

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.08.006

# 羟基磷灰石/壳聚糖-转化生长因子- $\beta$ 1 复合材料对糖尿病兔种植体周围 Runx-2/ALP/OC 基因的影响\*

刘星宇<sup>1,2</sup>,雷婷婷<sup>3</sup>,苟诗然<sup>1</sup>,郑立舫<sup>2 $\Delta$</sup> ,郭玲<sup>1</sup>,牟雁东<sup>2</sup>

- (1. 西南医科大学附属口腔医院修复科/西南医科大学口颌面修复重建和再生实验室,四川泸州 646000;  
2. 四川大学华西口腔医院/口腔疾病研究国家重点实验室,成都 610041;  
3. 西南医科大学附属医院规划财务部,四川泸州 646000)

**[摘要]** 目的 将制备的羟基磷灰石/壳聚糖-转化生长因子- $\beta$ 1 缓释微球复合涂层种植体运用于糖尿病兔胫骨,探讨其周围 Runx-2/ALP/OC 基因表达的改变,从分子水平评估该种植体的成骨性。方法 制备复合涂层种植体,运用扫描电镜(SEM)分析其表面形貌。并建立 SPF 级新西兰兔 2 型糖尿病模型,分别在其胫骨干骺端植入种植体,分别于术后 4、8、12 周,取出带种植体周围骨组织,采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)分别检测普通图和糖尿病兔在不同种植体植入后 Runx-2、碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OC)、晚期糖基化终末产物(AGEs)的表达量。结果 Runx-2、ALP、OC 在改性涂层种植体表面的 mRNA 表达在同一时间点上,改性种植体组的表达量高于普通种植体组;不同时间点上,使用改性种植体的 Runx-2、ALP、OC 的基因表达量增加高于普通种植体,正常兔改性种植体基因表达最高。结论 复合涂层种植体能促进高糖环境下 Runx-2/ALP/OC 基因表达,具有一定的临床运用前景。

**[关键词]** 糖尿病;逆转录聚合酶链反应;种植体;表面改性

**[中图分类号]** R783.4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)08-1023-04

## Investigation of hydroxyapatite/chitosan-TGF- $\beta$ 1 composite coatings on implant surfaces and its effect on the maker gene Runx 2/ALP/OC of diabetic rabbit osteoblasts\*

Liu Xingyu<sup>1,2</sup>, Lei Tingting<sup>3</sup>, Gou Shiran<sup>1</sup>, Zheng Lige<sup>2 $\Delta$</sup> , Guo Ling<sup>1</sup>, Mu Yandong<sup>2</sup>

- (1. Department of Prosthodontics, the Affiliated Hospital of Stomatology of Southwest Medical University/Laboratory & Oral and Maxillofacial Reconstruction and Regeneration Institute of Cardiovascular Medicine, Southwest Medical University/Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases & the Affiliated West China Stomatology Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 3. Department of Planning and Finance, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**[Abstract]** **Objective** This study investigated the effects of hydroxyapatite (HA)/chitosan (CS)-transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) composite coatings on implant surfaces, as well as on the symbol gene of diabetic rabbit osteoblasts. **Methods** Coatings were prepared on implant surfaces and studied by scanning electric microscope (SEM), New Zealand White rabbits were used to establish the model of type 2 diabetes. Implant the implants in tibial metaphysis of the rabbit and took them and surrounding bone tissue our after 4, 8, 12 weeks. Detcet the expression of AGEs, ALP, OC, Runx-2 mRNA by semi-quantitative RT-PCR. **Results** The expression level of Runx-2, ALP and OC mRNA on composite coatings implants tended to be higher than that on normal implant at each time point. The same differences occurred at different points in time, especially the implants in normal rabbits. **Conclusion** The composite coatings implants significantly promote the proliferation of osteoblast and the expression of Runx-2, ALP and OC in high glucose, and it's worth of further clinical use.

**[Key words]** diabetes mellitus; reverse transcriptase polymerase chain reaction; implant; surface modification

种植义齿是目前治疗牙列缺损或缺失的较为理想的修复方式,而糖尿病(DM)作为一种全身性疾病成为种植手术的相对禁忌证,如何提高 DM 患者种植体的骨结合是目前一个急需解决的问题。本实验在前期实验<sup>[1]</sup>的基础上,对羟基磷灰石/壳聚糖-转化生长因子- $\beta$ 1 缓释微球复合涂层种植体进行进一步的研究,将其运用于 DM 兔上,验证其成骨效能,为今后的临床运用提供一定的实验依据。

### 1 材料与方

**1.1 材料** 实验动物:6 月龄健康雄性新西兰大白兔(西南医科大学实验动物中心)。实验试剂与材料:纳米羟基磷灰石

(HA Sigma, 美国);明胶粉剂(Sigma, 美国);TGF- $\beta$ 1 及 ELISA 试剂盒(Cloud-clone, 美国);四氧嘧啶(Sigma, 美国);精蛋白长效胰岛素(30R 诺和诺德中国制药有限公司);血糖仪及配套血糖试纸(罗氏卓越血糖仪);自行设计种植体(3.3 mm $\times$ 4.0 mm)。实验仪器:QUANTA 200 扫描电子显微镜(SEM, FEI, 荷兰);微弧氧化电源(中南民大等离子体研究所);低温离心机(C2500, 湖南湘仪实验仪器厂)热循环仪(TCA0096 Thermo Fisher, 美国);实时荧光定量 PCR(RT-PCR)仪(PIKORed 9, Thermo Fisher, 美国)。

### 1.2 方法

\* 基金项目:口腔疾病研究国家重点实验室开放课题(SKLOD2015OF09);四川省卫生和计划生育委员会科研课题(16PJ173)。作者简

介:刘星宇(1990-),硕士,主要从事口腔修复学研究。 $\Delta$ 通信作者:Email:51141487@qq.com

**1.2.1 HA/CS-TGF- $\beta$ 1 缓释微球复合涂层种植体的制备**  
HA/CS-TGF- $\beta$ 1 缓释微球复合涂层的制备见前置实验,运用此方式,将复合涂层加载于种植体表面<sup>[1]</sup>。

**1.2.2 动物建模及分组** 选取雄性的新西兰大白兔共 29 只,体质量为(2.79 $\pm$ 0.24)kg。以 100 mg/kg 的计量计算并经耳缘静脉缓慢注射新鲜配制的 5% 四氧嘧啶溶液。于药物注射后的 2、4、6 h 分别于新西兰兔的皮下注射 5% 葡萄糖溶液 3 mL。建模期间,每天检测血糖 1 次,待实验动物血糖稳定后每 3 天检测血糖 1 次。以平均每日血糖稳定于 13.9 mmol/L(25 mg/L)以上为建模成功。将建模成功的实验动物 24 只分为如下 4 组,A 组(正常兔普通种植体),B 组(正常兔改性种植体),C 组(DM 普通种植体),D 组(DM 改性种植体);当兔仰卧平躺时,每只兔右脚为普通种植体,左脚为改性种植体。

**1.2.3 种植体植入** 用戊 3% 巴比妥钠(40 mg/kg),耳缘静脉注射以麻醉动物。将实验动物术区备皮消毒,沿胫骨上端内侧平面切开,分离肌肉及筋膜完全暴露胫骨面;用生理盐水让术区冷却,使用种植机于胫骨平面中央逐级预各种植窝,并植入复合涂层种植体(图 1),深度约 2 mm,分层严密缝合。术后每日肌内注射 40 万 U 的硫酸庆大霉素,观察实验动物愈合情况。

#### 1.2.4 RT-PCR 检测特定基因

**1.2.4.1 RNA 的提取与转录** 于术后第 4、8、12 周,普通兔

组、DM 兔组各处死 4 只新西兰兔,取双侧胫骨(图 2)种植体周围 0.8 cm $\times$ 0.8 cm $\times$ 1.0 cm 的骨块,经锡箔纸双侧包裹并编号后,温度于 80  $^{\circ}$ C 保存。待 3 批样本收集齐后,液氮下无菌研磨、离心、振荡、静置、提取含有 RNA 的上清液,将提取出的 RNA 于 -20  $^{\circ}$ C 保存。最后按照说明书依次加入各试剂,置 PCR 仪上进行反应,完成逆转录。



图 1 兔胫骨植入



图 2 兔胫骨改性种植体骨结合情况

**1.2.4.2 引物设计与 RT-PCR 反应** 所有引物均交由上海生工生物工程技术服务有限公司设计合成,所用引物及碱基序列如表 1。按照说明书相关要求,应用 Smart Cycler System RT-PCR II 扩增仪进行实验。使用 Thermo Scientific PikoReal 软件(Thermo 公司)分析 PCR 过程各检测样本的 CT (Threshold cycle)值,本实验室通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算 X 相对 mRNA 表达水平,GAPDH 为内参。

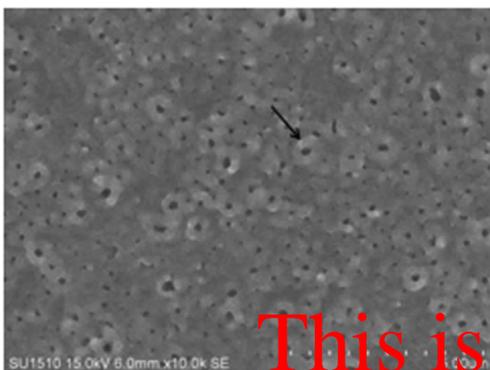
表 1 PCR 引物及碱基序列(3'~5')

引物名称	上游	下游
GAPDH	GATHCTGGTGCCGAGTAC	GCTGAGATGATGACCCTTTGG
AGEs	TGGAGCCAGAAGGTGGAGCAGTAGC	AGTTCGTGCGTTCCTCCTCGTCCTC
ALP	GCACGGTGTCCACGAGCAGAACTAC	CAACTGTCTGGGCTTGTGGGTGTC
OC	ACGCACAGAGCGACAGCATGAG	TGCCCTCCCTCTGGACACGAA
RUNX2	GCTCCGAAATGCCTCTGCTGTTATGA	GCTTCTGTCTGTGCCTTCTGGGTTCT

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,不符合正态分布的定量资料采用中位数及其四分位数间距表示;定量资料的组间比较采用单因素方差分析,重复测量资料组间差异性比较采用重复测量方差分析。检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

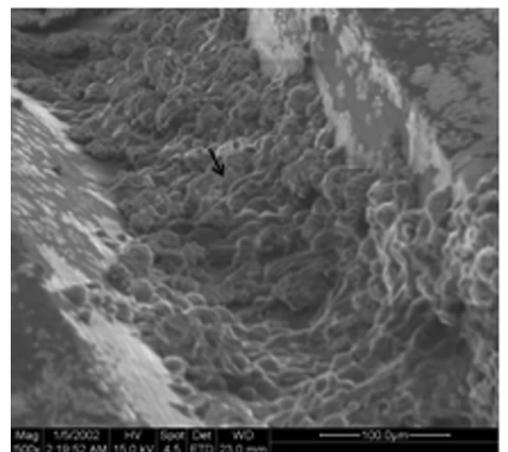
## 2 结 果

**2.1 种植体的表面形态** 由扫描电子显微镜(SEM)分别扫描微弧氧化后种植体和加载蛋白后改性种植体表面,可知种植体表面存在大量加载 TGF- $\beta$ 1 蛋白的明胶微球,明胶微球表面可见蛋白吸附,测得该微球球径为 8~30  $\mu$ m,见图 3、4。



箭头:微孔。

图 3 微弧氧化后种植体的表面微孔扫描电镜观察( $\times 2000$ )



箭头:加载蛋白。

图 4 微弧氧化后种植体的表面微孔扫描电镜观察( $\times 500$ )

**2.2 DM 模型的建立** 除两只动物建模时死亡,其余动物建模成功。建模后,模型组新西兰兔空腹血糖由(5.93 $\pm$ 0.66) mmol/L 增高到(18.61 $\pm$ 4.87) mmol/L,稳定于 13.8 mmol/L 以上。而对照组血糖为(6.12 $\pm$ 0.62) mmol/L,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.3  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法转换后不同时间点上各基因表达比较** 使用改性种植体的兔子(B、D 组),Runx-2、ALP、OC 的 mRNA 表达在可一时间点上高于普通种植体的兔子(A、C 组),差异有统计

表 2 2<sup>-ΔΔCT</sup>法转换后不同时间点上各基因表达比较( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	时间	AGEs	ALP	OC	Runx-2
A 组	第 1 个月	0.91±0.04	0.93±0.11	0.98±0.29	1.08±0.13
	第 2 个月	1.06±0.27	0.98±0.24	1.07±0.17	1.14±0.11
	第 3 个月	1.36±0.12	1.56±0.50	1.31±0.27	1.40±0.08
B 组	第 1 个月	0.89±0.20	1.02±0.11	1.32±0.44	1.57±0.23
	第 2 个月	1.02±0.18	1.25±0.11	1.51±0.20	1.76±0.33
	第 3 个月	1.29±0.23	1.83±0.15	1.95±0.17	2.32±0.37
C 组	第 1 个月	6.66±1.22	0.60±0.09	0.87±0.04	1.01±0.13
	第 2 个月	3.80±0.14	0.77±0.11	0.88±0.15	1.05±0.11
	第 3 个月	2.27±0.51	0.82±0.11	0.91±0.16	1.07±0.11
D 组	第 1 个月	3.56±0.76	0.83±0.21	0.95±0.19	1.10±0.21
	第 2 个月	2.51±0.24	0.90±0.05	1.02±0.13	1.22±0.27
	第 3 个月	1.59±0.38	1.38±0.09	1.34±0.30	1.55±0.12

学意义( $P < 0.05$ ),正常兔子改性种植体基因表达最高,DM 兔改性种植体率与正常兔子正常种植体的基因表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),DM 兔正常种植体最低。而随着时间的增加,使用改性种植体的 Runx-2、ALP、OC 的基因表达量增加高于普通种植体( $P < 0.05$ )。AGEs 的表达在普通兔子上,使用普通种植体随时间递增比改性种植体较快( $P < 0.05$ ),而在 DM 兔上,使用改性种植体后,AGEs 递减较快,普通种植体不变,见表 2、图 5。

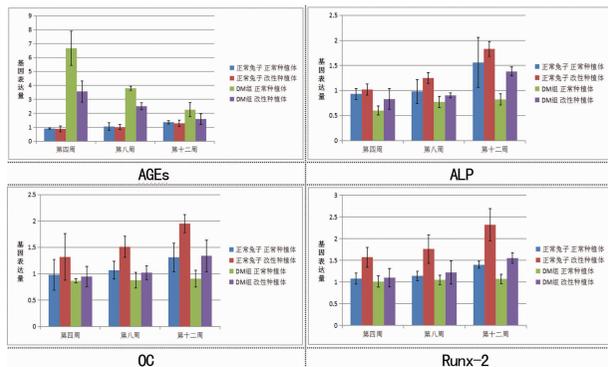


图 5 各组不同时间点上各基因表达比较

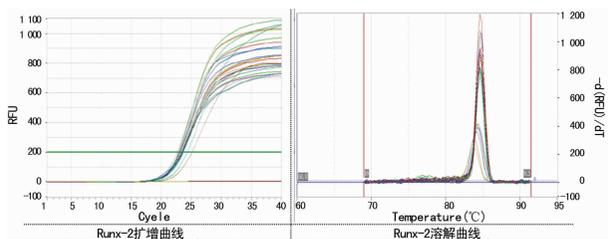


图 6 部分基因的扩增曲线和溶解曲线

### 3 讨论

DM 是一种常见的慢性全身性疾病,WHO 发布《全球糖尿病报告》来看,目前 DM 已成为重大的公共卫生问题。以往的研究表明,DM 患者的种植体成功率远低于健康人,因此对于 DM 患者种植体周围健康状况,不仅应及时进行治疗,更应该提前预防,以达到更好的修复效果<sup>[2-7]</sup>。

本实验对种植体进行表面改性,使其表面紧密吸附一层均匀的复合涂层,使种植体具有生物功能性,另一方面表面积增加了的种植体具有更高的骨结合率<sup>[8-9]</sup>。由电镜来看,种植体表面存在大量的载蛋白微球,这与以往的实验结果相似<sup>[1]</sup>。扩大了种植适应证,尤其是全身性疾病(如 DM、骨质疏松等)的患者时,单一钛种植体表面改性已不能满足目前的临床要求,结合理、化、生物方法及材料优点的改性技术以后必然的发展方向<sup>[10]</sup>。

本实验同时选取了 Runx-2、ALP、AGEs 和 OC 这几个在糖尿病成骨中有标志性的基因进行检测,由实验结果可知 Runx-2、ALP、OC 的 mRNA 表达在同一时间点上改性种植体的成骨性要高于普通种植体,DM 兔改性种植体率与正常兔子正种植体的基因表达相近。这说明使用复合涂层种植体后,对兔的成骨细胞增殖有促进作用,这可能与复合涂层中存在的 TGF-β 有关。Liu 等<sup>[11]</sup>研究表明,BMP 信号和 Runx-2 存在相关性,这一级联反应在成骨细胞分化过程中有着十分重要的作用。而在加入 TGF-β 后细胞 Runx-2、BMP2 mRNA 表达增加,表明细胞分化成骨能力增加,Sun 等<sup>[12]</sup>发现转化生长因子信号通路是一个重要的信号通路调节成骨细胞的矿化,加入 TGF-β 将影响 ALP 和 OC 的表达。这都与本实验结果基本相符。同时,改性种植体组中的 ALP 基因的表达量在动物实验的早期都维持在一个较高的水平,且远远大于普通种植体组,这可说明在成骨的早期,该复合涂层种植体提供羟基磷灰石对动物骨的矿化过程有较强的促进作用,复合涂层种植体能有效的促进成骨细胞 ALP 的基因的表达和其钙离子的释放,从而对成骨细胞的活性和矿化有一定作用。与此同时,在使用同种类型种植体时 DM 组的 Runx-2、ALP 和 OC 表达量少于正常兔子组,说明 DM 确实会引起实验动物的成骨能力下降。这可能 DM 的骨代谢有关系密切,DM 动物存在着钙磷及维生素 D 代谢异常,高血糖,糖基化终末产物,细胞因子与 Wnt 信号途径异常等问题,这些都可能造成糖尿病骨代谢异常从而诱发病理改变如骨愈合不良和骨再生能力受损等问题从而影响标志

性基因的表达<sup>[13]</sup>。与上述基因不同,AGEs 是一种与 DM 有密切关系的产物是在三酶促条件下,蛋白质、氨基酸、脂类或核酸等大分子

物质的游离氨基与还原糖的醛基经过缩合、重排、裂解、氧化修饰后产生一组稳定的终末产物<sup>[15-16]</sup>。组织中 AGEs 水平在一定程度上能反映 DM 肾病的严重程度,同时 AGEs 可与成骨细胞表面的受体 RAGE 结合,抑制成骨细胞分化,使成骨细胞成骨能力下降<sup>[17]</sup>。本实验中,高通 AGEs 的表达量在普通兔子使用普通时种植体随时间递增较快,而使用改性种植体递增较慢,但二者间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),说明在普通兔上,AGEs 表达改变不明显,而在 DM 兔上,使用改性种植体后,AGEs 递减迅速,普通种植体不变。这说明复合涂层种植体在可抑制 AGEs 的表达,从而促进 DM 动物的成骨,可能原因是与 AGEs 与 TGF- $\beta$ 1 呈负相关,而复合涂层种植体通过 TGF- $\beta$ 1 的过表达来抑制 AGEs 从而在 DM 中起到骨保护作用。

本实验使用的复合涂层改性种植体,在 DM 动物体内对于成骨具有明显的促进作用,该材料有望进一步研究以期以后的临床运用。

### 参考文献

- [1] 苟诗然,张帆,李萌婷,等. 钛表面羟磷灰石/壳聚糖-转化生长因子- $\beta$ 1 缓释微球复合涂层的制备及其对成骨细胞黏附与增殖的影响[J]. 华西口腔医学杂志,2016,34(3):229-233.
- [2] Aloufi F, Bissada N, Ficara A, et al. Clinical assessment of peri-implant tissues in patients with varying severity of chronic periodontitis[J]. Clin Implant Dent Relat Res, 2009,11(1):37-40.
- [3] Abreu MH, Bianchini MA, Magini RS, et al. Clinical and radiographic evaluation of periodontal and peri-implant conditions in patients with implant-supported prosthesis[J]. Acta Odontol Latinoam,2007,20(2):87-95.
- [4] Crespi R, Capparè P, Gherlone E. A 4-year evaluation of the peri-implant parameters of immediately loaded implants placed in fresh extraction sockets[J]. J Periodontol,2010,81(11):1629-1634.
- [5] Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, et al. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI dental implant system[J]. Clin Oral Implants Res,2003,14(3):329-339.
- [6] Yamalik N, Günday S, Kilinc K, et al. Analysis of cathepsin-K levels in biologic fluids from healthy or diseased natural teeth and dental implants[J]. Int J Oral Maxillofac Implants,2011,26(5):991-997.
- [7] Tang Z, Sha Y, Lin Y, et al. Peri-implant mucosal inflam-

mation and bone loss: clinical and radiographic evaluation of 108 dental implants after 1-year loading[J]. Chin J Dent Res,2000,3(2):15-20.

- [8] Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, et al. Advancing dental implant surface technology-from micron-to nanotopography[J]. Biomaterials,2008,29(28):3822-3835.
- [9] Dohan ED, Coelho PG, Kang BS, et al. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography[J]. Trends Biotechnol,2010,28(4):198-206.
- [10] Sarkar PD, Choudhury AB. Relationships between serum osteocalcin levels versus blood glucose, insulin resistance and markers of systemic inflammation in central Indian type 2 diabetic patients[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2013,17(12):1631-1635.
- [11] Liu T, Gao Y, Sakamoto K, et al. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx-2 deficient cell lines[J]. J Cell Physiol,2007,211(3):728-735.
- [12] Sun X, Cao Z, Zhang Q, et al. Aluminum trichloride inhibits osteoblast mineralization via TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway[J]. Chem Biol Interact,2016(244):449-2415.
- [13] Yamagishi SI. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes[J]. Curr Drug Targets,2011,12(14):2096-2102.
- [14] Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing[J]. Int J Vasc Med,2012(2012):918267.
- [15] Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, et al. AGE and their interaction with AGE receptor in vascular disease and diabetes I. The AGE concept[J]. Cardiovasc Res,1998,37(3):586-600.
- [16] Mai CY, Wang B, Wen JY, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and AGEs are associated with cardiovascular risk factors in women with history of gestational diabetes mellitus[J]. Gynecol Endocrinol,2014,30(3):241-244.
- [17] Santana RB, Xu L, Chase HB, et al. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes[J]. Diabetes,2003,52(6):1502-1510.

(收稿日期:2016-07-22 修回日期:2016-09-20)

(上接第 1022 页)

- [10] Rüdiger M, Wissel H, Ochs M, et al. Perfluorocarbons are taken up by isolated type II pneumocytes and influence its lipid synthesis and secretion[J]. Crit Care Med,2003,31(4):1190-1196.
- [11] Nakata S, Yasui K, Nakamura T, et al. Perfluorocarbon

suppresses lipopolysaccharide and alpha-toxin-induced interleukin-8 release from alveolar epithelial cells[J]. Neonatology,2007,91(2):127-133.

(收稿日期:2016-09-21 修回日期:2016-11-16)