

重组大鼠胰岛素样生长因子-1 聚（乳酸-羟基乙酸）共聚物 缓释微球对 2 型糖尿病 GK 大鼠种植体周围骨形成的影响

于 淼¹, 惠新民², 王 峰¹, 张 宁³, 张和鹏⁴, 宋应亮¹

¹第四军医大学口腔医学院种植科, 西安 710032

²陕西省黄陵县人民医院口腔科, 陕西黄陵 727300

³第四军医大学病原生物学教研室, 西安 710032

⁴西北工业大学理学院应用化学系, 西安 710072

通信作者: 宋应亮 电话: 029-84776454, 电子邮件: songyingliang@163.com

摘要: **目的** 评估重组大鼠胰岛素样生长因子-1 (rrIGF-1) 聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物 (PLGA) 缓释微球对 2 型糖尿病 GK 大鼠种植体周围骨形成的影响。**方法** 将 20 只雄性 GK 大鼠进行糖尿病造模成功后随机分为 2 组, 分别给予加载包裹 rrIGF-1 的 PLGA 缓释微球 (治疗组, $n=10$) 和加载包裹与 rrIGF-1 等量安慰剂的 PLGA 缓释微球 (糖尿病组, $n=10$) 处理, 再以 10 只未做处理的 SD 大鼠作为对照组。在所有大鼠胫骨内植入种植体, 治疗组和糖尿病组大鼠同时分别加载等量相应种类的 PLGA 缓释微球。术后 4、5、8 周在种植体周围局部采血, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清骨钙素 (OCN)、骨特异性碱性磷酸酶 (B-ALP) 及 I 型前胶原羧基前肽 (PICP) 含量。**结果** 种植体植入术后 4 周, 糖尿病组和治疗组的血清 OCN、B-ALP 和 PICP 水平均明显低于对照组 (P 均 <0.05); 术后 5 周, 糖尿病组的 OCN 和 B-ALP 水平明显低于对照组和治疗组 (P 均 <0.05), 糖尿病组和治疗组的 PICP 水平也均明显低于对照组 ($P < 0.05$), 治疗组的 OCN 水平明显高于术后 4 周 ($P < 0.05$), 对照组的 PICP 水平则明显低于术后 4 周 ($P < 0.05$); 术后 8 周, 糖尿病组大鼠的 OCN 和 B-ALP 水平明显低于对照组和治疗组 (P 均 <0.05), 糖尿病组和治疗组大鼠的血清 PICP 水平均明显低于对照组 (P 均 <0.05)。**结论** rrIGF-1 PLGA 缓释微球局部加载可促进 GK 大鼠种植体周围骨形成。

关键词: 重组大鼠胰岛素样生长因子-1; 聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物; 2 型糖尿病; GK 大鼠; 骨钙素; 骨特异性碱性磷酸酶; I 型前胶原羧基前肽

中图分类号: R318 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2010)03-0260-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2010.03.004

Effect of Sustained Release of Recombinant Rat Insulin-like Growth Factor-1 from Poly (lactide-CO-glycolide) Microspheres on Bone Formation in the Peri-implant Areas in Goto-Kakizaki Rats with Type 2 Diabetes

YU Miao¹, HUI Xin-min², WANG Feng¹, ZHANG Ning³, ZHANG He-peng⁴, SONG Ying-liang¹

¹Department of Oral Implantology, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

²Department of Stomatology, People's Hospital of Huangling County, Huangling County, Shaanxi Province 727300, China

³Department of Pathogenic Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

⁴Department of Applied Chemistry, School of Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China

Corresponding author: SONG Ying-liang Tel: 029-84776454, E-mail: songyingliang@163.com

ABSTRACT: Objective To evaluate the effect of sustained release of recombinant rat insulin-like growth factor-1 (rrIGF-1) from poly (lactide-CO-glycolide) (PLGA) microspheres on bone formation in the peri-implant areas in Goto-Kakizaki rats with type 2 diabetes. **Methods** Type 2 diabetes models were success-

fully established in 20 male Goto-Kakizaki rats, which were then randomly divided into treatment group (sustained release of rIGF-1 from PLGA microspheres were loaded on the peri-implant areas, $n = 10$) and diabetic group (loaded with isodose placebo from PLGA microspheres, $n = 10$). Another ten male SD rats served as control group (did not sustain any loading). Titanium implants were inserted into the tibias of 30 diabetic and normal animals. Four, 5, and 8 weeks after implantation, local blood samples around the implants were obtained for the determination of serum osteocalcin (OCN), serum bone specific alkaline phosphatase (B-ALP), and serum procollagen I carboxyterminal propeptide (PICP) with enzyme linked immunosorbent assays. **Results** Four weeks after implantation, OCN, B-ALP, and PICP were significantly lower in both treatment group and diabetic group than in control group (both $P < 0.05$). Five weeks after implantation, serum OCN and B-ALP levels of the diabetic group were significantly lower than those of the other two groups (all $P < 0.05$). Serum PICP levels of both diabetic group and treatment group were significantly lower than that of control group (both $P < 0.05$). The OCN level in the treatment group was significantly higher in the post-operative 5th week than in the post-operative 4th week, while the PICP levels in the diabetic group were significantly lower than those in the treatment group and control group in the post-operative 8th week (both $P < 0.05$). **Conclusion** Sustained release of rIGF-1 from PLGA microspheres loaded on the local peri-implant areas can promote bone formation in the peri-implant areas in Goto-Kakizaki rats with type 2 diabetes.

Key words: recombinant rat insulin like growth factor-1; poly(lactide-CO-glycolide); type 2 diabetes; Goto-Kakizaki rats; osteocalcin; bone specific alkaline phosphatase; procollagen I carboxyterminal propeptide

Acta Acad Med Sin, 2010, 32(3):260-264

糖尿病是一种全球性高发疾病,发病人数约占总人口的5%~10%^[1],其中90%为2型糖尿病。由于高血糖可影响种植体周围骨结合^[1-2],因此长期以来,糖尿病被视为缺牙患者进行口腔种植义齿修复的高风险因素和相对禁忌证^[3-5]。目前,治疗2型糖尿病的方法主要为注射胰岛素控制血糖。McCracken等^[6]研究显示,虽然糖尿病可引起全身性骨量减少,但应用生物材料能改变局部组织的反应。因此,通过局部加载因子,配合胰岛素控制血糖效果,可能促进糖尿病患者种植体周围骨形成,提高其骨结合。胰岛素样生长因子-1(insulin growth factor-1, IGF-1)为胰岛素原同系物,是1条包含3个二硫键,由70个氨基酸组成的多肽^[7],能促进骨祖细胞增殖,维持成骨细胞形成和存活,刺激骨形成^[8],但其在哺乳动物体内半衰期较短。聚(乳酸-羟基乙酸)共聚合物[poly(lactide-CO-glycolide), PLGA]具有可降解性及良好的生物相容性,已被美国食品药品监督管理局批准为安全的注射用高分子材料。Lam等^[9]采用人类重组IGF-1 PLGA缓释微球治疗糖尿病,结果证实IGF-1可作为对有胰岛素抵抗或胰岛素治疗效果不良糖尿病(2型糖尿病)患者的另一治疗选择。本研究评估了重组大鼠IGF-1(recombinant rat IGF-1, rIGF-1) PLGA缓释微球对2型糖尿

病 GK 大鼠种植体周围骨形成的影响。

材料和方法

试剂和仪器 雄性9周龄 GK 大鼠20只,购自上海斯莱克动物有限公司,体重(265±25)g,动物质量许可证号:0051934,许可证号:SCXK2007-0005,高脂高糖饲料喂养;雄性SD大鼠10只,购自第四军医大学实验动物中心,体重250~300g,普通饲料喂养。rIGF-1购自以色列prospec TechnoGene公司,PLGA由西北工业大学功能有机材料结构设计及制备技术实验室制作,大鼠骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨特异性碱性磷酸酶(bone specific alkaline phosphatase, B-ALP)及I型前胶原羧基前肽(procollagen I carboxyterminal propeptide, PICP)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国RD公司。JY92-II型超声波细胞粉碎机购自宁波天芝公司, FJ300-S数显高速分散均质机购自上海模具制造厂,扫描电子显微镜购自日本东京JEOL公司,激光共聚焦显微镜购自日本Olympus公司。

微球制备 采用W/O/W复乳溶剂挥发法制备rIGF-1 PLGA缓释微球,具体为:将10 μg rIGF-1

溶于 0.1 ml 双蒸水, 然后将 0.5 g PLGA 和 0.14 g 表面活性剂 Span80 溶于 10 ml CH_2Cl_2 组成油相; 将 40 ml 5% 聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 与 60 ml H_2O 混合生成 2% PVA 和 Tween80, 同时加入 0.1 ml Purmorphamine 溶液和 4 ml H_2O 组成水相, 再进行以下步骤: (1) 油相混合后用超声波细胞粉碎机超声分散 2 min; (2) 油相与水相混合后, 用数显高速分散均质机高速搅拌 10 min, 同时加入 100 ml 异丙醇; (3) 恒温磁力搅拌器搅拌、挥发 8 h 后, 分装在 2 个 100 ml 离心瓶中, 4 000 r/min 下离心 7 min, 可见预先有尼罗红染色的 rrIGF-1 PLGA 微球沉淀于底部, 滤去水分。将制备好的 rrIGF-1 PLGA 微球用 Co60 辐射消毒灭菌后, 分别在扫描电子显微镜和激光共聚焦显微镜下扫描, 同时采用休眠的 MG-63 细胞进行四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 证实微球持续释放 rrIGF-1 的作用^[10]。

动物模型制备及分组 将 20 只 GK 大鼠采用高脂高糖饲料喂养 3~6 个月, 测定血糖浓度 > 16.7 mmol/L 即表示建模成功, 随机分为 2 组: (1) 治疗组 ($n=10$): 给予加载包裹 rrIGF-1 PLGA 缓释微球处理; (2) 糖尿病组 ($n=10$): 给予加载包裹与 rrIGF-1 等量安慰剂的 PLGA 缓释微球处理。以 10 只未做处理的 SD 大鼠作为对照组。将大鼠用乙醚吸入麻醉后常规消毒、铺巾, 在大鼠胫骨隆突上方表面近中做一个长约 2.5 cm 纵形切口, 钝性分离肌肉组织、肌腱、骨膜, 显露膝盖下较平坦部分, 生理盐水冷却后用直径 2.2、2.8 mm 的环形齿科钻预备种植体窝, 穿透骨质有明显落空感, 然后将 3.3 mm \times 6 mm 的种植体植入种植窝, 扳手拧紧, 检查种植体方向和稳定性, 旋入愈合帽。治疗组用 200 μg rrIGF-1 PLGA 缓释微球混合血凝块植于种植窝, 加载在种植体周围; 糖尿病组用 200 μg 包裹安慰剂的 PLGA 微球作上述处理; 对照组不做处理。依次缝合骨膜、肌层、皮肤, 局部注射 6 mg/kg 硫酸庆大霉素, 术后给予 3 000 U 青霉素 G, 每日 2 次, 共 4 d。实验期间大鼠自由进食饮水, 房间温度维持在 23 $^{\circ}\text{C}$, 保持昼夜交替时间 12 h/12 h。

检测指标 术后 4、5、8 周, 在种植体周围局部采血, 具体为: 用乙醚将大鼠进行吸入麻醉后, 切开种植区皮肤, 钝性分离黏骨膜, 锐性分离种植体周围组织, 用吸管吸取血液后分层严密缝合, 加压包扎。每个标本取血清 200 μl 室温放置 1 h 后于

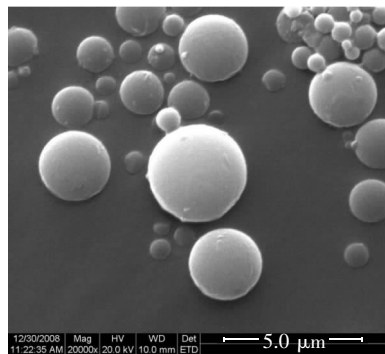
-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用^[6]。采用 ELISA 法检测血清中 OCN、B-ALP 及 PICP 浓度。

统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件, 实验数据以均数士标准差表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

微球测定结果 扫描电子显微镜下可见 w/o/w 法制备的微球形态基本为球形, 表面光滑, 质地均匀, 分散度较好 (图 1), 测得平均直径为 (1.2525 ± 0.6436) μm 。激光共聚焦显微镜下可见外层尼罗红完整包裹内层亲水性多肽 rrIGF-1 (无色), 微球边缘可见许多黑色小晕, 表明 rrIGF-1 正在缓慢释放 (图 2), 测得 PLGA 缓释微球包裹 rrIGF-1 因子的包裹率为 $(78.3 \pm 2.0)\%$ 。MTT 检测结果显示, 2 d 内 rrIGF-1 PLGA 微球体外释放的首次释放量约为总量的 55.3%, 随后 5 d 的持续释放量为 64.8%, 20 d 内 PLGA 微球释放的 rrIGF-1 量大于 85%。

各组大鼠血清 OCN 水平的变化情况 种植体植入术后 4 周, 糖尿病组和治疗组大鼠的血清 OCN 水平明显低于对照组 (P 均 < 0.05); 术后 5 周, 糖尿病组大鼠的 OCN 水平明显低于对照组和治疗组 (P 均 < 0.05), 治疗组大鼠的 OCN 水平也明显高于术后 4 周 ($P < 0.05$); 术后 8 周, 糖尿病组大鼠的 OCN 水平明显低于对照组和治疗组 (P 均 < 0.05) (表 1)。



PLGA: 聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物; rrIGF-1: 重组大鼠胰岛素样生长因子-1

PLGA: poly (lactide-CO-glycolide); rrIGF-1: recombinant rat insulin like growth factor-1

图 1 PLGA 包裹 rrIGF-1 制备出的微球扫描电子显微镜照片
Fig 1 The scanning electron micrograph of rrIGF-1 encapsulated by PLGA Microspheres

各组大鼠血清 B-ALP 水平的变化情况 种植体植入术后 4 周，糖尿病组和治疗组大鼠的血清 B-ALP 水平均明显低于对照组（ P 均 < 0.05 ）；术后 5、8 周，糖尿病组大鼠的 B-ALP 水平明显低于对照组和治疗组（ P 均 < 0.05 ）（表 2）。

各组大鼠血清 PICP 水平的变化情况 种植体植入术后 4、5、8 周，糖尿病组和治疗组大鼠的血清 PICP 水平均明显低于对照组（ P 均 < 0.05 ）；术后 5 周，对照组大鼠的 PICP 水平明显低于术后 4 周（ $P < 0.05$ ）（表 3）。

讨 论

McCracken 等^[6]报道，糖尿病患者口腔种植的成功率为 85.7% ~ 94.3%，明显低于正常患者的 95%^[4]。Mellado-Valero 等^[11]研究认为，高血糖可抑制成骨细胞分化，改变调节钙、磷代谢的甲状旁腺激素反应，还对骨基质及其组分产生有害作用，如导致胶原生成减少及胶原酶活性增加等。而骨愈合进程改变及矿化不足可导致种植体周围骨形成下降。OCN 由成骨细胞产生，其含量与新骨形成量直接相关^[12-13]。B-ALP 由成骨细胞分化的细胞产生，也是反映骨形成及矿化的指标^[14]，常常作为测量细胞因子对成骨细胞影响的手段^[15]。胶原是骨基质形成的条件，尤其 I 型胶原是早期骨形成的重要标志，而 PICP 可反映骨反应中 I 型胶原含量的变化^[16]。

Ahmad 等^[17]研究发现，GK 大鼠出生后不久即可自发轻到中度 2 型糖尿病，并长期维持疾病状态，病程类似人类 2 型糖尿病患者。故本研究采用高脂高糖饲料喂养非肥胖型 2 型糖尿病 GK 大鼠，使其发展为肥胖型 2 型糖尿病大鼠并成功造模，结果显示，种植体植入术后 4 周，糖尿病组大鼠种植体周围血清 OCN、B-ALP 及 PICP 水平显著低于对照组，表明 2 型糖尿病使种植体周围骨形成下降。术后 5 周，治疗组大鼠种植体周围血清 OCN 水平较术后 4 周显著升高，糖尿病组大鼠种植体周围血清 OCN 和 B-ALP 水平显著低于治疗组，表明早期局部治疗可使骨形成及骨基质形成增加，缓解糖尿病降低局部骨形成的情况。

本研究中，种植体植入术后 4、5、8 周，糖尿病组大鼠种植体周围血清 OCN 及 B-ALP 水平明显低于对照组，与 McCracken 等^[6]研究结果不同。后者发现植入种植体的 1 型糖尿病大鼠术后及术后 2 周血清 ALP 水平明显高于对照组，并认为这些不平衡的生化标志可能成为种植体周围骨增长及较弱骨整合之间不一致性的原因。推测造成这种差异的原因可能是，McCracken 等^[6]采用全身取血，而全身血循环改变可能遮盖了局部变化；本研究采取种植体周围取血，因此可能更准确反映局部骨代谢变化。

综上所述，本研究结果显示，2 型糖尿病可使 GK 大鼠种植体周围骨形成下降，rrIGF-1 PLGA 缓释微球局部加载可对骨形成有一定促进作用，提高初期骨愈合。

表 1 各组骨钙素变化情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, $\mu\text{g/L}$)

Table 1 Changes of osteocalcin levels in all groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, $\mu\text{g/L}$)

分组 Group	4 周 4 weeks	5 周 5 weeks	8 周 8 weeks
对照组 Control group	63.25 ± 0.95	53.42 ± 0.97	50.54 ± 1.02
糖尿病组 Diabetes group	25.23 ± 0.97 ^a	20.24 ± 0.86 ^a	16.75 ± 0.98 ^a
治疗组 Treatment group	28.35 ± 1.06 ^a	45.64 ± 0.91 ^{b,c}	40.38 ± 0.85 ^b

与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与糖尿病组比较，^b $P < 0.05$ ；与 4 周时比较，^c $P < 0.05$

^a $P < 0.05$ compared with control group; ^b $P < 0.05$ compared with diabetic group; ^c $P < 0.05$ compared with the 4-week levels

表 2 各组骨特异性碱性磷酸酶变化情况

($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, $\mu\text{g/L}$)

Table 2 Changes of bone-specific alkaline phosphatase levels in all groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, $\mu\text{g/L}$)

分组 Group	4 周 4 weeks	5 周 5 weeks	8 周 8 weeks
对照组 Control group	8.35 ± 0.97	7.24 ± 1.03	7.06 ± 0.82
糖尿病组 Diabetes group	4.25 ± 0.58 ^a	2.17 ± 0.66 ^a	1.98 ± 0.57 ^a
治疗组 Treatment group	5.03 ± 0.81 ^a	6.29 ± 0.45 ^b	6.12 ± 0.35 ^b

与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与糖尿病组比较，^b $P < 0.05$

^a $P < 0.05$ compared with control group; ^b $P < 0.05$ compared with diabetic group

表 3 各组 I 型前胶原羧基前肽变化情况

($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, $\mu\text{g/L}$)

Table 3 Changes of procollagen I carboxyterminal propeptide levels in all groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, $\mu\text{g/L}$)

分组 Group	4 周 4 weeks	5 周 5 weeks	8 周 8 weeks
对照组 Control group	24.29 ± 0.77	18.28 ± 1.85 ^c	16.35 ± 0.84
糖尿病组 Diabetes group	5.35 ± 0.87 ^a	4.29 ± 0.78 ^a	4.21 ± 0.74 ^a
治疗组 Treatment group	5.21 ± 0.72 ^a	10.33 ± 0.92 ^a	10.08 ± 0.96 ^a

与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与糖尿病组比较，^b $P < 0.05$ ；与 4 周时比较，^c $P < 0.05$

^a $P < 0.05$ compared with control group; ^b $P < 0.05$ compared with diabetes group; ^c $P < 0.05$ compared with 4-week levels

(本文图2见封三)

参 考 文 献

- [1] Casap N, Nimri S, Ziv E, *et al.* Type 2 diabetes has minimal effect on osseointegration of titanium implants in *Psammomys obesus* [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2008, 19(5):458-464.
- [2] Olson JW, Shernoff AF, Tarlow JL, *et al.* Dental endosseous implant assessments in a type 2 diabetic population: a prospective study [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2000, 15(6):811-818.
- [3] Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, *et al.* Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1998, 13(5):620-629.
- [4] Beikler T, Flemmig TF. Implants in the medically compromised patient [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2003, 14(4):305-316.
- [5] Dowell S, Oates TW, Robinson M. Implant success in people with type 2 diabetes mellitus with varying glycemic control: a pilot study [J]. *J Am Dent Assoc*, 2007, 138(3):355-361.
- [6] McCracken M, Lemons JE, Rahemtulla F, *et al.* Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2000, 15(3):345-354.
- [7] Zofková I. Pathophysiological and clinical importance of insulin-like growth factor-I with respect to bone metabolism [J]. *Physiol Res*, 2003, 52(6):657-679.
- [8] Ottoni CE, Chopard RP. Histomorphometric evaluation of new bone formation in diabetic rats submitted to insertion of temporary implants [J]. *Braz Dent J*, 2004, 15(2):87-92.
- [9] Lam XM, Duenas ET, Daugherty AL, *et al.* Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes [J]. *J Control Release*, 2000, 67(2-3):281-292.
- [10] Lopaczynski W, Harris S, Nissley P. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) dependent phosphorylation of the IGF-I receptor in MG-63 cells [J]. *Regul Pept*, 1993, 48(1-2):207-216.
- [11] Mellado-Valero A, Ferrer García JC, Herrera Ballester A, *et al.* Effects of diabetes on the osseointegration of dental implants [J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2007, 12(1):E38-E43.
- [12] He H, Liu R, Desta T, Leone C, *et al.* Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(1):447-452.
- [13] Takeshita N, Yoshino T, Mutoh S, *et al.* Possible involvement of vitamin D3-deficiency and relatively enhanced bone resorption in the development of bone loss in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Life Sci*, 1994, 55(4):291-299.
- [14] Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, *et al.* The role of implant surface characteristics in the healing of bone [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1996, 7(4):329-345.
- [15] Yoshikawa T, Ohgushi H, Akahane M, *et al.* Analysis of gene expression in osteogenic cultured marrow/hydroxyapatite construct implanted at ectopic sites: a comparison with the osteogenic ability of cancellous bone [J]. *J Biomed Mater Res*, 1998, 41(4):568-573.
- [16] Rotteveel J, Schoute E, Delemarre-van de Waal HA. Serum procollagen I carboxyterminal propeptide (PICP) levels through puberty: relation to height velocity and serum hormone levels [J]. *Acta Paediatr*, 1997, 86(2):143-147.
- [17] Ahmad T, Ohlsson C, Säaf M, *et al.* Skeletal changes in type-2 diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *J Endocrinol*, 2003, 178(1):111-116.

(收稿日期: 2009-12-30)