# 新型纳米仿生骨植入材料的生物相容性的初步研究

陈建洪[1], 唐 倩[1], 田 词[1], 梁焕友[1], 陈 晓[2], 吴 刚[2]
(1.中山大学附属第三医院口腔科,广东 广州 510630; 2.华南理工大学材料学院生物材料研究所,广东 广州 510060)

**摘 要**:【目的】研究新型纳米仿生骨植入材料的生物相容性。【方法】采用骨髓基质细胞体外培养技术,通过MTT法检测细胞相对增殖度,对材料的细胞毒性进行分级评价,并采用直接接触培养法,观察细胞在材料上的黏附与散布。【结果】材料的细胞毒性分级在0~1之间,骨髓基质细胞可紧密附着于材料表面,黏附生长,并有突起向材料的连通微孔内伸展。【结论】新型纳米仿生骨植入材料对骨髓基质细胞无毒性作用,符合医用生物材料的安全要求。

**关键词**: 仿生; 复合材料; 骨髓基质细胞; 浸提液; 生物相容性
**中图分类号**: R78 **文献标识码**: A **文章编号**: 1672-3554(2008)05-0629-04

**Preliminarily Study of Novel Bionic Scaffold with Nanostructure: Biocompatibility in Vitro** // CHEN Jian-hong[1], TANG Qian[1], Tian Ci[1], LIANG Huan-you[1], Chen Xiao-feng[2], WU Gang[2] (1.Department of Stomatology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2.Institute of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510060, China)

**Abstract**: 【Objective】 To study the biocompatibility of novel bionic scaffold with nanostructure in vitro. 【Methods】 Marrow stroma cells (MSC) were cultured with extracting solution of the novel bionic scaffold. Cell relative growth rate (RGR) measured by MTT methods was used as a quantitative assessment for cytotoxicity of the biomaterials. Adherency and spreading of MSCs on the surface of specimen, using direct contact cultivation, was observed by SEM. 【Results】 The toxicity gradation of the novel bionic scaffold ranked from grade 0 to grade 1. MSCs attached and then adhered firmly on the surface of the biomaterials, and proliferated rapidly. Obvious cell prominencies stretched into the micro-pores structure. 【Conclusion】 The results suggest that the novel bionic scaffold have no cytotoxicity to MSCs and accord with the security standards of medical biomaterials.

**Key words**: bionic; composites; bone marrow stromal cells; extract liquid; biocompatibility
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2008,29(5):629-632]

新型生物材料的生物相容性是影响其临床应用的主要因素,材料的孔径形状、大小以及孔隙率对引导细胞的附着、侵润和生长有着重要的作用[1,2],由于本实验材料需要植入体内与骨组织紧密接触,因此材料的骨细胞相容性是本研究的主要内容。本实验采用骨髓基质细胞的体外培养技术对新研制的新型纳米仿生骨植入材料(PHBV/SGBG)进行了初步评价,为今后进一步的研究提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

新型纳米仿生骨植入材料:3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸共聚物/溶胶-凝胶生物活性玻璃 [poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/ sol gel bioactiveglass,PHBV/SGBG](华南理工大学材料学研究所提供)。

主要仪器和设备:医用超净工作台、$CO_2$培养箱、台式离心机、酶联免疫检测仪、倒置相差显微镜(中山三院中心实验室提供);XL-30/DX-4I 扫描电镜/能谱分析仪(PHLIPS)(信息产业部电子五所国防科技重点实验室提供)。

主要试剂和材料:DMEM培养液(Gbico)、胎牛血清(Sigma)、胰蛋白酶(PAA)、MTT(Gbico)等(购自晶美生物制品公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 PHBV/SGBG材料的扫描电镜观察 常规干燥、表面喷金,进行SEM检查,直接观察材料的结构、多孔形态、孔径和孔的贯通性。

1.2.2 PHBV/SGBG材料的孔隙率测定 采用常规称量法[3],计算材料的孔隙率。

1.2.3 骨髓基质细胞的原代培养及传代 采用全骨髓培养法(直接贴壁法)进行原代培养,取传代生长良好的2~

收稿日期:2008-06-12
基金项目:广东省科技计划项目(2005B30901010),广东省医学科研基金(A2003049)
作者简介: 陈建洪(1959-),男,广东兴宁人,本科,副主任医师,E-mail:zcaswed@yahoo.com.cn;唐 倩,通讯作者,E-mail: doodooer@126.com

4代细胞制作细胞生长曲线。

1.2.4 PHBV/SGBG 植入材料浸提液的制备 PHBV/SGBG 植入材料用环氧乙烷消毒备用,确定材料浸提液的标准浓度为培养液与材料表面积之比:10 mL/cm$^2$,将支架材料浸入完全培养液中,标准条件下(37 ℃,5% $CO_2$,饱和湿度)的培养箱中浸提 2 ~ 3 d,吸出浸提液,无菌封存,4 ℃保存备用。同样方法制备 8 倍、4 倍、2 倍、1 倍、0.5 倍、0.25 倍标准浓度的浸提液。

1.2.5 MTT 法评价材料的毒性分级 根据已绘制的细胞生长曲线,确定本实验的细胞接种浓度和接种的细胞数量,测定不同浸提液浓度分组的细胞相对增殖率(relative growth rate,RGR),按 5 级毒性分级法评分:0 级 RGR≥100%;1 级 RGR≥80%;2 级 RGR≥50%;3 级 RGR≥30%;4 级 RGR≥0。

1.2.6 PHBV/SGBG 植入材料的细胞相容性 将 PHBV/SGBG 植入材料用高糖 DMEM 完全培养基浸泡 3 d,使用前用无菌滤纸吸干,置于 24 孔板中。取生长状态良好的第 2 ~ 4 代培养细胞,调整细胞浓度为 5 × 10$^5$/mL,滴加于材料表面接种于支架材料上,每块材料上接种细胞液 200 μL,静置 3 h 后加入培养基至浸没材料。2 ~ 3 d 常规换液一次,分别于 1 d、3 d、6 d 将细胞-材料复合物用 20 g/L 或体积分数为 3%戊二醛固定,乙醇逐级脱水,乙酸异内酯置换,临界点干燥,表面喷金后扫描电镜观察。

## 2 结 果

### 2.1 PHBV/SGBG 材料的结构

PHBV/SGBG 材料呈白色,略有弹性,表面为泡沫多孔状结构(图 1),扫描电镜下见材料为疏松多孔结构,孔隙多并相互联通,孔隙大小约 100 ~ 300 μm,其中可见纳米级的 SGBG 颗粒镶嵌或包裹在 PHBV 基体孔壁上(图 2)。

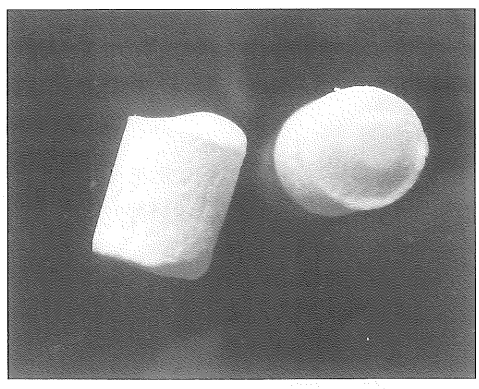


**图 1 PHBV/SGBG 材料大体观察**

**Fig.1 Gross observation of PHBV/SGBG**

### 2.2 PHBV/SGBG 材料的孔隙率

材料孔隙率的检测结果显示:ε > 90%

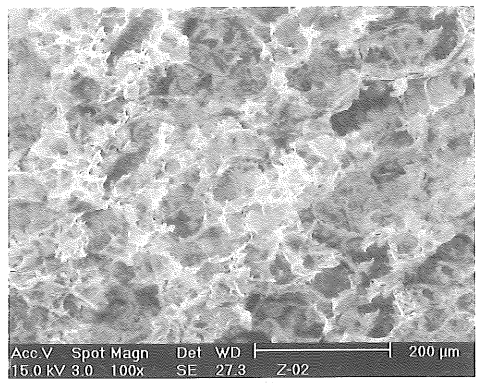



**图 2 PHBV/SGBG 材料扫描电镜观察**

**Fig.2 Observation of PHBV/SGBG under the scanning electron microscope(×100)**

### 2.3 PHBV/SGBG 骨植入材料的细胞毒性实验

根据培养细胞的生长标准曲线,本研究 PHBV/SGBG 骨植入材料浸提液进行 MTT 细胞毒性分析的实验分别在 1 d、3 d、5 d 分三次进行,在细胞培养的开始、进入快速增殖期、以及细胞数量达到极限值之前的三个时间段完成检测。结果见表 1,可见各浓度组不同时期的毒性分级均在 0~1 级之间。SPSS11.5 统计软件分析研究结果显示:随着材料浸提液浓度的增高,OD 值略有下降,但该变化并不具有显著性差异($P > 0.05$);高浓度的材料浸提液对细胞生长的影响与低浓度相比并不存在显著性差异($P > 0.05$);随着培养时间的延长各实验组细胞数量都明显增加,1 d、3 d、5 d 三个测试时间点上,各浓度组细胞增殖数 OD 值与对照组相比无明显差异($P > 0.05$)。不同浓度材料浸提液组,在 1、3、5 天时检测的 OD 值变化曲线图显示:各浓度组的 OD 值变化与对照组几乎完全重叠。

### 2.4 PHBV/SGBG 骨植入材料中细胞黏附和生长形态的观察

细胞培养第 1 天,可见骨髓基质细胞在 PHBV/SGBG 材料表面紧密贴壁生长,呈长梭形或有长突起的扁平多角形,突触舒展明显,相邻细胞胞体相连,并向材料孔隙中伸延(图 3A);细胞培养第 3 天,可见大量骨髓基质细胞在 PHBV/SGBG 材料表面黏附、增殖,胞体呈梭形、多角形,细胞生长密集的地方可见细胞堆积复层生长(图 3B);细胞培养第 6 天,仍可见骨髓基质细胞在 PHBV/SGBG 材料表面黏附、生长,细胞呈不规则形(图 3C)。

## 3 讨 论

### 3.1 PHBV/SGBG 充填材料的多孔结构与骨的生长

骨再生具有三个基本机制,即骨诱导、骨传导和骨生成。骨传导是指宿主骨床周围的毛细血管和骨祖细胞、成软骨细胞和成骨细胞长入骨缺损区,而植入材料则逐渐被宿主新骨组织替代的过程。研究发现具有类似自然骨的连通微孔结构的材料,可以支持和引导新生骨组织通过互相

表 1　MTT 法检测材料的细胞毒性结果

**Table 1　Results of the cytotoxicity tested by MTT method**

| Group | 1 d | | | 3 d | | | 5 d | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | OD value | RGR(%) | Toxicity grade | OD value | RGR(%) | Toxicity grade | OD value | RGR(%) | Toxicity grade |
| Control | 0.400 | | | 0.413 | | | 0.803 | | |
| 0.125 | 0.397 | 99.44 | 1 | 0.412 | 99.94 | 1 | 0.803 | 100 | 0 |
| 0.25 | 0.396 | 99.12 | 1 | 0.412 | 99.82 | 1 | 0.803 | 100 | 0 |
| 0.5 | 0.396 | 99.12 | 1 | 0.412 | 99.82 | 1 | 0.802 | 99.97 | 1 |
| 1.0 | 0.396 | 99.12 | 1 | 0.412 | 99.82 | 1 | 0.802 | 99.91 | 1 |
| 2.0 | 0.395 | 98.81 | 1 | 0.411 | 99.76 | 1 | 0.802 | 99.88 | 1 |
| 4.0 | 0.393 | 98.44 | 1 | 0.411 | 99.58 | 1 | 0.802 | 99.88 | 1 |
| 8.0 | 0.392 | 98.06 | 1 | 0.409 | 99.03 | 1 | 0.801 | 99.84 | 1 |

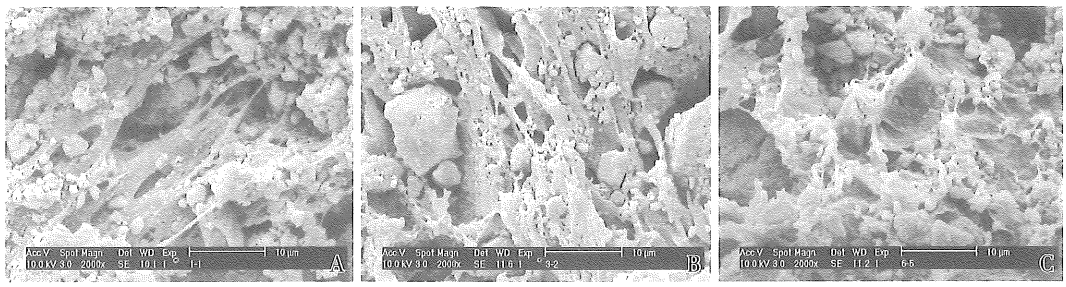


图 3　MSC 与 PHBV/SGBG 复合培养扫描电镜观察

**Fig.3　Observation of cultivated MSC on PHBV/SGBG under the scanning electron microscope(× 2 000)**

A: the first day; B: the third day; C: the sixth day

连通的孔道向材料的丛深生长，为骨组织的再生提供理想的支架结构[4]。孔径、孔隙率以及孔的连通性是评价材料空间结构的几个重要的指标。

本研究采用的 PHBV/SGBG 骨植入材料为疏松多孔结构，孔径大小为 100 ~ 300 μm，孔隙率 > 90%。孔隙多且孔孔之间互相连通，有助于新骨组织从材料表面长入内部和血液流通。同时大量的微孔以及较大的比表面积，不仅可使材料体积小，易降解，同时又能获得足够的机械强度，以满足临床治疗的需要。

### 3.2　PHBV/SGBG 骨植入材料的 MTT 毒性分析

材料的细胞毒性是评价生物材料与细胞之间相互作用的最重要的指标，而细胞相对增殖度（relative growth rate，RGR）则是材料细胞毒性评估中的一个重要参数[5]。本研究采用 MTT 法来计算细胞 RGR，并将细胞相对增殖率换算成毒性分级 1–5 级，来评估实验材料的细胞毒性[6]。研究结果显示随着材料浸提液浓度的增高，OD 值有所下降，但该变化并不具有显著性差异（$P > 0.05$），说明该材料浸提液浓度的提高并不抑制细胞的生长、增殖；随着培养时间的延长，各实验组细胞数量都明显增加，在 1d、3d、5d 三个测试时间点上，各浓度组细胞增殖数 OD 值与对照组几乎完全重叠，高浓度组的材料浸提液对细胞生长的影响与低浓度组相比并不存在显著性差异（$P > 0.05$），说明该材料浸提液的细胞毒性并未出现浓度依赖性，即使是高浓度的材料浸提液在细胞培养的开始、进入快速增殖期、以及细胞数量达到极限值之前的三个具代表性的时间段，都是安全、无毒的；倒置显微镜下可见各组各个时期的细胞呈梭形，伸展充分，形态良好，细胞密度高，生长旺盛，可见大量分裂细胞，与对照组相比，无显著性差异，说明各浓度组的细胞生长良好；各浓度组不同时期的毒性分级均在 0~1 级之间，说明该材料对骨髓基质细胞无细胞毒性作用，符合生物材料的医用标准。

本研究的 PHBV/SGBG 骨植入材料共制备了终浓度为 8 倍、4 倍、2 倍、1 倍、0.5 倍、0.25 倍、0.125 倍标准浓度的 7 种浸提液，较全面地探讨了该材料浸提液的细胞毒性。同时本研究根据材料植入体内部位和使用目的的要求，选择骨髓基质细胞作为体外培养的实验细胞，更好地模拟出了植入材料在体内骨组织中的真实情况，准确地反映出实验材料的细胞毒性及其与骨髓基质细胞间的相互作用。

### 3.3　PHBV/SGBG 骨植入材料的细胞相容性

观察植入材料与细胞之间的相互作用是研究植入材料细胞相容性的重要内容，采用直接接触的细胞培养法，可以直接观察到细胞在材料表面贴附的情况，一旦材料中有毒性物质释放时，细胞的形态、数量和增殖状态会立即发生变化，为材料的细胞相容性提供最直观的证据，其评价结果客观、敏感和有效[7]。本研究结果显示：骨髓基质细胞能紧密附着于 PHBV/SGBG 植入材料表面，贴附生长，并有突起向材料的连通微孔内伸展，增殖状态良好，结果证实该材料具有优良的细胞亲和性，这可能与材料的结构

有关。由于PHBV/SGBG植入材料具有泡沫多孔状结构，具有大小合适的孔径、较高的孔隙率和类似自然骨的连通微孔结构，利于骨髓基质细胞的粘附生长、营养物质的渗入和废物的排出，并促进其在材料上的迁移、分化和增殖。

**参考文献：**


[1] Chang BS, Lee CK, Hong KS, et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations [J]. Biomaterials, 2000,21(12):1291-1298.

[2] Cyster LA, Grant DM, Howdle SM, et al. The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering [J]. Biomaterials, 2005,26(7):697-702.

[3] 任耀彬，郑裕东，王迎军，等. 用于骨组织工程的羟基丁酸-戊酸共聚物/生物活性玻璃复合多孔支架材料[J]. 高分子材料科学与工程，2003,19(4):196-199.

[4] Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, et al. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials [J]. Biomaterials, 2005,26(17):3565-3575.

[5] Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines [J]. Eur J Oral Sci, 1996, 104(3): 292-299.

[6] Sieuwerts AM, Klijn JG, Peters HA, et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival [J]. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1995, 33(11): 813-823.

[7] Kudelska-Mazur D, Lewandowska-Szumiel M, Mazur M, et al. Osteogenic cell contact with biomaterials influences phenotype expression[J]. Cell Tissue Bank,2005,6(1):55-64.


（编辑 王晓鹰）

（上接第625页 from page 625）

动力学和足够的血容量，应用甘露醇，增加肾皮质血流和肾小球滤过率，减轻内皮细胞水肿和渗透性利尿作用，其自由基清除作用也可减轻肾脏的缺血性损伤。小剂量多巴胺也可扩张肾血管，增加肾血流。

### 3.4 血液、凝血功能的保护

胸腹主动脉瘤手术创面大、时间长，术中采用深低温，肝脏缺血及残余肝素，导致凝血异常[9]，出血较多，术中病例平均出血约2 000 mL，均以1:1的的比例给予红细胞悬液和新鲜冰冻血浆补充出血容量，并给冷沉淀，血小板及纤维蛋白原，防止凝血因子的过度减少，维持凝血功能，术中为减少低温、肝素及体外循环管道对血小板功能的抑制及血小板的破坏，血小板应选择等复温及停机后输注。

此外，还需采用特殊的麻醉技术，全胸腹主动脉替换术的病人，术中应使用双腔支气管插管，以利于手术野的暴露。常使用左侧双腔管，因右侧双腔管易于阻塞右上支气管[8]。本研究中选择右侧双腔管导管，因瘤体压迫左主支气管使其移位，插管时难以准确到位。全胸腹主动脉替换术中患者术中需在左锁骨下动脉近端阻断主动脉及行左股动脉动插管，故外周动脉测压采用右桡及右足背动脉。

**参考文献：**


[1] Sun LZ, Chang Q, Hu XP, et al. Clinical application of total or subtotal aortic replacement on the one stage [J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2005, 43(22):1425-1428.

[2] Hu XP, Chang Q, Zhu JM, et al. One-stage total or subtotal aortic replacement[J]. Ann Thorac Sug, 2006, 82(2):542-546.

[3] Adachi H, Kawahito K, Yamaguchi A, et al. Repair of thoracic and thoracoabdominal aortic aneurisms by the use of hypothermic circulatory arrest[J]. Kyobu Geka, 2004,57(4):291-294.

[4] Soukiasian HJ, Raissi SS, Kleisli T, et al. Total circulatory arrest for the replacement of the descending and thoracoabdominal aorta[J]. Arch Surg, 2005, 140(4):394-398.

[5] 张秀洲，刘雪平，李文华，等. 局部亚低温对脑出血后炎症因子的影响[J]. 新医学，2005,36(4):213-214.

[6] 许 刚，庄 建，张镜芳，等.尼莫通对幼犬深低温低流量体外循环的脑保护[J]. 中山大学学报：医学科学版，2004,25(4):334-337.

[7] 龙 村. 体外循环学[M]. 北京：人民军医出版社，2004:103-126.

[8] Cinà CS, It SC, Clase CM, et al. A cohort study of coagulation parameters and the use of blood products in surgery of the thoracic and thoracoabdominal aorta[J]. J Vasc Surg, 2001, 33(3): 462-468.

于钦军，李立环. 临床心血管麻醉实践[M]. 北京：人民卫生出版社，2005(5): 259-280.


（编辑 徐 杰）