

整合素靶向肽促进 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的增殖

https://doi.org/10.12307/2022.728

贾麒麟¹, 黄晓夏¹, 郭建¹, 黄金勇², 郭晓斌³, 阿卜杜萨拉木·阿力木江¹, 吴桐¹, 马创¹

投稿日期: 2021-10-25

采用日期: 2021-12-10

修回日期: 2022-01-04

在线日期: 2022-01-14

中图分类号:

R459.9; R318; R394.2

文章编号:

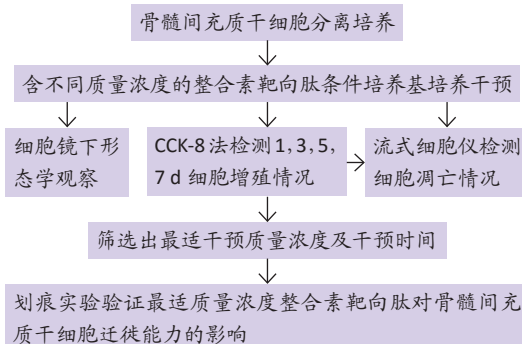
2095-4344(2022)30-04780-07

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△通过 F-moc 固相合成技术构建的整合素靶向肽集合了精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 序列和多巴胺 (DOPA) 基因两者优势, 可以抑制破骨细胞活化和促进细胞黏附, 在骨修复重建和牵张成骨技术领域具有极大的应用价值和发展潜力。
△探讨整合素靶向肽非改性状态下促进 SD 大鼠骨髓间充质干细胞增殖作用的最佳干预质量浓度及最佳干预时间, 为下一步整合素靶向肽诱导骨髓间充质干细胞向成骨分化和进一步在牵张成骨相关钛基材料改性中的应用奠定基础。



文题释义:

精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸多肽: 序列中含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸的短肽, 可显著提升细胞在生物材料表面的黏附能力, 广泛存在于纤维粘连蛋白、骨桥蛋白、血纤维蛋白、层粘连蛋白及玻连蛋白细胞外基质中。

多巴胺氨基酸: 来自海洋中紫贻贝类生物所分泌的多功能活性物质, 其具有良好的亲水性, 在碱性环境下易发生自聚-交联反应, 可在纯钛等材料表面形成聚多巴胺活性附着层。

摘要

背景: 研究报道整合素靶向肽多巴胺-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(dopamine-arginine-glycine-aspartic acid, DOPA-RGD)可以抑制破骨细胞活化和促进细胞黏附, 然而对于整合素靶向肽干预骨髓间充质干细胞或改性钛基材料的最适浓度及最适时间尚不明确。

目的: 探究DOPA-RGD肽促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖的最适干预质量浓度及最适干预时间。

方法: 体外分离培养SD大鼠骨髓间充质干细胞, 选取纯度达标的细胞进行下一步干预实验。96孔培养板中接种第3代骨髓间充质干细胞, 对照组细胞培养采用单纯 α -MEM完全培养基, 其余各实验组用含2.5, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L DOPA-RGD肽条件培养基培养, CCK-8法测定DOPA-RGD肽干预1, 3, 5, 7 d的细胞增殖情况, 筛选出DOPA-RGD肽干预骨髓间充质干细胞的最适质量浓度及干预时间, 流式细胞仪测定细胞凋亡率进一步验证最适干预质量浓度, 采取划痕实验验证最适质量浓度DOPA-RGD肽对骨髓间充质干细胞迁徙能力的影响。

结果与结论: ①重复测量方差分析结果显示, DOPA-RGD肽干预不同时间组间的吸光度值改变不同, 干预至第5天时增殖效果最佳, 存在显著性差异($F=3.012.618, P < 0.001$), 通过LSD法对分组因素行组间两两比较, 10 mg/L DOPA-RGD肽组与质量浓度 ≥ 20 mg/L的3个DOPA-RGD肽组及对照组比较存在显著性差异($P < 0.01$); ②细胞凋亡率测定显示, 与其余各组相比, 10 mg/L DOPA-RGD肽干预第5天可显著降低骨髓间充质干细胞的凋亡率($P < 0.001$); ③与对照组相比, 10 mg/L DOPA-RGD肽干预24 h后骨髓间充质干细胞呈现出一定迁徙能力, 迁徙速度明显加快; ④结果表明, 10 mg/L DOPA-RGD肽干预第5天对骨髓间充质干细胞有显著的促增殖效应。

关键词: 整合素; DOPA-RGD肽; 整合素靶向肽; 骨髓间充质干细胞; 细胞增殖; 细胞迁徙; 牵张成骨; 大鼠

缩略语: 多巴胺: dopamine, DOPA; 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸: arginine-glycine-aspartic acid, RGD

Integrin-targeted peptide promotes proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in SD rats

Jia Qiyu¹, Huang Xiaoxia¹, Guo Jian¹, Huang Jinyong², Guo Xiaobin³, Abdussalam·Alimujiang¹, Wu Tong¹, Ma Chuang¹

¹Department of Microprosthetic Surgery, ²Department of Traumatology and Orthopedics, ³Department of Joint Surgery, Orthopedic Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jia Qiyu, Master candidate, Department of Microprosthetic Surgery, Orthopedic Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Ma Chuang, PhD, Chief physician, Master's supervisor, Department of Microprosthetic Surgery, Orthopedic Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Studies have reported that integrin-targeted peptide dopamine-arginine-glycine-aspartic acid (DOPA-RGD) could inhibit osteoclast activation and promote cell adhesion, while the optimal concentration and optimal time to apply DOPA-RGD peptide to intervene with bone marrow mesenchymal stem cells or modified titanium-based materials are unclear.

新疆医科大学第一附属医院骨科中心, ¹显微修复外科, ²创伤骨科, ³关节外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

第一作者: 贾麒麟, 男, 1995年生, 浙江省金华市人, 汉族, 新疆医科大学第一附属医院骨科中心显微修复外科在读硕士, 主要从事细胞实验研究。

通讯作者: 马创, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 新疆医科大学第一附属医院骨科中心显微修复外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

https://orcid.org/0000-0003-1835-6665 (贾麒麟)

基金资助: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2020D01C263), 项目负责人: 郭晓斌; 国家自然科学基金(81760397), 项目负责人: 马创

引用本文: 贾麒麟, 黄晓夏, 郭建, 黄金勇, 郭晓斌, 阿卜杜萨拉木·阿力木江, 吴桐, 马创. 整合素靶向肽促进 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的增殖 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(30):4780-4786.



OBJECTIVE: To investigate the optimal mass concentration and the optimal intervention time of DOPA-RGD peptide to produce pro-proliferative effect when acting on bone marrow mesenchymal stem cells in rats.

METHODS: SD rat bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured *in vitro* and the cells with the required purity were selected for the next step of intervention. The third-generation bone marrow mesenchymal stem cells were inoculated in 96-well culture plates. Cells in the control group were cultured with simple α -MEM complete medium, while the remaining of the experimental groups were cultured with conditioned medium containing 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 mg/L DOPA-RGD peptide. Cell proliferation was measured by CCK-8 method after 1, 3, 5, and 7 days of DOPA-RGD peptide intervention. The optimal mass concentration and intervention time of DOPA-RGD peptide in bone marrow mesenchymal stem cells were selected, and the optimal mass concentration of DOPA-RGD peptide in bone marrow mesenchymal stem cells was further verified by apoptosis rate using flow cytometry. The effect of optimal mass concentration of DOPA-RGD peptide on the migration ability of bone marrow mesenchymal stem cells was verified by scratch assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Using repeated measures analysis of variance, the absorbance values of the cells intervened by DOPA-RGD peptide changed differently between different time length groups, and the best proliferation effect was achieved by the 5th day of intervention, and the difference was significant ($F=3.012.618, P < 0.001$). Paired comparison of grouping factors by the LSD method showed that there was a significant difference between the 10 mg/L DOPA-RGD peptide group and the three groups with concentrations greater than or equal to 20 mg/L and the control group ($P < 0.01$). (2) Apoptosis rate assay showed that DOPA-RGD peptide at a mass concentration of 10 mg/L on the fifth day of intervention significantly reduced the apoptosis rate of bone marrow stem cells compared with the rest of the groups ($P < 0.001$). (3) Compared with the control group, 10 mg/L DOPA-RGD peptide intervention for 24 hours showed some migration ability of bone marrow mesenchymal stem cells and the migration speed was significantly accelerated. (4) The results showed that 10 mg/L DOPA-RGD peptide intervention on day 5 had a significant pro-proliferative effect on bone marrow mesenchymal stem cells.

Key words: integrin; DOPA-RGD peptide; integrin-targeted peptide; bone marrow mesenchymal stem cells; cell proliferation; cell migration; distraction osteogenesis; rats

Funding: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2020D01C263 (to GXB); National Natural Science Foundation of China, No. 81760397 (to MC)

How to cite this article: JIA QY, HUANG XX, GUO J, HUANG JY, GUO XB, ALIMUJIANG A, WU T, MA C. Integrin-targeted peptide promotes proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in SD rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(30):4780-4786.

0 引言 Introduction

大段骨缺损的处理对外科医生和患者来说仍具有挑战性, 尽管包括组织工程在内的各个医学学科都取得了极大的进展, 但截肢的发生率仍然很高^[1]。值得注意的是, 在引入显微外科技术和自由组织转移概念之前, 截肢几乎是“唯一的解决方案”。在 20 世纪 50 年代中期, ILIZAROV 提出了牵张成骨的概念, 彻底改变了骨缺损的治疗方法^[2]。从那时起, 许多严重受伤的肢体都得到了挽救, 并取得了令人满意的结果。牵张成骨作为内源性骨组织工程, 目前被广泛应用于肢体大段骨缺损的修复以及四肢短缩畸形的矫正, 但其也存在新骨生成及矿化缓慢导致的带架时间长的局限性^[3], 严重影响患者的日常工作生活, 也极大地加重了患者的精神压力和经济负担。近年来, 髓内延长钉走进了骨科医生的视野, 由内芯钉(子钉)和中空套筒(母钉)构成的髓内延长钉系统, 既能用于肢体延长和部分肢体畸形的矫正, 还可用于骨搬运^[4]。该技术的应用减少了因依靠外固定架行下肢延长所导致的相关并发症, 如针道感染、关节僵硬、畸形、神经血管损伤、肌肉挛缩及移除外固定后再骨折等^[5-8], 且无需佩戴笨重的外固定架, 减少了患者的精神负担。

髓内延长钉虽然避免了许多依靠外固定架的延长技术所带来的问题, 但就目前来说仍有一些并发症无法避免, 疼痛是最常见并发症, 一定数量的患者需在麻醉下进行髓内延长^[9], 有文献报道存在 12% 的患者因拒绝接受麻醉最终导致股骨不完全延长^[10]。牵张率的不可控制也是早期髓内延长钉存在的主要问题, 这可能会导致骨不连、软组织损失和严重疼痛等严重并发症^[11-13]; 相关文献报道使用 ISKD 型髓内钉后有 8%–60% 的患者出现了骨再生不良的问题^[11, 14-15]。对最新髓内延长技术的进一步升级成为了亟待解决的问题, 通过组织工程学科交叉的特性去寻找答案也许是当下的最优选择。

研究显示, 骨髓间充质干细胞是牵张成骨过程中骨再生的关键因素之一^[16-17], 并有一系列相关研究显示其在促进骨折愈合及牵张区骨再生中起到了极大的作用^[18-20], 这为解决髓内延长钉相关并发症、缩短骨愈合时间提供了可能。随着

近年来材料学的蓬勃发展, 各种新型材料和生物涂层被应用于钛基材料的表面改性工程, 其中集合了精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartic acid, RGD)序列和多巴胺(dopamine, DOPA)基因两者优势的 DOPA-RGD 肽因其高度仿生、天然亲和的特性走进了学者的视野, 其被证实可以用于钛植入物表面的改性, 并起到改善植入物周围骨量的作用^[21-22], 其中起到主要作用的 RGD 序列已被证实可增强成骨细胞黏附、增殖、分化以及矿物质沉积^[23-25], 亦是迄今为止促进细胞在生物材料表面黏附的最有效和应用最多的小分子多肽^[26-27]。通过 RGD 多肽可对材料表面进行改性, 在材料表面为与受体介导的种子细胞提供特异性位点, 进而促进细胞的黏附和分化, 提高表面生物活性, 并在一定程度上赋予材料骨诱导功能, 改善植入材料的早期骨长入和基质矿化, 并诱导更多的骨接触到植入材料表面^[28]。KANTLEHNER 等^[29]通过浸泡 RGD 溶液对钛片进行表面改性, 结果观测到 RGD 序列可极大增强成骨细胞在钛板表面的黏附性。另外, MAS-MORUNO 等^[30]研究证实通过 RGD 序列修饰后的钛表面的细胞附着面积显著增加。DOPA 是启发于贻贝类生物所分泌的贻贝黏附蛋白, 是其发挥高黏附性的关键成分^[31-32], 已有研究表明该黏附蛋白能够提高细胞的黏附性^[33], 在骨组织工程中被广泛用于各种材料的表面改性^[34-35]。

然而 DOPA-RGD 肽是否具有促进骨髓间充质干细胞分化、增殖的作用尚无定论, 且 DOPA-RGD 肽干预骨髓间充质干细胞的最适改性质量浓度及最适时间也不明确。该研究旨在探讨 DOPA-RGD 肽非改性状态下对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞产生增殖作用的最适干预质量浓度及最适干预时间, 为进一步应用 DOPA-RGD 肽诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化和最终在髓内延长钉相关钛基材料改性中的应用奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 10 月至 2021 年 6 月在新疆医科大学第一附属医院科技楼完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠12只,4周龄,体质量120g,由新疆医科大学实验动物中心供应。在实验过程中严格按照中国动物医学伦理学标准及新疆医科大学动物中心实验室动物医学伦理学标准实施(伦理审批号:LACUC-20170222054)。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 实验试剂及仪器 磷酸盐缓冲液(Thermo,美国);胎牛血清(Hyclone,美国); α -MEM培养基(BI,以色列);青链霉素(Gibco,澳洲);胰蛋白酶/EDTA溶液(BI,以色列);倒置相差显微镜(Zeiss,德国);CCK-8(北京博奥森);细胞培养箱、酶标仪(Thermo,美国);CD45抗体(BD,美国);CD29抗体(BD,美国);CD34抗体(BD,美国);整合素靶向肽(DOPA)₄-S₅-GRGDS(江苏、申琅生物科技有限公司);流式细胞仪(BD,美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 SD大鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养 麻醉后断颈脱臼法处死SD大鼠,浸入体积分数为75%乙醇溶液中1min,置于无菌单上,用手术刀片沿股骨表面切开皮肤、肌肉,直达骨面,解脱髌、膝关节,将软组织完整剥除,抽出股骨,无菌纱进一步清理骨面残余软组织,取含10%双抗的磷酸盐缓冲液重复冲洗,组织剪剪开两端骨骺,10mL注射器抽取 α -MEM完全培养基,注入骨髓腔中冲出骨髓,然后用10,5,1mL注射器依次反复抽吸混匀骨髓液,直至骨髓液大体色泽均一,收集骨髓液上机离心(1500r/min、5min),更换培养基,继续重悬离心2次,末次重悬后将细胞悬液接种于培养瓶,置于CO₂细胞孵育箱,每3d全换液。

待细胞增殖至90%时进行传代,弃培养基,用适量磷酸盐缓冲液清洗细胞,用0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA消化细胞,按照1:2比例传代,倒置相差显微镜观察细胞形态,并摄片记录。

大鼠骨髓间充质干细胞的体外分离、培养及鉴定

细胞来源:	4周龄SD大鼠股骨骨髓
原代培养方法:	全骨髓贴壁培养法
基础培养基:	α -MEM基础培养基
添加材料:	体积分数为10%胎牛血清+1%青、链霉素+1%谷氨酰胺
原代细胞培养时间:	接种原代细胞3d后进行初次换液,以后每3d全换液1次,原代细胞培养周期为7-10d,待原代细胞融合率达约90%时进行传代
细胞传代:	细胞融合达约底面积90%时,用0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA消化,按1:2比例传代,培养的第3代细胞用于DOPA-RGD肽干预实验
细胞鉴定:	流式分析仪鉴定
伦理委员会批准:	实验方案经新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会批准,批准号为LACUC-20170222054

1.4.2 流式细胞鉴定 第3代骨髓间充质干细胞应用磷酸盐缓冲液充分清洗后,加入胰蛋白酶进行消化,加入 α -MEM完全培养基终止反应,将各组细胞单独收集于1.5mLEP管中,离心(1500r/min,5min),弃上清,加入1mL磷酸盐缓冲液重悬细胞,通过200目筛网将细胞悬液滤入EP管中,每管计数细胞约 1×10^6 个,各自加入CD45抗体3 μ L、CD29抗

体3.5 μ L、CD34抗体3 μ L,避光置于冰上孵育30min,再次离心弃上清,各加入400 μ L磷酸盐缓冲液重悬,分别移入流式管中,根据抗体调试流式细胞仪通道,上机测定CD29、CD45、CD34的抗原表达量。

1.4.3 CCK-8法确定DOPA-RGD肽的最佳干预时间及质量浓度 选取第3代生长状况良好的骨髓间充质干细胞接种于96孔板中,胰蛋白酶充分消化, α -MEM完全培养基稀释所得细胞,按5000个的单孔细胞量进行接种,各组设5个复孔,置于培养箱中继续培养,待细胞增殖至约50%时即可加入DOPA-RGD肽干预。空白组仅含 α -MEM完全培养基且无细胞,对照组采用单纯 α -MEM完全培养基培育细胞,实验组则采用质量浓度梯度分别为2.5,5,10,20,40,80mg/L的DOPA-RGD肽条件培养基进行细胞培育。待培养至1,3,5,7d时间点时,分别取出96孔板,预热普通恒温培养箱,注入CCK-8溶液(10 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C避光孵育2h,酶标仪测定吸光度值(波长:450nm),求得各组平均吸光度值,并以此作为纵坐标,绘制吸光度值在不同时间随DOPA-RGD肽质量浓度改变的折线图。

1.4.4 细胞凋亡率测定 对经CCK-8法筛选的DOPA-RGD肽最适干预质量浓度进行缩小区间进一步验证,并于增殖效应最佳的干预时间点,消化各组骨髓间充质干细胞,离心,加入2.5mL α -MEM培养基,吹匀,制成单细胞悬液,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.4.5 细胞迁徙实验 用 α -MEM完全培养基制备第3代大鼠骨髓间充质干细胞悬液,按 1×10^5 的单孔细胞量接种于6孔板中,并添加 α -MEM完全培养基1.5mL,12h后弃培养基,取100 μ L枪头于每孔做3条平行横行划痕,居中划痕位于孔中央,磷酸盐缓冲液清洗。对照组加入 α -MEM完全培养基培养,实验组则加入含10mg/LDOPA-RGD肽条件培养基,每组设2个复孔,分别于0,24,48h后镜下观测拍照,拍照时每条划痕应包括5个以上不同视野,对细胞迁徙程度进行记录分析。

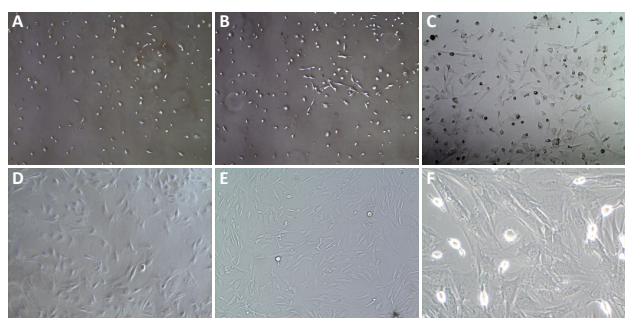
1.5 主要观察指标 ①倒置相差显微镜下SD大鼠骨髓间充质干细胞在不同培养阶段的形态及结构改变;②骨髓间充质干细胞流式细胞鉴定结果;③不同质量浓度DOPA-RGD肽作用下,骨髓间充质干细胞大体形态和生长趋势;④不同质量浓度DOPA-RGD肽作用下,骨髓间充质干细胞的增殖情况,并根据最终结果对DOPA-RGD肽最佳干预质量浓度及时长进行筛选;⑤划痕实验验证最适质量浓度DOPA-RGD肽对骨髓间充质干细胞迁徙能力的影响。

1.6 统计学分析 通过SPSS 26.0统计学软件进行数据的统计学分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准 $\alpha=0.05$,经K-S检验数据符合正态性($P > 0.05$),经Leven检验各组数据符合方差齐性。采用重复测量方差分析对数据主体效应进行检验,先进行球形检验,若球形检验 $P > 0.05$,表明服从球形假设,若不满足则采用多变量检验进行分析。文章统计学方法已通过新疆医科大学医学院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 大鼠骨髓间充质干细胞形态学变化 原代细胞体外分离培养的第3天,镜下可见大量的贴壁细胞,总体呈散状分布,

大体形态不统一，部分单侧伪足伸出，部分细胞整体呈梭形，两端均探出伪足，部分细胞有触角探出，另有部分呈多角形，见图 1A-C；轻轻晃动瓶身可见视野中存在漂浮的大量死细胞，对其进行清洗换液。首次换液时，镜下可见细胞密度较低，且分布不均，部分细胞呈聚集态成簇分布，少部分呈团块状，大概率为骨髓小粒未吹散，细胞整体饱满，折光性佳。生长达 10 d 时，细胞即可增殖至约瓶底面积的 90%。随之进入快速增殖阶段，并且随着代数的增加，生长排列愈发整齐，异型细胞逐渐减少，细胞大体形态趋向均一化，部分呈漩涡状生长，见图 1D-F。

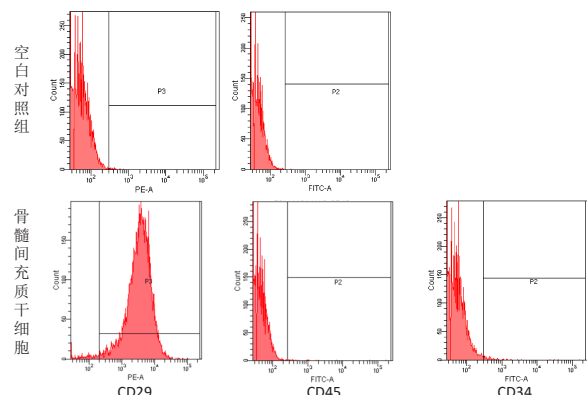


图注：图 A-C 为骨髓间充质干细胞体外分离培养 3 d 时的细胞形貌，50 倍镜下 (A, B) 可见未完全吹打均匀的簇状聚集细胞团块，细胞密度分布不均，部分细胞呈梭形、多边形生长，存在大量未贴壁的类型圆形漂浮细胞，100 倍明场视野下 (C) 细胞形态整体呈梭形及多边形，部分细胞呈多核分裂状态，胞核位于细胞中央；D-F 为第 3 代骨髓间充质干细胞，50 倍相差视野下 (D) 细胞整体形态均一，整齐规律排列，100 倍明场视野下 (E) 细胞核质结构清晰，未见漂浮细胞，200 倍镜下 (F) 细胞微观结构形态更为清晰，呈破棉絮状平铺于底壁，清晰可见细胞核位于细胞中央

图 1 | 骨髓间充质干细胞镜下大体形态

Figure 1 | General morphology of bone marrow mesenchymal stem cells under a microscope

2.2 流式鉴定结果 流式鉴定骨髓间充质干细胞，高表达间充质干细胞表面标志物 CD29(90.9%)，几乎不表达造血干细胞表面标志 CD34(1.0%) 和 CD45 (0.2%)，见图 2。鉴定结果符合间充质干细胞的特征，说明目的细胞纯度达要求，可应用于后续的实验。



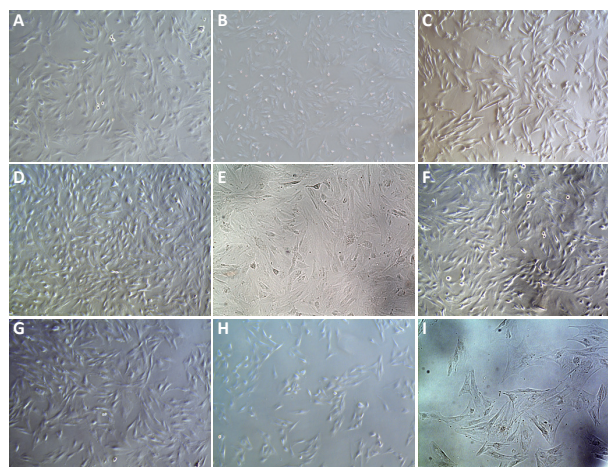
图注：骨髓间充质干细胞阳性表达 CD29(90.9%)，阴性表达 CD45(0.2%)，阴性表达 CD34(1.0%)

图 2 | 大鼠骨髓间充质干细胞表面标志物表达

Figure 2 | Expression of surface markers on rat bone marrow mesenchymal stem cells

2.3 DOPA-RGD 肽作用下骨髓间充质干细胞的形态变化 DOPA-RGD 肽作用第 1 天，质量浓度 > 20 mg/L 时，出现了细胞生长抑制现象，且随着 DOPA-RGD 肽质量浓度的升高，瓶中漂

浮的细胞愈发增多，凋亡现象较明显，细胞形态发生极大改变，部分仍为与之前一致的片状多极化生长，大部分细胞呈现两极化生长趋势，伪足呈细丝状改变，当质量浓度 ≤ 20 mg/L 时无显著变化，细胞仍呈密集化聚集生长，整体排布较为整齐，镜下可见均存在少量的漂浮细胞。DOPA-RGD 肽作用第 3 天，质量浓度 > 20 mg/L 时，细胞形态与第 1 天观察所见趋势相同，瓶底出现愈发增多的漂浮细胞，80 mg/L 组细胞大量凋亡，镜下细胞量显著减少；10 mg/L 组镜下可见仍存在少部分细胞漂浮于视野中，但细胞形态也已发生显著改变，形态呈多极化菱形趋势、聚集态生长，细胞密度显著高于其他组，且立体感更强，100 倍镜下细胞伸出的细丝状伪足互相交联呈网状。DOPA-RGD 肽作用第 5 天和第 7 天 时各组细胞形态变化趋势均同前一致，无显著改变，见图 3。



图注：图 A 为对照组第 3 代骨髓间充质干细胞，镜下细胞大体形态均一 (×50)；B 为 2.5 mg/L DOPA-RGD 肽干预第 3 天，较原生长特性无显著变化，排布整齐 (×50)；C 为 5 mg/L DOPA-RGD 肽干预第 3 天，部分细胞探出长条状伪足，细胞未出现显著增殖现象 (×50)；D 为 10 mg/L DOPA-RGD 肽干预第 3 天，小部分细胞凋亡漂浮于视野中，细胞呈立体化趋势，形态呈多极化菱形、聚集态生长，细胞密度显著高于其他组，部分细胞探出细丝状伪足 (×50)；E 为高倍镜下 10 mg/L DOPA-RGD 肽干预第 3 天，密集细胞满视野，伪足交织成网，细胞直径增大，核质结构清晰，细胞核位于细胞中央 (×100)；F 为 20 mg/L DOPA-RGD 肽干预第 3 天，大量细胞呈两极化生长 (×50)；G 为 40 mg/L DOPA-RGD 肽干预第 3 天，出现大量的漂浮细胞，贴壁细胞呈两极化生长，伪足细长，细胞聚集程度不均，排列不规整 (×50)；H 为 80 mg/L DOPA-RGD 肽干预第 3 天，细胞呈现大面积凋亡，贴壁细胞数量远小于其他组，且细胞形态不一 (×50)；I 为高倍镜下 80 mg/L DOPA-RGD 肽干预第 3 天，镜下细胞量显著减少，细胞形态整体向宽大方向发展，较对照组出现较高异型性 (×100)

图 3 | 经多巴胺-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (DOPA-RGD) 肽干预后骨髓间充质干细胞的形态变化

Figure 3 | Morphological changes induced by dopamine-arginine-glycine-aspartic acid (DOPA-RGD) peptide intervention in bone marrow mesenchymal stem cells

2.4 不同质量浓度 DOPA-RGD 肽对骨髓间充质干细胞增殖的影响 对所得数据行重复测量方差分析，结果表明经 DOPA-RGD 肽作用不同时间的骨髓间充质干细胞吸光度值改变不同，存在显著性差异 ($F=3\ 012.618$, $P < 0.001$)，说明随着 DOPA-RGD 肽作用时长增加，细胞增殖情况也随之发生明显改变。不同质量浓度 DOPA-RGD 肽干预骨髓间充质干细胞的吸光度值改变不同，存在显著性差异 ($F=7\ 421.033$, $P < 0.001$)，说明经不同质量浓度 DOPA-RGD 肽干预后，各组细胞增殖情况发生明显变化。

通过 LSD 法进一步对各组进行两两比较, 结果显示: 2.5 mg/L DOPA-RGD 肽组与质量浓度 ≥ 20 mg/L 的 3 个 DOPA-RGD 肽组及对照组比较均存在显著性差异 ($P < 0.05$); 5 mg/L DOPA-RGD 肽组与质量浓度 ≥ 20 mg/L 的 3 个 DOPA-RGD 肽组均存在显著性差异 ($P < 0.05$); 10 mg/L DOPA-RGD 肽组与质量浓度 ≥ 20 mg/L 的 3 个 DOPA-RGD 肽组及对照组比较差异均存在非常显著性差异 ($P < 0.01$); 20 mg/L DOPA-RGD 肽组与除对照组外的其他各组比较均存在显著性差异 ($P < 0.01$); 40 mg/L DOPA-RGD 肽组与 80 mg/L DOPA-RGD 肽组之间无显著差异 ($P > 0.05$), 40 mg/L DOPA-RGD 肽组与除 80 mg/L DOPA-RGD 肽组外的其他各组比较均存在显著性差异 ($P < 0.01$); 80 mg/L 组与质量浓度 ≤ 20 mg/L 组的 4 个 DOPA-RGD 肽组及对照组比较差异均存在显著性差异 ($P < 0.001$); 对照组与除 5, 20 mg/L DOPA-RGD 肽组外的其他组均存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

从各组吸光度值汇总数据中可以看出, 2.5–10 mg/L DOPA-RGD 肽组于第 5 天的吸光度值明显高于其余组, 随后整体呈下降趋势, 其中 10 mg/L DOPA-RGD 肽组在第 5 天和第 7 天吸光度值均最高。由此可见, 当质量浓度 ≤ 10 mg/L 的 DOPA-RGD 肽在干预 5 天时可促进细胞的增殖。DOPA-RGD 肽质量浓度 ≥ 20 mg/L 会促进细胞凋亡, 见表 1, 图 4。

表 1 | 不同质量浓度多巴胺-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (DOPA-RGD) 肽干预后骨髓间充质干细胞的吸光度值 ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Table 1 | Absorbance values of bone marrow mesenchymal stem cells after intervention with various concentrations of dopamine-arginine-glycine-aspartic acid (DOPA-RGD) peptide

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
对照组	0.364±0.043	0.983±0.128	2.076±0.202	1.782±0.043
2.5 mg/L DOPA-RGD 肽组	0.254±0.021 ^a	1.336±0.160 ^b	2.372±0.270 ^b	1.802±0.034 ^b
5 mg/L DOPA-RGD 肽组	0.236±0.017	1.122±0.091	2.347±0.275	1.940±0.048
10 mg/L DOPA-RGD 肽组	0.460±0.012 ^b	1.024±0.055 ^b	2.424±0.342 ^b	2.126±0.101 ^b
20 mg/L DOPA-RGD 肽组	0.477±0.051 ^{cde}	0.864±0.148 ^{cde}	1.859±0.052 ^{cde}	1.590±0.041 ^{cde}
40 mg/L DOPA-RGD 肽组	0.474±0.046 ^{bcdef}	0.562±0.083 ^{bcdef}	1.716±0.216 ^{bcdef}	1.169±0.073 ^{bcdef}
80 mg/L DOPA-RGD 肽组	0.503±0.022 ^{bcdef}	0.621±0.103 ^{bcdef}	1.582±0.081 ^{bcdef}	0.893±0.025 ^{bcdef}

表注: ① DOPA-RGD 肽干预不同时间后的细胞悬液吸光度值改变不同, 存在显著性差异 ($F=3\ 012.618$, $P < 0.001$); ② 不同质量浓度 DOPA-RGD 肽干预后的细胞悬液吸光度值改变不同, 存在显著性差异 ($F=7\ 421.033$, $P < 0.001$); ③ 两两比较结果, 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 2.5 mg/L DOPA-RGD 肽组比较, ^c $P < 0.01$; 与 5 mg/L DOPA-RGD 肽组比较, ^d $P < 0.01$; 与 10 mg/L DOPA-RGD 肽组比较, ^e $P < 0.01$; 与 20 mg/L DOPA-RGD 肽组比较, ^f $P < 0.01$

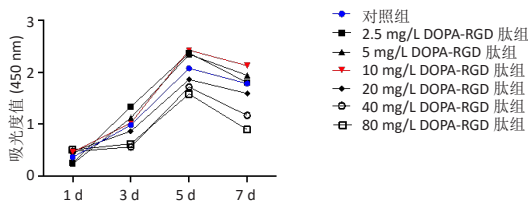
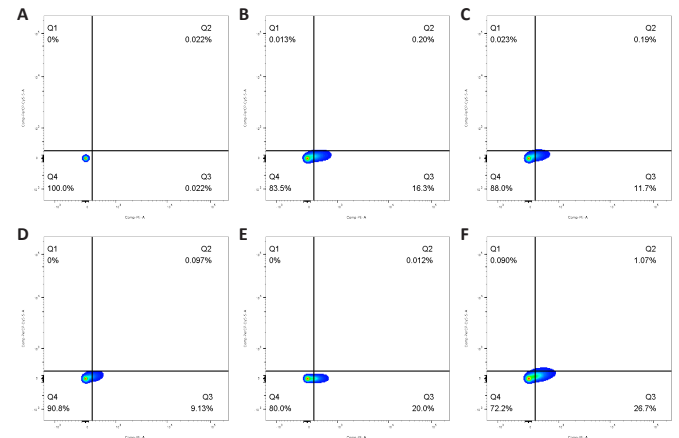


图 4 | 不同质量浓度多巴胺-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (DOPA-RGD) 肽干预后骨髓间充质干细胞的吸光度值折线图

Figure 4 | Folding line graphs of absorbance values of bone marrow mesenchymal stem cells with different mass concentrations of dopamine-arginine-glycine-aspartic acid (DOPA-RGD) peptide intervention

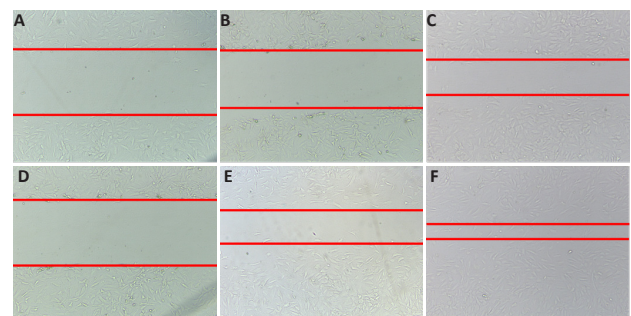
2.5 不同质量浓度 DOPA-RGD 肽对骨髓间充质干细胞凋亡的影响 在经 CCK-8 法确定的 DOPA-RGD 肽最佳干预时间, 即干预培养的第 5 天时, 单纯 α -MEM 培养基骨髓间充质干细胞凋亡率为 (16.24±0.86)%, 5, 10, 20, 40 mg/L DOPA-RGD 肽干预组细胞凋亡率为 (12.00±0.39)%, (9.22±0.54)%, (19.96±0.50)%, (27.88±0.24)%, 各组间方差分析结果表明均存在显著性差异 ($P < 0.001$), 该结果表明, 10 mg/L DOPA-RGD 肽干预第 5 天时可显著降低骨髓间充质干细胞的凋亡率, 当 DOPA-RGD 肽质量浓度 ≥ 20 mg/L 会促进细胞凋亡, 见图 5。



图注: 图 A 为空白组; B 为单纯 α -MEM 培养基对照组; C-F 为 5, 10, 20, 40 mg/L DOPA-RGD 肽干预组
图 5 | 不同质量浓度多巴胺-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (DOPA-RGD) 肽干预骨髓间充质干细胞第 5 天时的凋亡率

Figure 5 | Apoptosis rate of bone marrow mesenchymal stem cells at day 5 of intervention with various mass concentrations of dopamine-arginine-glycine-aspartic acid (DOPA-RGD) peptide

2.6 DOPA-RGD 肽对骨髓间充质干细胞迁徙能力的影响 相比于对照组, 10 mg/L DOPA-RGD 肽干预 24 h 骨髓间充质干细胞的迁徙速度明显加快; DOPA-RGD 肽干预 48 h 后骨髓间充质干细胞基本合拢, 但对照组细胞仍存有一定间隙, 提示 DOPA-RGD 肽可以明显提高骨髓间充质干细胞的迁徙能力, 见图 6。



图注: 图 A-C 分别为对照组 0, 24, 48 h 时的细胞分布情况; D-F 为 10 mg/L DOPA-RGD 肽条件培养基干预 0, 24, 48 h 时的细胞分布情况
图 6 | 在多巴胺-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (DOPA-RGD) 肽条件培养基中培养不同时间点骨髓间充质干细胞的迁移情况

Figure 6 | Migration of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in dopamine-arginine-glycine-aspartic acid (DOPA-RGD) peptide conditioned medium at different time points

3 讨论 Discussion

3.1 既往他人该领域研究的贡献和存在的问题 近年来髓内延长技术发展迅速,与国内仍采用外固定架进行延长不同,国外已逐渐将 Precice2 型髓内延长钉作为股骨延长术的首选植入物^[4]。采用髓内延长钉进行肢体延长及畸形矫正将是未来的研究热点,这是一项存在巨大潜力的新技术,尤其是面对一些复杂、难治的长骨畸形或骨不连来说更是如此。同时,如何预防相关并发症的发生也是在应用这一技术时不可回避的问题,DOPA-RGD 肽的钛基材料改性策略有望助力髓内延长技术以实现对新方法应用的新突破。

近几十年来,钛基材料表面生物改性技术得到了蓬勃发展。该研究中采用的 DOPA-RGD 仿生肽完整结构为 (DOPA)₄-S₅-GRGDS,由 C 末端的 RGD 序列和 N 末端的四肽 (DOPA)₄ 以及中部间隔的五肽 S₅ 组成,(DOPA)₄ 中的四价邻苯二酚基团可与钛基材料表层的 TiO₂ 相结合,形成稳定的 Ti-O-邻苯二酚配位。亲水性 S₅ 可减少非特异性表面蛋白的结合,提高细胞受体识别的可及性;RGD 序列作为细胞外基质蛋白与相应细胞的结合位点,可同相应黏附细胞膜表面整合素亚基识别结合,随之构成特异性黏附,并且转导生物信号,激活生长、增殖相关基因的转录,增强细胞黏附、增殖、分化和矿物质沉积^[36]。通过被称为“天然胶水”的 DOPA 氨基酸为媒介^[37],实现以仿生亲和的方式将 RGD 序列同髓内延长钉相结合,以期达到缩短骨愈合矿化时间、减少并发症发生的目的。

3.2 作者研究区别于他人他篇的特点 该研究首先对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的原代细胞进行分离与培养,结果表明,间充质干细胞本身具有良好的生长繁殖能力,自原代分离接种开始至可进行细胞传代的时间周期为 7-10 d。传至第 3 代时对其进行流式鉴定,其中 CD29 表达为 90.9%,同时阴性指标 CD34 和 CD45 的表达分别为 1.0% 和 0.2%,这表明所培育的种子细胞纯度符合实验要求,可用于下一步的药物作用实验。

GUO 等^[21]研究表明,源于紫贻贝足蛋白的整合素靶向 (DOPA)₄-S₅-GRGDS 可以很容易地被涂在钛板表面,可有效抑制经 RANKL 诱导的破骨细胞过度活化,在基因和蛋白水平上减少界面破骨细胞的生成,并且肽涂层的抑制作用可能与整合素靶向 RGD 序列有关,它能干扰整合素 $\alpha v \beta 3$,影响破骨细胞的细胞骨架组织和功能,进而抑制破骨细胞的过度活化和界面破骨细胞的生成。SECCHI 等^[38]将光滑的钛片表面进行了 RGD 肽的接枝改性,可观测到 RGD 修饰的钛板提高了成骨细胞的活性。ELMENGAARD 等^[39]在狗的胫骨中植入含或不含 RGD 涂层的 2 种钛合金内植物,结果表明 RGD 涂层组内植物周围骨量较对照组显著增多,RGD 涂层内植物周围的新生骨界面可承载更大的剪切力,具有更强的机械固定性。KROESE-DEUTMAN 等^[40]通过对 RGD 修饰钛基材料植入兔股骨头的实验,也得到了其具有促进内植物周围骨整合作用的结论。

鉴于上述研究,作者采用 DOPA-RGD 肽对骨髓间充质干细胞进行干预以促进其成骨分化,但尚无明确具体的干预质量浓度及时间。首先根据相关研究^[21-22],对 DOPA-RGD 肽干预大鼠骨髓间充质干细胞的质量浓度梯度进行设定,分别为 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L,并干预不同的时长,以

探究 DOPA-RGD 肽不同作用质量浓度和干预时长对细胞的影响。

从细胞形态学的角度来观测,随着作用药物质量浓度梯度的升高,细胞呈现不同程度的凋亡,当质量浓度 > 10 mg/L 时开始出现少量的漂浮细胞,这可能是经 DOPA-RGD 肽干预后细胞分化产生的代谢产物;当质量浓度上升至 20 mg/L 以上时,细胞凋亡趋势增加,可能是在此浓度区间 DOPA-RGD 肽已经初步产生对细胞的毒性作用;当测定质量浓度的最大值即 80 mg/L 时,DOPA-RGD 肽对细胞的毒性作用最为明显,呈现显著的凋亡现象。该结果表明,在适宜质量浓度范围下的 DOPA-RGD 肽干预骨髓间充质干细胞时,可诱导骨髓间充质干细胞分化为所需的靶细胞,当质量浓度超出适宜范围,则会对细胞产生毒性作用,并导致细胞死亡。随着干预时长的增加,10 mg/L DOPA-RGD 肽诱导至第 3 天时可见细胞立体化趋势更强,形态呈多极化菱形趋势、聚集态生长,细胞密度显著高于其他组,部分细胞探出细丝状伪足,致密的伪足相互交织成网,细胞直径增大,周围的细胞呈簇状生长相互聚集,形成一个管腔样结构。

经 CCK-8 法测定 DOPA-RGD 肽对骨髓间充质干细胞增殖的影响,并确定药物质量浓度与细胞增殖之间的关系,从而探明促进细胞增殖的最适给药质量浓度及给药时长。对所得结果进行统计分析发现,当考虑干预时长因素时,经 DOPA-RGD 肽干预不同时间的间充质干细胞吸光度值变化存在显著性差异,DOPA-RGD 肽作用于骨髓间充质干细胞时,延长干预时长其增殖效应会随之发生改变,当超过适宜时间节点时,细胞增殖速度会大幅降低,由此可见并不是 DOPA-RGD 肽干预诱导的时间越长越好。不同质量浓度的 DOPA-RGD 肽组吸光度值差异也存在显著性。正如结果中看到的那样,当采用质量浓度较低的 DOPA-RGD 肽进行细胞干预时,会产生一定的增殖作用,并且也不会促进细胞凋亡,而随着 DOPA-RGD 肽质量浓度增加,≥ 20 mg/L 时会促进骨髓间充质干细胞的凋亡,但这仍需要进一步实验加以验证。经分析得出 2.5 mg/L DOPA-RGD 肽组在干预 3 d 时对细胞的增殖效应显著;10 mg/L DOPA-RGD 肽组在干预 5 d 及 7 d 时对细胞有增殖作用,且效果最佳。上述结论也在后续进一步细胞凋亡实验中得到了证实,10 mg/L DOPA-RGD 肽的最适干预质量浓度也提示可以显著提高骨髓间充质干细胞的迁徙能力。

综上所述,DOPA-RGD 肽可显著且有效地促进骨髓间充质干细胞体外增殖,10 mg/L DOPA-RGD 肽诱导 5, 7 d 时对细胞增殖作用最强,2.5 mg/L DOPA-RGD 肽诱导 3 d 时的细胞增殖效果最佳。低质量浓度的 DOPA-RGD 肽能有效促进骨髓间充质干细胞增殖,而高质量浓度 DOPA-RGD 肽会促进细胞凋亡。

3.3 研究的局限性及重要意义 该实验并未将 DOPA-RGD 肽以改性钛基材料的方式与大鼠骨髓间充质干细胞进行共培养加以验证 DOPA-RGD 肽对于骨髓间充质干细胞的影响,而是选择先以 DOPA-RGD 条件培养基的形式去验证其单独的细胞毒性和增殖效应;其次,未对 DOPA-RGD 肽干预后的骨髓间充质干细胞进行再次鉴定,观测其是否因 DOPA-RGD 肽的相关诱导成骨分化功能而导致细胞特性的改变,这将在后续的

成骨诱导实验中加以验证。另外,考虑到对有代表性的干预时间和质量浓度进行高倍镜突出呈现结果的原因,并未选择采用横排为时间、纵列为质量浓度的阵列方式进行结果呈现。基于此次研究,可进一步进行 DOPA-RGD 肽改性的钛基材料促进骨髓间充质干细胞增殖及诱导其成骨分化的研究,并通过相关的通路来阐明 DOPA-RGD 肽诱导骨髓间充质干细胞增殖及其凋亡的原因,为加快髓内牵张成骨动物模型的骨愈合奠定研究基础。对髓内延长钉以及相关钛植入物的改性研究提供了新思路,并且为改善牵张成骨并发症的探索拓展了空间。

致谢: 感谢新疆医科大学动物实验中心给予实验的大力支持。

作者贡献: 所有作者均参与了实验过程,第一作者完成初稿,通讯作者审核。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》;文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重;文章经小同行外审专家双盲审稿,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- GIANNOUDIS PV, CALORI GM, BÉGUÉ T, et al. Tissue loss and bone repair: Time to develop an international strategy? *Injury*. 2015;46 Suppl 8:S1-2.
- PAPAKOSTIDIS C, BHANDARI M, GIANNOUDIS PV. Distraction osteogenesis in the treatment of long bone defects of the lower limbs: effectiveness, complications and clinical results; a systematic review and meta-analysis. *Bone Joint J*. 2013;95-B(12):1673-1680.
- VERLINDEN CR, VAN DE VIJFEIJKEN SE, TUINZING DB, et al. Complications of mandibular distraction osteogenesis for developmental deformities: a systematic review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(1):44-49.
- 张进, 张永红, 王鈔琦, 等. 髓内延长钉技术的研究进展 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2021,35(5):642-647.
- PALEY D. Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. *Clin Orthop Relat Res*. 1990;(250):81-104.
- YANAGISAWA Y, ITO A, HARA Y, et al. Initial clinical trial of pins coated with fibroblast growth factor-2-apatite composite layer in external fixation of distal radius fractures. *J Orthop*. 2018;16(1):69-73.
- GATHEN M, PLOEGER MM, JAENISCH M, et al. Outcome evaluation of new calcium titanate schanz-screws for external fixators. First clinical results and cadaver studies. *J Mater Sci Mater Med*. 2019;30(11):124.
- BAKHSK K, ZIMRI FK, ATIQU-UR-REHMAN, et al. Outcome of complex non-unions of femoral fractures managed with Ilizarov method of distraction osteogenesis. *Pak J Med Sci*. 2019;35(4):1055-1059.
- GUICHET JM, DEROMEDIS B, DONNAN LT, et al. Gradual femoral lengthening with the Albizzia intramedullary nail. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85(5):838-848.
- GARCÍA-CIMBRELO E, CURTO DE LA MANO A, GARCÍA-REY E, et al. The intramedullary elongation nail for femoral lengthening. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84(7):971-977.
- LEE DH, RYU KJ, SONG HR, et al. Complications of the Intramedullary Skeletal Kinetic Distractor (ISKD) in distraction osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(12):3852-3859.
- KRIEG AH, LENZE U, SPETH BM, et al. Intramedullary leg lengthening with a motorized nail. *Acta Orthop*. 2011;82(3):344-350.
- COLE JD, JUSTIN D, KASPARIS T, et al. The intramedullary skeletal kinetic distractor (ISKD): first clinical results of a new intramedullary nail for lengthening of the femur and tibia. *Injury*. 2001;32 Suppl 4:SD129-139.
- WANG K, EDWARDS E. Intramedullary skeletal kinetic distractor in the treatment of leg length discrepancy a review of 16 cases and analysis of complications. *J Orthop Trauma*. 2012;26(9):e138-144.
- GUICHET JM, SPIVAK JM, TROUILLOU P, et al. Lower limb-length discrepancy. An epidemiologic study. *Clin Orthop Relat Res*. 1991;(272):235-241.
- QI MC, ZOU SJ, HAN LC, et al. Expression of bone-related genes in bone marrow MSCs after cyclic mechanical strain: implications for distraction osteogenesis. *Int J Oral Sci*. 2009;1(3):143-150.
- QI MC, HU J, ZOU SJ, et al. Mechanical strain induces osteogenic differentiation: Cbfa1 and Ets-1 expression in stretched rat mesenchymal stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(5):453-458.
- 姜涛, 吴硕, 李志强, 等. 血小板衍生生长因子 BB 促进 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的增殖 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(13):1976-1981.
- PEREZ JR, KOUROUPIS D, LI DJ, et al. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:105.
- DUCHAMP DE LAGENESTE O, JULIEN A, Abou-Khalil R, et al. Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. *Nat Commun*. 2018;9(1):773.
- GUO X, LIU Y, BAI J, et al. Efficient Inhibition of Wear-Debris-Induced Osteolysis by Surface Biomimetic Engineering of Titanium Implant with a Mussel-Derived Integrin-Targeting Peptide. *Adv Biosyst*. 2019;3(2):e1800253.
- PAN G, SUN S, ZHANG W, et al. Biomimetic Design of Mussel-Derived Bioactive Peptides for Dual-Functionalization of Titanium-Based Biomaterials. *J Am Chem Soc*. 2016;138(45):15078-15086.
- VERSTAPPEN JFM, JIN J, KOÇER G, et al. RGD-functionalized supported lipid bilayers modulate pre-osteoblast adherence and promote osteogenic differentiation. *J Biomed Mater Res A*. 2020;108(4):923-937.
- HORI N, UENO T, MINAMIKAWA H, et al. Electrostatic control of protein adsorption on UV-photofunctionalized titanium. *Acta Biomater*. 2010;6(10):4175-4180.
- AITA H, HORI N, TAKEUCHI M, et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*. 2009;30(6):1015-1025.
- GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ M, ESCOBAR-BARRIOS VA, POZOS-GUILLÉN A, et al. RGD-functionalization of PLA/starch scaffolds obtained by electrospinning and evaluated in vitro for potential bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;96:798-806.
- LUO F, HONG G, MATSUI H, et al. Initial osteoblast adhesion and subsequent differentiation on zirconia surfaces are regulated by integrins and heparin-sensitive molecule. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:7657-7667.
- CHEN X, SEVILLA P, APARICIO C. Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;107:189-197.
- KANTLEHNER M, SCHAFFNER P, FINSINGER D, et al. Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem*. 2000;1(2):107-114.
- MAS-MORUNO C, FRAIOLI R, ALBERICIO F, et al. Novel peptide-based platform for the dual presentation of biologically active peptide motifs on biomaterials. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(9):6525-6536.
- WAITE JH. The DOPA Ephemera: A Recurrent Motif in Invertebrates. *Biol Bull*. 1992;183(1):178-184.
- WAITE JH. The phylogeny and chemical diversity of quinone-tanned glues and varnishes. *Comp Biochem Physiol B*. 1990;97(1):19-29.
- 李娜, 章非敏. 多巴胺与 I 型胶原对 MC3T3-E1 细胞初期粘附形态的影响 [J]. *口腔生物医学*, 2018,9(4):187-190.
- HUANG YZ, WANG JJ, HUANG YC, et al. Organic composite-mediated surface coating of human acellular bone matrix with strontium. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018;84:12-20.
- HUANG S, LIANG N, HU Y, et al. Polydopamine-Assisted Surface Modification for Bone Biosubstitutes. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2389895.
- DE JONGE LT, LEEUWENBURGH SC, WOLKE JG, et al. Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharm Res*. 2008;25(10):2357-2369.
- BRUBAKER CE, MESSERSMITH PB. Enzymatically degradable mussel-inspired adhesive hydrogel. *Biomacromolecules*. 2011;12(12):4326-4334.
- SECCHI AG, GRIGORIOU V, SHAPIRO IM, et al. RGDS peptides immobilized on titanium alloy stimulate bone cell attachment, differentiation and confer resistance to apoptosis. *J Biomed Mater Res A*. 2007;83(3):577-584.
- ELMENGAARD B, BECHTOLD JE, SØBALLE K. In vivo study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implants. *Biomaterials*. 2005;26(17):3521-3526.
- KROESE-DEUTMAN HC, VAN DEN DOLDER J, SPAUWEN PH, et al. Influence of RGD-loaded titanium implants on bone formation in vivo. *Tissue Eng*. 2005;11(11-12):1867-1875.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)