

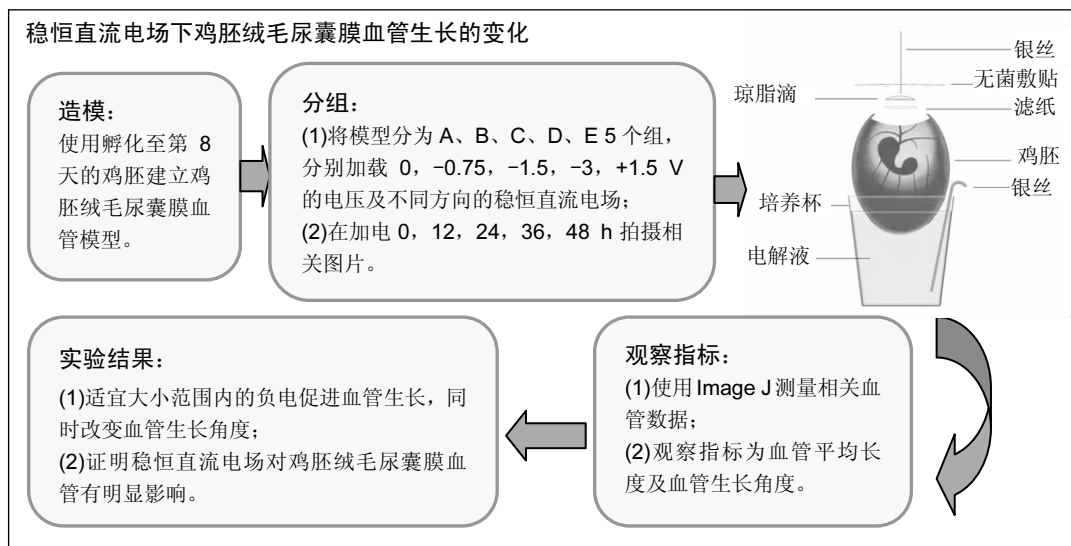
稳恒直流电场对鸡胚绒毛尿囊膜血管生长的影响

张馨月¹, 李晨军^{1, 2}, 李 焰², 任凯歌¹, 潘 莲¹, 陈俊驰¹(¹西南医科大学附属口腔医院, 四川省泸州市 646000; ²解放军成都军区总医院附属口腔医院, 四川省成都市 610000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0377

ORCID: 0000-0001-5589-5276(张馨月)

文章快速阅读:



张馨月, 女, 1991 年生, 山西省运城市人, 汉族, 2017 年西南医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事口腔医学方面的研究。

通讯作者: 李晨军, 西南医科大学附属口腔医院, 四川省泸州市 646000; 解放军成都军区总医院附属口腔医院, 四川省成都市 610000

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2018-02-06



文题释义:

稳恒直流电场: 研究发现自发的稳恒直流电场通过调控细胞行为, 可控制上皮细胞的细胞分裂和迁移, 加快上皮愈合, 刺激神经向伤口内生长, 刺激血管内皮生长因子的表达, 增加其分泌量, 同时血管内皮细胞向伤口趋电迁移, 损伤处出现血管发芽再生, 促进伤口血液供给, 加快愈合速率。在骨缺损中, 稳恒直流电场同样能发挥促进骨缺损愈合的作用。

组织工程骨植入体内的营养供应: 目前限制组织工程骨应用于临床的问题中最棘手的是植入体内的营养供应问题。植入体内的组织工程骨主要由血液-细胞间液完成营养供应, 此种方式营养供应极其有限, 同时新生血管长入缓慢, 容易发生植入的变性坏死, 一旦发生此类情况就意味着植入失败, 同时会给患者带来严重伤害。所以组织工程骨的快速血管化问题是植入成功与否的关键问题。

摘要

背景: 组织工程骨因其微创、安全、精确的特性, 已成为恢复颌面部骨缺损及牙周组织的重要手段。

目的: 以鸡胚绒毛尿囊膜血管为模型, 加载不同强度电场, 检验血管生长相关参数, 研究电场对组织工程骨预血管化的作用, 以期得到促进组织工程骨预血管化的方法, 增加缺损修复成功率。

方法: 使用孵化至第 8 天的鸡胚建立鸡胚绒毛尿囊膜血管模型(Inshell 模型), 将模型随机分为 A、B、C、D、E 5 个组, 分别加载 0, -0.75, -1.5, -3, +1.5 V 的不同大小及不同方向的稳恒直流电场, 在加电 0, 12, 24, 36, 48 h 拍摄相关图片, 使用 Image J 测量相关血管数据, 观察指标为血管平均长度及血管生长角度, 使用 SPSS 22.0 分析结果。

结果与结论: ①加载不同大小电场以后, A 组平均血管长度增长速率为 0.012 mm/h, B 组为 0.023 mm/h, C 组为 0.047 5 mm/h; ②使用独立样本 t 检验进行比较, 加载-1.5 V 电压 48 h 后的绒毛尿囊膜血管平均长度为(4.22±0.436)mm/mm², 加载 0 V 电压 48 h 后为(3.21±0.31)mm/mm², 两者差异有显著性意义(P < 0.01); ③48 h 后, 加载-1.5 V 电压血管角度为(21.36±20.16)°, 加载 0 V 电压则为(82.17±50.44)°, 差异有显著性意义(P < 0.05); ④D、E 2 组电极周围的鸡胚绒毛尿囊膜发生变性, 鸡胚死亡; ⑤提示适宜大小范围内的负电促进血管生长, 同时改变血管生长角度, 证明稳恒直流电场对鸡胚绒毛尿囊膜血管有明显影响。

关键词:

组织工程骨; 鸡胚绒毛尿囊膜; 稳恒直流电场; 血管化

主题词:

鸡胚; 绒毛尿囊膜; 新生血管化, 生理性; 组织工程

基金资助:

医学 3D 打印技术应用于头面部战伤防护及救治的研究(15QNP034)

缩略语:

稳恒直流电场: steady direct current electric field, sDCEF

Zhang Xin-yue, Master, Physician, Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Li Chen-jun, Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Hospital of Stomatology, General Hospital of Chengdu Military Region of PLA, Chengdu 610000, Sichuan Province, China

Effect of steady direct current electric field on the vascularization of chorioallantoic membrane

Zhang Xin-yue¹, Li Chen-jun^{1,2}, Li Yan², Ren Kai-ge¹, Pan Lian¹, Chen Jun-chi¹ (¹Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; ²Hospital of Stomatology, General Hospital of Chengdu Military Region of PLA, Chengdu 610000, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Tissue-engineered bone has become an important means of repairing maxillofacial bone defects due to its minimally invasive, safe and accurate characteristics.

OBJECTIVE: The model of chick chorioallantoic membrane was loaded with different intensities of electric field, to detect the blood vessel growth-related parameters, and to explore the effect of electric field on force-vascularization of tissue-engineered bone, in order to search for a method that can promote force-vascularization of tissue-engineered bone, thus increasing the repair success rate.

METHODS: The model of chick chorioallantoic membrane (Inshell model) was established using the chicken embryos hatched for 8 days. The models were randomized into A, B, C, D, and E groups, followed by loaded with 0, -0.75, -1.5, -3 and +1.5 V and steady direct current electric fields at different directions. The images were taken at 0, 12, 24, 36 and 48 hours. The average blood vessel length and growth angle were measured by Image J, and analyzed on SPSS 22.0 software.

RESULTS AND CONCLUSION: After loaded with different currents of electric fields, the average growth rate of vessel length in the groups A, B and C was 0.012, 0.023, and 0.047 5 mm/h, respectively. Independent sample *t* test results revealed that after loaded with -1.5 and 0 V for 48 hours, the average length of blood vessel was (4.22±0.436) and (3.21±0.31) mm/mm², respectively, and the difference was significant (*P* < 0.01). After loaded with -1.5 and 0 V for 48 hours, the angle of blood vessels was (21.36±20.16)° and (82.17±50.44)°, respectively, and the difference was significant (*P* < 0.05). The chick chorioallantoic membrane around the electrode in the groups D and E degenerated and chick embryos died. These findings indicate that appropriate negative electricity promotes the growth of blood vessels, and changes the angle of blood vessel growth, suggesting that steady direct current electric field greatly affects chick chorioallantoic membrane.

Subject headings: Chick Embryo; Chorioallantoic Membrane; Neovascularization, Physiologic; Tissue Engineering

Funding: the Research of Three Dimensional Printing applied in Prevention and Treatment of Craniofacial Trauma Caused by War, No. 15QNP034

0 引言 Introduction

骨缺损常引起患者功能缺损或缺失,造成容貌缺陷,是医学中较常见的问题。在口腔医学领域,创伤、肿瘤及炎症等均可引起不同程度的牙周组织缺损或颌骨缺损。目前,国内外修复此类缺损多采用骨移植或骨组织工程复合物,不论是自体骨移植还是异体骨移植都有诸多缺陷^[1],这些缺陷限制了骨移植在临床中的使用。

骨组织工程的基本含义是将细胞、合成材料、处理过的天然材料和组织、细胞因子及基因治疗广泛地应用于体内的骨组织再生或体外的骨组织构建。由于组织工程骨仅需要少量的细胞,并且来源于自体,抗原性甚微,同时支架材料可以被制备成所需要的三维形状^[2-4],这种微创、安全、精确的特性使骨组织工程复合物成为恢复颌面部骨和牙周组织缺损的主要手段。

目前限制组织工程骨应用于临床的问题中最棘手的是植入体内的营养供应问题。植入体内的组织工程骨主要由血液-细胞间液完成营养供应^[5],此种方式营养供应极其有限,同时新生血管长入缓慢,容易发生植入的变性坏死,一旦发生此类情况就意味着植入失败,同时会给患者带来严重伤害。所以组织工程骨的快速血管化问题是植入成功与否的关键问题。

组织损伤时,必然有细胞的破坏,伤口处跨细胞电势差骤降,因此在伤口和正常组织之间将产生一稳恒电势梯度并形成损伤电流及稳恒直流电场(steady direct current electric field, sDCEF),通常在人体上,损伤产生的自发性电场强度为40-200 mV/mm^[6]。19世纪40年代, DuBios-Reymond就在新鲜创口处观察到这种sDCEF,称其为内源性电场,首次提出了这种内源性电场具有促使损伤愈合等生物学效应^[7-8]。现已有大量研究证实,外源性直流电场同样可以调控血管内皮细胞细胞形态、垂直取向和定向迁移等运动行为^[9-12]。在外源性电场的作用下,血管内

皮细胞为降低跨细胞电压,其细胞长轴将按垂直于电场方向排列^[13],血管内皮细胞分泌血管内皮生长因子量增多,所有与血管生成有关的细胞其增殖能力增加^[14]。这些研究都提示,sDCEF在促进组织工程骨的快速预血管化及成骨方面可能有重大作用。

在以往的体外实验中,研究者多使用仓鼠颊囊、兔耳气室等作为实验对象,通过皮下植入材料来模拟组织工程材料的三维结构^[15]。这些实验动物价格昂贵,体外模型建立比较复杂,难以大量复制。鸡胚价格便宜,容易制备,同时鸡胚发育过程中的血管生长有利于模拟组织工程骨的血管构建。鸡胚发育至第3天时,卵黄囊上的血管开始初具形态;培育至第4天或第5天时,在胚胎附近将出现尿囊膜与胚胎相连。胚胎发育至第8天,尿囊膜上出现初级血管和原始血管网用以交换气体和进行新陈代谢,随后血管开始飞速生长直至第11天。第11天后血管内皮细胞有丝分裂指数下降,第18天后达到其最终形态^[16]。第8-11天时,绒毛尿囊膜血管内皮细胞有丝分裂指数较大,血管生成活跃,利用此时期能模拟组织工程骨在骨缺损断端处的血管生长情况,建立体外实验模型。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照实验。

1.2 时间及地点 于2015年2月至2016年10月在解放军成都军区总医院实验室完成。

1.3 材料 罗曼鸡受精鸡蛋(四川省圣迪乐村生态食品股份有限公司)、无齿镊、持针器、注射器、无菌敷贴、ETHICON 7-0缝线、滤纸、琼脂、电解液、蒸馏水、生理盐水、孵化箱、恒温恒湿箱、无菌操作台、体视野显微镜、直流电源等。

1.4 实验方法

1.4.1 建立鸡胚绒毛尿囊膜血管模型(Inshell模型) 选择

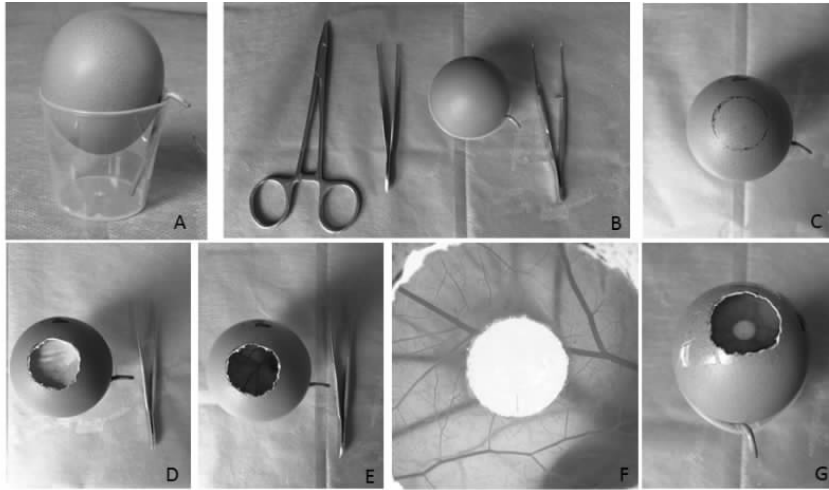


图1 鸡蛋开窗过程

Figure 1 Egg windowing process

图注: 图 A 为直立于培养杯中的罗曼鸡胚; B 图中从左至右依次为持针器、无齿镊、鸡胚、自制弯头镊; C 示甲紫溶液绘制开窗标志线; D 为剥去蛋壳后; E 为剥去壳膜后; F 示绒毛尿囊膜上放置加电载体; G 示放置完毕。

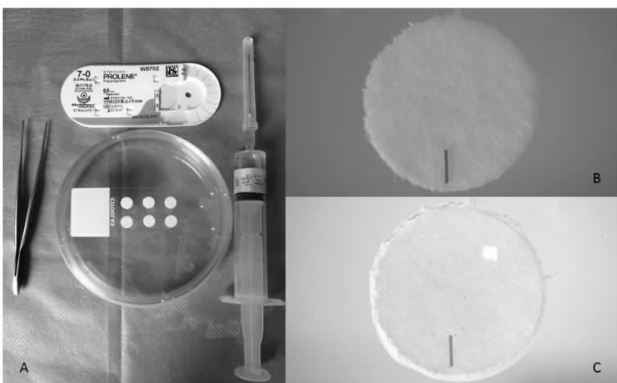


图2 琼脂滤纸复合体制备

Figure 2 Agar-filter paper complex preparation

图注: 图 A 为使用材料; B 为 7-0 缝线标记; C: 表面滴入琼脂滴。

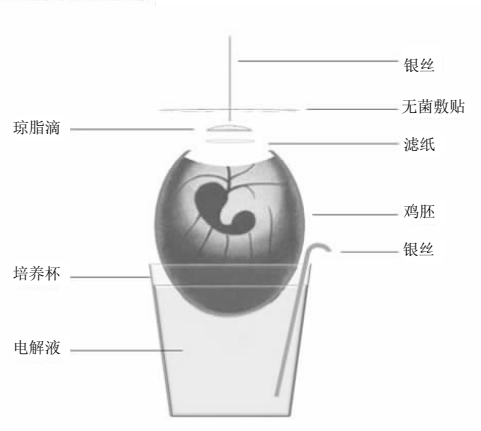


图4 实验模型各组成部分

Figure 4 Components of the model

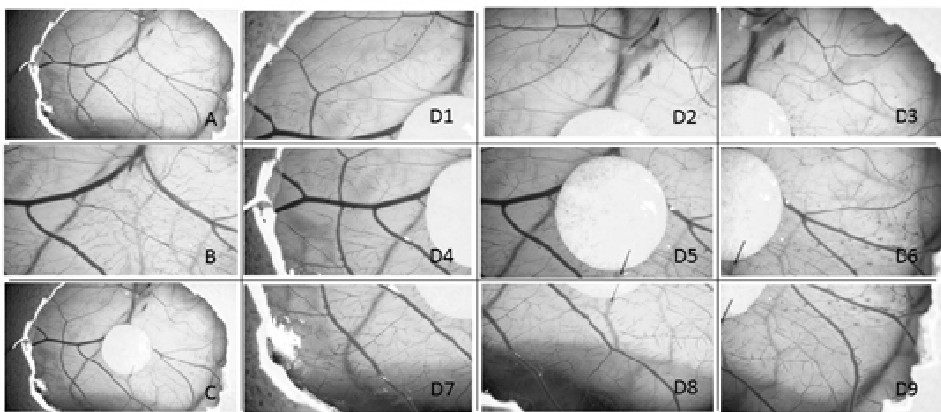


图3 体式野显微镜拍摄鸡胚血管图像

Figure 3 Images of the chick chorioallantoic membrane under stereomicroscope

图注: 图 A 为×0.7 倍率下; B 为×1.0 倍率下; C 为×0.7 倍率下放入琼脂滤纸复合体后。D1-D9 示从左上部区域开始至左侧区域每区域在×1.0 倍率下图像, 其中 D5 为中心图像。

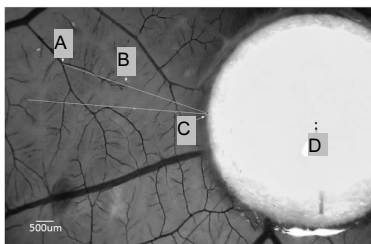


图5 血管角度测量示意图

Figure 5 Angle measurement schematic diagram

图注: 图中 A 为血管起点; B 为血管止点; C 为 AB 延长线与琼脂滤纸复合体边缘交点; D 为圆心。



图6 使用 Image J 测量每根血管长度, 逐一测出后计算总和

Figure 6 Vascular length measurement using Image J and summarization



图7 使用 Image J 测量图形可用面积为黄线内区域

Figure 7 Image J measurement graphics can be used within the area of the yellow line area

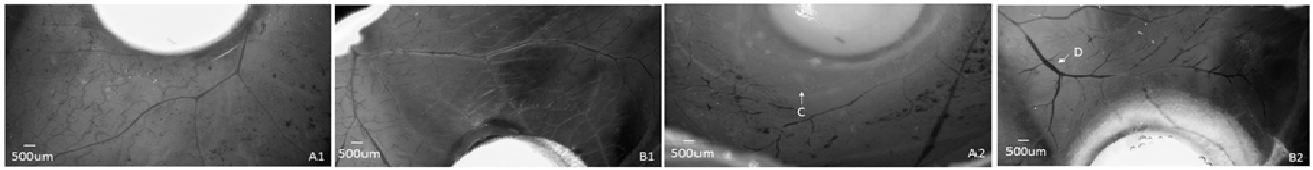


图8 加载-3 V电压下鸡胚血管情况

Figure 8 Chick chorioallantoic membrane loaded with 3 V of voltage

图注: 图 A1, B1 为-3 V 加电前图像; A2, B2 为加电 24 h 后图像。C 显示周围血管退化, D 显示血管充盈状态。

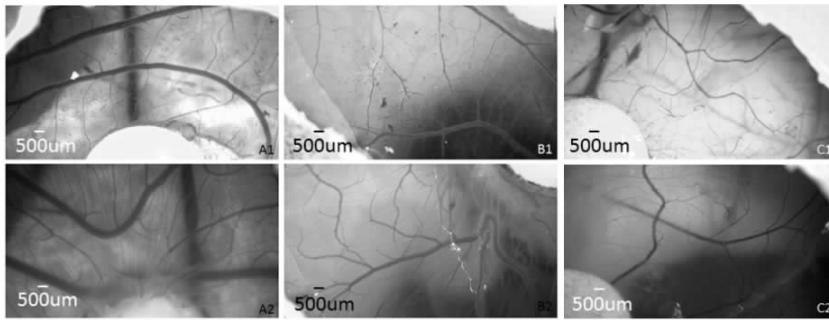


图9 加载-1.5, -0.75, 0 V 电压下鸡胚血管情况

Figure 9 Chick chorioallantoic membrane loaded with -1.5, -0.75 and 0 V of voltage

图注: 图 A1, A2 为-1.5 V 电压下 0 h 与 48 h 后变化对比; B1, B2 为-0.75 V 电压下变化对比; C1, C2 为 0 V 电压下变化对比。

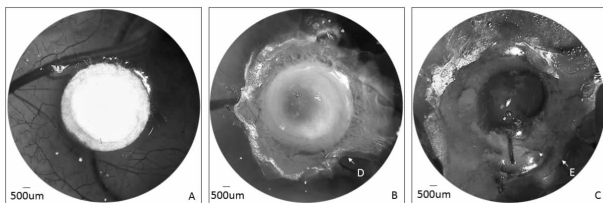


图10 加载+1.5 V 电压下加电不同时间鸡胚的变化

Figure 10 Changes of the chicken embryos loaded with +1.5 V of voltage

图注: 图 A-C 为+1.5 V 电压下加电 0, 12, 24 h 后的变化。

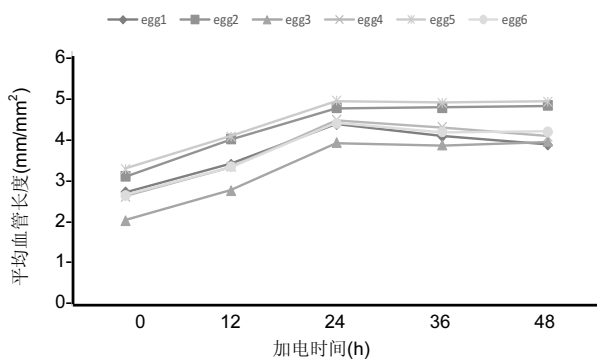


图11 加载-1.5 V 电压下血管平均长度变化折线图

Figure 11 Line chart of the average vascular length loaded with -1.5 V of voltage

图注: 可见电压加载后的 24 h 内血管平均长度发生变化, 出现增加的趋势, 24 h 后基本处于稳定状态。

罗曼鸡受精鸡蛋, 用蒸馏水擦拭鸡蛋表面后使用乙醇进行消毒。于温度为 37.5°C , 湿度为60%的孵化箱中孵化, 3 d 后使用强光手电进行检查, 淘汰所有未孵化的鸡胚。剩余鸡胚继续孵化。孵化途中保持湿度及温度, 每隔半小时, 孵化箱自动翻蛋1次。孵化至7 d后将鸡胚直立于培养杯中, 气室向上。

孵化8 d后, 将培养杯连同鸡胚从孵化箱中取出置于无菌操作台上。进行如下操作: ①乙醇消毒鸡胚表面, 并用甲紫溶液以鸡胚顶点为中心做一半径为0.75 cm的圆; ②使用持针器仔细沿甲紫线剥除蛋壳。使用无齿镊仔细取出壳膜, 注意不能伤及下方绒毛尿囊膜及血管; ③打孔器制备

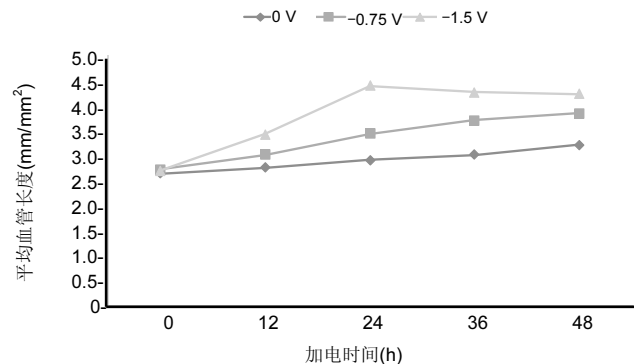


图12 加载-1.5, -0.75, 0 V 电压下血管平均长度变化折线图

Figure 12 Line chart of average vascular length loaded with -1.5, -0.75 and 0 V of voltage

图注: 0 V 与-0.75 V 的平均血管长度从 0-48 h 一直处于增加状态, -0.75 V 电压下增加速率平均为 0.023 mm/h , 而 0 V 为 0.012 mm/h 。

直径为6 mm的圆形滤纸片, 紫外线消毒后使用生理盐水浸润, 7-0外科缝线标记方位。10 mL一次性滴管吸取加热后融化状态的琼脂, 滴一滴在滤纸片上(图1, 2及表1); ④将制备的琼脂滤纸复合体放置于绒毛尿囊膜上, 使用体式野显微镜拍摄图片。将显微镜倍率调整为 $\times 0.7$, 拍摄鸡胚血管全貌, 随后将每枚鸡胚分为9个区域, 其中1个区域为滤纸全貌, 每个区域使用 $\times 1.0$ 倍率进行拍摄(图3)。拍摄后使用外科无菌敷贴封闭开窗处。将鸡胚放置于 37.5°C , 湿度为60%的恒温恒湿箱中继续培养。

1.4.2 sDCEF加载 将孵化至第8天的罗曼鸡鸡胚按随机数字表法分为A, B, C, D, E共5组, 分别加载0, -0.75,

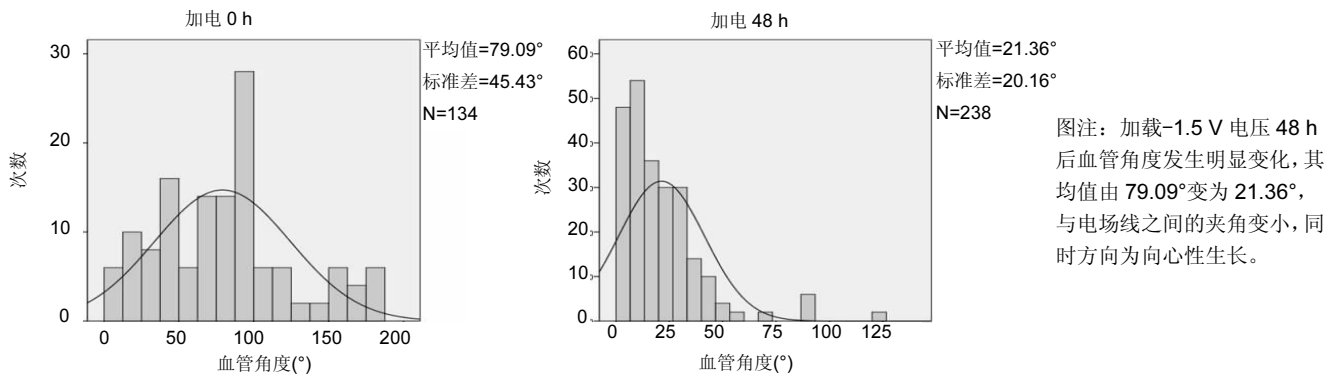


图 13 在-1.5 V 电压下, 0, 48 h 后血管角度分布柱状图及分布曲线

Figure 13 Vascular distribution histogram and the distribution curve loaded with -1.5 V of voltage for 0 and 48 hours

表 1 电解液及琼脂溶液制备

Table 1 Electrolyte and agar solution preparation

项目	电解液		琼脂	
	成分	质量	成分	质量
溶质	NaCl	34 g	琼脂粉	2 g
	KCl	0.5 g		
	CaNO ₃ ·4H ₂ O	1.0 g		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.13 g		
	Tris	5.52 g		
溶液	蒸馏水	1 000 mL	电解液	50 mL

表 2 在 0, -1.5 V 加电组 48 h 后平均血管长度的独立样本 t 检验
Table 2 Independent sample t test of the average vascular length loaded with 0 and -1.5 V of voltage for 48 hours

项目	$\bar{x} \pm s(\text{mm}/\text{mm}^2)$	t 值	显著性 (P 值)	标准误差	95%置信区间	
					下限	上限
0 V, 48 h	3.207±0.313	4.600	0.001	0.219	0.52	0.15
-1.5 V, 48 h	4.215±0.436					

表 3 在 0, -1.5 V 加电组 48 h 后血管角度的独立样本 t 检验

Table 3 Independent sample t test of the vascular angle loaded with 0 and -1.5 V of voltage for 48 hours

项目	$\bar{x} \pm s(^{\circ})$	t 值	显著性 (P 值)	标准误差	95%置信区间	
					下限	上限
0 V, 48 h	82.171±50.444	16.772	0.001	3.626	53.681	67.935
-1.5 V, 48 h	21.363±20.157					

-1.5, -3, +1.5 V 的电压, 每组6枚鸡胚。每个鸡胚培养杯中添一定量电解液, 电解液与银丝及鸡胚接触, 银丝长 5 mm, 直径1.5 mm。另取一根长度为50 mm, 直径为0.3 mm 的银丝由上至下从无菌敷贴处垂直插下, 以与滤纸中心接触但不造成压力为适宜。2处银丝分别与直流电源相连, 每组加载不同大小的直流电电压(图4)。继续于恒温恒湿箱中培养, 每隔12 h观察鸡胚存活情况, 淘汰已死亡的鸡胚, 剩余鸡胚于体式野显微镜下拍照后继续培养, 直至48 h。

1.5 主要观察指标 每枚鸡胚随机选择一个区域按拍摄时间顺序进行数据分析及统计, 使用Image J软件统计鸡胚

表 4 在 0 V 加电组 0-48 h 血管角度方差分析

Table 4 Variance analysis of the vascular angle loaded with 0 V of voltage for 0-48 hours

项目	平均差异	标准差	显著性 (P 值)	95%置信区间		
				下限	上限	
0 h	12 h	-0.28	6.63	0.997	-12.45	12.40
	24 h	11.87	6.18	0.055	-0.26	24.01
	36 h	9.60	5.94	0.107	-2.07	2.27
	48 h	1.45	5.83	0.804	-10.01	12.90
12 h	0 h	0.28	6.33	0.997	-12.40	12.45
	24 h	11.90	6.15	0.053	-1.75	23.98
	36 h	9.63	5.91	0.104	-1.99	21.24
	48 h	1.48	5.80	0.799	-9.92	12.87
24 h	0 h	-11.87	6.18	0.055	-24.01	0.26
	12 h	-11.90	6.15	0.053	-23.98	0.17
	36 h	-2.28	5.75	0.690	-13.57	9.02
	48 h	-10.43	5.64	0.065	-21.50	0.65
36 h	0 h	-9.60	5.94	0.107	-21.27	2.07
	12 h	-9.63	5.91	0.104	-21.24	1.99
	24 h	2.28	5.75	0.693	-9.02	13.57
	48 h	-8.15	5.80	0.130	-18.72	2.41
48 h	0 h	-1.45	5.83	0.804	-12.90	10.01
	12 h	-1.48	5.80	0.799	-12.87	9.92
	24 h	10.43	5.64	0.650	-0.65	21.50
	36 h	8.15	5.38	0.130	-2.41	18.72

血管生长方向及平均血管长度。

1.5.1 血管生长方向 AB延长线与CD延长线之间的夹角即为血管角度。血管向圆心生长取值为0°-90°, 反之则取值为90°-180°(图5)。

1.5.2 血管平均长度 统计血管总长度取均值并测量图形统计面积, 所得血管平均长度为长度/面积, 单位为 mm/mm²(图6, 7)。

1.6 统计学分析 数据使用SPSS Statistics 22.0进行统计分析, 组间比较使用独立样本t 检验, 组内比较使用方差分析。

2 结果 Results

2.1 实验现象 加载-3 V电压12-24 h后多数鸡胚绒毛尿囊膜出现蛋白变性, 鸡胚基本死亡, 血管可能退化也可能停留在充盈状态(图8)。

加载-1.5 V电压可以观察到血管角度发生明显变化,

同时血管数量增加。加载-0.75 V电压时也可观察到此现象(图9)。

加载+1.5 V电压成功率较低,容易发生鸡胚死亡,常观察到滤纸变色,同时周围绒毛尿囊膜上可能会出现变色及蛋白变性(图10)。

2.2 实验结果 使用SPSS软件绘制加载-1.5 V电压血管平均长度变化(图11),可见电压加载后的24 h内血管平均长度发生变化,出现增加的趋势,增加速率平均为0.047 5 mm/h,24 h后基本处于稳定状态。由于鸡胚的生长发育,加载0 V电压48 h后,平均血管长度增加,使用独立样本 t 检验比较,加载-1.5 V电压48 h后的绒毛尿囊膜血管平均长度为(4.22±0.436) mm/mm²,对照组(加载0 V电压48 h)为(3.21±0.31) mm/mm², $P < 0.01$,差异有显著性意义(表2)。

将加载0, -0.75, -1.5 V电压的平均血管长度进行比较,由折线图可见(图12),0 V与-0.75 V的平均血管长度从0-48 h一直处于增加状态,-0.75 V电压下增加速率平均为0.023 mm/h,而0 V为0.012 mm/h。

加载-1.5 V电压48 h后血管角度发生明显变化,其均值由79.09°变为21.36°,与电场线之间的夹角变小,同时方向为向心性生长,其95%置信区间也由(71.32°, 86.85°)变为(18.78°, 23.93°)。加载-1.5 V电压48 h后血管角度为(21.36±20.16)°,对照组(加载0 V电压48 h)则为(82.17±50.44)°,同时 $P < 0.05$,差异有显著性意义(图13及表3)。统计0 V电压下鸡胚绒毛尿囊膜血管角度数值,将5个不同时间点数据进行方差分析,各个组间进行比较, P 值最大为0.997,最小为0.053,均 > 0.05 ,差异无显著性意义。表明加载0 V电压后血管角度未发生明显变化(表4)。

3 讨论 Discussion

骨缺损的修复离不开血管的形成,血管生成在骨的新生、再生和修复中都有着重要作用^[17]。血管内皮细胞不仅是血管形成的种子细胞,它还可以分化为成骨细胞或成骨前细胞,这意味着血管直接参与了骨形成^[18]。同时,新生血管的建立,为骨缺损部位及组织工程骨再生及代谢提供有利的微环境。所以血管生成是保证植入材料成功修复骨缺损的重要前提^[19]。

内源性电场是创伤愈合及胚胎发育的重要条件^[20-22]。研究发现自发的sDCEF通过调控细胞行为,控制上皮细胞的细胞分裂和迁移,加快上皮愈合,刺激神经向伤口内生长^[23-24],刺激血管内皮生长因子的表达,增加其分泌量,同时血管内皮细胞向伤口趋电迁移,损伤处出现血管发芽再生,促进伤口血液供给,加快愈合速率^[25]。在骨缺损中,sDCEF同样能发挥促进骨缺损愈合的作用,已有大量研究证实,细胞在受到电刺激时细胞骨架发生重排,同时生理强度的外源性电场可控制和加强骨髓间充质干细胞在骨愈合过程中的迁移,促进骨形成^[26-27]。Li等^[28]研究发现,外源性直流电场可诱导表皮干细胞向负极定向迁移;同时,Rouabhia等^[29]研究发现电刺激能促进成纤维细胞的增殖和迁移,增加生长因子的分泌量,促进细胞分化,从而促进伤口愈合。

此次实验加载-3 V电压后,多数绒毛尿囊膜出现蛋白

变性,鸡胚死亡,同时血管退化或处于充盈状态。造成的变性死亡的原因可能为长时间加载过大电压超过鸡胚绒毛尿囊膜蛋白所能承受范围,造成血管退化,同时过大的电压引起鸡胚心血管系统受损,致使鸡胚死亡^[30-31]。部分血管死亡时停留在充盈状态,此现象提示稳恒直流电加载后,血管首先出现的反应可能是充血或淤血,随后再出现血管的改建。加载-1.5 V及-0.75 V电压后,均出现血管密度及角度的明显变化,统计结果中,加载-1.5 V电压后血管走形与电场线之间的夹角变小,同时生长方向为向着负电加载点的方向。此现象与Bai等^[32]的研究结果相似,他们研究发现,暴露于电场强度为150-200 mV/mm的直流电场中,血管内皮细胞向负极发生定向迁移。但也有学者认为,加载后血管向负极生长与血液流体力学有关^[33]。

在平均血管长度的比较中,-0.75 V与-1.5 V电压对血管的影响大小有所不同。加载-1.5 V电压24 h后,血管生长趋于平缓,而-0.75 V在加载48 h后仍呈现增加的状态,且可能未达到其最高值,这提示不同的电压其加电效应是不同的,对于此研究分组来看,-1.5 V电压最能促进血管生长。但不同生物的最适电压应有所不同,尚需大量实验研究不同生物的合适电压。适当范围内的负电通过血管后,血管的生长被促进,有国内外学者认为与不同因子的分泌量改变有关,特别是血管内皮生长因子分泌的增加。血管内皮生长因子与血管内皮生长因子受体结合后通过产生血管基底膜分解所需的蛋白酶及整合素,促进内皮细胞的增殖与迁移,同时增加微血管通透性,促进新生血管形成,后期产生的血小板衍生生长因子可通过募集周细胞,促进血管平滑肌细胞发育,促进新生血管的功能和稳定^[34]。电压加载第24-48小时,绒毛尿囊膜处于发育中的第9,10天,其有丝分裂仍处于高峰期,但此时加载-1.5 V电压的鸡胚其平均血管长度维持在一个比较稳定的数值,与快速发育期应有的表现有所出入,可能为电流加快了鸡胚绒毛尿囊膜血管发育的进程更早的达到峰值,目前尚需大量研究探索其原因。

加载0 V电压后,不同时间点血管角度的变化无明显差异,这提示此加电模型中滤纸、琼脂以及插入银针后造成的轻微压力对鸡胚发育无明显影响,不会干扰加电后产生各种变化的分析结果。加载+1.5 V电压的成功率较低,出现的变性及变色现象对结果统计产生了严重影响,所以未与其余组进行比较分析。加正电后出现鸡胚死亡的原因猜想为,正电加载后对鸡胚绒毛尿囊膜上血管的生长有抑制作用,抑制了鸡胚的新陈代谢,同时正电通过与鸡胚相接的银针后,在电流的作用下,银针可能发生一定程度的电离,银离子释放,过量的银离子致使鸡胚死亡^[35-37],同时引起绒毛尿囊膜蛋白变性及形成黑色物质。应采用其余导电物体研究正电对血管的影响。

组织工程骨植入体内后营养供应问题急需解决,若能实现组织工程骨的体外预血管化或体内快速血管化将有利于提高移植成功率。sDCEF对血管有明显影响,电压加载后平均血管长度明显增加,意味着血管密度及数量的增加,同时走形为向负电生长。在组织工程骨内加载负电,有利于血管大量且快速的向生物材料内生长,将植入后细胞间液扩散营养转变为由血液直接供应营养,结合与牙周组织

及颌面部骨组织相关的各种种子细胞共培养体系^[38-40]、可实现快速成骨, 提高颌面骨缺损患者的整复成功率, 增加牙周缺损患者牙槽骨成骨概率, 采用更好的方式治疗骨缺损及其带来的其他不良影响。

致谢: 文章是在李晨军及李焰老师的悉心指导下完成的, 同时感谢解放军成都军区总医院口腔科所有老师及同事的帮助与指导。

作者贡献: 张馨月、李焰负责课题设计, 张馨月、任凯歌、潘莲、陈俊驰负责实验实施, 李晨军及李焰负责实验结果及文章审核, 张馨月负责文章撰写。

经费支持: 该文章接受了“医学 3D 打印技术应用于头面部战伤防护及救治的研究(15QNP034)”的基金资助。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中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经西南医科大学附属口腔医院动物实验伦理委员会批准。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。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经西南医科大学生物统计学专家审核。

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4.0”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] 邵杰, 杨长伟, 李明. 同种异体骨移植的研究进展[J]. 骨科, 2016, 7(4): 291-293.
- [2] Bandyopadhyay A, Das S. 3D printing of biomaterials. MRS Bull. 2015; 40:108-115.
- [3] 张海峰, 杜子婧, 毛曦媛, 等. 3D打印PLA-HA复合材料构建组织工程骨的实验研究[J]. 国际骨科学杂志, 2016, 37(1):57-63.
- [4] Song KD, Li WF, Zhu YX, et al. Dynamic Fabrication of Tissue-Engineered Bone Substitutes Based on Derived Can-cellous Bone Scaffold in a Spinner Flask Bioreactor System. Appl Biochem Biotechnol. 2014; 174(4):1331-1343.
- [5] Khademi R, Mohebbi-Kalhari D, Hadjizadeh A. Computational study of culture conditions and nutrient supply in a hollow membrane sheet bioreactor for large-scale bone tissue engineering. J Artif Organs. 2014; 17(1):69-80.
- [6] Nuccitelli R. A role for endogenous electric fields in wound healing. Curr Top Dev Biol. 2003; 58:1-26.
- [7] Barnes TC. Healing rate of human skin determined by measurement of the electrical potential of experimental abrasions. Am J Surg. 1945; 69:82-88.
- [8] 董晓蒙, 高晶, 孙沁, 等. 内源性电场及其生物学意义[J]. 生物化学与生物物理进展, 2016; 43(8):731-738.
- [9] 高晶. 小鼠皮肤伤口内源性电场及离子流研究[D]. 昆明: 云南师范大学, 2016.
- [10] 胡雪飞, 程勇, 文星, 等. 电场对内皮祖细胞迁移行为及形态的影响[J]. 重庆医学, 2016; 45(10):1316-1319.
- [11] 刘永玲. 外源性微直流电场对小鼠主动脉环血管新生的影响[D]. 昆明: 云南师范大学, 2014.
- [12] 任浙. 脉冲直流电场诱导表皮细胞趋性的作用研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
- [13] Nishimura KY, Isseroff RR, Nuccitelli R. Human keratinocytes migrate to the negative pole in direct current electric fields comparable to those measured in mammalian wounds. J Cell Sci. 1996; 109(1):199-207.
- [14] Sawyer PN, Himmelfarb E, Lustrin I, et al. Measurement of steaming potentials of mammalian blood vessels, aorta and vena cava, in vivo. Biophys J. 1966; 6:641-651.
- [15] Ribatti D, Vacca A. Models for studying angiogenesis in vivo. Int J Biol Markers. 1999; 14:207-213.
- [16] Ribatti D, Nico B, Vacca A, et al. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. Anat Rec. 2001; 264:317-324.
- [17] Menicanin D, Mrozik KM, Wada N, et al. Periodontalligament-derived stem cells exhibit the capacity for long-term survival, self-renewal, and regeneration of multiple tissue types in vivo. Stem Cells Dev. 2014; 23(9):1001-1011.
- [18] Liu Z, Luyten FP, Lammens J, et al. Molecular signaling in bone fracture healing and distraction osteogenesis. Histol Histopathol. 1999; 14:587-595.
- [19] Barnes R, Shahin Y, Gohil R, et al. Electrical stimulation vs. standard care for chronic ulcer healing: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Eur J Clin Invest. 2014; 44(4):429-440.
- [20] Baer ML, Henderson SC, Colello RJ. Elucidating the role of injury-induced electric fields (EFs) in regulating the astrocytic response to injury in the mammalian central nervous system. PLoS One. 2015; 10(11): e0142740.
- [21] Funk RH. Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration. Front Physiol. 2015; 6: 143-151.
- [22] Lobikin M, Pare JF, Kaplan DL, et al. Selective depolarization of transmembrane potential alters muscle patterning and muscle cell localization in *Xenopus laevis* embryos. Int J Dev Biol. 2015; 59(7-9): 303-311.
- [23] Song B, Zhao M, Fottester J, et al. Nerve regeneration and wound healing are stimulated and directed by an endogenous electrical field in vivo. J Cell Sci. 2004; 117:4681-4690.
- [24] Leppik LP, Froemel D, Slavici A, et al. Effects of electrical stimulation on rat limb regeneration, a new look at an old model. Sci Reports. 2015; 5: 18353-18362.
- [25] Zhao M, Bai H, Wang E, et al. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. J Cell Sci. 2004; 117:397-405.
- [26] Hammerick KE, James AW, Huang Z, et al. Pulsed direct current electric fields enhance osteogenesis in adipose-derived stromal cells. Tissue Eng Part A. 2010; 16(3):917-931.
- [27] Zhao Z, Watt C, Karystinou A, et al. Directed migration of human bone marrow mesenchymal stem cells in a physiological direct current electric field. Eur Cell Mater. 2011; 22:344-358.
- [28] Li L, Gu W, Du J, et al. Electric fields guide migration of epidermal stem cells and promote skin wound healing. Wound Repair Regen. 2012; 20(6):840-851.
- [29] Rouabhia M, Park H, Meng S, et al. Electrical stimulation promotes wound healing by enhancing dermal fibroblast activity and promoting myofibroblast transdifferentiation. PLoS One. 2013; 8(8):e71660.
- [30] 卢均坤, 初而复, 李欣, 等. SD大鼠电击损伤后心肌损伤与氧化应激关系的研究[J]. 临床心血管病杂志, 2016, 32(5):513-516.
- [31] 刘曙平. 电击伤患者心肌标志物以及肝功能等生化指标的检测[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(14):2109-2110.
- [32] Bai H, McCaig CD, Forrester JV, et al. DC electric fields induce distinct preangiogenic responses in microvascular and macrovascular cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24(7):1234-1239.
- [33] Kilarski WW, Samolov B, Petersson L, et al. Biomechanical regulation of blood vessel growth during tissue vascularization. Nature Med. 2009; 15(6):657-665.
- [34] Schwarz F, Ferrari D, Podolsky L, et al. Initial pattern of angiogenesis and bone formation following lateral ridge augmentation using rhPDGF and guided bone regeneration: an immunohistochemical study in dogs. Clin Oral Implants Res. 2010; 21(1):90-99.
- [35] 张帮勇. 纳米银诱导氧化应激及其毒性机制研究[D]. 南京: 东南大学, 2016.
- [36] 辛琦, 章强, 程金平. 纳米银和银离子对斑马鱼胚胎早期生长发育的影响及作用机制[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(4):55-64.
- [37] 李昊一. 银纳米粒子和银离子杀菌机理的红外光谱研究[D]. 石家庄: 河北大学, 2016.
- [38] Szpalski C, Barbaro M, Sagebin F, et al. Bone tissue engineering: current strategies and techniques-part II: Cell types. Tissue Eng Part B Rev. 2012; 18(4):258-269.
- [39] Yang ZH, Jin F, Zhang XJ, et al. A novel possible strategy based on self-assembly approach to achieve complete periodontal regeneration. Artif Organs. 2010; 34(7):603-609.
- [40] Lei G, Yu Y, Jiang Y, et al. Differentiation of BMSCs into odontoblast-like cells induced by natural dentine matrix. Arch Oral Biol. 2013; 58(7):862-870.