

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.21.002

RGD 多肽修饰钙磷陶瓷支架材料对骨质疏松兔成骨能力及骨功能影响的机制研究 *

侯 睿¹ 苗聪聪² 田振川² 赵 雍¹ 杨志海¹

(1 首都医科大学附属北京世纪坛医院口腔科 北京 100038; 2 首都医科大学附属北京口腔医院动物实验室 北京 100050)

摘要 目的:探究 RGD 多肽修饰钙磷陶瓷支架材料对骨质疏松(osteoporosis, OP)兔成骨能力和骨功能的影响极其可能的作用机制。**方法:**选取 40 只雌性 SPF 级新西兰大白兔,随机分为 A 组(正常对照组)和 B 组(OP 组),每组各 20 只,再将 A 组随机分为 A1 组:sham 组、A2 组:sham+HA 组、A3 组:sham+BCP 组、A4 组:sham+RGD-BCP 组,每组 5 只;B 组随机分为 B1 组:OP 组、B2 组:OP+HA 组、B3 组:OP+BCP 组和 B4 组:OP+RGD-BCP 组,每组 5 只。B 组采用去势法制备 OP 模型,检测相关指标。**结果:**A 组兔术前和术后 3 个月时 BMD 无变化($P>0.05$),B 组兔术后 3 个月时的 BMD 值较术前下降($P<0.05$)。自第 4 d 开始,A 组和 B 组 RGD-BCP 支架材料组细胞的 OD 值高于 HA 和 BCP 支架材料($P<0.05$),且 B 组之间的差异较 A 组更大($P<0.05$)。Western Blot 分析显示,A、B 两组中 RGD-BCP 中整合素 $\alpha\beta3$ 的表达高于 HA 和 BCP($P<0.05$),且 B 组之间的差异较 A 组更大($P<0.05$)。B4 和 A4 组 p38 MAPK 蛋白的相对表达均低于 Wnt5a 和 β -catenin 表达均高于 B2、B3 和 A2、A3 组($P<0.05$),此外,A4 组 p38 MAPK 蛋白的相对表达低于 Wnt5a 和 β -catenin 表达高于 B4 组($P<0.05$)。**结论:**RGD-BCP 对兔 BMSCs 具有良好的相容性和吸附作用,对 OP 模型兔更显著;且 RGD-BCP 的机制可能与调控 p38 MAPK/Wnt5a/ β -catenin 信号通路有关,为 OP 合并骨缺损的修复提供了新的思路 and 理论依据。

关键词:精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸;骨质疏松;成骨能力;骨功能

中图分类号:R-33;R68;R318.08 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)21-4007-06

Study of Influences and Its Mechanism of RGD Peptide Modified Calcium Phosphate Ceramic Scaffold Material on Bone Forming Ability and Bone Function of Osteoporosis Rabbits*

HOU Rui¹, MIAO Cong-cong², TIAN Zhen-chuan², ZHAO Yong¹, YANG Zhi-hai¹

(1 Department of Stomatology, Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, 100038, China;

2 Animal Laboratories, Beijing Stomatological Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, 100050, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the influences and its mechanism of RGD peptide modified calcium phosphate ceramic scaffold material on bone forming ability and bone function of osteoporosis (OP) rabbits. **Methods:** 40 female new zealand rabbits were randomly divided into group A(normal control group) and group B(OP group), with 20 rabbits in each group. Group A were randomly divided into group A1(sham group), group A2(sham+HA group), group A3(sham+BCP group) and group A4(sham+RGD-BCP group); group B were randomly divided into group B1 (OP group), group B2 (OP+HA group), group B3 (OP+BCP group) and group B4(OP+RGD-BCP group), with 5 rabbits in each group. In group B, the OP model was prepared by the castration method to detect the relevant indicators. **Results:** The BMD of group A preoperative and 3 months postoperative had no difference ($P>0.05$), the BMD of group B was decrease 3 months postoperative($P<0.05$). The OD of RGD-BCP in group A and B were higher than HA and BCP from 4th day($P<0.05$), and the difference of group B was larger than group A ($P<0.05$). The expression of integrin $\alpha\beta3$ of RGD-BCP in group A and B were higher than HA and BCP ($P<0.05$), and the difference of group B was larger than group A ($P<0.05$). The relative expression of p38 MAPK of group B4 and A4 were lower, Wnt5a and β -catenin were higher than group B2, B3 and A2, A3($P<0.05$), besides, the relative expression of p38 MAPK of group A4 were lower, Wnt5a and β -catenin were higher than group B4 ($P<0.05$). **Conclusion:** RGD-BCP has good compatibility and adsorption on rabbit BMSCs, and is more significant for OP model rabbits; and the mechanism of RGD-BCP may be related to the regulation of p38 MAPK / Wnt 5 a / β -catenin signaling pathway, which provides a new idea and theoretical basis for the repair of OP with bone defect.

Key words: Arginine-glycin-aspartic; Osteoporosis; Bone forming ability; Bone function

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R68; R318.08 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)21-4007-06

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81571814)

作者简介:侯睿(1990-),男,硕士研究生,医师,研究方向:支架材料与颌骨再生,E-mail:hourui3398@bjshjth.cn

(收稿日期:2023-04-04 接受日期:2023-04-28)

前言

骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种常见的骨矿基退行性代谢性疾病,多发于老年人和绝经期后女性,主要表现为骨密度(bone mineral density, BMD)下降、骨质含量减少、骨脆性增高以及骨组织显微结构改变等,以致于骨折及骨缺损的风险大大增加、骨愈合大大延迟,增加了患者的致残率和致死率^[1,2]。OP的发病机制较为复杂,尚未研究透彻,目前认为其主要病理过程为成骨和破骨细胞功能失调,骨吸收活跃而骨形成受抑制,导致骨基质和骨矿物含量减少,骨皮质变薄以及骨小梁变细,本病可能的诱因包括遗传、衰老、性腺机能减退、激素水平及多种细胞因子水平的失调等^[3,4]。随着世界人口老龄化的进展,OP已逐渐成为社会性的健康问题,愈发受到关注。目前,临床上由于外伤等原因导致的骨缺损病例愈来愈多,对患者的生活质量造成了极大的影响,而OP合并骨缺损的治疗依然是当前亟待解决的难题之一。骨组织所含矿物质及细胞成分复杂,结构特殊,且力学性能独特,因此寻找有效的可进行骨修复的理想替代材料难度极大^[5]。随着组织工程学的不断发展,生长因子、种子细胞以及支架材料研究逐渐深入和广泛,支架材料已逐步成为修复骨缺损的重要载体^[6]。基于此,本研究针对一种钙磷陶瓷支架材料,通过分别与正常及OP模型兔骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)共同培养,并植入体内,初步探讨该材料对于正常及OP模型兔BMSCs增殖和成骨功能的影响,并探究其可能的作用机制,为OP合并骨缺损的修复提供新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级新西兰大白兔40只,雌性,5月龄左右,体质量(2.5 ± 0.25)kg,由我院动物医学实验室提供,许可证号:SYXK(苏)2022-1223,实验开始前适应性饲养2周,普通颗粒饲料,自由摄食饮水。

1.1.2 实验材料 HA钙磷陶瓷支架材料、BCP双相磷酸钙支架材料、RGD多肽表面修饰双相磷酸钙陶瓷支架材料(RGD-BCP):四川大学国家生物医学材料工程技术研究中心提供。

1.1.3 主要试剂 α -MEM培养基、淋巴细胞分离液、胎牛血清:美国Gibco公司;青-链霉素双抗、胰蛋白酶:美国Sigma公司;CCK-8试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司;南京建成生物工程研究所;p38 MAPK/Wnt5a/ β -catenin抗体:美国Invitrogen公司。

1.1.4 主要仪器 酶标仪:美国Bio-Tek公司;生物安全柜:北京东联哈尔仪器制造有限公司;细胞培养箱:Thermo Fisher Scientific;超低温冰箱:美国Thermo Scientific公司;低温高速离心机:美国Sigma公司;倒置光学显微镜:日本尼康仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及建模 将40只新西兰兔随机分为A组(正常对照组)和B组(OP组),每组各20只。其中再将A组随机分为A1组:sham组、A2组:sham+HA组、A3组:sham+BCP组、A4

组:sham+RGD-BCP组,每组5只;B组随机分为B1组:OP组、B2组:OP+HA组、B3组:OP+BCP组和B4组:OP+RGD-BCP组,每组5只。B组兔固定于手术台上,常规备皮、消毒,耳缘静脉注射3%戊巴比妥,待麻醉效果满意后,沿腹中线行5cm纵切口打开腹腔,结扎双侧卵巢和输卵管并摘除,逐层缝合;A组采取与B组相同的麻醉方法和手术入路,打开腹腔后切除两块与卵巢和输卵管相邻的大小相当的脂肪组织,随后关闭腹腔。两组兔术后均肌肉注射16000iu/100g青霉素预防感染,常规喂养。

1.2.2 BMD测定 建模后3个月时,处死A组和B组所有动物,取股骨头,采用微型计算机断层扫描系统(microCT:美国GE公司)进行旋转扫描,对数据进行三维重建分析,测定各组兔的BMD值。

1.2.3 兔BMSCs的提取和培养 兔固定于手术台上,髂脊处备皮备皮、消毒,耳缘静脉注射3%戊巴比妥,待麻醉效果满意后,切口约1cm暴露髂棘,采用克氏针钻孔穿刺至髓腔,含肝素针筒吸取骨髓5mL,转移至 α -MEM培养基中混匀,静置,吸弃上层悬浮的脂肪层,吹打成细胞悬液,加入5mL淋巴细胞分离液,1500rpm离心10min,吸弃中间细胞层后再次离心,得到糜状单核细胞层,吸取单核细胞制成细胞悬液,调节密度为 1×10^6 /L接种于含1%双抗和10%胎牛血清的完全培养基中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,隔日换液一次,待细胞融合达80%即可以0.25%胰蛋白酶消化传代,待传至第三代时,转移至含 1×10^{-2} mol/L β -磷酸甘油钠、50 mg/L维生素C和 1×10^{-8} mol/L地塞米松的 α -MEM培养基中诱导培养3d,诱导后经细胞表型鉴定为成骨样细胞后进行后续实验。

1.2.4 CCK-8法测定不同支架材料对细胞增殖的影响 取第三代兔BMSCs,0.25%胰蛋白酶消化,培养基重悬并调整至 1×10^4 个/孔,接种于96孔板中,取HA、BCP和RGD-BCP三种支架材料浸泡于 α -MEM培养基中1d,弃去废液,接种细胞,加入20%FBS α -MEM培养基至支架材料刚刚完全浸没,分别于第1、4、7、9d时,采用酶标仪测量各组细胞在450nm处的吸光度(OD)值,使用GraphPad Prism 6软件分析并绘制细胞生长曲线。

1.2.5 Western Blot检测整合素 α v β 3的表达 取A2-A4组和B2-B4组兔,在其背部左侧制作肌袋,根据分组将三种不同的支架材料分别植入相应兔的肌袋中并缝合,另在背部右侧制作空白对照区域,只进行切开缝合,不植入材料(图1),在植入16周后,取出各组兔背部植入的支架材料及周围肌肉组织,将周围肌肉组织研磨匀浆,离心后取下层沉淀,加入RIPA裂解液裂解提取总蛋白,BCA法测定总蛋白浓度,各组取20 μ g蛋白上样,电泳,转膜,5%脱脂奶粉封闭,洗膜,加一抗,4℃下孵育过夜,TBST洗涤3次,加二抗,室温下孵育2h,ECL显色,以GAPDH为内参,Image Lab软件处理分析各组兔肌肉组织中整合素 α v β 3的表达。

1.2.6 Western Blot测定p38 MAPK/Wnt5a/ β -catenin信号通路蛋白的表达 取各组BMSCs,离心取下层沉淀,加入RIPA裂解液裂解提取总蛋白,BCA法测定总蛋白,上样,电泳,转膜,封闭,洗膜,加一抗,4℃下孵育12h,TBST洗膜,加二抗,室温孵育1h,TBST洗膜,ECL显色,以 β -actin为内参,Image Lab

软件处理分析各组细胞 p38 MAPK、Wnt5a、 β -catenin 蛋白的相对表达。

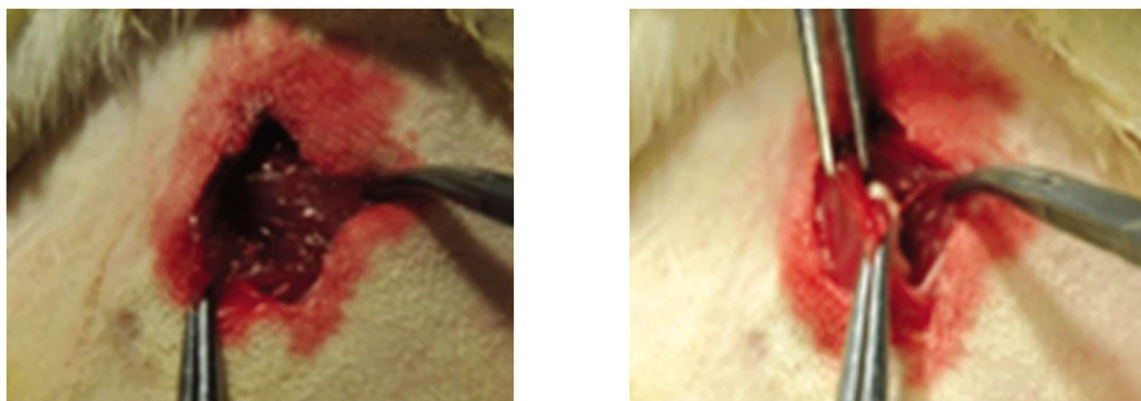


图 1 支架材料植入手术图

Fig.1 Surgical diagram of stent material implantation

1.3 统计学方法

应用 SPSS 23.0 软件进行数据统计分析,计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察及 BMD 变化

两组兔在造模之后术后伤口愈合良好,无红肿、感染、开裂等症状,3 个月内均存活良好,未见死亡,毛色灰暗,两组兔均体重明显增加,A 组增加 (0.61 ± 0.21) kg, B 组增加 (1.12 ± 0.43) kg, B 组增加更为明显。A 组兔术前和术后 3 个月时 BMD 无明显变化 ($P > 0.05$), B 组兔术后 3 个月时的 BMD 值较术前显著下降 ($P < 0.05$),结果见表 1。

表 1 两组兔股骨 BMD 值比较($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 1 Comparison of BMD values of both rabbit femoral groups ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Groups	Preoperative	Three months after surgery	t	P
Group A	0.36 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.06	0.310	0.764
Group B	0.37 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.03*	6.519	<0.001
t	0.349	5.667		
P	0.736	<0.001		

Note: * $P < 0.05$ compared to 3 months after group A and before group B.

2.2 原代兔 BMSCs 形态观察

倒置显微镜观察可见, A 组原代细胞形状较为规则, 呈现典型的梭型、纺锤型 BMSCs 形态; B 组原代细胞形状杂乱不一, 部分可见梭型、纺锤型 BMSCs 形态。

2.3 三种支架材料对兔 BMSCs 增殖的影响

三种不同支架材料对正常或 OP 模型兔 BMSCs 增殖的影响见图 3, 第 1 d 时各组细胞所测得的 OD 值无明显差异 ($P > 0.05$), 自第 4 d 开始, A 组和 B 组 RGD-BCP 支架材料组细胞的 OD 值显著高于 HA 和 BCP 支架材料 ($P < 0.05$), 且 B 组之间的差异较 A 组更大 ($P < 0.05$)。

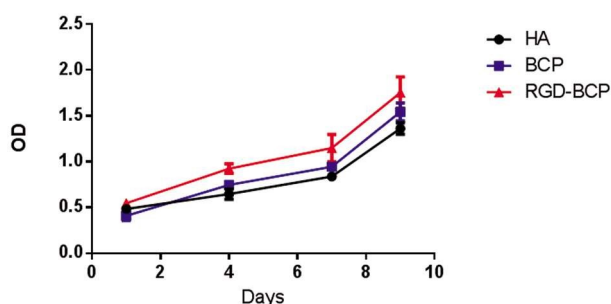


图 2-1 正常兔 BMSCs 与三种支架材料复合培养细胞生长曲线

Fig.2-1 Growth curves of normal rabbit BMSCs with three scaffolds

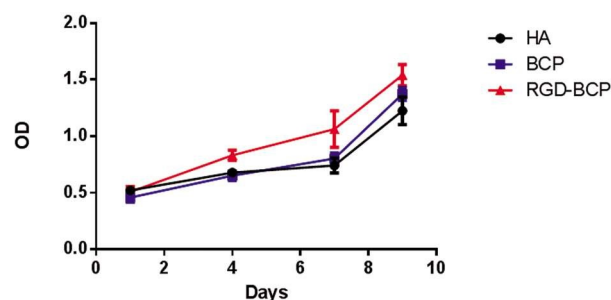


图 2-2 OP 模型兔 BMSCs 与三种支架材料复合培养细胞生长曲线

Fig.2-2 Growth curves of rabbit BMSCs in combination with three scaffolds

2.4 整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达比较

Western Blot 分析显示, 三种支架植入体内后周围肌肉组织中整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达均显著高于空白肌肉组织 ($P < 0.05$),

同时 A、B 两组中 RGD-BCP 中整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达显著高于 HA 和 BCP ($P < 0.05$), 且 B 组之间的差异较 A 组更大 ($P < 0.05$), 各组 Western Blot 检测条带图分析见图 3。

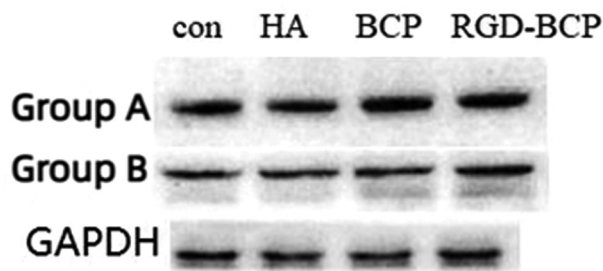


图3 整合素 $\alpha v\beta 3$ Western Blot 检测条带图

Fig.3 Plot of the integrin $\alpha v\beta 3$ Western Blot detection bands

表2 各组细胞中 p38 MAPK/Wnt5a/ β -catenin 信号通路蛋白的相对表达比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Comparative comparison of relative expression of p38 MAPK / Wnt 5 a / β -catenin signaling pathway proteins in cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Groups	p38 AMPK	Wnt5a	β -catenin
A2	2.34 $\pm$ 0.64	0.81 $\pm$ 0.09	0.81 $\pm$ 0.17
A3	1.86 $\pm$ 0.35	1.05 $\pm$ 0.13	1.09 $\pm$ 0.23
A4	1.23 $\pm$ 0.14	1.21 $\pm$ 0.22	1.33 $\pm$ 0.27
B2	3.45 $\pm$ 1.09*	0.49 $\pm$ 0.11*	0.54 $\pm$ 0.13*
B3	2.27 $\pm$ 0.35*	0.67 $\pm$ 0.09*	0.83 $\pm$ 0.21*
B4	1.63 $\pm$ 0.23**	0.89 $\pm$ 0.17**	1.06 $\pm$ 0.29**

Note: * $P < 0.05$ compared to A2, A3 and A4; ** $P < 0.05$ compared to B2 and B3.

量和生命健康^[7],而因各种原因所导致的骨缺损的发生率同样也在持续走高,但对于OP合并骨缺损却缺乏理想的治疗手段^[8,9]。目前临床上采取的骨修复手段主要包括自体骨移植、同种异体骨移植和人工骨移植替代材料,但自体骨获取过程极为复杂,患者较为痛苦,而同种异体骨移植存在较大的异物排斥反应和感染风险,上述两者均存在一定的缺陷^[10,11]。随着生长因子、种子细胞和生物材料支架等三大因素所构成的组织工程技术的不断发展,骨组织工程学为修复骨缺损提供了一个新的选择。

理想的骨缺损修复生物支架材料应具备以下特性:生物相容性、降解性、多孔三维结构、骨传导、骨诱导及成骨作用等^[12]。现有的支架材料种类繁多,HA 钙磷陶瓷作为常见的支架材料,具有良好的生物相容性及诱导成骨能力^[13];双相磷酸钙(BCP)通常为一定比例的 β -磷酸三钙和羟基磷灰石所构成的复合体,同时具备上述两种材料的生物活性、生物相容性、适宜的降解率以及优异的骨传导和骨诱导性等优点,不仅可为特定细胞提供结构支撑,有利于细胞的增殖、分化和粘附,而且还可为细胞生长提供合适的支架结构,以利于细胞营养物质的交换和代谢产物的排出,此外还可引导骨组织再生以及控制骨组织结构形态,方便用于填充特定尺寸和形状的骨缺损,近年来在牙颌、颅面骨缺损重建中应用愈加广泛^[14]。然而 BCP 作为支架材料尚存一定的不足,如亲水性较差、表面自由能较低、对细胞缺乏供其吸附识别的位点等,因而易造成接种细胞的脱落和流失,不利于材料发挥治疗作用^[5],故考虑对其表面进行修饰,以加强其对于细胞的吸附能力,从而有效增强支架材料的治疗作用。

植入材料的表面特性将直接影响细胞的黏附、分化乃至组织的愈合,细胞在材料表面的初期黏附将决定其后的铺展、增

2.5 p38 MAPK/Wnt5a/ β -catenin 信号通路蛋白的相对表达

B4 和 A4 组 p38 MAPK 蛋白的相对表达均低于、Wnt5a 和 β -catenin 表达均高于 B2、B3 和 A2、A3 组($P < 0.05$),此外,A4 组 p38 MAPK 蛋白的相对低于、Wnt5a 和 β -catenin 表达高于 B4 组($P < 0.05$),见表 2。

3 讨论

OP 已被世卫组织列为包括心脑血管病、肿瘤、艾滋病在内的二十一世纪影响人类健康的四大疾病之一,严重影响生活质

殖和分化,由细胞表面整合素受体调节的细胞与植入材料之间的黏附作用是一个复杂的过程^[16]。RGD 序列是广泛存在于层粘连蛋白、玻璃粘连蛋白及纤维粘连蛋白等细胞外基质中的短肽,也是整合素家族中大多数能识别其配体的最小氨基酸序列,故将该氨基酸序列修饰在材料表面可以实现使细胞与之特异性结合的目的^[17]。通过外源性 RGD 多肽修饰表面后的植入材料,既可保留原有的理化性质和生物相容性,同时又被赋予了新的表面活性,从而更好的促进细胞的黏附,与周围组织发生牢固而持久的结合^[18]。已有多项研究^[19,20]表明,RGD 可促进多种生物材料(如壳聚糖、小牛骨粉等)与细胞之间的黏附,并促进细胞的增殖和分化,且不会影响机体组织的酶活性和代谢。对于 OP 的治疗,有学者^[21]将雌激素与 RGD 多肽缀合后得出结论:使用 RGD 与雌激素缀合有效提高了激素替代治疗的疗效,且降低了替代治疗的不良反应。上述研究提示,RGD 多肽序列在 OP 的治疗当中起着较为明显的作用,而将 RGD 多肽序列修饰于支架材料的表面也被研究证明对于骨缺损情况下的成骨有利,故 RGD 修饰 BCP 支架材料在对 OP 合并骨缺损的治疗中应该具有较为明显的优势。

在本研究中,应用 CCK-8 法分别对与三种支架材料复合培养的 BMSCs 进行细胞活性测定,结果显示,各组细胞在实验期间均呈现显著的增殖趋势,提示三种材料均对兔 BMSCs 无细胞增殖毒性;此外,各组细胞在第 1 d 时所测得的 OD 值相近,而自第 4 d 开始,各组细胞测得的 OD 值开始出现较为明显差异,RGD-BCP 组的 OD 值明显高于其他两种材料,而 B 组各组分间的差异较 A 组更为明显,提示 RGD-BCP 材料对 OP 兔 BMSCs 的增殖促进作用较其他两种材料更强,细胞相容性更优,说明 BMSCs 在 RGD-BCP 材料的表面和孔隙内粘附、生

长、分化和增殖。

支架材料对于细胞的粘附能力主要依靠对于受体-整合素的特异性识别而发挥作用,整合素是由 α 、 β 两个亚基组成的跨膜受体, α 、 β 亚基的外区构成特异性受体与配体的结合,最常见的配体位点是 RGD 序列^[22,23]。在正常状态下,骨组织不断地进行着重建,骨组织的形成与改建与成骨细胞和破骨细胞的发挥作用密切相关的。破骨细胞在旧骨表面附着,后释放细胞因子,当细胞因子被识别后,即开始形成骨吸收。在骨吸收的过程中,与细胞外基质的粘附是作用开始的关键步骤^[24]。既往研究^[25]表明,破骨细胞外最为重要的细胞因子为整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 。RGD 可破骨细胞粘附分子的特异性结合可以封闭破骨细胞的整合素天然受体通道,发挥竞争性拮抗作用,抑制破骨细胞发挥骨吸收的作用。在 OP 环境当中,成骨细胞与破骨细胞同时发挥作用,由于破骨细胞的抑制减少,使得破骨强于成骨作用而使骨质破坏增多,而 RGD 多肽序列修饰的支架材料即作为一种既可满足抑制骨吸收、同时又可促进新骨形成的理想材料。本研究结果显示,三种支架材料周围肌肉组织整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 的表达水平明显升高,RGD-BCP 材料周围肌肉组织中整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 的表达较 HA 和 BCP 材料更高,而在 OP 模型兔中,RGD-BCP 支架材料周围肌肉组织中整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 的表达较其他组提高的比例更为明显,提示 RGD 有效结合了 OP 模型兔整合素 $\alpha\text{v}\beta3$,表明其对于成骨相关细胞起到了较为明显的吸附作用。

对进一步机制通路的研究显示,B4 和 A4 组 p38 MAPK 蛋白的相对表达均低于 Wnt5a 和 β -catenin 表达均高于 B2、B3 和 A2、A3 组($P<0.05$),此外,A4 组 p38 MAPK 蛋白的相对表达低于 Wnt5a 和 β -catenin 表达高于 B4 组($P<0.05$),提示 RGD-BCP 对成骨分化功能的调节与下调 p38 MAPK、上调 Wnt5a 和 β -catenin 表达有关。AMPK 为丝/苏氨酸蛋白激酶组成的机体中的重要能量调节器,参与能量代谢、内皮功能、炎症反应和氧化还原反应等多项生理病理进程之中,在氧化应激状态下可激活化为磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(pAMPK),促进 ATP 的生成并抑制其消耗,以帮助细胞渡过急性损伤^[26]。Wnt 配体是一类分泌型糖蛋白,可同时激活 Wnt 经典和非经典通路,诱导复杂信号网络的形成。经典的 Wnt 信号通路传导分子包括 Wnt 分泌蛋白、 β -连环蛋白、糖原合成激酶 3 β 、跨膜受体卷曲蛋白、松散蛋白、轴蛋白、T 细胞因子、酪蛋白激酶 1 等, β -连环蛋白是其中重要的功能蛋白之一,早期研究发现其具有粘附分子和维持细胞膜稳定的作用,此外还涉及重要的细胞活动和信号转导,是介导成骨细胞生长和分化的重要因子之一,而 β -catenin 在细胞核内的含量变化是信号转导的关键步骤^[27]。国内有学者研究报道^[28],氧化应激反应通过激活 p38 MAPK 而引起组织和细胞损伤,破坏成骨细胞的活性,过多的活性氧可促进 Wnt/ β -catenin 通路中关键基因的转录,最终抑制成骨细胞的增殖、分化和矿化,从而形成 OP,p38 MAPK 磷酸化水平可代表其激活状态和损伤程度;抗氧化药物通过清除活性氧和增强机体内源性抗氧化能力,抵抗对成骨细胞的损伤,促进其增殖和分化,该作用是通过调控 p38 MAPK/Wnt5a/ β -catenin 信号转导通路实现的。

综上所述,RGD-BCP 对兔 BMSCs 具有良好的相容性和吸

附作用,对 OP 模型兔更显著;且 RGD-BCP 的机制可能与调控 p38 MAPK/Wnt5a/ β -catenin 信号通路有关,为 OP 合并骨缺损的修复提供了新的思路和理论依据。

参考文献(References)

- [1] 李静,闫丰娜,吴桔,等.海藻酸钙对骨质疏松症大鼠骨骼肌 SDF-1 含量和骨密度的影响[J].现代生物医学进展,2022,22(7): 1229-1233
- [2] El Hage C, Hallit S, Akel M, et al. Osteoporosis awareness and health beliefs among Lebanese women aged 40 years and above [J]. Osteoporos Int, 2019, 30(4): 771-786
- [3] Alizadeh-Mohajer M, Raisi A, Farjanikish G, et al. Effect of Local Administration of Verapamil Combined with Chitosan Based Hybrid Nanofiber Conduit on Transected Sciatic Nerve in Rat[J]. Bull Emerg Trauma, 2019, 7(1): 28-34
- [4] Humberto Valencia C. Hydrolytic degradation and in vivo resorption of poly-L-lactic acid-chitosan biomedical devices in the parietal bones of Wistar rats[J]. J Int Med Res, 2019, 47(4): 1705-1716
- [5] Peng XY, Hu M, Liao F, et al. La-Doped mesoporous calcium silicate / chitosan scaffolds for bone tissue engineering [J]. Bio mater Sci, 2019, 7(4): 1565-1573
- [6] HINES JT, JO WL, CUI Q, et al. Osteonecrosis of the Femoral Head: an Updated Review of ARCO on Pathogenesis, Staging and Treatment[J]. J Korean Med Sci, 2021, 36(24): e177
- [7] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317-318
- [8] Rezus E, Tamba BI, Badescu MC, et al. Osteonecrosis of the Femoral Head in Patients with Hypercoagulability-From Pathophysiology to Therapeutic Implications[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6801
- [9] 云大科,符丽娜,纪志华,等.骨愈灵片联合依降钙素注射液对骨质疏松症患者 Oswestry 功能障碍指数评分及骨密度、骨代谢指标的影响[J].现代生物医学进展,2022,22(10): 1986-1990
- [10] Erickson AE, Sun J, Lan Levengood SK, et al. Chitosan-based composite bilayer scaffold as an in vitro osteochondral defect regeneration model[J]. Biomed Microdevices, 2019, 21(2): 34
- [11] Tang Q, Hu Z, Jin H, et al. Microporous polysaccharide multilayer coated BCP composite scaffolds with immobilised calcitriol promote osteoporotic bone regeneration both in vitro and in vivo [J]. Theranostics, 2019, 9(4): 1125-1143
- [12] LIU S, ZHOU H, LIU H, et al. Fluorine-contained hydroxyapatite suppresses bone resorption through inhibiting osteoclasts differentiation and function in vitro and in vivo [J]. Cell Prolif, 2019, 52(3): e12613
- [13] Guggenbuhl P, Robin F, Cadiou S, et al. Etiology of avascular osteonecrosis of the femoral head [J]. Morphologie, 2021, 105(349): 80-84
- [14] Tang P, Han L, Li P, et al. Mussel-Inspired Electroactive and Antioxidative Scaffolds with Incorporation of Polydopamine-Reduced Graphene Oxide for Enhancing Skin Wound Healing [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(8): 7703-7714
- [15] Al-Eesa NA, Fernandes SD, Hill RG, et al. Remineralising fluorine containing bioactive glass composites [J]. Dent Mater, 2021, 37(4): 672-681
- [16] CCiosek Z, Kot K, Kosik-Bogacka D, et al. The Effects of Calcium,

- Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue [J]. Biomolecules, 2021, 11(4): 506
- [17] RONDANELLI M, FALIVA MA, TARTARA A, et al. An update on magnesium and bone health[J]. Biometals, 2021, 34(4): 715-736
- [18] 薛鹏, 杜斌, 刘铎, 等. 镀膜工艺结合 3D 打印制备 Mg-F 膜 / 淫羊藿素膜 / β -磷酸三钙支架的表征及成骨能力 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(16): 1-8
- [19] MURAB S, HAWK T, SNYDER A, et al. Tissue Engineering Strategies for Treating Avascular Necrosis of the Femoral Head[J]. Bioengineering (Basel), 2021, 8(12): 200
- [20] Hoogervorst P, Campbell JC, Scholz N, et al. Core Decompression and Bone Marrow Aspiration Concentrate Grafting for Osteonecrosis of the Femoral Head[J]. J Bone Joint Surg Am, 2022, 104(Suppl 2): 54-60
- [21] Cui Q, Jo WL, Koo KH, et al. ARCO Consensus on the Pathogenesis of Non-traumatic Osteonecrosis of the Femoral Head [J]. J Korean Med Sci, 2021, 36(10): e65
- [22] 龙燕鸣, 谢梦生, 黄加洁, 等. 酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1 调控骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞的成骨能力[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(6): 1-5
- [23] Menale C, Robinson LJ, Palagano E, et al. Absence of dipeptidyl peptidase 3 increases oxidative stress and causes bone loss[J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(11): 2133-2148
- [24] Ma H, Wang H, Zhang H, et al. Effects of phenanthrene on oxidative stress and inflammation in lung and liver of female rats [J]. Environ Toxicol, 2020, 35(1): 37-46
- [25] Ventura-Clapier R, Piquereau J, Veksler V, et al. Estrogens, estrogen receptors effects on cardiac and skeletal muscle mitochondria [J]. Front Endocrinol(Lausanne), 2019, 10(1): 557
- [26] 张帆, 梁清洋, 韩超, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路调控成骨细胞, 破骨细胞在骨质疏松中的作用探讨[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(10): 1540-1544
- [27] Weng J, Wu J, Chen W, et al. KLF14 inhibits osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by downregulating WNT3A [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(8): 4445-4455
- [28] 赵容山, 梁伟坚, 邓炜聪, 等. 姜黄素通过抗氧化应激保护成骨细胞功能的作用机制研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(8): 1-12

(上接第 4053 页)

- [24] 周立宾, 薛红. ACS 患者血清 IMA、Hcy、NT-proBNP 水平变化及其诊断价值[J]. 医学临床研究, 2019, 36(1): 175-176, 181
- [25] 陈培培. 急性 ST 段抬高型心肌梗死患者 PCI 术后 ST 段回落不良的影响因素研究[D]. 河南: 郑州大学, 2021
- [26] Crea F, Montone RA, Rinaldi R. Pathophysiology of coronary microvascular dysfunction[J]. Circ J, 2022, 86(9): 1319-1328
- [27] 胡诗宛, 杨佳. 血小板活化与动脉硬化相关性的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(12): 2205-2209
- [28] George R, Bhatt A, Narayani J, et al. Enhanced P-selectin expression on platelet-a marker of platelet activation, in young patients with angiographically proven coronary artery disease [J]. Mol Cell Biochem, 2016, 419(1-2): 125-133
- [29] 李泽, 李新刚, 沈素. P-选择素在血栓形成中的作用及 P-选择素抑制剂的研究进展[J]. 中南药学, 2020, 18(2): 276-279
- [30] 何志凌, 万泽民, 招煦杰. 平均血小板体积 / 血小板计数、P 选择素、血小板-淋巴细胞聚集与急性心肌梗死患者经皮冠状动脉介入术后 TIMI 血流分级的关联及其预测主要不良心血管事件的效能研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29(2): 25-31
- [31] 吴秀华. 急性心肌梗死患者经皮冠脉介入术 ST 段回落与 P 选择素关系研究[D]. 上海: 同济大学, 2017
- [32] 张云, 黄文珠, 许端敏, 等. 急性心肌梗死经皮冠状动脉介入治疗后 ST 段回落不良的相关因素[J]. 中国医药, 2013, 8(4): 448-450
- [33] 杨晓仪, 张晓坤, 付玉梅, 等. 急性心肌梗死患者急诊 PCI 术后 ST 段回落与术前血清 NT-proBNP 水平的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(14): 1949-1952
- [34] 吴秀华, 来晏, 陈飞, 等. 急性心肌梗死经皮冠状动脉介入治疗术后心电图 ST 段回落与 P 选择素的关系[J]. 老年医学与保健, 2018, 24(4): 404-407
- [35] 陈云宪, 唐良秋, 徐新, 等. 缺血修饰白蛋白在急性 ST 段抬高型心肌梗死再灌注疗效评价中的价值 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2014, 7(2): 146-148, 152