

成骨细胞在两种胶原支架材料上的生长特征

马 超, 张 丁, 李 平, 李小姣

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院口腔科, 北京 100730

通信作者: 张 丁 电话: 010-65296331, 电子邮件: dingz77@sina.com

摘要: **目的** 探讨成骨细胞在两种可吸收胶原膜上的生长特征, 对比成骨细胞在两种材料内部的黏附、迁移和增殖。**方法** 将 MC3T3-E1 成骨细胞系以一定密度接种于 BME-10X[®] 和 Bio-Gide[®] 胶原膜, 于体外共培养, 光镜下观察细胞在两种材料的附着和迁移范围, CCK-8 试剂盒检测细胞增殖, 扫描电镜观察细胞与材料黏附的超微结构。**结果** MC3T3-E1 成骨细胞在两种材料上均能黏附、迁移、增殖, 细胞在 BME-10X[®] 膜有孔层和无孔层表面的增殖差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 在 Bio-Gide[®] 膜疏松层和致密层的增殖差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** BME-10X[®] 和 Bio-Gide[®] 胶原膜均有良好的生物相容性, Bio-Gide[®] 膜的双层结构可阻止细胞向致密层生长。

关键词: 成骨细胞; 生物相容性; 引导组织再生; 牙周组织工程

中图分类号: R781.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-503X(2011)05-0538-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2011.05.012

Growth of Osteoblasts Following Culture on Two Collagen Scaffolds

MA Chao, ZHANG Ding, LI Ping, LI Xiao-jiao

Department of Stomatology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: ZHANG Ding Tel: 010-65296331, E-mail: dingz77@sina.com

ABSTRACT: Objective To explore the growth of osteoblasts following culture on two absorbable collagen scaffolds. **Methods** MC3T3-E1 osteoblast cell line was inoculated on two collagen scaffolds (BME-10X[®] and Bio-Gide[®]) and co-cultured *in vitro*. The adhesion and migration of cells were detected by optical microscope. Cell proliferation was detected using CCK-8 reagent kit. The ultrastructure of the adhesion between cells and scaffolds were observed using electronic microscopy. **Results** MC3T3-E1 osteoblast cell line could adhere, migrate, and proliferate on both two membranes. The proliferation of cells showed no significant difference between porous layer and nonporous layer of BME-10X[®] ($P > 0.05$), while the rate of proliferation was significantly different between loose layer and dense layer of Bio-Gide[®] ($P < 0.05$). **Conclusion** Both BME-10X[®] and Bio-Gide[®] have good biocompatibility with MC3T3-E1 osteoblast cell line, and the double-layer structure of Bio-Gide[®] can prevent the cells to grow into the dense layer.

Key words: osteoblasts; biocompatibility; guided tissue regeneration; periodontal tissue engineering

Acta Acad Med Sin, 2011, 33(5): 538-542

牙周炎是由牙菌斑内的致病微生物导致的感染性疾病, 可造成牙槽骨的进行性吸收。目前主要的

牙周再生术有植骨术和引导组织再生术, 其中引导组织再生术 (guided tissue regeneration, GTR) 自上世纪

基金项目: 国家自然科学基金 (31070829) Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (31070829)

纪 80 年代提出以来已取得很大进展,其原理为通过放置 GTR 膜防止上皮细胞直接与牙根接触形成长上皮连接,为牙周膜和骨细胞的生长争取时间。其中胶原材料由于其抗原性低、生物相容性好并可参与组织愈合过程被广泛用作 GTR 膜。但研究显示 GTR 临床效果并非稳定,受多种因素的影响^[1]。随着生物工程的快速发展,将组织工程应用于牙周组织再生为治疗牙周缺损提供了新的思路^[2],其支架材料的选择是目前研究的热点之一。本研究选取两种商品化的 GTR 胶原膜,评估成骨细胞在其内部生长的效果,为牙周组织工程支架材料的选择提供参考。

材料和方法

材料 α -MEM 培养基、双抗、胰蛋白酶(中国医学科学院细胞中心);胎牛血清(Gibco,美国);CCK-8 细胞增殖试剂盒(日本同仁化学公司);超净工作台(哈尔滨东联);CO₂ 孵箱(SANYO,日本);扫描电镜(JSM-5600 LV,日本);BME-10X[®]膜为国产胶原膜(中国医学科学院生物工程研究所),主要成分为牛 I 型胶原,肉眼可见该膜一面表层多孔,另一面无孔,内部网状结构孔径大小不一。Bio-Gide[®]膜(瑞士 Geistlich 公司)主要成分为猪 I 型和 III 型胶原,分致密层和疏松层,肉眼可区分,疏松层表面粗糙,呈绒毛状,孔径为 30~100 μ m;致密层表面光滑,孔径为 0.5~2.0 μ m。无菌条件下将 BME-10X[®]膜和 Bio-Gide[®]膜剪成 8 mm \times 8 mm 大小, γ 射线照射灭菌,置 24 孔板内用加入血清和双抗的完全 α -MEM 培养基浸泡 24 h 后吸出培养基,负压吸干生物膜内部的液体后接种细胞。

MC3T3-E1 成骨细胞与胶原膜的共培养 从中国科学院力学研究所获赠 MC3T3-E1 成骨细胞系,使用 α -MEM 培养基(内加 10% 胎牛血清和 1% 双抗)培养,待细胞长满瓶底 80% 时使用 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 以 1:3 传代,取第 5 代细胞离心后制成细胞密度为 2×10^6 /ml 的细胞悬液。分别将 50 μ l 细胞悬液小心接种于 BME-10X[®]膜多孔层、无孔层和 Bio-Gide[®]膜疏松层、致密层的各层表面,置入 37 $^{\circ}$ C 孵箱中使细胞黏附,4 h 后加入培养基 500 μ l,每 3 天换液。

光镜观察 于培养第 14 天取出 MC3T3-E1 细胞与生物膜的复合物,PBS 冲洗 3 遍,10% 中性福尔马林固定 24h 后,常规石蜡包埋切片,HE 染色。

CCK-8 法检测细胞增殖 按上述步骤分别将细胞接种于 BME-10X[®]膜和 Bio-Gide[®]膜的各层表面为实验组,单纯生物膜不接种细胞为对照组,每组均设 3 个复孔,分别于培养 1、3、5、7、9、11、13 d 时更换新鲜培养基 500 μ l,每孔加入 50 μ l CCK-8 试剂并充分混匀,将培养板置入孵箱孵育 2 h,将待测孔的溶液混匀后以每孔 100 μ l 加入 96 孔板,注意避免产生气泡,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值,以对照孔调零。

扫描电镜观察 于培养第 10 天取出 MC3T3-E1 细胞与生物膜的复合物,PBS 冲洗 3 遍,2.5% 戊二醛固定,乙醇梯度脱水,真空干燥后喷金,扫描电镜观察。

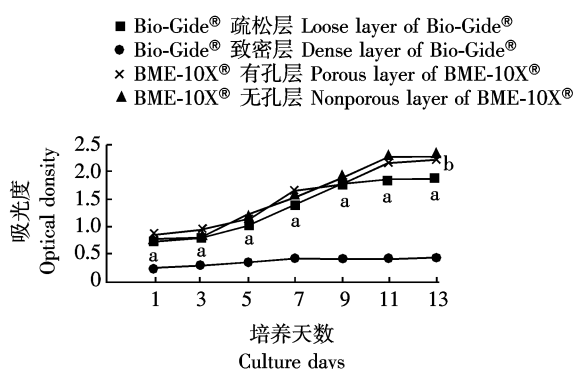
统计学处理 采用 SPSS 12.0 软件行方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

MC3T3-E1 成骨细胞在两种生物膜上的黏附情况 光镜下可见 BME-10X[®]膜内部较为疏松,孔隙较 Bio-Gide[®]膜大,MC3T3-E1 细胞均匀分布于 BME-10X[®]膜的内部,多孔层和无孔层无明显差异(图 1A)。Bio-Gide[®]膜疏松层和致密层分界明确,致密层孔隙明显小于疏松层,接种于疏松层的细胞可沿材料表面和孔隙迁移,但主要集中于疏松层(图 1B、C);接种于致密层表面的细胞呈单层生长,不能进入材料内部(图 1D)。

MC3T3-E1 成骨细胞在两种生物膜上的增殖情况 MC3T3-E1 细胞在 BME-10X[®]膜有孔层和无孔层表面的增殖差异无统计学意义($P > 0.05$),在 Bio-Gide[®]膜疏松层和致密层的增殖差异具有统计学意义($P < 0.05$)。细胞在 BME-10X[®]膜上第 3~11 天为对数生长期,第 13 天出现平台期。细胞在 Bio-Gide[®]膜致密层黏附数量少且增殖缓慢,在疏松层从第 3 天开始呈对数生长,在第 9 天趋于平稳,增殖后最终细胞数量较 BME-10X[®]膜少,二者比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 2)。

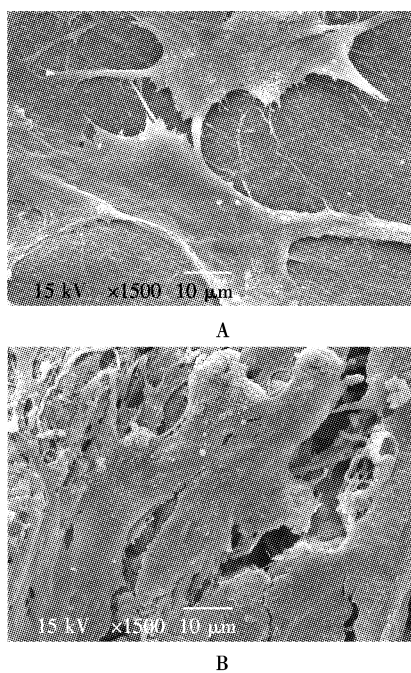
扫描电镜观察结果 MC3T3-E1 细胞黏附于 BME-10X[®]膜和 Bio-Gide[®]膜疏松层的胶原纤维,伸出胞浆突起和片状伪足,在 Bio-Gide[®]上细胞分泌的细胞外基质较多,在 BME-10X[®]上的细胞较为分散生长(图 3)。



与 Bio-Gide®膜致密层的细胞增殖相比,^a $P < 0.05$; 与 Bio-Gide®膜疏松层最终细胞数量相比,^b $P < 0.05$

^a $P < 0.05$ compared with the rate of proliferation of cells on the dense layer of Bio-Gide®; ^b $P < 0.05$ compared with the ultimate number of cells on the loose layer of Bio-Gide®

图2 MC3T3-E1 细胞在两种胶原膜的 CCK-8 实验结果
Fig 2 Growth of MC3T3-E1 cells on two collagen membranes in the CCK-8 experiment



A. BME-10X® (×1500); B. Bio-Gide® (×1500)
图3 MC3T3-E1 细胞接种于胶原膜表面体外共培养 10 d 后扫描电镜图像

Fig 3 Scanning electron microscopy of MC3T3-E1 cell line adherent to collagen membranes after 10 days

讨 论

牙周病导致牙周附着降低和牙槽骨丧失, 在牙

周病早期牙周组织尚有少量自身修复, 但由于牙周支持组织结构的复杂性, 一旦发生牙周炎后很少发生牙周组织再生, 需要植骨术、GTR 等治疗手段促进牙周组织包括牙周膜、牙槽骨和牙骨质的再生^[1]。GTR 是利用膜的物理屏障功能阻止牙龈上皮细胞与根面接触, 为根方牙周膜来源细胞和牙槽骨细胞提供空隙, 促进其优先占据根面并向冠方生长爬行^[3-4], 使特定组织的再生功能得到最大的发挥。一般 GTR 材料应满足以下要求: 良好的生物相容性、有利于创口愈合、良好的选择性细胞阻隔功能、可操作性好^[5]。

GTR 自上世纪 80 年代提出以来已广泛应用于临床, 并取得了良好的效果, 但研究显示其临床效果并非稳定, 缺损面积、患者年龄以及遗传等因素决定了缺损区域再生细胞的数量^[1]。Ripamonti^[6]、Bartold 等^[7]认为, 通过组织工程的手段, 即将合适的支架材料、种子细胞和生长因子体外共培养后植入缺损处可弥补 GTR 的不足, 获得理想的牙周组织修复。

细胞外基质对细胞的黏附、增殖和分化发挥重要的作用, 牙周组织工程需在缺损区域重建细胞外基质^[8]。胶原作为一种人工细胞外基质, 由于其具有可吸收性、无毒副作用以及机械强度、可塑性良好而广泛用作组织工程支架材料。并且研究表明 I 型胶原可促进成骨细胞表达碱性磷酸酶、I 型胶原和骨桥蛋白^[9]。因此本研究选取两种商品化胶原膜 BME-10X®和 Bio-Gide®评估成骨细胞在其内部生长的效果。

细胞能够黏附、迁移、增殖是重要的生物相容性评价标准, 贴壁细胞黏附后才可迁移、增殖和分化^[10]。细胞形态可反映细胞黏附的状况, 扁平的细胞可通过胞浆突起和片状伪足牢固的黏附^[11], 本研究扫描电镜结果示细胞在 BME-10X®膜和 Bio-Gide®膜疏松层的表面均呈纺锤形且伸出胞浆突起和片状伪足, 表明两种材料的表面均能促进成骨细胞的黏附。Hillmann 等^[12]认为, 细胞培养 2~3 周后是材料的最佳塑形时期, 本研究取细胞与材料共培养 14d 后的组织切片示成骨细胞深入 BME-10X®膜内部生长, 均匀布满整个膜, 表明其生物相容性好。在 Bio-Gide®膜成骨细胞可黏附于疏松层表面且有三维方向的迁移, 但多集中于疏松层, 与 Hillmann 等^[12]和闫福华等^[13]采用牙龈成纤维细胞和牙周膜细胞的结果一致。将成骨细胞接种于致密层发现细胞在表

面呈单层生长,不能进入材料内部,可能与其设计有关,表明 Bio-Gide[®]膜有良好的细胞阻隔功能,并印证了 Takata 等^[14]关于材料表面性能可影响细胞黏附,粗糙多孔的表面更利于细胞黏附的观点。

本研究采用 CCK-8 测定细胞增殖率,其原理是活细胞线粒体脱氢酶转化的黄色甲臞产物为高度水溶性,生成的甲臞物的数量与活细胞的数量成正比,用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量^[15]。其操作简便、灵敏度高且对细胞毒性小,目前广泛用于细胞增殖的检测。通过 CCK-8 细胞增殖实验显示成骨细胞在 BME-10X[®]膜的两层和 Bio-Gide[®]膜疏松层均呈对数生长,增殖后 Bio-Gide[®]膜疏松层最终细胞数量较 BME-10X[®]膜少;在 Bio-Gide[®]膜致密层黏附细胞数量少且增殖缓慢。结合组织切片结果,笔者认为两种材料均可促进成骨细胞的黏附、迁移和增殖,有良好的生物相容性。因扫描电镜只能观察到材料表面的情况,所以尽管图 3 示成骨细胞在 BME-10X[®]膜表面细胞生长较为分散且分泌细胞外基质较少,但从图 1、2 看到细胞在 BME-10X[®]膜孔隙内生长情况良好,细胞深入材料全层,分布较为均匀,更为接近正常骨组织形态,符合组织工程支架材料对细胞三维培养的要求^[16];而在 Bio-Gide[®]膜内,细胞集中生长在疏松层,致密层未见细胞生长,符合 GTR 材料的要求,通过将致密层朝牙龈软组织侧放置可阻止牙龈上皮细胞进入牙周袋内与牙根面接触;为相对生长缓慢的骨细胞提供生长空间。但因细胞不能模仿机体组织在膜全层生长, Bio-Gide[®]不宜单独用作牙周组织工程支架材料,与 Hillmann 等^[12]采用牙龈成纤维细胞得出的结论一致。

细胞接种于材料后其生物合成功能也是评估牙周组织工程支架材料的重要标准,研究显示 GTR 胶原膜可抑制骨髓基质细胞向破骨方向分化,但其机制尚不清楚^[17]。生长因子是组织工程的三大要素之一^[2],本研究均尚未涉及。综合考虑体外实验以及采用单一细胞系的局限性,今后的研究将不断改进深入。

本研究将 MC3T3-E1 成骨细胞系与 BME-10X[®]膜和 Bio-Gide[®]膜共培养,对材料的生物相容性以及作为牙周组织工程支架材料的可能性做出了研究。结果显示,二者均有良好的生物相容性,MC3T3-E1 成骨细胞均可在材料的纤维之间黏附、增殖,但是在控制细胞生长的方向上存在差异, Bio-Gide[®]膜的双

层结构可阻止细胞向致密层生长,因此,与 BME-10X[®]膜相比,前者可以更好地阻止上皮来源的细胞优先占据根面。

(志谢:感谢北京协和医院中心实验室王彭主任,中国医学科学院生物工程研究所张其清教授、李学敏老师对本研究的指导和帮助)

(本文图 1 见插图第 3 页)

参 考 文 献

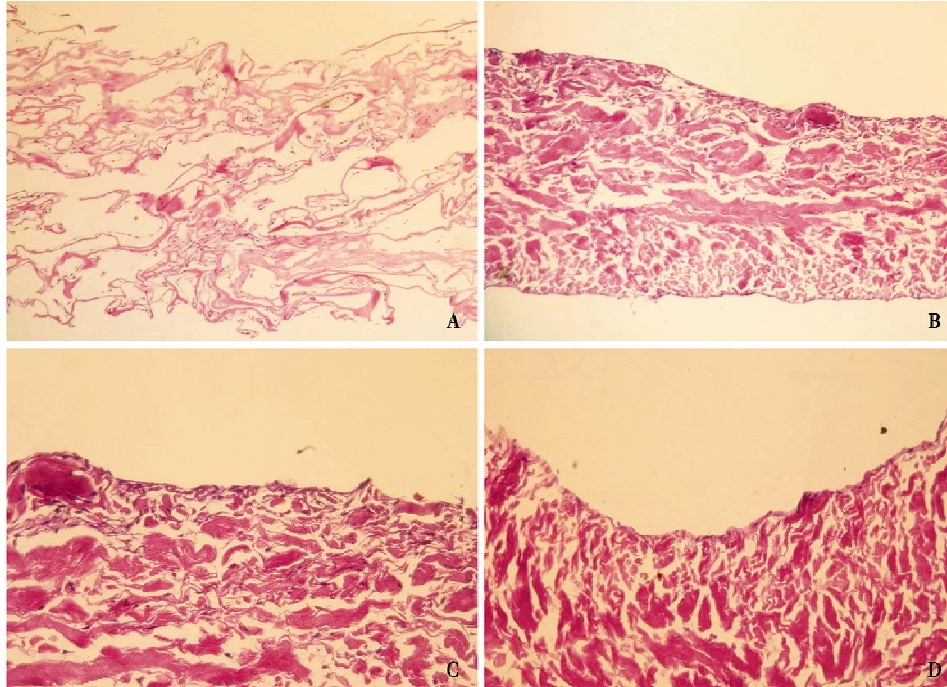
- [1] McClain PK, Schallhorn RG. Focus on furcation defects-guided tissue regeneration in combination with bone grafting [J]. *Periodontol*, 2000, 22(1):190-212.
- [2] Chen FM, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities [J]. *Tissue Eng Part B ReV*, 2010, 16(2):219-255.
- [3] Dahlin C, Linde A, Gottlow J, et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1988, 81(5):672-676.
- [4] Karring T, Nyman S, Gottlow J, et al. Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies [J]. *Periodontol*, 2000, 1(1): 26-35.
- [5] Seantlebury TV. 1982-1992: a decade of technology development for guided tissue regeneration [J]. *J Periodontol*, 1993, 64(11):1129-1137.
- [6] Ripamonti U. Recapitulating development: a template for periodontal tissue engineering [J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(1):51-57.
- [7] Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, et al. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology [J]. *Periodontol*, 2000, 24(1):253-269.
- [8] Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications [J]. *Tissue Eng Part B*, 2008, 14(2):149-165.
- [9] Shi S, Kirk M, Kahn AJ. The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype [J]. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(8):1139-1145.
- [10] Grinnell F. Cellular adhesiveness and extracellular substrata [J]. *Int Rev Cytol*, 1978, 53:65-144.
- [11] Trylovich DJ, Cobb CM, Pippin DJ, et al. The effects of the Nd: YAG laser on *in vitro* fibroblast attachment to endotoxin-treated root surfaces [J]. *J Periodontol*, 1992, 63(7): 626-632.
- [12] Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, et al. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(6): 1461-

- 1469.
- [13] 闫福华, 骆凯, 金岩, 等. 牙周膜成纤维细胞与三种可吸收引导组织再生膜生物相容性实验研究 [J]. 口腔医学研究, 2003, 19(3):161-165.
- [14] Takata T, Wang HL, Miyauchi M. Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes [J]. J Periodont Res, 2001, 36(5):322-327
- [15] Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay [J]. Anal Commun, 1999, 36(2):47-50.
- [16] Dietmar W. Hutmacher Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [J]. Biomaterials, 2000, 21(24):2529-2543.
- [17] Agis H, Magdalenko M, Stogerer K, et al. Collagen barrier membranes decrease osteoclastogenesis in murine bone marrow cultures [J]. Clin Oral Impl Res, 2010, 21(6):656-661.

(收稿日期: 2011-01-25)

成骨细胞在两种胶原支架材料上的生长特征

(正文见第 538 页)



A. BME-10X[®] (×10); B. Bio-Gide[®] (×10); C. Bio-Gide[®]疏松层 (×20); D. Bio-Gide[®]致密层 (×20)

A. BME-10X[®] (×10); B. Bio-Gide[®] (×10); C. loose layer of Bio-Gide[®] (×20); D. dense layer of Bio-Gide[®] (×20)

图 1 MC3T3-E1 细胞接种于胶原膜表面体外共培养 14 d 后光镜下结果 (HE 染色, 蓝染示细胞)

Fig 1 Light microscopy of MC3T3-E1 osteoblast cell line attached to two collagen membranes after 14 days (HE staining; blue staining indicates cells)