DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.021
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2216 2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2216-04

论著

消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质材料支架的体外细胞相容性实验研究

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

提 要:目的 研究一种新的骨替代材料——消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质(PDLLA/HA/DBM)骨细胞界面形态,评价其生物相容性。方法 采用体外细胞培养技术,选用培养的人成骨细胞,通过光镜和扫描电镜等观察,了解细胞在材料中的生长情况和相互关系,并与消旋聚乳酸(PDLLA)及脱钙骨(DBM)相比较。结果 随着培养时间的延长,细胞在PDLLA/HA/DBM材料表面的密度增加,未见细胞死亡。细胞以锚状结构牢固地附着于材料表面,并分泌细胞外基质,覆盖并完全包裹材料颗粒。结论 PDLLA/HA/DBM与人成骨细胞能早期形成骨性结合界面,具有良好的生物相容性,可望成为一种新的具有前景的骨替代材料。

关键词:成骨细胞;生物相容性;细胞培养;消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质
中图法分类号:R318.08;R322.71 文献标识码:A

Biocompatibility of PDLLA/HA/DBM with human osteoblasts co-cultured *in vitro*

GUO Qiao-nan, ZHAO Jian-hua, LU Jia-you (Research Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the osteocompatibility of poly(D, L-lactic acid)/hydroxyapatite/decalcified bone matrix (PDLLA/HA/DBM) and to compare the osteocompatibility with that of PDLLA and DBM. Methods The isolated human osteoblasts from the femoral head of patients were inoculated onto PDLLA/HA/DBM, PLA, and DBM. The interface between biomaterial and osteoblasts was investigated with phase contrast microscope and scanning electron microscope. Results Osteoblasts were attached tightly to the surface of biomaterial with an arched structure and had normal morphology. The extracellular collagenous matrix covered the surface of biomaterial and packed the granules of biomaterial completely. Conclusion PDLLA/HA/DBM can form osteointegrated interface at the early stage with good biocompability.

Key words: osteoblast; biocompatibility; cell culture; PDLLA/HA/DBM

骨具有再生和自行修复能力,因肿瘤切除、外伤、骨异常生长所造成的骨缺损,在单纯依靠骨自行修复无法愈合的情况下,则需采用手术治疗。传统的移植方式主要有自体骨移植和异体骨移植,但自体移植骨源有限,而异体骨移植又有传播疾病和免疫排斥反应等问题。组织工程骨为解决骨缺损修复这一难题展示了新的希望,它是在支架材料中复合具有成骨能力的成骨细胞,于体外构建具有活力的骨组织,再移植至所需修复的骨缺损区,使其直接发挥成骨作用,从而促进骨缺损的修复。成骨细胞是骨细胞修复过程中的主要功能细胞,其体外分离、培养技术已成熟,而骨组织工程研究中支架材料的选取尚存在分歧[1~5]。

目前常用的骨替代材料很多,如金属、陶瓷、高分子及复合材料。其中尤以羟基磷灰石应用最为广泛。但是因其细胞相容性差、立体空间结构紊乱,无成骨诱导因子存在等缺点,故进一步应用受到限制。而聚乳酸易于降解,会使局部酸性增强而引起炎症反应,并有可能改变新生骨的动力强度。据此,我们构建了成分类似自然骨的消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质(PDLLA/HA/DBM)复合材料支架。为了探讨其生物相容性,我们应用体外细胞培养技术,选用培养的人成骨细胞,从光镜和扫描电镜两个层面观察细胞和材料之间的相互作用,评价该材料的成骨潜能和生物相容性。

基金项目:重庆市攻关项目(2003)
Supported by the Research Project 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,主要从事肿瘤病理学及细胞生物学方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754497
收稿日期:2003-04-14;修回日期:2003-07-13

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

1　材料和方法

1.1　材料准备

将 PDLLP/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[6,7], 获得的生物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 1 h, 灭菌后的材料用培养基浸泡 1 h, 备用。

1.2　骨膜成骨细胞分离培养、纯化和鉴定

取青年人因股骨头置换而手术切除的股骨头骨松质制成骨组织碎块, 放置入 25 ml 培养瓶中, 加入 F12 培养液(含 20% 的小牛血清, V_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[8]。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。

1.3　细胞接种

用所备用的 48 孔培养板, 每孔放入 1 片材料, 3 种材料均设 1、2、3、5、7 d 5 组, 每组 3 孔, 将细胞浓度为 3.5×10^5/ml 的人成骨细胞悬液接种于消毒备用的 3 种材料表面, 静置片刻, 缓慢从材料边缘加入 199 培养液, 轻轻摇晃, 使细胞悬液充分渗入材料孔隙内。密闭后置于 37 ℃恒温培养箱中密闭联合培养。8 h 后加入培养液, 其后隔天换液 1 次, 倒置相差显微镜下连续观察材料边缘及孔隙表面的变化情况, 并摄像记录。同时分别取 1、3、5、7 d 标本, 3% 戊二醛固定, 临界点干燥, 镀金膜, AMRAY-1000 扫描电镜观察材料与细胞之间的关系。设两组对照, 分别为单纯接种细胞或未接种细胞的各种材料, 其步骤同上。

2　结果

2.1　倒置显微镜(Inverted phase microscope, IPM)观察

人成骨细胞第 3 代体外培养时呈现贴壁生长的特性, 多呈多角形、短梭形。由于材料的不透光性, 倒置显微镜观察不到细胞贴附后的形态, 镜下仅见材料及孔隙的表面有较多的细胞聚集。接种 1 d 后, 3 种材料边缘附着的细胞较少, 以圆形细胞为主, 远离材料的培养板边缘有散在的单个或多个细胞。细胞形态为三角形、短梭形或圆形。随着培养时间延长, 材料边缘附着或聚集的细胞密度增加, 形态以三角形、短梭形、多角形为主。3 种材料边缘细胞数量有差异。随着时间延长, 成骨细胞在 PDLLA/HA/DBM 复合材料边缘细胞数量逐渐增多, 见图 1。而 PDLLA 与成骨细胞复合培养时, 材料边缘细胞虽逐日增多, 但数量较复合材料要少, 见图 2; 成骨细胞在 DBM 材料边缘细胞数量介于上述二者材料之间, 见图 3。



图 1　PDLLA/HA/DBM 与成骨细胞共培养后 7 d, 材料边缘有大量成骨细胞, 并可见钙化结节　(IPM× 100)

Fig 1　Lots of osteoblasts at the edge of the biomaterial and visible calcified nodes at 7 d after co-culture of PDLLA/HA/DBM with human osteoblasts　(IPM× 100)

图 2　PDLLA 与成骨细胞共培养后 7 d, 材料边缘细胞略有增多　(IPM× 100)

Fig 2　Increased osteoblasts at the edge of the biomaterial at 7 d after co-culture of PDLLA with human osteoblasts　(IPM× 100)

图 3　DBM 与成骨细胞共培养后 7 d, 材料边缘有大量细胞, 但较之复合材料要少　(IPM× 100)

Fig 3　Lots of osteoblasts at the edge of the biomaterial at 7 d after co-culture of DBM with human osteoblasts, but fewer than those of PDLLA/HA/DBM and PDLLA　(IPM× 100)

2.2　扫描电镜观察

接种 3 d 后 PDLLA/HA/DBM 复合生物材料表面可见成骨细胞粘附于材料表面, 正在延伸的细胞表面不光滑, 而伸展的细胞表面光滑, 并以多个细小的突起伸入到材料颗粒之间, 形成一种牢固的锚状结构, 见图 4。此时, 细胞分泌的细胞外基质较少, 材料颗粒结构清晰可见, 随着培养时间的延长(7 d 时), 细胞数量逐渐增加的同时, 细胞外基质也增多。分泌的细胞外基质包绕于细胞周围, 有散在的微小钙结节形成, 部分细胞间伪足相互接触融合。材料周边细胞密度增大, 包埋在其周围分泌大量细胞外基质中, 几乎将材料孔填满, 并与材料混合在一起。脱钙骨基质上的成骨细胞只位于表面及周围, 细胞呈梭形, 有成簇现象, 见图 5。而 PDLLA 早期细胞呈球形, 周围有胶原纤维网形成, 随着培养时间延长, PLA 因降解而使支架孔隙变形或者消失, 成骨细胞与材料融合, 细胞形态不清楚, 材料表面细胞数量较少, 见图 6。

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

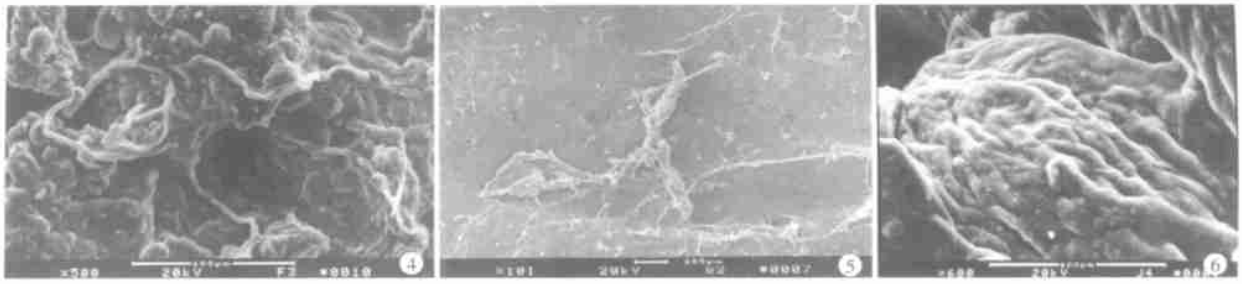


图 4 PDLLA/HA/DBM 与成骨细胞共培养后 3 d, 材料表面的成骨细胞并以多个细小的突起伸入到材料颗粒之间, 形成一种牢固的锚状结构 (SEM×500)

Fig 4 Osteoblasts anchoring into biomaterial surface in the form of tiny processes at 3 d after co-culture of PDLLA/HA/DBM with human osteoblasts (SEM × 500)

图 5 DBM 与成骨细胞共培养后 3 天, 成骨细胞呈簇排列 (SEM× 100)

Fig 5 Osteoblasts arranged in clusters on the biomaterial at 3 d after co-culture of DBM with human osteoblasts (SEM×100)

图 6 PDLLA 与成骨细胞共培养后 7 d, 成骨细胞与材料混合在一起, 界限不清, 但细胞伸展尚可 (SEM× 600)

Fig 6 Well-spread osteoblasts mixed with the biomaterial without clear boundary at 7 d after co-culture of PDLLA with human osteoblasts (SEM× 600)

3 讨论

评价硬组织替代生物材料生物相容性的方法很多。近年, 体外细胞复合培养法已成为评价生物相容性的主要方法[9,10]。体外成骨细胞培养模型可以排除体内多种因素的影响, 控制实验条件, 同时成骨细胞为材料植入部位的主要功能细胞, 可直接反映材料与细胞之间的相互作用关系。本实验选用经鉴定具有成骨细胞多种生物学特性的培养人成骨细胞, 与新型骨替代材料——消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质(PDLLA/HA/DBM)共同培养, 并与消旋聚乳酸、脱钙骨基质相比较, 从形态学角度观察其骨界面的形成。由于 PDLLA/HA/DBM 复合材料支架主要成分为消旋聚乳酸, 植入机体后, 随着诱导成骨作用和骨传导作用的发挥, PDLLA 逐渐被溶解吸收, 其可降解的特性符合作为构建组织工程骨组织支架材料的基本要求。

3.1 PDLLA/HA/DBM 的生物学特性

采用乳液共混法制备的 PDLLA/HA/DBM 生物复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[9], 与骨的 pH 值近似, 在植入体内条件下, 对机体组织细胞酶的活性和代谢影响较小[11]。PDLLA/HA/DBM 孔隙率高(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。本实验表明, 随着培养时间的延长, 复合生物材料边缘的细胞密度呈逐渐增加, 且细胞形态与正常无明显差别, 表明本材料对细胞无明显毒副作用。约 7 d 时, 细胞已完全牢固地附着于材料的表面。并呈锚状结构附着于材料表面, 同时细胞外基质也增多, 分泌的细胞外基质包绕于细胞周围, 有散在的微小钙结节形成, 这表明材料复合培养不影响成骨细胞胞外基质的矿化能力。PDLLA/HA/DBM 复合生物材料的这种早期形成骨性结合界面的机制, 可能是由于其与骨近似的 pH 值以及在体内环境下良好的可降解性, 这种较大的降解性不仅为细胞的伸入提供了位置, 而且有利于与机体之间的物质交换, 促进游离磷酸钙的沉积。材料表面的可降解性能较早的引起骨修复, 促进早期骨的形成。由此可见, PDLLA/HA/DBM 的这种可降解性有利于与组织进行离子交换, 使材料具有一定的生物活性, 可引起早期的骨界面的形成, 复合材料的缓慢降解较之消旋聚乳酸更有利于延长材料强度维持时间及有利于成骨细胞长入及生存环境的稳定, 另一方面也可避免短期内大量降解产物释放, 从而增加材料的生物相容性。

3.2 PDLLA/HA/DBM 的成骨潜能

骨替代材料的生物相容性是影响移植物在宿主体内转归的决定因素, 也是组织工程研究中判断支架材料质量的重要标准。PDLLA 与种子细胞宿主间均具有免疫抗原性低、生物相容性好的特点, 本实验扫描电镜观察可见细胞以锚状结构与材料紧密结合, 并分泌出大量的细胞外基质, 逐渐包裹材料颗粒, 并在材料表面形成一层较厚的膜状结构。细胞外基质的形成非常重要, 是形成骨基质并发生钙化继而形成新骨的重要条件。本研究所采用的生物复合材料较之消旋聚乳酸,

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

具有较好的骨传导作用，有利于骨长入。有研究表明[7]，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。这时材料已进入快速降解期，将释放大量 DBM，为局部提供足够外源性骨诱导因子有利于骨愈合。

本研究初步表明，作为一种新的人工合成的硬组织替代材料，PDLLA/HA/DBM 能与骨细胞形成早期的骨性结合界面，它结合了消旋聚乳酸和脱钙骨基质的特点，具有良好的成骨潜能，生物相容性优良，可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] Winn S R, Hollinger J O. An osteogenic cell culture system to evaluate the cytocompatibility of osteoset, a calcium surface bone void filler[J]. Biomaterials, 2000, 21(23): 2413－2425.
[2] Hardouin P, Anselme K, Flautre B, *et al*. Tissue engineering and skeletal disease[J]. Joint Bone Spine, 2000, 67(5): 419－424.
[3] Wiese K G, Heinemann D E, Ostermeier D, *et al*. Biomaterial properties and biocompatibility in cell culture of a novel self-inflating hydrogel tissue expanda[J]. J Biomed Mater Res, 2001, 54(2): 179－188.
[4] 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.
[5] Lewandowska-Szumiel M, Komender J. Interaction between tissues and implantable materials[J]. Front Med Biol Eng, 2000, 10(2): 79－82.
[6] 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.
[7] 赵建华，柳 峰，王远亮. 生物复合人工骨及其制备工艺[J]. 发明专利公报，2002，18(2)：20.
[8] Kim H D, Valentini R F. Human osteoblst response *in vitro* to PDGF and TGFβ delivered from controlled-release polymer rods[J]. Biomaterials, 1997, 18(8): 1175－1184.
[9] 卢晓风，李胜富，张 杰，等. HA/TCP 双相陶瓷与人成骨细胞生物相容性的体外实验研究[J]. 生物医学工程学杂志，2001，18(4)：497－499.
[10] 谭训香，姜红江，李秋静，等. 成人成骨细胞与多孔羟基磷灰石联合培养观察[J]. 中国矫形外科杂志，2001，8(9)：879－880.
[11] 赵建华，廖维宏，刘 鹏，等. 消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质人工骨修复兔桡骨大段骨缺损的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(21)：1943－1946.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2003)24-2219-02

个案与短篇

海水浸泡对犬弹烧复合伤多脏器组织病理学的影响

The pathological changes of projectile-burn combined wound in dogs with seawater immersion

陈 强[1]，赖西南[2]，葛衡江[1]，牟江洪[3]（第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所：[1] 麻醉科，[2] 第六研究室；[3] 病理科，重庆 400042）

战伤统计表明，海战较陆地战斗有较高的伤死率，其中弹烧复合伤在战斗减员中占据重要地位。如何对这类伤员进行救治，对于保障我军战斗力具有重要意义。目前国内外对这方面的研究未见报道，建立海水浸泡弹烧复合伤模型，研究各脏器病理改变，对于进一步了解致伤机制具有重要的理论和临床实际意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

健康成年杂交犬 15 只，体质量 12～15 kg，平均 13.7 kg，雌雄不拘，分成 2 组：①海水浸泡组（n＝8）：致弹烧复合伤后立即置入海水中浸泡，4 h 后捞出热风吹干犬毛，置于室温为25 ℃的室内进一步观察；②非浸泡组（n＝7）：致伤方法同浸泡组，致伤后不浸泡直接置于室温为 25 ℃的室内进一步观察。

1.2 动物模型制作

实验犬用 3%戊巴比妥钠 1 ml/kg 后肢静脉注射麻醉，常检后背部 10%区域剪毛，15%硫化钠脱毛，3%凝固汽油按 1 ml/20 cm^2 均匀涂擦脱毛区，燃烧 10 s 后，湿巾灭火，致 10%Ⅱ度烧伤（病理证实）。随后，将犬仰卧，后肢垂直悬吊于特制固定架，53 式滑膛枪发射 1.03 g 钢珠，致犬右后肢切线伤。致复合伤后立即用固定架将犬浸泡于特定海域海水（水温 21～23℃），保持犬双上肢以上露出水面。

2 结果

2.1 动物存活情况，见表 1

表 1 两组实验动物不同时段存活情况

组别	n	伤后时间(h)			
		4～10	11～16	17～20	21～28
非浸泡组	7	7	7	5	5
浸泡组	8	8	5	4	4

（下转 2225 页）

基金项目：全军“十五”指令性课题(01-L011)
Supported by the Research Project of PLA Tenth Five-year Plan(01-L011)
作者简介：陈 强(1969－)，男，河南省潢川市人，硕士，主治医师，讲师，主要从事海水浸泡复合战伤早期救治方面的研究。电话：(023)68757340
收稿日期：2003-05-13；修回日期：2003-07-20

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