

• 实验研究 •

成骨细胞株与强韧化纳米人工骨支架 联合培养实验研究[△]



戴伯军 李家顺 贾连顺 吕宏 陈岗 叶晓健 蔡舒* 张立德**

摘要 目的: 观察成骨细胞株(3T3-E1)在新型纳米氧化锆强韧化高孔隙率人工骨支架(下文简称人工骨支架)材料上生长情况。方法: 成骨细胞株(3T3-E1)与人工骨支架联合培养, 通过光镜观察和细胞计数的方法了解成骨细胞与支架结合能力, 扫描电镜观察细胞生长的情况。结果: 新型强韧化纳米人工骨材料与建株成骨细胞有良好的结合能力, 成骨细胞株(3T3-E1)在人工骨材料上生长良好。结论: 纳米骨支架是较理想的骨组织工程支架材料, 成骨细胞复合支架用于骨缺损的修复, 具有广阔的临床应用前景。

关键词 纳米; 成骨细胞; 支架; 组织工程; 细胞培养; 体外培养

中图分类号 687 文献标识码 A 文章编号 1005-8478(2004)12-0919-03

Experimental study on union culture of osteoblast-like cells(3T3-E1) with hyper-porosity $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bone cells scaffold/NM ZrO_2 reinforced in vitro DAI Bo-jun, LI Jia-shun, JIA Lian-shun, et al. Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003

Abstract Objective: To investigate the growth state of osteoblast-like cells(3T3-E1) on hyper-porosity $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bone cells scaffold/NM ZrO_2 reinforced (be called scaffold for short in the following text) in vitro. Method: The cells were union cultured on the scaffold. The growth state and combination ability of osteoblast-like cells with scaffold was observed by optical microscope, scanning electron microscope and cells counting respectively. Result: osteoblast-like cells(3T3-E1) grew well on the scaffold. New type scaffold had good combination ability with cells, and showed no adverse effect on cell function. Conclusion: New type scaffold is an optimal scaffold material for bone tissue engineering, which may have potentially clinical application for bone defect repair.

Key words NM; Osteoblast; Scaffold; Tissue engineering; Cells culture; In vitro culture

骨组织工程是利用组织工程学方法将一定数量的成骨细胞接种到具有空间三维结构的支架材料上, 在体外或植入体内联合培养, 获得具有一定结构和功能的骨组织^[1]。其中成骨细胞载体, 即支架材料, 是骨组织工程研究的热点和重点。本实验既是观察一种新型人工骨支架材料与建株成骨细胞(3T3-E1)联合培养后细胞生长情况和结合数量, 以评价该支架生物相容性及细胞复合能力, 为进一步临床应用提供实验依据。

1 主要仪器及试剂

DMEM 培养液(GIBCO); 小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所产品); 胰蛋白酶(GIBCO); 类成骨细胞株(3T3-E1, 中科院上海细胞所); 强韧化纳米人工骨细胞支架(孔径200~300 μm 孔隙率85%~90%, 自制); CO_2 培养箱

(SANYO); 倒置显微镜(OLMPUS); 扫描电镜。

2 实验方法

2.1 类成骨细胞株(3T3-E1)的传代培养鉴定

倒置显微镜下观察类成骨细胞株生长至80%~90%, PBS冲洗后0.5%胰蛋白酶消化4~6min, 吹打制成单细胞悬液, 洗涤离心后, 培养液重新悬起制备成单细胞悬液, 按1:2传代接种于50ml培养瓶中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下细胞培养箱培养。隔天换液。倒置显微镜下观察细胞形态。

2.2 类成骨细胞株与支架材料联合培养

洗涤离心后 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 单细胞悬液, 负压条件下接种于5mm \times 5mm \times 4mm细胞支架上, 细胞培养箱中作用4h后取出复合支架置于12孔培养板中, 加入培养液联合培养。

2.3 支架复合培养细胞计数、光镜观察

联合培养4d支架材料, PBS液反复冲洗, 加入5%胰蛋白酶消化液消化10min, 吸取消液冲洗支架材料, 使类成骨细胞株完全脱落, 收集冲洗液中终止消化, 进行细胞计数并在光学显微镜下观察细胞形态。将冲洗所得细胞洗涤离心后接种于25mm \times 10mm培养皿中继续培养, 1周后再次做形态学对比, 光镜观察类成骨细胞形态学改变。

[△]国家自然科学基金资助项目(编号:30170954)

作者单位: 第二军医大学附属长征医院, 上海凤阳路415号 200003

* 天津大学材料学院

** 合肥中科院固体所

作者简介: 戴伯军(1970), 男, 主治医师, 博士。研究方向: 脊柱外科。

电话:(021)25070038

2.4 电镜观察

取联合培养 4d 后支架材料, PBS 液冲洗, 2% 戊二醛固定, 乙醇逐级脱水, 醋酸异戊酯浸泡, 以固体 CO₂ 作为临界点干燥, 旋转喷镀金膜, 制作电镜标本, 扫描电镜下观察类成骨细胞株在支架多孔表面上生长情况。

3 结果

3.1 类成骨细胞株观察

类成骨细胞株 (3T3-E1) 光镜下观察为圆形, 4h 左右贴壁, 贴壁后细胞呈条索状生长, 细胞为多边形、梭形, 有较多突起, 胞浆淡, 单个细胞核, 较大, 1~2 个核仁, 呈现典型类成骨细胞形态特征 (见图 1)。

3.2 电镜观察

电镜下观察见细胞附着生长, 但分布不均匀, 支架底部附着生长细胞明显多于顶部。细胞沿微孔壁爬行生长, 多树枝状突起, 部分微孔被细胞遮盖 (见图 2)。

3.3 细胞计数及光镜观察

冲洗液经离心沉淀后, 制成单细胞悬液, 光学显微镜下用细胞计数板计数, 计算可知支架结合细胞数为 $4 \times 10^5/\text{mm}^3$ 。光镜下观察冲洗下成骨细胞, 形态较对照正常培养的建株细胞无明显改变, 将冲洗所得细胞洗涤离心后接种于 25mm × 10mm 培养皿中继续培养, 1 周后再次做形态学对比, 成骨细胞无明显形态学改变 (见图 3)。

4 讨论

4.1 骨组织工程中作为种子细胞载体的支架材料选择

骨组织工程观察的重点是寻求能够作为成骨细胞移植并引导新骨生长的支架结构。骨组织工程支架材料主要作用是提供成骨细胞生长的空间, 同时, 支架在调节与其相复合的细胞的行为方面也有积极而复杂的作用。

理想的骨组织工程细胞外基质材料的要求有^[2,3]: (1) 良好的生物相容性。除满足生物材料的一般要求, 如无毒、不致畸性等外, 还应利于种子细胞粘附、增殖, 降解产物对细胞无毒害作用, 不引起炎症反应, 甚至利于细胞生长和分化; (2) 良好的生物降解性。基质材料在完成支架作用后应能降解, 降解率应与组织细胞生长率相适应, 降解时间应根据组织生长特性作人为调控; (3) 具有三维立体多孔结构。基质材料可加工成三维立体结构, 孔隙率最好达 90% 以上, 具有较高的面积体积比。这种结构可提供宽大的表面积和空间, 利于细胞粘附生长、细胞外基质沉积、营养和氧气进入、代谢产物排出, 也有利于血管和神经长入; (4) 可塑性和一定的机械强度。基质材料具有良好的可塑性, 可预先

制作成一定形状。并具有一定的机械强度, 为新生组织提供支撑, 并保持一定时间直至新生组织具有自身生物力学特性; (5) 良好的材料-细胞界面。材料应能提供良好的细胞界面, 利于细胞粘附、增殖, 更重要的是能激活细胞特异基因表达, 维持细胞正常表型表达。

4.2 纳米氧化锆强韧化高孔隙率人工骨支架特点

骨骼是自然界一种天然纳米材料, 由骨胶原和羟基磷灰石构成^[4]。它们组合成复杂的骨骼, 形成纳米复合材料, 其具有的性能是各种合成材料都难以达到的。骨胶原和羟基磷灰石本身不能做结构材料, 因此合成与骨骼完全一样的人工骨非常困难。同时除了自体骨移植 (骨移植中的骨细胞存活, 不需完全的爬行替代, 可慢慢修饰) 异体骨移植以及其他人工仿生骨都需要骨断端骨细胞的爬行替代过程最终要被宿主的成骨细胞爬行替代掉的^[5]。作者利用纳米技术, 在 β -磷酸三钙中加入一定比例的纳米氧化锆颗粒, 利用其纳米微粒特性, 对磷酸钙陶瓷起到增强补韧的作用, 制备纳米氧化锆强韧化高孔隙率磷酸钙人工骨细胞支架, 之所以不叫人工骨而是称之为一种良好的骨细胞爬行支架, 是因为它具有较高强度, 孔径适当的高孔隙率网状支架 (物理上称之为无序的宏孔固体), 孔径 250 μm 左右, 很高的孔隙率 85% ~ 90%^[6]。同时仍然保持了 β -磷酸三钙本身具有的骨诱导作用和自降解作用^[7,8]。该支架追求性能上一定要适宜宿主成骨细胞的爬行替代, 外观上则放弃了以往人工骨研究在外观和化学组成上拘泥于对人体正常骨骼简单模仿。

4.3 类成骨细胞株 (3T3-E1) 与支架材料复合及联合培养观察

3T3-E1 成骨细胞株采用大鼠胚胎颅骨成骨细胞来源, 在体外培养中具有成骨细胞的表型特征, 因而可作为一个良好的研究成骨细胞表型成骨的体外模型系统^[9]

类成骨细胞株 (3T3-E1) 纳米氧化锆强韧化高孔隙率磷酸钙人工骨细胞支架进行联合培养是了解该支架生物相容性最直接的方法^[9]。

接种于支架材料上的类成骨细胞经光镜下比对, 与未经接种的成骨细胞在形态学上无明显差异, 继续传代培养后生物学性状亦改变不大。经过作者继续传代培养 6~7 代, 细胞株生长正常, 充分证实支架材料对联合培养的建株细胞生物学性状影响不大。

经过联合培养的支架材料上所承载的细胞数对于评价支架材料的性能具有极为重要的意义。研制该支架最主要目的就是最大限度适应成骨细胞爬行替代, 加速支架与宿主骨的融合, 理论上讲单位体积的支架材料所承载的细胞数量越大, 其作为骨组织工程材料细胞载体的作用越满意。实验中



图 1 类成骨细胞 (3T3-E1)。图 2 类成骨细胞 (3T3-E1) 在支架材料上复合生长电镜照片。图 3 支架复合培养后类成骨细胞 (3T3-E1)。

类成骨细胞株(3T3-E1)与支架能有效地黏附、爬行,表明作为成骨细胞爬行支架具有良好的生物相容性和细胞黏附性,具有广阔的临床应用前景。

参考文献:

- [1] Vacanti CA, Upton J. Tissue engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices[J]. Clin Plast Surg, 1994, 21: 445~ 462.
- [2] Freed CE, Vunjak-Novakovic G, Iron KJ. Biodegradable polymer scaffolds fortissue engineering[J]. Biotechnology NY, 1994, 12(7): 689.
- [3] Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices fortissue engineering[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(5): 224.
- [4] 张立德. 纳米材料[M]. 化学工业出版社, 2000, 11.

- [5] 徐传达. 实用临床骨缺损修复应用解剖学[M]. 中国医药科技出版社, 2000, 1.
- [6] Hillsley MV, Frangos JA. Reviews: Bone tissue engineering: The role of interstitial fluid flow[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 43: 573~ 581.
- [7] Gundler R, Joyner CJ, Triffitt JT. Interactions of human osteogenitors with porous ceramic following diffusion chamber implantation in a xenogenic host[J]. Jmater SciMater Med, 1997, 8: 519~ 523.
- [8] Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells[J]. Clin Orthop, 1991, 274~ 283.
- [9] 张伟国, 王丽珍, 刘正. 氟对鼠颌骨成骨细胞表型发育影响的体外研究[J]. 上海口腔医学, 1998, 7(2): 88~ 93.

(收稿:2004-04-01)

• 个案报告 •

Traumatic closed patella overturn entirely: A case report 外伤性闭合性髌骨完全翻转 1 例报告

ZHANG Shi-qiang(张世强) LIU Ling(刘玲)* ZHANG Ying-ze(张英泽) WU Xi-rui(吴希瑞)

中图分类号 R683.42

文献标识码 C

文章编号 1005-8478(2004)12-0921-01

A 34-year-old man was involved in a high-speed motor vehicle collision. Survey revealed the right lower extremity was very swelling, the skin undermining deglove injury in the limb lateral between the level of great trochanter and 10cm upper ankle, skin temperature low, touching the skin having the feeling of floating. The right knee can't move. We pushed the right patella, find that the moving range of patella outward is abnormal. The radiographs revealed the right patella overturn entirely (Fig. 1). The patient was then emergently taken to the operating room for repair. The medial parts of quadriceps femoris attaching to the upper pole of patella, the expanding part of quadriceps femoris were found to be ruptured. The patella and patellar ligament were twisting 180° contra the hour hand of a clock. The debridement and repair operation was being performed (Fig. 2). Used closed drainage and compression bandaging to treat the skin undermining deglove injury in the limb lateral.



Fig. 1 The right patella overturn entirely Fig. 2 the right patella is restored. The position of the patella is get right

DISCUSSION: Traumatic closed patella overturn entirely is rare. In large series of patella dislocations, there are no closed patella overturns entirely mentioned. To our knowledge, this case represents the first reported case. We questioned the reason of patella overturn entirely. The patient suffered the injury with a high-energy force coming from this direction of the anterior-medial to the knee when the knee was at flexed position. The medial parts of quadriceps femoris, the expanding part of quadriceps femoris attaching to the medial of patella were ruptured. The high-energy force continuous act caused the expanding part of quadriceps femoris attaching to the lateral of patella ruptured as well. The patella shows 180° overturn entirely.

(收稿:2004-04-10)

Address: Department of Orthopaedics The Third Hospital Affiliated to Hebei Medical University, 050051

* Department of Pediatrics The Third Hospital Affiliated to Hebei Medical University

Author: Zhangshiqiang (1971-), male, born in Shijiazhuang, associate professor, Ph.D., research direction: orthopedics. Tel: 0311-7027951-3103