

## · 实验研究 ·

成骨细胞在珍珠层复合人工骨表面的粘附和增殖<sup>△</sup>

吴一民\* 陈建庭\* 孙 炜\* 金大地\*

**摘要** 目的 评价人成骨细胞在珍珠层聚乳酸人工骨上的粘附能力。方法 将珍珠层聚乳酸人工骨与人成骨细胞体外复合培养,采用倒置相差显微镜、扫描电镜、透射电镜及流式细胞仪检测,观察人成骨细胞在珍珠层聚乳酸人工骨上的粘附能力。结果 珍珠层聚乳酸人工骨与人成骨细胞体外复合培养 1 周后,细胞通过伪足贴附于人工骨表面。透射电镜下成骨细胞形态正常,胞浆内有丰富的粗面内质网和线粒体,并可观察到细胞之间形成的连接。流式细胞仪检测结果显示,附着在珍珠层复合人工骨的成骨细胞增殖指数增高。结论 珍珠层复合人工骨材料有利于成骨细胞的粘附、增殖和分化。

**关键词** 珍珠层;人工骨;成骨细胞;粘附

## Adhesion and Proliferation of Human Osteoblasts on the Surface of the Nacre Composite Artificial Bone

Wu Yimin, Chen Jianing, Sun Wei, et al. Department of Orthopedic, Nanfang Hospital, Guangzhou, 510515

**Abstract Objective** To study the adhesion and proliferation of osteoblast on the surface of artificial bone. **Methods** The iliac trabecular bone specimens were treated with collagenase-trypsin, a lot of osteoblasts were released out. Then the osteoblasts were purified and cultured. Osteoblasts were incubated with nacre composite artificial bone. The appearance of human osteoblasts was observed under the phase contrast microscope, adhesion of the cell on the scaffold were observed under scanning electron microscopy. Microstructure of the osteoblast was observed under transmission electron microscope. The flow cytometry were used to observe the effect on the proliferation of osteoblasts. **Results** Under the scanning electron microscopy, the artificial bone skeleton was composed of crystals and irregular pores and micropores, and the morphology of an adhered differentiation cell after incubation was a flat cell with extending pseudopodia. The observation of transmission electron microscopy showed that the nucleus of the osteoblasts were big and round, and there were a large number of mitochondrion and rough endoplasmic reticulum within the osteoblasts. **Conclusion** The matrix of nacre is effective in promoting the attachment and spreading of osteoblast on the surface of artificial bone.

**Key words** Nacre; Artificial bone; Osteoblasts; Adhesion

本实验采用浇铸盐浸技术将珍珠层粉与聚乳酸相复合制成的多孔材料,根据体外细胞培养的方法,通过材料和人成骨细胞的复合培养,研究人成骨细胞在珍珠层聚乳酸人工骨上的粘附能力,为珍珠层聚乳酸人工骨的临床应用提供依据。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 参照文献<sup>[1]</sup>的方法制备直径 5 mm、厚 1 mm、孔隙率为 50% 的圆片状聚乳酸材料及珍珠层复合人工骨材料,环氧乙烷消毒备用。

1.2 人成骨细胞分离培养和鉴定 无菌条件下获得髂骨松质骨,剪碎后, Hank 液冲洗, 0.25% 胰蛋白酶 (Sigma) 消化 45 min, 去除上清, 1% I 型胶原酶 (Sigma) 消化 45 min 弃消化液, Hank 液冲洗。胶原酶重复消化 2 h, 滤除杂质, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, IMDM (Gibco) 培养液

重悬,置入培养瓶中。培养条件为 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度, pH 7.2, 加 10% 胎牛血清 (Gibco), 青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μg/ml。经形态学及碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测鉴定为成骨细胞。

1.3 实验方法 取 24 孔培养板两块, 实验组每孔加入一片人工骨材料, 对照组加入聚乳酸, 将第 2 代人成骨细胞以  $1.5 \times 10^4$ /ml 接种于培养板, 每 3 d 换液一次。

1.3.1 倒置相差显微镜观察 Olympus 倒置相差显微镜观察细胞在人工骨材料周围、孔隙内附着及生长情况。

1.3.2 扫描电镜观察 将人工骨材料与成骨细胞复合培养一周后取出, 用 2% 戊二醛固定, 梯度丙酮脱水, 临界点干燥、喷金, 于 HITachi-450 型扫描电子显微镜下观察细胞在材料上附着情况。

1.3.3 透射电镜观察 将人工骨、聚乳酸两种材料与成骨细胞复合培养一周后取出, 2% 戊二醛固定 24 h, PBS 充分

<sup>△</sup>广东省医学科学基金资助项目 (A1998333)

\* 第一军医大学附属南方医院脊柱骨病科 广州市 510515

漂洗, 1% 四氧化锇后固定 1.5 h, 梯度丙酮脱水 (50%、70%、90%、100% 三次, 每次 15 min), 环氧树脂浸透包埋, 超薄切片机进行自动半薄切片, 铀-铅染色, EM-1200EX 型透射电子显微镜观察。

**1.3.4 流式细胞仪检测** 将人工骨材料与成骨细胞复合培养一周后取出, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 2 min, 用 Hanks 液持续吹打材料表面 10 min, 离心后将细胞用 70% 乙醇固定 30 min, PBS 冲洗两次, 加入 RNA 酶 37℃ 消化 30 min, PBS 冲洗两次, 重悬, 再加入碘化丙啶 4℃ 孵育 30 min。用流式细胞仪 (美国 FACSC Alibur Becton Dickinson 公司) 进行细胞周期分析, 以增殖指数 (Proliferation Index, PI) 表示材料对成骨细胞分裂增殖的影响。PI =  $(S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$ 。

## 2 结果

**2.1 倒置相差显微镜观察** 细胞接种后 24 h, 可见人工骨材料周围有细胞附着, 随培养时间延长, 附于材料上的细胞逐渐增多, 细胞形态多为梭形及三角形。

**2.2 扫描电镜** 培养一周后, 人工骨材料上附着的成骨细胞呈梭形或三角形。细胞通过多个伪足贴附于人工骨表面。细胞表面有丝状纤维形成, 细胞之间通过伪足及丝状纤维形成细胞间的连接, 细胞上及细胞间可见颗粒状钙盐结晶沉 (图 1)。

**2.3 透射电镜** 可见成骨细胞核大而圆, 位于胞体一端, 核仁清晰, 细胞胞浆内有丰富的粗面内质网和线粒体, 具有典型的分泌细胞特征, 并可观察到细胞之间形成的连接 (图 2)。



图1 成骨细胞附着在人工骨表面, 细胞呈梭形或三角形, 可见颗粒状钙盐结晶沉(扫描电镜×1 000)



图2 成骨细胞浆内含丰富的粗面内质网, 细胞之间形成连接(透射电镜×1 500)

**2.4 流式细胞仪** 检测结果显示, 实验组与对照组相比, S 期细胞显著增加 (实验组为 15.32%, 对照组为 13.28%), 细胞增殖指数增高 (实验组为 31.15%, 对照组为 26.28%)。提示珍珠层复合人工骨材料有利于成骨细胞的粘附、增殖和分化。

## 3 讨论

人体骨组织由无机的骨盐成份和有机的骨基质成份紧密结合而组成的复合材料, 因此, 将无机钙类材料与胶原、聚乳酸等有机材料复合可能是获得理想骨修复材料的一条重要途径, 国内已有利用磷酸三钙和聚乳酸等材料制作复合人工骨的报道并同时对这些复合材料的理化性能及在动物模型上修复骨缺损能力进行了研究<sup>[2,3]</sup>。本实验从仿生学角度出发, 采用天然生物材料珍珠层取代无机材料磷酸三钙与聚乳酸混合制成复合人工骨, 目的是利用珍珠层所含的生物信息促进其与细胞的相互作用。

人工骨材料在体内主要是通过成骨细胞的相互作用而形成新生骨组织, 其中成骨细胞在人工骨材料表面良好的贴附生长是影响其发挥功能的前提条件, 细胞必须与材料发生适当的粘附, 才能进行增殖和分化, 最终形成骨组织, 因此人工骨材料除应具有生物相容性、可降解性及机械强度外, 还应具有良好的表面活性, 有利于成骨细胞的粘附, 并为成骨细胞在其表面增殖和分化提供良好的微环境。

在生物材料的研究中, 天然材料与人工合成材料相比最大的优点是包含细胞识别信号 (包括多种蛋白质和蛋白多糖等大分子物质), 有利于细胞识别和粘附。珍珠层是海洋生物珍珠贝科动物珠母贝的贝壳内层, 其主要成分是文石型碳酸钙并含有纤维蛋白、蛋白多糖等大分子物质, 其理化性质及生物学特性与骨组织非常接近<sup>[4]</sup>。本研究结果表明, 采用天然生物材料珍珠层与聚乳酸混合制成复合人工骨可促进成骨细胞的粘附与增殖。

### 参考文献

- 1 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检测. 第一军医大学学报, 2002, 22 (3): 236
- 2 张亮, 靳安民, 郭志民等. 三维多孔骨修复材料 DL-PLA 及 β-TCP/DL-PLA 的体外降解研究. 骨与关节损伤杂志, 2001, 16 (3): 184
- 3 徐晓良, 同志勤, 王坤正等. bBMP/胶原/珊瑚复合人工骨修复股骨头骨缺损的实验研究. 骨与关节损伤杂志, 2000, 15(3): 209
- 4 Liao H, Mutvei H, Sjostrom M, et al. Tissue responses to natural aragonite (Margaritifera shell) implants in vivo. Biomaterials, 2000, 21: 457