

· 论著 ·

负载 BMP-2 掺锶磷酸钙复合材料对成骨细胞增殖及功能的影响

陶周善¹ 周皖舒^{2*} 江云云¹ 吴兴净¹ 王林¹ 杨民¹ 谢加兵¹ 徐祝军¹

1. 皖南医学院第一附属医院, 弋矶山医院创伤骨科, 安徽 芜湖 241000

2. 皖南医学院第二附属医院老年病科, 安徽 芜湖 241000

中图分类号: R587.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 07-0888-05

摘要: **目的** 探索负载 BMP-2 掺锶磷酸钙复合材料对成骨细胞增殖及功能的影响。**方法** 获取 SD 大鼠成骨细胞, 随机分为空白对照组 (Con 组)、磷酸钙组 (CPC 组) 和复合材料组 (BSCPC 组); 培养基中分别添加安慰剂、磷酸钙和负载 BMP-2 掺锶磷酸钙共培养一段时间, 通过 CCK-8 法检测成骨细胞的增殖情况, 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 及茜素红染色观察细胞的功能状态, 蛋白电泳观察骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)、核因子 κ B 受体活化因子 (receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK) 及核因子 κ B 受体活化因子配体 (ligand of receptor activator of nuclear factor- κ B, RANKL) 蛋白的表达情况。**结果** 共培养 1、3、5 和 7 d, 和 Con 组比较, CPC 组和 BSCPC 组的成骨细胞数目明显增加 ($P < 0.05$), 且以 BSCPC 组成骨细胞数目最多 ($P < 0.05$); 共培养 14 d 及 21 d, 和 Con 组比较, CPC 组和 BSCPC 组的成骨细胞的矿化能力及 ALP 活性明显增加 ($P < 0.05$), 且以 BSCPC 组细胞钙化能力最强及 ALP 活性最高 ($P < 0.05$); 共培养 7 d, 和 Con 组比较, CPC 组和 BSCPC 组的成骨细胞的 OPG 表达明显增加, 而 RANK 及 RANKL 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 且以 BSCPC 组的成骨细胞蛋白 OPG、RANK 及 RANKL 蛋白表达量改善最为显著 ($P < 0.05$)。**结论** 负载 BMP-2 掺锶磷酸钙复合材料促进成骨细胞增殖分化和改善细胞活性和功能。**关键词:** 骨形成蛋白-2; 锶; 成骨细胞; 增殖; 功能; 磷酸钙

Effects of strontium-doped calcium phosphate loaded with BMP-2 on proliferation and function of osteoblastsTAO Zhoushan¹, ZHOU Wanshu^{2*}, JIANG Yunyun¹, WU Xingjing¹, Lin Wang¹, YANG Min¹, XIE Jiabing¹, XU Zhuojun¹

1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Yijishan Hospital, Wuhu 241000, China

2. Department of Geriatrics, the Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, China

* Corresponding author; ZHOU Wanshu, Email: 1025066337@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of strontium-doped calcium phosphate loaded with BMP-2 on the proliferation and function of osteoblasts. **Methods** The osteoblasts of SD rats were obtained and randomly divided into blank control group (Con group), calcium phosphate group (CPC group), and composite group (BSCPC group). Placebo, calcium phosphate, and strontium-doped calcium phosphate loaded with BMP-2 were added to culture medium for co-culture for a period of time. The proliferation of osteoblasts was detected using CCK-8 assay. Alkaline phosphatase (ALP) and Alizarin red staining were used to observe the functional status of the cells. Protein electrophoresis was used to observe the expression of osteoprotegerin (OPG), RANK, and RANKL. **Results** Compared with Con group, the number of osteoblasts in CPC group and BSCPC group increased significantly ($P < 0.05$), and the number of osteoblasts was the highest in BSCPC group ($P < 0.05$). Compared with Con group, the mineralization and ALP activity of osteoblasts in CPC group and BSCPC group increased significantly ($P < 0.05$), and the cells in BSCPC group had the highest calcification ability and the highest ALP activity ($P < 0.05$). Compared with Con group, the OPG expression of osteoblasts in CPC group and BSCPC group increased significantly, while the expression of RANK and RANKL protein decreased significantly ($P < 0.05$). The expression levels of OPG, RANK and RANKL protein improved most significantly in BSCPC group ($P < 0.05$). **Conclusion** Strontium-doped calcium phosphate composites loaded with BMP-2 promotes

基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学研究重点项目 (KJ2017A266); 安徽省自然科学基金 (1708085QH209)。

* 通讯作者: 周皖舒, Email: 1025066337@qq.com

osteoblast proliferation and differentiation and improves cell activity and function.

Key words: Bone morphogenetic protein-2; Strontium; Osteoblast; Proliferation; Function; Calcium phosphate

骨组织的形成和重吸收之间的动态平衡受成骨细胞和破骨细胞的调控,随着年龄的增长,特别是对于绝经后妇女,当骨吸收率超过骨形成速率时,骨组织会被破坏,这可能会导致骨质疏松症^[1]。随着社会老年人群不断增加,近年来骨质疏松症成为继冠心病后危害人群健康的全球性问题^[2]。这类患者一旦发生骨折或缺损,需要整形手术进行骨修复,但是这类患者本身骨质较差,大都年龄较大且合并较多的基础疾病,自体骨移植很难满足骨缺损修复的需要^[3]。近年来随着生物组织工程的不断发展,一系列人工生物材料被应用于临床并取得较好的效果,其中以磷酸钙材料使用最为广泛,但是这类材料在骨质疏松状态下表现不佳^[4],主要由于骨质疏松状态下局部成骨能力显著下降,严重影响材料的骨诱导作用的发挥^[5]。近些年的研究表明局部添加锶离子(Sr)或骨形成蛋白-2(BMP-2)可以显著促进骨材料的骨诱导能力,加速骨愈合^[6,7];同时骨材料中掺 Sr 可以促进局部形成 BMP-2 来促进骨诱导,增加材料骨的诱导能力^[8]。鉴于此,是否可以通过外界添加 BMP-2 和 Sr 来共同促进骨愈合。本研究通过局部添加 BMP-2 和 Sr 制成负载 BMP-2 掺锶磷酸钙复合材料,通过其对大鼠成骨细胞增殖和分化的影响来探索这种材料治疗骨质疏松骨缺损的细胞学可行性。

1 材料和方法

1.1 试剂与材料

二氧化碳细胞培养箱(Sanyo 公司);骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、核因子 κ B 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)和核因子 κ B 受体活化因子配体(ligand of receptor activator of nuclear factor- κ B, RANKL)多克隆抗体(SantaCruz 公司),倒置相差显微镜(Olympus 公司);碘佛醇(武汉远城科技发展有限公司);多功能酶标仪(BioTek 公司);磷酸四钙,无水磷酸氢钙和无水磷酸氢锶(上海熹垣生物科技有限公司);胎牛血清(ScienCell 公司);磷酸钙干粉(上海玉研科学仪器有限公司); α -MEM 培养基(维森特公司);CCK-8 试剂(日本同仁化学研究所);磷酸(深圳市思美泉生物科技有限公司);碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(购于碧云天公司);茜素红 S 染色液(索

莱宝公司);成骨细胞(SD 大鼠胎鼠颅骨分离所得)。

1.2 材料制备

负载 BMP-2 掺锶磷酸钙复合材料制备:掺锶磷酸钙固相成分通过磷酸四钙,无水磷酸氢钙和无水磷酸氢锶按照 1:0.75:0.25 质量比例充分混合而成,固化剂为 0.5 mol/L 稀磷酸,在室温、100% 相对湿度条件下分别固化 24 h,制成直径 1 mm,厚 1 mm 样品(固化时粉、液质量比为 2:1);将上述制作完成的 5% 掺锶磷酸钙,按每 1 g 5% 掺锶磷酸钙携带 0.4 mg 的比例称取 BMP-2 材料 0.4 mg,加入 0.6 mL 碘佛醇注射液中,震荡混匀直至溶解,同时加入 1 g 新制备的 5% 掺锶磷酸钙,4 °C 固化保存备用。磷酸钙干粉和 0.5 mol/L 稀磷酸按照固化时粉、液质量 2:1 制备单纯磷酸钙材料。

1.3 成骨细胞的培养

本研究分为 3 组:即空白对照组(Con 组)、磷酸钙组(CPC 组)和复合材料组(BSCPC 组);将第四代大鼠成骨细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种到 96 孔板中,CPC 组和 BSCPC 组的培养液中分别加入磷酸钙和负载 BMP-2 掺锶磷酸钙,37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度下培养,隔日换液。

1.4 材料共培养对成骨细胞的影响

1.4.1 细胞增殖情况:将成骨细胞以 2×10^5 接种于 96 孔板(37 °C, 100% 相对湿度, 5% CO₂) 中。CPC 组和 BSCPC 组在每个孔中分别加入磷酸钙和负载 BMP-2 掺锶磷酸钙以在 24 h 后代替培养基。使用细胞计数试剂盒 CCK-8 试剂盒在第 1、3、5 和 7 d 测定细胞增殖。通过分光光度计在 450 nm 处检测上清液的光密度(OD)。

1.4.2 成骨细胞 ALP 活性染色:将成骨细胞以 2×10^5 接种于 24 孔板,CPC 组和 BSCPC 组在每个孔中分别加入磷酸钙和负载 BMP-2 掺锶磷酸钙,用细胞分化液共培养 14 d。使用 ALP 酶活性染色试剂盒测定 ALP 活性,其通过底物的蓝色指示 ALP 活性。在光学显微镜下获得图像。

1.4.3 成骨细胞茜素红染色:将成骨细胞以 1×10^5 接种于 24 孔板,CPC 组和 BSCPC 组在每个孔中分别加入磷酸钙和负载 BMP-2 掺锶磷酸钙,并与其一起共培养 21 d。使用茜素红试剂盒染色检测细胞矿化能力,其通过改变底物的颜色来指示细胞矿化红

色。在光学显微镜下获得图像。

1.4.4 OPG、RANK、RANKL 蛋白表达情况:按上述方案培养到 14 d,提取细胞总蛋白,加热变性后,于 -20°C 保存。取蛋白 $30\ \mu\text{L}$,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将分离后的蛋白质电转移到 PVDF 膜上,用封闭液封闭滤膜 4 h,依次结合相应浓度的抗 OPG、RANK 及 RANKL 和抗 β -actin 抗体(1:1 000),于 4°C 孵育过夜,洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/兔抗鼠(1:2 000),孵育 1 h。用化学发光法曝光胶片,冲洗显色,检测相应蛋白条带。用凝胶成像分析系统扫描分析蛋白条带。

2 结果

2.1 共培养对成骨细胞增殖影响

经过不同材料共培养 1、3、5 和 7 d,CCK-8 检测的结果如图 1 所示,相对于 Con 组,CPC 组和 BSCPC 组的成骨细胞数目明显增加,和对照组比较相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),且以 BSCPC 组成骨细胞数目最多($P < 0.05$),这表明负载 BMP-

2 掺铈磷酸钙对成骨细胞增殖促进作用显著。

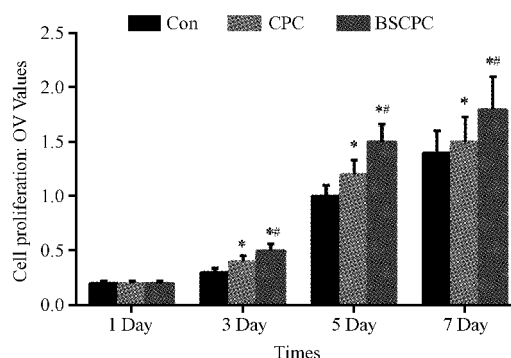


图 1 成骨细胞增殖情况

注:与 Con 组比较,* $P < 0.05$;与 CPC 组比较,# $P < 0.05$

Fig. 1 The proliferation of osteoblasts

2.2 成骨细胞茜素红染色及碱性磷酸酶活性

经过不同材料共培养 14 d 及 21 d,各组碱性磷酸酶染色及细胞茜素红染色的结果如图 2 A、B 所示,定量结果如图 2 C、D 所示,结果表明 CPC 组和 BSCPC 组的成骨细胞的矿化能力及 ALP 活性明显

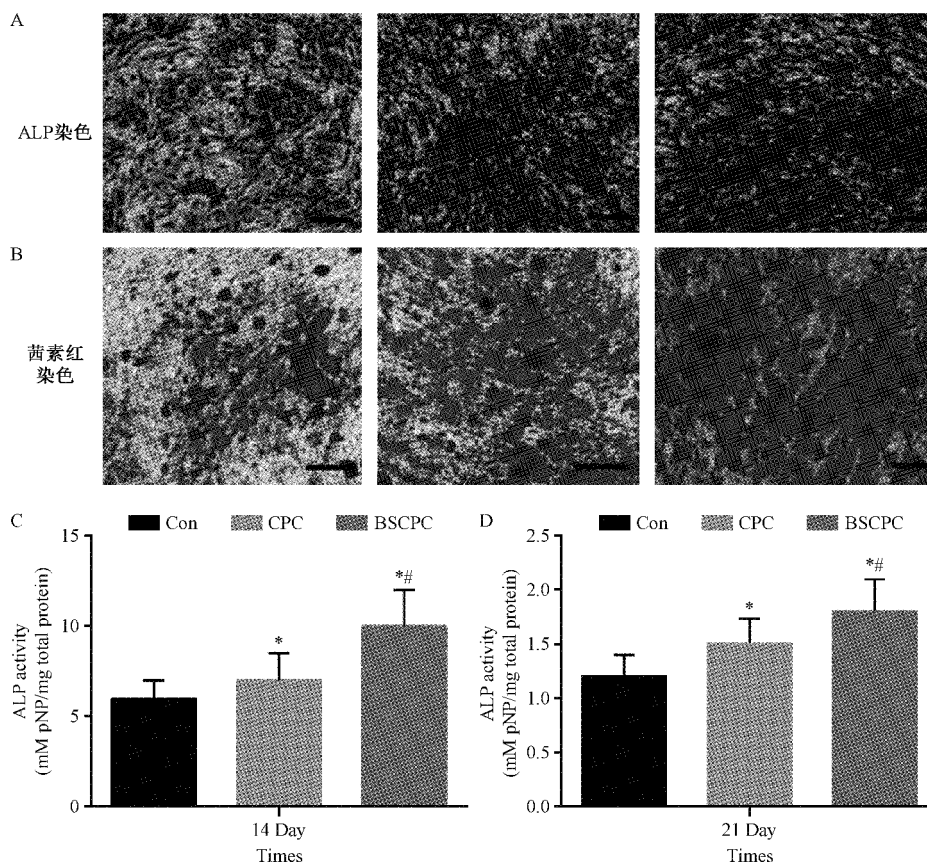


图 2 不同组细胞 ALP 和茜素红染色结果

注:A 成骨细胞 ALP 染色结果;B 成骨细胞茜素红染色结果;C 成骨细胞 ALP 活性定量结果;D 成骨细胞茜素红染色定量结果(与 Con 组比较,* $P < 0.05$;和 CPC 组比较,# $P < 0.05$;×10)

Fig. 2 Results of ALP and Alizarin red staining in different groups

增加,和对照组比较相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),且以 BSCPC 组细胞钙化能力最强及 ALP 活性最高($P < 0.05$),这表明负载 BMP-2 掺锶磷酸钙可以显著提高成骨细胞矿化能力及 ALP 活性。

2.3 成骨细胞 OPG、RANK 及 RANKL 表达情况

经过不同材料共培养 7 d, 各组细胞 OPG、RANK 及 RANKL 蛋白表达的结果如图 3 A 所示,定量结果如图 3 B 所示,结果表明 CPC 组和 BSCPC 组

的成骨细胞的 OPG 表达明显增加,而 RANK 及 RANKL 蛋白表达明显降低,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且以 BSCPC 组的成骨细胞蛋白 OPG、RANK 及 RANKL 蛋白表达量改善最为显著($P < 0.05$),这表明负载 BMP-2 掺锶磷酸钙对成骨细胞 OPG、RANK 及 RANKL 蛋白表达影响显著。

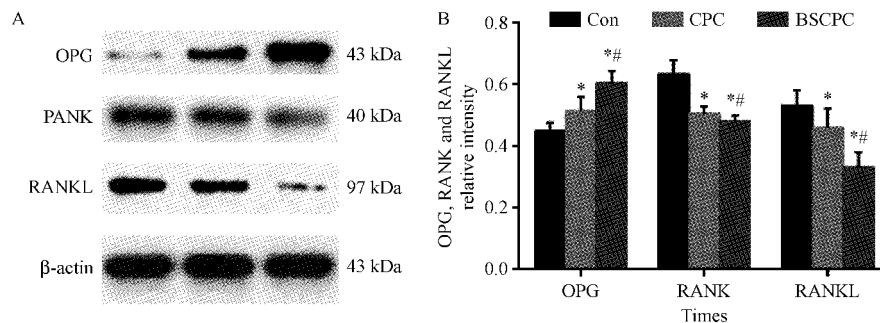


图3 各组细胞 OPG、RANK 及 RANKL 蛋白表达情况

注:A 各组细胞 OPG、RANK 及 RANKL 蛋白表达的结果;B 定量结果(与 Con 组比较, * $P < 0.05$; 与 CPC 组比较, # $P < 0.05$)

Fig. 3 The protein expressions of OPG, RANK, and RANKL in each group

3 讨论

修复由创伤、肿瘤、感染等原因引起的骨缺损仍然是骨科医生面临的主要挑战之一。尽管自体骨多年来一直被认为是骨移植材料的金标准,因为其优异的成骨组合(含有活的祖细胞)、骨诱导(含有许多能够募集祖细胞和/或异位骨形成的生长因子)和骨传导(能够支持三维组织向内生长和未来的新骨形成)^[9]。由于供应有限,供体部位的并发症以及疾病传播的风险,自体移植和同种异体移植在临床中应用受到限制^[10]。近年来随着骨生物材料制造技术不断发展,组织工程骨在骨缺损修复巨大潜力越来越受到人们的重视^[11]。迄今为止,合成的骨移植替代品中磷酸钙类的生物材料是最有希望的,由于其与骨矿物状态下的化学结果相似^[12]。尽管如此,合成骨移植物的性能仍然不如自体移植,由于缺少必要的骨诱导性能。

近年来主要通过这几种方案来提高磷酸钙材料修复骨缺损的能力,包括将它们与促骨形成因子,细胞和无机添加剂结合来加强其修复效果^[13]。将镁(Mg),锶(Sr)等无机添加剂掺入合成骨移植中越来越受欢迎,因为这些添加剂可能直接诱导细胞的变化,例如通过离子通道,潜在地起到“合成生长因

子”的作用^[13]。这些生物无机物在骨组织中的潜在作用以及它们对骨形成的作用,在我们早期发表的文献已经证实^[6]。在骨组织工程中已经进行了大量的努力以将成骨生长因子与支架结合以控制它们的释放,从而以最小的副作用再生骨缺损^[14]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族成员,在调节细胞增殖、凋亡、分化和器官发生中起着至关重要的作用^[15]。据报道,在通过缩短手术时间和降低住院费用方面,使用 BMP-2 比“金标准”自体骨移植更有优势,然而 BMP-2 使用也带来了一部分副作用,这些副作用归因于局部高剂量 BMP-2 不受控制的释放;同时一些研究显示了 BMP-2 的使用与癌发生之间的联系^[16]。

本研究中通过组织工程手段合成负载 BMP-2 掺锶磷酸钙复合材料,我们 BMP-2 剂量较低,同时由于材料组添加了 Sr,即可通过刺激局部合成骨形成相关因子弥补 BMP-2 剂量不足对骨形成诱导能力降低的影响,有潜力在降低 BMP-2 剂量的同时不降低骨诱导效果。我们的研究结果显示 BSCPC 组的成骨细胞增殖情况显著优于 Con 组和 CPC 组;同时 BSCPC 组 ALP 染色和茜素红染色结果显示该组成骨细胞的活性更高,且矿化能力更强;BSCPC 组

成骨细胞 OPG、RANK 及 RANKL 蛋白表达的结果更好的表明负载 BMP-2 掺锶磷酸钙复合材料能改善成骨细胞成骨能力。我们认为负载 BMP-2 掺锶磷酸钙复合材料较单独复合 BMP-2 或添加 Sr 具有较大的优势,既可以避免局部大剂量 BMP-2 爆发性释放出现的不良反应^[16];同时由于 Sr 这类无机材料通过改善成骨因子来促进成骨^[17],不同于 BMP-2 直接作用成骨细胞,对后续的骨形成促进作用意义重大。

总的来说,我们研究证实了负载 BMP-2 掺锶磷酸钙复合材料对成骨细胞增殖分化和改善细胞活性和功能方面的作用显著;本研究也有不足之处,分组较少,且体内实验尚未进行;且这种材料和较高剂量的单独掺 BMP-2 磷酸钙复合材料或较高剂量的单独掺锶磷酸钙复合材料成骨效果尚未进行比较,因此后期进一步研究这种复合材料的优势显得非常有必要。

【参 考 文 献】

- [1] Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases [J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1508-1514.
- [2] Zhang Y, Cheng N, Miron R, et al. Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects [J]. *Biomaterials*, 2012, 33 (28): 6698-6708.
- [3] Khan SN, Tomin E, Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes[J]. *Orthopedic Clinics of North America*, 2000, 31 (3): 389-398.
- [4] Tao ZS, Qiang Z, Tu KK, et al. Treatment study of distal femur for parathyroid hormone (1-34) and beta-tricalcium phosphate on bone formation in critical size defects in rats [J]. *J Biomater Appl*, 2015, 30(4): 484-491.
- [5] Tao ZS, Zhou WS, Tu KK, et al. Treatment study of distal femur for parathyroid hormone (1-34) and beta-tricalcium phosphate on bone formation in critical-sized defects in osteopenic rats [J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2015, 43(10): 2136-2143.
- [6] Tao ZS, Zhou WS, He XW, et al. A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 62: 226-232.
- [7] Maisani M, Sindhu KR, Fenelon M, et al. Prolonged delivery of BMP-2 by a non-polymer hydrogel for bone defect regeneration [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2018, 8(1): 178-190
- [8] Huang B, Tian Y, Zhang W, et al. Strontium doping promotes bioactivity of rhBMP-2 upon calcium phosphate cement via elevated recognition and expression of BMPR-1A [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 159: 684-695.
- [9] Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards [J]. *Journal of Dental Research*, 2012, 91 (8): 736.
- [10] Beier JP, Horch RE, Hess A, et al. Axial vascularization of a large volume calcium phosphate ceramic bone substitute in the sheep AV loop model [J]. *Journal of Tissue Engineering & Regenerative Medicine*, 2010, 4(3): 216-223.
- [11] Jin WL, Kang KS, Lee SH, et al. Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly (propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(3): 744-752.
- [12] Böhner M, Galey L, Doebelin N. Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes [J]. *Journal of the European Ceramic Society*, 2012, 32(11): 2663-2671.
- [13] Z TB, Malhotra A, van Blitterswijk CA, et al. Human mesenchymal stromal cells response to biomimetic octacalcium phosphate containing strontium [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2016, 104(8): 1946.
- [14] Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for Controlled Delivery of Growth Factors and Cells for Bone Regeneration [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64(12): 1292-1309.
- [15] Reddi AH, Reddi AH. BMPs: From bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005, 16(3): 249-250.
- [16] Tannoury CA, An HS. Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery [J]. *Spine J*, 2014, 14(3): 552-559.
- [17] Zhao L, Wang H, Huo K, et al. The osteogenic activity of strontium loaded titania nanotube arrays on titanium substrates [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(1): 19-29.

(收稿日期: 2017-12-23; 修回日期: 2018-01-14)