DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.023
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)10-0905-03

论著

PDLLA/HA/DBM复合生物材料对成骨细胞增殖活性的影响

郭乔楠[1],赵建华[2],卢佳友[1] (第三军医大学:[1]西南医院病理科,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所骨科,重庆 400042)

提 要:目的 研究人成骨细胞在一种新型骨替代材料消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质(PDLLA/HA/DBM)上的生长情况,并与消旋聚乳酸PDLLA和脱钙骨基质(DBM)相比较,从细胞水平评价材料的生物相容性。方法 将培养的人成骨细胞第3代,密度为3.5×10^5/ml悬液,分别种植于PDLLA/HA/DBM、PDLLA及DBM上,利用细胞计数法检测种植后1、2、3、5、7 d的细胞增殖率。结果 成骨细胞在PDLLA/HA/DBM表面的增殖速度较PDLLA和DBM快。结论 PDLLA/HA/DBM更有利于成骨细胞种植。

关键词:成骨细胞;细胞培养;生物材料;细胞增殖
中图法分类号:R318.08;R322.71;R329.28 文献标识码:A

Effects of PDLLA/HA/DBM biomaterials on the activity of osteoblast proliferation

GUO Qiao-nan[1], ZHAO Jian-hua[2], LU Jia-you[1] ([1]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Chongqing 400038, [2]Department of Orthopaedics, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of PDLLA/HA/DBMV biomaterials on cell proliferation by comparison of polyactic acid (PDLLA) and decalcified bone matrix (DBM) so as to evaluate the biocompatibility of the biomaterials at the cell level. **Methods** The isolated third generation human fetal osteoblasts (suspension, 3.5×10^5/ml) were inoculated onto the biomaterials of PDLLAHA/DBM, PDLLA, and DBM for 1, 2, 3, 5, and 7 d. Proliferation rates of cells on different materials were determined by flow cytometry. **Results** The osteoblast proliferation rate on PDLLA/HA/DBM was higher than that on PLA and DBM. **Conclusion** PDLLA/HA/DBM is compatible for the growth of osteoblasts.

Key words: osteoblast; cell culture; biomaterial; cell proliferation

在骨组织工程研究中,细胞、支架材料、细胞与材料的相互作用是研究的重点。理想的骨替代材料应具有良好的生物相容性,对细胞和组织无毒副作用,同时与骨组织之间能早期形成骨性结合界面[1,2]。消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质(D, L-polylactic acid/Hydroxyapatite/decalcified bone matrix, PDLLA/HA/DBM)是人工合成的一种新型硬组织替代材料[3],为了探讨其生物相容性,本实验应用体外细胞培养技术,选用股骨头置换术所取得的人股骨头碎片培养的成骨细胞,从成骨细胞增殖活性的角度来探讨细胞与材料之间的相互作用。

基金项目:重庆市攻关项目(2003)
Supported by the Research Project of Sci &Tech of Chongqing (2003)
作者简介:郭乔楠(1964-),女,湖南省桃源县人,博士,主任医师,教授,主要从事骨肿瘤病理学方面的临床及基础方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754497
通信作者:赵建华,电话:(023)68757264
收稿日期:2003-02-20;修回日期:2003-05-05

1 材料与方法

1.1 材料

F12培养基(Gibco),含20%的小牛血清,Vitamin C、青霉素等,培养用三蒸水。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养支架材料准备 将PDLLA/HA/DBM生物复合材料及消旋聚乳酸(重庆大学生物工程学院提供)制备成直径7 mm,厚1.5 mm的圆盘状,制作方法按照我们以前所报道的方法[1,2],获得的生物材料复合物为多孔的三维立体结构,孔径为100~400 μm,孔隙率为71.3%。另将脱钙骨基质DBM制成长7 mm,宽5 mm的方片,置于48孔培养板的孔底,75%的乙醇溶液浸泡2 h,用三蒸水反复冲洗,除去水分,在密闭环境中用高效紫外灯照射1h,灭菌后的材料用培养基浸泡1 h,备用。

1.2.2 成骨细胞分离培养、纯化和鉴定 取股骨头置换术的人股骨头松质骨,将其剪成碎块,放置入25 ml培养瓶中,加入F12培养液(含20%的小牛血清,Vitamin C、青霉素等)置于37 ℃恒温培养箱,每3 d换液1次,约1~2周可获得第1代细胞[4]。收集细胞分瓶传代,经形态学和Ⅰ型胶原及碱性磷酸酶活性鉴定为成骨细胞,选用第3代成骨细胞用于实验。Ⅰ型胶

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

原单克隆抗体及ABC试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司，为即用型抗体。成骨细胞碱性磷酸酶染色方法简述如下：取出盖玻片后用TBS液洗涤5 min×4次，在1 ml TBS缓冲液中加20 μl BCIP/NBP显色盒试剂（博士德公司）并混匀，待标本风干后，加至标本上，室温避光显色20 min，冲洗后，梯度脱水，干燥封片。阳性染色为蓝色颗粒。

1.2.3 材料中成骨细胞的种植 将培养的人成骨细胞（第3代）稀释至密度为3.5×10^5/ml，用加样器吸取0.5 ml细胞悬液，均匀加入到材料中，轻轻摇晃，使细胞悬液充分渗透到材料中，于培养箱中恒温培养4 h，再向培养孔中加入充足的培养液，每2～3 d更换培养液。

1.2.4 支架材料中成骨细胞计数 将培养到1、2、3、5、7 d的标本从培养液中取出，用PBS液冲洗2次，加入0.7 ml消化液（含0.25%胰蛋白酶，0.02% EDTA）消化3～5 min，用吸管轻轻吹打数次，再加入0.1 ml FBS以终止消化，用细胞计数板计数。每孔重复3次，取平均值。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，行方差分析。

2 结果

2.1 成骨细胞的鉴定

培养的细胞在培养的第10～14天始，可见细胞呈复层生长，并见钙化物质出现，Ⅰ型胶原免疫组化染色及碱性磷酸酶染色阳性，见图1，2，3。

2.2 成骨细胞在材料上的增殖情况

成骨细胞增殖率见图4。

结果表明：①3种材料表面的成骨细胞随着培养时间的延长，细胞数量逐渐增加，其差异经统计学处理有显著意义（$P<0.05$）；尤其是第3天以后，细胞数量增加与第1、2天相比增加明显。②同PDLLA相比和DBM相比，3、5、7 d后成骨细胞在PDLLA/HA/DBM表面增殖速度较快，而DBM次之，三者比较，成骨细胞在PDLLA上的增殖率最慢。经统计学处理有显著意义（$P<0.05$）。



图1 Ⅰ型胶原阳性染色颗粒呈棕黄色位于成骨细胞胞浆内（ABC×200）

Fig 1 Type Ⅰ collagen positive staining of brownish yellow granules in the osteoblast cytoplasm （ABC×200）



图2 碱性磷酸酶阳性染色颗粒呈蓝色位于成骨细胞胞浆内（×100）

Fig 2 Alkaline phosphatase positive staining of blue granules in the osteoblast cytoplasm （×100）

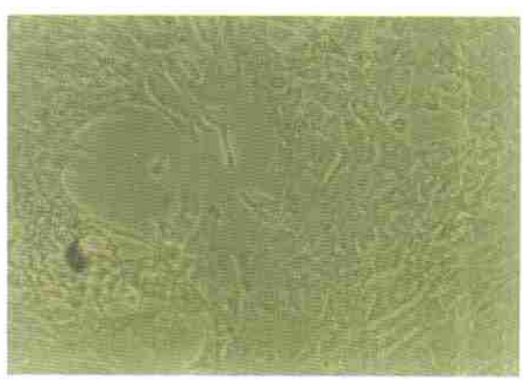
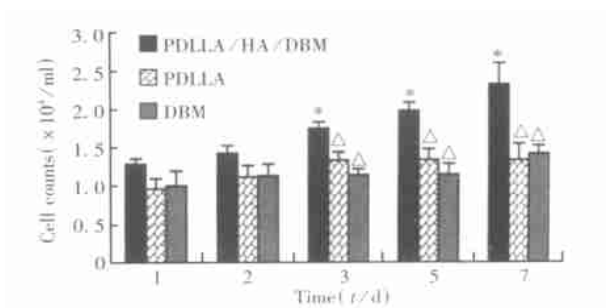


图3 成骨细胞与复合材料共培养7 d后，材料边缘细胞簇中可见钙结节沉积（×100）

Fig 3 Calcium sediment in the cell clusters at the edge of the material at 7 d after coculture of osteoblasts and the biomaterial （×100）



*：$P<0.05$ *vs* 1，2 d；△：$P<0.05$ *vs* PDLLA/HA/DBM at the same time point

图4 三种材料表面培养的成骨细胞增殖情况

Fig 4 Proliferation rates of osteoblasts cultured on the 3 biomaterials

3 讨论

采用乳液共混法制备的PDLLA/HA/DBM生物复

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

合材料具有良好的孔隙率和降解特性。在 0～5 周内 PDLLA/HA/DBM 能保持良好的空间结构和生物力学性能, 具有较好的骨传导作用, 有利于骨长入。pH 值经历 12 周后仅下降至 6.4[3]。在植入体内条件下, 不会影响机体组织细胞酶的活性和代谢。PDLLA/HA/DBM 孔隙率为 71.3%, 孔径在 100～400 μm 左右, 支架有效空间大, 这种结构特征, 不但能保证其具有很好的骨传导性能, 而且可以有效的为种子细胞粘附、分化及成骨提供更好的场所。骨创伤早期, 骨断端将释放大量内源性骨诱导因子促进骨生长, 5 周后内源性骨诱导因子急剧减少。这时 PDLLA/HA/DBM 复合材料已进入快速降解期, DBM 释放增加, 为局部提供足够外源性骨诱导因子有利于骨愈合。

本实验采用细胞直接计数法测定细胞增殖率, 该法可直接反映细胞在材料表面的生长情况, 可以较好地评价材料细胞相容性[5,6]。本实验结果表明, 成骨细胞在 PDLLA/HA/DBM 复合材料表面增殖速度较 PDLLA 及 DBM 快, 该新型复合材料克服了 PDLLA 强度低的缺点, 又结合了 DBM 的骨诱导作用, 所以具有较好的细胞生物相容性和成骨潜能, 有望成为一种具有良好应用前景的硬组织替代材料。

参考文献:

[1] Porter B D, Oldham J B, He S L, *et al*. Mechanical properties of a biodegradable bone regeneration scaffold[J]. J Biomech Eng, 2000, 122(3): 286－288.

[2] Lewandowska S, Komender J. Interaction between tissues and implantable materials[J]. Front Med Biol Eng, 2000, 10(2): 79－82.

[3] 赵建华, 廖维宏, 王远亮, 等. 消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质的制备及其体外降解特性研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17(1): 61－64.

[4] Kim H D, Valentini R F. Human osteoblast response *in vitro* to platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta delivered from controlled-release polymer rods[J]. Biomaterials, 1997, 18(17): 1175－1184.

[5] 唐　昭, 刘为军. 三种生物陶瓷材料的细胞相容性的实验研究[J]. 中国口腔种植学杂志, 2000, 5(1): 8－10.

[6] Lindblad M, Lestelius M, Johansson A, *et al*. Cell and soft tissue interactions with methyl-and hydroxyl-terminated alkane thiols on gold surfaces[J]. Biomaterials, 1997, 18(15): 1059－1068.

（编辑　陈聪连）

（上接 898 页）

可吸收线整形缝合肌肉形成小子宫。

2　结果

45 例患者的腹部切口均在 3～4 cm, 其中切口在 3 cm 者有 31 例(子宫≤孕 70 d), 4 cm 者有 14 cm(子宫＞孕 70 d)。45 例中行纵切口 41 例, 横切口 4 例, 手术时间为 48～87 min, 平均时间为(63.4±11.8) min。术中出血量 58～259 ml, 平均(145±24.4) ml。行子宫全切术 6 例, 三角形子宫切除术 5 例, 子宫肌瘤挖除术 8 例, 子宫次全切除术 26 例。无 1 例发生副损伤和并发症, 无 1 例伤口感染, 术后平均住院日 4.4 d(3～5 d)。

3　讨论

3.1　手术的操作技巧

腹腔镜下子宫肌瘤挖除术俱有微创的优势, 但缝合及止血均较困难, 手术时间长, 出血量较多[1], 作者采用小切口行子宫良性病变切除术, 既保留了微创的优势, 又有操作简单, 止血及缝合可靠的特点。三角形子宫切除术不仅切除了病变, 又保留了部分子宫体, 可维持盆底的功能。操作均在直视下进行, 处理哪个部位, 暴露哪个部位, 切口虽小仍然暴露清楚。从小切口取出较大的子宫时应用电刀纵行切开子宫, 则取出宫体并不费力, 或将肌瘤挖除后再取出子宫。对于子宫肌瘤挖除术关键是扎好止血带, 在腹腔内行肌瘤挖除术, 大多数妇科医生均能迅速掌握该项不需专业培训技术。

3.2　小切口的优点

小切口手术具有创伤小, 术后患者疼痛轻, 手术时间短, 术后恢复快等优点。与腹腔镜子宫切除比较, 小切口的优点是节省人力和费用, 手术时间更短, 不需专门的设备和技术, 其操作较腹腔镜方便, 缝扎及止血可靠, 因而更具安全性, 尤其是一些比较大的肌瘤, 腹腔镜手术会十分困难。于常规子宫切除术比较, 小切口手术具有某些微创手术的优点[2]: ①创伤小, 切口小, 腹腔内脏暴露少, 手术中对肠道的干扰少, 因而术后患者疼痛轻, 肠功能恢复快。②手术时间短。切口小, 开腹与关腹时间均短, 勿需悬吊膀胱及安放固定拉钩。最短仅 48 min, 平均手术时间 63 min。③切口美观。④缩短住院时间。小切口术后恢复快, 伤口不需拆线, 术后 3～5 d 即可出院, 较常规手术提前 2～3 d 出院。小切口适用于所有子宫良性病变需行子宫切除术患者。

关键词: 子宫良性病变; 微创手术
中图法分类号: R713.4　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Hwang J L, Seow K M, Tsai Y L, Huang L W. Comparative study of vaginal, laparoscopically assisted vaginal and abdominal hysterectomies for uterine myoma larger than 6 cm in diameter or uterus weighing at least 450g: a prospective randomized study[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2002, 81(2): 1132－1138.

[2] Al Fozan H, Tulandi T. Factors affecting early surgical intervention after uterine artery embolization[J]. Obstet GynecolSurv, 2002, 57(12): 810－815.

（编辑　刘洪娥）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net