

可控释淫羊藿苷的仿生组装骨诱导修复材料

吴涛^{*}, 南开辉^{*}, 陈景帝, 金丹, 江汕, 赵培冉, 徐俊昌, 杜浩, 张晓强,
黎健伟, 裴国献[†]

南方医科大学南方医院创伤骨科, 广州 510515,
温州医学院附属眼视光医院, 温州 325027;
华南理工大学特种功能材料教育部重点实验室, 广州 510640

^{*} 同等贡献

[†] 联系人, E-mail: nfperry@163.com

2008-11-30 收稿, 2009-03-08 接受

中国博士后科学基金(编号: 20060390206)和国家自然科学基金(批准号: 30700180)资助项目

摘要 中药来源的植物黄酮淫羊藿苷具有良好的成骨药理活性, 其来源广泛、价格低廉、性质稳定, 有望作为一种新的成骨因子应用于骨组织工程研究. 本研究采用原位复合和冷冻干燥技术, 探索性地仿生构建了淫羊藿苷-壳聚糖/羟基磷灰石(淫羊藿苷-CS/HA)复合材料, 并对其物理特征、力学性能、体外细胞相容性、药物控释行为和原位骨缺损修复进行了研究. 结果表明: 淫羊藿苷载药过程对 CS/HA 复合材料的物理结构无显著影响, 对其力学性能的影响与载药剂量相关; 该材料细胞相容性良好, 可诱导骨髓间充质干细胞向成骨方向分化; 在体外释药缓慢, 对所载淫羊藿苷的控释时间可达 90 d 以上; 另外, 体内骨修复试验亦证明该材料具有良好的骨传导性和骨诱导活性, 能有效填充骨缺损并促进早期成骨. 这些结果都说明淫羊藿苷-CS/HA 复合材料是一种理想的骨组织工程诱导修复材料, 其制备方法可为载药支架材料研究提供新的思路.

关键词
淫羊藿苷
壳聚糖
羟基磷灰石
控释
仿生
骨组织工程
支架材料

中医药治疗骨折和骨不连具有数千年的历史, 用药独到、简便灵验, 但由于成分复杂、基础研究落后, 其优势尚未得到充分发掘. 中药与生物材料的复合及其在组织工程骨构建中的应用, 国外尚未见正式报道, 国内在此方面的研究也处于刚刚起步的阶段^[1-4]. 在前期研究中^[5], 我们考察了中药来源的淫羊藿苷(icariin, C₃₃H₄₀O₁₅, 分子量: 676.67) 这一植物黄酮苷类化合物的成骨性能. 我们发现: 淫羊藿苷可通过增加S期和G₂/M期的细胞数量缩短细胞群体倍增时间, 有效促进骨髓间充质干细胞的增殖; 并可通过诱导碱性磷酸酶、骨钙素和 I 型胶原的表达促进骨髓间充质干细胞的成骨分化. 其他研究亦证明: 淫羊藿苷可促进成骨细胞BMP和Cbfa1 基因

^[6-8]的表达, 抑制间充质细胞的成脂分化^[9]; 可通过发挥雌激素样作用, 增加去卵巢大鼠的骨形成、抑制骨吸收^[10]. 这些结果都暗示, 淫羊藿苷可作为一种骨诱导活性因子应用于骨再生研究. 另外, 淫羊藿苷来源广泛, 提取工艺相对简单, 性质稳定, 易于储存, 可耐受消毒灭菌, 这些特性亦为支架材料的载药提供了方便.

本研究将传统中药提取物淫羊藿苷与现代材料制备技术相结合, 采用原位复合和冷冻干燥方法仿生构建淫羊藿苷-壳聚糖/羟基磷灰石(淫羊藿苷-CS/HA)复合材料, 通过考查其体外生物相容性、药物释放行为和体内诱导原位成骨能力, 初步探讨其用于骨修复的可行性.

引用格式: 吴涛, 南开辉, 陈景帝, 等. 可控释淫羊藿苷的仿生组装骨诱导修复材料. 科学通报, 2009, 54(9): 1198~1206

Wu T, Nan K H, Chen J D, et al. A new bone repair scaffold combined with chitosan/hydroxyapatite and sustained releasing icariin. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0250-z

1 实验

() 材料. 淫羊藿苷标准品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110737-200312, 纯度 98.3%), 壳聚糖(脱乙酰度 90.0%, 黏度 < 100 cps, 上海伯奥生物科技有限公司), 冰醋酸、硝酸钙($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)和磷酸二氢钾(KH_2PO_4)购于广州市鑫镁化工有限公司, DMEM 和胎牛血清(FBS)购于美国 Hyclone 公司, 噻唑兰(MTT)和二甲亚砜(DMSO)购于美国 Sigma 公司, 碱性磷酸酶检测试剂盒购于南京建成生物试剂公司, BCA 试剂盒购于江苏碧云天公司.

() 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的制备. 称取一定量的淫羊藿苷溶于无水乙醇, 将其和壳聚糖加入 2% (体积比)的乙酸溶液中, 搅拌 2 h 后每隔 1 h 按 Ca/P=1.67 分别加入一定质量的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 KH_2PO_4 , 最终配成 CS/HA 前体溶液(其中 CS 浓度为 2.5%, CS/HA 理论生成量质量比为 1:2), 继续搅拌 4 h, 离心去气泡, 然后注入模具, 4 ℃ 冰箱静置 6 h 后放入 -10 ℃ 冷冻 3 h, 再进行冻干燥. 于室温下将样品在含饱和淫羊藿苷的 4% NaOH 去离子水中浸泡 10 h, 继而用含饱和淫羊藿苷的去离子水反复浸洗至中性, 再次进行冷冻和冷冻干燥得到所需样品. 依此法制备载药量分别为 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol 的 $\Phi 4$ mm × 15 mm 圆柱形淫羊藿苷-CS/HA 复合材料. 单纯 CS/HA 复合材料制备过程中不加入淫羊藿苷, 亦不用含饱和淫羊藿苷的溶剂浸洗. 所有支架材料均采用 20 kGy ^{60}Co 辐照灭菌消毒.

() 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的物理特征和力学性能分析. 材料形貌采用扫描电子显微镜(SEM)和组织切片染色进行观察; 支架密度、孔隙率、孔径大小采用文献描述的方法^[11,12]进行测量; 于万能材料试验机(5567 型, 美国 Instron 公司)上对湿态材料的机械性能进行测试.

() 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的细胞相容性分析. 取消毒材料 1.5 g, 眼科剪剪成碎末状, 置于 13.5 mL 低糖 DMEM 中 37 ℃ 恒温振荡 72 h, 20 μm 微孔滤膜过滤, 加 FBS 1.5 mL, 配成含 0.1 g/mL 材料浸提液培养基. 细胞增殖实验(MTT 法): 将人骨髓间充质干细胞(human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, hBMSCs)接种至 96 孔板, 2×10^3 细胞/孔, 贴壁后加入 150 μL 材料浸提液培养基培养, 对照组加入普通 DMEM 培养. 48 h 后每孔加 MTT 20 μL , 37 ℃ 孵育 4 h, 弃原培养液加 DMSO 150 μL , 持续振

荡 10 min, 酶标仪(LEX800 型, 美国 BioTek 公司) 570/630 nm 检测吸光度(A), 细胞增殖率(%) = $A_{\text{浸提液组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$. 碱性磷酸酶(ALP)检测: 将 hBMSCs 接种至 6 孔板, 2×10^7 细胞/孔, 贴壁后加入 1.5 mL 材料浸提液培养基进行培养, 对照组加入等量 DMEM 培养. 10 d 后用 PBS 漂洗 2 次, 加 100 μL 超纯水 4 超声裂解细胞, 分别采用碱性磷酸酶检测试剂盒和 BCA 试剂盒分析细胞裂解液中的 ALP 和总蛋白含量, 各组 ALP 活性用 ALP/总蛋白表示. 扫描电子显微镜观察: 将 hBMSCs 细胞悬液滴加至材料表面, 1×10^5 细胞/ cm^2 , 培养 10 d 后用扫描电子显微镜(S-3000N 型, 日本 Hitachi 公司)观察材料表面细胞形态.

() 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的体外释药行为研究. 将淫羊藿苷-CS/HA 材料置于盛有 5 mL PBS(pH 7.4)的密闭玻璃离心管中, 37 ℃ 恒温振荡, 10 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 分别于 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 d 定时收集全部溶液, 4 ℃ 储存以备检测, 同时补足等体积的 PBS. 检测时, 离心取 0.5 mL 上清于另一离心管中, 加入 0.5 mL 的乙腈, 涡旋 1 min, 16000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 再取上清 20 μL 过膜, 超高效液相色谱仪(UPLC, Acquity UPLCTM 型, 美国 Waters 公司)检测并记录淫羊藿苷的峰面积积分值, 根据标准曲线换算释药量, 计算其累积释放百分率.

() 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的骨修复性能研究. 60 只雄性新西兰大白兔(购于南方医院实验动物中心), 清洁级, 平均体重(2.0±0.2) kg, 肌注速眠新麻醉后, 于右侧桡骨中段截骨, 制作长度为 1.5 cm 的骨缺损模型. 将 CS/HA 和载 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料随机植入骨缺损处(12 样本/组), 骨缺损模型组不植入材料. 放射性核素骨扫描(ECT)检查: 术后 4 周各组随机选取 4 只动物于耳缘静脉注射 99mTc-MDP, 5 MBq/kg 体重, 3 h 后置单光子核素扫描仪(Millennium VG-8 型, 美国 GE 公司)上检测骨缺损部位 99mTc-MDP 浓聚情况. 采集条件: 平面静态, 矩阵 256×256, 放大倍数 2, 计数 500 K. 采集结束后在图像上选取相同面积的感兴趣区域(ROI)进行定量计数, ROI 均值=计数/面积. X 射线检查: 各时间点处死动物后收集右前臂尺桡骨进行拍片(Polydoros 100 X 光机, 德国 Siemens 公司), 摄片条件: 电压 40 kV, 电流 50 mA, 曝光时间 0.2 s. 骨密度(BMD)检查: 取各组术后 12 周标本行骨密度检查

(XR-46 双能骨密度仪, 美国 Norland 公司), 于计算机上选取桡骨缺损区域并计算该区域的骨矿含量(BMC), $BMD(g/cm^2)=BMC/\text{选取面积}$. 组织学观察: 术后 4, 8, 12 周随机选取 4 只动物处死, 组织样本经固定、脱钙、切片后行 HE 染色观察.

() 统计分析. 所有数据来自至少 3 次独立实验; 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用完全随机设计资料的单因素方差分析, LSD 法进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异; 采用 SPSS 13.0 软件包进行数据处理.

2 结果

2.1 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的物理特征和力学性能

由图 1 可知, 仿生构建的 CS/HA 复合材料具有

相互连通的孔隙结构, 孔隙率较大, 孔径约为 $110 \mu\text{m}$ 且均匀一致, 可为细胞生长提供良好的三维空间结构; 淫羊藿苷载药过程对 CS/HA 复合材料的结构无明显影响; 但是 10^{-6} 和 10^{-5} mol 的淫羊藿苷载药剂量却部分降低了材料的力学性能(与 CS/HA 组比较, $P < 0.05$; 图 1, 表 1).

2.2 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的细胞相容性

采用材料浸提液法和直接接触法对淫羊藿苷-CS/HA 支架的生物相容性进行评价. 采用不同组别的材料浸提液和普通 DMEM 培养低密度接种的 hBMSCs 48 h, 与对照组比较, CS/HA 组并未降低 hBMSCs 的增殖活性, 说明 CS/HA 复合材料本身无细胞毒性; 3 个剂量的淫羊藿苷-CS/HA 组不同程度地降低了 hBMSCs 的增殖活性且与载药剂量相关

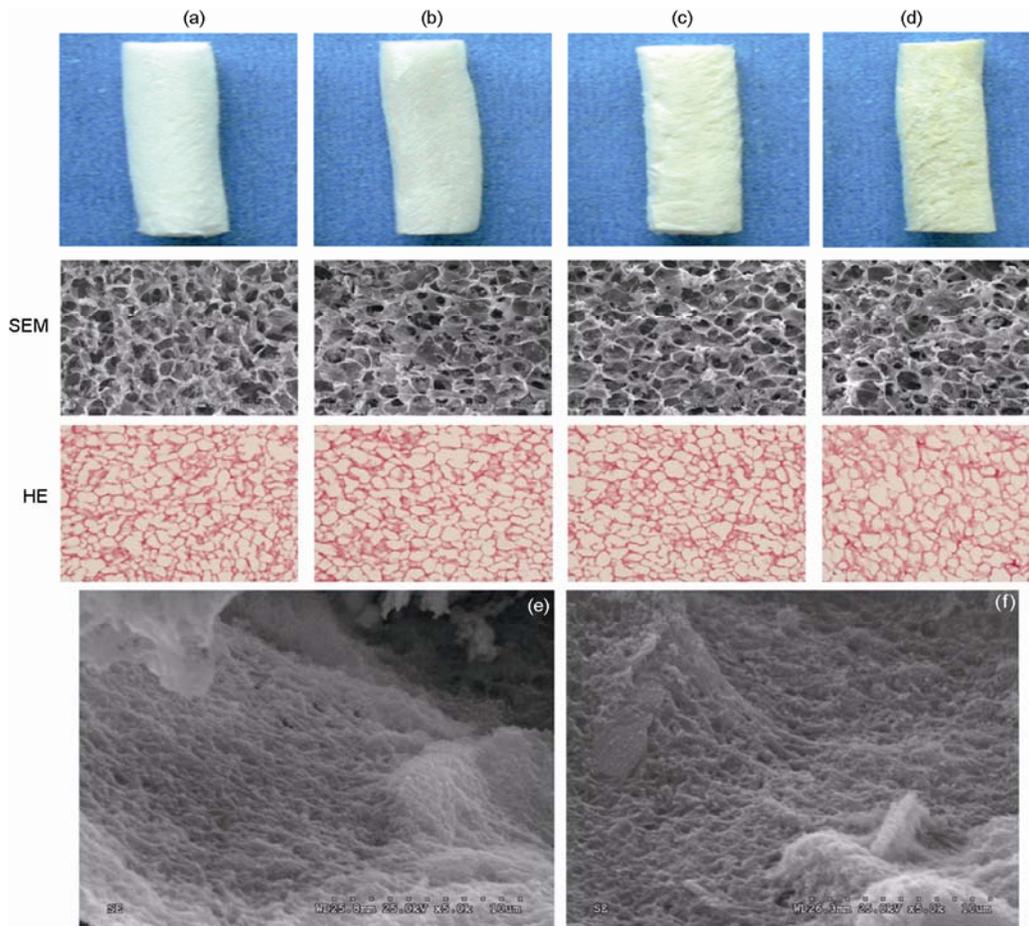


图 1 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料

(a) CS/HA 材料; (b)~(d) 载药量分别为 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol 的淫羊藿苷-CS/HA 材料(SEM, 200 \times ; HE, 200 \times); (e) CS/HA 材料微表面结构(SEM, 5000 \times); (f) 载药量为 10^{-5} mol 的淫羊藿苷-CS/HA 材料微表面结构(SEM, 5000 \times).

表 1 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的物理特征和力学性能

材料	n	孔隙率(%)	孔径/ μm	密度/ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$	断裂强度/MPa	弹性模量/kPa
CS/HA	5	88.7 \pm 2.3	112.6 \pm 20.5	71.5 \pm 2.6	1.5 \pm 0.2	37.5 \pm 3.4
10 ⁻⁷ mol 淫羊藿苷-CS/HA	5	87.1 \pm 3.2	118.9 \pm 21.6	70.1 \pm 2.8	1.4 \pm 0.2	34.6 \pm 4.1
10 ⁻⁶ mol 淫羊藿苷-CS/HA	5	88.8 \pm 3.9	116.6 \pm 24.6	73.0 \pm 3.7	1.2 \pm 0.2	31.0 \pm 4.4 ^{a)}
10 ⁻⁵ mol 淫羊藿苷-CS/HA	5	85.4 \pm 3.9	124.1 \pm 28.5	67.8 \pm 3.8	1.1 \pm 0.2 ^{a)}	28.7 \pm 4.9 ^{a)}
F 值		1.057	0.199	2.256	3.902	4.217
P 值		0.395	0.895	0.121	0.029	0.022

a) 与 CS/HA 组比较, $P < 0.05$

(图 2(a)). 高密度接种细胞后, 其增殖活性受到抑制, 采用 3 种淫羊藿苷材料浸提液培养 hBMSCs 10 d, 细胞内 ALP 含量显著增加了 7~9 倍(与对照组和 CS/HA 组比较 $P < 0.001$), 说明细胞正向成骨细胞分化(图 2(b)). 与此同时, 扫描电子显微镜观察亦发现, 接种于 CS/HA 复合材料上的细胞呈三角形、细长梭形等形态, 细胞呈散在性生长, 其表面光滑, 细胞外基质分泌不明显; 而接种于 3 种剂量的淫羊藿苷-CS/HA 复合材料上的细胞呈现出多种不规则形态, 聚集生长, 细胞表面可见大量细小颗粒分泌, 聚集生长的细胞周围可见钙化结节样结构形成(图 2(c)).

2.3 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的体外释药行为

对药物进行良好的缓/控释是载药支架材料研究的重要方面, 无论是采取物理吸附、包裹, 还是表面改性, 均是为了在局部维持有效药物浓度, 从而更好地诱导组织再生. 图 3(a)~(e)系淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的 UPLC 图, 其中 CS/HA 材料在 0.56 min 有一处吸收峰, 淫羊藿苷标准品在 1.30 min 有一处吸收峰. 通过标准曲线换算出每次释药量, 将结果按释药百分率累积得图 3(f). 释药初期(0~3 d), 药物从支架材料中爆发性地释放出来, 约达载药量的 25%; 而后释药速度迅速下降, 至第 20 d 约有 40%~60%左右的药物释出, 之后以低速持续释放, 90 天后仍有部分药物存留于支架材料中, 这说明淫羊藿苷-CS/HA 复合材料具有良好的控释效果.

2.4 淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的骨修复性能

兔桡骨骨缺损模型是公认的骨缺损模型之一. 从本研究的模型组来看, 骨缺损部位自身修复能力低下, 4~8 周两断端骨髓腔逐渐出现闭合, 12 W 时髓腔已完全封闭形成骨缺损(图 4(a)~(d)). ECT 是检测早期骨形成的敏感指标, 通过扫描 99mTc-MDP 在局部的浓聚密度可直接反映局部的成骨情况. 我们选择在第 4 周进行 ECT 检测, 结果表明, 4 个材料植

入组的 ECT 值均显著高于骨缺损模型组($P < 0.001$), 载药量为 10⁻⁶ 和 10⁻⁵ mol 的淫羊藿苷-CS/HA 组显著高于单纯 CS/HA 植入组($P < 0.001$, 图 4(a)). 在第 4 周的 X 线检查亦表明, 植入淫羊藿苷-CS/HA 材料可观察到明显的骨痂桥接断端, 这充分说明淫羊藿苷-CS/HA 复合材料具有早期诱导成骨性能. 后续的 X 射线检查进一步表明, 植入 8 周, 骨痂大量生长, 骨缺损基本愈合; 到 12 周时髓腔再通, 骨愈合进入塑形期(图 4(b)). 我们用 BMD 对骨修复 12 W 的情况进行了检测, 4 个材料植入组的 BMD 值均显著高于骨缺损模型组($P < 0.001$), 载药量为 10⁻⁶ mol 和 10⁻⁵ mol 的淫羊藿苷-CS/HA 组显著高于单纯 CS/HA 植入组($P < 0.001$, 图 4(c)). 综合各期影像学检测结果发现, 载淫羊藿苷-CS/HA 复合材料的骨修复速度优于单纯 CS/HA 复合材料.

从组织学切片的结果来看(图 4(d)), CS/HA 植入 4 周, 支架材料部分降解, 内部孔隙结构消失, 材料中央有炎性细胞浸润, 周围可见纤维组织形成; 8 周后, 材料大部降解, 纤维和部分软骨组织沿材料爬行桥接; 到 12 周时, 材料基本由软骨组织取代, 残留的材料被分割包裹, 骨缺损处主要由新生的软骨和骨组织填充. 淫羊藿苷-CS/HA 植入骨缺损后, 材料的降解速度随载药剂量的增加而明显加快, 4 周时材料即发生明显的崩解、碎裂, 其周围可见大量新生软骨形成并逐渐向材料的中央长入; 8 周时材料进一步降解, 被分割的材料间隙有大量软骨组织形成, 部分发生骨化; 至 12 周时材料完全降解, 软骨被骨组织替代, 新生的骨组织排列紊乱, 中央可见细小的骨髓腔结构.

3 讨论

寻找一种结构和功能上与骨相近且具有骨诱导活性的修复材料一直是骨组织工程和材料学热衷不衰的研究课题. 随着对原位组织再生理解的深入,

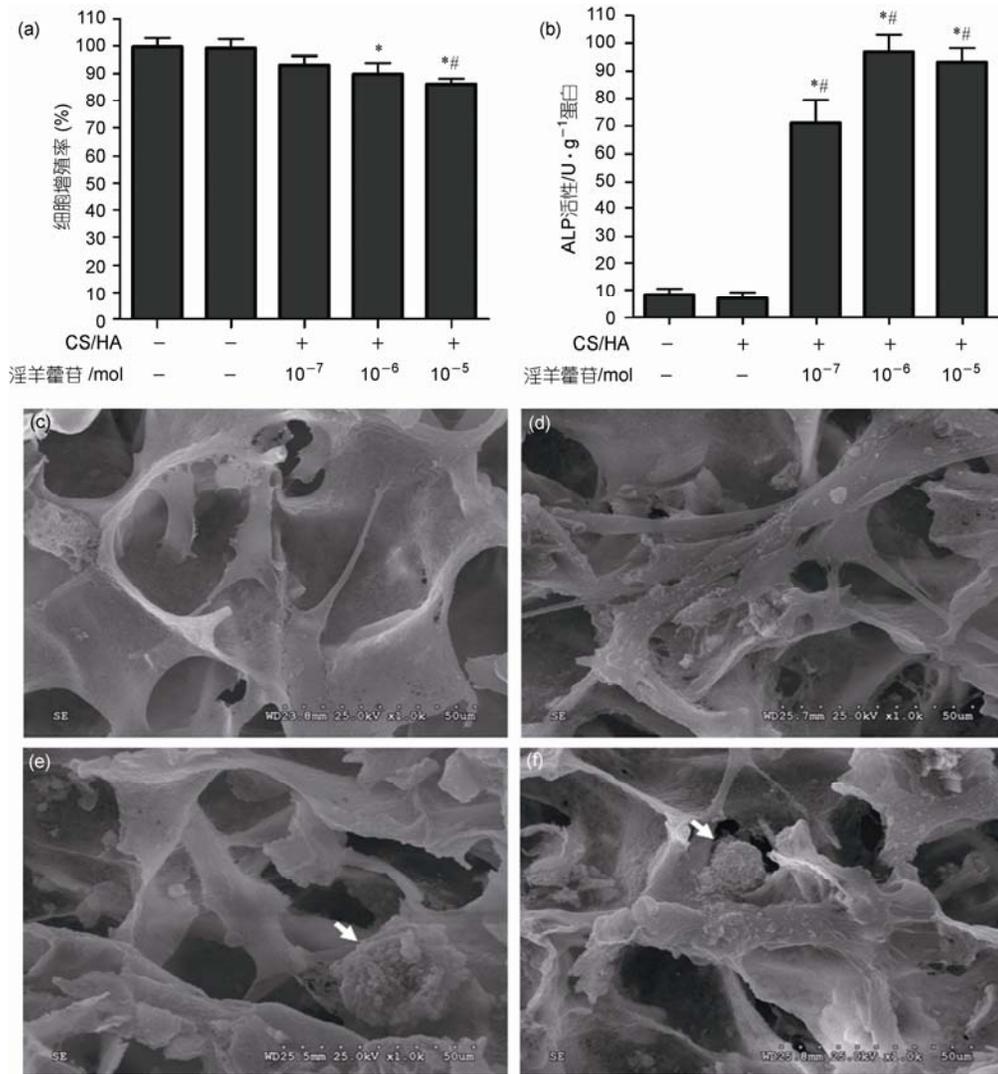


图2 淫羊藿苷-CS/HA复合材料的细胞相容性

(a) CS/HA和淫羊藿苷-CS/HA材料浸提液对hBMSCs增殖的影响 ($n=6, F=3.172, P=0.031$), *示与对照组比较, $P<0.05$; #示与CS/HA组比较, $P<0.05$; (b) CS/HA和淫羊藿苷-CS/HA材料浸提液对hBMSCs成骨分化的影响 ($n=4, F=68.116, P=0.000$), *示与空白对照组比较, $P<0.001$, #示与CS/HA组比较, $P<0.001$; (c)~(f) SEM观察材料对其表面接种的hBMSCs的影响, 1000 \times ; (c)为CS/HA复合材料, (d)~(f)为载药量分别为 $10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}$ mol的淫羊藿苷-CS/HA复合材料, 箭头指示为钙化结节样结构

负载骨诱导活性因子的复合材料逐渐受到了人们的关注,“生长因子+支架材料”这一骨修复模式成为了组织工程骨构建的重要策略^[13-15]。以BMP为代表的生长因子具备良好的骨诱导活性,然而其天然“娇贵”的特性却对支架材料提出了苛刻的要求,如材料本身不能损害生长因子的活性;经吸附/包裹后要有良好的缓/控释效果;为避免消毒对生长因子的灭活,自载药后到体内应用的整个过程均需严格无菌操作等等,这些都困扰着新材料的制备。那么,能否转变一种思维角度来解决这个问题呢?在前期工作

中^[5],我们论证了淫羊藿苷这一植物黄酮作为骨诱导因子的可行性,另外,淫羊藿苷熔点高(231 $^{\circ}$ C)、易于储存、性质稳定、可耐受⁶⁰Co辐照灭菌,这些都是其构建复合材料的优势,基于此,本实验探索性地构建了淫羊藿苷-CS/HA复合材料。

壳聚糖(chitosan, CS)是一种天然多糖,生物相容性良好,易于塑形;羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)是天然骨组织的主要成分,可被机体直接吸收利用,二者均已广泛应用于组织工程材料构建^[16,17],复合制备工艺比较成熟^[12,18]。采用原位复合方法可

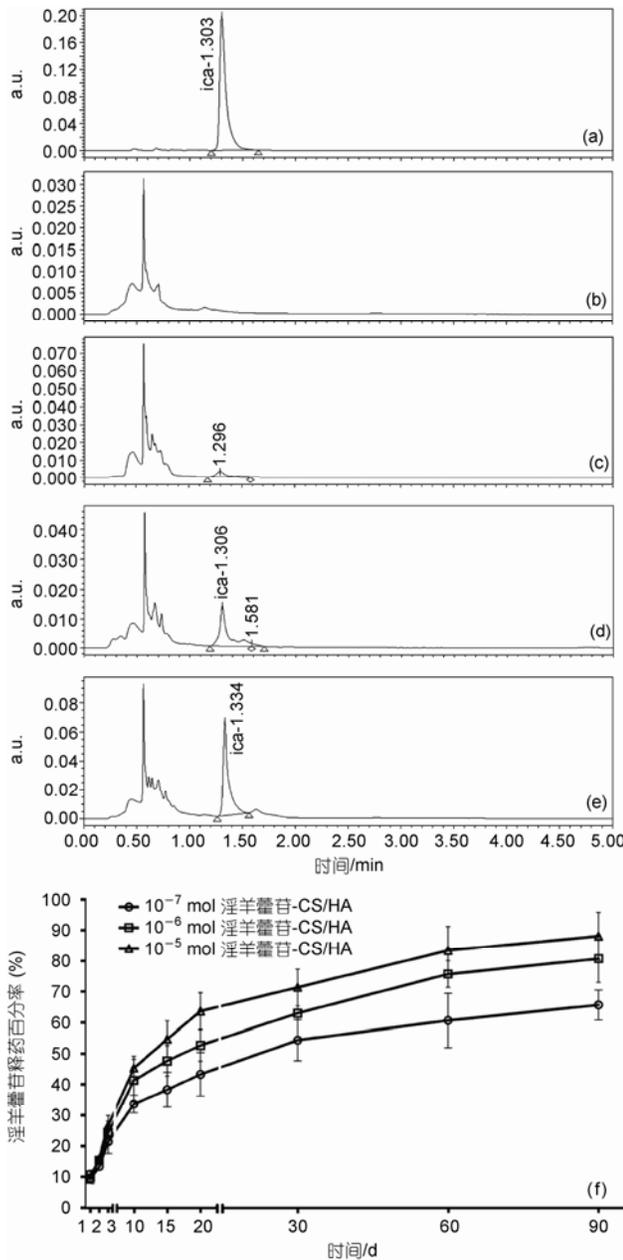


图3 淫羊藿苷-CS/HA复合材料的体外释药行为

(a)~(e) 淫羊藿苷-CS/HA复合材料的UPLC测定图谱, (a)为淫羊藿苷, (b)为CS/HA复合材料, (c)~(e)为载药量分别为 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol的淫羊藿苷-CS/HA复合材料; (f) 淫羊藿苷-CS/HA复合材料的体外累积释药曲线 ($n=3$)

获得分散均匀的纳米级HA, 避免了传统方法将HA与CS共混时存在的易聚集、难分散的缺点; 冷冻干燥方法用水作为致孔剂, 可获得良好的孔隙并减低材料的毒性. 从微观层面上看, 纳米HA牢固包裹/嵌合于CS高分子聚合物之中, 虽然材料的载荷主要

由HA承担, 但由于HA和生物分子可通过静电相互作用、范德华力、氢键、疏水键等作用结合, 载荷可以在矿物相和有机相之间传递, 故能较好地改善材料的机械性能. 另外, 材料中纳米级HA晶体尺度极小, 可直接被组织细胞摄取; CS是天然碱性多糖, 无毒, 可生物降解, 因此CS/HA支架本身就具有极好的生物活性.

构建淫羊藿苷-CS/HA复合材料的主要问题在于制备后药物活性的维持和支架材料性状的保持. 文献研究表明, 淫羊藿苷性质稳定, 即便在模拟胃液中亦可较好保持原苷形式^[19]. 本研究中, 我们在材料制备早期即掺入了淫羊藿苷, 并且经历了酸、碱、冷冻干燥和辐照灭菌等过程, 从后续UPLC的结果来看, 材料中的淫羊藿苷依然可以在其标准品所固有的时间点上出峰, 另外细胞ALP活力检测和体内骨修复试验也证明淫羊藿苷发挥了较好的生物活性, 因此可以认为, 材料制备过程对淫羊藿苷的药理活性无明显损害. 从材料角度来看, 其内部的淫羊藿苷会被纳米HA吸附、CS包裹或散在于材料细微的间隙, 这些存在形式可能会对材料的物理性质产生影响. 在前期摸索中, 单块材料的最大载药量可达 3.0×10^{-5} mol而对其孔隙结构不发生显著干扰, 本研究的最大载药量为 1.0×10^{-5} mol. 从载药后的SEM和切片染色结果来看, 载药本身并未对材料的密度、孔隙率、孔径发生明显影响, 材料微表面结构亦未因药物的掺入而发生显著改变; 力学性能上, 随载药剂量的提高, 材料虽在断裂强度和弹性模量上有一定的降低, 但是其强度也能基本满足非负重部位的骨修复要求, 因此可以断定, 不高于 1.0×10^{-5} mol的载药量对构建符合要求的CS/HA支架材料是可行的.

从生物相容性来看, 材料浸提液培养hBMSCs 48 h, 单纯CS/HA材料并未显著抑制细胞的增殖, 说明材料本身是安全无毒的; 但是淫羊藿苷-CS/HA材料却部分抑制了hBMSCs的增殖. 我们知道, 增殖和分化是细胞生命活动的两个方面, 增殖中的细胞分化功能受到抑制, 而分化中的细胞其增殖能力降低^[20,21]. 因此, 我们考虑材料浸提液中的药物可能系通过促进细胞的分化而抑制了其增殖活力. ALP检测证实了我们的推测: 采用含有淫羊藿苷的材料浸提液培养高密度接种的细胞(其增殖功能受到抑制)显著提高了细胞内ALP的表达. 同时, SEM观察结

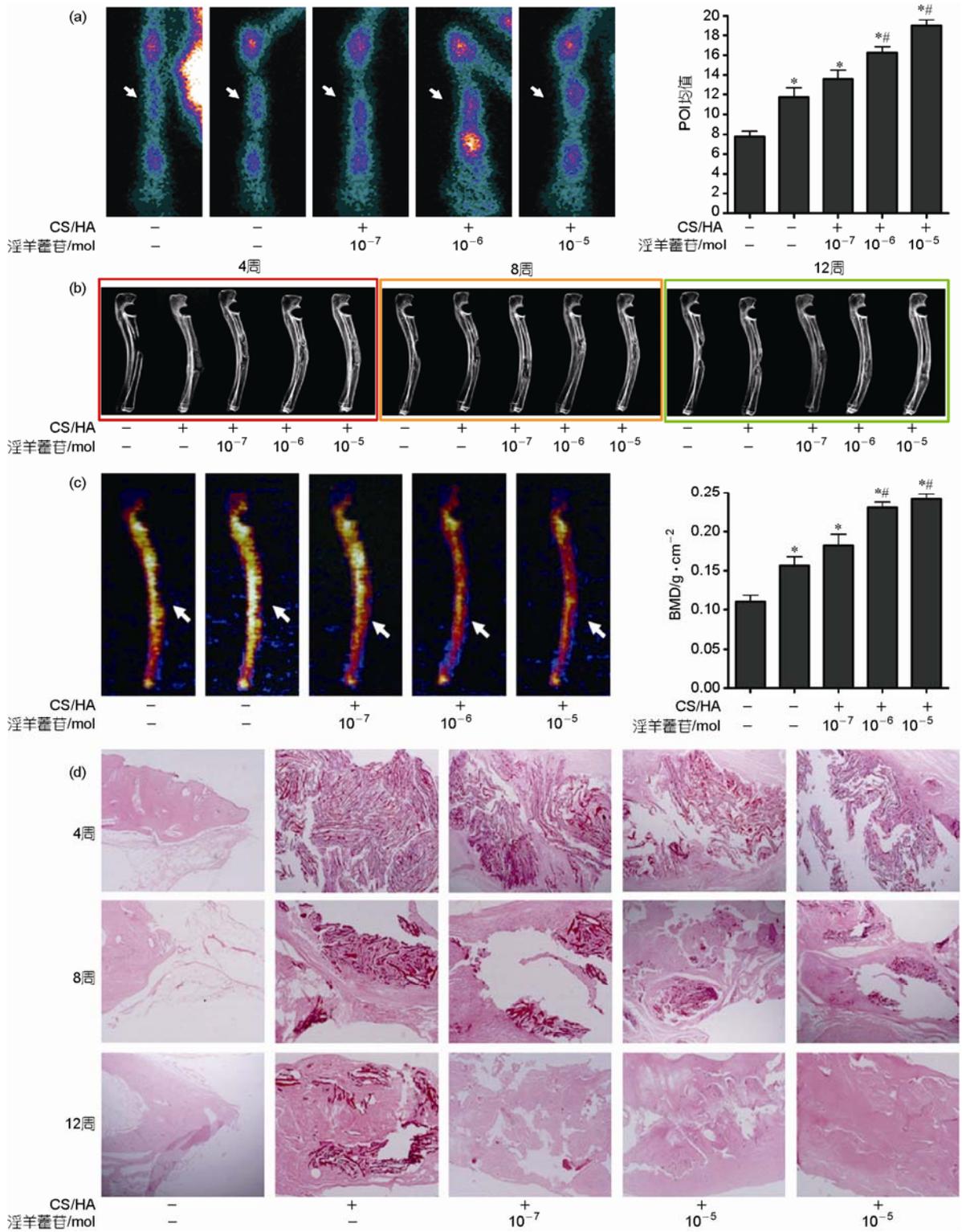


图4 淫羊藿苷-CS/HA复合材料的骨修复性能

(a) 放射性核素骨扫描(ECT)检查和 ROI 定量分析 ($n=4, F=32.010, P=0.000$; * 示与骨缺损模型组比较, $P < 0.001$; # 示与 CS/HA 组比较, $P < 0.001$), 箭头指示为定量分析部位; (b) X 射线检查; (c) 骨密度(BMD)检查和定量分析 ($n=4, F=28.720, P=0.000$; * 示与骨缺损模型组比较, $P < 0.001$; # 示与 CS/HA 组比较, $P < 0.001$), 箭头指示为定量分析部位; (d) 组织学切片, HE 染色, 40×

果亦发现,单纯 CS/HA 材料表面接种的细胞未见明显的细胞外基质分泌;载淫羊藿苷材料细胞外基质分泌旺盛,部分聚集生长的细胞周围形成了钙化结节样结构。这些结果都表明,淫羊藿苷-CS/HA 材料具有良好的生物相容性和成骨诱导活性。

良好的缓/控释作用是载药支架材料所要解决的重要问题^[22,23]。BMP等生长因子因性能和结构上的不稳定,往往只能通过简单浸渍或包裹的方法与生物材料进行复合,控释效果不甚理想。本研究中支架材料的制备方法同简单的物理吸附法相比具有明显的不同:淫羊藿苷首先以乙醇溶解形式掺入材料前体溶液,通过搅拌获得均匀一致的分散体,后续的冷冻干燥和浸洗过程带走乙醇,材料内留存的药物被纳米HA吸附、CS形成的结构包裹或储留于材料细微的间隙,这种方法制备的支架材料载药均匀,且便于对材料的载药剂量进行精确控制。当支架材料与释放介质接触时,CS吸水膨胀,位于CS浅表网络中的药物被首先释放出来,因此在释药早期会发生突释现象;当溶胀达到平衡后,药物只能通过网络空间缓慢扩散或通过材料的降解而释放,此时的释药行为遵守扩散控制机制,释药速度减慢,这都与体外试验观察到的情况相一致。此外,材料中的纳米HA粒子也可能对释药行为发生一定影响。药物

在纳米粒子表面存在一个吸附-解吸附过程,若粒子表面积较大,则药物的解吸附需要克服较大的分子间力才能从粒子表面扩散出去,从而增加药物释放时间。

骨传导性和骨诱导活性一直是骨组织工程支架材料所追求的两个方面:广阔的空间结构可为新生组织的爬行替代提供必要的载体,而良好的骨诱导活性则可加速新生组织骨化,利于早期成骨和改善新骨载荷功能。本研究中的病理切片结果表明,单纯 CS/HA 材料具有良好的组织相容性,可很好地填充骨缺损部位并被新生的软骨组织爬行替代,发挥骨传导作用。载淫羊藿苷材料除具备以上优点外,还可促进早期软骨内骨化形成,加速骨缺损的修复和改建。结合影像学结果,充分说明材料中的淫羊藿苷保持并发挥了良好的药理活性,淫羊藿苷-CS/HA 复合材料具有良好的骨诱导修复活性。

本研究论证了淫羊藿苷-CS/HA 复合材料从制备到体内骨修复的可行性,虽然在诸多方面还有待进一步改进,如材料的机械强度、降解性能、高剂量载药会对材料力学性能发生影响等,但是其价格低廉、制备过程简便、控释和修复效果满意且易于储存,因此有望作为一种新的思路和方法用于骨组织工程的研究和实践。

参考文献

- 1 邹琴,张利,左奕,等.载黄芪多糖骨水泥的理化性能及体外细胞相容性研究.功能材料,2008,39:1515—1518
- 2 屈树新,翁杰,沈如,等.含中药的磷酸钙生物材料制备方法的研究.生物医学工程与临床,2005,9:65—68
- 3 李茂红,屈树新,姚宁,等.含丹参磷酸钙骨水泥的制备和表征.生物医学工程与临床,2005,9:132—135
- 4 许春姣,翦新春,彭解英,等.黄芪-壳聚糖/聚乳酸多孔支架对犬骨髓基质细胞生物学行为的影响.中南大学学报(医学版),2005,30:283—287
- 5 南开辉.仿生组装淫羊藿苷控释型骨组织工程支架及其对骨髓基质干细胞生物学行为干预研究.南方医科大学博士后出站报告.广州:南方医科大学,2007.30—56
- 6 Zhao J, Ohba S, Shinkai M, et al. Icariin induces osteogenic differentiation in vitro in a BMP- and Runx2-dependent manner. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369: 444—448[doi]
- 7 Yin X X, Chen Z Q, Liu Z J, et al. Icariin stimulates proliferation and differentiation of human osteoblasts by increasing production of bone morphogenetic protein 2. Chin Med J (Engl), 2007, 120: 204—210
- 8 Qian G, Zhang X, Lu L, et al. Regulation of *Cbfa1* expression by total flavonoids of *Herba epimedii*. Endocr J, 2006, 53: 87—94[doi]
- 9 Sheng H, Zhang G, Wang X L, et al. Phytochemical molecule icariin stimulates osteogenic but inhibits adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Bone, 2008, 43: S42—43[doi]
- 10 Qin L, Han T, Zhang Q, et al. Antiosteoporotic chemical constituents from Er-Xian Decoction, a traditional Chinese herbal formula. J Ethnopharmacol, 2008, 118: 271—279[doi]
- 11 裴国献,魏宽海,金丹.组织工程学实验技术.北京:人民军医出版社,2006.168
- 12 王新,刘玲蓉,张其清.纳米羟基磷灰石-壳聚糖骨组织工程支架的研究.中国修复重建外科杂志,2007,21:120—124

- 13 Lee J Y, Nam S H, Im S Y, et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J Control Release*, 2002, 78: 187—197[doi]
- 14 Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng*, 2006, 12: 1305—1311[doi]
- 15 Chen F M, Zhao Y M, Wu H, et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by locally controlled delivery of insulin-like growth factor-I from dextran-co-gelatin microspheres. *J Control Release*, 2006, 114: 209—222[doi]
- 16 王春, 扶雄, 杨连生. 一种新的蛋白释放载体——水溶性壳聚糖纳米粒子. *科学通报*, 2007, 52: 35—40
- 17 Matsumoto T, Okazaki M, Inoue M, et al. Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein. *Biomaterials*, 2004, 25: 3807—3812[doi]
- 18 Hu Q, Li B, Wang M, et al. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via *in situ* hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*, 2004, 25: 779—785[doi]
- 19 刘铁汉, 王毅, 王本祥, 等. 淫羊藿苷的肠菌代谢研究 I. 肠内细菌对淫羊藿苷的代谢转化. *中草药*, 2000, 31: 834—837
- 20 金岩. *组织工程学原理与技术*. 西安: 第四军医大学出版社, 2004. 36—41
- 21 刘大鹏, 艾合麦提, 古丽, 等. 体外培养骨髓基质细胞增殖和分化的相互关系. *中国临床康复*, 2005, 9: 9—12
- 22 Vaibhav B, Nilesh P, Vikram S, et al. Bone morphogenetic protein and its application in trauma cases: A current concept update. *Injury*, 2007, 38: 1227—1235[doi]
- 23 Liu H W, Chen C H, Tsai C L, et al. Targeted delivery system for juxtacrine signaling growth factor based on rhBMP-2-mediated carrier-protein conjugation. *Bone*, 2006, 39: 825—836[doi]

《中国科学 C 辑: 生命科学》 第 39 卷 第 4 期 目次

评述

- 松材线虫入侵种群形成与扩张机制——国家重点基础研究发展计划“农林危险生物入侵机理与控制基础研究”进展
 谢丙炎 成新跃 石 娟 张青文 戴素明 成飞雪 骆有庆 (333)

论文

- 携带 EBV-LMP2 基因的 DNA 疫苗、腺相关病毒疫苗和腺病毒疫苗免疫小鼠的特异性细胞免疫应答 杨松梅 王 湛 周 玲 杜海军 莫武宁 曾 毅 (342)
- 不同亚型流感病毒 NS1 蛋白在酵母菌细胞中转录激活功能的差异 李卫中 王革非 曾 俊 张丹桂 张 衡 陈小璇 陈幼莹 李康生 (346)
- 内皮素-1 通过 L-型钙通道的 Ca²⁺内流和钙致钙释放诱导心肌细胞内[Ca²⁺]的增加 曾庆华 李星婷 张文杰 钟国赣 孙成文 (352)
- Heregulin- α 及其受体在小鼠乳腺中的表达与作用 耿丽晶 李庆章 (362)
- 家蚕荧光茧色的判性机理 张雨青 虞晓华 沈卫德 马永雷 周丽霞 许乃霞 尹书倩 (372)
- 化学激活和季节对克隆猪出生率的影响 马育芳 卫恒习
 李 燕 李秋艳 方 锐 赵 蕊 张 坤 薛 恺 娄彦坤 戴蕴平 连林生 李 宁 (384)
- 亚磁环境孵化对雏鸡厌恶性条件化记忆的影响及相关的树突棘密度变化 肖 颖 王 倩 徐慕玲 李俊凤 李 兵 蒋锦昌 (392)
- 空间注意策略对 Flanker 任务下冲突适应的影响 陈 加 李 畅 何春红 陈安涛 (401)
- 一个新的水稻卷叶突变体的遗传分析与基因定位 施勇峰 陈 洁 刘文强 黄奇娜 沈波 HEI Leung 吴建利 (407)
- 水稻叶片光谱对亚铁胁迫的响应 迟光宇 陈 欣 史 奕 刘新会 (413)
- 信息熵方法大批量分析成熟体及前体 miRNA 序列的重要位点 杜江峰 武永军 张银霞 吴 磊 陶士珩 (420)