

# 黄芪多糖缓释纤维对成骨细胞MC3T3-E1增殖分化的影响

王相峰<sup>1\*</sup>, 刘童斌<sup>2</sup>, 陈亚丹<sup>1</sup>, 付秀娟<sup>1#</sup> (1. 吉林大学第二医院, 长春 130041; 2. 吉林大学口腔医院, 长春 130041)

中图分类号 R944.9;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)04-0484-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.04.17

**摘要** 目的:研究黄芪多糖(AP)缓释纤维对成骨细胞MC3T3-E1增殖分化的影响。方法:将AP分别与左旋聚乳酸(PLLA)结合制备成AP质量浓度分别为0、25、50、100 μg/ml的静电纺丝缓释纤维,即PLLA、PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3,以异硫氰酸荧光素为指示剂于荧光显微镜下观察MC3T3-E1细胞在上述4种缓释纤维上的黏附情况;采用紫外分光光度法在490 nm波长处测定PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3中AP的含量,考察其21 d内的体外释放情况;采用MTT法检测4种缓释纤维作用24、48、72 h时MC3T3-E1细胞的增殖情况;采用酶标仪法检测4种缓释纤维对MC3T3-E1细胞作用3、5、7 d时的碱性磷酸酶(ALP)活性表达情况。结果:镜下观察PLLA纤维连续,较多空隙,表面光滑;PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3纤维呈纵横交错的三维、多空网络结构,且3种AP载药量下纤维形态未见明显改变。PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3能持续释放AP 21 d,且最初的24 h内释药呈突释状态。与PLLA比较,PLLA/AP2、PLLA/AP3能促进MC3T3-E1细胞的增殖,PLLA/AP1仅作用48 h时能促进MC3T3-E1细胞的增殖,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3均能增强MC3T3-E1细胞中ALP活性表达,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),且与AP浓度呈正相关。结论:AP缓释纤维具有一定的缓释作用,且对MC3T3-E1细胞的增殖、分化具有剂量依赖性的促进作用。

**关键词** 黄芪多糖;左旋聚乳酸;缓释纤维;MC3T3-E1细胞;增殖;分化

## Effects of Astragalus Polysaccharides Sustained-release Fibers on the Proliferation and Differentiation of Osteoblast Cells MC3T3-E1

WANG Xiang-feng<sup>1</sup>, LIU Tong-bin<sup>2</sup>, CHEN Ya-dan<sup>1</sup>, FU Xiu-juan<sup>1</sup> (1.The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China; 2.Stomatology Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of Astragalus polysaccharides (AP) sustained-release fibers on the proliferation and differentiation of osteoblast cells MC3T3-E1. METHODS: 0, 25, 50 and 100 μg/ml AP were dispersed into Poly-L-lactide acid (PLLA) to fabricate electrospun fibers, i.e. PLLA, PLLA/AP1, PLLA/AP2 and PLLA/AP3. The adhesion of MC3T3-E1 to 4 kinds of sustained-release fiber were observed by fluorescence microscope using fluorescein isothiocyanate as indicator. The contents of AP in PLLA/AP1, PLLA/AP2 and PLLA/AP3 were determined by UV spectrophotometry at 490 nm. The *in vitro* release of AP was investigated within 21 d. The proliferation of MC3T3-E1 treated with 4 kinds of sustained-release fibers for 24, 48 and 72 h were measured by MTT assay. The expression of alkaline phosphatase (ALP) of MC3T3-E1 cells was detected by ELISA after treated with 4 kinds of sustained-release fibers for 3, 5 and 7 d. RESULTS: PLLA fibers were continuous and smooth in appearance, and had multiple gaps. PLLA/AP1, PLLA/AP2 and PLLA/AP3 fibers showed the maze of three-dimensional multiple-gap reticular structure, and there was no obvious change of fiber morphology under the drug-loading amount of 3 kinds of AP. AP could be continuously released by PLLA/AP1, PLLA/AP2 and PLLA/AP3 for 21 d, and showed burst release within first 24 h. Compared with PLLA, PLLA/AP2 and PLLA/AP3 could promote the proliferation of MC3T3-E1, and the promotion effect of PLLA/AP1 on the proliferation of MC3T3-E1 only needed 48 h; there was statistical significance ( $P<0.05$ ). PLLA/AP1, PLLA/AP2 and PLLA/AP3 could enhance the expression of ALP in MC3T3-E1, which was positively associated with AP dose; there was statistical significance ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: AP can effectively control the release of AP and promote the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 in dose-dependent manner.

**KEYWORDS** Astragalus polysaccharides; Poly-L-lactide acid; Sustained-release fiber; MC3T3-E1 cell; Proliferation; Differentiation

[14] 冯自立, 刘金生, 李旭午. D-101大孔树脂吸附薯蓣水溶性皂苷的热力学和动力学分析[J]. 广东化工, 2012, 39

\* 药师, 硕士研究生。研究方向: 临床药学。电话: 0431-88796255。E-mail: xiangfeng1012@163.com

# 通信作者: 主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 0431-88796255。E-mail: fxj462003@163.com

(10):10.

[15] 杨小彦, 李稳宏, 唐璇, 等. 胡芦巴总皂苷在HPD 400A大孔树脂上的吸附性能研究[J]. 离子交换与吸附, 2011, 27(1):53.

(收稿日期:2014-03-06 修回日期:2014-06-27)

(编辑:张静)

黄芪多糖(Astragalus polysaccharides, AP)是黄芪中最重要天然有效成分。随着对多糖研究的深入,发现多糖具有多方面的生物活性及功能。AP也因其具有抗骨质疏松、增强机体免疫力、抗衰老、降血糖等方面有较强的活性而备受关注<sup>[1-2]</sup>。有研究报道,黄芪水提液能够促进骨形成<sup>[3]</sup>,AP能促进大鼠原代成骨细胞的增殖、分化与矿化<sup>[4-5]</sup>,适宜浓度的AP在短期内对体外牙周膜细胞的增殖也具有一定的促进作用<sup>[6-9]</sup>。

临床上中老年患者行种植牙手术时,其骨量骨质的条件往往不理想。目前,最理想的骨修复方式是自体骨移植,但供需骨的丧失和二次手术等缺陷限制了其应用<sup>[10]</sup>。组织工程技术作为一种新的再生模式,为牙周骨缺损的修复重建提供了新思路。左旋聚乳酸(PLLA)是一种可降解生物高分子材料,具有机械性能良好、可降解等特点,被广泛应用于医疗行业;电纺丝作为一种新兴的技术手段,操作简易,可制备包裹有效药物成分的可控、缓释药物的复合材料。乳液法电纺丝技术是基于高压静电纺丝发展而来,将药物加入静电纺丝纤维中,药物分散均匀,缓释效果较好,且具备经济实惠、制备方法简单的优势。因此,本研究将AP与PLLA结合制成AP缓释纤维,通过考察AP缓释纤维的体外释放以及其对成骨细胞MC3T3-E1的黏附、增殖和分化的影响,初步探讨AP缓释纤维用于种植体周骨缺损修复的可行性。

## 1 材料

### 1.1 仪器

静电纺丝推进装置(北京锐为信科技有限公司);超纯水仪(美国Millipore公司);HZQ-X100型恒温震荡培养箱(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);Micrion FEI PHILIPS场发射扫描电子显微镜(美国FEI公司);TU-1810紫外-可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);TGL-16G-A离心机(上海安亭公司,离心半径:3.5 cm);MCO-18AIC(UV)型CO<sub>2</sub>培养箱(日本三洋电机株式会社);倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);恒温水箱(上海医疗器械五厂)。

### 1.2 药品与试剂

PLLA(上海丽昂化学有限公司,批号:320140124,纯度:>95%);AP(南京景竹生物科技有限公司,批号:20131022,纯度:90%);胰酶(宝泰克生物有限公司,批号:20140411,分析纯);高糖达尔伯克改良伊格尔(DMEM)培养基(美国Gibco公司,批号:126H4526D);MTT(宝泰克生物有限公司,批号:20131102,分析纯);碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140523);异硫氰酸荧光素(FITC,美国Sigma公司,批号:F1407295);磷酸盐缓冲液(PBS,长春汇力生物技术有限公司,批号:720140625);二甲基亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)、三氯甲烷、油酸山梨坦等试剂均为分析纯,购自北京化工厂。

### 1.3 细胞

小鼠成骨细胞MC3T3-E1细胞系由中国科学院细胞库提供。

## 2 方法

### 2.1 缓释纤维的制备

常温下用8 ml三氯甲烷溶解1 g PLLA,充分溶解后,加入3 ml N,N-二甲基甲酰胺、30  $\mu$ l油酸山梨坦,搅拌均匀作为外油相。将AP溶于PBS中制备成质量浓度分别为0、25、50、100  $\mu$ g/ml的溶液,作为内水相。将0.5 ml内水相逐滴加至外油相

中,采用磁力搅拌30 min,形成W/O型乳液。将乳液加入静电纺丝推进装置,加高压静电20 kV,室温下静电纺丝为纤维薄膜,晾干,制得缓释纤维。分别依次记为PLLA(0  $\mu$ g/ml AP)、PLLA/AP1(25  $\mu$ g/ml AP)、PLLA/AP2(50  $\mu$ g/ml AP)、PLLA/AP3(100  $\mu$ g/ml AP),备用。

### 2.2 缓释纤维的形态观察

将PLLA、PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3分别裁剪成5 mm $\times$ 5 mm大小,将纤维样品固定在导电胶上,经过喷金后,在扫描电子显微镜下观察其表面形态,电子加速率为15 kV。

### 2.3 缓释纤维的AP体外释放试验

精密称量PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3各0.2 g,分别浸泡在装有10 ml模拟体液的塑料管中,37  $^{\circ}$ C水浴震荡,分别于1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 d取出浸提液,然后加入同温度同体积的模拟体液。将取出的浸提液采用苯酚-浓硫酸法显色,在490 nm波长处测定AP的吸光度,计算释放度<sup>[11]</sup>,绘制体外释放曲线。

### 2.4 细胞在AP缓释纤维上的黏附考察

将FITC混入AP质量浓度为50  $\mu$ g/ml的内水相中,使其质量浓度为1  $\mu$ g/ml,其余步骤同“2.1”项下方法制备成AP缓释纤维,记为PLLA/AP/FITC。使用特制打孔器在PLLA/AP/FITC上取直径为30 mm的纤维膜,正反面分别进行紫外线照射消毒。纤维膜用MC3T3-E1细胞培养液浸泡1 h后,置于6孔板中,将MC3T3-E1细胞( $1.0 \times 10^5$ 个/孔)接种于纤维膜上。将6孔板置于37  $^{\circ}$ C下含5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养4 h,用PI染色,置于荧光显微镜下观察MC3T3-E1细胞在AP缓释纤维上的黏附情况。

### 2.5 缓释纤维对MC3T3-E1细胞增殖的影响

试验分为4组,即PLLA组、PLLA/AP1组、PLLA/AP2组、PLLA/AP3组。使用特制打孔器在PLLA、PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3纤维膜上分别取得直径为8 mm的纤维膜,每组6份,将纤维正反面紫外线照射消毒后置于96孔板内,将MC3T3-E1细胞( $4 \times 10^3$ 个/孔)接种于纤维膜上,将96孔板置于37  $^{\circ}$ C下含5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。分别在24、48、72 h时每孔加入20  $\mu$ l MTT,放入培养箱继续培养4 h后,将培养液吸出,每个样品加入DMSO 150  $\mu$ l,室温下振荡10 min,加样于96孔板中,用酶标仪测定570 nm波长处的光密度,考察MC3T3-E1细胞的增殖情况。

### 2.6 缓释纤维对MC3T3-E1细胞中ALP活性的影响

试验分组同“2.5”项。使用特制打孔器在PLLA、PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3纤维膜上分别取直径15 mm的纤维膜,每组6份,将纤维正反面紫外线照射消毒后置于24孔板内,将MC3T3-E1细胞( $1 \times 10^4$ 个/孔)接种于纤维膜上,将24孔板置于37  $^{\circ}$ C下含5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。分别在3、5、7 d时用0.25%胰蛋白酶消化2 min,加培养液终止消化。将所有液体及细胞转入EP管,1 000 r/min离心10 min,弃上清,留沉淀细胞,加入1 ml PBS轻轻吹打,再次离心10 min,弃上清,在细胞沉淀中加入200  $\mu$ l PBS,反复冻融3次。按ALP试剂盒操作步骤加样于96孔板中,用酶标仪测定520 nm波长处的光密度,计算ALP活性。

### 2.7 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行统计分析,采用SigmaPlot 12.5软件作图。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用 $t$ 检验。检验标准 $\alpha =$

0.05,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 缓释纤维形态学表现

扫描电镜图中显示, PLLA 可见纤维连续, 彼此有较多空隙, 表面光滑; PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3 的纤维呈纵横交错的三维、多空网络结构, 与 PLLA 比较纤维的粘连程度降低, 直径均一性降低, 且 3 种 AP 载药量下纤维形态未见明显改变。扫描电镜图见图 1。

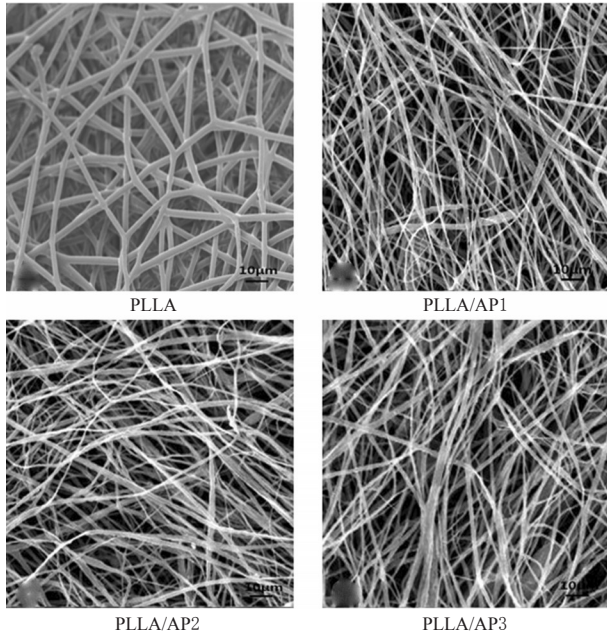


图 1 扫描电镜图( $\times 500$ )

Fig 1 Fluorescence microgram( $\times 500$ )

#### 3.2 体外释放试验结果

结果显示, PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3 中 AP 第 1 天的累积释放度分别为 37%、38%、40%, 第 7 天的累积释放度分别为 72%、73%、75%, 第 21 天的累积释放度均在 90% 左右。表明第 1 周 AP 释放较快, 随后释放速率减慢。在最初的 1 d 内, AP 的释放呈现一种突释状态, 其中 PLLA/AP3 较 PLLA/AP1 和 PLLA/AP2 的释药速度略快。AP 缓释纤维的药物释放曲线见图 2。

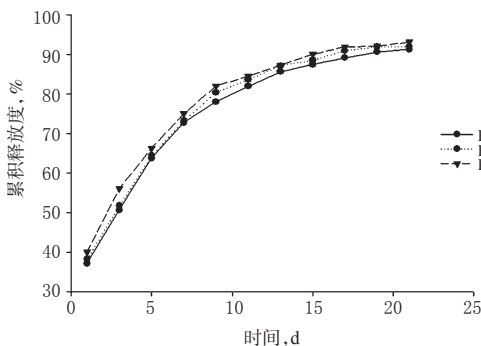


图 2 AP 缓释纤维的药物释放曲线

Fig 2 Drug release curve of AP sustained-release fiber

#### 3.3 细胞在 PLLA/AP/FITC 上的黏附情况

结果显示, MC3T3-E1 细胞能在 PLLA/AP/FITC 上黏附生

长, 呈不规则多边形, 细胞与纤维结合牢固。荧光显微镜图见图 3。

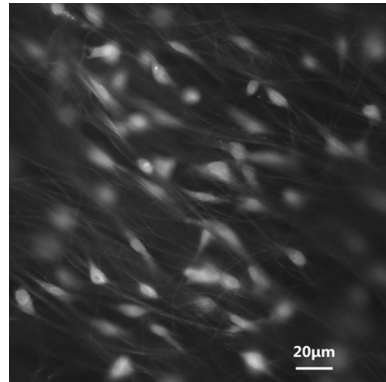


图 3 荧光显微镜图( $\times 400$ )

Fig 3 Fluorescence microgram( $\times 400$ )

#### 3.4 MC3T3-E1 细胞的增殖情况

与 PLLA 比较, PLLA/AP2、PLLA/AP3 能促进 MC3T3-E1 细胞的增殖, 而 PLLA/AP1 仅作用 48 h 时能促进 MC3T3-E1 细胞的增殖, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且作用与 AP 质量浓度呈正相关。各组 MC3T3-E1 细胞的增殖情况见表 1。

表 1 各组 MC3T3-E1 细胞的增殖情况( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 The proliferation of MC3T3-E1 in each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	作用时间		
	24 h	48 h	72 h
PLLA 组	0.356 ± 0.023	0.427 ± 0.019	0.528 ± 0.027
PLLA/AP1 组	0.379 ± 0.025	0.537 ± 0.016*	0.633 ± 0.017
PLLA/AP2 组	0.387 ± 0.019*	0.589 ± 0.024*	0.654 ± 0.021*
PLLA/AP3 组	0.391 ± 0.022*	0.655 ± 0.023*	0.733 ± 0.018*

注: 与 PLLA 组比较,  $*P < 0.05$

Note: vs. PLLA group,  $*P < 0.05$

#### 3.5 MC3T3-E1 细胞中 ALP 活性的变化

与 PLLA 比较, PLLA/AP1、PLLA/AP2、PLLA/AP3 均能增强 MC3T3-E1 细胞中 ALP 活性表达, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且与 AP 浓度呈正相关。各组 MC3T3-E1 细胞中 ALP 活性表达情况见表 2。

表 2 各组 MC3T3-E1 细胞中 ALP 活性表达情况( $\bar{x} \pm s, n=6, u/L$ )

Tab 2 Expression of ALP in MC3T3-E1 each group( $\bar{x} \pm s, n=6, u/L$ )

组别	作用时间		
	3 d	5 d	7 d
PLLA 组	1.21 ± 0.1	2.02 ± 0.12	2.53 ± 0.14
PLLA/AP1 组	1.25 ± 0.09*	2.13 ± 0.15*	3.14 ± 0.13*
PLLA/AP2 组	1.31 ± 0.13*	2.17 ± 0.08*	3.38 ± 0.16*
PLLA/AP3 组	1.52 ± 0.11*	2.24 ± 0.14*	3.45 ± 0.15*

注: 与 PLLA 组比较,  $*P < 0.05$

Note: vs. PLLA group,  $*P < 0.05$

### 4 讨论

大量基础研究表明, AP 卓越的促成骨功能使之具有较好的临床应用前景<sup>[3-9]</sup>。孔祥鹤等<sup>[5]</sup>的研究发现不同质量浓度(0.1、0.3、1、3、10、30、100  $\mu\text{g/ml}$ )的 AP 能够促进大鼠原代成骨细胞的增殖、分化及矿化。刘豫蓉等<sup>[10]</sup>分别用 0.08、0.1、0.2、

0.4 mg/ml的AP作用于体外培养新生大鼠颅骨成骨细胞,发现AP在短期内对体外成骨细胞的增殖与分化具有一定的促进作用。许春姣等<sup>[8]</sup>的研究发现,AP(50 μg/ml)与壳聚糖/聚乳酸制成复合材料能够促进犬牙周缺损部位的骨形成。为此,本研究选择25、50、100 μg/ml的AP与PLLA相结合,制备AP缓释纤维。

AP缓释纤维在模拟体液的作用下,PLLA缓慢降解,AP不断从纤维表面释放出来。AP缓释纤维的体外释放试验结果表明,释放大致分为两个阶段,即突释期和稳定期。第1天AP累积释放度约为40%;第2~5天进入释放稳定期,每天释放量约为10%。此时纤维表面形成的孔洞有利于药物进一步缓慢释放,AP的释放呈现相对规律的状态。5 d后,释放速率进一步降低。笔者推测:最初的突释状态可能是由于纤维表面AP的释放以及纤维所具有的高比表面积所引起的,而随后的平稳缓慢释放则是因为伴随着PLLA的缓慢降解,从而AP缓慢释放。这说明AP缓释纤维具有良好的缓释效果。另外药物浓度与释放速率呈现一定程度的正相关。笔者认为:随着载药量的增加,释药速率增大,一是因为载药量大的纤维单位体积内AP浓度高、药物扩散的浓度梯度大,这就更有利于纤维上的药物扩散、溶解到释放介质中<sup>[12]</sup>;二是因为载药量大的纤维,靠近表面的AP增多,其首先释放完毕,在纤维表面形成较多的孔道,使得纤维内部的AP扩散出来的几率增大<sup>[13]</sup>。从整个过程来看,AP缓释纤维可对AP起到缓释作用。

MC3T3-E1细胞具有体外培养成骨细胞的各种生物学特性,是研究药物对成骨细胞影响的理想的体外细胞模型<sup>[14]</sup>。利用荧光染色可见MC3T3-E1细胞在AP缓释纤维上黏附生长,呈不规则的多边形,伪足伸展充分,细胞生长状态较好;但细胞间没有紧密联系,没有形成细胞团片。通过MTT比色分析发现,各PLLA/AP组能够显著地促进MC3T3-E1细胞的增殖,尤其是PLLA/AP3组在各时间段均具有显著的促增殖作用( $P<0.05$ ),说明AP缓释纤维能够有效促进MC3T3-E1细胞的增殖。ALP是成骨细胞所分泌的一种酶蛋白,其高表达是成骨细胞分化成熟的早期标志。本研究表明,ALP的活性与AP的浓度成正比,随着AP浓度的增加,MC3T3-E1细胞ALP活性显著增加。该结果提示AP缓释纤维能够有效促进MC3T3-E1细胞的分化( $P<0.05$ )。

本研究表明,静电纺丝制备的AP缓释纤维具有一定的AP缓释能力,表面可以黏附MC3T3-E1细胞,并对细胞增殖、分化有促进作用。其制备过程简便、易于储存,因此有望应用于老年人种植体周围骨缺损的修复,但仍需进行动物实验以进一步验证其可行性。

## 参考文献

- [1] 张蕾,高文远,满淑丽.黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J].中国中药杂志,2012,31(21):3 203.
- [2] 梁丽娟,屠鹏飞,赵奎君.黄芪多糖的药理作用研究进展[J].中国药房,2010,21(43):4 113.
- [3] 刘念,程泽能,李焕德.抗骨质疏松药物研究进展[J].中国新药杂志,2004,13(12):1 243.
- [4] 刘豫蓉,张朝良,孔祥丽,等.黄芪多糖对成骨细胞增殖分化和结构的影响[J].国际口腔医学杂志,2010,37(2):133.
- [5] 孔祥鹤,牛银波,王婷梅,等.黄芪多糖对大鼠原代成骨细胞的影响及其机制研究[J].中草药,2011,42(10):2 065.
- [6] 张朝良,孔祥丽,陈思秀,等.黄芪多糖对牙周膜细胞增殖与结构的形态学影响[J].华西口腔医学杂志,2010,28(5):556.
- [7] 常立娜,屈树新,林孙忠,等.载黄芪多糖羟基磷灰石的制备及生物学性能评价[J].无机材料学报,2011,26(1):22.
- [8] 许春姣,翦新春,郭峰,等.黄芪多糖/壳聚糖/聚乳酸为支架的组织工程骨修复牙周组织缺损的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2007,21(7):748.
- [9] 许春姣,郭峰,高清平,等.骨髓基质干细胞与黄芪-壳聚糖/聚乳酸支架对犬牙周骨缺损再生的影响[J].中南大学学报:医学版,2006,31(4):512.
- [10] Xu HH, Quinn JB, Takagi S, et al. Synergistic reinforcement of in situ hardening calcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(6):1 029.
- [11] 蓝永锋,欧国灯.苯酚硫酸法测定黄芪中多糖含量[J].药物与人,2014,27(8):14.
- [12] Kim GH, Yoon H, Park YK. Drug release from various thicknesses of layered mats consisting of electrospun polycaprolactone and polyethylene oxide micro/nanofiber[J]. *Appl Phys A*, 2010, 100(4):1197.
- [13] 蒋岩岩,秦静雯,钱伟伟,等.载药聚乳酸丝素/纳米纤维的制备及缓释性能[J].纺织学报,2012,33(11):15.
- [14] Chen LL, Lei LH, Ding PH, et al. Osteogenic effect of drynariae rhizoma extracts and naringin on MC3T3-E1 cells and an induced rat alveolar bone resorption model[J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(12):1 655.

(收稿日期:2014-10-13 修回日期:2014-11-27)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅