

# 骨组织工程三维复合支架修复兔桡骨骨缺损

叶鹏<sup>1</sup>, 马立坤<sup>1</sup>, 黄文良<sup>2</sup>, 余荣峰<sup>3</sup>, 田仁元<sup>1</sup>, 邓江<sup>4</sup> (<sup>1</sup>遵义医学院, 贵州省遵义市 563003; 遵义医学院第三附属医院, <sup>2</sup>骨一病区, <sup>4</sup>骨科, 贵州省遵义市 563003; <sup>3</sup>贵州省人民医院骨一科, 贵州省贵阳市 550000)

## 文章亮点:

实验的创新在于将前期实验制备的具有良好机械性能和理化性质的丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石三维复合支架, 用于修复兔桡骨大段骨缺损, 证实了复合支架良好的生物相容性、骨诱导性和成骨作用, 并发现其降解速度与正常骨组织再生修复速度一致。

## 关键词:

生物材料; 骨生物材料; 丝素; 壳聚糖; 纳米羟基磷灰石; 骨组织工程; 复合支架; 骨缺损

## 主题词:

生物相容性材料; 丝素蛋白; 壳聚糖; 纳米粒; 羟基磷灰石类

## 基金资助:

贵州省科学技术基金项目(黔科合SY字[2010]3101), 项目名称:《SF-CS-nHA 支架与基因修饰后 BMSCs 构建人工骨种植体的成骨作用研究》; 贵州省社会攻关项目(遵义市科合社字 [2010]015 号), 项目名称: RGD 表面修饰 SF-CS-nHA 材料复合携带目的基因的 BMSCs 成骨性能研究; 贵州省省长基金项目(2011(25)), 项目名称: rhBMP-2 缓释系统/自体松质骨复合生物支架修复骨缺损的研究

## 摘要

**背景:** 前期实验构建的丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石复合支架具有良好的理化性质。

**目的:** 观察丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石三维复合支架修复兔桡骨大段骨缺损的效果。

**方法:** 取新西兰大白兔 36 只, 建立右侧桡骨长段骨缺损模型, 随机均分为 3 组, 实验组于骨缺损处植入丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石复合支架, 对照组于骨缺损处植入丝素/壳聚糖复合支架, 空白对照组造模后不作任何处理。术后 4, 8, 12, 16 周进行 X 射线摄片、标本大体观察、组织病理学观察。

**结果与结论:** 术后 16 周, 实验组缺损区 X 射线影像与正常骨组织无区别, 骨髓腔完全再通, 有明显的骨组织生成, 苏木精-伊红染色可见骨小梁和较多核深染的长梭形骨细胞; 对照组 X 射线骨密度影略低于正常骨组织, 部分骨髓腔再通, 苏木精-伊红染色可见骨细胞周围有不少软骨细胞, 未见明显的骨小梁或骨板结构, 排列较紊乱; 空白对照组断端骨钙化影同正常骨组织一致, 断端各自封闭形成骨不连, 苏木精-伊红染色可见较多的纤维组织和少量的类骨组织。表明丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石三维复合支架可较好地修复兔桡骨大段骨缺损。

叶鹏, 马立坤, 黄文良, 余荣峰, 田仁元, 邓江. 骨组织工程三维复合支架修复兔桡骨骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(3):383-388.

## Repairing rabbit radial bone defects with three-dimensional tissue-engineered bone composite scaffold

Ye Peng<sup>1</sup>, Ma Li-kun<sup>1</sup>, Huang Wen-liang<sup>2</sup>, She Rong-feng<sup>3</sup>, Tian Ren-yuan<sup>1</sup>, Deng Jiang<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou Province, China; <sup>2</sup>First Orthopedics Ward, <sup>4</sup>Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou Province, China; <sup>3</sup>First Department of Orthopedics, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550000, Guizhou Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Silk fibroin/chitosan/nano hydroxyapatite (SF/CS/nHA) composite scaffold constructed in preliminary experiments has good physical and chemical properties.

**OBJECTIVE:** To study the capacity and mechanism of SF/CS/nHA composite scaffold for repair of rabbit radial bone defects.

**METHODS:** Thirty-six New Zealand white rabbits were selected to make animal models of right radial bone defects, and then randomly divided into SF/CS/nHA group, SF/CS group and blank control group. Blank control group had no treatment after modeling. X-ray radiography, gross observation and histopathological observation were performed at 4, 8, 12, 16 weeks postoperatively.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Sixteen weeks after surgery, bone defects in the SF/CS/nHA group were completely replaced by normal bone tissue on X-ray images, and the bone marrow cavity showed complete recanalization with new bone formation; hematoxylin-eosin staining showed bone trabecula and many fusiform bone cells. In the SF/CS group, the bone mineral density in the defect area was slightly lower than that of the normal bone tissues, the bone marrow cavity was partly rehabilitated, and many chondrocytes were seen around

叶鹏, 男, 1988 年生, 重庆市人, 汉族, 遵义医学院 2011 级骨外科在读硕士, 主要从事骨关节创伤方面的研究。

通讯作者: 邓江, 教授, 主任医师, 研究生导师, 遵义医学院第三附属医院骨科, 贵州省遵义市 563003

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.03.009  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)03-00383-06

稿件接受: 2013-11-02

Ye Peng, Studying for master's degree, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Corresponding author: Deng Jiang, Professor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Accepted: 2013-11-02

bone cells that arranged irregularly with no bone trabecula or bone lamella. In the blank control group, the images of bone calcification were consistent with normal bone tissues, and a closed bone union was formed at each end; hematoxylin-eosin staining showed that the blank control group was filled by fibrous connective tissue and a small amount of bone-like tissues. SF/CS/nHA composite scaffold is better for repair of rabbit radial bone defects.

**Subject headings:** biocompatible materials; silk fibroin; chitosan; nanoparticles; hydroxyapatites

**Funding:** the Science and Technology Foundation of Guizhou Province, No. [2010]3101; the Social Tackle Key Program of Guizhou Province, No. [2010]015; the Governor's Foundation of Guizhou Province, No. 2011(25)

Ye P, Ma LK, Huang WL, She RF, Tian RY, Deng J. Repairing rabbit radial bone defects with three-dimensional tissue-engineered bone composite scaffold. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(3):383-388.

## 0 引言 Introduction

在临床工作中, 各种疾病、创伤、肿瘤引起的骨缺损, 特别是长段骨缺损的治疗一直是国内外研究的难点。统计显示美国年需进行骨移植的骨修复手术约80万台。而中国每年单因创伤所致的骨缺损患者就达到了300多万例<sup>[1]</sup>。虽然理想的骨替代材料存在着巨大的需求, 但目前尚无一种理想的骨替代材料在具有良好的生物相容性及力学强度的同时, 还具备良好的降解性能和经济价值<sup>[2-3]</sup>。随着组织工程的出现, 人工组织工程骨以其低免疫原性、不引起二次创伤、材料来源广泛等优点, 逐渐替代异体骨移植、自体骨移植成为研究的热点。在组织工程骨中各种单一生物材料制作的支架在体内外实验中各有优缺点, 都还不能达到理想的效果。为了解决这一难题, 国内外研究者利用生物材料复合技术, 通过调节材料的比例与相应的组合方式使其发挥各自的优点, 进而制作理想的支架材料<sup>[4-5]</sup>。

Budiraharjo等<sup>[6]</sup>将纳米羟基磷灰石涂层后的壳聚糖支架材料与干细胞共培养, 发现其具有良好的生物相容性和成骨诱导能力。Alves da Silva等<sup>[7]</sup>将壳聚糖与丝素聚合制作的复合支架用于骨髓干细胞的体外培养, 发现其能够诱导软骨细胞分化。

课题组前期将以丝素、壳聚糖制作的复合支架用于兔膝关节修复中, 显示出了良好的细胞相容性和合适的降解速率, 并以此为基础制作了拥有良好机械性能和理化性质的丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石三维复合支架<sup>[8]</sup>。实验在此基础上将丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石三维复合支架用于兔桡骨大段骨缺损的修复治疗, 运用影像学技术、病理技术从大体、组织显微水平探讨其成骨作用及机制, 为理想的骨组织工程支架提供理论依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机分组动物体内对照实验。

**时间及地点:** 实验于2012年8月至2013年5月在遵义医学院中心实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 健康2月龄新西兰大白兔36只, 由重庆医科大学动物实验中心提供, 雌雄不拘, 体质量(2.5±0.2) kg。实验过程中对实验动物的各项操作符合医学伦理学精神。

骨组织工程三维复合支架修复兔桡骨缺损实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
纳米羟基磷灰石	南京埃普瑞纳米材料有限公司
丝素/壳聚糖复合支架	前期实验制备
丝素蛋白溶液	前期实验自行提取
壳聚糖	山东潍坊市海之源生物公司
恒温加热磁力搅拌器	美国 C-MAG HS4
苏木精、伊红	美国 AmreSCo 公司
戊巴比妥钠	美国 MerCk
低温冷冻干燥机	美国 VIRTIS
光学显微镜	德国 Leifa
电子分析天平	德国 sartorius

### 实验方法:

**丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石三维复合支架的制备:** 将丝素蛋白、壳聚糖、纳米羟基磷灰石分别配置成为2%溶液, 然后以体积比1:1:1比例混合, 在C-MAG HS4磁力加热搅拌器中以55℃恒温搅拌直到3种液体中没有气泡充分混合均匀。然后迅速将其用20 mL针筒注入9孔板中, 放入-80℃冰箱冷冻24 h。把冷冻好的支架用封口膜迅速密封, 在支架相应区域制作细孔后放入真空干燥机抽吸36 h。将干燥后所得的支架浸入含有体积分数75%甲醇和1 mol/L氢氧化钠混合液中进行预处理15 h, 超纯水反复洗净后再次真空干燥, 然后将所得支架在以EDC、NHS混合的交联剂中, 浸泡10 h后洗净。再将染湿的复合支架于-80℃冷冻24 h后真空干燥36 h。将制备的三维复合支架密封后备用<sup>[9-11]</sup>。

**动物模型的建立:** 取新西兰大白兔36只, 手术前6 h禁食禁饮。以2.5%戊巴比妥耳缘静脉注射麻醉。麻醉妥当后, 妥善固定其四肢, 以免术中挣扎损伤血管或神经, 并注意充分暴露其右前肢。备皮, 常规碘伏、乙醇消毒后取桡骨中段中点为中心切开皮肤, 逐层仔细分离, 注意勿伤其神经或血管以免影响实验效果的评估。充分暴露桡骨, 用消毒好的无菌锯片制备长约2 cm的全段骨缺损<sup>[12-14]</sup>。随机均分为3组, 按照实验设计实验组植入预先制备好的丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石复合支架, 对照组植入丝素/壳聚糖复合支架, 空白对照组未植入任何材料。逐层缝合伤口,

术后碘伏消毒伤口, 纱布包扎后不用外固定, 肌注青链霉素双抗预防感染。术后单笼喂养。

术后4, 8, 12, 16周各组分别进行X射线检查, X射线检查完毕后进行组织病理学检查。

**大体观察及影像学检查:** 术后定期观察兔进食、活动、伤口愈合情况, 并进行桡骨正位片X射线摄片检查, 观察骨痂的生长情况, 以及支架被骨组织替代爬行的情况。大体观察植入物在体内修复骨缺损的情况, 与周围组织的关系, 以及支架的吸收程度。观察后把所取材料制作成病理切片。

**病理组织学观察:** 分别以横切面、纵切面制作标本, 以便立体观察其修复情况。所取标本经过固定、脱钙, 制成4  $\mu\text{m}$ 厚切片。切片经过二甲苯脱蜡、各级乙醇至水洗后风干, 分别进行苏木精-伊红染色, 最后脱水、透明、封固后在倒置显微镜下观察, 并进行组织学评分。

#### Lane-Sandhu 组织学评分标准:

评分	愈合情况	骨痂情况	骨髓情况
0分	无愈合	无骨痂	切除部位无骨髓
1分	纤维性愈合	少量骨痂	骨髓开始出现
2分	纤维软骨性愈合	中等骨痂	骨髓存在>50%的缺损区
3分	骨性愈合	大量骨痂	完全为红骨髓
4分	完全愈合, 有骨小梁和皮质骨	连续骨痂	成熟的脂肪性骨髓

**主要观察指标:** 各组动物模型的大体观察、影像学检查及组织学观测和评价。

**统计学分析:** 所得数据采用SPSS 17.0统计软件进行分析, 多个样本均数的两两比较采用F检验。

## 2 结果 Results

**2.1 各组术后一般情况与大体观察** 各组兔术后半天开始进食, 术后1周内伤口陆续愈合, 未见感染, 无红肿、肿胀现象。1周后实验组、对照组兔活动明显较空白对照组活跃, 3周后各组活动皆可。术后4周时实验组、对照组支架外层被纤维结缔组织所包裹, 在骨膜下支架开始钙化呈现出灰白色, 两组区别不大。术后8周时再观察发现实验组支架由骨痂样物质所替代, 对照组内部呈现出淡黄色。第12-16周时实验组支架则逐渐呈现出色泽、质地与正常骨组织无明显区别的骨连接; 对照组表现出支架呈现淡黄色外观, 与软骨组织相似; 而空白对照组两断端虽然早期有一定的骨组织生长延长, 但最终未能完成骨缺损的连接, 中间部分始终由软组织所填充(图1)。

**2.2 各组术后X射线成骨情况** 实验组术后4周时可见缺损区支架材料填充部分有较明显的灰白色高密度影; 术后8周时钙化影较前加深, 与周围软组织区别明显; 术后12周时可见由两断端向中间有少许的骨髓腔再通; 术后16周时

缺损区影像与正常骨组织已无区别, 骨髓腔完成了再通, (图2)。

对照组术后4周时可见支架材料部分有散在的钙化影, 较周围软组织影明显升高, 但整体形态比较模糊; 术后8周时钙化影进一步升高, 但比正常骨组织影低, 整体形态较前期清晰; 术后12-16周的X射线显示骨密度影略低于正常骨组织, 有部分骨髓腔再通(图3)。

空白对照组术后4周时骨缺损两断端都有新生的骨组织向断端中央爬行生长, 但生长的距离很短; 术后8周时两断端的骨钙化影有进一步的升高, 但延长效果并不明显, 空白部分可见软组织影; 术后12-16周两短端的比较显示骨延长的效果已停止, 断端的钙化影升高同正常骨组织一致, 断端各自封闭, 形成了骨不连接(图4)。

**2.3 术后各组病理切片结果及组织学评分** 随着时间的延长, 各组骨缺损均有恢复, 至15周时, 实验组有明显的骨组织生成, 低倍镜下可见骨小梁和较多核深染的长梭形骨细胞, 清晰的骨板平面, 并可见中央管和外围层状排列的骨基质与其中的骨细胞; 高倍镜下可见长梭形的骨细胞(图5A, B)。对照组低倍镜可见部分材料由骨组织所替代修复, 但可见骨细胞周围有不少的软骨细胞, 未见明显的骨小梁或骨板结构, 排列较紊乱; 高倍镜下可见有较多软骨细胞存在(图5C, D)。空白对照组低倍镜下可见较多纤维组织和少量类骨组织; 高倍镜下见圆形深染的肌纤维细胞核, 其形态较骨细胞明显大和空泡状的脂肪细胞(图5E, F)。各组 Lane-Sandhu 组织学评分结果(表1)。

## 3 讨论 Discussion

理想的骨组织工程支架材料应达到以下的要求: ①具有良好机械强度的同时拥有一定的韧性。②与受体具有良好的生物相容性。③支架的内部结构要利于正常组织的再生。④合适的降解速率<sup>[15-18]</sup>。在骨组织工程的各种材料中, 目前主要分为天然高分子材料, 包括胶原、壳聚糖、藻酸盐等; 人工合成的高分子材料, 包括聚乳酸、聚偶磷氮、聚 $\beta$ -羟基丁酸等; 人工合成的无机材料, 包括羟基磷灰石、生物活性玻璃、 $\beta$ -磷酸三钙等。天然高分子材料虽然生物相容性好, 但存在着机械强度不足的问题; 人工合成的高分子材料可以模拟正常骨的无机成分, 但亦导致炎症或异物反应; 人工合成的无机材料具有较好的可塑性、机械强度, 但亲水性差, 降解速度难以控制<sup>[19]</sup>。鉴于单一材料一般难以满足骨组织工程支架的各项要求, 研究人员逐渐开始将材料复合, 综合各种单一材料的优点, 从而达到理想组织工程骨的要求<sup>[20-23]</sup>。

朱凌云等<sup>[24]</sup>将纳米羟基磷灰石、聚磷酸钙、聚乳酸用溶媒浇铸、粒子滤取技术与气体发泡相结合制备骨组织工程支架, 支架呈三维网状结构, 孔径200-400  $\mu\text{m}$ , 具有较好的弹性模量, 显示出了复合材料较单一材料更好的机械强度。肖海军等<sup>[25]</sup>以共沉淀技术制备了纳米羟基磷灰石/羧



图 1 兔桡骨缺损处植入不同材料 16 周后的大体观察

Figure 1 The general observation of rabbit radial defects at 16 weeks after implantation with different materials

图注: ①图中 A 为植入丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石复合支架的实验组; B 为植入丝素/壳聚糖复合支架的对照组; C 为未植入任何材料的空白对照组。②实验组支架呈现出色泽, 质地与正常骨组织无明显区别的骨连接; 对照组表现出支架呈现淡黄色外观, 与软组织相似; 空白对照组两断端虽然早期有一定的骨组织生长延长, 但最终未能完成骨缺损的连接, 中间部分始终由软组织所填充。



图 2 兔桡骨缺损处植入丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石复合支架不同时间点的 X 射线观察

Figure 2 X-ray observation of rabbit radial defects at different time after implantation of silk fibroin/chitosan/nano hydroxyapatite composite scaffolds

图注: ①图中 A-D 为术后 4, 8, 12, 16 周时的 X 射线片情况。②术后 4 周时可见缺损区支架材料填充部分有较明显的灰白色高密度影; 术后 8 周时钙化影较前加深, 与周围软组织区别明显; 术后 12 周时可见由两断端向中间有少许的骨髓腔再通; 术后 16 周时缺损区影像与正常骨组织已无区别, 骨髓腔完成了再通。



图 3 兔桡骨缺损处植入丝素/壳聚糖复合支架后不同时间点的 X 射线观察

Figure 3 X-ray observation of rabbit radial defects at different time after implantation of silk fibroin/chitosan composite scaffolds

图注: ①图中 A-D 为术后 4, 8, 12, 16 周时的 X 射线片情况。②术后 4 周时可见支架材料部分有散在的钙化影, 较周围软组织影明显升高, 但整体形态比较模糊; 术后 8 周时钙化影进一步升高, 但比正常骨组织影低, 整体形态较前期清晰; 术后 12-16 周骨密度影略低于正常骨组织, 有部分骨髓腔再通。



图 4 空白对照组兔桡骨缺损不同时间点的 X 射线观察

Figure 4 X-ray observations of rabbit radial defects with no treatment at different time

图注: ①图中 A-D 为术后 4, 8, 12, 16 周时的 X 射线观察情况。②术后 4 周时骨缺损两断端都有新生的骨组织向断端中央爬行生长, 但生长的距离很短; 术后 8 周时两断端的骨钙化影有进一步的升高, 但延长效果并不明显, 空白部分可见软组织影; 术后 12-16 周两短端的比较显示骨延长的效果已停止, 断端的钙化影升高同正常骨组织一致, 断端各自封闭, 形成了骨不连接。

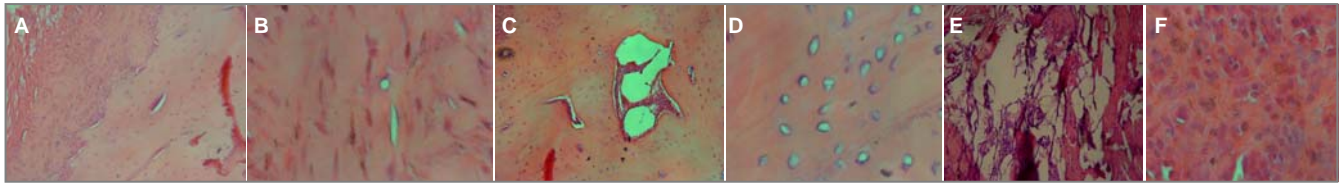


图5 兔桡骨缺损植入不同材料 16 周后的苏木精-伊红染色

Figure 5 Hematoxylin-eosin staining of rabbit radial defects at 16 weeks after implantation with different materials

图注: ①图中 A, B 为丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石复合支架( $\times 100$ ,  $\times 1\ 000$ ), C, D 为丝素/壳聚糖复合支架( $\times 100$ ,  $\times 1\ 000$ ), E, F 为未植入任何物质的对照组( $\times 100$ ,  $\times 1\ 000$ )。②丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石复合支架组有明显的骨组织生成, 低倍镜下可见骨小梁和较多核深染的长梭形骨细胞, 清晰的骨板平面, 并可见中央管和外围层状排列的骨基质与其中的骨细胞; 高倍镜下可见长梭形的骨细胞。③丝素/壳聚糖复合支架组低倍镜下可见部分材料由骨组织所替代修复, 空白但可见骨细胞周围有不少的软骨细胞, 未见明显的骨小梁或骨板结构, 排列较紊乱; 高倍镜下可见有较多软骨细胞存在。④未植入任何物质的对照组, 低倍镜下可见较多纤维组织和少量类骨组织, 高倍镜下见圆形深染的肌纤维细胞核, 其形态较骨细胞明显大和空泡状的脂肪细胞。

表 1 兔桡骨缺损处植入不同材料后的 Lane-Sandhu 组织学评分结果

Table 1 Lane-Sandhu scores in each group after implantation

组别	( $\bar{x} \pm s$ , $n=12$ )			
	4 周	8 周	12 周	16 周
丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石组	6.50 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	8.75 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	9.85 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	10.54 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
丝素/壳聚糖组	3.95 $\pm$ 0.38	5.56 $\pm$ 0.68	7.25 $\pm$ 0.51	8.54 $\pm$ 0.25
空白对照组	2.54 $\pm$ 0.31	3.58 $\pm$ 0.54	4.39 $\pm$ 0.42	6.44 $\pm$ 0.41

表注: 表明丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石复合支架具有良好的骨诱导及成骨作用。与其他组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

甲基壳聚糖/海藻酸钠复合骨水泥, 在体外将其与兔骨髓基质干细胞共培养, 结果发现复合材料在体外实验中具有较好的细胞相容性。叶荣等<sup>[26]</sup>将以静电纺丝技术得到的羧基丁酸-羟基戊酸共聚物三维支架和单一的 $\beta$ -磷酸三钙人工骨用于修复兔胫骨缺损, 结果显示8周之后复合材料显示出了更好的修复能力, 且共聚物复合材料的降解速率更适宜于骨组织修复骨缺损速度。杨耀等<sup>[27]</sup>将丝素蛋白/羟基磷灰石复合支架用于修复兔关节软骨缺损, 取材观察可见软骨缺损修复平整, 厚度均匀, CT显示关节面光滑, 关节间隙正常; 病理切片可见大量软骨细胞填充, 与周围软骨结合紧密, 可见成熟的骨小梁和网状板层, 软骨下骨修复完整, 表明复合材料在体内修复实验中起到了良好的支架效果, 具有良好的生物相容性。复合材料能够结合各种生物材料的优势, 通过调整组成材料的比例和制备技术得到骨组织工程骨所需要属性的支架材料, 达到理想支架材料要求的理化性质, 已成为国内外研究的热点。课题组前期制备的丝素/壳聚糖支架在修复兔膝关节实验中显示出了良好的生物相容性, 但由于骨缺损对支架材料的机械性能有着更高的要求, 所以在此基础之上选择了加入纳米羟基磷灰石<sup>[28-30]</sup>。

实验中所制备的丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石支架材料为三维立体结构, 孔径100-200  $\mu\text{m}$ , 显示出了良好的理化性质。实验中选择兔桡骨中段骨制作骨缺损模型, 造模长度2.0 cm, 均采用桡骨中段皮肤切开, 分离暴露后制作不保留骨膜的全段骨缺损, 均采用同样的手术方式与入路。造模的长度大于兔桡骨骨干4倍直径, 骨缺损程度远超出其自

我修复能力, 同时排除了骨膜的成骨作用, 这使得实验能够充分说明复合支架是否具有成骨性能。在支架植入1周内, 实验组兔并未出现切口红肿、发热的感染征象; 2周后切口愈合良好, 无流脓、渗液等排斥反应发生; 16周后未出现实验组动物无厌食、呕吐等全身反应或死亡。说明了复合支架植入兔体内后并无发生异物排斥反应, 具有良好的生物相容性。在影像学检查中实验组支架随着时间的延长钙化影逐渐升高, 形态规则, 边缘清晰; 16周时已与正常骨组织影像学表现无异, 说明了复合支架具有良好的骨诱导性能和成骨作用。对照组中相应时间点钙化影明显低于实验组, 成骨性能较差, 这可能是由于加入纳米羟基磷灰石的支架中, 为成骨的进行提供了大量的钙、磷离子<sup>[31-32]</sup>。而空白对照组中两断端最终自我封闭, 未能自我修复。在组织学检测中, 实验组在低倍镜下成骨细胞数量明显多于对照组, 且能够发现骨小梁, 骨纤维环等骨组织典型的基本结构, 高倍镜下发现实验组在骨陷窝内有典型的成骨细胞; 而对照组中高倍镜下发现了较多的圆形成软骨细胞, 这在组织学层面证明加入纳米羟基磷灰石的支架具有明显的骨诱导能力。

综上, 丝素/壳聚糖/纳米羟基磷灰石骨组织工程支架在兔桡骨缺损的修复实验中表现出了良好的生物相容性, 骨诱导性和成骨作用, 其降解速度与正常骨组织的再生修复速度一致, 有望成为一种新的骨修复材料, 但其修复骨缺损的具体机制仍需进一步探讨。

**致谢:** 感谢遵义医学院中心实验室的各位老师。

**作者贡献:** 通讯作者、第一作者进行实验的设计, 实验实施为第一、二作者。实验评估为第三作者。资料收集为第四、五作者。第一作者成文, 通讯作者审校。通讯作者、第一作者对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 壳聚糖-是甲壳素脱N-乙酰基的产物, 一般而言, N-乙酰基脱去55%以上的就可称之为壳聚糖, 或者说, 能在1%乙酸或1%盐酸中溶解1%的脱乙酰甲壳素, 这种脱乙酰甲壳素被

称之为壳聚糖。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Puppi D, Chiellini F, Piras AM, et al. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci.* 2010;35:403-440.
- [2] Pan Z, Ding JD. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus.* 2012;2(3):366-377.
- [3] Park SH, Park DS, Shin JW, et al. Scaffolds for bone tissue engineering fabricated from two different materials by the rapid prototyping technique: PCL versus PLGA. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(11):2671-2678.
- [4] Wang Z, Li M, Yu B, et al. Nanocalcium-deficient hydroxyapatite-poly (ε-caprolactone)-polyethylene glycol-poly (ε-caprolactone) composite scaffolds. *Int J Nanomed.* 2012; 7:3123-3131.
- [5] De Santis R, Gloria A, Russo T, et al. A basic approach toward the development of nanocomposite magnetic scaffolds for advanced bonetissue engineering. *J Appl Polym Sci.* 2011; 122(6): 3599-3605.
- [6] Budiraharjo R, Neoh KG, Kang ET. Hydroxyapatite-coated carboxymethyl chitosan scaffolds for promoting osteoblast and stem cell differentiation. *J Colloid Interface Sci.* 2012; 366(1):224-232.
- [7] Alves da Silva ML, Crawford A, Mundy JM, et al. Chitosan/polyester-based scaffolds for cartilage tissue engineering: assessment of extracellular matrix formation. *Acta Biomater.* 2010;6:1149-1157.
- [8] 邓江, 余荣峰, 黄文良, 等. 丝素蛋白/壳聚糖生物支架复合骨髓间质干细胞修复老年兔软骨缺损[J]. *中华老年医学杂志*, 2012, 31(2): 156-160.
- [9] Tiyaboonchai W, Chomchalao P, Pongcharoen S, et al. Preparation and characterization of blended Bombyx mori silk fibroin scaffolds. *Fiber Polym.* 2011; 12:324-333.
- [10] Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31:461-466.
- [11] Lu Q, Zhang X, Hu X, et al. Green Process to Prepare Silk Fibroin/Gelatin Biomaterial Scaffolds. *Macromol Biosci.* 2010; 10:289-298.
- [12] Zhang HF, Zhao CY, Fan HS. Histological and biomechanical study of repairing rabbit radius segmental bone defect with porous titanium. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2011;43(5):724-729.
- [13] Rahimzadeh R, Veshkini A, Sharifi D, et al. Value of color Doppler ultrasonography and radiography for the assessment of the cancellous bone scaffold coated with nano-hydroxyapatite in repair of radial bone in rabbit. *Acta Cir Bras.* 2012;27(2):148-154.
- [14] Hao W, Dong J, Jiang M, et al. Enhanced bone formation in large segmental radial defects by combining adipose-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 2 with nHA/RHLC/PLA scaffold. *Int Orthop.* 2010;34(8):1341-1349.
- [15] Salerno M, Cenni E, Fotia C, et al. Bone-targeted doxorubicin-loaded nanoparticles as a tool for the treatment of skeletal metastases. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(7): 649-659.
- [16] Yewle JN, Puleo DA, Bachas LG. Enhanced affinity bifunctional bisphosphonates for targeted delivery of therapeutic agents to bone. *Bioconjug Chem.* 2011;22(12):2496-2506.
- [17] Kelly DJ, Jacobs CR. The Role of Mechanical Signals in Regulating Chondrogenesis and Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2010;90:75-85.
- [18] Jayasuriya AC, Bhat A. Fabrication and characterization of novel hybrid organic/inorganic microparticles to apply in bone regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93(4):1280-1288.
- [19] Lee JS, Park WY, Cha JK, et al. Periodontal tissue reaction to customized nano-hydroxyapatite block scaffold in one-wall intrabony defect: a histologic study in dogs. *J Periodontal Implant Sci.* 2012;42:50-58.
- [20] Martínez-Vázquez FJ, Perera FH, Miranda P, et al. Improving the compressive strength of bioceramic robocast scaffolds by polymer infiltration. *Acta Biomater.* 2010;6(11):4361-4368.
- [21] Crouzier T, Sailhan F, Becquart P, et al. The performance of BMP-2 loaded TCP/HAP porous ceramics with a polyelectrolyte multilayer film coating. *Biomaterials.* 2011; 32(30): 7543-7554.
- [22] van der Pol U, Mathieu L, Zeiter S, et al. Augmentation of bone defect healing using a new biocomposite scaffold: an in vivo study in sheep. *Acta Biomater.* 2010;6(9):3755-3762.
- [23] Liao F, Chen Y, Li Z, et al. A novel bioactive three-dimensional beta-tricalcium phosphate/chitosan scaffold for periodontal tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(2): 489-496.
- [24] 朱凌云, 王彦平, 石宗利. 纳米羟基磷灰石/聚磷酸钙纤维/聚乳酸骨组织工程复合支架的特性[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(3): 431-433.
- [25] 肖海军, 薛锋, 何志敏. 纳米羟基磷灰石/羧甲基壳聚糖-海藻酸钠复合骨水泥的性能[J]. *中国组织工程研究*, 2011, 15(38): 7113-7117.
- [26] 叶荣, 张晓峰, 严怀宁. 羟基丁酸-羟基戊酸纳米纤维材料修复胫骨缺损[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(34):6284-6288.
- [27] 杨耀, 徐卫袁, 张亚. 丝素蛋白/羟基磷灰石材料复合骨髓间充质干细胞构建组织工程化软骨[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(29):5339-5342.
- [28] Marelli B, Ghezzi CE, Mohn D. Accelerated mineralization of dense collagen-nano bioactive glass hybrid gels increases scaffold stiffness and regulates osteoblastic function. *Biomaterials.* 2011;32(34):8915-8926.
- [29] Lao LH, Wang YJ, Zhu Y, et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;22(8):4374-4378.
- [30] Sun F, Zhou H, Lee J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. *Acta Biomater.* 2011;7(11):3813-3828.
- [31] Zhou H, Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2011;7(7):2769-2781.
- [32] Zhang CY, Lu H, Zhuang Z, et al. Nano-hydroxyapatite/poly (L-lactic acid) composite synthesized by a modified in situ precipitation: preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(12):3077-3083.