

网络出版时间: 2017-7-20 23:54 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170720.2354.001.html>

◇基础医学研究◇

HIF-1 α 介导 BMSCs 复合 PLGA 修复大鼠颅骨标准骨缺损的研究

朱艳秋^{1,2}, 王默涵^{1,2}, 周咏^{1,2}, 许敏^{1,2}, 何家才^{1,2}

摘要 目的 构建低氧诱导因子(HIF)-1 α 介导骨髓间充质干细胞(BMSCs)复合聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(PLGA)支架材料血管化组织工程骨,观察其在大鼠颅骨标准骨缺损中的修复效果。方法 将目的基因HIF-1 α 转染至BMSCs后,与支架材料PLGA复合,修复SD大鼠颅骨双侧直径5 mm的标准骨缺损($n=18$),随机分为3组:实验组植入HIF-1 α -BMSCs/PLGA复合体($n=6$),对照组植入BMSCs/PLGA复合体($n=6$),材料组仅植入PLGA支架材料($n=6$)。术后8周处死大鼠取材,分别行大体观察、X线片检查和HE染色观察缺损区骨形成情况。结果 大体观察、X线片检查和HE染色均显示实验组缺损区新骨形成量明显大于对照组及材料组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 体内研究表明HIF-1 α 能够介导BMSCs促进骨组织形成,PLGA是理想的支架材料,用其构建的血管化工程骨能够有效修复骨缺损。

关键词 低氧诱导因子-1 α ;骨髓间充质干细胞;聚乳酸-聚乙醇酸共聚物;组织工程骨;标准骨缺损

中图分类号 R 318.08

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1261-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.001

肿瘤、创伤、感染等因素均可造成颌面部骨缺损,特别是大面积骨缺损,而由于自体骨和异体骨移植应用受限,使骨缺损的修复成为目前临床医学亟待解决的难题之一^[1]。随着材料学和基因治疗学的发展,运用基因增强的组织工程技术修复骨缺损成为当前的研究热点,且用其构建血管化组织工程骨修复骨缺损是未来再生医学的一个重要研究领域^[2-3]。该研究以骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)为种子细胞,以聚乳酸-聚

乙醇酸共聚物(poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA)为支架材料,以低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)为细胞因子,同时利用HIF-1 α 具有促进BMSCs成血管和成骨双重调控作用,构建血管化组织工程骨,通过修复大鼠颅骨标准骨缺损,探讨HIF-1 α 介导BMSCs复合PLGA构建的血管化工程骨修复骨缺损的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠18只,8周龄, (300 \pm 10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于中国科技大学实验动物中心,随机分为3组:实验组植入HIF-1 α -BMSCs/PLGA复合体,对照组植入BMSCs/PLGA复合体,材料组仅植入PLGA支架材料,每组6只,标准环境适应性饲养1周。健康清洁级SD大鼠4只,4周龄, (100 \pm 10)g,购自安徽医科大学实验动物中心。在整个实验过程中对动物的处置均符合医学伦理学标准。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(FBS)(浙江天杭生物科技有限公司);胰酶细胞消化液(上海碧云天生物技术有限公司);慢病毒载体(上海和元生物有限公司);PLGA(上海聚睿生物材料有限公司);EDTA(美国Sigma-Aldrich公司);二氧化碳孵箱(美国Thermo公司);倒置相差显微镜(德国Leica公司);种植机(奥地利W&H公司)。

1.1.3 慢病毒载体构建 慢病毒载体Lenti-HIF-1 α 的构建由上海和元生物技术有限公司构建、鉴定和提供,病毒滴度为2.33 \times 10⁹ TU/ml。病毒包装完成后,收集病毒原液,超速离心机浓缩,并进行病毒滴度测定,确定最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI) = 加入病毒总数/细胞总数。

1.2 方法

1.2.1 SD大鼠BMSCs的分离与培养 选取健康4周龄SD大鼠,按照Maniatopoulos et al^[4]的方法,在无菌条件下分离大鼠后肢股骨,剪去两端骨髓,用不

2017-04-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81371114);安徽省自然科学基金(编号:1408085MKL29);安徽省科技攻关项目(编号:1604a0802082)

作者单位:¹安徽医科大学口腔医学院,合肥 230032

²安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:朱艳秋,女,硕士研究生;

何家才,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail:hejiacai@163.com

含血清 DMEM 培养液将骨髓冲出,完全培养基(含 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的培养基)制成单细胞悬液,接种至培养皿中,在 37 °C、5% CO₂ 条件下进行原代培养 2~3 d 换液 1 次,待细胞融合达 80%~90% 时,用 0.25% 胰酶消化传代,取生长状态良好的第 2~3 代细胞用于后续实验。

1.2.2 Lenti-HIF-1 α 转染 SD 大鼠 BMSCs 根据预实验结果,当 MOI = 12 时,转染效率最高,且 BMSCs 细胞仍然保持增殖状态,说明该转染滴度对 BMSCs 细胞扩增状态影响很小。取对数生长期的细胞按照每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,根据 MOI 值计算所需要的病毒量加入病毒浓缩液(按已测定 MOI 值用培养液稀释),并按 1 : 1 000 的比例加入终浓度为 8 μ g/ml 的 Polybrene。24 h 后加入完全培养液,观察细胞形态及生长情况,并在转染后的 3~7 d 运用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况,确定病毒转染效率。

1.2.3 构建 BMSCs/PLGA 复合体与扫描电镜观察 取直径 5 mm,厚度 2 mm 的无菌 PLGA 支架材料置入培养液中润湿过夜,设接种 HIF-1 α -BMSCs 为实验组,仅接种 BMSCs 为对照组,不接种细胞为材料组。收集对数生长期的第 2 代 BMSCs 及目的基因转染 1 周后的 BMSCs,将重悬后密度为 2×10^7 / ml 的单细胞悬液接种在 PLGA 上,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中 4 h 后,每孔加入足量培养液,培养 72 h 后用于动物实验。另每组各取 1 块材料或复合体,4% 多聚甲醛固定 20 min,常规脱水、干燥、喷金,扫描电镜下观察材料形态和细胞状态。

1.2.4 SD 大鼠颅骨标准骨缺损模型的建立与修复 无菌状态下,10% 水合氯醛行 SD 大鼠腹腔麻醉,麻醉剂量为 0.3~0.4 ml/100 g。麻醉起效后,术区备皮、消毒、铺巾。在大鼠颅骨正中行 2 cm 纵向切口,皮肤、肌肉和骨膜全层切开后翻瓣,暴露颅骨骨板。用携带外径 5 mm 环钻的种植机在大鼠颅中缝两侧钻出直径 5 mm 的圆形全层骨质缺损区 2 处。术中始终用 0.9% 无菌生理盐水喷水冷却环钻。标准骨缺损制备好后,仔细冲洗创面,除去残留碎骨,严密止血。骨膜和皮肤对位后,分层缝合,见图 1。

1.2.5 标本制备与修复效果观察 术后 8 周,过量 10% 水合氯醛腹腔注射处死大鼠,获取标本,大体标本观察缺损区颅骨修复情况,触诊新生骨组织硬度及范围;并通过口腔 X 线成像仪在 70 kV、7 mA 条件下对离体标本行 X 线片检查;10% 福尔马林固定

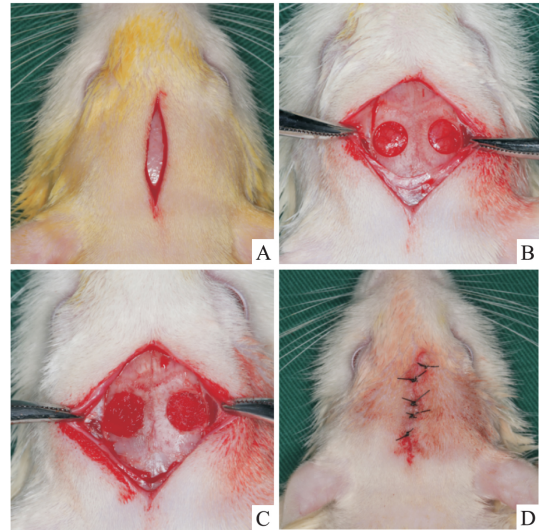


图 1 SD 大鼠颅骨标准骨缺损模型的建立与修复的手术过程
A:切开;B:建立标准骨缺损模型;C:PLGA 及其复合体修复;D:缝合

标本 72 h 后 10% EDTA 脱钙,脱水,石蜡包埋切片,常规 HE 染色,光学显微镜下进行组织学观察,并用图像分析软件(Image-Pro Plus™ Media Cybernetic, 美国)对 HE 染色结果进行组织形态计量分析,测量每个标本上两个骨缺损区的新生骨面积,计算新生骨面积的百分比,取平均值,新生骨面积百分比(%) = 成骨面积 / 缺损总面积 \times 100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用 One-Way ANOVA 法进行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SD 大鼠 BMSCs 转染结果 根据预实验结果,当 MOI = 12 时,Lenti-HIF-1 α 转染效率达到最高,且细胞形态为梭形,呈旋涡状生长,细胞仍保持增殖状态。目的基因转染 7 d 后,荧光显微镜下观察其转染效率达 80% 以上,见图 2。

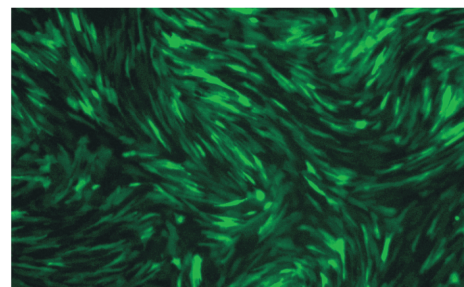


图 2 荧光显微镜下 Lenti-HIF-1 α 转染 BMSCs 7 d 时转染结果 \times 100

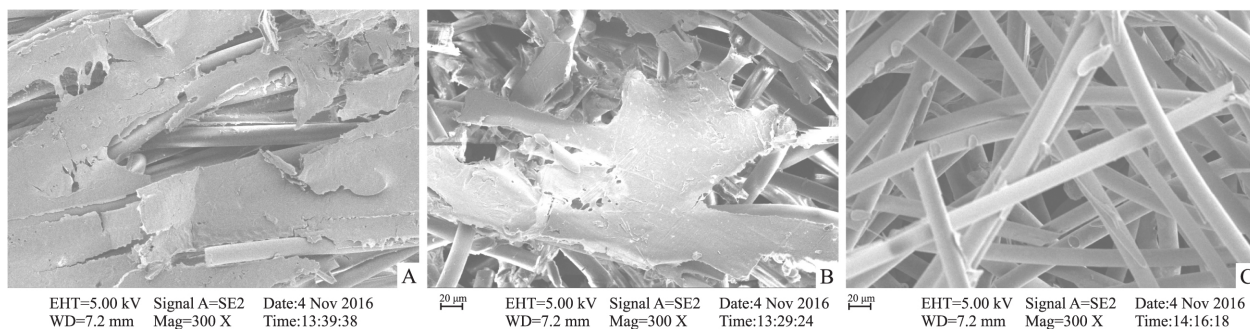


图3 PLGA 及其与细胞复合体扫描电镜图 × 300
A: 实验组; B: 对照组; C: 材料组

2.2 扫描电镜观察 PLGA 及其与细胞复合体扫描电镜结果可见转染目的基因 HIF-1 α 后的 BMSCs 和单纯 BMSCs 均可黏附至 PLGA 上, 且 HIF-1 α -BMSCs/PLGA 实验组可见丰富细胞外基质形成。材料组可见 PLGA 纤维相互交错, 呈三维立体多孔状, 见图 3。

2.3 大体观察

2.3.1 术后一般情况 术后 4 h, 大鼠可自行站立, 术后 3 d, 活动基本恢复正常, 进食良好。术后 1 周伤口即完全愈合, 所有动物术后恢复良好, 无异常死亡, 无伤口感染等术后并发症。

2.3.2 离体标本观察 大体标本观察可见实验组骨缺损区大面积致密新生骨形成, 仅中央尚余少量软组织区, 且新生骨与缺损区周围骨质无明显界限, 触诊新生骨质地坚硬; 对照组缺损区周围可见少量的新骨形成, 仍余大面积软组织区, 新生骨与缺损区周围骨质界限明显, 触诊新生骨有一定硬度, 但与实验组相比较软; 材料组骨缺损区为软组织覆盖, 偶见点状成骨, 触诊示缺损区质地松软, 见图 4。

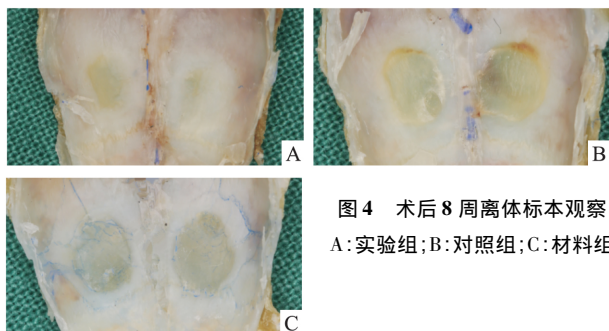


图4 术后8周离体标本观察
A: 实验组; B: 对照组; C: 材料组

2.4 X 线片检查 术后 8 周离体标本 X 线片结果显示实验组骨缺损区为大面积阻射影, 仅中央区尚余少量透射影, 且新生骨阻射影与缺损区周围骨质

阻射影无明显界限; 对照组骨缺损区周围可见少量阻射影, 密度较实验组低, 且与缺损区周围骨质阻射影界限明显; 材料组骨缺损区为大面积透射影, 偶见点状阻射影, 见图 5。

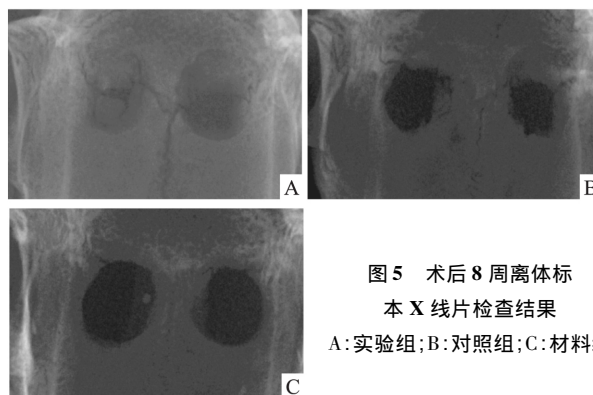


图5 术后8周离体标本 X 线片检查结果
A: 实验组; B: 对照组; C: 材料组

2.5 组织学观察 术后 8 周时, HE 染色镜下观察可见实验组骨缺损区绝大部分被新生骨充填, 部分区域出现改建成熟的骨组织; 对照组缺损区周围可见明显的新骨形成, 但明显少于实验组; 材料组缺损区边缘可见少量无细胞的、均质的类骨质形成; 三组均无 PLGA 残留, 见图 6。Image-Pro Plus 软件组织形态计量分析实验组、对照组、材料组的新生骨面积百分比, 差异有统计学意义 ($F = 296.69, P < 0.05$), 见图 7。

3 讨论

在骨发育和再生过程中, 血管生成与骨形成以耦合的形式存在^[5], 所以目前血管再生已被推测是骨组织工程中继种子细胞、支架材料、细胞因子三大要素之后的第 4 大要素^[6]。

BMSCs 具有自我更新和多向分化潜能等优点

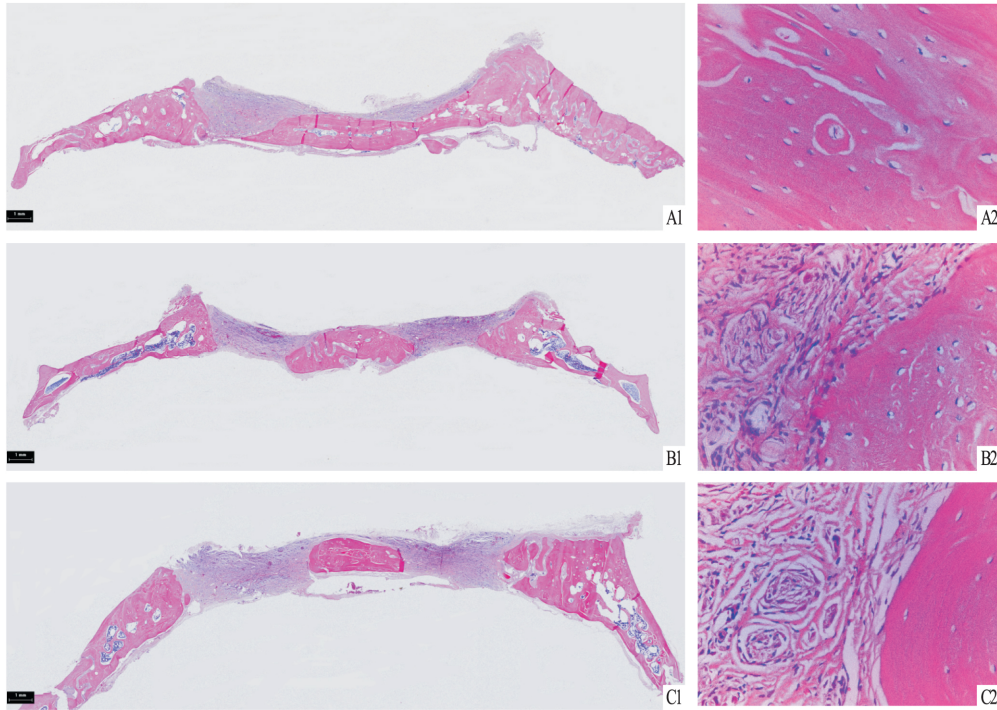


图6 术后8周 HE 染色组织学观察
A:实验组;B:对照组;C:材料组;1:×10;2:×40

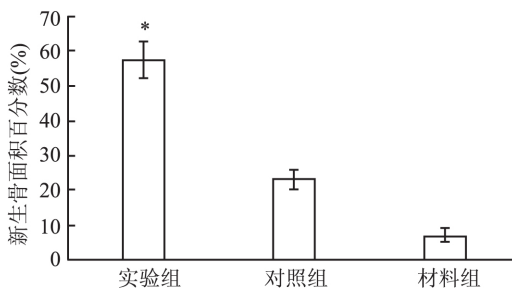


图7 组织形态计量分析各组新生骨面积百分数与对照组比较: * P < 0.05

而被广泛应用于骨组织工程领域,故本实验选择此细胞作为种子细胞。至于支架材料,本实验选用的是通过美国食品及药物管理局认证的 PLGA,是一种人工合成高分子可降解材料。在本实验中,通过扫描电镜结果显示 PLGA 具有三维立体多孔结构,这可为细胞生长提供空间以及营养物质与代谢产物的交换通道;且 BMSCs 和 HIF-1 α -BMSCs 均可正常黏附至材料上,说明该支架材料没有细胞毒性。另外,大鼠术后观察伤口愈合良好,无伤口感染等并发症,证明其具有良好生物相容性。此外,PLGA 的降解速度和机械性能具有可控性,可通过调节聚乳酸(PLA)和聚乙醇酸(PGA)的组成和配比进行控制^[7],研究^[8]表明当 PLA/PGA 比例为 90/10,支架

的降解速度近似于细胞外基质产生的速度,可为细胞外基质形成建立支撑,本研究所采用的 PLGA 支架材料的 PLA/PGA 比例即 90/10,组织学观察可见 8 周时支架材料几乎被完全吸收。因此,PLGA 符合理想支架材料的要求^[9]。

细胞因子是组织工程骨的关键要素,种类繁多,如骨形态发生蛋白-2、血管内皮生长因子等,本实验选用的是本课题组前期研究中成功构建的突变型 HIF-1 α 。在前期研究中,根据人的 HIF-1 α 基因(编号:001530),对其全长编码区序列进行如下定点突变:803 位天冬酰胺突变成丙氨酸,564 位脯氨酸突变成丙氨酸,402 位脯氨酸突变成丙氨酸,成功构建了突变型 HIF-1 α 慢病毒载体,并将其转染至 293T 细胞后分别在常氧和低氧条件下培养发现,突变型 HIF-1 α 具有显著的抗降解作用,且更加稳定^[10]。本研究中 Lenti-HIF-1 α 转染 SD 大鼠 BMSCs 后第 7 天荧光显微镜下观察其转染效率已达 80% 以上,进一步证实此突变型 HIF-1 α 在常氧条件下可稳定高效表达。体外研究^[11]已证明突变型 HIF-1 α 能够显著促进 BMSCs 表达 VEGF、SDF-1 等成血管因子,因此本实验通过构建 HIF-1 α -BMSCs/PLGA 血管化组织工程骨修复 SD 大鼠颅骨标准骨缺损,结果显示实验组修复效果明显优于材料组和对照组,并对 HE 染色结果进行组织形态计量分析,显示实验组

新生骨面积百分比约为对照组的 2 倍, 差异有统计学意义。本研究结果表明 HIF-1 α 能够介导 BMSCs 促进骨组织形成, 并有效修复骨缺损。若适当延长观察时间, 图 5 中实验组骨缺损区中央少量透射影将消失, 修复效果会更理想。Zou et al^[12] 通过 HIF-1 α 转染至 Fisher 344 大鼠 BMSCs 复合磷酸骨水泥支架材料有效修复大鼠颅骨标准骨缺损, 本研究结果与其修复效果一致。

综上所述, 本研究通过构建 HIF-1 α 介导 BMSCs 复合 PLGA 血管化工程骨, 修复 SD 大鼠颅骨标准骨缺损, 体内研究表明 HIF-1 α 能够介导 BMSCs 促进骨组织形成, PLGA 是理想的骨组织工程支架材料之一, 用其构建的血管化工程骨能够有效修复骨缺损, 可为解决临床上骨缺损的修复提供理论和实验依据。

参考文献

- [1] Bauer T W, Muschler G F. Bone graft materials: an overview of the basic science [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2000, 371(371): 10-27.
- [2] Barabaschi G D, Manoharan V, Li Q, et al. Engineering pre-vascularized scaffolds for bone regeneration [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 881: 79-94.
- [3] Chen F M, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010, 16(2): 219-55.
- [4] Maniopoulos C, Sodek J, Melcher A H. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats [J]. *Cell Tissue Res*, 1988, 254(2): 317-30.
- [5] Chen D, Tian W, Li Y, et al. Osteoblast-specific transcription factor Osterix (Ox) and HIF-1 α cooperatively regulate gene expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(1): 176-81.
- [6] Genova T, Munaron L, Carossa S, et al. Overcoming physical constraints in bone engineering: the importance of being vascularized [J]. *J Biomater Appl*, 2016, 30(7): 940-51.
- [7] Cai Q, Bei J Z, Wang S G, et al. Study on the biocompatibility and degradation behavior of poly(lactide-co-glycolide) *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Functional Polymers*, 2000, 13(3): 249-54.
- [8] 张巍巍, 李艳萍, 梁鹏, 等. 人牙髓干细胞在聚乳酸-聚乙醇酸共聚物支架上粘附与增殖的研究 [J]. *口腔医学研究*, 2011, 27(12): 1083-5.
- [9] Hutmacher D W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2529-43.
- [10] 王彦梅, 何家才, 邹多宏, 等. 突变型 HIF-1 α 慢病毒载体的构建及其在常氧条件下的抗降解作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(10): 1147-51.
- [11] Zou D, Han W, You S, et al. *In vitro* study of enhanced osteogenesis induced by HIF-1 α -transduced bone marrow stem cells [J]. *Cell Prolif*, 2011, 44(3): 234-43.
- [12] Zou D, Zhang Z, He J, et al. Repairing critical-sized calvarial defects with BMSCs modified by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor-1 α and a phosphate cement scaffold [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(36): 9707-18.

Effects of HIF-1 α transfected BMSCs combined with PLGA on repairing rat calvarial bone defects

Zhu Yanqiu^{1,2}, Wang Mohan^{1,2}, Zhou Yong^{1,2}, et al

(¹Stomatologic College of Anhui Medical University, Hefei 230032; ²The Affiliated Stomatologic Hospital of Anhui Medical University, Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct the vascular tissue engineering bone of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) mediated bone mesenchymal stem cells (BMSCs) combined with polylactic-co-glycolic acid (PLGA) scaffold, and to observe the effect on repairing the critical-sized calvarial bone defect in rat. **Methods** The target gene HIF-1 α was transfected into BMSCs, and combined with PLGA scaffold, then implanted to repair bilateral calvarial defect (Φ 5 mm) of SD rat ($n=18$). The rats were randomly divided into three groups: HIF-1 α -BMSCs/PLGA group ($n=6$), BMSCs/PLGA group ($n=6$) and only PLGA scaffold group ($n=6$). The new bone formation was observed by gross inspection, X-ray examination and HE staining respectively at 8 weeks after surgery. **Results** The gross inspection, X-ray examination and HE staining showed that the amount of new bone formation in the experimental group was significantly higher than that in the control group and the material group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** HIF-1 can mediate BMSCs to promote bone tissue formation. PLGA is an ideal scaffold material and the bone defect can be repaired effectively by using this vascular tissue engineering bone.

Key words hypoxia-inducible factor-1 α ; bone marrow mesenchymal stem cells; polylactic-co-glycolic acid; tissue-engineered bone; critical-sized bone defects