

骨膜组织工程的研究进展

宋菊青^{1,2}, 施雪涛^{1,2}, 王迎军^{1,2}

(1. 华南理工大学 国家人体组织功能重建与修复中心, 广州 广东 510641)

(2. 华南理工大学 材料科学与工程学院, 广州 广东 510641)

摘要: 一直以来, 由创伤、肿瘤切除和先天畸形引起的临界性骨缺损的临床治疗都存在极大的挑战, 包括自体骨移植在内的传统骨缺损治疗方法, 由于供体不足和免疫排斥反应等问题, 已经不足以满足临床需求。而组织工程的发展改变了骨修复的传统治疗模式, 基于人工和天然生物材料的各种组织工程复合支架被用于修复受损骨。与此同时, 也有越来越多的学者认识到骨膜在骨缺损修复中的重要作用, 尤其是组织工程支架的整合性和血管化。除了自体或异体骨膜移植, 研究者将组织工程的理念融入到骨膜修复中, 从结构和功能上模拟天然骨膜。从组织工程骨膜的不同设计理念出发, 简单回顾了 4 类组织工程骨膜的研究进展, 包括结构仿生型、微观结构仿生型、血管化型和外力刺激型, 这些将为骨组织工程构建和骨膜深入研究提供理论基础并开启新的思路和方法。

关键词: 骨缺损治疗; 骨膜组织工程; 微图案化; 血管化

中图分类号: R318 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2016)06-0461-04

Research Development of Periosteum Tissue Engineering

SONG Juqing^{1,2}, SHI Xuetao^{1,2}, WANG Yingjun^{1,2}

(1. National Engineering Research Center for Tissue Restoration and Reconstruction,
South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(2. School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: Always, the clinical therapy of critical-sized bone defects caused by trauma, tumor removal surgery and congenital malformation undergoes great challenges. The traditional treatments for bone defects, including autografting, are unable to meet the clinical needs because of the shortage of donors and immunological rejection. The development of tissue engineering changes the traditional treatment modes, and various tissue engineering cell-biomaterial composite scaffolds based on synthetic and natural biomaterials have been implemented to reconstruct injured bone. At the same time, more researchers are aware of the important role of periosteum in the bone defect healing, especially the integration and vascularization of the scaffold materials. Except the periosteum grafts (auto-or allo-), researchers also provide a biomimetic methodology that integrates the concept of tissue engineering into the periosteum repair. A variety of periosteum tissue engineering have been proposed, which biomimic the native periosteum from structure or function. Here we simply review four types of functional tissue engineering periosteum, including structure biomimic, micro-structure biomimic, vascularization and mechanical stimulation, which would provide theoretical basis and open new opportunities for the construction of bone tissue engineering and the research of periosteum.

Key words: bone defect healing; periosteum tissue engineering; micropatterning; vascularization

1 前言

近年来, 由于社会工业化程度提高, 由创伤、肿瘤切除、病理变性和先天畸形引起的骨缺损病例日益增多。据不完全统计, 我国每年新增骨损伤病人达 300 万例。临床上通常采用骨移植手术治疗骨缺损, 传统的骨缺损治疗方法包括: 自体骨移植 (autografting)^[1]、同种异体骨移植 (allografting)^[2] 和异种骨移植 (xenografting)。

收稿日期: 2015-10-30

基金项目: 广东省自然科学基金青年基金(2016A030306018)

第一作者: 宋菊青, 女, 博士研究生.

通讯作者: 施雪涛, 男, 教授, 博士生导师, Email:
shxt@scut.edu.cn

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.2016.06.10

自体骨移植是公认的骨组织修复的黄金标准,但是患者要经受自体组织移植手术创伤的痛苦,而且可移植部位及数量有限;同种异体骨移植具有良好的组织特性,但存在免疫排斥并有感染病毒及细菌的危险,而且制样、处理和存储成本较高,其应用也受到极大限制^[3]。组织工程的提出及发展,为解决这个难题提供了新的思路,改变了骨修复的传统治疗模式。基于各种人工或天然生物材料的组织工程支架的开发,为骨缺损的临床治疗提供了新的途径。

骨组织工程的核心是建立细胞与生物材料的三维空间复合体,即具有生命力的活体组织,用以对病损组织进行形态、结构和功能的重建并达到永久性替代。其基本原理和方法是将体外培养扩增的正常骨组织细胞,吸附于一种生物相容性良好并可被机体吸收的生物材料上形成复合物,并将细胞-生物材料复合物植入骨缺损部位,细胞在生物材料逐渐被机体降解吸收的过程中,形成新的在形态和功能方面与损伤部位相一致的组织,而达到修复创伤和重建功能的目的^[4]。然而,目前所采用的天然或人工合成的骨修复材料在成分和结构上均与天然骨组织存在较大差异,与骨组织间难以达到真正的生物性融合;其降解速度与新骨生长速度难以匹配;材料植入骨缺损部位后,其修复过程基本是一种被动的“充填”过程,缺乏对生理环境的主动感知。并且,骨组织细胞构建的骨修复材料由于内部缺乏血管,往往存在细胞营养供给不足,内部组织易坏死,长期疗效差等缺点。

理想的骨缺损修复是工程化的骨替代物能够与宿主骨组织整合并且恢复缺损的生理学结构和功能。就骨的生理机能而言,除了其他重要因素的参与,骨膜在骨形成和缺损治疗中起到了决定性的作用。骨膜是高度血管化的组织,其中含有成骨和成软骨祖细胞以及其他相关的生物活性因子,而被描述成血管化较好的“骨/软骨器官”,它为骨提供血液循环,被认为是骨的“脐带”,骨膜剥落通常会破坏骨的动脉营养供应^[5-7]。骨膜是由微血管化的致密结缔组织组成的,它通过夏贝氏纤维(Sharpey's fibers,也称贯通纤维)紧紧地覆盖在皮质骨外表面,形成一层薄而坚韧的膜^[8]。从组织结构上讲,骨膜被分成不同的两层:由成纤维细胞和夏贝氏纤维组成的外层纤维层,以及含有多能间充质干细胞和骨母细胞的内层生发层,这些细胞有助于正常骨的生长、愈合和再生^[9-13]。尽管自体 and 异体骨膜移植已经用于各种尺寸的骨缺损修复,但是骨膜移植仍然存在供体不足、供区并发症和免疫学问题,因此,研究者将组织工程的概念引入到骨膜中,期待能够更好地解决骨缺损修复的临床难题。

本文从组织工程骨膜的不同设计理念,简单回顾了其发展过程,包括宏观和微观的结构仿生以及血管化和力学应答的功能仿生等,期待为后续的研究提供基本的思路和方法。

2 结构仿生组织工程骨膜

骨膜植入物能够提供骨祖细胞和屏蔽瘢痕组织而有助于骨修复,然而,这些植入物存在着固体不足和供体并发症等问题。Schönmeyr 等采用人脱细胞真皮和成骨细胞/间充质干细胞(MSCs)合成了骨模样材料^[14]。体外结果显示,成骨细胞更乐于在人脱细胞真皮上黏附和增殖。另外,在骨形态发生蛋白(BMP)的刺激下,成骨细胞表现出分化的潜能。生长在人脱细胞真皮上的细胞能够有效地被腺病毒转染,且没有明显的细胞毒性。Schönmeyr 等也对细胞传递性和骨形成潜能进行了体内评价,他们将带有绿色荧光蛋白(GFP)的 MSCs 接种在人脱细胞真皮上,并用 BMP-2 转染,之后将这一结构缠绕在同源小鼠的内收肌上,并植入到裸鼠下颌进行临界性骨缺损治疗。三周之后,带有 GFP 的细胞仍然存在,且新骨取代了肌肉和植入结构的界面,六周之后,临界性骨缺损被成功地治疗。这一研究表明,人脱细胞真皮能够用于合成组织工程骨膜,且可以传递细胞和骨诱导蛋白。

Zhou 等将由猪骨髓间充质干细胞(BMSCs)组成的细胞层和由医用级聚己内酯-磷酸钙(mPCL-CaP)构成的完全连通支架组装,制备具有一定结构和功能的骨植入物^[15]。他们从细胞培养板中收集 BMSCs 层并将其包裹在预接种的 mPCL-CaP 复合支架。培养 8 周之后发现,细胞层与支架/细胞结构很好地整合且保持细胞活性,在支架的内部和外部均出现了矿化的节结。碱性磷酸酶活性(ALP)和骨相关蛋白表达的检测表明,支架/细胞结构中的细胞经历了常规的体外成骨分化。在体内实验中,他们分别将两组不同的细胞层-支架/细胞结构植入裸鼠皮下。其中,第一组结构($5 \times 5 \times 4 \text{ mm}^3$)与 BMSCs 层组装,并在植入前体外培养 8 周,而第二组结构($10 \times 10 \times 4 \text{ mm}^3$)与 BMSCs 层组装后并没有进一步体外培养,则是直接植入体内。结果显示,两组结构中均形成了新的血管化的疏松皮质骨,体积将近 40%。组织学和免疫组织化学检测表明,新的骨组织从接种的 BMSCs 区域形成,且主要以软骨内成骨方式为主形成编织骨基质,最后成熟为完全矿化的致密骨,呈现出天然骨的组织学标记物。这一研究表明,将 BMSCs 层技术与具有优化的力学、营养物质运输和血管化性能的复合支架相结合,可以再生类似于天然骨的大块骨组织。

骨膜和其中的干细胞群可以调整骨缺损愈合,而这在异体移植中是缺乏的。因此,如何提高同种异体移植的愈合和整合,是研究者亟待解决的问题。Hoffman 等利用可水降解的水凝胶将间充质干细胞(MSCs)传递和集中到异体移植表面来制备骨膜类似物,即组织工程骨膜^[16]。结果显示,植入16周后,与未处理的同种异体移植相比,组织工程骨膜提高了移植血管化(约2.4倍)、软骨内骨形成(约2.8倍)和生物力学强度(约1.8倍)。与自体移植相比,组织工程骨膜尽管增强了愈合,却推迟了软骨内成骨的过程,因此,研究者认为,在临床应用前,还需要对这种组织工程骨膜进行改善。例如,将这种自下而上的生物材料制备方法所得到的工程骨膜与相关的细胞种类、基质和小分子药物结合起来加快骨化过程。

3 微观结构仿生组织工程骨膜

尽管结构仿生组织工程骨膜改善和提高了同种异体移植和人工支架再生,但是这些工程骨膜只是在宏观上类似于天然骨膜,在表面形貌和微观结构却与天然骨膜存在很大的差异性。Shi 等采用表面微图案化技术,将骨膜的天然表面形貌和微观结构融入到组织工程骨膜和骨的设计理念,创新性地提出了简单易操作的仿生方法。前期研究中,他们用骨膜作为模板将其精致的纳米/微米形貌复制到胶原膜表面,使胶原膜表面继承了骨膜精确的沟槽微图案拓扑结构,从而,可以更有效地指导细胞沿着天然骨膜的方式取向^[17]。之后,他们采用冻干技术,将载有人骨髓间充质干细胞和人真皮微血管内皮细胞的胶原膜(伪骨膜)与纳米生物活性玻璃复合形成三维多孔支架,来研究伪骨膜对骨生成的作用。结果显示,相比于未处理的支架,覆盖有伪骨膜的支架表现出明显的成骨性,说明伪骨膜在骨再生中起到了重要的作用。这一研究不仅为骨组织工程支架构建提出了新的理念,也为骨膜研究提供了新的方法。

考虑到骨膜表面的多级拓扑结构,为了使人造骨膜更有效地固定在或与骨支架(如自体移植、同种异体移植和人造多孔支架)整合,Shi 等采用微图案化技术在 PLGA 纳米片上创造拓扑结构,以调控细胞核细胞外基质的取向类似于天然骨膜^[18]。他们将旋涂和微图案化技术结合制备了富有弹性的、具有多种图案的“便签样”PLGA 纳米片,用带有沟槽微图案化的 PLGA 纳米片模拟天然骨膜用于骨修复治疗。值得一提的是,这种独立的纳米片能够稳固地固定在多种骨修复组织工程支架上,并保持表面拓扑形貌。这些微图案化的纳米片能够黏附在各种支架和植入物上,且在水环境下也具有高

稳定性和粘合性。这一独特的性能使得载有细胞的纳米片在体外培养和体内植入时都能固定在多种骨植入物上。另外,他们用覆盖有微沟槽化纳米片的钛块研究干细胞的骨生成。结果表明,覆盖有微沟槽化纳米片的钛块有效地促进了干细胞成骨标记物的表达。这一研究表明,微图案化的“便签样”PLGA 纳米片可以为组织工程骨膜再生提供稳定的仿生模板,并用于骨修复和生物学研究,同时也说明组织工程应用中仿生骨膜的发展将提供骨再生治疗的新策略。

4 血管化组织工程骨膜

正如前面所提到的,天然骨膜中含有丰富的血管组织,为骨膜提供氧气和营养物质,因此,如何在组织工程骨膜中引入新的血管,以便在骨缺损区域形成血管化的骨组织,实现功能上仿生天然骨膜,是研究者急需解决的另一问题。Fan 等将骨髓间充质干细胞(BMSCs)和二氯化钴(CoCl_2 , 低氧模拟试剂)处理的 BMSCs 结合,体外构建了组织工程骨膜^[19]。通过体外实验测试内皮细胞特定标记基因(VEGF/PEDF)的表达,发现低氧模拟试剂 CoCl_2 处理的 BMSCs 表现出较高的 VEGF(助血管生成)和较低的 PDEF(抗血管生成)表达。另外,他们将这一工程骨膜植入严重联合免疫缺陷小鼠的皮下(2周)和颅骨缺损(4周),用 micro-CT、组织形貌学和免疫组织化学方法来评价异位和正位骨生成和血管生成。研究结果显示,二氯化钴预处理的 BMSCs 诱导了更高的血管化程度并增强了骨生成。这一研究为增强组织工程骨膜中血管化的骨形成提供了新方法。

为了更好地解决合成支架治疗大的骨缺损存在血管化不足的问题,Kang 等通过结合血管化的仿生细胞层工程骨膜(CSEP)和生物可降解的多孔 β -TCP 支架来构建血管化的骨移植^[20]。首先,体外培养人骨髓间充质干细胞(hMSCs)形成细胞层,然后将人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)接种在未分化的 hMSCs 层形成血管化的细胞层来模拟天然骨膜的纤维层,同时经过体外培养形成矿化的 hMSCs 层来模拟天然骨膜的生发层;之后,将矿化的 hMSCs 缠绕在圆柱形的 β -TCP 支架;最后,将血管化的 HUVEC/hMSCs 层缠绕在其上,这样就在 β -TCP 支架上形成了仿生的 CSEP。以非骨膜结构细胞层包裹的 β -TCP 和未处理的 β -TCP 作为实验组,进行体内和体外研究。体外结果显示,未分化的 hMSCs 层促进了 HUVECs 形成丰富的毛细血管网络。体内结果显示,仿生 CSEP 增强了体外预成型的人毛细血管与宿主小鼠脉管系统之间的血管生成和功能融合。另外,与其他组相比,Micro-CT 分析和骨钙蛋白染色显示仿生的

CSEP/ β -TCP 移植物形成了更多的骨基质。这些结果表明,模拟骨膜细胞内成份和空间构象的 CSEP 在血管生成和骨生成中起到了决定性的作用。这一研究表明仿生骨膜包裹的 β -TCP 支架在骨再生中是非常有前景的。

5 外力刺激组织工程骨膜

已经有大量研究表明,由纵向组装的细胞和胶原纤维构成的骨膜内层,即生发层,对骨的生长、重构和骨折修复是非常重要的^[21-23]。存在于这一层的干细胞是高度力学敏感的,其一旦受到力学刺激,将改变多种信号分子的产物^[10, 24-25]。为了模拟骨膜并促进干细胞向成骨表型分化,将力学和拓扑信号结合,来构建能够调控细胞形貌和行为(增殖和分化)的支架是很有必要的^[26-28]。Shi 等通过模拟骨膜微环境,将力学和拓扑信号结合起来,体外构建能够诱导干细胞成骨的支架^[29]。首先,他们采用表面改性技术构建了聚多巴胺涂敷的石蜡膜,结果显示,生长在其上的细胞能够很好地黏附和增殖。另外,由于石蜡膜具有很好的可塑性和延展性,很容易产生微图案来调控细胞的空间取向并施加不同的力学应力。因此,他们构建了沟槽微图案化的聚多巴胺涂敷的石蜡膜来诱导干细胞的成骨分化。结果显示,与没有拉伸作用的细胞相比,生长在聚多巴胺改性石蜡膜的脂肪间充质干细胞表现出更高的成骨性能,而这正是细胞对力学和空间信号的应答。这一研究将为再生医学应用中的干细胞诱导成骨和体外骨生成中的骨膜分化研究开启新的时机。

6 结 语

目前,对于组织工程骨膜的研究已经取得了一定的成果,研究者主要从骨膜的宏观结构、微观结构、血管化以及力学应答等方面来仿生构建组织工程骨膜,并在体外和体内进行大量的研究实验,验证工程骨膜的性能,完善其在骨缺损修复中的作用。但是,对于骨膜微观结构和生物学功能的仿生研究还处于初始阶段,无论是材料选择、设计理念和性能评价,都需要学者更加深入、系统的研究,进一步完善其理论基础和建立可行的体内模型,以满足骨缺损修复的临床需要。

参考文献 References

- [1] Burchardt H, Busbee G A, Enneking W F. *The Journal of Bone & Joint Surgery*[J], 1975, 57(6): 814-819.
- [2] Goldberg V M, Bos G D, Heiple K G, et al. *The Journal of Bone & Joint Surgery*[J], 1984, 66(6): 937-950.
- [3] Stevenson S, Horowitz M. *The Journal of Bone & Joint Surgery* [J], 1992, 74(6): 939-950.
- [4] Declercq H, Van den Vreken N, De Maeyer E, et al. *Biomaterials*[J], 2004, 25(5): 757-768.
- [5] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. *Stem Cells*[J], 2001, 19(3): 180-192.
- [6] Davy D T. *Orthop Clin N Am*[J], 1999, 30(4): 553-563.
- [7] Enneking W F, Campanacci D A. *The Journal of Bone & Joint Surgery*[J], 2001, 83(7): 971-986.
- [8] Malizos K N, Papatheodorou L K. *Injury*[J], 2005, 36(3): S13-S19.
- [9] Allen M R, Hock J M, Burr D B. *Bone*[J], 2004, 35(5): 1 003-1 012.
- [10] Augustin G, Antabak A, Davila S. *Injury*[J], 2007, 38(10): 1 115-1 130.
- [11] Ito Y, Fitzsimmons J S, Sanyal A, et al. *Osteoarthr Cartilage* [J], 2001, 9(3): 215-223.
- [12] Orwoll E S. *J Bone Miner Res*[J], 2003, 18(6): 949-954.
- [13] WEODARSKI KH. *Clin Orthop Relat R*[J], 1989, 241: 265-277.
- [14] Schönmeyr B, Clavin N, Avraham T, et al. *Tissue Engineering Part A*[J], 2009, 15(7): 1 833-1 841.
- [15] Zhou Y, Chen F, Ho S T, et al. *Biomaterials*[J], 2007, 28(5): 814-824.
- [16] Hoffman M D, Xie C, Zhang X, et al. *Biomaterials*[J], 2013, 34(35): 8 887-8 898.
- [17] Shi X, Chen S, Zhao Y, et al. *Advanced Healthcare Materials* [J], 2013, 2(9): 1 229-1 235.
- [18] Shi X, Fujie T, Saito A, et al. *Adv Mater*[J], 2014, 26(20): 3 290-3 296.
- [19] Fan W, Crawford R, Xiao Y. *Biomaterials*[J], 2010, 31(13): 3 580-3 589.
- [20] Kang Y, Ren L, Yang Y. *ACS Applied Materials & Interfaces* [J], 2014, 6(12): 9 622-9 633.
- [21] Ochareon P, Herring S W. *The Anatomical Record*[J], 2007, 290(11): 1 366-1 376.
- [22] Parfitt A M. *J Bone Miner Res* [J], 2002, 17(10): 1 741-1743.
- [23] Einhorn T A. *Clin Orthop Relat R*[J], 1998, 355: S7-S21.
- [24] Guvendiren M, Burdick J A. *Advanced Healthcare Materials*[J], 2013, 2(1): 155-164.
- [25] Discher D E, Mooney D J, Zandstra P W. *Science*[J], 2009, 324(5935): 1 673-1 677.
- [26] Zhang J T, Nie J, Mühlstädt M, et al. *Adv Funct Mater*[J], 2011, 21(21): 4 079-4 087.
- [27] Tang L, Lin Z, Li Y. *Biochem Bioph Res Co*[J], 2006, 344(1): 122-128.
- [28] Foolen J, van Donkelaar C, Nowlan N, et al. *J Orthop Res*[J], 2008, 26(9): 1 263-1 268.
- [29] Shi X, Li L, Ostrovidov S, et al. *ACS Applied Materials & Interfaces*[J], 2014, 6(15): 11 915-11 923.