

· 基础研究 ·

三维连通多孔钛表面成骨能力的实验研究

张国强¹, 王岩¹, 田杰谟², 温宁¹, 董利民², 王晨², 柴伟¹

(1. 中国人民解放军总医院骨科, 北京 100853; 2. 清华大学新型陶瓷与精细工艺国家重点实验室)

【摘要】目的: 通过体外成骨细胞培养实验, 评估单纯连通多孔钛材料和复合类骨磷灰石的连通多孔钛材料表面的成骨能力。方法: 先将纯钛粉应用热等静压法制备出单纯连通多孔钛并分成 2 组(每组 50 件), 将其中一组按 1.5 倍模拟体液浸泡法制备出复合连通多孔钛。将两组多孔钛制成标准试件(5 mm×5 mm×4 mm)并均置于 24 孔板内。取新生 SD 鼠颅骨的成骨细胞进行原代培养及传代, 然后将传代后的成骨细胞接种于 24 孔板内的两组多孔钛试件中并继续培养。在培养期间进行细胞增殖性测定(MTT 法, 在培养第 1、3、5、7、9 天测定)以及碱性磷酸酶活性检测(在培养第 7、14、21 天测定)。培养 7 d 后对 2 组多孔钛内的成骨细胞进行扫描电镜观察。结果: 2 组的 MTT 吸光值和 ALP 值均随着时间的延长而增加, 但复合多孔钛组在 MTT 吸光值的增加幅度和速度以及 ALP 活性均优于单纯多孔钛组 ($P < 0.05$)。培养 7 d 后扫描电镜显示复合连通多孔钛试件内成骨细胞生长活跃, 黏附牢靠。结论: 三维连通多孔钛表面具备成骨活性, 在多孔钛内壁复合类骨磷灰石后, 这种成骨活性明显增强, 更有利于成骨细胞在材料表面的黏附和增殖。

【关键词】 成骨细胞; 钛; 材料试验; 磷灰石

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.06.023

Research on the osteogenic ability of 3-Ds interconnected porous titanium ZHANG Guo-qiang, WANG Yan*, TIA Jie-mo, WEN Ning, DONG Li-min, WANG Chen, CHAI Wei. *The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

ABSTRACT Objective: To evaluate the osteogenic ability of the three-dimensional interconnected porous titanium (TDIPT) coated with bonelike apatite, by the test of the culture of osteoblast in vitro. **Methods:** The pure TDIPT was prepared by the high temperature isostatic pressing (HIP) and was divided into two groups. One group of TDIPT was dipped into the 1.5 simulated body fluid (1.5SBF) and developed the TDIPT coated with bonelike apatite (The test group). Another group was control group (pure TDIPT). The porous titanium of the two groups were all made into standard parts (5 mm×5 mm×4 mm) and placed into the 24-hole plates. The osteoblasts were extracted from SD rat. After the primary culture and subculture of the osteoblast in vitro, the osteoblasts were inoculated into the samples in the 24-pole plate and cultured continually. MTT Cell Proliferation Assay was done on the 1st, 3rd, 5th, 7th and 9th day respectively after inoculating. The ALP activity was tested on the 7th, 14th and 21st day, respectively. The collected data were analyzed by use of the student *t* test. **Results:** The MTT value and the ALP activity increased with the increasing of the culture time in the two group, but those of the test group was more significant than those of the control group ($P < 0.05$). Moreover, the osteoblast tachyauexis and stable adhesion were observed in test group by SEM at the 7th day after culturing. **Conclusion:** The bioactivity of the TDIPT improves significantly after coating with the bone-like apatite onto the surface of the TDIPT.

KEYWORDS Osteoblasts; Titanium; Materials testing; Apatites

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(6): 517-520 www.zggszz.com

细胞体外培养技术目前已成为组织工程技术研究领域的一个重要手段。随着成骨细胞体外培养技术的发展, 其在骨组织工程及骨替代材料研究方面发挥着越来越重要的作用^[1-2]。它可用于体内植入实验前对材料进行快速的初步筛选, 进一步明确材料本身的生物学特性以及建立评价材料生物相容性的标准实验等。体外细胞培养比体内材料植入实验所

需的条件更易控制并且经济、快速, 对材料的毒性更敏感。本文针对我们前期研发的三维连通多孔钛材料^[3]设计了成骨细胞在连通多孔钛孔壁表面培养的体外实验, 研究成骨细胞在该材料上的黏附、诱导培养的增殖和成熟情况, 评价该材料的生物相容性及诱导成骨能力。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 高糖 DMEM 培养基 (含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 庆大霉素; Sigma 公司, 上海), D-Hanks 缓冲液, MTT (5 mg/ml), 二甲基亚砜, 细胞裂解液 (1% Triton X-100), 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公

基金项目: 国家 863 重大专项课题 (编号: 2006AA02A136)

Fund programs: Supported by the Major Project of National High Technology Research and Development Program of China (No. 2006AA02A136)

通讯作者: 王岩 E-mail: 301wangyan@sina.com

司), ALP 检测试剂 (德国罗氏公司), 24 孔培养板 (Corning)。

1.2 实验设备 倒置相差显微镜 (Olympus IX70 型, 日本), 显微镜摄像系统 (Olympus CCD-MP5.1 型, 日本), CO₂ 培养箱 (Hereus BB5060 型; 上海德国 Hereus 公司), 超净工作台 (SW-CJ-2FB; 苏州净化, 江苏苏州), 扫描电镜 (JSM-35C 型, 日本)。低温离心机 (Allegrax-22R 型; BECKMAN 公司, 美国), 常温离心机 (B-40 型; 上海安亭科学仪器厂, 上海), 恒温磁力加热搅拌器 (85-2 型, 上海司乐仪器厂, 上海), 酶联免疫检测仪 (南京华东电子集团医疗装备有限责任公司, 江苏南京), 全自动生化分析仪 (日立 7600 型, 日本)

1.3 实验动物 SD 大鼠 10 只 (出生 24 h 内的裸鼠), 雄雌不拘。

1.4 实验样品及分组 按李众利等^[3]的方法制备出单纯连通多孔钛材料 (单纯多孔钛), 将该材料分成 2 组, 每组 50 件。将其中一组多孔钛按文献^[4]的方法制备出复合类骨磷灰石的连通多孔钛材料 (复合多孔钛)。两组多孔钛均加工成 5 mm×5 mm×4 mm 的标准件。

1.5 实验方法

1.5.1 SD 鼠成骨细胞原代培养及传代 取新生 SD 鼠颅盖骨经清洗后剪成 <1 mm 骨片, 经消化 (先在含 0.25% 胰蛋白酶的 D-Hanks 液中预消化 5 min, 后在高糖 DMEM 培养液中磁力搅拌消化 30~60 min)、过滤、分离 (1 500 r/min, 常温离心 5 min) 并提取成骨细胞。然后将成骨细胞接种于高糖 DMEM 培养液中, 在 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 在细胞增殖到培养瓶面积的 80% 时进行细胞传代处理, 共传 2 代。用 5 ml 的 D-Hanks 液清洗细胞 2 次, 加入 0.2 ml 胰蛋白酶液 (浓度为 0.125%), 在室温下消化。然后吸去胰蛋白酶液并加入 5 ml 含 12% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 吹打悬浮细胞后传至 2~3 个新培养瓶中。

1.5.2 2 组多孔钛件接种细胞并培养 将 2 组加工好的标准件分别置入 24 孔板, 每孔置入 1 个标准件。采用 70% 乙醇灭菌过夜, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 并用紫外线照射消毒 2 h。在 2 组多孔钛试件中细胞的接种密度为每孔接种 1×10⁴ 个细胞。保

持温度为 37 ℃、含 5%CO₂ 的空气, 继续培养。其间用光学显微镜进行连续观察, 比较 2 组多孔钛内的细胞生长、增殖情况。

1.6 观测指标与方法

1.6.1 MTT 法测定细胞增殖性 对 2 组试件在复合培养 1、3、5、7、9 d 进行检测, 每组每个时间点平行测定 4 个试件 (每组共检测 20 个试件)。弃去培养基, 在每孔中加入 1 ml DMEM 培养基和 100 μl MTT (5 mg/ml), 在 CO₂ 培养箱中温育 4 h。然后弃去上清, 在每孔中加入 150 μl 二甲基亚砷, 放在 CO₂ 培养箱中避光温育 15 min。用酶联检测仪测定 570 nm 处的吸收值。

1.6.2 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性检测 对 2 组试件在复合培养 7、14、21 d 时的 ALP 活性进行检测, 每组每个时间点平行测定 8 个试件, 共 24 件。弃去培养基, PBS 洗 3 次后加入 0.25% 的胰酶消化 30 min, 常温下以 2 500 r/min 的转速离心 15 min, 弃去上清液。在每个试管内加入 250 μl 细胞裂解液 (1% Triton X-100) 混合搅拌, 放入冰箱 (保持在 4 ℃) 过夜。将试管放置到 -18 ℃ 环境中冷冻, 常温下融化并重复 3 次。取每个试管中样品 240 μl 转移至 1.5 ml 离心管中, 在 4 ℃ 下 15 000 g 离心 15 min, 取出上清。

每个样品分别取 20 μl 细胞裂解上清, 采用国际 IFCC 推荐的方法测定细胞的 ALP 活性。每种样品测定 3 次。

1.6.3 扫描电镜观察 另取每组 2 个多孔钛试件在诱导培养 7 d 时进行扫描电镜检测, 观察成骨细胞在多孔钛表面的生长形态、数量及黏附情况。

1.7 统计学处理 数据应用 SPSS 11.0 软件包处理, 数据结果用均数±标准差表示, 对两组数据采用 Student *t* 检验, 设定 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成骨细胞生长增殖情况 随着成骨细胞在连通多孔钛的两组样品上复合培养时间的延长, MTT 吸光值都在增加, 但在复合多孔钛样品上细胞的增殖速度明显比单纯连通多孔钛快。复合多孔钛组的 MTT 吸光值随时间延长增长幅度较大; 而单纯多孔钛组的 MTT 吸光值随时间延长而增长的幅度相对

表 1 两组材料在复合培养不同时间点的 MTT 吸光值 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab.1 MTT OD values of two groups on the different time after inoculating ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 9 天
单纯多孔钛组	0.20±0.02	0.25±0.06	0.34±0.06	0.48±0.08	0.56±0.10
复合多孔钛组	0.22±0.01	0.39±0.07	0.603±0.08	0.94±0.12	1.038±0.12
<i>t</i> 值	-1.789	-3.037	-5.260	-6.379	-6.120
<i>P</i> 值	0.123 8	0.022 9	0.001 9	0.000 7	0.000 9

平缓。见表 1。

2.2 ALP 活性检测结果 两种连通多孔钛样品在植入成骨细胞进行培养后,7、14、21 d 的 ALP 检测结果差异均有统计学意义($P<0.01$),且在培养后 7、14、21 d 的检测值均依次递增(见表 2)。在细胞培养相同天数时,两组样品在培养 7、14、21 d 的比较结果显示,复合多孔钛组样品的 ALP 活性高于单纯连通多孔钛样品,其差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 扫描电镜观察结果 成骨细胞与两组连通多

表 2 两组材料在不同培养时间的 ALP 活性检测结果 ($\bar{x}\pm s, n=8$, 国际单位)

Tab.2 The ALP activity of two groups on the different time after inoculating ($\bar{x}\pm s, n=8, IU$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天
单纯多孔钛组	1.175±0.648	1.585±1.328	2.244±1.104
复合多孔钛组	4.100±2.040	6.871±7.982	20.600±2.803
t 值	3.873	2.355	18.279
P 值	0.001 5	0.026 7	0.000 0

孔钛样品复合培养 7 d 后,在扫描电镜下均可见细胞附着(图 1-2)。复合类骨磷灰石层的连通多孔钛

样品的孔隙内成骨细胞生长活跃,大量的细胞贴壁生长,细胞间由丝状纤维互相联结,并重叠覆盖。有的成骨细胞伸出长短不一的伪足,有的与其他胞体的伪足相连,有的伸向孔壁形成细胞桥。成骨细胞与连通多孔钛表面类骨磷灰石层的贴附在感官上非常的牢靠。

3 讨论

成骨细胞具有易于在粗糙表面上贴附、沉积的特点,而本研究制备的三维连通多孔钛材料正是迎合了成骨细胞的这一特点,可以更好地使成骨细胞在材料表面生长、增殖且附着牢固,有利于成骨。从对 2 组连通多孔钛材料种植成骨细胞后的连续观察可以看出,在连通多孔钛表面以及连通孔内表面上均有大量的细胞附着沉积并增殖,而且在复合连通多孔钛样品中,这种现象更为明显,这是因为连通多孔钛表面复合一层类骨磷灰石,具有与人体骨极为相似的成分和结构,细胞更容易识别和附着,而且表面复合类骨磷灰石后使该复合材料的表面形貌更为复杂,更为粗糙,成骨细胞也就更容易黏附沉积^[5-8]。在倒置显微镜下我们可以观察到复合类骨磷灰石层的

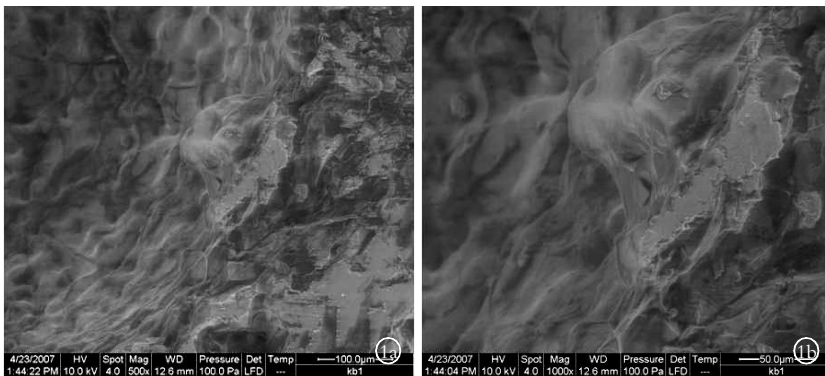


图 1 扫描电镜显示的单纯连通多孔钛上成骨细胞的形貌(1a×500,1b×1 000)

Fig.1 SEM photograph of morphologies of osteoblast on the pure three-dimensional interconnected porous titanium(pure TDIPT) (1a×500,1b×1 000)

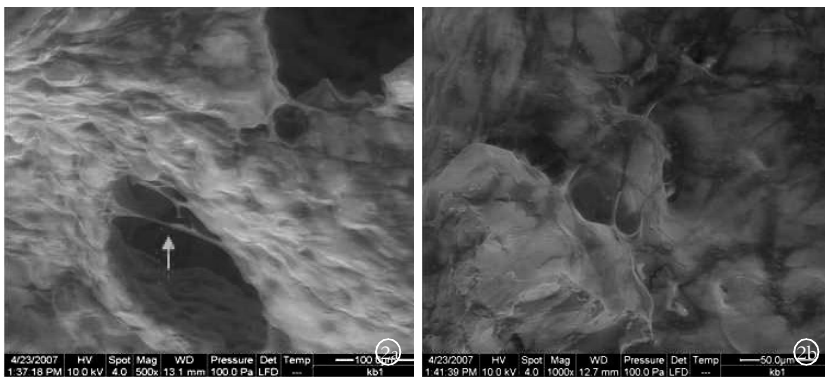


图 2 扫描电镜显示的复合类骨磷灰石层的连通多孔钛上成骨细胞的形貌(2a×500,2b×1000);可见成骨细胞形态各异,伸出伪足,在孔内形成细胞桥(箭头所示)

Fig.2 SEM photograph of morphologies of osteoblast on the TDIPT coated with bonelike apatite (1a×500,1b×1 000);osteoblasts adhered to the TDIPT in different shapes,spread of pseudopodium and developed cell-bridges in the hole(arrowed)

的连通多孔钛的孔隙中成骨细胞呈多突触生长并与多个粗糙缘相接触形成细胞桥,这说明成骨细胞在进入多孔钛孔隙后向多个方向伸展。细胞的骨架成分分布的方向性在成骨细胞方向性的构建骨基质、形成交叉连接式的骨结合、增加种植体骨界面的结合强度等方面起到了重要作用,细胞桥的形成与复合类骨磷灰石层的连通多孔钛材料特殊的表面形貌和三维结构密切相关。

本研究用 MTT 检测法对 2 组连通多孔钛样品上成骨细胞的生长、增殖情况进行分析。在连通多孔钛上形成的类骨磷灰石层由微小晶粒和有缺陷结构的羟基磷灰石构成,其与人体骨的无机成分和结构十分相似,因此容易被细胞、因子等识别,从而增加了材料的表面活性,从 MTT 法检测结果看,复合多孔钛试件在成骨细胞的识别、黏附和增殖方面明显较单纯连通多孔钛性能突出。所以,复合类骨磷灰石层的连通多孔钛材料无细胞毒性,更有利于细胞的黏附、生

· 经验交流 ·

粗丝线缝合肱三头肌腱膜内固定治疗尺骨鹰嘴骨折 28 例

马成荣

(康乐县人民医院外二科,甘肃 康乐 731500 E-mail:348463264@qq.com)

关键词 尺骨骨折; 缝合技术; 内固定器

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2011.06.024

Treatment of ulna olecranon fractures with coarse silk suture for the fixation of triceps aponeurosis; a report of 28 cases MA Cheng-rong. *The Second Surgery, People's Hospital of Kangle, Kangle 731500, Gansu, China*

KEYWORDS Ulna fractures; Suture techniques; Internal fixators

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(6): 520-521 www.zggszz.com

尺骨鹰嘴骨折是肘部常见的损伤,成人多见,除少数为尺骨鹰嘴尖端撕脱骨折外,大多数病例为骨折线波及半月状关节面的关节内骨折,由于肘关节伸屈肌的收缩作用骨折容易发生分离移位,因此治疗时恢复其关节面的正常解剖对位是

获得良好功能的重要措施,如果关节面对合不整齐,日后可能引起创伤性关节炎,导致关节疼痛和功能受限。尺骨鹰嘴骨折的损伤因间接暴力所致,当跌倒时手掌着地,肘关节呈半屈状,肱三头肌猛烈收缩,即可将尺骨鹰嘴造成撕脱骨折,或肘

长和增殖。

成熟期的成骨细胞,以 ALP 活性升高和 I 型胶原的分泌为特征,因此常将 ALP 看作是成骨细胞分化成熟的重要标志。ALP 活性检测的原理是:在碱性条件下,ALP 能使无色的对硝基苯磷酸二钠水解,生成黄色的对硝基苯酚和磷酸盐。通过测定对硝基苯酚在 450 nm 处的吸光度,可确定被水解的对硝基苯磷酸二钠的量,从而间接测定细胞的 ALP 活性^[9]。ALP 活性可以反映成骨细胞功能活性的状况。因此,本实验除通过 MTT 法检测成骨细胞连通多孔钛上增殖情况的同时,还应用 ALP 活性检测方法对成骨细胞的分化能力进行评价。从检测结果看,成骨细胞复合类骨磷灰石的连通多孔钛上的分化能力较单纯连通多孔钛具有明显的优势,而且这种优势从细胞培养开始一直保持到培养结束,说明在连通多孔钛上形成的类骨磷灰石由于其与人体骨相似的无机成分和结构,为成骨细胞的分化提供了适宜的环境,有利于最终成骨^[10]。

实验结果表明,复合类骨磷灰石层的连通多孔钛的表面具有与人体骨相似的无机成分和结构,具有良好的细胞相容性,促进了细胞的黏附、增殖和分化,是一种很好的人工关节表面生物活性涂层材料。

参考文献

[1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering[J]. Science, 1993, 260(5110): 920-926.

[2] Putnam AJ, Mooney DJ. Tissue engineering using synthetic extracellular matrices[J]. Nat Med, 1996, 2(7): 824.

[3] 李众利, 王岩, 张国强, 等. 新型三维连通多孔钛的制备及特性

[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2007, 4(1): 1-4.

Li ZL, Wang Y, Zhang GQ, et al. New 3-D porous Ti manufacture and feature [J]. Sheng Wu Gu Ke Cai Liao Yu Lin Chuang Yan Jiu, 2007, 4(1): 1-4. Chinese.

[4] 张国强, 王岩, 温宁, 等. 连通多孔钛表面活化处理方法的筛选 [J]. 骨科, 2010, 1(2): 69-73.

Zhang GQ, Wang Y, Wen N, et al. Screening the surface treatments of the interconnected porous titanium [J]. Gu Ke, 2010, 1(2): 69-73. Chinese.

[5] Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG. Bone tissue engineering [J]. Nat Med, 1995, 1(12): 1322.

[6] Jia PL, Pamela H, Mirellavanden D, et al. Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition [J]. Biomaterials, 2007, 28(18): 2810-2820.

[7] Timothy DS, Mustafa OG, Scott MO. Hybrid bone implants; self-assembly of peptide amphiphile nanofibers within porous titanium [J]. Biomaterials, 2008, 29(2): 161-171.

[8] 张国强, 王岩. 人工关节表面涂层研究现状 [J]. 中国骨伤, 2007, 20(5): 355-358.

Zhang GQ, Wang Y. Progress in research on coatings on joint prosthesis [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2007, 20(5): 355-358. Chinese with abstract in English.

[9] 任高宏, 裴国献, 王钢, 等. 成人骨髓成骨细胞体外培养 [J]. 骨与关节损伤杂志, 2003, 18(2): 118-121.

Ren GH, Pei GX, Wang G, et al. In vitro culture of adult human osteoblasts from bone marrow [J]. Gu Yu Guan Jie Sun Shang Za Zhi, 2003, 18(2): 118-121. Chinese.

[10] 曾晓峰, 赵建宁. 人工关节无菌性松动的生物学机制 [J]. 中国骨伤, 2003, 16(6): 380-382.

Zeng XF, Zhao JN. Biological mechanism of aseptic loosening of prosthesis [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2003, 16(6): 380-382. Chinese with abstract in English.

(收稿日期: 2011-05-17 本文编辑: 王宏)