

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.004

骨形态发生蛋白 2 聚乳酸缓释微球对兔骨髓间充质干细胞相容性研究*

马立坤, 邓江[△], 黄文良, 叶鹏, 田仁元, 吕雪峰
(遵义医学院第三附属医院骨一科, 贵州遵义 563000)

[摘要] **目的** 观察重组人骨形态发生蛋白 2(rhBMP-2)聚乳酸(PLA)缓释微球对兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)相容性。**方法** 通过复乳干燥法制备 rhBMP-2-PLA 缓释微球,并与兔 BMSCs 共培养,采用 MTT 法检测 rhBMP-2-PLA 缓释微球对细胞的毒性及增殖,并通过倒置显微镜及扫描电镜等评价材料的细胞相容性。**结果** rhBMP-2-PLA 缓释微球各浓度浸提液与 BMSCs 培养得出对细胞无毒性。实验组与对照组 4 个不同时间细胞增殖光密度(OD)值经重复测量方差分析得出时间之间 OD 值比较,差异有统计学意义($P=0.000$);实验组与对照组 OD 值比较差异有统计学意义($P=0.025$),实验组 OD 值高于对照组,时间与组数有显著交互效应,二者变化趋势明显不同($P=0.006$)。倒置显微镜观察材料组细胞增殖正常,扫描电镜发现接种 7 d 后细胞周边有 rhBMP-2-PLA 缓释微球,细胞生长良好,增殖分裂活跃。**结论** rhBMP-2-PLA 缓释微球对 BMSCs 无毒性,具有良好的细胞相容性。

[关键词] rhBMP-2;PLA;缓释微球;骨髓间充质干细胞;细胞毒性

[中图分类号] R318.08 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)08-1022-03

Bone morphogenetic protein 2 poly lactic acid sustained release microspheres for compatibility between rabbit bone marrow mesenchymal stem cell research*

Ma Likun, Deng Jiang[△], Huang Wenliang, Ye Peng, Tian Renyuan, Lv Xuefeng

(Department of Orthopaedics, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2)of poly lactic acid(PLA) release microspheres for compatibility of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs). **Methods** The rhBMP-2-PLA release microspheres were prepared by w/o/w multiple emulsion volatilizing method and then cocultured BMSCs. The effects of rhBMP-2-PLA release microspheres on the cytotoxicity and relative proliferation rate by MTT assay. Evaluation of materials biocompatibility by inverted microscope and scanning electron microscope(SEM). **Results** The rhBMP-2-PLA release microspheres in various concentration of leaching solution and BMSCs training of uninfected cells. Experimental group and control group in 4 different time cell proliferation OD values by analysis of repeated measurement variance between time OD values were statistically significant($P=0.000$), the experimental group and control group OD values are statistically significant($P=0.025$), the experimental group higher than the control group, experimental group OD value time there was a significant interaction effect and the group number, the change trend are obviously different($P=0.006$). Inverted microscope to observe materials normal cell proliferation, SEM found that vaccination cells surrounding rhBMP-2-PLA release microspheres of 7 days later, the cells grew well and split proliferation activity. **Conclusion** rhBMP-2-PLA release microspheres of BMSCs has non-toxic and has compatibility.

[Key words] rhBMP-2;PLA;release microspheres;BMSCs;cytotoxicity

重组人骨形态发生蛋白 2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)具有骨诱导能力,但在体内半衰期短,难以达到有效生理浓度^[1-2]。目前,对蛋白多肽缓释载体进行了大量研究,其中,聚乳酸(poly lactic acid, PLA)具有良好的生物相容性,最终代谢产物为水(H₂O)和二氧化碳(CO₂),广泛用于药物缓释载体^[3]。本实验在前期通过复乳干燥法制备出 rhBMP-2-PLA 缓释微球,并考察微球粒径、载药率及体外缓释特性的基础上与兔骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)体外共培养,通过 MTT、ALP 检测及电镜观察该微球在体外对其 BMSCs 生物相容性进行评价。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 新西兰种系 1 月龄白兔购自第三军医大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2012-0003。

1.2 主要试剂及仪器 rhBMP-2 冻干粉(上海瑞邦生物材料有限公司);PLA(相对分子质量 3×10^4 , 济南岱罡生物工程有限公司);二氯甲烷(重庆川江化学试剂厂);聚乙烯醇(PVA, 天津市科密欧化学试剂有限公司);DMEM 培养基、胰酶、胎牛血清(Hyclone 公司);MTT(Amresco 公司);DMSO(Amresco 公司);CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);冷冻高速离心机(美国 Thermo 公司);超声分散器(中国);真空冷冻干燥机(美国 Thermo 公司);倒置显微镜(日本 Olympus);超净工作台(苏州安泰有限公司);扫描电镜(日本日立 S-3400N 公司);50 万居里⁶⁰CO 辐照装置(贵州金农辐照科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 rhBMP-2 缓释微球的制备^[4-5] 取适量 rhBMP-2 溶于 1 mL 双蒸水中,使其完全溶解作为水相。准确称取 100 mg

* 基金项目:贵州省省长基金资助项目[2011(25)];贵州省科学技术基金资助项目(黔科合 SY[2010]3101);贵州省社会公共基金资助项目(遵义市科合社字[2010]015 号)。作者简介:马立坤(1984—),医师,在读硕士,主要从事骨与关节创伤的研究。△ 通讯作者, Tel: 13007874786; E-mail: DJ30666@126.com。

PLA 溶于 4 mL 二氯甲烷和 1 mL 丙酮有机溶剂中做为油相。取 100 μ L 水相与油相相混合,在冰浴下超声分散(100 W, 1 min)形成初乳,用注射器将初乳缓慢加入 1% 的 PVA 溶液 25 mL 内,冰浴下超声(200 W, 3 min)形成复乳。然后将此复合体系在磁力搅拌器中低速(400 r/min)搅拌 3~5 h,使其二氯甲烷、丙酮完全挥发,所得乳液冷冻高速(12 000 r/min)离心 20 min,收集 rhBMP-2-PLA 缓释微球,用双蒸水洗 3 遍,冷冻干燥后用 3 000 Gy⁶⁰Co 照射消毒,密封,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 兔 BMSCs 分离培养 采用全骨髓贴壁筛选法分离 BMSCs^[6]。取新西兰幼兔,麻醉后消毒铺巾,取出双侧股骨和胫骨,除去肌肉,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗。胶骨钳咬除两端骨髓,用 Hanks 液(含肝素抗凝)冲出骨髓,然后用 200 目过滤筛过滤。1 000 r/min 离心 5 min,用低糖 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清、100 U/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素)反复吹打制成单细胞悬液接种于培养瓶,放于细胞培养箱中培养。48 h 半换液,72 h 全换液,以后视情况每隔 2~3 d 换液,待细胞生长至 80%~85% 时,用胰蛋白酶消化,按 1:2 进行传代培养,培养条件同原代。

1.3.3 rhBMP-2-PLA 缓释微球体外毒性实验^[7] 精确称取 200 mg rhBMP-2-PLA 缓释微球加入 10 mL 低糖 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中浸提 24 h 分别制备 100%、50%、25% 组浸提液。取第 3 代生长良好的 BMSCs,调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL,每孔接种 100 μ L 于 96 孔板中,细胞培养箱中培养 24 h 后,弃去原液换成各浓度组浸提液,以单纯低糖 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)为对照组,继续在细胞培养箱中培养,分别于 24、48、72 h 随机取一 96 孔板,MTT 法测定各孔光密度(OD)值。

1.3.4 rhBMP-2-PLA 缓释微球细胞增殖活力测定 实验组用含理论量为 2 μ g rhBMP-2 的缓释微球 DMEM 培养液,对照组仅加入 DMEM 培养液。取第 3 代生长良好的 BMSCs,调整细胞浓度为 2×10^4 个/mL,每孔取 100 μ L 按实验组、对照组接种于 4 块 96 孔板。分别在第 1、3、5、7 天随机取 1 板,MTT 法测定各孔 OD 值。

1.3.5 细胞和 rhBMP-2-PLA 缓释微球共培养生长情况观察 每天在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况,用理论含量为 2 μ g rhBMP-2 的 rhBMP-2-PLA 缓释微球与细胞共培养 7 d,取出细胞爬片用 2.5% 戊二醛固定 2 h,梯度乙醇脱水、干燥、喷金,扫描电镜下观察细胞生长情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果用重复测量数据的方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 rhBMP-2-PLA 缓释微球表征 微球平均粒径 839.6 nm,包封率及载药率分别为 $(88.943 \pm 2.878)\%$ 、 $(0.026 \pm 0.001)\%$,体外释药第 1 天释药率约 10.199%,至第 19 天累计释药率约 54.643%。

2.2 BMSCs 原代及传代培养形态 原代 BMSCs 接种 48 h 后出现较多的贴壁细胞,经半换液、全换液除去未贴壁细胞,约 72 h 细胞开始增殖,生长良好,BMSCs 成纤维状、梭形。约 7 d 时细胞生长融合达 80%~90%,见图 1。传代后细胞形态基本一致,细胞以梭形为主,增殖正常,6~8 d 时细胞可铺满瓶底,见图 2。

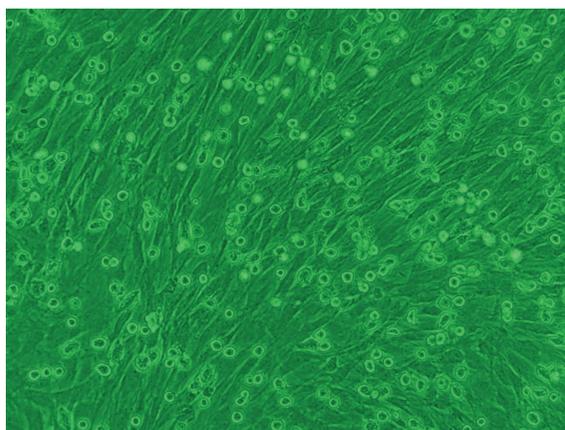


图 1 原代 BMSCs 培养第 7 天($\times 100$)

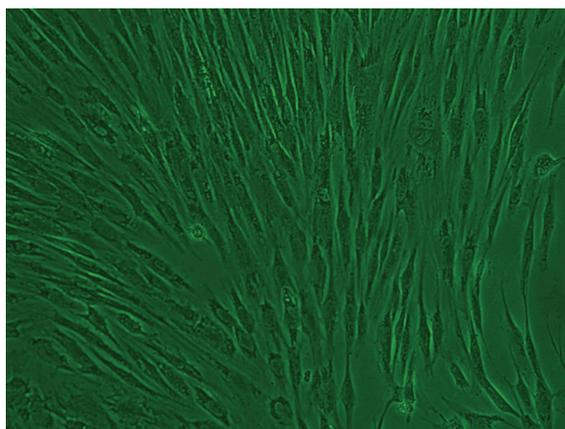


图 2 第 3 代 BMSCs 培养第 7 天($\times 100$)

2.3 缓释微球对细胞毒性评价结果^[8] 各浓度浸提液实验组的平均 OD 值为 OD1,对照组平均 OD 值为 OD2,通过细胞相对生长率(RGR) = $OD1/OD2 \times 100\%$,分别计算出各浓度实验组 RGR,得出 rhBMP-2-PLA 缓释微球对 BMSCs 无细胞毒性,见表 1、2。

表 1 rhBMP-2-PLA 缓释微球浸提液与 BMSCs 培养的 RGR 和 CTG($n=8$)

混合浓度(%)	细胞相对生长率(%)			反应分级(n)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
100	75.532	120.634	128.814	1	0	0
50	80.319	147.619	161.017	1	0	0
25	100.000	133.330	169.492	0	0	0

表 2 细胞毒性反应分级标准

细胞相对生长率(%)	反应分级(n)	判断结论
≥ 100	0	合格
75~99	1	合格
50~74	2	结合细胞形态分析
25~49	3	不合格
1~24	4	
0	5	

2.4 共培养细胞增殖活力测定结果 实验组与对照组 4 个不

同时间细胞增殖 OD 值经重复测量方差分析得出时间之间 OD 值差异有统计学意义 ($P=0.000$), 实验组与对照组 OD 值比较差异有统计学意义 ($P=0.025$), 实验组 OD 值高于对照组, 时间与组数有显著交互效应, 二者变化趋势明显不同 ($P=0.006$), 见表 3。

表 3 不同时间 rhBMP-2-PLA 缓释微球对细胞增殖活力 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
实验组	0.077±0.034	0.094±0.019	0.128±0.012	0.365±0.083
对照组	0.071±0.018	0.081±0.012	0.114±0.032	0.227±0.031

2.5 倒置相差显微镜观察共培养细胞增殖结果 能见到梭形、多角形细胞周围有大量缓释微球, 并随时间延长, 细胞数量逐渐增多, 生长良好, 见图 3。

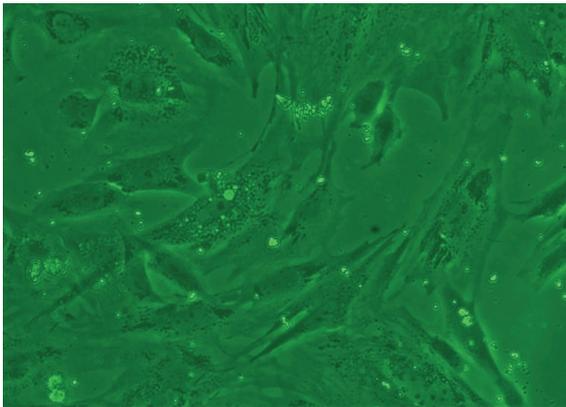


图 3 rhBMP-2-PLA 缓释微球与 BMSCs 共培养 7 d ($\times 200$)

2.6 共培养细胞电镜观察结果 共培养 7 d 时扫描电镜可见细胞伸展为长梭形, 并伸出伪足黏附在缓释微球的周围, 细胞分裂增殖正常, 见图 4。

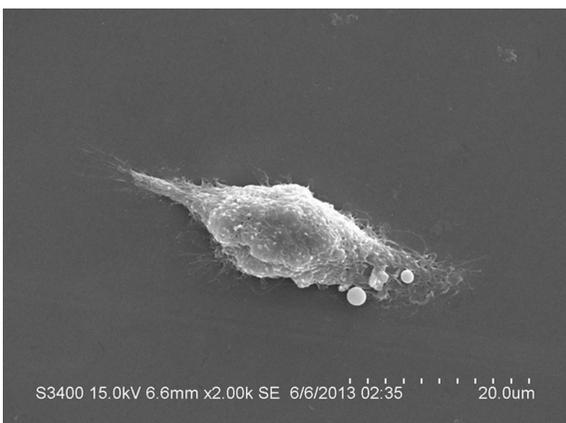


图 4 rhBMP-2-PLA 缓释微球与 BMSCs 共培养 7 d SEM ($\times 2000$)

3 讨论

组织工程研究主要有支架材料、细胞因子、种子细胞。大量临床研究认为 rhBMP-2 是体内重要的骨诱导因子。但作为外源性的细胞诱导因子在体内容易被蛋白酶分解, 难以起到诱导作用, 因此, 通过制备出具有缓释作用的 rhBMP-2-PLA 微球从而解决了 rhBMP-2 在体内不能持续作用的难题。但作为修复骨缺损的骨组织工程材料首先必须具有良好的生物相容

性^[9]。目前, 评价材料的毒性主要有体外、体内实验, 而体外细胞毒性实验具有更直观、重复性好等特点, 从而奠定了在评价材料生物相容性方面重要的地位^[10]。目前, 选用实验细胞主要有 2 类, 一类是优先选用已建株系细胞, 另一类为根据实验特需要求直接从活体组织获取的原代细胞。研究表明材料与不同组织来源细胞的相容性具有差异性, 通过选取与植入或修复的组织来源一致的细胞进行实验, 其结果更符合组织工程要求^[11]。因此, 本实验选用的实验细胞为与实验目的一致性的 BMSCs。

BMSCs 具有取材方便、易于分离培养扩增, 并且具有自我复制, 在特定的诱导环境下能向成骨细胞、成软骨细胞等多向分化潜能, 在连续培养和冷冻保存后仍然具有多向分化潜能, 而成为骨组织工程的理想种子细胞之一^[12-14]。rhBMP-2 因子是参与骨、软骨损伤修复的重要因子。rhBMP-2 因子在作用条件下能促进 BMSCs 向成骨细胞定向分化及 BMSCs 增殖, 且对 rhBMP-2 浓度具有依赖性^[15]。实验组 BMSCs 与对照组 BMSCs 在第 1、3、5 天增殖量方面比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 在第 7 天实验组 BMSCs 增殖明显多于对照组, 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 其结果表明 rhBMP-2-PLA 缓释微球与 BMSCs 具有良好的生物相容性且 rhBMP-2 在微球制备过程中没有失活。

MTT 法是间接反映细胞生长和存活经典的经典方法, 具有经济、重复性好、易操作、灵敏度高等特点^[16]。本实验制备出不同浓度组 rhBMP-2-PLA 低糖 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清) 浸提液为实验组, 以单纯低糖 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清) 为对照组, 通过 MTT 法测定不同时间的 BMSCs 的相对增殖率, 3 种浓度的浸提液反应等级为 0 或 1, 均为合格。

参考文献

- [1] Rey-Rico A, Silva M, Couceiro J, et al. Osteogenic efficiency of in situ gelling poloxamine systems with and without bone morphogenetic protein-2[J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 21: 317-340.
- [2] Schmidmaier G, Schwabe P, Strobel C, et al. Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics [J]. *Injury*, 2008, 39(Suppl 2): S37-43.
- [3] Fournier E, Passirani C, Montero-Menei CN, et al. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(19): 3311-3331.
- [4] Chen L, Liu L, Li C, et al. A new growth factor controlled drug release system to promote healing of bone fractures: nanospheres of recombinant human bone morphogenetic-2 and polylactic acid [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2011, 11(4): 3107-3114.
- [5] Wen J, Kim GJ, Leong KW. Poly (D, L-lactide-co-ethyl ethylene phosphate)s as new drug carriers [J]. *J Control Release*, 2003, 92(1/2): 39-48.
- [6] 王共先, 汪洪, 刘伟鹏, 等. 骨髓间充质干细胞-聚乳酸聚乙醇酸共聚复合物支架修复组织损伤的实验研究 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(6): 403-406.
- [7] 刘建华, 王国海, 徐栋梁. 聚己内酯与左(下转第 1028 页)

- ness of radiofrequency ablation with or without transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(3):2655-2659.
- [2] Chen JL. PP-042 Clinical research of HG-2000 regional high-frequency hyperthermia combined with TACE in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Infect Dis*, 2008, 12(3):S67-68.
- [3] 张国武, 乔正荣, 吴华平, 等. 射频联合化疗、体外高频序贯治疗兔肝 VX2 肿瘤的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(8):938-946.
- [4] 唐荣, 乔正荣, 吴华平, 等. 射频消融联合高频热疗对兔肝 VX2 肿瘤侵袭能力的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(5):564-569.
- [5] 吴华平, 张国武, 唐荣, 等. RFA 联合 TACE 和 HFH 对兔肝 VX2 肿瘤的作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(1):16-20.
- [6] Rai R, Richardson C, Flecknell P, et al. Study of apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in hepatocytes following radiofrequency ablation (RFA)[J]. *Prog Urol*, 2013, 23(2):105-112.
- [7] Gao L, Song JR, Zhang JW, et al. Chloroquine promotes the anticancer effect of TACE in a rabbit VX2 liver tumor model[J]. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(4):322-330.
- [8] Takahashi A, Matsumoto H, Nagayama K, et al. Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24):8839-8845.
- [9] Weinmann M, Jendrossek V, Handrick R, et al. Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis; critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/Caspase-8 independent manner[J]. *Oncogene*, 2004, 23(21):3757-3769.
- [10] Li Y, Zheng YB, Zhao W, et al. Sorafenib in combination with transarterial chemoembolization and radiofrequency ablation in the treatment for unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(4):730.
- [11] Kim JW, Shin SS, Kim JK, et al. Radiofrequency ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization for the treatment of single hepatocellular carcinoma of 2 to 5 cm in diameter: comparison with surgical resection[J]. *Korean J Radiol*, 2013, 14(4):626-635.
- [12] Liao M, Huang J, Zhang T, et al. Transarterial chemoembolization in combination with local therapies for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e68453.
- [13] Ni JY, Liu SS, Xu LF, et al. Meta-analysis of radiofrequency ablation in combination with transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(24):3872-3882.
- [14] Li JX, Wu H, Huang JW, et al. The influence on liver function after transcatheter arterial chemoembolization combined with percutaneous radiofrequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *J Formos Med Assoc*, 2012, 111(9):510-515.
- [15] Wang S, Yang C, Zhang J, et al. First experience of high-intensity focused ultrasound combined with transcatheter arterial embolization as local control for hepatoblastoma[J]. *Hepatology*, 2014, 59(1):170-177.
- (收稿日期:2014-10-18 修回日期:2014-12-22)
-
- (上接第 1024 页)
- 旋聚乳酸共聚物支架的细胞相容性测定及与软骨细胞体外复合的实验研究[J]. *医学研究生学报*, 2009, 22(2):131-134.
- [8] 王玮, 尹庆水, 张余. 重组人骨形态发生蛋白 2 壳聚糖纳米微球的制备及体外细胞毒性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(25):4611-4614.
- [9] 王晶, 张涇, 刘华. 骨髓间充质细胞与速固化磷酸钙支架共培养的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2007, 15(9):706-708.
- [10] 张燕搏, 姜明, 王强, 等. 组织工程血管材料体外细胞毒性评价实验研究[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2011, 25(6):539-542.
- [11] 余荣峰, 邓江, 黄文良, 等. 丝素蛋白/壳聚糖复合支架材料的细胞相容性[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(3):455-458.
- [12] Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, et al. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution[J]. *Transplantation*, 2000, 69(1):128-134.
- [13] 乔丽萍, 侯世科, 姚利秀, 等. 角膜缘损伤模型静脉移植兔骨髓间充质干细胞体内动态分布特点的初步研究[J]. *医学研究生学报*, 2013, 26(2):128-133.
- [14] 苏寒, 张森林, 董震. 组织工程化引导骨再生膜的构建及其修复牙槽骨缺损的实验研究[J]. *医学研究生学报*, 2013, 26(9):932-936.
- [15] 侯锐, 毛天球, 陈书军, 等. rhBMP-2 及 rhbFGF 对兔骨髓间充质干细胞分化作用长期效应的实验研究[J]. *医学研究生学报*, 2004, 17(8):694-697.
- [16] Qi R, Shen M, Cao X, et al. Exploring the dark side of MTT viability assay of cells cultured onto electrospun PLGA-based composite nanofibrous scaffolding materials[J]. *Analyst*, 2011, 136(14):2897-2903.
- (收稿日期:2014-10-28 修回日期:2014-12-25)