

纳米珍珠粉/壳聚糖-透明质酸支架 修复兔股骨远端骨缺损的实验研究

王秋子,徐普*,李娜,陈明炜,张文柏

中南大学湘雅医学院附属海口医院 海南省口腔医学中心种植科,海口 570100

摘要:通过体内实验探讨纳米珍珠粉/壳聚糖-透明质酸(NPP/C-HA)复合支架的促成骨能力。采用双侧兔股骨远端骨缺损模型(直径7 mm,深度10 mm),通过大体标本、影像学检查、分子生物学检查及组织学检查来观察骨缺损的修复效果。发现各组均未出现明显不良组织反应;随观察时间增加实验组骨缺损区范围最小,在第8周和第12周数据的差异存在统计学意义($P < 0.05$);在第4周、6周、8周时实验组BALP含量与其他组比较 $P < 0.05$;实验组缺损区边缘出现更多的新生骨,但在骨质成熟度上未见明显差异。结果表明NPP/C-HA支架具有良好的生物相容性及促成骨作用,为进一步研究NPP/C-HA在骨组织工程中的作用提供了实验和理论基础。

关键词:纳米珍珠粉;壳聚糖;透明质酸;支架;骨缺损

中图分类号:R285.5;R965

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)4-0696-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.4.022

Repair of bone defect of distal femur in rabbits with nanometer pearl powder/chitosan-hyaluronic acid scaffold

WANG Qiu-zi, XU Pu*, LI Na, CHEN Ming-wei, ZHANG Wen-bo

Oral implant Department, Affiliate Haikou Hospital of Xiangya Medical School, Center South University ·
Hainan Provincial Stomatology Center, Haikou 570208, China

Abstract: To investigate the osteogenesis ability of NPP/C-HA composite scaffold by in vivo experiments. The distal bone defect model (diameter 7mm, depth 10mm) of bilateral rabbit femur was used to observe the repair effect of bone defect by gross specimen, imaging examination, molecular biology examination and histological examination. No obvious adverse tissue reaction was observed in each group. With the increase of observation time, As the observation time increases, the bone defect area of the experimental group gradually becomes smaller, The BALP content of the experimental group at 4 weeks, 6 weeks, and 8 weeks exist statistically significant compared with other groups; in the experimental group, more new bone appeared at the edge of the defect area, but there was no significant difference in bone maturity. The results showed that NPP/C-HA scaffold has good biocompatibility and positive osteogenic effect, which provides an experimental and theoretical basis for further study of the application of NPP/C-HA in bone tissue engineering.

Key words: nanometer pearl powder; chitosan; hyaluronic acid; scaffold; bone defect

骨缺损为临床较为常见的现象,当缺失过大或自我修复能力下降时,则需要人为干预促进骨组织再生。骨缺损的修复是一个严峻的挑战,常需要昂贵的费用及较长的恢复时间,且在复杂的临床情况下效果不理想^[1],无论是自体骨还是异体骨在临床使用上均存在缺陷^[2]。因此,骨缺损的修复成为学

者们的研究热点^[3,4]。

随着生物材料的发展,目前骨组织工程中常见的生物支架都存在生物力学性能不佳的共性。珍珠粉作为天然生物材料,在2000年前已作为中药成分使用,具有较好的药用价值,现代珍珠粉已被添加于化妆品、保健品等外用或内服的产品中,得到广泛认可。珍珠内部无机物晶体与有机基质相互交错排列成“砖墙结构”,致密均匀,排列整齐。无机晶体多为板层状文石型碳酸钙,常见的有多边形或六边形,

收稿日期:2018-09-11 接受日期:2019-02-18

基金项目:海南省重点研发项目(ZDYF2016018)

*通信作者 Tel:86-898-66189640; E-mail: hnxupu@163.com

多种有机基质分布于碳酸钙板层间,形成特殊的物理学特性。

课题组前期研究结果表明,珍珠粉其微观结构类似于天然骨组织,有机-无机复合的板层样结构决定其具有良好的力学性能^[5],同时,体内外实验均显示珍珠粉具有良好的促成骨作用^[6-8]。然而粉剂材料存在团聚、孔隙率不稳定、难以维持骨修复空间等问题,且临床使用中操作不方便,导致流失较多或充填不均匀。因此课题组进一步研制出 NPP/C-HA 支架,并对支架物理性能检测,其符合骨组织中理想生物支架要求,而体外实验表明支架可促进小鼠前成骨干细胞增殖分化^[9]。本文以此为基础旨在探讨 NPP/C-HA 复合支架的体内促成骨效果。

1 材料与方法

1.1 材料合成

以蒸馏水为介质通过机械球磨法获得纳米级珍珠粉(图1),过120目筛备用。壳聚糖(4wt%)和透明质酸(1wt%)分别溶于1%的醋酸,于搅拌机中以2000 rpm 搅拌5分钟,室温静置24小时,将壳聚糖和透明质酸混合,再以2000 rpm 搅拌5分钟,然后加入纳米珍珠粉(10wt%),以2000 rpm 再搅拌5分钟,浇铸于96孔板中,置于-20℃冷冻24小时后,冷冻干燥48小时,取出制备好的复合支架(支架规格:7 mm×10 mm 圆柱体),经 Co-60 γ 消毒后置于-20℃冰箱密封保存备用。

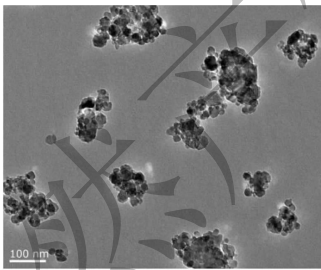


图1 纳米级珍珠粉扫描电镜图

Fig. 1 Scanning electron microscopy of nanometer pearl powder

1.2 骨缺损模型的建立

实验符合《关于善待实验动物的指导性意见》的要求,并通过中南大学湘雅医学院附属海口医院伦理委员会审查(2016 科研伦审-002)。

取36只6~10月龄新西兰大白兔(SCXK<湘>2014-0011),雄兔,2.5~3 kg,适应性喂养7天。全麻下进行骨缺损制备,随时关注实验兔麻醉状态,待呼吸平稳,以腹式呼吸为主、角膜反射消失、肌肉

松弛及对皮肤夹捏无反应时,认为麻醉深度良好。

将36只新西兰大白兔随机分为4组,A组为空白对照组、B组为壳聚糖-透明质酸组(C-HA组)、C组为纳米珍珠粉组(NPP组)、D组为纳米珍珠粉/壳聚糖-透明质酸组(NPP/C-HA组),每组9只。术区备皮,消毒,于双侧股骨髁外侧纵行切口,暴露股骨远端,以干骺线为参照制备直径7 mm,深度10 mm的骨缺损。术中使用4℃无菌0.9% NaCl 冲洗降温。按不同分组于骨缺损区植入不同材料,空白组不植入任何外来材料。造模过程为单盲实验。

术后使用抗生素及镇痛药,继续饲养。术后第4周,第8周,第12周对实验兔行安乐死,取双侧股骨髁标本进行下一步观察。

1.3 观察指标

1.3.1 大体观察

术后观察实验兔活动情况、进食进水情况、排便情况、伤口愈合情况、周围组织反应以及骨缺损区骨修复情况等。

1.3.2 影像学观察

造模前后,术后第4周、第8周、第12周行双侧股骨CBCT检查。统一拍摄条件,通过扫描数据进行三维重建,并进行Lane-Sandhu X射线评分,评估骨缺损区骨组织愈合情况及骨化情况。

1.3.3 血清骨碱性磷酸酶含量测定

于0、2、4、6、8、10、12周抽取兔耳中央动脉血,离心后使用Elisa试剂盒检测血清中BALP含量。

1.3.4 组织学观察

术后第4周、第8周和第12周每组处死3只实验兔,取双侧骨缺损区标本,厚度约4 mm,置于10%福尔马林,经脱钙、包埋、切片、封片后行HE染色及Masson染色,评估正常骨组织与缺损区连接处新生骨组织情况及骨组织成熟度。

1.4 统计学方法

所有数据采用SPSS19.0软件进行分析,计量资料用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据进行正态性及方差齐性检验,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

所有实验兔均在2小时内苏醒,术后3天活动较少,饮食饮水均较差,排便减少。术后7天拆线,伤口愈合良好,未出现明显感染现象,饮食饮水等生

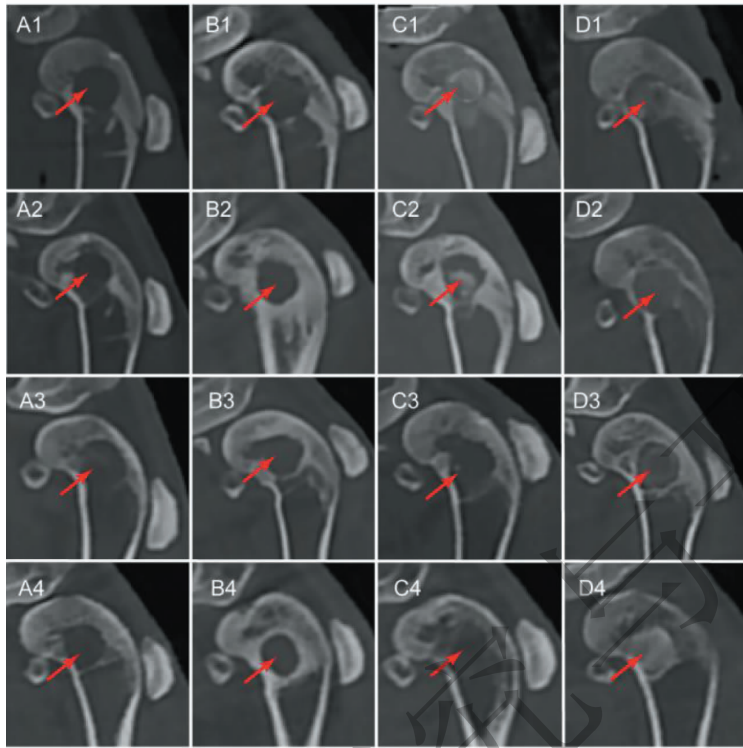


图2 术后第4、8、12周与造模后的CBCT对比

Fig. 2 Comparison of CBCT 4, 8, and 12 weeks after surgery with after modeling

注:A:空白对照组,B:C-HA组,C:NPP组,D:NPP/C-HA组,1为造模后,2为术后第4周,3为术后第8周,4为术后第12周,箭头为缺损区域。

Note:A:blank control group,B:C-HA group,C:NPP group,D:NPP/C-HA group,1 is after modeling,2 is the 4th week after surgery,3 is the 8th week after surgery,4 is the 12th week after surgery,the arrow indicates position is defect area.

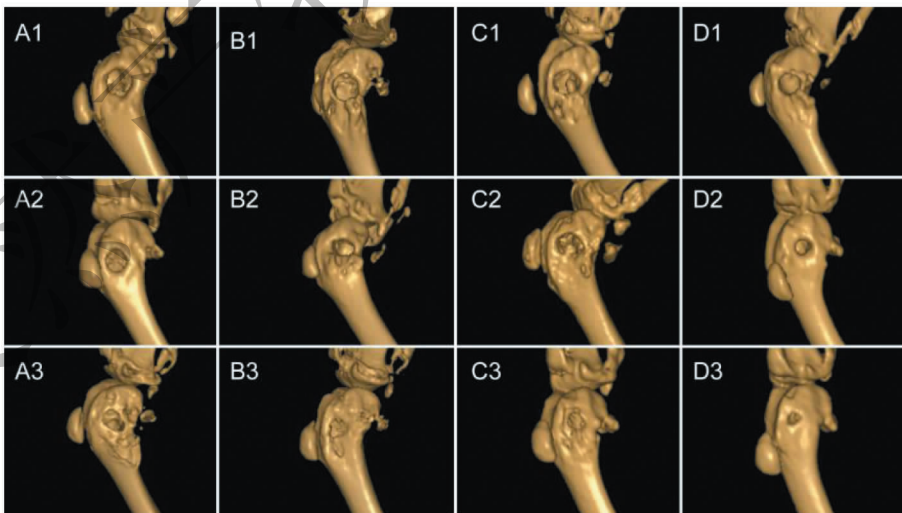


图3 不同时间段的3D重建对比

Fig. 3 Comparison of 3D reconstruction in different time

注:A:空白对照组,B:C-HA组,C:NPP组,D:NPP/C-HA组,1为术后第4周,2为术后第8周,3为术后第12周。

Note:A:blank control group,B:C-HA group,C:NPP group,D:NPP/C-HA group,1 is the 4th week after surgery,2 is the 8th week after surgery,3 is the 12th week after surgery.

活习惯基本恢复正常。术后及处死时,术区未见明显红肿、溢脓等局部炎症。骨缺损区标本见软组织附着,缺损区被新生组织充填,骨面凹陷。

2.2 影像学

由 CBCT 可知(图 2),造模后四组均可见低密度的骨缺损区,C 组呈现高密度影,D 组密度较 AB 组稍高。术后第 4 周,各组缺损区边缘不规则,C 组高密度充填影变小,D 组缺损区密度更均匀。术后第 8 周,各组缺损区有所变小。术后第 12 周,缺损区大小进一步缩小,A 组缺损区密度略高于造模后,B 组缺损区边缘密度明显增高,C 组缺损区边界难

以分辨,中心区域密度仍较低,D 组缺损区被新生骨组织充填,其密度高于正常骨组织。

三维重建可知(图 3),每组随着时间的增加,同样缺损区面积变小,但在观察期内缺损区未被完全充填。同一时间各组也存在差别,D 组缺损区面积最小,B 组与 C 组相差无几,BCD 组缺损区面积较 A 组均小,且 D 组缺损区表面骨质更为光滑,其他组骨面凹凸不平。

将 CBCT 图像根据 Lane-sandhu X 射线评分进行统计分析,统计结果如表 1、图 4。

表 1 各组不同时间点 Lane-sandhu X 射线评分分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Results of Lane-sandhu X-ray analysis at different time points in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	第 8 周 8 weeks	第 12 周 12 weeks	合计 Total	F 值 F-value	P 值 P-value
A 组 Group A	3.67 ± 1.21	5.00 ± 0.89	4.33 ± 1.23	4.706	0.055
B 组 Group B	4.17 ± 0.75	5.33 ± 0.82	4.75 ± 0.97	6.622	0.028 *
C 组 Group C	4.50 ± 0.84	6.83 ± 0.41	5.67 ± 1.37	37.692	0.000 **
D 组 Group D	5.83 ± 0.41	8.67 ± 1.03	7.25 ± 1.66	39.054	0.000 **
合计 Total	4.54 ± 1.14	6.46 ± 1.67	5.50 ± 1.71	21.592	0.000 **
F 值 F-value	7.107	24.918	11.338		
P 值 P-value	0.002 **	0.000 **	0.000 **		

注:A:空白对照组,B:C-HA 组,C:NPP 组,D:NPP/C-HA 组,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:A:blank control group,B:C-HA group,C:NPP group,D:NPP/C-HA group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

第 8 周和第 12 周中各组比较差异具有统计学意义,组间两两比较如图 4,第 8 周时,D 组 AB 组比较 $P < 0.05$,第 12 周时,D 组与 ABC 组比较 $P < 0.05$ 。

2.3 BALP 含量测定

四组血清中 BALP 含量在 0 周至 6 周逐渐上升,在第 6 周时达到峰值,随后开始下降,第 12 周时各组血清中 BALP 含量逐渐降低,接近初始水平(图 5)。

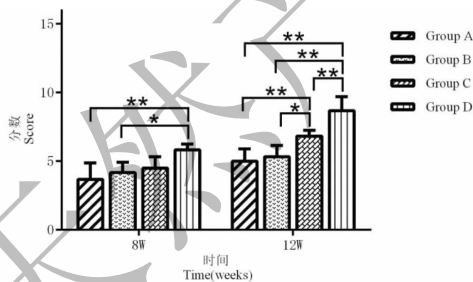


图 4 各组不同时间点 Lane-sandhu X 射线评分分析结果两两比较

Fig. 4 Pairwise comparisons of Lane-sandhu X-ray analysis results at different time points in each group

注:A:空白对照组,B:C-HA 组,C:NPP 组,D:NPP/C-HA 组,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:A:blank control group,B:C-HA group,C:NPP group,D:NPP/C-HA group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$).

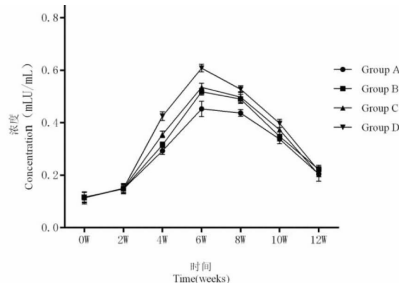


图 5 不同时间点各组血清中 BALP 含量变化

Fig. 5 Changes of BALP levels in serum at different time points in each groups

注:A:空白对照组,B:C-HA 组,C:NPP 组,D:NPP/C-HA 组。

Note:A:blank control group,B:C-HA group,C:NPP group,D:NPP/C-HA group.

对各组数据进行统计分析(表2),第4周、第6周、第8周四组比较差异具有统计学。

表2 不同时间点各组血清中骨碱性磷酸酶含量(mLU/mL) ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Bone alkaline phosphatase levels in serum at different time points in each groups ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D	F值 F-value	P值 P-value
0W	0.116 ± 0.054	0.116 ± 0.056	0.114 ± 0.069	0.115 ± 0.059	0.004	1.000
2W	0.148 ± 0.056	0.148 ± 0.048	0.149 ± 0.043	0.150 ± 0.055	0.004	1.000
4W	0.293 ± 0.039	0.315 ± 0.033	0.356 ± 0.036	0.425 ± 0.049	19.250	0.000**
6W	0.453 ± 0.073	0.518 ± 0.032	0.535 ± 0.036	0.609 ± 0.035	11.122	0.000**
8W	0.437 ± 0.031	0.491 ± 0.041	0.498 ± 0.051	0.528 ± 0.032	5.483	0.006**
10W	0.338 ± 0.030	0.348 ± 0.030	0.373 ± 0.014	0.397 ± 0.026	3.237	0.082
12W	0.204 ± 0.047	0.222 ± 0.027	0.203 ± 0.014	0.217 ± 0.027	0.277	0.841

注:A:空白对照组,B:C-HA组,C:NPP组,D:NPP/C-HA组,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note:A:blank control group,B:C-HA group,C:NPP group,D:NPP/C-HA group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

将第4周、第6周、第8周进行各组间两两比较(图6)。第4周时NPP/C-HA组与其他三组比较均具有统计学意义,其中空白对照组与NPP组比较也具有统计学意义。在第6周时,NPP/C-HA组与空白对照组和C-HA组比较具有显著差异,空白对照组与NPP组差异具有统计学意义。在第8周时,仅NPP/C-HA组与空白对照组差异具有统计学意义。

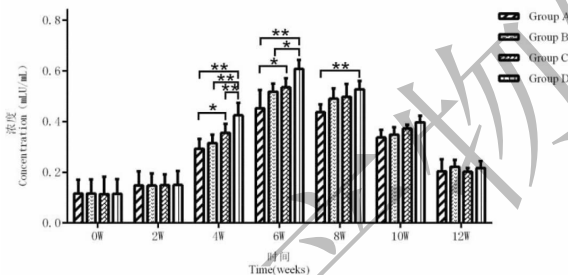


图6 不同时间点各组血清中骨碱性磷酸酶含量两两比较

Fig.6 Pairwise comparisons of bone alkaline phosphatase levels in serum at different time points in each groups

注:A:空白对照组,B:C-HA组,C:NPP组,D:NPP/C-HA组,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:A:blank control group,B:C-HA group,C:NPP group,D:NPP/C-HA group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2.4 组织学观察结果

2.4.1 HE染色

图7,术后第4周,各组可见炎细胞浸润,A组缺损区边缘见新生纤维组织,靠缺损中心区域纤维组织疏松,B组见新生纤维组织长入材料间隙,有少量无规则结构的未成熟类骨质,C组未降解的珍珠粉成团分布于新生纤维间,D组缺损区边缘致密的

纤维组织与植入材料相互融合,纤维间见新生类骨质,B、C两组新生骨周围见成骨细胞。

术后第8周,各组未见炎性细胞浸润,A组纤维间有少量新生类骨质,B组致密的纤维组织间见新生类骨质,内部含丰富的骨细胞,周围见成骨细胞,C组不成熟的类骨质间见新生血管,D组缺损区纤维间同样见新生类骨质,周围见成骨细胞,且植入材料间有块状类骨质形成。

术后第12周,A组致密的纤维间有类骨质,但缺损区中心区域仍未被填满,B组材料未完全降解,靠近缺损区中心材料间隙新生组织较少,C组植入材料难以分辨,大量不成熟的类骨质周围见成骨细胞,有新生血管存在,D组纤维由缺损区边缘向植入材料移行,材料逐渐被不成熟的类骨质取代,大量新生的类骨质周围见成骨细胞及新生血管。

2.4.2 Masson染色

图8,术后第4周,A组缺损区边缘正常骨组织呈红蓝相间,靠近缺损区的为蓝染,B组见少量蓝染的新生类骨质,其他多为红蓝相间的正常骨组织,C组未见明显的新生类骨质,D组见明显不规则的蓝染类骨质。

术后第8周,A组缺损区边缘见不定型的蓝染类骨质,B组新生蓝染类骨质出现少许红染,材料间隙未被新生组织填满,C组见蓝染的类骨质具有一定的形态,靠近缺损区一侧的类骨质含较多骨细胞,先形成的类骨质出现红染,D组蓝染的类骨质具有规则的形态,内含大量骨细胞,早期形成的类骨质有红染。

术后第12周,各组视野内均为蓝染的新生类骨

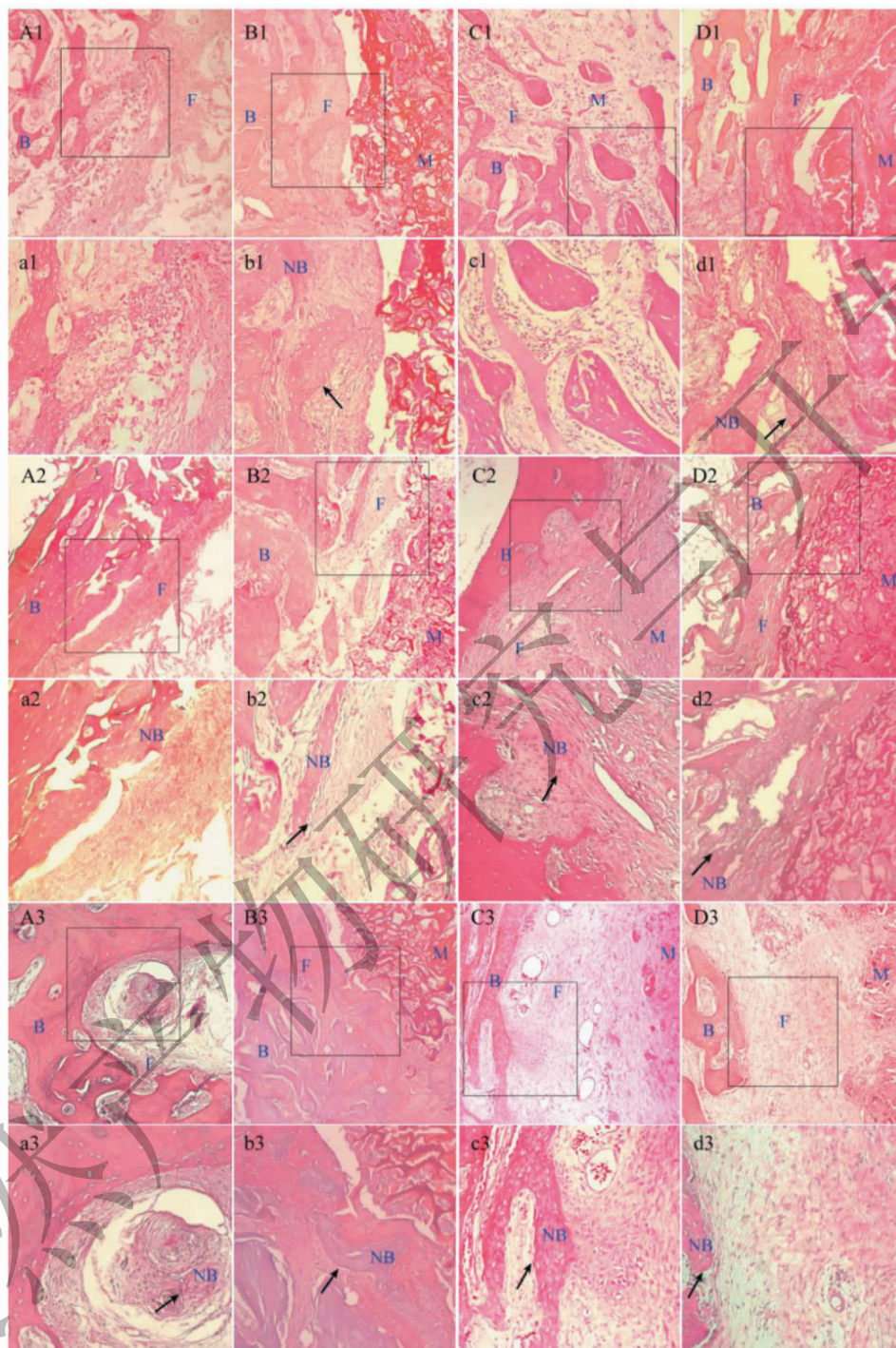


图 7 术后不同阶段各组 HE 染色对比图 (x100, x200)

Fig. 7 Comparison of HE staining at different time after surgery in each group (x100, x200)

注:A:空白对照组,B:C-HA组,C:NPP组,D:NPP/C-HA组,abcd为局部放大图,箭头为成骨细胞, B为骨组织,F为纤维组织,NB为新生骨组织,1为术后第4周,2为术后第8周,3为术后第12周。

Note: A: blank control group, B: C-HA group, C: NPP group, D: NPP/C-HA group,

a, b, c and d is partial enlarged drawing, B is bone tissue, F is fibrous tissue, NB is new bone tissue.

质,A组缺损区中心缺乏新生类骨质,B组致密的纤维间见不规则的蓝染类骨质,C组见大量蓝染类骨

质,排列疏松,D组连接区有大量蓝染的不规则类骨质,早期形成的类骨质形态规则。

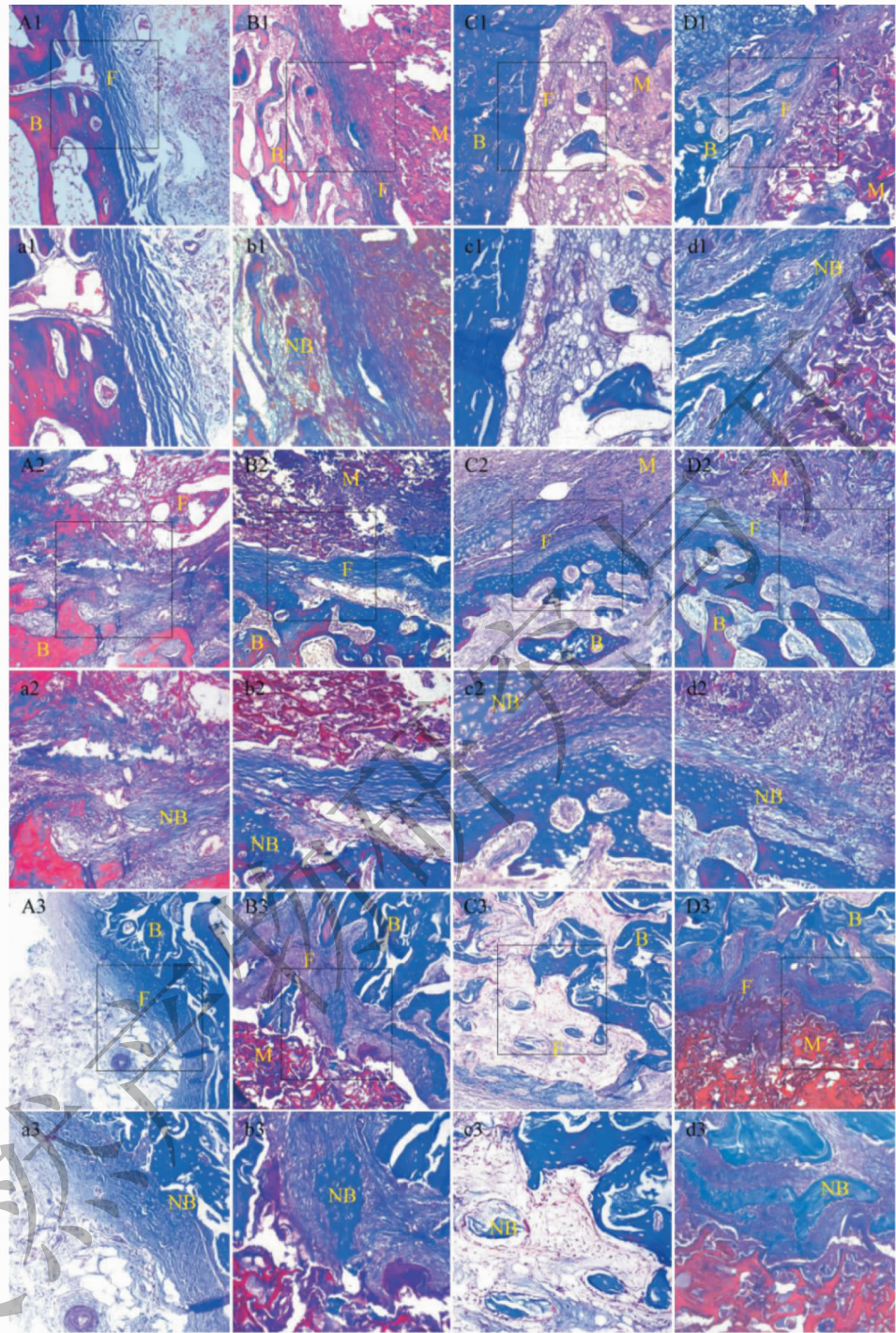


图8 术后不同阶段各组 Masson 染色对比图 (x100, x200)

Fig. 8 Comparison of Masson staining at different time after surgery in each group (x100, x200)

注:A:空白对照组,B:C-HA组,C:NPP组,D:NPP/C-HA组,abcd为局部放大图,箭头为成骨细胞,B为骨组织,F为纤维组织,NB为新生骨组织,1为术后第4周,2为术后第8周,3为术后第12周。

Note: A: blank control group, B: C-HA group, C: NPP group, D: NPP/C-HA group, a, b, c and d is partial enlarged drawing, B is bone tissue, F is fibrous tissue, NB is new bone tissue.

3 讨论

目前骨组织工程中常见的羟基磷灰石吸收非常

缓慢^[10],人工合成高分子聚合物的降解产物呈弱碱性,可能会引起不良反应^[11],并且生物力学均不佳。

生物材料如壳聚糖^[12]、透明质酸^[13,14]等受到人们的欢迎,也都存在一定缺陷。为了完善材料性能,学者们常对其进行改性处理^[15]。

本实验中所用复合材料包括透明质酸、壳聚糖和纳米珍珠粉。透明质酸自身性能不稳定,其中的阴离子基团(-COOH)可与壳聚糖中的阳离子基团(-NH₂)发生反应生成稳定的聚合物^[16]。在复合材料中再添加纳米珍珠粉,珍珠粉颗粒可均匀分散于复合支架中,使支架获得理想的孔隙结构和强度,所形成的三维支架更有利于细胞的生长及矿化,促成骨效果也得到进一步提升^[17-19]。

实验结果显示机体与材料相互融合,组织细胞逐渐长入材料孔隙,随着材料缓慢降解,新生组织也慢慢代替缺损区材料,表明植入材料具有良好的生物相容性。

影像学研究结果提示,随着时间的延长,缺损区骨密度逐渐增高,骨组织逐步修复。骨修复的过程不仅有新生骨组织充填缺损区,也包括周围组织的改建,随着密度增高形成更为成熟更适应自身需求的骨结构。

研究报道常用碱性磷酸酶来评价成骨细胞的活性^[20,21],但目前发现的6种同工酶中,仅有1种来源于成骨细胞,本实验中选用特异性的BALP,更精确的体现了成骨细胞活性^[22],随着骨形成的相对增强而骨吸收相对减弱,成骨细胞活性增强,分泌大量BALP进入血液循环,表现为血清中BALP含量升高,更好的反应材料的促成骨作用。

NPP/C-HA组植入材料间隙中见未成熟的类骨质更多,随着成骨细胞的分化成熟,形成成骨中心,进而逐渐有类骨质出现,体现其良好的成骨作用,且比其他组更能促进骨组织再生,说明其良好的骨传导作用^[23],但在骨质成熟度方面并没有明显的优势。同时发现各组缺损区边缘存在致密规则的纤维组织,而有研究表明纤维细胞可分泌与成骨细胞一样的I型胶原,促进骨愈合过程中的钙盐沉积,具有成骨潜能^[24]。同时中心区域血供较差,细胞生长繁殖所需的营养难以很好的供给,所产生的代谢废物也不能及时排出,成骨稍困难,因此缺损区边缘成骨优于缺损区中心区域。

本实验通过影像学、组织学和分子生物学分析了NPP/C-HA组复合支架对骨组织缺损的修复效果。该天然生物支架材料利用较低的成本可达到良好的成骨效果,符合理想支架材料的特性,在骨组织工程领域具有良好的应用前景。

本研究也存在一定的局限,实验观察时间为3个月,观察期间各组缺损区均未完全修复,骨的完全修复或许需要更长时间,实验中未对新生骨组织的机械性能做详细检测等。

参考文献

- Oryan A, Bigham-Sadegh A, Abbasi-Teshnizi F. Effects of osteogenic medium on healing of the experimental critical bone defect in a rabbit model[J]. *Bone*, 2014; 63: 53-60.
- Cochran D, Blieden T, Bouwsma O, et al. Position paper-Tissue banking of bone allografts used in periodontal regeneration[J]. *J Periodontol*, 2015, 72: 834-838.
- Chiu LH, Lai WFT, Chang SF, et al. The effect of type II collagen on MSC osteogenic differentiation and bone defect repair[J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 2680-2691.
- Ahlfeld T, Akkineni AR, Förster Y, et al. Design and fabrication of complex scaffolds for bone defect healing: combined 3D plotting of a calcium phosphate cement and a growth factor-loaded hydrogel [J]. *Ann Biomed Eng*, 2017, 45: 224-236.
- Yang YL, Chang CH, Huang CC, et al. Osteogenic activity of nanonized pearl powder poly(lactide-co-glycolide) composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Biomed Mater Eng*, 2014, 24: 979-985.
- Zhen ZP, Mao XQ, Review on the biological properties of nacre powder composite scaffolds repairing bone defect[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 176-179.
- Yang HL, Korivi M, Lin MK, et al. Antihemolytic and antioxidant properties of pearl powder against 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced hemolysis and oxidative damage to erythrocyte membrane lipids and proteins [J]. *J Food Drug Anal*, 2017, 25: 898-907.
- Lamghari M, Almeida MJ, Berland S, et al. Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre; *in vivo* and *in vitro* studies [J]. *Bone*, 1999, 25: 91S-94S.
- Li XN. Nano-pearl powder/chitosan-hyaluronic acid porous composite scaffold and preliminary study of its osteogenesis mechanism [D]. Changsha: Central South University (中南大学), 2017.
- Gao D, Xu YQ, Li FB. Application and research progress of bioceramic materials [J]. *Med J Nat Def For in Southwest China* (西南国防医药), 2014, 24: 1028-1030.
- Marques PAAP, Goncalves G, Singh MK, et al. Graphene oxide and hydroxyapatite as fillers of polylactic acid nanocomposites: preparation and characterization [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2012, 12: 6686-6692.