

Eprgdnyr 修饰牛骨片的放射性示踪研究

仝 健¹, 张洪卫², 李怀芬², 牛惠生^{2,*}

(1. 天津医科大学 口腔医院, 天津 300070; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学 放射医学研究所, 天津 300192)

摘要: 骨组织缺损治疗的重要手段是在支架材料上引入粘附蛋白(RGD 八肽)和细胞生长因子等生物活性物质赋予材料表面成骨细胞增殖的条件。利用¹²⁵I-Eprgdnyr 放射性示踪技术研究经紫外线辐照活化的牛骨片在化学偶联剂(EDC)作用下的 Eprgdnyr 偶联量。结果表明: Eprgdnyr 偶联到牛骨片上的量与反应液中 Eprgdnyr 和 EDC 含量呈正相关。为利用放射性示踪技术进行骨重建支撑材料表面修饰研究提供依据。

关键词: Eprgdnyr(RGD 八肽); 骨组织工程; 放射性示踪

中图分类号: TQ463.7; R817.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-6931(2008)10-0879-04

Surface of Allogra on Bone-Cow of Eprgdnyr by Radioactive Tracing

TONG Jian¹, ZHANG Hong-wei², LI Huai-fen², NIU Hui-sheng^{2,*}

(1. Stomatological Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

2. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China)

Abstract: Growth bone tissue engineering is one of the creative medical fields in reconstruction of bone defect. It can provide the surface of the material with condition of rich osteoblast multiplication through bioactive materials such as Eprgdnyr (RGD peptide) and cell factor introduced in frame material. A quantity measure of the degree that the pieces of calf bone activated by the radiation of the ultra-violet couple RGD peptide onto the pieces of calf bone under the function of the EDC was given by tracer technique ¹²⁵I-Eprgdnyr. The result shows that the amount that RGD peptide couples onto the bone pieces has positive correlation to that of Eprgdnyr and EDC, aimed at providing scientific basis for facial modification of bone reconstruct and support material.

Key words: Eprgdnyr (RGD peptide); bone tissue engineering; radioactive tracing

骨缺损治疗的重要手段是选择有利于成骨细胞增殖和生长的支撑材料、种子细胞和促进细胞生长的生物活性因子,其中最关键的技术是支撑材料及表面修饰^[1-3]。已见报道的支撑

材料有金属(钛合金)、特种陶瓷和异体骨片(如牛骨),这些材料都因表面缺乏种子细胞生长的条件而影响细胞粘附的效率,限制了材料与组织界面的有效融合。因此,用结构上含有 RGD

类粘附蛋白修饰支撑材料的研究成为骨组织缺损治疗研究领域的热点^[4-5]。近年来,利用仿生学原理模拟细胞外基质蛋白与细胞间的微环境,利用物理化学方法将向支撑材料表面引入粘附性蛋白及细胞生长因子,在支撑材料表面人为创造种子细胞生长的微环境。20世纪80年代,人们从细胞外基质(ECM)中分离出的糖蛋白都在细胞粘附中起重要作用(称为粘附蛋白),它们在结构上均含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 Arg-Gly-Asp(RGD)三肽序列。文献^[6]首先确定了 RGD 类肽或蛋白是细胞结合位点。RGD 序列是分布广泛的细胞膜识别体系的信号单位,是粘附蛋白中能够为细胞膜整合素特异受体蛋白识别的特异肽段序列^[7-9]。我们采用无免疫排斥活性的牛骨片通过紫外辐射活化,再经化学偶联(EDC)方法将人工合成的含有 RGD 序列的八肽 Eprgdnyr (Glu-Pro-Arg-Gly-Asp-Asn-Tyr-Arg)结合到骨片上,再将修饰后的骨片植入骨重建环境中,满足了成骨细胞增殖生长的要求^[10-12]。本研究拟利用放射性示踪技术,解决牛骨片通过紫外线辐照和化学偶联方法使 RGD 序列的八肽共价偶合数量的测定方法,为骨重建研究提供技术支持。

1 实验材料

1.1 主要试剂

人工合成 Eprgdnyr(含 RGD 八肽, Glu-Pro-Arg-Gly-Asp-Asn-Tyr-Arg), 相对分子质量 1 006.5, 纯度 $\geq 98\%$, Peptide 生物工程公司; 氯胺-T(ch-T), Aldrich; 偏亚硫酸钠, 分析纯, 天津市化学试剂二厂; 肽偶联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC), 化学纯度 $\geq 99\%$, Sigma 公司; Na^{125}I , 3.7 GBq/mL, (643.8 GBq/mg), PerkinElmer 公司; Sephadex G-50, Pharmacia 公司; 牛骨片, 自制牛密质骨切制成 10.0 mm \times 5.0 mm \times 0.2 mm 薄片, 脱脂洗净, 真空干燥密封包装, 辐射灭菌后备用。

1.2 主要仪器

SN-6100 型全自动放射免疫 γ 计数器, 上海核所日环光电仪器有限公司; 百万分之一电子天平, 瑞士产; ZSZ-20(20 W) 主线 253.7 nm 紫外灯, 天津广泽特种光源有限公司; PY-120

水平脱色摇床, 北京鼎国生物技术发展中心; 微型 PH 仪(PH-meter G817), 东海医理科株式会社; 电子显示卡尺, 上海量具厂生产。

2 实验方法

2.1 ^{125}I -RGD 制备^[13]

取 50 μL 20 g/L Eprgdnyr 加入 2 mL 具塞锥形塑料管中, 再加入 10 μL 3.7 \times 10⁷ Bq Na^{125}I 溶液, 继续加入 50 μL 1.0 g/L ch-T 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应 1.0 min, 之后, 加入 50 μL 1.0 g/L 偏重亚硫酸钠终止反应。反应液全部转移到经蛋白和碘化钠吸附及 50 mol/L、pH=7.4 磷酸缓冲液平衡的 Sephadex G-75 (1.0 mm \times 15 cm) 柱层析, 用 50 mol/L、pH=7.4 磷酸缓冲液洗脱, 流速约 1 滴/min, 每管收集 5 滴, 收集 80 管, 每管取 1.0 μL 到测量管中进行放射强度测定, ^{125}I -Eprgdnyr 层析峰合并, 总体积 2.0 mL, ^{125}I -Eprgdnyr 总活度为 1.628 \times 10⁷ Bq, 比活度为 11.7 kBq/ μg 。

2.2 Eprgdnyr 偶联到牛骨片上方法^[14]

把实验用牛骨片(每实验组 8 片)浸泡在无菌去离子水中 24 h, 吸干水分后, 在 20 W 紫外灯 40 cm 处正反两面各照射 1.0 h, 然后分别装入 2.0 mL 含有一定量 ^{125}I -Eprgdnyr (RGD 八肽) 和 Eprgdnyr(0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 和 4.0 mg/mL) 的反应液中, 在 PY-120 摇床上振摇 30 min, 用 0.1 mol/L HCl 溶液调节 pH 至 4.5~4.7 后, 分别加入偶联剂(EDC)60 μL (终浓度为 3%), 继续振摇 30 min, 再调 pH 至 4.5~4.7, 继续摇振 24 h, 再分别加入 60 μL EDC, 振摇 30 min 后, 再调 pH 至 4.5~4.7, 振摇 24 h 后, 弃去反应液, 每次 2.0 mL 水洗, 每间隔 2 h 更换水, 连续 6 次, 弃水后, 用丙酮连续脱水 3 次, 然后再水洗 5 次, 取出骨片自然干燥后, 测量放射性强度。用卡尺测量骨片的长、宽和厚。

3 结果与讨论

3.1 牛骨片偶联 Eprgdnyr 量及偶联量与 Eprgdnyr 浓度间的关系

Eprgdnyr 在反应液中浓度为 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 和 4.0 g/L, EDC 浓度为 3%, 共分 6 组, 每组 8 片牛骨, 约 20 $^{\circ}\text{C}$ 下进行偶合反应, 结果列于表 1。

表 1 Eprgdnyr 偶联牛骨片量结果统计
Table 1 Results of amount on Eprgdnyr-calf bone

样品编号	Eprgdnyr 浓度/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	牛骨片体积/ mm^3		变异系数/%	Eprgdnyr 偶联量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-2})$		变异系数/%
		平均值	标准差		平均值	标准差	
1	3×10^{-5} ¹⁾	111.8	6.0	5.4	0.001	0.002	0.16
2	0.1	109.3	4.9	4.5	0.20	0.02	10.0
3	0.5	110.5	9.6	8.5	0.42	0.09	21.0
4	1.0	111.4	5.8	5.2	0.79	0.21	26.0
5	2.0	111.2	5.1	4.6	1.09	0.09	8.0
6	4.0	114.4	5.9	5.2	1.25	0.19	15.0

注:1) ^{125}I -RGD 带入的 RGD

从表 1 可看出:骨片制作很规范,总体积为 $111.8 \sim 109.3 \text{ mm}^3$ 。牛骨片接枝 Eprgdnyr 的量与反应液中 Eprgdnyr 浓度成正相关,当 Eprgdnyr 浓度为 $0.1 \sim 1.0 \text{ mg/mL}$ 时,Eprgdnyr 接枝到牛骨片量 ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) 线性增加;Eprgdnyr 浓度 $>1.0 \text{ g/L}$ 时,Eprgdnyr 接枝到牛骨片上的量则表现为随 Eprgdnyr 浓度的增加而平缓增加的趋势,与文献[15-16]的结果一致。

3.2 Eprgdnyr 偶联牛骨片量与反应液中偶联剂(EDC)浓度关系

牛骨片接枝 Eprgdnyr 量与反应液中偶联剂(EDC)浓度的关系(图 1)显示出 Eprgdnyr 接枝量对 EDC 浓度有依赖性。研究表明:采用紫外线辐照与化学偶合法可将反应液中的 Eprgdnyr 接枝到牛骨片上的量与反应液中 EDC 和 Eprgdnyr 浓度呈正相关^[17]。

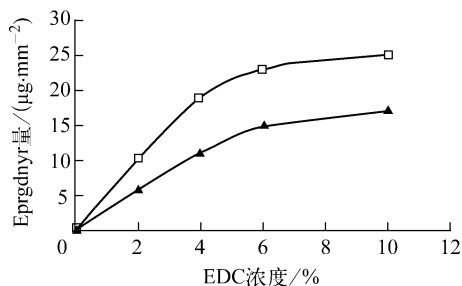


图 1 Eprgdnyr 偶联量与偶联剂(EDC)浓度关系

Fig. 1 Picture of Eprgdnyr-calf bone with EDC concentration

Eprgdnyr 浓度, mg/mL : ▲——2.0; □——4.0

4 结论

骨组织缺损治疗研究中支架材料的修饰给靶细胞创造良好的增加繁殖的环境。近年来,修饰材料多采用靶细胞膜外整合素特异识别肽(Arg-Gly-Asp, RGD)及 RGD 衍生肽类,采用物理化学方法修饰到支架表面,修饰程度至今无法判断。本工作用放射性示踪法对 RGD 八肽修饰支架(牛骨片)进行量化研究,初步解决了骨重建工程的支架表面修饰程度研究的技术问题。

参考文献:

- [1] 柯俐,陈璐璐. 整合素与骨重建[J]. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5(1): 79-82, 15.
KE Li, CHEN Lulu. Integrin with bone remodeling[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 1999, 5(1): 79-82, 15(in Chinese).
- [2] STOCK U A, VACANTI J P. Tissue engineering: Current state and prospects[J]. Ann Rev Med, 2001, 52: 443-451.
- [3] SERVICE R F. Tissue engineering build new bone[J]. Science, 2000, 289(5 484): 1 498-1 500.
- [4] 郭晓东,袁泉,郑启新,等. 具有骨诱导活性的仿生骨基质材料的制备[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(8): 985-987.
GUO Xiaodong, YUAN Quan, ZHENG Qixin, et al. Preparation and characterization of oligopeptide modified PLGA-[ASP-PEG] biomimetic scaffolds[J]. Chin J Exp Surg, 2006, 23(8): 985-987(in Chinese).
- [5] 兰旭,梁军,葛宝丰,等. RGD 多肽表面修饰对 HA-TCP 生物陶瓷细胞相容性的影响[J]. 口腔医学研究, 2007, 23(4): 383-385.

- LAN Xu, LIANG Jun, GE Baofeng, et al. Effect of surface modification of RGD peptide on cellular compatibility of HA-TEP bioceramics [J]. Journal of Oral Science Research, 2007, 23(4): 383-385(in Chinese).
- [6] PIERSCHBACHER M D, RUOSLATEI E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule [J]. Nature, 1984, 309: 30-33.
- [7] 刘红洁,王荣福,张春丽,等. ^{131}I 标记 RGD 环肽在荷瘤小鼠体内分布与显像研究[J]. 中国医学影像技术, 2008, 24(1): 131-133.
- LIU Hongjie, WANG Rongfu, ZHANG Chuhli, et al. Studies on distribution and imaging of ^{131}I -labelled RGD peptide in mice bearing tumors [J]. Chin J Med Imaging Technol, 2008, 24(1): 131-133(in Chinese).
- [8] HAU Y, WINN S R, KRAJBICH I, et al. Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid bone cell attachment and differentiation *in vitro* [J]. J Biomed Mater Res, 2003, A64: 583-590.
- [9] 邱凯,陈馨,万昌秀. 骨组织工程支架材料聚磷酸钙生物陶瓷研究进展[J]. 生物医学工程杂志, 2005, 22(3): 614-617.
- QIU Kai, CHEN Xin, WAN Changxiu. Advances in research on calcium polyphosphate bioceramic for bone engineering scaffold [J]. J Biomed Eng, 2005, 22(3): 614-617(in Chinese).
- [10] 黄辉,马轩祥,付涛,等. 生物材料表面固定粘附肽调节小鼠成骨细胞骨钙素的表达[J]. 实用口腔医学杂志, 2001, 17(2): 86-88.
- HUANG Hui, MA Xuanxiang, FU Tao, et al. Arg-Gly-Asp peptide on pure golden coated titanium regulates osteocalcin mRNA expression in osteoblasts *in vitro* [J]. J Pract Stomatol, 2001, 17(2): 86-88(in Chinese).
- [11] 李长文,郑启新,郭晓东,等. RGD 多肽修饰的改性 PLGA 仿生支架材料对骨髓间充质干细胞粘附性影响的研究[J]. 中华医学杂志, 2005, 29(6): 439-441.
- LI Changwen, ZHENG Qixin, GUO Xiaodong, et al. MSC adhesion to PLGA modified with RGD peptide [J]. National Medical Journal of China, 2005, 29(6): 439-441(in Chinese).
- [12] 张志友,方佩华,侯秉璋,等. 细胞粘附分子-1 ^{125}I 标记及其纯度免疫活性的鉴定[J]. 天津医科大学学报, 2001, 7(3): 323-325.
- ZHANG Zhiyou, FANG Peihua, HOU Bingzhang, et al. Labeling intercellular adhesion molecule 1 with ^{125}I and the identification of its purity and immune activity [J]. Journal of Tianjin Medical University, 2001, 7(3): 323-325 (in Chinese).
- [13] 马亮,王洪,杨述华,等. RGD 序列肽修饰的丝素蛋白仿生支架材料对骨髓间充质干细胞黏附、增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(48): 9 667-9 670.
- MA Liang, WANG Hong, YANG Shuhua, et al. Adhesion and proliferation of narrow mesenchymal stem cells cultured on silk fibroin biomaterial modified with RGD peptide [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research December, 2007, 11(48): 9 667-9 670(in Chinese).
- [14] 薛延,高璐,王芊,等. RGD 多肽(225): 一种抗骨丢失新制剂的实验研究[J]. 中国全科医学, 2005, 8(2): 109-111.
- XUE Yan, GAO Lu, WANG Qian, et al. The experimental study on a new-bone loss agent RGD-peptide(225) [J]. Chinese General Practice, 2005, 8(2): 109-111(in Chinese).
- [16] 邱凯,陈馨,李天全,等. 生物活性短肽 RGD 在骨组织诱导再生中的研究进展[J]. 生物医学工程杂志, 2003, 20(3): 546-549.
- QIU Kai, CHEN Xin, LI Tianquan, et al. The advance of bioactive peptide RGD in the research of bone regeneration [J]. J Biomed Eng, 2003, 20(3): 546-549(in Chinese).
- [17] SAIKI I, MURATA J, MAKABE T, et al. Inhibition of tumore angiogenesis by synthetic cell-adhesive polypeptide containing the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence offibronectin, poly9(RGD) [J]. Jpn J Cancer Res, 1990, 81(6-7): 668-675.