

CPC 固化中海藻酸钙凝胶微球对细胞的保护及相关影响因素

李芳芳^{1*}, 乔朋艳¹, 董利民², 刘玉华¹, 徐 韬³, 谢秋菲^{1△}

(1. 北京大学口腔医学院·口腔医院修复科, 北京 100081; 2. 清华大学核能与新能源技术研究院精细陶瓷室, 北京 100084; 3. 北京大学口腔医学院·口腔医院, 北京 100081)

[摘 要] **目的:** 通过体外细胞实验, 评价在磷酸钙骨水泥 (calcium phosphate cement, CPC) 浆料固化过程中海藻酸钙凝胶微球对小鼠成骨前体细胞 (mouse preosteoblastic cell line, MC3T3-E1) 的保护作用及相关影响因素。 **方法:** 将包封 MC3T3-E1 细胞的海藻酸钙凝胶微球与 CPC 浆料和固化块复合培养 2 d, CCK-8 检测 MC3T3-E1 细胞活性, 钙黄绿素-AM (Calcein-AM) 和碘化丙啶 (PI) 溶液分别对活细胞和死细胞染色。比较 CPC 浆料和 CPC 固化块、CPC 固化后不同处理方式以及不同换液时间对 MC3T3-E1 细胞活性的影响。 **结果:** CPC 浆料组和固化块组的光密度值无显著差异 (1 d: $P=0.827$; 2 d: $P=0.965$), 荧光图片见两组细胞数及形态无明显区别。CPC 固化后的不同处理方式以及不同换液时间对细胞活性有不同影响。 **结论:** 在 CPC 浆料固化过程中, 海藻酸钙凝胶微球对 MC3T3-E1 细胞有较好的保护作用。CPC 浆料固化后可能仍持续影响细胞增殖, 这种影响可能主要集中在固化后 24 h 内。CPC 浆料固化后 1 d 内每 6 h 换液, 有利于细胞的活性; 2 d 内每 6 h 换液可能对细胞活性产生不利影响。

[关键词] 骨黏合剂; 磷酸钙类; 微球体; 海藻酸钙; 成骨细胞

[中图分类号] R318.08 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2013)01-0033-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-167X.2013.01.008

Protective role of calcium alginate hydrogel beads in cells during calcium phosphate cement setting reaction and its influencing factors

LI Fang-fang^{1*}, QIAO Peng-yan¹, DONG Li-min², LIU Yu-hua¹, XU Tao³, XIE Qiu-fei^{1△}

(1. Department of Prosthodontics, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China; 2. Fine Ceramic Laboratory, Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the protection of calcium alginate hydrogel beads for mouse preosteoblastic cell line (MC3T3-E1) during the setting reaction of calcium phosphate cement (CPC) pastes and to analyze related influencing factors. **Methods:** The MC3T3-E1 cells encapsulated in alginate hydrogel beads were cultured *in vitro* with β -tricalcium phosphate/calcium phosphate cement (β -TCP/CPC) pastes and discs until 2 d. The cell viability and number of live/dead cells were tested using the CCK-8, Calcein-AM and PI, respectively. The effects of CPC paste and CPC disc, different treatment and time to renewal medium on cell viability were compared. **Results:** There were no significant differences in optical density and number of live cells between β -TCP/CPC pastes and discs (1 d: $P=0.827$; 2 d: $P=0.965$). There were different influences on cell viability between different treatment and time to renewal medium. **Conclusion:** The results indicated that the calcium alginate hydrogel beads had a good protection to MC3T3-E1 cells during the setting reaction of CPC pastes. CPC paste might affect the cell proliferation even when solidification. After setting reaction, it may be favorable for cell viability to renew the medium every 6 h in 1 d.

KEY WORDS Bone cements; Calcium phosphates; Microspheres; Calcium alginate; Osteoblasts

磷酸钙骨水泥 (calcium phosphate cement, CPC) 具有良好生物相容性、可降解性、骨传导性、可注射性及可塑形等优点^[1-3], 是骨缺损修复和替代材料的研究热点之一。可注射型 CPC 植入体内原位固

化, 固化过程引起周围微环境 pH 值和离子浓度波动, 对细胞产生一定影响^[4-6]。本课题组的孟丹等^[7]、张州等^[8]的研究已证实, CPC 固化过程对成骨细胞产生显著不利影响, CPC 固化过程中, 需要采

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)

△ Corresponding author's e-mail, xieqiu@163.com

* 现在北京大学口腔医学院第三门诊部

网络出版时间:2013-1-9 10:12:32 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20130109.1012.003.html>

取措施保护成骨细胞,使成骨细胞能成功复合到 CPC 中。海藻酸钙凝胶微球已广泛用于药学及生物技术研究领域^[9-10],本实验选择海藻酸钙凝胶微球包封小鼠成骨前体细胞(mouse preosteoblastic cell line, MC3T3-E1),将包封 MC3T3-E1 细胞的海藻酸钙凝胶微球与 β -磷酸三钙/磷酸钙骨水泥(β -tricalcium phosphate/calcium phosphate cement, β -TCP/CPC)浆料和固化块复合,检测 MC3T3-E1 细胞活性,研究在 β -TCP/CPC 固化过程中海藻酸钙凝胶微球对细胞的保护作用,为进一步将成骨细胞复合到 β -TCP/CPC 上探索可行方法。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及试剂

MC3T3-E1 细胞由中国协和医科大学基础医学细胞中心提供, β -TCP/CPC(简称 CPC)固相粉剂和固化液由清华大学核能与新能源技术研究院精细陶瓷室提供,质量浓度为 1 g/mL。1.5% (质量分数)海藻酸钠溶液购自中国医学科学院大连化学物理研究所。试剂有 Cell Counting Kit-8 (CCK-8)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、Calcein-AM (DOJINDO, 日本)、破囊液^[11] (0.2 mol/L NaHCO₃ 和 0.06 mol/L Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O, pH 为 7.8 ~ 8.2)、Tyrode's HEPES buffer^[4]等,常用试剂购自北京大学医学部药品库。

1.2 主要仪器

实验用主要仪器设备包括 Nikon TE 2000U 倒置荧光显微镜(Nikon Optiphot, 日本)、TECAN Sunrise 酶标仪(Tecan, 瑞士)、YD-05 型高压静电微胶囊制备仪(中国医学科学院大连化学物理研究所)、WO109-1B 注射泵执行单元、TJ-3A Syringe Pump Controller(保定兰格恒流泵有限公司)。

1.3 载 MC3T3-E1 细胞海藻酸钙凝胶微球的制备

参照张英等^[12]的报道,收集对数生长期 MC3T3-E1 细胞,加相应量 1.5% (质量分数)海藻酸钠溶液重悬细胞,制成 2.5×10^6 个/mL 细胞悬液。细胞悬液通过高压静电微胶囊制备仪滴入 1.11% (质量分数)CaCl₂ 溶液凝胶化反应,钙化 15 min 得到含细胞的海藻酸钙凝胶微球(A-cell)。

1.4 制备 CPC 浆料

12 孔板每孔放 1 个自制塑料小圆环(直径 8 mm,高约 3 mm),每环内加 0.2 g CPC + 0.2 mL 固化液,调和并修平材料。制备 CPC 固化块:0.2 g CPC + 0.2 mL 固化液调和得到的 CPC 浆料放入 CO₂ 培养箱,24 h 后与 A-cell 复合。

1.5 A-cell 复合 CPC

各组 8 个重复,6 个用于 CCK-8 检测,2 个用于 Calcein-AM 和 PI 荧光染色。12 孔板放入相应 CPC 浆料或固化块,每孔复合 200 μ L A-cell(约含有细胞 0.5×10^6 个/mL),静置 15 min,每孔补加 2 mL 培养液,轻吹下 CPC 表面细胞,放入 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱。

1.6 实验分组和处理

实验分为 A-cell 复合 CPC 浆料组、CPC 固化块组和对照组。本课题组孟丹等^[7]和张州等^[8]此前已证实,细胞在 CPC 固化块组具有良好增殖能力,而在浆料组细胞活性受到较大的不利影响。本研究目的在于采用海藻酸钙凝胶微球包封 MC3T3-E1,比较 A-cell 复合 CPC 浆料组、CPC 固化块组之后的细胞活性有无差异,从而验证海藻酸钙凝胶微球对细胞的保护作用。以每孔 20 μ L 破囊液处理 30 s 的 A-cell 为对照组,复合后 6 h 首次换液,之后 1 d 检测组不再换液,2 d 检测组在 24 h 换液 1 次。

为了进一步评价 CPC 浆料固化为固化块后是否持续影响细胞的增殖及活性,A-cell 复合 CPC 浆料组固化后进行不同处理:(1)CPC 浆料固化移除组(A-cell 复合 CPC 浆料后 6 h 换液,移除 CPC 材料,简称 CPC 移除组);(2)CPC 浆料固化清洗组(A-cell 复合 CPC 浆料后 6 h 换液,0.9% 生理盐水清洗 CPC 材料,简称 CPC 清洗组);(3)CPC 浆料固化不清洗组(A-cell 复合 CPC 浆料后 6 h 不换液,CPC 不作任何处理,简称 CPC 不清洗组);(4)对照组(破囊液处理的 A-cell)。

为研究 CPC 浆料固化后更换培养液的不同时间是否对细胞活性存在影响,从而为将来进一步实验中的换液时间提供依据,本实验设定 A-cell 复合 CPC 浆料组的固化后不同换液时间为复合后 6 h 首次换液,之后每 6 h 换液(6 h 换液组)和每 24 h 换液(24 h 换液组)。

以 CCK-8 法检测细胞活性,于 1 d、2 d 取 12 孔板,0.9% 生理盐水轻洗细胞,加培养液 1 mL 培养 2 h,生理盐水轻洗,每孔 300 μ L Tyrode's HEPES buffer + 30 μ L CCK-8 培养 2 h,取 200 μ L 至 96 孔板,Sunrise 酶标仪测定 450 nm 光密度值(D)。

1.7 Calcein-AM 和 PI 双重染色法

于 1 d、2 d 取 12 孔板,0.9% 生理盐水轻洗细胞,加培养液 1 mL 培养 2 h,生理盐水轻洗,每孔加 200 μ L 含 Calcein-AM 和 PI 的染色液(Calcein-AM 终浓度为 2 μ mol/L,PI 为 4 μ mol/L),放入 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱 15 min,Nikon 倒置荧光显微镜观察,活

细胞染成绿色,死细胞染成红色。所有组以相同参数拍照,蓝光激发拍摄活细胞,相同视野绿光激发拍摄死细胞。

1.8 统计学分析

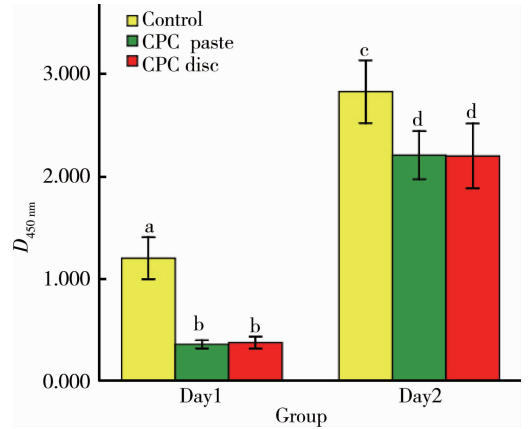
本实验数据为计量资料,采用双侧检验,使用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行 t 检验或单因素方差分析,方差齐性组间比较采用 LSD 检验,方差不齐应用 Games-Howell 检验, $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A-cell 复合 CPC 浆料与固化块

CCK-8 结果见图 1。CPC 浆料组、CPC 固化块组及对照组 1 d、2 d 的 D 值差异均有统计学意义(1 d: $P = 0.000$, 2 d: $P = 0.002$)。对照组与 CPC 浆料组、CPC 固化块组分别相比,差异均有统计学意义($P = 0.000$)。在 1 d 和 2 d 分别进行组间比较, CPC 浆料组和 CPC 固化块组间差异无统计学意义(1 d: $P = 0.827$, 2 d: $P = 0.965$)。

A-cell 复合 CPC 浆料和固化块后的形态学观察见图 2, Calcein-AM 和 PI 染色结果见图 3。



Different letters indicate that there has statistically significant difference between the groups ($P < 0.05$), the same letter indicates that there has no significant difference between the groups (b, $P = 0.827$; d, $P = 0.965$).

图 1 A-cell 复合 CPC 浆料组、CPC 固化块组以及对照组 $D_{450\text{ nm}}$ 值的比较($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

Figure 1 Comparison of $D_{450\text{ nm}}$ values among two test groups (A-cell cultured with CPC paste and CPC disc) and one control group ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

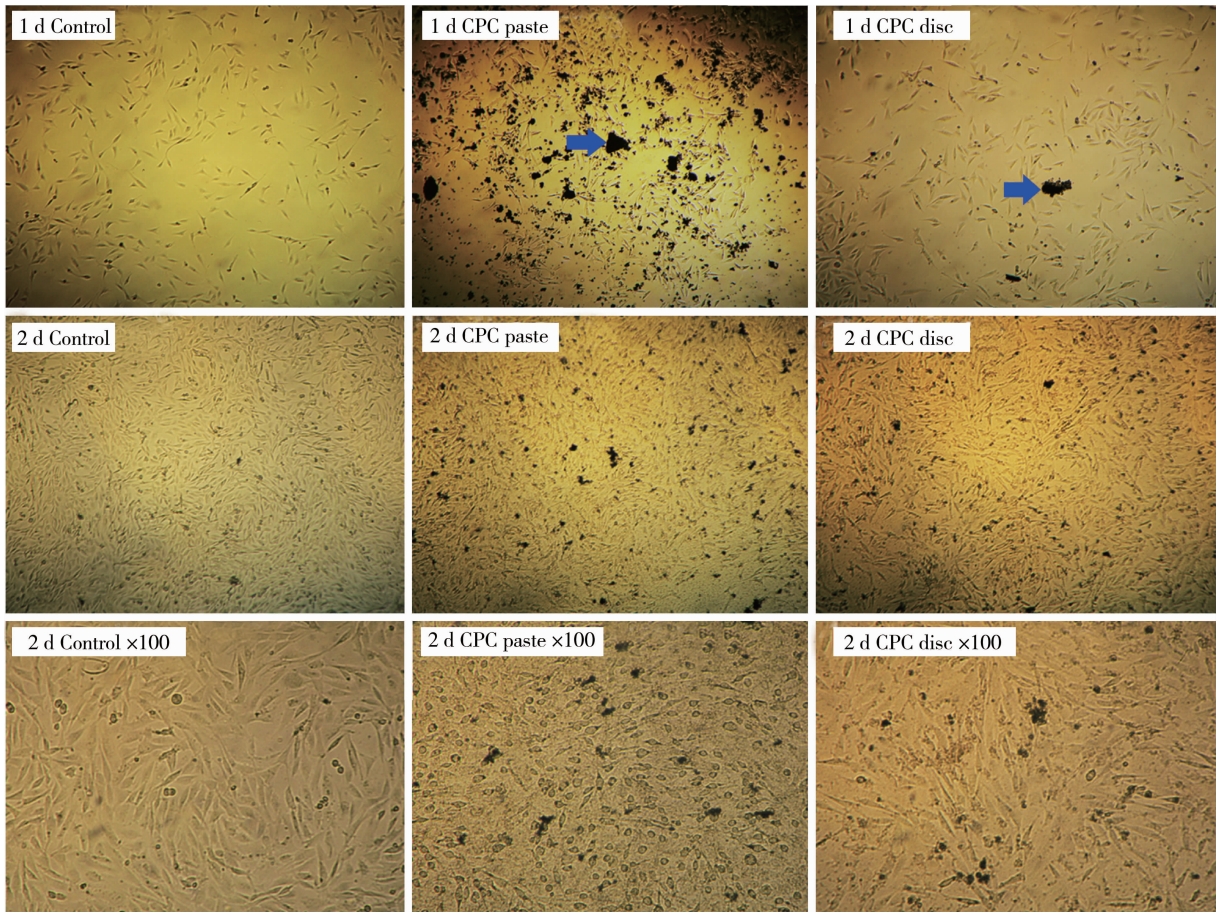


图 2 A-cell 复合 CPC 浆料组、CPC 固化块组及对照组的形态学观察图片,蓝色箭头所示为 CPC 材料

Figure 2 Cell morphological observation of the A-cell culture with CPC paste or CPC disc group and control group, blue arrows point out the CPC materials

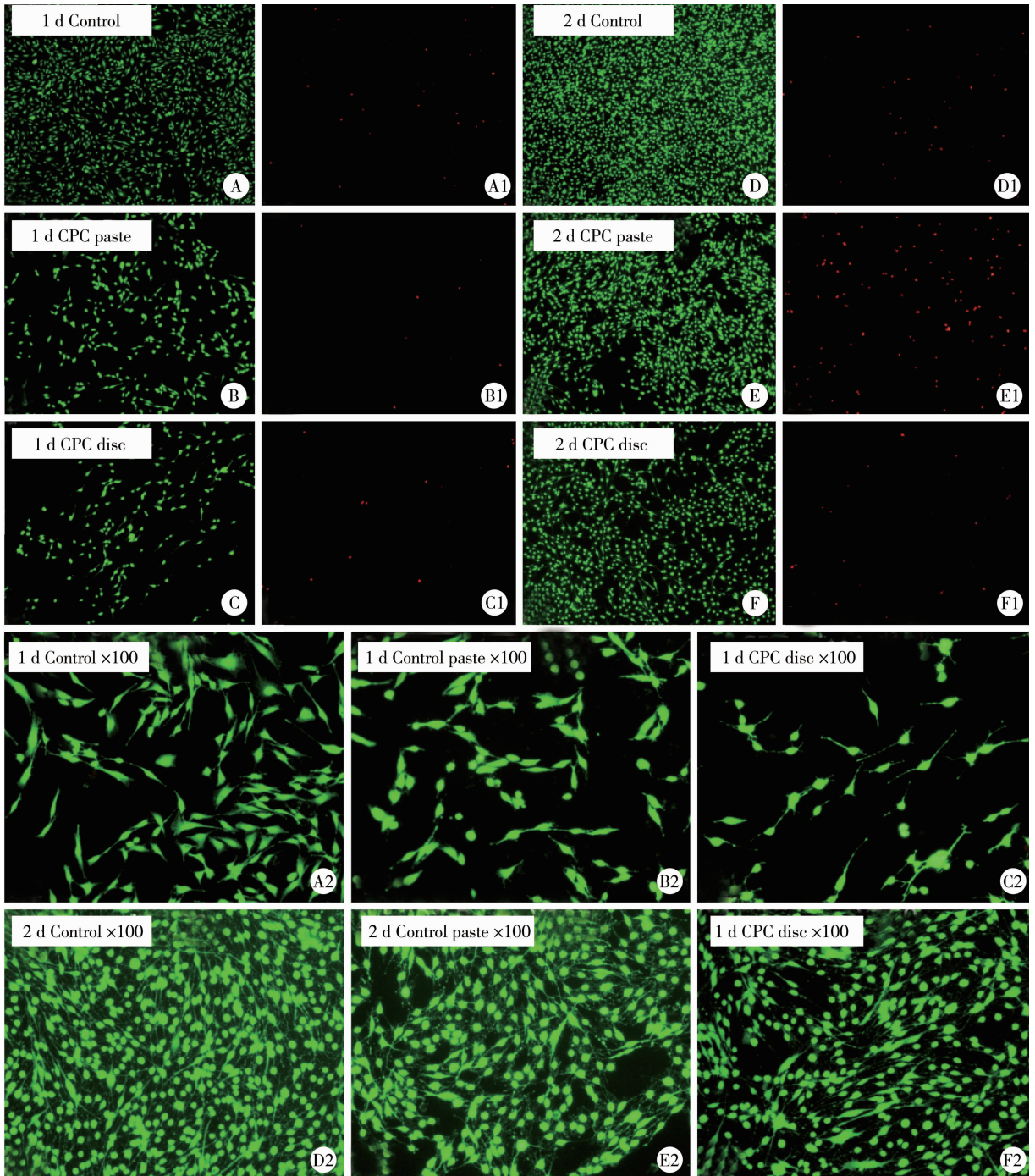


图 3 A-cell 复合 CPC 浆料组、CPC 固化块组及对照组的 Calcein-AM 和 PI 染色结果。A ~ F, 绿色活细胞 (×40); A1 ~ F1, 红色死细胞 (同一视野, ×40); A2 ~ F2, 绿色活细胞 (×100)。A、A1、A2, 1 d 对照; B、B1、B2, 1 d CPC 浆料; C、C1、C2, 1 d CPC 固化块; D、D1、D2, 2 d 对照; E、E1、E2, 2 d CPC 浆料; F、F1、F2, 2 d CPC 固化块

Figure 3 A-cell culture with CPC paste or CPC disc group and control group, Calcein-AM and PI stain. A-F, green live cells (×40); A1-F1, red dead cells (same field, ×40); A2-F2, green live cells (×100). A, A1, A2, 1 d control; B, B1, B2, 1 d CPC paste; C, C1, C2, 1 d CPC disc; D, D1, D2, 2 d control; E, E1, E2, 2 d CPC paste; F, F1, F2, 2 d CPC disc

图 3 中, 1 d 对照组 (A、A1) 活细胞较多, 呈多角或长梭形, 绿色荧光明亮; CPC 浆料组 (B、B1) 活细胞少于对照组, 表现为短梭形, 可见核分裂相; CPC 固化块组 (C、C1) 细胞数与浆料组相似, 为短梭或椭圆形, 丝状伪足极明显, 有核分裂相; 1 d 各组死细胞少量。2 d 对照组 (D、D1) 细胞密集长满, 胞体变

圆, 丝状伪足极明显, 死细胞明显增多; CPC 浆料组 (E、E1) 细胞密集, 细胞变圆, 细胞间连接紧密, 死细胞较多; CPC 固化块组 (F、F1) 细胞密集与浆料组相似, 长梭形细胞较多, 丝状伪足明显, 死细胞少量。

2.2 CPC 浆料固化后的不同处理

CCK-8 结果见图 4。1 d、2 d 分别进行组间比

较, D 值差异有统计学意义($P=0.000$)。1 d 对照组 D 值高于 CPC 移除组,2 d 组差异无统计学意义($P=0.451$)。1 d CPC 清洗组 D 值低于 CPC 不清洗组,2 d CPC 清洗组 D 值高于 CPC 不清洗组。1 d、2 d CPC 移除组 D 值均显著高于 CPC 清洗组和 CPC 不清洗组。

Calcein-AM 和 PI 染色结果见图 5。1 d 对照组(A、A1)活细胞较多,多角或长梭形;CPC 移除组(B、B1)活细胞少于对照组,多角或长梭形,有核分裂相;CPC 清洗组(C、C1)活细胞少于移除组,短梭形,有核分裂相;CPC 不清洗组(D、D1)活细胞数大致同清洗组,细胞变圆,丝状伪足少见;1 d 各组死细胞均较少。2 d CPC 移除组和对照组(E、E1、F、F1)活细胞密集长满,圆形;CPC 清洗组(G、G1)活细胞少于移除组,圆或椭圆形;CPC 不清洗组(H、H1)活细胞少于清洗组,圆形;2 d 各组丝状伪足明显,CPC 清洗组死细胞增多,另 3 组死细胞少量。

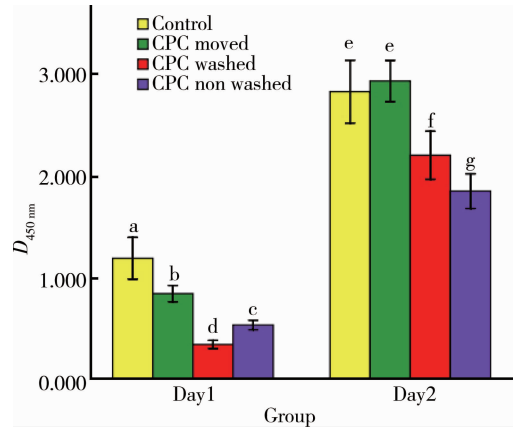


图 4 A-cell 复合 CPC 固化后,CPC 移除组、CPC 清洗组、CPC 不清洗组及对照组的 $D_{450\text{ nm}}$ 值比较($n=6, \bar{x} \pm s$), 不同字母表示 $D_{450\text{ nm}}$ 值差异有统计学意义($P < 0.05$)

Figure 4 Comparison of $D_{450\text{ nm}}$ values among the CPC washed, CPC non washed and control groups. A-cell were cultured with CPC pasted and treated with CPC removed or not removed ($n=6, \bar{x} \pm s$), different letters indicate that there has significant difference between the groups ($P < 0.05$)

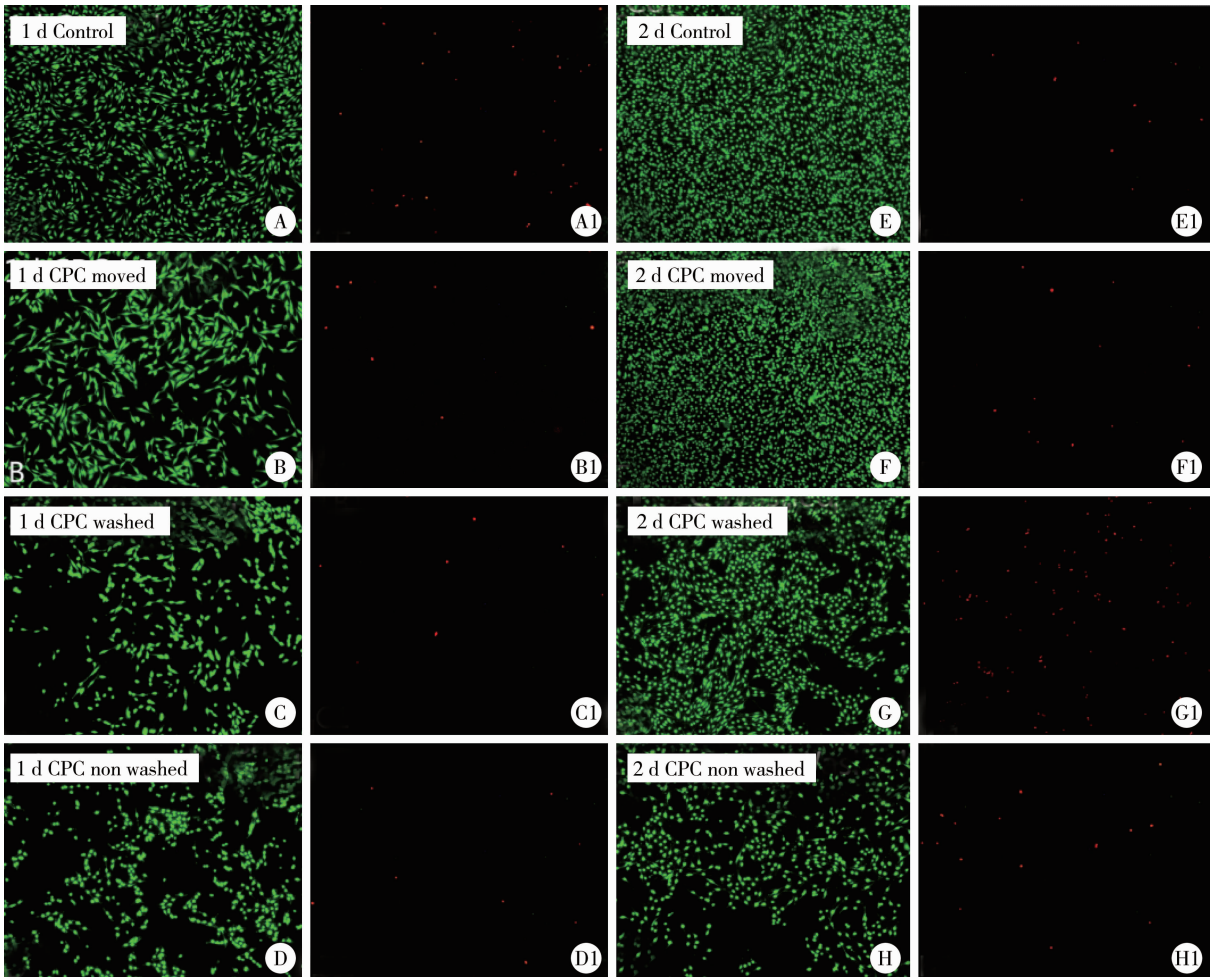


图 5 A-cell 复合 CPC 移除组、CPC 清洗组、CPC 不清洗组及对照组的 Calcein-AM 和 PI 染色结果。A~H,绿色活细胞($\times 40$); A1~H1,红色死细胞(同一视野, $\times 40$);A、A1,1 d 对照;B、B1,1 d CPC 移除;C、C1,1 d CPC 清洗;D、D1,1 d CPC 不清洗;E、E1,2 d 对照;F、F1,2 d CPC 移除;G、G1,2 d CPC 清洗;H、H1,2 d CPC 不清洗

Figure 5 A-cell were cultured with CPC moved、CPC wash、CPC non wash and control groups. Calcein-AM and PI stain.

A~H, green live cells ($\times 40$); A1~H1, red dead cells (same field, $\times 40$); A, A1, 1 d control; B, B1, 1 d CPC moved; C, C1, 1 d CPC washed; D, D1, 1 d CPC non washed; E, E1, 2 d control; F, F1, 2 d CPC moved; G, G1, 2 d CPC washed; H, H1, 2 d CPC non washed

2.3 CPC 浆料固化后的不同换液时间

CCK-8 结果见图 6。1 d 6 h 换液组 D 值高于 24 h 换液组, 2 d 6 h 换液组 D 值显著低于 24 h 换液组。

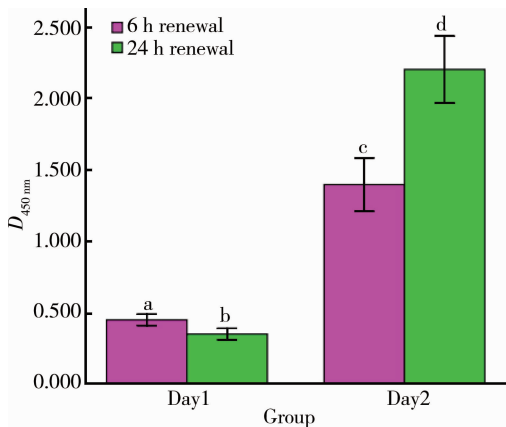


图 6 A-cell 复合 CPC 浆料, 6 h 换液组与 24 h 换液组

$D_{450\text{nm}}$ 值的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$), 不同字母

表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)

Figure 6 A-cell were cultured with CPC paste and treated with medium renewal at 6 h and 24 h ($n=6, \bar{x} \pm s$), different letters indicate that $D_{450\text{nm}}$ value has significant difference among the groups ($P < 0.05$)

Calcein-AM 和 PI 染色结果见图 7。1 d (A、A1、B、B1) 两组活细胞数接近, 细胞短梭形, 有核分裂相, 6 h 换液细胞丝状伪足更明显, 死细胞少量。2 d 6 h 换液组 (C、C1) 细胞密集长满, 绿色荧光较弱, 长梭形, 死细胞少量; 24 h 换液组 (D、D1) 细胞长满,

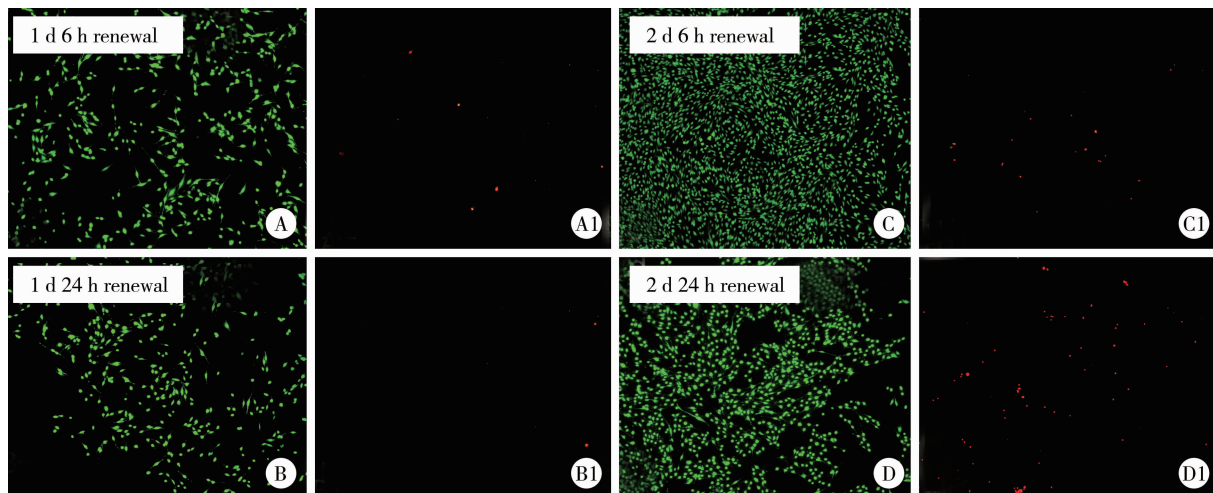


图 7 A-cell 复合 CPC 浆料, 6 h 换液组和 24 h 换液组, Calcein-AM 和 PI 染色结果。A ~ D, 绿色活细胞;

A1 ~ D1, 红色死细胞 (同一视野, $\times 40$); A、A1, 1 d 6 h 换液; B、B1, 1 d 24 h 换液; C、C1, 2 d 6 h 换液; D、D1, 2 d 24 h 换液

Figure 7 A-cell were cultured with CPC paste, 6 h and 24 h renewal medium, the results of Calcein-AM and PI stain.

A - D, green live cells ($\times 40$); A1 - D1, red dead cells (same field, $\times 40$); A, A1, 1 d 6 h renewal medium; B, B1, 1 d 24 h renewal medium; C, C1, 2 d 6 h renewal medium; D, D1, 2 d 24 h renewal medium

Simon 等^[4]制备了直径 3.6 mm 包封 MC3T3-E1 细胞的海藻酸钙凝胶小球, 与 CPC 浆料复合, 微球内细胞存活率为 74%。本研究检测了微球溶解释

短梭或圆形, 丝状伪足明显, 死细胞增多。

3 讨论

3.1 A-cell 复合 CPC 浆料与固化块

A-cell 复合 CPC 浆料组、复合 CPC 固化块组及对照组, 各组 1 d、2 d 的 D 值差异均有统计学意义, 2 d 的 D 值显著高于 1 d 的 D 值, 表明细胞有活性, 1 d 到 2 d 细胞有明显增殖。CPC 浆料、CPC 固化块组和对照组 1 d、2 d 的 D 值差异有统计学意义, 同一时间组间比较, CPC 浆料组和 CPC 固化块组的 D 值差异均无统计学意义。结果初步说明浆料组细胞在 CPC 固化过程中没有受到显著不利影响, 这提示使用海藻酸钙凝胶微球包封 MC3T3-E1 细胞, 与 CPC 浆料复合, 浆料固化中海藻酸钙凝胶微球对细胞提供了较好的保护作用。CPC 固化反应过程最剧烈的是最初的 15 min, 之后 CPC 初步固化, 海藻酸钙凝胶微球在与 CPC 浆料接触的 10 ~ 15 min 基本溶解完全, 溶解后微球呈溶胶状态, 细胞与 CPC 材料不直接接触, 可能还继续提供保护作用。对照组与 CPC 浆料、CPC 固化块组的 D 值相比差异有统计学意义, 可能与 CPC 材料的存在有关, CPC 浆料固化后在降解过程中将产生 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 等, 可能会影响细胞的贴壁生长和增殖。可认为在 CPC 固化过程中, 海藻酸钙凝胶微球对 MC3T3-E1 细胞有保护作用。

放细胞后贴壁再培养的细胞存活率, 1 d CPC 浆料组与对照组的 D 均值之比为 30%, 2 d 为 78%, 2 d 组的结果与 Simon 等^[4]的结果相近。

3.2 CPC 浆料固化后的不同处理

1 d 对照组的 D 值显著高于 CPC 移除组,2 d 无明显差异,提示 CPC 固化过程对细胞有一定影响,CPC 移除后细胞仍有效增殖,CPC 固化过程对细胞的影响在 2 d 中可能基本代偿。1 d CPC 清洗组的 D 值低于 CPC 不清洗组,可能因 6 h 换液时将部分状态差的细胞丢弃,影响了 D 值,而 6 h 换液后,CPC 清洗组的细胞状态较好,度过停滞期后快速增殖,所以 2 d CPC 清洗组的 D 值显著高于 CPC 不清洗组。另一个可能的解释是,CPC 浆料固化中或者固化后产生了对细胞不利的因素,CPC 清洗组 6 h 换液可去除部分固化中产生的不利因素,而 CPC 不清洗组的不利因素持续存在,持续影响细胞,故 2 d CPC 不清洗组的 D 值低于 CPC 清洗组。

CPC 移除组的 D 值在 1 d、2 d 均高于 CPC 清洗组和 CPC 不清洗组,2 d CPC 移除组的 D 值与对照组相比差异无统计学意义,可能提示 CPC 固化后在 2 d 内仍影响细胞生长和增殖,但是影响程度不大,细胞仍保持较高活性和增殖能力。

3.3 CPC 浆料固化后不同换液时间

在 1 d 中,CPC 浆料固化后 6 h 换液组的 D 值高于 24 h 换液组,提示 CPC 固化后 6~24 h 之间可能持续释放影响细胞增殖的物质,这些物质对细胞的影响大于频繁换液对细胞的不利影响。6 h 换液组去掉这个不利影响,则 6 h 换液组的 D 值高于 24 h 换液组。2 d 6 h 换液组的 D 值显著低于 24 h 换液组,可能因 24 h 换液组在 A-cell 复合 CPC 后 24 h 换液时,已去除 24 h 内产生的有害物质,细胞开始迅速增殖,而第 2 天仍然 6 h 换液造成的细胞培养环境的频繁改变可能严重影响细胞增殖。

综上所述,本研究探索了一种将成骨细胞复合到 CPC 材料的方法,结论如下:(1)CPC 浆料固化过程中,海藻酸钙凝胶微球对 MC3T3-E1 细胞有较好的保护作用;(2)A-cell 复合 CPC 浆料组的细胞 D

值较 CPC 固化块组差异无统计学意义,并显示了较好的细胞活性;(3)CPC 浆料固化后可能仍持续影响细胞增殖,这种影响可能主要集中在固化后 24 h 内;(4)CPC 浆料固化后 1 d 每 6 h 换液,有利于细胞的活性,2 d 每 6 h 换液,则可能对细胞活性产生不利影响。

参考文献

- [1] Brown WE, Chow LC. A new calcium setting cement [J]. Dent Res, 1983, 63: 762-765.
- [2] Tancred DC, Carr AJ, McCormack BA. Development of a new synthetic bone graft [J]. J Mater Sci Mater Med, 1998, 9(12): 819-823.
- [3] Ginebra MP, Delgado JA, Harr I, et al. Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam [J]. J Biomed Mater Res A, 2007, 80(2): 351-361.
- [4] Simon CG Jr, Guthrie WF, Wang FW. Cell seeding into calcium phosphate cement [J]. J Biomed Mater Res A, 2004, 68(4): 628-639.
- [5] Pan J, Tian JM, Dong LM, et al. Setting behavior of fast-setting calcium phosphate cement with mineral phase of bone [J]. Key Eng Mat, 2005, 280-283: 1567-1570.
- [6] Chai F, Blanchemain N, Lefevre A, et al. *In vitro* studies on the influence of precultural conditioning method on osteoblast reactions of a new type of injectable calcium cement material [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2006, 77(1): 104-113.
- [7] 孟丹,谢秋菲,肖建军. 两种磷酸钙骨水泥浆料固化过程对成骨细胞的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(3): 471-474.
- [8] 张州,乔朋艳,肖建军,等. 成骨细胞复合原位成型磷酸钙骨水泥的细胞学研究[J]. 北京大学学报:医学版, 2011, 43(1): 67-72.
- [9] Sakai S, Ono T, Ijima H, et al. MIN6 cells-enclosing aminopropyl-silicate membrane templated by alginate gels differences in guluronic acid content [J]. Int J Pharm, 2004, 270(1-2): 65-73.
- [10] Iemma F, Spizzirri UG, Puoci F, et al. pH sensitive hydrogels based on bovine serum albumin for oral drug delivery [J]. Int J Pharm, 2006, 312(1-2): 151-157.
- [11] 薛伟明,于炜婷,刘袖洞,等. 载细胞海藻酸钠/壳聚糖微胶囊的化学破囊方法研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(7): 1342-1346.
- [12] 张英,王为,吕国军,等. 微囊化重组 CHO 细胞制备和培养条件的优化[J]. 生物工程学报, 2007, 23(3): 502-507.

(2012-09-23 收稿)

(本文编辑:任英慧)