

通道造成一抗和(或)二抗、DAPI 进入细胞核减少,从而导致 Merm1/Wbscr22 及细胞核 DNA 荧光染色强度减弱^[14,15]。

根据结果,笔者认为细胞免疫荧光染色结合激光扫描共聚焦显微镜技术观察 Merm1/Wbscr22 在人肺癌细胞 NCI-H1299 中表达与定位的最佳实验步骤是细胞固定、透膜、封闭、Texas Red-鬼笔环肽标记 F-actin、一抗结合、二抗结合、DAPI 标记细胞核 DNA、最后共聚焦显微镜成像,这样既能减少鬼笔环肽非特异性染色,Merm1/Wbscr22 蛋白及细胞核 DNA 荧光强度又足够清晰便于观察。

参考文献

- 1 Poher BR. Williams-Beuren syndrome[J]. N Engl J Med, 2010, 362(3): 239-352
- 2 Merla G, Ucla C, Guipponi M, *et al.* Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region[J]. Hum Genet, 2002, 110(5): 429-438
- 3 Doll A, Grzeschik KH. Characterization of two novel genes, WBSCR220 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome[J]. Cytogenet Cell Genet, 2001, 95(1-2): 20-27
- 4 Nakazawa Y, Arai H, Fujita N. The novel metastasis promoter Merm1/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zacl/p53-dependent apoptosis[J]. Cancer Res, 2011, 71(3): 1146-1155
- 5 Meng F, Wehbe-Janek H, Henson R, *et al.* Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes[J]. Oncogene, 2008, 27(3): 378-386
- 6 Wieland T, Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous Amanita

- mushrooms[J]. CRC Crit Rev Biochem, 1978, 5(3): 185-260
- 7 Wulf E, Deboben A, Bautz FA, *et al.* Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979, 76(9): 4498-4502
- 8 Wehland J, Osborn M, Weber K. Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977, 74(12): 5613-5617
- 9 Osborn M, Weber K. The detergent-resistant cytoskeleton of tissue culture cells includes the nucleus and the microfilament bundles[J]. Exp Cell Res, 1977, 106(2): 339-349
- 10 徐国恒. 细胞骨架-肌动蛋白纤维[J]. 生物学通报, 2005, 40(2): 43
- 11 Flavahan NA, Bailey SR, William A, *et al.* Imaging remodeling of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle cells after mechanosensitive arteriolar constriction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(2): 660-669
- 12 Nakamura TY, Iwam Y, Sampaoli M, *et al.* Stretch-activated cation channels in skeletal muscle myotubes from sarcoglycan deficient hamsters[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281(2): C690-699
- 13 Zhang J, Ryder KD, Bethel JA, *et al.* PTH-induced actin depolymerization increases mechanosensitive channel activity to enhance mechanically stimulated Ca^{2+} signaling in osteoblasts[J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(11): 1729-1737
- 14 Wieland T. Modification of actins by phallotoxins[J]. Naturwissenschaften, 1977, 64(6): 303-309
- 15 Faulstich H, Schiffer AJ, Weckauf M. The dissociation of the phalloidin-actin complex[J]. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1977, 358(2): 181-184

(收稿日期:2012-09-11)

(修回日期:2012-09-27)

牡蛎壳粉/ α -半水硫酸钙复合人工骨修复兔股骨髁缺损的实验研究

寇冬权 林忠勤 王伟 程少文 陈庆玉 张伟 彭磊

摘要 **目的** 评价牡蛎壳粉/ α -半水硫酸钙复合人工骨材料填充兔股骨髁缺损的成骨能力及降解性。**方法** 用牡蛎壳粉及 α -半水硫酸钙按 1:3 比例混合,制备人工骨。采用新西兰大白兔制做股骨髁缺损的动物模型,将复合人工骨植于一侧股骨髁,另一侧为空白对照,分别于术后 4、8、12 周取材、脱钙、组织包埋、切片行 HE 染色,观察成骨及材料降解情况。**结果** 大体观察未见组织炎症反应,缺损区内填充的复合人工骨逐渐降解。4 周时实验组有少量新骨形成,对照组无明显成骨,到 8 周时实

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y405476)

作者单位:408000 重钢总医院康复科(寇冬权);325027 温州医学院附属第二医院(林忠勤、王伟、程少文、陈庆玉、张伟、彭磊);570100 海南医学院附属医院创伤中心(彭磊)

通讯作者:彭磊,教授,硕士生导师,电子信箱: penglei7511@yahoo.com.cn

验材料几乎降解完全,有部分骨小梁形成,对照组有少量新骨形成,生长部位主要在髓腔附近。在 12 周时实验组骨组织已经较为生熟,对照组有贴壁生长的骨小梁组织。经骨量评估发现在不同时间点,实验组骨量均高于对照组。**结论** 牡蛎壳粉/ α -半水硫酸钙复合人工骨材料成骨能力及降解能力良好。

关键词 牡蛎壳 α -半水硫酸钙 骨缺损 成骨 降解

Preparation of Oyster Shell Powder/ α -CSH Combined Bone Graft and Its Related Research. Kou Dongquan, Lin Zhongqin, Wang Wei, Cheng Shaowen, Chen Qingyu, Zhang Wei, Peng Lei. Chonggang General Hospital, Chongqing 408000, China

Abstract Objective To evaluate the osteoconduction and degradation of Oyster shell powder/ α -CSH combined bone graft in femur defect of rabbits. **Methods** The oyster shell and α -CSH were mixed into absolute ethyl alcohol, with mass ratio of 1:3, then injected into mould. New Zealand rabbits were used to produce the defect of femur. The combined bone graft was randomly implanted one femur, and the other femur was implanted nothing. After 4, 8, 12 weeks, the HE was used to observe the osteogenesis and degradation of material. **Results** The implantation didn't lead to joint effusion and inflammation and the combined bone graft gradually degraded. With the degradation of material, the new bone gradually grew into the extension of the bone tissue, new bone mature trabecular bone at 12 weeks. And in control group new bone was formed only at the edge of the defect, the density of central defects was almost near the density of hollow pith. At point-in-time, the result of forming new bone the experimental group was better than the control group, especially to the late. **Conclusion** Oyster shell powder/ α -CSH combined bone graft is a biocompatible and biodegradable material and osteoconduction is the main healing style in the bone defects.

Key words Oyster shell; α -CSH; Bone defect; Osteoconduction; Degradation

2004 年 Mount 等^[1]在《Science》报道牡蛎壳的形成与珊瑚形成以及人体内骨盐沉积有高度相似性并且具有纵向空隙通道,符合组织工程的基本要求。冯永增等^[2]报道,牡蛎粉具有良好的生物相容性,但是降解时间较长,有待改进。 α -半水硫酸钙生物相容性良好,但是材料降解时间远远低于新骨形成时间。笔者将两种材料复合制成人工骨,希望形成一种降解时间适中的新型骨材料。

材料与方法

1. 材料制备:(1)取温州乐清湾牡蛎壳,刷冲、风干,用医用粉碎机将牡蛎壳碾压致颗粒状,先用 40 目后用 100 目过滤筛过滤,得到 100 目以下的颗粒。将牡蛎粉置于 10% 氯仿溶液中浸泡 24h,密封,并用搅拌机搅拌。24h 后用蒸馏水冲洗 3 遍,过滤。然后加入 30% 双氧水中浸泡 24h,并用搅拌机搅拌。其后蒸馏水浸泡、冲洗、过滤,反复 3 遍,最后自然风干。使用前把牡蛎壳粉浸泡在无菌生理盐水中,用超声数控机去除牡蛎壳粉中的杂质,并在 37℃ 的电热恒温鼓风干燥箱中干燥,使用前密封保存。(2)在超声振荡、40℃ 的条件下,于磁力搅拌器中加入无水乙醇,向无水乙醇中以 1:3 质量比添加牡蛎壳粉和 α -半水硫酸钙,振荡 20min 后,两者混合均匀使 α -半水硫酸钙均匀分布于牡蛎壳粉中,然后将混合物注入 5mm×3mm 的自制模具中,将模具依次置室温、4℃ 梯度降温各 1 h,4℃ 冰箱中过夜,于 500Pa 负压下冻干 72h,将复合人工骨予环氧乙烷消毒,封存备用。

2. 动物选取:选取纯种新西兰大耳兔 24 只,体重 2~3kg,雌雄不限,按处置时间随机分为 3 组:4、8、12 周组。每组 8 只动物。动物饲养 1 周以适应环境,观察无饮食、活动及二便等异常;复合人工骨置于高压蒸汽锅内,120℃ 高压消毒 30min

备用。2.5% 戊巴比妥钠 1ml/kg 自耳缘静脉麻醉。动物双后肢剃毛,常规消毒、铺巾,自双侧膝关节前外侧做长约 2cm 的纵切口,显露股骨下端;用电钻在距膝关节下 1cm 的外侧髁处,形成 0.5cm×0.3cm 大小的圆形骨缺损。一侧种植复合人工骨,一侧不填充任何东西,逐层缝合切口,动物分笼饲养,术后 24h 内予 80 万单位青霉素注射。

3. 观测内容:(1)动物术后观察:观察动物的饮食、活动及切口是否红肿、渗出等情况。于术后 4、8、12 周注射空气栓子,处死动物。(2)大体标本观察及组织学观察:HE 染色观察成骨情况。动物处死后,截取含骨缺损区在内的股骨下端,观察种植材料的改变及周围软组织反应。材料进行脱钙 HE 染色,主要观察成骨情况及炎性反应。HE 切片制作过程如下:甲醛固定 1 周,EDTA 复合脱钙液脱钙,直至股骨变软可插入针头,正丁醇脱水,石蜡包埋,沿股骨纵轴切片,HE 染色,光镜观察。

4. 新骨形成评估:用 Quantimet 570C 型彩色图像分析仪对组织切片进行成骨定量分析,成骨量以切片中的成骨面积(μm^2)表示。选经材料中心、切面完整的组织切片 2 张,计平均值,用以代表该样本的成骨量。

5. 统计学方法:利用 SPSS 15.0 对所得数值进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般观察:种植人工骨后,全身未见异常,局部切口愈合良好,未见渗出、红肿,行为正常。术后 2 周切口完全愈合,切口缝线自动脱落。

2. 大体观察:术后 4 周实验组见材料表面呈黑色,外形完整;材料周围有新骨形成,新骨与材料之间无明显纤维组织;对照组缺损被血凝块填充,无新骨

长入;术后 8 周实验组见材料表面颜色变白,外形较完整,材料周围新骨形成增多,材料与宿主骨之间界限较 4 周稍模糊;对照组边缘有新骨生长,缺损中心被血凝块填充;术后 12 周实验组见材料颜色基本与宿主骨相同,外形较 8 周已经不明显,材料周围大量新骨形成,材料与宿主骨之间界限非常模糊;对照组见有部分骨小梁生长,但是不能填充完缺损部位。

3. HE 染色:4 周时实验组有少量新骨形成,对照组无明显成骨(图 1),到 8 周时实验材料几乎降解完全,有部分骨小梁形成,对照组有少量新骨形成,贴髓腔生长(图 2)。在 12 周时实验组骨组织已经较为成熟,对照组有贴壁生长的骨小梁组织(图 3)。在各个时间点,实验组成骨情况均好于对照组,特别是到后期,实验组成骨情况明显好于对照组。

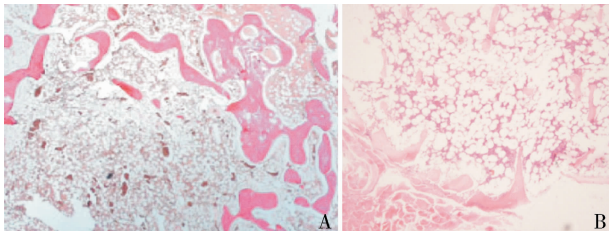


图 1 种植人工骨后 2 周成骨情况 (HE, ×100)
A. 实验组;B. 对照组

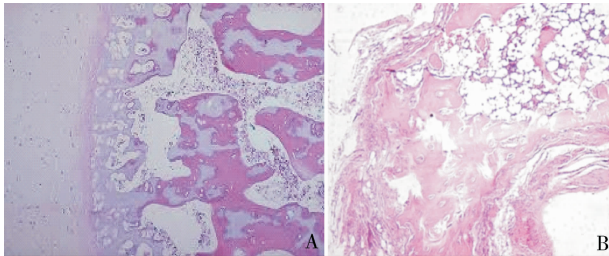


图 2 种植人工骨后 8 周成骨情况 (HE, ×100)
A. 实验组;B. 对照组

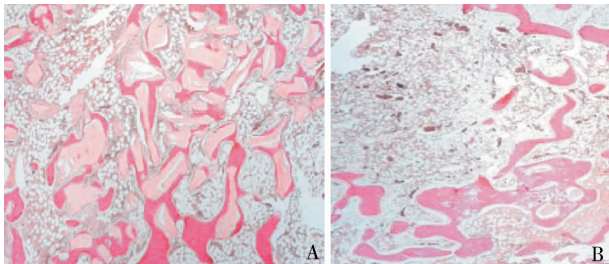


图 3 种植人工骨后 12 周成骨情况 (HE, ×100)
A. 实验组;B. 对照组

4. 新骨形成评估:由图像分析得出的两组成骨量

见表 1,从中可看出,实验组的成骨量明显多于同期对照组。

表 1 实验组和对照组的成骨量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

时间(周)	实验组 ($\times 10^5 \mu\text{m}^2$)	对照组 ($\times 10^5 \mu\text{m}^2$)	P
4	43.62 $\pm$ 3.82	17.96 $\pm$ 1.67	<0.01
8	175.13 $\pm$ 18.26	109.37 $\pm$ 11.25	<0.01
12	298.73 $\pm$ 32.14	237.71 $\pm$ 24.27	<0.01

讨 论

在骨组织工程方面,单一的材料总是存在着优势与劣势,人们发现多种材料复合往往可以取长补短,复合成更优良的材料。根据笔者课题组薛恩兴、冯永增等的实验结果,笔者发现利用牡蛎粉制成的人工骨虽然孔隙率、生物相容性优良但是可塑性差,降解缓慢,单独用于制作骨材料并不理想^[3]。1892 年,德国 Dessmann^[4]首次利用硫酸钙制成 α -半水硫酸钙。其后 Gao 等^[5]开展了 α -半水硫酸钙的相关动物实验研究,认为其生物相容性好、体内能够降解吸收且降解吸收产物不干扰新骨形成,应用于临床,也治愈了大量骨缺损患者,但发现 α -半水硫酸钙降解速度较快,与新骨生长速度不匹配,往往导致软组织长入缺损部位^[5]。上述两种材料不仅生物相容性良好,而且来源丰富,具有较大的开发潜力。笔者设想利用 α -半水硫酸钙降解较快和自身固化作用结合牡蛎粉良好的孔隙率及生物相容性,能否制作出一种较为理想的复合人工骨。

对骨材料生物性能的动物实验中,不同的动物模型,不同的种植部位其成骨情况不同^[6]。兔是骨缺损模型中运用较多比较成熟的动物,主要造模部位有头颅、桡骨^[7,8]。颅骨造模手术难度大,不易操作而桡骨形态不规则,不利于重复试验,两者均有不易克服的缺陷。近几年股骨髁模型也日益增多。股骨髁模型选取股骨髁为材料种植处,此处为松质骨,血供丰富,软组织少且易于剥离,而且有骨垢线作为手术解剖标志,重复性强^[9]。在制作骨缺损模型时,骨缺损标准的确立也很重要,因为直径 $<4\text{mm}$ 的骨缺损可自行愈合^[10]。但是对骨缺损标准存的具体值,组织工程界存在着分歧。本实验选择了直接为 5mm ,深 3mm 做为缺损标准。为满足这个标准,笔者选择的兔子均为 $2 \sim 3\text{kg}$,年龄至少 9 个月(股骨髁足够大,前后径 10mm)。从实际情况来看股骨髁模型是一种优良的骨缺损模型。

通过 HE 染色,笔者发现牡蛎壳粉/ α -半水硫酸

钙复合人工骨种植兔股骨髁的确有新骨的产生,且随着时间的增长,成骨量日益增多,肉眼观察与空白对照组相比,新骨的形成量明显多于空白对照组。根据 Quantimet 570C 型彩色图像分析仪对骨量的统计结果,在 4、8、12 周两种材料的成骨量也一直存在差异。从 HE 切片中可以发现,空白对照组仅在缺损区的边缘有新生的骨组织,中央区未见有骨组织生成,而实验组成骨则相对均匀,这种现象可能是由填充材料的骨传导性决定的。在新骨生长的同时笔者也发现随着时间的延长,材料不断降解,到 12 周时几乎完全降解。这种新型人工骨具有良好的骨传导性、降解性,这是成骨作用的基础。对于复合人工骨的成骨机制推测为:材料种植骨缺损后处于坚强固定状态,通过形成“切割圆锥”直接由松质骨重建骨单位的哈佛系统而恢复骨机械连续性^[11]。周围组织及血管的基质干细胞提供的成骨细胞前体进而转化为骨细胞。此过程中很少或无骨膜反应,没有骨痂生成。这说明新型的复合材料有良好的成骨性,相较于以前的报道过的单纯 α -半水硫酸钙的溶解时间短不易形成新骨的情况有了明显不同。这应该是牡蛎壳粉及 α -半水硫酸钙相复合延长了 α -半水硫酸钙的降解时间的缘故,其具体原理还有待进一步研究。

本文中 HE 染色只能对成骨起到定性的作用,并且不能知道具体的降解和骨生成量,这需要进一步的 Giemas 染色及 Mic-cT,限于条件和时间,这一部分工作在以后开展。

参考文献

- 1 Mountain AS, Wheeler AP, Snider D. Hemocyte-mediated shell mineralization in eastern oyster[J]. Science, 2004, 304(5668): 297-

- 300
- 2 冯永增,薛恩兴,徐华梓. 三维多孔牡蛎壳/消旋聚乳酸复合人工骨的研制及其相关性能的检测[J]. 中国组织工程学报, 2009, 3(2): 90-95
- 3 薛恩兴,徐华梓. 牡蛎壳材料填充兔股骨骨缺损的实验研究[J]. 浙江医学, 2009, 5(5): 437-439
- 4 Coetzee AS. Regeneration of bone in the presence of calcmium sulfate[J]. Arch otolaryn, 1980, 106(7): 405-409
- 5 Gao CJ, Huo SJ, Li X, et al. Characteristics of calcium sulfate/gelatin composite biomaterials for bone repair[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2007, 18(7): 799-824
- 6 Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture[J]. Biomaterials, 2005, 26(23): 4847-4855
- 7 Wang Y, Li Q. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in rabbit radius defects repaired with allogeneic and autogenic bone[J]. Clin Orthop Relat Res, 2010, 24(2): 230-234
- 8 King AM, Cranfield F. Radiographic anatomy of the rabbitskull with particular reference to the tympanic bulla and temporomandibular joint: Part 1: lateral and long axis rotational angles[J]. The Veterinary Journal, 2008, 42(2): 277-282
- 9 Nishimura K. Local application of simvastatin to rat incisor sockets augments bone[J]. Kokubyo Gk, 2008, 75(1): 49-54
- 10 Naomi Y, Toth C. A comparative assessment of synthetic ceramic bone substitutes with different composition and microstructure in rabbit femoral condyle model[J]. J Craniofac Surg, 2009, 15(27): 238-244
- 11 Graham J, Ayati M. Connecting biology and mechanics in fracture healing: an integrated mathematical modeling framework for the study of nonunions[J]. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, 2010, 35(55): 727-735 (收稿日期: 2012-06-14)
(修回日期: 2012-10-08)

儿童 OSAHS 血浆腺苷水平及认知障碍的研究

严杨艳 凡启军 刘国钧 林发明 黄赛瑜 蔡晓红 倪丽艳

摘要 **目的** 观察儿童阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(OSAHS)智力测定结果,探讨 OSAHS 儿童血浆腺苷(adenosine)水平变化及在认知功能损害中的可能作用。**方法** 儿童 OSAHS 患者 37 例,健康对照组儿童 20 例,采用中国-韦氏儿童智力量表(C-WYCSI)进行智力评估,用反相高效液相色谱-紫外检测法测定血浆腺苷水平。**结果** 儿童 OSAHS 组言语智商及操

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2110277);浙江省科技厅科研项目(2008C33011);温州市科技局社会发展科学研究项目(Y20080136)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院耳鼻喉科(严杨艳、凡启军、刘国钧、林发明、黄赛瑜、倪丽艳);温州医学院附属育英儿童医院呼吸科(蔡晓红)

通讯作者:倪丽艳,电子信箱:nily2001@126.com