doi:10.11659/jjssx.01E018099

·基础研究·

RADA-16 自组装多肽的合成表征及负载 BMP-2 的细胞相容性研究

于 鹏,李 明,贾丙申,纪志华,付 昆 (海南医学院第一附属医院关节创伤外科,海南 海口 570102)

[摘 要] **目的** 将 RADA-16、珊瑚和 BMP-2 组成复合材料体系,研究其超微结构及与 BMSCs 细胞相容性。**方法** 将 RADA-16溶解于 10% 无菌蔗糖溶液中,浓度为 1%(10 mg/mL,m/v),将 RADA-16 再用等体积细胞培养基 DMEM/F12 溶液触发多肽自组装,浸润珊瑚,进行电镜扫描。等比例混合 RADA-16 与 BMP-2 溶液后,把珊瑚在混合液中浸没,用相同体积的 DMEM/F12 培养基触发自组装的发生,扫描电镜检测。分离培养兔 BMSCs,细胞活性染色观察细胞相容性。**结果** RADA-16 自组装能够形成凝胶,在 50 倍电镜下观察珊瑚呈多孔状结构,大小均匀,孔隙在 200 ~ 500 μm 范围内,且孔隙紧密排布;130 倍扫描电镜下观察,RADA-16自组装多肽凝胶均匀附着于珊瑚孔隙中;1 000 倍扫描电镜显示,RADA-16 自组装形成片层与网状结构,其直径从几微米到几十微米不等;10 000 扫描电镜显示,在珊瑚孔隙中 BMP-2 黏附于 RADA-16,成功合成复合材料体系(RADA-16、珊瑚、BMP-2),BMSCs 培养过程中,实验 1 组(RADA-16、珊瑚、BMP-2)、实验 2 组(RADA-16、珊瑚)与对照组(珊瑚)中 BMSCs 都未见明显死亡细胞,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 多肽 RADA-16 在特定的条件下可以自组装复合材料体系(自组装多肽、珊瑚、BMP-2),与 BMSCs 有良好的相容性,可以作为骨修复组织工程的生物支架材料。

[关键词] 珊瑚;RADA-16 多肽;BMP-2;自组装;细胞相容性
[中图分类号] R593.22 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-01-26

Synthesis and characterization of self-assembling peptide RADA-16 and cytocompatibility of BMP-2 loaded thereon

YU Peng, LI Ming, JIA Bing-shen, JI Zhi-hua, FU Kun (Department of Joint Trauma, First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou Hainan 570102, China)

Abstract: Objective To investigate the ultrastructure of the composite system comprising RADA16, coral and BMP-2 and its cytocompatibility with BMSCs. **Methods** RADA-16 was dissolved in 10% sterile sucrose solution at a concentration of 1% (10 mg/mL, m/v), the self-assembly of the peptide RADA-16 was triggered by the isovolumetric cell culture medium DMEM/F12 solution, and the coral was infiltrated for scanning electron microscope. After RADA-16 and BMP-2 solutions were mixed in equal proportions, the coral was immersed in the resulting mixture, and the self-assembly of peptide was triggered by the same volume of DMEM/F12 medium and examined under a scanning electron microscope. Then, the BMSCs of rabbit were isolated and cultivated, aiming to observe cytocompatibility based on cellular activity staining. **Results** RADA-16 could be self-assembled into a gel. Under a 50X electron microscope, the coral had a porous structure with uniform size, and the pores were densely arranged in the range of 200 ~ 500 μm; under a 130X scanning electron microscope, the self-assembling peptide gel of RADA-16 was evenly attached to the coral pores; under a 1000X scanning electron microscope, the self-assembling of RADA-16 had the laminar and reticular structures ranging from a few micrometers to tens of micrometers in diameter; under a 10000X scanning electron microscope, BMP-2 adhered to RADA-16 in coral pores, and was successfully synthesized into a composite system (RADA-16, coral and BMP-2). During the cultivation of BMSCs, no obvious dying cells were seen in the experimental group 1 (RADA-16, coral and BMP-2), the experimental group 2 (RADA-16 and coral) and the control group (coral), and the differences among these groups were not statistically significant. **Conclusion** The peptide RADA-16 can achieve a self-assembled composite system (self-assembling peptide, coral and BMP-2) under specific conditions and can be used as a biological scaffold material in the field of bone repair and tissue engineering due to good compatibility with BMSCs.

Keywords: coral; RADA-16 peptide; BMP-2; self-assembly; cytocompatibility

骨缺损因自体骨移植受到自体骨源有限的限制,往往不能达到完全填充骨缺损区所需要的骨量,随着骨组织工程技术的发展,人造骨组织填充材料不断出现,其可以填充骨缺损区域并促进缺损区域骨生长愈合,提高治疗效果,缩短治疗时间[1]。骨形态发生蛋白 2(BMP-2)具有原位成骨和异位成骨作用,目前大量的实验和临床资料表明 BMP-2 具有较强的骨诱导活性,能诱导间充质干细胞(MSC)向骨细胞转化,从而促进骨缺损的修复[2]。但是大剂量 BMP-2 价格昂贵,半衰期短,且容易异位成骨,具有潜在风险,因而限制了 BMP-2 在临床中的应用。

目前国际上常用的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米微球包载技术存在包封率不理想等问题,且包封过程中需要使用氯仿,氯仿有生物毒性,这

[基金项目] 国家自然科学基金(81260271)

也限制了 PLGA 缓释微球的使用。RADA-16 是目前研究较成熟的自组装纳米短肽材料,具有自组装成胶容易控制、无细胞毒性、可被吸收、无免疫原性等特点[3]。有研究证明,RADA-16 胶体的纳米网状结构可以诱导干细胞长入,有助于干细胞的生长、增殖[4]。RADA-16 成胶过程中可以加入 BMP-2,成胶后将形成特殊的纳米网状结构将 BMP-2 分子网在胶体内。随着胶体的分解吸收,胶体内的 BMP-2 逐渐被释放出来,达到缓释成骨诱导因子的作用。本课题使用 RADA-16 纳米自组装多肽作为 BMP-2 的载体,既获得了良好的可塑形性,又获得了良好的生物相容性。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂和仪器

新西兰大白兔 10 只,6 月龄,雌雄各半,体质量 3 kg左右,购自南昌大学附属医院实验动物中心;RADA-16(氨基酸序列:ACN-RADARADARADARADA-CONH2),纯度大于 90%,购自上海生物工程有限公司;兔淋巴细胞分离液、链霉素、PBS 缓冲液和青霉素购自上海阿拉丁试剂有限公司;胰蛋白酶和L-DMEM 培养基购自美国 PE 公司;EM-30Plus 扫描电镜购自库赛姆中国,IX71 倒置荧光显微镜和 IME-II 倒置相差显微镜日本 Olympus 公司。

1.2 多肽的溶解

把 10 g 蔗糖溶于 90 mL 去离子水中,完全溶解后分装到 2 个离心管中,各 50 mL。分别取蔗糖溶液 1 mL与 RADA-16 粉 10 mg 溶于 2 mL 微型管中,在 37 ℃恒温下悬浮超声 30 min。

1.3 多肽的自组装

在 2 mL 微型管中,加入 500 μL RADA-16 溶液和 500 μL 的 DMEM/F12 培养基,用移液管枪头轻轻吹打混合。使 RADA-16 溶液得最终浓度为 0.5%。在 37 ℃温箱中孵育 30 min 后倒置,并观察多肽自组装的情况。

1.4 珊瑚微结构的观察

样本镀金处理,通过 50 ~ 100 倍扫描电镜(冷场)扫描高压蒸汽灭菌后的珊瑚块,采用图像分析软件(Topomatrix)对扫描电镜检测结果进行分析。

1.5 RADA-16-珊瑚超微结构检测

超声处理制备完成的 RADA-16 溶液 20 min,之后把超声后 RADA-16 溶液浸没珊瑚中,并加入相同体积的细胞 DMEM/F12 培养基,脱水至黏样粉末状,之后对粉末样本进行镀金处理,通过 100 ~ 1 000 倍扫描电镜(冷场)检测,Topomatrix 图像分析软件进行分析。

1.6 RADA-16-珊瑚-BMP-2 复合材料超微结构观察

将同体积的 RADA-16 与 BMP-2 溶液混合后浸没于珊瑚小块中,同样加入 DMEM/F12 培养基触发自组装的发生。脱水至黏样粉末状,之后对粉末样本进行镀金处理,通过 10 000 倍扫描电镜(冷场)检测,Topomatrix图像分析软件进行分析。

1.7 RADKPS 细胞相容性实验

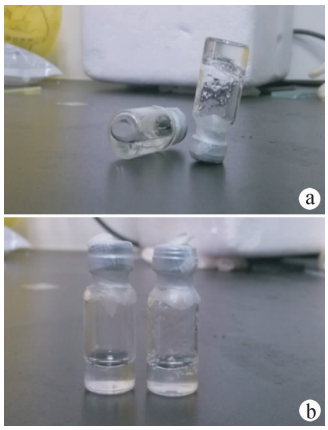
1.7.1 兔 BMSCs 分离培养 用 0.5 mL 氯胺酮通过肌肉注射麻醉新西兰大白兔后,抽取约 3 mL 胫骨下方穿刺的骨髓,迅速加入到 15 mL 离心管中,并立即加入 2 mL 肝素钠,混匀摇晃,对兔 BMSCs 进行分离培养,2 000 r/min 离心 20 min 后,吸取单个骨髓核细胞,PBS 洗涤 2 遍后进行离心计数,并用 5 mL 的 L-DMEM 培养液重悬细胞,按 1×10^6 个/cm^2 密度接种于培养瓶中,在湿度培养箱中行原代培养,每 48 h 换液,3 次 PBS 冲洗后,弃去未贴壁的细胞,之后每 2 天换液 1 次,进行传代培养。利用倒置相差显微镜下观察 BMSCs 细胞形态。

1.7.2 BMSCs 细胞活性染色观察 取第 3 代 BMSCs 细胞,在 0.25% 胰蛋白酶消化后,配置浓度为 1×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种于 96 孔板培养(100 μL/孔);培养 24 h 后,分为 3 组,第 1 组加 100 μL RADA-16/珊瑚/BMP-2 溶液,命名为实验组 1,第 2 组加 RADA-16/珊瑚溶液,命名为实验组 2,第 3 组加珊瑚溶液,命名为对照组,置于 FDA/PI 避光培养;在 37 ℃下孵育 5 min 后,用 PBS 每隔 3 min 冲洗 1 次,冲洗 3 次后,利用倒置荧光显微镜下进行观察。

2 结果

2.1 多肽自组装形成凝胶多肽

RADA-16 溶解后形成无色透明水凝胶,微形管倒置 30 min 后凝胶仍紧密黏附于管底,无滑脱(图 1)。



a:形成无色透明水凝胶;b:凝胶黏于管底

图 1 RADA-16 多肽溶液形成自组装多肽凝胶

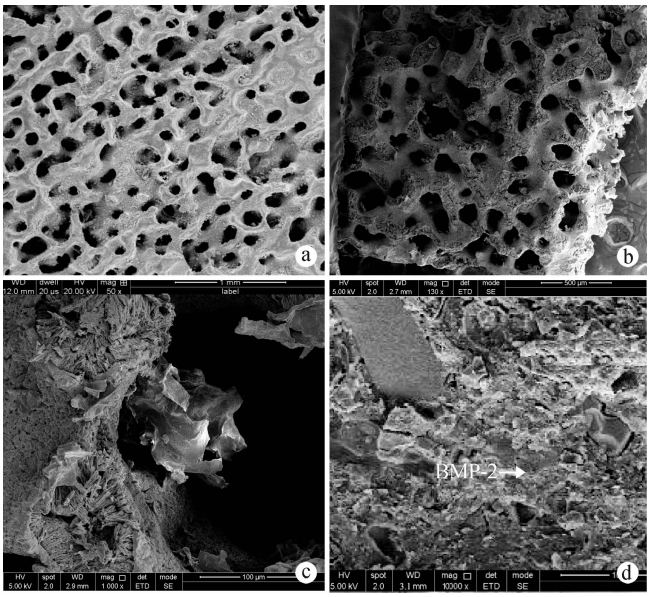
2.2 珊瑚微结构的观察

珊瑚于电镜下呈多孔状结构,孔隙排布紧密,大小均匀,孔隙大小从 200 μm 到 500 μm 不等(图 2a)。

130 倍扫描电镜下观察,RADA-16 自组装多肽凝胶均匀附着于珊瑚孔隙中(图 2b)。扫描电镜图像显示在珊瑚空隙中多肽 RADA-16 自组装形成纳米纤维及片层堆叠结构,其直径从几微米到几十微米不等(图 2c)。

2.3 扫描电镜图像显示

自组装多肽的纳米结构分布于珊瑚的空隙中,而在自组装多肽的纳米架构上,均匀黏附着骨形态发生蛋白颗粒。由此,珊瑚、自组装多肽、骨形态发生蛋白三者形成了层层递进的超微复合材料体系(图 2d)。

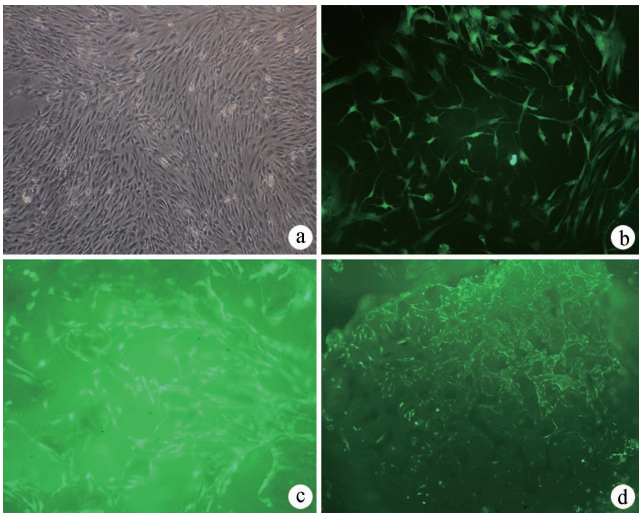


a:50 倍电镜下扫描;b:130 倍电镜下扫描;c:1000 倍扫描电镜下观,珊瑚孔隙中 RADA-16 自组装多肽凝胶形成规则纳米纤维及片层结构;d:10 000 倍扫描电镜下观察骨 BMP-2 均匀附着于 RADA-16 自组装多肽凝胶上

图 2 珊瑚电镜扫描图像

2.4 细胞相容性实验

倒置相差显微镜观察示,第 3 代新西兰大白兔 BMSCs 呈长梭形,漩涡样生长。培养 3 d 后,BMSCs 和不同系统的细胞相容性显示,生存细胞发绿色荧光,死亡细胞发红色荧光。BMSCs 培养过程中,实验组 1、实验组 2 与对照组内 BMSCs 未见明显死亡细胞(图 3)。



a:BMSCs 细胞形态;b:对照组(珊瑚组);c:实验组 1(RADA-16/珊瑚/BMP-2 组);d:实验组 2(RADA-16/珊瑚组)

图 3 培养 3 d 后,BMSCs 和不同系统的细胞相容性

3 讨论

种子细胞、生物材料和调控因子这三种主要的基本元素组合在一起组成了组织工程,体外模拟组织再生发现这三者的组合能够达到修复组织损伤与退变的功能。而在这三要素中,具有良好生物学活性结构的材料少之又少。以往的使用中,用到如壳聚糖、藻酸盐等材料,这些材料远远达不到人天然骨组织的性能,因此构建出具有提供合适的微环境给种子细胞增殖分化且具有优良生物学活性的生物材料成了目前的研究热点[5-6],其中,自组装多肽纳米纤维凝胶尤其被关注[7]。刘龙刚等[8]制备并评价载有 BMP-7 功能片段的新型功能化自组装多肽纳米纤维水凝胶支架材料 RADKPS 的生物相容性,为其在退变髓核再生领域中的体内研究提供实验依据。这是由于肽种的氨基酸之间的众多相互作用使其自身拥有复杂的自组装纳米结构。氨基酸间的相互作用类型的主要包括疏水相互作用,静电、氢键相互作用,范德华力以及芳族相互作用(π-π 堆叠)[9],因此可以利用这些氨基酸间的相互作用的特性影响肽的自组装行为,使其生物材料功能性发挥出来,成为自组装多肽纳米纤维凝胶[10-11]。有研究发现,由于其规则排列形成的三维超微结构,自组装多肽纳米纤维凝胶更接近于天然结构的材料性能,而且还具备原来多肽分子的生物性能[12]。

羟基磷灰石是珊瑚的主要成分,这与骨组织的刚性组成成分较相似,且对种子细胞或者活性成分都具有很好的容纳性质,这是由于珊瑚拥有具有较高孔隙率的孔隙结构。RADA-16 是一种含水量很高的自组装多肽(含水量 99% 以上),其实由阴性氨基酸(A,天门冬氨酸)和阳性氨基酸(R,精氨酸)分别交替组成的,其具有良好的生物相容性[13-15],可在适宜条件下自发地发生分子间自组装,形成有序三维纤维凝胶支架[16-17],因此被认为是一种理想的组织工程生物支架材料,已被广泛应用于细胞三维培养、药物缓释及组织再生中。在本实验中选用 RADA-16 作为凝胶组分的柔性部分,能够更好地在珊瑚刚性结构的保护下,在珊瑚的孔隙中自发形成三维结构,这更有助于为种子细胞的生长提供更适宜的微环境,且进一步增加珊瑚孔隙的表面积。研究表明,人体内骨髓间充质干细胞能够在 BMP-2 诱导下形成骨细胞分化,这一现象也在体

外实验中被证实了,因此整个系统中,BMP-2 的加入在微环境中作为生长因子起到重要职能[18]。本文发现 RADA-16 自组装能够形成凝胶,珊瑚 50 倍电镜下观察是呈多孔状结构,大小均匀,孔隙在 200 ~ 500 μm 范围内,且孔隙紧密排布,130 倍扫描电镜下观察,RADA-16 自组装多肽凝胶均匀附着于珊瑚孔隙中,1 000 倍扫描电镜显示 RADA-16 自组装形成片层与网状结构,其直径从几微米到几十微米不等,10 000 扫描电镜显示在珊瑚孔隙中,BMP-2 黏附于 RADA-16,成功合成复合材料体系(RADA-16、珊瑚、BMP-2)。这与陈辰[19]得到的复合材料体超微结构具有高度的相似度,陈辰是利用合成含有连接蛋白核心序列 Link N 的多肽两亲性分子 RADA-16,研究其自组装形成凝胶支架的超微结构,将 RADA-16、珊瑚和 BMP-2 组成复合材料体,并对复合材料体的超微结构进行研究,但并未对其细胞相容性进行研究。

通过 BMSCs 分离培养观察到该新型功能化 RADA-16 自组装多肽的合成表征及负载 BMP-2 对 BMSCs 细胞无毒性反应,这与刘纪恩等[20]的研究成果一致,其通过合成 RADA-16-骨形态发生蛋白(BMP)-2 相关多肽(P24)表面修饰活性多肽并在体外诱发其进行自组装,共价修饰聚乳酸羟基乙酸(PLGA)结合成 RADA-16-P24-PLGA 共聚物,检测与骨 BMSCs 细胞的毒性反应,发现无毒性反应,这意味着装载有 BMP-2 功能片段 RADA-16/珊瑚纳米水凝胶具有良好的细胞相容性,为进一步动物实验验证其修复骨损失的作用奠定了实验基础。

[参考文献]

[1] Chen K,Shi P,Teh TKH,et al. In vitro generation of a multilayered osteochondral construct with an osteochondral interface using rabbit bone marrow stromal cells and a silk peptide-based scaffold[J]. J Tissue Eng Regen Med,2016,10(4):284 - 293. doi:10.1002/term.1708.

[2] Wang CL,Xiao F,Wang CD,et al. Gremlin2 suppression increases the BMP-2-induced osteogenesis of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells via the BMP-2/Smad/Runx2 signaling pathway[J]. J Cell Biochem,2017,118(2):286 - 297. doi:10.1002/jcb.25635.

[3] 刘路阳. RADA16-NBD 自组装多肽纳米支架对炎症刺激下成骨细胞影响的研究[D]. 佳木斯:佳木斯大学,2014.

[4] Yokoi H,Kinoshita T,Zhang S. Dynamic reassembly of peptide RADAl6 nanofiber scaffold[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2005,102(24):8414 - 8419. doi:10.1073/pnas.0407843102.

[5] Childs A,Hemraz UD,Castro NJ,et al. Novel biologically-inspired rosette nanotube PLLA scaffolds for improving human mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation[J]. Biomed Mater,2013,8(6):065003. doi:10.1088/1748 - 6041/8/6/065003.

[6] Miller RE,Grodzinsky AJ,Barrett MF,et al. Effects of the combination of microfracture and self-assembling peptide filling on the repair of a clinically relevant trochlear defect in an equine model[J]. J Bone Joint Surg Am,2014,96(19):1601 - 1609. doi:10.2106/JBJS.M.01408.

[7] Ikeno M,Hibi H,Kinoshita K,et al. Effects of self-assembling peptide hydrogel scaffold on bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein-2[J]. Int J Oral Maxillofac Implants,2013,28(5):283 - 289. doi:10.11607/jomi.te09.

[8] 刘龙刚,伍耀宏,陶 晖,等. 修饰有 BMP-7 功能片段的功能化自组装多肽纳米纤维水凝胶 RADKPS 制备及其生物相容性研究[J]. 中国修复重建外科杂志,2016,30(4):491 - 498. doi:10.7507/1002 - 1892.20160098.

[9] Kaltofen S,Li C,Huang PS,et al. Computational de novo design of a self-assembling peptide with predefined structure[J]. J Mol Biol,2015,427(2):550 - 562. doi:10.1016/j.jmb.2014.12.002.

[10] Wang B,Sun C,Shao Z,et al. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds containing link protein N-terminal peptide induce chondrogenesis of rabbit bone marrow stem cells[J]. Biomed Res Int,2014,2014(4):1 - 10. doi:10.1155/2014/421954.

[11] Dissanayaka WL,Hargreaves KM,Jin L,et al. The interplay of dental pulp stem cells and endothelial cells in an injectable peptide hydrogel on angiogenesis and pulp regeneration in vivo[J]. Tissue Eng Part A,2015,21(3 - 4):550 - 563. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0154.

[12] Fernández-Muiños T,Recha-Sancho L,López-Chicón P,et al. Bimolecular based heparin and self-assembling hydrogel for tissue engineering applications[J]. Acta Biomater,2015,16(1):35 - 48. doi:10.1016/j.actbio.2015.01.008.

[13] Zhang S,Gelain F,Zhao X. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures[J]. Semin Cancer Biol,2005,15(5):413 - 420. doi:10.1016/j.semcancer.2005.05.007.

[14] Ni N,Hu Y,Ren H,et al. Self-assembling peptide nanofiber scaffolds enhance dopaminergic differentiation of mouse pluripotent stem cells in 3-dimensional culture[J]. PLoS One,2013,8(12):e84504. doi:10.1371/journal.pone.0084504.

[15] Kisiday J,Jin M,Kurz B,et al. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division:implications for cartilage tissue repair[J]. Proc Natl Acad Sci,2002,99(15):9996 - 10001. doi:10.1073/pnas.142309999.

[16] Zweckberger K,Liu Y,Wang J,et al. Synergetic use of neural precursor cells and self-assembling peptides in experimental cervical spinal cord injury[J]. J Vis Exp,2015,23(96):e52105. doi:10.3791/52105.

[17] Kumar VA,Taylor NL,Shi S,et al. Highly angiogenic peptide nanofibers[J]. ACS Nano,2015,9(1):860 - 868. doi:10.1021/nn506544b.

[18] Liu Y,Ye H,Satkunendrarajah K,et al. A self-assembling peptide reduces glial scarring,attenuates post-traumatic inflammation and promotes neurological recovery following spinal cord injury[J]. Acta Biomater,2013,9(9):8075 - 8088. doi:10.1016/j.actbio.2013.06.001.

[19] 陈 辰. 自组装多肽的合成,多肽自组装成纳米纤维凝胶及其与珊瑚,BMP-2 组成复合材料——结构观察与展望[J]. 中国医疗器械信息,2016,22(12):15 - 18. doi:10.7507/1002 - 1892.20160098.

[20] 刘纪恩,郝少飞,勾瑞恩,等. 表面修饰活性多肽 RADA16-P24 的生物相容性检测及体外缓释规律研究[J]. 中华实验外科杂志,2016,33(2):472 - 474. doi:10.3760/cma.j.issn.1001 - 9030.2016.02.059.

(编辑:魏 源)