

[文章编号] 1000-1182(2011)02-0125-04

骨髓间充质干细胞联合纤维蛋白胶修复大鼠牙槽骨缺损的研究

张亮 丁寅 邵金陵 董金山

(第四军医大学口腔医院 正畸科, 西安 710032)

[摘要] 目的 评价骨髓间充质干细胞(BMSCs)和纤维蛋白胶(FG)作为种子细胞和支架材料修复大鼠牙槽骨缺损的效果。方法 30只SD大鼠随机分成A、B组,建立SD大鼠上颌牙槽骨缺损模型,联合植入BMSCs和FG复合物,A组对照侧单纯植入FG,B组对照侧为空白对照。利用上颌骨实验区切片苏木精-伊红染色及Micro-CT扫描观察成骨效应。结果 苏木精-伊红染色切片显示:术后3周可见实验侧骨小梁形成,对照侧无明显骨修复;术后6周可见实验侧新骨形成增加,对照侧只有纤维组织修复。Micro-CT扫描表明实验侧成骨修复明显优于对照侧。结论 应用BMSCs联合FG可较好地修复大鼠牙槽骨缺损,是修复小范围骨缺损理想的种子细胞与支架材料。

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 纤维蛋白胶; 组织工程; 牙槽骨缺损

[中图分类号] R 782.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.02.004

Study of alveolar bone defects reparation by combination of bone marrow stromal cells and fibrin glue
ZHANG Liang, DING Yin, SHAO Jin-ling, DONG Jin-shan. (Dept. of Orthodontics, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects and feasibility of the repairing alveolar bone by combination of bone marrow stromal cells(BMSCs) and fibrin glue(FG). **Methods** BMSCs were obtained from the sucking mouse and then separated, cultured to the second generation to get ready for use. The available cells were combined with FG and then immediately implanted into the defect that had been established in one lateral maxilla of 30 SD rats. At the same time pure FG without BMSCs was implanted into the other side. The rats were killed at the 3rd and 6th week after operation. The hematoxylin-eosin staining and Micro-CT were used to observe and evaluate the osteogenesis. **Results** New bone trabecula formed at experiment side of the rats at 3rd week. The repairing seemed better after 6th week of operation than the control side. There were only fibrous tissues in the control side or none. **Conclusion** This experiment showed a feasible approach of repairing the defects in alveolar bone of the rats.

[Key words] bone marrow stromal cells; fibrin glue; tissue engineering; alveolar bone defect

骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)是较为理想的种子细胞,是组织工程中修复骨缺损的研究热点,已应用于口腔组织工程中修复牙周缺损;纤维蛋白胶(fibrin glue, FG)一种天然的细胞外基质,具有良好的生物相容性和可塑性,同时具有较好的弹力和黏附能力,在软骨组织及长骨缺损的修复中应用较为广泛,是较为理想的载体材料。本实验将BMSCs和FG复合物应用于口腔,研究其修复大鼠牙槽骨缺损的可行性,为进一步的临床应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验试剂

DMEM培养液、胎牛血清(Gibco公司,美国),胰蛋白酶、纤维蛋白胶(第四军医大学西京医院提供)。

1.2 实验动物

随机选取SD大鼠30只(第四军医大学动物实验中心提供,清洁级),2~3个月龄,体质量在150~180 g之间。随机分成A、B组,A、B组实验侧均植入骨髓间充质干细胞与纤维蛋白胶复合物。A组对照侧单纯植入纤维蛋白胶,B组对照侧不植入作为空白对照。

1.3 骨髓间充质干细胞的培养

脱颈处死2周SD大鼠,在无菌条件下手术摘取

[收稿日期] 2010-09-09; [修回日期] 2011-01-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30872913)

[作者简介] 张亮(1984—),男,陕西人,博士

[通讯作者] 丁寅, Tel: 029-84776138

乳鼠股骨和胫骨，DMEM冲洗骨髓腔获得骨髓，采用贴壁离心法，加入DMEM培养基，置入CO₂孵育箱培养。每2~3 d换培养液，显微镜下观察细胞长满培养瓶80%传代，培养至第2代时待用。

1.4 牙槽骨缺损模型的建立

2%戊巴比妥按40 mg·kg⁻¹腹腔注射麻醉，无菌条件下暴露上颌骨，用牙科钻在上颌两侧第一磨牙近中牙槽骨各造成3 mm×3 mm×3 mm的长方形箱型骨缺损。植入BMSCs和FG后缝合牙龈。

1.5 骨髓间充质干细胞与纤维蛋白胶复合移植

胰酶(100 mL PBS, 2.5 g·L⁻¹胰酶)消化待用骨髓间充质干细胞2~3 min，待细胞全部消化后，培养瓶中加入DMEM培养液终止消化，抽取液体至离心管中，800 r·min⁻¹离心5 min，弃去上清液，骨髓间充质干细胞沉淀在离心管底。混合纤维蛋白胶N粉

及液体，2 mL针管抽取混合液注入待用骨髓间充质干细胞，随后注入纤维蛋白胶C粉及液体混合物，控制细胞密度为每毫升1×10⁷个细胞，静置5 min后，复合物呈胶冻状固体，无菌条件下即刻移植入大鼠上颌一侧牙槽骨缺损处，另一侧单纯植入纤维蛋白胶或不植入作为对照。

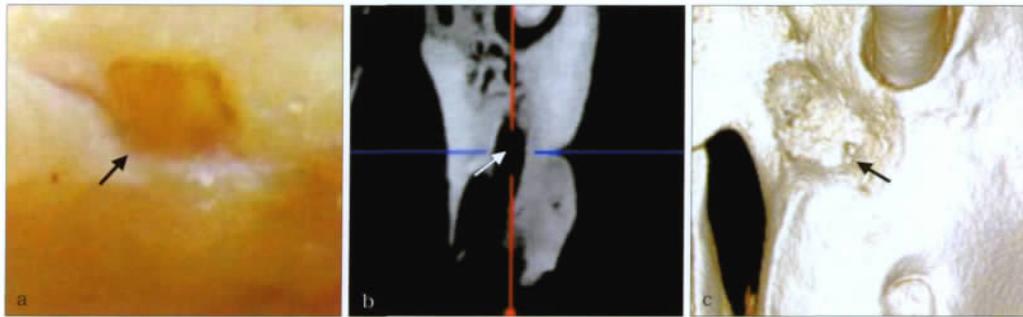
1.6 取材和观察

分别于3、6周取材，通过大体标本、常规苏木精-伊红染色及Micro-CT扫描观察缺损处成骨情况。

2 结果

2.1 牙槽骨缺损的建立

牙槽骨缺损的建立见图1，箭头所指为手术建立牙槽骨箱型缺损。



a: 大体观察; b: Micro-CT扫描; c: 三维重建。

图 1 牙槽骨缺损的建立

Fig 1 The establishment of alveolar bone defect

2.2 大体标本

BMSCs与FG复合物植入大鼠牙槽骨缺损处3周后，实验组已能看出骨性愈合，但愈合面不平整，

对照组均未见明显愈合；6周实验组愈合面较为平整，与正常组织无明显界限，对照侧无明显成骨，骨缺损仍然存在，见图2。



a: 空白对照组; b: 阴性对照组; c: 实验组; 箭头所指为新骨生成处。

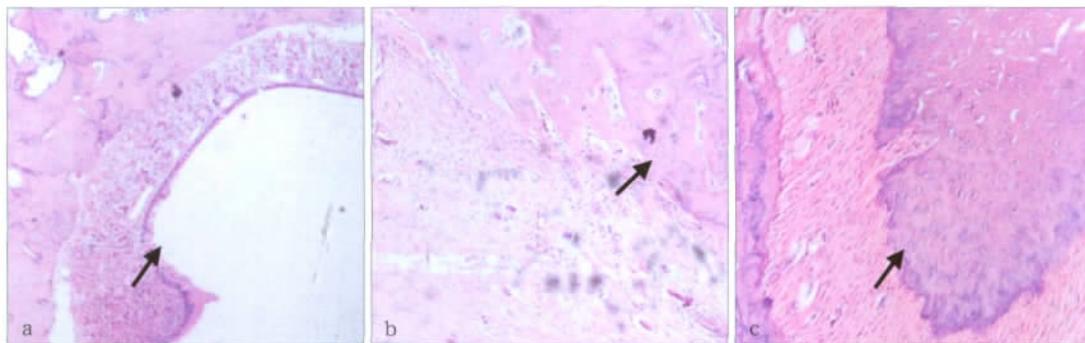
图 2 6周后大体观察结果

Fig 2 Gross observation six weeks after surgery

2.3 组织学观察

骨髓间充质干细胞与纤维蛋白胶复合移植后，实验组3周苏木精-伊红染色切片显示：上颌骨缺损处有新骨形成，但面积较小，新生骨小梁较为稀疏。6周时，新生骨面积增大，材料中心处新骨形成，但

无正常骨质中骨髓结构，新生骨质周边与原大鼠牙槽骨之间可见大量长圆形及梭形细胞，似纤维结缔组织充填其中。空白对照组及单纯植入纤维蛋白胶组各期无明显成骨，纤维组织充填或无明显愈合，见图3。



a: 阴性对照组(6周); b: 实验组(3周); c: 实验组(6周); 箭头所指为新骨生成处。

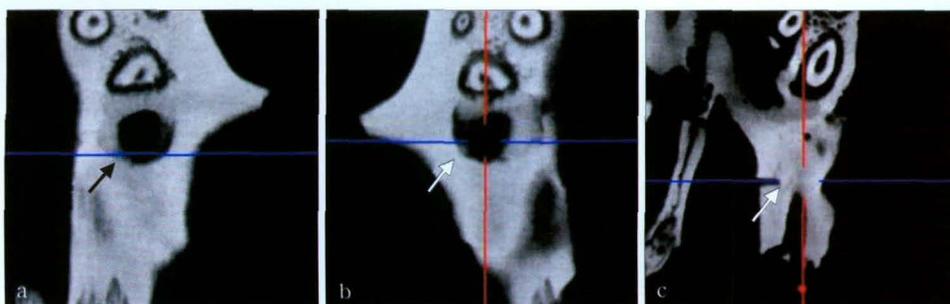
图3 组织学观察结果 HE ×100

Fig 3 Histological observation HE ×100

2.4 Micro-CT扫描结果

Micro-CT横断扫描及三维重建显示: 实验侧骨缺损处新骨生成, 骨密度与周围正常牙槽骨密度无

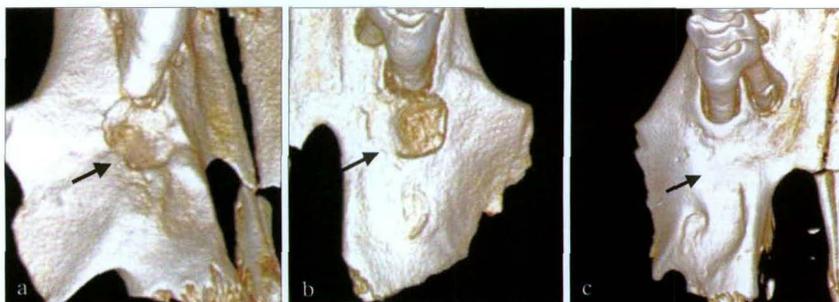
明显差异, 骨缺损基本愈合, 与正常周边牙槽骨未见明显界限。单纯植入纤维蛋白胶侧及空白对照侧无明显成骨, 骨缺损清晰可见, 见图4、5。



a: 空白对照组; b: 阴性对照组; c: 实验组; 箭头所指为新骨生成处。

图4 术后6周Micro-CT扫描

Fig 4 Micro-CT scanning six weeks after surgery



a: 空白对照组; b: 阴性对照组; c: 实验组; 箭头所指为新骨生成处。

图5 术后6周Micro-CT三维重建

Fig 5 Micro-CT three-dimensional reconstruction six weeks after surgery

3 讨论

1991年由Arnold Caplan首次提出间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)这一概念, 是指源于血液或骨髓系统, 离体条件下可贴壁增殖的同源细胞群。BMSCs具有多向分化潜能, 体外诱导可分化为软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞及肌细胞等^[1]。Caplan等^[2]研究表明骨髓来源的单个BMSCs可形成多种组织器官, 如: 肺、皮肤上皮、内脏等。Maniopoulos等^[3]首次报道了从成年大鼠骨髓获取BMSCs,

体外培养条件下, 能形成钙化的骨样组织。经X线衍射分析, 证实钙化组织具有羟磷灰石样结构。证明体外培养的BMSCs可以向成骨细胞分化并形成类骨组织。2006年, Weng等^[4]体外成骨诱导BMSCs后复合藻酸钙修复狗的牙槽骨缺损, 取得较为理想的效果。Hayashi等^[5]证实来源于骨髓和骨膜的基质细胞相比于来源于脂肪的基质细胞能够更好的成骨, 是较为理想的骨再生种子细胞。由于BMSCs只少量表达主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) 型分子, 而表达极少或不表达MHC 型

分子和B7共刺激分子，因此BMSCs具有同种异体移植的潜力^[6]。

研究者^[7-8]多利用羟磷灰石、生物陶瓷等材料作为复合BMSCs的载体，但此类材料存在体内不易降解，在一定程度上影响新骨生成，修复小范围不规则骨缺损难于操作等问题。本实验选取FG作为种子细胞的载体材料。FG最早作为天然的外科止血黏合剂于20世纪初期开始应用，临床显示在止血，组织粘连，伤口愈合方面疗效确切。FG可以促进细胞外基质生成，促进新血管形成而且不会导致炎症反应^[9]。FG的另一个重要特点是在体内能够降解吸收，降解速率通常在2周左右^[10]，这一特性有利于组织的愈合、细胞生成以及细胞因子的释放^[11]。对于小范围不规则骨缺损，注射型纤维蛋白胶则具有更加明显的优势。FG已作为载体材料应用于骨组织工程修复长骨缺损，但在修复牙槽骨方面少见报道。Isogai等^[12]将新生牛的桡骨干骺端的骨膜取下绞碎后与FG混合植入无胸腺裸鼠背部皮下观察异位骨化情况，结果发现：实验组12周有新骨形成，单纯FG组未见新骨形成；已有学者^[13]利用BMSCs与FG复合物修复骨肉瘤切除后所遗留下的骨缺损，效果良好。

骨组织的显著特征是坚硬，但同时骨组织是人体内可塑性强、适应性强的组织。尤其是颌骨中的牙槽骨是人体骨骼中最活跃的部分。牙槽骨缺损的修复依赖于其中成骨细胞的增殖与分化、未分化细胞向成骨细胞的转化，同时牙槽骨缺损促使牙周微环境改变，从而产生相关因子及信号分子促进骨缺损修复。实验组以BMSCs为种子细胞，为骨缺损的修复提供了充足的细胞来源，在牙周缺损的条件下，可大量增殖分化为成骨细胞，有利于骨缺损的修复；同时作为载体的纤维蛋白胶能够很好地介导细胞间的信号传递，可促进BMSCs的成骨分化。体外研究^[13]表明：FG能够促进BMSCs的成骨、延长BMSCs存活时间。本实验中看到：3周时，苏木精-伊红染色显示实验组有少量新生骨生成；6周时可见骨缺损区域已愈合；大体及Micro-CT三维重建均观察到骨缺损愈合良好，组织切片中可见新生骨质含大量成骨细胞，分布较均匀。

以往文献报道的以BMSCs作为种子细胞修复骨缺损，多为体外诱导其具有成骨特性后再移植入体内骨缺损处，虽然体外诱导增强了BMSCs的体内成骨能力，但是同时其多向分化的潜力也随之减弱。本实验直接植入BMSCs，较以往实验研究而言保留了BMSCs的多向分化能力，使其在局部微环境中能

够多向分化。6周时实验组苏木精-伊红染色切片中出现的大量梭形及长圆形细胞，形成类似于纤维结缔组织的结构，很好的连接了新生骨与周边牙槽骨。这种梭形细胞来源于移植的BMSCs，还是由原有牙槽骨中的未分化细胞分化而成，该问题将在进一步的研究中得到证实。但出现的该纤维条带很可能是机体向新生骨提供营养的通路。

[参考文献]

- [1] Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells(BMSCs) in bone engineering: Limitations and recent advances[J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(1) :160-165.
- [2] Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators[J]. J Cell Biochem, 2006, 98(5) :1076-1084.
- [3] Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats [J]. Cell Tissue Res, 1988, 254(2) 317-330.
- [4] Weng Y, Wang M, Liu W, et al. Repair of experimental alveolar bone defects by tissue-engineered bone[J]. Tissue Eng, 2006, 12(6) :1503-1513.
- [5] Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, et al. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue[J]. Calcif Tissue Int, 2008, 82(3) :238-247.
- [6] Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, et al. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects[J]. J Periodontol, 2006, 77(6) :1003-1007.
- [7] Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells[J]. J Dent Res, 2003, 82(12) 951-956.
- [8] Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, et al. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model[J]. Bone, 2010, 46(2) :418-424.
- [9] Romanos GE, Strub JR. Effect of tissucol on connective tissue matrix during wound healing: An immunohistochemical study in rat skin[J]. J Biomed Mater Res, 1998, 39(3) :462-468.
- [10] Juhan-Vague I, Hans M. From fibrinogen to fibrin and its dissolution[J]. Bull Acad Natl Med, 2003, 187(1) :69-84.
- [11] Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, et al. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation[J]. Biomaterials, 2003, 24(14) 2497-2502.
- [12] Isogai N, Landis WJ, Mori R, et al. Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells[J]. Plast Reconstr Surg, 2000, 105(3) 953-963.
- [13] Lee OK, Coathup MJ, Goodship AE, et al. Use of mesenchymal stem cells to facilitate bone regeneration in normal and chemotherapy-treated rats[J]. Tissue Eng, 2005, 11(11/12) :1727-1735.

(本文编辑 汤亚玲)