

文章编号 1006-8147(2021)03-0307-03

综述

微纳米分级形貌促进成骨细胞分化的分子机制研究进展

高倩,姚晓雨 综述,隋磊 审校

(天津医科大学口腔医院口腔修复科,天津 300070)

摘要 种植材料表面形貌因素能够通过调控种植体周围细胞的成骨向分化,影响种植体周围的骨形成。目前研究表明,相较于单一的微米级或者纳米级形貌而言,微纳米分级形貌具有更强的促进细胞成骨向分化的能力,从而促进种植体周围的骨整合。微纳米分级形貌既能够通过调控诸多生物化学信号通路如 Wnt/ β -catenin、Hedgehog-Gli1、YAP/TAZ 等,又能够影响表观遗传以及骨免疫微环境来促进种植体表面细胞成骨向分化。对微纳米分级形貌调控细胞成骨向分化的分子机制的研究,可以为功能活性种植体表面的设计与改良提供思路。

关键词 表面形貌;微/纳米分级结构;成骨;成骨向分化

中图分类号 R78

文献标志码 A

种植体表面改性以期获得更好的生物学性能是口腔材料学者致力研究的方向。钛种植体表面可以分为光滑、微米级、纳米级以及微纳米分级形貌,单一的微米结构可促进细胞成骨向分化,但抑制成骨细胞的增殖,从而影响其促成骨效应。单一的纳米结构可促进成骨细胞的黏附、增殖,但对成骨向分化的影响却存在争议^[1]。理论上,骨仿生结构-微纳米分级表面形貌,可以促进细胞的黏附与成骨向分化,从而加速种植体周围骨形成,并与钛表面牢固结合。而诸多研究也证实,微纳米分级形貌钛表面在体内及体外均具有良好的生物相容性^[2],促进细胞的黏附、增殖及各种干细胞/前体细胞的成骨向分化^[3-4]。近十年来,学者们对微纳米分级形貌调控细胞命运的分子机制进行了深入探究,试图从中发掘有助于优化骨内种植体表面微观形貌设计的线索,进而获得可特异性调控细胞命运的种植体表面形貌,确保种植体骨整合效果。虽然相关研究结果尚不足以全面阐释这一复杂机制,但也取得了若干积极进展。本文即尝试对该领域现有研究进展进行综述,旨在为进一步的机制探究梳理思路,进而助力功能活性种植体表面的设计与改良。

1 Wnt/ β -catenin 信号通路

Wnt(Wingless/Integrated)信号通路在骨形成中发挥重要作用,参与干细胞的分化调控^[5],并且可以参与细胞对机械信号响应的过程,因此,对微纳米

分级形貌钛表面促进细胞成骨向分化的分子机制研究最初即聚焦于 Wnt 信号通路及 Wnt 信号通路与其他信号通路的交互作用。微纳米分级形貌可以调控 Wnt/ β -catenin 信号通路的调节因子(激活剂和拮抗剂)来激活此信号通路,从而进一步促进材料表面细胞的成骨向分化。研究表明,微纳米分级形貌可以促进 MG63 细胞经典 Wnt 蛋白 Wnt3a、Wnt 受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 6(LDL receptor related protein 6,LRP6)的表达,从而促进 β -catenin 的入核,激活经典 Wnt 信号通路,同时能够下调 Wnt/ β -catenin 信号通路的拮抗剂 sFRP1(secreted Frizzled-related 1)、sFRP2(secreted Frizzled-related 2)、Dkk1(Dickkopf1)以及 Dkk2(Dickkopf2),活化 Wnt 信号通路,进而上调成骨向分化相关基因 RUNX2、碱性磷酸酶(ALP)及骨形态发生蛋白(BMP)的 mRNA 表达水平,促进成骨向分化;加入外源性的 Wnt 信号通路抑制剂 DKK1 可以抑制微纳米分级形貌表面促进 β -catenin 入核的作用,抑制 MG63 细胞的成骨向分化;而加入外源性 Wnt3a 可以促进光滑钛表面 β -catenin 的入核从而促进 MG63 细胞成骨向分化^[6],也验证了 Wnt/ β -catenin 信号通路在表面形貌调控细胞命运的过程中发挥了重要作用。体内实验报道了与之一致的结果:过表达 DKK1,种植体周围抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)活性明显增强,证明抑制 Wnt 信号通路能够增强种植体周围破骨细胞活性进而促进骨吸收;而加入外源性经典 Wnt 信号通路激活分子 Wnt3a 蛋白,种植体周围组织的 ALP、I 型胶原蛋白水平均上调,证实 Wnt3a 能够促进细胞的成骨向分化及种植体周

基金项目 国家自然科学基金(81970958);天津市研究生科研创新项目(2019YJSS170)

作者简介 高倩(1995-),女,硕士在读,研究方向:口腔材料;通信作者:隋磊,E-mail:suilei@tmu.edu.cn。

围组织的基质矿化,进而加快种植体周围骨形成。然而目前对 Wnt/ β -catenin 信号通路在微纳米分级形貌促进成骨向分化过程中发挥作用的具体途径尚存在一定争议,在前述研究中^[6],微纳米分级形貌促进了经典 Wnt 信号通路蛋白 Wnt3a 表达,而并未上调非经典 Wnt 信号通路蛋白 Wnt5a 表达量,故认为经典 Wnt 信号通路在其中起关键作用,而另有学者对微纳米分级形貌表面培养的人骨髓间充质干细胞(HMSCs)进行研究,结果显示 Wnt3a 的高表达可以促进细胞增殖,而对于细胞成骨向分化作用不大,而非经典 Wnt 信号通路蛋白 Wnt11 能够调控成骨向分化相关基因的 mRNA 以及蛋白水平的表达,在微纳米分级形貌促进细胞成骨向分化的过程中发挥更为显著的作用^[7]。

Wnt 信号通路 with 细胞黏附相关分子通路之间的交互作用也在微纳米分级形貌调控细胞成骨向分化中发挥一定作用。微纳米分级形貌可以激活黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)和黏着斑信号通路^[8],促进整合素相关激酶(integrin-linked kinase,ILK)的 mRNA 及蛋白表达,进而激活 β -catenin、RUNX2、ALP 及 BMP 的 mRNA 表达,促进 MG63 细胞的成骨向分化;同时微纳米分级形貌也可以降低 N-钙黏蛋白的表达,从而激活 β -catenin,促进 MC3T3-E1 细胞的成骨向分化^[9]。

此外,微纳米分级形貌通过 Wnt 信号通路调控细胞成骨向分化还与包括 RhoA、Rac 以及 Cdc42 等调控细胞骨架重组的 Rho GTP 酶家族密切相关,微纳米分级形貌可以上调 ROCK 表达,进而促进 Wnt5a 表达,促进 β -catenin 核聚集,最终促进大鼠骨髓间充质干细胞的成骨向分化^[10];同时也能够增强 Cdc42 的活性进一步促进 β -catenin 入核及细胞成骨向分化^[11]。

2 Hedgehog-Gli1 信号通路

Hedgehog-Gli1 信号通路可以调控细胞成骨向分化并参与骨形成的过程^[12]。对接种于微纳米分级形貌钛表面的 MG63 细胞的研究发现,微纳米分级形貌能够促进 Hedgehog 家族蛋白 Shh(Sonic hedgehog)、细胞膜受体蛋白 Smo(Smoothed)以及下游蛋白 Gli1 的表达,通过上调成骨向分化相关基因 RUNX2、ALP、OCN 及 BMP2 的 mRNA 表达水平促进 MG63 细胞成骨向分化,同时发现这一作用可以被 Smo 抑制剂 cyclopamine 抑制^[13],表明 Hedgehog-Gli1 信号通路参与了微纳米分级形貌表面调控细胞成骨向分化的过程,但其具体分子机制仍需深入探究。

3 YAP/TAZ

YAP/TAZ 是重要的机械响应分子,参与诸如基底硬度、剪切力等机械因素调控细胞命运的过程,且在细胞成骨向分化具有重要作用^[14]。在微纳米分级形貌调控干细胞分化过程中,YAP^[15]和 TAZ^[16]机械信号转导作用的发挥与细胞骨架^[17]密切相关。研究表明,微纳米分级形貌可以激活细胞骨架结合蛋白 AMOT130,从而促进 F-actin 的形成,促进 YAP 的核定位,进而激活成骨相关基因的表达^[18],敲低 YAP 可以消除微纳米分级形貌的促成骨作用,而抑制细胞骨架的聚合可以消除微纳米分级形貌对 YAP 的激活作用^[15]。

另外,微纳米分级形貌通过激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路中的 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、细胞外信号调节激酶(ERK)通路,进而活化 YAP/TAZ,通过增加 TAZ 的核定位及转录活性从而促进 HMSCs 的成骨向分化,采用 JNK 和 ERK 的特异性抑制剂能够抑制微纳米分级形貌表面对 TAZ 的转录激活及促进其核易位的作用^[19]。

此外,微纳米分级形貌作为机械信号调控细胞命运,依赖于细胞对形貌的感知,与细胞表面黏着斑信号通路的响应密不可分;而同时,黏着斑信号通路关键因子 ILK 可以调控作为 YAP/TAZ 上游的 MAPK 信号通路中的 ERK、P38 信号通路,从而参与微纳米分级形貌表面调节 MG63 细胞的成骨向分化^[19]。另外有研究表明 YAP 能够响应机械刺激,通过激活黏附相关蛋白的表达以及稳定细胞骨架与细胞膜的锚定而调控黏着斑的组装^[20],上述线索提示黏着斑信号通路可能参与了 YAP/TAZ 介导的表面形貌因素机械信号转导,并且各机械响应分子之间存在复杂的调控网络及正/负反馈调节机制。因此,YAP/TAZ 参与的微纳米分级形貌促进细胞成骨向分化的分子机制,仍需要更深入的探究。

4 表观遗传调控

除上述包含各个信号通路的分子机制外,表面形貌作为外源性因素能引起细胞表观遗传状态改变从而决定细胞命运的现象,也是微纳米分级形貌促进干细胞成骨向分化分子机制研究的重要内容之一。细胞可以被视为一个力学单位,通过其表面的黏附相关分子与外界基质相接触,表面形貌等外界机械信号经由细胞表面黏附相关分子/细胞骨架/LINC 复合体/细胞核骨架途径贯穿整个力学单位,转导至细胞核,引起细胞核形态的变化,导致染色质状态发生改变,引起表观遗传学的改变,从而影响细胞分化方向。70 nm 直径的纳米管可以造成 Runx2 启

动子区的 H3K4 三甲基化修饰增多,从而促进脂肪来源干细胞的成骨向分化^[21];微纳米分级形貌钛表面能够快速去除成骨相关基因启动子区组蛋白 H3K27 甲基化,增加组蛋白 H3K4 三甲基化水平,打破基因转录的抑制状态,从而促进骨髓间充质干细胞的成骨向分化^[22]。探究微纳米分级形貌通过表观遗传机制调控细胞命运是目前本领域的热点之一,其原因有二:一是表观遗传学调控是稳定且可遗传的改变,因此在分化调控机制研究的同时也可评价材料的生物安全性;二是表观遗传学调控与分子生物学信号通路可能共同组成调控网络,对表观遗传调控机制的研究有望将以往零散的信号通路线索连接起来,从而为微纳米分级形貌调控细胞成骨向分化提供更加全面的理解。

5 骨免疫调控

近年来,表面形貌对骨免疫反应的调控日益受到重视,也为微纳米分级形貌促进细胞成骨向分化的机制研究提供了一个新的方向。研究表明,微纳米分级形貌表面能够通过 ERK/Beclin1 自噬信号通路促进巨噬细胞发生 M2 型极化,有利于抑制炎症,同时促进细胞成骨向分化^[23]。除此之外,研究表明,植入材料表面粗糙度能够影响免疫细胞的吸附与伸展,因此微纳米分级形貌是否能够通过改变免疫细胞的上述影响改变其免疫调控状态也值得进一步深入探究。

微纳米分级形貌作为调控细胞命运的微环境刺激因素,对于种植体周围细胞的成骨向分化具有至关重要的调控作用,影响骨整合的形成。对其调控细胞成骨向分化的内在分子机制的全面了解,有助于明确种植体表面改性的方向。目前微纳米分级表面形貌制备方法的改进如通过算法制备形貌芯片、3D 打印结合酸蚀或者碱热处理^[24]、控温酸蚀处理^[25]等,为微纳米分级形貌的精确可控制备提供了新的可能,也必将有力推动相关机制研究的深入开展。

参考文献:

- [1] Souza J M, Sordi M B, Kanazawa M, et al. Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration[J]. *Acta Biomater*, 2019, 94: 112
- [2] Chen L, Yong Y, Yang L J, et al. *In vitro* bioactivity and biocompatibility of Bio-Inspired Ti-6Al-4V alloy surfaces modified by combined laser micro/Nano structuring[J]. *Molecules*, 2020, 25(7): 1494
- [3] Zhang J, Liu J, Wang C, et al. A comparative study of the osteogenic performance between the hierarchical micro/submicro-textured 3D-printed Ti6Al4V surface and the SLA surface[J]. *Bioact Mater*, 2020, 5(1): 9
- [4] Xu R G, Hu X C, Yu X L, et al. Micro-/nano-topography of selective laser melting titanium enhances adhesion and proliferation and regulates adhesion-related gene expressions of human gingival fibroblasts and human gingival epithelial cells[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 5045
- [5] Zhao X F, Xie L, Wang Z Y, et al. ZBP1(DAI/DLM-1) promotes osteogenic differentiation while inhibiting adipogenic differentiation in mesenchymal stem cells through a positive feedback loop of Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Bone Res*, 2020, 8: 12
- [6] Wang W, Zhao L Z, Ma Q L, et al. The role of the Wnt/beta-catenin pathway in the effect of implant topography on MG63 differentiation[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(32): 7993
- [7] Boyan B D, Olivares-Navarrete R, Berge M B, et al. Role of wnt11 during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on microstructured titanium surfaces[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8588
- [8] Lopes H B, Souza A P, Freitas G P, et al. Effect of focal adhesion kinase inhibition on osteoblastic cells grown on Titanium with different topographies[J]. *J Appl Oral Sci*, 2020, 28: e20190156
- [9] Liu Q, Wang W, Zhang L, et al. Involvement of N-cadherin/beta-catenin interaction in the micro/nanotopography induced indirect mechanotransduction[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(24): 6206
- [10] Yu Y L, Shen X K, Liu J J, et al. Regulation of osteogenesis by micro/nano hierarchical titanium surfaces through a Rock-Wnt5a feedback loop[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, 170: 1
- [11] Li G, Song Y, Shi M, et al. Mechanisms of Cdc42-mediated rat MSC differentiation on micro/nano-textured topography[J]. *Acta Biomater*, 2017, 49: 235
- [12] Yang J, Andre P, Ye L, et al. The Hedgehog signalling pathway in bone formation[J]. *Int J Oral Sci*, 2015, 7(2): 73
- [13] Lin Y, Huang Y, He J, et al. Role of Hedgehog-Gli1 signaling in the enhanced proliferation and differentiation of MG63 cells enabled by hierarchical micro-/nanotextured topography[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 3267
- [14] Ke G, Fu X C, Hui T, et al. TAZ promotes the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via the p-SMAD3[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(2): 1101
- [15] Pan H H, Xie Y T, Zhang Z Q, et al. YAP-mediated mechanotransduction regulates osteogenic and adipogenic differentiation of BMSCs on hierarchical structure[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 152: 344
- [16] Hwang J H, Lee D H, Byun M R, et al. Nanotopological plate stimulates osteogenic differentiation through TAZ activation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3632
- [17] Ohashi K, Fujiwara S, Mizuno K. Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction[J]. *J Biochem*, 2017, 161(3): 245
- [18] Liu X, Hou W Q, He L, et al. AMOT130/YAP pathway in topography-induced BMSC osteoblastic differentiation[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 182: 110332
- [19] Wang W, Liu Q, Zhang Y M, et al. Involvement of ILK/ERK1/2 and ILK/p38 pathways in mediating the enhanced osteoblast differentiation by micro/nanotopography[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(8): 3705
- [20] Nardone G, Oliver-De J L C, Vrbsky J, et al. YAP regulates cell me-

- gent gemcitabine in platinum-paclitaxel refractory ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 90(3):593
- [16] Cannistra S A, Matulonis U A, Penson R T, et al. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(33):5180
- [17] Chekerov R, Hilpert F, Mahner S, et al. Sorafenib plus topotecan versus placebo plus topotecan for platinum-resistant ovarian cancer (TRIAS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(9):1247
- [18] Friedlander M, Hancock K C, Rischin D, et al. A phase II, open-label study evaluating pazopanib in patients with recurrent ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 119(1):32
- [19] Pignata S, Lorusso D, Scambia G, et al. Pazopanib plus weekly paclitaxel versus weekly paclitaxel alone for platinum-resistant or platinum-refractory advanced ovarian cancer (MITO 11): a randomised, open-label, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(5):561
- [20] Monk B J, Poveda A, Vergote I, et al. Anti-angiopoietin therapy with trebananib for recurrent ovarian cancer (TRINOVA-1): a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(8):799
- [21] Coxon A, Bready J, Min H, et al. Context-dependent role of angiopoietin-1 inhibition in the suppression of angiogenesis and tumor growth: implications for AMG 386, an angiopoietin-1/2-neutralizing peptibody[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(10):2641
- [22] Marth C, Vergote I, Scambia G, et al. ENGOT-ov-6/TRINOVA-2: Randomised, double-blind, phase 3 study of pegylated liposomal doxorubicin plus trebananib or placebo in women with recurrent partially platinum-sensitive or resistant ovarian cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2017, 70(10):111
- [23] Oza A M, Tinker A V, Oaknin A, et al. Antitumor activity and safety of the PARP inhibitor rucaparib in patients with high-grade ovarian carcinoma and a germline or somatic BRCA1 or BRCA2 mutation: Integrated analysis of data from Study 10 and ARIEL2[J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 147(2):267
- [24] Coleman R L, Handley K F, Burger R, et al. Demcizumab combined with paclitaxel for platinum-resistant ovarian, primary peritoneal, and fallopian tube cancer: The SIERRA open-label phase I b trial[J]. *Gynecol Oncol*, 2020, 157(2):386
- [25] Lindemann K, Gibbs E, Avall-Lundqvist E, et al. Chemotherapy vs tamoxifen in platinum-resistant ovarian cancer: a phase III, randomised, multicentre trial (Ovaresist)[J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(4):455
- [26] Argenta P A, Thomas S G, Judson P L, et al. A phase II study of fulvestrant in the treatment of multiply-recurrent epithelial ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 113(2):205
- [27] Smyth J F, Gourley C, Walker G, et al. Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor-positive patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(12):3617
- [28] Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, et al. Safety and antitumor activity of anti-PD-1 antibody, Nivolumab, in patients with platinum-resistant ovarian cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(34):4015
- [29] Matulonis U A, Shapira-Frommer R, Santin A D, et al. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer: results from the phase II KEYNOTE-100 study[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(7):1080
- [30] Konstantinopoulos P A, Waggoner S, Vidal G A, et al. Single-arm phases 1 and 2 trial of niraparib in combination with Pembrolizumab in patients with recurrent platinum-resistant ovarian carcinoma[J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5, (8):1141

(2020-08-16 收稿)

(上接第 309 页)

- chanics by controlling focal adhesion assembly [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:15321
- [21] Liu Y, Zhang P, Zhang X, et al. Thenanoscale geometry of TiO₂ nanotubes influences the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by modulating H3K4 trimethylation[J]. *Biomaterials*, 2015, 39:193
- [22] Zheng G Y, Guan B B, Hu P H, et al. Topographical cues of direct metal laser sintering titanium surfaces facilitate osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through epigenetic regulation[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(4):e12460
- [23] 雒静. 微纳米形貌调控小鼠巨噬细胞 M2 极化促进种植体表面成骨分化的机制及应用研究[D]. 空军军医大学, 2019
- [24] Li R, Chen K L, Wang Y, et al. Establishment of a 3D printing system for bone tissue engineering scaffold fabrication and the evaluation of its controllability over macro and micro structure precision[J]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 2019, 51(1):115
- [25] Hasegawa M, Saruta J, Hirota M, et al. A newly created meso-, micro-, and Nano-Scale rough Titanium surface promotes Bone-Implant integration[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3):783

(2020-09-10 收稿)