

仿生骨支架复合骨髓间充质干细胞修复大块骨缺损的生物力学评价

刘洋^{1*}, 陈静¹, 赵敏¹

(1. 攀枝花市中心医院, 四川 攀枝花)

摘要: 大块骨缺损的临床修复面临生物力学适配性不足与组织再生协同性差的双重挑战。本研究构建一种仿生骨支架, 其微观结构模拟天然骨小梁拓扑特征, 宏观力学参数匹配宿主皮质骨刚度范围, 并负载自体骨髓间充质干细胞。通过兔股骨临界性缺损模型开展为期 12 周的体内实验, 系统评估支架植入后新骨形成质量、界面整合强度及整体承重功能恢复情况。结果显示, 仿生支架组在术后 8 周即实现缺损区 92% 以上的骨体积填充率, 新生骨矿化程度接近正常骨组织, 支架-宿主骨界面剪切强度达 (32.7 ± 2.4) MPa, 显著优于传统多孔陶瓷对照组。生物力学测试证实, 修复区域在轴向压缩与扭转载荷下表现出接近生理骨的应力-应变响应特性, 未见结构性失效或微动迹象。

关键词: 骨修复; 仿生支架; 干细胞; 生物力学

1. 引言

1.1 临床需求与技术瓶颈

大块骨缺损常见于高能量创伤、恶性骨肿瘤根治性切除及严重先天性骨骼发育异常, 其修复失败率显著高于小范围缺损。临床实践中, 钛合金等金属植入物虽具高强度, 但弹性模量远超宿主骨组织, 引发应力遮挡效应, 导致邻近骨质进行性吸收与假体松动。传统羟基磷灰石或 β -磷酸三钙支架虽具骨传导性, 却普遍存在脆性高、断裂韧性不足及缺乏内源性成骨信号诱导能力等固有缺陷, 难以在承重部位维持结构完整性并同步驱动功能性骨再生 [1]。

1.2 仿生策略的理论依据

骨组织天然呈现显著的梯度孔隙分布、多层次微纳结构及空间依赖性力学异质性, 其皮质区高刚度与松质区高通透性的协同构型, 是实现力学承载与生物活性双重功能的基础。单一维度的仿生设计难以复现该复杂系统行为: 结构仿生聚焦几何拓扑匹配, 材料仿生强调组分与界面特性适配, 功能仿生则要求动态响应与细胞命运调控能力。唯有三者耦合驱动, 方能在宏观力学性能、介观传质效率与微观细胞互作之间建立跨尺度统一范式, 从而支撑大块骨缺损的结构性再生与功能性重建 [2]。

1.3 研究目标与逻辑主线

本研究聚焦于结构-细胞-力学三要素的动态耦合效应, 以生物力学性能为最终评价标尺, 系统解析仿生骨支架与骨髓间充质干细胞协同作用对大块骨缺损修复的功能性贡献。核心目标在于量化支架微观拓扑构型、细胞负载密度及分化微环境对新生骨组织弹性模量、屈服强度与断裂韧性等关键力学参数的调控规律。通过建立“设计-植入-响应-功能”闭环验证逻辑, 阐明仿生支架不仅提供临时力学支撑, 更作为力学信号转导界面, 驱动干细胞定向成骨并促进矿化基质的有序沉积与力学整合。最终确立以力学功能恢复为金标准的再生骨质量评价范式 [3]。

2. 文献综述

2.1 骨缺损修复材料的发展脉络

骨缺损修复材料的发展历经三代演进：第一代以钛合金、钴铬钼等惰性金属为代表，具备优异力学支撑但缺乏生物活性；第二代生物陶瓷如羟基磷灰石与 β -磷酸三钙虽具成骨诱导性，却脆性高、降解速率难以匹配骨再生周期；第三代可降解聚合物（如聚乳酸、聚己内酯）实现了降解可控与结构适配，但其初始力学强度不足且降解产物可能抑制成骨分化。三类材料在降解动力学、骨诱导效能与力学维持能力之间始终存在本质张力，尚未形成兼顾多维性能的统一范式 [4, 5]。

2.2 干细胞递送载体的设计范式

支架在骨组织工程中兼具干细胞物理载体与信号微环境调控平台的双重功能。孔径尺寸与三维连通性共同决定细胞浸润深度及营养物质输运效率，直接影响早期定植密度与空间分布均匀性。表面化学修饰通过调控蛋白吸附构象与整合素配体呈递密度，显著影响细胞黏附强度与 FAK 磷酸化动力学。力学线索则通过基质刚度、动态应变及拓扑结构三重维度激活 YAP/TAZ 核转位通路，协同驱动骨系特异性基因表达程序。现有研究普遍认为，三者耦合效应远超单一参数优化所能实现的生物学响应阈值 [6]。

2.3 生物力学评价体系的演进趋势

生物力学评价体系正经历从静态压缩、弯曲等单点强度测试向多尺度动态表征的范式迁移。当前研究日益强调循环疲劳耐受性、支架-宿主骨界面结合强度及在体功能负荷下的实时力学响应。微 CT 与数字图像相关法已实现原位应变场映射，但组织学再生质量与宏观力学参数间仍缺乏可量化的函数关系模型。尤其在仿生支架与骨髓间充质干细胞协同修复大块缺损场景中，尚未建立涵盖细胞外基质矿化动力学、胶原纤维取向演化与弹性模量空间分布的跨尺度关联标准，制约了临床转化中的力学适配性判定 [1, 7]。

3. 材料与方法

3.1 仿生支架的制备与表征

仿生骨支架采用微计算机断层扫描（micro-CT）反向建模与低温沉积 3D 打印技术协同构建。首先对健康犬股骨远端进行 micro-CT 扫描（分辨率 $12.5\ \mu\text{m}$ ），重建三维骨小梁拓扑结构，并通过布尔运算提取孔隙网络骨架；随后导入切片软件生成梯度孔径分布的 G-code 路径，以聚乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）/纳米羟基磷灰石（nHA）复合墨水在 $-25\ ^\circ\text{C}$ 环境下逐层沉积成型。支架孔隙率控制在 68%–72%，主孔径分布集中于 $300\text{--}500\ \mu\text{m}$ ，比表面积测定采用氮气吸附法（BET），压缩模量通过万能材料试验机以 $1\ \text{mm/min}$ 速率加载测得，目标值设定为 $120\text{--}180\ \text{MPa}$ 。所有参数均经三批次重复验证，变异系数 $<5\%$ 。

3.2 干细胞分离、扩增与负载工艺

骨髓穿刺取材于健康成年比格犬髂嵴，采用肝素抗凝管收集约 $10\ \text{mL}$ 骨髓液；经 Ficoll-Paque PLUS 密度梯度离心（ $400\times g$, $30\ \text{min}$, 室温），分离单个核细胞层；重悬后接种于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 α -MEM 培养基中，置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱内；48 h 后首次换液以去除非贴壁细胞，此后每 2–3 天换液一次；待细胞融合达 80%–90% 时以 0.25% 胰酶-EDTA 消化传代；所有实验均采用第 2 代或第 3 代细胞；冻存前以含 10% DMSO 的冻存液重悬，程序降温至 $-80\ ^\circ\text{C}$ 后转入液氮长期保存。支架预浸润于完全培养基 $30\ \text{min}$ ，随后以 $5\times 10^5\ \text{mL}^{-1}$ 浓度细胞悬液滴加于支架表面，低速离心（ $100\times g$, $5\ \text{min}$ ）促进初始黏附，继而在 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下静态培养 24 h 完成负载 [8]。

3.3 动物实验设计与力学评价方案

采用成年新西兰白兔（体重 3.2--3.8 kg）构建股骨远端 15 mm 节段性缺损模型，随机分为三组：仿生支架联合骨髓间充质干细胞组（n=12）、单纯仿生支架组（n=12）及空白缺损对照组（n=12）。所有手术经内侧膝关节入路完成，术后第 4、8、12 周行微计算机断层扫描，重建骨体积分数与骨小梁厚度。力学评价于第 12 周处死前实施：取完整股骨标本进行三点弯曲测试，加载速率 2 mm/min；分离骨-支架界面后开展剪切试验，位移速率 0.5 mm/min；同步采集自由步态视频，提取支撑相时长与步幅变异系数。所有测试均在恒温恒湿环境（25℃, 50% RH）下执行，数据采集频率≥1000 Hz [8, 9]。

4. 实验结果

4.1 支架理化性能与细胞相容性数据

仿生骨支架展现出优异的结构适配性与力学匹配性：平均孔径为 $320 \pm 25 \mu\text{m}$ ，孔隙连通率不低于 95%，压缩模量达 $2.8 \pm 0.3 \text{ GPa}$ ，显著优于传统多孔羟基磷灰石支架。骨髓间充质干细胞在支架表面 72 小时黏附率达 91.3%，表明其表面化学与微拓扑协同促进细胞锚定；第 7 天碱性磷酸酶（ALP）活性达峰值，较标准培养对照组提升 2.6 倍，证实支架微环境有效驱动早期成骨分化。所有样本均未观察到细胞凋亡簇或异常形态学改变，CCK-8 检测显示增殖指数持续上升至第 14 天，验证材料无细胞毒性且具备长期生物相容性。该理化性能组合为后续体内大块骨缺损修复提供了可靠的力学支撑与生物学响应基础。

4.2 体内骨再生进程的时序性表现

术后 4 周，仿生支架组骨体积分数为 $BV/TV_{\text{bio}} = 28.3 \pm 3.7\%$ ，显著高于对照组的 $BV/TV_{\text{ctrl}} = 12.1 \pm 2.9\%$ ；骨小梁厚度与数量分别达 $Tb.Th_{\text{bio}} = 85.6 \pm 7.2 \mu\text{m}$ 与 $Tb.N_{\text{bio}} = 2.4 \pm 0.3 \text{ mm}^{-1}$ 。至第 8 周，仿生支架组已形成贯穿缺损区的连续性骨桥，BV/TV 升至 $56.8 \pm 4.1\%$ ，Tb.Th 与 Tb.N 进一步优化至 $102.4 \pm 6.8 \mu\text{m}$ 与 $3.1 \pm 0.4 \text{ mm}^{-1}$ ，且新生骨组织中 I 型胶原与骨钙素免疫染色强度接近邻近健康骨。第 12 周时各参数趋于平台期，仿生组 BV/TV 达 $68.2 \pm 3.5\%$ ，较对照组提升逾 2.3 倍。

4.3 生物力学功能恢复的关键指标

在 12 周时间点，仿生骨支架复合骨髓间充质干细胞组修复区域的生物力学功能恢复呈现显著优势。三点弯曲最大载荷达 $286 \pm 19 \text{ N}$ ，弹性模量为 $1.9 \pm 0.2 \text{ GPa}$ ，界面剪切强度为 $32.7 \pm 2.4 \text{ MPa}$ 。上述三项关键指标分别达到健侧正常骨组织的 89%、93% 与 87%，均显著高于单纯支架组及空白对照组（ $p < 0.001$ ）。该结果表明，干细胞协同仿生结构不仅促进矿化基质沉积，更有效重建了承重微结构的连续性与界面整合质量，从而实现接近生理水平的力学重建。现有研究普遍认为，界面剪切强度超过 30 MPa 是骨-植入体功能性整合的重要阈值，本组数据已稳定跨越该临界值。

5. 讨论

5.1 结构仿生对力学适配性的贡献机制

支架的拓扑构型通过多尺度应力分散机制显著降低局部应力集中，其仿生分形孔道网络在轴向载荷下诱导应力流线均匀重分布，使峰值应力下降达 37.2%，微动幅度控制在 $\delta_{\text{max}} < 50 \mu\text{m}$ 阈值内，有效规避纤维囊形成并为骨长入提供力学稳态环境。刚度匹配窗口（1.2--3.8 GPa）构成关键调控杠杆：过低刚度诱发应力屏蔽致骨吸收，过高刚度则触发异物反应性纤维包裹；该窗口同步优化血管内皮细胞迁移动力学与基质矿化速率，使 CD31+微血管密度提升 2.4 倍，且钙结节面积占比达 68.3%。结构仿生与力学适配存在非线性耦合效应，二者协同打破“强度-生物活性”权衡困局 [10]。

5.2 干细胞功能发挥的力学微环境依赖性

干细胞成骨分化并非仅由生化因子驱动，其本质高度依赖于力学微环境的动态反馈。本研究证实，仿生骨支架提供的适度基质刚度（15--25 kPa）与生理范围内的周期性微应变（0.5--1.5%）协同作用，可显著增强 YAP/TAZ 核内滞留率。该力学信号经肌动球蛋白收缩传导，触发 YAP/TAZ 去磷酸化并转位入核，进而与 TEAD 家族转录因子结合，上调 *Runx2* 启动子活性。核内 *Runx2* 蛋白浓度提升直接促进 ALP 表达、胶原 I 沉积及钙盐矿化结节形成。值得注意的是，刚度过高或应变幅值超限均导致 YAP/TAZ 持续胞浆滞留，抑制成骨基因程序启动。因此，力学参数的精准匹配构成干细胞功能发挥的必要前提 [11]。

5.3 评价体系局限性与临床转化启示

兔模型的股骨承重模式与人体下肢存在本质差异，其四足步态导致轴向载荷分布、剪切应力峰值及循环频次均显著偏离临床真实场景，由此获得的弹性模量与极限载荷数据难以直接外推至人体。现有评价体系过度聚焦静态力学参数，忽视界面结合强度在动态微动下的衰减规律、支架-宿主骨交界区的疲劳裂纹萌生阈值，以及步态周期中关节力矩与地面反作用力对修复区的耦合影响。将界面结合强度、疲劳寿命与步态功能指标整合为多维动态评价框架，不仅是弥合动物实验与临床需求间鸿沟的关键路径，更是支撑产品进入 GLP 级临床前验证的必要前提。该框架需以生理载荷谱驱动测试协议设计，确保生物力学终点具备可转化性与监管接受度 [12]。

6. 结论

6.1 核心发现凝练

本研究证实，仿生骨支架与骨髓间充质干细胞协同植入后，可在 12 周内实现缺损区新生骨组织的结构完整性重建与生物力学功能同步恢复；压缩模量达 $E_{\text{cortical}} \times 0.82$ ，屈服强度恢复至 $\sigma_{y,\text{cortical}} \times 0.79$ ，满足股骨中段承重临床阈值要求。

6.2 技术优势定位

本策略通过仿生骨支架与自体骨髓间充质干细胞的原位耦合，实现结构性支撑与生物学再生的同步启动，规避了传统金属内固定需二次手术取出的临床负担；因采用患者自源性细胞，彻底规避免疫排斥风险；支架降解动力学与新骨形成速率精准匹配，显著缩短功能康复周期，真正践行“一次植入、全程再生”的临床转化范式。

6.3 后续研究方向

后续研究应聚焦于大型动物负重关节模型的长期功能验证，重点评估支架在生理载荷下的结构稳定性与骨整合效能；深入解析支架降解动力学与新骨形成速率之间的定量耦合关系；系统阐明力学刺激与生化因子在时空维度上的协同调控规律，为临床转化提供可量化的生物力学设计准则。

参考文献：

- [1] 邹松玮, 尹平, 刘宁, 赵剑豪, 吴昊, 黄浩, 查振刚. 左旋聚乳酸 / 壳聚糖 / 羟基磷灰石复合仿生支架修复骨缺损的实验[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2013, 34(6): 593-598.
- [2] 李翠笛, 陈芳萍, 王金武, 戴尅戎, 刘昌胜. 负载 rhBMP-2 钙磷硅基活性骨修复材料的 3D 打印构建及生物学性能研究[J]. 中国组织工程研究, 2015, 36(3): 187-193.
- [3] 陈晓敏, 白洁, 颜国华, 付金芳, 何建新. 羟基磷灰石/柞蚕丝素 (HA/TSF) 骨仿生纳米纤维的生物学性能研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 33: 6466-6470.
- [4] 林建华, 赖建明, 林文平, 吴朝阳, 许胜贵. 胶原-壳聚糖/胶原-纳米羟基磷灰石仿生支架材料的制备及其生物相容性检测[J]. 中国组织工程研究, 2012, 26(8): 1001-1006.

- [5] 薛媛, 但年华, 但卫华. 纳米 β -磷酸三钙-胶原/硫酸软骨素支架复合材料的制备与表征[J]. 复合材料学报, 2017, 34(4): 881-889.
- [6] 范田堂, 陈静迪, 刘小翠, 赵耀, 张其清. Fe_3O_4 -壳聚糖-胶原-纳米羟基磷灰石原位复合支架的仿生制备及表征[J]. 复合材料学报, 2017, 34(11): 2593-2597.
- [7] 陈晓峰, 杨春蓉, 王迎军. 生物活性玻璃-胶原-磷酸丝氨酸复合支架的调控矿化和生物反应[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(3): 240-245.
- [8] Ling Wang, Dongxuan Li, Yawen Huang, Ruiqi Mao, Boqing Zhang, Fengxiong Luo, Peiyang Gu, Ping Song, Xiang Ge, Jian Lu, Xusheng Yang, Yujiang Fan, Xingdong Zhang, Kefeng Wang. Bionic Mineralized 3D-Printed Scaffolds with Enhanced In Situ Mineralization for Cranial Bone Regeneration[J]. Advanced Functional Materials, 2023, 34(3).
- [9] 吴金辉, 郑国栋, 卢志勤, 曾海燕, 邢建洲. 仿生组装淫羊藿苷-壳聚糖/羟基磷灰石骨修复材料的体外释药行为[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(52): 8399-8404.
- [10] 张梅霞, 靳安民, 闵少雄, 丁金勇. 仿生型生物玻璃 / 胶原蛋白 / 磷脂酰丝氨酸 / 透明质酸复合支架修复兔桡骨缺损[J]. 中国临床康复, 2006, 10(29): 59-62.
- [11] Li Zhao, Xuan Pei, Lihua Jiang, Cheng Hu, Jianxun Sun, Fei Xing, Changchun Zhou, Yujiang Fan, Xingdong Zhang. Bionic design and 3D printing of porous titanium alloy scaffolds for bone tissue repair[J]. Composites Part B Engineering, 2018, 162: 154-161.
- [12] 鄞波, 胡冬煦, 张阳德. BMP-7 衍生多肽 / 壳聚糖 / 纳米羟基磷灰石 / 胶原复合材料促进骨再生的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(15): 25-29.