

纳米羟磷灰石/聚酰胺 66 对成骨细胞生物学作用的实验研究

叶 玲, 苏 勤, 周学东

(口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 研究新型纳米根管充填材料纳米羟磷灰石/聚酰胺 66 (nHA-PA66) 对成骨细胞的生物学作用。方法 以含 nHA-PA66 的细胞培养基 (DMEM) 浸提液作用于实验组细胞, DMEM 培养基作用于对照组细胞, 采用 MTT 比色法检测 nHA-PA66 对成骨细胞生长的影响; 酶联法检测细胞 ALP 活性的变化; QRT-PCR 测量细胞骨钙素基因表达的变化。结果 实验组细胞的相对增殖率在 98% ~ 106% 之间, 且无量效关系, 实验组与对照组间无显著性差异 ($P > 0.05$); 实验组和对照组细胞的 ALP 活性及骨钙素基因表达相似, 皆无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 nHA-PA66 对成骨细胞的生长和功能无不良影响, 具有骨细胞相容性。

[关键词] 纳米羟磷灰石/聚酰胺 66; 实时定量 PCR; 成骨细胞

[中图分类号] R 781.31 **[文献标识码]** A

Biological Effects of Nano-hydroxyapatite/ Polyamide 66 on the Osteoblast YE Ling, SU Qin, ZHOU Xue-dong. (Key Lab. of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective To evaluate the biological effects of nano-hydroxyapatite/polyamide 66 (nHA-PA66) on the growth and activity of osteoblast. **Methods** MTT assay was used to determine the growth of osteoblast, enzymatic measure was used to determine the activity of ALP and quantitative RT-PCR (QRT-PCR) to evaluate the changes of osteocalcin mRNA expression in osteoblasts treated by DMEM eluate of nHA-PA66. **Results** Osteoblasts of different test groups demonstrated relative proliferation rate ranging from 98% ~ 106% without dose-dependent effect. The ALP activity and osteocalcin mRNA expression were similar in test and control groups ($P > 0.05$). **Conclusion** nHA-PA66 has no negative effects on the osteoblast and its osteoblast-compatibility is proved.

Key words nano-hydroxyapatite/polyamide 66; quantitative reverse transcriptase-PCR; osteoblast

新型纳米羟磷灰石/聚酰胺 66 复合材料 (nano-hydroxyapatite/polyamide 66, nHA-PA66) 由纳米羟磷灰石和聚酰胺 66 组成, 具有与人牙、骨相似的晶体结构和力学性能¹。研究²证明, nHA-PA66 对标准化的生物相容性筛查实验反应良好, 具有用于根管充填的基本理化性能, 还具有骨传导性和骨诱导活性。本实验拟检测 nHA-PA66 对成骨细胞生长和功能的影响, 采用实时定量 PCR (quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, QRT-PCR) 监测该材料对成骨细胞骨钙素 (osteocalcin, OC) 基因表达的作用, 从蛋白质和分子水平了解 nHA-PA66 对成骨细胞功能的影响, 评价其骨细胞相容性, 并阐明其骨诱导性的可能细胞机制, 希望开发出满足根管治疗要求的更好充填材料, 开拓 nHA-PA66 用于牙髓治疗的新前景。

1 材料和方法

1.1 主要实验试剂及仪器

nHA-PA66 由四川大学纳米生物材料研究中心提供, 分为粉、液两组分, 使用时按 1:1.5 调和至糊状; 细胞培养基 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media)、10% 小牛和胎牛血清、胰蛋白酶皆为美国 Gibco 公司产品; Trizol Total RNA Isolation Reagent (Life Technologies 公司, 美国); LightCycler-RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche 公司, 德国); 骨钙素上、下游引物 (上海 GeneCore 公司); CO₂ 细胞培养箱 (Forma Scientific 公司, 美国); DG3022A 型酶联仪 (中国国营华东电子仪器厂)。

1.2 nHA-PA66 浸提液制备

采用细胞培养基 DMEM 制备 nHA-PA66 的浸提液。将聚合粉碎后的 nHA-PA66 经常规高温高压消毒灭菌, 分别取 10 g、5 g、2.5 g 加入 50 ml 细胞培养基 DMEM 中, 制备成浓度为 200 g/L、100 g/L 以及

[收稿日期 2004-05-13; 修回日期 2004-10-27]

[基金项目] 四川省科委重点资助项目 (02SC022-001)

[作者简介] 叶 玲 (1975-), 女, 重庆人, 讲师, 博士

[通讯作者] 周学东, Tel: 028-85501439

50 g/L 的浸提液。振荡混匀后在细胞培养孵箱中 37℃ 放置 3 d,离心取上清液备用。

1.3 成骨细胞培养及细胞悬液的制备

取生长稳定的第 5 代人胚成骨细胞,经 0.25 %胰酶消化后进行细胞计数,用 DMEM 培养基配成所需细胞浓度的细胞悬液。

1.4 四唑盐比色法 (methyl thiazolil tetracolum, MTT)

按 5×10^3 个/孔将成骨细胞接种于 96 孔细胞培养板中,将细胞分为实验组和对照组,对照组为 DMEM 培养基(含 10 %小牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素),实验组又分为 A、B、C 3 组,分别加 200 μ l nHA-PA66-DMEM 浸提液(A 组浓度 200 g/L, B 组为 100 g/L, C 组为 50 g/L,实验组皆含 DMEM 培养基),每组复种 3 孔,在 5 %CO₂、95 %空气、37℃、饱和湿度的细胞培养箱中培养。培养 3、6、9、12 d 后在每孔中加入 20 μ l 5 g/L 的 MTT, 4 h 后终止反应, PBS 清洗 2 遍,每孔加入 200 μ l 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO),轻轻振摇 10 min,在 490 nm 波长下测定每孔的 OD 值,取 3 孔均值。并按下列公式计算细胞相对增殖率:细胞相对增殖率 = 实验组 OD 值/相应的对照组 OD 值 $\times 100$ %。

1.5 碱性磷酸酶(alkaline phosephatase, ALP) 测定

以 2×10^4 个/孔将成骨细胞接种于 24 孔板中,将细胞分为实验组和对照组,实验组加入 200 g/L 的 nHA-PA66 DMEM 浸提液,对照组加入 DMEM 培养基,每孔 2ml 液体。每隔 2 d 进行全量换液,培养 10 d,收集细胞,加入 0.05 %Triton 2 ml,超声震荡粉碎细胞膜,收集细胞裂解产物。采用酶联法检测 ALP 量,每孔加入 100 μ l 标准碱性磷酸酶底物,空白孔为 pH 8.8 的 Tris 缓冲液,37℃ 水浴半小时,加入 0.4 %NaOH 终止反应,在 410 nm 波长处测定 OD 值,经与标准曲线比较得到酶的含量。

1.6 骨钙素 mRNA 的实时定量 PCR 检测

以 1.25×10^5 个/瓶将细胞接种于 25 cm² 细胞培养瓶中,细胞同步化后,将细胞分为实验组和对照组,实验组加入 nHA-PA66 DMEM 浸提液 5 ml,对照组加入 DMEM 培养基,待细胞长至汇合后再培养 10 d,以 0.25 %胰蛋白酶消化,离心收集细胞于经 DEPC 水预处理的 1.5 ml 离心管中。

1.6.1 引物 根据 Bilbe 等³ 报道设计的骨钙素引物,内对照基因选用 β -actin,引物序列及扩增产物大小见表 1。

1.6.2 细胞总 RNA 的提取 采用 Life 公司的 Trizol 试剂盒按照说明提取细胞总 RNA,用 RNAase free 水溶解部分 RNA,在 UV-1601PC 型分光光度仪上测定 OD₂₆₀、OD₂₈₀,计算总 RNA 的量。剩余 RNA 溶入

RNAase free 水中,置于-70℃ 备用。

表 1 骨钙素引物序列及扩增物大小

| Tab 1 Primer of osteocalcin and the product size | | |
|--|--|------------|
| 基因名称 | 引物 | 扩增产物大小(bp) |
| 骨钙素 | ATG,AGA,GCC,CTC,ACA,CTC,CTC CTA,GAC,CGG,GCC,GTA,GAA,CGG | 303 |
| β -actin | TAA,TAG,TCA,CTC,CAA,GTA,TC GAA,GGT,GGG,GTA,TTT,GTG,AG | 535 |

1.6.3 RT-PCR 反应 采用 Roche 公司的 LightCycler-RNA Amplification Kit SYBR Green I 进行 RT-PCR 反应,反应条件为:55℃,10 min;95℃,30 s;60℃,2 min;72℃,2 min;共 40 个周期。每个样本复做 3 例,经 LightCycler data analysis (LCDA) 软件 3.5.28 分析得到数据,求均数。

1.7 统计分析

MTT 值、碱性磷酸酶活性及 QRT-PCR 结果采用单因素方差分析,相对细胞增殖率采用 t^2 检验。

2 结果

2.1 MTT 值

实验组和对照组不同时间的 MTT 值及相对增殖率见表 2,从表 2 结果可见,在 nHA-PA66 的浸提液作用下,实验组成骨细胞的相对增殖率均在 98 %以上,实验组的 MTT 值之间及它们与对照组间皆无显著性差异($P > 0.05$)。

表 2 实验组和对照组不同时间的 MTT 值及相对增殖率($n = 3$)

| Tab 2 MTT value and the relative proliferation ratio of test and control at different time($n = 3$) | | | | |
|---|--------------------|--------------------|------------------|------------------|
| 分组 | MTT 值(相对增殖率) | | | |
| | 3 d | 6 d | 9 d | 12 d |
| A 组 | 0.328 (101.5 %) | 0.428 (101.3 %) | 0.569 (101 %) | 0.609 (99 %) |
| B 组 | 0.317 (98 %) | 0.435 (103 %) | 0.597 (106 %) | 0.633 (103 %) |
| C 组 | 0.315 (98 %) | 0.416 (98 %) | 0.561 (99 %) | 0.649 (105 %) |
| 对照组 | 0.323 | 0.423 | 0.565 | 0.616 |

2.2 ALP 活性值

实验组成骨细胞 ALP 活性(127.48 ± 1.27) u/L,对照组为(128.23 ± 1.01) u/L,两者无显著性差异($P > 0.05$),表明 nHA-PA66 浸提液对成骨细胞碱性磷酸酶的活性无显著性影响。

2.3 OC mRNA 的 QRT-PCR 结果

实验组 OC 拷贝数的对数值为 4.46 ± 1.20 。对照组为 4.44 ± 1.55 ,两组 OC mRNA 表达水平无统计学显著性差异($P > 0.05$),说明 nHA-PA66 浸提液对成骨细胞骨钙素基因表达无不良影响。

3 讨论

根充材料充填根管后,通过根尖孔与根尖周组织接触,因此,采用体外培养的人成骨细胞反应评价根充材料的生物相容性,可准确的反映材料对机体的影响。成骨细胞的主要功能是合成和分泌有机类骨基质⁴,参与调节骨质矿化。细胞与材料的相互作用可影响细胞的生长和功能,材料对细胞生长的影响可通过细胞增殖能力的变化直接反映;细胞功能的变化可由特异性的酶活性或蛋白、基因表达改变体现,而骨钙素和 ALP 可以作为成骨细胞活性的标记物⁵。

由于细胞对材料表面和对培养孔板底部的粘附性有差异,因此在对成骨细胞的生物学行为进行研究时,使用了材料的浸提液,这样排除了在各项指标检测时,由于细胞洗脱率的不同而导致的干扰,从而更客观的评价材料对细胞的作用,而且以材料的浸提液代替材料本身在材料学的研究中已得到公认⁶。

MTT 法是常用的细胞增殖能力检测方法⁷。实验组的 MTT 值之间及它们与对照组间无显著性差异,实验组的细胞相对增殖率在 98%~106%,表明 nHA-PA66 DMEM 浸提液对成骨细胞的生长有轻微的促进作用,但不显著,且不存在量效关系。因此在对细胞的功能进行分析时,仅选用最高浓度浸提液作为实验组进行分析比较。nHA-PA66 对成骨细胞生长的轻微促进作用,可能与其中的钙、磷含量较高有关,因为前期研究显示该材料的 Ca/P 约为 1.96²,高于正常骨组织中的比例。但是否还有其他可溶出成分对成骨细胞有增强作用,尚待进一步的研究。

本实验采用酶联法对成骨细胞 ALP 的表达进行检测,结果表明实验组 ALP 的表达量与对照组相比无显著性差异,说明 nHA-PA66 对成骨细胞的功能酶没有显著性促进作用,但对其表达也无不良影响。

分子水平的变化较蛋白质的变化更早期、更敏感⁸,本实验采用 QRT-PCR 方法,检测 nHA-PA66 对成骨细胞骨钙素 mRNA 表达的影响。QRT-PCR 最早由 Chelly 等⁹于 1988 年报道,本实验以 SYBR Green I 作为探测示踪物,采用 LightCycler 系统,逆转录、PCR 反应和结果的分析一次完成,均为闭管操作,避免了常规 RT-PCR 方法中多步人为操作引起的误差。与常规的 RT-PCR 相比,实时 RT-PCR 的主要优点在于:可在较大的动力学范围内测定核酸分子浓度,进行高灵敏度、大容量的并行操作。

本实验所用的 RNA 样本 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.8~2.0 之间,纯度在正常范围内。所有的检测样本采用同样的实验条件,且每个样本均同时进行看家基

因——即内对照(β -actin)的扩增,样本的降解率和 RT-PCR 过程中的差异可与同一样本的内对照基因的扩增情况比较而校正。本实验结果显示实验组与对照组的表达量无显著性差异($P > 0.05$)。在目前的实验阶段,nHA-PA66 并未表现出促进成骨细胞骨钙素基因表达的作用,这可能与该材料不含有能促进骨钙素 mRNA 表达的物质有关。

由本实验的结果可以看出,nHA-PA66 对人胚骨膜性成骨细胞的生长仅有轻度促进作用,而在蛋白质和分子水平均未表现出对成骨细胞功能的增强作用,目前的数据不足以支持 nHA-PA66 通过作用于已分化的成骨细胞而起到骨形成促进作用。但骨形成本身是一个复杂的过程,除了对已分化的成骨细胞的影响外,促进骨髓间充质细胞向成骨细胞的分化,增加局部成骨细胞的数量等也可能是 nHA-PA66 骨传导性和诱导性的机制。nHA-PA66 表面具有孔隙状结构²,所形成的类似于自然骨、牙中的纳米羟磷灰石晶体有较大的表面积,可为周围组织细胞的沉积提供基质类环境;其高含量钙磷的释放,可形成适合骨形成的微环境,因此有必要对该材料的生物活性进行更深入的研究。虽然本实验未证明 nHA-PA66 对成骨细胞显著的促生长和分化功效,但证明了其具有成骨细胞相容性,就细胞水平而言,该材料用于根管充填时对根尖周组织造成刺激的可能性小,具有可行性。

[参考文献]

- 1] 严永刚,李玉宝,汪建新,等.聚酰胺 66/羟磷灰石复合材料的制备和性能研究J. 塑料工业,2000,28(3):38-40.
- 2] 王学江,李玉宝.羟基磷灰石纳米针晶与聚酰胺仿生复合生物材料研究J. 高技术通讯,2001,11(5):1-5.
- 3] Bilbe G, Roberts E, Birch M, et al. PCR phenotyping of cytokines in human osteoblast-like cell linesJ. Bone, 1996, 19(5):437.
- 4] Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, et al. Differentiation of osteoblast and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cellJ. Tissue Eng, 2001, 7(1):89-99.
- 5] 张兴凯,杨庆铭,邓廉夫,等.成人成骨细胞体外培养J. 中华外科杂志,2000,38(1):51-54.
- 6] Ersev H, Schmalz G, Bayirli G, et al. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells *in vitro*J. J Endod, 1999, 25(5):359-363.
- 7] 鄂征主编.组织培养和分子细胞学技术M. 北京:北京出版社,1995:21.
- 8] 张真,卢晓风.生物材料有效性和安全性评价的现状和趋势J. 生物医学工程杂志,2002,19(1):117-121.
- 9] Chelly J, Kaplan JC, Maire P, et al. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissueJ. Nature, 1988, 333(6176):858-860.

(本文编辑 汤亚玲)