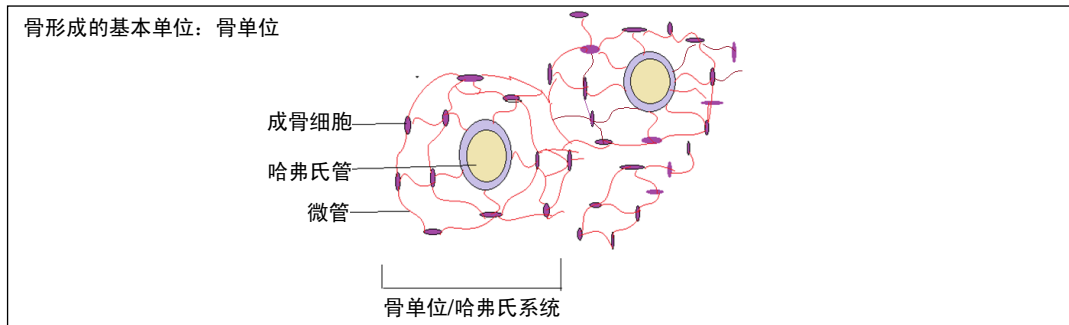


负载抗生素的纳米三维支架修复大段骨缺损

叶鹏^{1,2}, 黄文良³, 邓江³, 邓崇第¹, 张天喜¹, 喻安永¹, 余斌² (1遵义医学院附属医院急救创伤病区, 贵州省遵义市 563003; 2南方医科大学南方医院创伤骨科, 广东省广州市 510515; 3遵义医学院第三附属医院创伤骨科, 贵州省遵义市 563003)
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0966 ORCID: 0000-0002-4476-7604(叶鹏)

文章快速阅读:



叶鹏, 男, 1988年生, 贵州省遵义市人, 汉族, 遵义医学院附属医院急救创伤病区, 南方医科大学在读博士, 主要从事骨关节创伤方面的研究。

通讯作者: 喻安永, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 遵义医学院附属医院急救创伤病区, 贵州省遵义市 563003

通讯作者: 余斌, 教授, 主任医师, 博士生导师, 南方医科大学南方医院创伤骨科, 广东省广州市 510515

中图分类号: R318

文献标识码: A

稿件接受: 2018-04-12



Ye Peng, Doctoral candidate, Emergency Trauma Ward, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China; Department of Orthopedic Trauma, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Corresponding author: Yu An-yong, Professor, Chief physician, Master's supervisor, Emergency Trauma Ward, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Corresponding author: Yu Bin, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Orthopedic Trauma, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

文题释义:

纳米羟基磷灰石: 是人体和动物骨骼的主要无机成分, 它能与机体组织在界面上实现化学键性结合, 其在体内有一定的溶解度, 能释放对机体无害的离子, 能参与体内代谢, 对骨质增生有刺激或诱导作用, 能促进缺损组织的修复。

骨单位: 又称哈佛氏系统, 是长骨骨干的主要结构单位, 位于内、外环骨板之间, 数量多。骨单位的中轴为一条纵行的小管, 称中央管, 在中央管的周围有 10-20 层同心圆排列的骨板。

摘要

背景: 前期研究证明利用壳聚糖、丝素蛋白、纳米羟基磷灰石可以制备出具有一定机械性能的纳米三维支架材料。

目的: 在前期研究基础上, 将左氧氟沙星负载于丝素蛋白/壳聚糖/纳米羟基磷灰石三维支架上, 观察其对开放性长骨骨干骨缺损的抗感染及修复效果。

方法: 将 36 只新西兰大白兔随机分 3 组, 每组 12 只。3 组均于右侧桡骨中段建立长 2.0 cm 骨缺损, 实验组植入负载抗生素的纳米三维支架材料, 对照组植入纳米三维支架材料, 空白组未植入任何材料, 植入后 4 个月, 进行骨缺损区 X 射线及组织学检查。

结果与结论: ①植入后 1 个月, 实验组伤口无局部感染化脓, 对照组、空白组均出现了局部软组织炎症反应甚至死亡; ②植入后 4 个月, 实验组骨组织影像学表现与正常骨组织无明显区别, 支架完全由正常骨组织替代, 有骨髓腔再通; 对照组可见骨痂生长, 骨质密度低于实验组, 未见骨髓腔再通; 空白组支架断端已封闭, 停止生长, 骨折不愈合; ③苏木精-伊红染色显示, 实验组可见成骨细胞成群排列在基质中, 细胞形态良好; 对照组可见骨细胞、骨基质, 还可见新生毛细血管, 处于骨髓腔再通早期; 空白组可见纤维结缔组织及肌纤维组织生长; 实验组 Lane-Sandhu 组织学评分高于对照组、空白组 ($P < 0.05$); ④结果表明, 负载抗生素的丝素蛋白/壳聚糖/纳米羟基磷灰石三维支架在兔桡骨大段骨缺损修复中显示出了良好的抗感染能力、骨支架及骨诱导作用。

关键词:

纳米三维支架; 左氧氟沙星; 骨组织工程; 纳米羟基磷灰石; 骨感染; 生物材料

主题词:

抗菌药; 氧氟沙星; 羟基磷灰石类; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金(H0606)地区科学基金项目: SF/CS/nHA 仿生支架结合骨软骨镶嵌移植术和 PRP 对大面积骨软骨缺损修复的研究; 国家自然科学基金(A226)地区科学基金项目: 脾源性炎症反应介导的小胶质细胞活化在创伤性脑水肿形成中的作用及机制; 贵州省省长基金项目[2011(25)]: 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

A three-dimensional nano-scaffold carrying antibiotics for large-segmental bone defects

Ye Peng^{1,2}, Huang Wen-liang³, Deng Jiang³, Deng Chong-di¹, Zhang Tian-xi¹, Yu An-yong¹, Yu Bin² (1Emergency Trauma Ward, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China; 2Department of Orthopedic Trauma, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; 3Department of Orthopedic Trauma, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have shown that a three-dimensional nano-scaffold with mechanical performance can be prepared using silk fibroin (SF), chitosan (CS), and nanohydroxyapatite (n-HA).

OBJECTIVE: To explore the anti-infection and repair ability of the SF/CS/n-HA three-dimensional scaffold loaded with levofloxacin for the treatment of open long bone defects.

METHODS: Thirty-six New Zealand white rabbits were randomized into three groups ($n=12$ per group). An animal model of 2.0 cm bone defect in the right middle humerus was made in each rabbit, followed by implantation of SF/CS/n-HA three-dimensional scaffold loaded with levofloxacin in experimental group, three-dimensional nano-scaffold in control group and nothing in blank control group. X-ray and histological observations of the bone defect region were performed at 4 months after implantation.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) No infection or suppuration occurred in the experimental group at 1 month after implantation, but inflammatory reactions and even death happened in the control and blank control groups. (2) In the experimental group, imaging findings of the defected long bone showed no distinct difference from the normal bone tissues at 4 months after implantation. The scaffold in the experimental group was completely replaced by normal bone tissue accompanied by the recanalization of the bone marrow cavity. The control group showed bone callus growth, but the bone density was lower than that in the experimental group, and moreover, there was no recanalization of the medullary cavity. The blank control group exhibited closed ends of the scaffold, terminated growth of bone tissue, and fracture nonunion. (3) Hematoxylin-eosin staining results revealed that: in the experimental group, osteoblasts in the matrix arranged in clusters with good cell morphology; in the control group, there were bone cells, bone matrix, and new capillaries, and the medullary cavity of the fractured bone achieved recanalization; in the blank group, fibrous connective tissues and muscle fiber tissues were seen. The histological Lane-Sandhu score in the experimental group was significantly higher than that in the control and blank groups ($P < 0.05$). Overall findings suggest that the SF/CS/n-HA three-dimensional scaffold loaded with antibiotics is an excellent bone scaffold with good anti-infection and osteoinduction.

Subject headings: Anti-Bacterial Agents; Ofloxacin; Hydroxyapatites; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. H0606, A226; the Governor Foundation of Guizhou Province, No. 2011(25)

0 引言 Introduction

随着中国道路交通的飞速发展及汽车数量的猛增, 伴随而来的是以多发交通事故为主的安全隐患, 这种类型的创伤主要表现为四肢严重的开放性粉碎性骨折及软组织挫裂伤, 或合并脑、心脏、肝脏、脾脏及肾脏等重要脏器损伤, 严重威胁着患者的生命, 不恰当的处理将导致残疾甚至死亡, 对于创伤外科医生来说无疑是重大难题^[1-2]。

临床上治疗骨缺损主要包括自体骨移植及同种异体骨移植。自体骨移植是骨移植治疗的金标准, 但该治疗需从患者自身髂骨取骨, 需二次手术, 既加重患者痛苦及负担, 又延长手术时间及增加罹患术后并发症的风险。同种异体骨虽避免二次手术, 但具有免疫排斥反应和传播疾病的风险。其他常用的治疗方法包括骨牵引延长、骨水泥、骨形态发生蛋白的应用。治疗方法虽多, 却没有一种治疗方法具备所有理想的优点, 如高成骨诱导性、血管组织再生能力、生物安全性好、低毒性、无使用部位限制、手术容易获得、保质期长、价格合理等^[3-4]。

骨组织工程形成于30年前, 致力于研究治疗骨缺损的骨替代材料方案, 经历数十年的发展, 越来越多的研究成果在世界范围内发表。传统的骨组织工程突出了骨替代材料的几个关键要素: 具有细胞外基质微生物环境的生物相容性好的支架; 成骨能力强; 细胞外因子刺激细胞向所需方向分化; 具有血管再生条件, 为组织生长提供丰富的营养和代谢渠道^[5-6]。

此次研究在前期使用壳聚糖、纳米羟基磷灰石及丝素蛋白制备具有良好机械性能的三维复合支架的基础上负载抗生素, 将其运用于兔桡骨干骨缺损的修复, 并从宏观、微观、影像学及病理学方面探讨其抗感染及成骨能力, 以期获得一种既局部抗感染能力又能够充当骨组织替代物的新型组织工程骨^[7]。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组体内动物对照实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年5月至2017年9月在遵义市骨科研究所、遵义医学院中心实验室及遵义医学院动物实验中心完成。

1.3 材料

实验动物: 健康2月龄新西兰大白兔36只, 体质量(3.5 ± 0.5) kg, 雌雄不拘, 由遵义医学院动物实验中心提供。将36只兔随机分为实验组、对照组及空白组, 每组12只。

实验主要材料、试剂及仪器: 纳米羟基磷灰石(南京埃普瑞纳米材料有限公司); 丝素蛋白(苏州丝美特生物技术有限公司); 壳聚糖(山东昌瑞生物科技有限公司); 碳化二亚胺(Carbodiimide, EDC)、N-羟基硫代琥珀酰亚胺(N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt, NHS)(上海共价化学科技有限公司); 倒置显微镜(日本Nikon公司); 10%的水合氯醛(遵义医学院附属医院中心药房配制); 左氧氟沙星、5 mL : 0.1 g盐酸利多卡因(遵义医学院附属医院中心药房)。

1.4 实验方法

1.4.1 负载抗生素支架的制备 将壳聚糖溶于2%冰醋酸, 丝素蛋白、纳米羟基磷灰石分别配置成2%的溶液, 将上述液体按体积比1 : 1 : 1比例混合后, 在C-MAG HS4中磁力加热, 在搅拌器中恒温以55 °C搅拌直至3种液体混合均匀, 然后将其注入9孔塑料模板并密封, 放入-80 °C冰箱冷冻48 h。将冷冻好的支架取出, 用封口膜迅速密封, 并在支架区域的封口膜上制作细孔, 然后放入真空干燥机抽吸72 h, 再将支架浸入含有体积分数75%甲醇和1 mol/L氢氧化钠的混合液中预处理15 h, 取出后用超纯水反复洗净, 再次冷冻及真空干燥。将所得支架放入含有EDC及NHS的交联剂中浸泡10 h, 取出后用超纯水洗净, 再次冷



图 1 术后 1 周各组兔伤口愈合情况
Figure 1 Wound healing in rabbits at 1 week after implantation
 图注: 图中 A 为实验组, 皮肤愈合, 周围毛发生长; B 为对照组, 皮肤局部有红肿; C 为空白组, 局部皮肤生长, 但较实验组差。



图 2 植入后 1 个月各组桡骨缺损部位 X 射线检查结果
Figure 2 Radiological imaging results of the radial bone defect region at 1 month after implantation
 图注: 图中 A 为实验组, 可见骨缺损处白色高密度区域, 为支架所在部位; B 为对照组, 骨缺损区域也有部分密度增高区域, 为支架所在部位; C 为空白组, 骨缺损区域未显影。



图 3 植入后 2 个月各组桡骨缺损部位 X 射线检查结果
Figure 3 Radiological imaging results of the radial bone defect region at 2 months after implantation
 图注: 图中 A 为实验组, B 为对照组, C 为空白组。实验组及对照组支架显影更为明显; 空白组骨缺损区内无影像学改变, 骨折断端有高密度影的延长, 以近端增加为明显。



图 4 植入后 3 个月各组桡骨缺损部位 X 射线检查结果
Figure 4 Radiological imaging results of the radial bone defect region at 3 months after implantation
 图注: 图中 A 为实验组, 骨缺损区域高密度影明显, 其缺损区域高密度影甚至较正常骨组织密度影高; B 为对照组, 骨缺损区高密度影进一步增强; C 为空白组, 骨折断端高密度影进一步增加, 但中间区域仍为低密度影。

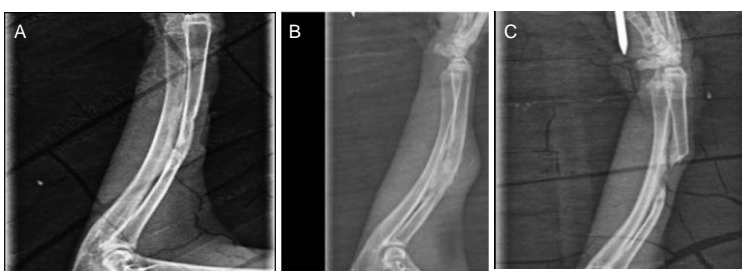


图 5 植入后 4 个月各组桡骨缺损部位 X 射线检查结果
Figure 5 Radiological imaging results of the radial bone defect region at 4 months after implantation
 图注: 图中 A 为实验组, 骨组织影像学表现与正常骨组织无明显区别, 支架完全由正常骨组织替代, 骨髓腔再通; B 为对照组, 开始髓腔再通过程, 但其程度小于实验组; C 为空白组, 支架断端已封闭, 停止生长, 骨折不愈合。

表 2 各组植入后不同时间段桡骨缺损处 Lane-Sandhu 组织学评分
 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 2 Lane-Sandhu histological scores of the radial bone defect region at different time after implantation

| 组别 | 植入后 1 个月 | 植入后 2 个月 | 植入后 3 个月 | 植入后 4 个月 |
|-----|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 实验组 | 6.60±0.55 ^a | 8.67±0.65 ^a | 10.81±0.43 ^a | 12.21±0.32 ^a |
| 对照组 | 6.00±0.46 | 8.45±0.49 | 9.86±0.26 | 10.61±0.53 |
| 空白组 | 2.55±0.36 | 3.65±0.44 | 4.56±0.46 | 6.87±0.38 |

表注: 与对照组及空白组比较, ^a $P < 0.05$ 。

冻及真空干燥, 然后将支架浸入等体积的左氧氟沙星溶液中浸泡 24 h, 取出后再次冷冻及真空干燥, 最终获得负载抗生素的丝素蛋白/壳聚糖/纳米羟基磷灰石 (silk fibroin/chitosan/nano-hydroxyapatite, SF/CS/nHA) 三维复合支架^[8]。

1.4.2 动物模型的建立 取 36 只大白兔, 以 10% 水合氯醛按 1 mL/kg 剂量腹腔注射麻醉, 待大白兔出现昏迷后, 妥善固定四肢, 充分暴露上肢, 行术区备皮后常规消毒铺巾, 以右侧前臂背侧桡骨中点为中心取 2.5 cm 切口, 钝性分离

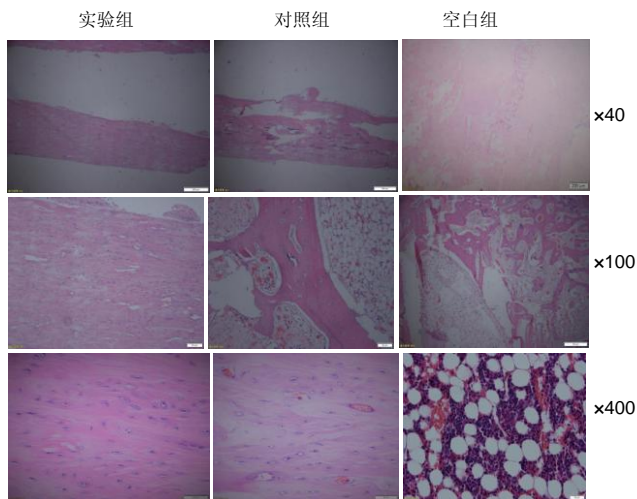


图6 植入后4个月各组桡骨缺损处病理观察结果(苏木精-伊红染色)
Figure 6 Histological observation of the radial bone defect region at 4 months after implantation (hematoxylin-eosin staining)

图注: 实验组可见成骨细胞成群排列在基质中, 细胞形态良好; 对照组可见骨细胞、骨基质, 还可见新生毛细血管, 处于骨髓腔再通早期; 空白组可见纤维结缔组织及肌纤维组织生长。

皮下及肌肉组织, 术中动作轻柔, 避免损伤血管及神经组织, 充分暴露桡骨后用无菌大力剪制备长约2.0 cm的大段骨缺损, 实验组植入负载抗生素的三维复合支架, 对照组植入无抗生素的三维复合支架, 空白组未植入任何材料, 然后消毒并缝合皮肤切口, 待麻醉苏醒后送回饲养房单笼饲养^[9]。各组动物模型的建立均由作者完成, 避免由手术因素造成的偏倚。

1.4.3 影像学及病理检测 植入后1, 2, 3, 4个月, 各组每个时间点分别取3只进行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、活动及切口愈合情况, 并进行桡骨正位X射线摄片检查, 观察有无骨痂及其生长情况, 以及支架被骨组织替代的情况。大体观察植入物在体内修复骨缺损的情况、与周围组织的关系及支架吸收程度。

病理学检查: 取桡骨缺损部分标本制作成病理切片, 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、脱钙及制作成4 μm厚切片, 切片经过二甲苯脱蜡、各级乙醇脱水后风干, 分别进行苏木精-伊红染色, 然后再脱水、透明、封固, 然后在倒置显微镜下观察, 并进行Lane-Sandhu 组织学评分(表1)。

表1 Lane-Sandhu 组织学评分标准

Table 1 Lane-Sandhu histological scoring

| 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 |

1.5 主要观察指标 术后各组动物切口愈合情况; 植入后1-4个月, 各组骨缺损部位影像学评估及病理组织学检查结果。

1.6 统计学分析 所得数据采用SPSS 17.0统计软件进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本t检验, 多组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 36只兔术后均存活, 进食正常, 均进入结果分析。

2.2 各组术后皮肤愈合情况 术后1周, 实验组兔手术切口皮肤完全愈合, 周围开始生长新的兔毛; 对照组皮肤尚未愈合; 空白组皮肤尚未完全愈合。术后1个月内, 实验组动物无死亡, 切口无感染; 对照组、空白组分别有3只、1只死亡, 并伴有切口感染(图1)。

2.3 各组植入后不同时间点X射线检查结果 植入后1个月, 各组骨缺损的两断端边缘有少许新生骨生长, 实验组可见骨缺损处白色高密度区域, 为支架所在部位; 对照组可见骨缺损区域也有部分密度增高区域, 为支架所在部位; 空白组骨缺损区域未显影, 见图2。

植入后2个月, 实验组及对照组骨缺损区域高密度影较植入后1个月增强, 支架显影更为明显; 空白组骨缺损区内无影像学改变, 骨折断端有高密度影的延长, 以近端增加为明显, 见图3。

植入后3个月, 实验组骨缺损区域高密度影明显, 其缺损区域高密度影甚至较正常骨组织密度影高; 对照组骨缺损区高密度影进一步增强; 空白组骨断端高密度影进一步增加, 但中间区域仍为低密度影, 见图4。

植入后4个月, 实验组骨组织影像学表现与正常骨组织无明显区别, 支架完全由正常骨组织替代, 骨髓腔再通; 对照组开始髓腔再通, 但程度小于实验组; 空白组支架断端已封闭, 停止生长, 骨折不愈合, 见图5。

2.4 各组植入后病理学检查结果 植入后1个月, 实验组可见沿支架表面向内部生长的骨组织或软骨组织, 支架内部不被染色; 对照组亦见到部分骨组织生长, 但可见巨噬细胞等炎性细胞浸润; 空白组中心区域由周围肌肉或纤维组织包裹, 说明了实验组抗生素的释放阻止了感染的发生, 而对照组感染后炎症期延长, 这可能是导致两组生长差别的原因(抗感染效果主要在植入后1个月内)。植入后2个月, 实验组支架进一步被骨组织代替, 但中心部位仍未完全被骨组织替代; 对照组支架周围开始出现骨组织生长; 空白组断端部位为骨组织替代, 中心部位为肌肉组织或纤维组织。植入后3个月, 实验组支架完全由骨组织代替; 对照组骨组织生长进一步增强, 而中心部位仍为支架; 空白组仍为肌肉或纤维组织替代。

植入后4个月: ①40倍显微镜下: 实验组染色均匀, 形态良好, 可见骨基质和散布其中的骨单元; 对照组大部分区域有骨组织生成; 空白组染色效果不佳, 未见正常骨组织为纤维组织替代; ②100倍显微镜下: 可以观察到实验组由密度染色均匀的红色细胞质和蓝色细胞核成分; 对

照组可见部分骨组织和脂肪组织;空白组可见形态不规则的软组织,软组织中间夹着部分骨组织;③400倍显微镜下:实验组可见成骨细胞成群的排列在基质中,细胞形态良好;对照组可见骨细胞、骨基质,还可见到新生的毛细血管;空白组可见纤维结缔组织及肌纤维组织生长,见图6。

2.5 各组植入后不同时间点Lane-Sandhu组织学评分随着植入时间的延长,各组Lane-Sandhu组织学评分逐渐升高,实验组植入后不同时间点的组织学评分均高于对照组和空白组,见表2。

3 讨论 Discussion

世界范围内的骨病、骨缺损修复呈现上升的趋势,特别以人口稠密合并老龄化、肥胖及缺乏体育锻炼的地区明显^[10-11]。为了构建具有再生和修复能力的支架材料,需对骨的生物力学、骨形成及其发生发展的变化过程进行了解。目前,应用骨组织工程材料修复骨缺损被认为是一种新的治疗方法,其在骨缺损修复过程中起到支撑及过渡作用,最终由自身骨组织生长所替代,达到再生的目的。骨组织功能广泛,是人体运动时承受压力的支撑装置,也是人体机能活动的体现,保护着内脏器官^[11-12]。

多数学者对单一材料的骨支架进行了大量研究。此次实验选择了壳聚糖、丝素蛋白及纳米羟基磷灰石作为原材料,应用各自不同的生物力学特点使修复效果更佳,目前被广泛应用于临床和基础研究中。壳聚糖在自然界中存在广泛,易于获得,原材料价格低廉且具有良好的生物相容性,使其成为骨支架材料的良好选择。蒋科等^[13]将其溶于2%醋酸后,通过戊二醛交联制作了壳聚糖微球,加入了转化生长因子 $\beta 3$ 制成了负载转化生长因子的支架,该支架空隙直径在180 μm 左右,水结合能力125%,物理特性稳定且不会出现溶解变形变性。赵建忠等^[14-15]在壳聚糖冰醋酸溶液中加入明胶,利用戊二醛进行交联获得壳聚糖支架材料,与人胃癌细胞BCG-823进行共培养后发现,细胞增殖曲线不受其影响,表明壳聚糖支架具有良好的细胞相容性。

丝素蛋白是由甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸以高度重叠的多肽组成的高分子材料,其在体内可降解,已广泛用于临床如手术缝线中,其蛋白构象可为曲柄形和反平行 β 折叠,使其具有良好的稳定性。王恺等^[16-19]将蚕丝融化于溴化锂溶液中,结合透析过滤得到浓缩的丝素纳米微球,然后通过冷冻干燥技术获得含有血管内皮生长因子的纳米微球,最后通过静电纺丝技术制得纤维薄膜,扫描电镜和透射电子显微镜下观察发现,纤维薄膜内部和表面均具有纳米颗粒,体外具有缓释血管内皮生长因子的作用。

纳米羟基磷灰石是一种天然的磷灰石矿物,50%-70%人类骨组织中的矿物质由纳米羟基磷灰石组成,很多目前的内植物材料都含有纳米羟基磷灰石,包括髌关节置换材料、牙体替代材料和骨诱导材料。李斯等^[20-21]以纳米羟基磷灰石作为原材料制作了支架,通过低于8%的戊二醛交联使其具有三维结构,纳米羟基磷灰石支架的直径为150-400 μm ,孔隙率为(80.6 \pm 4.1)%,将细胞接种在支架

上后发现,细胞在支架中黏附良好,吸光度分析表明细胞毒性为轻度,随着时间的延长碱性磷酸酶活性升高。荣子杰等^[22-24]将纳米羟基磷灰石支架用于兔股骨髁骨缺损修复中,也显示了良好的生物相容性。但单一的羟基磷灰石材料存在着一些缺陷,比如低生物降解性、不能刺激新生骨组织生长及低抗疲劳能力等。由于单一材料的局限性,越来越多的学者试着将不同特点的材料通过物理或生物化学形式结合起来,组成一定功能的复合材料。李海建等^[25-28]将纳米羟基磷灰石/ β -磷酸三钙复合支架与同种异体骨进行了生物相容性对比,研究将兔脂肪干细胞接种在支架上,培养3, 7, 11 d后进行扫描电镜、碱性磷酸酶活性检测,结果显示两种支架上均有多样细胞黏附,人工合成支架材料和同种异体骨材料有着相同的生物相容性。

此次课题将负载抗生素的新型三维骨组织工程支架应用于兔桡骨大段骨缺损修复,进行切口观察、影像学及病理学检查,结果显示实验组术后伤口无局部感染化脓,而对照组、空白组均出现了局部软组织炎症反应甚至死亡,表明实验组抗感染效果优于对照组及空白组;局部感染也可影响成骨作用。植入后1个月,影像学检查各组可见长约2.0 cm骨缺损存在,骨缺损两断裂边缘有少许新生骨成长,实验组及对照组可见骨缺损中间的高密度区域,为支架所在部位,表明支架已开始骨化过程;空白组骨缺损区域为软组织生长;说明实验组及对照组均有一定程度的骨组织替代支架后再生现象,但大体观察两组之间无明显区别,空白组骨缺损区域无骨组织再生。植入后2个月,实验组及对照组骨缺损区域的高密度影较植入后1个月增多,支架显影更为明显;空白组骨缺损区域内无影像学改变,但骨断端有高密度影的延长,以近端增加为明显;表明随着时间的延长,实验组、对照组支架进一步被骨组织所替代,实验组的效果优于对照组,而空白组骨缺损区域无新生骨组织的形成,骨断端有骨生长迹象。植入后3个月,实验组骨缺损区域高密度影明显,且密度高于正常骨组织,表明支架基本被骨组织替代,而正常骨有骨髓腔的存在,所以表现出密度差异;对照组骨缺损区域的高密度影也进一步增强,但密度较实验组低,表明实验组成骨效果较对照组好;空白组骨缺损区域两断端高密度影较前增多,但中间区域仍为低密度影,表明骨断端组织具有生长能力,有自我修复作用,但超过一定的限度则不能完全修复骨缺损;此次实验采用的2.0 cm骨缺损长度大于其自身修复能力,实验长度选择合理。植入后4个月,实验组骨组织影像学表现与正常骨组织已无明显区别,支架完全由正常骨组织替代,有骨髓腔再通;对照组处于骨髓腔再通的早期;空白组支架断端封闭,停止生长,骨折不愈合。植入后4个月病理学检查显示,实验组可见成骨细胞在基质中成群排列,细胞形态良好;对照组也可见骨细胞、骨基质,但较实验组成骨效果差;空白组可见纤维结缔组织及肌纤维组织生长;实验组各时间点组织学评分高于对照组和空白组,表明负载抗生素的支架植入后各时间点的成骨效果优于普通支架,这可能是由于术后早期抑制局部炎症反应的结果,且术后实验组动物未发生任何感染、坏死^[29-30]。

综上, 负载抗生素后的三维骨组织工程支架在兔桡骨大段骨缺损修复中显示出了良好的抗感染能力, 同时具有良好的骨支架及骨诱导作用, 可能成为一种新的创伤骨缺损修复材料。

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, 资料收集为第四作者, 第一作者成文, 通讯作者审核。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(H0606)地区科学基金”、“国家自然科学基金(A226)地区科学基金”、“贵州省省长基金[2011(25)]”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道, 不存在利益冲突。

伦理问题: 实验方案经遵义医学院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 81660367。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Jing ZW, Ma ZW, Li C, et al. Chitosan cross-linked with poly (ethylene glycol) dialdehyde via reductive amination as effective controlled release carriers for oral protein drug delivery. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27(4):1003-1006.
- [2] Braz L, Grenha A, Ferreira D, et al. Chitosan/sulfated locust bean gum nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation towards an application in oral immunization. *Int J Biol Macromol*. 2017;96:786-797.
- [3] Banerjee SL, Khamrai M, Sarkar K, et al. Modified chitosan encapsulated core-shell Ag Nps for superior antimicrobial and anticancer activity. *Int J Biol Macromol*. 2016;85:157-167.
- [4] Song K, Li L, Li W, et al. Three-dimensional dynamic fabrication of engineered cartilage based on chitosan/gelatin hybrid hydrogel scaffold in a spinner flask with a special designed steel frame. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;55:384-392.
- [5] Aznar-Cervantes S, Martinez JG, Bernabeu-Esclapez A, et al. Fabrication of electrospun silk fibroin scaffolds coated with graphene oxide and reduced graphene for applications in biomedicine. *Bioelectrochemistry*. 2016;108:36-45.
- [6] Choudhury AJ, Gogoi D, Kandimalla R, et al. Penicillin impregnation on oxygen plasma surface functionalized chitosan/Antheraea assama silk fibroin: Studies of antibacterial activity and antithrombogenic property. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;60:475-484.
- [7] Srisawasdi T, Petcharoen K, Tetteh G, et al. Electromechanical response of silk fibroin hydrogel and conductive polycarbazole/silk fibroin hydrogel composites as actuator material. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;56:1-8.
- [8] Kim SM, Jo JH, Lee SM, et al. Hydroxyapatite-coated magnesium implants with improved in vitro and in vivo biocorrosion, biocompatibility, and bone response. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(2):429-441.
- [9] Mallik PK, Basu B. Better early osteogenesis of electroconductive hydroxyapatite-calcium titanate composites in a rabbit animal model. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(3):842-851.
- [10] Rabiee SM, Ravarian R, Mehmanchi M, et al. Effect of alumina on microstructure and compressive strength of a porous silicated hydroxyapatite. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2014;12(2):102-106.
- [11] Yin P, Feng FF, Lei T, et al. Osteoblastic cell response on biphasic fluorhydroxyapatite/strontium-substituted hydroxyapatite coatings. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(3):621-627.
- [12] Deplaine H, Lebourg M, Ripalda P, et al. Biomimetic hydroxyapatite coating on pore walls improves osteointegration of poly(L-lactic acid) scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(1):173-186.
- [13] 蒋科, 熊雁, 余江, 等. 负载转化生长因子 β 3微球的壳聚糖三维支架的制备[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(10):988-991.
- [14] 赵建忠, 张广程, 狄东华, 等. 壳聚糖支架与BGC-823细胞的体外生物相容性研究[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(11):856-858.
- [15] 康献刚, 赵智远, 吴旭芝, 等. 壳聚糖-同种异体骨粉复合多孔支架修复大鼠骨缺损的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2016, 30(3):298-302.
- [16] Inci I, Kirsebom H, Galaev IY, et al. Gelatin cryogels crosslinked with oxidized dextran and containing freshly formed hydroxyapatite as potential bone tissue-engineering scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7(7):584-588.
- [17] 王恺, 马绍扬, 张钧. 利用装载内皮细胞生长因子的丝素纳米球制备具有生物活性的电纺支架材料[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2016, 49(6):80-85.
- [18] 张家庆. 等离子体磺酸化丝素蛋白膜膨体聚四氟乙烯复合小口径人工血管的体内实验研究[D]. 南方医科大学, 2016.
- [19] 曾超, 朱美峰, 徐宝山, 等. 丝素蛋白多孔支架与兔髓核细胞生物相容性研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2013, 21(23):2402-2407.
- [20] Xing ZC, Han SJ, Shin YS, et al. Enhanced osteoblast responses to poly(methyl methacrylate)/hydroxyapatite electrospun nanocomposites for bone tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2013;24(1):61-76.
- [21] 李斯, 胡晓文. 纳米羟基磷灰石/明胶仿生复合材料的制备及其细胞相容性[J]. 中南大学学报(医学版), 2014, 39(9):949-958.
- [22] Lambert F, Lecloux G, Léonard A, et al. Bone regeneration using porous titanium particles versus bovine hydroxyapatite: a sinus lift study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013;15(3):412-426.
- [23] 王大平, 熊建义, 朱伟民, 等. 纳米羟基磷灰石人工骨在骨缺损修复中的临床应用研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2014, 32(2):206-209.
- [24] 柴子杰, 杨联军, 张赞杰, 等. 载ADM-PLGA微球的纳米羟基磷灰石/胶原支架修复兔骨缺损的实验研究[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(22):3559-3562.
- [25] Khajuria DK, Zahra SF, Razdan R. Effect of locally administered novel biodegradable chitosan based risedronate/ zinc-hydroxyapatite intra-pocket dental film on alveolar bone density in rat model of periodontitis. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2018;29(1):74-91.
- [26] 李海建, 龙志成, 张峥, 等. HA/ β -TCA复合材料与同种异体骨体外脂肪干细胞生物相容性的对比实验[J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38(8):949-953.
- [27] 金光辉, 张馨雯, 孙晓飞, 等. 组织工程化纳米羟基磷灰石/聚己内酯人工骨支架修复兔桡骨大段骨缺损的实验研究[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2015, 10(1):43-49.
- [28] 朱文赫, 钟秀宏, 张巍, 等. 鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料对家兔下颌骨缺损愈合的促进作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2017, 43(3):527-531.
- [29] Nazeer MA, Yilgör E, Yilgör I. Intercalated chitosan/ hydroxyapatite nanocomposites: Promising materials for bone tissue engineering applications. *Carbohydr Polym*. 2017;175:38-46.
- [30] Przekora A, Ginalska G. Chitosan/ β -1,3-glucan/hydroxyapatite bone scaffold enhances osteogenic differentiation through TNF- α -mediated mechanism. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;73:225-233.