



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R318.08

U D C 604:616.7

密 级 公开

博士学位论文

仿生纤维内硅化胶原支架材料调控
单核细胞促骨原位再生的研究

孙津龙

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 口腔医学

二级学科(专业) 口腔临床医学(修复学)

研 究 方 向 应用生物材料

指 导 教 师 陈吉华 教授

培 养 单 位 第四军医大学口腔医院修复科

二〇一七年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表.....	1
中文摘要.....	3
ABSTRACT.....	10
前 言.....	17
文 献 回 顾.....	18
1 生物材料在骨缺损修复中的应用研究进展.....	18
2 免疫系统与生物材料的相互作用.....	25
正 文.....	30
第一部分 仿生纤维内硅化胶原支架的制备与表征.....	30
实验一 仿生纤维内硅化胶原支架的 形貌特征与缓释性能.....	31
1 材料与仪器.....	31
2 方法.....	32
3 结果和讨论.....	33
4 小结.....	36
实验二 仿生纤维内硅化胶原支架的生物相容性评价.....	37
1 材料与仪器.....	37
2 方法.....	38
3 结果与讨论.....	40
4 小结.....	45
第二部分 仿生纤维内硅化胶原支架修复小鼠颅骨缺损的体内实验研究.....	46
实验三 仿生纤维内硅化胶原支架促骨缺损修复的实验研究.....	47
1 材料与仪器.....	47
2 方法.....	48
3 结果和讨论.....	50
4 小结.....	55
实验四 仿生纤维内硅化胶原支架 促血管新生的实验研究.....	56
1 材料与仪器.....	56
2 方法.....	57
3 结果与讨论.....	58
4 小结.....	61
实验五 仿生纤维内硅化胶原支架材料参与宿主免疫应答反应的实验研究.....	62
1 材料与仪器.....	62
2 方法.....	63
3 结果和讨论.....	65
4 小结.....	72
第三部分 仿生纤维内硅化胶原支架调控单核细胞影响成骨成血管的实验研究.....	73

实验六 仿生纤维内硅化胶原支架对单核细胞增殖、凋亡及细胞内活性氧的影响	74
1 材料与仪器.....	74
2 方法.....	75
3 结果和讨论.....	77
4 小结.....	80
实验七 仿生纤维内硅化胶原支架对单核细胞分化以及分泌功能的影响	81
1 材料与仪器.....	81
2 方法.....	83
3 结果与讨论.....	85
4 小结.....	89
实验八 仿生纤维内硅化胶原支架调控单核细胞促进细胞归巢和血管生成的体外实验研究.....	90
1 材料与仪器.....	90
2 方法.....	91
3 结果与讨论.....	93
4 小结.....	96
第四部分 仿生纤维内硅化胶原支架调控单核细胞的信号转导机制研究.....	98
实验九 仿生纤维内硅化胶原支架对单核细胞调控的信号转导机制研究	99
1 材料与仪器.....	99
2 方法.....	100
3 结果与讨论.....	101
4 小结.....	107
实验十 仿生纤维内硅化胶原支架促大鼠股骨缺损血管化和骨再生的实验研究.....	109
1 材料与仪器.....	109
2 方法.....	110
3 结果与讨论.....	112
4 小结.....	118
实验十一 仿生纤维内硅化胶原支架调控单核细胞促进大鼠股骨缺损修复的机制研究	119
1 材料与仪器.....	119
2 方法.....	120
3 结果与讨论.....	120
4 小结.....	123
小 结.....	124
参考文献.....	127
附 录.....	134
1. 实验仪器.....	134
个人简历和研究成果	135
致 谢.....	137

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
α -MEM	α -Minimum essential medium	基础培养基 α
APC	Allophycocyanin	别藻青蛋白
BMD	Bone mineral density	骨密度
BMSC	Bone marrow derived stem cell	骨髓间充质干细胞
BV/TV	Bone volume / total volume	骨体积/总体积
CCK-8	Cell counting kit-8	细胞计数试剂盒 8
CCR7	C-C chemokine receptor type 7	趋化因子受体 7
CSF	Colony-stimulating factor	集落刺激因子
DAB	3,3'-diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DEPC	Diethy pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	杜氏改良 Eagle 培养基
DMSO	Dimethyl sulphoxide	二甲基亚砷
DSS	Demineralized cancellous sponge strip	脱矿骨胶原支架海绵
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
Emcn	Endomucin	内皮粘蛋白
EPC	Endothelial progenitor cell	血管内皮前体细胞
ERK1/2	Extracellular regulated protein kinases 1/2	细胞外调节蛋白激酶 1/2
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FDA	Food and Drug Administration	食品药品监督管理局
FITC	Fluorescein isothiocyanate isomer I	异硫氰酸荧光素
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
HE	Eematoxylin-eosin staining	苏木精-伊红

IFN- γ	Interferon- γ	干扰素 γ
IL-2	Interleukin-2	白细胞介素 2
IL-4	Interleukin-4	白细胞介素 4
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
Micro-CT	Micro-computed tomography	显微 CT
MMA	Methyl methacrylate	甲酯甲基丙烯
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl -2-H-tetrazolium bromide	噻唑蓝
NC	Negative control	阴性对照组
OD	Optical density	光密度
PAH	Poly(allylamine) hydrochloride	聚丙烯氯化铵
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PDGF-BB	Platelet derived growth factor	血小板衍生因子
PE	Phycoerythrin	藻红蛋白
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction	实时定量聚合酶链锁反应
RMPI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640	1640 细胞培养基
ROS	Reactive oxygen species	活性氧簇
SCS	Silicified collagen scaffold	硅化胶原支架
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1	间质细胞衍生因子-1
SPF	Specific pathogen free	无特定病原体
TEM	Transmission electron microscopy	透射电子显微镜检查
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1	转化生长因子 β 1
TRAP	Tartrate acid phosphatase	抗酒石酸酸性磷酸酶
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子

仿生纤维内硅化胶原支架材料调控单核细胞促骨原位再生的研究

博士研究生：孙津龙

导师：陈吉华 教授

辅导教师：牛丽娜 副教授

第四军医大学口腔医院修复科，西安 710032

资助基金项目：

国家自然科学基金（81130078，81470773，81400555，81671012）

国家高技术研究发展计划（2015AA020942）

国家建设高水平公派研究生项目（201603170201）

教育部长江学者与创新团队发展计划（IRT13051）

中文摘要

近年来，用于骨缺损修复的人工替代材料的研究取得了很大的进展，大量新型的修复材料已在临床上取得了广泛的应用。然而不同的材料由于其理化性能、机械性能以及生物应用性能方面的不同，修复效果差异很大。生物材料在植入体内后，宿主的免疫应答反应是影响其最终应用效果的最重要的因素之一。在早期的研究中，组织修复的研究策略倾向于抑制宿主的免疫应答来提高移植的成功率。而目前普遍接受的观点认为，宿主的免疫应答能够对组织再生修复起到积极的免疫调控作用，从而促进缺损修复以及组织再生。单核细胞是宿主免疫应答调控中的重要细胞，同时也是骨改建以及骨缺损修复进程中不可或缺的关键细胞之一，单核细胞与植入体内的生物材料之间的相互作用也是影响生物材料移植成功的关键因素之一。仿生纤

维内硅化胶原支架（SCS），以胶原纤维内部无定形水合二氧化硅有序沉积为特征，是一种具有良好理化性能和机械性能的生物材料。在前期的研究中，这种支架材料，在体外实验中表现出了良好的促进骨再生修复的潜力。然而其在体内应用于骨缺损的修复效果尚不明确，同时宿主免疫系统对其产生的反应目前仍未得到相关的评估。在本研究中，我们对仿生纤维内硅化胶原支架材料在骨缺损修复中的应用进行了全面的生物学评估，验证了其在动物模型上修复骨缺损的效果，并对其与宿主的免疫调控之间的相互作用进行了相关的探索，验证了该支架材料与单核细胞之间的作用，以及通过调控单核细胞来促进组织血管化、种子细胞募集，以及促进骨再生的作用。

1. 研究思路

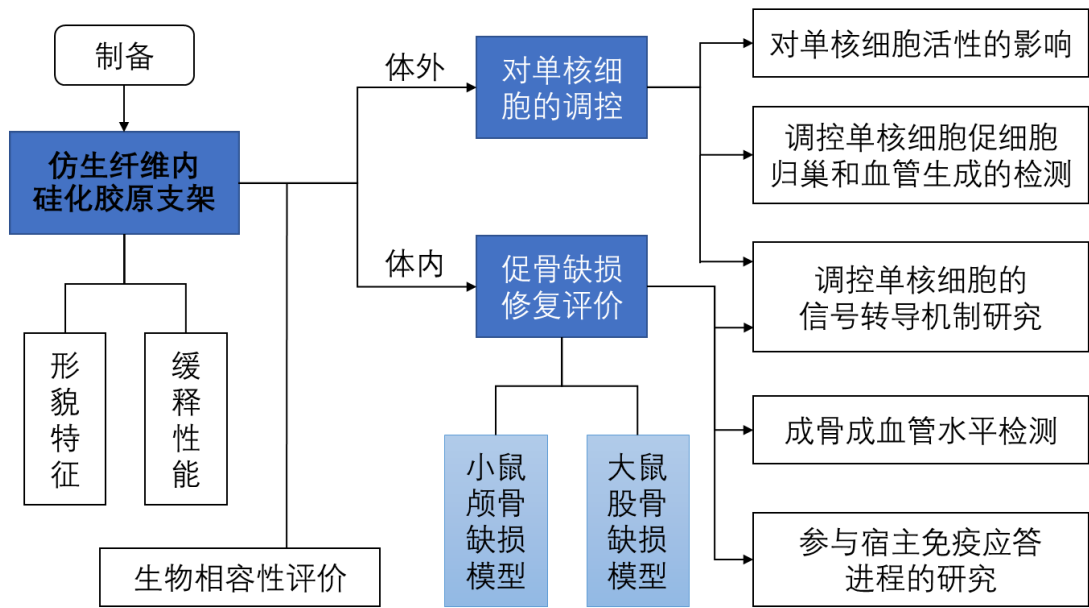
在第一部分实验中，我们采用胶原纤维模板诱导纳米液相矿物质前体（无定形硅酸）纤维内定向沉积的技术，构建出了仿生纤维内硅化胶原支架，并使用显微 CT（Micro-CT）技术和透射电子显微镜（TEM）技术对所构建出的纤维内硅化胶原支架进行了形貌观察；随后对其在体液环境中的硅酸的缓释水平进行了测定。通过小鼠体内异位植入模型对仿生纤维内硅化胶原材料的生物相容性进行了全面的评价：通过淋巴细胞二次刺激增殖实验评价硅化胶原的免疫原性；采用流式细胞技术（Flow Cytometry）评价异位植入的材料对循环淋巴细胞水平以及活性的影响；通过 ELISA 实验观察异位植入的材料对循环炎症因子水平的影响；通过植入部位组织学切片的 HE 染色来观察原位炎症细胞的浸润情况，为其进一步用于骨缺损修复提供了实验基础。

在第二部分实验中，我们应用纤维内硅化胶原支架修复了小鼠的颅骨缺损，并对其修复效果进行了评估。在植入后即刻、1 个月、3 个月时采用 Micro-CT 技术对骨缺损的修复情况、新骨形成量以及骨密度进行了测定；采用贯序荧光标记技术对修复后 3 个月时的骨改建活性进行了评估；使用修复后 3 个月时的组织标本制作硬组织切片，采用 Van Gieson 染色（VG staining）和 von Kossa 银染（VK silver staining）技术对切片分别进行染色，在组织学水平观察原位骨再生的情况；在修复后 3 个月时，采用血管造影技术对缺损原位的血管再生水平进行评估；在修复后 1 个月时进行组织学切片，通过免疫荧光技术（Immunofluorescence）、免疫组织化学技术

(Immunohistochemistry) 对缺损部位相关的单核巨噬细胞, 以及骨修复过程中的相关细胞因子表达水平进行评估, 并采用 TRAP 染色 (tartrate-resistant acid phosphatase staining) 对骨改建活性进行评估。

在第三部分实验中, 我们通过体外实验进一步对纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞的调控作用进行了深入研究。通过细胞增殖实验、凋亡实验、细胞内活性氧水平测定实验来检测支架材料对单核细胞增殖、凋亡、活性氧水平的影响; 采用 TRAP 细胞染色技术来检测支架材料对单核细胞分化的影响; 通过细胞免疫荧光染色技术、qRT-PCR 技术和 Western Blot 技术检测支架材料对单核细胞相关细胞因子分泌水平的影响; 通过 Transwell 细胞迁移实验检测支架材料与单核细胞相互作用后对骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 和血管内皮前体细胞 (EPCs) 迁移的影响; 通过 Matrigel 血管形成实验检测对 EPCs 成血管能力的影响; 通过添加中和抗体来检验支架材料调控单核细胞影响细胞迁移与血管生成的关键细胞因子。

在第四部分实验中, 我们采用仿生硅化胶原支架材料修复 SD 大鼠的股骨缺损, 进一步对支架材料通过影响单核细胞调控骨再生的信号通路进行了研究。通过显微 CT 技术、免疫组织化学技术以及 Van Geison 染色技术对支架材料修复后 1 个月时, 缺损部位的成骨水平, 以及血管生成水平进行了评估; 采用免疫荧光双标技术对缺损原位的单核细胞以及相关细胞因子的表达水平进行评估; 并进一步在体外实验中, 采用 Western Blot 技术对单核细胞相关的分子信号通路进行了检测; 采用 Western Blot 技术、TRAP 细胞染色技术以及 Transwell 细胞迁移实验、Matrigel 血管形成实验验证相关信号通路对单核细胞分化和分泌的影响; 最后通过体内应用通路抑制剂, 来观察相关信号通路阻断后, 股骨缺损修复水平的改变。



技术路线图

2. 实验结果

第一部分 仿生纤维内硅化胶原支架的制备与表征

- 1) 透射电镜观察下, 仿生纤维内硅化胶原支架材料的纤维内部间隙中可见无定形的二氧化硅有序沉积, 从而形成明显的带状结构。Micro-CT 结果可见仿生纤维内硅化胶原支架为具有多孔隙特征的三维网状纤维支架结构。在模拟体液环境中, 材料能够稳定的缓释硅酸, 在 1-10 天时缓释速度较快, 10-30 天时缓释速度趋于平稳, 平均每 100mg 硅化胶原在 10mL PBS 中暴露 30 天后, 溶液中的硅酸浓度能达到约 1.2mmol/L 的水平。
- 2) 仿生硅化胶原支架材料的生物相容性评价结果显示: 材料具有较低的免疫原性, 对淋巴细胞的二次刺激并没有引起明显的增殖反应 ($p>0.05$); 同时, 材料的异位植入对循环淋巴细胞的数量、活性没有影响 ($p>0.05$), 循环中的炎症因子浓度也维持在正常水平 ($p>0.05$); 原位组织学切片的 HE 染色结果显示, 硅化胶原支架在植入后 7 天、14 天发生了明显的吸收, 材料周围无明显炎症细胞浸润, 证明了仿生硅化胶原支架材料具有良好的生物相容性, 可以进一步安全地应用于体内骨缺损修复。

第二部分 仿生纤维内硅化胶原支架修复小鼠颅骨缺损的体内实验研究

- 3) Micro-CT 结果显示仿生纤维内硅化胶原支架材料能够明显的提升小鼠颅骨缺损的修复水平 ($p < 0.05$)。和对照组相比,在术后三个月时,能够观察到形成了更多的新骨,同时其修复后的骨组织的改建活动更加活跃。
- 4) 与对照组相比,在术后三个月硅化胶原支架材料修复后的颅骨缺损区域形成了更多的血管组织,其血管长度、厚度、连接性均明显高于对照组 ($p < 0.05$)。
- 5) 在术后一个月时,硅化胶原支架材料修复的缺损区域出现了更多的 CD31⁺Endomucin⁺双阳性的血管,并且有更多的 PDGF-BB 表达;缺损区域内 TRAP 阳性的单核细胞数量明显增多,同时单核细胞表达更多的趋化因子 SDF-1 以及转化生长因子 TGF- β 1;在硅化胶原支架材料修复后,缺损区域有更多的骨髓间充质干细胞标志物 Nestin 以及血管内皮生长因子 VEGF 的表达,提示募集到了更多的修复种子细胞 (p 均 < 0.05)。

第三部分 仿生纤维内硅化胶原支架调控单核细胞影响成骨成血管的实验研究

- 6) 硅化胶原支架材料对单核细胞的增殖、凋亡和细胞内活性氧水平均没有影响 ($p > 0.05$);材料自身所缓释的浸提液对 BMSCs 和 EPCs 的迁移也没有影响 ($p > 0.05$)。
- 7) 硅化胶原支架材料能够促进单核细胞向 TRAP 阳性的单核细胞分化 ($p < 0.05$),该类型的单核细胞能够在转录水平和翻译水平表达更多的相关细胞因子 (SDF-1, TGF- β , VEGF, PDGF-BB) (p 均 < 0.05)。
- 8) 使用硅化胶原支架材料对单核细胞进行刺激后的条件培养基能够明显的促进 BMSCs 和 EPCs 的迁移 ($p < 0.05$),及 EPCs 的成血管能力 ($p < 0.05$);中和抗体实验证明条件培养基中的 SDF-1, TGF- β 和 PDGF-BB 是促进迁移的关键细胞因子,而 TGF- β , VEGF, PDGF-BB 则是促进 EPCs 成血管的关键细胞因子。

第四部分 仿生纤维内硅化胶原支架调控单核细胞的信号转导机制研究

- 9) 硅化胶原支架材料对不同类型的骨缺损修复均有良好的应用,在大鼠股骨部分缺损的动物模型中,材料能够明显的促进血管与骨的再生 ($p<0.05$),缺损局部形成了更多的血管结构和更多的小梁骨结构 ($p<0.05$),表明其具有明显的促进愈合和骨重建的作用;免疫荧光双标的结果显示,缺损区域有更多的 $CD31^+Emcn^+$ 双阳性的血管生成 ($p<0.05$),同时表达更多的 $TRAP^+$ 的单核细胞 ($p<0.05$),单核细胞的 $PDGF-BB$ 分泌也明显增多 ($p<0.05$)。
- 10) 在体外实验中,硅化胶原支架材料刺激后,单核细胞的 $P38$ 和 $ERK1/2$ 被激活;使用通路抑制剂分别抑制 $P38$ 和 $ERK1/2$ 后,发现单核细胞向 $TRAP$ 阳性细胞的分化和相关细胞因子 ($SDF-1$, $TGF-\beta$, $VEGF$, $PDGF-BB$) 的分泌水平明显下降 ($p<0.05$),其与支架材料共培养后的条件培养基促进细胞迁移和 $EPCs$ 成血管的能力也明显下降 ($p<0.05$);进一步的体内实验研究表明,在 $P38$ 抑制后,大鼠股骨缺损局部形成的 $CD31^+Emcn^+$ 双阳性的血管明显减少 ($p<0.05$), $TRAP$ 阳性单核细胞的数目以及单核细胞表达 $PDGF-BB$ 的水平也明显降低 (p 均 <0.05),表明硅化胶原支架材料能够通过激活 $P38$ 信号通路来进一步促进单核细胞的分化和分泌能力,从而影响骨缺损修复的进程。

3. 结论

- 1) 仿生纤维内硅化胶原支架材料表现出了低免疫原性的特征,能够使宿主的免疫炎症反应控制在较低的水平范围内,并且不会引起局部组织的炎症细胞浸润以及循环炎症细胞和炎症因子的上升,具有良好的生物相容性,在生物应用方面具有明显的优势。
- 2) 纤维内仿生硅化胶原支架能够应用于不同类型的骨缺损修复(小鼠颅骨缺损,大鼠股骨部分缺损),可以促进缺损局部的血管再生和骨重建,具有良好的骨缺损修复效果。
- 3) 在骨缺损的修复早期,仿生纤维内硅化胶原支架材料能够通过单核细胞 $P38$ 信号通路的激活,促进单核细胞向 $TRAP$ 阳性单核细胞分化,分泌更多的相关细胞

因子 (SDF-1, TGF- β , VEGF, PDGF-BB); 一方面能够促进局部的血管生成, 尤其是形成更多的 CD31⁺Emcn⁺双阳性血管, 更好的促进成骨成血管的协同作用 (Coupling), 另一方面能够募集更多的宿主种子细胞 (BMSCs, EPCs) 到缺损区域, 从而进一步促进局部的血管生成和骨再生。

综上所述, 仿生纤维内硅化胶原支架材料具有良好的生物相容性, 在动物骨缺损模型的修复中表现出了良好的修复效果, 能够明显促进缺损局部的血管化和骨生成; 仿生纤维内硅化胶原支架材料能够通过调节单核细胞的调控, 在修复早期促进单核细胞的分化和分泌功能, 从而进一步促进局部的血管化和宿主种子细胞的募集, 与传统的骨修复材料需要额外加载种子细胞或者细胞因子相比, 在应用方面具有便捷性和明显的优势, 在骨组织的再生修复的应用中具有明显的转化潜力和应用前景。

关键词: 骨再生; 血管化; 纤维内硅化; 单核细胞; 免疫调控; 细胞归巢

Biomimetic intrafibrillarly silicified collagen scaffold promotes *in situ* bone regeneration by monocyte modulation

Candidate for Ph.D.: Jinlong Sun

Supervisor: Prof. Jihua Chen

Instructor: A/Prof. Lina Niu

Department of Prosthodontics, School of Stomatology, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, Shannxi, China

Sponsored Programs: National Nature Science Foundation of China grant 81130078,
81470773, 81400555 and 81671012

National High Technology Research and Development Program of China
2015AA020942

China Scholarship Council Program 201603170201

Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University IRT13051

Abstract

In recent years, researches focus on bone regenerative materials have gained great development for clinical use. However, the different physicochemical properties, mechanical properties and biological application of these materials usually cause large diversity in the restorative efficacies. Host immune response is one of the most critical factors affecting the fate of biomaterials *in vivo*. Previously, tissue regeneration strategies focused on minimizing host immune responses to promote engraftment efficacy. However, it is now generally accepted that the immune system exerts positive immunomodulatory effects on tissue regeneration, leading to the progress of defect repair and tissue regeneration.

Monocytes are crucially involved in the coupling process of osteoblast bone formation and osteoclast bone resorption, which are essential for bone regeneration. The interaction between monocytes and the implanted biomaterials directly affect the fate of the materials and engraftment efficacy.

Biomimetic intrafibrillar silicified collagen is a kind of biomaterials with favorable physicochemical properties and mechanical properties. 3-D silicified collagen scaffold (SCS) based on this material is infiltrated with highly-ordered, intrafibrillar amorphous silica nanoparticles that are derived from the condensation of poly(amine)-stabilized orthosilicic acid. Our previous *in vitro* study showed that the scaffold has great potential in promoting bone regeneration.

In our present study, we evaluate the biological application potential of the intrafibrillar silicified collagen scaffold in bone regeneration. Animal models were employed to validate the bone repair efficiency of this scaffold. The interaction of the scaffold and host immune response were also investigated, including the effect of SCS on monocytes, as well as promoted angiogenesis, cell homing and bone regeneration by this monocyte modulation.

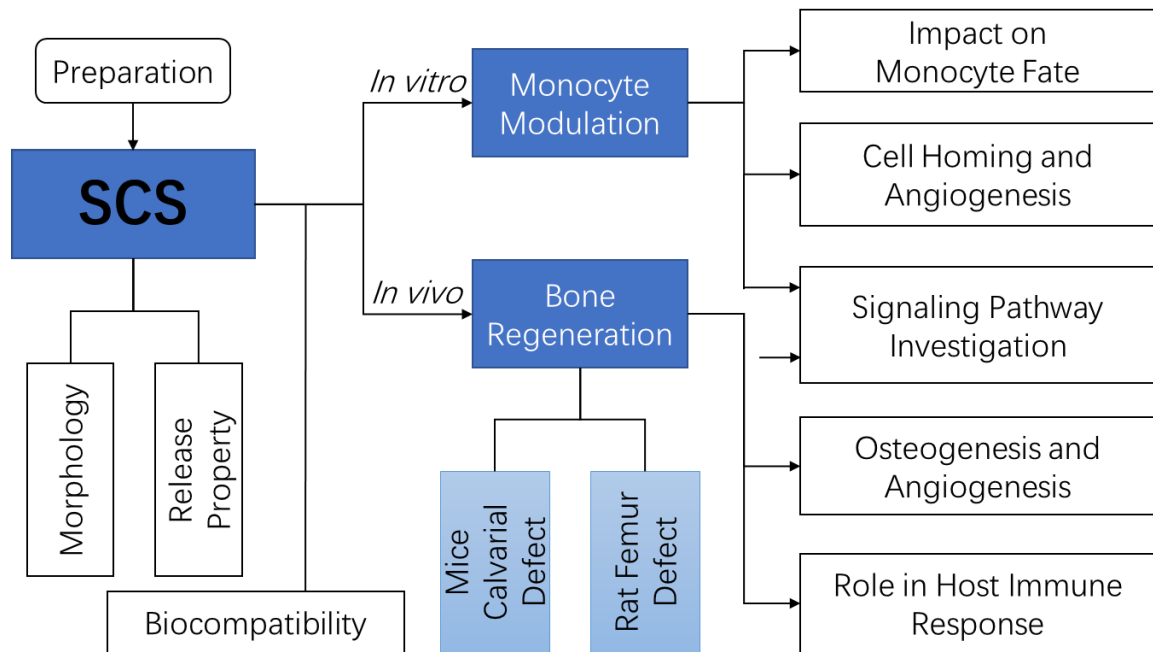
1. Scheme

- 1) With the help of transmission electron microscopy (TEM) and micro computed tomography (Micro-CT), we characterized the morphology features of the intrafibrillar silicified collagen scaffold. Cumulative release profile of Si derived from immersion of silicified collagen scaffolds in phosphate-buffered saline over a 30-day period was also calculated. The *in vivo* subcutaneous implant model was employed to evaluate the biocompatibility of the scaffold. *In vitro* proliferation of lymphocytes was evaluated to determine the immunogenicity of the scaffold. We also used flow cytometry to evaluate the effect of scaffold on the level and the activity of circulatory lymphocytes. ELISA was used to evaluate the level of circulatory inflammatory factors. HE staining was used to observe the infiltration of inflammatory cells *in situ*.
- 2) In the second part of this study, we built a mice calvarial defect model and the

intrafibrillar silicified collagen scaffold was used for defect repair. Micro-CT scanning was used to detect the level of bone regeneration, volume of new bone formation and bone mineral density immediately, 1 month and 3 months after scaffold implantation, respectively. Fluorescent double-labeling of calcein and alizarin red were used to evaluate the activity of bone regeneration at 3 months after implantation. And the undecalcified sections were made for Van Gieson staining and von Kossa silver staining to evaluate the efficiency of bone formation. Micro-CT angiography was used to evaluate angiogenesis of the defect site at 3 month after implantation. For further analysis, immunofluorescence and immunohistochemistry were used to investigate sections 1 month after implantation, and evaluate monocytes & macrophages, cytokines involved in bone regeneration. TRAP staining was used to observe the osteogenesis and the activity of osteoclasts.

- 3) In the third part of this study, we further examined the effect of the intrafibrillar silicified collagen scaffold on monocyte. MTT cell proliferation test, cell apoptosis test and intracellular ROS level test were used to examine the effect of SCSs on the cell fate of monocyte. TRAP cell staining was used to examine the effect of SCSs on the differentiation of monocyte. Expression of certain cytokines secreted by monocytes were evaluated by cell immunofluorescence, qRT-PCR and western blot at both mRNA and protein level. Transwell cell migration test was employed to determine the effect of interaction between SCSs and monocyte on the migration of BMSCs and EPCs. Matrigel tube formation test was used to evaluate the angiogenesis potential of EPCs affected by SCSs or monocyte-conditioned SCSs. Neutralizing antibodies were used to determine the level of monocyte cytokine expressions which might be involved in cell migration and angiogenesis exposed to SCSs.
- 4) In the last part of the study, we built a rat femur partial defect model and the SCSs were used for defect repair. This part was aimed to further investigate signaling pathways changes involved in monocyte exposed to SCSs. Micro-CT, immunohistochemistry and Van Geison staining were used to evaluate the efficiency of angiogenesis and bone regeneration in bone defect site at 1 month after implantation.

Immunofluorescence was used to investigate the distribution patterns and cytokines expression of monocyte *in situ*. In further *in vitro* study, western blot was used to examine the changes of signaling pathways. Monocytes inhibited by certain pathway were further examined by western blot, TRAP cell staining to investigate cell differentiation and secretion. Pathway inhibitors were also used *in vivo* to investigate signaling pathways involved in SCSs bone regeneration.



Flow Chart

2. Results

Part I Physicochemical properties and biocompatibility of biomimetic intrafibrillar silicified collagen scaffold

- 1) Collagen fibrils of SCSs contained an ordered deposition of intrafibrillar amorphous silica that creates a banded appearance. SCSs could release silicic acid sustainingly. Silicic acid release from the homogeneously silicified SCSs was characterized by an initial burst release, followed by a slower continuous release. 30 days after expose to

PBS (10mL), concentration of silicic acid could reach 1.2mmol/L per 100mg SCS.

- 2) Intrafibrillar silicified collagen scaffold is biocompatible. We have demonstrated that SCS has less immunogenicity, and induce minimum proliferation of lymphocytes after twice stimulation ($p>0.05$ when comparing with control group). Lymphocytes numbers and activity, as well as inflammatory cytokines were kept in general level after SCSs implantation ($p>0.05$ when comparing with control group). HE staining of *in situ* sections showed that collagen fibers were absorbed obviously 7 and 14 days after implantation, and there are minimum inflammatory cells infiltration around the scaffolds, which proves SCSs is biocompatible and could be further used in *in vivo* bone repair.

Part II Application of SCS in mice calvarial defect model

- 3) We found that intrafibrillar silicified collagen scaffold could promote bone regeneration in the mice calvarial defect. 3 months after surgery, more new bone formation and more active bone regeneration could be observed in SCSs group when comparing with the control groups ($p<0.05$).
- 4) 3 months after implantation, SCSs group generate more new vessels in defect site ($p<0.05$). Vessel length, thickness and connectivity of SCSs groups is significantly more than the negative control group ($p<0.05$).
- 5) One month after surgery, there could be observed more CD31⁺Endomucin⁺ subtype vessels in SCSs group ($p<0.05$), as well as more PDGF-BB expression ($p<0.05$). TRAP positive mononuclear cells were significantly more ($p<0.05$) and these cells express more SDF-1 and TGF- β 1 ($p<0.05$). In SCSs group, expression of BMSC marker Nestin and VEGF were increased in defect site ($p<0.05$), which indicated that there is an enhanced seed cell homing effect.

Part III The effect of SCSs on monocyte modulation

- 6) The SCSs did not affect monocyte proliferation, apoptosis and intracellular ROS level (for each experiment, $p>0.05$ when comparing with control group). Conditional medium of monocytes exposed to SCSs did not affect the migration of BMSCs and EPCs ($p>0.05$ when comparing with control group).

- 7) We demonstrated that monocytes could differentiate into TRAP positive mononuclear cells after exposed to SCSs. And this kind of monocytes could express more SDF-1, TGF- β , VEGF and PDGF-BB in both mRNA and protein level ($p < 0.05$ when comparing with control group).
- 8) Conditional medium of monocytes exposed to SCSs could significantly promote BMSCs and EPCs migration ($p < 0.05$), as well as EPCs tube formation ($p < 0.05$). Neutralizing antibodies verification demonstrated that SDF-1, TGF- β and PDGF-BB were the key factors that affect cell migration, and TGF- β , VEGF, PDGF-BB were the key factors that promote EPCs tube formation.

Part IV Cell signaling pathways of monocyte involved in SCSs modulation

- 9) We demonstrated that intrafibrillar silicified collagen scaffold is favorable for different bone defect models. In the rat femur partial defect model, SCSs could significantly promote vessels formation and trabecular bone formation ($p < 0.05$), which indicated that SCSs promote wound healing and bone repair. Immunofluorescence double labeling showed that numbers of CD31⁺Emcn⁺ subtype vessels ($p < 0.05$) as well as TRAP positive monocytes and PDGF-BB expression were increased ($p < 0.05$) in the SCS group.
- 10) *In vitro* study showed that the P38 and ERK1/2 of monocyte were activated by SCSs. Monocyte differentiation towards TRAP positive mononuclear cell and secretion of SDF-1, TGF- β , VEGF, PDGF-BB were decreased ($p < 0.05$) when P38 and ERK1/2 were inhibited, respectively. Conditional medium of SCS-exposed monocytes using P38 or ERK1/2 inhibitor could not promote BMSCs and EPCs migration ($p > 0.05$), nor EPCs tube formation ($p > 0.05$). Further *in vivo* study demonstrated that when P38 inhibitor was used, CD31⁺Emcn⁺ subtype vessels formation was significantly declined ($p < 0.05$ when comparing with SCS group). TRAP positive monocytes in defect site and expression of PDGF-BB were declined either ($p < 0.05$ $p < 0.05$ when comparing with SCS group). This indicated that P38 signaling pathway were the key factor in the modulation of monocyte by SCSs, which directly affects bone regeneration.

3. Conclusion

Firstly, our findings demonstrated that biomimetic intrafibrillar silicified collagen scaffold has minimum immunogenicity. After implantation, host inflammation response could be controlled in low degree, and cause no inflammatory cells infiltration, nor increased inflammatory cells/factors in circulation. These findings indicate that intrafibrillar silicified collagen scaffold is biocompatible, and is favorable for biological application.

Secondly, intrafibrillar silicified collagen scaffold could be used for different bone defect type (both mice calvarial defect model and rat femur partial defect model). SCSs promote local angiogenesis and bone regeneration significantly, which leads to advanced outcome.

Thirdly, in the early stage of defect repair, intrafibrillar silicified collagen scaffold could modulate monocytes to differentiate into TRAP positive mononuclear cells by activating P38 signaling pathway, which leads to an enhanced secretion of certain cytokines (SDF-1, TGF- β , VEGF, PDGF-BB). As a result, this could promote local angiogenesis, especially CD31⁺Emcn⁺ subtype vessels formation, which is critical in the coupling of angiogenesis and osteogenesis. Moreover, this could also enhance host BMSCs and EPCs homing towards the defect site, and promote local vessel and bone formation.

In conclusion, the biomimetic intrafibrillar silicified collagen scaffold is biocompatible, and has great potential in biological application. SCSs show favorable efficiency in bone defect model repair, and could promote local angiogenesis and osteogenesis significantly. By modulating monocytes, SCSs could promote local neovessels formation and host seed cells migration. Comparing with traditional bone grafts which need extra loading of cells or cytokines, SCSs show much advantage in convenience and potential clinical application.

Key words: Bone regeneration; Angiogenesis; Monocyte;

Intrafibrillar silicification; Immunomodulation; Cell homing

前 言

骨移植是目前临床上仅次于输血之外应用最广泛的组织移植。由于自体骨和异体骨移植的种种限制和缺点，骨组织缺损的人工替代材料的研发目前已成为相关基础研究和临床应用领域的重点和热点。采用聚胺诱导液相硅酸前体技术所构建的仿生纤维内硅化胶原支架材料，以胶原纤维内部无定形水合二氧化硅有序沉积为特征，并具有良好的理化性能和机械性能，作为骨缺损修复的人工替代材料具有巨大的应用潜力。

生物材料在植入体内后，宿主的免疫应答反应是影响其最终应用效果的重要因素之一。在早期的研究中，组织修复的研究策略倾向于抑制宿主的免疫应答来提高移植的成功率。而目前普遍接受的观点认为，宿主的免疫应答能够对组织再生修复起到积极的免疫调控作用，从而促进缺损的修复以及组织的再生。在急性炎症反应之后，单核细胞与淋巴细胞等单个核细胞在植入区域的集聚，标志着慢性炎症反应的进行。和急性炎症反应相比，慢性炎症反应在组织学上并没有统一的特征表现，一般来说，植入生物材料后的慢性炎症反应期相对较短暂，并且局限于植入区域，单核细胞、巨噬细胞、异物巨细胞在材料与组织的界面出现集聚。而生物材料和这些免疫细胞之间的相互作用，直接关系到了炎症反应的进程，以及随后修复组织再生的效果。单核细胞是宿主免疫应答调控中的重要细胞，同时也是骨重建以及骨缺损修复进程中不可或缺的关键细胞之一，单核细胞与植入体内的生物材料之间的相互作用也是影响生物材料移植成功的关键因素之一。

通过基础实验研究仿生纤维内硅化胶原支架材料的体内骨缺损修复的效果，以及其与宿主免疫系统之间的相互作用，是进一步评价仿生纤维内硅化胶原支架材料作为骨组织缺损人工替代材料应用前景的重要步骤，相关研究能够为仿生纤维内硅化胶原支架材料的进一步优化完善和临床转化提供相应的理论和实验基础。

文献回顾

随着生物医学和材料工程的发展，骨组织缺损的人工替代材料的研发也进入了新的阶段。传统的自体骨/异体骨移植技术是目前临床上和生物再生医学研究中效果最好的骨缺损修复解决方案，但是由于其受困于来源受限、免疫排斥、病原体传播等问题，无法解决临床上日益广泛的需求^[1-3]。目前，组织工程技术的革新使骨骼肌、软骨和骨组织的研究广泛开展，并在近 20 年中取得了极大的进展，大量的人工骨替代材料进入了临床研究和应用，为骨缺损患者的治疗提供了自体骨/异体骨移植以外新的解决方案。

骨组织的修复再生是一个复杂的生理过程，在一般的骨修复过程中，宿主的免疫系统，骨缺损修复材料，以及大量的组织细胞和细胞因子通过调控网络参与到骨再生的各个阶段，最终形成具有功能的骨^[4-7]。在骨重建的过程中，免疫系统的参与、组织的血管化、生物材料的性能等多方面的因素最终决定了生物材料的修复效果^[7,8]。我们将在文献回顾中首先系统回顾骨缺损修复的人工替代材料的研究现状，并对骨组织缺损重建的生理进程进行总结回顾。此外，我们也将系统回顾有关免疫系统在生物材料骨缺损修复中的作用的相关研究。

1 生物材料在骨缺损修复中的应用研究进展

骨是人体组织中体积最大的器官，在人的生命活动中起着至关重要的作用，而骨组织的缺损也是目前临床上高发的疾病之一^[9-11]。各种事故所导致的创伤，以及与骨组织相关的感染、肿瘤、遗传疾病等造成的骨组织缺损，导致全世界每年有数百万人需接受骨移植修复治疗^[11-12]。由于来源受限、免疫排斥、病原体传播等问题，传统的自体骨/异体骨移植技术并不能够满足日益增长的骨缺损修复材料的需要^[3]。因此，对骨缺损修复的人工替代材料的研发迫在眉睫。得益于组织工程技术和再生医学的发展，人工替代骨材料的研究目前取得了极大的进展，大量成熟的骨移植产品进入了临床应用^[13,14]。然而目前的骨缺损修复材料在应用的过程中，仍存在许多

不足与缺陷，如因血管化的问题对大段骨缺损修复效果欠佳，宿主的免疫排斥反应导致的高失败率等等^[13,15,16]。因此，对骨缺损修复的人工替代材料的研究和优化仍任重而道远。我们首先对骨缺损修复材料的研究概况进行回顾。

1.1 骨缺损修复的人工替代材料

近年来，用于骨缺损修复的人工材料的研究已取得了极大的进展。目前普遍接受的观点认为，良好的骨缺损修复的人工替代材料一般具有以下特征：（1）具有良好的生物相容性，无明显的细胞毒性，具有较低的免疫原性或无免疫原性；（2）具有较高孔隙率的三维立体结构，能够为细胞的迁移，以及组织的血管化提供充足的空间；（3）具有适宜细胞生长的局部微环境，能够为种子细胞骨生成的进程提供良好条件；（4）具有高度可控的降解性能，其降解速率能够与骨组织再生的速率相吻合，组织能够在生理状态下生长，无炎症反应；（5）具有接近天然骨组织的机械性能，能够应用于各类受力骨组织的修复；（6）易于获取，加工和储存便利，临床应用方便简洁。

目前，用于骨缺损修复的人工替代材料大量的应用于临床治疗，这些材料按其自身的物理性质来分类，主要分为无机材料和高分子材料两大类。

1.1.1 无机材料

目前被广泛研究的用于骨缺损修复的无机材料包括生物降解类陶瓷材料以及羟基磷灰石材料两大类^[17]。与其他类型的材料相比，无机材料具有相对简单的理化结构，以及良好的生物相容性的特点，在临床中应用较广泛。例如由瑞士 ED. Geistlich Sohne AG 公司生产的 Bio-oss 天然多孔骨无机材料系列，在口腔种植、头颈外科等相关领域的临床治疗中，均有良好的应用效果^[18-21]。

生物降解类的陶瓷材料主要为磷酸三钙、磷酸四钙等为基础的磷酸钙陶瓷类材料。这类材料由于其化学成分与骨组织的矿物质组成类似，和羟基磷灰石相比，具有更好的降解能力，能够在植入体内后被全部或部分吸收降解，因此具有良好的生物相容性^[22-24]。磷酸三钙（TCP）来源的磷酸钙陶瓷为目前临床应用较为广泛的生物降解类的陶瓷材料。根据其制备时烧结温度的不同，可分为 α -TCP 和 β -TCP。 β -TCP 的降解速度最快，明显高于 α -TCP 和羟基磷灰石等其他无机材料^[23]。研究表明，磷酸三钙在降解时所产生的钙及磷酸根离子一方面会被组织免疫反应过程中的吞噬细

胞所吞噬，另一方面也能够在骨修复的过程中被新生的骨组织所利用，具有一定的促进骨生成的作用^[25]。但是作为一类脆性材料，由于其机械性能方面的不足，例如脆性大，韧性低，抗弯曲强度低等问题，只能应用于非承重骨的缺损修复，其修复的缺损范围也受到很大限制，因此无法广泛地应用于临床上复杂的骨缺损修复的治疗中^[13,26]。

羟基磷灰石（hydroxyapatite, HA）是骨组织的主要无机组成成分，其在天然的骨组织中所占的比重约达 60%^[27]。与磷酸钙陶瓷类材料相类似，羟基磷灰石具有良好的生物活性和生物相容性，能够在植入缺损区域后，快速和机体组织相结合，对骨生成具有良好的应用效果^[28-30]。目前，对于羟基磷灰石的相关基础研究及临床应用均较为完善。在天然的骨中，羟基磷灰石的基本单位为柱状的晶体结构，长度约为 15-200nm，宽约 10-80nm，厚度约 2-7nm^[27]。目前能够通过多种方式合成人工羟基磷灰石用于骨缺损的修复，传统的共沉淀法、水热法、溶胶-凝胶法、超声合成法等制备方式工艺相对复杂，合成的过程难以控制，制备纯度容易受到制备条件的制约，且制备出的羟基磷灰石材料的脆性大，可塑性低^[1]。目前，通过纳米技术制备出的新型纳米羟基磷灰石材料，不仅具有更好的生物降解能力，同时，由于具有更高的表面积比例和孔隙率，因此其理化性能和机械性能大幅提升，与纳米级羟基磷灰石相关的研究也成为该领域的热点^[27]。然而，相关的研究和应用仍然存在很多的问题，一方面纳米材料的颗粒毒性、体内迁移等生物安全性相关的问题仍有待解决，另一方面材料的机械性能仍较自然骨组织相差甚远，其应用范围仍十分局限^[31]。

近年来有研究对磷酸三钙和羟基磷灰石复合的双相复合材料进行了检测，研究表明，不同理化性能的无机材料对骨再生的进程以及骨缺损修复中相关信号转导通路的影响也各不相同^[32]。磷酸三钙和羟基磷灰石复合的双相复合材料（TCP/HA）和单一的磷酸钙陶瓷或羟基磷灰石相比，具有更加良好的骨诱导作用，材料能够通过自身结构的优化以及物理组成的改变，来获得良好的骨生成促进作用^[33]。

1.1.2 高分子材料

应用于骨缺损修复的高分子材料主要分为天然高分子材料和人工合成高分子材料两大类。天然高分子材料包括脱钙骨基质、胶原、甲壳素及其衍生物等，人工合成的高分子材料主要有聚乳酸、聚己内酯等。与无机材料相比，高分子材料具有自身的优越性，包括具有良好的机械性能、骨诱导性，以及生物可降解性等^[34]。由于

支架材料较多具有多孔隙性的特征，因此拥有较强的渗透能力，并且可提供用于细胞黏附和生长的稳定微环境，相对于无机材料更易作为细胞因子等信号分子的载体^[35,36]。

脱钙骨基质（Demineralized bone matrix, DBM）在临床上的应用已超过 100 年。作为骨组织衍生材料，脱钙骨基质具有较强的骨诱导性，在骨缺损修复的应用中具有良好的应用效果^[37-39]。有研究表明，脱钙骨基质在某些动物模型的骨缺损修复中，能够达到与自体骨修复相同水平的修复效果^[40]。然而由于其来源的局限性，以及异体/异种来源组织脱蛋白过程中问题，导致其有可能会具有较强的免疫原性，导致较高的临床失败率，同时脱矿后机械性能的下降也影响了它的应用范围^[41]。

胶原（Collagen）支架材料作为一种天然高分子材料，具有独特的生物性能。胶原具有良好的生物吸收降解性，同时无毒，无抗原性。此外，作为天然的高分子材料，胶原也具有具有良好的生物相容性和生物安全性^[42]。天然的骨组织中，其有机成分 90% 以上为胶原，为成骨过程中成骨细胞所分泌的细胞外基质。研究表明，胶原支架材料对细胞的黏附、生长以及分化均具有促进作用，并且可作为钙盐沉积的支架和骨基质矿化的促进剂，以及生物矿化的模板^[43]。在胶原材料降解后，其释放的大量氨基酸能够为新生骨组织所利用，促进成骨的进程^[44]。但是胶原材料由于其机械性能较差，生理性能不稳定的缺点，单独作为支架材料应用时效果欠佳^[45]。

聚乳酸（polylactic acid, PLA）是一类人工合成的高分子材料，具有良好的生物相容性和生物降解性，其聚合物有 3 种立体构型：聚右旋乳酸（PDLA）、聚左旋乳酸（PLLA）、聚消旋乳酸（PDLLA），目前在临床中常作为骨折固定材料，如接骨螺钉、棒材等使用^[46]。但是目前的 PLA 相关材料普遍机械性能较差，且具有降解速度过快、不容易控制并导致组织炎症，降解产物呈酸性不利于细胞生长，以及制作工艺复杂、成本过高等缺点，其进一步生物应用仍然难以实现^[47]。有研究显示，聚乳酸（PLA）在植入机体后，会因材料迅速的降解导致局部环境 pH 值发生改变，进而于植入后中后期发生无菌性的炎症反应^[48]。

与聚乳酸相比，一种更新型的人工合成高分子材料，聚己内酯（PCL）在骨修复的应用中有着更好的表现。研究表明聚己内酯在降解性能方面要优于聚乳酸，同时其也具有有良好的机械性能和生物相容性，能够为骨细胞的生长和新生骨的发育提供稳定的环境，具有一定的骨诱导性^[49]。

1.1.3 复合材料

单一类型的骨缺损修复材料由于各自的缺点，单独用于缺损修复时不能够达到良好的治疗效果，无法满足临床复杂的骨缺损治疗需要。目前，越来越多的研究开始关注于对不同类型材料的联合应用来治疗骨缺损。无机材料和有机高分子材料的联合应用一方面能够通过材料的联合应用来弥补各自材料在理化性能、生物性能方面的不足，另一方面能够为骨缺损修复提供更加多元化的思路，使复合材料兼备有机、无机材料的优势，并通过纳米技术、生物加载技术等新技术的利用，实现单一类型骨缺损修复材料无法达到的修复能力。

例如无机材料虽然已在临床上应用了半个多世纪，并且对很多骨缺损类型的修复都有良好的效果，但是由于其自身的降解速度、力学性能等局限性，对临床上复杂情况的应用仍显不足^[50]。而新的研究表明，与其他的相关材料进行复合能够明显的对其降解速率、机械性能进行改善，从而提高其应用的范围。羟基磷灰石材料作为性能良好的无机材料，目前很多研究聚焦于对其与有机高分子材料的联合应用中。通过制备羟基磷灰石复合物，使羟基磷灰石与高分子材料共同构建具有多重性能的材料复合体。目前研究主要用于制备羟基磷灰石复合物的高分子材料包括胶原、纤维蛋白、几丁质、藻酸盐、聚乳酸、聚酰胺、聚乙烯等天然高分子材料和人工合成高分子材料。

随着组织工程与再生医学的发展，复合材料与细胞、信号分子的联合应用也是目前研究的热点之一。外源性加载的种子细胞如骨髓间充质干细胞、血管内皮前体细胞、成骨细胞等，能够在骨缺损修复的过程中发挥相应的作用，促进组织重建的过程^[51]。生长因子、趋化因子等信号分子能够在骨缺损重建的过程中通过对机体的调控，促进局部的骨再生^[52,53]。但是目前普遍采用的体外培养一体内移植的策略过程复杂，其制备进程难以控制，对宿主免疫反应的影响机制仍不明确。同时，外源性的种子细胞在植入后所发挥的作用目前仍有争论^[54]。

1.2 仿生矿化骨修复材料

仿生矿化的定义为人工应用生物矿化的原理来对生物矿化过程进行模拟，通过人为的控制无机矿物质在有机物模板上的沉积，形成具有特殊结构和功能的有机/无机复合材料^[55,56]。与其他骨缺损修复材料相比，由仿生矿化的方法所构建的人工替

代材料在骨缺损修复方面，具有独特的优势。

1.2.1 仿生矿化材料的研究进展

天然的骨组织的无机物构成以羟基磷灰石为主，而其有机物的成分则主要为胶原。羟基磷灰石晶体与胶原纤维从微观到宏观有序的排列，通过多分级的结构形成最终的骨组织结构，这种天然的骨组织具有良好的机械性能和生物亲和性^[57,58]。目前的仿生矿化研究主要集中于通过对胶原有机物与羟基磷灰石、磷酸钙等无机物之间的宏观结合，来模拟天然骨组织的宏观形态和成分组成特征。虽然通过这类方法获得的仿生矿化材料能够得到天然骨的类似结构，但是从微观层面看，其基本的微观结构与天然骨组织相差甚远，无法从微观结构上对天然骨组织中无机物在胶原纤维内部有序沉积的结构进行精确地模拟^[59,60]，而天然骨组织在微观结构上表现出的纤维内矿化是构成其多分级结构的微观基本结构，是保证其良好的机械性能和生物亲和性的根本结构因素^[58-62]。

目前大多数的人工合成骨修复材料均未能够同时准确模拟天然骨组织的组成成分和多分级的结构，因此所构建出的材料无法全面模拟天然骨组织良好的机械性能和生物亲和性的特征。而仿生纤维内矿化骨修复材料则能够通过对骨组织自然矿化过程的模拟，形成类似于骨组织多分级特征的材料结构，一方面其化学结构组成能够高度模拟自然的骨组织，另一方面能够获得接近天然骨组织的良好力学性能。和传统的仿生矿化材料相比，仿生纤维内矿化的修复材料具有更好的机械性能和生物亲和力。

目前，已有相关的研究实现了无机物在胶原纤维内部的矿化沉积。使用重组 I 型胶原作为模板，液相无定形矿物质纳米前体为基材，在胶原纤维内部实现了无机物的定向渗透、沉积、晶化，进而构建出具有良好生物相容性和机械性能的纤维内钙化的材料^[63,64]。但是该技术在应用过程中仍存在不足。由于无机物基材的渗透性控制的复杂性，在制备时难以在纤维内部实现均匀一致的钙化^[65,66]。同时材料进行矿化的周期通常为半个月至三个月左右，过长的矿化周期也对其进一步的骨缺损修复的应用制造了障碍。

1.2.2 仿生纤维内硅化胶原支架材料

近年来，二氧化硅的仿生合成领域成为了研究的热点。二氧化硅在建筑业、电子制造业、和医学等领域有着广泛的应用。由于具有良好的机械性能、化学惰性和

热稳定性，各种不同形态的二氧化硅在很多领域都具有不可替代的应用。目前的研究主要集中于通过不同的工艺来制备合成具有特殊结构和理化性能的二氧化硅，以应用于特定的环境和领域^[67,68]。但是目前主流合成方法所应用的高温、高压的反应条件，难以在微观结构或纳米结构上进行精确地控制。而仿生硅化的技术则通过对天然硅基生物的硅化机制的进行模拟，从而能够在相对温和的反应条件下，采用天然生物在硅化进程中所参与的相关蛋白及其类似物催化合成相应的二氧化硅材料，这种通过仿生硅化技术所合成的二氧化硅材料能够在材料精细结构方面进行精确的模拟和构建。

I型胶原是生物硬组织中的主要的有机成分，具有广泛的来源。目前，胶原合成的技术已相对成熟，是组织工程与再生医学领域较为常用的支架材料，具有良好的生物相容性和生物亲和性^[69]。仿生钙化领域中，相关的研究普遍聚焦于应用磷酸钙的无定形前体作为无机矿物相，在I型胶原模板上进行沉积，增强其机械强度并形成类似骨磷灰石样的结构。此外，胶原也常见于硅藻等硅基生物的硅质骨结构中。研究发现硅藻等生物能够在体内实现胶原的快速的硅化进程，因此已有研究关注于通过使用胶原做为矿化模板，通过仿生矿化的技术来合成硅化的胶原纤维^[70]。早期的研究构建了胶原蛋白与二氧化硅共沉积的产物，这种材料虽然能够模拟生物组织的组成成分，然而其其他的相关理化性能却与天然生物矿化组织相差甚远。也有研究实现了二氧化硅来源的微球在胶原纤维表面及其纤维组织的间隙内的沉积，但是这种纤维外硅化的材料与纤维外钙化材料类似，其机械性能和生物亲和力仍有明显的不足^[71]。也有研究通过利用基本结构单元自发形成有序结构的方法实现了二氧化硅在胶原纤维内部的矿化，但是由于有机物模板与无机物在自组装过程中的速率和反应机理不一致，其纤维内矿化的结构与自然生物硅化的组织差异明显^[72,73]。

目前，已有相关的研究通过聚天门冬氨酸、聚羧酸等非胶原蛋白类似物来对液相无定形磷酸钙无机物前体进行稳定，并引导其在胶原纤维内定向渗透、沉积、晶化，通过“由下而上”(bottom-up)的方式，实现胶原纤维内羟基磷灰石的有序沉积^[60-65]，制备出纤维内钙化的胶原支架材料。这种无机矿物相有序沉积于有机物模板内部的矿化形式大幅提高了材料的力学性能，同时也提高了胶原自身对周围刺激的抵抗性，克服了其在体内降解过快的缺点^[60]，为高仿真人工骨替代材料的研制提供了重要思路。

仿生硅化过程具有与前述纤维内仿生矿化过程相似的原理，同时又具有反应迅速（仅需数小时）、合成简单、易于控制等特点^[70,74]。已有研究表明，通过模拟硅藻类生物硅化机制，以合成迅速的二氧化硅替代传统的羟基磷灰石，实现了三维重组 I 型胶原支架的纤维内快速硅化（仅需要 4 天），明显缩短了仿生矿化的时间^[75]。

研究表明，纤维内仿生硅化胶原支架的材料表面含有活性硅醇基团，能够通过其实现对材料的功能化修饰。而随材料降解所缓释的硅，则能够促进骨修复相关细胞的分化，并促进其参与骨修复进程，具有良好的骨诱导性^[76,77]。

然而，仿生纤维内硅化胶原支架材料的进一步应用仍需对其进行更加深入的研究。材料自身的生物相容性，应用于骨缺损修复的体内效果等目前仍不明确，材料对宿主免疫系统的影响仍有待研究。相关问题的解决将会有助于仿生纤维内硅化胶原支架材料的进一步应用。

2 免疫系统与生物材料的相互作用

机体对生物材料的免疫应答在很长一段时间内，被认为是阻碍生物材料成功行使功能的一个障碍。然而近些年来，越来越多的研究认为，免疫系统与材料的相互作用，能够在一定程度上促进伤口愈合，并促进材料参与机体的修复重建进程。因此，越来越多的研究从如何抑制机体的免疫反应，转向如何调控机体对生物材料的应答，使免疫反应向促进伤口愈合、促进材料成功行使功能转变。

2.1 生物材料植入后机体的免疫应答

生物材料在植入体内后，机体会出现一系列的宿主反应，包括损伤、血液-材料相互作用、形成临时修复基质、急性炎症反应、慢性炎症反应、形成肉芽组织、异物反应、纤维化或形成纤维囊^[78-81]。从损伤修复的角度来看，血蛋白在材料表面的沉积即为临时基质形成，而临时基质则为损伤修复进程和异物反应提供结构支撑、生化基础以及细胞组成。在材料植入的最初阶段与血液发生相互作用，蛋白质吸附于材料表面，在材料的表面与周围形成血液来源的临时性修复基质，这也是最初的形成于材料-组织界面的血栓/血凝块。显然，蛋白吸附与纤维蛋白介导的临时基质的形成均与其机械应答密切相关。血供丰富的结缔组织损伤后，不仅引起炎症反应（固有免疫），同时会导致血栓形成，包括激活外源/内源性的凝固系统、补体系统、纤维蛋白溶解系统、激肽发生系统、以及血小板。这一系列的蛋白质级联反应与蛋白质

的吸附/解吸附的动力学现象密切相关，被称为 Vroman 效应^[82]。在临时性修复基质中，存在着细胞分裂素、趋化因子、细胞因子、生长因子，以及其他生物活性成分，能够行使激活/抑制的作用，并调控巨噬细胞活性，同时也能够调控参与免疫反应及损伤愈合应答的其他相关细胞群。因此，临时基质可被视为一个自然形成的，可降解的缓释系统，能够释放一系列生物活性成分，来调控随后的损伤愈合进程。

在最初阶段血液-材料相互作用，并形成临时修复基质后，会先后发生急性/慢性炎症反应。炎症反应的程度与范围取决于：1. 植入材料过程所造成的损伤的范围与程度；2. 植入材料的组织/器官；3. 临时基质形成的范围。中性粒细胞（多形核白细胞，PMNs）主要介导了急性炎症反应的发生。肥大细胞脱粒伴随的组胺释放以及纤维蛋白原吸附被认为是参与了宿主对植入材料的急性炎症反应的调控^[83,84]。肥大细胞脱颗粒过程中同时会释放白介素 4 和白介素 13，而这一进程在对随后发生的异物反应的程度和范围起到了重要的影响作用^[85,86]。

在急性炎症反应之后，单核细胞与淋巴细胞等单个核细胞在植入区域的集聚，标志着慢性炎症反应的进行^[84]。和急性炎症反应相比，慢性炎症反应在组织学上并没有统一的特征表现，一系列的细胞应答反应在诊断学上则有着广泛的应用。一般来说，包括淋巴细胞与浆细胞在内的单个核细胞的存在即被认为是慢性炎症反应，对于植入生物材料后的慢性炎症反应来说，其周期相对较短暂，并且局限于植入区域。而慢性炎症反应也被用于描述单核细胞、巨噬细胞、异物巨细胞在材料界面的集聚^[86]。

2.2 单核/巨噬细胞在骨组织工程中的作用

在体内，很多种细胞参与了骨再生与重建的过程。越来越多的证据表明，单核细胞与巨噬细胞在其中起到了核心作用^[87-89]。这些骨髓来源的细胞，常常因其在先天免疫过程中的功能被人熟知，却在骨再生、重建、改建以及骨折愈合等过程中，起到了基础的非免疫调控的作用。对这一作用的深入了解，则能够为骨组织工程的发展提供一个全新的途径。

单核/巨噬细胞能够通过多种方式调控骨内稳态。其中，细胞因子分泌被认为是最主要的一个方式。在不同的环境条件下，巨噬细胞表现出不同的极化状态，分泌大量由细胞因子组成的混合物，包括白介素、趋化因子、生长因子等，同时也会分

泌大量的小分子化合物。在这些分泌因子中，有许多是促进成骨的，例如白介素 1 和包括 OSM 的白介素 6 家族^[90-92]。也有很多是促进血管生成的，尤其是包括血管内皮生长因子（VEGF）和氧化一氮（nitric oxide）^[93]。在骨发生的初期，这些促成骨的因子，能够促进前体细胞（主要是间充质干细胞）成骨分化，并分泌促进矿化的相关蛋白，例如碱性磷酸酶（ALP），一型胶原(Col-1)等。而促进血管生成的因子能够促进宿主血管的长入，并进一步促进矿化^[94,95]。

单核/巨噬细胞能够激活环境中周围的其他细胞，促进其分泌能够促进骨生长的相关细胞因子，而这些细胞因子并非主要由单核/巨噬细胞自身所分泌。例如骨髓基质细胞分泌的白介素 11^[96]，以及 Th 细胞分泌的白介素 4，白介素 17^[97]等。各种不同细胞彼此之间的相互作用，为骨代谢提供了一个动态的调节基础。

单核/巨噬细胞的另一个独特的作用是，在骨修复过程中，能够提升机体损伤相关细胞因子对材料生物化学刺激的趋化反应^[88,95,98]。在骨折愈合过程中，初期损伤部位的炎症信号能够激活集聚单核/巨噬细胞，并释放相关的细胞因子，促进血管化，以及间充质干细胞的募集，以加速愈合重建^[94,99]。

以上这些独特的潜能使单核/巨噬细胞在骨组织工程的应用中具有极大的前景。目前在骨重建中应用单核/巨噬细胞能力的研究主要集中于以下两个方面。

2.2.1 单核/巨噬细胞与骨原细胞移植前共培养策略

为了使单核/巨噬细胞的分泌能力在骨组织工程应用中得以发挥，最直接的办法就是在体外将活化的单核/巨噬细胞与骨髓间充质干细胞进行共培养，这样前者所分泌产生的细胞因子能够直接实时地作用于后者。在骨髓间充质干细胞植入体内后，能够通过一个更加符合生理预期的途径向成骨细胞以及骨细胞分化。

目前，已有一些研究证实了单核/巨噬细胞的分泌能力能够在体外诱导成骨，虽然这些研究并不是在 3D 组织模型上进行的。研究表明，小鼠的成骨细胞，通过 Transwell 系统与 LPS 激活的巨噬细胞进行共培养后，与未和巨噬细胞共培养的成骨细胞相比，表现出了更强的钙化能力^[100]。类似的研究还有，人类间充质干细胞与 LPS 激活的人 CD14 阳性单核细胞共培养后，其矿化能力也得到了明显的增强，在这其中激活的单核细胞所分泌的 OSM 起到了关键的作用^[89]。值得关注的是，人类单核/巨噬细胞，即使未经过 LPS 的处理，同样能够通过 Transwell 系统促进人类间充质干细胞相关成骨标志物的表达与碱性磷酸酶的活性，而这一现象主要通过分泌 BMP-2

这一关键调控分子进行^[101]。

为了能够在生物材料上实现这一策略，需要对相关的生物材料进行两部分的设计。首先，第一部分需要一类生物惰性的水凝胶材料来构建，例如琼脂糖，用来对单核/巨噬细胞进行封装。材料的大分子网络能够在约束单核/巨噬细胞活动范围的同时，使其分泌的细胞因子以及其他小分子化合物传播扩散，而这也是这一部分构建的关键之所在。第二部分，需要构建一类高分子支架，来为间充质干细胞提供黏附、增殖和成骨分化的空间支持。这两部分材料通过类似于 Transwell 的共培养系统进行培养，使两类细胞在同一培养条件下进行培养，但是避免了细胞之间的相互接触。接下来会实现这一策略的核心：即封装的单核/巨噬细胞能够持续地分泌相关的细胞因子，并作用于间充质干细胞。最终，加载间充质干细胞的支架在达到一定的成骨能力之后，被单独用来进行体内移植。

对材料结构的合理设计是保证单核/巨噬细胞与骨原细胞顺利生长的重要因素。近几十年来，研究者们设计了大量的高分子支架来为骨原细胞提供支持。这些支架可进行移植，具有一定的机械强度，并且能够为成骨分化提供一个更为合适的 3D 环境^[102,103]。相反的是，目前很少有研究为单核/巨噬细胞提供合适的生物材料支架。这些细胞在我们的策略中，仅仅是提供成骨及其他相关的细胞因子，我们并不希望这些细胞发生增殖或迁移。如果单核/巨噬细胞发生增殖，则其分泌的细胞因子的水平就会发生改变，因而需要新的实验方案或者数学模型来预测/评价其相关的效果。而单核/巨噬细胞在体外培养过程中的迁移则会侵蚀到加载有间充质干细胞的支架，一旦支架被移植入体内，这些外来的，无法控制的免疫细胞会对宿主造成相关的不良影响。目前，一个可行的方案是使用生物惰性的琼脂糖水凝胶微球材料^[104]。

2.2.2 能够原位激活宿主自身单核/巨噬细胞的高分子材料设计

除了在体外利用单核/巨噬细胞的分泌能力以外，我们同样希望能够通过骨组织工程支架在体内富集并原位激活宿主自身的单核/巨噬细胞，来利用其趋化应答以及原位分泌的能力。对于植入体引起的宿主异物反应，长久以来研究者已经对此进行了深入的研究^[98]。截止目前，大量的研究发现了各式各样的材料，能够在体内通过各种不同的通路激活宿主单核/巨噬细胞。然而，目前并没有一个合理的方法学来规划如何合理利用材料-免疫细胞之间的相互作用来提升骨重建。

在这里，我们认为这类具有免疫增强作用的高分子材料可以一方面用来直接构建

支架，另一方面，也可以作为骨支架材料的修饰而发挥作用。首先，对相关的高分子材料进行筛选，筛选的条件即为其对单核/巨噬细胞的作用。那些能够促进单核/巨噬细胞分泌促成骨、成血管的高分子材料则被选出进行下一步的构建。这样选出的适宜的材料，一方面能够直接用于构建新的支架，另一方面，也能够作为免疫增强部分对现有的支架进行修饰。当被植入体内后，这些高分子材料能够吸引宿主的单核/巨噬细胞向植入区域募集，并激活这些细胞。这些被募集过来并被激活的单核/巨噬细胞能够分泌一系列促进成骨以及成血管的细胞因子，来促进原位骨再生。在这一策略中，这类被选中的材料扮演者支架与刺激源两类角色。

需要注意的是，这些骨修复策略的应用仍有一些相关的问题需要进一步的验证研究。例如，作为炎症反应的主要调控因子之一，单核/巨噬细胞在应用过程中仍需要关注其在免疫应答方面的作用。含有体外激活巨噬细胞的支架，或者能够不恰当的激活宿主巨噬细胞的支架，会打乱宿主的免疫内稳态，从而导致宿主的全身炎症反应。同样，极化的巨噬细胞是破骨细胞的前体，有可能在骨微环境中加速破骨的进程，并导致骨溶解。所有的这些问题在解决时，都需要对各类细胞的行为进行严格的控制，并在材料支架的设计过程中，系统性地对性能和安全性进行分析与评估。

正文

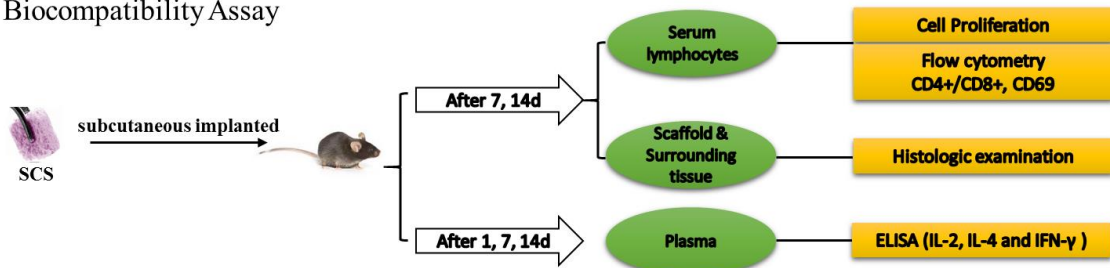
第一部分 仿生纤维内硅化胶原支架的制备与表征

在前期的研究中,我们基于应用无定形无机物的液相前体实现纤维内矿化的方案构建出了仿生纤维内硅化胶原支架材料^[75]。这种支架材料具有良好的生物降解能力和机械性能^[76],在骨缺损修复方面具有极大的应用潜力。在该部分研究中,我们拟对该材料的形貌以及缓释性能进行进一步的探索,并对其生物相容性进行全面的评估,为仿生纤维内硅化胶原支架材料进一步应用于体内骨缺损修复提供理论依据。

Preparation and characterization of SCS



Biocompatibility Assay



流程图 1. 仿生纤维内硅化胶原支架材料的理化性能与生物相容性研究

实验一 仿生纤维内硅化胶原支架的 形貌特征与缓释性能

纤维内硅化的胶原支架能够更好地模拟自然骨组织内部胶原纤维与矿物质有序排列的矿化形式，一方面具有更好的机械性能，另一方面能够通过自身的生物降解，实现纤维内硅酸的缓释^[76]。较好的机械性能能够使材料应用于承重骨、受力骨等不同骨组织缺损的修复，而缓释后的硅酸能够与宿主进行进一步的反应，从而对缺损修复的进程进行进一步的干预。本实验拟采用经 FDA 批准的，目前在临床上已有应用的脱矿骨胶原支架海绵材料 Demineralized cancellous sponge strip allograft (DSS) 为模板构建仿生纤维内硅化胶原支架，并对其形貌特征与缓释性能进行研究评价，以得到具有良好机械性能与缓释性能的支架材料，用于后续的相关研究。

1 材料与仪器

- 脱矿骨胶原支架海绵材料 Demineralized cancellous sponge strip allograft (OSSIF-*i sem*TM, Surgical Esthetics, Northridge, CA, USA)
- 聚丙烯氯化铵 PAH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 无水乙醇, 37% 盐酸, 氢氧化钠
- 氯化胆碱 (choline chloride) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- PBS 磷酸盐缓冲液 (DPBS, Corning Life Sciences, USA)
- Leica EM UC7 超薄切片机 (Leica, wetzlar, Germany)
- 梅特勒托利多 NewClassic MS 分析天平 (Mettler Toledo Inc, Columbus, OH, USA)
- Eppendorf 艾本德台式高速离心机 5424R (Eppendorf, German)
- 伯腾 Epoch R 微孔板分光光度计 (BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA)
- 透射电子显微镜 (JSM-1230, JEOL, Tokyo, Japan)
- SkyScan 1174 型显微计算机断层扫描仪 (Micro Photonics, Allentown, PA, USA)

2 方法

2.1 仿生纤维内硅化胶原支架材料的构建

室温下将 Silbond 40、无水乙醇、去离子水以及 37% 盐酸按照 15 : 182.8 : 2.167 : 0.008 的质量比（摩尔比为 1.875 : 396.79 : 12.03 : 0.0218）在磁力搅拌器搅拌情况下混匀 1 小时，以使正硅酸乙酯在酸性条件下水解为 3% 的正硅酸（orthosilicic acid）及其低聚体^[75]。将此 3% 的正硅酸（混合稀释后浓度为 1.5%）与 36 mM 氯化胆碱按照 1:1 的体积比均匀混合，并将终溶液 pH 值调至 5.5。3000 转/分钟离心 3 分钟，收集上清，即为制备好的氯化胆碱稳定的硅酸溶液^[75]，储存备用。

将脱矿骨胶原支架材料 DSS 修剪为 1×1×0.5 厘米的立方体，用双蒸水冲洗后备用。随后进行前期处理，即在 6.67×10^{-4} M 聚丙烯氯化铵溶液（PAH）中浸泡 4 小时。随后将胶原块浸泡于制备好的 1 mL 氯化胆碱稳定的硅酸溶液中，37°C、100% 湿度条件下孵育 4 天，每天更换硅化液。

2.2 仿生纤维内硅化胶原支架材料的 Micro-CT 观察

将制备完成的硅化胶原支架置入 CT 扫描架固定，进行扫描（参数 50 kV，800 μ A）。扫描后，采用系统自带的分析软件对图像进行重建。图像重建后，对其进行相关的数据分析。

2.3 仿生纤维内硅化胶原支架材料的透射电镜观察

将制备好的仿生纤维内硅化胶原支架材料（1×1×0.5cm）使用双蒸水冲洗处理后，依次使用浓度为 50%，70%，80%，95%，100% 的乙醇脱水。脱水后，常规使用不同浓度比例的环氧丙烷和包埋树脂进行浸透处理。完成浸透过程后，使用 100% 包埋树脂包埋，置于 60°C 烘箱 48 小时^[105]。随后对组织样本进行包埋，并制备约 80 nm 厚的透射电镜切片，电镜下进行观察，拍照并分析。

2.4 仿生纤维内硅化胶原支架材料的硅酸缓释测定

我们应用分光光度计对硅化胶原支架在 PBS 中硅酸释放特点进行检测，并绘制其相应的降阶曲线。硅化胶原支架材料（100 mg，每个时间段 N=3）进行干燥处理后，置于 10 mL 的 PBS 溶液中，37°C 孵箱孵育。每隔 24 小时，取出样本中 400 μ L 上清液加入 4.6 mL 双蒸水中进行后续测定。磁力搅拌下，依次加入 2.5 mL 1.0mol/L

的 HCl, 2.5 ml 的 Na_2EDTA 和 2.5 mL 的钼酸铵溶液, 搅拌 5 分钟后, 再加入 2.5 mL 酒石酸溶液及 5 mL 的亚硫酸钠溶液。溶液反应 10 分钟后, 取 300 μL 加入 96 孔板中, 使用伯腾 Epoch R 微孔板分光光度计记录吸光度 ($\lambda=700\text{ nm}$)。利用已知浓度的硅酸标准品, 采用同样方法绘制标准曲线, 并将所得吸光度带入标准曲线获得溶液中的硅酸浓度^[106,107]。

2.5 统计分析

检测所得数据首先进行正态分布检验和方差齐性检验。符合以上特征的数据将随后通过单因素方差分析和最小显著差数法进行多重比较。两组间的比较采用双尾 T 检验。

3 结果和讨论

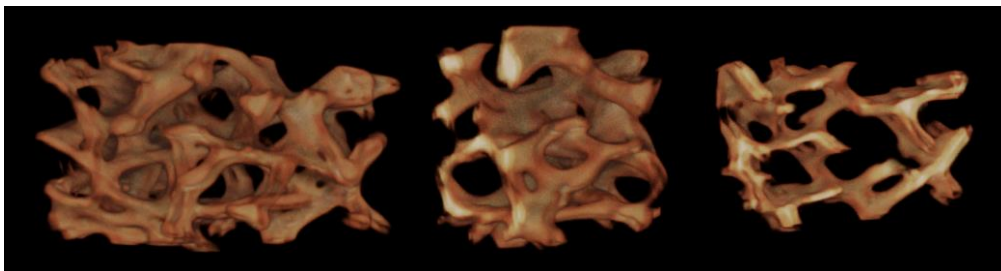


图 1-1 仿生纤维内硅化胶原支架材料的 Micro-CT 扫描结果

左：硅化胶原支架的整体观察；中：纵截面剖面观；右：冠状面剖面观。

我们以胶原纤维为矿化模板、稳定的硅酸前体为矿化基材、长链聚胺为催化剂, 通过脱矿骨胶原支架海绵材料的快速硅化, 成功制备了仿生纤维内硅化胶原支架材料^[75]。Micro-CT 扫描结果显示 (图 1-1), 硅化胶原支架材料保留了骨胶原多分级的结构特征, 骨小梁结构清晰可见, 整体呈多孔隙的蓬松网状结构, 其胶原支架内部孔隙均匀, 剖面观可见其呈现出内外均匀一致的矿物质沉积。硅化胶原支架材料在宏观层面上所表现出的多分级结构特征高度模拟了自然骨组织的宏观结构特征, 这一特征是保证其良好机械性能和力学性能的基础, 在参与骨组织重建的过程中, 能够为缺损区域的组织再生提供必要的基础条件。而多孔隙的蓬松网状结构保证了硅化胶原支架材料能够在植入后即刻被血液充盈, 能够迅速的形成功能临时基质, 从而为

损伤修复进程，尤其是组织血管化的进程提供结构支撑、生化基础以及细胞组成^[78,81]。而良好的血管化一方面能够为缺损区域募集更多的参与重建的种子细胞，另一方面也为骨组织的再生提供充足的血液供应。

材料的 3D 形貌及其内部剖面特征可参见 Micro-CT 检测所得视频：

https://v.youku.com/v_show/id_XMjYxMjQwMzg0MA==.html

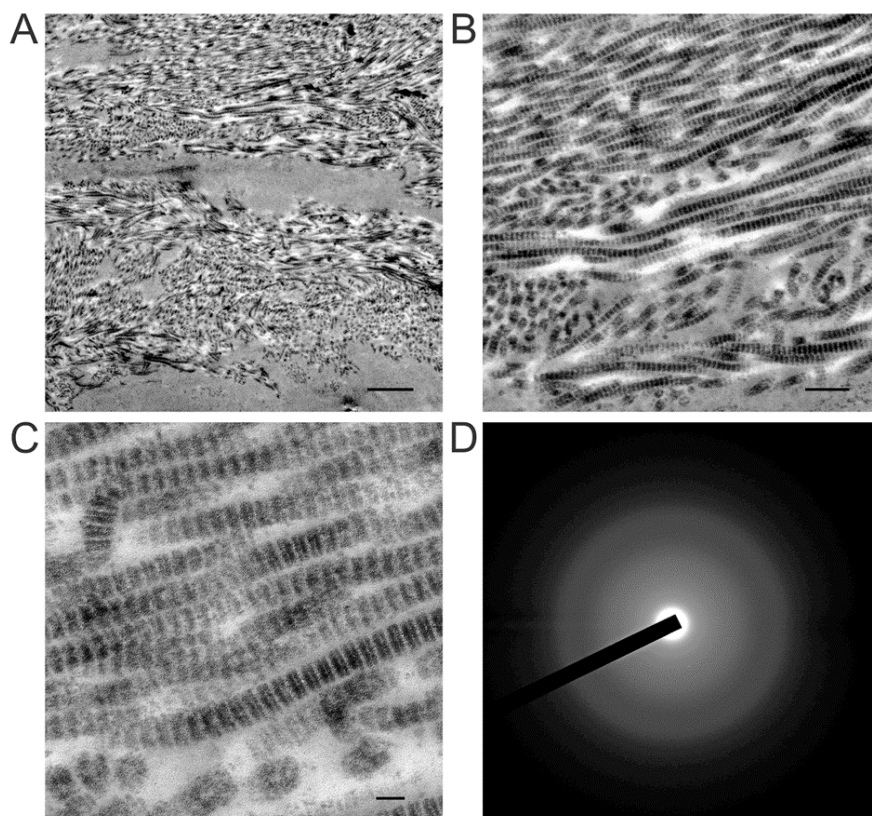


图 1-2 仿生纤维内硅化胶原支架材料的 TEM 结果

- A: 低倍观察 (标尺=2 μm);
- B: 高倍观察下可见胶原纤维内部的带状结构 (标尺=500 nm);
- C: 镜下可见胶原纤维内部存在针状/片状的矿化结构 (标尺=100 nm);
- D: 硅化胶原显微的电子衍射, 证实了纤维内矿物质为无定形结构。

通过透射电镜的结果，我们证实了脱矿骨胶原支架实现了良好的纤维内的硅化（图 1-2A, B）。能够在胶原纤维内部观察到有序的带状矿化结构，成功的模拟了自然骨组织胶原纤维内部矿化的结构特征^[75]。胶原纤维的横截面图也确认了胶原纤维内部二氧化硅的沉积（图 1-2C）。选区电子衍射实验证实了纤维内部二氧化硅是以无定形的形式存在（图 1-2D）。

良好的纤维内硅化能够模拟天然骨组织多分级结构中的微观基本结构^[58]，说明硅化胶原支架材料在力学性能方面能够模拟自然骨，同时能够模拟自然骨组织微观的生物特性。一方面其基本的结构单位能够高度模拟自然的骨组织，另一方面能够获得接近天然骨组织的良好力学性能。而和传统的仿生矿化材料相比，仿生纤维内矿化的修复材料具有更好的机械性能和生物亲和力^[61,62]。

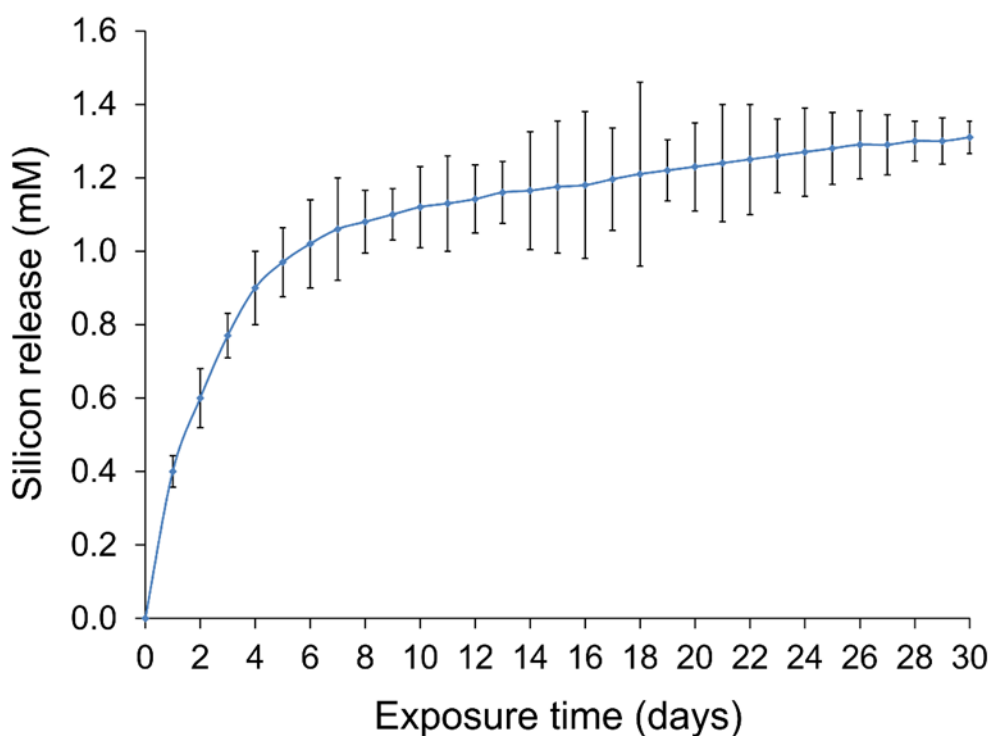


图 1-3 仿生纤维内硅化胶原支架材料的硅酸释放曲线

通过硅酸释放的曲线我们可以看出（图 1-3），随着时间的推移，仿生纤维内硅化胶原支架材料能够在 PBS 模拟体液环境中，稳定持续地释放硅酸。在前 7 天的时间里，材料具有较快的缓释速率，并在第八天时达到 1.0mmol/L 的浓度。在 7-30 天时，材料的硅酸的缓释速率趋于平稳，并最终维持在 1.2-1.4mmol/L 浓度的范围内。

仿生纤维内硅化胶原支架材料能够在降解的过程中，实现硅酸的缓释，这是硅化胶原支架材料重要的性能特征之一。已有研究证实了随硅化胶原支架材料降解所缓释的硅，能够促进骨髓间充质干细胞的成骨分化，促进其参与骨再生的修复进程，具有良好的骨诱导性^[76,77]。通过对硅化胶原支架材料制备时硅化程度的控制，我们

能够对硅酸随材料降解的缓释速率进行调整，这也为我们进一步研究硅酸缓释参与骨重建进程，以及机体免疫反应进程提供了实验基础。

4 小结

我们采用以氯化胆碱稳定的硅酸溶液作为基材，以 PAH 为硅藻聚胺类似物，以脱矿骨胶原支架海绵材料为模板，构建了仿生纤维内硅化胶原支架材料。通过材料的形貌观察证实所构建出的硅化胶原支架具有良好的纤维内硅化的效果，能够较好的模拟自然骨组织的纤维内矿化的形式；通过硅酸缓释曲线的测定，我们也对其缓释的性能有了进一步的了解，即材料能够在液体环境中稳定持续地进行硅酸的缓释。进而为我们下一步的生物体内应用提供了理论基础。

实验二 仿生纤维内硅化胶原支架的生物相容性评价

生物移植替代材料首先应该具有优良的生物相容性，这样在植入宿主体内后，才能有效地避免宿主异物反应以及免疫排斥反应的发生，进而提高移植的成功率^[83]。良好的生物相容性一方面来自材料自身的物质组成，另一方面来自于材料的表面形貌及内部结构特征^[84]。仿生纤维内硅化胶原支架材料的生物相容性如何，直接关系到其体内应用的效果。因此，我们拟在本实验中对材料的生物相容性进行全面的评价，为其进一步应用于骨缺损的修复提供基础。

1 材料与仪器

- 仿生纤维内硅化胶原支架材料（制备同第一部分，实验一）
- 雄性 2 月龄 C57/BL6 小鼠（购自第四军医大学动物实验中心，SPF 级环境饲养，常规给予食水，所有的动物实验均经第四军医大学动物管理使用委员会批准，并符合国家健康机构实验动物应用指导的规范，所有的实验操作均遵照受批准的指导与条例进行）。
- 无菌动物手术盒（手术剪，组织钳，止血钳，眼科剪，眼科直镊，眼科弯镊，手术刀柄，3 号手术刀片，角针，2/0 缝线，洞巾，纱布，棉球，碘伏，75% 医用酒精，剃刀，1% 戊巴比妥钠，生理盐水，注射器，无菌手术手套）
- 循环淋巴细胞提取试剂盒（LSF™; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA）
- Dulbecco's Modified Eagle Medium 细胞培养基（DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA）
- 青链霉素双抗 100 U/ml penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- 热灭活胎牛血清 heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, USA)
- PBS 磷酸盐缓冲液（同第一部分，实验一）
- 含 0.1% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶溶液（Corning Life Sciences, USA）
- Corning® 25cm² 细胞培养瓶（Corning Costar）
- Corning® 24 孔 细胞培养板（Corning Costar）

- Transwell 小室（24 孔板适用，孔径 0.4 μm , Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA）
- 15mL 无菌离心管（Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA）
- CCK8 细胞增殖试剂盒（MilliporeSigma, Billerica, MA, USA）
- PE/Cy5 anti-mouse CD3 Antibody, PE anti-mouse CD4 Antibody, FITC anti-mouse CD8a Antibody, APC anti-mouse CD69 Antibody（BioLegend Inc., San Diego, CA, USA）
- Mouse IL-2, IL-4 和 IFN- γ Quantikine ELISA Kit（R&D systems, Minneapolis, MN, USA）
- 10% 中性缓冲福尔马林
- 苏木素伊红(HE)染色试剂盒/Hematoxylin and Eosin Staining Kit（Beyotime, China）
- 封片用中性树胶，二甲苯，无水乙醇
- 莱卡 Leica RM2235 石蜡切片机（Leica, wetzlar, Germany）
- 垂直流超净细胞工作台
- 恒温含 5%CO₂ 细胞培养箱（Thermo Fisher Scientific, USA）
- Eppendorf 艾本德台式高速离心机 5424R（Eppendorf, German）
- 奥林巴斯光学倒置显微镜 OLYMPUS-IX51（Olympus, Tokyo, Japan）
- 奥林巴斯光学正置显微镜 OLYMPUS-BX61（Olympus, Tokyo, Japan）
- 伯腾 Epoch R 微孔板分光光度计（BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA）
- 贝克曼库尔特 FC 500 MCL/MPL 流式细胞仪（FC500, BECKMAN, USA）

2 方法

2.1 小鼠异位植入模型的建立

将仿生纤维内硅化胶原支架材料切成长宽高约 $3 \times 3 \times 1\text{mm}$ 的方形，钴-60 放射线照射消毒灭菌后，浸泡在 PBS 磷酸盐缓冲液中备用。

小鼠使用 1% 戊巴比妥钠注射麻醉(n=60 只, 注射用量为每公斤体重注射 10mL)。剃刀褪去背部两侧毛发，常规消毒铺巾，在脊柱下段 2/3 位置处两侧，距脊柱中线约 5mm 处纵向切开约 5mm 长的切口，向切口内钝性分离表皮，暴露皮下肌层，随后向外侧分离约 1cm，形成腔袋，将准备好的硅化胶原支架置于腔袋底部，常规缝合，

消毒。假手术对照组不放置硅化胶原支架。观察小鼠苏醒后，放回笼中待后续实验取用。

2.2 淋巴细胞二次刺激增殖实验

分别在硅化胶原支架植入 7 天和 14 天后提取循环淋巴细胞进行培养。小鼠（每组 $n=10$ ）胸腔常规消毒，打开胸腔后暴露心脏，行心脏取血。使用循环淋巴细胞提取试剂盒提取外周血中的淋巴细胞，向 15mL 离心管中加入 5mL 分离液，小心将提取到的血液样本置于分离液上部，随后置于离心机中 1000r/min 离心 15min，可见管中液体分为四层，第二层白色浑浊层即为淋巴细胞层。小心吸出第二层液体，PBS 洗涤 3 次后，将所得的细胞置于 25cm² 细胞培养瓶中，采用含 10% FBS 和 1% 青链霉素双抗的 DMEM 培养基进行细胞培养。

细胞长至 80% 融合后，传代至 24 孔板中（ 1×10^5 /孔），使用 Transwell 小室进行干预，将制备好的硅化胶原支架材料放入上室，进行细胞共培养。培养 24 小时后，使用 CCK8 细胞增殖试剂盒对细胞增殖活性进行测定，采用伯腾 Epoch R 微孔板分光光度计测定 450nm 处的吸光度（每样本测定 6 个复孔）。

2.3 循环淋巴细胞的流式细胞检测实验

分别在硅化胶原支架植入 7 天和 14 天后提取循环淋巴细胞（每组 $n=10$ ）。淋巴细胞提取方法同本实验 2.2。将所得的细胞置于 25cm² 细胞培养瓶中，采用含 10% FBS 和 1% 青链霉素双抗的 DMEM 培养基进行细胞培养。待细胞长至 80% 融合后，分别提取各组细胞进行流式检测。

使用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，将消化下来的细胞使用 PBS 洗涤 3 次，采用细胞计数法，定量 1×10^6 个细胞，置于新的离心管中，每个样本使用带荧光标记的一抗于冰上避光孵育 10min（PE/Cy5 anti-mouse CD3 Antibody, PE anti-mouse CD4 Antibody, FITC anti-mouse CD8a Antibody, APC anti-mouse CD69 Antibody（BioLegend Inc., San Diego, CA, USA））。抗体浓度依照生产厂家说明书推荐的浓度使用。随后洗去一抗，500 μ L PBS 重悬细胞，使用贝克曼库尔特 FC 500 MCL/MPL 流式细胞仪（FC500, BECKMAN, USA）对细胞进行检测并分析（每样本重复 3 次）。

2.4 外周血炎症因子的 ELISA 检测

分别在硅化胶原支架植入 1 天，7 天和 14 天后提取小鼠的外周血（每组 $n=10$ ）。

将血液样本置于 1.5mL EP 管中，4°C 1500r/min 离心 15 分钟，分离上层血浆，随后对血浆进行 ELISA 检测。

分别使用 Mouse IL-2 Quantikine ELISA kit, Mouse IL-4 Quantikine ELISA kit and Mouse IFN- γ Quantikine ELISA Kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 试剂盒对所提取样本进行检测，测定假手术对照组，与仿生纤维内硅化胶原支架组外周血中 IL-2, IL-4 和 IFN- γ 的表达水平。每个样本重复 3 个复孔，试剂用量与操作流程参照试剂盒说明书指示进行。

2.5 支架植入区域原位组织学切片 H&E 染色

分别在硅化胶原支架植入 7 天和 14 天后处死小鼠。小心分离植入区域的组织，将包含有未降解硅化胶原支架的组织块取出，使用 10% 中性缓冲福尔马林固定 24 小时。随后石蜡包埋，并制作原位组织的石蜡切片。

首先进行切片脱蜡至水。将制作好的石蜡切片置于二甲苯 I 中 15 分钟，随后置于二甲苯 II 中 15 分钟，随后采用梯度浓度的乙醇进行至水（100% 乙醇，95% 乙醇 I，95% 乙醇 II，85% 乙醇，75% 乙醇，65% 乙醇），各 5 分钟。将至水完成的石蜡切片置于蒸馏水中浸洗 1 分钟，加苏木素染液染色 5-10 分钟，随后大量水洗，并置入 1% 盐酸酒精中约 1-3 秒，随后放入饱和碳酸锂溶液中返蓝约 8-10 秒。大量流水冲洗后，使用伊红染色液进行染色约 1-3 分钟，大量水洗后，于镜下观察染色效果，染至合适状态后，采用梯度浓度的乙醇脱水（65% 乙醇，75% 乙醇，85% 乙醇，95% 乙醇 I，95% 乙醇 II，100% 乙醇），各 5 分钟。随后置于二甲苯 I 中 15 分钟，二甲苯 II 中 15 分钟。使用中性树脂封片。待树脂完全干燥凝固后（约 24 小时），于正置显微镜下观察拍照（每组 n=10）。

2.6 统计分析

同第一部分，实验一。

3 结果与讨论

在生物材料置入体内后，材料自身与宿主之间即开始发生相互作用。材料对植入区域以及宿主全身均产生影响和作用，而宿主的免疫系统也会对材料产生一系列的免疫应答。两者之间的相互作用会一直持续，直到两者达到反应平衡，或植入材

料被宿主的异物反应清除^[84]。仿生纤维内硅化胶原支架材料由于其材料本身的物质构成决定了其具有较低的免疫原性，因此较未脱矿脱蛋白的支架材料相比，具有明显的优势。

淋巴细胞二次刺激增殖实验证实了仿生纤维内硅化胶原支架材料具有低免疫原性的特点。当材料在体内引起宿主明显免疫应答后，宿主体内所产生的淋巴细胞将产生具有能够识别材料性征的表面抗原抗体反应，当细胞在体外第二次接触到免疫原时，将会产生明显的增殖反应^[87]。而本研究的结果表明（图 2-1），在材料植入 7 天后以及 14 天后，从宿主外周循环所提取出的淋巴细胞，通过 Transwell 共培养系统与硅化胶原支架共培养 24 小时后，并未产生明显的增殖反应，硅化胶原支架植入后的小鼠淋巴细胞增殖水平与假手术对照组相比，并没有统计学差异（ $p>0.05$ ）。该结果证实了植入体内后，硅化胶原支架并没有使宿主产生明显的免疫应答反应，宿主体内的外周循环淋巴细胞对硅化胶原支架材料本身并未产生明显的抗原抗体反应，因而未在体外实验中检测到特异性淋巴细胞的刺激增殖效应。证明了仿生纤维内硅化胶原支架材料具有低免疫原性的特点。

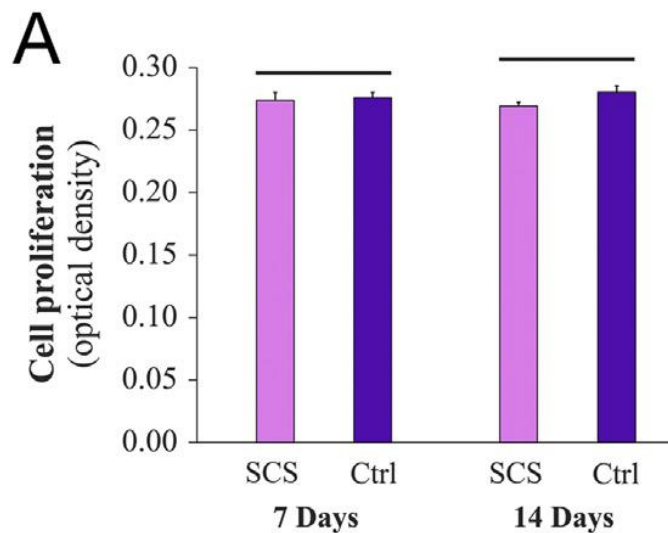


图 2-1 淋巴细胞二次刺激增殖实验

当宿主受到外来异物的刺激后，机体开始产生免疫应答反应，淋巴细胞等免疫炎症性细胞会通过外周循环进入到异物周边的组织区域，通过炎症反应、异物反应来与植入的生物材料进行作用^[83]。此时能够检测到外周循环中淋巴细胞数目的增加，

以及淋巴细胞活性的增加。植入材料的免疫原性越强，宿主所产生的免疫反应的程度也越重，能够反映在植入区域局部严重的急性炎症反应，以及在循环中检测到更多的活化淋巴细胞。此外，宿主的免疫应答反应也会导致外周血循环中的淋巴细胞，以及募集到植入区域的免疫细胞分泌大量炎症因子，如 IL-2, IL-4, IFN- γ 等，这些炎症因子参与到宿主的炎症反应中，一方面能够激活中性粒细胞和其他淋巴细胞，另一方面能够调节组织的代谢活性，促进各类相关细胞因子的合成和分泌^[83]。具有良好生物安全性的生物植入材料对宿主的刺激相对温和，能够最低限度范围的引起宿主的免疫炎症反应，避免出现对宿主的刺激，进而引发严重的异物反应和急性炎症反应，同时也能够迅速度过炎症应答期，使生物植入材料尽早进入行使功能的修复阶段。

通过对硅化胶原支架材料异位植入 7 天，14 天后小鼠外周血中 T 淋巴细胞亚类以及活性的测定，我们能够据此评估在硅化胶原支架植入后，宿主机体对材料的免疫应答的程度。我们首先通过 T 细胞表面标志物 CD3 设门，选取 CD3 阳性的细胞进行进一步的分选，分别测定 CD4 阳性与 CD8 阳性的细胞数量，并计算 CD4/CD8 的值，同时也测定 CD69 阳性的 T 细胞占总 T 细胞的比例(图 2-2)。外周血中 CD4/CD8 的比值一般情况下能够反应出机体免疫反应的程度，比值过高表明有强烈的免疫反应，而比值过低则反映为免疫缺陷或免疫功能下降^[108]。我们同时测定了 CD69 阳性 T 细胞占总 T 细胞的比例。CD69 是活化 T 细胞的表面标志物，在 T 细胞受到外来的刺激后，CD69 阳性 T 细胞的比例将会明显上升，活化后的 T 淋巴细胞会分泌一系列的炎症因子以应对外来的刺激，并进一步促进宿主免疫炎症反应的进行^[109]。

流式细胞检测结果显示(图 2-3)，在仿生硅化胶原支架植入小鼠体内后 7 天和 14 天两个时间点上，小鼠外周血中 T 淋巴细胞 CD4⁺/CD8⁺ 的比值与阴性对照组相比，没有统计学差异 ($p>0.05$)；且与阴性对照组相比，硅化胶原支架植入后的小鼠外周血中 CD69 阳性的活化 T 细胞的比例在植入后第 7 天和第 14 天均无统计学差异 ($p>0.05$)。上述结果表明，在植入小鼠体内后，仿生纤维内硅化胶原支架材料并未引起宿主外周循环中 T 淋巴细胞亚群比例的变化，对活化 T 细胞的数量也没有影响。反映出机体对材料植入所产生的免疫应答反应控制在较低的水平范围之内，硅化胶原支架材料具有较好的生物相容性。

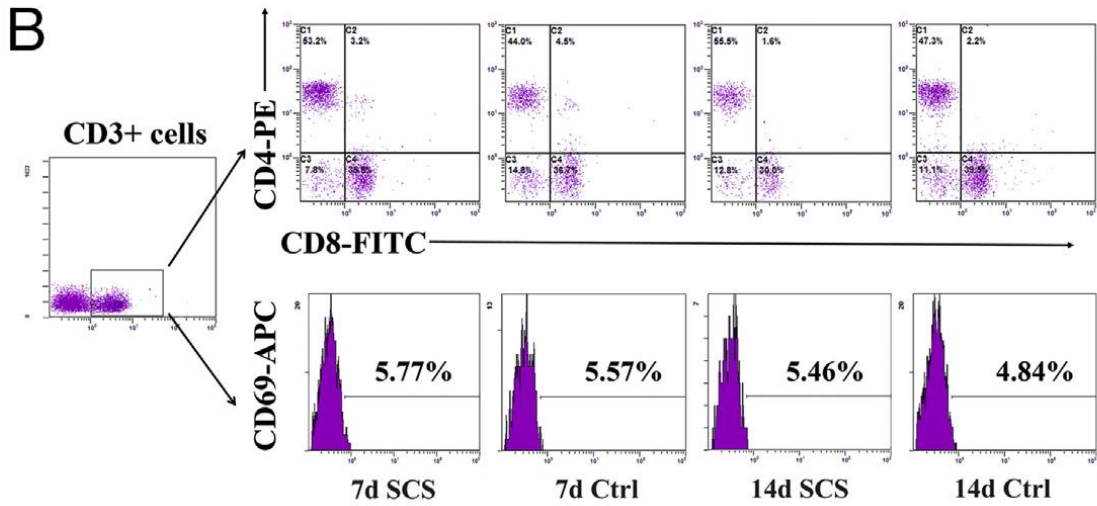


图 2-2 外周血 T 淋巴细胞的流式细胞检测结果

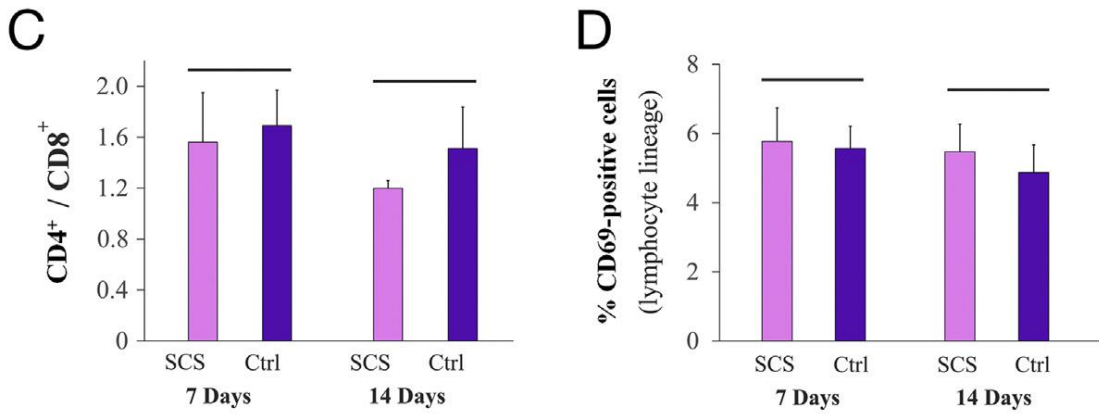


图 2-3 外周血 T 淋巴细胞的流式细胞检测结果分析

C: 在硅化胶原支架植入 7 天和 14 天后对外周血 T 淋巴细胞 CD4⁺/CD8⁺的比值进行测定。
 D: 在硅化胶原支架植入 7 天和 14 天后对外周血 CD68 阳性 T 淋巴细胞的比例进行测定。

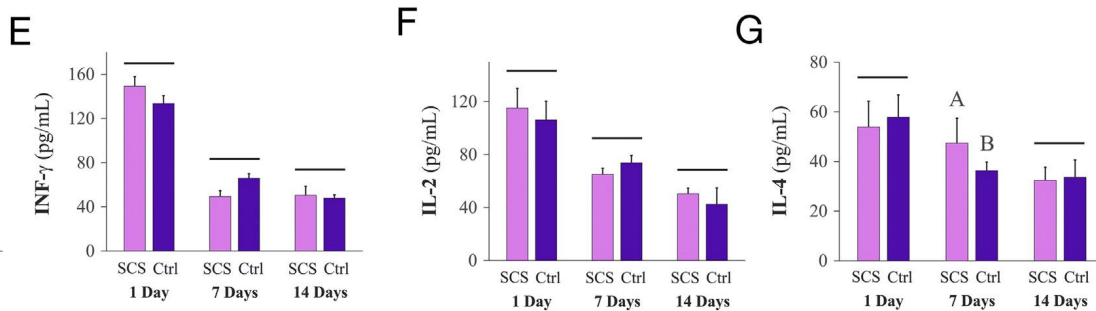


图 2-4 外周循环血中相关炎症因子的 ELISA 测定结果

E: IFN- γ 在仿生硅化胶原支架材料植入体内后 1 天, 7 天和 14 天时, 在外周循环血中的表达情况; F: IL-2 在仿生硅化胶原支架材料植入体内后 1 天, 7 天和 14 天时, 在外周循环血中的表达情况; G: IL-4 在仿生硅化胶原支架材料植入体内后 1 天, 7 天和 14 天时, 在外周循环血中的表达情况。Ctrl 为假手术对照组。

IL-2 即为白细胞介素 2, 又称 T 细胞生长因子, 主要由活化的 T 细胞分泌而来。IL-2 是参与机体免疫应答的重要细胞因子, 能够刺激活化的 T 细胞增殖, 并促进其产生一系列的相关炎症因子, 同时也能够激活 NK 细胞、巨噬细胞等免疫细胞参与到机体的免疫应答中来^[84]。IL-4 主要来源于活化的 T 细胞(人)或 Th2 细胞(小鼠), 是机体免疫应答反应中重要的细胞因子, 一方面 IL-4 能够通过免疫调节作用激活和促进相关免疫细胞的增殖, 例如 B 细胞、巨噬细胞、T 细胞等, 另一方面 IL-4 也能够和细胞集落刺激因子 CSF 产生协同作用, 刺激造血细胞的增殖^[110]。IFN- γ (γ 干扰素)一般来源于活化的 T 细胞和 NK 细胞, 是 Th1 亚类的 T 细胞的标志性细胞因子, 在免疫应答反应中主要起免疫调节的作用^[111]。外周血的 ELISA 结果显示, 在仿生纤维内硅化胶原支架材料植入后 1 天, 7 天和 14 天时, 血液循环中的 IL-2 和 IFN- γ 的表达水平较阴性对照组相比, 均未出现明显的变化 ($p>0.05$) (图 2-4E, F)。IL-4 的表达在材料植入后 1 天和 14 天时, 与对照组相比, 没有统计学差异 ($p>0.05$); 而在植入后的第七天, 其在血液中的表达水平略高于假手术对照组 ($p<0.05$) (图 2-4, G)。结果表明硅化胶原支架材料总体上对外周血循环中的相关细胞因子 (IL-2, IL-4, IFN- γ) 的表达水平基本没有影响, 虽然在植入后 7 天时, IL-4 的表达略高于对照组, 但在 14 天后其表达下降的水平已达到阴性对照的表达水平。

植入区域的炎症细胞浸润是影响生物材料植入成功的重要因素之一。当材料的免疫原性较强时, 通常会引起宿主严重的急性炎症反应, 大量炎症细胞和炎症因子通过血液向植入区域募集。在炎症早期, 浸润的炎症细胞以中性粒细胞为主, 而淋巴细胞和单核巨噬细胞则会在 48 小时后向缺损区域大量迁移^[83]。严重的急性炎症反应会影响局部组织的修复, 导致最终植入的失败。

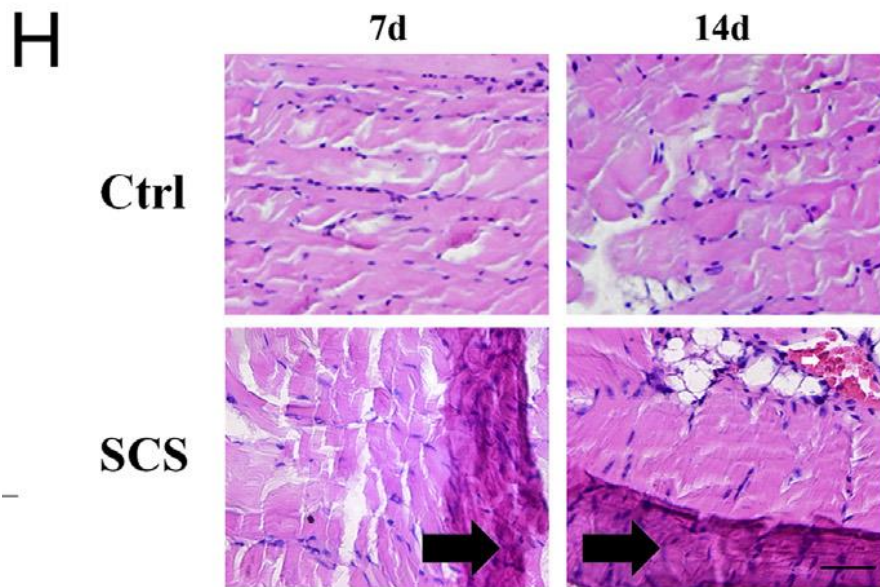


图 2-5 硅化胶原支架材料异位植入后 7 天和 14 天时的原位组织学切片 HE 染色结果

从结果中可看出，在植入后 7 天和 14 天时，硅化胶原支架材料的胶原纤维出现了部分的吸收，而在胶原纤维周边组织中，没有明显的炎症细胞浸润。黑色箭头表示胶原纤维，白色箭头显示的为周边组织中的血管。（标尺= 200 μ m）

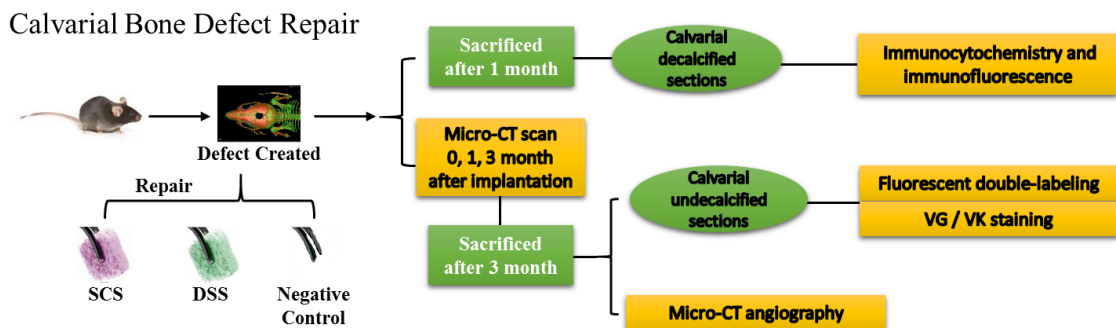
仿生纤维内硅化胶原支架材料植入体内后，我们在 7 天和 14 天时取原位组织切片进行 HE 染色观察。结果显示，在植入后 7 天和 14 天时，硅化胶原支架材料的胶原纤维出现了部分的吸收，而在胶原纤维周边组织中，没有明显的炎症细胞浸润（图 2-5）。结果表明硅化胶原支架材料具有良好的生物相容性，在植入体内后不会引起周边组织明显的炎症反应。

4 小结

通过本实验，我们对仿生纤维内硅化胶原支架材料的生物相容性进行了评估。结果表明硅化胶原支架材料具有较低的免疫原性，在异位植入后，不会引起外周血液循环中炎症因子与炎症细胞的增加，其植入后组织周边的炎症反应也维持在温和的范围之内。仿生纤维内硅化胶原支架材料具有较好的生物相容性，为其进一步应用于体内骨缺损的修复提供了基础。

第二部分 仿生纤维内硅化胶原支架修复小鼠颅骨缺损的体内实验研究

在第一部分实验中，我们证实纤维内硅化胶原支架材料能够稳定而持续地缓释硅酸离子，并表现出较低的免疫原性和良好的生物相容性，为其在骨缺损修复的替代材料方面的应用提供了实验基础。在本部分实验中，我们拟进一步将仿生纤维内硅化胶原支架材料应用于小鼠颅骨缺损的修复，通过 Micro-CT、贯序荧光标记、硬组织切片的组织学染色技术观察其修复后的成骨效果；通过血管灌注技术观察其促进血管生成的效果；通过免疫荧光染色、免疫组织化学、TRAP 染色技术对硅化胶原支架修复后的局部组织相关细胞增殖分化及细胞因子表达水平的变化进行评估，从而对仿生纤维内硅化胶原支架材料的骨缺损修复效果进行全面的评估。



流程图 2. 小鼠颅骨缺损修复的实验研究

实验三 仿生纤维内硅化胶原支架促骨缺损修复的实验研究

我们拟建立小鼠的颅骨缺损模型，使用处理好的硅化胶原支架植入缺损区域，对植入后即刻、1个月以及3个月时的修复效果进行全方位的评估，一方面对其成骨能力进行评价，另一方面也对其和机体免疫应答反应之间的相互作用进行探索。在本部分实验中，我们采用了脱矿骨胶原支架材料（DSS）作为阳性对照组。DSS作为脱矿脱蛋白的骨小梁来源的胶原支架，具有良好的韧性和弹性，在植入体内后，由于其多孔的特性，能够迅速被血液充盈，并能够通过其骨诱导的作用，促进组织再生^[112]。

1 材料与仪器

- 仿生纤维内硅化胶原支架材料（制备同第一部分，实验一）
- 脱矿骨胶原支架海绵材料 Demineralized cancellous sponge strip allograft（同第一部分，实验一）
- 雄性3月龄 C57/BL6 小鼠（同第一部分，实验二）。
- 无菌动物手术盒（同第一部分，实验二）
- 10%中性缓冲福尔马林
- 世新 STRONG 90 慢速牙科手机（STRONG, South Korea），700#牙科裂钻
- 西门子 Micro-CT 活体成像系统 Inveon micro-CT system（同第一部分，实验一）
- 茜素红 Alizarin Red（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）
- 钙黄绿素 Calcein（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）
- 奥林巴斯三通道倒置荧光显微镜（BX-60, Olympus, Japan）
- Image-Pro Plus software 数据分析软件（Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA）
- Von Kossa Sliver 染色液，Van Geison 染色液。
- Leica EM UC7 超薄切片机（Leica, wetzlar, Germany）

➤ 奥林巴斯光学正置显微镜 OLYMPUS-BX61 (Olympus, Tokyo, Japan)

2 方法

2.1 小鼠颅骨缺损模型的建立以及硅化胶原支架植入修复

将仿生纤维内硅化胶原支架材料和脱矿骨胶原支架材料 DSS 分别切成直径约 3mm，厚度 0.5mm 的圆片状，钴-60 放射线照射消毒灭菌后，浸泡在 PBS 磷酸盐缓冲液中备用。

取 3 月龄健康雄性 C57/B6L 小鼠 (n=54)，给予 1% 戊巴比妥钠注射麻醉 (每公斤体重 10mL 用量)。待麻醉完全后，剃刀剔去颅顶毛发，常规消毒铺巾。用手术刀于颅顶中线处，双眼连线后方约 5mm 处切开一纵向长约 8mm 的切口，向下分离皮下组织，暴露颅顶。用慢速涡轮手机连接 700#裂钻，在颅顶顶骨连接线中点处磨开一直径约 3mm 的洞，洞深度为打穿颅骨，暴露颅下组织。实验组 (SCS) 中，将准备好的硅化胶原支架材料置入缺损区域；在阳性对照组 (DSS) 中，将准备好的脱矿骨胶原支架材料 DSS 置入缺损区域；在阴性对照组 (NC) 中，缺损区域不放置任何修复材料 (每组小鼠 n=18)。常规缝合切口，消毒。待小鼠苏醒后放回笼中饲养，常规给予食水，每日观察记录健康状况。

2.2 Micro-CT 活体成像实验

在完成小鼠颅骨缺损模型的建立以及硅化胶原支架植入修复后，每组小鼠随机选取 12 只，在术后的 1 天，1 个月，3 个月时，分别使用 Micro-CT 活体成像技术对其头部进行扫描。小鼠首先使用 1% 戊巴比妥钠注射麻醉 (每公斤体重 10mL 用量)。待麻醉完全后，将其固定在扫描装置上，进行 CT 扫描 (精度为 10 μ m)。扫描参数：80 keV，500 mA。扫描完成后，约 10 μ m 厚的二维平面图像通过 inveon 数据分析系统进行三维重建。

将重建完成后的图像数据通过 Siemens Inveon Analysis 分析软件对其进行数据分析。选定缺损区域为中心，直径 3.5 毫米，高 2 毫米的区域作为分析区域，确定阈值后，测定区域内的新骨形成面积 (bone volume/total volume, BV/TV) 和骨密度 (bone mineral density, BMD)。

2.3 贯序荧光标记实验

在完成小鼠颅骨缺损模型的建立以及硅化胶原支架植入修复后，我们从每组中选取了 12 只小鼠进行了 Micro-CT 活体扫描的跟踪实验，在这 12 只小鼠中，我们再随机选取 6 只小鼠进行贯序荧光标记实验。选取的老鼠在 3 个月时，第三次 Micro-CT 活体扫描试验后处死。

在小鼠处死前 14 天和 13 天，向小鼠腹腔注射钙黄绿素(每公斤体重 5mg 用量)；在小鼠处死前 4 天和 3 天，向小鼠腹腔注射茜素红（每公斤体重 75mg 用量）。小鼠处死后，分离颅骨标本，置于 10% 中性缓冲福尔马林中固定 24 小时。完成固定后的组织标本进行硬组织切片处理（见本实验 2.4）。将处理好的组织切片置于荧光倒置显微镜下观察，使用 fluorescein isothiocyanate (FITC) 滤镜对茜素红着色情况进行观察，使用罗丹明 rhodamine 滤镜对钙黄绿素着色情况进行观察。

使用 Image Pro Plus 分析软件对结果进行分析处理，每个样本随机选取 5 个区域（400×），对区域内的累计光密度（integrated optical density, IOD）进行测定，以确定各样本骨表面钙黄绿素和茜素红的累积情况。

2.4 小鼠颅骨未脱钙硬组织切片的制作

小鼠颅骨在 10% 中性缓冲福尔马林中固定 24 小时后取出，流水冲洗后，浸入无水乙醇中，每 4 小时更换无水乙醇一次，共换液 6 次（于 24 小时内完成）。将脱水后的标本浸入 MMA（甲酯甲基丙烯）介质中，每隔 1 小时更换 1 次介质，总计更换 5 次。

将浸渗后的标本放入玻璃瓶内，注入包埋介质，用带通气孔的盖子盖紧，置于 50°C 的热水中 1 小时，随后将水温调至 37°C，恒温保持 24 小时使包埋块硬化。随后打开容器，取出包埋块，完成包埋。

用带齿粗锉修正包埋标本块，使其露出组织切面，随后将修整完成的标本块置于切片机上固定，首先进行粗旋，暴露出需要分析的颅骨缺损部位，随后进行细切，切片的厚度以 4-6μm 为宜。随后将切片粘至载玻片上，准备进行下一步的观察以及染色操作。

2.5 Von Kossa Silver 染色

将制备好的未脱钙骨切片脱塑至水，水洗后，浸于 Von Kossa Silver 染色液中，

置于紫外灯下，染色 10 分钟。使用蒸馏水冲洗后，浸入硫代硫酸钠水溶液中 2 分钟，随后对切片进行充分水洗，复染液染色 1 分钟。随后切片进行脱水，透明和封固。

染色液：2g 硝酸银加入 100mL 蒸馏水中；

复染液：1g 中性红加入 100mL 蒸馏水中。

2.6 Van Geison 染色

对制作好的未脱钙骨组织切片脱塑至水，随后浸入染色液染色 30-60 分钟。随后浸入分化液分化 5-10 分钟。大量水洗后，使用 75% 乙醇脱碘，并流水冲洗 10 分钟。VG 复染后，常规脱水，透明，封固。

染色液：5% 苏木素无水乙醇液 20mL + 10 氯化铁水溶液 8mL + Lugol 碘液 8mL；

分化液：氯化铁 2g + 蒸馏水 100mL。

2.7 统计分析

同第一部分，实验一。

3 结果和讨论

与传统的以羟基磷灰石为基础的粉末型或颗粒型骨修复替代材料相比，硅化胶原支架材料由于其具有相对稳定的三维结构，在骨缺损的修复中有着更好的修复效果^[42]。一方面硅化胶原支架具有一定的机械强度和稳定性，因此在承重骨和受力骨的缺损修复中有着明显的优势，另一方面由于硅化胶原支架的多孔隙的结构特征，能够充分的被血液充盈，从而促进大块的组织缺损修复。我们采用目前在临床上已有应用的脱矿骨胶原支架材料 Demineralized cancellous sponge strip allograft (DSS) 作为阳性对照组。DSS 作为脱矿脱蛋白的骨小梁来源的胶原支架，具有良好的韧性和弹性，在植入体内后，由于其多孔的特性，能够迅速被血液充盈，并能够通过其骨诱导的作用，促进组织再生。我们以此作为比照，来评估和 DSS 相比，仿生纤维内硅化胶原支架材料的修复效果。

我们建立了小鼠颅骨缺损模型，分别使用硅化胶原支架和 DSS 对其进行了修复。在术后即刻、1 个月和三个月时，进行 Micro-CT 活体扫描观察。结果显示（图 3-1），在术后即刻，DSS 组和阴性对照组中的缺损内，没有低密度影，而在 SCS 组内可见网状低密度影结构。在术后 1 个月时，能够看到 SCS 组的缺损范围明显缩小，缺损区域

内形成了近乎完整的较低密度的骨结构，而部分骨的密度已接近周边骨组织的密度；DSS 组中，可见低密度的网状结构，表明 DSS 的胶原支架纤维出现了矿化；而 NC 组中缺损区域内未见明显矿化结构的形成，其缺损范围略有缩小。在术后 3 个月时，可见在 SCS 组中，缺损区域形成了完整的骨结构，而 DSS 组中的骨密度要明显低于 SCS 组；阴性对照组中的缺损区域内则无明显矿化结构形成。

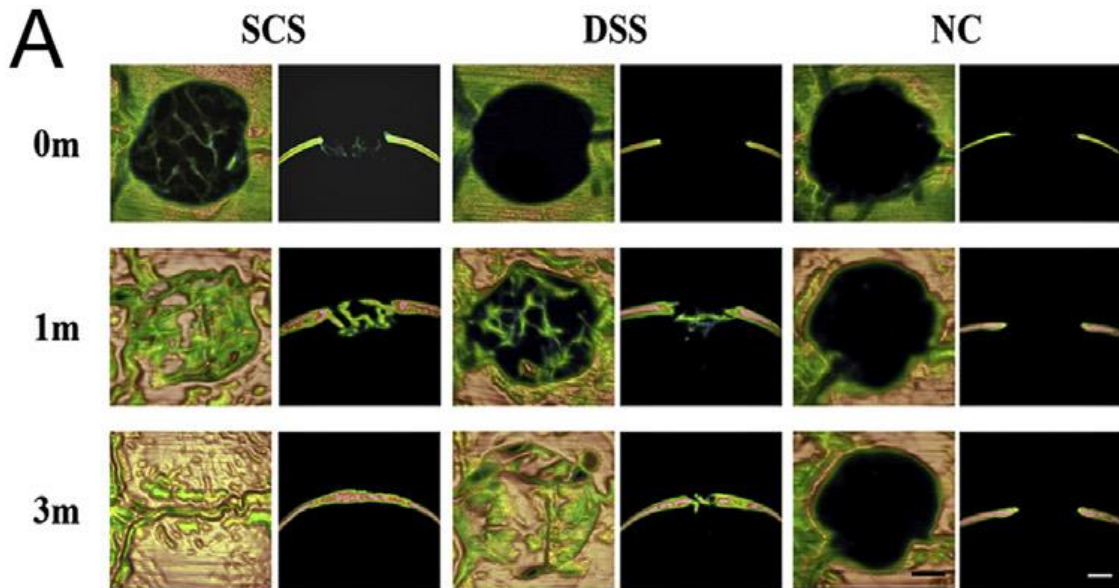


图 3-1 小鼠颅骨缺损修复 Micro-CT 活体扫描结果

术后即刻，DSS 组和阴性对照组中的缺损内，没有低密度影，而在 SCS 组内可见网状低密度影结构。术后 1 个月，SCS 组的缺损范围明显缩小，缺损区域内形成了完整的较低密度的骨结构，而部分骨的密度已接近周边骨组织的密度；DSS 组中，可见低密度的网状结构，表明 DSS 的胶原支架纤维出现了矿化；而 NC 组中缺损区域内未见明显矿化结构的形成，其缺损范围略有缩小。在术后 3 个月时，可观察在 SCS 组中，缺损区域形成了完整的骨结构，而 DSS 组中的骨密度要明显低于 SCS 组；阴性对照组中的缺损区域内则无明显矿化结构形成。SCS：仿生纤维内硅化胶原支架材料修复组；DSS：脱矿骨胶原支架材料 Demineralized cancellous sponge strip allograft 修复组（阳性对照）；NC：Negative Control，阴性对照组（标尺=1mm）。

进一步对扫描结果进行数据分析，结果显示（图 3-2），在术后即刻，SCS、DSS 和 NC 三组中的新生骨量和骨密度均没有明显差异（ $p>0.05$ ）。而在术后 1 个月和术后 3 个月，SCS 组中的新生骨量和骨密度均要明显高于 DSS 组（ $p<0.05$ ），而 DSS 组中的新生骨量和骨密度均要明显高于 NC 组（ $p<0.05$ ）。结果表明与 DSS 组相比，

仿生纤维内硅化胶原支架材料能够更快的促进缺损修复，在早期（1个月时）即能够形成更多的新骨，缺损区域内也能够检测到更高的骨密度，在术后3个月时，SCS能够完全的修复缺损，效果要明显好于DSS组。

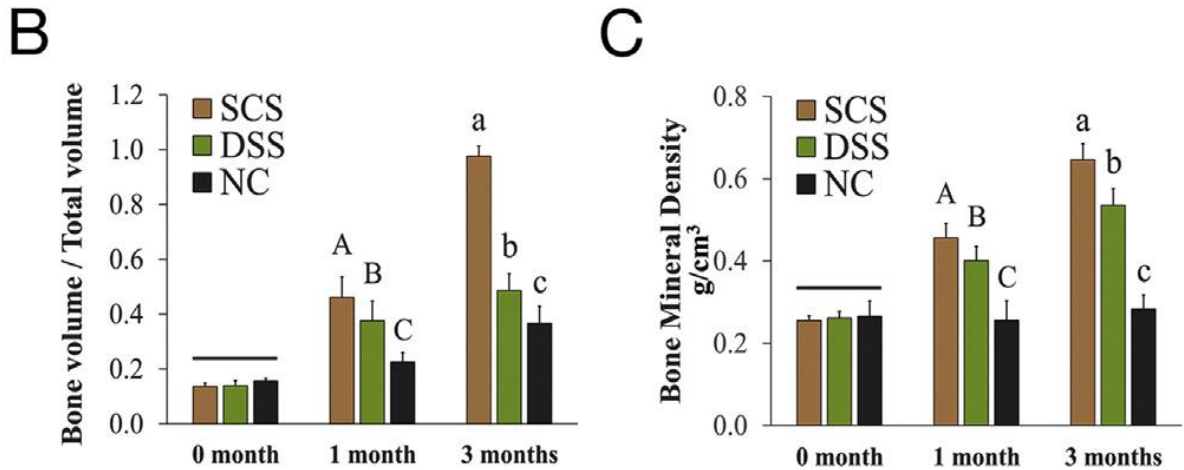


图 3-2 小鼠颅骨缺损修复 Micro-CT 活体扫描的定量分析

B: 新生骨量的定量检测（骨体积/总体积）；C: 骨密度的定量检测。

我们通过贯序荧光标记技术对骨改建的活跃程度进行了测定（图 3-3）。骨组织处于不断的改建过程中，而对于骨缺损修复来说，更高的改建活性通常意味着更好的修复效果。在腹腔注射荧光标记素后，在骨改建过程中的新生骨将被荧光素所标记，能够被荧光显微镜所识别。因此我们能够通过被荧光素所标记的新生骨组织的量，来检测骨缺损样本中的骨改建活性。实验结果显示（图 3-4），仿生纤维内硅化胶原支架材料组的骨改建活性要明显高于 DSS 组（ $p < 0.05$ ），而 DSS 组的骨改建活性则要明显高于 NC 阴性对照组（ $p < 0.05$ ）。与 DSS 和 NC 组相比，在硅化胶原支架材料修复后，小鼠颅骨的缺损区域内有着更加活跃的骨改建活动，形成了更多的新骨。这也和 Micro-CT 的结果相吻合，即硅化胶原支架材料能够较快地促进缺损区域骨组织的再生。

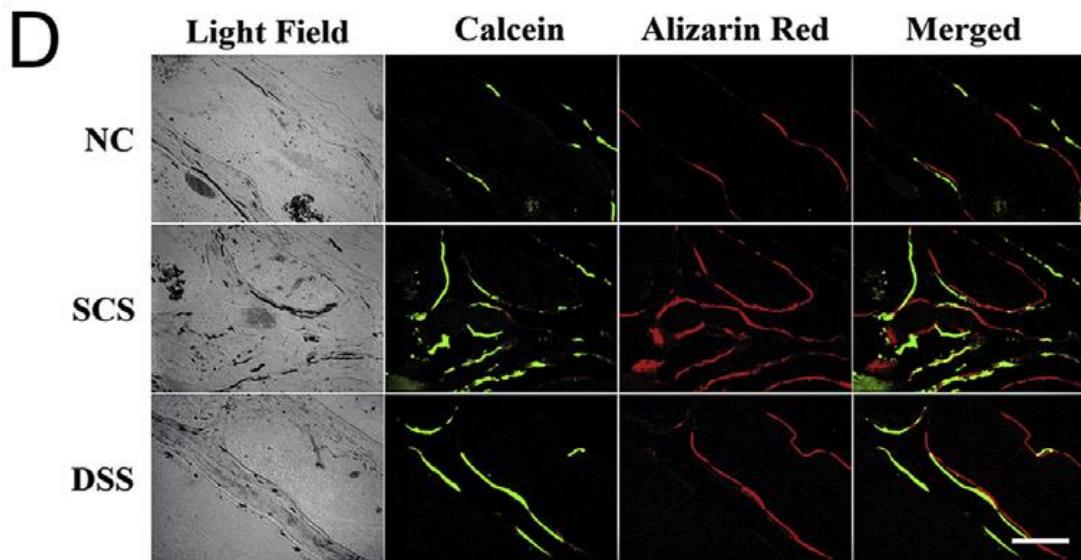


图 3-3 贯序荧光标记实验结果

绿色区域组织为钙黄绿素所标记的新骨形成的区域；红色区域组织为茜素红所标记的新骨。（标尺=200 μ m）。

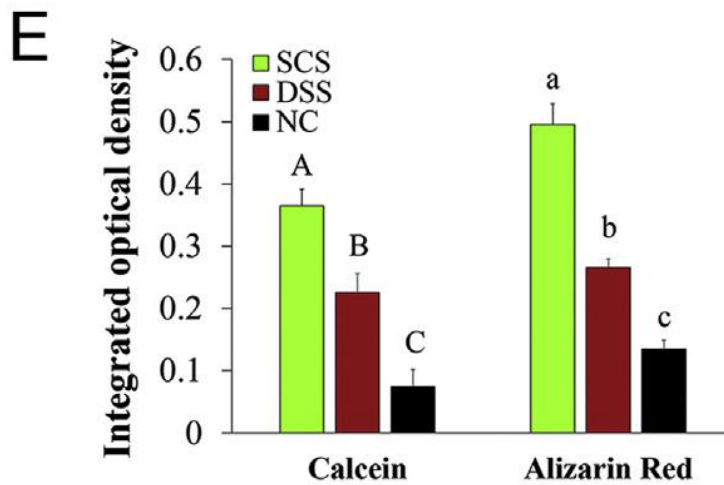


图 3-4 贯序荧光标记实验结果的半定量分析

通过 Van Geison 染色（图 3-5），我们能够观察到缺损区域组织内的胶原纤维组织（红色）。对染色结果进行定量分析，结果显示，仿生纤维内硅化胶原支架材料组形成了更多的胶原纤维结构，要明显高于 DSS 组和 NC 组 ($p < 0.05$)；而 Von Kossa Silver 染色的结果表明（图 3-6），仿生纤维内硅化胶原支架材料组形成了更多的矿化骨组织结构（黑色），其矿化程度要明显高于 DSS 组和 NC 组 ($p < 0.05$)。而 DSS

组中缺损区域内的胶原纤维结构和矿化骨组织结构要明显高于 NC 组 ($p < 0.05$)。

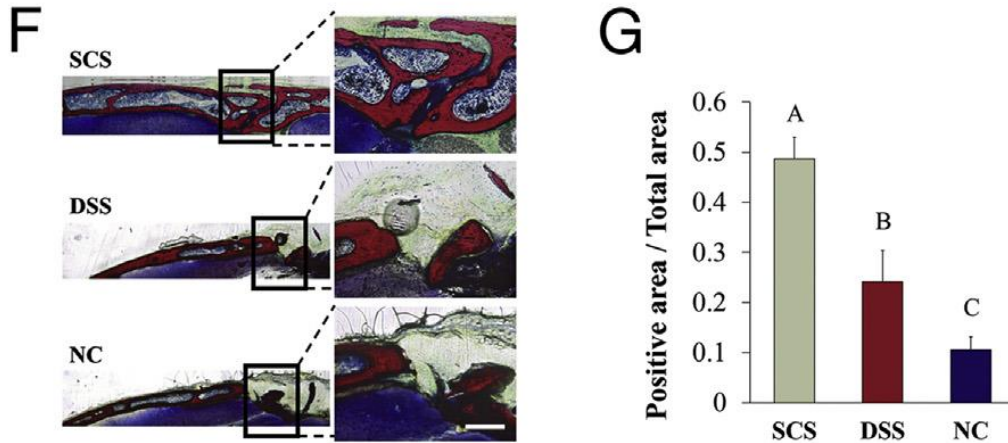


图 3-5 小鼠颅骨缺损 Van Geison 染色结果

红色：胶原纤维结构；蓝色：细胞核结构；黄色：肌纤维组织。（标尺=200 μ m）。

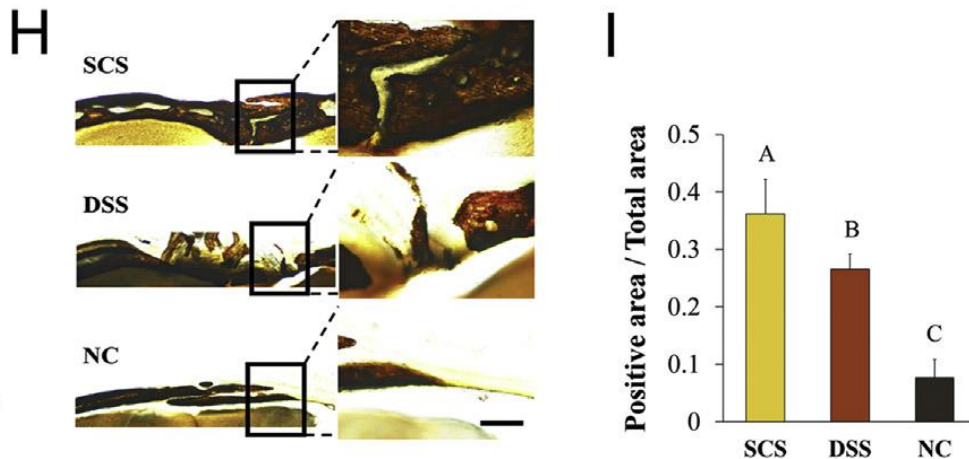


图 3-6 小鼠颅骨缺损 Von Kossa Silver 染色结果

钙质（磷酸盐及碳酸盐）呈棕黑色；细胞核呈深红色（标尺=200 μ m）。

天然骨是一种具有多分级结构的特殊组织，这种组织的结构基础为矿化胶原。矿化胶原是由胶原组织和其内填充的纳米羟基磷灰石所组成 [113,114]。我们所构建出的仿生纤维内硅化胶原支架材料能够高度模拟矿化胶原的分级结构，其胶原纤维内部有无定形硅的有序排列。这种支架材料在小鼠颅骨缺损模型的应用中，取得了良好的效果。硅化胶原支架能够促进新骨快速的形成，并且修复的缺损区域内的骨组织具有较高的骨改建活性。与脱矿骨胶原支架材料 Demineralized cancellous sponge

strip allograft (DSS) 相比, 具有成骨更加快速, 骨量更多, 骨密度更高的特点。我们认为这与仿生纤维内硅化胶原支架材料自身的特点密切相关。我们拟在后续的实验研究中, 进一步对其促进成骨的机制进行研究分析。

4 小结

通过小鼠颅骨缺损的动物模型, 我们检验了仿生纤维内硅化胶原支架材料的骨缺损修复效果。和脱矿骨胶原支架相比, 硅化胶原支架表现出更好的骨修复能力, 能够快速形成新骨, 其新骨的骨量, 骨密度均要明显高于脱矿骨胶原支架。同时在材料植入后 3 个月时, 硅化胶原支架修复后的骨改建活性也要明显增加, 能够在其修复区域内观察到更加活跃的成骨活动。

实验四 仿生纤维内硅化胶原支架 促血管新生的实验研究

在骨缺损修复替代材料的应用中，组织血管化是影响其修复效果的关键因素之一。机体出现骨折、骨缺损等损伤时，局部的血液充盈能够向缺损区域持续供应种子细胞、细胞因子等参与到组织的重建中来，而新骨的形成过程也是和血管生成相伴的^[115]。在修复大面积骨缺损时，修复材料常常会因为其内部血管化的缺乏，导致局部无法得到充足的养分供应，进而引起组织坏死，最终导致修复失败。胶原支架材料因其多孔隙的特点，能够在植入后迅速被血液充盈，因而常常具有良好的血管化效果。

我们在本实验中拟采用脱矿骨胶原支架材料 Demineralized cancellous sponge strip allograft (DSS) 作为阳性对照，以前期实验建立的小鼠颅骨缺损的动物模型为基础，对仿生纤维内硅化胶原支架材料促进血管化的效果进行评估。

1 材料与仪器

- 仿生纤维内硅化胶原支架材料（制备同第一部分，实验一）
- 脱矿骨胶原支架海绵材料 Demineralized cancellous sponge strip allograft（同第一部分，实验一）
- 雄性 3 月龄 C57/BL6 小鼠（同第一部分，实验二）。
- 无菌动物手术盒（同第一部分，实验二）
- 10% 中性缓冲福尔马林
- 肝素生理盐水（含肝素 12500U/mL）
- 世新 STRONG 90 慢速牙科手机（STRONG, South Korea），700#牙科裂钻
- 西门子 Micro-CT 活体成像系统 Inveon micro-CT system（Siemens AG, Munich, Germany）
- Microfil 血管灌注剂试剂盒（Microfil MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA）
- 5% EDTA 脱钙液

- 甘油
- 苏木素伊红(HE)染色试剂盒/Hematoxylin and Eosin Staining Kit(Beyotime, China)
- 封片用中性树胶, 二甲苯, 无水乙醇
- 莱卡 Leica RM2235 石蜡切片机 (Leica, wetzlar, Germany)

2 方法

2.1 小鼠颅骨缺损模型的建立以及硅化胶原支架植入修复

方法同实验三, 方法 2.1。

2.2 小鼠 Microfil 血管灌注实验

雄性 3 月龄 C57/BL6 小鼠在建立颅骨缺损模型, 并使用仿生纤维内硅化胶原支架材料修复。在术后 3 个月时取材, 进行 Microfil 血管灌注实验。

小鼠使用 1%戊巴比妥钠进行腹腔麻醉(每公斤体重注射 10mL 用量)。待小鼠麻醉完全后, 固定至工作台上, 胸腹腔向上。常规消毒, 铺巾。在胸腹腔连接处横向切开一切口, 切口两端切至两侧肋缘处。分别沿两侧肋缘再向上切开皮肤至腋下处, 揭开皮肤, 暴露胸部。随后沿剑突处切开腹膜, 横向分离至两侧肋缘, 分离膈肌, 沿两侧肋缘向上切开肋骨至腋下处, 向上翻起胸、肋骨, 暴露胸腔。剪开心包, 分离心脏周围组织, 暴露心脏位置。

使用 20mL 规格注射器(预先磨钝针头), 沿心尖位置插入左心房, 并向上浸入主动脉弓, 注射肝素生理盐水, 注射速度控制在 1mL/min。开始注射时, 立即剪开右心耳放血。大约注射 10mL 肝素生理盐水后, 能够观察到小鼠循环中的血液被基本置换完全, 小鼠手足、肝脏、眼、鼻等部位呈现苍白无血色, 继续注射完成总计 20mL 肝素生理盐水, 以充分灌洗循环组织。随后针尖保持固定在主动脉中, 更换注射器管部, 开始注射 10%中性缓冲福尔马林进行组织固定, 总计注射 20mL, 速度约 2mL/min。组织固定时, 可观察到小鼠四肢抽搐, 并逐渐僵硬, 触及肝脏时也可观察到肝脏逐渐变硬。完成组织固定后, 再次更换肝素生理盐水, 注射 20mL, 以完全置换出固定液。

Microfil 工作液与稀释液按 1: 1 混合, 随后加入 10%引发剂, 充分混匀后, 开始进行灌注。工作液配制完成后, 应于 20 分钟内完成注射。每只小鼠注射约 15-20mL 的灌注液。由于我们使用的 microfil 灌注剂 MV-122 是黄色标记, 因此在灌注过程中,

能够观察到小鼠手足、鼻、肝脏、肠系膜内的血管网状组织变黄，出现明显的黄色血管纹路。

灌注完成后，将小鼠标本置于保鲜袋内，放入 4℃冰箱放置 24 小时，以使灌注液充分完成聚合反应。聚合完成后，取小鼠头颅标本，进行脱水。首先加入 50%甘油中 24 小时，随后依次增加甘油浓度，分别在 70%、80%、90%、100%的甘油中浸泡 24 小时。完成脱水固定后，换入 EDTA 脱钙液中开始脱钙，脱钙流程为 1 个月时间，每 2 天更换一次脱钙液，当能够用注射器针尖轻松扎破骨壁时，为脱钙完成。

完成脱钙后，使用 Micro-CT 扫描技术对组织切片进行扫描，设置好固定阈值后，选取颅骨缺损区与直径 3.5mm，厚度 1.5mm 的区域进行后续分析。对每个样本的血管总长度，平均血管厚度，血管连结性，血管异向性进行测定。

2.3 小鼠颅骨缺损模型的 HE 组织学切片观察

取得小鼠颅骨标本后，进行石蜡包埋，并制作原位组织的石蜡切片。切片的制作和染色步骤同第一部分，实验二。将制作完成的切片于正置显微镜下进行观察拍照。

2.4 统计分析

同第一部分，实验一。

3 结果与讨论

在我们前期的实验研究中，经仿生硅化处理的胶原支架，其机械强度及弹性模量逐渐增加，在经过干燥程序的处理后，仿生纤维内硅化胶原支架材料仍能保持其原有的形貌特征而不出现塌陷、收缩的情况，而且能够表现出较好的可压缩性^[76]。硅化胶原支架的这种具有一定压缩性能的特点与传统的矿化胶原支架材料相比，具有更强的可塑性，在骨缺损修复的应用方面也具有更明显的优势，我们认为这种可压缩的特性与二氧化硅在胶原纤维内部的无定形性质有关。

具有这种特性的支架材料，能够在植入体内后，迅速被血液充盈，建立良好的细胞和生长因子输送通道，为缺损区域内部的修复和组织再生提供充分的血管化基础。我们也通过 microfil 血管灌注实验来对硅化胶原支架材料的成血管能力进行相应的评估。

Micro-CT 扫描的小鼠颅骨血管网络的全景结果可通过以下视频链接观看：

SCS: http://v.youku.com/v_show/id_XMjUzMjkzNTUyNA==.html;

DSS: http://v.youku.com/v_show/id_XMjUzMjkyNDcxNg==.html;

NC: http://v.youku.com/v_show/id_XMjUzMjkyMTYwNA==.html。

结果显示（图 4-1），硅化胶原支架材料修复后的缺损区域内形成了大量的血管组织，要明显高于 DSS 组和 NC 组。

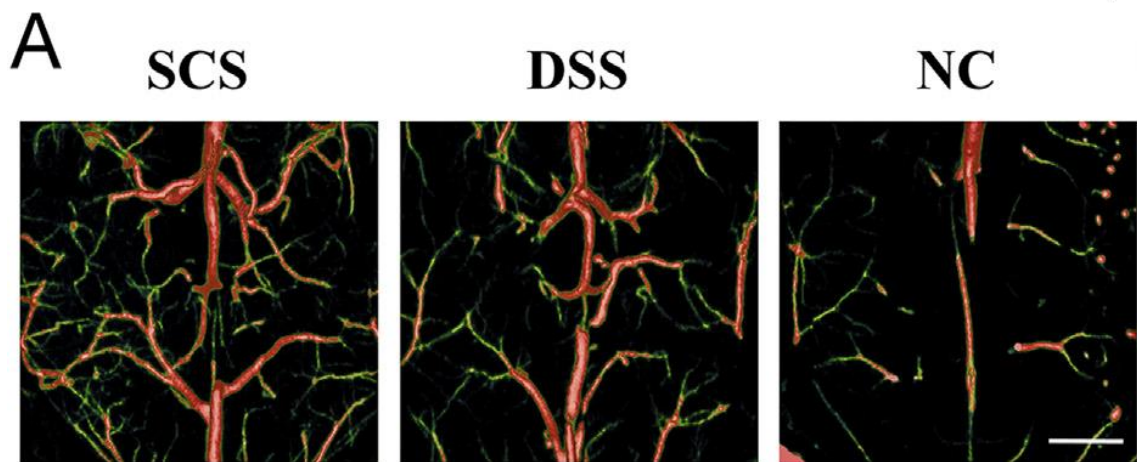


图 4-1 Microfil 血管灌注实验的 Micro-CT 扫描结果

图中的红色和绿色线条型组织为充盈了 microfil 造影剂的血管，较粗的红色部分为厚度剂密度较大的大血管，绿色为密度较低的细微血管组织。（标尺=500 μ m）。

对 Micro-CT 扫描结果的进一步数据分析显示（图 4-2），在硅化胶原支架材料组中，其缺损区域内所形成的血管组织的体积要明显高于脱矿骨胶原支架 DSS 组（ $p<0.05$ ）；同时，其缺损区域内的血管平均厚度，和血管的连接性也要明显高于 DSS 组（ $p<0.05$ ）；而 DSS 组中缺损区域内的血管体积、血管平均厚度和连接性则要明显高于 NC 阴性对照组（ $p<0.05$ ）。在血管异向性评估方面，SCS 组和 DSS 组之间没有明显统计学差异，两者的异向性均要低于 NC 组（ $p<0.05$ ）。

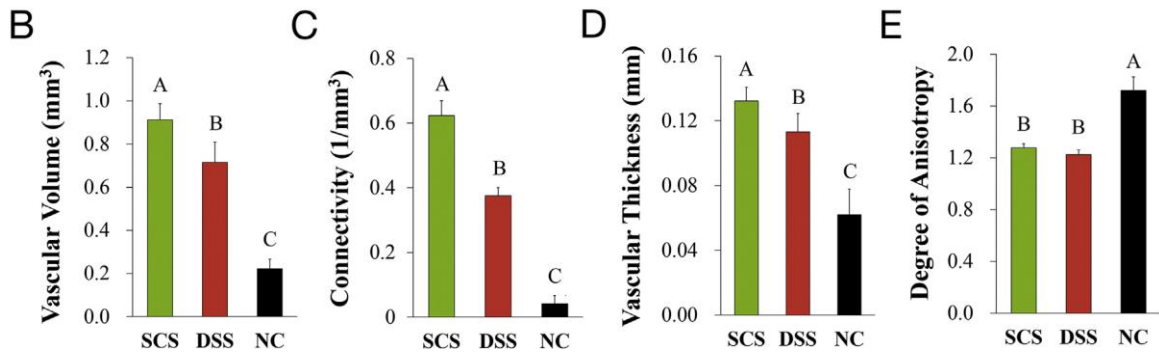


图 4-2 Microfil 血管灌注实验的 Micro-CT 扫描结果数据分析

缺损区域内的血管的体积和平均厚度表明了缺损区域内新生血管的形成能力。而血管的连接性也反映出了新生血管之间的交联程度，连接性越高，则表明血管的组织结构越紧密，其促进组织再生修复的能力也越强。血管的异向性（Degree of Anisotropy）反映出组织内各血管之间分布和方向之间的差异，当血管数量明显变少时，其异向性程度则会增加。

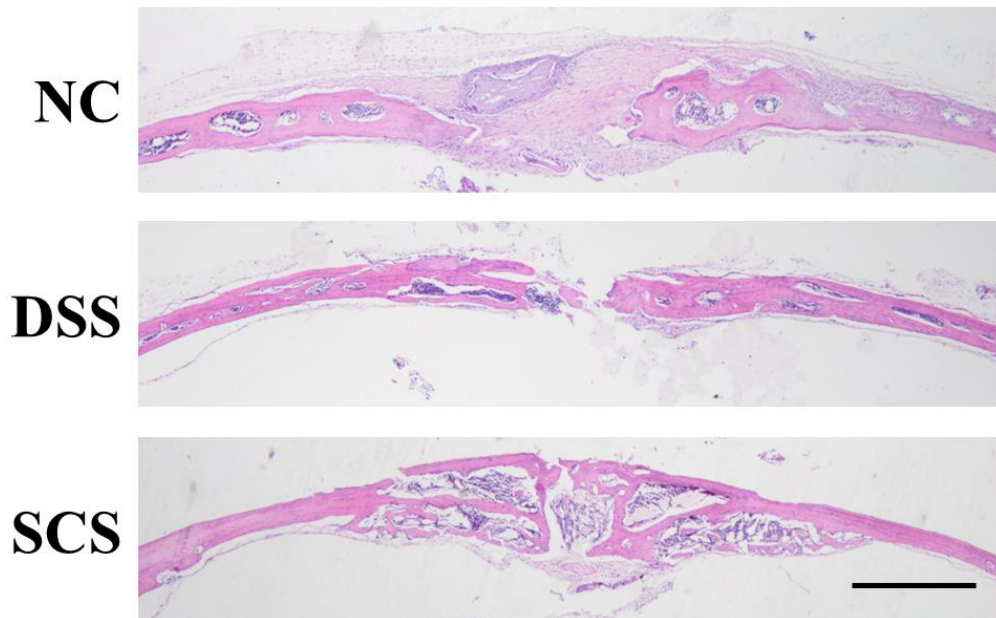


图 4-3 小鼠颅骨缺损修复后 3 个月时的石蜡切片 H&E 染色结果

可见 SCS 组中有大量的新骨形成，要明显高于 DSS 组和 NC 组，其组织内的血管计数数量也要明显高于 DSS 组和 NC 组。（标尺=1mm）

颅骨缺损组织的石蜡切片 HE 染色结果也证实了仿生纤维内硅化胶原支架材料修复后,在生成更多新生骨的同时,缺损区域内有更多的血管的生成。硅化胶原支架材料能够在早期快速的促进成骨和成血管,我们认为这与其独特的纤维内硅化的结构密切相关。在植入体内后,其降解时所缓释的硅酸在早期能够参与到宿主的免疫应答反应中,进而对宿主免疫反应进程,以及后续的组织修复进程产生影响。我们拟在下一步实验中对其进行深入研究。

4 小结

在本实验中,我们证实小鼠颅骨缺损的组织修复过程中,仿生纤维内硅化胶原支架材料能够更好地促进缺损区域局部的血管化。与脱矿骨胶原支架材料 DSS 相比,硅化胶原支架能够在缺损部位形成更多的新生血管,其血管体积、血管平均厚度和血管连接性均要明显高于 DSS。在实现良好血管化的同时,SCS 也能够明显的促进新生骨的形成。

实验五 仿生纤维内硅化胶原支架材料参与宿主免疫应答反应的实验研究

我们通过前期的生物相容性评价，证实了仿生纤维内硅化胶原支架材料能够在急性炎症反应期，最低限度范围内的影响宿主的免疫反应，具有较低的免疫原性和良好的生物相容性。在急性炎症反应之后，单核细胞与淋巴细胞等单个核细胞在植入区域的集聚，标志着慢性炎症反应的进行。和急性炎症反应相比，慢性炎症反应在组织学上并没有统一的特征表现，一系列的细胞应答反应在诊断学上则有着广泛的应用。一般来说，包括淋巴细胞与浆细胞在内的单个核细胞的存在即被认为是慢性炎症反应。一般来说，对于植入生物材料后的慢性炎症反应期相对较短暂，并且局限于植入区域。而慢性炎症反应也被用于描述单核细胞、巨噬细胞、异物巨细胞在材料界面的集聚^[83]。而生物材料和这些免疫细胞之间的相互作用，直接关系到炎症反应的进程，以及随后修复组织再生的效果。

我们通过小鼠颅骨缺损模型对仿生纤维内硅化胶原支架材料的应用进行了评估，硅化胶原支架表现出了良好的促进成骨成血管的能力，能够在早期实现快速的新骨生成，并且具有良好的促进血管化的效果。我们拟在本部分实验中，进一步对其和宿主相关免疫细胞（单核巨噬细胞）之间的相互作用，进行进一步的探索研究。

1 材料与仪器

- 仿生纤维内硅化胶原支架材料（制备同第一部分，实验一）
- 脱矿骨胶原支架海绵材料 Demineralized cancellous sponge strip allograft（同第一部分，实验一）
- 雄性 3 月龄 C57/BL6 小鼠（同第一部分，实验二）。
- 无菌动物手术盒（同第一部分，实验二）
- 10% 中性缓冲福尔马林
- 5% EDTA 脱钙液
- Image-Pro Plus software 数据分析软件（Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD,

USA)

- 山羊血清 (MilliporeSigma, Billerica, MA, USA)
- Anti-nestin (sc-21248, Santa Cruz), anti-VEGFa (ab51745, Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-PDGF-BB (ab23914, Abcam), anti-CD68 (sc-20060, Santa Cruz), anti-CD163 (sc-33560, Santa Cruz), anti-CCR7 (ab32527, Abcam)。
- 辣根过氧化物酶标记二抗, peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)
- 3,3-diaminobenzidine 溶液 (DAB, DAB Substrate Kit1, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)
- 苏木素染液 (碧云天, 中国)
- Anti-CD14 (sc-5749, Santa Cruz), anti-SDF-1 (sc-28876, Santa Cruz), anti-TGF- β 1 (sc-146, Santa Cruz), anti-TRAP (sc-28204, Santa Cruz), anti-CD31 (sc-28188, Santa Cruz), anti-endomucin (sc-19900, Santa Cruz)。
- Alexa Fluor 488 绿色荧光标记二抗, Alexa Fluor 594 红色荧光标记二抗 (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)
- DAPI 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, MilliporeSigma)
- TRAP staining kit, TRAP 组织染色试剂盒 (MilliporeSigma)
- 封片用中性树胶, 二甲苯, 无水乙醇
- 莱卡 Leica RM2235 石蜡切片机 (Leica, wetzlar, Germany)
- 奥林巴斯三通道倒置荧光显微镜 (FV-1000, Olympus, Japan)
- 奥林巴斯光学正置显微镜 OLYMPUS-BX61 (Olympus, Tokyo, Japan)

2 方法

2.1 小鼠颅骨缺损模型的建立以及硅化胶原支架植入修复

方法同实验三, 方法 2.1。

2.2 小鼠颅骨石蜡切片的制作

在小鼠建立颅骨缺损模型, 并应用仿生纤维内硅化胶原支架材料修复后 1 个月时取材。处死小鼠, 分离颅骨, 使用 10% 中性缓冲福尔马林固定 24 小时。随后使用 5% EDTA 脱钙液进行脱钙, 脱钙时间为 1 个月, 每 2 天更换一次脱钙液。脱钙完成

后，石蜡包埋，并制作原位组织的石蜡切片。

2.3 小鼠颅骨石蜡切片的免疫组织化学染色

首先将制作好的石蜡切片置于 55°C 烘箱内烤片过夜。完成烤片后，将切片浸入二甲苯 I 中 15 分钟，随后置于二甲苯 II 中 15 分钟，随后采用梯度浓度的乙醇进行至水。随后进行染色步骤：

1. 完成至水步骤后，使用 PBS 在摇床上洗涤 2 次，每次 5 分钟。
2. 甩干水分，向切片滴加 3% 过氧化氢，置入 37°C 温箱内放置 8 分钟，随后 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。
3. 滴加复合消化液，置入 37°C 温箱内放置 10 分钟，随后 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。
4. 滴加抗原修复液，置入 37°C 温箱内放置 10 分钟，随后 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。
5. 加入血清封闭，置于 37°C 温箱内放置 30-120 分钟。
- 甩去血清，分别加入稀释好的一抗：Anti-nestin (sc-21248, Santa Cruz), anti-VEGF α (ab51745, Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-PDGF-BB (ab23914, Abcam), anti-CD68 (sc-20060, Santa Cruz), anti-CD163 (sc-33560, Santa Cruz), anti-CCR7 (ab32527, Abcam)。置于 4°C 冰箱内过夜。
6. 将过夜后的切片置入 37°C 温箱内放置 30 分钟复温，随后使用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。
7. 加入辣根过氧化物酶二抗，置入 37°C 温箱内放置 30 分钟。
8. 洗去二抗，滴加生物素，置入 37°C 温箱内放置 10 分钟。随后使用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。
9. 加入现配好 DAB 显色液，显色约 1-5 分钟，于镜下观察显色程度，至显色适宜后，流水冲洗冲去染色液。
10. 使用苏木素染液复染胞核约 10 秒，加入盐酸酒精内分化 1 秒，随后浸入饱和碳酸里溶液内分化约 8-10 秒。
11. 大量流水冲洗后，进行常规脱水透明步骤，使用中性树胶封片。
12. 于镜下观察拍照，使用 Image Pro Plus 软件对结果进行半定量分析。

2.4 小鼠颅骨石蜡切片的免疫荧光双标染色

首先将制作好的石蜡切片置于 55°C 烘箱内烤片过夜。完成烤片后，对石蜡切片进行脱蜡至水的步骤。方法同本实验 2.3。随后进行染色步骤：

1. 完成至水步骤后，使用 PBS 在摇床上洗涤 2 次，每次 5 分钟。
2. 甩干水分，向切片滴加 3% 过氧化氢，置入 37°C 温箱内放置 8 分钟，随后 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。
3. 滴加复合消化液，置入 37°C 温箱内放置 10 分钟，随后 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。
4. 滴加抗原修复液，置入 37°C 温箱内放置 10 分钟，随后 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。
5. 加入血清封闭，置于 37°C 温箱内放置 30-120 分钟。
6. 甩去血清，分别加入稀释混合好的一抗：Anti-CD14 + anti-SDF-1；Anti-CD14 + anti-TGF- β 1，Anti-CD14 + anti-TRAP，anti-CD31 + anti-*endomucin*。置于 4°C 冰箱内过夜。
7. 将过夜后的切片置入 37°C 温箱内放置 30 分钟复温，随后使用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟。
8. 加入荧光标记二抗，置入 37°C 温箱内放置 30 分钟。
9. 洗净二抗，加入 DAPI 复染核 5 分钟。
10. 洗去 DAPI，用抗荧光淬灭封片剂封片。
11. 与荧光显微镜下观察拍照，采用 Image Pro Plus 软件对数据进行半定量分析。

2.5 小鼠颅骨石蜡切片的 TRAP 染色

首先将制作好的石蜡切片置于 55°C 烘箱内烤片过夜。完成烤片后，对石蜡切片进行脱蜡至水的步骤。方法同本实验 2.3。随后进行染色步骤，染色按照试剂盒说明书进行。染色完成后，苏木素复染胞核，常规脱水透明，中性树胶封片。

2.6 统计分析

同第一部分，实验一。

3 结果和讨论

最近的研究显示，在组织骨重建的过程中，CD31 和 *Endomucin* (Emcn) 双阳性

这一亚类的血管紧密地参与到了成骨和成血管联合的进程中^[116]。这一亚类血管能够更好的促进局部的骨组织的再生，以及局部骨、血管的同步改建的过程。因此，我们在对仿生纤维内硅化胶原支架材料参与宿主骨重建进程进行研究时，也对这一亚类的血管的表达进行了研究。结果表明（图 5-1），硅化胶原支架修复后 1 个月时，骨缺损区域内的 CD31⁺Emcn⁺血管的表达明显增多，其平均表达水平要明显高于 DSS 组和阴性对照组（ $p<0.05$ ）。DSS 组中 CD31⁺Emcn⁺血管的表达也要高于阴性对照组（ $p<0.05$ ）。结果表明仿生纤维内硅化胶原支架材料在促进缺损局部血管化的同时，能够促进 CD31⁺Emcn⁺血管这一亚类血管的增长。根据前期各文献所报道的研究进展，我们认为 CD31⁺Emcn⁺血管表达的增多与硅化胶原支架材料促进骨缺损修复密切相关，我们也拟在后续的研究中对其进行探索验证。

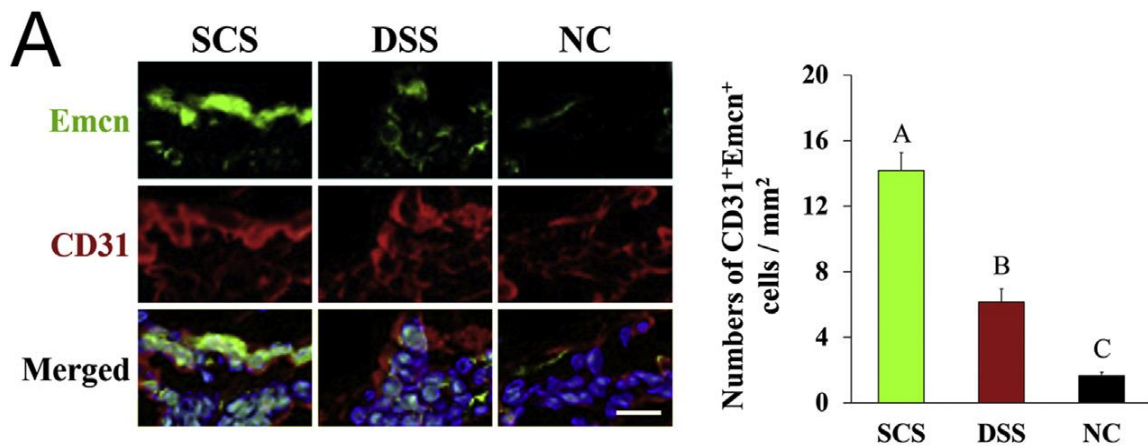


图 5-1 小鼠颅骨缺损修复 1 个月时的免疫荧光染色结果与荧光定量分析

图中红染部分为 CD31 标记的血管组织，绿色荧光标记为 Endomucin 表达的血管组织，蓝色为 DAPI 染色的细胞核组织。（标尺=100 μm ）。

在我们的进一步研究中，我们发现了硅化胶原支架修复后的小鼠颅骨缺损的区域中，其 PDGF-BB 的表达明显增高（图 5-2）。PDGF-BB 被认为是能够促进 CD31⁺Emcn⁺这一亚类血管增殖的关键性细胞因子^[117]。而 SCS 组中的 PDGF-BB 表达要明显高于 DSS 组和 NC 组（ $p<0.05$ ）。

PDGF-BB 的主要来源为破骨前体细胞（preosteoclast），而外周循环来源的单核细胞则是进一步向破骨前体细胞分化的主要来源细胞。单核细胞在通过血液循环募集到缺损区域后，一方面参与到宿主的免疫炎症应答反应当中，另一方面通过向破骨细胞的分化，参与到骨重建的进程中。单核细胞向破骨细胞分化的过程是一个连

续的分化进程，目前的研究显示并没有明显的分化阶段。而在这其中，TRAP 阳性的单个核细胞是单核细胞向破骨细胞分化的重要阶段，有研究将这一阶段称为破骨前体细胞，也有部分研究指出 TRAP 阳性的单个核细胞继续发生细胞间的融合，形成多核细胞时，才能够被称为破骨前体细胞，而这一称谓的定义目前并无定论^[118]。研究普遍接受的观点认为，TRAP 阳性的单个核细胞是单核细胞向破骨细胞分化的重要阶段，这类 TRAP 阳性的单核细胞能够分泌一系列的相关细胞因子，促进局部组织的修复改建。

实验结果显示（图 5-3），在仿生纤维内硅化胶原支架材料的作用下，小鼠颅骨缺损区域内的 CD14⁺TRAP⁺双阳性的单核细胞数目明显增多。这也和我们之前的预期相吻合，我们推测缺损局部增加的 PDGF-BB 的表达水平，来自于 CD14⁺TRAP⁺双阳性细胞数量的增加，本实验的结果也验证了这一点。和 DSS 组、NC 组相比，SCS 组中的 CD14⁺TRAP⁺双阳性细胞数目要明显增加（ $p < 0.05$ ）。

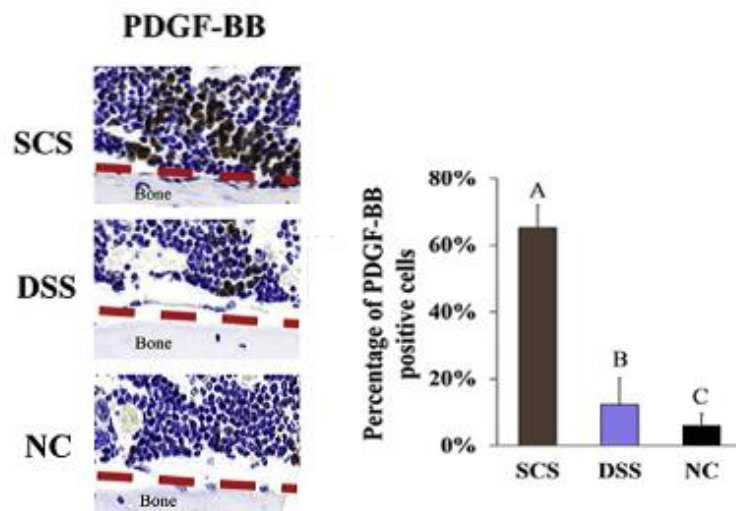


图 5-2 小鼠颅骨缺损修复 1 个月时的免疫组织化学染色结果与阳性细胞计数分析

（标尺=200 μm ）

我们也对缺损区域内单核细胞的分泌特性进行了检测。实验表明，仿生纤维内硅化胶原支架材料修复后，单核细胞不仅能够向 TRAP 阳性的单个核细胞分化，同时其缺损区域内的单核细胞分泌 SDF-1 和 TGF- β 的水平也明显增高。SDF-1（基质细胞衍生因子 1）又称 CXCL12，SDF-1 和其受体 CXCR4 之间的相互作用能够促进干细胞及其前

体细胞的细胞归巢能力,能够使细胞发生趋化运动^[119]。此外,近期的研究表明,SDF-1能够在体内外促进血管化的进程^[119,120]。TGF- β 在调控血管化中是关键性的调控因子之一^[121],而也有研究报道指出,TGF- β 能够通过调控SMAD信号通路来促进骨髓间充质干细胞(BMSC)的细胞迁移能力^[122]。本实验结果显示,SCS组中,单核细胞所表达的SDF-1和TGF- β 的水平要明显高于DSS组和NC组($p < 0.05$)。这说明硅化胶原支架能够通过调控单核细胞的调控,促进单核细胞向TRAP阳性的单核细胞分化,进而其分泌TGF- β 和SDF-1的水平也明显增加。我们认为相关细胞因子分泌的增加能够在促进血管化的同时,促进宿主参与重建的种子细胞的募集,从而进一步促进成骨成血管和缺损骨组织的修复。

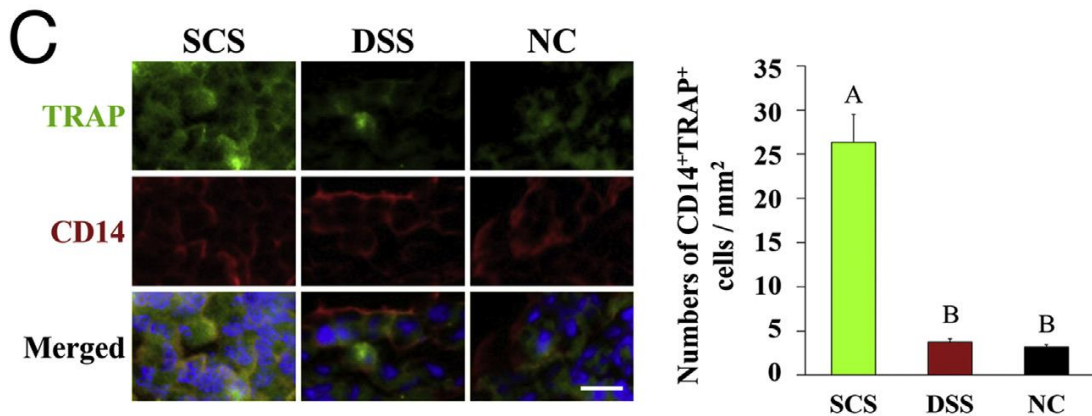


图 5-3 小鼠颅骨缺损修复 1 个月时的免疫荧光染色结果与荧光定量分析

图中红染部分为 CD14 标记的单核细胞,绿色荧光标记为 TRAP (抗酒石酸酸性磷酸酶),蓝色为 DAPI 染色的细胞核组织。(标尺=100 μm)。

我们在随后的实验中,也对小鼠颅骨缺损修复后 1 个月时,缺损区域内的 VEGF 表达水平和 Nestin 的表达水平进行了检测。VEGF 即血管内皮生长因子,是血管发生和血管生长过程中的重要参与因子。VEGF 表达的水平直接反映了区域血管生成的能力,也反映了区域内参与血管重建的内皮细胞以及内皮前体细胞的数目和增殖能力^[123]。而 Nestin 作为间充质干细胞的表面标志物^[124],其表达水平直接反映了间充质干细胞的数目,以及区域组织内成骨修复能力的强弱。实验结果显示(图 5-5),与 DSS 组和 NC 组相比,硅化胶原支架组修复后 1 个月时,其缺损区域内的 Nestin 表达水平要明显增高($p < 0.05$)(图 5-5),说明硅化胶原支架修复后,缺损区域内

有更多的间充质干细胞的存在，我们认为这可能和区域内相关趋化因子表达的增加有关。此外缺损区域内的 VEGF 表达的水平（图 5-5）也要明显高于 DSS 组和 NC 组 ($p < 0.05$)，说明硅化胶原支架材料也促进了缺损区域内血管生成相关细胞的增加。

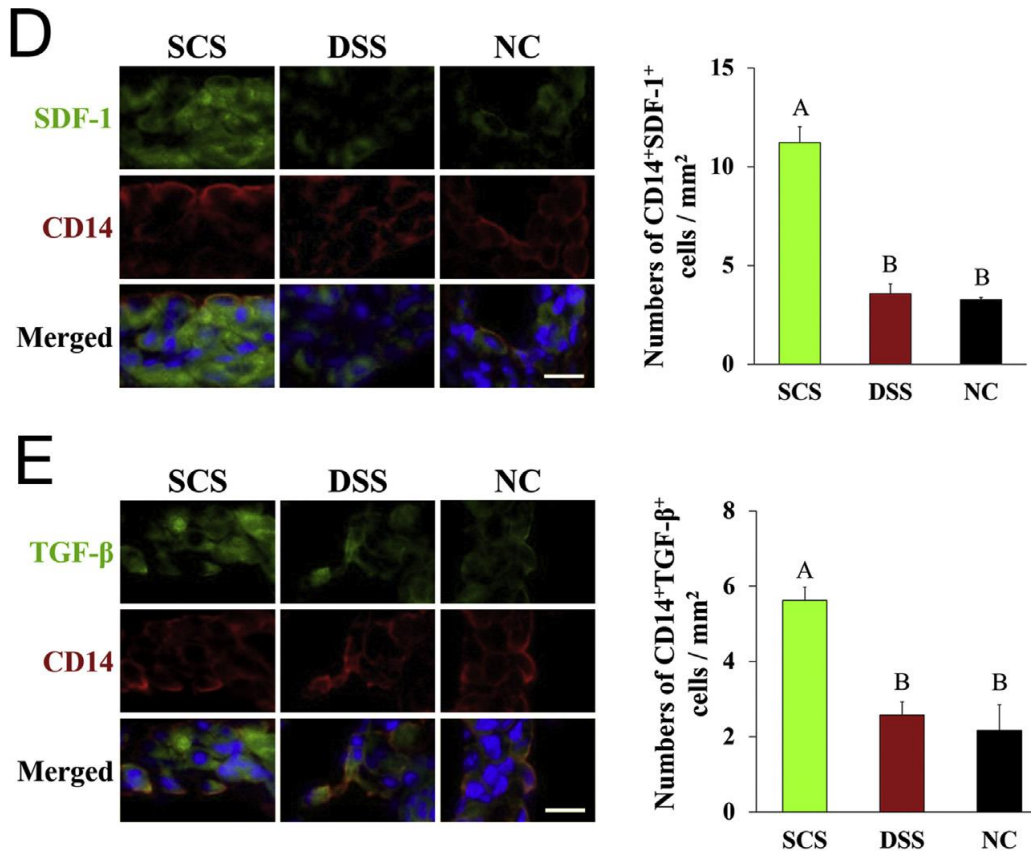


图 5-4 小鼠颅骨缺损修复 1 个月时的免疫荧光染色结果与荧光定量分析

D: 图中红染部分为 CD14 标记的单核细胞，绿色荧光标记为 SDF-1，蓝色为 DAPI 染色的细胞核组织。E: 图中红染部分为 CD14 标记的单核细胞，绿色荧光标记为 TGF-β，蓝色为 DAPI 染色的细胞核组织。（标尺=100 μm）。

综上所述，本实验的结果表明仿生纤维内硅化胶原支架材料能够通过调控单核细胞的调控，促进其向 TRAP 阳性的单核细胞分化，并分泌更多的 PDGF-BB，从而促进 CD31⁺Emcn⁺亚类血管的增长，进而促进局部成骨成血管的联合；另一方面，分化后的单核细胞能够分泌更多的 SDF-1, TGF-β 等相关细胞因子，进而进一步促进局部的血管化，以及宿主种子细胞的募集，从而进一步的加快骨缺损修复的进程。我们拟通过后续的体外实验，来验证我们在体内实验中发现的现象。

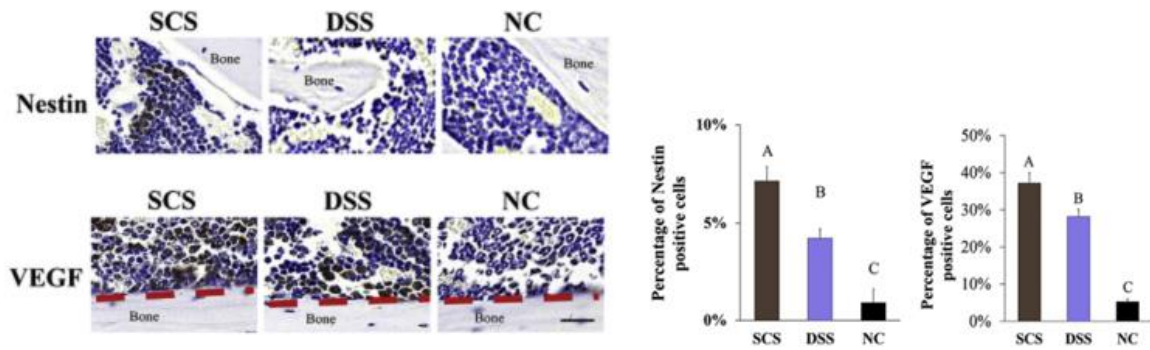


图 5-5 小鼠颅骨缺损修复 1 个月时的免疫组织化学染色结果与阳性细胞计数分析
(标尺=200 μm)

在组织炎症反应的初期，单核细胞参与到了宿主对材料的免疫应答反应当中。而随后单核细胞通过细胞融合，形成的巨噬细胞，也对宿主的免疫反应进程，以及生物材料的命运有着至关重要的影响。巨噬细胞的数量，以及其激活极化的方向与水平，直接关系到宿主免疫反应向加重炎症进程方向发展，还是向促进组织修复方向发展。因此我们也对颅骨缺损修复后 1 个月时，缺损区域局部组织的巨噬细胞进行了检测。我们对巨噬细胞表面标志物 CD68，M1 极化巨噬细胞表面标志物 CCR7，以及 M2 极化巨噬细胞表面标志物 CD163 进行了免疫组织化学检测。

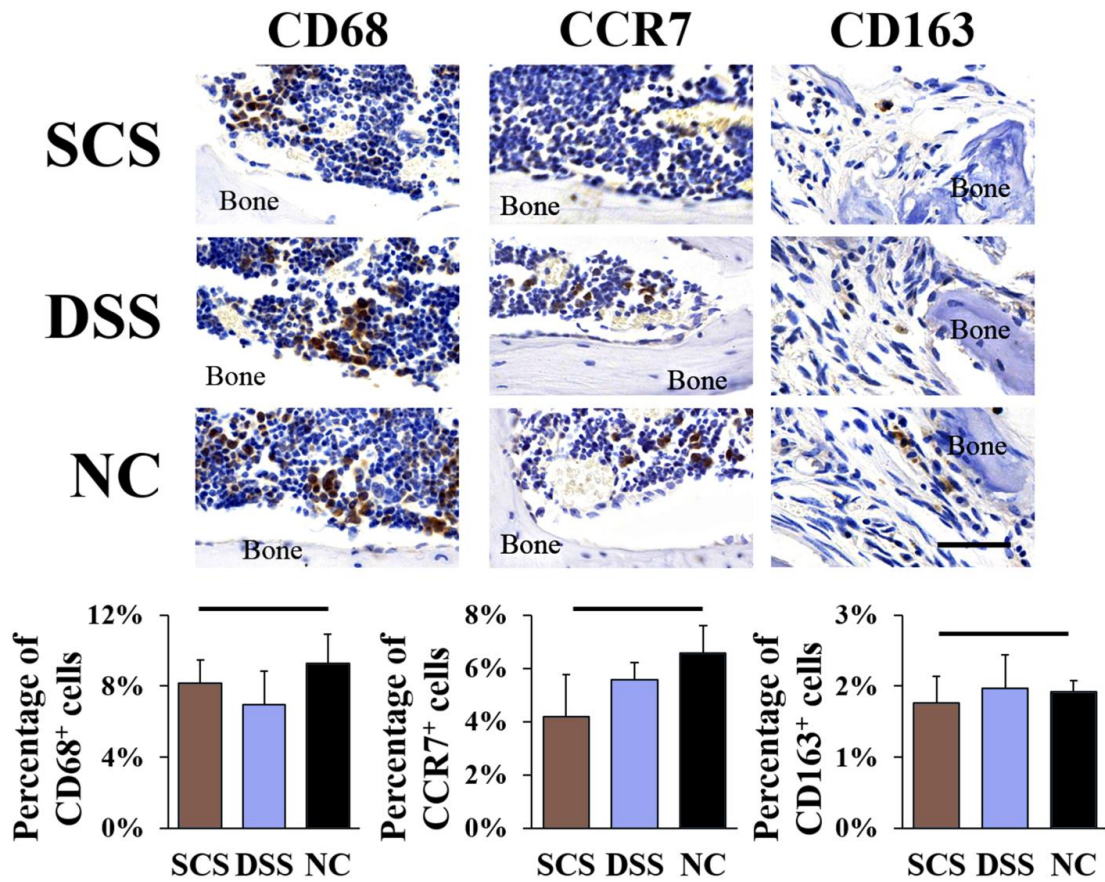


图 5-6 巨噬细胞分布及其极化状态的免疫组织化学染色结果与细胞计数分析

(标尺=200 μ m)

实验结果显示 (图 5-6), 在颅骨缺损修复后 1 个月时, SCS、DSS 和 NC 三组中巨噬细胞的数目没有统计学差异 ($p>0.05$), 此外三组中的 M1 极化的巨噬细胞比例和 M2 极化的巨噬细胞比例均没有统计学差异 ($p>0.05$)。我们认为巨噬细胞在参与到组织炎症反应和修复进程时, 能够对硅化胶原支架材料的降解及其所缓释的硅酸产生反应。本实验未检测到差异可能是由于颅骨缺损 1 个月时, 尚处于组织修复的早期阶段, 巨噬细胞尚未在这一修复阶段发挥功能。我们拟在后续的实验, 对修复中后期的组织进行巨噬细胞相关的检测。

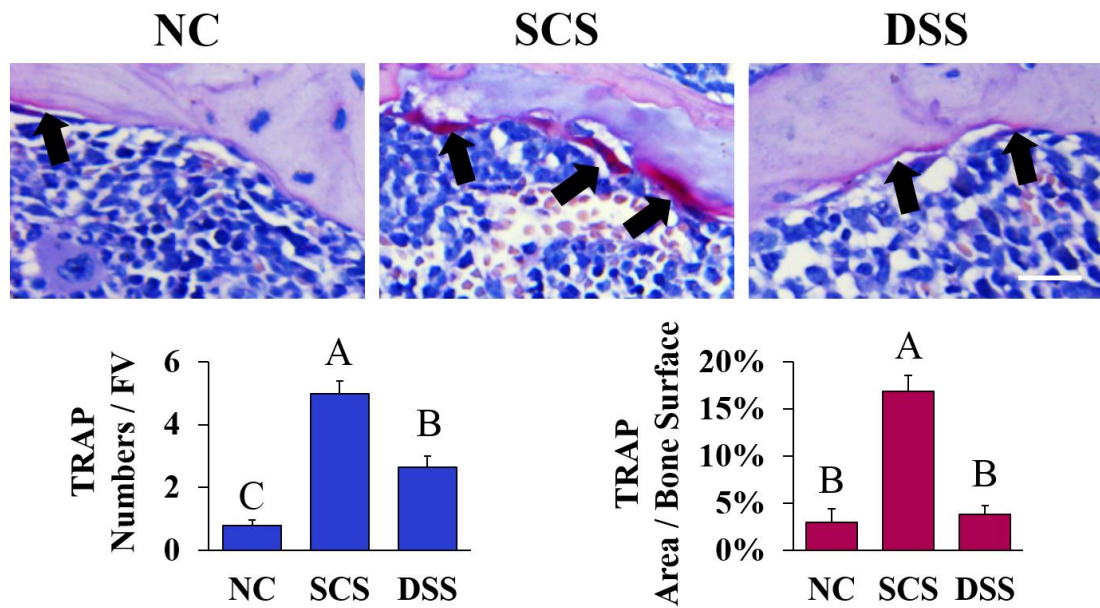


图 5-7 颅骨缺损修复后 1 个月时的 TRAP 染色结果及定量分析

(标尺=50 μ m)

我们也对颅骨缺损修复后 1 个月时，组织内的破骨细胞进行了检测。TRAP 染色的结果表明，硅化胶原支架材料修复后，其缺损区域内破骨细胞的活跃程度要明显高于 DSS 组和 NC 组 ($p < 0.05$)。结果表明，仿生纤维内硅化胶原支架材料修复后的组织具有更强的骨改建的活性。

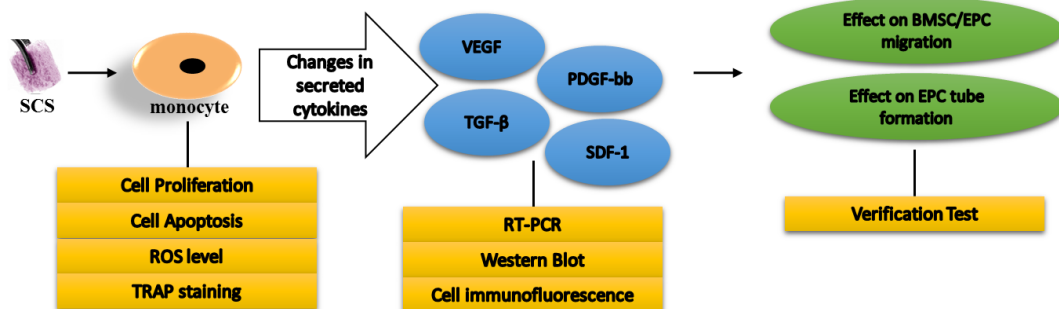
4 小结

通过本部分的实验，我们证实了仿生纤维内硅化胶原支架材料能够通过调控单核细胞的调控，促进其向 TRAP 阳性的单核细胞分化，并分泌更多的 PDGF-BB，从而促进 CD31⁺Emcn⁺亚类血管的增长，进而促进局部成骨成血管的联合；另一方面，分化后的单核细胞能够分泌更多的 SDF-1, TGF- β 等相关细胞因子，进而进一步促进局部的血管化，以及宿主种子细胞的募集，从而进一步的促进缺损区域的骨改建活性，加快骨缺损修复的进程。

第三部分 仿生纤维内硅化胶原支架调控单核细胞影响成骨成血管的实验研究

我们在第二部分的实验中，证实了仿生纤维内硅化胶原支架材料能够在小鼠颅骨缺损模型的修复中，通过对单核细胞的调控，发挥促进血管生成和宿主种子细胞募集的作用，从而进一步加快缺损修复的进程。我们拟通过本部分的体外实验研究，对我们之前发现的体内实验现象进行验证，从而明确硅化胶原支架材料和单核细胞之间相互作用的具体作用机制。我们拟通过细胞流式技术、实时定量 PCR 技术、Western Blot 技术、细胞 TRAP 染色，以及细胞免疫荧光技术等方法对经材料干预后的单核细胞的增殖、分化、凋亡，以及细胞内活性氧（ROS）水平等一系列细胞活性指标进行研究，同时对单核细胞的分泌功能在硅化胶原支架材料作用下发生的变化进行检测。此外，我们拟对单核细胞和材料相互作用与细胞归巢，以及细胞血管化功能之间的关系进行研究，并对所发现的现象使用中和抗体进行验证实验，从而进一步明确仿生纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞的作用，以及两者之间的作用对成骨成血管的影响。

In vitro Assay



流程图 3. 仿生纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞调控的实验研究

实验六 仿生纤维内硅化胶原支架对单核细胞增殖、凋亡及细胞内活性氧的影响

在前一部分实验中，我们验证了仿生纤维内硅化胶原支架材料体内促进骨缺损修复的能力。我们在体内实验中观察到了材料能够通过调控单核细胞，促进其分化为 TRAP 阳性的单核细胞，并进一步促进缺损区域内形成更多的 CD31⁺Emcn⁺ 亚类血管，促进成骨成血管的联合，此外单核细胞能够在硅化胶原支架材料的作用下分泌一系列相关的细胞因子，一方面促进组织的血管化进程，另一方面能够促进宿主种子细胞的募集，加快骨再生的进程。我们拟在本部分实验中通过体外实验验证材料对单核细胞的作用，以及材料和单核细胞相互作用对血管化和细胞归巢的影响。在本实验中，我们拟对仿生纤维内硅化胶原对单核细胞各项活性指标的影响以及对 BMSCs/EPCs 迁移能力的影响进行研究，以初步探明材料对单核细胞各项活性指标调控，以及种子细胞迁移的影响。

1 材料与仪器

- 仿生纤维内硅化胶原支架材料（制备同第一部分，实验一）
- 雄性 2 月龄 C57/BL6 小鼠（同第一部分，实验二）。
- 无菌动物手术盒（同第一部分，实验二）
- 小鼠骨髓单个核细胞提取试剂盒（LSF™; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA）
- RPMI 1640 细胞培养基（Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA）
- 青链霉素双抗 100 U/ml penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- 热灭活胎牛血清 heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, USA)
- PBS 磷酸盐缓冲液（DPBS, Corning, Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, MA, USA）
- 含 0.1% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶溶液 (Corning, Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, MA, USA)

- Corning® 25cm² 细胞培养瓶, Corning® 24 孔/96 孔细胞培养板 (Corning Costar)
- Transwell 小室(24 孔板适用, 孔径 8 μm, Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA)
- 15mL 无菌离心管 (Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA)
- MTT 细胞增殖试剂盒 (MilliporeSigma, Billerica, MA, USA)
- 4%多聚甲醛
- 抗荧光淬灭封片剂
- 预铺胶处理细胞爬片 (24 孔板适用) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Anti-CD14 (sc-5749, Santa Cruz)
- Alexfluor 594 红色荧光标记二抗 (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)
- DAPI 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, MilliporeSigma)
- Annexin V-FITC Apoptosis Detection 细胞凋亡检测试剂盒 (ab14085, Abcam)
- 细胞内氧化应激活性氧 (ROS) 初级绿色荧光测定试剂盒 (Genmed, Shanghai, China)
- α-MEM 细胞培养基 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)
- Endothelial Cell Growth Medium BulletKit™ 内皮细胞培养基套装 (Lonza, Basel, Switzerland)
- 结晶紫染色液 (Beyotime, China)
- 垂直流超净细胞工作台
- 恒温含 5%CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Eppendorf 艾本德台式高速离心机 5424R (Eppendorf, German)
- 奥林巴斯光学倒置显微镜 OLYMPUS-IX51 (Olympus, Tokyo, Japan)
- 奥林巴斯光学正置显微镜 OLYMPUS-BX61 (Olympus, Tokyo, Japan)
- 贝克曼库尔特 FC 500 MCL/MPL 流式细胞仪 (FC500, BECKMAN, USA)
- 奥林巴斯三通道倒置荧光显微镜 (FV-1000, Olympus, Japan)
- 伯腾 Epoch R 微孔板分光光度计 (BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA)

2 方法

2.1 单核细胞、骨髓间充质干细胞、血管内皮前体细胞的培养

单核细胞: C57 小鼠出死后, 于超净台内分离四肢长骨, 适用 PBS 冲洗骨髓腔

冲出骨髓，随后反复吹打至呈单细胞悬液状态，PBS 洗涤两次后，使用小鼠骨髓单个核细胞提取试剂盒(LSF™; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)提取单个核细胞。加入含 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基进行原代培养，常规换液、传代。第 3-5 代细胞用于后续实验。

骨髓间充质干细胞 (BMSC): C57 小鼠处死后，于超净台内分离四肢长骨，适用 PBS 冲洗骨髓腔冲出骨髓，随后反复吹打至呈单细胞悬液状态，PBS 洗涤两次后，使用含 10% FBS 的 α -MEM 细胞培养基进行原代培养，选取单细胞克隆集落进行传代培养。常规换液、传代。第 3-5 代细胞用于后续实验。

血管内皮前体细胞 (EPC): C57 小鼠处死后，于超净台内分离四肢长骨，适用 PBS 冲洗骨髓腔冲出骨髓，随后反复吹打至呈单细胞悬液状态，PBS 洗涤两次后，使用小鼠骨髓单个核细胞提取试剂盒提取单个核细胞，随后采用 Endothelial Cell Growth Medium BulletKit™ 内皮细胞培养基套装进行原代培养，每 3 天更换一次培养液。待单核细胞随换液减少后，可见血管内皮细胞开始增殖 (约 7-10 天)。待细胞长至 80% 融合后进行传代培养。第 1 代细胞用于后续实验。

2.2 BMSC/EPC 细胞 Transwell 迁移实验

在 24 孔板中使用孔径为 8 μ m 的 Transwell 小室，在其下层加入体积为 3 \times 3 \times 3mm³ 的仿生纤维内硅化胶原支架材料，再上层分别置入 BMSC 和 EPC。刺激 4 小时后取出小室，用棉签擦去上层细胞，4% 多聚甲醛固定小室的下层细胞，PBS 洗涤后，用结晶紫染色液对细胞进行染色，随后于奥林巴斯光学正置显微镜 OLYMPUS-BX61 下观察，并进行细胞计数。

使用 FBS 作为阳性对照组，使用无血清的培养基作为阴性对照组。

2.3 单核细胞的细胞爬片免疫荧光鉴定

将 24 孔板专用玻璃爬片置于紫外灯下照射过夜。随后将爬片放入 24 孔板内，以 1 \times 10⁵/100 μ L 浓度重悬细胞，向每个爬片中部加入 50 μ L 细胞，随后放入孵箱中孵育 30 分钟，取出，每孔加入 500 μ L 培养基。待细胞生长至合适密度时，开始后续的细胞免疫荧光实验。将爬好细胞的细胞爬片取出，PBS 洗涤后使用 4% 的多聚甲醛固定 15 分钟，随后于室温下使用 0.5% Triton X-100 透膜液透膜 20 分钟。洗涤后，常规血清封闭，加一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第二天加入荧光二抗孵育后，DAPI 复染细胞核，

用抗荧光淬灭的封片剂封片后，于荧光显微镜下观察采集图像。

2.4 单核细胞 MTT 细胞增殖实验

收集细胞，以 1000 个/孔的密度接种于 96 孔板，每组接种 6 个复孔。从接种后第二天开始每天取一组细胞进行鉴定，总计测定 7 天。测定时每孔加入 20 μ L MTT 溶液，孵育 4 小时后加入二甲基亚砷溶解沉淀，并使用酶标仪测定吸光度（490nm），绘制细胞生长曲线。

2.5 单核细胞细胞内活性氧含量定量实验

单核细胞传至 6 孔板内，待细胞长至 80% 融合后，消化细胞，PBS 重悬后，采用细胞内氧化应激活性氧（ROS）初级绿色荧光测定试剂盒对细胞进行标记定量，方法及试剂用量按说明书指示进行。使用贝克曼库尔特 FC 500 MCL/MPL 流式细胞仪对处理好的细胞进行细胞流式检测分析。

2.6 单核细胞的细胞凋亡检测实验

单核细胞传至 6 孔板内，待细胞长至 80% 融合后，消化细胞，PBS 重悬后，使用 4% 多聚甲醛于室温下固定细胞 10 分钟。随后采用 Annexin V-FITC Apoptosis Detection 细胞凋亡检测试剂盒对细胞进行标记定量，方法及试剂用量按说明书指示进行。使用贝克曼库尔特 FC 500 MCL/MPL 流式细胞仪对处理好的细胞进行细胞流式检测分析。

2.7 统计分析

同第一部分，实验一。

3 结果和讨论

我们采用细胞免疫荧光技术对原代培养而来的单核细胞进行鉴定，结果显示，细胞 100% 为表达 CD14 阳性的单个核细胞（图 6-1），证实了我们培养的细胞是单核细胞，能够用于后续仿生纤维内硅化胶原支架材料作用于单核细胞的体外实验中。CD14 又称 LPS（Lipopolysaccharide，脂多糖受体），是一种只存在于单核巨噬细胞表面的细胞表面抗原，可用作单核细胞的表面标志物对其进行鉴定。

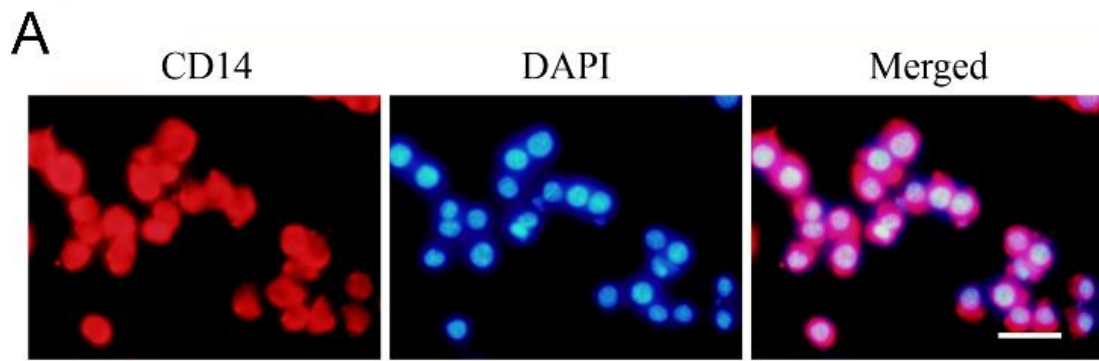


图 6-1 单核细胞的细胞免疫荧光鉴定
(标尺=100 μ m)

我们随后对仿生纤维内硅化胶原支架材料促进骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 和血管内皮前体细胞 (EPCs) 的细胞归巢能力进行了检测。Transwell 细胞迁移实验结果显示 (图 6-2), 硅化胶原支架并不能够促进 BMSCs 和 EPCs 的迁移。

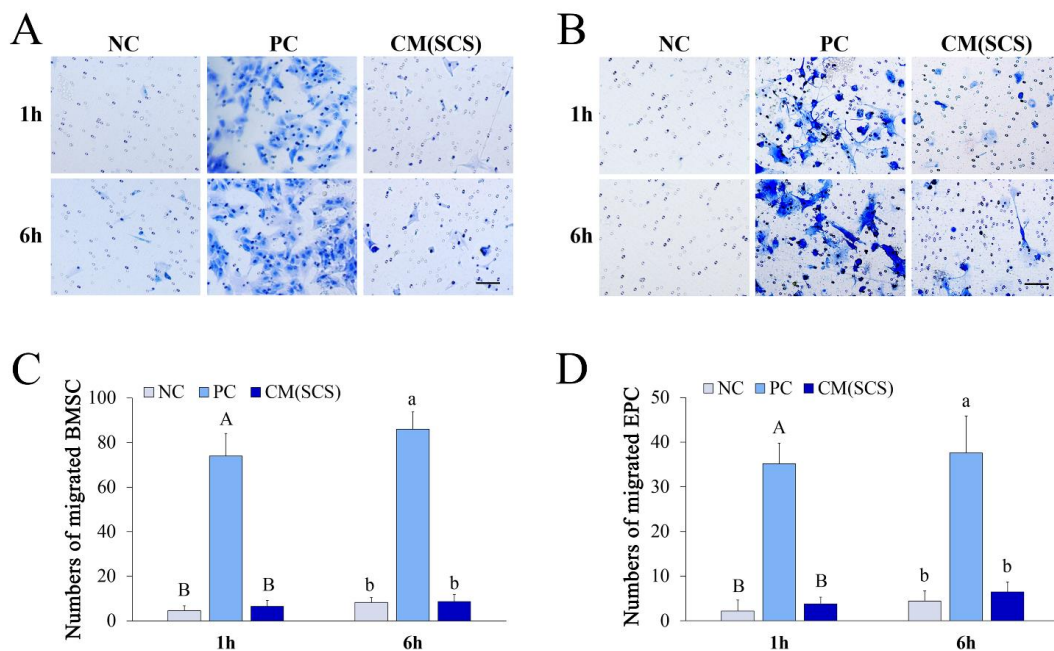


图 6-2 Transwell 细胞迁移实验

A: 骨髓间充质干细胞 (BMSC) 的细胞迁移实验结果; B: 血管内皮前体细胞 (EPC) 的细胞迁移实验结果; C: 骨髓间充质干细胞 (BMSC) 的细胞迁移计数; D: 血管内皮前体细胞 (EPC) 的细胞迁移计数。NC: 阴性对照组; PC: 阳性对照组; CM (SCS): Conditional Medium (SCS), 硅化胶原支架刺激组。(标尺=100 μ m)。

我们在体内实验中发现了宿主种子细胞（BMSC、EPC）向缺损区域募集的证据，但是在体外实验中，我们发现硅化胶原支架材料并不能够直接促进相关细胞的募集，因此我们认为可能是材料对单核细胞的作用间接促进了细胞归巢的增加。我们拟通过下一个实验对其进行验证。

我们随后研究了仿生纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞增殖的影响。结果表明（图 6-3），与硅化胶原材料共培养后，单核细胞的增殖水平并没有发生明显的变化（ $p>0.05$ ）。

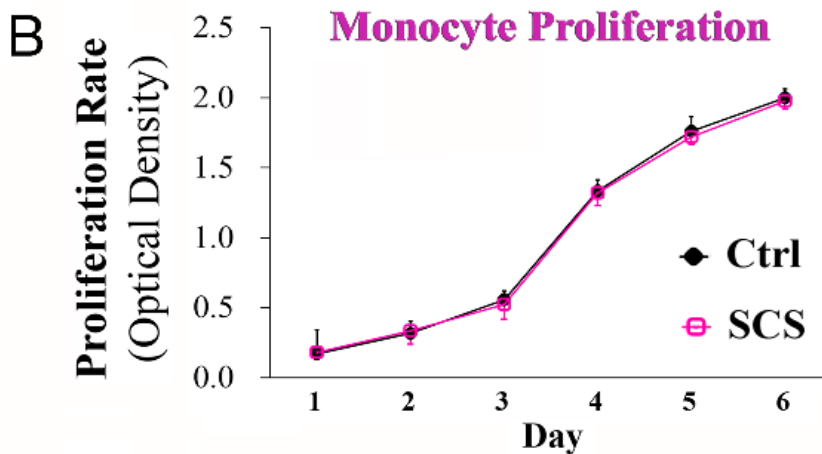


图 6-3 单核细胞 MTT 细胞增殖实验

我们随后研究了仿生纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞凋亡的影响。结果表明（图 6-4），与硅化胶原材料共培养后，单核细胞的凋亡并没有发生明显的变化（ $p>0.05$ ）。

我们随后研究了仿生纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞细胞内活性氧（ROS）水平的影响。结果表明（图 6-5），与硅化胶原材料共培养后，单核细胞的细胞内活性氧水平并没有发生明显的变化（ $p>0.05$ ）。

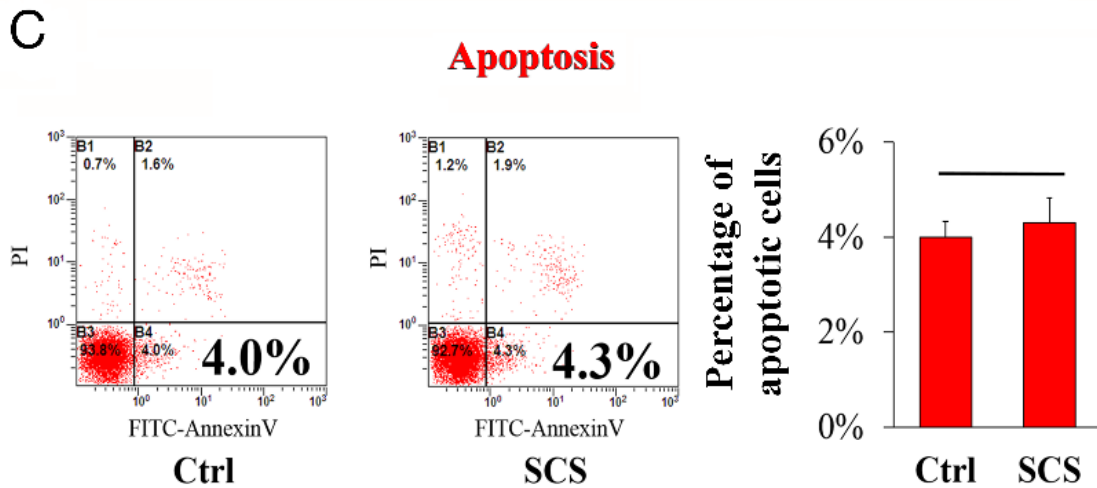


图 6-4 Annexin-V 细胞凋亡实验

横轴为 FITC-Annexin V，纵轴为 PI，每组的流式分析图中正常细胞（AnV/PI 阴性；左下）、早期凋亡细胞（AnV 阳性, PI 阴性；右下）、晚期凋亡细胞（AnV/PI 阳性；上右）和坏死细胞（AnV 阴性, PI 阳性；上左）。

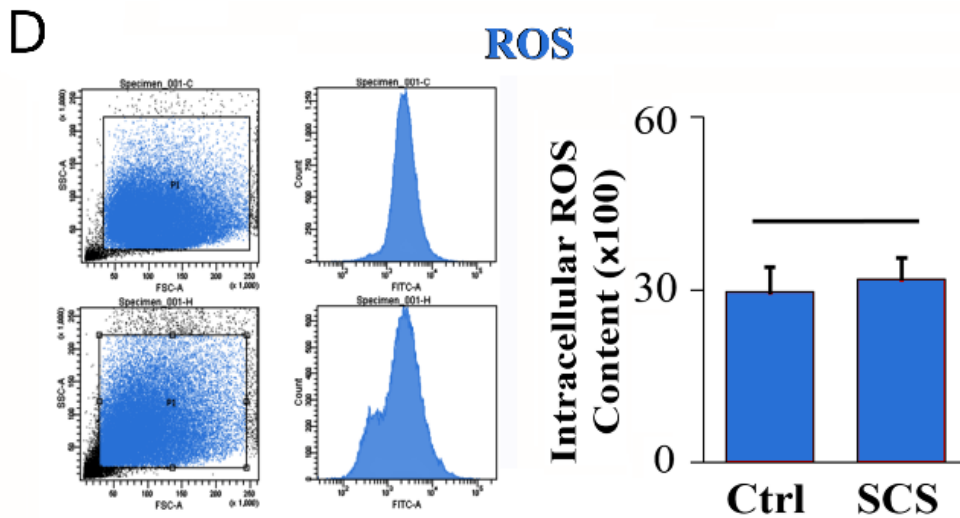


图 6-5 单核细胞的细胞内活性氧水平检测

4 小结

仿生纤维内硅化胶原对单核细胞命运的影响以及对 BMSC/EPC 迁移能力的影响实验的记过表明，材料对单核细胞的增殖、凋亡以及细胞内活性氧水平并没有产生影响。材料也不能够促进 BMSC/EPC 的迁移能力。

实验七 仿生纤维内硅化胶原支架对单核细胞分化以及分泌功能的影响

在本部分实验中，我们拟对仿生纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞分化以及分泌功能的影响进行体外实验的研究。我们在之前小鼠颅骨缺损修复的体内实验中，发现了在硅化胶原支架的作用下，单核细胞能够出现分化方面的改变，同时，其分泌功能也会受到影响。我们希望通过本实验来在体外对这一发现进行验证，系统观察材料对单核细胞分化和分泌功能的影响。

1 材料与仪器

- 仿生纤维内硅化胶原支架材料（制备同第一部分，实验一）
- 雄性 2 月龄 C57/BL6 小鼠（同第一部分，实验二）。
- 无菌动物手术盒（同第一部分，实验二）
- 小鼠骨髓单个核细胞提取试剂盒（LSF™; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA）
- RPMI 1640 细胞培养基（Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA）
- 青链霉素双抗 100 U/ml penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- 热灭活胎牛血清 heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, USA)
- PBS 磷酸盐缓冲液（DPBS, Corning, Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, MA, USA）
- 含 0.1% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶溶液 (Corning, Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, MA, USA)
- Corning® 25cm² 细胞培养瓶, Corning® 24 孔/96 孔细胞培养板（Corning Costar）
- 15mL 无菌离心管（Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA）
- Anti-VEGFa（ab51745, Abcam）, anti-PDGF-BB（ab23914, Abcam）, anti-SDF-1（sc-28876, Santa Cruz）, anti-TGF-β1（sc-146, Santa Cruz）, anti-β-actin（Cell Signaling Technology）

- 4%多聚甲醛
- 抗荧光淬灭封片剂
- 预铺胶处理细胞爬片（24孔板适用）（Thermo Fisher Scientific, USA）
- Alexa Fluor 488 绿色荧光标记二抗，Alexa Fluor 594 红色荧光标记二抗（Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.）
- DAPI 4',6-二脒基-2-苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole, MilliporeSigma）
- TRAP staining kit, TRAP 组织染色试剂盒（MilliporeSigma）
- Trizol reagent（Invitrogen）
- 氯仿，异丙醇，无水乙醇，RNAase Free H₂O
- PrimeScript RT reagent kit 反转录试剂盒（Takara Bio Inc., Shiga, Japan）
- SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II（Tli RNaseH Plus, Takara Bio Inc., Shiga, Japan）
- Primer Express 5.0 Software 引物合成软件
- 0.45 孔径及 0.22 孔径 PVDF 膜（MilliporeSigma），滤纸
- Western Blot 相关试剂：RIPA 裂解液（MilliporeSigma）；PMSF（MilliporeSigma）；磷酸酶抑制剂（Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA）；Bradford 蛋白定量试剂盒（beyotime, China）；5×蛋白上样缓冲液 Loading Buffer（beyotime）；SDS-Page 凝胶配制试剂盒（beyotime）；Tris-Glycine-SDS 电泳缓冲液，Tris-Tricine-SDS 转膜缓冲液；甲醇；ddH₂O；BSA 牛血清白蛋白（MilliporeSigma）；Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody（Santa Cruz）；超敏 ECL 化学发光试剂盒（GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA）
- 垂直流超净细胞工作台
- 恒温含 5%CO₂ 细胞培养箱（Thermo Fisher Scientific, USA）
- Eppendorf 艾本德台式高速离心机 5424R（Eppendorf, German）
- 奥林巴斯光学倒置显微镜 OLYMPUS-IX51（Olympus, Tokyo, Japan）
- 奥林巴斯光学正置显微镜 OLYMPUS-BX61（Olympus, Tokyo, Japan）
- 奥林巴斯三通道倒置荧光显微镜（FV-1000, Olympus, Japan）
- 伯腾 Epoch R 微孔板分光光度计（BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA）
- BIO-RAD CFX96 touch q-PCR system（Bio-Rad Laboratories, Inc., USA）
- ABI 2720 Thermal Cycler PCR（Thermo Fisher Scientific）

- PowerPac™ 基础电泳仪电源, Mini-PROTEAN® Tetra 电泳槽, ChemiDoc™ 成像系统 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- 摇床, 恒温烘箱, 磁力搅拌机

2 方法

2.1 单核细胞的培养与硅化胶原支架材料的刺激

单核细胞的培养方法同第三部分, 实验六。

仿生纤维内硅化胶原支架材料切成 500mg 每份的长方体, 浸于 50mL 配制好的 RPMI 1640 细胞培养液中, 4°C 放置 48 小时后, 取出材料, 培养液作为仿生纤维内硅化胶原支架材料的条件培养基 (浸提液), 用于后续实验中对细胞进行刺激。

2.2 细胞免疫荧光

细胞免疫荧光的实验方法同第三部分, 实验六。

2.3 单核细胞 TRAP 染色

将 24 孔板专用玻璃爬片置于紫外灯下照射过夜。随后将爬片放入 24 孔板内, 以 $1 \times 10^5/100\mu\text{L}$ 浓度重悬细胞, 向每个爬片中部加入 $50\mu\text{L}$ 细胞, 随后放入孵箱中孵育 30 分钟, 取出, 每孔加入 $500\mu\text{L}$ 培养基。待细胞生长至合适密度时, 开始后续的细胞 TRAP 染色实验。染色实验的步骤和试剂用量按说明书 TRAP staining kit, TRAP 组织染色试剂盒的指示进行。染色完成后, 常规封片, 于奥林巴斯光学正置显微镜 OLYMPUS-BX61 镜下观察拍照, 并计数分析。

2.4 实时定量 PCR (qRT-PCR)

将单核细胞以 $3 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于 6 孔板中, 分别给予材料浸提液 0h, 1h, 3h, 6h 和 12h 的处理。将材料刺激后的细胞 PBS 洗涤后, 加入 Trizol ($1\text{mL}/\text{孔}$), 充分裂解 5 分钟, 随后常规提取细胞总 RNA, 进行 RNA 定量。吸取 1000ng 总质量的 RNA 使用 PrimeScript RT reagent kit 反转录试剂盒进行反转录 ($20\mu\text{L}$ 体系)。使用 BIO-RAD CFX96 touch q-PCR system 进行实时定量 PCR 检测, 检测目的基因为 SDF-1, VEGF, TGF- β , PDGF-BB, 使用 GAPDH 作为内参 (引物序列见表 7-1)。

表 7-1 引物序列

Primer	Sequences
m-SDF1 α -F	5`-GAG AGC CAC ATC GCC AGA G-3`
m-SDF1 α -R	5`-TTT CGG GTC AAT GCA CAC TTG-3`
m-TGF β 1-F	5`-ACC GCA ACA ACG CCA TCT A-3`
m-TGF β 1-R	5`-GCC CTG TAT TCC GTC TCC TT-3`
m-VEGFa-F	5`-GAG TAC CCC GAC GAG ATA GA-3`
m-VEGFa-R	5`-GGC TTT GGT GAG GTT TGA T-3`
m-PDGFBB-F	5`-GGG TGG GAC TTT GGT GTA GAG AAG-3`
m-PDGFBB-R	5`-GGA ACG GAT TTT GGA GGT AGT GTC-3`
m-GAPDH-F	5`-TCA ACG GCA CAG TCA AGG-3`
m-GAPDH-R	5`-GAT GTT AGT GGG GTC TCG C-3`

Abbreviations - F: forward primer; R: reverse primer; SDF1 α : stromal cell-derived factor-1 α ; TGF β 1: transforming growth factor- β 1; VEGFa: vascular endothelial growth factor-a; PDGF-BB: platelet-derived growth factor-BB; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

2.5 Western Blot

将单核细胞以 3×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 分别给予材料浸提液 0h, 1h, 3h, 6h 和 12h 的处理。将材料刺激后的细胞 PBS 洗涤后, 使用加入 PMSF 和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取细胞总蛋白, 使用 Bradford 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 使用 Loading Buffer 配取蛋白, 浓度为 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 沸水中加热 10 分钟使蛋白变性。置于 -80°C 冰箱内待电泳上样。

常规配制 SDS-PAGE 凝胶, 上样, 电泳, 转膜, 封闭。一抗为 Anti-VEGFa(ab51745, Abcam), anti-PDGF-BB (ab23914, Abcam), anti-SDF-1 (sc-28876, Santa Cruz), anti-TGF- β 1 (sc-146, Santa Cruz), anti- β -actin (Cell Signaling Technology)。使用一抗种属来源的辣根酶偶联二抗孵育后, 使用超敏 ECL 化学发光试剂盒发光, ChemiDoc™ 成像系统拍照, 并进行定量分析。使用 β -actin 作为内参。

2.6 统计分析

同第一部分，实验一。

3 结果与讨论

我们首先通过细胞免疫荧光计数对单核细胞在材料作用下分泌情况的改变进行了研究。实验结果显示（图 7-1），在与硅化胶原支架材料浸提液接触 12 小时后，单核细胞的 VEGF, PDGF-BB, SDF-1 以及 TGF- β 的表达水平均要高于阴性对照组 ($p < 0.05$)。说明了单核细胞能够在硅化胶原支架材料的作用下发生相关细胞因子分泌的增加。

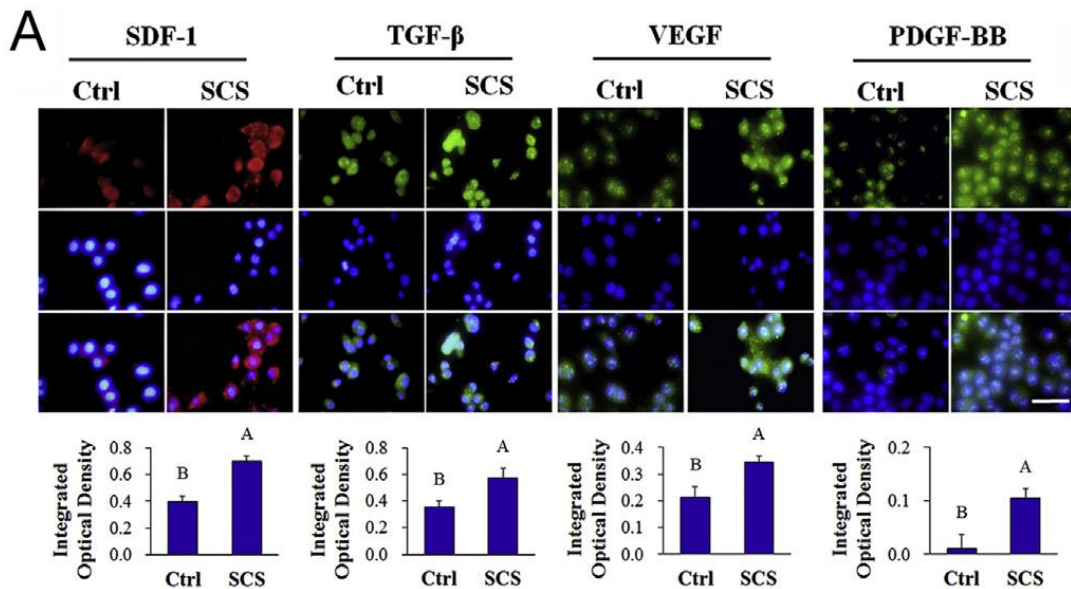


图 7-1 单核细胞的细胞免疫荧光结果（标尺=100 μ m）

我们随后通过 TRAP 染色对单核细胞分化情况进行了检测。实验结果显示（图 7-2），单核细胞在初始 0 小时时，不表达 TRAP，实验组和对照组中的 TRAP 阳性细胞比例均为 0。而在与硅化胶原支架接触 1 小时后，单核细胞即出现了明显的分化，TRAP 阳性的单核细胞比例占到了整体细胞比例的 69.3%，而对照组的单核细胞均无 TRAP 表达。在细胞与材料接触 3 小时后，单核细胞分化为 TRAP 阳性单个核细胞的比例占到了整体细胞比例的 95.5%。

实验结果说明仿生纤维内硅化胶原支架材料能够促使单核细胞分化为 TRAP 阳

性的单核细胞，而这类细胞作为破骨细胞的前体细胞，在细胞因子分泌，以及参与骨缺损修复重建的进程中发挥着重要的作用。

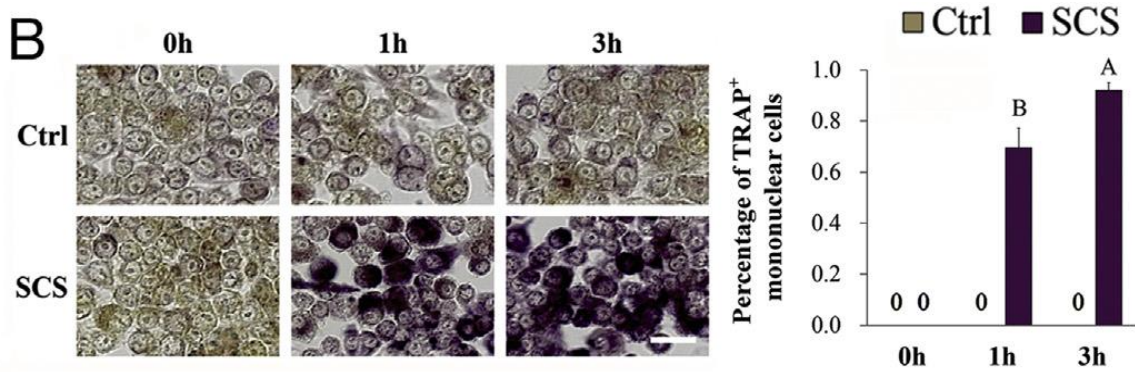


图 7-2 单核细胞 TRAP 染色结果与定量分析

TRAP 阳性的单核细胞为胞核呈紫色染色的单个核细胞。(标尺=50 μ m)

我们随后通过实时定量 PCR 对单核细胞在硅化胶原支架材料刺激下相关细胞因子 (VEGF, PDGF-BB, SDF-1, TGF- β) 在转录水平的表达情况进行了检测。实验结果显示 (图 7-3), 在材料刺激 1 小时后, SDF-1 的基因表达出现了明显的增高, 达到了对照组表达水平的 2.42 倍 ($p < 0.05$), 而在 3 小时时其表达水平也要略高于对照组 ($p < 0.05$), 在 6 小时和 12 小时时其表达水平与对照组相比没有统计学差异 ($p > 0.05$)。在材料刺激 3 小时后, TGF- β 的表达水平出现明显增高, 并在刺激后 6 小时和 12 小时时逐渐增加, 在 12 小时达到高峰, 其表达水平为对照组的 1.79 倍。VEGF 和 PDGF-BB 在材料刺激后 3 小时也出现了表达水平的增高, 分别达到了对照组表达水平的 1.76 倍和 2.42 倍。VEGF 和 PDGF-BB 在材料刺激后 6 小时和 12 小时时, 其表达水平仍要明显高于对照组 ($p < 0.05$)。

实时定量 PCR 的结果表明, 仿生纤维内硅化胶原支架材料能够从转录水平促进单核细胞相关细胞因子 (VEGF, PDGF-BB, SDF-1, TGF- β) 表达的增加。这一结果也和我们之前体内实验研究发现的缺损修复区域局部相关细胞因子表达增加的结果相一致。我们认为 VEGF, PDGF-BB, SDF-1 和 TGF- β 表达的增加, 能够促进局部组织的血管化和细胞归巢能力, 并促进骨缺损的修复。我们拟通过后续的实验继续对这一现象进行研究验证。

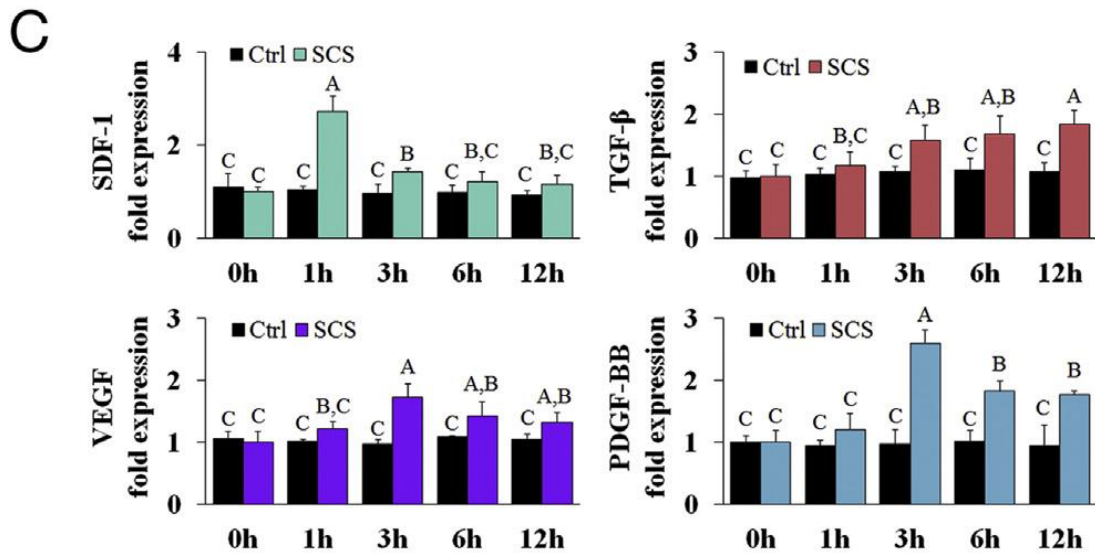


图 7-3 硅化胶原支架刺激后的单核细胞实时定量 PCR 结果

不同基因中，不同大写字母表示组间有显著统计学差异 ($P < 0.05$)。

我们也继续通过 Western Blot 技术对硅化胶原支架材料刺激后，不同时间点内单核细胞相关细胞因子 (VEGF, PDGF-BB, SDF-1, TGF- β) 在翻译水平的表达进行了检测 (图 7-4)。对结果进行定量分析显示 (图 7-5)，单核细胞中 VEGF, SDF-1, TGF- β 的表达在经硅化胶原支架刺激后明显上升 ($p < 0.05$)，而 PDGF-BB 在对照组中无表达，而在经硅化胶原支架刺激后，出现了表达，并随时间表达量大幅涨升。结果说明了经材料刺激后，单核细胞在分化为 TRAP 阳性的单个核细胞的同时，能够表达 TRAP 阳性单核细胞所表达的细胞因子 PDGF-BB，我们认为其 PDGF-BB 的表达与其促进成骨成血管的特性密切相关。此外，单核细胞在材料作用下表达增加的 VEGF, SDF-1 和 TGF- β 与组织缺损修复中的血管化，和细胞归巢也有直接的关系。单核细胞中相关细胞因子表达的增加能够促进组织的血管化，以及对宿主种子细胞的募集，并最终促进局部缺损的快速成骨修复。

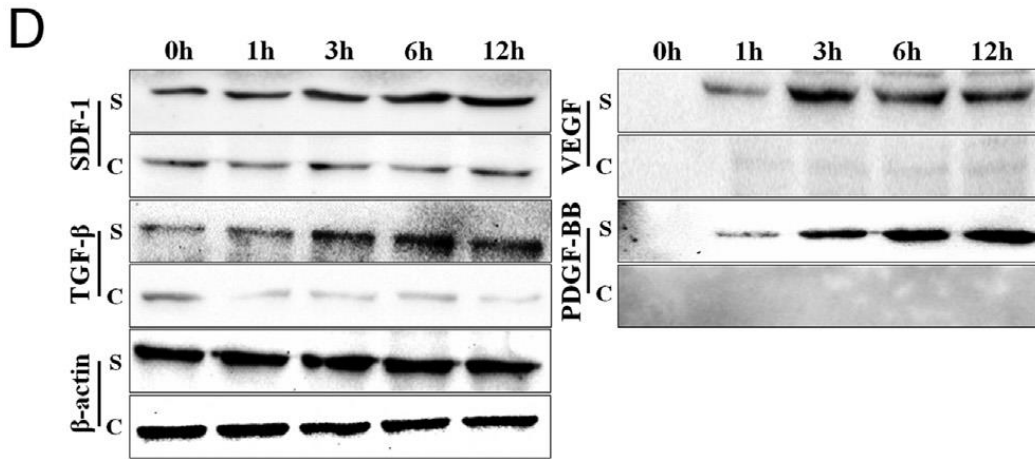


图 7-4 单核细胞经硅化胶原支架刺激后的 western blot 检测

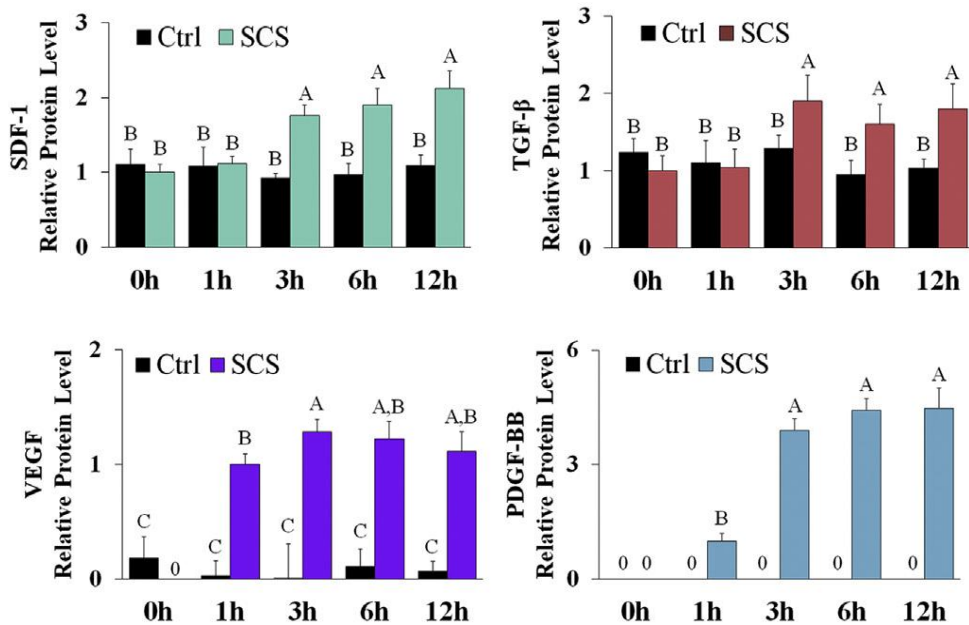


图 7-5 单核细胞经硅化胶原支架刺激后的 western blot 检测定量分析

我们发现在仿生纤维内硅化胶原支架的作用下，单核细胞的分化和分泌功能均发生了改变，我们认为正是材料对单核细胞的作用，使其分化和分泌功能出现了改变，从而改善了缺损局部血管化和细胞归巢的能力，从而进一步促进了其骨修复的效果。我们也拟通过后续的体外实验进一步对此进行验证。

4 小结

综上所述，单核细胞能够在仿生纤维内硅化胶原支架材料的作用下，分化为 TRAP 阳性的单个核细胞，其分化后的分泌功能也发生了明显改变。在材料的作用下，单核细胞能够在转录水平和翻译水平表达更多的相关细胞因子（VEGF，PDGF-BB，SDF-1，TGF- β ）。我们认为硅化胶原支架材料对单核细胞的这一作用是其促进血管化和细胞归巢能力，并最终促进骨缺损快速修复的重要影响因素。

实验八 仿生纤维内硅化胶原支架调控单核细胞促进细胞归巢和血管生成的体外实验研究

在小鼠颅骨缺损修复的实验中，我们发现了硅化胶原支架修复后的缺损区域内形成了更多的新生血管，且参与成骨成血管的种子细胞明显增多。在缺损区域中的单核细胞向 TRAP 阳性的单核细胞分化，且分泌了更多参与成骨成血管的相关细胞因子。随后的体外实验我们也发现在仿生纤维内硅化胶原支架的作用下，单核细胞的分化和分泌功能均发生了改变，我们认为正是材料对单核细胞的作用，使其分化和分泌功能出现了改变，从而改善了缺损局部血管化和细胞归巢的能力，从而进一步促进了其骨修复的效果。在本实验中，我们拟研究仿生纤维内硅化胶原支架材料与单核细胞相互作用对 BMSCs/EPCs 细胞归巢能力的影响，以及其对 EPCs 成血管能力的影响，以进一步确认材料和单核细胞的相互作用在骨组织修复进程中所扮演的角色。

1 材料与仪器

- 仿生纤维内硅化胶原支架材料（制备同第一部分，实验一）
- 雄性 2 月龄 C57/BL6 小鼠（同第一部分，实验二）。
- 无菌动物手术盒（同第一部分，实验二）
- 小鼠骨髓单个核细胞提取试剂盒（LSF™; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA）
- RPMI 1640 细胞培养基（Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA）
- 青链霉素双抗 100 U/ml penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- 热灭活胎牛血清 heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, USA)
- PBS 磷酸盐缓冲液（DPBS, Corning, Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, MA, USA）

- 含 0.1% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶溶液 (Corning, Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, MA, USA)
- Corning® 25cm² 细胞培养瓶, Corning® 24 孔/96 孔细胞培养板 (Corning Costar)
- Transwell 小室 (24 孔板适用, 孔径 8 μm, Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA)
- 15mL 无菌离心管 (Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA)
- 4% 多聚甲醛
- α-MEM 细胞培养基 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)
- Endothelial Cell Growth Medium BulletKit™ 内皮细胞培养基套装 (Lonza, Basel, Switzerland)
- 结晶紫染色液 (Beyotime, China)
- 中和抗体: neutralizing antibodies for SDF-1a (MAB310, R&D systems), TGF-β1 (ab64715, Abcam), VEGFa (AF-493-NA, R&D systems), PDGF-BB (ab34074, Abcam)
- Matrigel 血管生成试剂盒, *In vitro* angiogenesis assay kit (ECM625, Millipore, Billerica, CA)
- 垂直流超净细胞工作台
- 恒温含 5%CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Eppendorf 艾本德台式高速离心机 5424R (Eppendorf, German)
- 奥林巴斯光学倒置显微镜 OLYMPUS-IX51 (Olympus, Tokyo, Japan)
- 奥林巴斯光学正置显微镜 OLYMPUS-BX61 (Olympus, Tokyo, Japan)

2 方法

2.1 单核细胞、骨髓间充质干细胞、血管内皮前体细胞的培养

同第三部分, 实验六。

2.2 BMSC/EPC 细胞 Transwell 迁移实验

实验方法同第三部分, 实验六。在迁移 1 小时, 3 小时和 6 小时三个时间点取材, 进行细胞固定染色和分析。

仿生纤维内硅化胶原支架材料切成 500mg 每份的长方体, 浸于 50mL 配制好的

RMPI 1640 细胞培养液中，4°C放置 48 小时后，取出材料，培养液作为仿生纤维内硅化胶原支架材料的条件培养基（浸提液），用于后续实验中对细胞进行刺激。

分组如下：在细胞迁移实验中，CM（monocyte）组：使用只有单核细胞培养 48 小时的条件培养基；CM（monocyte+SCS）组：使用单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时的条件培养基。在细胞中和抗体验证实验中，CM（monocyte+SCS）组：使用单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时的条件培养基；anti VEGF/SDF-1/TGF- β /PDGF-BB 组：单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时并分别加入了 VEGF/SDF-1/TGF- β /PDGF-BB 中和抗体的实验组；anti S+P+T 组：单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时并加入了 SDF-1, TGF- β 和 PDGF-BB 中和抗体的实验组。

2.3 血管内皮前体细胞的 EPCs 血管生成实验

将 Matrigel 胶从-20°C冰箱取出，放入 4°C冰箱过夜。第二天取出 Matrigel 胶，以 100 μ L/孔铺于 96 孔板中，并置于 37°C孵箱中放置 30 分钟。将以不同条件培养基处理过的血管内皮前体细胞 EPCs 重悬，以每孔 10000 个细胞加入 96 孔板中，每组添加 6 个复孔。放入 37°C孵箱中，随后每 1 小时取出观察拍照。使用 Image Pro Plus 软件进行血管长度的定量分析。

分组如下：在细胞迁移实验中，CM（monocyte）组：使用只有单核细胞培养 48 小时的条件培养基；CM（SCS）组：使用硅化胶原支架材料的 48 小时浸提液；CM（monocyte+SCS）组：使用单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时的条件培养基。在细胞中和抗体验证实验中，CM（monocyte+SCS）组：使用单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时的条件培养基；anti VEGF/SDF-1/TGF- β /PDGF-BB 组：使用单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时并分别加入了 VEGF/SDF-1/TGF- β /PDGF-BB 中和抗体的实验组；anti ALL 组：使用单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时并加入了 SDF-1, TGF- β , VEGF 和 PDGF-BB 中和抗体的实验组。

2.4 统计分析

同第一部分，实验一。

3 结果与讨论

我们首先对经硅化胶原支架刺激后的单核细胞的条件培养基对骨髓间充质干细胞和血管内皮前体细胞的细胞迁移能力的影响进行了检测。实验结果显示（图 8-1），单核细胞的条件培养基在刺激 6 小时后，能够促进 BMSCs 和 EPCs 迁移能力的小幅增加，其迁移细胞数量均要明显高于阴性对照组（NC）（ $p < 0.05$ ）。而采用单核细胞与材料浸提液共培养的条件培养基进行诱导时，其在诱导 1 小时时，迁移的 BMSC/EPC 的数目就要高出了单核细胞的条件培养基刺激 6 小时组，但两者之间并没有统计学差异（ $p > 0.05$ ）；在分别诱导 3 小时和 6 小时后，单核细胞与材料浸提液共培养的条件培养基诱导组的 BMSC/EPC 的迁移数量明显上升，均要明显高于 NC 组和 CM（monocyte）组（ $p < 0.05$ ）；在诱导 6 小时后，其迁移细胞的数量达到了阳性对照组的水平，与阳性对照组（PC）相比，没有统计学差异（ $p > 0.05$ ）。

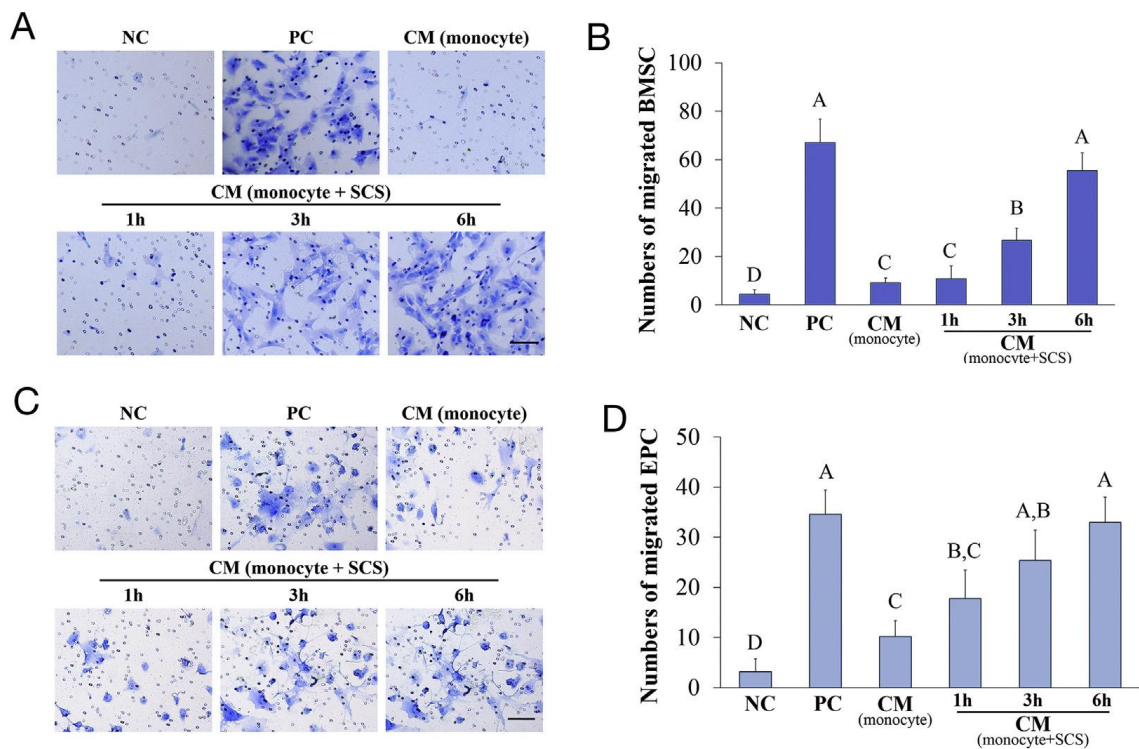


图 8-1 硅化胶原支架刺激后的 BMSCs/EPCs 细胞 Transwell 迁移实验结果

A: 骨髓间充质干细胞（BMSC）的细胞迁移结果；B: 骨髓间充质干细胞（BMSC）的细胞迁移计数；C: 血管内皮前体细胞（EPC）的细胞迁移结果；D: 血管内皮前体细胞（EPC）的细胞迁移计数。（标尺=200 μ m）。

我们随后对经硅化胶原支架刺激后的单核细胞的条件培养基对血管内皮前体细胞（EPC）的细胞呈血管能力的影响进行了检测。实验结果显示（图 8-2），单核细胞的条件培养基在刺激 6 小时后，并没有引起 EPC 血管生成的增多，其形成血管的长度与阴性对照组（NC）相比没有统计学差异（ $p>0.05$ ）；而硅化胶原支架材料的浸提液刺激组中，其在 6 小时时血管生成的长度要略高于阴性对照组（NC）和 CM（monocyte）组（ $p<0.05$ ），说明了材料所释放的硅酸具有促进 EPC 形成血管的能力。而采用单核细胞与材料浸提液共培养的条件培养基进行诱导时，其在 3 小时时的血管生成长度就要明显高于了 CM（SCS）组（ $p<0.05$ ），说明单核细胞与材料浸提液共培养的条件培养基具有明显促进 EPC 血管生成的能力；在诱导 6 小时后，CM（monocyte+SCS）组的血管生成长度达到了阳性对照组（PC）的水平，两者所形成的新生血管长度没有统计学差异（ $p>0.05$ ）。

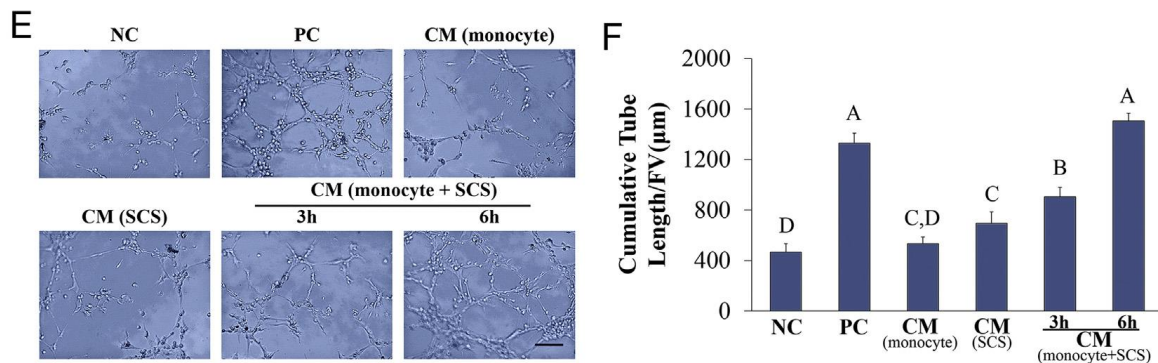


图 8-2 T 硅化胶原支架刺激后的 EPCs 细胞血管生成实验结果

NC: Negative Control, 阴性对照组; PC: Positive Control, 阳性对照组; CM (monocyte): 单核细胞的条件培养基诱导组; CM (SCS): 硅化胶原支架浸提液诱导组; CM (monocyte+SCS): 硅化胶原支架浸提液与单核细胞共培养的条件培养基诱导组。(标尺=200µm)。

根据实验结果，我们发现仿生纤维内硅化胶原支架材料与单核细胞同培养的条件培养基能够明显的促进 BMSC/EPC 的迁移能力，以及 EPC 血管生成的能力。结合之前的实验结果，我们认为这个作用是由于单核细胞在硅化胶原支架的作用下，进行分化并分泌一系列相关细胞因子所引起的。因此我们继续通过相关细胞因子（VEGF, PDGF-BB, SDF-1, TGF-β）的中和抗体，继续对 BMSC/EPC 的迁移能力，以及 EPC 血管生成的能力进行评估。

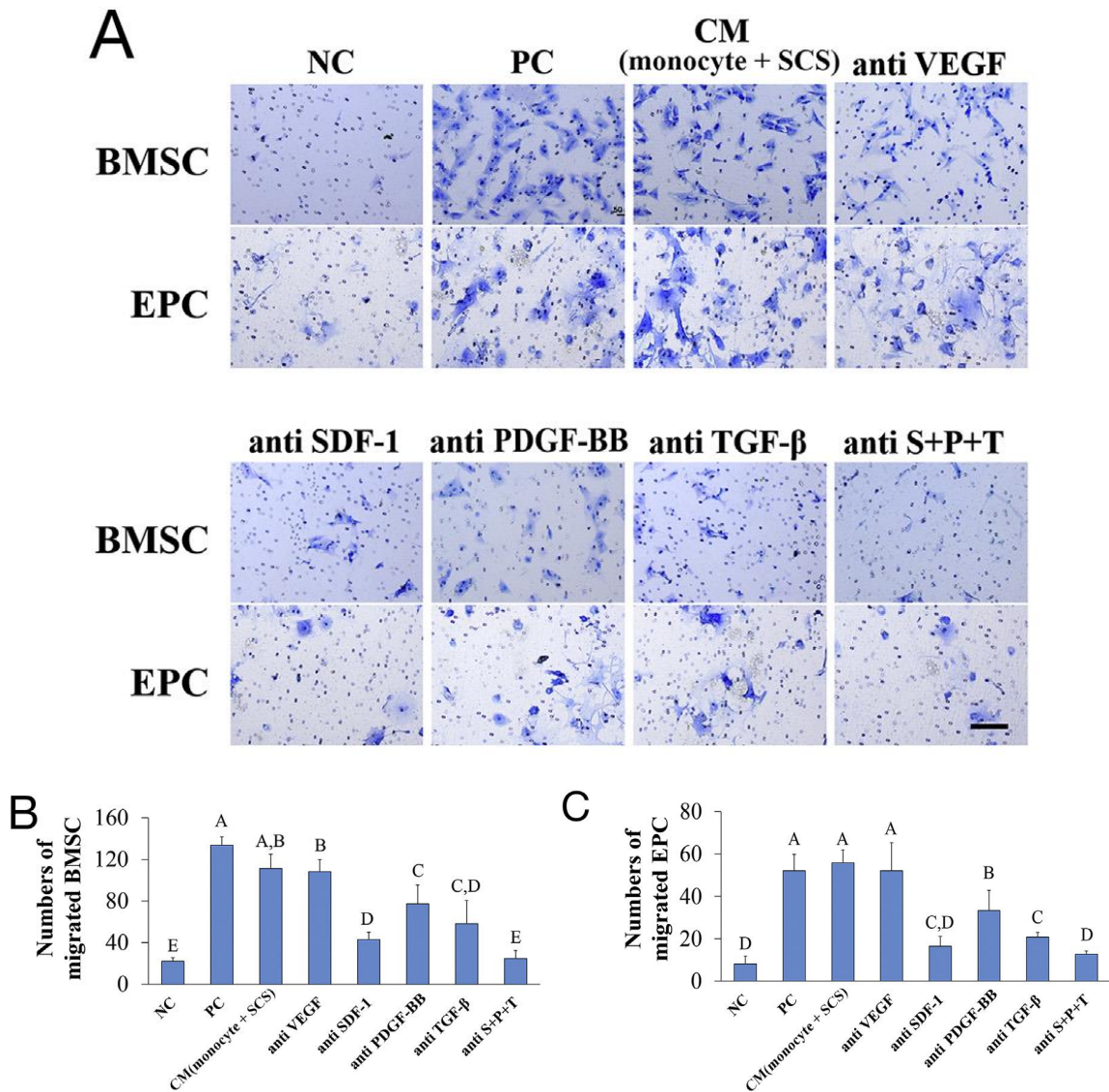


图 8-3 硅化胶原支架刺激后，加入中和抗体的 BMSCs/EPCs 细胞 Transwell 迁移实验结果

CM (monocyte+S_{CS}): 单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时的条件培养基; anti VEGF/SDF-1/TGF- β /PDGF-BB: 单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时并分别加入了 VEGF/SDF-1/TGF- β /PDGF-BB 中和抗体的实验组; anti S+P+T: 单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时并加入了 SDF-1, TGF- β 和 PDGF-BB 中和抗体的实验组。(标尺=200 μ m)。

中和抗体验证实验的结果表明 (图 8-3), VEGF 并没有参与到促进 BMSC/EPC 迁移的作用中, 在中和了 VEGF 的作用后, 条件培养基促进细胞迁移的能力并没有发生变化; 而 SDF-1、TGF- β 和 PDGF-BB 则均对细胞迁移的能力产生了影响 ($p < 0.05$)。而在血管生成中和抗体实验中, 结果显示 (图 8-4) VEGF、SDF-1、TGF- β 和 PDGF-BB 这四种细胞因子均对 EPC 血管生成能力产生了影响, 其中 SDF-1 的影

响最弱，而 VEGF 的影响最强。

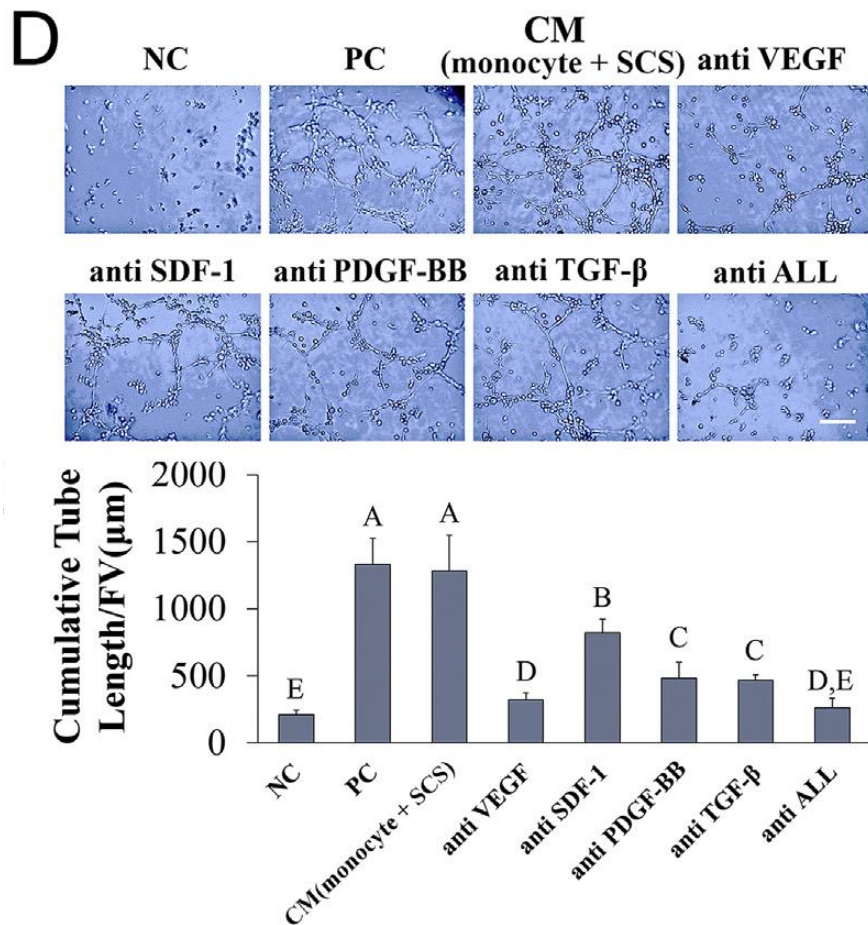


图 8-4 硅化胶原支架刺激后，加入中和抗体的 EPCs 血管生成实验结果

CM (monocyte+SCS): 单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时的条件培养基; anti VEGF/SDF-1/TGF-β/PDGF-BB: 单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时并分别加入了 VEGF/SDF-1/TGF-β/PDGF-BB 中和抗体的实验组; anti ALL: 单核细胞与材料浸提液共培养刺激 48 小时并加入了 VEGF, SDF-1, TGF-β 和 PDGF-BB 中和抗体的实验组。(标尺=200µm)。

4 小结

综上所述，我们通过本实验验证了在仿生纤维内硅化胶原支架材料的作用下，单核细胞分化为 TRAP 阳性的单个核细胞后，其所表达和分泌增加的相关细胞因子 (SDF-1, TGF-β 和 PDGF-BB) 能够在体外实验中促进骨髓间充质干细胞 BMSCs 和血管内皮前体细胞 EPCs 的细胞归巢能力，此外单核细胞分泌增加的相关细胞因子 (VEGF, SDF-1, TGF-β 和 PDGF-BB) 还能够促进血管内皮前体细胞 EPCs 的成血

管的能力。因此，我们也就通过体内实验和体外实验共同验证了仿生纤维内硅化胶原支架材料通过对单核细胞的调控，促进组织血管化和宿主种子细胞的募集，从而加快骨缺损修复进程的作用（图 8-5）。

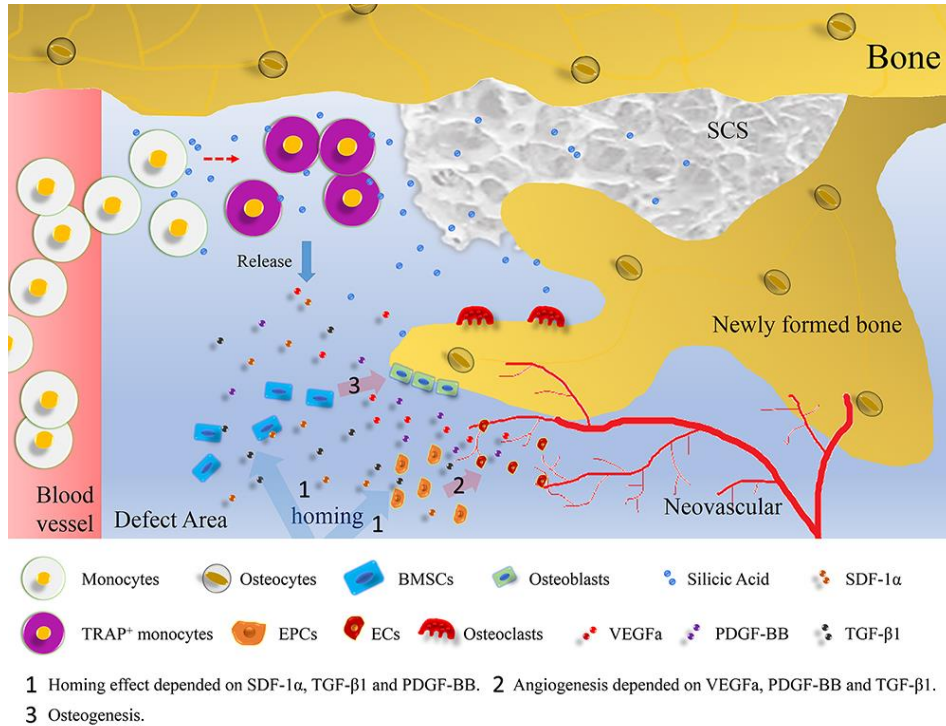
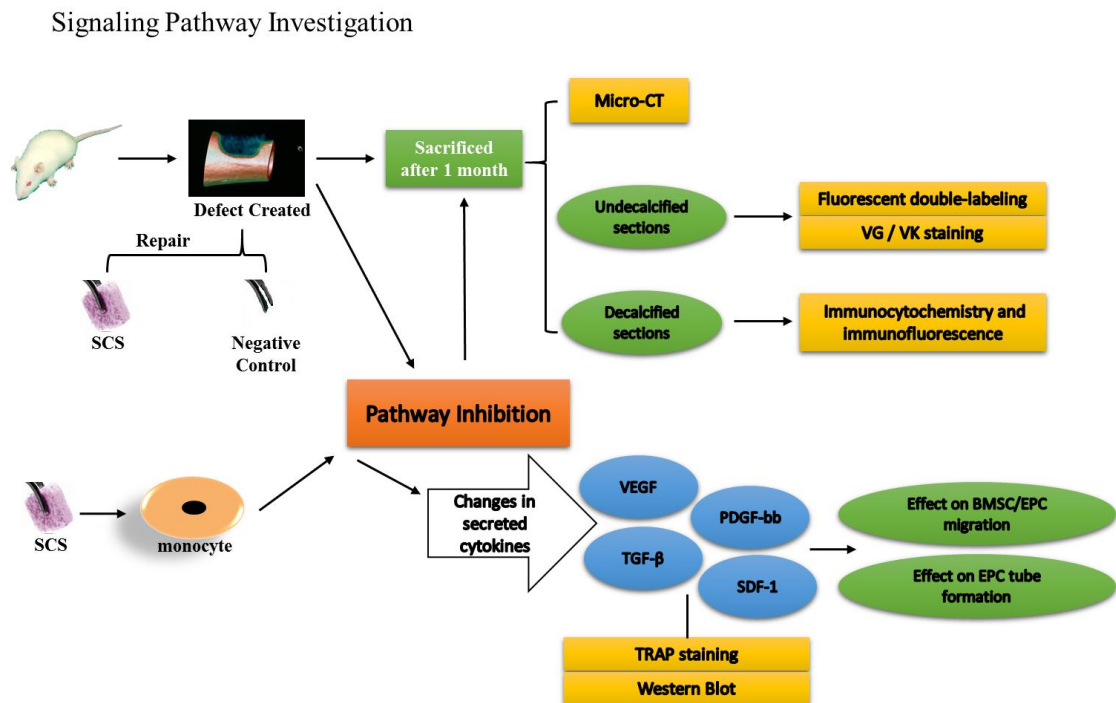


图 8-5 仿生纤维内硅化胶原支架材料通过对单核细胞的调控促进血管生成，细胞归巢，并促进骨缺损修复的流程示意图

在组织发生骨缺损后，从外周血循环募集来的单核细胞在仿生纤维内硅化胶原支架材料的作用下，分化为 TRAP 阳性的单个核细胞，并分泌 VEGF，SDF-1，TGF- β 和 PDGF-BB 等一系列的细胞因子，一方面促进缺损区域组织的血管化进程，另一方面能够促进对宿主干细胞、内皮前体细胞等修复重建种子细胞的募集，从而加快组织骨重建的进程。

第四部分 仿生纤维内硅化胶原支架调控单核细胞的信号转导机制研究

我们前期的研究表明，在组织发生骨缺损后，从外周血循环募集来的单核细胞在仿生纤维内硅化胶原支架材料的作用下，分化为 TRAP 阳性的单个核细胞，并分泌 VEGF, SDF-1, TGF- β 和 PDGF-BB 等一系列的细胞因子，一方面促进缺损区域组织的血管化进程，另一方面能够促进对宿主干细胞、内皮前体细胞等修复重建种子细胞的募集，从而加快组织骨重建的进程。在本部分实验中，我们把关注点放在硅化胶原支架材料作用于单核细胞的信号转导通路这一关键问题上。我们拟通过大鼠股骨部分缺损模型的体内实验，结合体外通路抑制实验，来探索材料对单核细胞分子信号通路的调控。



流程图 4. 仿生纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞分子信号通路调控的研究

实验九 仿生纤维内硅化胶原支架对单核细胞调控的信号转导机制研究

在单核细胞的分子信号转导通路中，MAPK 信号通路是调控其细胞命运（cell fate）和功能作用的重要信号转导通路。MAPK 信号通路能够对外界给予细胞的刺激产生灵敏的应答，并通过其不同的信号转导通路产生相应的应答反应^[125]。MAPK 信号转导通路也能够促进血管内皮细胞的增殖与新生血管的生成^[126,127]，因此我们推测其在单核细胞参与骨缺损修复的进程中可能起到关键作用。在不同的 MAPK 信号转导通路中，ERK1/2 信号转导通路能够通过调节细胞增殖、分化方向的调控来影响单核细胞，而 P38/MAPK 和 JNK 信号转导通路则参与了单核细胞在炎症免疫应答等应激反应中的调控^[125]。

我们拟通过本实验，对仿生纤维内硅化胶原支架材料调控单核细胞的相关分子信号通路进行研究，检测材料作用下单核细胞 P38/MAPK、JNK 以及 ERK1/2 信号的活化情况，并应用通路阻断技术，来验证相关信号通路在硅化胶原支架调控单核细胞分化以及分泌功能方面的影响。

1 材料与仪器

- 仿生纤维内硅化胶原支架材料（制备同第一部分，实验一）
- 雄性 2 月龄 C57/BL6 小鼠（同第一部分，实验二）。
- 无菌动物手术盒（同第一部分，实验二）
- 小鼠骨髓单个核细胞提取试剂盒（同第三部分，实验六）
- RPMI 1640 细胞培养基（同第三部分，实验六）
- 青链霉素双抗 100 U/ml penicillin and 100 mg/mL streptomycin（同第三部分，实验六）
- 热灭活胎牛血清 heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)（同第三部分，实验六）
- PBS 磷酸盐缓冲液（同第三部分，实验六）
- 含 0.1% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶溶液（同第三部分，实验六）

- Corning® 25cm² 细胞培养瓶, Corning® 24 孔细胞培养板 (同第三部分, 实验六)
- Transwell 小室 (同第三部分, 实验六)
- α -MEM 细胞培养基 (同第三部分, 实验六)
- Endothelial Cell Growth Medium BulletKit™ 内皮细胞培养基套装 (同第三部分, 实验六)
- 结晶紫染色液 (同第三部分, 实验六)
- Western Blot 相关试剂 (同第三部分, 实验七)
- 4%多聚甲醛
- Anti-VEGF α (ab51745, Abcam), anti-PDGF-BB (ab23914, Abcam), anti-SDF-1 (sc-28876, Santa Cruz), anti-TGF- β 1 (sc-146, Santa Cruz), anti- β -actin (Cell Signaling Technology)
- PD098059 (Selleck Chemicals, USA), SB203580 (Selleck Chemicals, USA)
- 垂直流超净细胞工作台
- 恒温含 5%CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Eppendorf 艾本德台式高速离心机 5424R (Eppendorf, German)
- 奥林巴斯光学倒置显微镜 OLYMPUS-IX51 (Olympus, Tokyo, Japan)
- 奥林巴斯光学正置显微镜 OLYMPUS-BX61 (Olympus, Tokyo, Japan)
- 伯腾 Epoch R 微孔板分光光度计 (BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA)
- PowerPac™ 基础电泳仪电源, Mini-PROTEAN® Tetra 电泳槽, ChemiDoc™ 成像系统 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- 摇床, 恒温烘箱, 磁力搅拌机

2 方法

2.1 单核细胞的培养与硅化胶原支架材料的刺激

同第三部分, 实验七。

通路抑制部分, 在进行硅化胶原支架材料刺激时, 分别向浸提液中加入 PD098059 (ERK 抑制剂) 或 SB203580 (P38 抑制剂), 浓度按照生产厂家说明书推荐用量使用。

2.2 单核细胞 TRAP 染色

同第三部分，实验七。

2.3 Western Blot

同第三部分，实验七。

2.4 BMSC/EPC 细胞 Transwell 迁移实验

同第三部分，实验七。

2.5 血管内皮前体细胞的 EPCs 血管生成实验

同第三部分，实验七。

2.6 统计分析

同第一部分，实验一。

3 结果与讨论

我们首先对小鼠来源的单核细胞进行了培养，使用仿生纤维内硅化胶原支架材料进行了刺激，于刺激后 0 分钟（未刺激）、10 分钟、20 分钟、30 分钟和 60 分钟时分别提取其蛋白，通过 Western Blot 技术对其相关分子信号通路进行检测。本实验中，我们对单核细胞 MAPK 相关的 3 个主要信号转导通路进行了检测，即分别检测了 P38，ERK1/2 以及 JNK 的磷酸化水平。

结果显示（图 9-1），在硅化胶原支架的作用下，单核细胞的 P38 蛋白出现了明显的磷酸化，在材料作用 10 分钟时，即发生了磷酸化的改变，且随材料作用时间延长 P38 磷酸化水平持续升高，在作用 30 分钟时达到峰值，在 60 分钟时可见 P38 磷酸化水平开始减退；ERK1/2 蛋白也在硅化胶原支架的作用下出现了磷酸化改变，在材料作用 10 分钟时即发生了明显的磷酸化改变，并在 20 分钟时持续升高，并达到峰值，而在 30 分钟时，其磷酸化水平开始减退，60 分钟时，基本消失；我们检测了 JNK 蛋白，在硅化胶原支架作用的 60 分钟时间里，其 JNK2 编码蛋白（Tyr185）的磷酸化水平没有发生改变，与作用 0 分钟时相比，在材料作用 10、20、30、60 分钟时均没有发生变化，说明仿生纤维内硅化胶原支架材料并没有引起 JNK 磷酸化水平的改变。

结果说明，P38 蛋白和 ERK1/2 蛋白参与了单核细胞对仿生纤维内硅化胶原支架

材料刺激时的应答反应。我们拟继续对这两个信号转导通路进行相关探索，以研究其与单核细胞在硅化胶原支架材料作用下发生的分化和分泌功能改变之间的联系。

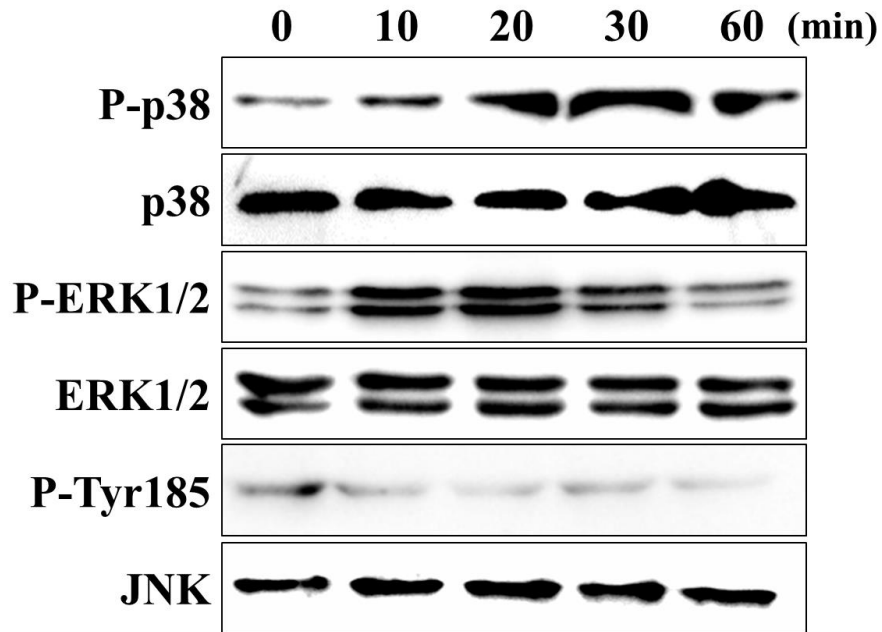


图 9-1 仿生纤维内硅化胶原支架对单核细胞在 MAPK 信号通路的活化情况

我们在接下来的实验中采用了 ERK1/2 的抑制剂 PD098059 (PD) 和 P38 的抑制剂 SB203580 (SB) 对硅化胶原支架材料作用于单核细胞的进程进行干预，以进一步确认这两个信号转导通路在材料促进单核细胞分化和分泌功能方面的影响。

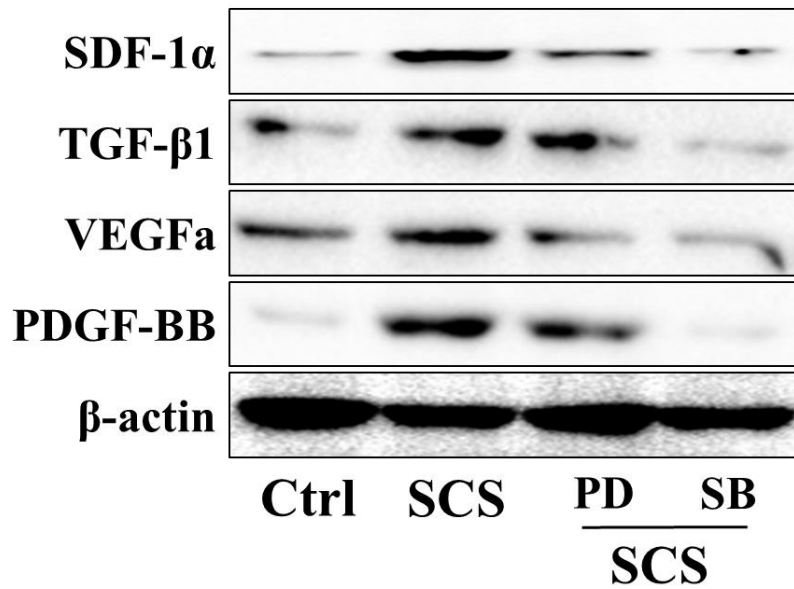


图 9-2 ERK1/2 和 P38 通路对单核细胞分泌趋化因子的影响 (Western Blot 结果)

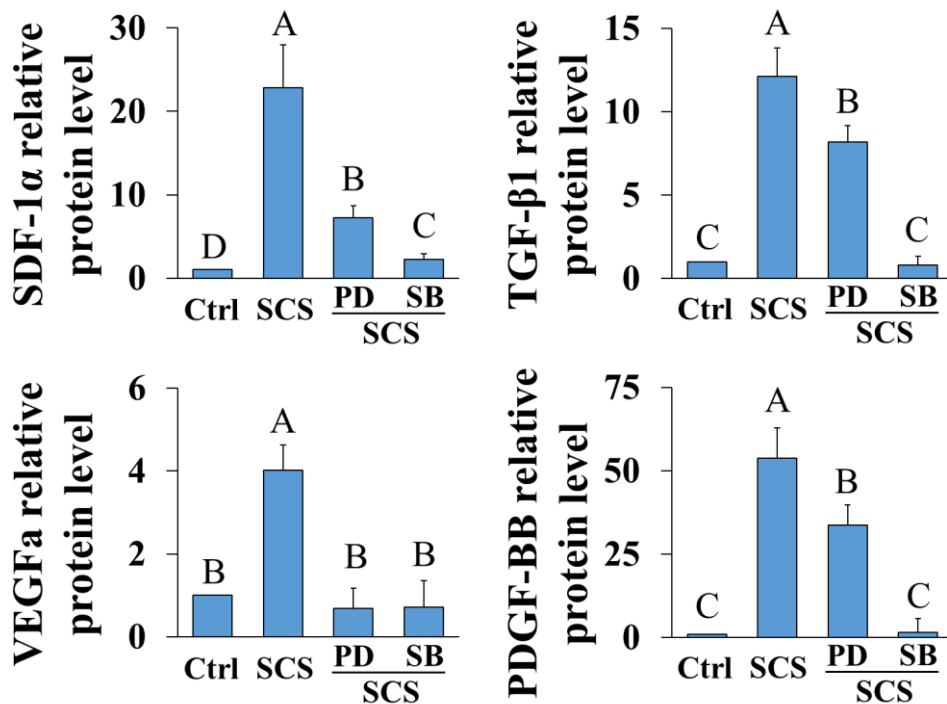


图 9-3 ERK1/2 和 P38 通路对单核细胞分泌趋化因子的影响 (Western Blot 结果定量分析)

我们首先通过 Western Blot 技术对单核细胞在硅化胶原支架材料 (SCS) 作用下 (刺激 3 小时) 的分泌情况进行了检测, 并分别对 ERK1/2 和 P38 进行了阻断 (图

9-2)。结果表明,在硅化胶原支架材料的作用下,单核细胞相关细胞因子(VEGF α , PDGF-BB, SDF-1 α , TGF- β 1)在蛋白水平的表达均出现了明显增高(图 9-3)。其中 SDF-1 α 的表达在应用 ERK1/2 抑制剂后出现了明显的下降,其表达水平要明显低于 SCS 组 ($p < 0.05$),但要高于 Ctrl 对照组 ($p < 0.05$),而在应用 P38 抑制剂后,其表达水平进一步降低,要低于 SCS+PD 组 ($p < 0.05$),高于 Ctrl 对照组 ($p < 0.05$)。TGF- β 1 的表达在应用 ERK1/2 抑制剂后出现了明显的下降,其表达水平要明显低于 SCS 组 ($p < 0.05$),而在应用 P38 抑制剂后,其表达水平进一步降低,要低于 SCS+PD 组 ($p < 0.05$),与 Ctrl 对照组相比没有统计学差异 ($p > 0.05$)。VEGF α 的表达在应用 ERK1/2 抑制剂和 P38 抑制剂后均出现了明显的下降,两组的表达水平均要明显低于 SCS 组 ($p < 0.05$),而其表达水平两者之间相比没有统计学差异 ($p > 0.05$),且均与 Ctrl 对照组相比没有统计学差异 ($p > 0.05$)。PDGF-BB 的表达在应用 ERK1/2 抑制剂后出现了明显的下降,其表达水平要明显低于 SCS 组 ($p < 0.05$),而在应用 P38 抑制剂后,其表达水平进一步降低,要低于 SCS+PD 组 ($p < 0.05$),与 Ctrl 对照组相比没有统计学差异 ($p > 0.05$)。

以上实验结果表明,在参与仿生纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞分泌功能影响的分子信号通路中,P38 和 ERK1/2 均对 VEGF α , PDGF-BB, SDF-1 α , TGF- β 1 的表达产生了影响,其中当 ERK1/2 被抑制后,PDGF-BB, SDF-1 α , TGF- β 1 的表达水平均出现下降,而当 P38 被抑制后,VEGF α , PDGF-BB, SDF-1 α , TGF- β 1 四个细胞因子的表达均出现了明显的下降,其中 VEGF α , PDGF-BB 和 TGF- β 1 下降至阴性对照组水平,说明了 P38 信号转导通路可能在参与单核细胞对硅化胶原支架应答的调控中起到了相对主要的作用。

我们随后继续对单核细胞在硅化胶原支架材料(SCS)作用下(刺激 12 小时)向 TRAP 阳性的单个核细胞分化情况进行了检测,并分别对 ERK1/2 和 P38 进行了阻断。实验结果显示(图 9-4),单核细胞在硅化胶原支架材料的作用下,明显发生了向 TRAP 阳性单个核细胞的分化情况,而当应用了 ERK1/2 抑制剂后,其分化的水平出现了下降,要低于 SCS 组 ($p < 0.05$),但仍要高于 Ctrl 组 ($p < 0.05$);而当应用了 P38 抑制剂后,其分化水平则出现了更加明显的下降,不仅低于 SCS 组和 SCS+PD 组 ($p < 0.05$),其分化水平仅与 Ctrl 对照组持平,两者之间无统计学差异(p 大于 0.05)。以上实验结果说明了单核细胞在硅化胶原支架材料作用下向 TRAP 阳性单个核细胞

分化的过程中，P38 和 ERK1/2 两个信号转导通路均起到了一定的作用，而 P38 在对其分化进程的影响更加重要，当 P38 的活化被抑制后，硅化胶原支架材料促进单核细胞分化的作用即消失。

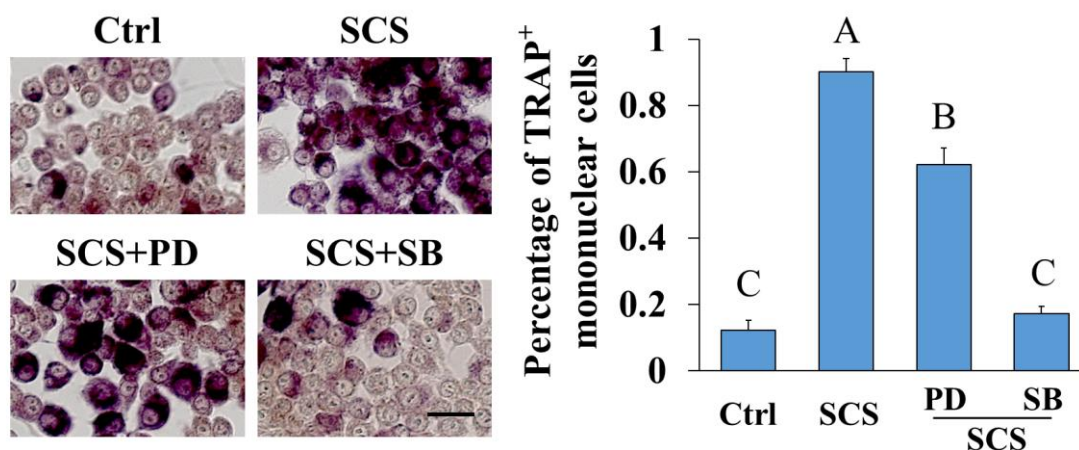


图 9-4 ERK1/2 和 P38 通路对单核细胞分化为 TRAP 阳性单个核细胞的影响

图中紫色深染部分的单个核的细胞为 TRAP 阳性的单核细胞；标尺=50 μ m。

我们随后继续对单核细胞在硅化胶原支架材料（SCS）作用下（刺激 12 小时）的条件培养基进行了收集，并分别在刺激时对 ERK1/2 和 P38 进行了阻断。随后我们使用该条件培养基对骨髓间充质干细胞 BMSCs 和血管内皮前体细胞 EPCs 进行了诱导，通过 Transwell 细胞迁移实验对其细胞迁移的能力进行了检测。

实验结果显示（图 9-5），当使用单核细胞在硅化胶原支架材料（SCS）作用下（刺激 3 小时）的条件培养基进行诱导时，BMSCs 和 EPCs 的细胞迁移出现了明显的增长，其迁移细胞的数量要明显高于 Ctrl 对照组（ $p < 0.05$ ）。而当使用了 ERK1/2 抑制剂后，骨髓间充质干细胞 BMSCs 的迁移数量出现了下降，其迁移的细胞数目要低于 SCS 组（ $p < 0.05$ ），当使用了 P38 抑制剂后，骨髓间充质干细胞 BMSCs 的迁移数量出现了更为明显的下降，其迁移的细胞数目要低于 SCS+PD 组（ $p < 0.05$ ），但两组的迁移细胞数量均要高于 Ctrl 对照组（ $p < 0.05$ ）。血管内皮前体细胞 EPCs 的迁移情况在使用添加了抑制剂的培养基刺激后也出现了类似的情况，当使用了 ERK1/2 抑制剂后，EPCs 的迁移数量出现了下降，其迁移的细胞数目要低于 SCS 组（ $p < 0.05$ ），当使用了 P38 抑制剂后，EPCs 的迁移数量出现了更为明显的下降，其迁移的细胞数

目要低于 SCS+PD 组($p<0.05$),但两组的迁移细胞数量均要高于 Ctrl 对照组($p<0.05$)。

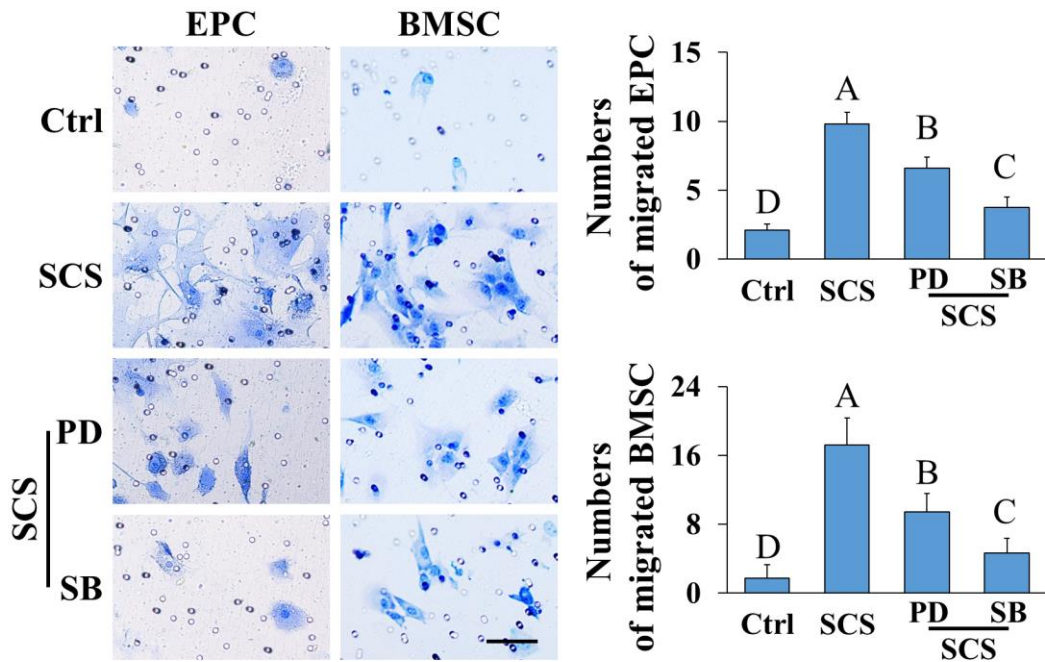


图 9-5 ERK1/2 和 P38 通路对单核细胞促 BMSCs/EPCs 迁移的影响
(标尺=100 μ m)

以上的实验结果表明,在单核细胞的相关信号转导通路(ERK1/2 和 P38)被抑制后,其促进 BMSCs/EPCs 迁移的能力出现了下降。我们认为这和通路抑制后,单核细胞促进细胞迁移的相关细胞因子(PDGF-BB, SDF-1 α , TGF- β 1)的分泌下降有关。而在这其中,P38 通路抑制后迁移细胞数量的下降更为明显,一方面说明了 P38 通路在材料促进单核细胞的趋化因子分泌方面起着更主要的作用,另一方面也说明了当 P38 通路被抑制后,单核细胞促进细胞归巢能力出现了下降。

我们随后通过 Matrigel 血管生成实验观察 ERK1/2 和 P38 通路对单核细胞促血管生成能力的影响。

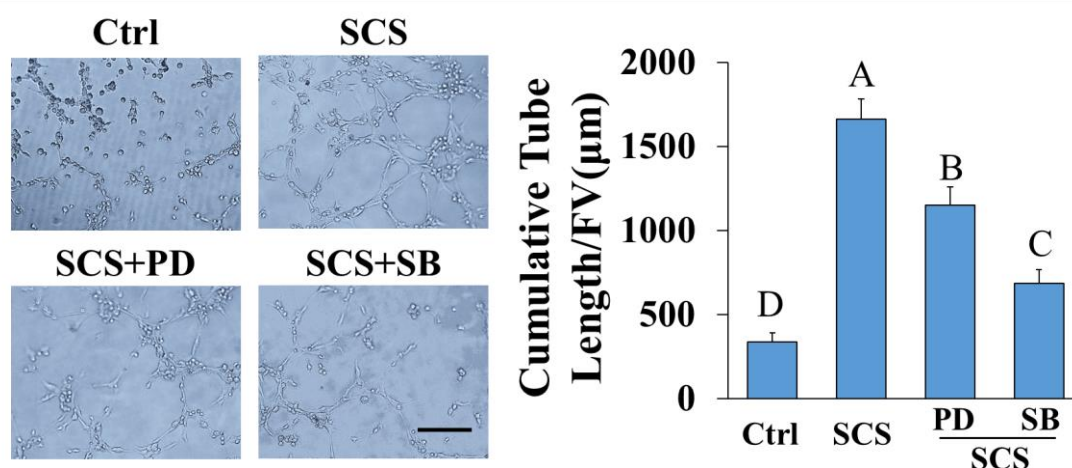


图 9-6 ERK1/2 和 P38 通路对单核细胞促血管生成的影响
(标尺=100µm)

实验结果显示(图 9-6),当使用单核细胞在硅化胶原支架材料(SCS)作用下(刺激 12 小时)的条件培养基进行诱导时, EPCs 的血管生成出现了明显的增长,其生成的血管长度要明显高于 Ctrl 对照组($p<0.05$)。而当使用了 ERK1/2 抑制剂后, EPCs 的血管生成出现了下降,其生成的血管长度要低于 SCS 组($p<0.05$),当使用了 P38 抑制剂后, EPCs 的血管生成出现了更为明显的下降,其生成的血管长度要低于 SCS+PD 组($p<0.05$),但两组的迁移细胞数量均要高于 Ctrl 对照组($p<0.05$)。

以上的实验结果表明,在单核细胞的相关信号转导通路(ERK1/2 和 P38)被抑制后,其在仿生纤维内硅化胶原支架材料作用下的条件培养基促进 EPCs 生成的血管长度出现了下降。我们认为这和通路抑制后,单核细胞促进血管化的相关细胞因子(VEGF α , PDGF-BB, SDF-1 α , TGF- β 1)的分泌下降有关。而在这其中, P38 抑制后形成血管长度的下降更为明显,一方面说明了 P38 在对单核细胞的相关细胞因子的分泌方面有着更主要的作用,另一方面也说明了当 P38 通路被抑制后,单核细胞的在参与促进组织血管化方面的能力出现了下降。

4 小结

通过本实验,我们首先发现了 P38 蛋白和 ERK1/2 蛋白参与了单核细胞对仿生纤维内硅化胶原支架材料刺激时的应答反应。结果表明,在参与仿生纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞分泌功能影响的分子信号通路中, P38 和 ERK1/2 均对 VEGF α , PDGF-BB, SDF-1 α , TGF- β 1 的表达产生了影响。此外,我们还发现单核细胞在硅

化胶原支架材料作用下向 TRAP 阳性单个核细胞分化的过程中, P38 和 ERK1/2 两个信号转导通路均起到了一定的作用, 而 P38 在对其分化进程的影响更加重要。而在单核细胞的相关信号转导通路 (ERK1/2 和 P38) 被抑制后, 其在仿生纤维内硅化胶原支架材料作用下的条件培养基促进 BMSCs/EPCs 迁移的能力出现了下降, 同时在材料作用下的条件培养基促进 EPCs 生成的血管长度也出现了下降。

实验十 仿生纤维内硅化胶原支架促大鼠股骨缺损血管化和骨再生的实验研究

在第二部分实验研究中，我们建立了小鼠颅骨缺损的动物模型，并使用仿生纤维内硅化胶原支架材料进行了修复。我们的研究结果显示，硅化胶原支架材料能够促进小鼠骨缺损的修复重建；同时我们发现硅化胶原支架材料能够通过调控单核细胞的调控，实现缺损区域内更好的血管化，并向宿主募集更多参与重建修复的种子细胞，从而促进骨缺损的快速修复。我们拟在本部分研究中，通过大鼠股骨部分缺损的动物模型对材料进行检验，一方面验证硅化胶原支架材料在不同的骨缺损模型，尤其是承重骨的缺损修复方面的效果，另一方面验证 P38 和 ERK1/2 信号转导通路在材料体内修复进程中的影响。

在本实验中，我们首先建立大鼠股骨部分缺损模型，并使用仿生纤维内硅化胶原支架材料进行缺损的修复，对其修复 1 个月后的效果进行研究测定。通过 Micro-CT 技术对修复后的骨缺损进行扫描并分析，观察其修复后的骨组织再生情况；通过未脱钙组织切片的组织学染色，观察骨重建修复的效果；通过脱钙组织的石蜡切片免疫组织化学染色技术，对硅化胶原支架材料修复后缺损区域内的血管化程度和自体干细胞数量进行评估。

1 材料与仪器

- 仿生纤维内硅化胶原支架材料（制备同第一部分，实验一）
- 雄性 3 月龄 SD 大鼠（购自第四军医大学动物实验中心，SPF 级环境饲养，常规给予食水，所有的动物实验均经第四军医大学动物管理使用委员会批准，并符合国家健康机构实验动物应用指导的规范，所有的实验操作均遵照受批准的指导与条例进行）。
- 无菌动物手术盒（同第二部分，实验三）
- PD098059（同第四部分，实验一），SB203580（同第四部分，实验一）
- 世新 STRONG 90 慢速牙科手机（同第二部分，实验三），700#牙科裂钻

- 10%中性缓冲福尔马林
- 5% EDTA 脱钙液
- Van Geison 染色液, Masson 三色染色液。
- 山羊血清 (同第二部分, 实验五)
- Anti-nestin (同第二部分, 实验五), anti-VEGFa (ab1316, Abcam), anti-SDF-1 (ab9797, Abcam), anti-CD31 (sc-28188, Santa Cruz)。
- 辣根过氧化物酶标记二抗, peroxidase-conjugated secondary antibody (同第二部分, 实验五)
- 3,3-diaminobenzidine 溶液 (同第二部分, 实验五)
- 苏木素染液 (碧云天, 中国)
- 封片用中性树胶, 二甲苯, 无水乙醇
- 西门子 Micro-CT 活体成像系统 Inveon micro-CT system (同第二部分, 实验三)
- Image-Pro Plus software 数据分析软件 (同第二部分, 实验三)
- Leica EM UC7 超薄切片机 (同第二部分, 实验三)
- 莱卡 Leica RM2235 石蜡切片机 (同第二部分, 实验五)
- 奥林巴斯光学正置显微镜 OLYMPUS-BX61 (同第二部分, 实验三)

2 方法

2.1 大鼠股骨部分缺损模型的建立以及硅化胶原支架植入修复

将仿生纤维内硅化胶原支架材料切成长宽高约 $3 \times 3 \times 2\text{mm}$ 的立方体形状 ($n=36$), 钴-60 放射线照射消毒灭菌后, 浸泡在 PBS 磷酸盐缓冲液中备用。

取 3 月龄健康雄性 SD 大鼠, 给予 1% 戊巴比妥钠注射麻醉 (每公斤体重 10mL 用量)。待麻醉完全后, 胸腹向下固定于手术板上, 剃刀剔去双侧下肢及背部下方毛发, 常规消毒铺巾。用手术刀于双侧股骨表层分别切开一纵向长约 8mm 的切口, 向下分离皮下组织及肌肉, 股骨。用慢速涡轮手机连接 700#裂钻, 在股骨中端磨切一长约 5mm, 深约 3mm 的洞, 使股骨部分离断。实验组中, 将准备好的硅化胶原支架材料置入缺损区域; 在阴性对照组中, 缺损区域不放置任何修复材料 (每组大鼠 $n=12$)。常规缝合切口, 消毒。待大鼠苏醒后放回笼中饲养, 常规给予食水, 每日观察记录健康状况。对于应用抑制剂的大鼠, 每周于缺损区肌肉注射给药 1 次, 给药

剂量为：PD098059（15mg/kg 体重，每侧），SB203580（1mg/kg 体重，每侧）。

2.2 大鼠股骨 Micro-CT 扫描实验

在手术后 1 个月时处死大鼠，分离双侧股骨，使用 10% 中性缓冲福尔马林固定。将固定 24 小时后的股骨标本固定于扫描装置上，进行 CT 扫描（精度为 20 μ m）。扫描参数：80 keV and 500 mA。扫描完成后，约 20 μ m 厚的二维平面图像通过 inveon 数据分析系统进行三维重建。

将重建完成后的图像数据通过 Siemens Inveon Analysis 分析软件对其进行数据分析。选定缺损区域为中心，长宽高分别为 5 \times 5 \times 7 毫米的区域作为分析区域，确定阈值后，测定区域内的新骨形成面积（bone volume/total volume, BV/TV）和骨密度（bone mineral density, BMD）。

2.3 大鼠股骨未脱钙硬组织切片的制作

大鼠股骨在完成 Micro-CT 扫描后，取一半的样本（n=6）流水冲洗，浸入无水乙醇中，每 4 小时更换无水乙醇一次，共换液 6 次（于 24 小时内完成）。将脱水后的标本浸入 MMA（甲酯甲基丙烯）介质中，每隔 1 小时更换 1 次介质，总计更换 5 次。

将浸渗后的标本放入玻璃瓶内，注入包埋介质，用带通气孔的盖子盖紧，置于 50 $^{\circ}$ C 的热水中 1 小时，随后将水温调至 37 $^{\circ}$ C，恒温保持 24 小时使包埋块硬化。随后打开容器，取出包埋块，完成包埋。

用带齿粗锉修正包埋标本块，使其露出组织切面，随后将修整完成的标本块置于切片机上固定，首先进行粗旋，暴露出需要分析的股骨缺损部位，随后进行细切，切片的厚度以 4-6 μ m 为宜。随后将切片粘至载玻片上，准备进行下一步的观察以及染色操作。

2.4 大鼠股骨未脱钙硬组织切片的组织学染色

Van Geison 染色方法同第二部分，实验三。

立春红三色染色按试剂盒生产厂家提供的说明书内建议的步骤和试剂用量进行染色，染色完成后常规脱水，封片，于正置显微镜下观察拍照，并应用 Image Pro Plus 软件进行数据分析。

2.5 大鼠股骨石蜡切片的制作

实验方法同第二部分，实验五。

2.6 大鼠股骨石蜡切片的免疫组织化学染色

实验方法与步骤同第二部分，实验五。

在本实验中所用到的一抗为：Anti-nestin（同第二部分，实验五），anti-VEGF α （ab1316, Abcam），anti-SDF-1（ab9797, Abcam），anti-CD31（sc-28188, Santa Cruz）。在 CD31 染色完成后，每张切片（每组 n=6）于 400 倍镜下随机选取 5 个视野进行观察拍照，进行微血管计数。微血管以镜下胞质内有 DAB 着色的细胞为血管内皮细胞阳性判断标准，数个集聚在一起的着色细胞计为一个微血管，直径大于 50 μ m 的着色细胞集落或有肌细胞层的成熟血管组织则不计数。

2.7 统计分析

同第一部分，实验一。

3 结果与讨论

我们通过对大鼠股骨部分缺损模型应用仿生纤维内硅化胶原支架材料进行修复，并分别给予了 ERK1/2 和 P38 抑制剂，以观察相关信号转导通路的激活在硅化胶原支架材料参与骨缺损的修复重建过程中的影响。在修复后 1 个月时，我们即取材进行了 Micro-CT 检测（每组 n=12）。实验结果显示（图 10-1），与阴性对照组相比，硅化胶原支架材料能够明显的促进大鼠股骨缺损的修复，其新骨形成的体积与平均骨密度均明显高于阴性对照组（ $p<0.05$ ），其中新生的骨体积与未手术的空白对照组相比无统计学差异（ $p>0.05$ ）。在使用了 ERK1/2 抑制剂后，大鼠的新生骨体积要略低于 SCS 组，但两组之间无统计学差异（ $p>0.05$ ），其平均骨密度则低于 SCS 组（ $p<0.05$ ）。在使用了 P38 抑制剂后，大鼠的新生骨体积和骨密度均出现了明显的下降，和 NC 组相比无统计学差异（ $p>0.05$ ），两者均要明显低于 SCS 组和 SCS+PD 组（ $p<0.05$ ）。

以上实验结果表明，在 SCS 参与修复的大鼠股骨缺损重建的过程中，P38 信号转导通路在修复早期（修复后 1 个月时），对骨组织的重建再生起到了关键的作用，当 P38 被抑制后，硅化胶原支架对骨组织再生的促进作用消失。而 ERK1/2 信号转导

通路也参与到了早期的骨缺损修复当中，当其被抑制后，SCS 促进成骨的程度也出现了降低（平均骨密度减少）。

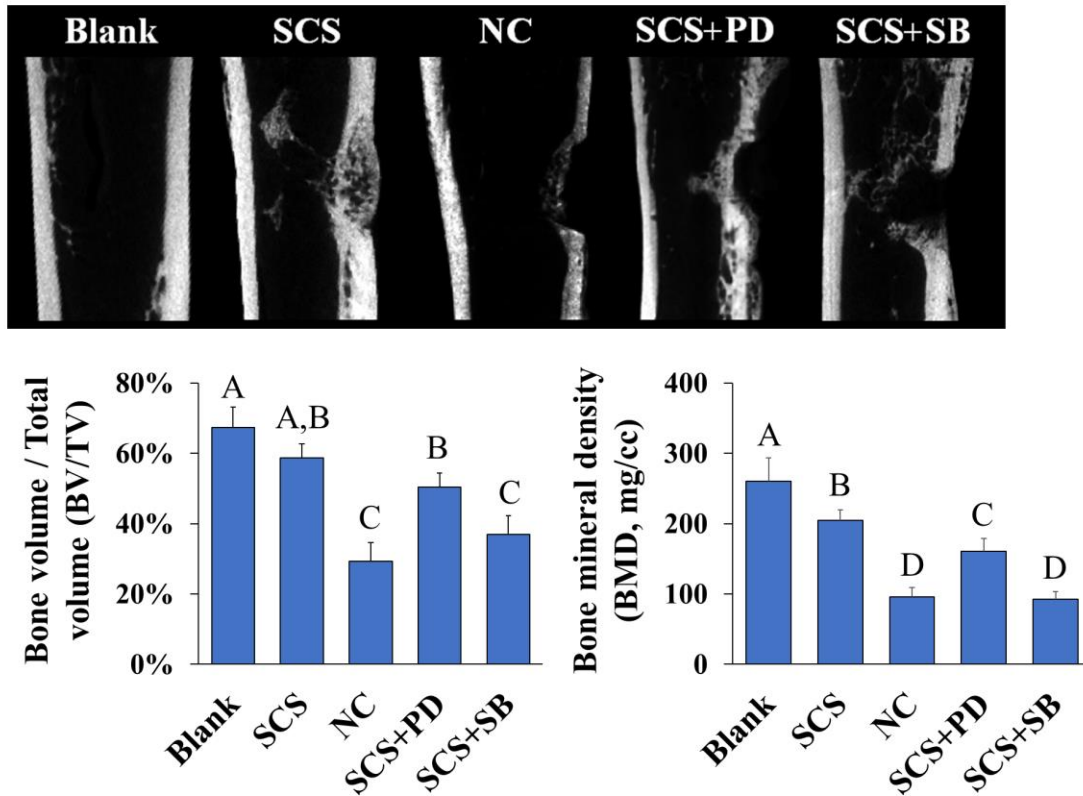


图 10-1 大鼠股骨部分缺损模型应用硅化胶原支架修复后 1 个月时的 Micro-CT 检测结果
Blank: 未手术的空白对照组; SCS: 硅化胶原支架修复组; NC: 手术后未修复的阴性对照组; SCS+PD: 硅化胶原支架修复+ERK1/2 抑制剂组; SCS+SB: 硅化胶原支架修复+P38 抑制剂组。

我们随后对经 Micro-CT 扫描后的大鼠股骨标本进行了未脱钙骨组织切片的制作（每组 $n=6$ ），并通过 Van Geison 染色和立春红三色染色实验来对其成骨的效果和成骨进程进行评估。Van Geison 染色的结果显示（图 10-2），硅化胶原支架修复后 1 个月时，大鼠股骨的缺损区域内形成了更多的胶原纤维组织（红色染色部分），对其进行半定量分析后，其阳性区域明显高于 NC 组（ $p<0.05$ ）。在使用了 ERK1/2 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的阳性区域面积和 SCS 组相比，两组之间无统计学差异（ $p>0.05$ ）。在使用了 P38 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的阳性区域面积出现了明显的下降，明显低于 SCS 组和 SCS+PD 组（ $p<0.05$ ），但是要略高于 NC 组（ $p<0.05$ ）。

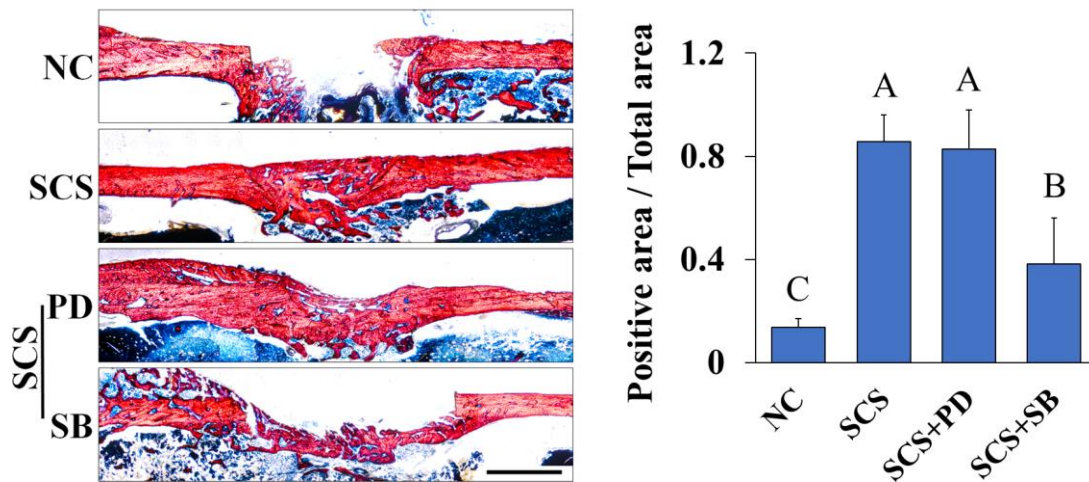


图 10-2 大鼠股骨部分缺损修复后 1 个月时的硬组织切片 Van Geison 染色结果

Blank: 未手术的空白对照组; SCS: 硅化胶原支架修复组; NC: 手术后未修复的阴性对照组; SCS+PD: 硅化胶原支架修复+ERK1/2 抑制剂组; SCS+SB: 硅化胶原支架修复+P38 抑制剂组。
(标尺=1mm)。

我们随后采用立春红三色染色技术对大鼠股骨未脱钙组织切片进行了染色，以观察其骨生成的进度。在立春红三色染色中，成熟的骨基质能够被染成红色，而新生的骨组织则会被染成蓝色，根据区域内不同阶段骨质的量，我们能够大体判断在缺损修复中，其骨重建的进程。结果显示（图 10-3），NC 组中基本无成熟的骨基质表达，其大部分区域内表达的时蓝色的新生骨质，说明在修复后 1 个月时，NC 组的骨重建仍处于较为初始的阶段。SCS 组中的缺损区域内大部分未已经成熟的骨组织，其缺损区域基本为小梁状的骨组织覆盖，局部可见少量的蓝色的新生骨质，说明 SCS 组中已经在修复后 1 个月时基本完成了缺损区域的骨修复重建，其修复后的组织具有较快的骨生成的能力。而应用了 ERK1/2 抑制剂后，我们发现 SCS+PD 组中的红色成熟骨基质和 SCS 组相比基本没有差异，也形成了大量的小梁状骨组织的结构，其中能够看到少量的蓝色新生骨质，说明了 ERK1/2 抑制后，其骨重建的进程并没有受到影响。而当应用了 P38 抑制剂后，我们发现 SCS+SB 组中的红色成熟骨基质明显减少，其形成的小梁状的骨组织结构也要明显少于 SCS+PD 和 SCS 组，但是要多余 NC 组，其缺损区域内较多覆盖的是蓝色的新生骨组织，说明了当 P38 抑制后，其骨重建的进程受到了明显的抑制。

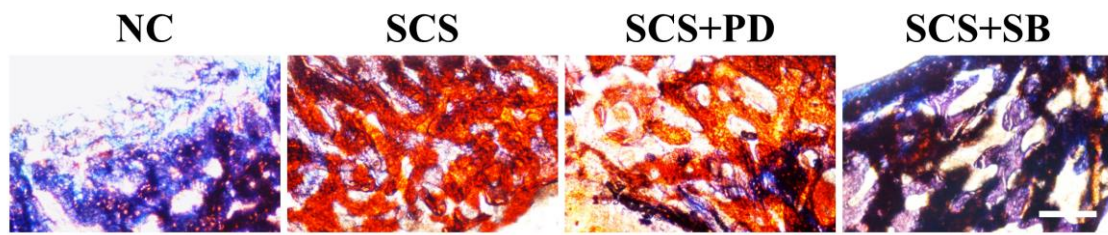


图 10-3 大鼠股骨部分缺损修复后 1 个月时的硬组织切片立春红三色染色结果

Blank: 未手术的空白对照组; SCS: 硅化胶原支架修复组; NC: 手术后未修复的阴性对照组; SCS+PD: 硅化胶原支架修复+ERK1/2 抑制剂组; SCS+SB: 硅化胶原支架修复+P38 抑制剂组。
(标尺=200 μ m)。

除了对骨再生进行定量分析，我们也通过免疫组织化学技术研究了在使用 P38 和 ERK1/2 抑制剂后，缺损区域内的血管化水平的变化。我们首先测定了 CD31 的表达，并对结果进行了微血管计数。实验结果显示（图 10-4），与 NC 组相比，硅化胶原支架修复后的大鼠股骨缺损的组织区域内形成了更多的血管结构，其每视野中的血管计数要明显高于 NC 对照组 ($p < 0.05$)。而使用了 ERK1/2 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的血管数目和 SCS 组相比，两组之间无统计学差异 ($p > 0.05$)。在使用了 P38 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的阳性区域面积出现了明显的下降，明显低于 SCS 组和 SCS+PD 组 ($p < 0.05$)，和 NC 组相比没有统计学差异 ($p > 0.05$)。

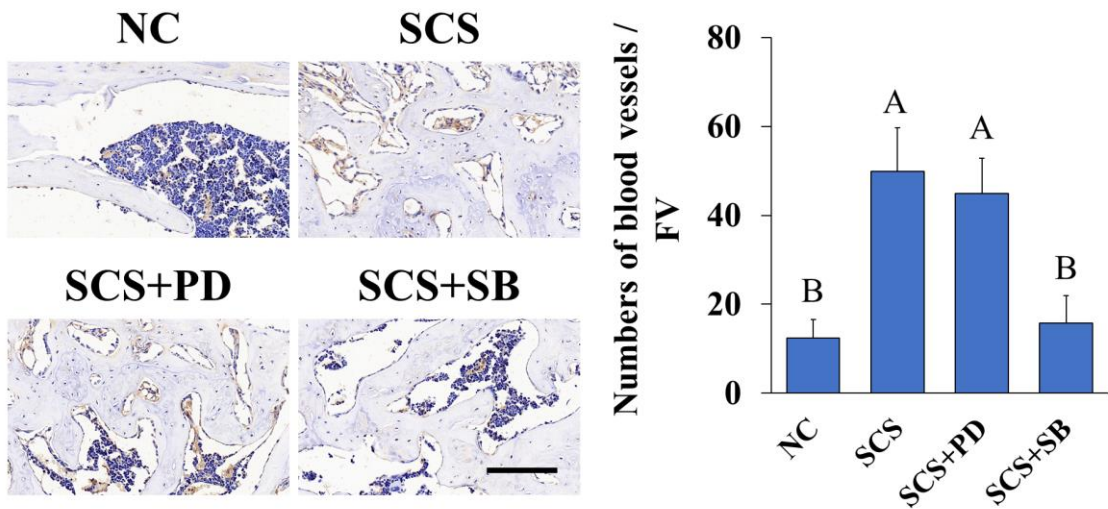


图 10-4 大鼠股骨缺损修复 1 个月时 CD31 染色结果与微血管计数分析

Blank: 未手术的空白对照组; SCS: 硅化胶原支架修复组; NC: 手术后未修复的阴性对照组; SCS+PD: 硅化胶原支架修复+ERK1/2 抑制剂组; SCS+SB: 硅化胶原支架修复+P38 抑制剂组。
(标尺=200 μ m)。

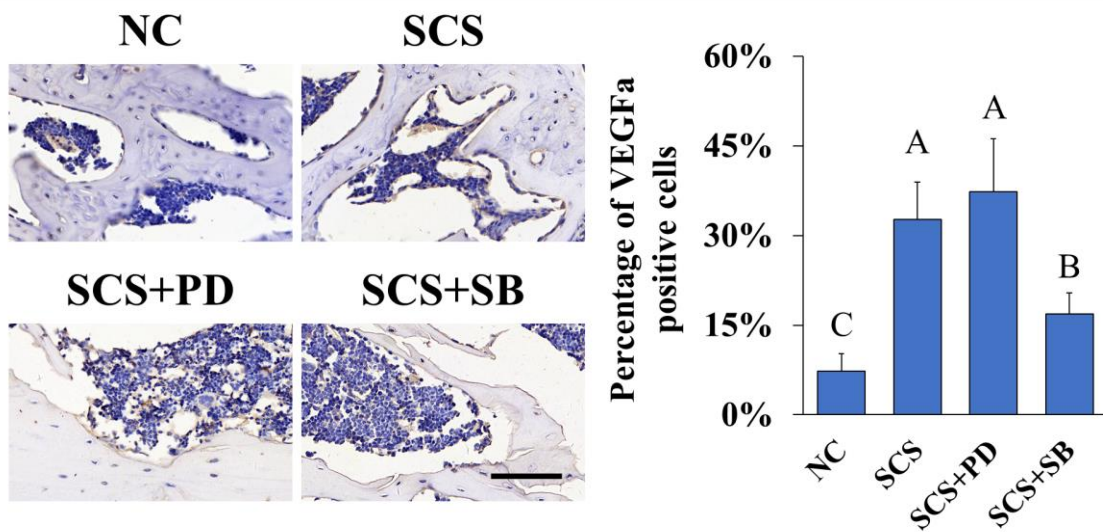


图 10-5 大鼠股骨缺损修复 1 个月时的 VEGF 染色结果与阳性细胞定量分析

Blank: 未手术的空白对照组; SCS: 硅化胶原支架修复组; NC: 手术后未修复的阴性对照组; SCS+PD: 硅化胶原支架修复+ERK1/2 抑制剂组; SCS+SB: 硅化胶原支架修复+P38 抑制剂组。
(标尺=100 μ m)。

我们也对缺损区域内反应血管化能力的细胞因子 VEGFa 的表达进行了测定。结果显示（图 10-5），与 NC 组相比，硅化胶原支架修复后的大鼠股骨缺损的组织区域内有更多的 VEGFa 的表达，其 VEGFa 阳性的细胞比例要明显高于 NC 对照组（ $p<0.05$ ）。而使用了 ERK1/2 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的 VEGFa 表达水平和 SCS 组相比，两组之间无统计学差异（ $p>0.05$ ）。在使用了 P38 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的 VEGFa 表达水平出现了明显的下降，明显低于 SCS 组和 SCS+PD 组（ $p<0.05$ ），但其表达要略高于 NC 组（ $p<0.05$ ）。

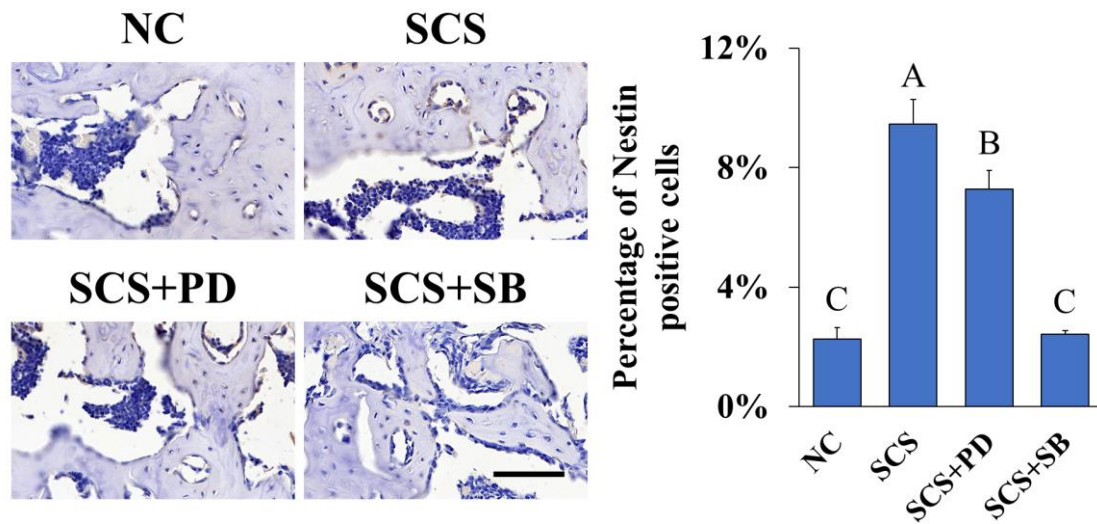


图 10-6 大鼠股骨缺损修复 1 个月时的 Nestin 染色结果与阳性细胞定量分析

Blank: 未手术的空白对照组；SCS: 硅化胶原支架修复组；NC: 手术后未修复的阴性对照组；SCS+PD: 硅化胶原支架修复+ERK1/2 抑制剂组；SCS+SB: 硅化胶原支架修复+P38 抑制剂组。（标尺=100 μ m）。

我们也对 Nestin 阳性间充质干细胞的分布及数量进行了检测。结果显示（图 10-6），与 NC 组相比，硅化胶原支架修复后的大鼠股骨缺损的组织区域内有更多的 Nestin 的表达，其 Nestin 阳性的细胞比例要明显高于 NC 对照组（ $p<0.05$ ）。而使用了 ERK1/2 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的 Nestin 表达水平和 SCS 组相比要略有降低（ $p<0.05$ ）。在使用了 P38 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的 Nestin 表达水平出现了明显的下降，明显低于 SCS 组和 SCS+PD 组（ $p<0.05$ ），

和 NC 组相比没有统计学差异 ($p>0.05$)。

体内实验的结果表明 ERK1/2 抑制剂并没有影响到大鼠股骨缺损区域的 VEGF 的表达,而在实验九的体外实验中,我们发现在 ERK1/2 抑制后,单核细胞的 VEGF 表达也受到了明显的抑制。我们认为出现这种结果的原因为体内实验中,虽然单核细胞分泌的 VEGF 水平受到了抑制,但是参与局部组织修复重建的整体细胞网络以及信号分子调控网络能够在 ERK1/2 受到抑制时,通过对参与其中的其他分泌细胞相关信号转导通路进行调控,从而在整体上维持了 VEGF 在局部的表达水平。我们也拟在后续的实验研究中,对 ERK1/2 信号转导通路在硅化胶原支架材料参与骨缺损修复进程中所扮演的角色进行进一步的研究。

以上实验结果表明,仿生纤维内硅化胶原支架材料能够明显的促进大鼠股骨缺损修复时的血管化,而 P38 是参与其血管化进程的重要信号转导通路,当 P38 受到抑制后,其促进血管化的能力明显降低;而 ERK1/2 抑制后,微血管计数和 VEGFa 的表达水平均没有发生改变,说明 ERK1/2 并没有对其血管化的进程产生影响。P38 和 ERK1/2 对缺损修复区域内以 Nestin 为表面标志物的骨髓间充质干细胞的数目均有影响,其中 P38 抑制后, BMSCs 的数目明显减少,说明了 P38 也参与到了 SCS 促进细胞归巢的进程中。

4 小结

通过本部分实验,我们验证了仿生纤维内硅化胶原支架材料能够促进承重骨的缺损修复,即能够明显的促进大鼠股骨部分缺损模型的骨重建。实验结果显示,硅化胶原支架能够促进早期的骨生成和血管化。而 P38 是参与硅化胶原支架促进成骨成血管的关键信号转导通路,当 P38 被抑制后,硅化胶原支架促进成骨和成血管能力受到了明显的抑制。此外,ERK1/2 也在硅化胶原支架促进成骨的体内实验中产生了影响,当 ERK1/2 被抑制后,缺损区域内的骨生成水平略有降低。

实验十一 仿生纤维内硅化胶原支架调控单核细胞促进大鼠股骨缺损修复的机制研究

通过前面的实验,我们验证了 P38 信号转导通路和 ERK1/2 信号转导通路在仿生纤维内硅化胶原支架材料促进大鼠股骨缺损修复中的作用。我们认为 P38 是调控硅化胶原支架促进缺损修复的关键因子,当给予大鼠局部 P38 抑制剂后,硅化胶原支架促进成骨和成血管的能力明显发生了下降;而 ERK1/2 也参与到了相关的成骨进程中。我们拟在本实验中,进一步对应用 P38 和 ERK1/2 抑制剂后,大鼠股骨缺损修复进程中的单核细胞的状态进行相关的检测,来观察抑制相关信号转导通路后单核细胞的分化和分泌功能受到了怎样的影响,以验证我们之前得出的结论,即硅化胶原支架材料通过对单核细胞的调控促进细胞募集,血管化和骨组织重建。

1 材料与仪器

- 大鼠股骨部分缺损模型的组织标本(来源于第四部分,实验十)
- 10%中性缓冲福尔马林
- 5% EDTA 脱钙液
- Anti-CD14(同第二部分,实验五), anti-PDGF-BB(同第二部分,实验五), anti-TRAP(同第二部分,实验五), anti-CD31(sc-28188, Santa Cruz), anti-Emcn(同第二部分,实验五)。
- Alexa Fluor 488 绿色荧光标记二抗, Alexa Fluor 594 红色荧光标记二抗(同第二部分,实验五)
- DAPI 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(同第二部分,实验五)
- 抗荧光淬灭封片剂,二甲苯,无水乙醇
- 莱卡 Leica RM2235 石蜡切片机(同第二部分,实验五)
- 奥林巴斯三通道倒置荧光显微镜(同第二部分,实验五)

2 方法

2.1 大鼠股骨标本石蜡切片的制作

同第二部分，实验五。

2.2 大鼠股骨标本石蜡切片的免疫荧光双标染色

同第二部分，实验五。

2.3 统计分析

同第一部分，实验一。

3 结果与讨论

我们对大鼠股骨标本进行了脱钙处理后，制作了石蜡切片，并通过免疫荧光双标技术对硅化胶原支架修复后的缺损区域内的单核细胞进行检测，以观察在 P38 和 ERK1/2 受到抑制后，缺损区域内单核细胞状态的改变。

实验结果显示（图 11-1），与 NC 组相比，硅化胶原支架修复后的大鼠股骨缺损的组织区域内出现了更多的 TRAP 阳性的单核细胞，其 TRAP 阳性的单核细胞数量比例要明显高于 NC 对照组（ $p < 0.05$ ）。而使用了 ERK1/2 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的 TRAP 阳性的单核细胞数量和 SCS 组相比，两组之间无统计学差异（ $p > 0.05$ ）。在使用了 P38 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的 TRAP 阳性的单核细胞数量出现了明显的下降，明显低于 SCS 组和 SCS+PD 组（ $p < 0.05$ ），与 NC 组相比没有统计学差异（ $p > 0.05$ ）。

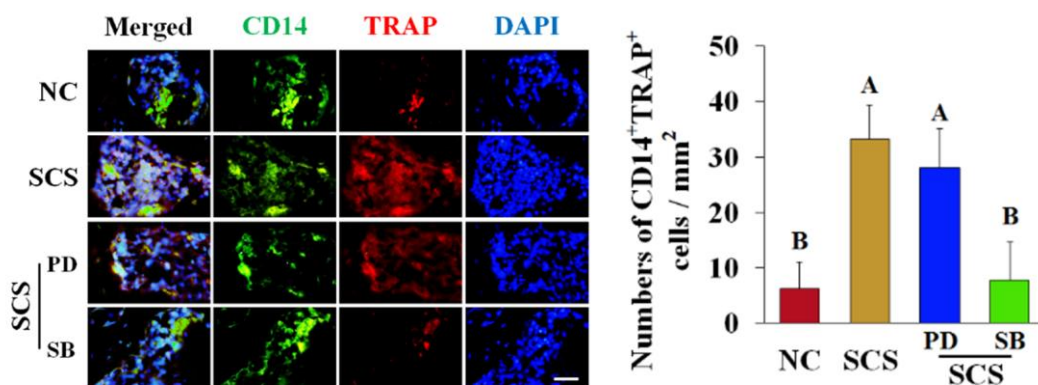


图 11-1 大鼠颅骨缺损修复 1 个月时的免疫荧光染色结果与荧光定量分析

图中绿染部分为 CD14 标记的单核细胞，红色荧光标记为 TRAP，蓝色为 DAPI 染色的细胞核组织。Blank：未手术的空白对照组；SCS：硅化胶原支架修复组；NC：手术后未修复的阴性对照组；SCS+PD：硅化胶原支架修复+ERK1/2 抑制剂组；SCS+SB：硅化胶原支架修复+P38 抑制剂组。（标尺=100 μ m）。

我们随后检测了缺损区域内单核细胞表达 PDGF-BB 的水平。实验结果显示（图 11-2），与 NC 组相比，硅化胶原支架修复后的大鼠股骨缺损的组织区域内单核细胞表达 PDGF-BB 的水平更高，其单核细胞表达 PDGF-BB 的水平要明显高于 NC 对照组（ $p < 0.05$ ）。而使用了 ERK1/2 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内单核细胞表达 PDGF-BB 的水平和 SCS 组相比，两组之间无统计学差异（ $p > 0.05$ ）。在使用了 P38 抑制剂后，SCS 组的大鼠股骨缺损区域内单核细胞表达 PDGF-BB 的水平出现了明显的下降，明显低于 SCS 组和 SCS+PD 组（ $p < 0.05$ ），与 NC 组相比没有统计学差异（ $p > 0.05$ ）。

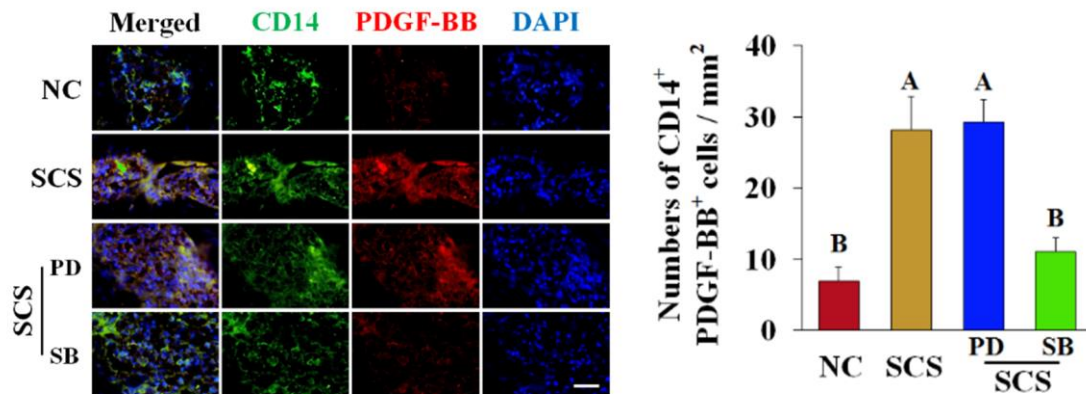


图 11-2 大鼠颅骨缺损修复 1 个月时的免疫荧光染色结果与荧光定量分析

图中绿染部分为 CD14 标记的单核细胞，红色荧光标记为 PDGF-BB，蓝色为 DAPI 染色的细胞核组织。Blank：未手术的空白对照组；SCS：硅化胶原支架修复组；NC：手术后未修复的阴性对照组；SCS+PD：硅化胶原支架修复+ERK1/2 抑制剂组；SCS+SB：硅化胶原支架修复+P38 抑制剂组。（标尺=100 μ m）。

我们随后也进一步对硅化胶原支架修复后的大鼠股骨缺损区域内的 CD31⁺Emcn⁺双阳性血管进行了定量的检测。实验结果显示（图 11-3），与 NC 组相比，硅化胶原支架修复后的大鼠股骨缺损的组织区域内出现了更多的 CD31⁺Emcn⁺双阳性血管，其 CD31⁺Emcn⁺双阳性血管的数量比例要明显高于 NC 对照组（ $p < 0.05$ ）。

而使用了 ERK1/2 抑制剂后, SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的 CD31⁺Emcn⁺双阳性血管的数量和 SCS 组相比, 两组之间无统计学差异 ($p>0.05$)。在使用了 P38 抑制剂后, SCS 组的大鼠股骨缺损区域内的 CD31⁺Emcn⁺双阳性血管的数量出现了明显的下降, 明显低于 SCS 组和 SCS+PD 组 ($p<0.05$), 与 NC 组相比没有统计学差异 ($p>0.05$)。

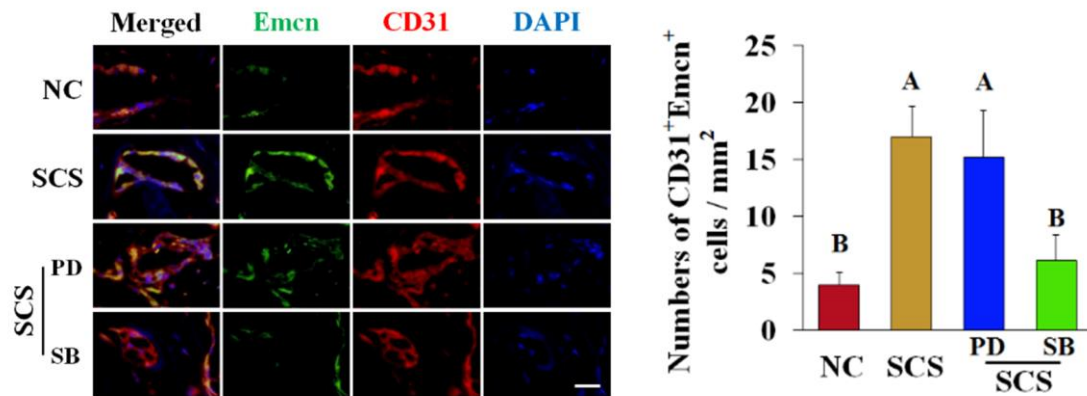


图 11-3 大鼠股骨缺损修复 1 个月时的免疫荧光染色结果与荧光定量分析

图中红染部分为 CD31 标记的血管组织, 绿色荧光标记为 Endomucin 表达的血管组织, 蓝色为 DAPI 染色的细胞核组织。Blank: 未手术的空白对照组; SCS: 硅化胶原支架修复组; NC: 手术后未修复的阴性对照组; SCS+PD: 硅化胶原支架修复+ERK1/2 抑制剂组; SCS+SB: 硅化胶原支架修复+P38 抑制剂组。(标尺=100 μ m)。

以上实验结果表明, 当单核细胞的 P38 信号转导通路受到抑制后, 其分化为 TRAP 阳性单核细胞的能力出现了下降, 这也与我们体外实验的结果一致。同时, 单核细胞分泌 PDGF-BB 的水平也明显降低, 缺损区域内主要由 PDGF-BB 介导的促进成骨成血管联合的 CD31⁺Emcn⁺双阳性血管的数目也明显降低。我们认为正是由于 P38 的抑制导致了单核细胞出现了分化和分泌功能的抑制, 从而对缺损修复初期, 组织的血管化和细胞募集造成了影响, 进而减缓了组织修复的进程。结果说明了仿生纤维内硅化胶原支架材料能够通过激活单核细胞的 P38 信号转导通路来促进单核细胞的分化和分泌功能, 从而促进局部的血管化和宿主种子细胞归巢, 进而实现快速的骨缺损重建修复。

而 ERK1/2 的抑制并未对单核细胞的状态产生影响, 说明了 ERK1/2 可能通过其他方式作用于缺损区域内的骨再生的进程。我们也拟通过后续的研究, 进一步探索 ERK1/2 信号转导通路在硅化胶原支架材料参与骨组织重建修复进程中的作用。

4 小结

综上所述，通过本实验我们发现了仿生纤维内硅化胶原支架材料能够通过激活单核细胞的 P38 信号转导通路来促进单核细胞的分化和分泌功能，从而促进局部的血管化和宿主种子细胞归巢，进而实现快速的骨缺损重建修复。当单核细胞的 P38 受到抑制后，硅化胶原支架对单核细胞分化和分泌功能的调控受到了影响，从而抑制了其促进骨组织重建的进程。而 ERK1/2 对单核细胞的分化和分泌功能没有影响，其可能通过单核细胞以外的其他方式作用于缺损区域内的骨再生的进程。

小 结

通过本研究，我们验证了仿生纤维内硅化胶原支架材料具有良好生物相容性的特点，并通过小鼠颅骨缺损模型和大鼠股骨缺损模型验证了其良好的骨缺损修复的能力。我们也进一步发现仿生纤维内硅化胶原支架材料能够在缺损修复的早期通过激活单核细胞的 P38 信号转导通路，促进单核细胞的分化和分泌功能，从而进一步促进局部血管化进程，并促进宿主种子细胞向缺损区域募集，从而加快骨组织缺损修复的进程。本研究验证了仿生纤维内硅化胶原支架材料作为骨缺损修复替代材料的良好应用潜能，为其进一步的转化研究提供了实验基础和理论支持。

主要实验结果：

1. 仿生纤维内硅化胶原支架材料具有良好的纤维内硅化的效果，能够较好的模拟自然骨组织多分级结构的纤维内矿化的形式，并能够在液体环境中稳定持续地进行硅酸的缓释。
2. 仿生纤维内硅化胶原支架材料具有较低的免疫原性，在异位植入后，不会引起外周血循环中炎症因子与炎症细胞的增加，其植入后组织周边的炎症反应也维持在温和的范围之内，具有较好的生物相容性。
3. 和传统的脱矿骨胶原支架相比，仿生纤维内硅化胶原支架材料表现出更好的骨修复能力，能够快速形成新骨，其新骨的骨量，骨密度均要明显高于脱矿骨胶原支架。同时在材料植入后 3 个月时，硅化胶原支架修复后的骨改建活性也要明显增加，能够在其修复区域内观察到更加活跃的成骨活动。
4. 小鼠颅骨缺损的组织修复过程中，仿生纤维内硅化胶原支架材料能够更好的促进缺损区域局部的血管化。与脱矿骨胶原支架材料 DSS 相比，硅化胶原支架能够在缺损部位形成更多的新生血管，其血管体积、血管平均厚度和血管连接性均要明显高于 DSS。此外，在实现良好血管化的同时，SCS 也能够明显的促进新生骨的形成。
5. 仿生纤维内硅化胶原支架材料能够通过单核细胞的调控，促进其向 TRAP 阳性的单核细胞分化，并分泌更多的 PDGF-BB，从而促进 CD31⁺Emcn⁺亚类血管的增

长，进而促进局部成骨成血管的联合；另一方面，分化后的单核细胞能够分泌更多的 SDF-1, TGF- β 等相关细胞因子，进而进一步促进局部的血管化，以及宿主种子细胞的募集，从而进一步的促进缺损区域的骨改建活性，加快骨缺损修复的进程。

6. 仿生纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞的增殖、凋亡以及细胞内活性氧水平并没有产生影响。此外，仿生纤维内硅化胶原支架材料自身也不能促进 BMSCs/EPCs 的迁移能力。
7. 单核细胞能够在仿生纤维内硅化胶原支架材料的作用下，分化为 TRAP 阳性的单个核细胞，其分化后的分泌功能也发生了明显改变。在材料的作用下，单核细胞能够在转录水平和翻译水平表达更多的相关细胞因子 (VEGF, PDGF-BB, SDF-1, TGF- β)。硅化胶原支架材料对单核细胞的这一作用是其促进血管化和细胞归巢能力，并最终促进骨缺损快速修复的重要影响因素。
8. 在仿生纤维内硅化胶原支架材料的作用下，单核细胞分化为 TRAP 阳性的单个核细胞后，其所表达和分泌增加的相关细胞因子 (SDF-1, TGF- β 和 PDGF-BB) 能够在体外实验中促进骨髓间充质干细胞 BMSCs 和血管内皮前体细胞 EPCs 的细胞归巢能力，此外单核细胞分泌增加的相关细胞因子 (VEGF, SDF-1, TGF- β 和 PDGF-BB) 还能够促进血管内皮前体细胞 EPCs 的成血管的能力。
9. P38 蛋白和 ERK1/2 蛋白参与了单核细胞对仿生纤维内硅化胶原支架材料刺激时的应激应答反应。在参与仿生纤维内硅化胶原支架材料对单核细胞分泌功能影响的分子信号通路中，P38 和 ERK1/2 均对 VEGFa, PDGF-BB, SDF-1 α , TGF- β 1 的表达产生了影响，P38 信号转导通路在参与单核细胞对硅化胶原支架应答的调控中起到了相对主要的作用。此外，单核细胞在硅化胶原支架材料作用下向 TRAP 阳性单个核细胞分化的过程中，P38 和 ERK1/2 两个信号转导通路均起到了一定的作用，而 P38 在对其分化进程的影响更加重要。而在单核细胞的相关信号转导通路 (ERK1/2 和 P38) 被抑制后，其在仿生纤维内硅化胶原支架材料作用下的条件培养基促进 BMSCs/EPCs 迁移的能力出现了下降，同时在材料作用下的条件培养基促进 EPCs 生成的血管长度也出现了下降。
10. 仿生纤维内硅化胶原支架材料能够促进承重骨的缺损修复，即能够明显的促进大鼠股骨部分缺损模型的骨重建。硅化胶原支架能够促进早期的骨生成和血管化。

而 P38 是参与硅化胶原支架促进成骨成血管的关键信号转导通路，当 P38 被抑制后，硅化胶原支架促进成骨和成血管能力受到了明显的抑制。此外，ERK1/2 也在硅化胶原支架促进成骨的体内实验中产生了影响，当 ERK1/2 被抑制后，缺损区域内的骨生成水平略有降低。

11. 仿生纤维内硅化胶原支架材料能够通过激活单核细胞的 P38 信号转导通路来促进单核细胞的分化和分泌功能，从而促进局部的血管化和宿主种子细胞归巢，进而实现快速的骨缺损重建修复。当单核细胞的 P38 受到抑制后，硅化胶原支架对单核细胞分化和分泌功能的调控受到了影响，从而抑制了其促进骨组织重建的进程。而 ERK1/2 对单核细胞的分化和分泌功能没有影响，其可能通过单核细胞以外的其他方式作用于缺损区域内的骨再生的进程。

结论：

综上所述，我们验证了仿生纤维内硅化胶原支架材料具有良好生物相容性的特点，并通过小鼠颅骨缺损模型和大鼠股骨缺损模型验证了其良好的骨缺损修复的能力。我们也进一步发现仿生纤维内硅化胶原支架材料能够在缺损修复的早期通过激活单核细胞的 P38 信号转导通路，促进单核细胞向 TRAP 阳性的单个核细胞分化，并进一步分泌更多相关细胞因子（VEGF, PDGF-BB, SDF-1, TGF- β ），一方面进一步促进局部血管化进程，另一方面能够促进宿主种子细胞向缺损区域募集，从而加快骨组织缺损修复的进程。

参考文献

- [1] Petite H, Viateau V, Bensaid W, et al. Tissue-engineered bone regeneration[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(9): 959-963.
- [2] Dahlin C, Linde A, Gottlow J, et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration[J]. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1988, 81(5): 672-676.
- [3] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, et al. Bone regeneration: current concepts and future directions[J]. *BMC Medicine*, 2011, 9(1): 66.
- [4] Urist M R. Bone: formation by autoinduction[J]. *Science*, 1965, 150(3698): 893-899.
- [5] Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1988, 81(2): 277.
- [6] Hadjidakis D J, Androulakis I I. Bone remodeling[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, 1092(1): 385-396.
- [7] Raisz L G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling[J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(8): 1353-1358.
- [8] Burg K J L, Porter S, Kellam J F. Biomaterial developments for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(23): 2347-2359.
- [9] Rose F R A J, Oreffo R O C. Bone tissue engineering: hope vs hype[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 292(1): 1-7.
- [10] Schnürer S M, Gopp U, Kühn K D, et al. Bone substitutes[J]. *Orthopade*, 2003, 32(1): 2-10.
- [11] Laurencin C T, El-Amin S F. Xenotransplantation in orthopaedic surgery[J]. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2008, 16(1): 4-8.
- [12] Giannoudis P V, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update[J]. *Injury*, 2005, 36(3): S20-S27.
- [13] Stevens M M. Biomaterials for bone tissue engineering[J]. *Materials Today*, 2008, 11(5): 18-25.
- [14] Reddi A H. Symbiosis of biotechnology and biomaterials: Applications in tissue engineering of bone and cartilage[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1994, 56(2): 192-195.
- [15] Schieker M, Seitz H, Drosse I, et al. Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering[J]. *European Journal of Trauma*, 2006, 32(2): 114-124.
- [16] Habibovic P, Barralet J E. Bioinorganics and biomaterials: bone repair[J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(8): 3013-3026.
- [17] Vallet-Regí M, González-Calbet J M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues[J]. *Progress in Solid State Chemistry*, 2004, 32(1): 1-31.
- [18] Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, et al. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review[J]. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2012, 41(1): 114-120.
- [19] Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, et al. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review[J]. *Clinical Oral Implants Research*, 2012, 23(3): 263-273.

- [20] Del Fabbro M, Testori T, Francetti L, et al. Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus[J]. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 2004, 24(6): 565-578.
- [21] Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard J R, et al. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss®) and bioactive glass (Biogran®) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR)[J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 2003, 30(7): 636-643.
- [22] Barrère F, van Blitterswijk C A, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2006, 1(3): 317.
- [23] Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics[J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1981, 157: 259-278.
- [24] Arinze T L, Tran T, Mcalary J, et al. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(17): 3631-3638.
- [25] Trisi P, Rao W, Rebaudi A, et al. Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects[J]. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 2003, 23(1): 69-78.
- [26] Bucholz R W, Carlton A, Holmes R E. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes[J]. *The Orthopedic Clinics of North America*, 1987, 18(2): 323.
- [27] Hunter G K, Goldberg H A. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90(18): 8562-8565.
- [28] Landi E, Celotti G, Logroscino G, et al. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute[J]. *Journal of the European Ceramic Society*, 2003, 23(15): 2931-2937.
- [29] Anselme K, Noel B, Flautre B, et al. Association of porous hydroxyapatite and bone marrow cells for bone regeneration[J]. *Bone*, 1999, 25(2): 51S-54S.
- [30] Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, et al. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite[J]. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2005, 63(11): 1626-1633.
- [31] Murugan R, Ramakrishna S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(17): 3829-3835.
- [32] Yuan H, Li Y, De Bruijn J D, et al. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(12): 1283-1290.
- [33] Ng A M H, Tan K K, Phang M Y, et al. Differential osteogenic activity of osteoprogenitor cells on HA and TCP/HA scaffold of tissue engineered bone[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, 85(2): 301-312.
- [34] Laurencin C T, Attawia M A, Elgendy H E, et al. Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized matrices[J]. *Bone*, 1996, 19(1): S93-S99.
- [35] Liu X, Ma P X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2004, 32(3): 477-486.
- [36] Mistry A S, Mikos A G. Tissue engineering strategies for bone regeneration[M]//*Regenerative Medicine II*. Springer Berlin Heidelberg, 2005: 1-22.
- [37] Harakas N K. Demineralized bone-matrix-induced osteogenesis[J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1984, 188: 239-251.

- [38] Urist M R. Bone: formation by autoinduction[J]. *Science*, 1965, 150(3698): 893-899.
- [39] Bolander M E, Balian G. The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts[J]. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 1986, 68(8): 1264-1274.
- [40] Connolly J F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair[J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1995, 313: 8-18.
- [41] An H S, Simpson J M, Glover J M, et al. Comparison Between Allograft Plus Demineralized Bone Matrix Versus Autograft in Anterior Cervical Fusion| A Prospective Multicenter Study[J]. *Spine*, 1995, 20(20): 2211-2216.
- [42] Ferreira A M, Gentile P, Chiono V, et al. Collagen for bone tissue regeneration[J]. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8(9): 3191-3200.
- [43] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, et al. Bone regeneration: current concepts and future directions[J]. *BMC Medicine*, 2011, 9(1): 66.
- [44] Schenk R K. Bone regeneration: biologic basis[J]. *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*, 1994: 49-100.
- [45] Hoexter D L. Bone regeneration graft materials[J]. *Journal of Oral Implantology*, 2002, 28(6): 290-294.
- [46] Athanasiou K A, Niederauer G G, Agrawal C M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers[J]. *Biomaterials*, 1996, 17(2): 93-102.
- [47] Hamad K, Kaseem M, Yang H W, et al. Properties and medical applications of polylactic acid: A review[J]. *Express Polymer Letters*, 2015, 9(5): 435-455.
- [48] Williams D F. Mechanisms of biodegradation of implantable polymers[J]. *Clinical Materials*, 1992, 10(1): 9-12.
- [49] Kweon H Y, Yoo M K, Park I K, et al. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(5): 801-808.
- [50] Guan B, Jiang G, Fu H, et al. Thermodynamic preparation window of alpha calcium sulfate hemihydrate from calcium sulfate dihydrate in non-electrolyte glycerol-water solution under mild conditions[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2011, 50(23): 13561-13567.
- [51] Kraus K H, KIRKER-HEAD C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration[J]. *Veterinary Surgery*, 2006, 35(3): 232-242.
- [52] Thomas M V, Puleo D A. Infection, inflammation, and bone regeneration a paradoxical relationship[J]. *Journal of Dental Research*, 2011, 90(9): 1052-1061.
- [53] Soltan M, Smiler D, Choi J H. Bone marrow: orchestrated cells, cytokines, and growth factors for bone regeneration[J]. *Implant Dentistry*, 2009, 18(2): 132-141.
- [54] Lindvall O. Stem cell transplantation[J]. *The Lancet*, 2001, 358: S47.
- [55] Veis A. A window on biomineralization[J]. *Science*, 2005, 307(5714): 1419-1420.
- [56] Mann S, Archibald D D, Didymus J M, et al. Crystallization at inorganic-organic interfaces: biominerals and biomimetic synthesis[J]. *Science*, 1993, 261(5126): 1286-1293.
- [57] Beniash E. Biominerals—hierarchical nanocomposites: the example of bone[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2011, 3(1): 47-69.
- [58] Fratzl P. Bone fracture: When the cracks begin to show[J]. *Nature Materials*, 2008, 7(8): 610-612.

- [59] Kinney J H, Habelitz S, Marshall S J, et al. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin[J]. *Journal of Dental Research*, 2003, 82(12): 957-961.
- [60] Tay F R, Pashley D H. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(8): 1127-1137.
- [61] Gower L B. Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biomineralization[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(11): 4551-4627.
- [62] Nudelman F, Pieterse K, George A, et al. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors[J]. *Nature Materials*, 2010, 9(12): 1004-1009.
- [63] Liu Y, Li N, Qi Y, et al. Intrafibrillar collagen mineralization produced by biomimetic hierarchical nanoapatite assembly[J]. *Advanced Materials*, 2011, 23(8): 975-980.
- [64] Wang Y, Azaïs T, Robin M, et al. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite[J]. *Nature Materials*, 2012, 11(8): 724-733.
- [65] Shi Y, Niedzinski J R, Samaniego A, et al. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2012, 18(13-14): 1313-1321.
- [66] Thula T T, Rodriguez D E, Lee M H, et al. In vitro mineralization of dense collagen substrates: a biomimetic approach toward the development of bone-graft materials[J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(8): 3158-3169.
- [67] Vialpando M, Martens J A, Van den Mooter G. Potential of ordered mesoporous silica for oral delivery of poorly soluble drugs[J]. *Therapeutic Delivery*, 2011, 2(8): 1079-91.
- [68] Bitar A, Ahmad N M, Fessi H, Elaissari A. Silica-based nanoparticles for biomedical applications[J]. *Drug Discovery Today*, 2012, 17(19-20): 1147-54.
- [69] Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering[J]. *Biopolymers*, 2008, 89(5): 338-44.
- [70] Ehrlich H, Deutzmann R, Brunner E, Cappellini E, Koon H, Solazzo C, et al. Mineralization of the metre-long biosilica structures of glass sponges is templated on hydroxylated collagen[J]. *Nature Chemistry*, 2010, 2(12): 1084-8.
- [71] Desimone M F, Helary C, Rietveld I B, Bataille I, Mosser G, Giraud-Guille M M, et al. Silica-collagen bionanocomposites as three-dimensional scaffolds for fibroblast immobilization[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(10): 3998-4004.
- [72] Eglin D, Coradin T, Giraud Guille M M, et al. Collagen-silica hybrid materials: sodium silicate and sodium chloride effects on type I collagen fibrillogenesis[J]. *Bio-medical Materials and Engineering*, 2005, 15(1, 2): 43-50.
- [73] Heinemann S, Heinemann C, Ehrlich H, et al. A novel biomimetic hybrid material made of silicified collagen: perspectives for bone replacement[J]. *Advanced Engineering Materials*, 2007, 9(12): 1061-1068.
- [74] Scheffel A, Poulsen N, Shian S, et al. Nanopatterned protein microrings from a diatom that direct silica morphogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(8): 3175-3180.
- [75] Niu L, Jiao K, Qi Y, et al. Infiltration of silica inside fibrillar collagen[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(49): 11688-11691.

- [76] Niu L N, Jiao K, Qi Y P, et al. Intrafibrillar silicification of collagen scaffolds for sustained release of stem cell homing chemokine in hard tissue regeneration[J]. *The FASEB Journal*, 2012, 26(11): 4517-4529.
- [77] Li N, Niu L, Qi Y, et al. Subtleties of biomineralisation revealed by manipulation of the eggshell membrane[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(34): 8743-8752.
- [78] Anderson J M. Biological responses to materials[J]. *Annual Review of Materials Research*, 2001, 31(1): 81-110.
- [79] Anderson J M. Multinucleated giant cells[J]. *Current Opinion in Hematology*, 2000, 7(1): 40-47.
- [80] Gretzer C, Emanuelsson L, Liljensten E, et al. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials[J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2006, 17(6): 669-687.
- [81] Luttkhuizen D T, Harmsen M C, Luyn M J A V. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction[J]. *Tissue Engineering*, 2006, 12(7): 1955-1970.
- [82] Ratner B D, Hoffman A S, Schoen F J, et al. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*[M]. Academic Press, 2004.
- [83] Zdolsek J, Eaton J W, Tang L. Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2007, 5(1): 31.
- [84] Tang L, Jennings T A, Eaton J W. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(15): 8841-8846.
- [85] Keegan A D. IL-4. In: Oppenheim J J; Feldman M, editors. *Cytokine Reference*[M]. San Diego, CA: Academic Press, 2001.
- [86] McKenzie A N J, Matthews, D J. IL-13. In: Oppenheim J J; Feldman M, editors. *Cytokine Reference*[M]. San Diego, CA: Academic Press, 2001.
- [87] Pollard J W. Trophic macrophages in development and disease[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(4): 259-270.
- [88] Stefater J A, Ren S, Lang R A, et al. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2011, 17(12): 743-752.
- [89] Guihard P, Danger Y, Brounais B, et al. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(4): 762-772.
- [90] Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, et al. Interleukin-1 β induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt-5a/receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway[J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2012, 64(10): 3355-3363.
- [91] Franchimont N, Wertz S, Malaise M. Interleukin-6: an osteotropic factor influencing bone formation?[J]. *Bone*, 2005, 37(5): 601-606.
- [92] Walker E C, McGregor N E, Poulton I J, et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010, 120(2): 582-592.
- [93] Carlevaro M F, Cermelli S, Cancedda R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation[J]. *Journal of Cell Science*, 2000, 113(1): 59-69.

- [94] Miclau T, Schneider R A, Eames B F, et al. Common molecular mechanisms regulating fetal bone formation and adult fracture repair[M]//Bone Regeneration and Repair. Humana Press, 2005: 45-55.
- [95] Mountziaris P M, Mikos A G. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration[J]. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2008, 14(2): 179-186.
- [96] Kido S, Kuriwaka-Kido R, Imamura T, et al. Mechanical stress induces Interleukin-11 expression to stimulate osteoblast differentiation[J]. Bone, 2009, 45(6): 1125-1132.
- [97] Kocić J, Santibañez J F, Krstić A, et al. Interleukin 17 inhibits myogenic and promotes osteogenic differentiation of C2C12 myoblasts by activating ERK1, 2[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2012, 1823(4): 838-849.
- [98] Brown B N, Ratner B D, Goodman S B, et al. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine[J]. Biomaterials, 2012, 33(15): 3792-3802.
- [99] Rundle C H, Wang H, Yu H, et al. Microarray analysis of gene expression during the inflammation and endochondral bone formation stages of rat femur fracture repair[J]. Bone, 2006, 38(4): 521-529.
- [100] Chang M K, Raggatt L J, Alexander K A, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo[J]. The Journal of Immunology, 2008, 181(2): 1232-1244.
- [101] Pirraco R P, Reis R L, Marques A P. Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs[J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2013, 7(5): 392-400.
- [102] Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds[J]. Trends in Biotechnology, 2012, 30(10): 546-554.
- [103] Benoit D S W, Schwartz M P, Durney A R, et al. Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells[J]. Nature Materials, 2008, 7(10): 816-823.
- [104] Wang C, Adrianus G N, Sheng N, et al. In vitro performance of an injectable hydrogel/microsphere based immunocyte delivery system for localised anti-tumour activity[J]. Biomaterials, 2009, 30(36): 6986-6995.
- [105] Liu Y, Kim Y K, Dai L, et al. Hierarchical and non-hierarchical mineralisation of collagen[J]. Biomaterials, 2011, 32(5): 1291-1300.
- [106] Belton D J, Deschaume O, Patwardhan S V, et al. A solution study of silica condensation and speciation with relevance to in vitro investigations of biosilicification[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2010, 114(31): 9947-9955.
- [107] De La Rocha C L, Brzezinski M A, DeNiro M J. Purification, recovery, and laser-driven fluorination of silicon from dissolved and particulate silica for the measurement of natural stable isotope abundances[J]. Analytical Chemistry, 1996, 68(21): 3746-3750.
- [108] Janeway Jr C A. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation[J]. Annual Review of Immunology, 1992, 10(1): 645-674.
- [109] Ziegler S F, Ramsdell F, Alderson M R. The activation antigen CD69[J]. Stem Cells, 1994, 12(5):

- 456-465.
- [110] Paul W E. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine[J]. *Blood*, 1991, 77(9): 1859-1870.
- [111] Frucht D M, Fukao T, Bogdan C, et al. IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge[J]. *Trends in Immunology*, 2001, 22(10): 556-560.
- [112] Wingrove S S. Peri-implant therapy for the dental hygienist: clinical guide to maintenance and disease complications[M]. John Wiley & Sons, 2013.
- [113] Boskey A L. Biomineralization: an overview[J]. *Connective Tissue Research*, 2003, 44(1): 5-9.
- [114] Lowenstam H A, Weiner S. On biomineralization[M]. Oxford University Press on Demand, 1989.
- [115] Ray R D. Vascularization of bone grafts and implants[J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1972, 87: 43-48.
- [116] Kusumbe A P, Ramasamy S K, Adams R H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone[J]. *Nature*, 2014, 507(7492): 323-328.
- [117] Xie H, Cui Z, Wang L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis[J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(11): 1270-1278.
- [118] Teitelbaum S L. Bone resorption by osteoclasts[J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1504-1508.
- [119] Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract[J]. *Nature*, 1998, 393(6685): 591-594.
- [120] Salcedo R, Wasserman K, Young H A, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: in vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 α [J]. *The American Journal of Pathology*, 1999, 154(4): 1125-1135.
- [121] Pepper M S. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 1997, 8(1): 21-43.
- [122] Pardali E, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis[J]. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 2008, 14: 4848-4861.
- [123] Ferrara N, Gerber H P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. *Nature Medicine*, 2003, 9(6): 669-676.
- [124] Xie L, Zeng X, Hu J, et al. Characterization of nestin, a selective marker for bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells International*, 2015, 2015.
- [125] Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade[J]. *The FASEB Journal*, 1995, 9(9): 726-735.
- [126] Mavria G, Vercoulen Y, Yeo M, et al. ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis[J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(1): 33-44.
- [127] Issbrücker K, Marti H H, Hippenstiel S, et al. p38 MAP kinase—a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability[J]. *The FASEB Journal*, 2003, 17(2): 262-264.

附 录

1.实验仪器



Bio-Rad CFX-96 实时定量PCR仪



徕卡 DMI6000 正置显微镜



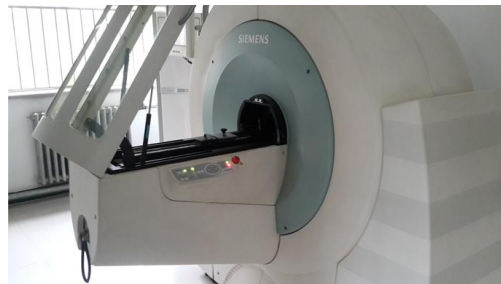
Leica SN2500&SP2600 硬组织切片系统



徕卡 DMI6000B 倒置显微镜



Eppendorf 5810 R 冷冻离心机



Siemens Inveon Micro CT



BioTek Epoch 酶联免疫检测仪



Olympus FV-1000 激光共聚焦显微镜

个人简历和研究成果

个人简历:

孙津龙, 男, 汉族, 1988年11月生于江苏省盱眙县, 党员

2006.09-2011.06 第四军医大学 获学士学位

2011.09-2014.06 第四军医大学口腔医学院 获硕士学位

2014.09-2017.06 第四军医大学口腔医学院 攻读博士学位

攻读博士期间发表文章情况 (*通讯作者):

1. **Sun JL**, Jiao K, Niu LN*, Jiao Y, Song Q, Shen LJ, Tay FR*, Chen JH*. Intrafibrillar silicified collagen scaffold modulates monocyte to promote cell homing, angiogenesis and bone regeneration[J]. *Biomaterials*, 2017, 113: 203-216.
2. **Sun JL**, Ming LG, Shang FQ, Shen LJ, Chen JH*, Jin Y*. Apocynin suppression of NADPH oxidase reverses the aging process in mesenchymal stem cells to promote osteogenesis and increase bone mass[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18572.
3. **Sun JL**, Jiao K, Niu LN*, Song Q, Shen LJ, Tay FR*, Chen JH*. Intrafibrillar silicified collagen scaffold promotes cell homing, angiogenesis and bone regeneration via regulating monocyte p38/ERK pathway. (*Acta Biomaterialia*, under review)
4. **Sun JL**, Jiao K, Niu LN*, Shen LJ, Tay FR*, Chen JH*. Neo-MTA activated macrophage M2 polarization promotes in situ bone regeneration by regulating PI3K/Akt signaling pathway. (under preparation)
5. Yang H, Niu LN, **Sun JL**, Huang XQ, Pei DD, Huang C*, Tay FR*. Biodegradable mesoporous delivery system for biomineralization precursors[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12: 839-854.
6. Jiao Y, Ma S, Wang YR, Li J, Shan LQ, **Sun JL**, Chen JH*. Methacryloxyethyl Cetyl Ammonium Chloride Induces DNA Damage and Apoptosis in Human Dental Pulp Cells via Generation of Oxidative Stress[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2016, 12(5): 580.
7. Jiao Y, Ma S, Li J, Shan LQ, Wang YJ, Tian M, Yang YW, **Sun JL**, Ban JH, Chen JH*. N-acetyl

cysteine (NAC)-directed detoxification of methacryloxyethyl cetyl ammonium chloride (DMAE-CB)[J]. PloS one, 2015, 10(8): e0135815.

8. Shang FQ, Ming LG, Zhou ZF, Yu Y, **Sun JL**, Ding Y*, Jin Y*. The effect of licochalcone A on cell-aggregates ECM secretion and osteogenic differentiation during bone formation in metaphyseal defects in ovariectomized rats[J]. Biomaterials, 2014, 35(9): 2789-2797.

致 谢

在博士学位论文即将付梓之际，我百感交集，心里充满了庆幸、感激和幸福。在枯燥的科研征程中，我哭过、笑过、退缩过、更勇敢过。在这收获的季节，我不知道用什么样的言语可以表达对导师陈吉华教授的感激之情。老师，是您带我走上科学之路，放飞我的研究梦想；是您渊博的专业知识和严谨的治学理念，教会我什么是科研之本；是您无微不至的关心和诲人不倦的高尚师德，给了我迎难而上的勇气，成为我人生道路上受用不尽的宝贵财富，同时也将激励我在以后的工作道路上不断开拓创新、勇往直前。

感谢我的辅导老师牛丽娜副教授。感谢您授我以鱼，更授我以渔。您对待科研的热情，工作时的忘我投入，使我置身其间，耳濡目染；您时刻迸发的灵感火花，灵活创新的思维方式，常常使我“山重水复疑无路，柳暗花明又一村”。同时也感谢牛丽娜副教授对课题的点拨和始终如亲人一般的爱护。

感谢 Franklin R. Tay 教授对我的悉心关怀和指导。是您带我走向了更加丰富多彩，充满艺术感的科学殿堂，在您的高瞻远瞩与指导帮助下，我对我的研究工作有了更加深入的了解，同时也在科研和学术的道路上走得更深更远。感谢焦凯副教授对我研究工作每一步的耐心指导和亲切帮助，您渊博的学识，严谨的科研态度和激情的工作作风使我受益良多。

感谢口腔医院院部领导多年来的殷切关怀和悉心指导，他们以开阔的胸襟和睿智的眼光为我指明方向。感谢修复科张少锋教授、全体领导、老师和同志们在我学习、工作和实验期间给予的关心和帮助！

感谢沈丽娟老师、罗娜老师、李岩师姐、周唯师姐、焦阳、林娉婷、宋群、帅逸、隋秉东、戚朦、张虹云、余浩翰、倪前伟、刘骞、周欢、刘葵在科研工作和生活上给予我的帮助和关爱，让我快乐的度过了博士研究生的学习生涯。

感谢我的父母和我的爱人王杨始终如一的关怀与爱护，以及一直以来的理解、支持和包容，使我顺利完成学业！

感谢在实验设计和论文撰写中被我引用或参考的论著的作者，并向致力于干细胞研究的专家学者致以崇高的敬意！