

海藻酸钠壳聚糖支架合成骨细胞 特异性多肽修复兔颅骨缺损

陈慧敏 宋婷婷 吴齐越 高启坤 庄艳琴 吴明月

摘要 目的 评价成骨细胞特异性识别多肽在骨缺损中的修复效果。方法 将成骨细胞特异性识别多肽与海藻酸钠/壳聚糖水凝胶(SA/CS Gel)复合植入兔颅骨双侧 ϕ 15 mm圆形极限骨缺损区,实验组缺损处植入海藻酸钠/壳聚糖/成骨细胞特异性识别多肽水凝胶(SA/CS/多肽 Gel),对照组植入SA/CS Gel,空白组不植入任何载体及药物,随机分组。术后8周活体行CBCT扫描,随后处死取材并常规HE染色行组织学检查观察成骨效果。结果 影像学及组织形态学结果可见,实验组缺损区成骨量明显大于对照组及空白组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 成骨细胞特异性识别多肽可促进兔颅骨缺损的骨修复。

关键词 成骨细胞特异性识别多肽; 颅骨缺损; 海藻酸钠/壳聚糖复合凝胶

中图分类号 R 318.08

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0504-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.009

外伤、肿瘤、炎症及先天疾病等造成的颅颌面骨缺损一直是临床治疗的难题,目前的骨缺损修复方法均存在一定不足,组织工程骨因材料来源丰富,加工生产方法简单等优点为骨缺损修复研究提供了新的思路和方法。该实验依据组织工程学原理,以课题组前期研究获得的成骨细胞特异性识别多肽作为信号因子,海藻酸钠/壳聚糖水凝胶(sodium alginate and chitosan composite hydrogels, SA/CS Gel)作为支架材料,将两者复合植入兔颅骨极限骨缺损的动物模型内,以评价该特异性多肽的促成骨效应。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组 健康新西兰兔12只(安徽医科大学动物实验中心提供),雌雄不限,2.8~3.5 kg,实验室内适应性饲养1周。12只新西兰兔均双侧制备 ϕ 15 mm的骨缺损,实验组缺损处植入SA/CS/多肽 Gel,对照组植入SA/CS Gel,空白组不植入

2017-02-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81170993)

作者单位: 安徽医科大学口腔医学院,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: 陈慧敏,女,硕士研究生;

吴明月,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: wumingyue321@126.com

Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry for identification of clinical yeasts

Zhang Boyun, Ye Naifang, Wang Zhongxin

(Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To evaluate the ability of MALDI-TOF MS in identification of the yeast isolated from clinical specimens. **Methods** 387 strains of yeasts were tested. All the strains were from clinical specimen and identified by VITEK MS and API ID 32C system at the same time. Sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA was used as the reference method in the analysis of a total of 387 yeast isolates. The accuracy of detected results was analyzed by the χ^2 test. **Results** The identification accuracy rates of VITEK MS, API ID 32C were respectively 97.7% and 93.0%. The difference was statistically significant ($\chi^2 = 9.439, P = 0.002$). There was no statistical significance between MALDI-TOF and ITS sequencing. **Conclusion** MALDI-TOF is a rapid simple and accurate method which is identified to species level in identification of yeasts.

Key words yeast; ITS gene sequencing; MALDI-TOF MS

任何载体及药物 随机分组。

1.2 实验试剂和仪器 CS、SA、 β -甘油磷酸钠、EDTA(美国 Sigma-Aldrich 公司);乙酸(上海国药集团化学试剂有限公司);成骨细胞特异性识别多肽(上海科肽生物有限公司);YJ-875 型超净工作台(苏州净化设备厂);组织切片机、倒置相差显微镜及照相系统(德国 Leica 公司);CBCT(合肥美亚光电公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 负载多肽的 SA/CS/Gel 支架制备 首先称取一定量的 CS 溶于 1.0 mol/L 的醋酸溶液中(CS 的浓度为 2.25%),121 °C 高压蒸汽灭菌 10 min 将 56% β -甘油磷酸钠(sodium β -glycerophosphate, GP)以 2:5 的体积比加入 CS 溶液中,测得 pH 为 7.2~7.4。将多肽溶解于 2.0% 的 SA 中,0.22 μ m 滤膜过滤除菌。在超净台上将含多肽的 SA 与 CS/GP 溶液以 3:7 的体积比搅拌反应(多肽浓度为 160 mg/ml)。取 0.5 ml 混合溶液于模具中,60 °C 条件下反应 20 min 即得 ϕ 15 mm、厚约 2 mm、同时负载多肽的凝胶支架。未加多肽的 SA 与 CS/GP 溶液通过上述反应即可获得对照组的复合凝胶支架。

1.3.2 动物模型的建立 健康新西兰兔 12 只。术前用 3% 的戊巴比妥钠按 1 ml/kg(先注射 2/3)剂量进行耳缘静脉注射。麻醉后头部备皮,常规消毒铺巾,自双耳正中向前做约 5 cm 的切口,依次分离皮肤、肌肉、骨膜,暴露颅骨。用种植小球钻制备双侧 ϕ 15 mm 的全层骨缺损,随后于骨缺损处随机置入各组。分层缝合,术后 3 d 连续青霉素 40×10^4 U/次,1 次/d 肌肉注射,预防感染。见图 1。

1.3.2.1 CBCT 观察 于术后 8 周在兔麻醉的状况下由放射科专业人员扫描(电压 82 kV、电流 2 mA),扫描结束后行冠状面重建及三维重建。

1.3.2.2 大体观察 8 周后以过量戊巴比妥钠麻醉剂处死动物取材,完整分离兔颅骨。观察缺损区颅骨修复情况,触诊新生组织硬度及范围。

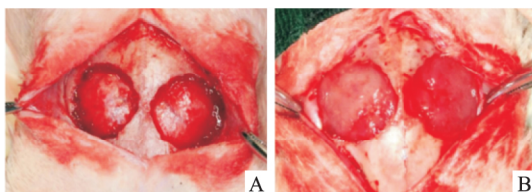


图 1 兔颅骨双侧极限骨缺损模型的建立
A: 制备的颅骨缺损; B: 缺损处植入凝胶

1.3.2.3 组织学观察 将固定后的标本置于 10%

EDTA 中脱钙,针刺易穿过标本即为脱钙完成,时间大约为 6 周。石蜡包埋,颅骨纵切 4 μ m 厚度的连续切片,常规 HE 染色。选择通过标本中心的切片,用图像分析软件 Image-Pro-Plus 定量分析切片缺损区域新骨生成率,计算公式为新生骨面积/骨缺损区域面积。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 9.0 软件进行分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据进行单因素方差分析,进一步分析采用 LSD 法进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察 术后 8 周处死动物取材行大体标本观察,实验组缺损区可见片状致密骨组织生成,与周围组织无明显分界,触诊质地硬且无弹性;空白组创面仍可见明显的骨缺损区,与周围组织有较显著分界,触诊略软且弹性明显;对照组缺损中央部位可见偏黄、微突、硬度较低纤维组织,与周边组织有少许骨性连接,触诊有一定硬度,但较实验组明显偏软。见图 2。

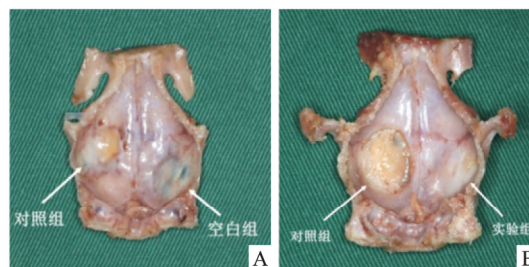


图 2 8 周后离体标本观察

A: 左侧为对照组,右侧为空白组; B: 左侧为对照组,右侧为实验组

2.2 CBCT 扫描和三维重建 术后 8 周三重建结果可见,实验组缺损区密度明显增高,缺损边缘及中央区域均可见新生骨覆盖;空白组缺损区内未见明显高密度影;对照组仅边缘少量高密度影,缺损范围较空白组小。冠状面观察,空白组可见颅顶部缺损明显,骨板不连续;复合凝胶对照组边缘部分出现高密度影,与周围骨质相延续,局部少许不连贯;复合凝胶/多肽实验组缺损区新生骨与周围骨质基本融合。见图 3。

2.3 组织学观察 HE 染色结果观察,可见空白组缺损区域主要为纤维组织包裹;实验组及对照组均可见新生骨组织,前者骨量明显多于后者,且实验组骨小梁更为粗大、致密(图 4)。Image-Pro-Plus 软件定量分析各组的新生骨生成率,实验组为($42.55 \pm$

2.67) % ,对照组为 (17.60 ± 4.91) % ,空白组为 (3.47 ± 2.69) % ,差异有统计学意义 ($F = 305.45$, $P < 0.05$) 。见图 5。

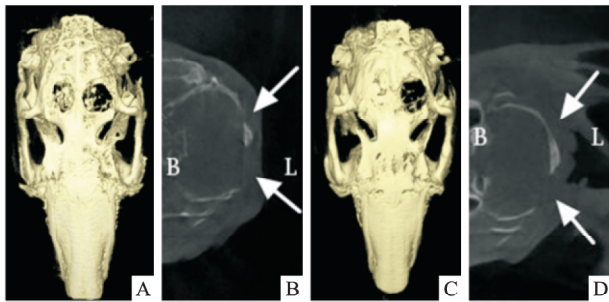


图3 术后8周CBCT扫描三维重建及冠状位水平CT

A: 左侧缺损为对照组,右侧缺损为空白组; B: 图A的冠状位CT; C: 左侧缺损为实验组,右侧缺损为空白组; D: 图C的冠状位CT; 冠状位CT中B代表颊侧方向,L代表舌侧方向

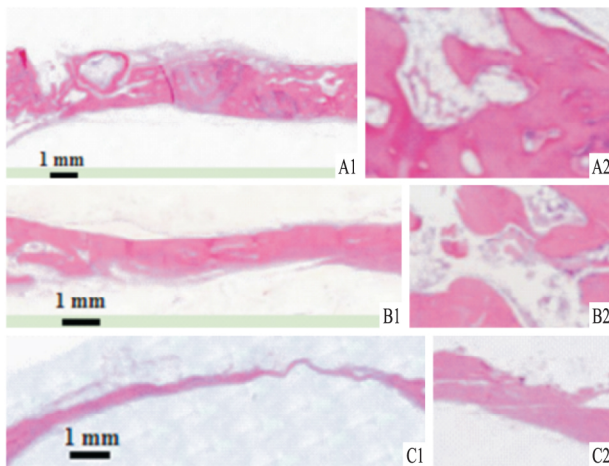


图4 术后8周组织学观察

A: 实验组; B: 对照组; C: 空白组; 1: 显微缩影图; 2: HE × 10

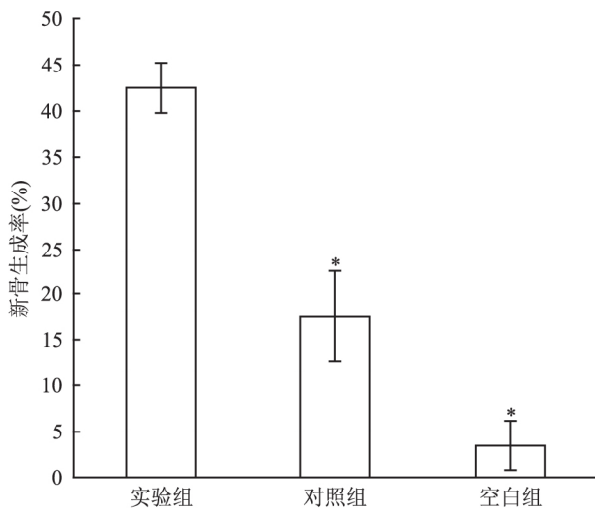


图5 缺损区新骨生成率
与实验组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

组织工程化骨能以最小的创伤和最佳的塑形来实现骨组织重建,可避免传统骨替代技术的不足,有望成为骨缺损修复研究领域更理想、有效的骨再生方法。组织工程骨重建方式有两种:一种是种子细胞 + 支架 + 信号因子,另一种是支架 + 信号因子。目前常用的信号因子有 BMP-2、TGF- β 等,但这些信号因子存在成本高、不易保存,制作程序复杂等缺点^[1]。本研究所采用的信号因子是成骨细胞特异性识别多肽(氨基酸序列为 VLAVPWSEPGYL),具备如下优点:结构简单,易消毒储存,较蛋白质更易设计和修饰,良好的生物相容性^[2-4]。本课题组前期研究^[5]证实 $10^{-8} \sim 10^{-4}$ mol/L 浓度范围的成骨细胞特异性识别多肽能够促进人颅骨成骨细胞的增殖和矿化,且在 10^{-5} mol/L 浓度促进成骨细胞增殖及矿化相关蛋白表达最为显著。据此,为进一步研究该特异性多肽的体内生物学效应,本研究依据组织工程学原理,采用 CS、SA 天然多糖作为支架,以上述特异性多肽作为信号因子,将两者复合植入兔颅骨缺损动物模型体内,并通过大体标本观察、影像学及组织形态学检测以评价其体内成骨效应。术后 8 周 CBCT 的曲面断层及三维重建观察可见实验组骨缺损已经基本修复,颅骨缺损剩余面积明显小于对照组及空白组。且 HE 组织学切片光镜下可见实验组的新生骨量明显多于对照组及空白组。结果证实,成骨细胞特异性识别多肽能够促进兔颅骨缺损的修复再生。根据种植体愈合的研究^[6]显示 2 ~ 6 周为编织骨形成阶段,6 ~ 18 周为板层骨致密化和骨重建期。骨缺损愈合 8 周后已经形成大量编织骨并开始进一步骨改建。故本实验选择 8 周为观察周期,且实验结果显示已能够较清晰观察、证实骨愈合效果。为了更全面地评估特异性识别多肽在骨缺损修复中的效果,还需在今后的动物实验中增加时间点并延长愈合周期。另外,该多肽仅通过动物实验从影像学及组织学水平探讨成骨作用,其具体的生理学机制尚有待进一步研究。

本实验选择 SA/CS Gel 作为载体负载特异性多肽,不仅能为成骨相关细胞提供生长、增殖空间,而且能充分发挥成骨细胞特异性多肽骨诱导功能。Li et al^[7-10]将 CS 进行磷酸化处理并应用于仿生矿化以及骨再生方面的研究,证实仿生合成 CS-磷灰石复合材料是一种有前途的骨组织修复材料。本研究兔颅骨骨缺损动物模型,因其缺损较为表浅,创面

小,要求水凝胶支架需具备一定的韧性和强度,而常温下制备的水凝胶流动性大,难以满足创面的填充和塑形。为此,经过大量实验摸索,最终制备的水凝胶支架具有良好的韧性及加工成型性且动物手术操作也证实上述复合支架材料完全符合设计的需要。复合凝胶支架的缓释以及同步降解实验本研究未与涉及,有待在后续实验中进一步探讨。

本实验建立兔颅骨双侧极限量缺损的动物模型,将复合特异性多肽的 SA/CS Gel 支架植入体内,通过 CT 影像学及组织形态学检测,结果证实该特异性识别多肽能够显著促进骨缺损的成骨修复,为临床上解决颅颌面部骨缺损及口腔种植中普遍存在的骨质、骨量不足问题提供新的研究思路和治疗方法。

参考文献

- [1] Tavakoli-darestani R, Manafi-rasi A, Kamrani-rad A. Dexamethasone-loaded hydroxyapatite enhances bone regeneration in rat calvarial defects[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(1): 423-8.
- [2] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-7.
- [3] Ullman C G, Frigotto L, Cooley R N. *In vitro* methods for peptide display and their applications[J]. *Brief Funct Genomics*, 2011, 10(3): 125-34.
- [4] Loi M, Di Paolo D, Soster M, et al. Novel phage display-derived neuroblastoma-targeting peptides potentiate the effect of drug nanocarriers in preclinical settings[J]. *J Control Release*, 2013, 170(2): 233-41.
- [5] 钱海燕, 陈慧敏, 杜明亮, 等. 成骨细胞特异性识别多肽对人成骨细胞增殖和矿化影响的实验研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(3): 337-40.
- [6] 宿玉成. 现代口腔种植学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004, 53-6.
- [7] Li Q L, Chen Z Q, Darvell B W, et al. Biomimetic synthesis of the composites of hydroxyapatite and chitosan-phosphorylated chitosan polyelectrolyte complex[J]. *Mater Lett*, 2006, 60(29-30): 3533-6.
- [8] Li Q L, Chen Z Q, Darvell B W, et al. Chitosan-phosphorylated chitosan polyelectrolyte complex hydrogel as an osteoblast carrier[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007, 82(2): 481-6.
- [9] Li Q L, Wu M Y, Tang L L, et al. Bioactivity of a novel nanocomposite of hydroxyapatite and chitosan-phosphorylated chitosan polyelectrolyte complex[J]. *J Bioact Compat Polym*, 2008, 23(6): 520-31.
- [10] Li Q L, Huang N, Chen J, et al. Anticoagulant surface modification of titanium *via* layer-by-layer assembly of collagen and sulfated chitosan multilayers[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 89(3): 575-84.

The effects of sodium alginate and chitosan composite hydrogels combination with the peptide that specifically bind to osteoblasts on the repair of rabbit calvarial defects

Chen Huimin, Song Tingting, Wu Qiyue, et al

(Stomatologic College & Hospital, Anhui Medical University,

Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To evaluate the effect of the peptide that specifically bind to osteoblasts on bone healing. **Methods** To enhance bone regeneration of the rabbit calvarial defect, sodium alginate and chitosan composite hydrogels (SA/CS Gel) were used as scaffold to load the peptide that specifically bind to osteoblasts. Bilateral parietal critical size bone defects of 15 mm diameter were performed in rabbits, all defects were randomly divided into SA/CS/Peptide Gel group, SA/CS Gel group and the empty group. The bone regeneration ability of the peptide that specifically bind to osteoblasts was investigated by CBCT. Hematoxylin and eosin staining (HE) was performed at 8 weeks after surgery. **Results** According to imaging and histomorphology, SA/CS/Peptide group showed the highest bone regeneration than SA/CS Gel group and the empty group ($P < 0.05$). **Conclusion** The peptide that specifically bind to osteoblasts can enhance the bone regeneration of rabbit calvarial defect.

Key words the peptide that specifically bind to osteoblasts; calvarial defect; sodium alginate/chitosan composite hydrogels