

磁性可切削生物活性微晶玻璃与骨髓基质干细胞的相容性研究

Biocompatibility between magnetic machinable bioactive glass-ceramic and bone marrow stromal cells

周新华¹, 陈安民², 陈 钢², 孙淑珍³

(1. 北京积水潭医院矫形骨科, 北京 100035; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科, 武汉 430030; 3. 武汉理工大学材料学院, 武汉 430070)

[摘要] **目的:**评价磁性可切削生物活性微晶玻璃(magnetic machinable bioactive glass-ceramic, MMBC)人工骨的细胞相容性。**方法:**将骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)分别和生物玻璃(BG)、MMBC在体外进行培养,在电镜下观察细胞的生长情况,从而评价MMBC的细胞相容性。**结果:**细胞培养10 d后,在MMBC的孔隙内或表面,有大量的胶原纤维丝相连,部分胶原纤维丝跨越孔隙。孔隙内可见多量细胞生长,而BG内并未见有明显的胶原纤维。**结论:**MMBC人工骨具有良好的细胞相容性。

[关键词] 磁性可切削生物活性微晶玻璃;骨髓基质干细胞;生物相容性材料

[中图分类号] R 318 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)07-0803-02

良好的生物活性相容性和物理相容性是医用生物材料选择的关键。磁性可切削生物活性微晶玻璃(magnetic machinable bioactive glass-ceramic, MMBC)是一种较为理想的新型医学生物材料,具有良好的生物力学性能及可切削性。为了进一步验证该材料的使用价值,本研究采用体外细胞培养技术,观察其对骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)的毒性,并和生物玻璃(BG)进行了比较,为其进一步开发应用提供必要的理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料 动物:4~5周龄健康的新西兰雄性大白兔1只。BG和MMBC:由武汉理工大学材料学院和华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科共同研制^[1]。仪器:移液管,盖玻片(5 mm×5 mm),干燥箱,小剪刀,镊子,手术刀,止血钳;各种规格的小玻璃瓶;恒温水浴箱;离心机(Sigma-3k18);24孔培养板(Corning);扫描电镜(型号:JSM-5610LV)等。试剂:三蒸水,0.1%胶原酶,RPMI 1640培养液(Gibco);小牛血清(杭州四季青生物制品有限公司生产);青霉素,链霉素,维生素C(Sigma);胰蛋白酶(天象人生物制品公司生产);2.5%戊二醛;丙酮。

1.2 BMSC的培养 取4~6周龄健康的雄性新西兰大白兔1只,用剪刀剪去双侧股骨部的毛发,用碘乙醇、乙醇严格消毒后按无菌操作原则铺巾,自股骨大转子部位用16号骨髓穿刺针穿入股骨骨髓腔,用注射器抽吸3 ml骨髓,混入10 ml RPMI 1640完全培养基(青霉素和链霉素各100 U/ml,维生素C 50 μg/ml,20%新生牛血清)中,用4号针头反复抽吸,制成单细胞悬液。用3%白细胞稀释液计数细胞,并以 3×10^6 /ml接种入50 ml培养瓶中,每瓶各加入细胞培养液3.5 ml,置于37℃、5% CO₂孵箱进行培养,5 d后再用RPMI 1640完全培养基进行半量换液,以后改为2~3 d全量换液1次。待细胞汇合成单层后再用0.25%胰蛋白酶进行消化,计数,并按 1×10^5 /ml密度接种于培养皿中,使用条件培养基(完全培养基+地塞米松 8~10 mol/ml+维生素C 50 μg/ml

+β-甘油磷酸钠 10 nmol/L)进行传代培养。

1.3 MMBC材料处理 将材料BG、MMBC分别切割成4 mm×4 mm×2 mm的块状,用三蒸水洗净,烘干,在温度为121~126℃,蒸气压力为104.0~137.3 kPa的条件下消毒30 min后保存备用。

1.4 细胞接种 将传至第3代的细胞按 1.5×10^4 /孔接种于24孔培养板中,其中12孔加入4 mm×4 mm×2 mm的MMBC各一块,另外12孔中加入4 mm×4 mm×2 mm的BG各一块,24孔中均加入培养基1 ml后再置于37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下复合培养,一定时间后取材进行观察。

1.5 扫描电镜观察 在接种培养后第10天分别取出标本,立即用2%戊二醛固定,丙酮逐级脱水,临界点干燥,表面喷金,进行扫描电镜观察,并与接种前的材料进行比较。

2 结果

扫描电镜下可见接种前的MMBC表面较粗糙,有多量孔隙,含有六方柱状的氟磷灰石、粒状的磷酸三钙及片状或长棒状云母晶体等(图1A)。MMBC接种BMSC后第10天,在材料的孔隙内或表面,可见大量的胶原纤维丝相连,部分胶原纤维丝跨越孔隙,孔隙内可见多量细胞生长(图1B),而BG接种BMSC后材料孔隙内未见有明显的胶原纤维生长(图1C)。

3 讨论

骨基质材料的构建是限制骨组织工程学发展的“瓶颈”,寻找理想的基质材料已经成为骨组织工程学学者的共识^[2,3]。根据“安全、有效”原则,新型生物医学材料不仅应满足临床所需的物理、化学性能,而且还需要良好的生物相容性,以保证患者的安全。生物材料与细胞混合体外培养是检测其生物相容性的最敏感的指标^[4]。生物材料在培养液中可降解

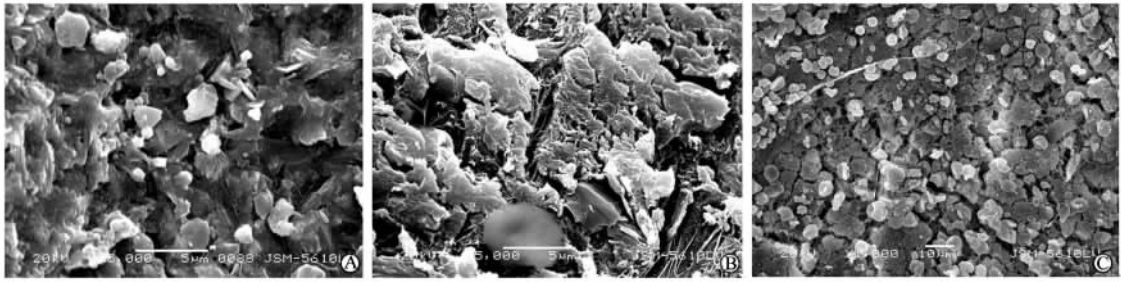


图1 MMBC和BMSC复合培养前后的形态(SEM)

A:接种前,MMBC表面较粗糙,有多量孔隙;B:MMBC接种BMSC后第10天,材料孔隙内或表面可见大量的胶原纤维丝相连,部分胶原纤维丝跨越孔隙,孔隙内可见多量细胞生长;C:BG接种BMSC后第10天,材料孔隙内未见有明显的胶原纤维生长

释放各种不同的成分,并可改变培养液中pH值,这些均对培养的细胞有多方面的影响。本实验采用MMBC与BMSC体外复合培养的方法,通过形态学观察,结果发现BMSC在MMBC的表面附着良好,随着培养时间的延长,BMSC在其上伸展、繁殖,并分泌胶原纤维等细胞外基质,同时可以附着于材料的孔隙周边或深入材料孔隙内生长。说明MMBC对细胞生长和功能表达未见有明显的抑制作用。另一方面,由于BMSC具有成骨能力,它在材料的表面及孔隙内生长表明新骨有望在这些部位形成。骨髓中含有大量的间充质细胞,这些细胞在某些因素作用下能分化成骨组织^[5]。因此,MMBC与BMSC良好的生物相容性,为我们进一步研究MMBC人工骨提供了较好的理论基础。

[参考文献]

[1] 周新华,褚颖,陈安民,等. 添加剂对可切削生物微晶玻璃结构的影响[J]. 北京生物医学工程杂志,2005,24:287-290.

[2] Boyan BD, Lohmann CH, Romero J. Bone and cartilage tissue engineering[J]. Clin Plast Surg, 1999,26: 629-645.

[3] Kim BS, Money DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering[J]. Trends Biotechnol, 1998;16:224.

[4] Uchida A, Nade S. Growth of bone marrow cells on porous ceramics *in vitro*[J]. J Biomed Mater Res,1987,21:1.

[5] Owen M. The origin of bone cells in the postnatal organism [J]. Arthritis Rheum, 1980,23:1074.

[收稿日期] 2006-03-15

[修回日期] 2006-07-05

[本文编辑] 孙岩