

复合成骨蛋白-1多肽水凝胶缓释系统对小鼠成骨细胞碱性磷酸酶、骨钙素和核心结合因子 $\alpha 1$ 表达的影响

胡飞琴^{1,2} 谢志坚^{1*} 张锋¹

(¹浙江大学医学院附属口腔医院, 杭州 310006; ²宁波天一职业技术学院, 宁波 315104)

摘要 研究复合成骨蛋白-1 (osteogenic protein-1, OP-1)多肽水凝胶缓释系统对小鼠成骨细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OC)和核心结合因子 $\alpha 1$ (core binding factor $\alpha 1$, Cbfa1)表达的影响。实验分 OP-1 组、OP-1/水凝胶组和对照组, 对小鼠成骨细胞培养 1 d、4 d、7 d、10 d、14 d 后, 运用免疫细胞化学方法分别检测各组各时间点 ALP、OC 和 Cbfa1 的表达。结果显示培养 4 d、7 d、10 d、14 d, OP-1 组和 OP-1/水凝胶组 ALP、OC、Cbfa1 阳性表达均比对照组多 ($P < 0.05$), 培养 4 d、7 d、10 d, OP-1/水凝胶组 ALP、OC、Cbfa1 阳性表达均较 OP-1 组少 ($P < 0.05$); OP-1 组培养 1 d, Cbfa1 开始有表达, 而其他组、其他指标在 1 d 均无表达; OP-1 组培养 7 d, ALP 和 Cbfa1 表达量达顶峰, 而 OP-1/水凝胶组培养 10 d 才达顶峰; 到 14 d OP-1 组和 OP-1/水凝胶组 ALP、Cbfa1 的表达无显著性差异 ($P > 0.05$)。研究表明复合 OP-1 多肽水凝胶缓释系统能缓慢释放 OP-1, 促进成骨细胞分化, 增加 ALP、OC 和 Cbfa1 的表达。

关键词 成骨蛋白-1; 多肽水凝胶缓释系统; 碱性磷酸酶; 骨钙素; 核心结合因子 $\alpha 1$

应用生长因子缓释系统可以有效促进成骨、缩短疗程, 这是当今医学领域和生物材料领域的研究热点。成骨蛋白-1 (osteogenic protein-1, OP-1)即骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein 7, BMP7), 是 BMP 家族中一员。最早是由 Ozkaynak 等^[1]在 1990 年从牛成骨蛋白提取物中分离出来的一种新的蛋白质。OP-1 是一种具有强大骨诱导活性的成骨因子, 能促进成骨细胞增殖和分化。但是没有合适的缓释系统, OP-1 在体内很快就被分解、稀释, 很难在体内长时间保持有效浓度, 与载体材料结合可持续保持其生物活性, 并控制其释放速率和有效浓度。自组装多肽水凝胶由于具有完美的生物相容性和极高的含水量, 能够保持药物的生物活性, 是近年在该领域一个新的发展方向。本实验用 RADA16 (RADARADARADA)多肽水凝胶与重组人成骨蛋白-1 (rhOP-1)复合成缓释系统, 观察其对小鼠成骨细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OC)和核心结合因子 $\alpha 1$ (core binding factor $\alpha 1$, Cbfa1)的表达影响, 为进一步研究复合 OP-1 多肽水凝胶缓释系统提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

rhOP-1 购自美国 PeproTech 公司; RADA16 多肽购自上海波泰生物科技有限公司; 小鼠成骨细胞株 (mouse osteoblast-like cells, MC3T3-E1)由中科院上海生命科学研究院细胞库提供; 胎牛血清、 α -MEM 培养液为 Gibco 公司产品; 胰蛋白酶为吉诺生物医药技术公司产品; ALP、OC、Cbfa1 多克隆抗体、免疫细胞化学 ABC 检测试剂盒、DAB 显色试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品。

1.2 实验分组

实验分为 3 组, 即 OP-1 组、OP-1/水凝胶组和对照组。OP-1 组在细胞接种后培养液中加入 rhOP-1; OP-1/水凝胶组是将细胞接种在水凝胶缓释系统环境中, 但细胞与水凝胶缓释系统不直接接触; 对照组则不采用任何干预措施。

收稿日期: 2009-07-16 接受日期: 2009-09-17

卫生部科研基金(WKJ2007-2-015)、浙江省科技厅基金(2007C23016)和浙江省卫生高层次创新人才基金(2008)资助

*通讯作者。Tel: 0571-87217457, E-mail: xzj66@zju.edu.cn

1.3 细胞培养及爬片

按常规复苏 MC3T3-E1, 置 37 °C、5% CO₂、95% 湿度培养箱中培养。每 2~3 天换培养液一次, α -MEM 培养液含 10% 胎牛血清。把直径 1.2 cm 的圆玻片(已高温消毒)平铺于 24 孔培养板底(24 孔培养板置紫外灯下照射过夜)。常温下以 1 mg 多肽与 100 μ l ddH₂O 比例配成 1% (W/V) 水凝胶, 包封 200 ng rhOP-1, OP-1/ 水凝胶组每孔玻片周边涂布 25 μ l 包封 rhOP-1 的水凝胶缓释系统, 置 37 °C、5% CO₂、95% 湿度培养箱中使之成凝胶状(备用)。细胞长满培养瓶底 80%~90% 时弃去培养液, 加入 PBS 液冲洗, 然后用 0.25% 胰蛋白酶常温消化, 镜下观察细胞收缩变形终止消化。转移入 10 ml 离心管 1 000 r/min 离心 5 min。吸出上层液体加培养液吹打均匀, 制备成单细胞悬液, 将细胞接种在各组圆玻片上。OP-1 组吸去等体积培养液后加入 50 ng rhOP-1, 最终使每孔培养液均为 200 μ l, 置 37 °C、5% CO₂、95% 湿度培养箱中培养 1 d、4 d、7 d、10 d、14 d。

1.4 免疫细胞化学

将细胞爬片用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 1 min; 4% 多聚甲醛室温固定 60 min, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 用新鲜配置的 0.3% Triton X-100 室温 10 min 暴露抗原, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 2 min; 6 mL/L H₂O₂- 甲醇室温浸泡 30 min 灭活内源性过氧化物酶, ddH₂O 洗 2 次; 用 5% BSA 封闭, 室温温育 20 min, 甩去多余液体, 不洗; 滴加一抗(1:100), 4 °C 温育过夜, 37 °C 复温 1 h, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 滴加生物素化二抗, 37 °C 温育 20 min, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 滴加链霉亲和

素-生物素-过氧化物酶复合物, 37 °C 温育 20 min, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 10 min; DAB 显色, 镜下控制反应时间, ddH₂O 终止显色。苏木素复染, 透明、封片, 显微镜观察。阴性对照用 PBS 代替一抗。

1.5 图像分析与统计学方法

应用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统, 将染色的细胞爬片在镜下统一放大 400 倍, 每张爬片随机选取不相重叠的 5 个视野, 获得每张爬片的平均灰度值 ($\bar{x} \pm s$)。灰度值是指图像中黑白深浅的程度, 最黑的灰度值为 0, 最白的灰度值为 255。应用 SPSS16.0 统计学软件, 采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

免疫细胞化学染色结果: ALP、OC 和 Cbfa1 阳性着色主要位于细胞质内, 表现为细胞质内棕黄色颗粒(图 1~图 3), 阴性对照显示细胞质无阳性表达。

2.1 OP-1 组 ALP、OC、Cbfa1 表达规律

见表 1 和图 4~图 6。OP-1 组细胞培养 1 d, Cbfa1 开始有表达, 而 OC 和 ALP 均无表达。培养 7 d, ALP 和 Cbfa1 表达量达高峰, 而 OC 在 10 d 达高峰。培养 4 d、7 d、10 d、14 d 分别与对照组比较各指标均有显著性差异($P < 0.05$), 表达量均明显多于对照组。

2.2 复合 OP-1 水凝胶缓释系统对 ALP 表达影响

OP-1/ 水凝胶组细胞培养 1 d ALP 未表达, 培养 4 d、7 d、10 d、14 d 均有阳性表达, 7 d 表达量明显多于 4 d, 10 d 表达量明显多于 7 d ($P < 0.05$), 10 d 表达量达高峰, 之后趋于平缓($P > 0.05$) (表 1, 图 4)。4 d、7 d、10 d、14 d 分别与对照组比较均有显

Table 1 Grey value of ALP, OC and Cbfa1 at different time points ($\bar{x} \pm s$)

Group		Grey value of ALP	Grey value of OC	Grey value of Cbfa1
OP-1 group	1 d	180.10 \pm 2.30	182.61 \pm 2.38	176.20 \pm 0.75*
	4 d	151.64 \pm 2.45*	168.25 \pm 0.76*	152.18 \pm 1.97*
	7 d	123.50 \pm 3.12*	146.23 \pm 0.88*	120.66 \pm 1.95*
	10 d	122.91 \pm 1.55*	130.63 \pm 1.93*	120.95 \pm 1.87*
	14 d	123.48 \pm 1.79*	129.91 \pm 2.18*	123.33 \pm 2.01*
OP-1/hydrogel group	1 d	180.76 \pm 1.18	183.13 \pm 1.91	178.99 \pm 0.95#
	4 d	160.14 \pm 1.33**	173.51 \pm 1.68**	158.47 \pm 0.83**
	7 d	145.52 \pm 0.85**	153.94 \pm 1.07**	140.72 \pm 1.38**
	10 d	126.04 \pm 1.25**	140.43 \pm 2.33**	124.32 \pm 1.92**
	14 d	125.28 \pm 3.61*	139.80 \pm 1.80**	124.35 \pm 2.33*
Control group	1 d	180.35 \pm 3.51	183.22 \pm 2.08	179.08 \pm 2.46
	4 d	167.30 \pm 0.73	176.37 \pm 1.55	162.31 \pm 0.90
	7 d	152.74 \pm 1.13	160.03 \pm 0.96	151.45 \pm 1.05
	10 d	140.74 \pm 1.01	147.27 \pm 0.88	136.87 \pm 1.25
	14 d	138.52 \pm 1.28	147.32 \pm 3.28	135.58 \pm 0.68

Compared with control group, * $P < 0.05$; compared with OP-1 group, # $P < 0.05$.

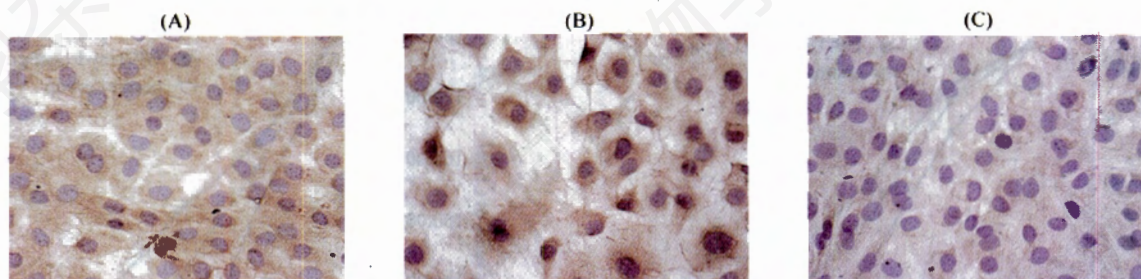


Fig.1 The expression of ALP in the cells after being cultured for seven days (SABC, 400 \times)
A: OP-1 group; B: OP-1/hydrogel group; C: control group.

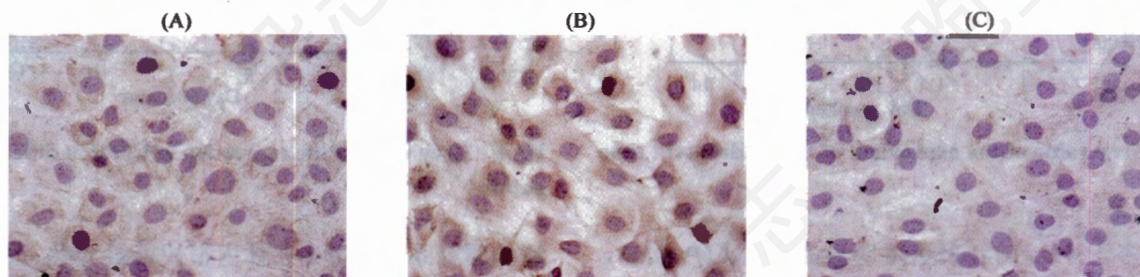


Fig.2 The expression of OC in the cells after being cultured for seven days (SABC, 400 \times)
A: OP-1 group; B: OP-1/hydrogel group; C: control group.

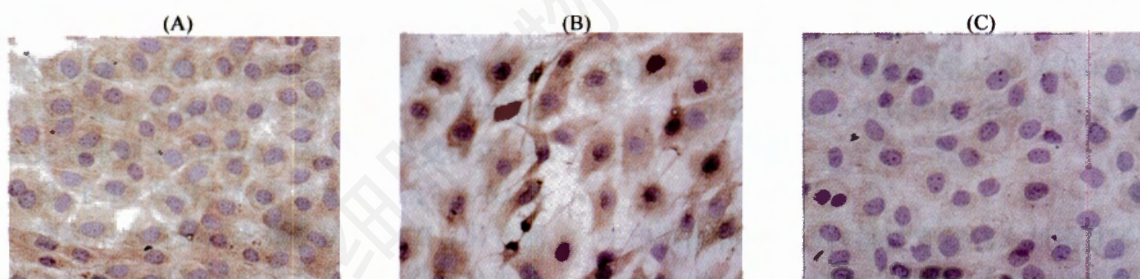


Fig.3 The expression of Cbfa1 in the cells after being cultured for seven days (SABC, 400 \times)
A: OP-1 group; B: OP-1/hydrogel group; C: control group.

著性差异($P < 0.05$), 表达量均明显多于对照组; 4 d、7 d、10 d 分别与 OP-1 组比较均有显著性差异($P < 0.05$), 表达量均少于 OP-1 组; 14 d 与 OP-1 组比较无显著性差异($P > 0.05$) (表 1, 图 4)。

2.3 复合 OP-1 水凝胶缓释系统对 OC 表达影响

OP-1/水凝胶组细胞培养 1 d OC 未表达, 培养 4 d、7 d、10 d、14 d 均有阳性表达, 7 d 表达量明显多于 4 d, 10 d 表达量明显多于 7 d ($P < 0.05$), 10 d 表达量达高峰, 之后趋于平缓($P > 0.05$) (表 1, 图 5)。4 d、7 d、10 d、14 d 分别与对照组比较均有显著性差异($P < 0.05$), 表达量均明显多于对照组; 4 d、7 d、10 d、14 d 分别与 OP-1 组比较均有显著性差异($P < 0.05$), 表达量均少于 OP-1 组(表 1, 图 5)。

2.4 复合 OP-1 水凝胶缓释系统对 Cbfa1 表达影响

OP-1/水凝胶组细胞培养 1 d Cbfa1 未表达, 培养 4 d、7 d、10 d、14 d 均有阳性表达, 7 d 表达

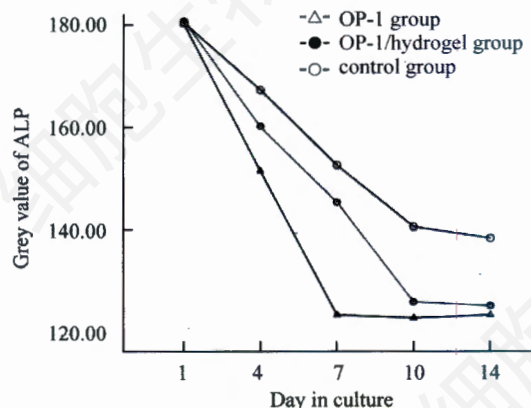


Fig.4 Grey value of the expression of ALP at different time points

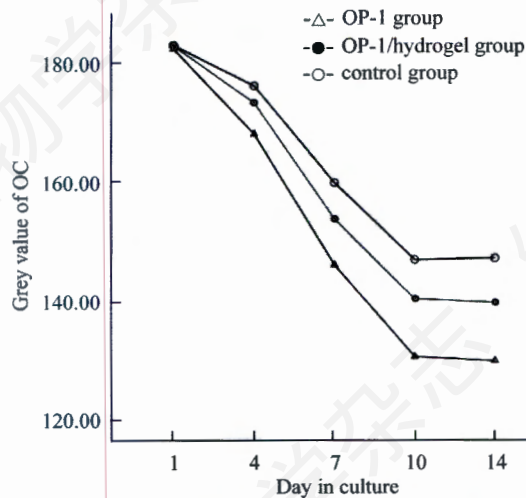


Fig.5 Grey value of the expression of OC at different time points

量明显多于 4 d, 10 d 表达量明显多于 7 d ($P < 0.05$), 10 d 表达量达高峰, 之后趋于平缓 ($P > 0.05$) (表 1, 图 6)。4 d、7 d、10 d、14 d 分别与对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 表达量均明显多于对照组; 1 d、4 d、7 d、10 d 分别与 OP-1 组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 表达量均少于 OP-1 组; 14 d 与 OP-1 组比较无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1, 图 6)。

3 讨论

自组装多肽水凝胶支架材料近年来开始被用于细胞培养和组织修复, 这些特殊的 0.1%~1% 多肽溶液在一定的 pH 值和离子浓度下能够自发的自组装成水凝胶^[2-4]。同时这类多肽水凝胶含有超过 99% 的水容量, 由直径约为 10 nm 的纤维组成三维网状结构, 内部的孔隙大小为 5~200 nm, 它们不仅被广泛应用于组织工程, 而且也被作为药物释放载体而加以研究^[5-7]。有研究表明, 如果能够设计出良好的药物释放系统而达到控释的目的就能极大地提高治疗的效率。当然, 设计的药物释放系统有很多严苛的要求, 不仅要有良好的生物相容性和稳定性, 而且能够保持活性分子的活性, 并以一定的速率在整个治疗过程中释放出来。从这些要求我们可以看出, 自组装多肽水凝胶其实是一个很好的潜在的药物缓释系统的候选者, 因为它有完美的生物相容性和极高的水含量, 能够保持药物的生物活性, 允许各种各样的分子在其中自由扩散。目前关于自组装多肽水凝胶材料作为缓释系统的研究在国内外都很罕见^[7]。大量研究表明 OP-1 具有明显的促成骨细胞分化的作用, 在骨缺损修复研究方面有很大的潜力。但是, 没有合

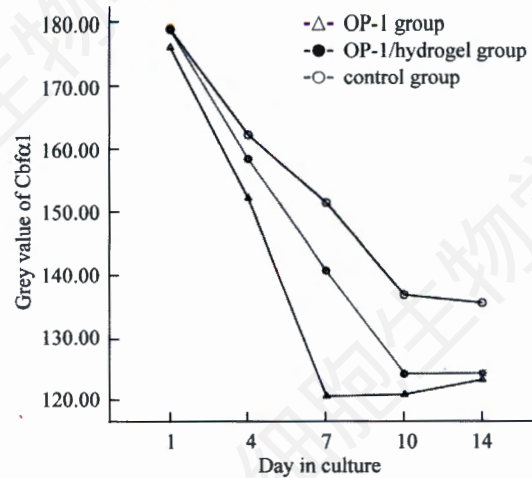


Fig.6 Grey value of the expression of Cbfa1 at different time points

适的缓释系统, OP-1 在体内很快就被分解, 很难在体内长时间保持有效浓度^[8]。正是在这样的背景下, 我们进行了本实验。

本实验将 rhOP-1 和 RADA16 多肽在室温下复合, 在 37 °C 下形成水凝胶缓释系统, 置于细胞生长环境中培养 MC3T3-E1, 结果显示 OP-1/水凝胶组在 4~14 d 各时间点, ALP、OC 和 Cbfa1 表达量明显多于对照组, 表明复合 OP-1 的 RADA16 多肽水凝胶系统可保持 OP-1 的活性, 并缓慢持续释放 OP-1, 促进成骨细胞分化。RADA16 多肽水凝胶在水中溶胀、保持大量水分并形成网状骨架结构, OP-1 以分子状态分散于骨架内, 水凝胶的溶胀作用使水凝胶表面的孔洞变大, 打开了水凝胶内外水分扩散途经, 水溶性的 OP-1 就被逐渐释放出来。另外, 多肽水凝胶良好的生物相容性对细胞的生长分化不会造成危害, 一些学者自组装的多肽水凝胶支架能用于细胞三维培养和组织再生也证明了这点^[9,10]。

Cbfa1 是一种含有 runt 结构域的能调节器官形成的转录因子, 在维持成骨活性, 调控成骨细胞分化或成熟中起着关键性的作用^[11]。有体内实验研究表明 Cbfa1 基因敲除的小鼠无成熟骨的形成, 且成骨相关基因 (ALP, OC, OPN, BSP 等) 表达受阻, 发现 Cbfa1 不仅可以上调 ALP 和 OC 的活性, 还能诱导 OPN、BSP 等矿化相关蛋白的表达, 对成骨细胞分化和骨形成有重要调控作用^[12], 说明 Cbfa1 表达可能是成骨细胞分化中的早期事件, 而本实验 OP-1 组培养 1 d Cbfa1 即有表达, ALP 和 OC 在 4 d 后才开始表达可能也提示了这一点。在培养 10 d 之后, Cbfa1 表达有下降趋势, 这可能是由于 Cbfa1 基因存在自身结合位

点, 具有自身负反馈调控作用, 当 $Cbfa1$ 达到一定量时, 能反馈地抑制 $Cbfa1$ 基因的表达, 这与 Drissi 等^[13] 研究结论一致。目前认为 OC 是成熟的成骨细胞所分泌, 是细胞分化的晚期指标, 我们在实验中也发现在三组的所有时间点上, ALP 与 $Cbfa1$ 表达量均高于 OC, 这可能从一个侧面支持了 OC 是成骨细胞分化的晚期事件这个结论。

本实验的 OP-1 组在培养的第 7 天 ALP 和 $Cbfa1$ 表达达到峰值, 而 OP-1/ 水凝胶组 ALP 和 $Cbfa1$ 表达高峰推迟, 为第 10 天, 我们推测可能因为缓释系统缓慢释放 OP-1, 在短时间内培养液中 OP-1 的浓度及其对成骨细胞生长分化的促进作用不如 OP-1 组(加等量 OP-1)。Zhang 等^[8]通过小鼠体内实验研究表明 OP-1 加缓释系统能显著促进局部成骨, 而 OP-1 直接注入小鼠体内无明显成骨作用, 认为无缓释系统的 OP-1 在体内会被迅速分解而起不到应有的生物学效应。由于本实验是体外研究, OP-1 组的培养液中加入 OP-1 后不存在类似 OP-1 在体内被分解而浓度下降的现象, 可能导致 4 d、7 d、10 d OP-1 组相关基因表达均高于 OP-1/ 水凝胶组, 但在培养第 14 天时两组基因表达量已无显著性差异, 这也从另一方面说明了本实验水凝胶缓释系统具有一定的缓释作用。当然, 本水凝胶缓释系统具体的缓释特点及释放曲线还有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, *et al.* OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family, *EMBO J*, 1990, 9 (7): 2085-2093
- [2] Zhang S, Yan L, Altman M, *et al.* Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation, *Biomaterials*, 1999, 20(13): 1213-1220
- [3] Zhang S, Marini DM, Hwang W, *et al.* Design of nanostructured biological materials through self-assembly of polypeptides and proteins, *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6(6): 865-871
- [4] Holmes TC, de Lacalle S, Su X, *et al.* Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling polypeptide scaffolds, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12):6728-6733
- [5] Zhang S, Gelain F, Zhao X. Designer self-assembling polypeptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures, *Semin Cancer Biol*, 2005, 15(5): 413-420
- [6] Horii A, Wang X, Gelain F, *et al.* Biological designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration, *PLoS ONE*, 2007, 2(2): e190
- [7] Nagai Y, Unsworth LD, Koutsopoulos S, *et al.* Slow release of molecules in self-assembling peptide nanofiber scaffold, *J Control Release*, 2006, 115(1): 18-25
- [8] Zhang R, Xu D, Landeryou T, *et al.* Ectopic bone formation using osteogenic protein-1 carried by a solution precipitated hydroxyapatite, *J Biomed Mater Res A*, 2004, 71(3): 412-418
- [9] Yokoi H, Kinoshita T, Zhang S. Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(24): 8414-8419
- [10] Bokhari MA, Akay G, Zhang SG, *et al.* The enhancement of osteoblast growth and differentiation *in vitro* on a peptide hydrogel-polyHIPE polymer hybrid material, *Biomaterials*, 2005, 26(25): 5198-5208
- [11] Krishnan V, Moore TL, Ma YL, *et al.* Parathyroid hormone bone anabolic action requires $Cbfa1$ /Runx2-dependent signaling, *Mol Endocrinol*, 2003, 17(3): 423-435
- [12] Vaes BL, Ducy P, Sijbers AM, *et al.* Microarray analysis on Runx2-deficient mouse embryos reveals novel Runx2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation, *Bone*, 2006, 39(4): 724-738
- [13] Drissi H, Luc Q, Shakoori R, *et al.* Transcriptional autoregulation of the bone related $CBFA1$ /RUNX2 gene, *J Cell Physiol*, 2000, 184(3): 341-350

Effect of Polypeptide Hydrogel Delivery System Combined with Osteogenic Protein-1 on Expression of Phosphatase, Osteocalcin and Core Binding Factor $\alpha 1$ in Mouse Osteoblasts

Fei-Qin Hu^{1,2}, Zhi-Jian Xie^{1*}, Feng Zhang¹

⁽¹⁾Hospital of Stomatology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China;

⁽²⁾Ningbo College of Health Sciences, Ningbo 315104, China)

Abstract Study on the effect of the polypeptide hydrogel delivery system combined with osteogenic protein-1 (OP-1) on expression of alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC) and core binding factor $\alpha 1$ ($Cbfa1$) in mouse osteoblasts. Culture cells and divide them into three groups (OP-1 group, OP-1/hydrogel group and control group). The expression of ALP, OC and $Cbfa1$ in these cells were observed with immunocytochemistry

after culturing for one day, four days, seven days, ten days and fourteen days. The expression of ALP, OC and Cbfa1 of OP-1 group and OP-1/hydrogel group were all more than that of control group after being cultured for four days, seven days, ten days and fourteen days ($P < 0.05$). The expression of ALP, OC and Cbfa1 of OP-1/hydrogel group were fewer than that of OP-1 group after being cultured for four days, seven days and ten days ($P < 0.05$). There was a little of expression of Cbfa1 of OP-1 group after being cultured for one day. But there was none of the others. The expression of ALP and Cbfa1 of OP-1 group reached zenith after being cultured for seven days. But that of OP-1/hydrogel group reached zenith after being cultured for ten days. The expression of ALP and Cbfa1 were not distinctly different between OP-1 group with OP-1/hydrogel group after being cultured for fourteen days ($P > 0.05$). These results revealed that the polypeptide hydrogel delivery system combined with OP-1 can release OP-1 slowly to promote the osteoblasts to differentiate and increase the expression of ALP, OC and Cbfa1 of them.

Key words osteogenic protein-1; polypeptide hydrogel delivery system; alkaline phosphatase; osteocalcin; core binding factor α 1

Received: July 16, 2009 Accepted: September 17, 2009

This work was supported by the Scientific Research Foundation of the Ministry of Health of China (WKJ2007-2-015), the Foundation of Science and Technology Department of Zhejiang Province (2007C23016), the Zhejiang Provincial Program for the Cultivation of High-level Innovative Health Talents (2008)

*Corresponding author. Tel: 86-571-87217457, E-mail: xzj66@zju.edu.cn