

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

同體中胚層幹細胞併二鈣磷酸鹽陶瓷材料植入骨幹缺損的
癒合研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC90-2314-B-002-203-

執行期間：90年08月01日至91年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院骨科

計畫主持人：林繼昌

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 12 日

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 (II)

計劃編號：NSC 90-2314-B-002-203

執行期間：九十年八月一日至九十一年七月三十一日

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。

本研究計劃旨在建立自體中胚層幹細胞分離和組織培養的流程，去年是以同源鼠骨髓分離培養而得之異體中胚層幹細胞，裝載入陶瓷材料做骨幹缺損的癒合之動物實驗。今年乃延續去年計劃，是以同一隻公兔骨髓分離培養得之同體中胚層幹細胞做材料，依相同的程序進行。在同一隻公兔身上先從腸骨抽出骨髓分離培養四週後，在一側之股骨幹中段切出 5mm 節段的缺損，先以骨板固定，在骨幹缺損區植入裝載有同體中胚層幹細胞的二鈣磷酸鹽陶瓷材料片，實驗組分 ABC 組，每組 6 隻，A 實驗組植入異體中胚層幹細胞併陶瓷片，B 實驗組只加陶瓷片，C 組為控制組不做任何植入，術後定期以 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。

研究成果顯示從公兔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，取培養三週後之幹細胞併陶瓷片植入動物體內股骨缺陷實驗，不做任何植入 C 控制組，四週及八週的觀察，沒有骨痂接橋現象。A、B 兩組皆可以從 X 光線照相及外觀看到骨痂從外圍包入缺陷部位，但從組織切片顯示，有加幹細胞的 A 組，骨痂量顯著比不加幹細胞的 B 組多。從公兔骨髓取得並培養之幹細胞數量個體間差異甚大，有無載入幹細胞所得之骨痂量差異則有明顯差異，表示除了陶瓷片拉近骨缺陷兩斷端雖可促進骨痂的生成，骨痂來源仍來生骨細胞，以同體骨髓幹細胞分離和組織培養，確可貢獻在修復分段型骨缺損的癒合。

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 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 any kind 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, another way to enhance bone healing is the supplement of some chemical growth factors such as bone morphogenetic proteins (BMP). The third approach is the direct implantation of bone or osteogenic cells which mostly come from the marrow either in fresh form or through extraction and expansion in tissue culture which have great potential to differentiate into osteoblasts for new bone formation. This pluripotent cells from the bone marrow called mesenchymal stem cells.

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 chondrogenesis. 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 present research follows the protocol developed in the project done last year in the extraction and expansion of mesenchymal stem cells with a shift on the animal model from syngenic Fisher Rats to isogenic New Zealand white rabbit. This advancement in species selection may mimic the real clinical situation when we try to implant stem cells in the fracture nonunion or defect region. The stem cells will be aspirated from the marrows in bilateral iliac crest of the rabbits followed by extraction and expansion in culture for 4 weeks. They will be introduced into the pores of dicalcium phosphate ceramic plates for the implantation.

Segmental bone defect model of 5mm in gap established in last project continued but on the central one-third of femoral shaft in 24 rabbits. The broken femur will be fixed with polyethylene plate, K wires and circlage wiring before implantation. There are 3 groups for investigation, the bone gap in group A of 12 rabbits will receive ceramic plate loaded with the mesenchymal stem cells of their own, group B of 6 rabbits receive the ceramic plate only, while group C of another 6 rabbits without any implantation as a negative control. The animals are sacrificed at 4th and 8th weeks.

The result shows the amount of stem cells obtained on 14 days of culture seems not good enough for the implantation. The cell mass becomes abundant in the end of three weeks enough for the integration into the ceramic block for the implantation. From the X ray and gross finding of the femora samples, the group without any implant shows no callus in the defect site. In groups with implantation of ceramic plate loaded either with or without marrow expanded stem cells shows visible periosteal callus bridging. From the histological investigation of the callus mass and volume of bony trabeculae, the group with cells loading showed superior and abundant callus to the group without cells loading. Our result supports the benefit of stem cells on the healing of callus and defect filling.

Keywords: mesenchymal stem cells, 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

本研究計劃延續去年計劃，旨在建立自體中胚層幹細胞分離和組織培養的流程，去年是以同源鼠骨髓分離培養而得之異體中胚層幹細胞，裝載入陶瓷材料做骨幹缺損的癒合之動物實驗。今年提高動物層級到紐西蘭白兔，將同一隻公兔骨髓分離培養得之同體中胚層幹細胞做材料，依相同的程序進行。以此同體骨髓分離放大產生的中胚層幹細胞為材料，選擇 24 隻紐西蘭白公成兔(New Zealand white rabbits)，體重平均約為 2 公斤。動物麻醉後在其背部雙側腸骨脊處用 16 號針頭 10ml 注射器抽取足量(以 10ml 為準)骨髓，注射器潤濕有 0.1ml 肝素 heparin(1000 單位/ml)，以防血液凝固。

將裹有 fibronectin 之陶瓷材料片放入 5ml 之無血清之 Dulbecco 修正的 Eagle 培養液含骨髓分離培養之幹細胞(1.0×10^6 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，持續約一週，直到手術開始為止。

骨幹缺損模型是以一側大腿骨骨幹中央部份做一段 5mm 長的骨切除術，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，實驗進行將動物隨機分成三組，A 組 12 隻之骨缺損區植入裝載同體中胚層幹細胞的多孔陶瓷材料片，B 組 6 隻只植入陶瓷材料片但未裝載幹細胞，C 組 6 隻為控制組其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，標本取出後做 X 光片檢查，評估 X 光片上每隻植入區與骨頭連接面之骨癒合的情形及骨痂的厚度。

組織形態學分析乃將骨頭標本以 10% 福爾馬林液固定，脫水、石蠟包埋，從中央部分縱切和二端橫切標本以 Mallory-Heidenheim 染料染色，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

研究成果顯示從公兔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，培養延長到三週，中胚層幹細胞的數量為 $2-4.5 \times 10^6$ Cells/ml，從公兔骨髓取得並培養之幹細胞數量個體間差異甚大，對於裝載幹細胞入陶瓷材料上，細胞濃度最好維持在 1.0×10^6 Cells/ml 以上。

從同體幹細胞之動物體內實驗，股骨缺陷片不做任何植入之 C 控制組，四

週及八週的觀察，絲毫沒有骨痂接橋現象，也是典型骨折不癒合之模型。有加幹細胞及陶瓷材料的 A 組以及陶瓷材料不加幹細胞的 B 組，兩組皆可以從 X 光線照相及外觀看到骨痂從外圍包入缺陷部位。

但從組織切片顯示，有加幹細胞的 A 組，其骨小樑面積顯著比不加幹細胞的 B 組多。有無載入幹細胞所得之骨痂量差異從 X 光線照相及組織切片都有明顯差異，表示除了陶瓷片拉近骨缺陷兩斷端雖可促進骨痂的生成，骨痂來源仍來生骨細胞，以同體骨髓幹細胞分離和組織培養，確可貢獻在修復分段型骨缺損的癒合。

討論

上一年度計劃是骨髓是取自異體，先將動物犧牲後做再分離及培養，與實際臨床狀況出入較大。次者，所用之對象為老鼠類之小動物，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。比較有無幹細胞併陶瓷片較難顯示期間之差異。

本研究取自同體之腸骨骨髓，是訓練實際自體中胚層幹細胞分離和組織培養的技術最佳的途徑，以利臨床上能從病人的骨髓內分離自體中胚層幹細胞，並能以組織培養擴大其數量。另外將提高動物層級到紐西蘭白兔，公兔骨髓在數量上明顯優於從老鼠股骨取出的細胞量，因此較易培養出足夠量之幹細胞裝載入陶瓷材料載體上。因此本研究成功的顯示出有無載入幹細胞所得之骨痂量差異從 X 光線照相及組織切片都有明顯差異，表示除了陶瓷片拉近骨缺陷兩斷端雖可促進骨痂的生成，骨痂來源仍來生骨細胞，以同體骨髓幹細胞分離和組織培養，確可貢獻在修復分段型骨缺損的癒合。

在不同動物身上做相同之試驗所產生相異的結果顯示，中胚層幹細胞的數量以及原骨缺陷區骨痂自然癒合的能力展有很重要之角色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，欲探詢骨髓或幹細胞的真正生骨能力，將來應改成骨外模型 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。

從二年之研究結果分析，要從動物骨髓取得並培養之中胚層幹細胞，技術上是可行，本研究取自同體之腸骨骨髓，是訓練實際自體中胚層幹細胞分離和組織培養的技術最佳的途徑，以利臨床上能從病人的骨髓內分離自體中胚層幹細胞，並能以組織培養擴大其數量，其中無菌操作的練習，也是將來應用於臨床工作很重要的一環。