

实验研究

珍珠层人工骨促进成骨细胞的体外成骨能力[△]

吴一民 陈建庭 孙 炜 金大地

摘 要 目的:研究珍珠层人工骨对人成骨细胞体外成骨能力的影响。方法:将珍珠层人工骨、聚乳酸(对照组)与人成骨细胞共同培养,观察细胞形态、细胞活性、碱性磷酸酶(ALP)活性和基质钙化情况。结果:实验组在细胞形态、细胞活性等指标与对照组相比差异无显著性;实验组在培养7d及14d后ALP阳性细胞数多于对照组;培养21d后可观察到骨结节,对照组没有骨结节产生。结论:珍珠层人工骨可促进成骨细胞的体外成骨能力。

关键词 珍珠层; 人工骨; 成骨细胞; 成骨

中图分类号 R687 **文献标识码** A **文章编号** 1005-8478(2002)03、4-0217-03

Osteogenic Ability of Osteoblast Promoted by Nacre Composite Artificial Bone in Vitro // WU Yi-min, CHEN Jian-ting, SUN Wei, et al. Department of Orthopedic Surgery, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515

Abstract Objective: To observe and analyze the effect of nacre composite artificial bone on osteogenic ability of human osteoblast in vitro. Methods: Human osteoblasts isolated from iliac bone were incubated with nacre composite artificial bone and polylactic acid. The appearance of human osteoblasts were observed under the phase contrast microscope. Neutral red assay was tested to observe the viability of human osteoblasts. The activity of alkaline phosphatase(ALP) and the formation of mineralized nodules were identified by histomorphometric analysis. Results: The OD value of the experimental group for neutral red tests was similar with the value of the control. There were significant increase of ALP positive cells in the experimental group, and formation of mineralized nodules were identified 21 days after subculture in the experimental group and not found in the control group. Conclusion: The nacre composite artificial bone can promote the osteogenic ability of human osteoblast in vitro.

Key words Nacre; Artificial bone; Osteoblast; Osteogenesis

目前临床常用的人工骨材料可分为天然生物材料和人工合成材料两大类。天然生物材料具有细胞识别信号,但其力学性能不足;人工合成材料可以提供可靠的机械性能,但缺乏生物信息使其不能与细胞发挥理想的相互作用,为解决机械性能与生物学性能之间的不协调,新型的具有生物活性的复合材料逐渐成为研究的重点^[1,2]。本实验将天然生物材料珍珠层粉与聚乳酸相复合制成多孔材料,该材料具有良好的生物力学性能,适合作为人工骨材料^[3]。本实验在体外将人成骨细胞与珍珠层人工骨共同培养,观察成骨细胞成骨能力的改变。

1 材料与方法

1.1 材料

珍珠层复合人工骨材料为本实验室自行研制。将珍珠层

复合人工骨和聚消旋乳酸(中山大学高分子研究所)制成直径5mm,厚1mm的圆片状,环氧乙烷消毒备用。

1.2 人成骨细胞分离培养和鉴定

无菌条件下将髂骨剪碎,冲洗,0.25%胰蛋白酶(Sigma)消化45min,去除上清,1% I型胶原酶(Sigma)消化45min,弃消化液,Hank液冲洗。胶原酶重复消化2h,滤除杂质,1000r/min离心10min,弃上清液,IMDM(Gibco)培养液重悬,置入培养瓶中。培养条件为37℃,5%CO₂,加10%胎牛血清(Gibco),青霉素100U/ml和链霉素100μg/ml。经碱性磷酸酶活性检测鉴定为成骨细胞。

1.3 实验分组

取24孔培养板4块(实验组和对照组各2块),每孔加盖玻片1片,实验组每孔加1片珍珠层复合人工骨,对照组加入聚消旋乳酸,将第2代人成骨细胞以 1.5×10^4 /ml接种于培养板,每3d更换培养液1次。另取96孔板1块,每块板设实验组和对照组各48孔,按上述密度接种成骨细胞。于不同时间进行处理,用于观察及检测。

1.4 检测指标

[△]基金项目:广东省医学科学基金资助项目(A1998333)

作者单位:第一军医大学附属南方医院脊柱骨病科,广州 510515

作者简介:吴一民(1970-),男,内蒙古包头人,主治医师,在读医学博士。研究方向:研究方向为人工骨的研制。电话:(020)61641724。E-mail:wuyid72@fimmu.com

1.4.1 光镜观察

Olympus 倒置显微镜观察细胞在材料周围附着及生长情况。

1.4.2 中性红实验检测细胞活性

细胞培养 3d 更换培养液前, 进行中性红染色: 96 孔板中每孔加入 0.1% 的中性红生理盐水溶液 100 μ l, 继续培养 1h。倾去上清液, 用磷酸缓冲液冲洗 3 遍, 浸入 0.1% 醋酸-乙醇溶液 200 μ l, 室温放置 30min, 用酶标仪在波长 490nm 处测 OD 值。

1.4.3 Gomori 细胞化学染色检测碱性磷酸酶活性

材料与细胞共同培养 7d 及 14d, 取培养板中生长的成骨细胞盖玻片, 冷丙酮固定 30min, 蒸馏水冲洗 3 次, 将盖玻片放入孵育液中 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2h, 滴加 2% 硝酸钴 2min, 流水冲洗 1min, 滴加 1% 硫化胺 5min, 流水冲洗 2min, 封片后在光学显微镜下观察。每张玻片随机观察 200 个细胞, 统计阳性细胞数。

1.4.4 Von·Kossa 染色显示钙化结节

材料与细胞共同培养 14d 及 21d, 将附有细胞的玻片取出, 95% 酒精固定 10min, 蒸馏水洗 3 次, 浸于 2% 硝酸银溶液中, 紫外线照射 15min, 蒸馏水冲洗 1min, 浸入 5% 硫代硫酸钠水溶液

2min, 蒸馏水充分洗涤, 中性红复染, 光学显微镜下观察。

1.5 统计学分析

所测数据采用 SPSS 8.0 软件包进行统计学处理, T 检验作组间均数的显著性检验, $P < 0.05$ 时有统计学差异。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察

细胞接种后 12h 可见材料周围有细胞附着, 随时间延长, 附于材料上的细胞逐渐增多。细胞形态为梭形、三角形、纺锤形等多种形态(图 1)。培养 10d 相邻细胞突起相互连接, 细胞边界难以区分, 培养 15d 出现立方形结节样物(图 2)。实验组与对照组细胞形态无差别。

2.2 中性红细胞活性检测

细胞活性测定结果是: 实验组 A 值($\bar{x} \pm s$)为 (0.383 ± 0.023) , 对照组 A 值为 (0.393 ± 0.021) , t 值为 1.77, $P = 0.08$, 差异无显著性($P < 0.05$)。

2.3 碱性磷酸酶活性

经 Gomori 改良钙钴法染色后, 在细胞的胞浆中可见浅棕色至棕黑色的细小颗粒, 细胞着色程度不一, 在细胞密集区反应强烈(图 3)。实验组 ALP 阳性细胞数多于对照组(表 1)。

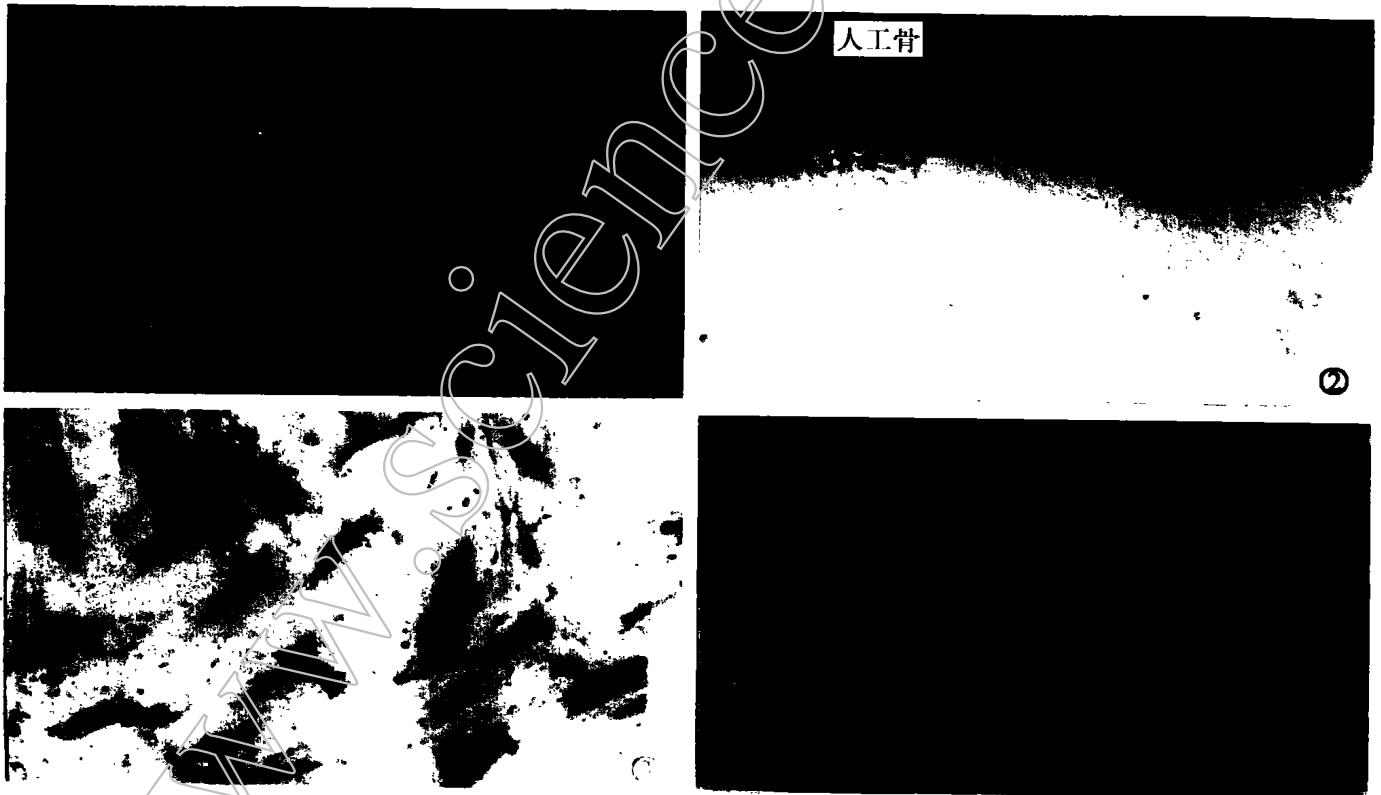


图 1 第 2 代人成骨细胞形态为梭形、三角形、纺锤等多种形态 中性红染色 $\times 100$ 图 2 成骨细胞在珍珠层人工骨周围附着并形成结节物(15d)倒置显微镜 $\times 100$ 图 3 ALP 阳性细胞胞浆中可见棕黑色的颗粒, 细胞着色程度不一 Gomori 染色 $\times 100$ 图 4 骨结节中央钙化部位为黑色, 周围细胞及基质为红色 Von·Kossa $\times 400$

表1 ALP阳性细胞数($\bar{x} \pm s, n=24$)

测定时间(d)	实验组	对照组	t 值	P
7	178.21 ± 5.91	165.71 ± 6.41	7.02	<0.01
14	190.54 ± 4.51	178.08 ± 4.42	9.66	<0.01

2.4 骨结节形成

材料与细胞共同培养14d后实验组和对照组中均没有骨结节产生,培养21d后实验组中可见有骨结节形成,对照组中未观察到骨结节。在光学显微镜下可见骨结节为圆形,中央钙化部位为黑色,周围细胞及基质为红色(图4)。

3 讨论

人工骨材料植入体内后,植入部位的毛细血管和破骨细胞、成骨细胞长入人工骨,其中成骨细胞在材料上增殖、分化最终形成新生骨组织。因此,研究人工骨材料对成骨细胞骨形成能力的影响,是评定人工骨材料生物学性能的重要依据。随着组织工程学的发展,利用体外细胞培养法观察生物材料与细胞间的相互作用和相互影响,日益受到人们的广泛重视。

在体外培养系统中,能够最终反映成骨细胞形成能力的因素是形成类似体内编织骨样的骨结节。骨结节的形成途径为成骨细胞大量增殖并聚集成团,形成多层细胞,细胞合成并分泌I型胶原,羟基磷灰石沉积在胶原纤维形成框架上,完成基质的矿化^[4]。

Buttery等的研究证实^[5],体外培养的成骨细胞形成胶原纤维框架后,需要在一些化学物质的诱导下才能完成基质矿化。其中较为常用的是在培养基中加入 β -磷酸甘油,加入后15d左右可形成大量的骨结节。目前常用的人工骨材料如羟基磷灰石、聚乳酸等在体外与成骨细胞共同培养后,均需在 β -磷酸甘油等诱导物质的存在下才能产生骨结节^[6,7]。碱性磷酸酶能水解 β -磷酸甘油,释放出磷离子,促进羟基磷灰石的形成,因此碱性磷酸酶活性代表了成骨细胞的成骨能力。本实验在培养基中加入珍珠层复合人工骨与成骨细胞共同培养,结果显示珍珠层复合人工骨组细胞碱性磷酸酶活性高于聚乳酸组,并且在不需要 β -磷酸甘油存在的条件下,实验组细胞在培养3周后可形成骨结节,说明珍珠层复合人工骨在体外可促进成

骨细胞的成骨能力。

珍珠层是海洋生物珠母贝的贝壳内层,属于天然生物材料,其主要成分是文石型碳酸钙,并含有能够促进成骨细胞基质钙化的有机物质^[8]。将珍珠层与聚乳酸加工形成的复合人工骨,即具有良好的微观结构和类似与皮质骨的机械性能,又包含必要的生物信息,可促进骨结节的形成,是有应用前景的骨替代材料。该材料植入体内后的生物相容性、降解过程及在体内修复骨组织的能力等问题需继续研究,为珍珠层聚乳酸人工骨的临床试用提供依据。

参考文献:

- [1] 龚泰芳,夏仁云.成骨细胞和组织工程化生物活性骨[J].中国矫形外科杂志,2002,9(1):69-71.
- [2] 熊建义.人工骨的研究进展[J].中国矫形外科杂志,2001,8(5):438-491.
- [3] 刘金标,陈建庭.珍珠层聚乳酸重组人工骨的研制及其相关性能检测[J].第一军医大学学报,2002,22(3):236-238.
- [4] 冀振亮,陈青海.成骨细胞的培养与移植[J].中国矫形外科杂志,1999,6(7):552-553.
- [5] Buttery LK, Bourne S, Xynos JD, et al. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells[J]. Tissue Engineering, 2001, 7(1): 89-99.
- [6] Cleries L, Pradas MF, Morenza JL. Bone growth on and resorption of calcium phosphate coatings obtained by pulsed laser deposition[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 49(1): 43-52.
- [7] Matsuzaka K, Walboomers XF, Ruijter JE, et al. The effect of poly-L-lactic acid with parallel surface micro groove on osteoblastlike cells in vitro[J]. Biomaterials, 1999, 20(14): 1293-1301.
- [8] Lamghari M, Berland S, Lopez E. Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep[J]. Biomaterials, 2001, 22(6): 555-562.

(收稿:2002-05-24 修回:2002-07-09)