

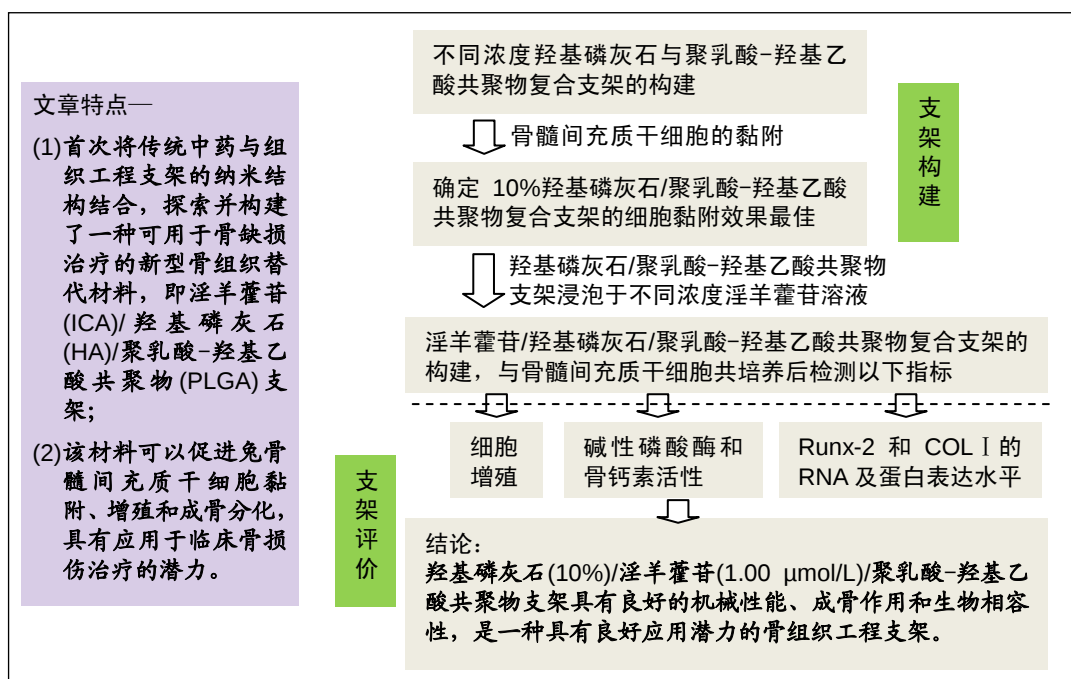
骨髓间充质干细胞在淫羊藿苷/羟基磷灰石/聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架上的成骨

王德欣¹, 许战武¹, 裴国献² (¹解放军联勤保障部队第962医院骨科, 黑龙江省哈尔滨市 150086; ²空军军医大学西京医院骨科, 陕西省西安市 710049)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2083

ORCID: 0000-0002-9770-9109(王德欣)

文章快速阅读:



王德欣, 男, 1986 年生, 辽宁省铁岭市人, 汉族, 2013 年空军军医大学(原第四军医大学)毕业, 博士, 主治医师, 主要从事骨科学、骨组织工程方面的研究。

通讯作者: 裴国献, 博士, 主任医师, 空军军医大学西京医院, 陕西省西安市 710049

文献标识码:A

投稿日期: 2019-09-11

送审日期: 2019-09-12

采用日期: 2019-12-05

在线日期: 2020-03-16



文题释义:

纳米结构: 是尺寸介于分子和微米尺度间的物体结构。当纳米羟基磷灰石与高分子材料物理混合后, 羟基磷灰石会发生自聚, 从而在材料表面产生纳米结构。这种纳米结构有利于细胞(如骨髓间充质干细胞)的黏附, 是骨修复材料表面细胞增殖和后期成骨分化的基础。

成骨分化: 当干细胞接受诱导时可以向成骨细胞转变。淫羊藿苷高分子复合支架与间充质干细胞共培养一段时间后, 其骨分化标志物碱性磷酸酶和骨钙素的活性增高, 同时成骨相关基因和蛋白(Runx-2、COL I)表达水平上升, 即细胞在淫羊藿苷诱导下发生了成骨分化。

摘要

背景: 近年来, 骨组织工程技术为临床治疗骨缺损提供了全新的思路 and 模式。该研究首次将传统中药与组织工程支架的纳米结构结合, 以期探索并构建一种可用于骨缺损治疗的新型骨组织替代材料。

目的: 研究淫羊藿苷(icariin, ICA)/羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)/聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)复合支架的成骨活性。

方法: 将 HA 与 PLGA 通过物理共混的方式制成 HA/PLGA 复合支架, 然后将其浸泡于不同浓度的 ICA 溶液中, 从而得到 ICA/HA/PLGA 支架。利用兔骨髓间充质干细胞分别对复合支架的细胞黏附、增殖、成骨作用和细胞毒性进行评价。细胞黏附、细胞增殖和细胞毒性采用 MTT 法进行检测, 碱性磷酸酶活性和骨钙素活性采用 ELISA 法进行检测, 成骨相关基因和蛋白表达水平分别用荧光定量 PCR 和 Western blot 法进行检测。

结果与结论: ①PLGA 中加入适量 HA 可以提高支架的力学强度, 且在 HA 含量为 10%时效果最佳, 拉伸强度为(1.67±0.37) MPa; 压缩模量为(4.17±1.62) MPa, 且会在支架表面形成纳米结构; 该微结构可以促进骨髓间充质干细胞在支架表面的黏附; ②ICA 不会影响骨髓间充质干细胞在复合支架上的增殖, 且 1.00 μmol/L ICA 水溶液浸泡后的 ICA/HA/PLGA 复合支架具有最优的成骨分化功能, 其碱性磷酸酶活性、骨钙素活性、成骨相关基因和蛋白(Runx-2 和 COL I)的表达水平均最高; ③ICA/HA/PLGA 复合支架无细胞毒性; ④结果表明, HA(10%)/ICA(1.00 μmol/L)/PLGA 支架具有良好的机械性能、成骨作用和生物相容性, 是一种具有良好应用潜力的骨组织工程支架。

关键词:

组织工程支架; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; 羟基磷灰石; 淫羊藿苷; 骨缺损; 成骨诱导

中图分类号: R459.9; R318.08; R681

Wang Dexin, MD, Attending physician, Department of Orthopedics, 962 Hospital of PLA Joint Logistic Support Force, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Pei Guoxian, MD, Chief physician, Department of Orthopedics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710049, Shaanxi Province, China

基金资助:

黑龙江省自然科学基金项目(QC2017120), 项目负责人: 王德欣

缩略语:

聚乳酸-羟基乙酸共聚物: poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA; 羟基磷灰石: hydroxyapatite, HA; 淫羊藿苷: icariin, ICA; 骨髓间充质干细胞: bone mesenchymal stem cells, BMSCs

Osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells on hydroxyapatite/icariin/poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds

Wang Dexin¹, Xu Zhanwu¹, Pei Guoxian² (¹Department of Orthopedics, 962 Hospital of PLA Joint Logistic Support Force, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China; ²Department of Orthopedics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710049, Shaanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone tissue engineering has provided a novel ideal for treating bone defects in clinic. This study is the first to combine traditional Chinese medicine with the nanostructures of tissue-engineered scaffolds in order to explore and construct a new bone tissue substitute material for the treatment of bone defects.

OBJECTIVE: To investigate the osteogenic activity of icariin (ICA)/hydroxyapatite (HA)/poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) composite scaffolds.

METHODS: A HA/PLGA composite scaffold was prepared by physical blending of HA and PLGA, and was then soaked in ICA solution of different concentrations to obtain the HA/ICA/PLGA scaffold. Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells were used to evaluate the cell adhesion, proliferation, osteogenesis and cytotoxicity of the composite scaffold. The cell adhesion, proliferation and cytotoxicity were detected by MTT method. The activities of alkaline phosphatase and osteocalcin were detected by ELISA. The expression levels of osteogenic genes and proteins were detected by fluorescence quantitative PCR and western blot assay, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Adding appropriate amount of HA into PLGA could improve the mechanical strength of the scaffold, and 10% HA had the best effect with tensile strength of (1.67±0.37) MPa, and compression modulus of (4.17±1.62) MPa, and nanostructure would be formed on the surface of the scaffold. The nanostructure could promote the adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells on the surface of the scaffold. ICA did not affect the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells on the composite scaffold. However, the HA/PLGA composite scaffold soaked in 1.00 μmol/L ICA aqueous solution had the optimal osteogenic differentiation function, and the expression levels of alkaline phosphatase, osteocalcin, osteogenic related genes and proteins (Runx-2 and COL I) were increased. The ICA/HA/PLGA scaffold had no cytotoxicity. These results suggest that HA (10%)/ICA (1.00 μmol/L)/PLGA scaffold has good mechanical properties, osteogenesis and biocompatibility, which has the potential to be a favorable scaffold for bone tissue engineering.

Key words: tissue engineering scaffolds; poly(lactic-co-glycolic acid); hydroxyapatite; icariin; bone defects; osteogenic induction

Funding: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. QC2017120 (to WDX)

0 引言 Introduction

骨缺损一般是指骨质缺损长度超过2 cm以上或骨周径超过50%, 通常是由于严重开放性粉碎性骨折、骨髓炎、骨肿瘤切除、先天性疾病等原因导致^[1]。目前, 骨缺损主要采用修复重建方法(牵引成骨技术、诱导膜技术和组织工程技术等)进行治疗, 但因手术复杂、治疗周期长、术后并发症多和术后合并软组织不佳等问题, 仍旧是临床治疗的难题^[2-3]。近年来, 随着生物材料和生物细胞等技术的快速发展, 骨组织工程技术为临床治疗骨缺损提供了全新的思路 and 模式^[1, 4-5]。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)是国内外公认的一种可降解、生物相容性良好的生物材料, 被广泛应用于骨组织替代支架的研究。然而, PLGA亲水性差且不具备成骨诱导性, 因此不利于种子细胞的黏附、生长和分化。羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)是动物骨的主要化学成分, 其与生物材料制备的组织支架具有良好的生物相容性、更快的骨再生速度以及无需中间连接组织直接与再生骨结合等优点^[6-7], 但HA复合支架却因缺少细胞因子而无法实现成骨诱导作用^[8]。淫羊藿苷(icariin, ICA)是一种淫羊藿植物来源的黄酮^[9], 可作为一种骨诱导活性因子用于骨再生, 有良好的临床应用前

景^[10-11]。将HA与ICA通过3D打印技术制成复合支架可以有效促进骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化、增加骨髓中神经生长因子表达水平, 从而具有修复骨缺损的潜力^[12]。此外, ICA也可促进聚乳酸/HA支架上的MC3T3-E1细胞增殖和成骨分化^[13]。

本研究选用降解速度更为可控的PLGA做为支架基底材料, 复合HA并确定其含量对支架微结构、力学性能和细胞黏附能力的影响, 然后该支架再进行ICA物理吸附修饰, 最后观察ICA/HA/PLGA复合支架对兔BMSCs的成骨作用。此研究首次将传统中药与组织工程支架的纳米结构结合, 以期探索并构建一种可用于骨缺损治疗的新型骨组织替代材料。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年5月至2019年4月在西京医院动物实验室完成。

1.3 材料 PLGA(中国纺织研究院); HA(上海麦克林生化科技有限公司); ICA(中国药品生物制品检定所); MTT及成骨相关基因引物(生工生物工程(上海)股份有限公司); 碱性磷酸酶和骨钙素活性检测ELISA试剂盒(上海康朗生物

科技有限公司);所有抗体(北京博奥森生物技术有限公司);NIH3T3细胞(中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心)。

实验动物: 5 d龄的新西兰幼兔由空军军医大学动物实验中心提供。

1.4 实验方法

1.4.1 复合支架制备 将HA与PLGA二氧六环溶液(0.12 g/mL)混合,其中HA含量分别为0, 5%, 10%, 20%, 40%^[14],采用冷冻萃取与致孔剂相结合的双工艺制备HA/PLGA多孔复合支架^[15]。即将HA/PLGA溶液与丙烯酸微球进行1:1混合,然后液氮中冷冻成圆盘;将圆盘浸入-20℃乙醇中2 d(每天更换3次乙醇),除去圆盘中的二氧六环溶液;将圆盘裁成所需尺寸(直径6 cm,厚度5 mm)后浸入室温乙醇中10 d(每天更换3次乙醇)直至洗脱液中没有丙烯酸;最后将样品在真空烘箱中烘干,密封保存,备用。

将HA/PLGA复合支架分别浸入0, 0.01, 0.10, 1.00, 10.00 μmol/L的ICA水溶液中12 h,真空冷冻干燥48 h,最终得到ICA/HA/PLGA复合支架。

1.4.2 支架表面形貌表征 为了观察支架的内部形态,首先将支架在液氮中破碎,然后样品表面喷金,通过场发射扫描电子显微镜(FE-SEM)在20 kV加速电压和高真空下进行形貌表征。

1.4.3 力学性能测试 参照国标(GB 9641-1988和GB 8813-88),将HA/PLGA复合支架制成测试试样,并采用万能试验机进行拉伸强度、断裂伸长率、压缩模量测试。

1.4.4 兔BMSCs制备及培养 将5 d龄的新西兰幼兔在无菌操作台上全身麻醉后,剪取股骨与胫骨,然后用含有双抗的α-MEM培养基反复冲洗骨髓腔,将冲洗液收集入离心管中,离心,弃上清液,加入α-MEM培养基重悬,再次离心后得到BMSCs,放入培养箱中培养,每隔3 d更换1次培养液,观察BMSCs生长状况。待BMSCs贴壁生长并在培养皿中增殖约90%后,对其进行传代培养,然后将传代到第3代的BMSCs进行以下实验。

兔骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	新西兰幼兔股骨与胫骨骨髓
基础培养基:	α-MEM 培养基
添加材料:	体积分数为 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素
细胞培养及传代:	原代细胞培养 4 d 开始换液,之后每隔 3 d 换液 1 次,待细胞在培养皿中增殖约 90%时开始传代,按 1:3 比例传代,3-5 d 传 1 代(视细胞生长状态),共传 3 代
细胞鉴定:	流式细胞鉴定法
伦理学批准:	该实验经过西京医院动物实验伦理委员会批准

1.4.5 细胞黏附和增殖 将裁剪好的ICA/HA/PLGA或HA/PLGA复合支架放入24孔板中,紫外光下照射2 h达到

灭菌目的。将BMSCs以 $4 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度重悬于含体积分数为10%胎牛血清的L-DMEM培养基中。取1 mL细胞混悬液加入装有ICA/HA/PLGA或HA/PLGA复合支架的24孔板中,置于培养箱中培养4 h后用MTT法评价HA/PLGA对BMSCs黏附水平的影响,从而筛选出后续实验采用的HA浓度,培养3, 6, 9 d后用MTT法测定ICA/HA/PLGA对BMSCs增殖水平的影响。

1.4.6 碱性磷酸酶和骨钙素活性检测 将无菌的ICA/HA/PLGA复合支架放入24孔板中,然后将BMSCs种植于其表面(2×10^4 /孔),在培养箱中培养3, 6, 9 d后弃去原培养液,PBS冲洗3次,然后加入0.25%胰酶消化,收集细胞,PBS冲洗3次,加入细胞裂解液,按ELISA试剂盒说明书操作,计算碱性磷酸酶和骨钙素活性。

1.4.7 荧光定量PCR检测成骨相关基因Runx-2和COL I表达水平 将无菌的ICA/HA/PLGA复合支架放入24孔板中,然后将BMSCs种植于其表面(2×10^4 /孔),在培养箱中培养3, 6, 9 d后收集细胞。采用RNA提取试剂盒提取总RNA,然后反转录合成cDNA,采用荧光定量PCR检测成骨相关基因Runx-2和COL I表达水平。选用GAPDH为对照基因,对目标检测基因进行标准化。引物序列见表1,反应条件为:94℃预变性2 min后变性20 s,58℃退火20 s后72℃延伸20 s,持续25个循环;然后86℃再延伸10 s。

表 1 基因引物序列
Table 1 Primer sequences

检测基因	上游引物序列	下游引物序列
Runx-2	5'-GAC TGT GGT TAC CGT CAT GGC-3'	5'-ACT TGG TTT TTC ATA ACA GCG GA-3'
COL I	5'-CAT CAA GGT CTT CTG CGA CA-3'	5'-CTT GGG GTT CTT GCT GAT GT-3'
GAPDH	5'-CTG GGC TAC ACT GAG CAC C-3'	5'-AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG-3'

1.4.8 Western blot检测Runx-2和COL I蛋白表达水平 将无菌的ICA/HA/PLGA复合支架放入24孔板中,然后将BMSCs种植于其表面(2×10^4 /孔),在培养箱中培养3, 6, 9 d后收集细胞,提取总蛋白,采用SDS-PAGE分离蛋白样品;以电转印法将电泳条带转印到PVDF膜上,用10%羊奶粉水溶液4℃封闭过夜;再分别以Runx-2、COL I和GAPDH单克隆抗体4℃孵育过夜,洗涤;加入IgG二抗孵育3 h,洗涤;最后加入ECL化学发光液,在暗室中曝光、显影、定影,电脑扫描,记录并分析结果。

1.4.9 细胞毒性 根据ISO 10993-5: 2009测试材料的细胞活力(即细胞毒性)。将HA含量10%、ICA浸泡浓度为1.00 μmol/L的ICA/HA/PLGA复合支架浸入37℃的DMEM溶液中,然后在1, 5, 10, 20, 30 d吸取上清液。将NIH3T3细胞(1×10^4 /孔)种植于96孔板中,培养24 h后将含体积分数10%胎牛血清的支架提取液(100 μL)和新鲜DMEM培养基(作为100%)添加到相应孔中,孵育24 h后采

用MTT法定量分析细胞活力。

1.5 主要观察指标 支架的力学强度、细胞黏附和增殖水平、碱性磷酸酶和骨钙素的活性、Runx-2和COL I的RNA及蛋白表达水平。

1.6 统计学分析 使用SPSS 17.0软件对数据进行分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,并选用 t 检验进行数据间统计分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 HA/PLGA复合支架的力学性能及表面形貌 将0, 5%, 10%, 20%, 40%的HA与PLGA共混后制成多孔(10–400 μm)复合支架,见图1A,其拉伸强度和压缩模量均呈现先升高后降低的趋势,且在HA含量为10%时达到最大值($P < 0.05$),见表2。对HA(10%)/PLGA的表面形貌进行观察,发现在其表面会形成纳米结构,见图1B(红圈内)。将BMSCs在HA/PLGA支架上培养4 h后评价其黏附水平,由表2和图2可见随着复合支架中HA含量升高细胞黏附量先升高后降低,这暗示着HA/PLGA支架表面的纳米结构可能会在一定程度上利于细胞黏附。

表2 HA/PLGA复合支架的力学性能及细胞黏附水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Table 2 Mechanical properties and cell adhesion level of hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds

复合支架(HA含量)	拉伸强度(MPa)	断裂伸长率(%)	压缩模量(MPa)	细胞黏附率(%)
HA/PLGA (0%)	0.71 $\pm$ 0.15	163.8 $\pm$ 14.9	2.37 $\pm$ 0.84	100.01 $\pm$ 0.82
HA/PLGA (5%)	0.89 $\pm$ 0.11	95.5 $\pm$ 10.9	3.26 $\pm$ 0.95	132.04 $\pm$ 4.97
HA/PLGA (10%)	1.67 $\pm$ 0.37	89.4 $\pm$ 8.6	4.17 $\pm$ 1.62	165.88 $\pm$ 6.06
HA/PLGA (20%)	1.32 $\pm$ 0.40	76.2 $\pm$ 7.4	3.09 $\pm$ 1.36	192.53 $\pm$ 5.40
HA/PLGA (40%)	0.48 $\pm$ 0.28	50.8 $\pm$ 11.3	2.19 $\pm$ 1.54	159.69 $\pm$ 9.33

表注: HA: 羟基磷灰石; PLGA: 聚乳酸-羟基乙酸共聚物

2.2 BMSCs在ICA/HA/PLGA复合支架上的增殖水平 根据HA/PLGA复合支架的力学强度和细胞黏附水平,选取10%含量HA制备ICA/HA/PLGA复合支架,同时支架表面的纳米结构没有被破坏,见图1C(红圈内)。培养3, 6, 9 d后, BMSCs在ICA/PLGA和ICA/HA/PLGA复合支架上增殖,见图3。在HA含量相同的情况下,支架表面的细胞生长情况不受ICA浓度影响。但在ICA浓度(1.00 $\mu\text{mol/L}$)相同情况下,没有HA的支架其表面细胞生长程度缓慢。这是因为HA会影响细胞在支架表面的黏附,即HA存在时支架表面细胞黏附的更多,则更利于细胞的生长。

2.3 BMSCs在ICA/HA/PLGA复合支架上的成骨作用 将BMSCs培养在不同浓度ICA溶液浸泡后的HA/PLGA支架上,然后评价其碱性磷酸酶和骨钙素活性。随着ICA溶液浓度升高,复合支架对BMSCs的碱性磷酸酶和骨钙素活性

呈先上升后下降的影响,见图4。ICA溶液浓度为1.00 $\mu\text{mol/L}$ 时, ICA/HA/PLGA支架上BMSCs的碱性磷酸酶和骨钙素活性最高,即对细胞的成骨诱导作用最为明显。

此外, 将BMSCs在HA/PLGA、ICA(1.00 $\mu\text{mol/L}$)/PLGA和ICA(1.00 $\mu\text{mol/L}$)/HA/PLGA上培养9 d后进行碱性磷酸酶和骨钙素活性比较,发现ICA(1.00 $\mu\text{mol/L}$)/HA/PLGA支架最利于细胞成骨分化,见表3。说明ICA(1.00 $\mu\text{mol/L}$)/HA/PLGA支架通过HA促进细胞黏附而加快细胞的成骨分化进程。

表3 复合支架上骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶和骨钙素活性 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Table 3 Activities of alkaline phosphatase and osteocalcin of bone marrow mesenchymal stem cells on the composite scaffolds

指标	HA/PLGA	ICA(1.00 $\mu\text{mol/L}$)/PLGA	ICA(1.00 $\mu\text{mol/L}$)/HA/PLGA
碱性磷酸酶(U/L)	11.8 $\pm$ 2.8	29.6 $\pm$ 3.3	48.0 $\pm$ 5.1
骨钙素($\mu\text{g/L}$)	69.7 $\pm$ 6.0	104.3 $\pm$ 4.1	138.7 $\pm$ 6.8

表注: HA: 羟基磷灰石; PLGA: 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; ICA: 淫羊藿苷

为进一步确定复合支架的成骨作用,对培养在其表面BMSCs的成骨相关基因和蛋白(Runx-2和COL I)表达水平进行检测。与对照组[HA(10%)/PLGA]相比, ICA(1.00 $\mu\text{mol/L}$)/HA(10%)/PLGA复合支架组细胞Runx-2和COL I在mRNA和蛋白水平上均表达更高($P < 0.05$),且随着时间的延长表达量升高,见图5, 6。

2.4 ICA/HA/PLGA复合支架的细胞毒性 将ICA(1.00 $\mu\text{mol/L}$)/HA(10%)/PLGA复合支架进行细胞毒性评价,图7结果显示,2种复合支架上细胞存活率均大于90%,没有细胞毒性,即生物相容性良好。

3 讨论 Discussion

骨缺损一直是临床治疗的难点,而骨组织工程技术的发生和发展正为其提供了新的思路 and 模式。通常骨组织工程支架包括支架材料、种子细胞和成骨活性分子^[16]。理想的骨替代材料应具有良好的生物相容性、与骨组织匹配的力学性能、炎症反应小、无毒性、骨再生诱导性和可加工性等。合成的可降解材料因其力学性能优异、无免疫原性、可加工性强和在生理环境下逐步降解而陆续应用于骨组织工程技术领域。目前,临床真正使用的可降解支架生物材料主要是聚乙醇酸和聚乳酸。PLGA是乳酸(LA)和乙醇酸(GA)的共聚物,可通过控制化学组成而调节其降解性能,是骨组织工程支架研究的热点生物材料之一^[17-18]。然而, PLGA由于亲水性差,且不具备成骨诱导性,因此不利于种子细胞的黏附、生长和分化^[19-20]。HA($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)与人骨化学组成十分相似,且释放的钙离子可以促进细胞增殖,利于骨组织再生与重建^[6, 21]。研究表明, HA与生物材料复合支架可提高材料的亲骨性和力学强度,利于细胞黏附^[22]。

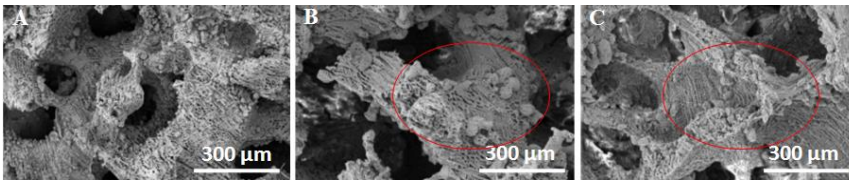
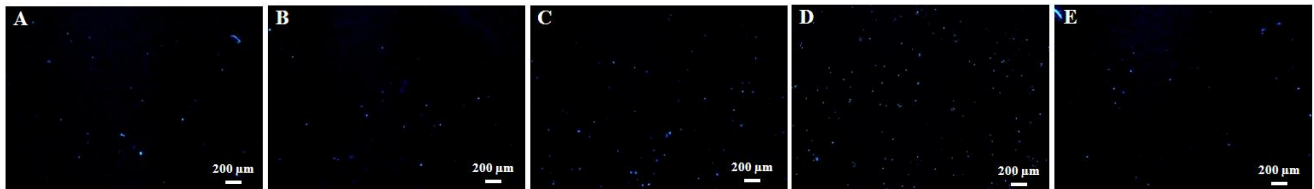


图1 支架的表面形貌

Figure 1 Surface morphology of the scaffolds

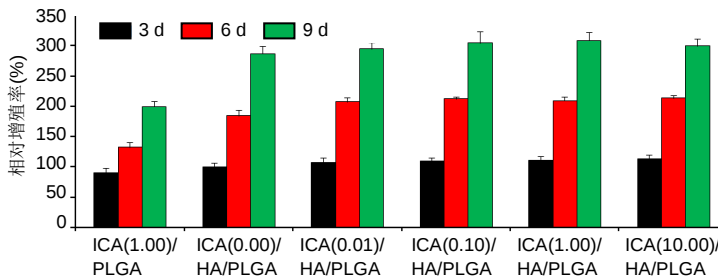
图注: 图中 A 为 PLGA 支架; B 为 HA/PLGA(HA 含量为 10%)复合支架; C 为 ICA/HAP/PLGA 复合支架(HA 含量为 10%, ICA 浓度为 1.00 μmol/L)。HA: 羟基磷灰石; PLGA: 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; ICA: 淫羊藿苷。红圈为 HA 在 PLGA 表面形成的纳米结构



图注: 图中 A-E 分别为骨髓间充质干细胞在 HA(0, 5%, 10%, 20%, 40%)/PLGA 多孔复合支架上的黏附情况。HA: 羟基磷灰石; PLGA: 聚乳酸-羟基乙酸共聚物

图2 不同 HA 含量 PLGA 支架上骨髓间充质干细胞黏附的荧光图片

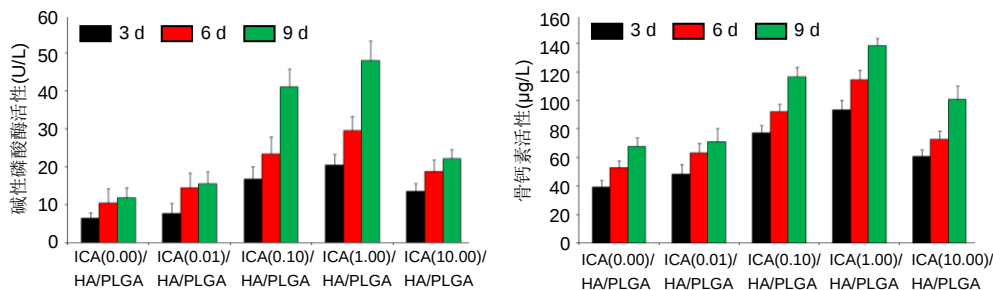
Figure 2 Fluorescent images of bone marrow mesenchymal stem cells attached to poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds with different hydroxyapatite contents



图注: 在 HA 含量相同的情况下, 支架表面的细胞生长情况不受 ICA 浓度影响。在 ICA 浓度(1.00 μmol/L)相同情况下, 没有 HA 的支架其表面细胞生长程度缓慢。HA: 羟基磷灰石; PLGA: 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; ICA: 淫羊藿苷(括号内为淫羊藿苷浓度)

图3 骨髓间充质干细胞在不同浓度 ICA 溶液浸泡 PLGA 或 HA/PLGA 复合支架上的相对增殖率

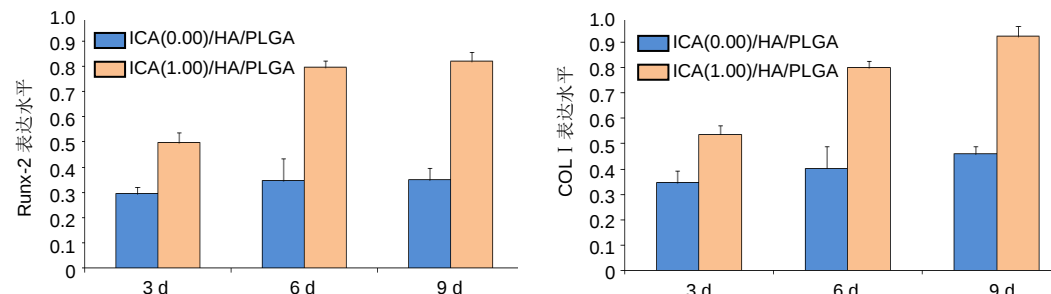
Figure 3 Relative proliferation rate of bone marrow mesenchymal stem cells on poly(lactic-co-glycolic acid) or hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds after immersion in icariin solution with different concentrations



图注: 随着 ICA 溶液浓度升高, 复合支架对骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶和骨钙素活性呈先上升后下降的趋势。ICA 溶液浓度为 1.00 μmol/L 时, ICA/HAP/PLGA 支架上骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶和骨钙素活性最高。HA: 羟基磷灰石; PLGA: 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; ICA: 淫羊藿苷(括号内为淫羊藿苷浓度)

图4 ELISA 检测骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶和骨钙素活性

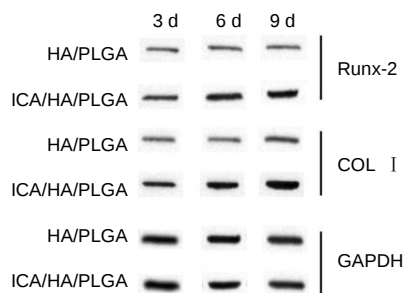
Figure 4 Alkaline phosphatase and osteocalcin activities of bone marrow mesenchymal stem cells detected by ELISA



图注: 与 HA(10%)/PLGA 相比, ICA(1.00 μmol/L)/HA(10%)/PLGA 复合支架上骨髓间充质干细胞的 Runx-2 和 COL I mRNA 表达更高($P < 0.05$), 且随着时间的延长表达量升高。HA: 羟基磷灰石; PLGA: 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; ICA: 淫羊藿苷(括号内为淫羊藿苷浓度)

图5 荧光定量 PCR 检测成骨相关基因 Runx-2 和 COL I 表达水平

Figure 5 Fluorescence quantitative PCR detection of the expression levels of osteogenesis related genes Runx-2 and COL I



图注：与 HA(10%)/PLGA 相比，ICA(1.00 $\mu\text{mol/L}$)/HA(10%)/PLGA 复合支架上骨髓间充质干细胞的 Runx-2 和 COL I 蛋白表达更高，且随着时间的延长表达量升高。HA：羟基磷灰石；PLGA：聚乳酸-羟基乙酸共聚物；ICA：淫羊藿苷

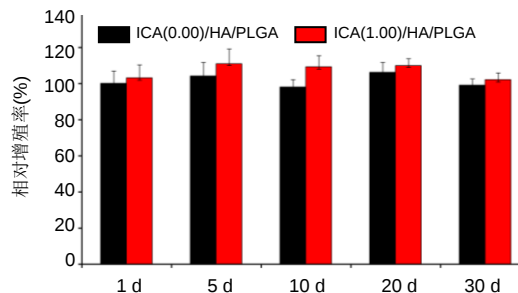
图 6 Western blot 检测 Runx-2 和 COL I 蛋白表达水平

Figure 6 Runx-2 and COL I protein expression levels detected by western blot assay

BMSCs具有体外增殖能力强、免疫原性低、诱导定向分化等优点，是骨组织支架最常用的种子细胞之一，其单一方向实现成骨分化是支架植入体内后骨组织再生的关键。诱导BMSCs成骨分化的方法主要是通过物理或化学方法在组织工程支架修饰细胞因子(如转化生长因子、核心结合因子1等)、化学药物(如地塞米松、维生素C等)、中药提取物(如人参果提取物、黄芪提取物等)和生物活性分子(如RGD短肽、骨形态发生蛋白等)^[23]。近年来，越来越多的研究指出传统中药成分ICA具有优秀的骨诱导分化作用，将其与骨组织支架复合可以促进种子细胞的增殖和分化^[9, 24-25]。

骨组织工程支架一般采用盐浸渍法、静电纺丝法、3D打印技术等工艺制备，然而盐浸渍法制备的多孔支架仅具有单一微孔结构，难以有效提供种子细胞生长空间，而静电纺丝和3D打印技术工艺十分复杂^[26]。该研究采用冷冻萃取与致孔剂相结合工艺^[15]，通过将HA与PLGA共混的方式制备了HA/PLGA支架。该方法制备的支架具有双尺寸微孔结构，其中大孔孔径为300–400 μm ，小孔孔径为10–50 μm ，孔隙率约为85%，并因为HA而在支架壁上形成了微纳米结构。实验证明，支架上的微结构利于BMSCs黏附。此外，随着支架中HA含量的增加，其力学强度也会得到提升，并在含量为10%时达到最大值，拉伸强度为(1.67 $\pm$ 0.37) MPa；压缩模量为(4.17 $\pm$ 1.62) MPa。综合HA/PLGA支架的机械强度和细胞黏附能力，实验将HA(10%)/PLGA支架浸泡在不同浓度的ICA水溶液中，从而制备ICA/HAP/PLGA复合支架。

XIE等^[27]和LUO等^[28]研究证明，ICA复合支架可以促进BMSCs分化。该研究通过评价BMSCs在ICA/HAP/PLGA复合支架上的碱性磷酸酶和骨钙素活性(其活性越高说明细胞成骨分化越明显^[29])，也证明了ICA对细胞成骨分化的促进作用，且当HA/PLGA支架浸泡在1.00 $\mu\text{mol/L}$ 浓度ICA水溶液时效果最佳，推测ICA可能通过PI3K/AKT-eNOS信号通路介导BMSCs成骨分化^[30]。此外，实验还发现HA/PLGA支架的促细胞黏附作用有助于其表面上细胞增殖，进而协同ICA(1.00 $\mu\text{mol/L}$)加速了细胞成骨分化进程。成骨相关基



图注：HA/PLGA 和 ICA/HAP/PLGA 复合支架上细胞存活率均大于 90%，说明 2 种复合支架的生物相容性良好。HA：羟基磷灰石；PLGA：聚乳酸-羟基乙酸共聚物；ICA：淫羊藿苷(括号内为淫羊藿苷浓度)

图 7 HA/PLGA 和 ICA/HAP/PLGA 复合支架的细胞毒性

Figure 7 Cytotoxicity of hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic acid) and icariin/hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds

因和蛋白(Runx-2和COL I)表达水平的升高^[24]，也进一步证明了复合支架对BMSCs的成骨作用。

综上所述，以兔BMSCs为种子细胞，以HA(10%)/PLGA为支架，复合传统中药成分ICA(1.00 $\mu\text{mol/L}$)，可以用作骨组织工程支架的替代材料。该研究提及的ICA/HAP/PLGA复合支架具有良好的力学性能，且可以促进BMSCs增殖和成骨分化，无细胞毒性。在下一步研究工作中，作者将深入研究该复合支架长期成骨诱导作用以及成骨作用机制，并将通过动物实验进一步探索其在生物体内的化学反应，最终希望能够为骨缺损组织工程治疗提供实际价值和帮助。

作者贡献：实验设计为王德欣，实验实施为王德欣和许战武，实验评估为王德欣和裴国献，资料收集为王德欣。

经费支持：该文章接受了“黑龙江省自然科学基金项目(QC2017120)”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：实验方案经西京医院动物实验伦理委员会批准，批准号为 18011。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表宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过空军军医大学西京医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] FERNANDEZ DE GRADO G, KELLER L, IDOUX-GILLET Y, et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng*. 2018;9:2041731418776819.
- [2] MORELLI I, DRAGO L, GEORGE DA, et al. Managing large bone defects in children: a systematic review of the 'induced membrane technique'. *J Pediatr Orthop B*. 2018;27(5): 443-455.
- [3] LESENSKY J, PRINCE DE. Distraction osteogenesis reconstruction of large segmental bone defects after primary tumor resection: pitfalls and benefits. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2017;27(6):715-727.
- [4] WANG S, ZHAO Z, YANG Y, et al. A high-strength mineralized collagen bone scaffold for large-sized cranial bone defect repair in sheep. *Regen Biomater*. 2018;5(5):283-292.
- [5] CHU LY, JIANG GQ, HU XL, et al. Osteogenesis, vascularization and osseointegration of a bioactive multiphase macroporous scaffold in the treatment of large bone defects. *J Mater Chem B*. 2018; 6(25): 4197-4204.
- [6] PEÑAFLORES T, CHAI Y, TAGAYA M. Hydroxyapatite Nanoparticle Coating on Polymer for Constructing Effective Biointeractive Interfaces. *Journal of Nanomaterials*.2019;(3): 1-23.
- [7] SIDDIQUI HA, PICKERING KL, MUCALO MR. A Review on the Use of Hydroxyapatite-Carbonaceous Structure Composites in Bone Replacement Materials for Strengthening Purposes. *Materials (Basel)*. 2018;11(10): E1813.
- [8] JUN SH, LEE EJ, JANG TS, et al. Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded hybrid coating on porous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(3):773-782.
- [9] CHEN B, NIU SP, WANG ZY, et al. Local administration of icariin contributes to peripheral nerve regeneration and functional recovery. *Neural Regen Res*. 2015;10(1):84-89.
- [10] 谢利娜,刘艳辉,赵波,等.淫羊藿苷与BMP-2对体外培养成骨细胞增殖的影响[J].北京口腔医学,2018,26(6):319-322.
- [11] LAI Y, CAO H, WANG X, et al. Porous composite scaffold incorporating osteogenic phytomolecule icariin for promoting skeletal regeneration in challenging osteonecrotic bone in rabbits. *Biomaterials*. 2018;153:1-13.
- [12] 石永新,逢增金,羊明智,等. 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[J].中国组织工程研究,2019,23(21):3309-3315.
- [13] 管明强,朱志霞,周观明.淫羊藿苷对聚乳酸/纳米羟基磷灰石支架上成骨细胞增殖与分化的影响[J].包头医学院学报,2018,34(1): 92-94.
- [14] 孔金海. PLLA/PLGA/HA复合材料的制备与评价[D].长沙:中南大学, 2009.
- [15] RÓDENAS-ROCHINA J, RIBELLES JL, LEBOURG M. Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(5):1293-1308.
- [16] ROSETI L, PARISI V, PETRETTA M, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;78:1246-1262.
- [17] ZHAO W, LI J, JIN K, et al. Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;59:1181-1194.
- [18] DEL CASTILLO-SANTAELLA T, ORTEGA-OLLER I, PADIAL-MOLINA M, et al. Formulation, Colloidal Characterization, and In Vitro Biological Effect of BMP-2 Loaded PLGA Nanoparticles for Bone Regeneration. *Pharmaceutics*. 2019;11(8): E388.
- [19] MARTINS C, SOUSA F, ARAÚJO F, et al. Functionalizing PLGA and PLGA Derivatives for Drug Delivery and Tissue Regeneration Applications. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(1): UNSP 1701035.
- [20] ZHAO X, HAN Y, LI J, et al. BMP-2 immobilized PLGA/hydroxyapatite fibrous scaffold via polydopamine stimulates osteoblast growth. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;78:658-666.
- [21] HAIDER A, HAIDER S, HAN SS, et al. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. *RSC Adv*. 2017; 7(13): 7442-7458.
- [22] ZHENG S, GUAN YH, YU HC, et al. Poly-L-lysine-coated PLGA/poly(amino acid)-modified hydroxyapatite porous scaffolds as efficient tissue engineering scaffolds for cell adhesion, proliferation, and differentiation. *New J Chem*. 2019; 43(25): 9989-10002.
- [23] 王帅,张霄雁,李哲海.骨髓间充质干细胞成骨细胞分化研究进展[J].医学综述,2015,21(12):2137-2139.
- [24] XU H, GE YW, LU JW, et al. Icariin loaded-hollow bioglass/chitosan therapeutic scaffolds promote osteogenic differentiation and bone regeneration. *Chem Eng J*. 2018; 354: 285-294.
- [25] WANG Z, WANG D, YANG D, et al. The effect of icariin on bone metabolism and its potential clinical application. *Osteoporosis Int*. 2018;29(3):535-544.
- [26] FU N, DONG TZ, MENG A, et al. Research progress of the types and preparation techniques of scaffold materials in cartilage tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018; 13(7): 583-590.
- [27] XIE YL, SUN WC, YAN FF, et al. Icariin-loaded porous scaffolds for bone regeneration through the regulation of the coupling process of osteogenesis and osteoclastic activity. *Int J Nanomed*. 2019; 14: 6019-6033.
- [28] LUO Y, ZHANG YD, MIU GJ, et al. Icariin promotes osteoblast differentiation and inhibits adipogenesis of bone marrow stem cells through activation of Wnt/beta-catenin signaling in vivo and in vitro. *Pharmazie*.2018;73(8):459-464.
- [29] ARIFFIN SHZ, MANOGARAN T, ABIDIN IZZ, et al. A perspective on stem cells as biological systems that produce differentiated osteoblasts and odontoblasts. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017; 12(3): 247-259.
- [30] 郭晓宇. PI3K/AKT-eNOS介导淫羊藿苷促进骨髓基质细胞和成骨细胞的成骨性分化研究[D].甘肃:甘肃农业大学, 2013.