

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2023.04.002

· 基础研究 ·

改良型富血小板纤维蛋白与 β -磷酸三钙复合物诱导成骨作用与机制

付冬梅¹, 周婧¹, 王浪¹, 杨昕¹, 兰红¹, 李素兰¹, 王劲¹, 方婕²

1. 资阳市雁江区人民医院口腔科, 四川 资阳(641300); 2. 四川大学华西口腔医院正畸科, 四川 成都(610041)

【摘要】 目的 探讨改良型富血小板纤维蛋白(advanced platelet-rich fibrin, A-PRF)与 β -磷酸三钙(β -tricalcium phosphate, β -TCP)构成比例对兔股骨缺损模型骨形成的作用及机制,为临床治疗骨缺损提供新思路。方法 24只新西兰大白兔构建骨缺损模型并分为模型组、1:1复合物组(A-PRF: β -TCP=1:1)、2:1复合物组(A-PRF: β -TCP=2:1)与4:1复合物组(A-PRF: β -TCP=4:1),每组6只。复合物组在骨缺损处填充复合材料,模型组不充填材料,8周后安乐法处死动物采标本。采用micro-CT测定股骨缺损区新生骨的骨密度(bone mineral density, BMD)、骨体积分数(bone volume fraction, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁分离度(trabecular separation/spacing, Tb.Sp)。HE染色观察新骨及新生血管形成情况;扫描电镜观察新生骨组织的形态变化;酶联免疫法检测新生股骨组织中磷酸化丝裂原活化蛋白激酶p38(phospho-p38 mitogen activated protein kinase, p-p38MAPK)、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)、磷酸化含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(phospho-cysteine aspartic protease-3, p-Caspase3)含量;实时定量PCR检测新生骨组织中骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、核因子 κ -B配体受体致活剂(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)、p38MAPK的mRNA表达量;免疫组织化学法观察新生骨组织中OPG、BMP-2、RANKL、p-p38MAPK、p-Caspase3蛋白表达情况;荧光Tunel染色观察新生股骨组织中细胞凋亡情况。**结果** 模型组股骨缺损区域骨形成缓慢,成骨质量差。与模型组相比,复合物组动物股骨缺损区域成骨情况良好,BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N升高,Tb.Sp下降,新生股骨组织中见新生毛细血管形成;p-p38MAPK、CHOP、p-Caspase3蛋白表达降低,OPG、BMP-2的mRNA与蛋白表达升高,RANKL与p38MAPK的mRNA表达降低($P < 0.05$);各组新生骨组织中的凋亡检测表明2:1复合物组样本中细胞凋亡率最低($P < 0.05$);A-PRF: β -TCP=2:1的配比成骨效果最佳。**结论** 由A-PRF与 β -TCP组成复合物能促进OPG表达,抑制RANKL表达和p38MAPK磷酸化,减少新生骨组织细胞凋亡,促进成骨分化。

【关键词】 改良型富血小板纤维蛋白; β -磷酸三钙; 骨缺损; 成骨分化; 丝裂原活化蛋白激酶p38; CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3; 骨保护素; 骨形态发生蛋白-2; 核因子 κ -B配体受体致活剂

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2023)04-0237-08

【引用著录格式】 付冬梅,周婧,王浪,等.改良型富血小板纤维蛋白与 β -磷酸三钙复合物诱导成骨作用与机制[J].口腔疾病防治,2023,31(4):237-244. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2023.04.002.

Study on the role and mechanism of osteogenesis induced by advanced platelet-rich fibrin and β -tricalcium phosphate complex FU Dongmei¹, ZHOU Jing¹, WANG Lang¹, YANG Xin¹, LAN Hong¹, LI Sulan¹, WANG Jin¹, FANG Jie². 1. Department of Stomatology, Yanjiang District People's Hospital, Ziyang City, Ziyang 641300, China;

2. Department of Orthodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China.

Corresponding author: FU Dongmei, Email: fdm200939jilian@163.com, Tel: 86-18200525700

【Abstract】 Objective To investigate the role and mechanism of bone formation caused by the ratio of advanced

【收稿日期】 2022-09-14; **【修回日期】** 2022-11-18

【基金项目】 四川省科学技术厅项目(23ZDYF2009);四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17ZD027);资阳市科技计划项目(Zykjssc20-yyjc-2020-09)

【通信作者】 付冬梅,副主任医师,硕士, Email: fdm200939jilian@163.com, Tel: 86-18200525700



微信公众号

platelet-rich fibrin (A-PRF) and β -tricalcium phosphate (β -TCP) in rabbit femur defect model, which provides a new idea for clinical treatment of bone defect. **Methods** Twenty-four New Zealand white rabbits were divided into model group, 1:1 complex group (A-PRF: β -TCP=1:1), 2:1 complex group (A-PRF: β -TCP=2:1) and 4:1 complex group (A-PRF: β -TCP=4:1), with 6 rabbits in each group. Femoral defect models were constructed in each group. In the composite group, the bone defect was filled with composite material, while in the model group, no material was filled. After 8 weeks, the animals were euthanized and specimens were collected. Bone mineral density (BMD), bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.SP) and trabecular number (Tb.N) in femoral defect tissue were measured by micro-CT and photographed. Hematoxylin-eosin staining was used to detect the pathological changes of new bone tissue. The morphological changes of the new bone tissue were observed by scanning electron microscopy. Determination of phospho-mitogen activated protein kinase p38 (p-p38MAPK), CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP) and phospho-cysteine aspartic protease-3 (p-Caspase3) in newborn femur by ELISA. The mRNA expressions of osteoprotegerin (OPG), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and p38MAPK were detected by real-time quantitative PCR. The expression of OPG, BMP-2, RANKL, p-p38MAPK and p-Caspase3 protein in the new bone tissue was observed by immunohistochemistry. **Results** In the model group, bone formation in the femoral defect area was slow and osteogenic quality was poor. Compared with the model group, the bone formation and neocapillaries of femoral defect area in the complex group was good, BMD, BV/TV, Tb.Th, Tb.N were increased, and Tb.Sp were decreased, the expressions of p-p38MAPK, CHOP and p-Caspase3 were decreased, and the mRNA and protein expressions of OPG and BMP-2 were increased. The mRNA expression of RANKL and p38MAPK was decreased. Apoptosis in new bone tissue of each group showed the lowest apoptosis rate in samples of the 2:1 complex group ($P < 0.05$); A-PRF: β -TCP=2:1 ratio has the best osteogenic effect. **Conclusion** The complex composed of A-PRF and β -TCP can promote the expression of OPG, inhibit the expression of RANKL and phosphorylation of p38MAPK, reduce the apoptosis of new bone tissue cells, and promote osteogenic differentiation.

【Key words】 advanced platelet-rich fibrin; β -tricalcium phosphate; bone defect; osteogenic differentiation; mitogen-activated protein kinase p38; CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; cysteine aspartic protease-3; osteoprotegerin; bone morphogenetic protein-2; receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

J Prev Treat Stomatol Dis, 2023, 31(4): 237-244.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from the Project of Science and Technology Department of Sichuan Provincial (No. 23ZDYF2009) and Health and Family Planning Commission of Sichuan Province (No. 17ZD027), Science and Technology Project of Ziyang (No. Zykjjs20-yyjc-2020-09).

在现有的治疗骨缺损技术中,引导骨再生技术已经被广泛运用^[1],但该技术使用的骨代替材料只有引导成骨的作用,且手术后恢复时间较长,使用的骨材料成本较高,严重影响了骨缺损修复的效果,增加患处炎症免疫反应和感染的风险^[2],因此寻求一种安全可靠、成本低、生物活性好的骨再生材料一直是骨缺损技术研究的重点。

改良型富血小板纤维蛋白(advanced platelet-rich fibrin, A-PRF)被证实可促进软硬组织的愈合及再生,并能有效应用于口腔颌面外科、整形外科、运动医学、牙周病学等多方面^[3-4]。临床研究证实A-PRF可作为生物活性材料单独或结合其他骨移植材料促进骨再生。 β -磷酸三钙(β -tricalcium phosphate, β -TCP)具有良好的生物相容性、骨引导性及生物降解性能,临床上主要应用作为支架材

料引导骨再生,如牙槽嵴裂骨缺损修复、位点保存、种植术区缺损修复,或者联合其他材料诱导骨再生,均取得良好的骨再生效果。本实验拟通过新西兰兔股骨缺损模型进一步探讨A-PRF与 β -TCP复合物诱导成骨的作用与可能涉及的机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

取清洁级新西兰大白兔24只,雄性,5~6月龄,体质量3~3.5 kg,购自成都达硕实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(川)2020-030。本实验经四川大学华西医院动物伦理委员会审批通过(20220916006)。

1.2 试剂与仪器

A-PRF在华西医院动物实验室提取, β -TCP(奥林巴斯泰尔茂生物材料株式会社, 日本); 二甲苯(天津致远化学试剂有限公司, 中国); DAB试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司, 中国); RNA提取试剂盒(合肥博美生物科技有限公司, 中国); RNA逆转录试剂盒(宝日医生物技术有限公司, 中国); RT-PCR试剂盒(宝日医生物技术有限公司, 中国); 荧光TUNEL检测试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司, 中国); 骨保护素(osteoprotegerin, OPG)(艾博抗贸易有限公司, 中国); 人核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)(艾博抗贸易有限公司, 中国); 骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)(艾博抗贸易有限公司, 中国); 磷酸化含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(phospho-cysteine aspartic protease-3, p-Caspase3)(艾博抗贸易有限公司, 中国); 磷酸化-丝裂原活化蛋白激酶p38(phospho-mitogen-activated protein kinase p38, p-p38MAPK)抗体(CST公司, 美国); 二抗工作液(北京中杉金桥生物有限公司, 中国)。Micro-CT(SkyScan 1276,

Bruker, 德国); 实时荧光定量仪(PIKORed 96, Thermo, 美国); 酶标仪(Multiskan Sky, Thermo, 美国); 热循环仪(TCA0096, Thermo, 美国); 显微镜(CX33, Olympus, 日本), 扫描电镜(S-4800, 日立, 日本)。

1.3 实验分组与方法

1.3.1 构建兔股骨缺损模型与分组 24只新西兰大白兔分为4组: 模型组、1:1复合物组(A-PRF: β -TCP=1:1)、2:1复合物组(A-PRF: β -TCP=2:1)与4:1复合物组(A-PRF: β -TCP=4:1)。各组动物耳缘静脉注射3%戊巴比妥钠溶液(1 mL/kg)进行麻醉, 自双后肢膝关节外侧距前缘1.0~1.5 cm处, 平行前缘作一长约5 cm弧形切口; 逐层分离暴露股骨外侧髁, 用骨钻制备直径为6 mm、深8 mm的圆柱形骨全层缺损。于距离骨缺损中央6 mm处, 左右对称各旋入1枚直径为2 mm的钛钉进行定位(图1)。模型组不作处理, 复合物组在骨缺损区域填充0.5 mL复合物, 所有动物均用医用胶原修复膜覆盖, 术后3 d内每天肌肉注射青霉素钠80万U。术后8周安乐法处死动物, 收集股骨组织进行后续指标检测。

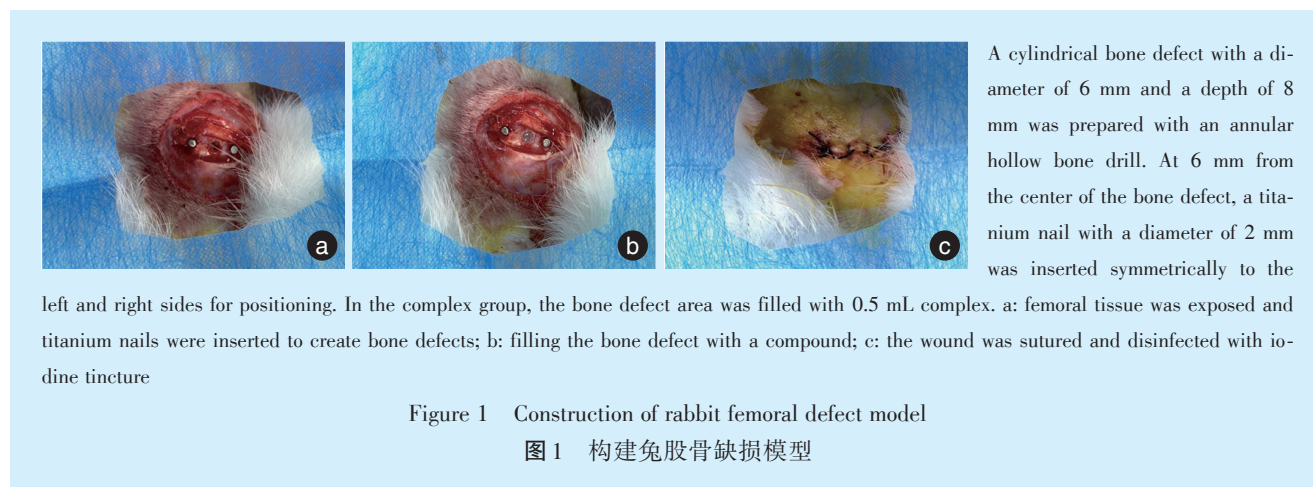


Figure 1 Construction of rabbit femoral defect model

图1 构建兔股骨缺损模型

1.3.2 Micro-CT扫描分析股骨缺损情况 使用动物Micro-CT扫描分析仪测定新生股骨组织中骨密度(bone mineral density, BMD)、骨体积分数(bone volume fraction, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁分离度(trabecular separation/spacing, Tb.Sp)、骨小梁数量(trabecular number, Tb.N), 扫描条件: 扫描高度1.5 cm, 层距19 μ m, 跨越780~800层, 曝光时间1 800 ms, 管电压80 kV, 管电流500 μ A。

1.3.3 组织病理学检测 将各组动物的新生股骨

组织在4%多聚甲醛中固定24 h以上, 依次进行脱钙、脱水处理, 制作石蜡切片, 最后使用苏木精-伊红染色法(HE染色)进行染色, 观察新生骨组织中血管形成情况与病变情况。

1.3.4 扫描电镜观察组织形态 将各组动物新生股骨组织制备成扫描电镜样本, 使用扫描电镜观察组织中骨形态结构、胶原纤维、成骨细胞附着等情况。

1.3.5 酶联免疫法检测新生股骨组织中p-p38MAPK、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhanc-

er-binding protein homologous protein, CHOP)、p-Caspase3的含量 将收集的各组动物新生股骨组织置于液氮中研磨,制成组织匀浆,4 000 r/min离心10 min收集上清液,按ELISA检测试剂盒说明书操作测定组织中 p-p38MAPK、CHOP、p-caspase3的含量。

1.3.6 免疫组织化学观察成骨相关蛋白表达 将1.3.3中制成的石蜡切片脱蜡至水,然后将切片置于二甲苯中3次,每次15 min,置于无水乙醇中2次,每次5 min,再分别置于85%(v/v)、75%(v/v)乙醇溶液中5 min,最后用蒸馏水清洗。将处理好的切片浸入柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0),微波炉高火加热10 min,停火8 min,中高火再加热10 min;冷却后,使用PBS清洗3次,每次5 min,在3%双氧水中室温静置10 min,取出使用PBS清洗3次,每次5 min;滴加山羊血清封闭液,室温封闭20 min,然后滴加一抗(1:100),4℃孵育过夜;PBS洗3次,每次5 min;滴加二抗,37℃室温孵育30 min,使用PBS清洗3次,每次5 min;孵育完成后将新鲜配置的DAB显色液滴加到组织上,室温显色,在显微镜观察下控制显色时间,当颜色为棕黄色时,蒸馏水洗涤终止显色;加入苏木素复染3 min,清水返蓝后流水冲洗;最后将切片依次置于75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、无水乙醇、二甲苯中浸泡10 min,中性树胶封片。使用显微摄像系统对切片进行图像采集,每例样本在400倍下分别采集3个视野进行拍照,计算每张图像的平均光密度,使用3张图像的平均光密度再计算每例样本的平均光密度,观察新生骨组织中OPG、BMP-2、RANKL、p-p38MAPK与p-Caspase3蛋白表达情况。

1.3.7 荧光TUNEL染色观察新生股骨组织细胞凋亡情况 收集各组动物新生骨痂组织,放入4%多

聚甲醇中固定过夜,制备石蜡切片。用TUNEL荧光试剂盒染色,观察新生骨组织细胞凋亡情况。

1.3.8 RT-qPCR 将收集的各组动物新生股骨组织置于液氮中研磨,按RNA提取试剂盒与RNA逆转录试剂盒说明书进行总RNA提取与cDNA逆转录,然后使用RT-PCR仪扩增,最后计算各组样本的CT值,通过计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值反映OPG、BMP-2、RANKL、p38MAPK基因的相对表达水平。引物序列:OPG:F:5'-GGACCATGCAGAAACCCTT-3',R:5'-CCTGTGCTTCACACAGAACTC-3';BMP-2:F:5'-TTGGTCACGATGGGAAGGGG-3',R:5'-TGTGCTAACGACACCCACAA-3';RANKL:F:5'-TCGACTCTGGAGAGCGAAGA-3',R:5'-GAGCCACGAACCTTCCATCA-3';p38MAPK:F:5'-GAGAGGCAGACGCTAAGCAG-3',R:5'-GGCGATTCTCTCACTGAGCC-3';GAPDH:5'-ACGACCACTTCGGCATTGTG-3',R:5'-CAGTGAGTTTCCCCTTCAGC-3'。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司生产提供。

1.4 统计学分析

使用SPSS 25.0进行数据分析,计量资料用均值±标准差表示。组间比较采用单因素方差分析,进一步组内两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同比例的A-PRF与β-TCP复合物对兔股骨缺损的修复效果

Micro-CT检测骨组织发现,与模型组相比,各复合物组动物股骨组织中BMD含量、BV/TV比例、Tb.Th与Tb.N均升高,Tb.Sp降低($P < 0.05$),见表1。模型组动物骨小梁骨髓腔较大,新生骨小梁较少,

表1 不同比例的富血小板纤维蛋白/β-三磷酸钙复合物组新生骨指标比较

Table 1 Comparison of new bone index between advanced platelet-rich fibrin and β-tricalcium phosphate complex composites with different proportions

Group	BMD/(g/cm ³)	BV/TV(%)	Tb.Th/μm	Tb.Sp/μm	Tb.N/(1/mm)
Model group	0.22 ± 0.04	18.86 ± 2.71	0.12 ± 0.02	1.64 ± 0.20	1.39 ± 0.07
1:1 complex group	0.32 ± 0.30*	27.34 ± 5.87*	0.15 ± 0.01*	1.25 ± 0.26*	1.64 ± 0.06*
2:1 complex group	0.54 ± 0.08**	35.24 ± 2.09**	0.20 ± 0.02**	0.66 ± 0.14**	1.98 ± 0.20**
4:1 complex group	0.42 ± 0.05**	31.42 ± 4.49**	0.19 ± 0.01**	0.70 ± 0.12**	1.94 ± 0.10**
<i>F</i>	18.96	8.920	16.28	18.86	15.73
<i>P</i>	0.001	0.006	0.001	0.001	0.001

1:1, 2:1 and 4:1 means A-PRF to β-TCP. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; A-PRF: advanced platelet-rich fibrin; β-TCP: β-tricalcium phosphate; BMD: bone mineral density; BV/TV: bone volume/total volume; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.Sp: trabecular separation/spacing; Tb.N: trabecular number

存在缺损未愈合区域;复合物组缺损区域基本填满新生骨组织,其中1:1复合物组修复效果较差,2:1复合物组修复效果最好。

扫描电镜结果显示,模型组动物缺损区域出现少量骨小梁,纤维组织增生不明显,成骨细胞附着不明显;复合物组缺损区域可见新生骨小梁大量形成,大量成骨细胞附着,纤维组织增生明显,以2:1复合物组修复程度最为突出。HE染色结果显示,模型组骨组织之间可见骨损伤区域,炎性细胞浸润情况明显。与模型组相比,各复合物组骨损伤区域、炎性细胞浸润情况较少,且见新生毛细血管形成,恢复程度2:1比例最佳,4:1比例次之,1:1较弱。见图2。

2.2 不同比例的A-PRF与β-TCP复合物对兔新生股骨组织中细胞凋亡的影响

与模型组相比,1:1复合物组、2:1复合物组与

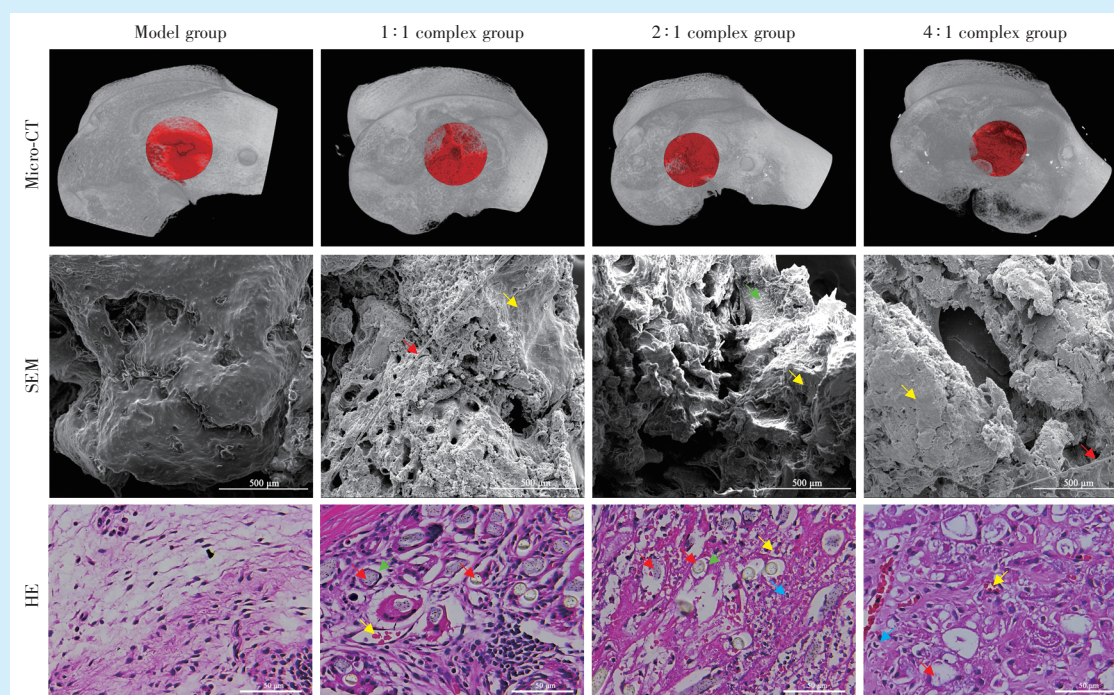
4:1复合物组样本中细胞凋亡率均显著性降低,2:1复合物组下降幅度最大($P < 0.05$),见表2。

2.3 不同比例的A-PRF与β-TCP复合物对兔新生股骨组织中p-p38MAPK、CHOP、p-Caspase3的影响

与模型组相比,2:1复合物组与4:1复合物组新生骨组织中p-p38MAPK、CHOP、p-Caspase3含量显著性降低($P < 0.05$),而1:1复合物组新生股骨样本中p-p38MAPK、p-Caspase3含量均无显著性变化($P > 0.05$),CHOP含量降低($P < 0.05$),p-p38MAPK、CHOP、p-Caspase3组间统计量值为($F = 3.168, 3.283, 3.238; P = 0.043, 0.038, 0.040$),见图3。

2.4 不同比例的A-PRF与β-TCP复合物对兔新生股骨组织中OPG/RANKL/RANK通路与P38MAPK通路的影响

与模型组相比,1:1复合物组新生股骨样本中BMP-2的mRNA升高($P < 0.05$),OPG、RANKL与



1:1, 2:1 and 4:1 means A-PRF to β-TCP; Micro-CT: the circular area (red) in the micro-CT image represents the bone injury area, in which the model group and 1:1 complex group have not been filled, while the 2:1 complex group and 4:1 complex group have been filled. SEM (bar=500 μm): the bone tissue formation status of complex group was good, while the bone tissue formation status of model group was less. Collagen fibre (red arrow), bone morphology and structure (yellow arrow), bone cell attachment (green arrow). HE (bar=50 μm): in complex group, there were repair materials (red arrow), surrounding fibrous tissue (green arrow), new born bone cell (blue arrow), new blood capillary (yellow arrow), and the repair situation was better than that in model group. A-PRF: advanced platelet-rich fibrin; β-TCP: β-tricalcium phosphate; HE: hematoxylin-eosin staining; SEM: scanning electron microscopy

Figure 2 Comparison of repair effects of advanced platelet-rich fibrin and β-tricalcium phosphate complex with different proportions on rabbit femoral defects

图2 不同比例的富血小板纤维蛋白/β-磷酸三钙复合物组兔股骨缺损的修复效果比较

表2 不同比例的富血小板纤维蛋白/ β -磷酸三钙复合物组新生骨组织中凋亡率比较

Table 2 Comparison of apoptosis rate in newborn bone tissue between advanced platelet-rich fibrin and β -tricalcium phosphate complex composites with different proportions

Group	Apoptosis rate (%)
Model group	11.20 \pm 0.32
1:1 complex group	8.29 \pm 0.16**
2:1 complex group	4.25 \pm 0.51**
4:1 complex group	6.63 \pm 0.51**
<i>F</i>	159.4
<i>P</i>	< 0.001

Compared with the model group, ***P* < 0.01

p38MAPK的mRNA则无显著变化($P > 0.05$),而2:1复合物组与4:1复合物组样本中OPG和BMP-2的mRNA均升高,RANKL和p38MAPK的mRNA表达量降低($P < 0.05$),各组OPG、BMP-2、RANKL和p38MAPK组间统计量值为($F = 15.65, 6.522, 7.048, 12.29; P = 0.001, 0.002, 0.002, 0.001$),见图4a。

免疫组织化学结果显示,与模型组相比,2:1复合物组与4:1复合物组新生骨组织中OPG和BMP-2蛋白表达水平升高,RANKL、p-p38MAPK与p-Caspase3蛋白表达水平下降($P < 0.05$),而1:1复合物组新生骨组织样本中5种蛋白的表达水平均无变化($P > 0.05$)。各组OPG、BMP-2、RANKL、p-p38MAPK与p-Caspase3组间统计量值为($F = 4.498, 8.916, 43.19, 12.56, 7.026; P = 0.040, 0.006, 0.000, 0.002, 0.012$),见图4b、4c。

3 讨论

目前,临床上使用的骨代替材料只有引导成骨作用,存在手术后并发症多等问题,严重影响了骨缺损修复治疗的开展^[5]。本团队前期研究发现,

A-PRF被证实可促进软硬组织的愈合及再生。目前有学者通过不同比例的A-PRF与 β -TCP复合物研究其诱导骨再生的效果,取得一定进展^[3],但涉及的机制仍不明确,不利于复合物的改良与发展。本实验发现A-PRF和 β -TCP的比例为2:1时,抑制p38MAPK通路减少细胞凋亡的发生,介导OPG/RANKL/RANK通路加快骨缺损修复。Micro-CT技术可全方位获得组织内部的三维结构图像,可直接观察新生骨与填充材料的结合情况^[6]。本实验通过Micro-CT辅助结合组织病理学与扫描电镜观察发现,当A-PRF和 β -TCP的配比为2:1时,骨缺损区域中新生骨与填充材料的结合程度最好,诱导新生骨的形成情况最多,BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N指标均升高,纤维组织增生明显,骨细胞聚集增多与骨结构形成情况良好。这可能与A-PRF具有高黏附性的膜性特点,利于细胞黏附,降解过程中所释放的生长因子可诱导骨髓基质细胞等的骨向分化与成骨细胞的附着、增殖和分化有关,但不建议与 β -TCP的构成比例超过2:1,因为A-PRF在会随着时间被体内蛋白酶降解、吸收,浓度过高会导致其释放的生长因子速度降低,诱导骨形成速度减慢,减弱 β -TCP诱导新生骨建成的速度与骨结构框架的形成效果。

在骨形成过程中,多种骨细胞、细胞因子和基因的相互作用促使骨组织恢复原有的结构和功能^[7]。有研究发现,OPG/RANKL/RANK通路在调节骨稳态和骨质量方面发挥关键作用^[8]。RANKL可与位于破骨细胞膜上的RANK特异性结合,触发一系列细胞内信号级联反应^[9]。OPG是肿瘤坏死因子受体家族成员,具有抑制破骨细胞分化、增加骨密度的功能^[10]。OPG可直接与RANKL结合,抑制RANKL与RANK的结合,从而抑制破骨细胞的

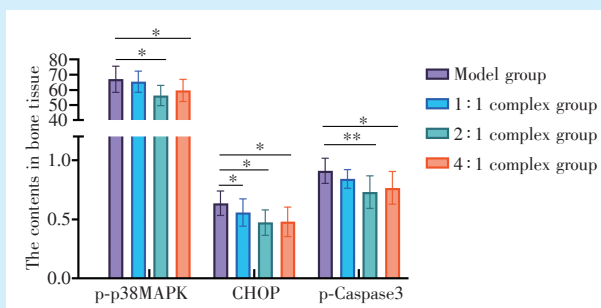
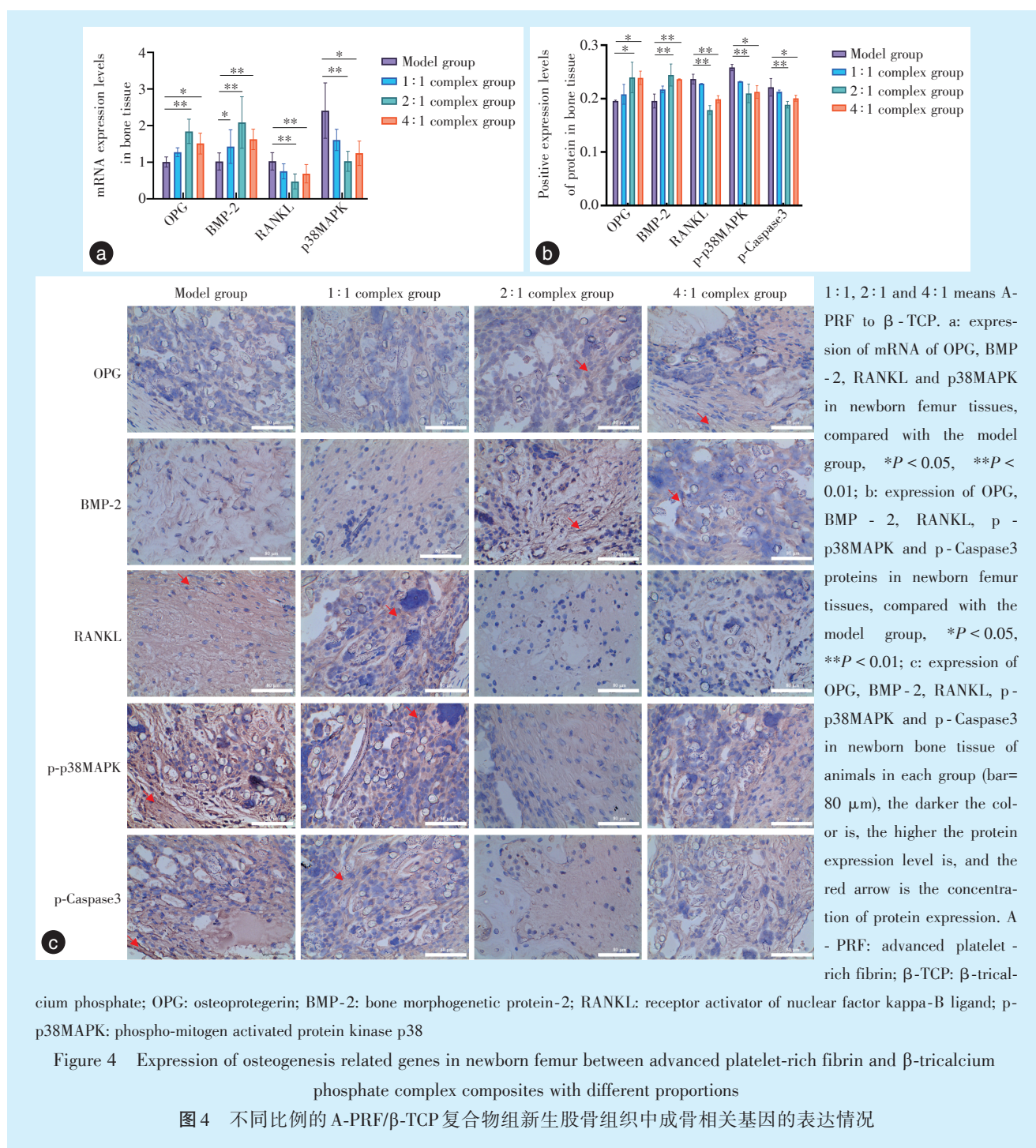


Figure 3 Comparison of the contents of p-p38MAPK, CHOP and p-Caspase3 in newborn bone tissues between advanced platelet-rich fibrin and β -tricalcium phosphate complex composites with different proportions

图3 不同比例的A-PRF/ β -TCP复合物组新生骨组织中p-p38MAPK、CHOP、p-Caspase3的蛋白表达情况

1:1, 2:1 and 4:1 means A-PRF to β -TCP. Compared with the model group ($n = 6$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The contents of p-p38MAPK (pg/mL), CHOP (ng/mL) and p-caspase3 (ng/mL) in newborn femur tissues of 2:1 and 4:1 complex group were decreased. A-PRF: advanced platelet-rich fibrin; β -TCP: β -tricalcium phosphate; p-p38MAPK: phospho-mitogen activated protein kinase p38; CHOP: CCAAT/enhancer binding protein homologous protein; p-Caspase3: phospho-cysteine aspartic protease-3



激活。OPG/RANKL/RANK 共同构成破骨细胞分化和骨吸收的关键信号通路^[11]。BMP 家族蛋白被认为与组织异位骨化形成和干细胞成骨分化潜能密切相关^[12]，其中 BMP-2 已被证明能够参与骨修复^[13]。在本实验中，使用复合物填充后，骨缺损区域骨形成显著增多，新生骨组织中 OPG 基因与蛋白的表达水平显著性升高，RANKL 基因与蛋白表达显著性下降，说明复合物通过增加 OPG 的含量，减少 RANKL 表达，抑制破骨细胞的分化，同时增

加 BMP-2 的表达，进一步诱导骨形成，填补缺损。

MAPK 信号通路是细胞表面到细胞核内部的重要信号传递，p38 是其中一条途径上的关键激酶^[14]。MAPK 通路激活后诱导细胞质中的 p38 磷酸化进入细胞核促进 CHOP、Caspase3 表达与活化，促进细胞凋亡^[15]，与 OPG/RANKL/RANK 通路在成骨途径中也具有相互作用的关系^[16]。当 RANKL/RANK 复合体形成后，能通过 TRAF6 激活 MAPK 家族蛋白表达^[17]，诱发骨质疏松、骨不愈合等疾病，

这说明 MAPK 信号通路有可能通过直接调控 OPG/RANKL/RANK 通路上的关键基因对成骨分化与骨再生进行干预。本实验中发现,填充复合物后,新生骨组织中 p38MAPK 基因表达量下降, p-p38MAPK、CHOP 与 p-Caspase3 的表达减少,说明复合物不仅能抑制 MAPK 通路,减少下游 CHOP 与 p-Caspase3 的含量,抑制细胞凋亡,还能减少 p38MAPK 磷酸化,抑制 RANKL/RANK 通路,减少破骨细胞分化,加速骨再生与保护新生骨组织。同时还发现,当 A-PRF 和 β -TCP 复合物构成比例为 2:1 时对 p38MAPK 通路抑制效果较强。

综上所述,由 A-PRF 与 β -TCP 组成复合物能促进 OPG 表达,抑制 RANKL 表达和 p38MAPK 磷酸化,降低内质网应激与炎症反应,减少新生骨细胞凋亡,诱导成骨分化。目前 A-PRF 与 β -TCP 均是组织工程学上常用的材料,但将两者结合用于组织修复的研究比较少,其复合物帮助组织重塑与再生的潜力十分巨大,如能在此基础上针对不同组织或信号通路结合对应靶点药物,能在针对性修复组织的同时减少并发症发生的风险,使其成为一种安全可靠、成本低、生物活性好的骨再生材料。

【Author contributions】 Fu DM designed the study, performed the experiments and wrote the article. Zhou J, Wang L, Yang X, Lan H, Li SL, Wang J and Fang J performed the experiments and revised the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Zeng JH, Qiu P, Xiong L, et al. Bone repair scaffold coated with bone morphogenetic protein-2 for bone regeneration in murine calvarial defect model: systematic review and quality evaluation[J]. *Int J Artif Organs*, 2019, 42(7): 325-337. doi: 10.1177/0391398819834944.
- [2] Zeng JH, Liu SW, Xiong L, et al. Scaffolds for the repair of bone defects in clinical studies: a systematic review[J]. *J Orthop Surg Res*, 2018, 13(1): 33. doi: 10.1186/s13018-018-0724-2.
- [3] Pietruszka P, Chruścińska I, Duś-Ilnicka I, et al. PRP and PRF-subgroups and divisions when used in dentistry[J]. *J Pers Med*, 2021, 11(10): 944. doi: 10.3390/jpm11100944.
- [4] Zeitounlouian TS, Zeno KG, Brad BA, et al. Effect of injectable platelet-rich fibrin (i-PRF) in accelerating orthodontic tooth movement: a randomized split-mouth-controlled trial[J]. *J Orofac Orthop*, 82(4):268-277. doi: 10.1007/s00056-020-00275-x.
- [5] Zhang Z, Ma Z, Zhang Y, et al. Dehydrothermally crosslinked collagen/hydroxyapatite composite for enhanced in vivo bone repair [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, 163: 394 - 401. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.01.011.
- [6] He T, Cao C, Xu Z, et al. A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16270. doi: 10.1038/s41598-017-16465-4.
- [7] Ma X, Yang J, Liu T, et al. Gukang capsule promotes fracture healing by activating BMP/SMAD and Wnt/ β -catenin signaling pathways[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 7184502. doi: 10.1155/2020/7184502.
- [8] Steller D, Simon R, Von Bialy R, et al. Impact of zoledronic acid and denosumab treatment on growth factor concentration in platelet rich fibrin of patients with osteolytic bone metastases[J]. *Anticancer Res*, 2021, 41(8): 3917 - 3923. doi: 10.21873/anticancer.15187.
- [9] Ono T, Hayashi M, Sasaki F, et al. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond[J]. *Inflamm Regen*, 2020, 40(1): 2. doi: 10.1186/s41232-019-0111-3.
- [10] Yakufu M, Wang Z, Wang Y, et al. Covalently functionalized poly(etheretherketone) implants with osteogenic growth peptide (OGP) to improve osteogenesis activity[J]. *RSC Adv*, 2020, 10(17): 9777-9785. doi: 10.1039/d0ra00103a.
- [11] Fu D, Yang S, Lu J, et al. LncRNA NORAD promotes bone marrow stem cell differentiation and proliferation by targeting miR-26a-5p in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 18. doi: 10.1186/s13287-020-02075-x.
- [12] Dai G, Li Y, Liu J, et al. Higher BMP expression in tendon stem/progenitor cells contributes to the increased heterotopic ossification in achilles tendon with aging[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 570605. doi: 10.3389/fcell.2020.570605.
- [13] Tateiwa D, Nakagawa S, Tsukazaki H, et al. A novel BMP-2-loaded hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate microsphere/hydrogel composite for bone regeneration[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 16924. doi: 10.1038/s41598-021-96484-4.
- [14] Tang X, Liu C, Li T, et al. Gambogic acid alleviates inflammation and apoptosis and protects the blood-milk barrier in mastitis induced by LPS[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86: 106697. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106697.
- [15] Stramucci L, Pranteda A, Bossi G. Insights of crosstalk between p53 protein and the MKK3/MKK6/p38 MAPK signaling pathway in cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(5): 131. doi: 10.3390/cancers10050131.
- [16] Ha MT, Tran PT, Tran HNK, et al. Anti-osteoclastogenic effects of indole alkaloids isolated from barley (*Hordeum vulgare* Var. *Hexastichon*) grass[J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(44):12994-13005. doi: 10.1021/acs.jafc.1c04337.
- [17] Fang Q, Zhou C, Nandakumar KS. Molecular and cellular pathways contributing to joint damage in rheumatoid arthritis[J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 3830212. doi: 10.1155/2020/3830212.

(编辑 周春华, 曾曙光)



官网