文章编号:1000-5404(2007)21-2073-03

论著

bFGF-PLA-Ns对体外培养成骨细胞增殖、分化及矿化的影响

张 纲[1],亓连军[2],谭颖徽[1],卢来春[3],裘松波[1],何 飞[1] (第三军医大学新桥医院:[1]口腔科,[3]药剂科,重庆 400037;[2]山东省莱芜市人民医院急诊科,莱芜 271100)

提 要:目的 观察制备的碱性成纤维生长因子聚乳酸纳米微球缓释系统(bFGF-PLA-Ns)对体外培养的兔成骨细胞的增殖、分化和矿化能力的影响。**方法** 体外培养兔成骨细胞并鉴定,将bFGF-PLA-Ns和第4代成骨细胞一起培养,碱性磷酸酶(ALP)试剂盒检测细胞ALP活性,茜素红染色方法观察矿化结节的形成,并与单纯bFGF和空白组的作用进行比较。**结果** bFGF-PLA-Ns具有良好的生物活性,能显著促进兔成骨细胞的分化和矿化,其效应高于单纯施加bFGF和空白组的效应。**结论** 制备的bFGF-PLA-Ns比单纯的bFGF对体外培养的成骨细胞有更为显著的生物学效应,在骨创伤的治疗中有良好的前景。

关键词:bFGF;纳米微球;生物学效益;成骨细胞
中图法分类号:R322.71;R329.28;R961 **文献标识码**:A

Effect of basic fibroblast growth factor-polylactide sustained release nanospheres on proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts *in vitro*

ZHANG Gang[1], QI Lian-jun[2], TAN Ying-hui[1], LU Lai-chun[3], QIU Song-bo[1], HE Fei[1] ([1]Department of Stomatology, [3]Department of Pharmacy, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037;[2]Department of Emergency, Laiwu People's Hospital, Laiwu 271100, China)

Abstract: Objective To study the effects of prepared basic fibroblast growth factor-polylactide sustained release nanospheres (bFGF-PLA-Ns) on proliferation, differentiation and mineralization of the cultured rabbit osteoblasts. **Methods** New Zealand rabbit osteoblasts were cultured and identified. bFGF-PLA-Ns and bFGF were added into the medium of the fourth generation of rabbit osteoblasts. Alkaline phosphatase (ALP) activities were detected by ALP kit. The formation of mineral tubercula was showed by alizarin bordeaux staining. **Results** bFGF-PLA-Ns had biological activity. bFGF-PLA-Ns could significantly enhance the differentiation and mineralization of rabbit osteoblasts, with significantly higher effects than bFGF only and blank group. **Conclusion** The biological effects of prepared bFGF-PLA-Ns were significantly higher on cultured osteoblasts than that of common bFGF only and that of blank group, and bFGF-PLA-Ns have a better prospect in bone traumatic healing.

Key words: bFGF; nanospheres; biological effects; osteoblast

碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种具有广谱作用的细胞因子,bFGF作为一种强有力的促分裂素,在骨折修复早期,一方面使成骨细胞大量增殖分化,促进骨折愈合;另一方面促进成纤维细胞有丝分裂,直接参与纤维骨痂的形成[1]。因此bFGF制剂的研究是目前创伤治疗领域的热点之一。但bFGF等细胞因子在体内存在着半衰期短,容易降解等缺点,无论是全身和局部使用,疗效都不能令人满意。近年高分子纳米微球包裹技术在医药领域得到了广泛运用[2]。我们前期的实验应用复乳-干燥法,以聚乳酸为包裹材料,制备碱性成纤维生长因子聚乳酸纳米微球(bFGF-PLA-Ns),并考察其药物浓度、形态和粒径分布、载药量、包封率以及体外缓释特性。体外试验证实了其确切的缓释效果[3]。本研究在先前实验的基础上,观察bFGF-PLA-Ns对体外培养的兔成骨细胞的生物学作用,从而为其在骨创伤愈合中的进一

基金项目:第三军医大学校管课题(2004D107);教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[2004]527号)
Supported by the Research Project of Third Military Medical University (2004D107) and the Initial Funds for Personnel Returning from Overseas by the Ministry of Education of China (2004-527)

作者简介:张 纲(1971-),男,湖南省邵东县人,博士,主治医师,讲师,主要从事口腔颌面外科创伤和整形方面的研究。电话:(023)68774801,E-mail:xqzhanggang@yahoo.com.cn
通讯作者:谭颖徽,电话:(023)68755632

收稿日期:2007-05-17;**修回日期**:2007-06-24

步应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和设备

bFGF 冻干粉剂(珠海亿胜生物制药有限公司);bFGF-PLA-Ns(自行合成);小牛血清(兰州生物公司);1640 培养基(实验室自配);MTT 试剂(美晶生物制品有限公司);二甲亚砜(DMSO,Sigma 公司);D-Hanks 平衡液(美国 HyClone 公司);ALP 检测试剂盒(Sigma 公司);β-磷酸甘油(武汉博士德生物有限公司);茜素红(Sigma 公司);0.01 mol/L PBS 溶液(pH = 7.2)(实验室自配);CO_2 孵育箱(重庆实验设备厂);数码天平(沈阳龙腾电子称量仪器有限公司);相差倒置显微镜(Olympus)。

1.2 兔成骨细胞的培养和鉴定

参照文献[4],采用二次胶原酶消化培养法,将出生 7 d 内的新西兰仔兔 2 只(第三军医大学新桥医院实验动物中心提供)于无菌操作下完整取出颅盖骨,手术刀片仔细去颅骨表面软组织部分,以 D-Hanks 液吹打、洗涤后,剪成 1 mm^3 左右的骨块。5% 胰蛋白酶消化 15 min 后,D-Hanks 液洗净消化液,将骨片移入培养瓶中分散铺开,加入 1640 培养液,按体积比(10∶1)加入 10% 小牛血清,置于 5% CO_2 培养箱内 37 ℃静置培养。细胞生长为单层后即开始传代,经 0.5% 胰酶消化,利用差数贴壁法去除成纤维细胞及上皮细胞,传代后细胞在相同条件下培养。倒置显微镜下每日观察成骨细胞的生长情况。行 Giemsa 和碱性磷酸酶(ALP)染色鉴别。成骨细胞 Giemsa 染色为阳性,见细胞核为淡红色,细胞质呈浅蓝色。ALP 染色阳性标准:细胞质内出现棕黑色沉淀颗粒。原代细胞培养传代 3 次,约 80% 以上的细胞呈阳性。收集第 4 代细胞进行实验。

1.3 碱性磷酸酶(ALP)测定

取传代 4 次的成骨细胞悬液,按 2×10^7/L 的密度,每孔 200 μl,分别接种于放有盖玻片的 96 孔培养板中,实验分 3 组,每组 32 孔:A 组培养液为没有添加药物的 10% 小牛血清 + 1640 培养基,B 组含 10% 小牛血清 + 含 20 ng/ml bFGF 的 1640 培养基,C 组培养液为 10% 小牛血清 + 含 20 ng/ml bFGF-PLA-Ns 的 1640 培养基。于 1、2、3、4、6、8 d 收集细胞测定。加入 0.2% Triton X-100 50 μl,按试剂盒要求先后加入缓冲液和基质液各 50 μl,显色剂 150 μl,在分光光度计 520 nm 波长处检测吸光度值[$D(520)$],以反映其对细胞分化的影响。

1.4 矿化结节形成的测定

将细胞消化计数,按每孔 1×10^5 个将细胞加入 96 孔板,按照实验 1.3 分组,加入含有不同药物培养基 3 ml。10 d 后加入 β-磷酸甘油,用 95% 乙醇原位固定。0.1% 茜素红染色 30 min,用带网格的涤纶薄膜贴附于培养板底(0.2 mm × 0.2 mm),并以红染,边界清楚,短径大于 100 μm 的标准,40 倍光镜下对每孔作矿化结节计数。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同组 ALP 活性

图 1 表明,在初期阶段,bFGF-PLA-Ns 组吸光度值 $D(520)$ 低于 bFGF 组,随着时间的延长,bFGF 组和 bFGF-PLA-Ns 组 $D(520)$ 逐渐增加。表明 bFGF 可以提高成骨细胞的增殖分化,并且表明 bFGF-PLA-Ns 中 bFGF 有具有良好的活性,没有在微球中失活。从第 5 天开始,$D(520)$ 为 bFGF-PLA-Ns 组 > bFGF 组 > 空白对照组($P < 0.05$)。

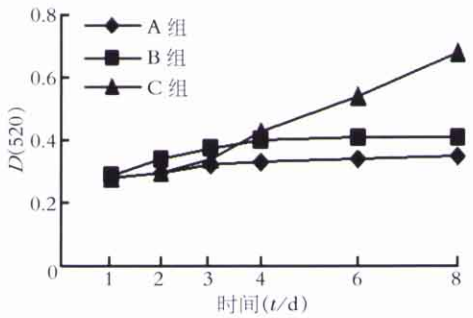


图 1 不同时间点 ALP 活性

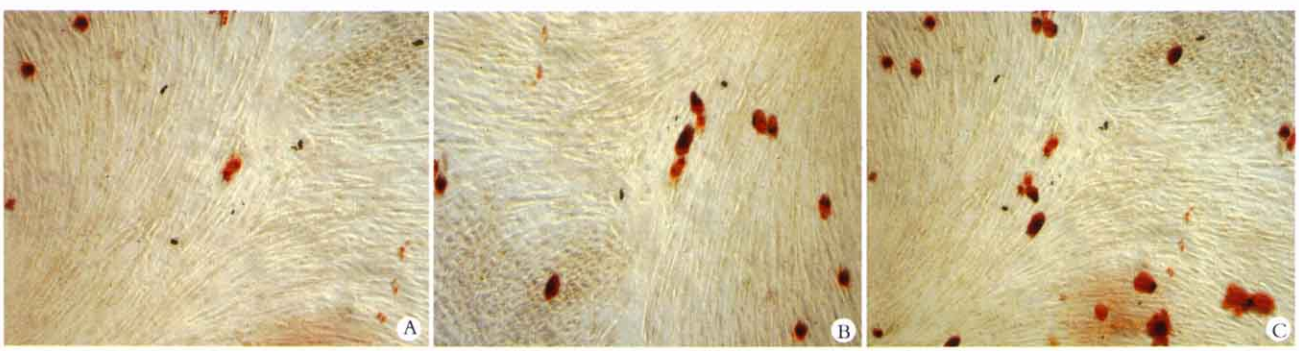
2.2 对成骨细胞矿化功能的影响

表 1 和图 2 结果提示经茜素红染色显示,bFGF-PLA-Ns 和单纯的 bFGF 以及空白对照组比较,能明显促进成骨细胞矿化结节的形成,差异显著($P < 0.05$)。

表 1 bFGF-PLA-Ns 对矿化结节形成的影响

组别	孔数	矿化结节计数
A 组	6	12.11 ± 2.35
B 组	6	14.24 ± 2.56
C 组	6	18.16 ± 3.72[a]

$F = 21.28$; a: $P < 0.05$, 与 A、B 两组比较



A:A 组; B:B 组; C:C 组

图 2 各组培养 10 d 后成骨细胞矿化结节观察 (茜素红 ×40)

3　讨论

bFGF 是多肽类生长因子,对于广泛来源于中胚层和神经外胚层的细胞具有明显的促分裂增殖作用。许多重要的生理过程如创伤愈合、血管生成、胚胎发育等都有 bFGF 参与。此外,它还具有趋化作用和促进细胞迁移运动等作用。外源性 bFGF 不仅可有上述作用,还可以促进内源性 bFGF 和其他生长因子的释放,从而协同促进创伤组织再生及功能恢复。在骨创伤的愈合中可促进骨原细胞分化为成骨细胞,诱导成骨细胞分裂、增殖并促使其合成骨基质、钙结合蛋白及含有羟基磷灰石颗粒的基质小泡,加快骨痂钙化[5]。但是,由于 bFGF 易被酶水解,在体内的半衰期仅有 3 ~ 10 min,过去采用的局部注射或者采用明胶水凝胶、甲基纤维素或者胶原复合膜等方法缓释。其中局部注射操作麻烦,一次药效时间短。采用的上述缓释方法亦存在缓释时间短,药效不够等问题,因而其局部或全身应用的生物效应差。而纳米给药系统具有独特的药物保护作用和控制释放特性,本研究制备的 bFGF-PLA-Ns 可持续 14 d 释放 bFGF,因而疗效得到充分发挥[2,3,5]。因此,本研究制备 bFGF 纳米微球有可能在创伤初期修复阶段,持续在组织局部释放 bFGF,并维持在有效生理浓度以上,以显著促进创伤组织修复。

本研究在兔成骨细胞体外培养和鉴定后,设立空白对照组、单纯的 bFGF 组和 bFGF-PLA-Ns 组进行对照研究,前期采用 MTT 法[6]检测体外培养的兔成骨细胞的增殖情况显示:培养初期 bFGF 组高于其余两组,在培养的中后期,bFGF-PLA-Ns 组的优势明显。可能的原因是:在培养初期,bFGF 组中游离的 bFGF 数量高于微球组通过缓释产生的 bFGF 数量。但到中后期,bFGF 组大部分 bFGF 失去活性,而游离微球组持续释放具有生物活性的 bFGF,因而促分裂增殖作用得到了充分发挥[2,7,8]。

ALP 活性是很多细胞如成骨细胞、牙周膜细胞、牙髓细胞等功能及分化程度的指标。在细胞中表达的多少,反映出细胞的分化程度和功能状态。ALP 是骨折愈合不可缺少的酶,骨痂中的成骨细胞、成纤维细胞、软骨细胞的细胞膜、线粒体和高尔基体、基质小泡等处含量较高,具有水解各种磷酸酯键而释放无机磷的作用,使局部无机磷浓度增高,有利于成骨过程。本研究中 ALP 活性检测证实 bFGF-PLA-Ns 早期可以促进 ALP 表达[9]。

矿化结节的形成代表了成骨细胞增殖成熟并行使成骨的功能。骨基质的矿化途径为,成骨细胞首先合成并分泌骨的有机质,此为骨矿化提供结构基础。机体吸收的钙离子和焦磷酸分解的磷离子合成羟基磷灰石,转运至骨胶原间隙区域内按一定的定位极性排列、沉积,完成骨机质的矿化。本研究茜素红染色显示,bFGF-PLA-Ns 和单纯的 bFGF 以及空白对照组比较,能明显促进成骨细胞矿化结节的形成,有统计学显著性差异($P<0.05$)。因而可以证明 bFGF-PLA-Ns 能促进成骨细胞增殖和成熟[10]。

本研究表明 bFGF-PLA-Ns 有优越的生物学活性,能促进成骨细胞的增殖和矿化,有一定的临床治疗潜能,为加快骨创伤的愈合提供了新的思路。

参考文献:

[1] Chen W J, Jingushi S, Aoyama I, *et al*. Effects of FGF-2 on metaphyseal fracture repair in rabbit tibiae[J]. J Bone Miner Metab, 2004, 22(4): 303 - 309.

[2] Jeon O, Kang S W, Lim H W, *et al*. Long-term and zero-order release of basic fibroblast growth factor from heparin-conjugated poly(L-lactide-co-glycolide) nanospheres and fibrin gel[J]. Biomaterials, 2006, 27(8): 1598 - 1607.

[3] 张　纲, 谭颖徽, 卢来春, 等. bFGF-PLA 缓释纳米微球的制备及体外释药的研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(11): 1002 - 1004.

[4] 王洪复. 骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 54 - 155.

[5] Dupree M A, Pollack S R, Levine E M, *et al*. Fibroblast growth factor-2 induced proliferation in osteoblasts and bone marrow stromal cells: a whole cell model[J]. Biophys J, 2006, 91(8): 3097 - 3112.

[6] 张　纲, 谭颖徽, 卢来春, 等. bFGF 聚乳酸纳米微球对兔成骨细胞增殖的影响[J]. 口腔医学研究, 2007, 23(1): 39 - 41.

[7] Lam X M, Duenas E T, Eaugherty A L, *et al*. Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-Ⅰ treatment of diabetes[J]. J Control Release, 2000, 67(2 - 3): 281 - 292.

[8] Wen J, Kim G J, Leong K W. Poly(D, L-lactide-co-ethyl ethylene phosphate)s as new drug carriers[J]. J Control Release, 2003, 92(1 - 2): 39 - 48.

[9] Tanaka E, Ishino Y, Sasaki A, *et al*. Fibroblast growth factor-2 augments recombinant human bone morphogenetic protein-2-induced osteoinductive activity[J]. Ann Biomed Eng, 2006, 34(5): 717 - 725.

[10] Ling L, Murali S, Dombrowski C, *et al*. Sulfated glycosaminoglycans mediate the effects of FGF2 on the osteogenic potential of rat calvarial osteoprogenitor cells[J]. J Cell Physiol, 2006, 209(3): 811 - 825.

(编辑　汪勤俭)