网络出版时间:2019-1-11 14:05 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.002.html

重组人甲状旁腺激素对 SLA 纯钛表面 MC3T3-E1 细胞黏附的影响

傅琪淋[1,2],朱中焰[3],刘 敏[2]

摘要 **目的** 体外研究重组人甲状旁腺激素[rhPTH(1-34)]对 MC3T3-E1 细胞在大颗粒喷砂酸蚀(SLA)处理纯钛表面黏附的影响。**方法** 通过 CCK8 法确定 rhPTH(1-34)的最佳作用浓度,将 MC3T3-E1 细胞分为用含最适浓度 rhPTH(1-34)培养基处理的实验组和用空白培养基处理的对照组,并分别接种于 SLA 处理的钛片上。用 DAPI 免疫荧光染色法、扫描电镜、RT-PCR 对钛片表面黏附的 MC3T3-E1 细胞进行细胞计数,观察其形态学变化并测定 MC3T3-E1 细胞整合素 α1、α5、β1 mRNA 的表达情况。**结果** 实验组成骨细胞的黏附数量较对照组多,肌动蛋白微丝的重构、细胞形态变化以及在钛片上黏附与伸展的速度较对照组更快,骨细胞整合素亚基 α1、α5、β1 表达高于对照组。**结论** rhPTH(1-34)能促进 MC3T3-E1 细胞在纯钛表面的的黏附。

关键词 重组人甲状旁腺激素;MC3T3-E1 细胞;黏附;整合素

中图分类号 R 78

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)02-0173-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.002

作为与生物材料间相互作用的第一阶段,成骨细胞在种植体表面的黏附情况是影响成骨的重要因素之一。因此,为获得高种植成功率,加快钛种植体与骨组织形成骨整合的速度是目前许多学者研究的热点。重组人甲状旁腺素(1-34)[human recombinant parathyroid hormone,rhPTH(1-34)],商品名特利帕肽(Teriparatide),作为目前唯一通过食品药品监督管理局批准的促合成代谢类药物,研究[1-2]表明其具有应用于口腔种植及牙周领域,促进新骨形成及种植体与周围骨组织形成骨整合的潜力。目前体外研究[3-5]结果显示,rhPTH(1-34)可能是通过活化种植体周围成骨细胞增殖与分化促进骨整合形成。由于种植体植入初期成骨细胞的黏附情况对骨整合的形成至关重要,但尚未有文献显示 rhPTH(1-34)对成骨细胞黏附的影响。该课题从细胞及分子水平初步研究 rhPTH(1-34)对成骨细胞在 SLA 钛表面初期黏附功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料和设备 小鼠成骨前体细胞株 MC3T3-E1 购自西南医科大学口颌面修复重建和再生实验室;rhPTH(1-34)购自上海吉尔生化有限公司;CCK-8 试剂盒购自上海贝博公司;TA2 型商业纯钛购自陕西宝鸡特殊钢厂;总 RNA 抽提试剂盒购自北京 tiangen 有限公司;ReverTra Ace qPCR RT Master Mix、SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购自日本 TOYOBO 公司;喷砂机购自北京荣辉机械设备有限公司;扫描电子显微镜 SEM 购自荷兰 FEI 公司;X 射线能谱仪购自英国 Oxford 公司;Image-Pro Plus 图像分析系统购自美国 Media Cybernetics 公司。

1.2 纯钛的表面 SLA 处理及材料学表征 将直径 10 mm 厚度 1 mm 的圆形钛片,用 400、600、800、

2018-10-19 接收

基金项目:四川省科技厅-泸州市科技局-泸州医学院联合项目(编号:LY-51)

作者单位:[1] 西南医科大学口腔医学院,泸州 646000

[2] 西南医科大学附属口腔医院修复科,泸州 646000

[3] 自贡市第一人民医院口腔科,自贡 643000

作者简介:傅琪淋,女,硕士研究生;

刘 敏,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:584494011@qq.com

shape. The migration distance of HepG2 cells was obviously decreased when treated with PMA and 4-HPR, wheras the distance was increased when treated with PMA alone($P<0.05$). A combination of PMA and 4-HPR also significantly decrease the protein expression of N-cadherin, MLCK and p-MLC. ***Conclusion*** Combining PMA with 4-HPR inhibit HepG2 cell migration. Compared with 4-HPR alone, the two durg combination lower the protein expression of MLCK and p-MLC more siginficantly. The study of two durg combination may provide the experimental basis for further discussing the liver cancer therapy.

Key words PMA;4-HPR;MLCK;N-cadherin;phosphorylation of MLC;liver cancer HepG2;migration

1200# 碳化硅砂纸抛光，110 μm 三氧化二铝（A1203）颗粒喷砂，喷砂处理时喷砂头与钛片表面保持垂直 50 mm 的距离，均匀转动喷射 30 s。依次分别使用丙酮、无水乙醇、75% 乙醇和去离子水（deionized water，dH_2O）在超声波清洗器中清洗钛各 10 min，室温干燥 1 h。用混合酸（18% 盐酸和 49% 硫酸混合物）在 60 ℃水浴预热条件下酸蚀处理钛片 30 min。dH_2O 超声清洗钛片 30 min，高温、高压灭菌，紫外灯照射 30 min，保存于密闭避光容器中。采用扫描电镜（SEM）观察各组钛片的表面形貌，用粗糙度测试仪测量大颗粒喷砂酸蚀（sand-blasted large grift acid-etched，SLA）处理后钛片表面粗糙度，采集数据得到轮廓算数平均偏差（roughness average，Ra）值，随机测量 3 个区域，取平均值。

1.3 最适 rhPTH(1-34) 浓度的测定 常规复苏传代培养 MC3T3-E1 细胞，将细胞分为 6 组，实验组分别为 10^{-9} mol/L rhPTH（1-34）一次性给药，10^{-7} mol/L、10^{-8} mol/L、10^{-9} mol/L、10^{-10} mol/L rhPTH（1-34）间歇性给药（每 24 h 的前 6 h 给予含 rhPTH（1-34）培养基，从第 7 小时开始更换为培养液），空白培养基作为对照组。6 组均分别对细胞进行预孵 24 h 后，将密度为 5×10^7 cells/L 的细胞接种于钛片上。第 0.5、1、2、4、8 小时用 CCK 8 法检测各组吸光度（optical delnsity，OD）值，实验重复 3 次，确定 rhPTH（1-34）的最佳作用浓度用于后续实验。

1.4 MC3T3-E1 细胞的黏附数量及形态学改变 实验组和对照组分别用含最适浓度 rhPTH（1-34）的培养基和空白培养基对 MC3T3-E1 细胞预孵 24 h 后，将细胞接种于钛片上。在第 4、8 小时进行多聚甲醛固定后，TRIton 透膜、DAPI 避光染色后，对钛片表面黏附的 MC3T3-E1 细胞进行细胞计数，免疫荧光显微镜观察成骨细胞肌动蛋白微丝以及细胞形态学变化。上述同样方法 24 h 预处理细胞接种于钛片上，在第 4、8 小时戊二醛固定后乙醇梯度脱水、喷金后扫描观察 MC3T3-E1 细胞黏附形态及铺展情况。

1.5 MC3T3-E1 细胞整合素亚基 α1、α5、β1 的表达水平 实验组和对照组分别用含最适浓度 rhPTH（1-34）的培养基和空白培养基对 MC3T3-E1 细胞预孵 24 h 后，在第 1、3、5 天提取总 RNA，通过 q PCR 检测整合素亚基 α1、α5、β1 表达情况。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析，对不同时间各组试件表面附着细胞计数结果行单因素方差分析，对同一时间点实验组和对照组比较，采用 t 检验。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纯钛表面形貌及粗糙度 SLA 处理后钛片表面检测 SEM 显示：钛片表面粗糙，呈弹坑状；表面粗糙度测量 Ra = 1.070 8 μm。

2.2 最适 rhPTH(1-34) 浓度 0.5 h 时实验组与对照组间比较（$F = 0.119$，$P > 0.05$），OD 值差异无统计学意义；1 h 时，实验组与对照组间比较（$F = 0.523$，$P > 0.05$），OD 值差异无统计学意义；2 h 时，实验组各浓度与对照组比较，除浓度 10^{-7} mol/L 组（$F = 0.182$，$P > 0.05$），差异无统计学意义外，其余实验组 OD 值上调，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；4 h 时，实验组各浓度与对照组比较，浓度 10^{-9} mol/L、10^{-8} mol/L 组 OD 值均有上调（$F = 0.001$、$F = 0.009$，$P < 0.05$），差异有统计学意义；8 h 时，实验组各浓度与对照组比较，浓度 10^{-9} mol/L、10^{-8} mol/L 组 OD 值均有上调（$F = 0.002$、$F = 0.048$，$P < 0.05$），差异有统计学意义；2、4、8 h 组间比较显示：相对于其余组，浓度 10^{-9} mol/L 细胞黏附数目最多，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。见表 1。

2.3 MC3T3-E1 细胞黏附数目 在第 4、8 小时同一时间点，细胞计数结果见表 2，实验组比对照组细胞黏附数目更多，组间比较差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

2.4 MC3T3-E1 细胞形态

2.4.1 免疫荧光观察细胞形态 细胞核染色后激发光为蓝色荧光，纤维状肌动蛋白微丝 F-action 染色后激发光显示为绿色荧光。实验组细胞伸出丝状伪足较多，细胞间伪足相互交联，部分细胞隐约可见纤维状肌动蛋白微丝 F-action 呈束状，沿细胞伸展方向排列。对照组胞体部分可见呈类梭形及类椭圆形，亦伸出伪足，但伪足较为圆钝，细胞铺展差，F-action 成网状，无明显束状结构。见图 1。8 h 时，细胞较对照组伪足更粗更长，细胞呈明显的多角形，细胞间连接更为紧密。见图 2。

2.4.2 SEM 显示 实验组钛表面黏附的成骨细胞数目较多，伸出丝状伪足嵌入钛表面窝洞中，形成成骨细胞典型的多角形形态，细胞胞体平铺伸展面积较大。对照组成骨细胞数目较少，胞体呈类梭形，表面初步伸出丝状伪足，数目较少。见图 3。

2.5 整合素 α1、α5、β1 基因表达情况 实时荧光

表1 各组 MC3T3-E1 细胞在不同时间点 OD 值($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

时间	对照组	连续 10^{-9} mol/L	10^{-10} mol/L	10^{-9} mol/L	10^{-8} mol/L	10^{-7} mol/L
0.5 h	0.478±0.024	0.485±0.035	0.481±0.022	0.486±0.021	0.484±0.018	0.477±0.026
1 h	0.489±0.015	0.498±0.027	0.502±0.034	0.508±0.026	0.501±0.042	0.485±0.020
2 h	0.500±0.011	0.519±0.002*	0.521±0.008*	0.543±0.011*	0.526±0.021*	0.513±0.027
4 h	0.523±0.008	0.546±0.021	0.540±0.022	0.579±0.008*	0.547±0.010*	0.516±0.015
8 h	0.539±0.022	0.553±0.033	0.561±0.012	0.631±0.028*	0.601±0.031*	0.530±0.019

与对照组比较:* $P<0.05$

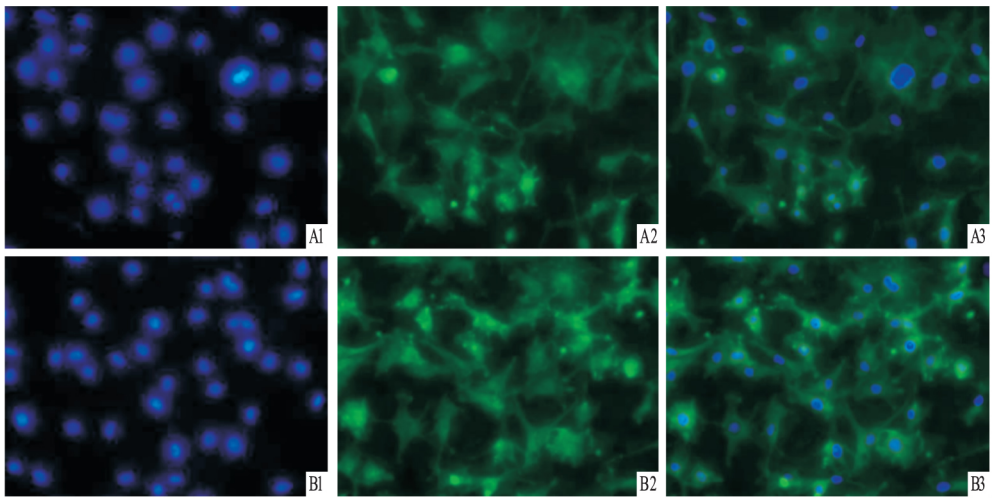

图1 接种后 4 h 倒置荧光显微镜下观察细胞形态 ×400

A:对照组;B:实验组;1:细胞核染色图像;2:纤维状肌动蛋白微丝 F-action 染色图像;3:细胞核和肌动蛋白微丝同时显色图像

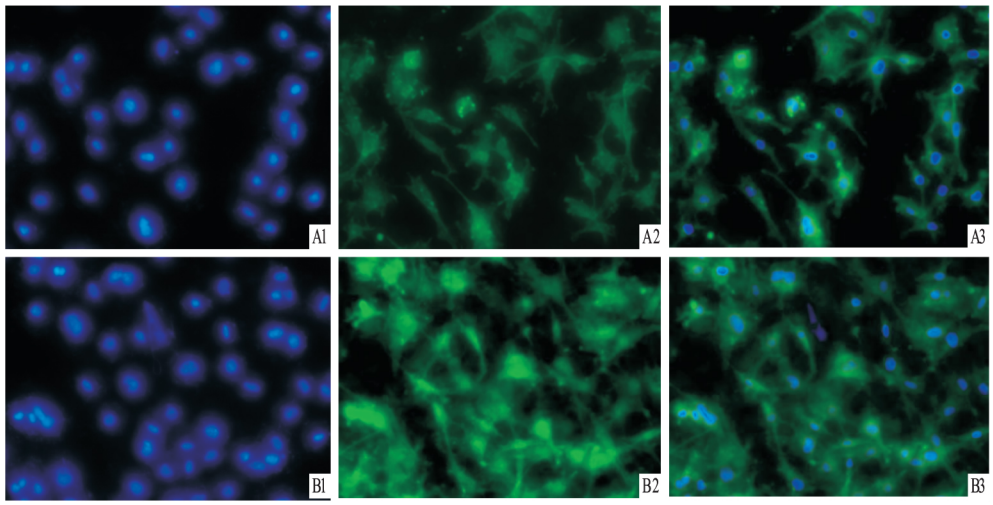

图2 接种后 8 h 倒置荧光显微镜下观察细胞形态 ×400

A:对照组;B:实验组;1:细胞核染色图像;2:纤维状肌动蛋白微丝 F-action 染色图像; 3:细胞核和肌动蛋白微丝同时显色图像

表2 各组 MC3T3-E1 细胞计数($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	细胞数目(个)	
	第4小时	第8小时
对照	165±14.57	246±10.02
实验	239±11.68*	336±22.61*
t 值	6.616	6.281
P 值	0.003	0.003

与对照组比较:* $P<0.05$

定量 PCR(RT-PCR)测定实验组和对照组细胞分别在第1、3、5天时,整合素 α1、α5、β1 表达量基因的表达情况。见表3。通过采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,计算出各组在各个时间点,实验组 α1、α5、β1 的基因表达水平均明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

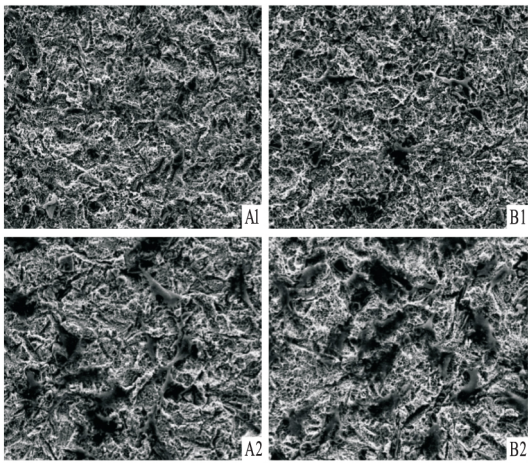

图 3　扫描电镜下观察细胞形态　×1 200
A:对照组 B:实验组;1:接种后 4 h;2:接种后 8 h

表 3　RT-PCR 检测整合素 α1、α5、β1 表达量($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

时间	整合素	对照组	实验组	t 值	P 值
第 1 天	整合素 α1	1.03 ± 0.24	1.58 ± 0.15*	3.368	0.028
	整合素 α5	1.01 ± 0.19	1.63 ± 0.13*	24.038	0.036
	整合素 β1	1.02 ± 0.22	1.61 ± 0.17*	3.036	0.039
第 3 天	整合素 α1	1.94 ± 0.27	2.88 ± 0.38*	5.583	0.012
	整合素 α5	1.89 ± 0.09	3.49 ± 0.35*	17.647	0.014
	整合素 β1	1.79 ± 0.15	2.41 ± 0.16*	4.340	0.012
第 5 天	整合素 α1	1.59 ± 0.21	2.15 ± 0.26*	2.929	0.043
	整合素 α5	2.73 ± 0.46	3.88 ± 0.16*	11.286	0.028
	整合素 β1	3.40 ± 0.28	6.77 ± 0.16*	9.927	0.001

与对照组比较:* $P<0.05$

3　讨论

在种植体植入初期,成骨细胞必须与其附着的材料表面发生适当的黏附才能进行迁移和增殖[6]。本实验通过研究 rhPTH(1-34)对成骨细胞在 SLA 钛表面初期黏附功能的影响,近一步了解 rhPTH(1-34)对骨整合的作用,为 rhPTH(1-34)能否用于增加种植体初期成骨作用提供参考。成骨细胞在钛表面黏附数量的影响因素,主要有生物学因素和材料因素。本实验 SLA 处理后钛片表面粗糙度检测结果显示 Ra = 1.070 8 μm,根据 Mustafa et al[7] 观察表面粗糙度对细胞附着、增殖和分化的影响等研究,实验所用钛片粗糙度有利于成骨细胞的黏附聚集,符合体外实验要求。

细胞的黏附根据细胞形态变化可分为 4 个连续又相互重叠的变化时相,即细胞附着、细胞铺展、肌动蛋白细胞骨架的重组和黏着斑的形成。体外培养的成骨细胞属于贴壁生长的细胞,在接种后 1 h 内,细胞主要是物理沉降和吸附过程。在细胞附着后,伴随少量细胞形状的变化及铺展,整合素相关的信号通路活化,介导细胞与生物材料发生结合。然后整合素与胞内的细胞骨架肌动蛋白通过黏着斑相连,使细胞能在细胞外基质(extracelluar matrix, ECM)产生力作用点,从而能使细胞形态改变,呈现出细胞不同功能状态[8]。

根据上述细胞黏附过程中的一系列变化,可以解释本实验中不同浓度 rhPTH(1-34)对 MC3T3-E1 细胞黏附数量的影响所得结果以及实验中观察到的细胞形态变化。通过 CCK8 法研究不同浓度 rhPTH(1-34)对 MC3T3-E1 细胞黏附数量的影响时,在最初的 0.5 ~ 1 h,对照组与实验各组结果间差异均无统计学意义。可能是因为 1 h 内,成骨细胞主要是物理沉降和吸附过程。在第 2、4、8 小时时,实验组与对照组 OD 值具有显著差异,并且 DAPI 染色细胞计数也显示实验组在钛片上黏附数目更多。原因可能是 rhPTH(1-34)通过促进黏附过程中整合素表达及细胞微丝骨架重组等,加速细胞黏附过程。

本研究结果显示实验组的成骨细胞不仅发生一系列形态变化而且变化更快。丝状伪足的增加,可以增加细胞的接触面积和黏附强度,从而促进细胞信号传导级联的活化,这可以解释 rhPTH(1-34)的正向成骨效果。除此之外,在体内外环境中,成骨细胞可以通过改变肌动蛋白微丝的排序来对物理和化学刺激作出反应。微丝骨架的重构是改变细胞形态和细胞在生物材料表面黏附的必然条件。在同一时间段内,图 1 显示的实验组和对照组细胞形态差异,表明 rhPTH(1-34)能促进成骨细胞肌动蛋白微丝的重构,加快在钛片上黏附进程。

整合素是由 α 和 β 亚基非共价键结合的异二聚体,在细胞的黏附过程中起着重要作用。本实验选取了具有代表意义的整合素亚基 α1、α5、β1 基因进行定量检测。研究[9-10]显示,整合素 β1 与 α1 或 α2 介导成骨细胞的初期黏附和细胞铺展。研究[11]表明整合素 α5、β1 明显促进成骨细胞在钛表面的黏附,提示整合素 α5、β1 参与了成骨细胞和 ECM 之间的黏附。结合本实验中 RT-PCR 的结果,rhPTH(1-34)可能是通过上调整合素 α5、β1 基因表达,促进细胞在钛表面的黏附。然而,rhPTH(1-34)促成骨细胞黏附是否是通过整合素介导以及相应信号通路机制,尚需进一步研究。

参考文献

[1]　Chiang T I, Chang I C, Lee H S, et al. Osteopontin regulates

anabolic effect in human menopausal osteoporosis with intermittent parathyroid hormone treatment [J]. Osteoporos Int,2011,22(2):577 - 85.

[2] Augustine M, Horwitz M J. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein analogs as therapies for osteoporosis [J]. Curr Osteoporos Rep,2013,11(4):400 - 6.

[3] 石晓婷. PTH-(1-34)对去势雌性大鼠种植体周围骨结合影响的实验研究 [D]. 济南:山东大学,2013.

[4] Daugaard H, Elmengaard B, Andreassen T T, et al. Systemic intermittent parathyroid hormone treatment improves osseointegration of press-fit inserted implants in cancellous bone [J]. Acta Orthop, 2012,83(4):411 - 9.

[5] 吴松涛,孟维艳,蔡 青,等. PTH(1-34)对兔骨质疏松种植体骨结合影响的研究 [J]. 实用口腔医学杂志,2011,27(2):181 - 4.

[6] 马 超,张 丁,李 平,等. 成骨细胞在两种胶原支架材料上的生长特征 [J]. 中国医学科学院学报,2011,33(5):538 - 42,593.

[7] Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, et al. Determining optimal surface roughness of TiO(2) blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone [J]. Clinical Oral Implants Res, 2001,12(5):515 - 25.

[8] Hung K Y, Lin Y C, Feng H P. The effects of acid etching on the nanomorphological surface characteristics and activation energy of titanium medical materials [J]. Materials 2017,10(10). pii: E1164.

[9] Moussa M, Banakh O, Wehrle-Haller B, et al. TiNxOy coatings facilitate the initial adhesion of osteoblasts to create a suitable environment for their proliferation and the recruitment of endothelial cells [J]. Biomed Mater, 2017,12(2):025001.

[10] Olivares-Navarrete R, Rodil S E, Hyzy S L, et al. Role of integrin subunits in mesenchymal stem cell differentiation and osteoblast maturation on graphitic carbon-coated microstructured surfaces [J]. Biomaterials, 2015,51:69 - 79.

[11] 王 兴,焦艳军,孙晓军,等. 整合素 α5β1 和纤维粘连蛋白在Ⅱ型糖尿病大鼠种植体周围骨组织的表达及意义 [J]. 临床口腔医学杂志,2011,27(9):530 - 2.

Effects of rhPTH (1-34) on adhesion of MC3T3-E1 osteoblasts cultured on titanium surfaces of SLA

Fu Qilin[1,2], Zhu Zhongyan[3], Liu Min[2]

([1]*Stomatological College of Southwest Medical University, Luzhou* 646000; [2]*Dept of Prosthodon, The Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University, Luzhou* 646000; [3]*Dept of Stomatology, First People's Hospital of Zigong City, Zigong* 643000)

Abstract ***Objective*** To evaluate the effects of the human recombinant parathyroid hormone [rhPTH (1-34)] on the initial adhesion of MC3T3-E1 osteoblasts cultured on titanium surfaces of sand-blasted large grift acid-etched (SLA). ***Methods*** The optimal concentration of the rhPTH(1-34) action was determined by the CCK8 method. Then the MC3T3-E1 cells were divided into experimental groups treated with the optimal concentration of the rhPTH (1-34) medium and control groups treated with blank medium, and inoculated on SLA-treated titanium plates. DAPI immunocytochemistry, scanning electron microscopy, and RT-PCR were used to count the cell adhesion of MC3T3-E1 cells on the surface of titanium plates. Morphological changes were observed and the expression of the integrin α1, α5, β1 mRNA in MC3T3-E1 cells was determined. ***Results*** Compared with the control group, the adherence of osteoblasts was more than that of the control group. The remodeling of actin filaments, the change of cell morphology, and the speed of adhesion and extension on the titanium plate were faster than that of the control group. The expression of the osteoblast integrin subunit α1, α5 and β1 was higher than that of the control group. ***Conclusion*** rhPTH (1-34) can promote the adhesion of MC3T3-E1 cells on pure titanium surface.

Key words human recombinant parathyroid hormone (1-34); MC3T3-E1 cell; adhesion; integrin