

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

計劃名稱：裝載中胚層幹細胞之二鈣磷酸鹽陶瓷材料植入骨 幹缺損的癒合研究 (I)

計劃編號： NSC 89-2314-B-002-478

執行期間： 八十九年八月一日至九十年七月三十一日

計劃主持人： 林 繼 昌

執行單位： 台灣大學醫學院骨科部

一、中文摘要

過去一直有很多研究提出各種不同的方法來增進骨頭的形成以促成缺損區的硬骨癒合，包含有植入骨傳導性的材料架構—硬的材料如多孔性氫氧基磷灰石陶瓷等，軟的材料如膠原纖維等，或加入刺激生長化學激素如骨形態促生蛋白質 bone morphogenetic proteins (BMP)，另外一種直接植入多導向之中胚層幹細胞即為造骨細胞的前身，來自於骨髓，可以取自骨髓直接應用，或者是由骨髓分離，再以組織培養增加其細胞的數目。

將骨髓或中胚層幹細胞裝載於有骨傳導性的材料架構上，可免除使用自體骨移植的必要性。而中胚層幹細胞優於新鮮骨髓的地方在於可直接轉變成造骨細胞，可不經軟骨中介階段，產生新生硬骨頭，提供了此以人體中胚層幹細胞為根基治療修復長骨幹分段型缺損模型的契機。

本研究計劃的目的在於建立自體中胚層幹細胞分離和組織培養的流程，從股骨收集同種源公鼠骨髓並分離，再予以組織培養，當二鈣磷酸鹽陶瓷材料片製作完成後，裝載入中胚層幹細胞。以小動物同種 Syngeneic 源公鼠 Fischer rat 30 隻進行動物實

驗，骨幹中段切除成分段型缺損和骨板固定的手術模型，在骨幹缺損區植入裝載中胚層幹細胞入二鈣磷酸鹽陶瓷材料片，再將股骨斷端以塑膠板及鐵絲固定。實驗組分 A、B 兩組，每組 12 隻，包括陶瓷材料片有無裝載自體中胚層幹細胞之差別，控制組為未植入陶瓷材料片，研究修復分段型骨缺損的癒合的能力，主要以 X 光線照相檢查、組織學與組織形態學技術評估缺陷部位的骨頭形成和癒合情形。

研究成果顯示從老鼠骨髓培養之中胚層幹細胞類似纖維母細胞，培養十四天後，其數量仍不多。動物體內股骨缺陷植入載細胞之陶瓷片實驗，A、B 兩組皆可以從組織切片看到骨痂從外圍包入缺陷部位，以老鼠類之小動物為對象，其生骨能力相當強，甚至不做任何植入的對側控制組，也有骨痂接橋現象。有二鈣磷酸鹽陶瓷材料片接上缺陷部位時，骨痂量顯著的比控制組多。數量上 A 組以幹細胞併陶瓷片植入者最豐富，B 組只加陶瓷片次之，控制組不做任何植入者則最少。從全盤研究結果分析，要從老鼠骨髓取得並培養之中胚層幹細胞，技術上是可行，但所得之數量差異甚大，從有無載入細胞之陶瓷片植入結

果，所得之骨痂量差異不大，表示骨痂來源仍來自骨外膜區。是否意味所載入之細胞數量不足，或所得之幹細胞分化成生骨細胞能力不足，有待後續研究探討。

關鍵詞：中胚層幹細胞、二鈣磷酸鹽陶瓷、骨幹缺損、骨髓、組織培養

Abstracts

Numerous proposals in orthopaedic research were erupted in the past two decades for the enhancement of bone formation for the healing in the segmental bone defects. The most popular and promising attempts include implantation of all kinds of osteoconductive scaffolds either made up of hard materials such as porous hydroxyapatite or soft one as collagen. Since these materials too much inert to activate osteogenesis, the concept of supplement of some chemical growth factors such as bone morphogenetic proteins (BMP) is also established. Another alternative is the application of pluripotential mesenchymal stem cells directly from marrow or extracted from the marrow and expanded through tissue culture to increase the source of osteogenic cells for bone formation.

Loading the mesenchymal stem cells on the osteoconductive scaffold is the combination of the strategies for bone healing in order to reduce the need of the autogenous bone grafts. The superiority of the mesenchymal stem cells over fresh bone marrow is their direct transformation into osteogenic cells without intermediate stage through cartilage transformation. With the technical improvement of human mesenchymal stem cells and the establishment of healing model of segmental bone defect, its clinical application of such combination is right on the hand.

The goal of this research project is the development of the protocol for the

extraction and expansion in the number of mesenchymal stem cells from the bone marrows in order to extend to the human subject. The primary source of the stem cells is derived from the marrow in the femora of the syngeneic Fischer Rats. They are extracted in vitro and expanded in tissue culture ready for the loading on the ceramic plate. Segmental bone defect model is established on the central portion of femora through surgery in 30 rats. The femur is fixed with polyethylene plate, K wires and circle wiring before implantation of the ceramic plate loaded with or without the mesenchymal stem cells for 12 rats in each group. Absence of any material implantation in the defect for the remaining 6 rats as control group. The animals were sacrificed at 4 and 8 weeks of observation. Histological section and histomorphological evaluation for the bone formation and repairing process were done for the femora specimens.

The result shows the amount of stem cells obtained on 14 days of culture seems not good enough for the implantation. In animal study either of implantation of ceramic plate loaded with or without cultured stem cells shows abundant periosteal callus bridging but only few on the control group without ceramic plate in the defect. Excellent periosteal bone formation is shown in the small animal as the rat that it made little difference in the ceramic plate with or without the cells. From the histological section, bone ingrowth only along the outer cortex of the ceramic. The less efficiency of the stem cells in this experiment maybe due to inadequate cell number or the poor performance of these kind of stem cell in bone forming activity.

Keywords: mesenchymal stem cells, dicalcium phosphate ceramics, Segmental bone defect, bone marrow, tissue culture

二、緣由與目的

臨床上中遇到重大外傷，骨幹出現分段型缺損是最難處理的事，其他諸如骨折治療期間發生感染，須以清創刮骨除去感染的骨塊後，或是腫瘤切除後也會有類似的問題發生，過去是以骨移植為主要治療的利器，而新一代的策略則為選擇正常生理狀況下修復和硬骨形成的必要條件再予以提高增強，以達到硬骨癒合的目標。

三、方法與材料

選擇 30 隻同種源小鼠，大小約為平均 300 公克體重，在大腿骨骨幹中央部份做一段 5mm 長的骨切除術，隨機分成三組，實驗組分 A B 兩組，每組 12 隻，A 組之骨缺損區植入裝載同種源中胚層幹細胞的多孔陶瓷材料片，B 組只植入陶瓷材料片但未裝載幹細胞，C 組為控制組 (6 隻) 之骨缺損區維持未治療狀態(無任何植入物)。每隻動物分開餵食，術後並允許無限制的載重和活動，術後第四及八星期時，各有半數動物犧牲後取出股骨，標本取出後固定染色後，再為組織學觀察和組織形態學評估處理。

術前先收集同種源小鼠骨髓，在動物麻醉後取出大腿骨，在骨幹兩端分別鑽洞與骨髓腔相通，近端接裝有潤濕 0.1ml 肝素(1000 單位/ml)鹽水血清溶液之注射器，用注射器壓力促使骨髓腔內容物從另一端開口釋出，擠出的骨髓腔內容物再經過小一號(18 號到 20 號)針頭的篩選，使得到中胚層幹細胞的單細胞浮懸液，且其理想細胞濃度在 $5-10 \times 10^8$ 個細胞/ml，細胞計數後，並且以 trypan blue 染色，檢查細胞的活性；骨髓內含核部份細胞即富含中胚層幹細胞，經由密度分層離心法分離出來。

分離出來的中胚層幹細胞溶液混以二體積量的完全培養基(含 10% 胎兒牛血清、青黴素 G(100 單位/ml)、鏈黴

素 (100 μ g/ml), 與 amphotericin B(0.25 μ g/ml)) 及低葡萄糖濃度的 Dulbecco 修正 Eagle 培養液，鋪陳於培養瓶內，在攝氏 37 度、潮濕及 5% 二氧化碳環境下培養，培養三天後，先將不黏貼的細胞先以培養液移除，黏貼的細胞每星期兩次更換新鮮培養液，直到十四天為止，準備裝載到陶瓷材料上。

5 公克重的磷酸鈉鹽 $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 粉末先溶於蒸餾水，再與 95 公克重的四鈣磷酸鹽 $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 粉末攪拌成泥狀，在 50°C 環境下乾燥三天。將乾泥塊研磨成粉後篩選 40-60 μ m 大小之顆粒，同時加上 5 及 500 μ m 大小的 polyethylene glycol 4000 之造孔顆粒及少許潤滑劑與聯結劑，倒入在鋼模中以 270MPa 的壓力，壓成外徑約 6mm、高 10mm 的圓盤狀初胚，在鎳鉻線圈燒爐內，以每分鐘提昇攝氏三度的速度緩緩加熱，達到燒結終溫 910°C 的溫度為止，並持續一小時，製作完成之二鈣磷酸鹽陶瓷材料片，超音波清潔，蒸餾水漂洗和以乾熱(攝氏 220 度)消毒，先浸泡於含 100 μ g/ml 的 fibronectin 十二小時，在室溫過夜陰乾燥後，在攝氏 4 度下儲存。

將裹有 fibronectin 之陶瓷材料片放入 5ml 之無血清之 Dulbecco 修正的 Eagle 培養液含細胞 (7.5×10^6 個細胞/ml) 之懸浮液內，試管置入真空容器，抽除去陶瓷孔隙內之空氣，以幫助培養液體流入孔隙內後，裝載後之陶瓷材料片放置於組織保溫箱內，繼續以例行的培養液更換，直到手術開始為止。

選擇同種源小鼠，大小約為平均 300 公克體重，以乙醚吸入麻醉和 Nembutal 鎮靜麻醉，在大腿骨外側股二頭肌和股外直肌間劃下傷口，股骨暴露出來後，先用一塑膠骨板 polyethylene plate 上下各以一支 K wire 及 18 號鋼絲固定在股骨前側壁上，再在骨幹中央部位以電鋸鋸開 5mm 長之

分段型皮質骨缺損，骨缺損以陶瓷材料片植入塞緊，然後再以一股鋼絲纏繞陶瓷材料片和塑膠骨板，控制組只有切骨成缺損，除塑膠骨板固定外不加任何治療，最後關上傷口。在術後第四及八星期時，各有半數動物犧牲後取出股骨，標本取出後做X光片檢查，固定染色後，再為組織學觀察和組織形態學評估處理。

股骨清除軟組織，拆除鋼絲、K wire 和固定板，每支大腿骨中段部分包含植入陶瓷材料片和骨頭界面切下來後，以 10%緩衝福爾馬林液固定，然後經過脫水、清潔，用石蠟包埋，薄切下 5 μ m 厚之切片標本，包括從矢狀平面做一縱切口，將中央部分縱切標本，和二張橫切標本，以 Mallory-Heidenheim 染料染色，組織形態學分析，觀察測量植入陶瓷材料片、骨頭和軟組織佔有的區域面積。

四、結果

研究成果顯示從老鼠骨髓培養之中胚層幹細胞類似纖維母細胞，培養十四天後，細胞並未長滿整個培養盤，其數量為 $1.2-5.0 \times 10^5$ Cells/ml。動物體內股骨缺陷植入載細胞之陶瓷片實驗，A,B 兩組皆可以從外貌看出骨痂從外圍包入缺陷部位，兩者幾乎不能分辨。從組織切片顯微鏡觀察，A,組可見細胞長入陶瓷片的孔洞內，不過多偏處於外圍區，B 組細胞長入陶瓷片的孔洞內的區域顯著比 A,組少。以老鼠類之小動物為對象，其生骨能力相當強，甚至不做任何植入的對側控制組，也有骨痂接橋現象。有二鈣磷酸鹽陶瓷材料片接上缺陷部位時，骨痂量顯著的比控制組多。數量上 A 組以幹細胞併陶瓷片植入者最豐富，B 組只加陶瓷片次之，控制組不做任何植入者則最少。

討論

從全盤研究結果分析，要從老鼠骨髓取得並培養之中胚層幹細胞，技術上是可行，但所得之數量差異甚大，從有無載入細胞之陶瓷片植入結果，所得之骨痂量差異不大，表示骨痂來源仍來自骨外膜區。是否意味所載入之細胞數量不足，或所得之幹細胞分化成生骨細胞能力不足，有待後續研究探討。欲探詢骨髓或幹細胞的真正生骨能力，本實驗以向骨性模型 orthotopic 方式容易受骨外膜及周圍組織干擾，將來應改成骨外膜模型 heterotopic 方式，如此真正有生骨能力的細胞可自己誘導產生骨間質，才是正牌之為分化但有生骨潛能的幹細胞。