

·基础研究·

3D打印胶原/羟基磷灰石支架对骨髓间充质干细胞成骨分化的作用研究

郭波^{1,2} 柳柳¹ 马旭^{1,2} 智春升³ 杜明昌¹ 翟良全¹ 杨政博¹ 王佳媛² 王译晗²

【摘要】 目的 探讨3D打印胶原/羟基磷灰石支架对骨髓间充质干细胞成骨分化的作用。**方法** 分离SPF级雄性SD大鼠骨髓间充质干细胞,实验分为:对照组、浸提组、诱导组及浸提诱导组,MTT法检测对照组,浸提组的细胞增殖情况,对比分析各组细胞的碱性磷酸酶(ALP)活性,对各组细胞诱导培养17天后进行茜素红染色,观察钙结节染色情况。**结果** MTT结果显示,浸提组与对照组在不同时间点的OD值比较,差异无统计学意义($P>0.05$),ALP活性结果显示,不同时间点各组与对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$);不同时间点浸提诱导组与浸提组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$);诱导组在48 h及72 h与浸提组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。茜素红染色结果显示,对照组细胞无钙结节点,浸提组及诱导组镜下肉眼可明显观察到红色区域染色,镜下观察可见钙结节点,浸提诱导组所产生的钙结节点的数量、大小以及染色的颜色深度均明显优于其他各组。**结论** 3D打印胶原/羟基磷灰石支架具有生物相容性好,可促进BMSCs向成骨分化,对细胞毒性低等特点,适宜用作骨缺损的治疗。

【关键词】 胶原; 羟基磷灰石; 间充质干细胞; 成骨分化

Effect of 3D printed collagen / hydroxyapatite scaffold on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells Wu Bo^{1,2}, Liu Ye¹, Ma Xu^{1,2}, Zhi Chunsheng³, Du Mingchang¹, Zhai Liangquan¹, Yang Zhengbo¹, Wang Jiayuan², Wang Yihan². ¹Department of Joint Surgery, Shenyang Orthopaedic Hospital, Shenyang 110044, China; ²Key Laboratory of Osteoarthropathy of Liaoning Province, Shenyang 110044, China; ³Department of Orthopaedic and Oncology, Shenyang Orthopaedic Hospital, Shenyang 110044, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of 3D printed collagen / hydroxyapatite scaffold on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. **Methods** Rat BMSCs were isolated from rat bone marrow. Cell proliferation and differentiation were detected by MTT and ALP activity. After inducing cell culture for 17 days, cells in each group were stained with alizarin red to observe the staining of calcium nodules. **Results** The MTT results showed that there was no significant difference in OD between the extraction group and the control group at different time point ($P>0.05$). ALP activity results showed that the extraction group had significant differences compared with the control group at different time point ($P<0.05$); the extraction induction group had significant differences at different time point compared with the extraction group ($P<0.05$); At 48 h and 72 h, the group had significant differences compared with the extraction group ($P<0.05$). Alizarin red staining showed that the cells in the control group had no calcium knot nodes. The red area staining was clearly observed under the microscope in the extraction group and the induction group, and the calcium knot nodes were observed under the microscope. The number, size and color depth of the knot nodes were significantly better than those of the other groups. **Conclusion** The scaffold has good biocompatibility, can promote the differentiation of BMSCs to osteogenesis, and has low cytotoxicity. It is suitable for the treatment of bone defect.

【Key words】 Collagen; Hydroxyapatite; Mesenchymal Stem Cells; Osteogenic differentiation

人工关节置换技术已逐渐成熟,但骨缺损仍是全膝关节置换中需要面对的重要难题。特别是在关

节翻修手术中,假体相对应的骨床侧极大的存在骨缺损的可能性^[1-2]。临床工作中,迫切需要有一种方

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2096-0263.2020.03.001

基金项目: 辽宁省自然科学基金指导计划(20180550795)

作者单位: 110044 沈阳市骨科医院关节外科¹; 110044 辽宁省骨关节病重点实验室²; 110044 沈阳市骨科医院骨病肿瘤科³

通信作者: 郭波, Email: wabc967@126.com

法,使骨缺损的治疗能够实现形状匹配度高、生物力学性能好、有利于骨长入等特点。目前主要的修复方法包括自体骨移植^[3]、同种异体骨或混合植骨^[4-5]、人工合成替代品^[6]、及金属衬垫块^[7]等方式来修复骨缺损,这些方法都有自身的局限性,特别是在形状方面存在不匹配的问题,难以满足临床上修复骨缺损的个性化需要。生物复合材料是最具发展前景的骨替代品,它包含骨原细胞、骨诱导生长因子以及合成的骨传导等特性^[8-9]。复合合成材料提供了一条把成骨的3个基本因素结合为一体的途径,并且克服了自体骨的缺点。3D打印技术可以依据影像学数据,等比复原所需形状,制备的支架材料具有良好的可控性,既能根据需要生产出不规则、定制化的支架外形,又可精确控制支架的孔径大小及孔径连通率^[10-11]。本文利用3D打印技术打印胶原/羟基磷灰石生物复合材料,并对复合材料的成骨作用进行探讨,以期为临床提供有效的骨缺损替代骨组织模块,达到更加理想的手术效果,为关节假体提供良好的稳定基础,增加假体的使用寿命,降低再次翻修手术的可能性,使患者受益。

材料与方法

一、实验材料

取3只4周龄SPF级雄性SD大鼠,体重90~120 g,由中国医科大学实验动物中心提供。3D打印胶原/羟基磷灰石支架,由第四军医大学西京医院提供。BI胎牛血清;BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);MTT细胞增殖检测试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);碱性磷酸酶测试盒说明书(南京建成生物工程研究所);茜素红染色液(上海源叶生物科技有限公司)。

二、原代骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的分离培养及分组

取4周龄SPF级SD大鼠双侧股骨及胫骨,剪去两端骨髓,用5 ml无菌注射器吸取DMEM培养基,冲洗髓腔,收集冲洗液,制成细胞悬液。接种于培养瓶中,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,2天后半量更换培养液,细胞生长达90%融合后,按1:2比例传代,继续扩大培养。实验分为:对照组:用10%胎牛血清的DMEM培养三代BMSCs;浸提组:将胶原/羟基磷灰石支架置入10%胎牛血清的DMEM中24 h浸泡制备浸提液(支架按1 mg:5 ml的比例浸泡),

诱导组(配置终浓度包含10 nM β-甘油磷酸二钠,100 nM 地塞米松,50 mg/ml Vit C的10%胎牛血清的DMEM作为诱导液,培养三代BMSCs)及浸提诱导组(配置终浓度包含10 nM β-甘油磷酸二钠,100 nM 地塞米松,50 mg/ml VitC的浸提液,培养三代BMSCs)。

三、MTT法检测胶原/羟基磷灰石支架对细胞增殖的影响

将传至三代的BMSCs用浸提液培养24 h,观察细胞形态。将细胞接种于96孔板,每组设8个复孔,每孔加入浓度为30 cells/μl的BMSCs 100 μl,MTT法检测吸光度值。对照组及浸提组于培养24 h、48 h、72 h、96 h后加入50 μl MTT,37℃下培养4 h后,每孔加入150 μl DMSO,摇匀,570 nm处测定吸光度。

四、BMSCs与胶原/羟基磷灰石支架材料体外共培养

将培养至第3代的BMSCs消化后制成细胞悬液,细胞浓度为10⁶/m,吸取1 ml滴到胶原/羟基磷灰石支架上,37℃,5%CO₂饱和湿度培养2 h后翻转材料滴加1 ml细胞悬液,相同条件培养2 h后加F12培养基(含10% FBS)浸没材料,放入培养箱中培养。

五、ALP活性测定

分别在培养24、48、72、96、120 h后取4组细胞的裂解液,于520 nm波长处测定OD值,计算碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性。

六、钙结节染色

诱导培养17天后行茜素红染色,Hanks液清洗两次,95%乙醇固定30 s,蒸馏水冲洗3次,0.1%茜素红(50 mM Tris-HCl, PH8.3)37℃,30 min,蒸馏水冲洗,干燥,封片,拍照。

七、统计分析

采用SPSS 22.0(IBM,美国)软件对所得数据进行统计分析,计量资料采用Kolmogorov-Smirnov检验是否符合正态分布,符合正态分布的MTT及ALP采用重复测量的方差分析检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准 α 值取双侧0.05。

结 果

一、MTT法检测胶原/羟基磷灰石支架对增殖的影响

不同时间点各组BMSCs中的MTT结果显示(见表1),两组之间OD值比较差异无统计学意义($P>0.05$),且两组细胞均长势良好,细胞形态均一,

呈现梭形,漩涡状生长,两组细胞形态无明显差别(见图1~2)。

二、ALP活力测定

检测不同时间点各组 BMSCs 中 ALP 活性结果显示,不同时间点各组与对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$);不同时间点浸提诱导组与浸提组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$);诱导组在 48 h 及 72 h 较浸提组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表2。

三、钙结节染色

各组细胞培养 19 天后,经茜素红染色,结果显示对照组细胞汇合处呈现多层重叠生长,镜下观察无钙结节点,浸提组及诱导组镜下肉眼可明显观察到红色区域染色,镜下观察可见钙结节点,浸提诱导组所产生的钙结节点的数量、大小以及染色的颜色

深度均明显优于其他各组(见图3~6)。

讨 论

一、骨缺损的治疗方法

3D 打印技术与组织工程化骨技术的结合,是利用影像学数据,等比复原打印支架,可根据需要打印出不规则、定制化的支架外形,具有良好的可控性,精确控制支架的孔径大小及孔径连通率,达到取材简便、损伤小、形状匹配度高、生物力学性能好、有利于骨长入的治疗要求^[12]。本文意在利用 3D 打印技术结合具有较好的生物相容性及机械性能的胶原/羟基磷灰石仿生活性骨支架材料制备的骨组织再生复合支架,对复合材料的成骨作用进行探讨,为伴有骨缺损的人工关节置换的临床治疗提供实验依据。

表1 不同时间点两组 BMSCs 中的 MTT 结果(OD, $\bar{x} \pm s$, 每组复孔数=8)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h	F值	P值
对照组	0.681±0.017	0.942±0.034	1.436±0.043	1.514±0.039	1060.99	<0.01
浸提组	0.676±0.018	0.921±0.028	1.428±0.035	1.506±0.041	1244.957	<0.01
F值	0.332	1.670	0.223	0.121		
P值	0.574	0.217	0.644	0.733		

注:BMSCs 为骨髓间充质干细胞

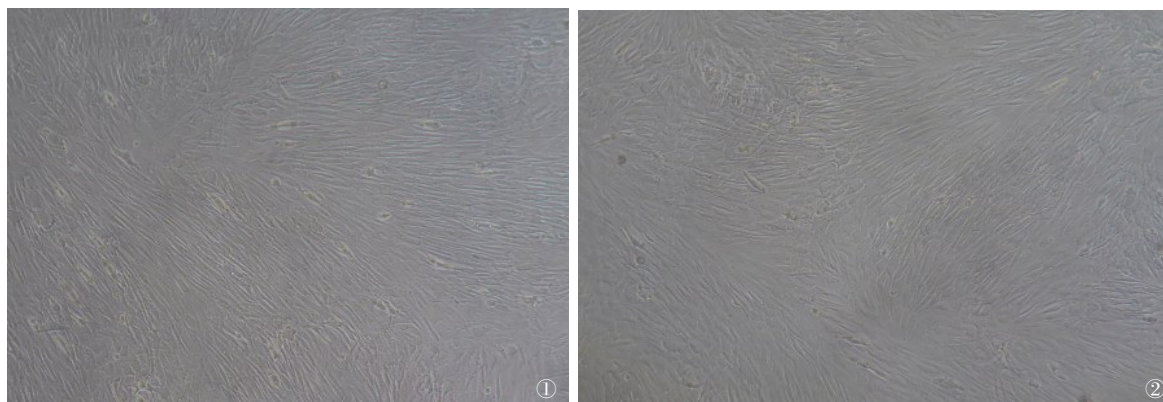


图1 对照组的骨髓间充质干细胞 图2 浸提组的骨髓间充质干细胞

表2 不同时间点各组 BMSCs 中 ALP 活性结果(U/g, $\bar{x} \pm s$, 每组复孔数=8)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h	F值	P值
对照组	10.42±0.36	12.54±0.58	12.13±0.61	11.73±0.54	23.685	<0.01
浸提组	14.71±1.79 ^a	18.38±1.83 ^a	17.25±1.63 ^a	15.912±1.58 ^a	7.035	0.001
诱导组	16.42±1.62 ^a	23.16±1.93 ^{ab}	20.85±1.95 ^{ab}	17.96±2.04 ^a	20.133	<0.01
浸提诱导组	17.37±2.06 ^{ab}	25.83±2.12 ^{ab}	20.44±1.86 ^{ab}	18.46±2.06 ^a	28.085	<0.01
F值	31.537	92.369	52.753	26.818		
P值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		

注:“^a”表示与对照组相比, $P<0.05$;“^{ab}”表示与浸提组相比, $P<0.05$,BMSCs 为骨髓间充质干细胞

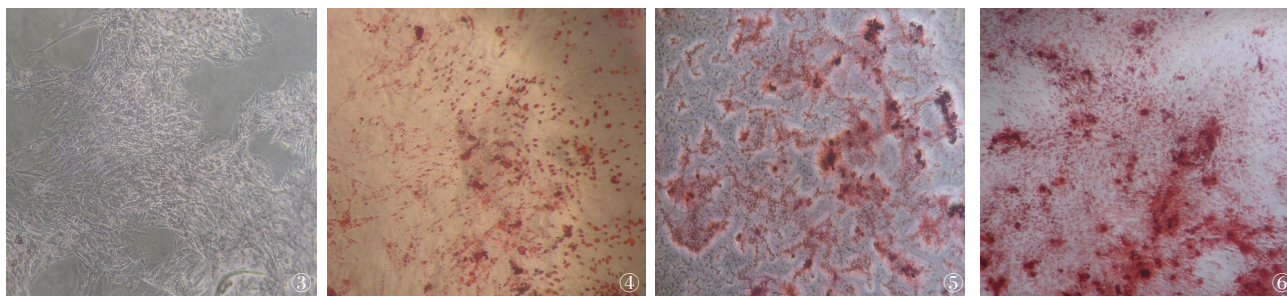


图3~6 各组BMSCs培养19天钙结节染色结果。图3 对照组;图4 浸提组;图5 诱导组;图6 浸提诱导组

这种等比复原的支架材料使不规则的轮廓变得平整,为其临床应用于关节置换术中骨缺损的填充提供了可靠实验基础。

在过去的30年中,已有各种各样的生物材料作为细胞生长的理想支架^[13-17],包括永久性、可生物降解的、天然存在的或合成的生物材料。这些生物材料都必须具有良好的生物相容性、骨诱导性、骨传导性、整合性、多孔性,以及与天然骨的机械相容性,以实现其在骨组织工程中的理想作用^[18]。成骨诱导是指诱导成骨祖细胞增殖和分化,以表达成骨表型的生物刺激。羟基磷灰石,一种天然的骨矿物质,不可吸收,很容易掺入骨中,具有骨传导性,但不能诱导骨^[19]。胶原是构成骨组织的重要成分,具有抗原性小,有利于干细胞的黏附、分化、增殖,生物相容性好等特点,但单一胶原支架具有机械性能差、降解速率高的缺点^[20]。本文将羟基磷灰石与胶原相混合,提高了材料的性能,保留了羟基磷灰石骨传导性及力学性能,同时又有利于干细胞的增殖分化。

二、3D打印组织工程骨的研究进展

本课题组前期通过3D打印技术在膝关节置换术中应用3D打印个性化导航模板,可更好的恢复患者下肢力线,增加关节活动度,提高手术的精确度^[21]。但在术者行膝关节置换术时,经常会遇到严重骨缺损的情况,传统的胫骨平台严重骨缺损通常采用垫块、骨块及打桩的方式进行修复^[22-23]。这些方法都有自身的局限性,特别是在形状方面存在不匹配的问题,难以满足临床上修复骨缺损的个性化需要。本课题中的胶原/羟基磷灰石仿生活性骨支架材料复合BMSC,为骨再生提供了一个便利的环境,以期能够开发具有较好的生物相容性及机械性能的胶原/羟基磷灰石仿生活性骨支架材料,结合3D打印技术制作骨组织再生的复合支架,为伴有骨缺损的人工关节置换的临床治疗提供实验依据。

文献表明,将羟基磷灰石与胶原相结合,可使二

者的生物相容性、骨诱导性、机械性能、骨传导性和生物降解性有所改善,从而促进干细胞的成骨分化^[24]。Dewey等^[25]制作了多尺度胶原/羟基磷灰石/聚乳酸复合材料,发现该材料在缺乏成骨诱导的情况下依然可以促使脂肪来源的干细胞向成骨细胞分化。本文通过对3D打印的胶原/羟基磷灰石支架与BMSCs构成复合物的研究,探讨其在体外维持成骨分化的作用,实验发现,BMSCs在支架上长势良好,支架浸提液对细胞增殖没有影响。浸提组及诱导组细胞的茜素红强度增加,ALP酶活性提高,表明细胞内有钙盐沉积,BMSCs向成骨细胞转化增加,浸提液与诱导液相同,具有诱导BMSCs向成骨细胞转化的作用,有利于骨组织的形成。

三、本研究的不足及展望

本实验中所采用的支架在前期研究中已证实具有良好的生物学特性,本文对细胞与材料的生物相容性、干细胞成骨分化性能、材料对细胞的毒性等进行了研究,表明该支架具有生物相容性好,可促进BMSCs向成骨分化,对细胞毒性低等特点。另外,由于本文只进行了体外实验,研究尚不全面,本课题组将对支架在骨缺损动物模型中植入后的骨再生能力作出进一步研究。期待能够最终应用于临床,在关节置换手术中有效的进行骨缺损修复,达到更加理想的手术效果,并且为关节假体提供良好的稳定基础,增加假体的使用寿命,降低再次翻修手术的可能性,使患者受益。

参 考 文 献

- 1 闫昭,曹晓瑞,孙孟帅,等.全膝关节翻修术中骨缺损的处理研究进展[J].中华关节外科杂志:电子版,2018,12(3):84-89.
- 2 危小东,陈永岗,刘佳,等.全膝关节置换术中胫骨平台骨缺损的最新处理进展[J].实用骨科杂志,2016,22(12):1100-1103.
- 3 Sugita T, Aizawa T, Miyatake N, et al. Preliminary results of managing large medial tibial defects in primary total knee arthroplasty: autogenous morcellised bone graft [J]. Int Orthop, 2017, 41(5): 931-937.

- 4 Vasso M, Beaufils P, Cerciello S, et al. Bone loss following knee arthroplasty: potential treatment options [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2014, 134(4): 543-553.
- 5 叶一林, 朱天岳, 柴卫兵, 等. 混合植骨技术结合髌臼加强杯或钛网杯重建髌臼严重骨缺损 [J]. 中华骨科杂志, 2012, 32(9): 830-836.
- 6 Venkatesan J, im S-K. Nano-Hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering-A review [J]. J Biomed Nano-technol, 2014, 10: 3124-3140.
- 7 Tsukada S, Wakui M, Matsueda M. Metal block augmentation for bone defects of the medial tibia during primary total knee arthroplasty [J]. J Orthop Surg Res, 2013: 36.
- 8 Chen Y, Zheng Z, Zhou R, et al. Developing a strontium-releasing graphene oxide/collagen-based organic-inorganic nanobiocomposite for large bone defect regeneration via MAPK signaling pathway [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019.
- 9 Chekmazov IA, Riabov AL, Skalozub OI, et al. Biocomposite nanostructured materials for the bone defects filling by osteomyelitis [J]. Khirurgiia (Mosk), 2013 (8): 56.
- 10 赵畅, 曾参军, 蔡道章. 髌膝关节翻修术中的关键问题及3D打印应对之策 [J]. 中华关节外科杂志: 电子版, 2017, 11(3): 284-288.
- 11 王荣诗, 谭伦, 周欣, 等. 3D打印技术在伴骨缺损髌关节置换(翻修)术中的应用 [J]. 临床骨科杂志, 2019, 22(2): 169-171.
- 12 Prashad R, Yasar O. Three-Dimensional scaffold fabrication with inverse photolithography [J]. MRS Advances, 2016, 2(19/20): 1071-1075.
- 13 Blakeney BA, Tambralli A, Anderson JM, et al. Cell infiltration and growth in a low density, uncompressed three-dimensional electrospun nanofibrous scaffold [J]. Biomaterials, 2011, 32(6): 1583-1590.
- 14 Adnan H, Sukyoung K, Man-Woo H, et al. BMP-2 Grafted nHA/PLGA Hybrid Nanofiber Scaffold Stimulates Osteoblastic Cells Growth [J]. Biomed Research International, 2015, 2015: 1-12.
- 15 Bianco JER, Rosa RG, Castillo AC, et al. Characterization of a novel decellularized bone marrow scaffold as inductive environment for hematopoietic stem cells [J]. Biomaterials Science, 2019, 7(1).
- 16 Liu X, Zhu C, Li Y, et al. The preparation and in vitro evaluations of a nanoscaled injectable bone repair material [J]. J Nanomater, 2015 (4): 1-8.
- 17 Mandrycky C, Wang Z, Kim K, et al. 3D bioprinting for engineering complex tissues [J]. Biotechnol Adv, 2016, 34(4): 422-434.
- 18 El-Ghannam E, Ahmed. Bone Reconstruction: from bioceramics to tissue engineering [J]. Expert Rev Med Devices, 2005, 2(1): 87-101.
- 19 Włodarski KH, Włodarski PK, Galus R. Bioactive composites for bone regeneration [J]. Ortop Traumatol Rehabil, 2008, 10(3): 201-210.
- 20 Rahman MS, Rana MM, Lucas-Sebastian S, et al. Fabrication of biocompatible porous scaffolds based on hydroxyapatite/collagen/chitosan composite for restoration of defected maxillofacial mandible bone [J]. Progress in Biomaterials, 2019, 8(3): 137-154.
- 21 鄢波, 柳柳, 马旭, 等. 3D打印个性化导航模板在全膝关节置换术中的应用 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2017, 32(2): 148-151.
- 22 Qiu YY, Yan CH, Chiu KY, et al. Review article: bone defect classifications in revision total knee arthroplasty [J]. J Orthop Surg (Hong Kong), 2011, 19(2): 238-243.
- 23 Luo W, Huang L, Liu H, et al. Customized knee prosthesis in treatment of giant cell tumors of the proximal tibia: application of 3-dimensional printing technology in surgical design [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 1691-1700.
- 24 Wang Xing, Xing Helin, Zhang Guilan, et al. Restoration of a critical mandibular bone defect using human alveolar bone-derived stem cells and porous nano-HA/Collagen/PLA scaffold [J]. Stem Cells International, 2016: 1-13.
- 25 Dewey MJ, Johnson EM, Weisgerber DW, et al. Shape-fitting collagen-PLA composite promotes osteogenic differentiation of porcine adipose stem cells [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2019, 95: 21-33.
- (收稿日期: 2020-03-20)
(本文编辑: 吕红芝)

鄢波, 柳柳, 马旭, 等. 3D打印胶原/羟基磷灰石支架对骨髓间充质干细胞成骨分化的作用研究 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2020, 6(3): 123-127.