DOI: 10.16016/j.1000-5404.201412085

论著

Lysine-Cyclic RGD肽对骨髓间充质干细胞黏附、增殖和分化的影响

罗科宇,梅铁牛,邓墨渊,李志强,侯天勇,罗 飞,许建中 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军矫形外科中心,组织工程国家地方联合工程实验室,重庆市再生重建医学工程技术研究中心,重庆市组织工程实验室)

[摘要] **目的** 研究物理电荷与生物配基两种因素相结合的新型表面修饰剂Lysine-Cyclic RGD(LcRGD)肽对骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)的黏附、增殖及分化的影响。**方法** 以光学接触角仪衡量LcRGD肽修饰表面的亲水性;以离心黏附实验、震荡黏附实验评价LcRGD肽对MSCs的黏附性能;以CCK-8实验评价LcRGD表面改性DBM上MSCs的增殖活力;以Western blot法检测LcRGD表面改性脱钙骨基质(decalcified bone matrix, DBM)上MSCs的Runx2和OCN蛋白的表达。**结果** LcRGD肽修饰表面接触角为(29.33±4.06)°,远低于普通cRGD肽修饰表面的接触角(63.72±8.65)°,提示LcRGD肽具有更好的亲水性($P<0.01$);离心黏附实验和震荡黏附实验显示相对于普通cRGD肽,LcRGD肽从细胞黏附早期开始便具有更好的细胞黏附性能;CCK-8实验提示MSCs在LcRGD修饰的DBM支架材料上的增殖活力高于普通cRGD肽修饰的DBM支架材料($P<0.05$);Western blot结果提示相对于普通cRGD肽修饰的DBM,MSCs在LcRGD修饰的DBM上表达更高的成骨标志蛋白水平,提示LcRGD肽具有更好的骨诱导性。**结论** 相对于普通的cRGD肽,物理电荷与生物配基相结合的LcRGD肽具有更好的细胞黏附、促增殖和骨诱导性能。

[关键词] 组织工程;支架材料;细胞黏附;生物材料;表面修饰
[中图法分类号] R318.08;R329.2 [文献标志码] A

Effect of bifunctional Lysine-Cyclic RGD peptide on adhesion, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells

Luo Keyu, Mei Tieniu, Deng Moyuan, Li Zhiqiang, Hou Tianyong, Luo Fei, Xu Jianzhong (Department of Orthopedics, National and Regional United Engineering Laboratory of Tissue Engineering, Chongqing Research Center of Regeneration and Reconstruction Medical Engineering Technology, Chongqing Laboratory of Tissue Engineering, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of Lysine-Cyclic RGD (LcRGD) peptide, which is new surface modifier based on biological ligand and physical positive charge, on the adhesion, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** The hydrophilicity of LcRGD peptide-modified cover glass was measured *via* contact angle that was detected with an optical tensiometer. The adhesion ability of MSCs to LcRGD peptide was measured by centrifugal cell adhesion assay and vortex cell adhesion assay. The proliferation and differentiation ability of the MSCs was detected by CCK-8 assay and Western blotting. **Results** LcRGD peptide-modified cover glass possessed contact angle (29.33±4.06)° lower than (63.72±8.65)° of cRGD peptide-modified cover glass, indicating better hydrophilicity ($P<0.01$). The results of centrifugal cell adhesion assay and vortex cell adhesion assay confirmed the LcRGD peptide had better cell adhesion ($P<0.01$) than cRGD peptide from the initial stage of cell adhesion. The results of CCK-8 assay and Western blotting showed that the MSCs seeded on LcRGD peptide-modified

[基金项目] 国家自然科学基金(81472059,31100694)
[通信作者] 罗 飞,E-mail:luofly1009@hotmail.com
许建中,E-mail:xjzslw@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150309.0840.014.html(2015-03-09)

decalcified bone matrix (DBM) showed higher proliferation activity as compared with cRGD peptide-modified DBM ($P < 0.05$), and Runx2 and OCN protein levels were significantly increased. **Conclusion** LcRGD peptide holds satisfactory cell adhesion, biocompatibility and osteoinduction, suggesting it is a preferable modifier for tissue engineered bone scaffold.

[**Key words**] tissue engineering; scaffold; cell adhesion; biomaterial; surface modification

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81472059, 31100694). Corresponding author: Luo Fei, E-mail: luofly1009@hotmail.com; Xu Jianzhong, E-mail: xjzslw@163.com

支架材料作为骨组织工程移植物中种子细胞发挥生物学效应的场所,其细胞粘附性能、生物相容性、骨诱导性能等在很大程度上决定骨修复效果。对支架材料进行仿生学修饰是改善支架材料以上性能、模拟天然细胞外环境的重要方法。纤连蛋白(fibronectin)、层粘连蛋白(laminin)、骨桥素(osteopontin)等是重要的细胞外基质成分,但若直接用于支架材料的修饰,则牵涉到免疫原性和蛋白降解等难题。RGD 序列(Arg-Gly-Asp)是以上蛋白共同拥有的高度保守序列[1],其通过与细胞整合素的特异性结合介导细胞的特异性黏附、增殖及分化等生物学行为[2-3]。人工合成的单纯 RGD 肽虽然被证实具有较好的促细胞增殖和成骨诱导作用[4-6],但由于相关协同结构域的丢失,其对整合素的亲和力、对整个细胞的黏附性远低于其蛋白本体[7-8]。

多聚赖氨酸(Poly-L-Lyscine, PLL)作为一种成熟、有效的促粘表面修饰剂,其侧链氨基带有较强的正电荷可与细胞表面蛋白的负电荷物理相吸。本研究在环五肽 c(RGDfK)中赖氨酸 K 侧链氨基连接 K20 多聚赖氨酸,构建新型 Lysine-Cyclic RGD 双功能多肽(LcRGD peptide),旨在保留 RGD 肽促增殖和成骨诱导活性的同时,协同 RGD-整合素介导的特异性黏附和多聚赖氨酸介导的非特异性黏附,以物理电荷和生物配基相结合的方式提高材料的整体性能。本研究以普通 Cyclic RGD 肽作为对照组,通过亲水性检测、黏附实验、CCK-8 细胞增殖检测及 Western blot 评估 LcRGD 肽对 MSC 黏附、增殖和成骨分化的影响,以期为其进一步应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要试剂

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs,由第三军医大学国家地方联合组织工程实验室提供),Lysine-cyclic RGD 肽[LcRGD 肽,c(RGDfK)-20K,分子质量为 3 167]、cyclic RGD 肽[cRGD 肽,c(RGDfK),分子质量为 603]购自上海强耀生物科技有限公司,脱钙骨基质(decalcified bone matrix, DBM,北京大清生物技术有限公司),DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(HyClone 公司),Runx2 多克隆抗体、OCN 多克隆抗体(Abcam 公司),β-actin 单克隆抗体(Santa Cruz 公司),HRP 标记的二抗(Cell Signaling 公司),ECL 显色试剂盒(Bio-Rad 公司),25 mm 圆形盖玻片(NEST 公司),CCK-8 试剂、Hoechst33342(Sigma 公司)。

1.2 实验仪器

低速离心机(Thermo 公司,德国),荧光显微镜(OLYMPUS 公司,日本),光学接触角仪(Theta Lite, Attension,芬兰),酶标仪(Varioskan Flash,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 LcRGD 肽修饰表面的亲水性 将 25 mm 规格的盖玻片分别置于 100 μmol/L LcRGD 肽溶液、100 μmol/L cRGD 肽溶液和超纯水中于 4 ℃浸泡 24 h,以无菌超纯水漂洗后于洁净空气中晾干。向光学接触角仪加液仓中注入超纯水,分别向 LcRGD 肽修饰的盖玻片、cRGD 修饰的盖玻片和未修饰的盖玻片上滴加5 μL 超纯水,待液滴稳定 30 s 之后以光学接触角仪分别测量其接触角。

1.3.2 MSCs 在 LcRGD 肽修饰表面的黏附性能 以离心黏附实验测量 LcRGD 肽修饰表面对间充质干细胞的黏附性能。将传至第 3 代的间充质干细胞以终浓度为 5 μg/mL 的 Hoechst33342 于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中避光染色 1 h 后以 PBS 洗去染液,常规消化离心后制成 5×10^5/mL 的单细胞悬液,以每孔 3 mL 的体积移入 6 孔板中充分混匀后,立即将 LcRGD 肽修饰的盖玻片、cRGD 肽修饰的盖玻片和未修饰的盖玻片分别置入其中,于孵箱中孵育,待细胞自然沉降贴壁 5 min 后轻柔取出,置于荧光显微镜下以随机视野快速摄取初始荧光图片,随后立即将盖玻片翻转置于离心装置中,以 $50 \times g$ 离心 5 min,离心完毕后再次于荧光显微镜下摄取荧光图片。将各组荧光图像以 Image Pro Plus 6.0 软件计数细胞个数,并按照视野实际面积将细胞密度换算为标准单位。

1.3.3 制备 LcRGD/DBM、cRGD/DBM 复合物 将低温冻存的无菌 DBM 在常温下以 PBS 缓冲液复水

2 h,复水饱和后以特制的离心管以200×*g*离心5 min以甩干多余水分后,分组浸没于100 μmol/L的LcRGD肽溶液或100 μmol/L的cRGD肽溶液中,静置于4 ℃冰箱修饰24 h。随后无菌操作下将各组DBM捞出沥干,以PBS缓冲液漂洗3次以洗去未贴附的LcRGD肽或cRGD肽,置入特制离心管以200×*g*离心5 min以甩干多余水分后待用。

1.3.4 LcRGD/DBM对MSCs的黏附性能 将LcRGD/DBM、cRGD/DBM和空白DBM各10块分别置于48孔板中,将传至第3代的间充质干细胞常规消化离心,调整成2×10^6/mL的细胞悬液,混匀后分别均匀滴加50 μL于各组材料上,置于孵箱中待其贴壁2 h。随后每组各取出5块材料,分别置入预热到37 ℃、盛有10 mL含10%胎牛血清的DMEM/F12全培养基的50 mL规格离心管中,将各离心管分别置于涡旋振荡器中心垂直放置,震荡30 s后取出,与未经涡旋震荡的材料一同分组移入48孔板中,沿孔壁各加入500 μL含10%胎牛血清的DMEM/F12全培养基,置入孵箱中孵育4 h后,向各孔加入50 μL CCK-8试剂,混匀后重新置入孵箱孵育2 h。孵育完成后将各孔液体混匀,每孔取3份100 μL液体移入96孔板,以酶标仪在450 nm波长处测定光密度值[*D*(450)]。

1.3.5 LcRGD/DBM对MSCs增殖活力的影响 将LcRGD/DBM、cRGD/DBM和空白DBM各15块分别置于48孔板中,将传至第3代的间充质干细胞消化离心,制成1×10^6/mL的细胞悬液,混匀后分别均匀滴加50 μL于各组DBM上,置于37 ℃、5% CO_2的孵箱中待其贴壁2 h后沿孔壁轻柔加入500 μL含10%胎牛血清的DMEM/F12全培养基,置于37 ℃、5% CO_2的孵箱中孵育。实验的同时制作本次实验细胞的CCK-8标准曲线。于6 h,1、3、5、7、9 d时,每组各取3块样品移入新的48孔板,各加入500 μL含10%胎牛血清的DMEM/F12全培养基和50 μL CCK-8试剂,混匀后置入孵箱培养2 h。孵育完成后重新混匀各孔液体,每孔取3份100 μL液体移入96孔板,以酶标仪在450 nm波长处测定光密度值[*D*(450)],并按照标准曲线转换为细胞绝对值。

1.3.6 LcRGD/DBM对MSCs成骨分化的影响 采用双面接种法将第3代间充质干细胞种于LcRGD/DBM、cRGD/DBM和空白DBM支架材料上,以成骨诱导培养基(含10%胎牛血清、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、100 nmol/L地塞米松、50 μmol/L抗坏血酸)孵育14 d,每3天换液。将各组样品以细胞裂解液于冰上反复混匀裂解30 min,将裂解液以12 000×*g*、4 ℃离心5 min后取上清以BCA法测定蛋白浓度。将得到浓度的蛋白稀释为1.5 μg/μL,加入等体积的SDS上样缓冲液,煮沸10 min后上样,SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳。转膜后,于摇床上以5%脱脂奶粉TBST溶液室温封闭60 min后,加入1∶1 000稀释的一抗,于4 ℃摇床上孵育过夜,TBST溶液漂洗3次,1∶10 000稀释HRP标记的二抗于室温下摇动孵育1 h,再次以TBST溶液漂洗3次后以ECL显色,用Bio-Rad凝胶成像系统拍照。

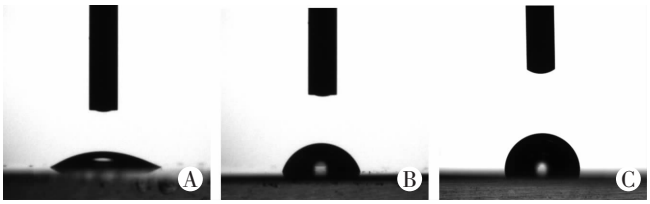
1.4 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件,数据以$\bar{x} \pm s$表示,对数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 表面接触角

LcRGD肽修饰的盖玻片表面接触角为(29.33 ± 4.06)°,而普通RGD肽修饰盖玻片表面与超纯水浸泡盖玻片表面的接触角分别为(63.72 ± 8.65)°和(88.67 ± 7.50)°,各组之间差异均具有统计学意义(P<0.01,图1)。



A:LcRGD肽修饰盖玻片;B:普通cRGD肽修饰盖玻片;C:超纯水浸泡的盖玻片

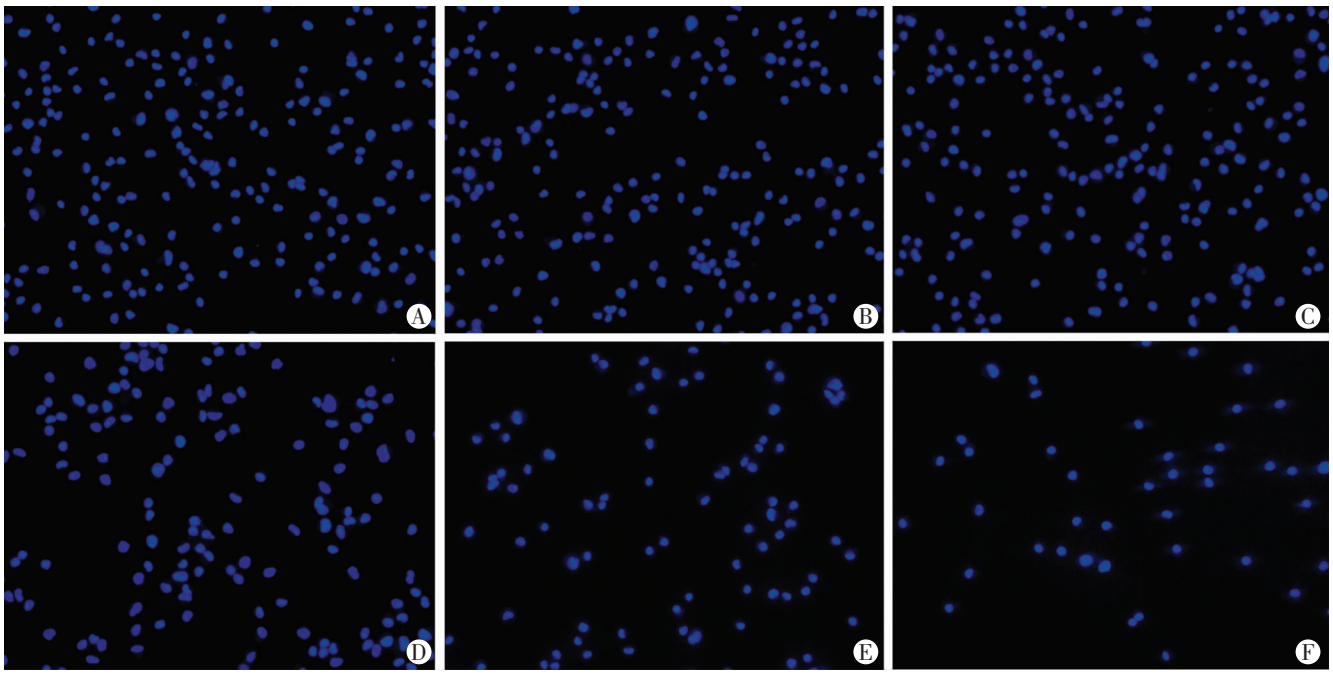
图1 不同材料修饰盖玻片的表面接触角

2.2 LcRGD肽修饰表面对MSCs的黏附性能

细胞自然沉降贴壁5 min,离心之前各组盖玻片(图2A~C)上细胞的密度为(5.91 ± 0.76)×10^4/cm^2,经过离心之后,LcRGD肽组(图2D)为(4.92 ± 0.63)×10^4/cm^2,cRGD肽组(图2E)和未修饰组(图2F)分别为(2.08 ± 0.41)×10^4/cm^2、(1.64 ± 0.38)×10^4/cm^2;LcRGD肽组离心后的细胞密度相较于cRGD组和未修饰组差异分别具有统计学意义(P<0.01)。

2.3 震荡实验检测LcRGD/DBM对MSCs的黏附性能

未经震荡的LcRGD/DBM组与CCK-8试剂反应之后,*D*(450)值为1.14 ± 0.08,cRGD/DBM组为1.09 ± 0.08,DBM组为1.05 ± 0.10,差异无统计学意义(P>0.05)。经过震荡处理之后,LcRGD/DBM组与CCK-8试剂反应之后,其*D*(450)值为0.84 ± 0.06,相对于cRGD/DBM组(0.66 ± 0.07)、DBM组(0.57 ± 0.08)差异均有统计学意义(P<0.05,P<0.01),cRGD/DBM组和DBM组之间差异无显著性。

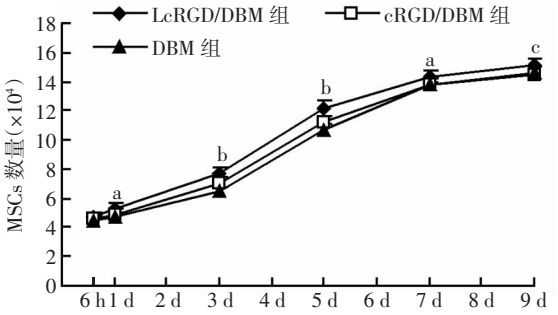


A与D、B与E、C与F分别代表离心前后LcRGD修饰的盖玻片、cRGD修饰的盖玻片、未经修饰的盖玻片上MSCs的密度

图2 倒置荧光显微镜下观察各组材料的细胞黏附性能 (×100)

2.4 MSCs在LcRGD/DBM材料上的增殖活力

CCK-8细胞增殖实验结果显示,6 h时MSCs在各组材料上的数量差异无统计学意义($P>0.05$),从24 h开始,LcRGD/DBM组的MSCs数量多于cRGD/DBM组或DBM组($P<0.05$,图3)。

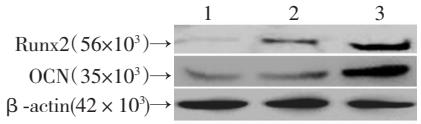


a:$P<0.05$,与DBM组比较;b:$P<0.05$,与cRGD/DBM和DBM组分别比较;c:$P<0.05$,与cRGD/DBM组比较

图3 CCK-8细胞增殖实验检测MSCs在各组材料上的增殖活力

2.5 MSCs在LcRGD/DBM材料上的成骨分化能力

Western blot实验结果显示,相对于cRGD/DBM和DBM组,在LcRGD/DBM组上经成骨诱导7 d的MSCs表达更高的Runx2和OCN水平,提示LcRGD肽具有更佳的骨诱导性能(图4)。



1:DBM组;2:cRGD/DBM组;C: LcRGD/DBM组

图4 Western blot检测各组细胞成骨标志蛋白表达

3 讨论

对支架材料进行修饰是提高其生物学性能的重要手段,常见的修饰物包括细胞外基质蛋白或其片段、细胞因子、化学基团或多肽等[9-12]。天然蛋白类修饰物涉及免疫原性和降解等难题,单纯的化学基团不易具备生物学性能,而多肽类修饰物由于不具有免疫原性,性质稳定,具有较好的组织相容性和生物学性能并易于生产,是一类较有前景的修饰物[13]。

RGD(Arg-Gly-Asp)序列是细胞外基质(extracellular matrix,ECM)多种蛋白的核心序列,可与细胞膜上的整合素形成异亲型结合[14],保持整合素的激活状态以维持其下游包括增殖和成骨信号在内的一系列信号通路[15],并为细胞提供特异性黏附的锚定点。人工合成的RGD肽虽被证实具有良好的生物相容性和骨诱导性,但其对整合素的亲和力、对细胞的黏附性能均远不如其蛋白本体。而赖氨酸序列在pH=7.4的环境中可提供正电荷,并能极大地增强材料亲水性,为细胞提供快速、有效的非特异性黏附力。本课

题组结合上述两种物质的优点,兼顾粘附性能和仿生学性能,设计制造了 Lysine-Cyclic RGD 肽。

接触角测试证实,LcRGD 肽修饰的表面相对于普通 cRGD 肽修饰表面以及未修饰的表面具有较高的亲水性($P<0.01$),而亲水性的材料较为有利于细胞的黏附和生长[16]。通过离心黏附实验,将自然沉降贴壁 5 min 的间充质干细胞以 50×g 离心后,以荧光显微镜拍照计数,结果显示 LcRGD 肽修饰的表面剩余 MSCs 数量多于普通 cRGD 肽修饰表面以及未修饰的表面($P<0.01$),提示相对于普通 cRGD 肽 LcRGD 肽在细胞黏附初期便具有更好的黏附性能。震荡黏附实验结果显示,MSCs 在各组材料上贴壁 2 h 后经过涡旋震荡,LcRGD 修饰的 DBM 上留存的 MSCs 多于普通 cRGD 肽修饰的 DBM($P<0.05$)和空白 DBM($P<0.01$),提示相比于普通 cRGD 肽 LcRGD 肽为支架材料提供了更好的细胞中晚期黏附性能,在此时间点上,MSCs 在 LcRGD/DBM 上便可以认为已经较稳定黏附。

CCK-8 细胞增殖实验显示,相对于普通 cRGD 肽修饰的 DBM,MSCs 在 LcRGD 修饰的 DBM 上有着更佳的生长活力($P<0.05$);Western blot 显示 MSCs 种植于 LcRGD 修饰的 DBM 材料上经过成骨诱导 14 d,相对于普通 cRGD 肽修饰的 DBM,其 Runx2 和 OCN 蛋白有更高的表达水平,提示 LcRGD 肽具有更好的骨诱导性。我们推测可能是 LcRGD 肽复合了赖氨酸基团,使得细胞膜上带负电荷的整合素蛋白的胞外结构域更容易伸展成待发状态,并靠近和结合于 RGD 序列,保持整合素激活状态以维持其下游包括增殖和分化在内的一系列信号转导。

本实验初步证明,物理电荷途径与生物信号途径相结合的 Lysine-Cyclic RGD 肽兼顾细胞黏附与仿生学性能,具有良好的生物相容性并对材料表面有良好的改性作用,可以较好地提高支架材料的粘附性能和骨诱导性能,作为组织工程支架材料的修饰剂具有很好的应用前景。

参考文献:

[1] Colombo M, Bianchi A. Click chemistry for the synthesis of RGD-containing integrin ligands[J]. Molecules, 2010, 15(1): 178-197.

[2] Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins[J]. Cell Tissue Res, 2010, 339(1): 269-280.

[3] Hu P, Luo B H. Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(2): 306-312.

[4] Shin Y M, Jo S Y, Park J S, *et al*. Synergistic effect of dual-functionalized fibrous scaffold with BCP and RGD containing peptide for improved osteogenic differentiation[J]. Macromol Biosci, 2014, 14(8): 1190-1198.

[5] Jager M, Boge C, Janissen R, *et al*. Osteoblastic potency of bone marrow cells cultivated on functionalized biometals with cyclic RGD-peptide[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(10): 2905-2914.

[6] Ardjomandi N, Klein C, Kohler K, *et al*. Indirect coating of RGD peptides using a poly-L-lysine spacer enhances jaw periosteal cell adhesion, proliferation, and differentiation into osteogenic tissue[J]. J Biomed Mater Res A, 2012, 100(8): 2034-2044.

[7] Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, *et al*. Fibronectin-integrin interactions[J]. Front Biosci, 1997, 2: d126-d146.

[8] Akiyama S K, Yamada K M. Synthetic peptides competitively inhibit both direct binding to fibroblasts and functional biological assays for the purified cell-binding domain of fibronectin[J]. J Biol Chem, 1985, 260(19): 10402-10405.

[9] 向强, 张瑗, 崔翔, 等. 一种具有双嗜性功能融合蛋白 FN/CDH 的制备及其促黏附、成骨生物活性鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(23): 2536-2541.

[10] Ratner B D, Bryant S J. Biomaterials: where we have been and where we are going[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2004, 6: 41-75.

[11] 李志强, 侯天勇, 罗飞, 等. 自组装肽复合脱钙骨基质作为骨髓富集支架材料的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(5): 441-444.

[12] 蒋科, 熊雁, 余江, 等. 负载转化生长因子 β3 微球的壳聚糖三维支架的制备[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(10): 988-991.

[13] Lee J Y, Choi Y S, Lee S J, *et al*. Bioactive peptide-modified biomaterials for bone regeneration[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(25): 2663-2676.

[14] Acharya A P, Dolgova N V, Moore N M, *et al*. The modulation of dendritic cell integrin binding and activation by RGD-peptide density gradient substrates[J]. Biomaterials, 2010, 31(29): 7444-7454.

[15] Harburger D S, Calderwood D A. Integrin signalling at a glance[J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 2): 159-163.

[16] Kuo S M, Tsai S W, Huang L H, *et al*. Plasma-modified nylon meshes as supports for cell culturing[J]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 1997, 25(6): 551-562.

(**收稿**:2014-12-08;**修回**:2014-12-22)

(编辑 龙 亮)