

## 双相陶瓷材料——羟基磷灰石与细胞黏附剂 协同促进成骨细胞增殖的研究<sup>①</sup>

黄力<sup>1,2</sup>, 赵劲民<sup>1,2,3</sup>②

- (1. 广西医科大学再生医学实验室, 广西 南宁 530021;
2. 广西医科大学第一附属医院创伤骨科手外科, 广西 南宁 530021;
3. 广西医科大学医学实验中心, 广西 南宁 530021)

**摘要:** **目的** 观察在体外涂刷细胞黏附剂 (cell adherent reagent, CAR) 对羟基磷灰石 (biphasic calcium phosphate, BCP) 生物学活性的影响。 **方法** 成骨细胞被种植入经过 CAR 涂刷的 BCP 材料 (实验组, 即 BCP-CAR 组) 和用生理盐水处理过的 BCP 材料 (空白组, 即 BCP 组) 中, 在培养 2 d、5 d、8 d 后, 分别测定细胞增殖、细胞生存活力、碱性磷酸酶 (ALP) 活性, RT-PCR 用于检测成骨细胞 runt 转录相关因子 2 (RUNX2)、ALP、骨唾液蛋白 (BSP) 和 I 型胶原酶 (COL I) 的基因表达。 **结果** 与空白组对比, 涂刷了 CAR 的 BCP 材料, 其成骨细胞的细胞增殖和 ALP 活力上调, RUNX2、BSP、ALP 及 COL I 基因表达上调, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 经过 CAR 涂刷能增强 BCP 材料的生物活性, 这为其临床应用提供了重要的依据。

**关键词:** 细胞黏附剂; 羟基磷灰石; 吸附能力; 成骨细胞

中图分类号: R-33 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2016)02-0132-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.02.002

### Promotive effect of biphasic calcium phosphate (BCP) ceramics coated with cell adherent reagent (CAR) on proliferation of osteoblasts: an *in vitro* study

Huang Li<sup>1,2</sup>, Zhao Jingmin<sup>1,2,3</sup>

- (1. Guangxi Key Laboratory of Regenerative Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China; 2. Department of Traumatic Orthopaedics/Hand Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China; 3. Centre for Experimental Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** This study aim is to observe the effects of the biphasic calcium phosphate (BCP) ceramics coated with cell adherent reagent (CAR) on biological activity of BCP ceramics *in vitro*. **Methods** Osteoblasts were cultivated on BCP ceramics administered with normal saline (the blank group or BCP group) and on BCP ceramics coated with cell adherent reagent (the experimental group or BCP/CAR group). On day 2, day 5 and day 8 of cultivation, the detection of cell proliferation, cell viability, alkaline phosphatase (ALP) activity were performed, respectively; and expressions of osteoblastic ALP, bone sialoprotein (BSP), type I collagen (COL I) genes and runt-related transcription factor 2 (RUNX2) were measured by using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. **Results** In the experimental group: the osteoblastic cell proliferation and ALP activity were upregulated; and expressions of RUNX2, BSP, ALP and COL I genes were upregulated. Comparison with the blank group showed there were all statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** BCP coated with CAR can promote the biological activity of BCP and this conclusion provides

① 基金项目: 国家自然科学基金(81160221)

② 通讯作者, E-mail: zhaojinmin@126.com

important evidence for its clinical use.

**Key words:** cell adherent reagent; biphasic calcium phosphate ceramic; adhesive ability; osteoblast

磷酸钙是一种被广泛用于骨骼修复的材料<sup>[1-2]</sup>, 它的矿物成分接近正常骨组织, 且其生物学活性、安全性、有效性及实用性相对其它材料更高。而在多种磷酸钙材料中, 双相陶瓷材料——羟基磷灰石 (BCP) 具有较好的生物学活性和可靠的生物降解作用, 是一种优良的生物载体, 在生物治疗领域有广阔的前景<sup>[3-4]</sup>。

细胞黏附是指在细胞识别的基础上, 同类细胞可发生聚集形成细胞团或组织的过程<sup>[5]</sup>。细胞黏附剂 (cell adherent reagent, CAR) 是一种能使材料产生黏附作用的试剂, CAR 能否增强 BCP 材料的生物学活性却是未知的。因此, 在本研究中, 用 CAR 处理 BCP 材料, 观察种植于 BCP 上的成骨细胞活性, 探讨 CAR 能否增强 BCP 材料的生物学活性。

## 1 材料与方 法

1.1 试剂 BCP 材料购于中国四川大学生物工程研究中心, CAR 购买于北京普利莱 (APPLYGEN) 基因技术有限公司, BCA 蛋白定量试剂盒购于博士德生物公司, ALP 检测试剂盒购于上海丰寿实业有限公司。

1.2 BCP 材料的处理 BCP 材料的形状为圆盘形, 直径约 1 cm, 厚 0.2 cm。CAR 按照试剂说明书操作, 将 CAR 按 30  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  涂刷于 BCP 材料表面, 并用紫外灯照射 1 h 以灭菌, 完成后 BCP 材料即可作为实验组 (BCP-CAR 组) 用于下一步的实验。同样, 空白组 (BCP 组) 处理过程基本与实验组相同, 用生理盐水涂于 BCP 材料表面后紫外灯照射 1 h 后即可。

1.3 分离培养原代成骨细胞 提取原代成骨细胞首先需要解剖分离出新生 SD 乳鼠的头盖骨, 得到的头盖骨经过 0.25% 胰蛋白酶 (Solarbio, China) 消化 30 min 后用剪刀将其剪碎, 再用 2 mg/ml I 型胶原酶 (collagenase type I, COL I) (Gibco, USA) 在  $\alpha$ -MEM (Gibco, USA) 培养基中孵育 4 h; 之后以 1 000 r/min 的速度离心 5 min, 重悬后的细胞转移至含有 20% 胎牛血清 (FBS), (Gibco, USA) 和 1% 青链霉素

的  $\alpha$ -MEM 培养基, 并置于 5%  $\text{CO}_2$  37  $^\circ\text{C}$  的培养箱中培养, 每 2 d 更换 1 次培养基。当成骨细胞生长达到培养皿 80%~90% 面积, 即可用于下一步实验。

1.4 细胞增殖检测 检测成骨细胞的增殖是通过 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-(diphenyltetra-zoliumbromide)] 检测法来实现的。首先, 把 2 组经过处理的 BCP 材料装在 24 孔板里, 然后用原代的成骨细胞经过胰蛋白酶消化、离心重悬后以  $5 \times 10^3$ /孔浓度种植入材料, 经过 2 d、5 d、8 d 的培养后可进行 MTT 检测。检测时在每孔里加入 1 ml 浓度为 0.5 mg/ml 的 MTT (Sigma) 溶液, 之后放入 5%  $\text{CO}_2$  37  $^\circ\text{C}$  的培养箱中孵育 4 h, 所形成的甲瓚晶体用 1 ml 二甲基亚砷 (DMSO) 溶解。得到的紫色溶液在充分混匀后以 200 毫升/孔加入 96 孔板, 每个组横向排列一行, 收集好所有样品后将 96 孔板放入酶标仪, 检测在 570 nm 波长下的吸光值。

1.5 细胞活力检测 收集经过 2 d、5 d、8 d 培养的成骨细胞, 用荧光素二乙酸酯 (FDA, Genway Biotech, Inc, USA)/ 碘化丙啶 (PI, Sigma, USA) 混合液来染色反映其细胞活力, FDA 和 PI 的浓度分别为 2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  和 2  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 将混合液加入样品中避光孵育 5 min 即可完成染色。图像采集由共聚焦显微镜完成。

1.6 碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测 用 200  $\mu\text{l}$  RIPA 裂解液 (Beyotime Institute of Biotechnology, China) 溶解, 然后加入苯甲基磺酰氟 (PMSF) 使得裂解的细胞溶液终浓度达到 1 mmol/L。总蛋白浓度和 ALP 活性的测定分别按照 BCA 蛋白定量试剂盒和 ALP 检测试剂盒检测。

1.7 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 抽取培养 2 d、5 d、8 d 时间成骨细胞的 RNA, 采用 RT-PCR 用于检测 runt 转录相关因子 2 (RUNX2)、ALP、骨唾液蛋白 (BSP) 和 COL I 的基因表达, 见表 1。

表 1 本实验引物

基因名	正向引物	反向引物
ALP	5'-GTTACAAGGTGGTGGACGGT-3'	5'-ACAGTGGTCAAGGTTGGCTC-3'
BSP	5'-CAATCTGTGCCACTCACTGC-3'	5'-TGCCCTGAAGTGGAAATCGTT-3'
COL I	5'-GTTTCAGCTTTGTGGACCTCCG-3'	5'-GCAGTTCTTGGTCTCGTCAC-3'
RUNX2	5'-TGTCATGGCGGGTAACGATG-3'	5'-CCCTAAATCACTGAGGCGGT-3'

1.8 统计学方法 数据采用 SPSS 13.0 进行分析。数据均用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 计量资料组间比较用方差分析。

最小显著性差异检验 (LSD-t) 对数据进行多重比较检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 细胞增殖的检测 实验组在初始第 2 d 就表现出较高的细胞增殖水平,随着时间的延长表现出促进细胞明显增殖的趋势,而空白组则类似于细胞自然增殖速度。结果显示,实验组材料对细胞增殖有促进作用,见图 1。

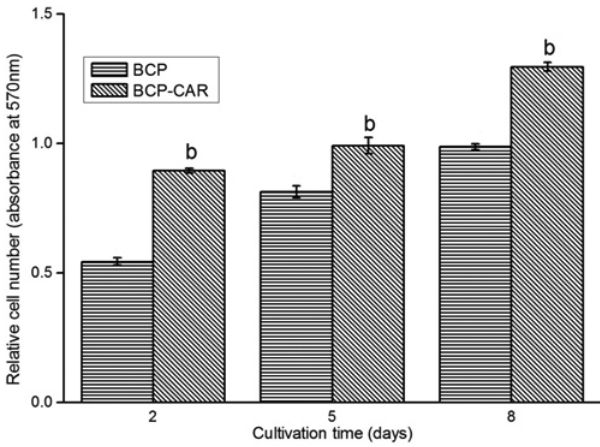


图 1 成骨细胞种植在 BCP 材料的增殖能力的检测结果 ( $n=9$ )  
注:与 BCP 组相比较,b:  $P < 0.05$

2.2 细胞活力的检测 FDA/PI 染色图显示,活细胞(绿色)在实验组要多于空白组,这个结果与细胞增殖实验结果一致,见图 2。

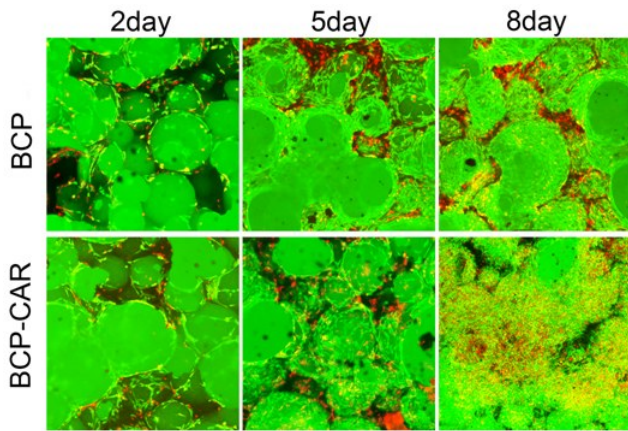


图 2 2 d,5 d,8 d 培养后 BCP 材料上成骨细胞 FDA/PI 染色结果

2.3 ALP 活性的检测 ALP 由成骨细胞产生,一般可视成骨细胞的标志物。实验组比空白组有更高的 ALP 活性。在所有组中,ALP 活性值都随着时间的延长而增长,见图 3。

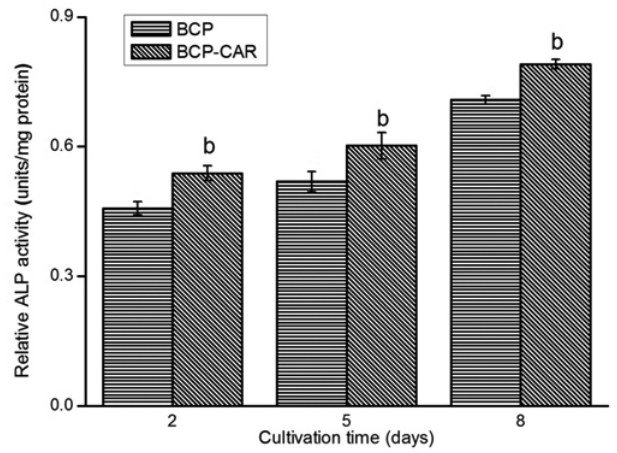


图 3 培养 2 d,5 d,8 d 成骨细胞的 ALP 活性检测结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
注:与 BCP 组相比较,b:  $P < 0.05$

2.4 逆转录 PCR 检测 检测培养 2 d,5 d,8 d 后 4 种成骨分化基因 RUNX2、BSP、ALP 和 COL I 的基因表达,发现 RUNX2、BSP、ALP 及 COL I 在实验组中均呈连续上调表达。在所有组中,除了 RUNX2 以外,所有基因表达的增长呈时间依赖性;RUNX2 在第 5 d 表达达到峰值后出现下降,见图 4。

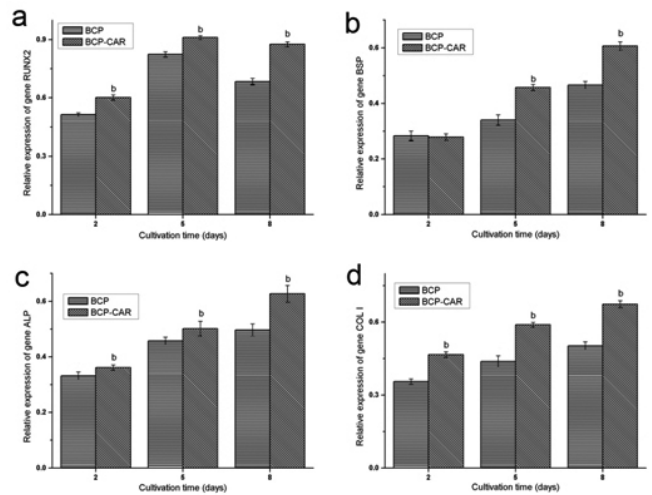


图 4 成骨相关基因 RUNX2(a)、BSP(b)、ALP(c)和 COL I (d)的表达 ( $n=3$ )  
注:与 BCP 组相比较,b:  $P < 0.05$

## 3 讨论

在本次研究中,我们探讨了用 CAR 处理 BCP 材料后的生物学的效果,结果表明,与同组对照组相比,BCP 涂刷了 CAR 后可以显著提高成骨细胞生长,细胞增殖速度和 FDA/PI 确定细胞生存力染色结果证明了这一点。MTT 实验结果表明,在 MTT 实验第 2 d 中,实验组的吸光度明显比空白组要高,这一结果提

示,在接种成骨细胞时,就有大量成骨细胞被吸附在材料表面,而对照组中细胞可能由于添加培养基或一些不可避免的实验操作使得细胞或游离于培养基中或接种到孔板上,自然在材料上的细胞则少于实验组,也间接说明了 CAR 使得 BCP 材料的吸附成骨细胞作用增强。

成骨细胞基质的主要成分为 ALP,是一种被明确定义的成骨细胞标记物,此标记物在成骨细胞成熟前一般都增加<sup>[6]</sup>。一般来说,在 ALP 活性下降时,标志着成骨细胞基本完全成熟。在培养期间,ALP 活性在 2 个组都逐步上调,这表明细胞外基质的生长阶段已经完全矿化。但是随着时间的推移,ALP 活性的增加呈平稳趋势。这表明成骨细胞已基本成熟,ALP 活性检测和 ALP 染色结果与基因表达相对一致。这些都证明,CAR 处理可使得成骨细胞大量聚集形成团或成骨漩涡,促进成骨细胞的分化。

与此同时,结果发现实验组上调了基因 ALP、RUNX2、COL I 和 BSP 的表达,且 ALP、COL I 和 BSP 的增长均表现出了时间依赖性。作为骨基质的主要结构蛋白,BSP 是由完全分化的成骨细胞特异表达的<sup>[7]</sup>,实验组中 BSP 的增长高于对照组说明了实验组成骨细胞相对于对照组更加成熟。RUNX2 的表达随着时间逐渐增加,在第 5 d 达到一个高峰,然后下降。RUNX2 是成骨细胞的发育和成熟过程中的一个重要调节器,在骨钙化的早期阶段起着举足轻重的作用<sup>[8]</sup>;除此之外,RUNX2 在一定程度上影响了 COL I 及 BSP 的表达<sup>[9]</sup>。结果表明,CAR 可能是通过调节成骨细胞特异性增强子的键活化剂刺激基质旺盛分泌来促进成骨细胞的生长。相比之下,不经任何处理的对照组表现出 RUNX2 较低水平的表达。

本次实验的研究结果表明,CAR 是一种能有效促进 BCP 生物活性的优越介质。本次研究与使用其它类型材料的研究结果是相符的。因此,经过 CAR 处理过的 BCP 材料在临床应用具有重要意义。

总而言之,BCP 经过 CAR 的预处理后对成骨细胞的生长显示出积极的作用,本研究表明,经过 CAR 涂刷处理过的 BCP 材料对该材料的生物学活性及临床应用价值有重要影响。

致谢:本研究由广西医科大学再生医学研究中心、

广西生物医学协同创新中心共同协助完成,特此鸣谢!

#### 参考文献:

- [1] 黄粹业. 骨缺损的临床修复与研究进展[J]. 右江民族医学院学报,2002,24(3): 427-429.
- [2] 蒋卫平. 骨缺损修复的实验研究和临床应用[J]. 右江民族医学院学报,1996,18(4): 636-638.
- [3] Ng AMH, Tan KK, Phang MY, et al. Differential osteogenic activity of osteoprogenitor cells on HA and TCP/HA scaffold of tissue engineered bone[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A,2008,85A(2): 301-312.
- [4] Alsayed A, Anil S, Jansen JA, et al. Comparative evaluation of the combined application of titanium implants and calcium phosphate bone substitutes in a rabbit model[J]. Clin Oral Implants Res,2014,124(2):578-579.
- [5] Gumbiner BM. Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis[J]. Cell,1996,84(3):345-357.
- [6] Shah KM, Quinn PD, Gartland A. Understanding the tissue effects of tribo-corrosion: Uptake, distribution, and speciation of cobalt and chromium in human bone cells [J]. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society,2015,33(1):114-121.
- [7] Bianco P, Riminucci M, Silvestrini G, et al. Localization of bone sialoprotein (BSP) to Golgi and post-Golgi secretory structures in osteoblasts and to discrete sites in early bone matrix[J]. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society,1993,41(2):193-203.
- [8] Meyer MB, Benkusky NA, Pike JW. The RUNX2 cis-trome in osteoblasts: characterization, down-regulation following differentiation, and relationship to gene expression[J]. The Journal of biological chemistry,2014,289(23):16016-16031.
- [9] Li Y, Ge C, Franceschi RT. Differentiation-dependent association of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase with the chromatin of osteoblast-related genes[J]. Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research,2010,25(1):154-163.

收稿日期:2016-02-24;修回日期:2016-03-17