

纳米磷酸钙对MG63细胞生物学行为的影响***◆

曹俊, 蔡玉荣, 马寅孙, 姚菊明

Effect of calcium phosphate nanoparticles on biological behaviors of MG63 cells

Cao Jun, Cai Yu-rong, Ma Yin-sun, Yao Ju-ming

文章亮点:

采用水热法和化学沉淀法制备出3种不同形貌的纳米磷酸钙并铺膜, 系统地分析了3种磷酸钙膜对MG63细胞的黏附、增殖、分化、迁移及凋亡等生物学行为的影响。

Abstract

BACKGROUND: Several studies have shown that many features of nanomaterials can influence nanomaterials toxicity obviously, such as their size, shape and crystallinity.

OBJECTIVE: To explore the effect of material shapes on the biological behaviors of MG63 cells and to analyze the correlations between their physical-chemical properties and biological effect by using three kinds of calcium phosphate nanoparticles with different shapes.

METHODS: Spherical, fusiform and rod-like calcium phosphate nanoparticles were synthesized by hydro-thermal method and chemical precipitation method and filmed on the glasses. The size, shape, roughness and crystallinity of calcium phosphate nanoparticles and their films were characterized by transmission electron microscope, field emission scanning electron microscopy, atomic force microscopy, dynamic light scattering and X-ray diffraction. MG63 cells were seeded and cultured on films. Effects of calcium phosphate on the biological behaviors of MG63 were detected, including adhesion, proliferation, differentiation, and apoptosis.

RESULTS AND CONCLUSION: The results showed that the shape and crystallinity of calcium phosphate influenced MG63 cells proliferation obviously. Calcium phosphate nanoparticles with high aspect ratio and high crystallinity could promote cells proliferation, and conversely, calcium phosphate nanoparticles with low aspect ratio and low crystallinity could inhibit cells proliferation. MG63 cells were sensitive to the roughness of calcium phosphate films, and cell adhesion ability was decreased with the increase of the roughness of calcium phosphate films. These findings suggest that the three kinds of calcium phosphate can promote cells migration effectively, but there are no obvious influences on cells differentiation and apoptosis.

Cao J, Cai YR, Ma YS, Yao JM. Effect of calcium phosphate nanoparticles on biological behaviors of MG63 cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(29): 5341-5344. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 纳米材料的尺寸、形貌、结晶度等性质对其毒性具有明显的影响。

目的: 选用3种不同形貌的磷酸钙纳米颗粒来探索材料形貌对MG63细胞各种生物学行为的影响, 并分析其物理化学性质与生物学效应之间的关系。

方法: 利用水热法和化学沉淀法制备球形、梭形和棒状3种不同形貌的磷酸钙颗粒并铺膜, 通过透射电镜、场发射扫描电镜、原子力显微镜、动态光散射、X射线衍射对磷酸钙颗粒及其膜的尺寸、形貌、粗糙度和结晶度等性质进行表征。在磷酸钙膜上培养MG63细胞, 检测磷酸钙对细胞的黏附、增殖、分化及凋亡的影响。

结果与结论: 磷酸钙形貌及结晶度对MG63细胞的增殖具有明显的影响。颗粒长径比大, 结晶度高的颗粒, 能促进细胞的增殖; 反之, 则抑制细胞的增殖。磷酸钙膜的粗糙度对细胞的黏附过程具有明显的影响, 粗糙度越大, 抑制作用越明显。3种磷酸钙对细胞的分化和凋亡没有明显的影响。

关键词: 磷酸钙; 细胞毒性; 结晶度; 生物材料; 生物活性; 纳米医学

曹俊, 蔡玉荣, 马寅孙, 姚菊明. 纳米磷酸钙对MG63细胞生物学行为的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(29):5341-5344. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Key Laboratory of Advanced Textile Materials & Manufacturing Technology, Ministry of Education, College of Materials and Textile, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

Cao Jun★, Studying for master's degree, Key Laboratory of Advanced Textile Materials & Manufacturing Technology, Ministry of Education, College of Materials and Textile, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China
caojunmy@gmail.com

Corresponding author: Yao Ju-ming, Doctor, Doctoral Supervisor, Professor, Key Laboratory of Advanced Textile Materials & Manufacturing Technology, Ministry of Education, College of Materials and Textile, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China
yaoj@zstu.edu.cn

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No.21041003*; 51172207*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.29.005

Received: 2011-12-01
Accepted: 2012-02-06

0 引言

磷酸钙是人体骨和牙齿的主要无机组成部

分, 具有良好的生物相容性, 生物可降解性以及骨传导性, 在骨修复替代、药物载体, 荧光探针等方面已表现出良好的应用前景^[1]。目前, 关于纳米磷酸钙的细胞毒性方面的报道也有很

浙江理工大学材料与纺织学院, 教育部先进纺织材料与制备技术重点实验室, 浙江省杭州市 310018

曹俊★, 男, 1987年生, 汉族, 四川省绵阳市人, 浙江理工大学在读硕士, 主要从事生物材料的研究。
caojunmy@gmail.com

通讯作者: 姚菊明, 博士, 博士生导师, 教授, 浙江理工大学材料与纺织学院, 浙江省杭州市 310018
yaojm@zstu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2012)29-05341-04

收稿日期: 2011-12-01
修回日期: 2012-02-06
(20110901010/D·T)

多。例如Yuan等^[2]发现磷酸钙对细胞增殖的影响具有尺寸依赖性, 磷酸钙能够通过线粒体依赖途径介导HepG2细胞的凋亡; Mostskin等^[3]认为不同磷酸钙的降解性差异导致其进入细胞后改变细胞内钙离子浓度的能力不同, 因而具有不同的细胞毒性。虽然对于磷酸钙的生物相容性进行了许多研究, 但是因为材料制备、关注角度和研究方法不同, 所得到的研究结果也不尽相同, 至今还没有关于磷酸钙细胞毒性的系统结论。本实验采用水热法和化学沉淀法制备出3种不同形貌的纳米磷酸钙并镀膜, 系统地分析了3种磷酸钙膜对MG63细胞的黏附、增殖、分化及凋亡等生物学行为的影响。

1 材料和方法

设计: 多组对照细胞学实验。

时间及地点: 材料制备表征及细胞生物学实验于2010-03/2011-06于浙江理工大学先进纺织材料与制备技术教育部重点实验室完成。部分检测于浙江大学华家池校区完成。

材料:

试剂及仪器	来源
MG63 细胞	中科院上海生科院细胞资源中心
DMEM	GIBICO
MTT 检测试剂盒、 Actin-Tracker Green 试剂盒	碧云天生物科技有限公司
ALP 检测试剂盒	南京建成生物工程研究所
丝胶蛋白	澳特丝生物科技有限公司
ELB2000 电子天平	日本津岛
ES-315 高压蒸汽灭菌锅	美国 TOMY 公司
680 型酶标仪	BIO-RAD
OP2-BSW 荧光显微镜	Olympus
X'TRA X 多晶粉末衍射仪	瑞士 ARL
LB550 激光粒度分析仪	日本 Horiba
s-4800 场发射扫描电镜	日本 日立
JEM-2100 透射电镜	日本 JEOL
XE-100E 原子力显微镜	Park Systems Inc

方法:

纳米磷酸钙的制备和镀膜: 采用水热法制备棒状磷酸钙, 具体步骤为: 将3 mL CTAB(0.09 mol/L)加入176 mL H₂O中搅拌30 min, 然后加入60 mL Na₂HPO₄(0.03 mol/L)并用NaOH(1 mol/L)调节pH至9.5, 室温下搅拌30 min, 缓慢滴加60 mL CaCl₂(0.05 mol/L), 在滴加过程中调节pH保持稳

定, 滴加完成后室温继续反应24 h, 最后在高压灭菌锅中反应20 min, 温度为121 °C。制得的磷酸钙用去离子水和乙醇分别洗3次, 冷冻干燥。利用化学沉淀法制备球状磷酸钙, 具体步骤为: 将1.25 g丝胶蛋白溶于150 mL H₂O中, 50 °C水浴至完全溶解, 然后加入50 mL CaCl₂并用NaOH(1 mol/L)调节pH至9.5, 搅拌30 min, 缓慢滴加60 mL Na₂HPO₄, 在滴加过程中调节pH保持稳定, 滴加完成后马上离心分离沉淀, 并将沉淀用去离子水和乙醇分别清洗3次, 冷冻干燥后得到球状磷酸钙样品。梭状磷酸钙样品的制备方法与球状磷酸钙的方法基本相同, 只是在反应过程中保持pH为12, 且反应持续时间为320 min, 经过同样的清洗、干燥过程, 得到样品。将制得的3种样品以0.1%的浓度均匀分散在乙醇中, 取100 μL上清液滴加在洗净的玻璃片上, 自然干燥, 即制得磷酸钙膜。将磷酸钙膜放置在165 °C干热灭菌箱中3 h, 灭菌好的磷酸钙膜置于超净台中备用。

MG63细胞黏附和增殖情况检测: 将灭菌好的磷酸钙膜置入48孔板, 每个孔中加入4×10⁵个MG63细胞。在37 °C体积分数5%CO₂条件下培养2 h, 吸出培养基, 用PBS洗1次, 加入200 μL无血清DMEM和MTT在37 °C、体积分数5%CO₂条件下放置4 h, 吸出培养基, 加入200 μL DMSO溶解紫色产物, 取100 μL加入96孔板, 酶标仪检查570 nm处吸光度值, 所得的吸光度值与黏附细胞的数量呈正比关系。每个样品设3组平行对照。

37 °C、体积分数5%CO₂条件下细胞在磷酸钙膜上分别培养2, 4, 6 d, 按同样方法检测570 nm处的吸光度值, 所得的吸光度值反映细胞增殖情况。每个样品设6组平行对照。

MG63细胞迁移情况观察: 将灭菌好的磷酸钙膜置入12孔板, 在膜上放置1个方形的玻片, 每个孔中加入4×10⁵个MG63细胞。在37 °C、体积分数5%CO₂条件下培养48 h, 然后取出方形玻片, 继续培养12 h, 在倒置显微镜下观察细胞的迁移情况。为了进一步了解细胞骨架的变化情况, 按1×10⁵/孔的细胞密度加入12孔板, 在37 °C、体积分数5%CO₂条件下培养24 h, 用微丝绿色荧光探针试剂盒对细胞骨架进行荧光标记, 在显微镜下观察细胞骨架的变化情况。

MG63细胞分化情况检测: 将灭菌好的磷酸钙膜置入48孔板, 每个孔中加入 4×10^5 个MG63细胞。在 37°C 、体积分数5% CO_2 条件下分别培养2, 4, 6 d。吸出培养基并加入 $200\ \mu\text{L}$ 1% triton x-100, -20°C 条件下反复冻融3次, 通过碱性磷酸酶试剂盒测定酶活力。每个样品设3组平行对照。

MG63细胞凋亡情况检测: 将灭菌好的磷酸钙膜置入48孔板, 每个孔中加入 4×10^5 个MG63细胞。在 37°C 、体积分数5% CO_2 条件下分别培养2, 4, 6 d。采用Hoechst 33258试剂盒对细胞核进行染色, 在荧光显微镜下观察细胞核的形态。

主要观察指标: 磷酸钙纳米颗粒及膜的表征及3种磷酸钙膜对MG63细胞黏附、增殖、迁移、凋亡的影响。

2 结果

2.1 磷酸钙纳米颗粒及膜的表征 制备的3种颗粒的形貌分别为均匀的棒状, 球状和梭状, 见图1a-c。其中棒状磷酸钙的长度约为120 nm, 宽度约为20 nm, 长径比约为6; 梭状磷酸钙的长度也约为120 nm, 宽度约为40 nm, 其长径比约为3; 球状磷酸钙的平均直径约为50 nm。

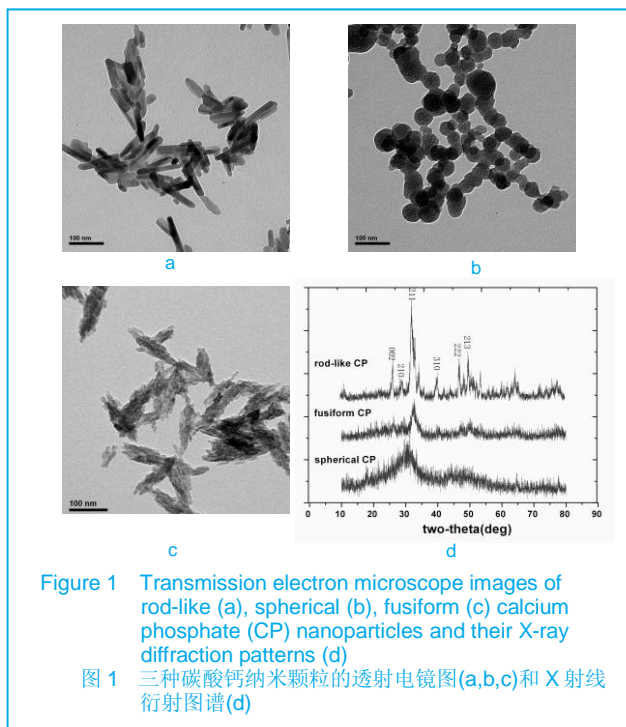


图1 三种磷酸钙纳米颗粒的透射电镜图(a,b,c)和X射线衍射图谱(d)

样品X射线衍射结果, 见图1d。棒状磷酸钙的衍射峰较多, 各衍射峰峰形较尖锐, 且均与羟基磷灰石特征衍射峰(卡片号9-432)相对应, 表明其为结晶度较好的羟基磷灰石; 与棒状磷酸钙颗粒的衍射图相比, 梭状磷酸钙的衍

射峰较少, 峰形宽化, 但是其图上出现的所有衍射峰都与羟基磷灰石衍射峰相对应, 表明该样品为结晶度较差的羟基磷灰石; 而球状磷酸钙只在 $25^\circ\sim 35^\circ$ 出现1个宽化的衍射峰, 表明其结晶度很差, 主要以非结晶态形式存在。

2.2 三种磷酸钙膜对MG63细胞黏附的影响 MG63细胞与3种膜共培养2 h之后, 采用MTT法对细胞的黏附情况进行了探索。培养2 h以后, 球状磷酸钙组吸光度明显比对照组小, 表明黏附其上的细胞数量较少, 而棒状和梭状磷酸钙组的吸光度值只有轻微的小, 结果说明球状磷酸钙膜对细胞的黏附能力有较大的抑制作用, 而棒状和梭状磷酸钙膜对细胞黏附有较轻微的抑制作用, 见图2。

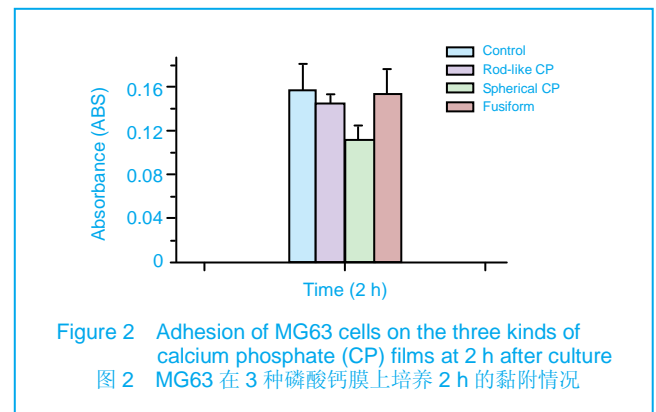


Figure 2 Adhesion of MG63 cells on the three kinds of calcium phosphate (CP) films at 2 h after culture
图2 MG63在3种磷酸钙膜上培养2 h的黏附情况

2.3 三种磷酸钙膜对MG63细胞增殖的影响 采用MTT法对细胞在3种膜上的增殖情况进行了评价, MTT检测结果, 见图3。在第2天时, 球状磷酸钙组的吸光度值低于对照组, 而棒状磷酸钙和梭状磷酸钙组与对照组比较, 差异无显著性意义; 在第4~6天时, 球状磷酸钙组吸光度值明显低于对照组, 而棒状磷酸钙和梭状磷酸钙组的吸光度值则明显高于对照组。结果表明球状磷酸钙颗粒能显著的抑制MG63细胞的增殖过程, 而棒状磷酸钙和梭状磷酸钙颗粒能促进MG63细胞的增殖过程。

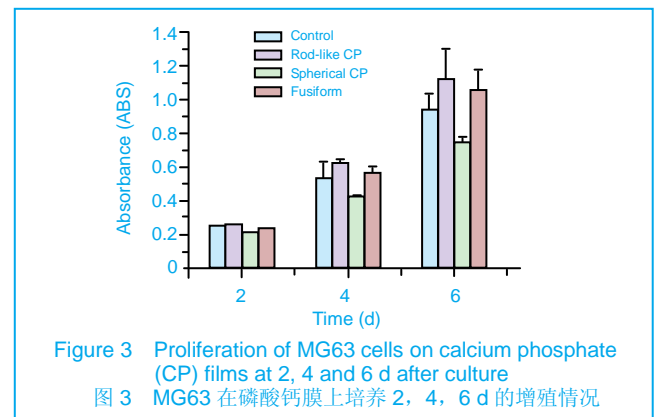
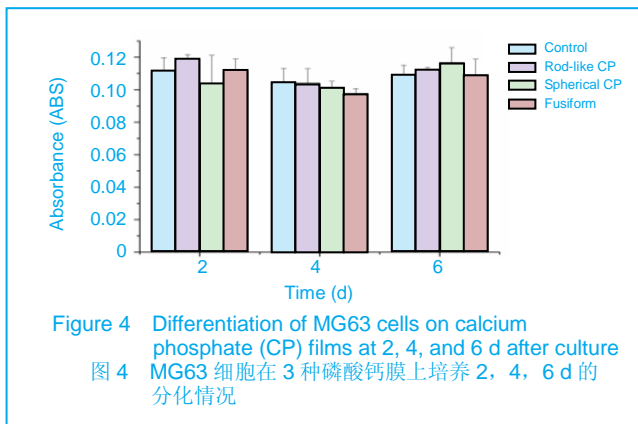


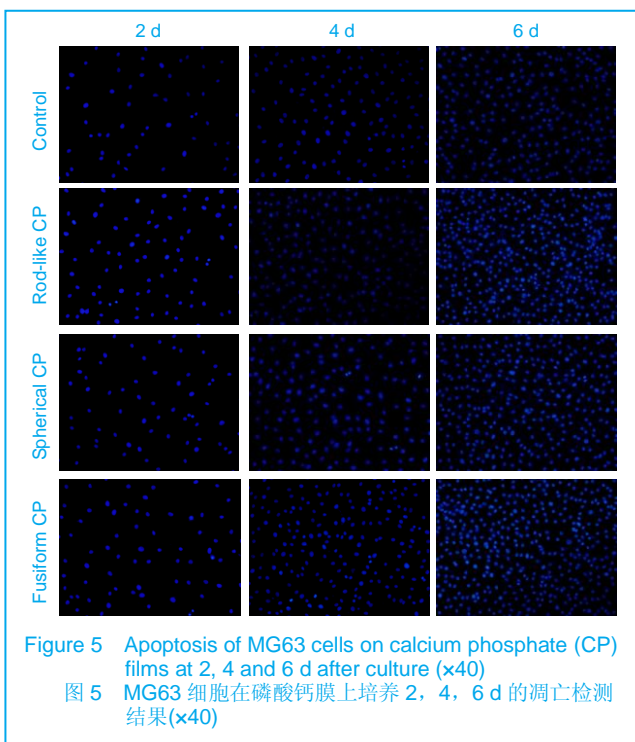
Figure 3 Proliferation of MG63 cells on calcium phosphate (CP) films at 2, 4 and 6 d after culture
图3 MG63在磷酸钙膜上培养2, 4, 6 d的增殖情况

2.4 三种磷酸钙膜对细胞分化的影响 MG63细胞在磷酸钙膜上分别培养2, 4, 6 d, 采用碱性磷酸酶试剂盒对MG63细胞分化情况进行检测, 结果见图4。在2,

4, 6 d后, 3种磷酸钙膜上的细胞碱性磷酸酶活性没有明显的变化规律, 表明3种磷酸钙膜对MG63细胞的分化过程没有明显的影响。



2.5 三种磷酸钙膜对细胞凋亡的影响 采用Hoechst 33258试剂盒对MG63细胞进行凋亡检测, 结果见图5, 随着共培养时间的增加, 细胞的数目不断增多, 这与图5结果相一致。细胞在3种膜上分别培养2, 4, 6 d后, 经染色的细胞核没有出现浓染致密的颗粒块状荧光, 说明细胞在磷酸钙膜上即使培养较长时间, 生长状况也较好, 没有明显的凋亡现象。



3 讨论

本课题研究了3种形貌的磷酸钙颗粒对MG63细胞的黏附, 增殖, 分化及凋亡等生物学行为的影响。从黏附的检测结果可知球状磷酸钙膜对细胞的黏附能力有

较大的影响, 而棒状和梭状磷酸钙膜对细胞黏附过程的抑制作用很小。球状磷酸钙膜上有较明显的孔洞结构, 而且具有较大的粗糙度, 这可能是导致细胞黏附数量较少的原因。Kunzler等^[4]也认为粗糙度大的基底会抑制细胞的黏附过程, 采用MTT法对MG63细胞的增殖过程进行检测, 结果证明球状磷酸钙膜抑制了细胞的增殖过程, 而棒状和梭状磷酸钙膜则促进细胞的增殖, 其中棒状磷酸钙的促进作用最明显。Chou等^[5]发现磷酸钙的结晶度影响细胞的增殖过程, 高结晶度磷酸钙能促进细胞的增殖。Yu等^[6]发现, 纳米颗粒的形貌也影响细胞的增殖, 长径比大的颗粒有促进细胞增殖的作用。Saunders等^[7]认为磷酸钙材料在与细胞共培养时, 会发生降解, 释放出的钙磷离子将改变细胞内线粒体功能, 从而会导致细胞的凋亡。但在本实验中没有发现明显的细胞凋亡现象, 原因可能是三种颗粒的稳定性较好, 在培养基中释放的钙磷离子浓度较小, 不足以引起大量细胞凋亡。

4 参考文献

- [1] Ethirajan A, Landfester K. Functional hybrid materials with polymer nanoparticles as templates. *Chemistry*. 2010;16(31): 9398-9412.
- [2] Yuan Y, Liu C, Qian J, et al. Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Biomaterials*. 2010;31(4):730-740.
- [3] Motskin M, Wright DM, Muller K, et al. Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials*. 2009;30(19): 3307-3317.
- [4] Kunzler TP, Huwiler C, Drobek T, et al. Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients. *Biomaterials*. 2007;28(33): 5000-5006.
- [5] Chou L, Marek B, Wagner WR. Effects of hydroxylapatite coating crystallinity on biosolubility, cell attachment efficiency and proliferation in vitro. *Biomaterials*. 1999;20(10):977-985.
- [6] Yu T, Malugin A, Ghandehari H. Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity. *ACS Nano*. 2011;5(7):5717-5128.
- [7] Saunders R, Szymczyk KH, Shapiro IM, et al. Matrix regulation of skeletal cell apoptosis III: mechanism of ion pair-induced apoptosis. *J Cell Biochem*. 2007;100(3): 703-715.

来自本文课题的更多信息—

基金声明: 国家自然科学基金(21041003): 纳米磷酸钙在硬组织相关细胞中的化学行为; 国家自然科学基金(51172207): 丝胶蛋白/磷酸钙复合材料的形成机理及其性能研究。