

# 包封骨形态发生蛋白2的不同相对分子质量聚乳酸-聚乙醇酸共聚物微囊促进成骨效果的研究

袁莉红<sup>1,2,3</sup> 陈晨<sup>1,2,3</sup> 马语笛<sup>2,3</sup> 梁睿贞<sup>2,3,4</sup>

1. 南京医科大学附属口腔医院牙体牙髓科, 南京 210029;

2. 口腔疾病研究与防治国家级重点实验室培育建设点, 南京 210029;

3. 江苏省口腔转化医学工程研究中心, 南京 210029;

4. 南京医科大学附属口腔医院第七门诊部, 南京 210029

**[摘要]** **目的** 探索不同相对分子质量聚乳酸-聚乙醇酸共聚物 (PLGA) 微囊包封骨形态发生蛋白2 (BMP-2) 对成骨细胞骨形成能力的影响。**方法** 用双通道微量注射泵制备包封 BMP-2 的 2 种相对分子质量 (12 000 和 30 000) 的 PLGA 微囊。用光学显微镜及扫描电子显微镜 (SEM) 观察微囊形态结构; 磷酸盐缓冲溶液浸泡法表征微囊缓释性能; 细胞 Calcein-AM/PI 染色及 CCK-8 法检测微囊细胞相容性; Transwell 迁移实验检测包封 BMP-2 的微囊作用 48 h 对 MC3T3-E1 细胞的趋化作用; 碱性磷酸酶活力测定、茜素红染色法检测微囊作用 MC3T3-E1 细胞后对细胞骨形成能力的影响。**结果** 2 种相对分子质量的微囊均表面光滑, 具有良好的细胞相容性。相对分子质量 12 000 的微囊的趋化作用最佳。相对分子质量 30 000 的微囊较相对分子质量 12 000 的微囊缓释时间长, 且初始爆发量减少了约 25%。成骨诱导 14、21 d 后, 相对分子质量 30 000 的微囊形成的钙沉积结节较相对分子质量 12 000 的微囊多。**结论** 本研究通过调控 PLGA 的相对分子质量控制 BMP-2 的释放, 发现相对分子质量 30 000 的微囊能够更好地诱导 MC3T3-E1 细胞的长期骨形成能力。

**[关键词]** 聚乳酸-聚乙醇酸共聚物微囊; 骨形态发生蛋白2; 成骨

**[中图分类号]** R318.08 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024075



本文链接 开放科学标识码

## Osteogenic effect of poly(lactic-co-glycolic acid) microcapsules with different molecular weights encapsulating bone morphogenetic protein 2

Yuan Lihong<sup>1,2,3</sup>, Chen Chen<sup>1,2,3</sup>, Ma Yudi<sup>2,3</sup>, Liang Ruizhen<sup>2,3,4</sup>

1. Dept. of Endodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

2. State Key Laboratory Cultivation Base of Research, Prevention and Treatment for Oral Diseases, Nanjing 210029,

China; 3. Jiangsu Province Engineering Research Center of Stomatological Translational Medicine, Nanjing 210029,

China; 4. The Seventh Clinic, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029,

China

Supported by: National Natural Science Foundation of China (81970927); Key Research and Development Program (Social Development Project) of Jiangsu Province (BE2022797)

Correspondence: Liang Ruizhen, E-mail: 13958432@qq.com

**[Abstract]** **Objective** This study aimed to explore the effects of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) encapsulated in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microcapsules with different molecular weights on the osteogenic ability of osteoblasts. **Methods** PLGA microcapsules with different molecular weights (12 000, 30 000) encapsulating BMP-2, were prepared using a dual-channel mi-

**[收稿日期]** 2024-03-01; **[修回日期]** 2024-05-17

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81970927); 江苏省重点研发计划社会发展项目 (BE2022797)

**[作者简介]** 袁莉红, 医师, 硕士, E-mail: 1449672307@qq.com

**[通信作者]** 梁睿贞, 主任医师, 博士, E-mail: 13958432@qq.com

croinjection pump. The morphology and structure of the microcapsules were characterized by optical microscopy and scanning electron microscopy. The sustained-release performance of the microcapsules was characterized by phosphate buffered saline immersion method. The cell compatibility of the microcapsules was detected by the Calcein-AM/PI staining and CCK-8 method. The chemotactic effect of BMP-2-encapsulated microcapsules on MC3T3-E1 cells after 48 h of treatment was detected by the Transwell assay. The alkaline phosphatase activity assay and Alizarin Red S staining were used to characterize the effect of microcapsules on the osteogenic ability of MC3T3-E1 cells. **Results** Both types of microcapsules with different molecular weights exhibited smooth surfaces, as well as uniform and good cell compatibility. The chemotactic effect of the 12 000 microcapsules was outstanding. The 30 000 microcapsules had a longer sustained-release time, and the initial burst release was reduced by approximately 25% compared with the 12 000 microcapsules. In addition, 30 000 microcapsules performed better in long-term osteogenesis induction than 12 000 microcapsules. **Conclusion** In this study, the release of BMP-2 is regulated by adjusting the molecular weight of PLGA, and the results indicate that 30 000 microcapsules can better induce the long-term osteogenic ability of MC3T3-E1 cells.

**[Key words]** poly(lactic-co-glycolic acid) microcapsules; bone morphogenetic protein 2; osteogenesis

组织工程支架能够支持和促进细胞生长,是当前组织缺损修复最重要的干预方法<sup>[1]</sup>。骨形态发生蛋白2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 是一种在骨和软骨发育、修复中发挥关键作用的转化生长因子,常被添加于骨组织工程支架中<sup>[2]</sup>,已被美国食品药品监督管理局批准在骨科和牙科中临床应用<sup>[2-3]</sup>。但是, BMP-2的大剂量应用不仅价格昂贵,还会导致异位骨化、炎症反应、软组织水肿、破骨细胞活化等严重并发症的发生。同时, BMP-2在体内会快速降解,半衰期短<sup>[4-5]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明, BMP-2至少需在数周的时间段内保持最小剂量水平才能有效<sup>[6-7]</sup>。针对此情况,目前最常见解决方式是通过能够缓释药物的支架来局部递送 BMP-2。

支架是用来支持细胞生长的结构,常见形式包括多孔的3D基质、水凝胶、球体和纤维网<sup>[1]</sup>。支架材料主要有金属、陶瓷、聚合物等。其中聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 这种合成聚合物具有良好的生物相容性,已获得美国食品药品监督管理局的生物医学应用批准。PLGA是一种可生物降解的脂肪族无定形聚合物,由乳酸 (lactic acid, LA) 和乙醇酸 (glycolic acid, GA) 两种单体聚合而成,其 LA:GA 配比、相对分子质量、分子链端基类型等都可以影响其降解速率<sup>[8-9]</sup>。Wei等<sup>[2]</sup>通过将 BMP-2 负载于介孔羟基磷灰石微球和 PLGA 组成的复合支架中使 BMP-2 缓释,该支架与骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 共培养,实时定量逆转录聚合酶链反应表明 BMP-2 缓慢、长期释放有利于成骨相关标志物的长期高表达。

目前通过支架递送 BMP-2 的方式主要包括与

支架共价结合、在支架中被非共价固定、包封在支架中等。其中,将 BMP-2 包封于颗粒中这种方式,由于可以将 BMP-2 在释放前与体内环境隔离,已经成为研究的一个热点<sup>[4]</sup>。但是,目前用于缓释生长因子的支架存在突释严重、释放时间短的缺点<sup>[3]</sup>。因此,制备一种能够减少突释,在未释放前将生长因子与体内环境隔离,并能够尽可能长时间维持其生物活性的支架,是现在研究的热点。本研究基于 BMP-2 缓释的目的,使用 PLGA 微囊包封 BMP-2,并对 2 种不同相对分子质量 (12 000 和 30 000) 微囊中 BMP-2 的释放速率及其对成骨细胞骨形成能力的影响进行探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 PLGA 微囊的制备

取 8 g 聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 溶于 400 mL 去离子水,制备成 2% 的 PVA 溶液。将 PVA 溶液与磁力搅拌子一起盛于 500 mL 烧杯中,置于磁力搅拌器 [MS-H-Pro<sup>+</sup>, 大龙兴创实验仪器 (北京) 有限公司] 上备用。取 1 g PLGA 溶于 10 mL 二氯甲烷,配置成 10% 的 PLGA 溶液,置于 50 mL 注射器中。将需要包封的内容物溶液装入 20 mL 注射器,包封的内容物有去离子水、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 溶液 (Bio-Froxx 公司,德国)、BMP-2 溶液 (500 ng/mL) (苏州近岸蛋白质科技股份有限公司)<sup>[10-11]</sup>,根据实验需要选择。将装有 PLGA 溶液的注射器与装有需要包封的内容物溶液的注射器分别安装到双通道微量注射泵 (SP-2000, 宁波安诺医疗器械科技有限公司) 的 A、B 通道,调整 A、B 通道注射速

度分别为 580、80 mL/h，连接同轴针头的外针和内针入口，将同轴针头置于 PVA 溶液液面以下，调整磁力搅拌器转速，190、270 r/min 分别对应相对分子质量为 12 000、30 000 的 PLGA 溶液。注射器排气后开始注射。注射结束后，将针头从 PVA 溶液中取出。搅拌 8~12 h 后，静置烧杯，使 PLGA 微囊沉淀，随后弃去大部分上清液，加入去离子水清洗 3 遍，冷冻干燥 12 h。

### 1.2 PLGA 微囊的形态观察及粒度分析

通过扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 在 10 kV 电压下观察微囊的形态。通过光学显微镜观察微囊形态，拍照记录后用 ImageJ 测量微囊的粒径 ( $n=300$ )。

### 1.3 PLGA 微囊的包封率检测

制备 PLGA 微囊时，在去上清液前，从烧杯中取出 2 mL PVA 溶液，加入 0.5 g 固体无水硫酸钠，涡旋 10 min，然后以 4 000 r/min 的转速离心 10 min。上清液中含有未被包裹在微囊内的 BSA，用超微量紫外分光光度计 (NanoDropOne, ThermoFisher-Scientific 公司，美国) 检测上清液中的 BSA 浓度 ( $C_x$ )。假设用于包封去离子水微囊的 PVA 溶液的 BSA 浓度为基础浓度 ( $C_0$ )，通过  $C_x$  减去  $C_0$  来计算 PVA 溶液中未被包裹的 BSA 的实际浓度。使用下列公式计算包封率： $Ma$  (mg) = ( $C_x - C_0$ ) × 400 (mL)；包封率 (%) =  $\frac{Mi - Ma}{Mi} \times 100\%$ 。其中， $M_i$  为制备内容物为 BSA 溶液的微囊时总共使用的 BSA 的量， $M_a$  为实际流失在 PVA 溶液中的 BSA 的总量。

### 1.4 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS) 浸泡法表征微囊缓释性能

称取 2 种相对分子质量 (12 000 和 30 000)、包封内容物分别为 BSA 和去离子水的 PLGA 微囊 50 mg，浸入 100  $\mu$ L PBS (pH=7.4) 中，并在 37  $^{\circ}$ C 恒温振荡器 (ZQZY-78AV, 上海知楚仪器有限公司) 中以 200 r/min 振荡。用超微量紫外分光光度计测定包封 BSA 微囊的 PBS 中的 BSA 浓度，并将该量设为  $C_x$ ，每 5 d 更换一次新鲜的 PBS。假设包封去离子水微囊的 PBS 中的 BSA 浓度为基础浓度 ( $C_0$ )。使用下列公式计算实际释放的 BSA 量 ( $M_t$ ):  $M_t$  ( $\mu$ g) = ( $C_x - C_0$ ) × 100 ( $\mu$ L)；使用下列公式计算 BSA 的实际释放率 (release rate, RR):  $RR$  (%) =  $\frac{M_t}{M_e} \times 100\%$ 。其中， $M_e$  为 50 mg 微囊中 BSA 的总量。

### 1.5 细胞 Calcein-AM/PI 染色及 CCK-8 法检测微囊细胞相容性

分别将 2 种相对分子质量 (12 000 和 30 000) 包封 BMP-2 的 PLGA 微囊 40  $\mu$ L 加入 24 孔板中，紫外照射 2 h 进行灭菌，PBS 清洗一遍，然后将微囊浸泡在 1 mL 完全培养基中 24 h 进行预培养。以不加任何刺激的孔为空白对照组。将 MC3T3-E1 细胞按  $5 \times 10^4$  个/孔的密度接种到孔板中，于 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  和 100% 湿度的细胞培养箱中进行培养，每 2 d 更换一次培养液，5 d 后用 Calcein-AM/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司) 按照说明书对细胞进行染色，倒置荧光显微镜 (Leica 公司，德国) 下观察染色结果。

分别将 2 种相对分子质量 (12 000 和 30 000) 包封去离子水或 BMP-2 的 PLGA 微囊 20  $\mu$ L 加入 96 孔板中，紫外照射 2 h 进行灭菌，PBS 清洗一遍，然后将微囊浸泡在完全培养基 (含 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素) 中 24 h 进行预培养。以不加任何刺激的孔为空白对照组。将 MC3T3-E1 细胞接种到孔板中 (接种密度 5 000 个细胞/孔)，于 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  和 100% 湿度的细胞培养箱中进行培养，每 2 d 更换一次培养基。在第 1、3、5、7 天分别吸除旧培养基，向每孔中加入 150  $\mu$ L 含 10% CCK-8 溶液 (APEX-BIO 公司，美国) 的基础培养基，避光孵育 2 h 后吸取 100  $\mu$ L 液体置于另一 96 孔板，使用酶标仪 (SpectraMax M2e, Molecular Devices 公司，美国) 于 450 nm 波长下检测光密度 (optical density, OD)。

### 1.6 Transwell 迁移实验检测细胞趋化

制备缓释微囊：分别将 2 种相对分子质量 (12 000 和 30 000) 包封 BMP-2 的 PLGA 微囊加入 24 孔板中，加入 1 mL PBS，37  $^{\circ}$ C 恒温振荡器以 200 r/min 的转速振荡 3 d 后吸除上清液，PBS 清洗一遍，冻干，设为 BMP-2 scaffolds (sustained release) 组，即 BMP-2 scaffolds SR 组。

取 20  $\mu$ L 缓释微囊加入 24 孔板的 Transwell 小室的下室，另取 2 种相同量未缓释微囊 (即按照 1.1 制备的包封 BMP-2 的 PLGA 微囊) 加入另外的孔中进行对照，设为 BMP-2 scaffolds (non-sustained-release) 组，即 BMP-2 scaffolds 组。

所有样品紫外照射 2 h 灭菌后，PBS 清洗一遍，并加入 1 mL 基础培养基预培养 24 h。第 2 天吸除旧培养基，PBS 清洗一遍，在下室中加入 700  $\mu$ L 基础培养基，上室中加入 200  $\mu$ L 基础培养基重悬

后的MC3T3-E1细胞,接种密度为 $2 \times 10^5$ 个/室。每组设置3个复孔。培养48 h后使用4%多聚甲醛(Biosharp,北京兰杰柯科技有限公司)固定细胞,并用棉球小心擦去上室细胞,使用结晶紫染色液(上海碧云天生物技术股份有限公司)对下室细胞进行染色,并在倒置荧光显微镜下观察细胞迁移结果。随后对下室细胞进行半定量分析,在小室中加入700  $\mu$ L 33%冰乙酸,37  $^{\circ}$ C静置20 min,使下室结晶紫充分溶解,在595 nm波长处检测OD值。

### 1.7 微囊的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活力测定

按照1.6中的方法制备缓释微囊,分别取2种相对分子质量(12 000和30 000)的缓释微囊40  $\mu$ L加入6孔板中,设为BMP-2 scaffolds SR组。取2种相同量未缓释微囊(即按照1.1制备的包封BMP-2的PLGA微囊)加入另外的孔中,设为BMP-2 scaffolds组,并设置一个不加任何刺激的孔作为空白对照组。所有样品紫外照射2 h灭菌后,PBS清洗一遍,加入2 mL完全培养基预培养24 h。

将MC3T3-E1细胞以 $3 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板。当细胞密度为70%时,用成骨诱导培养基诱导细胞成骨分化,培养基的配制成分为 $\alpha$ -MEM+10%FBS+1%青链霉素+10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠+0.2 mmol/L抗坏血酸+100 nmol/L地塞米松。每2~3 d更换1次培养基,培养7 d后,冰上吸弃各组旧培养基,PBS洗2遍。用RIPA裂解液(上海碧云天生物技术股份有限公司)提取总蛋白,BCA蛋白测定试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司)定量,按照AKP试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书测定各组样本的AKP活力。

### 1.8 浸提液诱导成骨分化

制备缓释微囊的浸提液:分别将2种相对分子质量(12 000和30 000)包封BMP-2的PLGA微囊200 mg放入2 mL冻存管中,紫外照射2 h灭菌,PBS清洗1遍。加入1 mL完全培养基,密封后置于37  $^{\circ}$ C恒温振荡器上以200 r/min振荡3 d,吸去旧培养基,PBS清洗1遍,加入1 mL新鲜的完全培养基,置于37  $^{\circ}$ C恒温振荡器上以200 r/min振荡。此后每72 h静置冻存管内液体并提取上清液,以1:20的比例加入成骨诱导培养基中。之后加入1 mL新鲜的完全培养基继续振荡。将该种培养液培养的细胞设为BMP-2 scaffolds (sustained release)组,即BMP-2 scaffolds SR组。

制备未缓释微囊的浸提液:称取2种相对分子质量(12 000和30 000)包封BMP-2的微囊200 mg于冻存管中,紫外照射2 h灭菌,PBS清洗一遍,加入1 mL完全培养基,置于37  $^{\circ}$ C恒温振荡器上以200 r/min振荡。此后每72 h静置冻存管内液体并提取上清液,以1:20的比例加入成骨诱导培养基中。之后加入1 mL新鲜的完全培养基继续振荡。将该种培养液培养的细胞设为BMP-2 scaffolds (non-sustained-release)组,即BMP-2 scaffolds组。

将MC3T3-E1细胞以 $3 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板。当细胞生长至70%汇合状态时,对照组用成骨诱导培养基,实验组用上述方法制成的浸提液培养基诱导成骨分化,成骨诱导培养基成分为 $\alpha$ -MEM+10%FBS+1%青链霉素+10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠+0.2 mmol/L抗坏血酸+100 nmol/L地塞米松。每3 d更换一次培养基。

### 1.9 微囊浸提液的AKP活力测定

按照1.8中的方法培养MC3T3-E1细胞,培养7 d后,冰上吸弃各组旧培养基,PBS洗2遍。用RIPA裂解液提取总蛋白,BCA蛋白测定试剂盒定量,按照AKP试剂盒说明书测定各组样本的AKP活力。

### 1.10 茜素红染色

按照1.8中的方法培养MC3T3-E1细胞,成骨诱导14、21 d后,用1%茜素红S染色液(pH4.2)(北京雷根生物技术有限公司)进行矿化检测。检测完毕后使用2%氯化十六烷基吡啶溶液(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)孵育30 min,使用酶标仪在562 nm波长处检测OD值。

### 1.11 统计学方法

采用SPSS 26软件进行统计学分析。用均数 $\pm$ 标准差表示数据,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PLGA微囊的形态及粒度

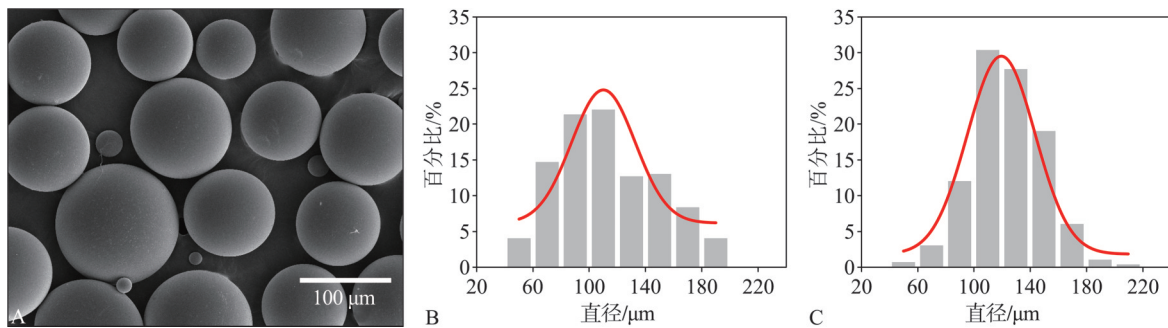
制备的PLGA微囊形态及粒度表征见图1,结果显示:PLGA微囊表面光滑,大多数粒径集中在80~160  $\mu$ m,相对分子质量30 000的PLGA微囊粒径较相对分子质量12 000的微囊粒径略大。

### 2.2 微囊的包封率

相对分子质量为12 000和30 000的PLGA微囊的包封率分别为 $24.52\% \pm 1.53\%$ 、 $46.32\% \pm 6.07\%$ 。

统计分析表明，相对分子质量为30 000的微囊封装率高于相对分子质量为12 000的微囊，差异有

统计学意义 ( $P=0.004$ )。



A: SEM观察PLGA微囊; B: 相对分子质量12 000的PLGA微囊粒径分析; C: 相对分子质量30 000的PLGA微囊粒径分析。

图1 PLGA微囊的表征

Fig 1 The characterizations of PLGA microcapsules

### 2.3 微囊的缓释性能

2种相对分子质量PLGA制备的包裹BSA溶液的微囊释放性能见图2，结果显示：这2种微囊均可以持续释放BSA，且第1天都表现出了初始爆发性释放。其中，相对分子质量12 000的微囊第1天释放率接近55%，10 d后释放速率显著减缓，第25天时几乎检测不到BSA的释放，累积释放率已达到90%；相对分子质量30 000的微囊第1天释放率约为30%，其后缓慢持续释放，第35天仍能检测到BSA的释放，累积释放率约为50%。与相对分子质量12 000的微囊相比，相对分子质量30 000的微囊的缓释时间更长，且初始爆发量减少了约25%。

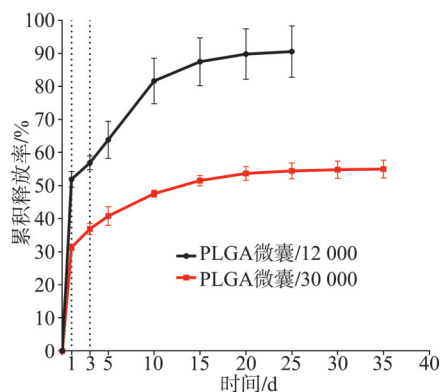


图2 PLGA微囊的体外释放结果

Fig 2 The cumulative release of PLGA microcapsules

### 2.4 细胞相容性

Calcein-AM/PI染色(图3A)显示，加入PLGA微囊的实验组与空白对照组细胞均能正常增殖，并且实验组细胞可以黏附到PLGA微囊表面，使PLGA微囊的轮廓变亮。相对分子质量12 000的微囊降解速率较快，降解后黏附于孔板底部，相

对分子质量30 000的微囊在第5天时仅有少部分黏附于底部。CCK-8结果(图3B、C)显示了空白对照组以及加入PLGA微囊的实验组1、3、5、7 d的细胞活力，可见实验组成骨细胞有随时间增殖的趋势，2种不同相对分子质量的PLGA微囊对成骨细胞均具有良好的生物相容性。

### 2.5 细胞趋化

各组下室细胞染色以及半定量结果(图4)显示：BMP-2 scaffolds/12 000组的趋化作用最佳( $P<0.05$ )，能吸引更多细胞向其迁移。

### 2.6 微囊的AKP活力

在成骨诱导培养基中培养7 d后，AKP活性测定结果(图5左)显示，BMP-2 scaffolds/12 000组相对AKP活力最高，表明BMP-2从微囊中释放后仍能保持活性，发挥成骨分化作用，同时从侧面表明BMP-2 scaffolds/12 000组在7 d内释放的药物较另外3组更多，这与2.3中得到的缓释结果相一致。2个BMP-2 scaffolds SR组AKP活力差异无统计学意义，但都高于空白对照组。表明2种微囊经过3 d的缓释仍能释放出BMP-2，并能够保持BMP-2的活性。BMP-2 scaffolds/30 000组微囊的AKP活力与空白对照组差异无统计学意义。

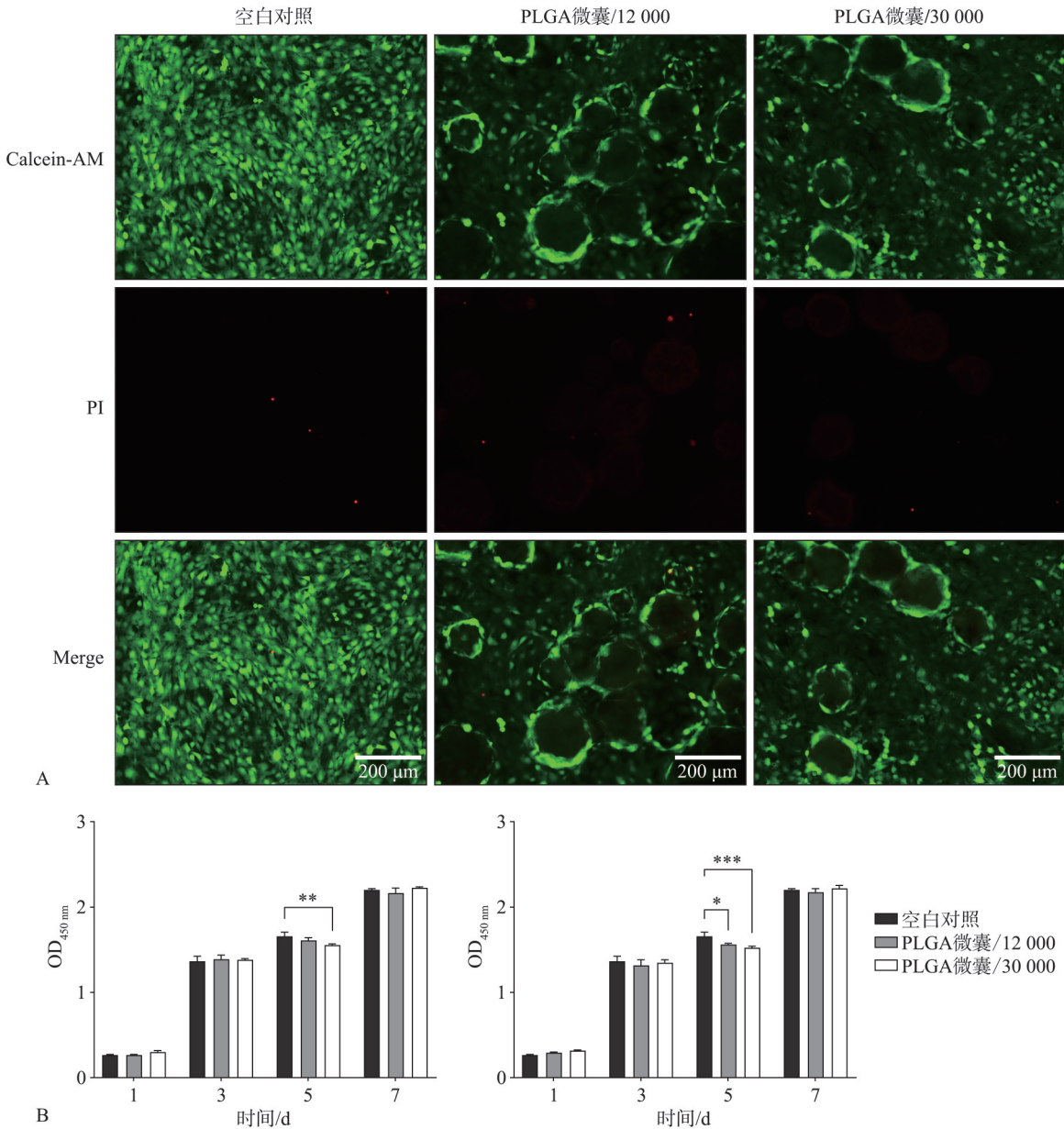
### 2.7 浸提液对MC3T3-E1体外成骨分化的影响

微囊浸提液的AKP活性测定结果(图5右)显示，相对分子质量12 000的微囊的AKP活力高于相对分子质量30 000的微囊( $P<0.05$ )，而相对分子质量30 000的微囊的AKP活力与空白对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

将MC3T3-E1细胞在成骨诱导培养基中培养，茜素红染色及半定量分析结果见图6。相对分子质量30 000的2组较其他组钙沉积结节多，相对分子

质量 12 000 的 2 组钙沉积结节较空白对照组少, BMP-2 scaffolds SR/12 000 组几乎无钙沉积结节。14、21 d 时茜素红染色结果对比, 空白对照组以及相对分子质量 30 000 的 2 组钙沉积结节都随时间增多, 但是相对分子质量 12 000 的 2 组钙沉积结节

21 d 时与 14 d 时差异无统计学意义。21 d 时茜素红半定量分析显示, 相对分子质量 30 000 的 2 组钙沉积结节高于空白对照组以及相对分子质量 12 000 的 2 组 ( $P<0.05$ )。



A: MC3T3-E1 细胞黏附于 2 种相对分子质量 (12 000 和 30 000) 包封 BMP-2 的 PLGA 微囊上, 其中 Calcein-AM 染色活细胞, 呈现绿色荧光, PI 染色死细胞, 呈现红色荧光; B: MC3T3-E1 细胞在包封去离子水 (左) 和包封 BMP-2 (右) 的 PLGA 微囊上的增殖情况。\* $P=0.012$  1, \*\* $P=0.005$  1, \*\*\* $P=0.000$  6。

图 3 PLGA 微囊细胞相容性检测

Fig 3 Cell compatibility test of PLGA microcapsules

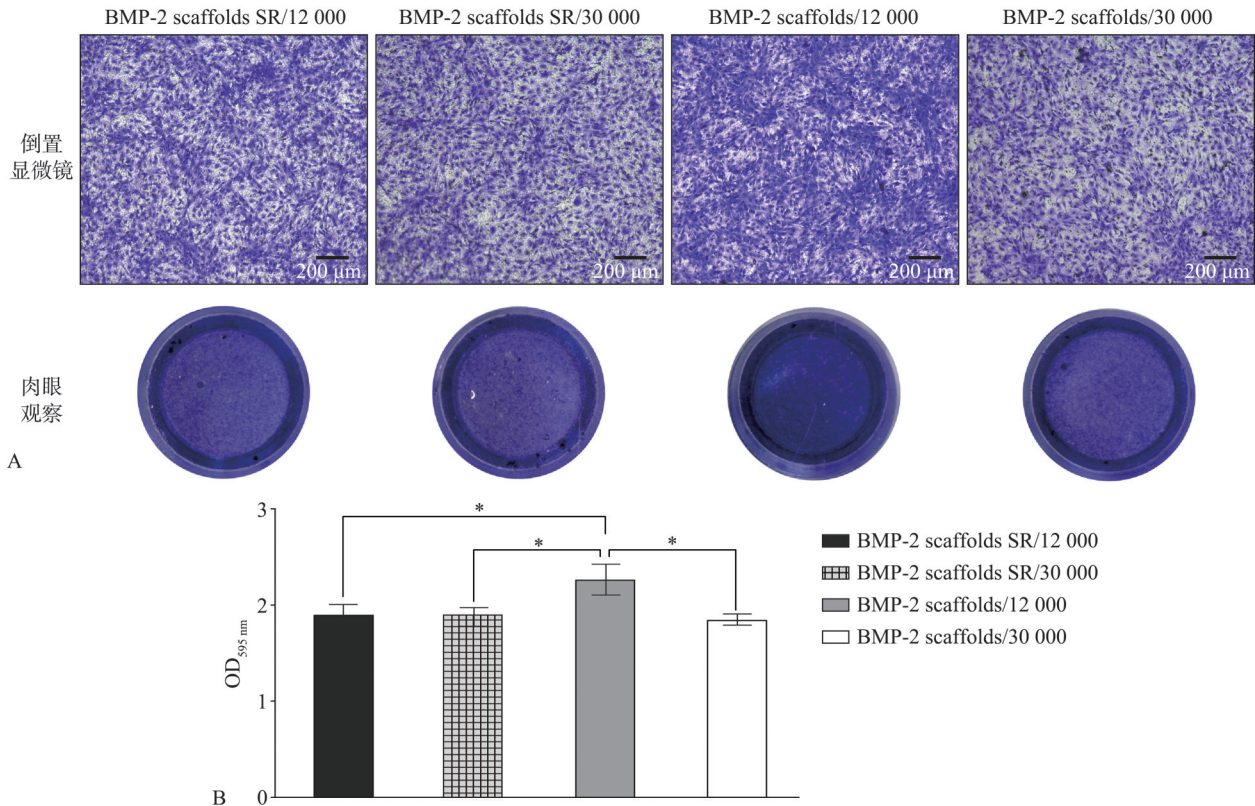
### 3 讨论

本课题组的前期研究利用相对分子质量为 12 000 以及 150 000 的 PLGA 微囊制备了一种可以

持续释放生长因子的支架。研究<sup>[10]</sup>表明, 相对分子质量为 12 000 的微囊在 14 d 内促进骨形成的能力优于相对分子质量为 150 000 的微囊。然而, 骨形成在体内是一个长期的过程, BMP-2 需要在体内释放至少数周。本研究基于上述实验结果, 选

择制备相对分子质量为 12 000 以及 30 000 的微囊进行对比, 在其内包裹 BSA 研究释药能力。结果表明, 相对分子质量为 12 000 的微囊释放 BSA 的时间持续约 25 d, 其中第 1 天约释放其含量的 55%; 相对分子质量为 30 000 的微囊在缓释 35 d 时仅释放了其所载药物的 50%, 第 1 天释放了其含量的 30%。BMP-2 通过初始爆发释放, 随后缓慢

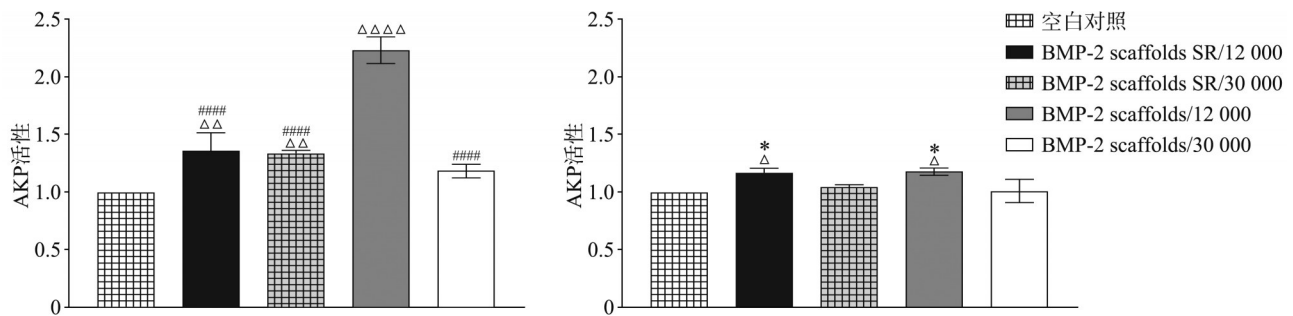
持续释放的方式递送能更好地促进骨形成<sup>[12]</sup>。同时释放动力学结果表明, 相对分子质量为 12 000 的微囊在初期释放的 BMP-2 含量最高, BMP-2 的作用为促进成骨细胞的增殖和分化<sup>[13-14]</sup>, 在细胞趋化实验中 BMP-2 也表现出了对成骨细胞的趋化作用, 这印证了前期课题组的研究结果<sup>[10]</sup>。



A: 细胞迁移的结晶紫染色倒置显微镜及肉眼观察; B: 细胞迁移结晶紫半定量分析, \*P<0.05。

图 4 BMP-2 微囊对成骨细胞的趋化作用

Fig 4 The effect of BMP-2 encapsulated PLGA microcapsules on cells chemotaxis



左: △为与对照组比较, △△P<0.01, △△△P<0.000 1; #为与 BMP-2 scaffolds/12 000 组比较, ####P<0.000 1。右: △为与对照组比较, △P<0.05; \*为与 BMP-2 scaffolds/30 000 组比较, \*P<0.05。

图 5 BMP-2 微囊 (左) 及微囊浸提液 (右) 对 MC3T3-E1 细胞 AKP 活力的影响

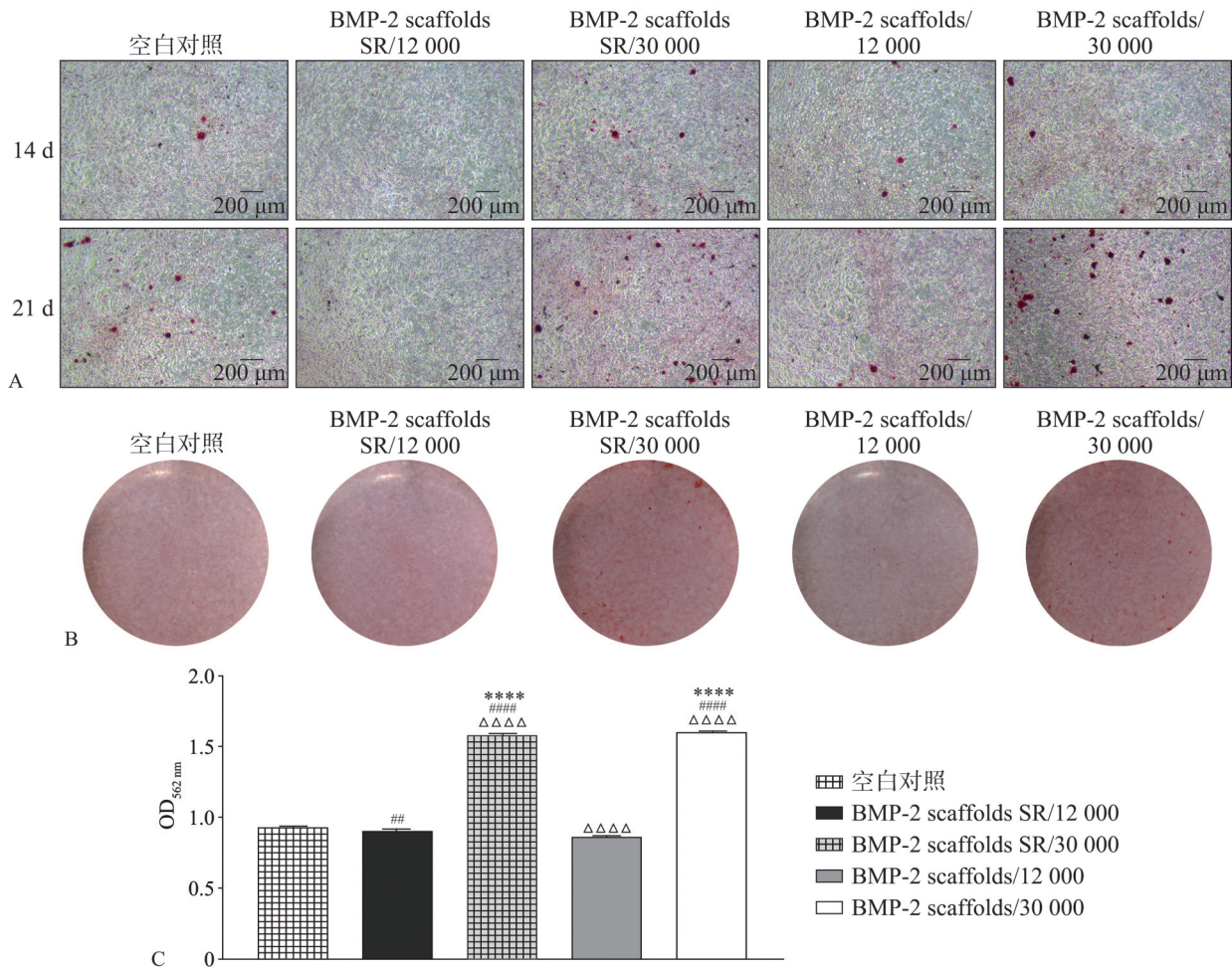
Fig 5 The effect of BMP-2 encapsulated PLGA microcapsules (left) and extracts (right) on AKP activity in MC3T3-E1 cells

本研究发现, 微囊的粒径大多数集中在 80~160 μm。支架的孔隙>50 μm 有利于细胞的进入以及血管生成<sup>[15]</sup>。Rmaid 等<sup>[16]</sup>测定了 PLGA 对细胞的

黏附, 光学显微镜显示将细胞与材料共培养 4 h 后细胞能够黏附并扩散在材料表面, 并且黏附的细胞总数约为接种总数的 90%。本研究微囊的 Calce-

in-AM/PI染色结果表明,5 d时有大量的MC3T3-E1黏附于微囊的周围,在微囊的边缘形成一个粗光圈,这是由于PLGA的疏水性可以使细胞迅速黏附至其表面。在这种微囊内部包裹BMP-2,通过AKP活力检测、茜素红染色及半定量分析证明了BMP-2被包裹后通过微囊缓释能够起到促进成骨的效果,同时从侧面证明BMP-2通过微囊释放后仍能保持其活性。但是相对分子质量为12 000的微囊虽然在7 d的AKP活性检测实验中表现出明显的诱导成骨能力,但是在14、21 d的长期诱导成骨实验中表现出了明显的不足,甚至成骨能力低于空白对照组。出现这种现象,一方面是由于相

对分子质量为12 000的微囊在前期突释严重,BMP-2已早期大量释放;另一方面,PLGA是通过酯键水解降解为乳酸和羟基乙酸,其酸性降解产物会引发PLGA自催化作用,加速其降解,并使局部微环境呈弱酸性。PLGA的水解过程分为两个阶段,第一阶段PLGA的相对分子质量逐渐降低,而总重量不变;第二阶段PLGA相对分子质量降低,水解产物溶于水,总重量快速下降<sup>[8-9,17]</sup>。由于相对分子质量为12 000的微囊的相对分子质量较小,导致在成骨初期就已到达水解的第二阶段。过快的水解导致周围环境呈弱酸性,周围组织出现炎症反应,阻碍了成骨分化的进程<sup>[8,18]</sup>。



A: 成骨诱导14、21 d茜素红染色光镜观察; B: 成骨诱导21 d茜素红染色肉眼观察; C: 茜素红染色21 d定量分析, \*为与BMP-2 scaffolds SR/12 000组比较, \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; Δ为与对照组比较, ΔΔΔΔ $P < 0.0001$ ; #为与BMP-2 scaffolds/12 000组比较, ## $P < 0.01$ , ##### $P < 0.0001$ 。

图6 MC3T3-E1成骨诱导后茜素红染色

Fig 6 Alizarin Red S staining of osteogenic induction

本研究初步证明,通过调控PLGA相对分子质量的大小,可以控制其内封装药物的释放速率。与相对分子质量为12 000的PLGA微囊相比,相对分子质量为30 000的PLGA微囊对诱导长期的成骨分化更有利。但是本研究仅局限于体外研究,并

且由于本研究目的在于比较2种相对分子质量微囊的释药能力对成骨效果的影响,应用了微囊的浸提液,对于该微囊的形态结构对MC3T3-E1成骨分化的影响体现不足,因此下一步需要改进实验方法,并增加体内实验,进一步验证该结论的准确

性。同时,在实际实验中发现低相对分子质量的微囊在缓释的后期会使周围环境呈酸性,不利于成骨<sup>[9]</sup>,后期也需要进一步研究以解决这一问题。对于微囊释放BMP-2来促进成骨分化的最适相对分子质量,也仍需比较更多不同相对分子质量的微囊以得出更准确的结论。本研究结果为进一步开发可控性骨组织工程技术材料提供了思路。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Ball JR, Shelby T, Hernandez F, et al. Delivery of growth factors to enhance bone repair[J]. *Bioengineering (Basel)*, 2023, 10(11): 1252.
- [2] Wei J, Xia X, Xiao S, et al. Sequential dual-biofactor release from the scaffold of mesoporous HA microspheres and PLGA matrix for boosting endogenous bone regeneration[J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(20): e2300624.
- [3] Minardi S, Fernandez-Moure JS, Fan D, et al. Biocompatible PLGA-mesoporous silicon microspheres for the controlled release of BMP-2 for bone augmentation[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(2): 118.
- [4] De Witte TM, Fratila-Apachitei LE, Zadpoor AA, et al. Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices[J]. *Regen Biomater*, 2018, 5(4): 197-211.
- [5] Guo X, Song P, Li F, et al. Research progress of design drugs and composite biomaterials in bone tissue engineering[J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 3595-3622.
- [6] Shah NJ, Macdonald ML, Beben YM, et al. Tunable dual growth factor delivery from polyelectrolyte multilayer films[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(26): 6183-6193.
- [7] Minardi S, Pandolfi L, Taraballi F, et al. PLGA-mesoporous silicon microspheres for the *in vivo* controlled temporospatial delivery of proteins[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(30): 16364-16373.
- [8] Jin S, Xia X, Huang J, et al. Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration[J]. *Acta Biomater*, 2021, 127: 56-79.
- [9] Sun F, Sun X, Wang H, et al. Application of 3D-printed, PLGA-based scaffolds in bone tissue engineering[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5831.
- [10] Wang Y, Zhao L, Zhou L, et al. Sequential release of vascular endothelial growth factor-A and bone morphogenetic protein-2 from osteogenic scaffolds assembled by PLGA microcapsules: a preliminary study *in vitro*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 232: 123330.
- [11] 王莹, 陈晨, 陈刚. BMP-2缓释型PLGA微囊作为引导骨再生支架的初步研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(9): 1216-1222.  
Wang Y, Chen C, Chen G. Preliminary study of a BMP-2 releasing scaffold comprised of PLGA microspheres for guiding bone regeneration[J]. *J Nanjing Med Univ (Nat Sci)*, 2022, 42(9): 1216-1222.
- [12] Nyberg E, Holmes C, Witham T, et al. Growth factor-eluting technologies for bone tissue engineering[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2016, 6(2): 184-194.
- [13] Wani TU, Khan RS, Rather AH, et al. Local dual delivery therapeutic strategies: using biomaterials for advanced bone tissue regeneration[J]. *J Control Release*, 2021, 339: 143-155.
- [14] Halloran D, Durbano HW, Nohe A. Bone morphogenetic protein-2 in development and bone homeostasis[J]. *J Dev Biol*, 2020, 8(3): 19.
- [15] Shi J, Dai W, Gupta A, et al. Frontiers of hydroxyapatite composites in bionic bone tissue engineering[J]. *Materials (Basel)*, 2022, 15(23): 8475.
- [16] Rmaidi A, Zelzer M, Sindji L, et al. Impact of the physico-chemical properties of polymeric microspheres functionalized with cell adhesion molecules on the behavior of mesenchymal stromal cells[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 121: 111852.
- [17] Zhao D, Zhu T, Li J, et al. Poly(lactic-co-glycolic acid)-based composite bone-substitute materials[J]. *Bioact Mater*, 2020, 6(2): 346-360.
- [18] Lee SK, Han CM, Park W, et al. Synergistically enhanced osteoconductivity and anti-inflammation of PLGA/ $\beta$ -TCP/Mg(OH)<sub>2</sub> composite for orthopedic applications [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 94: 65-75.
- [19] Yuan Y, Xu Y, Mao Y, et al. Three birds, one stone: an osteo-microenvironment stage-regulative scaffold for bone defect repair through modulating early osteo-immunomodulation, middle neovascularization, and later osteogenesis[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(6): e2306428.

(本文编辑 杜冰)