

· 综述 ·

生物陶瓷对体外培养大鼠成骨细胞的影响

朱元¹, 毕大卫², 全仁夫³

(1. 浙江中医药大学 2004级硕士研究生, 浙江 杭州 310053; 2. 杭州萧山区第一人民医院; 3. 杭州萧山中医院)

【摘要】 生物陶瓷是近 20年来研究的热点之一, 作为无机生物医学材料, 其良好的生物相容性, 在医学领域广阔的应用前景, 越来越受到学者们的重视。而大鼠成骨细胞的体外复合培养, 常被应用于评估材料与成骨细胞间的相互作用, 特别是材料对细胞增殖、功能、黏附的影响, 其结果往往成为材料体内植入实验的基地。随着相关文献的增多, 结合近年来有关文献就生物陶瓷对大鼠成骨细胞增殖、功能、黏附的影响作一回顾和分析。

【关键词】 生物陶瓷; 成骨细胞; 细胞, 培养的

Effect of bioceramics on rat osteoblast cells cultured in vitro ZHU Yuan^{*}, BIDAwei, QUAN Ren-fu^{*} Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT Bioceramics is one of the popular research in lastest 20 years, being inorganic biomedical materials, with fine biocompatibility, the broad application perspective in medical area, scientists has paid more attention on it Combined cultivation of rat osteoblast cells in vitro, bioceramics always be used for evaluating the interaction between materials and osteoblast, especially the effects of materials on osteoblast cell proliferation, function, and adhesion, with the results being basic of implant experiment This article has reviewed, analyzed the effects of proliferation, function, adhesion of rat osteoblast cells cultured in vitro with bioceramics

Key words Bioceramics; Osteoblasts; Cells, cultured

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(11): 795-797 www. zggszz. com

过去医学领域中应用最广泛的生物材料是金属和有机材料, 而金属长期埋植生物体内容易发生电解、腐蚀, 金属的磨屑会引起周围生物组织的吞噬或生化反应, 另外产生金属元素向各种器官转移, 造成其他组织或器官的损害和组织的变态反应等问题。而有机材料则由于强度问题, 在骨科领域的应用受到很大限制, 且存在材料的耐久性问题。故而近 20年来, 医学上广泛重视研究和应用各种生物陶瓷材料, 特别是以磷酸盐为基质材料的生物活性陶瓷^[1]。

基金项目: 浙江省科技计划项目 (NO: 021103026)

通讯作者: 朱元 Tel: 0571-82732852 E-mail: zhuyuan1981@msn.com

1 生物陶瓷的分类

生物陶瓷 (bioceramics) 按体内性质可以分为两类, 一类为生物惰性陶瓷, 如氧化铝、氧化锆、碳素材料等。这类陶瓷材料的结构都比较稳定, 分子中的键力较强, 而且都具有较高的强度、耐磨性和化学稳定性。另一类为生物活性陶瓷, 如羟基磷灰石、生物玻璃陶瓷等, 在生理环境中可通过其表面发生的生物化学反应与生物体组织形成化学键性结合。还有在体内可发生降解和吸收的生物陶瓷, 如磷酸三钙生物活性陶瓷, 在生理环境中可被逐步降解和吸收, 并为新生组织所替代。

1.1 生物惰性陶瓷 生物惰性材料定义是指在生物体内能

- 27 Katz Y, Nadiv O, Beer Y. Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukin-1, 6 and 8 in skin and synovial fibroblasts Arthritis Rheum, 2001, 44 (9): 2176-2184.
- 28 LeGrand A, Fennor B, Fink C, et al Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E₂ production in explants of human osteoarthritic knee menisci Arthritis Rheum, 2001, 44 (9): 2078-2083.
- 29 Rowan AD, Koshy PJ, Shingleton WD, et al Synergistic effect of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown Arthritis Rheum, 2001, 44 (7): 1620-1632.
- 30 Thomas B, Thirion S, Humbert L, et al Differentiation regulates interleukin-1 beta-induced cyclo-oxygenase-2 in human articular chondro-

cytes: role of p38 mitogen-activated protein kinase Biochem J, 2002, 362 (Pt 2): 367-373.

- 31 Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, et al Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro Arthritis Rheum, 2003, 48 (9): 2501-2508.
- 32 Hegemann N, Wondimu A, Kohn B, et al Cytokine profile in canine immune-mediated polyarthritis and osteoarthritis Vet Comp Orthop Traumatol, 2005, 18 (2): 67-72.
- 33 Evans CH, Gouze JN, Gouze E, et al Osteoarthritis gene therapy Gene Ther, 2004, 11 (4): 379-389.

(收稿日期: 2006-04-13 本文编辑: 王宏)

保持稳定,几乎不发生化学反应的材料。生物惰性材料植入体内后,基本上不发生化学和降解反应,它所引起的组织反应,是围绕植入体的表面形成一层包被性纤维膜,与组织间的结合主要是靠组织长入其粗糙不平的表面或微孔中,从而形成一种物理嵌合。

1.2 生物活性陶瓷 生物活性陶瓷作为无机生物医学材料,没有毒性和不良反应,与生物体组织有良好的生物相容性,越来越受到人们的重视。生物陶瓷的研究和临床应用,已从生物惰性材料发展到生物活性材料,从简单的填充发展为牢固性种植和永久性修复。

生物活性陶瓷包括:生物反应性陶瓷(表面生物活性陶瓷)、生物降解性陶瓷。这类材料的组成中含有能够通过人体正常的新陈代谢进行转换的钙(Ca)、磷(P)等元素,或含有能与人体组织发生键合的羟基(-OH)等基团。它们的表面同人体组织可通过键性结合达到完全的亲和,或部分或完全地被人体组织吸收或取代。磷酸钙材料有与骨骼矿化物相类似的成分和结构,属于生物活性材料范畴。磷酸钙与骨组织之间是以一种自然的方式生物键合。因此在临床上,磷酸钙作为骨组织较为理想的替代材料,受到了广泛的关注。

生物活性磷酸钙陶瓷,主要指磷灰石,包括羟基磷灰石(HA)和磷酸三钙(TCP)以及双相磷酸钙陶瓷。由于磷酸钙陶瓷强度较低,目前主要用于金属材料的活性涂层和低负载的植入体或作为非承载力的修复部件或矫正小的骨缺损。

2 对大鼠成骨细胞影响效应评价方法

2.1 成骨细胞体外培养和对生物材料的评估 成骨细胞的体外培养大致经过3个阶段:快速增殖(相对未分化)、细胞外基质成熟、基质矿化。常通过使用倒置相差显微镜观察细胞的形态变化及生长状况。成骨细胞是骨发生和骨形成的重要细胞,具有合成分泌骨基质和糖蛋白的作用,并通过钙化基质形成骨组织,是骨组织修复过程中的主要功能细胞,其体外分离、培养技术已经成熟。细胞体外复合培养可直接观察细胞与生物材料复合生长的情况,能有效检测细胞生理功能的变化,有利于了解细胞与材料之间的相互作用,具有简便快捷、敏感直观、重复性好等优点。在区别生物材料对细胞影响方面,体外培养法较体内法更为敏感直接,故成骨细胞的体外培养,现已广泛应用于评估各种材料对成骨细胞的影响,以探讨不同材料与骨细胞生长和代谢的相关性,为进一步研究体内植入材料提供理论依据。

2.2 对增殖活性的影响 测定细胞增殖率可以定量反映细胞相容性,测定的方法很多:活细胞染色、细胞直接计数、MTT比色法、 $^3\text{H-TdR}$ DNA测定、蛋白质测定等。常用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)进行细胞增殖测定,MTT只和活细胞结合,从而避免了死细胞的干扰,可以间接了解成骨细胞的增殖活性。细胞计数流式细胞仪法,流式细胞仪检测复合培养一定时期后成骨细胞各个细胞周期时相的DNA比例,从分子水平分析材料对成骨细胞增殖的影响。研究中发现,大鼠成骨细胞可以在HA、BGC和钛合金表面黏附、延展和增殖,但在HA和BGC表面的成骨细胞的增殖比例和正常相似,同时要高于在钛合金表面,这说明:HA和BGC的细胞相容性要高于钛合金(Ti-6Al-4V)^[2]。谭小兵等^[3]发现,

$\text{ZrO}_2\text{-CBC}$ 与成骨细胞共同培养时,对成骨细胞无毒性作用,实验早期对成骨细胞的增殖分化无抑制作用,后期轻度抑制成骨细胞的增殖,并且对ALP的分泌也有抑制作用。而全仁夫等^[4]提出: ZrO_2 梯度复合HAP明显促进体外培养的大鼠成骨细胞增殖和分化,具有良好的生物相容性,并且认为主要原因在于该材料表面的粗糙程度。唐昭等^[5]报道,将成骨细胞分别接种于HPA(聚羟基磷酸钙钠)、HA、BGC表面,成骨细胞在HPA表面的增殖速度较对照组快。与HA相比,其最大的特点是表面具有一定的降解性,这种较大的降解性有利于材料和机体之间的物质交换。磷酸陶瓷溶解产生的钙磷对成骨细胞的增殖起重要的作用。实验表明HPA结合钙离子的能力高于HA,而局部钙离子浓度的增加,有利于成骨细胞的黏附、生长和增殖。同时材料表面的降解,更为细胞的伸入提供了位置,对形成早期的骨性结合比较有利。

2.3 对成骨活性的影响 ALP富含于胞浆中,它可使无机磷酸盐水解,从而降低磷酸盐浓度,增加局部无机磷酸浓度,促进骨的矿化,是成骨细胞分化成熟的重要标志,目前比较一致认为,该酶在体外钙化中起着关键性作用。ALP活性是成骨细胞功能的重要指标之一,可以间接反映成骨细胞的活性和功能。在成骨细胞的基质成熟期,以碱性磷酸酶活性升高及型胶原分泌为其特征,故ALP是成骨细胞分化的主要特征酶之一,是成骨细胞矿化过程中主要的功能活性酶。纳米羟基磷灰石(nHA),其作为纳米材料固有的表面效应使其表面原子存在许多悬空键,并且有不饱和性质,具有很高的化学活性,可以增加材料的生物活性和成骨诱导能力。有学者报道HA对大鼠成骨细胞ALP活性和mRNA表达提高明显高于玻璃陶瓷和钛。温波等^[6]提出,在其对照普通HA的实验中,nHA表面接种的大鼠成骨细胞的成骨功能及代谢活动均明显高于对照组。随着成骨细胞的增殖,ALP活性逐渐增强,细胞总蛋白含量和细胞基质钙含量逐渐增加。各时期nHA表面附着的成骨细胞总蛋白含量明显高于同时期相应的常规陶瓷各组蛋白含量。人体骨骼中的无机成分不是纯的HA($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$),其中还含有碳酸根、钠、镁离子,以及微量的氟、锶、钡等离子。在HA中掺入氟,可以取代磷灰石中的羟基,使含氟羟基磷灰石($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}\text{F}_x$)(FHA)晶格常数变小,其结构变得紧密,从而使FHA溶解度较HA降低^[7],紧密的结构又能使材料的强度得到提高^[8]。故认为一定量的氟能促进成骨细胞及DNA的合成。

2.4 对细胞黏附的影响 细胞黏附于细胞外基质是组织发生与形成最重要的早期阶段。在骨修复材料的研究中,成骨细胞与基质材料的黏附状况一方面与材料的生物相容性有着极为密切的关系,同时也是植入手术成功与否的关键。只有当成骨细胞与材料界面发生适当的黏附后,细胞才能进行进一步的迁移、增殖和分化。细胞外基质在细胞与材料的黏附中重要的作用,邱凯等^[2]通过聚磷酸钙(calcium polyphosphate, CPP,是一种可降解的无机聚合物),与HA、-TCP的对照研究发现,CPP能促进大鼠成骨细胞的生长,同时具有良好的细胞相容性,与成骨细胞复合后,细胞能在材料中三维生长,并能分泌出细胞外基质。体外组织化学发现,细胞与细胞外基质分子间通过配体-受体结合方式,不仅产生牢固连接,

而且是细胞锚着依赖性生长分化的基础。江宏兵等^[9]采用 FN 处理材料,发现 FN 可以增进种子细胞的黏附,而单纯的 TCP/HA 材料不能实现其与细胞的生物结合。但也有学者^[10]观察到:将转基因大鼠的骨髓间充质细胞种植于透明 HA 表面,1 h 后观察到细胞的黏附和扩展,5 h 后更加明显,细胞逐渐分化为成骨细胞。结果证实,透明 HA 陶瓷支持细胞黏附、增殖和分化。而成骨细胞 80% 以上的胞外基质蛋白都是 I 型胶原^[11],Brodie 等^[12]通过其在不同比例的 HA 和 TCP 复合物表面有无 I 型胶原涂层的对照实验中,发现大鼠成骨细胞在有 I 型胶原涂层的材料表面增殖得到加强,认为 I 型胶原涂层可以提高磷酸钙陶瓷的生物相容性,促进骨整合过程。Doldera 等^[13]也认为植入物表面形成一层具有生物活性的 HA 陶瓷涂层,可以使骨替换材料与骨形成骨键合,达到较好的植入效果。

骨基质材料的表面粗糙度不仅与植入材料在体内的力学稳定性相关,而且显著影响成骨细胞在其上的黏附、增殖和分化等特征,同时对成骨细胞的整合有重要的影响。当粗糙度大时 (>1.5 μm),有利于成骨细胞的黏附和增殖^[14]。Webster 等^[15]观察到在 HA 中添加钇元素后,增加了 HA 表面的孔隙,促进了玻璃粘连蛋白和胶原之间的相互作用,从而加强了大鼠成骨细胞的黏附。并且认为 HA 可以通过合成处理,提高细胞相容性。TCP 多孔的结构使其具有宽大的内部空间和表面积,可以容纳大量的成骨细胞,使植入局部有较高的成骨细胞浓度。有学者观察到大鼠成骨细胞可以很好地黏附于 TCP 陶瓷表面,同时细胞的增殖也没有受到影响,可以认为 TCP 有很好的细胞相容性,并对成骨细胞的增殖有一定的促进作用。曾晖等^[16]观察到 TCP 陶瓷混悬液能够刺激成骨细胞的生长,且随浓度的递增其促进效应增强。同时发现:成骨细胞与 TCP 材料结合紧密,不仅存活、黏附于陶瓷表面,还向陶瓷孔内延伸生长,其形态、数量和生物学行为均未受到抑制或干扰。我们认为在大鼠成骨细胞培养中,TCP 降解对成骨细胞生长和分化起着重要的作用,它提高了材料的表面活性,使组织细胞易于附着、延伸和扩展。

以上几个方面的研究,可以基本反映生物活性陶瓷与成骨细胞之间的相互作用,尤其是前者对后者的影响,通过对大鼠成骨细胞的生长、增殖、生物活性及黏附的观察,可以比较直观地表现出生物活性陶瓷的特点,从而为进一步的体内实验打下基础。

3 结论与展望

可以发现,生物活性陶瓷在体外与大鼠成骨细胞的复合培养中,对成骨细胞的生长、增殖、生物活性等方面具有积极的影响,但同时也发现,生物陶瓷对大鼠成骨细胞基因表达影响的相关文献还很少,也是将来的一个研究方向。生物活性陶瓷相对于金属材料 and 生物惰性陶瓷在骨科领域有着无法比拟的优势,前者作为内植物不仅与机体之间有更加良好的界

面,而且在成骨细胞的生长、增殖、功能方面更具优势,将来一定会有广泛的应用。其不仅可以喷涂于金属假体、内固定钢板表面,更可以直接作为融合器以有效促进骨的融合,甚至可以制成内固定器材加以应用。复合陶瓷的发展将会成为生物陶瓷发展的热点之一。

参考文献

- Blom EJ, Klein-Nulend J, Wolke JG, et al Transforming growth factor-beta 1 incorporation in an alpha-tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dihydrate/tetracalcium phosphate monoxide cement release characteristics and physicochemical properties *Biomaterials*, 2002, 23 (4): 1261-1268.
- 邱凯, 万昌秀, 唐昌伟, 等. 骨修复材料多孔聚磷酸钙的制备及细胞相容性研究. *航天医学与医学工程*, 2005, 18 (6): 461-464.
- 谭小兵, 吴恩格, 赵德萍, 等. 新型生物陶瓷对体外培养成骨细胞影响的实验研究. *昆明医学院学报*, 2004, 25, (1): 41-44.
- 全仁夫, 杨迪生, 苗旭东, 等. 二氧化锆梯度复合羟基磷灰石生物材料对大鼠成骨细胞体外活性的影响. *中华创伤杂志*, 2006, 22 (11): 852-857.
- 唐昭, 陈治清, 刘卫军, 等. 聚羟基磷酸钙的骨细胞相容性体外研究. *生物医学工程学杂志*, 2000, 17 (2): 122-124.
- 温波, 陈治清, 蒋引珊, 等. 纳米羟基磷灰石对成骨细胞功能代谢影响的研究. *生物医学工程学杂志*, 2005, 22 (3): 463-467.
- Wei M, Evans JH, Bostrom T, et al Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite *J Mater Sci Mater Med*, 2003, 14 (4): 311-320.
- Cavalli M, Gnappi G, Montenero A, et al Hydroxy and fluorapatite films on Ti alloy substrates: Sol-gel preparation and characterization *J Mater Sci*, 2001, 36: 3253-3260.
- 江宏兵, 吴非非, 陈伟旭, 等. 大鼠成骨细胞与 TCP/HA 支架材料复合培养的实验研究. *皖南医学院学报*, 2005, 24 (1): 61-64.
- Kotobuki N, Iku K, Kawagoe D, et al Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics *Biomaterials*, 2005, 26 (7): 779-785.
- Anselme K Osteoblast adhesion on biomaterials *Biomaterials*, 2000, 21 (7): 667-681.
- Brodie JC, Goldie E, Connel G, et al Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen *J Biomed Mater Res A*, 2005, 73 (4): 409-421.
- Doldera JVD, de Ruijter AJE, Spauwen PHM, et al Observations on the effect of BMP-2 on rat bone marrow cells cultured on titanium substrates of different roughness *Biomaterials*, 2003, 24: 1853-1860.
- 蔡玉荣, 周廉. 用作生物材料的纳米陶瓷. *稀有金属快报*, 2002, 2: 1-3.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, et al Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. Mechanisms of osteoblast adhesion *J Biomed Mater Res*, 2002, 59 (2): 312-317.
- 曾晖, 杜靖远, 郑启新, 等. 磷酸三钙陶瓷和钙离子对成骨细胞生长的影响. *中华外科杂志*, 2001, 17 (9): 806.

(收稿日期: 2007-05-30 本文编辑: 王玉蔓)