

上调钙敏感受体对大鼠多孔钽-BMSCs复合培养成骨向分化的影响及其作用机制

刘凯楠¹, 李思雨², 李粤源³, 徐田杰¹, 郭小玲¹, 崔逸爽², 王茜^{1*}, 王志强³

¹华北理工大学基础医学院, 河北唐山 063200; ²华北理工大学公共卫生学院, 河北唐山 063200; ³华北理工大学临床医学院, 河北唐山 063200

[中图分类号] R459.9; R-331; R318.08

[文献标志码] A

[DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2023.03.0258

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 刘凯楠, 李思雨, 李粤源, 等. 上调钙敏感受体对大鼠多孔钽-BMSCs复合培养成骨向分化的影响及其作用机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(3): 258-266.

[收稿日期] 2022-04-08

[录用日期] 2022-04-25

[上线日期] 2022-09-19

[摘要] **目的** 探讨上调钙敏感受体(CaSR)对大鼠多孔钽-骨髓间充质干细胞(BMSCs)复合培养成骨向分化的影响及其作用机制。**方法** 提取SD大鼠BMSCs培养至第3代, 通过成骨向和成软骨向诱导后, 采用茜素红染色和甲苯胺蓝染色鉴定; 荧光显微镜观察BMSCs在多孔钽表面的生长黏附情况; CCK-8法检测BMSCs在不同浓度(200、250、300、350、400 μmol/L)GdCl₃(CaSR激动剂)处理下培养1~5 d的细胞增殖情况, 选取最适作用浓度; 激光共聚焦显微镜观察激活CaSR后细胞内钙离子分布情况。取第3代BMSCs成骨诱导并分为对照组(加入成骨诱导培养基)、GdCl₃组(加入含300 μmol/L GdCl₃的成骨诱导培养基)、多孔钽组(与国产多孔钽材料复合培养, 加入成骨诱导培养基)与GdCl₃+多孔钽组(与国产多孔钽材料复合培养, 加入含300 μmol/L GdCl₃的成骨诱导培养基)。培养第7天, 检测各组碱性磷酸酶(ALP)活性; 培养第7、14、21天, 采用ELISA法检测I型胶原(Col I)、骨桥蛋白(OPN)分泌水平, Western blotting检测Col I、OPN、Runx相关转录因子2(Runx2)、Homer 1蛋白的表达。**结果** 茜素红、甲苯胺蓝染色结果显示分离提取的细胞为BMSCs; CCK-8法检测结果显示, 300 μmol/L GdCl₃处理的细胞活性最高($P<0.05$); 激光共聚焦显微镜观察显示, 激活CaSR后细胞内钙离子荧光强度明显增高($P<0.05$)。GdCl₃组、多孔钽组和GdCl₃+多孔钽组培养第7天ALP活性以及第7、14、21天的Col I、OPN、Runx2、Homer1蛋白相对表达量均高于对照组($P<0.05$); GdCl₃+多孔钽组培养第7天的ALP活性以及Col I、Runx2、Homer1蛋白相对表达量高于GdCl₃组、多孔钽组, 第14天的Col I、OPN、Runx2、Homer1蛋白相对表达量高于GdCl₃组, 第21天的Col I、OPN、Runx2、Homer1蛋白相对表达量高于多孔钽组, 第7、14、21天的Col I与第7、21天的OPN蛋白分泌量明显高于GdCl₃组、多孔钽组和对照组($P<0.05$); 多孔钽组培养第7天的Col I与第21天的OPN蛋白分泌量高于对照组($P<0.05$); GdCl₃组培养第21天的Col I与第14天的OPN蛋白分泌量高于对照组($P<0.05$)。**结论** 多孔钽与BMSCs复合培养后, 上调CaSR可促进细胞成骨向分化, 其机制可能与激活Col I、Runx2、OPN等成骨基因的表达有关。

[关键词] 骨缺损; 多孔钽; 骨髓间充质干细胞; 钙敏感受体

Effect of calcium-sensing receptor up-regulation on osteogenic differentiation of porous tantalum-BMSCs composite culture

Liu Kai-Nan¹, Li Si-Yu², Li Yue-Yuan³, Xu Tian-Jie¹, Guo Xiao-Ling¹, Cui Yi-Shuang², Wang Qian^{1*}, Wang Zhi-Qiang³

¹School of Basic Medical Sciences, ²School of Public Health, ³School of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063200, China

*Corresponding author, E-mail: tswqxx008@126.com

This work was supported by the Ministry of Science and Technology of China (2012BAE06B03), the Hebei Provincial Medical

[基金项目] 国家科技部科技支撑课题(2012BAE06B03); 河北省医学科学研究重点课题计划(20160225); 河北省卫计委资助课题(20180733)

[作者简介] 刘凯楠, 硕士研究生, 主要从事骨组织工程方面的研究

[通信作者] 王茜, E-mail: tswqxx008@126.com

Research Project (20160225), and the Project Supported by Hebei Provincial Health and Family Planning Commission (20180733)

[Abstract] Objective To investigate the effect and mechanism of up-regulating calcium-sensing receptor (CaSR) on osteogenic differentiation of complex culture with porous tantalum-bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods**

BMSCs were extracted from SD rats and cultured to the third passage, and identified by alizarin red staining and toluidine blue staining after osteogenic and chondrogenic induction. The growth and adhesion of BMSCs on porous tantalum surface were observed by fluorescence microscope. CCK-8 assay was used to detect the proliferation of BMSCs cultured at different concentrations (200, 250, 300, 350, 400 $\mu\text{mol/L}$) of GdCl_3 for 1-5 d, and the optimal concentration was selected. Confocal laser scanning microscopy was used to observe the intracellular calcium distribution after activation of CaSR. The third-generation of BMSCs were divided into control group (with osteogenic induction medium), GdCl_3 group (with osteogenic induction medium containing 300 $\mu\text{mol/L}$ GdCl_3), porous tantalum group (with domestic porous tantalum material, with osteogenic induction medium) and GdCl_3 +porous tantalum group (with domestic porous tantalum material, with osteogenic induction medium containing 300 $\mu\text{mol/L}$ GdCl_3). At the 7th day of culturing, alkaline phosphatase (ALP) activity was measured in each group. On the 7th, 14th and 21st day of culturing, the protein secretion levels of type I collagen (Col I) and osteopontin (OPN) were detected by ELISA, and the protein expression levels of Col I, OPN, Runt-related transcription factor 2 (Runx2) and Homer 1 were detected by Western blotting. **Results** Alizarin red and toluidine blue staining showed that the isolated and extracted cells were BMSCs; CCK-8 assay showed that 300 $\mu\text{mol/L}$ GdCl_3 -treated cells had the highest activity ($P<0.05$); confocal laser scanning microscopy showed that the intracellular calcium content was significantly increased after activation of CaSR ($P<0.05$). ALP activity on day 7 and relative expression levels of Col I, OPN, Runx2 and Homer1 protein on days 7, 14 and 21 in GdCl_3 group, porous tantalum group and GdCl_3 +porous tantalum group were higher than those in control group ($P<0.05$). ALP activity and relative expression levels of Col I, Runx2 and Homer1 protein on day 7 were higher in GdCl_3 +porous tantalum group than those in GdCl_3 group and porous tantalum group; relative expression levels of Col I, OPN, Runx2 and Homer1 protein on day 14 were higher than those in GdCl_3 group; relative expression levels of Col I, OPN, Runx2 and Homer1 protein on day 21 were higher than those in porous tantalum group, the secretion levels of Col I on days 7, 14, and 21, and OPN on days 7 and 21 were higher than those in GdCl_3 group, porous tantalum group and GdCl_3 + porous tantalum group ($P<0.01$). The secretion levels of Col I on day 21 and OPN on day 14 in GdCl_3 group were higher than those in control group ($P<0.05$). The secretion of OPN protein was higher in GdCl_3 group than in control group on the 21st and 14th day of culture ($P<0.05$). **Conclusions** After co-culture of porous tantalum with BMSCs, up-regulation of CaSR may promote osteogenic differentiation of BMSCs by activating the expression of Col I, Runx2 and OPN.

[Key words] bone defect; porous tantalum; bone marrow mesenchymal stem cells; calcium-sensing receptor

骨缺损临床较为常见, 在其治疗中自体或同种异体骨移植技术已被广泛应用^[1], 其中自体骨移植为骨移植的金标准, 但仅适用于处理小尺寸缺陷^[2]; 异位骨移植具有排斥反应及潜在传播疾病的风险^[3], 因此亟需进行新型骨组织工程材料的研发^[4-5]。近年来, 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)由于具有多向分化潜能、抗炎及免疫调节等特性而在骨组织工程应用中展现出巨大优势^[6-8]。长期以来, 多孔支架被认为是骨组织修复的最佳替代品^[9]。国产多孔钽的孔隙率较高, 呈骨松质样微孔结构^[10-12], 可为BMSCs成骨向诱导及增殖提供力学支撑, 且其三维空间结构能够使营养物质被有效运输, 更加有利于细胞的生长增殖。钙离子是生物功能的重要辅助信使和调节因子, 可通过激活钙感受受体(calcium-sensing receptor, CaSR)发挥第一信使的作用^[6]。CaSR是一种G蛋白偶联受体, 在维持钙稳态中起着关键作用^[13-14]。近年来, CaSR在骨科领域中的应用逐渐增多, 如治疗骨质疏松的药物雷诺酸铈^[15-16]能够通过激活CaSR而发挥促进骨形成与抑制骨吸收

的作用^[17]。有研究发现, 成骨细胞上的钙感受器是骨痂成熟和骨折愈合所必需的^[18]。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、I型胶原(collagen type I, Col I)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是成骨早期分化的重要标志物, 而Runt相关转录因子2(runt-related transcription factor 2, Runx2)被认为是骨发育和成骨细胞分化的主要调节因子^[19-20]。本研究探讨了上调CaSR对多孔钽-BMSCs复合培养成骨向分化的影响及其作用机制, 旨在为后续以CaSR为作用靶点、结合多孔支架材料与种子细胞治疗骨缺损提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及仪器 多孔钽材料(直径15 mm、厚度2 mm, 圆形片状; 重庆润泽医疗器械有限公司)。CaSR激动剂三氯化钆(GdCl_3 , 上海Adams公司); β -甘油磷酸钠(美国Alfa Aesar公司); 地塞米松、抗坏血酸(梯希爱上海化成工业发展有限公司); α -MEM培养基(北京中生奥邦生物科技有限公司); 快速SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、

CCK-8试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司); ALP检测试剂盒、DAPI染色液(上海碧云天生物技术有限公司); 鬼笔环肽(Phalloidin, 上海翌圣生物科技股份有限公司); Col I、OPN ELISA检测试剂盒(江苏酶标生物科技有限公司); Fluo-4/AM(Molecular Probes, 美国Oregon公司)。二氧化碳培养箱(美国Esco公司); 低温高速离心机(美国Sigma-SK公司); 超净化工作台(上海一恒科学仪器有限公司); 倒置相差显微镜(日本Olympus公司); 激光共聚焦扫描显微镜(FV-100; 日本Olympus Corporation公司); 酶标仪(美国BI公司); 免疫印迹电泳槽、免疫印迹电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 BMSCs的分离与培养 3周龄Sprague-Dawley大鼠8只, 体重60~80 g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供(实验动物合格证号: 110322210100776462)。本研究经华北理工大学动物实验伦理委员会批准(LAEC-NCST-2020194), 实验过程符合国家和单位有关实验动物的管理和使用规定。

大鼠麻醉后采用脊椎脱臼法处死, 消毒后于细胞培养超净台中无菌分离股骨和胫骨, 剔除表面软组织, 于生理盐水中浸泡30 s, 去掉骨两端的干骺端, 使用10 ml注射器吸取 α -MEM培养基将骨髓冲入离心管中, 反复冲洗直至髓腔发白, 冲入离心管中的骨髓细胞经离心、完全培养基(含10%胎牛血清的 α -MEM培养基)重悬后接种于培养瓶中, 于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养。培养48 h后换液, 之后每3 d换液1次, 待细胞长至培养瓶底75%时进行传代。

1.3 BMSCs的诱导鉴定

1.3.1 茜素红染色 取第3代BMSCs, 制备细胞悬液, 按照 5×10^4 个/孔的密度接种于6孔板中, 采用完全培养基培养细胞稳定生长24 h后, 每孔加入2 ml成骨诱导培养基(完全培养基中含10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 mg/L抗坏血酸及 10^{-8} mol/L地塞米松), 每24 h换液1次, 诱导28 d后进行染色。弃去培养基, PBS冲洗3次, 95%乙醇固定10 min, 蒸馏水冲洗3次, 加入1%茜素红染色液(pH 4.2), 37℃温箱孵育30 min, ddH₂O冲洗3次, 自然晾干后于正置显微镜下观察并拍照。

1.3.2 甲苯胺蓝染色 取24孔板, 每孔放入细胞爬片, 将BMSCs细胞悬液按照 2.5×10^4 个/孔的密度接种于孔板中, 采用完全培养基培养细胞稳定生长24 h后, 每孔加入1 ml软骨诱导培养基(完全培养基中含110 mg/L丙酮酸钠、37.5 g/L抗坏血酸、 10^{-7} mol/L地塞米松及10 μ g/L转化生长因子- β_1), 每24 h换液1次; 7 d后取出细胞爬片进行染色, PBS

清洗3次, 滴加500 μ l甲苯胺蓝染色液染色5 min; 滴加500 μ l蒸馏水与染液充分混匀, 继续染色15 min; 吸去稀释染液, 蒸馏水清洗3次, 自然晾干后于正置显微镜下观察并拍照。

1.4 荧光显微镜观察BMSCs在多孔钽表面的生长黏附情况 将多孔钽材料用纯水清洗后, 浸泡于无水乙醇中过夜, 超声清洗3次, 每次20 min; 重复上述过程1~2次, 然后高压蒸汽灭菌后干燥箱烘干备用。将国产多孔钽片置于35 mm细胞培养皿中, 取第3代BMSCs按照 3×10^4 个/片分两次接种到多孔钽片的正反两面, 每隔48 h进行换液。培养第5天, 倒置显微镜下观察活细胞在多孔钽中的生长分布情况。弃去培养基, PBS清洗; 4%多聚甲醛溶液固定后再次使用PBS清洗, 使用0.5% Triton-100对细胞进行破膜处理10 min, PBS清洗; 加入按照鬼笔环肽说明书配制的FITC荧光标记的鬼笔环肽工作液, 室温避光孵育2 h, PBS清洗; 加入DAPI染色液对细胞核进行避光染色5 min, PBS清洗; 晾干后于荧光显微镜下观察细胞在多孔钽表面的生长黏附情况。

1.5 CCK-8法检测BMSCs的增殖能力 取第3代BMSCs, 按照2000个/孔的密度接种于96孔板中, 待稳定生长24 h后按顺序每孔分别加入含200、250、300、350、400 μ mol/L GdCl₃的完全培养基, 设置3个复孔。加入不同浓度GdCl₃培养后, 每隔24 h对细胞进行处理至第5天, 具体处理方法如下: 弃去培养基, PBS清洗3次, 每孔加入100 μ l完全培养基与10 μ l CCK-8溶液, 在细胞培养箱中孵育1 h后, 使用酶标仪检测450 nm处各孔的光密度(OD)值, 计算细胞活性。实验重复3次。后续实验选取细胞活性最高的GdCl₃浓度作为细胞最适增殖浓度。

1.6 激光共聚焦扫描显微镜观察钙离子分布情况

取生长状态良好的第3代BMSCs, 胰酶消化后加入完全培养基, 离心制成细胞悬液, 取 1×10^4 个细胞移入35 mm共聚焦培养皿并加入2 ml完全培养基培养24 h后, 设置对照组与GdCl₃组, 对照组加入2 ml成骨诱导培养基培养, GdCl₃组加入2 ml含300 μ mol/L GdCl₃的成骨诱导培养基培养。培养至第7天, 收集细胞, 使用钙离子指示剂Fluo-4/AM(激发波长488 nm)染细胞质, Hoechst 33342(激发波长405 nm)染细胞核, 20 min后采用激光共聚焦显微镜在相应激发波长及716 V电压下观察细胞内钙离子荧光强度。

1.7 ALP活性检测 取生长状态良好的第3代BMSCs, 用胰酶消化后加入完全培养基, 离心制成细胞悬液, 取 1×10^5 个细胞移入25 cm²培养瓶并加入5 ml完全培养基稳定培养24 h。设置对照组(加入成骨诱导培养基)、GdCl₃组(加入含300 μ mol/L

GdCl₃的成骨诱导培养基)、多孔钽组(与国产多孔钽材料复合培养,加入成骨诱导培养基)与GdCl₃+多孔钽组(与国产多孔钽材料复合培养,加入含300 μmol/L GdCl₃的成骨诱导培养基)。培养第7天,提取各组细胞总蛋白,按照ALP检测试剂盒说明书步骤操作,使用酶标仪检测405 nm处的OD值,绘制标准曲线并计算ALP活性。

1.8 ELISA法检测Col I、OPN浓度 按照1.7的方法进行分组和处理,培养第7、14、21天分别收集各组细胞上清培养液于EP管中,3000 r/min离心15 min。按照Col I、OPN ELISA检测试剂盒说明书步骤操作,于450 nm波长处检测各组Col I、OPN的OD值,绘制标准曲线并计算相应浓度。

1.9 Western blotting检测Col I、OPN、Runx2、Homer 1蛋白的表达 按照1.7的方法中进行分组和处理,培养第7、14、21天提取各组细胞总蛋白,根据快速SDS-PAGE凝胶制备说明书进行制胶,将蛋白与蛋白上样缓冲液按照4:1的比例混合后,使用煮沸法金属浴5 min。上样,经电泳、转膜、10%脱脂牛奶封闭后,分别加入Col I、OPN、Runx2、Homer1一抗(1:1000)以及GAPDH一抗(1:2000)4℃孵育10 h,洗涤后加入二抗(1:5000)室温摇床孵育40 min, TBST洗涤10 min×3次,加入显色液于凝胶成像仪中曝光显影,采用ImageJ软件分析。

1.10 统计学处理 采用SPSS 18.0软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布且方差齐,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠BMSCs诱导鉴定结果 茜素红染色结果显示,钙化细胞间形成的结节呈橘红色,符合典型成骨细胞特征(图1A)。甲苯胺蓝染色结果显示,细胞质呈深蓝色,细胞核呈蓝紫色,可见紫色异染颗粒,提示胞内存在大量蛋白聚糖,符合软骨细胞特征(图1B)。表明分离培养的细胞为BMSCs。

2.2 大鼠BMSCs在多孔钽表面的生长黏附情况 国产多孔钽材料外观呈深灰色,直径约15 mm,厚度约2 mm,表面凹凸不平有光泽,可见蜂窝状孔隙,质地坚硬,无磁性(图2A)。与BMSCs复合培养后,倒置显微镜观察可见少量细胞分布于多孔钽周边和孔隙中(图2B)。鬼笔环肽染色结果显示,多孔钽支架材料内部小梁结构清晰可见,小梁间有细微的微孔结构,细胞在小梁表面生长黏附,并逐渐长入到材料内部微孔的孔隙中,填充到材料内部(图2C)。

2.3 不同浓度GdCl₃对大鼠BMSCs增殖的影响 CCK-8法检测结果显示,培养1 d时,200、250、300、350、400 μmol/L GdCl₃处理的细胞活性差异无统计学意义($P>0.05$);培养2~3 d,300 μmol/L GdCl₃处理的细胞活性最高($P<0.05$);培养4 d时,300 μmol/L GdCl₃处理的细胞活性高于200、250、350 μmol/L GdCl₃处理($P<0.05$);培养5 d时,300 μmol/L GdCl₃处理的细胞活性高于200、250、400 μmol/L GdCl₃处理($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图3)。后续实验选取300 μmol/L GdCl₃作为细胞最适作用浓度。

2.4 上调CaSR对大鼠BMSCs内钙离子分布的影响 激光共聚焦显微镜观察显示,对照组可见少量荧

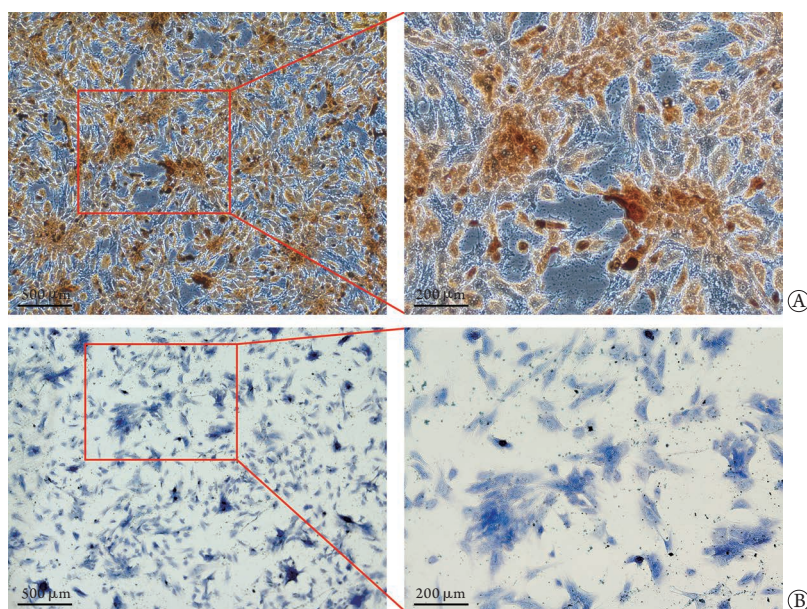


图1 大鼠BMSCs成骨、软骨向分化后染色鉴定

Fig.1 Staining identification of rat BMSCs after osteogenesis and cartilage differentiation
A. 成骨向诱导第28天(茜素红染色); B. 软骨向诱导第7天(甲苯胺蓝染色)

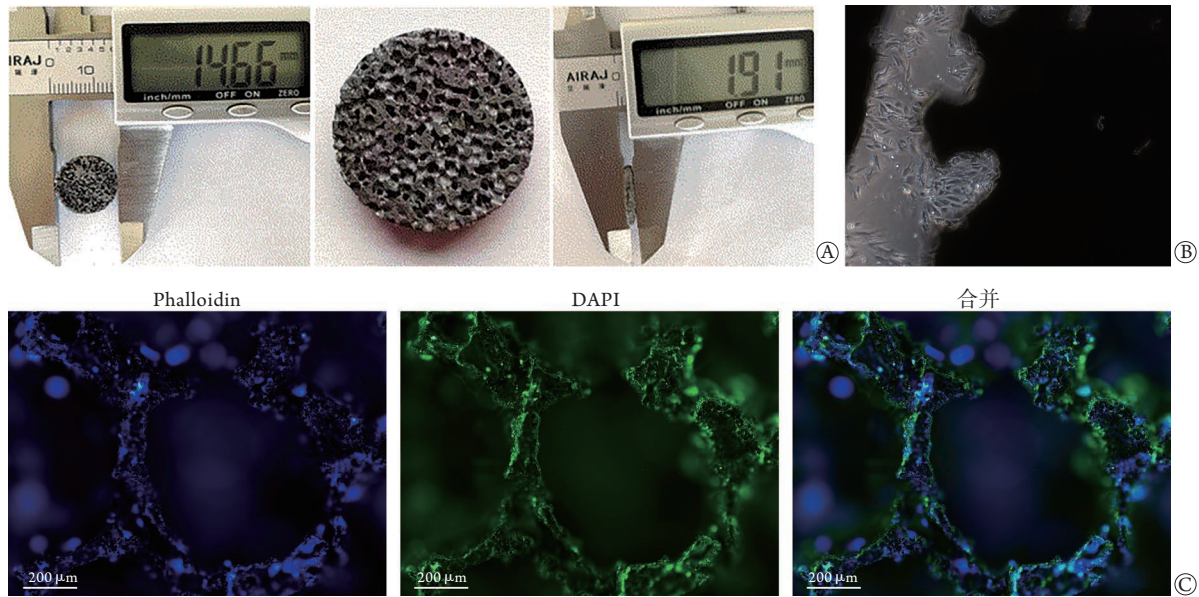


图2 大鼠BMSCs与国产多孔钽复合培养

Fig.2 Compound culture of rat BMSCs and domestic porous tantalum

A. 多孔钽表面大体观察；B. BMSCs在多孔钽表面及周围生长；C. 鬼笔环肽染色显示BMSCs在多孔钽材料上生长(绿色示细胞微丝结构，蓝色示细胞核)

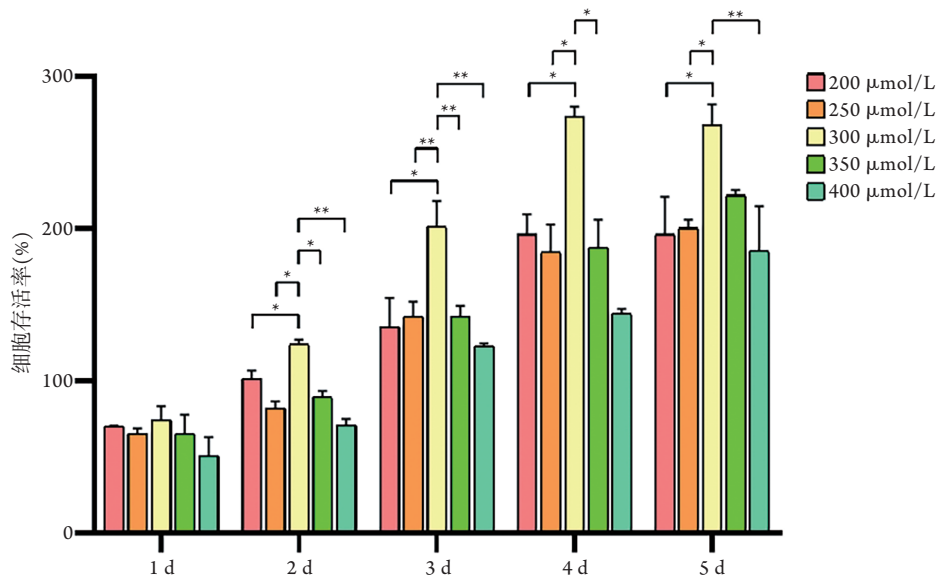


图3 CCK-8法检测不同浓度GdCl₃对大鼠BMSCs增殖的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of GdCl₃ on the proliferation of rat BMSCs detected by CCK-8 method

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

光细胞，细胞质呈绿色，细胞核呈蓝色；GdCl₃组荧光细胞数量较对照组明显增多。GdCl₃组BMSCs内钙离子荧光强度明显高于对照组，差异有统计学意义($P < 0.05$)(图4)。

2.5 各组大鼠BMSCs中ALP活性比较 GdCl₃组、多孔钽组、GdCl₃+多孔钽组ALP活性均高于对照组，差异有统计学意义($P < 0.01$)；GdCl₃+多孔钽组ALP活性高于GdCl₃组和多孔钽组，差异有统计学意义($P < 0.01$)；多孔钽组ALP活性低于GdCl₃组，差异有统计学意义($P < 0.01$ ，图5)。

2.6 各组大鼠BMSCs Col I、OPN分泌水平比较

ELISA法检测结果显示，GdCl₃+多孔钽组培养第7、14、21天的Col I蛋白分泌量明显高于对照组、GdCl₃组和多孔钽组，差异有统计学意义($P < 0.05$)；多孔钽组培养第7天的Col I蛋白分泌量高于对照组、GdCl₃组($P < 0.05$)，但培养第14、21天的Col I蛋白分泌量与对照组、GdCl₃组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)；GdCl₃组培养第21天的Col I蛋白分泌量高于对照组，差异有统计学意义($P < 0.05$)(表1)。

GdCl₃+多孔钽组培养第7、21天的OPN蛋白分

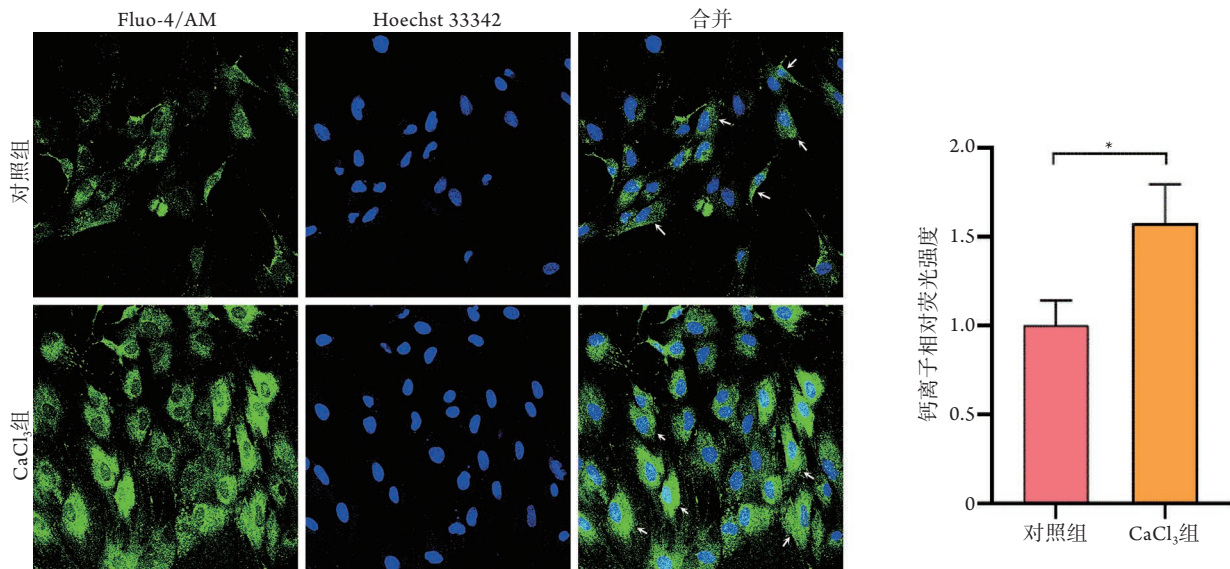


图4 上调CaSR对大鼠BMSCs内钙离子分布的影响

Fig.4 Effects of up-regulation of CaSR on the distribution of intracellular calcium ions of rat BMSCs
绿色为Fluo-4/AM钙荧光指示剂染细胞质，蓝色为Hoechst 33342染细胞核，箭头示代表性钙离子阳性结果；*P<0.05

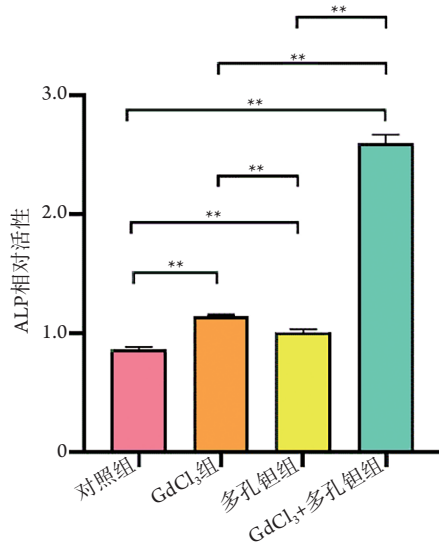


图5 各组大鼠BMSCs中ALP相对活性比较(n=18)

Fig.5 Comparison of relative ALP activity in rat BMSCs among groups (n=18)

ALP. 碱性磷酸酶；**P<0.01

泌量高于对照组、GdCl₃组和多孔钽组，差异有统计学意义(P<0.05)；多孔钽组培养第21天的OPN蛋白分泌量高于对照组，但低于GdCl₃组，差异均有统计学意义(P<0.05)；GdCl₃组培养第14天的OPN蛋白分泌量高于对照组，差异有统计学意义(P<0.05)(表1)。

2.7 各组大鼠BMSCs中Col I、OPN、Runx2、Homer1蛋白相对表达量比较 Western blotting检测结果显示，GdCl₃组、多孔钽组和GdCl₃+多孔钽组培养第7、14、21天的Col I、OPN、Runx2、Homer1蛋白相对表达量明显高于对照组，差异有统计学意义(P<0.05或P<0.01)。GdCl₃+多孔钽组培养第7天的Col I、Runx2、Homer1蛋白相对表达量高于GdCl₃组、多孔钽组，第14天的Col I、OPN、Runx2、Homer1蛋白相对表达量高于GdCl₃组，第21天的Col I、OPN、Runx2、Homer1蛋白相对表达量高于多孔钽组，差异有统计学意义(P<0.05或P<0.01)。GdCl₃组培养第7天时OPN蛋白相对表达量高于多孔钽组(P<0.05)，第21天低于多

表1 各组大鼠BMSCs Col I、OPN分泌水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab.1 Comparison of Col I and OPN secretion levels of rat BMSCs in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	Col I (μg/L)			OPN(ng/L)		
	第7天	第14天	第21天	第7天	第14天	第21天
对照组	13.490 ± 0.638	25.609 ± 0.935	24.625 ± 0.281	4.777 ± 0.300	4.759 ± 0.291	6.993 ± 0.078
GdCl ₃ 组	14.009 ± 0.510	26.910 ± 1.171	29.993 ± 3.817 ⁽¹⁾	5.444 ± 0.089 ⁽¹⁾	6.117 ± 0.685 ⁽¹⁾	7.697 ± 0.153 ⁽¹⁾
多孔钽组	15.363 ± 1.562 ⁽¹⁾⁽²⁾	26.227 ± 1.814	28.424 ± 5.308	5.090 ± 0.318	5.516 ± 0.700	7.283 ± 0.063 ⁽¹⁾⁽²⁾
GdCl ₃ +多孔钽组	18.719 ± 0.233 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	35.330 ± 6.225 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	41.190 ± 5.753 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	5.984 ± 0.457 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	6.412 ± 1.302	8.337 ± 0.058 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
F	41.989	11.326	16.031	15.809	4.670	221.510
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000

Col I. I型胶原；OPN. 骨桥蛋白；与对照组比较，(1)P<0.05；与GdCl₃组比较，(2)P<0.05；与多孔钽组比较，(3)P<0.05

孔钽组($P<0.05$), 培养第14、21天时Col I蛋白相对表达量低于多孔钽组($P<0.05$), 培养第7、14天时Runx2蛋白相对表达量培养高于多孔钽组($P<0.05$

或 $P<0.01$), 培养第7、21天时Homer1蛋白相对表达量高于多孔钽组, 差异均有统计学意义($P<0.05$) (图6)。

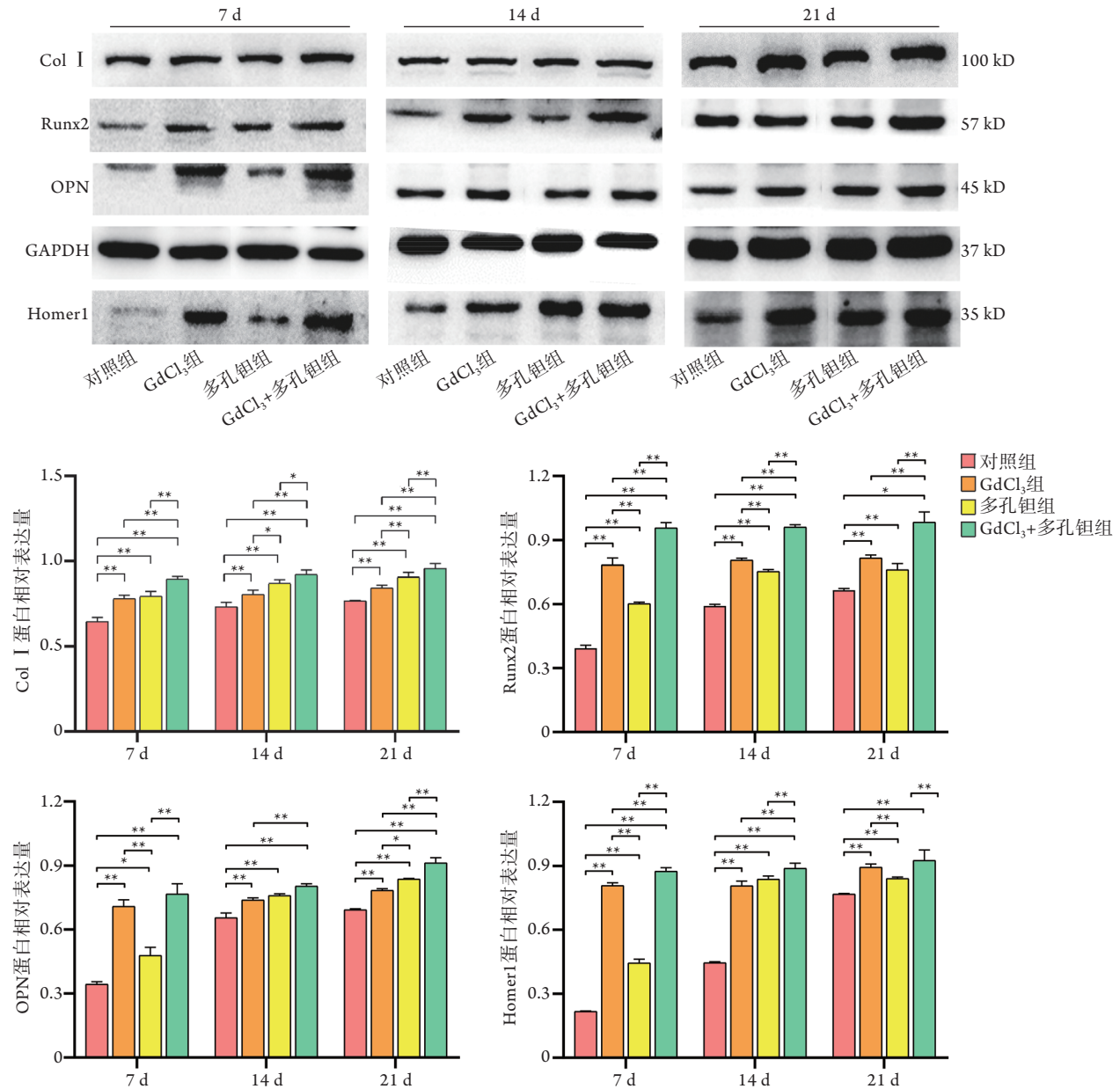


图6 各组大鼠BMSCs中Col I、OPN、Runx 2及Homer1蛋白相对表达量比较

Fig.6 Comparison of the relative protein expression levels of Col I, OPN, Runx2 and Homer1 in BMSCs of rats in each group
Col I. I型胶原; OPN. 骨桥蛋白; Runx2. Runt相关转录因子2; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

有研究发现, 平均孔径高达400 μm 、孔隙率高达70%的支架可促进细胞迁移、增殖、成骨分化以及血管和骨组织的形成^[22-23]。多孔钽是一种十分有应用前途的骨缺损修复材料, 其高孔隙率和相互连通的孔隙结构保证了内部空间内良好的成骨分化和新骨形成, 可进一步促进骨整合和长期骨植入的稳定性^[24]。BMSCs在骨代谢中发挥着非常重要的作

用, 是骨组织工程中最受欢迎的种子细胞之一^[25]。

本课题组前期研究证实, 国产多孔钽支架材料具备良好的生物相容性, 有利于细胞黏附生长, 但其促BMSCs成骨向分化的作用及机制尚不明确^[26]。BMSCs具有多向分化潜能和增殖能力^[27], 本研究通过诱导提取的大鼠BMSCs向成骨细胞、软骨细胞方向分化, 成功鉴定细胞类型。鬼笔环肽染色显示细胞在多孔钽表面、孔隙及周围生长黏附良好, 提示多孔钽支架材料生物相容性良好, 与相关研究结果

一致^[28]。

骨骼作为钙储存库，在维持机体的钙离子动态平衡中具有重要作用^[29]。CaSR是一种G蛋白偶联受体(GPCR)，在参与全身钙稳态的组织中呈高表达，对维持骨骼与钙含量之间的代谢平衡至关重要^[30]。GdCl₃是一种有效的CaSR激活剂，本研究CCK-8法检测结果表明GdCl₃对细胞增殖具有促进作用，提示激活CaSR可促进BMSCs的增殖。激光共聚焦扫描显微镜观察显示，加入GdCl₃后，细胞内荧光强度增高，提示激活CaSR可促进细胞内钙浓度升高。ELISA与Western blotting检测结果显示，在BMSCs成骨向分化过程中，激活CaSR后细胞分泌Col I、OPN蛋白量以及细胞中Runx2、Col I、OPN蛋白表达量明显增高，与既往研究报道的CaSR参与骨代谢，激活CaSR可促进细胞增殖，并刺激细胞分化和骨组织矿化的结果一致^[31-32]。

本研究同时发现，多孔钽与BMSCs复合培养时，激活CaSR后成骨相关因子Runx2、Col I和OPN的表达明显增加；ELISA与Western blotting检测结果显示，与对照组相比，国产多孔钽与BMSCs复合培养后，Col I、OPN蛋白分泌以及Runx2、Col I和OPN蛋白表达大多呈增高趋势，而CaSR激活后对此效应加持更加明显。Col I可决定骨组织的机械和弹性行为^[33]；OPN在骨基质的钙化和吸收中发挥重要作用^[34]；Runx2是成骨细胞分化必需的转录因子^[35]，可促进间充质细胞向成骨细胞分化^[36]，激活Runx2可调节ALP、OPN和Col I等成骨基因的表达，诱导成骨细胞的成功分化^[37]。因此，激活CaSR可能通过调控大鼠Runx2基因，促进Col I、OPN蛋白的表达，从而维持细胞外基质的生成代谢平衡，进而诱导BMSCs与多孔钽复合培养后的成骨向分化。同时CaSR上调后BMSCs中Homer1蛋白表达量有所升高，与多孔钽共培养组Col I、OPN、Runx2蛋白表达也明显升高。Homer1蛋白具有调节钙离子通道、支架蛋白Shank和内质网钙离子释放通道的功能^[38]。有研究发现，在细胞外钙离子的作用下，人成骨细胞中可形成一种CaSR、Homer1与mTORC2组成的蛋白质复合体，介导调控Akt磷酸化途径，从而促进成骨细胞的增殖分化^[39-40]。镉离子可通过作用于细胞膜的CaSR而发挥作用，增加Runx2的表达，促进BMSCs成骨向分化^[41]。由此可见，上调CaSR可能导致Homer1表达增加，进而激活Runx2，调节ALP、OPN和Col I等成骨基因的表达。BMSCs的成骨分化和成熟是一个复杂的过程，是否有其他信号分子或信号通路参与CaSR对BMSCs成骨向分化的调控仍待进一步研究。

综上所述，大鼠BMSCs与国产多孔钽体外复合培养后可正常生长增殖，表明国产多孔钽具有良好的生物相容性；BMSCs与国产多孔钽复合培养时，上调CaSR可影响Col I、OPN、Runx2及Homer1的表达，促进BMSCs的成骨向分化。由于多孔支架材料与种子细胞治疗骨缺损的机制较为复杂，CaSR对下游Homer1-Akt通路的影响以及可能涉及的信号通路尚不明确，仍需进一步验证。本研究未在动物模型中加以验证，后续研究将继续完善，以期为未来骨缺损及相关疾病的治疗提供更多理论依据。

【参考文献】

- [1] Yang YL, Xu P. Stem cell therapy for periodontal disease: new progress of microenvironment cognition[J]. Med J Chin PLA, 2021, 46(4): 404-409. [杨艳兰, 徐普. 干细胞修复牙槽骨缺损: 微环境认知新进展[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(4): 404-409.]
- [2] Calori G M, Colombo M, Ripamonti C, et al. Polytherapy in bone regeneration: clinical applications and preliminary considerations[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2011, 24(1 Suppl 2): 85-90.
- [3] Pace F, Randelli F, Ayeni O R, et al. Debridement, internal fixation and staged autogenous bone graft for the management of infected femoral non-union[J]. Injury, 2018, 49(Suppl 4): S48-S57.
- [4] Manzini BM, Machado L, Noritomi PY, et al. Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review[J]. J Biosci, 2021, 46: 17.
- [5] Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, et al. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering[J]. Acta Biomater, 2018, 80: 1-30.
- [6] Arthur A, Gronthos S. Clinical application of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells to Repair skeletal tissue[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9759.
- [7] Zhang XB, Shi JT, Zhang K, et al. Research progress in the treatment of disc degeneration by bone marrow mesenchymal stem cells and their exocrine[J]. Med J Chin PLA, 2020, 45(8): 862-868. [张晓勃, 施锦涛, 张凯, 等. 骨髓间充质干细胞及其外泌体治疗椎间盘退变的研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(8): 862-868.]
- [8] Wen JF, Wei BF. Research progress in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Med J Chin PLA, 2020, 45(11): 1207-1214. [温家福, 韦标方. 激素性股骨头坏死骨髓间充质干细胞成骨分化的研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(11): 1207-1214.]
- [9] Zhang L, Yang G, Johnson BN, et al. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair[J]. Acta Biomater, 2019, 84: 16-33.
- [10] Cui YS, Lai ZQ, Hu ZL, et al. Effect of bone morphogenetic protein-7 combined with porous tantalum on chondrogenic differentiation and function of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res, 2020, 24(16): 2478-2484. [崔逸爽, 赖振权, 胡中岭, 等. 骨形态发生蛋白7复合国产多孔钽对骨髓间充质干细胞向软骨分化及功能的影响[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(16): 2478-2484.]
- [11] Wang Q, Zhang H, Li Q, et al. Biocompatibility and osteogenic

- properties of porous tantalum[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(3): 780-786.
- [12] Dong ZH, Li YB, Zhang L, *et al.* Preparation and characterization of porous HA/PU scaffold material for soft bone repair[J]. *J Inorg Mater*, 2007, 22(6): 1255-1258. [董志红, 李玉宝, 张利, 等. 软骨修复用HA/PU多孔支架材料的制备与表征[J]. *无机材料学报*, 2007, 22(6): 1255-1258.]
- [13] Goltzman D, Hendy GN. The calcium-sensing receptor in bone-mechanistic and therapeutic insights[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(5): 298-307.
- [14] Lv Z, Li XQ, Xie G, *et al.* Analysis of the diagnostic value of serum cyclophilin A combined with calcium-sensing receptors in patients with acute myocardial infarction[J]. *Clin J Med Offic*, 2021, 49(9): 1032-1034, 1037. [吕琢, 李秀琪, 谢刚, 等. 血清亲环素A联合钙感受受体对急性心肌梗死患者诊断价值分析[J]. *临床军医杂志*, 2021, 49(9): 1032-1034, 1037.]
- [15] Kołodziejka B, Stępień N, Kolmas J. The influence of strontium on bone tissue metabolism and its application in osteoporosis treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6564.
- [16] Fromigue O, Haÿ E, Barbara A, *et al.* Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B): 2189-2199.
- [17] Brennan TC, Rybchyn MS, Green W, *et al.* Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate[J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(7): 1291-1300.
- [18] Cheng Z, Li A, Tu CL, *et al.* Calcium-sensing receptors in chondrocytes and osteoblasts are required for callus maturation and fracture healing in mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(1): 143-154.
- [19] Kim JH, Kim M, Jung HS, *et al.* Leonurus sibiricus L. ethanol extract promotes osteoblast differentiation and inhibits osteoclast formation[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(3): 913-926.
- [20] Liu T, Gao Y, Sakamoto K, *et al.* BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 211(3): 728-735.
- [21] Bobber t FSL, Zadpoor AA. Effects of bone substitute architecture and surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone[J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5(31): 6175-6192.
- [22] van der Stok J, van der Jagt OP, Amin YS, *et al.* Selective laser melting-produced porous titanium scaffolds regenerate bone in critical size cortical bone defects[J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(5): 792-799.
- [23] Arabnejad S, Johnston RB, Pura JA, *et al.* High-strength porous biomaterials for bone replacement: A strategy to assess the interplay between cell morphology, mechanical properties, bone ingrowth and manufacturing constraints[J]. *Acta Biomater*, 2016, 30: 345-356.
- [24] Huang G, Pan ST, Qiu JX. The clinical application of porous tantalum and its new development for bone tissue engineering[J]. *Materials (Basel)*, 2021, 14(10): 2647.
- [25] Xing Q, Feng J, Zhang X, *et al.* Semaphorin3 β promotes proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in a high-glucose microenvironment[J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 6637176.
- [26] Wang Q, Teng XF, Gan HQ, *et al.* Effects of domestic porous tantalum on biological behavior and function of rabbit osteoblasts[J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*, 2018, 22(30): 4757-4762. [王茜, 滕雪峰, 甘洪全, 等. 国产多孔钽对兔成骨细胞生物学行为及功能的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(30): 4757-4762.]
- [27] Liu F, Dong J, Zhang P, *et al.* Transcriptome sequencing reveals key genes in three early phases of osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 782054.
- [28] Wang X, Zhu Z, Xiao H, *et al.* Three-dimensional, multiScale, and interconnected trabecular bone mimic porous tantalum scaffold for bone tissue engineering[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(35): 22520-22528.
- [29] Brown EM. The calcium-sensing receptor: physiology, pathophysiology and CaR-based therapeutics[J]. *Subcell Biochem*, 2007, 45: 139-167.
- [30] Diez-Fraile A, Lammens T, Benoit Y, *et al.* The calcium-sensing receptor as a regulator of cellular fate in normal and pathological conditions[J]. *Curr Mol Med*, 2013, 13(2): 282-295.
- [31] Chattopadhyay N, Yano S, Tfelt-Hansen J, *et al.* Mitogenic action of calcium-sensing receptor on rat calvarial osteoblasts[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(7): 3451-3462.
- [32] Bai S, Sun J, Wu H, *et al.* Decrease in calcium-sensing receptor in the progress of diabetic cardiomyopathy[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 95(3): 378-385.
- [33] Romero-Castillo I, López-Ruiz E, Fernandez-Sanchez JF, *et al.* Self-assembled type I collagen-apatite fibers with varying mineralization extent and luminescent terbium promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Macromol Biosci*, 2021, 21(3): e2000319.
- [34] Bailey S, Karsenty G, Gundberg C, *et al.* Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1409(1): 79-84.
- [35] Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, *et al.* Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency[J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(7): 1876-1890.
- [36] Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): 1694.
- [37] Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 658: 43-49.
- [38] Jardin I, López JJ, Berna-Erro A, *et al.* Homer proteins in Ca²⁺ entry[J]. *IUBMB Life*, 2013, 65(6): 497-504.
- [39] Rybchyn MS, Islam KS, Brennan-Speranza TC, *et al.* Homer1 mediates CaSR-dependent activation of mTOR complex2 and initiates a novel pathway for AKT-dependent β -catenin stabilization in osteoblasts[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(44): 16337-16350.
- [40] Rybchyn MS, Brennan-Speranza TC, Mor D, *et al.* The mTORC2 regulator Homer1 modulates protein levels and sub-cellular localization of the CaSR in osteoblast-lineage cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6509.
- [41] Hu D, Li K, Xie Y, *et al.* The combined effects of nanotopography and Sr ion for enhanced osteogenic activity of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)[J]. *J Biomater Appl*, 2017, 31(8): 1135-1147.