

• 实验研究 •

三维打印羟基磷灰石/二氧化锆支架复合诱导多能干细胞来源间充质干细胞构建新型组织工程骨的实验研究

王拓^{1△} 黄小龙¹ 吴奕江¹ 杜伟斌¹ 韩雷¹ 汪灿锋¹ 全仁夫¹

[摘要] 目的:运用3D打印技术制备羟基磷灰石/二氧化锆(HA/ZrO₂)支架,复合诱导性多能干细胞(iPSC)来源的间充质干细胞(MSC)构建新型组织工程骨,观察其修复犬股骨干骨缺损的能力。方法:运用CT扫描数据结合3D打印技术构建犬股骨干缺损部位HA/ZrO₂支架,电镜及力学试验分析支架生物力学性能。诱导性多能干细胞通过诱导分化为间充质干细胞形态细胞,构建支架材料与诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞体外共培养体系,行细胞毒性等级测定,电镜观察细胞在支架上黏附、生长情况。12只比格犬根据植入材料的不同随机分为3组,每组4只。A组截取犬股骨中段25 mm后空置,B组截骨后植入HA/ZrO₂支架,C组截骨后植入复合诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞的HA/ZrO₂支架。术后X线、CT、力学试验分别观察新生骨长入情况、骨结合能力及力学性能。结果:通过CT扫描精准数据转化为3D打印数据,个体化制备HA/ZrO₂复合支架,支架抗压强度为(48.94±0.65)MPa;免疫荧光检测示诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞表达Vimentin,不表达OCT4和Nestin;支架材料与诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞体外共培养细胞毒性等级为0级;扫描电子显微镜可见梭形的诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞在HA/ZrO₂支架表面黏附、生长。动物实验术后X线影像学观察显示A组骨缺损断端吸收,骨不愈合;B组和C组支架与宿主骨结合牢固,支架内新生骨填充,有连续性骨痂通过。术后12周CT检测示B组单位体积骨量为(219.45±3.15)mm³/cm³,C组为(222.99±5.97)mm³/cm³,两组差异无统计学意义($P>0.05$)。术后12周抗压试验显示B组抗压强度为(52.21±2.41)MPa,C组抗压强度为(52.51±1.35)MPa,两组差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:3D打印制备的HA/ZrO₂支架符合临床个体化治疗原则,具备较强生物力学性能及良好生物相容性,复合诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞构建的新型组织工程骨成功修复犬股骨干骨缺损,是理想的骨组织替换材料。

[关键词] 三维打印;羟基磷灰石/二氧化锆;诱导多能干细胞;骨缺损;骨组织工程

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)05-0018-07

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240504

Experimental Study on Novel Tissue Engineered Bone Constructed by HA/ZrO₂ Scaffold Based on 3D Printing Technology Composite iPSCs-MSCsWANG Tuo^{1△} HUANG Xiaolong¹ WU Yijiang¹ DU Weibin¹
HAN Lei¹ WANG Canfeng¹ QUAN Renfu¹

¹ Jiangnan Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University (Hangzhou Xiaoshan Hospital of Traditional Chinese Medicine), Hangzhou 311200, China.

Abstract Objective: To observe dogs' bone repairing ability in femoral shaft defect by using novel tissue engineered bone which was constructed by HA/ZrO₂ scaffold based on 3D printing technology and induced pluripotent stem cell (iPSC)

source mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods:** CT scan data and 3D printing technology were used to construct dog femoral shaft defect HA/ZrO₂ scaffold. The biomechanical property of scaffold was analyzed by electron microscope and mechanical test. The iPSCs were induced and differentiated

基金项目:浙江省医药卫生科技项目(2020KY796)

¹ 浙江中医药大学附属江南医院(杭州市萧山区中医院)
(杭州,311200)

△通信作者 E-mail: wangtuo1119@126.com

into MSCs morphological cells, and in vitro co-culture system of scaffold and iPSCs-MSCs were constructed. Its cytotoxicity grade was determined. The cell adhesion and growth on the scaffold were observed by electron microscope. 12 dogs were divided into 3 groups according to the difference of implant material, with 4 dogs in each group. Group A: dogs' 25 mm mid femur were vacant after osteotomy. Group B: HA/ZrO₂ scaffolds were implanted after osteotomy. Group C: HA/ZrO₂ scaffolds composite iPSCs-MSCs were implanted after osteotomy. New born bone ingrowth, osseointegration ability and mechanical property were observed by X-ray, CT and mechanical test respectively. **Results:** HA/ZrO₂ composite scaffolds were individually prepared by CT scanning precision data into 3D printed data. Scaffold compressive strength was reached to (48.94 ± 0.65) MPa. Immunofluorescences showed that iPSCs-MSCs expressed Vimentin, while did not express OCT4 and Nestin. The cytotoxicity grade in vitro co-culture of scaffold material with iPSCs-MSCs was 0. Scanning electron microscope (SEM) showed that spindle-shape iPSCs-MSCs adhered and grew on the surface of the HA/ZrO₂ scaffold. X-ray examination showed: in group A, the broken end of the fracture was absorbed, and bone nonunion was formed; in group B and C, the scaffold was bonded strongly to the host bone, and the new bone was filled in the stent, with a continuous callus passing through. 3D reconstruction of CT after surgery was showed new born bone mass per unit volume was reached to (219.45 ± 3.15) mm³/cm³ in group B, while (222.99 ± 5.97) mm³/cm³ in group C, and there was no significant difference between two groups ($P > 0.05$). Ultimate compressive test in week 12 showed that compressive strength reached to (52.21 ± 2.41) MPa in group B, while (52.51 ± 1.35) MPa in group C, and there was no significant difference between two groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** The HA/ZrO₂ scaffolds prepared by 3D printing were in accordance with the principle of clinical individualized treatment, which are with strong biomechanical properties and good biocompatibility. Novel tissue engineered bone constructed by HA/ZrO₂ scaffold and iPSCs-MSCs could successfully repair femoral bone defect in dogs, and is an ideal replacement material for bone tissue.

Keywords: 3D printing; HA/ZrO₂; induced pluripotent stem cells (iPSCs); bone defect; bone tissue engineering

由于创伤、肿瘤、感染等因素引起的大段骨缺损无法自行愈合,一直是临床治疗的难题^[1]。当前的主要解决方案包括骨移植^[2]、骨搬运^[3]、人工替代物置换^[4]和组织工程骨等,其中组织工程骨设计和制备的基本原则体现了骨缺损的仿生修复理念,逐渐成为国内外研究的热点^[5]。优良的支架材料和种子细胞是组织工程骨修复的关键,研究表明 HA/ZrO₂ 复合材料支架具有羟基磷灰石(HA)良好的生物相容性,且结合的第二相颗粒 ZrO₂ 使得支架具备更好的力学强度。而 3D 打印技术与临床 CT 三维重建技术相结合,可以个体化制作出骨缺损部位填充所需的支架,相比传统支架制作有着不可比拟的优势^[6-7]。诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞(iPSCs-MSCs)是把诱导性多能干细胞(iPSCs)分化成类似间充质干细胞(MSCs)样的细胞,不但具有和骨髓间充质干细胞(BMSC)相类似的生物学性质和功能,规避了其他干细胞存在的伦理及获取难题,而且具有更强的增殖能力,还不存在致癌的潜在风险^[8]。本研究运用 3D 打印技术制备 HA/ZrO₂ 支架,复合 iPSCs-MSCs 构建新型组织工程骨,综合评价其在犬大段骨缺损中的修复效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级成年比格犬 12 只,雌雄不限,体重为 8~10 kg,购于浙江中医药大学动物实验研究中心,实验动物许可证号为 SYXK(浙)2021-0012。

1.2 实验药物及试剂

诱导性多能干细胞来源于浙江大学生命科学院实验室,α-MEM 培养基、SB431542 购于美国 Sigma; FBS、0.05% trypsin、Accutase、TrypLE 购于美国 Gibco; UltraGROTM-AdvancedHP CFDCRL05 购于美国 Helios; Gelatin 购于美国 Millipore; Matrigel 购于美国 BD 公司; mTeSR1 购于美国 StemCells; 戊二醛、叔丁醇购于 Macklin(中国); PBS 购于杭州吉诺生物医药技术有限公司; 4% PFA、3% BSA、CCK-8 检测试剂盒购于大连美仑生物科技有限公司; Triton-X100 购于美国 Amresco; DAPI 购于美国 Invitrogen。

1.3 实验仪器

扫描电子显微镜(SEM, Hitachi, 日本), 光固化 3D 打印机(Lithoz, 奥地利), C 臂机(Toshiba, 日本), Micro CT(Bruker, 比利时); 万能材料实验机(Instron, 美国)。

1.4 方法

1.4.1 HA/ZrO₂ 支架的 3D 打印制备与检测

1.4.1.1 建立比格犬股骨干骨缺损模型 实验动物麻醉后备皮、消毒、铺巾,取右股骨外侧切口,显露后沿股直肌与股外侧肌间隙暴露股骨干,截去股骨中段 25 mm 空置,选择合适长度重建钢板内固定, X 线机透视验证股骨断端对线满意后逐层缝合关闭切口。术后常规预防感染,部分制动饲养。

1.4.1.2 Micro CT 数据采集及转化 将犬股骨干截取的股骨包装后放入 Micro CT,进行容积扫描后以

Dicom数据格式输出。数据导入 Magics 21 软件中,根据所需支架孔隙率的要求,进行拉伸、数据转化和后期处理,保存结果并导出相应 3D 打印 STL 格式文件。

1.4.1.3 光固化成型 3D 打印 HA/ZrO₂ 支架材料 将犬股骨干 STL 数据导入光固化 3D 打印机中,设置标准层厚为 25 μm ,曝光时间为 1.3 s,倾斜上升速率为 12°/s,倾斜下降速率为 7°/s。设定 HA 和 ZrO₂ 质量比为 3:7,调配适当浓度树脂,利用光固化成型 3D 打印机光敏树脂聚合原理打印 HA/ZrO₂ 支架初胚。进一步脱脂烧结:1)升温期:从室温至 75 $^{\circ}\text{C}$,升温速率为 0.42 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,保温时间为 2 h。从 75 $^{\circ}\text{C}$ 至 115 $^{\circ}\text{C}$,升温速率为 0.17 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,保温时间为 4 h。从 115 $^{\circ}\text{C}$ 至 205 $^{\circ}\text{C}$,升温速率为 0.19 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,保温时间为 16 h。从 205 $^{\circ}\text{C}$ 至 430 $^{\circ}\text{C}$,升温速率为 0.19 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,保温时间为 4 h。2)烧结期:从 430 $^{\circ}\text{C}$ 至 600 $^{\circ}\text{C}$,升温速率为 0.47 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。持续升温至 850 $^{\circ}\text{C}$,升温速率为 0.52 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,保温时间为 2 h。从 850 $^{\circ}\text{C}$ 至 1 300 $^{\circ}\text{C}$,升温速率为 0.97 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,保温时间为 2 h。3)降温期:以 -1.62 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 进行冷却至室温。整个脱脂烧结过程共耗时 99 h,冷却后得到 HA/ZrO₂ 支架。

1.4.1.4 HA/ZrO₂ 支架检测:1)扫描电子显微镜观察,利用导电胶将 HA/ZrO₂ 支架固定于样品台上,用真空离子溅射仪进行表面溅射喷金处理后调整样品高度,放入扫描电子显微镜中观察支架表面结构。2)抗压强度检测,计算支架材料接触面积,将 HA/ZrO₂ 支架放置于万能试验机,以 0.5 mm/min 速率进行抗压试验,读出材料破坏时压力数据,抗压强度值为最大压力与接触面积之比。

1.4.2 iPSCs-MSCs 的制备与鉴定

1.4.2.1 iPSCs 向 MSCs 定向诱导分化 Matrigel 基质下复苏 iPSCs,用 Accutase 消化酶消化 10~15 min 传至 mTeSR1 培养基维持 3 d,iPSCs 培养至 30% 后转移至 MSCs 诱导培养基,每天换液,7 d 后传代,3 d 传代 1 次,第 3 次传代后细胞变成类 MSCs 样形态,换成 iPSCs-MSCs 维持培养基,筛选得到的细胞即为 iPSCs-MSCs。

1)MSCs 诱导培养基:10% FBS+90% α -MEM+10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SB431542。2)iPSCs-MSCs 维持培养基:25 mL UltraGROTM-Advanced 添加物+475 mL α -MEM。

1.4.2.2 iPSCs-MSCs 的免疫荧光鉴定 iPSCs-MSCs 接种至 Matrigel 基质 24 孔板培养 3 d,吸去培养液并用 PBS 漂洗,加入 4% PFA 固定 30 min,再次漂洗后加入 0.2% Triton-X100 通透 30 min,再用 3% BSA 封闭 60 min。分别加入一抗 Vimentin、Nestin、OCT4 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入二抗避光 60 min,最终加入 DAPI 核染 5 min,用水性封片剂封片。荧光倒置显

微镜下观察不同色荧光表达。

1.4.3 HA/ZrO₂ 支架与细胞共培养体系的建立

1.4.3.1 细胞相对增殖率和毒级检测 分别设 iPSCs-MSCs+HA/ZrO₂ 支架材料浸提液组和 iPSCs-MSCs 阴性对照组,每组平行设置 3 个样本。将 iPSCs-MSCs 用 TrypLE 消化后,分别用 iPSCs-MSCs 培养基和浸提液培养基重悬细胞,于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂ 细胞培养箱培养,分别于第 1 天、第 4 天及第 7 天检测各组光密度(OD)值。

1.4.3.2 复合培养及形貌观察 将预先制备好的空白 HA/ZrO₂ 梯度复合材料支架置于 12 孔板中。iPSCs-MSCs 用 TrypLE 消化后加入 iPSCs-MSCs 培养基重悬,调整细胞浓度至 1×10^5 个/mL,充分吹匀后,吸取 500 μL 细胞悬液均匀地滴至 HA/ZrO₂ 梯度复合材料支架表面,使细胞贴附在支架表面;37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂ 培养箱中培养 2 h,待细胞与支架贴合后,加入 iPSCs-MSCs 培养基,使支架完全浸入培养液中;继续培养 48 h 后取出,吸弃培养液,加入 4% 戊二醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h;PBS 反复冲洗 3 次,10 min/次,然后乙醇梯度脱水,依次浸入浓度为 70%,80%,90%,100% 无水乙醇中,每个梯度浸泡 10 min;再次叔丁醇梯度脱水,依次浸入浓度为 70%,80%,90%,100% 叔丁醇中,每个梯度浸泡 10 min,真空干燥 5 min,利用导电胶将 HA/ZrO₂ 支架材料固定于样品台上,临界点喷金后,扫描电子显微镜下观察 iPSCs-MSCs 的黏附性及细胞形态。

1.4.4 动物实验分组及检测指标

1.4.4.1 实验分组 将 12 只比格犬根据植入材料的不同随机分为 3 组,每组 4 只。A 组:截取一侧股骨干全层骨质 25 mm 后空置,行钢板固定。B 组:截取一侧股骨干全层骨质 25 mm 后,植入 HA/ZrO₂ 支架,并行钢板固定。C 组:截取一侧股骨干全层骨质 25 mm 后,植入复合 iPSCs-MSCs 的 HA/ZrO₂ 支架,并行钢板固定。手术入路、操作方法、术后治疗及饲养条件同 1.4.1.1 节。

1.4.4.2 术后检测 1)大体观察:术后观察实验犬切口愈合、活动度、进食量等情况,判断是否存在切口感染、活动受限、食欲减退等。

2)X 线影像检测:实验犬术后即刻至 12 周行 X 线影像检测,观察骨缺损区与植入物位置、形态、新生骨长入等情况,判断是否存在钢板和植入物移位、断裂、骨不愈合及骨痂生长缓慢等。

3)CT 扫描和骨量检测:术后 12 周离体标本行 CT 扫描并行三维重建,利用 CT 自带软件分析计算新生骨量。

4)抗压试验:术后 12 周离体标本行极限抗压试验测试,方法同 1.4.1.4 节。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 22.0 统计软件处理统计数据,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三维数据的采集与转化

动物实验截取 25 mm 比格犬股骨中段全层骨质,将犬股骨干缺损模型置于 Micro CT 中进行扫描,形成三维重建图像,数据以 Dicom 格式输出,见图 1。

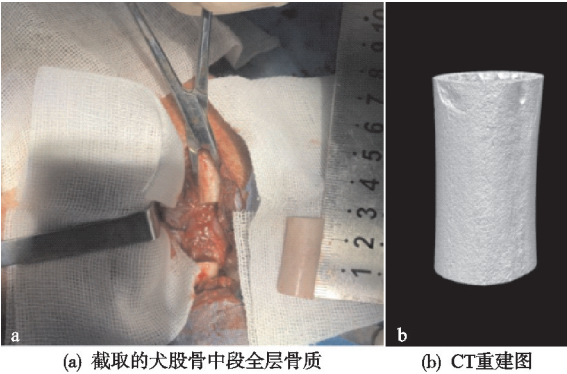


图 1 犬股骨中段全层骨质及 CT 重建

运用 Magics 21 软件对 Dicom 格式数据进行编辑和转化。取犬股骨干中段平均直径,包括外圈直径 12 mm,内圈直径 6 mm,长度 25 mm,设置材料孔径 500 μm ,形成均匀孔隙排列整齐的圆柱体模型,见图 2。

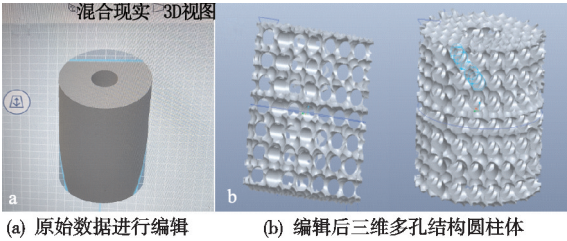


图 2 原始数据及编辑后三维多孔结构圆柱体

2.2 HA/ZrO₂ 支架的 3D 打印制备

经过光固化 3D 打印初胚并脱脂烧结,最终得到 HA/ZrO₂ 支架。支架完美复制数据模型结构特征,外圈直径 12 mm,内圈直径 6 mm,长度 25 mm,表面孔径 500 μm ,呈中空蜂窝状结构的圆柱体,见图 3。

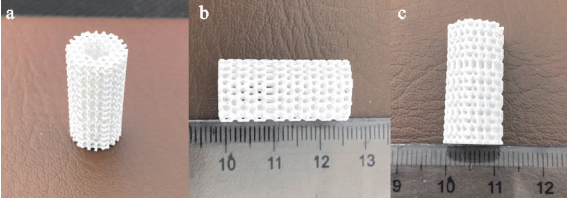


图 3 3D 打印初胚及脱脂烧结后 HA/ZrO₂ 支架

2.3 HA/ZrO₂ 支架的检测分析

2.3.1 扫描电子显微镜 扫描电子显微镜观察见支架表面均匀光滑,体现了 3D 打印的精准化制备,断层处见 HA 与 ZrO₂ 材料紧密结合,无明显分层及界线,见图 4。

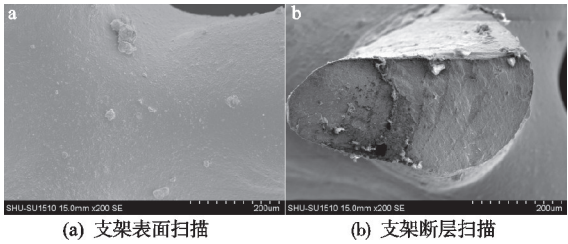


图 4 HA/ZrO₂ 支架扫描电子显微镜图($\times 200$)

2.3.2 抗压强度 万能试验机抗压强度检测显示:支架压力面表面积为 $(41.24 \pm 1.02) \text{ mm}^2$,最大压力为 $(2\,018.27 \pm 69.93) \text{ N}$,抗压强度为 $(48.94 \pm 0.65) \text{ MPa}$ 。

2.4 iPSCs-MSCs 的诱导

显微镜下见经 MSCs 诱导培养基培养后的 iPSCs 形态松散,体积增大(图 5a),7 d 后传代至 P1 代 iPSCs-MSCs 形态多样,呈现圆形、短梭形及三角形等(图 5b),继续传代至 P3 代 iPSCs-MSCs 形态规则稳定,呈长梭形(图 5c)。

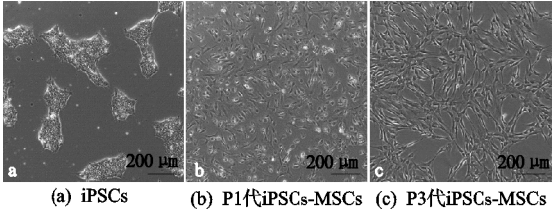


图 5 显微镜下细胞形态($\times 100$)

2.5 iPSCs-MSCs 的鉴定

免疫荧光染色鉴定 iPSCs-MSCs 与对照组蛋白表达情况见图 6,细胞经 DAPI 核染后显示 iPSCs 表达 OCT4, iPSCs-MSCs 与 BMSCs 均表达波形蛋白(Vimentin),不表达巢蛋白(Nestin)。Vimentin 为 MSCs 的标志蛋白,Nestin 为神经上皮干细胞上一种分子标记物,属外胚层标志物,OCT4 为人胚胎干细胞标志蛋白。

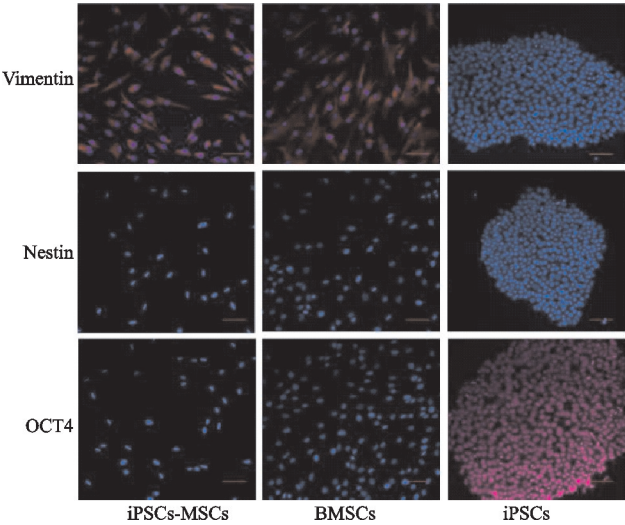


图 6 显微镜下 iPSCs、iPSCs-MSCs 及 BMSCs 免疫荧光染色结果($\times 200$)

2.6 HA/ZrO₂ 支架与细胞共培养体系的建立

通过酶标仪在 450 nm 波长下测量细胞不同时间点的 OD 值计算相对增殖率(RGR),如表 1 所示,随着

时间的增加各组 OD 值也随之升高,这表明细胞在此期间的增殖未受到影响,各时间点的相对增殖率均大于 100%,说明细胞毒性等级测定均为 0 级。

表 1 各组第 1,4,7 天的细胞毒性测定(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天			第 4 天			第 7 天		
	光密度值	相对增殖率/%	毒级	光密度值	相对增殖率/%	毒级	光密度值	相对增殖率/%	毒级
共培养组	0.801±0.089	101.56±0.86	0	1.102±0.174	108.52±3.63	0	1.567±0.029	104.83±2.57	0
阴性对照组	0.789±0.056			1.016±0.130			1.495±0.152		
<i>t</i>	0.277			0.568			0.286		
<i>P</i>	0.796			0.601			0.789		

采用扫描电镜的方式可以更直观地观察到 iPSCs-MSCs 在 HA/ZrO₂ 支架上的形貌和增殖情况。iPSCs-MSCs 在支架上培养 72 h,500 倍镜和 1 000 倍镜下可见梭形的 iPSCs-MSCs 紧贴在 HA/ZrO₂ 支架表面,表明 HA/ZrO₂ 可支持 iPSCs-MSCs 在其表面的黏附、生长,见图 7。

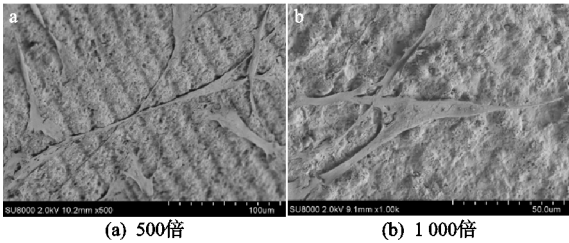


图 7 扫描电子显微镜下 iPSCs-MSCs 在 HA/ZrO₂ 支架上的生长情况

2.7 动物实验术后大体观察

实验犬术后均存活至实验结束,术后见切口对合满意,麻醉复苏后见患肢屈曲不能着地。术后 3 d 切口少许红肿,无渗液,精神萎靡,进食量偏少。术后 1 周红肿减退,进食量恢复至术前。术后 2 周切口均愈合拆线,A 组实验犬患肢仍无法着地,跛行明显;B 组和 C 组实验犬患肢着地,但行走不稳。术后 4 周 A 组实验犬行走同前,患肢活动仍受限;B 组和 C 组实验犬活动自如,患肢着地及行走平稳。

2.8 动物实验术后 X 线片

实验犬于术后第 2,4,8,12 周分别行术肢股骨正侧位 X 线片观察(图 8)。其中 A 组术后骨折端空置,骨折端随时间推移逐渐形成骨痂,继而增生肥大,断端吸收,固定钢板螺钉松动,骨折端无连续性骨痂通过,形成假关节。B 组术后 X 线可见骨折端与支架材料对位对线满意,术后 4 周可见支架边缘碎裂,但整体形态存在,随着时间推移可见新生骨痂爬行通过,支架孔隙可见新生骨覆盖填充,骨质增生较明显;术后 12 周可见连续性骨痂通过,支架与骨折断端界线消失。C 组支架形态良好,无明显移位碎裂,随着时间推移可见新生骨痂爬行通过,支架孔隙可见新生骨覆盖填充;术后 12 周可见连续性骨痂通过,支架与骨折断端界线消失。



(a) A 组术后即刻 X 线片,骨缺损区空置,仅行钢板固定;(b) B 组术后即刻 X 线片,骨缺损区支架植入并行钢板固定;(c) C 组术后即刻 X 线片,骨缺损区支架+iPSCs-MSCs 植入并行钢板固定;(d) A 组术后 12 周 X 线片,骨缺损区不愈合;(e) B 组术后 12 周 X 线片,骨缺损区愈合;(f) C 组术后 12 周 X 线片,骨缺损区愈合

图 8 术后三组 X 线片

2.9 动物实验术后 CT 重建及新生骨量分析

A 组因骨不连未进行 CT 扫描,B 组和 C 组骨折端行 Micro CT 扫描及三维重建,结果(图 9)显示:B 组新生骨长入支架内部,骨折断端及支架均被新生骨组织包裹覆盖,新生骨、宿主骨及支架融为一体,虽支架在宿主骨结合处可见少许碎裂,但整体的股骨塑形已完成;C 组骨折断端及支架孔隙新生骨组织覆盖良

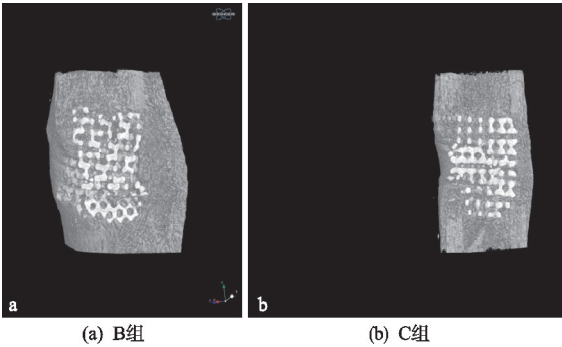


图 9 术后 12 周 CT 重建

好,骨缺损修复满意,支架无明显破坏,宿主骨与新生骨塑形完整。术后 12 周各组股骨术区单位体积内新生骨量结果显示 B 组新生骨量为 $(219.45\pm3.15)\text{ mm}^3/\text{cm}^3$,C 组新生骨量为 $(222.99\pm5.97)\text{ mm}^3/\text{cm}^3$,B 组和 C 组比较差异无统计学意义($t=1.051$, $P=0.334$),见表 2。

表 2 Micro CT 新生骨量检测结果($n=4,\bar{x}\pm s$)

组别	新生骨量/ $(\text{mm}^3\cdot\text{cm}^{-3})$
B 组	219.45 ± 3.15
C 组	222.99 ± 5.97
t	1.051
P	0.334

2.10 极限抗压能力

术后 12 周极限抗压试验结果显示:A 组骨不连无法行抗压试验,B 组抗压强度为 $(52.21\pm2.41)\text{ MPa}$,C 组抗压强度为 $(52.51\pm1.35)\text{ MPa}$,B 组和 C 组差异无统计学意义($t=0.217$, $P=0.835$),见表 3。

表 3 极限抗压实验结果($n=4,\bar{x}\pm s$)

组别	抗压强度/MPa
B 组	52.21 ± 2.41
C 组	52.51 ± 1.35
t	0.217
P	0.835

3 讨论

大段骨缺损目前没有明确的定义,Schmitz 等在动物实验中首次提出极量骨缺损概念,即某段骨不能自行愈合的最小骨缺损,而大段骨缺损是指骨缺损长度超过该段骨干直径的 1.5 倍,达到自体修复临界值的损伤^[9]。本研究根据犬股骨干直径测量为 12 mm,笔者设计骨缺损长度为 25 mm,超过自体修复临界值的 18 mm,预实验也证明犬股骨干 25 mm 骨缺损无法自行愈合。临床上采用骨移植治疗大段骨缺损已非常普遍^[10],自体骨移植虽在生物相容性上完全匹配,但因获取量有限及移植骨多不成形特点始终无法满足植入区的生物力学要求^[11]。而异体骨无成骨能力,骨愈合过程缓慢,存在不同程度排斥反应,各种材料人工骨移植的关键因素在于能否促进新生骨组织的长入^[12-13]。骨组织工程是将体外分离培养的种子细胞种植于具有良好生物相容性和一定程度上能降解吸收的生物支架上,通过细胞的不断增殖而促进新骨的生成,从而达到修复骨缺损的目的^[14],目前已成为骨缺损修复研究的主流方向。

当前骨组织工程中支架材料的选择趋向于多种材料复合,以发挥各自优势,笔者前期运用烧结法制备了 HA/ZrO₂ 复合材料支架,不仅具有 HA 良好的生物相容性,而且结合的 ZrO₂ 可以显著提高材料的力学性能^[15]。但传统烧结法制造材料耗时长、孔隙率不可

控、模具及成品固定,难以满足临床复杂骨缺损的要求。近年来,随着 3D 打印在 CT、MRI 等医学影像学数据结合技术上的不断改进,无论在骨骼外形还是内部结构上都可以实现患者骨缺损部位支架的个体化定制打印^[16],同时通过对 3D 数据的编辑,调控支架孔隙结构以适应细胞攀附,促进细胞生长^[17]。本研究通过光固化 3D 打印技术制备 HA/ZrO₂ 复合支架,不仅能通过计算机辅助设计控制孔隙的形状及排列,生成任何形状的试件,体现个体化精准治疗优势,而且相比传统制备方法,3D 打印能显著增加支架材料的生物力学性能,其抗压强度为 $(48.94\pm0.65)\text{ MPa}$,满足实验犬任何部位皮质骨支撑强度要求。

骨组织工程中的种子细胞要求其便于获取、扩增迅速、与支架材料有良好的亲和性,间充质干细胞是一种具有多向分化潜能的干细胞,在特定的诱导条件下能向成骨细胞、软骨细胞等多种细胞定向分化^[18-19],逐渐成为基因治疗适宜的细胞载体^[20]。但人体中间充质干细胞含量较少,获取细胞还会造成较大的创伤,且间充质干细胞的增殖、分化能力也与供者的年龄有密切关系^[21]。诱导性多能干细胞理论上拥有无限传代能力,在不同的诱导条件下可以向人体各种细胞定向分化,且不存在胚胎干细胞伦理道德问题,由于它可由患者自体细胞诱导而来,因此也不存在免疫排斥的风险^[22]。但考虑到直接应用诱导性多能干细胞作为组织工程骨的种子细胞可能有致癌风险,通过诱导性多能干细胞诱导的间充质干细胞不但具有更强的增殖能力^[23],而且不表达致癌相关基因^[24],作为一种新型的种子细胞,它具有来源充足,自我更新和分化能力强,一致性好等特点。Zhou 等^[25]利用诱导性多能干细胞诱导成功得到间充质干细胞,种植于支架材料构建组织工程骨,成功修复大鼠颅骨缺损。这些都使得诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞在细胞治疗和再生医学上有更广阔的应用前景。

本研究构建了诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞诱导分化体系并以此作为种子细胞,结合 3D 打印技术制备 HA/ZrO₂ 复合支架构建新型组织工程骨,验证了其良好的力学性能和促骨生成能力。动物实验显示,B 组和 C 组随着时间推移均可见新生骨爬行通过,支架孔隙新生骨覆盖填充,术后 12 周均有连续性骨痂通过,支架与骨折断端界线消失。但 B 组植骨区骨质增生较明显,分析原因可能是与 C 组相比,B 组单纯支架植入,缺乏诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞促新生骨长入作用,从而导致骨折愈合缓慢,局部稳定性较 C 组薄弱,迫使骨折端以病理性增生方式改善植骨区结构稳定有关。但是术后 12 周两组的骨修复效果相当,术后 12 周新生骨量检测显示:B 组新

生骨量为 $(219.45 \pm 3.15) \text{ mm}^3/\text{cm}^3$, C 组新生骨量为 $(222.99 \pm 5.97) \text{ mm}^3/\text{cm}^3$, B 组和 C 组差异无统计学意义。而术后 12 周极限抗压试验显示: B 组抗压强度为 $(52.21 \pm 2.41) \text{ MPa}$, C 组抗压强度为 $(52.51 \pm 1.35) \text{ MPa}$, 相较术前支架材料抗压强度均有一定的提升。究其原因可能是术后支架材料内新生骨长入, 矿化并形成骨小梁, 与宿主骨融为一体, 形成较强的生物结合力, 弥补了单纯支架机械结合力的不足, 而 B 组和 C 组因术后骨长入量相当, 故术后抗压强度无明显差异。

综上所述, 笔者通过 3D 打印技术制备 HA/ZrO₂ 支架, 复合诱导性多能干细胞来源间充质干细胞构建的组织工程骨能修复犬股骨干大段骨缺损, 为诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞复合 HA/ZrO₂ 支架的体内成骨分化和临床应用探索了方向, 同时为大段骨缺损的治疗提供了新的选择。但是由于研究条件及时间限制, 本研究的样本量偏少, 数据分析存在一定的偏倚, 且诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞的体内成骨机制、新生骨组织之间骨诱导机制、细胞水平研究及术后更长时间观察仍有待深入, 有待于后续试验中进一步研究。

参考文献

- [1] FU R, LIU C, YAN Y, et al. Bone defect reconstruction via endochondral ossification: a developmental engineering strategy[J]. *J Tissue Eng*, 2021, 12: 204173142110042.
- [2] WU D, MAO F, YUAN B, et al. Minimally invasive percutaneous plate osteosynthesis (MIPPO) combined with onionskin-like autologous bone grafting: a new technique for treatment of tibial nonunion[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 5997-6006.
- [3] KHIRA Y M, BADAWY H A. Pedicled vascularized fibular graft with Ilizarov external fixator for reconstructing a large bone defect of the tibia after tumor resection[J]. *J Orthop Traumatol*, 2013, 14(2): 91-100.
- [4] ZHANG T, WEI Q, ZHOU H, et al. Three-dimensional-printed individualized porous implants: a new “implant-bone” interface fusion concept for large bone defect treatment[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(11): 3659-3670.
- [5] QI J, YU T, HU B, et al. Current biomaterial-based bone tissue engineering and translational medicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10233.
- [6] SHAO R, QUAN R, WANG T, et al. Effects of a bone graft substitute consisting of porous gradient HA/ZrO₂ and gelatin/chitosan slow-release hydrogel containing BMP-2 and BMSCs on lumbar vertebral defect repair in rhesus monkey[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(3): e1813-e1825.
- [7] 王拓, 全仁夫, 杜伟斌, 等. 3D 打印技术制备新型 HA/ZrO₂ 梯度复合材料在犬股骨干骨缺损修复中的应用[J]. *中华解剖与临床杂志*, 2018, 23(5): 428-437.
- [8] ZHOU L, QUAN R, YANG J, et al. Healing of bone defects by induced pluripotent stem cell-derived bone marrow mesenchymal stem cells seeded on hydroxyapatite-zirconia[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(23): 1723.
- [9] SCHMITZ J P, HOLLINGER J O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial non-unions[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1986, 205: 299-308.
- [10] MEZA-MAURICIO J, FURQUIM C P, DOS REIS L D, et al. How efficacious is the combination of substitute bone graft with autogenous bone graft in comparison with substitute bone graft alone in the horizontal bone gain: A systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Exp Dent*, 2022, 14(8): e678-e688.
- [11] HARIMTEPATHIP P, CALLAWAY L F, SINKLER M A, et al. Progressive osteolysis after use of synthetic bone graft substitute[J]. *Cureus*, 2021, 13(11): e20002.
- [12] VLAD M D, FERNANDEZ AGUADO E, GOMEZ GONZALEZ S, et al. Novel titaniumapatite hybrid scaffolds with spongy bone-like micro architecture intended for spinal application: in vitro and in vivo study[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 110: 110658.
- [13] KUSHIOKA J, KAITO T, MAKINO T, et al. Difference in the fusion rate and bone formation between artificial bone and iliac autograft inside an inter-body fusion cage: a comparison between porous hydroxyapatite/type 1 collagen composite and autologous iliac bone[J]. *J Orthop Sci*, 2018, 23(4): 622-626.
- [14] ZHANG Q, NETTLESHIP I, SCHMELZER E, et al. Tissue engineering and regenerative medicine therapies for cell senescence in bone and cartilage[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2020, 26(1): 64-78.
- [15] SHAO R X, QUAN R F, HUANG X L, et al. Evaluation of porous gradient hydroxyapatite/zirconia composites for repair of lumbar vertebra defect in dogs[J]. *J Biomater Appl*, 2016, 30(9): 1312-1321.
- [16] LUO G, ZHANG Y, WANG X, et al. Individualized 3D printing-assisted repair and reconstruction of neoplastic bone defects at irregular bone sites: exploration and practice in the treatment of scapular aneurysmal bone cysts[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2021, 22(1): 984.
- [17] HALEEM A, JAVAID M, KHAN R H, et al. 3D printing applications in bone tissue engineering[J]. *J Clin Orthop Trauma*, 2020, 11(Suppl 1): S118-S124.
- [18] ILAS D C, CHURCHMAN S M, BABOOLAL T, et al. The simultaneous analysis of mesenchymal stem cells and early osteocytes accumulation in osteoarthritic femoral head sclerotic bone[J]. *Rheumatology*, 2019, 58(10): 1777-1783.

- [9] KAWAI M, NAGOSHI N, OKANO H, et al. A review of regenerative therapy for spinal cord injury using human iPS cells[J]. *N Am Spine Soc J*, 2022, 13:100184.
- [10] ISLAM F, BEPARY S, NAFADY M H, et al. Polyphenols targeting oxidative stress in spinal cord injury: current status and future vision[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022;8741787.
- [11] HUANG Y, XU W, ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9):2114-2127.
- [12] JIANG W, LI M, HE F, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome to attenuate spinal cord injury in mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1):207.
- [13] GUO R, GAO S, FENG Y, et al. Ulinastatin attenuates spinal cord injury by targeting AMPK/NLRP3 signaling pathway[J]. *J Chem Neuroanat*, 2022, 125:102145.
- [14] MI J, YANG Y, YAO H, et al. Inhibition of heat shock protein family A member 8 attenuates spinal cord ischemia-reperfusion injury via astrocyte NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway: HSPA8 inhibition protects spinal ischemia-reperfusion injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1):170.
- [15] LUO Y, ZHENG D, MOU T, et al. CMPK2 accelerates liver ischemia/reperfusion injury via the NLRP3 signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6):1358.
- [16] WANG J, ZHANG F, XU H, et al. TLR4 aggravates microglial pyroptosis by promoting DDX3X-mediated NLRP3 inflammasome activation via JAK2/STAT1 pathway after spinal cord injury[J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(6):e894.
- [17] RAHIMIAN R, BÉLAND L C, KRIZ J. Galectin-3: mediator of microglia responses in injured brain[J]. *Drug Discov Today*, 2018, 23(2):375-381.
- [18] TAN Y, ZHENG Y, XU D, et al. Galectin-3: a key player in microglia-mediated neuroinflammation and Alzheimer's disease[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1):78.
- [19] BOROVCANIN M M, RADOSAVLJEVIC G D, PANTIC J, et al. Contrasting roles of the galectin-3 in the schizophrenia onset, clinical presentation, and somatic comorbidity[J]. *Curr Top Med Chem*, 2021, 21(16):1471-1487.
- [20] SAYED A, MUNIR M, NABET M S, et al. Galectin-3: a novel marker for the prediction of stroke incidence and clinical prognosis[J]. *Mediators Inflamm*, 2022;2924773.
- [21] YANG C, XIA W, LIU X, et al. Role of TXNIP/NLRP3 in sepsis-induced myocardial dysfunction [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(2):417-426.
- [22] REN Z, LIANG W, SHENG J, et al. Gal-3 is a potential biomarker for spinal cord injury and Gal-3 deficiency attenuates neuroinflammation through ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(12):BSR20192368.

(收稿日期:2023-10-11)

(上接第 24 页)

- [19] KARAKA N, BAY S, TÜRKEL N, et al. Neurons from human mesenchymal stem cells display both spontaneous and stimuli responsive activity [J]. *PLoS One*, 2020, 15(5):e0228510.
- [20] KANGARI P, TALAEI-KHOZANI T, RAZEGHIAN-JAHROMI I, et al. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):492.
- [21] MOLLENTZE J, DURANDT C, PEPPER M S. An in vitro and in vivo comparison of osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal/stem cells[J]. *Stem Cells Int*, 2021;9919361.
- [22] LIU G, DAVID B T, TRAWCZYNSKI M, et al. Advances in pluripotent stem cells: history, mechanisms, technologies, and applications[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(1):3-32.
- [23] RAMARAJU H, KOHN D H. Cell and material-specific phage display peptides increase iPS-MSC mediated bone and vasculature formation in vivo[J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(9):e1801356.
- [24] MIYAZAKI T, HANAMATSU H, XU L, et al. Evaluation of residual human-induced pluripotent stem cells in human chondrocytes by cell type-specific glycosphingolipid glycome analysis based on the aminolysis technique[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1):231.
- [25] ZHOU L, QUAN R, YANG J, et al. Healing of bone defects by induced pluripotent stem cell-derived bone marrow mesenchymal stem cells seeded on hydroxyapatite-zirconia[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(23):1723.

(收稿日期:2023-10-05)