

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.09.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201209.1309.002.html\(2020-12-10\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201209.1309.002.html(2020-12-10))

序贯调节巨噬细胞极化的骨修复材料
构建及其体外成管化作用研究*

程 鹏,贺思豪,艾秋池,周江玲,侯天勇,邢军超[△]

(陆军军医大学第一附属医院骨科/全军矫形外科中心/陆军军医大学组织工程研究与开发中心,重庆 400038)

[摘要] **目的** 体外构建可序贯释放炎症因子调节巨噬细胞极化的骨修复材料并评价其体外成管化能力。**方法** 在脱钙骨基质(DBM)表面通过生物素-亲和素系统实现白细胞介素(IL)-4 的内层耦联及缓释,以诱导后期巨噬细胞向 M2 型极化;通过藻酸盐缓释系统实现干扰素(IFN)- γ 的外层负载及早期释放,以促进巨噬细胞向 M1 型极化。通过实时定量 PCR(RT-PCR)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、Transwell 迁移实验、管腔形成实验等手段观察因子的释放动力、巨噬细胞的极化状态,评估复合材料的促血管生成能力。**结果** 构建的复合材料在早期快速稳定释放 IFN- γ ,可诱导巨噬细胞高表达 M1 型标志物,分泌 IL-8 等炎症因子;第 4 天开始在 IL-4 的释放作用下巨噬细胞向 M2 型极化,大量表达血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF-BB)等促血管生成因子。复合材料可明显促进人骨髓来源内皮祖细胞(EPC)向 Mp 的迁移,阻断 CXCR2 趋化因子受体 2(CXCR2)抑制此作用;还可明显促进管腔形成,VEGF 受体 2(VEGFR2)抑制剂可阻断此效应。**结论** 序贯释放炎症因子调节巨噬细胞极化的复合材料在体外有促进管腔化生成作用,可为组织工程骨修复研究提供新的思路。

[关键词] 巨噬细胞极化;M1 型巨噬细胞;M2 型巨噬细胞;脱钙骨基质;血管生成

[中图法分类号] R318.08;R681.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2021)09-1461-07

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Construction of bone repair materials with sequential modulation of macrophage polarization and role of their vascularization in vitro*

CHENG Peng, HE Sihao, AI Qiuchi, ZHOU Jiangling, HOU Tianyong, XING Junchao[△]

(Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Army Military Medical University/

Orthopedic Center of PLA/Tissue Engineering Research and Development Center,

Army Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To in vitro construct the bone repair materials that can sequentially release inflammatory factors to regulate the polarization of macrophages, and to evaluate their in vitro vascularization ability. **Methods** The inner coupling and slow release of IL-4 in the decalcified bone matrix (DBM) surface were realized by the biotin-avidin system to induce the anaphase macrophages to polarize to M2 type. The outer layer load and early release of IFN- γ was realized by alginate-IFN sustained-release system to promote the M1-polarization of macrophages. The release ability of inflammatory factors, polarization status of macrophages were observed by the laboratory means such as RT-PCR, ELISA, Transwell migration test and tube formation test, and the angiogenesis ability of compound materials was evaluated. **Results** The constructed composite material rapidly and stably release IFN- γ in the early stage, and could induce the macrophages to highly express M1 type marker and secrete the inflammatory factors such as IL-8; under the IL-4 release action on 4 d, the macrophages was polarized to the M2 type and expressed the angiogenesis factors such as VEGF and PDGF-BB. The composite materials could significantly promote the migration of endothelial progenitor cells (EPC) to Mp, blocking CXCR2 could inhibit this effect, also significantly promote the lumen formation, VEGFR2 inhibitor could block this effect. **Conclusion** The composite materials that sequentially release inflammatory factors to regulate macrophage polarization have the in vitro angiogenesis effect and can provide a new idea for research of tissue engineered bone repair.

[Key words] macrophage polarization; M1 type macrophages; M2 type macrophages; decalcified bone matrix; angiogenesis

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81701846);全军医学科技青年培育计划孵化项目(16QN097)。 作者简介:程鹏(1983-),主治医师,硕士,主要从事脊柱外科科研与临床、骨关节结核相关方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail:46327289@qq.com。

大段骨缺损是临床骨组织损伤救治的一大难题, 重要原因之一在于缺乏有效可靠的具有组织重建功能的骨修复材料。既往骨修复材料的研发重点关注其成骨能力, 往往忽略血管化这一成骨活动的基础条件^[1-2]。有研究表明, 移植骨的成骨活动总是与血管化过程密切相关, 血管化的程度甚至直接决定了骨移植的成败^[3-4]。早期良好的血管化不仅为移植材料输送氧气及营养物质、移除代谢废物, 还为宿主成骨相关细胞如间充质干细胞(MSCs)等的迁移定植提供必需的条件^[5-6]。在骨缺损缺血区的血管及骨重建过程中, 局部炎症因子的协同作用调节的巨噬细胞极化扮演重要角色。巨噬细胞分为经典激活途径巨噬细胞(M1 型巨噬细胞)和替代激活途径巨噬细胞(M2 型巨噬细胞), 在组织修复早期, M1 型巨噬细胞发挥促炎功能, 在后期 M2 型巨噬细胞发挥抗炎、促进损伤组织修复和血管生长的作用^[7]。为此, 本研究利用藻酸盐缓释系统和生物素-亲和素系统耦联脱钙骨基质(DBM)构建骨修复材料, 实现干扰素(IFN)- γ 和白细胞介素(IL)-4 的序贯释放, 调节巨噬细胞极化从而促进血管生成, 为其在骨缺损修复治疗中的可行性提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人骨髓来源内皮祖细胞(EPC)购自美国 ATCC 公司(PCS-800-012), 人外周血来源单核巨噬细胞购自美国 ATCC 公司(CRL-9855); 内皮细胞培养基(ECM)、0.25%胰蛋白酶、特优胎牛血清(FBS)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、IMDM 培养基、DMEM/F12 培养基购自美国 HyClone 公司; 海藻酸钠、Dil-ac-LDL、FITC-UEA-1、Biotin-sulfo-LC-LC-NHS、酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、反转录试剂盒购自美国 Sigma 公司; 重组人 IL-4、IFN- γ 蛋白购自美国 PeproTec 公司; 抑制剂购自美国 Selleck 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

(1)EPC 的培养: 细胞复苏后加入新鲜 ECM, 将细胞接种于培养皿中, 于 5% CO₂, 37 °C 恒温孵箱孵育 24 h 后见细胞贴壁生长, 换液后以磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次以去除未贴壁细胞, 然后加入新鲜培养基, 隔天换液至细胞融合达到 90% 时传代, 取 P3 代对数生长期的细胞使用。(2)巨噬细胞的培养: 培养基为含 10% FBS 的 IMDM 培养基, 细胞解冻、离心、弃上清液后加入新鲜培养基并接种于超低吸附培养瓶(美国 Corning)中, 于 5% CO₂, 37 °C 恒温孵箱孵育 24 h 后换液, 隔天换液至细胞密度达到 80% 时传代, 传代后培养基中加入 10 ng/mL 的巨噬细胞克隆集落刺激因子(M-CSF), 隔天换液至第 5 天, 取细胞使用。

1.2.2 材料构建

将材料分为 4 组: 空白对照组(Ctrl 组)、单纯 IFN- γ 组(IFN 组)、单纯 IL-4 组(IL-4 组)、IL-4 加

IFN- γ 组(联合组)。(1)DBM 的制备: 按照本课题前述方法制备支架, 依托陆军军医大学第一附属医院骨库, 以云南小香猪胫骨、股骨近远端松质骨块, 制备支架材料。在密闭玻璃容器中加入 0.6 mol/L 盐酸, 支架投入其中浸泡脱钙。常温浸泡 24 h, 每 8 小时更换盐酸 1 次, 当皮质骨呈半透明能弯曲的弹性状态, 松质骨块呈海绵状压缩后自动恢复原状, 将骨块取出, 以无菌蒸馏水反复冲洗、浸泡, 直至 pH 值为 7, 吸出浸泡液将 DBM 支架材料置于离心管中, 300 × g 离心 5 min, 对 DBM 进行辐照处理以灭菌, 真空冷冻干燥机干燥后分装备用。(2)DBM 的生物素化: 取 DBM 支架于 PBS 浸泡后修剪大小约 3 mm × 3 mm × 3 mm, 将其浸泡于 10 mmol/L Biotin-sulfo-LC-LC-NHS 中 1 h, PBS 冲洗 3 次以清除未附着的生物素, 70%乙醇溶液浸泡消毒 10 min, 以 PBS 洗净后浸泡在 PBS 中, 4 °C 浸泡 24 h。(3)蛋白生物素化: 调整重组人 IL-4 蛋白溶液浓度为 1 mg/mL, 向其中加入 10 mmol/L Sulfo-NHS-Biotin 粉末, 室温放置 1 h 完成蛋白生物素化, PBS 透析移除未附着的生物素, 无菌过滤后存于 4 °C 备用。(4)支架-蛋白耦联: 将生物素化的 DBM 支架浸泡于 172 μ g/mL 的亲合素溶液中 1 h, PBS 冲洗 3 次, 再将 IL-4 组与联合组浸泡于生物素化的 IL-4 溶液 1 h, IFN 组和 Ctrl 组浸泡于 PBS 溶液中 1 h, PBS 冲洗 3 次。由于亲和素可提供 4 个高亲和力的生物素结合位点供其特异性结合, 使得 IL-4 与支架之间的非共价连接十分牢固。(5)复合材料构建: 制备含重组人 IFN- γ 蛋白的海藻酸钠溶液(IFN- γ 1 mg/mL, 海藻酸钠 80 mg/mL), 以其浸泡 IL-4 耦联的支架材料 30 min, Ctrl 组与 IL-4 组浸泡在不含 IFN- γ 的海藻酸钠溶液中 30 min, 浸泡于 10.1 mg/mL 氯化钙溶液中 10 min, 重复以上步骤 3 次, 见材料表面有浅白色絮状物附着, 去离子水洗净后 -80 °C 冻存干燥备用, 电镜下观察材料的微观结构。

1.2.3 缓释动力检测

取联合组复合材料放置在 10 mL 的 DMEM/F12 培养基中, 放置在 37 °C 恒温箱中, 每天更换液体并收集培养基, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液通过 ELISA 试剂盒测定 IL-4 与 IFN- γ 水平, 计算累计释放量。

1.2.4 复合材料对巨噬细胞极化的影响

取 M-CSF 刺激 5 d 的巨噬细胞, 以 1×10^6 /mL 的浓度采用双面静置接种法接种于各组材料, 加入培养基, 培育 3 d 后更换培养基。分别在培养 1、4、7 d 收集培养基, 通过 ELISA 检测其中蛋白水平。相同时间点取各组材料, 液氮研磨后提取 mRNA, 按反转录试剂盒说明书进行逆转录后行实时定量 PCR(RT-PCR)。肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、趋化因子受体 7(CCR7)、趋化因子配体 18(CCL18)、血小板衍生生长因子(PDGF-BB)、血管内皮生长因子(VEGF)等引物序列见表 1。扩增条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 57 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 15 s, 40 个循环。

表 1 RT-PCR 引物序列(5'-3')

基因	正向引物	反向引物
TNF-α	TCC TTC AGA CAC CCT CAA CC	AGG CCC CAG TTT GAA TTC TT
IL-1β	AAA CAG ATG AAG TGC TCC TTC CAG G	TGG AGA ACA CCA CTT GTT GCT CCA
CCR7	AGG CTA TTG TCC CCT AAA CC	GGA GGA GAG TGA AGA AAA CG
IL-8	ATG CTG CTG AAC CAG TAG A	CTA GTC TTC GTT TTG AAC AG
CD206	TTC GGA CAC CCA TCG GAA TTT	CAC AAG CGC TGC GTG GAT
CCL18	CTT TCC CCT TTC CCT TCA AC	GTG CTG AGC AAA ACC ATT CA
PDGF-BB	TCA GCA GCA AGG ACA CCA TG	CCG AGC AGG TCA GAA CGA AG
VEGF	ACC AAG GCC AGC ACA TAG G	ACG CTC CAG GAC TTA TAC CG
β-actin	TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT	GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT

1.2.5 Transwell 实验

取 EPC 以 ECM 重悬制备单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10⁴ 个/mL。在 24 孔板中组装 Transwell 小室,于下室按照实验分组,分别加入 700 μL 各组培育 3 d 后的培养基。按照实验分组于 Transwell 上室中分别加入 200 μL 含单细胞悬液、含 Axinitib(VEGFR2 抑制剂)或含 SB225002(IL-8 抑制剂)预处理 EPC 的单细胞悬液。将 Transwell 小室置于 5% CO₂、37 °C 的孵箱内,迁移 6 h 后终止。以无菌棉签擦拭碳酸酯膜上层以去除未迁移的细胞。用 PBS 冲洗碳酸酯膜 3 次。以 4% 的多聚甲醛固定 15 min,PBS 冲洗 3 次。0.5% Triton-X100 破膜 10 min,PBS 冲洗 3 次后以 DAPI 工作液(1 μg/mL)避光染色 5~8 min,PBS 冲洗 3 次。荧光显微镜下每个碳酸酯膜随机选取 10 个高倍视野(×200)分别计数,计算并比较每组细胞迁移数量。

1.2.6 管腔形成实验

将 Matrigel 胶置于 4 °C 过夜使其缓慢融化,加入

至 96 孔板中(50 μL/孔),37 °C 的孵箱内静置 30 min,以各组孵育 7 d 的培养基制备浓度为 2×10⁵/mL 的 EPC 单细胞悬液,每孔加入 50 μL 细胞悬液,37 °C 孵箱内孵育 8 h 后镜检。

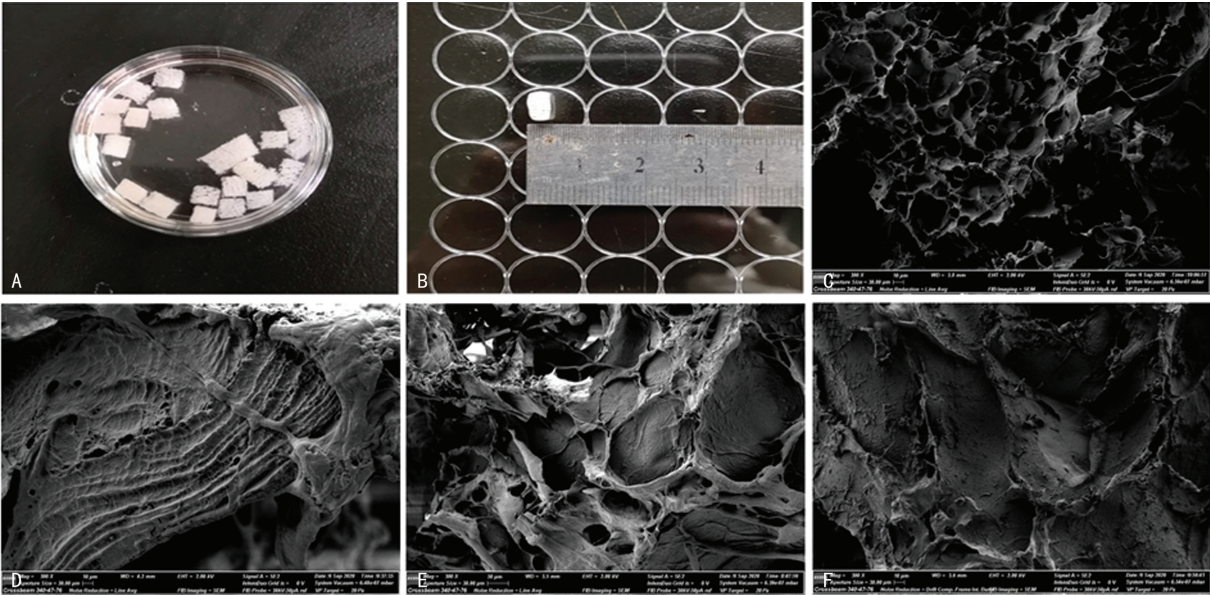
1.3 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件,进行单因素方差分析及最小显著性差异(LSD)比较,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 材料性状

DBM 外观如图 1A 所示,IFN-γ 藻酸盐混合溶液与氯化钙溶液反复浸泡后可在支架孔隙表面形成浅白色胶状物(图 1B)。扫描电镜结果显示 Ctrl 组支架孔隙率均一,微孔表面较为光滑(图 1C),IL-4、IFN 组可见蛋白基质均匀皱缩分布在支架表面(图 1D、E),联合组由于 IFN-γ 藻酸盐混合溶液与氯化钙溶液的反应形成凝胶样褶皱,见图 1F。



A、B: 支架大体观;C: Ctrl 组;D: IL-4 组;E: IFN 组;F: 联合组。

图 1 材料大体观与扫描电镜结果(×300,n=5)

2.2 复合材料的缓释动力

复合材料与 IFN- γ 和 IL-4 的结合稳定。复合材料通过藻酸盐缓释系统实现与 IFN- γ 外层负载达到早期释放的效果,IFN- γ 在前 4 d 稳定快速释放,4 d 内释放接近完全;复合材料通过生物素-亲和素系统实现 IL-4 的内层耦联达到缓释效果,IL-4 在前 3 d 无明显释放,在第 4~7 天快速稳定释放,此后每天少量释放,至第 13 天释放完全,见图 2。

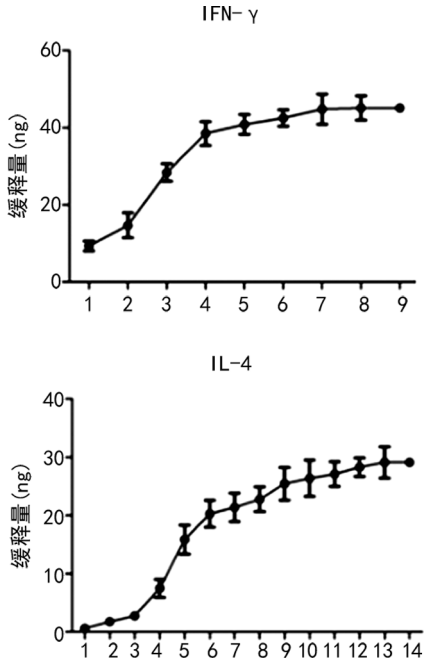


图 2 IFN- γ 及 IL-4 缓释动力 ($n=5$)

2.3 复合材料对巨噬细胞极化状态的影响

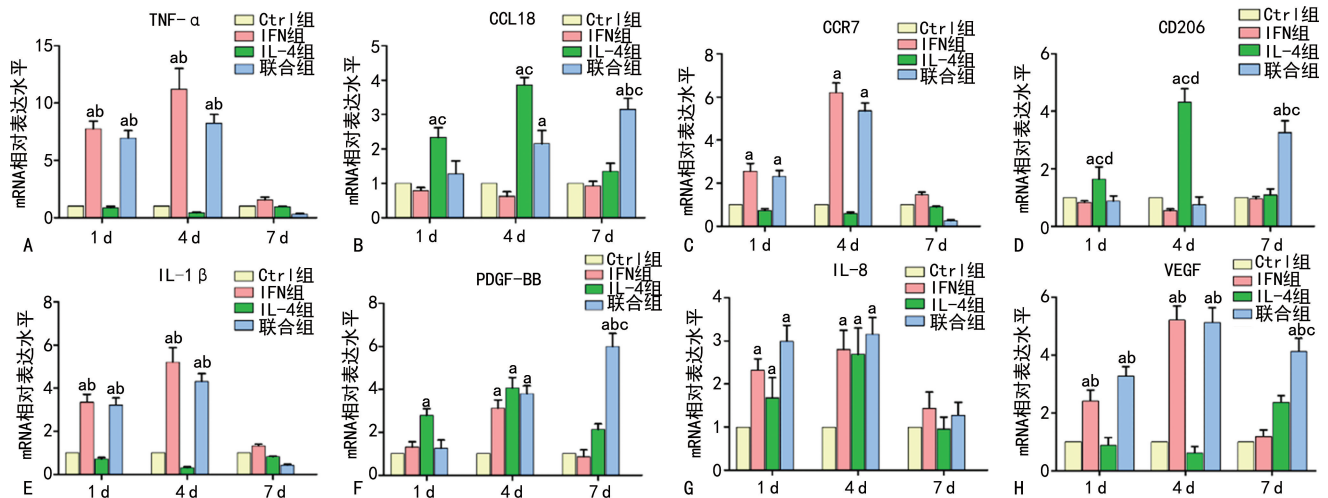


图 3 巨噬细胞 mRNA 表达变化 ($n=5$)

2.4 复合材料对血管生成的影响

管腔形成实验结果显示,IL-4 及联合组条件培养基可显著促进管腔形成;阻断 VEGF 受体(Axitinib)均可明显抑制联合组条件培养基的促血管生成作用,阻断 IL-8(SB225002)对联合组条件培养基的促血管生成作用影响甚微,见图 5。

RT-PCR 结果显示,IFN- γ 早期的释放使联合组与 IFN 组巨噬细胞向 M1 型极化,在培育第 1 天,IFN- γ 可诱导巨噬细胞释放 M1 型标志物 TNF- α ,表现出 M1 型极化的部分趋势;第 4 天,IFN- γ 的释放使得巨噬细胞表达 M1 型标志物 CCR7、TNF- α 及 IL-1 β ;第 7 天,M1 型标志物表达水平相比 Ctrl 组无明显差异。在第 1、4 天,耦联炎症因子的 3 组中细胞均高表达 IL-8,在第 7 天,IL-8 的表达在各组间无明显差异。IL-4 在第 4~7 天的稳定释放使 IL-4 组巨噬细胞向 M2 型极化,在培育第 1 天,IL-4 组细胞即高表达 M2 型标志物 CD206,证实 IL-4 可诱导 M2 型细胞极化;在第 4 天,IL-4 组细胞 CD206 表达明显升高,而联合组与 Ctrl 组无明显差异;在第 7 天,IL-4 组细胞 CD206 与 Ctrl 组无明显差异,而联合组 CD206 表达明显升高;在第 4、7 天,联合组由于 IL-4 的释放导致 M2 型标志物 CCL18 及 PDGF-BB 表达水平明显升高。对于 VEGF 表达而言,联合组细胞在第 1 天表达 VEGF,明显高于 IL-4 组,与 IFN 组水平相当,联合组细胞 VEGF 表达水平在第 4 天达到高峰,在第 7 天仍高表达,且明显高于其他 3 组,见图 3。ELISA 结果显示,在培育第 1 天和第 4 天,IFN- γ 的释放导致巨噬细胞高表达 M1 型标志物 TNF- α 、IL-1 β 及趋化因子 IL-8;IL-4 的释放导致巨噬细胞高表达 M2 型标志物 CCL18、PDGF-BB;在第 4 天和第 7 天,由于 IL-4 的释放,复合材料明显促进巨噬细胞的 M2 型极化标志物的分泌。对于 VEGF 的表达变化趋势,ELISA 结果与 PCR 结果较为一致,见图 4。

2.5 复合材料对 EPC 迁移的影响

Transwell 细胞迁移结果显示,IFN 组及联合组条件培养基可明显促进 EPC 迁移;尽管联合组 VEGF 表达量较高,阻断 VEGF 受体(Axitinib)后未见 EPC 的迁移发生明显改变;而阻断 IL-8(SB225002)可明显抑制联合组条件培养基对 EPC 的

募集作用,见图 6。

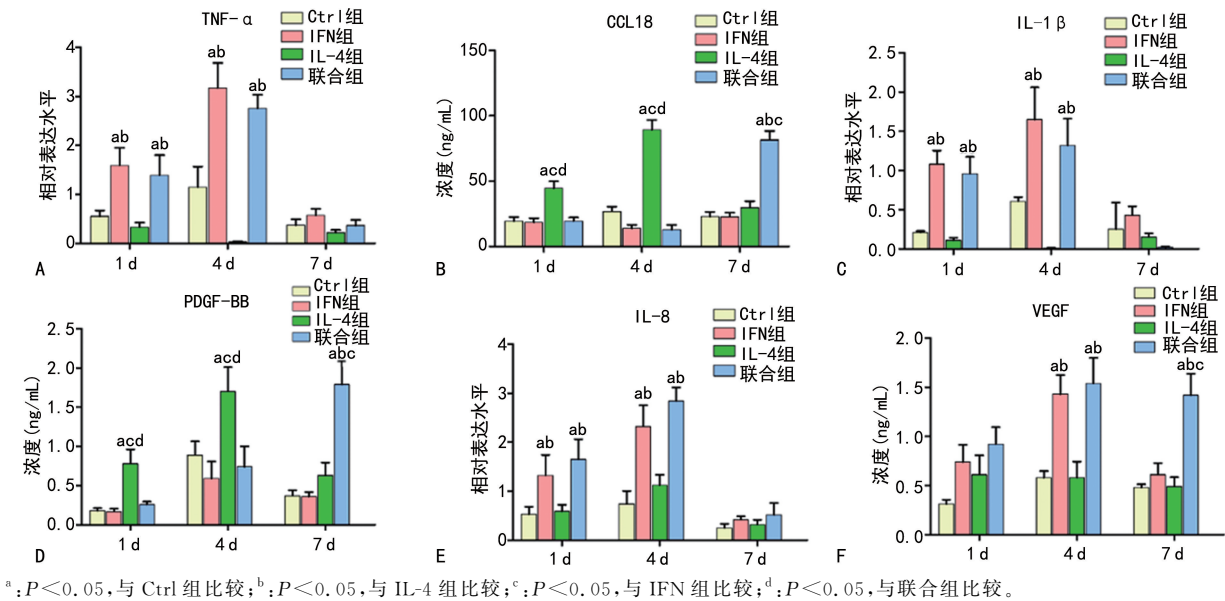
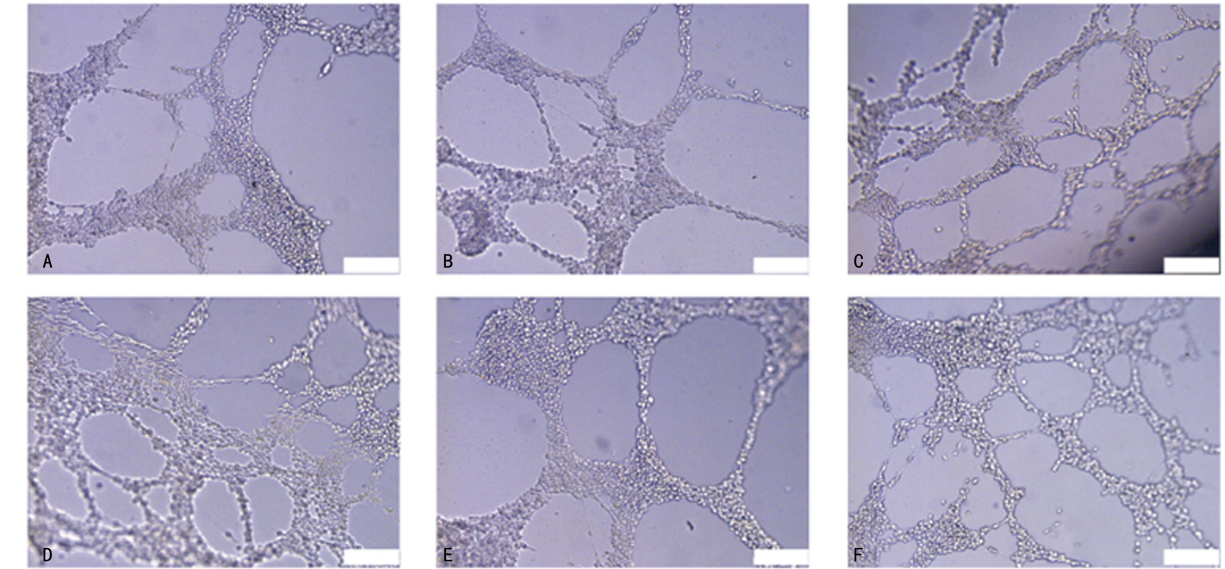
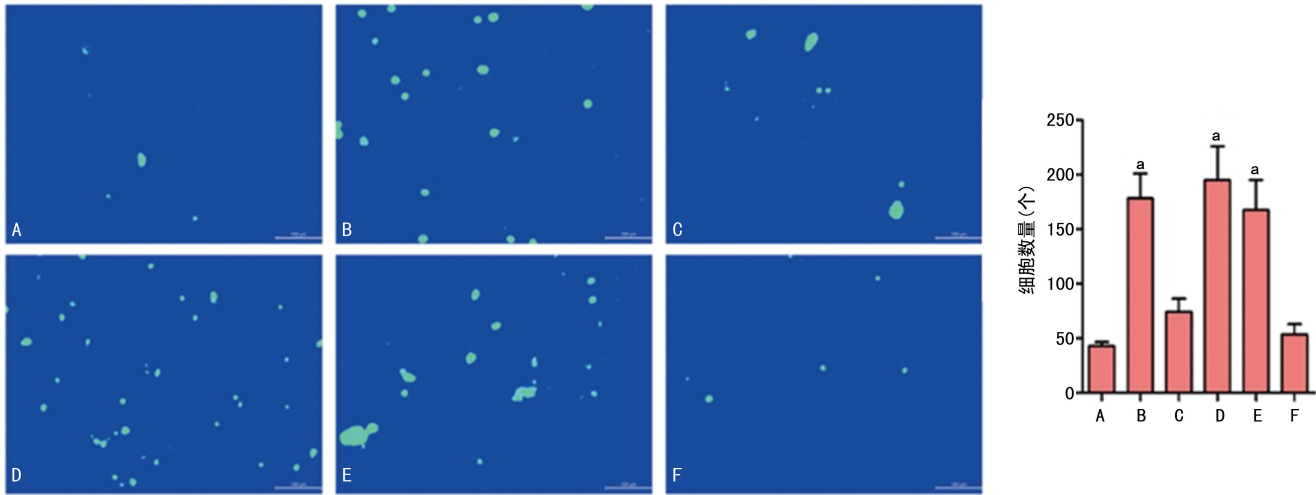


图 4 巨噬细胞蛋白表达变化 (n = 5)



A:Ctrl 组;B:IFN 组;C:IL-4 组;D:联合组;E:联合组+Axitinib 组;F:联合组+SB225002。

图 5 管腔形成实验 (×200, n = 5)



A:Ctrl 组;B:IFN 组;C:IL-4 组;D:联合组;E:联合组+Axitinib 组;F:联合组+SB225002;^a P < 0.05, 与 Ctrl 组比较。

图 6 Transwell 细胞迁移实验 DAPI 染色 (×200) 及细胞计数 (n = 5)

3 讨 论

巨噬细胞是机体的重要免疫细胞,具有吞噬病原、抗原递呈和分泌多种细胞因子等功能。除了在免疫反应过程中发挥重要作用,巨噬细胞在血管生成及骨生成过程中也扮演着不可或缺的角色^[8-9]。研究表明,当宿主巨噬细胞缺失时,移植物内的血管生成无法进行,而充分的血管发生对于骨的发育及修复必不可少^[10-11]。在不同的组织微环境、细胞因子作用下,根据细胞表面标识性分子及功能的不同,巨噬细胞可极化成 M1 和 M2 型。在 IFN- γ 为代表的众多因子的作用下,巨噬细胞极化为 M1 型,而在 IL-4 等因子作用下,其向 M2 型极化。在组织损伤修复过程中,早期损伤局部产生的炎症因子导致巨噬细胞以 M1 型为主,尔后 M2 型为巨噬细胞的主要存在形式^[12-13]。基于巨噬细胞在免疫防御、血管生成、骨生成方面的重要作用及其不同极化状态下的不同生理功能,通过移植材料调节宿主巨噬细胞极化状态,从而改善其移植环境内血管化水平的促组织修复方式极有可能更适合于临床大段骨缺损的救治。因此,骨移植材料如能顺序、可控地激活 M1 及 M2 型巨噬细胞,将充分调动宿主自身的抗感染及组织损伤后修复能力,这不仅符合当今医学界推崇的原位组织工程理念,还将为临床大段骨缺损的治疗提供新的思路。

为此,本研究利用藻酸盐缓释系统和链霉素-亲和素系统耦联 DBM 构建了复合材料。藻酸盐是在海藻中提取的天然多糖碳水化合物,为一种天然纤维素,无毒副作用,来源丰富、价格低廉,且具有良好的生物相容性和可降解性^[14]。藻酸盐在钙离子溶液中可即刻形成热稳定凝胶,其作为控释系统已被广泛应用^[15]。亲和素与生物素有着极强的亲和性,此外还能与一些含生物素的大分子蛋白结合,因此,生物素化的 DBM 支架和 IL-4 可由亲和素提供过高亲和力结合位点实现较为牢固的非共价连接。结果显示,复合材料可实现 IFN- γ 与 IL-4 的序贯释放。既往有学者采用气体发泡-粒子沥滤的方法制备了多聚-L-谷氨酸(PLG)支架,实现了促血管生成因子如 VEGF 及促成熟因子 PDGF-BB 的序贯释放,成功地改善了支架的血管生成能力,并揭示了细胞因子有序作用的重要性^[16]。血管生成过程复杂,对众多生长因子和信号分子有着严格的时间和剂量要求,使得针对单一或少数细胞因子的控释产生的作用存疑^[17]。而巨噬细胞主要通过分泌因子的方式调控血管生成,其对成骨相关细胞如 EPC、MSC、成骨细胞等的生物学行为均有着重要的调控作用。因此,通过材料序贯调控巨噬细胞的分泌功能可能对血管生成及骨修复形成级联放大的调控作用。本研究结果证实,复合材料可在序贯释放细胞因子的基础上实现巨噬细胞极化状态的序贯调节,即在 4 d 内,巨噬细胞以 M1 型为主,而后以 M2 型为主;体外实验结果与组织损伤修复过程中巨噬细

胞的极化状态变化时间较为吻合,亦体现了材料的仿生学特征。

在血管生成的过程中,EPC 的迁移是关键环节。在组织损伤信号的引导下,EPC 由骨髓动员至外周循环,再迁移至损伤部位促进局部新血管的形成,此外 EPC 已被证实多种动物模型中具有促进成骨细胞形成从而促进骨修复的作用^[5]。本研究结果发现,复合材料可明显促进 EPC 向巨噬细胞的迁移,提示复合材料具有良好的促血管生成作用。EPCs 的迁移受到多条信号转导通路的调节,比如 PI3K/Akt,SDF-1/CXCR4/eNOS 等,本课题组前期研究证实,在骨缺损模型中,EPC 向移植体迁移的主要信号途径为 CXCR2-Src-PKL/Vav2-Rac1 通路^[5]。IL-8 是 CXCR2 的一种高亲和力配体,最初被描述为一种炎症趋化因子,可以趋化白细胞。有研究表明,IL-8 可与 G-CSF 协同作用,通过结合 CXCR1 和 CXCR2 来调节 EPC 的动员进而促进骨的修复^[3,18]。SB225002 为 CXCR2 的高选择性抑制剂,在本研究中,发现复合材料对 EPC 向巨噬细胞迁移的促进作用可被 SB225002 阻断,提示 CXCR2 及其配体在其中的关键作用,也从另一方面论证了通过调控巨噬细胞旁分泌功能促进血管生成的可行性。除了通过分泌作用调控成骨细胞形成等过程外,EPC 促进血管生成的主要方式在于分化为内皮细胞,直接促进血管再生。EPC 通过向内皮细胞分化及促进成骨细胞形成进而促进血管化和骨修复。本研究中,观察到联合组条件培养基可明显促进血管生成,而阻断 VEGFR2 可明显抑制此作用,说明了 VEGF 在巨噬细胞调节血管生成过程中的重要作用;而 VEGF 在联合组持续高表达,亦反证了复合材料良好的促血管生成能力。此外,在众多的细胞因子中,VEGF 和 PDGF-BB 的促血管生成作用最具代表性,VEGF 的主要作用为募集内皮细胞启动血管生成,而 PDGF-BB 主要参与血管生成后期管腔形成及周细胞募集过程,二者在血管生成过程中相继大量表达从而使血管生成过程有序进行^[19-20]。本研究制备的复合材料通过调控巨噬细胞由 M1 向 M2 的极化,使得 VEGF 和 PDGF-BB 的表达高峰可以相继出现。

综上所述,血管化是骨移植成功的关键,而炎症反应在其中起重要作用。如果骨缺损局部的炎症微环境可以通过材料的制备技术和工艺加以合理控制,那么未来的材料将有希望彻底摆脱细胞的束缚、借助宿主的自我修复功能完成重建。为此,本研究构建了可序贯调节巨噬细胞极化的复合材料,通过体外实验初步证实了其促血管生成能力,可为骨缺损的治疗提供新的思路,在骨缺损的应用及研究中具有一定的潜在应用价值。

参考文献

[1] PETITE H,VIATEAU V,BENSAÏD W,et al.

- Tissue-engineered bone regeneration [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(9): 959-963.
- [2] BABIZHAYEV M A, YEGOROV Y E. Tissue formation and tissue engineering through host cell recruitment or a potential injectable cell-based biocomposite with replicative potential: molecular mechanisms controlling cellular senescence and the involvement of controlled transient telomerase activation therapies[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(12): 3993-4023.
- [3] YANG A, LU Y, XING J, et al. IL-8 enhances therapeutic effects of BMSCs on bone regeneration via CXCR2-mediated PI3k/Akt signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(1): 361-370.
- [4] STEGEN S, VAN GASTEL N, CARMELIET G. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration[J]. *Bone*, 2015, 70(9): 19-27.
- [5] LI Z, YANG A, YIN X, et al. Mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell migration, vascularization, and bone repair in tissue-engineered constructs via activating CXCR2-Src-PKL/Vav2-Rac1[J]. *FASEB J*, 2018, 32(4): 2197-2211.
- [6] BRANDI M L, COLLIN-OSDOBY P. Vascular biology and the skeleton[J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(2): 183-192.
- [7] SPILLER K L, NASSIRI S, WITHEREL C E, et al. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2015, 37(1): 194-207.
- [8] ARNOLD L, HENRY A, PORON F, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(5): 1057-1069.
- [9] ROHA J D, SAWH-MARTINEZ R, BRENNAN M P, et al. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(10): 4669-4674.
- [10] KANCZLER J M, OREFFO R O C. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone[J]. *Eur Cells Mater*, 2008, 15(2): 100-114.
- [11] FANTIN A, VIEIRA J M, GESTRI G, et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction[J]. *Blood*, 2010, 116(5): 829-840.
- [12] CHO D I, KIM M R, JEONG H Y, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages[J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46(1): 1-9.
- [13] GORDON S. Alternative activation of macrophages [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(1): 23-35.
- [14] NEVES M I, MORONI L, BARRIAS C C. Modulating alginate hydrogels for improved biological performance as cellular 3D microenvironments[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 665.
- [15] SUN J, TAN H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications[J]. *Materials (Basel)*, 2013, 6(4): 1285-1309.
- [16] CHEN R R, SILVA E A, YUEN W W, et al. Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation [J]. *Pharm Res*, 2007, 24(2): 258-264.
- [17] HERBERT S P, STAINIER D Y R. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(9): 551-564.
- [18] YOSHIMURA T. Discovery of IL-8/CXCL8 (the story from Frederick) [J]. *Front Immunol*, 2015, 6(JUN): 6-8.
- [19] COULTAS L, CHAWENGSAKSOPHAK K, ROSSANT J. Endothelial cells and VEGF in vascular development [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 937-945.
- [20] CONWAY E M, COLLEN D, CARMELIET P. Molecular mechanisms of blood vessel growth [J]. *Cardiovasc Res*, 2001; 49(3): 507-521.

(收稿日期: 2020-10-19 修回日期: 2020-12-07)