DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.004
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
506 2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0506-03

两种自制支架材料对体外培养关节软骨细胞生长与代谢的影响

戴 刚[1],石宗利[2],李起鸿[1],李重庵[2] ([1]第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038;[2]兰州铁道学院复合材料研究所,兰州 730070)

提 要:目的 评定两种自制支架材料DL-聚乳酸支架、聚磷酸钙纤维对体外培养关节软骨细胞生长与代谢的影响。方法 采用材料样品与体外单层培养关节软骨细胞直接接触法,并对其进行倒置显微镜观察、培养细胞计数与DAN含量及其细胞外基质^{35}S掺入量和羟脯氨酸含量测定。结果 两种支架材料可与培养关节软骨细胞完全相容,无关节软骨细胞毒性;对培养关节软骨细胞的DNA、蛋白多糖及胶原合成无异常影响。结论 两种支架材料具有良好的关节软骨细胞相容性,对其功能物质的合成无异常影响,经其结构与性能优化,即可满足关节软骨组织工程制备技术的各项要求。

关键词:DL-聚乳酸支架;聚磷酸钙纤维;关节软骨;组织工程
中图法分类号:R318.08;R322.72;R329.2 文献标识码:A

Effects of 2 scaffold materials on growth and metabolism of articular cartilage cells in monolayer culture

DAI Gang, SHI Zong-li, LI Qi-hong, LI Chong-an (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of 2 scaffold materials, poly-DL-lactic acid and calcium polyphosphate fibers, for the articular cartilage tissue engineering on growth and metabolism of articular cartilage cells in monolayer culture. Methods Converted microscopy, cell counting, total DNA assay and measurement of ^{35}S incorporation and hydrooxyprotine in cultured articular cartilage cells which were directly contacted with the scaffold materials were studied. Results Two scaffold materials showed entire biocompatibility with cultured chondrocytes and no chondrocytotoxicity was observed. They had no influence on the synthesis of DNA, proteoglycan and collagen of chondrocytes in monolayer culture. Conclusion These 2 scaffold materials have not only excellent chondrocyte biocompatibility but also no effect on the synthesis of functional substances of chondrocytes in monolayer culture. After further optimization in their structure and properties, they can be regarded as scaffold materials to satisfy the articular cartilage tissue engineering.

Key words: poly-DL-lactic acid scaffolds; calcium polyphosphate fiber; articular cartilage; tissue engineering

组织工程支架材料除应具有良好的组织生物相容性、生物降解性、三维立体结构及可塑性与相当的力学强度外,还应具有良好的表面活性,以有利于种子细胞的粘附,并为细胞在其表面生长繁殖、分泌基质提供良好的微环境[1]。为进行软骨组织工程研究而合成与制备的DL-聚乳酸(poly-DL-lactic acid, DL-PLA)微孔支架及聚磷酸钙(calcium polyphosphate, CPP)纤维,经检测其组织生物相容性和生物降解性良好;DL-PLA微孔支架的力学强度、孔隙度及可塑性与国外同类材料相近;CPP纤维的力学强度优于国外同类材料[2]。为判定其是否具有良好的表面活性,并可为种子细胞生长与代谢提供良好的微环境,经采用材料样品与体外培养关节软骨细胞直接接种法,通过培养细胞倒置显微镜动态观察、培养细胞计数与DNA含量测定及其基质^{35}S掺入量和羟脯氨酸含量测定,进行了两种自制支架材料对软骨组织工程种子细胞生长与代谢影响的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

重均分子量7.2×10^4 DL-PLA微孔支架,直径10~15 μm CPP纤维材料(自行制备)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 两种自制支架材料对体外培养关节软骨细胞生长与代谢影响研究的实验分组见表1。其中DL-PLA支架与CPP纤维的体积及阳性对照物-苯酚(Phenol)的工作浓度与添加量,均参照其半数致死量(LD_{50})及预实验结果确定。

表1 两种自制支架材料对体外培养关节软骨细胞生长与代谢影响研究的实验分组表

Tab 1 Grouping in the study on the 2 scaffold materials on the growth and metabolism of cultured chondrocytes

Group	n	DL-PLA scaffolds (mm^3/plate)	CPP fibers (mm^3/plate)	2.7% Phenol (μl/plate)	Medium (ml/plate)	Cell numbers (×10^5/plate)
Control I	6	—	—	—	4	2
DL-PLA scaffolds	6	6	—	—	4	2
CPP fibers	6	—	6	—	4	2
Control II	6	—	—	6	4	2

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100)与面上项目(30070224);全军"十五"医药卫生科研基金资助重点项目(01Z072)

作者简介:戴 刚(1960—),男,甘肃省秦安市人,博士,副主任医师,主要从事脊柱外科及组织工程研究,发表论文39篇,现在北京军区总医院骨科,北京 100700。电话:(010)64029345
通信作者:李起鸿,电话:(023)68754483

收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

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

1.2.2　实验步骤　　两种实验材料样品经洗涤、浸泡、真空干燥及消毒后, 放入底面积 25 cm^2 无菌培养瓶内。将收获的原代培养关节软骨细胞经计数后, 以 2×10^5 个细胞/每瓶接种于含 4 ml DMEM 培养液(其中含 15% 胎牛血清和 0.1% 青霉素与链霉素)及实验样品的培养瓶内。培养 24 h 后, 培养液每隔 1 d 更换 1 次。阳性对照液每 24 h 加 1 次。每日用倒置显微镜观察细胞生长状况和形态变化。传代培养 6 d 于细胞收获前 24 h, 以 ^{35}S 1.5 μCi/ml 培养液进行标记。细胞收获时, 先收集培养液, 然后消化分离细胞, 进行细胞计数, 并离心收集消化酶液。所收集培养液和酶液于 4 ℃保存, 离心沉淀的细胞冰冻保存, 待测。最后计算每瓶细胞增殖比(=培养后细胞数/培养时接种细胞数)和细胞相对增殖率(=各组别培养后细胞总数/空白对照组培养细胞总数×100%), 并进行软骨细胞代谢指标测定及统计学分析处理。

1.2.3　培养软骨细胞 DNA 含量测定　　采用 Karsten[3] 氏荧光探针菲啶溴红法。用 PBS 制备细胞悬液, 超声波处理。取 5 支试管依次编号, 按文献程序处理样品。在室温±0.5 ℃条件下, 1~60min 内用荧光分光光度计(日本岛津 RF-540 型)在激发波长=560 处比色。按下列公式计算 DNA 含量。

DAN 含量(μg/ml)= DNA 标准液浓度($F_{(4)}F_{(2)}F_{(5)}+F_{(3)}$)/$F_{(1)}-F_{(2)}$

注: $F_{(1)}$-$F_{(5)}$为试管(1)-(5)的荧光强度。

1.2.4　培养软骨细胞基质-蛋白多糖含量测定　　采用魏氏[4] 改良 ^{35}S 膜片法。取所收集的培养液和消化酶液各 1 ml, 加入 5%三氯醋酸 5 ml, 冰浴, 沉淀蛋白。沉淀液经微孔滤膜负压抽滤。将滤膜分别用 1%三氯醋酸溶液和纯酒精冲洗, 50 ℃烘干。放入闪烁杯内, 加入 PPO-POPO 闪烁液 2 ml, 用自动液相闪烁仪(美国 Packard 4000 型)检测其 ^{35}S 放射活性强度值(cpm)。

1.2.5　培养软骨细胞基质-胶原含量测定　　采用郑氏[5] 改良羟脯氨酸法。取所收集的培养液 0.5 ml 及消化酶液 1 ml, 加入 6N HCl 1.5 ml, 置 124~126 ℃烘箱中水解 2 h; 用 10 N HCl 0.9ml 调节 pH 为 6.0, 蒸馏水稀释至 5 ml 后, 离心 3 000 r/min、10 min。分别取上清液 1 ml、羟脯氨酸标准应用液(10 μg/ml)1ml 及空白蒸馏水 1 ml, 各加入柠檬酸缓冲液 0.5 ml、0.05 mol/L 氯氨 T 甲醇溶液 1 ml, 室温下氧化 6 min; 用 3.15 mol/L 过氯酸溶液 1 ml 室温下终止氧化 5 min。分别加入 10%对二甲氨基苯甲醛甲醇溶液 1 ml, 沸水中加热显色 2 min; 取出后置冷水中冷却, 用分光光度计(国产 721 型)在吸收波长= 560 nm 处比色, 以空白管调零。按下列公式计算测定羟脯氨酸含量。

羟脯氨酸含量(μg/ml)= 被测管光密度值/标准管光密度值×100。

1.2.6　统计学处理　　采用 t 检验。

2　结果

2.1　对培养关节软骨细胞生长过程和形态变化的影响

培养细胞倒置显微镜动态观察所见: ①空白对照组: 细胞培养 24 h, 大部分细胞贴壁、伸突, 少数细胞呈短梭状, 胞核不清, 偶见漂浮细胞; 48 h 后, 细胞大部分伸展呈梭形或多角形, 偶见细胞集落形成, 胞核清晰; 72 h 后, 细胞全部伸展呈梭形、多角形或多边形, 细胞集落数目增多; 96 h 后, 细胞呈多边形, 集落扩大, 部分集落融合; 细胞收获前 24 h, 大部分集落融合, 细胞排列较密, 胞核明显; 细胞收获前, 培养细胞呈梭形, 排列密集, 集落完全融合成单层, 见图 1。②实验组Ⅰ、Ⅱ: 与空白对照组比较, 细胞收获前, 培养细胞排列更为密集, 材料表面有细胞附着与生长, 见图 2, 3。③阳性对照组: 细胞培养后 24 h, 可见部分细胞漂浮, 贴壁细胞呈圆形; 48 h 后, 贴壁细胞散在, 呈短梭状; 72 h 后, 贴壁细胞伸展呈长梭形, 但仍散在, 无细胞集落形成; 细胞收获前 24 h, 漂浮细胞数目稍有增多, 贴壁细胞呈细长型或多角形, 细胞集落出现萎缩现象; 细胞收获时, 细胞散在, 集落萎缩更为明显, 呈孔洞状, 见图 4。

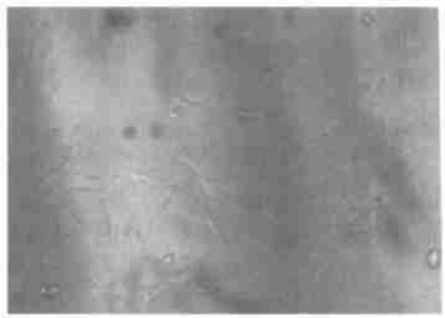


图 1　空白对照组细胞基本融合排列较密　(× 100)

Fig 1　Almost fused compact-arranged chondrocytes in monolayer culture in Control I　(× 100)



图 2　DL-PLA 组细胞融合排列紧密　(× 100)

Fig 2　Fused compact-arranged chondrocytes in monolayer culture in DL-PLA group　(× 100)

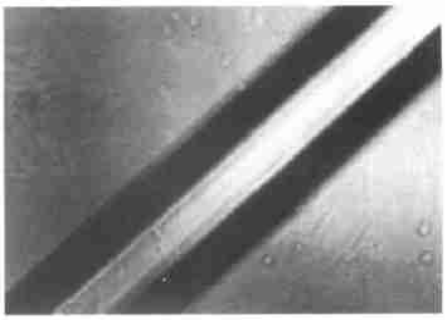


图 3　CPPf 组细胞基本融合排列较密　(× 100)

Fig 3　Fused compact-arranged chondrocytes in monolayer culture in CPPf group　(× 100)

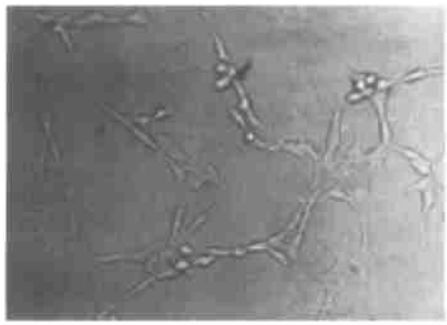


图 4　阳性对照组细胞集落萎缩空洞形成　(× 100)

Fig 4　Colony atropy and vacuolization in Control II chondrocytes in monolayer culture　(× 100)

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

上述结果表明,两种支架材料对培养关节软骨细胞的生长过程和形态变化无异常影响,可与软骨细胞完全相容,并有细胞在其表面附着与生长。

2.2 对培养关节软骨细胞增殖的影响

培养关节软骨细胞收获后,经细胞计数所得培养细胞增殖比和细胞相对增殖率,见表2。

表2 培养关节软骨细胞增殖比和细胞相对增殖率($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Proliferation ratio and relative proliferation rate of cultured articular cartilage cells($\bar{x}\pm s$)

Group	Cell proliferation ratio	Cell relative proliferation rate(%)
Control Ⅰ	2.492±0.490	100.0
DL-PLA scaffolds	2.617±0.851 *△	105.0
CPP fibers	2.558±0.633 *△	102.8
Control Ⅱ	0.508±0.238	40.5

*: $P>0.05$ *vs* Control Ⅰ; △: $P<0.01$ *vs* Control Ⅱ

表2结果表明,两种支架材料对培养关节软骨细胞的增殖无异常影响,即无关节软骨细胞毒性。

2.3 对培养关节软骨细胞基质-蛋白多糖和胶原代谢的影响

培养关节软骨细胞收获后,培养细胞DAN含量测定及其培养液与消化酶液中^{35}S掺入量和羟脯氨酸含量测定结果,见表3。

表3 培养关节软骨细胞DNA含量及其基质^{35}S掺入量和羟脯氨酸含量测定结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Amounts of DNA, ^{35}S incorporation and hydrooxyprotine in cultured articularcartilage cells($\bar{x}\pm s$)

Group	DNA(×10⁻²μg/10⁴cells)	^{35}S(×10³cpm/μgDNA)	Hydrooxyprotine(μg/μgDNA)
Control Ⅰ	7.66±1.28	10.56±0.96	87.23±13.66
DL-PLA scaffolds	7.87±0.49 ●	11.76±4.51 ●	99.56±11.39 ●
CPP fibers	8.03±0.90 ●	9.26±1.05 ●	83.58±10.69 ●
Control Ⅱ	3.81±0.77	1.68±1.15	14.23±4.34

*: $P>0.05$ *vs* Control Ⅰ; ●: $P<0.01$ *vs* Control Ⅱ; △: $P<0.05$ *vs* Control Ⅰ; ○: $0.10>P>0.05$ *vs* Control Ⅰ

表3结果表明,两种支架材料对培养关节软骨细胞的DAN合成无显著性影响;而DL-PLA微孔支架对其功能物质-蛋白多糖和胶原的合成则具有一定促进作用。

3 讨论

组织工程支架材料应为种子细胞提供良好的生长和代谢微环境。不同组织由于其生理功能和解剖结构不同,对支架材料的要求不同。软骨组织工程所需支架材料除应具有良好的组织生物相容性外,还必须具有以下特性:①具有三维立体结构:材料必须是高度多孔的,类似泡沫状,孔隙率达到90%以上,从而具有很大的内表面积,这样一方面有利于细胞植入、贴附,另一方面有利于细胞营养成分的渗入和细胞代谢产物的排除;②具有生物可降解吸收性:材料应是可降解吸收的,在组织形成过程中其逐渐分解吸收,从而不影响新形成组织的结构和功能;③具有良好的表面活性:材料应有利于细胞的贴附,并为细胞在其表面生长繁殖、分泌基质提供良好的微环境;④具有可塑性和适宜的力学性能:材料可被加工成所需要的形状,并有一定的力学强度,在植入人体内后的一定时间内仍可保持其原有形状,从而使新形成的组织具有一定的外形[1]。

为进行软骨组织工程研究而合成与制备的DL-PLA微孔支架及CMP纤维,经检测其组织生物相容性和生物降解性良好;DL-PLA微孔支架的孔隙度、力学强度及可塑性与国外文献报道相近;CPP纤维的抗张强度和弹性模量明显高于国外同类材料[2]。前述采用材料样品与体外培养关节软骨细胞直接接种法,通过培养细胞倒置显微镜动态观察、培养细胞计数与DAN含量测定及其基质^{35}S掺入量和羟脯氨酸含量测定所得结果表明,上述两种支架材料对培养细胞的生长过程和形态变化无异常影响,培养细胞可在其表面附着与生长,说明其可与关节软骨细胞完全相容;而对培养细胞的增殖无显著性影响,说明其无关节软骨细胞毒性。此外两种支架材料对培养细胞DAN、蛋白多糖和胶原的合成无异常影响,而DL-PLA微孔支架对其功能物质-蛋白多糖和胶原的合成则具有一定的促进作用。上述研究证实,自行合成与制备的两种软骨组织工程支架材料具有良好的关节软骨细胞相容性,可为其种子细胞提供良好的生长与代谢的微环境。而有关两种支架材料的生物降解速率与种子细胞生长同步化的方法,以及DL-PLA微孔支架促进培养关节软骨细胞功能物质合成的机制尚待进一步研究和探讨。

高强度可吸收性CPP纤维可作为骨与软骨组织工程的新型支架材料。目前为止,骨与软骨组织工程中取得最佳效果的支架材料是由15 μm、间隔150~200 μm的聚羟基乙酸纤维所构成的厚度为100 μm、孔隙率94%左右的L—聚乳酸涂层无纺网[6]。其缺陷是机械强度不足,受力时易变形而使种子细胞损伤[7]。而自行研制的CPP纤维具有良好的组织与细胞生物相容性及良好的生物降解吸收性,其抗张强度和弹性模量分别为人皮质骨上述指标的2.5倍和4.0倍以上[2],通过应用骨或软骨基质成分、或适宜平均分子量的生物降解型聚酯对其进行涂层交联,并使其生物降解速率与种子细胞生长过程同步化,即可满足骨与软骨组织工程制备技术对支架材料的各项要求。

参考文献:

[1] Temenoff J S, Mikos A G. Tissue engineering for regeneration of articular cartilage[J]. Biomaterials, 2000, 21(3): 431—440.

[2] 常 青,石宗利,李重庵.聚磷酸钙可降解纤维研究[J].环境科学,1997,18(1):52—53.

[3] Karsten U, Wollenbenger A. Ethidium bromide assay for DNA and RNA [J]. Anal Biochem, 1977, 77(3): 464—469.

[4] Wei X Q, Lin D L, Cao J L, *et al*. The effect of sodium selenite on chondrocytes in monolayer culture[J]. Arithritis Rheum, 1986, 29(5): 660—664.

[5] 郑少雄 熊咏明.血尿羟脯氨酸测定的方法改良[J].中华医学检验杂志,1983,6(3):133—136.

[6] Thomson R C, Wake M C, Yaszemski M J, *et al*. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs[J]. Adv Polym Sci, 1995, 122(2): 245—274.

[7] Martin Z, Quarto R, Dozin B, *et al*. Producing prefabricated tissues and organs via tissue engineering[J]. IEEE Eng Med Biol, 1997, 16(2): 73—80.

(编辑 王 红)

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