译文

运用聚乳酸－羟基乙酸共聚物膜－固定化条件培养液引导骨再生的实验研究

An Experimental Study on Guided Bone Regeneration Using a Polylactide-co-glycolide Membrane – Immobilized Conditioned Medium

Shuhei Tsuchiya, Masahiro Ohmori, Kenji Hara, Masahito Fujio, Masayuki Ikeno, Hideharu Hibi, Minoru Ueda

原载 The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, 2015, 30(5): 1175-1186.（英文）

黄明娣 译 滕 伟 审

摘 要

目的：探讨是否可以通过使用条件培养液（CM）和引导骨再生（GBR）技术加速骨再生。**材料与方法**：CM取自大鼠骨髓基质干细胞（BMSCs）。CM被固定在聚乳酸－羟基乙酸共聚物（PLGA）膜上，该膜需用0.5mol/L氢氧化钠（NaOH）处理以提高亲水性。实验分为4个组：PLGA膜处理①磷酸盐缓冲液（PBS；PBS–M），②PBS和0.5mol/L NaOH（亲水性处理；PBS–HM），③CM(CM–M)，④CM和0.5mol/L NaOH(CM–HM)。通过扫描电镜观察这些实验性膜。液相色谱－串联质谱法（LC/MS/MS）测定固定在PLGA膜上的来自骨髓间充质干细胞表达的蛋白。细胞增殖实验和碱性磷酸酶（ALP）活性测定分析CM对骨髓间充质干细胞活性的影响。实验性膜被移植到大鼠颅骨骨缺损模型。移植4周和8周后进行显微CT和组织学分析。**结果**：来自骨髓间充质干细胞的CM可固定于PLGA膜上。PLGA膜的亲水处理可增强CM的固定。LC/MS/MS分析表明，在PLGA膜表面的固定化蛋白质属于细胞外基质蛋白，如胶原蛋白、核心蛋白多糖、纤连蛋白。CM里从PLGA膜释放出的蛋白质，可以促进大鼠骨髓间充质干细胞的细胞增殖和碱性磷酸酶活性。被CM–HM处理过的骨缺损区域新骨形成明显高于被其他组膜处理对应的骨缺损区域。**结论**：PLGA膜经0.5mol/L NaOH和CM处理后可促进此大鼠颅骨缺损模型的骨再生。

关键词 条件培养液；引导骨组织再生；组织工程

译者单位 中山大学附属口腔医院
广州市陵园西路56号 510060

1 引言

大范围骨缺损是种植体外科手术中面临的主要临床问题。拔牙后骨丢失可能是由于牙周炎和根部病变引起的几种病理的结果。特别是，如果是在拔牙区域的口腔黏膜表面，拔牙后杯状骨丢失就会发生。这种骨条件难以插入植体。与组织工程技术相结合的生物材料，在新骨形成方面显示出令人鼓舞的成果。在这些情况下，引导骨再生（GBR）在牙种植部位裂开可以预见支持新骨形成，被认定为护理标准。

许多高分子材料已被用作GBR膜，从应用不可吸收聚四氟乙烯到可吸收聚乳酸、聚乳酸－乙交酯（PLGA）、胶原。可吸收膜由于其比不可吸收膜具有更高的生物相容性而越来越受青睐。此外，因为它们完全降解，所以不需要外科手术移除。已经有大量的骨愈合过程的研究，并且技术已被开发用于校正骨缺损，包括使用几种类型的移植物、膜，以及两者的结合使用。许多骨替代材料的使用是根据它们的骨传导和骨诱导性能，使用异体移植据报道有积极的结果。然而，异种移植有由未知的病毒和细菌引起感染的风险。GBR膜处理通常包括一个12周恢复骨丢失的周期。除了其传统作为一个屏障的被动角色，下一代的GBR膜应促进骨再生过程。一些生物材料和蛋白质，如人牙本质基质蛋白、冻干牛骨、肥大软骨细胞－外基质、釉基质衍生物、重组人生长激素和血管内皮生长因子（VEGF），通过与膜结合以减少愈合时间，促进骨再生量。这些生物分子促进骨再生，因为它们潜在地促进骨髓间充质干细胞增殖以及向成骨细胞的分化。然而，在移植区域和复杂的外科手术中，膜和生物分子的结合需要支架。为了克服这些并发症，涂有磷酸钙钠的GBR膜（LactoSorb）被研究运用于特定大小的缺损模型，并且展现出更高的骨再生潜力。近年来，在种植体和牙周治疗领域，各种生物分子已被固定于钛植体上和GBR膜，分别显示种植体周围骨愈合良好。

条件培养基（CM）是由培养细胞分泌的蛋白质，如细胞外基质蛋白、蛋白酶、生长因子、蛋白激素、免疫调节细胞因子，趋化因子，或其他对靶细胞表型有直接影响的生物活性分子。因此，来自骨髓间充质干细胞CM含有胰岛素样生长因子1、肝细胞生长因子、血管内皮生长因子和转化生长因子β1，这些生长因子通过影响细胞的增殖和分化进而促进骨再生。

我们研究固定在PLGA膜的条件培养基。用0.5mol/L氢氧化钠（NaOH）对PLGA膜进行亲水处理，可促进CM的固定，因为亲水性处理对蛋白药物递送有积极影响。液相色谱－串联质谱法（LC/MS/MS）测定在PLGA膜上的蛋白质。扫描电子显微镜观察在PLGA膜表面的被荧光纳米晶标记的CM。首先，固定在PLGA涂层的培养皿的CM可促进大鼠BMSCs体外细胞增殖和成骨分化。其次，利用大鼠颅骨临界骨缺损模型，对比在非CM固定膜的骨缺损区域，在CM固定的PLGA膜下方，骨缺损区域充满了更多新形成的骨。

2 材料与方法

2.1 大鼠骨髓间充质干细胞的分离

无菌条件下，从4周龄SD大鼠获得骨髓标本。根据以往描述的方法进行骨髓间充质干细胞的分离。供体大鼠用过量戊巴比妥处死，解剖胫骨和股骨。刮去附着的肌肉后，切断骨骼的两端，磷酸缓冲液（PBS）冲洗出骨髓。骨髓组织标本经移液管捣碎，再通过100μm尼龙滤网过滤(Becton Dickinson)。悬浮液离心，获得的细胞悬浮在含10%的胎牛血清、1%青霉素和链霉素的DMEM培养基中培养。24h后，更换培养基，移除悬浮细胞。当贴壁细胞生长至汇合，胰蛋白酶消化和传代。

2.2 来自于大鼠骨髓间充质干细胞的条件培养基CM的制备

第二代BMSCs接种于10cm×10cm的培养皿。PBS洗涤融合细胞。添加10ml无血清DMEM培养液，细胞额外培养48h。收集培养基，1500rpm离心15min。所得到的上清液中含有CM。利用BCA法测定CM的蛋白质含量。

2.3 PLGA膜的制备及其CM固定化

在无菌条件下，PLGA膜（GC公司的膜）切成10mm直径，然后将膜分成4片。第1片浸泡在PBS(PBS-M)；第2片室温下浸泡在经0.5mol/L NaOH亲水处理5min的PBS(PBS-HM)；第3片浸泡在CM（CM-M）；第4片浸泡在室温下经0.5mol/L NaOH亲水处理5min的CM中(CM-HM)。PLGA膜在PBS或CM中37℃培养24h。

2.4 LC/MS/MS

被分开的PLGA膜首先被含有30%乙腈的

100μl 25mmol/L 碳酸氢铵（NH_4HCO_3）（体积/体积）洗两次共20min，然后在CVE-3100离心蒸发器干燥（Tokyo Rikakikai）。来自CM-M和CM-HM的蛋白质消化是通过在50mmol/L碘乙酰胺（Wako）/100mmol/L NH_4HCO_3（pH 7.8）中，使用100μl 20μg/ml测序级胰蛋白酶（Promega公司）水化凝胶块1h 37℃，并加入25mmol/L碳酸氢铵（NH_4HCO_3）100μl，37℃孵育过夜。室温下，0.1%三氟乙酸及60%乙腈取萃取肽类20min。肽样品在离心式蒸发器中干燥。AMR进行肽质量指纹图谱检测。肽质谱被用来生成的肽质量列表，用于通过Mascot搜索引擎（www.matrixscience.com）查询瑞士Prot蛋白质库（限于哺乳动物蛋白）。搜索参数设置为允许一个胰蛋白酶裂解的误差，6100ppm的质量公差和蛋氨酸残基氧化。当被鉴别的蛋白中的4个或者更多的肽键在Mascot搜索引擎中产生的Mowse值具有统计学意义时，被鉴别的蛋白会被接受。

2.5 CM固定化膜的扫描电镜分析

不同处理的膜被固定于2.5%戊二醛固定，S-800S SEM（Hitachi）观察其表面拓扑结构。

2.6 量子点标记CM中的荧光蛋白

根据以前的报告，525 ITK氨基（聚乙二醇）量子点和655羧基量子点（Invitrogen）标记CM。简而言之，25μl 8μmol/L量子点，1mg/ml CM，1ml 10mmol/L硼酸盐缓冲液，pH 7.4，5.7μl 10mg/ml 3-乙基碳二亚胺（Sigma-Aldrich）作为交联剂进行混合，室温轻轻搅拌1h。被PBS-M、CM-M和CM-HM处理过PLGA膜浸泡在量子点混合试剂中37℃ 24h，量子点标记的PBS作为对照。

2.7 激光共聚焦扫描显微镜分析PLGA膜荧光标记的CM

使用蔡司Zeiss LSM5 Pascal共焦扫描显微镜头安装在一个配备×40目的倒置显微镜得到共聚焦荧光图像（Zeiss Axiovert 200M）。荧光强度采用Zeiss软件分析，随机选择的位置上进行荧光显微镜成像。

2.8 体外CM固定化PLGA膜上CM的释放

PLGA膜切成5mm×5mm。如前所述，量子点标记的CM固定在PLGA膜上。处理后的膜在37℃体外含1ml 2%牛血清白蛋白的PBS中分别摇匀孵育0h、3h、6h。通过共聚焦荧光显微镜观察固定在PBS-M、PBS-HM、CM-M和CM-HM膜上的CM。随机选择的位置上进行荧光显微镜成像。

2.9 细胞增殖和碱性磷酸酶活性测定

PLGA粒子（Wako）用与制备膜相同的方法处理，分为4个实验组：PBS-M、PBS-HM、CM-M和CM-HM。将大鼠骨髓间充质干细胞（5×10^5细胞）接种至六孔板。经PBS-M、PBS-HM、CM-M和CM-HM处理的PLGA粒子（100mg）置于细胞培养板上（Becton Dickinson），分别置于六孔板用于培养大鼠骨髓间充质干细胞。然后，细胞培养1d、7d和14d。使用含1%胎牛血清的DMEM培养液。培养的细胞用0.05%胰蛋白酶乙二胺四乙酸处理，细胞数通过血细胞计数仪（LMS）测定。

37℃定量测量Milli-Q超纯水15min内以快速对硝基苯磷酸片（Sigma）为基板测量对硝基酚片碱性磷酸酶活性。通过在波长为405nm，第1天、第3天、第7天、第10天和第14天（Bio-Rad），测量吸光度，测定未反应的对硝基苯酚的量。

2.10 动物

购买于Crea Japan的雄性SD大鼠24只，体重300～350g。动物的选择和管理，外科手术和准备工作遵循由日本古屋大学的机构动物护理和使用委员会批准的例程。

2.11 体内外科手术

成年雄性SD大鼠使用异氟醚（5%诱导；2.5%维持）麻醉，并在术前使用盐酸利多卡因进行疼痛缓解。手术部位进行搔刮和消毒。沿头皮中线作直线切口，暴露软组织和骨膜。在顶骨位置，以矢状缝为中心线，作一个圆形、直径为8mm的全层骨缺损，使用骨钻杆（GC Corp）的同时用生理盐水冲洗，并且避免硬脑膜穿孔。缺损部位用大量生理盐水冲洗并且把膜置于缺损部位（第1组：PBS-M；第2组：PBS-HM；第3组：CM-M；第4组：CM-HM）。使用4-0尼龙线（GC Corp）缝合缺损部位区域软组织。膜植入术后第4周、第8周，在全身麻醉状态下，用200ml PBS缓冲液处

死大鼠，使用200ml 4%（重量／体积）含PBS的多聚甲醛液进行灌注固定。随后，组织样品立即使用40ml 4%多聚甲醛固定，4℃ 24h。

2.12 新骨形成的评价

PBS清洗骨片并存放在4℃。X线断层扫描（μCT）分析使用体内的微型X射线CT系统R_mCT2（Rigaku），E=55 kVp，I=109μA，像素=21μm。缺损中心处直径为8mm、高度为1mm的区域代表每个样本，使用下面的分割参数进行分析：σ=1.2，支持=2，阈值=143。创建代表膜下区域的3D虚拟模型并使用微视3D图像处理软件（Rigaku）观察。使用相同的软件定量钙化面积。新骨形成区域确定方法如下：新骨形成区比值（%）=（标准8mm圆形透亮区－颅骨缺损手术后4周和8周透亮区）×100/标准8mm圆形透亮区。经过X线分析后，骨块在莫尔斯溶液脱钙，4℃ 14d。每个标本从骨缺损中心分成两部分并石蜡包埋。为了确定新骨形成的面积，每两个从中央部分被分开的植入物，切割15个连续切片（5μm）。在每个实验组和时间点，从30个切片中随机抽取5片。被选的5片用苏木精和伊红染色（H&E），使用BZ8000荧光显微镜（Keyence）观察。Image J软件进行图像分析（美国国立卫生研究院，贝塞斯达，马里兰州）。简单地说，总面积对应整个原始手术缺损区域。在总面积的范围内，新生骨区按总面积的一个部分进行测量和计算。缺陷中再生骨的测量用平均百分比表示。新形成的骨组织区域进行手动划定，然后平方微米测量。缺陷闭合的量也是测量从缺损边缘向中心的组织的长度，然后归一化到整个长度的缺陷。数据报告为三个不同的样本（$n=3$）的平均标准偏差。使用方差分析进行统计分析，随后Bonferroni进行校正。$P<0.05$和$P<0.01$时，试验组间的差异有统计学意义。

3 结果

3.1 条件培养基固定化膜表面的扫描电镜表征

图1显示了在这项研究中使用实验膜的微观

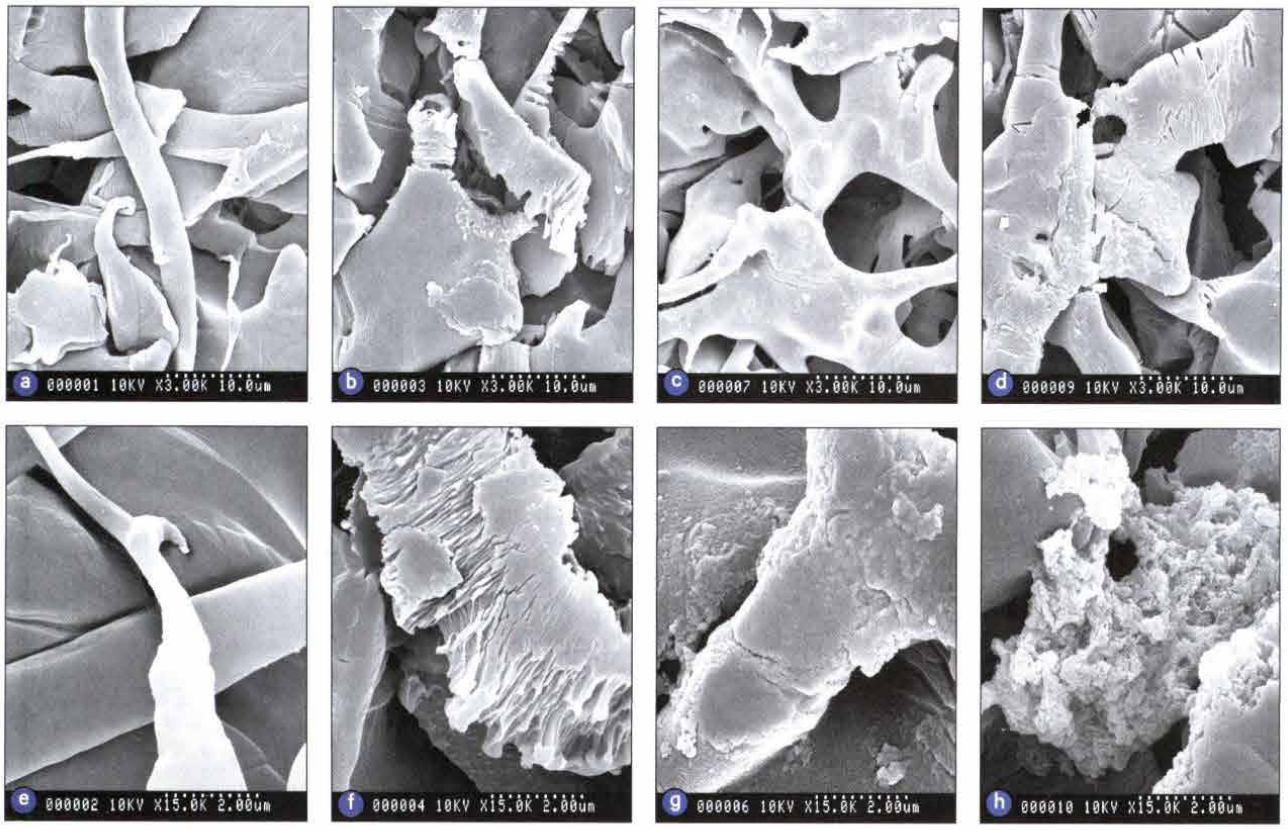


图1 有无NaOH和CM处理过的PLGA膜扫描电子显微照片。a、e. 未处理的膜，未处理的膜表面平坦和光滑；b、f. NaOH处理过的PLGA膜，可见人工划痕和裂缝；c、g. CM固定化PLGA膜，在高倍镜下可见均匀的纳米级粗糙度；d、h. NaOH和CM处理过的PLGA膜，可见人工划痕和裂缝。在高倍镜下，可观察到异构聚集［原始放大率 ×3000(a–d)，×15 000(e–h)］

结构。PBS-M组显示人工结构和光滑的表面，但没有纳米纤维成分和孔隙结构（图1a和图1e）。PBS-HM组形貌可见人工划痕和粗糙的表面（图1b和图1f）。此外，在CM-M组表面观察到颗粒结构（图1c）。高倍镜下观察可见微球（图1g）。在CM-HM组表面出现宽的裂纹（图1d），但没有观察到其完整的部分。在较高的放大倍率下，发现沟道结构和微球（图1h）。这些结果表明了CM固定化和0.5mol/L NaOH处理后的膜表面形貌的变化。

3.2 通过LC/MS/MS检测CM固定在PLGA膜上的蛋白

使用LC/MS/MS在CM组检测到约600的蛋白质，与PLGA膜表面几乎同样多。有趣的是，在PLGA膜表面的蛋白也在CM上检测到。这些生物分子包括细胞外基质，信号转导，蛋白质的合成和加工以及生长因子蛋白。特别是对胶原蛋白，蛋白多糖和纤连蛋白这些骨头的构成成分进行检测（表1）。

3.3 固定在PLGA膜上CM的蛋白质成像

CM含有大量来源于大鼠骨髓间充质干细胞的蛋白质；因此，假定固定在PLGA膜的成分是蛋白。研究包含在CM的蛋白质是否被固定在PLGA膜上，以量子点标记，使用共聚焦荧光显微镜分析。膜的三维荧光图像为图2a～图2d。虽然CM-M组显示稀疏的荧光信号（图2c），但是PBS-M组和PBS-HM组都没有荧光信号（图2a，2b，2e和2f）。CM-M剖视图显示荧光信号垂直重叠（图2g）。对CM-HM荧光信号比CM-M更加强和更广泛的（图2d）。CM-HM剖视图显示，相比于CM-M，膜中心产生一个强烈的信号（图2h）。这些结果表明，包含在CM的蛋白质被固定在PLGA膜上。

3.4 体外PLGA膜CM释放动力学

通过量子点标记使得CM在PLGA膜残留可视化。在PBS-M组（图3a，3e和3i）和PBS-HM组（图3b，3f和3j），红色信号指示在任何时间点观察不到固定化。另一方面，红色信号是由CM-M组（图3c，3g和3k）和CM-HM组（图3d，3h和3l）所产生的，然后强度逐渐减轻。0h和3h的孵育后，来自CM-HM组的红色信号高于CM-M组（图3c，3d，3g和3h）；然而，孵育6h后红色信号消失。这些结果表明，固定于PLGA膜上的CM在6h内完全释放，从而表明，CM的释放是由PLGA降解控制的。

3.5 细胞增殖和碱性磷酸酶活性测定

为了探讨CM固定在PLGA膜上是否影响骨髓间充质干细胞的功能，测定细胞增殖（图4a）和碱性磷酸酶活性（图4b）。培养1d后，在CM-HM组的细胞数显著高于在PBS-M组和PBS-HM组；此外，经过7d的培养，CM-HM组的细胞数更是显著高于其他3个实验组。经过14d的培养，在CM-HM组细胞数显著高于在PBS-M组

表1 在PLGA膜上CM蛋白的鉴定表

蛋白名称	蛋白质数据库登录号	pI/MW (Da)	位置	序列
胶原α-1链前体(I)	NP_445756	5.71/137 953.45	10q31	SGEYWIDPNQGCNLDAIK
胶原α-1链前体(II)	NP_037061	8.46/134 570.01	7q36	DGEPGTPGNPGPPGPPGPPGPPGLGGGNFAAQMAGGFDEK
胶原α-1链前体(XXVII)	NP_942042	9.73/187 811.56	5q24	DGYPGPLGLDGKPGLPGPK
胶原α-2链前体(I)	NP_445808	9.39/129 564.06	4q13	GPNGDAGRPGEPGLMGPRGLPGSPGNVGPAGK
纤连蛋白	NP_062016	5.44/272 446.09	9q33	DLQFVEVTDVK VDVLPVNLPGEHGQR
核心蛋白聚糖	NP_077043	8.96/39 805.10	7q13	ISPEAFKPLVK TSYTAVSLYSNPVR

CM. 条件培养液；PLGA. 聚乳酸－羟基乙酸共聚物；PI. 等电点；MW. 分子量

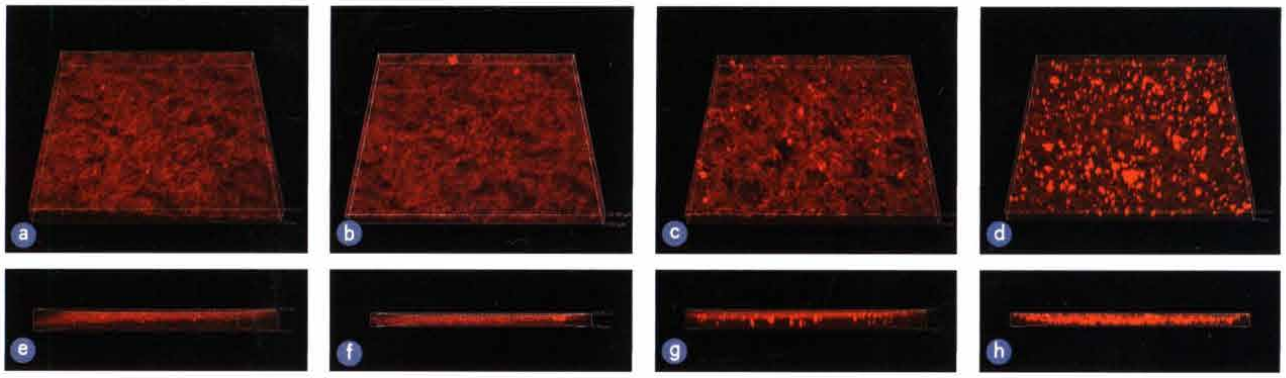


图 2 荧光共焦显微镜分析 PLGA 膜上的蛋白。在指定的 CM 表面上 37℃孵育 24h 后的三维荧光图像，红色通道显示的是 PLGA 膜上 CM 的蛋白

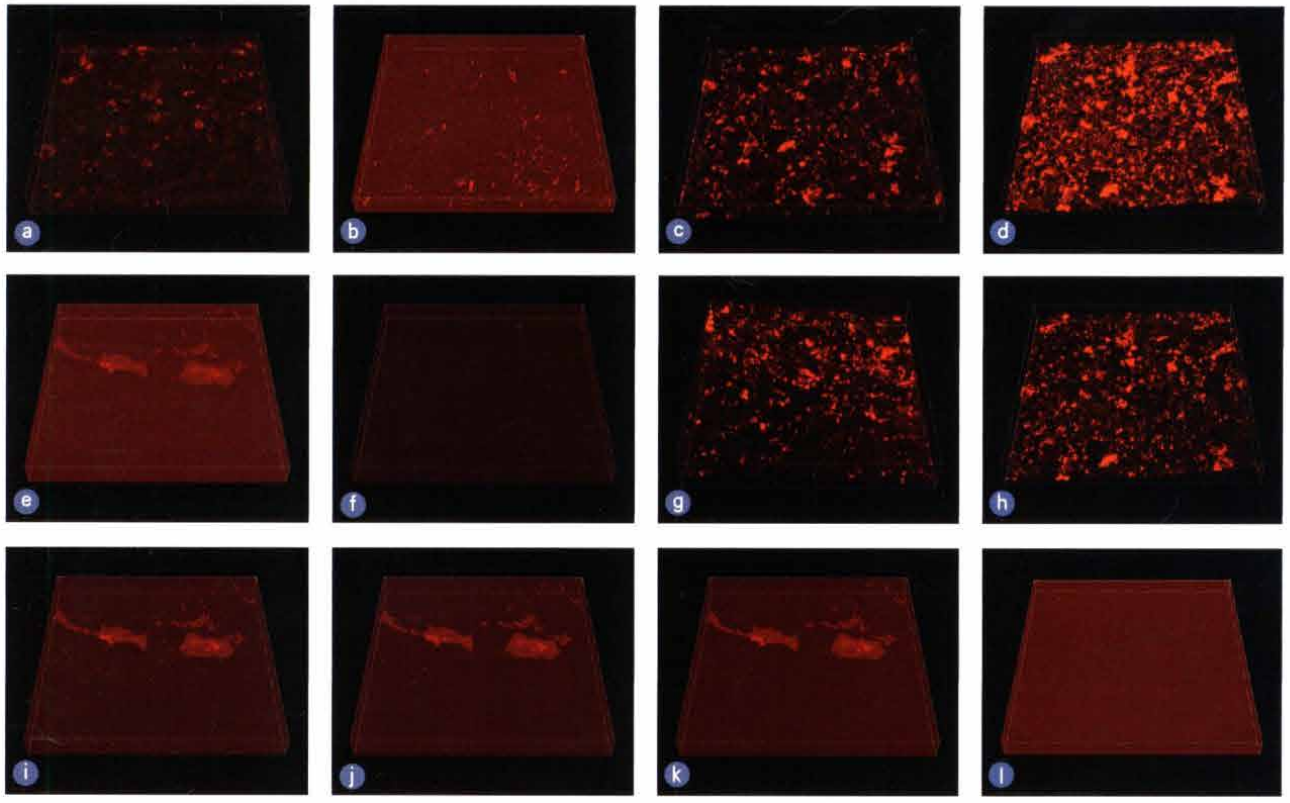


图 3 CM 固定化 PLGA 膜体外试验表明，所表示的时间段里，量子点纳米晶体标记的 CM 孵育于 2% 牛血清白蛋白红色信号表明 CM 是固定在 PLGA 膜上并且减少时间依赖性

和 PBS-HM 组，并且 PBS-HM 组和 CM-M 组细胞数显著高于 PBS-M 组。培养 1d 后，ALP 活性在 4 个实验组之间差异不显著。经过 7d 的培养，CM-HM 组 ALP 活性显著高于 PBS-M 组和 PBS-HM 组。经过 14d 的培养，CM-HM 组 ALP 活性显著高于其他 3 个实验组。这些结果表明，结合 CM 固定化和亲水处理可影响大鼠骨髓间充质干细胞的细胞增殖和碱性磷酸酶活性。

3.6 通过 μCT 证实与定量分析钙化体积

采用 μCT 对实验性大鼠模型颅骨上新形成钙化组织的三维结构进行评价。每个实验模型进行 2 个时间点的分析：支架植入 4 周和 8 周后。图 5 显示了三维 μCT 分析结果，发现钙化组织量在对照组和实验组（PBS-M，CM-M，CM-HM）的变化。在每种情况下骨修复的程度都表现在相应的 μCT 图像上。植入后 4 周的头盖骨视图显示，在

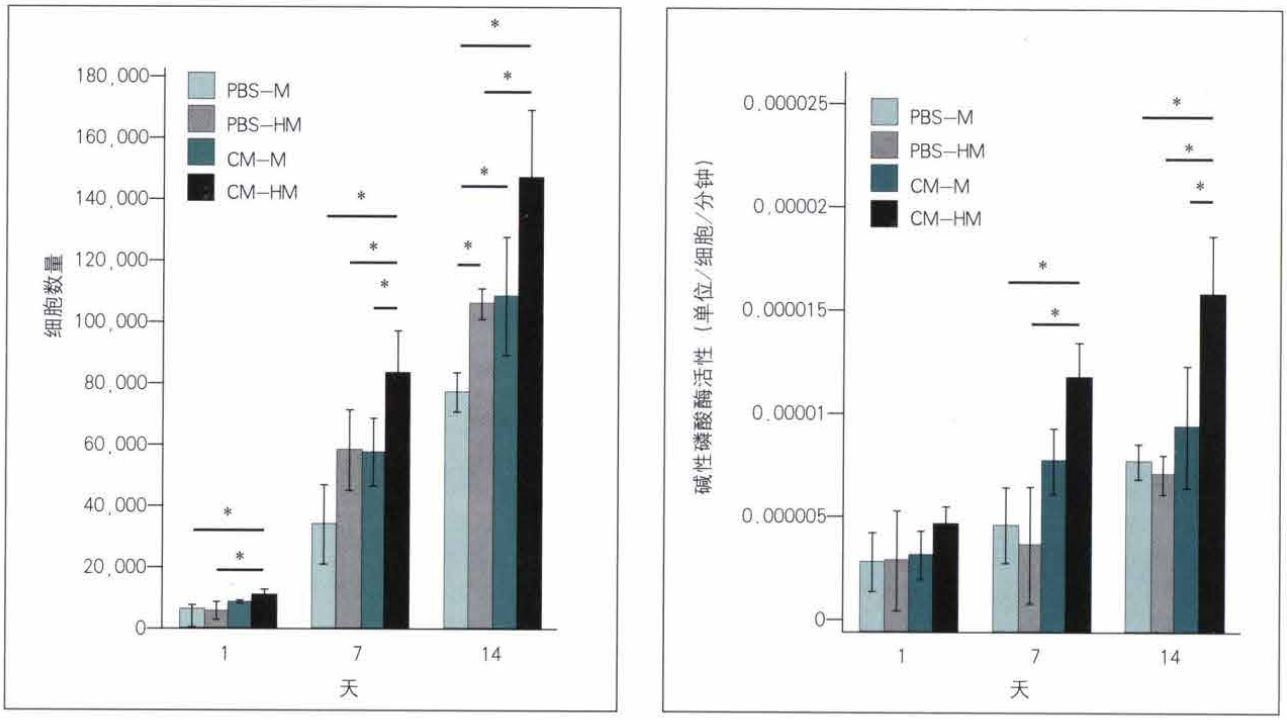


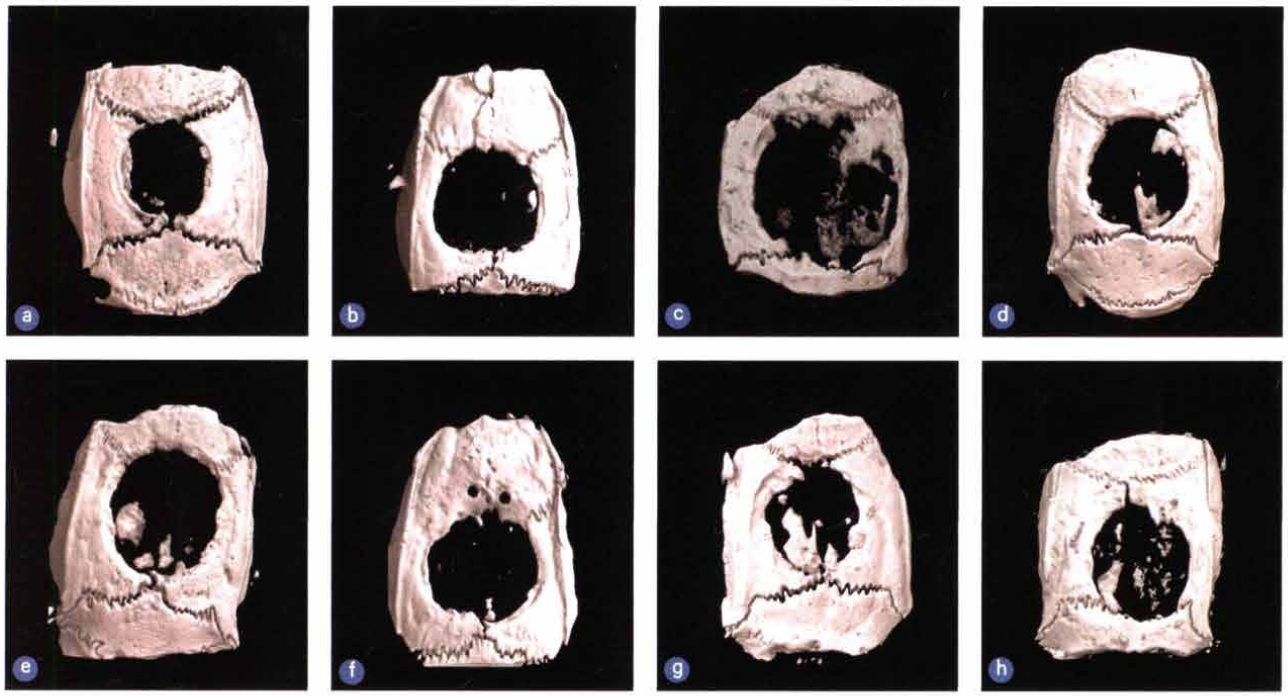
图4 大鼠骨髓间充质干细胞在采用NaOH和CM处理的PLGA涂层上细胞增殖和碱性磷酸酶活性。a. 大鼠骨髓间充质干细胞在PBS-M组，PBS-HM组，CM-M组和CM-HM组细胞增殖测定，CM-HM组大鼠骨髓间充质干细胞细胞数在所有时间点均显著高于PBS-M组和PBS-HM组；b. 大鼠骨髓间充质干细胞ALP活性的测定，CM-HM组ALP活性在所有时间点均显著高于PBS-M组和PBS-HM组

CM-M组和CM-HM组的缺损面积减少（图5b和5c），被骨样组织取代，而PBS-M组下的缺损面积仅有稍微的改变（图5a）。这些照片显示4周后，相对于CM-M组和PBS-M组，在CM-HM组有更广泛的骨样内突形成。然而，术后8周，观察到与CM-HM组和PBS-M组对比，CM-M组有更广泛的骨样内突（图5g、5e和5f）。图6显示4周和8周后缺损空隙体积的变化。钙化体积在4周和8周后，PBS-M组分别增加至8.1%和15.8%，在PBS-HM组分别是9.5%和21.6%。在CM-M组，钙化体积略有上升，4周后和8周后分别为14.5%和24.1%。即使CM-HM组增加了亲水化处理，钙化体积略有上升，4周后和8周后分别为22.7%，26.9%。在CM-HM组，第4周骨缺损的阻射性明显高于其他3组。此外第4周在CM-M组，骨缺损阻射性高于PBS-M组和PBS-HM组。植入术4周后PBS-M组和CM-HM组之间的差异具有统计学意义。术后8周，在CM-HM组，骨缺损阻射性明显高于PBS-M组和CM-M组。

3.7 组织学分析

图6是体内样本的组织学图像。植入术后4周，在PBS-M组和PBS-HM组，缺陷仅有部分恢复，一些组织内突朝缺陷中心和缺陷里的膜结构生长（图6a和6b）。然而，缺损内没有骨组织形成的迹象。另一方面，在CM-M组和CM-HM组的缺损边缘可观察到某种程度的新骨形成（图6c和6d）。对比于PBS-M组和PBS-HM组，在CM-HM组的新形成骨组织中可见成熟的钙化（图6d）。植入术后4周，高倍镜下观察，在CM-M组和CM-HM组下方，可见新骨的形成和钙化结节（图6g和6h），但明显的骨样组织并未见于PBS-M组和PBS-HM组（图6e和6f）。植入术后8周，新骨形成见于4个组（图6i，6j，6k和6l）。此外，所有实验组的膜结构均遗留于新生骨和骨缺损里。高倍镜下，植入术8周后在所有的3个样本观察到新骨形成（图6m，6n，6o和6p）。PBS-M组新形成的骨组织学与其他3组相比，是不成熟的，因为在钙化结节中未观察到骨细胞（图6m）。

图7所示为测量样品的骨形成面积。植入术后4周，PBS-M组和CM-HM组的结果明显



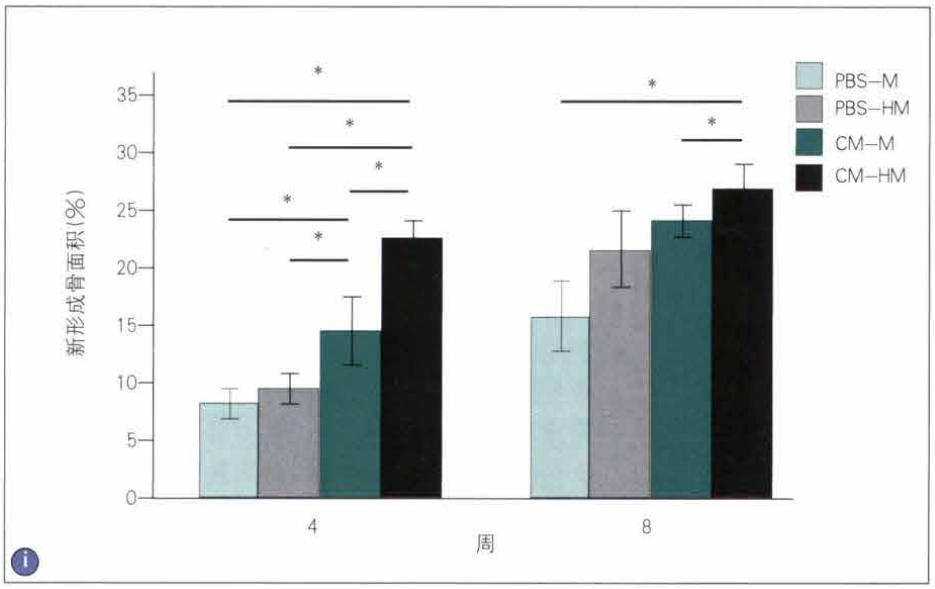


图5 术后4周和8周典型的影像学图像。a、e.PBS处理过的膜；b、f.亲水性PBS处理过的膜；c、g.CM处理过的膜；d、h.亲水性CM处理过的膜；i.手术部位的X线断层扫描图像评价钙化组织区域

不同（分别为16.9%和26.7%）。植入8周后，CM-HM组新骨形成面积（34.9%），比其他3组更高（在PBS-M21.5%，在PBS-HM24.5%，在CM-HM30.6%）。此外，在CM-M组新形成骨面积比PBS-M组和PBS-HM组都高。

4 讨论

在这项研究中，CM固定化PLGA膜结合GBR技术运用于促进骨再生。此外，亲水性处理是用于提高CM的固定和骨再生。

扫描电镜图像显示PLGA膜的表面形貌光滑。然而，在0.5mol/L NaOH处理的PLGA膜表面观察到粗糙结构，可能是由于膜被强碱NaOH降解。在CM-M组和CM-HM组的表面可见小基板，表明CM组件可以固定在PLGA膜。固定在PLGA上的CM其结构类似无机物质。这种形貌与固定于钛种植体和高分子生物活性玻璃复合材料表面的钙磷形貌相似。因为无机成分如钙和磷酸盐都包含在DMEM培养基中，暗示SEM图像中观察到CM-M和CM-HM上的基板是来自于DMEM培

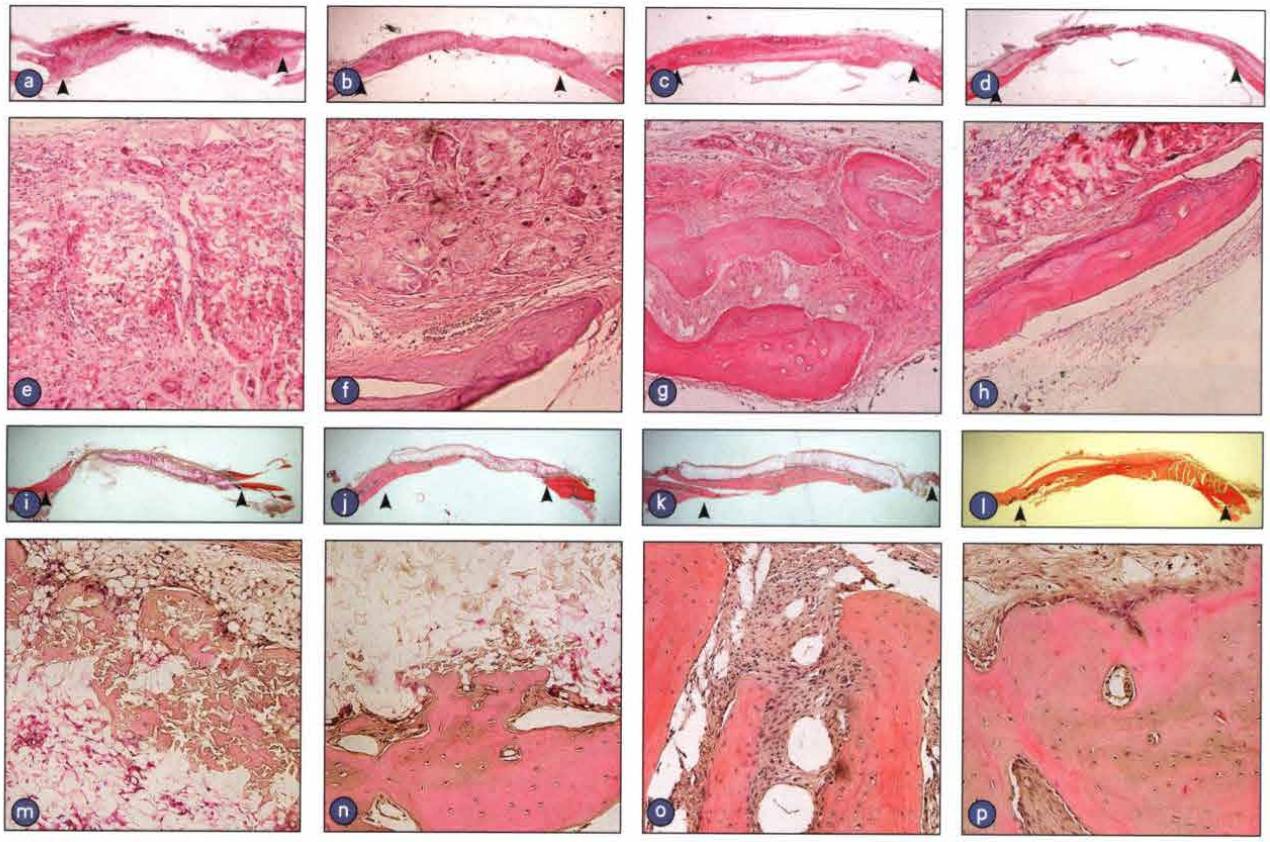


图6 组织学分析大鼠颅骨模型植入术后的新骨形成 a、e、i、m植入PBS-M；b、f、k、n植入PBS-HM；c、g、k、o植入CM-M；d、h、l、p植入CM-HM； a-h是外科处理后4周，i-p是外科处理后8周。箭头指示缺陷边缘

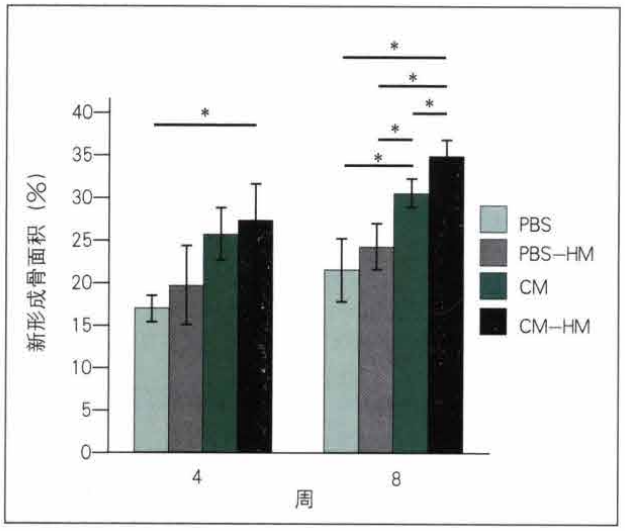


图7 骨再生区的组织学分析（表示为占总骨缺损面积的百分比）*$P<0.05$

养基的无机成分。

CM也包含了由骨髓间充质干细胞分泌至培养基上清的蛋白质。在前人报告中，人骨髓间充质干细胞的CM包含细胞因子，生长因子和细胞外基质。为了检测CM固定化PLGA膜的蛋白质，使用量子点标记蛋白质并用激光共聚焦显微镜观察。在PLGA膜表面观察到荧光标记的蛋白质，表明它们被固定在PLGA膜上。此外，CM-HM较CM-M的荧光信号宽，表明大量的可溶性蛋白结合至亲水处理的膜上，因为CM-HM表面比未处理膜更具亲水性。此外根据SEM图像可见，由于亲水性处理过的膜变得粗糙，其表面积也增加。另一方面，CM-M和CM-HM的荧光信号的厚度没有明显差异，提示包含在CM的蛋白质不能穿透膜而是仅局限在其表面。释放试验显示，CM是仅在6h内完全释放，表明包含在CM的蛋白释放是由PLGA降解控制。在以前的报告中，PLGA微球曾被作为运载控制血管内皮生长因子释放系统的载体。这项研究结果与本研究相一致，因为固定在PLGA微球上的VEGF在孵化后7～21d释放。释放时间的不同取决于分析方法和材料的形状。本研究采用量子点纳米晶体直接地观察所有蛋白质，并且灵敏度高。然而，为了确定释放蛋白质的性质，仍然需要进一

步的研究。

来自大鼠骨髓间充质干细胞的CM，能影响细胞的增殖和碱性磷酸酶活性，它含有细胞外基质蛋白，如I型胶原和纤维连接蛋白。以往的研究表明，这些分子可以固定在PLGA上，并且可以刺激骨髓间充质干细胞增殖和碱性磷酸酶活性。在目前的研究中，SEM图像表明，DMEM培养液中所包含的无机基质中是固定在PLGA膜表面。这些无机基质引起成骨分化是通过钙诱导的级联反应。本实验细胞增殖和分化研究结果与以往的报道结果一致。

植入术4周后，经影像学和组织学分析，体内在每个实验组的骨缺损区域均可见新骨形成。特别的是，CM-M组和CM-HM组中发现在临界骨缺陷的中心部分观察到新骨形成。这些结果表明，包含在CM里的细胞外基质是来自于PLGA膜释放并且发挥支架作用。在第4周和第8周，与PBS-M组和PBS-HM组比较，在CM-M组和CM-HM组的新骨形成增强。这些结果表明，包含在CM里的细胞因子和生长因子在骨缺损区释放，并刺激骨髓基质干细胞成骨分化和新骨形成，这与在体外研究中的ALP活性的结果一致。此外，根据组织学分析，PLGA膜亲水处理后的分解比不处理者分解更快。此结果表明，从膜中释放的PLGA在刺激骨再生中起重要作用。然而，需要进一步的研究来优化PLGA膜的亲水性处理的条件。

固定在PLGA膜表面的蛋白质量不能精确测量，因为对十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳的灵敏度来说，蛋白质的分子量太小了（数据未显示）。在未来，固定在PLGA膜上的无机基质和蛋白将运用诸如色谱法和LC/MS/MS的生化实验方法分析。因此，当运用GBR技术，CM里无机和有机基质的组合能增强新骨形成。此外，该动物颅骨模型是一种急性骨缺损。相比之下，临床上几乎所有的骨缺损是慢性缺损。慢性和急性骨缺损的骨再生过程是不同的。该膜在慢性骨缺损的效果需要进一步的研究确认。

最后，比起以往所用的组织工程方法，GBR治疗具有以下优点：①培养细胞数量少；②膜的制备容易；③不产生细胞移植后与HLA抗原的免疫反应。此外，由于不产生免疫反应，未来当建立起细胞系后，将不需要从患者个体获取骨髓间充质干细胞。这些优点将利于临床治疗。

5 结论

本研究表明，PLGA膜具有固定CM成分的能力，并且NaOH亲水性处理后可提升CM所含蛋白固定化的能力。结合CM固定和亲水处理可促进ALP活性和体外细胞增殖。影像学和组织学分析表明，亲水处理与否的CM固定化可促进体内新骨形成。在目前的研究中，为GBR制备的膜对于运用牙种植体来修复骨缺损是有利的。

6 鸣谢

此项研究得到日本教育部，文化部，体育部，科学与技术部（kakenhi wakate B，22791969 [S.T.]和kakenhi kiban B，19659524 [H.H.]）的赞助。本研究作者间无利益冲突。