

## • 基础研究 •

成骨细胞在生物活性玻璃与 TGF- $\beta$  复合生物支架上培养的实验研究

许少刚, 赵建宁, 杨书丰, 包倪荣

(南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院骨科, 江苏 南京 210002)

**【摘要】** 目的: 研究兔成骨细胞在生物活性玻璃与 TGF- $\beta$  复合生物支架中的生长情况, 探讨优化组织工程中生物材料支架的实验方法。方法: 体外培养的兔成骨细胞与 BG/TGF- $\beta$  构建的三维立体材料支架体外复合培养, 分别于 2、4、6、8 d 通过显微镜观察, 上清液 ALP 测定, MTT 细胞计数法及流式细胞仪检测, 评估 BG/TGF- $\beta$  构建的三维立体材料支架与兔成骨细胞的生物相容性。结果: 兔成骨细胞在 BG/TGF- $\beta$  构建的三维立体材料支架的表面及空隙内生长状态良好, 随着培养时间的延长, 各组细胞数量都明显增加, 各时间点 BG/TGF- $\beta$  构建的三维立体材料支架上 MTT 法测定细胞数实验组与对照组比较, 两组对照有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 上清液 ALP 测定值实验组与对照组进行统计处理, 两组对照有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。细胞凋亡率 (Ap) 实验组与对照组进行统计处理, 两组对照无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。结论: BG/TGF- $\beta$  复合支架不但具有良好生物相容性, 而且能促进成骨细胞的增殖与分化, 为骨组织工程支架材料的改良提供了依据。

**【关键词】** 成骨细胞; 生物活性玻璃; 转化生长因子- $\beta$ ; 组织工程

**Experimental research of the growth of rabbit osteoblast on the composite BG/TGF- $\beta$  material scaffolds** XU Shaogang, ZHAO Jian-ning, YANG Shu-feng, BAO Ni-rong, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA Nanjing, Nanjing 210002, Jiangsu, China

**ABSTRACT Objective** To invest the growth of rabbit osteoblast on the composite BG/TGF- $\beta$  material scaffolds and explore the experimental methods of optimized material scaffolds in bone tissue engineering. **Methods** Osteoblasts were cultured with bioactive glass ceramics together in vitro, the biological properties affected with BG/TGF- $\beta$  were observed and measured by light microscope, check of alkaline phosphatase in supernatant liquid and the cell proliferation was detected by MTT assay, flow cytometer at 2, 4, 6, 8 d. **Results** The results showed the cells on BG/TGF- $\beta$  were good adhesion and activity. The MTT assay showed the number of cells in the group were significantly increased with the culture time prolonged, the number of cells on BG/TGF- $\beta$  was higher than the control group ( $P < 0.05$ ). Check of alkaline phosphatase in supernatant liquid showed the number of the ALP in the BG/TGF- $\beta$  group was higher than the control group ( $P < 0.05$ ). There was not a significant difference about apoptosis result. The BG/TGF- $\beta$  group was close to the control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The porous composite material scaffold of BG/TGF- $\beta$  not only has good biocompatibility, but also can progressed osteoblasts growth and dividing.

**Key words** Osteoblasts; Bioactive glass (BG); Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ); Tissue engineering

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(5): 295-297 www.zggszz.com

组织工程的研究为骨缺损的修复这一骨科临床难题提供了新的方法, 是目前研究的热点。具有三维空间结构的材料支架、种子细胞和生长因子并称为组织工程的三大核心问题。骨髓来源的成骨细胞体外培养增殖旺盛, 有很强的成骨能力, 是骨组织工程中合适的种子细胞。生长因子是种子细胞的增殖与分化的促进因素。生物活性支架材料不但是种子细胞增

殖与分化的平台, 而且可作为生长因子释放的载体。生长因子与生物支架材料是种子细胞在生物体内增殖和分化的依托。本实验用生物材料支架-生长因子复合体与成骨细胞体外复合培养, 观察及检测其生物学性状的变化, 为骨组织工程中进一步改善支架材料性能提供依据。

### 1 材料与方法

**1.1 主要试剂及仪器** DMEM 培养液 (Gibco); 胎牛血清 (Hyclone); 胰蛋白酶 (Gibco); DM SO (Amersico); 生物安全柜 (ESCO); CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 SHELLAB); 倒置显微镜 (Olympus); 流式细胞仪 (FACScan 型, BD); 生物活性玻璃 (BG, 南

基金项目: 1. 全军十一五重点课题 (06G043); 2. 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2005085)

通讯作者: 赵建宁 Tel: 025-80860951 Email: cjxjsg@gmail.com

京大学生物材料系); TGF-β (SIGMA); ALP检测试剂盒 (SIGMA); MTT试剂盒 (Am erisco)。

**1.2 成骨细胞培养** 成骨细胞培养用 2~3月龄新西兰大白兔(购自南京军区南京总医院动物实验科), 无菌条件下抽取双侧髂骨骨髓 6 ml 密度梯度离心法结合贴壁培养法分离纯化出骨髓基质干细胞, 并进行增殖。成骨诱导剂与 DMEM 培养液组成完全培养基, 将第 2代细胞接种至培养板和培养瓶中, 每孔加入完全培养基, 2 d 后全量换液, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

**1.3 复合载体的制备** 研究表明, 骨组织工程要求支架的孔隙在 200~400 μm 范围内最有利于组织生长。因此本实验选用的 BG 材料为孔隙率 50%~80%, 孔径 200~400 μm。用口腔科特制的钻头将其切割成 10 mm × 5 mm × 5 mm 大小的条块状, 超声波清洗 30 min 用 PBS 液反复漂洗数次, 晾干后环氧乙烷熏蒸消毒灭菌。已消毒的 TGF-β 溶解于 DMEM 培养液中, 将切割灭菌后的 BG 浸入其中, 置入 700 kPa 的真空仓中, BG 孔隙中空气被置换, 取出后烘箱中烤干备用。

**1.4 细胞接种** 取 2块一次性无菌 48孔板, 选用生长状态良好的第 3代成骨细胞消化离心, 用含完全培养液配制成浓度为 3 × 10<sup>4</sup>/ml 的细胞悬液, 每孔加入细胞悬液 2 ml。实验分 2组, BG/TGF-β 组和对照组。其中 BG/TGF-β 组每孔加入 1块预制好的 10 mm × 5 mm × 5 mm 的复合 TGF-β 的 BG, 对照组单纯接种细胞, 然后将培养板放入 37℃, 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养, 2 d 换液 1次, 并进行有关的观察及检测。

**1.5 观察项目及检测方法**

**1.5.1 成骨细胞上清液 ALP 检测** 将培养细胞的上清液在不同时间 (2, 4, 6, 8 d) 换液时留取, 碱性磷酸酶活性测定按试剂盒提供的方法进行。

**1.5.2 流式细胞仪检测** 在细胞培养至第 6天时, 分别将 6孔 BG/TGF-β 及对照组的细胞完全消化, 其中 BG/TGF-β 材料上的细胞也消化下来, 离心 PBS 洗 2遍, 用 70% 乙醇 1 ml 固定, 送流式细胞仪检测。

**1.5.3 MTT 法测定成骨细胞增殖** 两组分别取出 16孔消化

后行 MTT 法检测, 于接种后的不同时间 (2, 4, 6, 8 d) 吸出培养基后每孔加入 DMEM 培养液及四甲基偶氮唑盐 (MTT), 在酶联免疫检测仪上测定。

**1.6 统计学处理** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 10.0 for Windows 统计软件进行计量资料的组间均值比较的 *t* 检验。

**2 结果**

**2.1 倒置显微镜下观察**

**2.1.1 对照组** 消化传代的成骨细胞在培养瓶中贴壁生长, 一开始在培养液中呈圆形, 并逐渐沉于瓶底, 2 h 后细胞开始贴壁伸展, 细胞形态变为三角形及梭形, 24 h 后细胞完全贴壁, 细胞之间开始形成连接。2~3 d 时, 细胞增殖明显, 核分裂相多见, 形态以有突起的三角形、梭形为主。5~6 d 细胞可长满瓶底。

**2.1.2 BG/TGF-β 组** BG 材料为不透光物质, 导致显微镜无法直接观察成骨细胞在 BG 表面生长情况, 但可以观察到材料周围的孔底下, 成骨细胞生长良好, 细胞核呈圆形, 可见核分裂相较多, 形态较对照组更成熟, 以梭形为主。

**2.2 碱性磷酸酶检测结果 (见表 1)** 染色显示细胞胞核周围呈黄褐色分泌, 定量分析结果显示: 在各时间点均可以检测到活性, 两组之间有显著性差异。分别比较对照组和 BG 材料组各时间点的差别, 有统计学差异 (*P* < 0.05)。

**2.3 流式细胞仪检测结果** 通过观察比较两组流式细胞仪的图形, 可见两组细胞在各细胞周期所占的比例大致相同, 因此两组细胞 DNA 含量分析图形相似 (见图 1、2)。两组细胞凋亡率的数值见表 2 分别比较对照组和 BG 材料组各时间点的差别, 无统计学意义 (*P* > 0.05)。

**2.4 MTT 法测定两组成骨细胞增殖 (见表 3)** 经 MTT 法测定两组第 3代培养细胞的 D<sub>50</sub> 发现, 随着培养时间的延长, 细胞数量不断增加, 相同时间点两组细胞增殖有显著差异, 分别比较对照组和 BG 材料组各时间点的差别, 有统计学差异 (*P* < 0.05)。

**3 讨论**

本实验所采用的生物活性玻璃是以溶胶-凝胶法制备的

表 1 两组碱性磷酸酶检测结果 (*n* = 24,  $\bar{x} \pm s$ , ml/mg 蛋白质)

Tab 1 The results of two groups of ALP test (*n* = 24,  $\bar{x} \pm s$  ml/mg protein)

组别	2 d	4 d	6 d	8 d
对照组	10.306 ± 0.275	8.431 ± 0.325	7.231 ± 0.235	4.736 ± 0.421
BG/TGF-β 组	14.937 ± 0.372	12.378 ± 0.278	10.367 ± 0.389	7.828 ± 0.184

表 2 流式细胞仪检测两组细胞凋亡率 (*n* = 12,  $\bar{x} \pm s$ , %)

Tab 2 Apoptosis of two groups tested by cytometer (*n* = 12,  $\bar{x} \pm s$  %)

组别	2 d	4 d	6 d	8 d
对照组	0.21 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.47 ± 0.06	0.55 ± 0.03
BG/TGF-β 组	0.22 ± 0.02	0.34 ± 0.07	0.45 ± 0.05	0.54 ± 0.02

表 3 MTT 法检测两组成骨细胞增殖 (*n* = 12,  $\bar{x} \pm s$ , %)

Tab 3 Osteoblast of two groups increase tested by MTT (*n* = 12,  $\bar{x} \pm s$  %)

组别	2 d	4 d	6 d	8 d
对照组	0.21 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.47 ± 0.06	0.55 ± 0.03
BG/TGF-β 组	0.30 ± 0.02	0.44 ± 0.07	0.53 ± 0.05	0.64 ± 0.02

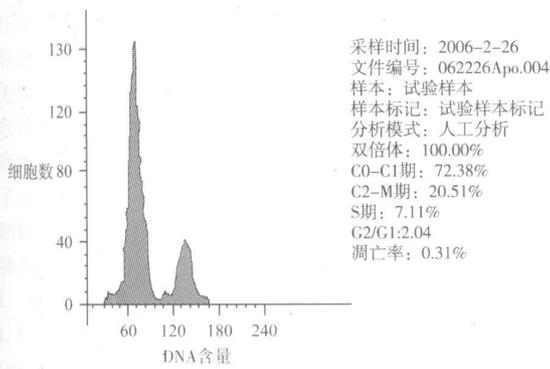
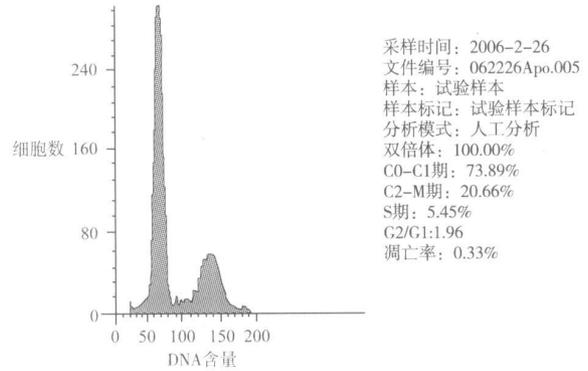


图 1 对照组流式细胞仪结果

图 2 BG/TGF- $\beta$  组流式细胞仪结果

活性玻璃粉为原料, 添加一定量无机造孔剂而制成的一种新型的骨修复和骨组织工程材料, 有利于新骨生长的各种胶原、蛋白质及骨细胞附着<sup>[1]</sup>。本实验表明: 在扫描电镜下, BG呈多孔态结构, 有较高的孔隙率, 成骨细胞有多量的细丝和微绒毛贴附于材料表面, 与材料结合紧密, 并且向材料内部的空隙中延伸。说明 BG 具有良好的生物相容性, 为成骨细胞的生长创造了良好的微环境。

细胞因子 TGF- $\beta$  具有促进成骨细胞增殖、分化的作用。贺小兵等<sup>[2]</sup>将 TGF- $\beta$  附载于聚乳酸 (PLA) 材料构成缓释支架进行动物骨缺损修复实验, 其结果证明局部应用外源性 TGF- $\beta$  可促进骨痂形成, 增强骨折愈合后骨组织的生物力学强度。本实验的研究表明实验组成骨细胞分化相对成熟, 同时本实验的研究结果也显示实验组较对照组的成骨细胞数量及 ALP 分泌量明显增高, 显示 TGF- $\beta$  有明显的成骨作用。

研究表明 BG 包埋的生物活性分子可调控在特定时期释放, 初期释放缓慢, 后期释放速率与时间的平方根成正比, 使骨缺损局部维持较高的生物活性分子浓度, 刺激细胞功能, 启动成骨过程, 并加速骨组织愈合<sup>[3]</sup>。本实验所用 BG 作为 TGF- $\beta$  的缓释载体, 延长了细胞生长因子释放时间, 通过对细胞生长因子的控制, 直接刺激成骨作用, 使成骨细胞能在细胞生长因子的调控下增殖, 同时 BG 为成骨细胞的生长提供了良好的依托, 促进了细胞的黏附, 加速了骨形成的过程, 增强了种子细胞的生物活性。

本试验主要观察细胞在复合材料中的生长情况、细胞增

殖及功能的表达等。MTT 法显示随着培养时间的延长各组细胞数量都明显增加, 与对照组比较各时间点差异显著 ( $P < 0.05$ ), ALP 活性测定染色及分泌定量分析的结果显示在各时间点均可以检测到活性, 与对照组之间有显著性差异, 说明复合支架材料有促进成骨作用。通过观察比较两组流式细胞仪的图形, 可见两组细胞 DNA 含量分析及细胞凋亡率的数值无显著性差异。上述实验结果证明了复合生物支架有较好的促细胞黏附作用而且有利于黏附后的细胞伸展及活性表达。释放的 TGF- $\beta$  能维持有效剂量并持续表达, 达到了缓释目的, 促进细胞的增殖及细胞数量的增加。

成骨细胞与改良的 BG/TGF- $\beta$  复合支架不但有良好的生物相容性, 而且能促进成骨细胞在支架上的增殖、分化与黏附, 可见复合生物支架有良好的生物相容性及促进成骨作用。

#### 参考文献

- 1 Gitlanova J, Salinas AJ, BuenLozano AL, et al. The in vivo behaviour of a sol-gel glass and a glass ceramic during critical diaphyseal bone defects healing. *Biomaterials*. 2005, 26(21): 4374-4382
- 2 贺小兵, 卢卫忠, 唐康来, 等. 骨形成蛋白和转化生长因子- $\beta$  对兔尺骨骨折愈合后生物力学性能的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2003, 17(3): 185-188
- 3 Meseguer-Olmo L, Ros-Nicolas MJ, Clavel-Sainz M, et al. Biocompatibility and in vivo gentamicin release from bioactive sol-gel glass implants. *J Biomed Mater Res* 2002, 61(3): 458-465

(收稿日期: 2007-01-20 本文编辑: 王玉蔓)

## 《当代脊柱内固定技术》已经出版

由著名骨科专家徐荣明、贾连顺、陈统一主编的《当代脊柱内固定技术》已经由上海科技教育出版社出版。本书与当前国外脊柱外科的先进技术接轨, 内容包括相关基础知识、各种脊柱内固定技术的应用, 其中颈椎椎弓根螺钉固定技术、侧块固定技术、腰骶部固定技术以及骨盆骨折的内固定技术等手术技术非常新颖。本书内容新颖, 实用性强。书中大量图片有助于读者理解, 适合各级骨科医生、研究生阅读。全国新华书店、医药卫生书店有售。定价: 98 元。需邮购者请与王庆医生联系。地址: 浙江省宁波市中山路 1059 号宁波市第六医院骨科。邮编: 315040。电话: 13205748139。