

# 自体脂肪基质细胞组织-脱细胞骨基质-壳聚糖支架 修复胫骨缺损及其生物相容性研究

王远庆<sup>1</sup> 钱浩明<sup>1</sup> 陈强<sup>1</sup> 吴莎莎<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨自体脂肪基质细胞组织(SVF)-脱细胞骨基质-壳聚糖支架修复胫骨缺损及其生物相容性。**方法:**于 2016 年 4 月 9 日选取辽宁医学院动物实验中心 4 月龄大白兔 40 只,随机选取其中 1 只提取兔 SVF 组织 10 g,体外分离培养脂肪基质细胞并行脂肪基质细胞多向分化(成脂和成骨诱导),以种植密度  $3 \times 10^7$  个/cm<sup>2</sup> 种植于脱细胞骨基质-壳聚糖支架上并制成 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架,将 P<sub>3</sub> 代的兔纤维软骨细胞分别种植到 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架(作为 SVF 组)和脱细胞骨基质-壳聚糖支架(作为对照组)并进行组织学和生物相容性检测,同时将所有大白兔的建立兔胫骨缺损模型,并用上述两种支架进行移植修复治疗,统计分析所有支架第 0,4,7,14 天的 DNA 含量、细胞存活率和第 0,2,4,8 周时兔胫骨骨矿物、骨密度水平及修复疗效、第 8 周时最大弯曲度负荷、抗弯刚度、破坏扰度水平。**结果:**SVF 组第 4,7,14 天时 DNA 含量明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );SVF 组第 4,7,14 天时细胞存活率明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );术后第 8 周,SVF 组大体观察可见仿生骨膜大部分完整、有骨痂生长,组织学观察可见软骨内骨化明显、缺损基本修复,免疫组织化学观察可见成熟骨基质部分 BMP 染色阳性、着色变浅,对照组大体观察可见膜降解呈碎片状、骨端骨痂较硬,组织学观察可见膜材大部分降解且出现幼稚髓腔样结构,免疫组织化学观察 BMP 轻度表达、软骨基质 BMP 染色阳性,前者第 2,4,8 周时骨矿物、骨密度和第 8 周时最大弯曲度负荷、抗弯刚度、破坏扰度水平明显高于后者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架具有良好的生物相容性,SVF 可作为骨组织工程的种子细胞,可能通过协同诱导、传导效应等增强骨再生能力,且具有良好的生物力学效果,有利于促进胫骨骨缺损的修复,值得临床进一步推广。

**[关键词]** 自体脂肪基质细胞组织;脱细胞骨基质;壳聚糖支架;胫骨缺损;生物相容性

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)08-0011-07

## Repair and Its Biocompatibility Effect of SVF-Decellularized Bone Matrix-Chitosan Scaffold in Repairing Tibia Defect

WANG Yuanqing<sup>1</sup> QIAN Haoming<sup>1</sup> CHEN Qiang<sup>1</sup> WU Shasha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Traumatology Luodian Hospital of Baoshan District of Shanghai, Shanghai 201908 China.

**Abstract Objective:** To discuss the repair and its biocompatibility effect of autologous adipose stromal cells(SVF)-decellularized bone matrix-chitosan scaffold in repairing tibia defect. **Methods:** White rabbit on April 9, 2016 were selected in Liaoning medical school animal experiment center, according to the random distribution, one extract rabbit were selected to extract 10 g SVF organization of the rabbit, adipose stromal cell cultivation in vitro in parallel adipose stromal cells(induced) into fat and osteogenesis, multi-directional differentiation to planting density  $3 \times 10^7$ /cm<sup>2</sup> were grown in cell-free bone matrix-chitosan scaffold and made into SVF-decellularized bone matrix-chitosan scaffold, P<sub>3</sub> generation of rabbit fibrocartilage cells were grown respectively to SVF-decellularized bone matrix-chitosan scaffold(as SVF group), and decellularized bone matrix-chitosan scaffold(as control group), and they were given histological and biological compatibility testing, at the same time, all the big white rabbit rabbit tibia defect model was established, and the above two stents transplant repair treatment, statistical analyzed all stents 0,4,7, 14 d of DNA content, cell survival and 0,2,4,8 weeks of rabbit tibia bone mineral, bone mineral density levels and repair effect, 8 weeks maximum bending load, bending stiffness, destroy the immunity levels. **Results:** 4,7,14 d DNA content of SVF group were significantly higher than those of control group, the difference were statistically significant( $P < 0.05$ ); 4,7,14 d cell survival rate of SVF group were significantly higher than those of control group, the difference were statistically significant( $P < 0.05$ ); Postoperative 8 weeks, gross observation visible bionic periosteum most complete, SVF group had the callus growth, histological observation endochondral ossification clearly visible, basic repair defect, immunohistochemical

<sup>1</sup> 上海市宝山区罗店医院中医骨伤科(上海, 201908)

observations were cooked bone matrix section BMP dyeing, color becomes shallow, membranous degradation fragmented, and control group in extremities callus harder, histological observation most visible membrane material degradation and appear naive medullary cavity structure, BMP immunohistochemical observation mild cartilage matrix expression, BMP staining positive, 2, 4, 8 weeks bone mineral density and bone minerals at 8 weeks maximum bending load, bending stiffness, destroy the immunity levels of the former were significantly higher than those of the latter, the difference were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** SVF-decellularized bone matrix-chitosan stent has good biocompatibility, SVF can be used as bone tissue engineering seed cells, it possibly through coordination induction, conduction effect enhancement foot of bone regeneration, and it has a good biomechanical effect, promote the tibia bone defect repair, it's worth for further clinical promotion.

**Keywords:** autologous adipose stromal cells; decellularized bone matrix; chitosan scaffold; tibia defect; biocompatibility

胫骨缺损是膝关节创伤中最常见的骨缺损之一,多由外界高能量作用胫骨所致,可导致局部肿胀、疼痛、功能受碍等情况发生,其常用的治疗方法为骨移植修复治疗,通过置入合适的骨材料可有效修复缺损,从而恢复缺损部位的功能<sup>[1]</sup>。目前,骨组织工程移植修复治疗中,主要通过植入具有成骨分化功能的种子细胞(干细胞)来转化为成骨细胞而促进骨缺损的修复,其常用的种子细胞为骨髓间充质干细胞,但由于细胞取材困难,体外纯化率低等,增加临床治疗的难度,故寻找一种新的干细胞替代骨髓间充质干细胞具有重要的临床意义<sup>[2,3]</sup>。有研究显示,干细胞在机体体内普遍存在,如存在于皮肤、肝脏、脂肪等组织,其中脂肪基质细胞也具有多向分化潜能,可分化为成骨细胞、软骨细胞等,也可作为骨组织工程移植修复治疗中种子细胞,且其具有取材容易、供区创伤小等特点<sup>[4,5]</sup>。对此,本研究通过制作自体脂肪基质细胞组织(SVF)-脱细胞骨基质-壳聚糖支架并检测生物相容性和建立修复胫骨缺损的动物体内实验进行验证,以期为SVF胞作为种子细胞进骨组织工程移植修复行胫骨缺损提供科学的依据,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

**1.1.1 实验动物** 4月龄大白兔40只由辽宁医学院动物实验中心提供,许可证号SCXK(辽)2003-0007,雌雄不限,其中雌20只,雄20只,体质量2.03~2.48 kg,平均体质量( $2.16 \pm 0.57$ )kg。

**1.1.2 实验药物和试剂** Dolbecco改良Eagle培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)、抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸钠、0.25%胰蛋白酶均购自美国Sigma公司;碱性磷酸酶(ALP)活性测定试剂盒购自南京建成生物技术有限公司;牛股骨、甲醇、氯仿等,2.5%双氧水( $H_2O_2$ )、盐酸(HCL)、无水乙醇、甲苯胺蓝染料、番红O染料、茜素红染液、BMP-2抗体、I型胶原等购自北京化学试剂有限公司;Hoechst33258染料购自上海碧云天生物技术有限公司;地塞米松、抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸钠、吡哆美辛、甲基黄嘌呤、牛胰岛素等均购自上海晶抗生物工程有限公司;

DNA提取试剂盒购自Tiangen公司。

**1.1.3 实验仪器** BB5060型CO<sub>2</sub>培养箱购自德国 Heraeus公司,RC-6+低温高速离心机购自德国 Thermo公司,冷冻干燥机购自北京博医康技术公司, TCS SP8共聚焦显微镜购自德国 Leica公司, BH-2型倒置显微镜, IX 70型荧光显微镜均购自日本 Olympus公司,扫描电镜购自日本 Hitachi公司,生物力学试验机购自美国 Bose公司, Quant-iT TMPicoGreen® dsDNA Assay Kit购自美国 Invitrogen公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 SVF的制备** 随机选取1只大白兔(雄性、体质量2.23 kg)按0.2 mL/kg速眠新麻醉后于兔背部左侧或右侧造3 cm切口并无菌切取皮下脂肪10 g,清除组织中小血管、结缔组织后冲洗并剪碎至1 mm<sup>3</sup>大小,加1 mg/mL I型胶原酶5 mL, 37℃水浴震荡消化60 min至液化状态,加两倍体积含FBS(100 mL/L)的DMEM培养液终止消化后于200目滤网过滤、离心(1 600 r/min,持续5 min)、PBS重悬沉淀、洗涤后再离心去上清,加5倍体积红细胞裂解液震荡10 min、离心去上清、PBS洗2次、加两倍体积含FBS(100 mL/L)的DMEM培养液后,取0.2 mL细胞液行盼蓝染色并接种至25 cm<sup>2</sup>培养瓶(种植密度 $1.5 \times 10^4$ 个/cm<sup>2</sup>, 37℃, 5%CO<sub>2</sub>, 3 d换液1次)培养,显微镜下观察细胞生长、细胞融合达90%时2.5 g/L胰蛋白酶消化传代。

**1.2.2 SVF多向分化及活性测定** 1)成脂诱导:SVF均匀接种至六孔板(种植密度 $2 \times 10^4$ 个/cm<sup>2</sup>),待细胞融合达100%后换至成脂培养基(ADM:DMEM-LG+10%FBS+1  $\mu$ mol/L地塞米松+60  $\mu$ mol/L吡哆美辛+500  $\mu$ mol/L甲基黄嘌呤+5  $\mu$ g/mL牛胰岛素,3 d换液1次,诱导14 d)后,吸去诱导液,PBS洗2次,加10%甲醛固定60 min,去固定液加番红O(24孔板加500~1 000  $\mu$ L)染色30 min,PBS洗3次,加PBS,干燥,封片。2)成骨诱导 SVF均匀接种至六孔板(种植密度 $3 \times 10^4$ 个/cm<sup>2</sup>),待细胞融合达100%后换至成骨培养基(ODM:DMEM-LG+10%FBS+100 nmol/L地塞米松

+0.2 mmol/L 抗坏血酸+10 mmol/L β-甘油磷酸钠,3 d 换液 1 次,诱导 21 d)后,吸去诱导液,PBS 洗 2 次,加 10%甲醛固定 60 min,去固定液加茜素红 S(24 孔板加 500~1 000 μL)染色 30 min,PBS 洗 3 次、加 PBS,干燥,封片。

**1.2.3 脱细胞骨支架制备** 取新鲜兔股骨干,清洗清除软组织、污物后加工成 1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm 骨块,无菌去离子水高压冲洗,加 1:1 的甲醇:氯仿 100 mL 中脱脂 24 h(12 h 换液 1 次,完毕后蒸馏水冲洗),加 300 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mL 脱蛋白 48 h(12 h 换液 1 次,完毕后蒸馏水冲洗)。6 mol/L HCl 100 mL 脱钙 5 min,蒸馏水冲洗 10 次后置-40℃冷冻干燥机中干燥 48 h,高速粉碎机粉碎,不锈钢筛筛选 10~50 μm 的骨基质粉,-40℃冷冻备用。

**1.2.4 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架制备** 按质量比 10:1 取骨基质粉、5%水溶性壳聚糖溶液,充分混合、离心去气泡后注入圆柱形磨具,-40℃冷冻 2 h,-40℃冷冻干燥机中干燥 48 h 并制成三维多孔支架,将支架紫外线(距光源 10 cm、波长 254 nm)照射交联 8 h,浸入 50 mmol/L 碳化二亚胺(EDAC)+N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)溶液中 4℃交联 24 h,三蒸水漂洗 5 次,-40℃冷冻干燥机中干燥,钴 60 消毒,-4℃冷冻备用。取支架照射灭菌,完全培养液预湿处理,置 6 孔板后将 SVF 种植(种植密度 3×10<sup>7</sup> 个/cm<sup>2</sup>)至支架上,37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下于培养箱下培养 1.2 h 后转至 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,于六孔板培养 72 h 后,-40℃冷冻干燥机中干燥,-40℃冷冻备用。

**1.2.5 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架组织学和生物相容性** 取空白支架和 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架置蒸馏水浸泡 15 min 后,将 P<sub>3</sub> 代的兔纤维软骨细胞分别种植到上述支架上,每块支架种植大约 8×10<sup>6</sup> 个细胞,37℃,5%CO<sub>2</sub> 条件下于培养箱下培养 3 d 后,取出冷冻切片、制片,苏木精-伊红染色,甲苯胺蓝、茜素红、BMP-2 抗体、I 型胶原免疫组织化学染色,同时进行死/活细胞检测处理,无菌 PBS 溶液清洗 2 次,加二乙酸荧光素(FDA)孵育 5 min,去除 FDA,PBS 清洗 2 次,碘化丙啶(PI)孵育 5 min,去除 PI,PBS 清洗 2 次,然后于培养第 0,4,7,14 天进行共聚焦显微镜观察,空白支架干燥后喷金直接镜检 SVF-脱细胞骨基

质-壳聚糖支架;2.5%戊二醛固定、梯度无水乙醇脱水、临界点干燥后喷金镜检,并计数确定死细胞数和活细胞数,细胞存活率=活细胞数/(死细胞数+活细胞数)×100%,同时对两种支架进行依据 Quant-iT™TM-PicoGreendsDNA Reagent and Kits 说明书通过 PicoGreen 荧光法进行细胞 DNA 含量测定。

**1.2.6 兔胫骨缺损模型的建立** 将 40 只大白兔手术区备皮、30 mg/kg 的氯氨酮耳缘静脉麻醉、消毒铺巾,将其一侧胫骨中远 1/3 段截断、去除胫骨干 5 mm 骨质和骨膜、骨蜡封闭骨质端(保持骨折间隙约 5 mm)。

**1.2.7 动物分组及 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架修复兔胫骨缺损** 将 40 只大白兔依据随机数表法按 1:1 比例随机分为 SVF 组和对照组,每组 20 只,所有大白兔按 3%苏巴比妥 30 mg/kg 耳缘静脉麻醉、消毒铺巾,常规切开皮肤、显露胫骨缺损部位、打通髓腔,SVF 组进行 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架移植修复,对照组给空白支架移植修复。

**1.2.8 指标观察** 所有大白兔于 2,4,8 周时给予 30 mg/kg 的氯氨酮耳缘静脉麻醉、胫骨屈曲位摆放于胶片盒、侧位东软 CR 机(40 kV,3.2 mA)下行侧位 X 线,并通过用 DPX-L 扫描机(美国 Lunar 公司)行胫骨骨矿物、骨密度检测,于 8 周后通过空气栓塞法处死所有大白兔,取胫骨缺损部位取材并于骨折端两侧边缘约 0.5 cm 出截去多余骨组织后置入 10%甲醛中固定 2 周,冲洗过夜、10%硝酸脱钙、无水乙醇梯度脱水、透明、石蜡包埋、切片(厚约 5 μm)、苏木精-伊红染色、光镜检查;同时进行生物力学检测,即取空白支架和 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架用 PBS 浸润 10 min 后行三点抗弯曲测试,并确定最大弯曲度负荷、抗弯刚度、破坏扰度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件处理数据,计数资料比较采用 χ<sup>2</sup> 检验,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 *t* 检验,*P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组各时段 DNA 含量情况比较

SVF 组和对照组第 0 周时 DNA 含量基本相同,差异无统计学意义(*P* > 0.05),SVF 组第 4,7,14 天时 DNA 含量明显高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 1 及图 1。

表 1 两组各时间 DNA 含量情况比较( $\bar{x} \pm s$ ,ng)

组别	例数	第 0 天	第 4 天	第 7 天	第 14 天
对照组	20	72.46±8.46	92.43±10.36	104.63±11.21	145.46±16.36
SVF 组	20	73.02±8.62	113.43±12.36	136.43±15.02	176.43±18.49
<i>t</i>		0.207	5.823	7.588	5.610
<i>P</i>		7.214	<0.001	<0.001	<0.001

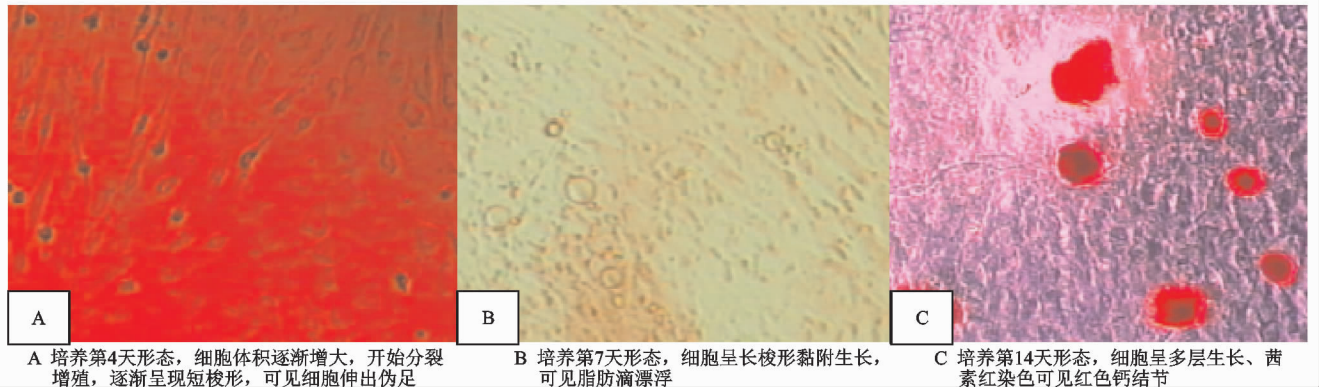


图 1 SVF 组细胞组织检测结果(200×)

2.2 两组各时段细胞存活率情况比较

SVF 组和对照组 0 天时细胞存活率基本相同，差异无统计学意义( $P>0.05$ ),SVF 组第 4,7,14 天时细胞存活率明显高于对照组，差异有统计学意义( $P<0.05$ )，见表 2 及图 2~3.

表 2 两组各时间细胞存活率情况比较( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	例数	第 0 天	第 4 天	第 7 天	第 14 天
对照组	20	100.00±0.00	94.43±3.42	90.43±4.32	91.43±4.52
SVF 组	20	100.00±0.00	98.46±1.24	95.13±3.42	96.87±3.57
<i>t</i>		0.000	4.954	3.815	4.224
<i>P</i>		14.231	<0.001	<0.001	<0.001

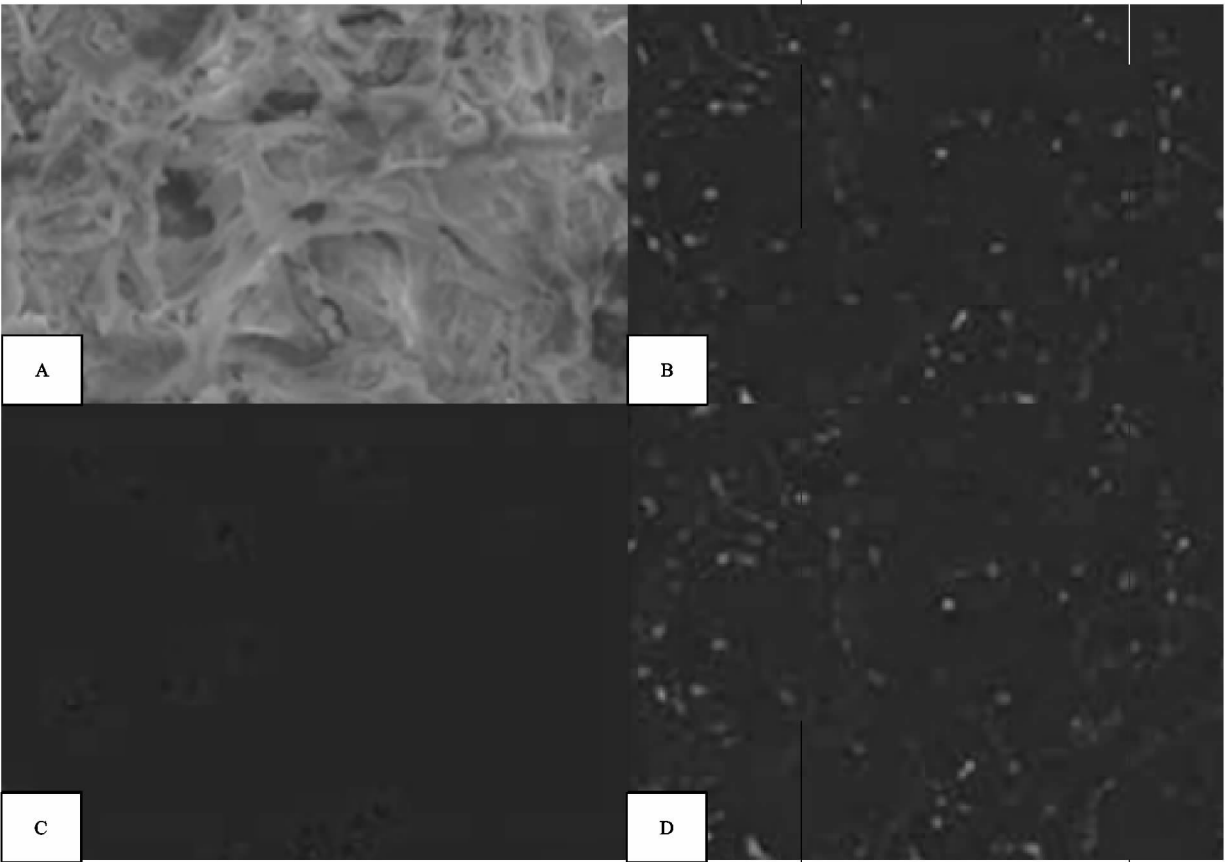
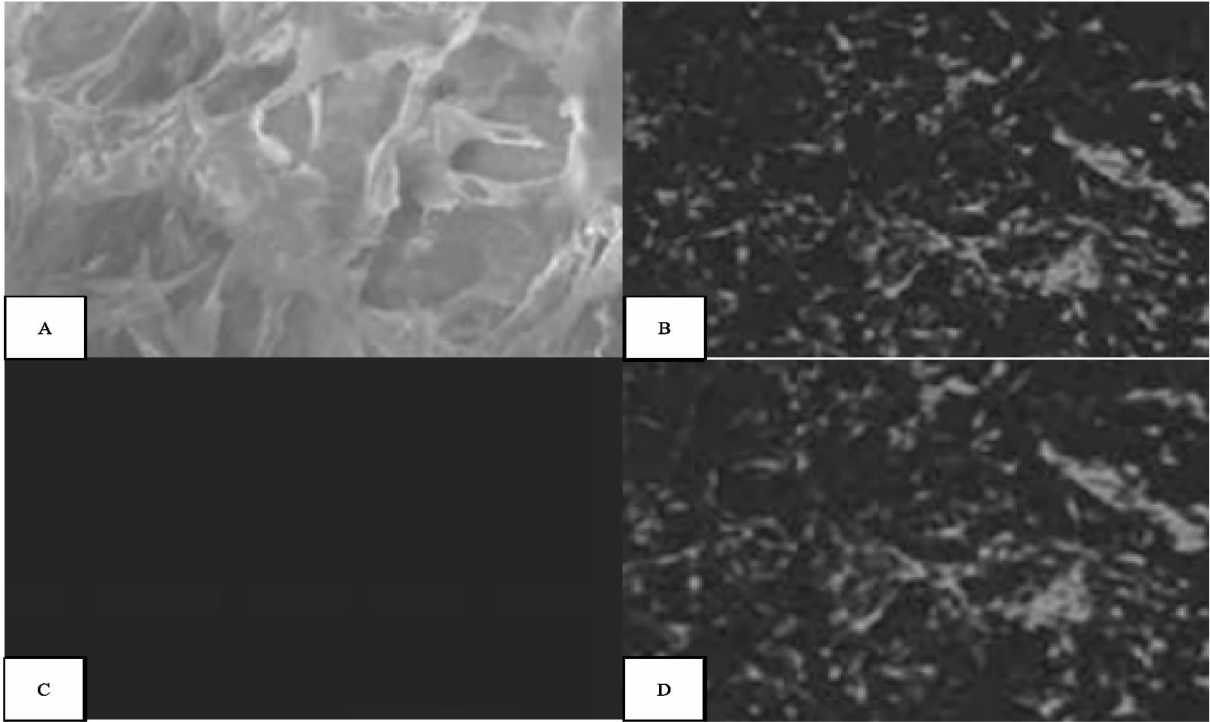


图 2 对照组第 14 天时细胞存活情况(200×)





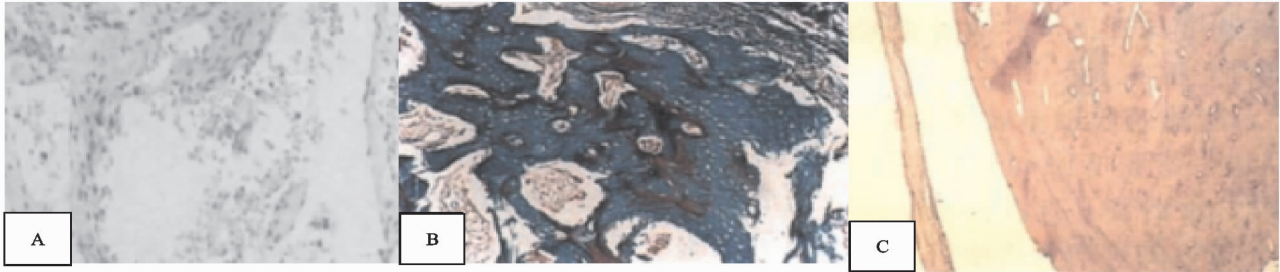
A为扫描电镜结果，B为活细胞染色结果，C为死细胞染色结果，D为活/死细胞染色叠加结果

图 3 SVF 组第 14 天时细胞存活情况(200×)

2.3 两组不同时期胫骨修复的大体观察、组织学观察、免疫组织化学观察情况

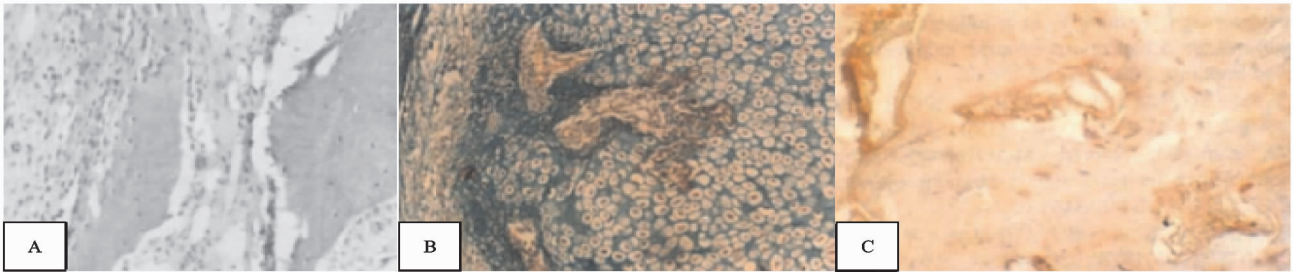
对照组第 2 周大体观察可见膜材完整，组织学观察可见少量新骨，免疫组织化学观察未见 BMP 染色阳性；第 4 周大体观察可见膜管内骨端下可见新生骨痂，组织学观察可见软骨内成骨为主，免疫组织化学观察未见 BMP 染色阳性；第 8 周大体观察可见膜降解呈碎片状、骨端骨痂较硬，组织学观察可见膜材大部分降解且出现幼稚髓腔样结构，免疫组织化学观察 BMP 轻度表达、软骨基质 BMP 染色阳性。SVF 组第 2 周大体观察可见新

生血肿及骨痂、仿生骨膜未见移位并与骨端结合处稳定、未见结缔组织在膜内生长，组织学观察可见大量类骨样组织生成，免疫组织化学观察可见骨端骨细胞、增生骨内膜 BMP 染色阳性；第 4 周大体观察可见仿生骨膜与骨端间有大量新生骨痂，组织学观察可见存在软骨内成骨为主的新骨，免疫组织化学观察可见痂骨细胞、骨髓腔 BMP 染色阳性、着色显著；第 8 周大体观察可见仿生骨膜大部分完整、有骨痂生长，组织学观察可见软骨内骨化明显、缺损基本修复，免疫组织化学观察可见熟骨基质部分 BMP 染色阳性、着色变浅。见图 4~5。



A 膜材完整但可见少量新骨(100×) B 第4周成骨细胞增殖活跃、大量新生骨胶原(100×) C 第8周出现幼稚髓腔样结构(200×)

图 4 对照组第 2,4,8 周大体观察、组织学观察、免疫组织化学观察



A 可见新生骨痂并与骨端结合处稳定但未见结缔组织在膜内生长(100×) B 第4周可见软骨内成骨为主的新生(100×) C 第8周骨髓腔骨髓腔骨形态形成蛋白染色性，着色显著(200×)

图 5 SVF 组第 2,4,8 周大体观察、组织学观察、免疫组织化学观察

2.4 两组不同时期骨矿物水平比较

SVF 组和对照组第 0 周时骨矿物水平基本相同, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ),SVF 组第 2,4,8 周时

骨矿物水平明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3.

表 3 两组不同时间骨矿物水平比较( $\bar{x}\pm s,g$ )

组别	例数	第 0 周	第 2 周	第 4 周	第 8 周
对照组		0.05±0.02	0.07±0.03	0.10±0.04	0.13±0.05
SVF 组		0.05±0.02	0.12±0.04	0.17±0.05	0.23±0.06
<i>t</i>		0.000	4.472	4.889	5.726
<i>P</i>		15.783	<0.001	<0.001	<0.001

2.5 两组不同时期骨密度水平比较

SVF 组和对照组第 0 周时骨密度水平基本相同, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ),SVF 组第 2,4,8 周时

骨密度水平明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 4.

表 4 两组不同时间骨密度水平比较( $\bar{x}\pm s,g/cm^2$ )

组别	例数	第 0 周	第 2 周	第 4 周	第 8 周
对照组	20	0.06±0.02	0.08±0.03	0.13±0.04	0.22±0.06
SVF 组	20	0.06±0.02	0.14±0.04	0.21±0.06	0.34±0.08
<i>t</i>		<0.001	5.367	4.961	5.367
<i>P</i>		15.372	<0.001	<0.001	<0.001

2.6 两组第 8 周时最大弯曲度负荷、抗弯刚度、破坏扰度水平比较

SVF 组第 8 周时最大弯曲度负荷、抗弯刚度、破

坏扰度水平明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 5.

表 5 两组第 8 周时最大弯曲度负荷、抗弯刚度、破坏扰度水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	最大弯曲度负荷(N)	抗弯刚度(N/mm <sup>2</sup> )	破坏扰度(mm)
对照组	20	98.67±10.26	2644.13±301.25	0.51±0.07
SVF 组	20	251.43±28.43	4316.16±502.31	0.28±0.03
<i>t</i>		22.603	12.766	13.506
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

胫骨缺损是最常见的骨缺损之一,可导致局部肿胀、疼痛、功能受碍等情况,其常用的治疗方法为自体骨移植、假体材料填充等,虽可有效修复缺损,但由于上述材料均无细胞活性,需要机体自身成骨细胞漫长逐步转化为新生骨方可完全完成修复作用,且若骨缺损大,易导致修复不完整,影响功能的恢复<sup>[6-9]</sup>。近年来,随着骨组织工程技术的发展,具有细胞活性的移植修复治疗技术已逐渐被应用于多种骨缺损疾病治疗中,通过植入具有成骨分化功能的种子细胞(干细胞),不仅可有效修复缺损,还可有效转化为成骨细胞而促进新生骨组织修复骨缺损,可有效解决上述传统方法存在的不足,从而达更为良好的治疗疗效<sup>[10-12]</sup>。有研究显示,种子细胞是骨组织工程技术的关键所在,其常用的种子细胞为骨髓间充质干细胞,可有效分化为成骨细胞,其在骨缺损治疗中的疗效和作用已被认可,但其可取材量少、操作困难、创伤大,易增加骨组织工程材料制作的难度,且不易被患者所接受,不利于临床推广应用<sup>[13-16]</sup>。而一些研究表明,SVF 中也存在具备良好体外扩增和多克隆能力的基质细胞,可诱导分化为成骨细胞,且其诱导分化后的成骨细胞也具有分泌骨基质而修复骨缺损的作用,且具有可取材量大、取材简单、供区创伤小等特点<sup>[17-20]</sup>。

对此,本研究通过制作 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架并检测生物相容性和建立修复胫骨缺损的动物体内实验进行验证,发现 SVF 组第 4,7,14 天时 DNA 含量和细胞存活率明显高于对照组,表明 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架具有良好的生物相容性,这可能是由于支架经过物理化学联合法有效脱去支架材料中的脂肪、蛋白、钙质等,彻底脱去 DNA 物质及可有效地保留了天然的细胞外基质成分,同时壳聚糖为壳素脱乙酰基后的产物,其制作而成的支架可形成一层膜性结构,使支架具有良好的表面活性和机械性能,且其具有良好的吸附能力、亲和力和溶解性,有利于促进种子细胞的黏附、增殖和分化,且对机体无毒性及免疫原性,故可为细胞生长提高良好的生物相容性环境,使 SVF 种植于脱细胞骨基质-壳聚糖支架上可有效分化为成骨细胞,并在载体上复合、增殖、成熟,同时可使纤维软骨细胞较好地黏附于支架上并生长增殖,且可能由于 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架中的 SVF 大量地增殖、成熟为成骨细胞,进而分泌大量的骨基质而发挥修复骨缺损的作用,有利于支架上纤维软骨细胞的生长增殖,从而增加支架上细胞的存活率和 DNA 含量。同时本研究还发现术后第 8 周,SVF 组大体观察可见仿生骨膜大部分完

整、有骨痂生长,组织学观察可见软骨内骨化明显、缺损基本修复,免疫组织化学观察可见熟骨基质部分 BMP 染色阳性、着色变浅,对照组大体观察可见膜降解呈碎片状、骨端骨痂较硬,组织学观察可见膜材大部分降解且出现幼稚髓腔样结构,免疫组织化学观察 BMP 轻度表达、软骨基质 BMP 染色阳性,前者第 2,4,8 周时骨矿物、骨密度和第 8 周时最大弯曲度负荷、抗弯刚度、破坏扰度水平明显高于后者,表明 SVF 可作为骨组织工程的种子细胞,以其为种子细胞制作的脱细胞骨基质-壳聚糖支架可有效促进胫骨骨缺损的修复。这可能是脱细胞骨基质-壳聚糖支架单纯地通过支架材料的骨传导和诱导作用来促进成骨,不具备含成骨活性的种子细胞,导致其需机体自身成骨细胞逐步转化,故其新骨形成较慢,修复效果也较差。

此外,本研究中的 SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架可能由于其具有良好的生物相容性,在植入骨缺损后不被排斥,且 SVF 可能由于经过诱导培养而具有良好的成骨分化潜能,可在体内血液供应、应力作用、缺损刺激等影响下,可有效分化为与骨髓间充质干细胞分化而成骨细胞功能的成骨细胞,进而可通过分泌大量的骨基质因子、血管生成因子、抗凋亡因子及其他细胞因子,吸引成骨前体细胞参与骨形成和促进缺损部位的血供恢复,从而发挥骨传导、骨诱导及自身成骨作用,改善胫骨缺损部位的骨矿物、骨密度水平,有利于体内新骨的生长和形成,并具有较强成骨及塑形的能力,最终促进胫骨骨缺损的修复,并使其具有更为良好的生物力学效果,表现为最大弯曲度负荷及抗弯刚度、破坏扰度水平显著提升。

综上所述,SVF-脱细胞骨基质-壳聚糖支架具有良好的生物相容性,SVF 可作为骨组织工程的种子细胞,可能通过协同诱导、传导效应等增强骨再生能力,具有良好的生物力学效果,有利于促进胫骨骨缺损的修复,值得临床进一步推广。

## 参考文献

- [1] 李阳,房艳,柏树令,等. 纳米“羟基磷灰石-胶原蛋白-壳聚糖”材料复合骨髓间充质干细胞修复小鼠胫骨缺损[J]. 解剖学报,2013,44(3):386-392.
- [2] Oprenyeszk F, Sanchez C, Dubuc JE, et al. Chitosan-enriched three-dimensional matrix reduces inflammatory and catabolic mediators production by human chondrocytes[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0128362.
- [3] 熊竹友,方小魁,徐静,等. 同种异体脂肪干细胞复合脱钙骨修复大鼠尺骨缺损[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2013, 9(5): 245-250.
- [4] 黄成龙,肖金刚. 脂肪干细胞成骨分化及与复合支架结合:在修复骨质疏松症骨缺损中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(41): 6696-6702.
- [5] Fossett E, Khan WS, Longo UG, et al. Effect of age and gender on cell proliferation and cell surface characterization of synovial fat pad derived mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 2012, 30(7): 1013-1018.
- [6] 朴成哲,刘军,刘新,等. 骨髓间充质细胞复合胶原-壳聚

糖材料联合骨搬运修复胫骨缺损:随机对照实验方案[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(32): 5231-5235.

- [7] Vindigni V, Tonello C, Lancerotto L, et al. Preliminary report of in vitro reconstruction of a vascularized tendonlike structure: a novel application for adipose-derived stem cells[J]. Ann Plast Surg, 2013, 71(6): 664-670.
- [8] 于丽凤,汪安,陈建荣,等. 碳酸化羟基磷灰石支架及其细胞因子复合物修复鼠胫骨缺损的实验研究[J]. 口腔颌面外科杂志, 2014, 24(5): 330-335.
- [9] Lee K, Kim H, Kim JM, et al. Systemic transplantation of human adipose-derived stem cells stimulates bone repair by promoting osteoblast and osteoclast function[J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(10): 2082-2094.
- [10] 杨函,康建平,丁裕名,等. 同种异体脂肪干细胞复合脱钙骨支架材料修复尺骨缺损:CT 扫描及组织学检测[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(28): 4520-4525.
- [11] Sandor GK, Tuovinen VJ, Wolff J, et al. Adipose stem cell tissue-engineered construct used to treat large anterior mandibular defect: a case report and review of the clinical application of good manufacturing practice-level adipose stem cells for bone regeneration[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 13(2): 219-224.
- [12] 杜明昌,刘宪民,祖启明,等. 自体脂肪干细胞复合不同初始浓度诱导支架修复猪膝关节软骨缺损的初步观察[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 7(6): 2523-2527.
- [13] Chung YG, Algarrahi K, Franck D, et al. The use of bi-layer silk fibroin scaffolds and small intestinal submucosa matrices to support bladder tissue regeneration in a rat model of spinal cord injury[J]. Biomaterials, 2014, 35(26): 7452-7459.
- [14] 杨世茂,王明国,李静,等. 复合 ADSCs/ $\beta$ -TCP 组织工程骨与 PRF 修复下颌骨缺损的实验研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2012, 28(6): 686-690.
- [15] Colosimo A, Rofani C, Ciraci E, et al. Osteogenic differentiation of CD271(+) cells from rabbit bone marrow cultured on three phase PCL/TZ-HA bioactive scaffolds: comparative study with mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 13154-13162.
- [16] 沈凌,王锡友,陈萍,等. 同种异体脂肪干细胞复合纳米级胶原基骨材料修复尺骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(32): 5162-5166.
- [17] Carvalho PP, Leonor IB, Smith BJ, et al. Undifferentiated human adipose-derived stromal/stem cells loaded onto wet-spun starch-polycaprolactone scaffolds enhance bone regeneration: nude mice calvarial defect in vivo study[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(9): 3102-3111.
- [18] 姚海军,赵阳,周哲,等. 人脂肪来源干细胞与左旋聚乳酸/聚己内酯支架的体内外生物相容性研究[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2014, 10(5): 255-258.
- [19] Kim U, Shin DG, Park JS. Homing of adipose-derived stem cells to radiofrequency catheter ablated canine atrium and differentiation into cardiomyocyte-like cells[J]. Int J Cardiol, 2011(3): 371-378.
- [20] 赵刚,刘学元,姚素艳,等. 续断皂苷 VI 诱导的脂肪间充质干细胞复合纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架治疗大鼠桡骨骨缺损[J]. 解剖学杂志, 2016, 39(4): 416-421.

(收稿日期:2016-12-13)