

# 纳米羟磷灰石-脂肪族聚酯酰胺复合材料对成骨细胞的生物学作用

邓霞<sup>1</sup> 夏熹<sup>2</sup>

(1.核工业416医院口腔科 成都 610051; 2.重庆医科大学附属口腔医院修复科 重庆 400015)

**[摘要]** 目的 研究纳米羟磷灰石-脂肪族聚酯酰胺(nHA-PEA)对成骨细胞的生物学作用。方法 以含有 nHA-PEA 的达尔贝科极限必需培养(DMEM)浸提液作用于试验组细胞, DMEM 作用于对照组细胞, 以甲噻唑四唑氮检测 nHA-PEA 对成骨细胞生长的影响, 流式细胞计数细胞周期的变化, 酶联免疫吸附测定细胞碱性磷酸酶(AKP)活性的变化。将细胞和材料联合培养, 观察细胞在复合材料上的黏附和生长情况。结果 试验组细胞的相对增殖率为 92%~107%且无量效关系, 试验组与对照组间差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 试验组和对照组细胞的细胞周期及 AKP 活性表达相似, 组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。成骨细胞直接培养于复合材料上, 显现出良好的黏附、铺展和生长行为。结论 nHA-PEA 对成骨细胞的生长和功能无不良影响, 具有骨细胞相容性。

**[关键词]** 纳米羟磷灰石-脂肪族聚酯酰胺; 成骨细胞; 生物相容性

**[中图分类号]** R 783.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.01.009

**Biological effects of nano-hydroxyapatite-aliphatic polyester-amide composite on the osteoblasts** Deng Xia<sup>1</sup>, Xia Xi<sup>2</sup>. (1. Dept. of Stomatology, Nuclear of Industry 416 Hospital, Chengdu 610051, China; 2. Dept. of Prosthodontics, The Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the biological effects of nano-hydroxyapatite-aliphatic polyester-amide composite(nHA-PEA) on the osteoblast. **Methods** The Dulbecco minimum essential medium(DMEM) leaching liquor of nHA-PEA was applied to the osteoblasts of the test groups while the DMEM itself was applied to control. The methyl thiazolyl tetrazolium assay, flow cytometry and alkaline phosphatase(AKP) analysis were used to evaluate the changes in cell growth, cell cycle and cell function. Moreover, osteoblasts were cultured on the surface of nHA-PEA composite and the attachment, growth and proliferation of osteoblast were investigated. **Results** The cultured osteoblasts grew well and showed nomorphological variation. Osteoblasts of different test groups demonstrated relative proliferation rate ranging from 92%~107% without dose-dependent effect( $P>0.05$ ). The cell cycle and AKP activity were similar in test and control groups( $P>0.05$ ). Good cell attachment and proliferation manner were observed on the membranes. **Conclusion** nHA-PEA has no negative effects on the osteoblast and its osteoblast-compatibility is proved.

**[Key words]** nano-hydroxyapatite-aliphatic polyester-amide composite; osteoblast; biocompatibility

有机-无机复合生物材料是组织工程学研究的热点<sup>[1]</sup>, 该材料主要用于修复和重建人体的硬组织。纳米羟磷灰石-脂肪族聚酯酰胺(nano-hydroxyapatite-aliphatic polyester-amide composite, nHA-PEA)复合材料由 nHA 粒子与 PEA 均匀混合制得, 其中羟磷灰石(hydroxyapatite, HA)是人体骨、牙等无机组织的主要成分, PEA 及其共聚物是一类新型的生物可降解高分子材料<sup>[2]</sup>。nHA-

PEA 复合材料兼具了有机物的韧性和无机物的刚性, 具有良好的理化性能。本研究将 nHA-PEA 复合材料作用于体外培养的成骨细胞, 检测其对细胞生长、增殖能力、细胞周期、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活性的影响, 观察细胞在其表面的黏附、铺展形态, 评价其对骨细胞的相容性和生物活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和仪器

达尔贝科极限必需培养液(Dulbecco minimum

[收稿日期] 2011-04-20; [修回日期] 2011-10-09

[作者简介] 邓霞(1977-), 女, 四川人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 夏熹, Tel: 023-88860120

essential medium, DMEM)、胰蛋白酶(Gibco 公司, 美国), 新生小牛血清(成都哈里生物工程有限公司), 甲噻唑四唑氮(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂(Sigma 公司, 美国), AKP 试剂盒(北京柏定生物工程有限公司)。Sanyomco-17AI 二氧化碳孵箱(Sanyo 公司, 日本), Olympus IX50 相差倒置显微镜(Olympus 公司, 日本), JSM-5900LV 型扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM; JEOL 公司, 日本), 可见光高效分析仪/HTS 7000plus 多孔板紫外/荧光(PE 公司, 美国), 流式细胞计数(flow cytometry, FCM; Coulter 公司, 美国), LightCycler 检测仪(Roche 公司, 德国)。

### 1.2 浸提液制备

按文献[3]制得 4 组 nHA-PEA 复合材料, 按其无机和有机成分的质量分数分组, 分别为 A 组 0 和 100%, B 组 10%和 90%, C 组 20%和 80%, D 组 30%和 70%。将 4 组 nHA-PEA 复合材料(平均厚度 0.5~1 mm)消毒灭菌后, 按照国际标准化组织 ISO 10993-5 医疗器械生物学评价标准所推荐的试样表面积和浸提介质为  $6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$  的比例<sup>[4]</sup>, 置 37 °C 滤除细菌的培养液中, 浸提 3~4 d 的浸提液备用。

### 1.3 成骨细胞培养和细胞悬液的制备

取生长稳定的第 4 代 SD 乳鼠颅骨成骨细胞, 经质量分数 0.25%的胰酶消化后行细胞计数, 用 DMEM 配制  $5 \times 10^4$  个每毫升的细胞悬液。

### 1.4 甲噻唑四唑氮比色

将 200  $\mu\text{L}$  密度为  $5 \times 10^4$  个每毫升的细胞悬液加入 96 孔板, 置于体积分数 5%的二氧化碳培养箱, 37 °C 培养 24 h, 细胞贴壁后弃掉原有培养液, 将细胞分为试验组(A~D)和对照组(E), 试验组每组均分别加入 200、100、50  $\mu\text{L}$  终质量分数分别为 100%、50%和 25%的浸提液, 形成 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>, D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>, 对照组加入原培养液。每日于相差显微镜下观察细胞形态, 生长和增殖情况。分别于第 1、3、5、7 d 各取 96 孔板 1 块, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  的 MTT, 孵育 4 h, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  二甲基亚砷, 振荡 1 min, 混匀, 570 nm 波长下测定各孔吸光度(A), 取 3 孔均值, 计算细胞增殖率(proliferation rate, R<sub>p</sub>):  $R_p = (A_{\text{试验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

### 1.5 流式细胞计数

接种对数生长期的成骨细胞  $1 \times 10^5$  个每毫升

瓶, 细胞贴壁后 A~D 组弃原培养液加入质量分数均为 100%的复合材料浸提液, E 组加入新鲜原培养液, 标准环境下 3 d 换液 1 次, 培养 7 d, 消化、离心并收集沉淀细胞。流式细胞计数 DNA 荧光强度及散光参数, Multicycle 软件分析细胞的周期分布和程序性死亡情况。

### 1.6 碱性磷酸酶活性检测

取  $1 \times 10^5$  个每毫升的细胞悬液 3 mL 加入小号培养瓶, 将其置于体积分数 5%的二氧化碳培养箱, 37 °C 培养 24 h, 细胞贴壁后弃掉原有培养液, A~D 组均加入质量分数 100%的浸提液, E 组加入新鲜原培养液, 分别于第 4 天和第 7 天中止培养, 收集 80  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 以 AKP 试剂盒通过 HTS 7000plus 多孔板高效分析仪行 AKP 活性测试。

### 1.7 成骨细胞与材料的复合培养

将载有 nHA-PEA 复合膜的血盖片试样置于 6 孔板内, 环氧乙烷冷消毒, 磷酸缓冲盐溶液浸泡清洗 3 次, 每次 1 h, DMEM 孵育过夜备用。取  $1 \times 10^5$  个每毫升的细胞悬液, 分别接种于已准备好的材料上, 37 °C, 体积分数 5%的二氧化碳孵箱继续静置培养 5 d。分别于第 1 天和第 5 天将试样取出, 以体积分数 10%的多聚甲醛固定, 体积分数 30%~100%的乙醇梯度脱水, 醋酸异戊酯置换乙醇, 临界点干燥, 表面喷金, SEM 下观察。

### 1.8 统计学分析

使用单因素方差分析, 分析各组总体均数间差别有无统计学意义, 在检验数据之前对数据进行方差齐性检验。用 *q* 检验比较两组间均数的差别。*P*>0.05 为差异无统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞生长观察及甲噻唑四唑氮比色结果

显微镜下, 不同质量分数的 nHA-PEA 复合材料浸提液组及对照组细胞培养 6 h 后均已贴壁, 12 h 细胞突逐渐舒展, 24 h 细胞开始铺展, 72 h 后细胞数目明显增多, 排列规则密集, 细胞呈梭形、三角形或不规则形, 形态分析各试验组与对照组细胞形态相似, 显示各组细胞均生长良好。试验组和对照组不同时间的 MTT 比色结果见表 1。试验组间的 MTT 值及其与其对照组间的差异无统计学意义(*P*>0.05); 试验组成骨细胞的相对增殖率为 92%~107%, 不同质量分数的 nHA-PEA 复合材料浸提液组对成骨细胞的细胞毒性级数为 0~

1级(0级：细胞相对增殖率大于等于 100%，1 级：细胞相对增殖率为 90%~99%)<sup>[5]</sup>，不同质量分数浸提液组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 1 不同时间点各组细胞的 MTT 值和增殖率

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

组别	MTT值/增殖率			
	1 d	3 d	5 d	7 d
A <sub>1</sub> /100%	0.337/98%	0.811/105%	1.055/96%	0.835/101%
A <sub>2</sub> /50%	0.353/103%	0.763/99%	1.086/98%	0.832/100%
A <sub>3</sub> /25%	0.352/103%	0.795/103%	1.071/97%	0.814/98%
B <sub>1</sub> /100%	0.346/101%	0.797/103%	1.147/104%	0.796/96%
B <sub>2</sub> /50%	0.332/97%	0.751/97%	1.119/101%	0.817/99%
B <sub>3</sub> /25%	0.376/106%	0.713/92%	1.099/99%	0.836/100%
C <sub>1</sub> /100%	0.360/105%	0.802/104%	1.144/104%	0.843/102%
C <sub>2</sub> /50%	0.351/102%	0.810/105%	1.183/107%	0.862/104%
C <sub>3</sub> /25%	0.354/103%	0.783/101%	1.174/106%	0.819/99%
D <sub>1</sub> /100%	0.315/92%	0.769/99%	1.108/100%	0.835/100%
D <sub>2</sub> /50%	0.332/97%	0.801/104%	1.117/101%	0.820/99%
D <sub>3</sub> /25%	0.327/95%	0.759/98%	1.123/101%	0.818/99%
E	0.343	0.772	1.104	0.829

## 2.2 流式细胞计数结果

FCM 检测结果(表2)显示，nHA-PEA 复合材料浸提液对成骨细胞的细胞周期影响不大，试验组和对照组细胞数处于 DNA 合成前期的细胞数最多，DNA 合成后期和分裂期的较少。细胞各亚周期组成比、细胞增殖指数和细胞程序性死亡率间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 2 浸提液对各组成骨细胞的细胞周期和程序性死亡的影响结果

Tab 2 The results of nHA-PEA leaching liquor to the cell cycles and apoptosis of test and control groups %

组别	合成前期	合成期	合成后期和分裂期	程序性死亡率
A	86.1	9.6	4.3	4.0
B	84.5	11.4	4.1	4.7
C	85.3	10.3	4.4	4.6
D	84.2	11.6	4.2	5.8
E	85.3	10.2	4.5	4.2

## 2.3 碱性磷酸酶活性结果

在成骨细胞培养的第 4 天和第 7 天，各组 AKP 活性结果见表 3，即各试验组间及其与对照组间差异无统计学意义。这表明 nHA-PEA 复合

材料浸提液对成骨细胞的 AKP 活性无影响。

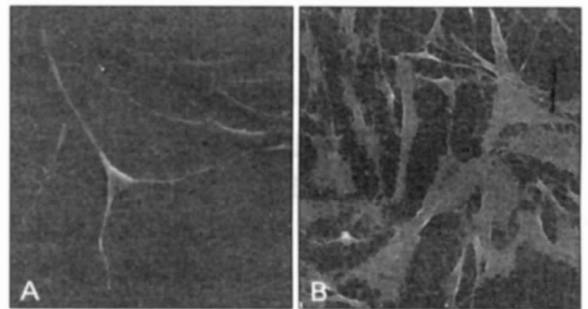
表 3 浸提液作用下的各组成骨细胞 AKP 活性

Tab 3 AKP activity of each group osteoblasts in leaching liquor U·g<sup>-1</sup>

组别	第4天	第7天
A	11.2±2.65	34.8±3.35
B	12.3±2.38	34.5±2.98
C	11.5±2.64	35.2±3.14
D	12.1±2.19	36.1±2.67
E	11.9±2.57	35.6±3.21

## 2.4 成骨细胞在 nHA-PEA 复合材料上的形貌

SEM 图片显示出成骨细胞在 nHA-PEA 复合材料上的生长形貌，即细胞接种 1 d 后，细胞呈多角性黏附于材料上，伸出的多个伪足与周围相邻细胞相互接触(图1A)；到第 5 天后，细胞完全铺展，增殖活跃，相互连接成片(图1B)。结果表明，成骨细胞在复合材料上具有良好的黏附、铺展和增殖行为，初步显示了该材料的细胞相容性，为进一步的细胞生物学研究及体内动物试验提供了基础。



A: 细胞接种后第 1 天, SEM ×500; B: 细胞接种后第 5 天, SEM ×500.

图 1 成骨细胞在 nHA-PEA 复合材料上的生长情况示例

Fig 1 Osteoblasts cultured on the composites

## 3 讨论

在生物医学材料的细胞毒性试验方法中，最常用的是材料浸提液培养法和细胞材料直接接触法。本试验综合运用了这两种方法，首先选择浸渍法，具体原因如下。1)对于 nHA-PEA 复合材料，nHA 的生物相容性毋庸置疑；而 PEA 是新型的人工合成的生物降解型高分子材料，其理化性能和降解性能已有相关研究<sup>[6]</sup>，但其生物相容性鲜有报道。2)由于直接接触法共同培养时，细胞对材料表面和对培养孔板底部的黏附性有差异，细胞洗脱率的不同会产生干扰而使试验复杂化。事实上，仅需考察 nHA-PEA 复合材料溶出物的

细胞毒性，就可以达到初步评价其生物相容性的目的，而且以材料的浸提液代替材料本身在材料学的研究中已得到公认。本试验严格按照国际标准化组织 ISO 10993-5 医疗器械生物学评价标准和要求制备生物医学材料浸提液<sup>[4]</sup>，以浸提出最大量的滤出物质，考察其对成骨细胞增殖和细胞周期的影响。

MTT 比色是常用的细胞增殖能力检测方法，可以对材料的细胞毒性作出可靠的定量评价<sup>[5]</sup>。本试验在相差倒置显微镜下观察到 nHA-PEA 复合材料浸提液不影响细胞的生长形态；MTT 值在试验组间以及各组与对照组间差异无统计学意义，试验组的细胞增殖率在 92%~107%，表明 nHA-PEA 复合材料浸提液对成骨细胞的生长无不良影响。因此在进一步地对细胞周期和功能进行的分析中，仅选用最高质量分数的 nHA-PEA 复合材料浸提液作为试验组进行分析比较。在加入 HA 的试验组，MTT 值略高于对照组，但差异无统计学意义且无量效关系。原因可能与其中的钙、磷水平较高有关。

流式细胞计数已广泛应用于肿瘤学、生物化学和免疫学等领域，细胞周期检测已成为生物材料生物相容性评价的一种可靠方法和指标<sup>[7]</sup>，是常规细胞增殖试验的一项重要补充。近年来，生物材料生物相容性研究进展之一是生物材料的生物功能性评价<sup>[8]</sup>。生物材料作用于细胞后使其周期改变，从而使其行为和功能发生改变。本试验在 MTT 比色的基础上进一步使用流式细胞计数，旨在从细胞增殖周期的角度来分析 nHA-PEA 复合材料浸提液对细胞增殖周期 DNA 合成的影响，从分子水平上评价材料的细胞毒性。从 MTT 比色可见，组间、组内不同质量分数的 nHA-PEA 复合材料浸提液对成骨细胞的增殖和增殖周期影响不大，细胞周期各亚期组成比和程序性死亡率差异亦无统计学意义。B、C、D 组处于 S 期的细胞略多，表明加入 HA 对细胞增殖有一定促进作用，但不显著，不存在量效关系。此结果与 MTT 比色结果一致。

除了对细胞增殖的影响，生物材料的细胞相容性还表现在材料对细胞重要功能的影响。AKP 是骨形成所必需的酶，是生物矿化和成骨细胞分化成熟的早期标志物<sup>[9-10]</sup>；其表达代表骨形成状况，表明细胞分化的开始，并随细胞分化的发展

而增强；其活性的高低，反映了相应细胞向成骨方向化的趋势。本研究采用酶联法对成骨细胞 AKP 的表达进行检测，结果显示试验组 AKP 的表达量与对照组相比较差异无统计学意义，说明 nHA-PEA 复合材料对成骨细胞的功能酶表达无不良影响，也没有明显的促进作用，不抑制其分化功能。

用浸提液作为试验样品测定复合材料中滤出物质对细胞生长、增殖的影响，仅为预测材料植入体内的潜在危害提供了初步依据，其结果尚有一定的局限性；因此，需在浸渍试验良性结果的基础上再采用直接法将成骨细胞与材料联合培养，以进一步考察材料本体的结构性能对细胞生物学的影响。研究表明，成骨细胞在复合材料上具有良好的黏附、铺展和增殖行为，即 nHA-PEA 复合材料具有成骨细胞相容性和良好的细胞相容性等特性。

#### 4 参考文献

- [1] Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(19): 4749-4757.
- [2] Han SI, Kim BS, Kang SW, et al. Cellular interactions and degradation of aliphatic polys derived from glycine and/or 4-amino butyric acid[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(20): 3453-3462.
- [3] 邓霞, 陈治清, 钱志勇, 等. 纳米羟磷灰石/脂肪族聚酯酰胺复合材料[J]. *生物医学工程学杂志*, 2008, 25(2): 378-381, 392.
- [4] 李玉宝. *生物医学材料*[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 8.
- [5] 王喜云, 王远亮. 生物材料的生物学评价方法研究进展[J]. *北京生物医学工程*, 2007, 26(1): 95-98.
- [6] Liu C, Gu Y, Qian Z, et al. Hydrolytic degradation behavior of biodegradable polyetheresteramide-based polyurethane copolymers[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2005, 75(2): 465-471.
- [7] 戴建国, 黄培林, 郭英, 等. 细胞周期作为生物相容性评价指标的研究[J]. *东南大学学报: 自然科学版*, 2005, 35(2): 271-274.
- [8] 杨晓芳, 奚廷斐. 生物材料生物相容性评价研究进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2001, 18(1): 123-128.
- [9] Liao H, Andersson AS, Sutherland D, et al. Response of rat osteoblast-like cells to microstructured model surfaces *in vitro*[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(4): 649-654.
- [10] 孟繁浩, 熊志立, 陶胜宇, 等. 成骨细胞的生物学特征及其调控活性物质[J]. *化学与生物工程*, 2005, 28(11): 8-10.

(本文编辑 汤亚玲)