doi:10.11659/jjssx.08E020102

·基础研究·

不同浓度多聚赖氨酸溶液对同种异体骨进行表面改性的实验研究

笪 虎[1],张建中[2],宋建宽[1],徐长明[1],熊 卓[3] (1.涟水县人民医院骨科,江苏 涟水 223400;2.淮安市急救中心,江苏 淮安 223001;3.清华大学机械工程系,北京 100084)

[摘 要] **目的** 探讨多聚赖氨酸溶液对兔同种异体骨进行表面改性使其具有良好的细胞亲和力与最低细胞毒性的最佳浓度。**方法** 使用浓度为100 mg/mL、30 mg/mL、1 mg/mL、0.1 mg/mL、0.025 mg/mL和0.01 mg/mL的多聚赖氨酸溶液,采取冻干法,分别对兔同种异体骨的微孔进行表面改性。根据多聚赖氨酸浓度,将兔同种异体骨分为100 mg/mL组、30 mg/mL组、1 mg/mL组、0.1 mg/mL组、0.025 mg/mL组和0.01 mg/mL组,同时,将未行表面改性的同种异体骨设为空白对照组。将兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)分别种植在各组同种异体骨内,并向成骨方向进行诱导和增殖。采用噻唑蓝(MTT)比色试验检测BMSCs在各组同种异体骨微孔表面的黏附、增殖情况,同时检测各组经诱导培养后的细胞表达碱性磷酸酶(ALP)的活性。**结果** 在经不同浓度多聚赖氨酸溶液表面改性的同种异体骨中,空白对照组和0.01 mg/mL组BMSCs增殖及其表达ALP的活性明显小于其他各组($P<0.05$),而其他各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 从经济、有效方面考虑,多聚赖氨酸溶液对同种异体骨进行表面改性的最佳浓度为0.025 mg/mL,该浓度可使同种异体骨具有良好的细胞亲和力与最低的细胞毒性。

[关键词] 多聚赖氨酸;浓度;同种异体骨;表面改性;细胞亲和力;细胞毒性

[中图分类号] R318.08 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-08-15

Effect of different concentrations of polylysine on surface modification of allograft bone

DA Hu[1],ZHANG Jian-zhong[2],SONG Jian-kuan[1],XU Chang-ming[1],XIONG Zhuo[3] (1.Department of Orthopedics,Lianshui County People's Hospital,Lianshui Jiangsu 223400,China;2.Huaian City Emergency Center,Huaian Jiangsu 223001,China;3.Department of Mechanical Engineering,Tsinghua University,Beijing 100084,China)

Abstract: Objective To investigate the best concentration of polylysine solution for surface modification of rabbit allograft bone with good cell affinity and minimum cytotoxicity. **Methods** The polylysine solution with concentrations of 100 mg/mL,30 mg/mL,1 mg/mL,

[基金项目] 国家自然科学基金(31070860)

[通信作者] 熊 卓,E-mail:xiongzhuo9@mails.thu.edu.cn

[19] Li XA,Ho YS,Chen L,et al. The protective effects of icariin against the homocysteine-induced neurotoxicity in the primary embryonic cultures of rat cortical neurons[J]. Molecules,2016,21(11):1557. doi:10.3390/molecules21111557.

[20] Zhang X,Sun H,Su Q,et al. Antidepressant-like activity of icariin mediated by group I mGluRs in prenatally stressed offspring[J]. Brain Dev,2017,39(7):593-600. doi:10.1016/j.braindev.2017.03.021.

[21] Chen ZW,Liu A,Liu Q,et al. MEF2D mediates the neuroprotective effect of methylene blue against glutamate-induced oxidative damage in ht22 hippocampal cells[J]. Mol Neurobiol,2017,54(3):2209-2222. doi:10.1007/s12035-016-9818-1.

[22] Akanda MR,Kim MJ,Kim IS,et al. Neuroprotective effects of sigesbeckia pubescens extract on glutamate-induced oxidative stress in HT22 cells via downregulation of MAPK/caspase-3 pathways[J]. Cell Mol Neurobiol,2018,38(2):497-505. doi:10.1007/s10571-017-0496-y.

[23] Spinelli JB,Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism[J]. Nat Cell Biol,2018,20(7):745-754. doi:10.1038/s41556-018-0124-1.

[24] 李 响,吴振起,马雪涛,等.注射用血栓通对大鼠血管内皮细胞凋亡机制的影响[J].中华中医药杂志,2010,25(7):1137-1139.

[25] 龚其海,杨丹莉,石京山,等.淫羊藿苷的神经药理作用及分子机制研究进展[J].中国新药与临床杂志,2011,30(7):481-486.

[26] 彭智远,刘旺华,曹 雯.脑缺血再灌注损伤细胞凋亡机制的研究进展[J].中华中医药学刊,2017,35(8):1957-1961. doi:10.13193/j.issn.1673-7717.2017.08.008.

[27] 方向楠,秦彦文,岳卫东.内质网应激与缺血性脑血管病的研究进展[J].中华老年心脑血管病杂志,2016,18(4):441-443. doi:10.3969/j.issn.1009-0126.2016.04.030.

[28] McCullough KD,Martindale JL,Klotz LO,et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state[J]. Mol Cell Biol,2001,21(4):1249-1259. doi:10.1128/mcb.21.4.1249-1259.2001.

[29] Puthalakath H,O'Reilly LA,Gunn P,et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim[J]. Cell,2007,129(7):1337-1349. doi:10.1016/j.cell.2007.04.027.

[30] Wasiak S,Zunino R,McBride HM. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death[J]. J Cell Biol,2007,177(3):439-450. doi:10.1083/jcb.200610042.

(编辑:贺绍梅)

0.1 mg/mL,0.025 mg/mL and 0.01 mg/mL were used to performed the surface modification of the micropore in rabbit allograft bone by freeze-drying method respectively. According to the concentration of polylysine solution,rabbit allograft bone were divided into the 100 mg/mL group, the 30 mg/mL group,the 1 mg/mL group,the 0.1 mg/mL group,the 0.025 mg/mL group and the 0.01 mg/mL group. In addition,the allograft bone without surface modification was set as the blank control groop. Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were implanted on the allograft bone of each group,and were induced and proliferated in the osteogenic direction. The adhesion and proliferation of BMSCs on the surface of the allograft bone micropore were investigated by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric test. And the activity of alkaline phosphatase (ALP) expressed by the cells in all groups after induction and culture was detected. **Results** In the allograft bone which was surface-modified by polylysine solution with different concentrations,the proliferation and the activity expressing ALP of BMSCs in the blank control group and the 0.01 mg/mL group were significantly less than those in the other groups ($P<0.05$),but there was no significant difference in the other groups ($P>0.05$). **Conclusion** In terms of economy and efficiency,the best concentration of polylysine solution for surface modification of allograft bone is 0.025 mg/mL,which can make allograft bone have good cell affinity and minimum cytotoxicity.

Keywords: polylysine;concentration;allograft bone;surface modification;cell affinity;cytotoxicity

针对大段骨缺损,临床上常使用组织工程骨进行修复。其中,同种异体骨是重要的组织工程骨之一[1-2]。但是,同种异体骨细胞亲和力(骨传导能力)不强,宿主细胞难以在其微孔表面大量黏附与增殖,临床治疗效果不佳[3-4]。为增强同种异体骨的细胞亲和力,本课题组在前期的实验中,采用冻干法,使用多聚赖氨酸溶液对兔同种异体骨的微孔进行表面改性,其细胞亲和力得到了显著提升;此外,该方法成本低廉,步骤简单,易于掌握和操作[5-7]。然而,有研究报道,多聚赖氨酸具有细胞毒性,可抑制细胞的生长[8]。为了使同种异体骨表面改性后具有最佳的细胞亲和力与最低的细胞毒性,本研究通过探讨多聚赖氨酸溶液的最佳浓度,旨在为其今后的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

成年新西兰大白兔由空军军医大学实验动物中心提供,兔同种异体骨购自西京医院骨库,左旋多聚赖氨酸(分子量 15 万~30 万)、L-抗坏血酸、地塞米松、胰蛋白酶、β-甘油磷酸钠、噻唑蓝(MTT)、DMSO 购自美国 Sigma,D-Hank's 液、转化生长因子-β_2(transforming growth factor-β_2, TGF-β_2)、DMEM 培养基购自美国 Gibico,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 兔同种异体骨的表面改性和分组 兔同种异体骨均取自于兔椎体松质骨,切割成边长为 3 mm 的正方体,然后分别浸入 100 mg/mL、30 mg/mL、1 mg/mL、0.1 mg/mL、0.025 mg/mL 和 0.01 mg/mL 的多聚赖氨酸溶液中,持续振荡 2 h,微孔被溶液充分浸透后取出,置于 12 孔培养板内,每孔放置 1 粒。先在 -20 ℃下预冷 2 h,随即转至 -80 ℃下冷冻 1 h,最后置于冷冻干燥机中干燥 24 h。根据同种异体骨所浸入的多聚赖氨酸浓度,将其分为 100 mg/mL 组、30 mg/mL 组、1 mg/mL 组、0.1 mg/mL 组、0.025 mg/mL 组和 0.01 mg/mL组,未经表面改性的同种异体骨纳入空白对照组。各组同种异体骨均经 20 kGy ^{60}Co 辐照灭菌,于 4 ℃密封无菌保存。

1.2.2 兔骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)的分离与扩增 以戊巴比妥麻醉新西兰大白兔后,将其股骨大粗隆及周围皮肤仔细反复消毒。持骨穿针,在股骨大粗隆处抽吸约 0.5 mL骨髓,迅速滴入含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基内,然后置于细胞培养箱内孵育,每 2 d 半量换液 1 次。采用全骨髓贴壁法提纯 BMSCs。待细胞 80% ~90% 融合时,进行消化、传代。

1.2.3 BMSCs 的种植、诱导和培养 第 3 代 BMSCs 置于成骨培养基(含 10% 胎牛血清、50 mg/L L-抗坏血酸、1×10^{-8} mol/L 地塞米松和 10 mmol/L β-甘油磷酸钠的高糖 DMEM)内,制成细胞密度为 1×10^7/mL 的悬液。将含 2×10^4 个 BMSCs 的悬液滴入各组同种异体骨内,在细胞培养箱中孵育 4 h 后添加成骨培养基,每 2 d 半量换液 1 次。

1.2.4 MTT 比色试验检测 BMSCs 黏附、增殖的情况 在培养和诱导的第 3、5、7、9、11、13、15、17 天,每组分别随机抽取 8 个标本。D-Hank's 液漂洗去除未黏附的细胞后,采用 MTT 比色试验法,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其吸光度 A 值,利用表格记录每个时间点各组的吸光度 A 值,以间接检测细胞在同种异体骨微孔表面黏附、增殖的情况。

1.2.5 检测各组同种异体骨内黏附细胞表达 ALP 的

活性　　在培养和诱导的第3、5、7、9、11、13、15、17天,每组分别随机抽取8个标本。D-Hank's液漂洗去除未黏附的细胞后,逐次使用ALP活性测定试剂盒测定ALP的活性。使用酶标仪在520 nm波长处测定吸光度A值,利用表格记录每个时间点各组的光吸收值,以间接检测向成骨细胞方向分化的细胞活力。

1.3　统计学处理

采用SPSS 14.0软件进行数据分析,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行t检验,$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　BMSCs在同种异体骨内的增殖情况

MTT比色试验结果显示:BMSCs在各组同种异体骨微孔表面的生长曲线呈抛物线样,从第3天至第17天,细胞数量一直持续上升,到第11天左右进入平台期,增速开始减慢。100 mg/mL组、30 mg/mL组、1 mg/mL组、0.1 mg/mL组和0.025 mg/mL组的细胞数量较多,增殖速度快,但各组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$);而0.01 mg/mL组和空白对照组的BMSCs增殖相对较慢,每个时间点的数量均少于其余各组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图1。

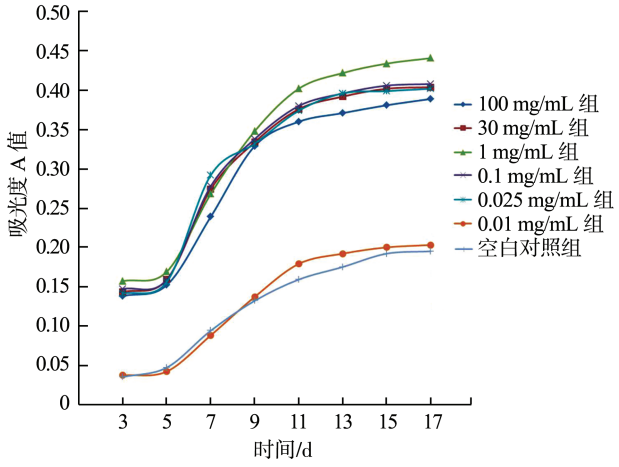


图1　BMSCs在同种异体骨微孔表面的增殖情况

2.2　细胞表达ALP的活性比较

BMSCs经成骨诱导、培养后,从第3天至第17天,各组表达ALP的活性持续增加,至第11天左右进入平台期,活性增速减慢,呈抛物线样。100 mg/mL组、30 mg/mL组、1 mg/mL组、0.1 mg/mL组和0.025 mg/mL组表达ALP的活性较高,但各组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$);而0.01 mg/mL组和空白对照组细胞表达ALP的活性较低,每个时间点的值均小于其他各组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图2。

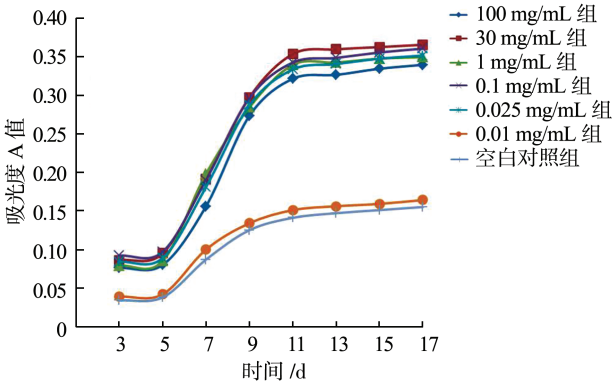


图2　BMSCs表达ALP的活性比较

3　讨论

在组织工程研究中,为提高组织工程骨对细胞的亲和力,优化骨传导能力,常常对其微孔表面进行改性[9-10]。然而,临床上所使用的同种异体骨在很多病例中难以修复骨缺损区,并且长期不被吸收[11-12]。其中,同种异体骨对细胞的亲和力不足是重要因素[13],这与其未经过表面改性,骨传导能力未得到优化有关[14-15]。

载玻片表面覆盖多聚赖氨酸后,其细胞黏附力明显增强,组织切片不易脱落[16-17]。受此启发,本课题组在前期研究中使用多聚赖氨酸对同种异体骨进行表面改性,发现表面改性后的同种异体骨对细胞的亲和力显著增加,即骨传导性得到明显提高[5-7]。此外,也有学者使用多聚赖氨酸对其他人工骨进行表面改性,并取得了良好的结果[18-19]。有研究报道多聚赖氨酸具有细胞毒性,可抑制细胞生长的特性,本课题组通过探索多聚赖氨酸溶液用于同种异体骨表面改性的最佳浓度,以期既能将细胞毒性控制在最低,又能发挥其最佳作用。

本课题组在着手研究之前,查阅了相关文献,并参照玻片包被方法所使用的多聚赖氨酸溶液的浓度[17,20-21],最终选择浓度为100 mg/mL、30 mg/mL、1 mg/mL、0.1 mg/mL、0.025 mg/mL和0.01 mg/mL的多聚赖氨酸溶液分别对兔同种异体骨进行表面改性。MTT比色试验和细胞表达ALP活性的结果显示,经100 mg/mL、30 mg/mL、1 mg/mL、0.1 mg/mL和0.025 mg/mL多聚赖氨酸溶液表面改性后的同种异体骨微孔表面的细胞亲和力均得到显著增强,细胞易在其表面黏附与增殖,均显著优于0.01 mg/mL组和空白对照组。此外,本研究结果还发现,100 mg/mL组、30 mg/mL组、1 mg/mL组、0.1 mg/mL组和0.025 mg/mL组细胞增殖的数量及表达ALP的活性无明显差异,提

示以上浓度的多赖氨酸溶液对细胞的增殖和活力影响相似。100 mg/mL、30 mg/mL的多聚赖氨酸溶液浓度较高,但高浓度的多聚赖氨酸未影响细胞黏附、增殖和分泌等活力,由此推断,多聚赖氨酸的细胞毒性很小,细胞相容性良好。因此,从经济、有效方面考虑,本研究推荐对同种异体骨进行表面改性的多聚赖氨酸溶液最佳浓度为0.025 mg/mL。

本研究使用的多聚赖氨酸溶液浓度差异很大,呈指数级,然而,并未发现多聚赖氨酸具有细胞毒性、抑制细胞生长等现象。分析可能有以下原因:①多聚赖氨酸的细胞毒性并没有其他报道所称的那么大,其细胞相容性良好;②本研究的实验方法尽可能与临床运用相一致,而与所报道的方法不一致,故得出的结论亦不同[22-24]。

综上所述,多聚赖氨酸的细胞毒性较低,利用其对同种异体骨进行表面改性的最佳浓度为0.025 mg/mL,本研究结果为提高同种异体骨在临床应用中的效果提供了重要的实验依据。但本研究是体外实验,细胞周围的环境与体内环境不同,故得出的结果尚不能完全代表体内的实际情况。拟在今后的研究中采取动物体内植入的方法,进行更加深入地观察与分析。

[参考文献]

[1] 王小志,杨 桦,张 辰,等.骨形态发生蛋白2联合基因转染骨髓间充质干细胞复合同种异体骨修复极限骨缺损[J].中国组织工程研究,2018,22(9):1313-1318. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.0458.

[2] 康鹏德,裴福兴.髋关节翻修中骨盆不连续的评估与重建[J].中华骨科杂志,2020,40(9):614-624. doi:10.3760/cma.j.cn121113-20200311-00152.

[3] 左 健,康建敏,潘 乐.同种异体骨移植用于骨缺损修复的应用现状[J].中国组织工程研究,2012,16(18):3395-3398. doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.18.035.

[4] 黄 硕,李永锋,谭新颖,等.同种异体骨复合骨髓间充质干细胞用于髁突缺损修复的实验性研究[J].口腔医学研究,2018,34(5):103-107. doi:10.13701/j.cnki.kqyxyj.2018.05.023.

[5] 笪 虎,焦 峰.多聚赖氨酸对同种异体骨的细胞亲和性影响的实验研究[J].创伤外科杂志,2016,18(5):291-294. doi:10.3936/j.issn.1009-4237.2016.05.010.

[6] 笪 虎,陈 伟.多聚赖氨酸表面改性后同种异体骨的骨传导能力研究[J].蚌埠医学院学报,2018,43(4):39-43. doi:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.04.009.

[7] 张建萍,笪 虎.多聚赖氨酸对同种异体骨进行表面改性的性能评价[J].现代中西医结合杂志,2017,26(4):362-364. doi:10.3969/j.issn.1008-8849.2017.04.007.

[8] 李英琦,张海燕.多聚赖氨酸与EDTA交联物对小鼠成纤维细胞的毒性研究[J].贵州医科大学学报,2015,40(4):360-362.

[9] 孙梦洁,金巨楼,杨军星,等.脱钙骨基质在骨缺损修复中的应用与改性研究概况[J].现代口腔医学杂志,2018,32(4):229-233.

[10] 李明善,李佰成.微孔同种异体表面脱钙骨基质明胶诱导成骨能力的实验研究[J].河南大学学报(医学版),2000,19(3):4-5.

[11] 周思佳,姜文学,尤 佳.骨缺损修复材料:现状与需求和未来[J].中国组织工程研究,2018,22(14):2251-2258. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.0754.

[12] 万东东,姜文学,胡茂忠,等.同种异体骨脱钙骨基质联合BMP修复兔桡骨骨缺损的实验研究[J].天津医科大学学报,2009,15(3):151-154.

[13] Yamamoto N,Hayashi K,Tsuchiya H. Progress in biological reconstruction and enhanced bone revitalization for bone defects[J]. J Orthop Sci,2019,24(3):387-392. doi:10.1016/j.jos.2019.01.015.

[14] Baldwin P,Li DJ,Auston DA,et al. Autograft,allograft,and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery[J]. J Orthop Trauma,2019,33(4):203-213. doi:10.1097/BOT.0000000000001420.

[15] Fillingham Y,Jacobs J. Bone grafts and their substitutes[J]. Bone Joint J,2016,98-B(1 Suppl A):6-9. doi:10.1302/0301-620X.98B.36350.

[16] 陈兰英,蓝春莲.介绍一种免疫组化防脱片的制作方法[J].诊断病理学杂志,2011,18(6):53. doi:10.3969/j.issn.1007-8096.2001.01.023.

[17] 虞 杰,顾冬梅,郭临川.防脱片剂在免疫组织化学染色中的应用[J].中国血液流变学杂志,2008,18(3):432-433. doi:10.3969/j.issn.1009-881X.2008.03.054.

[18] Zhang H,Zhou Y,Yu N,et al. Construction of vascularized tissue-engineered bone with polylysine-modified coral hydroxyapatite and a double cell-sheet complex to repair a large radius bone defect in rabbits[J]. Acta Biomater,2019,91:82-98. doi:10.1016/j.actbio.2019.04.024.

[19] Clifford A,Lee BEJ,Grandfield K,et al. Biomimetic modification of poly-l-lysine and electrodeposition of nanocomposite coatings for orthopaedic applications[J]. Colloids Surf B Biointerfaces,2019,176:115-121. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.12.049.

[20] 罗敏辉,任海涛,李培宁,等.鼠尾胶原、多聚赖氨酸和明胶3种基质对角膜上皮细胞增殖的影响[J].毒理学杂志,2015,29(2):130-133. doi:10.16421/j.cnki.1002-3127.2015.02.013.

[21] 付先利,支月莹,郑 芳,等.四种制作多聚赖氨酸免疫组化黏附载玻片方法的比较[J].临床与实验病理学杂,2016,32(3):347-348. doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2016.03.029.

[22] 张 虹,刘晓波,余学清,等.抗体靶向寡核苷酸复合物及SPA-PLL交联物对培养细胞的毒性作用[J].广东药学院学报,2006,22(6):651-653.

[23] 王玲玲,崔志明,徐冠华,等.电活性聚苯胺/聚乳酸支架的制备及生物相容性[J].中国组织工程研究,2018,22(22):3557-3562. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.0755.

[24] 王 齐,廖 华,秦建强,等.不同基质材料修饰的Sylgard184与C2C12细胞的相容性[J].解剖学报,2009,40(2):235-239. doi:10.3969/j.issn.0529-1356.2009.20.013.

(编辑:贺绍梅)