

· 基础研究 ·

# 骨碎补总黄酮对纳米羟基磷灰石-胶原复合材料与成骨细胞-血管内皮细胞共培养体系中血管内皮细胞增殖的影响

李晋玉<sup>1</sup>, 俞兴<sup>1</sup>, 姜俊杰<sup>2</sup>, 赵学干<sup>1</sup>, 孙旗<sup>1</sup>, 郑晨颖<sup>1</sup>, 白春晓<sup>1</sup>, 刘楚吟<sup>1</sup>, 贾育松<sup>1</sup>

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700;

2. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京 100700)

**摘要** 目的:探讨骨碎补总黄酮(osteopractic total flavone, OTF)对纳米羟基磷灰石-胶原(nano-hydroxyapatite collagen, nHAC)复合材料与成骨细胞-血管内皮细胞共培养体系中血管内皮细胞增殖的影响。方法:分别以浓度为  $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  及  $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 OTF 溶液干预生长在 nHAC 复合材料上的 hFOB1.19 人成骨细胞,干预 24 h 后收集 5 种上清液。再分别以 5 种上清液和人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)培养基混合培养 HUVEC,培养 24 h 和 48 h 后进行划痕实验,计算细胞迁移率,确定 OTF 溶液最佳干预浓度和时间。在 4 个培养皿中铺满 nHAC 复合材料,加入 DMEM/F12。A 培养皿中不添加其他材料;B、D 培养皿中接种 hFOB1.19 人成骨细胞,预培养 24 h 使细胞贴壁;C、D 培养皿中加入 OTF 溶液,根据上一步划痕实验确定的最佳干预浓度和时间进行干预。干预结束后收集各培养皿中的上清液进行后续实验。接种 HUVEC 于 HUVEC 培养基上,分为空白组和 A、B、C、D 共 5 组;空白组不添加其他材料,A、B、C、D 组分别加入 A、B、C、D 培养皿上清液;以 CCK-8 法测定细胞增殖率,HE 染色后观察 HUVEC 形态,以 ELISA 法检测血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)含量。结果:①OTF 溶液最佳干预浓度与时间检测结果。5 种浓度 OTF 溶液干预后,0~24 h 细胞迁移率的差异有统计学意义[(16.46±4.01)%, (21.71±1.30)%, (24.94±3.47)%, (22.08±2.46)%, (21.34±2.28)%,  $F=4.564$ ,  $P=0.013$ ],其中  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  OTF 溶液干预后的细胞迁移率高于其余 4 组( $P=0.001$ ,  $P=0.020$ ,  $P=0.014$ ,  $P=0.029$ );24~48 h 细胞迁移率的差异无统计学意义[(6.06±1.22)%, (5.37±1.85)%, (5.58±1.88)%, (6.14±1.52)%, (4.99±1.25)%,  $F=0.374$ ,  $P=0.823$ ]。提示 OTF 溶液最佳干预浓度为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,最佳干预时间为 24 h。②HUVEC 细胞活性检测结果。时间因素与分组因素存在交互效应( $F=14.039$ ,  $P=0.000$ );5 组 HUVEC 细胞增殖率总体比较,差异有统计学意义,即存在分组效应( $F=83.285$ ,  $P=0.000$ );干预开始后不同时间之间 HUVEC 细胞增殖率的差异有统计学意义,即存在时间效应( $F=1968.467$ ,  $P=0.000$ );5 组 HUVEC 细胞增殖率随时间变化均呈升高趋势,各组的变化趋势不完全相同(1.05±0.06, 1.81±0.09, 2.53±0.05, 6.10±0.17, 11.29±1.21,  $F=527.347$ ,  $P=0.000$ ;0.99±0.11, 2.37±0.40, 2.92±0.19, 7.35±0.19, 14.41±1.35,  $F=913.030$ ,  $P=0.000$ ;0.98±0.20, 3.50±0.18, 4.35±0.16, 8.53±0.99, 15.42±0.73,  $F=1637.304$ ,  $P=0.000$ ;1.02±0.10, 2.10±0.13, 2.59±0.15, 4.70±0.25, 11.41±1.21,  $F=494.876$ ,  $P=0.000$ ;1.01±0.06, 2.81±0.37, 3.31±0.08, 5.95±0.24, 12.74±2.03,  $F=878.982$ ,  $P=0.000$ );干预开始后 0 d 时,各组细胞增殖率比较,差异无统计学意义;干预开始后 1 d、2 d 时,B 组 HUVEC 细胞增殖率最高、D 组次之,其余 3 组增殖率较为接近;干预开始后 3 d、4 d 时,B 组 HUVEC 细胞增殖率最高、A 组次之,其余 3 组增殖率较为接近。③HUVEC 形态观察结果。细胞形态观察结果显示,干预开始后 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d 时各组 HUVEC 的形态均无明显差异。④VEGF 和 FGF-2 含量检测。A、B、C、D 4 组 VEGF 含量比较,差异无统计学意义(0.059±0.012, 0.057±0.016, 0.059±0.018, 0.057±0.014,  $F=0.060$ ,  $P=0.980$ )。4 组 FGF-2 含量比较,差异有统计学意义[(215.83±19.56)pg·mL<sup>-1</sup>, (565.83±47.14)pg·mL<sup>-1</sup>, (228.33±17.67)pg·mL<sup>-1</sup>, (445.00±17.69)pg·mL<sup>-1</sup>,  $F=317.377$ ,  $P=0.000$ ];B 组的 FGF-2 含量高于其余 3 组( $P=0.009$ ,  $P=0.010$ ,  $P=0.025$ ),D 组的 FGF-2 含量高于 A 组和 C 组( $P=0.013$ ,  $P=0.017$ ),A 组和 C 组 FGF-2 含量的差异无统计学意义( $P=0.050$ )。结论:人成骨细胞和 HUVEC 在 nHAC 复合材料上共培养,均可以良好贴附、生长和增殖;OTF 不能促进 nHAC 复合材料与人成骨细胞-HUVEC 共培养体系中 HUVEC 增殖;HUVEC 的增殖可能与成骨细胞分泌 FGF-2 有关。

**关键词** 骨碎补;黄酮;细胞增殖;血管内皮细胞;成骨细胞;共同培养技术;羟基磷灰石类;胶原;内皮生长因子;成纤维细胞生长因子 2;组织工程

基金项目:国家自然科学基金项目(81503601;81603517);北京中医药大学东直门医院“青苗人才培养计划”项目(DZMYS-201802);北京中医药大学 2018 年度基本科研业务项目(2018-JYBZZ-JS096);中华中药学会青年人才托举工程项目(CACM-2018-QNRC-C08)

通讯作者:贾育松 E-mail:13466584110@163.com

## Effects of osteopractic total flavone on proliferation of vascular endothelial cells of osteoblasts – vascular endothelial cells co – culture system in nano-hydroxyapatite collagen composite

LI Jinyu<sup>1</sup>, YU Xing<sup>1</sup>, JIANG Junjie<sup>2</sup>, ZHAO Xueqian<sup>1</sup>, SUN Qi<sup>1</sup>, ZHENG Chenying<sup>1</sup>, BAI Chunxiao<sup>1</sup>, LIU Chuyin<sup>1</sup>, JIA Yusong<sup>1</sup>

1. Dongzhimen Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the effects of osteopractic total flavone (OTF) on proliferation of vascular endothelial cells (VECs) of osteoblasts (OBs) – VECs co – culture system in nano-hydroxyapatite collagen (nHAC) composite. **Methods:** The hFOB1.19 human OBs were cultured in nHAC composite and were intervened by OTF solution with concentration of 500, 250, 100, 50 and 0  $\mu\text{g/mL}$  respectively for 24 hrs, and then 5 kinds of supernatants were collected. The HUVECs were cultured in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) medium supplemented with the 5 kinds of supernatants respectively. The scratch tests were performed after 24 – and 48 – hour cell cultivation to calculate the cell migration rate and determine the optimal intervention concentration and duration of OTF solution. Four petri dishes were overspread with nHAC composites and were added with DMEM/F12 medium respectively. No other mediums was added into petri dish A, while petri dish B and D were inoculated with hFOB1.19 human OBs and the OBs were precultured for 24 hrs till cell adhesion. The petri dish C and D were supplemented with OTF solution and the optimal intervention concentration and duration were determined by above scratch tests. The supernatant in each petri dish was collected for the following experiments after the end of intervention. HUVEC were inoculated into HUVEC medium and were divided into blank group and group A, B, C and D. The blank group were not added with other mediums, and group A, B, C and D were added with supernatants that collected from petri dish A, B, C and D respectively. The HUVEC proliferation rate was detected by using CCK – 8 method, and the morphology of HUVEC was observed through HE staining. The contents of vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor – 2 (FGF – 2) were detected by using ELISA method. **Results:** After intervention by OTF solution with concentrations of 500, 250, 100, 50 and 0  $\mu\text{g/mL}$ , there was statistical difference in 0 – 24 hour migration rate of HUVEC between the 5 groups (16.46  $\pm$  4.01, 21.71  $\pm$  1.30, 24.94  $\pm$  3.47, 22.08  $\pm$  2.46, 21.34  $\pm$  2.28%,  $F = 4.564$ ,  $P = 0.013$ ), and the migration rate was higher in group that was intervened by OTF solution with concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$  compared to the other 4 groups ( $P = 0.001$ ,  $P = 0.020$ ,  $P = 0.014$ ,  $P = 0.029$ ). There was no statistical difference in 24 – 48 hour migration rate of HUVEC between the 5 groups (6.06  $\pm$  1.22, 5.37  $\pm$  1.85, 5.58  $\pm$  1.88, 6.14  $\pm$  1.52, 4.99  $\pm$  1.25%,  $F = 0.374$ ,  $P = 0.823$ ). Above results suggested that the optimal intervention concentration of OTF solution was 100  $\mu\text{g/mL}$  and the optimal intervention duration was 24 hrs. There was interaction between time factor and group factor in HUVEC activity ( $F = 14.039$ ,  $P = 0.000$ ). There was statistical difference in HUVEC proliferation rate between the 5 groups in general, in other words, there was group effect ( $F = 83.285$ ,  $P = 0.000$ ). There was statistical difference in HUVEC proliferation rate between different timepoints after the beginning of intervention, in other words, there was time effect ( $F = 1968.467$ ,  $P = 0.000$ ). The HUVEC proliferation rate presented a time – dependent increasing trend in the 5 groups, while the 5 groups were inconsistent with each other in the variation tendency (1.05  $\pm$  0.06, 1.81  $\pm$  0.09, 2.53  $\pm$  0.05, 6.10  $\pm$  0.17, 11.29  $\pm$  1.21,  $F = 527.347$ ,  $P = 0.000$ ; 0.99  $\pm$  0.11, 2.37  $\pm$  0.40, 2.92  $\pm$  0.19, 7.35  $\pm$  0.19, 14.41  $\pm$  1.35,  $F = 913.030$ ,  $P = 0.000$ ; 0.98  $\pm$  0.20, 3.50  $\pm$  0.18, 4.35  $\pm$  0.16, 8.53  $\pm$  0.99, 15.42  $\pm$  0.73,  $F = 1637.304$ ,  $P = 0.000$ ; 1.02  $\pm$  0.10, 2.10  $\pm$  0.13, 2.59  $\pm$  0.15, 4.70  $\pm$  0.25, 11.41  $\pm$  1.21,  $F = 494.876$ ,  $P = 0.000$ ; 1.01  $\pm$  0.06, 2.81  $\pm$  0.37, 3.31  $\pm$  0.08, 5.95  $\pm$  0.24, 12.74  $\pm$  2.03,  $F = 878.982$ ,  $P = 0.000$ ). There was no statistical difference in HUVEC proliferation rate between the 5 groups at the beginning of intervention. The HUVEC proliferation rate was highest in group B and second highest in group D, and was similar to each other in the other 3 groups at 1 and 2 days after the beginning of intervention. The HUVEC proliferation rate was highest in group B and second highest in group A, and was similar to each other in the other 3 groups at 3 and 4 days after the beginning of intervention. The results of observation on HUVEC morphology showed that there was no obvious difference in HUVEC morphology at the beginning of intervention and at 1, 2, 3 and 4 days after the beginning of intervention. There was no statistical difference in content of VEGF between group A, B, C and D (0.059  $\pm$  0.012, 0.057  $\pm$  0.016, 0.059  $\pm$  0.018, 0.057  $\pm$  0.014,  $F = 0.060$ ,  $P = 0.980$ ). There was statistical difference in content of FGF – 2 between group A, B, C and D (215.83  $\pm$  19.56, 565.83  $\pm$  47.14, 228.33  $\pm$  17.67, 445.00  $\pm$  17.69  $\mu\text{g/mL}$ ,  $F = 317.377$ ,  $P = 0.000$ ). The content of FGF – 2 was higher in group B compared to the other 3 groups and was higher in

group D compared to group A and group C ( $P=0.009, P=0.010, P=0.025; P=0.013, P=0.017$ ). There was no statistical difference in content of FGF-2 between group A and group C ( $P=0.050$ ). **Conclusion:** Both human OBs and HUVEC, co-cultured in nHAC composite, can adhere, grow and proliferate well. OTF can not promote the proliferation of HUVEC of OBs-HUVECs co-culture system in nHAC composite. The proliferation of HUVEC may be related to FGF-2 secreted by OBs.

**Keywords** drynaria fortune; flavone; cell proliferation; vascular endothelial cell; osteoblasts; coculture techniques; hydroxyapatites; collagen; endothelial growth factors; fibroblast growth factor 2; tissue engineering

三维多孔支架复合骨细胞治疗骨缺损是目前临床研究的热点。中医药在促进骨愈合方面独具优势<sup>[1]</sup>,以中药干预的支架材料复合骨细胞<sup>[2]</sup>一直是中西医结合治疗骨缺损的研究重点。骨碎补总黄酮(osteopractic total flavone, OTF)是从中药骨碎补中提取的有效成分,具有促进成骨、抑制骨溶解、促进血管再生、抑制炎症反应等作用<sup>[3]</sup>。由清华大学研发的纳米羟基磷灰石-胶原(nano-hydroxyapatite collagen, nHAC)复合材料,是在仿生思路和既有胶原-钙磷盐复合材料的基础上研制的一种新型纳米复合材料,具备很好的生物组织相容性<sup>[4]</sup>。骨再生过程中血管体系的重建是组织支架细胞在体内成活的关键。本研究探讨了 OTF 对 nHAC 复合材料与成骨细胞-血管内皮细胞共培养体系中血管内皮细胞增殖的影响,现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验材料** nHAC 复合材料(清华大学材料科学与工程系); OTF(北京岐黄医药股份有限公司,国药准字 Z20030007,含量  $\geq 80\%$ ),用含 3% FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养基将 OTF 配成浓度为  $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,  $4^\circ\text{C}$  保存,后续使用时用含 3% FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养基将其稀释为需要的浓度,现用现配; hFOB1.19 人成骨细胞、人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)(赛百慷生物公司); DMEM/F12(1:1)液体培养基(Hyclone 公司); 特级 FBS(Excellgen 公司); HUVEC 培养基(湖北普诺赛生命科技有限公司); 0.25% TRYPSIN EDTA(Gibco 公司); 人血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)酶联免疫试剂盒、人成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)酶联免疫试剂盒(北京 JK 公司)。

**1.2 实验仪器** EQR/GL-41A 超净工作台(ESO 公司), GENions 酶标仪(TECAN 公司), MCO-20AIC  $\text{CO}_2$  细胞培养箱(SANYO 公司), 倒置显微镜(Olym-

pus 公司), 小型台式离心机(Sigma 公司), BP221S 型电子分析天平(Sartorius 公司), GloMaxTM20/20 微孔板发光检测仪(Promega 公司), 培养小室(Ibidi 公司)。

## 2 方法

**2.1 OTF 溶液最佳干预浓度和时间确定** 将 nHAC 复合材料切成厚度均匀的薄片, 铺满 48 孔培养板底部。将 hFOB1.19 人成骨细胞接种至 48 孔板的 nHAC 材料表面, 每孔加入 DMEM/F12(1:1)液体培养基  $300 \mu\text{L}$ 。培养 24 h, 待细胞完全贴壁后分为 5 组, 分别以浓度为  $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  及  $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 OTF 溶液干预, 干预 24 h 后收集各组上清液备用。

在 24 孔板中放置划痕实验专用培养小室, 加入 HUVEC( $7 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 HUVEC 培养基, 培养 24 h, 待细胞铺满小室后, 用 PBS 清洗贴壁细胞。以混合培养基[上述培养上清液(5 种)与 HUVEC 培养基 1:1( $250 \mu\text{L}: 250 \mu\text{L}$ )混合]继续培养, 24 h 后进行划痕实验。分别在划痕实验开始后 0 h、24 h、48 h 拍照, 计算细胞 0~24 h 迁移率和 24~48 h 迁移率。 $0 \sim 24 \text{ h}$  迁移率 = (24 h 时划痕区域细胞面积 - 0 h 时划痕区域细胞面积) / 0 h 时划痕区域细胞面积  $\times 100\%$ ,  $24 \sim 48 \text{ h}$  迁移率 = (48 h 时划痕区域细胞面积 - 24 h 时划痕区域细胞面积) / 24 h 时划痕区域细胞面积  $\times 100\%$ 。

**2.2 HUVEC 细胞活性检测** 将 4 个培养皿分别标记为 A、B、C、D, 铺满 nHAC 复合材料, 加入 DMEM/F12(1:1)液体培养基。A 培养皿中不添加其他材料; B、D 培养皿中接种 hFOB1.19 人成骨细胞, 预培养 24 h 使细胞贴壁; C、D 培养皿中加入 OTF 溶液。OTF 溶液的浓度和干预时间为根据上一步划痕实验确定的最佳干预浓度和时间。干预结束后收集各培养皿中的上清液进行后续实验。

在 96 孔板中接种 HUVEC, 并将细胞分为空白组

和 A、B、C、D 共 5 组, 每组 6 个复孔, 每孔细胞数为  $1 \times 10^4$  个。预培养 24 h 后, 空白组不添加其他材料, A、B、C、D 组分别加入 A、B、C、D 培养皿上清液。分别在干预开始后 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d, 以 CCK-8 法测定细胞增殖情况。具体方法如下: 收集细胞前 4 h 向每孔加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 溶液, 将培养板置于培养箱内继续孵育 2 h, 在酶联免疫监测仪上 450 nm 处测定细胞增殖情况。

**2.3 HUVEC 形态观察** 将爬片用的盖玻片用多聚赖氨酸处理后放入 12 孔板, 加入 HUVEC 细胞过夜。待其贴壁后换成混合培养基[上述培养上清液(5 种)与 HUVEC 培养基 1:1 (250  $\mu\text{L}$ : 250  $\mu\text{L}$ ) 混合]培养 24 h, 分别在 0、1、2、3、4 d 行 HE 染色后拍照, 观察细胞形态。

**2.4 VEGF 和 FGF-2 含量检测** 接种 HUVEC, 分为 A 组、B 组、C 组、D 组, 每组加入对应培养基(同 HUVEC 细胞活性检测), 每孔 50  $\mu\text{L}$ 。室温孵育 2 h, 弃掉液体, 每孔加 300  $\mu\text{L}$  洗液洗板, 洗涤 6 次。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素, 用新的封板膜封板, 室温孵育 45 min; 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  显色底物 TMB, 避光、室温孵育 20 min, 然后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  终止液, 用酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值。取 150  $\mu\text{L}$  浓缩的 FGF-2 标准品, 加入 150  $\mu\text{L}$  细胞培养基, 作为标准曲线的最高浓度(2000  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。每次移液时, 确保充分混匀。以细胞培养基作为标准曲线的零浓度, 从而计算样品浓度。

**2.5 数据统计** 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析。各组细胞 0~24 h 迁移率、24~48 h 迁移率、VEGF 含量、FGF-2 含量的组间总体比较均采用单因素方差分析, 同一指标组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; 各组细胞干预后不同时间增殖率比较采用重复测量资料的方差分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

### 3 结果

**3.1 OTF 溶液最佳干预浓度和时间检测结果** 5 种浓度 OTF 溶液干预后, 0~24 h 细胞迁移率比较差异有统计学意义 [ $(16.46 \pm 4.01)\%$ ,  $(21.71 \pm 1.30)\%$ ,  $(24.94 \pm 3.47)\%$ ,  $(22.08 \pm 2.46)\%$ ,  $(21.34 \pm 2.28)\%$ ,  $F=4.564$ ,  $P=0.013$ ], 其中 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  OTF 溶液干预后的细胞迁移率高于其余 4 组 ( $P=0.001$ ,  $P=0.020$ ,  $P=0.014$ ,  $P=0.029$ );

24~48 h 细胞迁移率比较, 差异无统计学意义 [ $(6.06 \pm 1.22)\%$ ,  $(5.37 \pm 1.85)\%$ ,  $(5.58 \pm 1.88)\%$ ,  $(6.14 \pm 1.52)\%$ ,  $(4.99 \pm 1.25)\%$ ,  $F=0.374$ ,  $P=0.823$ ]。提示 OTF 溶液最佳干预浓度为 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 最佳干预时间为 24 h。

**3.2 HUVEC 细胞活性检测结果** 时间因素与分组因素存在交互效应; 5 组 HUVEC 细胞增殖率总体比较, 差异有统计学意义, 即存在分组效应; 干预开始后不同时间之间 HUVEC 细胞增殖率的差异有统计学意义, 即存在时间效应; 5 组 HUVEC 细胞增殖率随时间变化均呈升高趋势, 各组的变化趋势不完全相同; 干预开始后 0 d 时, 各组细胞增殖率比较, 差异无统计学意义; 干预开始后 1 d、2 d 时, B 组 HUVEC 细胞增殖率最高、D 组次之, 其余 3 组增殖率较为接近; 干预开始后 3 d、4 d 时, B 组 HUVEC 细胞增殖率最高、A 组次之, 其余 3 组增殖率较为接近。见图 1、表 1。

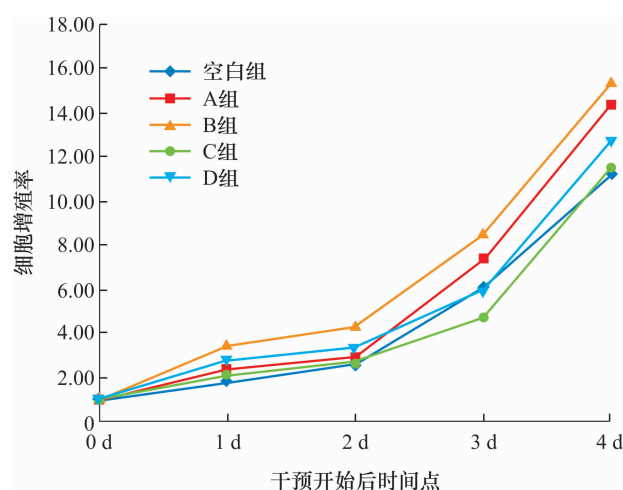


图 1 干预开始后不同时间点 5 组人脐静脉血管内皮细胞增殖率变化趋势图

**3.3 HUVEC 形态观察结果** 相差显微镜下观察结果显示, 干预开始后 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d 时各组 HUVEC 的形态均无明显差异(图 2 至图 6)。

**3.4 VEGF 和 FGF-2 含量检测结果** A、B、C、D 4 组 VEGF 含量比较, 差异无统计学意义。4 组 FGF-2 含量比较, 差异有统计学意义; B 组的 FGF-2 含量高于其余 3 组 ( $P=0.009$ ,  $P=0.010$ ,  $P=0.025$ ), D 组的 FGF-2 含量高于 A 组和 C 组 ( $P=0.013$ ,  $P=0.017$ ), A 组和 C 组 FGF-2 含量的差异无统计学意义 ( $P=0.050$ )。见表 2。

表 1 干预开始后不同时间点 5 组人脐静脉血管内皮细胞增殖率

组别	样本量 (孔)	干预开始后不同时间点细胞增殖率( $\bar{x} \pm s$ )						F 值	P 值
		0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	合计		
空白组	6	1.05 ± 0.06	1.81 ± 0.09	2.53 ± 0.05	6.10 ± 0.17	11.29 ± 1.21	6.27 ± 5.21	527.347	0.000
A 组	6	0.99 ± 0.11	2.37 ± 0.40	2.92 ± 0.19	7.35 ± 0.19	14.41 ± 1.35	8.12 ± 7.31	913.030	0.000
B 组	6	0.98 ± 0.20	3.50 ± 0.18	4.35 ± 0.16	8.53 ± 0.99	15.42 ± 0.73	9.43 ± 8.00	1 637.304	0.000
C 组	6	1.02 ± 0.10	2.10 ± 0.13	2.59 ± 0.15	4.70 ± 0.25	11.41 ± 1.21	6.40 ± 5.72	494.876	0.000
D 组	6	1.01 ± 0.06	2.81 ± 0.37	3.31 ± 0.08	5.95 ± 0.24	12.74 ± 2.03	7.81 ± 7.10	878.982	0.000
合计	30	1.01 ± 0.11	2.52 ± 0.64	3.14 ± 0.68	6.53 ± 1.39	13.05 ± 2.09	7.61 ± 6.85	1 968.467 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
F 值		0.497	61.965	286.133	91.901	17.748	83.285 <sup>1)</sup>	$F = 14.039^{2)}$ ,	
P 值		0.738	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 <sup>1)</sup>	$P = 0.000^{2)}$	

1)主效应的 F 值和 P 值;2)交互效应的 F 值和 P 值

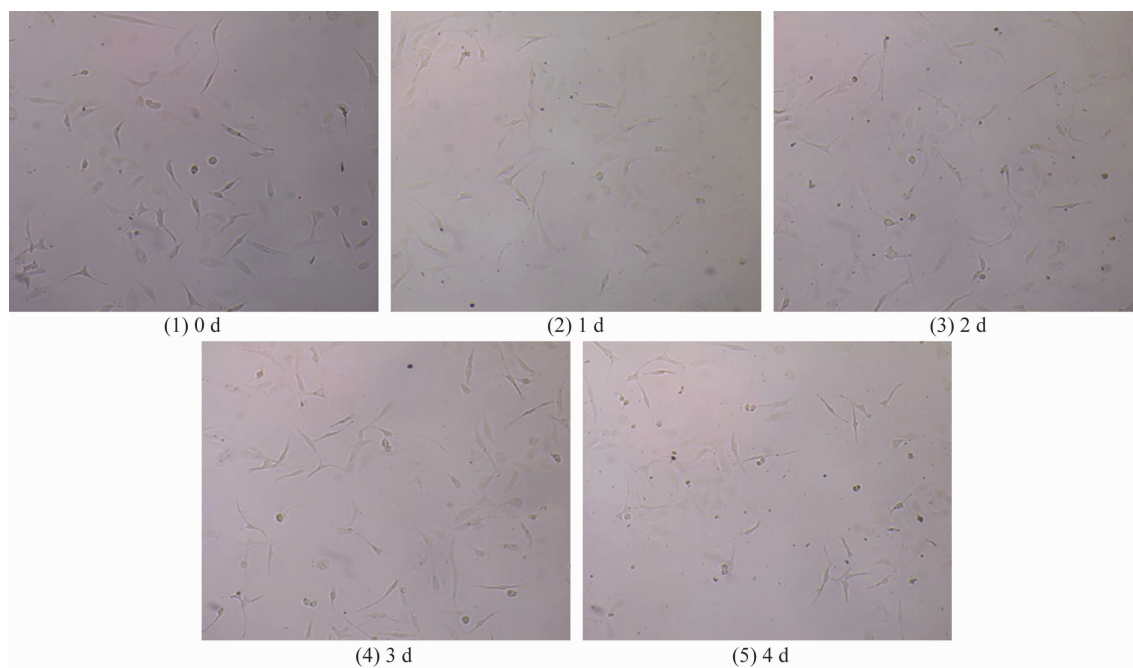


图 2 干预开始后不同时间点空白组人脐静脉血管内皮细胞形态(HE 染色 ×10)

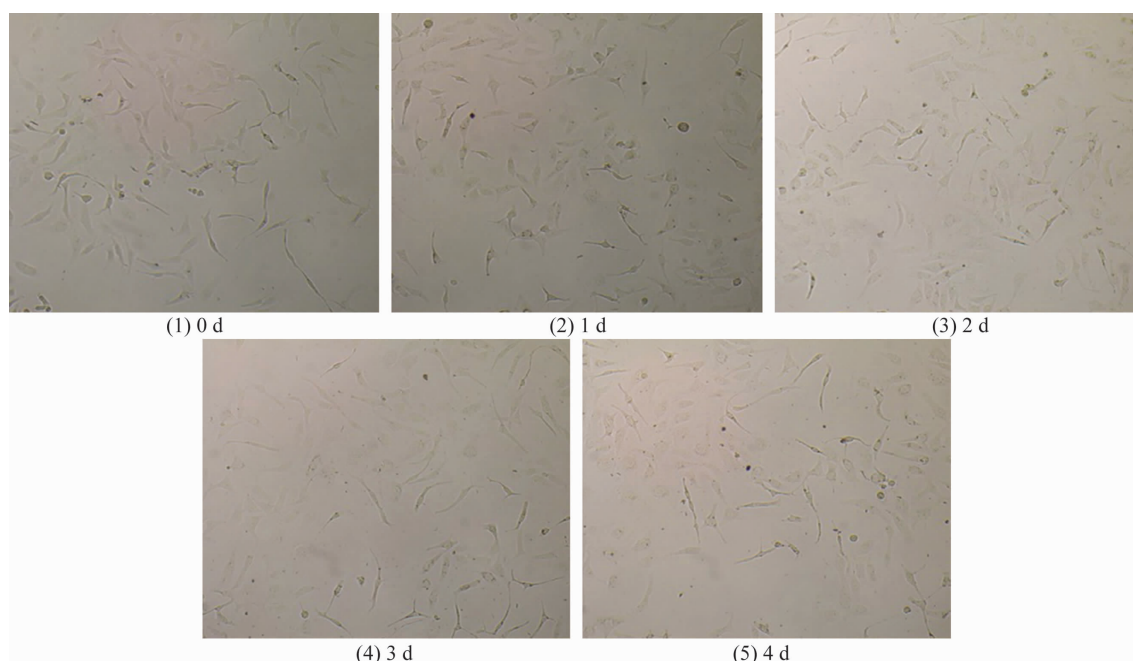


图 3 干预开始后不同时间点 A 组人脐静脉血管内皮细胞形态(HE 染色 ×10)



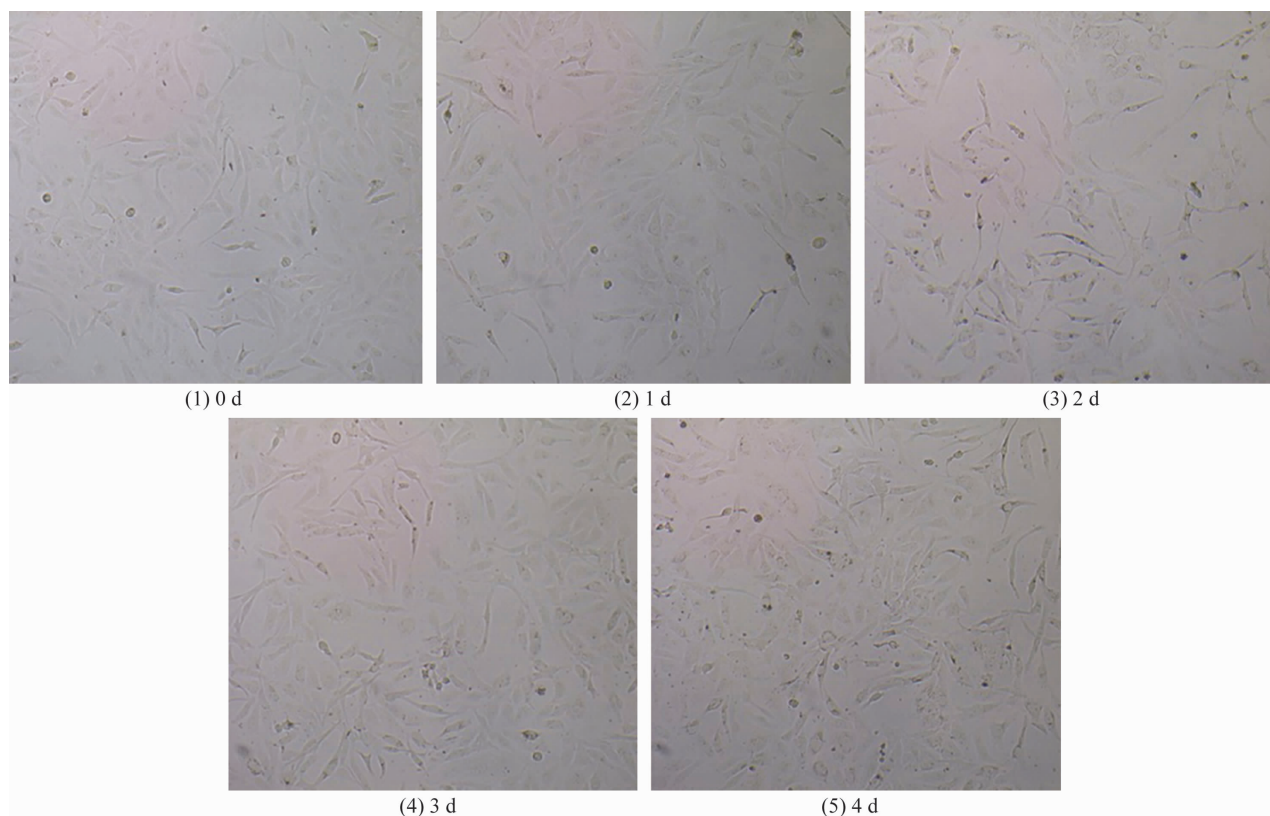


图 4 干预开始后不同时间点 B 组人脐静脉血管内皮细胞形态 (HE 染色  $\times 10$ )

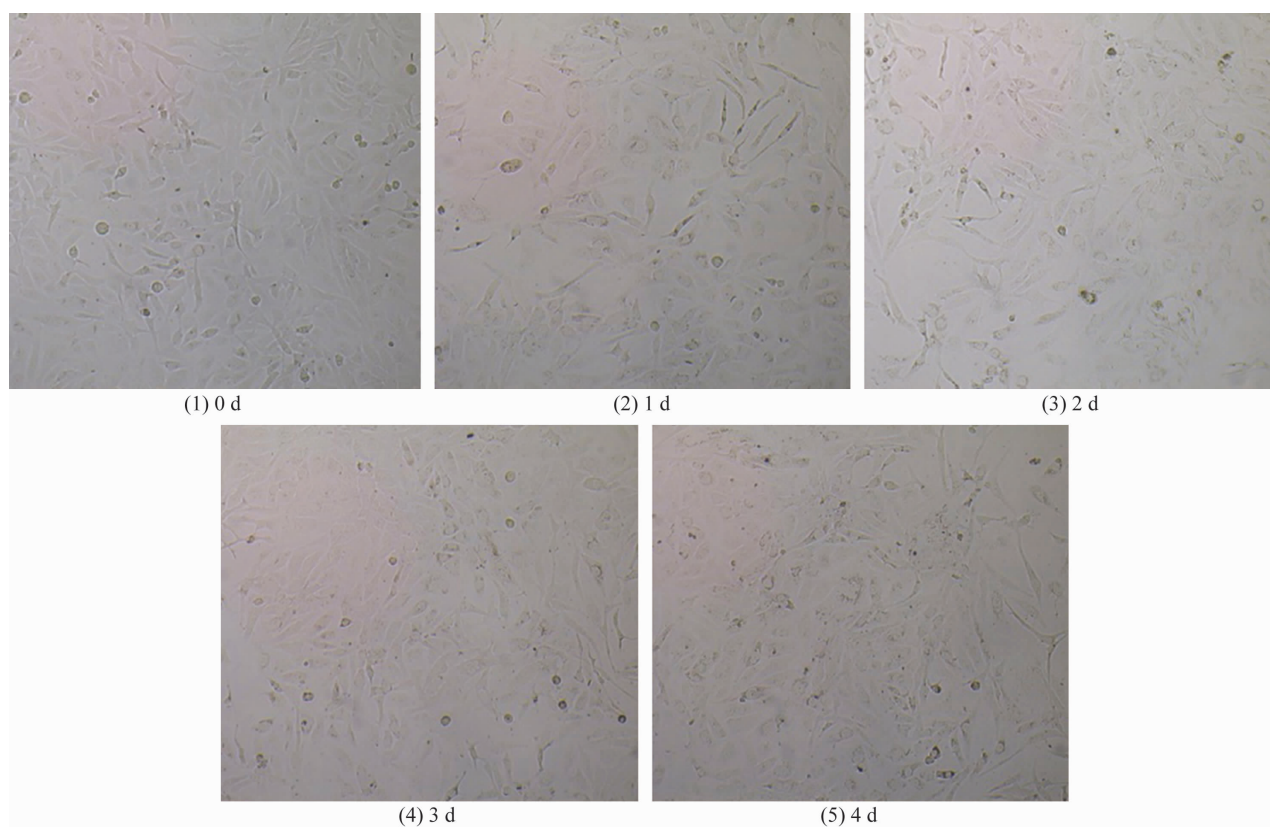


图 5 干预开始后不同时间点 C 组人脐静脉血管内皮细胞形态 (HE 染色  $\times 10$ )

#### 4 讨 论

骨碎补为槲蕨的干燥根茎,是一味常用的传统中药。骨碎补性温、味苦,归肝、肾经,具有强骨补肾、止

痛续伤的功效,临床用于筋骨折伤、肾虚腰痛、跌扑闪挫、耳鸣耳聋、牙齿松动等的治疗<sup>[5]</sup>。骨碎补的主要生物活性成分是黄酮类化合物,因其潜在的药用价值

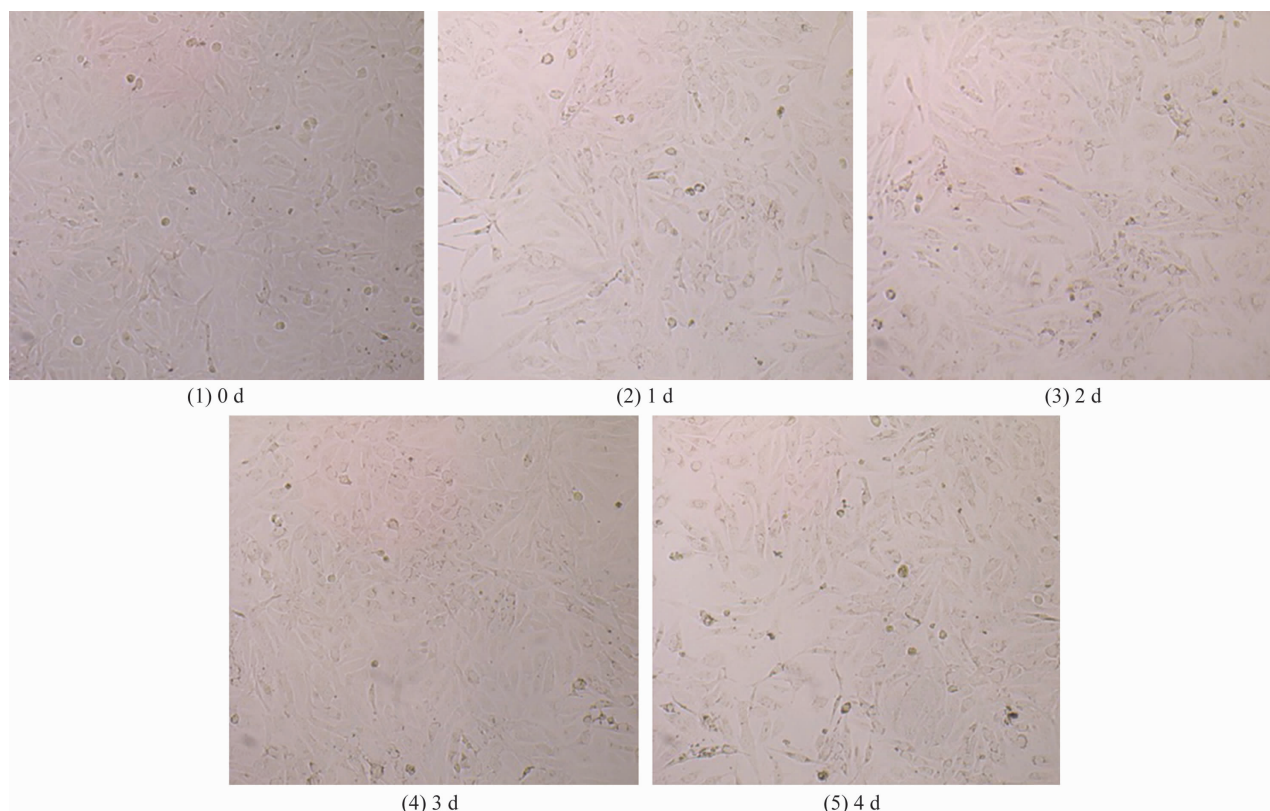


图 6 干预开始后不同时间点 D 组人脐静脉血管内皮细胞形态 (HE 染色  $\times 10$ )

表 2 干预后 4 组人脐静脉血管内皮细胞的血管内皮生长因子和成纤维细胞生长因子 -2 含量

组别	样本量 (孔)	VEGF 含量 (OD 值) ( $\bar{x} \pm s$ )	FGF - 2 含量 ( $\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
A 组	6	$0.059 \pm 0.012$	$215.83 \pm 19.56$
B 组	6	$0.057 \pm 0.016$	$565.83 \pm 47.14$
C 组	6	$0.059 \pm 0.018$	$228.33 \pm 17.67$
D 组	6	$0.057 \pm 0.014$	$445.00 \pm 17.69$
F 值		0.060	317.377
P 值		0.980	0.000

VEGF: 血管内皮生长因子; FGF - 2: 成纤维细胞生长因子 - 2 而备受关注。体外实验证实, OTF 能通过 MAPK 信号通路、Wnt/ $\beta$  - catenin 信号通路、mTOR 信号通路等促进间充质干细胞向成骨细胞增殖、分化成熟<sup>[6-9]</sup>, 从而发挥促进骨折愈合的作用<sup>[10-11]</sup>。另外, OTF 可通过调节 VEGF 的释放促进骨折愈合<sup>[12-15]</sup>。上官文姬等<sup>[16]</sup>也发现 OTF 可刺激 VEGF 和 FGF - 2 的表达, 进一步促进局部血管形成及成骨细胞增殖、分化, 促进骨组织钙化, 提高骨密度。

用 nHAC 材料制成的骨植体, 表面可提供适宜的环境促进胶原和矿物沉积以及成骨细胞粘附, 一旦细胞粘附于种植体表面, 随后的骨生长便在细胞的调节下进行。除了生物活性和优异的骨传导性能, nHAC 也是一种生物可降解材料。前期研究发现, 通过体外

培养小鼠成骨细胞 (MC3T3 - E1) 与 nHAC 材料复合体, OTF 诱导小鼠成骨细胞培养后具有成骨细胞活性及生物学特性, 适宜作为构建骨组织工程的种子细胞和三维条件下进行细胞实验的研究对象<sup>[17]</sup>。

在骨缺损修复过程中成骨细胞表达 VEGF, 可促进血管内皮细胞分裂增殖, 同时可促进血管内皮细胞表达骨形态发生蛋白 - 2。后者作用于成骨细胞一方面可以增强血管内皮细胞的表达, 另一方面可以促进骨再生。可见 2 种细胞分泌的生长因子之间形成一个正反馈调节, 可互相促进<sup>[18]</sup>。

本研究所建立的骨再生体外研究模型, 以 nHAC 材料为附着基质、hFOB1. 19 人成骨细胞为主要骨细胞, 与 HUVEC 构成的共培养体系模拟骨再生, 可以更好地模拟体内骨再生的环境。FGF - 2 是最强有力的血管生成因子, 对人骨髓间充质干细胞<sup>[19]</sup>、人胚胎大脑神经干细胞<sup>[20]</sup>、小鼠成骨细胞 (MC3T3 - E1)<sup>[21]</sup>、血管平滑肌细胞<sup>[22]</sup>、HUVEC<sup>[23]</sup>等细胞均具有显著地促增殖作用。细胞活性检测结果提示, hFOB1. 19 人成骨细胞培养上清液对 HUVEC 增殖有促进作用, OTF 对 HUVEC 增殖无明显促进作用。我们推测其原因可能有以下几点: ①与 nHAC 材料干预有关; ②本实验所采用的细胞类型为人类来源, 与以

往采用的大鼠来源的血管内皮细胞不同;③两种细胞的相互作用对 OTF 作用发挥造成了一定影响。具体原因还有待后期实验进一步验证。各组 FGF-2 含量的比较结果与 HUVEC 细胞增殖率比较结果大致相同,提示 HUVEC 细胞增殖能力的提高可能是 FGF-2 发挥了作用。

本研究的结果提示,人成骨细胞和 HUVEC 在 nHAC 复合材料上共培养,均可以良好贴附、生长和增殖;OTF 不能促进 nHAC 复合材料与人成骨细胞-HUVEC 共培养体系中 HUVEC 增殖;HUVEC 的增殖可能与成骨细胞分泌 FGF-2 有关。目前的研究有一定局限性,只探讨了 OTF 在 nHAC 复合材料与人成骨细胞-HUVEC 共培养系统中的作用,进一步的研究会将这些结果与成骨细胞单一培养系统进行比较,以确定是否存在血管内皮细胞和 OTF 刺激的协同作用。未来的研究还将探讨动物模型中 OTF 与血管生成和骨形成之间的关系。

## 5 参考文献

- [1] 巴音额古乐,金鸿宾.单味中药促进骨愈合实验研究进展[J].内蒙古中医药,2017,36(5):126-128.
- [2] 张叶,崔元璐.中药在干细胞增殖和组织工程中的应用[J].中国组织工程研究,2016,20(28):4243-4249.
- [3] 李晋玉,赵学千,孙旗,等.骨碎补总黄酮的实验及临床研究概况[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(10):1357-1364.
- [4] 冯庆玲,崔福斋,张伟.纳米羟基磷灰石/胶原骨修复材料[J].中国医学科学院学报,2002,24(2):124-128.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:化学工业出版社,2005:121.
- [6] 孙奇峰,尹文哲,高原,等.失重下骨碎补总黄酮经 MAPK 通路促间充质干细胞向成骨细胞分化研究[J].中医药学报,2016,44(4):10-13.
- [7] 史岩,马秋野,喻一东,等.骨碎补总黄酮促进骨质疏松性骨折愈合中参与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的初步研究[J].中医药学报,2018,46(2):49-52.
- [8] 张新涛,江华基,梁祖儒,等.骨碎补总黄酮通过激活 mTOR 信号通路促进大鼠腱骨愈合的实验研究[J].中国骨伤,2018,31(3):248-253.
- [9] 韩亚力,罗奕,曾佳学.骨碎补总黄酮基于 Notch 信号通路改善骨质疏松的作用及机制研究[J].中国免疫学杂志,2018,34(2):261-266.
- [10] 姜自伟,曾景奇,黄枫,等.骨碎补总黄酮对大鼠胫骨牵引成骨效能的影响[J].中华中医药杂志,2018,33(2):661-663.
- [11] 姜自伟,曾景奇,李悦,等.骨碎补总黄酮对大鼠胫骨牵引成骨 BMP-2 与 Smad-1 表达的影响[J].辽宁中医杂志,2018,45(1):166-168.
- [12] 李明,李君,付昆.骨碎补总黄酮对膝关节炎模型兔 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达的影响[J].中国药房,2018,29(18):2484-2488.
- [13] 王庆丰,王孝辉,张彩丽,等.骨碎补总黄酮促进大鼠诱导膜中 VEGF、BMP-2 表达的实验研究[J].药物评价研究,2018,41(7):1220-1223.
- [14] 王雷,王孝辉,张海龙,等.不同剂量骨碎补总黄酮对大鼠 Masquelet 技术诱导膜中 BMP-2 和 VEGF 表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2018,26(4):1-4.
- [15] SONG N, ZHAO Z, MA X, et al. Naringin promotes fracture healing through stimulation of angiogenesis by regulating the VEGF/VEGFR-2 signaling pathway in osteoporotic rats[J]. Chem Biol Interact, 2017, 261:11-17.
- [16] 上官文姬,李鹤,汤璐敏.骨碎补总黄酮对大鼠成骨细胞 VEGF 和 FGF-2 表达的影响[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(8):38-41.
- [17] 李晋玉,俞兴,姜俊杰,等.骨碎补总黄酮联合纳米骨材料诱导 MC3T3-E1 细胞的成骨分化及其机制[J].中国组织工程研究,2019,23(18):2888-2893.
- [18] SHAH A R, SHAH S R, OH S, et al. Migration of co-cultured endothelial cells and osteoblasts in composite hydroxyapatite/poly(lactic acid) scaffolds [J]. Ann Biomed Eng, 2011, 39(10):2501-2509.
- [19] MURAGLIA A, MARTIN I, CANCEDDA R, et al. A nude mouse model for human bone formation in unloaded conditions[J]. Bone, 1998, 22(5 Suppl):131S-134S.
- [20] PINCUS D W, GOODMAN R R, FRASER R A, et al. Neural stem and progenitor cells: a strategy for gene therapy and brain repair[J]. Neurosurgery, 1998, 42(4):858-867.
- [21] KATO K, TOKUDA H, ADACHI S A, et al. AMP-activated protein kinase positively regulates FGF-2-stimulated VEGF synthesis in osteoblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 400(1):123-127.
- [22] 曹慧青.新信号通路 STAT-5B/HSP27/FGF-2 在促凝血酶诱导的血管平滑肌细胞增殖迁移中的作用[J].上海医学,2007,30(S1):200-201.
- [23] BAI Y, LENG Y, YIN G, et al. Effects of combinations of BMP-2 with FGF-2 and/or VEGF on HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis in vivo [J]. Cell Tissue Res, 2014, 356(1):109-121.

(收稿日期:2018-12-08 本文编辑:李晓乐)