

[文章编号 1000-1182(2005)01-0079-03

# 纳米羟磷灰石/聚酰胺 66 对牙髓 细胞生物学作用的实验研究

苏勤, 叶玲, 周学东

(口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 探讨新型纳米羟磷灰石/聚酰胺 66 复合生物材料(nHA-PA66)对牙髓细胞的生物学作用。方法 采用细胞培养技术、倒置显微镜观察、四唑盐比色法(MTT)、流式细胞术、碱性磷酸酶活性检测和实时定量 RT-PCR(QRT-PCR)等实验技术及方法,从细胞分子水平研究 nHA-PA66 对体外培养的人牙髓细胞生长及功能的影响。结果 牙髓细胞在 nHA-PA66 浸提液作用下,细胞外形无明显改变;nHA-PA66 对牙髓细胞增殖、细胞周期、碱性磷酸酶活性及牙本质涎磷蛋白(DSPP)mRNA 的表达无明显促进或抑制作用。结论 nHA-PA66 作为一种新型纳米生物材料,对牙髓细胞的生长和功能无不良影响,有较好的生物相容性,但未见到明显的细胞生物活性作用。

**[关键词]** 纳米羟磷灰石/聚酰胺 66; 生物相容性; 生物活性

**[中图分类号]** R 781.31 **[文献标识码]** A

**Biological Effects of Nano-hydroxyapatite/Polyamide 66 on the Dental Pulp Cells** SU Qin, YE Ling, ZHOU Xue-dong.  
(Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the biological effects of the new nano-hydroxyapatite/polyamide 66 biological composites (nHA-PA66) on the dental pulp cells. **Methods** After interaction with the nHA-PA66 eluate, the growth, proliferation, and function of the *in vitro* cultured human dental pulp cells were studied by cell culture technique, inverted phase-contrast microscope observation, MTT assay, flow cytometry, ALP activity assay and quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (QRT-PCR) analysis. **Results** The cultured pulp cells grew well and showed no morphological variation. Moreover, this material had no negative effects on the proliferation, cell cycle, ALP activity and the expression of dentin sialophosphoprotein (DSPP) mRNA of the pulp cells. **Conclusion** As a new nano-biomaterial, nHA-PA66 has good biocompatibility to the pulp cells, but no obvious bioactivity.

**[Key words]** nano-hydroxyapatite/polyamide 66; biocompatibility; bioactivity

纳米羟磷灰石/聚酰胺 66 (nano-hydroxyapatite/polyamide 66, nHA-PA66) 由聚酰胺类有机物和纳米羟磷灰石微晶体复合而成,其无机物成分羟磷灰石为骨组织和牙体硬组织固有基本成分,是一种正在研制开发的新型人体硬组织替代材料。nHA-PA66 被试用作直接盖髓材料,但其对牙髓细胞是否有良好的细胞生物相容性及生物活性,目前尚不清楚。本实验将 nHA-PA66 作用于体外培养的人牙髓细胞,旨在研究该材料对牙髓细胞生长、增殖能力、细胞周期、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性及牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)mRNA 表达的影响,了解该材料的牙髓细胞生物相容性和生物活性,为 nHA-PA66 用作盖髓材料提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料与仪器

DMEM 培养液、胰蛋白酶、胎牛血清(Gibco 公司,美国),总 RNA 分离试剂(Life Technologies 公司,美国),LightCycler RT-PCR 试剂盒 SYBR Green I (Roche 公司,德国),DSPP 引物和内对照基因  $\beta$ -actin 引物(中国上海 GeneCore 公司提供),nHA-PA66(四川大学纳米生物材料研究中心提供)分为粉、液两组分,使用时按 1:1.5 调拌聚合。

细胞培养箱(Forma Scientific 公司,美国),倒置相差显微镜(Olympus 公司,日本),酶联检测仪(中国营华东电子仪器厂),流式细胞仪(Coulter 公司,美国),LightCycler 检测仪(Roche 公司,德国)。

### 1.2 材料浸提液的制备

将聚合粉碎后的 nHA-PA66 经常规高温高压消毒灭菌,取 5 g 加入 50 ml 滤过除菌的 DMEM 培养液中,振荡混匀后在细胞培养箱中 37℃ 放置 3 d,离心

[收稿日期 2004-05-13; 修回日期 2004-09-19]

[基金项目]四川省科委重点资助项目(02SC022-001)

[作者简介]苏勤(1971-),女,重庆人,副教授,博士

[通讯作者]周学东, Tel: 028-85501439

取上清液备用;将氢氧化钙粉剂 121 g 溶于 100 ml 蒸馏水中,磁力搅拌 30 min 后离心取上清液,过滤除菌备用。

### 1.3 牙髓细胞体外培养

选用因阻生拔除的新鲜、健康年轻恒牙,劈冠取出牙髓,双抗 HANK s 液反复冲洗后将牙髓组织剪碎,加入含双抗和 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置入条件为 5% CO<sub>2</sub>、95% 空气、37 °C 饱和湿度的细胞培养箱中培养。待牙髓细胞游出铺满瓶底约 1/2 时,0.25% 胰蛋白酶消化传代,并在倒置显微镜下观察细胞形态。

### 1.4 四唑盐比色法 (methyl thiazolil tetracolum, MTT) 检测

取第 5 代生长良好牙髓细胞制备成  $1 \times 10^7$  个/L 细胞悬液,96 孔板每孔等量接种,细胞贴壁后分为 5 组,A、B、C 组分别含 nHA-PA66 浸提液 200、100、50  $\mu$ l;D 组加入氢氧化钙上清液 5  $\mu$ l,E 组阴性对照组为 DMEM 培养液,均含 10% 胎牛血清。每孔液体量为 200  $\mu$ l,每组设 3 孔。标准环境下培养,分别于 1、3、5、7 d 进行 MTT 检测,用酶联检测仪测定 490 nm 波长下各孔光密度值,取 3 孔均值。

### 1.5 流式细胞检测 (flow cytometry, FCM)

接种生长良好第 5 代牙髓细胞  $1.25 \times 10^5$  个/瓶,细胞贴壁后实验组为 nHA-PA66 浸提液,对照组为含 10% 胎牛血清的 DMEM,标准环境下培养 72 h。消化、离心收集沉淀细胞,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/L,以碘化丙啶一步插入法进行 DNA 定量荧光染色,流式细胞仪检测, Multicycle 分析软件进行细胞周期分析。

### 1.6 碱性磷酸酶活性检测

细胞培养及分组同 MTT 法。培养 5 d 后弃去孔内培养液,裂解细胞,加入标准碱性磷酸酶底物,37 °C 孵育 30 min,用 NaOH 终止反应,混匀,静置 15 min,酶联检测仪在 410 nm 波长处测各孔光密度值,取 3 孔均值,计算牙髓细胞的 ALP 活性。

### 1.7 DSPP mRNA 表达的检测

根据基因文库 hDSPP 的序列及文献设计 PCR 扩增引物<sup>1</sup>。DSPP 上游引物 5'-GAGGATAAAGGACCAACATGG-3', 下游引物 5'-AAGAAGCATCTCCTCGGC-3', 产物大小为 280 bp;内对照基因  $\beta$ -actin 上游引物 5'-TAATAGTCACTCCAAGTATC-3', 下游引物 5'-GAAGGTGGGGTATTTGTGAG-3', 产物大小为 535 bp。

接种生长良好第 5 代牙髓细胞  $1.25 \times 10^5$  个/瓶,A 组为 nHA-PA66 浸提液组,B 组为含氢氧化钙上清液组 每 1 ml DMEM 培养液中加入氢氧化钙上清液

25  $\mu$ l,C 组阴性对照组为 DMEM 培养液,均含 10% 胎牛血清。连续培养 24 d,每 3~4 d 换液一次。消化、收集沉淀细胞,采用 Life 公司的 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,分光光度仪上测定 OD<sub>260</sub> 值和 OD<sub>280</sub> 值,计算各样本 RNA 含量。采用 LightCycler RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 反应,反应条件:55 °C,10 min;95 °C,30 s;60 °C,2 min;72 °C,2 min;共 40 个循环周期。RT-PCR 结果经 LightCycler data analysis (LCDA) 软件 3.5.28 分析得到数据。RT-PCR 扩增产物行琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后在紫外光下进行观察照相。

### 1.8 统计分析

采用 SPSS10.0 统计软件对数据进行方差分析。

## 2 结果

倒置相差显微镜下实验组和对照组细胞均贴壁生长良好,细胞呈长梭形。MTT 结果显示(表 1),牙髓细胞在不同浓度 nHA-PA66 浸提液作用下,相对增殖率在 93%~109% 之间,同一培养时间各浓度组之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。氢氧化钙组与 nHA-PA66 浸提液组在统计上无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。根据细胞毒性评分标准,均为 0 级(细胞相对增殖率 100%)或 1 级(细胞相对增殖率为 90%~99%),表明该材料对牙髓细胞的生长无不良影响,但也不具有明显促增殖能力。

表 1 实验组和对照组在不同培养时间 MTT 值及相对增殖率

Tab 1 MTT value and the relative proliferation ratio of test and control group at different times

时间 (d)	MTT 值(相对增殖率)				
	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
1	0.31 (106.89%)	0.27 (93.10%)	0.30 (103.45%)	0.32 (110.34%)	0.29
3	0.39 (105.41%)	0.38 (102.70%)	0.35 (94.59%)	0.40 (108.11%)	0.37
5	0.63 (108.62%)	0.56 (96.55%)	0.58 (100.00%)	0.61 (105.17%)	0.58
7	0.62 (96.88%)	0.66 (103.13%)	0.63 (98.44%)	0.67 (104.69%)	0.64

注:括号内为实验组相对阴性对照组的增殖率

FCM 检测结果表明(表 2),nHA-PA66 浸提液对牙髓细胞的细胞周期影响不大,实验组和对照组处于 DNA 合成前期的细胞数最多,DNA 合成后期及分裂期的较少,细胞周期各亚期组成比无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

表 2 实验组和对照组各细胞周期中细胞所占比例 (%)

Tab 2 Cell ratio of test and control group in cell cycle (%)

细胞周期	实验组	对照组
DNA 合成前期 (G <sub>1</sub> )	75.6	78.3
DNA 合成期 (S)	14.7	12.4
DNA 合成后期及分裂期 (G <sub>2</sub> M)	9.7	9.3

实验组和对照组牙髓细胞 ALP 活性见表 3,由表 3 可见,nHA-PA66 浸提液与阴性对照组相比,对牙髓细胞 ALP 活性无明显影响( $P > 0.05$ ),不具有促 ALP 活性的作用,而氢氧化钙组牙髓细胞 ALP 活性稍高于对照组和材料组,但三者统计学上无显著性差异( $P > 0.05$ )。

表 3 实验组和对照组牙髓细胞 ALP 活性(U/L,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 ALP activity of the pulp cells in test and control group(U/L,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	材料	ALP 活性
A 组	200 $\mu$ l nHA-PA66 浸提液	140.15 $\pm$ 1.24
B 组	100 $\mu$ l nHA-PA66 浸提液	137.21 $\pm$ 6.73
C 组	50 $\mu$ l nHA-PA66 浸提液	138.56 $\pm$ 5.91
D 组	含氢氧化钙的 DMEM 培养液	142.37 $\pm$ 3.44
E 组	10% FBS 的 DMEM 培养液	138.23 $\pm$ 5.52

DSPP mRNA 表达的检测结果显示,所有样本总 RNA 的纯度在正常范围内。设定外标准的拷贝数为  $5 \times 10^5$ ,根据外标准曲线和 DSPP RT-PCR 的起始循环数得到的相对拷贝数的对数值代表了 DSPP mRNA 的相对表达量。nHA-PA66 浸提液组、氢氧化钙组和对照组三组牙髓细胞 DSPP mRNA 表达量分别为 4.55、4.52、4.53,经统计分析,三者表达量无显著性差异( $P > 0.05$ )。琼脂糖凝胶电泳表明 RT-PCR 扩增后的 DSPP 的 DNA 片段大小在 280 bp 左右,与设计片段大小相符。

### 3 讨论

细胞生物相容性及生物活性是评价材料生物学性能的一项基本内容。在本实验中,倒置显微镜下观察 nHA-PA66 浸提液和氢氧化钙均不影响细胞生长形态,MTT 法检测细胞增殖情况显示,各组间无显著性差异。尽管有研究报道<sup>2</sup> 氢氧化钙(0.8 g/L)对培养的牙髓细胞的形态及增殖有明显的抑制作用,但在本实验却未发现。对培养 3 d 的牙髓细胞 FCM 结果分析,两组细胞各亚期的比例无显著性差异,表明 nHA-PA66 对牙髓细胞增殖周期没有明显影响。

材料的细胞生物活性表现在材料对细胞重要功能的影响。ALP 是参与牙、骨硬组织矿化形成的重要的酶,在牙、骨组织中 ALP 水平较高,尤其在钙化开始时,ALP 的活性显著增高。因此,一般认为 ALP 是成骨细胞分化成熟的早期标志<sup>3</sup>,也是目前实验研究中判断牙髓组织中未分化间充质细胞向成牙本质样细胞分化的常用指标之一。本实验中,nHA-PA66 浸提液和氢氧化钙上清液均不明显促进牙髓细胞 ALP 的活性,与对照组相比无显著性差异,表明该材料对

牙髓细胞的分化功能无明显促进作用,但也不抑制牙髓细胞分化功能酶的活性。本实验中,成牙本质细胞合成的特异性蛋白 DSPP 在 mRNA 水平上的表达也作为观察牙髓细胞分化的一个指标。DSPP 是牙本质磷蛋白和牙本质涎蛋白的合称,研究发现两者基因都定位于人的 4 q 染色体上,且相互连锁<sup>4</sup>。一般认为牙本质磷蛋白在牙本质矿化中起成核作用,启动和调节羟磷灰石晶体的形态、大小和生长速度<sup>5</sup>。由于牙髓细胞中 DSPP 的提取率较低,易在提取过程中发生降解,故本实验采用实时定量 (quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, QRT-PCR) 方法来检测 DSPP mRNA 的表达水平。与常规的 RT-PCR 相比,QRT-PCR 可提供关于 PCR 动力学的瞬时信息,通过内对照或外对照的使用,可校正不同样品间扩增效率的差异。本实验通过内对照校正和外标准曲线由分析软件计算出的相对拷贝数的对数值,反映了各样本 PCR 循环起始数的大小,而后者与样本中 mRNA 量成正相关关系,故相对拷贝数的对数值代表了样本中 mRNA 的相对量<sup>6</sup>。经统计分析,nHA-PA66 浸提液组、氢氧化钙组与对照组牙髓细胞的 DSPP mRNA 表达量无显著性差异( $P > 0.05$ ),表明 nHA-PA66 浸提液不影响牙髓细胞 DSPP 的合成,对其分化也无不良效应。本实验初步表明,nHA-PA66 作为一种新型纳米生物材料,对牙髓细胞的生长和功能无明显促进或抑制作用,具有牙髓细胞生物相容性,但未发现明显的细胞生物活性作用。因此,将 nHA-PA66 用作一种新型盖髓材料,还有待进一步研究以全面深入了解其生物学性能。

### [参考文献]

- 1] Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, et al. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth J. Bone, 2002, 30(2):377-385.
- 2] Alliot-Licht B, Jean A, Gregoire M. Comparative effect of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts *in vitro* J. Arch Oral Biol, 1994, 39(6):481-489.
- 3] Fukayama S, Tashjian AH Jr. Involvement of alkaline phosphatase in the modulation of receptor signaling in osteoblasts: evidence for a difference between human parathyroid hormone-related protein and human parathyroid hormone J. J Cell Physiol, 1994, 158(3):391-397.
- 4] Gu K, Chang S, Ritchie HH, et al. Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene J. Eur J Oral Sci, 2000, 108(1):35-42.
- 5] Butler WT, Ritchie HH, Bronckers AL. Extracellular matrix proteins of dentine J. Ciba Found Symp, 1997, 205:107-115.
- 6] Harting I, Wiesner RJ. Quantification of transcript-to-transcript ratios as a measure of gene expression using RT-PCR J. Biotechniques, 1997, 23(3):450-455.

(本文编辑 汤亚玲)