

氟转化涂层镁合金材料与诱导后人骨髓间充质干细胞的相容性**

姜海英¹, 闫征斌^{1,2}, 张 照³, 艾红军⁴

Cellular biocompatibility of induced human bone marrow stromal cells to fluoride conversion coating magnesium alloys

Jiang Hai-ying¹, Yan Zheng-bin^{1,2}, Zhang Zhao³, Ai Hong-jun¹

Abstract

BACKGROUND: As newly developed magnesium alloy, whether fluoride conversion coating and β -tricalcium phosphate (β -TCP) coating Biodegradable AZ31B magnesium alloy has better cell compatibility is not confirmed.

OBJECTIVE: To evaluate the cell compatibility of fluoride conversion coating and β -TCP coating Biodegradable AZ31B magnesium alloy tested with the induced human bone marrow stromal cells.

METHODS: The experiment was divided into three groups: AZ31B magnesium alloy group, fluoride conversion coating AZ31B magnesium alloy group and β -TCP coating Biodegradable AZ31B magnesium alloy group. The induced human bone marrow stromal cells were regarded as the tested cells, and the extracts of the three materials were used in the compatibility experiments *in vitro*.

RESULTS AND CONCLUSION: The toxicity of cells in the leaching liquor of fluoride conversion coating and β -TCP coating Biodegradable AZ31B magnesium alloys were Grade 1. The toxicity of cells in the leaching liquor of AZ31B magnesium alloys was Grade 2. This experiment had proved that the fluoride conversion coating and β -TCP coating Biodegradable AZ31B magnesium alloys were superior than AZ31B magnesium alloys.

Jiang HY, Yan ZB, Zhang Z, Ai HJ. Cellular biocompatibility of induced human bone marrow stromal cells to fluoride conversion coating magnesium alloys. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(3): 459-462.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 氟转化涂层的 AZ31B 镁合金和 β -磷酸三钙涂层的 AZ31B 镁合金是中科院金属研究所新研制的镁合金, 是否具有好的生物相容性尚不明确。

目的: 以诱导的人骨髓间充质细胞作为检测细胞, 评价氟转化涂层的 AZ31B 镁合金和 β -磷酸三钙涂层的 AZ31B 镁合金材料的细胞相容性。

方法: 实验分为镁合金 AZ31B 组, 氟转化涂层的 AZ31B 镁合金组和 β -磷酸三钙涂层的 AZ31B 镁合金组。以诱导的人骨髓间充质细胞作为检测细胞, 分别取 3 种材料浸提液进行体外细胞相容性实验。

结果与结论: 氟转化涂层的 AZ31B 镁合金和 β -磷酸三钙涂层的 AZ31B 镁合金材料细胞毒性分级均为 1 级, 镁合金 AZ31B 材料细胞毒性分级为 2 级。提示氟转化涂层的 AZ31B 镁合金和 β -磷酸三钙涂层的 AZ31B 镁合金材料生物相容性优于未经处理镁合金 AZ31B 材料。

关键词: 镁合金; 生物医用材料; 骨髓间充质干细胞; β -磷酸三钙; 生物相容性

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.03.017

姜海英, 闫征斌, 张照, 艾红军. 氟转化涂层镁合金材料与诱导后人骨髓间充质干细胞的相容性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(3):459-462. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

因为镁及其合金有优良的综合力学性能、与人体良好的生物相容性能以及生物可降解吸收等特点, 使其有望成为一类新型可降解骨植入材料^[1-5]。

中科院金属研究所杨柯研究组一直致力于通过对 AZ31B 镁合金表面进行处理以达到控制镁合金降解速度的同时赋予其表面以良好的生物活性目的^[6-10]。最近, 采用化学方法对 AZ31B 镁合金进行了氟转化涂层和 β -磷酸三钙 (β -tricalcium phosphate, β -TCP) 涂层, 为了证实氟转化涂层和 β -TCP 涂层 AZ31B 镁合金材料

生物相容性优于未经处理镁合金 AZ31B 材料, 实验以诱导的人骨髓间充质细胞作为检测细胞, 评价氟转化涂层和 β -TCP 涂层 AZ31B 镁合金材料的细胞相容性。

1 材料和方法

设计: 对比观察体外实验

时间及地点: 于 2009-01/2010-06 在大庆油田总医院中心实验室和中国医科大学实验中心完成。

材料: 镁合金 AZ31B 作为对照组 A, 将氟转化涂层和 β -TCP 涂层 AZ31B 镁合金材料的镁合金 AZ31B 材料分为实验组 B, 实验组 C。材料均

¹Department of Stomatology, Daqing Oilfield General Hospital, Daqing 163001, Heilongjiang Province, China;
²Oral Medicine College of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China;
³Clinics of Guangzhou Sports Vocational College, Guangzhou 510650, Guangdong Province, China;
⁴Department of Prosthodontics, Affiliated Dental Hospital of China Medical University, Shenyang 110002, Liaoning Province, China

Jiang Hai-ying★, Master, Attending physician, Department of Stomatology, Daqing Oilfield General Hospital, Daqing 163001, Heilongjiang Province, China wanghaoyu2002@126.com

Correspondence to: Ai Hong-jun, Professor, Doctoral supervisor, Department of Prosthodontics, Affiliated Dental Hospital of China Medical University, Shenyang 110002, Liaoning Province, China

Supported by: Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 2008079*

Received: 2011-07-20 Accepted: 2011-11-08

¹ 大庆市油田总医院口腔科, 黑龙江省大庆市 163001; ² 佳木斯大学口腔医学院, 黑龙江省佳木斯市 154002; ³ 广州体育职业技术学院医务所, 广东省广州市 510650; ⁴ 中国医科大学附属口腔医院口腔修复科, 辽宁省沈阳市 110002

姜海英★, 女, 1974年生, 黑龙江省大庆市人, 汉族, 2009年中国医科大学口腔医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事生物医用材料的研究。
wanghaoyu2002@126.com

通讯作者: 艾红军, 教授, 博士生导师, 中国医科大学附属口腔医院口腔修复科, 辽宁省沈阳市 110002

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)03-00459-04

收稿日期: 2011-07-20
修回日期: 2011-11-08 (20101220010/W·C)

为直径1 cm厚0.3 cm的圆片状, 无水乙醇超声清洁5 min, ⁶⁰CO消毒。以上材料均由中国科学院金属研究所生物医用材料课题组提供。

仪器:

仪器	来源
YZ-2500 型超净工作台	苏州净化设备厂
OLYMPUS IX70 倒置显微镜	美国奥林巴斯
2010 酶标仪	奥地利安图斯
恒温 CO ₂ 细胞培养箱	日本三洋
Milli-Q Academic 超纯水系统	美国密理博
Biofuge primo R 多用途离心机	德国贺力氏

实验方法:

细胞培养^[11-12]: 大庆油田总医院骨科志愿者5名, 志愿者知情同意并经伦理委员会批准。无菌条件下抽取志愿者髌后上棘骨髓15 mL, 加入50 mL离心管(预装0.5 mL肝素及F12的培养基5 mL), PBS等比例混匀。将Ficoll-Paque Plus按1:1比例加入离心管中。离心吸取中间的乳白色的单核细胞层, 加入PBS吹打均匀后离心, 弃上清后加入原代培养基(DMEM-F12, 体积分数15%胎牛血清)吹打均匀后制成细胞悬液, 移入75 cm²的培养瓶内, 在37 °C, 体积分数5%CO₂孵化箱内培养, 每隔2 d全量换液。7~10 d后, 相差显微镜下见细胞汇合成单层时, 即可用胰蛋白酶消化法以1:2的比例进行传代培养。传代培养过程中隔2 d换液, 直至贴壁细胞彼此融合, 但尚未铺满变致密时再进行传代。于传代培养的细胞中加入矿化诱导液(DMEM-F12含有10 mmol/L β-磷酸甘油钠; 10⁻⁸ mol/L地塞米松; 50 μg/L左旋抗坏血酸; 体积分数15%胎牛血清)37 °C, 体积分数5%CO₂孵化箱内培养, 隔2 d换液。3代细胞用于后续实验。

相差显微镜下观察和记录细胞的生长情况: 在细胞的培养过程中, 每天观察细胞的贴壁情况、细胞形态、有无污染等指标, 并照相记录。

钙钴法碱性磷酸酶染色: 取诱导后的诱导培养7 d的附有细胞的盖玻片做钙钴法碱性磷酸酶染色, 阳性细胞胞浆呈现黑色颗粒, 证实为酶活性较高的成骨细胞。

矿化结节茜素红染色法: 将诱导培养20 d的附有细胞的盖玻片取出用0.1%茜素红Tris-HCl染色30 min, 染色鲜红即代表矿化结节。

浸提液的制备^[13]: 将消毒好的材料按浸提比例为每3 cm²样品加入浸提介质(条件培养基)1 mL, 在37 °C细胞培养箱中放置72 h, 收集浸提液, 无菌封存, -20 °C保存备用。

细胞存活率的测定: 将成骨诱导第3代细胞调整细胞浓度到2.5×10⁷ L⁻¹, 接种在96孔培养板内, 200 μL/孔。恒温箱中培养24 h后, 用预制的金属A, B, C浸提液换液, 空白对照组用条件培养基更换, 然后再孵育72 h。每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μL, 37 °C, 继续孵育4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 加入二甲基亚砜(150 μL/孔), 室温下将平板移至微孔振荡器上振荡10 min, 使结晶物溶解。选490 nm波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值, 记录结果。

细胞相对生长率的计算: 各组浸提液培养细胞后用MTT法测得的A值, 按下面公式计算出细胞相对生长率(RGR)的范围。

$$\text{细胞相对生长率(relative growth rate, RGR)} = \frac{\text{实验组A值的平均值}}{\text{对照组A值的平均值}} \times 100\%$$

材料浸提液对细胞存活率影响的评定方法: 参照国家标准[GB/T 16886.5], 以阴性对照组为100%, 参照公式计算细胞存活率X, X ≥ 100%(0级); X ≥ 80%(1级); X ≥ 50%(2级) X ≥ 30%(3级); X ≥ 0(4级); “标准”规定用于植入材料对细胞存活率的影响不能低于1级。

主要观察指标: ①细胞生长形态。②碱性磷酸酶组织化学染色结果。③茜素红矿化结节染色结果。④镁合金材料浸提液对细胞存活率的影响。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜下观察细胞生长形态

原代培养: 从骨髓获取的细胞悬液中可见大量的圆形细胞。接种6 h后, 可见细胞开始贴壁, 细胞呈圆形, 胞体较小, 见图1。



Figure 1 Growth of bone marrow stromal stem cells after cultured for 6 h (×100)
图1 培养6 h 骨髓间充质干细胞生长状态(×100)

接种4 d后, 贴壁细胞数量众多, 长梭形为主呈束状生长, 伴有少量不定型、多角细胞, 见图2。

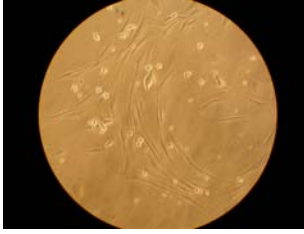


Figure 2 Growth of bone marrow stromal stem cells after cultured for 4 d (×100)
图2 培养4 d 骨髓间充质干细胞生长状态(×100)

培养7 d, 细胞可相互融合, 细胞成片生长, 细胞形态较一致, 见图3。

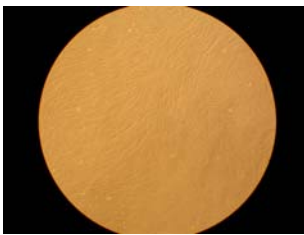


Figure 3 Growth of bone marrow mesenchymal stem cells after cultured for 7 d (×100)
图3 培养7 d 骨髓间充质干细胞生长状态(×100)

矿化诱导培养: 传代细胞经矿化诱导4 d, 细胞体积增大, 星形, 多角形细胞增多, 核浆比例变大, 可见多核仁。有聚集生长趋势, 见图4。



Figure 4 Growth of induced bone marrow stromal stem cells after cultured for 4 d (×200)
图4 矿化诱导培养4 d 细胞生长状态(×200)

矿化诱导7 d细胞呈漩涡状生长, 见图5。

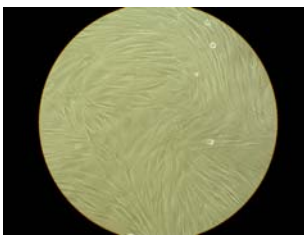


Figure 5 Growth of induced bone marrow stromal stem cells after cultured for 7 d (×200)
图5 矿化诱导培养7 d 细胞生长状态(×200)

2.2 碱性磷酸酶组织化学染色结果 诱导1周后大部

分的细胞为阳性, 见图6。说明在矿化诱导培养后的细胞内, 表现出较高的碱性磷酸酶活性。

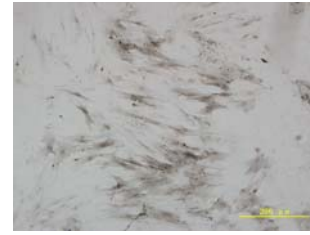


Figure 6 Alkaline phosphatase staining of bone marrow stromal cells after mineralization and induction (×200)
图6 矿化诱导骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶染色(×200)

2.3 茜素红矿化结节染色结果 可见于细胞密集层叠生长区域中央部位形成红色不规则形的钙化结节, 见图7。说明在矿化培养后的细胞可以形成细胞外矿化基质。

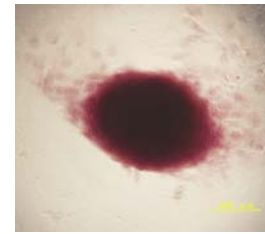


Figure 7 Alizarin red staining of bone marrow stromal cells after mineralization and induction (×200)
图7 矿化诱导骨髓间充质干细胞茜素红矿化结节染色(×200)

2.4 镁合金材料浸提液对细胞存活率的影响 见表1。

表1 MTT 实验各组 A 值和 RGR 分级
Table 1 Absorbance value and RGR grading in each group detected by MTT assay

Group	Absorbance value ($\bar{x} \pm s$)	RGR	Grading
Negative control	0.625±0.015	100	\
AZ31B magnesium alloy	0.402±0.020	64.2	2
Fluoride conversion coating	0.573±0.014	91.7	1
β -tricalcium phosphate coating	0.591±0.022	94.5	1

3 讨论

本实验将人骨髓间充质干细胞矿化诱导至第3代^[14-15], 经碱性磷酸酶检测证明有阳性表达, 经茜素红矿化结节染色, 证明在矿化培养后的细胞可以形成细胞外矿化基质, 说明人BMSCs经体外诱导形成成骨细胞。

设计的体外实验模型应本着“最接近应用状况”原则, 作者所要研究AZ31B镁合金是作为可降解骨植入材料, 骨的形成是以成骨细胞为中心, 由胞外基质、破骨细胞、血管内皮细胞及骨细胞参与, 并受多种生长因子

和激素调控的复杂的生理活动的影响。这就要求骨植入材料应构建有利于成骨细胞成骨的正常细胞生存环境, 用成骨细胞来评价骨组织工程材料的生物相容性更为可靠。因此, 本实验应用骨髓源成骨细胞作为生物相容性检测细胞。

镁合金作为新型医用植入材料, 具有优异的力学性能和可降解性, 有广阔的应用前景。但到目前为止, 还没有一种针对生物医用植入材料而发展成熟的镁合金材料成功应用在临床上^[16-17], 主要问题是镁合金降解速度过快, 因此采取适当的方法降低镁合金的降解速度并提高镁的生物相容性具有重要意义。Thomann等^[18]通过氟转化处理在Mg-Ca合金表面制备涂层, 并将处理后的镁合金钉植入兔子腿骨髓腔内, 研究结果证明氟转化涂层在体内的良好生物相容性, 氟化镁涂层能够提高镁合金的耐腐蚀性能。Geng等^[19-20]在多孔纯镁样品表面沉积制备了β-TCP涂层, 研究结果表明, 该涂层不但有效改善了镁金属的耐蚀性能, 还表现出了良好的细胞黏附性和增殖性。中科院金属研究所杨柯研究小组对AZ31B进行了氟转化涂层和β-TCP涂层拟开发为新型可降解骨植入材料。

实验应用MTT法评价细胞毒性, 观察未经表面处理AZ31B镁合金、氟转化涂层AZ31B镁合金、β-TCP涂层AZ31B镁合金材料浸提液对人骨髓源成骨细胞增殖的影响, 评价不同AZ31B镁合金生物相容性。结果发现, 氟转化涂层和β-TCP涂层AZ31B镁合金材料生物相容性优于未经处理镁合金AZ31B材料, 对细胞存活率的影响结果符合国家标准对生物材料要求的规定。氟处理涂层和β-TCP涂层可有效地延缓AZ31B镁合金降解产物的释放速度, 增加人骨髓源成骨细胞存活率, 与溶血实验中氟处理涂层和β-TCP涂层可减轻合金在体内诱导的组织炎性反应, 显著降低合金的溶血率相吻合^[21-23]。可见氟处理涂层和β-TCP涂层镁合金具有良好的生物相容性, 有望成为新一代可降解生物医学材料。

4 参考文献

[1] Yan YT, Tan LL, Xiong DS, et al. Cailiao Daobao. 2008;22(1): 110-112.
颜廷亨, 谭丽丽, 熊党生, 等. 医用镁金属材料的研究进展[J]. 材料导报, 2008, 22(1):110-112.

[2] Zheng YF, Gu XN, Li N, et al. Zhongguo Cailiao Jinzhan. 2011;30(4):30-43.
郑玉峰, 顾雪楠, 李楠, 等. 生物可降解镁合金的发展现状与展望[J]. 中国材料进展, 2011, 30(4):30-43.

[3] Xu L, Zhang E, Yang K. Phosphating treatment and corrosion properties of Mg-Mn-Zn alloy for biomedical application. J Mater Sci Mater Med. 2009; 20(4): 859-867.

[4] Xu L, Zhang E, Yin D, et al. In vitro corrosion behaviour of Mg alloys in a phosphate buffered solution for bone implant application. J Mater Sci Mater Med. 2008; 19(3): 1017-1025.

[5] Xu L, Pan F, Yu G. In vitro and in vivo evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy. Biomaterials. 2009; 30(8): 1512-1152.

[6] Liu K, Guo L, Huang JJ, et al. Zhongguo Shengwu Gongcheng Zazhi. 2008, 28(3):59-63.
刘魁, 郭磊, 黄晶晶, 等. AZ31B镁合金植入小鼠的生物相容性考察[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(3):59-63.

[7] Guo L, Liu K, Zhang SL, et al. Xiyou Jinshu Cailiao yu Gongcheng. 2008, 37(6):1027-1031.
郭磊, 刘魁, 张世亮, 等. 氧化镁膜 AZ31B 镁合金材料的细胞毒性研究[J]. 稀有金属材料与工程, 2008, 37(6):1027-1031.

[8] Yang K, Tan LL, Ren YB, et al. Zhongguo Cailiao Jinzhan. 2009; 28(2): 28-30.
杨柯, 谭丽丽, 任寅, 等. AZ31镁合金的生物降解行为研究[J]. 中国材料进展, 2009, 28(2):28-30.

[9] Guo L, Liu K, Gao XY, et al. Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi. 2009; 19(2):161-163.
郭磊, 刘魁, 高晓宇, 等. 磷酸钙涂层的 AZ31B 镁合金材料对成骨细胞功能的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(2):161-163.

[10] Yan TT, Tan LL, Xiong DS, et al. Xiyou Jinshu Cailiao yu Gongcheng. 2009; 38(5):918-992.
颜廷亨, 谭丽丽, 熊党生, 等. 生物医用 AZ31B 镁合金表面稀土转化膜的制备及其性能研究[J]. 稀有金属材料与工程, 2009, 38(5): 918-992.

[11] Hu W, Yu X, Zhu LQ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009, 13(49): 9709-9712.
胡炜, 俞兴, 朱陵群, 等. 比较不同传代人骨髓间充质干细胞的生物学特性: 推荐第3-6代细胞可用于临床[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(49): 9709-9712.

[12] Ilmer M, Karow M, Geissler C, et al. Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells. Tissue Eng Part A. 2009; 15(9):2397-2409.

[13] ISO 10993, Part 5 and Part 12: Test for in vitro cytotoxicity. Sample preparation and reference materials.

[14] Decaris ML, Leach JK. Design of experiments approach to engineer cell-secreted matrices for directing osteogenic differentiation. Ann Biomed Eng. 2011; 39(4):1174-1185.

[15] Aan BJ, Yan GY. Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi. 2011; 19(9): 758-764.
安佰京, 邢那彦. 冲击波与地塞米松对自体血清培养的骨髓间充质干细胞成骨分化的比较研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(9): 758-764.

[16] Qiao LY, Gao JC, Wang Y. Zhongguo Cailiao Jinzhan. 2011; 30(4):23-29.
乔丽英, 高家诚, 王勇. 镁基生物材料表面改性及其生物相容性的研究与发展现状[J]. 中国材料进展, 2011, 30(4):23-29.

[17] Zhang J, Zong Y, Fu PH, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009; 13(29):5747-5750.
张佳, 宗阳, 付彭怀, 等. 镁合金在生物医用材料领域的应用及发展前景[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(29):5747-5750.

[18] Thomann M, Krause C, Angrisani N, et al. Influence of a magnesium-fluoride coating of magnesium-based implants (MgCa0.8) on degradation in a rabbit model. Journal of Biomedical Materials Research: A. 2010; 93(4):1609-1619.

[19] Geng F, Tan L L, Jin XX, et al. The preparation, cytocompatibility, and in vitro biodegradation study of pure β-TCP on Magnesium. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2009; 20(5):1149-1157.

[20] Geng F, Tan L L, Zhang B C, et al. Study on β-TCP coated porous Mg as bone tissue engineering scaffold material. Journal of Materials Science and Technology. 2009; 25(1):123-129.

[21] Guo L, Liu K, Zhang SL, et al. Xiyou Jinshu Cailiao yu Gongcheng. 2009; 38(1):99-102.
郭磊, 刘魁, 张世亮, 等. CA-P/AZ31B 镁合金的生物相容性研究[J]. 稀有金属材料与工程, 2009, 38(1):99-102.

[22] Wang ZZ, Pan F, Zhang EL. Jiepo Kexue Jinzhan. 2011; 17(1): 40-43.
王佐周, 潘锋, 张二林. 细胞培养法评价含硅羟基磷酸钙涂层镁合金的生物相容性[J]. 解剖科学进展, 2011, 17(1):40-43.

[23] Li Q, Liu XJ, Wang ZQ, et al. Cailiao Yanjiu Xuebao. 2011; 25(2):193-198.
李琦, 刘新杰, 王泽庆, 等. AZ31B镁合金表面氟涂层的生物相容性和抗菌性能[J]. 材料研究学报, 2011, 25(2):193-198.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 辽宁省自然科学基金(2008079)。

作者贡献: 实验设计与实施为第一作者, 实验评估为闫征斌, 资料收集为张照, 艾红军审核并对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 根据国务院《医疗机构管理条例》规定, 志愿者均知情同意。

本文创新性: 国内外此类研究检测镁合金的生物相容性都是采用动物成骨细胞来源。本实验采用人骨髓间充质干细胞检测 AZ31B 镁合金生物相容性符合“最接近应用状况”原则, 具有创新性。