

# 成骨细胞复合原位成型磷酸钙骨水泥的细胞学研究

张 洲<sup>1\*</sup>, 乔朋艳<sup>1</sup>, 肖军军<sup>2</sup>, 董利民<sup>3</sup>, 谢秋菲<sup>1△</sup>, 徐 韬<sup>4</sup>

(1. 北京大学口腔医学院·口腔医院修复科, 北京 100081; 2. 北京大学基础医学院细胞生物学系, 北京100191; 3. 清华大学核能与新能源技术研究院, 精细陶瓷北京市重点实验, 北京 100084; 4. 北京大学口腔医学院·口腔医院预防科, 北京 100081)

**[摘 要]** **目的:**通过体外细胞培养实验,观察分析壳聚糖微球/磷酸钙骨水泥、 $\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -TCP)/磷酸钙骨水泥、含钾磷酸钙骨水泥浆料固化过程对成骨细胞的影响以及固化后 10 d 细胞的生物活性变化。**方法:**首先以兔的骨髓为组织来源,采用密度梯度分离法和贴壁分离法分离培养原代兔骨髓基质细胞(rabbit marrow stromal cell, rMSC),通过流式细胞分析和分选得到成分比较单一的兔骨髓基质细胞,经过体外诱导得到兔成骨细胞,用茜素红染色法验证其成骨功能。将 rMSC 分别与上述 3 种骨水泥固化块及其浆料复合培养,空白对照组是直接 在 24 孔板上接种细胞,每组 4 个样本。在复合培养的第 1、4、7、10 天,通过酸性磷酸酶(acid phosphatase assay, APA)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性测定,检测细胞的增殖和分化能力;吖啶橙(acridine orange, AO)染色后荧光显微镜观察,对细胞进行计数并分析。环境扫描电子显微镜观察细胞在材料表面的生长、黏附状况。各组结果进行双因素方差分析,用 LSD 法进行组间比较。**结果:**3 种骨水泥浆料在固化过程中均对 rMSC 有较大影响,细胞的增殖活性(复合培养第 10 天 APA 活性浆料组吸光度平均值分别为 0.049, 0.050, 0.049; 固化块组分别为 0.898, 0.867, 0.909;  $P < 0.001$ )和分化能力(复合培养第 10 天 ALP 活性浆料组平均值分别为 0.775, 0.782, 0.798 U/g protein; 固化块组分别为 49.288, 49.631, 49.744 U/g protein;  $P < 0.001$ )均明显低于固化块组,细胞数目也明显减少(复合培养第 10 天细胞数目每视野平均为 3.7, 3.7, 3.7 个; 固化块组分别为 91.1, 89.7, 93.7 个,  $P < 0.001$ ),且这种影响是不可恢复的;rMSC 在 3 种骨水泥的固化块上能较好地黏附,细胞数目、增殖和分化能力基本不受影响。**结论:**可注射性磷酸钙骨水泥浆料固化过程对成骨细胞有较大的影响,用成骨细胞复合浆料前需对细胞采取保护措施。

**[关键词]** 成骨细胞; 磷酸钙类; 骨代用品

**[中图分类号]** R68 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2011)01-0067-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-167X.2011.01.015

## Cytological study on osteoblasts and *in-situ* setting calcium phosphate cements

ZHANG Zhou<sup>1\*</sup>, QIAO Peng-yan<sup>1</sup>, XIAO Jun-jun<sup>2</sup>, DONG Li-min<sup>3</sup>, XIE Qiu-fei<sup>1△</sup>, XU Tao<sup>4</sup>

(1. Department of Prosthodontics, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China; 2. Laboratory of Cells and Biology, Peking University School of Basic Medical Science, Beijing 100191, China; 3. Beijing Key Lab of Fine Ceramics, Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Energy Science Building, Beijing 100084, China; 4. Department of Preventive Dentistry, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China)

**ABSTRACT Objective:** To evaluate biocompatibility of three kinds of self-developed injectable calcium phosphate cements (CPCs): chitosan microspheres/CPC,  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP)/CPC, and  $K^+$ /CPC and the viability of the osteogenic cells cultured with CPC pastes and discs for 10 days. **Methods:** The rabbit marrow stromal cells (rMSCs), isolated from rabbit bone marrow with density gradient centrifugation and flow cytometer, were cultured, expanded and induced into osteoblasts. Alizarin red staining was used to determine the function of ossification. Then, rMSCs were incubated randomly on both the pastes and solidified discs of the 3 kinds of CPCs. The cells cultured on a 24-well plate were as blank control. Each group had 4 samples. The proliferation and differentiation of each group were observed using acid phosphatase assay (APA) and by testing the activity of alkaline phosphatase (ALP) at day 1, 4, 7, and 10. After stained by acridine orange (AO), the cells were observed, counted and ana-

**基金项目:** 国家自然科学基金(30772447)和北京大学医学部引进人才计划(bmu2009139)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China(30772447) and The Talent Introduction Project of Peking University Health Science Center(bmu2009139)

<sup>△</sup> Corresponding author's e-mail, xieqiu@163.com

\* 现在北京五月花口腔诊所

lyzed with an epifluorescence microscopy. The morphology of the cells on CPCs was observed with scanning electron microscope (SEM). The data was subjected to two-way ANOVA followed by LSD test to compare between groups. **Results:** The process of solidification of the three kinds of CPC pastes has the toxic effect on cells, which is irreversible. The proliferation (the average absorption of pastes are 0.049, 0.050, 0.049; the discs are 0.898, 0.867, 0.909;  $P < 0.001$ ), function (the average ALP activity of pastes after ten days are 0.775, 0.782, 0.798 U/g protein; the discs are 49.288, 49.631, 49.744 U/g protein;  $P < 0.001$ ) and number of cells (the average number of cells of pastes after ten days are 3.7, 3.7, 3.7; the discs are 91.1, 89.7, 93.7;  $P < 0.001$ ) directly exposed to CPC paste significantly decreased compared with those contacting with the discs. By contrast, cells on the three kinds of discs showed better viability, proliferation, and ossification and cell numbers increased obviously with culture days. **Conclusion:** The process of solidification of the three kinds of CPC pastes has toxic effect on cells. Further study needs to explore a method to protect osteoblasts when seeded into the CPC paste.

**KEY WORDS** Osteoblasts; Calcium phosphates; Bone substitutes

骨是人体的支撑系统,具有支持、承重、力的传导、保护内脏器官等功能,是人体的重要组成部分<sup>[1]</sup>。在临床上,由于创伤、感染、肿瘤以及发育异常等原因导致的骨缺损发病率较高。由于有些缺损面积较大,单纯依靠骨的自身修复无法完全愈合,必须采用外科手术进行治疗<sup>[2]</sup>。最早用于骨修复的是自体骨移植和同种异体骨移植,它们都有着明显的自限性而不能满足临床治疗的要求<sup>[3]</sup>,因此人工骨替代材料的研究越来越受关注。近年来出现的磷酸钙骨水泥 (calcium phosphate cement, CPC)——一种新型的人工骨修复材料,因其化学成分与人体骨组织的无机成分极为相似,生物相容性好,同时该材料在数分钟内可固化,固化体的物理性能良好,同时具有良好的生物相容性、成骨活性、降解活性等,在临床上得到了很好的应用<sup>[4]</sup>。本课题组与清华大学核能与新能源技术研究院精细陶瓷北京市重点实验室及北京大学基础医学院细胞生物学系合作,就开发的3种复合型可注射性磷酸钙骨水泥浆料固化过程对兔成骨细胞的影响程度,以及固化过程完成后细胞生物学活性的变化进行研究分析,进而为进一步研制新型骨水泥材料提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 兔骨髓基质细胞的分离培养和成骨诱导

**1.1.1 主要试剂** alpha Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM)购自迈晨科技有限公司,特级胎牛血清购自北京元亨金马生物技术有限公司,鼠抗兔 CD44 多克隆抗体、鼠抗兔 CD45 多克隆抗体、荧光标记的羊抗鼠二抗购自美国 Santa Cruz 公司,其他常用试剂均为市售。

**1.1.2 实验方法和步骤** 大耳白兔 1 只,4 月龄,称重,从耳缘静脉注射 3% (1 mL/kg) 戊巴比妥钠进行全麻,无菌条件下用 16 号 (30 mm) 髂骨穿刺针从股骨第三转子尖下方 3~5 mm 处,沿与股骨轴线垂

直从外向内上方穿入,到达髓腔后立即注入肝素 (1 000 U/mL) 1 mL,抽取股骨近干骺端骨髓 4 mL。将骨髓分别注入装有少量抗凝液的 2 个试管,混匀。将混悬液贴壁轻轻加入预置装有 5 mL Percol 分离液的离心管中,2 000 r/min,离心 30 min。收集云雾状白膜层的单个核细胞,置于离心管内用  $\alpha$ -MEM 培养液洗涤 2 次 (1 000 r/min,离心 10 min),用含 10% FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养液重悬后接种于培养瓶中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养。接种后 2~3 d 开始可见有细胞贴壁,8~10 d 原代细胞首次传代。经流式细胞分析分选、瑞氏染色以获得成分比较单一的 CD44 阳性、CD45 阴性的兔骨髓基质细胞。经成骨诱导培养液诱导后,用 0.1% 饱和茜素红溶液染色鉴定细胞的成骨能力。取 4~6 代细胞用于后续实验研究。

### 1.2 兔骨髓基质细胞与材料复合培养

**1.2.1 实验材料** 由清华大学核能与新能源技术研究院精细陶瓷室提供。 $\beta$ -TCP/磷酸钙骨水泥和壳聚糖微球/磷酸钙骨水泥:粉剂是在  $\alpha$ -磷酸三钙骨水泥 ( $\alpha$ -tricalcium phosphate,  $\alpha$ -TCP)/磷酸二氢钙/碳酸钙体系分别加入 50% (质量分数) 的  $\beta$ -TCP 和 10% (质量分数) 的壳聚糖微球,得到  $\beta$ -TCP/磷酸钙骨水泥和壳聚糖微球/磷酸钙骨水泥的固相粉末,选用 pH 值为 7.5 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲溶液为固化液。含钾磷酸钙骨水泥:固相粉末为磷酸钙骨水泥复合粉末 (CMC 粉末),固化液选用 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲溶液。固化液/固相粉末比为 1 mL/g。固相粉末用 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线在辐照剂量为 25 kGy 的条件下辐照灭菌,固化液通过高温、高压下严密消毒,分别密封包装,用于实验。

**1.2.2 实验步骤** 固化块组:接种细胞前,将壳聚糖微球/磷酸钙骨水泥固化块、 $\beta$ -TCP/磷酸钙骨水泥固化块和含钾磷酸钙骨水泥固化块放入 24 孔板,70% 乙醇灭菌过夜,PBS 冲洗,紫外照射,培养液平

衡过夜。每孔接种 50  $\mu\text{L}$  含有  $2 \times 10^4$  个细胞的诱导培养基,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中静置 3 h,每孔再补加 1.5 mL 培养基进行培养。浆料组:接种细胞前,将壳聚糖微球/磷酸钙骨水泥粉末、 $\beta$ -TCP/磷酸钙骨水泥粉末和含钾磷酸钙骨水泥粉末分装成每孔 0.2 g 放入 24 孔板,每孔加入相应固化液 0.2 mL,调和成糊状,修整表面,即刻每孔接种 50  $\mu\text{L}$  含有  $2 \times 10^4$  个细胞的诱导培养基,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中静置 3 h,每孔再补加 1.5 mL 培养基进行培养。

### 1.3 细胞生物学性能的检测

壳聚糖微球/磷酸钙骨水泥固化块组、 $\beta$ -TCP/磷酸钙骨水泥固化块组、含钾磷酸钙骨水泥固化块组、壳聚糖微球/磷酸钙骨水泥浆料组、 $\beta$ -TCP/磷酸钙骨水泥浆料组、含钾磷酸钙骨水泥浆料组和阴性对照组分别在复合培养的第 1、4、7、10 天,每组每个时间点平行取 4 个样本,阴性对照组为置于培养液中不接种细胞的材料,进行酸性磷酸酶检测 (acid phosphatase assay, APA)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性测定和吖啶橙 (acridine orange, AO) 荧光染色和环境扫描电子显微镜观察。

### 1.4 统计学分析

采用统计软件 SPSS 14.0 for Windows 分析实验数据。各组结果进行双因素方差分析 (two-way ANOVA),用最小显著差 (LSD) 法进行组间比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 兔骨髓基质细胞分离培养和成骨诱导

**2.1.1 光镜观察** 原代细胞接种 1~3 d 后开始贴壁,并开始分裂增殖,细胞体积增大,并伸出突起,呈多角形、梭形。随着培养时间延长,细胞呈集落性生长,呈长梭形外观,细胞突起相互连接,并呈辐射状排列 (图 1),生长期细胞分裂较多,细胞突起相互连接,并沿一定方向排列。7~10 d 后细胞长满瓶底,传代细胞生长明显加快,3~4 d 即可传代。

**2.1.2 兔骨髓基质细胞鉴定的结果** 流式细胞分析:第 4 代细胞 CD44 阳性 16.83%, CD45 阳性 2.63%;第 5 代细胞 CD44 阳性 25.75%, CD45 阳性 6.32%。流式细胞分选:经过分选得到成分比较单一的 CD44 阳性、CD45 阴性的兔骨髓基质细胞。瑞氏染色结果:光镜下可见细胞核被深染呈蓝黑色,胞浆淡染呈淡紫色。细胞呈长梭形,细胞核呈圆形,较大,可见核仁明显 (图 2)。

**2.1.3 兔骨髓基质细胞的成骨诱导及鉴定结果** 成骨诱导的细胞生长速度减慢,成骨诱导后,倒置显

微镜下可见逐渐形成透光性低的结节样物质。细胞爬片固定后,茜素红染色阳性 (图 3),细胞胞浆呈淡红色,胞外基质中可见深染的钙化结节 (箭头所示)。利用兔骨髓为材料所获得的骨髓基质细胞进行体外培养,经梯度密度分离法、贴壁分离法和流式细胞分析分选,得到了成分比较单一的骨髓基质细胞,经过诱导,可见钙化结节形成,证明骨髓基质细胞转化为具有成骨功能的成骨细胞,可以用于后续实验。

### 2.2 兔骨髓基质细胞与材料复合培养后生物学性能检测

**2.2.1 酸性磷酸酶法测定细胞增殖活性** CPC 材料种类和培养时间对 APA 吸光值具有显著性影响。细胞与材料复合培养过程中,在每个采样时间点上,固化块组 APA 吸光值都大于浆料组,差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 图 4);随时间延长,固化块组的每种材料的 APA 吸光值逐渐增大明显,差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。

**2.2.2 碱性磷酸酶活性测定** CPC 材料种类和培养时间对 ALP 活性具有显著性影响。细胞与材料复合培养过程中,在每个采样时间点上,固化块组 ALP 活性都大于浆料组,差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。随培养天数增加,固化块组的每种材料的 ALP 活性均逐渐增强明显,且具有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 图 5)。

**2.2.3 吖啶橙荧光染色** 吖啶橙荧光染色后在荧光显微镜下观察黏附于骨水泥浆料和固化块的细胞并计数分析。复合培养 10 d 后,黏附于材料固化块上的细胞发出亮绿色的荧光,而浆料上仅有少数细胞存留,明显少于固化块组。方差分析显示 CPC 材料种类和培养时间对细胞数均具有显著性影响。细胞与材料复合培养过程中,在每个采样时间点上,固化块组细胞数都远大于浆料组细胞数,差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 图 6),且这种差异与材料种类无关,只与材料的状态为固化块还是浆料有关。随培养天数增加,固化块组的每种材料的细胞数目均明显增多,差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。

**2.2.4 细胞的环境扫描电子显微镜观察** 细胞与 3 种材料的固化块附着良好,细胞大多呈多角形,向四周伸出长短不一的伪足。细胞或分散在材料表面,或拉伸在孔壁之间,可覆盖表面孔隙,形成独立的网状结构,也有部分细胞进入孔隙内部。细胞数随时间增长明显增多 (图 7~9)。细胞与 3 种材料的浆料复合培养后,基本无法观察到细胞 (图 10~12)。

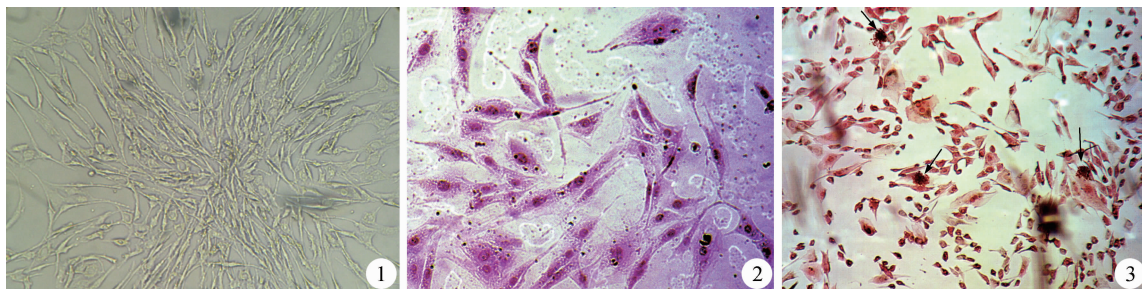
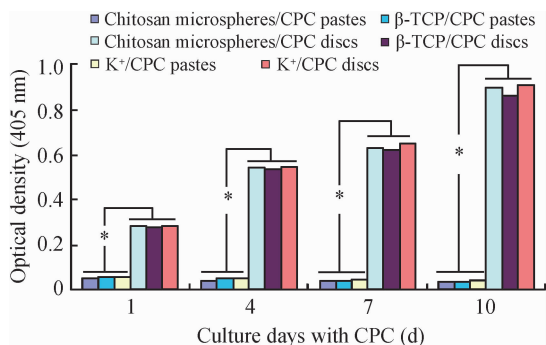


图 1 原代 rMSC 培养第 8 天 (×40) 图 2 分选后的 rMSC (瑞氏染色 ×100)

图 3 rMSC 经诱导后 (茜素红染色 ×10) 可见钙化结节 (箭头所示)

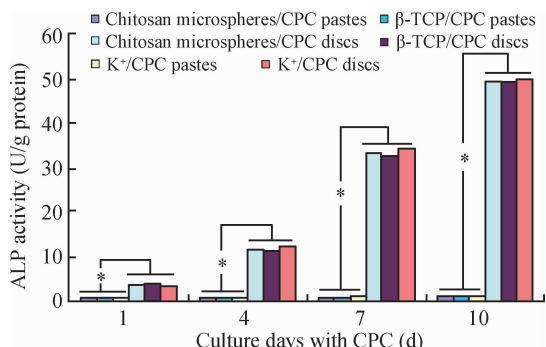
Figure 1 Primary culture of rMSC to 8 d (×40) Figure 2 Isolated rMSC (Wright's stain ×100), Figure 3 Induced rMSC (Alizarin red stain ×10), Calcified nodule in the extracellular matrix (arrow)



\* P < 0.001, comparison between pastes and discs of 3 kinds of CPC.

图 4 rMSC 在 6 组材料上培养不同时间 APA 法检测细胞增殖活性结果

Figure 4 APA assay to identify the proliferation function of rMSCs for 6 groups at day 1, 4, 7, 10



\* P < 0.001, comparison of different culture times of each group.

图 5 rMSC 在 6 种材料上培养 4 个时间点 ALP 法检测细胞成骨活性结果

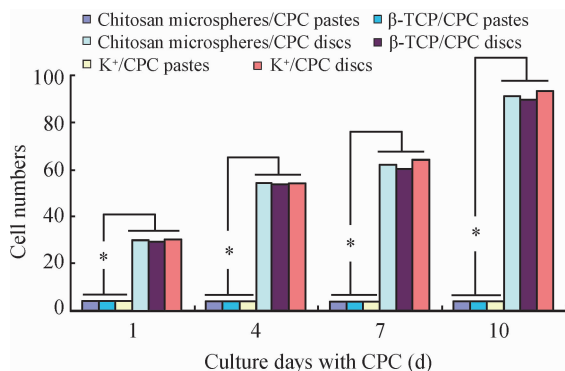
Figure 5 ALP assay to identify the ossification function of rMSCs for 6 groups at day 1, 4, 7, 10

### 3 讨论

#### 3.1 兔骨髓基质细胞的分离培养和成骨诱导

本实验利用兔骨髓为材料获得的骨髓基质细胞进行体外培养,采用 Percoll 分离液,利用密度梯度离心法并结合贴壁分离筛选法来分离纯化骨髓基质细胞,有效地避免了一些缺陷。由于骨髓基

质细胞没有特异性表面标志物,因而本实验采用 CD44 (干细胞表面标志物) 作为阳性抗体, CD45 (白细胞祖细胞表面标志物) 作为阴性抗体,经流式细胞仪分析可见,细胞表达 CD44,不表达 CD45,说明培养的细胞是不同于造血干细胞的另一类干细胞,同时随着细胞的传代,骨髓基质细胞含量逐步上升,变化趋势与文献报告一致。为进一步纯化细胞,又采用流式细胞分选得到了成分比较单一的骨髓基质细胞,通过瑞氏染色,进一步观察了细胞形态,细胞核深染,呈圆形,体积较大,核仁明显,说明细胞正处于活跃的增殖阶段。



\* P < 0.001, comparison between pastes and discs of 3 kinds of CPC.

图 6 rMSC 在 6 组材料上培养 4 个时间点的吖啶橙染色后细胞数比较

Figure 6 Acridine orange stain to count the numbers of rMSCs for 6 groups at day 1, 4, 7, 10

骨髓基质细胞在体外诱导培养,用茜素红染色证明了体外培养的骨髓基质细胞具有成骨能力<sup>[5]</sup>。茜素红染色的原理是成骨诱导的过程使钙离子能够以钙盐的方式沉淀下来,而茜素红染料可以与钙离子结合形成深红色的螯合物。本实验中细胞经诱导后,可见钙化结节样物质形成,茜素红染色阳性,说明本方法培养的兔骨髓基质细胞虽然脱离了原有体内组织环境仍具有成骨细胞特性,而细胞本身被淡染,说明细胞浆内存在钙离子。

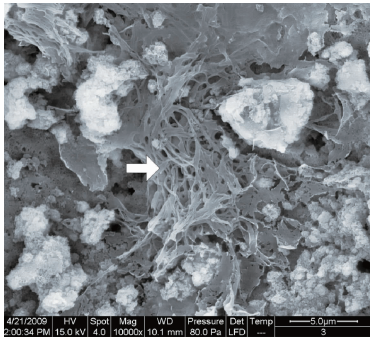


图7 rMSC与壳聚糖微球/CPC固化块复合培养10 d,材料表面可见细胞生长旺盛,伪足呈丝状伸展(如箭头所示)

Figure 7 SEM morphology of rMSC cultured on chitosan microspheres/CPC discs for 10 days. Cells grew vigorously (arrow)

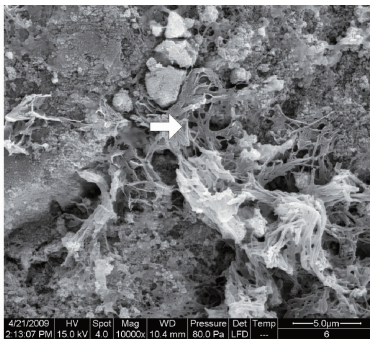


图8 rMSC与 $\beta$ -TCP/CPC固化块复合培养10 d,材料表面可见细胞生长旺盛,伪足相互伸展交织呈网状(如箭头所示)

Figure 8 SEM morphology of rMSC cultured on  $\beta$ -TCP /CPC discs for 10 days. Cells grew vigorously (arrow)

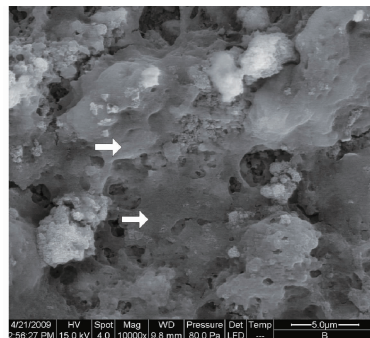


图9 rMSC与含钾CPC固化块复合培养10 d,材料表面细胞生长旺盛成片

Figure 9 SEM morphology of rMSC cultured on  $K^+$ /CPC discs for 10 days. Cells grew vigorously

### 3.2 兔骨髓基质细胞与材料复合培养

**3.2.1 磷酸钙骨水泥的研究背景** 在过去的几十年中,有关CPC的生物学研究已有大量报道,从生物安全性检测到植入体内的组织相容性观察,进而分析其降解过程中产生的颗粒碎片对细胞功能的影响,研究在不断深入。目前普遍使用的两种方法:一是将材料直接植入实验动物肌肉或骨组织内,间隔一段时间后取出观察组织生长情况;

二是在简化的体外模型上研究细胞的黏附、伸展、生长和生物学特性。细胞的生物相容性研究是检测材料生物相容性的一种快速、简便、重复性好的方法,具有诸如排除非特异性因素、敏感性高等优点,但是毕竟体外培养时间短,影响因素相对简单,对于材料在机体内长期复杂环境的生物学变化,还需要配合体内实验共同对材料的生物相容性做出评价。

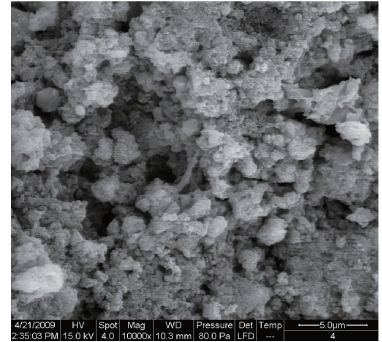


图10 rMSC与壳聚糖微球/CPC浆料复合培养10 d,材料表面局部未见细胞

Figure 10 SEM morphology of rMSC cultured on chitosan microspheres/CPC pastes for 10 days. None cell grew

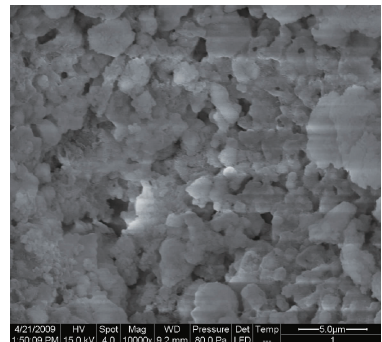


图11 rMSC与 $\beta$ -TCP/CPC浆料复合培养10 d,材料表面局部未见细胞

Figure 11 SEM morphology of rMSC cultured on  $\beta$ -TCP /CPC pastes for 10 days. None cell grew

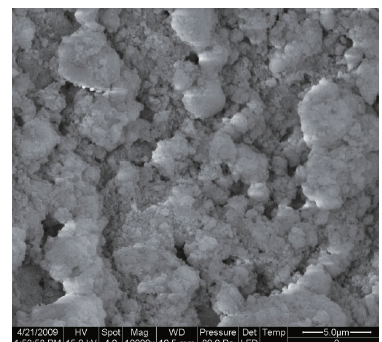


图12 细胞与含钾CPC浆料复合培养10 d,材料表面局部未见细胞

Figure 12 SEM morphology of rMSC cultured on  $K^+$ /CPC pastes for 10 days. None cell grew

**3.2.2 CPC 材料的选择** 本研究选取了本课题组之前研究已经证明了具有良好生物相容性的壳聚糖微球/磷酸钙骨水泥、 $\beta$ -TCP/磷酸钙骨水泥以及含钾磷酸钙骨水泥的固化块作为对照组<sup>[6]</sup>,而以它们相对应的浆料作为实验组,可注射性骨水泥是以浆料的形态被使用的,因而浆料状态骨水泥的细胞学性质具有重要临床意义。本试验着重研究了浆料的固化过程对细胞的影响,同时,将实验的周期定为 10 d,这是一个相对于材料固化时间(几分钟)来说比较长的时间,而相对于实验细胞的增殖周期(3 ~ 4 d)来讲也是足够长的,所以研究的结果可以作为评价材料固化过程对细胞影响以及固化过程完成后细胞生物学活性是否有所恢复的依据。

**3.2.3 实验细胞的选择** 不同组织来源的细胞对不同材料的敏感性是有差异的<sup>[7]</sup>,对于骨替代材料来说,其最终将植入骨组织内,所接触的是骨环境,因此骨替代材料应选择骨组织来源的细胞作为实验细胞。本实验利用兔骨髓组织,经原代分离、培养、纯化得到兔骨髓基质细胞,再经过诱导成为成骨细胞,作为实验细胞,为以后兔的动物实验做准备。该方法具有以下优点:来源丰富,可以多次抽取;取材简单安全,对供体损伤小;成骨能力确切;能提供同源细胞,无免疫原性,使自体回植成为可能。

**3.2.4 实验结果的分析** 目前关于可注射性 CPC 的细胞相容性研究主要集中在 CPC 固化完成后对细胞生物学活性的影响<sup>[8]</sup>,而 CPC 固化过程中局部微环境的变化对细胞影响方面的研究甚少。CPC 固化过程是一个溶解-析出晶体的过程,变化最为显著的指标是温度、pH 值和离子浓度<sup>[9]</sup>。通过 APA 法检测细胞在材料上的增殖活性可以得知,细胞与 3 种骨水泥浆料复合培养后,绝大部分细胞死亡,只有极个别细胞存活,且没有随时间延长回复增殖能力的迹象,而在对照组与骨水泥固化块复合培养的细胞,细胞生长良好,增殖旺盛。方差分析的结果表明,材料的状态对细胞数有显著影响,而实验采用的 3 种骨水泥之间差异并没有统计学意义,这一鲜明的对比表明,骨水泥浆料固化的过程对细胞产生了致命的影响。本研究将观察时间延长至复合培养后的 10 d,10 d 是正常细胞传代 2 ~ 3 次的时间,结果

发现细胞的增殖活性、成骨活性以及能观察到的活细胞数没有显著性的改变,说明材料固化过程对细胞生物学活性的影响是不可逆转的,在固化过程完成后没有恢复的趋势。当然,在用荧光显微镜观察时,由于材料会吸附一部分染料产生荧光混杂,而且在对实验组的观察时由于浆料表面无法达到完全平整,在显微镜聚焦时可能遗漏一些不处于聚焦平面上的细胞,进而可能造成实验组细胞数目比实际偏少;但是细胞增殖活性和成骨活性的检测不存在显微镜聚焦的混杂因素,而这两项结果也证实了固化过程对细胞影响这一结论,所以可以认为吖啶橙染色的结果是可信的。环境扫描电子显微镜的结果同样支持上述实验结论:兔成骨细胞与骨水泥的固化块复合良好,细胞生长旺盛;而与骨水泥浆料复合培养组则很难观察到细胞。

通过本研究可知,无论是实验中哪种骨水泥材料,其浆料在固化过程中均对成骨细胞有显著的毒性影响,造成活细胞数量降低,而且影响细胞增殖及功能的各个方面,且这种影响在本研究的时间周期中是不可恢复的,因此研究保护植入细胞是今后可注射性骨水泥材料研究的一个重要方向。

#### 参考文献

- [ 1 ] Sikavtsas VI, Temenoff JS. Biomaterials and bone mechanotransduction[J]. Biomaterials, 2001, 22(19): 2581 - 2593.
- [ 2 ] 王 臻. 肢体大块骨缺损的大段同种异体骨关节移植[J]. 中华外科杂志, 1997, 35(4): 35 - 40.
- [ 3 ] Bieber EJ, Wood MB. Bone reconstruction[J]. Clin Plast Surg, 1986, 13(4): 645 - 655.
- [ 4 ] Chow LC. Calcium phosphate materials: reactor response[J]. Adv Dent Res, 1988, 2(1): 181 - 186.
- [ 5 ] Lennon DP, Haynesworth SE, Young KG, et al. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Exp Cell Res, 1995, 21(9): 211 - 222.
- [ 6 ] 刘海兰. 可体内降解成孔的磷酸钙骨水泥复合材料研究[D]. 北京: 清华大学核能与新能源技术研究院, 2007.
- [ 7 ] Cheung HS, Heak MH. Growth of osteoblast on porous calcium phosphate ceramic: an *in vitro* model for biocompatibility study[J]. Biomaterials, 1989, 10(1): 63 - 67.
- [ 8 ] 苗 军,刘春蓉,夏 群,等. 可注射性磷酸钙骨水泥生物相容性评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(48): 9683 - 9687.
- [ 9 ] Pan J, Tian JM, Dong LM, et al. Setting behavior of fast-setting calcium phosphate cement with mineral phase of bone[J]. Key Eng Mater, 2005, 280 - 283: 1567 - 1570.

(2010-10-10 收稿)

( 本 文 编 辑 : 刘 淑 萍 )