

特约专栏

微纳米生物玻璃的体外成骨性能研究

李玉莉^{1,2,3}, 陈晓峰^{1,2,3}, 韩雪^{1,2,3}, 苗国厚^{1,2,3}, 胡庆^{1,2,3}, 雷波^{1,2,3}

(1. 华南理工大学材料科学与工程学院, 广东 广州 510640)

(2. 国家人体组织功能重建工程技术研究中心, 广东 广州 510006)

(3. 广东省生物医学工程重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 微纳米生物活性玻璃因其具有特殊的形态结构和理化性能目前引起众多研究者的关注, 但是目前对微纳米生物活性玻璃的结构及形态对细胞性能的影响研究的较少。本文通过溶胶-凝胶法结合模板仿生技术合成了具有特殊结构和形态的微纳米生物活性玻璃, 并通过体外细胞实验, 研究了这种微纳米结构对人骨髓间充质干细胞成骨性能(ALP, Runx2, Col1a1 和 OPN)的影响, 结果证明具有规则形态的生物活性玻璃(SBG)相比不规则形态的生物活性玻璃(IBG)更能促进细胞的体外成骨性能, 为将来设计具有特定结构的生物活性玻璃提供了参考依据。

关键词: 微纳米生物玻璃; 溶胶-凝胶技术; 碱性磷酸酶; 成骨基因

中图分类号: R318.08 文献标识码: A 文章编号: 1674-3962(2012)06-0007-05

Biocompatibility and Osteogenesis of Micro- and Nano-Bioactive Glasses

LI Yuli^{1,2,3}, CHEN Xiaofeng^{1,2,3}, HAN Xue^{1,2,3}, MIAO Guohou^{1,2,3},
HU Qing^{1,2,3}, LEI Bo^{1,2,3}

(1. School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(2. National Engineering Research Center for Tissue Restoration and Reconstruction, Guangzhou 510006, China)

(3. Guangdong Province Key Laboratory of Biomedical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Because of the special morphology and characterization, micro- and nano- bioactive glass caused much attention by researchers, but the morphology of micro- and nano-bioactive glass on cell performance has been underappreciated and underinvestigated. The special morphology of micro- and nano-bioactive glass was synthesized by the Sol-gel method combined with the template bionic. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) were seeded on bioactive glass for 6 days and 10 days *in vitro* for alkaline phosphatase (ALP) activity and 5 days for osteogenic gene expression analysis. Based on the results of ALP activity and osteogenic gene expression analysis, the responses of hMSCs to the SBG exhibited a higher degree of osteogenic differentiation than those on IBG *in vitro*. This work will provide a reference for design of specific morphology of the bioactive glass in the future.

Key words: micro- and nano-bioactive glass; Sol-gel method; alkaline phosphatase; osteogenic gene expression

1 前言

由美国佛罗里达大学 Larry L. Hench 教授于 20 世纪 70 年代初研制的生物活性玻璃 (Bio-Active Glass) 是

无机类生物活性材料的一个重要组成部分^[1]。其与之前的生物材料的最大的区别, 是可以与骨组织形成键合。由于其具有良好的生物活性, 能够与骨形成牢固的化学结合, 一问世便引起国际生物材料学界的高度关注。经过 10 多年的研究, 在 1985 获得 FDA 批准进入临床^[2], 并引发了生物活性玻璃研究的热潮。目前, 对生物玻璃的结构、理化及生物学性能研究仍在不断深入, 特别是近年来, 在生物玻璃的细胞学研究方面取得一些突破性进展, 证明生物玻璃具有一定的细胞和基因激活作用, 这对于骨组织的再生修复是一

收稿日期: 2012-04-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50830101, 51072055, 51172073); 华南理工大学中央高校基本科研业务费资助项目, (2012ZP0001)

作者简介: 李玉莉, 女, 1979 年生, 博士

通讯作者: 陈晓峰, 男, 1956 年生, 教授, 博士生导师

个关键因素^[3-5]。溶胶-凝胶法是一种新兴的技术,在 20 世纪 90 年代才被引用到生物玻璃的制备过程中来^[6]。由于溶胶-凝胶技术室温可控,后续的热处理温度在 600~700 ℃,在工艺上易于操作。并且,制备的生物玻璃具有多孔结构、密度小、比表面积高,生物活性高,在保持生物活性的前提下,其化学组成可在较大范围内进行调整,是一种非常有前途的制备方法。进入 21 世纪后,随着纳米时代的到来,为了进一步改善生物活性材料的组织修复特性,近年来对生物活性材料的纳米化,引起国内外生物医学材料学界的广泛重视。但由于微纳米生物玻璃与传统的生物玻璃 45S5 和溶胶-凝胶生物玻璃 58S、77S 和 70S30C 等,在形态上存在很大的区别,因此,单纯从生物玻璃溶出离子角度很难评价微纳米生物活性玻璃的形态对细胞学行为的影响。

本文采用溶胶-凝胶技术结合有机模板法,制备了一种具有规则形态的微纳米生物活性玻璃,并通过体外实验研究了这种形态的生物活性玻璃对细胞行为的影响,考察了其成骨基因表达的影响。

2 材料与方法

2.1 生物玻璃的制备与表征

以生物活性良好的化学组分为 60% SiO₂, 36% CaO, 4% P₂O₅ (摩尔百分数) 的溶胶-凝胶生物玻璃 (58S) 为研究对象。制备微球颗粒形态的 60S 生物玻璃工艺过程主要分为以下几步: 将一定量的柠檬酸 (CA) 溶解于无水乙醇的水溶液中, 磁力搅拌 10 min, 形成溶液 A; 将一定量的前驱体原料正硅酸乙脂 (TEOS)、磷酸三乙脂 (TEP)、四水硝酸钙按顺序加至溶液 A 中, 形成溶胶 B; 将一定量的聚乙二醇 (PEG-6000, PEG-10000) 加入到溶胶 B 中并继续搅拌 4 h, 以使生物玻璃的前驱体充分水解以及 PEG 分子的成形组装; 将充分水解的溶胶 B 装入密封的 50 ml 塑料离心管中, 于 60 ℃ 水热老化 24 h; 将塑料管中的湿凝胶取出于 60 ℃ 干燥 24 h; 将烘干好的干凝胶研磨后, 置入高温炉中以 10 ℃/min 升至 600 ℃ 热处理 2 h, 研磨无需过筛即可得到分散良好的生物活性玻璃微球颗粒。

样品的微纳米结构形貌采用日本 JSM6330F 高分辨场发射扫描电镜进行观察。

2.2 人骨髓间充质干细胞的分离

人骨髓间充质干细胞 (HMSCs) 取自非造血系统、非

遗传性疾病且未累及骨髓的正常成人骨髓, 将原代细胞置于低糖培养基 (L-DMEM, GIBCO) 中, 在 37 ℃、体积分数 5% 的 CO₂ 及饱和湿度条件下培养。细胞贴壁并汇合成单层后, 按 1:3 传代进行扩增。传至第 3 代, 消化离心以 1×10^5 个/cm² 密度, 分别在成骨诱导液、L-DMEM 中, 将两种生物玻璃与细胞共培养, 考察其成骨性能。

2.3 检测项目与方法

2.3.1 碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测

蛋白提取 细胞和生物玻璃在 6 孔板中培养 6, 10 d 时, 用冰冷的 PBS 洗两次, 加入 300 μl ALP 裂解液, 转移到 EP 管中, 冰上裂解数分钟。用超声细胞破碎机超声裂解。然后转移到冰冻离心机中, 13 000 rpm 离心 2 min, 将上清液分装, -80 ℃ 冰冻保存。

碱性磷酸酶 (ALP) 测定 将 200 μl 浓度 5 mmol/L 的对硝基苯酚 (p-Nitrophenol, BIO BASIC INC) 加入到 1.5 ml 的 EP 管中, 再将解冻的样品吸取 20 μl 加入, 37 ℃ 水浴 15 min。再加入 0.5 ml 浓度 0.1 mol/L 的 NaOH 终止反应, 用酶标仪读取 410 nm 处的读数。

BCA 测定总蛋白 按照 BCA 试剂盒 (BCATM Protein Assay Kit, Thermo) 的说明, 吸取每一份待测液 25 μl 注入 96 孔板中, 加 200 μl 的 BCA 工作液到每一个孔中, 在摇床上摇晃 30 s 使液体充分的混匀, 再盖上孔板 37 ℃ 孵化 30 min。结束后将孔板取出, 冷却至室温, 用酶标仪测量 562 nm 处的吸光度。

碱性磷酸酶 (ALP) 活性等于 ALP 测定的观测值与总蛋白测定的观测值之比。

2.3.2 成骨基因检测

RNA 的提取 将与材料复合培养 5 d 的细胞抽提 RNA。每孔加入 1 ml Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 反复吹打, 按照说明书上的步骤抽提 RNA, 将干燥后的 RNA 溶于 20 μl 的 DEPC 水中, 在 NanoDrop2000 (Thermo Scientific) 上检测 RNA 浓度, 并立即进行逆转录。

RNA 的逆转录 取 500 ng 总 RAN, 采用 Fermentas Life Sciences 公司的逆转录试剂盒, 在 PCR 仪 (TC-412, TECHNE 公司) 上进行逆转录, 逆转录完成后, cDNA 立即进行 Real-time PCR (qRT-PCR)。

Real-time PCR (qRT-PCR) 检测 采用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix EX Taq 在实时定量 PCR 仪 (Chromo4, BIO-RAD 公司) 上进行 Real-time PCR (qRT-PCR) 检测, 引物序列见表 1。

表1 成骨相关基因引物序列

Table 1 Primer sequences of correlative genes for osteogen

Gene	Primer
GAPDH	AGAAAAACCTGCCAAATATGATGAC
(NM_002046)	TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC
Runx2	AGAAGGCACAGACAGAAGCTTGA
(NM_001015051.3)	AGGAATGCGCCCTAAATCACT
OPN	GCGAGGAGTTGAATGGTG
(NM_013227.2)	CTTGTGGCTGTGGGTTTC
COL1A1a1	CAGCCGCTTCACCTACAGC
(NM_000088)	TTTTGTATTCAATCACTGTCTTGCC

2.4 数据统计分析

采用 SPSS Version 18.0 对实验结果进行统计分析,

其中组间比较采用 One-Way ANOVA 法分析, 方差齐时采用 S-N-K 法分析统计显著性水平为 $P < 0.05$ 。

3 结果与分析

3.1 生物活性玻璃微球制备技术对微球形貌的影响

实验前期研究了酸催化溶胶-凝胶技术结合 PEG 作模板剂制备微纳米生物活性玻璃的过程中, PEG 分子量对微纳米生物活性玻璃的形貌和尺寸的影响^[7]。研究发现, PEG6000 制备得到直径为 5 μm 左右的规则的微米球, 球体表面有明显的微纳米裂纹(SBG, 图 1a, b); 当使用 PEG10000 制备时, 合成了不规则的纳米生物活性玻璃颗粒, 尺寸在 70 ~ 200 nm 之间, 颗粒之间有轻微团聚(IBG, 图 1c, d)。

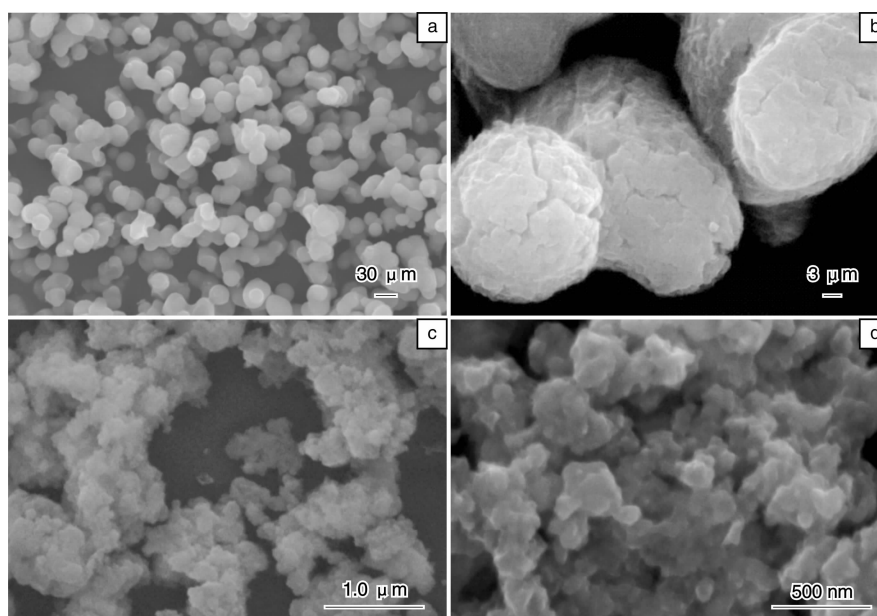


图1 生物活性玻璃微球的 SEM 照片: (a, b) SBG, (c, d) IBG
Fig.1 SEM micrographs of bioactive glasses: (a, b) SBG and (c, d) IBG

3.2 SBS 和 IBS 生物活性玻璃微球对 HMSCs 成骨性能影响的比较

碱性磷酸酶(ALP)在成骨诱导初期由成骨细胞分泌, 是骨前体细胞成骨分化的标志之一^[8], 常用碱性磷酸酶活性来定量表达骨髓间充质干细胞成骨分化的水平。从图2可以看出, 6 d 和 10 d 时成骨诱导下 SBG 和 IBG 的 ALP 的表达水平比对照组都要高, 且具有显著性统计学差异($P < 0.001$), 成骨诱导环境中 SBG 的 ALP 表达均值在 6 d 和 10 d 时比 IBG 组要高, 但是不具有统计学差异。在非成骨诱导环境下, SBG 在 10 d 时 ALP 表达水平比 IBG 高。因此, SBG 显示出比 IBG 更好的 ALP 表达的情况。

3.3 成骨基因表达

I 型胶原(COL1a1)由骨细胞生产的骨基质中的主要有机成分^[9-12]; 骨桥蛋白(OPN)是骨细胞通过它们的 $\alpha\text{V}\beta3$ 整合素锚钉到矿化的骨表面^[9-10,13]; 成骨特异性转录因子(Runx2)是骨生成的“主导基因”, 敲除 Runx2 的老鼠不能成骨(只形成软骨的骨架, 但是缺乏矿化的组织)^[9,14-15]。

实验通过实时定量 PCR(qRT-PCR)的方法, 测定相关成骨基因表达, 同样通过持家基因 GAPDH 对相关基因进行均一化, 图3是诱导培养 5 d 后, HMSCs 在 4 种生物活性玻璃上相关成骨基因表达的情况。HMSCs 分别在成骨诱导液和普通完全培养液的培养条件下, Runx2、

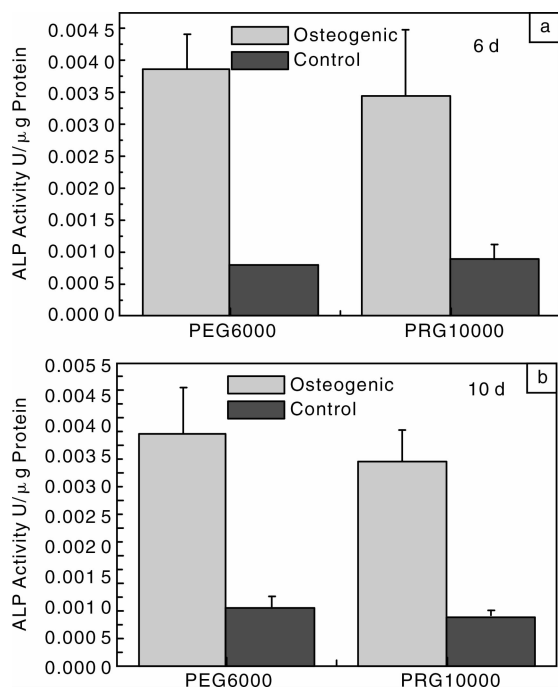


图2 HMSCs在两种生物玻璃微粒诱导培养6 d和10 d后ALP表达的情况

Fig. 2 Alkaline phosphatase (ALP) activity of HMSCs seeded for 6 d and 10 d

OPN和COL1a1这3个与成骨相关的基因的表达量,成骨诱导组要明显高于对照组的。两种生物玻璃的成骨诱导组和成骨对照组,Runx2这个促使积极分裂的成骨前体细胞转向分化的相关基因已经高表达,而且成骨诱导组高于对照组,表明两种生物玻璃在外环境下培养5 d, HMSCs在两种培养条件下,特别是在成骨诱导的条件下,生物玻璃上的细胞已经从G1期走向G0期,退出了细胞周期,从有丝分裂转向细胞分化,并通过激活骨细胞表型基因,促进成骨细胞分化和成熟。其中在成骨诱导环境下,SBG组明显高于IBG组。

从图3可以看出,诱导组的OPN和COL1a1与骨细胞外基质合成相关的基因表达量都发生上调,并且明显可见,诱导组的上调量高于对照组的。其中,在诱导环境下SBG组的基因表达量又明显高于IBG,尤其是OPN表达差异具有显著性统计学差异($P < 0.001$)。从基因的相对表达量可见,与I型胶原合成相关的COL1a1基因作为细胞分化早期的标志物,其相对于其他基因有较高的表达量,标志着I型胶原这种骨组织的主要细胞外基质逐步走向成熟。此外,其大量的合成和分泌还会为组织的矿化、钙结节的形成提供基底,并对成骨细胞表型的分化起到加速的作用。可见,SBG在成骨诱导的条件下,已经相对于其他实验组和对照组,更早的进入了这种时期。

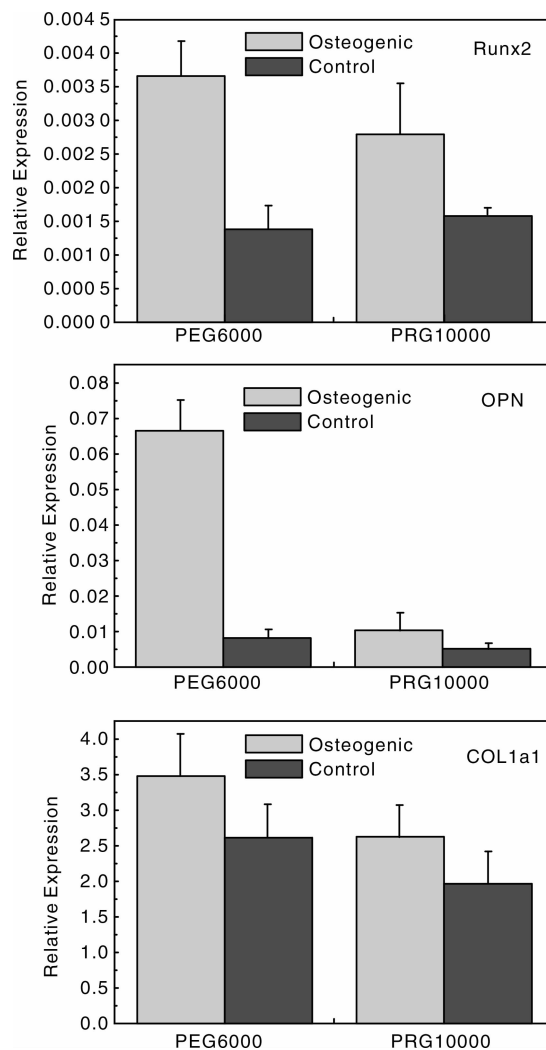


图3 HMSCs诱导培养5 d后,成骨基因的表达

Fig. 3 Gene expression levels of osteogenic markers for cells seeded on SBG as measured at 5 d culture

基于近几年的研究,Hench教授于2009年对生物玻璃的基因激活作用的机理提出了一个假说:从生物玻璃中溶出的离子,激活了细胞的基因朝着再生和自我修复的方向发展。生物玻璃中可溶性含水Si及Ca离子基团,溶出所形成的局部化学微环境,有利于激发内皮祖细胞的成骨细胞进入细胞周期的活性阶段(从G1期进入S期)^[16]。因为Hench教授的理论主要是针对45S5提出的,所以更多的是注重溶出离子而没有将生物玻璃的其他性能考虑在内。Jell等^[17]提出了另外一个更加全面的机制,同时考虑到生物玻璃溶出离子、表面化学以及拓扑结构几方面的影响,更加适合新型生物玻璃(图4)。细胞不断地通过自己的受体检测其周围环境中的细胞因子、趋化因子、机械应力、气体和重要的生理离子等,细胞表面受体(如整合素)与细胞外基质相互作用引起的细胞内信号分子细胞级联,最终通过级联细胞转

录因子(如成骨细胞核心结合因子 Runx2),启动或关闭基因的表达,生物活性玻璃激活的基因(以前报告的是由生物玻璃 45S5 上调或下调基因)DNA 解螺旋,转录成 mRNA 和翻译成蛋白质(图 4),这些蛋白质决定了细胞表型,因此回应了最初的激活作用,也就是增殖、分化、基质形成或细胞死亡的初始刺激的反应。

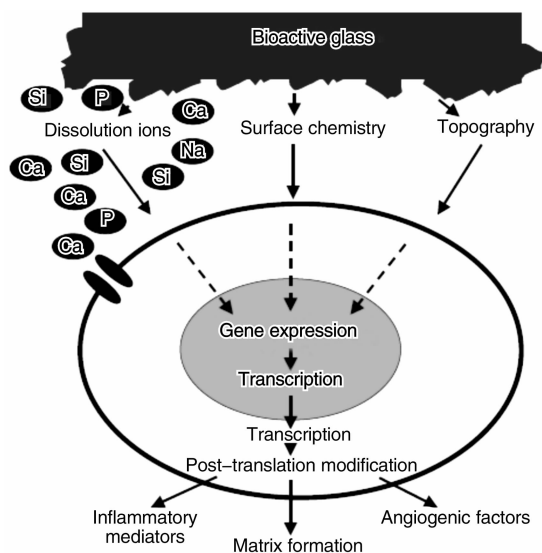


图 4 生物活性玻璃基因表达调控机制示意图

Fig. 4 Gene expression regulation mechanisms by bioactive glasses

4 结 论

生物玻璃可以通过形态来影响成骨基因的表达。具有规则球形的生物玻璃相比具有不规则纳米结构的生物玻璃,更能促进 ALP 的表达及成骨相关基因 COL1a1、OPN 和 Runx2 的表达,为我们将来设计生物玻璃的形态,提供了理论依据。

参考文献 References

- [1] Hench L L, Splinter R J, Allen W C, et al. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1971. 5(6): 117-141.
- [2] Hench L L. The Story of Bioglass[J]. *Journal of Materials Science; Materials in Medicine*, 2006. 17(11): 967-978.
- [3] Hench L L, Polak J M. Third-Generation Biomedical Materials[J]. *Science*, 2002, 295: 1 014-1 017.
- [4] Hench L L, Xynos I, Edgar A, et al. 激活基因的玻璃[J]. *Journal of Inorganic Materials (无机材料学报)*, 2002, 17(5): 807-909.
- [5] Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive Ceramics: the Effect of Surface Reactivity on Bone Formation and Bone Cell Function[J]. *Biomaterials*, 1999, 20: 2 287-2 303.
- [6] Li R, Clark A E, Hench L L. An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing[J]. *J Appl Biomater*, 1991(2): 231-39.
- [7] Lei Bo(雷波). *Fabrication and Properties of the Novel Micro-Nanoscale Bioactive Glasses*(新型微纳米生物活性玻璃的研制及性能研究)[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2009.
- [8] Lüthen F, Lange R, Becker P, et al. The Influence of Surface Roughness of Titanium on β 1- and β 3- Integrin Adhesion and the Organization of Fibronectin in Human Osteoblastic Cells[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2 423-2 440.
- [9] Christodoulou I, Buttery L D K, Saravanapavan P, et al. Dose- and Time-Dependent Effect of Bioactive Gel-Glass Ionic-Dissolution Products on Human Fetal Osteoblast-Specific Gene Expression[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2005, 74(1): 529-537.
- [10] Knabe C, Stiller M, Berger G, et al. The Effect of Bioactive Glass Ceramics on Expression of Bone-Related Genes and Proteins in Vitro[J]. *Clinical Oral Implants Research*, 2005, 16(1): 119-127.
- [11] Phan P V, Grzanna M, Chu J, et al. The Effect of Silica-Containing Calcium-Phosphate Particles on Human Osteoblasts in Vitro[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 67A(3): 1 001-1 008.
- [12] Gao T, Aro H T, Yl nen H, et al. Silica-Based Bioactive Glasses Modulate Expression of Bone Morphogenetic Protein-2 mRNA in Saos-2 Osteoblasts in Vitro[J]. *Biomaterials*, 2001. 22(12): 1 475-1 483.
- [13] Effah Kaufmann E A, Ducheyne P, Shapiro I M. Evaluation of Osteoblast Response to Porous Bioactive Glass (45S5) Substrates by RT-PCR Analysis[J]. *Tissue Engineering*, 2000(6): 19-28.
- [14] Bielby R C, Pryce R S, Hench L L, et al. Enhanced Derivation of Osteogenic Cells from Murine Embryonic Stem Cells after Treatment with Ionic Dissolution Products of 58S Bioactive Sol-Gel Glass[J]. *Tissue Engineering*, 2005, 11(3/4): 479-488.
- [15] Hattar S, Berdal A, Asselin A, et al. Behaviour of Moderately Differentiated Osteoblast-Like Cells Cultured in Contact with Bioactive Glasses[J]. *Eur Cell Mater*, 2002, 4(31): 61-69.
- [16] Hench L. Genetic Design of Bioactive Glass[J]. *Journal of the European Ceramic Society*, 2009, 29(7): 1 257-1 265.
- [17] Jell G, Stevens M. Gene Activation by Bioactive Glasses[J]. *Journal of Materials Science; Materials in Medicine*, 2006, 17(11): 997-1 002.