

氟化钠对掺锶透钙磷石骨水泥成骨活性的影响

张阳阳¹, 王红美¹, 戚孟春¹, 董伟¹, 简永义¹, 孙红²

摘要 探究掺入不同质量氟化钠至锶透钙磷石骨水泥对理化性能及成骨活性的影响。以二水合磷酸氢钙与碳酸钙为原料制备β-磷酸三钙,以氯化锶为原料制备掺锶透钙磷石骨水泥,考察将氟化钠按不同质量比(0.5wt%、1.0wt%、1.5wt%)制备的掺氟锶透钙磷石骨水泥微观形貌、元素含量、物相形式及抗压强度,MTT法检测细胞增殖,并对其碱性磷酸酶(ALP)和骨保护素(OPG)mRNA表达进行检测。掺氟锶透钙磷石骨水泥抗压强度低于单一掺锶透钙磷石骨水泥($P > 0.05$),当氟化钠质量比为1.5wt%时促进MC3T3-E1的增殖及ALP效果最好,1.0wt%时显著促进OPG蛋白表达。

关键词 氟化钠; 锶; 透钙磷石; 骨水泥; 成骨细胞

中图分类号 R 782.13

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)11-1824-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.033

透钙磷石($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, brushite)是羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)的前体物质,具有良好的生物相容性以及促成骨作用。作为一种微量元素,锶(Sr)与钙(Ca)相似,并对成骨及破骨可以双向调控^[1],并可促进骨保护素(osteoprotegerin, OPG)mRNA高度表达,是骨改建系统中重要抑制骨吸收的细胞因子^[2-3]。氟元素为人机体内必需微量元素之一,经体外实验验证低剂量的氟对成骨细胞的增殖和分化能力都具有促进作用^[4]。闫玉婷等^[5]尝试制备10%锶透钙磷石,无明显毒性,对骨缺损修复效果显著优于透钙磷石组。经课题组前期实验探索,将单一氟化钠按0.5wt%、1.0wt%、1.5wt%掺至透钙磷石骨水泥后经检测均可促进小鼠前成骨细胞

增殖与骨向分化。本实验尝试将氟加至掺锶透钙磷石骨水泥中并确定最适锶氟联合用量,提高材料对成骨性能的影响,为进一步研究骨缺损修复材料提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 二水合磷酸氢钙、碳酸钙、焦磷酸钠、磷酸二氢钙、柠檬酸、氯化锶、氟化钠均购自天津麦克林公司;碱性磷酸酶(ALP)测定试剂盒(南京建成公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(中国Beyotime公司);OPG(兔抗鼠,美国Santa Cruz公司);辣根过氧化物酶(羊抗兔,北京博奥森公司);ECL显色试剂测定盒(美国PIERCE公司);马弗炉(上海星诺仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 骨水泥的制备 将二水合磷酸氢钙与碳酸钙以Ca/P摩尔比为1.5充分混合后,经200#筛研磨后在1000℃的马弗炉中煅烧12h以得到β-磷酸三钙(β-TCP),称取β-TCP粉末3.102g、磷酸二氢钙2.521g、焦磷酸钠0.35g、氯化锶1.173g,此用量制备所得材料Sr/(Sr+Ca)摩尔比为10%;按实验分组将氟化钠按不同质量比(0.5wt%、1.0wt%、1.5wt%)加入其中,以单一掺锶透钙磷石骨水泥组为对照组,按2.5g/ml固液比加入柠檬酸水溶液固化液后放入37℃、湿度恒为100%温箱中固化24h。以上此4组透钙磷石骨水泥分组分别命名为F0组、F0.5组、F1.0组、F1.5组。

1.2.2 扫描电镜观察及能谱分析 扫描电子显微镜(Scios03040702)扫描4组骨水泥的微观形貌,并通过能谱分析进行分析。

1.2.3 物相观察 通过X射线衍射仪(D/MAX2500PC03030502)对4组骨水泥进行成分结构分析。采用激光照射铜靶所产生的 $\text{K}\alpha$ ($\lambda = 0.154\text{ nm}$)作为射线源,扫描速度为 $1^\circ/\text{min}$ 。

1.2.4 抗压强度测试 通过万能实验机(AGS-X-10KNG)检测4组骨水泥抗压强度,接触柱直径为5mm,压缩速度为1mm/min,使用5个样品进行测

2019-05-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81270965);河北省教育厅重点研究项目(编号:ZD2015005);河北省自然科学基金(编号:H2017209114)

工作单位:华北理工大学¹口腔医学院口腔颌面外科教研室、²基础医学院病理教研室,唐山 063210

作者简介:张阳阳,女,医师,硕士研究生;

戚孟春,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: qimengchun@163.com

试 结果取统计值。

1.2.5 MTT 法检测各组骨水泥浸提液对细胞增殖的影响 培养基含 2% 胎牛血清的骨水泥浸提液, 将细胞按 10^3 /孔接种到 96 孔板中, 每组 4 个复孔。第 1、3、5、7 天后每孔加入 20 μ l MTT 液, 孵育 4 h 后, 弃全部液体加 200 μ l DMSO。SM600 酶标仪于 492 nm 波长测定吸光度(OD) 值。

1.2.6 不同分组骨水泥浸提液对细胞碱性磷酸酶(ALP) 活性的影响 培养基含 2% 胎牛血清的骨水泥浸提液, 将细胞按 10^5 /孔接种于 24 孔板上, 每组设置 3 个复孔, 培养 3 d 后收获细胞, BCA 试剂盒计算蛋白总量, 使用 ALP 试剂盒测定 ALP 活性。

1.2.7 不同分组骨水泥浸提液对细胞人骨保护素(OPG) 蛋白表达的影响 以 5×10^3 /孔密度接种于细胞培养皿中, 每组设置 3 个复孔, 其培养基成分为含 2% 的胎牛血清浸提液和成骨细胞诱导剂, 7 d 后加入现配的 100 μ l 裂解液(1.5 ml 冷 RIPA 裂解液中加入 6 μ l 蛋白酶抑制剂) 提取细胞总蛋白, 经 SDS-PAGE 后以湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 封闭后兔抗鼠 OPG 孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 盒中洗后滴加羊抗兔辣根过氧化物酶(1:5 000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 显影后采集图像分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件对实验数据进行分析, 所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数单因素方差分析(One-way ANOVA), 采用单因素方差分析及多组间两两比较, $\alpha = 0.05$ 为检验性水准; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SEM 及 EDS 分析 四组骨水泥材料表面微观形貌的扫描电镜(SEM) 观察见图 1。图 1A 为 F0 组, 表面为片状、散在颗粒状晶体和缝隙; 图 1B 为 F0.5 组, 主要为长条状、团块状晶体, 裂隙明显; 图 1C 为 F1.0 组, 晶体部分排列成簇状, 微隙更为明显; 图 1D 为 F1.5 组, 晶体间间隙进一步增大。观察显示, 随着氟化钠质量比的增加, 微观形貌表面透钙磷石晶体成片状增加, 晶体与晶体之间的缝隙增多, 导致致密程度稍有下降。能谱仪对不同分组骨水泥的元素含量进行检测, 结果见表 1, 掺入氟化钠后实验组均测到氟和锶元素的存在, 随着氟元素含量的增加, 锶元素从 $(5.62 \pm 0.06)\%$ 降低至 $(4.63 \pm 0.03)\%$ 。这可能是由于氟与锶元素同时掺入透

钙磷石中产生一些互斥反应。

2.2 抗压结果分析 F0、F0.5、F1.0 和 F1.5 四组骨水泥抗压强度见图 2。结果显示, 随着氟化钠质量比的增加, 抗压强度稍有下降, 差异无统计学意义 ($F = 1.048, P > 0.05$), 说明氟化钠量的浮动对于透钙磷石骨水泥的抗压强度没有显著影响。

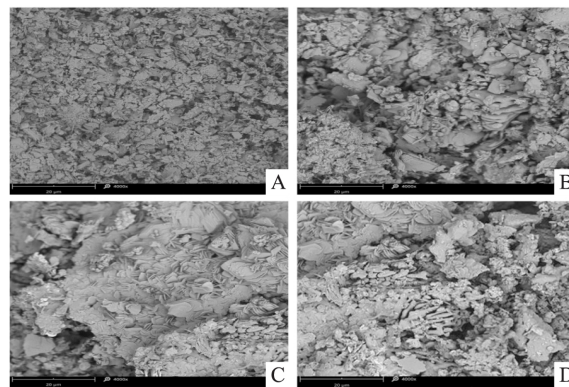


图 1 四组骨水泥扫描电镜下表面微观形貌 $\times 4000$
A: F0 组; B: F0.5 组; C: F1.0 组; D: F1.5 组

表 1 EDS 对四组骨水泥表面化学元素含量分析比较 (wt% $\bar{x} \pm s$)

分组	氟	锶
F0 组	-	5.62 ± 0.06
F0.5 组	0.31 ± 0.05	5.20 ± 0.03
F1.0 组	0.51 ± 0.07	4.82 ± 0.04
F1.5 组	0.79 ± 0.05	4.63 ± 0.03

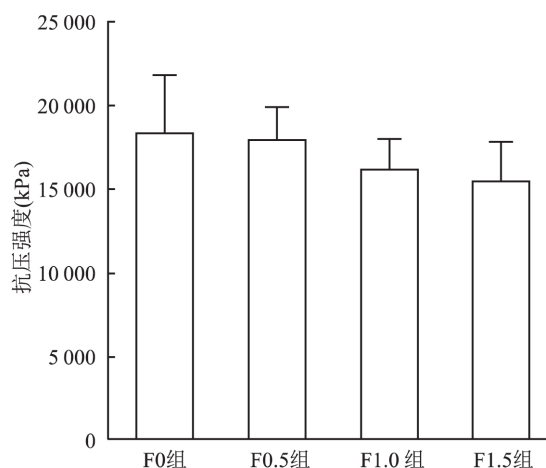


图 2 四组材料抗压强度测试

2.3 细胞增殖实验结果 培养第 1、3、7 天时, 各组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 培养第 5 天时, F1.5 组显著高于 F0 组 ($F = 1.988, P < 0.05$)。上述结果说明, 掺氟透钙磷石骨水泥对小鼠前成骨细胞增殖影响优于单纯掺锶透钙磷石骨水泥, 氟化

钠的最佳掺入量为 1.5wt%。见图 3。

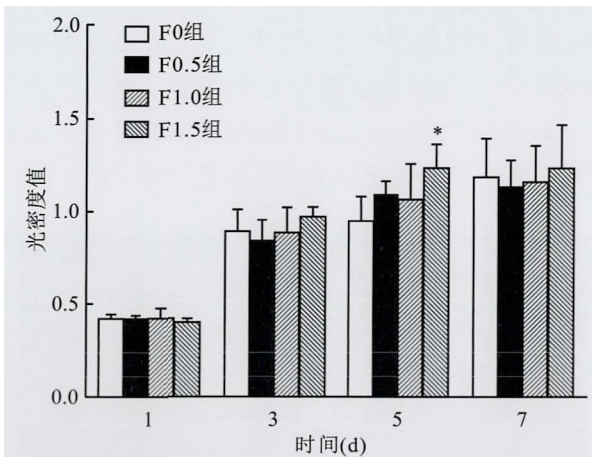


图3 四组透钙磷石骨水泥浸提液作用下的细胞增殖活性分析与 F0 组比较: * P < 0.05

2.4 ALP 活性结果 细胞在各组骨水泥浸提液作用 3 d 后 F1.5 组 ALP 活性最高,显著高于其他三组,差异有统计学意义 (F = 8.132, P < 0.05),而后三组间差异无统计学意义 (P > 0.05)。上述结果表明,当氟化钠质量比为 1.5wt% 时可有效提高小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 的 ALP 活性并促进其骨分化。

2.5 OPG 蛋白表达结果 使用蛋白印迹法检测 OPG 蛋白表达水平,蛋白条带见图 4。经软件分析 F1.0 组光密度值为 (190.093 ± 11.724),显著高于 F0 组 (168.017 ± 7.778)、F0.5 组 (155.723 ± 4.044) 和 F1.5 组 (164.550 ± 8.651) (F = 8.863, P < 0.05),但 F0、F0.5 和 F1.5 组之间差异无统计学意义 (P > 0.05)。上述结果说明,当氟化钠掺入量为 1.0wt% 时,可以有效地促进小鼠前成骨细胞的 OPG 蛋白表达。

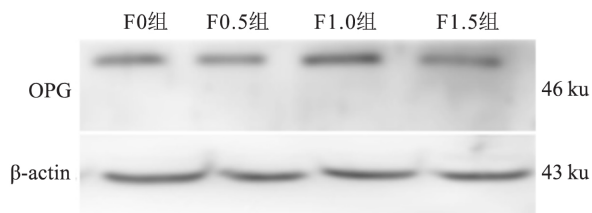


图4 Western blot 法检测四组材料浸提液对 MC3T3-E1 细胞中 OPG 蛋白表达的水平

3 讨论

透钙磷石属于磷酸钙骨水泥的一种,近年来备

受关注,其具有良好的生物相容性和理化性能,且在生物体内具有良好的降解性^[6]。抗压强度也与透钙磷石孔隙率有显著关联^[7],孔隙率越大,抗压强度越弱。扫描电镜结果可以观察到随着掺入氟化钠质量比的增加,晶体之间孔隙随之增加,且排列无序,这可能是由于氟元素与锶元素对透钙磷石共同作用引起的。Pors Nielsen et al^[8] 在研究中发现粒径越小,有利于增强粉末与液体的结合力,抗压强度越大。本实验中 β-TCP 经 200 目筛网筛取充分混合后制作透钙磷石,预防骨水泥由于材料的颗粒尺寸因素影响抗压强度。理想的骨修复材料应满足力学性能要求,非承重骨部位以小梁骨为准,抗压强度应大于 5 MP,从实验结果来看,掺氟锶透钙磷石骨水泥抗压强度在 15 ~ 19 MP 之间,因而可以应用颅颌面部部分骨缺损或非承重区域骨缺损的修复。

锶元素与氟元素类似,都被称为是一种亲骨元素,两者在一定范围内对成骨方面都表现为促进作用^[9-10]。在此基础上,周建宏等^[11] 制备掺锶氟羟基磷灰石微弧氧化复合涂层,再次证实锶氟较有效促进了新骨的形成。在本实验细胞培养的第 5 天,F1.5 组浸提液对小鼠前成骨细胞有增殖效应,证实氟锶联合应用对小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 具有增殖效应。但是在第 7 天结果没有显著差异,可能与培养一定的时间内细胞脱落有关。综上,极大可能推断出氟锶元素可以联合作用于细胞,对细胞的增殖具有协同作用且无明显毒性。

OPG 是由成骨细胞分泌的一种糖蛋白,在成熟成骨细胞中高度表达,骨代谢的调节具有重要的作用。作为一种破骨细胞成熟分化过程中的关键因子,也称为破骨细胞形成抑制因子,其抑制破骨细胞的形成和分化并影响成熟破骨细胞的骨吸收活性,导致其凋亡^[12-13]。周秋娟等^[14] 经体外实验证实掺透钙磷石骨水泥由于锶的掺入促进了 OPG 的表达。同时,氟处于低浓度时,对骨向分化具有促进作用^[15]。本研究通过 Western blot 法检测四组骨水泥浸提液对 MC3T3-E1 中 OPG 蛋白表达的影响,结果显示当氟元素与锶元素同时掺入透钙磷石组时与单一掺锶透钙磷石组相比较,前者 OPG 的蛋白表达水平明显升高,且氟掺入量为 1.0wt% 时对 OPG 的蛋白表达促进效果最佳。因此可以推断,这其中的差异来源于氟锶的共同促进作用。

参考文献

- [1] Caverzasio J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms [J]. *Bone*, 2008, 42(6): 1131–6.
- [2] Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(12): 5050–5.
- [3] Ma B, Zhang Q, Wu D, et al. Strontium fructose 1,6-diphosphate prevents bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis via the OPG/RANKL/RANK pathway [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2012, 33(4): 479–89.
- [4] 吴培福. 成骨细胞和破骨细胞的体外培养及氟对其的影响 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2004.
- [5] 闫玉婷, 李忻畅, 田景瑞, 等. 掺锶 10% 透钙磷石骨水泥修复兔下颌牙槽骨缺损的效果 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2016, 51(5): 614–7.
- [6] 杨迪诚, 钟建, 刘涛, 等. 透钙磷石骨水泥制备及其载药性能 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(3): 427–33.
- [7] 梁猛, 陈浩, 魏坤. 不同量 β -TCP 对 PLGA 微球支架的抗压强度、孔隙率和细胞相容性的影响 [J]. *高校化学工程学报*, 2016, 30(4): 871–7.
- [8] Pors Nielsen S. The biological role of strontium [J]. *Bone*, 2004, 35(3): 583–8.
- [9] 王买全, 李运峰. 微量元素锶与骨质疏松症 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(10): 1258–62.
- [10] 马家晴, 于萌, 张海松. 锶对骨矿代谢的研究进展 [J]. *医学研究与教育*, 2015, 32(2): 82–6.
- [11] 周建宏. 二氧化钛/含锶氟羟基磷灰石生物活性纳米复合涂层及其制备方法和应用: 中国, 104726921 [P]. 2017–05–31.
- [12] Cao J J, Wronski T J, Iwaniec U, et al. Aging increases stromal/osteoblastic cell-induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(9): 1659–68.
- [13] Pivonka P, Zimak J, Smith D W, et al. Model structure and control of bone remodeling: a theoretical study [J]. *Bone*, 2008, 43(2): 249–63.
- [14] 周秋娟, 梁永强, 李淑静, 等. 掺锶透钙磷石骨水泥修复家兔牙槽骨缺损的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(4): 589–92.
- [15] 陈建伟, 许骏, 曹玉广. 氟对骨形态发生蛋白在成骨细胞中表达的影响 [J]. *中国公共卫生*, 2003, 19(11): 1310–1.

Study on the effect of sodium fluoride on the osteogenic potential of doped-strontium brushite bone cement

Zhang Yangyang, Wang Hongmei, Qi Mengchun, et al

(*Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210*)

Abstract To incorporate sodium fluoride with different mass ratios into doped-strontium calcium phosphate stone cement to test its physical and chemical properties and its effect on osteogenic activity. β -tricalcium phosphate was synthesized from calcium hydrogen phosphate dihydrate and calcium carbonate, and strontium-doped calcium phosphate stone cement was prepared with SrCl_2 . The morphology, element content, phase form and compressive strength of fluorine-doped yttrium-calcium phosphate cement prepared by sodium fluoride at different mass ratios (0.5wt%, 1.0wt%, 1.5wt%) were investigated. MTT method cell proliferation was measured and its alkaline phosphatase (ALP) and osteoprotegerin OPG mRNA expression was examined. The compressive strength of doped F/Sr brushite bone cement was lower than that of single doped Sr brushite bone cement ($P > 0.05$), when sodium fluoride was 1.5wt%, the proliferation and ALP effect of MC3T3-E1 were promoted, the expression of OPG protein was significantly promoted when it was 1.0wt%.

Key words sodium fluoride; strontium; brushite; bone cement; osteoblast