[13] Rudmik LR，Magliocco AM. Molecular mechanism of hepatic metastasis in colorectal cancer [J]. J Surg Oncol，2005，92 (4)：347-359.

· 基础研究 ·

仿生聚己内酯-壳聚糖复合骨组织支架的制备研究

福建省福州市第二医院骨科（福州 300007）　翁　艳　郑　竑[1]

【摘　要】　目的　以 CPC（磷酸钙骨水泥）为基体，以 PCL-CS（聚己内酯-壳聚糖）为增强基体支架来制备微结构及力学性能优良的仿生网络结构复合多孔支架。**方法**　采用烧制、减压灌液法和相分离技术制备 PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架并进行表征。以 MTT 法及细胞计数板法分别测定 PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架及 CPC 支架内细胞活力及细胞黏附率。**结果**　PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架孔容 27.62 cm^3/g、平均孔径 378.56 μm、孔隙率 92.14%，比表面积 61.4 m^2/g，支架内各组细胞活力及细胞黏附率随着培养天数的增加而增长，PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架从第 4 天开始的支架内细胞增殖活力较 CPC 支架显著增强（$P<0.05$），从第 2 天开始，PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架细胞黏附率显著高于 CPC 支架（$P<0.05$）。**结论**　成功制备了 PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架，相较于传统的 CPC 骨架，其在力学性能和生物学性能上均有所提高。

【关键词】聚己内酯-壳聚糖/磷酸钙；骨水泥；骨组织工程支架；复合材料

【中图分类号】R608　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1002-2600(2019)05-0123-03

在替代与修复骨组织的众多材料中，骨组织工程支架作为新兴材料对于骨组织缺损修复起着至关重要的作用。目前，在骨组织工程支架中应用广泛的磷酸钙骨水泥（CPC）比传统材料具有任意塑形、降解速度慢、操作方便等优点，但其韧性低、脆性差、机械性能低，因此研究性能更好的材料刻不容缓。

本研究以 CPC 为基础物，以聚己内酯-壳聚糖（PCL-CS）为增强物，利用壳聚糖（CS）、聚己内酯（PCL）和 CPC 材料的互补性，不同材料自身结构及降解速率的差异性来构建复合型组织工程材料，并对聚己内酯-壳聚糖磷酸钙骨水泥复合骨组织工程支架的结构进行表征，同时考察其生物相容性，为聚己内酯-壳聚糖磷酸钙骨水泥复合骨组织工程支架在替代及骨修复中的应用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　试剂与仪器：α-磷酸三钙（α-TCP）、二水磷酸氢钙（DCPD）（湖北鑫润德化工有限公司）、固相添加剂羟基磷灰石（HA）（北京德科岛金科技有限公司）、无水 $CaCO_3$（北京化工有限公司）、Na_2HPO_4（国安化学化工有限公司）、壳聚糖（CS）（西安瑞禧生物科技有限公司）、聚己内酯-壳聚糖（PCL）（深圳市光华伟业实业有限公司）、乙醇、戊二醛、豚鼠、新西兰兔、胎牛血清、DMEM-α 培养基；差示扫描量热仪（北京恒久实验设备有限公司）、X-射线衍射仪（奥林巴斯仪器有限公司）、全自动比表面积和孔径分布分析仪（美国麦克仪器公司）、S3500 激光粒度仪（美国麦奇克有限公司）、场发射扫描电镜［复纳科学仪器（上海）有限公司］、深温冷冻粉碎机（青岛微纳粉体机械有限公司）等。

1.2　方法：

1.2.1　CS/CPC 多孔支架的制备：

1.2.1.1　α-TCP 体系 CPC 固相粉末及固化液的配制：按粉体重量比 100∶6∶6∶6 称取 α-TCP、DCPD、HA 和 $CaCO_3$，将它们放入陶瓷研钵中混合研磨 3 h，过筛后得到平均粒径为 4 μm 的 α-TCP 体系 CPC 固相粉末，随后配制 2%的 Na_2HPO_4 溶液作为固化液。

1.2.1.2　CS/CPC 的注塑：将干燥后的 α-TCP 体系 CPC 粉末和 CS 微球与 1 L Na_2HPO_4 固化液混合，装入准备好的圆柱形器具中凝固，35 ℃、95%以上湿度的空气中养护 40～48 h[1]。

1.2.1.3　CS/CPC 多孔支架的烧结：将 CPC 及 CPC/CS 圆柱坯体烘干，20 ℃/min，1 200 ℃实验箱式烧结炉中进行烧结，自然冷却后即得 CPC 多孔支架。

1.2.2　PCL-CS/CPC 多孔复合支架的制备及表征：分别取 5 g PCL 和 CPC/CS 多孔支架按质量比 1∶1 的比例混合后溶解在 0.5 L、5.2%的 TCP 溶液中，其中 PCL 颗粒溶解前需在深温冷冻机中粉碎均匀并煅烧，随后加入 5 mL、6.0%的戊二醛，在减压下灌入备好的 CPC 多孔支架中，采用 TD-4 低速台式离心机（上海卢湘仪离心机仪器有限公司）以 4 000 r/min 离心 4 min 后取出，40 ℃干燥后即得 PCL-CS/CPC 多孔复合支架。利用场发射扫描电镜带能谱仪观察所制备的支架的表面微观形貌及平均孔径，利用全自动比表

基金项目：2018 年福建省自然科学基金面上项目（2018J01358）；2017 年福建省自然科学基金面上项目（2017J01337）；2018 年福建省临床重点专科建设项目

1　通信作者，Email：zhenghong_fj@126.com

面积和孔径分布分析仪测定孔容及比表面积[2]。

1.2.3　PCL-CS/CPC 多孔复合支架的生物相容性：对 PCL-CS/CPC 多孔复合支架进行消毒灭菌，70 ℃无菌下在真空干燥箱中用生理盐水浸提 24 h。重复浸提 2～3 次后，分别以 PCL-CS/CPC 复合工程材料及 CPC 支架材料为实验组和对照组，置于培养瓶中，分别加入同等质量的 100 μL 细胞浓度为 5×10^6/L 的 BMSCs 细胞，置于细胞箱中培养，分别在 1、2、4、6 d 取样，利用 MTT 法测定吸光度（*A*）值，采用计数板法测定支架上黏附的细胞数。计算公式为：细胞活性＝（实验组 *A* 值－背景 *A* 值）/（对照组 *A* 值－背景 *A* 值）×100%，细胞黏附率＝（接种细胞数－未附着细胞数）/接种细胞数×100%。

1.3　统计学分析：用 SPSS 19.0 对结果进行统计学分析。计量资料以均数±标准差表示，结果采用 *t* 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　PCL-CS/CPC 多孔复合支架的形态特征：PCL-CS/CPC 多孔复合支架的表征结果见表 1。

表 1　PCL-CS/CPC 多孔复合支架的表征

项目	孔容/（cm^3/g）	平均孔径/μm	孔隙率/%	比表面积/（m^2/g）
数值	27.62	378.56	92.14	64.1

2.2　PCL-CS/CPC 复合支架对支架内细胞增殖活力的影响：各组细胞数量随着培养天数的增加呈现正比例增长，对照组与实验组从第 4 天开始，两组支架内细胞增殖活力比较，差异有统计学意义（$P<0.05$，表 2），说明随着细胞培养时间的增加，实验组支架更有助于 BMSCS 细胞的增殖。

表 2　PCL-CS/CPC 多孔复合支架对 BMSCS 增殖活力（*A* 值）的影响（$\bar{x}\pm s$）

时间	对照组	实验组
1 d	0.059±0.009	0.054±0.013
2 d	0.167±0.012	0.174±0.016
4 d	0.318±0.016	0.448±0.022*
6 d	0.546±0.068	0.626±0.035*

注：与对照组比较，* $P<0.05$。

2.3　PCL-CS/CPC 复合支架对支架内细胞黏附的影响：两组实验中细胞黏附率均随时间增大而增大，从第 2 天开始，实验组支架上的细胞黏附率显著高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$，表 3），说明实验组支架的多孔结构更有助于 BMSCS 细胞的黏附。

表 3　PCL-CS/CPC 多孔复合支架对 BMSCs 黏附率的影响（%，$\bar{x}\pm s$）

时间	对照组	实验组
1 d	55.14±0.501	53.23±0.430
2 d	67.21±0.646	73.34±0.538*
4 d	71.36±0.612	82.25±0.715*
6 d	76.46±0.703	88.97±0.724*

注：与对照组比较，* $P<0.05$。

3　讨论

骨组织工程对于组织工程而言是一个非常重要的分支，不仅是市场对于骨组织材料巨大的需求量，对于医学上骨缺陷等方面的治疗都具有非常重要的意义。目前临床上使用的多是基于“爬行替代”的机制制造出的人工替骨材料，对于骨缺陷修复、再生等方面仍存在诸多缺陷。为了解决该难题，骨组织工程在此基础上，提出“诱导成骨”机制，将支架材料、骨生长因子和骨组织细胞三者做成一个复合体，其中支架材料作为核心，不仅为两者提供载体和相互作用的支持，还为新生长的骨组织提供一个稳定的保护环境。因此，支架材料对于骨组织工程来说至关重要。

目前市场上的各种支架都有其优缺点。其中应用最广泛的 CPC 较之传统材料虽然具有任意塑形、降解速度慢、操作方便等优点，但仍然具有韧性低、较脆等低机械性能的缺点。天然生物材料如壳聚糖等虽然具有良好的生物相容性和降解性，但单纯的天然生物材料制备的支架材料仍然具有机械效能差、生物响应不足等缺点。高分子聚合物如 PCL 等虽然具有良好的力学性能和可降解性，但存在细胞亲和性较差等缺点。多项研究表明，单一材料很难符合骨组织工程中支架材料的要求，期望通过几种材料互相融合，制备出具有良好性能的支架材料[3-4]。Shen 等[5]将自制硫酸钙/贝壳复合支架与硫酸钙支架分别置入家兔股骨缺损模型中，复合支架组显示出更好的促成骨作用。Han 等[6]将血间质祖细胞负载到纳米羟基磷灰石/硫酸钙/胶原蛋白复合支架上并植入裸鼠背部，8 周后背部有明显骨形成。Depan 等[7]将纳米羟基磷灰石、壳聚糖、海藻酸钠相混合制备了骨修复支架并考察了其对成骨细胞的毒性，结果表明该支架的浸提物对 MC3T3-E1 成骨细胞无毒性，且细胞黏附率、增殖率均显著高于单纯壳聚糖支架。

因此，本研究以 CPC 为基体，PCL-CS 网络结构为增强有机物，利用 CS、PCL 和 CPC 材料的互补性，得到具有“支架中的支架”型结构的材料，充分利用每种材料的自身结构和降解速率的不同，为细胞的种植和组织的长入提供了理想的环境。结果表明，支架内各组细胞活力及细胞黏附率随着培养天数的增加而增长，PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架从第 4 天开始的支架内细胞增殖活力较 CPC 支架显著增强，从第 2 天开始，PCL-CS/CPC 复合骨组织工程支架细胞黏附率同样显著高于 CPC 支架，由此说明复合工程材料的微结构、生物相容性、内部细胞生长环境较单一材料均有显著的提升，这与上述同类研究结果是一致的。下一步将进一步观察成骨细胞在其内部的生长和迁移情况，为该复合支架最终临床上的应用奠定基础。

参考文献

[1] 蔡舒，于显著，许国华，等. α-磷酸三钙骨水泥自固化制备多孔磷酸钙复相陶瓷 [J]. 硅酸盐学报，2006，34（3）：324-328.

[2] 吴学军，冯尔宥. 聚己内酯-壳聚糖磷酸钙骨水泥复合骨组织工程支架的制备及细胞毒性研究 [J]. 福建医药杂志，2018，40（6）：126-128.

[3] 张志达，江晓兵，沈耿杨，等. 磷酸钙及硫酸钙支架在骨组织工程中的研究进展 [J]. 中国组织工程研究，2016，20（8）：1203-1209.
[4] 马新芳，张静莹. 骨组织工程支架材料的研究现状与应用前景 [J]. 中国组织工程研究，2014，18（30）：4895-4899.
[5] Shen Y，Yang S，Liu J，et al. Engineering scaffolds integrated with calcium sulfate and oyster shell for enhanced bone tissue regeneration [J]，ACS Appl Mater Interfaces，2014，6（15）：12177-12188.
[6] Han X，Wu X，Liu H，et al. Ectopic osteogenesis of an injectable nHAC/CSH loaded with blood-acquired mesenchymal progenitor cells in a nude mice model [J]. J Mater Sci Mater Med，2015，26（1）：5338.
[7] Depan D，Shah J，Misra R. Degradation mechanism and increased stability of chitosan-based hybrid scaffolds cross-linked with nanostructured carbon：process-structure-functional property relationship [J]. Polym Degrad Stabil，2013，98（11）：2331-2339.

· 基础研究 ·

基于多重信号放大的 miR-135b 电化学传感器的制备及效果评价

福建省福州市第二医院（福州 350007）　陈冬冬[1]　林佳生[1]　严　伟[1]　张　韬[2]

【摘　要】　目的　通过“多重信号放大策略”构建一种 miR-135b 电化学传感器，并将其用于骨肉瘤标志物 miR-135b 的检测，考察其应用价值。**方法**　设计高特异性茎环捕获探针（CP）并进行末端氨基修饰，再采用 L-赖氨酸通过循环伏安电聚合法在电极表面形成一层纳米膜，将捕获探针与修饰电极通过共价键相连后，通过 T-7 核算外切酶实现靶序列（TP）循环，再通过辅助探针 AP1 和 AP2，使得捕获探针、辅助探针 AP1 和 AP2 三者通过 DNA 纳米长距自组装技术进行级联杂交，从而在电极表面形成“三明治”DNA 双链形态的 miR-135b 电化学传感器，并用其检测骨肉瘤、良性骨肿瘤及健康对照组人群血清中的 miR-135b。**结果**　成功构建了一种基于“多重信号放大策略”的 miR-135b 电化学传感器，其检测峰电流值与 miR-135b 浓度的对数在 1.0～1.0×10^4 pmol/L 范围内成正比，检出限（S/N＝3）为 0.52 pmol/L，具备良好的稳定性、重现性和特异性，在检测人血清时具有良好的灵敏性。**结论**　成功构建了一种基于“多重信号放大策略”的 miR-135b 电化学传感器，其检测限低，准确性好，作为骨肉瘤患者的大规模筛查和连续动态检测具有重大的现实意义。

【关键词】 miR-135b；电化学传感器；多重信号放大策略；骨肉瘤
【中图分类号】 R44　**【文献标识码】** A　**【文章编号】** 1002-2600(2019)05-0125-03

近些年，虽然骨肉瘤的治疗获得了较大的发展，但由于其早期极易发生肺转移，故患者 5 年整体生存率低于 30%，所以骨肉瘤的早期诊断是疾病治疗的关键[1]。生物传感器是利用生物特异性对生物分子进行特异性识别与反应并进行检测的新一代生物检测技术，在肿瘤标志物的快速检测方面得到了迅猛发展[2]。本研究拟利用 microRNA 的结构特点，设计高特异性茎环捕获探针（CP）并进行末端氨基修饰，再采用 L-赖氨酸通过循环伏安电聚合法在电极表面形成一层纳米膜，将捕获探针与修饰电极通过共价键相连后，通过 T-7 核酸外切酶实现靶序列（TP）循环，再通过辅助探针 AP1 和 AP2 形成“多重信号放大”，从而实现对骨肉瘤特异性标记物 microRNA-135b 的灵敏检测，为骨肉瘤的早期临床诊断奠定基础。

1　材料和方法

1.1　实验材料：三电极（玻碳电极、饱和甘汞电极、铂丝电极）系统（北京仪电科技有限公司）；T7 核酸外切酶（美国 Hy-clone 公司）；聚 L-赖氨酸、Al_2O_3 粉（国药集团化学试剂有限公司）、探针成环溶液（宝生物工程（大连）有限公司）；磷酸盐（PBS）缓冲溶液（美国 Sigma）。

1.2　实验方法：

1.2.1　miR-135b 高特异性茎环（HP）捕获探针及辅助探针 AP1、AP2 的设计：从 miRNA 数据库 miRBase（http：//microrna. sanger. ac. uk/）中查找 miR-135b 序列，按照 DNA 互补原则得到其茎环识别探针的环部。然后，将上述环部 DNA 序列和启动区 DNA 序列相结合，选用文献[3]中提供的茎环二级结构预测系统，从而设计出 miR-135b 的最适茎环识别探针，再根据 miR-135b HP 捕获探针设计出辅助探针 AP1、AP2。本实验使用的所有探针 DNA 序列均由上海生工生物技术有限公司合成，其序列如下：

表 1　所用探针的 DNA 序列

序列名称	碱基序列
目标探针(TP)	5′-CTC AAT AAG CAA AAT GGG TTA CCC TAG GGT AAA AA-3′
捕获探针(CP)	5′-TATGGGTAA CCC TTA TTG AG-NH-3′
辅助探针 1(AP1)	5′-TTA CCC ATA GGG TAA TTA TAA CCC TTA GGC-3′
辅助探针 2(AP2)	5′-TTA CCC TTA CCC TTA GCC AAT GGG TTA TAA-3′

基金项目：2016 年福建省自然科学基金面上项目（2016J01594）；2015 年福州市临床重点专科建设项目（骨科）
1　骨病骨肿瘤科；2　骨科研究所，通信作者，Email：james155@foxmail. com