

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.12.011

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20250721.1502.021\(2025-07-22\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20250721.1502.021(2025-07-22))

搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原凝胶促进 BMSCs 成骨分化的研究

刘邦定¹, 唐永亮¹, 李妮², 任波^{1△}

(1. 西安市中心医院骨二科, 西安 710004; 2. 西安市胸科医院体检中心, 西安 710004)

[摘要] **目的** 基于纳米羟基磷灰石(nHA)和胶原蛋白合成生物矿化胶原凝胶支架,并搭载骨形态发生蛋白-2(BMP-2)多肽,探究其缓释功能及对骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化。**方法** 将 BMSCs 细胞、雄性 SD 大鼠、新西兰大耳白兔根据其干预材料分为空白组(不作生物矿化胶原凝胶干预)、对照组(使用不搭载 BMP-2 的生物矿化胶原凝胶干预)和实验组(使用搭载 BMP-2 的生物矿化胶原凝胶干预)。制备搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原凝胶。利用雌性新西兰乳兔提取兔 BMSCs,将 BMSCs 与生物矿化胶原凝胶共培养并分组,采用电子扫描显微镜观察各组 BMSCs 表征;将生物矿化胶原凝胶注射至大鼠背部皮下两侧并分组,观察各组大鼠皮下凝胶降解情况及皮肤炎症情况。CCK-8 法检测各组 BMSCs 增殖情况,碱性磷酸酶(ALP)显色试剂盒定性和定量分析各组 BMSCs ALP 活性,分别在共培养 1、3 d 后进行活细胞/死细胞免疫荧光染色。茜素红染色评价各组 BMSCs 钙结节矿化情况,qPCR 检测各组 BMSCs 成骨相关基因 RUNX2、OCN 的 mRNA 表达水平,免疫荧光染色检测各组 BMSCs RUNX2、OCN 的蛋白表达水平。采用雄性新西兰大耳白兔建立体内桡骨临界骨缺损模型,按分组植入相应生物矿化胶原,Micro-CT 检测大耳白兔桡骨骨再生情况,获取骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)数据并作比较;HE 染色、Masson 染色评估各组兔桡骨新生骨结构、材料残留、炎症反应及胶原纤维成熟度。**结果** 体外实验中,CCK-8 法结果表明,在共培养第 7 天,与空白组比较,对照组和实验组 BMSCs 细胞增殖率明显升高($P<0.01$)。与空白组比较,实验组和对照组 ALP 活性明显升高($P<0.001$),且实验组高于对照组($P<0.001$)。茜素红染色结果显示,与空白组比较,实验组及对照组的钙结节明显增多($P<0.001$),且实验组多于对照组($P<0.01$)。qPCR 结果显示,实验组 OCN、RUNX2 mRNA 表达水平较对照组和空白组明显升高,免疫荧光染色结果显示相同的趋势。体内实验中,HE 及 Masson 染色结果显示,实验组的体内成骨性能明显高于空白组和对照组($P<0.001$)。实验组 BV/TV、Tb.Th 明显高于空白组和对照组($P<0.001$)。**结论** 搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原凝胶能够在体外促进 BMSCs 的增殖,同时促进 BMSCs 的成骨分化。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;胶原;骨形态发生蛋白-2;缓释;骨再生

[中图法分类号] R318.08 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)12-2782-10

Study on osteogenic differentiation of BMSCs promoted by a bio-mineralized collagen gel loaded with BMP-2 peptide

LIU Bangding¹, TANG Yongliang¹, LI Ni², REN Bo^{1△}

(1. Department of Orthopedics II, Xi'an Central Hospital, Xi'an, Shaanxi 710004, China;

2. Health Examination Center, Xi'an Chest Hospital, Xi'an, Shaanxi 710004, China)

[Abstract] **Objective** To synthesize a bio-mineralized collagen gel scaffold based on nano-hydroxyapatite (nHA) and collagen, and load with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) peptide, to explore its sustained-release function and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** BMSCs cells, male SD rats, and New Zealand big-eared white rabbits were divided into the blank group (no intervention with bio-mineralized collagen gel), the control group (intervention with bio-mineralized collagen gel without BMP-2), and the experimental group (intervention with bio-mineralized collagen gel loaded with BMP-2) according to their intervention materials. Prepared bio-mineralized collagen gel loaded with BMP-2. Rabbit BMSCs were extracted from female New Zealand milk rabbits. The BMSCs were co-cultured with bio-mineralized collagen gel and grouped. The characterization of BMSCs in each group was observed by

△ 通信作者, E-mail: rb619yj@163.com。

electron scanning microscope. The bio-mineralized collagen gel was injected into both sides of the subcutaneous tissue on the back of rats and grouped. The degradation of the subcutaneous gel and the skin inflammation in each group of rats were observed. The proliferation of BMSCs in each group was detected by CCK-8 method. The alkaline phosphatase (ALP) activity of BMSCs in each group was qualitatively and quantitatively analyzed by ALP chromogenic kit. Live cell/dead cell immunofluorescence staining was performed after co-culture for 1 and 3 days, respectively. Alizarin red staining was used to evaluate the mineralization of calcium nodules in BMSCs of each group. qPCR was used to detect the mRNA expression levels of osteogenesis-related genes RUNX2 and OCN in BMSCs of each group. Immunofluorescence staining was used to detect the protein expression levels of RUNX2 and OCN in BMSCs of each group. The critical bone defect model of the radius in vivo was established using male New Zealand white rabbits with big ears. The corresponding biomaterialized collagen was implanted according to the groups. The bone regeneration of the radius in the white rabbits with big ears was detected by micro-CT. The data of bone volume fraction (BV/TV) and trabecular bone thickness (Tb. Th) were obtained and compared. HE staining and Masson staining were used to evaluate the new bone structure, material residue, inflammatory response and collagen fiber maturity of the radius in each group of rabbits. **Results** In vitro experiments showed that on the 7th day of co-culture, compared with the blank group, the proliferation rate of BMSCs in the control group and the experimental group was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the blank group, the ALP activity in the experimental group and the control group was significantly increased ($P < 0.001$), and the activity in the experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.001$). Alizarin red staining results showed that compared with the blank group, the number of calcium nodules in the experimental group and the control group was significantly increased ($P < 0.001$), and the number in the experimental group was more than that in the control group ($P < 0.01$). The qPCR results showed that the expression levels of OCN and RUNX2 mRNA in the experimental group were significantly higher than those in the control group and the blank group, and the immunofluorescence staining results showed the same trend. In vivo experiments, the results of HE and Masson staining showed that the in vivo osteogenic performance of the experimental group was significantly higher than that of the blank group and the control group ($P < 0.001$). The BV/TV and Tb. Th in the experimental group were significantly higher than those in the blank group and the control group ($P < 0.001$). **Conclusion** The bio-mineralized collagen gel loaded with BMP-2 polypeptide can promote the proliferation of BMSCs in vitro and the osteogenic differentiation of BMSCs at the same time.

[Key words] bone marrow mesenchymal stem cells; collagen; bone morphogenetic protein-2; sustained release; bone regeneration

临床中,由高能量骨折、肿瘤切除和骨髓炎等疾病引起的骨量丢失或骨不连常导致大段骨缺损,是目前的治疗难题^[1-2]。迄今为止,骨移植仍然是治疗骨缺损最有效的手段,尤其是自体骨移植,是临床治疗的金标准^[3-4]。然而,自体骨移植存在着供区并发症及供区骨量有限等缺点,且治疗周期长,常给患者的经济和生活带来巨大负担^[5-6]。随着骨组织工程的发展,生物活性材料逐渐成为治疗骨缺损的潜在方法^[7-9]。

理想的骨组织工程生物活性材料应当具备修复骨组织缺损的潜力,同时具备良好的力学性能^[10]。由纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite, nHA)和胶原蛋白组成的生物矿化胶原凝胶复合物是一种新型的骨组织工程支架材料,近年已被广泛研究^[11-12]。胶原蛋白和 nHA 的结构、成分与天然骨组织相似,并且 nHA 已被美国食品药品监督管理局批准应用于临床^[13]。尽管 nHA 具有良好的生物相容性和骨传导性,但其

成骨诱导能力在修复大段骨缺损或骨不连时仍有待提高^[14]。骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)属于转化生长因子 β 家族,在骨组织生长发育及再生过程中发挥重要作用^[15-16]。天然 BMP-2 存在着成本高、活性不稳定等缺点,并且局部高剂量 BMP-2 所带来的不良反应在临床报道中也越来越多,尤其是异位骨化,严重时可能引起瘫痪及脊髓损伤^[17]。因此,开发一种能持续释放 BMP-2 或其功能片段的载体系统至关重要。已有研究将 BMP-2 多肽整合到由 nHA 和胶原蛋白组成的矿化胶原中,并表现了良好的骨再生能力^[18]。然而,关于如何高效地利用 BMP-2 多肽引导骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)向成骨分化仍鲜有研究^[19]。

本研究旨在探索一种新型的 BMP-2 多肽缓释系统,即生物矿化胶原凝胶缓释平台。通过体外实验证实 BMP-2 在矿化胶原凝胶中的缓释特性,利用 qPCR

和免疫荧光等技术分析 BMP-2 缓释对 BMSCs 向成骨分化的调控作用并探讨其潜在机制,并进一步在家兔桡骨临界缺损模型中验证其修复性能。

1 材料与方法

1.1 材料

雌性新西兰乳兔 2 只(1 周龄,体重 100~120 g)、雄性新西兰大白兔 24 只(12 周龄,体重 2.5~3.0 kg)、雄性 SD 大鼠 18 只(1 月龄,体重 200~240 g)购自西安市博马克实验动物公司。低糖 DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)和 1% 青-链霉素购自美国 Gibco 公司;BMP-2 多肽由北京博奥森生物技术有限公司设计合成;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)、钙黄绿素(calcein acetoxymethyl ester, AM)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒及显色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔 BMSCs 成骨诱导培养基和茜素红染色液购自美国 Hyclone 公司;逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒及 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, RUNX2)一抗、骨钙素(osteocalcin, OCN)一抗购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;荧光二抗、荧光染料、HE 染色试剂盒染料购自美国 Sigma 公司。本研究已通过西安市中心医院伦理委员会批准[审批号:(2021 年)研审第(52)号]。所有动物饲养于恒温环境(22±2)℃,湿度 50%~60%,自由饮食,自然光照。

1.2 方法

1.2.1 制备搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原凝胶

将 I 型胶原蛋白稀释至浓度 0.67 g/L,随后在溶液逐滴加入 CaCl_2 和 H_3PO_4 (Ca/P 比值为 1.66)。在室温条件下,缓慢搅拌混合溶液,并用 NaOH 溶液滴定至 pH 值至 7.4。48 h 后通过离心收集 nHA 矿化胶原沉淀并冷冻干燥^[20]。在无菌条件下,将 BMP-2 溶解于 5% 的海藻糖中重建,并稀释至浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,将 nHA 冻干粉末溶于无菌的去离子水中,浓度为 0.04 g/L,随后与 BMP-2 多肽结合从而完成整合^[21]。

1.2.2 搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原凝胶的表征观察

将制备好的生物矿化胶原凝胶于-80℃进行预冷冻过夜,随后放入冷冻干燥机中-70℃冻干 48 h。对样品进行表面喷金处理,在电子扫描显微镜下观察表面形态。使用流变仪(奥地利 Anton Paar 公司)测定生物矿化胶原凝胶的流动变形特性,在温度 0~100℃范围内,测量生物矿化胶原凝胶的存储模量(G')和损耗模量(G'')的变化。将搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原凝胶在 5 mL 模拟体液中孵育,在恒温水浴箱(中国国华集团公司)中振荡 1、2、3、4、5、6、7、10、12、14 d,去除上清液并用新鲜的模拟体液代替。通过

紫外分光光度计在 280 nm 下测量洗脱的 BMP-2 多肽的吸光度 $[A_{(280)}]$ 值,并绘制 BMP-2 多肽释放曲线。

1.2.3 分组

将 BMSCs 细胞、雄性 SD 大鼠、新西兰大耳大白兔根据其干预材料分为空白组(不作生物矿化胶原凝胶干预)、对照组(使用不搭载 BMP-2 的生物矿化胶原凝胶干预)和实验组(使用搭载 BMP-2 的生物矿化胶原凝胶干预)。

1.2.4 体内生物矿化胶原凝胶降解性观察

选取 1 月龄、体重为 200~240 g 的雄性 SD 大鼠,将生物矿化胶原凝胶注射至大鼠背部皮下两侧,分别在注射后 0、4、7、14、21、42 d 取出大鼠皮肤标本,观察并测量凝胶降解情况,并进行 HE 染色观察皮肤炎症反应情况,绘制生物矿化胶原凝胶降解曲线。

1.2.5 BMSCs 的增殖、活性检测

选取 1 周龄、体重为 100~120 g 的新西兰雌性乳兔进行 BMSCs 的提取与扩增,具体方法如文献[22]所描述。简言之,将 2 只 1 周龄的新西兰乳兔处死,并暴露四肢骨,从关节部位剪开髓腔,用装有 1 mL 含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的低糖 DMEM 的注射器反复冲洗髓腔 5~6 次至细胞培养皿中。在 37℃、5% CO_2 环境中孵育,扩增传代至第 3 代用于后续细胞实验^[23]。

将各组 BMSCs 以 2.0×10^4 /孔密度接种于 12 孔板中。分别在培养第 1、3、7 天根据试剂盒说明书使用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况:即细胞在更换新鲜培养基后加入 10% 的 CCK-8 染色液,在 37℃、5% CO_2 环境中继续培养 2 h 后使用酶标仪检测 $A_{(450)}$ 值。为观察各组中 BMSCs 的细胞活性,分别在共培养 1、3 d 后进行活细胞/死细胞染色,并于 FV 1000 荧光显微镜下(美国 Olympus 公司)观察拍照。

1.2.6 BMSCs 的成骨分化能力检测

将 BMSCs 以 8.0×10^4 /孔密度接种于 24 孔板中。待细胞贴壁 80% 以上后,使用含有 1×10^{-8} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和 50 mg/L 抗坏血酸的低糖 DMEM 培养基制备成骨分化诱导培养基进行成骨诱导,随后每 3 天进行一次换液。在培养 7 d 后移走成骨分化诱导培养基,用 200 μL RIPA 裂解液裂解细胞,采用 ALP 显色试剂盒进行染色以定性及定量分析 ALP 活性。此外,用茜素红染色评价钙结节矿化情况,其主要作用原理是通过茜素红与钙盐结合使得新形成的钙结节在显微镜下呈现出明显的红色^[24]。观察结束后,向孔板中加入 10% 氯化十六烷基吡啶溶解染色,在酶标仪下检测标本溶液的 $A_{(562)}$ 值。

使用 qPCR 方法检测各组 BMSCs 成骨相关基因 RUNX2、OCN mRNA 表达水平。将各组 BMSCs 成骨诱导 7 d 后,采用快速提取法提取细胞总 RNA,用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA,以 GAP-

DH 作为内参,随后使用 $2\times$ Fast SYBR Green Master Mix 在 LightCycler 480 PCR 仪上进行 qPCR 扩增和检测。RUNX2 引物:正向 5'-ACT ACC AGC CAC CGA GAC CA-3',反向 5'-ACT GCT TGC AGC CTT AAA TGA CTC T-3';OCN 引物:正向 5'-AGC CAC CGA GAC ACC ATG AGA-3',反向 5'-AGC CAC CGA GAC ACC ATG AGA-3';GAPDH 引物:正向 5'-GTT CCA CGG CAC GGT CAA GG-3',反向 5'-CCA GGG GGG CTA AGC AGT TG-3'。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因 mRNA 表达水平。于成骨诱导 14 d 后通过免疫荧光染色,评估成骨相关蛋白 RUNX2、OCN 表达情况,移除孔板中的培养基,PBS 润洗 3 次,随后用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,PBS 润洗 3 次,再用 0.1% TritonX-100 透化细胞 15 min,然后用体积分数为 10% 的山羊血清封闭细胞 1 h。加入一抗,于 4℃ 下孵育过夜,再用山羊抗兔二抗于 37℃ 下孵育 1 h。最后加入 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染液对细胞核染色 5 min,在荧光显微镜下观察染色结果,并使用 ImageJ 软件记录阳性细胞数量。

1.2.7 建立体内桡骨临界骨缺损模型

选取 12 周龄、体重为 2.5~3.0 kg 的雄性新西兰大耳白兔建立桡骨临界骨缺损模型。麻醉后,于右侧桡骨中段制备 15 mm 长的全层骨缺损模型,随机分为 3 组,每组 8 只,实验组、对照组分别植入搭载和不搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原凝胶,对照组仅制骨缺损模型,不做其他处理。造模后逐层缝合筋膜与皮肤,术后 3 d 内注射抗生素预防感染。

1.2.8 Micro-CT 检测

在凝胶植入术后 8 周处死模型动物,获取桡骨标本,使用 Micro-CT(Skyscan 1176, Bruker 公司)进行扫描(分辨率 18 μ m,电压 80 kV,电流 500 μ A)获取图片、骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)及骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)参数。

1.2.9 组织病理学观察

获取的模型动物桡骨标本经 4% 多聚甲醛固定,10% EDTA 脱钙 4 周,石蜡包埋后制备 5 μ m 纵行切片。进行 HE 染色评估新生骨结构、材料残留及炎症反应。行 Masson 染色分析新生骨结构,胶原纤维成熟度。使用 ImageJ 软件对新生骨区域进行定量分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS25.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方法分析,组间两两比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原的构建、表

征、释放率

制备好的生物矿化胶原凝胶在室温状态下呈现乳白色状态(图 1A),电子扫描显微镜下可观察到搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原具有良好的多孔结构,形态和孔径均匀,其上可见 BMP-2 多肽附着(图 1B,红色箭头)。通过对搭载 BMP-2 多肽的矿化胶原凝胶进行流动变形特性检测,发现随着温度的不断升高,矿化胶原的 G' 始终大于 G'' ,具备凝胶的固态属性,其压缩模量大约为 637 kPa,表明了该生物矿化胶原凝胶具有充足的黏附强度和力学支撑性能(图 1C)。生物矿化胶原中的 BMP-2 多肽累积释放量如图 1D 所示,释放率在第 2 天最快,而后以持续释放的方式速率逐渐降低。第 14 天($83.48\pm0.94\%$)的 BMP-2 多肽被释放。此外,通过对大鼠背部皮肤组织行 HE 染色可以发现,生物矿化胶原未使皮肤产生炎症反应,表明了具有良好的体内生物相容性(图 2A),且在体内可持续降解达 42 d 以上,见图 2B。

2.2 BMSCs 的增殖、活性

CCK-8 实验结果显示:随着培养时间的增加,各组细胞数量均有所增加。共培养第 1 天,各组间细胞增殖率差异无统计学意义($P>0.05$),共培养第 3 天,实验组细胞增殖率较对照组和空白组明显增加($P<0.01$)。对照组与空白组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。共培养第 7 天,对照组与实验组细胞增殖率较空白组明显增加($P<0.01$),但对照组与实验组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3A。活细胞/死细胞染色结果显示,3 组中的 BMSCs 均呈现较多绿染的活细胞,而红染的死细胞数量极少,见图 3B,表明各组细胞活性未受明显影响。

2.3 BMSCs 的成骨能力

经体外成骨诱导培养 7 d 后,ALP 显色实验结果表明,实验组的 ALP 活性明显高于空白组和对照组($P<0.001$),镜下图像显示深染的 ALP;同时,对照组的 ALP 活性也明显高于空白组($P<0.001$),见图 4A。茜素红染色结果显示,对照组和实验组的钙结节沉积较空白组更明显。对染色结果进一步进行半定量分析,在对照组和实验组检测到明显的钙沉积量,两组明显多于空白组($P<0.001$),且实验组也多于对照组($P<0.01$),见图 4B。qPCR 结果显示,体外成骨诱导培养 7 d,实验组 RUNX2、OCN mRNA 表达水平明显高于空白组和对照组($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),而对照组也明显高于空白组($P<0.05$, $P<0.01$),见图 5。为进一步验证搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原凝胶对 BMSCs 成骨分化的影响,采用免疫荧光法对成骨相关蛋白进行检测,结果显示,体外成骨诱导培养 7 d,实验组 RUNX2 和 OCN 表达水平高于对照组和空白组,对照组也高于空白组,与 qPCR 的结果一致。免疫荧光定量分析结果显示,实验组 RUNX2、OCN 阳性表达率明显高于对照组和空

白组 ($P<0.01, P<0.001$), 对照组也高于空白组 ($P<0.01, P<0.001$), 见图 6。

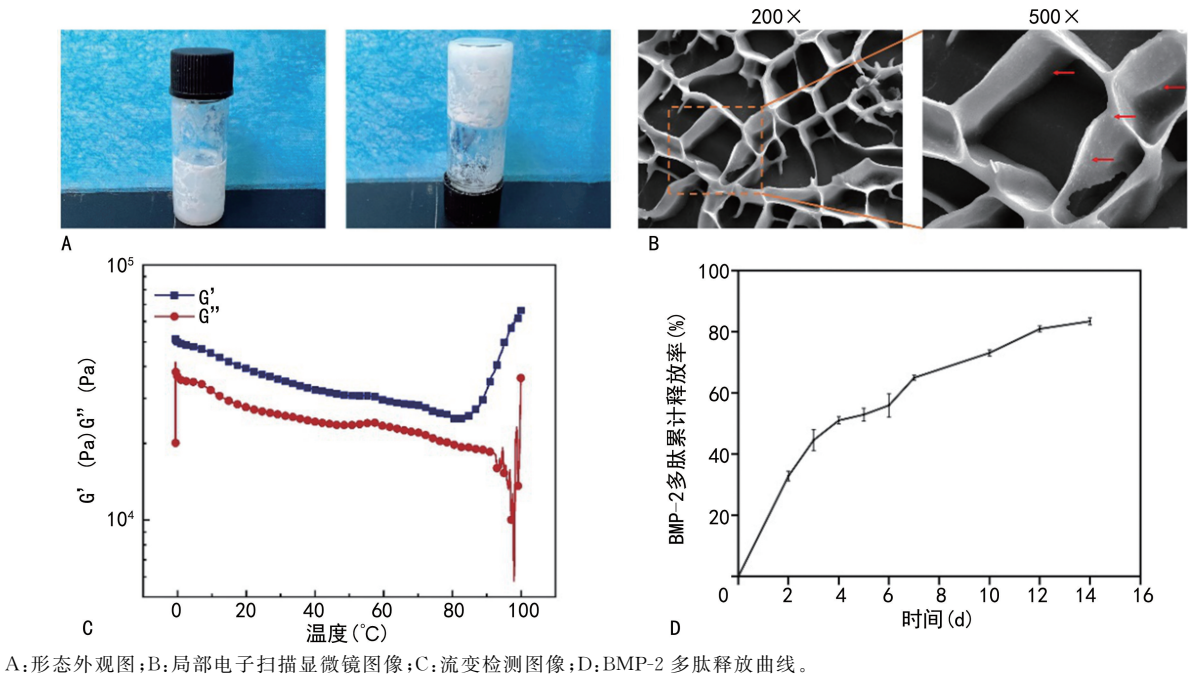


图 1 搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原凝胶的构建及表征观察

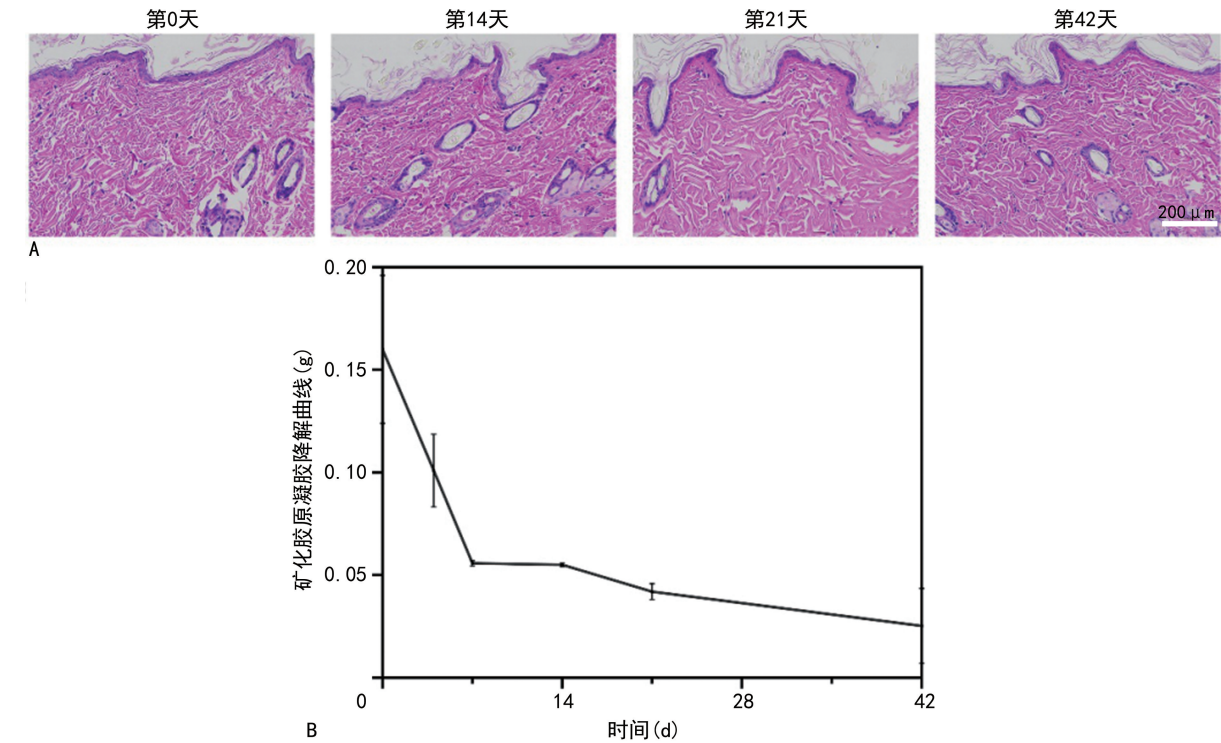


图 2 搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原凝胶体内降解情况

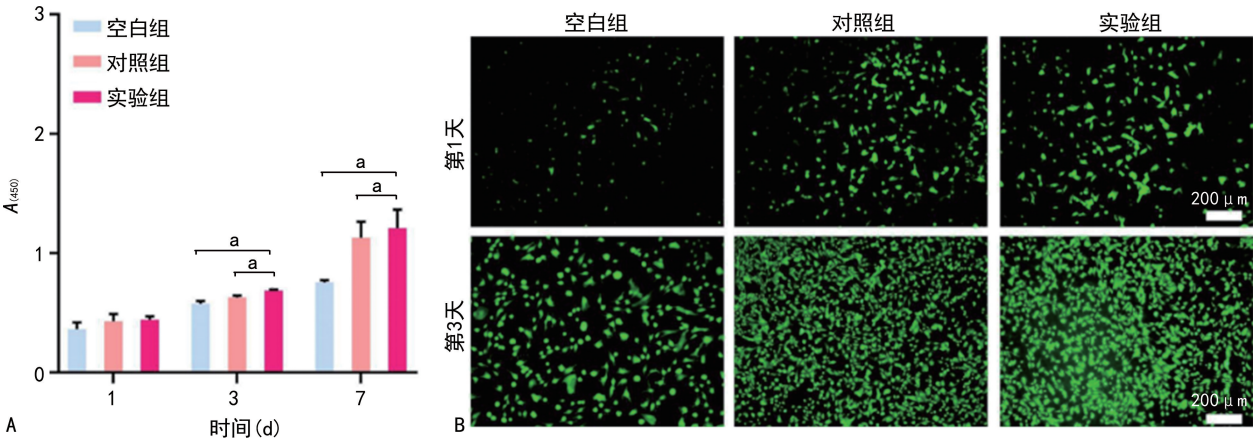
2.4 体内实验结果

术后 8 周, 实验组新生骨小梁呈定向排列, 几乎完全实现了骨再生, 与断端形成力学连续性的骨组织, 空白组缺损区虽有少量新生骨组织, 但是仍为纤维性骨缺损, 见图 7A。定量分析结果显示, 实验组的 $BV/TV[(72.2 \pm 5.6)\%]$ 与 $Tb. Th[(35.3 \pm 3.5) \mu m]$ 明显高于对照组 $[(24.3 \pm 2.1)\%, (43.6 \pm 2.1)$

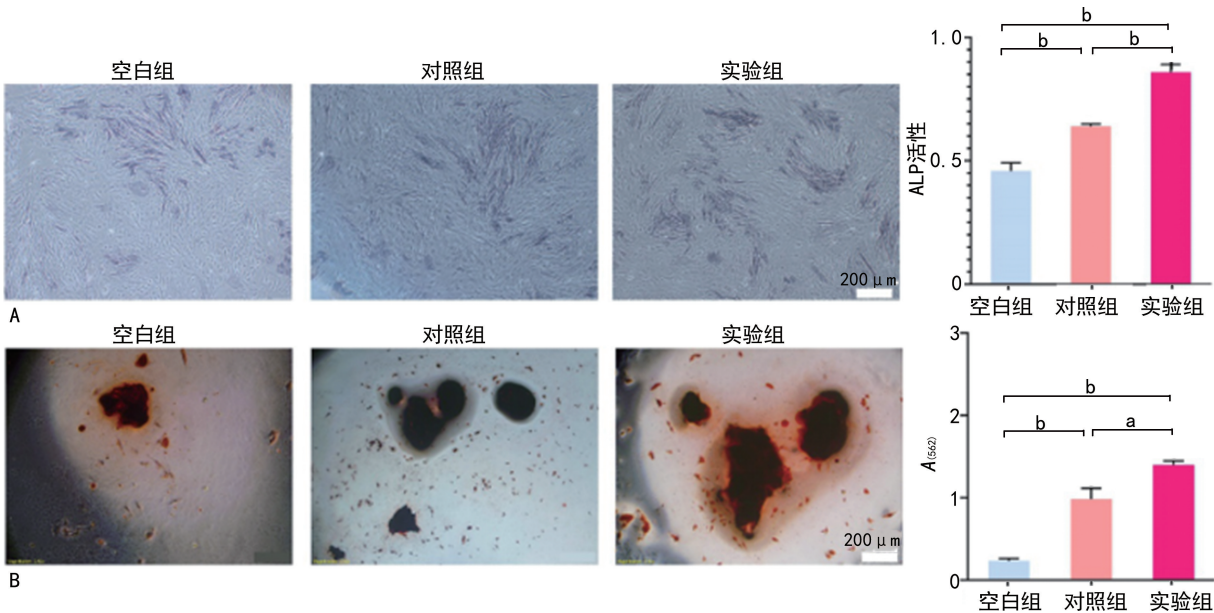
$\mu m]$ 及空白组 $[(13.8 \pm 0.4)\%, (35.3 \pm 3.5) \mu m]$, $P<0.01$, 对照组也高于空白组 ($P<0.01$), 见图 7B, 表明载有 BMP-2 多肽的矿化胶原凝胶具有促进骨小梁新生的作用。HE 染色结果显示, 实验组术后 8 周可见成熟板层骨与哈佛氏系统, 材料完全降解, 无残留碎片或炎症细胞浸润; 而对照组新生骨以编织骨为主, 新生骨量少, 且边缘存在炎症因子, 而空白组几乎

无新生骨产生,且断端萎缩,呈鼠尾状,有形成骨不连的趋势,见图 8A。Masson 染色结果显示,实验组胶原纤维排列有序,矿化前沿清晰,而空白组和对照组的胶原纤维排列紊乱,见图 8B。通过对 HE 染色区域

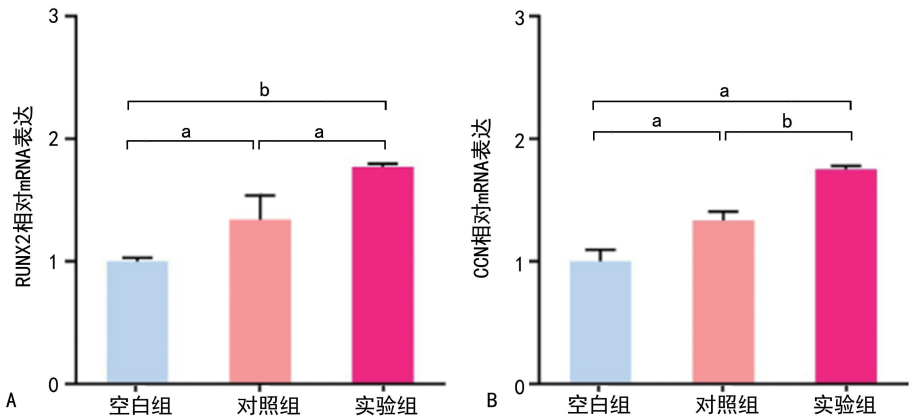
进行定量分析发现,实验组的新生骨面积占比明显高于空白组和对照组 ($P<0.001$),Masson 染色的定量结果与 HE 染色结果一致,见图 8C、D。



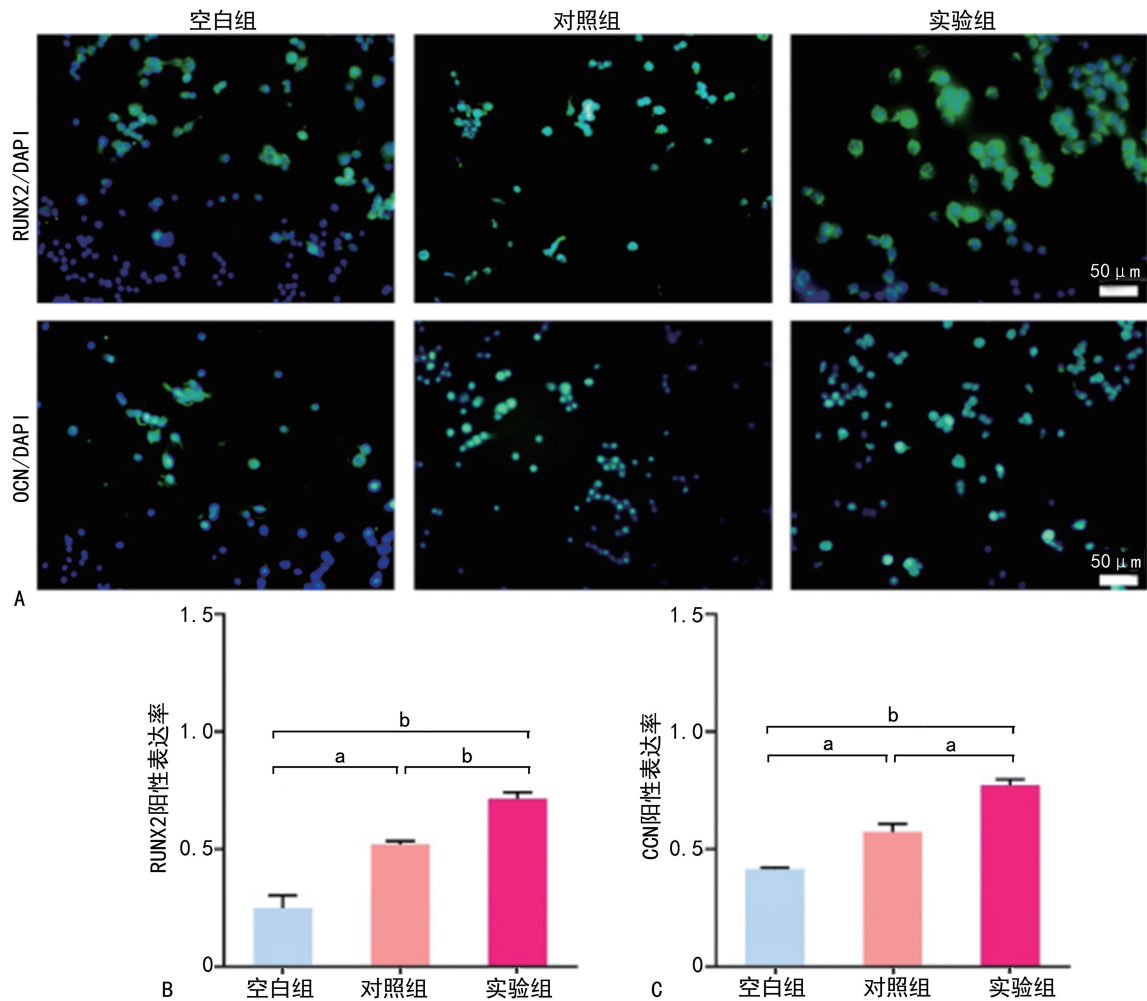
A: CCK-8 实验定量分析; B: 活细胞/死细胞染色结果; ^a: $P<0.01$ 。
图 3 各组 BMSCs 细胞增殖率与活性比较



A: ALP 显色实验及其定量分析; B: 茜素红染色及其半定量分析; ^a: $P<0.01$, ^b: $P<0.001$ 。
图 4 各组 BMSCs ALP 显色和茜素红染色结果

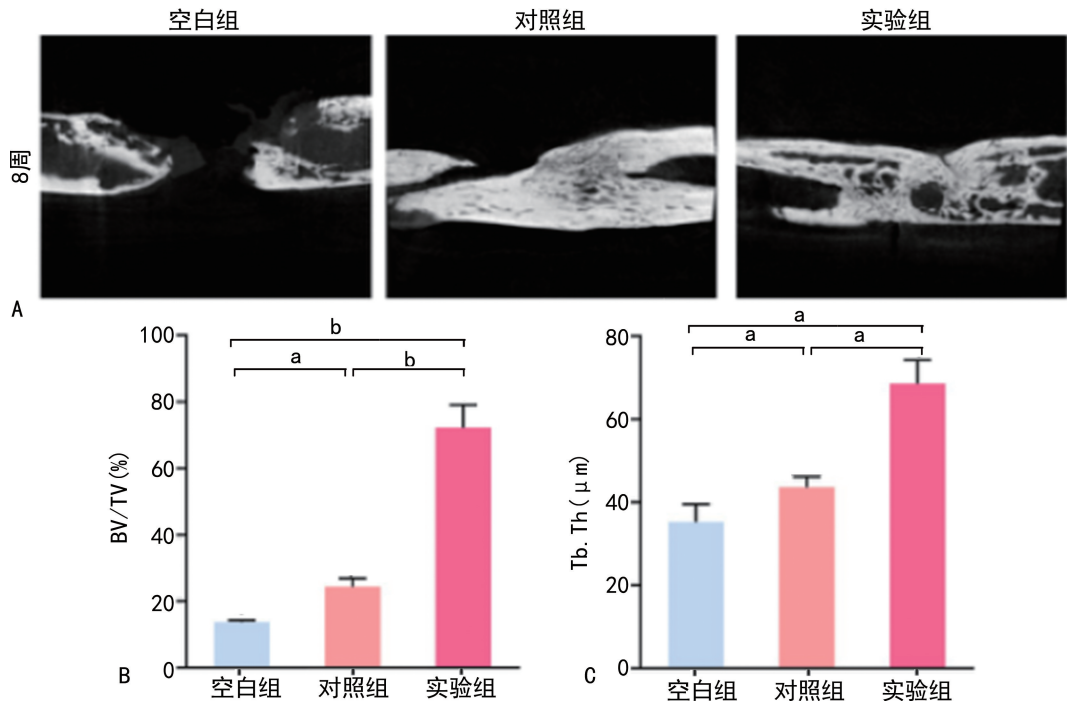


A: RUNX2 mRNA; B: OCN mRNA; ^a: $P<0.01$, ^b: $P<0.001$ 。
图 5 各组 BMSCs qPCR 检测结果



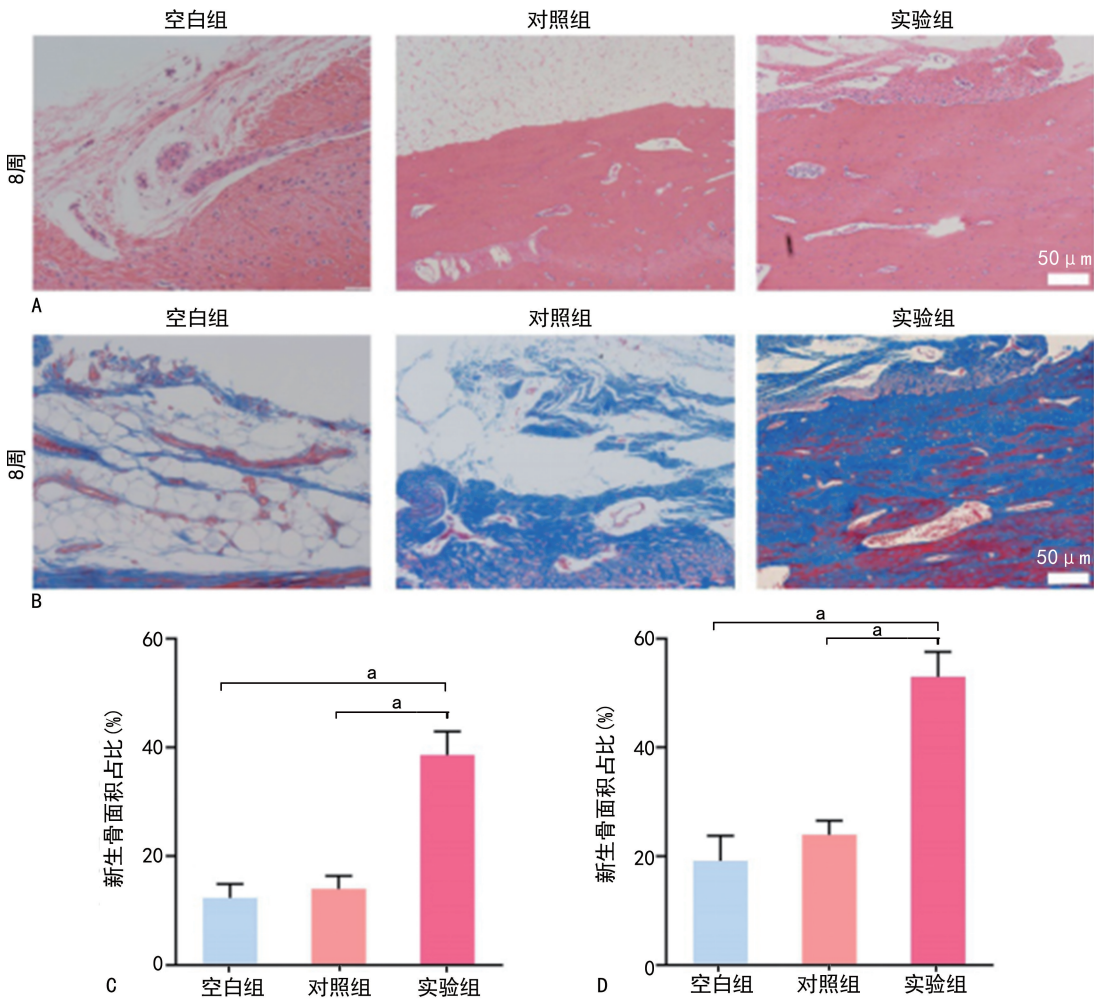
A:成骨诱导培养 7 d 后 RUNX2 和 OCN 的免疫荧光图;B:RUNX2 阳性表达细胞的定量分析;C:OCN 阳性表达细胞的定量分析;^a: $P < 0.01$; ^b: $P < 0.001$ 。

图 6 各组 BMSCs 免疫荧光染色结果



A:各组术后 8 周的 Micro-CT 影像图;B:BV/TV;定量分析;C:Tb、Th 的定量分析;^a: $P < 0.01$; ^b: $P < 0.001$ 。

图 7 各组 Micro-CT 结果及定量数据分析



A: HE 染色; B: Masson 染色; C: HE 染色新生骨面积定量分析; D: Masson 染色新生骨面积定量分析; ^a: $P < 0.001$ 。

图 8 各组体内组织病理学染色分析

3 讨 论

在骨组织工程领域, BMSCs 因其强大的自我更新能力和多向分化潜能而备受关注。特别是在促进骨再生方面, BMSCs 能够分化为成骨细胞, 进而形成新骨组织^[7, 25]。因此, 高效地引导 BMSCs 向成骨细胞分化, 并加速骨愈合过程, 对于治疗大段骨缺损, 是一个较有潜力的探索方向。

BMP-2 是一种化学合成多肽, 可以轻松整合到矿化胶原中并在局部区域保持活性^[26]。有研究表明, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BMP-2 具有良好的成骨性能及生物相容性, 不会对细胞产生毒性作用, 而由 nHA 组成的生物矿化胶原与细胞外基质具有相似的结构, 同样具有天然的生物相容性^[27-28]。本研究成功构建了一种新型的具备 BMP-2 多肽缓释功能的生物矿化胶原凝胶, 通过将 BMP-2 多肽整合到生物矿化胶原凝胶中, 不仅保留了 BMP-2 多肽的活性, 还实现了 BMP-2 多肽的持续释放, 通过调节 BMP-2 多肽和生物矿化胶原的配比, 最终成胶达到了力学强度的平衡性。对该生物矿化胶原凝胶进行表征观察发现, BMP-2 多肽附着在矿化胶原外部和内部多孔区域的表面上, 且矿化胶原凝胶具有与天然松质骨相近的三维多孔结构, 孔径

大约为 200 μm , 这种仿生设计不仅为 BMSCs 提供物理支撑, 在其表面的 nHA 沉积还能够通过整合素/FAK 通路增强细胞黏附与铺展^[29]。

在体外释放研究中 BMP-2 多肽显示出相对快速的初始释放, 随后进入缓释阶段, 这主要是基于胶原外部多孔区域表面的物理吸附特性。这种双相释放特性归因于材料的多级孔隙结构, 胶原外表面的松散物理吸附导致初期爆发性释放, 而内部矿化网络通过 Ca^{2+} -羧基配位作用稳定结合多肽, 实现长效缓释^[30]。值得关注的是, 这种释放模式与骨再生进程的生物学需求高度匹配, 初期爆发性释放可快速激活 BMSCs 的成骨定向分化, 而持续低剂量释放则可维持微环境中 BMP-2 通路的稳态激活, 避免因高剂量暴露引发的细胞凋亡或异位矿化^[31]。这一优势在体内实验中得到进一步验证, 术后 8 周 Micro-CT 显示实验组新生骨 BV/TV 明显高于对照组和空白组, 且骨小梁呈现力学优化的定向排列, 表明缓释 BMP-2 多肽有效协调了骨痂形成与结构重塑的时空进程。同时, 在体外, 这种 BMP-2 多肽的初始爆发式释放为细胞增殖提供了足够的条件, 体外 BMSCs 增殖结果显示, 随着培育时间的增加, BMSCs 数量也不断增多, 且实验组最明

显。此外,结合大鼠皮肤 HE 染色结果,证实该矿化胶原良好的生物可降解性和生物相容性,说明其组成结构与天然骨相近^[32]。BMP-2 诱导的转录因子 RUNX2 和 OCN 的靶基因对于调节基质矿化和矿物质沉积至关重要^[33]。本研究 qPCR 实验结果显示,实验组 RUNX2、OCN mRNA 表达水平较空白组和对照组明显升高($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),而对照组中 RUNX2、OCN mRNA 表达水平也较空白组明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),同时免疫荧光结果进一步证实了这一结果。

综上所述,矿化胶原是 BMP-2 多肽缓释的良好载体,搭载 BMP-2 多肽明显增强了矿化胶原的成骨能力,这使得 BMP-2 多肽及其复合材料在作为骨科植入物的候选材料中具有很大的应用前景。搭载 BMP-2 多肽的生物矿化胶原凝胶可能是一种理想的生物材料,值得进一步研究,接下来的研究应集中在 BMP-2 多肽的智能可控释放及评估体内骨形成的剂量反应方面。

参考文献

- [1] LENG Y, REN G, CUI Y, et al. Platelet-rich plasma-enhanced osseointegration of decellularized bone matrix in critical-size radial defects in rabbits[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(5): 198.
- [2] YAMAKAWA J, HASHIMOTO J, TAKANO M, et al. The bone regeneration using bone marrow stromal cells with moderate concentration platelet-rich plasma in femoral segmental defect of rats[J]. *Open Orthop J*, 2017, 11: 1-11.
- [3] WANG J, YIN Q, GU S, et al. Induced membrane technique in the treatment of infectious bone defect: a clinical analysis [J]. *Orthop Traumatol Surg Res*, 2019, 105(3): 535-539.
- [4] ANGERAME M R, JENNINGS J M, HOLST D C, et al. Management of bone defects in revision total knee arthroplasty with use of a stepped, porous-coated metaphyseal sleeve[J]. *JBJS Essent Surg Tech*, 2019, 9(2): e14.
- [5] BALDWIN P, LI D J, AUSTON D A, et al. Autograft, Allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery[J]. *J Orthop Trauma*, 2019, 33(4): 203-213.
- [6] XIE H, CAO L, YE L, et al. Autogenous bone particles combined with platelet-rich plasma can stimulate bone regeneration in rabbits[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 279.
- [7] SHANG F, YU Y, LIU S, et al. Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(3): 666-683.
- [8] SPITZHORN L, RAHMAN M S, SCHWINDT L, et al. Isolation and molecular characterization of amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells obtained from caesarean sections[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 5932706.
- [9] PEISELER M, KUBES P. More friend than foe: the emerging role of neutrophils in tissue repair [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(7): 2629-2639.
- [10] KELLY C N, MILLER A T, HOLLISTER S J, et al. Design and structure-function characterization of 3D printed synthetic porous biomaterials for tissue engineering [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(7): e1701095.
- [11] ZHANG X, GUO W, CUI H, et al. In vitro and in vivo enhancement of osteogenic capacity in a synthetic BMP-2 derived peptide-coated mineralized collagen composite[J]. *J Tissue Eng Regen M*, 2016, 10(2): 99-107.
- [12] SONG J E, TIAN J, KOOK Y J, et al. A BMSCs-laden quercetin/duck's feet collagen/hydroxyapatite sponge for enhanced bone regeneration[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2020, 108(3): 784-794.
- [13] LEE K, WANG S, YASZEMSKI M J, et al. Physical properties and cellular responses to crosslinkable poly (propylene fumarate)/hydroxyapatite nanocomposites [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(19): 2839-2848.
- [14] JU T, ZHAO Z, MA L, et al. Cyclic Adenosine monophosphate-enhanced calvarial regeneration by bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a hydroxyapatite/gelatin scaffold[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(21): 13684-13694.
- [15] STEPHAN S J, THOLPADY S S, GROSS B, et al. Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect[J]. *Laryngoscope*, 2010, 120(5): 895-901.
- [16] ZHANG C, HU Y, CUI F, et al. A study on a tissue-engineered bone using rhBMP-2 induced periosteal cells with a porous nano-hydroxyapa-

- tite/collagen/poly(L-lactic acid) scaffold[J]. *Biomedical Materials*,2006,1(2):56-62.
- [17] ZHANG Z,WANG F,HUANG X,et al. Engineered sensory nerve guides self-adaptive bone healing via NGF-TrkA signaling pathway[J]. *Adv Sci (Weinh)*,2023,10(10):e2206155.
- [18] LIAO S S,GUAN K,CUI F Z,et al. Lumbar spinal fusion with a mineralized collagen matrix and rhBMP-2 in a rabbit model[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*,2003,28(17):1954-1960.
- [19] BAI H,ZHAO Y,WANG C,et al. Enhanced osseointegration of three-dimensional supra-molecular bioactive interface through osteoporotic microenvironment regulation[J]. *Theranostics*,2020,10(11):4779-4794.
- [20] ZHANG L,MU W,CHEN S,et al. The enhancement of osteogenic capacity in a synthetic BMP-2 derived peptide coated mineralized collagen composite in the treatment of the mandibular defects[J]. *Biomed Mater Eng*,2016,27(5):495-505.
- [21] WANG Z,DONG L,HAN L,et al. Self-assembled biodegradable nanoparticles and polysaccharides as biomimetic ECM nanostructures for the synergistic effect of RGD and BMP-2 on bone formation[J]. *Sci Rep*,2016,6:25090.
- [22] CUI Y,WANG Z,LI Z,et al. Functionalized anti-osteoporosis drug delivery system enhances osseointegration of an inorganic-organic bioactive interface in osteoporotic microenvironment[J]. *Mater Design*,2021,206:109753.
- [23] LIU H C,E L L,WANG D S,et al. Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide) [J]. *Tissue Eng Part A*,2011,17(19/20):2417-2433.
- [24] WANG S,ZHANG J,LI W,et al. Hyaluronic acid-guided assembly of ceria nanozymes as plaque-targeting ROS scavengers for anti-atherosclerotic therapy[J]. *Carbohydr Polym*,2022,296:119940.
- [25] CHEN Y,XU J,HUANG Z,et al. An innovative approach for enhancing bone defect healing using PLGA scaffolds seeded with extracorporeal-shock-wave-treated bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)[J]. *Sci Rep*,2017,7:44130.
- [26] ZHU L,LIU Y,WANG A,et al. Application of BMP in bone tissue engineering[J]. *Front Bioeng Biotechnol*,2022,10:810880.
- [27] 刘建恒. 载骨形态发生蛋白 2 功能多肽可注射硫酸钙/矿化胶原骨修复材料的研究[D]. 北京:中国人民解放军医学院,2013.
- [28] 邓楠. PLGA/nHA 支架复合 rhBMP-2 壳聚糖纳米微球水凝胶缓释载体体内诱导成骨的实验研究[D]. 青岛:青岛大学,2019.
- [29] 崔宇韬. 基于成骨微环境构建的整合素特异性水凝胶激活原位 NUSC 促进萎缩性骨不连再修复的研究[D]. 长春:吉林大学,2024.
- [30] FANG B,QIU P,XIA C,et al. Extracellular matrix scaffold crosslinked with vancomycin for multifunctional antibacterial bone infection therapy[J]. *Biomaterials*,2021,268:120603.
- [31] CHRISTENSEN T J,ANNIS P,HOHL J B,et al. Neuroforaminal chondrocyte metaplasia and clustering associated with recombinant bone morphogenetic protein-2 usage in transforaminal lumbar interbody fusion[J]. *Spine J*,2014,14(6):e23-28.
- [32] SHI M,ZHANG P,ZHAO Q,et al. Dual functional monocytes modulate bactericidal and anti-inflammation process for severe osteomyelitis treatment[J]. *Small*,2020,16(4):e1905185.
- [33] ZHANG L,LUO Q,SHU Y,et al. Transcriptional landscape regulated by the 14 types of bone morphogenetic proteins (BMPs) in lineage commitment and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. *Genes Dis*,2019,6(3):258-275.

(收稿日期:2025-02-25 修回日期:2025-08-13)

(编辑:姚 雪)