

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)09-0799-03

rhBMP-2 明胶微球的制备及对人牙周膜细胞增殖和碱性磷酸酶活性影响

肖玉鸿¹ 吴红² 刘宏伟¹ 陈书军¹ 李飞³ 吴道澄²(1 南方医科大学南方医院口腔科, 广东 广州 510515, 第四军医大学² 药理学系化学教研室; ³ 口腔医学院修复科 陕西 西安 710033)

Preparation of rhBMP-2-loaded gelatin microspheres and biological effects of rhBMP-2-GMs on proliferation and alkaline phosphatase expression of human periodontal ligament cells

XIAO Yu-Hong¹, WU Hong², LIU Hong-Wei¹, CHEN Shu-Jun¹, LI Fei³, WU Dao-Cheng²¹Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China, ²Department of Chemistry, School of Pharmacy, ³Department of Prosthodontics, College of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To evaluate the biological effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 gelatin microspheres (rhBMP-2-GMs) on the proliferation and alkaline phosphatase (ALP) expression of human periodontal ligament cells (PDLs). **METHODS:** MTT method and enzyme dynamics method were used to observe the proliferation and ALP expression of PDLs after different doses of rhBMP-2 and rhBMP-2-GMs were added into the culture medium. **RESULTS:** Both rhBMP-2 and rhBMP-2-GMs promoted the proliferation and increase the ALP activity of PDLs in a concentration-related manner. Significantly greater proliferation and expression were found in rhBMP-2-GMs group compared with those in rhBMP-2 group. **CONCLUSION:** The results indicate that rhBMP-2-GMs can significantly promote the proliferation and increase the ALP activity of PDLs by sustained release.

【Keywords】 gelatin microspheres; recombinant human bone morphogenetic protein-2; periodontal ligament cells; sustained release

【摘要】 目的: 观察重组人骨形成蛋白-2(rhBMP-2)明胶微球(rhBMP-2-GMs)对人牙周膜细胞(PDLs)增殖和碱性磷酸

酶活性的影响。方法: 体外培养人 PDLs, 分别用不同浓度的 rhBMP-2 和 rhBMP-2-GMs 作用, 用四唑盐比色实验(MTT)和酶动力学方法进行观察。结果: rhBMP-2 和 rhBMP-2-GMs 均可以明显促进人 PDLs 增殖、提高碱性磷酸酶(ALP)活性, 并呈剂量依赖性, rhBMP-2-GMs 较单独应用 rhBMP-2 的效应更加显著。结论: rhBMP-2-GMs 利用其对 rhBMP-2 的缓释作用, 对人 PDLs 增殖和碱性磷酸酶活性的作用效果优于单独应用 rhBMP-2。

【关键词】 明胶微球 重组人骨形成蛋白-2 牙周膜细胞 缓释
【中图分类号】 R780.2 **【文献标识码】** A

0 引言

牙周组织再生的细胞学基础是牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLs), PDLs 是一组多能干细胞, 具有多向分化潜能, 在一定条件下可分化为成牙骨质细胞、成骨细胞^[1]。亦有研究表明, BMP 能够诱导牙周组织中未分化间充质细胞分化为成牙骨质细胞和成骨细胞^[2], 但 BMP 单纯植入体内扩散太快, 也易被蛋白酶水解, 因而不能在有效的时间内作用于更多的靶细胞。我们利用生物相容性好、无毒、可生物降解的明胶作为载体材料, 采用优化的双相乳化冷凝聚合法制备重组人骨形成蛋白-2(rhBMP-2)明胶微球(rhBMP-2-GMs), 并探讨其对 PDLs 生物学行为的影响, 了解其在牙周组织工程中的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料 明胶(Sigma 公司); GEM-2000EX 电子显微镜(日本日立公司); 贝克曼 DU640 紫外分光光度计(瑞典贝克曼公司); DMEM 培养基(Gibco 公司); rhBMP-2(第四军医大学生化教研室惠赠); 碱性磷酸酶试剂盒(广州标佳科技有限公司); 四唑盐(MTT, Sigma 公司); 异丙醇、乙醚、丙酮均为分析纯(西安化学试剂厂)。

1.2 方法

1.2.1 空白微球的制备^[3] 液体石蜡置于三口瓶中, 55℃, 800 r/min 条件下搅拌, 10 mL 250 mL/L 明胶溶液中加入适量 span-80 充分混匀后逐滴加入石蜡中, 搅拌 10 min 后迅速改冰浴, 10 min 后加入异丙

收稿日期 2004-10-25; 修回日期 2004-12-08

通讯作者 刘宏伟. Tel. (020) 81642021 Email. hwliu@fmmu.com

作者简介: 肖玉鸿(1972-), 男(汉族), 湖南省娄底市人, 主治医师, 硕士生(导师刘宏伟). Tel. (029) 82554122 Email. xyhld000@yahoo.com.cn

醇 12 mL 250 mL/L 戊二醛 2 mL 继续在冰浴条件下搅拌 2 h 后,依次以异丙醇、乙醚、双蒸水漂洗各 3 次,加入少许 250 mL/L 戊二醛置于 4℃ 冰箱固化 24 h,乙醚清洗,真空干燥后过筛,3 kGy 剂量的 $Co^{60}\gamma$ 线辐照消毒后备用。

1.2.2 rhBMP-2-GMs 的制备及性质检测 称取适量空白 GMs,浸泡于 4 mol/L 的 rhBMP-2 盐酸胍饱和溶液 24 h,负压冻干,称质量,计算微球前后质量差,并依此计算包封率。同时将两份干燥的 GMs 50 mg 置于 0.1 mol/L, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中,摇匀,置 37℃ 孵箱中,1 wk, 2 wk 后分别取出微球,冻干,称质量,按下列公式计算微球的降解率:降解率(%) = $W_2/W_1 \times 100\%$, W_1 为干微球的质量、 W_2 为已降解微球的质量。

1.2.3 人 PDLCs 的体外培养及来源鉴定 采用改良组织块法,收集临床上因正畸需要拔除的牙周健康、无龋的新鲜第一前磨牙,随即在无菌条件下用无血清 α -MEM 培养液冲洗 3 遍,以除去血液。刮取根中 1/3 牙周膜组织,均匀铺于 6 孔培养板底面。在饱和湿度、50 mL/L CO_2 , 950 mL/L 空气、37℃ 标准环境下静置孵育,6 h 后待组织块帖壁牢固,再加入 4 mL 培养液,继续培养。待细胞从组织块周围游出并铺满培养板底后,用 2.5 mL/L 胰蛋白酶消化传代,取 4~8 代细胞用于实验。波形丝蛋白及角蛋白免疫组化染色。

1.2.4 rhBMP-2-GMs 对 PDLCs 增殖和 ALP 细胞活性的影响 取生长良好的第 5 代人 PDLCs,离心收集,加入含 10 mL/L FCS 的 DMEM,调整细胞密度至 $1 \times 10^5/L$,接种 3 块 96 孔培养板,分组如下:rhBMP-2-GMs 组,加入 rhBMP-2-GMs,微球中所含 rhBMP-2 与溶液相对浓度分别为 10, 20, 40, 80 和 160 $\mu g/L$; rhBMP-2 组,加入 rhBMP-2 浓度分别为 10, 20, 40, 80 和 160 $\mu g/L$;对照组不加 rhBMP-2。各浓度组 18 孔,2 d 换液一次。标准环境下孵育 5 d 后每组取 3 孔行细胞计数。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖情况 各浓度组取 6 孔分别在培养第 6 日弃培养基,每孔加入无血清培养基 1 mL 和 MTT 100 μL ,标准环境下孵育 4 h 后弃上清,加二甲基亚砜 1 mL,振荡 10 min,选择 490 nm 波长,酶联免疫检测仪测定 A 值。

1.2.6 ALP 活性测定 第 7 日行 ALP 活性检测,每个浓度组 6 孔。各孔弃上清, Hank's 液冲洗 3 次,吸干,每孔加入 50 μL 的 1 mL/L Triton X-100 置 4℃ 冰箱中过夜,用吸管反复吹打,镜下观察已无完整细胞结构后每孔加入标准底物液(含对硝基苯酯二钠盐

和氯化镁)100 μL , 37℃, 30 min,以 1 mol/L 的 NaOH 终止反应,在酶联免疫检测仪上选择 410 nm 波长测定 A 值。

统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异特别显著。

2 结果

2.1 rhBMP-2-GMs 经图像分析仪检测,圆度为 1.02 ± 0.005 ,直径为 12~210 μm ,平均直径为 68.6 μm 。扫描电镜观察固化后的微球表面均匀、圆整(Fig 1)。药物的包裹率 78.5%,微球载药率为 5.8%,即每毫克微球中含 58 μg 。1 wk 时微球的降解率为 65%,2 wk 时微球的降解率为 86%。

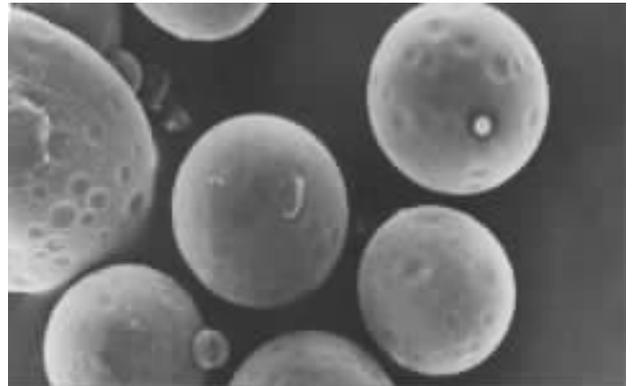


Fig 1 Scanning electron micrographs of gelatin microspheres $\times 300$

图 1 明胶微球扫描电镜照片

2.2 PDLCs 细胞呈放射状、漩涡状排列,呈长梭形,胞体丰满,胞突细长,胞质均匀,中央可见椭圆型或圆型的胞核,核仁清晰。免疫组化实验显示细胞波形丝蛋白染色阳性,角蛋白染色阴性,提示细胞来源于外胚间充质。

2.3 rhBMP-2 和 rhBMP-2-GMs 对人 PDLCs 的增殖作用 对照组 A 值为 0.18 ± 0.03 ,实验组各浓度 A 值见 Tab 1, rhBMP-2 组各浓度水平与对照组比较,所含 rhBMP-2 浓度为 20 $\mu g/L$ 时, $P < 0.05$,提示 PDLCs 的增殖活性与对照组比较有显著差异,所含浓度为 40, 80 和 160 $\mu g/L$ 时 $P < 0.01$,有特别显著差异, rhBMP-2-GMs 与对照组比较,在各浓度水平对人 PDLCs 的增殖作用与 rhBMP-2 有相似的结果, Tab 1 所示, rhBMP-2 和 rhBMP-2-GMs 两组间相比较,所含 rhBMP-2 浓度大于 40 $\mu g/L$ 时后者的细胞增殖效果更加显著。

2.4 rhBMP-2 和 rhBMP-2-GMs 对人 PDLCs ALP 活性的影响 对照组 A 值为 0.26 ± 0.03 , 实验组各浓度 A 值见 Tab 1, rhBMP-2 组各浓度水平与对照组比较, 所含 rhBMP-2 浓度为 $20 \mu\text{g/L}$ 时, $P < 0.05$, PDLCs 的 ALP 活性与对照组比较有显著差异, 所含浓度为 $40, 80$ 和 $160 \mu\text{g/L}$ 时 $P < 0.01$, 有特别显著差异, rhBMP-2-GMs 与对照组比较, 在各浓度水平对人 PDLCs ALP 活性的表达与 rhBMP-2 有相似的结果, Tab 1 所示, rhBMP-2 和 rhBMP-2-GMs 两组间相比较, 所含 rhBMP-2 浓度大于 $40 \mu\text{g/L}$ 时后者有更加显著的效果。

表 1 rhBMP-2 和 rhBMP-2-GMs 对人 PDLCs 的增殖作用及 ALP 活性的影响 (A 值)

Tab 1 Proliferation effect and the ALP activity of rhBMP-2 and rhBMP-2-GMs on PDLCs ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Proliferation effect		ALP activity	
	rhBMP-2-GMs	rhBMP-2	rhBMP-2-GMs	rhBMP-2
0	—	—	—	—
10	0.21 ± 0.04	0.20 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.04
20	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.04	0.37 ± 0.05^a	0.31 ± 0.04
40	0.35 ± 0.04^a	0.29 ± 0.04	0.46 ± 0.04^b	0.39 ± 0.03
80	0.44 ± 0.05^b	0.33 ± 0.03	0.55 ± 0.03^b	0.47 ± 0.06
160	0.46 ± 0.04^b	0.36 ± 0.04	0.54 ± 0.04^a	0.51 ± 0.04

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs rhBMP-2.

3 讨论

BMP 是目前所发现的唯一能在体内异位诱导成骨与软骨的细胞因子, 它能诱导未分化的间充质细胞分化, 表达骨与软骨细胞表型, 还能刺激软骨细胞和成骨细胞分化, 并提高细胞 ALP 的活性^[4]。其跨种诱导成骨的能力已被多次实验所证实^[5,6]。rhBMP-2 与骨组织中提取的 BMP 具有类似的理化性质, 单纯植入体内扩散太快, 也易被蛋白酶水解, 其优良的生物黏附性适用于眼、口腔、鼻腔、肠道等^[7]。已有实验证实 GMs 作用于上述部位能明显延长药物作用时间^[8]。GMs 的制备机制是明胶分子溶于水后伸展为纤维状, 在冷冻脱水的条件下卷曲, 并由多个分子凝聚成球状微粒, 在固化剂的作用下, 明胶分子形成三维网状的稳定结构, 因为药物分子与明胶分子之间有一定的亲和力, 从而使药物被明胶所吸附并被包裹于微粒中^[9]。国内目前尚无成熟的 GMs 制品, 用于实验的多为临时自制明胶颗粒。本实验制备微粒粒径适当, 平均粒径 $68.6 \mu\text{m}$, $50 \sim 200 \mu\text{m}$ 占 78%, 且制备工艺成熟, 具有可靠的重复性。实验中发现 GMs

在水介质中固化易黏连, 固化时可选择异丙醇-水系统, 固化好后用 20 mL/L 甘氨酸洗去过量固化剂, 再用异丙醇-乙醚洗, 吹干, 黏连现象有所缓解。

有研究表明, 牙周膜组织及细胞中有 BMP 分布, BMP 可促进 PDLCs 增殖和 DNA 合成, 升高 PDLCs 的 ALP 活性^[10]。本实验表明, rhBMP-2 和 rhBMP-2-GMs 均可以明显促进人 PDLCs 增殖、提高 ALP 活性, 并呈剂量依赖性。鉴于 BMP 在体内容易被酶解, 本实验将 rhBMP-2 包裹于 GMs 中, 利用其对 rhBMP-2 的缓释作用, 持续作用于 PDLCs, 对人 PDLCs 增殖和 ALP 活性的作用效果优于单独应用 rhBMP-2。体内 GMs 对 rhBMP-2 的缓释作用尚需进一步证实。

【参考文献】

- [1] Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues[J]. *J Periodontol*, 1976; 47: 256.
- [2] Danesh-Meyer MJ. Tissue engineering in periodontics using rhBMP-2[J]. *J Periodontol*, 2000; 25(8): 10-14.
- [3] 吴红, 吴道澄, 于开涛, 等. 平阳霉素明胶微球的制备及其释药特性[J]. *生物医学工程学杂志* 2003; 20(4): 646-649. Wu H, Wu DC, Yu KT, et al. Preparation of Pingyangmycin gelatin microspheres and drug release characteristics[J]. *J Biomed Eng*, 2003; 20(4): 646-649.
- [4] Hiraki Y, Inoue H. Bone morphogenetic protein (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cell *in vitro*[J]. *J Bone Miner Res*, 1991; 6(12): 1373-1385.
- [5] Cook SD, Dalton JE, Tan EH. *In vivo* evaluation of recombinant human osteogenic protein (rhOP-1) implants as a bone graft substitute for spinal fusion[J]. *Spine*, 1994; 19(15): 1655-1663.
- [6] 耐文华, 毛天球, 陈福林, 等. 重组人骨形成蛋白-2、胶原、珊瑚复合人工骨异位诱导成骨的实验研究[J]. *现代口腔医学杂志*, 2000; 14(4): 231-232. Wei WH, Mao TQ, Chen FL, et al. Experimental study on the bone inductivity of rhBMP-2 collagen and coral complex[J]. *J Mod Stom*, 2000; 14(4): 231-232.
- [7] Esposito E, Pastesini C. Controlled release of 1-D-arabinofuranosylcytosine from hydrophilic gelatin microsphere: *in vitro* studies[J]. *Inter J Pharm*, 1995; 17: 151-158.
- [8] Morimoto K, Katsumata H. Evaluation of gelatin microspheres for nasal intramuscular administrations of salmon calcitonin[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2001; 13: 179-185.
- [9] Welz M, Ofner C. Examination of self-crosslinked gelatin as a hydrogel for controlled release[J]. *J Pharm Sci*, 1992; 81(1): 85.
- [10] Kobayashi M, Takiguchi T, Suzuki R. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament[J]. *J Dent Res*, 1999; 78(10): 1624-1633.