

# RGD 多肽修饰多孔钽对 MG63 成骨样细胞-钽界面形态及成骨因子表达的影响

甘洪全<sup>1</sup>, 王 茜<sup>2</sup>, 张 辉<sup>3</sup>, 刘 鑫<sup>4</sup>, 邓华民<sup>1</sup>, 宋会平<sup>1</sup>, 王志强<sup>1</sup>, 李琪佳<sup>5△</sup>

(1. 华北理工大学附属医院骨科, 2. 华北理工大学基础医学院人体解剖系, 3. 唐山市第二医院关节科, 4. 开滦总医院检验科, 5. 华北理工大学医学实验中心, 河北唐山 063000)

**[摘 要]** **目的:**通过观察精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp polypeptides, RGD)多肽表面修饰多孔钽对 MG63 成骨样细胞-多孔钽结合界面形态变化以及相关成骨因子表达的影响, 评价 RGD 修饰多孔钽对钽-骨界面骨整合所起的重要作用。**方法:**直径 10 mm、厚 3 mm 的多孔钽片通过表面吸附法分别将 3 种质量浓度的 RGD 溶液(1 g/L、5 g/L、10 g/L)吸附于多孔钽表面。取第 2 代 MG63 成骨样细胞与钽-RGD 复合培养成为成骨细胞/钽/RGD 复合物, 分为 4 组: 未修饰 Ta 组(对照组), 1 g/L 成骨细胞/Ta/RGD 组, 5 g/L 成骨细胞/Ta/RGD 组及 10 g/L 成骨细胞/Ta/RGD 组。扫描电子显微镜观察多孔钽及复合物外观特征、成骨细胞与 Ta/RGD 界面的相互作用, 测定成骨细胞在 Ta/RGD 材料上的黏附率, 免疫细胞化学染色检测各组成骨蛋白钙蛋白(osteocalcin, OC)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)及丝状肌动蛋白(filamentous actin, F-actin)的表达。**结果:**扫描电子显微镜观察, 成骨细胞在 RGD 修饰后多孔钽界面铺展并向孔隙内伸延, 分泌细胞外基质覆盖于多孔钽微孔内及界面。24 h、48 h 及 72 h 各组成骨细胞在 Ta/RGD 材料界面的黏附率均高于未修饰组(对照组), 其中 5 g/L 成骨细胞/Ta/RGD 组在 48 h 的黏附力最强 [(68.07 ± 3.80) vs. (23.40 ± 4.39),  $P < 0.05$ ]。免疫细胞化学染色发现, 成骨细胞与 Ta/RGD 复合培养 48 h 成骨细胞 OC、FN 及 F-actin 的阳性表达均高于未修饰组, 其中 5 g/L 成骨细胞/Ta/RGD 组高于 10 g/L 组及 1 g/L 组 [OC: (18.08 ± 0.08) vs. (15.14 ± 0.19),  $P < 0.05$ ; (18.08 ± 0.08) vs. (14.04 ± 0.61),  $P < 0.05$ 。FN: (24.60 ± 0.98) vs. (15.90 ± 0.53),  $P < 0.05$ ; (24.60 ± 0.98) vs. (15.30 ± 0.42),  $P < 0.05$ 。F-actin: (29.20 ± 1.31) vs. (24.50 ± 1.51),  $P < 0.05$ ; (29.20 ± 1.31) vs. (16.92 ± 0.40),  $P < 0.05$ ]。细胞骨架蛋白 F-actin 呈丝状分布于胞质, 沿细胞胞突纵向排列, 其蛋白表达高于 OC 及 FN。**结论:**RGD 多肽有利于成骨细胞在多孔钽界面黏附、铺展及细胞骨架蛋白的重组, 从而促进成骨细胞-多孔钽界面改建及骨整合。

**[关键词]** RGD 多肽; 钽; 细胞黏附; 成骨细胞

**[中图分类号]** R318.08 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2018)01-0176-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-167X.2018.01.030

## Effects of RGD peptides-grafted porous tantalum on morphological change of MG63 osteoblasts-tantalum conjunctive interface and expression of osteogenesis factors

GAN Hong-quan<sup>1</sup>, WANG Qian<sup>2</sup>, ZHANG Hui<sup>3</sup>, LIU Xin<sup>4</sup>, DENG Hua-min<sup>1</sup>, SONG Hui-ping<sup>1</sup>, WANG Zhi-qiang<sup>1</sup>, LI Qi-jia<sup>5△</sup>

(1. Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology; 2. Department of Anatomy, Basic Medical College, North China University of Science and Technology; 3. Department of Joint Surgery, the Second Hospital of Tangshan; 4. Department of Clinical Laboratory, Kailuan General Hospital; 5. Experimental Center, North China University of Science and Technology; Tangshan 063000, Hebei, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of the Arg-Gly-Asp polypeptides (RGD) peptides-modified porous tantalum surface on osteoblasts morphology and expressions of osteogenesis factors, and to evaluate RGD peptides promotes junctura ossium of tantalum-bone interface *in vivo*. **Methods:** RGD peptides of different concentrations (1 g/L, 5 g/L, and 10 g/L) were loaded to porous tantalum slices with a diameter of 10 mm and a thickness of 3 mm by physical absorption. The 3rd generation of MG63 cells were co-cultured with tantalum and divided into 4 groups: Ta-cells (control) group, 1 g/L cells/Ta/RGD group, 5 g/L cells/Ta/RGD group, and 10 g/L cells/Ta/RGD group. Porous tantalum compo-

**基金项目:**“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAE06B03)、河北省科技支撑项目(16277776D)、河北省卫生和计划生育委员会 2015 年临床医学优秀人才培养项目(361036)、河北省医学科学研究重点课题计划(20160225)资助 Supported by the National Ministry of Science and Technology Support Project for “12<sup>th</sup> Five-Year Plan” (2012BAE06B03), Science and Technology Support Project of Hebei Province (16277776D), Health and Family Planning Commission Clinical Medical Project of Hebei Province (361036), Key Program for Medical Science Project of Hebei Province (20160225)

△ Corresponding author's e-mail, qjl1222de@163.com

网络出版时间:2017-12-19 16:03:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20171219.1603.030.html>

sites and osteoblasts-tantalum interface were observed by scanning electron microscopy. The adhesion rate of osteoblasts was detected and immunocytochemistry was used to detect the expressions of filamentous actin (F-actin), osteocalcin (OC) and fibronectin (FN). **Results:** The scanning electron microscope (SEM) revealed that osteoblasts distributed on the surface of porous tantalum and secreted extracellular matrix on outside and inner of micro-pores. The osteoblasts adhesion rate on porous tantalum modified with RGD was higher than that in the unmodified porous tantalum at the end of 24, 48, and 72 hours. The best adhesion effect was got in 5 g/L cells-Ta/RGD group at hour 48 [(68.07 ± 3.80) vs. (23.40 ± 4.39),  $P < 0.05$ ]. The results of immunocytochemistry showed that the expressions intensity of F-actin, OC and FN in osteoblasts on porous tantalum modified groups with RGD were stronger than that in the unmodified groups, and the expressions of 5 g/L cells-Ta/RGD group were significantly higher than those in the 10 g/L group and 1 g/L group [OC: (18.08 ± 0.08) vs. (15.14 ± 0.19),  $P < 0.05$ ; (18.08 ± 0.08) vs. (14.04 ± 0.61),  $P < 0.05$ . FN: (24.60 ± 0.98) vs. (15.90 ± 0.53),  $P < 0.05$ ; (24.60 ± 0.98) vs. (15.30 ± 0.42),  $P < 0.05$ . F-actin: (29.20 ± 1.31) vs. (24.50 ± 1.51),  $P < 0.05$ ; (29.20 ± 1.31) vs. (16.92 ± 0.40),  $P < 0.05$ ]. Correspondingly F-actin in osteoblasts was showed in longitudinal arrangement, and the expressions intensity was stronger than those OC and FN. **Conclusion:** The RGD peptides is beneficial to enhance adhesion of osteoblast, spreading and reorganization of cytoskeleton on porous tantalum surface and improve the interface morphology, further promoting osteoblasts-tantalum conjunctive interface osseointegration.

**KEY WORDS** Arg-Gly-Asp polypeptides peptides; Tantalum; Cell adhesion; Osteoblasts

将金属材料植入骨组织以代替修复骨损伤及缺损,这就要求植入材料与其周围的宿主骨能达到良好紧密的结合。金属材料与骨组织直接接触、长入且融合为一体,是理想的界面形式<sup>[1-2]</sup>,而植入材料之所以能成功,在于植入材料与人体骨之间早期的相互作用,即形成骨性结合。在影响金属材料与骨界面形成的诸多因素中,材料表面的理化特性及材料的表面改性是其中重要因素<sup>[3]</sup>。

多孔钽是近年来出现的较为理想的医用植入金属材料,它的立体三维构型及多孔结构与人松质骨极为相似,同时具有良好的细胞亲和性、生物相容性及骨传导能力,在植入时可使其周围细胞快速黏附并向孔隙内生长,最终由机械固定变为生物固定<sup>[4-6]</sup>。

含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp polypeptides, RGD)片段的多肽是整合素与配体相互结合的细胞识别作用位点,在细胞外基质糖蛋白、胶原蛋白、纤维蛋白原、骨桥蛋白中介导细胞与支架材料黏附、分化并可加强细胞外基质蛋白之间的相互作用,是目前作为细胞黏附序列最有效且应用最广的多肽性物质。RGD多肽可修饰支架材料植入体内,增加细胞黏附,促进细胞增殖而并不会影响机体组织的酶活性和代谢<sup>[7-8]</sup>。

本研究应用 RGD 多肽对国产多孔钽材料表面进行修饰及改性,同时与 MG63 成骨样细胞进行复合培养,倒置相差显微镜及扫描电子显微镜观察不同时间点成骨样细胞形态变化及细胞-钽结合界面相互作用并计算细胞黏附率。免疫细胞化学检测骨钙蛋白(osteocalcin, OC)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、丝状肌动蛋白(filamentous actin, F-actin)

在多孔钽修饰前后的表达水平,从而评价 RGD 多肽在材料表面修饰对成骨细胞-钽界面骨整合能力及生物学性能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂、细胞株及仪器

本研究使用的主要试剂、细胞株及仪器有:多孔钽材料(重庆润泽医疗器械有限公司),MG63 成骨样细胞(中国医学科学院基础医学研究所),环 RGD 多肽(上海淘普生化有限公司),DMEM、胰蛋白酶、FBS(Gibco 公司,美国),兔抗人 F-actin、OC、FN 多克隆抗体(Abgent 公司,美国),PV-9000 两步法免疫细胞化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),倒置相差显微镜(Nikon 公司,日本),S-4800 扫描电子显微镜(电子株式会社,日本),Bio-Rad 680 酶标仪(Bio-Rad 公司,美国),3K30 高速冷冻离心机(Sigma 公司,德国)。

### 1.2 MG63 成骨样细胞形态及鉴定

取 MG63 成骨样细胞,复苏并加入含 10% (体积分数)胎牛血清、含双抗各 100 U/mL 的 DMEM 培养液,37 °C、5% (体积分数)CO<sub>2</sub> 及饱和湿度孵育箱培养。每日换液且在倒置相差显微镜下观察细胞生长状态及形态特点。待细胞生长融合至 80% ~ 90% 时传代。取生长良好的第 2 代细胞接种于 24 孔板内先进行碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、I 型胶原免疫细胞化学染色鉴定成骨细胞。

### 1.3 RGD 多肽修饰多孔钽制备 Ta/RGD 界面及实验分组

直径 10 mm、高 3 mm 的扁圆柱形多孔钽材料用去离子水超声清洗,高压蒸汽灭菌后干燥。以物

理吸附法将多孔钽分别置于 3 种质量浓度(1 g/L、5 g/L、10 g/L)的 50 mL RGD 多肽溶液中充分浸泡,使钽孔隙内充分浸入 RGD 溶液,取出后室温充分干燥,紫外线照射备用。

实验分为 4 组:未修饰 Ta 组(对照组),1 g/L、5 g/L、10 g/L 成骨细胞/Ta/RGD 组。

#### 1.4 制备成骨细胞/Ta/RGD 复合物

将预先修饰处理好的各组及对照组多孔钽置入 24 孔板中,每孔钽加入 200  $\mu$ L DMEM 培养液于培养箱内预湿过夜,取生长状态良好的第 2 代成骨细胞,将调整细胞含量为  $1 \times 10^6$ /mL 的单细胞悬液 200  $\mu$ L 接种于多孔钽表面及内部,并于支架周边缓慢加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液使其没过多孔钽,培养箱内培养,每日更换培养液,于 1、2、3 d 取出用于实验。

#### 1.5 扫描电子显微镜观察成骨细胞形态及其与 Ta/RGD 界面的相互作用

取修饰后各组成骨细胞/Ta/RGD 复合物,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗后,25 g/L 戊二醛溶液固定 4 h,梯度乙醇溶液脱水,临界点干燥、喷金。扫描电子显微镜观察比较各组不同时间成骨细胞在 Ta/RGD 材料上的形态变化及相互作用。

#### 1.6 成骨细胞在 Ta/RGD 材料上黏附率的测定

将各组 Ta/RGD 置于 24 孔板,每孔支架滴加 200  $\mu$ L DMEM 培养液,培养箱内预湿过夜,吸取细胞含量为  $1 \times 10^6$ /mL 的成骨细胞悬液 200  $\mu$ L 接种到各组 Ta/RGD 表面及内部,然后再加 DMEM 培养液使其没过多孔钽,继续培养并于 1、2、3、4 d 分别取出各组支架材料,PBS 冲洗,转移至新 24 孔板内,每孔加 500  $\mu$ L 的 0.25% (体积分数)胰蛋白酶消

化,计数板计数取平均值,计算细胞黏附率(黏附率 = 黏附细胞数/接种细胞数  $\times 100\%$ )。

#### 1.7 免疫细胞化学染色检测各组成骨蛋白 OC、FN 及 F-actin 表达

分别取培养第 2 天的各组 Ta/RGD/成骨细胞复合物,0.25% 胰蛋白酶消化,转移至 6 孔板内的盖玻片上做细胞爬片。按照王茜等<sup>[9]</sup>和张辉等<sup>[10]</sup>的研究方法进行免疫细胞化学染色,检测各组成骨蛋白 OC、FN、F-actin 的表达。

图像分析及结果判定:各组选取 3 张切片在高倍镜( $\times 200$ )下选取 5 个(四周及中央)视野计数,取其均值。阳性细胞采用统计分析软件 Image Pro-Puls 进行统计分析,以积分光密度(integrated optical density, IOD)值作为表达量。

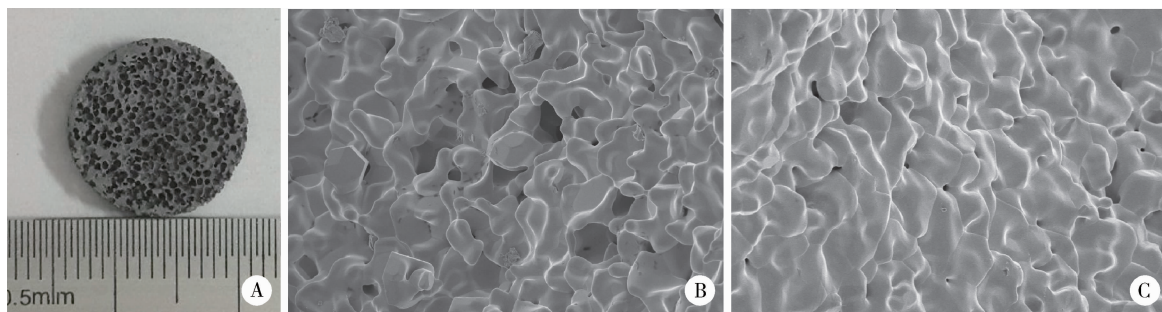
#### 1.8 统计学分析

结果数据采用 SPSS 20.0 统计软件分析处理,统计量以均数  $\pm$  标准差表示,对各组数据采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 SNK 检验(Student-Newman-Keuls)进行组间比较, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RGD 多肽修饰多孔钽前后界面物理特征

多孔钽材料断面为 10 mm  $\times$  3 mm 扁圆形、呈灰黑多孔状,孔约为针孔大小。在 RGD 多肽修饰前,扫描电子显微镜下可见钽表面微孔状结构相互连通并向深部延伸,小孔直径约 200 ~ 700  $\mu$ m,间隔均匀一致。经不同浓度 RGD 多肽修饰后,多孔钽界面为灰色,可见一层均质状涂层覆盖、包裹,使小孔状结构稍变浅,但孔状结构仍清晰(图 1)。



A, appearance of porous tantalum; B, observation of porous tantalum (SEM  $\times 1000$ ); C, RGD peptides-modified porous tantalum (SEM  $\times 1000$ ). SEM, scanning electron microscope.

图 1 多孔钽结构

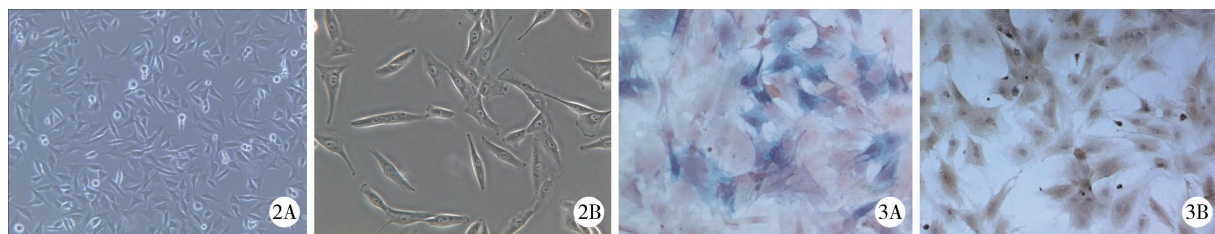
Figure 1 Structure of porous tantalum

### 2.2 倒置相差显微镜及扫描电子显微镜观察成骨细胞在 Ta/RGD 表面形态变化及钽-细胞间相互作用

倒置相差显微镜观察:MG63 原代成骨样细胞在与 Ta/RGD 复合之前其形态多为小圆形状,大小

一致,部分悬浮,10 h 后开始贴壁,24 h 开始体积增大,传代后体积开始增大,形状呈梭形及多角形,胞

浆丰富(图 2A、B),ALP、I 型胶原免疫细胞化学染色阳性(图 3A、B)。



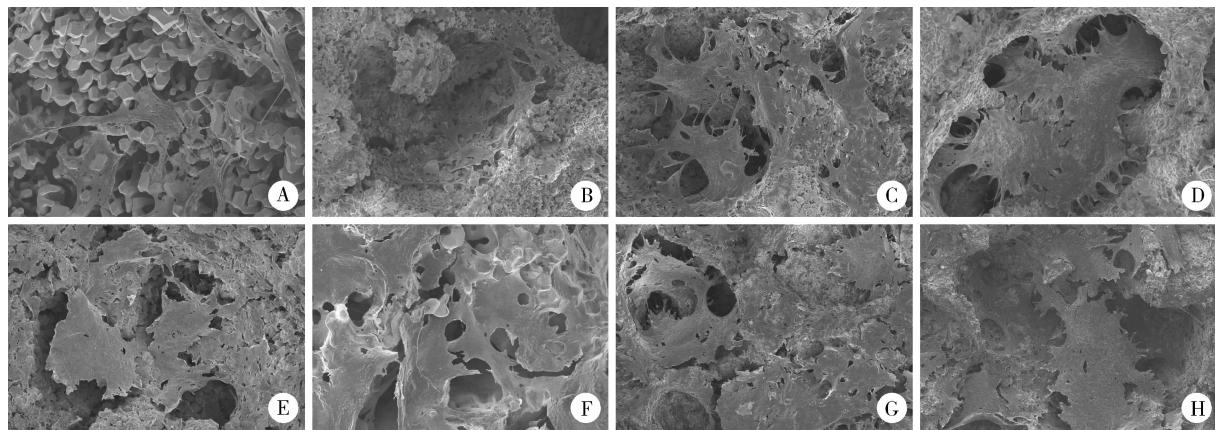
2A, primary cells at 24 hours (inverted microscope  $\times 100$ ); 2B, the 2nd-generation cells (inverted microscope  $\times 200$ ). 3A, alkaline phosphatase staining positive of MG63 cells ( $\times 200$ ); 3B, collagen type I of osteoblasts immunocytochemistry staining positive ( $\times 200$ ).

图 2 MG63 成骨样细胞 图 3 MG63 成骨细胞的鉴定

Figure 2 MG63 osteoblasts Figure 3 MG63 osteoblasts identified

扫描电子显微镜观察:在 RGD 修饰多孔钽之前成骨细胞在多孔钽表面生长,数量少且细胞伪足细、胞体小(图 4A、B),当细胞与 Ta/RGD 复合后胞体开始伸出伪足并随时间的延长逐渐伸长。细胞伪足 24 h 后向四周伸展但并无方向性,细胞与多孔钽界面结合紧密,随着复合培养时间延长,细胞出现不规则形状,伪足进一步伸展并附于多孔钽孔隙边缘,与钽片

表面结合紧密,或平铺于孔隙表面或深入孔洞内部(图 4C、D)。48 h 时各组细胞进一步增大,扁平、多角形,胞突伸长并跨越钽间隙及孔洞(图 4E、F)。72 h 上述各组细胞与多孔钽表面界面贴附紧密,胞体以扁平状为主,覆盖大部分钽表面,相邻细胞相互融合,细胞伪足突起增多,除深入相邻较大空洞,上下联通的细小孔洞也已穿越,细胞之间突起相互连接(图 4G、H)。



A and B, tantalum/osteoblasts composites (A, SEM  $\times 1000$ ; B, SEM  $\times 200$ ); C and D, RGD/tantalum/osteoblasts composites at 24 hours (C, SEM  $\times 200$ ; D, SEM  $\times 180$ ); E and F, RGD/tantalum/osteoblasts composites at 48 hours (E, SEM  $\times 200$ ; F, SEM  $\times 800$ ); G and H, RGD/tantalum/osteoblasts composites at 72 hours (G, SEM  $\times 100$ ; H, SEM  $\times 100$ ). SEM, scanning electron microscope; RGD, Arg-Gly-Asp polypeptides.

图 4 RGD 多肽修饰多孔钽与成骨细胞复合培养的扫描电子显微镜观察

Figure 4 SEM observation of RGD/tantalum/osteoblasts

### 2.3 不同时间成骨细胞在 Ta/RGD 材料界面生长的黏附率

成骨细胞接种于修饰前后的 Ta/RGD 材料,检测各组 Ta/RGD/成骨细胞复合后 24 h、48 h 及 72 h 的细胞黏附率,结果 RGD 多肽修饰多孔钽各组的黏附率均高于未修饰组(对照组, $P < 0.05$ ),组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 RGD 多肽修饰多孔钽可明显促进成骨细胞在多孔钽界面的黏附生长,其中,5 g/L 成骨细胞/Ta/RGD 组及 10 g/L 成骨细胞/Ta/RGD 组的界面黏附能力均高于 1 g/L 组,但以 5 g/L 组的黏附率最高。同时,各组细胞的黏附率在 24 h、48 h 及 72 h

之间比较均不同,以 48 h 时黏附率达到最高,各时间点之间的比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1)。

### 2.4 免疫细胞化学染色检测各组成骨细胞与 Ta/RGD 复合培养成骨蛋白 OC、FN 及细胞骨架蛋白 F-actin 的表达

免疫组织化学染色观察多孔钽经 RGD 修饰前后成骨细胞与其复合培养 48 h OC、FN 及 F-actin 蛋白的表达。免疫细胞化学图像分析结果显示,各组成骨细胞 OC、FN 及 F-actin 的阳性物质均位于胞质,呈棕黄色。修饰后 3 种蛋白表达强度均高于修饰前(图 5A ~ C)。F-actin 表达的细胞骨架蛋白呈

丝状分布于胞质,同细胞突起方向一致。1 g/L、5 g/L及 10 g/L 成骨细胞/Ta/RGD 组与未修饰 Ta 组的 IOD 值比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );

组间比较,5 g/L成骨细胞/Ta/RGD 组高于 10 g/L 及 1 g/L 组 ( $P < 0.05$ ,图 5D ~ F);同时,F-actin 的表达高于 OC、FN ( $P < 0.05$ ),具体见表 2。

表 1 成骨细胞在 Ta/RGD 复合材料界面生长的黏附率( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 The adhesion rate of osteoblasts attached to RGD peptides-modified porous tantalum ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Groups	Adhesion rate/%			F	P
	24 h	48 h	72 h		
Ta-cell (control)	9.87 ± 1.51	23.40 ± 4.39	12.27 ± 0.85	8.33	<0.05
1 g/L cells/Ta/RGD	14.28 ± 2.36 *	44.47 ± 3.99 *	22.93 ± 1.51 *	8.93	<0.05
5 g/L cells/Ta/RGD	41.00 ± 4.80 *▲	68.07 ± 3.80 *▲	52.38 ± 2.22 *▲	78.39	<0.05
10 g/L cells/Ta/RGD	29.40 ± 4.10 *▲#	53.77 ± 5.59 *▲#	40.35 ± 3.49 *▲#	44.29	<0.05
F	10.24	11.03	10.06		
P	<0.05	<0.05	<0.05		

\*  $P < 0.05$ , compared with the control group; ▲  $P < 0.05$ , compared with the 1 g/L cells/Ta/RGD group; #  $P < 0.05$ , compared with the 5 g/L cells/Ta/RGD group.

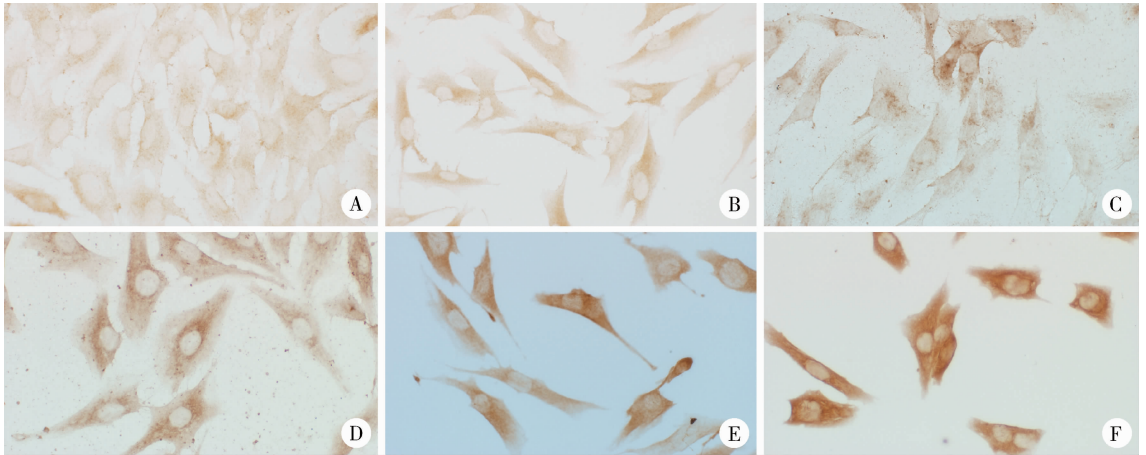


Figure 5 Immunocytochemical staining of RGD/tantalum/osteoblasts composites at 48 hours. A, unmodify OC ( $\times 200$ ); B, unmodify FN ( $\times 200$ ); C, unmodify F-actin ( $\times 200$ ); D, OC in group 5 g/L cells/Ta/RGD ( $\times 200$ ); E, FN in group 5 g/L cells/Ta/RGD ( $\times 200$ ); F, F-actin in group 5 g/L cells/Ta/RGD ( $\times 200$ ). OC, osteocalcin; FN, fibronectin; F-actin, filamentous actin.

图 5 成骨细胞与 Ta/RGD 复合培养 48 h 各组免疫细胞化学染色结果

Figure 5 Immunocytochemical staining of RGD/tantalum/osteoblasts composites at 48 hours

表 2 免疫细胞化学检测成骨细胞与 Ta/RGD 复合培养 48 h OC、FN 及 F-actin 的表达 (IOD,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Expressions of OC, FN, and F-actin by immunocytochemical staining at 48 hours (IOD,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Groups	OC	FN	F-actin	F	P
Ta-cell (control)	12.73 ± 0.48	13.08 ± 0.36	15.13 ± 0.12	40.68	<0.05
1 g/L cells/Ta/RGD	14.04 ± 0.61 *	15.30 ± 0.42 *	16.92 ± 0.40 *	26.17	<0.05
5 g/L cells/Ta/RGD	18.08 ± 0.08 *▲	24.60 ± 0.98 *▲	29.20 ± 1.31 *▲	104.25	<0.05
10 g/L cells/Ta/RGD	15.14 ± 0.19 *▲#	15.90 ± 0.53 *▲#	24.50 ± 1.51 *▲#	93.75	<0.05
F	96.15	198.48	124.27		
P	<0.05	<0.05	<0.05		

\*  $P < 0.05$ , compared with the control group; ▲  $P < 0.05$ , compared with the 1 g/L cells/Ta/RGD group; #  $P < 0.05$ , compared with the 5 g/L cells/Ta/RGD group. IOD, integrated optical density; OC, osteocalcin; FN, fibronectin; F-actin, filamentous actin.

### 3 讨论

当金属骨移植材料植入骨内修复骨缺损时,骨

内植入成功的首要条件是形成预期的植入材料-骨结合界面。影响界面形成的诸多因素中,金属材料表面的物理特性是重要因素之一<sup>[11-12]</sup>。一些学者

认为,植入材料表面的粗糙程度以及表面修饰后可与骨结合更紧密,有助于骨结合界面的形成,其机制是植入材料与骨界面之间的微观结构发生了改建,此种改建是一个动态变化过程,当界面的机械负荷(植入材料)增加,将力学刺激信号传导给效应细胞(成骨细胞),诱发了一系列相应的生物学效应以完成成骨过程,首先是材料-骨界面活跃的成骨细胞分泌细胞外基质蛋白(如 OC、FN、I 型胶原、骨桥蛋白、骨唾液蛋白等)参与成骨的信号传导,其次是激活了转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)、胰岛素样生长因子(insulin like growth factor, IGF)等参与新生骨的增殖和分化<sup>[13-15]</sup>。

RGD 多肽是精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 3 个氨基酸构成的短肽复合体,存在于纤连蛋白、骨桥蛋白、骨涎蛋白等细胞外基质蛋白中,也是细胞外基质中的组成成分,可作为细胞膜整合素受体与细胞外配体结合的识别位点,当与细胞表面整合素蛋白结合时,可促进细胞与细胞间黏附<sup>[16-17]</sup>。经过外源性 RGD 多肽表面处理后的植入材料既保留了原有的理化性能及生物相容性,同时又赋予了新的表面活性,能够更好地促进细胞的黏附,与周围组织发生牢固而持久的结合。当材料表面 RGD 与细胞直接接触后使界面没有其他成分介入,提高了材料-细胞界面结合的成功率。RGD 按其结构特点分为线性肽和环状肽,大多数线性 RGD 肽在体内半衰期短,对整合素受体亲和力低,容易被蛋白酶降解,环形 RGD 肽具有更高的受体结合特异性,与整合素的结合强度是线形 RGD 肽的 100 倍。将环 RGD 吸附多孔钽修饰其表面,能明显促进成骨细胞增殖、黏附和铺展。但无论何种修饰物与植入材料的结合量,目前对此均无精确、可靠的测量及计算方法。有学者通过粗糙度测试仪测得涂层的厚度,间接推测涂层材料的结合量<sup>[18-19]</sup>。

本研究将环 RGD 肽处理多孔钽材料表面,在其表面形成致密膜状结构,呈多孔状粗糙结构,进一步增加了 RGD 与多孔钽接触面积,其后再将 MG63 成骨样细胞与经环 RGD 多肽修饰后的多孔钽复合培养,观察修饰前后钽-骨界面形成的微观形态变化及细胞黏附率,结果显示,经不同浓度 RGD 多肽修饰后多孔钽表面可见覆盖均质层状涂层结构,小孔稍变浅,但相互连通的孔状结构仍清晰。成骨细胞在与 Ta/RGD 复合之前其形态从小圆形状逐渐贴壁,体积增大,形状为多角形或梭形,当与 Ta/RGD 复合后胞体进一步增大,细胞伪足向四周伸展,与多孔钽

界面结合紧密,随着 RGD 修饰浓度的增加及 Ta/RGD/成骨细胞复合时间的延长,细胞伪足进一步伸展并附于多孔钽孔隙边缘,与钽表面结合紧密,或平铺于孔隙表面或深入孔洞内部,胞突跨越钽间隙,胞体覆盖大部分钽表面,相邻细胞相互融合。

植入材料表面的特性可直接影响细胞的黏附和细胞的分化乃至组织的愈合。由细胞表面整合素受体调节的细胞与植入材料的黏附是一个复杂的过程,细胞在材料表面的初期黏附决定了细胞其后的铺展、增殖和分化。RGD 修饰多孔钽对成骨细胞的黏附具有促进作用。当细胞一旦接触到 RGD 修饰后的钽表面时,成骨细胞膜上的整合素受体即可识别材料表面的 RGD 短肽序列,从而加速了细胞的黏附过程,而细胞铺展、延伸及体积增大则发生在细胞黏附之后<sup>[20]</sup>。

本研究采用的多孔钽材料是我国具有自主知识产权的骨移植金属材料,其粗糙的表面及内部丰富的多孔状结构形成了良好的材料-成骨细胞接触界面,十分有益于细胞的吸附。本研究各组 Ta/RGD/成骨细胞复合后 24 h、48 h 及 72 h 细胞黏附率均高于未修饰组,但以 5 g/L 成骨细胞/Ta/RGD 组在 48 h 时的黏附率最高,说明此种条件下 RGD 多肽在体外通过改变多孔钽表面形貌,增加其粗糙度进而增强了钽-成骨细胞界面黏附力,使细胞充分伸展,相邻细胞突起融合、相互攀附,细胞生长及生物学行为能更好的体现,同时,植入体内后也可增强钽-骨界面的机械锁合作用,促进诱导骨整合作用。

本研究还通过免疫细胞化学方法检测成骨细胞与钽界面相互作用后骨架丝状肌动蛋白 F-actin、成骨相关蛋白 OC、FN 的表达模式,探讨成骨细胞-钽界面相互作用后成骨分化过程中的分子机制,结果发现,成骨细胞与 Ta/RGD 复合培养后 48 h,5 g/L RGD 条件下,细胞黏附率达到最高时,F-actin、OC、FN 蛋白均呈阳性表达,其中 F-actin 的表达最强,呈丝状分布于胞质,并同细胞长轴平行一致。

细胞骨架是细胞内呈细丝纤维状结构的蛋白质成分,通过膜蛋白感受细胞外基质变化从而激活胞内信使,传递细胞内外信息,在基因及蛋白水平引导相应基因表达、蛋白合成、细胞增殖、形态改变以及细胞运动<sup>[21]</sup>。微丝蛋白 actin 是细胞骨架的一部分,其结构与膜性蛋白脂质结构(细胞膜及核膜)相连接,参与维持细胞形态、分裂、细胞内物质转运及信号转导功能,是细胞生长重要的内部环境基础。细胞内 actin 包括聚合态(F-actin)和游离态(G-actin)。正常时细胞内两种 actin 处于动态平衡状态,

当受到外界刺激后,细胞内游离 G-actin 自身旋转,骨架结构彼此结合、重排成为螺旋状微丝,即成为 F-actin。细胞骨架与细胞的功能关系密切<sup>[22-23]</sup>,成骨细胞在成骨分化过程中胞体细长的胞突与相邻细胞胞突通过细胞之间的缝隙连接融合成一体来感受骨形成中外界力学变化,此时 actin 结构发生重排而成为 F-actin,介导了骨生成及骨重建。

FN 同 OC 一样是由成骨细胞合成及分泌,对成骨细胞黏附、增殖及 I 型胶原表达起到重要作用,同时还具有多种生物活性,如促进细胞贴壁功能及细胞代谢<sup>[24]</sup>。

本研究结果表明成骨细胞与 Ta/RGD 复合培养后,当细胞黏附移植材料的过程一旦开始,即出现细胞肌动蛋白 F-actin 表达增强,使得细胞骨架发生了改变及重组,将信息传递到细胞内,调控成骨基因的表达,从而行使成骨功能。同时,我们认为成骨细胞-钽界面的相互作用,在力学负荷调节的作用下 F-actin 重组也促进了成骨细胞形态变化,从而促进了成骨蛋白 OC、FN 的表达,骨基质矿化速度加速,细胞增殖、代谢加速及 I 型胶原表达增强。

综上,本研究将生物活性多肽 RGD 与多孔钽复合可以促进成骨细胞对多孔钽等生物材料的黏附,使成骨细胞变形、延展,从而促进多孔钽-骨界面骨整合作用,本研究前期的实验证实了多孔钽材料动物骨内植入具有良好的生物相容性,可促进宿主骨长入内部孔隙结构,促进骨组织和小血管内生性生长,使材料与宿主之间产生稳定的连接及骨整合。

## 参考文献

[ 1 ] Vestermark MT. Strontium in the bone-implant interface [J]. *Dan Med Bull*, 2011, 58(5): B4286.

[ 2 ] Cunha A, Renz RP, Blando E, et al. Osseointegration of atmospheric plasma-sprayed titanium implants: Influence of the native oxide layer [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102(1): 30 - 36.

[ 3 ] Xu JL, Zhong ZC, Yu DZ, et al. Effect of micro-arc oxidation surface modification on the properties of the NiTi shape memory alloy [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2012, 23(12): 2839 - 2846.

[ 4 ] Davies JH, Laflamme GY, Delisle J, et al. Trabecular metal used for major bone loss in acetabular hip revision [J]. *Arthroplasty*, 2011, 26(8): 1245 - 1250.

[ 5 ] Mrosek EH, Schagemann JC, Chung HW, et al. Porous tantalum and poly-epsilon-caprolactone biocomposites for osteochondral defect repair: preliminary studies in rabbits [J]. *Orthop Res*, 2010, 28(2): 141 - 148.

[ 6 ] Jami K, Chua KH, Joudi S, et al. Development of a cartilage composite utilizing porous tantalum, fibrin, and rabbit chondrocytes for treatment of cartilage defect [J]. *J Orthop Surg Res*, 2015, (10): 27.

[ 7 ] Ryu JJ, Park K, Kim HS, et al. Effects of anodized titanium with Arg-Gly-Asp (RGD) peptide immobilized via chemical grafting or physical adsorption on bone cell adhesion and differentiation [J].

*Int J Oral Maxillofac Implants*, 2013, 28(4): 963 - 972.

[ 8 ] Pegueroles M, Aguirre A, Engel E, et al. Effect of blasting treatment and Fn coating on MG63 adhesion and differentiation on titanium: a gene expression study using real-time RT-PCR [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22(3): 617 - 627.

[ 9 ] 王茜, 张辉, 耿丽鑫, 等. MG63 细胞与国产多孔钽材料共培养后成骨相关因子的表达研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2014, 28(11): 1422 - 1427.

[ 10 ] 张辉, 李亮, 王茜, 等. 骨形成蛋白-7 对多孔钽-软骨细胞复合物分泌功能以及 COL-Ⅱ、AGG 和 Sox9 基因表达的影响 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2015, 47(1): 216 - 222.

[ 11 ] Yugeswaran S, Yoganand CP, Kobayashi A, et al. Mechanical properties, electrochemical corrosion and *in vitro* bioactivity of yttria stabilized zirconia reinforced hydroxyapatite coatings prepared by gas tunnel type plasma spraying [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2012, 9(1): 22 - 33.

[ 12 ] Hosgor F, Yilmaz N, Senyurt O, et al. Effect of osteoblast cell culture on the bone implant contact [J]. *Acta Odontol Scand*, 2013, 71(3-4): 626 - 631.

[ 13 ] Krauss JF, Borcard F, Staedler D. Functionalization of microstructured open-porous bioceramic scaffolds with human fetal bone cells [J]. *Bioconjug Chem*, 2012, 23(11): 2278 - 2290.

[ 14 ] Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, et al. Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopographically-modified, microroughened titanium-aluminum-vanadium alloy surfaces [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(35): 8986 - 8994.

[ 15 ] Li B, Chen X, Guo B, et al. Fabrication and cellular biocompatibility of porous carbonated biphasic calcium phosphate ceramics with a nanostructure [J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(1): 134 - 143.

[ 16 ] Sawyer AA, Hennessy KM, Bellis SL, et al. Regulation of mesenchymal stem cell attachment and spreading on hydroxyapatite by RGD peptides and adsorbed serum proteins [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(13): 1467 - 1475.

[ 17 ] Brian E, Joan EB, Kjeld S. *In vivo* study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implant [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(17): 3521 - 3526.

[ 18 ] Hsu S, Wu SW, Hsieh SC, et al. Evaluation of chitosan-alginate-hyaluronate complexes modified by an RGD-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration [J]. *Artificial organs*, 2004, 28(8): 693 - 703.

[ 19 ] 汪皖, 吴海珍. RGD 肽在种植体表面涂层的成骨作用 [J]. *中国口腔种植学杂志*, 2011, 16(3): 183 - 187.

[ 20 ] Paredes V, Salvagni E, Rodríguez-Castellon E, et al. Study on the use of 3-aminopropyltriethoxysilane and 3-chloropropyltriethoxysilane to surface biochemical modification of a novel low elastic modulus Ti-Nb-Hf alloy [J]. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 2015, 103(3): 495 - 502.

[ 21 ] Knight MM, Toyoda T, Lee DA, et al. Mechanical compression and hydrostatic pressure induce reversible changes in actin cytoskeletal organization in chondrocytes in agarose [J]. *J Biomech*, 2006, 39(8): 1547 - 1551.

[ 22 ] 王斌, 陈景藻, 牟翔, 等. 低强度次声对体外培养的骨样细胞骨架蛋白 F-actin 表达的动态影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(3): 197 - 199.

[ 23 ] 乔磊, 丁仲鹏, 张立亚, 等. 微弧氧化钛表面对成骨细胞形态及细胞骨架的影响 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2013, 31(5): 468 - 471.

[ 24 ] Shinohara ML, Kim HJ, Kim JH, et al. Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(20): 7235 - 7239.