

- in base excision repair of oxidative DNA damage during spontaneous hepatocarcinogenesis in Long Evans Cinnamon rats[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22):7704-7707.
- [5] Fuentealba IC, Aburto EM. Animal models of copper-associated liver disease[J]. *Comp Hepatol*, 2003, 2(1):5.
- [6] Barbisan LF, Scolastici C, Miyamoto M, et al. Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine [J]. *Genet Mol Res*, 2003, 2(3):295-308.
- [7] Fu Y, Deng W, Kawarada Y, et al. Mutation and expression of the p53 gene during chemical hepatocarcinogenesis in F344 rats [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1628(1):40-49.
- [8] 邓居有, 郭萍, 文国义, 等. 血清 GST- π , sIgA, Ferr 含量在肝占位病变鉴别诊断的作用[J]. *新消化病学杂志*, 1995, 3(2):87-88.
- [9] Bralet MP, Pichard V, Ferry N. Demonstration of direct lineage between hepatocytes and hepatocellular carcinoma in diethylnitrosamine-treated rats[J]. *Hepatology*, 2002, 36(3):623-630.
- [10] Gelderblom WC, Marasas WF, Lebepe-Mazur S, et al. Interaction of fumonisin B(1) and aflatoxin B(1) in a short-term carcinogenesis model in rat liver[J]. *Toxicology*, 2002, 171(2-3):161-173.
- [11] Chen SY, Wang LY, Lunn RM, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in liver tissues of hepatocellular carcinoma patients and controls[J]. *Int J Cancer*, 2002, 99(1):14-21.
- [12] Whysner J, Wang CX. Hepatocellular iron accumulation and increased cell proliferation in polychlorinated biphenyl-exposed Sprague-Dawley rats and the development of hepatocarcinogenesis[J]. *Toxicol Sci*, 2001, 62(1):36-45.
- [13] Moreno-Bueno G, Rodriguez-Perales S, Sanchez-Estevéz C, et al. Molecular alterations associated with cyclin D1 overexpression in endometrial cancer[J]. *Int J Cancer*, 2004, 110(2):194-200.
- [14] Reszec J, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, et al. Evaluation of apoptosis markers in conjunctival and eyelid benign and malignant tumors[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010:748-751.
- [15] Kamata Y, Watanabe J, Hata H, et al. Quantitative study on the correlation between p53 gene mutation and its expression in endometrial carcinoma cell lines[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2004, 25(1):55-60.
- [收稿日期] 2004-04-13 [修回日期] 2004-09-13
[本文编辑] 曹静

• 研究简报 •

成骨细胞(Hos8603)与强韧化纳米人工骨支架的联合培养

Combined culture of osteoblast-like cells (Hos8603) and nm zirconium dioxide reinforced hyper-porosity tricalcium phosphate bone cells scaffold

陈岗¹, 李家顺¹, 贾连顺¹, 吕宏¹, 叶晓健¹, 戴伯军¹, 蔡舒², 张立德³

(1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003; 2. 天津大学材料学院, 天津 300072; 3. 中国科学院固体物理研究所, 合肥 230031)

[关键词] 成骨细胞; 人工骨; 纳米氧化锆; 组织工程

[中图分类号] R 318.08

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2005)01-0115-02

骨组织工程是利用组织工程学方法将一定数量的成骨细胞接种到具有空间三维结构的支架材料上, 在体外或植入体内联合培养, 获得具有一定结构和功能的骨组织^[1]。本实验观察自制强韧化纳米人工骨支架与建株成骨细胞(Hos8603)联合培养后细胞生长情况和结合数量, 以评价该支架生物相容性及细胞复合能力, 为临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 强韧化纳米人工骨支架的制备 我科与天津大学材料学院及中科院固体物理研究所合作研制, 材料由纳米氧化锆颗粒与羟基磷灰石粉末在一定复合添加剂条件下烧结制成, 孔径 200~300 μm , 孔隙率 85%~95%。

1.2 主要仪器及试剂 DMEM 培养液(Gibco); 小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所); 胰蛋白酶(Gibco); 成骨细胞(Hos8603, 中科院上海细胞所); CO₂ 培养箱(Sanyo); 倒置显微镜(Olympus); 扫描电镜(东芝公司)。

1.3 成骨细胞与支架材料联合培养 成骨细胞(Hos8603)光镜下为圆形, 接种 4 h 贴壁, 贴壁细胞呈条索状生长, 为多边形、梭形, 有较多突起, 胞质淡, 单核, 较大, 1~2 个核仁, 具有典型成骨细胞形态特征。镜下观察细胞长满瓶底 80%~90%, 常规传代培养。取 1×10^5 /ml 单细胞悬液, 负压条件下接种于 5 mm \times 5 mm \times 4 mm 细胞支架上, 细胞培养箱中作用 4 h 后取出复合支架置于 6 孔培养板中, 加入培养液联合培养。

1.4 支架复合培养体的细胞计数及光镜观察 取联合培养 4 d 的支架材料, PBS 液反复冲洗, 加入 5% 胰蛋白酶消化液消化 10 min, 吸取消化液冲洗支架材料, 使成骨细胞完全脱落, 收集冲洗液中中止消化, 进行细胞计数并在光镜下观察细胞形态。将冲洗所得细胞洗涤离心后接种于 25 mm \times 10

[基金项目] 国家自然科学基金(30170954)。

[作者简介] 陈岗(1972-), 男(汉族), 硕士, 主治医师。

E-mail: chengang365@sina.com

mm 培养皿中继续培养,1周后再次作形态学对比,光镜观察成骨细胞形态学改变。

1.5 支架复合培养体的电镜观察 取联合培养4d后支架材料,PBS液冲洗,2%戊二醛固定,乙醇逐级脱水,醋酸异戊酯浸泡,以固体CO₂作为临界点干燥,旋转喷镀金膜,制作电镜标本,扫描电镜下观察成骨细胞株在支架多孔表面上的生长情况。

2 结果

2.1 支架复合培养体电镜观察 电镜下见细胞附着生长,但分布不均匀,支架底部附着生长细胞明显多于顶部。细胞沿微孔壁爬行生长,多树枝状突起,部分微孔被细胞遮盖(图1)。



图1 成骨细胞(Hos8603)在支架材料上复合生长电镜照片(×200)

2.2 支架复合培养细胞计数及光镜观察 冲洗液经离心沉淀后,制成单细胞悬液,光学显微镜下用细胞计数板计数,计算可知支架结合细胞数为 $4 \times 10^5 / \text{mm}^3$ 。光镜下观察冲洗下细胞,其形态与正常培养的建株细胞相比无明显改变。将冲洗所得细胞洗涤离心后接种于25 mm×10 mm培养皿中继续培养,1周后再次作形态学对比,成骨细胞无明显形态学改变(图2)。

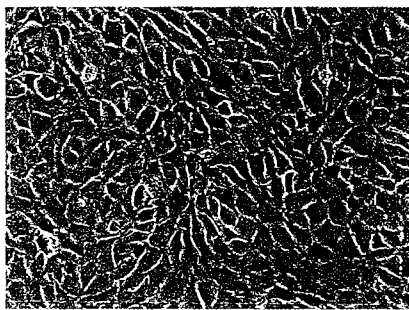


图2 支架复合培养后成骨细胞(Hos8603)(×40)

3 讨论

3.1 纳米氧化锆强韧化高孔隙率人工骨支架特点 骨骼是自然界一种天然纳米材料,由骨胶原和羟基磷灰石构成^[2]。它们组合成复杂的骨骼,形成纳米复合材料,其具有的性能是各种合成材料都难以达到的。骨胶原和羟基磷灰石本身不能作结构材料,因此合成与骨骼完全一样的人工骨非常困难。同时除了自体骨移植,异体骨移植以及其他人工仿生骨都需要骨断端骨细胞的爬行替代过程并最终被宿主的成骨

细胞爬行所替代^[3]。我们利用纳米技术,在β-三磷酸钙中加入一定比例的纳米氧化锆颗粒,利用后者的纳米微粒特性,对磷酸钙陶瓷起到增强补韧的作用,制备纳米氧化锆强韧化高孔隙率磷酸钙人工骨细胞支架,它具有较高强度,孔径适当(约250 μm)的高孔隙率(85%~90%)网状支架(物理上称之为无序的宏孔固体);同时仍然保持了β-三磷酸钙本身具有的骨诱导作用和自降解作用^[4,5]。该支架性能上追求一定要适宜宿主成骨细胞的爬行替代,外观上则放弃了以往人工骨研究拘泥于对人体正常骨骼的简单模仿。

3.2 成骨细胞株(Hos8603)与支架材料复合及联合培养观察 Hos8603成骨细胞株采用人骨肉瘤细胞来源,在体外培养中具有成骨细胞的表型特征,因而可作为一个良好的研究成骨细胞表型的体外模型系统。本实验接种于支架材料上的成骨细胞经光镜下比对,与未经接种的成骨细胞在形态学上无明显差异,继续传代培养后生物学性状亦改变不大。经过继续传代培养6~7代,细胞株生长正常,充分证实支架材料对联合培养的建株细胞生物学性状影响不大。

经过联合培养的支架材料上所承载的细胞数对于评价支架材料的性能具有极为重要的意义。研制该支架最主要目的就是最大限度适应成骨细胞爬行替代,加速支架与宿主骨的融合,理论上讲单位体积的支架材料所承载的细胞数量越大,其作为骨组织工程材料细胞载体的作用越满意。本研究中成骨细胞株(Hos8603)与支架能有效地黏附、爬行,表明作为成骨细胞爬行支架具有良好的生物相容性和细胞黏附性。实验中我们观察到成骨细胞在三维细胞支架中分布不均,多集中于底部,支架中心部位少有细胞长入,唐开等^[6]观察到相同的实验结果,这可能与体外联合培养方式有关,采用动态三维培养方法可以有效地提高支架中联合培养细胞的数量,同时部分纠正细胞在支架中分布不均的情况。

【参考文献】

- [1] Vacanti CA, Upton J. Tissue engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices[J]. *Clin Plast Surg*, 1994, 21(3):445-462.
- [2] 张立德. 纳米材料[M]. 北京:化学工业出版社,2000. 11.
- [3] 徐传达. 实用临床骨缺损修复应用解剖学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2000. 1.
- [4] Gundle R, Joyner CJ, Triffitt JT. Human bone tissue formation in diffusion chamber culture in vivo by bone-derived cells and marrow stromal fibroblastic cells[J]. *Bone*, 1995, 16(6):597-601.
- [5] Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells[J]. *Clin Orthop*, 1991, (269):274-283.
- [6] 唐开, 党耕町, 郭昭庆. 动力性三维细胞培养骨髓基质成骨细胞[J]. *中华外科杂志*, 2002, 40(8):637.

【收稿日期】 2004-03-15

【修回日期】 2004-06-15

【本文编辑】 邓晓群