of highly macroporous ceramic scaffolds for bone tissue engineering[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 93(2): 567-575.

[15] Guda T, Walker JA, Singleton B, et al. Hydroxyapatite scaffold pore architecture effects in large bone defects in vivo[J]. J Biomater Appl, 2014, 28(7): 1016-1027.