

· 基础研究 ·

镁锌合金促成骨细胞增殖作用及其相关机制研究*

刘 波¹, 潘 琦¹, 王希明¹, 田启俊¹, 周华江¹, 潘 锋²

(1. 山东省济南市第四人民医院骨三科 250031; 2. 中国医科大学生物材料研究室, 辽宁沈阳 110001)

摘要:目的 观察镁锌合金(Mg-Zn)共同培养对成骨细胞 MC3T3-E1 的促增殖作用及相关的的作用机制。方法 实验分为对照组、Mg-Zn 组、聚 L-丙交酯(PLLA)组。采用细胞毒实验(MTT)法检测细胞增殖活性,酶联免疫分析(ELISA)法检测整合素 β_2 的表达变化,免疫印迹法(Western blotting)检测细胞 BMP-2 和 p-Smad1 蛋白的表达变化。结果 培养到第 2 天,3 组间细胞增殖活性差异无统计学意义($P>0.05$)。第 4、6、8、10 天时,Mg-Zn 组 MC3T3-E1 细胞增殖显著高于对照组和 PLLA 组,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组与 PLLA 组细胞增殖活性比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。3 组 MC3T3-E1 细胞整合素 β_2 的表达在第 2、4、6 天逐渐升高,第 8 天又逐渐减低,差异有统计学意义($P<0.05$),在同一时间点 Mg-Zn 组整合素 β_2 的表达显著高于对照组和 PLLA 组,差异有统计学意义($P<0.01$),对照组和 PLLA 组之间整合素 β_2 的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 Mg-Zn 共培养可以促进成骨细胞的增殖,上调整合素 β_2 的表达和激活 BMP/Smad 信号通路能是其主要的的作用机制。

关键词:整合素类;Smad 蛋白质类;镁锌合金;骨修复;骨形成蛋白;Smad 蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.35.018

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)35-3732-02

The study on effect of magnesium zinc alloy on the proliferation of osteoblasts*

Liu Bo¹, Pan Qi¹, Wang Ximing¹, Tian Qijun¹, Zhou Hua Jiang¹, Pan Feng²

(1. Third Department of Orthopedic, the Fourth People's Hospital of Jinan City, Shandong 250031, China;

2. Department of Biological Materials, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of magnesium zinc(Mg-Zn) alloy on the proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts, and to study its action mechanisms. **Methods** The treatment was divided into three group: control group, Mg-Zn alloy group, PLLA group. The activity of cells proliferation was measured by MTT analysis. The protein level of integrin β_1 was determined by ELISA assay. Western blot was used to detect the protein expression of BMP-2 and p-Smad1, respectively. **Results** There were no significant difference among 3 groups in the second day($P>0.05$); in the fourth, sixth, eighth and tenth day, the proliferation of MC3T3-E1 cells in Mg-Zn alloy group was significantly higher than that in control group and PLLA group($P<0.05$); there were no statistics significance of the proliferation in control group and PLLA group($P>0.05$); the expression of cell integrin β_2 in 3 groups increased gradually in the second, fourth and sixth day and decreased gradually in the eighth day and showed statistic significance($P<0.05$); at the same point of time, the expression of cell integrin β_2 of Mg-Zn alloy were significantly higher than the that in control group and PLLA group($P<0.01$); there were no statistic significance in the difference of the expression of cell integrin β_2 between control group and PLLA group($P>0.05$). **Conclusion** Mg-Zn alloy significantly promoted the proliferation of osteoblasts. The up-regulation of the expression of integrin β_2 and in stimulation of BMP/Smad pathway are the main action mechanisms.

Key words: integrins; smad proteins; Mg-Zn alloy; bone repair; bone morphogenetic proteins

生物可降解的镁锌合金(Mg-Zn)具有好的机械学特性和生物相容性,在医学领域得到了广泛的应用研究,例如心血管的可降解支架、骨的固定材料等^[1-2]。近期的研究显示, Mg-Zn 材料不仅有良好的生物相容性,还可以促进成骨和化股过程,其相关的作用机制研究极少^[3],因此,本研究将 Mg-Zn 材料与成骨细胞混合培养,观察 Mg-Zn 对成骨细胞的促生长作用,并探讨其相关作用机制。

1 材料与方

1.1 材料 成骨细胞 MC3T3-E1 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养于低糖 DMEM 培养液中(10% 胎牛血清、青霉素和链霉素各 100 IU/mL),并分为对照组、Mg-Zn 组、聚 L-丙交酯(PLLA)组。青霉素、链霉素购于美国 Sigma 公司,胎牛血清购于美国 Gibco 公司,DMEM 培养基为广州英韦创津公司产

品,生物可降解 Mg-Zn 为上海奥芮济医疗科技有限公司产品,聚 L-丙交酯(PLLA)由长春圣博玛生物材料有限公司提供,人 β_2 整合素酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒购自上海希美生物科技有限公司,BMP-2、p-Smad1、GAPDH 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,HRP 标记二抗购自上海康成生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖实验 MC3T3-E1 细胞接种到 96 孔板(400/孔),3 组分别于培养 2、4、6、8、10 d 时,加入 0.5 mg/mL 二甲基四氮唑蓝(MTT),检测细胞的增殖活性,以酶标仪 570 nm 波长处测定的吸光度(A)值为纵坐标,时间为横坐标绘制生长曲线。

1.2.2 整合素 β_2 的检测 MC3T3-E1 细胞接种到 6 孔板(1

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81000791)。

×10⁵/孔),3 组分别于培养 2、4、6、8、10 d 时取培养液上清液,严格按照整合素 β₂ ELISA 试剂盒说明操作,酶标仪 450 nm 波长处测定测定各孔的 A 值,以 A 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,然后对照标准曲线计算出整合素 β₂ 的浓度。

1.2.3 目的蛋白的免疫印迹法(Western blotting)检测 MC3T3-E1 细胞接种到 6 孔板(5×10⁵/孔),48 h 后,3 组分别采用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次,1×SDS 上样缓冲液裂解细胞,95 ℃ 加热 10 min,12 000×g 离心 10 min,取上清液,8%~12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转移蛋白至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,含 5% 脱脂奶粉的洗膜缓冲液(TBST)浸润 PVDF 膜 1 h 封闭非特异性结合,加入特异性的一抗(1:1 000)4 ℃ 过夜,加入 1:5 000 稀释的二抗室温 1 h,化学发光,X 线曝光。扫描曝光胶片,Bio Rad 凝胶成像仪分析软件测定各蛋白条带密度值,目的蛋白与内参磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的比值为蛋白表达相对定量值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mg-Zn 对 MC3T3-E1 细胞增殖活性的影响 3 组对 MC3T3-E1 细胞的增殖活性显示,在第 2 天时,3 组间细胞增殖活性差异无统计学意义(*P*>0.05),到第 4、6、8、10 天时,Mg-Zn 组细胞增殖显著高于对照组和 PLLA 组,差异有统计学意义(*P*<0.05),对照组和 PLLA 组细胞增殖活性比较,差异无统计学意义(*P*>0.05),说明 Mg-Zn 可以促进 MC3T3-E1 细胞的增殖,见图 1。

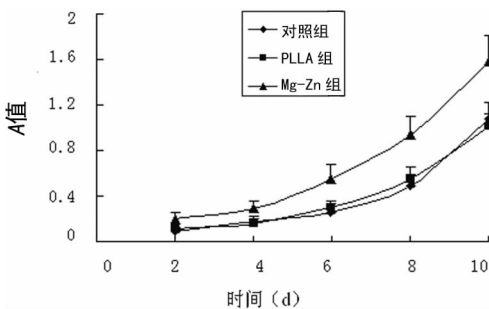


图 1 3 组成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖活性

表 1 3 组 MC3T3-E1 细胞整合素 β₂ 表达 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

组别	第 2 天	第 4 天	第 6 天	第 8 天	第 10 天
对照组	0.31±0.06	0.85±0.26	0.91±0.28	0.65±0.18	0.53±0.09
PLLA 组	0.37±0.05	0.94±0.21	1.04±0.33	0.71±0.15	0.61±0.10
Mg-Zn 组	0.64±0.13*	1.67±0.34*	1.62±0.41*	1.21±0.17*	1.08±0.16*

*: *P*<0.01,与对照组和 PLLA 组比较。

2.2 Mg-Zn 对 MC3T3-E1 细胞整合素 β₂ 表达的影响 3 组 MC3T3-E1 细胞整合素 β₂ 的表达在第 2、4、6 天逐渐升高,第 8 天又逐渐减低,差异有统计学意义(*P*<0.05);在同一时间点 Mg-Zn 组 MC3T3-E1 细胞整合素 β₂ 的表达水平高于对照组和 PLLA 组,差异有统计学意义(*P*<0.01),对照组与 PLLA

组之间整合素 β₂ 的表达,差异无统计学意义(*P*>0.05)。

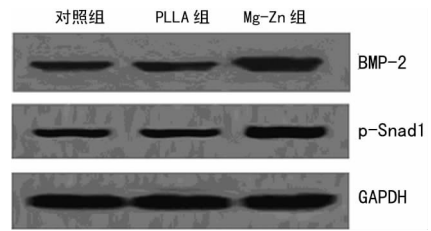


图 2 3 组 MC3T3-E1 细胞 BMP-2 和 p-Smad1 蛋白的表达

2.3 Mg-Zn 对 MC3T3-E1 细胞 BMP-2 和 p-Smad1 表达的影响 与对照组比较 Mg-Zn 组显著升高了 MC3T3-E1 细胞 BMP-2 的表达,随后 Smad1 蛋白的磷酸水平也相应地出现了升高,而 PLLA 并没有显现出激活 BMP/Smad 通路的活性,见图 2。

3 讨论

近年来生物可降解的骨内固定材料在骨科中的应用已成为研究的热点,生物可降解的 Mg-Zn 内固定材料因其强度和塑性均强于可降解的陶瓷或聚合物材料,故而受到更多学者的关注^[4-5]。镁和锌是体内含量丰富的不可缺少的重要金属元素,对机体多个系统的生长发育具有重要的影响,因此,Mg-Zn 内固定材料不仅不会释放有毒离子,而且其释放的镁、锌金属离子反而会促进成骨细胞的增殖和分化^[6-8]。本研究显示,Mg-Zn 与成骨细胞 MC3T3-E1 共培养可以促进细胞的增殖,而另外一个生物可降解吸收骨内固定材料 PLLA 没有发现这个现象,说明 Mg-Zn 可以促进骨折的愈合。

整合素是细胞黏附的一个重要调节蛋白,调节着细胞的增殖和分化。本研究显示,与 PLLA 组相比 Mg-Zn 组可以促进成骨细胞 MC3T3-E1 高表达整合素 β₂ 蛋白,Mg-Zn 组表面比 PLLA 组粗糙,而粗糙的表面也是刺激整合素表达的一个因素,但其具体的机制还有待进一步的研究^[9-11]。骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)能诱导成骨细胞和软骨细胞的分化成熟,在骨的修复中起到重要作用,BMPs 的缺失会导致骨折的不愈合和骨缺损,BMPs 通过磷酸化 Smad 蛋白,使 p-Smad 蛋白入核发挥转录因子的作用,激活下游靶基因的表达调控骨和软骨的生成^[12]。本研究显示,Mg-Zn 共同培养可以上调 MC3T3-E1 细胞 BMP-2 和 p-Smad 蛋白的表达,说明 Mg-Zn 共同培养可以激活 BMP/Smad 信号通路。

综上所述,Mg-Zn 共同培养可以促进成骨细胞的增殖,其作用机制可能与上调整合素 β₂ 的表达和激活 BMP/Smad 信号通路相关。

参考文献:

[1] Slottow TL, Pakala R, Okabe T, et al. Optical coherence tomography and intravascular ultrasound imaging of bio-absorbable magnesium stent degradation in porcine coronary arteries[J]. Cardiovasc Revasc Med, 2008, 9(4): 248-254.

[2] Dasgupta S, Banerjee SS, Bandyopadhyay A, et al. Zn- and Mg-doped hydroxyapatite nanoparticles for controlled release of protein[J]. Langmuir, 2010, 26(7): 4958-4964.

[3] 袁青领, 阎钧, 郑起, 等. 镁锌合金与大鼠肠道的生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, (下转第 3736 页)

细胞凋亡密切相关^[13]。野生型 p53 基因半衰期短,免疫细胞化学方法检测不到其表达,故本研究检测突变型 p53 基因的表达。本研究结果显示,p53 基因在对照组不表达,照射组表达率显著升高,但各 APS 组和 NS 组比较差异不明显,这可能是由于突变型 p53 基因的表达不会因为损伤得到修复而减少所致。细胞周期和凋亡率检测结果显示,NS 组与对照组相比, G_0/G_1 期比例和凋亡率均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),各 APS 组与 NS 组比较, G_0/G_1 期比例和凋亡率均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明电离辐射可以诱导细胞凋亡,APS 可以促进细胞周期阻滞及凋亡的恢复。

目前,放疗是肿瘤的主要治疗方式,它在杀死肿瘤细胞的同时也损伤机体正常细胞,因此,辐射保护剂的开发势在必行。大量文献报道 APS 有明显的抗辐射、抗肿瘤等作用,但其具体机制仍不清楚,本研究就 APS 抗电离辐射的机制进行基础研究,为后续研究提供参考依据。

参考文献:

- [1] 李成军,金香兰,沈云虹. 当归多糖的成分及其生物学作用[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2007,28(9):1096-1097.
- [2] 胡小平,李玉云,李先何. 当归多糖的成分及药理学研究新进展[J]. 中药材,2004,27(1):70-72.
- [3] Wong SH,Lowes KN,Bertoncello L, et al. Evaluation of Scl-1 and c-kit as selectivemarkers for muscle remodeling by nonhemopoietic bone marrow cells [J]. Stem Cells, 2007,25(6):1364-1374.
- [4] 张雁,吴宏,关雪晶,等. 当归多糖对放射损伤小鼠骨髓单个核细胞黏附分子表达及细胞周期的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2010,23(6):1-6.
- [5] 胡晶,吴宏. 当归多糖对小鼠外周造血干细胞动员作用的研究[J]. 中草药,2006,37(12):1835-1838.
- [6] 张荣侠,杜秀平. 磷酸羟基哌啶对血液系统辐射损伤保护作用的研究[J]. 徐州医学院学报,2010,30(2):99-101.
- [7] 周永,糜漫天,杨镇洲,等. 染料木素对小鼠辐射造血损伤保护作用的研究[J]. 第三军医大学学报,2006,28(24):2406-2408.
- [8] 王燕,单体中. 当归多糖的生物学功能研究进展[J]. 中国饲料,2006,16(9):18-21.
- [9] 孟慧玲. 当归多糖的药理学研究新进展[J]. 甘肃中医,2007,20(1):44-46.
- [10] 聂小燕,陈青,李祝,等. 当归多糖药理活性研究新进展[J]. 现代农业科学,2008,15(10):36-37.
- [11] 李宗山,邱世翠,韩兆东,等. 当归对 X 线辐射小鼠骨髓细胞增殖抗体产生的影响[J]. 中国中医药科技,2005,12(2):118.
- [12] Richardson RB. Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea[J]. AGING,2009,1(11):887-902.
- [13] Fumagalli S,Thomas G. The Role of p53 in Ribosomopathies[J]. Semin Hematol,2011,48(2):97-105.

(收稿日期:2012-06-13 修回日期:2012-09-12)

(上接第 3733 页)

- [4] Wei J, Jia J, Wu F, et al. Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium-calcium phosphate for bone tissue regeneration [J]. Biomaterials, 2010, 31(6):1260-1269.
- [5] Habibovic P, Barralet JE. Bioinorganics and biomaterials: Bone repair [J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(9): 3013-3026.
- [6] Xue W, Dahlquist K, Banerjee A, et al. Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants[J]. J Mater Sci Mater Med, 2008, 19(7): 2669-2677.
- [7] He Y, Tao H, Zhang Y, et al. Biocompatibility of bio-Mg-Zn alloys within bone with Heart, liver, kidney and spleen [J]. Chinese Science Bulletin, 2009, 11(3): 484-491.
- [8] Zreiqat H, Valenzuela SM, Nissan BB, et al. The effect of surface chemistry modification of titanium alloy on signaling pathways in human osteoblasts [J]. Biomaterials, 2005, 26(36): 7579-7586.
- [9] 王茸影,易静. 骨形成蛋白调控成骨分化的信号机制[J]. 生命科学, 2005, 17(1): 34-39
- [10] Reddi AH, Reddi A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(5/6): 341-342.
- [11] Li C W, Zhou R, Ge W. Differential regulation of gonadotropin receptors by bone morphogenetic proteins in the zebrafish ovary [J]. Gen Comp Endocrinol, 2012, 176(3): 420-425.
- [12] Garcia P, Pieruschka A, Klein M, et al. Temporal and spatial vascularization patterns of unions and nonunions; role of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic proteins [J]. J Bone Joint Surg Am, 2012, 94(1): 49-58.

(收稿日期:2012-06-13 修回日期:2012-09-12)