

载骨碎补总黄酮磷酸钙骨水泥对骨缺损模型大鼠诱导膜中成骨细胞分化的影响及其机制研究[△]

董航^{1*}, 黄嘉华², 麦喆钊³, 陈柏行¹, 黄培镇¹, 蔡群斌¹, 陈超¹, 纪树亮², 孙伟鹏², 黄尹滢², 周琦石^{1#} (1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510006; 3. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006)

中图分类号 R314;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)10-1321-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.10.06

摘要 目的:探究载骨碎补总黄酮磷酸钙骨水泥对骨缺损模型大鼠诱导膜成骨分化的作用及其机制。方法:分别以磷酸钙骨水泥(CPC)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)骨水泥为载体,以强骨胶囊内容物(有效成分为骨碎补总黄酮)制备载药CPC和载药PMMA骨水泥。选取64只雄性SD大鼠,随机分为载药CPC组、载药PMMA骨水泥组、未载药CPC组、未载药PMMA骨水泥组,每组16只。分离大鼠股骨并行截骨,以制备骨缺损模型,然后分别植入相应骨水泥。造模4周后,各组大鼠切开并保护好诱导膜,取出骨水泥,植入自体松质骨。于造模后第4周对大鼠后肢骨进行X射线拍片;于造模后第4周和植骨后第6周时分别取大鼠骨缺损区诱导膜和新生骨,采用苏木精-伊红染色法观察诱导膜组织形态学,并测定新生骨组织的骨小梁宽度及成骨细胞数;采用免疫组化检测诱导膜中人骨成型蛋白2(BMP-2)、血管内皮生长因子(VEGF)的蛋白表达水平;采用Western blotting法检测新生骨组织中Smad1、Smad4、Smad7的蛋白表达水平。结果:与其余3组比较,载药CPC组大鼠骨缺损区的骨水泥降解更明显,且可见诱导膜组织形成,骨缺损区域更小;诱导膜中毛细血管内皮细胞丰富、排列有序;新生骨组织中骨小梁宽度及成骨细胞数均显著增加($P < 0.05$);诱导膜中BMP-2、VEGF的蛋白表达水平和新生骨组织中Smad1、Smad4、Smad7的蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论:载骨碎补总黄酮CPC具有促进骨缺损模型大鼠诱导膜成骨的作用。这可能是通过激活BMP-2/Smad通路,从而调节成骨细胞分化;同时通过提高VEGF表达,促进血管内皮细胞分化,加快形成毛细血管网,从而促进骨愈合。

关键词 骨碎补;总黄酮;磷酸钙骨水泥;诱导膜;骨缺损;成骨分化;机制;大鼠

Study on the Effects and Its Mechanism of Calcium Phosphate Bone Cement Loading Total Flavonoids of *Davallia mariesii* on Osteoblast Differentiation in Induced Membrane of Bone Defect Model Rats

DONG Hang¹, HUANG Jiahua², MAI Zhexing³, CHEN Boxing¹, HUANG Peizhen¹, CAI Qunbin¹, CHEN Chao¹, JI Shuliang², SUN Weipeng², HUANG Yinying², ZHOU Qishi¹ (1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 2. School of the First Clinical Medical Sciences, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 3. School of the Second Clinical Medical Sciences, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects and its mechanism of calcium phosphate bone cement (CPC) loading total flavonoids of *Davallia mariesii* on osteogenic differentiation of induced membrane in rats. METHODS: Drug-loading CPC and drug-loading polymethyl methacrylate (PMMA) cement were prepared with the contents of Qianggu capsules (total flavonoids of *D. mariesii* as active ingredient) using CPC and PMMA cement as carrier. Totally 64 male SD rats were randomly divided into drug-loading CPC group, drug-loading PMMA cement group, no-drug CPC group, no-drug PMMA cement group, with 16 rats in each group. The femur of rats was separated and osteotomized to prepare bone defect model, and then the corresponding bone cement was implanted. Four weeks after modeling, the induced membranes of rats were cut and protected. Bone cement was taken out and autogenous cancellous bone was implanted. At the 4th week after modeling, X-ray photographs were taken on the hind limb bones of rats. At the 4th week after modeling and 6th week after bone grafting, induced membranes and new bone were taken from the bone defect area of rats respectively. HE staining was used to observe the morphology of induced membrane, and the width of bone trabecular and the number of osteoblasts of new bone tissue were measured. Immunohistochemistry was used to detect the protein expression of BMP-2 and VEGF in induced membrane. Western blotting assay was used to detect the protein expression of Smad1, Smad4 and Smad7 in new bone. RESULTS:

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81674001);广东省中医药局科研项目(No.20172046)

* 主治医师,硕士。研究方向:中西医结合治疗骨伤。电话:020-36588581。E-mail:15920313256@139.com

通信作者:副主任医师,硕士生导师,博士。研究方向:中西医结合治疗骨伤。E-mail:13600456498@139.com

Compared with other 3 groups, the degradation of bone cement in drug-loading CPC group was more obvious in the bone defect areas, which showed that the formation of induced membrane was observed and the bone defect areas were smaller; capillary endothelial cells were abundant and

orderly arranged in the induced membranes, and the width of bone trabeculae and the number of osteoblasts in the new bone tissue increased significantly ($P < 0.05$); the protein expression of BMP-2 and VEGF in the induced membrane, the protein expression of Smad1, Smad4 and Smad7 in new bone were increased significantly ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: CPC loading total flavonoids of *D. mariesii* promotes the formation of induced membrane osteoblast in bone defect model rats, which may be associated with regulating osteoblast differentiation by activating BMP-2/Smad pathway; at the same time, it can promote bone healing by promoting the differentiation of vascular endothelial cells, accelerating the formation of capillary network and increasing the expression of vascular endothelial cells.

KEYWORDS *Davallia mariesii*; Total flavonoids; Calcium phosphate bone cement; Induced membrane; Bone defects; Osteogenic differentiation; Mechanism; Rat

骨缺损的治疗是骨科手术治疗中最困难的挑战之一。既往研究表明,当骨缺损的长度大于骨内直径的2.5倍时,如果不采用手术治疗干预,则骨缺损将难以通过自身修复^[1]。目前,诱导膜(Masquelet)技术被认为是一种治疗骨缺损的有效手段,具有骨愈合时间短、技术要求低、并发症少等特点;而且诱导膜在成骨过程中,可促进机体分泌多种生长因子,加快骨愈合^[2]。该技术主要分为两步:第一步是对骨缺损处进行清创,将骨水泥置入缺损处进行旷置,产生诱导膜;第二步是切开诱导膜,移除骨水泥,在诱导膜内填充足量的颗粒状自体松质骨^[3]。

目前广泛应用于临床的骨水泥是聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)骨水泥,但由于其不能降解、缺乏生物活性等原因,常被其他材质的骨水泥取代^[4]。磷酸钙骨水泥(CPC)由于具有性质稳定、可降解等特性,而且在低温环境下能保持自身理化性质稳定,因此已被认为是骨骼系统理想的药物载体^[5]。不过单一的CPC治疗骨缺损效果欠佳,因此有学者尝试通过改变诱导材料(即骨水泥成分)来改变诱导膜的生物活性,从而提高成骨效能、改善临床疗效^[6]。联合药物的局部释放可能是提高CPC治疗效果的一种新方法,但加入何种药物成分能增加诱导膜的成骨效能,目前报道甚少。已有研究发现,中药对于促进成骨具有良好疗效^[7-8]。本课题组在前期研究中也发现,骨碎补总黄酮可上调诱导膜中转化生长因子 β (TGF- β)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达,还能促进骨缺损模型动物的骨痂形成、提高其局部碱性磷酸酶(ALP)和人骨成型蛋白2(BMP-2)的含量,具有促进成骨的作用^[1]。姜自伟等^[9]研究发现,骨碎补总黄酮可通过提高局部BMP-2和Smad1的含量以促进新骨形成、加快骨痂矿化和增强生物力学性能。但骨碎补总黄酮的局部释放能否促进诱导膜生物学特性的发挥、促进骨的再生与修复,其作用机制又是什么?目前国内外尚无相关研究。因此,本课题组采用载有骨碎补总黄酮的CPC干预治疗骨缺损模型大鼠,观察大鼠骨修复情况以及相关因子的变化,探索该载药骨水泥对诱导膜成骨分化的影响及作用机制,为其临床应用提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器

FD-X型数字遥控X线机(中山大学第一附属医院提供);Eclipse CI型正置光学显微镜(日本Nikon公司);7500型化学发光免疫分析仪(美国Beckman公司);FluorChem Q型蛋白印迹成像和定量分析系统(美国Alpha公司)BT256型石蜡切片机(湖北阔海医疗科技有限公司);12 cm手术用剪、10 cm眼用有齿镊、微摆锯(上海金钟医疗手术器械厂);不锈钢六孔钢板(课题组自制);Secura型分析天平(德国Sartorius公司);HW-60型孵化摇床(常州朗越仪器制造有限公司)。

1.2 药品与试剂

强骨胶囊(北京岐黄医药股份有限公司,批号:20030007,规格:0.25 g;其有效成分为骨碎补总黄酮);CPC、PMMA骨水泥(上海瑞邦生物技术公司;CPC由固相粉末和固化液两部分组成,PMMA骨水泥由固剂和液剂两部分组成);兔抗人Smad1/4/7单克隆抗体、人抗兔BMP-2单克隆抗体、人抗兔VEGF单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔单克隆抗体(二抗)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Cell Signaling Technology公司);苏木精-伊红(HE)染料、二喹啉甲酸(BCA)测定试剂盒、电泳胶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);RIPA裂解液(北京博凌科为生物科技有限公司);ECL化学发光显色试剂盒[爱必信(上海)生物技术有限公司];硫酸庆大霉素注射液(广东南国药业有限公司,规格:1 mL:8 \times 10⁴ U);戊巴比妥(国药集团化学试剂有限公司,纯度:>99%);氯化钠注射液(四川美大康华康药业有限公司,规格:500 mL:4.5 g;作生理盐水使用);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 动物

健康雄性SD大鼠,2~3月龄,体质量260~280 g,由广州中医药大学实验动物中心提取,动物生产许可证号:SYXK(粤)2013-0092。

2 方法

2.1 载药/未载药骨水泥的制备

2.1.1 载骨碎补总黄酮/未载药CPC 在20℃环境温度下,取CPC的固相粉末、固化液和骨碎补总黄酮溶液(取强骨胶囊内容物,以生理盐水为溶剂,按0.1 mg:10 mL

的比例配制成溶液,下同),按2:1:10(g/mL/mg)的比例放入50 mL注射器中混合成糊状,灌注入直通型无菌吸痰管中固化20 min,制成载骨碎补总黄酮CPC(以下简称“载药CPC”)。另以等体积生理盐水代替骨碎补总黄酮溶液,同法制备未载药CPC。两者均于121 °C消毒20 min,保存,备用^[10]。

2.1.2 载骨碎补总黄酮/未载药PMMA骨水泥 在20 °C环境温度下,取PMMA骨水泥的固剂、液剂和骨碎补总黄酮溶液,按2:1:10(g/g/mg)的比例放入50 mL注射器中混合成糊状,灌注入直通型无菌吸痰管中固化5 min,制成载骨碎补总黄酮PMMA骨水泥(以下简称“载药PMMA骨水泥”)。另以等体积生理盐水代替骨碎补总黄酮溶液,同法制备未载药PMMA骨水泥。两者均于121 °C消毒20 min,保存,备用^[10]。

2.2 大鼠分组、造模与干预治疗

取64只大鼠,随机分为载药CPC组、载药PMMA骨水泥组、未载药CPC组、未载药PMMA骨水泥组,每组16只。各组大鼠以2%戊巴比妥腹腔注射麻醉,在无菌条件下于其右侧股骨处作3 cm纵向外侧切口,分离并显露股骨,取中段用微摆锯行4 mm截骨并行钢板固定,以建立大鼠骨缺损模型。各组大鼠分别在骨缺损部位植入相应骨水泥适量,然后缝合周围软组织及皮肤切口。4周后,各组大鼠同法麻醉,切除部分尾巴,取下适量皮质骨及松质骨,剪成颗粒状,作为自体松质骨备用;在原股骨切口处依次切开皮肤及皮下组织,切开并保护好诱导膜,取出骨水泥,植入颗粒状自体松质骨,再依次缝合诱导膜、皮下及皮肤组织。每次术后均对大鼠肌内注射庆大霉素 8×10^4 U, qd, 连续3 d,以防止术后感染。

2.3 大鼠骨缺损区诱导膜形成情况观察

造模后第4周,对各组大鼠后肢骨进行X射线拍片,以观察其骨缺损区的骨水泥材料降解、诱导膜形成及新生骨组织形成等情况。

2.4 大鼠骨缺损区诱导膜及新生骨组织形态学观察

术后观察大鼠饮食、活动及伤口情况。各组大鼠分别于造模后第4周和植入自体松质骨后第6周时各取8只大鼠取材,获取造模后第4周时的诱导膜组织和植骨后第6周时的骨缺损区域周围新生骨1 cm。将诱导膜组织和新生骨以10%福尔马林固定24 h,经脱钙(诱导膜不作脱钙处理)、乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋、切片后,行HE染色。在显微镜下观察诱导膜的组织形态学变化;采用显微测微尺测量并计算新生骨的骨小梁宽度,并采用Image J 1.46r软件计数100倍视野范围内的成骨细胞个数。实验重复3次。

2.5 大鼠骨缺损区诱导膜中BMP-2、VEGF蛋白的表达水平检测

采用免疫组化法进行检测。取“2.4”项下大鼠诱导膜组织的石蜡切片,脱蜡至水,室温下使用3% H_2O_2 处理5 min;水洗涤,37 °C下以羊血清封闭10 min。分别加入

BMP-2、VEGF抗体(稀释度均为1:1 000),37 °C孵育1 h;水洗涤,加入二抗(稀释度为1:3 000),37 °C孵育30 min;加入DAB显色剂反应5 min,水洗涤,苏木精复染细胞核、脱水、透明、封片,在显微镜下观察阳性染色情况。以细胞膜或细胞质内出现较强棕黄色或棕红色时定为目的蛋白阳性染色,无上述染色现象者为阴性^[10];采用Image J 1.46r软件进行图像分析,以灰度值表示目的蛋白表达水平。实验重复3次。

2.6 大鼠骨缺损区新生骨组织中Smad1、Smad4、Smad7蛋白的表达水平检测

采用Western blotting法进行检测。取“2.4”项下取材的新生骨组织,采用全蛋白提取液(RIPA裂解液-蛋白酶抑制剂混合物-蛋白酶抑制剂混合物-苯甲基磺酰氯的体积比为100:1:1:1)提取其全蛋白,并采用BCA法进行蛋白定量。蛋白以组织裂解液稀释至相同浓度后,加入 $5 \times$ Loading buffer上样缓冲液,100 °C水浴10 min,在-80 °C条件下保存,备用。分别采用浓缩胶和分离胶进行蛋白电泳,300 mA转膜28~60 min,5%脱脂奶粉封闭1 h。将PVDF膜分别放入Smad1、Smad4、Smad7抗体稀释液(稀释度均为1:1 000)中,4 °C孵育过夜;次日以TBST缓冲液洗涤PVDF膜5 min \times 4次,然后将PVDF膜放入二抗稀释液(稀释度为1:3 000)中,室温下以摇床平缓摇动孵育1 h;以TBST缓冲液洗涤PVDF膜5 min \times 4次,采用ECL化学发光法显色。采用蛋白印迹成像和定量分析系统进行检测,采用Image J 1.46r软件进行图像分析,以GADPH为内参计算相对灰度值,用来表示蛋白表达水平。实验重复3次。

2.7 统计学方法

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠骨缺损区诱导膜形成情况

X射线检查结果显示,造模后第4周时,载药CPC组大鼠骨缺损区的骨水泥大部分降解,呈模糊、絮状影,周围可见膜状诱导膜组织形成,骨缺损区域相较于其余组更小;载药PMMA骨水泥组大鼠骨缺损区骨水泥部分降解,但仍呈高密度影,界限较模糊,周围可见膜状诱导膜组织形成;未载药CPC组、未载药PMMA骨水泥组大鼠骨缺损区的骨水泥均未见明显降解,仍呈高密度影,界限较为清晰。各组大鼠后肢骨区X射线检查图见图1(注:图中箭头处为大鼠骨缺损区)。

3.2 各组大鼠骨缺损区诱导膜和新生骨的组织形态学

镜下观察可见,造模后第4周时,载药CPC组大鼠诱导膜中毛细血管内皮细胞丰富,排列有序,形成丰富毛细血管网的趋势较其余组更明显;载药PMMA骨水泥组大鼠诱导膜中毛细血管内皮细胞增生较多,排列有序性不明显;未载药CPC组大鼠诱导膜中毛细血管内皮

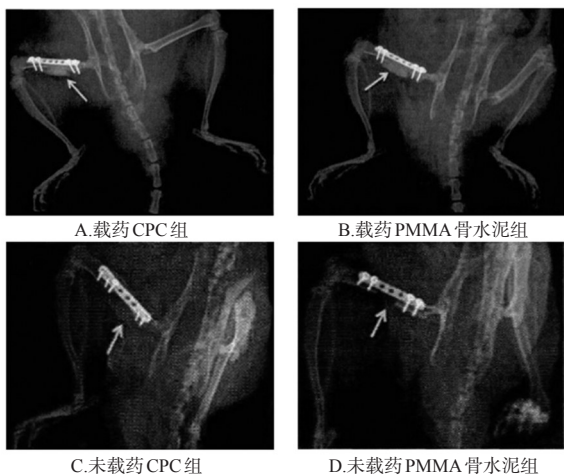


图1 各组大鼠后肢骨区X射线检查图

Fig 1 X-ray map of hind limb bone area of rats in each group

细胞增生较多,但分化未成熟、排列紊乱;未载药PMMA骨水泥组大鼠诱导膜中毛细血管内皮细胞增生不明显,且分化未成熟、排列紊乱。植骨后第6周时,各组大鼠新生骨的骨小梁宽度和成骨细胞数均显著增加;与载药PMMA骨水泥组、未载药CPC组、未载药PMMA骨水泥组分别比较,载药CPC组大鼠新生骨的骨小梁宽度和成骨细胞数均显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠骨缺损区诱导膜组织形态学显微图见图2,骨缺损区新生骨指标水平见表1。

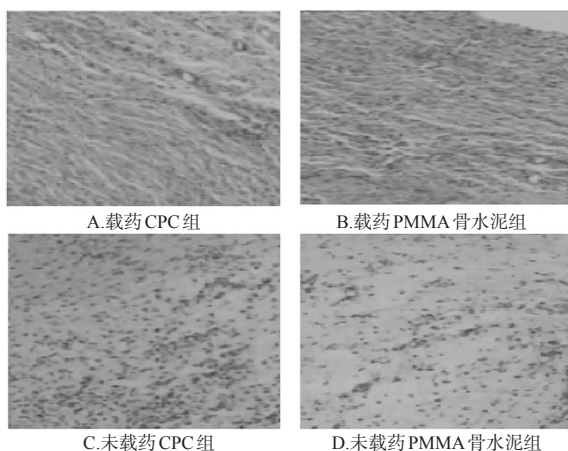


图2 各组大鼠骨缺损区诱导膜组织形态学显微图(HE染色,×100)

Fig 2 Histomorphological micrographs of induced membranes in bone defect areas of rats in each group (HE staining, ×100)

3.3 各组大鼠骨缺损区诱导膜中BMP-2、VEGF的蛋白表达水平

镜下观察可见,造模后第4周时,各组大鼠诱导膜中BMP-2、VEGF蛋白染色均匀,细胞核明显。其中,载药CPC组阳性染色区域大且染色程度深,阳性和阴性染色区域区分明显;载药PMMA骨水泥组阳性染色区域较

表1 各组大鼠骨缺损区新生骨指标水平($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 The level of new bone indexes in bone defect area of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	骨小梁宽度, μm	成骨细胞数, 个
载药CPC组	$417.18 \pm 42.31^{*#A}$	$61.81 \pm 8.26^{*#A}$
载药PMMA骨水泥组	398.22 ± 20.13	55.12 ± 5.63
未载药CPC组	310.22 ± 15.96	49.24 ± 6.24
未载药PMMA骨水泥组	291.38 ± 11.52	41.21 ± 6.52

注:与载药PMMA骨水泥组比较, $*P < 0.05$;与未载药CPC组比较, $^{\#}P < 0.05$;与未载药PMMA骨水泥组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

Note: vs. drug-loading PMMA cement group, $*P < 0.05$; vs. no-drug CPC group, $^{\#}P < 0.05$; vs. no-drug PMMA cement group, $^{\Delta}P < 0.05$

大但较载药CPC组小,染色程度较深,阳性和阴性染色区域区分明显;未载药CPC组阳性染色区域较小且染色程度较浅,但仍可区分阳性和阴性染色区域;未载药PMMA骨水泥组阳性染色区域极小且染色程度极浅,阳性和阴性染色区域边界较模糊。VEGF蛋白染色后镜下观察结果与BMP-2蛋白观察结果类似。定量分析结果显示,与载药PMMA骨水泥组、未载药CPC组、未载药PMMA骨水泥组分别比较,载药CPC组大鼠诱导膜中BMP-2、VEGF的蛋白表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠诱导膜中BMP-2、VEGF蛋白阳性染色显微图见图3、图4(图中,粗箭头为蓝染细胞核,细箭头为棕色阳性染色),蛋白表达水平见表2。

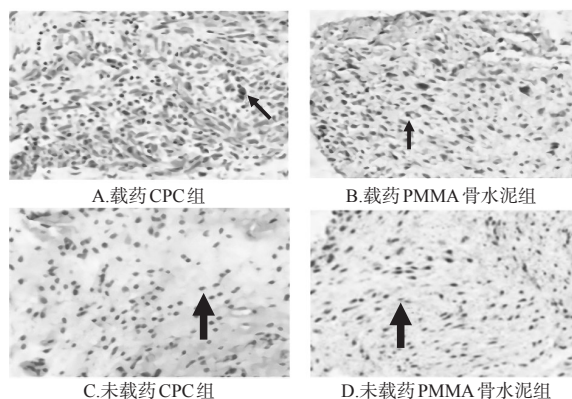


图3 各组大鼠诱导膜中BMP-2蛋白阳性染色显微图(×200)

Fig 3 Micrographs of BMP-2 protein positive staining in the induced membranes of rats in each group (×200)

3.4 各组大鼠骨缺损区新生骨组织中Smad1、Smad4、Smad7的蛋白表达水平

镜下观察可见,植骨后第6周时,与载药PMMA骨水泥组、未载药CPC组、未载药PMMA骨水泥组分别比较,载药CPC组大鼠新生骨组织中Smad1、Smad4、Smad7的蛋白表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠骨缺损区新生骨组织中Smad1、Smad4、Smad7蛋白电泳图见图5,蛋白表达水平见表3。

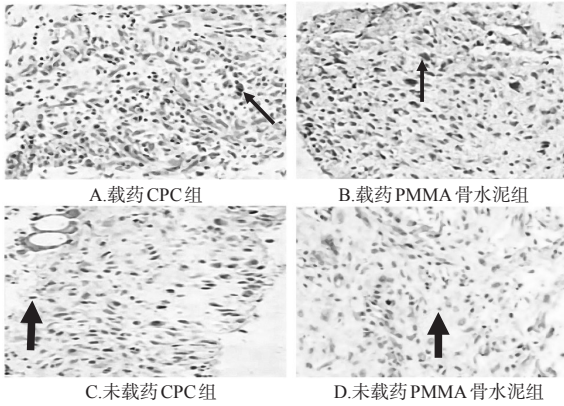


图4 各组大鼠诱导膜中VEGF蛋白阳性染色显微镜图($\times 200$)

Fig 4 Micrographs of VEGF protein positive staining in the induced membranes of rats in each group ($\times 200$)

表2 各组大鼠诱导膜中BMP-2、VEGF的蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Protein expression of BMP-2 and VEGF in the induced membranes of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	BMP-2	VEGF
载药CPC组	10.31 \pm 0.89 ^{***}	224.38 \pm 5.12 ^{***}
载药PMMA骨水泥组	8.56 \pm 0.49	201.52 \pm 5.63
未载药CPC组	6.14 \pm 0.21	186.58 \pm 4.18
未载药PMMA骨水泥组	4.14 \pm 0.78	151.64 \pm 3.24

注:与载药PMMA骨水泥组比较, * $P < 0.05$;与未载药CPC组比较, # $P < 0.05$;与未载药PMMA骨水泥组比较, $\Delta P < 0.05$

Note: vs. drug-loading PMMA cement group, * $P < 0.05$; vs. no-drug CPC group, # $P < 0.05$; vs. no-drug PMMA cement group, $\Delta P < 0.05$

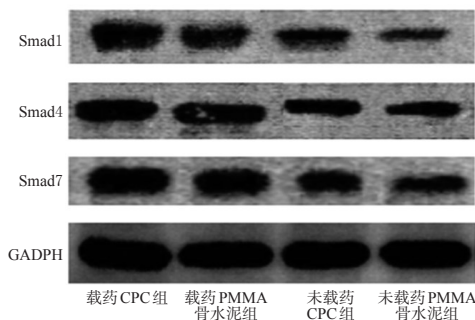


图5 各组大鼠骨缺损区新生骨组织中Smad1、Smad4、Smad7蛋白电泳图

Fig 5 Electrophoregrams of Smad1, Smad4 and Smad7 proteins in new bone tissues of bone defect areas of rats in each group

4 讨论

CPC作为一种新型非陶瓷型羟基磷灰石类人工骨材料,在体内可生物降解,并能被新生骨以爬行方式代替;其机械强度较松质骨强,而弹性模量与皮质骨相仿,具有优良的生物相容性、可降解性和多孔性等特点,加之其无毒、无刺激性的优点,使之成为细胞生长、增殖的

表3 各组大鼠骨缺损区新生骨组织中Smad1、Smad4、Smad7的蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Expression levels of Smad1, Smad4 and Smad7 in new bone tissue of bone defect areas of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Smad1	Smad4	Smad7
载药CPC组	1.18 \pm 0.12 ^{***}	1.01 \pm 0.02 ^{***}	2.16 \pm 0.25 ^{***}
载药PMMA骨水泥组	0.98 \pm 0.04	0.87 \pm 0.12	1.97 \pm 0.13
未载药CPC组	0.59 \pm 0.11	0.80 \pm 0.04	1.65 \pm 0.19
未载药PMMA骨水泥组	0.51 \pm 0.02	0.71 \pm 0.13	1.59 \pm 0.21

注:与载药PMMA骨水泥组比较, * $P < 0.05$;与未载药CPC组比较, # $P < 0.05$;与未载药PMMA骨水泥组比较, $\Delta P < 0.05$

Note: vs. drug-loading PMMA cement group, * $P < 0.05$; vs. no-drug CPC group, # $P < 0.05$; vs. no-drug PMMA cement group, $\Delta P < 0.05$

理想场所^[11]。CPC不仅可作为骨缺损的填充物,还可作为药物的载体,实现药物的局部缓释^[12],并在一段时间内维持局部药物浓度处于高水平^[13],达到治疗与修复骨损伤的目的。中药骨碎补具有活血续伤、补肾强骨的作用,是治疗跌扑损伤、筋断骨折的要药,可促进诱导膜内血管的形成^[1]。现代药理学研究发现,骨碎补总黄酮可下调滑膜组织及软骨组织/细胞中缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)和VEGF的表达,从而减轻膝骨性关节炎模型兔滑膜和软骨组织的损伤^[14];在兔股骨缺损模型中植入含骨碎补总黄酮的CPC支架后,在骨缺损修复区周围可见新骨生成,并随着时间推移而逐渐成熟,新生骨小梁从缺损边缘向内部生长,成骨逐渐成形^[15]。但载药骨碎补总黄酮CPC促进骨损伤愈合的具体机制仍未阐明,因此本研究重点考察了该骨水泥对诱导膜骨分化的影响,旨在探索其促进骨愈合的相关机制。

骨修复主要由成骨细胞来完成,成骨细胞的有效增殖可促进骨重建^[16]。本研究采用X射线检查后发现,载药CPC对于促进大鼠骨缺损修复的效率高于未载药CPC,载药PMMA骨水泥对骨缺损修复效率亦高于未载药PMMA骨水泥,这说明骨碎补总黄酮对于骨修复具有积极的促进作用。同时,载药CPC对骨缺损修复效率高于载药PMMA骨水泥,未载药CPC对骨缺损修复效率亦高于未载药PMMA骨水泥,这说明CPC在骨修复方面的效果优于PMMA骨水泥,与已有研究^[4-5]结果吻合。本研究同时发现,各组大鼠骨缺损区的骨水泥材料均未完全降解,这可能与本实验周期较短,骨水泥材料没有充足的降解时间有关。但载药CPC的降解速度明显快于未载药CPC,这可能是由于骨碎补总黄酮能促进诱导膜形成,诱导膜产生的某种因子加快了CPC的降解,但具体原因仍待相关研究确证。

新生血管的形成和成骨密切相关,诱导膜组织的形成可促进骨缺损创口愈合^[17]。本研究结果显示,载药CPC组大鼠诱导膜组织的血管内皮细胞较其余3组更成熟;在植骨6周后,载药CPC组大鼠新生骨组织中的骨小梁宽度和成骨细胞数亦较其余3组显著增加。这提示

其能刺激诱导膜中的血管新生,进而促进骨损伤修复。

经典成骨信号通路BMP/Smads通路中,BMP属于TGF- β 超家族成员,可发挥促胚胎发育、软骨内骨形成和骨骼生长、重建、再生作用^[18]。BMP-2与多种细胞因子形成BMP-2信号通路,促进成骨细胞的成熟,并诱导骨细胞外基质的合成和分泌^[19]。Smads家族是TGF- β 超家族信号转导通路中的胞浆递质,同时也是BMP信号通路中的关键因子,BMP激活Smad蛋白,可将转化TGF- β 信号直接由细胞膜转入细胞核内。研究发现,Smad1的激活具有促进成骨细胞分化的作用^[20];Smad4可调节BMP-2的信号转导物参与成骨细胞分化,同时与BMP-2复合体产生相互协调作用,从而应答成骨细胞转录调节信号,促进成骨细胞分化^[21];Smad7可传导抑制性信号,抑制人骨髓间充质干细胞向成骨分化^[22],但也有学者认为Smad7的表达对于成骨过程有一定的促进作用^[23]。本研究结果显示,载药CPC干预治疗后大鼠骨缺损区新生骨细胞中BMP-2、Smad1、Smad4、Smad7蛋白均呈高表达,提示骨碎补总黄酮可能通过激活BMP/Smads通路来促进成骨细胞的成熟,加快骨缺损的修复。

VEGF是一类促血管生成因子,具有较强的促进血管内皮增生和新血管形成的生物学功能,其在骨组织中的表达增高有利于骨组织内新血管形成,可促进新生骨的形成^[24]。本研究结果显示,载药CPC组大鼠新生骨组织中VEGF蛋白呈高表达,提示骨碎补总黄酮可能通过提高骨细胞中的VEGF蛋白表达,加快毛细血管网的新生和成骨细胞的分化,从而加快骨缺损的修复。

综上所述,载骨碎补总黄酮CPC具有促进诱导膜成骨的作用,这可能是通过激活BMP-2/Smad通路,从而调节成骨细胞分化;同时,其可通过提高VEGF表达,促进血管内皮细胞分化,加快形成毛细血管网,从而促进骨愈合。但高表达的Smad7在骨愈合中具体是发挥促进还是抑制作用,或者说其生物作用与表达量相关,又是否存在双向调节作用?为此,课题组后续拟进一步研究探索Smad7与成骨过程之间的调控关系,深入揭示骨碎补总黄酮促骨损伤修复的分子机制。

参考文献

[1] 蔡群斌,李定,李悦,等.骨碎补总黄酮对Masquelet技术诱导膜内血管形成的影响[J].广州中医药大学学报,2017,34(6):867-871.

[2] DONEGAN DJ, SCOLARO J, MATUSZEWSKI PE, et al. Staged bone grafting following placement of an antibiotic spacer block for the management of segmental long bone defects[J]. *Orthopedics*, 2011, 34(11):e730-e735.

[3] TAYLOR BC, FRENCH BG, FOWLER TT, et al. Induced membrane technique for reconstruction to manage bone loss[J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2012, 20(3):142-150.

[4] 梁佩清,全昌云,康婷,等.改性PMMA骨水泥的临床研究进展[J].功能材料,2017,48(2):2048-2054.

[5] 宋炎成,裴福兴,万昌秀.磷酸钙骨水泥:骨骼系统理想的药物载体[J].中国临床康复,2006,10(41):117-120.

[6] LEE K, WEIR MD, LIPPENS E, et al. Bone regeneration via novel macroporous CPC scaffolds in critical-sized cranial defects in rats[J]. *Dent Mater*, 2014, 30(7):e199-e207.

[7] CHENG SW, LIN ZQ, WANG W, et al. Osteogenic capability of autologous rabbit adipose-derived stromal cells in repairing calvarial defects[J]. *Chin J Traumatol*, 2011, 14(5):288-292.

[8] 杨洲,唐德志,姚长风,等.健腰密骨片对成骨细胞增殖分化和BMP信号通路报导基因活性的影响[J].上海中医药大学学报,2014,28(5):80-83.

[9] 姜自伟,曾景奇,李悦,等.骨碎补总黄酮对大鼠胫骨牵张末期BMP-2与Smad-1表达的影响[J].辽宁中医杂志,2018,45(1):166-168,227.

[10] 王泰龄,黄受方,李维华,等.《全国免疫组织化学技术与诊断标准化专题研讨会》会议纪要[J].中华病理学杂志,1996,25(6):326-328.

[11] 叶向阳,甄平,李晓飞,等.磷酸钙骨水泥药物缓释体系的研究应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(47):9317-9320.

[12] 李娟莹,黄剑锋,曹丽云.磷酸钙骨水泥药物缓释载体的研究进展[J].陕西科技大学学报(自然科学版),2008,26(3):25-29.

[13] WOO KM, JUN JH, CHEN VJ, et al. Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(2):335-343.

[14] 李明,李君,付昆.骨碎补总黄酮对膝关节炎模型兔HIF-1 α 和VEGF表达的影响[J].中国药房,2018,29(18):2484-2488.

[15] 姜晓鑫.载骨碎补磷酸钙骨水泥的研究[D].重庆:西南交通大学,2011.

[16] 李晋玉,赵学千,孙旗,等.骨碎补总黄酮的实验及临床研究概况[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(10):1357-1364.

[17] 王雷,王孝辉,张海龙,等.不同剂量骨碎补总黄酮对大鼠Masquelet技术诱导膜中BMP-2和VEGF表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2018,26(4):1-4.

[18] QUITTET MS, TOUZANI O, SINDJI L, et al. Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat[J]. *Acta Biomater*, 2015. DOI:10.1016/j.actbio.2014.12.017.

[19] KUAMR Y, BISWAS T, THACKER G, et al. BMP signaling driven osteogenesis critically dependent on Prdx-1 expression-mediated maintenance of chondrocyte prehypertrophy[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 2(16):2980-2993.

[20] 周强,朱嘉琦,孙鑫,等.左归丸对去卵巢致绝经后骨质疏松症大鼠骨组织中BMP2、Smad1表达的影响[J].辽宁中医杂志,2016,43(12):2659-2661.

[21] 高璐,郑洪新,陈谊敬,等.淫羊藿苷、补骨脂素、齐墩果

紫杉醇-索拉非尼-聚乳酸-羟基乙酸载药栓塞微球的制备及体外释药特性研究^Δ

陈鑫^{1*}, 李翔^{2#}, 罗晓健^{1,2}, 刘微^{1,2} (1.江西中医药大学药学院, 南昌 330006; 2.江西中医药大学创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 南昌 330038)

中图分类号 R944;R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)10-1327-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.10.07

摘要 目的:制备紫杉醇-索拉非尼-聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)载药栓塞微球,建立其含量的测定方法,并考察其体外释药特性。方法:采用乳化-溶剂挥发法制备紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球。采用高效液相色谱法测定微球中紫杉醇、索拉非尼的含量并计算载药量及包封率,色谱柱为Agilent TC-C₁₈,流动相为水-乙腈(40:60, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为228 nm,柱温为28 ℃,进样量为10 μL。采用光学显微镜、扫描电镜观察微球的形态,采用激光粒度仪测定微球的粒径;采用高效液相色谱法测定生理温度(37 ℃)下紫杉醇、索拉非尼的释放度;采用阿伦尼乌斯方程预测37 ℃下的反应速率常数,并与实测(37 ℃)值进行比较。结果:紫杉醇、索拉非尼的检测质量浓度线性范围均为2.0~400.0 μg/mL(*r*均为0.999 6);定量限分别为1.902 6、1.890 2 μg/mL,检测限分别为0.985 5、1.264 5 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;回收率分别为99.00%~102.91%(RSD=1.12%, *n*=9)、98.39%~102.96%(RSD=1.94%, *n*=9)。所得微球形态圆整,表面光滑无粘连、无突起,平均粒径为(139±1.16) μm;紫杉醇、索拉非尼的载药量分别为1.12%、0.85%,包封率分别为73.11%、58.65%;在37 ℃下,41 d内累积释放度分别为(71.83±3.96)%、(81.44±6.02)%;紫杉醇、索拉非尼预测反应速率常数与实测值相对标准偏差的RSD<10%,相似因子分别为83.53、73.95。结论:成功制备紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球,其形态较好,且具有较好的缓释作用;预测释放度曲线与实测释放度曲线相关性较好;所建含量测定方法操作简便、稳定性较好。

关键词 紫杉醇;索拉非尼;聚乳酸-羟基乙酸;载药栓塞微球;体外释药

Study on Preparation of Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded Embolic Microspheres and *in vitro* Drug Release Characteristics

CHEN Xin¹, LI Xiang², LUO Xiaojian^{1,2}, LIU Wei^{1,2} (1. School of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330006, China; 2. State Key Laboratory of Innovative Drugs and High Efficiency, Energy Saving and Consumption Reducing Pharmaceutical Equipment, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres, and to establish a method for the content determination and investigate their *in vitro* drug release characteristics. METHODS: Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres were prepared by emulsification-solvent evaporation method. HPLC method was used to determine the contents of paclitaxel and sorafenib in Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres; drug-loading amount and encapsulation efficiency were calculated. The determination was performed on Agilent TC-C₁₈ column with mobile phase consisted of water-acetonitrile (40:60, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 228 nm, and column temperature was 28 ℃. The sample size was 10 μL. The morphology of the microspheres was observed by optical microscopy and scanning electron microscopy. The particle size and granularity distribution of microspheres were measured by laser granularity

酸、二苯乙烯苷正交配伍调控BMP2、Smad1、4诱导BMSCs成骨分化的影响[J].世界科学技术:中医药现代化, 2014,16(5):1094-1102.

[22] ABDOLLAH S, MACIAS-SILVA M, TSUKAZAKI T,

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603054);江西省青年科学基金资助项目(No.20171ACB21074);江西省杰出青年人才资助计划(No.20171BCB23097);江西省卫生计生委中医药科研课题项目(No.2016A008)

* 硕士研究生。研究方向:药物新制剂与新剂型。电话:0791-87119661。E-mail:1757647300@qq.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:药物新制剂与新剂型。电话:0791-87119661。E-mail:sterlinghawk@163.com

et al. TβR1 phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(44):27678-27685.

[23] 莘晓陶,李曦光,毕贤峰,等. Smad7在兔下颌骨牵张成骨过程中的表达[J].中国组织工程研究与临床康复, 2010,14(20):3633-3636.

[24] 孙效棠,赵黎,胡蕴玉,等.磷酸钙骨水泥载药核心的块型重组异种骨体内缓释及修复兔长段感染性骨缺损的研究[J].中国修复重建外科杂志,2005,19(3):165-169.

(收稿日期:2018-09-07 修回日期:2019-04-02)

(编辑:段思怡)