DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.030
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2237-03

论著

3种磨损颗粒对体外原代培养人成骨细胞的作用

王文良[1],吴岳嵩[2],焦炳华[3],杨 柳[1],许建中[1],娄永华[3] ([1]第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038;第二军医大学;[2]附属长海医院骨科;[3]基础医学部分子毒理学教研室,上海 200433)

提 要:目的 比较3种不同磨损颗粒对体外原代培养人成骨细胞的作用。方法 PE颗粒、Ti-6Al-4V颗粒、Co-Cr-Mo颗粒加入体外原代培养的人成骨细胞,噻唑蓝(MTT)比色试验检测细胞存活和生长。用酶联免疫检测仪在490 nm波长处测定其吸光度值,可间接反映活细胞数量。结果 不同浓度、不同磨损颗粒对原代培养成骨细胞成活无明显影响。结论 不同浓度、不同磨损颗粒对原代培养成骨细胞成活无明显影响,表明人工关节松动中磨损颗粒的骨溶解作用是通过其它途径起作用的。

关键词:磨损颗粒;成骨细胞;人工关节;无菌性松动;细胞培养
中图法分类号:R318.17;R329.24 文献标识码:A

Effects of 3 kinds of wear particles on primary cultured human osteoblasts

WANG Wen-liang, WU Yue-song, JIAO Bing-hua, YANG Liu, XU Jian-zhong, LOU Yong-hua (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract: Objective To compare the effects of 3 kinds of wear particles on primary cultured human osteoblasts. Methods After PE, Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo particles were added into primary cultured human osteoblasts, the viability and growth of the osteoblasts were measured by MTT assay. Optical density (OD) at 490 nm was determined by ELISA. Results Wear particles of different kinds and concentrations had no effect on viability and growth of osteoblasts. Conclusion The clinical findings suggest that osteolysis during aseptic loosening is by other route instead of the direct action of wear particles on osteoblasts.

Key words: wear particle; osteoblast; arthroplasy; aseptic loosening; cell culture

成骨细胞体外培养为体外研究成骨细胞和骨代谢之间关系提供了一个体外模型。通过体外培养可以研究植入材料的生物学特性,如生物相容性,生物毒性等,可以研究骨代谢过程中一些激素和细胞因子调节的过程和作用机制[1]。国内目前报道成骨细胞体外培养有骨膜成骨细胞培养和骨粒成骨细胞培养。培养标本来源涉及禽类,啮齿类,哺乳动物并最终过渡到人类。在培养方法上由单层的二维单层培养向有培养支持物的三维空间转化,使更接近正常生理环境和正常生理状态[2~4]。

人工关节磨损颗粒在人工关节的远期松动中起重要作用。一般认为其引起骨溶解(Osteolysis)的机制是首先被巨噬细胞吞噬,继而释放各种炎性介质。单核巨噬细胞吞噬异物即磨损颗粒,包括骨水泥颗粒(PMMA)、PE颗粒、Co-Cr-Mo颗粒、Ti-6Al-4V颗粒,并分泌炎症介质。这些炎症介质能趋化周围的其他细胞并诱导细胞功能变化而导致一系列反应。这些炎症介质包括IL-6, TNF-α, OPG/OCIF, PG(Prostaglandins)等,参与反应的细胞包括单核巨噬细胞、成骨细胞、破骨细胞等[5,6]。研究认为:IL-1, IL-6, TNF-α, M-CSF, ODF/OPGL(Osteoclast differentiation factor/osteoprotegerin ligand)等细胞因子直接或间接刺激破骨细胞的发生、分化、成熟和活性,增加破骨细胞的数目,引起骨吸收。对其对于成骨细胞的直接作用研究较少。

本实验旨在建立一种胎儿头骨成骨细胞原代培养体系,采用碱性磷酸酶染色方法鉴定。加入不同种类不同浓度的磨损颗粒,观察细胞反应,了解成骨细胞在这一过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂

CO_2孵箱(瑞士Heraeus公司),超净工作台(上海山湖超净设备厂),酶联分析仪,离心机(Beckman公司)。DMEM培养液(GIBECO公司),小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所),

作者简介:王文良(1968-),男,安徽省六安市人,博士,主治医师,讲师,主要从事运动医学与人工关节方面的研究。电话:(023)65340297

收稿日期:2002-10-13;修回日期:2003-03-25

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

0.25%胰蛋白酶, 0.02%EDTA, Hanks 液, MTT(噻唑蓝, 华美生物工程公司)。染色用试剂: 固定液, 冷丙酮, ALPase 活性检测试剂盒(BCH 公司)。0.1% Triton X-100 孵育液: 2%巴比妥钠(5 ml, 上海化学试剂公司), 3%β-甘油磷酸钠(5 ml, MERCK 公司), 2%硝酸钙(10 ml, 上海化学试剂公司), 2%硫酸镁(5 ml, 上海化学试剂公司), 蒸馏水(25 ml, 上海化学试剂公司), 磨损颗粒: PE 颗粒、TI-6Al-4V 颗粒、Co-Cr-Mo 颗粒(均为 Zimmer 公司惠赠)。

1.2 主要步骤

1.2.1 取材 无菌条件下取流产 70 d 胎儿头盖骨(上海长海医院妇产科), 剪碎成 2 mm×2 mm×2 mm~5 mm×5 mm×5 mm, Hanks 液反复冲洗, 取 20 个左右组织块, 置于培养瓶中, 翻转培养 2 h, 加入 DMEM, 培养, ALP 鉴定染色。对照组: 孵育液中以 10 ml 蒸馏水代替甘油磷酸钠。

1.2.2 染色步骤 固定、干燥, 入孵育液 2 h, 蒸馏水洗, 2%硝酸钙 2 min, 2%硝酸钴 2 min, 蒸馏水洗, 0.5%硫化铵 1 min, 水洗、脱水、透明、封片。

1.2.3 ALP 活性检测 细胞接种于 96 孔板, 每孔加 200 μl 0.1% Triton X-100 12 min, 超声破碎(冰浴、150 W、5 s 间歇), 加新鲜配制底物 100 μl, 37 ℃孵育 30 min, 加 NaOH 终止反应, 免疫酶联检测, 波长 410 nm。

1.2.4 磨损颗粒与成骨细胞相容性检测 接种细胞于 96 孔板, 加磨损颗粒, 生理盐水(阴性对照), 磨损颗粒浓度分别为 0.1、1、10、100 ng/ml, 培养 24 h, 呈色, 每孔加 MTT(5 mg/ml) 20 μl, 孵育 4 h, 弃上清, 加 150 μl DMSO 振荡 10 min, 比色, 490 nm 波长酶联免疫检测仪测定光吸收值(A 值)。

1.3 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 SPSS 医用统计软件包。采用 ANOVA 方差分析, 并行方差齐性检验。

2 结果

2.1 培养成骨细胞倒置显微镜观察

培养 2~3 d 后, 倒置相差显微镜下可见骨块周围开始细胞长出, 贴壁生长, 成梭形, 胞核呈椭圆形, 见图 1。7 d 左右细胞开始融合成片, 分界模糊, 有多层现象, 见图 2。

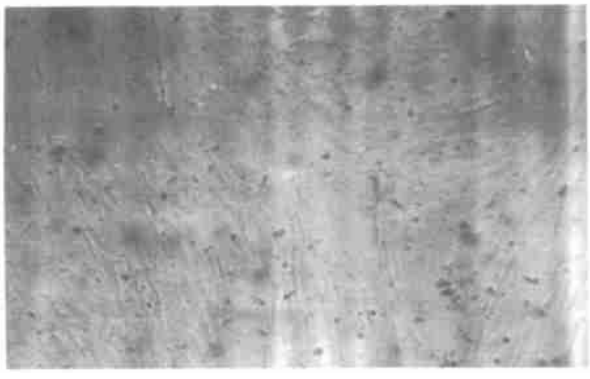


图 1 培养 3 d 的成骨细胞 (倒置显微镜×100)

Fig 1 Osteoblasts after culture for 3 d (Inverted phase microscope×100)

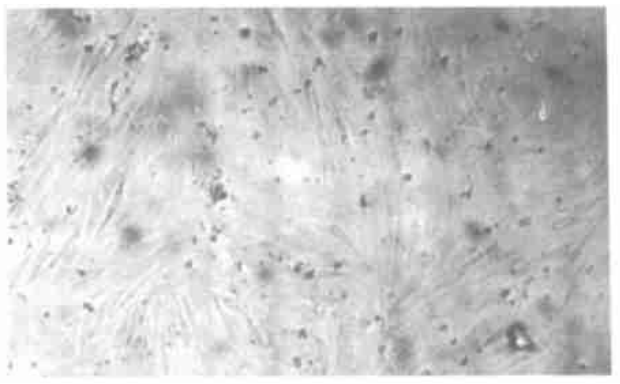


图 2 培养 7 d 的成骨细胞 (倒置显微镜×100)

Fig 2 Osteoblasts after culture for 7 d (Inverted phase microscope×100)

2.2 培养成骨细胞碱性磷酸酶染色结果

经 AKP 染色后, 多数细胞的胞质中可见灰褐色的细小颗粒, 有些融合成片状, 表明 AKP 含量较高, 见图 3。



图 3 碱性磷酸酶染色显示, 培养细胞浆内有灰褐色细小颗粒 (×200)

Fig 3 AKP staining of cultured osteoblasts (×200)

2.3 MTT 法结果

将不同种类不同浓度所得的 A 值进行方差分析, 结果各组数据之间无显著性差异($P>0.05$, $n=10$), 见表 1。

表 1 不同种类磨损颗粒加入后的 MTT 法光吸收值(A_{490}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 A_{490} value after adding different kinds of wear particles by MTT(A_{490}, $\bar{x}\pm s$)

Wear particles	Concentration(ng/ml)			
	0.1	1	10	100
PE	0.25±0.006	0.28±0.050	0.28±0.053	0.26±0.010
TI-6Al-4V	0.26±0.035	0.28±0.042	0.27±0.060	0.28±0.015
Co-Cr-Mo	0.27±0.015	0.27±0.006	0.28±0.042	0.25±0.031
DMEM	0.27±0.032	0.28±0.040	0.26±0.006	0.27±0.036

3 讨论

成骨细胞体外培养经过近 40 年的发展[4], 目前已成为一种成熟的方法。本实验按照 Riccio 等[1] 方法建

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

立原代体外培养的成骨细胞。原代培养最大的优点是组织与细胞刚刚离体, 生物学性状尚未发生很大变化, 具有二倍体遗传性, 在一定程度上能反应体内状态。同时原代培养也是建立各种细胞系的前提。故成骨细胞的原代培养目前仍是成骨细胞体外实验的重要来源。

本实验采取组织块移行生长法培养。Ecarot-charrier 根据成骨细胞具有移行生长的特点, 1983 年首次提出用组织块移行生长法分离成骨细胞并获成功。组织块移行生长法较为简单, 对细胞损伤少, 所得成骨细胞数量较少, 不能满足短期内获得大量成骨细胞的需要。成骨细胞呈贴壁型生长, 形态均匀一致, 均为梭形, 胞质透明颗粒少, 单个核, 具有多数学者报道的形态学特征[7,8]。成骨细胞鉴定方法包括形态观察、碱性磷酸酶(ALP)活性检测、Ⅰ型胶原测定等。形态上, 成骨细胞一般呈长梭形, 与纤维细胞相似[2,3]。而碱性磷酸酶检测是最为常用的细胞的成骨鉴定方法。Bruder 等[9] 研究发现, 碱性磷酸酶在骨、肝、肾、肠等组织都有表达, 它们是同工酶。除小肠的碱性磷酸酶外, 由同一基因编码, 分子质量在 155×10^3 左右。Bruder 等[9] 制成一种针对鸡成骨细胞的特异性抗体 SB-1, 经实验证实, 这种特异性抗体就是针对碱性磷酸酶表位(Epitope)的。碱性磷酸酶活性是成骨细胞分化成熟的重要标志之一, 可采用细胞化学或定量测定, 并以同源的其它细胞(多用纤维细胞)为对照。成骨细胞碱性磷酸酶染色阳性, 或可测得一定数值, 同源的其它细胞染色阳性, 定量数值往往测不到。本试验选用改良的 Gomori 钙钴法染色, 结果碱性磷酸酶呈淡灰、灰黄、灰黑色, 色深者表示酶多。

人工关节置换术后, 当局部磨损颗粒产生时, 与周围环境中的单核巨噬细胞、成骨细胞、破骨细胞和血循环中的白细胞接触, 故有必要研究磨损颗粒对各种细胞的作用。单核巨噬细胞吞噬磨损颗粒, 如骨水泥颗粒(PMMA)、PE 颗粒、Co-Cr-Mo 颗粒、TI-6Al-4V 颗粒后, 分泌炎症介质。这些炎症介质能趋化周围的其他细胞并诱导细胞功能变化而导致一系列反应。这些炎症介质包括 IL-6, TNF-α, OPG/OCIF, PG(Prostaglandins)等, 参与反应的细胞包括单核巨噬细胞、成骨细胞、破骨细胞等[3,7]。研究认为: IL-1, IL-6, TNF-α, M-CSF, ODF/OPGL 等细胞因子直接或间接刺激破骨细胞的发生、分化、成熟和活性, 增加破骨细胞的数目, 引起骨吸收[5,10]。Wang 等[6] 观察到不同浓度的金属颗粒如钛、钴、铬颗粒对成骨细胞系 CRL 1534 细胞无毒性作用, 但可以刺激细胞分泌 IL-1β, IL-6, 和 TNF-α, 同时不分泌 TGF-β1。本实验将 PE 颗粒、TI-6Al-4V 颗粒、Co-Cr-Mo 颗粒加入体外原代培养的人成骨细胞培养环境中, 比较 3 种不同磨损颗粒对体外原代培养人成骨细胞的作用。结果显示不同浓度、不同磨损颗粒对原代培养成骨细胞成活均无明显影响, 但至于磨损颗粒对成骨细胞有无刺激分泌各种炎性介质或影响代谢等作用, 有待于进一步实验证实。

参考文献:

[1] Riccio V, Della R, Marrone G, *et al*. Cultures of human embryonic osteoblasts: A new *in vitro* model for biocompatibility studies[J]. Clin Orthop Related Res, 1994, 308(11): 73—78.

[2] 郭昭庆, 党耕町, 王志国, 等. 成人成骨细胞培养[J]. 中华骨科杂志, 1996, 15(9): 627—630.

[3] 欧阳钧, 王　前, 王国英, 等. 人骨膜成骨细胞培养及初步观察[J]. 中华骨科杂志, 1995, 15(11): 789—790.

[4] 王卫华. 成骨细胞体外培养方法研究进展[J]. 国外医学口腔医学分册, 1996, 23(5): 287—291.

[5] 吕厚山. 人工关节外科学[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 550.

[6] Wang J Y, Wicklund B H, Gustilo R B, *et al*. Prosthetic metals Interfere with the functions of human osteoblast cells *in vitro*[J]. Clin Orthop, 1997, 339(3): 216—226.

[7] Marie P J, Lomri A, Sabbagh A, *et al*. Culture and behavior of osteoblastic cells isolated from normal trabecular bone surfaces[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol, 1989, 25(4): 373—380.

[8] Auf'mkolk B, Hauschka P V, Schwartz E R. Characterization of human bone cells in culture[J]. Calcif Tissue Int, 1985, 37(3): 228—235.

[9] Bruder S P, Caplan A I. A monoclonal antibody against the surface of osteoblasts recognizes alkaline phosphatase isoenzymes in bone, liver, kidney, and intestine[J]. Bone, 1990, 11(2): 133—139.

[10] 戴克戎. 影响人工关节远期效果的多因素分析[J]. 中华骨科杂志, 1995, 15(4): 250—251.

(编辑　陈聪连)

(上接 2231 页)

列腺素 E_1 可使宫颈纤维组织软化胶原降解, 引起子宫平滑肌收缩, 因此能有效地促进子宫收缩。从本研究看, 前列腺素 E_1 对采用缩宫素等方法治疗宫缩乏力性出血无效时, 仍能发挥较好的促宫缩作用, 且在较短时间内获得显著的临床效果。因此, 我们认为前列腺素 E_1 治疗宫缩乏力性出血疗效可靠, 副作用小, 起效快, 无特殊禁忌, 尤其是目前无麦角新碱药物时的最佳选择。

关键词: 产后出血; 宫缩乏力; 前列腺素 E_1

中图法分类号: R714.461; R977.6　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 廖秦平. 妇产科学[J]. 北京: 科学文献出版社, 2002. 242—245.

[2] 张贺勤. 米索前列腺醇治疗宫缩乏力性产后出血[J]. 长治医学院学报, 2002, 16(3): 200.

[3] 陈桂英, 苏　芹, 赵　洁. 米索前列醇在产后出血中的应用(附 28 例分析)[J]. 广西医学, 2002, 24(9): 1433.

(编辑　张　宁)

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