

## · 基础研究 ·

## 新型掺锶硫酸钙材料的成骨细胞生长活性研究

张春丽, 赵彦涛, 侯树勋, 衷鸿宾, 李忠海, 刘彦, 周颖

(解放军总医院第一附属医院 全军骨科研究所, 北京 100048)

**【摘要】** 目的: 评价新型掺锶硫酸钙材料的成骨细胞生长活性, 并与硫酸钙材料进行比较。方法: 通过成骨细胞在掺锶硫酸钙和硫酸钙材料表面的直接接种, 于第 1, 3, 5 天观察成骨细胞的增殖活性, 分别在 5 d 后检测细胞碱性磷酸酶活性和骨钙素活性, 并用扫描电子显微镜观察细胞生长微观形态结构。结果: 成骨细胞在掺锶硫酸钙材料表面旺盛生长。掺锶硫酸钙材料表面的细胞数量显著高于普通硫酸钙组 ( $P < 0.05$ )。其碱性磷酸酶活性较对照组高出 57.8%, 两者差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。成骨细胞的骨钙素水平较后者高出 40.2% ( $P < 0.05$ )。掺锶硫酸钙材料表面成骨细胞呈多角形或梭形生长, 胞浆丰富, 状态活跃。结论: 掺锶硫酸钙材料具有优良的成骨细胞生长活性, 有望成为一种理想的骨替代材料。

**【关键词】** 骨缺损; 硫酸钙; 锶; 成骨细胞; 生物活性

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2014.05.015

**Growth activity of osteoblast on a novel strontium incorporated calcium sulfate** ZHANG Chun-li, ZHAO Yan-tao, HOU Shu-xun, ZHONG Hong-bin, LI Zhong-hai, LIU Yan, and ZHOU Ying. Institute of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100048, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the growth activity of osteoblast on a novel strontium incorporated calcium sulfate and make comparison with normal calcium sulfate material. **Methods:** Osteoblast was inoculated on samples and cell proliferation was measured on the 1st, 3rd, 5th days, and the activities of ALP and osteocalcin were observed on the 5th day. And microscopic morphology of osteoblast was observed by scanning electron microscopy (SEM). **Results:** Osteoblast grows robustly on tested material. Cell quantity on the surface of novel material was obviously higher than normal calcium sulfate material ( $P < 0.05$ ). The activity of ALP and osteocalcin on novel material was 57.8% and 40.2% higher than on normal calcium sulfate material respectively ( $P < 0.05$ ). On strontium incorporated surface, osteoblast spread well. Cells were polygonal with abundant cytoplasm and the morphology was active. **Conclusion:** Strontium incorporated calcium sulfate can sustain robust growth activity of osteoblast, which is promising to be used for bone substitute materials.

**KEYWORDS** Bone defects; Calcium sulfate; Strontium; Osteoblasts; Bioactivity

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(5): 415-418 www.zggszz.com

骨缺损在口腔科和外科临床上都非常常见, 然而骨组织缺损一直都是困扰广大医生和患者的棘手问题<sup>[1-2]</sup>。硫酸钙人工骨材料目前已广泛应用于骨科、整形外科和口腔科等多个学科领域, 特别是在西方发达国家其应用历史较长<sup>[3]</sup>。硫酸钙材料具有优良的生物相容性, 然而成骨活性与自体骨或异体骨相比仍有一定的差距。此外, 硫酸钙的降解速率相对较快, 这就与其成骨活性相对较弱构成了比较突出的矛盾, 在此情况下更易出现骨缺损修复的失败<sup>[4]</sup>。笔者此前的研究中利用在冻干骨的支架中离子交换

掺入具有促进成骨活性作用的锶元素, 显著提高了同种异体骨的成骨能力和应用效果<sup>[5-6]</sup>。在此研究的基础上, 笔者尝试利用碳酸锶的引入改善人工骨修复材料硫酸钙的生物学性能。在本实验中应用成骨细胞直接接种培养法, 评价掺锶硫酸钙材料的细胞相容性和对成骨细胞的活性作用, 以期为该新型材料的研究和应用提供参考依据。

## 1 材料方法

**1.1 主要试剂和仪器** 培养基为 DMEM-F12 (Hyclone, 美国), 碱性磷酸酶检测试剂盒 (南京建成, 中国), 酶联免疫测定仪 (Dynex, 美国), 微量移液器 (1 000  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 100  $\mu$ l) (Eppendorf, 德国), 细胞培养瓶 (75  $\text{cm}^2$ ) (Corning, 美国), 细胞培养板 (24, 96 孔) (Corning, 美国), HITACHI-7180 多功能生化分析仪 (HITACHI, 日本), 骨钙素检测试剂盒 (原子高科, 中国), JSM-840 型电子显微镜 (JEOL, 日本)。

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (编号: NSFC 81201380); 博士后科学基金 (编号: 201150M1538)

Fund program: Youth Project of National Natural Science Fund (No. NSFC 81201380)

通讯作者: 侯树勋 E-mail: hsxortho@hotmail.com

Corresponding author: HOU Shu-xun E-mail: hsxortho@hotmail.com

**1.2 材料准备** 两种硫酸钙材料:普通硫酸钙材料和掺锶硫酸钙,分别将分析纯的  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (北京国药试剂公司,中国)和含有 6%  $\text{SrCO}_3$  (北京国药试剂公司,中国)的  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  粉末 1 g 在 19.6~20.2 kN 压力下冷压成直径 13 mm×1.5 mm 的圆片,75%乙醇清洗 1 次,再用三蒸水清洗 3 遍,烘干,3 层真空封装,钴 60 辐射灭菌备用。

**1.3 成骨细胞的培养** 本实验选择 MC-3T3 成骨细胞,冻存细胞在 37.5 °C 水浴中复苏,加入 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液,37 °C,5%  $\text{CO}_2$  环境中培养,隔天换液。细胞生长至 80% 密度时,胰酶消化传代,取传第 2 代细胞进行实验。

**1.4 观察项目与方法**

**1.4.1 细胞增殖** 将两种硫酸钙材料圆片放入 24 孔板内,加入 1.5 ml 的 DMEM 培养液浸泡 24 h 后,将细胞接种于材料表面,浓度为  $2 \times 10^4$  /ml。细胞分别在接种后 1、3、5 d,每孔加 5 mg/ml 的 MTT 200  $\mu\text{l}$ ,37 °C 孵育 4 h。弃上清,加纯 DMSO 1 500  $\mu\text{l}$ /孔,震荡 10 min。分别吸取 200  $\mu\text{l}$  于 96 孔板中,酶联免疫仪上,490 波长下测光吸收值,取平均值。

**1.4.2 碱性磷酸酶、骨钙素活性** 细胞培养 5 d 后,取培养液每孔 1 000  $\mu\text{l}$ 。用碱性磷酸酶检测试剂在 HITACHI-7180 多功能生化分析仪检测碱性磷酸酶活性;采用核医学科放射免疫检测方法检测骨钙素活性。以细胞增殖实验吸光度进行标准化。

**1.4.3 细胞形态学观察** 将培养至第 3 天带有贴壁生长细胞的材料分别取出,用 0.01 mol/L 的 PBS (pH7.4)洗 3 遍,体积分数为 0.3% 戊二醛固定,乙醇梯度脱水,临界点干燥,喷金,扫描电镜观察。

**1.5 统计学处理** 用 SPSS 13.0 软件对两组计量数据包括细胞增殖检测光吸收值,碱性磷酸酶活性和骨钙素活性结果进行 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 细胞增殖** 测试结果显示第 1、3、5 天成骨细胞在两种硫酸钙材料表面成功附着生长,细胞增殖的数量呈指数性增加(见表 1)。成骨细胞在材料表面附着及增殖情况正常,第 5 天掺锶硫酸钙材料表面的细胞数量检测指标显著高于普通硫酸钙组材料 ( $P < 0.05$ ),其吸光度值检测较后者高出 31.5%。

**2.2 碱性磷酸酶、骨钙素活性** 两组材料的碱性磷酸酶活性观察结果见表 2,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),掺锶硫酸钙材料表面的碱性磷酸酶活性检测指标较后者高出 57.8%。实验观察时间内骨钙素活性水平测试结果见表 2,两组材料差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),掺锶硫酸钙材料表面的骨钙素相对活

**表 1 两种材料不同接种时间表面细胞增殖 MTT 光吸收值**  
( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab.1 The MTT absorbancy of osteoblast on two samples at different vaccination times**( $\bar{x} \pm s$ )

组别	培养孔数	接种时间		
		第 1 天	第 3 天	第 5 天
普通硫酸钙	6	0.29±0.03	0.47±0.05	0.89±0.11
掺锶硫酸钙	6	0.30±0.04	0.58±0.04	1.17±0.06
<i>t</i> 值	-	0.234	2.807	3.96
<i>P</i> 值	-	0.826	0.049	0.017

**表 2 两种材料表面碱性磷酸酶、骨钙素活性检测结果**( $\bar{x} \pm s$ )  
**Tab.2 Results of the relaty activity of ALP and osteocalcin on the surface of two samples**( $\bar{x} \pm s$ )

组别	培养孔数	碱性磷酸酶活性	骨钙素活性
普通硫酸钙	6	20.4±3.6	8.2±1.4
掺锶硫酸钙	6	32.2±4.2	11.5±1.8
<i>t</i> 值	-	3.689	3.471
<i>P</i> 值	-	0.021	0.006

性检测指标较后者高出 40.2%。

**2.3 细胞形态学观察** 成骨细胞在材料表面形态学观察结果见图 1-2,扫描电镜下显示成骨细胞在两种硫酸钙材料表面生长第 3 天的附着形态。电镜观察可见,细胞突起附着在材料表面,细胞呈多角形或梭形,胞浆丰富,细胞成片生长。细胞有伪足状结构,在掺锶硫酸钙材料表面细胞突起末端可以观察到一些细小突触结构,显示了活跃的细胞生长状态。此外,特别是在掺锶硫酸钙组材料表面和成骨细胞周围还观察到数量较多的蛋白质结晶颗粒样结构。

**3 讨论**

硫酸钙材料作为一种人工骨修复材料,降解速率较快而成骨活性相对较低。改善材料的成骨活性和减慢材料的吸收速率是诸多研究者所关注的问题。有研究表明锶元素可以显著促进成骨细胞的生长复制,刺激新骨形成;在培养液中加入少量锶离子;体外成骨前体细胞培养 24 h 后,实验组 DNA 合成量是空白组的 3~4 倍,成骨细胞内的胶原和非胶原蛋白增加了 35%<sup>[7]</sup>。相关研究认为锶元素可以至少通过两种途径促进成骨细胞的生成和增强成骨作用,并抑制体内破骨细胞的吸收作用<sup>[8]</sup>。有关的锶化合物已用于治疗骨质疏松症,被认为是一种可靠的治疗方法,而且具有高效低成本的优点。在人工骨修复材料中复合锶元素将可望使得锶元素在骨缺损局部直接发生促成骨作用,从而缩短患者的愈合周期,提高骨替代材料的修复效果。

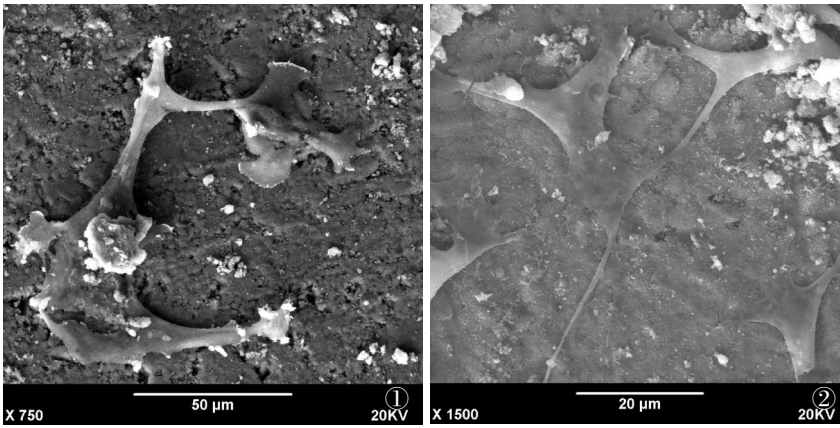


图 1 成骨细胞在硫酸钙材料表面的形貌(第 3 天),成骨细胞周围可见白色蛋白质结晶颗粒样结构(电镜×750) 图 2 成骨细胞在掺锶硫酸钙材料表面的形貌(第 3 天),细胞周围可见大量白色蛋白质结晶颗粒样结构(电镜×1 500)

**Fig.1** Morphology of osteoblast on the surface of calcium sulfate on the 3rd day after vaccination, white protein particles were observed around osteoblast (SEM×750) **Fig.2** Morphology of osteoblast on the surface of strontium incorporated calcium sulfate on the 3rd day after vaccination, quantities of white protein particles were observed around osteoblast (SEM×1 500)

成骨活性元素锶的应用具有相对的稳定性和较高的安全预期<sup>[9-11]</sup>。这是因为化学元素锶是与钙元素同族的碱土金属元素,在成熟骨骼中约相当于钙元素含量的 0.035%,是人体骨中必需元素之一。在骨质发生的早期缺乏锶元素可以导致骨形成不足及骨钙化不良,新骨形成的初期锶离子的浓度较高,随着骨基质的成熟,锶离子逐渐被钙离子替换,锶离子在骨基质中保持一定的比例以维持骨质的正常功能<sup>[12]</sup>;而骨质中锶元素的含量还与骨质的抗压强度大小密切相关。在代谢上与钙离子排泄途径相似,因而具有较高的安全性。

本研究中锶元素的掺入浓度是参考了长期服用雷奈酸锶后,人们骨质中锶元素的掺入浓度 6%<sup>[14]</sup>。本研究中两种硫酸钙材料表面成骨细胞生长旺盛。在掺锶组表面成骨细胞 24 h 后的最初附着数量与对照组相当,而其增殖速率则显著高于普通组材料,细胞数量迅速超出普通组材料。表现出较为显著的促进成骨细胞生长的作用。

在功能蛋白酶碱性磷酸酶和骨钙素的表达方面,掺锶硫酸钙材料表面的成骨细胞所合成的碱性磷酸酶和骨钙素水平显著高于普通材料组 ( $P < 0.05$ ),这一现象提示,掺锶硫酸钙材料非常有助于骨组织的早期钙化形成<sup>[13]</sup>。对于成骨细胞产生的新生骨组织尽快发生矿化和实现结构支持具有重要的意义。

通过扫描电子显微镜的观察发现在两种硫酸钙材料表面成骨细胞都能够正常附着和生长,呈现出典型的成骨细胞极化功能状态,细胞外观呈多角形。

在硫酸钙材料表面细胞突起末端可以观察到一些较细小的微突触结构,细胞处于较高的活性状态,同时这种突触结构也是在活性生物材料表面曾经观察报道的结构特征<sup>[14]</sup>。在掺锶硫酸钙材料组成骨细胞表面还观察到了许多微小的蛋白结晶颗粒样结构,目前推测与细胞的功能蛋白质合成、分泌的活性旺盛密切相关。这一现象在掺锶冻干骨材料的细胞相容性研究中也曾被观察报道<sup>[6]</sup>。

上述结果均提示,掺锶硫酸钙材料具有非常出色的细胞相容性。当然,这些体外研究的实验条件并不能完全代表体内应用的情况,进一步的动物体内实验应该被用于检测该新型掺锶硫酸钙材

料的生物相容性和成骨活性。

#### 参考文献

- [1] 陈帅,张宁,陈维善,等.富血小板血浆修复骨缺损的机制研究进展[J].中国骨伤,2012,28(3):258-261.  
Chen S,Zhang N,Chen WS,et al. Research progress of the mechanism of repairing bone defect with PRP[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2012,28(3):258-261. Chinese with abstract in English.
- [2] 孙俊,侯筱魁,匡勇,等.不同比例骨软骨镶嵌成形术联合基因增强组织工程方法治疗骨软骨缺损[J].中国骨伤,2011,24(9):768-774.  
Sun J,Hou XK,Kuang Y,et al. Research on the repair of acute large osteochondral defects with Mosaicplasty associated with genes-enhanced tissue engineering in different proportion[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2011,24(9):768-774. Chinese with abstract in English.
- [3] Kim YK, Lee JY, Kim SG, et al. Guided bone regeneration using demineralized allogenic bone matrix with calcium sulfate; case series[J]. J Adv Prosthodont, 2013, 5(2): 167-171.
- [4] Shih TC, Teng NC, Wang PD, et al. In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in beagles; Histological properties [J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(8): 2405-2411.
- [5] 双峰,赵彦涛,侯树勋,等.掺锶冻干骨体内植入的生物相容性[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(12):2149-2152.  
Shuang F,Zhao YT,Hou SX,et al. Biocompatibility of in vivo implanted strontium incorporated frozen dried bone[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu, 2011, 15(12): 2149-2152. Chinese.
- [6] 赵彦涛,侯树勋,闫钧,等.一种新型掺锶冻干骨材料的细胞相容性研究[J].中国组织工程研究,2012,12(51):1024-1029.  
Zhao YT,Hou SX,Yan J,et al. Cellular biocompatibility of a novel strontium incorporated freeze dried bone material[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu, 2012, 12(51): 1024-1029. Chinese.
- [7] Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, et al. Dual effect of strontium

- ranelate; stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro[J]. Bone, 2008, 42(1): 129-138.
- [8] Caverzasio J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms[J]. Bone, 2008, 42(6): 1131-1136.
- [9] Namazi H. Efficacy and safety of oral strontium ranelate for the treatment of knee osteoarthritis: rationale and design of randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Curr Med Res Opin, 2012, 28(4): 609-610.
- [10] Cooper C, Reginster JY, Cortet B, et al. Long-term treatment of osteoporosis in postmenopausal women: a review from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the International Osteoporosis Foundation (IOF)[J]. Curr Med Res Opin, 2012, 28(3): 475-491.
- [11] Silverman S, Christiansen C. Individualizing osteoporosis therapy[J]. Osteoporos Int, 2012, 23(3): 797-809.
- [12] Pors Nielsen S. The biological role of strontium[J]. Bone, 2004, 35(3): 583-588.
- [13] Jensen J-EB, Stang H, Kringsholm B. Relationship between trace element content and mechanical bone strength[J]. Bone, 1997, 20(Suppl 4): 104.
- [14] Zhao Y, Zhang Y, Zhao Y, et al. Synthesis and cellular biocompatibility of two nanophase hydroxyapatite with different Ca/P ratio[J]. J Nanoscience Nanotechnology, 2011, 11(12): 11069-11073.
- (收稿日期: 2013-09-20 本文编辑: 王玉蔓)

## 胫骨平台塌陷性骨折克氏针网状固定的生物力学评价

陈朝祥, 张卫, 贺洪辉, 刘鸣江, 曾德辉

(南华大学附属南华医院关节运动科, 湖南 衡阳 421002)

**【摘要】** 目的: 评价采用克氏针束网状支撑固定治疗胫骨平台塌陷性骨折的生物力学性能。方法: 在自行设计的骨折模型上, 分别用 8 枚 1.5 mm 克氏针网状固定和 2 枚 3.5 mm 皮质骨螺钉固定, 分别进行面压缩试验和点压缩试验, 对这两种固定方式在最大抗压缩力、固定强度等方面进行生物力学评价。结果: 面压缩试验中, 平均最大抗压缩力, 螺钉固定为  $(1\ 925.31 \pm 444.26)$  N, 克氏针束网状固定为  $(1\ 609.62 \pm 277.72)$  N; 平均最大固定强度, 螺钉固定为  $(2.28 \pm 0.53)$  N/mm<sup>2</sup>, 克氏针束网状固定为  $(1.90 \pm 0.33)$  N/mm<sup>2</sup>, 两种固定方式生物力学性能接近 ( $P > 0.05$ ); 在点压缩试验组中平均最大抗压缩力, 螺钉固定为  $(411.13 \pm 233.88)$  N, 克氏针束网状固定为  $(1\ 105.58 \pm 290.66)$  N; 平均最大固定强度, 螺钉固定为  $(2.66 \pm 1.52)$  N/mm<sup>2</sup>, 克氏针束网状固定为  $(7.18 \pm 1.89)$  N/mm<sup>2</sup>, 网状固定明显具有生物力学优势 ( $P < 0.01$ )。结论: 克氏针网状支撑固定胫骨平台骨折, 对骨折施行生物学固定, 固定牢靠。

**【关键词】** 胫骨平台; 塌陷骨折; 骨折固定术, 内; 生物力学

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2014.05.016

**Biomechanical study on a net-fixation of Kirschner wire in treating depressed tibial plateau fractures** CHEN Zhao-xiang, ZHANG Wei, HE Hong-hui, LIU Ming-jiang, and ZENG De-hui. Department of Joint Movement, the Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang 421002, Hunan, China

**ABSTRACT Objective:** To evaluate the biomechanical properties of tibial plateau depressed fracture fixed with a net-fixation of Kirschner wires. **Methods:** Twenty homemade fracture models were fixed with eight 1.5 mm Kirschner wires in a net-fixation; 20 homemade fracture models were fixed with two 3.5 mm cortical screws. Plane-compressed and dot-compressed test were made on each 10 models of the two groups. The maximal force of anti-ompress and stiffness were measured and evaluated. **Results:** In plane-compressed test, mean maximal force of anti-compress and stiffness for screw fixation was  $(1\ 925.31 \pm 444.26)$  N and  $(2.28 \pm 0.53)$  N/mm<sup>2</sup>, respectively, for net-fixation was  $(1\ 609.62 \pm 277.72)$  N and  $(1.90 \pm 0.33)$  N/mm<sup>2</sup>, respectively. There was no statistical difference between the two fixation methods ( $P > 0.05$ ). In dot-compressed test, mean maximal force of anti-compress and stiffness for screw fixation was  $(411.13 \pm 233.88)$  N and  $(2.66 \pm 1.52)$  N/mm<sup>2</sup>, respectively, for net-fixation was  $(1\ 105.58 \pm 290.66)$  N and  $(7.18 \pm 1.89)$  N/mm<sup>2</sup>, respectively, the net-fixation was better than that of the screw fixation ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Treatment of tibial plateau depressed fracture with a net-fixation of Kirschner wires is a biological fixation and is a reliably method.

通讯作者: 陈朝祥 E-mail: chenzhaoxiang415@163.com

Corresponding author: CHEN Zhao-xiang E-mail: chenzhaoxiang415@163.com