

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.43.019 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

樊宇平<sup>1</sup>, 黄靖香<sup>2</sup>, 蔡胥<sup>3</sup>. 中空钛合金假体壁上孔洞直径对细胞生长的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(43): 8067-8070.

## 中空钛合金假体壁上孔洞直径对细胞生长的影响\*\*

樊宇平<sup>1</sup>, 黄靖香<sup>2</sup>, 蔡胥<sup>3</sup>

**文章亮点:** 在体外骨髓基质干细胞在适当的钛合金金属孔径内可直接相向生长并联结, 以预防植入物-宿主骨潜在间隙的形成; 同时这种空间构型可为再生骨提供足够的生长空间。

**关键词:** 中空试件; 孔径; 骨髓基质干细胞; 生长方式; 钛合金; 生物材料

### 摘要

**背景:** 细胞在支架上的生长行为受到支架孔径及孔隙率等多种因素影响。

**目的:** 观察在体外中空钛合金假体壁上孔洞直径对骨髓基质干细胞生长及分化的影响。

**方法:** 将中空多孔金属试件按照壁上及底面孔径大小分为:  $\phi_1$ : 1 mm;  $\phi_2$ : 1.5 mm 两组, 均置于骨髓基质干细胞悬液中进行成骨诱导培养, 以未成骨诱导培养作对照。分别于 2, 4 周倒置相差显微镜观察细胞形态、生长情况, 成骨诱导钙结节结果。

**结果与结论:** 4 周时  $\phi_1$  实验组孔洞中细胞相向生长并相连,  $\phi_2$  组孔洞中未见相连现象; 成骨诱导组在第 4 周有明显的钙结节形成。表明在体外骨髓基质干细胞在适当的钛合金金属孔径内可直接相向生长并联结, 以预防植入物-宿主骨潜在间隙的形成; 同时这种空间构型可为再生骨提供足够的生长空间。

### Effect of different pore sizes of hollow titanium alloy prosthesis's wall on the growth of bone marrow stromal cells

Fan Yu-ping<sup>1</sup>, Huang Jing-xiang<sup>2</sup>, Cai Xu<sup>3</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** The growth behavior of cells on a stent is influenced by the pore size and porosity of stents as well as many other factors.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of different pore sizes of hollow titanium alloy prosthesis's wall on the growth of bone marrow stromal cells (BMSCs).

**METHODS:** Hollow porous metal prostheses were divided into two groups by the pore size of the wall, which were  $\phi_1$ : 1 mm and  $\phi_2$ : 1.5 mm. The prosthesis was located in the BMSCs suspension for osteogenic induction. BMSCs without osteogenic induction served as controls. The cell morphology, growth and calcium nodules were observed under inverted phase contrast microscope.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 4 week, BMSCs were linked directly through the hole of the group  $\phi_1$ , but not in the group  $\phi_2$ . Calcium nodules were formed in the groups  $\phi_1$  and  $\phi_2$ . These indicate that BMSCs cultured *in vitro* can be linked directly in the proper pore size to prevent a potential gap between implants and the host bone. In addition, this spatial structure can provide sufficient space for the growth of regenerated bones.

Fan YP, Huang JX, Cai X. Effect of different pore sizes of hollow titanium alloy prosthesis's wall on the growth of bone marrow stromal cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(43): 8067-8070.

### 0 引言

目前, 为适应不同需求而选择金属植入物表面理想的孔径是该领域的研究重点之一。单纯的细胞生长支架所要求的范围是

300-500  $\mu\text{m}$ 、且具有较高的孔隙率和交通率, 尽管此范围内的孔径在实验中显示了良好的结果<sup>[1]</sup>, 但在实际应用于植入物表面时, 骨长入率仅为5%-20%<sup>[2-3]</sup>, 并不能达到植入物在体内长期稳定的要求。本实验利用中空多孔金属框架为骨组织工程再生构架, 观察了体外中空钛合

<sup>1</sup> 内蒙古乌兰察布市中心医院骨科, 内蒙古自治区乌兰察布市 012000; 解放军总医院, <sup>2</sup> 骨科实验室; <sup>3</sup> 骨科, 北京市 100853

樊宇平★, 男, 1970年生, 内蒙古自治区凉城县人, 汉族, 2007年解放军总医院军医进修学院毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事人工关节的研发。  
Fanyuping1024@126.com

通讯作者: 蔡胥, 博士, 主任医师, 解放军总医院骨科, 北京市 100853

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344 (2012)43-08067-04

收稿日期: 2012-02-02  
修回日期: 2012-03-02  
(20111102022/W · W)

<sup>1</sup>Department of Orthopedics, Ulanqab Central Hospital, Ulanqab 012000, Inner Mongolia Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Orthopedics Laboratory, <sup>3</sup>Department of Orthopedics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Fan Yu-ping★, Master, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Ulanqab Central Hospital, Ulanqab 012000, Inner Mongolia Autonomous Region, China  
Fanyuping1024@126.com

Corresponding author: Cai Xu, Doctor, Chief physician, Department of Orthopedics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30471755\*

Received: 2012-02-02  
Accepted: 2012-03-02

金假体壁上孔洞直径大小对骨髓基质干细胞生长以及分化的影响, 探讨以中空多孔金属假体为框架构建组织工程化骨以及应用于体内进一步促进金属植入物与骨质相对一体化结合的可行性, 为研制中空多孔人工关节假体或其他骨组织再生植入物提供实验依据。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察。

**时间及地点:** 于2006年5至12月在解放军总医院骨科实验中心完成。

**材料:** 健康成年犬由解放军总医院实验动物中心提供。

**中空多孔金属框架的制作:** 设计适合六孔培养板培养的中空金属试件, 钛合金棒材加工制作。中空金属试件为圆柱桶状, 顶端开口, 外径为10 mm, 壁厚为0.5 mm, 于底面及侧面底部打孔, 见图1。整个试件表面用烧结法制备羟基磷灰石涂层, 涂层厚度约(100±50) μm。中空金属试件打孔直径为2种规格: 1 mm/1.5 mm。钴60照射后真空无菌包装。



Figure 1 Hollow metal specimen  
图1 中空金属试件

以上实验试件由北京蒙太茵生物科技有限公司制作, 羟基磷灰石纯度95%, Ca/P为1.67, 晶体率70%<sup>[1]</sup>。

**实验方法:**

**实验分组:** 将中空多孔金属试件按照壁上及底面孔径大小分为4组:  $\phi_1$  1 mm, 分为成骨诱导组及非诱导组;  $\phi_2$  1.5 mm, 同样也分为诱导组及非诱导组, 每组5枚; 别于2, 4周观察相关指标。

**骨髓基质干细胞分离、培养及鉴定:** 参考文献方法进行<sup>[4]</sup>。选取健康成年犬, 用100 g/L戊巴比妥钠25 mg/kg麻醉, 抽出骨髓血约20 mL, 离心、洗涤并吸取有核细胞层在50 mL培养瓶

中用含体积分数10%胎牛血清的低糖DMEM培养液在37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>条件下培养<sup>[4]</sup>。

**骨髓基质干细胞传代培养:** 在倒置相差显微镜下观察有核细胞贴壁及生长、增殖情况, 待6-8 d后, 细胞形态多转化为长梭形, 并可见细胞间以突起相互连接, 细胞集落出现融合现象, 铺满瓶底时进行传代。取骨髓基质干细胞第4, 5代, 收集骨髓基质干细胞于50 mL离心管内, 细胞计数, 离心(1 500 r/min, 5 min)。将各离心管内的细胞收集于10 mL离心管内, 加入DMEM培养液制备成 $3 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 的细胞混悬液。将中空试件放入6孔培养板中, 底部置盖玻片, 倒置相差显微镜观察骨髓基质干细胞的生长、增殖。

**成骨诱导培养液的配制:** 地塞米松 0.1 μmol/L; L-抗坏血酸 50 mg/L; β-甘油磷酸钠10 mmol/L; 体积分数10%胎牛血清的高糖DMEM培养液<sup>[4]</sup>。收集 $3 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 的细胞混悬液置于10 mL无菌离心管内, 按实验分组分别将上述实验试件置入细胞混悬液中, 37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>条件下静置2 h后, 倒置相差显微镜下观察骨髓基质干细胞于DBM细胞支架贴附后, 将各实验试件移入6孔培养板中, 37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>条件下培养。隔日换液。分别于2, 4周倒置相差显微镜观察细胞形态及钙结节形成情况。

**主要观察指标:** 各组试件倒置相差显微镜观察结果。

## 2 结果

**各组试件倒置相差显微镜观察结果:** 实验试件孔洞边缘, 细胞明显呈长梭形, 并呈多层叠加结构, 见图2。

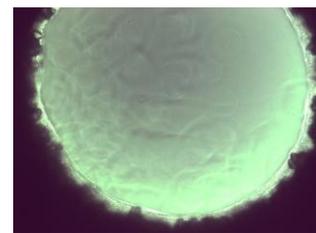


Figure 2 Adherent cells at the pore edge (×40)  
图2 实验试件孔洞边缘细胞贴壁情况(×40)

2周时未见增厚, 4周各组孔洞边缘细胞厚度, 但在  $\varphi_1$ : 1 mm 的实验组孔洞中出现孔壁细胞相向直接生长并相连接的现象,  $\varphi_2$ : 1.5 mm 直径规格的孔洞未见相连现象。见图3, 4。



Figure 3 Opposite growth and linkage of adherent cells in the pore (x40)  
图3 孔洞贴壁细胞相向生长并相连(x40)



Figure 4 Partial enlargement image (x40)  
图4 局部放大图(x40)

在成骨诱导液组载玻片上可观察到有钙结节形成。见图5。



Figure 5 Calcium nodules formed following osteogenic induction under inverted phase contrast microscope (x40)  
图5 成骨诱导液组倒置相差显微镜下钙结节形成(x40)

### 3 讨论

将实验用钛合金金属试件设计为空心体构架, 应用组织工程学方法在体外诱导骨髓基质干细胞在中空结构中生长, 观察交通孔径对于局部细胞生长与相互联系方式的影响, 同时观测骨髓基质干细胞在体外金属构架内的成骨性能, 为进一步研究理想的交通孔径提供理论依据。

Cohnheim最早提出骨髓中存在骨髓基质干细胞, 体外培养的骨髓基质干细胞形成典型的成纤维样细胞集落形成单位, 具有多种分化潜能<sup>[5]</sup>。Benayahu<sup>[6]</sup>将骨髓基质干细胞体外培养获得了具有典型成骨细胞特性的细胞: 骨特异性碱性磷酸酶活性高, I型胶原阳性, 有矿化基质产生, 因而成为骨组织工程学中种子细胞的最佳来源。由于骨髓基质细胞贴壁而其他杂细胞不贴壁, 所以可通过培养中的换液和传代过程来去除后者、保留前者, 这种纯化骨髓基质细胞的方法简便易行, 只需少量骨髓即可。

本实验自行制备成骨诱导液, 其中地塞米松与骨髓基质细胞表面的特异糖皮质激素受体相结合对其分化时的基因表达有一定调控作用, 从而促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化、成熟, 它在促进基质合成与钙化的同时还提高骨特异性碱性磷酸酶活性;  $\beta$ -甘油磷酸钠则提供磷离子作为骨特异性碱性磷酸酶作用的底物, 诱导和激活骨特异性碱性磷酸酶, 促进有机磷向无机磷转化, 加速钙盐沉积; L-抗坏血酸的作用在于促进体外培养细胞合成胶原, 形成钙化, 也能调节骨特异性碱性磷酸酶活性。结果表明骨髓基质干细胞经诱导后, 骨特异性碱性磷酸酶活性呈强阳性, 呈现出成骨细胞的特性<sup>[7-8]</sup>。

以前植入物的内部结构是实心一体化, 为加强其稳定性以及长期在位率, 相关的研究集中在植入物的表面处理上。但这类方法未能达到有效的骨-假体一体化整合目的, 尤其是在长期反复的应力作用下, 往往产生无菌性骨溶解, 从而影响植入物在体内的长期稳定。

本试验试图通过探索新型金属植入物的空间结构, 观察空心植入物在体外对细胞生长方式的影响, 同时观察这种植入物上孔洞孔径大小对于细胞贴附和生长方式的影响。通过这种植入物-骨的新型结合模式, 使得植入物内外能够通过壁上孔洞达到直接连接的目的, 从而达到这种植入物的内锁机械力大幅增加, 获得植入物更加长期的稳定性<sup>[9]</sup>。目前仅有体内骨收集室(BHC)作为孔径大小的参考(孔径: 1 mm), 但该模型仅仅用于体内试验, 且并无植入物与宿主骨界面的显微观察。最初Albrektsson等<sup>[10]</sup>在研究钛金属植入物在体内与不同的环境下(如: 止血状态、外周血以及自体骨髓)的骨形成率时, 设计和应用了BHC这一模型。之后Goodman<sup>[11]</sup>在研究磨损颗粒与人工假体松动的关系和途径时, 同样应用这一模型在动物体内模拟人工假体微动时产生磨损颗粒并导致骨-假体界面相应异常炎症反应, 干扰了假体表面的骨长入。而体外研究尚未见金属表面孔洞形状、直径以及孔洞深度的研究。本实验设计植入物的孔

径时设定为1.0 mm和1.5 mm两组, 每组中再根据是否诱导分为2亚组。试验结果显示在4周时, 直径为1 mm的孔径中可以观察到孔洞边缘细胞相向生长并连接的现象, 因无细胞生长所需的细胞三维支架的附着, 故无明显的组织形成。但该结果仍能够证实该直径能够满足细胞生长的需求, 而在1.5 mm直径的孔径中未观察到此现象。但只是体外试验的结果, 应当在体内试验中进一步通过组织切片证实。

本实验研究表明, 在体外骨髓基质干细胞在适当的钛合金金属孔径范围内可直接相向生长并联结, 以预防植入物—宿主骨潜在间隙的形成; 同时这种空间构型可为再生骨提供足够的生长空间, 增大与宿主骨的接触面积, 促进再生骨与宿主之间形成的绞锁, 提示这种中空钛合金实验试件能够作为一种新型植入物的空间结构, 具有进一步深入研究的价值。本实验主要探索了植入物壁上孔径的大小, 在以后的进一步研究中, 还应当在孔洞的深度方面进一步研究, 同时观察孔径与孔洞深度之间的相互影响。

#### 4 参考文献

- [1] Hollinger JO, Enhorn TA, Doll BA, et al. Bone Tissue Engineering. Washington, D.C: CRC PRESS. 2005:165-178.
- [2] LaPorte DM, Mont MA, Hungerford DS. Proximally porous-coated ingrowth prostheses: limits of use. Orthopedics. 1999; 22(12):1154-1160.
- [3] Kalebo P, Buch F, Albrektsson T. Bone formation rate in osseointegrated titanium implants: Influence of locally applied haemostasis, peripheral blood, autologous bone marrow and fibrin adhesive system (FAS). Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg. 1988;15 (4):59-72.
- [4] Situ ZQ, Wu JZ. Xi'an: Shijie Tushu Chubanshe. 1996: 111-115.  
司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996: 111-115.
- [5] Sanchez RJ, Song S, Cardozo PF, et al. Adult bone marrow stromal cell differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol. 2000;164(2):247-256.
- [6] Benayahu D. Osteocalcin(BGP), gene expression, and protein production by marrow stromal adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1997;233(1):30-35.
- [7] Liu X, Le YL. Zhongguo Shengwu Yixue Gongcheng Xuebao. 1997;16(1):71-82.  
刘侠, 乐以伦. 碱性磷酸酶与钙化[J]. 中国生物医学工程学报, 1997, 16(1):71-82.
- [8] Li XX, Lin Q, Bao ZY. Zhongguo Guzhi Shusong Zazhi. 2003; 9(8):211-213.  
李晓新, 林琴, 包振英. 不同方法检测成骨细胞中碱性磷酸酶的比较[J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9(8):211-213.
- [9] Cai X. Shijie Yiliao Qixie. 2004; 10(2):12-15.  
蔡谔. 生物复合型中空人工关节假体[J]. 世界医疗器械, 2004, 10(2):12-15.
- [10] Albrektsson T, Jacobsson M, Kalebo P. The harvest chamber - a newly developed implant for analysis of bone remodeling in situ. Biomaterials and Biomechanics. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984:283-288.
- [11] Goodman SB. The effects of micromotion and particulate materials on tissue differentiation. Bone chamber studies in rabbits. Acta Orthop Scand. 1994; Suppl:64-71.

#### 来自本文课题的更多信息——

**基金声明:** 国家自然科学基金项目资助 (30471755)。

**作者贡献:** 设计、实施、评估为本文作者。

**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:** 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**文章要点:** 观察在体外中空钛合金假体壁上孔洞直径对骨髓基质干细胞生长及分化的影响。

**关键信息:** 在体外骨髓基质干细胞在适当的钛合金金属孔径范围内可直接相向生长并联结, 以预防植入物—宿主骨潜在间隙的形成。

**研究的创新之处与不足:** 人工假体植入的无菌性骨溶解是多因素造成的, 此实验仅仅是为预防界面磨损颗粒进入目的而设计的。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。