

联合应用纳米金和磷酸钙骨水泥支架促进牙髓干细胞的增殖和成骨分化

夏 阳^{1,2*}, 陈慧敏², 胡姝颖², 孙剑飞¹, 郭 宇², 马珊珊²

¹东南大学江苏省生物材料与器件重点实验室, 江苏 南京 210009; ²南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 江苏南京 210029

[摘要] 目的:磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)支架以其良好的生物相容性和骨引导活性而广泛应用于组织工程骨缺损的修复中,但是其骨引导活性有限。因此考虑联合应用纳米金(gold nanoparticles, AuNPs)以促进牙髓干细胞的增殖和成骨分化。方法:以CPC支架作为基底接种牙髓干细胞,在培养基中添加5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AuNPs进行干细胞培养,以常规培养基组为对照。用透射电镜检测AuNPs的形貌。以荧光显微镜检测细胞接种4 h后的黏附状态,以CCK-8检测细胞增殖情况,检测细胞碱性磷酸酶的活性,并进行茜素红染色以说明矿化物形成情况。结果:AuNPs为均匀的球形,直径20 nm左右。细胞接种后4 h,实验组和对照组的细胞黏附状态没有显著差异。CPC上AuNPs培养基中的细胞14 d时数量多于对照组($P < 0.05$);且AuNPs培养基中细胞的碱性磷酸酶活性显著增高($P < 0.05$),矿化物的形成也显著增多($P < 0.05$)。结论:CPC支架联合AuNPs可显著促进牙髓干细胞的增殖和成骨分化。

[关键词] 纳米金;磷酸钙骨水泥;牙髓干细胞;增殖;成骨分化

[中图分类号] Q813

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)05-590-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180504

Calcium phosphate cement scaffold with gold nanoparticles on promotes the proliferation and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells

Xia Yang^{1,2*}, Chen Huiming², Hu Shuying², Sun Jianfei¹, Guo Yu², Ma Shanshan²

¹Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, Southeast University, Nanjing 210009; ²Jiangsu Key Laboratory of Oral Disease, NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** Calcium phosphate cement (CPC) scaffold is widely used in bone tissue engineering due to its good biocompatibility and osteoconduction properties. However, it needs further improvements to widen its application. In this study, CPC scaffold with gold nanoparticles (AuNPs) were used to promote the proliferation and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs). **Methods:** The morphology of AuNPs was detected by transmission electron microscope (TEM). The cells were seeded on CPC, and cultured in media containing 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AuNPs. Those seeded on CPC and cultured in normal media was set as control. The cell adhesion was detected by fluorescent stain 4 h after seeding. The cell proliferation was detected by CCK-8, and the alkaline phosphatase (ALP) activity was measured. Alizarin red staining (ARS) was used to detect the mineral synthesis. **Results:** TEM image showed that AuNPs were spherical with 20 nm in average diameter. Fluorescent images showed no significant difference in cell adhesion between the two groups. Significant difference in cell proliferation was detected at 14 days ($P < 0.05$). ALP activity of the AuNPs media group was significantly increased ($P < 0.05$), and the mineralization formation of DPSCs was also increased compared with that of cells in normal media ($P < 0.05$). **Conclusion:** It was concluded that CPC scaffold with AuNPs can promote the proliferation and osteogenic differentiation of DPSCs.

[Key words] gold nanoparticles; calcium phosphate cement; dental pulp stem cells; proliferation; osteogenic differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(05):590-594]

[基金项目] 国家自然科学基金(81771044);中国博士后基金(2015M571647);江苏省博士后基金(1402044B);江苏高校优势学科建设工程资助项目(2014-37);江苏省青年医学人才(QNRC2016853)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xiayang@njmu.edu.cn

磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)是一种新型非陶瓷型羟基磷灰石人工骨材料。其具有自凝固性,使用简便;凝固过程不产热,凝固前可任意塑型;降解缓慢,在局部维持时间长。这些特点可以满足临床骨缺损修复的需要。因此,CPC问世后成为国内外的研究热点。但是,单纯CPC的生物活性较差,不利于成骨类细胞的增殖、分化和最终的骨修复。因此,各种方法被用来增强CPC的生物活性,包括在其表面接枝多肽、在其内添加生长因子或者是可降解的高分子聚合物如壳聚糖等^[1-3]。

纳米材料的出现和发展为组织工程骨缺损修复带来新的希望。纳米金(gold nanoparticles, AuNPs)易于合成且生物相容性极佳。更重要的是,AuNPs对成骨细胞^[4]、破骨细胞^[5]、软骨细胞^[6]及骨髓间充质干细胞^[7]等多种骨修复中涉及的细胞均有调节作用,是有潜力的骨组织工程活性因子。

牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)具有高度增殖能力、多向分化潜能及自我更新的生物学特性,可以向成牙本质细胞、成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等方向分化;且其获取简便,与骨髓干细胞的获取相比,对人体几乎无创。因此在骨组织修复领域极具应用潜力^[8]。

目前国内外尚无联合应用CPC与AuNPs以促进DPSCs增殖和成骨分化的研究报道。因此,在本研究中考考虑将AuNPs与CPC联合应用,期望借AuNPs起到增强CPC生物活性、促进干细胞成骨分化的目的。

1 材料和方法

1.1 材料

人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)和CPC粉体由美国马里兰牙学院Xu Hockin教授提供。DMEM培养基、胎牛血清、PBS(1×), 0.25%胰酶(Gibco公司,美国),CCK-8(Enzo Biochem公司,美国),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(Wako Pure Chemical公司,日本),蛋白定量试剂盒Pierce BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific公司,美国),细胞荧光染料(live/dead staining solution, Invitrogen公司,美国),β-甘油磷酸钠、胰蛋白酶、地塞米松、维生素C、茜素红、三氯化金、柠檬酸钠(Sigma公司,美国)。扫描电镜(JEOL JSM-840,美国),酶标仪(SpectraMax M5,美国),荧光显微镜(Eclipse TE-2000S, Nikon公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 AuNPs的制备

将95 mL超纯去离子水和1 mL 1%三氯化金加入250 mL三颈烧瓶中,加热至沸腾。然后向溶液中加入4 mL 1%柠檬酸钠,再加热25 min,冷却至室温,保持剧烈搅拌。离心浓缩,得到0.5 mg/mL的稳定AuNPs胶体溶液用于后续实验。用透射电镜检测AuNPs的形貌。

1.2.2 CPC的制备

以纯净水作为CPC液体,粉液比例为2:1,制备CPC支架。充填入模具后,将CPC支架放置于37℃,100%湿度的水浴箱中24 h,然后脱模备用。

1.2.3 实验分组

将AuNPs加入培养基中配制为5 μg/mL。细胞增殖实验用完全培养基,细胞分化实验用骨向诱导培养基。分为以下两组:①CPC支架普通培养基(CPC Media)组:以CPC支架作为基底,常规培养基进行细胞培养;②CPC支架Au培养基(CPC Au Media组):以CPC支架作为基底,含5 μg/mL AuNPs的培养基进行细胞培养。

1.2.4 细胞黏附检测

hDPSCs的提取、培养和鉴定按照以往确定的实验步骤^[9]。选用3~5代细胞进行实验。在细胞接种4 h后,将黏附有细胞的CPC支架浸没于荧光染料中,在37℃孵箱中孵育15 min,然后用荧光显微镜检测支架上黏附的细胞情况。

1.2.5 细胞增殖的测定

细胞以每孔5 000个接种于96孔板,于37℃,5% CO₂的孵育箱内培养过夜。每孔加入含10% CCK-8的培养基孵育,培养箱内孵育2 h后,从各孔中吸取液体加入96孔板中,于酶标仪上波长450 nm测试吸光度值。

1.2.6 ALP活性检测

细胞培养14 d后进行ALP的检测。从孵箱中取出96孔板,PBS漂洗3遍,每孔加入50 μL 0.25% TritonX-100,置于37℃孵箱2 h后加入100 μL反应底物,再置于37℃孵箱2 h,用酶标仪于波长405 nm测吸光度。将ALP除以蛋白定量检测值后进行统计分析以排除不同细胞数对ALP值的影响。

1.2.7 茜素红染色

细胞培养21 d后,进行钙结节茜素红染色和定量检测。hDPSC经成骨诱导21 d,PBS清洗,10%福尔马林固定30 min,2%茜素红染色45 min,PBS清洗后拍照。10%的氯化十六烷基吡啶溶液溶解矿化

物,并在550 nm下进行检测。

1.3 统计学方法

定量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用统计分析软件SPSS13.0进行独立样本 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AuNPs 的表征

透射电子显微镜显示,所合成的 AuNPs 粒子为均匀球形,粒径约 20 nm,颗粒之间单分散良好(图1)。

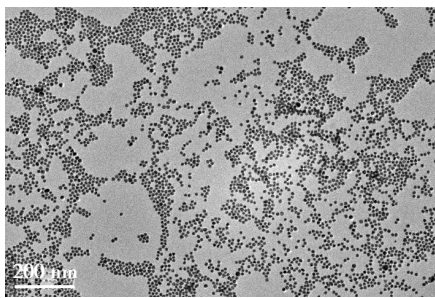


图1 AuNPs 颗粒的透射电镜图片
Figure 1 TEM image of gold nanoparticles

2.2 细胞黏附检测

荧光图片显示,接种 4 h 后,两种培养基中的 CPC 支架材料上都黏附了大量的细胞。细胞有一定程度的铺展,两组之间没有显著差异(图2)。

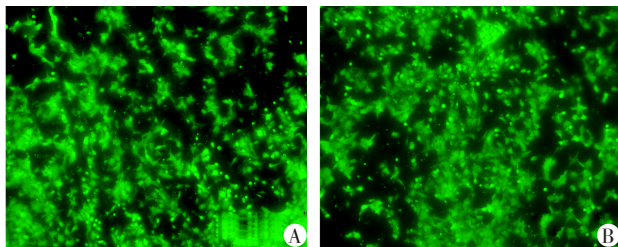


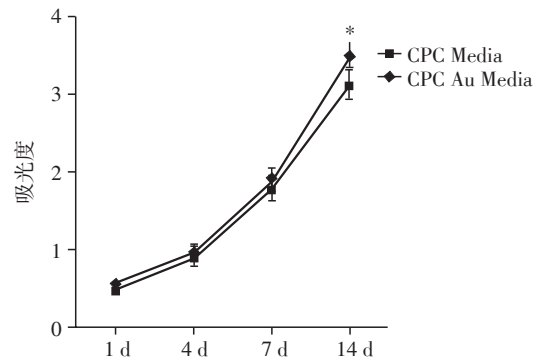
图2 接种细胞 4 h 后 CPC Media 组(A)和 CPC Au Media 组(B)的 Live/Dead 荧光染色图片($\times 40$)
Figure 2 Fluorescent images by Live/Dead stain of the cells 4 h after cell seeding($\times 40$)

2.3 细胞增殖检测

在检测的 4 个时间点中,前 3 个时间点两组之间没有显著差异。但是,在 14 d CPC Au Media 组的细胞增殖显著高于 CPC Media 组($P < 0.05$,图3)。

2.4 ALP 活性检测

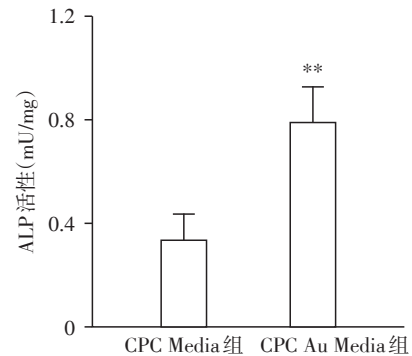
骨向诱导 14 d 后,检测两组中细胞的 ALP 活性,结果显示 CPC Au Media 组的 ALP 活性与 CPC Media 组相比有了显著提高($P < 0.01$,图4)。



与 CPC Media 组比较, $^*P < 0.05$ ($n=4$)。

图3 CCK-8 检测细胞增殖情况

Figure 3 Cell proliferation test by CCK-8



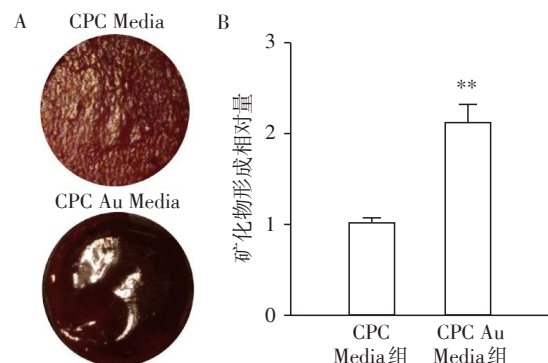
与 CPC Media 组比较, $^{**}P < 0.01$ ($n=4$)。

图4 ALP 活性检测结果

Figure 4 Alkaline phosphatase activity results

2.5 矿化结节形成检测

骨向诱导 21 d 后,检测两组中细胞的矿化结节形成量。ARS 染色结果显示 CPC Au Media 组 CPC 支架表面的染色更深、矿化结节更厚(图5A)。定量检测结果显示 CPC Au Media 组的矿化结节形成量与 CPC Media 组相比有了显著提高($P < 0.01$,图5B)。



与 CPC Media 组比较, $^{**}P < 0.01$ ($n=4$)。

图5 茜素红染色(A, $\times 3$)和矿化物定量检测(B)

Figure 5 Mineral synthesis by Alizarin red test (A, $\times 3$) and quantitative measurement (B)

3 讨 论

AuNPs在骨科学细胞领域有着独特的作用,如抑制破骨细胞分化^[5],刺激成骨细胞与软骨细胞相关生长因子的表达^[6],促进骨髓间充质干细胞的成骨分化^[7]等。因此,在本研究中考考虑将其作为活性因子,与CPC联合应用,期望达到增强CPC生物活性、促进干细胞骨向分化的目的。

CPC具有良好的生物相容性和生物安全性。在成骨活性方面,CPC不具有诱导成骨活性,但可以通过骨传导作用成骨。CPC具有生物降解活性,且降解的过程和新骨长入是协调进行的。有研究报道,将CPC与骨形态发生蛋白(BMP)等成骨因子复合在一起,不仅可以大大提高材料的骨修复能力,还可以明显加快CPC的降解^[10]。因此,有很多研究试图通过各种方法提高CPC的生物活性。在本研究中,希望借助AuNPs粒子对干细胞的调节作用以提高CPC的生物活性。

CPC可以作为药物和活性因子的载体,但是AuNPs要进入细胞才能发挥其生物学功能^[7],因此本研究将AuNPs直接添加进培养基中,作为一个探索性尝试,检测AuNPs是否可以增强CPC对干细胞的骨向分化。在进一步的实验中,还可以考虑将AuNPs添加进CPC中做成纳米复合CPC。纳米材料的添加会改变CPC的微观结构,而支架结构的变化也会对干细胞的分化起到不同的调节作用,因此预期其影响因素将比本研究中直接添加进培养基中复杂。

AuNPs的尺寸、形貌和浓度均会对细胞产生不同的影响^[11-12]。本研究使用的AuNPs是直径20 nm左右的球形纳米颗粒,表面修饰物是柠檬酸钠。柠檬酸钠具有良好的生物相容性,并且可以保持AuNPs良好的单分散性。20 nm AuNPs粒子对成骨细胞行为的上调能力较强^[7]。细胞增殖结果表明,在选用浓度下,培养基中的AuNPs对DPSCs没有毒性,还可以促进细胞增殖。不过,该促进作用在早期并没有表现出显著作用,实验组和对照组之间在细胞黏附数量和形态上都没有显著差异。说明培养基中的AuNPs并没有促进细胞黏附。对细胞黏附起主要作用的应该是支架材料的表面形态结构和成分^[13]。

ALP活性是成骨分化的一个早期标志,骨的形成由此开始。矿化结节是成骨分化成熟的晚期标志,细胞培养2~3周后矿化结节开始形成并且达到高峰期。在本研究中,骨向诱导14 d后检测到CPC上AuNPs培养基中干细胞的ALP活性增强,21 d检

测到干细胞的矿化物形成增强。DPSCs具有向成骨方向分化的潜能,但是需要合适的刺激诱导因素^[14]。以CPC为支架材料,自体来源的DPSCs为种子细胞,是将来骨缺损修复的理想方案。实验结果表明,AuNPs作用于CPC上的DPSCs,促进了细胞的增殖、成骨分化和矿化,形成钙沉积。

AuNPs可透过细胞膜附着于细胞质内的细胞器与蛋白,通过传递适当的机械应力来刺激p38/MARK信号通路^[7],该通路是骨形成与骨重建的关键调节器。AuNPs进入细胞后,主要附着于细胞内质网,给予内质网一定的应力强度,类似于机械强度。

虽然AuNPs有着独特的生物学作用,部分作用的机制和原理已被揭示,但目前仍未知的方面,如其适用于人体中并且对细胞具有正性作用(如促进增殖、增强组织细胞合成能力)时的浓度要求;不同直径、不同修饰的AuNPs的不同性质。不过,可以明确的是,不同直径、不同表面修饰物的AuNPs在骨科学细胞治疗领域有着独特的作用,AuNPs更多的生物效能在今后将会被发现,性质将会更加趋于稳定,其在生物医学领域中的应用亦将愈来愈广泛。

因此,本研究结果为AuNPs对DPSCs骨向分化的促进作用提供了实验依据,同时也为进一步研究CPC与AuNPs的联合应用以增强CPC的生物活性奠定了基础。但本研究也存在一定局限性,对成骨分化指标如RUNX2和OCN等没有在基因和蛋白水平进行检测。在进一步的研究中,将对AuNPs促进DPSCs的增殖和成骨分化的机制进行深入探讨。

[参考文献]

- [1] Chen W, Zhou H, Weir M, et al. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate cement-chitosan-RGD scaffold for bone repair [J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(7-8):915-927
- [2] Zhao L, Tang M, Weir M, et al. Osteogenic media and rh-BMP-2-induced differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells encapsulated in alginate microbeads and integrated in an injectable calcium phosphate-chitosan fibrous scaffold [J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(7-8):969-979
- [3] Theinhan W, Weir M, Simon CG, et al. Non-rigid calcium phosphate cement containing hydrogel microbeads and absorbable fibres seeded with umbilical cord stem cells for bone engineering [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(10):777-787
- [4] Zhang D, Liu D, Zhang J, et al. Gold nanoparticles stimulate differentiation and mineralization of primary osteoblasts through the ERK/MAPK signaling pathway [J]. *Ma-*

- ter Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014, 42: 70-77
- [5] Heo DN, Ko WK, Moom HJ, et al. Inhibition of osteoclast differentiation by gold nanoparticles functionalized with cyclodextrin curcumin complexes [J]. ACS Nano, 2014, 8(12): 12049-12062
- [6] Dwivedi P, Nayak V, Kowshik M. Role of gold nanoparticles as drug delivery vehicles for chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis [J]. Biotechnol Prog, 2015, 31(5): 1416-1422
- [7] Yi C, Liu D, Fong C, et al. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway [J]. ACS Nano, 2010, 4(11): 6439-6448
- [8] Morad G, Kheiri L, Khojasteh A. Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration: a systematic review of literature [J]. Arch Oral Biol, 2013, 58(12): 1818-1827
- [9] Wang L, Zhang C, Li C, et al. Injectable calcium phosphate with hydrogel fibers encapsulating induced pluripotent, dental pulp and bone marrow stem cells for bone repair [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 69: 1125-1136
- [10] Habraken W, Boerman O, Wolke J, et al. In vitro growth factor release from injectable calcium phosphate cements containing gelatin microspheres [J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 91(2): 614-622
- [11] Li J, Li J, Zhang J, et al. Gold nanoparticle size and shape influence on osteogenesis of mesenchymal stem cells [J]. Nanoscale, 2016, 8(15): 7992-8007
- [12] Yao Y, Shi X, Chen F. The effect of gold nanoparticles on the proliferation and differentiation of murine osteoblast: a study of MC3T3-E1 cells *in vitro* [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2014, 14(7): 4851-4857
- [13] Lin X, Shi Y, Cao Y, et al. Recent progress in stem cell differentiation directed by material and mechanical cues [J]. Biomed Mater, 2016, 11(1): 014109
- [14] Kolind K, Kraft D, Bøggild T, et al. Control of proliferation and osteogenic differentiation of human dental-pulp-derived stem cells by distinct surface structures [J]. Acta Biomater, 2014, 10(2): 641-650

[收稿日期] 2017-07-07

诚聘医学杂志编辑

《生物医学研究》是由南京医科大学(中国)和忠北国立大学(韩国)联合主办并面向全球发行英文学术双月刊,旨在增进各国生物医学研究者间的交流沟通。本刊现诚聘助理编辑一名,职责如下:

- 协助执行主编处理日常事务;
- 与作者联络,负责跟进稿件及投稿咨询;
- 按约定期限及时处理投稿;
- 邀请专家同行评审,与评审人约定稿件返回日期。向作者反馈同行评审意见,确保作者按要求修改稿件;
- 按排版格式要求及时编辑文章;
- 与作者沟通校对稿及修改事宜,确保稿件及时修回;
- 协助编辑部在相关领域正常运作发展;
- 在重点研究领域积极拓展文章选题;
- 协助执行主编与顶尖专家开展视频专访,准备相关问题,安排访谈日程;
- 确保出版内容与预期目标和日程相符;
- 在公开场合(如学术会议)中推广本刊。

录用人员自即日起开始工作,暂为临时性岗位,2018年9月可转为正式员工。

应聘人员须具有硕士或博士学位,临床医学或生物医学专业为佳;具有良好的语言文字能力;能与同事高效合作,头脑冷静,方法灵活。有编辑经验者优先考虑,无经验亦可,由编辑部提供相关培训。工作地点为《生物医学研究》南京编辑部(江宁校区),享受标准福利待遇。应聘者请提交简历及求职信至韩老师邮箱 xihan@njmu.edu.cn。