

# 基因/蛋白质组学技术在生物材料生物相容性研究中的应用

吕晓迎, 黄 炎, 俞亚东, 杨雅敏

(东南大学 生物电子学国家重点实验室, 南京 210096)

**摘 要:** 生物材料的生物相容性是生物材料研究领域的关键科学问题。分子生物学技术的发展使生物材料的生物相容性评价从动物水平和细胞水平深入到分子水平。生物组学技术的发展为高通量进行生物材料分子生物相容性评价、阐明生物材料与生物体的相互作用机理提供了有效的手段。本文综述了生物材料生物相容性研究现状及基因组学、蛋白质组学技术在生物材料生物相容性研究中的应用。

**关 键 词:** 基因组学; 蛋白质组学; 高通量; 生物材料; 生物相容性; 综述

中图分类号: R318

文献标识码: A

## Application of Genomics/Proteomics Technologies in the Research of Biocompatibility of Biomaterials

LÜ Xiao-Ying, HUANG Yan, YU Ya-Dong, YANG Ya-Min

(State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096, China)

**Abstract:** Biocompatibility is a key scientific issue in the research area of biomaterials. With the development of molecular biology techniques, the evaluation of biocompatibility of biomaterials has deepened from the animal level and cellular level to molecular level. The development of biomimetics technologies provide effective tools for high-throughput evaluating molecular biocompatibility on whole scale, and understanding the interaction mechanism between biomaterial and human body. In this paper, current research of biocompatibility and the application of biomimetics technologies in biocompatibility study of biomaterials were reviewed.

**Key words:** genomics; proteomics; high-throughput; biomaterials; molecular biocompatibility; review

生物材料的生物相容性是生物材料研究领域的关键科学问题。由于生物材料的质量和“人命关天”，因而良好的生物相容性是生物材料安全应用于临床的先决条件，所以任何生物材料在应用于临床前都必须进行充分的生物相容性评价。

由于受生物学和医学领域相关技术发展的限制，加上生物材料生物相容性评价具有相当的难度和复杂性，现有的标准和实验方法还不能完全满足生物材料安全应用于人体的要求，如现有标准体系推荐的方法大多是生物学和医学领域的一些早期的、简

单的技术和检测手段，并多停留在细胞水平，缺少当今生命科学领域中不断涌现的最新、最先进的技术和方法，因此对材料的有些潜在危害还无法及时灵敏地检测出来；对有些危害的检测标准还有待建立。上述这些标准的不完善之处也会增加生物材料的应用风险。因此，生物材料生物相容性评价标准和相应的实验方法需要与时俱进，不断更新和完善，特别应注重多引入原创性的工作，为生物材料从现阶段“可接受”水平过渡到“安全应用”于人体创造条件。

收稿日期: 2012-04-26; 收到修改稿日期: 2012-07-18

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划) (2009CB930000); 国家自然科学基金(31170910, 30770583, 30470478, 31271012); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20100092110027); 江苏省自然科学基金(BK2007109) Chinese Ministry of Science and Technology (973 Project, 2009CB930000); National Natural Science Foundation of China (31170910, 30770583, 30470478, 31271012); Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20100092110027); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2007109)

作者简介: 吕晓迎(1956-), 女, 教授. E-mail: luxy@seu.edu.cn

# 1 生物相容性的概念及其评价方法的发展

## 1.1 生物相容性的概念

生物相容性一词最早于 1970 年由 Hegyeli<sup>[1]</sup>和 Homsy 等<sup>[2]</sup>提出,而生物相容性在科学文献上得到普遍使用是在 20 多年以后。国际标准化组织 150 技术委员会第四工作组在 1987 年 10 月的 BANDOL 会议上将生物相容性定义为“生命体组织对非活性材料产生合乎要求的反应的一种性能”<sup>[3]</sup>,也有其他组织和研究者对生物相容性进行了定义(表 1)。2008 年,生物材料领域权威杂志 *Biomaterials* 主编 Williams 教授将生物相容性定义为“生物材料能实现其作为医学治疗所需的功能,不引起任何局部或全身不良反应,但能在特定的情形下产生最适当的有益的细胞或组织反应的能力”<sup>[6]</sup>。根据他的观点,在针对某一种特定用途的生物材料时,其生物相容性概念侧重点会有所不同。例如针对需要长期植入人体内的植入器件而言,其所用生物材料的生物相容性是指“生物材料与机体达到所需的融合程度及不引起局部或全身不良反应的能力”,即侧重于对机体安全性的评价;而针对组织工程中的生物材料,其生物相容性主要指“支架材料具有的支持细胞特定功能(包括激发细胞内分子信号通路及力学信号通路等),促进组织再生,且不引起机体内不必要的局部或全身不良反应的能力”,即满足安全性要求的同时,更加注重其功能性评价。

## 1.2 生物相容性评价方法的发展

迄今为止的生物材料生物相容性研究可以分为

动物、细胞和分子三个水平。动物水平评价可以真实全面地反映材料作用于机体后的整体状况,但是周期长、费用昂贵、实验复杂、不容易控制个体差异和干扰因素,而且动物实验结果并不一定能很好地外推到人类。细胞实验具有简便、快速、灵敏和经济等优点,且容易实现标准化,重复性好,但是不能很好地模拟体内复杂的生理环境。

借助已建立的动物实验和细胞实验方法虽然能够直接观察材料是否对机体和细胞产生影响,对材料的生物相容性做出定性定量的评价,但不能进一步揭示材料对机体和细胞的作用机理,只能回答“是什么”,而不能回答“为什么”的问题。事实上,生物材料作为“异物”植入人体后,其对生物体的作用往往首先从材料的表面形貌和基本组分(分子、离子、化学基团等)对生物体的基本结构—核酸、蛋白质等生物大分子(也叫“生物学终点”: bio-endpoint)的影响上表现出来,然后再引起细胞学和组织学变化。也就是说,细胞水平乃至整体水平的变化是由机体分子水平上的改变引起的。所以,只有在分子水平上对生物材料的影响进行深入研究,才能揭示材料与机体相互作用的机理<sup>[7]</sup>。而且,由于分子水平上的改变先于细胞水平上的表现,当生物材料对机体的影响在细胞水平上表现出来之前,在分子水平上一定就已经可以检测到相应的变化。因此,生物材料分子生物相容性研究方法比细胞学方法更为快速、灵敏,对于生物材料的安全性评价具有更重要的意义。

1995 年,周来生教授首先提出了在分子水平上对生物材料生物相容性进行评价,并通过 RNA 印

表 1 生物相容性的定义  
Table 1 Definitions of biocompatibility

	Definition	Source
1986	Biocompatibility is the capability of a prosthesis implanted in the body to exist in harmony with tissue without causing deleterious changes.	International Dictionary of Medicine and Biology Williams D F <sup>[4]</sup>
1987	Biocompatibility refers to the ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific situation.	
2003	The quality of not having toxic or injurious effects on biological systems.	Dorland's Medical Dictionary Rickert D <sup>[5]</sup>
2006	“Biocompatibility” is defined not only by the lack of cytotoxicity of a biomaterial, but also by the biofunctionality of the material, which enables it to support cell–biomaterial interactions according to the local and organ-specific situation where the biomaterial is applied.	
2008	Comparison of the tissue response produced through the close association of the implanted candidate material to its implant site within the host animal to that tissue response recognized and established as suitable with control materials.	American Society for Testing and Materials (ASTM) Williams D F <sup>[6]</sup>
2008	Biocompatibility refers to the ability of a biomaterial to perform its desired function with respect to a medical therapy, without eliciting any undesirable local or systemic effects in the recipient or beneficiary of that therapy, but generating the most appropriate beneficial cellular or tissue response in that specific situation, and optimising the clinically relevant performance of that therapy.	

迹法证明了镀钛硅片的表面形貌对细胞形态的改变、纤连蛋白在 mRNA 水平上的调节等产生影响<sup>[8]</sup>。他还发现通过调节转录和转录后水平的基质金属蛋白表达能够控制相连组织的重塑过程<sup>[9-10]</sup>。随后,一些研究者采用逆转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)、原位核酸分子杂交法、RNA 印迹分子杂交法、酶联免疫法、蛋白印迹法等多种分子生物学方法研究了不同生物材料与细胞作用后对细胞内 mRNA、细胞因子、蛋白质表达的影响<sup>[11-13]</sup>。

上述分子生物学技术为在分子水平上评价生物材料的生物相容性提供了更加灵敏有效的手段,但是这些传统的生物分子学方法偏重于研究单个或部分基因/蛋白质的变化,费时、费钱、工作量大、难于自动化,无法在全基因组和蛋白质组范围进行高通量、大规模的研究,因而不能全面系统地认识生物材料在分子水平上对机体产生的影响。事实上,任何一种生理现象都是多个基因和蛋白质共同作用的结果,生物材料对机体产生的分子水平上的影响也往往与众多基因和蛋白质的作用有关。生物材料分子生物相容性研究只有从整体上全面考虑各个基因/蛋白质之间的相互关系,了解它们的共同作用,才能阐明生物材料对组织和细胞产生的不同影响(如抑制细胞增殖/细胞毒性或促进细胞增殖/分化等)的机理。基因组学、蛋白质组学等生物组学技术的发展使生命科学从对单个基因/蛋白质孤立进行研究发展到对整体基因/蛋白质高通量进行研究的崭新阶段,同时也为进行生物材料的分子生物相容性评价和机理研究提供了强有力的技术和方法。

## 2 基因组学技术和蛋白质组学技术

基因组学是研究生物基因组的组成,组内各基因的精确结构、相互关系和表达调控的科学。基因表达谱芯片技术是基因组学研究的一种有效手段,是目前技术比较成熟、应用最广泛的一种基因芯片,其原理是将细胞内的 mRNA 在逆转录反应中用不同颜色的荧光标记成探针,将探针混合后与芯片或微阵列板上的基因片段进行严格杂交,再通过不同波长的荧光扫描芯片,将扫描所得每一点荧光信号值自动输入计算机并进行信息处理,给出每一个点在不同波长下的荧光强度值及其比值,同时计算机还给出直观的显色图,这些信号代表了样品中的基因转录表达状况<sup>[14]</sup>。该技术可对组织或细胞内基因的表达状况进行高通量平行分析,为大规模研究基因调控及其机理,揭示不同层次多基因协同作用的生命过程提供了手段,目前已经在毒理

学、疾病相关基因的鉴别和药物筛选等领域得到了广泛应用。

蛋白质组学是一门对某一生物或细胞在特定生理或病理状态下表达的所有蛋白质的特征、数量和功能进行系统性研究的科学<sup>[15]</sup>,其主要的研究手段是将来源于不同刺激下的细胞内的蛋白质样品提取出来,然后采用高通量双向凝胶电泳进行分离,形成一个蛋白质组的二维图谱,通过图谱扫描和计算机图像识别系统对各蛋白质点进行计算和分析,筛选出与正常对照组细胞中提取的蛋白质相比发生差异表达的蛋白质点,再结合质谱技术和蛋白质信息学技术进行蛋白质的分析和鉴定,通过检索蛋白质数据库获得差异表达蛋白质的详细信息<sup>[16]</sup>。蛋白质组学技术已经应用于基础生物学、临床诊断和疾病标志物的鉴定、药物开发等研究中。

## 3 基因/蛋白质组学技术在生物材料生物相容性研究中的应用

基因组学和蛋白质组学技术作为最主要的两种生物组学技术,已经在生物材料生物相容性研究领域中得到越来越多的应用。以下结合本研究组十多年来的工作,对基因组学和蛋白质组学技术在不同种类生物材料生物相容性中的应用做一介绍。

### 3.1 生物医用金属材料及其无机涂层材料的生物相容性研究

金属生物材料通常用于人体硬组织如牙齿、骨、关节等和软组织如心脏瓣膜、脑膜、腹膜等的修复中。由于金属生物材料常常需要在体液环境中使用几年甚至几十年,其植入后导致的金属离子溶出可能对机体产生毒副作用,如铁离子会抑制细胞增殖相关基因的表达<sup>[17]</sup>。镍钛合金溶出的镍离子的毒性问题也引起了人们的关注。本研究组采用基因表达谱芯片技术结合生物信息学分析对镍离子的细胞毒性分子机理进行了研究,发现镍离子可能对细胞外基质、葡萄糖转运及肌动蛋白细胞骨架产生影响,引起细胞形态变化;可能导致细胞氧化性损伤,并影响蛋白质的合成;诱导 DNA 损伤,并抑制 DNA 损伤的修复机制,可能对细胞周期的进程产生延缓或停滞作用<sup>[6,18]</sup>。该研究结果不但得到了与从时间跨度 33 年(从 1970 年到 2003 年)的 317 篇文献中总结得出的用传统分子生物学方法研究镍离子与细胞作用分子机制<sup>[19]</sup>结果相一致的结论,还发现了在镍离子的诱导下细胞内电子传递链可能会被抑制和细胞外胶原有可能发生堆积等几项新的作用机制。这一结果表明,与传统分

子生物学研究方法相比,基因表达谱芯片技术可以快速、灵敏、高效、全面地在全基因组范围研究生物材料的细胞毒性机理,阐明细胞-材料相互作用的生物学过程。

为了使金属材料更加安全地应用于临床,研究者采用多种表面修饰技术如离子注入、表面涂层处理等以减少金属离子释放,改善其生物相容性。本研究组联合采用基因表达谱芯片技术、蛋白质组学技术和生物信息学分析研究了镍钛合金和氮化钛涂层镍钛合金与人脐静脉内皮细胞相互作用机制,研究表明,与无涂层镍钛合金相比,氮化钛涂层镍钛合金能够增加细胞肌动蛋白骨架的解聚平衡、对细胞粘附和抗血栓形成的能力显著增强、能促进细胞内蛋白质合成和能量代谢、通过加强细胞自身的修复机制,使细胞的抗凋亡能力增强、并减少炎症反应,促进细胞有丝分裂<sup>[20-22]</sup>。在此理论分析基础上,本研究组进一步针对细胞凋亡和炎症反应进行了验证,证明了氮化钛涂层镍钛合金的抗凋亡能力和抗炎反应能力均优于镍钛合金,该结果与上述生物信息学分析结果一致。

Lee 等<sup>[23]</sup>的研究发现,采用可吸收喷砂介质处理钛表面生长的成骨细胞中骨诱导基因的含量较高,而在机械加工钛表面,与粘附相关的基因的表达量较高。Sollazzo 等<sup>[24]</sup>的研究发现,氧化锆涂层处理可使与细胞周期调控、信号转导、免疫、细胞骨架成分等相关的基因发生差异表达。Derhami 等<sup>[25]</sup>的研究结果显示生长在纯钛表面的皮肤成纤维细胞中纤粘连蛋白和细胞骨架蛋白的表达量低于聚苯乙烯。Leven 等<sup>[26]</sup>研究了大鼠骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)在不同粗糙度的 Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V 片上培养 24 和 48 h 后的情况,发现在粗糙度较小的材料表面生长的细胞表现出成纤维细胞的形貌,而在粗糙度较大的材料表面生长的细胞则呈现上皮细胞的形貌。通过对在两种表面上生长的 MSCs 中与骨和软骨发育、细胞粘附、细胞外基质蛋白、转录因子、骨形态发生蛋白、磷脂酶、蛋白激酶相关基因的相对表达水平研究发现,在粗糙度较大材料表面上生长的细胞中与骨和软骨发育相关的基因也发生了上调表达,说明粗糙度并不是一个特定的成骨刺激因子。而造成细胞分化差异的原因可能与粗糙度较大的表面上细胞中转录因子 *Hox 1.4*、*PLA2* 和 *SMAD 4* 基因的上调表达有关。Zhao 等<sup>[27]</sup>比较了在钛和聚醚醚酮表面培养的成骨样细胞 MG-63 中的蛋白质表达谱,发现在两种材料表面,蛋白质表达变化的模式相似,且都涉及了与生物合

成、代谢和细胞粘附相关的通路。此外,聚醚醚酮对 mRNA 表达具有更强的抑制作用,从而导致细胞在其表面的增殖率较低。

### 3.2 生物医用无机非金属材料生物相容性研究

生物医用无机材料的发展历史悠久,主要包括生物陶瓷、生物玻璃和碳质材料等,其中羟基磷灰石(Hydroxypatite, HA)是受到研究人员广泛关注的一类无机材料。Xie 等<sup>[28]</sup>发现 HA 能够引起成骨细胞粘附、增殖、细胞外基质合成和分化相关的基因发生差异表达,这些基因可能与 HA 表面增强的成骨细胞分化有关。Song 等<sup>[29]</sup>的研究发现 HA 能够激活 ERK 信号通路,并引起包括 *SOX9* 在内的 11 个与钙调节和骨基质形成相关的基因发生上调表达,因而认为 HA 对 *ERK* 和 *SOX9* 的激活可能对理解细胞在分子水平上对 HA 的反应机制有重要的意义。也有研究者采用蛋白质组学技术开展了羟基磷灰石对细胞作用的研究。Xu 等<sup>[30]</sup>比较了 HA 和碳纳米管增强 HA 表面成骨细胞的蛋白质表达谱,发现与细胞骨架蛋白、代谢酶、信号分子和细胞生长蛋白等与细胞粘附和增殖相关的蛋白质在两种材料表面发生差异表达,且在 HA 表面培养的细胞中这些蛋白质表达普遍较高,表明这些细胞的增殖水平较高。该研究组还比较了 HA 和多壁碳纳米管增强 HA 表面成骨细胞的蛋白质表达谱,鉴定出 60 个差异表达蛋白质<sup>[31]</sup>。但采用多种生物信息学方法全面系统地揭示基因/蛋白质通过何种通路诱导成骨,基因/蛋白质之间又通过怎样的相互作用促进成骨分化的研究还未见报道。

本研究组采用基因组学中表达谱芯片技术和蛋白质组学中 iTRAQ 结合二维液相色谱-串联质谱(LC/MS/MS)的新技术研究了 HA 对小鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)的成骨诱导机理,发现天然 HA 可以通过影响一些关键基因,如 *Bmp2*、*Bmp4*、*Tgfb2*、*Bmp1*、*Bmpr1a*、*Bmp2k*、*Spp1*、*Tcfe3* 和 *Vdr* 等来激活 TGF- $\beta$  信号通路,调节 MSCs 的成骨分化。除此之外,Notch、MAPK、Wnt 等细胞生长、增殖、分化过程中十分重要的信号通路也可能在 HA 诱导 MSCs 成骨分化过程中发挥作用<sup>[32-33]</sup>。该研究除了找到文献中已经报道的成骨分化基因外,还发现了新的成骨分化相关基因。对蛋白质组学与基因组学实验结果的联合分析发现,MAPK 信号通路在天然 HA 诱导 MSCs 成骨分化过程中发挥重要作用,差异表达基因与蛋白质分布于该通路的上下游,且基因和蛋白质的上调或下调表达具有较好的一致性<sup>[34]</sup>。

通过对天然与合成 HA 与细胞作用的蛋白质组学实验结果的比较分析发现,两者对在其表面生长的 MSCs 的细胞迁移、氧化磷酸化、mRNA 代谢、骨骼的发育、肌肉与骨骼运动、钙离子体内平衡、片状伪足的形成等方面的影响相似,但对磷酸根离子体内平衡、微管细胞骨架的组织与形成、Wnt 受体信号通路、牙发生等重要功能的影响存在差异。

在其他生物无机材料研究方面,Carinci 等<sup>[35]</sup>筛选出了由 Bio-Oss 调控的成骨细胞中几个显著上调或下调的基因,这些基因涉及的功能包含有信号转导、转录、细胞周期调控、囊泡运输、凋亡、免疫等。Zhang 等<sup>[36]</sup>研究了多孔和致密平整磷酸钙陶瓷(羟基磷灰石、 $\beta$ -磷酸三钙、双相磷酸钙)对小鼠类成骨细胞中基因表达的影响,发现在两种不同形貌磷酸钙陶瓷表面培养的细胞中的基因表达谱不同,多孔表面对成骨细胞成熟的潜在影响高于平整表面。

### 3.3 生物纳米材料的生物相容性研究

纳米材料的诸多优越性使其在医学成像、诊断、药物治疗等生物医学领域获得越来越多的应用,然而纳米生物材料已经显示出一些特殊的生物效应以及对人体健康潜在的影响,但目前只是对众多纳米材料中很少的几种材料的生物效应开展了研究,且研究数据也很不全面。更重要的是,纳米生物材料与生物体的相互作用机理尚不清楚。

金、银纳米粒子是生物医学领域中受到广泛关注的两种纳米生物材料。Khan 等<sup>[37]</sup>研究发现 Hela 细胞与纳米金作用后,与应激、压力相关的基因发生差异表达。纳米金可能会诱发细胞产生由外源性物质引起的应激效应,能够使细胞抵御外界侵害,阻止细胞死亡。Kawata 等<sup>[38]</sup>发现不同浓度的纳米银对细胞的影响不同,低剂量的纳米银诱导与细胞周期相关的基因的显著表达,加速细胞的增殖;而高剂量纳米银则导致显著细胞毒性,造成染色体的损伤,并诱导细胞的形态发生异常改变。Kim 等<sup>[39]</sup>采用蛋白质组学方法研究了纳米银对小鼠内脏的影响,发现了与纳米银毒性如凋亡、活性氧、血栓形成等相关的蛋白质发生差异表达。

本研究组联合采用基因组学和蛋白质组学技术研究了金、银纳米粒子与人皮肤成纤维细胞的相互作用机理,发现两种纳米粒子对细胞的影响较为相似,如都影响细胞骨架、细胞粘附、能量代谢、基因表达调控过程、细胞周期等,并使细胞产生氧化应激,但所影响的基因/蛋白质的种类、作用的通路并不完全相同。两种纳米粒子对细胞作用的生物学

终点也有不同之处,如银纳米粒子能造成 DNA 损伤,而金纳米粒子没有造成这种影响<sup>[40-43]</sup>。此外,本研究组还发现了金、银纳米粒子与细胞相互作用的一些新的生物学效应,如金纳米粒子可能对 mRNA 加工、转录和翻译过程产生影响,并引起细胞内能量代谢的改变;银纳米粒子影响遗传信息传递相关生物学通路,包括转录起始、mRNA 加工、翻译因子和核糖体蛋白等。而在此基础上进行的一系列生物学验证实验(细胞凋亡、氧化应激、能量代谢、细胞骨架)均与这些生物信息学理论分析相一致。

除纳米粒子外,研究者也对其他纳米生物材料,如碳纳米管、TiO<sub>2</sub> 纳米管等进行了研究。Cui 等<sup>[44]</sup>发现单壁碳纳米管能够诱导一些细胞周期和信号转导相关基因差异表达,认为这种单壁碳纳米管通过诱导细胞凋亡和降低细胞粘附能力来抑制细胞的生长。Ding 等<sup>[45]</sup>发现多壁碳纳米管能扰乱成纤维细胞内多种细胞信号转导通路,并激活新陈代谢、细胞周期调节和压力响应等的相关基因的表达。Peng 等<sup>[46]</sup>发现, TiO<sub>2</sub> 纳米管与细胞作用后,与炎症和凝集分子相关的基因发生下调表达, TiO<sub>2</sub> 纳米管能够增强人内皮细胞的增殖和动力,而降低血管平滑肌细胞的增殖能力。

纳米纤维能够有效地模仿细胞外基质,为细胞提供良好的三维生长空间,并具有良好的组织诱导功能,因而已成为生物材料重要的组成部分。目前常用的纳米纤维生物材料有胶原、聚乳酸、聚己内酯、壳聚糖、明胶等。Chew 等<sup>[47]</sup>采用基因表达谱芯片技术发现定向聚己内酯(Polycaprolactone, PCL)纳米纤维能使施旺细胞中髓磷脂关联糖蛋白(MAG)基因、成熟标志基因 P0 上调表达,不成熟标记基因 NCAM-1 下调表达,说明定向电纺 PCL 纳米纤维更能促进施旺细胞的粘附和成熟。Agudelo-Garcia 等<sup>[48]</sup>发现了胶质瘤细胞在定向 PCL 纳米纤维上的迁移与神经胶质瘤恶性进展驱动子 STAT3 信号增强之间的关系,在亚致死浓度上, STAT3 信号的抑制可降低细胞迁移能力。He 等<sup>[49]</sup>发现与正常培养的内皮细胞相比,在定向及不定向胶原涂层聚乳酸-聚己内酯共聚物纳米纤维网上生长的内皮细胞形态都能维持稳定,且基因表达模式相似,表明该共聚物纳米纤维网内皮化的有效性和快速性。本研究组采用基因表达谱芯片对聚乳酸定向纳米纤维对大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12 细胞)分化的影响进行了研究,发现该定向纳米纤维能够通过整合蛋白介导的 MAPK 信号通路,促进 PC12 细胞的分化<sup>[50]</sup>。

除了上文中所总结的多种生物材料外, 基因/蛋白质组学技术也已应用于医用高分子材料和组织工程材料等的生物相容性研究中<sup>[51-55]</sup>。

## 4 总结与展望

迄今为止, 本研究组已成功采用基因组学和蛋白质组学技术进行了镍离子对 L929 细胞的毒性机理、镍钛合金/氮化钛涂层镍钛合金表面与人脐静脉内皮细胞相互作用机理、羟基磷灰石对小鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导作用机理、金/银纳米粒子与人皮肤成纤维细胞的相互作用机理、聚乳酸纳米纤维诱导 PC12 细胞生长机理等研究, 在十多年的研究过程中形成了一套完整的技术方案(图 1): 首先进行材料的制备与表征; 接着在细胞水平上评价材料对细胞形态、细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡等的影响; 然后进行生物组学实验, 包括基因组学、蛋白质组学实验等, 以获得材料与细胞作用的基因/蛋白质表达谱; 并进一步对获得的差异表达基因/蛋白质进行全面系统的生物信息学分析, 包括聚类、Gene Ontology(GO)功能分类、生物学通路和基因-基因、蛋白质-蛋白质相互作用网络分析等, 筛选出关键的基因/蛋白质及其参与的重要生物学功能通路; 在此基础上, 将“湿法”和“干法”相结

合, 采用多种传统的细胞/分子生物学方法对不同材料与细胞作用机理的理论分析结果进行系列实验验证(细胞凋亡、炎症反应、氧化应激、能量代谢、细胞骨架等), 最后综合上述细胞实验、组学实验、生物信息学分析和验证实验结果, 探讨不同材料与细胞作用的分子机制。

本研究组在采用两种生物组学方法, 同时分析材料对细胞中基因和蛋白质影响的研究中发现, 那些受到影响的差异表达基因和蛋白质的主要功能类别是相同的, 而且两者以多种方式共同参与了多个生物学通路, 因而据此得出的材料对细胞影响的基因和蛋白质两种分子机制相似, 说明细胞对于材料的响应在这两种分子水平上呈现出较大的相关性。但同时也发现, 差异表达基因数量远多于差异表达蛋白质, 因而涉及的 GO 功能类别、生物学通路和相互作用网络更为广泛。差异表达的基因-蛋白质并不存在一一对应关系, 即使存在对应关系, 两者的表达模式也并不完全相同。之所以产生这样的差异, 一部分的原因可能是目前对于蛋白质的研究不够深入和全面, 蛋白质数据库仍不完善, 但也可能与 mRNA 翻译为成熟蛋白质过程中复杂的转录及翻译后调控机制有关。随着近几年开始的对 microRNA(miRNA)的研究, 人们发现 miRNA 在 mRNA 翻译为蛋白质的过程中起着重要的作用。因此, 本研究

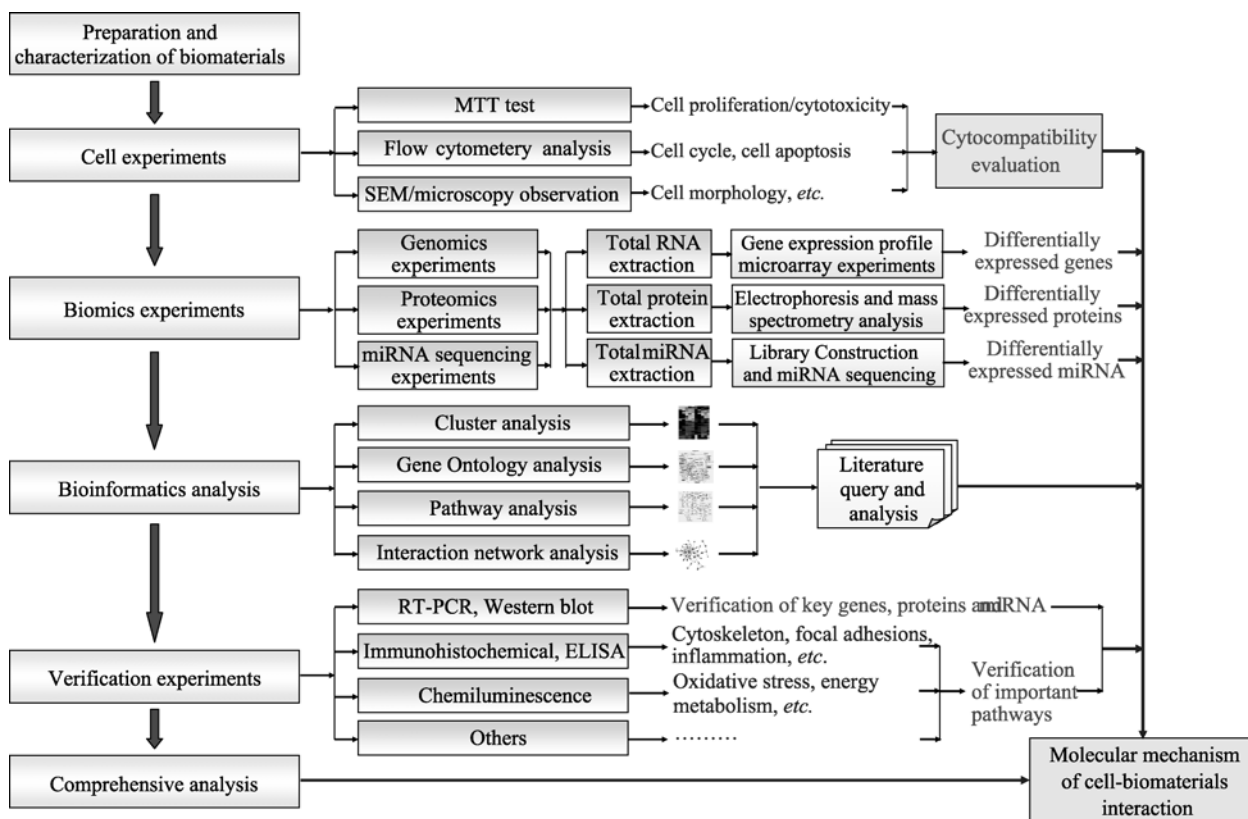


图 1 基于生物组学和生物信息学技术的生物材料分子生物相容性研究技术路线

Fig. 1 Common routes of the molecular biocompatibility study based on biomics and bioinformatics technologies

组进一步采用 miRNA 测序技术研究生物材料与细胞作用中 miRNA 的调控作用, 探讨基因-miRNA-蛋白质表达的内在联系及作用途径, 从 miRNA 的调控机理上解释上述两种生物组学实验结果的差异, 这一生物材料分子生物相容性研究的新思路还未见报道, 同时也进一步完善了上述技术路线。

本研究组采用图 1 所示的技术路线, 既找到了已有文献报道的材料与细胞相互作用的标志性差异表达基因/蛋白质, 也发现了新的相关基因/蛋白质差异表达及其新的生物学效应和作用机制。通过上述研究, 本研究组已在生物相容性评价方法研究中探索出了以机制、定量研究为主的“信息生物学”模式, 建立了应用基因/蛋白质组学/miRNA 测序技术、结合生物信息学分析与系列验证实验评价生物材料分子相容性的新的研究体系。

随着现代社会动物保护要求的提高, 生物材料安全性评价标准中提出了进一步“减少应用动物的数量、优化应用步骤、发展可代替动物试验的试验方法(3R)”的要求<sup>[56]</sup>, 而上述基因/蛋白质组学方法是可以达到该要求的理想替代实验方法<sup>[57]</sup>, 它们既可用于进行生物相容性基础研究, 即弄清生物材料与生物体间的相互作用关系, 阐明其作用机理; 也可用于应用研究, 即通过筛选不同生物材料与组织、细胞作用的标志性基因/蛋白质, 探索生物材料对细胞和生物大分子短时生物学效应和对机体长期毒性之间的对应关系, 从而对不同材料对机体可能产生的毒性作用进行预测, 指导新型生物材料的研制、开发和应用, 为减少实验动物用量、建立生物(纳米)材料安全性评价的新标准和新方法打下基础。

## 参考文献:

- [1] Hegyeli R J. Limitations of current techniques for assessing bio-hazards and biocompatibility of new candidate materials—orpl. *Abstracts of papers of the American Chemical Society*, 1970, 1.
- [2] Homsy C A, Ansevin KD, Obannon W, et al. Rapid in-vitro screening of polymers for biocompatibility. *J. Macromol. Sci. A*, 1970, **4(3)**: 615.
- [3] 顾汉卿, 徐国风. 生物医学材料学. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1993: 92.
- [4] Williams D F. Definitions in biomaterials. *Progress in biomedical engineering*, Amsterdam: Elsevier, 1987: 72.
- [5] Rickert D, Lendlein A, Peters I, et al. Biocompatibility testing of novel multifunctional polymeric biomaterials for tissue engineering applications in head and neck surgery: an overview. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2006, **263(3)**: 215–222.
- [6] Williams D F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 2008, **29(20)**: 2941–2953.
- [7] Lü XY, Bao X, Huang Y, et al. Mechanisms of cytotoxicity of nickel ions based on gene expression profiles. *Biomaterials*, 2009, **30(2)**: 141–148.
- [8] Chou L S, Firth J D, Uitto V J, et al. Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *J. Cell Sci.*, 1995, **108(4)**: 1563–1573.
- [9] Chou L S, Firth J D, Nathanson D, et al. Effects of titanium on transcriptional and post-transcriptional regulation of fibronectin in human fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996, **31(2)**: 209–217.
- [10] Chou L S, Firth J D, Uitto V J, et al. Effects of titanium substratum and grooved surface topography on metalloproteinase-2 expression in human fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, **39(3)**: 437–445.
- [11] Ripamonti U, Crooks J, Khoah L, et al. The induction of bone formation by coral-derived calcium carbonate/hydroxyapatite constructs. *Biomaterials*, 2009, **30(7)**: 1428–1439.
- [12] Park S H, Gil E S, Shi H, et al. Relationships between degradability of silk scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 2010, **31(24)**: 6162–6172.
- [13] Im D D, Kruger E A, Huang W B R, et al. Extracellular-signal-related kinase 1/2 is responsible for inhibition of osteogenesis in three-dimensional cultured MC3T3-E1 cells. *Tissue Eng. A*, 2010, **16(11)**: 3485–3494.
- [14] Brown P O, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet. (Suppl)*, 1999, **21(1)**: 33–37.
- [15] Peng J, Gygi S P. Proteomics: the move to mixtures. *J. Mass Spectrom.*, 2001, **36(10)**: 1083–1091.
- [16] Yuan Q, Zhao F K. New frontiers in the proteome research: quantitative proteomics. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica.*, 2001, **33(5)**: 477–482.
- [17] Mueller P P, May T, Perz A, et al. Control of muscle cell proliferation by ferrous iron. *Biomaterials*, 2006, **27(10)**: 2193–2200.
- [18] Lü X Y, Lu H Q, Zhao L F, et al. Genome-wide pathways analysis of nickel ion-induced differential genes expression in fibroblasts. *Biomaterials*, 2010, **31(8)**: 1965–1973.
- [19] Kasprzak K S, Sunderman F W, Salnikow K. Nickel carcinogenesis. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 2003, **533(1/2)**: 67–97.
- [20] Zhao L F, Hong Y, Yang D Y, et al. The underlying biological mechanisms of biocompatibility differences between bare and TiN-coated NiTi alloys. *Biomed. Mater.*, 2011, **6(2)**: 025012–1–12.
- [21] Hong Y, Zhao L F, Yang D Y, et al. Analyses of differentially expressed genes in human cell in response to uncoated and Ti-coated NiTi alloys. The 2011 International Conference on Information Science and Technology (ICIST 2011), Nanjing, 2011: 1377–1381.
- [22] Yang D Y, Hong Y, Zhao L F, et al. Proteomic analysis of human endothelial cells in response to bare and titanium nitride-coated NiTi alloys. 3rd Chinese-Europe Symposium on Biomaterials in Regenerative Medicine, Nanjing, 2011: 159.
- [23] Lee H, Ko S H. Microarray analysis of MC3T3-E1 osteoblastic cell response to machined titanium surface and resorbable blast material titanium surface. *Bone*, 2011, **48(Suppl 2)**: S111.
- [24] Sollazzo V, Palmieri A, Pezzetti F, et al. Genetic effect of zirconium oxide coating on osteoblast-like cells. *J. Biomed. Mater. Res.*



- B, 2008, **84B(2)**: 550–558.
- [25] Derhami K, Zheng J, Li L, *et al.* Proteomic analysis of human skin fibroblasts grown on titanium: novel approach to study molecular biocompatibility. *J. Biomed Mater Res.*, 2001, **56(2)**: 234–244.
- [26] Leven R M, Viridi A S, Sumner D R. Patterns of gene expression in rat bone marrow stromal cells cultured on titanium alloy discs of different roughness. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2004, **70A(3)**: 391–401.
- [27] Zhao M, An M, Wang Q, *et al.* Quantitative proteomic analysis of human osteoblast-like MG-63 cells in response to bioinert implant material titanium and polyetheretherketone. *J. Proteomics*, 2012, **75(12)**: 3560–3573.
- [28] Xie J, Baumann M J, McCabe L R. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2004, **71A(1)**: 108–117.
- [29] Song J H, Kim J H, Park S, *et al.* Signaling responses of osteoblast cells to hydroxyapatite: the activation of ERK and SOX9. *J. Bone Miner. Metab.*, 2008, **26(2)**: 138–142.
- [30] Xu J L, Khor K A, Sui J J, *et al.* Comparative proteomics profile of osteoblasts cultured on dissimilar hydroxyapatite biomaterials: an iTRAQ-coupled 2-D LC-MS/MS analysis. *Proteomics*, 2008, **8(20)**: 4249–4258.
- [31] Xu J L, Khor K A, Sui J J, *et al.* Protein expression profiles in osteoblasts in response to differentially shaped hydroxyapatite nanoparticles. *Biomaterials*, 2009, **30(29)**: 5385–5391.
- [32] 王健丹. 基于基因表达谱芯片技术的天然羟基磷灰石成骨诱导机理研究. 南京: 东南大学硕士论文, 2010.
- [33] Wang J D, Lü X Y, Li B, *et al.* Mechanism Study on Osteoinductive Property of Natural Hydroxyapatite to Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell. National Conference on Biomaterials, Chengdu, 2010.
- [34] Zhang Z W, Lü X Y, Wang J D. Pilot Study of Osteoinduction mechanism of Natural Hydroxyapatite. 9<sup>th</sup> World Biomaterials Congress, Chengdu, 2012.
- [35] Carinci F, Piattelli A, Degidi M, *et al.* Genetic effects of anorganic bovine bone (Bio-Oss®) on osteoblast-like MG63 cells. *Arch. Oral Biol.*, 2006, **51(2)**: 154–163.
- [36] Zhang L L, Hanagata N, Maeda M, *et al.* Porous hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics promote ectopic osteoblast differentiation from mesenchymal stem cells. *Sci. Tech. Adv. Mater.*, 2009, **10(2)**: 025003.
- [37] Khan J A, Pillai B, Das T K, *et al.* Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells. *ChemBioChem*, 2007, **8(11)**: 1237–1240.
- [38] Kawata K, Osawa M, Okabe S. *In vitro* toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43(15)**: 6046–6051.
- [39] Kim E, Chu Y C, Han J Y, *et al.* Proteomic analysis of silver nanoparticle toxicity in rat. *Toxicol. Environ. Health. Sci.*, 2010, **2(4)**: 251–262.
- [40] Yang Y M, Qu Y H, Lü X Y. Global gene expression analysis of the effects of gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *J. Biomed Nanotechnol.*, 2010, **6(3)**: 234–246.
- [41] Ma J W, Lü X Y, Huang Y. Genomic analysis of cytotoxicity response to nanosilver in human dermal fibroblasts. *J. Biomed Nanotechnol.*, 2011, **7(2)**: 263–275.
- [42] Lv X Y, Qu Y H, Yang Y M, *et al.* Proteomic analysis of molecular mechanism of interactions between gold nanoparticles and human dermal fibroblasts-fetal. *Journal of Functional Materials*, 2011, **42(6)**: 1016–1020.
- [43] Lü X Y, Huang Y, Ma J W. Mechanism study of cytotoxicity of silver nanoparticles based on biomimics methods. *Chinese Journal of Dental Materials and Devices*, 2010, **19(4)**: 179–182.
- [44] Cui D X, Tian F R, Ozkan C S, *et al.* Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol. Lett.*, 2005, **155(1)**: 73–85.
- [45] Ding L G, Stilwell J, Zhang T T, *et al.* Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Lett.*, 2005, **5(12)**: 2448–2464.
- [46] Peng L, Barczak A J, Barbeau R A, *et al.* Whole genome expression analysis reveals differential effects of TiO<sub>2</sub> nanotubes on vascular cells. *Nano Lett.*, 2010, **10(1)**: 143–148.
- [47] Chew S Y, Mi R, Hoke A, *et al.* The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation. *Biomaterials*, 2008, **29(6)**: 653–661.
- [48] Agudelo-Garcia P A, De Jesus J K, Williams S P, *et al.* Glioma cell migration on three-dimensional nanofiber scaffolds is regulated by substrate topography and abolished by inhibition of STAT3 signaling. *Neoplasia*, 2011, **13(9)**: 831–840.
- [49] He W, Yong T, Ma Z W, *et al.* Biodegradable polymer nanofiber mesh to maintain functions of endothelial cells. *Tissue Eng.*, 2006, **12(9)**: 2457–2466.
- [50] Yu Y D, Lü X Y. Integrin roles in Aligned Nanofiber influence PC12 Cell Differentiation. 9<sup>th</sup> World Biomaterials Congress, Chengdu, 2012.
- [51] Dinnes D L M, Marcal H, Mahler S M, *et al.* Material surfaces affect the protein expression patterns of human macrophages: a proteomics approach. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2007, **80A(4)**: 895–908.
- [52] Rahman M A, Kumar S G, Kim S W, *et al.* Proteomic analysis for inhibitory effect of chitosan oligosaccharides on 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Proteomics*, 2008, **8(3)**: 569–581.
- [53] Jaworski J, Klapperich C M. Fibroblast remodeling activity at two- and three-dimensional collagen – glycosaminoglycan interfaces. *Biomaterials*, 2006, **27(23)**: 4212–4220.
- [54] Klapperich C M, Bertozzi C R. Global gene expression of cells attached to a tissue engineering scaffold. *Biomaterials*, 2004, **25(25)**: 5631–5641.
- [55] Li G N, Livi L L, Gourd C M, *et al.* Genomic and morphological changes of neuroblastoma cells in response to three-dimensional matrices. *Tissue Eng.*, 2007, **13(5)**: 1035–1047.
- [56] Xue M. Biological evaluation of medical devices-test animal welfare requirements. *Chinese Journal of Dental Materials and Devices*, 2007, **16(3)**: 117–124.
- [57] Johansson H, Lindstedt M, Albrekt A S, *et al.* A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based *in vitro* alternative to animal tests. *BMC Genomics*, 2011, **12**: 399–1–19.