

挣扎,栓线易刺破血管膜引发蛛网膜下腔出血,或栓线全部拔出致血液经 ECA 断端流出,故麻醉后拔出栓线为佳。

通过实验研究笔者发现 MCAO 模型的成功制作与多种因素相关,最关键因素在于大鼠体重和选择的所用栓线的规格的匹配。故笔者在实验中选择购于公司的规格一致的栓线,以排除人工制作栓线引起的实验误差。本研究结果显示,体重范围在  $238 \pm 6\text{g}$  的 SD 大鼠采用沙东 2636-4A 型号的栓线可得到稳定的,可重复的 MCAO 模型,稳定的动物模型是进一步研究的基础,才能使基于该模型展开的实验研究所得出的实验结果真实可信。

#### 参考文献

- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989,20(1): 84-91
- Liu X, Wang Z, Wang P, *et al.* Green tea polyphenols alleviate early BBB damage during experimental focal cerebral ischemia through regu-

lating tight junctions and PKC $\alpha$  signaling[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013,13(1):187

- Jokivarsi KT, Liimatainen T, Kauppinen RA, *et al.* Relaxation along a fictitious field (RAFF) and Z-spectroscopy using alternating-phase irradiation (ZAPI) in permanent focal cerebral ischemia in rat[J]. *PLoS One*, 2013,8(7):e69157
- Belayev L, Busto R, Zhao W, *et al.* HU-211, a novel noncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonist, improves neurological deficit and reduces infarct volume after reversible focal cerebral ischemia in the rat[J]. *Stroke*, 1995,26(12):2313-2319, 2319-2320
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986,17(3):472-476
- 包新杰,赵浩,赵英杰,等. 线栓法插线深度对大鼠脑梗死模型制备的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2011,19(3):233-236
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T. Experimental studies of ischemic brain edema:1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. *Stroke*, 1986,8(5):1-8 (收稿日期:2013-08-05)  
(修回日期:2013-09-04)

## 烫伤大鼠小肠黏膜组织 HSP70 的表达与细胞凋亡的变化规律研究及山莨菪碱的影响

刘政军 葛茂星 付晋凤 刘文军 卢才教 林 才 郭海雷

**摘 要** **目的** 研究烫伤后早期给山莨菪碱(654-2)对大鼠小肠黏膜组织细胞热休克蛋白 70 (heat shock protein, HSP70) 表达及细胞凋亡的影响。**方法** 采用随机数字表法将 SD 大鼠分为单纯烫伤组(烧伤组)、烫伤后 654-2 治疗组(治疗组),SD 大鼠 30% TBSA 3 度烫伤,伤后不同时相点,取小肠黏膜组织。以免疫组织化学的方法检测分析各组小肠组织黏膜 HSP70 的表达情况,以 TUNEL 法检测分析各组小肠组织黏膜细胞凋亡情况,同时观测各组小肠组织黏膜的病理形态学变化。**结果** 伤后大鼠小肠黏膜组织细胞凋亡增加,治疗组凋亡指数下降,同时细胞内 HSP70 表达增加。**结论** 严重烧伤早期 SD 大鼠小肠黏膜组织损伤明显,小肠黏膜细胞凋亡可能是严重烧伤早期大鼠小肠黏膜组织损伤的重要原因之一,早期应用 654-2 对烧伤早期 SD 大鼠小肠黏膜组织损伤具有明显保护作用。山莨菪碱对小肠黏膜组织的保护作用可能与其增强细胞内 HSP70 表达、抗小肠黏膜细胞凋亡有关。

**关键词** 山莨菪碱(654-2) 热休克蛋白 70 凋亡 烧伤 肠黏膜屏障

[中图分类号] R644 [文献标识码] A

**Effect of Anisodamine on Expression of HSP70 and the Apoptosis in Small Intestinal Epithelium Cells of Scalded Rats During Early Postburn Stage.** Liu Zhengjun, Ge Maoxing, Fu Jinfeng, *et al.* Burn Department, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

**Abstract Objective** To observe the pathological changes, the expression of Heat Shock Protein (HSP70) and the apoptosis in small intestinal epithelium after burn injury and the treatment of anisodamine. **Methods** The scalded rats were randomly divided into 2

基金项目:云南省卫生科技计划基金资助项目(2009NS084)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院烧伤科(刘政军、卢才教、林才、郭海雷);昆明医学院附属第二医院烧伤科(葛茂星、付晋凤、刘文军)

groups; simple burn group (group A), anisodamine + burn group (group B). The intestinal tissue was determined at 3, 6, 12, 24 and 48 hour after 50% TBSA III degree scald. HSP70 expression in small intestinal mucosa was determined by immunohistochemistry. The pathological changes of intestinal tissues were observed by HE. **Results** Apoptotic index of group A was increased after scald. Apoptotic index of group B were relieved obviously, And the expression of HSP70 of group B was increased at the same time. **Conclusion** The small intestinal epithelium tissues of SD rats were damaged obviously during the early burning stage, and maybe the apoptosis in small intestinal epithelium cells is one of the most important reasons in the damage of small intestinal epithelium tissues of SD rats after burn injury. Anisodamine can prevent the apoptosis in small intestinal epithelium cells and relieve the damage of small intestinal epithelium tissues in the early stage of burning. Anisodamine can enhance the expression of HSP70 in small intestinal epithelium tissues of scalded rats. Overexpression of HSP70 induced by anisodamine maybe an important mechanism for anisodamine to prevent the apoptosis and protect intestinal mucus barrier.

**Key words** Anisodamine; HSP70; Apoptosis; Burn; Intestinal mucus barrier

严重烧伤后肠黏膜细胞发生凋亡造成肠黏膜生理屏障的损害进而引起肠内细菌和内毒素移位被认为是引发“肠源性感染”的重要原因<sup>[1]</sup>。如何减少严重烧伤后肠黏膜细胞的凋亡是防治肠源性感染值得期待的研究方向之一。本研究采用大鼠烫伤模型以山莨菪碱进行干预,观察烫伤早期大鼠小肠黏膜组织的病理形态学变化、HSP70 的表达及肠黏膜细胞的凋亡情况,探讨 654-2 保护肠黏膜屏障的可能作用机制。

### 材料与方法

1. 主要仪器:HP1A-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统(澳大利亚 ADInstrument)、OLIMPUS 光学显微镜(日本 OLIMPUS 公司)、电热恒温培养箱(型号:隔水式 303B-3S, 沪南试验仪器厂)。

2. 主要试剂:654-2 注射剂 10mg:1 毫升/支(杭州民生药业集团有限公司),HSP70 单克隆抗体(一抗),原位细胞凋亡检测(TUNEL)试剂盒,第 2 代免疫组化广谱试剂盒,除山莨菪碱外其余试剂均购于福州迈新生物技术开发有限公司。

3. 动物分组:健康 SD 大鼠(昆明医学院动物实验中心提供)100 只,雌雄不拘,体重  $260 \pm 20$ g,随机分为单纯烫伤组(烧伤组)、烫伤后 654-2 治疗组(治疗组)。烧伤组  $n = 50$  只,分别于烧伤后 3、6、12、24、48h 5 个时间点取标本,每个时间点设有 10 只大鼠。治疗组  $n = 50$ ,时间点及标本数的设置同烧伤组,每只大鼠在伤后 5min 内以 654-2 (3mg/kg)腹腔注射,每 12h 以相同剂量重复注射。

4. 大鼠烫伤模型制作及标本处理:健康 SD 大鼠,于烫伤前 1 天以 20% 硫化钠溶液涂于背部脱去拟烫伤部位毛发,伤前 12h 禁食,自由饮水,氯胺酮针剂 80mg/kg 体重腹腔注射麻醉,按照 Walker 等<sup>[2]</sup>报道的制作标准大鼠烫伤模型的方法将脱毛区置于 96℃ 的热水中 18s,造成 30% TBSA III 度烫伤(病理切片证实),伤后腹腔注射复苏液(乳酸林格液,40ml/kg)进行补液复苏,单笼饲养,自由饮水。对照组同样禁食、麻醉、脱毛,但不烫伤。SD 大鼠经麻醉后立刻剖腹,在距回盲部 5cm 处切取小肠 2~3cm。所有标本切取后以 PBS 液略作漂洗,立刻置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,切片,进行 HE 染色、免疫组织化学染色和 TUNEL 检测,严格按照说明书

进行。

5. 指标检测与观察:(1)免疫组织化学染色结果观察与判定:观察 SD 大鼠小肠黏膜组织细胞 HSP70 的表达情况,阳性细胞即表达 HSP70 的细胞胞质被染成浅黄色、黄色或棕黄色。请两名病理科专业人员根据阳性细胞率和染色强度的不同对每张切片进行双盲评分,然后对分数进行统计学分析<sup>[3]</sup>。(2)TUNEL 法:检测细胞凋亡,计算凋亡指数(AI)<sup>[4]</sup>。(3)HE 染色及结果观察:标本脱水,石蜡包埋,切片(厚度 2μm),常规 HE 染色,光学显微镜下观察对照组、烧伤组、治疗组 SD 大鼠小肠黏膜组织的病理形态学变化,并比较二者的差异。根据 CHIU 氏 6 级评分对小肠的损伤程度进行评定。双盲法判读病理切片并计分。

6. 统计学方法:使用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。全部数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,以  $P < 0.05$  为统计学意义。各实验组不同时间点间采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)对资料进行分析。同一时间点烧伤组与治疗组间采用成组  $t$  检验。

### 结 果

1. 各实验组 SD 大鼠小肠黏膜组织细胞 HSP70 的表达:(1)各实验组内不同时间点 SD 大鼠小肠黏膜组织细胞 HSP70 的表达变化:烧伤组伤后 3h 时表达明显增高  $4.00 \pm 1.22$ , 6~12h 达到高峰( $7.40 \pm 1.34$ ,  $9.20 \pm 1.64$ ), 24h 表达已经回落  $3.40 \pm 0.89$ , 但 48h 时间点时又出现第 2 次增高  $6.80 \pm 1.10$ 。烧伤组 3、24h 组与 6、12、48h 组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在治疗组观察到类似的变化,在伤后 6~12h 小肠黏膜组织细胞 HSP70 的表达达到高峰,在伤后 24h 表达已经降低,但 48h 又有增加(图 1)。(2)各实验组间相同时间点 SD 大鼠小肠黏膜组织细胞 HSP70 的表达变化:治疗组 3、6、12、24h 各时间点 SD 大鼠小肠黏膜组织细胞 HSP70 的表达与对应的相同时间点烧伤组 SD 大鼠小肠黏膜组织细胞 HSP70 的表达比较均有统计学意义( $t_{3h} = 2.86$ ,  $P < 0.05$ ;  $t_{6h} = 2.52$ ,  $P < 0.05$ ;  $t_{12h} = 2.31$ ,  $P < 0.05$ ;

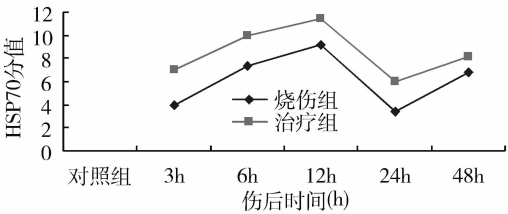


图1 各组小肠黏膜 HSP70 评分变化图

表1 各组 HSP70 评分比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 伤后 3h         | 伤后 6h          | 伤后 12h         | 伤后 24h         | 伤后 48h      |
|-----|---------------|----------------|----------------|----------------|-------------|
| 烧伤组 | 4.00 ± 1.22   | 7.40 ± 1.34    | 9.20 ± 1.64    | 3.40 ± 0.89    | 6.80 ± 1.10 |
| 治疗组 | 7.00 ± 2.00 * | 10.00 ± 1.87 * | 11.40 ± 1.34 * | 6.00 ± 1.41 ** | 8.20 ± 1.30 |

与相同时间点烧伤组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

0.67), 但 48h 时间点时凋亡指数又出现第 2 次增高 ( $7.96 \pm 0.95$ )。伤后各组间除 3h 组与 24h 组, 6h 组与 48h 组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 其余各组间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。在治疗组观察到类似的变化, 在伤后 6 ~ 12h 小肠黏膜组织细胞凋亡达到高峰, 在伤后 24h 凋亡指数已经降低, 但 48h 又有增加 (图 2)。(2) 各实验组间相同时间点 SD 大鼠小肠黏膜组织细胞凋亡指数的变化: 治疗组 3、6、12、24h 各时间点 SD 大鼠小肠黏膜组织细胞凋亡指数与对应的相同时间点烧伤组 SD 大鼠小肠黏膜组

$t_{24h} = 3.47, P < 0.01$ ), 治疗组 48h 与烧伤组 48h 比较, 差异不明显 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。

2. 各实验组 SD 大鼠小肠黏膜组织细胞凋亡的情况: (1) 各实验组内不同时间点 SD 大鼠小肠黏膜组织细胞凋亡指数的变化: 烧伤组伤后 3h 小肠黏膜组织细胞凋亡指数明显增高 ( $3.08 \pm 0.33$ ), 到伤后 12h 达到高峰 ( $10.98 \pm 1.30$ ), 24h 减低 ( $3.36 \pm$

组织细胞凋亡指数比较均有统计学差异 ( $t_{3h} = 2.48, P < 0.05$ ;  $t_{6h} = 2.71, P < 0.05$ ;  $t_{12h} = 2.43, P < 0.05$ ;  $t_{24h} = 2.47, P < 0.01$ ), 治疗组 48h 与烧伤组 48h 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表 2)。

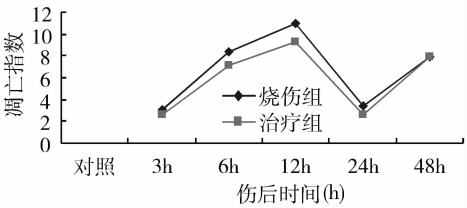


图2 各组凋亡指数变化图

表2 各组凋亡指数 (AI) 比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 伤前          | 伤后 3h         | 伤后 6h         | 伤后 12h        | 伤后 24h        | 伤后 48h      |
|-----|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
| 烧伤组 | 1.40 ± 0.14 | 3.08 ± 0.33   | 8.36 ± 0.92   | 10.98 ± 1.30  | 3.36 ± 0.67   | 7.96 ± 0.95 |
| 治疗组 |             | 2.56 ± 0.33 * | 7.08 ± 0.91 * | 9.28 ± 0.99 * | 2.56 ± 0.96 * | 7.88 ± 0.98 |

与相同时间点烧伤组比较, \*  $P < 0.05$

3. 各时间点各实验组 HSP70 表达变化与细胞凋亡变化比较: 从伤后 3h 到伤后 24h 各时间点上都存在治疗前后 HSP70 表达明显的增加同时伴随细胞凋亡指数的明显减少 (图 3)。

3. 各实验组 SD 大鼠小肠黏膜组织病理形态学变化: 烧伤后小肠固有膜充血、水肿, 炎性细胞浸润, 部分绒毛顶部上皮脱落、坏死, 肠腔内出血。治疗组各时间点上小肠的病理形态学改变较相应时间点烧伤组的小肠病理改变减轻 (表 3)。

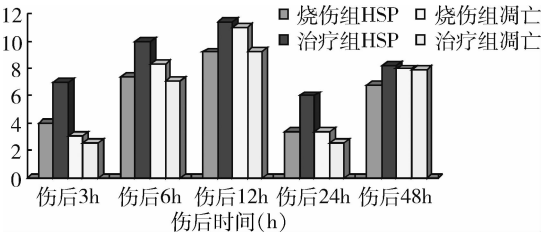


图3 各时间点各组 HSP70 表达变化与细胞凋亡变化比较图

纵轴为 HSP70 分值或凋亡指数数值

表3 各组小肠黏膜组织病理评分比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 伤前         | 伤后 3h      | 伤后 6h        | 伤后 12h       | 伤后 24h       | 伤后 48h     |
|-----|------------|------------|--------------|--------------|--------------|------------|
| 烧伤组 | 0.2 ± 0.48 | 1.6 ± 0.55 | 2.6 ± 0.55   | 3.4 ± 0.55   | 3.0 ± 0.71   | 3.8 ± 0.84 |
| 治疗组 |            | 1.2 ± 0.48 | 1.6 ± 0.55 * | 2.4 ± 0.55 * | 2.6 ± 0.55 * | 2.8 ± 0.45 |

与相同时间点烧伤组比较, \*  $P < 0.05$

## 讨 论

细胞凋亡 (apoptosis) 做为不同于细胞坏死的另一种细胞死亡方式,最早由 Kerr 等发现并提出。本研究中笔者观察到大鼠严重烫伤后早期小肠黏膜细胞凋亡明显增加,于伤后 6~12h 达到高峰,与国内外相关的报道一致<sup>[5]</sup>。这一时期也正是烧伤休克后肠道细菌、内毒素易位的高峰期,提示肠黏膜细胞凋亡与肠黏膜机械屏障功能的损伤有关。本实验中烧伤 12h 后至 24h 小肠黏膜细胞凋亡数量开始减少,表明凋亡过程开始终止及肠黏膜细胞开始修复。目前认为严重烧伤后介导细胞凋亡的因素可能有烧伤早期缺血再灌注损伤 (I/R)、细胞因子、氧化应激、细菌感染及内毒素等,这些因素之间又相互影响,并通过不同的机制调控细胞的凋亡。近期的研究发现,烧伤等严重应激后细胞凋亡的发生机制可能包括氧自由基机制和钙超载机制,除了以上所提机制外,各种凋亡调控基因也在其中发挥着不同的作用<sup>[6]</sup>。总之,烧伤等严重应激后细胞凋亡的发生机制极其复杂,亟待阐明。另外,本实验结果还显示出在伤后 24h 小肠黏膜细胞凋亡数量开始减少,但至 48h 又出现第 2 次增高,我们认为这可能与伤后机体经第 1 次休克打击后肠道功能尚未及调整,此时又进入水肿回吸收期,肠道经受了缺血再灌注损伤有关,在水肿液回吸收过程中大量的有害物质包括炎症介质、细胞因子、毒素等可能进入血液,不仅使人体抵抗力出于低潮,而且可促进全身炎症反应的发生和发展,甚至引起全身炎症反应综合征 (SIRS),直至 MSOF,这就是所谓的“二次打击”,这也解释了为什么小肠黏膜细胞会再次出现凋亡增加。

654-2 早期在经典药理中被列为 M 乙酰胆碱受体竞争性阻断药。近年来,随着基础研究的深入,不断发现其新的药理作用<sup>[7]</sup>。现在认为其抗休克机制并非仅是直接扩血管,而且还在细胞水平上保护细胞,提高细胞对缺血缺氧的耐受力,如钙拮抗作用、细胞膜稳定作用、抗氧化作用、抑止某些激素及细胞因子的释放等。另外,还有研究结果显示 654-2 可能还具有抑制核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 激活、降低血液黏度、增加白细胞及红细胞变形能力的药理作用。在本研究中我们在烧伤早期给予大鼠腹腔注射小剂量 654-2 治疗后发现肠黏膜细胞凋亡数目明显减少,表明早期应用小剂量 654-2 即可能具有抗肠黏膜细胞凋亡的作用。目前对 654-2 的抗细胞凋亡的机制还未完全阐明,已有的研究认为可能与以下作用有

关<sup>[8]</sup>:①抗氧自由基损伤;②减少兴奋性氨基酸的生成与释放;③阻断 Ca 通道,减轻 Ca 超载;④抑制一氧化氮 (No) 生成;⑤减少线粒体损伤,阻止凋亡发生。另外近年来有多个实验证实 HSP70 的表达可能有抑制细胞凋亡的作用<sup>[9-10]</sup>。笔者的实验发现 654-2 可提高烧伤早期肠黏膜 HSP70 的表达,提示山莨菪碱诱导 HSP70 的表达可能是其抗细胞凋亡的作用机制之一。

近年来研究发现 HSP70 作为一种非特异性的细胞内源性保护蛋白,在防止应激引起的细胞损害或者使受损的细胞恢复方面起着重要作用。Depre 等<sup>[11]</sup>、Jayakumar 等<sup>[12]</sup>、Galois 等<sup>[13]</sup> 人的实验分别证实了 HSP70 对肝细胞、神经细胞、软骨细胞的抗凋亡作用。在本实验中,我们在大鼠烫伤后早期给予 654-2,后检测发现在相同时间点上肠黏膜细胞 HSP70 表达有增加,同时有肠黏膜细胞凋亡的减少。据此,笔者分析伤后诱导肠黏膜细胞 HSP70 的表达可能有抗细胞凋亡作用。目前,HSP70 的抗凋亡机制仍未完全弄清,可能与影响介导凋亡的信号通路有关,包括对线粒体通路、死亡受体通路、促凋亡 JNK 信号通路和 Bag-Raf-Mek-Erk 抗凋亡通路的调节<sup>[14]</sup>。

综上所述,严重烧伤早期 SD 大鼠小肠黏膜组织损伤明显,小肠黏膜细胞凋亡可能是严重烧伤早期大鼠小肠黏膜组织损伤的重要原因之一,早期应用 654-2 对烧伤早期 SD 大鼠小肠黏膜组织损伤具有明显保护作用。654-2 对小肠黏膜组织的保护作用可能与其增强细胞内 HSP70 表达、抗小肠黏膜细胞凋亡有关。

## 参考文献

- 1 Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, *et al.* Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis[J]. PLoS Med., 2008, 5(3): e54
- 2 Walker HL, Mason AD. A standard animal burn[J]. J Trauma, 1968, 8(6): 1049
- 3 曹立宇, 张洪福. 大肠肿瘤 P53 和 BCL-2 蛋白表达[J]. 临床与病理杂志, 2010, 16(3): 214-216
- 4 陈静, 王甲汉, 任加良. 烫伤大鼠复苏前后小肠组织凋亡基因表达的变化[J]. 中华烧伤杂志, 2009, 21, (1): 55-56
- 5 袁建成, 李艳萍, 秦孝健, 等. 细胞凋亡在严重烧伤大鼠肠粘膜屏障损伤中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2009, 11: 715-717
- 6 张诚, 盛志勇, 柴家科, 等. 氧自由基对烫伤大鼠延迟复苏后肠上皮凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2008, 8: 487-491
- 7 Poupko JM, Baskin SI, Moore E. The pharmacological properties of anisodamine[J]. J Appl Toxicol, 2011, 27(2): 116-121

- 8 吴昊,晁福,杨鸿生,等. 山莨菪碱对兔肺缺血-再灌注损伤保护作用的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2009,5:310-312
- 9 Frydman J. Folding of newly translated proteins in vivo; the role of molecular chaperones[J]. Annu Rev Biochem,2008,70:607-613
- 10 安立敏,胡健,夏经纲,等. 药理预适应对兔急性心肌梗死保护作用的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2010,2:104-106
- 11 Depre C, Kim S, John A, et al. Program of cell survival underlying human and experimental hibernating myocardium[J]. Circ Res,2010 Sep 3,107(5):615-619
- 12 Jayakumar J, Suzuki K, Sammut IA, et al. Heat shock protein 70 gene-transfection protect mitochondrial and ventricular ar function against ischemia 2 reperfusion injury[J]. Eur J Neurosci,2009,30(8):1517-1526
- 13 Galois L, Etienne S, Grossin L, et al. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study[J]. Osteoarthritis - Cartilage,2009,12(10):779-786
- 14 Man K, Ng KT, Lee TK, et al. FTY720 attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in normal and cirrhotic livers[J]. Am J Transplant,2005,5(1):40-49

(收稿日期:2013-01-07)

(修回日期:2013-03-12)

# 人牙周膜细胞复合壳聚糖-胶原温敏水凝胶 异种移植构建可注射骨组织的研究

李 颖 杨亚冬 谷子芽 杨 悦 傅 婷 张文元

**摘 要** **目的** 观察人牙周膜细胞复合壳聚糖-胶原温敏水凝胶异种移植小鼠皮下的组织再生,评价其作为可注射骨组织的可行性。**方法** 将壳聚糖、胶原、 $\beta$ -磷酸甘油钠按比例混合构建温敏性水凝胶。通过活/死细胞染色法检测人牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLs)在壳聚糖-胶原水凝胶三维培养中的存活。PDLs成骨预诱导后复合水凝胶注入小鼠背部皮下,6周后取出植入物,通过HE、Masson染色法观察组织的再生以及胶原纤维的形成。**结果** 壳聚糖-胶原水凝胶可支持PDLs的三维培养,体内实验表明无刺激性。复合细胞后的凝胶支架在动物皮下可形成血管化包块,结缔组织和胶原纤维形成明显高于无细胞的对照组。**结论** 壳聚糖-胶原温敏水凝胶是一种理想的可注射支架,复合PDLs有望构建可注射骨组织,修复骨缺损。

**关键词** 牙周膜细胞 壳聚糖 胶原 温敏水凝胶 成骨分化

[中图分类号] R318 [文献标识码] A

**Transplantation of Human Periodontal Ligament Cells Embedded Thermosensitive Chitosan-collagen Hydrogel in an Immunocompetent Xenogeneic Animal Model.** Li Ying, Yang Yadong, Gu Ziya, Yang Yue, Fu Ting, Zhang Wenyuan. Institute of Biological Engineering, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang 310012, China

**Abstract Objective** To access the potential application of human periodontal ligament cells (PDLs) embedded thermosensitive chitosan-collagen hydrogel for injectable bone tissue engineering. **Methods** Live/dead staining was used to access the survival of the PDLs cultured in the hydrogel scaffold. Osteo-induced PDLs embedded hydrogel was injected in the subcutaneous dorsum of ICR mice. After 6 weeks the implants were separated for HE and Masson staining. **Results** Most PDL cells can survive in the hydrogel scaffold after 3D culture. Cell-embedded hydrogel formed vascularized implants under the skin. Histological staining showed that increasing connective tissue and collagen fiber formation in the implants. **Conclusion** The thermosensitive chitosan-collagen hydrogel might be an ideal injectable scaffold. Combining it with PDLs is promising to injectable tissue engineering for bone regeneration.

**Key words** Periodontal ligament cells; Chitosan; Collagen; Thermosensitive hydrogel; Osteogenic differentiation

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2012KYB056);浙江省科技厅基金资助项目(2011F20015);浙江省科技计划项目(2013F10006);杭州市科技发展计划项目(20130633B35)

作者单位:310012 杭州,浙江省医学科学院生物工程所(李颖、杨亚冬、傅婷、张文元);310012 杭州口腔医院城西分院综合科(谷子芽);浙江省立同德医院病理科(杨悦)

通讯作者:张文元,电子信箱:zhangwy61@163.com

牙周病是一种慢性骨破坏性疾病,尤其是牙槽骨的破坏和丧失可导致牙齿脱落,严重影响患者生活质量。重建牙槽骨是治疗的关键,近年来组织工程研究为牙周再生治疗提供了新的希望。支架材料和种子细胞都是组织工程成功应用的重要因素。以凝胶材料为支架的可注射系统是组织工程的一种新的研究方向<sup>[1]</sup>。凝胶材料在体外为液态,进入体内可快速