

· 论 著 ·

重组成骨蛋白-1 在钛合金微粒环境下对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖、分化、矿化的影响

孙国静¹, 杨书丰², 郭国栋¹, 樊根涛¹, 吴俊¹, 赵建宁¹

[摘要] **目的** 在钛-6 铝-4 钒 (Ti-6Al-4V) 合金微粒环境下观察重组成骨蛋白-1 (recombinant OP-1, rOP-1) 对成骨细胞的影响, 为防治关节假体无菌性松动提供新的治疗途径。**方法** 根据小鼠颅顶骨前成骨细胞亚克隆 14 (MC3T3-E1) 中是否加入 Ti-6Al-4V 微粒和 rOP-1, 分为微粒组 (5、10、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ti-6Al-4V)、处理组 (微粒组加入 200 ng/mL rOP-1)、阳性组 (加入 200 ng/mL rOP-1) 和对照组, 检测各组 24、72、120 h MC3T3-E1 细胞增殖能力、72 h 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP)、骨钙素 (osteocalcin, OCN) 和骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) mRNA 的表达, 及 120 h 成骨细胞的矿化能力。**结果** ① rOP-1 无促进 Ti-6Al-4V 微粒环境下成骨细胞增殖能力, 与微粒组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); ② rOP-1 可提高成骨细胞分化, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 同时逆转 Ti-6Al-4V 微粒抑制成骨细胞分化, 与微粒组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); ③ 茜素红 S 染色后 Ti-6Al-4V 微粒钙结节数量随着浓度增加逐渐降低, 和微粒组比较, 加入 rOP-1 后钙结节数量呈增多趋势。**结论** Ti-6Al-4V 微粒环境下, rOP-1 无提高成骨细胞增殖能力, 能提高细胞分化矿化能力, rOP-1 可以作为潜在治疗关节假体无菌性松动一种方法。

[关键词] 钛合金微粒; 重组成骨蛋白-1; 成骨细胞; 骨溶解

[中图分类号] R684.3 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.01.001

Effect of rop-1 on the proliferation, diferentiation, and mineralizatio of titanium alloy particles-induced MC3T3-E1 osteoblastic cells

SUN Guo-jing¹, YANG Shu-feng², GUO Guo-dong¹, FAN Gen-tao¹, WU Jun¹, ZHAO Jian-ning¹. 1. Department of Orthopedics, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Department of Orthopedics, 81 Hospital of PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** Our results has been shown that titanium alloy particles (Ti-6Al-4V) inhibited RUNX2 mRNA and protein expression of osteoblasts. In order to improve the boneformation on osteoblasts induced-Ti-6Al-4V, we observed the effect of rOP-1 on the proliferation, diferentiation, and mineralizatio of Ti-6Al-4V induce osteoblast, to provide a new treatment method of artificial joint aseptic loosening. **Methods** Cell counting Kit8 test used to assay the cell proliferation after 24 h, 72 h and 120 h-incubation with Ti-6Al-4V \pm rOP-1, respectively. Furthermore, alkaline phosphatase (AKP), osteocalcin (OCN) and osteopontin (OPN) mRNA level were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively, at the time point of 72 h. Cell biomineralization was assessed through alizarin red S staining after 120 h. **Results** ① Compared with Ti-6Al-4V group, after 24 h, 72 h and 120 h-incubation with Ti-6Al-4V + rOP-1, the proliferation of osteoblast did not increase significance with comparison of the Ti-6Al-4V group ($P > 0.05$); ② compared with Ti-6Al-4V group, AKP, OCN and OPN mRNA level were increased by 72 h-exposure to Ti-6Al-4V + rOP-1, respectively ($P < 0.05$). rOP-1 can stimulate osteoblast differentiation and mineralization, compared with Ti-6Al-4V group, there was statistically significance ($P < 0.05$); ③ compared with Ti-6Al-4V group, alizarin red staining demonstrated that the quantity of calcium nodules were markedly increased in the Ti-6Al-4V + rOP-1 group at hours 120. **Conclusion** Our result indicate that rOP-1 can stimulate differentiation and mineralization, while the proliferation remained unchanged on osteoblast with Ti-6Al-4V particles. We suppose that rOP-1 may be a therapeutic candidate for the prevention of artificial joint aseptic loosening.

[Key words] titanium alloy particles; recombinant OP-1; osteoblast; osteolysis

关节置换术后假体发生无菌性松动的问题一直

难以解决, 既往很多研究从破骨细胞着手, 抑制破骨细胞相关靶点, 但是疗效甚微。我们前期研究表明, 钛-6 铝-4 钒 (Ti-6Al-4V) 合金微粒能够抑制成骨细胞活性^[1], 提示我们从促成骨能力方面为切入点, 找到解决问题的关键。在促骨形成因子中, 重组骨蛋白-1 (recombinant OP-1, rOP-1) 占据重要作用,

基金项目: 江苏省临床医学科技专项 (BL2012002); 南京军区医学科技创新项目 (11Z028); 南京市科技发展项目 (2012sc311020)

作者单位: 1. 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院骨科; 2. 210002 江苏南京, 解放军 81 医院骨科

通讯作者: 赵建宁, E-mail: sugine@126.com

具有高效促进骨基质合成能力^[2-4],美国已经用于临床治疗包括大段长骨骨缺损修复和脊柱融合等病例。而关节假体无菌性松动后,主要是成骨不足和破骨吸收加剧产生骨重建失衡,采用 rOP-1 对关节假体无菌性松动进行治疗则未见报道。本文拟观察了解在 Ti-6Al-4V 微粒环境下,rOP-1 对小鼠颅顶骨前成骨细胞亚克隆 14(MC3T3-E1)成骨细胞增殖、分化和矿化的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 MC3T3-E1 成骨细胞(购自中国科学院细胞库),细胞计数试剂盒-8(CCK-8,上海睿安生物科技有限公司),茜素红 S(Sigma 公司,美国),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的 RT-PCR 检测试剂盒(Takara 公司,美国),Ti-6Al-4V(直径 50 ~ 150 nm,南京工业大学),DMEM 培养基(Invitrogen 公司,美国),0.25% 胰蛋白酶(Sigma 公司,美国),二甲基亚砷(DMSO, Sigma 公司),胎牛血清(Invitrogen 公司,美国),rOP-1(Cell Signaling Technology 公司,美国)。

1.2 钛合金微粒处理和准备 将 10 mg Ti-6Al-4V 微粒置离心管中,加入 75% 乙醇震荡消毒 30 min,低速离心去除乙醇,用无菌 PBS 洗涤沉淀 3 次,将消毒后的微粒用 PBS 稀释成 5、10、15 μg/mL。经检测显示微粒黏附内毒素浓度 < 0.10 EU/mL,排除其对试验的影响。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养和分组 将 MC3T3-E1 细胞株在 5% CO₂、37℃ 条件下常规培养于 α-MEM 培养基(含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青、链霉素)中。细胞分别以 5 × 10³ 的浓度分别接种于 96 孔板中,并各加入 200 μL 培养基。根据研究目的分为空白对照组、阳性组、微粒组(5、10、15 μg/mL Ti-6Al-4V)和处理组(微粒组加入 200 ng/mL rOP-1),各孔相应加入不同浓度 Ti-6Al-4V 微粒及 200 ng/mL rOP-1 后培养,三个时间点(24 h、48 h、72 h)分别以 CCK-8 法检测细胞增殖能力,72 h 以 RT-PCR 法检测 AKP、OCN 和 OPN mRNA 的表达,120 h 以茜素红 S 染色法检测细胞矿化能力。

1.3.2 CCK-8 法检测成骨细胞增殖能力 细胞培养达到药物处理时间时,按照 100 μL 加入 10 μL CCK-8 溶液的比例,在相应孔中加入 CCK-8 反应液。37℃ 培养箱中放置 1 h 后,读取 450 nm 处的吸光度(optical density, OD),以 OD 值显示成骨细胞的

增殖能力。

1.3.3 RT-PCR 法检测 AKP、OCN 和 OPNmRNA 水平的变化 均按试剂盒操作说明提取细胞总 RNA,反转录为 cDNA,在 PCR 仪上进行定量 PCR。以 18S rRNA 为内参基因,所检测基因的引物序列见表 1(上海捷瑞公司设计)。

表 1 检测基因的引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')
AKP	5'-TGAGCGACACGACAAGA-3'
	5'-GAGTGTGTGTTGATGGTCCGG-3'
OCN	5'-CCAAGCAGGAGCGCAATA-3'
	5'-AATCCTGGACACGACCGGA-3'
OPN	5'-AGCAAGAAACTCTTCCAAGCAA-3'
	5'-GTGAGATTTCGTACATTTCATCCG-3'
18S rRNA	5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3'
	5'-CGTTCGAGGGCCTCACT-3'

1.3.4 茜素红 S 染色法测定细胞矿化能力 室温下,相应细胞培养孔弃去培养液,用 4% 多聚甲醛固定 30 min 后,用 PBS 清洗 2 次。浸入 1% 茜素红 S,静置 1 h 后采用 von Kossa 方法,浸入 5% 硝酸银水溶液中紫外光 1 h,蒸馏水洗涤后浸入 5% 次亚硫酸钠溶液中,再经蒸馏水洗,扫描仪进行图片扫描后观察细胞矿化能力。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件包,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用单因素方差分析(One-way, ANOVA);组间两两比较采用 LSD 检验;P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rOP-1 对不同浓度 Ti-6Al-4V 微粒环境下 MC3T3-E1 成骨细胞增殖能力影响 Ti-6Al-4V 微粒浓度为 10 μg/mL,在生长 120 h 后与同时点空白对照组比较亦出现细胞增殖抑制(表 2, P < 0.05);微粒浓度达 15 μg/mL 时各时间点抑制成骨细胞增殖更为显著(P < 0.05),提示高浓度 Ti-6Al-4V 微粒对成骨细胞增殖有抑制现象,此抑制可能受到多因素影响,如抑制时间和微粒浓度等。加 rOP-1 处理组,与微粒组比较,差异无统计学意义(P > 0.05),提示成骨细胞在 Ti-6Al-4V 微粒中,加入 rOP-1 改善成骨细胞增殖能力,效果并不理想。

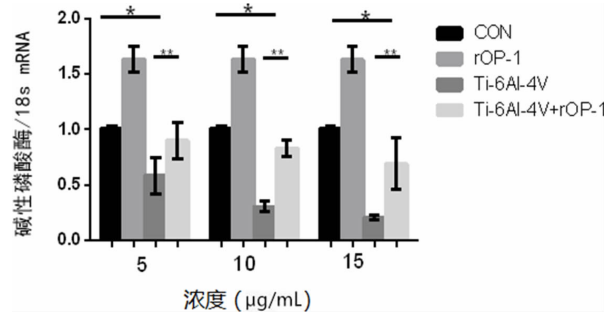
2.2 rOP-1 对不同浓度 Ti-6Al-4V 微粒环境下 MC3T3-E1 成骨细胞 AKP、OCN 和 OPN mRNA 表达的影响 Ti-6Al-4V 微粒可以抑制 MC3T3-E1 成骨细胞 AKP、OCN 和 OPNmRNA 表达,与空白对照组

表 2 rOP-1 及 Ti-6Al-4V 微粒环境下 MC3T3-E1 成骨细胞增殖能力比较($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值		
	24 h	72 h	120 h
空白对照组	0.360 ± 0.015	0.556 ± 0.006	0.677 ± 0.012
微粒组			
5 μg/mL	0.344 ± 0.006	0.525 ± 0.002	0.654 ± 0.003
10 μg/mL	0.351 ± 0.007	0.505 ± 0.154	0.604 ± 0.017 *
15 μg/mL	0.348 ± 0.007 *	0.307 ± 0.023 *	0.289 ± 0.013 *
处理组			
5 μg/mL	0.346 ± 0.005	0.527 ± 0.005	0.659 ± 0.021
10 μg/mL	0.349 ± 0.003	0.507 ± 0.020	0.604 ± 0.018
15 μg/mL	0.339 ± 0.013	0.305 ± 0.007	0.299 ± 0.018

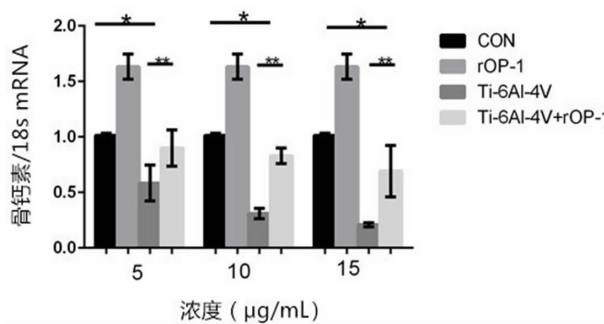
注:与同时点对对照组比较, * $P < 0.05$

比较差异有统计学意义(图 1~3, P 均 < 0.05),提示 Ti-6Al-4V 微粒抑制成骨细胞分化。而加入 rOP-1 后,与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),与微粒组比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$),提示 rOP-1 能促进成骨细胞分化,降低 Ti-6Al-4V 微粒抑制成骨细胞分化效应。



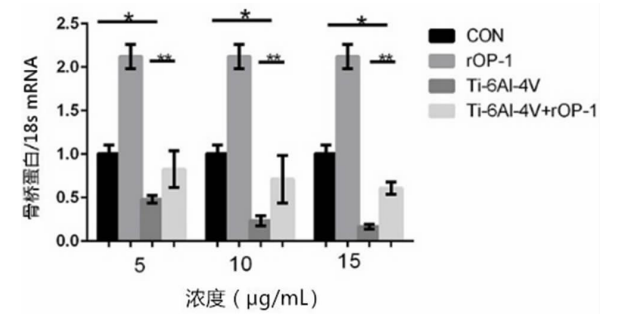
与对照组 (con) 比较, * $P < 0.05$;微粒组 (Ti-6Al-4V) 和处理组 (Ti-6Al-4V + rOP-1) 比较, ** $P < 0.05$

图 1 rOP-1 对不同浓度 Ti-6Al-4V 微粒环境下成骨细胞 AKPmRNA 表达的影响



与对照组 (con) 比较, * $P < 0.05$;微粒组 (Ti-6Al-4V) 和处理组 (Ti-6Al-4V + rOP-1) 比较, ** $P < 0.05$

图 2 rOP-1 对不同浓度 Ti-6Al-4V 微粒环境下成骨细胞 OCN mRNA 表达的影响



与对照组 (con) 比较, * $P < 0.05$;微粒组 (Ti-6Al-4V) 和处理组 (Ti-6Al-4V + rOP-1) 比较, ** $P < 0.05$

图 3 rOP-1 对不同浓度 Ti-6Al-4V 微粒环境下成骨细胞 OPN mRNA 表达的影响

2.3 rOP-1 对不同浓度 Ti-6Al-4V 微粒环境下 MC3T3-E1 成骨细胞矿化影响 随着 Ti-6Al-4V 微粒浓度增加,抑制成骨细胞矿化明显。加入 rOP-1 后,可以降低 Ti-6Al-4V 微粒抑制作用。见图 4。

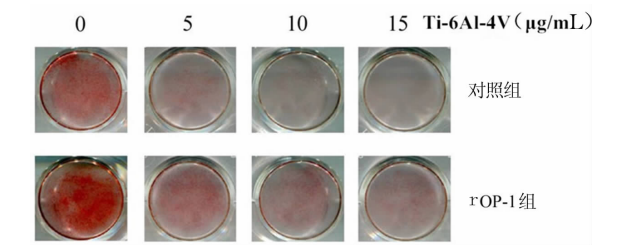


图 4 rOP-1 对不同浓度 Ti-6Al-4V 微粒环境下成骨细胞矿化影响

3 讨论

人工关节置换技术已是较为成熟的技术^[5],随着关节假体置换广泛开展,其并发症也日益显著。长期随访资料显示,目前人工假体晚期失败的最主要原因,是关节界面的磨损颗粒在体内导致的假体

周围骨溶解造成的无菌性松动。尽管多项实验结果证明磨损微粒激活巨噬细胞系统和增加破骨细胞活性造成假体周围出现无菌性松动^[6],但是不可否认,无菌性松动假体周围成骨细胞数目明显减少^[7]以及钛微粒、聚乙烯微粒和钴铬钼合金微粒均能影响成骨细胞分化、成熟和功能^[8-9]。本实验认为 rOP-1 可以促进 Ti-6Al-4V 微粒环境中成骨细胞分化和矿化能力,但是这种机制仍然不甚清楚。本实验通过 CCK-8 法证实在 24 h、48 h 和 72 h Ti-6Al-4V 微粒的不同浓度均能抑制细胞增殖,说明此环境中细胞增殖受到多方面因素影响,包括 Ti-6Al-4V 微粒的浓度以及时间等因素的影响。本实验亦发现,在 Ti-6Al-4V 微粒环境下,rOP-1 具促进成骨细胞增殖的有意义的现象。

Shawn 等^[10]研究结果证实 rOP-1 能够刺激聚乙烯微粒中成骨细胞 AKP 表达,AKP 是成骨细胞分化成熟标志,存在能和 RUNX2 结合位点结合的 OSE 序列,说明 rOP-1 能够刺激聚乙烯微粒中成骨细胞分化。我们的前期研究^[9]表明,Ti-6Al-4V 微粒可以抑制成骨细胞相关转录因子 2(runt-related transcription factor2, RUNX2) 的表达,rOP-1 亦可以提高 Runx2 mRNA 的表达。RUNX2 和 AKP、OCN 和 OPN 密切相关,RUNX2 可以促进 OCN 和 OPN 等细胞外基质蛋白合成^[11]。在本研究中,5、10、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 Ti-6Al-4V 微粒均能抑制 AKP、OCN 和 OPN mRNA 表达,经过 rOP-1 干预后,明显可以提高成骨细胞在 Ti-6Al-4V 微粒环境下的分化能力,故在 Ti-6Al-4V 和聚乙烯微粒这两种微粒环境下,应用 rOP-1 均能提高成骨细胞的分化能力。

本实验中,加入 rOP-1 可成功抑制 Ti-6Al-4V 微粒对成骨细胞矿化能力的不利影响。采用茜素红 S 染色法实验,可以反映成骨细胞矿化能力^[12],而骨矿化能力直接反映是否最终成为钙化骨,反之,形成胶原纤维组织,造成骨形成障碍。本实验表明,随着 Ti-6Al-4V 微粒浓度增加,成骨细胞矿化能力逐渐减弱,加入 rOP-1 后则可有效促进细胞的矿化。

总之,rOP-1 可以促进 Ti-6Al-4V 微粒环境下 MC3T3-E1 细胞的分化和矿化能力,采用局部输送 rOP-1 治疗假体无菌性松动可能是一种潜在的治疗方法。Ti-6Al-4V 微粒抑制细胞分化、矿化和 RUNX2,但它们之间通过何种通路发生联系仍然需

要进一步研究。

【参考文献】

- [1] 孙国静,杨书丰,郭 亭,等.不同浓度钛合金微粒对成骨细胞信号通路中转录表达因子 RUNX2 影响[J].医学研究生学报,2013,26(3):251-254.
- [2] Takahashi T, Muneta T, Tsuji K, et al. BMP-7 inhibits cartilage degeneration through suppression of inflammation in rat zymosan-induced arthritis[J]. Cell Tissue Res, 2011, 344(2):321-332.
- [3] Barr T, McNamara AJ, Sándor GK, et al. Comparison of the osteoinductivity of bioimplants containing recombinant human bone morphogenetic proteins 2 (Infuse) and 7 (OP-1)[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010, 109(4):531-540.
- [4] Spiro AS, Beil FT, Baranowsky A, et al. BMP-7-induced ectopic bone formation and fracture healing is impaired by systemic NSAID application in C57BL/6-mice[J]. J Orthop Res, 2010, 28(6):785-791.
- [5] 陶伟伟,朱建非,张 穹,等.股骨头无菌性坏死中高保留骨量技术应用在初次人工全髋关节置换的临床疗效[J].东南国防医药,2014,16(2):135-137.
- [6] Purdue PE, Koulouvaris P, Potter HG, et al. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2007, 454:251-261.
- [7] Zhang F, Ren LF, Lin HS, et al. The optimal dose of recombinant human osteogenic protein-1 enhances differentiation of mouse osteoblast-like cells; an in vitro study[J]. Arch Oral Biol, 2012, 57(5):460-468.
- [8] Goodman SB, Ma T, Chiu R, et al. Effects of orthopaedic wear particles on osteoprogenitor cells[J]. Biomaterials, 2006, 27(36):6096-6101.
- [9] Jiang Y, Jia T, Gong W, et al. Effects of Ti, PMMA, UHMWPE, and Co-Cr wear particles on differentiation and functions of bone marrow stromal cells[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(10):2817-2825.
- [10] Shawn K, Richard C, Ting Ma, et al. OP-1 (BMP-7) stimulates osteoprogenitor cell differentiation in the presence of polymethylmethacrylate particles[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 94(2):485-488.
- [11] Chiu R, Ma T, Smith RL, et al. Polymethylmethacrylate particles inhibit osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 osteoprogenitor cells[J]. J Orthop Res, 2008, 26(7):932-936.
- [12] Kann S, Chiu R, Ma T, Goodman SB. OP-1 (BMP-7) stimulates osteoprogenitor cell differentiation in the presence of polymethylmethacrylate particles[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 94(2):485-488.

(收稿日期:2014-10-11;修回日期:2014-11-14)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)