

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:48 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.007.html>

两种支架材料搭载骨髓间充质干细胞 联合高压氧修复海水浸泡兔桡骨骨缺损

张 淦¹ 程迅生¹ 陈聪聪¹ 陈肖松¹ 马武秀¹ 王 崎² 符来想²

摘要 目的 探讨 n-HA/明胶- β -TCP/明胶搭载骨髓间充质干细胞(BMSCs)联合高压氧修复海水浸泡兔桡骨开放性骨缺损的效果。方法 45只新西兰大耳兔,在兔双侧桡骨中段制作15 mm的骨缺损区,双前肢人工海水浸泡3 h,制成海水浸泡开放性骨缺损模型。将实验兔随机分成3组即对照组、n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组,每组15只。伤口浸泡于人工海水3 h,彻底清创后,对照组在骨缺损区单纯植入BMSCs, n-HA/明胶组植入 n-HA/明胶/BMSCs, β -TCP/明胶组植入 β -TCP/明胶/BMSCs。手术后立即进行高压氧疗,每天1次,连续14 d。于手术后第4、8、12周摄片后分批处死后取材,行组织学和生物力学检测。比较各组缺损修复的效果。结果 ① X线片检查:术后4周对照组、n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组骨缺损区有薄云状骨痂阴影,阴影区域 n-HA/明胶组 > β -TCP/明胶组 > 对照组。术后8周,对照组少量骨痂形成; n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组新生骨痂大量形成。术后12周,对照组骨缺损未完成修复; n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组皮质连续性好,髓腔再通,基本完成修复; ② 骨痂灰度值测量:相同时间观察点,骨痂灰度值 n-HA/明胶组 > β -TCP/明胶组 > 对照组。术后第12周时,对照组、n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组骨痂灰度值差异有统计学意义

($P < 0.05$); ③ 组织学观察:术后第4周, n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组有新生骨小梁生成,骨小梁形成量 n-HA/明胶组 > β -TCP/明胶组 > 对照组,可见部分移植的支架材料残余;术后第8周,对照组未见板层骨形成, n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组有大量板层骨形成,术后第12周,对照组少量板层骨, n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组大量板层骨形成,两组移植的支架材料均消失; ④ 生物力学检测:术后12周各组最大抗折力 n-HA/明胶组 > β -TCP/明胶组 > 对照组, n-HA/明胶组和 β -TCP/明胶组抗折力接近于正常骨。结论 n-HA/明胶/BMSCs联合高压氧和 β -TCP/明胶/BMSCs联合高压氧均能修复海水浸泡开放性骨缺损。n-HA/明胶/BMSCs效果优于 β -TCP/明胶/BMSCs。

关键词 海水浸泡; 骨缺损; 高压氧; 骨髓间充质干细胞; n-HA/明胶; β -TCP/明胶

中图分类号 R 683.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1425-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.007

海水浸泡开放性骨缺损是一个新的研究领域。由于海水浸泡后骨膜成骨能力下降^[1],相关生长因子表达延迟并减弱^[2],导致海水浸泡骨缺损比单纯的骨缺损的治疗更复杂和困难,纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite, n-HA)/明胶和 β -三磷酸钙(β -tricalciumphosphate, β -TCP)/明胶在治疗单纯的骨缺损中取得良好的效果。将 n-HA/明胶支架移植入SD大鼠的颅骨缺损处,8周后成功修复颅骨缺损^[3]。研究^[4]表明 β -TCP/明胶作为支架搭载自体

2016-05-19 接收

基金项目: 南京军区医学科技创新重点课题(编号:11Z011)

作者单位: 安徽医科大学解放军临床学院¹ 骨一科、² 骨三科, 合肥 230031

作者简介: 张 淦,男,硕士研究生;

程迅生,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: 18909696280@163.com

tion of the survival time and survival rate after techyzoites inoculation, and BALB/c mice and Kunming mice were infected respectively with *T. gondii*. The coding sequences of virulence related effectors of GRA15 and ROP16 were amplified by PCR, and the polymorphism was compared. **Results** A total of 6 strains of *T. gondii* were isolated from cats, and genotyping results showed that 2 strains belonged to type Chinese 1(ToxoDB#9) and 4 strains were found to be ToxoDB#205. All of the six isolates exhibited strong virulence, leading to 100% death after 5~7 days in BALB/c mice and 9~12 days in Kunming mice post-infection. The analysis of virulence related GRA15 and ROP16 genes showed that the Chinese 1 strains possessed the polymorphic GRA15_{II} and ROP16_{I/III}, whereas the ToxoDB#205 strains carried GRA15_{II} and ROP16_{II}. **Conclusion** The *T. gondii* isolates collected from Xuzhou have limited genotypes which share the polymorphic virulence effectors.

Key words *Toxoplasma gondii*; genotyping; virulence; GRA15; ROP16

干细胞和 BMP-2 能成功地修复单纯的骨缺损。高压氧在单纯骨缺损治疗取得良好的效果。该实验探索 n-HA/明胶和 β -TCP/明胶在修复海水浸泡骨缺损中的效果。

1 材料与方法

1.1 材料 n-HA/明胶、 β -TCP/明胶(山东省医用高分子材料重点实验室); Olympus 光学显微镜、O-LYMPUS-IX71 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 生物安全柜(济南鑫贝生物科技有限公司); CO₂ 培养箱(美国热电公司); 台式离心机(湖南湘仪仪器有限公司); 动物实验高压氧舱(上海杨园医用氧舱厂); 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 完全培养基、BMSCs(广东赛业生物科技有限公司); 磷酸盐缓冲液(美国 Sigma 公司); EDTA 脱钙液、4% 多聚甲醛(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的培养 BMSCs 在 MSCs 生长培养基中复苏和培养。置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度环境中孵育 2~3 d 半量换液, 当 80% 融合, 用 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 消化 3 min, 1:2 传代。每天观察细胞形态和生长情况。传至 3 代的细胞用于实验。

1.2.2 BMSCs 与支架复合 将已经消毒的支架 n-HA/明胶和 β -TCP/明胶分别置于 24 孔板中, 生长培养基预湿。收集传至 3 代的 BMSCs 制成密度 2×10^7 个/ml 的细胞悬液。吸取 200 μ l 的细胞悬液滴加在支架的顶部, 置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件的孵箱 2 h。随后追加 2 ml MSCs 生长培养基, 再次置于孵箱备用。

1.2.3 动物实验 45 只新西兰大耳兔(2.5~3.0 kg) 由安徽医科大学动物实验中心提供, 随机分成 3 组即对照组、n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组, 每组 15 只。实验动物模型制作参考文献^[5]报道的方法, 采用 3% 戊巴比妥(30 mg/kg) 耳缘静脉注射麻醉, 双侧前肢剃毛。在桡骨前外侧制作约 3 cm 的皮肤切口, 分离组织充分暴露桡骨, 在桡骨中段制作 15 mm 的骨缺损。实验兔前肢放入制备好的人工海水中浸泡 3 h 后, 制作成海水浸泡开放性骨缺损模型。彻底清创后, n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组分别移植预先制备好的 n-HA/明胶/BMSCs 和 β -TCP/明胶/BMSCs, 对照组注射 BMSCs, 逐层缝合伤口。术后立即行高压氧治疗, 每天 1 次, 连续 14 d^[6]。每天给予

青霉素 40 万单位肌肉注射。

1.2.4 观察指标 ① X 线片检查: 术后 4、8、12 周分别拍摄桡骨 X 线片, 观察桡骨缺损修复情况; ② 骨痂灰质度测定: X 线片中随机选取骨缺损区 5 个点, 用 photoshop 7.0 软件分析各观察点的灰度值, 并计算平均值; ③ 骨组织染色: 在术后 4、8、12 周摄片后, 各组随机处死 4 只, 收集桡骨缺损标本, 固定、脱钙; ④ 生物力学检测: 术后 12 周后, 各组剩余 3 只兔处死后取出桡骨, 行三点应力实验。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 多组均数组间比较采用方差分析及两两比较 Bonferroni 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 实验动物一般情况 有 2 只实验兔在麻醉后死亡, 立即补齐。术后 1 d, 实验兔开始活动和进食, HA/明胶组有 1 只兔伤口出现感染, 青霉素 80 万单位肌注 2 d 后死亡, 事后补做 1 只实验兔。其余实验兔伤口未出现感染, 一期愈合。

2.2 细胞形态学观察 BMSCs 复苏后 3~4 h 观察可见细胞开始贴壁, 细胞呈圆形。24 h 后细胞几乎全部贴壁, 形态呈扁圆形或梭形; 3~4 d 细胞增殖迅速, 第 7 天铺满培养皿 80% 面积, 呈旋涡状紧密排列。传代培养后 BMSCs 生长迅速, 6~7 d 传代 1 次, 传代培养后 BMSCs 呈长梭形(图 1)。

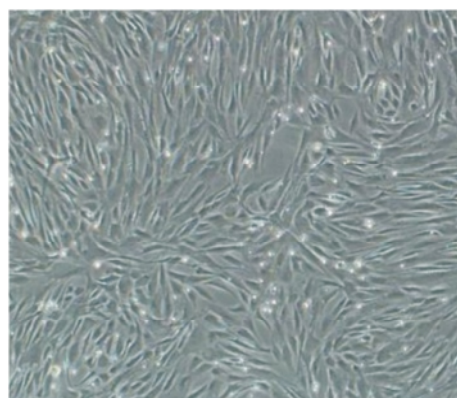


图 1 BMSCs P3 传代 3 d $\times 10$

2.3 影像学观察 术后 4 周, 对照组、n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组均有模糊新生骨痂形成, HA/明胶组最多, 对照组最少。术后 8 周后, 对照组骨痂少量增加, n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组都用大量骨痂生成, 新生骨痂灰质度也增加, n-HA/明胶组骨痂形成最多, 术后 12 周, 对照组留有大块缺损, 未完成修

表 1 各组不同时间点骨痂灰质度($\bar{x} \pm s$)

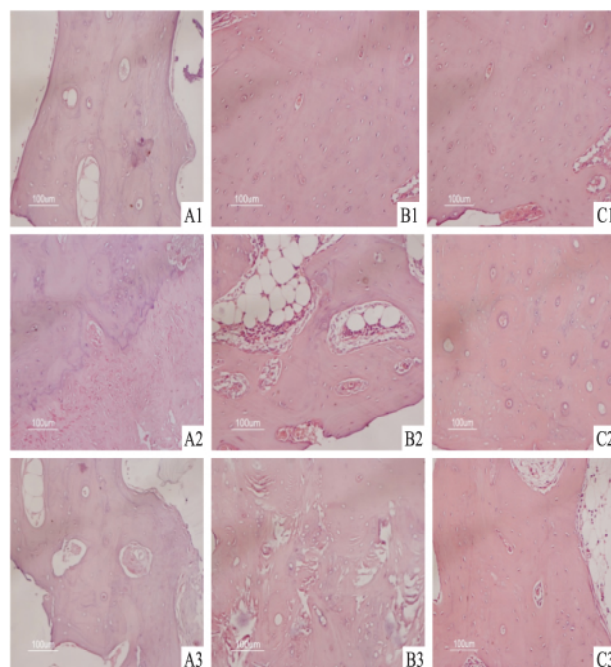
时间	对照组	n-HA/明胶组	β -TCP/明胶组	F 值	P 值
第 4 周	62.5 \pm 3.1	144.1 \pm 4.0 [*]	137.8 \pm 2.8 ^{* #}	1 825	0.00
第 8 周	93.7 \pm 4.0	175.4 \pm 2.4 [*]	164.0 \pm 2.2 ^{* #}	1 116	0.00
第 12 周	109.1 \pm 2.2	207.3 \pm 4.1 [*]	195.8 \pm 2.6 ^{* #}	1 102	0.00

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 n-HA/明胶组比较: [#] $P < 0.05$

复。n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组骨缺损基本修复,皮质连续性好、塑形好、髓腔再通。各个时间观察点骨痂灰质度 n-HA/明胶组 $>$ β -TCP/明胶组 $>$ 对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组骨痂灰质度值比较见表 1。

2.4 组织学观察 术后 4 周对照组有少量骨小梁形成; n-HA/明胶组和 β -TCP/明胶组有较多新生骨小梁形成,骨小梁排列紊乱,支架材料开始降解, n-HA/明胶组骨小梁较对照组多。术后 8 周,对照组有新生骨小梁形成,未见板层骨形成; n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组支架已经完全降解,形成少量的板层骨,骨小梁排列较为整齐,主要是纤维骨样组织。n-HA/明胶组板层骨比 β -TCP/明胶组多。术后 12 周,对照组形成少量板层骨,缺损区主要被纤

维组织填充; n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组大量的板层骨形成,骨小梁排列规则,髓腔再通,哈弗式系统形成,骨缺损完全修复(图 3)。

图 3 组织学观察 HE $\times 200$

A: 对照组; B: n-HA/明胶组; C: β -TCP/明胶组; 1: 术后 4 周; 2: 术后 8 周; 3: 术后 12 周

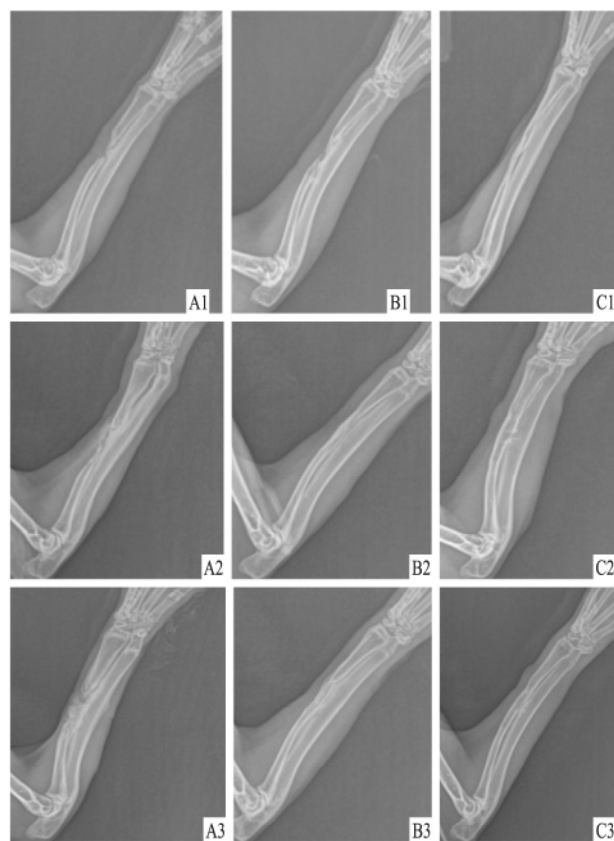


图 2 各组影像学检查

A: 对照组; B: n-HA/明胶组; C: β -TCP/明胶组; 1: 术后 4 周; 2: 术后 8 周; 3: 术后 12 周

2.5 生物力学观察 对照组抗折力为(86.6 \pm 4.8); n-HA/明胶组抗折力为(116.6 \pm 4.7); β -TCP/明胶组为(106.9 \pm 4.8); 标准骨组为(122.4 \pm 3.4)。标准骨组 $>$ n-HA/明胶组 $>$ β -TCP/明胶组 $>$ 对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

种子细胞是骨组织工程的重要组成部分。BM-SCs 有自我更新和多向分化的潜能,是应用最广泛的种子细胞。BMSCs 种子细胞浓度也是影响成骨的一个重要因素,田志逢等^[7]分别将浓度 1×10^8 / L、 5×10^8 / L、 1×10^9 / L、 5×10^9 / L 的 BMSCs 接种于骨基质明胶,移植入 SD 大鼠桡骨缺损,4 组成骨效果随着初始细胞浓度增加,成骨效果增强,但是到达

一定浓度,成骨能力不增加。田志逢等^[7]认为接植于支架上细胞浓度不小于 5×10^8 /L。本实验的 BMSCs 浓度为 2×10^9 /L,符合上述要求。BMSCs 在移植入骨缺损处能转化成成骨细胞原因:① 骨缺损处形成的成骨微环境。将经过成骨诱导后的脂肪基质细胞植入肌肉区不能成骨,植入骨缺损区成骨明显^[8]。证明了成骨微环境对干细胞成骨分化的重要影响;② 高压氧。高压氧具有促进 MSCs 向成骨方向分化的作用^[9];③ 磷酸钙陶瓷。磷酸钙陶瓷具有骨诱导活性,在国际上逐渐得到公认^[10]。

天然骨是由无机质和有机质组成,无机质主要包含 n-HA,有机质主要包含胶原。n-HA/明胶和 β -TCP/明胶与天然骨相似的组成。明胶是胶原的代谢物,具有可降解性、无免疫原性、良好的生物相容性,广泛应用于组织工程支架。用明胶作为支架搭载干细胞移植入兔骨缺损处,术后 12 周成功修复了兔桡骨缺损^[11]。明胶的缺点是降解速度快、没有足够的力学强度,当明胶与 n-HA 或者 β -TCP 混合,可以提高支架的力学强度和降低支架的降解速度。Azami et al^[3]制作的 n-HA/明胶与成骨细胞培养通过细胞增殖实验和碱性磷酸酶(ALP)染色、茜素红(ARS)染色显示 n-HA/明胶不抑制成骨的增殖,并且能促进成骨细胞分化和基质的矿化,有良好的生物相容性。移植入 SD 大鼠的颅骨缺损模型 8 周后修复骨缺损。在本实验中 n-HA/明胶组 X 线片检测术后 12 周可见骨缺损完全修复,髓腔再通。HE 染色术后 12 周新生骨趋于成熟和自然骨的构成一致。 β -TCP/明胶作为 MSCs 或者 BMP-2 的载体,成功修复了骨缺损^[4,12]。在本实验也得到证实,X 线片和 HE 染色结果都表明兔桡骨骨缺损基本修复,但是在成熟度上欠缺。在 n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组 HE 染色中未发现免疫细胞,提示 n-HA/明胶和 β -TCP/明胶两种支架具有良好的生物相容性,不会引起免疫反应。

虽然两种材料都能修复骨缺损,但是 n-HA/明胶还是优于 β -TCP/明胶。n-HA/明胶组 X 线片显示 8 周骨痂灰质度强于 β -TCP/明胶,提示 n-HA/明胶组骨缺损修复的进程提前。力学实验显示 HA/明胶组的力学强度强于 β -TCP/明胶组。可能原因:① 纳米级 HA 修复骨缺损能力明显优于微米级 HA^[13],HA 比 β -TCP 具有更好的生物相容性^[14];② n-HA/明胶组的 n-HA 是纳米结构,自然骨的 HA 也主要是纳米结构,而 β -TCP/明胶组的 β -TCP 是微米结构,n-HA 在自然骨,更有利于 n-HA 的吸收和利

用。

高压氧也是促进骨缺损修复的一个重要因素。骨缺损区血运遭到严重破坏导致无法获取充分的氧气和营养,海水浸泡的骨缺损加重了缺血低氧的情况。血管化与成骨密切相关,血管网形成和充足的血流量是组织工程骨修复骨缺损成功的关键。高压氧具有促进新生血管形成的作用^[15],新生的血管为新生骨组织再生提供充足的原料和营养,从而加速骨再生。同时高压氧的促进干细胞成骨分化^[9],在骨再生方面起到重要作用。研究^[4]表明高压氧有促进海水浸泡骨缺损修复的作用。

综上所述,n-HA/明胶和 β -TCP/明胶复合 BM-SCs 联合高压氧能修复海水浸泡开放性骨缺损。n-HA/明胶支架在治疗海水浸泡开放性骨缺损治疗中优于 β -TCP/明胶。

参考文献

- [1] 王长生,程迅生,陈肖松,等.兔肢体软组织开放性损伤合并海水浸泡伤对骨膜的影响[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2010,17(2):77-80.
- [2] 陈肖松,程迅生,陈肖松,等.海水浸泡对兔胫骨开放性骨折愈合进程的影响[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2011,18(3):142-9.
- [3] Azami M, Tavakol S, Samadikuchaksaraei A, et al. A porous hydroxyapatite/gelatin nanocomposite scaffold for bone tissue repair: *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2012, 23(18):2353-68.
- [4] Yamamoto M, Hokugo A, Takahashi Y, et al. Combination of BMP-2-releasing gelatin/ β -TCP sponges with autologous bone marrow for bone regeneration of X-ray-irradiated rabbit ulnar defects[J]. Biomaterials, 2015, 56:18-25.
- [5] 马武秀,程迅生,陈肖松,等.海水浸泡兔桡骨开放性骨缺损最佳植骨时间的研究[J].中华航海医学与高压氧医学杂志,2012,19(2):85-90.
- [6] 陈聪聪,程迅生,马武秀,等.高压氧对兔桡骨开放性缺损海水浸泡后异体骨髓间充质干细胞移植修复效果的影响[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2014,21(1):26-30.
- [7] 田志逢,秦书俭,张小玲,等.不同接种密度骨髓间充质干细胞/骨基质明胶复合体修复大鼠桡骨缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(49):9126-30.
- [8] 李晓宇,姚金凤,刘政华,等.成骨诱导脂肪基质细胞在骨组织工程体内成骨中的作用[J].中国组织工程研究,2012,16(27):4985-90.
- [9] Lin S S, Ueng S W, Niu C C, et al. Effects of hyperbaric oxygen on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2014, 15:56.
- [10] 包崇云,张兴栋.磷酸钙生物材料固有骨诱导性的研究现状与展望[J].生物医学工程学杂志,2006,23(2):442-5.
- [11] 刘刚,汪明星,闫长明,等.脂肪干细胞复合明胶海绵修复兔

- 桡骨缺损[J]. 中国组织工程研究 2013, 17(34): 6083-8.
- [12] Omata K, Matsuno T, Asano K, et al. Enhanced bone regeneration by gelatin- β -tricalciumphosphate composites enabling controlled release of bFGF [J]. *J Tissue Eng Regen Med* 2014, 8(8): 604-15.
- [13] 朱伟民, 王大平, 孟志斌, 等. 纳米羟基磷灰石人工骨修复骨缺损实验研究[J]. 中国临床解剖学杂志 2005, 24(6): 670-3.
- [14] 汪群力, 裴国献, 曾宪利, 等. 恒河猴骨髓基质干细胞与新型可吸收羟基磷灰石及 β -磷酸三钙体外相容性的观察[J]. 第一军医大学学报 2005, 25(1): 44-7.
- [15] Grassmann J P, Schnependahl J, Hakimi A R, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves angiogenesis and bone formation in critical sized diaphyseal defects [J]. *J Orthop Res* 2015, 33(4): 513-20.

BMSCs seeding in two scaffold incorporation with hyperbaric oxygen treat seawater immersed bony defect

Zhang Gan, Cheng Xunsheng, Chen Congcong, et al
(Dept of Orthopedics, 105 Hospital of PLA, Hefei 230031)

Abstract Objective To investigate the efficiency of n-HA/gelatin and β -TCP/gelatin scaffold incorporation with HBO to enhance seawater immersed open bone defect. **Methods** A 15 mm radius defect was made in 45 rabbits, and then wound limbs were immersed in seawater for 3 h. The rabbit model of bone defect immersed by seawater was established. All rabbits were randomly divided into 3 groups. BMSCs were implanted in control group, n-HA/gelatin/BMSCs were implanted into n-HA/gelatin group and β -TCP/gelatin/BMSCs were implanted in β -TCP/gelatin group. Each rabbit received HBO for 14 days after surgery. X-ray, histologic and mechanical analysis were used to evaluate the repair in each group. **Results** ① X-ray showed that 4 weeks after surgery, bone defect area in control group, n-HA/gelatin group, β -TCP/gelatin group had thin cloudy callus shadow, the area of callus shadow in n-HA/gelatin group > that in β -TCP/gelatin group > that in control group. After 8 weeks a small amount of callus formed in control group, a large amount of new bone callus formed in n-HA/gelatin group and β -TCP/gelatin group. After 12 weeks, in control group the repairment of bone defect unfinished; bone defect was basically completed to repair in n-HA/gelatin group and β -TCP/gelatin group with good cortical continuity, recanalized marrow cavity. ② Bone callus grey value demonstrated 12 weeks after surgery, bone callus grey value had statistical significance in control groups, n-HA/gelatin group and β -TCP/gelatin group ($P < 0.05$). ③ HE staining indicated the formation of bone trabecula in both n-HA/gelatin group and β -TCP/gelatin group was more than that in control group, and residual material could be found in n-HA/gelatin group and β -TCP/gelatin group 4 weeks after surgery. After 8 weeks, no lamellar bone formed in control group, a large number of lamellar bone formed in group n-HA/gelatin and β -TCP/gelatin. After 12 weeks, a small amount of lamellar bone formed in control group; a large number of lamellar bone formed in n-HA/gelatin group and β -TCP/gelatin group, residual materials in two groups were completely degraded. ④ Biomechanical testing showed that 12 weeks after surgery, the maximum bending force in n-HA/gelatin group > that in β -TCP/gelatin group > that in control group, the bending force in n-HA/gelatin group and β -TCP/gelatin group were close to normal bone. **Conclusion** Scaffold of n-HA/gelatin/BMSCs and β -TCP/gelatin/BMSCs incorporation with HBO are effective to treat seawater immersed bone defect, and that n-HA/gelatin scaffold is more excellent than that of β -TCP/gelatin scaffold.

Key word seawater immersed; bone defect; bone marrow mesenchymal stem cells; hyperbaric oxygen; n-HA/gelatin; β -TCP/gelatin