

珊瑚羟基磷灰石负载含 BMP-2 纳米缓释微球体系促进人间充质干细胞骨形成的研究

于鹏 纪志华* 贾丙申 周立义 付昆

海南医学院第一附属医院关节创伤外科,海南 海口 570102

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 02-0152-04

摘要: **目的** 探讨珊瑚羟基磷灰石负载含骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)纳米缓释微球体系在促进人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells,hMSCs)骨形成中的作用。**方法** 从骨移植患者中收集 hMSCs,分离培养后使用 BMP-2 纳米微球作为载体,装载到珊瑚羟基磷灰石(coral hydroxyapatite,CHA)支架上。将 CHA-BMP-2-hMSCs 与 CHA-hMSCs 分别植入两组小鼠的 L4 和 L5 横向软组织中,10 周后检测小鼠碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性,通过 Western blot 检测 Runx2 蛋白与骨桥蛋白表达水平,通过显微镜观察骨质生长情况。**结果** CHA-BMP-2-hMSCs 小鼠的支架上骨组织覆盖面积显著大于 CHA-hMSCs 小鼠,ALP 活性显著高于非缓释组小鼠,骨钙素、Runx2 蛋白与骨桥蛋白表达水平高于非缓释组小鼠。**结论** CHA-BMP-2-hMSCs 缓释系统有利于在较长时间内诱导骨形成。

关键词: 珊瑚羟基磷灰石;人骨形态发生蛋白 2;人间充质干细胞;对照研究;动物实验

Study on the bone formation of human mesenchymal stem cells by coral hydroxyapatite loaded with BMP-2 nanoscale microspheres

YU Peng, JI Zhihua*, JIA Bingshen, ZHOU Liyi, FU Kun

Department of Traumatic Surgery, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, China

* Corresponding author; Ji ZH,Email: 983744125@qq.com

Abstract: Objective To investigate the role of coral-hydroxyapatite-loaded BMP-2 nano-release microspheres in promoting bone formation of human mesenchymal stem cells. **Methods** Human mesenchymal stem cells (MSCs) were collected from bone transplant recipients. After isolation and culture, bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) was loaded onto coral hydroxyapatite (CHA) scaffolds. The CHA-BMP2-hMSCs and CHA-hMSCs were implanted into L4 and L5 transverse soft tissues of mice, respectively. After 10 weeks, alkaline phosphatase (ALP) activity in mice was detected, Runx2 protein and osteogenic protein expression were detected by Western blot, and bone growth was observed using microscope. **Results** Compared with CHA-hMSCs, the ALP activity of the sustained-release mice was significantly higher than that of the non-sustained-release mice, and the osteocalcin, Runx2 and osteopontin levels were higher than those of the non-sustained release group mice. **Conclusion** CHA-BMP2-hMSCs sustained release system is conducive to induce bone formation in a long time.

Key words: coral hydroxyapatite; human bone morphogenetic protein 2; human mesenchymal stem cells; control study; animal experiment

骨移植手术中,自体骨是最有效的材料,但将其用于修复骨缺损或脊柱融合术中存在造成取骨供体部位创伤及骨量有限因素限制。自体或同种异体骨可常规应用于促进骨再生^[1],但供体骨来源同样有限,且具有病原体感染和排异的潜在风险。人工骨

的研究和使用解决了这个问题,而珊瑚羟基磷灰石(coral hydroxyapatite,CHA)人工骨的研究是其中的热点。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)具有广泛的骨形成潜能^[2],鉴于难以评估其在人体内的成骨潜能,之前多采用的是免疫功能低下的动物系统进行实验研究^[3],例如小鼠等模型系统在此类实验中被广泛使用,免疫缺陷小鼠的 MSCs 发育形成成熟的骨组织

基金项目: 国家自然科学基金(81260271)

* 通信作者: 纪志华,Email:983744125@qq.com

是一个长期的过程,其形成极有可能依赖于细胞生存环境的稳定。相关研究表明^[4],通过培养使得MSCs形成异位骨组织,可以成功将其植入免疫缺陷小鼠体内。然而仅仅在2周内就基本被机体清除,无法得到长期的保留与发育。可据此推测,成骨细胞移植到免疫缺陷小鼠体内后无法维持发育的原因是小鼠体内环境不适宜该细胞生长发育,因为人类成骨细胞的发育需要特定生长因子,而小鼠缺乏,因而导致宿主巨噬细胞和其他免疫细胞增生为特征的炎症反应,引起广泛的异位骨吸收。本研究旨在通过CHA负载含BMP-2纳米缓释微球体系促进MSCs分化成骨。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究使用的CHA的孔径和表面结构参考以往同类研究^[5-6],购自北京创意生物工程新材料有限公司。BMP-2购自上海嵘崑达实业有限公司。聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA](50:50)购自北京沃海环球科技有限公司(阿波罗试剂)。甲醛、Triton X100、丙酮、甲醇、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、甲苯胺蓝染色均购自上海生工公司。从自脊柱融合的髂骨移植术后患者抽取10 mL骨髓,采用无菌肝素抗凝的注射器盛装,用以制备MSCs。患者对本研究均知情同意,并签署骨髓捐赠知情同意书,本研究获得医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 MSCs分离与培养:每个骨髓样品用PBS洗涤3次,保留沉淀与上清液5 mL,采用密度梯度离心,从1.073 g/mL的密度界面分离出目的细胞,将细胞重悬并接种于T-75烧瓶中,每瓶 2×10^5 个。培养液中含有20%胎牛血清(FBS)和抗生素的达尔伯克改良伊格尔的中低葡萄糖(DMEM-LG; Gibco, Grand Island, NY),培养箱环境为37℃,5%CO₂。连续培养7 d后更换培养基,加入青霉素(100 mL)和链霉素(100 mg/mL)。同时除去未贴壁细胞。MSCs作为对称集落生长,用0.05%胰蛋白酶(郑州奇雅化工产品有限公司)处理10~14 d后传代并接种到新瓶内。

1.2.2 制备BMP-2并载到CHA上的过程:采用水-油-水方式制备BMP-2缓释微球的PLGA。将200 mg PLGA溶解在1 mL二氯甲烷中,混匀后加入1

mg BSA作为BMP-2的载体。配比为BSA 1 mg + rhBMP-2 20 g,去离子水200 μL。将整个混合物用超声波发生器(Microson™ Ultrasonic Cell Disruptor, NY)在2 W的冰水浴中超声处理1 min(静止10 s,静止10 s)以形成初级水油乳液,室温下用1%聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol PVA)10 mL溶液以6 500 r/min的转速均质化30 s。将所得的乳液在搅拌下倒入1%PVA 90 mL溶液中3 h以蒸发有机溶剂。所得的PLGA微球体用蒸馏去离子水洗涤3次,并通过以2 000 r/min离心(Beckman Coulter, Allegrax12R, USA)进行收集。将微球体冻干(Edwards Modulyo, Crawley, England)过夜,即为CHA-BMP-2-hMSCs成品冷冻保存待用。

将BMP-2包封的微球体悬浮在具有CHA的溶液中,涡旋混匀确保微球体能够渗入CHA中的200 μm多孔通道。通过超声处理将微球悬浮于0.02%吐温80℃的水溶液中10 min。通过溶剂萃取法测定BMP-2在PLGA微球中的包封率,将rhBMP-2包封的微球体溶解在2 mL二氯甲烷中,后加入0.1 mol/L PBS 5 mL。使用IKA微型反应器(MS2, IKA works Inc., USA)以2 500 r/min转速将混合物涡旋1 min,37℃温育将BMP-2从有机相中萃取至水相,1 000 r/min振荡2 h。低温离心机以10 000 r/min离心之后测定上清液中的蛋白质,平行测定3次。

1.2.3 分组进行皮下植入:在体外培养培养基中培养2周,将CHA-BMP-2-hMSCs与CHA-hMSCs移植分别植入两组小鼠的L4和L5横向软组织中。10周后处死小鼠,进行骨矿物质含量(bone mineral content, BMC)检查。

1.2.4 指标检测:(1)检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性。10 d后,取小鼠血样采用全自动生化分析仪进行ALP活性测定。(2)免疫组织化学。将植入物取出后进行切片晾干并固定在10%福尔马林缓冲液、0.5%苯胺、pH 4.5醋酸缓冲液中染色,显微镜下观察骨样组织形成的面积。(3)Western blotting检测。采用Western blot方式检测小鼠血中Runx2蛋白与骨桥蛋白表达水平。

1.3 统计学分析

数据显示为均数±标准差($\bar{x} \pm s$),并用SPSS 20.0统计对数据进行两独立样本t检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测 ALP 活性

10 d 后,取小鼠血样采用全自动生化分析仪进行 ALP 活性测定。非缓释组小鼠的 ALP 活性为 (1.67 ± 0.42) nmol/min,显著低于 CHA-BMP-2-hMSCs 的 (2.55 ± 0.53) nmol/min ($t = 8.254, P < 0.01$)。

2.2 免疫组织化学

将植入物取出后进行切片晾干并固定在 10% 福尔马林缓冲液、0.5% 苯胺、pH 4.5 醋酸缓冲液中染色,显微镜下观察骨样组织形成的面积。结果可见非缓释组小鼠的 CHA 支架表面未见骨样组织形成。而在缓释组小鼠的 CHA 支架上可见约 20% 的面积已被骨状组织覆盖。非缓释组小鼠骨样组织形成面积显著低于缓释组小鼠 ($P < 0.05$)。见图 1。

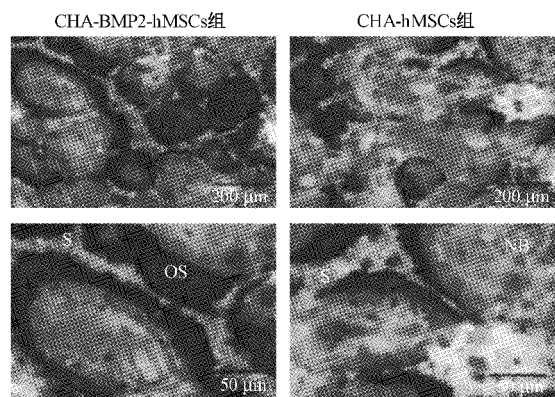


图 1 两组免疫组织化学染色(显微镜下观察骨样组织形成的面积)

Fig. 1 Immunohistochemical staining (microscopic observation of the area of bone-like tissue formation)

注:NB:新骨;OS:类骨质;S:复合物

2.3 Western blot 检测

采用 Western blot 方式检测小鼠血中 Runx2 蛋白与骨桥蛋白表达水平。结果可见非缓释组小鼠的 Runx2 蛋白表达水平为 (1.42 ± 0.18) fold,显著低于缓释组的 (2.36 ± 0.21) fold ($t = 6.758, P < 0.01$);骨桥蛋白表达水平为 (1.78 ± 0.26) fold,显著低于缓释组的 (3.17 ± 0.27) fold ($t = 9.724, P < 0.01$);骨钙素表达水平为 (1.24 ± 0.08) fold,显著低于缓释组的 (1.75 ± 0.12) fold ($t = 4.336, P < 0.01$)。

3 讨论

骨骼形成后需要成骨细胞与破骨细胞的平衡来

维持。成骨细胞的形成和破骨细胞引导的生理过程受多种生物学与力学因素的调节,由成骨细胞形成新骨,由破骨细胞破坏吸收旧骨并引导成骨细胞成骨。有研究显示,自年轻患者与老年患者体内分离的 hMSCs 克隆形成率无显著差异^[7],年轻患者与老年患者的区别在于骨增殖能力和骨再生能力的不同。老年人骨形成和骨吸收不平衡,有利于骨吸收,导致骨丢失和骨质疏松^[8]。可能的原因为老年人激素水平已经发生改变,或局部产生了细胞因子^[9-10]。CHA 已被证明能够支持 MSCs 在体外的增殖和分化,因此可被用作骨替代材料^[11],CHA 结合 BMP 或胶原蛋白也成功地在体外实验中实现了骨再生。然而在早期研究显示,将 CHA 结合 hMSCs 后植入免疫缺陷小鼠,5 周后没有生长出任何骨组织^[12]。这意味着成骨细胞在成骨诱导过程中可能在某种程度上依赖于由支架化学成分与宿主组织之间相互作用建立的局部微环境。为了能够长时间维持骨形成过程,可能需要骨形成信号的长时间作用。然而,这种骨是来源于供体细胞还是通过宿主细胞的骨诱导,尚未得到确定。

为了促进以骨吸收为主的环境中的骨形成,可能需要持续供应刺激合成代谢的生长因子以延长期望的骨形成过程。BMP-2 已被广泛用作体内和体外骨形成的诱导剂和增强剂^[13],并已广泛应用于临床^[14-15]。且目前 BMP 的应用剂量相对较高,如 BMP7 为 3.5 mg 单剂量, rhBMP-2 单剂量为 12 mg^[16]。但无论剂量如何,应用的哪种 BMP,若要在长时间内维持稳定剂量都需要一个适宜的递送系统,以便优化骨愈合的长期过程^[17]。这种系统不仅能够提供适当的释放时间,还能提供释放的载体,以保持与周围组织之间的完整性。优化的输送系统能够提高成骨潜能而尽可能减少 BMP 的总体用量,更为安全而经济^[17-18]。

由于上述原因,本研究将 hBMP-2 包裹在用于控制释放 hBMP-2 的微球中。将复合物植入免疫缺陷小鼠皮下,通过 hBMP-2 的缓释作用,在植入 10 周后处死小鼠,可见在植入 CHA-hBMP-2-hMSC 后的小鼠 CHA 支架上观察到骨组织的形成。血清学与 Western blot 也显示植入 CHA-hBMP-2-hMSC 后的小鼠骨生成较植入 CHA-hMSC 后的小鼠更为活跃。

由此可见,通过优化 CHA-hBMP-2-hMSC 组合,可以将 CHA 作为功能性生物材料进行激活,有效弥补较大的骨缺损、老龄以及炎症等之前被认为缺乏

适合长期骨组织形成环境的劣势,通过 CHA-hBMP-2-hMSC 系统的缓释作用解决问题。

综上所述,将 CHA 作为支架结合 MSCs,并配合 BMP-2 缓释微球形成复合物进行植入,通过上调骨钙素、Runx2 蛋白与骨桥蛋白表达水平,支持免疫缺陷小鼠骨形成的时间能够长达 10 周。

【参 考 文 献】

- [1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering[J]. Science, 1993, 260(5110):920-926.
- [2] Miao T, Wang J, Zeng Y, et al. Polysaccharide-based controlled release systems for therapeutics delivery and tissue engineering: From bench to bedside [J]. Adv Sci (Weinh), 2018, 5(4):1700513.
- [3] Triffitt JT. Osteogenic stem cells and orthopedic engineering: summary and update [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 63(4):384-389.
- [4] Xia Z, Taylor PR, Locklin RM, et al. Innate immune response to human bone marrow fibroblastic cell implantation in CB17 scid/beige mice [J]. J Cell Biochem, 2006, 98(4):966-980.
- [5] Mora F, Ouhayoun JP. Clinical evaluation of natural coral and porous hydroxyapatite implants in periodontal bone lesions: Results of a 1-year follow-up [J]. J Clin Periodontol, 1995, 22(11):877-884.
- [6] Hou R, Chen F, Yang Y, et al. Comparative study between coral-mesenchymal stem cells-rhBMP-2 composite and auto-bone-graft in rabbit critical-sized cranial defect model [J]. J Biomed Mater Res, 2007, 80(1):85-93.
- [7] Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT. Skeletal progenitor cells and ageing human populations [J]. Clin Sci (Lond), 1998, 94(5):549-555.
- [8] Seeman E. Reduced bone formation and increased bone resorption: Rational targets for the treatment of osteoporosis [J]. Osteoporos Int, 2003, 14(Suppl 3):S2-S8.
- [9] Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis: The second decade [J]. Endocrinology, 1998, 139(6):2659-2661.
- [10] Abrahamsen B, Bonnevie-Nielsen V, Ebbesen EN, et al. Cytokines and bone loss in a 5 year longitudinal study: Hormone replacement therapy suppresses serum soluble interleukin-6 receptor and increases interleukin-1-receptor antagonist: The danish osteoporosis prevention Study [J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(8):1545-1554.
- [11] Leize EM, Hemmerle J, Voegel JC, et al. CHA characterization and histological analyses of a coral-collagen composite used for bone-replacement graft material: A report of clinical cases [J]. J Mater Sci Mater Med, 1999, 10(1):47-51.
- [12] Harris CT, Cooper LF. Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis [J]. J Biomed Mater Res, 2004, 68(4):747-755.
- [13] Arnaud E, De Pollak C, Meunier A, et al. Osteogenesis with coral is increased by BMP and BMC in a rat cranioplasty [J]. Biomaterials, 1999, 20(20):1909-1918.
- [14] White AP, Vaccaro AR, Hall JA, et al. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, non-unions and spinal fusion [J]. Int Orthop, 2007, 31(6):735-741.
- [15] Johnsson R, Stromqvist B, Aspenberg P. Randomized radio-stereometric study comparing osteogenic protein-1 (BMP-7) and autograft bone in human noninstrumented posterolateral lumbar fusion: 2002 Volvo Award in clinical studies [J]. Spine, 2002, 27(23):2654-2661.
- [16] Jones AL, Bucholz RW, Bosse MJ, et al. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(7):1431-1441.
- [17] Chen FM, Wu ZF, Sun HH, et al. Release of bioactive BMP from dextran-derived microspheres: A novel delivery concept [J]. Int J Pharm, 2006, 307(1):23-32.
- [18] Maire M, CHAubert F, Mary P, et al. Bovine BMP osteoinductive potential enhanced by functionalized dextran-derived hydrogels [J]. Biomaterials, 2005, 26(4):5085-5092.
- [19] Russell RG, Xia Z, Dunford JE, et al. Bisphosphonates: An update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy [J]. Ann NY Acad Sci, 2007, 1117:209-257.
- [20] Henneman ZJ, Nancollas GH, Ebetino FH, et al. Bisphosphonate binding affinity as assessed by inhibition of carbonated apatite dissolution in vitro [J]. J Biomed Mater Res, 2008, 85(4):993-1000.
- [21] Gandsman EJ, McCullough RW. Dynamic bone imaging in the differential diagnosis of skeletal lesions [J]. Int J Rad Appl Instrum, 1990, 17(6):533-541.

(收稿日期: 2018-04-10; 修回日期: 2018-05-10)