分类号 _____ 密级 _____

UDC _____ 编号 _____

南方醫科大學

博 士 学 位 论 文

镁合金表面层状双氢氧化物涂层构建及其治疗骨肉瘤的实验研究

Fabrication of layered double hydroxide coating on Mg alloy and its application in treatment of osteosarcoma

程 实

导 师 姓 名 张余 教授

专 业 名 称 外科学（骨外）

培 养 类 型 学术型博士研究生

论 文 提 交 日 期 2021 年 03 月 28 日

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

南方医科大学2018级博士学位论文

镁合金表面层状双氢氧化物涂层构建及其治疗骨肉瘤的实验研究

Fabrication of layered double hydroxide coating on Mg alloy and its application in treatment of osteosarcoma

课题来源：国家重点研发计划（2017YFB0702604），
国家自然科学基金面上项目（31771038）

学 位 申 请 人　程实
导 师 姓 名　张余 教授
专 业 名 称　外科学（骨外）
培 养 类 型　学术型研究生
培 养 层 次　博士研究生
所 在 学 院　第二临床医学院

答辩委员会主席　郑玉峰 教授
答辩委员会委员　白晓春 教授
宁成云 教授
吴水林 教授
邹学农 教授
刘宣勇 教授
杨磊　教授

2021年5月19日 广州

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

镁合金表面层状双氢氧化物涂层构建及其治疗骨肉瘤的实验研究

博士研究生：程实

指导教师：张余

摘　要

骨肉瘤是最常见的恶性骨肿瘤，常见于儿童及青少年，致死率或致残率极高，对社会家庭危害重大。目前临床使用的标准化治疗方案包括新辅助化疗+手术+术后化疗的保肢治疗方式，但近5年患者总体生存率未进一步提高，主要原因在于术后局部复发和转移。目前应用于保肢治疗的材料主要为钛合金、不锈钢或钴铬钼合金等，均为惰性材料无生物活性对肿瘤治疗无作用，且远期因力学不匹配导致植入材料松动、断裂。植入材料直接与体内组织相接触，可作为抗肿瘤的第一道战线，因此赋予植入材料抗肿瘤效果是提升骨肉瘤疗效的潜在手段。镁合金是可降解金属的代表，被誉为下一代生物医用金属材料，具有良好的力学性能和可降解性，其降解产生的镁离子能有效促进新骨生成。最新研究表明镁基金属具有良好的抗肿瘤效应，因此镁合金在骨肉瘤治疗中亦具有极大潜力。但其仍有许多不足，首先是镁合金降解速率过快，产生大量镁离子和氢气，导致组织周围碱性微环境和炎症反应；其次是其抗肿瘤效果虽强于钛合金等惰性材料，但在治疗恶性肿瘤方面仍不够满意。因此，为满足临床应用需求，需改善其抗腐蚀效果并提升抗肿瘤效应。为解决这两个问题，本研究采用水热法原位生成的方式在镁合金表面构建Mg-Al双氢氧化物（LDH）涂层，并利用涂层的层间置换效应负载活性药物雷公藤红素（celastrol），研究结果发现：1、镁合金表面LDH涂层可显著改善镁合金的抗腐蚀效果和生物相容性，体内外研究显示其成骨成血管作用也得到提升；2、LDH镁合金材料负载雷公藤红素

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

后能缓慢释放药物，且体内外实验显示负载雷公藤红素的LDH镁合金可有效杀死骨肉瘤细胞，其作用与诱导肿瘤细胞凋亡和活性氧产生有关，而自噬在其中起到拮抗凋亡的作用，当抑制自噬后肿瘤细胞凋亡进一步增加；3、体内实验显示负载雷公藤红素LDH镁合金材料可在早期明显促进新骨生成，有利于材料与骨的稳定结合，这可能与雷公藤红素在体内释放后抑制破骨细胞活性有关。综上，本研究以镁合金为基底构建LDH涂层并负载雷公藤红素，所制备的新型材料可有效杀死骨肉瘤细胞并促进骨修复，从植入材料的角度为骨肉瘤的综合治疗提出新方法。

关键词 骨肉瘤 植入材料 镁合金 双氢氧化物涂层 雷公藤红素

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Fabrication of layered double hydroxide coating on Mg alloy and its application in treatment of osteosarcoma

Name: Cheng Shi

Supervisor: Zhang Yu

ABSTRACT

Osteosarcoma is the most common malignant bone tumor in children and adolescents, causing high mortality or disability rate of patients and great harm to the community and family. Currently, the clinically used standardized treatment schedule includes neoadjuvant chemotherapy + limb slavage surgery + postoperative adjuvant chemotherapy, but the overall survival rate of patients has not been further improved in the past 5 years, mainly due to postoperative local recurrence and metastasis of tumor. At present, the materials used in limb salvage therapy are mainly titanium alloy, stainless steel or cobalt-chromium-molybdenum(Co-Cr-Mo) alloy, all of which are inert and have no help to osteosarcoma treatment, and the loosens and ruptures rate of implant material is high due to mechanical mismatching with nature bone after implantation in the long term. Implant materials are in direct contact with focus lesion, thus can be used as the first front in the anti-tumor process. Therefore, the anti-tumor effect of implant materials is a potential mean to improve the treatment efficacy of osteosarcoma. Magnesium alloy is a representative of degradable metals and is known as the next generation of biomedical metal materials. It has good mechanical properties and degradability, and the magnesium ions produced by its degradation can effectively promote the formation of new bone.Recent studies have shown that

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

magnesium alloy has good anti-tumor effect, so it also has great potential in the treatment of osteosarcoma.However, there are still many dissatisfactory shortcomings. Firstly, the degradation rate of magnesium alloy is too fast, which produces a large amount of magnesium ions and hydrogen, leading to the alkaline microenvironment around the focus lesion and will causing inflammatory reaction.Secondly, its anti-tumor effect is stronger than inert materials such as titanium alloy, but it is still not strong enough in the treatment of malignant tumors.Therefore, in order to meet the clinical application needs, it is necessary to improve the anti-corrosion effect and enhance the anti-tumor effect.To solve these two problems, this study in situ constructed Mg - Al double hydroxide (LDH) coating in the magnesium alloy surface by means of hydrothermal method, and load anion drug celastrol taking advantage of the substitution effect between LDH layer. The mainly results of this study includes: 1, the magnesium alloy coating on the surface of LDH can significantly improve the corrosion resistance effect and biological compatibility of magnesium alloy, results of in vivo and in vitro research shown that the effect of osteogenesis and angiogenesis also improved; 2, celastrol can slowly released from the LDH coating magnesium alloy after load into the LDH layer, and the experiments shown that the celastrol loaded LDH material can effectively kill osteosarcoma cells, inducing tumor cell apoptosis and reactive oxide species production. We further investigated the role of autophagy in celastrol loaded LDH material induced osteosarcoma cell apoptosis, and found that the apoptosis rate of tumor cell would increased when inhibit autophage, on the contray the apoptosis rate of tumor cell would decreased when activated autophage, thus reveal that autophage plays a antagonism role in celastrol loaded LDH material induced osteosarcoma cell apoptosis; 3. In vivo experiments showed that celastrol loaded LDH material could significantly promote the formation of new bone at the early stage, which was conducive to the early stable binding of the

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

material to bone, which might be related to the inhibition of osteoclast activity after the release of celastrol in bone environment. In conclusion, in this study, magnesium alloy was used as the substrate material to construct LDH coating and loaded with celastrol. The constructed new material can effectively kill osteosarcoma cells and promote bone repair, which proposed a new treatment method of osteosarcoma from the perspective of implant material.

KEYWORDS: Osteosarcoma;Implanted material;Mgnesium alloy;Layered Double hydroxide;Celastrol

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

目 录

摘 要.....I

ABSTRACT.....i

绪 论.....1

第一章 镁合金表面 Mg-Al LDH 涂层构建及其表征.....6

1.1 实验材料.....6

1.2 实验方法.....7

1.3 实验结果.....9

1.4 讨论.....10

1.5 附图.....12

第二章 Mg-Al LDH 涂层镁合金的生物安全性及成骨性能研究.....14

2.1 实验材料.....14

2.2 实验方法.....16

2.3 统计学分析.....22

2.4 实验结果.....22

2.5 讨论.....25

2.6 附图.....27

第三章 雷公藤红素负载 LDH 的表征及体外抗肿瘤机制.....35

3.1 实验材料.....36

3.2 实验方法.....39

3.3 统计学分析.....46

3.4 实验结果.....46

3.5 讨论.....51

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.6 附图.....54
第四章 雷公藤负载LDH的体内抗肿瘤效果及成骨性能评价.....65
4.1 实验材料.....65
4.2 实验方法.....66
4.3 统计学分析.....69
4.4 实验结果.....70
4.5 讨论.....72
4.6 附图.....73
结 论.....78
参考文献.....79
中英文对照缩略词表.....91
攻读博士学位期间成果.....92
致 谢.....94
南方医科大学学位论文原创性声明.....96

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

绪 论

1.1 骨肉瘤的治疗现状

1.1.1 骨肉瘤的流行病学

骨肉瘤（osteosarcoma）是最常见的起源于骨骼系统的原发恶性骨肿瘤，据统计，骨肉瘤发病率为每年 0.002‰~0.003‰，但由于我国人口基数大，每年新发的病例数近 1 万例[1, 2]。骨肉瘤致病因素不明确，已知的危险因素包括放射性物质、Paget 病、以 P53 基因突变为特征的 Li–Fraumeni 综合征、以 RB1 基因突变为特征的视网膜母细胞瘤、Werner 综合征、Rothmund–Thomson 综合征等[3-8]。80%的骨肉瘤患者为 10-20 岁儿童和青少年，其次为 50 岁以上中老年人，男性与女性发病率之比约为 1.4:1，恶性程度高，自然病程的截肢率或死亡率极高，对社会和家庭造成巨大影响[9]。

1.1.2 骨肉瘤的化疗进展

骨肉瘤好发于骨骼发育生长最快的股骨远端或胫骨近端，这些负重骨行手术切除将严重影响患者的肢体功能[10]。在 1970 年之前，单纯截肢手术仍是骨肉瘤的主要治疗手段，然而根据 1946—1971 年的文献报道，1286 例患者采取截肢手术后的 5 年生存率平均仅为 19.7%(16%～23%)，大多数患者在截肢后的 1 年内发现肺转移灶，因此有学者提出患者在确诊骨肉瘤时即伴有微小转移灶的理论学说，提示截肢手术并不能从根本上消灭肿瘤病灶[11-13]。在 1970 以后，有学者尝试在术后使用化疗药物来提升骨肉瘤患者的生存率，并在随后的随访中发现骨肉瘤的治疗效果较单纯截肢手术大大提升。一项来自多中心骨肉瘤协作组(TheMulti-Institutional Osteosarcoma Study，MIOS)和加州大学洛杉矶医院的前瞻性随机对照研究证实采取术后辅助化疗患者的 2 年生存率为 63%，而单纯手术组仅为 12%，确认了术后辅助化疗的重要性[14]。此后各大肿瘤治疗中心不断尝试不同化疗药物配伍及剂量，众多研究结果均显示术后辅助化疗的良好效果，并提出化疗的主要作用可能为杀灭肺微小转移灶或者延迟肺转移灶出现的时间，从而确立化疗在骨肉瘤治疗中的核心地位[15, 16]。随着外科技术的进步，尤其是

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

关节假体的发明及在骨肉瘤治疗中的应用，保肢的概念应运而生，患者可通过保肢治疗避免截肢带来的痛苦[17]。然而过去假体设计及制作需要 2-3 个月的时间，为避免在等待的时间内骨肉瘤患者的病情进展，最早 Rosen 等设计了一种新辅助化疗方案 T5，给予甲氨喋呤(MTX, 200 mg/kg)、长春新碱(VCR,15 mg/m^2)、多柔比星(ADM, 45 mg/m^2)化疗，每种药物循环 1 次后手术[18]，此后纪念斯隆-凯瑟琳癌症中心也开展了关于术前新辅助化疗应用的研究，并提出了 T-10 方案[19]。随后“术前新辅助化疗+保肢手术+术后新辅助化疗”的综合治疗模式被各大肿瘤治疗中心认可并采纳。但随后美国儿童肿瘤协作组(Pediatric Oncology Group，POG)和德奥瑞骨肉瘤协作组(The Cooperative Osteosarcoma Study Group，COSS)等国际上知名的骨肉瘤治疗协作组研究发现，新辅助化疗并不能增加患者的生存时间，是否采取术后辅助化疗才是影响生存率的关键因素[19-21]。目前对于新辅助化疗的作用主要归纳为以下几个方面：1、为保肢手术设计争取时间；2、使肿瘤边界更加明确，利于手术范围的确定；3、根据术前新辅助化疗的结果可评估肿瘤坏死率，不仅可提示预后，还可根据化疗方案敏感性对辅助化疗方案进行修订，即挽救化疗(salvage chemotherapy)。这种综合治疗方式作为 NCCN 指南中骨肉瘤的标准化治疗方式在世界各肿瘤治疗中心广泛应用，并确立了以表柔比星、顺铂、异环磷酰胺和甲氨蝶呤为核心的化疗方案[22, 23]。但近年来根据各大肿瘤治疗中心随访结果发现，近 30 年来骨肉瘤患者的 5 年生存率较前未进一步提升。同时，由于使用大剂量化疗药物带来的副作用如阿霉素导致的心脏毒性[24]、顺铂导致的肾毒性和耳毒性[25]以及甲氨蝶呤导致的骨髓抑制[26]等却给临床治疗带来许多困难。因此，找到更为安全有效的化疗药物或给药方式是现今骨肉瘤内科治疗中亟待解决的关键问题之一。

1.1.3 骨肉瘤外科治疗研究进展

在化疗应用于骨肉瘤之前，截肢是骨肉瘤最主要的治疗方式，然而其对患者身心打击巨大。随着影像、化疗、放疗和人工假体等技术的发展和应用，保肢手术逐渐取代截肢手术成为主要外科治疗方式，现在 90%以上的骨肉瘤患者能接受保肢治疗[27]。国内外许多学者就保肢手术和截肢手术的疗效进行对比，

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

发现采取两种方式治疗患者远期生存时间无差别，但保肢治疗的患者远期心理接受度和肢体功能更好，表明保肢手术相对截肢手术同样安全但肢体功能效果更好[28-31]。骨肉瘤的保肢手术外科治疗有两方面的要求，首要目标是完整、彻底的切除或灭活肿瘤组织，其次是重建因切除导致的骨与软组织缺损。为了准确彻底的切除肿瘤，需要明确肿瘤分期和外科边界的概念。Ennking 最早提出的 MSTS 外科分期系统是目前骨肉瘤治疗中最为广泛应用的一类分期系统，相较于国际通用的美国癌症联合委员会（AJCC）提出的恶性骨肿瘤分期系统，MSTS 分期引入了解剖间室的概念，将完全位于骨内的称为间室内肿瘤，而穿透骨皮质的称为间室外肿瘤[32]，因此更有利于骨肿瘤医生规划切除范围。基于 MSTS 分期系统而产生的 MSTS 外科边界评价系统也广泛用于指导手术，该系统将外科边界分为囊内切除、边缘切除、广泛切除及根治性切除[32]。囊内切除指保留肿瘤的包膜，切除部分或全部肿瘤组织；边缘切除指经肿瘤的真性或假性包膜外切除肿瘤，可能有微小的肿瘤组织残留；广泛切除是指整块切除肿瘤和肿瘤外的正常组织，不经肿瘤内或包膜进行操作，术野无肿瘤残留；根治性切除指将解剖间室结构连同肿瘤全部切除。广泛切除是骨肉瘤外科手术追求的目标，既完整的切除肿瘤组织，又尽可能保留更多的骨量利于肿瘤切除后的修复重建，而达到这一目标的关键在于如何精确判断骨肉瘤病灶的边界。目前，如何精准判断骨肉瘤累及范围仍是亟待解决的难题。临床工作中常依据新辅助化疗后的 MRI 判断肿瘤边界，根据反应带的边界扩大 3-5cm 来确定截骨范围，然而此种标准是否真正安全仍有争议[33, 34]。Bertrand 等人的研究指出，局部复发的风险与切除边缘至肿瘤距离无关，关联最直接的是切缘是否被肿瘤细胞污染，病理学阴性的边界才是最安全的边界[35]。这对外科医生的操作提出更高的要求，显然在获得病理学阴性边界的条件下，截除范围越小因操作造成肿瘤细胞污染的可能性越大，而术中却无法精准判断骨肉瘤的边界。在这种两难的情况下，植入材料可以作为体内抗肿瘤的第一道战线发挥作用，因此赋予植入材料抗肿瘤的效果也许是降低局部复发率的可能手段。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 兼具抗肿瘤与骨修复生物材料研究现状

如前所述，不同于其他肿瘤，骨肿瘤的治疗需要同时兼顾肿瘤学和骨科学两方面的内容，即除需要彻底杀死肿瘤细胞外，还需考虑外科切除后功能重建的问题[36]。传统支架材料虽然部分解决了骨缺损的问题，但其对骨肉瘤的治疗并无帮助。而植入材料在骨肉瘤切除区域直接与周围组织接触，可以作为体内与肿瘤细胞对抗的第一道战线，达到降低局部复发率的效果。因此如何赋予支架材料抗肿瘤效果是值得深入研究的问题。国内外也有许多学者关注这一难题，试图通过对材料进行不同设计和改性解决这一临床问题。Wu 等人将 MoS2 和 CuFeSe2 等具有良好光热效果的材料制备到 3D 打印的β-TCP 陶瓷材料表面，在低功率近红外光辐射下即可使材料表面温度迅速升高，从而杀死肿瘤细胞，同时，支架释放的生物活性离子能够显著促进骨间充质干细胞的增殖与分化，并诱导体内新生骨组织的长入[37-41]。Zhang 等人在钛合金表面采用等离子喷涂方式构建一层黑色 TiO2 涂层，在近红外光照射下能迅速升温杀死肿瘤细胞，远期促进骨修复[42]。Lu 等制备了一种生物陶瓷-壳聚糖多孔支架，内部负载磁性 $SrFe_{12}O_{19}$ 纳米颗粒，通过磁控产热的方式杀死肿瘤细胞，在植入体内 3 月后发现具有促进成骨效果[43]。这些研究都显示出了令人振奋的结果，然而多采用传统金属材料，不可降解，远期仍会有磨损、松动等问题；光热的穿透性差并不适合于骨这样的深部组织而磁热的可控性仍有待观察。基底材料和治疗手段的合理选择对于提高重建质量、降低局部复发率至关重要。与传统医用金属材料相比，可降解镁金属的骨科应用使内植入物同时具有了生物相容性好、成骨诱导性佳、避免二次手术取出等优势，具有很好的应用潜力及推广价值。

1.3 应用于骨肿瘤治疗中的镁合金

镁基金属被誉为一类革命性的医用金属材料。与传统的金属类骨科植入材料相比，其不仅具有体液环境下可降解，避免二次手术取出的优势，且接近人体骨组织密度和弹性模量，可有效避免“应力遮挡”效应，诱导新骨生成并有效促进骨整合。并且已有部分镁基金属产品在临床上应用，如经 CE 批准认证的

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

MAGNEZIX®加压螺钉和韩国食品药品监督管理局认证批准的 K-MET 镁金属螺钉，表明镁合金材料已经走向临床应用[44, 45]。在骨肿瘤领域，也有许多研究发现镁合金具有一定抗肿瘤效果。2013 年，Ma 等首次报道镁合金具有应用于骨肿瘤治疗中的潜在作用，提出可通过控制镁合金降解产生的氢气和 PH 值来调节细胞活性氧的含量达到抗肿瘤的目的[46]。随后，Hakimi 等构建了新型多孔镁合金支架 EW62，提升其抗腐蚀性和力学性能，并通过体外研究发现其对骨肉瘤细胞增殖具有显著抑制效果[47]。Kim 等人发现镁基颗粒在体外能杀死骨肉瘤细胞 SAOS2，可能与诱导活性氧产生有关[48]。Dai 等人进一步通过更加完整的体内体外实验验证了镁及镁合金相较于钛基金属对骨肉瘤生长及转移的抑制作用，并发现机制可能与镁合金降解后使肿瘤微环境内 PH 值升高，镁离子蓄集有关，而且能促使 CXCR4 信号轴的激活[49]。我们课题组在前期研究中发现，负载二磷酸盐的镁锶合金可激活 NF-KB 信号通路诱导骨巨细胞瘤凋亡[50]，此外，对镁锶合金化微球进行表面微弧氧化掺杂含氮双磷酸盐药物，通过体内外研究发现其可通过甲羟戊酸途径诱导骨肉瘤细胞凋亡及坏死，然而仍缺乏对成骨性能的研究[51]。以上研究均显示镁基金属在骨肉瘤和其他类型骨肿瘤治疗中的应用前景，但其临床应用前仍有部分不足，首先镁合金在体内降解速度过快，产生过多的镁离子会造成过碱微环境并释放大量氢气不利于组织再生，其次其虽有抗肿瘤活性但仍不能满足需求。为解决这两个问题，本课题选用镁合金 AZ31 作为基底材料，通过表面改性构建双金属氢氧化物涂层，负载抗肿瘤药物雷公藤红素，深入研究其对骨肉瘤的杀伤效果及机制，并通过体内实验评价其对骨修复的作用。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第一章 镁合金表面 Mg-Al LDH 涂层构建及其表征

骨肉瘤的治疗需要切除肿瘤组织并重建肢体功能。目前，应用于骨肉瘤治疗中的传统骨植入材料（钛合金、不锈钢、钴铬钼合金等）的缺点明显，包括释放毒性离子、不可降解、生物活性差且不具备抗肿瘤特性等[52-57]。镁合金被誉为下一代生物医用金属材料，不仅具有良好的生物活性，且其弹性模量更接近机体骨组织[58-60]。研究发现镁合金降解产生的镁离子可通过诱导神经末梢释放活性肽 CGRP 进而诱导骨生成[61]。近年来也有多数研究证实镁合金对肿瘤的生长有抑制作用，因此适合作为骨肿瘤术后的内植物[46, 49, 51]。但是生物医用镁基金属材料在机体内富含氯离子的微环境下降解速率过快，产生大量氢气和碱性环境不利于骨组织修复[62]。因此，需要对镁合金进行表面改性，以调整其降解速率达到与机体骨组织修复相匹配，并可赋予其特定的生物性能，如载药，促骨生成和血管生成等效果。镁合金的表面改性方式包括物理改性如电化学沉积[63]、离子注入[64]、微弧氧化[65]、磁控溅射等，而化学改性包括水热/碱热处理[66]、氟处理[67]、电化学氧化处理[68]等，本课题组前期在镁合金表面构造了一种基于层状双氢氧化物（Layered double hydroxide，LDH）的 Mg-Al LDH 薄膜，发现其可显著降低镁合金 AZ31 的降解速度并提高其生物相容性[69]。基于上述工作，在本章中我们采用氢氟酸处理后再使用水热原位生成法在 AZ31 表面制备纯度更佳的 Mg-Al LDH 涂层，并且对其体内体外抗腐蚀性、电化学性能、微观结构等进行评价。

1.1 实验材料

1.1.1　主要仪器和试剂

主要试剂和仪器	厂家及来源
微量移液枪（1 μL/10 μL/100 μL/1000 μL）	Eppendorf 公司，德国
6 孔细胞培养板	Corning 公司，美国
24 孔细胞培养板	Corning 公司，美国

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

超声清洗机	上海一恒公司，中国
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9146A, 上海精宏
超纯水机	PeproTech 公司，美国
电子显微镜	Hitachi-S3400N, 日本日立
氟化氢	国药集团，上海
硝酸铝	国药集团，上海
能量射散铺仪	IXRF-550i, IXRF SYSTEMS, 美国
X 射线衍射仪	D/Max, RIGAKU,日本
电化学工作站	CHI760C; 中国
扫描电子显微镜	Hitachi-S3400N,日本日立

1.1.2 实验所需主要溶液的配制

（1）PBS 磷酸盐缓冲液

1LPBS 磷酸盐缓冲液的配制方法：磷酸二氢钾(KH2PO4)：0.27 g，磷酸氢二钠(Na2HPO4)：1.42 g，氯化钠(NaCl)：8 g，氯化钾(KCl)：0.2 g，加去离子水约 800 mL 充分搅拌溶解，然后加入浓盐酸调 pH 至 7.4，最后定容到 1 L。

（2）40%（v/v）的氟化氢（HF）溶液

将 40mL 氟化氢缓慢加入 60 mL 超纯水内，搅拌均匀，配置成为浓度为 40%（v/v）的 HF 溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 镁合金 AZ31 表面 Mg-Al LDH 涂层的构建

镁合金 AZ31 购买自苏州川茂金属材料有限公司，并切割成直径 10 mm，厚度 2 mm 的片状试样，用 1000#碳化硅（SiC）砂纸以高转速打磨镁合金材料表面以去除表面的氧化层及杂质；打磨后的镁合金浸泡于无水乙醇（国药集团，上海）内并使用超声清洗三遍，每次 5 min，清洗完成后置于 37℃烘箱内晾干备用。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

将清洗好的 AZ31 样品倾斜放于六孔板内，将 40% HF 溶液缓慢加入到六孔板中直到完全浸没材料表面。然后将六孔板置于烘箱内，调整温度为 25 ℃使其反应 6h。HF 处理结束后，收集处理过的 AZ31 样品并使用去离子水反复清洗 5 次，每次 3 min。将 HF 处理 6h 组命名为 HF-1#,而 HF 处理 12h，24h，36h 和 72h 组同样按照上述方式处理，并分别命名为 HF-2#, HF-3#, HF-4#和 HF-5#。

配置反应所需溶液：称量 213 mg 硝酸铝（$Al(NO3)_3$）粉末，加入 50 mL 超纯水中，配置成 0.02M 硝酸铝溶液，缓慢滴入 NaOH 调整溶液 PH 值至 12.8。将上述 HF 处理过的各组 AZ31 样品水平放入聚四氟乙烯内衬，加入反应液，再将聚四氟乙烯内衬放入不锈钢反应釜，在电热恒温鼓风干燥箱内保温 12h，设置温度为 120℃。反应完成后，获得的样品使用去离子水反复清洗样品表面，自然干燥，并分别命名为 HT#, HT-1#, HT-2#, HT-3#, HT-4#和 HT-5#。

1.2. 2 镁合金 AZ31 表面 Mg-Al LDH 涂层的表征

首先采用场发射扫描电子显微镜观察 HF 处理前后 AZ31 样品表面形貌；采用能量射散谱仪（energy dispersive spectxrmleter, EDS）检测样品表面 Al，Mg 和 F 的含量；样品表面物相组成使用 X 射线衍射仪进行检测（X-ray diffraction, XRD），射线源为 Cu Kα（40 kV, 30 mA, 发射波长为 1.5148A 扫描范围为 10°到 55°，扫描速率为 3°/分钟）。

1.2.3 材料抗腐蚀性评价

AZ31 和 HT-3#的动电位极化曲线采用电化学工作站（Electrochemical workstation）进行分析评价。测试所采用的溶液为 PBS 缓冲液。工作体系为三电极体系，其中辅助电极为石墨，参比电极为 KCl 溶液饱和甘汞电极（SCE），工作电极为测试样品，样品暴露于电解液的面积为 0.255 cm^2，在进行测试之前，样品首先浸泡于 PBS 溶液中以获得稳定开路电势。极化曲线扫描速度为 10 mV/s，腐蚀电位（*Ecorr*）和腐蚀电流密度以及极化电阻（*Rp*）通过 Tafel 外推法计算获得。电阻抗谱测试采用 5 mV 正弦扰动信号，记录范围为 100 kHz 至 10 mHz。所获得的结果使用 ZView 软件进行分析。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

使用浸泡试验测试样品的抗腐蚀效果。各组样品放置于 400 mL 烧杯中，并加入 360 mL PBS，置于 37°C 烘箱内。在烧杯上方倒置一漏斗以收集析出的氢气，每天记录析出氢气的量，连续记录七天，样品表面积和 PBS 溶液的体积比为 50 cm^2/L。在浸泡 1,4,7 天后，将各组样品取出，去离子水清洗干净，自然干燥后使用扫描电镜（scanning electron microscope, SEM）观察各组样品的腐蚀形貌。

1.3 实验结果

1.3.1 AZ31 表面 Mg-Al LDH 涂层的形貌和组成

各组材料样品表面形貌如图 1.5.1 所示。所有涂层均呈现微纳片状结构，被 SiC 摩擦产生的空隙基本上全部被微纳-微米结构填充，这与之前我们观察到的现象一致[69]。随着 HF 处理的时间延长，更多的纳米结构微粒出现，可能与 MgF_2 的沉积有关。在 HF 处理时间到 72h 时，MgF_2 膜太厚，导致 HF-5#样品表面出现裂痕（图 1.5.1 （f））。图 1.5.1 中展示了 AZ31 和 HF 处理后的各组样品 XRD 结果，六组结构相似，主要检测到明显的 Mg 羽峰，MgF_2 相并未在 HF 处理组中检测出来，可能与其较差的结晶化有关。然而，EDS 的结果确认了 MgF_2 相的形成。图 1.5.1 （h）-（m）显示了水热处理后的各组样品表面形貌，LDH 涂层典型的微纳鳞片样结构有序的排列在各组样品表面，并填满 SiC 摩擦后产生的缝隙中。水热处理的各组样品的 XRD 结果显示在图 1.5.1（n）中，HT#、HT-1#和 HT-2#三组样品显示相同的峰。除了 Mg 的特征峰外，在 12°、18°、38°和 58°也都检测出来特征峰，12°的峰代表 Mg-Al LDH 的形成，而其他特征峰代表 $Mg(OH)_2$ 掺杂。然而，在 HT-3#, HT-4 和 HT-5#样品组仅检测到 Mg-Al LDH 相而未见 $Mg(OH)_2$ 掺杂。图 1.5.1（p）显示了 HF 处理后各组样品 Mg 和 F 的元素组成，随着处理时间的延长，Mg 的含量降低而 F 的含量升高。这表明 MgF_2 相的形成且薄膜逐渐增厚。而水热处理后，如图 1.5.1 （q）所见，在 HT#,、HT-1#、HT-2#和 HT-3#各组无氟元素检测出来，说明 MgF_2 在水热过程中被完全溶解。当 HF 处理时间延长到 36 和 72h 时，可以在 HT-4#和 HT-5#样品上检测到少量氟元素，表明所形成的涂层内包含 MgF_2 相。通过 XRD 结果分析，可知 HT-3#样

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

品组所形成的为纯 Mg-Al LDH 涂层，因为没检测出 $Mg(OH)_2$ 相和氟元素。

1.3.2 电化学性能检测及体外抗腐蚀效果评价

镁的化学性质活泼，镁合金在体内会快速降解产生大量氢气和镁离子造成植入体周围碱性微环境和氢气腔。因此，可通过在体外模拟体液浸泡检测镁合金降解产生的氢气释放量来评价其抗腐蚀性能。本章采用电化学测试、析氢实验以及样品腐蚀形貌评价涂层体外抗腐蚀性能。因在上一章中我们发现 HT-3# 表面形成的 LDH 涂层最纯，因此后续研究均只对 HT-3#样品进行分析。AZ31 镁合金和 HT-3#的动电位极化曲线如图 1.5.3 所示，与 AZ31 镁合金相比，水热处理后的 HT-3#样品自腐蚀电压升高，而自腐蚀电流密度降低，说明生成涂层能降低镁合金腐蚀速率。两组样品的累积氢气释放量随时间变化曲线如图 1.5.3（d）所示，HT-3#的氢气释放量和速度显著低于 AZ31，说明 HT-3#样品具有良好的抗腐蚀性能，这与动电位极化曲线结果是复合的。进一步通过扫描电镜观察各组样品表面的形貌，结果如图 1.5.3（e）所示，样品浸泡在α-MEM 后，在 AZ31 组仅 1 天后即可观察到样品表面有明显裂纹形成，随着浸泡时间的延长，在 4 天和 7 天时可见到更多和更深的裂纹形成；而在 HT-3#组浸泡 4 天后样品表面仍未见明显裂痕，在 7 天时可见样品表面有少量腐蚀形成的裂纹，但仍显著少于 AZ31 组，以上结果说明在表面构建 LDH 涂层的 HT-3#组能显著提升 AZ31 的抗腐蚀性能，有效保护镁合金基底。

1.4 讨论

镁的平衡电位为-2.37V，其化学性质活泼，在空气中与氧能够形成一层很薄的 MgO 或 $Mg(OH)_2$ 氧化膜，可保护内部结构延缓腐蚀速率。通常对镁合金进行碱热处理表面形成的也是薄层 $Mg(OH)_2$ 以保护基底材料。然而形成的 $Mg(OH)_2$ 氧化膜微溶于水，且在体液微环境内，富含的 Cl^- 离子（约为 150 mmol/L）会攻击氧化层，$Mg(OH)_2$ 与氯离子反应形成易溶于水的氯化镁并释放氢气，从而破坏稳定结构，导致表面保护膜提前丧失，加速其腐蚀反应。由于腐蚀速度过快会与骨的修复速率不匹配且造成炎症反应，因此需要进行涂层化以延缓其腐蚀速

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度，达到与骨修复相匹配的效果。在本章中，我们通过在镁合金表面原位生成纯 Mg-Al LDH 涂层，并对其进行表征，在体外浸泡实验发现其显著提升镁合金的抗腐蚀能力。LDH 涂层是双层结构，其间有阴离子沉积，且沉积的阴离子具有可替代性。在样品反应液中阴离子为 OH^-和 NO^{3-}，因此可以推测其表面 Mg-Al LDH 相层间阴离子同样为 OH^-和 NO^{3-}，其中 NO^{3-}易被周围溶液中 Cl^-替代，将 Cl^-替换至其层间，使 Cl^-更难渗透到镁合金基底。其次，Mg-Al LDH 能够通过层间离子交换机制降低周围 Cl^-浓度，从而降低 Cl^-对 $Mg(OH)_2$涂层的攻击，保护涂层。

已有许多研究致力于在镁合金表面制备 LDH 涂层，然而由于镁离子会快速从基底材料中释放，导致所形成的 LDH 涂层不纯，往往伴有氢氧化镁相。既往研究采取先对镁合金进行预处理（如阳极氧化等），但是氢氧化镁的掺杂仍不可避免。因此在水热形成 Mg-Al LDH 涂层前需要一种新的预处理方法。在本研究中我们采用 HF 对镁合金进行预处理，原因如下：1.HF 预处理是镁合金的常用办法，因为生产的 MgF_2钝化层能够提升其抗腐蚀效果；2.少量的氟元素有利于镁基植入物的生物学表现，如抗菌和诱导新骨生成；3.最重要的是，氟化镁的溶度积比氢氧化镁高，表明氟化镁会缓慢转变为氢氧化镁，而其是 Mg-Al LDH 的前体物质。因此，通过控制氢氧化镁的形成可以得到纯的 Mg-Al LDH 涂层。在这两步法形成的 Mg-Al LDH 涂层过程中，我们发现如果 HF 处理小于等于 12h，MgF_2相厚度不够因此无法抑制镁离子的快速释放，从而氢氧化镁形成。而当 HF 处理到 24h 时，MgF_2层便逐渐溶解且释放合适量的镁离子形成 Mg-Al LDH 涂层，而非氢氧化镁涂层，从而就获得了纯的 Mg-Al LDH 涂层。进而当 HF 处理高于 24h 时，MgF_2层太厚，尽管没发现氢氧化镁相掺杂，但是在最终的涂层中观察到氟元素存在。因此，我们采用 HT-3#作为后续研究对象，因为其表面形成的 Mg-Al LDH 涂层是纯度最高的。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5 附图

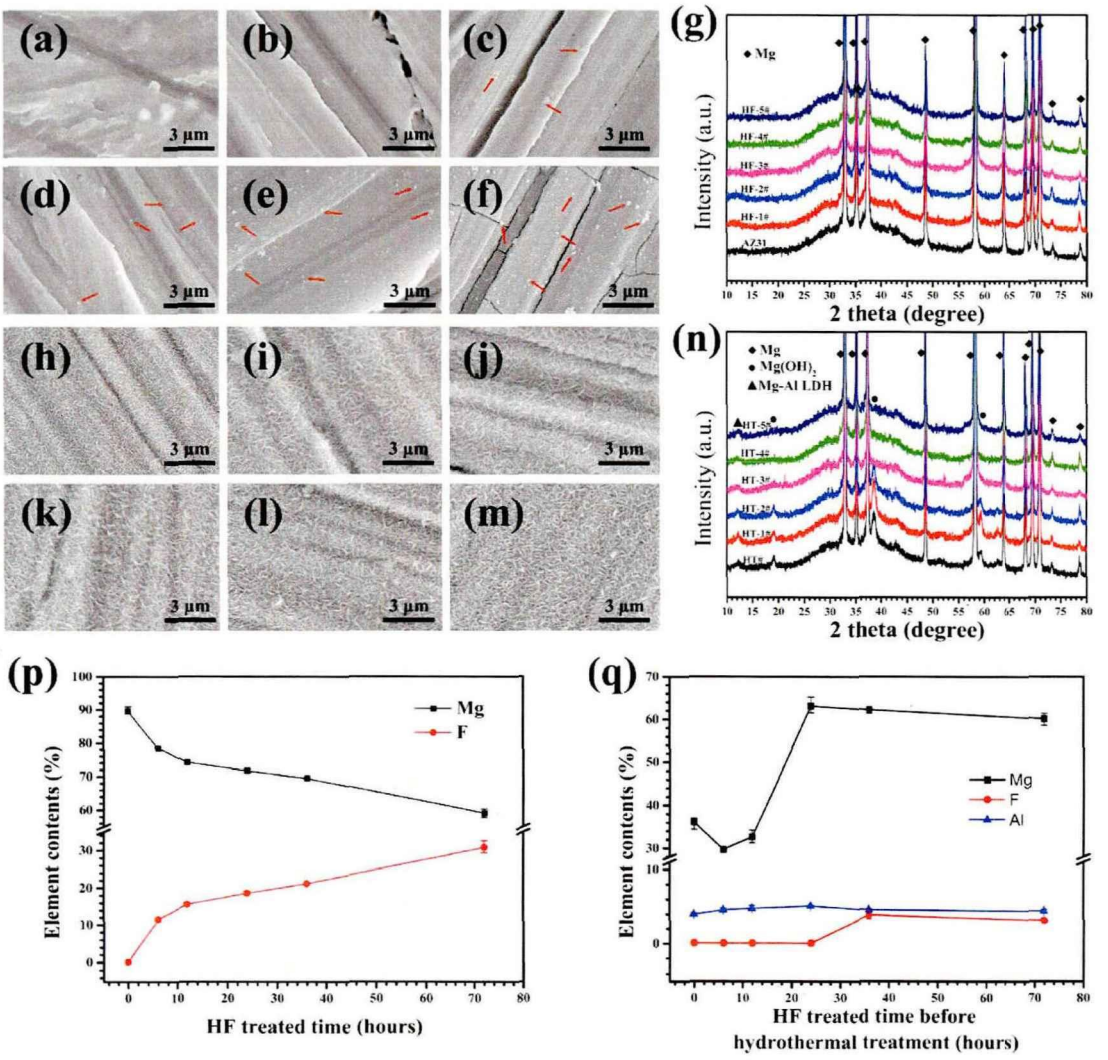

图 1.5.1 材料的表面形貌及元素分布

Figure 1.5.1　The surface morphologies and element compositions of acquired materials

注：AZ31（a）、HF-1#（b）、HF-2#（c）、HF-3#（d）、HF-4#（e）、HF-5#（f）的表面形貌，（g）各组材料的 XRD 图谱，（p）Mg 和 F 元素组成。HT# (h), HT-1# (i), HT-2# (j), HT-3# (k), HT-4# (l), HT-5# (m)的表面形貌，（q）各组 XRD 图谱和（q）元素组成。

Note：Surface morphologies of AZ31 (a), HF-1# (b), HF-2# (c), HF-3# (d), HF-4# (e) and HF-5# (f), and their corresponding XRD patterns (g) and element (Mg, F) compositions (p). Surface morphologies of HT# (h), HT-1# (i), HT-2# (j), HT-3# (k), HT-4# (l), HT-5# (m), and their corresponding XRD patterns (n) and element (Mg , Al, F) compositions (q)

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

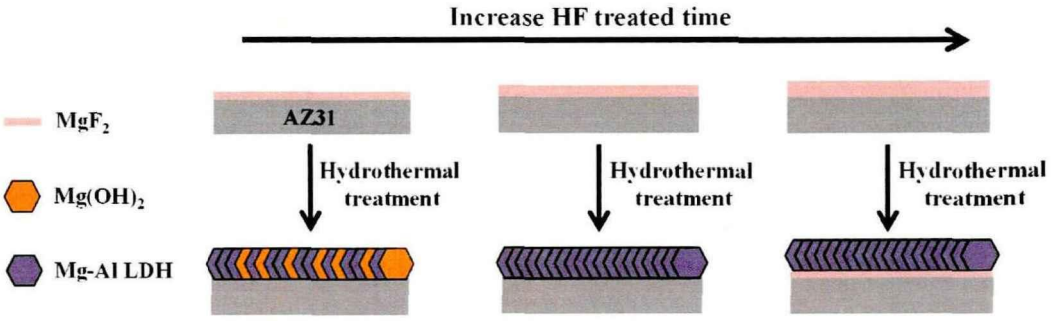

图 1.5.2 两步法在镁合金 AZ31 表面形成 Mg-Al LDH 方式

Figure 1.5.2 . Formation of Mg-Al LDH film on AZ31 alloy via the proposed two-step method

注：AZ31 先在 HF 溶液中处理不同时间，再于反应釜中进行水热反应获得 Mg-Al LDH 涂层。当 HF 处理时间较短时，所获得的 LDH 涂层有 Mg(OH)2 相掺杂；当 HF 处理时间较长时，所形成的 LDH 涂层下有 MgF2 沉积，结果发现在 HF 处理 24h 组能获得纯化的 LDH 涂层。

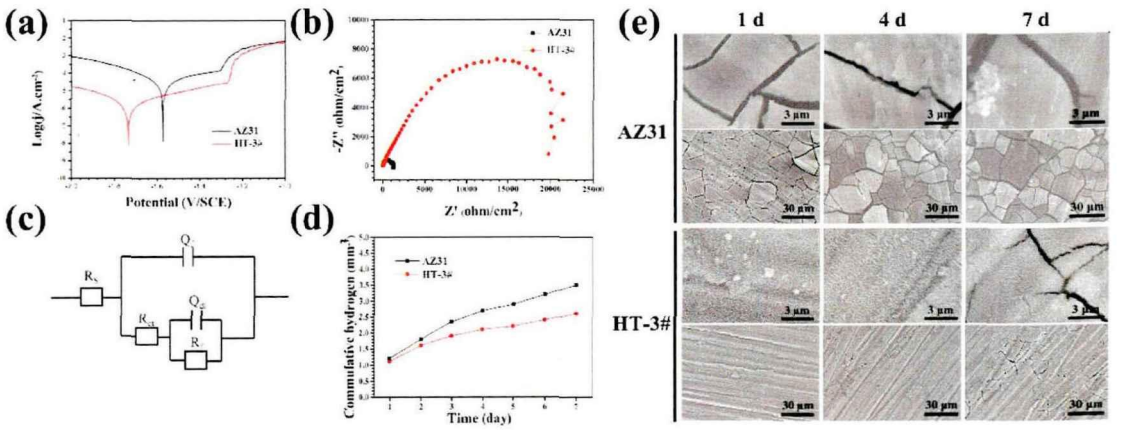

图 1.5.3 电化学性能检测及体外抗腐蚀效果评价

Figure 1.5.3 Potentiodynamic polarization (a) and EIS (b) results of AZ31 and HT-3#.

注：图（a）为 AZ31 和 HT-3#动电位极化曲线，图（b）为 AZ31 and HT-3#电化学阻抗谱，图（c）为电化学阻抗谱的等效电路，Rs 代表溶液电阻，Qf 和 Rf 分别代表与界面电荷转移相关的双电层容抗和反应电阻。图（d）为 AZ31 和 HT-3#材料浸泡于 PBS 中累积氢气释放变化，图（e）为浸泡实验后两组材料的表面形貌。

Note： Potentiodynamic polarization (a) and EIS (b) results of AZ31 and HT-3#. The equivalent circuit of EIS results (c). Rs is the solution resistance. Qf and Rf are the capacitance and resistance of the corrosion production or coating on AZ31, respectively. Rct and Qdl are the charge transfer resistance and the constant phase element of the electrical double layer, espectively. Accumulative hydrogen evolution (d) and surface views (e) of AZ31 and HT-3# samples after immersed in PBS.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第二部分 Mg-Al LDH 涂层镁合金的生物安全性及成骨性能研究

金属材料具有良好的力学性能，在骨科领域广泛应用[70]。传统生物医用金属材料主要为不锈钢、钴铬钼合金、钛合金等，在临床应用后发现这一类材料力学性能与骨组织不匹配、产生应力遮挡，磨损和腐蚀后产生的毒性粒子会对周围组织产生毒副作用。此外，由于不可降解，在骨重建后需要二次取出，对患者造成不必要的痛苦和风险。随着生物材料的发展，生物医用金属材料逐渐从惰性材料演变为生物活性材料，其中可降解镁合金成为领域内研究的重点。镁合金具有良好的生物相容性和可降解的优势，降解产生的镁离子有助于新骨的生成，且新近研究表明其有抗肿瘤活性，因此具有应用于骨肿瘤治疗中的潜力。然而纯镁或镁合金在体液环境内降解速度过快，除无法与新骨产生的速度相匹配外，产生的过多镁离子会造成局部过碱性微环境，而产生的氢气会对周围组织造成炎症反应。因此需要通过表面改性的手段调控镁基金属的降解速度，赋予其更优越多变的生物学性能。在第一章中，我们成功设计并在镁合金表面上构建了 Mg-Al LDH 涂层，通过扫描电镜发现表面形成典型 LDH 状结构，并在体外抗腐蚀实验中验证了其显著提升镁合金的抗腐蚀效果。且通过 XRD 和 EDS 检测结果发现 HT-3#样品表面形成的 LDH 是最纯的，HT-1#和 HT-2#样品表面 LDH 有 Mg（OH）2 相掺杂而 HT-4#和 HT-5#样品有 MgF2 相掺杂，因此在后续实验中我们仅对 HT-3#样品进行实验分析，并以 LDH 代表 HT-3#样品。在本章中，将通过一系列生物学实验对比 LDH 材料和镁合金 AZ31 的生物安全性和体内外成骨效果。

2.1 实验材料

2.1.1 主要仪器与试剂

主要试剂和仪器	厂家及来源
超纯水机	PeproTech 公司，美国
Live/dead 细胞死活检测试剂盒	BestBio，中国

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Cell counting kit-8 试剂盒	Dojindo 公司，日本
全波长酶标仪	Biotek，美国
胎牛血清	Gibco 公司，美国
α-MEM 培养基	索莱宝科技有限公司，中国
胰蛋白酶	Sigma 公司，美国
共聚焦显微镜	Leica SP8，日本
正/倒置荧光显微镜	Nikon 公司，日本
恒温培养箱	ThermoFisher 公司，美国
台式离心机	ThermoFisher 公司，美国
电热恒温水浴槽	一恒公司，上海
微量移液器	Eppendrof 公司，德国
细胞培养瓶	Corning 公司，美国
细胞培养孔板	Corning 公司，美国
人 VEGF Elisa 检测试剂盒	酶免，中国
碱性磷酸酶活性检测试剂盒	碧云天，中国
PCR 基因扩增仪	Bio-rad，美国
Trizol 裂解液	赛默飞世尔，美国
Nanodrop 2000	赛默飞世尔，美国
荧光定量 PCR 仪	Bio-rad CFX，美国

2.1.2 实验所需溶液配制：

（1）实验所需浸提液的配置：各组样品均提前采用环氧乙烷法灭菌处理，将灭菌后的各组材料按照 ISO 10993-5:1999 的标准，材料面积与提取介质的比例为 1.25 cm^2/mL。将各组材料按照比例浸泡于α-MEM 或内皮细胞培养基 ECM 中 24h，收集浸提液存储于 4℃冰箱内，用于后续细胞实验。

（2）完全培养基的配置：500 mLα-MEM 加入 50 mL 胎牛血清和 5 mL 青-链霉素，配置成含 10% FBS 和 1%双抗的完全培养基，分装至 50 mL 离心管内，

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4℃保存备用。500 mL 内皮细胞培养基加入 50 mL 胎牛血清、5 mL 青链霉素和 5 mL 内皮细胞生长因子/肝素，配置成完全培养基，分装至 50 mL 离心管内，4℃保存备用。

（3）10%氯代十六烷恶吡啶的配置：称取 1.79 g 磷酸二氢钠溶于 500 mL 水中，配制成 10 mM 磷酸氢二钠溶液。称取 5 g 氯代十六烷恶吡啶加入 50 mL 磷酸氢二钠溶液（10 mM）中溶解。放入离心管内加热溶解备用；最终 10%的氯代十六烷恶吡啶应呈微黄色。

（4）细胞冻存液的配置：9 mL 胎牛血清加入 1 mL 二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide，DMSO），混匀后移至 15 mL 离心管，-20℃冻存备用。

2.2 实验方法

2.2.1 溶血实验

收集健康志愿者的血液备用。将 AZ31 和 LDH 样品使用 PBS 清洗干净，环氧乙烷灭菌后备用。4 mL 新鲜血液稀释于 5 mL 生理盐水中，去离子水和 PBS 作为阳性和阴性对照。将各组样品放于 24 孔板内，加入 2mL 生理盐水，并在 37℃保持 30min，然后每孔加入 40μL 稀释血液，在 30,60,120 分钟后，使用酶标仪在 545nm 处检测吸光度。溶血率=(AS545-AN545)/(AP545-AN545) × 100%，其中 AS545, AN545 和 AP545 分别代表待测样品、阴性对照和阳性对照。

2.2.2 细胞培养、冻存及复苏

本部分实验使用小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 和人血管内皮细胞系 HUVECs，均购买自中科院上海细胞库。MC3T3-E1 使用α-MEM 完全培养基，HUVECs 使用内皮细胞完全培养基，均在 37℃，5%CO_2条件培养箱内培养。每日观察，长满后传代。细胞传代步骤：弃上清，加入 PBS 清洗 1 遍，加入 0.25%胰蛋白酶，置于培养箱内消化 30s-1min，待显微镜下观察细胞变圆并有少量飘起时，立即加入等量完全培养基终止消化。将细胞悬液加入 15mL 离心管内，1000 转离心 5min，弃上清，加入完全培养基重悬后铺板继续培养。细胞冻存步骤：将细胞消化至离心管内，离心弃上清，加入冻存液重悬，分装至 2mL 冻存管内。将冻存管放置在预先复温的梯度降温盒中，放在-80℃冰箱内，1 天后移入液氮

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中保存。细胞复苏步骤：将冻存管从液氮中取出，快速于 37℃水浴箱中摇晃融化，随即移至离心管内，1000 转 5min 离心后弃上清，加入 PBS 漂洗一遍，离心弃上清后加入完全培养基，移至培养瓶中在培养箱内培养。

2.2.3 细胞死活检测

各组样品采用环氧乙烷灭菌，放于 24 孔板内。将 MC3T3-E1 消化后，按照 1×10^4/mL 的浓度，每孔加入 1mL 细胞悬液滴在材料表面。随后将孔板放入培养箱中，3 天后取出孔板通过 live-Dead 实验检测材料表面细胞活性。按照试剂盒说明书配置死活染色工作液。吸弃每孔内的培养基后，加入 PBS 轻柔漂洗一遍，每孔加入 500μL 死活染色工作液，滴加至浸没材料表面。将孔板放入培养箱内反应 30min 后，吸弃染液再加入 PBS 清洗一遍。将各组材料取出，放在载玻片上，使用共聚焦显微镜在 488nm 处观察细胞死活状态。

2.2.4 扫描电镜观察细胞粘附状态

样品放于 24 孔板中，每孔加入 5×10^4 个细胞，缓慢滴于材料表面。将孔板放入 24 孔板中培养，在培养后的 1,4,24 h，吸弃培养基并使用 PBS 轻柔清洗 3 遍。随后，每孔加入 2.5%（体积比）戊二醛在 4℃固定过夜。随后样品分别浸泡于 30%, 50%, 75%, 90%, 95%和 100%的乙醇溶液（体积比）中脱水，每个浓度浸泡 10 min。样品晾干后，表面喷金使用扫描电镜观察细胞粘附状态。

2.2.5 阿尔玛蓝(Alamar Blue)法检测细胞增殖活力

将 MC3T3-E1 和 HUVECs 消化后调整浓度至 1×10^4/mL 的浓度，在 96 孔板中每孔加入 100μL 细胞悬液，在培养箱中培养 1 天，使细胞粘附。随后将孔板内的培养基更换为各组材料浸提液，继续培养 1、3、5 天。在每个检测时间点，使用 Alamar Blue 试剂盒检测细胞增殖活力。每孔加入 10μL Alamar Blue，放入培养箱孵育 4h。孵育完成后，使用酶标仪在 570nm 处测定吸光度。

2.2.6 体外成骨实验

2.2.6.1 茜素红染色及定量实验

MC3T3-E1 培养在 24 孔板内，待细胞长至 70%汇集度时，将培养基更换为各组浸提液，继续培养 7 天。然后使用 75%酒精将细胞固定过夜，PBS 清洗 3

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

遍，加入茜素红染液常温下避光染色 1h。染色完成后吸弃染液，使用 PBS 清洗 3 遍，在倒置相差显微镜下拍照。定量实验使用氯代十六烷基吡啶溶解与钙结节螯合的茜素红染液，并将反应后的液体移植 96 孔板中，使用酶标仪在 600nm 处检测吸光度。

2.2.6.2 碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）活性检测

MC3T3-E1 在各组浸提液中培养 7 天，吸弃浸提液后，使用 4%多聚甲醛固定细胞 2h，吸弃多聚甲醛并用 PBS 清洗 3 遍，加入 ALP 染色液，室温下反应 4h，吸弃染液再用 PBS 清洗 3 次，在倒置显微镜下拍照观察各组 ALP 活性。定量实验使用碱性磷酸酶活性检测试剂盒（碧云天，P0321M）,其原理是在碱性条件下，底物 Para-nitrophenyl phosphate (pNPP)可在碱性磷酸酶作用下生成黄色产物 para-nitrophenol，随后可以在 400-415nm 检测吸光度。

2.2.6.3 一型胶原分泌检测

MC3T3-E1 在各组浸提液中培养 7 天，随后吸弃培养基，PBS 清洗后加入 4%多聚甲醛固定，再清洗 3 遍，加入 0.1%天狼星红染液，随即在倒置显微镜下观察并拍照。定量实验通过氢氧化钠与甲醇的混合液溶解吸附在细胞外基质表面的天狼星红染液，并将溶解后的溶液移至 96 孔板中，在 492nm 处检测吸光度。

2.2.6.4 实时定量多聚链式反应（qRT-PCR）检测成骨相关基因表达

MC3T3-E1 在各组浸提液中培养 7 天，随后提取 RNA 检测成骨相关基因 ALP, type-1 collagen (COL-I)、osteocalcin (OCN)、osteopontin (OPN)和 runt-related transcription factor 2 (RUNX-2)的表达。提取 RNA 步骤如下：吸弃各组培养基，使用预冷 PBS 将细胞漂洗 3 次，按照 6 孔板每孔 500μL 加入 Trizol 裂解液，冰上静置 30min 后用移液器吹打孔板表面保证细胞完全裂解。收集细胞裂解液加入无 RNA 酶的 1.5mL EP 管中，加入氯仿，盖紧 EP 管剧烈上下摇动 30s，室温静置 5min 可见明显分层。随后将 EP 管放入预冷 4℃高速离心机内，12000 转离心 15min。离心后小心吸取上层水相液体至无 RNA 酶 EP 管内，加入等体积预冷异丙醇，盖紧瓶口反复上下震荡至完全混合。再次放入 4℃预冷高速离心机内，12000 转离心 10min。吸弃上清，加入 1mL 预冷 75%乙醇，摇晃均匀，以相同

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

条件离心 5min。尽量吸弃上清，室温下干燥 30min，加入足量无 RNA 酶的 DEPC 水，溶解白色沉淀，所得即是溶解后的 RNA。随后使用 Nanodrop 分光光度计检测 RNA 纯度，计算出 260nm/280nm 的 OD 值之比，当其处于 1.8-2.0 之间时代表 RNA 纯度好。将各组测得纯度好的 RNA 样品继续下一步实验或放于-80℃冷藏室内保存。逆转录反应：参照 cDNA 第一链合成试剂盒（Yeasen，中国）操作手册进行逆转录反应，其中包含 1ug 总 RNA，all-in-one 逆转录试剂和无 RNA 酶的 DEPC 水，加好各组试剂后于高速漩涡震荡仪上震荡混合，并离心 10s，确保各反应组分混合均匀，随后放入 PCR 仪中，设置反应温度 37℃,15min;85 度,5 秒;4 度,FOREVER，逆转录完成获得的 cDNA 保存于-20℃以便后续 PCR 操作。实时荧光定量 PCR 步骤：反应体系按照 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 操作步骤进行配置 (Yeasen, 中国)。Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix(Low Rox Plus)是 2×实时定量 PCR 扩增的预混合溶液。Mix 中含有热启动 Hieff® DNA Polymerase、SYBR Green I、dNTPs、Mg^{2+}及 Low Rox。所有操作在冰上进行，并需要戴口罩和手套尽量防止 RNA 酶的污染导致模板降解。反应体系为 20μL，八连管每孔分别加入 10μL 的 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (Low Rox Plus)，0.4μL 的上游引物（10μM）和 0.4μL 的下游引物（10μM），加入 cDNA，并加无酶水到 20μL。为防止操作误差，应算好各样品总量后并预备余量再平均分配到各孔中。反应体系配置完成后，将八连管离心 15s 以使各组成分混匀，放入 PCR 基因扩增仪中，设置扩增程序：95℃预变性 5min，循环 1 次；95℃变性 10s，55-60℃退火 20s，72℃延伸 20s，循环 40 次，并设置机器默认获得熔解曲线。若最终结果熔解曲线单峰，表明反应特异性好可以进行定量结果分析；若熔解曲线出现双峰或者多峰，则表明形成引物二聚体或其他非正常情况，不能进行定量分析。反应结束后保存拷贝文件，并进行 PCR 数据分析处理。采用 $2^{-\triangle\triangle}$CT 计算方法计算某一种基因的相对表达量，△CT=目标基因 Ct 值-内参基因的 Ct 值,将所计算得到的相对表达倍数输入 Graphpad 软件作图。所检测基因引物序列如表 1 所示。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 成骨相关目标基因引物序列

Table 1 The primer sequence of target gene related with osteogenesis

基因名称	上游引物序列(Forward sequence)	下游引物序列(Reverse sequence)
RUNX-2	GTGGCAGTGTCATCATCTGAAAT	TCGCCTCAGTGATTTAGGGCGCA
OPN	GGAGGAAACCAGCCAAGG	TGCCAGAATCAGTCACTTTCAC
OCN	AGACTCCGGCGCTACCTT	CTCGTCACAAGCAGGGTTAAG
ALP	ACTCAGGGCAATGAGGTCAC	CACCCGAGTGGTAGTCACAA
COL-I	CCTAATGCTGCCTTTTCTGC	ATGTCCCAGCAGGATTTGAG
GAPDH	TGTCCGTCGTGGATCTGAC	CCTGCTTCACCACCTTCTTG

2.2.7 体外血管生成实验

2.2.7.1 划痕实验

HUVECs 以 1×10^5 每孔的密度种于材料表面，待细胞长满后，使用 1mL 枪头移液器画出一道笔直的划痕，并用 PBS 轻柔洗去表面漂浮细胞，并进行死活染色，在荧光显微镜下拍照记为 0h 组。12h 组将各组种植细胞后的材料在培养箱中培养 12h 后，取出孔板，进行死活染色并于荧光显微镜下观察细胞迁移情况，随后在荧光显微镜下拍照。

2.2.7.2 Elisa 法检测血管内皮生长因子（VEGF）分泌情况

HUVECs 以 1×10^5 每孔的密度种于 24 孔板内，待培养 1 天贴壁后，更换培养基为各组浸提液，并继续培养 3 天和 7 天，在各时间点使用酶联免疫法（Elisa）检测上清中 VEGF 的表达情况。具体步骤如下：首先按照说明配置不同浓度的 VEGF 标准品。随后进行加样，分别设空白孔、标准品孔和待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100μL，而标准品孔和待测样品孔分别加入标准品和待测样品 100μL，轻轻晃动摇匀，将酶标板盖上覆膜，放于培养箱中 37℃条件下反应 120 分钟。随后弃去液体，加入检测溶液 A 工作液 100μL，盖上覆膜 37℃反应 60min，弃去液体，甩干，加入检测 B 工作液 100μL，再次孵育 60min，弃去液体后甩干，每孔加入底物溶液 90μL，避光孵育 30min 后加入终止溶液 50μL，此时可见蓝色转变为黄色，立即用酶标仪在 450nm 波长处检测各孔的吸光度（OD 值）。然后根据绘制的标准曲线计算得到各组 VEGF 的浓度。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.7.3 qRT-PCR 法检测成血管基因表达

HUVECs 以 1×10^5 每孔的密度种于 24 孔板内，待培养 1 天贴壁后，更换培养基为各组浸提液，并继续培养 3 天和 7 天，PCR 按照 2.2.6.4 中描述步骤操作，检测指标为血管内皮生长因子受体 2（KDR），低氧诱导因子(HIF-α)和血管内皮生长因子（VEGF）。检测目标基因引物序列如表 2 所示。

表 2 成血管相关目标基因引物序列

Table 2 The primer sequence of target gene related with angiogenesis

基因名称	上游引物序列(Forward sequence)	下游引物序列(Reverse sequence)
HIF-α	TCTACCAGTTGCAGCCTGAC	GTTCCCTTCCTCCTTGATTT
KDR	AGCAGGATGGCAAAGACTAC	TACTTCCTCCTCCTCCATACAG
VEGF	CAGGACATTGCTGTGCTTTG	CTCAGAAGCAGGTGAGAGTAAG
GAPDH	CAAGAGCACAAGAGGAAGAGAG	CTACATGGCAACTGTGAGGAG

2.2.8 动物实验

2.2.8.1 SD 大鼠髓内针模型检测成骨效果

实验所用 SD 大鼠由南方医科大学实验动物中心提供，并已通过广东省人民医院伦理委员会审查，遵守赫尔辛基宣言规范。实验采用 12 只雄性 SD 大鼠，4 周龄。手术步骤如下：配制质量体积比为 10%的戊巴比妥钠溶液，按照 40mg/kg 的量腹腔注射 SD 大鼠体内。待大鼠麻醉后，使用电动剃毛器剃去大鼠双侧膝关节周围的毛发，并用碘伏消毒两遍。随后在髌骨外侧行长约 2cm 的直切口，屈膝内翻髌骨，暴露出滑车，使用手转配 2mm 转头，高速在滑车中央沿着股骨长轴方向转出孔洞并扩髓，将材料塞入髓腔内，随后复位髌骨，仔细缝合筋膜及皮肤。术后 3 天每天使用抗生素肌肉注射以预防感染。在术后的第 4 和第 8 周行 microCT 扫描观察新骨生成。随后脱颈法处死大鼠，收集股骨组织，固定于 4%多聚甲醛内，切片染色观察材料周围新骨生成。并收集大鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏组织，切片行 HE 染色评价材料对重要器官的毒性。

2.2.8.2 大鼠皮下模型检测局部炎症反应

实验采用雄性 4 周龄 SD 大鼠，戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。麻醉后使用电动

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

剃毛器将背部毛发剃除，碘伏消毒。随后在背部两侧分别切一小口，将材料塞入两侧口袋内，分别在 4 周和 8 周采用脱颈法处死大鼠，取出材料及包裹材料的周围组织，通过扫描电镜观察材料表面抗腐蚀效果，通过组织切片观察炎症细胞浸润情况。

2.3 统计学分析

采集的实验原始数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析，使用 Graphpad 作图，数值均用均值±标准差表示，对计量资料多组间比较则采取方差分析，使用 LSD 法进行组内两两比较。$P<0.05$ 提示差异具有统计学意义。

2.4 实验结果

2.4.1 LDH 组显著提升镁合金生物相容性

图 2.6.1 显示溶血实验结果，可以观察到 AZ31 样品组对红细胞有明显的溶血效应，然而 LDH 组未见溶血反应，红细胞离心后沉淀于离心管底。各组溶血比率显示 AZ31 组溶血率接近 70%，而 LDH 组溶血率低于 2%，符合临床应用标准（低于 5%）。这与 LDH 表面修饰后提高镁合金抗腐蚀效果，降低 PH 变化和 Mg 离子的释放速度，因此不会对红细胞造成严重损伤。与之前的研究相比，通过水热法原位生成的 LDH 薄膜将溶血率从 6%降低至 2%以下，表明通过水热法原位生成 LDH 能够更好的提高其生物相容性。图 2.6.2 显示成骨细胞 MC3T3-E1 在材料表面的粘附情况，AZ31 组仅观察到材料表面的裂痕，未见细胞粘附，表明由于材料的毒性导致细胞难以在其表面附着。而在加入细胞培养的 1h 即可观察到有多数细胞粘附于 LDH 组材料表面，在培养 24h 后，可见细胞伸展产生的丝状伪足和板状伪足，表面材料的生物相容性良好。图 2.6.3 显示材料表面培养 3 天后的死活染色结果，在 AZ31 表面仅观察到少量死细胞而未见活细胞生长，而在 LDH 组可见多数活细胞粘附。浸提液检测细胞活性结果显示，在 AZ31 组培养 3 天和 5 天时细胞活性低于 70%，而 LDH 组细胞活性接近 100%，同样表明 LDH 修饰后明显改善镁合金的生物相容性。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4.2 LDH 表面改性提升镁合金成骨及血管生成效果

图 2.6.4 显示体外成骨实验结果，茜素红染色及定量实验结果显示细胞外基质内钙结节升高，而通过十六烷基吡啶将螯合于细胞外基质内钙结节上的茜素红染液溶解后，进行吸光度检测定量结果发现，LDH 组数值更高，说明与定性结果趋势相同。碱性磷酸酶是骨形成过程中的关键调控酶，可直接反映成骨活性。结果显示，LDH 组碱性磷酸酶染色较对照组更深，表明 LDH 组 ALP 活性更高，进一步通过 ALP 活性检测试剂盒进行定量实验发现，趋势同染色结果一致，LDH 组 ALP 活性更高。一型胶原是骨的重要组成成分，通过天狼星红染色可以显示出细胞外基质内的一型胶原含量。如图所示，LDH 组染色更深，通过溶解后定量分析结果与染色结果相同。我们进一步在基因表达层面对两组成骨效果进行比较，通过检测成骨相关基因 COL-I、ALP、OCN、OPN、RUNX-2 的表达，发现在培养后七天，LDH 组细胞成骨基因表达相对于对照组明显升高，提示成骨活性明显上升。新骨生成除骨本身结构的构建外，还需要血管的参与以为其输送营养。因此目前研究除关注干细胞或成骨前体细胞的成骨分化外，也同时关注材料对血管新生的作用。在本研究中我们也将材料对人血管内皮细胞血管化的作用纳入分析。图 2.6.7 显示了两组材料对内皮细胞增殖、迁移及血管化的影响。CCK-8 结果显示 LDH 组细胞活性较对照组提升，划痕实验结果显示在 12h 后，LDH 组细胞迁移距离更高，提示其迁移活性提升。VEGF 是内皮细胞血管化过程中的关键调控因子，Elisa 结果显示 LDH 组内皮细胞分泌更多的 VEGF 以加速血管化进程。进一步在基因表达层面上检测,PCR 结果显示，LDH 组血管生成过程中关键调控基因 KDR、VEGF 和 HIF-α的表达更高。综上实验结果表明，在体外实验中，LDH 组的成骨成血管作用均较对照组明显提升。

2.4.3 皮下炎症及抗腐蚀实验

再第一章体外浸泡实验中已证明 LDH 材料显著提升镁合金 AZ31 的抗腐蚀性能，但体外实验条件较为简单，往往不能说明在体效果，因此需要体内实验进一步验证其效果。图 2.6.5 显示材料植入大鼠背部皮肤后，组织的炎症反应情况及材料表面涂层的降解情况。如图所示，在植入后的 4 周和 8 周，AZ31 材料

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

周围组织里有较厚的纤维层及内部有较多中性粒细胞和巨噬细胞聚集，而 LDH 组周围纤维包裹明显较少而且其内部炎症细胞更少，说明 LDH 组在早期和晚期都可以显著降低镁合金降解导致的炎症反应发生，提示其具有良好的生物相容性。而通过扫描电镜观察到的样品表面形貌，能更直观的看到，在植入后的 4 周，AZ31 表面即可观察到多数细小裂纹产生，而 LDH 组无明显变化；在植入后的 8 周，AZ31 样品表面裂痕更加明显且不规则，有降解产生的坑穴及裂痕，而 LDH 组仅观察到少量裂纹，在体实验结果表明 LDH 涂层显著提升 AZ31 的抗腐蚀效果。

2.4.4 体内成骨实验

本研究采用 SD 大鼠髓内针模型来观察两组样品的体内成骨效果。如图所示，microCT 扫描截面图结果显示在 LDH 组材料周围有许多新骨生成，而 AZ31 周围新骨较少，通过三维重建图像可以观察到红色标注为材料表面的新生骨，而绿色为材料本体。明显可观察到不论在 4 周或 8 周时，LDH 组材料表面红色区域较对照组更多，表明其有更多的新骨生成。骨密度（Bone mineral density，BMD）和骨体积分数（Bone volume/Total volume，BV/TV）都是对骨生成进行定量分析的指标，两者升高均代表新骨生成。对 CT 扫描结果进一步定量分析显示，虽然两组骨密度在 4 周和 8 周时均无差别，但 8 周时 LDH 组的骨体积分数显著高于 AZ31 组，表明 LDH 组有更多新骨生成，与 CT 图像所观察到趋势一致。进一步对所获得的骨标本进行硬组织切片染色可发现，在 4 周时 LDH 组材料表面新生骨即显著多于对照组，且可观察到 AZ31 组在 4 周时就有明显的降解破坏，表面可见明显凹陷及降解产物，而 LDH 组材料仍然保持完整。在 8 周时 LDH 组的新生骨相对 4 周更多，且仍明显高于 AZ31 组。AZ31 组 8 周的降解破坏更加明显，周围有被纤维组织包裹的降解产物及微小气泡产生，而 LDH 组仅偶尔可见微小坑隙，以上表明 LDH 组显著提升镁合金的抗腐蚀性且提高了其成骨效果。

2.4.5 生物安全性评价

为了进一步检测镁合金 AZ31 及 LDH 两组样品的生物安全性，本研究将植入后 4 周和 8 周时的 SD 大鼠的内脏组织包括心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏组

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

织取出并进行 HE 切片观察组织病理结构的变化。如图所示，4 周和 8 周时，两组 SD 大鼠的心肌纤维排列有序，无肿胀或坏死；肝小管及肝血窦结构正常，无坏死溶解等病理改变；脾脏生发中心及网状纤维结构正常，无淤血肿胀等病理变化；肺血管及细微支气管、肺泡结构正常无淤血、萎缩纤维化等情况；肾小球及各级小管结构正常，未见炎症、萎缩、出血或坏死等病理情况。综上，可认为镁合金 AZ31 和 LDH 两组样品生物安全性良好，对身体各重要器官无毒副作用。

2.5 讨论

作为可降解金属的代表，镁合金在骨科领域研究广泛。镁的密度为 1.74g/cm^3，与正常的骨组织非常接近（1.8-2.1g/cm^3）。纯镁的弹性模量为 41-45GPa，与人体皮质骨弹性模量相近，可有效避免应力遮挡效应，有利于骨组织受到正常应力刺激诱导新骨生成并有效促进骨整合，因此被誉为一类革命性的医用金属材料[71-74]。镁作为人体必须的营养元素，在体内含量丰富，其中约 53%的镁储存在骨组织中[75]。除此之外，镁元素还是体内多种酶系反应的必须品，并参与维持核酸分子结构的稳定[76]。正常生理情况下，人体可通过泌尿系统和小肠代谢等来维持镁的动态平衡，关于镁合金的生物安全性已有大量文献研究，并且作为心血管支架材料以应用于临床，各项研究结果均表明镁在血液和机体内环境下观察均没有不良反应[77, 78]。本实验结果也证实镁合金 AZ31 和经 LDH 涂层表面改性后的镁合金生物安全性良好，植入后的 4 周 8 周各重要脏器无结构变化，表明其对机体无毒副作用。已有多数研究表明镁合金降解释放的镁离子可促进成骨细胞在材料表面粘附、增殖及分化，且可通过诱导神经细胞产生活性肽 CGRP 进而诱导新骨生成，可见镁基金属内植物具有较大临床应用潜力。然而实际上，由于表面无保护膜，纯镁或镁合金在体内高氯离子环境下降解速率非常快，其快速降解产生的过量镁离子会导致周围产生碱性微环境，且产生的氢气也会对周围组织造成不良反应。此外由于快速降解，力学性能快速降低导致其不能满足骨肿瘤术后修复期所需要的力学支撑条件。因此需要通过表面改性方

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

式延缓镁基金属的降解速率，进而调控其生物学性能。在本章中，我们对镁合金 AZ31 表面进行 LDH 涂层改性，在确认涂层已成功构建后，我们对其生物安全性、体内及体外的成骨及成血管效果进行评价。由第一章的结果得知，HT-3#组在 AZ31 表面形成的 LDH 是最纯的，其他各组有 $Mg(OH)_2$ 或 MgF_2 相掺杂，因此在本章及后续章节中仅采用 HT-3#作为 LDH 组进行研究。结果显示 LDH 涂层组与 AZ31 均具有良好生物安全性，然而 LDH 组材料表面更适合细胞粘附生长，成骨细胞系及血管内皮细胞在 LDH 组材料表面生长活性均较对照组提升。体外实验显示 LDH 组成骨及成血管效果均较对照组更好，而体内实验进一步证实这一现象。虽然未能对材料周围骨髓液中的镁离子浓度和 PH 值进行检测，但我们推测 LDH 涂层改善镁合金的成骨性能可能与如下因素有关：1、控制镁合金降解速率，降低材料周围镁离子浓度和碱性微环境；2、控制镁合金降解导致材料周围氢气释放减少，降低炎症反应发生；3、材料本身生物相容性增加，细胞更易粘附增殖，更有益于细胞在材料表面形成新生骨，即促进骨整合进程。

正如在第一章的体外抗腐蚀结果所示，与 AZ31 相比，LDH 改性后的样品自腐蚀电压升高，而自腐蚀电流密度降低，说明生成涂层能降低镁合金腐蚀速率。在本章中我们分别在大鼠皮下和骨髓腔内两种体内微环境来观察材料的抗腐蚀性能。结果均显示 LDH 涂层组的抗腐蚀性能显著提升，表现为材料表面更少的裂纹和孔隙，且材料周围炎性纤维组织明显减少。LDH 涂层优越的抗腐蚀效果与其是双层结构，层间阴离子可交换氯离子，进而降低材料周围微环境中氯离子浓度以及 Mg-Al LDH 阻碍氯离子渗透涂层，从而保护涂层和镁合金基底。综上，本章证明了 LDH 涂层具有良好生物相容性，能促进细胞粘附增殖，且具有更好的成骨成血管性能，具备作为骨肿瘤术后修复材料的条件。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.6 附图

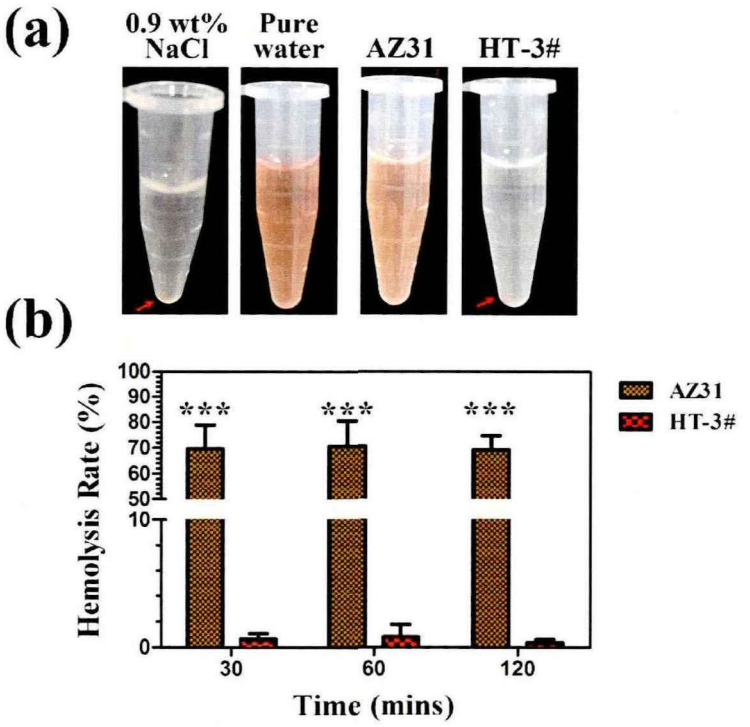

图 2.6.1 :溶血实验检测结果

Figure 2.6.1: Results of hemolytic test

注：溶血实验检测结果如图所示 AZ31 样品溶血率高达 70%以上。水热处理的 LDH 组样品溶血率降低到约 6%，可满足临床应用要求。

Note: As shown in the figure, the hemolysis rate of AZ31 sample is more than 70%.The hemolysis rate of LDH samples after hydrothermal treatment was reduced to about 6%, which could meet the requirements of clinical application.*** indicate P value<0.01

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

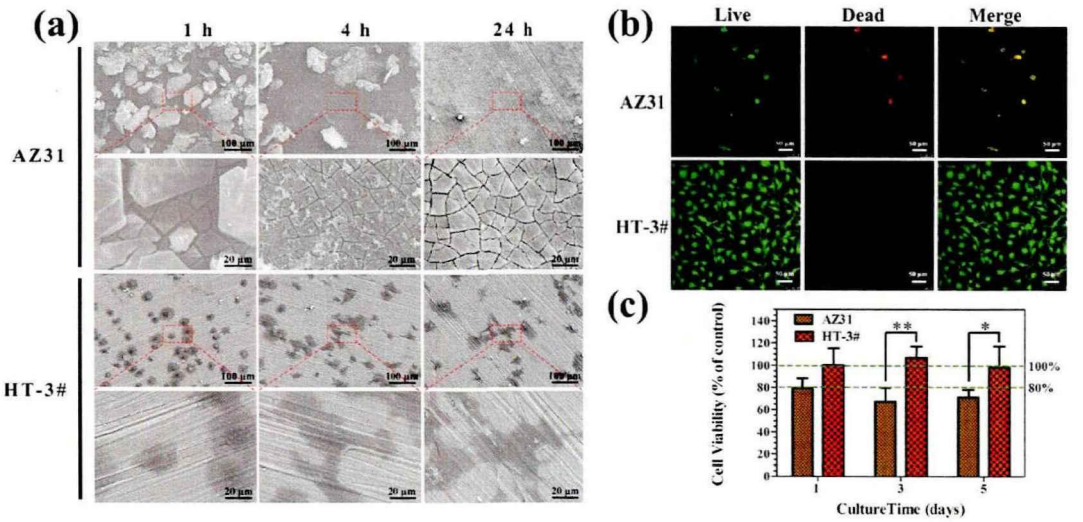

图 2.6.2 :材料表面细胞粘附及增殖情况

Figure 2.6.2: Cell adhesion and proliferation on the surface of the material

注：图（a）显示 AZ31 浸泡于培养基内 1h 即可见明显裂纹，随着时间增加裂纹更加明显，且无细胞在其表面粘附，而 LDH 组在浸泡 24h 后表面也无腐蚀产生，且有多数细胞在其表面粘附伸展。图（b）显示培养 1 天后 AZ31 表面几乎无活细胞而 LDH 组有大量活细胞生长。图（c）显示在材料表面培养第 3 和 5 天时 LDH 组材料细胞活性显著高于对照组。

Note: Figure (a) showed that AZ31 was immersed in the medium for 1h, and the cracks became more obvious with the increase of time, and there was no cell adhesion on the surface. However, in the LDH group, there was no corrosion on the surface after immersion for 24h, and most cells adhered to and extended on the surface. Figure (b) showed that after culture for 1 day, there were almost no living cells on the surface of AZ31 while a large number of living cells grew in the LDH group. Figure (c) showed that the cell activity of LDH group was significantly higher than that of control group at the 3th and 5th day of culture on the material surface.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

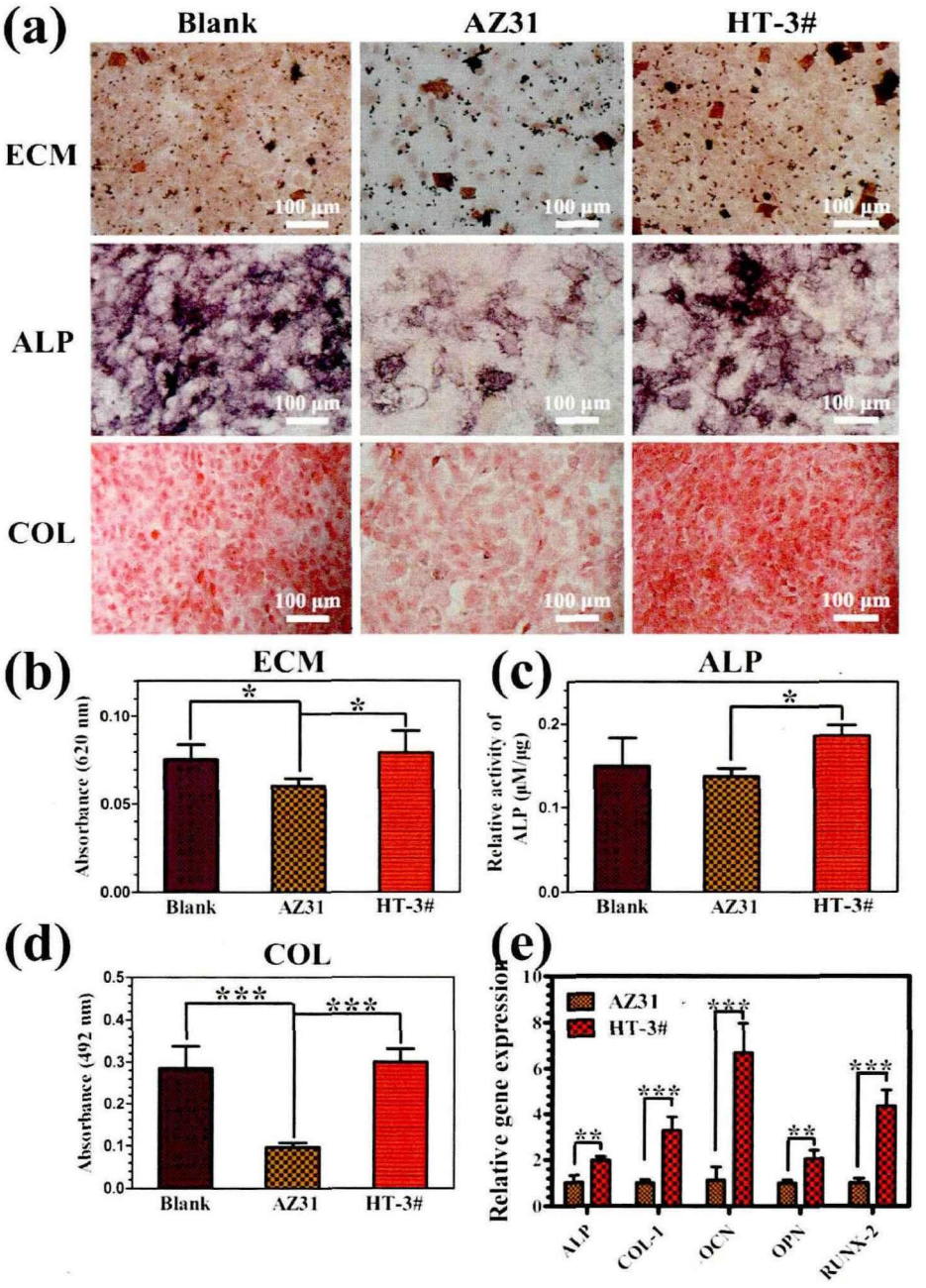

图 2.6.3：体外成骨效果检测

Figure 2.6.3: Detection of osteogenesis effect in vitro

注： 图（a）第一行为各组茜素红染色结果，第二行为各组 ALP 染色结果，第三行为一型胶原染色结果，可见 LDH 组均较 AZ31 组染色更深。图（b）、（c）、（d）分别为茜素红

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

染色、ALP 染色和一型胶原染色的定量分析结果，可见定量分析显示 LDH 组较 AZ31 组更高，图（e）为各组成骨相关基因的表达，LDH 组较 AZ31 显著增高，表明成骨活性更高。

Note：Figure (a) Results of alizarin red staining in the first group, ALP staining in the second group, and collagen type 1 staining in the third group showed that the staining was deeper in LDH group than in AZ31 group.Figure (b), (c) and (d) show the quantitative analysis results of alizer red staining, ALP staining and collagen type I staining, respectively. It can be seen that the quantitative analysis shows that the LDH group is higher than the AZ31 group. Figure (e) shows the expression of osteogenic related genes in each group.

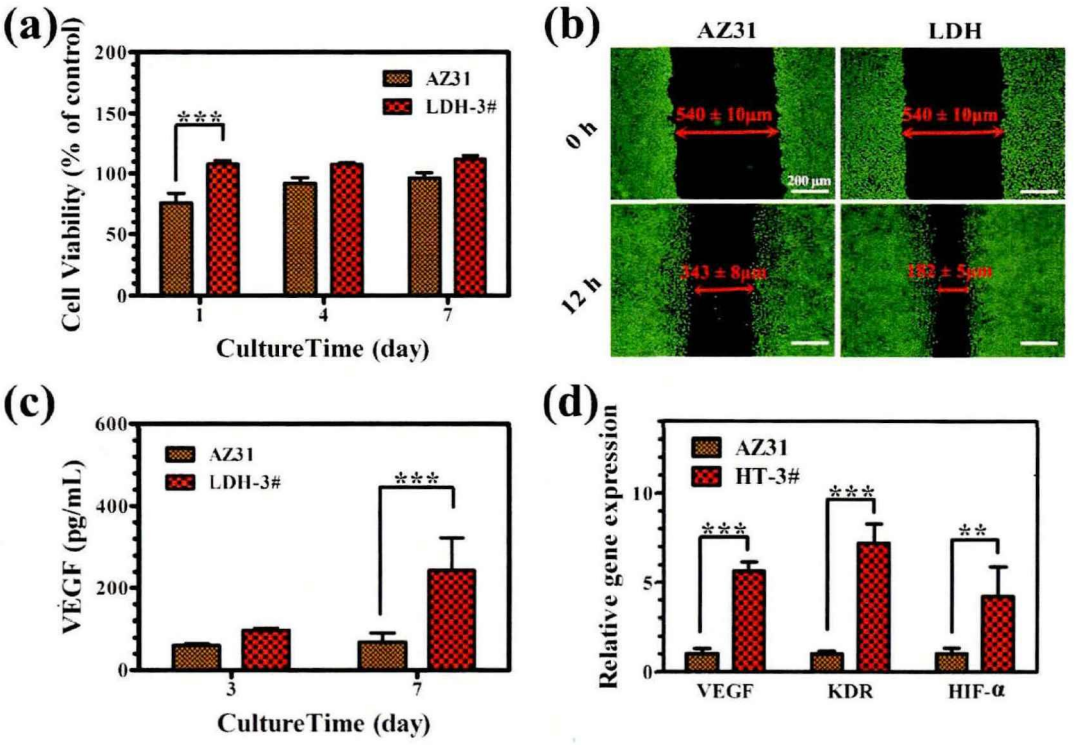

图 2.6.4 体外血管化效果检测

Figure 2.6.4：Detection of angiogenesis effect in vitro

注： 图（a）显示 HUVECs 在材料表面生长的细胞活性，在 1 天时 LDH 组细胞活性较 AZ31 组更高。图（b）显示各组划痕实验结果，结果显示 12h 后 LDH 组内皮细胞迁移活性更高。图（c）为 Elisa 实验结果，表明在培养 7 天后，LDH 组上清内 VEGF 的含量显著高

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

于 AZ31 组。图（d）为各组成血管相关基因表达的检测结果，LDH 组的成血管相关基因明显高于 AZ31 组，表明其成血管活性更高。

Note：Figure (a) shows the cell activity of HUVECs growing on the material surface. At day 1, the cell activity of LDH group was higher than that of AZ31 group.Figure (b) shows the wound healing test results of each group. The results showed that the migration activity of HUVECs in LDH group was higher after 12h compared with AZ31 group.Figure (c) shows the results of ELISA experiment. After culturing for 7 days, the content of VEGF in supernatant of LDH group was significantly higher than that of AZ31 group.Figure (d) shows the results of the expression of angiogenic related genes in each group. The expression of angiogenic related genes in LDH group were significantly higher than those in AZ31 group, indicating higher angiogenic activity.

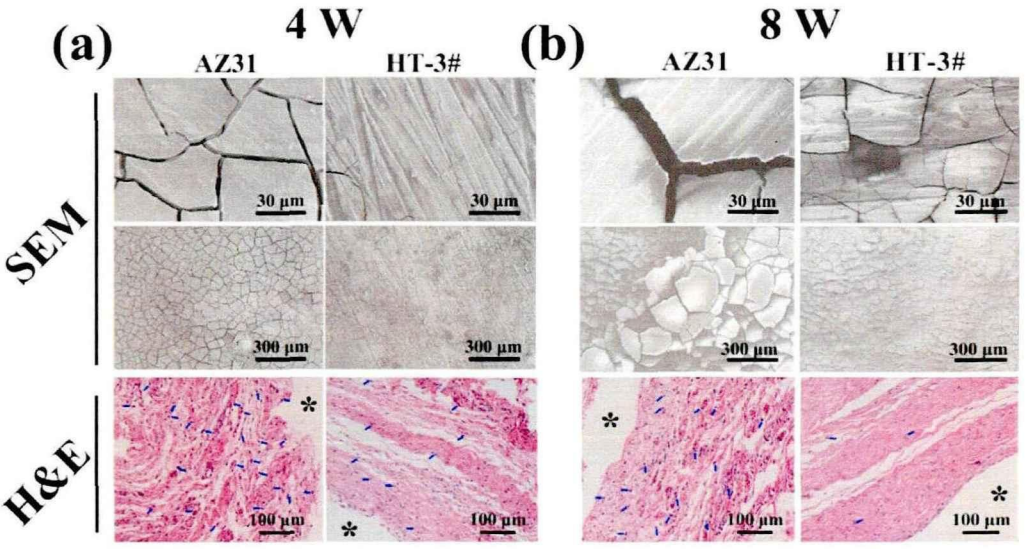

图 2.6.5 皮下炎症及抗腐蚀性检测

Figure 2.6.5：Detection of subcutaneous inflammation and corrosion resistance in vivo

注：图（a）显示皮下植入 4 周后各组材料表面形貌及材料周围组织炎症反应。图（b）显示皮下植入 8 周后各组材料表面形貌及材料周围组织炎症反应。

Note：Fig(a) shows the surface morphology and the inflammatory response of surrounding tissues of each group of materials after subcutaneous implantation for 4 weeks. Fig(b) shows the surface morphology and the inflammatory response of surrounding tissues of each group of materials after subcutaneous implantation for 8 weeks.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

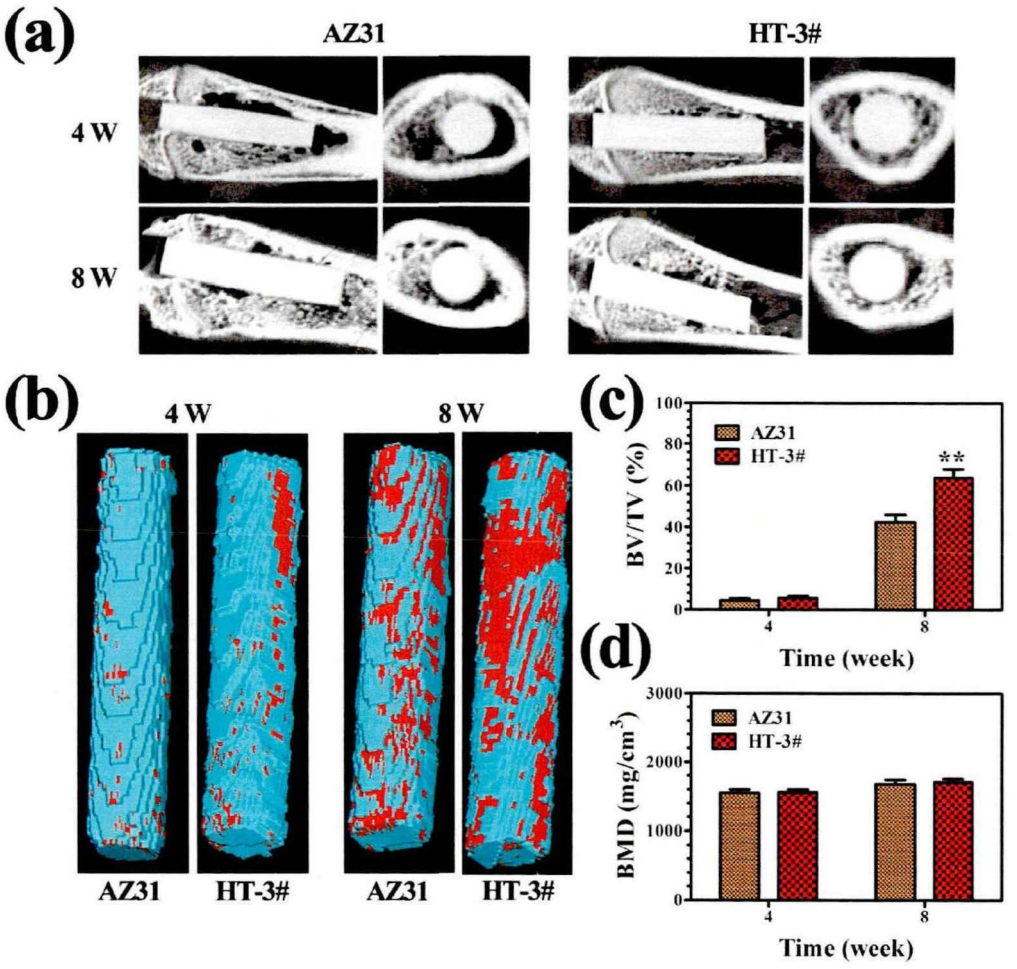

图 2.6.6 体内成骨效果检测

Figure 2.6.6：Detection of osteogenesis effect in vivo

注：图（a）为各组材料在植入 4 周和 8 周时，大鼠股骨 CT 扫描结果的典型截面图。图（b）为植入 4 周和 8 周时各组材料 CT 扫描三维重建图像，蓝色为材料本体，红色为新生骨，可见 LDH 组新生骨组织含量更多。图（c）为 4 周和 8 周时骨体积分数的定量分析，图（d）为 4 周和 8 周时骨密度的定量分析。可见在 8 周时 LDH 组的骨体积分数显著高于 AZ31 组。

Note：Fig(a) shows the typical cross-sectional images of CT scan results of rat femur at 4 and 8 weeks after implantation of each group of materials.Fig(b) shows CT scan 3D reconstruction images of each group of materials at 4 and 8 weeks after implantation. The blue is the material body, and the red is the new bone, indicating more new bone tissue content in LDH group.Figure(c) shows the quantitative analysis of bone volume fraction at 4 and 8 weeks, and Figure(d) shows the quantitative analysis of bone mineral density at 4 and 8 weeks.It can be seen

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

that bone volume fraction in LDH group was significantly higher than that in AZ31 group at 8 weeks.

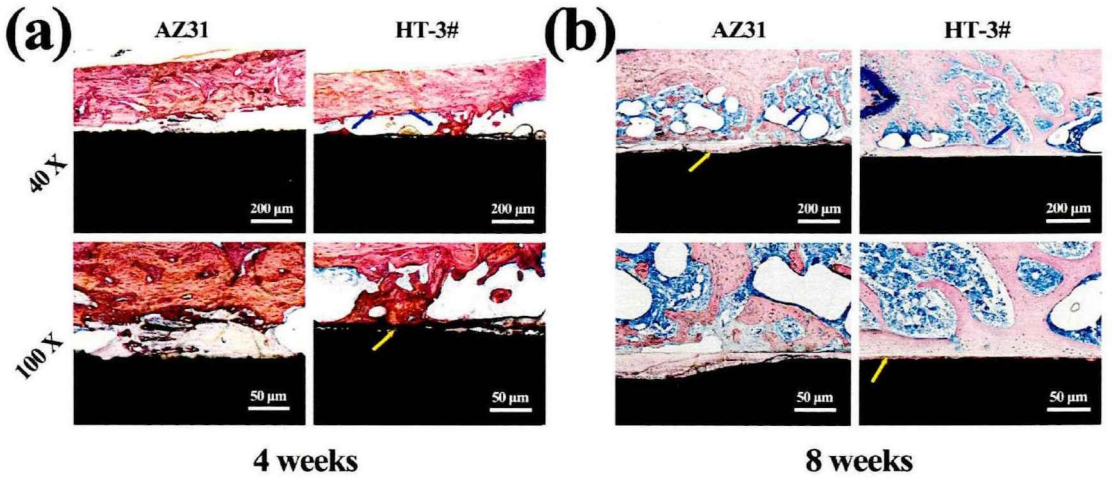

图 2.6.7 硬组织切片染色结果

Figure 2.6.6: Detection of the in vivo osteogenesis effect by hard-tissue slicing

注：图（a）为植入 4 周后股骨的硬组织切片 HE 染色结果，可见 LDH 组有新骨粘附在材料表面，而 AZ31 组未见任何骨组织在材料表面形成，且在 AZ31 组可见腐蚀产生的凹陷产生。图（b）为植入 8 周后股骨的硬组织切片 HE 染色结果，可见 LDH 组有更多的新骨粘附在材料表面，且骨的组织结构更为有序且致密。而在 AZ31 组粘附于材料表面的新骨组织较少，且表面有明显降解导致的凹陷、坑隙，材料周围有纤维组织包裹。

Note: Fig(a) shows the HE staining results of the hard tissue section of femur after 4 weeks implantation. It can be seen that few new bone adheres to the material surface in the LDH group, while no bone tissue was formed on the material surface in the AZ31 group, and corrosion induced holes and cracks can be seen in the AZ31 group. Fig(b) shows the HE staining results of the hard tissue section of femur after 8 weeks implantation. It can be seen that in the LDH group, more new bone adhered to the material surface, and the bone structure was more similar with nature bone.However, in AZ31 group, less new bone tissue were adhered to the material surface, and can found many crack and pits on the sample surface, which mainly caused by degradation, and the material was surrounded by inflammatory fibrous tissue.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

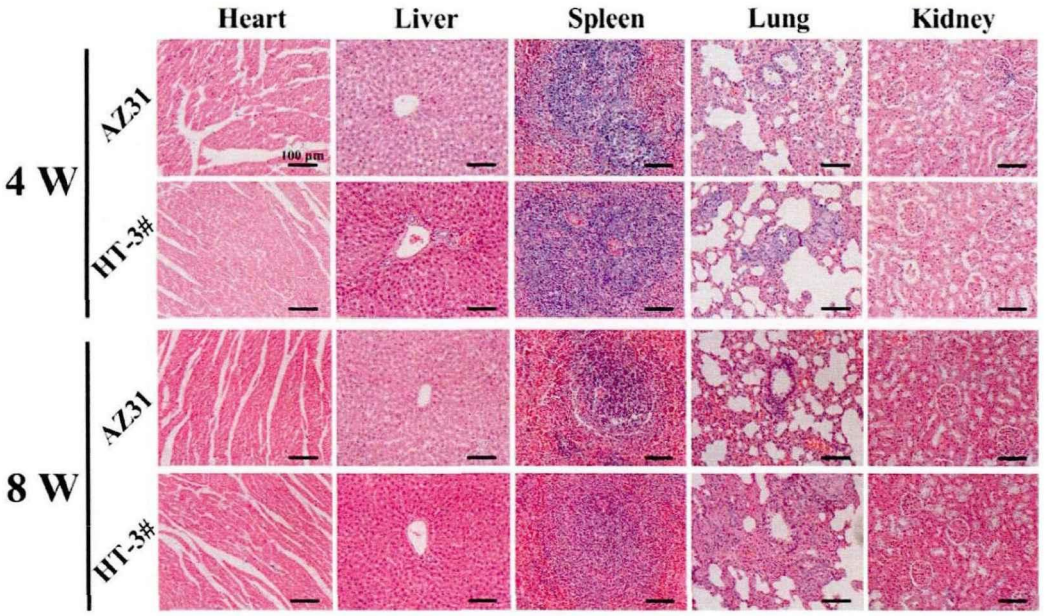

图 2.6.8 生物安全性检测

Figure 2.6.8：Biosafety testing of samples

注：图中从左到右依次是心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏的 HE 组织切片，可见在植入 4 周和 8 周后各重要器官均无病理改变，表明材料生物安全性良好。

Note：The HE tissue sections of the heart, liver, spleen, lung and kidney are shown from left to right in the figure. It can be seen that there was no pathological change in all the important organs 4 and 8 weeks after implantation, indicating good biosecurity of the materials.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第三章 雷公藤红素负载LDH的表征及体外抗肿瘤机制

前两章中我们设计了镁合金表面Mg-Al双层氢氧化物涂层，并通过体内外实验发现其显著提高镁合金的抗腐蚀性及成骨成血管效果，显示其具有作为骨科术后内植物的潜力。骨肉瘤保肢治疗中面临肿瘤学和骨科学两方面问题，即对应杀灭肿瘤细胞和重建肢体功能。通过前面两章内容的研究，镁合金降解过快的问题已初步解决，在这一部分将着重提升镁合金的抗肿瘤效果。LDH涂层是水滑石类插层材料，由二价和三价金属阳离子组成的层状晶体结构构成[79]。LDH的结构通式为$[M_{1-x}M_x(OH)_2]^{x+}[A^{n-}_{x/n}]^{x-}\cdot mH_2O$,其中M表示二价金属阳离子,如$Mg^{2+}$、$Fe^{2+}$、$Ni^{2+}$、$Zn^{2+}$[80]。 LDH具有带正电荷的层片和可交换阴离子的层间结构,层状结构的存在有助于极性有机化合物合理地容纳在层板之间并形成各种插层化合物[81]。LDH片层之间的阴离子可较容易地与其他阴离子类药物进行生物分子交换[82, 83]。已有较多研究利用LDH这一特性负载抗肿瘤药物并应用于肿瘤治疗中[84-87]。因此利用LDH的载药特性可在镁合金表面负载抗肿瘤药物，显著提升材料的抗肿瘤性能，达到杀死材料周围微环境内的肿瘤细胞的目的。

雷公藤红素是从传统中药雷公藤中提取的活性成分，属于三萜类化合物，分子式为$C_{29}H_{28}O_4$，结构中有羧基基团。2007年Cell杂志将青蒿素、雷公藤红素、雷公藤甲素、辣椒素和姜黄素评为最具有潜力实现临床应用转化的传统中药天然产物，有巨大的开发价值[84-87]。近年来有研究发现雷公藤红素具有良好的抗肿瘤特性，大量研究表明雷公藤红素具有广泛而显著的抗肿瘤活性，对前列腺癌、肺癌、肝癌、白血病、胶质瘤、结肠癌、卵巢癌、乳腺癌等肿瘤均有作用,可引起肿瘤细胞的凋亡和坏死[89, 90]。而且其抗肿瘤效应的机制可能有以下几个方面：1、诱导肿瘤细胞凋亡或自噬；2、细胞增殖周期阻滞；3、抗转移及抑制血管生成；4、抑制炎症反应；5、抗氧化应激作用[91, 92]。此外，多数研究报道雷公藤红素可以激活多条信号通路如活性氧（ROS）/JNK信号通路[93]、Akt/mTOR信号通路、NF-kB信号通路[94]、STAT3/JAK2[95]、HSP90[96]、ERa[97]等。但是由于雷公藤红素难溶于水，口服生物利用度低，因此目前应用新的递

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

药方式增加雷公藤红素的生物利用度也是研究热点。有多数研究利用纳米-微米微载体负载雷公藤红素，并发现可以提高其水溶性、化学稳定性、效应及安全性并降低雷公藤红素的并发症[98-101]。而在骨肉瘤的治疗方面，雷公藤红素也显示出优越的抗肿瘤性能，Li 等使用雷公藤红素刺激人骨肉瘤细胞，发现其可以诱导肿瘤细胞自噬和凋亡，而且其可通过细胞周期阻滞抑制肿瘤细胞增殖，并促使细胞内产生过量活性氧，体内实验也发现雷公藤具有显著抗骨肉瘤增殖效果[102]。鉴于雷公藤红素对骨肉瘤优越的抑制效应，在本章中我们将利用 LDH 涂层的载药性能负载抗肿瘤药物雷公藤红素，验证其体外释放效果探索最佳载药浓度，并通过体外实验研究其抗肿瘤机制。

3.1 实验材料

3.1.1 主要仪器和试剂

试剂和仪器	厂家及来源
六孔细胞培养板	Corning 公司，美国
24 孔细胞培养板	Corning 公司，美国
Transwell 培养板	Corning 公司，美国
无水乙醇	国药集团，中国
1%结晶紫染液	雷根生物，中国
细胞骨架染色试剂盒	AAT Bioquest，美国
胎牛血清	Gibco 公司，美国
高糖 DMEM 培养基	Gibco 公司，美国
细胞凋亡检测试剂盒（AV/PI）	同仁化学，日本
CCK-8 试剂盒	同仁化学，日本
活性氧检测试剂盒	碧云天公司，中国
线粒体膜电位染色试剂盒	碧云天公司，中国
全波长酶标仪	Thermo Scientific，美国
96 孔细胞培养板	Corning 公司，美国

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4 %多聚甲醛溶液	博士德公司，中国
流式细胞仪	Beckman CytoFLEX，美国
RIPA 裂解液	碧云天公司，中国
BCA 蛋白浓度检测试剂盒	碧云天公司，中国
Caspase 3 活性检测试剂盒	碧云天公司，中国
蛋白酶抑制剂	碧云天公司，中国
PVDF 膜	Milipore，美国
脱脂奶粉	伊利，中国
LC3B（D11）XP Rabbit mAb	3868T，CST，美国
AKT（Pan）（C67E7）Rabbit mAb	4691T，CST,美国
p-AKT(Ser473) XP Rabbit mAb	4060T，CST,美国
Caspase-3 一抗	ab13847，abcam，美国
P62 一抗	ab109012，abcam，美国
Beclin 一抗	ab207612,abcam,美国
β-actin 一抗	B1029，博奥龙，中国
HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗	ab205718,abcam,美国
山羊抗兔 IgG 荧光二抗（488）	ab150077,abcam,美国
共聚焦显微镜	SP8，Leica，日本
PCR 引物	生工科技有限公司，上海
DEPC 水	PeproTech 公司，美国
WB 蛋白电泳装置	Bio-rad 公司,美国
Trizol 试剂	Thermo Scientific，美国
雷公藤红素（纯度>98%）	德思特 DL0035,中国
3-Methyladenine（3-MA）	HY-19312，MCE，美国
紫外分光光度计	Thermo Scientific，美国
Chloroquine（CQ）	HY-17589A，MCE，美国

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

apamycin（RAPA）	HY-10219,MCE,美国
彩虹预染蛋白 marker	Fermantas，美国
氯仿	国药集团，上海
ECL 显影液	Millipore，美国
山羊抗兔二抗免疫组化试剂盒	中国，武汉博士德生物有限公司
DAB 显色液	索莱宝生物科技有限公司，中国

3.1.1 实验所需溶液配制：

（1）4 %多聚甲醛溶液

在电子分析天平上精确量取 4.0 g 多聚甲醛，溶解至 80 mL PBS 溶液内，将电热恒温水浴槽调至 60℃，将试管放入温水中帮助溶解，待肉眼观无粉末残留后，提示溶解完全，即可加 PBS 定容至 100 mL，反复颠倒混匀，放入 4℃冰箱冷藏备用。

（2）0.1%结晶紫染液配制

取 1 mL 1%结晶紫染液加入 9 mL 超纯水中，配制得到 0.1%结晶紫染液。

（3）负载雷公藤红素 LDH 材料的浸提液配制

将已负载不同浓度雷公藤（0,20,50,100,150 μM）的各组材料放于 24 孔板中，根据所培养细胞的要求加入不同的完全培养基如高糖 DMEM 或干细胞培养基，在 37℃下浸泡 24h，收集浸提液，避光保存于 4℃用于后续实验。

（4）电转缓冲液的配制：Tris 3.03 g，甘氨酸 14.4g，SDS 0.37 g，甲醇 200 mL，将上述试剂加入大烧杯中，先加入 500 mL 蒸馏水，磁力搅拌器作用下反复搅拌至肉眼观察无粉末试剂残留，然后加蒸馏水定容至 1000 mL。

（5）电泳缓冲液：需 Tris 6.06 g，甘氨酸 37.54 g，SDS 2 g，将上述试剂加入大烧杯中，先加入 500 mL 蒸馏水，磁力搅拌器作用下反复搅拌至肉眼观察无粉末试剂残留，然后加蒸馏水定容至 2000 mL。

（6）TBST 缓冲液的配制：TrisHCL(1M,PH 7.5) 50 mL，氯化钠 8 g，氯化钾 0.2g，Tween20 0.5 mL，将上述试剂依次加入大烧杯中，加入蒸馏水 500 mL，

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

磁力搅拌器搅拌至肉眼观察无粉末残留，表明溶解彻底，然后加入蒸馏水定容至 1 L。

3.2 实验方法

3.2.1 雷公藤红素负载及其体外释放

雷公藤红素溶液制备：使用无水乙醇溶解雷公藤红素，雷公藤红素分子量 450，先配制浓度为 600 μM 的母液，需将 13.5 mg 雷公藤红素加入 50 mL 无水乙醇中，摇匀避光置于 4℃备用。此后分别稀释至不同浓度用于后续实验，20 μM 溶液需要将 1.67 mL 母液加入 50 mL 无水乙醇内，50 μM 溶液需要将 4.1 mL 母液加入 50 mL 无水乙醇中，100 μM 溶液需要将 8.3 mL 母液加入 50 mL 无水乙醇中，150 μM 溶液需要将 12.5 mL 母液加入 50 mL 无水乙醇中。然后将环氧乙烷灭菌后的 LDH 材料放于 24 孔板内，每孔 1 个，加入 1 mL 不同浓度雷公藤红素溶液，没过材料表面避光浸泡 24 h，0 uM 组浸泡不含雷公藤红素的无水乙醇，将材料取出在 37℃培养箱内烘干，便制备了含有不同剂量雷公藤红素的 LDH 材料用于后续实验。浸提液的制备：将含有不同浓度雷公藤红素的 LDH 材料置于 24 孔板中，每个孔放 1 个材料，加入 1mL 完全培养基，完全培养基的选择视后续所配养的细胞而定，浸泡 24h，收集浸泡完的浸提液放于离心管中，避光保存于 4℃冰箱内，使用时于 37℃复温。

采用紫外-可见分光光度计（UV-Vis）测定雷公藤的负载量，测定波长范围在 400 到 600 nm，雷公藤的特征吸收峰位于 425 nm 处，测定载药前后雷公藤溶液的吸光度值，根据公式 1 计算样品的载药率：

$$\frac{A0-A}{A0} \times 100\% \text{（公式 1）}$$

其中 A0 为原始药物溶液的吸光度值，A 为浸泡样品的药物溶液的吸光度值。将载药样品静置于 PBS 中，37℃下浸泡不同的时间段，利用 UV-Vis 定量分析溶出的雷公藤的浓度。

3.2.2 细胞培养

本章采用人肿瘤细胞系 143b，HOS 和大鼠骨髓间充质干细胞评价负载不同

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

浓度雷公藤LDH材料对肿瘤细胞和正常细胞的杀伤效果。人骨肉瘤细胞系143b和HOS均购买自中科院上海细胞库，肿瘤细胞采用DMEM高糖培养基+10%血清配制的完全培养基培养，大鼠骨髓间充质干细胞购买自广州赛业公司，使用干细胞完全培养基培养。细胞传代、冻存、复苏的步骤如2.2.2中所述。

3.2.2 CCK-8实验及死活染色检测材料表面肿瘤细胞活性

将负载不同浓度雷公滕红素的LDH材料（0,20,50,100,150 μM）放于24孔板中，每孔1个，肿瘤细胞以1×10^4的密度种于各组材料表面，放入细胞培养箱中，在37℃和5%CO_2条件下培养。分别在培养后的1,3,5,7天时更换培养基为配好的CCK-8工作液，放入培养箱中继续反应40min，吸取110 μL反应后的液体移入96孔板中，使用酶标仪在450 nm处检测各组吸光度变化。死活染色步骤：肿瘤细胞按照1×10^5密度小心滴在材料表面，放入培养箱培养3天后，加入配好的死活染色工作液（终浓度为2 μmol/L的Calcein-AM和终浓度为4umol/L的碘化吡啶混合液），放入培养箱中孵育40min，取出后用PBS小心清洗3遍去除漂浮的死细胞，在荧光显微镜下，用488nm波长观察细胞状态，绿色荧光代表活细胞而红色荧光代表死细胞。

3.2.3 电镜及细胞骨架染色观察细胞粘附情况

肿瘤细胞及干细胞分别在各组材料（0,20,50,100,150μM）表面培养2天后进行细胞骨架染色。具体步骤参照试剂盒中说明进行，首先配制1×染色工作液，过程中注意避光。将细胞在4%多聚甲醛中固定30min，注意固定液中不能包含甲醇，用PBS清洗3遍去除固定液，加入0.1%Triton-100到每孔中3-5分钟，以在细胞膜表面打孔使染色剂更易进入细胞内，用PBS清洗3遍，加入染色工作液，常温避光孵育1h，加入PBS清洗2-3遍去除多余染色液，再加入DAPI染液5min复染细胞核，加入PBS清洗3遍后即可上机观察。本实验采用iFlor-Phalloidin为红色，因此染出的细胞骨架呈红色，在545nm处观察，而细胞核呈蓝色。肿瘤细胞及干细胞分别在各组材料表面培养2天后在电镜下观察细胞粘附情况，具体操作步骤如2.2.4中所述

3.2.4 划痕实验及Transwell实验观察细胞迁移能力变化

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在六孔板中培养 143b，需要等待细胞生长至 90%以上融合率再进行划痕实验。使用 1mL 枪头在无菌直尺的辅助下，在超净台内平行地于六孔板每孔的中央划出一道笔直的线，用 PBS 轻柔的洗去漂浮的细胞，此时在显微镜下观察并拍照，计为 0h 的状态，并在所观察部位底部做标记。更换培养基为不含血清的各组浸提液（即提前使用不含血清培养基浸泡各组材料 24h 提取浸提液），放入培养箱培养 12h，在相同位置用显微镜拍照，即为 12h 的状态，使用 image J 软件分析各组细胞划痕距离，并用 Graphpad 软件统计数据作图。Transwell 实验使用 Transwell 培养板进行操作，内含 12 个 Transwell 小室。将 100μL 浓度为 1×10^6 的细胞悬液加入 Transwell 小孔上室，此时细胞悬液的培养基为各组无血清浸提液，加入 500μL 含 10%血清的完全培养基于 Transwell 下室，保证上室与下室接触界面间无气泡产生，放入培养箱中培养 8h，吸弃培养基，加入多聚甲醛固定，PBS 清洗 2 遍后加入 0.1%结晶紫染液进行染色，使用棉签轻柔擦去内层未迁移的细胞以便观察，于显微镜下观察底面迁移的细胞，拍照并使用 image J 软件计算穿过膜的细胞数目。

3.2.5 活性氧（reactive oxide species，ROS）染色及流式细胞仪检测细胞内活性氧水平

按照 ROS 染色试剂盒说明进行操作，肿瘤细胞在材料（0,20,50μM）表面上培养 2 天后再装载探针检测 ROS 水平。首先按照 1:1000 的比例用无血清培养基稀释 DCFH-DA，使其终浓度为 10 μmol/L,去除细胞培养液，加入 1 mL 稀释好的 DCFH-DA，覆盖细胞表面，放入培养箱中孵育 20 min，用无血清细胞培养基清洗细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的荧光探针，使用正置荧光显微镜在 488 nm 波长处检测并拍照。流式细胞仪检测时需提前将细胞消化下来，使用稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞，细胞浓度为 1×10^6/mL，37°C 细胞培养箱内孵育 20 分钟。每隔 3-5 分钟颠倒混匀，使探针和细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。然后上机检测，选择 FITC 通道检测荧光变化，作直方图。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡水平变化

肿瘤细胞在各组材料（0,20,50 μM）表面培养1天后，加入胰酶将细胞消化下来，注意上清也需要一并收集，后续操作所有液体均收集至同一离心管以避免遗失上清液中凋亡细胞。将消化后的细胞悬液收集至15 mL离心管中，离心弃上清加入PBS清洗1遍。加入1 mLPBS重悬并计数，使各管细胞数为1×10^5个。加入预先配好的1×Annexin V binding solution，制成终浓度为1×10^6个/mL的细胞悬液。取100μL细胞悬液到EP管中，加入5μL Annexin V FITC结合物，再加入5μL的PI溶液，在室温下避光孵育15min，加入400μL 1×Annexin V FITC结合物，在1h内上机检测。流式细胞仪操作步骤：分别设空白，单染AV管、单染PI管和双染组。根据空白组细胞大小调整SSV和FSV参数，使细胞聚集于左下象限，根据单染调整补偿，并设门，圈出双染的阳性结果，所示结果右上象限应为坏死细胞，右下象限为早期凋亡细胞而左上象限为细胞碎片。

3.2.7 细胞核DAPI染色观察染色质碎裂情况

肿瘤细胞在各组材料表面上培养2天，吸弃培养基，加入DAPI染液，常温下孵育10min，用PBS清洗3遍，在荧光显微镜下观察细胞核内染色质断裂情况。

3.2.8 集落形成实验

将肿瘤细胞消化下来，加入1 mL完全培养基重悬并计数，稀释细胞至500个/mL，加入2 mL细胞悬液到六孔板1个孔内，使每个孔细胞数在1000个左右，放入培养箱中培养，1天后观察细胞贴壁情况，并更换培养基为各组浸提液（0,20,50,100,150 μM），每隔2天换液1次，在培养10天后，吸弃培养基，加入4%多聚甲醛固定1h，PBS清洗2遍后加入0.1%结晶紫染液室温下染色30min，使用PBS将染液清洗干净，用相机拍照。

3.2.9 Caspase 3活性检测

肿瘤细胞种于各组材料表面，培养1天后按照试剂盒说明书检测凋亡关键调控酶Caspase 3的活性。首先配制pNA使用标准品稀释液稀释为0、10、20、50、100和200 μM，每个浓度取100μL用酶标仪进行检测，绘制标准曲线，相

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

关系数应大于 0.99。胰酶消化细胞，收集至离心管中，PBS 清洗一次，按照 200 万细胞加入 100μL 裂解液的比例加入裂解液，重悬沉淀并冰浴下裂解 15 min。离心收集上清，在管中分别加入检测缓冲液、待测样品、裂解液、反应底物，37℃下孵育 60-120 min 后测定 A405，减去空白对照的 A405，通过标准曲线对比即可计算出样品中催化的底物的量，在用 Bradford 法测出待测样品中的蛋白浓度，即可计算出每单位重量蛋白中所含 caspase 3 的酶活力单位。

3.2.10 线粒体膜电位检测

肿瘤细胞种于各组材料表面，在培养 2 天后，按照线粒体膜电位检测试剂盒说明进行操作。首先配制 JC-1 染色工作液，按照每 50ul JC-1(200X)加入 8 mL 超纯水的比例稀释 JC-1,充分混匀溶解，再加入 2 mL JC-1 染色缓冲液（5X）混匀后即为 JC-1 染色工作液。吸弃细胞培养基，加入 PBS 清洗 1 遍，加入染色工作液，在培养箱中 37℃孵育 20 min。按照 1 mL JC-1 染色缓冲液（5X）加入 4 mL 蒸馏水的比例配制 JC-1 染色缓冲液，待孵育结束后，吸弃上清使用 JC-1 染色缓冲液清洗 2 次，在荧光显微镜下激发光 490nm 处观察拍照。

3.2.11 Western-Blotting 检测凋亡相关蛋白水平变化

人骨肉瘤细胞系 143b 在六孔板中培养，加入各组样品浸提液中培养 2 天后，提取蛋白检测凋亡或自噬相关指标的变化。为进一步研究机制，部分细胞预先加入 CQ、3-MA 或 RAPA 刺激 12h，再加入浸提液刺激 48h，提取蛋白检测指标变化。Western-Blotting 具体步骤如下：

（1）提取总蛋白并检测蛋白浓度：RIPA 裂解液室温溶解，在使用前加入磷酸化酶抑制剂 PMSF。吸弃六孔板培养基，加入预冷 PBS 清洗 1 遍，加入 RIPA 蛋白裂解液 50-100 μL，视细胞密度而定，冰上孵育 20 min，并用细胞刮反复刮板底部，收集裂解液，在预冷至 4℃的低温离心机内，12000g 离心 10 min，小心吸取上清到 EP 管中，避免触碰到下层沉淀避免污染。随后使用 BCA 法检测蛋白浓度，首先配制蛋白标准品，将试剂盒内的蛋白标准品按照不同比例稀释，取待测蛋白样品 50 μL，分别在待测样品和蛋白标准品孔内加入 BCA 工作液，37℃

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

下孵育 30 min，在 582 nm 处检测吸光度，根据蛋白标准品的 OD 值计算得到标准曲线，根据待测样品的 OD 值算出蛋白浓度，并将各组样品蛋白浓度调至一致，并加入溴酚蓝指示剂，使用金属煮样器在 90°煮 5min 使蛋白变性稳定，随后放于-80℃保存。

（2）SDS-PAGE 电泳：首先按照比例配制好分离胶和积层胶，配制各浓度分离胶所需组分如表 3 中所示。将玻璃板用去污剂仔细清洗并在通风处晾干，将两块玻璃板于制胶架中固定好，往玻璃板中灌入凝胶，先加入分离胶再加积层胶，加入积层胶后立即插入梳子，避免胶凝固后梳子无法插入。等待胶凝固后，将玻璃板放于电泳槽中，灌满电泳液，小心将梳子拔出，在各孔内分别加入 Marker 和各组蛋白样品，调整电压，首先采用 80V 半小时，观察 Marker 及各组溴酚蓝指示剂跑至分离胶时更换电压至 120V，继续电泳 1h 至 Marker 显示各条带均完全分离或溴酚蓝指示剂快要跑出玻璃板为止随即停止电泳，取出玻璃板，小心撬开，取出凝胶并切去不需要的部分。

表 3 不同浓度分离胶配制方法

Table 3 The protocol for different concentration separate hydrogel

胶浓度	6%	8%	10%	12%	15%
ddH_2O	2.6	2.3	1.9	1.6	1.1
10%SDS	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
30%Acr/Bis	1.0	1.3	1.7	2.0	2.5
10%APS（μL）	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED（μL）	0.004	0.003	0.002	0.002	0.002
1.5M Tris/Hcl	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3

（3）电转：预先裁剪好与胶同样大小的硝酸纤维素膜和滤纸，浸入转膜缓冲液中，硝酸纤维素膜在甲醇中激活 30s。将转膜装置按照从下至上阳极碳板、2 层滤纸、NC 膜、凝胶、2 层滤纸、阴极碳板的顺序放好，确认滤纸、凝胶和硝酸纤维素膜对齐，并注意硝酸纤维素膜和凝胶之间不能有气泡，夹紧转膜装置，

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

放于转膜槽中，灌满转膜缓冲液，放于提前准备好的冰槽中，接通电源,调整电压为 100V，转移 1.5h。转移结束后，断开电源将膜取出,割取待测膜条做免疫印迹。

（4）封闭：称取 5g 脱脂奶粉加入 50mL 超纯水中配制成 10%的脱脂牛奶。将转膜后的硝酸纤维素膜取出，用 TBST 漂洗 2 遍，加入 10%脱脂牛奶，在摇床上室温缓慢孵育 2h。

（5）免疫反应：吸弃脱脂牛奶，用 TBST 在摇床上洗膜 3 次，期间使用一抗稀释液配好一抗，抗体浓度按照说明书中的要求稀释,CST 抗体稀释比例为 1:1000。洗膜后，加入一抗在 4℃条件下孵育过夜，并在摇床上缓慢晃动使膜与抗体充分接触。收集一抗，并加入 TBST 洗膜 3 遍，加入辣根过氧化物酶偶联的二抗（按合适稀释比例用二抗稀释液稀释），摇床上平稳摇动，室温下孵育 2h。

（6）显色反应：吸弃二抗，用 TBST 洗膜 3 次，随后加入配好的显色液，在成像系统中拍照观察，并使用 image J 软件分析各组蛋白表达情况。

注意事项：电泳时不能将胶长时间放在仪器里，如果在没有电流下蛋白一直在胶里，蛋白未被固定会扩散导致转膜后条带难看。常用的封闭液虽为 5%脱脂奶粉，但具体选择时应根据抗体说明书要求来确定封闭液。当目的蛋白在 15 KD 以下时，使用 300 mA 电流跑 45 min 即可，当目的蛋白大于 110 KD 时，使用 300 mA 电泳 150 min 以上，200 KD 以上的蛋白需要用 7%的分离胶和 3.5%的积层胶。

3.2.12 细胞免疫荧光检测自噬相关蛋白 LC3B 的表达

将 143b 种于各组材料表面，1 天后通过细胞免疫荧光实验检测自噬蛋白 LC3B 的表达，具体步骤如下：1、吸弃培养基，加入 PBS 清洗 2 遍，加入 4%多聚甲醛固定 1h；2、加入 PBS 清洗 2 遍，加入 0.5% Triton-100 使细胞膜表面溶解形成孔洞；3、加入山羊血清封闭 30min；4、用滤纸吸干血清，加入 LC3 一抗，在 4℃条件下孵育过夜；5、回收一抗，加入 PBS 清洗 2 遍，随即加入兔抗鼠荧光二抗，室温避光条件下孵育 2h；6、吸弃二抗，加入 DAPI 染液复染细胞核 5 min；7、使用 PBS 漂洗 2 遍，使用共聚焦显微镜观察并拍照，荧光强度使用 image J 软件进行分析，最后用 Graphpad 作图。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.3 统计学分析

采集的实验原始数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析，使用 Graphpad 作图，数值均用均值±标准差表示，计量资料多组间比较则采取方差分析，使用 LSD 法进行组内两两比较。P＜0.05 提示差异具有统计学意义。

3.4 实验结果

3.4.1 负载雷公藤红素 LDH 材料的药物缓释效果

LDH 材料具有特殊的层状结构，通过离子交换可在层间负载阴离子药物，因此在药物运输方面有较好的应用价值。如图 3.6.1 所示，随着 LDH 材料负载的雷公藤红素浓度升高，其缓释的药物的量也随之上升。且各组材料随着浸泡时间的延长，释放出的药物量也随之增加，在 30h-120h 时间呈线性关系，说明负载雷公藤红素 LDH 材料能有效缓释药物。LDH 片层释放药物有两种形式，一种为溶液中的阴离子与 LDH 层间的雷公藤红素药物发生交换，缓慢释放出药物，另一种为在酸性微环境中，呈碱性的 LDH 与氢离子发生中和，导致片层逐渐崩解进而释放出内部药物。在本实验中浸泡液采用 PBS，呈中性，因此推测其释放药物主要通过第一种方式进行，而在体内肿瘤偏酸性微环境内其释放速度可能会加快。

3.4.2 材料对肿瘤细胞和间充质干细胞增殖活性的影响

如图 3.6.2 所示，人骨肉瘤细胞系 143b 和 HOS 在材料表面培养第一天时各浓度梯度组均无明显差别，从第三天开始可明显观察到随着负载药物浓度的增加，肿瘤细胞增殖活性明显降低，且 100 μM 和 150 μM 组细胞几乎无增殖活性。而在第 5 到 7 天过程中可见 50 μM 组肿瘤细胞增殖活力显著降低，而 20 μM 组亦无显著增加，对照组细胞增殖活力明显，这说明负载雷公藤红素 LDH 材料能显著抑制肿瘤细胞的增殖活性。有趣的是，当间充质干细胞在负载雷公藤红素 LDH 材料表面种植后，可见在第一天各组细胞增殖活性相似，表明所种细胞量无明显差别，从第 3 天开始，除 100 μM 和 150 μM 组细胞增殖活性明显降低外，其余各组细胞增殖活性无统计学差异，表明在 20 μM 到 50 μM 范围内，材料对

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

间充质干细胞无明显毒性。而使用人血管内皮细胞进行检测发现，趋势类似于间充质干细胞的检测结果，在种植后的 3 到 7 天，在 20 μM 到 50 μM 范围内材料对 HUVECs 的增殖无明显影响，而大于 50 μM 范围会明显抑制内皮细胞的增殖活力。

3.4.3 骨肉瘤细胞和间充质干细胞在材料表面的增殖和细胞粘附情况

图 3.6.3 展示了骨肉瘤细胞和间充质干细胞在材料表面的死活染色情况，可见在培养 2 天后，骨肉瘤细胞系 143b 在 20 μM 组死亡细胞数明显多于对照组，50 μM 组尚可观察到少数存活的肿瘤细胞，而在 100 μM 和 150 μM 组则完全观测不到存活的细胞，表明肿瘤细胞已全部死亡。而 HOS 细胞系存活情况虽好于 143b，但可看到在 20 μM 组有部分细胞死亡，而 50-150 μM 组死亡细胞数明显增加，表明负载雷公藤红素 LDH 材料对其也有一定杀伤效果。与 CCK-8 结果相类似，我们在材料表面种植间充质干细胞后，观察到干细胞在材料表面无明显死亡，但是在 100 μM 和 150 μM 组细胞的密度较对照组和 20-50 μM 组稀少，表明其可能增殖受到一定程度抑制。进一步通过扫描电镜观察发现，143b 细胞在对照组粘附良好，而在负载雷公藤红素组细胞几乎全部凋亡，仅剩下少部分细胞紧缩成团和少部分细胞碎片。但间充质干细胞则不同，不同浓度组都有细胞粘附，20 和 50 μM 组与对照组细胞密度接近，而 100 和 150 μM 组则细胞明显减少，说明在 20 和 50 μM 浓度下，材料对正常组织细胞无明显毒性产生。进一步通过细胞骨架染色发现，20 μM 组的 143b 细胞伪足伸展尚可，铺展于材料表面。而 50-150 μM 组细胞紧缩成团，无板状或丝状伪足伸展附着在材料表面，表明材料表面的微环境不适合肿瘤细胞在其上粘附。而间充质干细胞却在各组材料表面均粘附良好，除 150 μM 组可见部分细胞萎缩成团。图 3.6.5 为各组材料浸提液对肿瘤细胞和间充质干细胞集落形成的影响。集落形成实验利用肿瘤细胞或干细胞的单个细胞即可增殖分裂成细胞集落的能力来检测细胞的增殖水平。结果显示加入浸提液培养 10 天后，肿瘤细胞 143b 和 HOS 形成的集落随着各组材料浸提液中雷公藤红素浓度的增加而明显降低，143b 细胞系趋势更为明

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

显，可见在 100 μM 和 150 μM 组几乎无集落形成，而 50 μM 组形成的集落明显面积更小，提示分裂产生的细胞更少，表明材料对肿瘤细胞的增殖有明显抑制效果。综合以上结果表明，负载雷公藤红素 LDH 材料可以有效的抑制骨肉瘤细胞增殖并诱导其凋亡，对抗肿瘤细胞在其表面粘附生长，而且 20 μM 和 50 μM 组对正常组织细胞如间充质干细胞和血管内皮细胞无明显毒性，浓度在 50 μM 以上时会对正常组织细胞产生毒性作用。因此后续实验多采用 20 μM 组和 50 μM 组进行研究。

3.4.4 负载雷公藤红素 LDH 材料能抑制肿瘤细胞迁移水平

划痕实验和 Transwell 实验是检测细胞迁移水平较为常用的两种方法。如图 3.6.6 所示，对照组在划痕后 8h 显示出最大的迁移距离，两侧划痕几乎愈合，而随着加入浸提液中雷公藤红素浓度的增加，迁移距离明显降低。Traswell 迁移实验结果类似，随着药物浓度增加，从膜的一侧迁移至另一侧的细胞数明显减少，20 μM 组尚有少量细胞迁移，而 50-150 μM 组几乎观察不到迁移的细胞，实验结果表明浸提液可显著抑制肿瘤细胞的迁移能力。

3.4.4 负载雷公藤红素 LDH 材料能诱导肿瘤细胞凋亡和活性氧的产生

因 100 μM 和 150 μM 组对正常组织细胞有一定毒性，因此后续研究都采用 20 μM 和 50 μM 组进行研究。图 3.6.7 展示了细胞在各组材料表面培养后活性氧的产生水平，绿色强度代表活性氧产生的量。如图所示，20 μM 组和 50 μM 组材料表面的肿瘤细胞内活性氧相对于对照组明显增加，而进一步通过流式细胞术定量检测发现趋势同显微镜下观察，143b 细胞系在 20 μM 组和 50 μM 组分别有大约 13.4%和 32.1%细胞活性氧检测阳性，而 HOS 细胞系在 20 μM 组和 50 μM 组分别有大约 10.1%和 21.9%细胞活性氧检测阳性。通过流式细胞仪检测肿瘤细胞 143b 凋亡水平，结果如图 3.6.8 所示，对照组仅有约 6.41%的细胞发生凋亡坏死，复合正常细胞培养水平，而 20 μM 和 50 μM 组分别有 17.02%和 20.93%的细胞发生凋亡坏死，差别有统计学意义。DPAI 染色结果如图 3.6.9 所示，红色箭头代表材料表面的细胞核内染色质断裂情况，在 50 μM 组明显可观察到月牙状

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

高亮的染色质断裂、扭曲等情况，表明细胞发生凋亡，且 50 μM 组凋亡细胞数量显著高于 20 μM 组。为进一步观察细胞凋亡的具体机制，本部分通过 WB 实验检测细胞凋亡过程中关键蛋白的表达水平。如图 3.6.10 所示，随着所加药物浓度的增加，抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达明显降低，而促凋亡蛋白如 Bax、PARP、caspase 3 的表达明显增加，此外细胞周期阻滞蛋白 P53 的表达明显上升，且 NF-kb 信号通路中的抑制蛋白 IKb 表达明显下调。此外，随着药物作用时间的逐渐增加，这些指标的表达也呈现相同趋势，这表明除了浓度效应外，随着作用时间的增加，肿瘤细胞的凋亡水平也随之上升。以上结果表明负载雷公藤红素的 LDH 材料浸提液可显著诱导骨肉瘤细胞发生凋亡坏死，且可诱导 P53 的表达进而阻滞细胞周期抑制细胞增殖，且在此过程中，NF-kb 信号通路激活，可能参与凋亡的调控中。由于各组浸提液中差别仅存在于负载雷公藤红素的浓度，因此可认为产生此种效果为其缓释的雷公藤红素所致。促凋亡蛋白 Bax 一般存在于胞质中，当接收到凋亡信号时，Bax 重新定位于线粒体表面，在线粒体表面构成跨线粒体膜的孔，导致膜电位降低，膜通透性增加，从而释放凋亡因子。由于 WB 结果显示 Bax 等凋亡相关蛋白表达增加，因此我们进一步检测线粒体膜电位以验证是否由凋亡蛋白的激活导致线粒体膜电位下降进而导致细胞凋亡。实验结果如图 3.6.11 所示，当线粒体膜电位降低时，线粒体基质内的荧光探针 JC-1 聚合物分解为单体，显示为线粒体内红色转变为绿色。随着细胞在不同浓度雷公藤红素 LDH 材料表面培养，可见 20 μM 组和 50 μM 组细胞内绿色明显增加，而红色相对减弱，尤其以 50 μM 组更为明显，这表明随着药物浓度增加，肿瘤细胞凋亡水平明显升高。结合 WB 结果，提示在肿瘤细胞发生凋亡的过程中，主要是 Bcl-2/Bax/Caspase 3 参与的线粒体介导的内源性凋亡通路发挥作用。此外，NF-kb 这一炎症和凋亡相关的信号通路也可能参与到肿瘤细胞凋亡的调控过程中。

3.4.5 材料对肿瘤细胞自噬水平的影响

细胞自噬即细胞自食，是细胞将细胞内多余或受损的蛋白或细胞器清理掉，

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

利用细胞继续生存下去。自噬和凋亡均在肿瘤的发展和演变中发挥重要作用，但两者的关系在不同阶段表现不同。自噬被认为是双刃剑，既有可能促进肿瘤的生长也有可能发挥促进肿瘤细胞凋亡的作用。因此在本章中我们进一步观察材料表面种植肿瘤细胞后其自噬水平的变化以明确自噬在雷公藤红素LDH材料诱导骨肉瘤细胞凋亡过程中扮演的角色。首先通过细胞在材料表面种植后的细胞免疫荧光检测微管相关蛋白1轻链3（LC3）的表达情况，如图3.6.12所示，红色为细胞骨架染色，蓝色代表细胞核而绿色为LC3的免疫荧光染色，结果显示20 μM组和50 μM组LC3的表达相对于对照组显著升高，尤其以50uM组表达最高。在自噬囊泡的成核过程中，需要ATG6即在哺乳动物中为Beclin-1的参与介导其他自噬蛋白定位于自噬泡，因此Beclin-1的表达增高被视为自噬激活的一种指标。而P62蛋白是自噬的底物，在自噬激活过程中其被消耗因此细胞内含量减少。在自噬调控的上游通路中，最为重要和经典的通路即是PI3K-AKT-mTOR信号通路，而mTOR对自噬发挥抑制作用，因此当PI3K-AKT-mTOR信号通路激活时，细胞自噬活性降低。在本实验中我们进一步对PI3K-AKT-mTOR信号通路中的关键分子p-AKT的表达进行检测，发现在AKT总量无明显变化的情况下，p-AKT的表达随着雷公藤红素负载浓度的增加而降低，说明该条信号通路处于抑制状态，因此mTOR对自噬的抑制解除，进而说明自噬活性的升高。然而以上结果虽说明自噬在起始和成核等阶段处于激活状态，但仍不能完全说明自噬的激活，因为若细胞的真实自噬水平在自噬的最后阶段被抑制，在起始和成核等阶段发挥作用的蛋白仍可能表达增多。氯喹（CQ）可通过破坏溶酶体的结构和功能而抑制自噬的作用，导致自噬溶酶体聚集，可以使自噬相关蛋白LC3B II与p62等降解减少，抑制细胞自噬发生。加入CQ提前处理肿瘤细胞后，若肿瘤细胞真实的自噬水平是在自噬的最后阶段被阻滞的，那加入CQ处理后再检测自噬相关蛋白如Beclin-1和P62、LC3等指标不会再发生变化，反之，如果加入CQ处理后检测自噬相关蛋白的表达明显增加，则说明肿瘤细胞的真实自噬水平未在最后阶段被阻滞，表明自噬流的增加，即

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

强有力的说明自噬真实水平的增加。如图 3.6.12 所示，加入 CQ 处理后的雷公藤红素 LDH 组较单独雷公藤红素 LDH 组 LC3 表达明显增加，表明雷公藤红素 LDH 组肿瘤细胞的真实自噬水平确实是增加的。综上，实验结果表明在雷公藤红素 LDH 材料组肿瘤细胞的自噬水平上调。

3.4.6 肿瘤细胞自噬与凋亡间的相互作用机制

细胞凋亡和自噬的关系较为复杂，轻度的自噬有利于肿瘤细胞利用自身代谢废物获取能量，在缺乏营养、应激条件下其有利于肿瘤细胞的存活，进而抵抗凋亡。而过度的自噬又会导致过度消耗细胞内的蛋白和细胞器而使细胞无法继续生存，这时细胞就会启动凋亡程序并抑制自噬，使细胞发生程序性死亡。因此明确自噬在凋亡过程中的作用有利于揭示负载雷公藤红素 LDH 材料诱导肿瘤细胞凋亡的具体机制。如图 3.6.13 所示，使用流式细胞术检测各组肿瘤细胞凋亡水平，可见在加入自噬抑制剂 3-MA 后，雷公藤红素 LDH 材料对肿瘤细胞的凋亡作用明显增加，体现为总凋亡率由 20.74%上升到 27.4%，且结果有统计学意义，而加入自噬激活剂雷帕霉素 RAPA 后，总凋亡率由 26.09%下降至 11.93%。以上结果说明在激活自噬时，肿瘤细胞凋亡率降低，细胞存活增加，而在抑制自噬后，肿瘤细胞总凋亡率升高，细胞死亡增多，说明在雷公藤红素 LDH 材料诱导的肿瘤细胞凋亡过程中，细胞的自噬起到对抗肿瘤细胞凋亡的作用。

3.5 讨论

在第二章中我们证明了镁合金表面 Mg-Al LDH 涂层能显著提升镁合金 AZ31 的抗腐蚀效果，进而提升其生物相容性并促进其成骨成血管效果。LDH 涂层本身是层状结构，两片层间具有一定间隙，可通过离子交换负载阴离子药物。在本章中我们首先利用 LDH 涂层这一特殊性质，负载抗肿瘤药物雷公藤红素，由于雷公藤红素难溶于水，因此使用无水乙醇溶解，并将材料泡于不同浓度雷公藤红素溶液中以达到负载不同浓度雷公藤红素的目的。通过体外释放试验我们发现负载药物后的 LDH 材料能有效缓释雷公藤红素，且随着负载药物浓度的增加其释放药物的量也随之上升，表明药物成功被负载到材料上。考虑到雷公

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

藤的分子结构中包含羧基，我们推测其被负载的原因是阴离子交换作用置换到LDH片层中。如前所述，雷公藤红素口服生物利用度低，且过量使用有一定毒副作用，因此构建新的递药方式是提高其利用效率的研究热点，在本实验中LDH材料负载雷公藤红素可直接在局部微环境内释放药物，避免经血液循环，可提高其生物利用效率。在成功负载雷公藤红素后，我们设计一系列实验验证其是否能够有效杀死肿瘤细胞，结果显示在材料表面培养骨肉瘤细胞后，细胞死亡明显增多且增殖水平显著下降，而且随着负载药物浓度的增加其抗肿瘤效果更加明显，表明肿瘤细胞无法在材料表面粘附增殖。除对肿瘤细胞的增殖作用外，其还可抑制肿瘤细胞的迁移能力，表明具有抑制骨肉瘤细胞转移的能力。而有意思的是，在材料表面培养正常细胞如干细胞和内皮细胞则发现在浓度范围20-50 μM时对正常组织细胞无明显毒副作用，干细胞和内皮细胞尚可正常增殖粘附，这有利于材料早期启动成骨进程。研究表明，雷公藤红素是一种蛋白酶体抑制剂，可通过抑制蛋白酶体活性诱导肿瘤细胞凋亡，或发挥抗炎、促代谢等活性作用。推测其在一定范围内对肿瘤细胞明显毒性而正常细胞无毒性的原因在于肿瘤细胞与正常细胞代谢通路不同所致。肿瘤细胞在其恶变演化进程中会激活许多与细胞周期、抗凋亡等相关的蛋白酶，代谢模式由正常细胞的有氧糖酵解变为无氧糖酵解，称为warburg效应。因此，我们推测雷公藤红素LDH材料可能通过抑制某些与肿瘤细胞代谢过程中密切相关的关键蛋白酶发挥作用。本研究进一步探索了肿瘤细胞的死亡机制，前已述及雷公藤红素可以诱导肿瘤细胞凋亡，因此本研究也首先检测了肿瘤细胞的凋亡水平。细胞凋亡是程序性死亡的一种，是指在生理或病理条件下，为维持自身内环境的稳态通过调控凋亡基因使细胞产生主动有序的死亡。在凋亡进程中细胞会发生一些特殊的形态和生化方面的变化，主要表现为核固缩、DNA断裂、细胞皱缩、线粒体膜电位下降等。实验结果显示，在材料表面培养的肿瘤细胞明显皱缩变小，DAPI染色发现核内有大量染色质断裂扭曲等情况，而线粒体膜电位染色也证明随着所负载药物浓度的增加，线粒体膜电位明显降低，进一步通过AV/PI染色发现早凋和晚凋的细胞明显增多，这些均是细胞凋亡的典型表现。介导凋亡的信号通路主

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

要可分为3大类，分别是线粒体通路、死亡受体通路以及内质网通路。线粒体通路指细胞受到凋亡刺激后，引起胞质内的Bax/Bak形成低聚物复合体，插入到线粒体外膜孔隙，导致线粒体渗透压改变，跨膜电位丢失，促使Cyt C从线粒体释放到细胞质，并与细胞凋亡激活因子1（Apaf-1）结合形成凋亡复合体，活化Caspase-9前体，进而激活Caspase-3和Caspase-7，引发Caspase级联反应，从而诱发细胞凋亡。在本研究中我们发现在材料表面培养的肿瘤细胞线粒体膜电位明显下降，而且WB结果显示线粒体途径中的促凋亡蛋白Bax、caspase 3的表达随着药物浓度的增加和作用时间的增加而明显上调，而拮抗凋亡的蛋白Bcl-2的表达下降，这些结果表明在细胞凋亡过程中，线粒体凋亡途径主要发挥作用。如前所述，肿瘤细胞自噬在其恶变进展中发挥重要作用，但其与凋亡比较复杂，轻度自噬有利于肿瘤细胞生存对抗凋亡而过度自噬则会诱导细胞凋亡。为了明确本实验中自噬在肿瘤细胞凋亡中的作用，我们进一步对自噬相关指标进行检测。实验结果表明在雷公藤红素LDH材料诱导骨肉瘤细胞凋亡进程中，自噬起到对抗凋亡的作用。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.6 附图

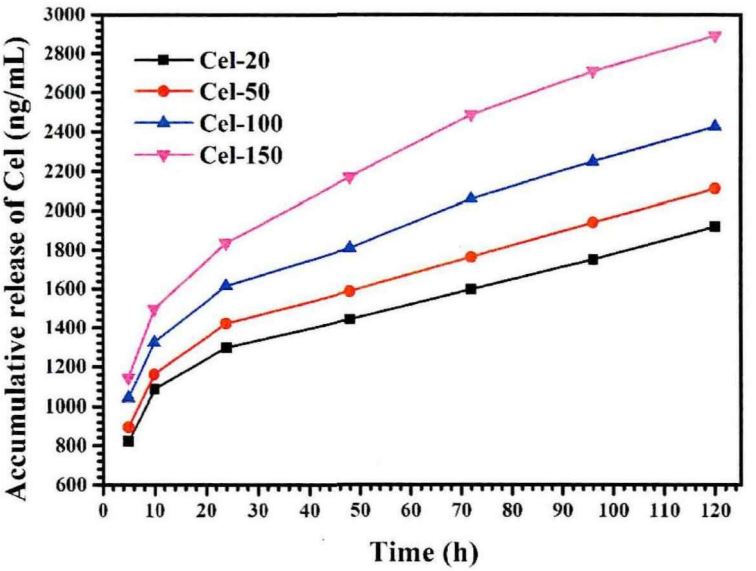

图 3.6.1 负载雷公藤红素 LDH 材料的药物缓释效果

Figure 3.6.1 Sustained release effect of LDH loaded with celastrol

注： Cel 代表雷公藤红素，随着材料负载的雷公藤红素浓度升高，其缓释的药物的量也随之上升。且各组材料随着浸泡时间的延长，释放出的药物量也随之增加，说明负载雷公藤红素 LDH 材料能有效缓释药物

Note： Cel stands for celastrol, resμLts indicating that LDH loaded with celastrol can effectively sustained-release drugs.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

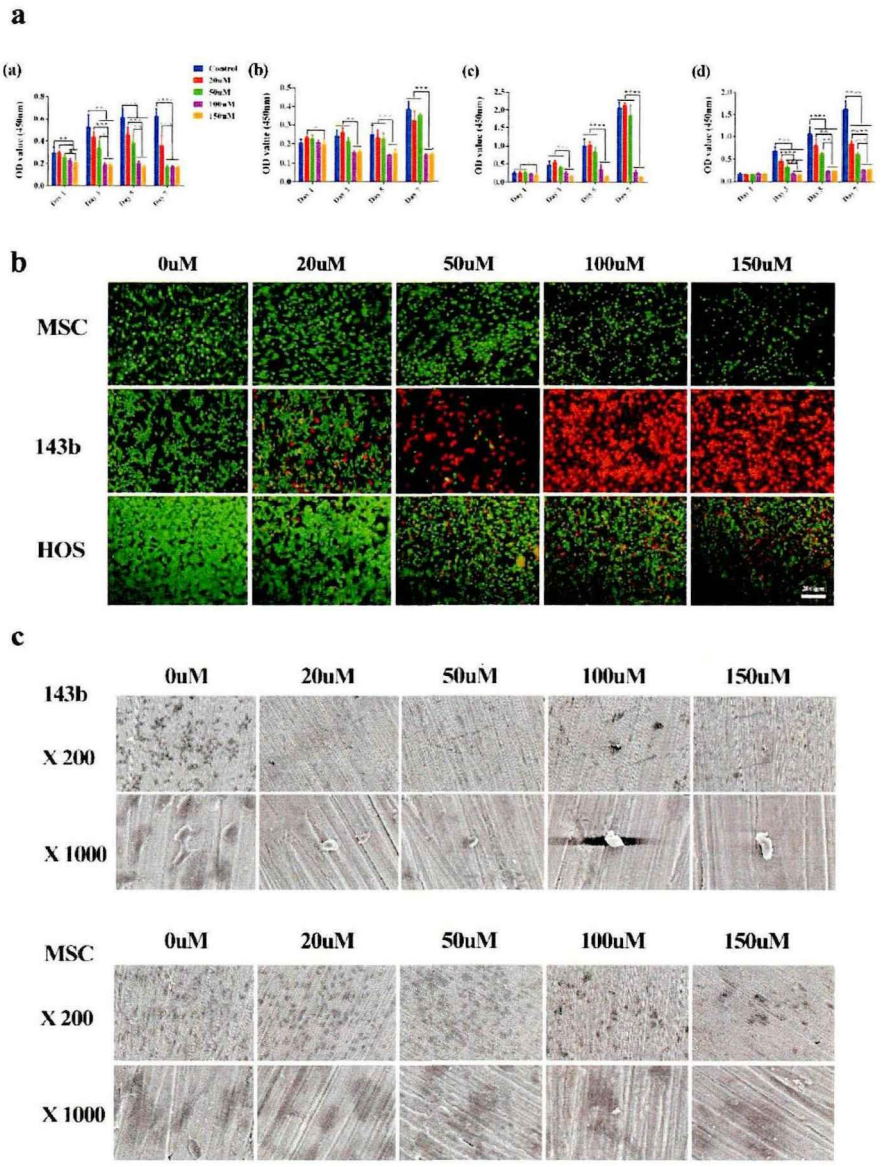

图 3.6.2 细胞在材料表面的增殖和粘附

Figure 3.6.2：The result of cell proliferation and adhesion

注：图 a 为细胞在各组材料表面增殖 CCK-8 结果，其中（a）为骨肉瘤细胞系 143b 的增殖结果，图（b）为间充质干细胞的增殖结果，图（c）为人血管内皮细胞 HUVECs 的增殖结果，图（d）为骨肉瘤细胞系 HOS 的增殖实验结果。可见在 20 μM-50 μM 范围内 MSC 和 HUVECs 的增殖水平与对照组无明显差异，而 20 μM-150 μM 范围显著抑制骨肉瘤细胞系增殖活性。图 b 为各组材料表面细胞死活染色结果，可见 MSC 组在 100-150 μM 范围仅细胞

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

数目减少而各组均无明显死细胞出现，而骨肉瘤细胞系从20 μM组开始各组死细胞数目逐渐增多，表明材料对骨肉瘤细胞系杀伤效果明显。图c为各组细胞在材料表面粘附的电镜结果，可见在0 μM组骨肉瘤细胞粘附较多，而在20-150 μM组细胞粘附明显减少且细胞缩小变圆，表明材料对骨肉瘤细胞有杀伤效果，而间充质干细胞在材料表面粘附较好，仅在100-150 μM组观察到细胞数目减少且皱缩明显，表明在100-150 μM范围对间充质干细胞有一定毒性。

Note: Figure a shows the results of cell proliferation results after culturing on the surface of materials, in which (a) is the proliferation result of osteosarcoma cell line 143b, figure (b) is the proliferation result of mesenchymal stem cells, and figure (c) is the proliferation results of HUVECs. Figure (d) shows the proliferation results of the osteosarcoma cell line HOS. It can be seen that the proliferation level of MSC and HUVECs in the range of 20 μM-50 μM is not significantly different from that of the control group, while the range of 20uM-150uM significantly inhibits the proliferation activity of osteosarcoma cell lines. Figure b shows the results of live/dead staining of cells on the materials surface. It can be seen that in the MSC group, only the number of cells decreased in the range of 100-150 μM, but no obvious dead cells appeared in each group, while the number of dead osteosarcoma cells gradually increased from the 20 μM group , Indicating that the material has obvious toxic effect on osteosarcoma cell lines. Figure c shows the electron microscope results of the adhesion of cells in each group on the surface of the material.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

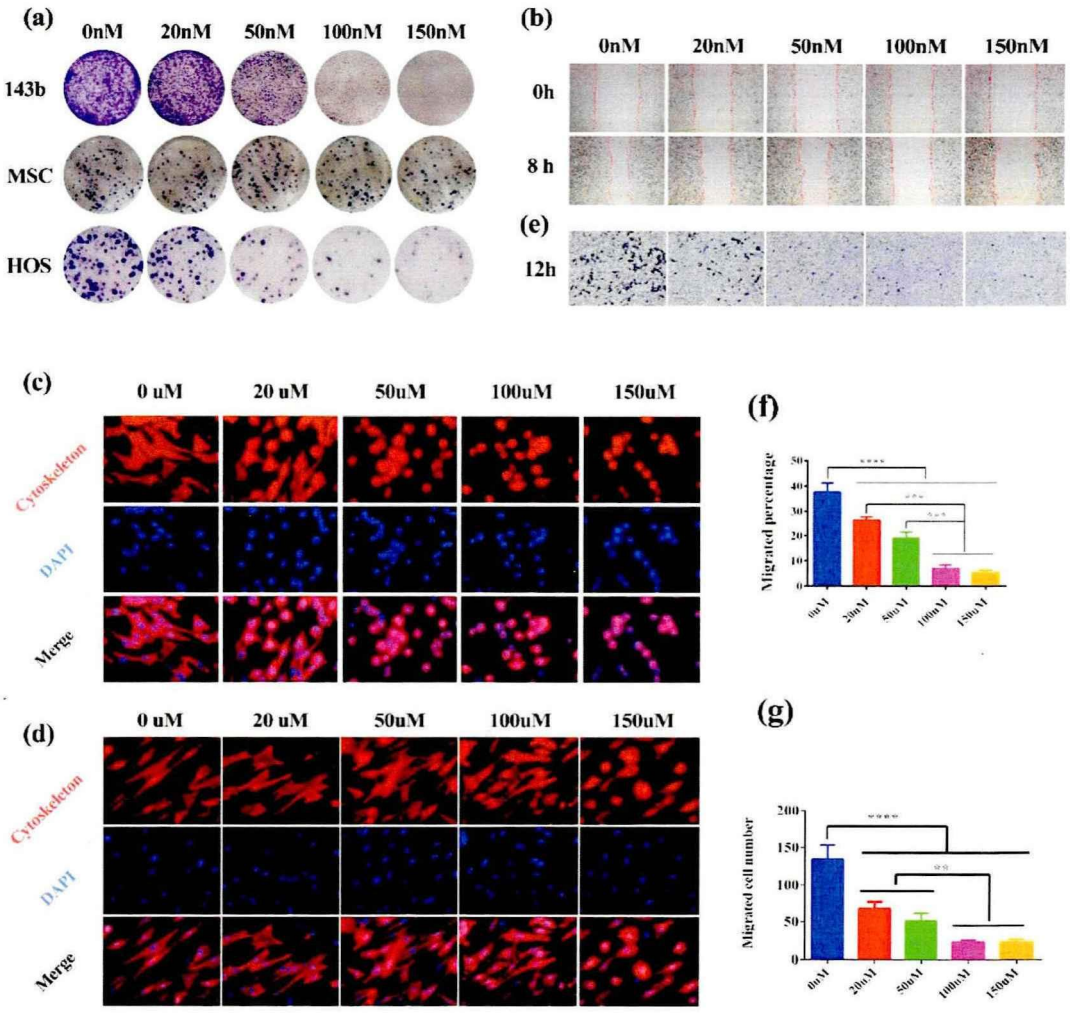

图 3.6.3 细胞在材料表面的增殖、粘附及迁移

Figure 3.6.3：The result of Transwell assay

注：图（a）为各组细胞的集落形成实验结果，可见骨肉瘤细胞系 143b 和 HOS 随着浸提液中雷公藤红素浓度的增加所形成的集落数目明显减少，而间充质干细胞变化并不显著；图（b）为使用浸提液刺激 143b 细胞系的划痕实验结果，图（e）为 143b 细胞系的 Transwell 实验结果，图（f）和图（g）为相应的定量分析结果，显示随着浸提液中药物浓度的增加，骨肉瘤细胞的迁移能力逐渐降低；图（c）为 143b 细胞系在材料表面的细胞骨架染色情况，可见与电镜观察类似，随着载药浓度增加，细胞逐渐皱缩变圆；图（d）为间充质干细胞在材料表面的骨架染色情况，可见在 0-50 范围内细胞伸展良好，在 100 μM 组有少量细胞形态发生变化，而 150 μM 组可见细胞形态皱缩明显，表明 100-150 μM 范围对间充质干细胞有一定毒性。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Note: Figure (a) shows the results of the colony formation experiment of each group of cells. It can be seen that the number of colonies formed by the osteosarcoma cell line 143b and HOS was significantly reduced with the increased loading concentration of celastrol in the extract, while have little influence on MSC; Figure (b) is the result of the wound healing test ;Figure (e) is the result of Transwell; Figure (f) and Figure (g) are the corresponding quantitative analysis results , Which shows that with the increase of the drug concentration in the extract, the migration ability of osteosarcoma cells gradually decreases; Figure (c) shows the cytoskeleton staining of the 143b cell line on the surface of the material, which is similar to the results of electron microscope observation. As the cells increase, the cells gradually became shrink and round; Figure (d) shows the cellular skeletal staining of MSC on the surface of the material. It can be seen that the cells stretch well in the range of 0-50 μM groups, while the cell morphology shrinks significantly in the 100-150 μM group, indicating that the range of 100-150 μM is toxic to mesenchymal stem cells.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

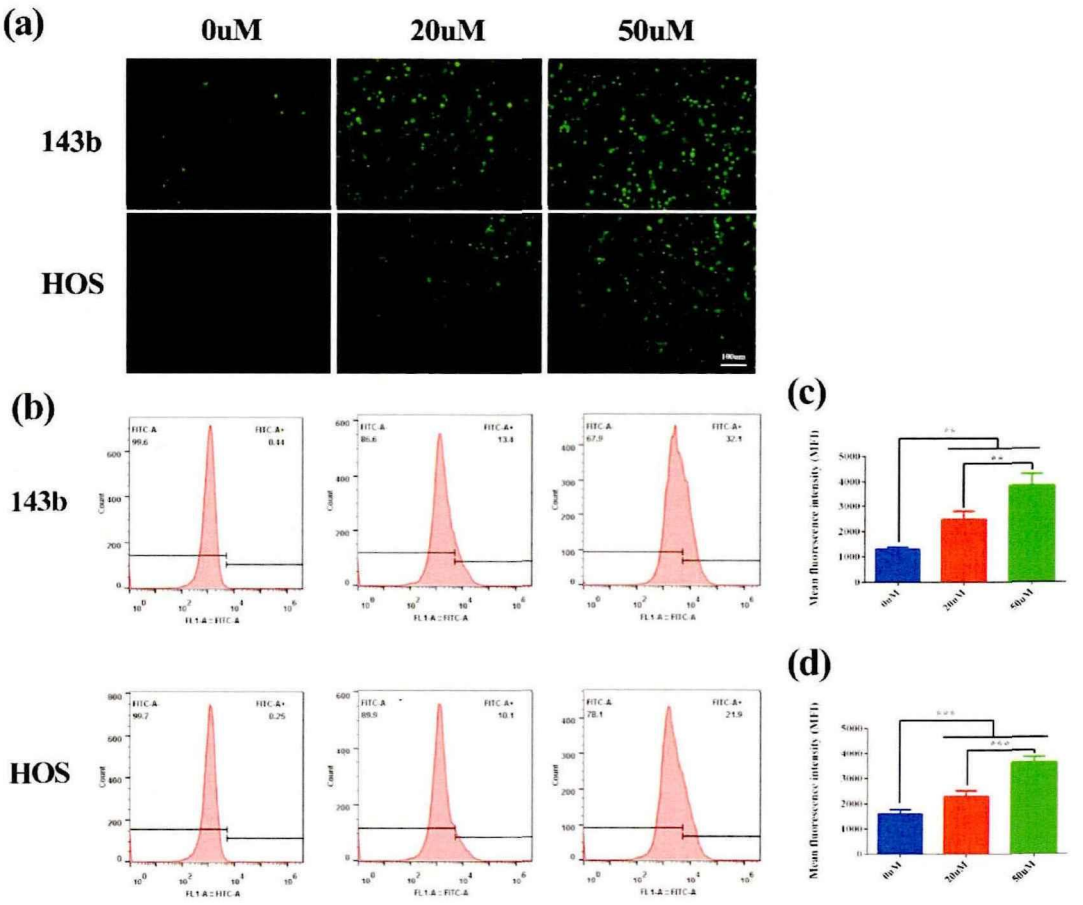

图 3.6.4 细胞活性氧水平检测

Figure 3.6.4：Detection of ROS expression of each group

注：图（a）为各组细胞在材料表面培养后的 ROS 荧光显色结果，可见随着载药浓度增加，各组细胞内 ROS 的含量逐渐上升；图（b）通过流式细胞术检测绿色荧光的表达量，可见与 0μM 组相比，随着载药浓度提升，荧光信号峰逐渐右移，说明绿色荧光强度逐渐提升，表明 ROS 的含量逐渐上升，图（c）和图（d）分别为 143b 和 HOS 的定量分析结果，显示各组荧光强度有统计学差异。

Note: Figure (a) shows the ROS fluorescence coloring results of cells in each group after cultured on the surface of the material. It can be seen that with the increase of drug loading concentration, the content of ROS in each group gradually increases; Figure (b) Green fluorescence detected by flow cytometry It can be seen that compared with the 0μM group, as the drug loading concentration increases, the fluorescence signal peak gradually shifts to the right, indicating that

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

the green fluorescence intensity gradually increases, indicating that the content of ROS is gradually increasing. Figures (c) and (d) are respectively quantitative analysis results of 143b and HOS, which showed that the fluorescence intensity of each group was statistically different.

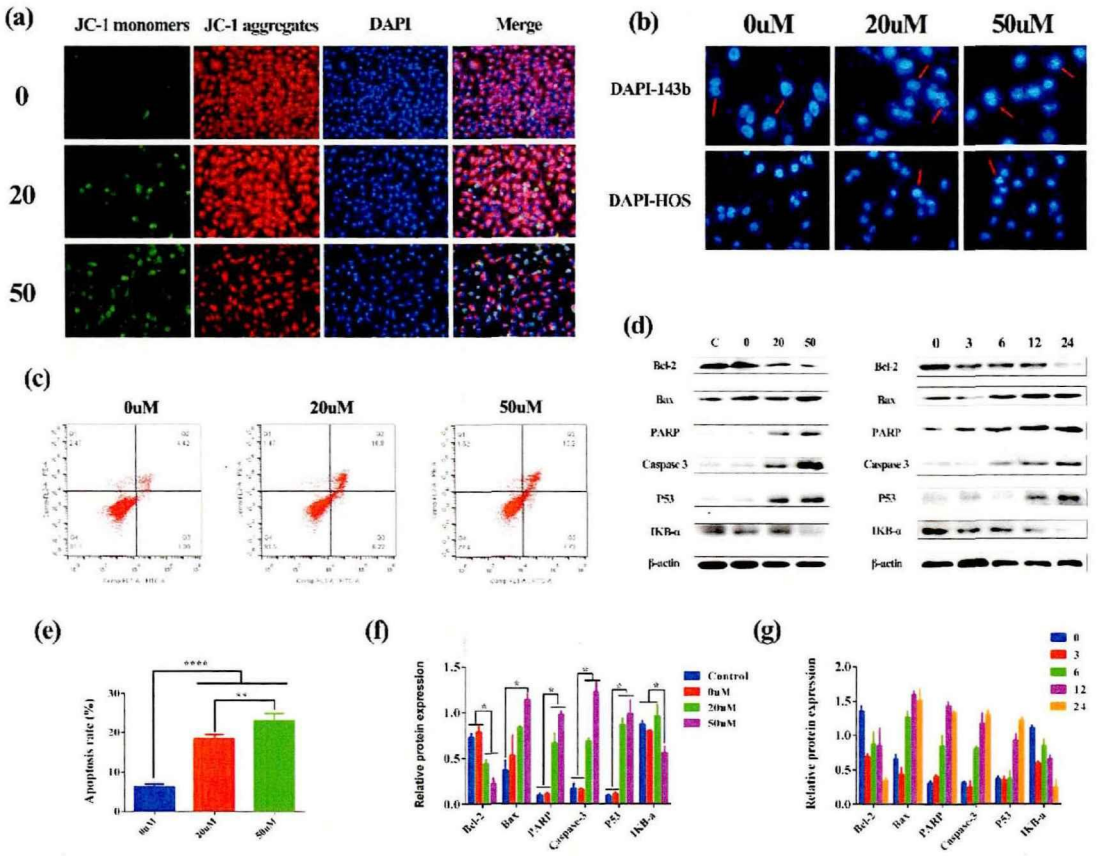

图 3.6.5 各组细胞凋亡水平检测

Figure 3.6.5: Detection of cell apoptosis level of each group

注：图（a）为各组材料表面肿瘤细胞线粒体膜电位染色图像，可见随着作用浓度增加，线粒体膜电位逐渐降低，体现为 JC-1 聚合物逐渐分解为单体。图（b）为各组细胞在材料表面培养后的 DAPI 染色结果，可见在 20 μM 和 50 μM 组细胞核有多数变形高亮，核内有断裂或扭曲的染色质，表明细胞凋亡水平的增加；图（c）和图（e）为细胞凋亡染色后流式细胞仪的统计结果，显示随着载药浓度的增加，细胞凋亡水平升高；图（d）为 WB 结果，可见随着载药浓度和药物作用时间的增加，凋亡相关蛋白 BAX、PARP 和 Caspase-3 的表达显著上升，而凋亡拮抗蛋白 Bcl-2 的表达逐渐降低，且细胞周期阻滞相关蛋白 P53 表达上升而

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

NF-KB 信号通路的关键调控蛋白 IKB-α的表达降低，提示细胞凋亡水平上升，且细胞周期可能发生阻滞，NF-KB 信号通路的激活可能参与调控这一进程。图（f）和图（g）为 WB 结果相对应的定量分析结果。

Note: Figure (a) is the mitochondrial membrane potential of tumor cell after cultured on the surface of materials. It can be seen that as the concentration increases, the mitochondrial membrane potential gradually decreases, which is reflected in the gradual decomposition of JC-1 polymer into monomers. Figure (b) shows the DAPI staining results of each group of cells after cultured on the surface of the material. It can be seen that most of the cellular nuclei in the 20μM and 50μM groups are deformed and highlighted, and there are broken or distorted chromatin in the nucleus, indicating an increase in the level of apoptosis; Figure (c) and Figure (e) are the statistical results of flow cytometry after cell apoptosis staining, showing that with the increase of drug loading concentration, the level of cell apoptosis rises; Figure (d) is the result of WB, which shows that with the increase of drug concentration and drug action time, the expression of apoptosis-related proteins BAX, PARP and Caspase-3 increased significantly, while the expression of apoptosis antagonist protein Bcl-2 gradually decreased, and the expression of cell cycle arrest related protein P53 increased while NF-KB signaling pathway was activated. The activation of the NF-KB signaling pathway may be involved in regulating this process. Figures (f) and (g) are the quantitative analysis results corresponding to the WB results.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

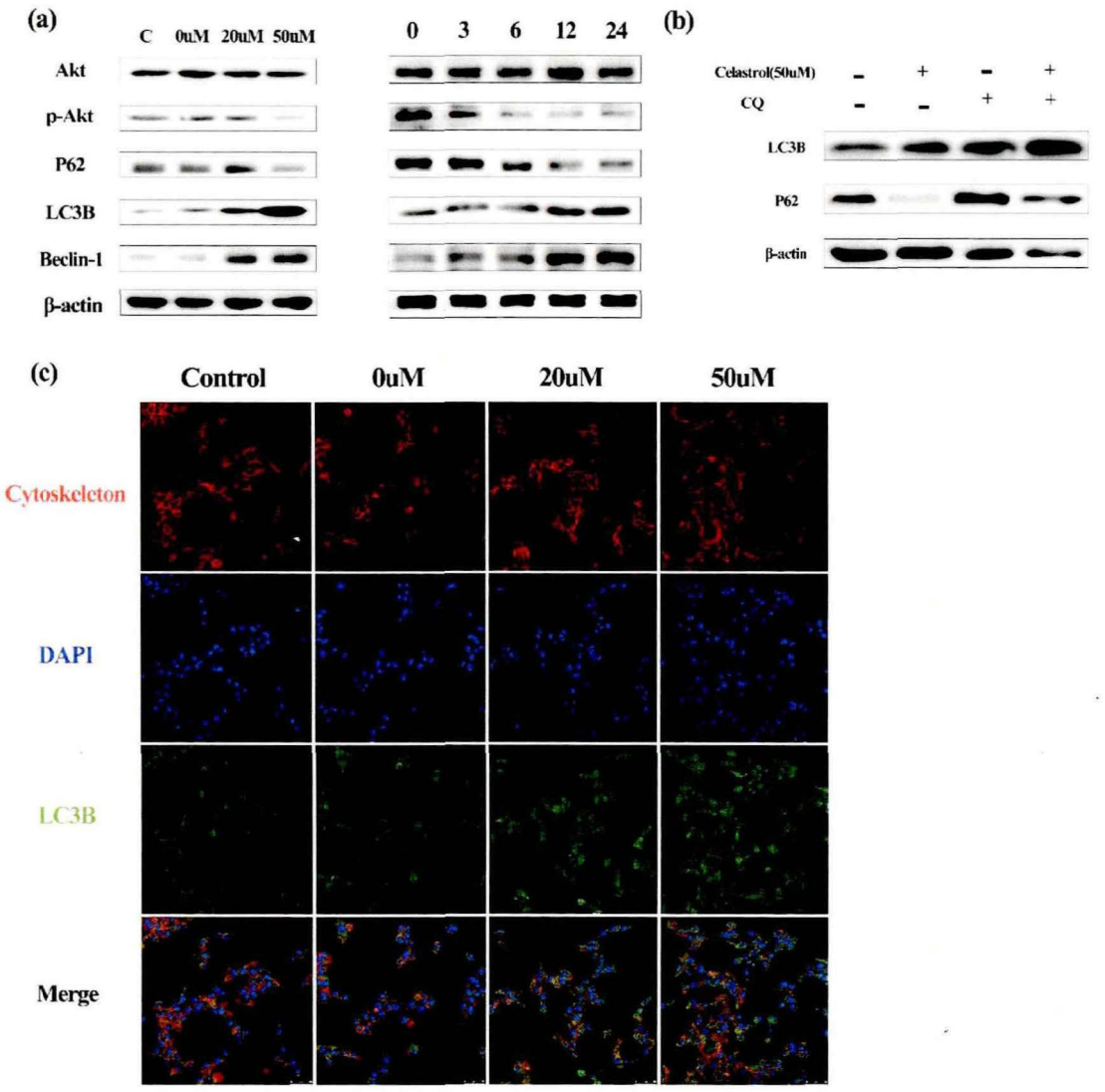

图 3.6.6 各组细胞自噬水平检测

Figure 3.6.6: Detection of cell autophage level of each group

注：图（a）为 WB 结果，可见随着载药浓度和作用时间的增加，PI3K-AKT 信号通路表达逐渐降低，自噬底物 P62 被消耗增加，而自噬标志物 LC3B 和 Beclin-1 的表达逐渐升高，表明细胞自噬激活，且有浓度效应和时间效应。图（b）为加入自噬抑制剂氯喹后，可见自噬标志物 LC3B 的增加和自噬底物 P62 的进一步降低，表明自噬流的增加，进一步说明自噬的真实水平是上升的。图（c）为 LC3B 的细胞免疫荧光图像，可见随着载药浓度的上升，自噬标志蛋白 LC3B 的表达升高，说明细胞自噬水平提升。

Note: Figure (a) shows the result of WB. It can be seen that with the increase of drug loading

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

concentration and react time, the activation of PI3K-AKT signaling pathway gradually decreases, the consumption of autophagy substrate P62 increases, and the expression of autophagy markers LC3B and Beclin-1 gradually increase, indicating that autophagy is activated and having a concentration and time effect. Figure (b) shows the increase of autophagy marker LC3B and the further decrease P62 after the addition of autophagy inhibitor chloroquine, indicating an increase in autophagy flux and further indicating that the true level of autophagy is rising. Figure (c) is the cell immunofluorescence image of LC3B. It can be seen that with the increase of drug loading concentration, the expression of autophagy marker protein LC3B increases, indicating that the level of cell autophagy increases.

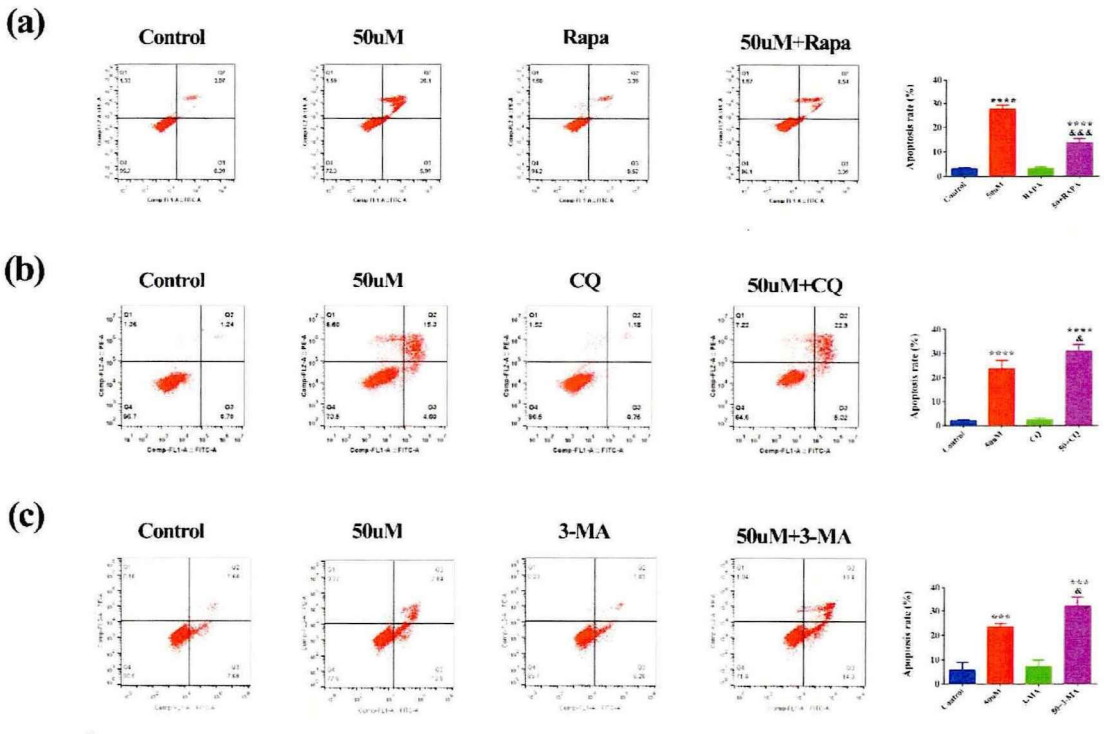

图 3.6.7 流式检测自噬和凋亡间的交互作用

Figure 3.6.7: The cross talk between autophage and apoptosis detected by flow cytometry

注：图（a）为加入自噬激活剂雷帕霉素预处理后，各组细胞的凋亡情况，其中 50μM 代表负载雷公藤红素 LDH 组，可见 50μM 组显著诱导细胞凋亡，然而在激活自噬后，细胞凋亡水平降低，其中*代表与 control 和 RAPA 组有统计学差异，&代表与 50μM 组比较有统计学差异；图（b）为加入自噬抑制剂氯喹预处理后，各组细胞的凋亡情况，可见在加入氯喹后细胞的凋亡率进一步提升，表明抑制自噬凋亡率增加；图（c）为加入自噬抑制剂 3-MA 预处理后各组细胞的凋亡情况，可见加入 3-MA 后各组细胞凋亡显著上升，同样表明抑制自

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

噬凋亡率增加。以上结果表明自噬在负载雷公藤红素LDH材料诱导肿瘤细胞凋亡过程中起到拮抗作用。

Note: Figure (a) shows the apoptosis of cells in each group after pretreatment with the autophagy activator rapamycin. It can be seen that the 50μM group significantly induced apoptosis of osteosarcoma cells, but the apoptosis rate significantly decreased when the autophagy was active, where * represents a statistical difference with the control and RAPA groups, & represents a statistical difference with the 50μM group; Figure (b) shows the results of apoptosis rate after pretreatment with the autophagy inhibitor chloroquine, it can be seen that the apoptosis rate of cells is further increased after adding chloroquine; Figure (c) shows the apoptosis of cells in each group after pretreatment with the autophagy inhibitor 3-MA. It can be seen that cell apoptosis in each group increased significantly after adding 3-MA. The above results indicate that autophagy plays an antagonistic role in the process of tumor cell apoptosis induced by LDH loaded with celastrol.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第四章 雷公藤负载LDH的体内抗肿瘤效果及成骨性能评价

雷公藤红素除具有显著的抗肿瘤效应外，多数研究报道其有较强的对抗炎症反应、抑制破骨细胞形成的作用，因此也用于骨关节炎、类风湿性关节炎等病的治疗中。在第三章中我们发现负载雷公藤红素的LDH材料能够明显杀死骨肉瘤细胞，且在20-50μM浓度下对正常细胞无明显毒性，且发现其同时诱导肿瘤细胞发生凋亡和自噬，而自噬起到对抗凋亡的作用，在抑制自噬后，凋亡率增加。然而体外实验的结果仍需体内实验进一步考察，且载药后是否会对体内骨再生产生影响亦需进一步观察，因此在本章中我们将继续通过体内实验验证材料的抗肿瘤效果，并通过体内实验观察材料远期对骨再生修复的影响。

4.1 实验材料

4.1.1 主要试剂和仪器

试剂和仪器	厂家及来源
荧光显微镜	Olympus公司，日本
Tunel染色试剂盒	碧云天公司，中国
microCT	LCT-200; HITACHI, 日本
M-CSF	315-02，peprotech，美国
Rankl	315-11，peprotech，美国
PCR引物	生工生物科技有限公司，上海
免疫组化湿盒	柏奥易杰，中国
抗荧光淬灭封片液	碧云天公司，中国

4.1.2 实验所需溶液配制：

（1）20μM及50μM雷公藤红素溶液

取13.5 mg雷公藤红素加入50 mL无水乙醇中，混匀充分溶解即为600 μM母液，取4.1mL母液加入50 mL无水乙醇中即获得50 μM雷公藤红素溶液。取

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.67 mL 母液加入 50 mL 无水乙醇中即获得 20μM 雷公藤红素溶液。

（2）3%戊巴比妥钠溶液

在电子天平上称取 3h 戊巴比妥钠粉剂，在量筒上量取 100mL 0.9%生理盐水，将 3g 戊巴比妥钠粉剂加入 100mL 生理盐水混匀，即获得 3%戊巴比妥钠溶液。

4.2 实验方法

4.2.1 材料准备

裸鼠皮下模型所用棒材 AZ31 购买自苏州川茂金属材料有限公司，并切割成直径 2mm，长度 5mm 的棒状试样，大鼠股骨植入模型所用棒材 AZ31 直径 2mm，长度 1cm。使用无水乙醇浸泡并使用超声清洗三遍，每次 5min，清洗完成后置于 37℃烘箱内晾干备用。将材料浸泡于 20μM 和 50μM 的雷公藤红素溶液中 1 天，取出放于孔板内在 37℃培养箱中烘干备用。

4.2.2 裸鼠皮下肿瘤模型构建

实验采用 4 周龄雄性 BALB/c 裸鼠（购自南方医科大学实验动物中心，饲养于华南理工大学免疫缺陷动物实验中心的无特定病原体环境）进行操作，将人骨肉瘤细胞 HOS 从 75 cm^2 培养瓶中消化下来，使用无血清培养基重悬并调整细胞浓度为 1×10^7/mL，吸入 EP 管中备用。为模拟临床骨肉瘤术后肿瘤残留的情况，我们将材料泡在细胞悬液中 5s，让各组材料表面均沾满肿瘤细胞。将裸鼠随机分为 3 组，一组为对照组，一组为 20 μM 雷公藤材料组，一组为 50 μM 雷公藤材料组。随后将裸鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠麻醉，待麻醉完成后固定在超净台中，在裸鼠背部切一小口并将材料塞入远端，随后再次注射 100 μL 细胞悬液在材料周围，缓慢退针避免细胞悬液带出。此后每日观察裸鼠皮下肿瘤大小，每日测量肿瘤体积和裸鼠体重，并观察裸鼠生存状态是否有恶病质等情况，记录死活状态，肿瘤体积按照长×宽 ^{2}/2 的方法计算。在第七天取出肿瘤，称重后固定于 4%多聚甲醛中进行后续切片操作。

4.2.3 组织切片制备及 HE 染色

将多聚甲醛固定后的肿瘤组织用梯度酒精脱水，浓度依次为 30%、50%、70%、

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

80%、90%、95%和 100%每次 30min，再将组织块从无水乙醇中取出，先放入二甲苯和无水乙醇等量混合的溶剂中 1 小时，然后放入二甲苯中 20min 使其透明化。随后加热融化石蜡，将组织块浸于已融化的石蜡中，待石蜡完全浸入组织块后进行包埋。熔化石蜡，将已浸透石蜡的组织块放入其中冷却凝固成块，待其变硬即可在切片机上进行后续切片处理。随后将已包埋完成的组织蜡块固定于切片机上，设置切片参数为 5 mm 厚，然后将切片在热水中烫平，随即贴在载玻片上，载玻片上提前滴上薄层蛋白甘油，后放入格盘内，在 38℃温箱中烘干，然后可进行染色处理。HE 染色步骤：首先进行脱蜡处理，先将组织蜡块在二甲苯中浸泡 30 min，随后浸入二甲苯和无水乙醇等量混合溶剂中 30 min，随后分别泡于无水乙醇、70%乙醇、50%乙醇中 20 min，随后在自来水中冲洗 10s，即可放入苏木精中染色 30 min，在自来水中漂洗 15 min 使切片颜色变蓝。将切片放入 1%盐酸乙醇液中褪色 10s，可见切片颜色变红，随后自来水漂洗使其恢复蓝色，将切片浸入 50%乙醇，70%乙醇和 80%乙醇各 3 min，用 0.5%伊红乙醇液对比染色 1-3 min，将切片放入 95%乙醇中洗去多余红色，放于无水乙醇中 3 min，最后吸水纸吸干乙醇，将切片放入二甲苯中 3 min，最后用中性树胶封片，即可在显微镜下观察拍照。

4.2.4 Tunel 染色及免疫组化染色

Tunel 染色步骤：首先将石蜡切片在二甲苯中脱蜡 5-10 min，换用新鲜的二甲苯再次脱蜡 5-10 min，再将切片泡入梯度酒精中水化，依次为无水乙醇 5 min，90%乙醇 2min，70%乙醇 2 min，蒸馏水 2 min，随后滴加 20ug/mL 不含 DNA 酶的蛋白酶 K，在 37℃条件下作用 20 min，用 PBS 洗涤 3 次，将蛋白酶清洗干净。分别按 Tunel 染色试剂盒说明书中的比例将 TdT 酶、荧光标记液和 Tunel 染色检测液混合均匀配制成 Tunel 检测液，现配先用，在切片样品上滴加 50 μLTunel 检测液，37℃避光孵育 60 min，再用 PBS 漂洗 3 次，用抗荧光淬灭封片液封片后使用荧光显微镜在 515nm 处观察拍照。免疫组化染色步骤：石蜡切片脱蜡水化同 Tunel 染色步骤，然后在蒸馏水下漂洗并用 PBS 浸泡 5min，再使用 3%过氧

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

化氢避光处理10min封闭内源性过氧化物酶，再用蒸馏水漂洗2次，随后加入抗原修复液并在微波炉内加热5min进行抗原修复。再使用PBS清洗2遍，滴加与二抗同源的动物血清进行封闭。封闭完成后用滤纸吸去血清，不洗直接滴加一抗在4℃条件下孵育过夜。再用PBS清洗2次，滴加生物素标记的二抗，在室温下孵育2h，PBS清洗2次，滴加SAB复合物，室温下孵育1h，加入PBS清洗2次，随后用DAB显色，并用蒸馏水终止反应，加入封片液封片并在显微镜下观察拍照。

4.2.5 骨植入实验

骨植入实验采用的雄性4周龄SD大鼠购买自南方医科大学实验动物中心，饲养于华南理工大学动物实验中心。16只SD大鼠随机分为两组，一组为LDH组，另一组为负载雷公藤红素LDH组（50 μM）。手术所用器械及植入材料均提前使用环氧乙烷灭菌。在进行动物实验前，配制好麻醉动物所需要的3%戊巴比妥钠溶液，按照0.1mL/100g的比例将戊巴比妥钠注射入SD大鼠腹腔，待麻醉后，使用电动剃毛机在手术区域即股骨周围备皮。手术区域皮肤使用碘伏消毒两遍，外翻髌骨，沿股骨滑车切开皮肤及皮下组织，暴露股骨滑车，使用手持电钻配以2mm转头，在股骨滑车中心转孔并沿股骨长轴扩髓。随后将各组材料塞入髓腔，每只SD大鼠两侧股骨植入相同材料。植入后逐层缝合皮下组织及皮肤，使用70%酒精在皮肤层消毒一遍，并在肌肉注射4万单位青霉素预防伤口感染。随后每天观察大鼠状态，在术后4周和8周时随机取4只实验组和4只对照组处死并取出股骨，进行后续micro-CT扫描和组织切片染色观察骨新生情况。

4.2.6 使用RT-PCR检测负载雷公藤红素LDH材料对破骨细胞活性的影响

按照hu等人分享的方法[103]分离培养C57小鼠破骨细胞（购自南方医科大学实验动物中心，4周龄），在提取原代细胞之前，需首先配制灭活处理后的完全培养基。将胎牛血清在恒温水浴箱内以50℃条件孵育1h，可灭活血清内的补体等免疫活性物质，避免提取的巨噬细胞发生极化。首先分离小鼠骨髓来源巨

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

噬细胞（Bone Marrow Derived Macrophage,BMDM）,脱颈法处死 C57 小鼠，并将其浸泡于 75%乙醇中消毒，尽量在无菌条件下切开皮肤，剥离股骨和胫骨周围肌肉取出骨头，使用组织剪剪开股骨和胫骨两端，用 1 mL 细针抽取培养基冲洗骨髓腔，将骨髓冲至培养皿内，使用 5 mL 注射器反复冲洗骨髓组织使其分散为单细胞状态，加入红细胞裂解液裂解 5 min，1500 转离心 10 min 去除上清，再次用完全培养基重悬，并分至培养皿中，在 37℃，5% CO_2 条件下培养，24h 后吸取上清内的细胞至 12 孔培养板中调整细胞浓度 1.6-2.0× 10^6/mL，每孔加入 2 mL 细胞悬液，随后加入集落刺激因子（macrophage colony-stimulating factor，M-CSF，终浓度为 25 ng/mL）和破骨细胞分化因子 RANKL（终浓度为 50 ng/mL），在第四天更换培养基为各组材料浸提液并继续加入两种细胞因子。刺激 1 天后提取 RNA 进行 RT-PCR 检测破骨相关标志基因 Trap，Ctr，Ctsk 和 MMP-9 的表达情况。RT-PCR 步骤如 2.2.6.4 所述。引物序列如表 4 所示。

表 4 破骨相关基因引物序列

Tble 4 The primer sequence of osteoclast related gene

基因名称	上游序列（Forward sequence）	下游序列(Reverse sequence)
Trap	GGAACTTCCCCAGCCCTTAC	AGGTCTCGAGGCATTTTGGG
Ctr	CTGGAGCCACAGCCTATCAG	AGTTGGACCAGGTTCGGTTG
Ctsk	GCCACGCTTCCTATCCGAAA	CCTCCGGAGACAGAGCAAAG
MMP-9	CAGCCGACTTTTGTGGTCTT	CGGCCGTAGAGACTGCTTC
GAPDH	TGTCCGTCGTGGATCTGAC	CCTGCTTCACCACCTTCTTG

4.2.7 生物安全性评价

在骨植入实验取材时，解剖大鼠并取出心脏、肝脏、肺脏、脾脏、肾脏，进行 HE 切片观察组织结构变化。

4.3 统计学分析

采集的实验原始数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析，使用

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Graphpad 作图，数值均用均值±标准差表示，计量资料多组间比较则采取方差分析，使用 LSD 法进行组内两两比较。P＜0.05 提示差异具有统计学意义。

4.4 实验结果

4.4.1 负载雷公藤红素 LDH 材料对裸鼠皮下肿瘤大小和裸鼠体重的影响

在本部分我们构建模拟临床术后材料周围肿瘤残留的模型，在材料表面沾满肿瘤细胞植入裸鼠皮下，并在材料周围注射肿瘤细胞，以观察材料在体内对肿瘤细胞的杀伤效果，结果如图 4.6.1 所示，在种植 7 天后，可见对照组肿瘤体积明显较负载雷公藤红素组更大，且 20 μM 组显著大于 50 μM 组，而肿瘤体积增长曲线可见，从第 3 天起，无药物负载的对照组肿瘤体积开始加速增长，而负载雷公藤红素药物组增长并不明显，且 50 μM 组的增长速度明显低于 20 μM 组，将肿瘤组织取出后进行称重，结果显示对照组重量明显高于负载雷公藤红素药物组，且 20 μM 组大于 50 μM 组。以上结果表明负载雷公藤红素 LDH 材料能有效抑制肿瘤生长，具有显著抗肿瘤效果。各组裸鼠的体重并无明显差别，也表明植入材料对其本身并无明显毒性。为进一步证实肿瘤生长抑制是否是由于材料诱导的细胞凋亡，我们对肿瘤组织进行免疫组化染色和 Tunel 染色。Caspase 3 免疫组化结果表明，负载雷公藤红素组阳性率明显较对照组更高，趋势为 50 μM>20 μM>对照组，表明加入药物后会诱导肿瘤组织凋亡，而 Ki67 免疫组化染色结果也与此想对应，作为肿瘤生长的指标，Ki67 通常表达于细胞核内，其增高表明细胞增殖活力明显上升。实验结果显示对照组肿瘤细胞高表达 Ki67，其趋势为对照组>20 μM 组>50 μM 组，表明加入药物后肿瘤细胞的增殖活力被明显抑制。Tunel 染色又被称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法，正常的或处于增殖状态的细胞几乎没有 DNA 的断裂，而在凋亡细胞种染色体 DNA 会发生断裂，链上会出现缺口而产生 3'-OH 末端，可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶的作用下，将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸化酶或生物素形成的衍生物标记到 DNA 的 3'末端，进而可检测出发生凋亡的细胞。Tunel 染色结果显示，50 μM 组肿瘤组织内的阳性细胞明显多于 20 μM 组

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和对照组，趋势为 50 μM>20 μM>对照组，同样表明负载药物后，肿瘤组织的凋亡水平明显增加，以上结果均说明负载雷公藤红素的 LDH 材料具有良好的抗肿瘤效果。

4.4.2 负载雷公藤红素 LDH 材料对体内成骨性能的影响

我们在植入后的 4 周和 8 周，通过 microCT 扫描和硬组织切片染色观察体内成骨效果。结果如图 4.6.2 所示，黑色代表植入的棒材，红色代表新生骨组织，在 4 周时载有雷公藤红素组的 BV/TV(骨体积分数)明显高于对照组，结果有统计学差异，而 8 周时两组则无明显差别，BMD 结果趋势与 BV/TV 相同，显示在 4 周时负载雷公藤红素组的骨矿物密度更高，提示负载雷公藤红素组在早期更有利于新骨生成。

4.4.3 负载雷公藤红素 LDH 材料对破骨相关基因表达的影响

如图 4.6.3 a 所示，在对照组和 0 μM 组形成的多核巨细胞形态典型，呈不规则圆形且有多核，且细胞聚集形成的多核巨细胞数目较多。而在 20 μM 和 50 μM 组可见多数巨噬细胞未融合成多核巨细胞，且少量形成的多核巨细胞形态明显较小；抗酒石酸的酸性磷酸酶（Trap），组织蛋白酶 K（cathepsin K），降钙素受体（Ctr）和基质金属蛋白酶 MMP-9 是破骨细胞活化的指标，如图 4.6.3 所示，20 μM 组和 50 μM 组破骨细胞的标志基因 Ctsk、Ctr、MMP-9 和 Trap 的表达较对照组明显更低，表明负载雷公藤红素 LDH 材料浸提液相较于对照组能够有效的抑制破骨细胞活性，而其可能与缓释的雷公藤红素有关。

4.4.4 负载雷公藤红素 LDH 材料的生物安全性

在植入后的 4 周和 8 周，SD 大鼠的重要脏器被取出进行组织切片观察结构变化，如图 4.6.4 显示，不论在 4 周或 8 周，HE 染色结果显示两组大鼠的心、肝、脾、肺和肾脏组织均无明显纤维化、溶解、肿胀等毒副反应，而在第二章中已证明 LDH 材料本身是没有毒性的，且在植入材料后的时间内大鼠均无死亡或疾病等异常，因此可说明负载药物后对大鼠无毒副作用，生物安全性良好。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4.5 讨论

在本章中我们通过将材料与肿瘤细胞同时植入裸鼠皮下的方式模拟临床骨肉瘤术后材料周围肿瘤残留的模型，结果显示负载雷公藤红素LDH材料具有显著抗肿瘤效果，且通过免疫组化染色和Tunel染色发现其能显著诱导肿瘤细胞凋亡，这些结果与体外实验结果相同，说明雷公藤红素在LDH片层中释放后能有效地杀死周围肿瘤细胞发挥作用。而体内成骨实验同样显示了负载雷公藤红素组具有更好的成骨效果，我们推测这与雷公藤红素对破骨细胞的抑制作用有关。因此进一步进行体外Trap染色和RT-PCR实验来探索负载雷公藤红素LDH材料浸提液对破骨细胞活性的影响，结果显示在加入材料浸提液后，所形成的典型多核空泡样破骨细胞明显减少，且其标志基因ctsk、Ctr、MMP和Trap的表达较对照组明显更低，说明其缓释的雷公藤红素能有效抑制破骨细胞活性。实际上，有多数研究关注雷公藤红素对破骨细胞的抑制作用。近年来国内外许多课题组证实雷公藤红素在治疗类风湿性关节炎中的有效作用，并指出其可通过抑制破骨细胞形成及抑制破骨细胞活性发挥作用。Idris AL等发现雷公藤红素可以通过降低RANKL的表达进而抑制破骨细胞形成和活化[104]，Nanjundaiah SM等证明雷公藤红素能够减少骨和软骨损伤,主要是通过调节RANKL/OPG比值、炎性细胞因子和MMP-9来实现的[105]。破骨细胞与成骨细胞是骨重建过程中的关键参与者，破骨细胞来源于巨噬细胞，其主要负责将骨吸收溶解，而成骨细胞主要是分泌骨基质形成新生骨结构。因此当雷公藤红素释放后抑制破骨细胞形成及激活，将更有利于新生骨结构的产生，进而促进骨修复进程。本实验也有一定缺陷，采用裸鼠皮下肿瘤模型并不能很好地模拟骨肉瘤的实际情况，采用有免疫力的小鼠并在骨原位构建骨肉瘤模型可能更能模拟骨肉瘤的实际情况。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4.6 附图

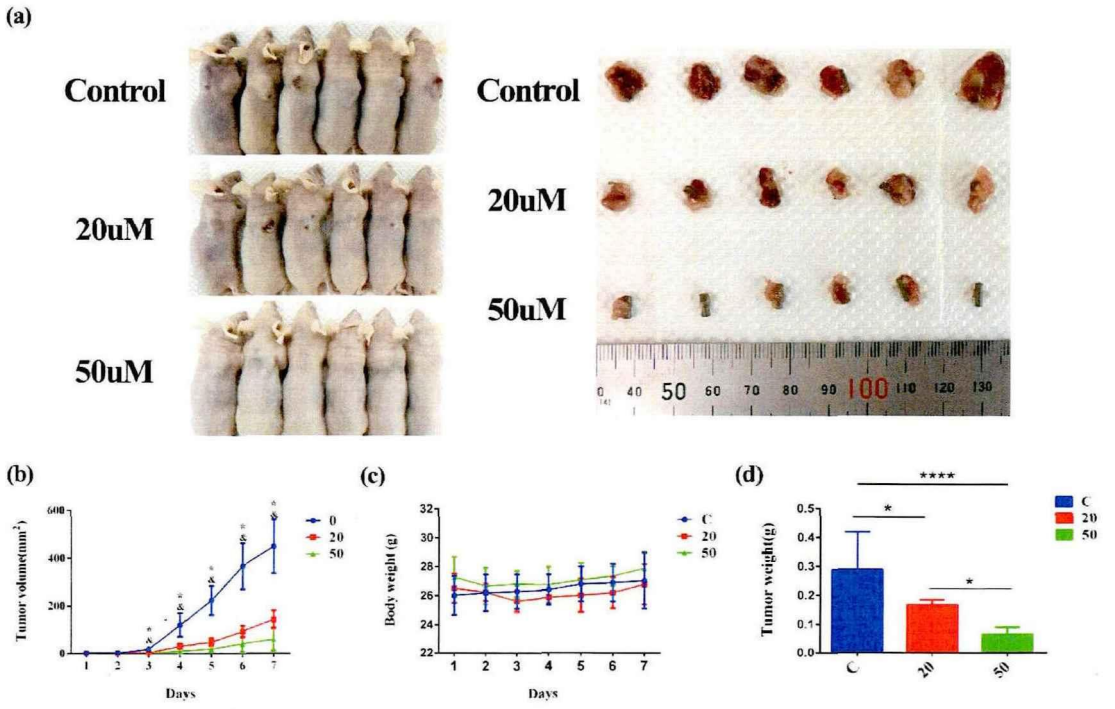

图 4.6.1 各组材料对裸鼠皮下肿瘤的杀伤作用

Figure 4.6.1 The results of in vivo anti-tumor experiment

注： 图（a）为裸鼠皮下肿瘤模型在体内植入 7 天后的大体照片和取出后的肿瘤和材料的照片，可见随着载药量的增加，肿瘤体积明显缩小；图（b）为各时间点的肿瘤体积随时间变化曲线图，*代表 0 μM 组与 20 μM 组对比有统计学差异（P<0.05），&代表 0μM 组与 50μM 组对比有显著差异（P<0.05），可见从第 3 天起 20 μM 组和 50 μM 组的肿瘤体积明显较对照组小；图（c）为各组各时间点裸鼠体重，可见在各时间点各组裸鼠体重无显著差异；图（d）为肿瘤在裸鼠皮下生长 7 天后，肿瘤取出时的重量，可见呈现随着载药量增加肿瘤重量逐渐降低的趋势，与大体观察结果一致。

Note：Figure (a) shows the general photos of the subcutaneous tumor model in nude mice 7 days after implantation and the photos of the harvested tumor and material. It can be seen that the tumor volume decreased significantly with the increase of drug loading.Figure (b) is the graph of tumor volume change over time at each time point. * represents a statistical difference between the 0 μM group and the 20 μM group, and & represents a significant difference between the 0 μMgroup and the 50 μMgroup. It can be seen that tumor volume in the 20μM and 50μM groups was significantly smaller than that in the control group from the 3rd day. Figure (c) shows the

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

body weight of nude mice in each group at each time point, indicating that there was no significant difference in the body weight of nude mice in each group at each time point.Figure (d) shows the weight of the tumor at the time of removal after 7 days of subcutaneous growth in nude mice, showing a trend of gradual decrease in tumor weight with the increase of drug loading, consistent with the general observation results.

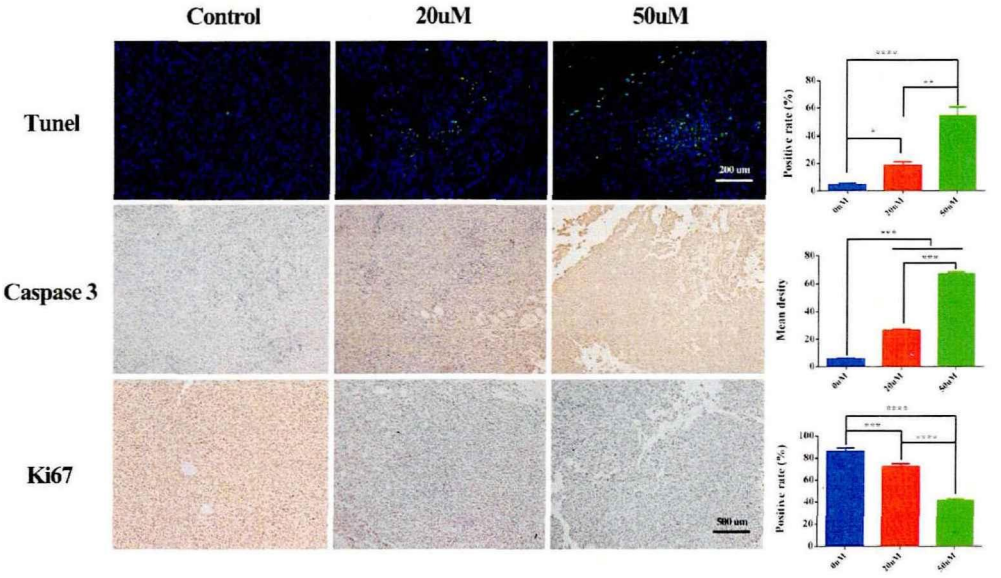

图 4.6.2 组织切片染色

Figure 4.6.2 Tunel staning, immunohistochemical staining results of caspase3 and Ki67

注：从上之下分别为肿瘤组织切片 Tunel 染色、Caspase 3 免疫组化及 Ki67 免疫组化结果及其相对应的定量分析结果。Tunel 染色中绿色代表凋亡细胞，可见随着负载药物的浓度增加，材料周围肿瘤组织凋亡细胞增加；而 caspase 3 和 Ki67 免疫组化结果显示，随着载药浓度增加，凋亡标志蛋白 caspase 3 表达上调，而细胞增殖标志蛋白 Ki67 的表达明显下降。

Note: The results of Tunel staining, Caspase 3 immunohistochemistry and Ki67 immunohistochemistry of tumor tissue sections and their corresponding quantitative analysis results were shown from top to bottom. Green represents the apoptotic tumor cells in Tunel staining,indicating that the number of apoptotic cells in the surrounding tumor tissue of implanted materials increased with the increased concentration of drug. The results of immunohistochemistry of caspase 3 and Ki67 shown that with the increase of drug loading concentration, the expression of apoptosis marker protein caspase 3 was up-regulated, while the expression of cell proliferation marker protein Ki67 was significantly decreased.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

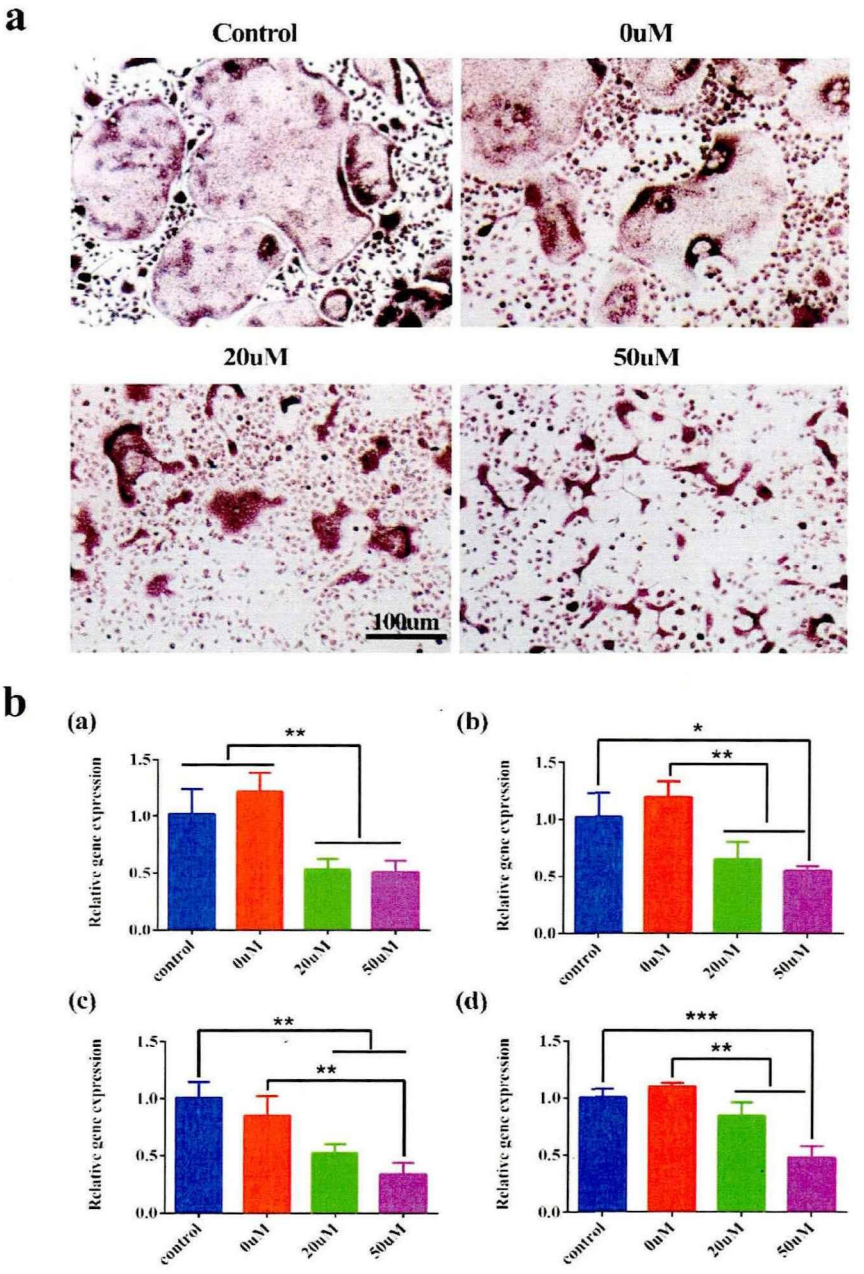

图 4.6.3 体外实验检测破骨细胞活化情况

Figure 4.6.3 RT-PCR results of osteoclast related gene expression

注：图 a 为各组细胞 Trap 染色结果；图 b 为基因表达情况，其中（a）为使用各组材料浸提液刺激诱导的破骨细胞后，MMP-9 的表达情况；图（b）为 Trap 的表达水平；图（c）为 CTR 的表达情况；图（d）为 Cts 的表达情况。可见随着载药浓度的提高，破骨细胞活性及其相关基因的表达均显著降低，提示材料具有显著的抑制破骨细胞活化的效应。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Note：Figure a is the results of Trap staining of osteoclast in each groups; Figure b is the osteoclast-related gene expression level (a) represent the expression of MMP-9 of osteoclasts after stimulation with extracts of each group;(b) represents the expression level of TRAP of each group;(c) shows the expression level of CTR of each group;(d) shows the expression level of Cts.It can be seen that with the increase of drug loading concentration, the expression of osteoclast related genes and the number of formed osteoclast cell were significantly decreased, suggesting that the material has a significant inhibitory effect on osteoclast activation.

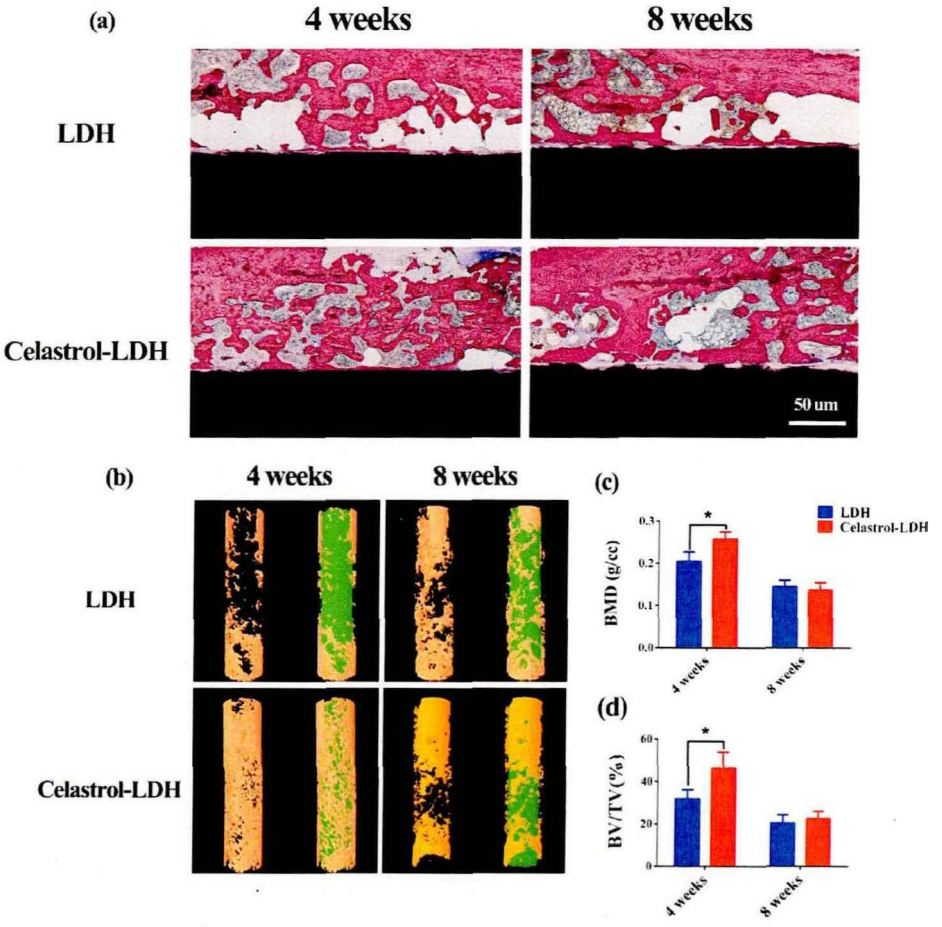

图 4.6.4 各组材料植入大鼠股骨后的成骨效果

Figure 4.6.4 The results of in vivo osteogenesis experiment

注：图（a）为两组材料植入大鼠股骨后的硬组织切片 HE 染色结果；图（b）为 microCT 扫描后三维重建结果，其中黄色部分代表新生骨组织，绿色为植入的棒材；图（c）是 microCT 定量分析的骨密度结果，显示在四周时负载雷公藤红素 LDH 材料较对照组骨密度明显提升，两组结果有统计学差异，而在八周时两组骨密度无差别；图（d）是两组的骨体积分数计量结果，显示在四周时负载雷公藤红素 LDH 材料组 BV/TV 较对照组明显提升，而在八周时

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

无明显差别。

Note：Figure (a) shows the HE staining results of hard tissue sections of the two groups after implanted in femur. Figure (b) shows the results of 3D reconstruction after microCT scaning, in which the yellow part represents the new bone tissue and the green part represents the implanted materials.Figure (c) shows the results of bone mineral density analized through microCT, which shows the BMD of the celastrol-LDH group was significantly improved compared with that of the control group at 4 weeks while there was no difference between the two groups at 8 weeks.Figure (d) is the measurement results of bone volume/total volume in the two groups, showing that BV/TV in the celastrol-LDH group significantly increased at 4 weeks compared with the control group, while there was no significant difference at 8 weeks.

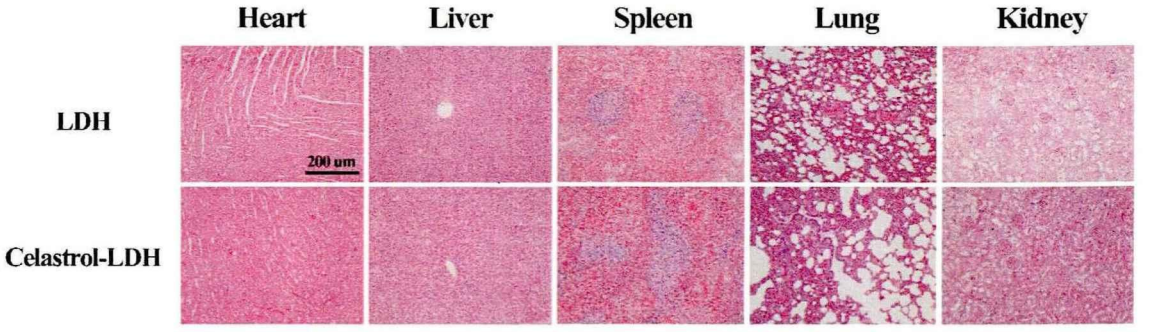

图 4.6.5 各组材料生物安全性评价

Figure 4.6.5 Results of biosafty evaluation of each group

注：从左到右依次为心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏的 HE 切片，可见各重要器官组织结构正常，表明两组材料的生物安全性良好。

Note：HE staining of tissue sections of the heart, liver, spleen, lung and kidney were arranged from left to right.No abnormal structure was found in all the important organs,which indicating satisfied biosafety of the two materials.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结 论

本论文证明了通过水热法生成的Mg-Al LDH涂层可显著提高镁合金的抗腐蚀性能、生物相容性及成骨成血管效果。为了提高其抗肿瘤活性，本研究利用LDH的层间交换作用负载雷公藤红素，体内外研究发现其可通过缓释药物杀死骨肉瘤细胞，且在负载浓度在20 μM到50 μM的浓度范围内不仅可有效杀死骨肉瘤细胞且对正常细胞无明显毒副作用。进一步对其抗肿瘤机制研究发现，其主要通过诱导肿瘤细胞凋亡且激发活性氧的产生发挥作用，而自噬在负载雷公藤红素LDH材料对抗肿瘤细胞的过程中起到拮抗凋亡的作用，当抑制自噬时细胞凋亡进一步增加。体内成骨实验结果显示负载雷公藤红素的LDH材料相较于LDH材料其早期成骨效果显著提升，可能与雷公藤红素抑制破骨细胞活性有关，这有利于材料在早期与骨的牢固结合。综上，本研究以镁合金为基底构建了新型抗肿瘤且促成骨多功能生物材料，通过植入材料缓释药物达到杀死肿瘤细胞，而远期降解后促进骨修复的作用，为镁基金属材料在骨肉瘤治疗领域中的应用打下基础。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

[1] Jaffe N, Puri A, Gelderblom H. Osteosarcoma: evolution of treatment paradigms[J]. Sarcoma,2013,2013:203531.

[2] He X, Gao Z, Xu H, et al. A meta-analysis of randomized control trials of surgical methods with osteosarcoma outcomes[J]. J Orthop Surg Res,2017,12(1):5.

[3] Friend S H, Bernards R, Rogelj S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma[J]. Nature,1986,323(6089):643-646.

[4] Bacci G, Longhi A, Ferrari S, et al. Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase in osteosarcoma of the extremity: experience at Rizzoli on 1421 patients treated over the last 30 years[J]. Tumori,2004,90(5):478-484.

[5] Whelan J S, Jinks R C, Mctiernan A, et al. Survival from high-grade localised extremity osteosarcoma: combined results and prognostic factors from three European Osteosarcoma Intergroup randomised controlled trials[J]. Ann Oncol,2012,23(6):1607-1616.

[6] Altaf S, Enders F, Jeavons E, et al. High-BMI at diagnosis is associated with inferior survival in patients with osteosarcoma: a report from the Children's Oncology Group[J]. Pediatr Blood Cancer,2013,60(12):2042-2046.

[7] Collins M, Wilhelm M, Conyers R, et al. Benefits and adverse events in younger versus older patients receiving neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma: findings from a meta-analysis[J]. J Clin Oncol,2013,31(18):2303-2312.

[8] Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, et al. Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: an analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute[J]. Ann Oncol,2001,12(8):1145-1150.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[9] Stiller C A, Bielack S S, Jundt G, et al. Bone tumours in European children and adolescents, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project[J]. Eur J Cancer,2006,42(13):2124-2135.

[10] Whelan J, Seddon B, Perisoglou M. Management of osteosarcoma[J]. Curr Treat Options Oncol,2006,7(6):444-455.

[11] Jaffe N. Recent advances in the chemotherapy of metastatic osteogenic sarcoma[J]. Cancer,1972,30(6):1627-1631.

[12] Rosen G, Marcove R C, Caparros B, et al. Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery[J]. Cancer,1979,43(6):2163-2177.

[13] Carter S K. The dilemma of adjuvant chemotherapy for osteogenic sarcoma[J]. Cancer Clin Trials,1980,3(1):29-36.

[14] Link M P, Goorin A M, Miser A W, et al. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity[J]. N Engl J Med,1986,314(25):1600-1606.

[15] Meyers P A, Schwartz C L, Krailo M D, et al. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival--a report from the Children's Oncology Group[J]. J Clin Oncol,2008,26(4):633-638.

[16] Waters K D. Treatment of osteosarcoma[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl,1979,5:11-16.

[17] Agarwal M, Anchan C, Shah M, et al. Limb salvage surgery for osteosarcoma: effective low-cost treatment[J]. Clin Orthop Relat Res,2007,459:82-91.

[18] Rosen G, Marcove R C, Caparros B, et al. Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery[J]. Cancer,1979,43(6):2163-2177.

[19] Meyers P A, Heller G, Healey J, et al. Chemotherapy for nonmetastatic

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience[J]. J Clin Oncol,1992,10(1):5-15.

[20] Goorin A M, Schwartzentruber D J, Devidas M, et al. Presurgical chemotherapy compared with immediate surgery and adjuvant chemotherapy for nonmetastatic osteosarcoma: Pediatric Oncology Group Study POG-8651[J]. J Clin Oncol,2003,21(8):1574-1580.

[21] Bielack S S, Kempf-Bielack B, Heise U, et al. Combined modality treatment for osteosarcoma occurring as a second malignant disease. Cooperative German-Austrian-Swiss Osteosarcoma Study Group[J]. J Clin Oncol,1999,17(4):1164.

[22] Meyers P A, Schwartz C L, Krailo M D, et al. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival--a report from the Children's Oncology Group[J]. J Clin Oncol,2008,26(4):633-638.

[23] Longhi A, Ferrari S, Bacci G, et al. Long-term follow-up of patients with doxorubicin-induced cardiac toxicity after chemotherapy for osteosarcoma[J]. Anticancer Drugs,2007,18(6):737-744.

[24] Yu D, Zhang S, Feng A, et al. Methotrexate, doxorubicin, and cisplatinum regimen is still the preferred option for osteosarcoma chemotherapy: A meta-analysis and clinical observation[J]. Medicine (Baltimore),2019,98(19):e15582.

[25] Abe S, Nishimoto Y, Isu K, et al. Preoperative cisplatin for initial treatment of limb osteosarcoma: its local effect and impact on prognosis[J]. Cancer Chemother Pharmacol,2002,50(4):320-324.

[26] Graf N, Winkler K, Betlemovic M, et al. Methotrexate pharmacokinetics and prognosis in osteosarcoma[J]. J Clin Oncol,1994,12(7):1443-1451.

[27] Vijayakumar V, Lowery R, Zhang X, et al. Pediatric osteosarcoma: a single

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

institution's experience[J]. South Med J,2014,107(11):671-675.

[28] Simon M A, Aschliman M A, Thomas N, et al. Limb-salvage treatment versus amputation for osteosarcoma of the distal end of the femur[J]. J Bone Joint Surg Am,1986,68(9):1331-1337.

[29] Bacci G, Ferrari S, Lari S, et al. Osteosarcoma of the limb. Amputation or limb salvage in patients treated by neoadjuvant chemotherapy[J]. J Bone Joint Surg Br,2002,84(1):88-92.

[30] Mavrogenis A F, Abati C N, Romagnoli C, et al. Similar survival but better function for patients after limb salvage versus amputation for distal tibia osteosarcoma[J]. Clin Orthop Relat Res,2012,470(6):1735-1748.

[31] Aksnes L H, Bauer H C, Jebsen N L, et al. Limb-sparing surgery preserves more function than amputation: a Scandinavian sarcoma group study of 118 patients[J]. J Bone Joint Surg Br,2008,90(6):786-794.

[32] Enneking W F, Spanier S S, Goodman M A. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma[J]. Clin Orthop Relat Res,1980(153):106-120.

[33] Gherlinzoni F, Picci P, Bacci G, et al. Limb sparing versus amputation in osteosarcoma. Correlation between local control, surgical margins and tumor necrosis: Istituto Rizzoli experience[J]. Ann Oncol,1992,3 Suppl 2:S23-S27.

[34] Enneking W F. A system of staging musculoskeletal neoplasms[J]. Instr Course Lect,1988,37:3-10.

[35] Bertrand T E, Cruz A, Binitie O, et al. Do Surgical Margins Affect Local Recurrence and Survival in Extremity, Nonmetastatic, High-grade Osteosarcoma?[J]. Clin Orthop Relat Res,2016,474(3):677-683.

[36] 郭卫，牛晓辉，肖建如，等. 骨肉瘤临床循证诊疗指南[J]. 中华骨与关节外科杂志,2018,11(04):288-301.

[37] Ma H, Luo J, Sun Z, et al. 3D printing of biomaterials with mussel-inspired

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

nanostructures for tumor therapy and tissue regeneration[J]. Biomaterials,2016,111:138-148.

[38] Dang W, Ma B, Li B, et al. 3D printing of metal-organic framework nanosheets-structured scaffolds with tumor therapy and bone construction[J]. Biofabrication,2020,12(2):25005.

[39] Zhuang H, Lin R, Liu Y, et al. Three-Dimensional-Printed Bioceramic Scaffolds with Osteogenic Activity for Simultaneous Photo/Magnetothermal Therapy of Bone Tumors[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering,2019,5(12):6725-6734.

[40] Ma H, Feng C, Chang J, et al. 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy[J]. Acta biomaterialia,2018,79:37-59.

[41] Dang W, Li T, Li B, et al. A bifunctional scaffold with CuFeSe2 nanocrystals for tumor therapy and bone reconstruction[J]. Biomaterials,2018,160:92-106.

[42] Zhang W, Gu J, Li K, et al. A hydrogenated black TiO2 coating with excellent effects for photothermal therapy of bone tumor and bone regeneration[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl,2019,102:458-470.

[43] Lu J, Yang F, Ke Q, et al. Magnetic nanoparticles modified-porous scaffolds for bone regeneration and photothermal therapy against tumors[J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,2018,14(3):811-822.

[44] Windhagen H, Radtke K, Weizbauer A, et al. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study[J]. Biomed Eng Online,2013,12:62.

[45] Lee J W, Han H S, Han K J, et al. Long-term clinical study and multiscale analysis of in vivo biodegradation mechanism of Mg alloy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2016,113(3):716-721.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[46] Nan M, Yangmei C, Bangcheng Y. Magnesium metal—A potential biomaterial with antibone cancer properties[J]. Journal of biomedical materials research. Part A,2014,102(8):2644-2651.

[47] Hakimi O, Ventura Y, Goldman J, et al. Porous biodegradable EW62 medical implants resist tumor cell growth[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl,2016,61:516-525.

[48] Kim J, Gilbert J L. In vitro cytotoxicity of galvanically coupled magnesium-titanium particles on human osteosarcoma SAOS2 cells: A potential cancer therapy[J]. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials,2019,107(1):178-189.

[49] Dai Y, Tang Y, Xu X, et al. Evaluation of the mechanisms and effects of Mg–Ag–Y alloy on the tumor growth and metastasis of the MG63 osteosarcoma cell line[J]. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials,2019,107(8):2537-2548.

[50] Li M, Wang W, Zhu Y, et al. Molecular and cellular mechanisms for zoledronic acid-loaded magnesium-strontium alloys to inhibit giant cell tumors of bone[J]. Acta Biomater,2018,77:365-379.

[51] Li M, Yao M, Wang W, et al. Nitrogen-containing bisphosphonate-loaded micro-arc oxidation coating for biodegradable magnesium alloy pellets inhibits osteosarcoma through targeting of the mevalonate pathway[J]. Acta Biomater,2021,121:682-694.

[52] Puleo D A, Huh W W. Acute toxicity of metal ions in cultures of osteogenic cells derived from bone marrow stromal cells[J]. J Appl Biomater,1995,6(2):109-116.

[53] Jacobs J J, Gilbert J L, Urban R M. Corrosion of metal orthopaedic implants[J]. J Bone Joint Surg Am,1998,80(2):268-282.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[54] Jacobs J J, Hallab N J, Skipor A K, et al. Metal degradation products: a cause for concern in metal-metal bearings?[J]. Clin Orthop Relat Res,2003(417):139-147.

[55] Niki Y, Matsumoto H, Suda Y, et al. Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synoviocytes and bone marrow macrophages[J]. Biomaterials,2003,24(8):1447-1457.

[56] Bi Y, Van De Motter R R, Ragab A A, et al. Titanium particles stimulate bone resorption by inducing differentiation of murine osteoclasts[J]. J Bone Joint Surg Am,2001,83(4):501-508.

[57] Nagels J, Stokdijk M, Rozing P M. Stress shielding and bone resorption in shoulder arthroplasty[J]. J Shoulder Elbow Surg,2003,12(1):35-39.

[58] Staiger M P, Pietak A M, Huadmai J, et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review[J]. Biomaterials,2006,27(9):1728-1734.

[59] Wang J L, Xu J K, Hopkins C, et al. Biodegradable Magnesium-Based Implants in Orthopedics-A General Review and Perspectives[J]. Adv Sci (Weinh),2020,7(8):1902443.

[60] Zhao D, Witte F, Lu F, et al. Current status on clinical applications of magnesium-based orthopaedic implants: A review from clinical translational perspective[J]. Biomaterials,2017,112:287-302.

[61] Zhang Y, Xu J, Ruan Y C, et al. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats[J]. Nat Med,2016,22(10):1160-1169.

[62] Uddin M S, Hall C, Murphy P. Surface treatments for controlling corrosion rate of biodegradable Mg and Mg-based alloy implants[J]. Sci Technol Adv Mater,2015,16(5):53501.

[63] Wang H X, Guan S K, Wang X, et al. In vitro degradation and mechanical

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

integrity of Mg-Zn-Ca alloy coated with Ca-deficient hydroxyapatite by the pulse electrodeposition process[J]. Acta Biomater,2010,6(5):1743-1748.

[64] Lin Z, Wu S, Liu X, et al. A surface-engineered multifunctional TiO2 based nano-layer simultaneously elevates the corrosion resistance, osteoconductivity and antimicrobial property of a magnesium alloy[J]. Acta Biomater,2019,99:495-513.

[65] Gu X N, Li N, Zhou W R, et al. Corrosion resistance and surface biocompatibility of a microarc oxidation coating on a Mg-Ca alloy[J]. Acta Biomater,2011,7(4):1880-1889.

[66] Gu X N, Zheng W, Cheng Y, et al. A study on alkaline heat treated Mg-Ca alloy for the control of the biocorrosion rate[J]. Acta Biomater,2009,5(7):2790-2799.

[67] Li J, Song Y, Zhang S, et al. In vitro responses of human bone marrow stromal cells to a fluoridated hydroxyapatite coated biodegradable Mg-Zn alloy[J]. Biomaterials,2010,31(22):5782-5788.

[68] Song Y, Zhang S, Li J, et al. Electrodeposition of Ca-P coatings on biodegradable Mg alloy: in vitro biomineralization behavior[J]. Acta Biomater,2010,6(5):1736-1742.

[69] Peng F, Li H, Wang D, et al. Enhanced Corrosion Resistance and Biocompatibility of Magnesium Alloy by Mg-Al-Layered Double Hydroxide[J]. ACS Appl Mater Interfaces,2016,8(51):35033-35044.

[70] Lewallen E A, Riester S M, Bonin C A, et al. Biological strategies for improved osseointegration and osteoinduction of porous metal orthopedic implants[J]. Tissue Eng Part B Rev,2015,21(2):218-230.

[71] Trivedi D V, Muretta J M, Swenson A M, et al. Magnesium impacts myosin V motor activity by altering key conformational changes in the

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mechanochemical cycle[J]. Biochemistry,2013,52(27):4710-4722.

[72] Hartwig A. Role of magnesium in genomic stability[J]. Mutat Res,2001,475(1-2):113-121.

[73] Blaszczyk U, Duda-Chodak A. Magnesium: its role in nutrition and carcinogenesis[J]. Rocz Panstw Zakl Hig,2013,64(3):165-171.

[74] Zreiqat H, Howlett C R, Zannettino A, et al. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants[J]. J Biomed Mater Res,2002,62(2):175-184.

[75] Zhai Z, Qu X, Li H, et al. The effect of metallic magnesium degradation products on osteoclast-induced osteolysis and attenuation of NF-kappaB and NFATc1 signaling[J]. Biomaterials,2014,35(24):6299-6310.

[76] Laires M J, Monteiro C P, Bicho M. Role of cellular magnesium in health and human disease[J]. Front Biosci,2004,9:262-276.

[77] Wolf F I, Cittadini A. Chemistry and biochemistry of magnesium[J]. Mol Aspects Med,2003,24(1-3):3-9.

[78] Moravej M, Mantovani D. Biodegradable metals for cardiovascular stent application: interests and new opportunities[J]. Int J Mol Sci,2011,12(7):4250-4270.

[79] Sideris P J, Nielsen U G, Gan Z, et al. Mg/Al ordering in layered double hydroxides revealed by multinuclear NMR spectroscopy[J]. Science,2008,321(5885):113-117.

[80] Choy J H, Jung J S, Oh J M, et al. Layered double hydroxide as an efficient drug reservoir for folate derivatives[J]. Biomaterials,2004,25(15):3059-3064.

[81] Li D, Zhang Y T, Yu M, et al. Cancer therapy and fluorescence imaging using the active release of doxorubicin from MSPs/Ni-LDH folate targeting nanoparticles[J]. Biomaterials,2013,34(32):7913-7922.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[82] Ameena S V, Sankar R, Johnson A P, et al. Advanced drug delivery applications of layered double hydroxide[J]. J Control Release,2020,330:398-426.

[83] Riaz U, Ashraf S M. Double layered hydroxides as potential anti-cancer drug delivery agents[J]. Mini Rev Med Chem,2013,13(4):522-529.

[84] Ray S S, Mosangi D, Pillai S. Layered Double Hydroxide-Based Functional Nanohybrids as Controlled Release Carriers of Pharmaceutically Active Ingredients[J]. The Chemical Record,2018,18(7-8):913-927.

[85] Ma K, Li Y, Wang Z, et al. Core-Shell Gold Nanorod@Layered Double Hydroxide Nanomaterial with Highly Efficient Photothermal Conversion and Its Application in Antibacterial and Tumor Therapy[J]. ACS Appl Mater Interfaces,2019,11(33):29630-29640.

[86] Zuo H, Chen W, Cooper H M, et al. A Facile Way of Modifying Layered Double Hydroxide Nanoparticles with Targeting Ligand-Conjugated Albumin for Enhanced Delivery to Brain Tumour Cells[J]. ACS Appl Mater Interfaces,2017,9(24):20444-20453.

[87] Zhang H, Zhu Y, Sun X, et al. Curcumin-Loaded Layered Double Hydroxide Nanoparticles-Induced Autophagy for Reducing Glioma Cell Migration and Invasion[J]. J Biomed Nanotechnol,2016,12(11):2051-2062.

[88] Corson T W, Crews C M. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials[J]. Cell,2007,130(5):769-774.

[89] Kashyap D, Sharma A, Tuli H S, et al. Molecular targets of celastrol in cancer: Recent trends and advancements[J]. Crit Rev Oncol Hematol,2018,128:70-81.

[90] Yadav P, Jaswal V, Sharma A, et al. Celastrol as a pentacyclic triterpenoid with chemopreventive properties[J]. Pharm Pat Anal,2018,7(4):155-167.

[91] Cascao R, Fonseca J E, Moita L F. Celastrol: A Spectrum of Treatment

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Opportunities in Chronic Diseases[J]. Front Med (Lausanne),2017,4:69.

[92] Shi J, Li J, Xu Z, et al. Celastrol: A Review of Useful Strategies Overcoming its Limitation in Anticancer Application[J]. Front Pharmacol,2020,11:558741.

[93] Liu X, Zhao P, Wang X, et al. Celastrol mediates autophagy and apoptosis via the ROS/JNK and Akt/mTOR signaling pathways in glioma cells[J]. J Exp Clin Cancer Res,2019,38(1):184.

[94] Chiang K C, Tsui K H, Chung L C, et al. Topoisomerase inhibitors modulate gene expression of B-cell translocation gene 2 and prostate specific antigen in prostate carcinoma cells[J]. PLoS One,2014,9(2):e89117.

[95] Rajendran P, Li F, Shanmugam M K, et al. Celastrol suppresses growth and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma through the modulation of STAT3/JAK2 signaling cascade in vitro and in vivo[J]. Cancer Prev Res (Phila),2012,5(4):631-643.

[96] Zhang T, Li Y, Yu Y, et al. Characterization of celastrol to inhibit hsp90 and cdc37 interaction[J]. J Biol Chem,2009,284(51):35381-35389.

[97] Jang S Y, Jang S W, Ko J. Celastrol inhibits the growth of estrogen positive human breast cancer cells through modulation of estrogen receptor alpha[J]. Cancer Lett,2011,300(1):57-65.

[98] Li Z, Wu X, Li J, et al. Antitumor activity of celastrol nanoparticles in a xenograft retinoblastoma tumor model[J]. Int J Nanomedicine,2012,7:2389-2398.

[99] Tan Y, Zhu Y, Zhao Y, et al. Mitochondrial alkaline pH-responsive drug release mediated by Celastrol loaded glycolipid-like micelles for cancer therapy[J]. Biomaterials,2018,154:169-181.

[100] Yin J, Wang P, Yin Y, et al. Optimization on biodistribution and antitumor

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

activity of tripterine using polymeric nanoparticles through RES saturation[J]. Drug Deliv,2017,24(1):1891-1897.

[101] Xiao Y, Liu J, Guo M, et al. Synergistic combination chemotherapy using carrier-free celastrol and doxorubicin nanocrystals for overcoming drug resistance[J]. Nanoscale,2018,10(26):12639-12649.

[102] Li H Y, Zhang J, Sun L L, et al. Celastrol induces apoptosis and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells: an in vitro and in vivo study[J]. Cell Death Dis,2015,6:e1604.

[103] Zhuang X, Zhang H, Li X, et al. Differential effects on lung and bone metastasis of breast cancer by Wnt signalling inhibitor DKK1[J]. Nat Cell Biol,2017,19(10):1274-1285.

[104] Idris A I, Krishnan M, Simic P, et al. Small molecule inhibitors of IkappaB kinase signaling inhibit osteoclast formation in vitro and prevent ovariectomy-induced bone loss in vivo[J]. FASEB J,2010,24(11):4545-4555.

[105] Nanjundaiah S M, Venkatesha S H, Yu H, et al. Celastrus and its bioactive celastrol protect against bone damage in autoimmune arthritis by modulating osteoimmune cross-talk[J]. J Biol Chem,2012,287(26):22216-22226.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中英文对照缩略词表

(Commentary of English Abbreviation)

简写	英文全称	中文名称
LDH	Layered double hydroxide	层状双氢氧化物
ROS	Reactive oxide species	活性氧
EDS	Energy dispersive spectxrmleter	能量射散谱仪
XRD	X-ray diffraction	X 射线衍射仪
SEM	Scanning electron microscope	扫描电镜
HUVECs	Human vascular endothelial cells	人血管内皮细胞
VEGF	Vascular endothelial cell growth factor	血管内皮细胞生长因子
Rankl	Receptor activator of the NF-KB ligand	人核因子 KB 受体活化因子配体
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	集落刺激因子

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

攻读博士学位期间成果

1. 论文发表情况

1) **Shi Cheng**, Jin Ke, Mengyu Yao, Hongwei Shao, Jielong Zhou, Ming Wang, Xiongfa Ji, Guoqing Zhong, Feng Peng*, Limin Ma*, Yu Zhang*. Improving osteointegration and angiogenesis of strontium-incorporated 3D-printed Tantalum scaffold via bioinspired polydopamine coating (Accept, Journal of Materials Science & Technology, June 2020);

2) **Shi Cheng**, Dongdong Zhang, Mei Li, Xuanyong Liu,d, Yu Zhang*, Shi Qian*,Feng Peng*, Osteogenesis, angiogenesis and immune response of Mg-Al layered double hydroxide coating on pure Mg （Bioactive materials, 2020 Aug 11;6(1):91-105,DOI : 10.1016/j.bioact mat.2020.07.014.);

3) **Shi Cheng**, **Wanshun Wang**, Donghui Wang, Binglin Li, Jielong Zhou, Dongdong Zhang, Lidan Liu, Feng Peng*, Xuanyong Liu*, Yu Zhang*, Comparison of Mg(OH)2, MgF2 and hydroxyapatite coated Mg on degradation and osteointegration an in vitro and in vivo study(Biomaterial Science, 2020 May 20. DOI: 10.1039/d0bm00467g);

4) **Shi Cheng**, Donghui Wang, Jin Ke, Limin Ma, Jielong Zhou, Hongwei Shao, Hongqin Zhu, Lidan Liu, Yu Zhang*, Feng Peng*, Xuanyong Liu*, Improved in vitro angiogenic behavior of human umbilical vein endothelial cells with oxidized polydopamine coating (COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTER FACES, 2020 Jun 6;194:111176. Doi:10.1016/j.colsurfb. 2020. 111176);

5) **Shi Cheng**, **Xiaochuan Li**, Linghan Lin, Zhiwei Jia, Yachao Zhao, Deli Wang*, Dike Ruan*, Yu Zhang*, Identification of Aberrantly Expressed Genes during Aging in Rat Nucleus Pulposus Cells (Stem Cells International. 2019 Jul 10;2019:2785207. Doi: 10.1155/2019/2785 207.)

6) 程实，柯晋，周洁龙，陈旭琼，姚孟宇，傅光涛，杨涛，张余，经皮置钉开放微波消融术治疗脊柱转移瘤[J].中华骨科杂志, 2020 年 40 卷 16 期，DOI：10.3760/cma.j.cn121113-20200330-00198

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2. 参加国内学术会议

1）中华医学会第二十届骨科学术会议暨第十一届 COA 国际学术大会会议，厦门，2018 年 11 月 17-20 日

2）骨与软组织肿瘤微波专项能力培训暨国家级继续教育学习班，广州，2019 年 6 月 21-23 日

3. 所获奖励

1) 2020 年 南方医科大学 优秀研究生

2) 2020 年 南方医科大学 一等奖学金

3) 2019 年 南方医科大学 优秀研究生

4) 2019 年 南方医科大学 一等奖学金

5) 2018 年 南方医科大学 一等奖学金

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

致 谢

时光荏苒，岁月如梭，在我怀着激动的心情写下这些文字的时候才意识到博士生涯即将结束，而这也意味着自己即将告别医学生身份转变为一名真正的临床医生。回顾自己的博士生活，有过迷茫、辛酸、焦虑、疲惫，但更多的是充实、感动、欢乐和踏实。而这些也构成了博士生活中的酸甜苦辣，让我深深体会不经历风雨怎能见彩虹的道理。在此，我想对各位帮助过我的老师、师兄弟朋友一一道谢。

首先特别感谢我的导师张余教授对我的悉心指导和帮助，能入到您的门下我感到非常荣幸，在临床工作中您以身作则，经常奋斗到深夜甚至凌晨，您精湛的手术技术、渊博的学识、高远的见识和广阔的心胸使我获益匪浅，并激励着我在工作和学习中更加努力。您对学生倍加爱护，还常常教导我们做人的道理，要团结互助并且善待他人，在学术上要严谨务实，您的谆谆教诲学生铭记在心且感激不尽！

此外，我还要感谢骨科实验室李梅老师、王晓岚老师、马立敏老师、楚晓老师、边东老师对我的指导帮助，尤其是实验室王晓岚老师、李梅老师和马立敏老师对我实验技术和课题设计上指导良多，非常感谢。

特别感谢彭峰博士后和纪雄发博士后对我课题的悉心指导和帮助，两位师兄丰富的科研知识和努力拼搏的奋斗精神让我获益良多，你们是我的榜样。

感谢柯晋、姚孟宇、周洁龙、邵宏伟、钟国庆、王鸣、曾小龙、徐子杨、罗国文、何玥、丘龙海等师兄弟的帮助，你们让我感受到了骨科大家庭的温暖，让我三年的博士生活充满色彩，祝福你们前程似锦，幸福美满。

感谢骨科中心傅广涛医师、黄文汉医师、张弛医师、杨涛主治医师、肖进主任和张晓静、张瑞英护士长等各位老师的悉心指导帮助， 您们是我的榜样，让我学习到了很多临床理论和技能。

感谢医学研究部林秋雄主任、陈秀云老师、朱老师和候老师的指导和包容，有了您们的帮助我的实验才得以顺利进行。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

最后要对我的父母表达最深的谢意，感激您们为我默默的付出和支持，您们辛苦了，作为子女最开心的是您们能因为我的一点点进步而开心骄傲，您们是我在外求学奋斗时最深的牵挂，衷心的祝愿您们身体健康、幸福快乐。感谢其他亲朋对我学习、生活的关心和无私帮助以及在读博历程中帮助过我的人，衷心的祝愿你们身体健康，幸福美满。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

南方医科大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。除与外单位合作项目将予以明确方式规定外，本研究已发表与未发表成果的知识产权均归属南方医科大学。

本人承诺承担本声明的法律效果。

作者签名：程实　　日期：2021年5月19日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权南方医科大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于（请在以下相应方框内打“√”）：

1、保密□，在___年解密后适用本授权书。

2、不保密☑。

作者签名：程实　　日期：2021年5月19日

导师签名：　　日期：2021年5月19日

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net