

# 新西兰兔骨髓间充质干细胞-庆大霉素-藻酸钙三维缓释培养体系的构建及体外评价

沈 锋<sup>1</sup>, 康一凡<sup>1</sup>, 扶晓明<sup>2</sup>, 唐 昊<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433

2. 解放军 169 中心医院骨科, 衡阳 421000

**[摘要]** **目的** 构建新西兰兔骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)-庆大霉素-藻酸钙三维缓释培养体系, 研究 BMSCs 的生长和分化情况。**方法** 分别构建 BMSCs-藻酸钙三维培养体系(W 组)及 BMSCs-庆大霉素-藻酸钙三维缓释培养体系(U 组), 在 37℃、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 培养液为高糖 DMEM(含 15% 胎牛血清、10 ng/mL 转化生长因子  $\beta_1$ ), 隔日换液, 观察细胞形态变化及凝珠形态变化。第 2、4、6 周对凝珠进行 H-E 染色、甲苯胺蓝染色及 II 型胶原染色。**结果** 两组三维凝珠培养第 10 天局部有细胞团簇形成; 第 21 天可见大量细胞团簇形成, BMSCs 多保持圆球形或类球形。两组细胞增殖及生长能力差异无统计学意义( $P>0.05$ )。培养 2 周, 两组凝珠甲苯胺蓝染色均呈阳性, 但无明显细胞外基质形成, II 型胶原抗体染色均呈弱阳性; 培养 4 周, 两组凝珠甲苯胺蓝染色均显示位于细胞团块外周的细胞呈蓝色, 中央的细胞染色不明显, 细胞团外周蓝色染色物质较少, 中央有较多紫红色物质, II 型胶原抗体染色均呈强阳性。H-E 染色、甲苯胺蓝染色及 II 型胶原抗体染色均未发现两组 BMSCs 的转化生长有差异, 增殖数量差异也无统计学意义。**结论** 适量的庆大霉素局部缓释并未明显影响 BMSCs 的生长及转化, 又可达到最小抑菌浓度; 庆大霉素对 BMSCs 及软骨细胞超微结构的影响有待进一步探讨。

**[关键词]** 骨髓; 间质干细胞; 庆大霉素类; 藻酸钙; 细胞培养技术

**[中图分类号]** R 329.29

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2013)05-0482-06

## Establishment of New Zealand rabbit BMSCs-gentamicin-calcium alginate 3D sustained-release system and *in vitro* evaluation

SHEN Feng<sup>1</sup>, KANG Yi-fan<sup>1</sup>, FU Xiao-ming<sup>2</sup>, TANG Hao<sup>1\*</sup>

1. Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Orthopaedics, No. 169 Hospital of PLA, Hengyang 421000, Hunan, China

**[Abstract]** **Objective** To establish a New Zealand rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)-gentamicin-calcium alginate 3D sustained-release culture system and to study the growth and differentiation of BMSCs. **Methods** BMSCs-calcium alginate 3D culture system (W group) and BMSCs-gentamicin-calcium alginate 3D sustained-release culture system (U group) were constructed and were cultured with HG-DMEM (15% FBS, 10 ng/mL TGF- $\beta_1$ ) under saturated humidity, 37℃ and at 5% CO<sub>2</sub>, with the culture medium changed on a daily basis, and the cell morphology and microsphere morphology changes were observed. H-E staining, toluidine blue staining and type II collagen staining were performed for the microspheres on week 2, 4, and 6. **Results** Cell clusters were formed locally in the two groups after the 3D microspheres were cultured for 10 days. A large number of cell clusters were formed after 21 days, and BMSCs maintained a spherical or approximate spherical shape. There was no significant difference in cell proliferation or growth between the two groups ( $P>0.05$ ). After a 2-week culture, toluidine blue staining of microspheres showed positive staining in both groups, but with no obvious extracellular matrix formation, and staining for collagen type II antibody was weakly positive. After a 4-week culture, toluidine blue staining was obvious in the periphery of the cell microspheres in both groups, but the staining was unapparent in the center; extracellular matrix around the cell clusters had less blue colored substance, and the central cell clusters had more mauve substance; collagen

**[收稿日期]** 2013-01-29

**[接受日期]** 2013-04-18

**[基金项目]** 上海市自然科学基金(10411960400). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai (10411960400).

**[作者简介]** 沈 锋, 博士生, 主治医师. E-mail: feng\_sh98@qq.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161696, E-mail: tanghao1978@163.com

type II staining was strongly positive in both groups. **Conclusion** Local sustained-release of appropriate amount of gentamicin has no noticeable effect on the growth and transformation of BMSCs while reaching the minimum inhibitory concentration. The influence of Gentamicin on ultrastructure of BMSCs and chondrocytes remains to be further investigated.

**[Key words]** bone marrow; mesenchymal stem cells; gentamicins; calcium alginate; cell culture techniques

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(5): 482-487]

兔骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)-藻酸钙三维培养体系的构建已有很多成功的范例,通过三维培养更易诱导细胞向软骨细胞分化生长,逐步形成新生软骨,以达到修复软骨缺损的目的<sup>[1-4]</sup>。我们前期的实验已成功研制出庆大霉素-藻酸钙缓释微球,并测定了微球的庆大霉素缓释水平,但当 BMSCs、庆大霉素、藻酸钙 3 个元素整合在一起时,持续的庆大霉素释放是否会对 BMSCs 向软骨细胞转化造成影响,甚至抑制细胞的生长,目前尚无定论。

本研究拟采用庆大霉素-藻酸钙三维缓释凝珠作为新西兰兔 BMSCs 的细胞培养支架进行三维立体培养,探讨 BMSCs 在上述三维培养体系中的生长及增殖能力,为后期的动物体内修复软骨缺损研究奠定实验基础。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 藻酸钠粉(Sigma 公司,美国);CaCl<sub>2</sub>,庆大霉素粉,兔抗人 II 型胶原抗体,羊抗兔二抗(武汉生工生物科技有限公司);高糖 DMEM 培养液(Gibco 公司,美国);转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ , Peprotech 公司,英国);超纯水系统(Labconco 公司,美国);电子天平(Ohaus 公司,美国);紫外分光光度计(东芝公司,日本);60 型实验室酸碱度测试仪(南京庚辰科学仪器公司);CO<sub>2</sub> 细胞孵箱(Heraeus 公司,德国);IBE2003 CONIC 倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂);扫描电子显微镜(FEI 公司,荷兰)。

### 1.2 主要实验试剂的配制

1.2.1 藻酸钠凝胶 电子天平称取 5.00 g 藻酸钠,溶于 100 mL 三蒸水中,取 NaOH 溶液用酸碱度测试仪将 pH 值调到 7.40,加入 1 mol/L 羟乙基呱嗪乙硫磺酸(HEPES)溶液 2 mL,使 HEPES 浓度为 20 mmol/L。称取 0.875 5 g NaCl 溶于藻酸钠溶液中,浓度为 0.15 mol/L,高压灭菌,常温保存。

1.2.2 庆大霉素-藻酸钠凝胶 取庆大霉素 3.0 g,加 10 mL 双蒸水溶解,用 1 mol/L NaOH 滴定至 pH 值为 7.40,加入 HEPES 液 5  $\mu$ L,加入 0.043 8 g NaCl,充分搅拌混匀。再加入 20 mL 的藻酸钠凝

胶,配制成 30 mL 的庆大霉素-藻酸钠凝胶,其中庆大霉素浓度为 10%。密封瓶包装好后送钴-60 辐照消毒,剂量 3 kGy,常温保存。

1.2.3 CaCl<sub>2</sub> 溶液 电子天平称取 22.644 g CaCl<sub>2</sub>,溶于 500 mL 三蒸水中,取 NaOH 溶液用酸碱度测试仪将 pH 值调到 7.40,加入 1 mol/L HEPES 溶液 2.5 mL,使其终浓度为 5 mmol/L,高压灭菌,常温保存。

1.3 BMSCs-藻酸钠凝胶悬液制备 取已培养的第 2 代新西兰幼兔[上海甲干生物科技有限公司,许可证号:SCXK(沪)2010-0028]BMSCs,将密度为  $5 \times 10^9$ /L 的新西兰幼兔 BMSCs 悬浮液 0.5 mL 和藻酸钠凝胶 2 mL 充分混匀,制成 BMSCs-藻酸钠胶状悬液,置入 37℃、饱和湿度条件下的 CO<sub>2</sub> 孵育箱中进行短暂培养,备用。

1.4 BMSCs-庆大霉素-藻酸钠凝胶悬液制备 取已培养的第二代新西兰幼兔 BMSCs,将密度为  $5 \times 10^9$ /L 的新西兰幼兔 BMSCs 悬浮液 0.5 mL 和庆大霉素-藻酸钠凝胶 2 mL 充分混匀,制成 BMSCs-庆大霉素-藻酸钠胶状悬液,置入 37℃、饱和湿度条件下的 CO<sub>2</sub> 孵育箱中进行短暂培养,备用。

1.5 BMSCs-藻酸钙凝珠三维培养体系(W 组)的构建 用玻璃滴管吸取已孵育 30 min 的 BMSCs-藻酸钠胶状悬液,尽量避免产生气泡,于液面 5 cm 高度处滴入盛有 20 mL CaCl<sub>2</sub>(5 mmol/L HEPES, pH 7.40)溶液的玻璃培养皿(1 mL 约 25 滴),凝珠聚合 10 min,可见凝珠呈现乳白色或透明淡黄色,轻轻晃动溶液避免培养皿内凝珠发生聚集成团块,吸尽 CaCl<sub>2</sub> 溶液,20 mL 0.15 mol/L NaCl 溶液冲洗 2 次,将 BMSCs-藻酸钙凝珠移入 6 孔培养板中,每孔加 3 mL 高糖 DMEM(15% 胎牛血清、VitC 50 mg/mL、地塞米松  $10^{-8}$  mmol/L、TGF- $\beta_1$  10 ng/mL)不完全诱导培养液,培养箱(培养条件:37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度)孵育,隔日换液。

1.6 BMSCs-庆大霉素-藻酸钙凝珠三维缓释培养体系(U 组)的构建 用玻璃滴管抽取已孵育 30 min 的 BMSCs-庆大霉素-藻酸钠胶状悬液,余同 W 组方法制成 BMSCs-庆大霉素-藻酸钙缓释凝珠,培养箱

孵育,隔日换液。

1.7 观察指标 (1)肉眼观察细胞形态变化及凝珠形态变化。(2)凝珠的倒置相差显微镜下观察。(3)凝珠在低温环境扫描电镜下观察。(4)三维培养体系内细胞活力测定:每隔2 d从6孔板中随机取出2枚凝珠,加入0.02%乙二胺四乙酸溶液1 mL,溶解凝珠,300×g速度离心10 min,去上清液,获得的藻酸钠细胞悬液加入离心管内,制成细胞悬液。取0.1 mL细胞悬液,PBS稀释为1 mL。细胞计数方法及公式:用吸管吸取部分细胞悬液,滴两滴入细胞计数板,置于倒置相差显微镜下进行细胞总数计数。细胞总数=显微镜下4个象限细胞数之和/ $4 \times 10^4 \times$ 毫升数。计算活细胞比率:0.4%锥虫蓝染色,死的BMSCs为蓝染细胞,活细胞不染色,用血细胞计数板计数,计算活细胞比率。根据数据绘制BMSCs细胞生长曲线。(5)凝珠染色方法:取培养第2、4、6周的凝珠每组各6枚,石蜡包埋、切片。行H-E染色,观察细胞在支架内的分布情况;甲苯胺蓝染色,了解细胞与外周基质染色情况;采用免疫组化方法检测Ⅱ型胶原的表达。

1.8 统计学处理 用SAS 13.0软件进行 $t$ 检验,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 三维培养凝珠的大体形态 藻酸钠凝胶滴入 $\text{CaCl}_2$ 溶液中即可形成透明的球状液滴,漂浮在溶液表层,经与 $\text{Ca}^{2+}$ 充分交联聚合后,凝珠逐渐变为乳

白色,质地均一,有一定的强度和弹性,并沉入液体底层。BMSCs-藻酸钙凝珠与BMSCs-庆大霉素-藻酸钙凝珠的直径均为3~5 mm;凝珠浸入DMEM后即变为浅红色,说明凝珠具有丰富的孔隙及良好的亲水性;长时间浸泡于DMEM中不发生崩解(图1)。

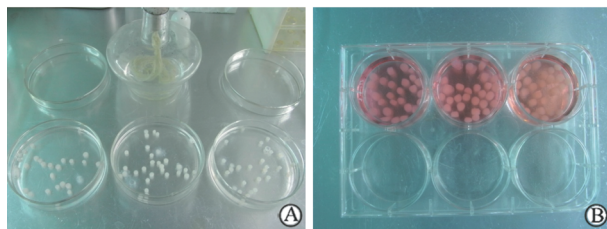


图1 BMSCs-庆大霉素-藻酸钙凝珠大体观察

Fig1 Images of bone mesenchymal stem cells (BMSCs)-gentamicin-calcium alginate microspheres

Microspheres gradually become milky, homogeneous in texture, with certain strength and elasticity, sinking into the liquid underlying (A). Diameter is 3-5 mm. The microspheres gradually become pale red after placed into 15% FBS-HG-DMEM medium, showing good hydrophilic feature (B)

2.2 三维培养凝珠的显微镜下形态 W组接种后大量的单个BMSCs均匀地分散于三维凝胶的各层中,细胞形态呈圆球形或椭圆形;从转入三维培养的第5天起,细胞出现分裂增殖,培养第10天局部有细胞团簇形成;到培养第21天,有大量细胞团簇形成。U组细胞生长过程与W组类似。在培养过程中,W组(图2A,2C)和U组(图2B,2D)BMSCs外形多保持圆球形或类球形。

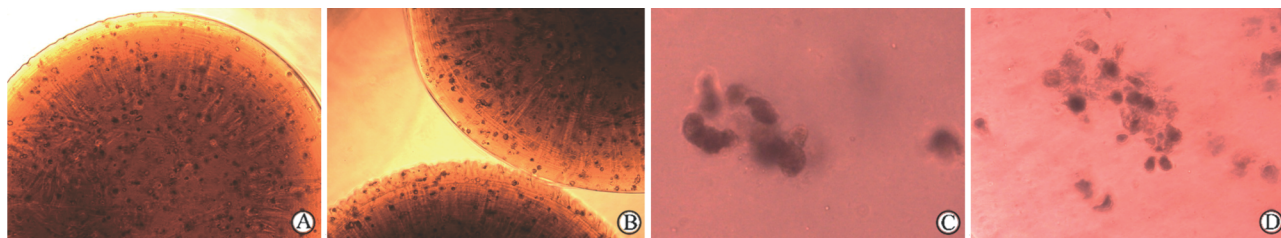


图2 倒置显微镜下BMSCs-庆大霉素-藻酸钙凝珠观察

Fig 2 Bone mesenchymal stem cells (BMSCs)-gentamicin-calcium alginate microspheres under inverted microscope

A,B: BMSCs cells were seeded in calcium alginate microspheres in the W group (BMSCs-calcium alginate 3D culture system) and U group (BMSCs-gentamicin-calcium alginate 3D sustained-release culture system), respectively; evenly distributed cells had a semi-translucent spherical shape. The cavities and pipelines were distributed intricately in the microsphere, which was conducive to cell metabolism; C,D: BMSCs cultured in the W group and U group for 28 d, respectively; cells proliferated and formed into many cell clusters, with tightly packed cells. Original magnification:  $\times 100$  (A,B);  $\times 400$  (C,D)

2.3 三维培养凝珠的电镜下形态 在低温环境扫描电镜下观察三维凝珠的断面,可以看见藻酸钙支

架内部有较多的孔隙,利于细胞贴附生长,并使细胞能够保持球形或类球形的空间形态(图3)。

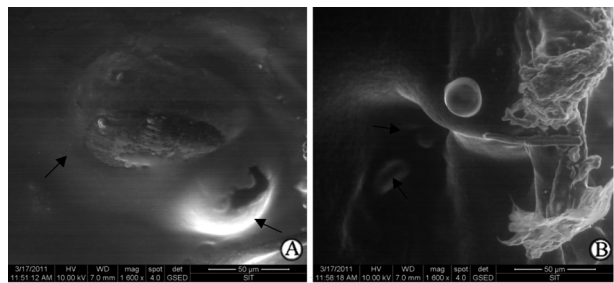


图 3 低温环境扫描电镜下观察  
BMSCs-庆大霉素-藻酸钙凝珠

Fig 3 Bone mesenchymal stem cells (BMSCs)-gentamicin-calcium alginate microsphere under low temperature environmental scanning electron microscope

BMSCs cells were embedded in calcium alginate scaffold, and the cells had a spherical shape. The calcium alginate scaffold had uneven surface with many pores. Cells were attached to the pore and pipeline, which was conducive to nutrient uptake and metabolites of cells. Original magnification:  $\times 1\,600$ (A);  $\times 800$ (B)

2.4 细胞增殖能力、生长曲线 藻酸钙凝胶三维培养条件下活细胞率为 95.8 %~99.2 %。在藻酸钙凝胶内,BMSCs 前期增殖较慢,细胞数少许下降,培养第 7~21 天细胞增殖明显。第 4 周细胞生长进入平台期,数量无明显变化。U 组和 W 组差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ,图 4)。

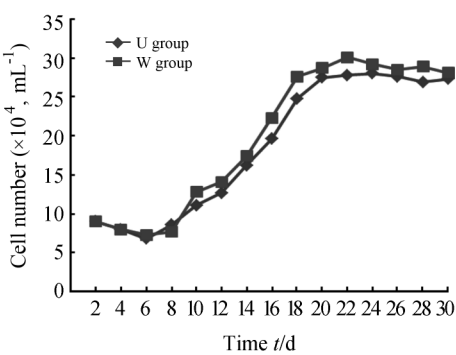


图 4 藻酸钙三维培养条件下 BMSCs 生长曲线

Fig 4 Bone mesenchymal stem cells (BMSCs) growth curve under alginate three-dimensional culture conditions

The growth curve was “S” shaped. BMSCs began to proliferate at the 5<sup>th</sup> day, and the proliferation was obvious from the 7<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> day. Cell growth reached a platform at the 4<sup>th</sup> week of culture. U group: BMSCs-gentamicin-calcium alginate 3D sustained-release culture system; W group: BMSCs-calcium alginate 3D culture system

2.5 H-E 染色结果 H-E 染色证实,载体中存在多个微孔,细胞生长于微孔中,形态为圆形,分裂增殖后形成细胞团块。在培养过程中,三维培养 BMSCs 形态始终保持圆形,胞核较大,核质比例高,说明细胞在藻酸钙支架内保持良好的生物学活性 (图 5A)。

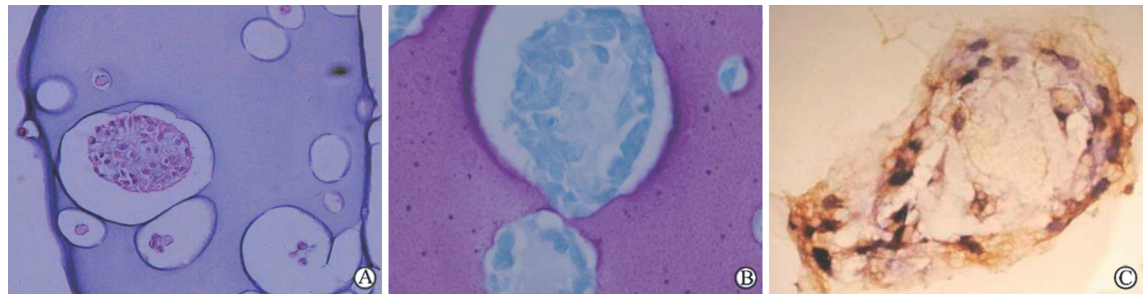


图 5 BMSCs-庆大霉素-藻酸钙凝珠培养 4 周 H-E、甲苯胺蓝及 II 型胶原染色

Fig 5 H-E, toluidine blue and type II collagen staining after BMSCs-gentamicin-calcium alginate microspheres cultured for 4 weeks  
A: H-E staining showed cell cluster or single cell growth in the micropores of microsphere. Most cells proliferated into cell mass. Cells were spheroidal in shape. The nuclei were enlarged and the ratio of nuclear cytoplasm was high; B: Toluidine blue staining showed marked increase of cells, and the cells and peripheral matrix were dyed blue; C: Collagen type II staining cells showed marked increase of cells; the peripheral cells and their surrounding matrix were dark brown, and central cells and their matrix were light brown. Original magnification:  $\times 100$  (A);  $\times 400$  (B,C)

2.6 甲苯胺蓝染色结果 甲苯胺蓝染色见 BMSCs-藻酸钙凝珠有大小不一、大致均匀分布的网孔状结构,BMSCs 细胞团存在于微间隙中。培养 2 周后 U 组与 W 组细胞团甲苯胺蓝染色均呈阳性,但

无明显细胞外基质形成。培养 4 周以后,位于细胞团块外周的细胞呈蓝色,位于中央的细胞染色不明显,细胞团外周呈蓝色染色物质较少,细胞团中央有较多紫红色物质(图 5B)。



2.7 II型胶原免疫组化染色结果 检测结果显示,BMSCs在藻酸钙载体微孔中呈团簇状生长。培养2周后,W组与U组凝珠的BMSCs II型胶原均呈弱阳性表达;培养4周后,两组凝珠的BMSCs II型胶原均呈强阳性表达,说明两组BMSCs已分化成软骨细胞(图5C)。

### 3 讨论

3.1 BMSCs-藻酸钙三维培养体系的特点 相比二维平面培养,三维立体培养体系具有众多独特优点:(1)三维立体结构可为细胞的贴附生长提供更多的空间,使得单位面积下容纳的细胞数增多;(2)代谢产物的存在和堆积会破坏细胞生长的内环境,影响细胞正常生长,支架的三维立体结构有利于细胞迅速有效排出代谢产物,优化生长环境;(3)研究证实细胞间相互作用和影响对细胞生长非常重要,三维支架使细胞处于立体生长状态,细胞间的联系更加紧密,这使得相毗邻的细胞能充分交换细胞生长信号和活性生长因子,从而促进细胞的生长<sup>[1]</sup>;(4)三维支架的存在也使得细胞分泌的细胞因子聚集在材料周围,不易流失,这些都有利于细胞在三维支架上生长。因此,三维支架能为细胞提供与体内生长相似的三维立体结构,并为细胞提供更广泛的生长空间,从而使细胞大量增殖成为可能,还能迅速而及时地排除细胞代谢产物,优化细胞生存环境,有效维持细胞的生物学行为。

藻酸盐是从褐海藻中分离出的一种不分支的线性多糖,是由D-甘露糖醛酸(mannuronic acid)和L-古洛糖醛酸(guluronic acid)以 $\beta$ -1,4和 $\alpha$ -1,4糖苷键聚合而成的长链高分子化合物,相对分子质量为 $1 \times 10^6$ 左右。其溶液在二价阳离子如 $\text{Ca}^{2+}$ 存在时可通过离子交联反应形成开放晶格的水凝胶,而加入螯合剂(如柠檬酸盐、乙二胺四乙酸等)后藻酸盐凝胶载体很快被分解。藻酸盐水凝胶在生物体内以酶解方式生成甘露糖醛酸和葡萄糖醛酸单体,对机体无毒性 and 免疫原性<sup>[2]</sup>。

研究证实应用藻酸盐三维培养体系,培养传代的软骨细胞可以在较长的时间内保持软骨细胞的某些特征,很好维持软骨细胞的表型稳定,分泌特异性细胞外基质<sup>[3-8]</sup>,甚至进入去分化期的软骨细胞可以发生重新分化,重新恢复软骨细胞表型,表达大量II型胶原<sup>[9-11]</sup>。也有实验证实BMSCs在藻酸钙三维培养体系中具有良好的生物学活性<sup>[2,12-13]</sup>。其可

能机制:(1)藻酸钙培养系统能够维持软骨细胞的圆球形态,该细胞形态对细胞表型的维持具有重要作用;(2)位于藻酸钙支架内的软骨细胞分泌的细胞外基质一般都聚集于软骨细胞周围,模拟着软骨陷窝的三维立体形态。本实验也证实:藻酸钙凝胶具有一定的弹性和强度,长期浸泡于培养基中不发生崩解;具有良好的组织相容性,BMSCs在藻酸钙凝胶中具有良好的生物学活性,并向软骨细胞转化。

3.2 庆大霉素对BMSCs向软骨细胞转化的影响 通过对影响骨生长的研究表明抗生素对成骨细胞和骨的再生有抑制作用,抑制作用取决于应用的抗生素的种类<sup>[14]</sup>。如:喹诺酮类抗生素在系统用药时,低药物浓度对骨折愈合就有较大的影响。应用环丙沙星治疗的动物骨痂显示软骨形态和软骨内骨化明显异常,软骨细胞明显减少,而静脉应用庆大霉素、头孢唑啉、万古霉素对动物的骨愈合无明显影响。局部高的抗生素浓度对成骨样细胞生长的研究表明抗生素浓度对骨的生长有影响,当庆大霉素局部浓度大于 $100 \mu\text{g/mL}$ 时,碱性磷酸酶活性明显下降,<sup>3</sup>H-胸苷合成降低,浓度大于 $700 \mu\text{g/mL}$ 时,总DNA含量下降;当妥布霉素、头孢唑啉局部浓度分别大于 $400$ 、 $200 \mu\text{g/mL}$ 时,成骨样细胞的增殖明显减少;而万古霉素局部浓度小于 $1000 \mu\text{g/mL}$ 时,对成骨样细胞的增殖无影响,万古霉素的细胞毒性低于头孢唑啉和其他氨基糖苷类抗生素<sup>[15-16]</sup>。已有研究证实庆大霉素-藻酸钙微球的庆大霉素缓释作用,且庆大霉素并没有引起对周围细胞的损伤<sup>[17]</sup>。本研究H-E染色、甲苯胺蓝染色及II型胶原抗体染色结果显示U组和W组间没有明显的差异,细胞的转化及生长基本同步,细胞增殖数量也较为一致。因此,适当剂量庆大霉素的局部使用并未明显影响种子细胞的生长及转化,又可以使局部缓释的药物浓度达到最小抑菌浓度,可以作为缓释系统修复关节软骨的备选抗生素。

3.3 研制BMSCs-庆大霉素-藻酸钙三维缓释系统的意义 感染在生活中十分常见,小到皮肤疖肿,大到败血症,曾经严重危及人们的生命。随着医学科学发展,各种各样感染的终期结果也在不断改变,越来越多的感染可以得到控制和治疗。但关节感染仍困扰着诸多外科医生,特别是严重的关节感染合并大量的关节软骨损伤、大面积剥脱伤。关节腔是存在极低循环的密闭腔室,全身应用抗生素的血药浓度对于关节腔内细菌的作用是微乎其微的,而局部注射抗生素

存在导致外源性感染的可能性以及细菌耐药,反复的注射疼痛也让患者望而生畏;由于关节软骨具有无神经支配、缺乏血液供应、软骨细胞增殖迁移能力低等组织学特点,关节软骨自身修复能力非常有限。我们对此进行研究,认为局部药物释放系统是治疗骨关节感染的一种积极的策略。而对于关节软骨损伤合并感染的患者,基于软骨修复重建与抗感染药物缓释两个要点,以生物降解型材料为抗生素载体的药物缓释系统最为理想。藻酸钙作为药物的载体已在国内外广泛应用<sup>[18]</sup>。局部植入型抗生素缓释系统与全身性应用抗生素相比具有不可比拟的优势,但局部高浓度抗生素在有效防治感染的同时对局部 BMSCs 和软骨细胞的生长有无影响也是我们必须关注的问题。本实验研究表明 U 组剂量庆大霉素的释放对三维缓释系统内的 BMSCs 和软骨细胞的生长以及 BMSCs 向软骨细胞转化未造成明显影响。这也为后期动物模型体内实验提供有力的依据。

庆大霉素对兔 BMSCs 及软骨细胞超微结构有无影响还需要进一步研究探讨。我们希望通过制备 BMSCs-庆大霉素-藻酸钙三维缓释凝珠,同时控制其粒径大小,填充关节软骨缺损区,在抗感染的同时修复关节软骨,使其接近于正常的关节,恢复关节的功能,提高关节感染的治疗效果。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Siting M, Bujia J, Roter N, Reitzel D, Minuth W W, Burmester G R. Tissue engineering and autologous transplant-formation; practical approaches with erisorb-able biomaterials and new cell culture techniques[J]. J Biomaterials, 1996, 17; 237-245.
- [2] Diduch D R, Jordan L C, Mierisch C M, Balian G. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects[J]. Arthroscopy, 2000, 16; 571-577.
- [3] Marijnissen W J, Vanosch G J, Aigner J, Veen S W, Hollander A P, Verwoerd-Verhoef H L, et al. Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering[J]. Biomaterials, 2002, 23; 1511-1517.
- [4] 何清义, 李 强, 罗 飞, 许建中. 三维立体培养法诱导去分化软骨细胞 II 型胶原的重新表达[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24; 307-309.
- [5] Schulze M, Kuettner K E, Cole A A. Adult human chondrocytes in alginate culture. Preservation of the phenotype for further use in transplantation models [J]. Orthopade, 2000, 29; 100-106.
- [6] Chalain T, Phillips J H, Hinek A. Bioengineering of elastic cartilage with aggregated porcine and human auricular chondrocytes and hydrogels containing alginate, collagen, and kapp-aelastin [J]. Biomed Mater Res, 1999, 44; 280-288.
- [7] Marler J, Guha A, Rowley J, Koka R, Mooney D, Upton J, et al. Soft tissue augmentation with injectable alginate and syngeneic fibroblasts [J]. Plast Reconstr Surg, 2000, 105; 2049-2058.
- [8] Schulze M, Kuettner K E, Cole A A. Adult human chondrocytes in alginate culture[J]. World Urol, 2000, 18; 2-9.
- [9] Mandl E W, Vanderveen S W, Verhaar J A, Vanosch G J. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity[J]. Tissue Eng, 2004, 10; 109-118.
- [10] van Osch G J, van der Veen S W, Verwoerd-Verhoef H L. *In vitro* redifferentiation of culture-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction[J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 107; 433-440.
- [11] Seifer D R, Furman B D, Guilak F, Olson S A, Brooks S C 3rd, Kraus V B. Novel synovial fluid recovery method allows for quantification of a marker of arthritis in mice [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2008, 16; 1532-1538.
- [12] Wilke A, Orth J, Lomb M, Fuhrmann R, Kienapfel P, Griss P, et al. Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures[J]. Biomed Mater Res, 1998, 40; 301-306.
- [13] 孙 磊, 胡蕴玉, 窦榆生, 孟国林, 徐建强. 骨髓基质细胞在藻酸盐凝胶中的生物学行为[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 9; 158-160.
- [14] Perry A C, Prpa B, Rouse M S, Piper K E, Hanssen A D, Steckelberg J M, et al. Levofloxacin and trovafloxacin inhibition of experimental fracture-healing[J]. Clin Orthop, 2003, 414; 95-100.
- [15] Isefuku S, Joyner C J, Simpson A H. Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis [J]. J Orthop Trauma, 2003, 17; 212-216.
- [16] Hassen A D. Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection[J]. Clin Orthop, 2005, 437; 91-96.
- [17] David Chen C H, Chen C C, Shie M Y, Huang C H, Ding S J. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate/alginate bone cement[J]. Mat Sci Engineer: C, 2011, 31; 334-341.
- [18] 李 莉, 黄永灿, 常 丽, 李驯虎. 盐酸四环素缓释微球的制备[J]. 华西药学杂志, 2008, 23; 391-393.

[本文编辑] 贾泽军