

含锶/锌钙磷涂层对 RAW264.7 破骨细胞体外影响的研究

龙甜 程志刚*

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院口腔科 湖北 武汉 430014)

[摘要] 目的:研究锶或锌加入电化学沉积钙磷涂层后对类破骨细胞增殖和分化的影响。方法:以电化学沉积钙磷涂层为对照组,与加入锶或锌的电化学沉积钙磷涂层相比较。3种涂层分别接种 RAW264.7 细胞培养 8 d,采用细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞培养 6 d 后的增殖情况,同时检测细胞培养 8 d 后的抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 活性。结果:3种涂层接种 RAW264.7 细胞后,使用 CCK-8 试剂盒检测,结果显示第 4 小时加入锌的钙磷涂层其吸光度值明显高于其他两组,但第 2 天时的细胞增殖指数低于其他两组 ($P < 0.05$)。第 14 天的 TRAP 酶活性检测结果显示 3 组间比较差异无统计学意义。结论:含锌电化学沉积钙磷涂层促进破骨细胞的粘附,但加入锶或锌对类破骨细胞在电化学沉积钙磷涂层表面的增殖和分化无影响。

[关键词] 锶 锌 钙磷涂层 类破骨细胞 RAW264.7

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-7651(2018)08-0910-03

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.08.026

Proliferation and Differentiation of Osteoclast-like Cells on Calcium Phosphate/Zn/Sr Coatings. LONG Tian, CHENG Zhi-gang*. Department of Stomatology, The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, China.

[Abstract] **Objective:** To verify the hypothesis that the incorporation of strontium (Sr) or zinc (Zn) into electrodeposited calcium phosphate coatings (ECP) does not influence the proliferative ability and differentiation potential of osteoclasts. **Methods:** Titanium alloy plates electrolytically coated with calcium phosphates with or without Sr or Zn were incubated with osteoclast-like RAW264.7 cells for eight days. The proliferation index within 6 days and the differentiation after 8 days were analyzed. **Results:** Although presenting different cell attachment pattern, the osteoclast-like cells demonstrated similar differentiation potential. Coatings with Zn presented statistical lower cell proliferative ability. **Conclusion:** Electrodeposited calcium phosphate coatings with Zn enhanced the attachment of osteoclasts. The incorporation of Sr and Zn to the electrodeposited calcium phosphate coatings does not influence the proliferation and differentiation of osteoclast-like cells.

[Key words] Strontium Zinc Calcium phosphate coating Osteoclast-like cell

在种植体表面制备钙磷(CaP)涂层是对钛及钛合金的一种表面处理技术^[1]。

锶(strontium, Sr)是存在于骨的无机相中,特别是骨代谢活跃部位的微量元素。在体外实验中, Sr 表现出了对成骨细胞的促进和对破骨细胞的抑制作用;体内实验结果表明, Sr 抑制了骨吸收并促进了新骨形成^[2~4]。锌(zinc, Zn)也是一种对生物体非常重要的微量元素,构成多种金属酶的活性成分,研究发现 Zn 对破骨细胞的活性抑制作用明显,

且浓度越高抑制作用越大^[5,6]。

基于此,本文以电化学沉积 CaP 涂层为模型,加入 Sr、Zn,然后与破骨细胞共培养,研究其对破骨细胞的增殖和分化的影响,探讨元素加入可能对 CaP 涂层降解性能的影响。

由于原代破骨细胞较难获得,在本实验中我们选用破骨细胞系来代替。RAW264.7 细胞系属于巨噬细胞系,它可以在巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 和核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of the NF κ B ligand, RANKL) 的作用下分化为破骨细胞^[7]。研究证实,该分化过程需要 5~7 d,该细胞系已被普遍用于检测生物材料对破骨

作者简介 龙甜(1987~),女,湖北人,博士,主治医师,主要从事种植体表面处理技术的研究工作。

* 通讯作者 程志刚,电话:027-82211511

细胞的影响^[8]。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器和材料 钛片(直径 20 mm,厚 1 mm,宝鸡德昌钛镍有限公司,中国);对硝基苯磷酸二钠(Promoter 公司,中国);细胞计数试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8,Dojindo Laboratory 公司,Japan);二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(Boster 公司,中国);酶标仪(Shimadzu UV-240IPC,Japan);其余化学试剂均购自上海试剂有限公司。

1.2 CaP 涂层的制备 在钛合金片表面行喷砂和酸蚀处理。依次用丙酮、无水乙醇和去离子水行超声冲洗。制备 3 种涂层,分别为 CaP 涂层(elcctrolytic deposited calcium phosphate coating,ECP 涂层)、含 Sr 的 CaP 涂层(elcctrolytic deposited calcium phosphate coating with strontium,ECPS 涂层)和含 Zn 的 CaP 涂层(elcctrolytic deposited calcium phosphate coating with zinc,ECPZ 涂层)。将一组钛片作为阴极插入电解液中,每 4 个钛片为一组,电流总量为 21 mA,反应时间为 8 h。

在实验中发现,添加的离子浓度越高,涂层的稳定性越差。我们经过多次实验,最终确定 Sr 的上限浓度为 1 mmol/L,Zn 的上限浓度为 0.1 mmol/L,因为在此浓度时,涂层的稳定性处于可以接受的范围。制备 3 种涂层使用的电解液配制方法见表 1。

1.3 类破骨细胞

1.3.1 细胞培养 用 α -MEM(α -modified eagle's medium,含有 10%胎牛血清、100 000 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素)培养 RAW264.7。所有涂层在进行消毒处理后,放入 12 孔板中浸泡 2 h α -MEM 后备用。每孔接种 500 μ L 细胞悬液(1.6×10^5 /mL),细胞贴附 4 h 后磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)轻轻冲洗 3 次,将钛片移至新的 12 孔板中,每孔精确加入 2 mL 含有 20 μ g/L M-CSF 和 40 μ g/L RANKL 的培养基以诱导分化。每 3~4 d 更换 1 次培养液,实验时间持续 14 d,以未接种细胞的钛片作为对照组。

1.3.2 细胞的粘附及增殖 细胞接种 4 h 和 14 d 后,去除培养基,加入含有 10% CCK-8 的新鲜培养基,孵育 1 h 后,检测在 450 nm 处 A 值($n=6$)。该 A 值代表了检测时细胞的线粒体活性,与细胞个数呈线性关系。其中细胞的增殖指数使用 $\text{Log}_2(A_{14d}/A_{4h})$ 表示。

1.3.3 抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase,TRAP)活性的定量分析 TRAP 可将对硝基苯磷酸二钠(p-nitrophenyl phosphate,PNPP)降解为对硝基苯酚(p-nitrophenol,PNP)。细胞培养 14 d 后用 0.2% Triton \times 100 在 4 $^{\circ}$ C 下裂解 4 h($n=6$)。将 100 μ L 细胞悬液与 100 μ L PNPP 溶液(含有 5 mmol/L PNPP、25 mmol/L 醋酸钠、20 mmol/L 酒石酸钠,pH 4.8) 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加入 200 mL NaOH(0.5 mol/L)终止反应,检测 405 nm 处 A 值。BCA 试剂盒检测细胞悬液中总蛋白的含量。TRAP 的活性用总蛋白行标准化,以 nmoL PNP/g \cdot min 表示。

1.4 统计学分析 细胞增殖指数和 TRAP 酶活性均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 13.0 单因素方差分析进行各组间比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

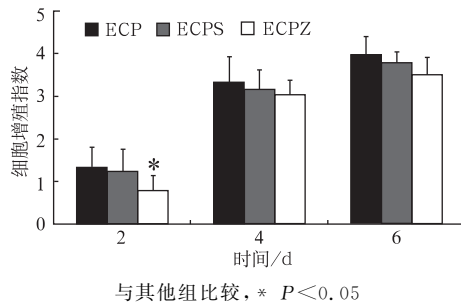


图 1 RAW264.7 细胞培养 6 天时间内的细胞增殖指数

Fig. 1 Cell doubling index of the adherent RAW264.7 cells on different coatings at day 2, 4, and 6.

2 结果

2.1 细胞的粘附与增殖 RAW264.7 细胞接种于 3 种涂层上 4 h 后,ECPZ 组使用 CCK-8 试剂盒测得的 A 值明显高于另两组,可见在 ECPZ 涂层表面的细胞数量高于其他两组($P>0.05$),但 2d 后,

表 1 ECP、ECPS 和 ECPZ 涂层的电解液配方

Table 1 The composition of the electrolyte

组别	NaCl/ mmol \cdot L ⁻¹	CaCl ₂ / mmol \cdot L ⁻¹	Na ₂ HPO ₄ \cdot 12H ₂ O/ mmol \cdot L ⁻¹	SrAc ² / mmol \cdot L ⁻¹	ZnAc ₂ / mmol \cdot L ⁻¹	pH 值
ECP	136.89	4	2.28	—	—	7.0
ECPS	136.89	4	2.28	1	—	7.0
ECPZ	136.89	4	2.28	—	0.1	7.0

ECPZ 涂层表面的细胞倍增指数明显低于其他两组(图 1)。

2.2 细胞的分化 细胞培养 14 d 后的 TRAP 酶活性[单位: nmol/(g · min)]分别为: ECP:(1.26 ± 0.13), ECPS:(1.30 ± 0.06), ECPZ(1.62 ± 0.54)。3 组间的 TRAP 酶活性比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 这表示 3 组涂层分化为破骨细胞的能力相似。

3 讨论

本文采用的 CaP 涂层的制备方法为电化学沉积法, 因其操作简单、成本低廉、涂层的成分和厚度可以控制等因素而受到重视, 并且已有众多学者通过控制电化学沉积涂层的形成条件, 例如电流密度和电解质溶液成分等, 合成了对骨诱导有显著效果的涂层^[9]。

虽然众多学者在不同 CaP 或 CaP 涂层中加入 Sr 或 Zn 以促进其生物活性, 并取得了较好的效果, 但微量元素的加入是否会影响到 CaP 或 CaP 涂层的降解却不得而知。种植体表面成骨细胞的活性是新骨形成的关键, 活跃的破骨细胞对新骨的形成起负性作用, 可能会导致过度的骨吸收, 从而导致种植体的失败。

理想的涂层不仅要成骨有促进作用, 还应当可以在体内被降解, 并且两者的相对速度应匹配, 也就是说, 新骨应能逐渐取代涂层的位置, 从而直接与种植体发生骨整合, 因此涂层对破骨细胞的影响需得到进一步研究。

本实验通过将类破骨细胞 RAW264.7 细胞接种于 ECP、ECPS 和 ECPZ 3 种涂层上, 比较了各涂层对破骨细胞增殖和分化的影响。

3.1 细胞粘附与增殖 由结果可知, ECPZ 涂层对细胞的粘附有明显的促进作用, 但第 2 天时, ECPZ 涂层的细胞增殖指数明显降低, 我们推测是因为 Zn 对破骨细胞的增殖呈现一定程度的抑制作用, 但由于后期细胞生长较快, 这种抑制作用在第 4、6 天时并不明显。这证明 Zn 的加入提高了涂层的生物活性, 促进了细胞的粘附, 但由于 CaP 涂层本身具有优秀的生物相容性, 其对细胞增殖有显著的促进作用, 所以加入金属离子后抑制破骨细胞增殖的效果并不显著。

3.2 细胞分化 TRAP 酶是破骨细胞的标志性酶, 其反应了破骨细胞的数量及活性。本实验结果显示, 3 种涂层对破骨细胞的 TRAP 酶含量无明显影响, 即 3 种涂层对破骨细胞的分化无明显影响。

Yang 等^[10]将不同浓度的 Sr 和 Zn 加入到仿生 CaP 涂层中, 在接种破骨细胞后对吸收陷窝进行计数, 发现加入的离子浓度越高, 吸收陷窝的数量及面积越小, 其中最低的有效浓度为 Sr 1 mmol/L, Zn 0.1 mmol/L。但该涂层与本实验的涂层制备方式并不相同, 我们推测本实验中无明显差异性是由于将 Sr 或 Zn 加入电化学沉积形成的 CaP 涂层对破骨细胞的分化无显著性影响。

在本研究结果显示, Sr 和 Zn 加入电化学沉积 CaP 涂层对破骨细胞在涂层表面的增殖和分化影响并不明显。

参考文献

- [1] 曹亚洲, 程伟, 胡勤刚. 钛表面 RGD/仿生磷酸钙复合涂层对 MC3T3-E1 细胞黏附、增殖、分化的影响[J]. 口腔医学研究, 2017, 33(7): 693-697
- [2] Mi B, Xiong W, Xu N, et al. Strontium-loaded titania nanotube arrays repress osteoclast differentiation through multiple signalling pathways: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2328
- [3] Wornham DP, Hajjawi MO, Orriss IR, et al. Strontium and osteoblast function [J]. Osteoporos Int, 2015, 26(8): 2215
- [4] Zhu S, Hu X, Tao Y, et al. Strontium inhibits titanium particle-induced osteoclast activation and chronic inflammation via suppression of NF- κ B pathway [J]. Sci Rep, 2016, 6: 36251
- [5] 秦博恒, 杨彝, 何东宁. 载锌多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料成骨性能的研究[J]. 口腔医学研究, 2017, 33(7): 725-728
- [6] Boanini E, Torricelli P, Sima F, et al. Gradient coatings of strontium hydroxyapatite/zinc beta-tricalcium phosphate as a tool to modulate osteoblast/osteoclast response [J]. J Inorg Biochem, 2018, 183: 1-8
- [7] Matsuike R, Tanaka H, Nakai K, et al. Continuous application of compressive force induces fusion of osteoclast-like RAW264.7 cells via upregulation of RANK and downregulation of LGR4 [J]. Life Sci, 2018, 201: 30-36
- [8] Wang P, Liu J, Yang Y, et al. Differential intensity-dependent effects of pulsed electromagnetic fields on RANKL-induced osteoclast formation, apoptosis, and bone resorbing ability in RAW264.7 cells [J]. Bioelectromagnetics, 2017, 38(8): 602-612
- [9] Azem FA, Delice TK, Ungan G, et al. Investigation of duty cycle effect on corrosion properties of electrodeposited calcium phosphate coatings [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 68: 681-686
- [10] Yang L, Perez-Amodio S, Barrere-De Groot FY, et al. The effects of inorganic additives to calcium phosphate on *in vitro* behavior of osteoblasts and osteoclasts [J]. Biomaterials, 2010, 31(11): 2976-2989