• 研究论文 •

肝素化丝素支架作为骨形态发生蛋白-2 缓释载体的研究

马寅孙 蔡玉荣 刘琳 姚菊明*

(浙江理工大学材料与纺织学院 先进纺织材料与制备技术教育部重点实验室 杭州 310018)

摘要 骨形态发生蛋白-2(BMP-2)的缓释载体一直是骨组织工程中的研究热点. 本研究通过化学改性制备了两种肝素化丝素支架, 并浸渍吸附 BMP-2, 研究了 BMP-2 在不同丝素支架样品上的吸附能力、体外释放性能及其对人骨肉瘤细胞 MG-63 碱性磷酸酶活性(ALP)的影响. 结果表明, 肝素化丝素支架对 BMP-2 具有较强的吸附能力, 并能保持其体外缓慢释放性能; MG-63 细胞在肝素化支架上生长状态良好, 并具有显著的增殖能力, 负载 BMP-2 后的肝素化支架能显著促进 MG-63 细胞的分化. 因此, 肝素化丝素支架是一种较理想的 BMP-2 缓释载体.

关键词 丝素支架; BMP-2; 碱性磷酸酶; 缓释

Heparinized Silk Fibroin Scaffolds as the Sustained Release Carrier of Bone Morphogenetic Protein-2

Ma, Yinsun Cai, Yurong Liu, Lin Yao, Juming*

(The Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Manufacturing Technology of Ministry of Education, College of Materials and Textiles, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018)

Abstract Sustained release carrier for the bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) is currently a hot subject of research on the bone tissue engineering. In this work, two kinds of heparinized silk fibroin scaffolds were prepared. The binding ability to BMP-2, *in vitro* sustained release property and the alkaline phosphatase (ALP) activity of the scaffolds were investigated. Results showed that the heparinized silk fibroin scaffolds could bind BMP-2 well and sustained release the BMP-2. The scaffolds with BMP-2 could improve the MG-63 cell growth and cell differentiation with high ALP activity. So the heparinized silk fibroin scaffolds could be an ideal sustained release carrier for BMP-2.

Keywords silk fibroin scaffold; BMP-2; alkaline phosphatase; sustained release

骨形态发生蛋白(BMPs)是一种多功能生长因子, 属于转化生长因子- β 超家族的成员^[1]. 其中骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)因其强诱导成骨活性而在骨组织工程领域得到广泛应用. 由于 BMP-2 在体内环境中具有较短的半衰期, 而且经注射后很容易被体液稀释^[2]从而降低了其生物活性, 所以研究者们把 BMP-2 和合适的载体进行复合来提高它的生物效应.

由于 BMP-2 序列的 N-末端区域含有肝素结合位

点^[3], 因此肝素常被接枝到载体上以提高对 BMP-2 结合能力^[4,5]. 丝素蛋白作为一种结构性蛋白, 由于其优良的机械性能、良好的生物相容性、生物降解性, 在组织工程、药物载体等领域得到广泛研究^[6~10]. 本实验以丝素支架作为 BMP-2 的载体, 为提高 BMP-2 在丝素支架上的结合能力, 采用碳二亚胺法对丝素支架进行化学改性, 分别制备了肝素化丝素支架(HP/SF)和肝素化赖氨酸丝素支架(HP/L-SF). 研究了 BMP-2 在 SF, HP/SF 和

* E-mail: yaoj@zstu.edu.cn; Tel: 0571-86843618; Fax: 0571-86843619

Received August 30, 2011; revised October 10, 2011; accepted November 28, 2011.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21041003 and 51172207).

国家自然科学基金(Nos. 21041003, 51172207)资助项目.

HP/L-SF 三种支架上的结合能力、释放行为, 及其对人骨肉瘤细胞 MG-63 碱性磷酸酶活性的影响.

1 材料与方法

1.1 主要材料

人骨肉瘤细胞 MG-63 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心. DMEM 培养基及胎牛血清购自 GIBICO 公司. 细胞膜荧光探针(Dio)及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司. 蛋白胨、酵母粉和琼脂粉购自上海申能博彩生物科技有限公司. 碱性磷酸酶(ALP)活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所. 肝素(HP)购自北京鼎国生物公司, 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl), *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自上海延长生化科技发展有限公司. 无水溴化锂、磷酸氢二钠等购自杭州米克化工仪器有限公司.

1.2 丝素支架及肝素化丝素支架的制备

参照文献[11]的方法制备丝素溶液. 将蚕茧剪碎后在 5 g/L Na_2CO_3 水溶液中煮沸 30 min, 然后用去离子水漂洗以除去丝胶蛋白及蜡质, 重复 3 次后得到丝素纤维. 将丝素纤维以 1:5 的比例加入 9.30 mol/L 溴化锂溶液, 在 37 °C 下待完全溶解后, 在室温下用去离子水透析 3 d, 溶液经过滤除杂后, 用去离子水稀释至 4% (w/V), 注入 48 孔板并放入 -20 °C 冰箱冷冻 12 h, 再用冷冻干燥机干燥制得丝素支架(SF). 采用扫描电子显微镜

(JSM-5610LV, JEOL)观察丝素支架的表面形貌, 电压 8 kV.

用碳二亚胺法在 SF 上接枝赖氨酸, 制得赖氨酸化丝素支架(L-SF); 然后将 200 mg 肝素溶解在 100 mL 含有 0.1 mol/L HCl, 200 mg EDC 和 120 mg NHS 的 MES (pH 5.5)溶液中(肝素的活化反应见图 1), 4 °C 活化反应 4 h 后, 把 L-SF 浸入上述溶液中进行肝素的接枝反应, 37 °C 过夜后, 用蒸馏水在超声条件下洗涤 3 次, 制得肝素化赖氨酸丝素支架(HP/L-SF). 肝素化丝素支架(HP/SF)的制备方法除了对 SF 未经赖氨酸接枝外, 其它步骤同 HP/L-SF 的制备. 二种肝素化丝素支架的制备原理见图 2.

图 1 肝素的活化

Figure 1 Activation of heparin

图 2 两种肝素化丝素支架 HP/SF 和 HP/L-SF 的制备过程

Figure 2 Preparation of two kinds of heparinized silk fibroin scaffolds, HP/SF and HP/L-SF

1.3 支架上细胞的形态学观察和细胞毒性检测

将直径为 10 mm、厚度为 2 mm 的 SF, HP/SF, HP/L-SF 三种支架置于无菌培养皿中, 加入 75% 酒精溶液消毒处理 30 min, 并在 PBS 缓冲液(pH 7.40)中充分浸泡 1 h, 中间换液以交换出残留酒精。然后置于紫外灯下照射 1 h, 自然风干。灭菌后的材料用 DMEM 培养液(2%胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素)浸泡 24 h, 移入 48 孔细胞培养板。将人骨肉瘤 MG-63 细胞按每孔 3×10^4 个细胞种植于 48 孔板中, 并在孔板中加入 200 μ L 含有 2% FBS 的 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养, 次日换液, 以后隔日换液一次, 分别培养 1, 3, 5 d 后, 通过荧光染料 Dio 标记, 采用倒置荧光显微镜(OP2-BSW, Olympus)观察细胞形态及细胞增殖情况。

细胞毒性采用溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)染色的方法检测。当培养 1, 3, 5 d 后将细胞培养液从孔板中吸出, 用 PBS 缓冲液洗涤后, 每孔分别加入 20 μ L MTT (5 mg/mL)和 200 μ L 无血清培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h 后, 将孔板中的液体吸出, 每孔中再加入 200 μ L DMSO, 待紫色结晶物全部溶解后, 利用酶标仪(Bio-Rad 680)测定其 OD (570 nm)值。每组 3 个平行试样, 取其平均值。

1.4 肝素在丝素支架上的接枝量测定

用甲苯胺蓝法测定丝素支架上肝素的接枝量^[4]。首先将 50 mg 甲苯胺蓝加入到含有 0.2 wt% NaCl 的 HCl 溶液(0.1 mol/L)中, 得到甲苯胺蓝溶液; 称取 5 mg 支架放入 1.20 mL 的甲苯胺蓝溶液, 用振荡器剧烈震荡后, 未反应的甲苯胺蓝用酶标仪测定 OD (630 nm)值。每组 3 个平行试样, 取其平均值。用一系列浓度的肝素绘制标准曲线, 然后对照标准曲线获得支架上的肝素接枝量。

1.5 BMP-2 的吸附与释放性能

BMP-2 由本实验室制备^[12]。采用浸渍吸附的方法, 将支架浸渍在不同浓度的 BMP-2 溶液中(50, 100, 150 μ g/mL), 在 37 $^{\circ}$ C 情况下浸渍吸附 2 h, 然后取出支架, 通过 BCA 法测定溶液中剩余蛋白含量, 量差法计算支架样品上 BMP-2 的吸附量。释放性能是将负载 BMP-2 的三种支架分别浸入 PBS 缓冲液中, 37 $^{\circ}$ C 下缓慢震荡, 分别在 1, 3, 5, 7 d 通过 BCA 法测定 BMP-2 在缓冲液的释放量。每组均做 3 个平行试样, 取其平均值。用标准品的 BSA 溶液绘制蛋白浓度标准曲线, 根据标准曲线测定支架上 BMP-2 的吸附量和释放量。

1.6 MG-63 细胞碱性磷酸酶(ALP)活性的检测

先将支架(直径 10 mm、厚度 2 mm)放在 150 μ g/mL

BMP-2 溶液中 37 $^{\circ}$ C 吸附 2 h, 再分别置于 48 孔板中, 将 MG-63 细胞按照每孔 3×10^4 个细胞种植于支架上。37 $^{\circ}$ C 下用含有 0.5% FBS 的 DMEM 培养 1, 3, 5, 7 d 后, 将样品用 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤 3 次, 每孔加入 0.1% Triton-100 细胞裂解液 200 μ L, 反复冻融 3 次裂解细胞。以纯丝素支架作为对照, 每组 3 个平行试样, 取其平均值。细胞裂解液利用碱性磷酸酶测定试剂盒检测酶活力, 用分光光度计测定 OD (490 nm)后, 计算 ALP 活性。

定义酶活性国际单位(U/L): 1 L 上清中 1 min 内能够催化 1 μ mol/L 底物的酶浓度。碱性磷酸酶(ALP)活性计算公式及碱性磷酸酶单位换算公式如下:

碱性磷酸酶(金氏单位)=

$$\frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times \text{标准管含量} (0.005 \text{ mL}) \times \frac{100 \text{ mL}}{0.05 \text{ mL}}$$

国际单位(U/L)=7.14 $\times$ 金氏单位(King Unit/100 mL)

2 结果和讨论

2.1 支架上的细胞形态观察和支架的细胞毒性检测

Dio 是一种标记细胞膜的常用荧光染料。在三种支架上分别植入 Dio 标记的 MG-63 细胞, 培养 1, 3, 5 d 后的结果如图 3 所示。随着培养时间的增加, 细胞在三种支架上进行生长迁移, 慢慢开始生长进入支架的内部, 且铺展良好, 这是由于支架具有均匀的多孔结构, 孔径约为 100~200 μ m, 而铺展开后的细胞大小约为 50~100 μ m, 支架能提供给细胞生长、迁移和营养物质代谢足够的空间(如图 4)。采用 MTT 法检验碳二亚胺法化学接枝的支架对细胞毒性的影响, 以空白 SF 作为对照, 结果如图 5 所示。HP/SF, HP/L-SF 与空白 SF 相比, 细胞数无明显差别, 说明用碳二亚胺法化学接枝后制得的 HP/SF、HP/L-SF 两种支架不具有明显的细胞毒性。

2.2 丝素支架对 BMP-2 的吸附与释放性能

用两种方法对丝素支架进行肝素化修饰, 肝素接枝量如图 6 所示, 与 SF 相比, 经过赖氨酸修饰的 L-SF 上由于表面存在更多的氨基基团, 使得接枝的肝素量有了显著的提高($p < 0.01$), 达到了 $1.80 \pm 0.14 \mu\text{g/mg}$, 而未经赖氨酸处理的 SF, 其肝素接枝量为 $1.10 \pm 0.22 \mu\text{g/mg}$ 。然后将丝素支架与这二种肝素化支架(直径为 10 mm, 厚度为 2 mm)浸渍在不同浓度的 BMP-2 溶液中 2 h 后, 支架对 BMP-2 的吸附情况如图 7。HP/SF 的 BMP-2 吸附能力较 SF 有显著性提高($p < 0.01$), 在三种不同浓度的 BMP-2 溶液(50, 100 和 150 μ g/mL)中, 纯 SF 支架上 BMP-2 吸附量仅为 $2.07 \pm 0.59 \mu\text{g}$, $7.8 \pm 0.94 \mu\text{g}$ 和

图3 不同支架材料上 Dio 标记的 MG-63 细胞
 Figure 3 Dio-labeled MG-63 cells on different scaffolds
 (a) SF ($\times 100$); (b) HP/SF ($\times 100$); (c) HP/L-SF ($\times 100$)

图4 SF 表面 SEM 形貌观察
 Figure 4 Scanning electron microscopic observation of SF scaffolds
 (a) SF ($\times 100$); (b) SF ($\times 400$)

$12.21 \pm 0.52 \mu\text{g}$, HP/SF 的吸附量分别为 $3.97 \pm 0.62 \mu\text{g}$, $11.17 \pm 1.10 \mu\text{g}$ 和 $15.15 \pm 0.93 \mu\text{g}$; 而 HP/L-SF 吸附能力最高, 分别为 $6.32 \pm 0.34 \mu\text{g}$, $13.53 \pm 0.27 \mu\text{g}$ 和

$19.65 \pm 1.81 \mu\text{g}$. 肝素化 SF 对 BMP-2 吸附能力明显增加, 主要是由于支架上的肝素与 BMP-2 发生特异性结合, 提高了 BMP-2 与支架之间的亲和性; 而 HP/L-SF 比

图5 MG-63 细胞在三种不同丝素支架上的增殖情况

Figure 5 MG-63 cell proliferation on three kinds of SF scaffolds

图6 SF 与 L-SF 肝素接枝量

Figure 6 Incorporated heparin on the SF and L-SF scaffolds
Asterisks indicate the significant difference between the indicated groups (** $p < 0.01$)

图7 三种不同丝素支架对 BMP-2 的吸附作用

Figure 7 BMP-2 adsorption of three kinds of SF scaffolds
Asterisks indicate the significant difference between the indicated groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

HP/SF 对 BMP-2 具有更高的吸附能力。

图8是将三种支架浸渍在 150 μg/mL BMP-2 溶液中吸附 2 h 后, 在 PBS 缓冲液中的释放性能. 其中, SF 在第一天就有明显的突释, 达到了 50.41% 的释放率, 而 HP/SF 和 HP/L-SF 在第一天的释放率分别为 29.90% 和 26.82%, 且在 3, 5, 7 d 时均以较慢的速率释放; 一周后, SF 的释放率达到 78.41%, 而 HP/SF 和 HP/L-SF 的释放率分别为 53.53% 和 40.97%, 说明丝素支架经肝素化后能明显减缓 BMP-2 的释放, 这主要是由于接枝肝素后, 增加了 BMP-2 与支架之间的亲和力, 减缓了其从支架上释放的速度, 达到了良好的缓释效果。

图8 支架中 BMP-2 的体外释放

Figure 8 *in vitro* release of BMP-2 from the scaffolds
(a) release of BMP-2 from HP/L-SF; (b) release of BMP-2 from HP/SF; (c) release of BMP-2 from SF

2.3 碱性磷酸酶(ALP)活性测定

碱性磷酸酶(ALP)活性与细胞的分化密切相关. 磷酸苯二钠可以在碱性磷酸酶的作用下分解为游离酚和磷酸. 在碱性溶液中, 游离酚在铁氰化钾作用下生成红色醌衍生物, 因此可以根据红色深浅来测定 ALP 活性. 图9是 MG-63 细胞在不同支架材料上的 ALP 活性测定结果. 与空白 SF 相比, 其它支架上 MG-63 细胞 ALP 活性都有不同程度的增强, 说明 BMP-2 的加入对细胞分化具有促进作用($p < 0.01$); 其中, 负载 BMP-2 的三组支架中, SF 组与 HP/SF 组在第一天没有明显差别, 但从第 3 d 开始, HP/SF 和 HP/L-SF 上细胞的 ALP 活性比 SF 有了显著提高($p < 0.05$), 而 HP/L-SF 上细胞的 ALP 活性最高. 细胞 ALP 活性的提高与支架上 BMP-2 的持续缓慢释放密切相关, 可以保证在较长一段时间内细胞培养液中维持一定的 BMP-2 浓度, 从而促进细胞的分化^[13].

3 结论

本研究采用碳二亚胺法将丝素支架表面进行化学修饰, 成功地制备了二种适合细胞生长的肝素化丝素支

图9 MG-63 在不同支架上培养后的碱性磷酸酶活性

Figure 9 ALP activity of MG-63 cells cultured on the different scaffolds

Asterisks indicate the significant difference between the indicated groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

架(HP/SF、HP/L-SF), 将具有生物活性的 BMP-2 载入支架后, 肝素化丝素支架对 BMP-2 的吸附能力显著增强, 并且实现了对 BMP-2 的缓慢释放. 细胞实验结果表明, 载入 BMP-2 的 HP/SF、HP/L-SF 能持续有效地促进 MG-63 细胞的分化, 是一种潜在的骨组织修复材料.

References

- 1 Brigid, L. H. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1996**, 6, 432.
- 2 Ruhe, P. Q.; Boerman, O. C.; Russel, F. G.; Mikos, A. G.; Spauwen, P. H.; Jansen, J. A. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2006**, 17, 919.
- 3 Ruppert, R.; Hoffmann, E.; Sebal, W. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 237, 295.
- 4 Lin, H.; Zhao, Y. N.; Sun, W. J.; Zhang, J.; Zhao, W. X.; Xiao, Z. F.; Dai, J. W. *Biomaterials* **2008**, 29, 1189.
- 5 Jeon, O.; Song, S. J.; Kang, S. W.; Putnam, A. J.; Kim, B. S. *Biomaterials* **2007**, 28, 2763.
- 6 Altman, G. H.; Diaz, F.; Jakuba, C.; Calabro, T.; Horan, R. L.; Chen, J. S.; Lu, H.; Richmond, J.; Kaplan, D. L. *Biomaterials* **2003**, 24, 401.
- 7 Karageorgiou, V.; Tomkins, M.; Fajardo, R.; Meinel, L.; Snyder, B.; Wade, K.; Chen, J.; Novakovic, G. V.; Kaplan, D. L. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, 78, 324.
- 8 Santin, M.; Motta, A.; Freddi, G.; Cannas, M. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 46, 382.
- 9 Liu, L.; Kong, X. D.; Cai, Y. R.; Yao, J. M. *Acta Chim. Sinica* **2008**, 66, 1919 (in Chinese).
(刘琳, 孔祥东, 蔡玉荣, 姚菊明, 化学学报, **2008**, 66, 1919.)
- 10 Zhang, Y. H.; Yao, J. M.; Zhu, L. J. *Sci. Sericul.* **2011**, 37, 705 (in Chinese).
(张艳红, 姚菊明, 朱良均, 蚕业科学, **2011**, 37, 705.)
- 11 Liu, L.; Liu, J. Y.; Wang, M. Q.; Min, S. J.; Cai, Y. R.; Zhu, L. J.; Yao, J. M. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2008**, 19, 325.
- 12 Zhang, Y. H.; Ma, Y. S.; Yang, M. Y.; Min, S. J.; Yao, J. M.; Zhu, L. J. *Protein Expression Purif.* **2011**, 75, 155.
- 13 Zhao, Y. N.; Zhang, J.; Wang, X.; Chen, B.; Xiao, Z. F.; Shi, C. Y.; Wei, Z. L.; Hou, X. L.; Wang, Q. B.; Dai, J. W. *J. Controlled Release* **2010**, 141, 30.

(A1108303 Zhao, X.)