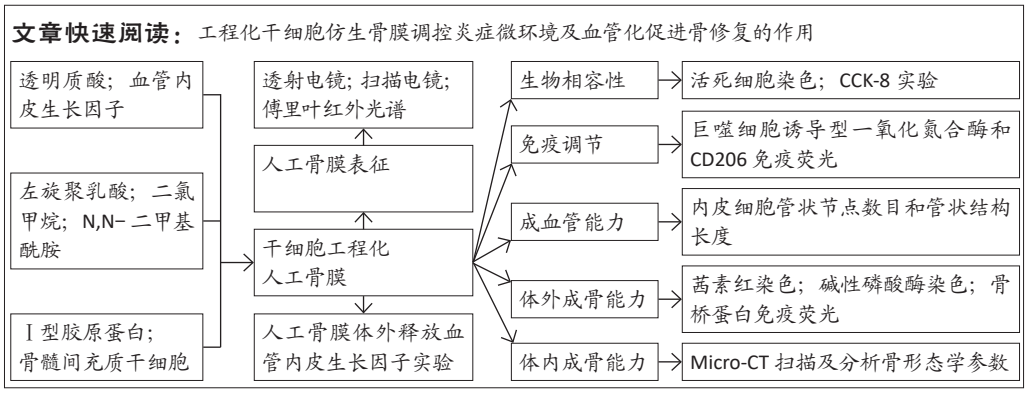
工程化干细胞仿生骨膜协调免疫炎症及血管化促进骨再生

孙慧雯，郭强强，王 伟，武 杰，郗 焜，顾 勇

https://doi.org/10.12307/2025.551
采用日期：2024-09-05
修回日期：2024-10-23
在线日期：2024-11-12
中图分类号：
R459.9；R318.08；R683.4
文章编号：
2095-4344(2026)01-00021-13
文献标识码：A



文题释义：

骨膜：是覆盖在骨组织表面的一层薄且坚韧的结缔组织膜，在骨的生长、修复以及提供营养方面起着重要作用。骨膜主要包括2层结构，外层富含胶原，能为骨组织提供支撑和机械保护；内层含有骨细胞，参与骨生成、修复和骨厚度的增加。

骨髓间充质干细胞：是一种存在于骨髓中的干细胞，具有自我更新和多向分化能力，经过不同的刺激能分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞等多种细胞类型，还在免疫调节、组织修复和再生医学中发挥重要作用。

摘要

背景：临床上主要应用自体骨、异体骨或人工骨促进骨缺损修复，然而不愈合率仍维持较高水平状态，关键是忽视了骨膜在骨愈合过程中的重要性。项目组前期通过构建负载血管内皮生长因子的静电纺丝膜在骨缺损处高度模拟天然骨膜的膜内成骨过程，一定程度上促进了骨再生。但是，损伤局部常面临巨噬细胞介导的剧烈炎症反应和种子细胞匮乏的窘境，导致递送生物因子面临失活或弥散的风险。因此，尚需进一步优化和协调仿生骨膜的免疫调控和成血管功能，促进骨修复。

目的：探讨干细胞工程化仿生骨膜的理化性质以及调控炎症微环境促进骨修复的作用。

方法：将左旋聚乳酸基微溶胶静电纺丝、Ⅰ型胶原蛋白自组装与凝胶干细胞移植技术结合，构建核层负载血管内皮生长因子、壳层递送骨髓间充质干细胞调控骨缺损免疫微环境的仿生骨膜(M@C-B)。通过扫描电镜、透射电镜、傅里叶红外光谱仪等检测骨膜的理化特性；通过仿生骨膜与巨噬细胞、骨髓间充质干细胞和人脐静脉内皮细胞建立共培养体系，探讨其免疫调控、体外成骨和成血管能力；最后，在大鼠股骨髁缺损模型中进一步验证干细胞工程化仿生骨膜的成骨性能。

结果与结论：①透射电镜观察显示微溶胶静电纺丝(MS)人工骨膜形成明显的核壳结构，扫描电镜观察显示负载血管内皮生长因子的微溶胶表面自组装Ⅰ型胶原蛋白(M@C)人工骨膜表面出现明显“蜘蛛网状”纤维结构沉积，红外光谱检测进一步表明Ⅰ型胶原蛋白自组装成功；释放实验证明M@C人工骨膜较MS人工骨膜缓解了突释现象的发生，维持内部血管内皮生长因子活性和长效释放；②活死荧光染色、CCK-8实验显示，骨髓间充质干细胞在MS人工骨膜、单纯定向左旋聚乳酸表面自组装Ⅰ型胶原蛋白(PLLA@C)人工骨膜以及M@C-B人工骨膜上良好增殖并存活，其中M@C-B组活细胞数目最多且增殖速率最高；③碱性磷酸酶染色、茜素红染色、骨桥蛋白免疫荧光染色显示，PLLA@C组和M@C-B组人工骨膜可显著促进骨髓间充质干细胞成骨分化；成血管实验显示，MS组、M@C-B组血管长度更长，血管样染色结构呈网状形态，交叉节点更多，其中M@C-B组更为明显；④免疫荧光和细胞流式显示，M@C-B组人工骨膜能显著抑制促炎巨噬细胞表型，促进巨噬细胞向抗炎M2表型方向极化；⑤体内研究进一步表明M@C-B组大鼠骨密度、骨小梁厚度、相对骨体积和骨小梁间隙皆优于其他组；⑥结果提示：构建的骨髓间充质干细胞工程化人工骨膜通过Ⅰ型胶原蛋白/骨髓间充质干细胞外相快速调控骨缺损免疫微环境与内相微溶胶静电纺丝核壳结构持续释放血管内皮生长因子，协同双向促进骨愈合。

关键词：骨缺损修复；仿生骨膜；静电纺丝；血管内皮生长因子；骨髓间充质干细胞；巨噬细胞；工程化干细胞

Engineered stem cell bionic periosteum coordinates immune inflammation and vascularization to promote bone regeneration

Sun Huiwen, Guo Qiangqiang, Wang Wei, Wu Jie, Xi Kun, Gu Yong
First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China
Sun Huiwen, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

苏州大学附属第一医院，江苏省苏州市 215000
第一作者：孙慧雯，女，2002年生，苏州大学临床医学在读学士。
共同第一作者：郭强强，男，1998年生，苏州大学附属第一医院在读硕士，主要从事骨外科方面的研究。
通讯作者：顾勇，博士，副主任医师，硕士生导师，苏州大学附属第一医院，江苏省苏州市 215000
https://orcid.org/0000-0002-0482-1610 (顾勇)

基金资助：国家自然科学基金项目 (82072438，82272501)，项目负责人：顾勇；国家自然科学基金项目 (82102589)，项目负责人：郗焜
引用本文：孙慧雯，郭强强，王伟，武杰，郗焜，顾勇 . 工程化干细胞仿生骨膜协调免疫炎症及血管化促进骨再生 [J]. 中国组织工程研究，2026，30(1):21-33.

Guo Qiangqiang, Master candidate, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China
Sun Huiwen and Guo Qiangqiang contributed equally to this article.
Corresponding author: Gu Yong, MD, Associate chief physician, Master's supervisor, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Autologous bone, allogeneic bone or artificial bone has been used to promote bone defect repair in the clinic, but the rate of non-healing is still high. The key is to ignore the importance of periosteum in the bone healing process. In the early stage of the project, the project team constructed an electrospinning membrane loaded with vascular endothelial growth factor to highly simulate the intramembranous osteogenesis of natural periosteum at the bone defect site, which promoted bone regeneration to a certain extent. However, the injured area often faces the dilemma of severe inflammatory response mediated by macrophages and lack of seed cells, resulting in the risk of inactivation or diffusion of delivered biological factors. Therefore, it is necessary to further optimize and coordinate the immune regulation and angiogenesis functions of biomimetic periosteum to promote bone repair.

OBJECTIVE: To investigate the physicochemical properties of stem cell-engineered bionic periosteum and its role in regulating the inflammatory microenvironment to promote bone repair.

METHODS: By combining L-polylactic acid-based microsol electrospinning, type I collagen self-assembly and gel stem cell transplantation technology, a bionic periosteum (M@C-B) was constructed, in which the core layer loaded with vascular endothelial growth factor and the shell layer delivered bone marrow mesenchymal stem cells to regulate the immune microenvironment of bone defects. The physicochemical properties of the periosteum were characterized by scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy. A co-culture system was established between the bionic periosteum and macrophages, bone marrow mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells to explore immune regulation and *in vitro* osteogenic and angiogenic abilities. Finally, the osteogenic properties of the stem cell engineered bionic periosteum were further verified in a rat femoral condyle defect model.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Transmission electron microscopy results showed that the micro-sol electrospinning (MS) formed a distinct core-shell structure. Scanning electron microscopy indicated that after the assembly of the collagen-I artificial periosteum (M@C) on the surface of the vascular endothelial growth factor-loaded micro-sol, a distinct "spider web-like" fibrous structure was deposited. Infrared spectroscopy further confirmed the successful self-assembly of collagen-I. Release experiments demonstrated that the M@C group mitigated the burst release phenomenon compared to the MS group, maintaining internal vascular endothelial growth factor activity and sustained release. (2) Live/dead cell staining and CCK-8 assay showed that bone marrow mesenchymal stem cells proliferated well and survived on three types of artificial periosteum: MS, purely aligned poly(L-lactic acid) (PLLA) surface self-assembled collagen-I artificial periosteum (PLLA@C), and vascular endothelial growth factor-loaded micro-sol fiber surface self-assembled collagen-I-bone marrow mesenchymal stem cells artificial periosteum (M@C-B). Among them, the M@C-B group had the highest number of live cells and the fastest proliferation rate. (3) Alkaline phosphatase staining, alizarin red staining, and osteopontin immunofluorescence staining showed that the PLLA@C and M@C-B groups significantly promoted osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Angiogenesis experiments demonstrated that the vascular endothelial growth factor-loaded groups (MS and M@C-B) had longer blood vessel lengths and more reticular vascular-like structures with more cross-linked nodes, with the M@C-B group being the most prominent. (4) Immunofluorescence and flow cytometry showed that artificial periosteum in the M@C-B group significantly inhibited the pro-inflammatory macrophage phenotype and promoted the polarization of macrophages towards the anti-inflammatory M2 phenotype. (5) *In vivo* studies further confirmed that the M@C-B group showed superior bone mineral density, trabecular thickness, relative bone volume, and trabecular spacing compared to other groups. (6) These results indicate that bone marrow mesenchymal stem cell-engineered artificial periosteum, through the rapid regulation of the bone defect immune microenvironment by the collagen-I-bone marrow mesenchymal stem cells outer phase and the sustained release of vascular endothelial growth factor by the micro-sol electrospinning core-shell structure of the inner phase, synergistically promotes bone healing.

Key words: bone defect repair; bionic periosteum; electrospinning; vascular endothelial growth factor; bone marrow mesenchymal stem cell; macrophage; engineered stem cell

Funding: *National Natural Science Foundation of China, No. 82072438, 82272501 (to GY); National Natural Science Foundation of China, No. 82102589 (to XK)*
How to cite this article: *SUN HW, GUO QQ, WANG W, WU J, XI K, GU Y. Engineered stem cell bionic periosteum coordinates immune inflammation and vascularization to promote bone regeneration. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2026;30(1):21-33.*

0 引言 Introduction

当前临床上通过自体骨、同种异体骨或人工骨移植治疗骨缺损不愈合率高达 10%，很大程度上归因于忽视了骨膜在骨愈合中的重要作用 [1-3]。尽管项目组前期构建的人工骨膜缓释血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor，VEGF) 在一定程度上促进了骨修复，但骨缺损局部存在的免疫炎症反应显著增加了骨修复失败的风险 [4-5]。若能够制备一种为膜内成骨提供良好免疫微环境的仿生骨膜，将更有利于提高骨愈合率 [6]。

骨膜呈高度血管化，由两层组成，外层富含成纤维细胞、Ⅰ型胶原和弹性蛋白纤维，内层富含成骨细胞、成纤维细胞、骨祖细胞和骨干细胞；骨膜在骨的发育和损伤修复中起重要作用，骨膜损伤越重则骨修复延迟、骨缺损不愈合率越高 [7-8]。目前已有研究通过肠黏膜下层、异体胶原、脱细胞外基质、左旋聚乳酸 (poly-l-lactic acid，PLLA) 等天然或高分子合成物构建了具有细胞 / 生长因子递送功能的仿生骨膜，但仍存在生物活性下降、缺乏炎症调控作用以及骨再生种子细胞匮乏的缺陷 [9-10]。而在成功的骨缺损愈合过程中，炎症细胞与骨形成细胞之间的协调作用是不可或缺的 [11]。在骨损伤急性炎症期，巨噬细胞被认为是免疫应答过程中最重要的细胞之一。巨噬细胞极化是巨噬细胞对特定组织中微环境和信号刺激产生特定表型和功能反应的过程：M1 型通过释放炎症递质和分解代谢酶、驱动炎症过程、触发分解代谢事件实现促炎过程；M2 型则通过产生解决炎症和支持组织再生的信号分子实现抗炎作用 [12-14]。构建一种能够适时调控巨噬细胞向 M2 型极化的仿生骨膜，将有利于骨损伤修复，降低骨不愈合率。

组织工程技术结合了细胞、工程材料和生化因素的知识，开发出合适的人工细胞支架来维持或再生受损组织，骨组织工程主要包括 3 个要素：种子细胞、生物支架和生长因子，生物支架是骨组织工程的研究重点 [15-16]。血管内皮生长因子是一种具有促血管生成活性的重要生长因子，对内皮细胞具有促有丝分裂和抗凋亡作用，增加血管通透性，促进细胞迁移等。在骨骼发育过程中，成血管 – 成骨耦合发挥着关键作用 [17-18]。然而，骨缺损局部巨噬细胞触发的炎症级联效应影响了仿生骨膜递送血管内皮生长因子的生物活性 [19-20]。骨髓间充质干细胞是细胞疗法和组织工程中最常用的细胞，更重

要的是，骨髓间充质干细胞是兼具骨修复种子细胞和免疫调控作用的功能性干细胞，受机械和生化因素的调控迁移到骨缺损局部，通过旁分泌和定向分化功能推进骨再生[21-23]。课题组前期以聚乳酸为原料，通过静电纺丝技术制备的微溶胶静电纺丝(microsol-electrospinning，MS)纤维膜具有多孔结构，可以为新形成的成骨细胞提供外壳和足够的移植细胞附着点，浸渍或包埋药物和生长因子的同时提供临时的骨机械支撑[24]。

此研究将血管内皮生长因子负载于透明质酸鞘中，通过静电纺丝技术制备定向左旋聚乳酸微溶胶静电纺丝，利用胶原自组装技术将骨髓间充质干细胞接种于纤维表面，构建了干细胞工程化仿生骨膜。首先，在体外探讨了其理化特性、细胞相容性、巨噬细胞表型转化的调控作用。然后，在体内进一步验证了复合仿生骨膜调控巨噬细胞极化并促进成血管，进而修复骨缺损的能力。综上，该实验构建了调控干细胞−巨噬细胞良性交互、增强骨缺损膜内成骨的仿生骨膜，有望为治疗骨损伤提供新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料与细胞相容性的体外实验及动物体内验证实验，定量数据采用正态和方差齐性检验。

1.2 时间及地点 实验于2023年5月至2024年5月在苏州大学骨科研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 主要材料、细胞、试剂 透明质酸(武汉远城科技发展有限公司)；左旋聚乳酸(济南怠罡生物科技有限公司)；二氯甲烷(江苏强盛功能化学股份有限公司)；N，N−二甲基甲酰胺(上海强顺化学试剂有限公司)；司班80(span-80)(美国Sigma公司)；乙酸(国药集团上海化学试剂有限公司)；无水乙醇(国药集团上海化学试剂有限公司)；血管内皮细胞生长因子(美国R&D公司)；大鼠骨髓间充质干细胞(苏州大学骨科研究所制备)；人脐静脉内皮细胞(上海富衡细胞库)；成骨诱导培养基(广州赛业生物科技公司)；血管内皮生长因子ELISA试剂盒(美国R&D公司)；10×PBS(美国Hyclone公司)；α-MEM培养基(美国Gibco公司)；40 g/L多聚甲醛(上海Biosharp公司)；CCK-8试剂盒(日本东仁化学研究所)；LIVE/DEAD染色试剂盒(美国Invitrogen生命技术有限公司)；碱性磷酸酶染色试剂盒(上海碧云天公司)；茜素红染色试剂盒(北京天恩泽公司)；骨桥蛋白一抗(美国R&D公司)；生长因子减少型基质胶(美国Corning公司)；FITC鬼笔环肽、罗丹明鬼笔环肽(美国Cytoskeleton公司)；DAPI(美国Abcam公司)；CD11b抗体(BD Pharmingen，美国)；CD86抗体(BD Pharmingen)；CD206抗体(Santa Cruz，美国)；脂多糖(美国Thermo Fisher Scientific公司)；Ⅰ型胶原蛋白(德国MERCK公司)。

1.3.2 主要仪器设备 电纺丝收集滚筒(苏州大学骨研所实验室自制)；真空冷冻干燥器(德国Christ公司)；磁力加热搅拌仪(德国IKA公司)；精密电子分析天平(上海天平仪器厂)；扫描电子显微镜(日本日立公司)；透射电镜(美国FEI公司)；傅里叶红外光谱仪(美国Nicolet公司)；力学测试机(上海衡仪精密仪器有限公司)；超净工作台(苏州净化设备厂)；正置显微镜(美国蔡司公司)；细胞培养箱(新加坡艺思高科技有限公司)；酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)；荧光显微镜(德国Carl Zeiss公司)；Transwell板(美国Corning公司)；流式细胞仪(美国Beckman-Coulter公司)；Micro-CT(比利时，SkyScan公司)。

1.3.3 实验动物 雄性SD大鼠30只，4−8周龄，SPF级，体质量(200±20) g，购自苏州昭衍研究中心有限公司，许可证号：SCXK(苏)2018-0006，饲养于苏州大学骨科研究所SPF级动物实验室。所有手术步骤及术后处理均经苏州大学动物伦理委员会批准，审批号为SUDA20240619A01。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的分离与培养 3只4−8周龄SD大鼠，腹腔注射2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)后颈椎脱臼处死，分离双侧股骨和胫骨，在体积分数75%乙醇中浸泡5 min后置于无菌PBS中，于超净台无菌条件下剪去长骨两端，用5 mL注射器吸取α-MEM培养基冲洗髓腔至冲洗液变清亮，收集细胞悬液于37 ℃、1 200 r/min离心5 min，弃上清液，用α-MEM培养基重悬后于37 ℃、体积分数5% CO_2培养箱培养24 h，胰酶消化后重新接种于培养皿中，得到原代骨髓间充质干细胞，两三天换液1次，待融合率至80%−90%时传代。

1.4.2 Ⅰ型胶原蛋白/骨髓间充质干细胞悬液的制备

(1) Ⅰ型胶原蛋白溶液的配置：将Ⅰ型胶原蛋白冻干粉溶于0.02 mol/L乙酸中，保存质量浓度为5 mg/mL。使用前需配制成3 mg/mL的胶原溶液，具体步骤为：在1.5 mL EP管中依次加入无菌预冷的10× PBS 120 μL、1 mol/L NaOH溶液17 μL、蒸馏水343 μL，混匀置于冰上，加入5 mg/mL Ⅰ型胶原蛋白溶液720 μL，混匀。全程冰上操作，配制好的溶液立即使用或可在冰上放置两三个小时。

(2) Ⅰ型胶原蛋白/骨髓间充质干细胞的配置：待骨髓

间充质干细胞传至第 3 代，弃上清后用上述Ⅰ型胶原蛋白溶液重悬，得到细胞浓度为 1×10^8 L^{-1} 的Ⅰ型胶原蛋白 / 骨髓间充质干细胞悬液。

1.4.3 人工骨膜的制备

(1) 左旋聚乳酸人工骨膜的配制：聚乳酸静电纺丝溶液是将 0.5 g 左旋聚乳酸与 4.0 g 二氯甲烷共搅拌 2 h，待原料完全溶解后加入 2.0 g N，N− 二甲基甲酰胺共同搅拌 1 h 而获得。将左旋聚乳酸纺丝液加入 10 mL 注射器，使用内径为 9 mm 的特制钝头钢针，将高压电源的正、负极分别与针头、接收装置相连，调节电压至 15 kV，接收距离为 15 cm，采用 2 根平行电极板作为接收装置，最终得到定向左旋聚乳酸人工骨膜 (PLLA 组)。

(2) 微溶胶静电纺丝人工骨膜的制备：微溶胶静电纺丝溶液是将 50 μL 透明质酸水溶液 (1.2%)、10 μL 血管内皮生长因子水溶液 (100 μg/mL) 与 0.01 g Span-80 超声分散于 4.0 g 二氯甲烷中，向得到的分散液中加入 0.5 g 左旋聚乳酸共搅拌 2 h 至固体完全溶解后，再加入 2.0 g N，N− 二甲基甲酰胺共同搅拌 1 h 而获得。用 10 mL 注射器吸取微溶胶静电纺丝液，使用内径为 9 mm 的特制钝头钢针，将高压电源的正、负极分别与针头、接收装置相连，调节电压至 15 kV，接收距离为 15 cm，采用 2 根平行电极板作为接收装置，最终得到定向微溶胶静电纺丝人工骨膜 (MS 组)。

(3) 左旋聚乳酸 @ Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜的制备：将 1.4.3(1) 中定向左旋聚乳酸纺丝膜置于 24 孔板中，用体积分数为 75% 乙醇浸泡 1 h，去离子水洗涤 3 次以去除残留的乙醇。将 1.4.2(1) 中Ⅰ型胶原蛋白溶液缓慢均匀滴加在左旋聚乳酸纺丝膜表面，置入 37 ℃、体积分数 5%CO_2 培养箱中 30 min，待充分自组装后去离子水洗涤 3 次，得到左旋聚乳酸 @ Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜 (PLLA@C 组)。

(4) 微溶胶静电纺丝 @ Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜的制备：将上述 1.4.3(2) 中定向微溶胶静电纺丝膜置于 24 孔板中，用体积分数为 75% 乙醇浸泡 1 h，去离子水洗涤 3 次以去除残留的乙醇。将 1.4.2(1) 中Ⅰ型胶原蛋白溶液缓慢均匀滴加在微溶胶静电纺丝膜表面，置入 37 ℃、体积分数 5%CO_2 培养箱中 30 min，待充分自组装后去离子水洗涤 3 次，得到微溶胶静电纺丝 @ Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜 (M@C 组)。

(5) 干细胞工程化仿生骨膜的制备：将上述 1.4.3(2) 中定向微溶胶静电纺丝膜置于 24 孔板中，用体积分数为 75% 乙醇浸泡 1 h，去离子水洗涤 3 次以去除残留的乙醇。将将 1.4.2(2) 中Ⅰ型胶原蛋白 / 骨髓间充质干细胞悬液悬液滴加在微溶胶静电纺丝膜表面，置入 37 ℃、体积分数 5%CO_2 培养箱中 30 min，待充分自组装后去离子水洗涤 3 次，得到负载骨髓间充质干细胞的仿生骨膜 (M@C-B 组)。

通过不同工艺制备 5 组人工骨膜，具体分组如**表 1** 所示。

表 1 | 人工骨膜分组
Table 1 | **Group assignment of artificial periosteum**

组别	描述
PLLA 组	单纯定向左旋聚乳酸人工骨膜
MS 组	负载血管内皮生长因子的微溶胶人工骨膜
PLLA@C 组	单纯定向左旋聚乳酸表面自组装Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜
M@C 组	负载血管内皮生长因子的微溶胶表面自组装Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜
M@C-B 组	负载血管内皮生长因子的微溶胶表面自组装Ⅰ型胶原蛋白 / 骨髓间充质干细胞人工骨膜

1.5 材料表征

1.5.1 扫描电镜分析 为观察 PLLA 组、MS 组和 M@C 组静电纺丝的表面形态，将 3 组静电纺丝通过导电胶固定在载物台上，置于离子溅射仪中利用金靶在材料表面喷金 45 s，然后移至扫描电镜下观察材料的微观结构；随机选取 5 个视野中 20 根纺丝，用 Image J 测量分析其平均直径。

1.5.2 透射电镜分析 用特制双目铜网收集 PLLA 组及 MS 组静电纺丝，置于透射电镜中观察表面形态，观察 MS 组静电纺丝中核壳结构。

1.5.3 傅里叶变换红外光谱测试 将 PLLA 组、MS 组、M@C 组静电纺丝剪裁成 1 cm×1 cm 大小，置于红外光谱仪中测试，加入适量溴化钾在研钵中研磨成粉末，通过压片法制成直径 1 cm 大小的薄片再进行测试。每个样品在 4 cm^{-1} 的分辨率下扫描 128 次，扫描范围为 400−4 000 cm^{-1}。

1.6 血管内皮生长因子释放量测定 取 MS 组及 M@C 组静电纺丝各 10 mg(M@C 组静电纺丝为组装胶原蛋白前称质量)，分别置于盛有 10 mL 含 1%BSA 的 PBS(1×) 的 50 mL 离心管中，于恒温振荡仪 37 ℃条件下 100 r/min 充分振荡，在第 0.5，1，2，4，6，8，10，14，18，23，28 天收集离心管中溶液并用新的 10 mL 含 1%BSA 的 PBS 替换离心管中全部液体，收集的溶液于 −20 ℃冷冻保存，用 ELISA 法测定上述各时间点溶液中血管内皮生长因子含量。

1.7 体外细胞实验

1.7.1 骨髓巨噬细胞的分离与培养 取 3 只 4−8 周龄 SD 大鼠，腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 后颈椎脱臼处死，分离双侧股骨和胫骨，在体积分数 75% 乙醇中浸泡 5 min 后置于无菌 PBS 中，于超净台无菌条件下剪去长骨两端，用 5 mL 注射器吸取 α-MEM 培养基冲洗髓腔至冲洗液变清亮。将骨髓冲洗液吹打均匀收集于 15 mL 离心管中，加入红细胞裂解液，1 200 r/min 离心 5 min，弃去上清，2 mL α-MEM 培养基重悬后转移至培养皿中，补充 α-MEM 培养基至 10 mL，培养箱中静置 12−16 h 后收集上层悬浮细胞，转移至 6 孔板中培养，

加入含 30 μg/L 集落刺激因子的 α-MEM 培养液 2 mL，继续培养 3 d 后得到骨髓巨噬细胞用于后续实验。

1.7.2 细胞活力测定 将 PLLA 组、MS 组、PLLA@C 组和 M@C-B 组人工骨膜分别置于 24 孔板中，以空白爬片为对照组，每孔材料或爬片表面接种 1×10^5 个骨髓间充质干细胞，置于细胞培养箱中培养 3 d 后，弃去培养基，用无菌 PBS 冲洗 3 次，每孔加入 300 μL 活 / 死细胞染液，37 ℃孵化 1 h 后吸去染液，用无菌 PBS 冲洗 3 次，置于正置显微镜下观察，利用 Image J 进行荧光强度半定量分析。

1.7.3 细胞增殖实验 将 PLLA 组、MS 组、PLLA@C 组和 M@C-B 组人工骨膜分别置于 24 孔板中，以空白爬片为对照，每孔材料或爬片表面接种 5×10^4 个骨髓间充质干细胞，置于细胞培养箱中培养第 1，3，5，7 天弃去培养基，用无菌 PBS 冲洗 3 次，加入含 10%CCK-8 试剂的培养基共同培养 2 h，吸取上清液于 96 孔板中，用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值。

1.7.4 体外成骨特性 将 PLLA 组、MS 组、PLLA@C 组和 M@C-B 组人工骨膜分别置于 24 孔板中，以空白爬片为对照，每孔材料或爬片表面接种 2×10^4 个骨髓间充质干细胞，置于细胞培养箱中培养至融合度达 60%，弃去上清，加入成骨诱导分化培养基，诱导 7 d 后利用碱性磷酸酶定量试剂盒测定碱性磷酸酶含量，诱导 14 d 后利用免疫荧光染色测定成骨特异性标记物骨桥蛋白的表达，诱导 21 d 后用茜素红染色试剂盒观察钙结节形成情况。

1.7.5 体外成血管实验 向 24 孔共培养细胞板中每孔加入 100 μL 生长因子减少型基质胶并使之凝胶化。将 PLLA 组、MS 组、M@C-B 组人工骨膜浸入 α-MEM 培养基，于 0.4 μm 24 孔共培养细胞板上室过夜，以含 10 ng/mL 血管内皮生长因子的 α-MEM 培养基作为阳性对照组，次日下室每孔接种 5×10^4 个人脐静脉内皮细胞，置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱。培养 3 h 和 6 h 时，分别用 40 g/L 多聚甲醛溶液固定人脐静脉内皮细胞，用 PBS 洗涤 3 次，用罗丹明标记的鬼笔环肽和 DAPI 染色细胞肌动蛋白和细胞核，用荧光显微镜对标记的人脐静脉内皮细胞进行拍照，并用 Image J 软件对 6 个随机区域的管状结构的长度和管状节点的数目进行量化。

1.7.6 免疫调节实验 以空白细胞爬片为空白对照组，将 MS 组、M@C-B 组人工骨膜分别与 30 ng/mL 脂多糖诱导 3 d 的骨髓巨噬细胞通过 24 孔 Transwell 板共培养，上室加入 1×10^4 个骨髓巨噬细胞，下室分别加入空白细胞爬片及 MS 组、M@C-B 组人工骨膜，每孔加入 1 mL α-MEM 培养基共培养 3 d 后，40 g/L 多聚甲醛室温下固定 30 min；5%BSA 封闭非特异性抗原过夜，次日用抗 F4/80 的一抗标记骨髓巨噬细胞，再分别用抗 CD86(M1 型) 的一抗和抗 CD206(M2 型) 的一抗分别标记不同亚型的巨噬细胞，用对应的二抗在室温下染色；用 DAPI 对细胞核进行染色，在正置荧光显微镜下观察。用 Image J 软件对平均荧光强度进行半定量分析。

1.8 体内实验评价不同人工骨膜对股骨髁缺损的治疗效果 24 只 4–8 周龄 SD 大鼠随机分为 4 组：MS 组、PLLA@C 组、M@C-B 组和对照组，每组 6 只。首先建立大鼠双侧股骨髁缺损模型，采用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射 2.5 mL/kg 麻醉，显露手术野，通过肌间隙钝性分离显露股骨髁，术中注意保护周围血管和神经，采用直径 3 mm 的钻头低速钻穿双层皮质，术中向手术区域滴入生理盐水，防止局部温度过高，最后将 MS、PLLA@C、M@C-B 人工骨膜放置到骨缺损区域，以不放材料为对照组。在逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤后，置于温暖通风处饲养至自然苏醒，给予青霉素肌注预防感染 3 d。

术后 4 周，对大鼠实施安乐死，收集股骨髁组织样本，用体积分数 10% 甲醛溶液固定 1 周，用 Micro-CT 在 65 kV 和 385 mA 下进行扫描。对于圆柱形缺陷区域，通过 CT Analyzer 软件分析以下数据：相对骨体积、骨密度、骨小梁厚度和骨小梁间隙 (n=3)。

1.9 主要观察指标 人工骨膜的微观形貌、红外光谱；人工骨膜中血管内皮生长因子的体外释放量；人工骨膜的生物相容性、免疫调节、体外成骨能力和成血管能力；人工骨膜的体内成骨能力。

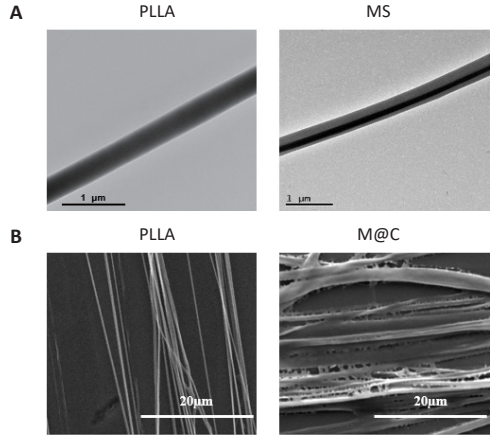
1.10 统计学分析 所有实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。采用 Origin 9.1 或 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析及绘制图片。通过 One-way 或 Two-way ANOVA 以及 Turkey's 分析，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经苏州大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 电纺丝人工骨膜的微观形貌 如**图 1** 所示，通过使用扫描电镜和透射电镜观测单根纤维纺丝的内部结构和电纺纤维膜的表面形态。从图 1A 透射电镜图片中可以看出，与定向 PLLA 人工骨膜纤维均一结构明显不同的是，MS 人工骨膜纤维内部可以清楚观察到核壳结构的形成，外层颜色较浅的是左旋聚乳酸外壳，可以对纤维起支撑的作用；内层颜色较深的是透明质酸内芯，它携带着血管内皮生长因子。

图 1B 扫描电镜下可见两组纤维束粗细均匀，方向高度一致，其中 M@C 人工骨膜表面形成了明显的微 / 纳米纤维结构，电纺纤维的表面及其孔隙内部有大量更细的蛛网样Ⅰ型胶原纤维沉积。

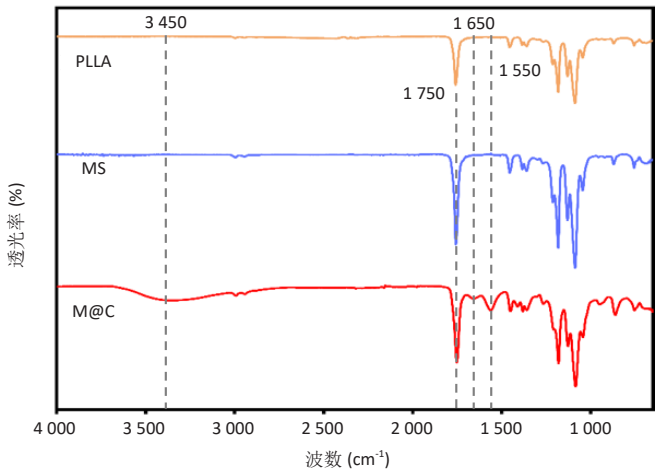
2.2 人工骨膜的红外光谱图 3 种纤维束的红外光谱图如**图 2** 所示，单纯 PLLA 组人工骨膜的红外光谱是在



图注：图 A 为 PLLA 和 MS 人工骨膜在透射电镜下的图片；B 为 PLLA 和 M@C 人工骨膜在扫描电镜下的图片。PLLA：单纯定向左旋聚乳酸人工骨膜；MS：负载血管内皮生长因子的微溶胶人工骨膜；M@C：负载血管内皮生长因子的微溶胶表面自组装Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜。

图 1 | 各组人工骨膜在透射电镜和扫描电镜下的形貌

Figure 1 | Mrophology of artificial periosteum in each group under transmission electron microscope and scanning electron microscope



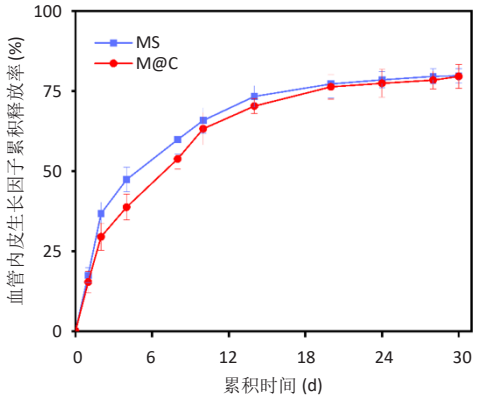
图注：PLLA 为单纯定向左旋聚乳酸人工骨膜；MS 为负载血管内皮生长因子的微溶胶人工骨膜；M@C 为负载血管内皮生长因子的微溶胶表面自组装Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜。

图 2 | 各组人工骨膜的红外光谱图

Figure 2 | Infrared spectra of artificial periosteum in each group

1 750 cm^{-1} 处的 C=O 的伸缩振动带，MS 组人工骨膜的红外光谱与 PLLA 组基本相同，没有出现特征透明质酸带，因此，无法单纯在红外光谱上进行区分。单纯的Ⅰ型胶原蛋白有 2 个主要的特征带，分别在 1 650 cm^{-1} 处有酰胺Ⅰ(C=O)带，在 1 550 cm^{-1} 处有酰胺Ⅱ(N-H)带。M@C 组人工骨膜在这两处都可以清楚地观测到Ⅰ型胶原蛋白的特征峰，说明Ⅰ型胶原蛋白与 MS 人工骨膜以酰胺键自组装成功。

2.3 人工骨膜中血管内皮生长因子的体外缓释 用 ELISA 试剂盒检测血管内皮生长因子的体外释放量。如**图 3** 所示，MS 组和 M@C 组在前 2 d 的血管内皮生长因子释放速度较快，总释放量分别为 (36.4±1.5)% 和 (30.1±1.4)%，随后释放速度逐渐减缓，不过释放率都具有持续性，其中 M@C 组的释放速度比 MS 组更为缓慢，至第 14 天的总释放率分别为 (68.6±1.1)% 和 (71.8±0.7)%，最终释放时间达 30 d 时，累计释放率分别为 (78.3±0.4)% 和 (77.9±0.3)%，M@C 组的释放速度更加缓慢，释放总量也较少，这可能归因于外层Ⅰ型胶原蛋白的存在，直接影响了人工骨膜内部生物活性分子的释放动力学。



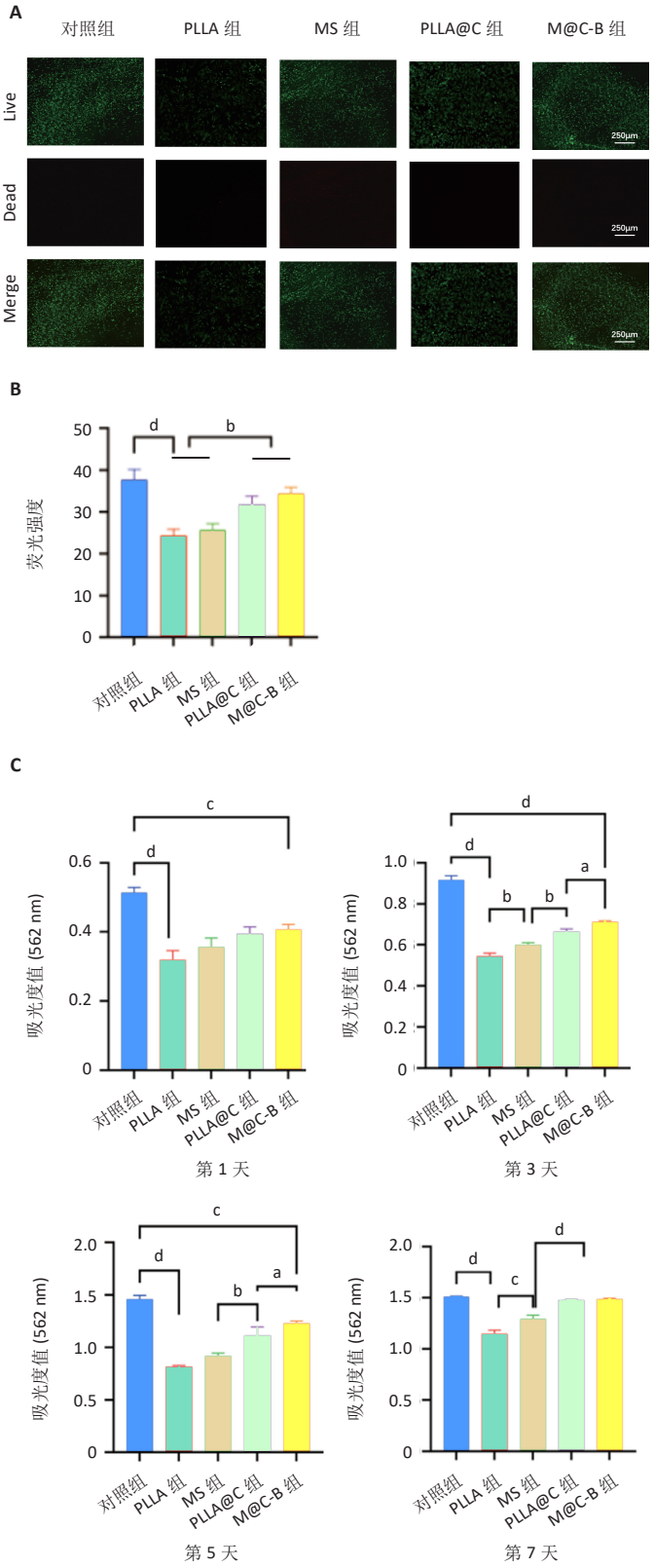
图注：MS 为负载血管内皮生长因子的微溶胶人工骨膜；M@C 为负载血管内皮生长因子的微溶胶表面自组装Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜。

图 3 | 各组人工骨膜的血管内皮生长因子体外释放量

Figure 3 | *In vitro* release of vascular endothelial growth factor from artificial periosteum in each group

2.4 人工骨膜的生物相容性 如**图 4A** 活死染色显示，细胞接种在不同人工骨膜和普通培养板上进行培养，由于 PLLA 和 MS 表面疏水性质，细胞黏附性较低，在其上生长的活细胞数量明显少于Ⅰ型胶原蛋白自组装组 (PLLA@C 和 M@C-B)，并且死细胞数量也较多，可能是由于添加的透明质酸都在纤维内部，对 PLLA 的疏水性没有改善。而胶原自组装后，由于胶原的加入显著提升了材料的生物相容性，**图 4B** 为活死染色的荧光强度。细胞增殖实验结果如**图 4C** 所示，骨髓间充质干细胞能在各材料表面增殖生长，第 1–7 天各组细胞数目总体是上升趋势，对照组细胞增殖速率优于各材料组，到第 7 天时，对照组与 PLLA@C 组、M@C-B 组无明显统计学差异。总之，由于普通培养板专业的细胞培养性能，材料组的细胞增殖速率均低于对照组，但是胶原的加入显著增强了材料的生物相容性。

2.5 人工骨膜的体外成骨能力 **图 5** 为各组人工骨膜的成骨分化指标，碱性磷酸酶是成骨分化早期的指标，可反映出人工骨膜对骨髓间充质干细胞早期成骨分化的影响。图 5A 可见各组人工骨膜的成骨分化均为上升趋势，其中 PLLA 组和对照组染色较浅，密度也较低，而 MS 组、PLLA@C 组和 M@C-B 组与前两组相比，染色和密度均有所提高，其中 PLLA@C 组和 M@C-B 组提高较明显。骨桥蛋白为成骨分化的中晚期指标，图 5B 荧光图片显示，骨桥蛋白的表达与碱性磷酸酶类似。钙结节是成骨分化的晚期标识物，经茜素红染色后为铁锈色，染色结果显示 PLLA@C 组和 M@C-B 组钙结节面积最大，



图注：图 A 为各组人工骨膜上骨髓间充质干细胞的活死荧光图片；B 为 A 图荧光的半定量图；C 为 CCK-8 检测各组人工骨膜上骨髓间充质干细胞的增殖能力。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$，$^{d}P < 0.000\ 1$。PLLA 为单纯定向左旋聚乳酸人工骨膜；MS 为负载血管内皮生长因子的微溶胶人工骨膜；PLLA@C 为单纯定向左旋聚乳酸表面自组装Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜；M@C-B 为负载血管内皮生长因子的微溶胶表面自组装Ⅰ型胶原蛋白 / 骨髓间充质干细胞人工骨膜。

图 4 | 骨髓间充质干细胞在各组人工骨膜上的活力和增殖能力

Figure 4 | Viability and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells on artificial periosteum in each group

吸光度最强，说明了Ⅰ型胶原蛋白的加入不仅通过其表面丰富的细胞膜配体增强骨髓间充质干细胞的生物学效应，而且在一定程度上能够促进其向成骨分化。图 5C–E 的半定量结果与上述结果一致。

2.6 人工骨膜的体外成血管能力 恢复骨膜的血液供应是骨修复的关键过程，如**图 6A** 所示，在体外的成血管实验中对照组和 PLLA 组的成血管能力没有显著差异，而负载了血管内皮生长因子的 MS 组和 M@C-B 组的成血管能力有明显提高，其血管长度更长，呈节段状分布，血管染色呈网状形态，并且交叉节点明显多于对照组和 PLLA 组。对管状节点数量和管状结构长度进行计数，见**图 6B**。

2.7 人工骨膜的体外免疫调节能力 将人工骨膜与骨髓巨噬细胞通过 Transwell 体系共培养 3 d 后，采用免疫荧光染色和流式细胞术检测巨噬细胞的不同表型。如**图 7** 显示，M@C-B 组的 M1 亚型标记物诱导型一氧化氮合酶的红色荧光强度较弱，明显低于其他组 (图 7A，B)，M2 亚型标记物 CD206 的红色荧光强度较强，明显强于其他组 (图 7C，D)。采用流式细胞术检测巨噬细胞 M1 和 M2 亚型的极化情况 (图 7E，G)，相比于对照组和 MS 组，M@C-B 组 CD86 和 CD11b 双阳性 (M1 亚型) 比例为 41.8%，比对照组 (77.5%) 下降一半。M@C-B 组 CD206 和 CD11b 双阳性 (M2 亚型) 比例明显上升，为 39.1%，约为对照组 (16.7%) 的 2.3 倍。流式的半定量图与免疫荧光结果类似 (图 7F，H)，证明 M@C-B 具有一定的免疫协调能力，能一定程度上抑制促炎巨噬细胞的极化，促进巨噬细胞向抗炎表型的转变。

2.8 人工骨膜的体内成骨效果 术后第 4 周时，使用 Micro-CT 观察材料的成骨效果，结果如**图 8A** 所示，可见人工骨膜 (MS 组、PLLA@C 组、M@C-B 组) 的植入减小了骨缺损区域的面积，其中 MS 组虽然具有缓慢释放血管内皮生长因子的作用，然而缺乏骨髓间充质干细胞的免疫调控和种子细胞补充作用，骨缺损区域较Ⅰ型胶原蛋白自组装组 (PLLA@C、M@C-B) 大，而 PLLA@C 组中Ⅰ型胶原蛋白在一定程度上能够促进内源性骨髓间充质干细胞的黏附和成骨分化等生物学效应，但伴随体内降解较快，且缺乏炎症调节和血管内皮生长因子持续补充，仍可见损伤局部骨缺损。此外，M@C-B 组较其他组协调了免疫炎症调节和血管内皮生长因子促血管化作用，成骨效果最为明显。与对照组相比，植入材料组的骨参数 (相对骨体积、骨密度和骨小梁厚度) 均明显升高，其中 M@C-B 组效果最显著。更重要的是，植入人工骨膜后骨小梁间隙减小，说明人工骨膜的应用加速了成骨的过程，减少了骨质疏松 (**图 8B**)。以上现象可能是人工骨膜植入增加了细胞的附着面积，更有利于迁移、黏附和分化。

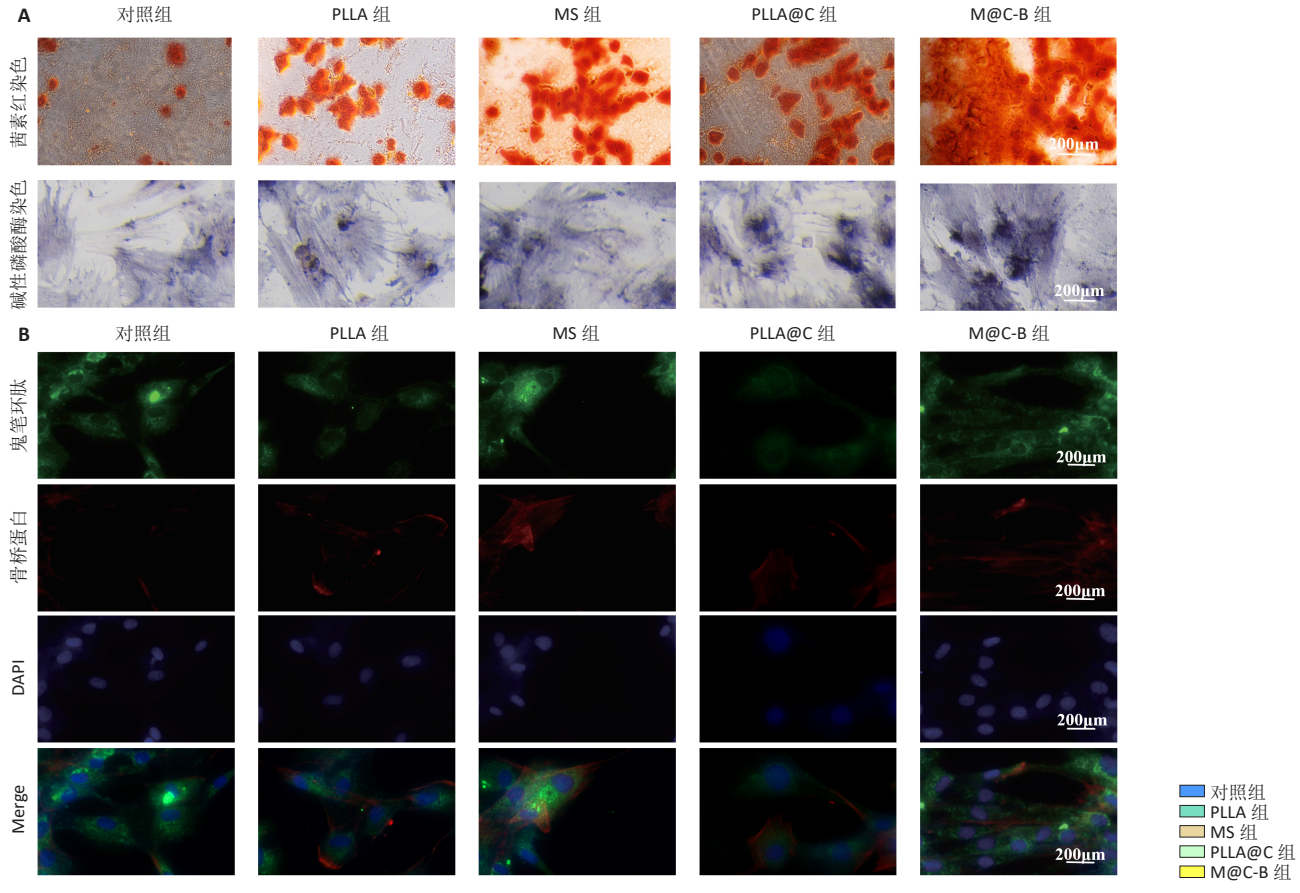
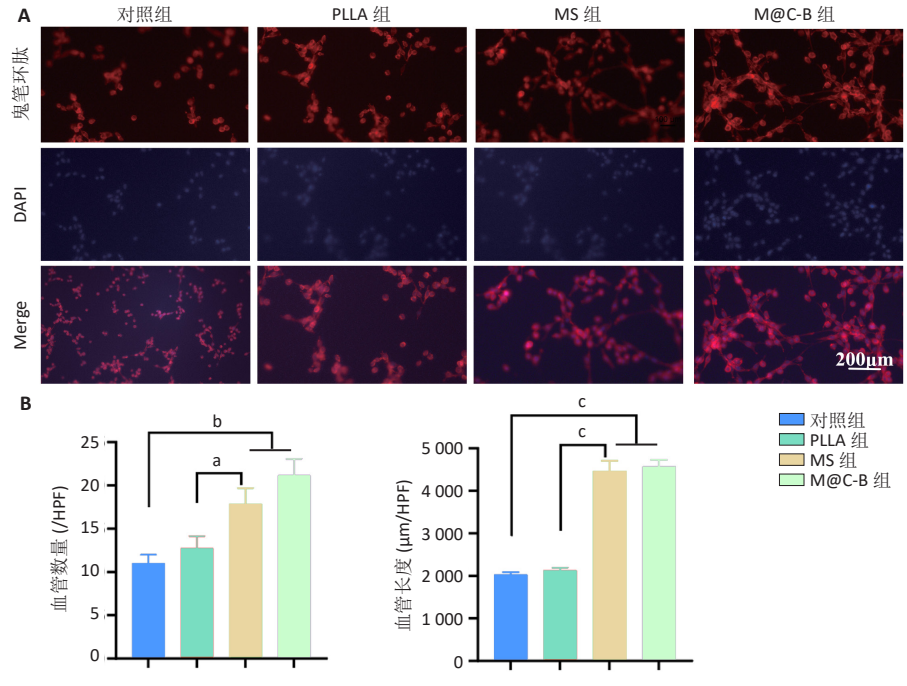


图 5 | 各组人工骨膜的体外成骨指标

Figure 5 | *In vitro* osteogenic indexes of artificial periosteum of each group

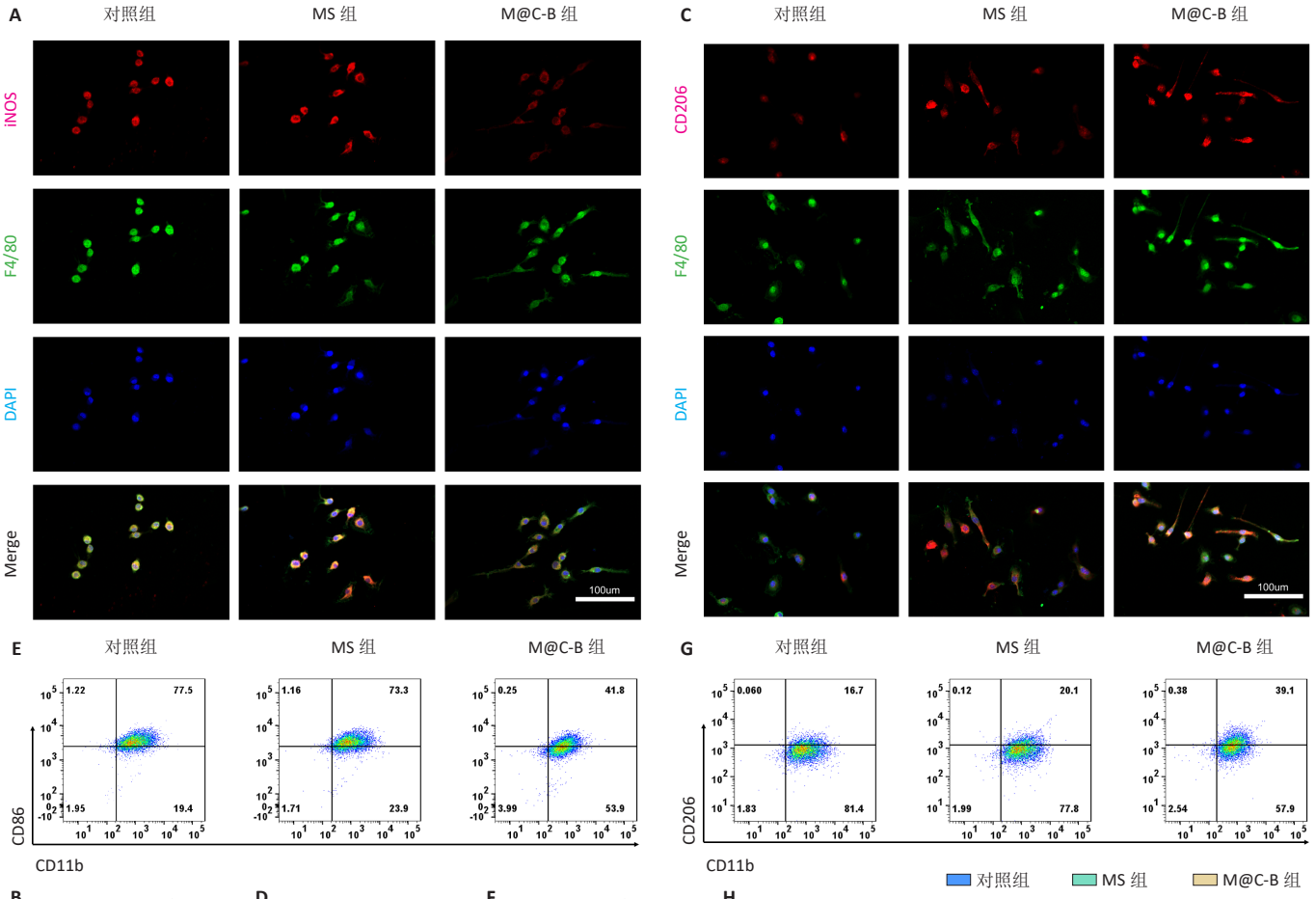
图注：图 A 为不同人工骨膜的茜素红染色和碱性磷酸酶染色；B 为骨桥蛋白荧光染色图；C 为茜素红染色半定量分析；D 为碱性磷酸酶染色定量分析；E 为骨桥蛋白荧光半定量分析。$^{a}P < 0.01$，$^{b}P < 0.001$，$^{c}P < 0.000\ 1$。PLLA 为单纯定向左旋聚乳酸人工骨膜；MS 为负载血管内皮生长因子的微溶胶人工骨膜；PLLA@C 为单纯定向左旋聚乳酸表面自组装Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜；M@C-B 为负载血管内皮生长因子的微溶胶表面自组装Ⅰ型胶原蛋白 / 骨髓间充质干细胞人工骨膜。



图注：图 A 为人脐静脉内皮细胞与各组纤维膜共培养后的荧光图片；B 为血管数量和长度的半定量分析。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.001$，$^{c}P < 0.000\ 1$。PLLA 为单纯定向左旋聚乳酸人工骨膜；MS 为负载血管内皮生长因子的微溶胶人工骨膜；M@C-B 为负载血管内皮生长因子的微溶胶表面自组装Ⅰ型胶原蛋白 / 骨髓间充质干细胞人工骨膜。

图 6 | 各组人工骨膜的体外成血管能力

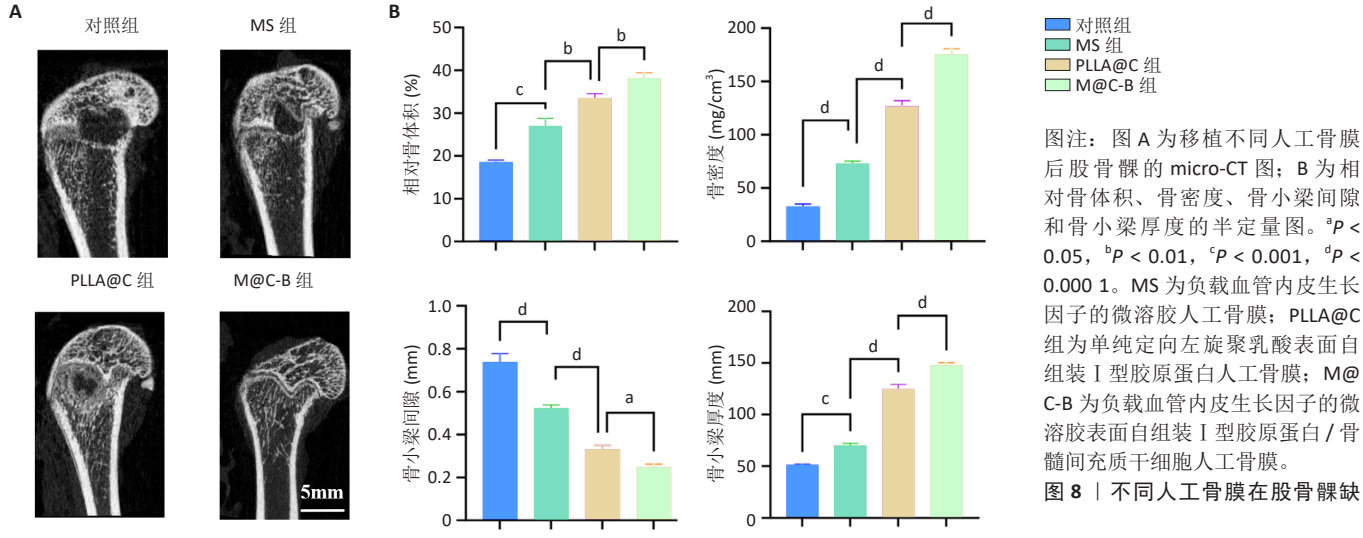
Figure 6 | Angiogenesis capacity *in vitro* of artificial periosteum of each group



图注：图 A，C 为共培养后巨噬细胞极化的免疫荧光图；B，D 为 A，C 的荧光半定量分析；E，G 为共培养后巨噬细胞极化的流式图；F，H 为 E，G 的定量分析。[a]$P < 0.001$，[b]$P < 0.000\ 1$。iNOS：诱导型一氧化氮合酶。MS 为负载血管内皮生长因子的微溶胶人工骨膜；M@C-B 为负载血管内皮生长因子的微溶胶表面自组装Ⅰ型胶原蛋白/骨髓间充质干细胞人工骨膜。

图 7 | 巨噬细胞与人工骨膜共培养后的极化情况

Figure 7 | **Polarization of macrophages cultured on artificial periosteum**



图注：图 A 为移植不同人工骨膜后股骨髁的 micro-CT 图；B 为相对骨体积、骨密度、骨小梁间隙和骨小梁厚度的半定量图。[a]$P < 0.05$，[b]$P < 0.01$，[c]$P < 0.001$，[d]$P < 0.000\ 1$。MS 为负载血管内皮生长因子的微溶胶人工骨膜；PLLA@C 组为单纯定向左旋聚乳酸表面自组装Ⅰ型胶原蛋白人工骨膜；M@C-B 为负载血管内皮生长因子的微溶胶表面自组装Ⅰ型胶原蛋白/骨髓间充质干细胞人工骨膜。

图 8 | 不同人工骨膜在股骨髁缺损模型大鼠体内的成骨效果

Figure 8 | **Osteogenic effect of different artificial periosteum in rats with femoral condyle defect model**

3 讨论 Discussion

巨噬细胞作为启动和调节炎症反应的主要参与者，分泌的细胞因子参与成骨，并作为破骨细胞前体，参与骨重建及材料降解等过程[25-26]。未激活巨噬细胞 (M0) 在不同因素刺激下可极化为致炎表型 (M1) 或抗炎表型 (M2)。M1 型分泌诱导型一氧化氮合成酶、单核细胞趋化蛋白 1、肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 或血管内皮生长因子等，还能募集间充质干细胞和促进血管新生。而 M2 型表达精氨酸酶 1、CD206、白细胞介素 4、白细胞介素 10、白细胞介素 13、转化生长因子 β 及血小板衍生因子等促进组织修复[27-29]。因此，巨噬细胞被认为是炎症反应和组织再生之间的“主开关”。而骨髓间充质干细胞不仅作为多能干细胞通过多向分化作用为骨缺损愈合提供“源动力”，而且更以旁分泌前列腺素 E2、吲哚胺 2,3–双加氧酶以及白细胞介素 10 等细胞因子促进骨缺损局部 M1 型巨噬细胞向 M2 极化，为骨再生提供良好的免疫微环境[30-31]。然而，直接局部移植干细胞仍然存在弥散或坏死性凋亡的现象[32]。近年，人工仿生骨膜在成血管和骨修复中表现出优异性能，但是普遍缺乏主动化炎症调节作用[33]。因此，课题组关注到能否在前期仿生骨膜缓释递送血管内皮生长因子增强膜内成骨的基础上，进一步负载移植骨髓间充质干细胞发挥免疫调控作用。

该研究整合了静电纺丝与胶原自组装技术，制备了一种通过干细胞移植的形式协调骨缺损局部免疫炎症、骨修复以及血管化的工程化仿生骨膜。MS 人工骨膜内部核层结构的形成是保证所包封血管内皮生长因子持久释放、增强仿生骨膜膜内成骨的基础[34]。通过透射电镜观察单纯 PLLA 组与 MS 组人工骨膜内部结构，发现 MS 组人工骨膜由于内部透明质酸与外部左旋聚乳酸的异质性，在相同纺丝参数条件下，静电场作用明显形成了内 – 外核壳结构，为后续整体干细胞工程化仿生骨膜长效发挥促成骨作用铺平道路。Ⅰ型胶原蛋白不但是骨膜内重要的纤维成分，还是最重要的骨组织结构蛋白，不仅促进细胞黏附、增殖等，而且具有良好的钙沉积矿化作用[35-36]。但目前受限制于胶原的应用形式，用单纯的电纺胶原或自组装水凝胶作为纤维层不能提供足够的物理强度[37-38]。然而，通过调节外界温度、酸碱度和电解质浓度，Ⅰ型胶原蛋白能够自组装形成具有三维螺旋结构的纳米纤维，提高胶原纤维力学属性[39]。此外，合成聚合物左旋聚乳酸表面含有羧基、氨基等活性官能团，对Ⅰ型胶原蛋白分子具有较强亲和力[4, 40]。因此，以左旋聚乳酸为壳层原料，通过静电纺丝技术搭建的人工骨膜平台具有较高的比表面积、高孔隙率和良好的物理机械强度等优点，更有利于负载干细胞生长，并且隔绝骨缺损外周软组织的侵入。扫描电镜观察显示，PLLA 组人工骨膜纤维呈笔直排列，表面光滑，而 M@C 组人工骨膜可见Ⅰ型胶原蛋白较均匀分布于纤维表面，整体纤维连接紧密形成了三维等级性网络结构，构成了良好的微 / 纳米纤维细胞外基质微环境，有利于骨髓间充质干细胞的黏附并诱导其增殖分化为成骨细胞，又能提供一定的物理屏障功能。同时，红外光谱图可见 M@C 组人工骨膜在 1 650 cm^{-1} 和 1 550 cm^{-1} 处出现了Ⅰ型胶原蛋白特征峰，进一步证明Ⅰ型胶原蛋白已自组装于 MS 人工骨膜表面。功能化仿生骨膜最重要的作用是需要保护并维持递送的生物因子活性以及局部有效浓度，传统单纯左旋聚乳酸负载血管内皮生长因子的人工骨膜由于材料界面内外生物因子浓度差导致扩散过快，已被证明无法延缓药物和活性因子的释放，导致两者利用度下降[4, 24, 41]。因此，为了解决该问题，利用微溶胶静电纺丝和胶原自组装复合技术合成了 M@C 人工骨膜，与没有Ⅰ型胶原蛋白自组装的 MS 组对比可以发现，二者内部的纺丝核壳结构不仅可以很好地将血管内皮生长因子包裹在纺丝内层达到缓慢释放的效果，还能为骨缺损部位提供一定的机械支撑。而 M@C 组人工骨膜外层包裹的Ⅰ型胶原蛋白像“水坝”样拦截，在 0–15 d 时间点明显缓解了血管内皮生长因子的突释效应，为后续进一步构建人工骨膜移植骨髓间充质干细胞发挥免疫调控争取了有效时间窗，降低了因骨缺损局部剧烈炎症反应而引起递送血管内皮生长因子失活的风险。

生物相容性是纳米材料植入后能否发挥预期生物学效应的重要因素[42]。活死染色和 CCK-8 增殖实验结果显示，PLLA@C 组和 M@C-B 组细胞生存明显高于 MS 组，这可能是由于上述两组人工骨膜表面自组装的Ⅰ型胶原蛋白含有多种生物活性模体可以更好地模拟细胞外基质，更纠正了左旋聚乳酸表面疏水特性，能够增强与种植的骨髓间充质干细胞表面整合素受体亚型相结合，进而促进细胞黏附和增殖。此外，在体外茜素红染色、碱性磷酸酶以及骨桥蛋白染色和半定量分析研究中，均提示 PLLA@C 组和 M@C-B 组Ⅰ型胶原蛋白加入后形成的微纳米纤维结构促进了骨髓间充质干细胞的成骨效应，引起这一现象的主要原因是Ⅰ型胶原蛋白是生理骨组织细胞外基质的主要有机成分，其中天冬氨酸 – 甘氨酸 – 谷氨酸 – 丙氨酸 (DGEA) 序列能够与骨髓间充质干细胞表面整合素受体特异性结合，促进黏着斑蛋白 (Vinculin) 募集，在黏着斑激酶推动下将细胞外基质信号传入胞内，激活 Ras-Raf-MEK-ERKs 信号转导通路，触发成骨基因转录和翻译，进而增强了钙结节矿化和碱性磷酸酶的表达[43-44]。

生理性骨膜在骨发育和骨损伤修复过程中扮演着营养物质输送和代谢物质转运的角色，但诸如出现骨膜广泛性脱落、手术中过度剥离等情况，都会严重影响骨愈合，甚至出现骨坏死或骨折不愈合的现象[45-46]。更重要的是，骨组织再生和血管生长在时空上有着密切的关系。STREET 等[47]证明了相较于其他促血管生成因子，血管内皮生长因子不仅具有强大的促血管生成能力，还能够将血管生成与骨形成及骨重塑紧密结合起来，并且具有迁移成骨细胞、抑制成骨细胞凋亡和促进成骨细胞增殖的作用。在体外人脐静脉内皮细胞血管化的研究中进一步证明负载血管内皮生长因子的 MS 人工骨膜和 M@C-B 人工骨膜具有促进血管化的良好功能。调控骨缺损局部巨噬细胞介导的固有免疫炎症反应是维持仿生骨膜持续释放所负载因子发挥生物效应的必备条件。近年研究发现，M2 型巨噬细胞能够分泌重组人血小板衍生生长因子、骨形态发生蛋白 2、转化生长因子 β 等促进骨愈合和血管再生的细胞因子[48]。因此，在巨噬细胞浸润骨损伤局部 3−7 d 时间内高效调控其抗炎亚型是促进骨修复的关键。现已证明骨髓间充质干细胞不仅作为骨再生的重要种子细胞，更能够通过白细胞介素 10、前列腺素 E2、吲哚胺 2,3− 双加氧酶以及多种外泌体等旁分泌途径激活巨噬细胞精氨酸酶 1、CD206 的表达。在人工骨膜 − 巨噬细胞 − 骨髓间充质干细胞共培养研究中，同样在 I 型胶原蛋白自组装情况下，与 M@C 组比较，负载骨髓间充质干细胞的 M@C-B 组巨噬细胞中诱导型一氧化氮合酶表达显著降低的同时 CD206 处于高表达状态。流式细胞术检测更证实了骨髓间充质干细胞能够明显促进巨噬细胞抗炎亚型表达，该研究结果为下一步开展干细胞工程化仿生骨膜修复动物股骨髁缺损提供了研究基础。

骨缺损愈合是多细胞交互的复杂过程，其中可能涉及成骨 − 破骨、内源性间充质干细胞、血管内皮细胞以及骨损伤时募集到局部的中性粒细胞和巨噬细胞，其中免疫系统决定着骨组织修复的预后走向[49-51]。炎性巨噬细胞的过度表达可能会导致局部幸存骨组织或外周软组织坏死性凋亡，因此及时调控巨噬细胞极化方向能够为后期骨再生提供良好的平台[52]。该研究通过 I 型胶原蛋白 / 骨髓间充质干细胞悬液均匀滴加在负载有血管内皮生长因子的 MS 人工骨膜表面，构建了干细胞工程化仿生骨膜。在大鼠股骨髁缺损模型中，对照组无人工骨膜的植入，可能存在缺损后周围软组织侵入，术后 4 周时骨缺损明显，而且相对骨体积、骨密度、骨小梁厚度都明显低于人工骨膜移植组。MS 组负载血管内皮生长因子能够在一定程度上促进骨组织修复，但骨损伤局部炎症反应可能导致递送的血管内皮生长因子出现失活的现象，整体修复程度低于 PLLA@C 组和 M@C-B 组。而在 PLLA@C 组中由于 I 型胶原蛋白的加入，左旋聚乳酸微米纤维与 I 型胶原蛋白纳米纤维相互交错，使得整体人工骨膜的硬度提升，促进向 M2 型巨噬细胞转化，并且 I 型胶原蛋白自组装后形成的三维螺旋结构更提高了与细胞整合素配体接触的密度，更有利于增强募集而来的内源性干细胞黏附和成骨分化。M@C-B 组不仅保留了上述 I 型胶原蛋白促进成骨修复的优势，自组装悬液中富含的骨髓间充质干细胞更通过旁分泌途径快速调控局部巨噬细胞表型，而且及时补充了种子细胞，为持续释放的血管内皮生长因子促进血管萌芽和血管成熟提供良好的微环境，进而为达到骨修复的目标提供有益条件。

综上，该研究通过微溶胶静电纺丝技术与胶原自组装技术相结合，制备了核层负载血管内皮生长因子和壳层移植骨髓间充质干细胞的干细胞工程化仿生骨膜 (M@C-B)。在结构上，该仿生骨膜内部核层和外部壳层自组装 I 型胶原蛋白涂层有效维持了内部血管内皮生长因子的活性并缓解了整体突释现象，I 型胶原蛋白富含的生物活性模体更高效促进了移植的骨髓间充质干细胞黏附和增殖效应；在功能上，外部黏附的骨髓间充质干细胞不仅及时补充了种子细胞，而且作为快相通过旁分泌途径调控骨缺损局部巨噬细胞抗炎亚型，为骨再生提供良好的免疫微环境，内部核壳结构中血管内皮生长因子作为慢相持续释放，提高了损伤局部再血管化效率，整体仿生骨膜从外到内以“快 − 慢”相结合的形式协调骨免疫与骨修复进程，最终达到了骨再生的目标。

然而，巨噬细胞作为一种对外界微环境超敏感的可塑性免疫细胞，其敏感性主要体现于内部代谢产物和途径改变以适应所处环境的变化[53]。虽然通过骨髓间充质干细胞旁分泌途径调控了巨噬细胞抗炎亚型，但是巨噬细胞摄入细胞因子后是否引起了内部代谢方式改变，仍有待进一步探索和研究。若能够深入探究骨髓间充质干细胞通过代谢途径调控巨噬细胞亚型的生物学机制，无疑将为进一步开发功能性仿生骨膜促进骨再生提供新思路。

作者贡献：孙慧雯负责实验实施、论文撰写，孙慧雯、郭强强负责细胞培养、指标检测、数据分析处理，王伟、武杰、郝焜负责数据和文章的校对，顾勇负责实验设计。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名 − 非商业性使用 − 相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，

允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] DAI K, DENG S, YU Y, et al. Construction of developmentally inspired periosteum-like tissue for bone regeneration. Bone Res. 2022;10(1):1.

[2] ZHANG X, DENG C, QI S. Periosteum Containing Implicit Stem Cells: A Progressive Source of Inspiration for Bone Tissue Regeneration. Int J Mol Sci. 2024;25(4):2162.

[3] 张伯宇 , 王建南 . 天然高分子材料在人工骨膜领域研究进展 [J]. 现代丝绸科学与技术 ,2024,39(1):28-32.

[4] WU L, GU Y, LIU L, et al. Hierarchical micro/nanofibrous membranes of sustained releasing VEGF for periosteal regeneration. Biomaterials. 2020;227:119555.

[5] 杨雨晴 , 陈志宇 . 早期短暂 M1 巨噬细胞在骨组织工程中的作用及应用 [J]. 中国组织工程研究 ,2024,28(4):594-601.

[6] SCHLUNDT C, FISCHER H, BUCHER CH, et al. The multifaceted roles of macrophages in bone regeneration: A story of polarization, activation and time. Acta Biomater. 2021;133:46-57.

[7] LU Y, LIAN X, CAO Y, et al. An enhanced tri-layer bionic periosteum with gradient structure loaded by mineralized collagen for guided bone regeneration and in-situ repair. Int J Biol Macromol. 2024;277(Pt 1):134148.

[8] CHEN X, YU B, WANG Z, et al. Progress of Periosteal Osteogenesis: The Prospect of In Vivo Bioreactor. Orthop Surg. 2022;14(9):1930-1939.

[9] ZHANG W, WANG N, YANG M, et al. Periosteum and development of the tissue-engineered periosteum for guided bone regeneration. J Orthop Translat. 2022;33:41-54.

[10] WANG J, CHEN G, CHEN ZM, et al. Current strategies in biomaterial-based periosteum scaffolds to promote bone regeneration: A review. J Biomater Appl. 2023;37(7):1259-1270.

[11] WANG YH, ZHAO CZ, WANG RY, et al. Correction: The crosstalk between macrophages and bone marrow mesenchymal stem cells in bone healing. Stem Cell Res Ther. 2022;13(1):524.

[12] 张怡凡 , 陈悦 , 周硕 , 等 .HIF-1α 通过调控 H 型血管生成参与牙周炎的发展 [J]. 山西医科大学学报 ,2024,55(6):746-752.

[13] HU Y, HUANG J, CHEN C, et al. Strategies of Macrophages to Maintain Bone Homeostasis and Promote Bone Repair: A Narrative Review. J Funct Biomater. 2022;14(1):18.

[14] GOU M, WANG H, XIE H, et al. Macrophages in guided bone regeneration: potential roles and future directions. Front Immunol. 2024;15:1396759.

[15] 王寒 , 邢辉 .3D 打印生物工程骨支架的相关研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志 ,2024,32(11):1001-1006.

[16] WANG J, LIU M, YANG C, et al. Biomaterials for bone defect repair: Types, mechanisms and effects. Int J Artif Organs. 2024;47(2):75-84.

[17] SHAW P, DWIVEDI SKD, BHATTACHARYA R, et al. VEGF signaling: Role in angiogenesis and beyond. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2024;1879(2):189079.

[18] PATEL SA, NILSSON MB, LE X, et al. Molecular Mechanisms and Future Implications of VEGF/VEGFR in Cancer Therapy. Clin Cancer Res. 2023;29(1):30-39.

[19] QIN Q, LEE S, PATEL N, et al. Neurovascular coupling in bone regeneration. Exp Mol Med. 2022;54(11):1844-1849.

[20] ZHANG J, TONG D, SONG H, et al. Osteoimmunity-Regulating Biomimetically Hierarchical Scaffold for Augmented Bone Regeneration. Adv Mater. 2022;34(36):e2202044.

[21] MA S, WANG C, DONG Y, et al. Microsphere-Gel Composite System with Mesenchymal Stem Cell Recruitment, Antibacterial, and Immunomodulatory Properties Promote Bone Regeneration via Sequential Release of LL37 and W9 Peptides. ACS Appl Mater Interfaces. 2022;14(34):38525-38540.

[22] 李华德 , 时强 , 史晨丽 . 骨髓干细胞聚乳酸羟基乙酸修复大鼠软骨缺损 [J]. 中国矫形外科杂志 ,2024,32(13):1222-1228.

[23] GAO Y, ZOU Y, SOKOLOWSKEI D, et al. Nr4a1 enhances Wnt4 transcription to promote mesenchymal stem cell osteogenesis and alleviates inflammation-inhibited bone regeneration. Mol Ther. 2024;32(5):1479-1496.

[24] XU Z, WU L, TANG Y, et al. Spatiotemporal Regulation of the Bone Immune Microenvironment via Dam-Like Biphasic Bionic Periosteum for Bone Regeneration. Adv Healthc Mater. 2023;12(1):e2201661.

[25] 张洁 , 田艾 .M2 巨噬细胞参与骨再生相关信号通路的作用与机制 [J]. 中国组织工程研究 ,2023,27(2):314-321.

[26] LIU Z, ZHU J, LI Z, et al. Biomaterial scaffolds regulate macrophage activity to accelerate bone regeneration. Front Bioeng Biotechnol. 2023;11:1140393.

[27] 赵月鑫 , 陈滨 . 巨噬细胞极化在骨组织工程免疫研究中的进展 [J]. 中国组织工程研究 ,2022,26(13):2120-2126.

[28] HU K, SHANG Z, YANG X, et al. Macrophage Polarization and the Regulation of Bone Immunity in Bone Homeostasis. J Inflamm Res. 2023;16:3563-3580.

[29] WU M, LIU H, ZHU Y, et al. Bioinspired soft-hard combined system with mild photothermal therapeutic activity promotes diabetic bone defect healing via synergetic effects of immune activation and angiogenesis. Theranostics. 2024;14(10):4014-4057.

[30] ZHAO Q, LIU X, YU C, et al. Macrophages and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Work in Concert to Promote Fracture Healing: A Brief Review. DNA Cell Biol. 2022;41(3):276-284.

[31] YOON SJ, KIM SH, CHOI JW, et al. Guided cortical and cancellous bone formation using a minimally invasive technique of BMSC- and BMP-2-laden visible light-cured carboxymethyl chitosan hydrogels. Int J Biol Macromol. 2023;227:641-653.

[32] ARTHUR A, GRONTHOS S. Clinical Application of Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells to Repair Skeletal Tissue. Int J Mol Sci. 2020;21(24):9759.

[33] ZHENG ZW, CHEN YH, WU DY, et al. Development of an Accurate and Proactive Immunomodulatory Strategy to Improve Bone Substitute Material-Mediated Osteogenesis and Angiogenesis. Theranostics. 2018;8(19):5482-5500.
[34] MAO Y, CHEN Y, LI W, et al. Physiology-Inspired Multilayer Nanofibrous Membranes Modulating Endogenous Stem Cell Recruitment and Osteo-Differentiation for Staged Bone Regeneration. Adv Healthc Mater. 2022; 11(21):e2201457.
[35] JIN H, ZHU X, LIU H, et al. Type-I Collagen Polypeptide-Based Composite Nanofiber Membranes for Fast and Efficient Bone Regeneration. ACS Biomater Sci Eng. 2024;10(9):5632-5640.
[36] JOVANOVIC M, GUTERMAN-RAM G, MARINI JC. Osteogenesis Imperfecta: Mechanisms and Signaling Pathways Connecting Classical and Rare OI Types. Endocr Rev. 2022;43(1):61-90.
[37] CHENG L, CHEN Z, CAI Z, et al. Bioinspired Functional Black Phosphorus Electrospun Fibers Achieving Recruitment and Biomineralization for Staged Bone Regeneration. Small. 2020;16(50):e2005433.
[38] HUA X, HOU M, DENG L, et al. Irisin-loaded electrospun core-shell nanofibers as calvarial periosteum accelerate vascularized bone regeneration by activating the mitochondrial SIRT3 pathway. Regen Biomater. 2023;11:rbad096.
[39] ZHAO L, LAN W, DONG X, et al. Enhenced cell adhesion on collagen I treated parylene-C microplates. J Biomater Sci Polym Ed. 2021;32(17):2195-2209.
[40] LE D, MCMILLAN S. A Novel Distal Biceps Rupture Repair Technique Utilizing a Biocomposite Scaffold. Surg Technol Int. 2023. doi: 10.52198/23.STI.42.OS1656.
[41] DONG C, TAN G, ZHANG G, et al. The function of immunomodulation and biomaterials for scaffold in the process of bone defect repair: A review. Front Bioeng Biotechnol. 2023;11:1133995.
[42] WANG G, LV Z, WANG T, et al. Surface Functionalization of Hydroxyapatite Scaffolds with MgAlEu-LDH Nanosheets for High-Performance Bone Regeneration. Adv Sci (Weinh). 2022;10(1): e2204234.
[43] KIM T, HONG J, KIM J, et al. Two-Dimensional Peptide Assembly via Arene-Perfluoroarene Interactions for Proliferation and Differentiation of Myoblasts. J Am Chem Soc. 2023;145(3): 1793-1802.
[44] SUZAWA M, TAMURA Y, FUKUMOTO S, et al. Stimulation of Smad1 transcriptional activity by Ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation. J Bone Miner Res. 2002;17(2):240-248.
[45] HUANG J, HAN Q, CAI M, et al. Effect of Angiogenesis in Bone Tissue Engineering. Ann Biomed Eng. 2022;50(8):898-913.
[46] 过丽强 , 赵世天 , 舒冰 .Notch 信号通路在骨折愈合过程中作用的研究进展 [J]. 上海交通大学学报 (医学版),2023,43(2):222-229.
[47] STREET J, BAO M, DEGUZMAN L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(15):9656-9661.
[48] WEIVODA MM, BRADLEY EW. Macrophages and Bone Remodeling. J Bone Miner Res. 2023;38(3):359-369.
[49] VERMEULEN S, TAHMASEBI BIRGANI Z, HABIBOVIC P. Biomaterial-induced pathway modulation for bone regeneration. Biomaterials. 2022;283:121431.
[50] XUE N, DING X, HUANG R, et al. Bone Tissue Engineering in the Treatment of Bone Defects. Pharmaceuticals (Basel). 2022; 15(7):879.
[51] 杜锦洲 , 钱运 , 范存义 .β- 磷酸三钙的骨诱导性和组织工程应用研究进展 [J]. 中华骨科杂志 ,2024,44(13):906-914.
[52] ZHANG FF, HAO Y, ZHANG KX, et al. Interplay between mesenchymal stem cells and macrophages: Promoting bone tissue repair. World J Stem Cells. 2024;16(4):375-388.
[53] LOCATI M, CURTALE G, MANTOVANI A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. Annu Rev Pathol. 2020;15: 123-147.

(责任编辑：马征华，邱杨，张楠)