

[文章编号] 1000-1182(2008)01-0101-04

磷灰石-多孔纤维素复合物与成骨细胞相容性的研究

叶咏梅¹, 李全利², 陈治清¹

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2.材料先进技术教育部重点实验室, 西南交通大学, 四川 成都 610000)

[摘要] 目的 制备磷灰石-多孔纤维素复合物, 评价该复合物的细胞相容性。方法 通过化学修饰将磷酸根接枝于天然多孔纤维素玉米芯表面, 经预矿化处理后, 在模拟体液中进行仿生矿化, X线衍射检测磷灰石-多孔纤维素复合物表面磷灰石微晶的形成, 扫描电镜(SEM)观察复合物表面形貌。体外分离培养扩增乳鼠颅盖骨成骨细胞, 经传代培养作为种子细胞接种于复合物表面进行培养。采用MTT和碱性磷酸酶(ALP)活性检测及SEM观察细胞在复合物表面生长、增殖与分化情况。结果 仿生矿化后玉米芯表面形成了磷灰石晶体。成骨细胞在磷灰石-多孔纤维素复合物表面吸附、铺展, 具有较好的增殖及合成ALP的能力。结论 磷灰石-多孔纤维素复合物与成骨细胞具有良好的相容性, 在仿生构建骨再生材料方面具有潜在的价值。

[关键词] 仿生矿化; 磷灰石; 纤维素; 细胞相容性

[中图分类号] R783.1 [文献标识码] A

Preparation and cytocompatibility of apatite-porous fibers composite YE Yong-mei¹, LI Quan-li², CHEN Zhi-qing¹. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Advanced Technologies of Material, Ministry of Education, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610000, China)

[Abstract] Objective The purpose of this article was to prepare apatite-porous fibers composite through biomimetic synthesis and to investigate its cytocompatibility. Methods Phosphate groups were incorporated into the surface of natural porous fiber-corncob by chemical modification. After precalcification, corncob was immersed into simulated body fluid. The surface of composite was observed through scanning electron microscope(SEM) and X-ray diffraction. Infant rat calvarias osteoblasts were isolated and expanded in vitro and the cells were seeded onto composite. Osteoblasts growth, proliferation and differentiation were assessed through SEM, MTT and alkaline phosphatase(ALP). Results Apatite crystal was formed on the surface of corncob after reaction. Cell adhered and spread well on the surface of the composite, having high abilities of proliferation and synthesis of ALP. Conclusion There is good compatibility between the osteoblast and apatite-porous fibers composite. This composite may serve as a potential biomaterial used in bone repair and regeneration.

[Key words] biomimetic mineralization; apatite; fiber; cytocompatibility

许多三维结构的生物材料已经用于骨组织工程中修复缺失硬组织的形态和功能^[1-3], 包括大分子、生物陶瓷、金属材料以及它们的复合物等。这些材料虽然可用作骨替代材料, 但由于其自身的局限性, 目前有一种材料能完全地替代活组织。大量的研究仍集中在寻找更完善的生物材料上。研究^[4]显示, 木材和竹子等显示出较好的生物相容性以及

与人骨相近的机械性能, 尤其是其纤维排列方向的弹性模量与人类长骨接近。玉米芯的化学组成与木材竹子等相似, 主要由纤维素组成, 其中纤维素排列成多等级三维多孔结构, 孔隙完全相通。

仿生矿化是一项特定条件下合成新型生物材料的重要技术, 其要点在于首先对基质材料进行功能化处理, 随后浸泡到仿生体液中。本研究采用仿生矿化法对玉米芯进行处理, 合成磷灰石-多孔纤维素复合物, 将其与成骨细胞复合培养, 评价其细胞相容性, 为仿生矿化合成天然多孔骨修复材料提供实验基础。

[收稿日期] 2007-06-21; [修回日期] 2007-09-05

[基金项目] 教育部新世纪优秀人才基金资助项目(NCET-06-0782)

[作者简介] 叶咏梅(1973-), 女, 重庆人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 叶咏梅, Tel: 028-85503467

1 材料和方法

1.1 玉米芯表面修饰

将玉米芯垂直于长轴切成1.5 mm厚片, 去除芯髓, 室温下用体积分数为100%乙醇提纯2周。采用Li等^[5]报道的方法进行磷酸化反应: 将5.0 g提纯烘干的样本用质量分数为10%NaOH溶液处理10 min, 纯乙醇及去离子水彻底冲洗。然后置于含体积分数为7.8% H_3PO_4 的DMF液中加热到154℃, 反应持续30 min。整个反应在氮气的保护下, 在一个装有温度计、机械搅拌器、冷凝回收装置的圆底瓶中进行, 反应完成后, 去离子水冲掉表面未反应的磷酸。

1.2 玉米芯仿生矿化

将1.0 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶解于300 mL去离子水中, 室温下搅拌1 h, 静置1 h, 取上清液过滤制备成饱和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液。首先将磷酸化处理过的玉米芯浸泡于该溶液中进行预矿化, 然后将预矿化后的样本浸泡于仿生体液中, 其离子浓度为 Na^+ 142.0、 K^+ 5.0、 Mg^{2+} 1.5、 Ca^{2+} 2.5、 Cl^- 148.8、 HCO_3^- 4.2、 HPO_4^{2-} 1.0、 SO_4^{2-} 0.5 mmol/L, pH值为7.0, 整个浸泡过程在37℃水浴中完成。分别于矿化7、14、21 d时取出样本, 冲洗干燥, X线衍射检测磷灰石-多孔纤维素复合物表面磷灰石微晶的形成, 并利用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察样本表面形貌。

1.3 复合物与成骨细胞的作用

1.3.1 成骨细胞与复合物的共同培养 取新生SD大鼠的颅盖骨, 首先去尽骨膜等软组织, 置于乙醇及双抗液浸泡。然后将颅盖骨剪成组织块, 均匀涂布于25 mm的培养瓶内, 加入培养液(F12加体积分数为20%小牛血清)培养, 6 h后置入37℃、体积分数为5% CO_2 的培养箱内常规培养, 体积分数为0.25%胰蛋白酶常规消化传代。将矿化21 d的玉米芯(实验组)及未经矿化处理的空白玉米芯(对照组)干燥, 环氧乙烷消毒。

第3代成骨细胞悬液以每毫升 4×10^4 个密度接种于含有矿化21 d样本及空白玉米芯的24孔培养板中, 每孔加入细胞悬液1 mL, 然后置于培养箱中孵育, 4 h后每孔补充培养液2 mL, 常规培养, 每2 d更换一次培养液。

1.3.2 MTT检测 分别于接种后1、3、5、7 d进行MTT检测。将玉米芯从培养孔中取出, 在PBS液中轻轻清洗3次, 置于新的培养板中, 每孔加入培养液1 000 μL 以及MTT 40 μL , 培养箱中继续培养4 h, 然后吸弃培养液, 加650 μL 二甲基亚砜, 摇床上振荡30 min, 每孔取200 μL 至96孔板内, 选择490 nm

波长在分光光度仪测定各孔光密度值, 每组测量3孔。

1.3.3 碱性磷酸酶活性(alkaline phosphatase, ALP)检测 采用测定细胞培养液中碱性磷酸酶表达水平的方法进行。精确量取第7天培养孔中的培养液, 按试剂盒中的说明步骤进行, 选择496 nm波长在分光光度仪测定各孔光密度值, 每组测量3孔, 结果用SPSS 11.0统计软件进行t检验分析。

1.3.4 扫描电镜观察 将矿化21 d并与细胞培养7 d的材料置于体积分数为5%戊二醛液中固定1 h, 梯度乙醇脱水, 临界点干燥, 镀膜机内喷金, 扫描电镜观察磷灰石-多孔纤维素复合物表面形貌。

2 结果

2.1 仿生矿化后玉米芯X线衍射检测结果

不同矿化周期的玉米芯X线衍射光谱见图1, 仿生矿化7 d, 2 θ 为26°、32°、39°时出现较弱但明显的峰, 提示已有少量低结晶度的磷灰石晶体形成。仿生矿化14 d, 各磷灰石特征峰变得窄而强, 玉米芯表面沉积的磷灰石数量逐渐增多, 结晶度也更高。仿生矿化21 d与14 d相比, X线衍射峰型无明显变化。

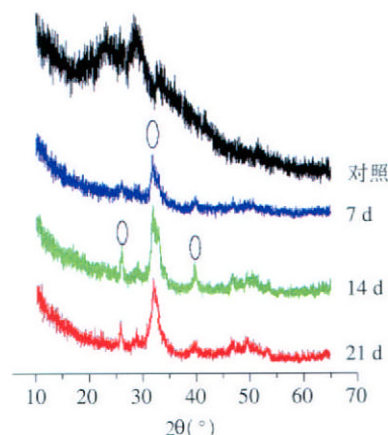


图1 仿生矿化处理后玉米芯X线衍射图谱

Fig 1 Diffraction of X-ray of corncob after biomimetic mineralization treatment

2.2 仿生矿化后玉米芯表面形貌

图2是扫描电镜放大250倍条件下未经处理的玉米芯表面形貌, 可以看到玉米芯具有开放网状结构, 纤维排列成大孔套小孔的多孔等级结构, 孔隙之间相通, 孔隙率较高, 分布均匀, 孔径20~250 μm , 孔壁上有许多尺寸较小的微孔。图3是仿生矿化21 d后玉米芯的扫描电镜照片, 图中显示仿生矿化后, 玉米芯表面被矿化晶体完全覆盖, 晶体由片层结构交错排列成珊瑚状, 表面呈多孔网格结构。片层的厚度小于0.20 μm , 平均长度和宽度约为6.76 μm 和2.50 μm , 晶体涂层平均厚度为30 μm 。

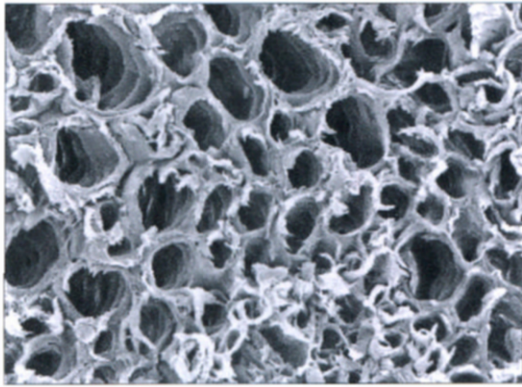


图2 未经矿化处理的玉米芯表面形貌 扫描电镜 $\times 250$
Fig 2 Original corncob without biomimetic mineralization treatment SEM $\times 250$

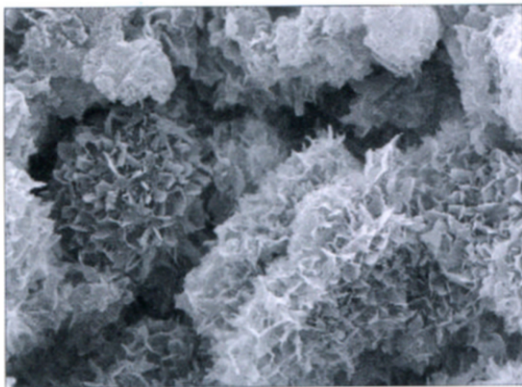


图3 仿生矿化21 d后的玉米芯表面形貌 扫描电镜 $\times 1500$
Fig 3 Corncob with biomimetic mineralization treatment of 21 days SEM $\times 1500$

2.3 复合物与成骨细胞共同培养的作用

2.3.1 成骨细胞增殖与分化 成骨细胞在玉米芯复合物表面增殖的光密度值见表1。从表1可以看出,实验组与对照组两组光密度值随培养时间延长而增大,培养各时段实验组光密度值均高于对照组,差别有统计学意义($P < 0.05$)。培养第7天时,实验组ALP光密度值 0.139 ± 0.008 高于对照组 0.087 ± 0.011 ,显示细胞在仿生矿化复合物上较强的增殖与分化能力。

表1 成骨细胞在玉米芯复合物表面增殖的光密度值
($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Optical density value of proliferation of osteoblasts on the surface of corncob composite ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	光密度值			
	第1天	第3天	第5天	第7天
实验组	0.125 ± 0.002	0.173 ± 0.006	0.298 ± 0.004	0.386 ± 0.007
对照组	0.076 ± 0.003	0.094 ± 0.005	0.112 ± 0.001	0.152 ± 0.004

2.3.2 扫描电镜观察 与成骨细胞培养7 d后的复合物表面形貌见图4。由图4可见,成骨细胞已在材料表面完全铺展,细胞之间伸出伪足互相连接,形成

网状结构,细胞形态扁平,呈多角形或梭形,排列较为紧密,表面光滑,有多个长条状角,与材料紧密结合。有的细胞已长入矿化颗粒下面,与材料之间分界不清。所有细胞密集成层状排列,生长状况良好。

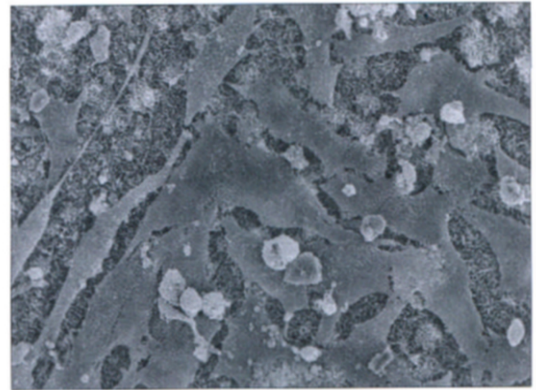


图4 在复合物表面培养7 d后,成骨细胞生长良好 扫描电镜 $\times 500$

Fig 4 Osteoblasts grew well on the surface of composite after 7 d incubation SEM $\times 500$

3 讨论

骨缺损再生的关键是在修复区有足够的骨母细胞和理想的细胞载体,以促进成骨细胞的增殖和分化。生物材料的目的是为细胞提供理想的细胞外基质环境。木材、竹子等天然纤维用作生物材料的研究已有报道。研究人员对它们的解剖结构、化学组成、机械特性、生物学特性等方面进行了研究,发现它们在结构、机械特性上表现出与人类长骨相似的特性,特别是竹子具有较高的强度和韧性。玉米芯的化学组成和结构与竹子相似,同时它是由一系列大小不等的孔隙组成,孔隙相通,便于营养物质的传递及新骨的长入。

天然的生物矿化组织都是由生物大分子和无机矿物质组成的复合材料,合成生物材料的关键点之一是在其表面诱导磷灰石形成。在天然矿化组织的无机相进化中,磷酸钙盐是自然选择的结果。另外,磷酸根离子与 Ca^{2+} 的结合能力也大于碳酸根离子和 OH^- 。因此在基质材料表面引入磷酸根离子,诱导磷灰石的仿生沉积,是目前生物材料仿生矿化的一个重要思路。本研究引入含磷酸根的单体到玉米芯表面进行聚合反应,对天然纤维进行表面改性^[6-7],NaOH处理能打破纤维素分子之间的范德华力及氢氧键,可以使更多的纤维素暴露于磷酸中,纤维素表面接枝磷酸根离子后,对 Ca^{2+} 的捕获能力进一步加强,而具有较强的 Ca^{2+} 捕获和交换能力是硬组织替代材料具有生物活性的一个重要标志,也是仿生矿化沉积磷灰石的首要步骤。在纤维素材料

浸入模拟体液之前,将基质材料首先浸入饱和的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 中预处理,这样材料表面的 Ca^{2+} 浓度增加,使磷灰石晶体异相成核所需的局部过饱和度得到充分保障,从而降低磷灰石成核的能量阈值。另一方面,磷酸化材料表面常呈酸性,通过预矿化处理,可提高其pH值而有利于矿化。

采用亚稳定的钙磷过饱和液作为仿生矿化反应的介质,是目前合成生物材料的一种重要方法,特别是模拟体液介质应用最为广泛。本研究将模拟体液的pH值从常用的7.4调为7.0,这样的pH值对矿化的影响不大,有利于溶液的稳定,从而提高了实验的可靠性。有研究^[9]表明,在 Ca^{2+} 浓度为2.0 mmol/L, pH=7.0时,磷灰石晶体即可在Ti表面沉积。模拟体液不稳定,本实验观察到溶液变得不透明时,则重新配置溶液,因为这时溶液已经发生了同相成核作用,再在固体表面诱导异相成核机会很少,所以保持溶液的稳定性是实验成功的关键。

组织工程研究工作中常采用体外细胞培养的方法评价细胞与材料界面的反应状况,即将细胞置于材料表面,在细胞培养条件下检测细胞黏附、扩散、生存、功能和死亡等指标。体外细胞培养法具有简便、快速、敏感性高及缩短生物材料研究周期等优点。本研究将成骨细胞与磷灰石-多孔纤维素复合物培养,观察细胞在复合物上的生长、增殖和分化情况。MTT及ALP检测表明细胞在复合物表面呈较旺盛的增殖状态,分化良好。SEM观察显示成

骨细胞在复合物表面良好地铺展,与材料紧密结合,较多数量的细胞形成细胞层,形态正常。结果提示实验得到的磷灰石-多孔纤维素复合物与成骨细胞表现出较好的亲和性,有利于细胞的附着、增殖与分化。

[参考文献]

- [1] Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials[J]. Science, 1994, 263(5154):1715-1719.
- [2] Griffith LG. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 961(1): 83-95.
- [3] Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials[J]. Science, 2002, 295(5557):1014-1017.
- [4] Li SH, Liu Q, de Wijn J, et al. In vitro calcium phosphate formation on a natural composite material, bamboo[J]. Biomaterials, 1997, 18(5):389-395.
- [5] Li S, Liu Q, de Wijn J, et al. In vitro apatite formation on phosphorylated bamboo[J]. J Mater Sci Mater Med, 1997, 8(9):543-549.
- [6] Mucalo MR, Yokagawa Y, Toriyama M, et al. Growth of calcium phosphate on surface-modified cotton[J]. J Mater Sci Mater Med, 1995, 6(6):597-605.
- [7] Mucalo MR, Yokogawa Y, Suzuki T, et al. Further studies of calcium phosphate growth on phosphorylated cotton fibers[J]. J Mater Sci Mater Med, 1995, 6(6):658-669.
- [8] Feng QL, Cui FZ, Wang H, et al. Influence of solution conditions on deposition of calcium phosphate on titanium by NaOH treatment[J]. J Crystal Growth, 2000, 210(4):735-740.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第100页)

呈整体一致性的恢复。

本研究结果表明,24 h内乳猪肢体牙痕处淤斑变化没有明显规律,牙凹痕处三维形态变化迅速,提示在实际案件中应及早尽快地搜集咬痕证据;利用三坐标机可对牙痕进行三维测量和分析,提示在未来的法齿学中可以通过搜集牙凹痕轮廓和疑犯牙列的三维空间数据,并进行精确对比,以提高咬痕分析鉴定的准确性^[7-8]。

[参考文献]

- [1] 吴珪华,陈新民,侯睿.乳猪肢体牙痕损伤模型的建立[J].华西口腔医学杂志,2007,25(增刊):13-14.
WU Jun-hua, CHEN Xin-min, HOU Rui. Research of model for toothmark damage in porket limb[J]. West China J Stomatol, 2007, 25(Suppl):13-14.
- [2] 赵云凤,叶德临.不同年龄正常牙力值的测定[J].华西医科大学学报,1994,25(4):414-417.
ZHAO Yun-feng, YE De-lin. Measurement of biting force of normal teeth at different ages[J]. J West China Univ Med Sci,

1994, 25(4):414-417.

- [3] Harvey W. Dental identification and forensic odontology[M]. London: Henry Kimpton, 1976:91-92.
- [4] Vale GL, Noguchi TT. Anatomical distribution of human bite marks in a series of 67 cases[J]. J Forensic Sci, 1983, 28(1):61-69.
- [5] Pretty IA, Sweet D. Anatomical location of bitemarks and associated findings in 101 cases from the united states[J]. J Forensic Sci, 2000, 45(4):812-814.
- [6] 曾衍钧,许传青,杨坚,等.软组织的生物力学特性[J].中国科学(G辑),2003,33(1):1-5.
ZENG Yan-jun, XU Chuan-qing, YANG Jian, et al. Biomechanics of soft tissue[J]. Science China(Series G), 2003, 33(1):1-5.
- [7] van der Velden A, Spiessens M, Willems G. Bite mark analysis and comparison using image perception technology[J]. J Forensic Odontostomatol, 2006, 24(1):14-17.
- [8] Blackwell SA, Taylor RV, Gordon I, et al. 3-D imaging and quantitative comparison of human dentitions and simulated bite marks[J]. Int J Legal Med, 2007, 121(1):9-17.

(本文编辑 汤亚玲)