

郭维民



3D 打印仿生半月板取向结构的双相支架构建组织工程半月板 实验研究

郭维民, 刘舒云, 陈明学, 高爽, 卢世璧, 郭全义

中国人民解放军总医院

目的: 通过 3D 打印技术结合脱细胞技术, 制备既仿生半月板取向性结构又仿生半月板纤维软骨细胞微环境的组织工程半月板双相支架, 通过复合半月板纤维软骨细胞体外实验及裸鼠皮下异位成纤维软骨实验, 证实双向支架可构建组织工程半月板。

方法: 1. 以聚己内酯 (Polycaprolactone, PCL) 为原料, 采用 3D 打印的方法, 制备仿造半月板内在结构的三维取向支架组及非取向支架组, 检测其理化学性能、生物力学性能; 2. 将 MFC (P3) 种植在两组支架内, 培养 7 天、14 天, 评价细胞活性、相容性以及表型变化; 3. 将 GFP 大鼠 MFC (P3) 种植在两组支架内, 体外培养后 14 天植入裸大鼠皮下, 4 周后取材, 荧光示踪法、组织学及免疫荧光法评价构建组织工程半月板特性。

结果: 构建的半月板取向结构的双相支架较非取向结构的双相支架组具有更好的压缩以及拉伸模量, 能很好地维持细胞活性, 具有很好的生物相容性, 并且可以指导 MFC 取向性再生以及维持细胞表型。裸大鼠皮下异位成软骨实验证实 GFP 标记的 MFC (P3) 细胞生长良好, 并且可以被双向支架诱导分泌 I、II 胶原以及 GAG 成分。

结论: 3D 打印仿生半月板取向结构的双相支架不但具有很好的生物力学性能以及细胞相容性, 而且可以很好的指导 MFC (P3) 取向性生长以及维持细胞表型, 异位成纤维软骨实验证实双向支架可构建组织工程半月板, 因此该取向性双相支架可能是未来组织工程半月板中相当有应用前景的支架之一。

关键词: 组织工程半月板; 半月板细胞外基质; 3D 打印; 取向性结构; 双相支架

**通讯作者: 卢世璧, 郭全义, Email: lushibi301@126.com, doctouguo_301@163.com.

受国家自然科学基金资助 (基金号: 81472092), 国家高技术研究发展研究计划资助 (863 计划) (基金号: 2012AA020502)

陈萌萌 (附件 PDF)



不同浓度甲基丙烯酸甲酯对 SD 大鼠乳鼠脊髓背根神经元影响的实验研究

陈萌萌¹, 唐海²

1. 北京房山区第二医院北京市房山区良乡医院

2. 北京友谊医院

体外实验探索骨水泥单体甲基丙烯酸甲酯 (Methyl methacrylate, MMA) 对斯普拉格大鼠 (sprague dawley, SD) 乳鼠脊髓背根神经元的影响。**方法** 体外模拟椎体成形术制备骨水泥球, 采用气相色谱法测定 MMA 单体释放的浓度范围及变化趋势; 显微操作下提取乳鼠背根神经节并体外培养乳鼠脊髓背根神经细胞 (dorsal root ganglion neurons, DRGs), 用神经元特异性烯醇化酶 (neuron specificity enolization enzymes, NSE) 免疫荧光化学染色鉴定 DRGs; 根据体外实验模拟椎体成形术测得的 MMA 释放浓度范围, DRGs 加入含有不同浓度 MMA 的培养基, 设为正常对照组, 10^{-3} g/L, 10^{-2} g/L, 10^{-1} g/L, 1 g/L 和 10 g/L MMA 组; 采用台盼蓝染色法测定神经元存活率, 采用 Annexin V 法进行流式细胞检测, 分析 MMA 单体诱导的 DRGs 细胞凋亡情况。**结果** 骨水泥在植入后前 10min 内释放出大量单体, 约占总释放量的 90% 以上, 随着时间延长, 单体的释放总量基本保持平稳。60min 内 MMA 单体的最大浓度范围为 (0.1025 ± 0.0068) g/L。DRGs 加入 MMA 单体作用后, 10^{-3} g/L 和 10^{-2} g/L 组的细胞存活率分别为 $(95.00 \pm 2.24)\%$ 、 $(92.20 \pm 2.77)\%$, 与对照组 $(97.00 \pm 1.87)\%$ 比较无明显差异, P 值分别 0.38, 0.07; 10^{-1} g/L、1g/L、10 g/L 细胞存活率分别为 $(89.40 \pm 5.18)\%$ 、 $(86.20 \pm 4.32)\%$ 、 $(77.60 \pm 3.78)\%$, 与对照组比较差异有统计学意义, P 值均小于 0.05。MMA 单体诱导的 DRGs 的凋亡, MMA 单体 10^{-3} g/L、 10^{-2} g/L、 10^{-1} g/L、1g/L、10g/L 均能够诱导细胞的凋亡, 凋亡率分别为 $(38.3 \pm 2.2)\%$ 、 $(40.5 \pm 1.1)\%$ 、 $(44.1 \pm 3.5)\%$ 、 $(48.0 \pm 1.8)\%$ 、 $(54.8 \pm 2.7)\%$, 与空白对照组凋亡率 $(22.6 \pm 5.0)\%$ 比较, 差异有统计学意义, P 值均小于 0.05。**结论:** 椎体成形术中存在 MMA 单体的释放, 并且对椎体内感觉神经细胞存在毒性, 因此 MMA 单体释放对椎体成形术的快速止痛有一定意义。

包同新



P 物质、降钙素基因相关肽、白介素 6 与椎体骨折并发远隔部位疼痛的相关性研究

包同新, 赵京元, 唐小穗

航天中心医院

摘要

目的

探讨胸腰段椎体压缩骨折出现远隔部位疼痛的病因。

方法

选取 Denis 分类屈曲型骨折的手术病例 62 例, 腰痛伴远隔部位疼痛 11 例为实验组, 占全部病例的 17.74%; 腰痛不伴远隔部位疼痛 51 例为对照组, 占全部病例的 82.26%。术前腰椎正侧位片、腰椎核磁共振检查, 计算椎体前缘高度和后缘高度的比值来衡量伤椎的压缩程度,

通过核磁共振排除合并远隔部位软组织损伤病例；术中取得多裂肌标本，制作冰冻切片，P物质（SP）、降钙素基因相关肽（CGRP）、白介素6（IL-6）抗体免疫组化染色；手术前及手术后2周分别行VAS、JOA、ODI评分；统计分析。

结 果

实验组：术前椎体压缩程度（ 68.73 ± 11.91 ）%、VAS（ 8.09 ± 1.51 ）、ODI（ 40.45 ± 3.48 ）、JOA（ 14.00 ± 3.80 ），术后椎体压缩程度（ 84.00 ± 6.08 ）%、VAS（ 5.00 ± 1.34 ）、ODI（ 21.73 ± 3.80 ）、JOA（ 15.36 ± 3.56 ）；对照组：术前椎体压缩程度（ 75.27 ± 14.14 ）%、VAS（ 7.65 ± 1.43 ）、ODI（ 39.24 ± 4.64 ）、JOA（ 11.90 ± 3.59 ），术后椎体压缩程度（ 83.75 ± 8.89 ）%、VAS（ 2.76 ± 1.18 ）、ODI（ 15.82 ± 3.65 ）、JOA（ 20.84 ± 3.71 ）。实验组与对照组术前椎体压缩程度无统计学差异（ $P > 0.05$ ），术后椎体压缩程度无统计学差异（ $P > 0.05$ ）。实验组与对照组术前VAS、ODI、JOA评分无统计学差异（ $P > 0.05$ ），术后VAS、ODI、JOA评分对照组优于实验组（ $P < 0.05$ ）。免疫组化：实验组11例标本SP、CGRP、IL-6染色结果均为阳性。对照组51例标本SP、CGRP、IL-6染色结果阴性。

结 论

屈曲暴力造成脊柱后方组织损伤，SP、CGRP、IL-6介导的炎症反应刺激脊神经后支，是产生远隔部位疼痛的重要原因。

**论文题目： P物质、降钙素基因相关肽、白介素6
与椎体骨折并发远隔部位疼痛的相关性
研究**

专 业： 人体解剖与组织胚胎学

学位类型： 学术型

专业型

学 号： 2012008

论文相关领域 1:	椎体压缩骨折
论文相关领域 2:	免疫组织化学
论文相关领域 3:	
论文相关领域 4:	
论文相关领域 5:	

要求:

- 1、论文题目及学号均用小二号字宋体加粗。
- 2、论文在页面左侧简单装订即可。
- 3、不包含在学期间科研成绩、致谢和个人简介。
- 4、论文中组织学、电泳等图片必须为彩色照片。

目录

一、摘 要

中文论著摘要.....1

英文论著摘要.....3

二、英文缩略语.....6

三、论 文

前言.....7

资料与方法.....7

结果.....10

讨论.....12

结论.....13

四、参考文献.....	13
五、本研究创新性的自我评价.....	15
六、附 录	
附图.....	16
综述.....	19

• 中文论著摘要 •

P 物质、降钙素基因相关肽、白介素 6 与椎体骨折并发远隔部位疼痛的相关性研究

目 的

探讨胸腰段椎体压缩骨折出现远隔部位疼痛的病因。

方 法

选取 Denis 分类屈曲型骨折的手术病例 62 例，腰痛伴远隔部位疼痛 11 例为实验组，占全部病例的 17.74%；腰痛不伴远隔部位疼痛 51 例为对照组，占全部病例的 82.26%。术前腰椎正侧位片、腰椎核磁共振检查，计算椎体前缘高度和后缘高度的比值来衡量伤椎的压缩程度，通过核磁共振排除合并远隔部位软组织损伤病例；术中取得多裂肌标本，制作冰冻切片，P 物质（SP）、降钙素基因相关肽（CGRP）、白介素 6（IL-6）抗体免疫组化染色；手术前及手术后 2 周分别行 VAS、JOA、ODI 评分；统计分析。

结 果

实验组：术前椎体压缩程度（ 68.73 ± 11.91 ）%、VAS（ 8.09 ± 1.51 ）、ODI（ 40.45 ± 3.48 ）、JOA（ 14.00 ± 3.80 ），术后椎体压缩程度（ 84.00 ± 6.08 ）%、VAS（ 5.00 ± 1.34 ）、ODI（ 21.73 ± 3.80 ）、JOA（ 15.36 ± 3.56 ）；对照组：术前椎体压缩程度（ 75.27 ± 14.14 ）%、VAS（ 7.65 ± 1.43 ）、ODI（ 39.24 ± 4.64 ）、JOA（ 11.90 ± 3.59 ），术后椎体压缩程度（ 83.75 ± 8.89 ）%、VAS（ 2.76 ± 1.18 ）、ODI（ 15.82 ± 3.65 ）、JOA（ 20.84 ± 3.71 ）。实验组与对照组术前椎体压缩程度无统计学差异（ $P > 0.05$ ），术后椎体压缩程度无统计学差异（ $P > 0.05$ ）。实验组与对照组术前 VAS、ODI、JOA 评分无统计学差异（ $P > 0.05$ ），术后 VAS、ODI、JOA 评分对照组优于实验组（ $P < 0.05$ ）。免疫组化：实验组 11 例标本 SP、CGRP、IL-6 染色结果均为阳性。对照组 51 例标本 SP、CGRP、IL-6 染色结果阴性。

结 论

屈曲暴力造成脊柱后方组织损伤，SP、CGRP、IL-6 介导的炎症反应刺激脊神经后支，是产生远隔部位疼痛的重要原因。

关 键 词

压缩骨折； 远隔部位疼痛； 冰冻病理； 免疫组化； 脊神经后支

• 英文论著摘要 •

Study on the correlation between the SP,CGRP,IL-6 and distant pain with thoracolumbar compressive fracture

Objective

To investigate the cause of the distant pain after thoracolumbar compressive fracture.

Methods

Select 62 surgical cases of Denis classification type of buckling fracture, 11 cases of back pain with distant pain were divided into experimental group, which accounts for 17.74% of all the cases; 51 cases of Lumbago without distant pain were divided into the control group, which accounts for 82.26% of all cases . multifidus muscle specimens obtained during the operation were made into frozen section and substance P (SP), calcitonin gene related peptide (CGRP), interleukin 6 (IL - 6) antibody immunohistochemical staining. The ratio of height of the front flange and the trailing edge to investigate the degree of injury of the vertebral compression. VAS, JOA, ODI obtained before the operation and two weeks after the operation carried out the data analysis.

Results

experimental group: the preoperative degree of vertebral compression (68.73 ± 11.91) %, VAS (8.09 ± 1.51), ODI (40.45 ± 3.48), JOA (14.00 ± 3.80), the degree of postoperative vertebral compression (84.00 ± 6.08) %, VAS (5.00 ± 1.34), ODI (21.73 ± 3.80), JOA (15.36 ± 3.56); control group: the preoperative degree of vertebral compression (75.27 ± 14.14) %, VAS (7.65 ± 1.43), ODI (39.24 ± 4.64), JOA (11.90 ± 3.59), the degree of postoperative vertebral compression (83.75 ± 8.89) %, VAS (2.76 ± 1.18), ODI (15.82 ± 3.65), JOA (20.84 ± 3.71). The difference in preoperation of vertebral compression was not statistic significant between the two groups ($P > 0.05$). There were not statistic significant between postoperation of vertebral compression ($P > 0.05$). The difference in preoperation of VAS、ODI and JOA score was not statistic significant between them ($P > 0.05$), but the difference in postoperation of VAS、ODI and JOA score was statistic significant between the two groups ($P < 0.05$). Immunohistochemical: SP, CGRP, IL - 6 dyeing results of the 11 cases of specimens in the experimental group are all positive, while those of the 51 cases of specimens in the control specimens are negative.

Conclusion

It is the important cause of the distant pain that inflammatory reaction causing by SP, CGRP, IL - 6 stimulated to posterior rami of

spinal nerves, that were released after buckling violence lead to the spine tissue damage.

Key words

Compression fracture; Distant pain; frozen section;
Immunohistochemical; Posterior rami of spinal nerves

• 英文缩略语表 •

缩写	英文全称	中文全称
VAS	Visual Analogue Scale /Score	疼痛视觉模拟评分
ODI	Oswestry disability index	Oswestry 功能障碍 评分
JOA	JOA score	日本矫形外科学会 评分
SP	substance P	P 物质
IL-6	Interleukin -6	白介素-6
CGRP	Calcitonin gene related peptide	降钙素基因相关肽
PKP	Percutaneous Kyphoplasty	椎体后凸成形术

• 论文 •

P 物质、降钙素基因相关肽、白介素 6 与椎体骨折并发远隔部位疼痛的相关性研究

前言

胸腰段椎体 (T11-L2)^[1] 为压缩骨折的好发部位, 约占脊柱骨折的 60% 左右^[2], 部分患者伤后感觉疼痛最明显的部位并不在伤椎水平, 而是出现了伤椎以下远隔部位的疼痛, 多见于腰骶部, 其特点是: 腰部轻微活动或平卧位即可出现剧烈的痉挛性疼痛, 患者因惧怕疼痛而拒绝翻身^[3], 主诉远隔疼痛处无明显瘀血、肿胀等迹象。

资料与方法

1.1 一般资料 选取自 2012 年 9 月至 2014 年 6 月在我科行椎体后凸成形术 (Percutaneous Kyphoplasty, PKP) 治疗的 62 例 Denis 分类屈曲型新鲜压缩骨折病例采用免疫组化方法分析多裂肌内 SP、CGRP、IL-6 在远隔部位疼痛中的作用。纳入及排除标准 纳入标准: ①胸腰段椎体新鲜压缩骨折; ②按 Denis 分类为屈曲型骨折^[4]。③年龄 ≥ 60 岁。④自愿参加本实验研究。排除标准: ①肿瘤、结核等病理性骨折。②受伤前因患腰椎间盘突出、腰椎滑脱等疾病, 腰骶部或下肢疼痛。③远隔部位有明显擦伤、淤血及肿胀等软组织损伤表现。④合并椎管内血肿、脊髓损伤致下肢运动感觉障碍。

1.2 术前特殊检查 所有患者术前常规行腰椎正侧位片、腰椎 MR 检查, 以明确诊断, 确定骨折分型, 排除不符合标准的患者, 进行影像学测量, 确定骨折压缩程度。并由指定医师进行 VAS\ODI\JOA 评分。

1.3 分组方法 腰痛伴远隔部位疼痛的 11 例为实验组, 腰痛不伴远隔部位疼痛的 51 例为对照组。两组病例在性别、年龄、侧别、病程方面差异比较无统计学意义 ($P > 0.05$), 具可比性。

1.4 实验方法

1.4.1 病史采集 甄别记录患者一般情况：性别，年龄等。通过病史采集，排除既往患腰椎疾病导致下腰部、腰骶部或下肢疼痛的病例。

1.4.2 影像学检查及测量 通过腰椎 X 线侧位片测量，并依据公式计算：椎体压缩程度=椎体前缘高度/椎体后缘高度×100%^[5]（图 1）。阅读腰椎核磁共振片，排除①腰部椎旁肌、棘间韧带、棘上韧带等处有明显出血、肿胀征象的病例。②合并椎管内血肿病例（图 2）。

1.4.3 疼痛及功能评分：术前和术后 2 周由同一名医师采用问卷方式进行疼痛视觉模拟评分（VAS）、Oswestry 功能障碍评分（ODI）、日本矫形外科学会（JOA）腰腿痛评分^[6]。

1.4.4 实验仪器与试剂 莱卡 1900 冰冻切片机，OLYMPUS-BX40 光学显微镜、图像采集系统，常温吹风机等。SP、CGRP、IL-6 单克隆抗体（Santa Cruz）、II 抗（迈新抗羊/鼠酶标抗体），双氧水，Tween-20，Triton X-100，小牛血清及 HE 染色试剂等。

1.3.5 HE 及免疫组化染色：经患者知情同意后，征得医院伦理委员会批准，手术当中取伤椎棘突旁多裂肌组织约 1cm×1cm×1cm，生理盐水冲洗修整后，OCT 包埋，-80℃低温保存。标本分组：①实验组：椎体压缩骨折腰痛伴远隔部位疼痛的病例。②对照组：椎体压缩骨折腰痛不伴远隔部位疼痛的病例。③空白对照组：实验组标本以 PBS 替代 I 抗作为空白对照。连续冰冻切片，厚度 8 μm。行常规 HE 染色及免疫组化染色。

免疫组化流程:

- ①冰冻切片用常温吹风机干燥 2 小时以上。
- ②丙酮固定 20min。
- ③滴加新配制 3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶活性，室温下暗盒避光 10min。
- ④PBS 水洗 2 次(每次 2min)，滤纸吸拭。
- ⑤0.2% Triton X-100 孵育 5min。
- ⑥0.1%小牛血清孵育，封闭非特异性抗原。
- ⑦分别滴加 SP、CGRP、IL-6 I 抗 4℃湿盒孵育过夜，空白对照组以 PBS 替代 I 抗。
- ⑧次日，取出标本后常温下复温 2 小时，PBS 水洗 3 次(每次 2min)，滤纸吸拭。
- ⑨II 抗常温孵育 15 分钟，PBS 水洗 3 次(每次 2min)，滤纸吸拭。
- ⑩10%甲醛固定 20min，PBS 水洗 3 次(每次 2min)，DAB 染色 5min，注意观察，随时终止反应。苏木精复染，脱水透明，树胶封片，显微镜下采集图像。

1.5 实验结果的判定 在免疫组化染色组织切片上，出现棕黄色颗粒即为阳性表现。

1.6 统计学方法 统计处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较用 t 检验；定性资料比较采用 χ^2 检验。以 $p < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

2.1 影像学测量结果 腰椎侧位片测量结果：术前椎体压缩程度实验组与对照组间无统计学差异($p>0.05$)；术后椎体压缩程度实验组与对照组间无统计学差异($p>0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者椎体压缩程度的比较

组别	术前($\bar{x} \pm s, \%$)	术后($\bar{x} \pm s, \%$)
实验组	68.73 ± 11.91	84.00 ± 6.08
对照组	75.27 ± 14.14	83.75 ± 8.89
检验值	t=-0.159	t=-0.910
P 值	>0.05	>0.05

2.2 疼痛及功能评分结果 术前实验组与对照组 VAS、ODI、JOA 评分无统计学差异($p>0.05$)。术后实验组 VAS 评分、ODI 评分明显高于对照组，JOA 评分明显低于对照组($p>0.01$)。见表 2。实验组病例术后评分差主要是受远隔部位疼痛影响。

表 2 两组患者 VAS、JOA、ODI 评分结果比较

组别	术前			术后		
	VAS	ODI	JOA	VAS	ODI	JOA
实验组	8.09 ± 1.51	40.45 ± 3.48	14.00 ± 3.80	5.00 ± 1.34	21.73 ± 3.80	15.36 ± 3.56
对照组	7.65 ± 1.43	39.24 ± 4.64	11.90 ± 3.59	2.76 ± 1.18	15.82 ± 3.65	20.84 ± 3.71
检验值	t=0.358	t=0.415	t=0.086	t=0.00	t=0.00	t=0.00
P 值	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 HE 染色结果 实验组标本肌纤维排列规律紧密，细胞无明显变形，无明显肌纤维断裂、溶解现象，局部肌纤维周围出现炎性细胞浸润，血管形态正常。见图 3。对照组标本肌纤维周围无炎性细胞浸润，其余结构正常。

2.4 免疫组化染色结果 实验组多裂肌标本 SP、CGRP、IL-6 免疫组化染色全部呈阳性反应见图 4-6，在血管内皮细胞胞浆、血管周围

组织内出现棕黄色颗粒；肌纤维胞浆内无棕黄色颗粒。对照组及空白对照组标本 SP、CGRP、IL-6 全部呈阴性反应。

讨 论

3.1 脊髓、脊神经前支以及肌肉损伤与远隔部位疼痛的关系 本组病例选择年龄在 60 岁以上的胸腰段 Denis 分类屈曲型骨折患者，伤椎后壁完整，骨折不累及中后柱，椎管内无血肿，椎管内的脊髓和神经根不受压迫，下肢运动感觉正常，可排除脊髓及脊神经根主干损伤导致远隔部位疼痛的可能性。腰椎核磁共振对软组织损伤非常敏感，能够观察到肌纤维间和肌间隙的血肿。核磁检查提示入组病例伤椎的远隔部位均无肌肉、筋膜断裂出血的征象。可排除由于远隔部位肌肉、肌筋膜损伤导致疼痛的可能性。

3.2 椎体压缩程度与远隔部位疼痛的关系 屈曲型骨折累及椎体的前部，椎体前缘高度丢失，引起后凸畸形，对比实验组与对照组，术前压缩程度无统计学差异，通过 PKP 手术治疗，椎体高度基本恢复，脊柱后凸得到改善，术后压缩程度两组间也无统计学差异。实验组病例 PKP 手术后，恢复椎体高度和稳定性，伤椎疼痛的病因被去除，疼痛缓解。而远隔部位疼痛仍然存在，提示引起远隔部位疼痛的病变不在椎体。

3.3 疼痛及功能评分 对照组病例术后疼痛明显减轻，PKP 恢复伤椎高度和稳定性、固化过程中产热毁损椎体内神经，使骨折引起的腰痛在 1 周左右明显缓解。对照组病例恢复情况与吴耀等^[7]的报道一致。实验组术后椎体高度也基本恢复，与对照组无统计学差异，但由于远隔部位疼痛的存在，导致 PKP 术后 2 周的 VAS、ODI 评分明显高于对照组，JOA 评分明显低于对照组。PKP 术后远隔部位疼痛仍长时间存在，对手术效果造成负面影响，也提示远隔部位疼痛的病变部位不在椎体。

3.4 SP、CGRP、IL-6 在多裂肌内表达的意义 SP 是一种速激肽，由脊神经节内的神经细胞胞体合成，通过轴流转运到感觉神经末梢，损伤后由感觉神经末梢释放到周围组织，改变伤害性感受器周围的化学环境增加其兴奋性，降低痛阈。SP 还通过扩张血管，增加血管通透性及蛋白渗出；并与淋巴细胞、单核巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞等胞膜上受体结合，诱导释放 IL-1、IL-6、TNF- α 等细胞因子。CGRP 也是感觉神经纤维的兴奋性递质，单独存在或与 SP 共同贮存释放，具有比 SP 更加强烈的扩血管作用，也诱导释放 IL-1、

IL-6、TNF- α 等细胞因子。IL-6 等细胞因子可刺激单核巨噬细胞、肥大细胞释放组胺、激肽和前列腺素等炎症介质，加剧炎症和疼痛反应^[8]；还能诱导 T 细胞、单核细胞的分化增殖，参与炎症过程。实验组多裂肌标本的血管内皮及血管周围组织内 SP、CGRP、IL-6 聚集，肌纤维内出现炎症细胞的浸润，提示伤椎节段的后方软组织内存在损伤导致的炎症反应。受损伤的初级传入神经释放出 SP 和 CGRP，诱发免疫细胞的渗出、血管扩张导致炎症细胞因子群的释放^[9]，IL-6 就是其中的一种。初级感觉神经释放的 SP，还可以诱导白细胞粘附，浸润，使炎性细胞保持在肌纤维间的炎症部位，促进炎症反应的进一步发生^[10]。而对照组标本中无 SP、CGRP、IL-6 聚集，肌纤维间无炎性细胞浸润，提示对照组患者多裂肌附近无明显 SP、CGRP、IL-6 介导的炎症反应。实验组病例的肌肉组织中出现炎症反应后，刺激脊神经后支，产生异位电冲动，并双向传导，沿感觉神经传入中枢，产生疼痛，疼痛中枢误判为来自脊神经后支感觉末梢分布区域即腰骶部的疼痛，临床表现为远隔部位的牵涉性疼痛。沿运动神经向远端传导的冲动到达伤椎下方的椎旁肌，引起肌痉挛^[11]，痉挛造成肌肉缺血加剧疼痛^[12]。

在此过程中，运动神经递质的变化，以及交感/副交感神经在远隔部位疼痛中的作用尚待进一步研究。

结 论

屈曲暴力造成脊柱后方组织损伤，SP、CGRP、IL-6 介导的炎症反应刺激脊神经后支，是产生远隔部位疼痛的重要原因。

• 参考文献 •

- 1 蒋伟宇, 赵刘军, 马维虎, 等. 经伤椎固定与经伤椎植骨在治疗胸腰段爆裂骨折的病例对照研究[J]. 中国骨伤, 2013, 26(11):923-926.
- 2 唐天骊. 胸腰段脊柱脊髓损伤的外科治疗进展[J]. 中国创伤杂志, 1995, 11(6): 327-329.
- 3 刘保新, 黄承军, 徐敏, 等. 骨质疏松性脊柱骨折患者腰背部抽搐样疼痛的治疗[J]. 创伤外科杂志, 2011, 13(2):131-135.

- 4 Denis F, The three column spine and it's significance in the classification of acute thoracolumbar. Spine injure Spine, 1983, 8:817.
- 5 卫力晋, 刘岩, 宋正鑫, 等. 微创内固定并注射硫酸钙治疗胸腰椎骨折[J]. 实用骨科杂志, 2014, (6):540-543.
- 6 双峰, 任东风, 侯树勋. 常用腰痛评估量表/问卷的建立原则及特点[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(7):601-604.
- 7 吴耀, 王峰, 周建强, 等. 经皮椎体成形术和经皮椎体后凸成形术治疗骨质疏松性椎体骨折的临床疗效分析[J]. 中国骨伤, 2014, 27(5):385-389.
- 8 Quinlan Kl, Naik SM, Cannon G, et al. Substance P activates coincident NF-AT-and NF-kB-dependent adhesion molecule gene expression in microvascular endothelial cells through intracellular calcium mobilization[J]. Immunol, 1999, 163:5656-5665.
- 9 伍磊, 林洪, 沙漠, 等. 神经病理性疼痛的发病机制研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2014, 19(3):186-188.
- 10 周武庆, 李义梅. P 物质与炎症研究进展[J]. 国外医学免疫学分册, 1997, 2:95-98.
- 11 陈仲, 邵振海, 靳安民, 等. 非特异性腰痛的重要原因-脊神经后支综合征[J]. 中华骨科杂志, 1999, 19(3):139-141.
- 12 杨远滨, 金爽. 痉挛状态与疼痛[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(3): 293-295.

• 本研究创新性的自我评价 •

对于胸腰段椎体压缩骨折出现远隔部位疼痛的病因，缺乏病理学方面的研究。因此设计了此试验，通过多裂肌冰冻病理和免疫组化实验，发现实验组标本中，SP、IL-6、CGRP 均有表达，而这三种神经递质和细胞因子与炎症疼痛的发生密切相关，而在对照组没有发现类似变化，由此推测，脊柱屈曲暴力造成脊柱后方组织损伤，SP、CGRP、IL-6 介导的炎症反应刺激脊神经后支，是产生远隔部位疼痛的重要原因。

• 附图 •

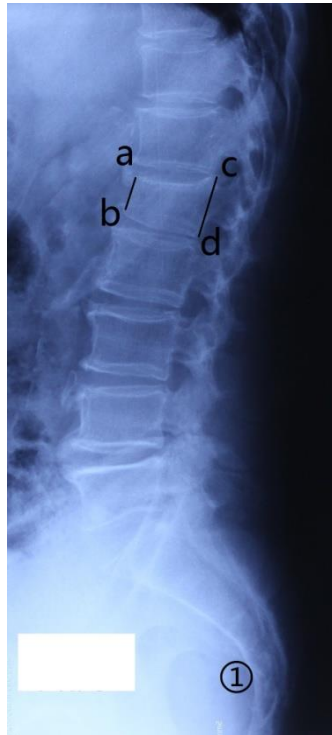


图 1 腰椎侧位片，腰 1 椎体压缩骨折，椎体压缩程度= $ab/cd \times 100\%$ 。



图 2 腰椎核磁，腰 1 椎体压缩骨折，T2WI 抑脂像可见腰 1 椎体内高信号，椎旁肌信号均匀。

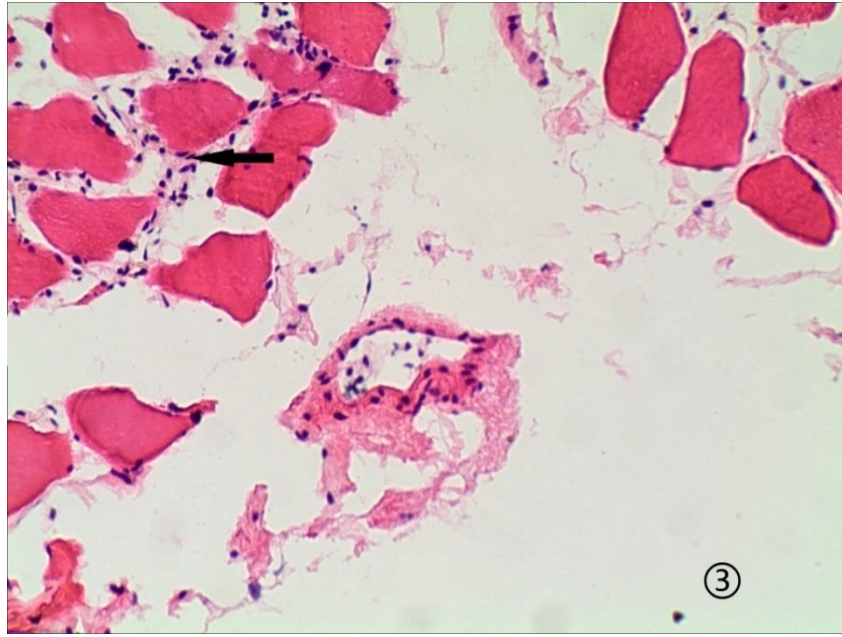


图3 实验组肌肉镜下观察结果（HE×100），箭头所指为肌纤维间炎性细胞浸润。

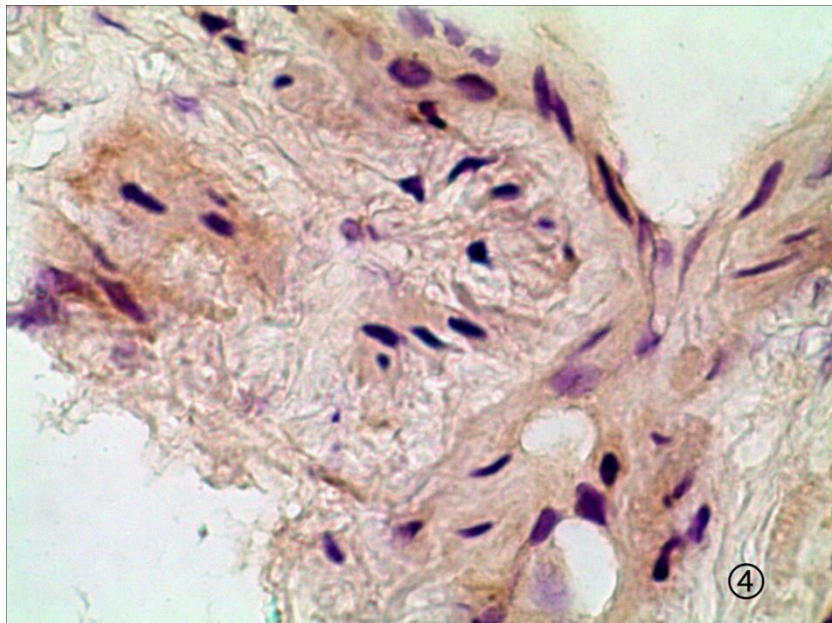


图4 实验组肌肉 SP 免疫组化染色结果（×400），血管内皮细胞及周围组织内可见棕黄色颗粒。

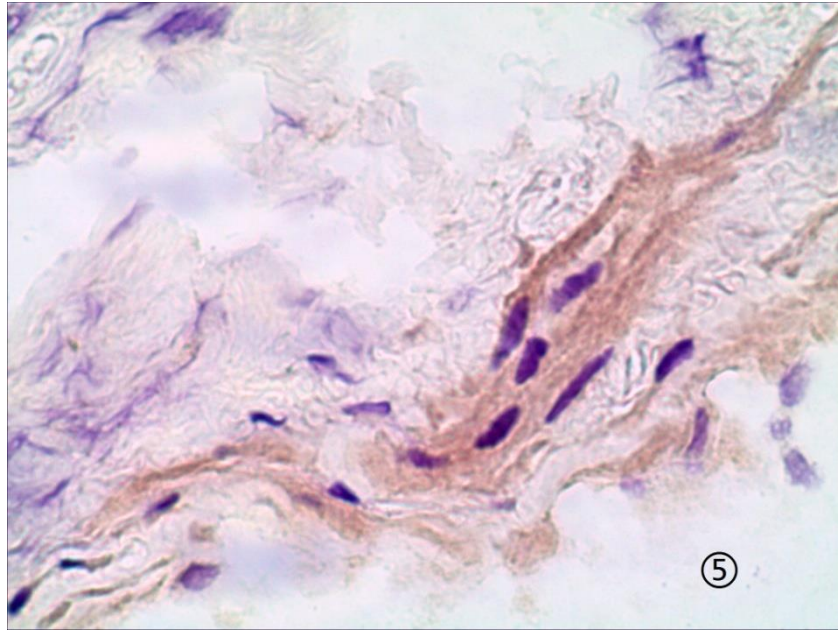


图 5 实验组肌肉 CGRP 免疫组化染色结果（×400），血管内皮细胞及周围组织内可见棕黄色颗粒。

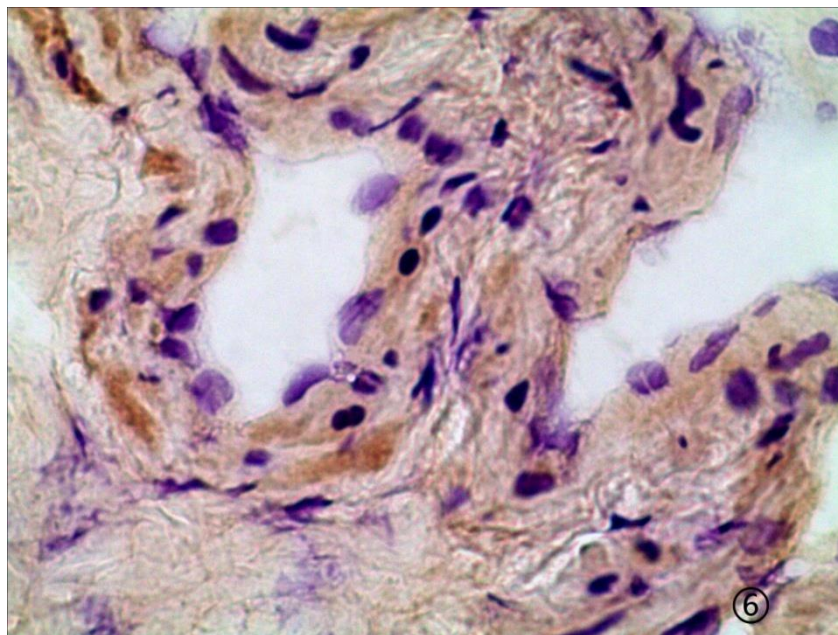


图 6 实验组肌肉 IL-6 免疫组化染色结果（×400），血管内皮细胞及周围组织内可见棕黄色颗粒。

• 附录 •

一、文献综述

胸腰段椎体压缩骨折致远隔部位疼痛的病因研究

胸腰段椎体（胸 11-腰 2）^[1]为脊柱压缩骨折的好发部位，约占脊柱骨折的 60%左右^[2]，一部分患者在伤后出现了远隔部位疼痛，多见于下腰部、腰骶部，其特点是：痉挛性疼痛，静卧休息亦不能缓解，局部无红肿及麻木，程度超过骨折本身，腰部轻微活动即可引起剧烈的抽搐样疼痛，而使患者拒绝翻身^[3]。产生远隔部位疼痛的原因，可能是神经损伤、炎症刺激、或是远隔部位的软组织损伤^[4]。

腰背肌及其筋膜的损伤与远隔部位疼痛的关系：压缩骨折多为屈曲暴力所致，脊柱后方的腰背肌及其筋膜可能受到牵拉暴力的损伤，但损伤一般临近于伤椎，并且疼痛较轻，常被伤椎骨折的剧烈疼痛所掩盖。核磁表现为 T1WI 低信号，T2WI 高信号，T2W-SPAIR 序列高信号^[5]，是软组织损伤后出血、水肿的表现，疼痛部位的核磁检查可以反映软组织损伤，如果远隔部位有明显的损伤迹象，核磁可以较早的发现。

脊神经后支与远隔部位疼痛的关系：下腰部、腰骶部为脊神经后支支配区域，脊神经后支较细，为混合神经，由运动神经纤维和感觉神经纤维构成，于椎间孔处在脊神经节外侧发出，行经骨纤维孔（由横突间韧带、下位椎体横突上缘及上关节突与横突交界处骨面所围成的间隙），出孔后分为为后内侧支和后外侧支。后内侧支经乳突与副突之间的骨纤维管，向内下跨越 1-3 个椎体，分布于椎间关节突连线内侧方的结构，如棘间肌、多裂肌、黄韧带、椎间关节囊、棘上韧带、棘间韧带等^[6]。多裂肌受脊神经后内侧支唯一支配，且每个肌束仅由单一分支支配，分支间无交通支^[7]。后外侧支出骨纤维孔后向外下方斜行，在接近下位椎体横突背侧中点处进入骶棘肌，然后由髂嵴最高点连线上下 10mm、距中线 60-70mm 处穿出骶棘肌。后外侧支支配横突间韧带、髂腰韧带、腰背筋膜和骶棘肌，还分出皮支，组成臀上皮神经。脊神经后支在骨纤维孔处位置固定，应力大，易受损伤，以腰 2 明显^[8,9]。与后内侧支伴行的血管表面有来自腰交感干的纤维包绕，形成神经丛，也会受到挤压。根据脊神经后支跨节段分布的解剖特点，在其受到损伤或炎症刺激后，可能引起远隔部位疼痛。

交感、副交感神经与远隔部位疼痛的关系：交感神经分布在椎体前缘，支配椎体、椎间盘前缘、前纵韧带等结构，而椎体、椎间盘外侧和后外侧由交感干分支、交通支及脊神经分支共同支配^[10]。椎体压缩骨折，损伤椎体，累及分布在前纵韧带及椎间盘的交感神经，产生疼痛，疼痛信号可经过交感干传至多节段脊神经节^[11]。交感神经节后纤维通过灰交通支加入脊神经，其中部分纤维通过脊神经后支分布^[12]。在周围神经损伤、软组织创伤和组织炎症等病理条件下，交感神经既可在感受器水平，也可在感觉传入通路上对感觉信息进行调制^[13]。交感神经节后纤维可能通过释放去甲肾上腺素和神经肽作用于初级感觉神经元，或是通过影响背根节血流，致初级感觉神经元兴奋性增强，释放神经递质如 SP，作用于次级神经元，传递痛觉信息^[14]。另外，在交感神经的参与下传入神经纤维在外周端也释放血管活性物质，主要是 SP 和其他一些多肽，引起神经炎症，加重了疼痛症状^[15]。

外周神经源性疼痛是由于外周神经轴突损伤诱发的痛觉过敏、痛觉超敏，以及由于组织损伤后从初级传入纤维、损伤组织或血液循环中释放的内源性炎性物质，包括神经递质（P 物质、降钙素基因相关肽及其他多肽），前列腺素，5-HT，组胺，腺苷，缓激肽等，这些活性物质被释放到胞间引起血管扩张，血浆渗出而诱发炎症痛；同时降低痛阈，加重疼痛症状。P 物质（Substance P, SP）和降钙素基因相关肽（Calcitonin gene-related peptide, CGRP）被认为是感觉神经纤维的标记物；神经肽 Y（Neuropeptide Y, NPY）被认为是交感神经纤维的标记物；血管活性肠肽（Vasoactive intestinal peptide, VIP）被认为是副交感神经神经纤维的标记物^[16]；蛋白基因产物 9.5（PGP9.5）是一种神经元特异蛋白，表达在中枢神经和外周神经系统的神经元和神经纤维上^[17]。SP 是一种神经肽类递质，属速激肽，由 18 个氨基酸构成，大多数由 B 型神经元细胞合成通过中枢神经系统及外周神经系统运输到身体的其他部位，含有 SP 的感觉神经纤维在中枢神经系统及外周神经系统都有广泛的分布^[18]。主要分布在周围神经中无髓鞘的 C 型神经感觉纤维上，特别是细而无髓的伤害性初级传入神经末梢部位，SP 可以直接导致疼痛的发生，也可加强 C 型感觉纤维诱发的脊髓后角伤害性神经元放电，从而降低痛阈。用 capsaicin（辣椒碱）排空 P 物质后可使实验动物对化学和温度刺激的痛阈提高^[19]。局部的神经或组织损伤，会激活初

级传入纤维，其中炎症疼痛的主要传入纤维就是 C 纤维。SP 作为一种神经递质参与神经源性炎症反应的过程，低浓度的 SP 具有扩血管作用，可以增强血管通透性，引起血浆渗出和水肿形成；较高浓度的 SP 可促进单核细胞合成和释放 IL-1, IL-6, TNF- α 等炎性细胞因子，加重炎症反应，形成双重效应^[20,21]。白细胞介素-6 (IL-6) 具有多效性，能够激活中性粒细胞，诱导和调节 T 细胞激活，促进 B 细胞的成熟，延迟吞噬细胞的衰老，参与全身炎症反应^[22]。SP 的舒血管效应是内皮依赖性，血管内皮细胞上有 SP 特异性受体；机体调节血管变化的 SP 除来自血管旁的神经末梢释放和循环中 SP 外，血管内皮细胞本身亦能合成。SP 诱导白细胞粘附，浸润，可将炎性细胞保持在炎症部位，有助于炎症反应的进一步发生。SP 调节细胞因子，促进外周单核细胞释放 IL-1、IL-6、TNF- α ^[23]。

CGRP 单独存在或与 SP 共存，在背根节，CGRP 主要存在于中、小神经元细胞，有 DRG 内发出无髓纤维 (C 纤维) 和细的有髓纤维 (A δ 纤维) 的小型假单极细胞产生，CGRP 在腰 DRG 中小型细胞内含量较高^[24]，作为感觉神经纤维的兴奋性神经递质，参与痛觉信息传递^[25~27]。

神经肽-Y (NPY) 是由交感神经节后神经元合成和分泌的一种多肽，是交感神经中含量最丰富的神经肽^[28]。生理情况下，NPY 是由交感、副交感神经及脊髓神经元合成释放，与儿茶酚胺类递质共同贮存在外周神经组织中^[29]；病理情况下，NPY 及其受体在调控躯体感觉伤害性信息 (如疼痛) 中发挥重要的作用，周围神经损伤后，NPY 及其受体 mRNA 的表达均可发生变化^[30]。组织损伤、炎症、疼痛等病理刺激可激活交感神经系统引起外周交感神经系统的 NPY 与去甲肾上腺素一起释放，引起血管长时间的强烈收缩，SP 也能促进 NPY 的分泌，吗啡则能抑制其分泌^[31]。NPY 浓度增加可能引起肌肉痉挛，对于中枢神经损伤所致的肌肉痉挛，切断交感神经后 NPY 浓度下降可能使骨骼肌松弛^[32]。

血管活性肠肽 (VIP)：既是胃肠道激素，又是神经肽。在外周神经中，VIP 作为神经递质的分泌，大多来自背根神经节。神经肽 VIP 与神经根损害有关，具有调节神经根功能的作用，如扩张血管，改善循环，缓解创伤反应的作用。神经根及背根神经节在近端受到压迫时分泌的大量 VIP 回流受到障碍，造成局部及外周血中含量升高^[33]。

蛋白基因产物 9.5 (PGP9.5)：是一种神经元特异蛋白^[34]。神经纤维的辨识依赖于不同的神经蛋白质，这些蛋白质可分为细胞骨架蛋白质、神经肽和细胞溶质蛋白等。大多数神经蛋白质只能标记一种神经元和轴突，但 PGP9.5 广泛分布于中枢与周围神经系统的神经元、神经纤维、多种神经内分泌细胞，以及卵细胞等其他细胞中，可特异性的标记神经元和神经纤维^[35~37]。

胸腰段椎体压缩骨折导致了远隔部位疼痛。该疼痛可能是一种由于创伤引起急性炎症反应，直接刺激脊神经后支，或刺激交感神经，节后纤维通过释放去甲肾上腺素和神经肽作用于初级感觉神经元，或是通过影响背根神经节血流，致初级感觉神经元兴奋性增强，释放神经递质如 SP，作用于次级神经元，导致疼痛。一系列神经损害均会引起神经递质在外周组织中的浓度变化，通过免疫组织化学方法，分析相关神经递质变化规律，可初步推断远隔部位疼痛的发病机理。

• 参考文献 •

- 1 李子荣，椎弓根钉治疗胸腰段骨折的一些问题。中华创伤杂志 1995. 12. 第 11 卷 (6)，345
- 2 唐天骊，胸腰段脊柱脊髓损伤的外科治疗进展[J]. 中国创伤杂志，1995，11 (6)：327-329
- 3 刘保新等. 骨质疏松性脊柱骨折患者腰背部抽搐样疼痛的治疗，创伤外科杂志 2011. 13. 2:131135
- 4 刘宪义，李淳德，于峥嵘，等。胸腰段椎体压缩骨折后远隔部位疼痛的诊治。中华医学杂志 2010:90(5)：346-348
- 5 徐人杰，椎体成形术后残留腰背痛与腰背筋膜损伤的相关性研究，中国骨与关节外科，2012. 10. 第 5 卷 (5) 390
- 6 邵元福，等主编，颈肩腰腿痛应用解剖学。2000. 第一版：400-401
- 7 Kuriyama N. Ito H. Electromyographic functional analysis of the lumbar spiral muscles with low back pain J Nippon Men Sch. 2005:72(3)：165-173
- 8 陈志坤，邵镇海. 脊神经后支性腰痛的解剖学和生物力学研究[J]. 骨与关节损伤杂志，1994, 9:116-118
- 9 Maigne JY, Maigen R. Anatomical study of the intervention of the jumbosacral region: Application to the physiopathology of certain jumbalgias[J]. Rev Rhum Mal Osteoartic, 1998, 55(2) :107-111
- 10 陈金栋，侯树勋，彭宝淦，等，人腰椎交感神经解剖学研究[J]. 中华医学杂

- 志, 2007, 87 (9) : 602-605
- 11 Ohtori S, Inoue G, Koshi T, et al. Sensory innervation of lumbar vertebral bodies in rats [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2007, 32(14):1498-1502
 - 12 Xie W, Strong JA, Zhang JM. Increases excitability and spontaneous activity of rat sensory neurons following in vitro stimulation of sympathetic fiber sprouts in the isolated root ganglion [J]. *Pain*, 2010:341-439.
 - 13 Windhorst U. Neuroplasticity and modulation of chronic pain [M]. Gale University Press, Sweden, 2003. 207-224.
 - 14 Habler H, Eschenfelder S, Liu XG. Sympathetic sensory coupling after L5 spinal nerve lesion in the rat and its relation to changes in dorsal root ganglion blood flow [J]. *Pain*, 2000. 335-345.
 - 15 朱月莲. 背根反射在炎症痛中的作用机制及其研究进展. *医学研究杂志*, 2009. 7; 38. 7:13-16
 - 16 Hill EL, Elde R. Distribution of CGRP-, VIP-, D beta H-, SP-, and NPY-immunoreactive nerves in the periosteum of the rat [J]. *Cell and Tissue Research*, 1991. 469-480.
 - 17 Leslie TA, Emson PC, Dowd PM, et al. Neve growth factor contributes to the up-regulation of growth-associated protein 43 and preprotachykinin A messenger RNAs in primary sensory neurons following peripheral inflammation [J]. *Neuroscience*, 1995, 67 (35) :753-761
 - 18 VON EULER U S, GADDUM JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts [J]. *J Physiol*, 1931, 72(1):74-89.
 - 19 张世红. P物质在初级传入兴奋传递中的作用,
 - 20 Kowalski M, et al. *Br J Immunol*, 1990;145:1214
 - 21 Desmond WT, et al, *Br J Pharmacol*, 1995;114:1340
 - 22 王敬博, 金鸿宾, 损伤控制理论在创伤骨科救治领域的应用. *中国骨伤*, 2009, 22:563-566
 - 23 周武庆, 李义梅. P物质与炎症研究进展. *国外医学免疫学分册*, 1997, 2:95-98
 - 24 Ohtori S, Takahashi K, Chiba T. Substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactive sensory DRG neurons innervating the lumbar facet joints in rats. *Auton [J]. Neuroscience*, 2000, (1-2):13-17.
 - 25 Berggreen E, Heyeraas KJ. Effect of the sensory neuropeptide antagonists h-CGRP(8-37) and SR140.33 on pulpal and gingival blood flow in ferrets [J]. *Archives of Oral Biology*, 2000, (07):537-542.
 - 26 Ohtori S, Takahashi K, Chiba J. Phenotypic inflammation switch in rats shown by calcitonin gene-related peptide immunoreactive dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar facet joints [J]. *Spine*, 2001, (09):1009-1013.
 - 27 Salmon AM, Damaj MI, Marubio LM. Altered neuroadaptation in opiate dependence and neurogenic inflammatory nociception in alpha CGRP-

- deficient mice[J]. Nature Neuroscience, 2001, (04):357-358.
- 28 Malmstrom RE. Pharmacology of neuropeptide Y receptor antagonists. Focus on cardiovascular functions[J]. European Journal of Pharmacology, 2002, (01):11-30. doi:10.1016/S0014-2999(02)01889-7.
- 29 Mark MA, Jarrott B, Colvin LA. The release of immunoreactive neuropeptide Y in the spinal cord of the anaesthetized rat and cat[J]. Brain Research, 1997. 195-203.
- 30 Timothy DM, William F, Colmers. Opioid-Like Actions of Neuropeptide Y in Rat Substantia Gelatinosa: Y1 Suppression of Inhibition and Y2 Suppression of Excitation[J]. Journal of Neurophysiology, 2004. 3266-3275.
- 31 Jason J. McDougall, Lisa Watkins, Zongming Li. Vasoactive intestinal peptide is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis[J]. Pain, 2006. 98-105.
- 32 黄晓伟, 吴珊鹏等, 颈交感神经切断对臂丛神经节神经肽 Y 含量及前支痉挛影响的实验研究. 中国医药导报, 2012. 7 第 9 卷第 19 期: 33-37
- 33 Howe JF, loser Jd. mechanical sensitivity of dorsal root ganglion and chronically injury axons, A physiological basis for the radicular pain of nerve root[J]. PAIN, 1997. 25-41.
- 34 Leslie TA, Emson PC, Dowd PM, et al. Neve growth factor contributes to the up-regulation of growth-associated protein 43 and preprotachykinin A messenger RNAs in primary sensory neurons following peripheral inflammation [J]. neuroscience, 1995, 67 (35):753-761
- 35 Hsieh ST, Lin WM, Chiang HY. Skin innervation and its effects on the epidermis[J]. J Biomed Sci, 1997, (05):264-268.
- 36 Hasan W, Cowen T, Barnett PS. The sweating apparatus in growth hormone deficiency, following treatment with r-hGH and in acromegaly[J]. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, 2001, (1-2):100-109.
- 37 Loo LS, Ng YK, Zhu YZ. Cortical expression of endothelin receptor subtypes A and B following middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Neuroscience, 2002, (04):993-1000.

张雨



人脐带间充质干细胞与原代软骨细胞共培养修复山羊膝关节负重区全层软骨缺损

张雨, 刘舒云, 郭维民, 张学亮, 李旭, 彭江, 汪爱媛, 卢世璧, 郭全义
中国人民解放军总医院

目的：将人脐带间充质干细胞（hUCSCs）共培养在由原代软骨细胞（pACs）和脱细胞软骨细胞外基质（ACECM）取向支架模拟重建的软骨生物微环境中，通过细胞间的相互作用等生物信号调控 hUCSCs 自然成软骨分化，以此获得足够数量和良好质量的软骨组织工程种子细胞，从而实现结构性与功能性的软骨组织再生。

方法：将 pACs 和 hUCSCs 两种细胞以不同比例混合在 ACECM 支架构建组织工程组织，体外共培养 1 周和 3 周，通过基因及蛋白表达水平、细胞学行为评价并比较各组共培养体的生物学特性；以山羊膝关节负重区全层软骨缺损为实验模型，选择软骨组织学特性较好的共培养组为实验组，对照组为 ACECM 支架组、微骨折组、ACECM+hUCSCs 组、ACECM+pACs 组和空白对照组，每组 3 只山羊。术后观察炎症反应，6、9 个月取材从大体观和组织学水平评价修复效果、软骨基质成分定量检测（糖胺多糖）、影像学检测（7T MRI）及全膝关节影像学评分和生物力学检测（纳米压痕技术）、细胞示踪观察修复区细胞的来源，系统评价各组软骨修复效果。

结果：体外共培养 1、3 周后支架孔隙被细胞及细胞外基质不同程度的填充，死活染色可见各组细胞均生长良好；共培养后 pACs 的增长速率加快，而 hUCSCs 则相对减缓；Rt-PCR 结果显示 hUCSCs 软骨相关基因（如 collagen II、aggrecan）表达水平上调，表明细胞发生了成软骨分化；组织学染色和 western-blot 结果均可见共培养组分泌大量软骨特异性细胞外基质，共培养体显示了更好地软骨组织学特性；体内实验显示，术后各组间膝关节炎症反应无明显差异；大体形态学及组织学染色结果均证实实验组修复区新生组织更加接近天然软骨，且与周边整合良好，软骨下骨保留完整，基质成分定量和生物力学检测表明实验组新生组织糖胺多糖含量更高和力学强度更优；影像学 T2W1 抑脂像结果可见实验组信号均匀，9 月结果中软骨下骨水肿信号基本消失，关节腔关节液信号低；细胞示踪发现 hUCSCs 存在新生组织区域，参与了软骨损伤的修复过程。

结论：由 hUCSCs、pACs 和 ACECM 支架共同构建的共培养体在结构和功能上获得了更好的软骨修复效果，解决了软骨组织工程中软骨细胞来源受限的问题，以及体外机械性添加诱导因子诱导干细胞分化成软骨不稳定的困境，也避免了其带来的风险，该策略有望成为未来软骨组织修复与再生最具前景的策略之一。

雍磊



Oleandrin 上调铜转运蛋白 CTR1 以增加人成骨肉瘤细胞对顺铂的敏感性

雍磊, 马云龙, 王鹏, 梁辰, 何观平, 赵志刚, 刘晓光

北京大学第三医院

【摘要】 目的 探讨强心苷类药物 Oleandrin 与顺铂对人成骨肉瘤细胞的联合抗肿瘤效应及机制。**方法** 在人成骨肉瘤细胞系 U2OS、MG-63 和 SaOS-2 中，利用 CCK-8 实验、DAPI 染色及流式细胞术评价 Oleandrin 和顺铂单用或联合时对骨肉瘤细胞增殖抑制及凋亡诱导的影响，绘制联合指数（CI）曲线评估联合效应。电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）检测顺铂单药组和联合用药组细胞内的铂（Pt）累积量；Western Blot 检测顺铂和 Oleandrin 单独用药对铜转运蛋白 CTR1 的表达影响。**结果** Oleandrin 与顺铂在 U2OS 和 MG-63 细胞中起协同抗肿瘤效应，在 SaOS-2 细胞中仅具有加和效应。U2OS 和 MG-63 联合用药组相对于顺

铂单药组，细胞内 Pt 累积量显著升高 ($p < 0.001$)，而 SaOS-2 细胞内 Pt 累积量无明显变化 ($p > 0.05$)。Oleandrin 能显著上调 U2OS 和 MG-63 细胞 CTR1 的表达，而对 SaOS-2 细胞 CTR1 的表达无明显影响。**结论** 在人成骨肉瘤细胞中，Oleandrin 与顺铂联合应用产生的协同抗肿瘤效应与 Oleandrin 上调 CTR1，从而使细胞内 Pt 累积量显著增高有关。

孙浩林



新型可注射磷酸钙纳米复合材料对增强空心椎弓根螺钉 内 固定的应用研究

孙浩林, 李绪文, 张正, 李淳德
北京大学第一医院

目的:

本实验通过对比磷酸钙纳米复合材料 (calcium phosphate-based nanocomposite, CPN) 及 PMMA 骨水泥强化空心螺钉、传统螺钉的生物力学性能，以期测试 CPN 应用于椎弓根螺钉强化技术的生物力学特性，为其进一步的临床应用提供参考。

材料与amp;方法:

向磷酸钙骨水泥 (calcium phosphate cement, CPC) 中混入淀粉凝胶及 BaSO₄ (BS) 制备 CPN，通过 X 线衍射和傅里叶变换红外光谱分析其物相组成，并对比其与 PMMA、CPC 和 CPC-BS 在机械强度、可降解性和可注射性，以及在合成的复合骨材料 (Sawbones) 骨质疏松模型中流动性和弥散性差异。然后在 Sawbones 骨质疏松模型中对比 PMMA 与磷酸钙基骨水泥 (CPC、CPC-BS 和 CPN) 强化空心螺钉和实心螺钉的轴向拔出力及最大扭矩。此外，将 CPN 植入大鼠股骨缺损模型并培养 8 周，通过组织学分析检测其在体内的骨整合能力。

结果:

(1) 凝胶淀粉纳米网状结构明显增强了 CPN 机械强度，其抗压强度是 CPC 和 CPC-BS 的近 3 倍，压缩模量是 PMMA 的近 2 倍。(2) CPN 在三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液中的降解性高于 CPC，其在 0.6ml/g 的液固比时可注射性高达 95%±1%。(3) CPN 的流动性和弥散性均优于 CPC，但过高或过低的液固比均会影响其在松质骨中的分布，我们建议在强化空心椎弓根螺钉时将骨水泥的液固比控制在 0.8~1.6。(4) 在空心螺钉组中，CPN 的最大拔出力 (120N) 高于 PMMA 且显著高于 CPC-BS 及 CPC ($P < 0.05$)；而在实心螺钉组中不同骨水泥强化螺钉的拔出力没有明显差异。(5) PMMA 强化空心和实心螺钉的扭矩最高，CPN 次之。PMMA 和 CPN 的最大扭矩在空心螺钉中分别为 1400N·m 和 600N·m，在实心螺钉中分别为 1000N·m 和 750N·m。(6) 组织学分析显示 8 周后柱状 CPN 骨水泥的边界变得不规则，并且在这些边界上发现了新骨的长入，而在靠近骨水泥中心区域形成一个空隙。

结论:

CPN 是一种新型可注射、可生物降解、可植入的纳米复合物，其生物力学特性优于传统 CPC，且作为空心椎弓根螺钉的强化材料表现出不亚于 PMMA 的生物力学特性及与之相似的流动性和弥散能力，因而适用于空心椎弓根螺钉的强化固定。

类别：基础学组



脊柱极度背伸对脊髓功能及血流的影响

张军卫, 洪毅

中国康复研究中心北京博爱医院

目的：制作脊柱极度背伸兔模型，探究脊柱背伸角度与脊髓的血流及传导功能变化间的关系。为儿童舞蹈下腰致脊髓损伤（中国儿童脊髓损伤常见原因）的相关研究提供客观依据。

方法：30只3个月大新西兰大白兔被随机分为3组，对照组、脊柱背伸60°组、脊柱背伸120°组，各组新西兰大白兔（下文简称为兔）于X线定位后于麻醉下切除胸10椎的椎板，暴露椎板下脊髓，然后固定于脊柱背伸仪器上，分别于水平位、弯曲部件背伸60°、120°，分别固定5min后进行动作诱发电位检测，并应用线扫描激光多普勒血流成像仪监测脊髓背侧血流。各组实验动物于一周后统一采用使用麻醉药的安乐法处死，取标本进行病理学检查。

结果：对照组、背伸60°组、背伸120°组潜伏期分别为 10.35 ± 0.41 、 10.55 ± 0.53 、 11.7 ± 0.22 （单位：ms）。脊柱背伸60度：潜伏期 $P=0.519 > 0.05$ ，兔子脊柱在60度背伸组潜伏期都没有变化。脊柱背伸120度：潜伏期 $P=0.00 < 0.05$ ，120度造成潜伏期延长。对照组、背伸60°组、背伸120°组波幅分别为 6.31 ± 0.85 、 7.17 ± 1.33 、 0.73 ± 0.19 （单位：mv）。脊柱背伸60度：波幅 $P > 0.05$ ，兔子脊柱在60度背伸下5min波幅无异常。脊柱背伸120度：波幅 $P=0.00 < 0.05$ ，120度造成波幅降低。各组血流值分别为 582.1 ± 181.8 ， 500.1 ± 144.2 ， 149.3 ± 52.0 （单位：PU）。对照组与背伸60°组之间 $P=0.283 > 0.05$ ，所记录的脊髓血流值差异无统计学意义（ $P < 0.05$ ）；对照组与背伸120°组，背伸60°组与背伸120°组之间均 $P < 0.01$ ，差异有显著的统计学差异（ $P < 0.05$ ）。多元回归分析脊柱背伸角度的系数为 -0.762 ， $R^2=0.581$ 且 $P < 0.01$ ，即发现脊髓血流值与脊柱背伸角度呈中度负相关。病理学检查发现背伸120°组脊髓内有明确损伤所见。

结论：脊柱背伸60°5min动作诱发电位点潜伏期及波幅变化不明显，背伸120°潜伏期延长、波幅降低。血流观察发现：脊髓显露面积与血流值无关，背伸角度与血流值呈负相关。病理组织观察提示随着脊柱背伸的角度增加，脊髓损伤的严重程度增加。

关键词：兔 脊柱背伸 动作诱发电位 多普勒血流成像仪

关键字

参考文献

类别：基础学组

684039



具有超顺磁响应性的 Gelation/nHA 修饰 3D 打印多孔钛诱导成骨的实验研究

王海
北京协和医院

目的: 构建以 Gelation/nHA/MNPs (纳米磁性粒子) 修饰的 3D 打印多孔钛支架, 并对其施加外部静磁场 (SMF), 以创造诱导成骨分化的微环境, 从而探索具有超顺磁响应性的生物活性 3D 打印多孔钛骨科内植物。

方法: 采用 Laser Concept 金属 3D 打印机制备以正十二面体为结构单位、孔径 1500um、孔柱 300um 的多孔钛支架, 再以液态加压灌注、冷冻干燥法分别制备 Gelation/nHA 以及 Gelation/nHA/MNPs (纳米磁性粒子) 修饰的多孔钛支架; 用扫描电镜 (SEM) 观察复合支架的表面特征, 以 EDS (Energy Dispersive Spectrometer) 分析支架元素组分; 采用 cck8 试剂盒和 live-dead 试剂盒检测小鼠前成骨细胞 (MC3T3-E1) 在支架上的增殖情况, 以验证支架的生物相容性; 采用 ELISA 试剂盒来检测 ALP、OC、COL-1 等成骨指标, 以验证细胞的成骨分化; 将 3 种支架植入兔桡骨缺损模型, 分别于 4 周、8 周、12 周进行 micro-CT 和硬组织切片 VG 染色, 以验证其在体内的成骨效应。

结果: Gelation/nHA/MNPs (纳米磁性粒子) 修饰的 3D 打印多孔钛支架, 在施加外部静磁场 (SMF) 的作用下, 具有明显的促进小鼠前成骨细胞 (MC3T3-E1) 增殖和成骨分化的效应, 体内实验可见其在 8 周、12 周, 与另外两组相比有更多的骨和类骨组织生成, 差异有统计学意义。

结论: Gelation/nHA/MNPs (纳米磁性粒子) 修饰的多孔钛支架具有良好的生物相容性, 在施加外部静磁场 (SMF) 的作用下具有明显的促进局部成骨的效应。

关键字

参考文献

类别: 基础学组
685290



下肢骨折患者深静脉血栓与载脂蛋白 ApoE4 之间关系初步探讨

石少辉, 吴国平, 姜忠彩, 梁绛槟
航空总医院

目的：通过 85 例新鲜下肢闭合性骨折患者血清脂蛋白 ApoE 表型及下肢血管超声检测，初步探讨下肢骨折患者脂蛋白 ApoE 表型与深静脉血栓关系。方法：2017 年 3 月至 2017 年 6 月航空总医院，新鲜下肢骨折住院患者 96 例，年龄 60-87 岁，平均年龄 65 岁，所有患者入院 24 小时内抽静脉血，通过免疫印迹法检测患者脂蛋白 ApoE 表型，患者入院根据创伤骨科下肢深静脉血栓预防指南常规采用物理及低分子预防下肢深静脉血栓发生。患者入院后和术后 3-5 天内（超声预约时间不固定）下肢血管超声检测，观察下肢深静脉血栓发生情况。结果：患者载脂蛋白 ApoE 基因型 2/2 3 例，ApoE 基因型 2/3 9 例，ApoE 基因型 3/3 42 例，ApoE 基因型 3/4 20 例，ApoE 基因型 4/4 9 例，ApoE 基因型 2/4 2 例。ApoE 表现型 E2 8 例，ApoE 表现型 E3 49 例，ApoE 表现型 E4 28 例。下肢超声共检测到血栓发生患者 7 例，其中包括深静脉血栓 2 例，全为 ApoE 表现型 E4；为肌肉间血栓 5 例。其中 ApoE 表现型 E4 为 4 例，ApoE 表现型 E3 为 1 例。结论 下肢骨折患者静脉血栓发生可能与脂蛋白 ApoE 表型有关，ApoE 表型 4 患者下肢静脉血栓形成的危险性要高，然而，这项试点研究应该进一步大规模研究的支持。

关键字

参考文献

类别：基础学组

686236



骨肉瘤原发灶与配对邻近瘤栓转录组学比较研究

姬涛, 郭卫, 李大森, 杜志叶, 王毅飞, 谢璐

北京大学人民医院

【背景】骨肉瘤目前治疗瓶颈在于肺转移，一直以来没有得到有效的控制和治疗，本研究拟通过二代测序方法对骨肉瘤原发灶及瘤栓进行全转录组测序，以期找到关键基因，为转移治疗提供参考。

【方法】通过对收集到的 3 例合并瘤栓形成的骨肉瘤病例标本进行全转录组测序（RNA-seq），标本为骨肉瘤原发灶肿瘤组织，瘤旁静脉内瘤栓组织（瘤栓分别位于腋静脉 1 例，髂总静脉 2 例），患者血液样本。先提取组织中总 RNA，后进行文库构建，构建后通过 Qubit2.0 对文库进行初步定量，后稀释到 1ng/μl，后用 Agilent2100 对文库浓度进行定量，有效浓度为 >2nM。后利用 NextSeq5000（Illumina）进行测序。生信分析流程按常规进行，查找在不同种样本间的差异表达基因，以及在肿瘤组织和瘤栓中特异存在的可变剪切（外显子跳跃事件）和基因融合情况。

【结果】3 例标本肿瘤和瘤栓基因表达相关性为 $R^2=0.906$ 。第 1 例骨肉瘤样本中，骨肉瘤原发灶相对于正常组织差异表达基因 8002 个，瘤栓和正常组织本之间有 7892 个差异表达

基因，瘤栓样本相对于肿瘤组织有 713 (3.8%) 个基因上调，738 个基因下调 (4.0%)；第 2 例骨肉瘤样本中，骨肉瘤和瘤栓样本之间有 4920 (27.3%) 个差异表达基因；第 3 例瘤栓相对于骨肉瘤标本差异基因为 1715 (8.6%) 个基因。在 3 例骨肉瘤中，分析瘤栓相对于肿瘤差异表达基因的富集情况 (GO 及 KEGG)，我们发现差异表达基因主要富集在 Focal adhesion, ECM-receptor 相互作用通路，及 Complement and coagulation cascades 通路。同时，我们发现瘤栓组织相对于肿瘤组织中促进转移或转移相关关键基因表达水平增高。在对照和骨肉瘤和瘤栓之间，两两比较差异的外显子跳跃事件，未发现与肿瘤相关的可变剪切事件。在 3 组骨肉瘤和瘤栓标本的基因融合结果中，我们都发现了 NOTCH2NL-NBPF1 基因融合情况。

【结论】 瘤栓与骨肉瘤转移高度相关，本研究对 3 例配对瘤栓及骨肉瘤标本进行全转录组分析表明瘤栓相对于肿瘤在细胞粘附通路表达量降低可能是其发生转移的起始步骤，此外补体-凝集通路活化与瘤栓形成有关，这可能为研究骨肉瘤增殖及转移提供新的研究思路。同时 NOTCH2NL-NBPF1 的基因融合可能与骨肉瘤瘤栓的产生相关。

关键字

参考文献

类别：基础学组

686240



PMMA 骨水泥及同种异体骨的体外抗骨髓瘤性质及其机制的 实验研究

要星辰, 杜心如

首都医科大学附属北京朝阳医院

目的：评估 PMMA 骨水泥及同种异体骨的体外抗肿瘤活性，为临床 MM 手术中的填充物选择提供理论依据。

方法：浸提法制备 PMMA 骨水泥及同种异体骨浸提液，分别对 PMMA 及同种异体骨 24h 释放组、48h 释放组进行细胞毒试验，通过 CCK-8 法计算各组对多发性骨髓瘤细胞 U266 的抑制率，流式细胞仪检测细胞凋亡率，Western bolt 检测处理后凋亡相关蛋白 Active - Caspase-3、Bcl-2、Bax 的表达。

结果：PMMA 浸提液对 U266 细胞增殖具有抑制作用，呈浓度依赖 ($P < 0.05$)，最大抑制率为 $31.34 \pm 0.56\%$ ；PMMA 浸提液可诱导 U266 细胞凋亡且呈浓度依赖，最大凋亡率为 51.3%，其中早期凋亡率为 39.7%，晚期凋亡率为 11.6%；PMMA 浸提液作用 U266 细胞后降低 Bcl-2 的表达，增加 Active-Caspase-3 蛋白表达，Bax 的表达未见明显改变。

结论：PMMA 骨水泥具有一定细胞毒作用，其通过降低 Bcl-2 表达、增加 Active-

Caspase-3 蛋白的表达促进细胞凋亡。同种异体骨对肿瘤细胞的增殖没有明显的抑制作用。在多发性骨髓瘤外科手术中, PMMA 骨水泥应作为首选。

关键字

参考文献

类别: 基础学组

687210



脊髓损伤急性期内源性酮体增加与运动功能恢复相关性实验研究

张丽河, 洪毅, 王方永, 张芹, 蔡亚飞

首都医科大学

摘要

目的: 本研究目标是探讨生酮饮食是否有助于保护胸脊髓损伤急性期的神经组织和促进功能恢复。

方法: 20 只健康成年 Sprague-Dawley 大鼠随机分为 A 组 (标准对照组)、B 组 (限制饮食组)、C (3:1 生酮组)、D (6:1 生酮组)。制作 T10 脊髓损伤钳夹模型。A 组正常进食标准饲料和水; B 组进食量减少 25%; C 组正常进食 KR 值为 3: 1 的生酮饲料 (脂肪比蛋白质和碳水化合物=3); D 组正常进食 KR 值为 6: 1 的生酮饲料 (脂肪比蛋白质和碳水化合物=6)。每组均于造模前 3 周给予相应饮食疗法, 除 B 组外其余各组进食热量一致, 造模后每组继续造模前饮食疗法。组间比较造模前后不同时间点大鼠体重、饲料摄入量与热量、血和尿的 β -羟丁酸浓度、大鼠行为学指标 (改良 BBB 评分、步态分析)。

结果: 术后 1-8 周, 每周四组大鼠体重无显著性差异 ($P>0.05$), 但术后第 6 天 B 组大鼠体重明显较 A、D 组轻。术后每周, 四组大鼠 BBB 评分无显著性差异 ($P>0.05$)。术后 8 周, 四组大鼠 MEP 潜伏期和波幅无显著性差异 ($P>0.05$)。术后 8 周取材: 1) 四组脊髓损伤节段 HE 染色病理表现显示组织变性程度 $B>A>D>C$; 2) 四组 TUNEL 检测示凋亡率 $B>A>D>C$, 生酮组 (C+D) $>$ 对照组 A ($P<0.05$); 3) 四组间 NF-200 轴突计数 $D>C>A>B$, 生酮组 (C+D) $>$ 对照组 A ($P<0.05$); 4) GFAP 表达生酮组 (C+D) $>$ 对照组 A ($P<0.05$)。

结论: 生酮疗法可以有效提升脊髓损伤大鼠体内血酮和尿酮水平。病理染色显示 3:1 生酮配方组组织变性程度最轻。不同配方的生酮疗法尚无法有效改善脊髓损伤大鼠下肢运动功能, 考虑可能与样本量相对较小及模型损伤程度重有关。

关键字

参考文献

类别: 基础学组



神经微丝蛋白免疫荧光染色法观察周围神经运动终板

寇玉辉

北京大学人民医院

目的 了解应用神经微丝蛋白免疫荧光染色法观察周围神经运动终板效果。**方法** 取 SPF 级大鼠 6 只，麻醉状态下取材双侧比目鱼肌入肌点组织，多聚甲醛固定，冰冻切片，行神经微丝蛋白免疫荧光染色，荧光显微镜和激光共聚焦显微镜下观察周围神经运动终板形态，并用激光共聚焦显微镜的相关应用软件对运动终板形态进行三维重建。**结果** 染色切片在荧光显微镜和激光共聚焦显微镜下均可观察到运动终板爪形结构形态，激光共聚焦显微镜采集图像进行三维重建后，可以得到运动终板立体结构。**结论** 神经微丝蛋白免疫荧光染色法是一种较好周围神经运动终板的观察方法。

关键字

参考文献

类别：基础学组

688830



低温成型技术制备不同三维空间结构 PLGA/TCP 支架材料对雪旺细胞增殖的影响研究

唐鹏¹, 段春光², 王铮³, 杨倩⁴, 王春梅², 王安庆¹, 刘四海¹, 王飞¹, 崔志刚¹, 亓攀¹, 顾蕊¹

1. 北京博爱医院

2. 第四军医大学附属西京医院创伤骨科

3. 沈阳军区总医院骨科

4. 第四军医大学附属西京医院超声科

目的 探讨支架材料本身的结构变化对神经细胞增殖的影响，为后期体内构建出具有仿生学意义的血管神经化组织工程骨修复材料提供细胞学依据。

方法 选择新生 SD 大鼠进行雪旺细胞原代培养及纯化。制备不同孔径的 PLGA/TCP 支架材料。取二代 SCs 与支架材料复合培养 24-48h，分别对支架材料上细胞进行扫描电镜、5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷荧光标记观察以及 CCK-8 和酶联免疫法检测。

结果 形态学结果显示大孔径组的孔径周围，细胞数量明显多于小孔径组。CCK-8 细胞增殖曲线显示早期细胞数量间无差异，后期大孔径组细胞增殖明显多于小孔径组 ($P < 0.05$)。

ELISA 检测结果显示 NGF 在细胞复合材料 24h 时小孔径组大于大孔径组, 48h 时大孔径组超过小孔径组 ($P < 0.05$)。

结论 小孔径支架材料早期虽然刺激了细胞的增殖, 最终, SCs 的细胞生物学行为受到抑制。大孔径支架材料虽然早期细胞基数不足, 但因支架材料三维空间结构足够容纳细胞, 使细胞数量逐步增加。因此, 支架材料的不同三维空间结构可直接影响神经细胞在支架材料上的增殖。

【关键词】 聚丙交酯-乙交酯共聚物; 磷酸三钙; 雪旺细胞; 神经化;

关键字

参考文献

附件:

低温成型技术制备不同三维空间结构 PLGA/TCP 支架材料对雪旺细胞增殖的影响研究

唐鹏 段春光 王铮 杨倩 王春梅 王安庆 刘四海 王飞 亓攀 顾蕊 崔志刚

【摘要】 目的 探讨支架材料本身的结构变化对神经细胞增殖的影响, 为后期体内构建出具有仿生学意义的血管神经化组织工程骨修复材料提供细胞学依据。**方法** 选择新生 SD 大鼠进行雪旺细胞原代培养及纯化。制备不同孔径的 PLGA/TCP 支架材料。取二代 SCs 与支架材料复合培养 24-48h, 分别对支架材料上细胞进行扫描电镜、5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷荧光标记观察以及 CCK-8 和酶联免疫法检测。**结果** 形态学结果显示大孔径组的孔径周围, 细胞数量明显多于小孔径组。CCK-8 细胞增殖曲线显示早期细胞数量间无差异, 后期大孔径组细胞增殖明显多于小孔径组 ($P < 0.05$)。ELISA 检测结果显示 NGF 在细胞复合材料 24h 时小孔径组大于大孔径组, 48h 时大孔径组超过小孔径组

($P < 0.05$)。**结论** 小孔径支架材料早期虽然刺激了细胞的增殖, 最终, SCs 的细胞生物学行为受到抑制。大孔径支架材料虽然早期细胞基数不足, 但因支架材料三维空间结构足够容纳细胞, 使细胞数量逐步增加。因此, 支架材料的不同三维空间结构可直接影响神经细胞在支架材料上的增殖。

【关键词】 聚丙交酯-乙交酯共聚物; 磷酸三钙; 雪旺细胞; 神经化;

Study on low temperature forming technology for preparation of different structure of PLGA/TCP scaffold on proliferation of Schwann cells *Tang Peng, Wang Zheng, Yang Qian, Wang Chunmei, Wang AnQin, Liu Sihai, Wang Fei, Qi pan, Gu Rui, Cui*

Zhigan, Duan Chunguang* * *Department of Traumatic Orthopaedics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi' an, Shanxi 710032, China.*

Corresponding author: Duan Chunguang, Email: stoptang@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the structural changes of scaffold materials on the proliferation of neural cells. **Method** Extracted the original culture of Schwann cells (Schwann cell, SCs) from the sciatic and brachial plexus nerve of the 1-3 days of fetal SD rats. The purified SCs inoculation in different aperture on PLGA/TCP scaffolds by instillation. Observing cell in different aperture PLGA/TCP scaffolds materials on the proliferation of morphology and molecular biology. **Result** The histological results showed that the cell proliferation in the large aperture group were better than that of the small aperture group. The results of CCK-8 showed that After 48h, the proliferation of the large aperture group was significantly better than that the small aperture group ($P < 0.0001$). The results of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed that the expression of NGF in the large aperture group was higher than that in the small aperture group ($P < 0.05$). **Conclusion** After the SCs composite on 400-600 scaffold materials, the number of neurotrophic factor and the promoting of cell proliferation ability are smaller than the small aperture group at the early stage.

【Key words】 poly(lactic-co-glycolic acid); tricalcium phosphate; Schwann cells; neurotization

骨缺损作为临床上常见的骨组织损伤往往可导致周围血管和神经的大范围受损，从而影响骨组织再生^[1-3]。因此，骨缺损，尤其是大段骨缺损在临床上普遍存在难愈合、易感染等特点，治疗非常困难。19世纪以来应用理想的骨组织替代物修复缺损骨组织以达到促进骨愈合的目的已成为医学家们不断追求的目标。随着分子生物学和材料学的发展，组织工程技术进入了发展的快车道。组织工程支架材料的研究难点主要包括如何构建具有生物活性并满足各类组织特点的支架材料上^[4]。早期学者将研究重点放到了如何构建具有良好血管化活性的组织工程骨上，但构建出的组织工程骨仍出现局部成骨不良等问题，距离临

床应用还有一段差距^[5-7]。除了对血管化的研究外，随着神经解剖学的发展，有学者发现了骨组织中的神经分布情况。他们试图分析了神经在骨重塑和骨修复过程中的调控作用，为我们构建更为理想的具有仿生学意义的组织工程材料打开了新的思路^[8,9]。

正常骨组织是由钙磷比为1.77的羟基磷灰石结构和一型胶原等骨基质组成^[10]。根据仿生学原理，我们为了使组织工程支架材料更加接近于真正的骨组织，除了化学成份外，还要考虑其空间结构是否有利于细胞的营养物质和废物的代谢。因此，在骨支架材料的设计和制备时也应尽可能的模拟天然皮质骨和松质骨的三维多孔结构。在骨缺损的修复过程中，具备立体形态特性的三维空间结构对支架材料的修复效果起到了重要的作用。首先，多孔结构利于细胞向材料内部的迁移，从而促进细胞的增殖和修复^[11]。其次，材料的孔隙结构满足血管和神经走形的仿生学要求并可以更好的使它们在骨重建过程中彼此交联成网。保证了材料内部的组织和细胞的养分供应^[12,13]。再次，具有三维空间结构可增加材料和骨组织间的接触面积，使组织与材料间的结合更加牢固^[14]。最后，三维空间结构提升了材料的方向性，促使新生骨组织更好的向缺损较深的部位生长^[11,15]。因此，良好三维空间结构的骨组织工程支架是能否发挥成骨、成血管甚至是成神经的关键。

本研究通过制备出具有不同孔径的多孔聚丙交酯-乙交酯共聚物（poly lactic-co-glycolic acid; PLGA）和磷酸三钙（tricalcium phosphate, TCP）复合多孔支架材料^[16]。以神经研究最常用的雪旺细胞（Schwann Cells, SCs）作为种子细胞与其复合培养，在体外观察不同三维空间结构材料上神经细胞的增殖情况。明确与不同三维结构支架材料复合后神经细胞相关因子分泌的差异，为体内的神经化研究提供细胞学基础和依据。

材料与方法

一、材料

1.主要试剂：聚丙交酯-乙交酯共聚物（山东医疗器械公司）、磷酸三钙（温州化学材料厂）、1, 4-二氧六环（西安化工厂）、细胞活力检测试剂盒（恩晶生物科技有限公司）、DMEM/F12（美国Hyclone公司）、胎牛血清（FBS）（美国Gibico公司）、D-Hanks液（美国Scienccell公司）、S-100抗体

(美国Gibico公司)、594 二抗(美国Gibico公司)、BrdU 标记法细胞增殖荧光显微检测试剂盒(美国GENMED SCIENTIFICS公司)、NGF酶联免疫检测试剂盒(上海AMEKO公司)、。

2.主要仪器: 低温沉积 3D 打印机(清华大学机械工程系)、扫描电子显微镜(美国GE公司)、体式显微镜(德国莱卡公司)、PH 计(德国Sartorius公司)、解剖显微镜(德国莱卡公司)、酶联免疫检测仪(美国Nuair公司)、激光共聚焦显微镜(德国Olympus公司)。

二、方法

1. PLGA/TCP 支架材料的制备

根据孔径大小,在计算机中分别设计孔径为100-300 μm 和400-600 μm 的支架材料。PLGA(PLA/PGA=75:25,粘度=1.41dl/g)与TCP以7:3的比例在45 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下溶解于有机溶剂1,4-二氧六环中,配制成容积为17%的均质浆料。在28 $^{\circ}\text{C}$ 摄氏度恒温条件下制备成形,支架材料放于冷冻干燥机内冷冻干燥并得到长 \times 宽 \times 高分别为14 \times 14 \times 5和9 \times 9 \times 5的大孔径组与小孔径组支架材料,如图2(A、B)所示。

2. SCs 的培养

取1-2天SD大鼠(第四军医大学实验动物中心提供)体内的坐骨和臂丛神经,充分剥离神经束膜。将剥离干净的神经组织转移至3.5cm的培养皿中,剪至糜状。消化、离心后以相同密度接种于六孔板中并纯化^[17]。

3. SCs 与 PLGA/TCP 支架材料的复合

随机选取大孔径组(10)和小孔径组(10)支架材料做成4 \times 4 \times 5大小的PLGA/TCP支架。60Co射线消毒材料并选取II代SCs等量滴注在材料上,培养箱继续培养24-48小时。

4. 扫描电子显微镜

复合细胞后,材料样本用37 $^{\circ}\text{C}$ PBS轻柔清洗1-2次,2.5%戊二醛溶液固定2-4小时后送检。送检样本经脱水、干燥、喷金后,在加速电压5 kV条件下,扫描电子显微镜(SEM,日立S-3400N,日本)观察体外不同孔径支架材料上细胞表面形态和生长状况。

5. 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine,BrdU)染色

确保材料样本的细胞铺满率达50%以上，应用BrdU荧光染色试剂盒（GENMED SCIENTIFICS INC, U.S.A）分别对两组材料上的SCs进行染色。分别在20x和60x条件下，应用激光共聚焦显微镜（Olympus,FV1000,Japan）观察不同组间细胞的增殖情况。

6. Cell Counting Kit(CCK-8)检测

在体外的大孔径组、小孔径组和正常培养组中，随机抽取5个样本，接种细胞后24小时、48小时、72小时和96小时分别滴入CCK-8(Dojindo, Japan)检测试剂，放入培养箱中孵育1-4h。酶标仪测定450nm处的吸光度（OD值）并分析不同样本间细胞增殖的差异。

7. 酶联免疫法检测（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）

在体外的大孔径组、小孔径组中，随机抽取5个样本。在接种SCs后的24小时和48小时，分别使用Elisa检测试剂盒（AMEKO, Shanghai, China）进行处理。处理后样本以450nm波长依序用酶标仪测量其吸光度（OD值）。根据标准品的浓度及对应的OD值计算出标准曲线的直线回归方程，再根据样品的OD值在回归方程上计算出对应的样品浓度。各重复孔的OD值用均数表示以分析不同样本间细胞分泌神经生长因子（Nerve Growth Factor, NGF）的差异。

8. 统计学分析

所有数据用SPSS20.0统计软件处理。两组间应用计量资料的两样本间t检验进行比较， $P < 0.05$ 时，计算结果被认为有统计学差异。每组时间点之间差异用完全随机设计的多样本比较的Kruskal-WallisH检验，同一时间点组间的差异用两独立样本比较的Wilcoxon秩和检验， $P < 0.05$ 为有显著性差异。

结 果

1. 扫描电子显微镜结果

PLGA/TCP 支架材料呈立体交叉支撑的三维空间结构，表面有大量微孔。SCs 接种于材料 48h，大孔径组的孔壁周边出现大量成簇的扁平状梭形细胞，细胞生长状态良好，如图 4（A）。放大后见胞体与材料粘附紧密，胞体与胞体间首尾相接如图 4（C）。小孔径组材料表面的微孔结构消失，小孔周边多为单

个胞体，只有少量成簇生长的扁平状细胞，但胞体与胞体间较大孔径组黏附更为紧密，其细胞数量较大孔径组少，如图 4（D）。

2. BrdU 染色结果

SCs 生长 48h 后应用激光共聚焦显微镜观察 BrdU 在不同孔径支架上的表达，发现在大孔径组的孔径周围，细胞数量明显多于小孔径组，如图 5 C1 和 C2。单个细胞形态良好，细胞增殖明显，增殖后细胞聚集呈团簇样，如图 5 f1。小孔径组孔径周围的细胞呈线状或条状首尾相接的散在分布，细胞数量较少，如图 5 C2。虽然，孔径周围只有少量的新增细胞，但是，材料表面的新增增殖细胞量比孔径周围多，细胞聚集明显且呈聚集性生长趋势，如图 5 f2。

3. CCK-8 检测结果

在培养 24h、48h、72h 和 96h，CCK-8 的细胞增殖检测结果显示。24h 的 SCs 细胞在对照组、小孔径组和大孔径组未见明显的增殖差异（ $P>0.05$ ）。48h 各组虽然有不同程度的细胞增殖，但小孔径组增殖明显比大孔径组和对照组多（ $P<0.05$ ）。72h 正常对照组细胞增殖有明显升高。大孔径组细胞增殖趋势明显，72h 的细胞数量比 48h 增加（ $P<0.05$ ）。小孔径组细胞在 72h 几乎未增殖，与 48h 的细胞量平齐（ $P>0.05$ ）。96h 后，正常对照组的细胞增殖明显高于实验组。大孔径组与小孔径组相比，大孔径组的细胞增殖明显。96h 的细胞增殖比 48h 和 72h 时均有明显升高（ $P<0.05$ ），如图 6。

4. Elisa 检测结果

检测 SCs 复合不同孔径材料 24h 和 48h 相关神经生长因子的分泌情况。结果显示在材料上复合 24h，小孔径组 NGF 低于大孔径组（ $P<0.05$ ）。复合 48h，大孔径组的 SCs 释放增加超过小孔径组，未见显著差异（ $P<0.05$ ）。

讨 论

骨组织内部含有丰富的神经、血管。早期学者发现骨细胞的表面有大量神经递质的受体，它们分别与神经细胞释放的不同神经递质结合，调节骨的再生和修复^[4, 18]。这些发现彻底使我们了解了骨组织是有神经支配的，也使我们认识到神经的存在势必参与了骨组织的代谢与重塑。然而，目前在利用组织工程技术治疗大段骨缺损的研究中，大部分的学者仅将重点集中于对血管化的研究

上，往往忽略了神经的存在。本实验通过观察复合在不同三维空间结构支架材料上神经细胞的细胞生物学行为，探讨支架材料本身的结构变化对神经细胞的影响，为后期体内构建出具有仿生学意义的血管神经化组织工程骨修复材料提供细胞学依据。

我们通过对实验结果的分析发现，大孔径组支架材料的结构更有益于 SCs 的生长和增殖。究其原因，可能是由于其比表面积较大，细胞有充足的生存空间。而充足的生存空间直接决定了是否有利于细胞向支架材料内部的迁移运动和细胞的增殖^[19]。而小孔径材料上的细胞，由于材料较大的外部表面积及其本身良好的细胞相容性，在实验早期，虽然材料上的细胞基数明显增大。但是，由于受到材料内部比表面积的限制，随着细胞数量增加，直接导致细胞间接触性抑制作用逐渐增强，增殖和迁移能力逐渐减弱^[20]。最终影响了 SCs 的增殖。

众所周知，神经营养因子家族是重要的多功能性的亲神经因素。在神经再生及修复过程中，神经生长因子家族可通过 SCs 的分泌发挥其重要的生理作用^[21, 22]。在细胞附着材料早期的小孔径材料上，由于材料本身较大的外表面积增加了粘附在材料表面细胞的基数。但是，随着材料表面 SCs 的增殖的不断提高，其释放 NGF 的数量反而降低。究其原因，这可能是由于小孔径支架材料较小的内部表面积直接影响了雪旺细胞，使其抑制了细胞的不断增殖。在这种环境下，促使神经营养因子通过自分泌的方式抑制了细胞的增殖、迁移，以调节微环境的平衡^[23-25]。而大孔径材料的比表面积相对较大，内部表面积足以容纳细胞的增殖和迁移。虽然，在细胞附着材料早期，由于大孔径支架材料本身的高渗透率和较低的外部表面积损失了相当一部分细胞，减少了细胞基数。但是，随着大孔径材料上 SCs 释放的神经营养因子水平的增加，促进了雪旺细胞的增殖。因此，大孔径材料本身的结构不但可以给 SCs 的生长提供良好的环境。而且，良好环境中生长的 SCs 在释放大量神经生长因子的同时，它还可以有明显的促血管化的作用，最终影响材料的成骨活性。然而，在后期的实验研究中，我们仍需要进一步对这一推断进行验证。

综上所述，小孔径支架材料复合 SCs 后，虽然早期刺激了细胞的增殖、迁移和分化，但最终因为材料本身结构的限制，SCs 的细胞生物学行为受到抑制。大孔径支架材料虽然实验早期细胞基数不足，SCs 释放的神经营养因子数

量较小孔径组少，促细胞的增殖能力也较弱，但随着细胞数量逐步增加和材料本身的结构优势，促进了 SCs 各项能力的提升。因此，具有不同三维空间结构的支架材料可以影响 SCs 的细胞生物学行为，其中，大孔径材料更有利于细胞的增殖、迁移和分化能力的提升。

致谢 感谢清华大学机械工程系快速成型制造中心熊卓教授、张婷副教授等对本实验提供材料制作的支持和帮助

参考文献

- [1] Rimondini L, Nicoli-Aldini N, Fini M, et al. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2005,99(2):148-154. DOI: 10.1016/j.tripleo.2004.05.010.
- [2] Lindsey RW, Gugala Z, Milne E, et al. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect[J]. *J Orthop Res*, 2006,24(7):1438-1453. DOI: 10.1002/jor.20154.
- [3] Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research[J]. *Biomaterials*, 2009,30(12):2149-2163. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.050.
- [4] Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, et al. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view[J]. *J Cell Mol Med*, 2006,10(1):7-19.
- [5] Sukmana I. Microvascular guidance: a challenge to support the development of vascularised tissue engineering construct[J]. *ScientificWorldJournal*, 2012,2012:201352. DOI: 10.1100/2012/201352.
- [6] Li J, Zhao Q, Wang E, et al. Transplantation of Cbfa1-overexpressing adipose stem cells together with vascularized periosteal flaps repair segmental bone defects[J]. *J Surg Res*, 2012,176(1):e13-20. DOI: 10.1016/j.jss.2011.12.011.
- [7] Si HP, Lu ZH, Lin YL, et al. Transfect bone marrow stromal cells with pcDNA3.1-VEGF to construct tissue engineered bone in defect repair[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012,125(5):906-911.
- [8] Patel MS, Elefteriou F. The new field of neuroskeletal biology[J]. *Calcif Tissue Int*, 2007,80(5):337-347. DOI: 10.1007/s00223-007-9015-3.
- [9] McCredie J. Nerves in bone: the silent partners[J]. *Skeletal Radiol*, 2007,36(6):473-475. DOI: 10.1007/s00256-006-0253-7.
- [10] Kaplan FS, Hayes WC, Keaveny TM, et al. *Orthopedic Basic Science*[J]. 1994,
- [11] Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis[J]. *J Biomed Mater Res*, 1998,39(2):190-199.
- [12] Lu JX, Flautre B, Anselme K, et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 1999,10(2):111-120.

- [13] Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics[J]. *Biomaterials*, 2006,27(17):3230-3237. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.031.
- [14] Story BJ, Wagner WR, Gaisser DM, et al. In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1998,13(6):749-757.
- [15] Hu X, Huang J, Ye Z, et al. A novel scaffold with longitudinally oriented microchannels promotes peripheral nerve regeneration[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009,15(11):3297-3308. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0017.
- [16] Xiong Z, Yan Y, Wang S, et al. Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering via low-temperature deposition[J]. *Scr Mater*, 2002,46(11):771-776.
- [17] Mey J, Schrage K, Wessels I, et al. Effects of inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, and TNFalpha on the intracellular localization of retinoid receptors in Schwann cells[J]. *Glia*, 2007,55(2):152-164. DOI: 10.1002/glia.20444.
- [18] Zhou J, Lin H, Fang T, et al. The repair of large segmental bone defects in the rabbit with vascularized tissue engineered bone[J]. *Biomaterials*, 2010,31(6):1171-1179. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.043.
- [19] Haastert K, Semmler N, Wesemann M, et al. Establishment of cocultures of osteoblasts, Schwann cells, and neurons towards a tissue-engineered approach for orofacial reconstruction[J]. *Cell Transplant*, 2006,15(15):733-744.
- [20] 姜晓锐, 张鑫鑫, 肖剑晖, 等. 大鼠雪旺细胞对两种来源的成骨细胞增殖分化影响的研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2010,12(6):551-556. *Chin J Orthop Trauma*, 2010,12(6):551-556.
- [21] Rosenberg AF, Isaacman-Beck J, Franzini-Armstrong C, et al. Schwann cells and deleted in colorectal carcinoma direct regenerating motor axons towards their original path[J]. *J Neurosci*, 2014,34(44):14668-14681. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2007-14.2014.
- [22] Lewis GM, Kucenas S. Perineurial glia are essential for motor axon regrowth following nerve injury[J]. *J Neurosci*, 2014,34(38):12762-12777. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1906-14.2014.
- [23] Byun JH, Lee JH, Choi YJ, et al. Co-expression of nerve growth factor and p75NGFR in the inferior alveolar nerve after mandibular distraction osteogenesis[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2008,37(5):467-472. DOI: 10.1016/j.ijom.2008.01.017.
- [24] Madduri S, di SP, Papalozos M, et al. Effect of controlled co-delivery of synergistic neurotrophic factors on early nerve regeneration in rats[J]. *Biomaterials*, 2010,31(32):8402-8409. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.052.
- [25] Walmod PS, Kolkova K, Berezin V, et al. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction[J]. *Neurochem Res*, 2004,29(11):2015-2035.

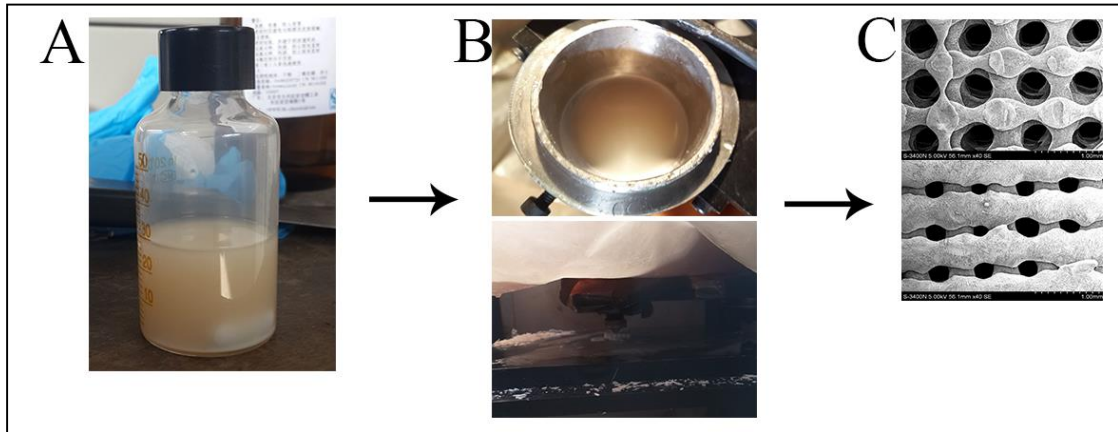


图 1 利用低温沉积技术制备 PLGA/TCP 支架材料
A: 配置好的 PLGA/TCP 浆料; B: 料仓与打印喷头;
C: 制备的不同孔径支架材料的扫描电镜影像

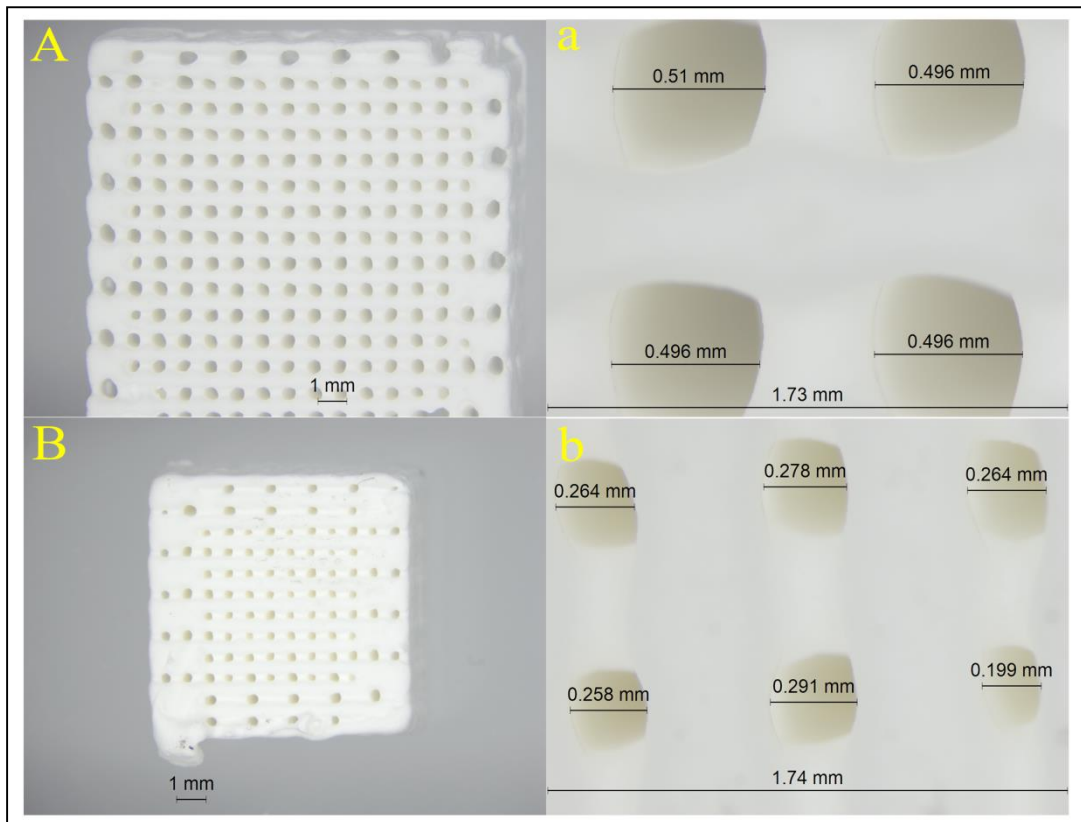


图 2 低温沉积 3D 打印出的多孔 PLGA/TCP 支架材料

A: 大孔径支架材料; B: 小孔径支架材料;

a: 大孔径组的孔径大小; b: 小孔径组的孔径大小;

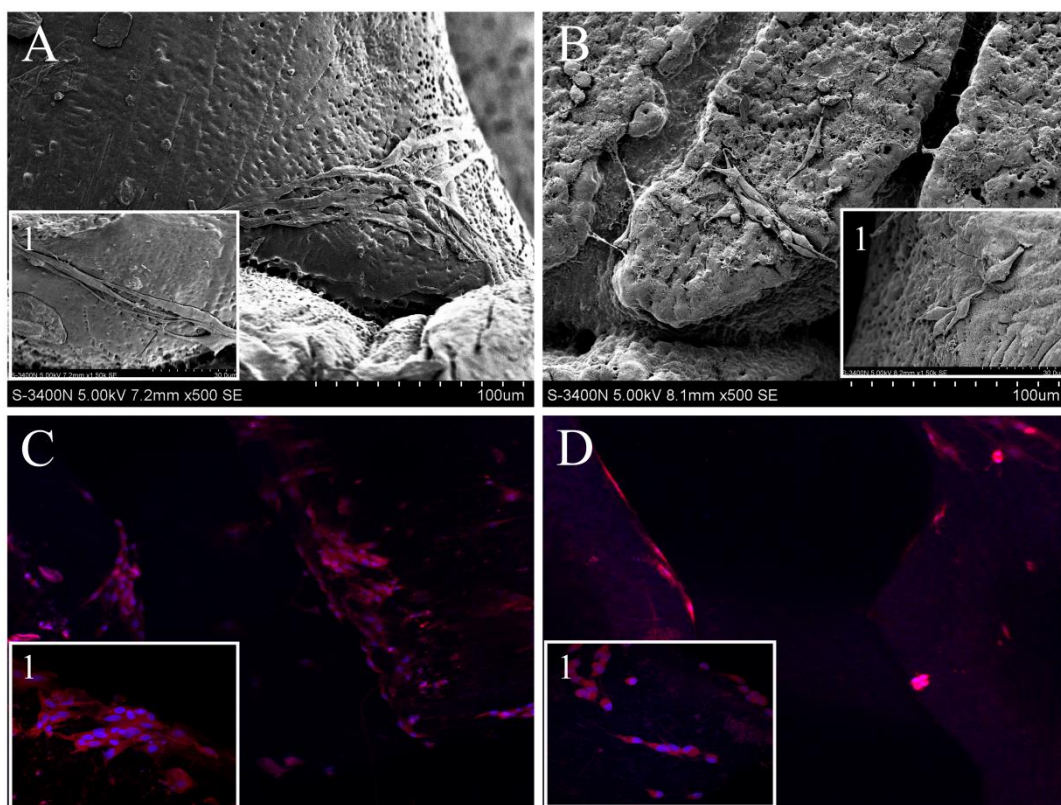


图 3 雪旺细胞和纯化后鉴定结果

- A/1: 大孔径 SCs 增殖 (SEM, 500×1000×) ;
 B/1: 小孔径 SCs 增殖 (SEM, 500×1000×) ;
 C/1: 大孔周边 (BrdU 标记胞体为红色; DAPI 标记胞核为蓝色; 20×60×) ;
 D/1: 小孔周边 (BrdU 标记胞体为红色; DAPI 标记胞核为蓝色; 20×60×) ;

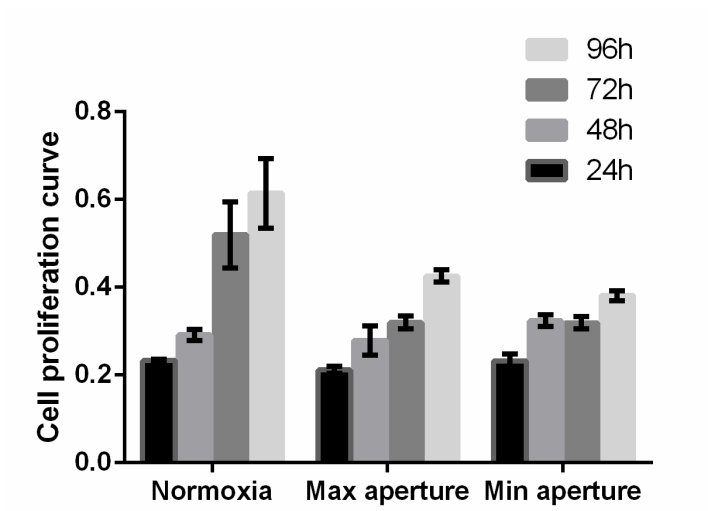


图 4 CCK-8 法检测不同时间的细胞增殖情况

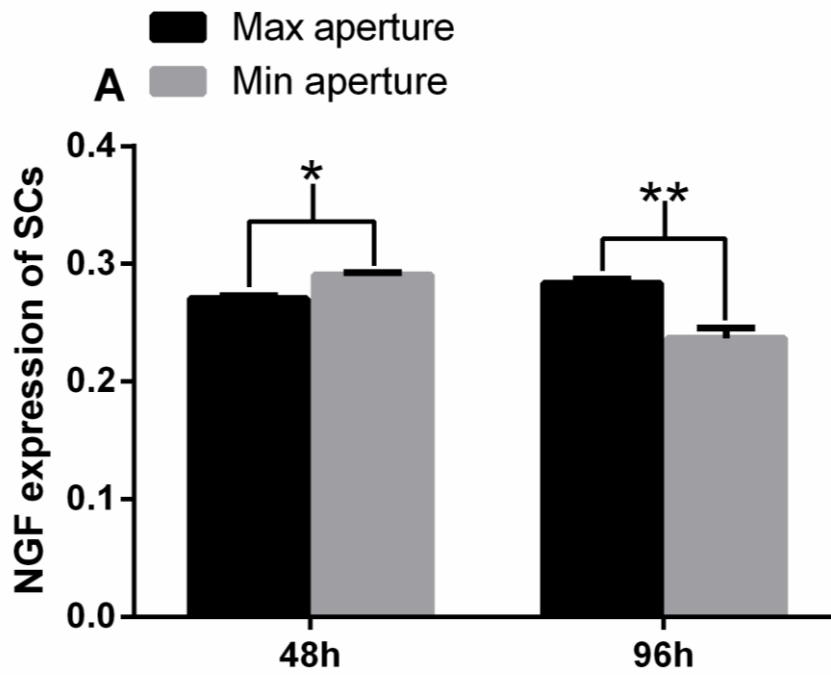


图 5 酶联免疫法检测 NGF 的表达



膝骨关节炎病人 WOMAC 评分和 KSS 评分与步态参数的相关性研究

王颖鹏^{1,2}, 曾纪洲², 张宽¹, 张星火², 张亚奎², 朱旭²

1. 首都医科大学生物医学工程学院
2. 首都医科大学附属北京潞河医院骨科

目的: WOMAC、KSS 是临床上评估膝骨关节炎病人膝关节疼痛和功能最常用的方法。WOMAC 和 KSS 方法使用方便、经济, 但是缺乏一定的客观性。步态时空参数等作为客观指标, 可以较好地评估步行功能。WOMAC 评分和 KSS 评分在多大程度上能够反映步行功能, 其与步态参数的相关性是一个重要的指标, 因此本文旨在研究晚期 KOA 病人 WOMAC 评分和 KSS 评分与步态时空参数之间的相关性。

方法: 本研究纳入 34 名 (8 男 26 女) 做全膝关节置换手术的晚期 KOA 病人。病人使用 WOMAC 评分报告膝关节疼痛、僵直和功能评分, 医生使用 KSS 评分报告病人膝关节疼痛、查体和功能评分。在步态实验室中采集病人的步态数据, 使用步态分析软件计算步速、跨步长、步频、步长、站立相和双腿支撑期百分比等时空参数。计算各评分与各步态参数的皮尔逊相关系数。

结果: WOMAC 疼痛项与功能项相关系数为 0.791 ($p < 0.001$), KSS 疼痛项与功能项相关系数为 0.601 ($p < 0.001$)。WOMAC 与 KSS 相同测量项目的相关系数分别为总分 0.752 ($p < 0.001$), 疼痛项 0.647 ($p < 0.001$), 功能项 0.724 ($p < 0.001$), 除 WOMAC 僵直项外, WOMAC 其余各项也与 KSS 各项显著相关 ($r = 0.470 \sim 0.732$, $p < 0.001$)。WOMAC 总分、疼痛项和功能项与步速、跨步长、步长、站立相和双腿支撑期百分比等步态参数中度相关 ($r = 0.425 \sim 0.630$, $p < 0.05$), WOMAC 总分与各步态参数相关性最高。KSS 总分、疼痛项和功能项与步速、跨步长、步长、站立相和双腿支撑期百分比等步态参数中度相关 ($r = 0.401 \sim 0.728$, $p < 0.05$), KSS 功能项与步态参数相关性最高。KSS 总分和功能项与步态参数相关性强于 WOMAC 总分和功能项, 而 KSS 疼痛项与步态参数相关性弱于 WOMAC 疼痛项。

结论: 晚期 KOA 病人的 WOMAC 评分与 KSS 评分显著相关, 两者有较好的一致性。两种评分均与步态参数存在一定相关性, 但 KSS 功能评分与步态参数的相关性强于 WOMAC, 且其总分和功能评分受疼痛影响小于 WOMAC, 所以 KSS 反映 KOA 病人行走功能的能力比 WOMAC 稍好, 建议使用 KSS 评分。尽管如此, KSS 评分与步态参数的相关性仍不是很高, 因此临床上需要一套更能反映行走能力且受疼痛影响较小的新的评分标准。

关键字

参考文献

类别：基础学组
704230



不同浓度富马酸替诺福韦酯对小鼠成骨前体细胞 MC3T3-E1 增殖、凋亡及矿化的影响

赵汝岗, 张强, 赵昌松, 陈宗锋, 李鑫
首都医科大学附属北京地坛医院

目的 探讨富马酸替诺福韦酯 (TDF Tenofovir disoproxil fumarate) 对体外培养小鼠胚胎前体成骨样细胞 MC3T3-E1 增殖、凋亡及矿化的影响。

方法 体外培养 MC3T3-E1 细胞, 分为正常细胞对照组、dmsO 处理组、TDF 处理组 (50nmol/L、500nmol/L、5 μ mol/L、50 μ mol/L、250 μ mol/L、500 μ mol/L), 干预 24、48 小时。CCK8 法检测细胞增殖抑制率, ANNEXIN V/7AAD 凋亡试剂盒检测细胞凋亡率, 茜红素染色检测钙结节形成。

结果 低浓度的 TDF 对 MC3T3-E1 增殖无影响, 高浓度的 TDF 能抑制体外培养的 MC3T3-E1 细胞增殖; TDF (250 μ M、500 μ M) 促进细胞凋亡; 茜红素染色显示 TDF 能抑制钙结节形成。

结论 TDF 抑制前成骨细胞的增殖, 促进凋亡, 抑制钙结节形成, 可能是 TDF 相关性骨质疏松或骨量减少的机制之一。

关键字
参考文献

类别：基础学组
710815



老年髌部骨折患者骨代谢特点及其围手术期变化趋势分析

刘军川, 薛庆云
北京医院

目的：探讨老年髌部骨折患者骨代谢特点及其围手术期变化趋势。

方法：前瞻性的纳入 150 例老年髌部骨折患者（65<年龄<85）及 100 例非骨折对照患者（65<年龄<85）。非骨折组入院后测定血清骨代谢生化指标（PINP、 β -CTX、OC、25-(OH)-VitD）和骨密度；髌部骨折患者测定骨密度，并分别于入院后、术后第一天测量血清骨代谢生化指标（PINP、 β -CTX、OC、25-(OH)-VitD）。通过组间独立样本 T 检验、方差分析和组内配对样本 T 检验，比较老年髌部骨折患者与非骨折患者的骨代谢和骨密度差异，分析髌部骨折围手术期骨代谢变化趋势。

结果：髌部骨折组与非骨折组相比：骨密度明显下降（ $P<0.01$ ），25-(OH)-VitD 明显缺乏（ $P<0.05$ ），而 PINP、 β -CTX 和 OC 水平无明显差异。髌部骨折组中术后第一天与入院时的骨代谢生化指标相比：OC 和 25-(OH)-VitD 明显下降（ $P<0.01$ ）， β -CTX 明显升高（ $P<0.05$ ），PINP 呈下降趋势，但无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

结论：老年髌部骨折患者骨密度显著下降，25-(OH)-VitD 水平明显降低，应重视 25-(OH)-VitD 的补充；髌部骨折发生早期骨代谢水平即发生明显变化，骨形成作用减弱而骨破坏作用增强，应在早期进行抗骨质疏松治疗。

关键字

参考文献

类别：基础学组

647065



基于小间隙套接缝合放大支配效应理论移植自体腓肠神经 修复腓总神经损伤

李明, 张培训, 姜保国

北京大学人民医院

摘要

目的：观察可吸收生物套管小间隙套接缝合技术联合自体神经修复长段周围神经缺损的研究效果。

方法：30 只 SD 大鼠随机分成 5 组，每组 6 只。A 组：对照组，只取出 10mm 长腓肠神经，不做其他处理；B 组，制作 10mm 长腓总神经缺损模型，利用等长、同侧自体来源腓肠神经修复，神经外膜缝合吻合口；C 组，制作 10mm 长腓总神经缺损模型，利用等长、同侧自体来源腓肠神经修复，神经外膜缝合近端吻合口，可吸收生物套管小间隙套接技术缝合远端吻合口；D 组，制作 10mm 长腓总神经缺损模型，利用等长、同侧自体来源腓肠神经修复，可吸收生物套管小间隙套接技术缝合近端吻合口，神经外膜缝合远端吻合口；E 组，制作 10mm 长腓总神经缺损模型，利用等长、同侧自体来源腓肠神经修复，可吸收生物套管小间

隙套接技术缝合近端、远端吻合口。12 周后，观察和比较神经和肌肉功能恢复情况。

结果：双套管组远端腓总神经数量为(1817±31)，优于远端套管组(1719±32, P<0.05)、近端套管组(1645±30, P<0.05)和外膜缝合组(1542±52, P<0.05)，但低于对照组(2047±66, P<0.05)，差异具有统计学意义。双套管组最大肌肉收缩力和肌肉湿重高于其他实验组，差异具有统计学意义(P<0.05)。套管组腓总神经功能指数优于外膜缝合组(P<0.05)，但组间比较无统计学差异(P>0.05)。各组神经传导速度均低于对照组(P<0.05)，但组间比较无统计学差异(P>0.05)。

结论：可吸收生物套管小间隙套接法联合自体腓肠神经修复长段腓总神经损伤，明显优于传统外膜缝合修复，建议在吻合口两端均应用小间隙套管缝合。

关键词：小间隙套接缝合，长段神经缺损，腓总神经，自体神经移植

关键字

参考文献

附件：

Autologous sural nerve repair long common peroneal nerve defect by biodegradable conduit small gap tubulization

Ming Li#, Jiuxu Deng#, Jian Weng, Fei Yu, Yuhui Kou, Na Han, Xiaofeng Yin, Peixun Zhang* & Baoguo Jiang*

Department of Orthopedics and Trauma, Peking University People's Hospital, Beijing, China

#Equal contributors and co-first authors

*Correspondence to: Peixun Zhang, M.D., zhangpeixun@bjmu.edu.cn. Baoguo Jiang, M.D., jiangbaoguo@vip.sina.com.

Abstract

To investigate and compare the effect of biodegradable conduit small gap tubulization on varying anastomotic stoma combined with single autologous sural nerve on the repair of long common peroneal nerve defect. Rat models of common peroneal nerve defect were established and biodegradable conduit small gap tubulization on different anastomotic stoma combined with single autologous sural nerve were performed. After postoperative 12 weeks, nerve morphological variation and functional recovery were observed. The results showed that regenerated nerve in group of biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma (1817±31) was more than group of proximal anastomotic stoma (1645±30, P<0.05), group of distal anastomotic stoma (1719±32, P<0.05), and group of epineurium suture (1542±52, P<0.05), but less than normal group (2047±66, P<0.05). The maximum tetanic contraction force and wet weight ratios of tibialis anterior muscles in group of biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma were also better than other experimental groups (P<0.05). The common peroneal nerve function index in small gap tubulization groups were superior than group of epineurium suture (P<0.05) and inferior to normal group (P<0.05), but there was no statistically significant differences between intergroup (P>0.05). The motor nerve conduction velocity in experimental groups were lower than normal group (P<0.05), but there was no statistically significant differences between intergroup (P>0.05). This study suggested that when use autologous sural nerve repair long common peroneal nerve injury, performing biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma may be a better choice for nerve regeneration and

functional recovery.

Keywords: biodegradable conduit small gap tubulization, long common peroneal nerve injury, autologous sural nerve, nerve regeneration, functional recovery.

Introduction

Peripheral nerve injury is a serious medical problem in modern trauma, which may give rise to irreversible physical disability and tremendous psychic damage for patients (Braga Silva J et al., 2017;Chen Y et al., 2016; Singh AK., 2017). Although the researchers have made a great progress in the remedial technology, there is still not a satisfying therapeutic method for the repair of peripheral nerve injury, especially for long nerve defects so far (Rinker B et al., 2017). It is quite common to see the majority of surgeons are more worried about long nerve defects than general nerve defects which can be bridged directly for the reasons including bad prognosis and poor functional recovery (Jiang CQ et al., 2016). Along with growing number of global terrorism, natural disaster and traffic injury, additional peripheral nerve injury patients will be more than 1,000,000 every year and 30% of them will exist nerve defects(Long B et al., 2016). Therefore, it is necessary and urgent to develop an effective treatment for the repair of long nerve defects.

For small nerve defect, injured nerve stump can be sutured directly by skilled microsurgical technique,

but for large nerve defect, injured nerve stump is too long to suture directly and neurofibroma will be induced to inhibit functional recovery at last (Takahashi M et al., 2014; Bolton WD, et al., 2017). For a long time, a great number of studies focus on nerve substitutes including vessel, autologous nerve and artificial nerve, trying to improve the therapeutic efficacy of large nerve defect (Chen C et al., 2015; Levi AD et al., 2016; Shah SR et al., 2016). In 1870, Philipeaux and Vulpain firstly reported to use autologous nerve transplantation repair peripheral nerve injury, and then numerous surgeons in the world utilized this technology for different complex nerve injury and regarded it as “golden standard” in neuro-rehabilitation (Millesi.,1979;). However, autologous nerve transplantation inevitably has some disadvantages including small nerve diameter, limited quantity, and inaccuracy connection between motor nerve and sensory nerves (Jiang CQ et al., 2016).

To further increase the utilization ration of transplanted autologous nerve and treatment effect of large peripheral nerve defects, Jiang et al. invented small gap sleeve suture technique and used it in the repair of peripheral nerve injury (Jiang et al. 2006). Our previous studies found that, compared with traditional epineurium suture technique, small gap sleeve suture technique could improve nerve growth rate and nerve connective accuracy (Zhang P et al. 2009; Zhang P et al. 2013). It would be advisable to mention that our lab has invented an absorbable biological sleeve for repairing peripheral nerve defects (Patent number: 01136314.2). Furthermore, we have demonstrated that with the help of small gap sleeve suture technique, small transplanted peripheral nerve could repair huge defected peripheral nerve injury well, but effect of biodegradable conduit small gap tubulization on varying anastomotic stoma combined with autologous nerve is still unknow.

In this study, rat models of common peroneal nerve defect were established and biodegradable conduit small gap tubulization on different anastomotic stoma combined with single autologous sural nerve were performed. The nerve morphological variation and functional recovery of biodegradable conduit small gap tubulization on varying anastomotic stoma were observed.

Materials and methods

Animal preparation and material

All the animal experiments were approved and performed strictly according to the guidelines of Institute Animal Care and Use Committee of Peking University People's Hospital, Beijing, China (Permit Number:2011-16). We have tried all the efforts to minimize suffering of rats. The bridging material was a deacetylated chitin biological tube with a length of 8 mm, an inner diameter of 1.5 mm and a wall thickness of 0.1 mm (jointly developed by the People's Hospital of Peking University and China Textile Academy; Patent number: 01136314.2; this conduit is now in a preclinical study).

Experimental group and surgical procedures

Thirty healthy male adult Sprague Dawley rats (220-250g), acquired from Laboratory Animal Center of Peking University People's Hospital were randomly divided into 5 groups (6 rats in each group). Right side sural nerves (10mm) were transected from all the rats. The rats were only exsected right side sural nerve (group A); the rats were exsected right side common peroneal nerve (10mm), explanted autologous sural nerve, and sutured by epineurium on both proximal and distal anastomotic stoma (group B); the rats were exsected right side common peroneal nerve (10mm), explanted autologous sural nerve, sutured by epineurium on proximal anastomotic stoma and sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on distal anastomotic stoma (group C); the rats were exsected right side common peroneal nerve (10mm), explanted autologous sural nerve, sutured by epineurium on distal anastomotic stoma and sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on proximal

anastomotic stoma(group D); the rats were exsected right side common peroneal nerve (10mm), explanted autologous sural nerve, sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma(group E).

Rats were anesthetized by 2% pentobarbital sodium (30 mg/kg i.p.). After complete anaesthesia, skin preparation and disinfection were carried out on the right hind limb of rats. Then a longitudinal incision was performed along the femoral long axis, the sciatic nerve and its three branches (the tibial nerve, the common peroneal nerve and sural nerve) were exposed. To establish experimental model of rat common peroneal nerve (CPN) defect, common peroneal nerve was cut at approximately 10mm below the bifurcation point from the sciatic nerve, and selected another shearpoin at 10mm range to the distal end. Meanwhile, approximately 10mm segment of sural nerve was also exsected below the merge point of nerve fascicle. After that, corresponding operations were performed on different group with 10-0 nylon sutures respectively. It should be noted that group (C), (D) and (E) used a small gap sleeve suture at proximal and distal anastomosis with a gap of 2 mm. Finally, the surgical site was closed in layers with 4-0 nylon sutures (**Figure 1**).

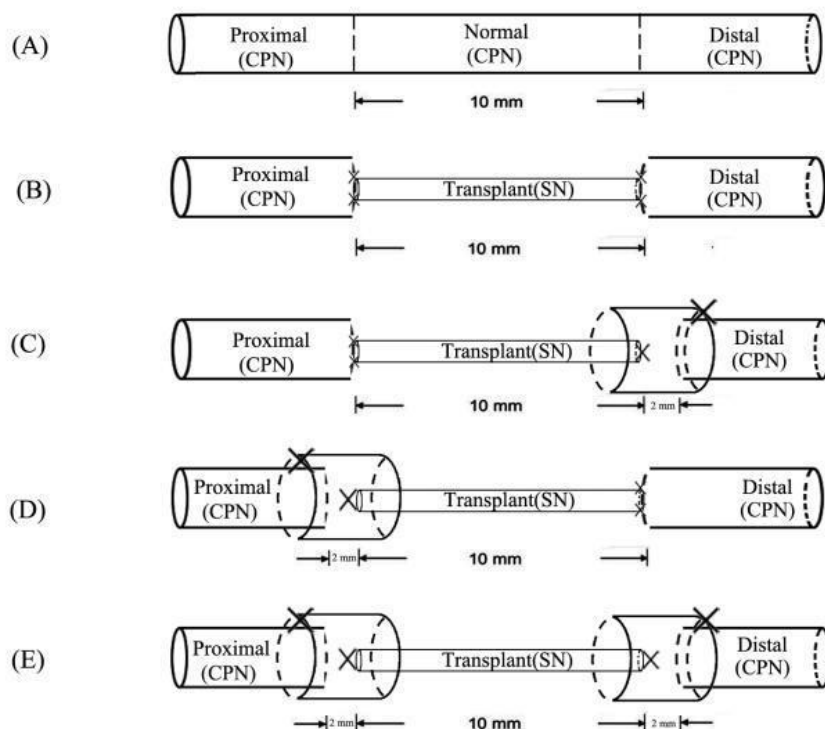


Figure 1. The diagram of repair model in each group. (A) Normal group; (B) autologous sural nerve sutured by epineurium; (C) autologous sural nerve sutured by epineurium on proximal anastomotic stoma and sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on distal anastomotic stoma; (D) autologous sural nerve sutured by epineurium on distal anastomotic stoma and sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on proximal anastomotic stoma; (E) autologous sural nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization. (C), (D) and (E) used a small gap sleeve suture at proximal and distal anastomosis with a gap of 2 mm. CPN: the common peroneal nerve; SN: sural nerve.

General observations

At postoperative 12 weeks, general conditions of rats including the activity of operated limb, degree

of wound healing, ulcer formation, and rotten situation on feet caused by self-biting toes were observed respectively.

Common peroneal nerve function index

At postoperative 12 weeks, footprints of rats in each group were recorded and common peroneal nerve function index (PFI) was calculated exactly by walking track analysis. Rats were placed in a transparent runway (length \times width \times height = 100cm \times 15cm \times 20cm) with a 45° angled mirror below

the track and trained to walk from one side to the other side. Images were acquired by a digital camera and footprints of rats were captured by screenshot (Figure 2).Footprint parameters including print length (distance from heel to toe, PL), toe spread (distance from first to fifth toe, TS), and intermediary toe spread (distance from second to fourth toe, IT) were recorded in left normal control foot (NPL, NTS, NIT) and corresponding right experimental foot (EPL, ETS, EIT) for each rat (**Figure 2**). Common peroneal nerve function index (PFI) was calculated according to the Bain-Mackinnon-Hunter formula (Dijkstra J. R et al., 2000): $PFI=174.9 \left(\frac{EPL-NPL}{NPL} \right) + 80.3 \left(\frac{ETS-NTS}{NTS} \right) - 13.4$.

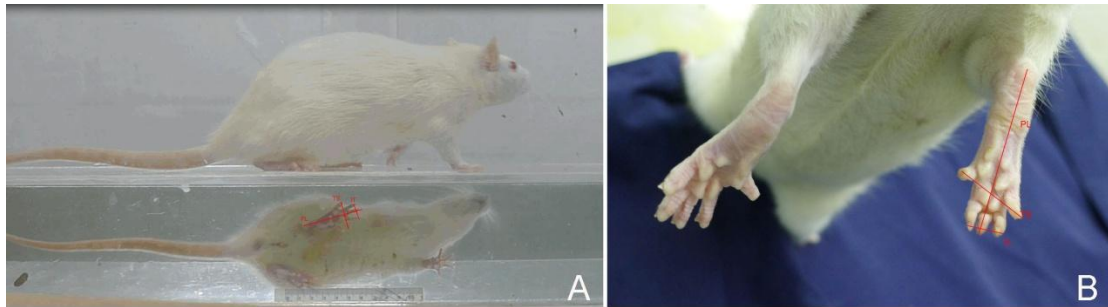


Figure 2. Walking track analysis of rats conducted in a confined walkway on postoperative 12 weeks. A: foot prints appeared on the mirror when rats walked through the track. Paired footprint parameters of hind limbs were recorded. B: PL: print length; TS: toe spread; IT: intermediary toe spread.

Electrophysiological assessment

At postoperative 12 weeks, electrophysiological assessment (mainly referring to the conduction properties of operated graft nerve) was conducted before sacrifice of rats. After rats anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg i.p.), the treated common peroneal nerve was exposed and stimulating bipolar electrodes were placed at the proximal and distal repair site. Then we placed the recording electrode in tibialis anterior muscle, placed the ground electrode in the same-side thigh muscle, and used rectangular pulses (duration 0.1ms, 0.9mA, 1Hz) to stimulate the nerves. The motor nerve conduction velocity (MNCV; m/s) was obtained semi-automatically by surveying the distance between two stimulating sites and dividing it by the onset latency difference of compound muscle action potentials.

The maximum tetanic contraction strength

After electrophysiological assessment, bilateral tibialis anterior muscle strength was measured and the maximum tetanic contraction strength was recorded by PCLAB-UE biomedical signal acquisition and processing system (Beijing Microsignal star Inc., Beijing, China). First, the rats were fully anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg i.p.) before sample collection. Then, the hind limb was fixed on a tailored holding frame, the distal end of tibialis anterior muscle was dissected completely and dissociated appropriately, and the proximal origin was still intact. A tension sensor (MLT500/D; Force Transducer, AD Instruments) was connected to the distal tendon of tibialis anterior muscle using 4-0 suture and the initial tension was maintained at a certain level ($0 < F < 0.1N$). Hook-shaped stimulating electrodes were placed in the common peroneal nerve proximal to the repair site. The stimulation electric current was subsequently strengthened from initial intensity of 0.9mA, a wave length of 0.1ms and a frequency of 1Hz until the waveform of the tetanic contraction stopped increasing. The monitoring data was analyzed by the scope software (version 3.6.12). The muscle strength of the control side was measured as well and the ratio of maximum tetanic contraction strength in experimental side to the control side was used as the overall recovery rate of muscle strength (Shin et al., 2008)

Muscle wet weight measurement

After detection of bilateral tibialis anterior muscle strength, rats were sacrificed and tibialis anterior muscles of operated and non-operated side were isolated entirely and weighed immediately using an electronic scale. The ratio of muscle wet weight in experimental side to the control side was used to evaluate the overall recovery rate of muscle mass.

Histological analysis for nerve regeneration

At postoperative 12 weeks, the segments of distal common peroneal nerve (2mm to the repair site) at operated side, the corresponding common peroneal nerve at normal side, and sural nerve at normal side were collected in each group. These segments were fixed and stained in 1% osmium tetroxide for 24 hours, dehydrated with ethanol of different concentration, and embedded in paraffin. Then, the nerve blocks were cross-sectioned at a 2 μ m slice thickness using an ultramicrotome. All the nerve sections were transferred to microscope slides and photographed using a DFC 300FX color digital camera (Leica, Germany). The results of osmium tetroxide staining were analyzed by Leica Q550CW analytical system and the number of myelinated fibers was calculated manually.

Data analysis

All experimental data were statistically analyzed by SPSS17.0 software and presented as mean \pm SD. The significance of data in each group was tested by one-way ANOVA method and comparison between groups was tested by LSD (Least-Significant Difference) method. P<0.05 was considered a significant difference.

Results

General observation for regenerated nerve

At postoperative 12 weeks, all rats survived and Wounds healed well without infection and trophic ulceration. Conspicuous muscle atrophy was observed in all experimental groups. The proximal common peroneal nerve could grow to distal common peroneal nerve after nerve repair. Many newly generated adherent tissues could be observed in the transplanted nerve and its surrounding area. The transplanted nerve grew well in each group and the diameter of operated nerve achieved or even exceeded to the normal common peroneal nerve, especially in the anastomotic stoma. The newly generated nerve-like tissue could be seen with no apparent neurofibroma (**Figure 3**).

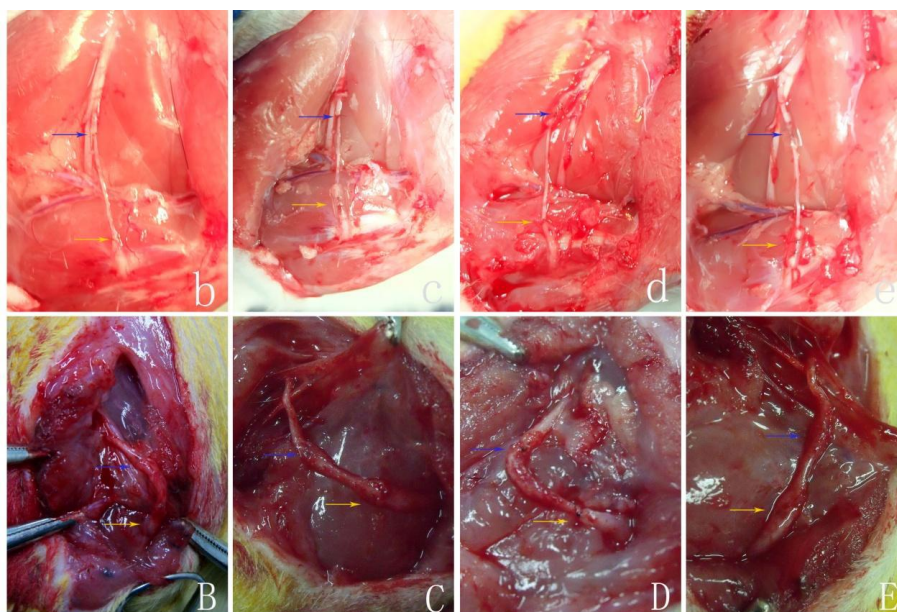


Figure 3. Preparation and general observation of experimental animal models:(b) common peroneal nerve was sutured by epineurium on both proximal and distal anastomotic stoma; (c) common peroneal nerve sutured by epineurium on proximal anastomotic stoma and by biodegradable conduit small gap tubulization on distal anastomotic stoma; (d) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on proximal anastomotic stoma and by epineurium on distal anastomotic stoma; (e) common peroneal nerve was sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma;(B-E) general observation of each group at postoperative 12 weeks respectively.

Normal and regenerated myelinated nerve fibers counting and morphometric analysis

Under a high magnification microscopic, the average diameter of myelinated nerve fibers in experimental groups was lower than normal common peroneal nerve. Moreover, disorderly arrangement of regenerated axons was observed and connective tissues were generated between axons. The thickness of myelin sheath of regenerated nerve fibers in experimental groups was uneven and remnant of necrotic myelin sheath could be observed occasionally (**Figure 4**).The numbers of regenerated myelinated nerve fibers in distal anastomotic stoma were shown in **Table 1**. The results showed that regenerated nerve in group of biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma (1817±31) was more than group of proximal anastomotic stoma (1645±30, P<0.05), group of distal anastomotic stoma (1719±32,P<0.05,), and group of epineurium suture(1542±52, P<0.05), but less than normal group (2047±66,P<0.05).

Table 1. The number of nerve fiber in each group

Group	Group B	Group C	Group D	Group E	Normal SN
A					
Distal anastomosis	2047±66	1542±52	1719±32	1645±30	1817±31
893±23					

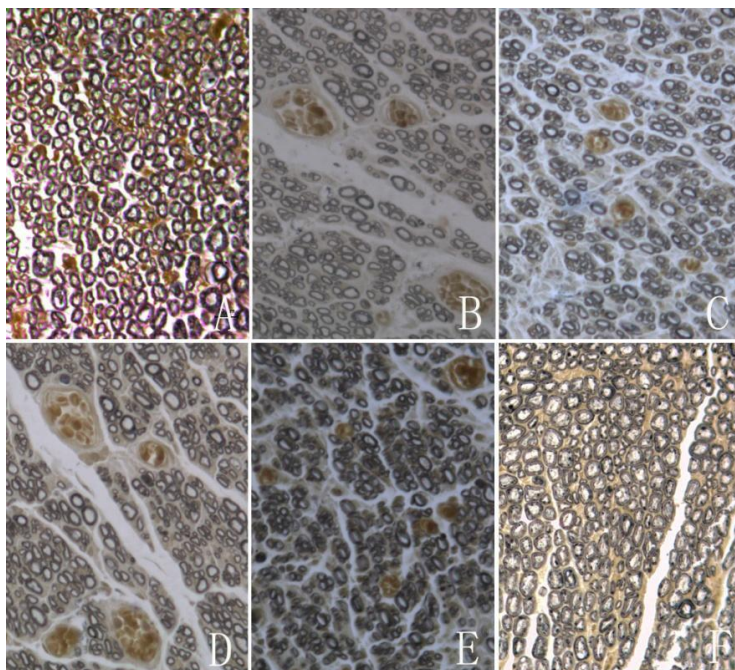


Figure 4. Osmium tetroxide staining for distal common peroneal nerve and normal sural nerve in each group: (A) normal common peroneal nerve; (B) common peroneal nerve sutured by epineurium on both proximal and distal anastomotic stoma; (C) common peroneal nerve sutured by epineurium on proximal anastomotic stoma and by biodegradable conduit small gap tubulization on distal anastomotic stoma; (D) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on proximal anastomotic stoma and by epineurium on distal anastomotic stoma; (E) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma; (F) normal sural nerve. (Bar=10 μ m).

The common peroneal nerve function index

The common peroneal nerve function indexes (PFI) in group A-E were -13.67 ± 1.86 , -48.50 ± 2.74 , -38.33 ± 1.37 , -39.83 ± 1.94 , and -37.67 ± 1.37 respectively. PFI in small gap tubulization groups were superior than group of epineurium suture ($P < 0.05$) and inferior to normal group ($P < 0.05$), but there was no statistically significant differences between intergroup ($P > 0.05$) (Figure 5).

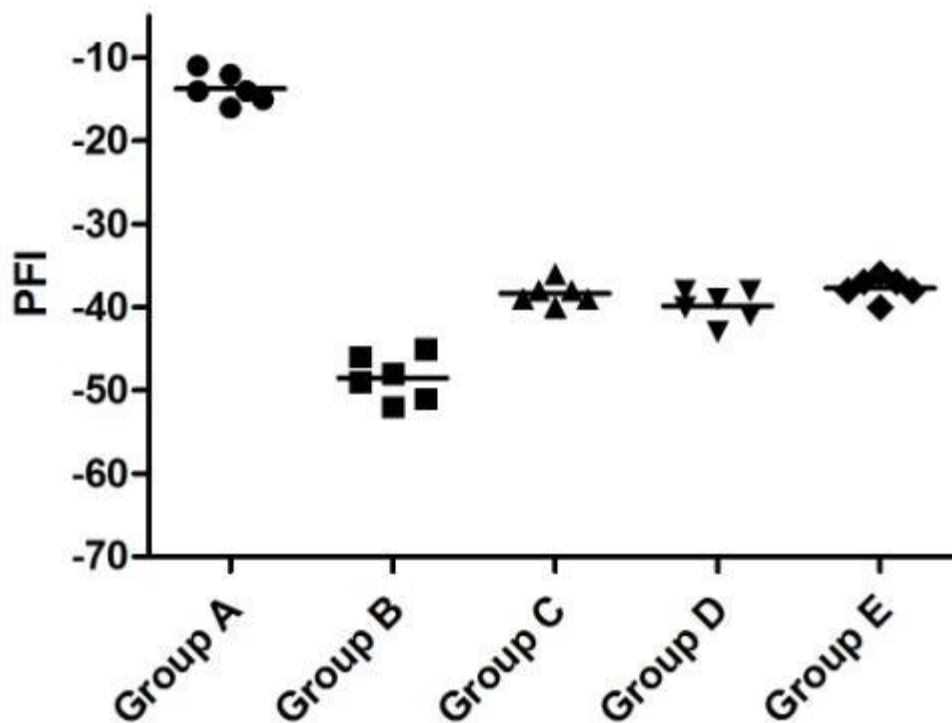


Figure 5. The PFI values in each group at postoperative 12 weeks. (A) normal common peroneal nerve; (B) common peroneal nerve sutured by epineurium on both proximal and distal anastomotic stoma; (C) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on distal anastomotic stoma; (D) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on proximal anastomotic stoma; (E) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma. The values were no significant differences between group C, D and E ($P > 0.05$) ($n=6$).

Electrophysiological assessment for regenerated nerve

The motor nerve conduction velocity (MNCV; m/s) in normal common peroneal nerve was 55.2 ± 2.6 m/s (group A), in new generated nerve were 23.6 ± 2.3 m/s (group B), 25.6 ± 2.7 m/s (group C), 24.0 ± 2.0 m/s (group D), and 24.5 ± 2.5 m/s (group E) separately. The result showed that the motor nerve conduction velocity in experimental groups were lower than normal group ($P < 0.05$), but there was no statistically significant differences between intergroup ($P > 0.05$) (**Figure 6**).

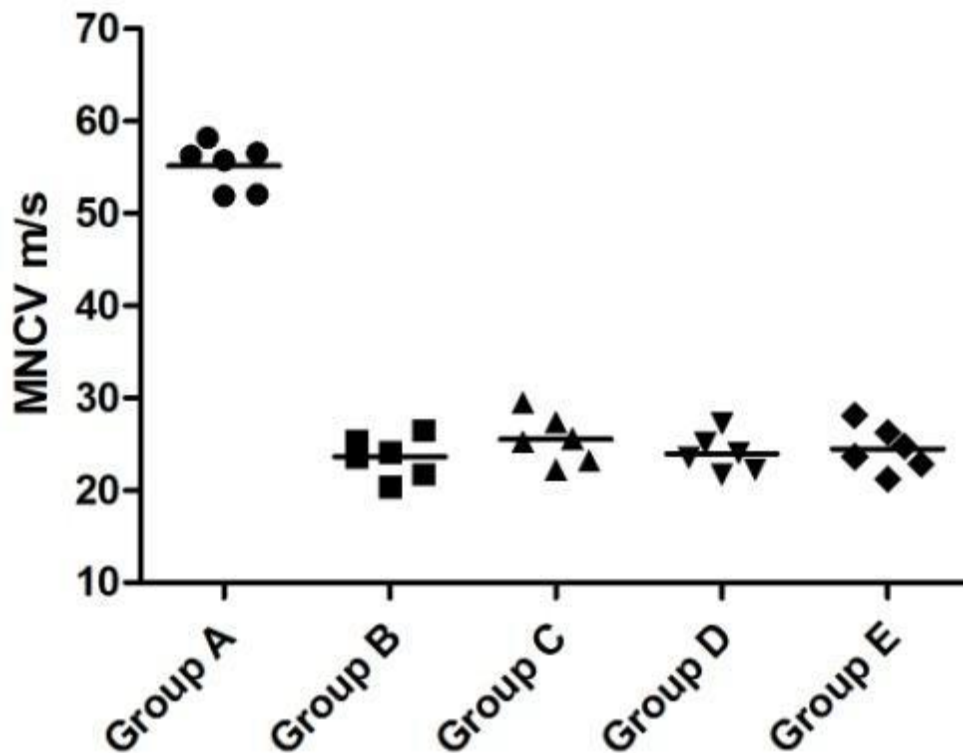


Figure 6. The MNCV values in each group at postoperative 12 weeks. (A) normal common peroneal nerve; (B) common peroneal nerve sutured by epineurium on both proximal and distal anastomotic stoma; (C) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on distal anastomotic stoma; (D) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on proximal anastomotic stoma; (E) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma. The values were no significant differences between group B, C, D and E ($P > 0.05$)($n=6$).

The maximum tetanic contraction strength

The maximum tetanic contraction force in normal group (group A) was $97.25 \pm 2.47\%$, in experimental groups were $56.65 \pm 4.23\%$ (group B), $69.32 \pm 2.62\%$ (group C), $63.19 \pm 3.73\%$ (group D), and $80.24 \pm 4.49\%$ (group E) separately (**Table 2**).The maximum tetanic contraction force of tibialis anterior muscles in group of biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma were superior to other experimental groups ($P < 0.05$) (**Figure 7**).

Table 2. The maximum tetanic contraction force of bilateral tibialis anterior muscles

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E
Right side	39.49 ± 1.58	23.24 ± 1.78	28.13 ± 1.18	26.24 ± 2.30	31.66 ± 1.73
Left side	40.60 ± 1.09	41.04 ± 1.31	40.58 ± 1.24	41.48 ± 1.92	40.27 ± 1.44

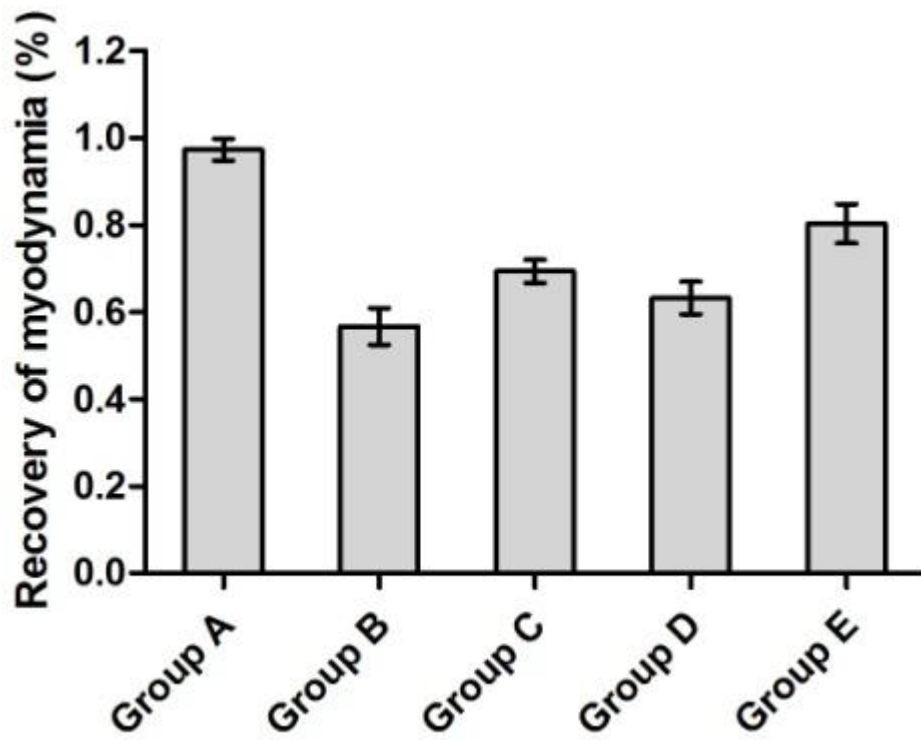


Figure 7. The recovery of myodynamia in each group at postoperative 12 weeks. (A) normal common peroneal nerve; (B) common peroneal nerve sutured by epineurium on both proximal and distal anastomotic stoma; (C) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on distal anastomotic stoma; (D) common peroneal nerve sutured by

biodegradable conduit small gap tubulization on proximal anastomotic stoma; (E) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma. The value in group E was better than group B, C and D ($P<0.05$)($n=6$).

Wet muscle weight measurement

The wet weight ratio of tibialis anterior muscle in normal group (group A) was $97.79\pm 1.65\%$, in experimental groups were $49.72\pm 2.2\%$ (group B), $58.46\pm 1.69\%$ (group C), $53.82\pm 4.99\%$ (group D), and $63.56\pm 2.80\%$ (group E) separately. The wet weight ratio of tibialis anterior muscles in group of biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma were superior to other experimental groups ($P<0.05$) (Table 3; Figure8).

Table 3. The wet weight ratio of tibialis anterior muscle (g)

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E
Right side	1.12 ± 0.07	0.57 ± 0.02	0.67 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.72 ± 0.07
Left side	1.14 ± 0.07	1.16 ± 0.06	1.14 ± 0.07	1.17 ± 0.06	1.13 ± 0.07

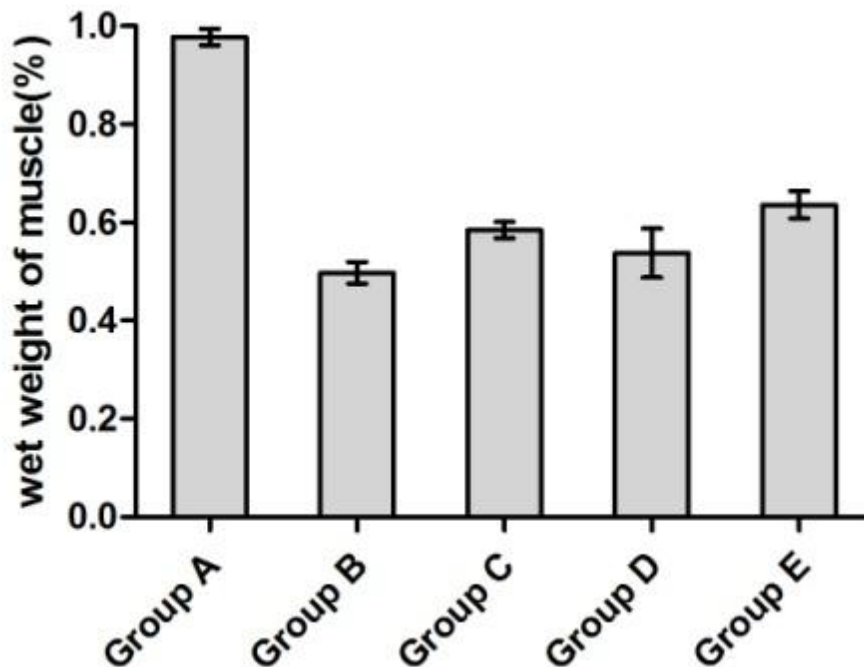


Figure 7. The wet weight ratio of tibialis anterior muscle in each group at postoperative 12 weeks. (A) normal common peroneal nerve; (B) common peroneal nerve sutured by epineurium on both proximal and distal anastomotic stoma; (C) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on distal anastomotic stoma; (D) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on proximal anastomotic stoma; (E) common peroneal nerve sutured by biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma. The value in group E was better than group B, C and D ($P<0.05$) ($n=6$).

Discussion

Along with the increase of peripheral nerve injury, current therapeutic method could not reach the requirements of big expectation of patients, especially for large or long peripheral nerve defects. Autologous nerve transplantation for treatment of peripheral nerve defect was firstly established and introduced by Philipeaux and Vulpain in 1870 (Millesi, 1972) and regarded as “golden standard” for neuro-rehabilitation. Compared with allogeneic nerve transplantation, artificial nerve transplantation, or epineurium suture, autologous nerve transplantation has the following advantages: with this

improvised method, regenerating axon can orderly arrange and grow toward remote target zone, receive a blood supply quickly and not generate immunoreaction, and possess normal diameter, myelination and conduction of action potential in a relatively short period (Gaudin et al., 2016). However, autologous nerve transplantation inevitably has several shortcomings including limited quantity, small nerve diameter and inaccuracy connection between motor and sensory nerve, which may inhibit the therapeutic efficacy of operation. To look for the best proportion of nerve transplantation, another study in our lab has been carried out to compare the different effects of using single sural nerve transplantation and multiple sural nerve transplantation to repair long common peroneal nerve injury. The results showed that single sural nerve transplantation could meet the demand of neurological functional recovery. Therefore, we select single sural nerve as the transplantation nerve to repair long common peroneal nerve injury in this study.

To reduce the inaccuracy connection between motor and sensory nerve and further improve the therapeutic efficacy of peripheral nerve injury, Jiang BG of our lab firstly reported the innovative nerve repair method of small gap sleeve suturation, which could create enough selective growth space for nerve regeneration, reduce the scar tissue in anastomotic stoma, prevent the formation of neurofibroma, and greatly improve the accurate connection between injury nerves (Jiang et al., 2006; Yu et al., 2016; Yu et al., 2015; Zhang et al., 2013). In our previous study, with independent intellectual property right of chitin biological tube, we have confirmed the possibility of using small gap sleeve suturation instead of traditional suture method from different perspective of neuroelectrophysiology, histological and ethology (Jianping P et al., 2012; Kou et al., 2011; Li et al., 2014; Wang et al., 2012; Wei et al, 2009; Wei S et al., 2009). In this study, we went a little further to investigate and compare the effect of biodegradable conduit small gap tubulization on varying anastomotic stoma combined with single autologous sural nerve on the repair of long common peroneal nerve defect (10mm), to look for better ways to improve peripheral nerve regeneration and function recovery.

After postoperative 12 weeks, in this study, our results showed that regenerated nerve in group of biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma (1817 ± 31) was more than group of proximal anastomotic stoma (1645 ± 30 , $P < 0.05$), group of distal anastomotic stoma (1719 ± 32 , $P < 0.05$), and group of epineurium suture (1542 ± 52 , $P < 0.05$), but less than normal group (2047 ± 66 , $P < 0.05$). The maximum tetanic contraction force and wet weight ratios of tibialis anterior muscles in group of biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma were also better than other experimental groups ($P < 0.05$). However, the peroneal nerve functional index (PFI) and regenerated motor nerve conduction velocity (MNCV) in experiment groups had no significant statistical differences between each other.

When peripheral nerve injury occurred, axons will start regeneration reaction immediately as long as the neurons survive. The neonatal axons include not only the initial axons but also collateral branches of adjacent fiber, so in a certain extent and time, regeneration of peripheral nerve possess "multiple regeneration", which refers to the number of new axis buds can far outstrip the number of injury proximal nerve fiber. Millesi (Millesi et al., 1972) reported that a single autologous nerve could restore median nerve injury and ulnar nerve injury simultaneously. Our study gave new supporting evidence that even a smaller nerve segment would be able to repair a larger nerve defect. What's more, to reduce the wrong nerve connection rate, we designed and incorporated biodegradable conduit small gap tubulization on varying anastomotic stoma combined with single autologous nerve to repair long peripheral nerve injury. Our aim was to provide a special microenvironment and

growing space so the regenerated axons could decide and work by subjective initiative. In our study, the nerve function and muscle recovery in group of biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma were superior to other experimental groups that support our hypothesis. It's pointed out that only biodegradable conduit small gap tubulization could not repair (>5mm) long peripheral nerve injury well, which has been proved by another researcher in our previous study, that is why we transfer our visual field to combine with autologous nerve.

Based on the experiment and discussions above in our study, we can draw the following conclusions: when use autologous sural nerve repair long common peroneal nerve injury, performing biodegradable conduit small gap tubulization on both proximal and distal anastomotic stoma may be a better choice for nerve regeneration and functional recovery. However, due to the defects of laboratory animals study, increasing high-quality clinical studies were still required in future.

Declaration of interest

This study was supported by the Chinese National Ministry of Science and Technology 973 Project Planning (No.2014CB542200), and the National Natural Science Fund (31471144, 31571002, 31571236, 31571235, 31640045, 31671246, 31671248, 81372044, 81671215,). The Ministry of Education Innovation Team (IRT 1201). The key national development planning project (2016YFC1101604). The co-first authors are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Bolton WD, Ben-Or S, Hale AL, Stephenson JE. (2017). Reconstruction of a Long-Segment Tracheal Defect Using an AlloDerm Conduit. *Innovations (Phila)*. 12(2):137-139.
- Braga Silva J, Marchese GM, Cauduro CG, Debiasi M.(2017). Nerve conduits for treating peripheral nerve injuries: A systematic literature review.*Hand Surg Rehabil*. 36(2):71-85.
- Chen C, Tang P, Zhang L. (2015). Reconstruction of a large soft-tissue defect in the single finger using the modified cross-finger flap.*J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 68(7):990-4
- Chen Y, Weng J, Han D, Chen B, Ma M, Yu Y, Li M, Liu Z, Zhang P, Jiang B. (2016). GSK3 β inhibition accelerates axon debris clearance and new axon remyelination.*Am J Transl Res*. 8(12):5410-5420.
- Dijkstra, J. R., Meek, M. F., Robinson, P. H., & Gramsbergen, A. (2000). Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods*, 96(2), 89-96.
- Gaudin, R., Knipfer, C., Henningsen, A., Smeets, R., Heiland, M., & Hadlock, T. (2016). Approaches to Peripheral Nerve Repair: Generations of Biomaterial Conduits Yielding to Replacing Autologous Nerve Grafts in Craniomaxillofacial Surgery. *Biomed Res Int*, 2016, 3856262. doi:10.1155/2016/3856262
- Jiang B., Zhang P., Zhang D., Fu Z., Yin X., & Zhang H. (2006). Study on small gap sleeve bridging peripheral nerve injury. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 34(1), 55-74.
- Jiang CQ, Hu J, Xiang JP, Zhu JK, Liu XL, Luo P. (2016). Tissue-engineered rhesus monkey nerve grafts for the repair of long ulnar nerve defects: similar outcomes to autologous nerve grafts.*Neural Regen Res*. 11(11):1845-1850.
- Jianping, P., Xiaofeng, Y., Yanhua, W., Zhenwei, W., Yuhui, K., Chungui, X., . . . Baoguo, J. (2012). Different multiple regeneration capacities of motor and sensory axons in peripheral nerve. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 40(5), 309-316. doi:10.3109/10731199.2012.657205
- Kou, Y., Zhang, P., Yin, X., Wei, S., Wang, Y., Zhang, H., & Jiang, B. (2011). Influence of different distal nerve degeneration period on peripheral nerve collateral sprouts regeneration. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 39(4), 223-227. doi:10.3109/10731199.2010.533127
- Long B, Koyfman A. The emergency medicine approach to transplant complications.(2016).*Am J Emerg Med*.34(11):2200-2208.
- Levi AD, Burks SS, Anderson KD, Dididze M, Khan A, Dietrich WD.(2016). The Use of Autologous Schwann Cells to

- Supplement Sciatic Nerve Repair With a Large Gap: First in Human Experience. *Cell Transplant*. 25(7):1395-403.
- Li, Q., Zhang, P., Yin, X., Han, N., Kou, Y., & Jiang, B. (2014). Early sensory protection in reverse end-to-side neurorrhaphy to improve the functional recovery of chronically denervated muscle in rat: a pilot study. *J Neurosurg*, 121(2), 415-422.
doi:10.3171/2014.4.JNS131723
- Millesi, H., Meissl, G., & Berger, A. (1972). The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg Am*, 54(4), 727-750.
- Millesi, H. (1979). Microsurgery of peripheral nerves. *World J Surg*, 3(1), 67-79, 128-129.
- Rinker B, Zoldos J, Weber RV, Ko J, Thayer W, Greenberg J, Leversedge FJ, Safa B, Buncke G.(2017). Use of Processed Nerve Allografts to Repair Nerve Injuries Greater Than 25 mm in the Hand. *Ann Plast Surg*. 78(6S Suppl 5):S292-S295.
- Singh AK. Peripheral nerve injuries - A call for better evaluation and preventive measures.(2017). *Neurol India*. 65(3):556-557.
- Shah SR, Young S, Goldman JL, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG.(2016). A composite critical-size rabbit mandibular defect for evaluation of craniofacial tissue regeneration. *Nat Protoc*. 11(10):1989-2009.
- Shin, R. H., Vathana, T., Giessler, G. A., Friedrich, P. F., Bishop, A. T., & Shin, A. Y. (2008). Isometric tetanic force measurement method of the tibialis anterior in the rat. *Microsurgery*, 28(6), 452-457.
- Takahashi M, Kasai T, Nishisho T, Takai M, Endo H, Hirose T, Sairyō K.(2014). Reverse adipofascial flap after resection of a malignant perineurioma of the forearm. *Orthopedics*. 37(7):e661-4.
- Wang, Y., Zhang, P., Yin, X., Peng, J., Kou, Y., Zhang, Z., . . . Jiang, B. (2012). Characteristics of peripheral nerve regeneration following a second nerve injury and repair. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 40(4), 296-302.
doi:10.3109/10731199.2011.652259
- Wei, S., Yin, X., Kou, Y., & Jiang, B. (2009). Lumbricus extract promotes the regeneration of injured peripheral nerve in rats. *J Ethnopharmacol*, 123(1), 51-54. doi:10.1016/j.jep.2009.02.030
- Xu, C., Kou, Y., Zhang, P., Han, N., Yin, X., Deng, J., . . . Jiang, B. (2014). Electrical stimulation promotes regeneration of defective peripheral nerves after delayed repair intervals lasting under one month. *PLoS One*, 9(9), e105045. doi:10.1371/journal.pone.0105045
- Yu, Y., Zhang, P., Yin, X., Han, N., Kou, Y., & Jiang, B. (2015). Specificity of motor axon regeneration: a comparison of recovery following biodegradable conduit small gap tubulization and epineurial neurorrhaphy. *Am J Transl Res*, 7(1), 53-65.
- Yu, Y., Zhang, P., Han, N., Kou, Y., Yin, X., & Jiang, B. (2016). Collateral development and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. *Am J Transl Res*, 8(7), 2897-2911.
- Zhang P., Zhang C., Kou Y., Yin X., Zhang H., & Jiang, B. (2009). The histological analysis of biological conduit sleeve bridging rhesus monkey median nerve injury with small gap. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 37(2), 101-104.
- Zhang P., Han N., Wang T., Xue F., Kou Y., Wang Y., Jiang, B. (2013). Biodegradable conduit small gap tubulization for peripheral nerve mutilation: a substitute for traditional epineurial neurorrhaphy. *Int J Med Sci*, 10(2), 171-175.

类别：基础学组
681346



重组骨形态发生蛋白-2 通过 PI3K/AKT 信号通路抑制肝癌细胞系 SK-HEP-1 细胞增殖

刘书中¹, 劳立峰¹

1. 北京协和医院

2. 上海交通大学医学院附属仁济医院骨科

目的: 研究重组人骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2) 对肝癌细胞系 SK-HEP-1 生物学行为的作用及其机制。

方法: 体外试验: 肝细胞癌 SK-HEP-1 细胞系增殖能力通过 CCK-8 试验与流式细胞分析检测, 利用 Western blot 技术检测 BMP-2 的信号转导通路。体内试验: 将 20 只裸鼠平均分为实验组 (10 只) 和对照组 (10 只), 实验组成瘤方案为肝癌 SK-HEP-1 细胞+BMP-2, 对照组成瘤方案为肝癌 SK-HEP-1 细胞, 分别于裸鼠皮下及股骨内注射。每周测量实验组及对照组裸鼠成瘤大小、体积, 行股骨 X 线检查评估裸鼠股骨内成瘤骨质破坏情况。处死裸鼠并取肿瘤组织行免疫组化、RT-PCR 等检测蛋白表达与基因表达情况。

结果: 体外实验表明重组人骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2) 对肝癌细胞系 SK-HEP-1 具有显著抑制作用, 该作用与肝癌细胞系中 PI3K/AKT 信号传导通路密切相关, 并通过调节多种细胞周期蛋白的表达实现。

体内试验通过免疫组化检测经 BMP-2 处理与否小鼠荷瘤组织中 ki-67 的表达差异, 发现 BMP-2 处理后可显著降低组织中 ki-67 的表达水平。

结论: 研究从基础水平证实重组人骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2) 对肝癌细胞系 SK-HEP-1 生长具有显著抑制作用, 并未显著增加肝癌的患病风险, 为临床上脊柱融合手术及骨不连等治疗中应用重组人骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2) 提供了理论基础。

关键词: BMP-2, PI3K/AKT, 肝细胞癌, SK-HEP-1 细胞系, 细胞增殖

关键字

参考文献

类别: 基础学组

687812



含银骨水泥间隔器的制备与表征

吴浩, 李卓扬, 曹永平

北京大学第一医院

目的: 制备具有良好力学性能的纳米银及含壳聚糖/羧甲基壳聚糖纳米银的复合材料骨水泥间隔器, 并比较其抗菌性能的差异。

方法: 通过氧化还原法制备壳聚糖/羧甲基壳聚糖纳米银, 并将其混入 PMMA 骨水泥中, 得到试验组: 10wt%的纳米银组、壳聚糖纳米银组、羧甲基壳聚糖纳米银 PMMA 组及对照组: 普通 PMMA 组和含庆大霉素 PMMA 组, 并分别测量这 5 组样品浸泡前后的机械性能, 表征其抗压强度及抗弯曲强度, 并用扫描电镜进行形貌表征。

将试验组分为 1%、5%及 10wt 浓度梯度的 3 组: 纳米银组、壳聚糖纳米银组及羧甲基

壳聚糖纳米银 PMMA 骨水泥组，对照组分为 4 组：普通 PMMA 组，含庆大霉素 PMMA 组，壳聚糖 PMMA 组及羧甲基壳聚糖 PMMA 组。用金黄色葡萄球菌及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）作菌种对样品进行抗菌性检测，并通过扫描电镜观测材料表面生物膜形成情况。

结果：机械性能表征结果：浸泡前，纳米银、壳聚糖纳米银、羧甲基壳聚糖纳米银组的机械性能均明显优于对照组，抗压强度分别提高 7.1%、20.1% 及 26.1%。浸泡后，纳米银组的机械性能无明显改变。壳聚糖纳米银组及羧甲基壳聚糖纳米银组的机械性能有所下降，其中抗压强度分别下降 16.5% 及 16.2%。扫描电镜可以发现浸泡前，后两组表面较对照组更为紧致，平整，浸泡后则出现更多的孔隙。

抗菌性能表征：1、纸片实验结果：对金葡菌，5% 及 10%wt 羧甲基壳聚糖纳米银组和庆大霉素组均可观测到抑菌环，直径分别为 17.6、18.5 及 30.3mm，其余各组均无抑菌环存在；对 MRSA，5% 及 10%wt 羧甲基壳聚糖纳米银组可观测到抑菌环，直径分别为 14 及 15.6mm，其余各组均无抑菌环存在。2、振荡烧瓶法：对金葡菌，5% 及 10%wt 羧甲基壳聚糖纳米银组和庆大霉素组表现出良好的抑菌性能，抑菌率分别为 99.7%、99.9% 及 100%；对 MRSA，仅 10%wt 羧甲基壳聚糖纳米银组表现出抑菌作用，抑菌率为 89%。用扫描电镜观测 MRSA 细菌生物膜形貌可以发现，仅 10%wt 羧甲基壳聚糖纳米银组样品表面未见明显细菌生物膜形成。

结论：5%wt 以上的羧甲基壳聚糖纳米银骨水泥与庆大霉素骨水泥具有相同的良好的抗金黄色葡萄球菌性能。10%wt 的羧甲基壳聚糖纳米银骨水泥具有良好的抗 MRSA 及其细菌生物膜形成性能。

关键字

参考文献

类别：基础学组

688047



一种新型髌骨骨折内固定物——生物力学实验

韩帅, 付中国, 姜保国

北京大学人民医院

髌骨骨折是一个相对常见的骨折类型，占全身骨折的 1%，在 20-50 岁男性人群中发生率最高。髌骨是膝关节一个必不可少的部分，所以髌骨骨折的治疗和髌骨的保留对于膝关节功能至关重要。外科手术的目的即尽可能多保留大部分髌骨，解剖复位并辅以坚强内固定，恢复膝关节屈伸功能，早期活动。克氏针张力带固定是经典的髌骨骨折内固定技术，但是术后早期骨折块移位达 22-30%，内固定的失败导致长期预后并不理想。同时，由克氏针引起皮肤激惹，从而造成术后疼痛的问题也是非常普遍，所以，有高达 65% 的病例需要再次手术取出克氏针。针对这一问题，我们设计了一种新型的髌骨骨折内固定物——髌骨钩板，并通过尸体骨生物力学实验，与克氏针张力带比较，评估新内固定物的生物力学性能。

16个福尔马林防腐保存的膝关节标本，按骨密度和年龄进行匹配后，分为钩板组和张力带组。于股骨上三分之点及胫骨平台下25cm截骨，保留膝关节囊、股四头肌腱、髌骨及髌韧带，胫骨远端配重3.2kg。骨折模型为髌骨横行骨折（OTA分型34-C1.1）。张力带组根据A0内固定原则，使用2.00mm克氏针和1.25mm钢丝张力带进行“8”字张力带固定。钩板组使用专用导航器将钩板从髌骨下极植入，最后用3.5mm加压螺钉固定。

力学实验为疲劳试验。将股骨近端水平固定于力学机上，通过钢丝绳和定滑轮将股四头肌腱和传感器连接起来，施加拉力载荷使膝关节从屈曲90°到完全伸展，反复100循环，循环速度为50mm/min。记录每个样本从屈曲90°到完全伸展的位移量及最大拉力值，第1循环和第100循环后髌骨骨折缝的平均宽度。统计分析使用SPSS 20.0进行单因素方差分析和t检验。

两组从屈曲90°到完全伸展的位移量（ $p = 0.294$ ）及最大拉力值（ $p = 0.853$ ）无统计学差异。钩板组和张力带组第1循环后骨缝宽度分别为 0.54 ± 0.72 mm和 0.83 ± 0.74 mm， $p = 0.440$ ，无统计学差异；第100循环后骨缝宽度分别为 2.97 ± 1.39 mm和 1.53 ± 0.93 mm， $p = 0.029$ ，具有明显统计学差异。

在100循环的疲劳试验后，髌骨钩板的骨折固定效果明显优于克氏针张力带固定，推荐其用于临床髌骨骨折的固定。

关键字

参考文献

类别：基础学组

689012



小剂量葡萄球菌A蛋白的生物安全性研究

王东, 周君琳

首都医科大学附属北京朝阳医院

实验目的: 评估腹腔注射1mg/kg葡萄球菌A蛋白(SPA)对机体的影响

实验方法: 选用wistar大鼠作为研究对象。取60只wistar大鼠，随机平均分为3组，A组为SPA1mg/kg腹腔注射组，B组为无菌生理盐水腹腔注射组，C组为空白对照组。记录大鼠腹腔注射SPA后每隔20分钟的体温；每隔2小时尾静脉取血，检测细胞因子；每隔6小时尾静脉取血，进行血生化检查；24小时后处死所有wistar大鼠，取肝脏行病理切片检查。

实验结果: 在大鼠体温变化方面，腹腔注射1mg/kg SPA后大鼠体温与未注射SPA或者腹腔注射无菌生理盐水相比，体温升高明显，具有统计学差异。大鼠血清细胞因子方面，腹腔注射1mg/kg SPA的大鼠与未注射SPA或者腹腔注射无菌生理盐水的大鼠相比，IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 值升高明显，具有统计学差异。大鼠血生化方面，各指标均在正常范围内，在动物血生化检测项目中未发现异常指标。肝脏组织切片镜下观察未发现结构改

变。

结论: (1) 对 wistar 大鼠腹腔注射 1mg/kg SPA, 大鼠体温及血中 IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 均有明显升高, 但在腹腔注射后 24 小时都恢复至正常。(2) 1mg/kg SPA 并没有造成大鼠血生化各指标的异常以及肝脏组织结构的变化, 在一定程度上表明 1mg/kg SPA 并没有对大鼠各脏器造成明显损伤。

关键字

参考文献

类别: 基础学组

700759



应用 6%纳米二氧化硅改性氨基丙烯酸酯抗菌胶的抗菌性研究

陈文, 杨玉明, 肇刚, 滕立佳
解放军第二六一医院

目的: 研究 6%纳米二氧化硅改性氨基丙烯酸酯抗菌胶的抗菌性能。

方法: 采用滤纸片法测试 6%纳米二氧化硅/抗菌胶对金黄色葡萄球菌 (ATCC29213) 的抑菌性能, 以未改性的抗菌胶作为对照, 测量抑菌圈直径。制作大鼠外伤动物模型, 分别用改性后的抗菌胶及纱布包扎处理伤口, 观察伤口的大体情况, 做血常规检查及病理切片, 并分别进行白细胞计数。

结果: 6%纳米二氧化硅/抗菌胶组第 5 天的抑菌圈直径为 $28.61 \pm 0.91\text{mm}$, 抗菌胶组为 $28.24 \pm 2.69\text{mm}$ ($P > 0.05$)。动物实验方面, 在血常规及创面组织病理切片中, 6%纳米二氧化硅/抗菌胶处理伤口的感染情况均低于纱布包扎处理伤口 ($P < 0.05$)。

结论: 6%纳米二氧化硅改性的抗菌胶具有较好的抗菌性能 (抗金黄色葡萄球菌)。

[关键词]

氨基丙烯酸酯; 抗菌胶; 纳米二氧化硅; 三氯生

关键字

参考文献

类别: 基础学组

704727



国人前外侧韧带的解剖学确认及临床研究

赵峰, 张星火, 张亚奎, 赵福龙, 曾纪洲

首都医科大学附属北京潞河医院骨关节外科与运动医学科

目的: 以国人尸体为研究对象, 通过尸体解剖探寻国人膝关节前外侧韧带的出现率、解剖学特点及周围组织毗邻关系, 为指导临床实践工作提供解剖学依据。

方法: 将取自 30 具不同截肢尸体的膝关节标本进行分层次解剖, 以膝关节关节囊层为解剖终点, 寻找前外侧韧带纤维, 解剖游离后拍照, 观察并描述前外侧韧带的起止点、与周围组织毗邻关系、长度、宽度、形态及出现频率。

结果: 30 例膝关节标本中, 膝关节前外侧韧带出现率为 10%, 2 例韧带起自股骨外上髁、外侧副韧带起点前下方, 1 例起自外侧副韧带起点后上方, 3 例韧带均与外侧副韧带共用部分纤维束作为起点。此韧带自起点处向前下方走行, 紧密连接外侧半月板体部中 1/3, 止于 Gerdy's 最高点与腓骨头尖端连线的中点附近胫骨平台边缘。3 例标本中, 止点距 Gerdy's 结节最高点平均 19.6mm (18-21mm), 韧带止点宽度约 4.2-6.3mm, 韧带长度平均 28.6mm (24.3-30.8mm), 其长度与胫骨平台宽度大体呈正相关。前外侧韧带走行过程中与关节囊等周围组织界限不清, 无法测量其韧带宽度。27 例未发现前外侧韧带标本中, 前外侧方向的关节囊较周围关节囊增厚约 0.8-1mm。

结论: 前外侧韧带在国人膝关节内发现概率较低, 但其走行方向上的关节囊均有增厚, 提示膝关节前外侧软组织对维持膝关节稳定性存在一定作用。前外侧韧带的走行与解剖特点对临床重建前外侧软组织结构损伤的病例具有一定指导意义。

关键字

参考文献

类别: 基础学组

709704



基于羧基化 PLGA 纳米骨修复材料的制备及相关性能研究

刘建恒, 唐佩福, 张里程, 崔翔, 李明

解放军总医院

摘要

目的 探讨基于羧基化 PLGA 纳米骨修复材料的制备方法, 并对纳米骨修复材料的相关表征、力学性能、降解性能、生物相容性进行检测以及体内骨缺损修复性能进行初步研

究。

方法 基于羧基化 PLGA，制备 PLGA-COOH/HAP 和 PLGA-COOH/TCP 纳米复合支架。研究其相关表征及力学性能和降解性能。复合支架与 MC3T3-E1 细胞体外共培养定性和定量分析支架对细胞增值、细胞周期及黏附性能的影响。通过兔颅骨临界性骨缺损模型评价支架无负荷情况下骨缺损修复性能。术后 2 周，4 周，8 周，12 周分批处死动物，进行 X 线，Micro-CT，组织学观察及生物力学测试。

结果：核磁氢谱和分子量检测显示，羧基被成功接枝在 PLGA 聚合物末端，PLGA 聚合物分子量 120000 左右。SEM 和 Micro CT 扫描显示支架具有多孔结构，孔径均一。EDX 证实两种支架的特征性元素均为钙、磷和碳。力学性能测试显示两种支架的抗压缩和抗弯曲强度没有明显差异。降解实验显示随着时间延长，两种支架重量均减低；支架中无机成分晶体结构稳定；PLGA 聚合物分子量随时间延长而减低。CCK-8 和流式结果显示，两种支架具有良好的生物相容性和促细胞增值作用。扫描电镜和激光共聚焦结果显示，复合支架和羧基化 PLGA 均有利于细胞的黏附，且细胞形态较好。复合支架具有修复无负荷情况下兔颅骨临界性骨缺损的能力，与单纯 PLGA 聚合物比，更有利于新生骨生成和骨改建。

结论：成功制备基于羧基化 PLGA 的纳米复合材料，其具有较好的细胞生物相容性及促细胞增值无明显的细胞毒性，体内具有较强的骨修复和骨改建能力，可作为一种理想的骨组织工程修复材料。

关键词：骨组织工程，聚（乳酸-羟基乙酸）聚合物，纳米羟基磷灰石，纳米磷酸三钙

关键字

参考文献

类别：基础学组

710168



兔离断后肢二甲基亚砷最佳灌注浓度的探究

朱泽兴, 张树明, 乔林, 王晓宇, 宋迪煜, 张楠

解放军火箭军总医院骨科

目的:在 17%v/v-20%v/v 之间，以 1%v/vDMSO 浓度梯度灌注兔离断后肢，对各组织部位的保护剂浓度进行定量分析对比，评估灌注效果，找出最佳灌注浓度，为冷冻保护剂的灌注使用提供参考，奠定深低温保护复合组织有效使用冷冻保护剂方法学基础。**方法:**取健康新西兰成年大白兔 9 只，随机分为三组：17%v/v、18%v/v、19%v/v 组，每组六只后肢，在室温、兔生理压力（120mmHg）条件下，将配置好的 17%v/vDMSO 组、18%v/vDMSO 组、19%v/vDMSO 溶液分别灌注兔离断后肢，磁共振波谱分析，经 MestReNova 软件进行数据处理后获得组织内 DMSO 浓度值，数据处理后采用 SPSS20.0 行 q 检验，进行统计学分析。**结果:** 17%v/v DMSO 组皮下和肌肉的组织 DMSO 浓度为 4.03%v/v、7.16%v/v。18%v/v DMSO 组

皮下和肌肉的组织 DMSO 浓度为 6.44%v/v、7.67%v/v。19%v/v DMSO 组皮下和肌肉的组织 DMSO 浓度为 8.31%v/v、9.87%v/v。20%v/v DMSO 组皮下和肌肉的组织 DMSO 浓度为 12.94%v/v、11.81%v/v。**结论：**随着兔离断后肢灌注浓度的升高，组织内 DMSO 浓度也随之升高，呈现正相关关系；在室温、兔生理压力下，最佳离体灌注浓度为 19%v/v，可达到较为均匀、有效的 DMSO 组织内浓度。

关键字

参考文献

类别：基础学组

710704



模拟微重力条件下骨量减少与骨细胞衰老的关系的研究

沙鑫

解放军第 306 医院

目的：研究表明微重力环境会诱导机体骨量丢失同时细胞衰老现象会增加，为了探究骨量丢失与骨髓微细胞衰老现象的相关性，我们在模拟微重力状环境的吊尾小鼠模型身上检测骨髓细胞的衰老水平，并检测相关的细胞衰老相关蛋白 SASP 及 mRNA 水平的变化。**方法：**(1) 建立吊尾小鼠模型来模拟微重力状态，通过吊尾悬挂小鼠 25 天以快速改变小鼠生存条件。通过相关骨代谢指标检测并于对照组对比来验证吊尾小鼠模型的建立。(2) 冲洗出小鼠骨髓中的细胞，通过流式细胞术分离不同的细胞亚型，并通过衰老相关标记因子来检测不同细胞亚群中细胞衰老的程度，与对照组对比分析模拟微重力条件下，细胞衰老的变化。(3) 提取吊尾小鼠骨组织的蛋白和 mRNA，并通过蛋白印记技术和 qPCR 技术来检测相关衰老标记蛋白和 mRNA 的变化。(4) 确认主要影响的分子信号通路，并通过抑制和过表达证实其重要性。

结果：成功建立吊尾小鼠模拟微重力模型，通过骨代谢指标检测证实吊尾小鼠的骨量丢失相较于对照组增加；并检测到吊尾小鼠组骨细胞衰老数量相较于对照组增多趋势；进一步在蛋白水平和 mRNA 水平检测到吊尾小鼠组与对照组相比衰老相关的 p16, p53 基因和 SASP 相关分子的增多。初步确定微重力条件下影响小鼠骨量的分子信号通路。

讨论：那么通过清除衰老细胞来降低骨量丢失也为解决微重力环境下骨丢失提供了一种理论基础。本研究中首次提出了微重力条件下可能与骨髓微环境中的细胞，特别是骨细胞的衰老现象相关，验证这一结论的正确，以致进一步探究微重力下骨丢失的机制，及相关治疗方案的探索。

关键字

参考文献

类别：基础学组

665404



低浓度 TNF- α 对大鼠髓核基质干细胞增殖迁移及分化功能的影响

程实, 林凌瀚, 应金威, 王德利, 阮狄克

中国人民解放军海军总医院

目的 阐明椎间盘退变早期低浓度 TNF- α (肿瘤坏死因子- α) 对大鼠髓核基质干细胞增殖、克隆形成、迁移及向类髓核细胞分化能力等生物学功能的影响

方法 1) 低密度接种法筛选髓核基质干细胞, 流式检测干细胞表型, 三系诱导检测分化能力 2) 应用低浓度 TNF- α (0.1ng/ml、1ng/ml、10ng/ml) 处理髓核基质干细胞, 分别在培养 1, 3, 5, 7 天后应用 CCK-8 检测各组细胞增殖活性, 通过平板集落形成检测各组干细胞自我更新能力, 流式细胞仪检测细胞周期, PCR 检测各组增殖相关抗原 PCNA、P53、P21 的表达水平 3) 通过划痕实验及 Transwell 实验检测各组迁移能力 4) 含不同浓度 TNF- α 的成软骨诱导液诱导髓核基质干细胞向类髓核细胞分化, 21 天后检测软骨小球大小及重量, 阿利新蓝染色观察蛋白多糖含量。通过 Western-Blotting 技术测定低浓度 TNF- α 作用下髓核基质干细胞向类髓核细胞分化指标 Aggrecan、collagen II 及 Sox-9 表达情况

结果 1) 成功分离髓核基质干细胞, 高表达 CD44, CD29, CD90, 低表达 CD34, CD45, 并且具有成脂成骨成软骨的三系分化能力 2) CCK-8 结果显示随着 TNF- α 浓度在 0.1-10ng/ml 逐渐升高, 髓核基质干细胞增殖活力逐渐上升。此外, 随着 TNF- α 浓度在 0.1-10ng/ml 逐渐升高, 集落形成实验显示形成集落数逐渐增多, 细胞周期显示 G2 期细胞逐渐增多。PCR 检测显示 PCNA 表达升高, P53、P21 表达下调, 并具有浓度效应。以上结果表明随着 TNF- α 在 0.1-10ng/ml 增加, 髓核基质干细胞增殖能力上升 3) 随着 TNF- α 浓度增加, Transwell 迁移细胞数逐渐增多, 划痕实验显示迁移距离逐渐增加, 表明细胞迁移能力上升 4) 随着 TNF- α 浓度增加, 软骨小球逐渐减小, 重量逐渐减轻, 阿利新蓝染色面积减小, 程度变浅, Western-Blotting 显示 Aggrecan、collagen II 及 Sox-9 表达逐渐下降趋势, 表明 TNF- α 具有抑制髓核基质干细胞向类髓核细胞分化的作用。

结论 本实验系统的观察了低浓度 TNF- α 对于大鼠髓核基质干细胞生物学特性的影响, 随着 TNF- α 浓度的增加, 髓核基质干细胞增殖及迁移能力逐渐上升, 但分化能力降低。

关键字 椎间盘; TNF- α ; 髓核基质干细胞; 增殖; 迁移; 分化

关键字

参考文献

类别：基础学组

685428



Wnt 信号通路促进大鼠周围神经再生修复过程中神经放大作用的研究

翁鉴, 李明, 于斐, 韩帅, 饶峰, 袁玉松, 李冬冬, 张培训, 殷晓峰, 姜保国
北京大学人民医院

目的: 研究 Wnt 信号对周围神经再生修复过程中神经放大作用的影响。

方法: 本实验采用 8 周大健康雌性 SD 大鼠, 平均随机分为正常组, 小间隙套接神经放大模型组, 模型组内分氯化锂治疗组和对照组, 分别在术后 12 周小鼠走步行道实验分析胫神经功能指数(TFI), 取材套管近远端神经做钼酸染色形态学分析, 手术侧腓肠肌做 HE 染色分析, 套管内的神经切片做 β -catenin 免疫组织化学染色, 检测 GSK3 β 的酶抑制剂氯化锂对神经放大现象的作用。

结果: 通过组织形态学分析, 氯化锂治疗组的平均髓鞘和轴突的直径均比对照组大, 髓鞘也比对照组厚, 神经再生放大率比高于对照组; 肌肉 HE 染色结果表明氯化锂组的肌纤维直径比对照组长; 跑道实验分析得出氯化锂治疗并没有加快胫神经功能的恢复; 免疫组织化学染色结果显示氯化锂治疗组再生的神经组织中 WNT 信号增强。

结论: GSK3 β 酶抑制剂如氯化锂可以增强神经损伤后再生修复过程中的放大效应, 而且验证了氯化锂促进这种放大效应是通过激活 Wnt 信号通路。

关键字

参考文献