

不同孔径 CPC 材料对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响 *

董 鑫¹ 孟国林¹ 白 峰¹ 刘 建^{1△} 刘昌胜² 郝 赋¹

何 树¹ 陈 实¹ 赵轶男¹ 李征宇¹ 姜 杰³

(1 第四军医大学西京医院全军骨科研究所 陕西 西安 710032 ;

2 华东理工大学材料科学与工程学院生物材料研究所 上海 200237 ; 3 中国人民解放军 93383 部队)

摘要 目的:评价不同大小孔径的磷酸钙骨水泥(Calcium phosphate cement,CPC)材料对大鼠骨髓间充质干细胞(Bone mesenchymal stem cells ,BMSCs)增殖能力的影响。方法:用盐析法制备三种不同孔径的(200-300 μ m、300-450 μ m、450-600 μ m)CPC 材料,利用 Micro-CT 测量三种材料的平均孔径、孔隙率。无菌条件下取新生大鼠 BMSCs 原代培养并传代,将三组材料分别放置于 24 孔板内,每个材料接种 5×10^4 个细胞后,37 $^{\circ}$ C、饱和湿度环境下静置培养。于接种后第 1、4、7、14、21 天用 picogreen 试剂盒测定细胞增殖率,并在第 14 天、21 天戊二醛固定材料并干燥喷金,扫描电镜观察材料表面细胞生长情况。结果:Micro-CT 测量结果显示:三种 CPC 材料孔径间相互连通,孔隙率均大于 68%,平均孔径分别为 235 μ m、422 μ m、505 μ m。细胞在三组材料上均呈对数增长趋势,在第 14 天到达平台期,在第 1 天三组细胞数量无明显差异,第 4 天 450-600 μ m 组细胞数量明显高于其余两组 ($P < 0.05$),在第 7 天细胞数量随孔径的增加而增加,3 组间均有统计学差异($P < 0.05$),第 14 天和第 21 天 200-300 μ m 组细胞数量明显少于其余两组($P < 0.05$),300-450 μ m 组和 450-600 μ m 组间无统计学差异($P > 0.05$)。结论:孔径大小可影响大鼠 BMSCs 在多孔 CPC 材料上的增殖能力,随着孔径增大,细胞增殖力增高。本研究为进一步研究孔径结构对细胞的影响提供了实验依据。

关键词 多孔 CPC 材料;BMSCs;细胞增殖;孔径大小

中图分类号:Q95-3 R318.08 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)07-1246-04

Effect of different sizes of aperture of calcium phosphate cement scaffolds on cell proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats*

DONG Xin¹, MENG Guo-lin¹, BAI Feng¹, LIU Jian^{1△}, LIU Chang-sheng², HAO Fu¹,

HE Shu¹, CHEN Shi¹, ZHAO Yi-nan¹, LI Zheng-yu¹, JIANG Jie³

(1 Research Institute of Orthopaedic Surgery, Xijing Hospital, The fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

2 School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

3 93383 PLA Troops)

ABSTRACT Objective: To study the effect of CPC material with different pore sizes on cell proliferation. **Methods:** Primary cultured rat bone mesenchymal stem cells were used in the present study. Three kinds of CPC scaffolds with different pore sizes (200-300 μ m, 300-450 μ m, 450-600 μ m) were divided into three groups. Micro-CT was used to analyze the average pore size and porosity. The three kinds of CPC material were placed in 24-well plates and 5×10^4 cells were incubated per-well. The cells were harvested 1,4,7,14 and 21 days after the incubation, and then use the PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent kit to test the cell proliferation on the three group of scaffolds. The cell morphology and cell condition were observed by scanning electron microscope. **Results:** The pore sizes of CPC material used in this study were interconnected. Porosity of the three groups was greater than 68% with the average pore size of 235 μ m, 422 μ m and 505 μ m, respectively. The amount of cell in the 3 groups has no significant in day 1. In the 4th day the amount of cell in the 450 - 600 μ m group more than that of B and C groups. The number of cell necrosis in A group was significantly more than that of B and C groups. In the 7th day, increase of the pore size, the amount of cell increased gradually. In the 14th and 21th day, the amount of cell in 200-300 μ m group was significantly less than that the other two groups. **Conclusion:** The pore size may affect cell proliferation. Along with the increase of the spore size, cell adhesion rate increased gradually. The present study provides the foundation for further study on the effect of aperture structure on cell viability.

Key words: Porous CPC scaffolds; BMSCs; Cell proliferation; Pore size

Chinese Library Classification: Q95-3, R318.08 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)07-1246-04

前言

目前大段骨缺损的修复仍然是骨科医生临床上所面临的难题,骨组织工程的研究和发展为大段骨缺损的修复提供了一

* 基金项目 国家科技支撑计划(2008BAI16B02)

作者简介 董鑫 (1984-) 男, 硕士研究生, 研究方向:骨组织工程。电话:13809191616, E-mail:dongx_fmumu@163.com

△通讯作者 刘建, 电话:029-84771013, E-mail:ljreny@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-01-23 接受日期:2011-02-18)

条良好的途径,良好的支架材料能够为细胞提供附着及相互作用的场所,因此要求支架材料必须有良好的生物相容性、与周围组织炎性反应小、生物降解速度与新骨再生速度相适应、合适的机械力学强度^[1]。近几年越来越多的模拟骨结构的多孔支架材料被证实其促进骨折愈合的能力明显的优于无孔径结构的支架,因此说明材料的三维结构可以影响新生骨的形成及骨传导^[2]。材料的孔径结构和孔隙率是影响材料结构的重要因素,孔与孔之间必须相互连通才能使细胞长入和迁移,才能使营养物质进入材料内部,而只有相互连通的孔才能使新生骨连续的长入^[3]。目前有关材料孔径结构对宿主细胞的功能及行为影响方面的研究相当匮乏。我们前期的研究发现孔径的大小可影响细胞在材料上的粘附能力,通过观察接种在不同孔径大小的CPC材料上细胞的粘附和坏死,发现随着孔径增大,细胞粘附率逐渐增高,同时随着孔径的增大,细胞坏死率也逐渐降低。但前期试验仅探讨细胞接种后48小时内的变化,缺乏长时间的动态观察。本次研究我们的目的是长时间观察细胞接种材料后细胞形态以及增殖情况的差异,探讨孔径结构对细胞增殖的影响。为今后研究孔径结构对细胞分化以及选择最佳结构的生物材料修复骨缺损提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

SD大鼠购自第四军医大学实验动物中心,DMEM/F12培养基(GIBCO公司,美国),胎牛血清、青链霉素(Hyclone公司,美国),倒置相差显微镜(Nikon公司,日本),CO₂细胞培养箱、各种规格培养板、培养皿、离心管(Corning公司,美国);PICOGREEN细胞增殖定量检测试剂盒(杰美基因,中国);扫描电镜(日立公司,日本);显微CT(通用电气公司,美国)。

1.2 支架材料的制备

CPC支架华东理工大学材料科学与工程学院生物材料研究所制造^[4,5],材料圆柱状,高4mm,直径5mm,CPC材料制备方法如下:氯化钠结晶按不同要求将其造粒筛分别制成200~300μm、300~450μm、450~600μm的颗粒备用,将CPC粉末、氯化钠结晶和固化剂按照一定比例放入研钵中混合,随后放入不锈钢模具,在100Mpa压力下、37℃、100%湿度环境中固化,48h取出,放入超纯水中3d,溶解NaCl成孔,取出在120℃干燥并高压灭菌,最后得到三种不同孔径的支架材料,

-20℃无菌保存备用#。采用Micro-CT扫描并三维重建,通过软件分析三种材料平均孔径、孔隙率等物理参数。实验前材料需进行预处理,完全培养基浸泡12h,无菌吸水纸充分干燥。

1.3 大鼠 BMSCs 的原代和传代培养

选出生3周的SD大鼠,麻醉处死,无菌条件下取股骨和胫骨,用剪刀将两端干骺端切除,冲洗骨髓腔,制成单细胞悬液,接种于25cm²的培养瓶内,置37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养,7~10d左右,达到70~80%铺满,胰酶进行消化传代,1×10⁴个细胞/cm²接种,每3天换液。本实验均采用第3代细胞进行。

1.4 大鼠 BMSCs 接种 CPC 材料

取经过预处理的3组CPC材料,分组放入24孔培养板内。用完全培养基将P3代BMSCs制成细胞悬液调整浓度为2.5×10⁶个/ml,每个材料滴加10μl(2.5×10⁴个细胞/材料),静置于37℃、5%CO₂浓度饱和湿度细胞培养箱内,2h后取出并翻转材料,再滴加10μl细胞悬液(2.5×10⁴个细胞/材料)。静置于细胞培养箱内。2小时后再添加含10%FBS的完全培养基1.5ml,后隔日换液。

1.5 细胞增殖率测定

分别于细胞接种材料后1天、2天、4天、7天、14天、21天,每组取3个材料,无菌PBS冲洗后放置于新24孔板内,按照picogreen细胞增殖检测试剂盒说明进行操作,最后将反应液转移至96孔板内,紫外酶标仪480nm测定吸光度值。

1.6 SEM 观察

材料接种细胞后7天、21天取各组CPC支架材料,PBS漂洗,戊二醛固定过夜,采用临界干燥法对材料进行脱水干燥,真空喷金,扫描电镜观察细胞形态及与材料表面粘附情况。

1.7 统计分析

所有数据用SPSS17.0软件处理。采用单因素方差分析进行比较,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。P<0.05为有显著性差异。

2 结果

2.1 micro-CT 分析结果

通过软件分析可精确计算出三组材料孔径大小和孔隙率。三组材料孔径间相互连通,孔隙率均大于68%,平均孔径分别为235μm、422μm、505μm,见表1。

表1 micro-CT 分析三组材料平均孔径及孔隙率

Table 1 The average pore sizes and porosities of the three group scaffolds analyzed by micro-CT

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C
孔径 Pore size	200-300μm	300-450μm	450-600μm
平均孔径 Average pore size	235±24μm	422±21μm	505±31μm
孔隙率 Porosity	69.0±3.2%	68.3±3.3%	68.9±1.6%

2.2 细胞增殖率测定

从图1中可以看出:细胞在三组材料上均呈对数增长趋势,在第14天到达平台期,在第1天三组细胞数量无明显差异,第4天450-600μm组细胞数量明显高于其余两组(P<

0.05),在第7天细胞数量随孔径的增加而增加,3组间均有统计学差异(P<0.05),第14天和第21天200-300μm组细胞数量明显少于其余两组(P<0.05),300-450μm组和450-600μm组间无统计学差异(P>0.05)。

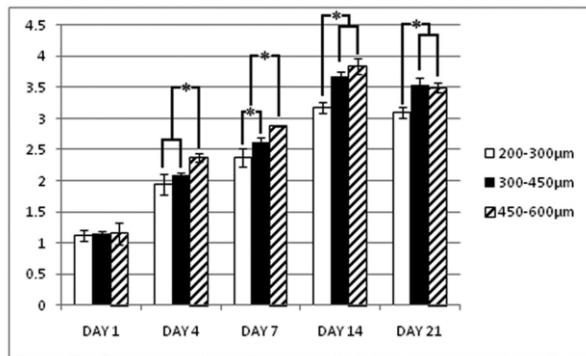


图1 三组细胞增殖率

Fig.1 Percentage of cells proliferation on the three groups of CPC scaffolds at 1,4,7,14 and 21 days post seeding

2.3 扫描电镜观察

通过扫描电镜可以表现材料外表面与细胞的粘附情况,同时反映细胞形态和增殖情况,见图2、图3。从电镜照片我们可以观察到三种CPC材料孔径差异明显,BMSCs在三组CPC材料表面均能良好生长。

第7天,三组材料上接种的细胞在形态上无差异,细胞均伸展连接成片块状,在细胞表面可看到少量圆点状细胞外基质沉积及部分坏死细胞存在,见图2。

第21天,三组材料表面被细胞层均匀覆盖,孔内及孔间均被细胞覆盖且连成片状,从电镜照片看不出三组间差异,见图3。

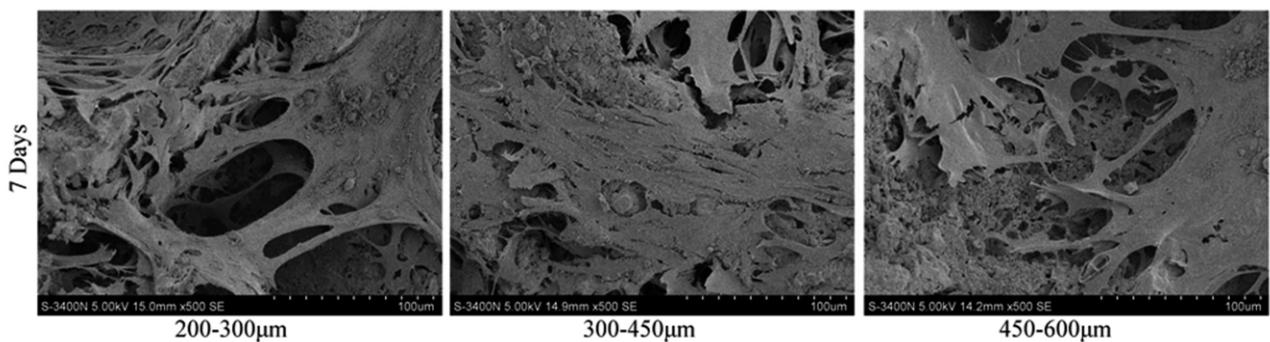


图2 第7天3组材料扫描电镜照片

Fig 2 The SEM photos of the three groups in the 7th day

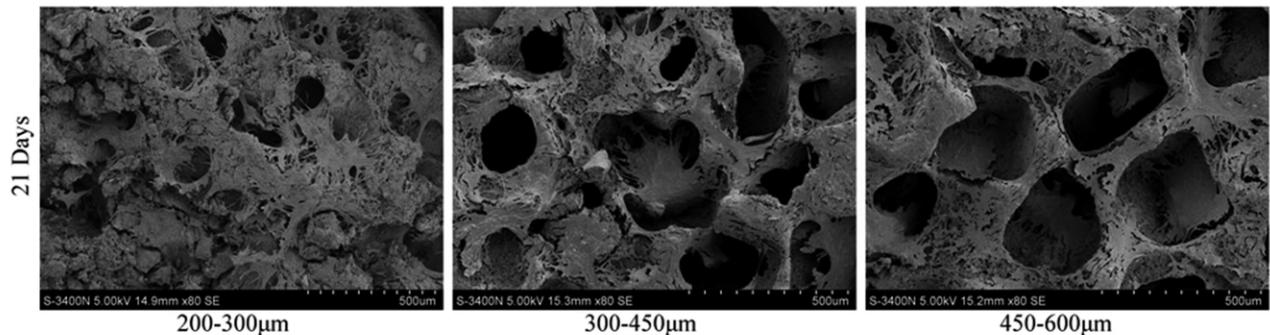


图3 第21天3组材料扫描电镜照片

Fig 3 The SEM photos of the three groups in the 21th day

3 讨论

组织工程构建人工骨是一种较成熟的技术,它主要包括3个方面的内容:种子细胞、支架材料和生长因子^[6]。其中支架材料作为细胞交互作用和骨基质形成的载体同时还要具备新生骨组织长入的结构^[7]。同时,生物材料还应该作为营养物质以及生长因子的运输工具来促进干细胞及前成骨细胞的增殖和成骨分化用以促进骨传导。为了更好的与周围组织相融合,生物材料需要在制作工艺上模拟真实的骨结构、形态和功能。近几年多孔支架材料的三维结构是国内外研究的热点。本实验所使用的CPC材料由华东理工大学材料科学与工程学院生物材料

研究所制造,该材料组成是骨组织中的主要无机成分,且拥有接近于松质骨的孔隙率,有良好的生物相容性、可控的降解速度、骨传导性和优秀的力学强度,已在之前的研究中得以验证^[4,5]。

孔隙率和孔径大小是生物材料的两个非常重要的物理参数^[8]。相关动物实验研究报道^[9],孔隙率大于60%更有利于新生骨的长入。体外研究也证实,较高的孔隙率促进细胞增殖,但是过高的孔隙率(>70%)会降低材料的机械力学强度^[10]。但是孔径的大小对于细胞的粘附、增殖以及分化的影响是没有统一的观点。国外文献报道:Tina Mygind^[7]等人利用人骨髓间充质干细胞和多孔的羟基磷灰石材料,在第14天和第21天观察到500µm孔径的材料细胞数量明显多于200µm孔径材料;

Ciara M^[11]等人利用胶原糖胺材料与 MC3T3 前成骨细胞系也得出类似结论。Itoh M^[12]等人利用复合胶原的磷酸石材料与 MC3T3 前成骨细胞系研究发现 50-300 μm 孔径范围内细胞增殖无统计学差异。Akin FA^[13]等人发现与大孔(49 μm)相比,小孔(0.4、13 μm)的 TiO₂ 材料更利于促进人成骨细胞的增殖。

细胞增殖是一个复杂的过程,其中生物材料的表面特性决定了细胞的粘附增殖以及分化能力^[14]。在接种细胞后 1 天,三组材料表面细胞增殖无统计学差异,第 4 天 450-600 μm 材料上细胞数量明显多于其余两组。结合前期试验考虑为孔径大更利于早期细胞粘附,因此在早期大孔径材料表面有更多的细胞基数^[15,16]。同时孔径大,更有利于细胞向材料内部爬行生长。而随着时间的推移,到第 7 天,因为孔径大更有利于细胞向材料内部爬行生长因此孔径越大,材料内细胞数量越多。到第 14 天和 21 天,小孔径材料内细胞数量明显少于其余两组,考虑为孔径越大,材料的表面积越大,有利于更多的细胞与材料表面的接触^[15,17]。

通过扫描电镜我们在三组材料间看不出明显差异,材料表面已经被细胞所覆盖,说明在第 7 天细胞已爬行至材料内部空间继续增殖,在第 14 天细胞进入平台期,考虑因细胞间"接触抑制"^[18]作用,材料表面及内部空间均已被细胞所铺满减慢了增殖速度^[19]。

本研究证实了孔径大小可以影响细胞的增殖能力。大孔径材料(450-600 μm)的细胞增殖能力明显强于小孔径材料(200-300 μm),我们可以推断材料的孔径大小以及表面积在细胞增殖上面起到非常重要的作用,但是确切的干预机制和因素我们仍不清楚,有待进一步研究。本实验仅从形态、增殖率探讨了孔径的大小对细胞增殖的影响,而孔径结构对细胞体外分化能力以及体内成骨能力又会出现怎样的影响均有待进一步的实验。

参考文献(References)

- [1] Giannoudis P V, Einhorn T A, Schmidmaier G, et al. The diamond concept--open questions.[J]. Injury, 2008,39 Suppl 2:S5-S8
- [2] Zhang Z Y, Teoh S H, Chong M S, et al. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells.[J]. Stem Cells, 2009,27(1):126-137
- [3] O'Brien F J, Harley B A, Yannas I V, et al. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. [J]. Biomaterials, 2005,26(4):433-441
- [4] 唐华,徐志飞,刘昌胜,等.多孔 CPC 组织工程肋骨支架制备及 BMSCs 在其表面增殖黏附的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志,2008,22(10):1238-1241
Tang Hua, Xu Zhi-fei, Liu Chang-sheng, et al. Preparation of cpc for tissue engineering artificial rib and a study on proliferation and adhesion of BMSCs on CPC.[J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2008,22(10):1238-1241. (In Chinese)
- [5] 魏杰,刘昌胜,洪华,等.新型可降解钙磷骨水泥多孔支架研究[J].无机材料学报,2006,21(4) 958-964
Wei Jie, Liu Chang-Sheng, Hong Hua, et al. Novel Biodegradable Scaffold of Calcium Phosphate Cement[J]. Journal of Inorganic Materials, 2006,21(4) 958-964(In Chinese)
- [6] Kneser U, Schaefer D J, Polykandriotis E, et al. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view.[J]. J Cell Mol Med, 2006,10(1):7-19
- [7] Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, et al. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds.[J]. Biomaterials, 2007,28(6):1036-1047
- [8] Skardal A, Sarker S F, Crabbe A, et al. The generation of 3-D tissue models based on hyaluronan hydrogel-coated microcarriers within a rotating wall vessel bioreactor. [J]. Biomaterials,2010,31(32): 8426-8435
- [9] Akay G, Birch M A, Bokhari M A. Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro[J]. Biomaterials, 2004,25(18):3991-4000
- [10] Karageorgiou V, Kaplan D, de Magalhaes P M, et al. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis.[J]. Biomaterials; Artif Organs, 2005,26(27):5474-5491
- [11] Murphy C M, Haugh M G, O'Brien F J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering.[J]. Biomaterials, 2010,31(3):461-466
- [12] Itoh M, Shimazu A, Hirata I, et al. Characterization of CO₃Ap-collagen sponges using X-ray high-resolution microtomography. [J]. Biomaterials, 2004,25(13):2577-2583
- [13] Akin F A, Zreiqat H, Jordan S, et al. Preparation and analysis of macroporous TiO₂ films on Ti surfaces for bone-tissue implants.[J]. J Biomed Mater Res, 2001,57(4):588-596
- [14] 刘刚,胡蕴玉,赵建宁,等.型胶原促进骨髓基质干细胞粘附的细胞机制[J].中华创伤骨科杂志,2006,8(6):549-552
Liu Gang, Hu Yun-yu, Zhao Jian-ning, et al. The cellular mechanism of stimulative effects of Collagen on rabbit bone marrow stromal cells (BMSCs) adhesion.[J]. Chinese Journal of Orthopaedic Trauma, 2006,8(6):549-552
- [15] Schmidt S, Friedl P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms.[J]. Cell Tissue Res, 2010,339(1):83-92
- [16] Duong L T, Lakkakorpi P, Nakamura I, et al. Integrins and signaling in osteoclast function.[J]. Matrix Biol, 2000,19(2):97-105
- [17] Binulal N S, Deepthy M, Selvamurugan N, et al. Role of nanofibrous poly(caprolactone) scaffolds in human mesenchymal stem cell attachment and spreading for in vitro bone tissue engineering--response to osteogenic regulators.[J]. Tissue Eng Part A, 2010,16(2):393-404
- [18] Zhang Z Y, Teoh S H, Chong M S, et al. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. [J]. Biomaterials, 2010,31(4):608-620
- [19] Rhee S. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling[J]. Exp Mol Med, 2009,41(12):858-865