

骨科学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000249

钛纳米管及不同化学诱导条件对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

王明, 张赫, 杨生, 王璐

(重庆医科大学附属口腔医院修复科、口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室; 重庆 401147)

【摘要】目的:在不同培养基中,对比研究 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在 TiO_2 纳米管表面的成骨向分化特点。**方法:**分离并纯化 MSCs,电化学阳极氧化法制备 TiO_2 纳米管。使用 4 种培养体系:常规培养体系、抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠培养体系、抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+ $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D3 培养体系、抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+地塞米松培养体系,分别在光滑面纯钛片,管径 30、70、100 nm 的 TiO_2 纳米管表面培养 MSCs, 3、7、14 d 后检测碱性磷酸酶活性; 21 d 后检测钙沉积量; 14 d 后 real-time PCR 检测成骨相关基因 Runx2 及 OSX 的表达。**结果:**同一种 TiO_2 纳米管结构表面,抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+地塞米松组碱性磷酸酶活性 ($F=338.542, P=0.000$)、钙沉积量 ($F=417.012, P=0.000$) 及成骨相关转录因子 Runx2 ($F=14.419, P=0.000$) 和 OSX ($F=42.011, P=0.000$) 的表达均较其他组高,差异具有统计学意义;同一种培养体系下,管径 30 nm 的 TiO_2 纳米管结构表面碱性磷酸酶活性 ($F=53.170, P=0.000$)、钙沉积量 ($F=264.268, P=0.000$) 及成骨相关转录因子 Runx2 ($F=3.196, P=0.037$) 及 OSX ($F=5.895, P=0.003$) 的表达均较其他组高,差异具有统计学意义。培养体系与材料结构有交互作用(碱性磷酸酶活性 ($F=6.322, P=0.000$)、钙沉积量 ($F=33.330, P=0.000$)、OSX 的表达量 ($F=2.825, P=0.015$),其中抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+地塞米松培养体系和管径 30 nm 的 TiO_2 纳米管结构是最佳组合。**结论:**MSCs 的成骨向分化与材料的表面结构和诱导药物的化学刺激相关。在相同的 TiO_2 纳米管结构表面, MSCs 在抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+地塞米松培养体系下成骨向分化能力较好;在相同培养体系下,管径 30 nm 的 TiO_2 纳米管结构更有利于 MSCs 的成骨向分化;抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+地塞米松培养体系和管径 30 nm 的 TiO_2 纳米管结构的组合条件最有利于 MSCs 的成骨向分化。

【关键词】骨髓间充质干细胞; TiO_2 纳米管; 成骨分化; 地塞米松; $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D3

【中图分类号】R318.08

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-01-09

Influences of TiO_2 nanotubes and chemical stimulation on osteogenetic differentiation of MSCs

Wang Ming, Zhang He, Yang Sheng, Wang Lu

(Department of Prosthodontics, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences)

【Abstract】Objective: To investigate the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) derived from Sprague Dawley rats on TiO_2 nanotubes under different inducing conditions. **Methods:** Isolated and purified MSCs were cultured on the surface structures of plane titanium and TiO_2 nanotubes anodized of 30, 70, 100 nm diameter. Four osteogenic differentiation methods were approached: regular culture medium (control group), regular medium with L-Ascorbic acid and β -glycerophosphate, regular medium with L-ascorbic acid, β -glycerophosphate and $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3 and regular medium with L-ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone. Alkaline phosphatase (ALP) activities of all groups were analyzed on 3, 7, 14 d after the culture, respectively. Calcium deposition was detected on 21 d after the culture. Real-time PCR was applied to quantitate the expression of osteoblast related

gene Runx2 and OSX on 14 d after the culture. **Results:** MSCs cultured on the same surface structure demonstrated higher ALP activity ($F=338.542, P=0.000$), calcium deposition ($F=417.012, P=0.000$) as well as Runx2 ($F=14.419, P=0.000$) and OSX ($F=42.011, P=0.000$) gene expression in the L-ascorbic acid + β -glycerophosphate + dexamethasone group than in the others, with statistically significant differences. Within the same culture condition, ALP activity ($F=53.170, P=0.000$), calcium deposition ($F=264.268, P=0.000$) and Runx2 ($F=3.196, P=0.037$) and OSX ($F=5.895, P=0.003$) gene expression were much higher on the

作者简介: 王明, Email: wswm126@126.com,

研究方向: 生物材料。

通信作者: 王璐, Email: ysdentist@hotmail.com。

基金项目: 重庆市科委自然科学基金一般资助项目 (编号: cstc2012jjA0178); 重庆市卫生局面上资助项目 (编号: 2012-2-121); 高等学校博士学科点专研基金新教师资助项目 (编号: 20125503120009); 重庆医科大学口腔医学院博士科研启动基金资助项目 (编号: 2011)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1109.006.html> (2014-04-28)

surface structure of 30 nm diameter TiO_2 nanotubes, with statistically significant differences. Culture condition and material structure had interactions (ALP activity ($F=6.322, P=0.000$), calcium deposition ($F=33.330, P=0.000$) and gene expression of OSX ($F=2.825, P=0.015$)), in which L-ascorbic acid + β -glycerophosphate + dexamethasone culture and 30 nm diameter TiO_2 nanotubes was the best combination. **Conclusion:** The osteogenic differentiation of MSCs can be influenced by both the structure of material surface and chemical stimulation. On the same surface structure, MSCs in the L-ascorbic acid + β -glycerophosphate + dexamethasone culture group has greater potential of osteogenic differentiation than the others. Under the same chemical stimulation, MSCs on 30 nm diameter TiO_2 nanotubes are more apt to differentiating towards osteoblasts than the way on other surface structures. The combination condition of L-ascorbic acid + β -glycerophosphate + dexamethasone culture and 30 nm diameter TiO_2 nanotubes is most conducive to the osteogenic differentiation of MSCs.

【Key words】mesenchymal stem cell; TiO_2 nanotubes; osteogenic differentiation; dexamethasone; $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D3

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是具有多向分化潜能的成体干细胞^[1-2]。如何高效诱导其成骨向分化一直以来是骨组织工程研究的热点问题^[3-9]。学者们普遍认为不同的培养基对 MSCs 成骨向分化的影响不同^[5]。MSCs 的体外分化不仅会受到培养基化学成分的影响, 还会受到细胞贴附表面结构的制约。钛是骨组织工程中最常用的植入材料。研究 MSCs 的体外诱导分化条件和其在不同结构表面的成骨向分化规律, 有利于掌握 MSCs 体外分化的最优条件, 为钛种植材料表面的优化设计提供参考。体外诱导 MSCs 成骨向分化的经典方法是抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠和地塞米松的联合使用^[8], 而部分学者认为含有 $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D3 的培养基更能促进 MSCs 成骨向分化^[3]。由于 TiO_2 纳米管具有高比表面积和有序的一维内部结构, 相对于光滑面纯钛而言, TiO_2 纳米管更有利于 MSCs 的成骨向分化^[10]。因此本实验综合考察了不同培养基及 TiO_2 纳米管表面结构对 MSCs 成骨向分化的影响, 以探索 MSCs 在 TiO_2 纳米管表面成骨向分化的有利条件。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

钛片 (天津阿尔法公司); 茜素红 (天津阿尔法公司); 油红 O (Invitrogen); 胎牛血清 (Hyclone); DMEM/F12 培养基 (Hyclone); 青霉素/链霉素 (Invitrogen); L-谷氨酰胺 (Invitrogen); 抗坏血酸 (Sigma, CAS 号: 50-81-7); β -甘油磷酸钠 (Sigma, CAS 号: 154804-51-0); $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D3 (Sigma, CAS 号: 32222-06-3); 地塞米松 (J&K Scientific, CAS 号: 50-02-2); 扫描电镜 (FEINova 400 Nano SEM, Phillips Co, Holland); 碱性磷酸酶活性测试盒 (南京建成, A059-2); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) (碧云天, P0010S); RNA 提取试剂盒 (TaKaRa,

Code: RR9108)、逆转录试剂盒 (TaKaRa, Code: RR047A) 及 SYBR 定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa, Code: RR820A); 倒置显微镜 (TE2000-U, 尼康); 酶标仪 (F039300, TECAN); 定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX96)。

1.2 实验方法

1.2.1 MSCs 的提取、培养 采用贴壁筛选法分离纯化 MSCs, 使用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、12 $\mu\text{mol/L}$ L-谷氨酰胺的 DMEM/F12 培养基进行培养。

1.2.2 形态学鉴定 倒置显微镜观察 P3 代 MSCs 形态。选取 P3 代 MSCs 以 5×10^3 个/ cm^2 的密度接种, 制作细胞爬片, 培养 1 d 后进行 HE 染色。

1.2.3 诱导成骨分化鉴定 配制含 50 $\mu\text{g/ml}$ 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 DMEM/F12 成骨诱导液。将 P3 代 MSCs 以密度 6×10^3 个/ cm^2 接种于 6 孔板中, 使用上述普通培养基培养。2 d 后更换新鲜成骨诱导液, 之后每隔 2 d 换液。成骨诱导 21 d 后使用 40 mmol/L 茜素红染色。倒置显微镜观察。

1.2.4 诱导成脂分化鉴定 配制含 5 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、50 $\mu\text{mol/L}$ 吡嗪美辛、10% 胎牛血清、1% 青/链霉素的 α -MEM 成脂诱导液。将 P3 代 MSCs 以密度 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 以含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 α -MEM 培养基培养 1 d。第 2 天更换新鲜成脂诱导液, 之后每隔 2 d 换液。诱导 14 d 后进行油红 O 染色。弃培养液, PBS 清洗 2 次, 10% 福尔马林室温固定 30 min 后弃废液, 双蒸水清洗, 每孔加 100% 丙二醇 2 ml, 室温静置 5 min。弃丙二醇, 添加适量 0.5% 油红 O 溶液覆盖细胞表面, 60 $^\circ\text{C}$ 静置 10 min, 弃油红 O 废液, 每孔加入 80% 丙二醇 2 ml, 静置 5 min。弃丙二醇, 室温自来水清洗。倒置显微镜观察拍照。

1.2.5 TiO_2 纳米管的制备及其形貌观察 采用电化学阳极氧化法在 3 种电压条件下分别制备 3 种管径的 TiO_2 纳米管, 样本面积为 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 。方法同文献[11]。阳极为钛片, 阴极为铂片, 电解液为含 0.27 mol/L 氟化铵的丙三醇溶液 (丙三醇与双蒸水的体积比为 1:1), 使用电压调节器在 10、20、30 V 的电压条件下分别电解 3 h, 以制备管径 30、70、100 nm 的 TiO_2 纳米管。扫描电镜观察表面形貌。

1.2.6 构建 4 种诱导条件 第 1 种:常规培养体系,为含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 DMEM/F12 培养基,用“R”表示;第 2 种:抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠培养体系,为在常规培养体系中添加 50 μ g/ml 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠,用“O”表示;第 3 种:抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+1 α ,25-双羟维生素 D₃ 培养体系,为在常规培养体系中添加 50 μ g/ml 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和 10⁻⁷ mol/L 1 α ,25-双羟维生素 D₃,用“V”表示;第 4 种:抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+地塞米松培养体系,为在常规培养体系中添加 50 μ g/ml 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和 10⁻⁸ mol/L 地塞米松,用“D”表示。

1.2.7 碱性磷酸酶活性测试 在光滑面纯钛片,管径 30、70、100 nm 的 TiO₂ 纳米管表面以密度 2×10^4 个/cm² 接种 P3 代 MSCs,使用 1.2.6 所述的 4 种培养条件在 24 孔板内培养。依次标记为 RTi、R30、R70、R100、OTi、O30、O70、O100、VTi、V30、V70、V100、DTi、D30、D70、D100。每组 5 个重复样本。培养 3、7、14 d 后按碱性磷酸酶测试盒说明书进行检测。按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测总蛋白浓度。按公式:碱性磷酸酶(U/gprot)=(测定 A 值-空白 A 值)/(标准 A 值-空白 A 值) $\times$ 酚标准品浓度(0.02 mg/ml) $\div$ 待测样本蛋白浓度(gprot/ml) 计算碱性磷酸酶活性值。

1.2.8 矿化测试 按 1.2.7 所述的方法在光滑面纯钛片,管径 30、70、100 nm 的 TiO₂ 纳米管表面培养 MSCs。每组 5 个重复样本。21 d 后按以下步骤进行材料表面钙沉淀量检测。弃培养液,使用 PBS 清洗 2 次,4%多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗 3 次,然后用 40 mmol/L 茜素红室温染色 20 min,双蒸水洗 3 次。每孔加入 400 μ l 10% HAC(v/v),摇匀,孵育 30 min,收集至 1.5 ml EP 管中。85 $^{\circ}$ C 加热 10 min。离心,取上清至离心管中,加入 200 μ l 10%氢氧化铵。酶标仪 405 nm 检测上清液 A 值。

1.2.9 Real-time PCR 按 1.2.7 所述的方法对光滑面纯钛片,管径 30、70、100 nm 的 TiO₂ 纳米管表面培养的 MSCs 进行成骨诱导。14 d 后检测成骨相关转录因子 Runx2 和 OSX 的表达。根据 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒及 SYBR 定量 PCR 试剂盒的说明书进行操作,使用定量 PCR 仪检测分析。重复 3 次实验。相对基因的表达使用比较循环阈值的方法,用 GAPDH 作为内参,以 RTi 组做归一化处理。引物序列如下:Runx2 上游 5'-CCGGTCTCCTTCCAGGAT-3',下游 5'-GGGAGCTGCTGTGGCTTC-3' (上海生工);OSX 上游 5'-GGGAAAAGGAGGCACAAAGAA-3',下游 5'-AGGAAATG-AGTGGGAAAGGG-3';GAPDH 上游 5'-CCTGGAGAAACC-TGCCAAG-3',下游 5'-CACAGGAGACAACCTGCTCC-3' (华大基因)。

1.3 统计学分析

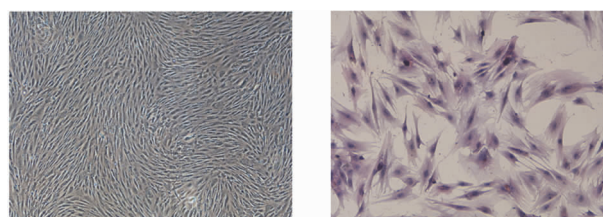
实验采用培养体系和材料结构 2 个因素的析因设计,数据采用 SPSS 19.0 统计软件处理,碱性磷酸酶活性测试、矿化定量测试及定量 PCR 数据均为计量资料,一般描述用均

数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示,多组间总的比较采用析因设计的方差分析,多组间两两比较采用 Dunnett-*t* 法,检验水准定为 $\alpha=0.05$ 。用 Microsoft excel 作图。

2 结果

2.1 MSCs 形态学观察

光学显微镜下融合的 P3 代 MSCs 呈梭形,漩涡状、放射状生长,排列规则,形态均一,见图 1A。HE 染色观察 P3 代 MSCs 为多边形、星形、纺锤形或长梭形的扁平状细胞,核浆比大,细胞核呈规则的卵圆形,每个胞核内可见 1~2 个核仁,无核分裂像,见图 1B。与文献^[1,2,12]所描述的 MSCs 形态一致。



A. 倒置显微镜 (40 $\times$)

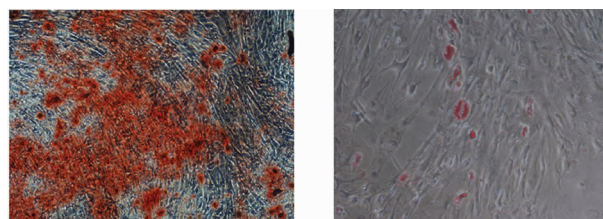
B. HE 染色 (200 $\times$)

图 1 P3 代 MSCs 的形态

Fig.1 Morphologies of MSCs of P3

2.2 MSCs 多向分化能力的检测

MSCs 在成骨诱导 21 d 后茜素红染色见大面积矿化现象,见图 2A;成脂诱导 14 d 后,油红 O 染色阳性,见图 2B。表明提取的 MSCs 能向成骨及成脂方向分化,具备干细胞的特征。



A. 成骨诱导 21 d 茜素红染色

B. 成脂诱导 14 d 油红 O 染色

图 2 MSCs 的诱导分化鉴定 (100 $\times$)

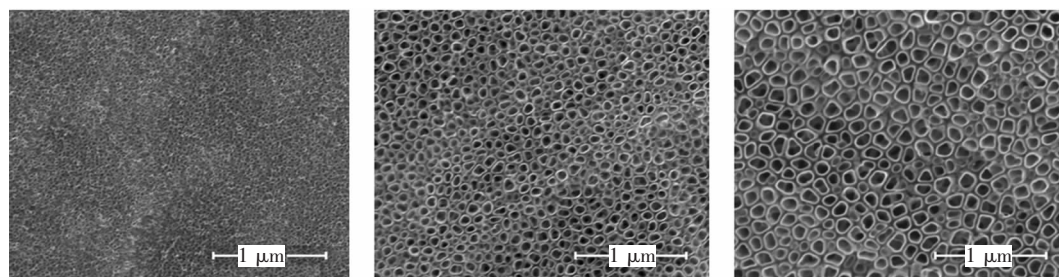
Fig.2 Identification of MSCs by induced differentiation (100 $\times$)

2.3 TiO₂ 纳米管表面形貌

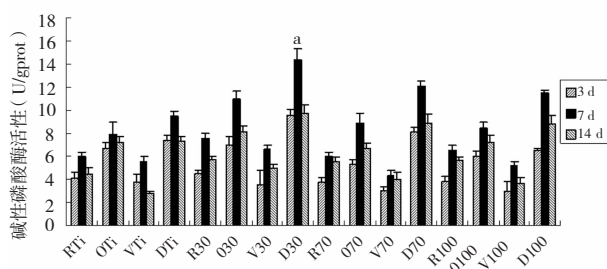
SEM 观察阳极氧化法制备的管径 30、70、100 nm 的 TiO₂ 纳米管,管径大小均匀,阵列整齐,结构完好,见图 3。

2.4 碱性磷酸酶活性测试检测 MSCs 成骨向分化

成骨诱导 3、7、14 d,各组碱性磷酸酶活性均呈现先增高后降低的趋势,其中诱导第 7 d,各组碱性磷酸酶活性达最高值。不同的培养体系作用不同 ($F=338.542, P=0.000$),其中抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+地塞米松培养体系的碱性磷酸酶活性较常规培养体系 ($P=0.000$),抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠培养体系 ($P=0.000$),抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+1 α ,25-双羟维生

A. 管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管B. 管径 70 nm 的 TiO₂ 纳米管C. 管径 100 nm 的 TiO₂ 纳米管图 3 TiO₂ 纳米管的表面形貌Fig.3 Surface topographies of TiO₂ nanotubes

素 D3 培养体系 ($P=0.000$) 成骨诱导第 7 d 的碱性磷酸酶活性高, 差异具有统计学意义; 不同的材料结构的作用也不同 ($F=53.170, P=0.000$), 其中 30 nm 组较光滑面纯钛片组 ($P=0.000$), 70 nm 组 ($P=0.000$) 及 100 nm 组 ($P=0.000$) 的成骨诱导第 7 d 的碱性磷酸酶活性高, 差异具有统计学意义; 培养体系与材料结构具有交互作用 ($F=6.322, P=0.000$), 其中抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+地塞米松培养体系与管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管结构是最佳组合。见图 4。



R: 常规培养体系; O: 抗坏血酸+β-甘油磷酸钠培养体系; V: 抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+1α, 25-双羟维生素 D3 培养体系; D: 抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+地塞米松培养体系; Ti: 光滑面纯钛; 30: 管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管; 70: 管径 70 nm 的 TiO₂ 纳米管; 100: 管径 100 nm 的 TiO₂ 纳米管; a: 管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管表面抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+地塞米松培养体系与其余培养体系比较, $P<0.05$

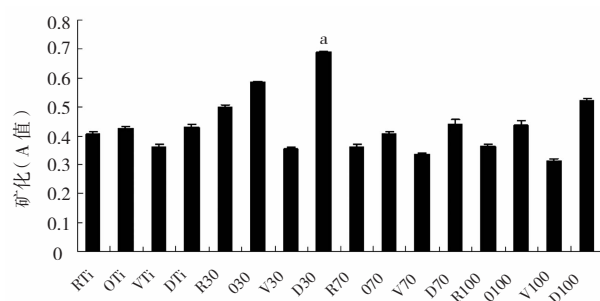
图 4 成骨诱导 3、7、14 d 的碱性磷酸酶活性变化特征

Fig.4 ALP activity characteristics on 3, 7, 14 d after osteogenic culture

2.5 矿化测试定量检测钙沉积量

成骨诱导 21 d, 不同的培养体系作用不同 ($F=417.012, P=0.000$), 其中抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+地塞米松组较常规培养体系 ($P=0.000$), 抗坏血酸+β-甘油磷酸钠培养体系 ($P=0.000$), 抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+1α, 25-双羟维生素 D3 培养体系 ($P=0.000$) 的钙沉积量高, 差异具有统计学意义; 不同的材料结构的作用也不同 ($F=264.268, P=0.000$), 其中 30 nm 组较光滑面纯钛片组 ($P=0.000$), 70 nm 组 ($P=0.000$) 及 100 nm 组 ($P=0.000$) 的钙沉积量高, 差异具有统计学意义; 培养体系与材料结构具有交互作用 ($F=33.330, P=0.000$), 其中

抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+地塞米松培养体系与管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管结构是最佳组合。见图 5。



R: 常规培养体系; O: 抗坏血酸+β-甘油磷酸钠培养体系; V: 抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+1α, 25-双羟维生素 D3 培养体系; D: 抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+地塞米松培养体系; Ti: 光滑面纯钛; 30: 管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管; 70: 管径 70 nm 的 TiO₂ 纳米管; 100: 管径 100 nm 的 TiO₂ 纳米管; a: 管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管表面抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+地塞米松培养体系与其余培养体系比较, $P<0.05$

图 5 成骨诱导 21 d 矿化定量测试

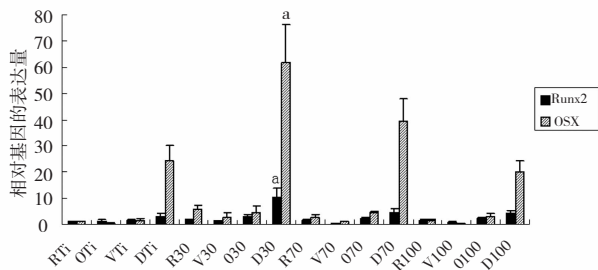
Fig.5 Quantification of mineralization on different substrates on 21 d after osteogenic culture

2.6 Real-time PCR 检测

成骨诱导第 14 天, 不同的培养体系 OSX 基因的表达量不同 ($F=42.011, P=0.000$), 其中抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+地塞米松培养体系较常规培养体系 ($P=0.000$), 抗坏血酸+β-甘油磷酸钠培养体系 ($P=0.000$), 抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+1α, 25-双羟维生素 D3 培养体系 ($P=0.000$) 的 OSX 基因的表达量高, 差异具有统计学意义; 不同的材料结构的作用也不同 ($F=5.895, P=0.003$), 其中 30 nm 组较光滑面纯钛组 ($P=0.001$), 70 nm 组 ($P=0.013$) 及 100 nm 组 ($P=0.009$) 的 OSX 基因的表达量高, 差异具有统计学意义; 培养体系与材料结构具有交互作用 ($F=2.825, P=0.015$), 其中抗坏血酸+β-甘油磷酸钠+地塞米松培养体系与管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管结构是最佳组合。

成骨诱导第 14 天, 不同的培养体系 Runx2 基因的表达量也不同 ($F=14.419, P=0.000$), 其中抗坏血酸+β-甘油磷酸

钠+地塞米松培养体系较常规培养体系 ($P=0.000$), 抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠培养体系 ($P=0.050$), 抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+ $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D₃ 培养体系 ($P=0.000$) 的 Runx2 基因的表达量高, 差异具有统计学意义; 不同的材料结构的作用也不同 ($F=3.196, P=0.037$), 其中 30 nm 组较光滑面纯钛片组 ($P=0.017$) 的 Runx2 基因的表达量高, 差异具有统计学意义; 30 nm 组与 70 nm 组 ($P=0.493$) 及 100 nm 组 ($P=0.098$) 的 Runx2 基因的表达量相当, 差异不具有统计学意义。如图 6 所示。



R: 常规培养体系; O: 抗坏血酸 + β -甘油磷酸钠培养体系; V: 抗坏血酸 + β -甘油磷酸钠 + $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D₃ 培养体系; D: 抗坏血酸 + β -甘油磷酸钠 + 地塞米松培养体系; Ti: 光滑面纯钛; 30: 管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管; 70: 管径 70 nm 的 TiO₂ 纳米管; 100: 管径 100 nm 的 TiO₂ 纳米管; a: 管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管表面抗坏血酸 + β -甘油磷酸钠 + 地塞米松培养体系与其余培养体系比较, $P<0.05$

图 6 成骨诱导 14 d 定量 PCR 检测基因 Runx2 及 OSX 的表达
Fig.6 Gene expression of Runx2 and OSX analyzed by real-time PCR on 14 d after osteogenic culture

3 讨论

MSCs 的体外诱导成骨向分化是骨组织工程的研究热点。细胞体外诱导分化的条件和细胞贴壁生长材料的表面结构是影响细胞分化的 2 个重要因素。在诱导分化条件方面, 目前报道的观点各不相同, 关于 $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D₃ 和地塞米松是否促进 MSCs 的成骨向分化也尚存争议。Oliveres-Navarrete 等^[3]研究表明建立一个富含磷元素的环境有利于胞外矿化基质的形成, $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D₃ 通过 VDR 受体途径, 激活 MSCs 的蛋白激酶 C, 可促进其成骨向分化。Kogawa 等^[4]认为 $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D₃ 能通过增高关键的破骨分化因子受体的激活及 RANKL 受体的表达, 降低其拮抗剂和骨保护素的表达来促进破骨分化。Hee 等^[6]也报道在成骨培养基中添加 $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D₃, MSCs 未出现成骨向分化。许多学者还研究了地塞米松对 MSCs 成

骨向分化的作用。Wang 等^[9]和 Park^[13]认为地塞米松的作用具有剂量依赖性, 在普通培养基中只添加地塞米松不足以产生矿化, 地塞米松与抗坏血酸和 β -甘油磷酸钠联合使用能促进 MSCs 成骨向分化。Cameron 等^[7]报道浓度 10^{-7} mol/L 的地塞米松能促进 MSCs 的成骨分化, 与 Wang 等^[9]报道的研究结果不一致。Cameron 等^[7]报道浓度 10^{-8} mol/L 的地塞米松足以诱导 MSCs 的成骨分化。目前体外诱导 MSCs 的成骨向分化哪个条件更好尚没有定论。

随着纳米技术的出现, 许多新技术被应用于骨科及牙科领域。相当多的研究专注于通过涂层, 化学修饰, 制备纳米结构对钛种植体表面进行改建^[14-17]。在钛表面制备垂直向的 TiO₂ 纳米管结构被认为是具有前景的改建方法^[14]。关于 TiO₂ 纳米管结构对 MSCs 成骨向分化的影响同时也成为了研究的焦点^[10]。本课题组采用阳极氧化法成功制备了管径 30、70、100 nm 的 TiO₂ 纳米管; 分别采用 4 种诱导条件来考察不同 TiO₂ 纳米管结构表面 MSCs 的成骨向分化, 以探讨哪种诱导条件更利于 MSCs 在 TiO₂ 纳米管结构表面的成骨向分化。

MSCs 向成骨向分化要经历以下过程: MSCs—骨祖细胞—前成骨细胞—成熟成骨细胞—骨细胞。碱性磷酸酶是成骨分化的早期标志, 能反应成骨细胞分化的表型特征, 在没有诱导的 MSCs 没有碱性磷酸酶^[7]。MSCs 的成骨向分化受 OSX 等细胞因子的调控^[18]。Runx2 是最特异的成骨相关转录因子, 调控成骨细胞的形成, 分化及基质矿化^[7]。本实验发现 MSCs 的成骨向分化与诱导条件的化学刺激相关, 经过实验证实, 不管在哪种管径的 TiO₂ 纳米管结构表面, MSCs 在抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠及地塞米松联合使用的诱导条件下碱性磷酸酶活性, 矿化程度及成骨相关基因 Runx2 和 OSX 的表达均较其他培养条件显著增高, 表明这种诱导条件能促进 TiO₂ 纳米管结构表面 MSCs 的成骨向分化。Fiorentini 等^[19]研究表明抗坏血酸能促进 MSCs 增殖及形成克隆生长集落; 地塞米松能促进碱性磷酸酶的表达及增强矿化; 对于成骨向分化则需要地塞米松, β -甘油磷酸钠及抗坏血酸的联合使用。地塞米松和 β -甘油磷酸钠是 MSCs 接收的成骨分化信号。本实验还发现, 在抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠和 $1\alpha, 25$ -双羟维生素 D₃ 联合使用的诱导条件下, 未出现碱性磷酸酶活性, 矿化程度及成骨相关基因 Runx2 和 OSX 的

表达较其他培养条件下增高的现象,表明这种培养体系不利于材料结构表面 MSCs 的成骨向分化。除此之外,实验还发现 MSCs 的成骨向分化与材料的结构相关。在相同的诱导条件下,管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管表面 MSCs 的成骨向分化能力最强。培养体系与材料结构有交互作用,其中抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+地塞米松培养体系和管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管结构联合应用的诱导条件最有利于 MSCs 的成骨向分化。

本实验依据文献^[3,7]仅探索了浓度 10⁻⁸ mol/L 的 1 α ,25-双羟维生素 D₃ 及浓度 10⁻⁸ mol/L 的地塞米松对 TiO₂ 纳米管表面 MSCs 的成骨向分化的作用,关于添加不同浓度的 1 α ,25-双羟维生素 D₃ 及地塞米松培养体系对 TiO₂ 纳米管表面 MSCs 的成骨向分化本实验尚未探讨。在后续工作中课题组将对药物浓度的影响进行进一步研究。

综上所述,MSCs 的成骨向分化与培养条件的化学刺激和细胞贴附材料的表面结构均相关。抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠和地塞米松的联合使用能有效促进各材料结构表面的 MSCs 的成骨向分化;而抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠和 1 α ,25-双羟维生素 D₃ 的联合使用不利于各材料结构表面的 MSCs 的成骨向分化;在相同的诱导条件下,管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管表面结构更有利于 MSCs 的成骨向分化。培养体系与材料结构有交互作用,其中抗坏血酸+ β -甘油磷酸钠+地塞米松培养体系和管径 30 nm 的 TiO₂ 纳米管结构联合应用的诱导条件最有利于 MSCs 的成骨向分化。

参 考 文 献

- [1] Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone[J]. Nat Protoc, 2010, 5(3): 550-560.
- [2] Zhang L, Chan C. Isolation and enrichment of rat mesenchymal stem cells(MSCs) and separation of single-colony derived MSCs[J]. J Vis Exp, 2010 (37): 1-4.
- [3] Olivares-Navarrete R, Sutha K, Hyzy S L, et al. Osteogenic differentiation of stem cells alters vitamin D receptor expression[J]. Stem Cells and Dev, 2011, 21(10): 1726-1735.
- [4] Kogawa M, Findlay DM, Anderson PH, et al. Osteoclastic metabolism of 25(OH)-vitamin D₃: a potential mechanism for optimization of bone resorption[J]. Endocrinology, 2010, 151(10): 4613-4625.
- [5] Adamzyk C, Emonds T, Falkenstein J, et al. Different culture media affect proliferation, surface epitope expression, and differentiation of ovine MSC[J]. Stem Cells Int, 2013, doi: 10.1155/2013/387324[Epub ahead of time].
- [6] Hee CK, Nicoll SB. Differential surface antigen expression and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ responsiveness distinguish human dermal fibroblasts with age-dependent osteogenic differentiation potential from marrow-derived stromal cells in vitro[J]. Cytotherapy, 2011, 13(5): 528-538.
- [7] Cameron K, Travers P, Chander C, et al. Directed osteogenic differentiation of human mesenchymal stem/precursor cells on silicate substituted calcium phosphate[J]. J Biomed Mater Res Part A, 2013, 101(1): 13-22.
- [8] Su Y, Su Q, Liu W, et al. Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLACL-collagen fibers for use in bone tissue engineering[J]. Acta Biomaterialia, 2012, 8(2): 763-771.
- [9] Wang H, Pang B, Li Y, et al. Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells[J]. Cytotherapy, 2012, 14(4): 423-430.
- [10] Tan AW, Pingguan-Murphy B, Ahmad R, et al. Review of titania nanotubes: fabrication and cellular response[J]. Ceramics International, 2012, 38(6): 4421-4435.
- [11] Lai M, Cai K, Zhao L, et al. Surface functionalization of TiO₂ nanotubes with bone morphogenetic protein 2 and its synergistic effect on the differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Biomacromolecules, 2011, 12(4): 1097-1105.
- [12] 杨丽, 张荣华, 谢厚杰, 等. 建立大鼠骨髓间充质干细胞稳定分离培养体系与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(6): 1064-1068.
- [13] Park JB. The effects of dexamethasone, ascorbic acid, and β -glycerophosphate on osteoblastic differentiation by regulating estrogen receptor and osteopontin expression[J]. J Surg Res, 2012, 173(1): 99-104.
- [14] Gulati K, Ramakrishnan S, Aw MS, et al. Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion[J]. Acta Biomater, 2012, 8(1): 449-456.
- [15] Minagar S, Berndt CC, Wang J, et al. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces[J]. Acta Biomater, 2012, 8(8): 2875-2888.
- [16] Sato M, Sambito MA, Aslani A, et al. Increased osteoblast functions on undoped and yttrium-doped nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium[J]. Biomaterials, 2006, 27(11): 2358-2369.
- [17] Wang J, Lin Z. Freestanding TiO₂ nanotube arrays with ultrahigh aspect ratio via electrochemical anodization[J]. Chemistry of Materials, 2008, 20(4): 1257-1261.
- [18] Chen YC, Ninomiya T, Hosoya A, et al. 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits osteoblastic differentiation of mouse periodontal fibroblasts[J]. Arch Oral Biol, 2012, 57: 453-459.
- [19] Fiorentini E, Granchi D, Leonardi E, et al. Effects of osteogenic differentiation inducers on in vitro expanded adult mesenchymal stromal cells[J]. Int J Artif Organs, 2011, 34(10): 998-1011.

(责任编辑: 关蕴良)