

四种骨组织替代材料对成骨细胞 IGF-1 mRNA 表达水平影响的研究

欧国敏 陈治清

摘要 采用 SD 乳鼠颅顶骨体外培养成骨细胞, 运用核酸分子原位杂交技术研究了三个时期, 4 种骨组织替代材料对成骨细胞 IGF-1 mRNA 表达水平的影响。结果表明, 替代材料能够影响成骨细胞 IGF-1 mRNA 的表达, 其表达规律的检测有可能成为评价骨组织替代材料生物相容性的一个指标。

关键词 IGF-1 mRNA 核酸原位杂交 成骨细胞 骨组织替代材料

胰岛素样生长因子-I(IGF-1)mRNA 在成骨细胞中的表达¹, 以及其膜受体² 和结合蛋白³ 的发现, 已成为骨形成与改建研究中的热点之一。IGF-1 能协调成骨细胞成熟过程中细胞增殖与分化这两个互相反馈制约的过程⁴。但是, 对成骨细胞功能能够产生影响的生物材料, 能否影响成骨细胞的 IGF-1 mRNA 表达, 以及 IGF-1 mRNA 的表达与成骨细胞的增殖、分化状态之间的联系, 目前尚不清楚。

本研究采用体外细胞培养实验, 建立了骨组织替代材料与成骨细胞相互作用的实验模型⁵, 利用核酸原位杂交技术, 研究不同骨组织替代材料对成骨细胞 IGF-1 mRNA 表达水平的影响, 探讨 IGF-1 mRNA 表达水平与成骨细胞功能状态的关系。

1 材料和方法

1.1 成骨细胞的培养及制备

大鼠成骨细胞体外培养的材料、方法和成骨细胞的鉴定见参考文献⁵。

1.2 实验用骨组织替代材料及制备

4种骨组织替代材料: 生物玻璃陶瓷(BGC, 华西医科大学口腔生物医学工程重点实验室提供); 钛合金(Ti6Al4V, 宝鸡有色金属研究所提供); 羟基磷灰石(HA, 华西医科大学口腔生物材料研究室提供); 羟基聚磷酸钙钠(HPA, 中国科学院成都有机化学研究所提供)。

HA, BGC, HPA 3种实验用陶瓷类材料的尺寸为: 直径 5 mm, 厚度 1 mm; Ti6Al4V 合金直径 3 mm, 厚度 1 mm。经 95% 乙醇浸泡, 在蒸馏水内用超声波振荡清洗 3 遍, 100℃ 烘箱干燥, 37℃ 烘箱保存备用。

1.3 IGF-1 mRNA 原位杂交实验

1.3.1 材料表面的成骨细胞培养及细胞涂片制备 将第三代成骨细胞经胰蛋白酶消化后(浓度 $5 \times 10^5/\text{ml}$) 接种到置于培养瓶中的材料表面, 分别在 3 d, 7 d 和 21 d 取样, 经胰酶消化, 加入 199 培养液, 用液体轻轻敲打材料表面。将细胞悬液移入离心管中, 1200 r/min, 离心 8 min。倾去上清液, 加入 $1 \times \text{PBS}$, 重复离心, 将细胞悬液涂于玻片表面(表面有多聚赖氨酸), 室温吹干, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 吹干后 4℃ 保存备用。

1.3.2 细胞核酸原位杂交用主要试剂 IGF-1 寡聚核苷酸探针由上海细胞所赛尔公司合成, 探针序列为: 5'TCC ACA CAC GAA CTG AAG AGC ATC CAC CAG 3', 地高辛(Dig)标记 3' 末端加尾标记试剂盒及地高辛标记检测试剂盒(Boehringer Mannheim); RNA 酶(Sigma)。

1.3.3 寡聚核苷酸末端标记 标记反应体系为 $5 \times$ 反应缓冲液 4 μl , CoCl₂ 4 μl , Dig-11-dUTP 1 μl , 寡聚核苷酸 1 μl (100 pmol), dATP 1 μl , 末端转移酶 1 μl , 双蒸水 8 μl , 将反应管置于冰上。混匀后于 37℃ 水浴 20 min, 然后置于冰上; 1 μl 糖原和 200 μl 0.2 mol/L EDTA 混合液, 取其 2 μl 加入反应管, 以终止反应。加 2.5 μl 4 mol/L LiCl, 75 μl 冷乙醇于反应管, -70℃ 下沉淀核苷酸 0.5 h; 1300 r/min 冷冻离心 15 min; 倾去乙醇, 再加 50 μl 70% 冷乙醇, 洗涤沉淀, 重复离心; 冷风吹干沉淀, 加 20 μl 双蒸水, -20℃ 下保存备用。

1.3.4 核酸原位杂交程序 取出细胞涂片, 风干 10 min; 二乙基焦碳酸(DEPC) 0.1% 水液重新水化 5 min, 风干; 用 RNA 酶(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理作阴性对照; 其它各种阳性和阴性对照以及实验组用 $1 \times \text{PBS}$ (37℃) 一起孵育 30 min; DEPC 液洗, 5 min \times 2, 风干; 杂交液探针浓度 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37℃ 杂

本课题为国家自然科学基金资助项目

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院

交 16 h; 2 × SSC 15 m in × 1, 0.2 × SSC 10 m in × 1, Buffer (I) 浸; 抗 Dig-Ap 酶(1 500), 37 , 50 m in; Buffer (I) 10 m in × 2, Buffer (III) 5 m in × 2, 20 显色(显色液为: NBT 4 μl+ BCIP 3 μl+ Buffer (III) 1 m l, 水洗, 终止后用甲基绿衬染细胞核。

1.3.5 原位杂交结果观察和计算机图像分析 原位杂交结果, 以细胞浆染为紫红色为阳性, 图像分析以细胞浆区染色的灰度为参数进行测定, 并进行统计学方差分析和 *t* 检验。

2 结 果

阴性对照片, 成骨细胞胞核被染为绿色, 胞浆未着色, 为阴性结果。

4 种骨组织替代材料接种成骨细胞, 成骨细胞原位杂交结果, 胞浆阳性, 呈紫红色, 胞核经甲基绿衬染为绿色, 各组细胞染色深浅有差异(见图 1, 2), 但总的趋势是细胞阳性程度与实验时间有关, 并受实验材料理化性质的影响。

不同时期材料对成骨细胞 IGF-ImRNA 表达的影响结果见附表。在 3 d, 7 d 两个时期中, HA, HPA 组阳性程度均高于对照组, 而 BGC 与对照组相近。Ti6Al4V 7 d 时 IGF-ImRNA 表达较 3 d 时增高, 这两期内 IGF-ImRNA 的表达程度存在显著性差异。21 d 时各材料组细胞表达 IGF-ImRNA 均减弱, 且与对照组无显著性差异。

附表 不同时期 4 种材料

对成骨细胞 IGF-ImRNA 表达影响的结果

分组	IGF-ImRNA ($\bar{x} \pm s$)		
	3 d	7 d	21 d
对照组	127.38 ± 6.04	123.46 ± 12.29	112.55 ± 8.61
HPA	141.30 ± 7.52*	139.86 ± 13.51*	114.82 ± 24.06
HA	140.04 ± 9.33*	128.15 ± 10.36	106.35 ± 11.00
BGC	129.50 ± 14.99	116.40 ± 14.63	114.43 ± 8.88
Ti	125.77 ± 7.16	132.25 ± 13.48*	121.38 ± 14.68

对照组: 不加任何材料组

* 各材料与同期对照组之间存在显著性差异 $P < 0.05$

3 讨 论

自 Bindeman 首次用大鼠颅骨培养出成骨细胞以来, 人们用体外细胞培养模型, 研究了不同组成和结构的植入材料对成骨细胞的影响。本实验选用 SD 乳鼠颅骨成骨细胞体外培养, 研究了 4 种替代材料对成骨细胞 IGF-ImRNA 表达水平的影响。

本实验发现成骨细胞接种于材料表面后 3 d, HA 和 HPA 组细胞的 IGF-ImRNA 表达较强, 而 Ti6Al4V, BGC 组与空白对照组无显著性差异。这可能与 HA, HPA 的晶体结构、表面亲和性有关。HA, HPA 能够快速吸附培养液中的蛋白质成份, 使骨细胞快速附着, 对成骨细胞的增殖早期产生促进作用。而成骨细胞在金属钛表面达到附着、增殖的时间可能较长些。7 d 后, 成骨细胞功能处于活跃状态, HA, HPA 组的 IGF-ImRNA 表达水平仍然较高, HPA 组最高, 这可能与 HPA 的活性有关⁶, 它具有交换和捕捉 Ca^{2+} 的能力, 对成骨细胞基质形成的促进作用大, 进而影响到 IGF-ImRNA 的表达。7 d 时钛合金组的 IGF-ImRNA 表达较 3 d 时有显著性增强, 这可能与钛合金表面已经形成一层很薄的细胞外基质有关, 它的形成完全改变了钛合金的表面性质, 细胞逐渐适应了这种表面结构, 并

通过材料表面不断变化的成份, 对成骨细胞的功能产生了影响。21 d 时, 除钛合金外, 各组 IGF-ImRNA 水平均较低, 这可能与细胞的分化和成熟有关。而此时钛合金组 IGF-ImRNA 表达仍较强, 可能与钛合金所引起的成骨细胞分化时期出现较晚有关, 这一点与体内实验时, 钛合金植入后达到骨性结合的时间较磷灰石类长是相一致的。在整个实验中, BGC 对成骨细胞的影响较小, 与其他学者所报道的该材料生物相容性评价结果不同, 可能与所用材料不完全相同有关。

本实验表明, 不同替代材料能够不同程度影响成骨细胞对 IGF-ImRNA 的基因表达水平。这种影响可能与替代材料改变了细胞外基质成份和结构有关, 因为不同材料表面形成的细胞外基质层是不同的, 细胞外基质通过细胞膜上的结合蛋白或受体与细胞内骨架结构相连, 而细胞骨架结构和基因表达之间存在联系, Sloan 等⁷ 认为肌动蛋白丝的重新组织是启动不同蛋白相应基因的前提。已有文献表明⁸, 细胞基因的表达会受到细胞外基质的影响, 并且在细胞形态改变之前, 基因表达已经受到影响。

已有研究表明⁴ 成骨细胞在成熟过程中, 其功能状态有一个重要的转折点, 即成骨细胞的增殖、基质形成向基质成熟、矿化的转变, 这种功能状态的转变相互反馈制约 每一期都以某些特定蛋白基

因表达为特征, 基因表达之间相互促进、制约。Hock 等⁹研究了 IGF-I 对成骨细胞增殖与分化的效应, 发现 IGF-I 作用于前成骨细胞和已具分化的成骨细胞的机制是不同的, 彼此相互独立。其它研究也表明 IGF-I 能促进前成骨细胞的增殖, 且同时增加成骨细胞合成 I 型胶原¹⁰ 和骨钙蛋白 (osteocalcin)¹¹, 增加成骨细胞碱性磷酸酶的活性。IGF-I 所具有的这种既可以刺激前成骨细胞的增殖, 又可以促进新形成的成骨细胞进一步高度分化的性质是非常重要的, 因为前期细胞的增殖与骨早期形成的量和后期细胞分化程度与骨的分化、钙化程度分别相关。本实验表明 IGF-I mRNA 的表达水平与材料对成骨细胞的影响有关, 而成骨细胞的增殖和分化状态的改变能够反映材料的生物学性能。IGF-I mRNA 的表达规律与骨组织替代材料的生物学性能有一定的联系。成骨细胞 IGF-I mRNA 表达的检测, 有可能成为评价骨组织替代材料生物相容性的一个指标。

(本文图见中心插页 6)

4 参考文献

- 1 Canalis E, McCarthy T, Centrella M, et al Isolation and characterization of insulin-like growth factor- I from cultures of fetal calvariae Endocrinology, 1988, 122: 22
- 2 Sloopweg MC, Hoogerbrugge CW, Depoortor TL, et al The presence of classical insulin-like growth factors type- I and II receptor on mouse osteoblasts: autocrine /pa-

- racrine growth effects of IGFs J Endocrinol, 1990, 125 (2): 271
- 3 Lamson G, Gindice LC, Rosenfeld KG, et al Insulin-like growth factor binding proteins structural and molecular relationships Growth Factors, 1991, 5(1): 19
- 4 Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation / differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype Endocr Rev, 1993, 14(4): 424
- 5 唐 昭, 陈治清 大鼠成骨细胞体外培养的研究 华西口腔医学杂志, 1997, 15(1): 70
- 6 陈治清, 张 敏, 管利民, 等. 具有生物活性的人体骨组织替代材料的研究(715- 29- 01- 02)内部资料
- 7 Sloan P. Current concepts of the role of fibroblasts and extracellular matrix in wound healing and their relevance to oral implantology. J Dent, 1991, 19: 107
- 8 Davies JE. The Bone-biomaterials Interface Toronto: University of Toronto press, 1991: 205
- 9 Hock JM, Centrella M, Canalis E, et al Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication Endocrinology, 1988, 122: 206
- 10 McCarthy TL, Centrella M, Canalis E, et al Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial culture Endocrinology, 1989, 124: 301
- 11 Canalis E, Lian JB. Effects of bone associated growth factors on DNA collagen and osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae Bone, 1988, 9: 243

(1996- 11- 14 收稿)

The Research on Effect of Four Kinds of Substitutive Materials for the Bone Tissues on IGF- I mRNA Expression Level of Osteoblast

Ou Guomin, Chen Zhiqing

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

The authors studied the expression level of IGF-I mRNA of osteoblasts cultured from the rats' calvarias, affected by four kinds of substitutive materials for bone tissues, using the technique in situ hybridization. The result showed that the substitutive materials could affect the expression level of IGF-I mRNA of osteoblasts. The measurement of expression regulation may be a parameter for evaluation of biocompatibility of substitutive materials for bone tissues.

Key words: IGF-I mRNA in situ hybridization osteoblast