

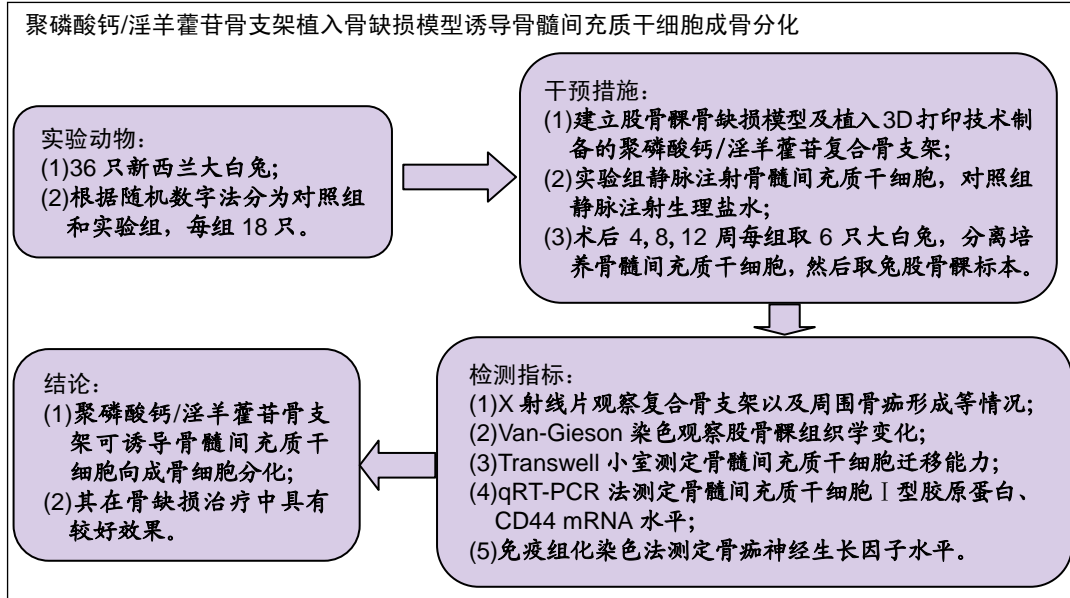
3D打印技术制备聚磷酸钙/淫羊藿苷骨支架诱导骨髓间充质干细胞成骨分化治疗骨缺损

石永新¹, 逢增金², 羊明智³, 彭立军³, 李富琴¹, 宋 晖¹, 罗福薇⁴ (¹中国科学院大学深圳医院(光明), 广东省深圳市 518106; ²深圳市宝安区松岗人民医院, 广东省深圳市 518105; ³南华大学附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001; ⁴深圳市妇幼保健院, 广东省深圳市 518017)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1758

ORCID: 0000-0002-4799-0318(石永新)

文章快速阅读:



石永新, 男, 1984 年生, 甘肃省成县人, 汉族, 2010 年南华大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨与关节损伤的研究。

通讯作者: 李富琴, 硕士, 主管技师, 中国科学院大学深圳医院(光明), 广东省深圳市 518106

文献标识码:A
稿件接受: 2019-03-16



文题释义:

聚磷酸钙: 是一种新型的骨修复材料, 具有长链结构, 在动物体内 10 d 可降解分化, 聚磷酸钙支架具有良好的骨诱导性和优良的可控降解性, 在体内生物相容性良好, 其降解断链可释放出细胞活动所需的能量, 降解产物为可溶性钙盐、磷酸盐和游离的钙、磷离子, 不会引起局部炎性反应; 同时作为骨修复材料, 聚磷酸钙也具有理想的力学强度, 可用于修复骨组织缺损, 也可作为支架材料用于组织工程, 在人体骨组织缺损修复方面具有良好的应用前景。

淫羊藿苷: 为箭叶淫羊藿、巫山淫羊藿、柔毛淫羊藿等干燥茎叶提取物, 呈淡黄色针状结晶粉末, 具有补肾壮阳、抗衰老等功效, 还具有促进造血功能、增加心脑血管血流量、免疫功能和骨代谢功能, 可促进骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化。

摘要

背景: 随着组织工程学的快速发展, 寻找最佳的支架材料、诱导细胞成骨分化的因子以及分化增殖能力强、来源充足的干细胞, 成为骨科领域研究的热点。

目的: 探讨聚磷酸钙/淫羊藿苷骨支架诱导骨髓间充质干细胞成骨分化治疗骨缺损的效果。

方法: 采用 3D 打印技术制备聚磷酸钙/淫羊藿苷复合骨支架, 分离和培养兔骨髓间充质干细胞。36 只新西兰大白兔根据随机数字法分为对照组和实验组, 每组 18 只, 均建立股骨髁骨缺损模型并植入聚磷酸钙/淫羊藿苷骨支架复合体, 然后实验组大白兔经股静脉注入骨髓间充质干细胞 1.5 mL(1×10⁹ L⁻¹), 对照组大白兔经股静脉注入等量生理盐水。术后 4, 8, 12 周每组取 6 只大白兔, 分离培养骨髓间充质干细胞, Transwell 小室测定骨髓间充质干细胞迁移能力, qRT-PCR 法测定骨髓间充质干细胞 I 型胶原蛋白、CD44 mRNA 水平; 然后取兔股骨髁标本, X 射线片观察复合骨支架以及周围骨痂形成情况, Van-Gieson 染色观察骨组织学变化, 免疫组化染色法测定骨痂神经生长因子水平。

结果与结论: ①实验组兔骨髓间充质干细胞迁移数均高于对照组(P < 0.05); 实验组兔骨髓间充质干细胞 I 型胶原蛋白、CD44 mRNA 水平均高于对照组(P < 0.05); ②X 射线检查和组织学观察结果显示实验组骨痂形成速度和效果优于对照组; ③实验组骨痂神经生长因子水平均高于对照组(P < 0.05); ④结果表明 3D 打印技术制备的聚磷酸钙/淫羊藿苷骨支架可诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化, 在骨缺损治疗中具有较好效果。

关键词:

股骨髁; 骨缺损; 聚磷酸钙; 淫羊藿苷; 复合骨支架; 3D 打印技术; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化

中图分类号: R459.9; R394.2

Shi Yongxin, Master, Attending physician, Shenzhen Hospital, University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518106, Guangdong Province, China

Corresponding author: Li Fuqin, Master, Technologist-in-charge, Shenzhen Hospital, University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518106, Guangdong Province, China

基金资助:

2018 广东省中医药局建设专项资金立项资助科研课题(20181239), 项目负责人: 石永新; 深圳市宝安区科创局医疗卫生基础科研项目(2017JD071), 项目负责人: 逢增金

A 3D-printed calcium polyphosphate/icariin bone scaffold induces osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells for treating bone defects

Shi Yongxin¹, Pang Zengjin², Yang Mingzhi³, Peng Lijun³, Li Fuqin¹, Song Hui¹, Luo Fuwei⁴ (¹Shenzhen Hospital, University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518106, Guangdong Province, China; ²Songgang People's Hospital, Shenzhen 518105, Guangdong Province, China; ³the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China; ⁴Shenzhen Maternity & Child Healthcare Hospital, Shenzhen 518017, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: With the rapid development of tissue engineering, seeking for optimal scaffold materials, osteogenic factors and abundant stem cells with strong differentiation and proliferation potential has been an issue of concern in the field of orthopedics.
OBJECTIVE: To explore the effect of calcium polyphosphate/icariin bone scaffold to induce osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of bone defects.
METHODS: The CPP/ICA composite bone scaffold was prepared using 3D printing technology. The rabbit bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured. Bone defect models were made in 36 New Zealand white rabbits, and equally randomized into control group and experimental group, followed by implantation of calcium polyphosphate/icariin composite bone scaffold. Afterwards, in the experimental group, 1.5 mL of bone marrow mesenchymal stem cells ($1 \times 10^9/L$) was injected through the femoral vein into the rabbits, while the rabbits in the control group were given the same amount of normal saline *via* the femoral vein. At 4, 8 and 12 weeks postoperatively, six rabbits from each group were taken to isolate and culture bone marrow mesenchymal stem cells. Transwell chamber assay was used to measure the migration ability of bone marrow mesenchymal stem cells. Fluorescence quantification-reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to determine the type I collagen and CD44 mRNA levels in the cells. Rabbit femoral condyle specimens were taken, and X-ray films were used to observe the formation of epiphyses around the composite scaffold. Van-Gieson staining was used to observe the histological changes of bone tissues. Immunohistochemical staining was used to determine the level of epiphyseal nerve growth factors.
RESULTS AND CONCLUSION: The number of migrated bone marrow mesenchymal stem cells was significantly higher in the experimental group than the control group ($P < 0.05$). The type I collagen and CD44 mRNA levels in the cells were also higher in the experimental group than the control group ($P < 0.05$). Findings from X-ray examination and histological observation showed more osteophytes in the experimental group than the control group. The level of epiphyseal nerve growth factors in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). To conclude, the calcium polyphosphate/icariin bone scaffold prepared by 3D printing technology can induce the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, and has a good effect in the treatment of bone defects.
Key words: femoral condyle; bone defect; calcium polyphosphate; icariin; composite bone scaffold; 3D printing technology; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation
Funding: Special Fund for Scientific Research of Guangdong Provincial Traditional Chinese Medicine Bureau, No. 20181239 (to SYX); Health Foundation Research Project of Baoan District Science and Technology Innovation Bureau, Shenzhen, No. 2017JD071 (to PZJ)

0 引言 Introduction

骨缺损是骨科治疗的难题之一, 传统治疗骨缺损的方法有骨段延长技术(由Ilizarow发明, 又称Ilizarow技术)、异体骨移植、自体骨移植等, 但这些方法治疗周期长、费用昂贵、并发症比较多。组织工程和基因治疗越来越受到大家重视, 成为近年来修复骨缺损的研究热点^[1-2]。聚磷酸钙(calcium polyphosphate, CPP)为新型骨修复材料, 具有良好的骨诱导性、可控降解性和生物相容性, 在骨缺损修复中具有有良好的应用前景^[3]。淫羊藿苷(Icariin, ICA)是中国传统中药成分, 来源广泛、提取工艺简单、费用低^[4], 可促进骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化, 在骨缺损修复中同样具有良好的应用前景^[5-6]。骨髓间充质干细胞由于取材比较容易, 体外培养具有较强的增殖能力和多向分化能力, 已成为目前公认的理想种子细胞^[7]。该实验拟将聚磷酸钙/淫羊藿苷复合骨支架填充兔股骨骨髓缺损区并经股静脉移植骨髓间充质干细胞, 观察其修复效果, 为临床骨缺损寻找新的治疗思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物实验对比观察。

1.2 时间及地点 于2018年8至12月在南华大学完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康3月龄新西兰大白兔40只, 雌雄各半, 体质量2.3–2.8 kg, 其中36只用于建立骨缺损模型, 4只用于制备骨髓间充质干细胞, 由南华大学动物实验中心提供, 实验动物和设施许可证号: SYXK(湘)2015-0001。

1.3.2 实验药物、材料及试剂 淫羊藿苷(西安昊轩生物有限公司, 批号: YYH120318, 纯度98%); 聚磷酸钙(南京化学试剂股份有限公司, 批号: CAS 10031-30-8); DMEM培养基、胎牛血清(美国Sigma公司); 免疫组化鼠抗兔CD34多克隆抗体、鼠抗兔CD44多克隆抗体、兔抗鼠神经生长因子多克隆抗体、羊抗兔IgG多克隆抗体(美国Santa Cruz公司); 免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒、qRT-PCR试剂盒(美国Invitrogen公司)等。

1.4 实验方法

1.4.1 制备聚磷酸钙/淫羊藿苷复合骨支架 将 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 在500 °C保温后再升温至熔融, 淬冷后制得聚磷酸钙非晶烧料, 用无水乙醇清洗, 烘箱烘干, 研磨过筛, 选取粒径范围为70–100 μm的聚磷酸钙非晶粉末

用于实验烧料。将上述制得的聚磷酸钙烧料放入电阻炉中二次烧结,再缓慢升温至580℃后保温一段时间,然后冷却得到聚磷酸钙骨支架材料,按4:1质量比例加入淫羊藿苷,采用3D快速打印成形,得到实验需要的骨支架复合体,其体积和长度为缺损段股骨体积和长度的平均值,密封保存备用。3D打印机喷头直径500 μm,移动速度100 mm/min,支架存储为STL格式,输入3D打印设备中,打印参数:X轴为4 mm,Y轴为4 mm,Z轴为10 mm。聚磷酸钙/淫羊藿苷复合骨支架体外具有控释功能,在17 d时淫羊藿苷释放量达总量的50%,在30 d时淫羊藿苷释放量达总量的58%。

1.4.2 兔骨髓间充质干细胞的分离与培养 将新西兰大白兔麻醉成功后,消毒铺巾,自股骨髁上结节处行骨髓穿刺,骨髓穿刺针有落空感后,抽出穿刺针针芯,接上注射器,抽取2 mL骨髓液,并用同样方法抽取对侧骨髓液,将抽取的骨髓加到Percoll液面上,离心(2 000 r/min)20 min,吸取单核细胞层(云雾状),PBS洗涤后收集细胞,加入DMEM完全培养基(含青霉素100 U/mL、链霉素100 U/mL、体积分数10%胎牛血清)中培养,48 h全量换液,以后每3 d进行全量换液,细胞基本铺满瓶底时进行传代培养。

1.4.3 兔骨髓间充质干细胞鉴定 采用免疫组化法鉴定,将生长良好的第3代骨髓间充质干细胞接种到放有盖玻片的6孔板中培养24 h,取出盖玻片,使有细胞的一层向上,生理盐水冲洗2遍,晾干,多聚甲醛固定,加入过氧化氢孵育10 min,蒸馏水洗涤,加入鼠抗兔CD34抗体和鼠抗兔CD44抗体过夜孵育,PBS冲洗,加入DAB显色液孵育10 min,PBS洗涤,中性树脂胶封固,显微镜下拍照观察染色情况。

兔骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	新西兰大白兔股骨髁上结节处骨髓
培养方法:	密度梯度离心法结合贴壁培养法
基础培养基:	DMEM 培养基
添加材料:	青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL、体积分数 10%胎牛血清
培养时间:	48 h 全量换液,以后每 3 d 进行全量换液,细胞基本铺满瓶底时进行传代培养
细胞传代:	细胞融合至 80%~90%用胰酶消化传至下 1 代,按 1:2 比例传代,5 d 左右传 1 代,共传 3 代
细胞鉴定:	免疫组化染色显示,细胞阳性表达 CD44,阴性表达 CD34,表明培养细胞为骨髓间充质干细胞
伦理学批准:	该实验经过南华大学伦理学委员会批准

1.4.4 建立兔股骨髁骨缺损模型及植入骨支架复合体 将36只新西兰大白兔根据随机数字法分为对照组和实验组,每组18只。采用戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉后,取仰卧位,手术区备皮、消毒,在兔大白兔双侧股骨远端后内侧切口,暴露股骨内侧髁,取内侧髁上1.5 cm处作为钻孔点,用钻头(直径4 mm)钻取深度10 mm左右,钻孔过程中避免钻透,生理

盐水冲洗骨屑,植入骨支架复合体,缝合切口,术后青霉素预防感染3 d。植入骨支架复合体的同时,实验组大白兔经股静脉注入骨髓间充质干细胞1.5 mL(1×10^9 L⁻¹),对照组大白兔经股静脉注入等量生理盐水。

1.4.5 取材 术后4, 8, 12周每组分别处死6只新西兰大白兔,按上述方法于股骨髁上结节处行骨髓穿刺抽取骨髓,分离和培养骨髓间充质干细胞,用于检测骨髓间充质干细胞迁移数和骨髓间充质干细胞I型胶原蛋白、CD44水平;然后取兔双侧股骨髁标本,一侧股骨髁标本用于影像学检查和骨痂神经生长因子水平测定,一侧股骨髁标本用于Van-Gieson染色。

1.4.6 影像学检查骨痂形成情况 上述股骨髁标本拍摄X射线片,观察复合骨支架以及周围骨痂形成等情况。

1.4.7 Van-Gieson染色观察股骨髁组织学变化 将上述股骨髁标本浸泡在中性甲醛中7 d后取出,不进行脱钙,梯度乙醇脱水,置于包埋液中包埋,3周后通过硬组织切片沿股骨长轴切4.5 μm厚切片,采用Van-Gieson染色观察组织学变化:将石蜡切片脱蜡后用Weigert苏木精染色20 min,返蓝5 min, Van-Gieson染色1 min,弃Van-Gieson染色液,乙醇分化数秒,脱水、透明、封固,光学显微镜下(x100)下观察股骨髁组织学变化。

1.4.8 Transwell小室检测骨髓间充质干细胞迁移数 按照上述方法再次分离培养骨髓间充质干细胞,采用Transwell小室检测骨髓间充质干细胞的迁移能力:将6孔Transwell小室的上室加入第2代骨髓间充质干细胞悬液(2×10^5 个细胞),置入培养箱中培养24 h,取出Transwell小室,弃去培养液,甲醇进行固定,结晶紫法进行染色,棉签擦掉未迁移细胞,倒置相差显微镜下观察迁移骨髓间充质干细胞数。

1.4.9 qRT-PCR法测定骨髓间充质干细胞中I型胶原蛋白、CD44 mRNA表达 取第2代骨髓间充质干细胞,用Trizol法提取总RNA,反转录成cDNA,采用qRT-PCR法测定骨髓间充质干细胞I型胶原蛋白、CD44 mRNA水平,以β-actin为内参照,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示I型胶原蛋白、CD44 mRNA表达量。I型胶原蛋白基因上游引物序列:5'-GAG AGC ATG ACC GAT GGA T-3',下游引物序列:5'-ATG TTT TGG TGG TTC AGG AGG-3'; CD44基因上游引物序列:5'-CCC TGC TAC CAG AGA CCA AGA C-3',下游引物序列:5'-GCA GGT TCC TTG TCT CAT CAG C-3'。

1.4.10 免疫组化染色测定骨痂神经生长因子水平 取新西兰大白兔骨痂,多聚甲醛固定,石蜡切片,采用免疫组化法测定骨痂神经生长因子水平:将石蜡切片进行免疫组化染色,以兔抗鼠神经生长因子(1:100)为一抗,以羊抗兔IgG(1:1 000)为二抗,DAB显色,显微镜下观察神经生长因子表达,采用Image-pro Plus6.0软件分析吸光度,神经生长因子水平以吸光度值表示。

1.5 主要观察指标 ①骨髓间充质干细胞形态;②聚磷酸

钙/淫羊藿苷复合骨支架的超微结构; ③X射线检查骨痂形成等情况; ④Van-Gieson染色观察股骨髁组织学变化; ⑤骨髓间充质干细胞迁移数; ⑥骨髓间充质干细胞 I 型胶原蛋白、CD44 mRNA 表达; ⑦骨痂神经生长因子水平。

1.6 统计学分析 采用SPSS 20.0软件分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间各指标比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞形态 培养24 h见细胞贴壁生长, 培养第3天细胞呈短梭形, 散在分布, 见图1A, 培养第5天细胞呈集落样生长, 数量明显增多, 见图1B, 培养第10天细胞呈明显的长梭形, 集落面积增加, 集落之间相互融合, 见图1C, 培养第14天时细胞达80%以上融合, 单个细胞呈狭长梭形, 有一定方向性, 呈漩涡状排列, 见图1D。第3代细胞呈梭形, 呈漩涡状排列, 见图1E。

2.2 骨髓间充质干细胞鉴定结果 免疫组化染色显示, 细胞阳性表达CD44, 阴性表达CD34, 表明培养细胞为骨髓间充质干细胞, 见图2。

2.3 聚磷酸钙/淫羊藿苷复合骨支架的超微结构 扫描电镜下可见淫羊藿苷均匀分布在聚磷酸钙支架表面, 见图3。

2.4 两组大白兔X射线检查结果 第4周, 对照组复合骨支架和两端股骨界面清晰, 无骨痂包绕, 实验组复合骨支架和两端股骨界面模糊, 骨支架旁侧有少量骨痂生长; 第8周, 对照组复合骨支架和两端股骨界面模糊, 骨支架旁侧有少量骨痂生成, 实验组复合骨支架和两端股骨界面模糊, 骨支架旁侧有较多骨痂生长; 第12周, 对照组复合骨支架和两端股骨界面处有大量骨痂包裹, 实验组复合骨支架周围完全被新生的骨痂组织包裹, 见图4。

2.5 两组大白兔组织学观察(Van-Gieson染色)结果 第4周, 实验组骨支架和新生骨结合较紧密, 骨支架边缘部分降解, 对照组骨支架和新生骨界限明显, 骨支架无明显降解; 第8周, 实验组骨支架和新生骨交界被新生骨小梁包绕, 骨支架进一步降解, 新生骨小梁沿骨支架降解形成的空隙向骨支架内部生长, 对照组骨支架边缘部分降解, 有少量新生骨小梁; 第12周, 实验组骨支架中央降解形成空隙, 新生骨小梁沿骨支架降解空隙继续长入, 对照组新生骨小梁少, 骨支架降解缓慢, 骨小梁长入骨支架空隙的范围比较局限, 见图5。

2.6 两组大白兔骨髓间充质干细胞迁移数 实验组大白兔骨髓间充质干细胞迁移数高于对照组($P < 0.05$), 见表1和图6。

2.7 两组大白兔骨髓间充质干细胞 I 型胶原蛋白、CD44 mRNA 表达比较 第4, 8, 12周时, 实验组大白兔骨髓间充质干细胞 I 型胶原蛋白、CD44 mRNA 表达均高于对照组($P < 0.05$), 见表2。

2.8 免疫组化染色检测骨痂神经生长因子水平 第4, 8,

12周时, 实验组大白兔骨痂神经生长因子水平均高于对照组($P < 0.05$), 见表3和图7。

表1 两组大白兔骨髓间充质干细胞迁移数比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 Comparison of migration of bone marrow mesenchymal stem cells between two groups of rabbits

组别	迁移细胞数(个)		
	4周	8周	12周
对照组	104.25±17.56	107.24±18.93	102.53±17.58
实验组	213.64±21.15	198.35±22.62	187.24±19.05
<i>t</i> 值	9.747	7.566	8.005
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表2 两组大白兔骨髓间充质干细胞 I 型胶原蛋白、CD44 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Comparison of type I collagen and CD44 levels in bone marrow mesenchymal stem cells between two groups of rabbits

组别	I 型胶原蛋白 mRNA			CD44 mRNA		
	4周	8周	12周	4周	8周	12周
对照组	1.00±0.11	1.00±0.13	1.00±0.12	1.00±0.09	1.00±0.11	1.00±0.10
实验组	2.25±0.16	1.82±0.17	1.64±0.14	1.74±0.12	1.65±0.13	1.47±0.11
<i>t</i> 值	15.769	9.385	8.502	12.084	9.35	7.744
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

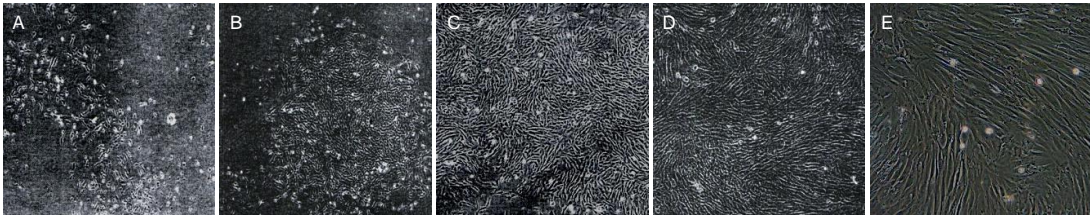
表3 两组大白兔骨痂神经生长因子水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$, 吸光度)
Table 3 Comparison of epiphyseal nerve growth factor levels between two groups of rabbits

组别	4周	8周	12周
	对照组	13.24±1.25	11.65±1.37
实验组	24.63±1.42	21.47±1.36	15.59±1.47
<i>t</i> 值	14.748	12.461	7.743
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

3 讨论 Discussion

在骨科, 骨肿瘤、外伤、骨髓炎、骨坏死等原因均可引起不同程度的骨缺损, 尤其是大段骨缺损, 是骨科面临的一大难题, 传统的骨骼移植材料主要为自体骨、异体骨和人工支架, 因机体需要将移植材料逐步吸收、改建, 治疗效果缓慢, 而且可能出现再次骨缺损, 严重影响骨移植效果。随着组织工程学的快速发展, 寻找最佳的新支架材料、诱导细胞成骨分化的因子以及分化增殖能力强、来源充足的干细胞, 成为骨科领域研究的热点^[8-9]。

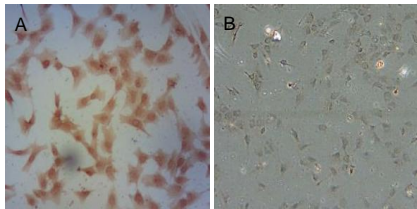
聚磷酸钙为一种无机聚合物, 具有长链结构, 在动物体内可逐渐降解分化^[10]; 聚磷酸钙支架的骨诱导性和生物相容性比较好, 降解断链可释放能量, 供细胞活动所需, 降解产物为可溶性磷酸盐、钙盐和游离的钙离子、磷离子, 不引起局部炎症反应; 聚磷酸钙作为骨修复材料也具有比较理想的力学强度, 可作为支架材料修复骨组织缺损^[11]。



图注：图中 A 为培养第 3 天，细胞呈短梭形，散在分布；B 为培养第 5 天，细胞呈集落样生长，数量明显增多；C 为培养第 10 天，细胞呈明显的长梭形，集落面积增加，集落之间相互融合；D 为培养第 14 天，细胞达 80% 以上融合，单个细胞呈狭长梭形，漩涡状排列；E 为第 3 代细胞，呈梭形，漩涡状排列。

图 1 兔骨髓间充质干细胞形态(x40)

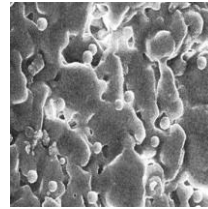
Figure 1 Morphology of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (x40)



图注：图中 A 为阳性表达 CD44；B 为阴性表达 CD34。

图 2 免疫组化染色鉴定骨髓间充质干细胞(x400)

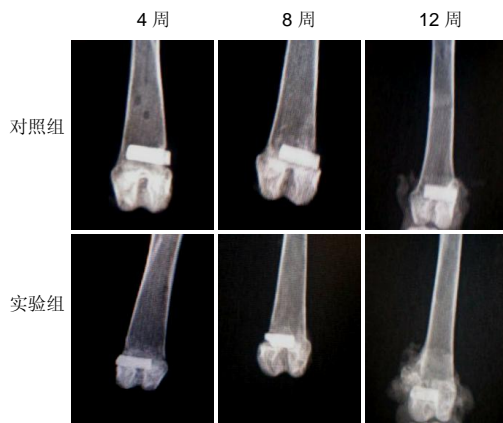
Figure 2 Identification of bone marrow mesenchymal stem cells by immunohistochemical staining (x400)



图注：淫羊藿苷均匀分布在聚磷酸钙支架表面。

图 3 扫描电镜观察聚磷酸钙/淫羊藿苷复合骨支架的超微结构(x50)

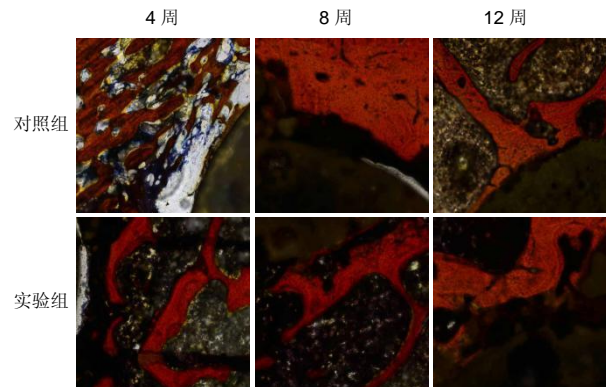
Figure 3 Ultrastructural observation of calcium polyphosphate/icariin composite bone scaffold by scanning electron microscopy (x50)



图注：第 4 周，对照组无骨痂包绕，实验组骨支架旁侧有少量骨痂生长；第 8 周，对照组骨支架旁侧有少量骨痂生成，实验组骨支架旁侧有较多骨痂生长；第 12 周，对照组复合骨支架和两端股骨界面处有大量骨痂包裹，实验组复合骨支架周围完全被新生的骨痂组织包裹。

图 4 两组大白兔 X 射线检查结果

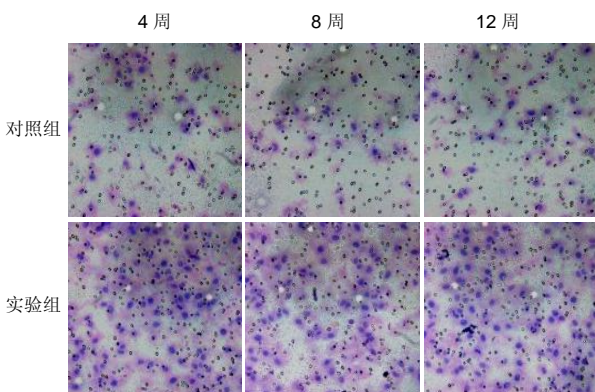
Figure 4 X-ray examination results of two groups of white rabbits



图注：第 4 周，实验组骨支架边缘部分降解，对照组骨支架无明显降解；第 8 周，实验组骨支架进一步降解，对照组骨支架边缘部分降解；第 12 周，实验组骨支架中央降解形成空隙，对照组骨支架降解缓慢。

图 5 两组大白兔股骨髁组织 Van-Gieson 染色(x100)

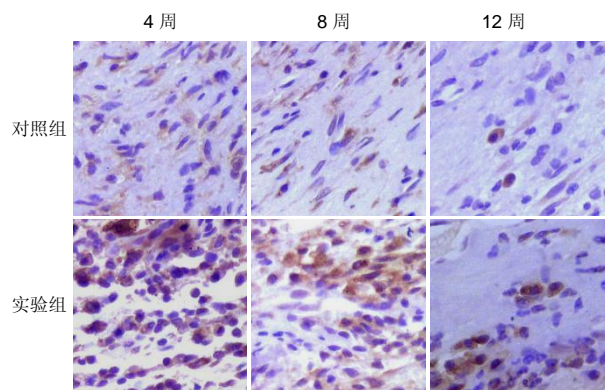
Figure 5 Van-Gieson staining of the rabbit femoral condyle (x100)



图注：紫色细胞为迁移细胞。实验组大白兔骨髓间充质干细胞迁移数高于对照组。

图 6 Transwell 小室测定两组大白兔骨髓间充质干细胞迁移数(x100)

Figure 6 Transwell chamber detection of bone marrow mesenchymal stem cells migrated in two groups of rabbits (x100)



图注：实验组大白兔骨痂神经生长因子表达高于对照组。

图 7 免疫组化染色检测骨痂神经生长因子的表达(x400)

Figure 7 Immunohistochemical detection of epiphyseal nerve growth factor expression (x400)

淫羊藿苷为一种中药成分, 具有抗衰老、保护心血管系统、提高免疫功能等功效^[12-13], 在多种疾病中被广泛应用, 研究发现淫羊藿苷可以促进间充质干细胞成骨分化^[14-15], 可用于骨组织工程中促进骨缺损修复, 具有良好应用前景。

骨髓间充质干细胞具有体外扩增能力强、对机体损伤小、免疫原性低、多向分化潜能等优点, 且比较容易分离和培养, 是各种临床和基础研究中常用的种子细胞^[16-17]。骨髓间充质干细胞在特定条件下可向成骨细胞分化, 可与支架材料复合植入机体组织, 是组织工程骨常用的种子细胞^[18]。

目前骨缺损修复中存在不足: 各种研究方法的技术水平尚不完善, 骨缺损局部反应比较复杂, 体外研究存在缺陷, 从而不同程度制约了骨缺损的研究进展。因此, 从骨的生长和修复机制出发, 联合多种方法, 相互补充其不足之处, 加强在体内研究, 寻找修复骨缺损的理想方法。

骨组织工程联合前沿的生物材料和细胞生物学技术达到理想的骨修复是目前研究的热点, 实验建立兔骨缺损模型, 将聚磷酸钙/淫羊藿苷复合骨支架材料填充到骨缺损区, 静脉注入兔骨髓间充质干细胞, 观察复合骨支架对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响及对骨缺损的修复效果。结果发现, 聚磷酸钙/淫羊藿苷复合骨支架可促进骨缺损处骨痂形成和修复, 可促进骨髓间充质干细胞迁移, 提高 I 型胶原蛋白、CD44 mRNA 表达, 提高骨髓中神经生长因子水平。间充质干细胞迁移到靶组织对机体具有重要的生物学作用, 成年后机体间充质干细胞含量下降, 但在骨、循环系统、脂肪等中仍有少量表达, 并具有多向分化潜能, 间充质干细胞可以特异性迁移到损伤部位发挥重要作用^[19], 该研究中实验组骨髓间充质干细胞迁移能力增强, 由于标记方法局限, 尚不清楚具有高迁移能力的是内源性骨髓间充质干细胞还是外源性骨髓间充质干细胞。实验组静脉注射骨髓间充质干细胞, 对照组静脉注射生理盐水, 两组其他实验步骤均相同, 因此考虑外源性骨髓间充质干细胞发挥作用可能性大, 需在今后的研究中尝试用有效的标记方法对外源性骨髓间充质干细胞进行标记研究。CD44 为一种透明质酸受体, CD44 和透明质酸相互作用可促进细胞迁移, CD44 表达可促进骨髓间充质干细胞对损伤的修复作用^[20-22], 该研究中骨髓间充质干细胞 CD44 水平升高可能是其迁移能力增强的机制之一。I 型胶原蛋白的合成分泌对矿化有促进作用, 是骨组织形成的前体, 构成了组织的蛋白框架, 可作为成骨细胞分化的检测指标, 骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞后分泌大量的 I 型胶原蛋白^[23], I 型胶原蛋白和成骨细胞分化有关, 并可促进成骨细胞增殖以及类骨质分泌^[24], 骨髓间充质干细胞中 I 型胶原蛋白水平升高, 表明聚磷酸钙/淫羊藿苷复合骨支架可促进骨髓间充质干细胞成骨分化。神经生长因子具有低亲和力受体 LNGFR 和高亲和力受体 TrKA 两种, 在成骨细胞膜上有 LNGFR, 神经生长因子通过与 LNGFR 结合对成骨细胞产生影响^[25], 使成骨细胞发生磷酸化, 增强成骨细胞活性和

成骨能力, 在骨折愈合中发挥重要作用^[26-27], 该研究骨髓中神经生长因子水平升高, 考虑聚磷酸钙/淫羊藿苷复合骨支架通过提高神经生长因子水平促进骨缺损的修复。

综上所述, 聚磷酸钙/淫羊藿苷复合骨支架通过促进骨髓间充质干细胞成骨分化、增加神经生长因子水平进而促进骨缺损的修复。

作者贡献: 石永新、李富琴、彭立军进行实验设计、实施、资料收集与成文, 羊明智、宋晖、罗福薇、逢增金进行实验评估, 羊明智校审, 石永新对文章负责。

经费支持: 该文章接受了“2018 广东省中医药局建设专项资金立项资助科研课题(20181239)”“深圳市宝安区科创局医疗卫生基础科研项目(2017JD071)”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中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经南华大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 SYXK(湘)201809116。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通过南华大学衡阳医学院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] Kopen'kov AV. Healing of experimental defect in a long bone after implantation of "CollapAn" osteoplastic material in its cavity (computed tomographic study). *Morfologija*. 2015;147(1): 59-62.
- [2] Holzapfel BM, Rudert M, Hutmacher DW. Scaffold-based Bone Tissue Engineering. *Orthopade*. 2017;46(8):701-710.
- [3] Qin H, Yang Z, Li L, et al. A promising scaffold with excellent cytocompatibility and pro-angiogenesis action for dental tissue engineering: Strontium-doped calcium polyphosphate. *Dent Mater J*. 2016;35(2):241-249.
- [4] 吴曦, 彭锐. 不同浓度淫羊藿苷对人骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(5):669-674.
- [5] Lian F, Zhao C, Qu J, et al. Icarin attenuates titanium particle-induced inhibition of osteogenic differentiation and matrix mineralization via miR-21-5p. *Cell Biol Int*. 2018;42(8): 931-939.

- [6] 杨志烈,王成龙,赵东峰,等.淫羊藿苷对环磷酰胺化疗导致小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化障碍的保护作用[J].中国组织工程研究, 2016,20(6):777-784.
- [7] Sun BY, Zhao BX, Zhu JY, et al. Role of TGF- β 1 expressed in bone marrow-derived mesenchymal stem cells in promoting bone formation in a rabbit femoral defect model. *Int J Mol Med*. 2018;42(2):897-904.
- [8] Vasylijev RG, Oksymets VM, Rodnichenko AE, et al. Tissue-engineered bone for treatment of combat related limb injuries. *Exp Oncol*. 2017;39(3):191-196.
- [9] Xing J, Jin H, Hou T, et al. Establishment of a bilateral femoral large segmental bone defect mouse model potentially applicable to basic research in bone tissue engineering. *J Surg Res*. 2014;192(2):454-463.
- [10] Wang X, Tang P, Xu Y, et al. In vitro study of strontium doped calcium polyphosphate-modified arteries fixed by dialdehyde carboxymethyl cellulose for vascular scaffolds. *Int J Biol Macromol*. 2016;93(Pt B):1583-1590.
- [11] Chen L, Song W, Markel DC, et al. Flow perfusion culture of MC3T3-E1 osteogenic cells on gradient calcium polyphosphate scaffolds with different pore sizes. *J Biomater Appl*. 2016;30(7):908-918.
- [12] Wang Z, Wang D, Yang D, et al. The effect of icariin on bone metabolism and its potential clinical application. *Osteoporos Int*. 2018;29(3):535-544.
- [13] 姜文涛,梅伟,王庆德,等.淫羊藿苷对成骨细胞增殖、分化及矿化的影响[J].中华实验外科杂志,2017,34(3):446-448.
- [14] 陈震东,高辉,徐房添,等.淫羊藿苷促进间充质干细胞成骨分化:为治疗骨缺损提供一个良好的方向[J].中国组织工程研究, 2016, 20(50):7594-7600.
- [15] Li X, Peng B, Pan Y, et al. Icariin stimulates osteogenic differentiation and suppresses adipogenic differentiation of rBMSCs via estrogen receptor signaling. *Mol Med Rep*. 2018; 18(3):3483-3489.
- [16] Nakajima K, Kunimatsu R, Ando K, et al. Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth, human dental pulp stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497(3):876-882.
- [17] Deng Y, Guo T, Li J, et al. Repair of Calvarial Bone Defect Using Jarid1a-Knockdown Bone Mesenchymal Stem Cells in Rats. *Tissue Eng Part A*. 2018;24(9-10):711-718.
- [18] Zhang F, Peng WX, Wang L, et al. Role of FGF-2 Transfected Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Engineered Bone Tissue for Repair of Avascular Necrosis of Femoral Head in Rabbits. *Cell Physiol Biochem*. 2018;48(2):773-784.
- [19] Camorani S, Hill BS, Fontanella R, et al. Inhibition of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Homing Towards Triple-Negative Breast Cancer Microenvironment Using an Anti-PDGFR β Aptamer. *Theranostics*. 2017;7(14):3595-3607.
- [20] Li F, Niyibizi C. Engraftability of Murine Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cell Subpopulations in the Tissues of Developing Mice following Systemic Transplantation. *Cells Tissues Organs*. 2016;201(1):14-25.
- [21] 尹燕雪,李传伟,于爱莲,等. 盐霉素通过TGF β 1/Smad信号通路抑制MMP-2、9降低CD44+/CD24-/low表型乳腺癌干细胞迁移和侵袭能力[J].临床与实验病理学杂志, 2016,32(3):262-267.
- [22] Cao H, Heazlewood SY, Williams B, et al. The role of CD44 in fetal and adult hematopoietic stem cell regulation. *Haematologica*. 2016;101(1):26-37.
- [23] Scioli MG, Bielli A, Gentile P, et al. Combined treatment with platelet-rich plasma and insulin favours chondrogenic and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in three-dimensional collagen scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(8):2398-2410.
- [24] Fujioka-Kobayashi M, Schaller B, Saulacic N, et al. Growth factor delivery of BMP9 using a novel natural bovine bone graft with integrated atelo-collagen type I: Biosynthesis, characterization, and cell behavior. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(2):408-418.
- [25] Han X, Liu H, Kuang X, et al. Silk Fibroin Improves the Release of Nerve Growth Factor from Hydroxyapatite Particles Maintaining its Bioactivity. *Curr Drug Deliv*. 2018;15(6):879-886.
- [26] 王裕祥,王卫东,杨应忠,等.NGF、转化生长因子 β 1、成纤维细胞生长因子在骨折愈合中的作用效果分析[J].湖南师范大学学报(医学版),2018,15(3):95-98.
- [27] Chen WH, Mao CQ, Zhuo LL, et al. Beta-nerve growth factor promotes neurogenesis and angiogenesis during the repair of bone defects. *Neural Regen Res*. 2015;10(7):1159-1165.