

成骨诱导人脐带间充质干细胞与纳米羟基磷灰石/聚酰胺66支架材料的生物相容性☆

陈刚¹, 廖前德², 胡优威¹, 谭益云¹, 钟达²

Biocompatibility of nano-hydroxyapatite/polyamide 66 materials composite with human umbilical cord mesenchymal stem cells after osteogenic induction

Chen Gang¹, Liao Qian-de², Hu You-wei¹, Tan Yi-yun¹, Zhong Da²

Abstract

BACKGROUND: Nano-hydroxyapatite/polyamide (nHA/PA) 66 materials are beneficial to osteoblast regeneration and new bone formation. Their bending strength and compressive strength are close to mechanical properties of normal bone tissues to meet the needs of hard tissue repair in animal experiment.

OBJECTIVE: To explore the biocompatibility of nHA/PA66 materials composite with human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) after osteogenic induction.

METHODS: The hUCMSCs were isolated, cultured and osteoblastic-induced *in vitro*. The third-generation hUCMSCs were seeded on the nHA/PA66 materials. The growth and proliferation of hUCMSCs and cytotoxicity materials were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: The osteoblastic-induced hUCMSCs grew well on the composite scaffolds, and proliferative activity of the cells did not change. The levels of alkaline phosphatase were gradually increased as the time of culture went on in the first 14 days of osteogenic induction. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay results showed that the cells were atoxic. Scanning electron microscopic observation: the cells showed the attached growth on the surfaces of nHA/PA66 scaffolds at 1 day; the cells grew well on the surface of nHA/PA66 scaffold and extended into the interspace of the scaffolds at 7 days. The nHA/PA66 materials can be used as cell carrier for hUCMSCs. They can satisfy the demand of bone tissue engineering due to their good biocompatibility.

Chen G, Liao QD, Hu YW, Tan YY, Zhong D. Biocompatibility of nano-hydroxyapatite/polyamide 66 materials composite with human umbilical cord mesenchymal stem cells after osteogenic induction. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(16):2931-2934. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 材料有利于成骨细胞的长入和新生骨的形成、且抗弯强度、抗压强度等各项参数与正常骨组织的力学性能相接近, 能满足实验动物硬组织修复的要求。

目的: 分析成骨诱导后人脐带间充质干细胞与纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 复合支架的生物相容性。

方法: 体外培养人脐带间充质干细胞, 纯化增殖, 成骨诱导。取成骨诱导后的第 3 代人脐带间充质干细胞接种于纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 支架材料上, 观察细胞的生长、增殖情况及材料细胞毒性。

结果与结论: 成骨诱导后人脐带间充质干细胞在复合支架上生长分化良好, 增殖活性不受材料影响。成骨诱导 14 d 内, 可见碱性磷酸酶活性随着培养时间延长而逐渐增高。MTT 法检测细胞无毒性。扫描电镜观察, 1 d 后可见细胞在支架表面附着生长; 7 d 后可见细胞在材料上生长良好, 材料空隙有大量充填。说明纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 支架可作为骨组织工程中人脐带间充质干细胞的细胞载体, 具有良好的生物相容性, 能满足骨组织工程的需要。

关键词: 羟基磷灰石/聚酰胺 66; 人脐带间充质干细胞; 细胞培养; 骨组织工程; 支架; 生物相容性

缩略语注释: nHA/PA66: nano-hydroxyapatite crystals and polyamide 66, 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66; hUCMSCs: human umbilical cord mesenchymal stem cells, 人脐带间充质干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.16.019

陈刚, 廖前德, 胡优威, 谭益云, 钟达. 成骨诱导人脐带间充质干细胞与纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 支架材料的生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(16):2931-2934. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

在组织工程研究中, 支架材料是指能与组织活体细胞结合并能植入生物体的材料, 它是构建了骨组织工程的最基本构架, 与其附着生长的种子细胞共同构成三维空间细胞/材料复合体^[1]。各种单一材料均难以完全满足骨组织工程的需要, 通过合适的方法将两种或多种类型的材料组合起来, 在性能上取长补短, 以得到具备更佳性能的复合支架材料^[2-4]。基于仿生原理, 近年来利用纳米羟基磷灰石与聚乳酸、聚

乙酰、聚酰胺等不同物质复合制备各种复合支架^[5]。其中纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(nano-hydroxyapatite crystals and polyamide 66, nHA/PA66)材料孔径在 300~500 μm、孔壁又有大量微孔, 相互贯通, 有利于成骨细胞的长入和新生骨的形成、且抗弯强度、抗压强度等各项参数与正常骨组织的力学性能相接近, 能满足实验动物硬组织修复的要求。

实验以人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)为种子细胞, 成骨诱导接种在nHA/PA66材料上进行复合培养, 阐明在体外培养体系中, hUCMSCs

¹Department of Spinal Surgery, Xiangtan Central Hospital, Xiangtan 411100, Hunan Province, China; ²Department of Orthopedics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Chen Gang☆,
Doctor, Attending physician,
Department of Spinal Surgery, Xiangtan Central Hospital, Xiangtan 411100, Hunan Province, China
diancaixx@tom.com

Received: 2011-10-19
Accepted: 2011-11-08

¹湘潭市中心医院
脊柱外科, 湖南省
湘潭市 411100; ²中南大
学湘雅医院骨科,
湖南省长沙市
410008

陈刚☆, 男, 1979
年生, 湖南省湘潭市人, 汉族, 2011
年中南大学毕业,
博士, 主治医生,
主要从事骨组织
工程及脊柱外科
研究。
diancaixx@
tom.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2012)16-02931-04

收稿日期: 2011-10-19
修回日期: 2011-11-08
(20110719008/D · L)

在nHA/PA66材料上生长、增殖等生物学特性以及该支架对其成骨性能的影响, 探讨在骨组织工程中nHA/PA66支架材料作为种子细胞hUCMScs载体的可能性, 为下一步动物体内成骨研究提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察及重复测量观察。

时间及地点: 于2010-05/2011-03在湘潭市中心医院基础实验室和中南大学湘雅医院中心实验室完成。

材料: 人足月妊娠剖宫产健康胎儿的脐带来源于湘潭市中心医院产科, 供者及家属均完全知情同意并签署知情同意书, 实验经医院伦理委员会批准。

主要试剂和仪器:

主要试剂和仪器	来源
DMEM/F12、DMEM 高糖培养基、Gibco, 美国	
噻唑蓝(MTT)	
胎牛血清	北京鼎国公司
β-甘油磷酸钠、地塞米松、抗坏血酸、维生素C	Sigma, 美国
碱性磷酸酶试剂盒	江苏碧云天生物技术研究所
扫描电子显微镜	AMARAY, 美国
nHA/PA66 支架材料	四川大学纳米生物材料研究中心

方法:

hUCMScs的分离、扩增及成骨诱导^[6]: 将脐带去除脐血管、外膜, 剪成1 mm³组织块; 分别加入0.1%胶原酶II及0.125%胰酶, 消化离心, 调整细胞浓度为1×10⁶/cm², 置于5%CO₂的培养箱中培养。每3 d换液1次, 直至细胞融合80%~90%时, 用0.25%胰酶消化, 并按1:3比例传代培养。选取第3代hUCMScs, 置于含体积分数为10%FBS、1.0×10⁻⁷ mol/L地塞米松, 50 mg/L抗坏血酸, 50 mg/L维生素C, 1.0×10⁻³ mol/Lβ-甘油磷酸钠的高糖DMEM培养基, 进行成骨诱导。

细胞形态学观察: 观察hUCMScs贴壁时间、形态变化、生长增殖情况, 照相并记录实验结果。

nHA/PA66支架的预处理: 无菌条件下, 将支架材料修整成0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm, ⁶⁰Co消毒后暂以DMEM培养液浸泡, 干燥备用。

hUCMScs与nHA/PA66复合培养: 收集成骨诱导的第3代hUCMScs, 消化离心后, 调整细胞浓度为1.0×10⁸ L⁻¹, 均匀接种在nHA/PA66支架上。37 °C饱和湿度培养箱内孵育4 h; 继续置入成骨诱导体系中培养备用, 液面稍覆盖支架表面以上, 以便细胞在支架中充分生长。

测定生长曲线: 复合培养后第2, 4, 6, 8, 12天, hUCMScs+nHA/PA66为实验组, 对照组为体外培养第3代的成骨诱导hUCMScs悬液。分别置于12孔板中培养, 随机取6孔, 每孔加入5%MTT 20 μL, 培养箱内孵

育4 h, 吸弃上清液, 每孔加200 μL DMSO, 振荡10 min。检测波长为490 nm, 自动酶标测定仪检测各孔A值, 并以时间(d)为横坐标, A值为纵坐标, 绘制生长曲线。

碱性磷酸酶定量测定: 复合培养第2, 4, 6, 8, 10, 12, 14天行碱性磷酸酶活性检测, 对照组为未行成骨诱导hUCMScs与nHA/PA66复合常规培养的上清液。第2~14天各时间点收集细胞, 按照试剂盒说明进行碱性磷酸酶活性测定。

nHA/PA66支架材料细胞毒性测定: 复合培养第2, 4, 8天取样测细胞增殖率, 每孔加入5%MTT 100 μL, 37 °C孵育4 h, 吸弃上清液后每孔加DMSO 500 μL振荡15 min, 每孔取200 μL液体加入96孔板中, 测定波长490 nm处的吸光度值(A值)。取6孔吸光度的均值。阴性对照为相同密度的成骨诱导后hUCMScs接种到培养孔。

材料细胞毒性评价标准: 细胞相对增殖度(relative growth rate, RGR)=(实验组平均吸光度值/阴性对照组平均吸光度值)×100。

毒性分级标准:

反应	细胞相对增殖度(RGR)
0 级	≥100
1 级	75~99
2 级	50~74
3 级	25~49
4 级	1~24
5 级	0

电镜扫描: 分别在复合培养的第1天及第7天后取细胞/支架复合物, 用3%的戊二醛固定24 h; PBS冲洗3次; 1%锇酸固定后用体积分数30%~100%乙醇梯度洗脱; 用梯度醋酸异戊酯置换后, 放入无菌网盒中, 临界点干燥、真空喷镀金膜后, 电镜扫描下观察hUCMScs在支架材料上生长情况。

主要观察指标: ①原代及传代hUCMScs生长情况。②成骨诱导后hUCMScs在nHA/PA66中的生长增殖。③ALP的活性测定。④细胞毒性检测情况。

统计学分析: 所有数据由第一作者经过SPSS11.5统计软件包处理, 两组数据采用t检验, P < 0.05表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 hUCMScs细胞生长情况及形态特征 培养24 h内可见少量散在分布的贴壁细胞。二三天左右可见梭形及多角形细胞, 细胞增多。培养五六天后可见梭形或多突起形贴壁细胞, 生长速度增快, 之后增生为形态相对均一稳定的成纤维样长梭形细胞, 呈漩涡状生长或平行排列生长, 10~12 d细胞融合至80%~90%, 见图1a。传2代以后细胞形态呈均一成纤维样长梭形排列, 见图1b。



Figure 1 Growth and morphology of primary and passaged human umbilical cord mesenchymal stem cells ($\times 100$)
图 1 原代及传代 hUCMSCs 生长情况及形态特征($\times 100$)

2.2 成骨诱导hUCMSCs在nHA/PA66中生长增殖情况
电镜扫描可见复合培养1 d后细胞在材料表面附着生长, 见图2a。5~7 d后, 细胞牢固黏附在支架上, 材料孔隙内可见细胞充填, 见图2b。

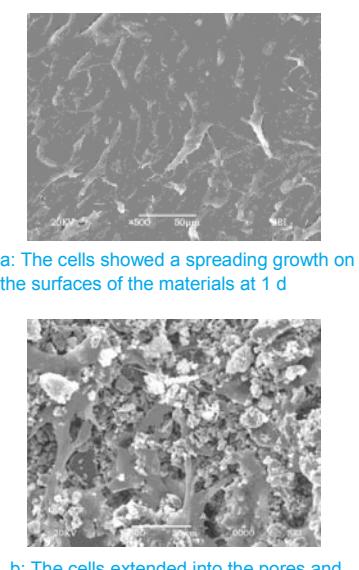


Figure 2 Growth and proliferation of human umbilical cord mesenchymal stem cells on nano-hydroxyapatite/polyamide 66 materials after osteogenic induction
图 2 成骨诱导 hUCMSCs 在 nHA/PA66 上的生长增殖

hUCMSCs复合nHA/PA66材料生长曲线可见, 五六天后细胞快速增长, 9~10 d进入平台期。实验组及对照组hUCMSCs生长增殖活性随着时间延长而增加, 到达顶峰进入平台期后略有下降, 见图3, 2~12 d各时间点两组A值差异无显著性意义($P > 0.05$), 且从生长曲线增殖规律看出两者相似, 均提示nHA/PA66多孔材料对成

骨诱导后hUCMSCs的生长和增殖没有影响。

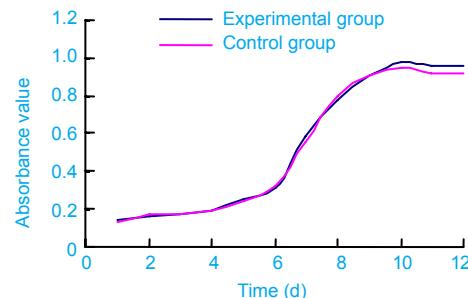


Figure 3 Cell growth curves of the experimental and control groups tested by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay
图 3 实验组与对照组 MTT 法测定细胞生长曲线图

2.3 碱性磷酸酶定量检测结果 第4天开始碱性磷酸酶活性逐渐增高, 10 d后逐渐达到最高值水平, 对照组增高不明显。各时间点实验组的碱性磷酸酶活性水平明显高于对照组, 两组之间差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。

Table 1 Comparison of alkaline phosphatase activity between the experimental and control groups ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{kat/L}$)

Time	Control group	Experimental group
2 d	170.37 \pm 2.17	216.38 \pm 21.84 ^a
4 d	201.04 \pm 17.00	333.90 \pm 22.17 ^a
6 d	240.55 \pm 17.00	500.27 \pm 16.34 ^a
8 d	266.39 \pm 17.00	787.16 \pm 18.17 ^a
10 d	285.56 \pm 18.84	896.51 \pm 27.01 ^a
12 d	310.90 \pm 16.84	1 032.21 \pm 16.84 ^a
14 d	334.57 \pm 15.34	1 058.04 \pm 28.51 ^a

^a $P < 0.05$, vs. control group

2.4 细胞毒性测试结果 2, 4 d时间点支架材料细胞毒性评级均为0级, 8 d毒性评级为1级, 实验组与对照组A值比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 各组对hUCMSCs的增殖无明显影响, 说明nHA/PA66支架对hUCMSCs生长基本无毒性作用。

3 讨论

目前评价的生物相容性的方法主要为: 体内埋植法和体外培养法^[7-8]。其中体外培养法通过生物材料与相应细胞复合后在体外培养, 直接观察细胞在该材料表面粘附、生长和增殖, 并有效检测细胞生理变化^[9]。此方法简单有效, 重复性好, 有利于了解细胞与材料的相互作用, 在目前评定生物相容性的方法中常应用得最广泛^[10]。本实验运用体外培养法, 主要从细胞在材料上的黏附及生长增殖、材料细胞毒性、材料对细胞成骨性能影响等几个方面评价hUCMSCs与nHA/PA66材料在体外培养体系中的生物相容性。

本实验观察hUCMSCs在nHA/PA66支架材料的粘附、生长情况, 为材料与细胞的相容性在细胞形态学上提供直接的证据。实验结果发现hUCMSCs在24 h内贴

附nHA/PA66表面生长; 5~7 d细胞增多并可伸入材料孔隙, 并覆盖孔隙表面。说明nHA/PA66支架材料不但对hUCMSCs附着、生长无不良影响, 而且提供三维空间让细胞向孔隙内部生长。

碱性磷酸酶是成骨细胞分化的早期重要标志酶之一, 代表成骨分化的开始。该酶活性越高, 说明前成骨细胞向成熟成骨细胞分化越明显^[11-13]。本实验在成骨诱导hUCMSCs与nHA/PA66复合培养后, 碱性磷酸酶活性随着成骨复合培养的时间增长而增加, 可以说明hUCMSCs在nHA/PA66支架材料可以继续维持成骨分化的潜能。种子细胞与材料体外培养时, 支架材料对细胞的毒性过大, 会影响细胞对材料的黏附、增殖、分化甚至母体正常的生理功能。因此, 支架材料对种子细胞的细胞毒性大小也是检验生物相容性好坏的重要指标^[14-15]。本实验选择MTT法检测材料对细胞的毒性作用, 由于该方法具有成本较低、操作简单、无环境污染等优点, 能灵敏地反映出细胞被损害的程度^[16-18], 目前已被国内外公认且应用广泛。既往在鉴定细胞毒性试验中应用最早及使用最广泛的测定细胞是小鼠成纤维细胞(L929), 而目前越来越多的学者根据使用目的选择人体不同或/和组织来源的细胞作为实验细胞, 其结果也更为准确与客观^[19]。本实验直接以成骨诱导的hUCMSCs为测定细胞, 通过MTT法首先检测hUCMSCs在支架材料上生长增殖活性, 从绘制的生长曲线上分析, 发现成骨诱导培养的hUCMSCs在nHA/PA66上仍具备较高的增殖能力, 实验组及对照组hUCMSCs生长增殖活性随着时间延长而增加, 且从生长曲线增殖规律看出两组相似, 均说明nHA/PA66多孔材料可以为种子细胞hUCMSCs的良好载体, 对其生长和增殖无不良影响。且MTT法检测nHA/P66对hUCMSCs细胞毒性, 各时间点均评价为无毒。说明nHA/P66材料对成骨诱导的hUCMSCs无毒, 生物相容性好。

hUCMSCs作为一种多潜能干细胞, 具有取材方便、来源更加原始、生物性能稳定、免疫原性低, 其在骨组织工程领域具有广阔的应用前景^[20]。nHA/PA66多孔支架材料可作为骨组织工程中hUCMSCs的细胞载体, 生物相容性良好, 不影响该细胞的生长增殖及成骨分化, 满足骨组织工程的需要。

4 参考文献

- [1] Wang X,Wenk E,Zhang X,et al.Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering.J Control Release. 2009;134(2):81-90.
- [2] Kizuki T,Ohgaki M,Ichinose S,et al.Specific response of osteoblast-like cells on hydroxypatite layer containing serum protein.J Mater Sci Mater Med. 2006;17(9):859-867.
- [3] Chesnutt BM,Yuan Y,Buddington K,et al.Composite chitosan/nano-hydroxyapatite scaffolds induce osteocalcin production by osteoblasts in vitro and support bone formation in vivo.Tissue Eng Part A. 2009;15(9):2571-2579.

- [4] Shi YY,Wang GL,Yang HL,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14 (8):1341-1344.
施咏毅,王根林,杨惠林,等.多孔型丝素蛋白/羟基磷灰石复合脂肪间充质干细胞修复兔股骨缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14 (8):1341-1344.
- [5] Li YH,Cao LH,Huang JF,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(41):8143-8146.
李颖华,曹丽华,黄剑锋,等.生物医药纳米羟基磷灰石的性质及其制备[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(41):8143-8146.
- [6] Roberta T,Andrea A,Michela C,et al.Development of sarcomas in mice implanted with mesenchymal stem cells seeded onto bioscaffolds. Carcinogenesis Oxford. 2009;30(1):150-157.
- [7] Mathieu LM,Mueller TL,Bourban PE,et al.Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2006;27(6):905-916.
- [8] Schofer MD,Boudriot U,Leifeld I,et al.Characterization of a PLLA-collagen I blend nanofiber scaffold with respect to growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. ScientificWorldJournal. 2009;9:118-129.
- [9] Hwang YS,Cho J,Tay F,et al.The use of murine embryonic stem cells,alginate encapsulation, and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering. Biomaterials. 2009;30(4):499-507.
- [10] Li RY,Li JJ,Yao YL,et al.Jiepouxue Zazhi. 2010;33(4):506-508.
李如月,李俊杰,姚玉丽,等.新型壳聚糖基仿生支架材料生物相容性的评价[J].解剖学杂志,2010,33(4):506-508.
- [11] Bobis S,Jarocha D,Majka M.Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications.Folia Histochem Cytopiol. 2006;44(4):215-230.
- [12] Friedman MS,Long MW,Hankenson KD.Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. Cell Biochem. 2006;98(3):538-554.
- [13] Vidal MA,Kilroy GE,Lopez MJ,et al.Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Vet Surg. 2007;36(7): 613-622.
- [14] Cheng G,Guoji Kouqiang Yixue Zazhi. 2010;37(5):593-596.
程谷.骨组织工程中的检测方法及其效果评价展望[J].国际口腔医学杂志,2010,37(5):593-596.
- [15] Ioletti DP,Takei H,Lin T,et al.The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast function. Biomaterials. 2000;21(10):1103-1114.
- [16] Lv XY,Koppent HF.Zhonghua Kouqiang Zazhi. 1995;30(3): 337-338.
吕晓迎,Koppent HF.牙体材料细胞毒性评定的新方法MTT[J].中华口腔医学杂志,1995,30(3):337-338.
- [17] Ma L,Wang H,Li YJ,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang kangfu. 2007;11(40):8021-8024.
马亮,王洪,李艳军,等.三维丝素支架材料制备及其与骨髓间充质干细胞的生物相容性[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(40):8021-8024.
- [18] Zheng XY,Zhang ZT,Fang Y,et al.Beijing Kouqiang Yixue. 2006;14(3):189-191.
郑晓雁,张振庭,方玉,等.MTT法评价国产碳纤维桩材料的细胞毒性[J].北京口腔医学,2006,14(3):189-191.
- [19] Min SX,Jin AM,Guowai Yixue Shengwuxue Gongcheng Fence. 2000;23(6):353-355.
闵少雄,靳安民.医用生物材料-骨组织界面研究[J].国外医学:生物医学工程分册,2000,23(6):353-355.
- [20] Frey MA.Umbilical cord stem cell transplantation.Semin Oncol Nurs. 2009;25(2):115-119.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 第三、四、五作者进行实施、评估, 资料收集为第一、四、五作者, 第一作者成文, 第二作者审校, 第一作者对文章负责。

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。

伦理要求: 参与实验的患病个体及其家属自愿参加, 在充分了解本治疗方案的前提下签署“知情同意书”; 治疗方案获医院伦理委员会批准。

本文创新性: 实验直接以成骨诱导的人脐带间充质干细胞为测定细胞, 通过MTT法首先检测人脐带间充质干细胞在支架材料上生长增殖活性, 从绘制的生长曲线上分析, 发现成骨诱导培养的人脐带间充质干细胞在纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 多孔支架上仍具备较高的增殖能力。