

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.51.012

[http://www.crter.org]

翁志强, 孙敏, 唐旭炎, 吴占敖, 端礼荣, 姜涛. 纳米钛酸钙对鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(51):8856-8862.

纳米钛酸钙对鼠成骨细胞增殖与分化的影响*

翁志强¹, 孙敏², 唐旭炎³, 吴占敖², 端礼荣⁴, 姜涛² (¹解放军南京军区南京总医院门诊, 江苏省南京市 210002; ²解放军359医院口腔科, 江苏省镇江市 212001; ³安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 安徽省合肥市 230032; ⁴江苏大学基础与医学技术学院, 江苏省镇江市 212013)

文章亮点:

实验的特色在于采用水热合成法以聚乙二醇、十六烷基三甲基溴化铵、柠檬酸钠为修饰剂和无修饰剂制备纳米钛酸钙生物材料, 实现了钛酸钙形貌的可控制备, 并且证实了利用或未利用修饰剂的纳米钛酸钙对成骨细胞无毒性作用, 能促进成骨细胞的增殖和分化。

关键词:

生物材料; 纳米生物材料; 纳米; 钛酸钙; 成骨细胞; 细胞增殖; 细胞分化; 其他基金

主题词:

生物材料; 纳米粒; 成骨细胞; 细胞增殖; 口腔

基金资助:

南京军区医学科技创新项目重点课题(联卫 2013-71 号)*

翁志强, 男, 1963 年生, 汉族, 解放军第四军医大学医学毕业, 副主任医师, 主要从事种植体表面改性研究。

wenzhiqiang9898@sina.com

通讯作者: 唐旭炎, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 安徽医科大学附属口腔医院口腔修复科, 安徽省合肥市 230032
txy8302@hotmail.com

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344
(2013)51-08856-07

修回日期: 2013-09-17
(201305037/GW · W)

摘要

背景: 以不同修饰剂制备的纳米钛酸钙具有良好的骨传导性、生物相容性及生物活性。

目的: 观察纳米钛酸钙材料对成骨细胞增殖、分化的影响。

方法: 分别以聚乙二醇、十六烷基三甲基溴化铵、柠檬酸钠为修饰剂制备纳米钛酸钙, 同时制备无修饰剂的纳米钛酸钙。将制备的 4 组纳米钛酸钙分别配制为 0.1, 1.0, 10 g/L 的浸提液, MTT 方法检测材料浸提液对乳鼠成骨细胞增殖及碱性磷酸酶活性的影响, 以正常培养的细胞为对照。

结果与结论: 以聚乙二醇、十六烷基三甲基溴化铵、柠檬酸钠为修饰剂制备的纳米钛酸钙, 无修饰剂的纳米钛酸钙在 1.0, 10 g/L 质量浓度下可明显促进成骨细胞的增殖; 上述 4 组纳米钛酸钙浸提液在 1.0, 10 g/L 质量浓度下, 培养 3, 6, 9 d 的细胞 A 值也高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 培养 6, 9 d 的细胞碱性磷酸酶活性值均高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。表明以聚乙二醇、十六烷基三甲基溴化铵、柠檬酸钠、无修饰剂制备的钛酸钙对成骨细胞无毒性作用, 可促进成骨细胞的增殖和分化。

Nano-calcium titanate effects on rat osteoblast proliferation and differentiation

Weng Zhi-qiang¹, Sun Min², Tang Xu-yan³, Wu Zhan-ao², Duanli Rong⁴, Jiang Tao² (¹Outpatient Department, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China; ²Department of Stomatology, the 359 Hospital of Chinese PLA, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China; ³Stomatologic Hospital & College, Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032, Anhui Province, China; ⁴School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Nano-calcium titanate, prepared with different modifiers, have properties of good osteogenesis, bone conductivity and biocompatibility.

OBJECTIVE: To observe the influence of nano-calcium titanate materials on the proliferation and differentiation of osteoblasts.

METHODS: Nano-calcium titanate was prepared with modifiers such as polyethylene glycol, acetyl trim ethyl ammonium bromide and sodium citrate. Meanwhile, nano-calcium titanate without modifier was prepared. All the four kinds of nano-calcium titanate materials were used to prepare nano-calcium titanate extracts under the concentration of 0.1, 1.0, 10 g/L, respectively. The proliferation of osteoblasts was observed through 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay and alkaline phosphatase activity of osteoblasts was observed. Osteoblasts cultured in normal condition served as contrast.

RESULTS AND CONCLUSION: The proliferation of osteoblasts cultured in the calcium titanate extracts prepared with polyethylene glycol, acetyl trim ethyl ammonium bromide and sodium citrate and without modifier was obviously improved under the concentration of 1.0 and 10 g/L. Absorbance value of the cells cultured in the above-mentioned four kinds of calcium titanate extracts 1.0 and 10 g/L for 3, 6, 9 days exceeded the contrast ($P < 0.05$, $P < 0.01$), as well as the alkaline phosphatase activity ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Calcium titanate prepared with polyethylene glycol, acetyl trim ethyl ammonium bromide and sodium citrate and without modifier has no

Weng Zhi-qiang, Associate chief physician, Outpatient Department, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China
wenzhiqiang9898@sina.com

Corresponding author: Tang Xu-yan, Associate professor, Associate chief physician, Master's supervisor, Stomatologic Hospital & College, Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032, Anhui Province, China
txy8302@hotmail.com

Accepted: 2013-09-17

cytotoxicity effect on osteoblasts, and can promote the proliferation and differentiation of osteoblasts.

Subject headings: biomaterials; nanoparticles; osteoblasts; cell proliferation; mouth

Funding: Medical Science and Technology Innovation Project of Nanjing Military Region, No. 2013-71*

Weng ZQ, Sun M, Tang XY, Wu ZA, Duanli R, Jiang T. Nano-calcium titanate effects on rat osteoblast proliferation and differentiation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(51):8856-8862.

0 引言 Introduction

纳米钛酸钙生物材料具有骨传导性, 提供生物相容性支架, 适合新骨生长; 具有骨诱导性, 可使干细胞分化为成骨细胞; 具有骨生长性, 材料含有促进成骨细胞不同阶段分化的细胞成分。生物材料是能够直接与生理系统接触并发生相互作用, 能够对细胞、组织和器官进行诊断治疗、替换修复或诱导再生的具有特殊性能和功能的材料^[1-4]。钛具有良好的机械强度和生物相容性, 因此钛种植体已被广泛应用于临床修复牙列缺失或牙列缺损。种植体种植成功的关键在于形成良好的种植体-骨结合界面, 而成骨细胞是种植体-骨结合界面中的重要细胞组成部分, 对于形成良好的骨结合界面至关重要^[5]。

对生物材料的要求不仅仅局限于无毒、安全, 生物相容性、血液相容性好, 而且要求生物材料具有细胞外基质的作用, 即生物材料在生理环境中应与活体细胞产生相互作用, 有特殊的细胞响应, 从而诱导细胞发展成有生命力的新生组织或器官。鉴于大多数从生物体组织中分离出来的细胞是贴附生长型的, 即细胞首先必须贴附于材料表面, 然后才有细胞的伸展、迁移、聚集、分化, 细胞与材料的相互作用和其他的生长模式。生物材料组织工程学的研究已进入一个新的发展期, 也面临着知识更新和实验技术转型前所未有的挑战。以分子生物学的知识和技术来研究材料的生物特性, 才能真正掌握生物材料内在的生物功能, 研究开发出创新性的仿生材料, 用于修复并重建人体生理功能。实验证明任何材料的表面化学结构和表面形态结构都可作为生物信号, 这类信号能在分子水平上有效地和特异性地调节人体附着细胞功能性基因的表达、信息核糖核酸的结构稳定、基因产物的合成与功能, 从而有效地产生材料的诱导性生物效应^[6-9]。此类生物效应不仅决定了生物材料的安全性, 也决定了生物材料用于重建人体生理功能的特异性。这类材料表面信号对人体细胞的调节作用是功能特异性的和极其敏感的, 在基因水平的有效调节可在细胞与材料接触的几小时内即出现。

实验采用水热合成法制备以聚乙二醇、十六烷基三甲基溴化铵、柠檬酸钠为修饰剂和无修饰剂纳米钛酸钙生物材料, 旨在评价其对乳鼠成骨细胞生物活性

及增殖和分化的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 对比观察细胞学实验。

时间及地点: 实验于2012年4月至2013年4月在江苏大学化学化工院实验室和江苏大学基础与医学技术学院实验室完成。

材料:

实验动物: 新生一两天SD乳鼠20只, 雌雄不拘, 由江苏大学动物实验中心提供, 许可证号: SYXK(苏)2008-0024。

纳米钛酸钙对鼠成骨细胞增殖与分化影响实验的主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
以聚乙二醇、十六烷基三甲基溴化铵、柠檬酸钠(上海宏瑞化工有限公司)为修饰剂和无修饰剂制备的纳米钛酸钙	江苏大学化学化工学院, 应用化学研究所
DMEM 培养基	GIBCO 公司
胰蛋白酶、胎牛血清、Model680 酶标光度仪	美国 Sigma 公司
倒置相差显微镜	日本 Olympus 公司
MTT	北京中生瑞泰科技有限公司
碱性磷酸酶试剂盒	南京建成生物研究所
CO ₂ 细胞培养箱	上海赛默飞世尔科技公司
台式低速离心机	江苏常州中捷实验仪器制造有限公司

实验方法:

纳米钛酸钙的制备: 将钛酸四正丁酯与无水乙醇室温下混合放入水热反应釜中, 再将称量后的氧化钙和不同的修饰剂(聚乙二醇、十六烷基三甲基溴化铵、柠檬酸钠或无修饰剂)用去离子水溶解后也加入至釜中, 添加去离子水至内胆填充量的80%。密闭后放入DGG-9023A型电热恒温鼓风干燥箱, 反应120 °C 24 h。反应后的底物过滤, 去离子水冲洗、120 °C干燥, 进一步在马弗炉中650 °C下煅烧1 h得到煅烧后的产品, 即为样品。

反应方程式: $Ti(C_4H_9O)_4 + H_2O \rightarrow Ti(OH)_4 + C_4H_9OH$, 钛酸丁酯+水→钛酸+丁醇, $Ti(OH)_4 + OH^- \rightarrow TiO_3^{2-} + H_2O$, 钛酸+氢氧根离子→钛酸根离子+水分子, $Ca^{2+} + TiO_3^{2-} \rightarrow CaTiO_3$, 钙离子+钛酸根离子→钙钛矿。

纳米钛酸钙浸提液的制备: 将以聚乙二醇、十六烷基

三甲基溴化铵、柠檬酸钠为修饰剂和无修饰剂纳米钛酸钙以双重蒸馏水分别配置成0.1, 1.0, 10 g/L 3种质量浓度, 吸取浸提液为50 μL , 浸提质分别为5, 50, 500 μg 。

实验样品:

序号	样品
1	以聚乙二醇为修饰剂制备的 0.1 g/L 钛酸钙
2	以聚乙二醇为修饰剂制备的 1.0 g/L 钛酸钙
3	以聚乙二醇为修饰剂制备的 10g/L 钛酸钙
4	以十六烷基三甲基溴化铵为修饰剂制备的 0.1 g/L 钛酸钙
5	以十六烷基三甲基溴化铵为修饰剂制备的 1.0 g/L 钛酸钙
6	以十六烷基三甲基溴化铵为修饰剂制备的 10 g/L 钛酸钙
7	以柠檬酸钠为修饰剂制备的 0.1 g/L 钛酸钙
8	以柠檬酸钠为修饰剂制备的 1.0 g/L 钛酸钙
9	以柠檬酸钠为修饰剂制备的 10 g/L 钛酸钙
10	无修饰剂的 0.1 g/L 钛酸钙
11	无修饰剂的 1.0 g/L 钛酸钙
12	无修饰剂的 10 g/L 钛酸钙

新生SD大鼠成骨细胞的分离、接种与传代培养^[10-11]: 将10只大鼠胎鼠浸泡于体积分数75%乙醇5 min, 取出后放入培养皿中, 剥出颅骨, 剔除骨膜、血管和结缔组织, 放入含青霉素、链霉素的0.01 mol/L 的PBS(pH=7.4)中浸泡。移入超净台内, 用PBS将取下的颅骨冲洗3次, 并将冲洗干净的骨片剪碎(1 mm \times 1 mm), 均匀地排放到培养瓶中, 贴壁12 h后用培养基洗涤一两次(除去杂质和没有完全贴壁的细胞), 然后加入含体积分数10%胎牛血清完全培养基; 放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5%CO₂培养箱中培养。以后每3 d换培养液1次, 待生长细胞铺满平皿90%后进行传代。传代时先用PBS洗2次, 加入0.25%胰蛋白酶1 mL, 润湿细胞后放在倒置显微镜下进行观察; 待细胞变圆立即加5 mL 含体积分数10%胎牛血清的完全培养基终止消化, 吸管吹打至细胞分散, 以1:2进行传代; 每次传代时将细胞放入培养瓶后, 先将培养瓶翻转放入培养箱中2 h贴壁, 然后再将细胞翻转过来。每5 d传代1次, 将传3代细胞备用。

MTT 法检测成骨细胞增殖: 采用锥虫蓝染色计算活细胞数 $\geq 95\%$, 按 $3\times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 浓度制备细胞混悬液, 分别加于5块96孔板内, 每孔200 μL 。培养24 h观察细胞贴壁后换含不同浓度聚乙二醇、柠檬酸钠、十六烷基三甲基溴化铵为修饰剂或无修饰剂制备的纳米钛酸钙0.1, 1.0, 10 g/L, 每组各5个复孔, 每孔加入50 μL , 空白对照组不加。然后每孔加入完全培养基150 μL , 放入CO₂培养箱培养1, 3, 6, 9 d后, 每孔加入5 g/L MTT液10 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养4 h, 每孔加入150 μL 的二甲基亚砜, 振荡器内温度为37 $^{\circ}\text{C}$, 120 min/次, 振荡5 min后分别在酶标仪(490 nm)波长处测定各孔A值。

成骨细胞鉴定活细胞形态观察: 细胞培养后每日用倒置相差显微镜观察细胞形态变化及生长状况。

Giemsa染色和钙化结节染色(茜素红法): 将事先准备的

圆型无菌盖玻片放入24孔培养内, 将上述培养纯化后的细胞调至 $3\times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于24孔培养板盖玻片上, 然后每孔加入完全培养基150 μL , 放入体积分数5%CO₂培养箱培养培养7 d后取出, PBS洗3次, 甲醇固定10 min, Giemsa染液染15 min, 自来水冲洗, 空气干燥, 二甲苯透明, 树胶封固, 镜下观察成骨细胞形态变化。

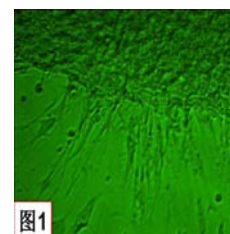
成骨细胞碱性磷酸酶活性测定: 将传代后的细胞以 $3\times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于96培养板中, 培养4 h观察细胞贴壁后, 分别设置培养1, 3, 6, 9 d, 加入换以不同浓度聚乙二醇、柠檬酸钠、十六烷基三甲基溴化铵为修饰剂或无修饰剂制备的纳米钛酸钙0.1, 1.0, 10 g/L, 每组各5个复孔, 每孔加入50 μL , 空白对照组不加。在410 nm波长下测定A值并用细胞总蛋白标准化代表细胞碱性磷酸酶活性(A值)。严格按碱性磷酸酶试剂盒说明操作。

主要观察指标: 纳米钛酸钙对乳鼠成骨细胞增殖及碱性磷酸酶活性的影响。

统计学分析: 应用SPSS 16.0统计软件进行数据分析, 资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 对各组成骨细胞增殖情况和碱性磷酸酶活性进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 乳鼠成骨细胞原代培养和传代培养的活细胞观察 从颅盖骨经酶消化分离所得细胞接种于培养瓶培养4 h后, 待细胞可贴壁后呈梭形、三角形或不规则多边形, 有数量不等的突起伸出; 传代后细胞以梭形、三角形为主, 胞核呈圆形或椭圆形, 呈集落样生长趋势, 集落中心细胞排列紧密甚重叠, 周围细胞以突起相连, 随着细胞增殖最终连成一片, 可复层生长, 见图1, 2。



注: 细胞呈梭形、三角形或不规则多边形, 有数量不等的突起伸出。

图1 SD乳鼠成骨细胞原代培养7 d的细胞形态(倒置显微镜, $\times 200$)

Figure 1 The morphology of osteoblasts primarily cultured for 7 d (Inverted microscope, $\times 200$)

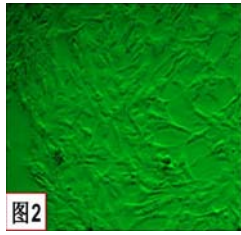


图2

注: 细胞以梭形、三角形为主, 胞核呈圆形或椭圆形, 呈集落样生长趋势, 集落中心细胞排列紧密甚重叠, 周围细胞以突起相连, 随着细胞增殖最终连成一片, 可复层生长。

图2 成骨细胞传代培养7 d的细胞形态(倒置显微镜, ×200)

Figure 2 The morphology of osteoblasts passaged for 7 d (Inverted microscope, ×200)

2.2 成骨细胞Giemsa和钙化结节染色结果 见图3-6。

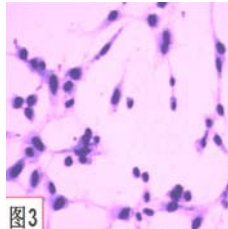


图3

注: 细胞多呈三角形或梭形, 胞浆丰富, 染成粉红色, 细胞核染成紫蓝色, 呈圆形或卵圆形, 细胞生长融合成复层。

图3 利用聚乙二醇修饰剂制备的纳米钛酸钙 10 g/L 对成骨细胞传代培养的形态的影响(倒置显微镜, ×200)

Figure 3 The changes in cell morphology of osteoblasts subcultured in 10 g/L nano-calcium titanate extract prepared using polyethylene glycol as a modifier (Inverted microscope, ×200)

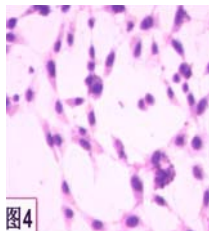


图4

注: 细胞多呈三角形或梭形, 胞浆丰富, 染成粉红色, 细胞核染成紫蓝色, 呈圆形或卵圆形, 细胞生长融合成复层。

图4 利用十六烷基三甲基溴化铵为修饰剂制备的纳米钛酸钙 10 g/L 对成骨细胞传代培养形态的影响(倒置显微镜, ×200)

Figure 4 The changes in morphology of osteoblasts subcultured in 10 g/L nano-calcium titanate extract prepared using acetyl trimethyl ammonium bromide as a modifier (Inverted microscope, ×200)

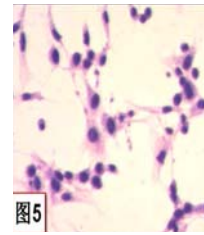


图5

注: 细胞多呈三角形或梭形, 胞浆丰富, 染成粉红色, 细胞核染成紫蓝色, 呈圆形或卵圆形, 位于细胞中央, 细胞生长融合成复层。

图5 利用柠檬酸钠为修饰剂制备的纳米钛酸钙 10 g/L 对成骨细胞传代培养形态的影响(倒置显微镜, ×200)

Figure 5 The changes in morphology of osteoblasts subcultured in 10 g/L nano-calcium titanate extract prepared using sodium citrate as a modifier (Inverted microscope, ×200)

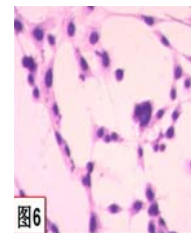


图6

注: 细胞多呈三角形或梭形, 胞浆丰富, 染成粉红色, 细胞核染成紫蓝色, 呈圆形或卵圆形, 位于细胞中央, 细胞生长融合成复层。

图6 无修饰剂制备的纳米钛酸钙 10 g/L 对成骨细胞传代培养形态的影响(倒置显微镜, ×200)

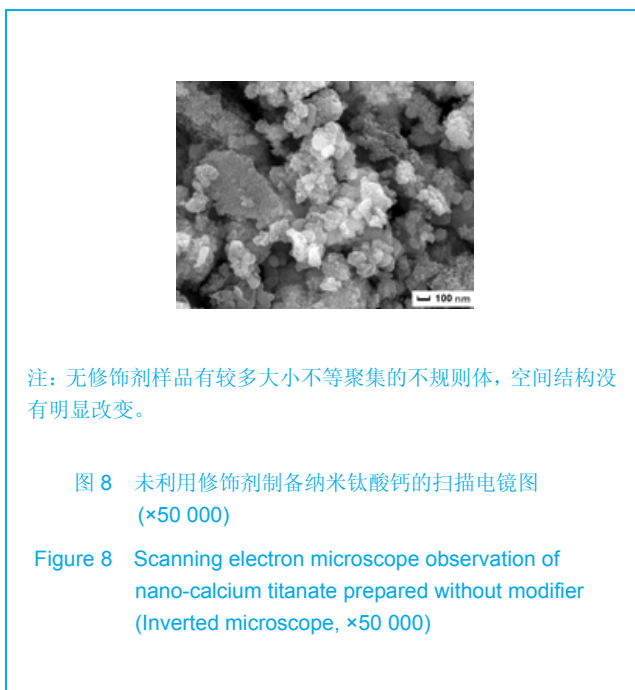
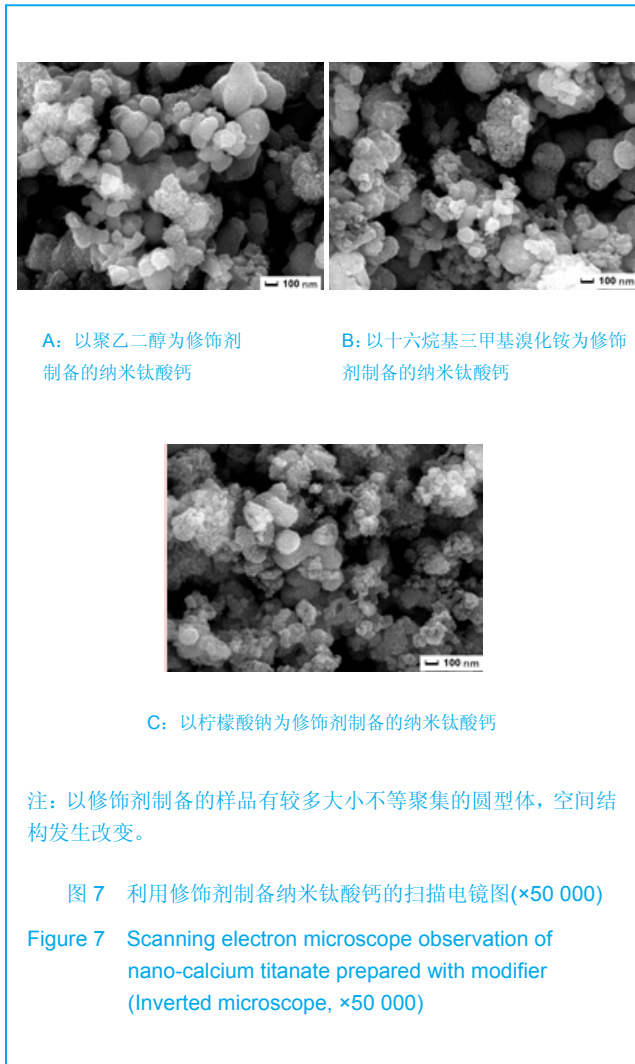
Figure 6 The changes in morphology of osteoblasts subcultured in 10 g/L nano-calcium titanate extract prepared without modifier (Inverted microscope, ×200)

传代培养7 d后成骨细胞多呈三角形或梭形, 胞浆丰富, 染成粉红色, 细胞核染成紫蓝色, 呈圆形或卵圆形, 位于细胞中央, 细胞生长融合成复层。以聚乙二醇、十六烷基三甲基溴化铵、柠檬酸钠为修饰剂和无修饰剂制备的纳米钛酸钙在1.0, 10 g/L质量浓度下对成骨细胞有明显促增殖作用。

2.3 不同修饰剂制备样品和无修饰剂制备样品的结构变化

经650 °C下煅烧1 h后修饰剂处理后的样品, 有聚乙二醇、十六烷基三甲基溴化铵、柠檬酸钠3种, 通过电镜扫描后出现形状改变, 有较多大小不等聚集的圆型体, 另外, 空间结构也发生改变; 无修饰剂样品有较多大小不等聚集的不规则体, 另外, 空间结构没有明显

改变, 见图7, 8。



2.4 成骨细胞增殖检测结果 见表1。

表1 利用修饰剂或未利用修饰剂制备纳米钛酸钙对成骨细胞增殖和分化的影响

Table 1 Effect of nano-calcium titanate prepared with or without modifier on the proliferation and differentiation of osteoblasts ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, absorbance)

组别	1 d	3 d
对照组	0.043 \pm 0.020	0.045 \pm 0.020
聚乙二醇修饰剂组		
0.1 g/L	0.042 \pm 0.030	0.092 \pm 0.040
1 g/L	0.046 \pm 0.020	0.095 \pm 0.050 ^{ab}
10 g/L	0.041 \pm 0.010	0.098 \pm 0.060 ^{ab}
十六烷基三甲基溴化铵修饰剂组		
0.1 g/L	0.039 \pm 0.022	0.097 \pm 0.062
1 g/L	0.042 \pm 0.011	0.119 \pm 0.054 ^{ab}
10 g/L	0.043 \pm 0.021	0.146 \pm 0.052 ^{ab}
柠檬酸钠修饰剂组		
0.1 g/L	0.049 \pm 0.010	0.116 \pm 0.062
1 g/L	0.045 \pm 0.030	0.121 \pm 0.093 ^{ab}
10 g/L	0.059 \pm 0.040	0.175 \pm 0.071 ^{ab}
无修饰剂组		
0.1 g/L	0.042 \pm 0.020	0.122 \pm 0.060
1 g/L	0.042 \pm 0.030	0.134 \pm 0.060 ^{ab}
10 g/L	0.047 \pm 0.010	0.136 \pm 0.070 ^{ab}

组别	6 d	9 d
对照组	0.057 \pm 0.010	0.061 \pm 0.020
聚乙二醇修饰剂组		
0.1 g/L	0.122 \pm 0.010	0.162 \pm 0.050
1 g/L	0.144 \pm 0.080 ^{ab}	0.170 \pm 0.030 ^{ab}
10 g/L	0.169 \pm 0.090 ^{ab}	0.198 \pm 0.050 ^{ac}
十六烷基三甲基溴化铵修饰剂组		
0.1 g/L	0.135 \pm 0.092	0.188 \pm 0.073
1 g/L	0.145 \pm 0.073 ^{ab}	0.194 \pm 0.093 ^{ac}
10 g/L	0.165 \pm 0.065 ^{ac}	0.207 \pm 0.071 ^{ac}
柠檬酸钠修饰剂组		
0.1 g/L	0.153 \pm 0.094	0.195 \pm 0.062
1 g/L	0.169 \pm 0.054 ^{ab}	0.212 \pm 0.064 ^{ac}
10 g/L	0.181 \pm 0.062 ^{ac}	0.226 \pm 0.082 ^{ab}
无修饰剂组		
0.1 g/L	0.149 \pm 0.032	0.206 \pm 0.051
1 g/L	0.157 \pm 0.031 ^{ab}	0.220 \pm 0.032 ^{ac}
10 g/L	0.163 \pm 0.025 ^{ac}	0.231 \pm 0.052 ^{ab}

与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 组内与其他质量浓度比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

注: 对照组为正常培养的细胞。结果表明纳米钛酸钙质量浓度在1.0-10.0 g/L 范围内对成骨细胞的促增殖和分化作用与浓度和时间有关。

与对照组比较, 当材料质量浓度在1.0-10.0 g/L作用第3-9天后细胞增殖逐渐升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。各个实验组组内不同时间点比较, 除第1天差异无显著性意义($P > 0.05$)外, 3-9 d比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 表明有无修饰剂制备的纳米钛酸钙质量浓度在1.0-10.0 g/L范围内对成骨细胞的增殖和分化作用与浓度和时间有关。

2.5 传代成骨细胞碱性磷酸酶活性检测结果 见表2。

表2 利用修饰剂或未利用修饰剂制备纳米钛酸钙对成骨细胞碱性磷酸酶活性影响

Table 2 Effect of nano-calcium titanate prepared with or without modifier on alkaline phosphatase activity of osteoblasts ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, absorbance)

组别	1 d	3 d
对照组	0.052±0.020	0.081±0.030
聚乙二醇修饰剂组		
0.1 g/L	0.055±0.030	0.091±0.040
1 g/L	0.078±0.030	0.098±0.030
10 g/L	0.049±0.013	0.124±0.036 ^a
十六烷基三甲基溴化铵修饰剂组		
0.1 g/L	0.058±0.024	0.093±0.053
1 g/L	0.078±0.012	0.119±0.044 ^{ac}
10 g/L	0.094±0.033	0.124±0.036 ^{ac}
柠檬酸钠修饰剂组		
0.1 g/L	0.062±0.082	0.099±0.053
1 g/L	0.086±0.031	0.117±0.042 ^{ac}
10 g/L	0.101±0.034	0.144±0.041 ^{ac}
无修饰剂组		
0.1 g/L	0.062±0.012	0.104±0.042
1 g/L	0.089±0.032	0.140±0.035 ^{ac}
10 g/L	0.101±0.031	0.144±0.044 ^{ac}

组别	6 d	9 d
对照组	0.106±0.050	0.118±0.040
聚乙二醇修饰剂组		
0.1 g/L	0.105±0.050	0.129±0.050
1 g/L	0.107±0.020 ^{ac}	0.172±0.080 ^{ac}
10 g/L	0.268±0.072 ^{ac}	0.332±0.057 ^{bc}
十六烷基三甲基溴化铵修饰剂组		
0.1 g/L	0.130±0.061	0.289±0.072 ^a
1 g/L	0.215±0.072 ^{ac}	0.298±0.044 ^{bc}
10 g/L	0.288±0.040 ^{bc}	0.317±0.072 ^{bc}
柠檬酸钠修饰剂组		
0.1 g/L	0.129±0.051	0.138±0.053 ^a
1 g/L	0.155±0.062 ^{ac}	0.278±0.062 ^{bc}
10 g/L	0.296±0.073 ^{bc}	0.336±0.044 ^{ac}
无修饰剂组		
0.1 g/L	0.129±0.052	0.198±0.043 ^a
1 g/L	0.234±0.06 ^{ac}	0.268±0.071 ^{bc}
10 g/L	0.284±0.064 ^{bc}	0.334±0.052 ^{ac}

与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.05$; 组内与其他质量浓度比较, ^c $P < 0.05$ 。

注: 对照组为正常培养的细胞。结果表明纳米钛酸钙质量浓度在1.0-10.0 g/L 范围内能提高成骨细胞碱性磷酸酶活性。

与对照组比较, 各组生物材料在1.0, 10 g/L质量浓度下成骨细胞碱性磷酸酶活性均提高。同一时间点下, 各个实验组组不同浓度间比较, 除第1天无差异外 ($P > 0.05$), 第3-9天组间差异有显著性意义 ($P < 0.05$), ($P < 0.01$)。表明4种生物材料样品在1.0, 10 g/L质量浓度下能提高成骨细胞碱性磷酸酶活性。

3 讨论 Discussion

随着细胞培养技术的发展, 目前体外成骨细胞培养技术已日渐成熟, 已从骨组织、骨膜及间充质中分离培养出典型的成骨细胞, 证实了其体内和体外的成骨能力。成骨细胞体外培养技术不仅是研究成骨细胞生物学特性及功能调节的重要工具, 而且常用来研究与骨相关疾病的发病机制及防治问题。成骨细胞是骨代谢过程中重要的执行细胞^[12]。体外分离培养成骨细胞是研究其生物学特性及功能调节的重要工具^[13]。碱性磷酸酶活性变化可以了解成骨细胞的增殖和分化成熟程度, 以及成骨矿化能力, 碱性磷酸酶的合成及矿化结节的形成是成骨细胞的表型特征^[14-17]。成骨细胞的增殖和分化不仅具有时间依赖性, 而且受多种因素的调节。实验利用组织块培养法原代分离培养成骨细胞, 在体外可移行出骨组织的特点。在原代培养时要适时传代, 当细胞生长融合成一层时传代, 传代太晚细胞会发生衰老, 传代太早又会因细胞数量太少不能骤然适应新环境而影响细胞增殖^[18-19]。实验采用细胞化学方法对成骨细胞作了进一步鉴定。碱性磷酸酶部分来源于成骨细胞, 碱性磷酸酶活性的提高和成骨细胞骨钙素分泌的升高表明分化水平增加, 提示该表面有利于成骨细胞的分化。由于成骨细胞能合成和分泌碱性磷酸酶, 碱性磷酸酶活性被认为是成骨细胞的一个重要生物学标志^[20-26]。实验结果显示当细胞生长出现聚集, 多层重叠, 显微镜下可见多个大小不等的透明区域时, Giemsa和钙化结节染色呈阳性反应, 证实胞浆丰富, 染成粉红色, 细胞核染成紫蓝色, 不透明区域为钙化结节。通过形态学观察证实原代培养细胞具有与成骨细胞相似的形态和生长特点。成骨细胞在不同分化时期各基因表达调控的规律也不同。各实验组随着时间改变碱性磷酸酶活性均高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。实验可以观察到成骨细胞在体外的成熟过程, 细胞在汇合以后碱性磷酸酶水平处于上升趋势。因此实验体外培养成骨细胞的方法是切实可行的、有效的, 可为骨形成、骨代谢机制、成骨细胞黏附、增殖和分化能力研究及骨组织工程研究提供生物学性能。

致谢: 感谢殷恒波教授、吴晓亮等的帮助, 以及江苏大学分析测试中心各位老师的指导和帮助。

作者贡献: 翁志强、孙敏、端礼荣进行实验设计, 实验实施为孙敏, 实验评估为吴占教、端礼荣, 资料收集为孙敏, 温志强、孙敏成文, 端礼荣、姜涛审校, 唐旭炎、吴占教对文章负责。

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: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical

issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 钛酸钙-是一种具有优异介电特性、温度特性、机械特性以及光学特性的基础无机介电材料,被广泛应用于陶瓷电容器、PTC热敏电阻器、微波天线、滤波器以及不锈钢焊条等领域。

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。

4 参考文献 References

- [1] Macocinschi D, Filip D, Vlad S, et al. Segmented biopolyurethanes for medical applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(8):1659-1668.
- [2] Kütting M, Roggenkamp J, Urban U, et al. Polyurethane heart valves: past, present and future. *Expert Rev Med Devices.* 2011;8(2):227-233.
- [3] Ma Y, Cai ZB. Bionic design of human bone microstructure based on fractal theory. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res.* 2007;14:2784-2786.
- [4] 刘琳,包广洁. 牙髓牙本质组织工程生物支架材料的研究进展[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(8):1455-1460.
- [5] 黄晶,蓝琳,肖东琴,等. 热化学法制备CaTiO₃涂层及涂层的生物相容性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(16):2901-2904.
- [6] Comesaña R, Quintero F, Lusquiños F, et al. Laser cladding of bioactive glass coatings. *Acta Biomater.* 2010;6(3):953-961.
- [7] Ueda M, Ikeda M, Ogawa M. Chemical-hydrothermal combined surface modification of titanium for improvement of osteointegration. *Mater Sci Eng C.* 2009;29(3):994-1000.
- [8] Sugiyama N, Xu H, Onoki T, et al. Bioactive titanate nanomesh layer on the Ti-based bulk metallic glass by hydrothermal-electrochemical technique. *Acta Biomater.* 2009;5(4):1367-1373.
- [9] Inoue M, Rodriguez AP, Takagi T, et al. Effect of a new titanium coating material (CaTiO₃-aC) prepared by thermal decomposition method on osteoblastic cell response. *J Biomater Appl.* 2010;24(7):657-672.
- [10] 严洪海,胡玲华,黄海蓉. 不同粗糙表面的纯钛种植体的耐腐蚀性评价[J]. *中国口腔种植学杂志*, 2008, 13(4):175-179.
- [11] 李先安,雷光华,刘文和,等. 大鼠成骨细胞的体外培养和鉴定[J]. *湖南学院学报: 医学版*, 2007, 9(1):23-26.
- [12] 傅德皓,杨述华,马德彰,等. 鼠胚成骨细胞的原代培养与鉴定[J]. *创伤外科杂志*, 2006, 8(2):157-160.
- [13] Morra M. Biochemical modification of titanium surfaces peptides and ECM proteins. *Eur Cell Mater.* 2006;12:1-15.
- [14] Morra M, Cassinelli C, Meda L, et al. Surface analysis and effects on interfacial bone microhardness of collagen-coated titanium implants: A rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20(1):23-30.
- [15] Parfitt AM. Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling implications for the understanding of osteoporosis. // Marcus R, Feldman D, Kelsey J, Eds. *Osteoporosis.* San Diego, CA: Academic, 1996:315-329.
- [16] Jayakumar P, Di Silvio L. Osteoblasts in bone tissue engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H. J Eng Med.* 2010;224(12):1415-1417.
- [17] Liao H, Andersson AS, Sutherland D, et al. Response of rat osteoblast-like cells to microstructured model surfaces in vitro. *Biomaterials.* 2003;24(4):649-654.
- [18] Gordjestani M, Dermaut L, De Ridder L, et al. Osteopontin and bone metabolism: a histology and scintigraphy study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(7):794-799.
- [19] 吕晶,柯杰,王琳,等. 与软骨细胞共培养和条件培养液诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的比较[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(19):3421-3426.
- [20] Keeney M, Pandit A. The osteochondral junction and its repair via bi-phasic tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009;15(1):55-73.
- [21] Matsusaki M, Kadowaki K, Tateishi K, et al. Scaffold-free tissue-engineered construct-hydroxyapatite composites generated by an alternate soaking process: potential for repair of bone defects. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(1):55-63.
- [22] Getgood AM, Kew SJ, Brooks R, et al. Evaluation of early-stage osteochondral defect repair using a biphasic scaffold based on a collagen-glycosaminoglycan biopolymer in a caprine model. *Knee.* 2012;19(4):422-430.
- [23] Filová E, Jelínek F, Handl M, et al. Novel composite hyaluronan/ type I collagen/fibrin scaffold enhances repair of osteochondral defect in rabbit knee. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;87(2):415-424.
- [24] Khanarian NT, Jiang J, Wan LQ, et al. A hydrogel-mineral composite scaffold for osteochondral interface tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2012; 18(5-6):533-545.
- [25] Sundelacruz S, Kaplan DL. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol.* 2009; 20(6):646-655.
- [26] Brady MA, Sivanathan S, Mudera V, et al. The primordium of a biological joint replacement: Coupling of two stem cell pathways in biphasic ultrarapid compressed gel niches. *Craniofacial Surg.* 2011;39(5):380-386.