

携载 BMP4 基因的核壳结构 纳米粒子修复兔桡骨临界骨缺损的研究

荣洁琳¹ 林福星² 汪谟贞² 葛学武² 赵宇¹

摘要 目的 将改性的壳聚糖包裹骨形态发生蛋白 4 (BMP4) 质粒形成核壳结构,以明胶海绵为此纳米粒子载体,探究其对兔桡骨临界骨缺损的修复作用。方法 新西兰大白兔 24 只,每只兔子的左右前肢按随机法分为负载 BMP4 质粒核壳结构组 (TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组)、负载 BMP4 质粒核壳结构组 (TACS/pBMP4/G 组) 和对照组。在双侧桡骨制备长约 18 mm 的完全性临界骨缺损,分别植入含有 TACS@EG-HBC/pBMP4 或 TACS/pBMP4 的明胶海绵,对照组仅植入单纯的明胶海绵。术后 2、4、8、12 周取标本做分别处理,检测缺损部位的大体标本、骨密度及骨矿物质含量、X 线、HE 染色、免疫组化法、生物力学。结果 24 只兔子均纳入分析,术后切口未见感染、化脓等症状。大体标本示: TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组骨缺损完全骨化修复;骨密度及骨矿物质含量显著高于 TACS/pBMP4/G 组和对照组 ($P < 0.05$); X 线示: 术后 12 周骨缺损处已完全修复,骨髓腔已再通; HE 染色结果显示: 新生骨小梁相互连接成板层骨;免疫组化结果显示: BMP4 棕色蛋白染色明显;生物力学测定结果显示: 所形成的新生骨与正常骨组织生物力学差异无统计学意义。结论 TACS@EG-HBC/pBMP4/G 具有良好的安全性和成骨能力。

关键词 壳聚糖; 基因治疗; 骨形态发生蛋白 4; 临界骨缺损; 修复

中图分类号 R 33; R 318-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1616-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.008

骨缺损常因创伤、感染、肿瘤等所致,传统的治疗方法如自体骨移植、异体骨移植或非骨性材料移植等并发症多且效果不理想^[1]。因此,研究者们将骨组织工程与基因治疗技术结合,探讨能够在体外安全有效缓释并表达目的基因的载体^[2]。最近研究^[3-4]表明,壳聚糖也可以作为基因载体,其具有独特的生物安全性和生物相容性,可与基因形成稳定

的纳米粒子,在体内缓慢降解而缓释基因。骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 在骨修复及骨再生中起着非常重要的作用^[5], BMP4 蛋白是 BMP 家族中重要的蛋白之一,具有诱导骨细胞分化和促进新生骨的形成作用。课题组前期研究^[6-7]证实包裹 BMP4 基因的核壳结构体外可缓释基因并且有效表达。该研究旨在探究修饰后的壳聚糖的核壳结构及核壳结构在体内的骨缺损修复作用。

1 材料与方法

1.1 材料 BMP4 质粒由课题组 pBMP4-EGFP 质粒剪切重组后得到; 巯基烷基化壳聚糖 (thiolated and N-alkylated chitosan, TACS) 及聚乙二醇修饰羟丁基壳聚糖 [hydroxybutyl chitosan grafted with poly (ethylene glycol), EG-HBC] 由中国科学技术大学材料与化学研究实验室提供; 质粒抽取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 仪器由安徽医科大学免疫实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 核壳结构的制备 按照课题组前期研究^[6-7]成果,以氮磷比 1:20 制备核壳结构。先将 TACS 与 100 ng pBMP4 混合于 PBS 缓冲液中,室温静置 30 min 形成 TACS/pBMP4。再加入与 TACS 等量的 EG-HBC,室温静置 30 min, EG-HBC 即被吸附至 TACS/pBMP4 表面形成核壳结构 TACS@EG-HBC/pBMP4。

1.2.2 植入物的准备 在无菌条件下,将 2.0 cm × 3.0 cm × 0.5 cm 的明胶海绵充分吸收已制备的纳米粒子溶液,无菌冻干后,将长方形的明胶海绵卷成筒,长 2 cm,直径 0.5 cm,类似于兔桡骨,储存在 -20 °C 无菌条件备用。

1.2.3 实验动物及分组 3~4 月龄新西兰健康雄性白兔 24 只,3.0~3.5 (3.26 ± 0.24) kg,由安徽医科大学实验动物中心提供,将每只兔子的前肢分为 TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组、TACS/pBMP4/G 组和对照组。

1.2.4 动物模型的制备 3% 戊巴比妥按 1 ml/kg

2017-07-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81171829)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

²中国科学技术大学材料与化学研究部,合肥 230031

作者简介: 荣洁琳,女,硕士研究生;

赵宇,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-

mail: zhaoyuzj@aliyun.com

体重耳缘静脉注射,麻醉起效后,双前肢剃毛备皮,将兔子仰卧固定于手术台上。碘伏消毒、铺无菌巾。双前肢内侧做长约3 cm纵行切口,分离肌间隙,骨膜剥离子分离尺桡骨间隙,充分暴露桡骨中段,剥离骨膜后,用锯条截取18 mm长的桡骨以形成完全性骨缺损,将制备好的材料植于兔子的骨缺损处,见图1,逐层缝合。术后切口无菌纱布包扎,前肢不予任何固定,术后3 d肌肉注射青霉素40万单位抗感染治疗,常规条件下由同一饲养员分笼饲养。

1.2.5 骨密度及骨矿物质含量的测定 术后2、4、8、12周用3%戊巴比妥将兔子麻醉成功后,固定于双能X线骨密度仪(安徽医科大学第一附属医院骨密度室提供)上进行扫描。

1.2.6 X线检查 术后2、4、8、12周实验兔子,固定于DR扫描床(美国GE公司)上,调好视野后扫描。

1.2.7 大体观察 耳缘静脉注入20 ml空气处死兔子,沿原切口位置切开皮肤及肌肉,观察局部骨痂形成、骨断端愈合以及周围组织的粘连情况。

1.2.8 组织学检查 距缺损部位上下各10 mm处锯断尺桡骨,取下标本后用4%多聚甲醛溶液固定24 h,20% EDTA脱钙液温和脱钙2~3 d更换一次脱钙液,直至标本骨质完全软化,充分水洗后酒精逐级脱水,在交界面内侧5 mm处作石蜡包埋切片,进行HE染色及免疫组化分析,光学显微镜下观察骨痂生长情况及BMP4蛋白表达情况。

1.2.9 生物力学测定 12周后,将标本置于微机控制电子万能试验机上(扬州华辉检测仪器有限公司),测量标本三点弯曲的强度,以正常桡骨为对照。

1.3 统计学处理 采用SPSS 17.0统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 24只兔子均纳入分析。术后2 d兔子精神和饮食稍差,活动较少,第3天精神好转,饮食正常,活动有所增加。各组均未出现手术切口感染、化脓等情况,未见死亡。

2.2 大体标本 观察对照组术后2周末见明显改变,术后8周骨缺损处充满软组织,纤维组织增生,术后12周断端膨大,缺损两端未完全连接。TACS/pBMP4/G组2周时少量骨痂形成,4周骨痂变多,8周骨痂沿着尺骨表面延伸,暂未桥接,12周骨缺损处新生骨骨化并桥接,中间部位未完全骨化。TACS@EG-HBC/pBMP4/G组2周可见新生骨痂,4周缺损处骨痂接近桥接,中间有纤维组织,8周骨痂骨化并桥接,12周骨缺损完全骨化修复。见图2。

2.3 骨密度及骨矿物质含量 分析术后2、4、8周各组进行骨密度检测分析,12周进行骨密度和骨矿物质含量分析,统计方法采用单因素方差分析。结果显示12周时TACS@EG-HBC/pBMP4/G组、TACS/pBMP4/G组、对照组的骨矿物质含量分别为 (115.97 ± 7.89) 、 (90.83 ± 7.58) 、 (47.30 ± 6.48) mg;骨密度分别为 (242.37 ± 8.27) 、 (198.63 ± 12.20) 、 (131.23 ± 10.95) mg/cc; TACS@EG-HBC/pBMP4/G组和TACS/pBMP4/G组骨矿物质含量值及骨密度值显著高于对照组($F = 72.89, 83.65, P < 0.05$),且TACS@EG-HBC/pBMP4/G组和TACS/pBMP4/G组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图3。

2.4 X线检查结果 对照组术后2~4周缺损部位未见明显新生骨痂,8周时两端可见新生骨,12周骨痂增多,骨缺损减小,并未修复。TACS/pBMP4/G组术后两组有骨痂形成,4周骨痂变多,8周缺损处骨痂接近桥连并骨化,12周缺损两端骨痂连接,未



图1 手术图片

A: 量取18 mm桡骨; B: 切除18 mm桡骨; C: 冻干的明胶海绵卷

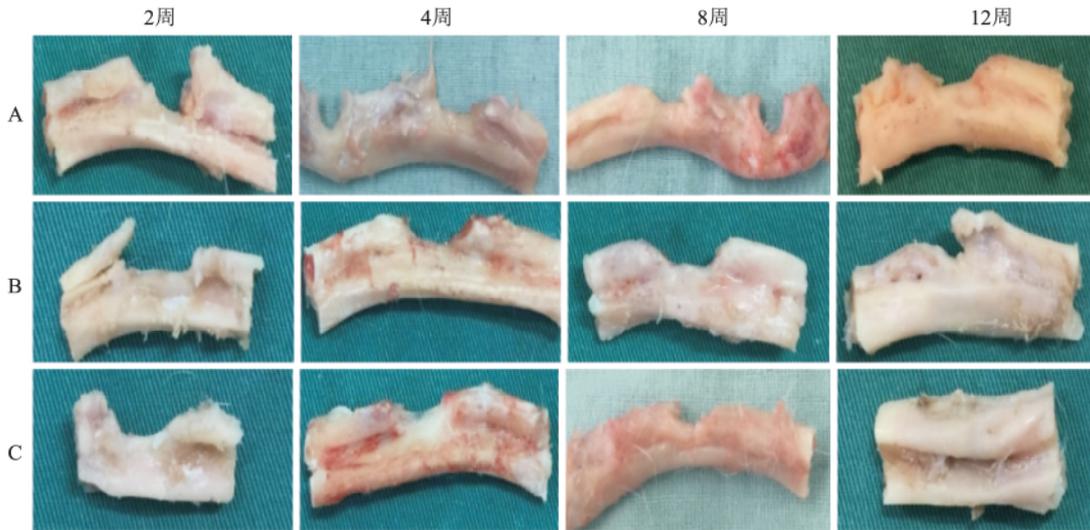


图2 术后不同时间点骨缺损处的大体标本

A: 对照组; B: TACS/pBMP4/G 组; C: TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组

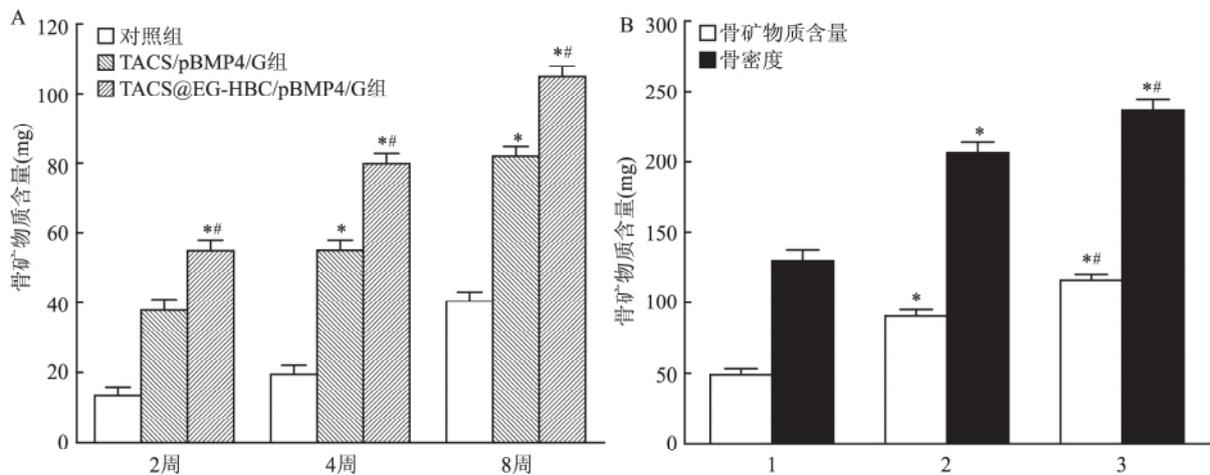


图3 骨矿物质含量及骨密度统计图

A: 术后 2、4、8 周骨矿物质含量; B: 术后 12 周骨矿物质含量及骨密度; 1: 对照组; 2: TACS/pBMP4/G 组; 3: TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 TACS/pBMP4/G 比较: # $P < 0.05$

完全骨化,骨髓腔部分再通。TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组术后 2 周有大量骨痂再生 4 周有较多骨痂出现 密度较之前增加 8 周骨痂部分骨化,缺损处已连接,12 周骨痂基本完全骨化,形成连贯的皮质骨,骨缺损处已完全修复,骨髓腔已再通。见图 4。

2.5 组织 HE 染色 对照组空明胶海绵植入 2 周后可见残留 4 周开始出现较多纤维组织 8 周肉芽组织增多,少量软骨细胞,12 周出现大量软骨细胞。TACS/pBMP4/G 组 2 周开始出现新生血管及纤维组织 4 周血管增多 8 周出现大量软骨细胞及基质,12 周可见部分骨小梁。TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组 2 周时大量的软骨细胞出现 持续到 4 周,骨基质

增多 8 周可见较多软骨骨化形成骨小梁,12 周时骨小梁连接成片,可见大量板层骨形成,骨质致密。见图 5。

2.6 免疫组织化学分析 对照组未见明显 BMP4 蛋白的棕色染色,TACS/pBMP4/G 组 8 周和 12 周软骨细胞周围出现明显的棕色染色,TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组 2 周开始出现棕色染色,后逐渐增多加深,12 周板层骨仍可见染色。见图 6。

2.7 弯曲刚度 TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组弯曲刚度(68.32 ± 2.13) MPa,正常桡骨的弯曲刚度(72.06 ± 2.48) MPa,两组差异无统计学意义,说明 TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组新生骨为完全骨性愈合。TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组和 TACS/pBMP4/G

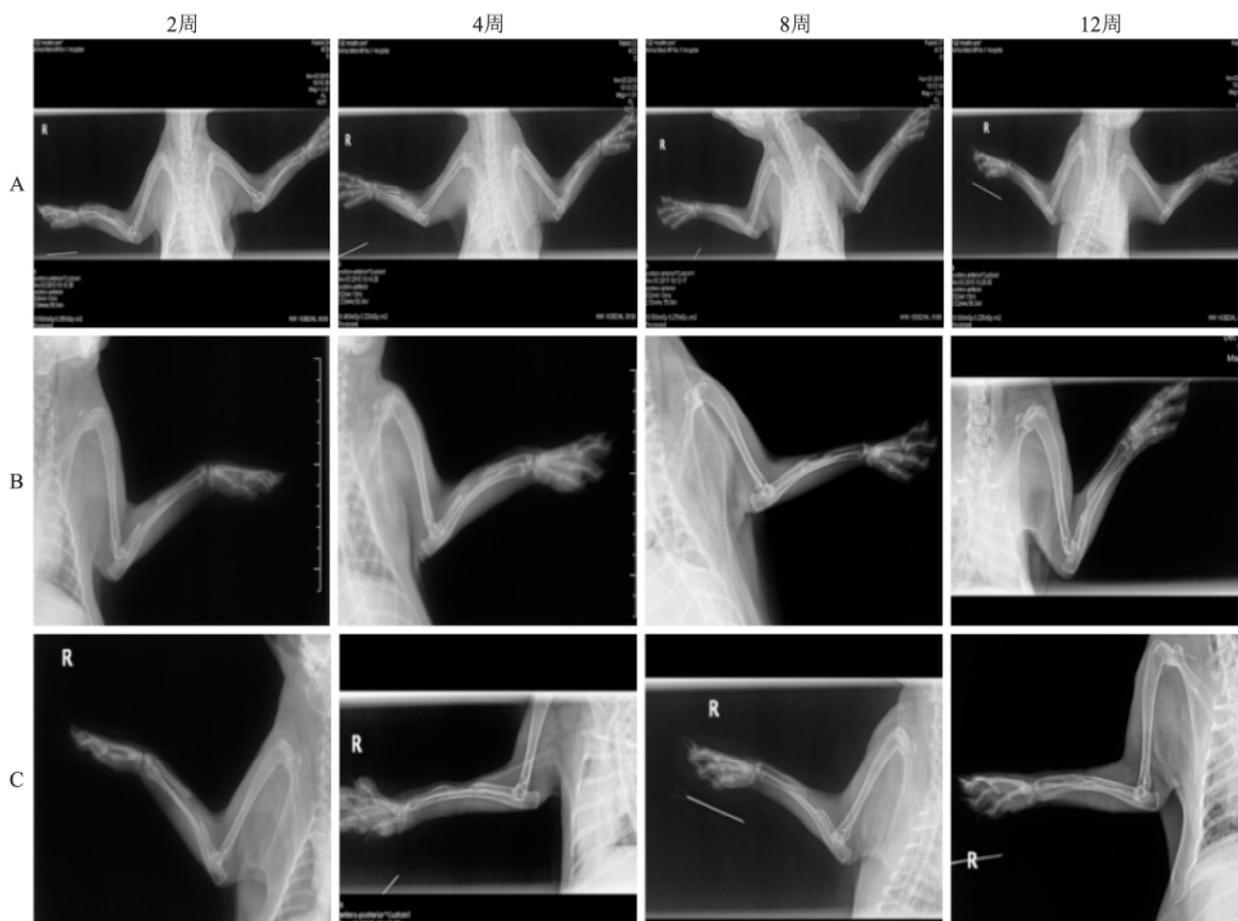


图4 术后不同时间点骨缺损处X线观察

A: 对照组; B: TACS/pBMP4/G组; C: TACS@EG-HBC/pBMP4/G组

组新生骨与对照组差异有统计学意义($P < 0.05$), TACS@EG-HBC/pBMP4/G组和TACS/pBMP4/G组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图7。

3 讨论

骨缺损的愈合是一个复杂的、相互协调的过程,涉及众多的分子、细胞、生化和机械机制^[8]。在骨组织工程的发展过程中,骨生长因子的使用在临床上已取得较大的成就,其中BMP是最强的新生骨诱导因子。但研究^[9]表明,外源性的生长因子半衰期短,易被体液中各种酶类消化降解,同时蛋白质价格昂贵,不适合在体内长期使用。因此选用安全有效并且具有缓释效果的运载体和基因表达系统,保持生长因子的有效浓度显得至关重要。

基因治疗是利用分子克隆技术、转基因技术、转染技术将目的基因导入靶细胞内,使目的基因持续稳定的表达为功能蛋白的技术。有研究^[10]表明,将表达BMP的骨髓间充质干细胞(BMSCs)注入骨缺损部位,可取得良好的骨修复效果;然而注射自体

BMSCs原代细胞的培养与传代较困难并且耗时较长,异体BMSCs则存在免疫反应,此种方法具有一定的限制性。本研究研制出将改良的壳聚糖作为基因的运载体,其具有良好的生物相容性及安全性,通过分子间的静电作用形成的核壳结构不仅对目的基因起到保护作用,同时在体内缓慢降解从而达到基因缓释的目的。课题组前期研究^[7]中将脱细胞骨作为支架植于骨缺损处,同时注射核壳结构纳米粒子溶液修复骨缺损,壳聚糖虽然具有温敏特性,但环境温度很难达到 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,注射入体内时仍为液体,可沿组织及切口间隙渗出,导致骨缺损部位核壳结构的量减少。

本组实验对羟丁基壳聚糖进行重新修饰,提升了纳米粒子的生物安全性、稳定性和转染效率^[6]。选用明胶海绵作为基础支架,因其多孔结构可以吸附纳米粒子溶液,在体内的降解时间长,无菌冻干后可将粒子均匀包裹,植入体内后,随着明胶海绵的降解释放出纳米粒子,起到了二重缓释的作用^[11]。明胶海绵质地较软,制备成20 mm后的圆柱体植入缺

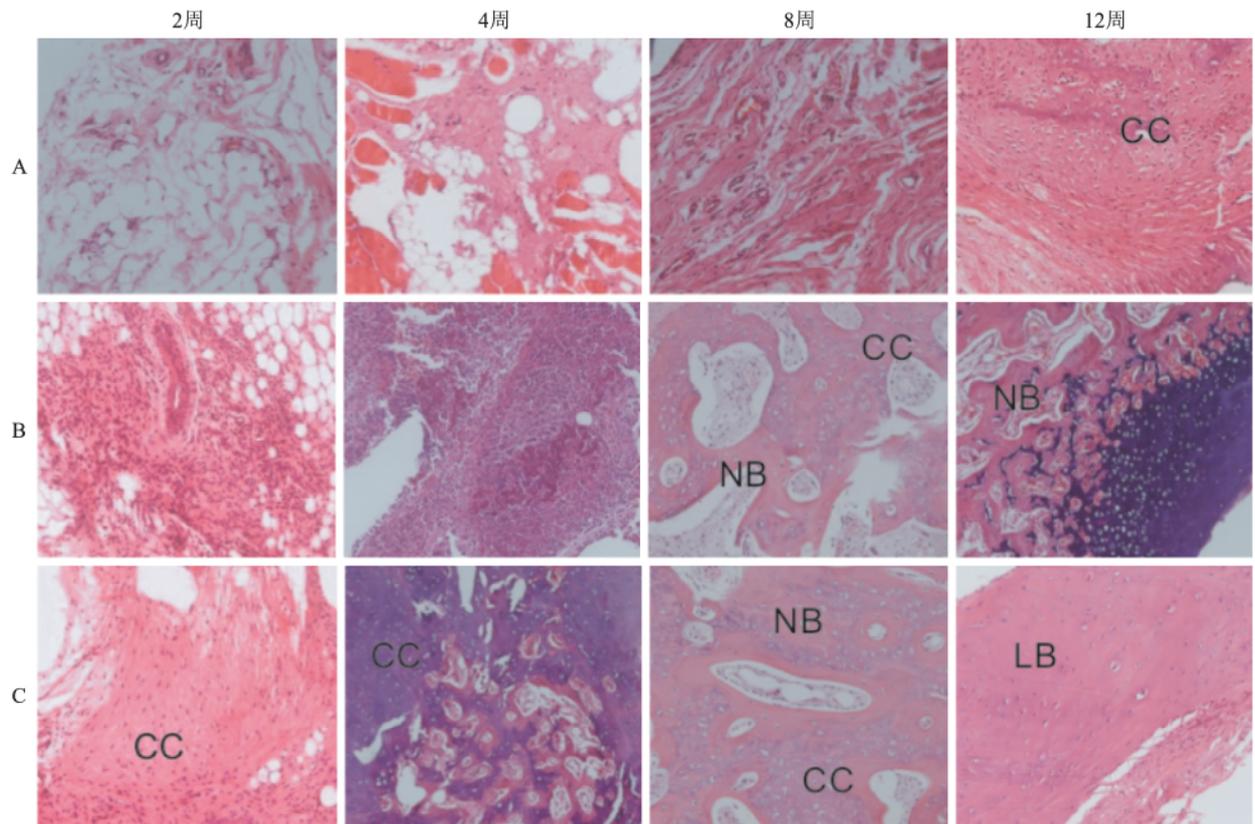


图5 术后不同时间点骨缺损处组织 HE 染色 ×200

A: 对照组; B: TACS/pBMP4/G 组; C: TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组; CC: 软骨细胞; NB: 新生骨; LB: 板层骨

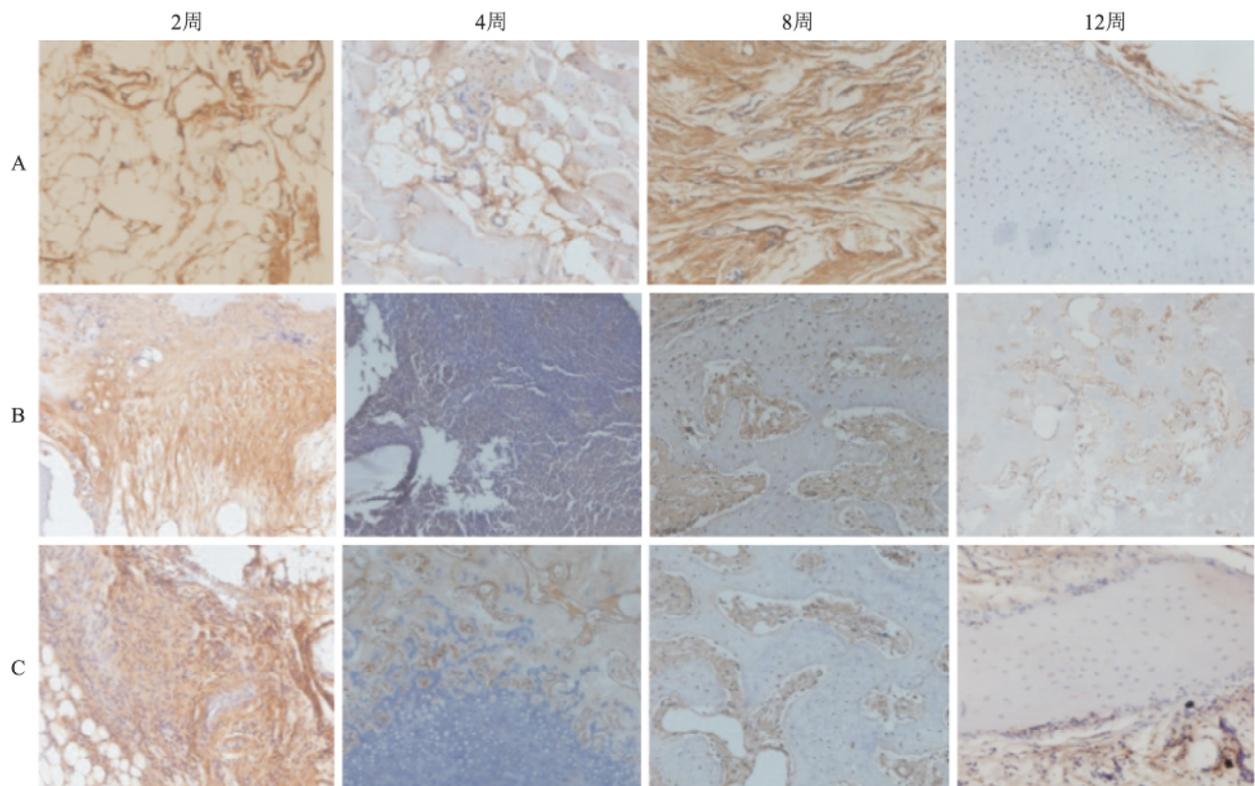


图6 术后不同时间点骨缺损处免疫组织化学分析 IHC 染色 ×200

A: 对照组; B: TACS/pBMP4/G 组; C: TACS@EG-HBC/pBMP4/G 组

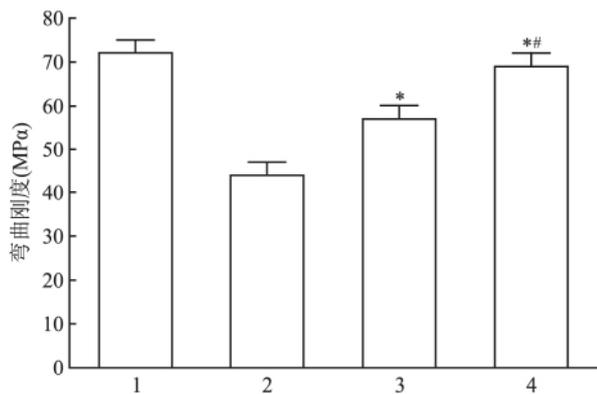


图7 术后12周骨缺损处新生骨组织生物力学测定

1: 正常桡骨; 2: 对照组; 3: TACS/pBMP4/G 组; 4: TACS@ EG-HBC/pBMP4/G 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 TACS/pBMP4/G 比较: # $P < 0.05$

损部位 18 mm 后, 支架和骨断端可以紧密连接, 促进骨再生。明胶海绵质地软会导致其机械性能较硬性材料差, 故其适合于非承重骨缺损的修复。本研究中, TACS@ EG-HBC/pBMP4/G 组骨缺损的部位较早出现新生骨, 后期形成大量的板层骨, 骨皮质和骨小梁结构已恢复正常, 骨髓腔完全再通, 骨缺损完全修复。TACS /pBMP4/G 组及对照组骨小梁及骨基质出现晚, 数量少, 大部分为纤维结缔组织, 后期骨缺损处仅有部分修复。TACS@ EG-HBC/pBMP4/G 修复了大面积的兔桡骨临界骨缺损(长 18 mm, 直径 5 mm), 证明其具有良好的促进骨再生修复重建的作用, 对骨再生及骨愈合有重要意义。因其支架为多孔的明胶海绵, 力学强度较低, 可作为一种理想的非承重骨的修复材料。因此, 开发具有更好力学性能的支架而不影响现有的核壳结构纳米粒子缓释功能是下一步实验的重点。

Bone regeneration in a critical sized defect using pBMP4-loaded TACS@ EG-HBC particles

Rong Jieli¹, Lin Fuxing², Wang Mozhen², et al

(¹ Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022;

² Division of Chemistry and Materials, University of Science and Technology of China Hefei 230031)

Abstract Objective To evaluate the core-shell nanoparticles encapsulated with bone morphogenetic protein 4 plasmids ability of bone regeneration in a critical sized radius defect. **Methods** 24 New Zealand white rabbits were randomly divided into two group: experimental groups and control group. Prepared 18 mm complete bone defect model at the bilateral radius, the experimental groups were implanted with TACS@ EG-HBC/pBMP4/G and TACS/pBMP4/G, While control groups implanted with only gelatin sponge. The radius bone defect were observed by bone mineral density and bone mineral content, anatomy, X ray, HE staining, immunohistochemistry and biomechanical

参考文献

- [1] McMahon R E, Wang L, Skoracki R, et al. Development of nanomaterials for bone repair and regeneration[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2013, 101(2): 387-97.
- [2] Buschmann M D, Merzouki A, Lavertu M, et al. Chitosans for delivery of nucleic acids[J]. Adv Drug Deliv Rev 2013, 65(9): 1234-70.
- [3] Raftery R, O'Brien F J, Cryan S A. Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications[J]. Molecules 2013, 18(5): 5611-47.
- [4] Wang Y, Lin F X, Zhao Y, et al. The sustained-release behavior and *in vitro* and *in vivo* transfection of pEGFP-loaded core-shell-structured chitosan-based composite particles[J]. Int J Nanomedicine 2014, 9: 4965-78.
- [5] Atkinson P J, Wise A K, Flynn B O, et al. Viability of long-term gene therapy in the cochlea[J]. Sci Rep 2014, 4: 4733.
- [6] Lin F, Rong J, Wang M, et al. Chitosan-based core-shell structured particles for *in vivo* sustainable gene transfection[J]. J Mater Chem B 2016, 4(5): 893-901.
- [7] 包丹丹, 林福星, 汪谟贞, 等. 缓释核壳结构利用基因传递用于骨缺损的研究[J]. 安徽医科大学学报 2016, 51(3): 358-62.
- [8] Liu H, Peng H, Wu Y, et al. The promotion of bone regeneration by nanofibrous hydroxyapatite/chitosan scaffolds by effects on integrin-BMP/Smad signaling pathway in BMSCs[J]. Biomaterials, 2013, 34(18): 4404-17.
- [9] Hosseinkhani H, He W J, Chiang C H, et al. Biodegradable nanoparticles for gene therapy technology[J]. J Nanopart Res 2013, 15(7): 1794.
- [10] Prosecká E, Rampichová M, Litvinec A, et al. Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect *in vivo*[J]. J Biomed Mater Res A, 2015, 103(2): 671-82.
- [11] Cao L, Wang J, Hou J, et al. Vascularization and bone regeneration in a critical sized defect using 2-N 6-O sulfated chitosan nanoparticles incorporating BMP-2[J]. Biomaterials 2014, 35(2): 684-98.

PJA1 及 miR-130a 基因在口腔肿瘤组织中的表达及相关性分析

许旭东, 王银龙, 朱友明, 汪聪

摘要 目的 研究 PJA1 及 miR-130a 在口腔肿瘤组织中的表达情况, 明确对肿瘤细胞迁移增殖的影响, 并探究两种基因之间的相互作用。方法 收集 15 组口腔肿瘤及其瘤旁组织, 提取组织内 RNA, 应用 qRT-PCR 法检测组织中 PJA1 及 miR-130a 的表达情况; 构建 PJA1 过表达、miR-130a 过表达及两者同时过表达的口腔肿瘤细胞株 SCC-3, 应用 MTT 实验和 Wound scratch assay 实验分别检测细胞增殖与迁移的影响。结果 qRT-PCR 结果表明 PJA1 在口腔肿瘤组织中的表达明显低于瘤旁组织 ($P < 0.05$), miR-130a 在口腔肿瘤组织中的表达明显高于瘤旁组织 ($P < 0.05$); MTT 和 Wound scratch assay 实验结果表明 PJA1 过表达可以抑制肿瘤细胞的增殖与迁移, miR-130a 过表达可以促进肿瘤细胞的增殖与迁移, 两者同时过表达 PJA1 可以抑制 miR-130a 促进肿瘤细胞增殖与迁移的能力。结论 PJA1 在口腔肿瘤组织中低表达, 具有抑制肿瘤细胞增殖和迁移的能力; miR-130a 在口腔肿瘤组织中高表达, 具有促进肿瘤细胞增殖和迁移的能力; miR-130a 可能通过抑制了 PJA1 从而促进肿瘤细胞的增殖和迁移。

关键词 口腔肿瘤; PJA1; miR-130a; 增殖; 迁移
中图分类号 R 739.8
文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2017) 11 - 1622 - 05
 doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2017. 11. 009

口腔肿瘤比较多见, 系头颈部肿瘤的重要组成

2017 - 07 - 06 接收
 基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31501103); 安徽省自然科学基金(编号: 1508085QC62)
 作者单位: 安徽医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 合肥 230032
 作者简介: 许旭东, 男, 硕士研究生;
 王银龙, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangylah@sina.com

部分, 被认为是一种基因分子疾病, 可能受到体内外多种因素的调控, 其细胞形态、组织结构非常复杂。目前临床上多以手术切除为主, 但是因解剖部位的特殊, 术后继发畸形影响面貌、功能及身心健康。随着分子生物学的发展, 对于肿瘤的研究也踏入了基因水平, 寻找口腔肿瘤相关基因, 通过基因治疗可以有针对性的、特异性的诊治口腔肿瘤。PJA1 是一种肿瘤抑制基因, 被证实可以诱导宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡^[1]; miR-130a 定位于染色体 11q12.1 上, 在多种肿瘤组织中表达增高^[2-5]。目前, 关于 PJA1 及 miR-130a 在口腔肿瘤组织中的表达及两者之间的作用研究较少。该研究取 15 组口腔肿瘤和瘤旁组织, 检测 PJA1 及 miR-130a 的表达水平, 同时检测 PJA1 及 miR-130a 对肿瘤细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及培养条件 人口腔肿瘤细胞株 SCC-3 及病毒包装所用 293T 细胞由安徽医科大学口腔实验室提供。细胞培养在含 10% 胎牛血清、青霉素、链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 5% CO₂、饱和湿度、37 °C 培养箱内。

1.1.2 标本组织来源 收集 2015 年 1 月 ~ 10 月安徽医科大学附属口腔医院口腔颌面外科术中切除的口腔肿瘤组织及瘤旁组织 15 组。所有病例未做过局部扩大切除手术, 已通过病理学检查证实, 并且术前未接受放射治疗、化学药物治疗等, 无其他疾病。将切除后的组织置于冻存管内, 立即放置在液

testing at 2, 4, 8, 12 weeks. **Results** All the 24 rabbits were in analysis and no injection and diapysis was found around the incision. At 12 weeks after operation, new bone formation significantly increased in the TACS@ EG-HBC/pBMP4/G treatment. It demonstrated significant increase in BMC and BMD values ($P < 0.05$) compared to the other two groups at 2, 4, 8 and 12 weeks. X-ray also showed the reunion of bone marrow cavity at 12 weeks. HE staining: new bone trabecula interconnected turned into lamellar bone. Immunohistochemistry: protein BMP4 staining with brown color was apparent. It also showed the bending stiffness of regenerated new bones at 12 weeks have no statistical differences compared with the normal radius. **Conclusion** TACS@ EG-HBC/pBMP4/G is biosecurity and can be used to repair bone defect.

Key words chitosan; gene therapy; bone morphogenetic protein 4; critical bone defects; repair