

· 实验研究 ·

三维打印人工骨支架结合 BMP-7 和 VEGF 双重转染干细胞修复兔桡骨缺损

李旭¹ 刘征宇¹ 赵宇¹ 王楠¹ 崔军¹ 郑海峰^{1△}

[摘要] **目的:**通过 3D 打印羟基磷灰石(HA)、丝素蛋白(SF)和聚乳酸(PLA)三元复合材料人工骨支架,结合双重转染骨形态发生蛋白-7(BMP-7)和血管内皮生长因子(VEGF)间充质干细胞(MSCs),构建骨组织工程材料用于修复兔桡骨骨缺损模型,并观察其骨组织修复效果。**方法:**利用 3D 打印技术制作羟基磷灰石/丝素蛋白/聚乳酸复合支架,通过扫描电子显微镜(SEM)观察其微观结构,确定其多孔性和抗压强度。培养间充质干细胞,随后采用双重基因转染技术,将 BMP-7 和 VEGF 导入细胞内,并检测转染后的基因表达水平。将转染后的干细胞与羟基磷灰石/丝素蛋白/聚乳酸支架共培养,并移植至兔桡骨骨缺损模型中。本实验设四组:对照组、单独支架组、单独干细胞组、支架与转染干细胞组。通过碱性磷酸酶(ALP)活性检测、茜素红染色、Micro-CT 扫描、组织切片染色等方法评估各组成骨效果。**结果:**成骨活性(碱性磷酸酶活性):支架+MSC 组的碱性磷酸酶活性显著高于其他组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。支架+MSC 组随着时间推移,成骨活性不断增强。矿化水平:支架+MSC 组矿化面积占比在术后第 4,8,12 周均显著高于其他组($P < 0.01$),尤其在术后第 12 周时达到 71.9%,显示出较强骨矿化能力。骨密度:术后第 12 周,支架+MSC 组骨密度为 0.85 g/cm^3 ,显著高于其他组,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明其成骨效果最优。血管生成:支架+MSC 组血管密度显著高于其他组,差异有统计学意义($P < 0.01$),VEGF 基因转染显著促进血管生成,增强新生骨血供。成骨基因表达:术后第 8 周时,支架+MSC 组成骨相关基因(RUNX2、ALP、OCN)表达显著高于其他组,差异有统计学意义($P < 0.01$),证实双重基因转染对成骨过程有促进作用。**结论:**成功构建基于羟基磷灰石/丝素蛋白/聚乳酸复合材料的骨组织工程支架,并通过 BMP-7 和 VEGF 双重基因转染技术促进间充质干细胞的成骨和血管生成,可为临床开展大段骨缺损修复提供理论依据。

[关键词] 三维打印;骨组织工程;羟基磷灰石;丝素蛋白;聚乳酸;间充质干细胞;骨缺损修复

[中图分类号] R687 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2025)12-0008-07

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.251202

3D Printing of Artificial Bone Scaffold and Dual Transfection of BMP-7/VEGF Stem Cells for Repairing Rabbit Radius Defects

LI Xu¹ LIU Zhengyu¹ ZHAO Yu¹ WANG Nan¹ CUI Jun¹ ZHENG Haiheng^{1△}

¹ Affiliated Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China.

Abstract Objective: To construct a bone tissue engineering material using a 3D-printed artificial bone scaffold composed of hydroxyapatite (HA), silk fibroin (SF), and polylactic acid (PLA), combined with bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) and vascular endothelial growth factor (VEGF) dual-transfected mesenchymal stem cells (MSCs), to repair rabbit radial bone defects and observe its bone tissue repair efficacy. **Methods:** A HA/SF/PLA composite scaffold was fabricated using 3D printing technology, and its microstructure was observed via scanning electron microscopy (SEM) to assess porosity and compressive strength. Rabbit MSCs were cultured, and dual-gene transfection of BMP-7 and VEGF was performed, with gene expression levels monitored post-transfection. The transfected MSCs were co-cultured with the HA/SF/PLA scaffold and implanted into a rabbit radial bone defect model. The study included four groups: control group with no cells or scaffold, scaffold-only group, MSC-only group, and scaffold + transfected MSC group. The osteogenic effects were evaluated using alkaline phosphatase (ALP)

基金项目:沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目
(RC210304)

¹ 沈阳医学院附属中心医院(沈阳,110024)

△通信作者 E-mail:18618464483@163.com

and its microstructure was observed via scanning electron microscopy (SEM) to assess porosity and compressive strength. Rabbit MSCs were cultured, and dual-gene transfection of BMP-7 and VEGF was performed, with gene expression levels monitored post-transfection. The transfected MSCs were co-cultured with the HA/SF/PLA scaffold and implanted into a rabbit radial bone defect model. The study included four groups: control group with no cells or scaffold, scaffold-only group, MSC-only group, and scaffold + transfected MSC group. The osteogenic effects were evaluated using alkaline phosphatase (ALP)

activity, Alizarin Red staining, Micro-CT scanning, and histological staining. **Results:** Osteogenic activity (ALP activity): At all time points, the ALP activity in the scaffold+MSC group was significantly higher than that in the other groups ($P<0.01$). Over time, the ALP activity gradually increased, the scaffold+MSC group indicating a continuous enhancement of osteogenic activity. Mineralization Level: The scaffold+MSC group showed a significantly higher percentage of mineralized area at 4, 8, and 12 weeks compared to the other groups ($P<0.01$), reaching 71.9% at 12 weeks, demonstrating a strong bone mineralization capacity. Bone Density: At 12 weeks post-surgery, the bone mineral density (BMD) in the scaffold+MSC group was 0.85 g/cm^3 , significantly higher than that in the other groups ($P<0.01$), indicating optimal osteogenic performance. Vascularization: The vascular density in the scaffold+MSC group was significantly higher than that in the other groups ($P<0.01$). VEGF gene transfection significantly promoted vascular formation, enhancing the blood supply to the newly formed bone. Osteogenic Gene Expression: At 8 weeks, the expression levels of osteogenic-related genes (RUNX2, ALP, OCN) in the scaffold+MSC group were significantly higher than those in the other groups ($P<0.01$), further confirming the promoting effect of dual gene transfection on the osteogenesis process. **Conclusion:** This study successfully constructed a bone tissue engineering scaffold based on HA/SF/PLA composite material and demonstrated that BMP-7 and VEGF dual-gene transfection effectively promoted MSC osteogenesis and angiogenesis. This provides a theoretical foundation for the clinical repair of large bone defects.

Keywords: 3D printing; bone tissue engineering; hydroxyapatite; silk fibroin; polylactic acid; mesenchymal stem cells; bone defect repair

骨缺损的修复一直是骨科的重大难题^[1],传统的自体骨和异体骨移植存在供体有限、免疫排斥和并发症等问题,亟需更有效的替代疗法^[2]。近年来,骨组织工程技术迅速发展,通过支架材料、种子细胞和生长因子构建新骨成为研究热点^[3]。3D 打印技术因其能够精确控制支架的结构和性能,在构建骨组织工程材料方面具有显著优势^[4]。羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)、丝素蛋白(Silk Fibroin, SF)和聚乳酸(Polylactic Acid, PLA)三元复合材料兼具生物相容性、机械强度和适中的降解速率,是理想的骨组织工程支架材料^[5]。间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cell, MSC)作为种子细胞,具有自我更新和多向分化潜力^[6]。通过骨形态发生蛋白-7(BMP-7)和血管内皮生长因子(VEGF)的双重基因转染,可以显著提高间充质干细胞的成骨和促血管生成能力,加速骨修复过程^[7-9]。本研究通过 3D 打印技术构建羟基磷灰石/丝素蛋白/聚乳酸复合支架,结合双重基因转染间充质干细胞,旨在开发新型骨组织工程材料,用于修复兔桡骨骨缺损,为临床大段骨缺损治疗提供新策略,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用健康的新西兰兔 40 只,体重为 2.5~3.0 kg,购于大连医科大学(SCXK(辽)2024-0001)。本研究进行的动物实验经大连医科大学动物实验中心伦理委员会审核批准(动(伦)2024-05028)。

1.2 药品和试剂

羟基磷灰石(HA,美国 Sigma-Aldrich 公司),丝素蛋白(SF,日本 Seiren 公司),聚乳酸(PLA,美国 NatureWorks 公司),基因转染试剂(Lipofectamine™

3000,美国 Thermo Fisher Scientific 公司),BMP-7 质粒(美国 Addgene 公司),VEGF 质粒(美国 Addgene 公司),DMEM 培养基(Gibco,美国 Thermo Fisher Scientific 公司),胎牛血清(FBS,美国 Thermo Fisher Scientific 公司),抗生素溶液(青霉素/链霉素,美国 Sigma-Aldrich 公司),碱性磷酸酶检测试剂盒(ALP,中国 Beyotime Biotechnology 公司),茜素红染色试剂盒(中国 Solarbio Life Sciences 公司),免疫组化试剂(CD31 抗体,英国 Abcam 公司),qPCR 试剂盒(SYBR Green,日本 Takara Bio 公司),Western Blot 试剂(美国 Bio-Rad Laboratories 公司)。

1.3 实验仪器

3D 打印机(荷兰 Ultimaker 公司),支架环氧乙烷灭菌设备(美国 3M 公司),Micro-CT 设备(SkyScan 1176,比利时 Bruker Micro-CT 公司)。

1.4 方法

1.4.1 溶液制备 将羟基磷灰石粉末加入丝素蛋白溶液中,按照羟基磷灰石/丝素蛋白的质量比 4:1 在搅拌器中混合,确保羟基磷灰石均匀分散在丝素蛋白中。用超声波处理器对混合液进行超声处理,进一步提高羟基磷灰石的分散性,确保其在丝素蛋白中均匀分布。将聚乳酸颗粒加入到氯仿或二氯甲烷中,轻轻搅拌至完全溶解,制备成浓度为 10%~15%的聚乳酸溶液。将已准备好的羟基磷灰石/丝素蛋白混合液与聚乳酸溶液按照设定的比例(羟基磷灰石/丝素蛋白/聚乳酸为 4:1:5)混合,用搅拌器均匀混合,得到均匀的复合材料溶液。

1.4.2 3D 打印 根据所需的支架结构设计 3D 打印模型,采用计算机辅助设计(CAD)软件建模,确定支

架的孔径、孔隙率和层间连接等参数。设置 3D 打印机的打印速度、层厚(通常为 0.1~0.2 mm)、温度(通常为 190~220 °C)等打印参数,确保打印过程的稳定性。采用熔融沉积成型(FDM)技术,将复合材料溶液注入到 3D 打印机的挤出头中,逐层打印成型。保持打印环境的温度和湿度,以确保材料的稳定性。打印完成后,得到的羟基磷灰石/丝素蛋白/聚乳酸支架应具有良好的孔隙结构和力学强度。3D 打印羟基磷灰石/丝素蛋白/聚乳酸人工骨支架的基本参数:孔径 500 μm ;孔隙率为 60%;力学强度方面,支架抗压强度为 7.35 MPa,弹性模量为 235.92 MPa;支架设计为较粗糙的表面以促进细胞附着和增殖,有助于支架在骨缺损修复中的效果与安全性。



图 1 3D 打印羟基磷灰石/丝素蛋白/聚乳酸人工骨支架

1.4.3 后处理 为提高支架的机械强度和稳定性,采用化学交联方法,选择戊二醛(GA)对打印完成的支架进行处理。将支架浸泡在交联剂溶液中,反应时间为 1~2 h,然后用去离子水洗涤,去除未反应的交联剂。将交联后的支架在真空干燥箱中干燥至恒重,温度控制在 30~40 °C,干燥后通过环氧乙烷或高压灭菌等方法对支架进行消毒,以确保其无菌状态,便于后续的生物实验。

1.4.4 细胞培养与基因转染

1.4.4.1 间充质干细胞(MSCs)的分离与培养 实验采用健康新西兰兔的骨髓间充质干细胞(Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells, BM-MSCs)。兔的选择标准为体重 2.5~3.0 kg,健康无疾病。在无菌条件下对实验动物进行全身麻醉,通过穿刺兔的髌骨或股骨,用注射器抽取 5~10 mL 骨髓液。密度梯度离心:将骨髓液与等量的淋巴细胞分离液(Ficoll 或 Percoll 密度梯度液)混合,然后以 1 000g 离心 30 min,分离出单个核细胞层。细胞收集:用移液管小心吸取单个核细胞层,置于 PBS 中洗涤 2 或 3 次,以去除残留的分离液。

1.4.4.2 间充质干细胞的培养与扩增 将收集的细胞悬液接种于培养瓶中,培养基为低糖 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)添加 10%胎牛血清

(FBS)、1%青霉素-链霉素(P/S)。培养条件为 37 °C 下 5%CO₂ 的湿润培养箱中。培养 48 h 后,更换培养基去除未贴壁的细胞。之后每 2~3 d 更换一次培养基,待细胞达到 80%~90%融合后,用 0.25%胰蛋白酶消化细胞,进行传代培养。通常进行 2 或 3 次传代后用于实验。细胞在传代过程中,保留一部分用于细胞冻存,保存于液氮中供后续使用。

1.4.4.3 间充质干细胞鉴定 通过流式细胞仪检测间充质干细胞表面标志物(CD73、CD90 和 CD105 阳性,CD34 和 CD45 阴性),确保所分离细胞为间充质干细胞。

1.4.4.4 双重基因转染 本实验采用 BMP-7 和 VEGF 基因的双重转染技术,提升间充质干细胞的成骨和促血管生成能力,具体转染过程如下:提取 BMP-7 和 VEGF 的表达质粒,用质粒提取试剂盒(EndoFree Plasmid Kit)纯化质粒 DNA。通过紫外分光光度计测量质粒浓度(OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应在 1.8~2.0 之间),确保质粒的纯度和浓度合适。在转染前 24 h,将间充质干细胞接种到 6 孔板或直径 10 cm 培养皿中,细胞密度为 70%~80%,以确保细胞处于对数生长期,转染时细胞状态最佳。

1.4.4.5 基因转染方法 本实验采用脂质体介导的转染方法(X-tremeGENE DNA Transfection Reagent),具体步骤如下:在无菌条件下,将所需量的 BMP-7 质粒和 VEGF 质粒(每孔各 500~1 000 ng)加入到 Opti-MEM(无血清培养基)中,轻轻混匀。将适量的转染试剂(Lipofectamine 3000)稀释在 Opti-MEM 中,按照质粒质量和试剂体积的比例(1:2)配置。将质粒溶液与转染试剂溶液混合,室温下静置 5~10 min,形成 DNA-脂质体复合物。转染操作:小心移去间充质干细胞的培养基,加入含有 DNA-脂质体复合物的 Opti-MEM 溶液。在 37 °C 下 5%CO₂ 培养箱中孵育 4~6 h,然后用含有 10%FBS 的 DMEM 完全培养基替换 Opti-MEM,继续培养 48 h。

1.4.4.6 转染效率的评估 转染后 24~48 h,在质粒 DNA 中加入绿色荧光蛋白(GFP)标记,可以通过荧光显微镜观察细胞中的绿色荧光,初步评估转染效率。提取转染细胞的 RNA,逆转录为 cDNA 后,通过定量 PCR(qPCR)检测 BMP-7 和 VEGF 的 mRNA 表达水平,相对表达结果与对照组进行比较。通过蛋白质提取与 SDS-PAGE 电泳,用针对 BMP-7 和 VEGF 的抗体进行 Western Blot 分析,以验证蛋白质水平的表达。

1.4.5 动物实验

1.4.5.1 兔桡骨缺损模型的建立 手术前禁食 12 h,在无菌条件下对兔进行全身麻醉,暴露桡骨并用骨钻在桡骨中制作直径 5 mm 的圆形骨缺损。对照组

不植入任何材料。单独支架组植入羟基磷灰石/丝素蛋白/聚乳酸支架。单独 MSC 组将转染后的间充质干细胞植入缺损处。支架+MSC 组将含有间充质干细胞的复合支架植入缺损处。

1.4.5.2 术后护理与取样 手术结束后对实验动物切口进行无菌缝合。术后每天观察动物的饮食、行为和伤口愈合情况,必要时给予抗生素预防感染。取样时间:术后第 2,4,8,12 周,分别进行成骨活性检测、矿化水平分析和组织学检测。

1.4.6 实验检测与评估

1.4.6.1 影像学检查 在术后即刻及术后第 2,4,8,12 周,通过 X 线定期检查兔桡骨缺损及修复情况,并进行记录。

1.4.6.2 成骨活性检测(碱性磷酸酶活性) 在术后第 2,4,8,12 周,抽取缺损部位的骨组织样本,用碱性磷酸酶检测试剂盒测定碱性磷酸酶活性。每组取样后立即分析,结果以 U/L 为单位表示。

1.4.6.3 矿化水平分析 采用茜素红染色对新骨的矿化结节进行染色,定量分析不同时间点(术后第 4,8,12 周)的矿化面积。用显微镜拍摄图片,并通过 Image J 软件定量分析矿化结节面积百分比。

1.4.6.4 骨密度测定(Micro-CT) 在术后第 12 周时,镜下观察包括苏木精-伊红(HE)染色,Masson-Goldner 染色与 Elastica van Gieson 染色。用 Micro-CT 对每组样本进行三维成像,重建骨缺损区域,测量骨密度(BMD),结果单位以 g/cm^3 表示。

1.4.6.5 血管生成检测 用免疫组化染色(CD31 抗体)对术后第 12 周的血管生成进行检测,计算每个视野下的血管数量,评估血管密度。

1.4.6.6 基因表达分析 通过 qPCR 检测术后第 8 周时成骨相关基因(RUNX2、OCN、ALP)的表达水平,计算相对表达量。

1.5 统计学方法

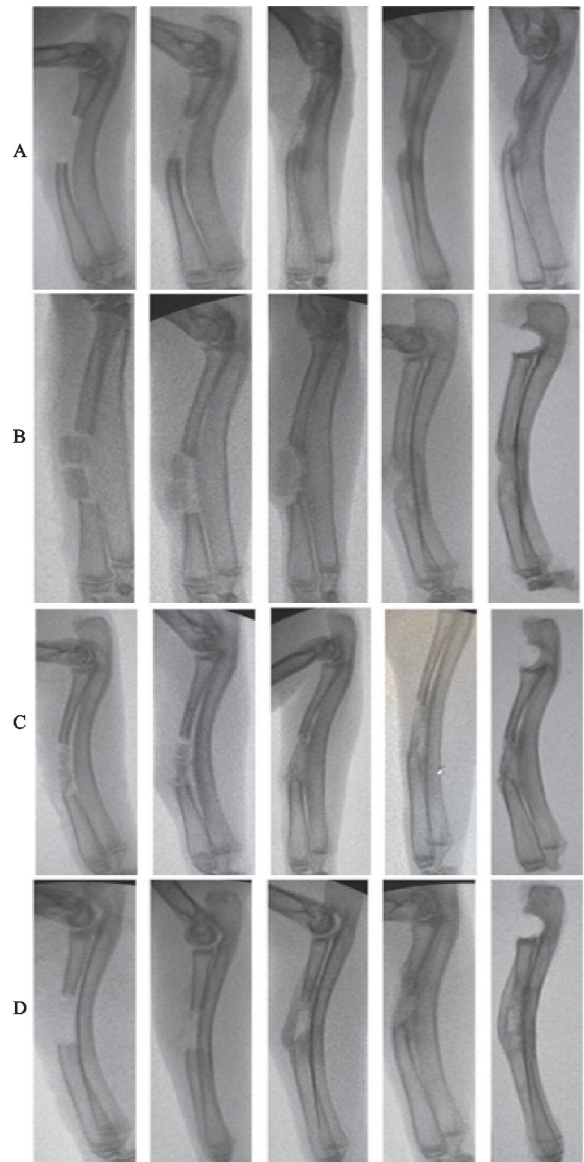
实验数据用 SPSS 26.0 软件进行统计学比较分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,首先通过 Shapiro-Wilk 检验评估正态性,Levene 检验验证方差齐性。符合正态分布且方差齐的数据,两组间比较采用 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析;非正态或方差不齐的数据采用 Mann-Whitney *U* 检验或 Kruskal-Wallis *H* 检验。计数资料比较则采用秩和检验或 χ^2 检验对统计结果进行分析。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 影像学检查

在术后即刻及手术后第 2,4,8,12 周,通过 X 线定期检查兔桡骨缺损以及修复情况,并进行记录,对不同时间点骨形成情况进行比较,支架+MSC 组在术后

第 2,4,8,12 周骨形成显著优于其他三组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。



术后即刻 术后第2周 术后第4周 术后第8周 术后第12周
注: A-对照组; B-单独支架组; C-单独MSC组; D-支架+MSC组(下同)

图 2 影像学检查结果

2.2 成骨活性评估

记录各组在术后第 2,4,8,12 周的碱性磷酸酶活性检测结果。采用单因素方差分析对不同时间点的碱性磷酸酶活性进行比较,支架+MSC 组在术后第 2,4,8,12 周的碱性磷酸酶活性显著优于其他三组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

2.3 矿化水平评估

记录各组在术后第 4,8,12 周的矿化面积百分比(%):采用 Tukey 事后检验对各组矿化面积进行比较,支架+MSC 组的矿化水平在术后第 4,8,12 周均显著高于其他三组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。尤其是在术后第 12 周,支架+MSC 组的矿化面积占比达到 71.9%,显著高于单独支架组和单独 MSC 组,

表 1 各组在不同时间点的成骨活性比较($n=10, \bar{x} \pm s, U/L$)

组别	术后第 2 周	术后第 4 周	术后第 8 周	术后第 12 周
对照组	23.5 ± 3.2 ¹⁾	32.7 ± 4.1 ¹⁾	41.4 ± 5.3 ¹⁾	49.7 ± 5.8 ¹⁾
单独支架组	45.8 ± 4.5 ¹⁾²⁾	58.9 ± 5.2 ¹⁾²⁾	72.1 ± 6.4 ¹⁾²⁾	82.4 ± 7.2 ¹⁾²⁾
单独 MSC 组	52.1 ± 5.3 ¹⁾²⁾³⁾	68.4 ± 6.2 ¹⁾²⁾³⁾	82.3 ± 7.0 ¹⁾²⁾³⁾	96.7 ± 8.4 ¹⁾²⁾³⁾
支架 + MSC 组	87.3 ± 6.8 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	127.6 ± 8.1 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	159.3 ± 9.6 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	175.4 ± 10.5 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
F	233.6	311.8	215.6	221.9
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)同一组内不同时间点相比, $P<0.05$;2)与对照组相比, $P<0.05$;3)与单独支架组相比, $P<0.05$;4)与单独 MSC 组相比, $P<0.05$ 。

差异有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

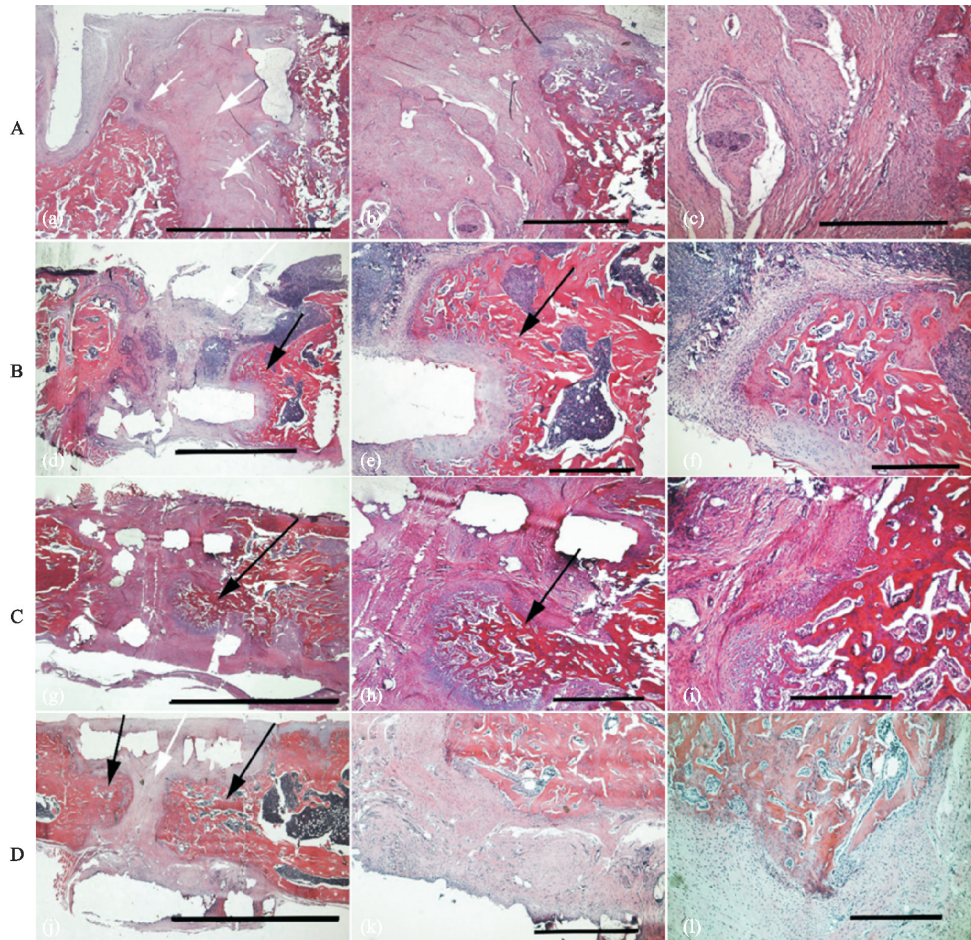
表 2 各组在不同时间点的矿化水平(矿化面积占比)比较($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	术后第 4 周	术后第 8 周	术后第 12 周
对照组	5.6 ± 1.3 ¹⁾	9.8 ± 2.1 ¹⁾	12.7 ± 2.4 ¹⁾
单独支架组	9.8 ± 2.1 ¹⁾²⁾	31.4 ± 3.7 ¹⁾²⁾	41.5 ± 4.2 ¹⁾²⁾
单独 MSC 组	12.7 ± 2.4 ¹⁾²⁾³⁾	34.6 ± 4.1 ¹⁾²⁾³⁾	47.8 ± 4.7 ¹⁾²⁾³⁾
支架 + MSC 组	18.4 ± 2.2 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	58.2 ± 4.5 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	71.9 ± 5.3 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
F	153.9	175.9	211.5
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)同一组内不同时间点相比, $P<0.05$;2)与对照组相比, $P<0.05$;3)与单独支架组相比, $P<0.05$;4)与单独 MSC 组相比, $P<0.05$ 。

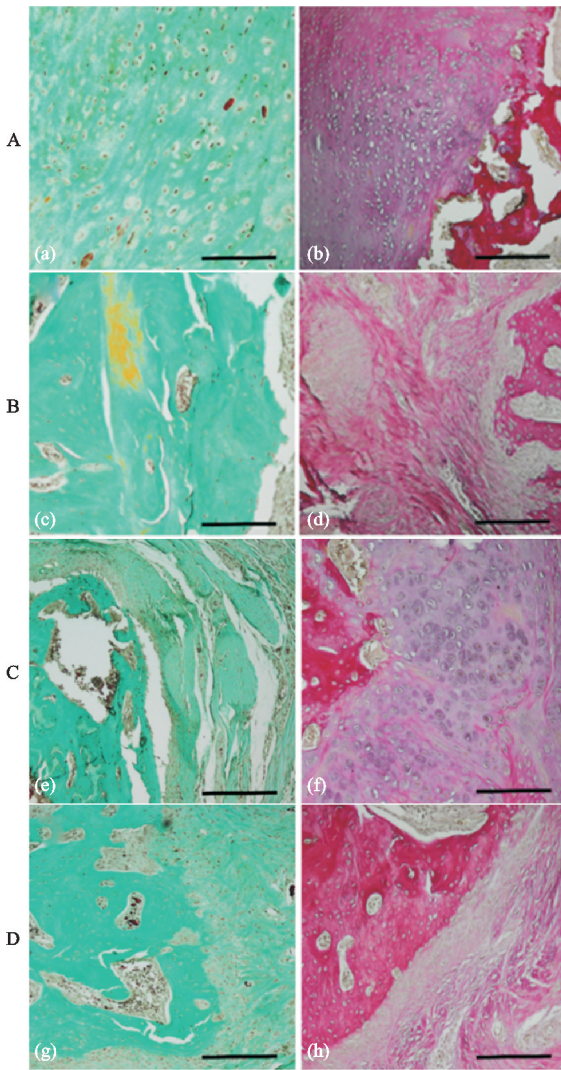
2.4 骨密度评估

首先对各组分别进行 HE 染色、Masson-Goldner 染色与 Elastica van Gieson 染色,见图 3。图 3 中白箭头指示结缔组织区域,黑箭头指示骨生长并显示骨组织的孔状结构。Micro-CT 扫描评估各组在术后第 12 周时的骨密度,对照组为(0.45 ± 0.05)g/cm³,单独支架组为(0.65 ± 0.07)g/cm³,单独 MSC 组为(0.72 ± 0.08)g/cm³,支架 + MSC 组为(0.85 ± 0.09)g/cm³。用单因素方差分析对各组骨密度进行比较,结果显示支架 + MSC 组的骨密度显著高于其他三组,差异有统计学意义($P<0.01$)。与对照组相比,支架 + MSC 组的骨密度提高了约 88.9%,见图 3 和图 4。



(a)~(c) 对照组可以看到结缔(软)组织增生,无明显骨骼孔洞结构出现,血管逐渐开始形成;(d)~(f) 单独支架组可以看到骨骼孔洞结构出现,但骨骼增长较缓慢,少量血管形成;(g)~(i) 单独 MSC 组可以看到典型骨骼生长的多孔结构,明显的血管结构出现;(j)~(l) 支架 + MSC 组可以看到两端骨骼结构逐渐生长并开始愈合,骨折断端仅间隔少量结缔组织,血管结构已经建立,血供较丰富

图 3 HE 染色结果($\times 100$)



Masson-Goldner染色 Elastic van Gieson染色
 (a)(b) 对照组可以看到结缔(软)组织增生为主, 少量骨骼孔洞结构出现, 血管结构开始出现但是不明显; (c)(d) 单独支架组可以看到骨骼孔洞结构和结缔组织混杂出现, 提示骨骼增长较缓慢, 少量血管结构出现并产生血供; (e)(f) 单独MSC组可以看到典型骨骼生长的多孔结构, 可以看到比较明显的血管结构切面; (g)(h) 支架+MSC组可以看到更明显多孔骨骼生长, 已经进行骨结构重塑, 血供比较丰富, 供血系统较成熟

图 4 实验动物术后第 12 周进行 Masson-Goldner 染色与 Elastic van Gieson 染色(×200)

2.5 血管生成评估

记录术后第 12 周时的血管密度(血管数量/视野), 对照组为 6.7 ± 1.4 , 单独支架组为 15.3 ± 2.1 , 单独 MSC 组为 21.8 ± 2.8 , 支架 + MSC 组为 34.2 ± 3.6 。通过单因素方差分析比较各组的血管密度, 结果显示支架 + MSC 组的血管密度显著高于其他三组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。支架 + MSC 组的血管生成能力显著增强, 是对照组的 5 倍, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见图 3 和图 4。

2.6 成骨基因表达

定量 PCR 检测了在术后第 8 周时与成骨相关的基因(RUNX2、ALP、OCN)的相对表达水平, 统计学分析结果显示, 支架 + MSC 组的 RUNX2、ALP、OCN 表达水平显著高于其他三组, 差异有统计学意义($P <$

0.01), 见表 3。

表 3 各组在术后第 8 周时的成骨相关基因表达比较($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	RUNX2	ALP	OCN
对照组	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
单独支架组	$2.5 \pm 0.4^{1)}$	$2.9 \pm 0.5^{1)}$	$2.3 \pm 0.4^{1)}$
单独 MSC 组	$3.8 \pm 0.6^{1)2)}$	$4.2 \pm 0.7^{1)2)}$	$3.6 \pm 0.5^{1)2)}$
支架 + MSC 组	$6.7 \pm 0.9^{1)2)3)}$	$7.4 \pm 1.0^{1)2)3)}$	$6.5 \pm 0.8^{1)2)3)}$
F	121.3	165.6	179.5
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 1)与对照组相比, $P < 0.05$; 2)与单独支架组相比, $P < 0.05$; 3)与单独 MSC 组相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

3D 打印技术作为一种先进的制造技术, 能够精确控制支架的孔隙结构和几何形状, 在骨组织工程中具有明显优势^[10]。与传统支架制造方法相比, 3D 打印能够根据特定骨缺损需求定制支架^[11-15], 特别对于复杂骨缺损修复, 此技术可以显著提高支架与骨缺损部位匹配性^[16]。双重基因转染技术在骨组织工程中具有显著的生物学优势; 骨形态发生蛋白-7 作为一种重要成骨诱导因子, 能够促进间充质干细胞向成骨细胞分化, 并显著增加新骨形成; 血管内皮生长因子则通过促进血管生成, 改善局部组织的血供, 为新生骨组织提供必要的营养^[17-21]。本研究通过 3D 打印技术构建了由羟基磷灰石、丝素蛋白和聚乳酸三元复合材料制成的骨组织工程支架, 并结合骨形态发生蛋白-7 和血管内皮生长因子双重基因转染的间充质干细胞, 详细观察了其在兔桡骨骨缺损修复中的成骨及促血管生成作用, 结果表明支架 + MSC 组在成骨活性、矿化水平、骨密度及血管生成方面均显著优于单一支架或干细胞组, 验证了该复合材料的成骨潜力。

成骨活性是评价骨组织工程材料成骨效果的重要指标之一^[22], 碱性磷酸酶是成骨细胞早期分化的标志物, 其活性反映了骨形成的初期状态^[23]。本研究中, 支架 + MSC 组在术后第 2, 4, 8, 12 周的碱性磷酸酶活性均显著高于对照组和其他组, 表明双重基因转染的间充质干细胞显著促进了早期成骨细胞的分化。这与先前研究结果一致, 即骨形态发生蛋白-7 作为成骨因子能够强效诱导间充质干细胞向成骨细胞分化, 而血管内皮生长因子通过促进局部血管生成, 为成骨细胞提供足够的血供。碱性磷酸酶活性随时间增加, 说明成骨活性持续增强, 这表明双重基因转染不仅能促进早期成骨, 还能在长时间内维持较高的成骨效率。

矿化是成骨过程中最重要的晚期阶段, 其标志是骨基质中钙磷盐的沉积^[24]。本研究中支架 + MSC 组在术后第 4, 8, 12 周的矿化面积占比均显著高于单独支架和 MSC 组, 术后第 12 周时矿化面积达 71.9%,

表明骨形态发生蛋白-7 和血管内皮生长因子的双重基因转染明显加速了骨组织的矿化进程。骨形态发生蛋白-7 不仅能诱导间充质干细胞分化为成骨细胞,还能促进骨基质的矿化。血管内皮生长因子通过促进新生血管的生成,增加了骨组织血供和营养供应,从而进一步加速了矿化进程,矿化水平提高提示复合支架能够更快、更稳定地形成新骨组织。

骨密度是衡量新生骨质量和强度重要指标^[25], Micro-CT 结果表明,支架+MSC 组在术后第 12 周的骨密度(0.85 g/cm^3)显著高于其他组,说明双重基因转染不仅促进早期成骨和矿化,而且在长时间内维持了较高骨密度。这与矿化水平结果一致,支架+MSC 组的矿化和骨密度均表现出最佳效果,表明双重基因转染对骨修复效果具有明显增强作用^[26]。骨形态发生蛋白-7 和血管内皮生长因子共同作用可以显著提高骨密度,骨形态发生蛋白-7 通过增强成骨细胞的分化和矿化作用,而血管内皮生长因子通过增加局部血管化,改善新生骨组织的血供,这些因素共同促进了新骨组织形成和成熟。

血管生成在骨组织再生过程中起着至关重要作用^[27],良好的血管网络可以为新生骨组织提供必要营养和氧气。本研究中,支架+MSC 组血管密度显著高于其他组,血管内皮生长因子基因转染明显促进局部血管生成,证明血管内皮生长因子是一种主要血管生成因子,能够刺激血管内皮细胞增殖、迁移,并促进新生血管形成。足够的血供不仅有助于为成骨过程提供能量,还能促进骨组织内废物清除,维持局部微环境稳态,因此,血管内皮生长因子共转染明显加速了骨组织修复进程。

术后第 8 周时,支架+MSC 组成骨相关基因(RUNX2、ALP、OCN)表达显著高于其他组,进一步验证了双重基因转染对成骨过程的促进作用。RUNX2 是成骨细胞早期分化的关键调控因子,碱性磷酸酶是成骨细胞分化早期标志,而骨钙素(OCN)则是成骨细胞成熟标志^[28]。这些基因高表达说明间充质干细胞在双重基因转染后,成骨能力显著增强,成骨细胞从早期分化到晚期矿化均得到良好促进作用。骨形态发生蛋白-7 基因的过表达直接上调了 RUNX2、碱性磷酸酶等成骨相关基因,而血管内皮生长因子通过促进血管生成,为成骨细胞提供了良好生长环境,使其功能得到充分发挥。

本研究设立 4 个实验组,每组 10 只兔,术前饲养过程中未死亡。移植手术后,每只兔取 3 个骨组织样本用于评估骨修复、骨再生及生物相容性等。尽管因手术创伤、感染或骨不愈合等原因有 2 只兔死亡,2 个样本无法继续分析,但已及时排除不合格样本,确保最

终数据的有效性和代表性。

尽管本研究显示了双重基因转染间充质干细胞与羟基磷灰石/丝素蛋白/聚乳酸复合支架在骨缺损修复中的显著优势,但实验仍存在一些局限性。首先,实验是在兔桡骨骨缺损模型中进行的,其结果可能不能完全代表人体骨修复过程。其次,基因转染的长期安全性仍需进一步研究,尤其是在临床应用中的可行性与潜在风险需要进一步评估。此外,本研究仅用骨形态发生蛋白-7 和血管内皮生长因子两种基因,未来可以考虑结合其他成骨或血管生成因子,以进一步提升骨组织修复效果。未来研究可以集中于大型动物实验及临床试验,进一步验证这种复合材料的临床应用潜力。此外,随着基因编辑技术发展,可以探索通过更精确的基因调控方法进一步优化间充质干细胞的成骨能力和血管生成能力,为骨缺损修复提供更多的可能性。

综上所述,3D 打印羟基磷灰石/丝素蛋白/聚乳酸复合支架与双重基因转染的间充质干细胞组合具有显著的成骨和促血管生成能力,能够明显促进兔桡骨骨缺损修复。成骨活性、矿化水平、骨密度及血管生成均在支架+MSC 组中表现最佳,表明该组合材料在骨组织工程中具有良好应用前景。未来研究应进一步验证其临床效果,并探讨基因转染的长期安全性和有效性。

参考文献

- [1] ZHAI X, RUAN C, MA Y, et al. 3D-bioprinting of mesenchymal stem cells with strong mechanical strength for the repair of bone defects in rabbits[J]. *Bone Res*, 2021, 9(1):1-10.
- [2] ZHANG M, ZHAO Y, CHEN L, et al. 3D-printed porous scaffolds with bioactive glass and polylactic acid for bone tissue engineering[J]. *Mater Sci Eng: C*, 2021, 118: 111423.
- [3] 王艳,刘敏,周涛. 聚乳酸基支架在骨缺损修复中的应用进展[J]. *中华骨科杂志*, 2023, 43(2):123-130.
- [4] 李海燕,陈志勇. 羟基磷灰石/丝素蛋白复合材料的制备及其在骨修复中的应用[J]. *中国生物材料学报*, 2023, 23(4):298-305.
- [5] LIU C, WANG Z, ZHENG J, et al. 3D-printed PCL/HA composite scaffolds for bone tissue engineering: in vitro and in vivo evaluation[J]. *Mater*, 2021, 14(11):3073.
- [6] CHEN Y, YANG L, LI Y, et al. Recent advances in 3D printing of bone scaffolds: a review[J]. *Adv Healthcare Mater*, 2021, 10(19):2100842.
- [7] 陈伟,赵琳. 间充质干细胞在骨组织再生中的应用进展[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(1):89-95.

- drial dysfunction in oxidative stress-mediated intervertebral disc degeneration[J]. *Orthopaedic Surgery*, 2022, 14(8):1569-1582.
- [13] XIANG Q, CHENG Z R, WANG J T, et al. Allicin attenuated advanced oxidation protein product-induced oxidative stress and mitochondrial apoptosis in human nucleus pulposus cells[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020:6685043.
- [14] BAHAR M E, HWANG J S, LAI T H, et al. The survival of human intervertebral disc nucleus pulposus cells under oxidative stress relies on the autophagy triggered by delphinidin[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(7):759.
- [15] NAN L P, WANG F, LIU Y, et al. 6-gingerol protects nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells from oxidative injury by activating autophagy[J]. *World Journal of Stem Cells*, 2020, 12(12):1603-1622.
- [16] LIU Y. Hydrogen peroxide induces nucleus pulposus cell apoptosis by ATF4/CHOP signaling pathway[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, 20(4):3244-3252.
- [17] CHEN Y, CAO X K, PAN B, et al. Verapamil attenuates intervertebral disc degeneration by suppressing ROS overproduction and pyroptosis via targeting the Nrf2/TXNIP/NLRP3 axis in four-week puncture-induced rat models both in vivo and in vitro[J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 123:110789.
- [18] SONG Y C, LIU C T, LEE H J, et al. Cordycepin prevents and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting leukocyte infiltration and reducing neuroinflammation[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2022, 197:114918.
- [19] 陈发慧, 赵志波, 白梦琦, 等. 虫草素预处理间充质干细胞抑制趋化因子受体 2 释放保护肾小管上皮细胞发挥抗凋亡作用[J/OL]. *临床肾脏病杂志*, 2025:1-9. (2025-03-06). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=LCSB20250304001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [20] ZHANG X L, HUANG W M, TANG P C, et al. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of natural cordycepin in rotenone-induced PD models through inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission[J]. *NeuroToxicology*, 2021, 84:1-13.

(收稿日期:2025-05-09)

(上接第 14 页)

- [8] 刘晓, 王军. 自体骨移植与骨组织工程材料的对比研究[J]. *中华显微外科杂志*, 2023, 46(6):489-495.
- [9] AHN J, KIM S H, LEE J S, et al. 3D printing of bioactive ceramics for bone tissue engineering: a review[J]. *Ceram Int*, 2022, 48(5):6764-6775.
- [10] 孙涛, 陶莉. 骨形态发生蛋白在骨缺损修复中的作用机制[J]. *中华骨科杂志*, 2024, 43(3):234-240.
- [11] YANG X, ZHAO H. Advances in 3D printing technology for bone tissue engineering: a review[J]. *Bioact Mater*, 2022, 7(1):1-14.
- [12] YANG J, ZHAO Y, LI X, et al. 3D printing of bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: a review[J]. *J Mater Sci Technol*, 2021, 70:130-140.
- [13] 何明, 孙波. 骨组织工程技术与材料的发展趋势[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2023, 37(2):123-130.
- [14] FUCH J R, HETRICK E M. Bioactive glass and its potential for bone tissue engineering: a review[J]. *Biomed Mater*, 2022, 17(1):012001.
- [15] ROY M, BANDYOPADHYAY A. 3D printing of bio-ceramics for bone tissue engineering: a review[J]. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater*, 2021, 109(6):1145-1160.
- [16] GARZÓN J, VÁZQUEZ F. Bone tissue engineering: progress and challenges[J]. *J Orthop Transl*, 2021, 26:98-108.
- [17] 李俊, 高翔. 基因转染技术在骨组织工程中的应用研究[J]. *中国医学科学院学报*, 2023, 44(5):487-492.
- [18] 李静, 丁晓宇. 骨组织工程材料的生物相容性研究进展[J]. *中华生物材料学报*, 2023, 22(5):423-429.
- [19] KHANG D, KIM H B. Engineering of a dual-functional hydrogel for bone regeneration[J]. *J Biomater Appl*, 2022, 37(3):390-400.
- [20] 邓小平, 杨斌. 生物材料在骨缺损修复中的研究进展[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(6):722-728.
- [21] WANG Y, CHENG Y, ZHANG C. Biodegradable polymer-based scaffolds for bone tissue engineering: a review[J]. *J Biomed Mater Res: A*, 2022, 110(5):929-945.
- [22] WU C, ZHANG X. Advances in the development of porous scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10:792992.
- [23] 张丽, 赵亮. 3D 打印技术构建骨组织工程支架的研究进展[J]. *生物材料*, 2024, 35(2):107-113.
- [24] 王志刚, 何伟. 3D 打印支架在骨组织工程中的应用前景[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2023, 37(1):15-20.
- [25] 黄丽, 曹强. 蛋白质基生物材料在骨组织工程中的研究进展[J]. *中国生物医学工程杂志*, 2024, 27(3):225-230.
- [26] MA Y, HU K. Bioactive materials for bone tissue engineering: a review[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(8):2400-2412.
- [27] 郑丽, 李晓敏. 骨组织工程中间充质干细胞的应用研究[J]. *中国生物材料学报*, 2023, 22(3):187-193.
- [28] DETERME W, HAUGE S C, DEMEUSE J, et al. Osteocalcin: a bone protein with multiple endocrine functions[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2025, 567:120067.

(收稿日期:2025-04-11)