

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.11.003

PCL/ β -TCP 调控巨噬细胞极化对成血管效应的影响*

郭 硕 刘文文 魏星辉 王 宁 李小康 郭 征[△]

(空军军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探究生物可降解材料聚己内酯/ β -磷酸三钙(PCL/ β -TCP)通过调控巨噬细胞极化对骨组织内血管生成的作用,为其临床应用提供依据。**方法:**采用3D打印技术制备试样并加以表征。体内实验采用模型为SD大鼠股骨远端植入模型。双侧植入PCL/ β -TCP支架后采取免疫荧光染色观察支架内部成血管标记物CD31的表达差异,并采用血管灌注方法进行血管造影,评价支架内部血管体积。采用免疫荧光染色检测炎症标记物iNOS,抑炎标记物Arg-1的表达情况。体外实验采用细胞共培养的方式检测PCL/ β -TCP对巨噬细胞极化的调控作用以及免疫介导的血管形成改变。实验分为两组,空白组(Control)及PCL/ β -TCP(PT5)组。将巨噬细胞系Raw264.7接种于材料表面并对其极化水平及分泌改变进行检测。通过免疫荧光染色检测M1巨噬细胞标记物iNOS、M2巨噬细胞标记物Arg-1的表达情况。通过RT-qPCR检测CCR-7、CD206,血管内皮生长因子(VEGF),血小板源性生长因子(PDGF-BB),肿瘤坏死因子 α (TNF- α),白细胞介素-10(IL-10)的转录情况。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测VEGF、PDGF-BB、IL-10、TNF- α 的分泌情况。应用Transwell迁移实验检测PCL/ β -TCP刺激下巨噬细胞分泌作用对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)迁移能力的影响,应用免疫荧光染色检测PCL/ β -TCP刺激下巨噬细胞分泌作用对HUVECs表面血管形成指标CD31表达情况的影响。**结果:**在体内实验中,支架周围组织CD31表达升高($P<0.001$),血管灌注结果提示支架内部血管体积显著增加($P<0.001$),同时炎症标记物iNOS表达下调($P<0.001$),抗炎标记物Arg-1升高($P<0.001$)。在体外实验中,与Control相比,PT5组巨噬细胞中炎症标记物iNOS合成无明显差异,抑炎标记物Arg-1合成增加;炎症标记物CCR-7及TNF- α 转录水平下调($P<0.01$, $P<0.01$),抗炎标记物CD206及IL-10转录上调($P<0.001$, $P<0.001$);VEGF转录水平下调($P<0.01$),PDGF-BB转录上调($P<0.01$);VEGF分泌水平下降($P<0.001$),PDGF-BB分泌增加($P<0.01$),IL-10分泌水平提高($P<0.001$),TNF- α 分泌水平下降($P<0.05$)。在巨噬细胞分泌作用下,HUVECs的迁移能力提高($P<0.001$),CD31表达上调($P<0.001$)。**结论:**骨修复材料PCL/ β -TCP可通过调控巨噬细胞向M2方向极化进而促进血管形成,可作为骨修复材料的候选材料之一。

关键词:骨修复支架;炎症反应;成血管效应;生物陶瓷;巨噬细胞极化

中图分类号:R-33;R683.2;R318.08 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)11-2012-07

Effect of PCL/ β -TCP on Angiogenesis Through Regulating Macrophage Polarization*

GUO Shuo, LIU Wen-wen, WEI Xing-hui, WANG Ning, LI Xiao-kang, GUO Zheng[△]

(Department of Orthopedics, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shannxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the angiogenesis changes caused by biodegradable material polycaprolactone/ β -tricalcium phosphate (PCL/ β -TCP) through the regulation of macrophage polarization, and to provide a basis for its clinical application. **Methods:** The samples were prepared by 3D printing technology and characterized. In vivo experiments, SD rats were implanted in distal femur. Immunofluorescence staining was performed to detect the expression of angiogenesis marker CD31 and angiography was used to evaluate the vascular volume in the stent. Pro-inflammatory marker iNOS and anti-inflammatory marker Arg-1 in the scaffold were detected by immunofluorescence staining after implantation. PCL/ β -TCP and its effect on angiogenesis through the regulation of macrophage polarization were detected by cell co-culture in vitro. The experiment was divided into two groups, the blank group (Control) and the PCL/ β -TCP (PT5) group. Macrophage cell line Raw264.7 was inoculated on the surface of the material and the polarization and secretion changes were detected. The expression of the M1 macrophage marker iNOS and M2 macrophage marker Arg-1 were detected by immunofluorescence staining. The transcription of vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF-BB), M1 macrophage marker CCR-7, and M2 macrophage marker CD206 were detected by RT-qPCR. The secretion of VEGF, TNF- α , PDGF-BB and IL-10 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Transwell migration experiment was used to detect the effect of macrophage secretion on HUVECs migration ability of human umbilical vein endothelial cells stimulated by PCL/ β -TCP. **Results:** In vivo experiments, the volume and expression of CD31 were enhanced ($P<0.001$, $P<0.001$). Expression of inflammatory marker iNOS decreased ($P<0.001$), while the anti-inflammatory marker Arg-1 increased ($P<0.001$). In vitro study, compared with Control, there was no significant difference in synthesis of inflammatory marker iNOS ($P>0.05$), and the synthesis of anti-inflammatory marker Arg-1

* 基金项目:国家重点研究发展计划项目(2017YFC1104902);国家自然科学基金面上项目(51771227)

作者简介:郭硕(1994-),男,博士研究生,主要研究方向:骨修复材料,E-mail: doctorguoshuo@163.com

[△] 通讯作者:郭征(1965-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:骨修复材料其表面改性研究,E-mail: guozheng@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2020-02-23 接受日期:2020-03-18)

increased in PT5 ($P<0.001$). Transcription level of inflammatory marker CCR-7 and TNF- α was decreased ($P<0.01$, $P<0.01$) in PT5, while the transcription of anti-inflammatory markers CD206 and IL-10 were up-regulated ($P<0.001$, $P<0.001$). Transcription of VEGF was down-regulated ($P<0.01$) in PT5, and PDGF-BB transcription level was up-regulated ($P<0.001$). Treated with PT5, the secretion level of VEGF decreased ($P<0.01$), while the secretion level of PDGF-BB was upregulated ($P<0.01$) as well as IL-10 ($P<0.001$). Compared with Control, the secretion of TNF- α was impaired in PT5 ($P<0.05$). Under the action of macrophage secretion, HUVECs migration ability and expression of CD31 were enhanced ($P<0.001$). **Conclusion:** Bone repair material PCL/ β -TCP can promote angiogenesis by regulating the polarization of macrophages towards M2, and can be one of the candidate materials for bone repair materials.

Key words: Bone repair scaffold; Inflammation response; Vascularization effect; Bioceramics; Macrophage polarization

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R683.2; R318.08 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)11-2012-07

前言

由于创伤性骨折、骨肿瘤切除、截骨矫形等骨缺损患者的数目不断增加,寻求合适的治疗方法是当前临床上关注的热点。骨移植被认为是骨缺损修复最合适的方法。骨移植可分为自体骨移植、异体骨移植和人工骨移植。自体骨和异体骨移植虽然可以有效的促进骨组织的自我修复,但由于其来源的局限性,排异反应和易感染等副作用,使得人工骨越来越受到临床工作者及科研人员的关注^[1]。其中可降解人工骨修复材料由于可以完全实现自体骨的爬行替代修复而成为研究热点。当前,由于 PCL/ β -TCP 支架为可降解材料,且具有优良的成骨特性以及与天然骨相匹配的机械性能而成为骨修复材料的候选材料之一^[2-4]。

成骨和成血管在时间和空间上存在着相互促进的作用,这种紧密的联系被称为“血管成骨耦联”^[5,6]。血管网络可为骨组织提供营养,氧气及多能干细胞^[7,8]。因此越来越多的学者指出,骨科植入物的设计要同时考虑其成骨和成血管能力^[9]。当前有研究发现 β -TCP 可有效促进骨内血管形成^[10],但对于 PCL/ β -TCP 复合支架的成血管作用研究较少。同时,在骨修复过程中,巨噬细胞在早期的血肿和炎症反应过程及后期的组织再生过程中均扮演着重要的角色,这主要是因为巨噬细胞在早期可分化为促进炎症反应的 M1 型,而随着修复过程的进行,巨噬细胞逐渐分化为促进修复的 M2 型^[11-14]。而巨噬细胞的分型同时也对血管的再生也起到至关重要的作用^[15,16]。但是当前并没有针对 PCL/ β -TCP 支架对于巨噬细胞分化以及由此带来的成血管影响的研究。因此我们通过体外细胞学实验及体内动物骨缺损模型共同探讨 PCL/ β -TCP 支架对于骨缺损修复过程中的血管形成作用,以及 PCL/ β -TCP 支架是否是通过调控巨噬细胞极化方向改变血管形成效应。

1 材料与方法

1.1 材料

MiniBEST Universal RNA Extraction 试剂盒, PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒, FastStart Universal SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒购自日本 Takara 公司;结晶紫染色液购自中国碧云天公司;抗体如下: iNOS、Arg-1、CD31 购自英国 Abcam 公司, IgG 购自中国金克隆公司;实验用 SD 大鼠由空军军医大学动物实验中心提供;激光共聚焦显微镜购自日本尼康公司; Microfil 造影剂购自印度 Flow Tech 公司;聚己内酯购自美国

苏威公司;磷酸三钙购自中国连云港中宏化工有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PCL/ β -TCP 支架的制备 所有样品均来自陕西东望科技有限公司。质量比 5:5 的 PCL 与 β -TCP 在 60 °C 条件下预混。然后在 70 °C 的双螺杆熔体挤出机中将混合物制成棒料。空气中冷却后通过 3D 打印机 (EZAU, DW-BI, 陕西东望科技有限公司) 制作试样。喷嘴直径 400 μ m, 层厚 80 μ m。PCL/ β -TCP 制成支架(直径 4 mm, 高 5 mm, 孔隙度 64 %)用于体内研究。将多孔支架孔径设为 0.8 mm, 丝径 0.4 mm。采用能量色散 X 射线光谱仪 EDX, 薄膜 X 射线衍射仪 (TF-XRD, X'Pert PRO, 荷兰) 对试样进行了表征。采用接触角测量仪 (DSA30, Kruss, Germany) 进行亲水性测定。

1.2.2 免疫荧光染色检测支架内部血管形成效应 所有实验过程均经过空军军医大学伦理委员会根据相关准则和规定批准。手术过程如下:从实验动物中心获得 8 周龄 SD 大鼠。大鼠饲养条件为:22 °C 室温, 常规湿度。给与正常食水饲养。将所得动物随机编号, 分为两组, 分别为 PT5 及空白对照组。在无菌条件下进行手术。大鼠采取戊巴比妥钠 (10 mg/100 g 体重) 全身麻醉, 股骨远端外侧沿长轴做 1.5 cm 左右经皮切口, 对肌肉进行钝性分离, 暴露股骨干骺端。于干骺端垂直股骨长轴方向制备直径 4 mm、深度 5 mm 的孔道。生理盐水冲洗, 洗除骨颗粒。轻柔放入 PCL/ β -TCP 支架。用丝线依次缝合深筋膜和皮肤。对侧股骨实施相同操作。伤口涂抹红霉素软膏预防感染。术后及术后每 2 天给予青霉素钠 (10 万 IU/250 g), 肌肉注射, 持续一周。植入 7 天后, 过量麻醉致死大鼠。对大鼠进行灌注处理。灌注结束后采集股骨远端标本, 立即用 4 % 多聚甲醛固定 2 天, 其后转入 75 % 乙醇, 保存备检。标本浸泡于 10 % EDTA 脱钙液中进行脱钙。脱钙完成后修剪标本至合适大小及形状, 浸没于乙醇梯度脱水, 嵌入石蜡块中进行包埋切片。所得切片 60 °C 条件下烤片 0.5 h, 100 % 二甲苯浸没 3 次, 每次 10 min; 乙醇溶液梯度处理, 蒸馏水浸泡 5 min; 依次将标本浸没于 0.1 % 的胰蛋白酶溶液, 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液, 煮沸, 自然冷却; 封闭 30 min; 依次滴加 CD31 及二抗。DAPI 复染 10 min, 使用荧光显微镜观察, 拍照; 用 IPP 软件对获得的图片进行测量, 计算 ROI 内的 CD31 平均荧光强度, 以评价 PCL/ β -TCP 支架内部成血管标记物合成情况。

1.2.3 造影剂灌注检测血管体积 植入 14 天后进行取材, 灌注操作同前述过程。灌注血管造影剂的标本进行脱钙处理, 并采用 Micro-CT 扫描, 检测支架内部血管体积, 所用软件为

VGStudio MAX。

1.2.4 PCL/ β -TCP 对巨噬细胞极化的影响 本部分实验分为两组：空白对照组及 PT5。将巨噬细胞系 Raw264.7 接种于 PCL/ β -TCP 试样表面,细胞培养条件:配制完全培养基(含热灭活的 10 %胎牛血清、1 %青 / 链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基),37 $^{\circ}$ C,5 % CO₂ 加湿细胞培养箱。采用 RT-qPCR 检测其 M1 极化相关基因 CCR-7、TNF- α ,M2 极化相关基因 CD206、IL-10 的转录情况,引物序列见表 1。使用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction 试剂盒提取总 RNA,使用 Prime-ScriptTM RT Master Mix 试剂盒将约 500 ng 总 RNA 进行反转录得到 cDNA。应用试剂盒(FastStart Universal SYBR[®] Premix Ex TaqTM II)在 PCR 系统(CFX96 TM,Bio-Rad,USA)上进行 qPCR。选择甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为管家基因。采用免疫荧光染色检测 M1 标记物 iNOS,M2 标记物 Arg-1 的蛋白表达情况。细胞接种后 3 天,使用 PBS 洗涤。然后用 4 %多聚甲醛固定 30 min,Triton X-100 通透 15 min。继而封闭样品 1 h,相继孵育一抗(iNOS,Arg-1)以及对应二抗(Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 抗体和 FITC 标记的驴抗小鼠 IgG),最后复染细胞核。采用激光共聚焦显微镜获取图像。同时,通过体内实验对 PCL/ β -TCP 支架内部的炎症反应加以探讨,手术操作同前,所用抗体为 iNOS 及 Arg-1,计算 ROI 内平均荧光强度,以评价 PCL/ β -TCP 支架内部炎症反应情况。收集前述培养上清,离心、过滤,保存于 -80 $^{\circ}$ C;配制待测因子所对应标准品,梯度稀释,配制抗体工作液及 ABC 工作液并依次加入孔中,37 $^{\circ}$ C 下反应 90 min;加入生物素标记抗体,在 37 $^{\circ}$ C 下反应 60 min;洗涤液清洗,拍干;加入 ABC 工作液,在 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min;加入 TMB 显色液,在 37 $^{\circ}$ C 下避光反应 15 min;加入终止液,读取 450 nm 处吸光值,绘制标准曲线,计算样品中 TNF- α 及 IL-10 浓度。

1.2.5 PCL/ β -TCP 通过调节巨噬细胞极化对 HUVECs 成血管能力的影响 提取空白对照组,PT5 培养巨噬细胞所得培养

基(condition medium a,CMA),分别与 ECM 完全培养基以 1:1 混合后构造间接共培养体系,用以培养 HUVECs,分别记为 CMA+C,CMA+PT5。培养 5 天后采用 Transwell 迁移实验检测其迁移能力的改变。接种前使用基质胶预处理 Transwell 小室。配制无血清条件培养基(无血清 ECM 培养基与前述所得 Raw264.7 培养基按 1:1 比例混合),并重悬细胞。接种于 Transwell 小室上表面。上层加入等量前述所得 HUVECs,下层加入 ECM 完全培养基(含 10 %FBS)。24 h 后取下,采用 4 %多聚甲醛固定 20 分钟。PBS 洗涤后以结晶紫染液染色。Transwell 小室上层用棉拭子擦净,将其置于载玻片上,Olympus 显微镜下观察并进行细胞计数,比较组间细胞数差异。分别使用 CMA+C、CMA+PT5 培养 HUVECs,5 天后采用免疫荧光染色检测表面标记物 CD31 表达情况。使用 PBS 洗涤,然后用 4 %多聚甲醛固定 30 min,Triton X-100 通透 15 min。继而用牛血清白蛋白(BSA)封闭样品 1 h,相继孵育对应一抗(CD31,1:100)、二抗。采用激光共聚焦显微镜获取图像并分析单位面积荧光强度。采用 RT-qPCR 及 ELISA 对巨噬细胞表达 VEGF 及 PDGF-BB 水平进行检测,所用引物见表 1,ELISA 操作同前。

1.2.6 统计学分析 所有实验均独立重复至少 3 次,所选图表为重复结果之一。数据以平均值 $\pm$ SD 表示。采用 SPSS 24.0 进行统计学分析。采用单因素方差分析(ANOVA)比较总体差异, $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 材料表征

EDX 检测(图 1A,表 1)结果显示,Ca、P 原子比接近 3:2,证实其组成成分中含有 β -TCP。由 XRD 所呈现特征峰可知(图 1B),PT5 物相组成分别为 PCL 和 β -TCP。根据图 1C 所示接触角测试结果可知,PT5=28.9 $\pm$ 2 $^{\circ}$,其亲水性优于纯钛^[17],具有生物学相容性。

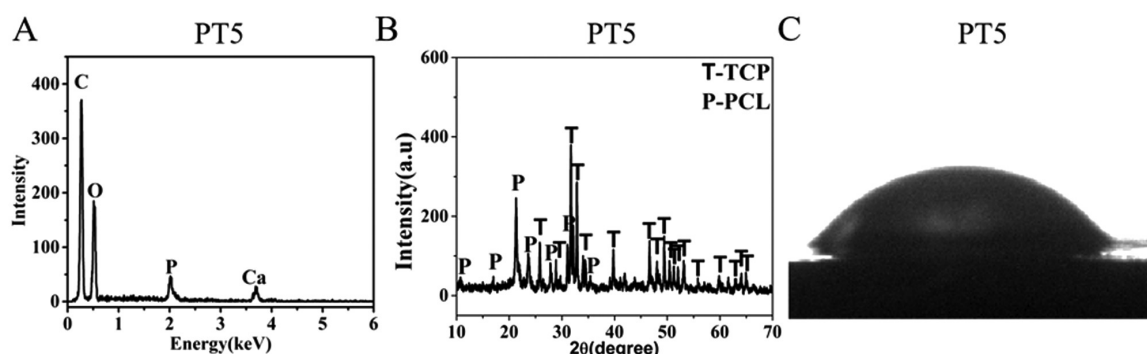


图 1 材料表征分析

Fig.1 Characterization of PCL/ β -TCP specimens.

A Distribution of element. B TF-XRD patterns of PT5. C Detection of contact angles.

表 1 EDX 检测试样元素组成

Table 1 The elemental compositions of specimens detected by EDX

Groups	Elemental composition (Wt.%)			
	C	O	Ca	P
PT5	40.94 $\pm$ 8.27	27.12 $\pm$ 10.15	20.78 $\pm$ 5.55	11.15 $\pm$ 4.02

2.2 体内植入 PCL/ β -TCP 支架内部血管形成效应

在体内实验中,免疫荧光染色结果如图 2A,C 所示,植入 7 天后,相对于 Control 组,支架周围组织 CD31 荧光强度增强,

证实 CD31 表达上调且具有统计学差异($P<0.001$)。植入 14 天后血管造影结果如图 2B,C 所示,支架内部血管体积明显高于对照组($P<0.001$),血管密度明显增大。

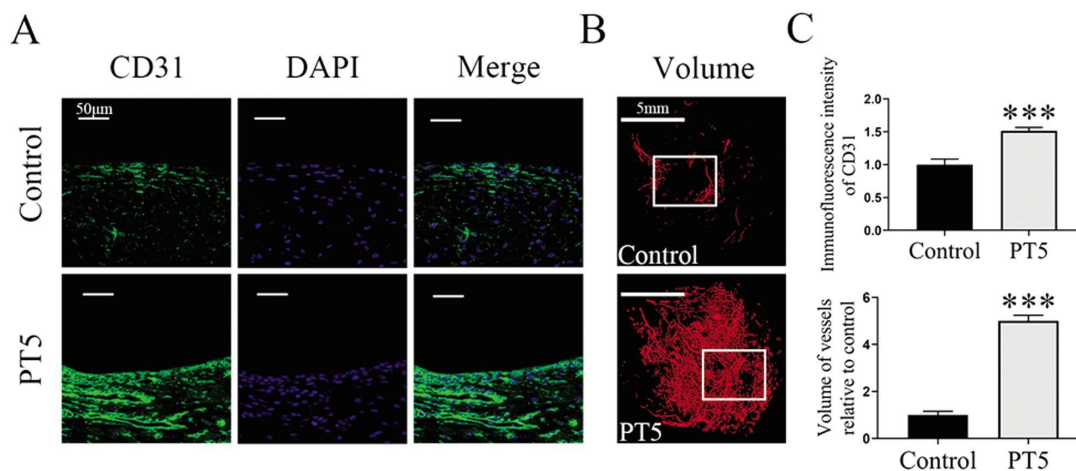


图2 体内血管形成检测

Fig.2 Angiogenesis detection in vivo

A: Synthesis of angiogenic marker CD31 was detected by immunofluorescence staining.

B: Vessels perfusion to detect the vascular volume, the defect was contained in box:

C: Statistical analysis of the angiogenesis effect.

Note: $n=3$, compared with Control, *** $P<0.001$.

2.3 体内 PCL/ β -TCP 对巨噬细胞极化的影响

在体内实验中,免疫荧光染色结果如下所示,植入后 7 天,相对于空白组,支架附近炎症标记物 iNOS 荧光强度明显低于

对照组($P<0.001$),说明 M1 型巨噬细胞比例减少,抗炎标记物 Arg-1 荧光强度增强($P<0.001$),M2 型巨噬细胞比例增多,如图 3A,B。

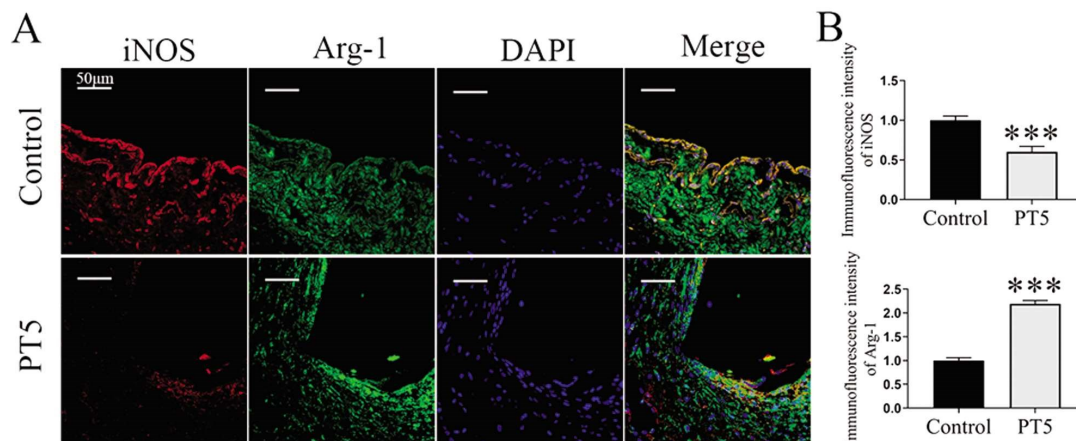


图3 体内炎症反应检测

Fig.3 Inflammatory response detection in vivo

A, B: Synthesis and statistical analysis of polarization related markers iNOS (red) and Arg-1 (green) in macrophages were detected by immunofluorescence staining.

Note: $n=3$, compared with Control, *** $P<0.001$.

2.4 体外 PCL/ β -TCP 对巨噬细胞极化的影响

如图 4A,植入后 3 天,免疫荧光染色结果显示,与 Control 相比,巨噬细胞中炎症标记物 iNOS 合成无明显差异,抑炎标记物 Arg-1 合成明显增加;RT-qPCR 结果见图 4B,C,巨噬细胞炎症标记物 CCR-7, TNF- α 转录水平下调($P<0.01$, $P<0.01$),抗炎标记物 CD206 及 IL-10 转录上调($P<0.001$, $P<0.001$)。ELISA 结果见图 4D,巨噬细胞 IL-10 分泌水平提高($P<0.001$),

TNF- α 分泌水平下降($P<0.05$)。

2.5 PCL/ β -TCP 通过调节巨噬细胞极化对血管形成能力的影响

如图 5A,RT-qPCR 结果显示巨噬细胞中 VEGF 转录水平下调($P<0.01$),PDGF-BB 转录上调($P<0.001$);ELISA 结果显示巨噬细胞 VEGF 分泌水平下降($P<0.01$),PDGF-BB 分泌上调($P<0.01$)。Transwell 迁移实验如图 5C,D,结果显示,在巨噬

细胞分泌作用下,相同时间内,CMA+PT5 培养下穿过 Transwell 小室的 HUVECs 数量明显增加($P<0.001$),提示其迁移能力增强。免疫荧光染色结果如图 5B,D,单位面积内成血管标记

物 CD31 荧光强度增强,提示其表达上调,周围血管形成行为活跃($P<0.001$)。

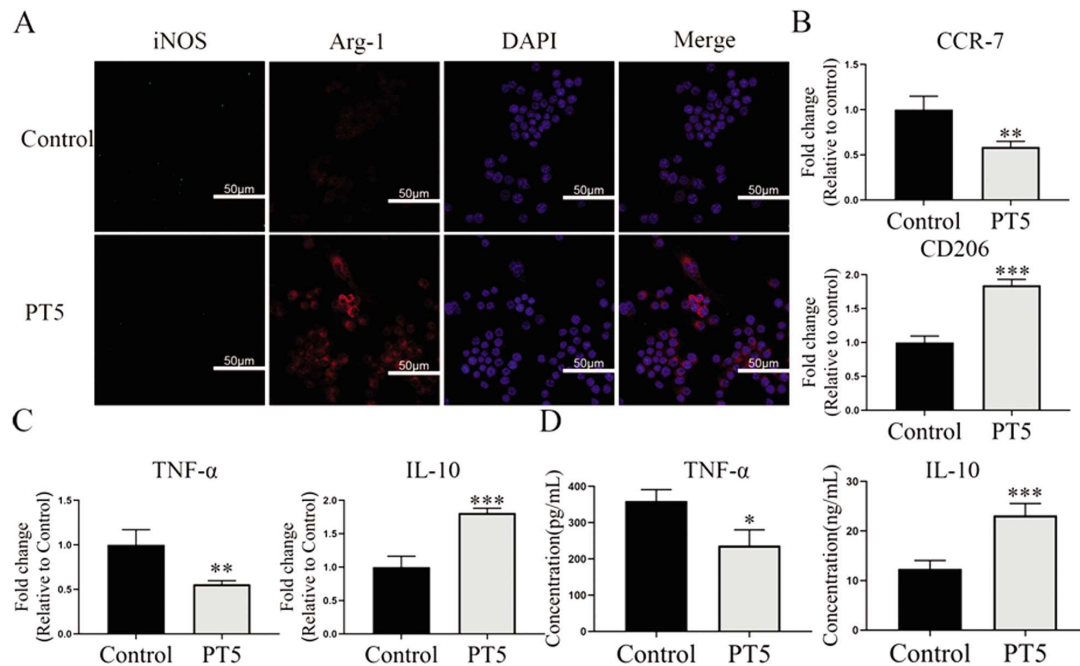


图 4 PCL/β-TCP 对巨噬细胞极化的影响

Fig.4 Effect of PCL/β-TCP on macrophage polarization and angiogenesis potential

A: The synthesis of iNOS and Arg-1 in macrophages detected by immunofluorescence.

B: Transcription levels of CCR-7 and CD206 detected by RT-qPCR.

C-D: Transcription and secretion of TNF-α and IL-10 detected by RT-qPCR and ELISA.

Note: n=4, compared with Control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

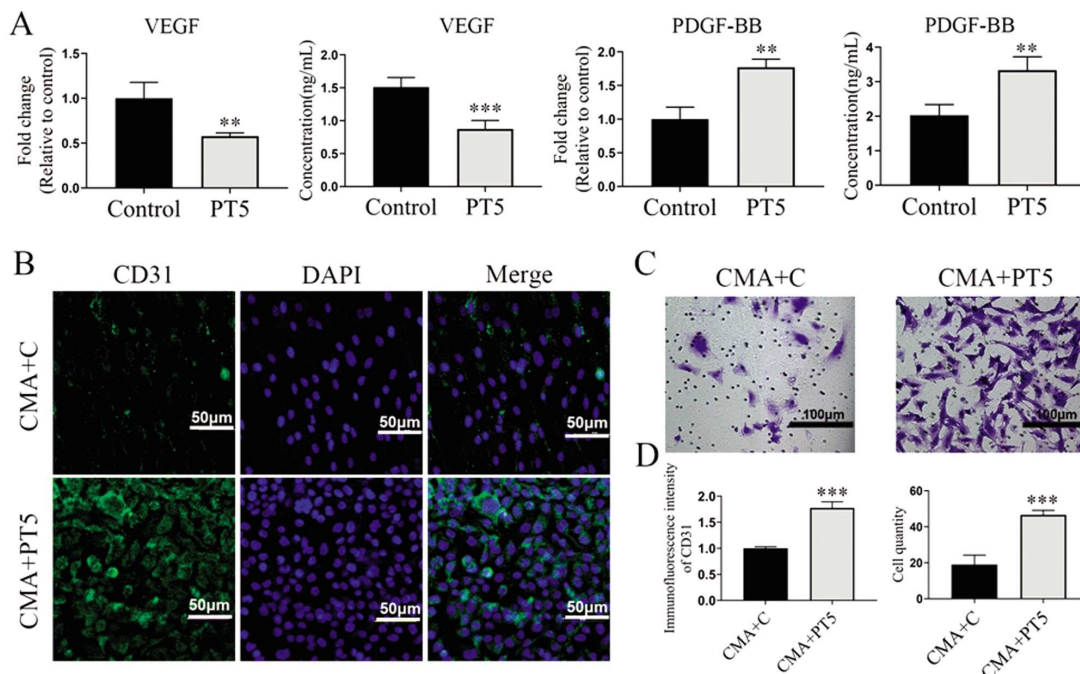


图 5 PCL/β-TCP 通过巨噬细胞极化对血管形成效应的影响

Fig.5 Effect of PCL/β-TCP on angiogenesis through macrophage polarization

A: The transcription and secretion of VEGF and PDGF-BB were detected by RT-qPCR and ELISA.

B: Synthesis of CD31 was detected by immunofluorescence. C: Migration ability of HUVECs was detected by Transwell assay. D: Statistical analysis of fluorescence intensity and cell migration ability.

Note: n=4, compared with Control, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

3 讨论

PCL/ β -TCP 复合材料包含了医用级聚己内酯(PCL)和 β 磷酸三钙(β -TCP),当前这两种材料已广泛用于骨科假体制备。PCL 由于其良好生物相容性、可降解性以及较为低廉的价格已经被 FDA 批准作为生物可降解植入物^[18]。 β -TCP 是一种可生物降解的磷酸钙衍生物,与天然骨的磷酸钙成分相类似,因此具有内在的仿生潜力,并已被证明具有促进新骨生长的骨传导特性^[19,20]。PCL 与 β -TCP 的组合在保持原有优势的前提下,进一步提高了两组材料的成骨相关性能。如 PCL/ β -TCP 具有更亲水的性能,使得材料更适合细胞或周围组织的生长^[3,4]。PCL/ β -TCP 也可根据两组材料比例的不同使其具有更为可控的机械性能和可控的生物降解能力^[21]。因此,PCL/ β -TCP 已经被视为骨缺损修复的优势材料之一。Li 等人制备了 PCL/ β -TCP 椎间融合器并将其应用于羊的椎间融合,观察到了良好的骨长入效果^[2]。Lee 等人通过 3D 打印技术制备 PCL/ β -TCP 支架,并将其应用于犬的下颌骨缺损修复中,发现支架内部有较多的骨形成^[22]。

骨组织内部血管形成可为骨组织修复提供氧气,生长因子等相关物质,这种“血管-成骨耦联”关系对骨组织修复具有重要意义。近年来,也有学者发现了骨组织内的一种独特的血管亚型,称为 H 型血管。该血管亚型将血管生成和成骨结合在一起,进一步证实了血管化在成骨中的重要作用^[5,6]。因此,当前越来越多的学者在骨科植入物设计时将材料内部血管化也作为参考指标^[9]。Qin^[23]等人通过将镁掺杂入可降解 PLGA/TCP 材料中发现,他们新设计的骨科植入物在促进骨修复的过程中也极大的促进了骨组织内部的血管形成。然而,虽然 PCL/ β -TCP 支架已被证实可以有效促进骨缺损部位的骨修复与骨再生,但是其对于骨组织内部的血管再生作用的研究则相对较少。在本研究中,通过构建大鼠股骨外侧髁缺损模型,发现 PCL/ β -TCP 支架可有效促进材料周围及材料内部的血管形成。

针对 PCL/ β -TCP 支架对于血管化的促进作用,本研究进一步对其可能的机理进行了探讨。有学者指出, β -TCP 可通过促进巨噬细胞向 M2 方向极化进而促进间充质干细胞的成骨分化^[24,25],且传统上认为,M2 型巨噬细胞可通过分泌 PDGF-BB 等细胞因子促进血管形成^[26-28]。那么,复合材料 PCL/ β -TCP 是否可通过调控巨噬细胞极化进而产生对血管形成产生影响呢?为进一步探明 PCL/ β -TCP 支架促进骨组织血管化的可能机理及与巨噬细胞极化之间的潜在关系,我们首先通过体内外实验检测了其对于巨噬细胞极化方向的调控。结果证实,复合材料 PCL/ β -TCP 下调了炎症相关标记物 TNF- α 、CCR-7 的表达,巨噬细胞内抗炎标记物 Arg-1、CD206 的表达上调,证实其促进巨噬细胞向 M2 方向极化。此外,我们也对其促血管相关蛋白的合成进行了检测,结果发现,PCL/ β -TCP 提高了巨噬细胞 PDGF-BB 的转录与分泌。Spiller^[29]等人提出 M1 巨噬细胞与 VEGF 的分泌相关而 M2 型巨噬细胞更倾向于分泌 PDGF-BB,二者均对血管形成起到重要作用。因此,在本实验中,成血管相关蛋白 VEGF 表达有所降低可能由向 M1 方向极化减弱导致。为进一步验证巨噬细胞分泌作用对成血管能力的影响,我们利用条件培养基培养 HUVECs,发现经过 PT5 培养后的巨噬细

胞可明显增强 HUVEC 表面 CD31 的表达并提高 HUVEC 的迁移能力,提示其血管形成能力增强,这可能与 PT5 培养巨噬细胞后的上清中含有较高水平 IL-10 及 PDGF-BB 有关^[9,15,30]。

综上所述,本研究发现 PCL/ β -TCP 复合支架可有效促进骨组织内部的血管形成,同时发现此促进作用可能是通过刺激巨噬细胞向 M2 型分化,从而间接加强了骨组织内部的血管形成。尽管本研究发现 PCL/ β -TCP 对于血管形成具有一定积极作用,为其下一步的临床使用提供了一定的借鉴,但仍存在一些不足。例如并未对 PCL 和 β -TCP 两组材料组分比例进行细化,尚需在下一步的研究中加以完善,为 PCL/ β -TCP 复合材料的临床应用提供更多的理论支撑。

参考文献(References)

- [1] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, et al. Bone regeneration: current concepts and future directions[J]. BMC Medicine, 2011, 9(1): 66
- [2] Li Y, Wu Z G, Li X K, et al. A polycaprolactone-tricalcium phosphate composite scaffold as an autograft-free spinal fusion cage in a sheep model[J]. Biomaterials, 2014, 35(22): 5647-5659
- [3] Huang S H, Hsu T T, Huang T H, et al. Fabrication and characterization of polycaprolactone and tricalcium phosphate composites for tissue engineering applications [J]. Journal of Dental Sciences, 2016: S1991790216300538
- [4] Park S H, Park S A, Kang Y G, et al. PCL/ β -TCP Composite Scaffolds Exhibit Positive Osteogenic Differentiation with Mechanical Stimulation [J]. Tissue Engineering & Regenerative Medicine, 2017, 14(4): 349-358
- [5] Ramasamy S K, Kusumbe A P, Wang L, et al. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone [J]. Nature, 2014, 507(7492): 376-380
- [6] Kusumbe A P, Ramasamy S K, Adams R H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone [J]. Nature, 2014, 507(7492): 323-328, b1
- [7] Hankenson K D, Dishowitz M, Gray C, et al. Angiogenesis in bone regeneration[J]. Injury, 2011, 42(6): 556-561
- [8] Andrea G, Burger M G, Alexander L, et al. It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration [J]. Frontiers in Bioengineering & Biotechnology, 2017, 5: 68
- [9] Fujian Z, Bo L, Xian L, et al. Promoting, in vivo, early angiogenesis with sub-micrometer strontium-contained bioactive microspheres through modulating macrophage phenotypes [J]. Biomaterials, 2018, 06(178): 36-47
- [10] Xiao X, WWang, D Liu, et al. The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways[J]. Scientific Report, 2015, 5: 9409
- [11] Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, et al. Immune responses to implants - A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials[J]. Biomaterials, 2011, 32(28): 6692-6709
- [12] Serhan C N, Dalli J, Colas R A, et al. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome[J]. Biochimica Et Biophysica Acta Molecular & Cell Biology of Lipids, 2015, 1851(4): 397-413
- [13] Schmidt-Bleek K, Kwee B J, Mooney D J, et al. Boon and Bane of

- Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis[J]. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 2015, 21(4): 354-364
- [14] Bryan N. Brown. Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials[J]. *Acta biomaterialia*, 2012, 8(3): 978-987
- [15] Wang J, Qian S, Liu X, et al. M2 macrophages contribute to osteogenesis and angiogenesis on nanotubular TiO₂ surfaces[J]. *J. mater. chem. b*, 2017, 5(18): 3364-3376
- [16] Roh J D, R Sawh-Martinez, M P Brennan, et al. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(10): 4669-4674
- [17] Li Y, W Yang, X Li, et al. Improving Osteointegration and Osteogenesis of Three-Dimensional Porous Ti6Al4V Scaffolds by Polydopamine-Assisted Biomimetic Hydroxyapatite Coating [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(10): 5715-5724
- [18] Siddiqui N, Asawa S, Birru B, et al. PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications [J]. *Molecular Biotechnology*, 2018, 60(7): 506-532
- [19] Pina S, Rebelo R, Correlo V M, et al. Bioceramics for Osteochondral Tissue Engineering and Regeneration [J]. *Advances in experimental medicine & biology*, 2018, 1058: 53-75
- [20] Ng J, Spiller K, Bernhard J, et al. Biomimetic Approaches for Bone Tissue Engineering [J]. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 2017, 23(5): 480-493
- [21] Doyle H, Lohfeld S, McDonnell P, et al. Evaluation of a Multiscale Modelling Methodology to Predict the Mechanical Properties of PCL/ β -TCP Sintered Scaffold Materials[J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2015, 43(8): 1989-1998
- [22] Lee S, Choi D, Shim JH, Nam W. Efficacy of three-dimensionally printed polycaprolactone/beta tricalcium phosphate scaffold on mandibular reconstruction[J]. *Scientific Report*, 2020, 10(1): 4979
- [23] Lai Y, Li Y, Cao H, et al. Osteogenic magnesium incorporated into PLGA/TCP porous scaffold by 3D printing for repairing challenging bone defect[J]. *Biomaterials*, 2019, 197: 207-219
- [24] Chen, Zetao, Wu, Chengtie, Gu, Wenyi, et al. Osteogenic differentiation of bone marrow MSCs by β -tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(5): 1507-1518
- [25] Chen Z, Mao X, Tan L, et al. Osteoimmunomodulatory properties of magnesium scaffolds coated with β -tricalcium Phosphate [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(30): 8553-8565
- [26] Xie H, Z Cui, L Wang, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis [J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(11): 1270-1278
- [27] Jetten N, Verbruggen S, Gijbels M J, et al. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo[J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(1): 109-118
- [28] Xiaoshi J, Hudi X, Miron R J, et al. EZH1 Is Associated with TCP-Induced Bone Regeneration through Macrophage Polarization [J]. *Stem Cells International*, 2018, 2018: 1-10
- [29] Spiller K L, Anfang R R, Spiller K J, et al. The Role of Macrophage Phenotype in Vascularization of Tissue Engineering Scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(15): 4477-4488
- [30] Suen J L, Y Chang, Y S Shiu, et al. IL-10 from plasmacytoid dendritic cells promotes angiogenesis in the early stage of endometriosis[J]. *Journal of Pathology*, 2019, 249(4): 485-497

(上接第 2005 页)

- [20] Chu D, Gao J, Wang Z. Neutrophil-Mediated Delivery of Therapeutic Nanoparticles across Blood Vessel Barrier for Treatment of Inflammation and Infection[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(12): 11800-11811
- [21] Hu Q, Sun W, Wang J, et al. Conjugation of haematopoietic stem cells and platelets decorated with anti-PD-1 antibodies augments anti-leukaemia efficacy[J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2(11): 831-840
- [22] Zhang W, Wang M, Tang W, et al. Nanoparticle-Laden Macrophages for Tumor-Tropic Drug Delivery [J]. *Adv Mater*, 2018, 30(50): e1805557
- [23] Bai F, Wang C, Lu Q, et al. Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor neovasculature to combat P-gp expressing multidrug resistant cancer[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(26): 6163-6174
- [24] Zhong Q-Z, Li S, Chen J, et al. Oxidation-Mediated Kinetic Strategies for Engineering Metal-Phenolic Networks [J]. *Angew Chem*, 2019, 58(36): 12563-12568
- [25] Tang L, Zheng Y, Melo MB, et al. Enhancing T cell therapy through TCR-signaling-responsive nanoparticle drug delivery[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(8): 707-716
- [26] Kim H, Shin K, Park OK, et al. General and Facile Coating of Single Cells via Mild Reduction [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(4): 1199-1202
- [27] Shao J, Xuan M, Zhang H, et al. Chemotaxis-Guided Hybrid Neutrophil Micromotors for Targeted Drug Transport [J]. *Angew Chem*, 2017, 56(42): 12935-12939
- [28] Park J, Andrade B, Seo Y, et al. Engineering the Surface of Therapeutic "Living" Cells[J]. *Chem Rev*, 2018, 118(4): 1664-1690
- [29] Stephan MT, Moon JJ, Um SH, et al. Therapeutic cell engineering with surface-conjugated synthetic nanoparticles[J]. *Nat Med*, 2010, 16(9): 1035-1041
- [30] Ayer M, Klok H-A. Cell-mediated delivery of synthetic nano- and microparticles[J]. *J Control Release*, 2017, 259: 92-104