



新型骨基质材料细胞相容性的形态学研究

理想的骨基质材料的选择和研制是骨组织工程学研究领域中的重要内容。由于目前单纯生物类材料、无机陶瓷类材料和有机聚合物类材料均不能满足要求,研制复合类新型材料便成为组织工程学研究的紧迫而重要的任务[1]。基于此,我们和天津南开大学高分子研究所共同开发研制出一种新型骨基质材料(new bone-matrix material, NBM), 该材料将有机成分和无机成分通过合适的方法进行交联, 取长补短, 模拟天然骨基质组成成分和大体形态, 制作成一种有机-无机多孔复合类材料。本实验观察NBM与骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)体外复合培养时细胞生长情况, 对该材料的体外细胞相容性作了初步检测, 为该材料的进一步改良提供相关实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和材料

相差显微镜(Nikon); 扫描电镜(日立S 550型); RPMI 1640(Gibco); 新生牛血清(杭州四季青生物制品公司); 胰蛋白酶(天象人生物制品公司); 地塞米松(Sigma); 维生素 C(Sigma); β -甘油磷酸钠(Sigma); 24孔培养板(Corning); NBM(天津南开大学高分子研究所); BGC(中国科学院成都光电研究所)。

1.2 细胞培养

按我科以往建立的兔BMSC培养方法进行细胞培养和鉴定[2]。取4~8周龄健康新西兰大白兔, 双侧股部剪毛、常规消毒后, 使用 16号骨穿针自股骨大转子部穿入股骨骨髓腔, 20 ml注射器抽吸双侧股骨骨髓共3 ml, 混入1640完全培养基(含100 U/ml青、链霉素, 50 μ g/ml 维生素C, 20%新生牛血清)10 ml, 经4号针头反复抽吸, 制成单细胞悬液, 用3%白细胞稀释液计细胞数, 以 3×10^6 /ml细胞数接种入50 ml培养瓶中, 每瓶中加入3.5 ml培养基, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱中, 5 d后半量换液(1640完全培养基), 以后2~3 d全量换液1次。待细胞汇合成单层后, 用0.25%胰蛋白酶消化, 计数, 1×10^5 /ml接种于培养皿中, 进行传代培养。传代培养使用条件培养基(为完全培养基加入 1×10^{-8} mol/L 地塞米松、50 μ g/ml维生素C、10 nmol/L β -甘油磷酸钠)。

1.3 生物材料制备和处理

NBM是将 I 型胶原、明胶、壳聚糖、海藻酸钠等天然高分子材料和b-磷酸三钙、磷酸氢二钙、羟基磷灰石等无机成分按一定比例混合, 加入一定量制孔剂和甲醛在30~50 $^{\circ}$ C进行交联, 真空干燥而制得。NBM大体形态为多孔块状, 孔隙大小不一, 孔隙率较高, 材料干态时较硬, 浸泡后膨胀, 孔隙变大, 其大体形态见图1。本实验将NBM切割成4 mm \times 4 mm \times 2 mm大小长方形块状物, 三蒸水清洗、烘干, 高温高压灭菌后完全培养基浸泡3 d, 备用。

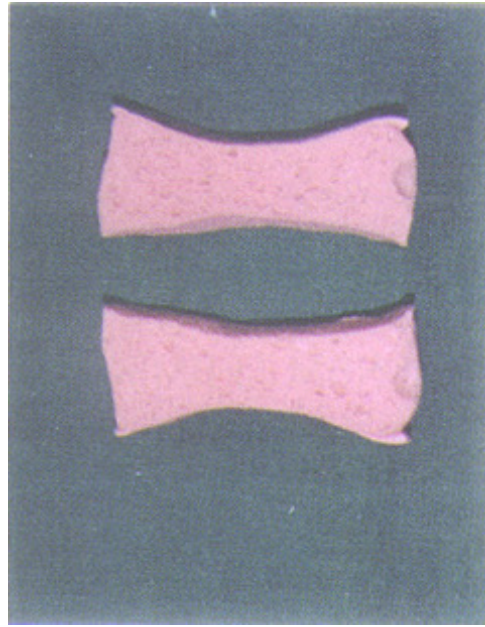


图1 新型骨基质材料的大体结构($\times 0.5$)

Fig.1 Macrostructure of the new bone-matrix material ($\times 0.5$)

The material processes a porous foam-like structure, resembling cancellous bone

1.4 细胞接种

将传至第3代的细胞以 1.5×10^4 /孔密度接种于24孔培养板，每孔加4 mm \times 4 mm \times 2 mm NBM材料1块，再加入培养基1 ml，于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂及饱和湿度条件下复合培养，一定时间后取出用于观察及检测。

1.5 相差显微镜观察

逐日使用相差显微镜观察细胞生长及与生物材料附着情况。

1.6 扫描电镜观察

分别于培养第2、4、6、8、10天将培养孔内生物材料取出，2%戊二醛固定，系列丙酮脱水，乙酸异戊酯置换，临界点干燥，表面喷金，上机观察。

2 结果

2.1 细胞培养

通过我科以往建立的方法培养的BMSC呈贴壁生长，多为梭形或多角形，不出现接触抑制现象，呈多层重叠生长；电镜下可见细胞形成胶原纤维并有钙盐沉积；并能表现出较强的碱性磷酸酶活性。我们培养的BMSC脱离了原有的骨骼环境，在体外仍有成骨表现，为确定性骨祖细胞，具有明确的成骨能力[2]。

2.2 相差显微镜观察

NBM复合细胞培养时，2~4 d培养期内细胞增殖不明显，材料近周细胞量少，远周细胞量较多。6~8 d细胞明显增多，并逐渐向材料移行，部分细胞直接贴附于材料边缘。14 d以后细胞连接成片，填充材料周边及凹陷，并分泌基质，材料边缘部分区域还可见细胞层叠成团，形成细胞钙化灶，中央细胞钙化坏死。细胞形态多为梭形及多角形(图2)。

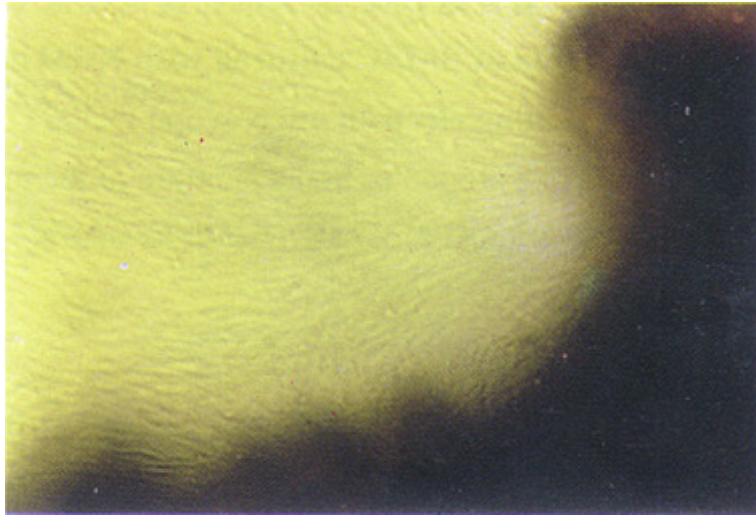


图2 NBM与BMSC复合培养第8天的相差显微镜观察 (×40)

Fig.2 Phase-contrast microscopic observation of bone marrow stromal cells cultured with the new bone-matrix material on day 8(×40)
The cells have grown in close contact with the material

2.3 扫描电镜观察

2.3.1 单纯材料扫描电镜结果 扫描电镜下NBM表面较粗糙，呈粗颗粒状，孔隙较多，大小不一，孔隙间多有交通(图3)。

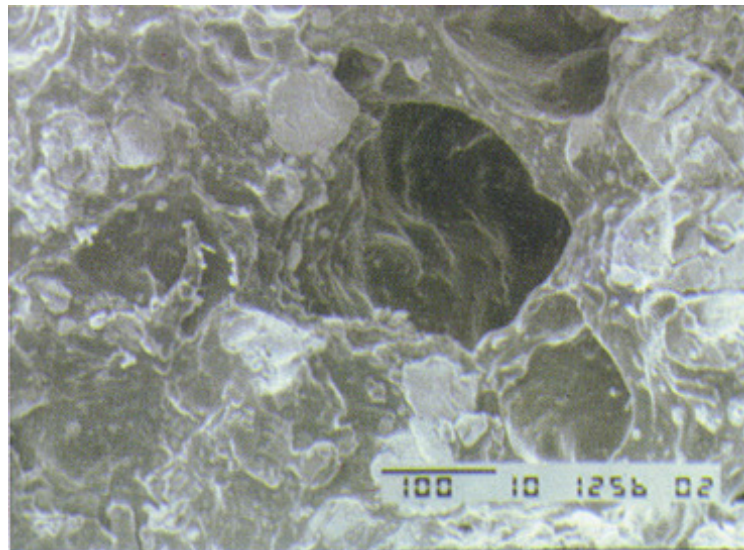


图3 扫描电镜下NBM 的多孔泡沫样结构 (×40)

Fig.3 The porous foam-like structure of the new material under scanning electron microscope(×40)

2.3.2 NBM复合BMSC体外培养扫描电镜结果 NBM与BMSC复合培养早期，细胞散在材料孔隙内或表面，呈梭型，细胞间无连接。培养10~12 d以后细胞增多，在孔口周围连成一圈，细胞间有大量胶原纤维丝连接，部分细胞跨越孔隙，呈长梭型。孔隙内也可见成团的细胞长入，多呈梭型，被细胞外基质包围(图4)。

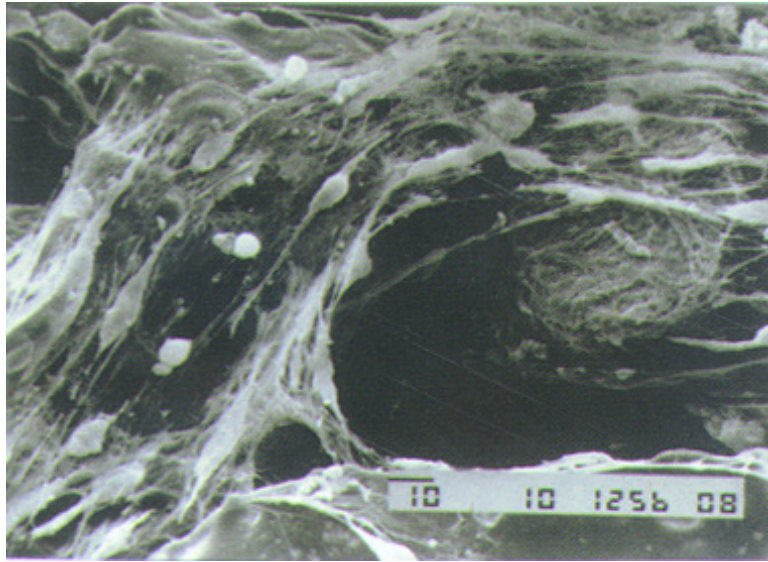


图4 NBM与BMSC复合培养第14天的扫描电镜像 ($\times 300$)

Fig.4 The observation of BMSC cultured with NBM on day 14 under scanning electron microscope ($\times 300$)

The cells well proliferate around or in the aperture of the material, secreting large quantities of extracellular matrix

3 讨论

骨组织工程研究不仅需要取材简便、成骨能力强的种子细胞,更需要适宜的人工细胞外基质(即细胞载体)材料。由于骨组织的特殊生理结构和力学性能,对骨组织工程细胞外基质材料有特殊要求。理想的细胞外基质材料要求[3][4][5]:(1)有良好的生物相容性:骨基质材料要利于种子细胞粘附、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)有良好的生物降解性: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,具有高的面积体积比,以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。

而现有生物材料均不能满足骨组织工程理想细胞外基质材料的要求[6]。生物类材料主要包括同种异体骨和异种骨,两者都存在免疫原性问题,且还存在机械强度不足和降解过快等缺点。生物陶瓷类材料以HA、TCP、BGC和HA/TCP[7]为代表,是骨组织工程中常用的细胞外基质材料,具有良好的成骨能力,但存在脆性大、降解慢等缺陷,影响新生骨替代进程和骨组织后期改建。天然聚合物包括胶原[8]、纤维蛋白[9]、壳聚糖[10]和藻酸盐[11]等,组织相容性好,但也存在许多缺点,如大规模生产的限制、不同批号制成品的差异、材料本身因素控制的困难(如机械强度、降解速度等)。合成聚合物以聚乳酸(PLA)、聚羟乙酸(PGA)、聚羟乙酸-乳酸(PLGA)[12]为代表,这类材料在组成成分、大体形态、微结构、机械性能和降解速度等方面可进行一定的预先调控,但其最大的缺陷是缺乏细胞识别信号(如某些氨基酸序列等),与组织细胞难以有生物特异性相互作用。目前,学者们通过各种增强细胞粘附的方法改善合成聚合物材料与细胞的相互作用,取得了初步成功[13]。

针对单纯一类材料的各自局限性,我们研制出一种新型骨基质材料(NBM),将有机成分和无机成分通过合

适的方法进行交联, 取长补短, 模拟天然骨基质组成成分和大体形态, 制作成为一种有机-无机多孔复合类材料, 材料的大体以及扫描电镜图象显示, NBM具有多孔隙、孔隙大小不一, 表面呈粗颗粒状等特点, 类似于人骨松质结构, 基本符合理想基质材料的结构要求。

本实验采用NBM与BMSC体外复合培养的方法, 通过形态学观察, 结果发现BMSC可以在NBM的表面良好附着, 随着换液和培养时间的延长, BMSC在其上伸展、繁殖, 分泌胶原纤维与钙盐结晶等细胞外基质, 同时可以附着于材料的孔隙周边或深入材料孔隙内生长, 材料表面还可见细胞钙化灶。因此我们认为新研制的复合材料NBM的细胞相容性问题基本解决, 对细胞生长和功能表达未见明显抑制作用。

同时我们也注意到了NBM可能有残存化学物质毒性的不足之处, 这或许是造成复合培养早期材料近周细胞量相对于远周少的原因。NBM目前虽不能完全满足理想骨组织工程基质材料的要求, 但大体结构令人满意, 生物相容性问题基本解决。它的研制本身是一个很好的开端, 对其进行完善将是一个不断改进的过程, 这需要组织工程研究人员和材料学家们加强合作, 共同努力。

参考文献:

- [1] 郑磊, 王前, 裴国献. 可降解聚合物在骨组织工程中的应用进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(3): 175-80.
Zheng L, Wang Q, Pei GX. Development of biodegradable polymer scaffolds for bone tissue engineering[J]. Chin J Reconstr Surg, 2000, 14(3): 175-80.
- [2] 金丹, 裴国献, 王前. 骨髓基质干细胞与生物活性玻璃陶瓷和聚乳酸生物相容性的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(1): 39-43.
Jin D, Pei GX, Wang Q. Biocompatibility studies on bioactive glass ceramics and polylactic acid combined with cultured bone marrow stromal cells in vitro[J]. Chin J Reconstr Surg, 2000, 14(1): 39-43.
- [3] Freed CE, Vunjak-Novakovic G, Iron KJ. Biodegradable polymerscaffolds for tissue engineering[J]. Biotechnol NY, 1994, 12(7): 689-93.
- [4] Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(5): 224-30.
- [5] 郑磊, 王前, 魏宽海, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对骨髓基质细胞粘附、增殖和分化的影响[J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(2): S4-S5.
Zheng L, Wang Q, Wei KH, et al. Biological effects of basic fibroblast growth factor on bone marrow stromal cells[J]. J First Mil Med Univ, 2000, 20(2): S4-S5.
- [6] Hubble JA. Biomaterials in tissue engineering[J]. Biotechnology, 1995, 13(6): 565-76.
- [7] 何炳林, 马建标. 生物医用材料基础研究进展[J]. 中国科学基金, 1996, 10(3): 165-72.
He BL, Ma JB. The recent development of biomedical materials in China[J]. Bulletin National Natur Sci Foundat of Chin, 1996, 10(3): 165-72.
- [8] Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, et al. Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo[J]. Bone, 1997, 20(2): 101-7.
- [9] Sims CD, Butler PE, Cao YL, et al. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes[J]. Plast Reconstr Surg, 1998, 101(6): 1580-5.
- [10] Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, et al. Osteogenesis enhances by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro[J]. J Periodontol, 1996, 67(11): 1170-5.
- [11] Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, et al. De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs[J]. Plast Reconstr Surg, 1996, 97(1): 168-78.
- [12] Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, et al. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery[J]. J Biomed Mater Res, 1997, 36(1): 1-8.

[13] 秦廷武, 杨志明, 蔡绍哲, 等. 组织工程中细胞与材料的粘附作用[J]. 中国修复重建外科杂志, 1999, 13(1): 31-7.

Qin TW, Yang ZM, Cai SX, et al. Interaction of cell adhesion to materials in tissue engineering[J]. Chin J Reconstr Surg, 1999, 13(1): 31-7.

参考文献:

[1] 郑磊, 王前, 裴国献. 可降解聚合物在骨组织工程中的应用进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(3): 175-80.

Zheng L, Wang Q, Pei GX. Development of biodegradable polymer scaffolds for bone tissue engineering[J]. Chin J Reconstr Surg, 2000, 14(3): 175-80.

[2] 金丹, 裴国献, 王前. 骨髓基质干细胞与生物活性玻璃陶瓷和聚乳酸生物相容性的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(1): 39-43.

Jin D, Pei GX, Wang Q. Biocompatibility studies on bioactive glass ceramics and polylactic acid combined with cultured bone marrow stromal cells in vitro[J]. Chin J Reconstr Surg, 2000, 14(1): 39-43.

[3] Freed CE, Vunjak-Novakovic G, Iron KJ. Biodegradable polymerscaffolds for tissue engineering[J]. Biotechnol NY, 1994, 12(7): 689-93.

[4] Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(5): 224-30.

[5] 郑磊, 王前, 魏宽海, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对骨髓基质细胞粘附、增殖和分化的影响[J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(2): S4-S5.

Zheng L, Wang Q, Wei KH, et al. Biological effects of basic fibroblast growth factor on bone marrow stromal cells[J]. J First Mil Med Univ, 2000, 20(2): S4-S5.

[6] Hubble JA. Biomaterials in tissue engineering[J]. Biotechnology, 1995, 13(6): 565-76.

[7] 何炳林, 马建标. 生物医用材料基础研究进展[J]. 中国科学基金, 1996, 10(3): 165-72.

He BL, Ma JB. The recent development of biomedical materials in China[J]. Bulletin National Natur Sci Foundat of Chin, 1996, 10(3): 165-72.

[8] Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, et al. Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo[J]. Bone, 1997, 20(2): 101-7.

[9] Sims CD, Butler PE, Cao YL, et al. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes[J]. Plast Reconstr Surg, 1998, 101(6): 1580-5.

[10] Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, et al. Osteogenesis enhances by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro[J]. J Periodontol, 1996, 67(11): 1170-5.

[11] Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, et al. De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs[J]. Plast Reconstr Surg, 1996, 97(1): 168-78.

[12] Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, et al. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery[J]. J Biomed Mater Res, 1997, 36(1): 1-8.

[13] 秦廷武, 杨志明, 蔡绍哲, 等. 组织工程中细胞与材料的粘附作用[J]. 中国修复重建外科杂志, 1999, 13(1): 31-7.

Qin TW, Yang ZM, Cai SX, et al. Interaction of cell adhesion to materials in tissue engineering[J]. Chin J Reconstr Surg, 1999, 13(1): 31-7.

