

MC 3T3-E1 细胞在纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合支架上的增殖和分化 Proliferation and Differentiation of MC 3T3-E1 Cells Cultured on Nanohydroxyapatite/chitosan Composite Scaffolds

孔丽君¹ 敖 强² 奚 静¹ 张 玲¹ 公衍道¹ 赵南明¹ 张秀芳^{1*}

KONG Li-Jun¹, AO Qiang², XI Jing¹, ZHANG Ling¹, GONG Yan-Dao¹, ZHAO Nan-Ming¹ and ZHANG Xiu-Fang^{1*}

¹ 清华大学生物科学与技术系 生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100084

² 清华大学脑神经疾病研究所 北京 100084

¹ Department of Biological Sciences and Biotechnology, State Key Lab of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

² Institute of Neurological Disorder, Tsinghua University, Beijing 100084, China

摘 要 用原位合成纳米羟基磷灰石的方法制备多孔纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合支架,在支架上接种 MC 3T3-E1 细胞,瑞氏染色检测细胞形态,MTT 法检测其增殖情况,在诱导培养基中培养 30d 后,碱性磷酸酶染色比较其分化水平,定量检测细胞的碱性磷酸酶活性,RT-PCR 检测成骨相关基因的表达情况。实验结果表明,MC 3T3-E1 细胞在纳米级羟基磷灰石/壳聚糖复合支架上粘附铺展良好,其增殖率显著高于培养于纯壳聚糖支架上的细胞。碱性磷酸酶染色表明复合支架上的细胞有较高水平的碱性磷酸酶表达。进一步定量检测细胞的碱性磷酸酶活性,结果说明在复合支架上细胞比纯壳聚糖支架上培养的细胞碱性磷酸酶活性提高了约 8 倍。此外,骨分化相关特征基因骨桥蛋白 OPN 在复合支架上培养的细胞中的表达水平也明显高于纯壳聚糖上培养的细胞。分化成熟标志基因骨钙素 OC 在复合支架上培养的细胞中有表达,但是纯壳聚糖支架上培养的细胞中却未检测到。支架中纳米羟基磷灰石的加入不仅提高了前成骨细胞在复合支架上的增殖,而且还促进了它的分化。纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合支架表现出良好的生物相容性和生物活性,是极具前景的骨组织工程支架材料。

关键词 组织工程,分化,纳米羟基磷灰石,壳聚糖,生物相容性

中图分类号 Q318.08 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0262-06

Abstract Nanohydroxyapatite/chitosan composite scaffolds were fabricated and the proliferation and differentiation of preosteoblast MC 3T3-E1 on them were examined for the assessment of their biocompatibility. Nanohydroxyapatite was combined with chitosan in situ using a chemical method and a porous structure obtained was then lyophilized. Preosteoblast MC 3T3-E1 cells were inoculated into the porous composite scaffolds and chitosan scaffolds, respectively. The morphology of cells cultured on the scaffolds was examined after staining it with Wright's stain. Their proliferation was assessed using MTT assay. After being cultured in conditioned medium for 30 days, the cells' alkaline phosphatase activities on the scaffolds were studied in situ to compare their differentiation level about. Moreover, the alkaline phosphatase activities were assessed with a kit. The expression

Received: September 14, 2006; Accepted: November 6, 2006.

This work was supported by the National Basic Research Program (also called "973" Project) of China (No. 2005CB623905), the Tsinghua-Yue-Yuen Medical Science Fund, Beijing Municipal Science & Technology Commission (No. H060920050430) and the National Natural Science Foundation of China (No. 30670528).

* Corresponding author. Tel: +86-10-62783261; E-mail: zxf-dbs@mail.tsinghua.edu.cn

国家"973"项目(No. 2005CB623905)、清华-裕元医学研究基金、北京市科委项目(No. H060920050430)和国家自然科学基金项目(No. 30670528)支持。

level of characteristic osteogenic gene was evaluated using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The results indicated that MC 3T3-E1 cells grown on the composite scaffolds showed a higher proliferation rate and spread better than that on chitosan scaffolds. The alkaline phosphatase stain results showed that the alkaline phosphatase activity of cells on composite scaffolds was significantly higher than that on the chitosan scaffolds. In addition, the quantitative examination of alkaline phosphatase activity indicated that the cells cultured on the composite scaffolds expressed an activity level about 8 times higher than that on chitosan scaffolds. Simultaneously, the osteogenic gene osteopontin (OPN) of cells cultured on composite scaffolds showed a higher expression level than that on chitosan scaffolds. Another osteogenic gene osteocalcin (OC) was expressed in cells cultured on composite scaffolds, whereas it was not detected in cells on chitosan scaffolds. The addition of nanohydroxyapatite in the scaffolds improved not only the proliferation but also the differentiation of preosteoblast cultured on them. The composite scaffolds showed good biocompatibility and bioactivity. These scaffolds would be promising in bone tissue engineering.

Key words tissue engineering, differentiation, nanohydroxyapatite, chitosan, biocompatibility

羟基磷灰石是骨中无机物的主要组成成分,由于其良好的生物相容性和骨传导性,成为骨组织工程中的常用生物活性材料^[1]。但是因为脆性大等原因,限制了它的应用,将其与聚合物的复合是解决方法之一。壳聚糖是由甲壳类动物提取的几丁质部分脱乙酰的产物,由于其良好的生物相容性和降解性能,成为在组织工程研究中被广泛应用的一种天然多糖^[2-6]。赵峰^[7]等研究了羟基磷灰石、明胶和壳聚糖的物理混合法制备复合支架,并取得了良好的效果。胡巧玲^[8]等用原位复合的方法制备羟基磷灰石/壳聚糖的实心复合棒材,可以用作骨钉。本文报道了纳米羟基磷灰石与壳聚糖的复合多孔支架的原位制备方法,并检测了在复合支架上类成骨细胞的增殖和分化,评估了纳米羟基磷灰石的加入对支架生物相容性的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

壳聚糖,脱乙酰度为 93.5%(NMR 检测),平均粘度分子量为 1.7×10^6 ,购自青岛海生公司。 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 等分析纯无机试剂均购自北京化工厂。 α -MEM 培养基购自 Gibco,胎牛血清购自兰州民海生物公司,TRIzol 试剂及 RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司,碱性磷酸酶染色试剂盒购自中国医科院血液研究所,碱性磷酸酶检测试剂盒购自中生北控公司。BCA 试剂盒购自 Sigma 公司。引物由上海生工公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 支架的制备及表征^[3] 搅拌下向 2% 壳聚糖乙酸溶液中依次滴加等量的 0.1 mol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液和 0.06 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶液,使 $\text{Ca}:\text{P} = 10:6$ 。充分混匀后,脱气,注入模具中。 -20°C 冷冻过夜,

冻干机中冻干后取出,浸入 10% NaOH 溶液中 48 h,蒸馏水洗滌至中性,再冻干得复合支架。纯壳聚糖支架则由壳聚糖溶液同样条件下冻干后脱酸得到。用刀片切开材料,暴露内部结构,喷金后,扫描电镜观察支架的微观形态。

1.2.2 细胞培养 前成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞,常用于骨组织工程支架的生物相容性评价^[9]。在含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基中,置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养。隔天换新鲜培养液,待长至汇合后,用 0.25% 胰酶消化,用含血清的培养基中止并制备细胞悬液。以 2×10^6 个/mL 的细胞密度分别接种至纯壳聚糖和复合支架上培养用作细胞增殖实验,每块支架上接种 200 μL 。另外,以 6×10^6 个/mL 的细胞浓度分别接种于纯壳聚糖和复合物多孔支架中,用含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗坏血酸,10 mmol/L β -甘油磷酸钠,10% 胎牛血清的诱导培养基诱导培养 30 d 后检测分化。

1.2.3 细胞形态检测 接种在支架上的细胞培养 3d 后,用瑞氏染液染 20min, PBS 洗去非特异性染色,拍照。

1.2.4 MTT 检测细胞增殖 接种到支架上的 MC3T3-E1 细胞培养 7d 后,弃去培养基,每孔加入 1mL 无血清培养基和 100 μL 5mg/mL 的 MTT 溶液, 37°C 温育 4h。弃上清,加入 250 μL 溶于 0.01mol/L HCl 的 10% SDS 溶液, 37°C 温育 6h。取上清于 570nm 下检测吸光度。

1.2.5 碱性磷酸酶染色 已接种细胞用作分化检测的复合支架和纯壳聚糖支架各取三个样品,按照试剂盒说明书操作,原位染色,拍照。

1.2.6 碱性磷酸酶活性测定 已接种细胞用于分化检测的每种支架各取三个平行样品,加入细胞裂解液,反复冻融裂解细胞,取细胞裂解液按照试剂盒说

明书测定碱性磷酸酶活性。BCA 法检测总蛋白浓度,计算单位质量总蛋白中的碱磷酶活性。

1.2.7 RT-PCR 检测基因表达 :TRIzol 试剂提取总 RNA,以看家基因 GAPDH 作为基准,RT-PCR 半定量检测基因表达情况,所用引物见表 1。

表 1 半定量 RT-PCR 中所用引物

Table 1 Primers used in semi-quantitative RT-PCR			
mRNA		Primer sequences	PCR product size(bp)
OC	Sense	5'-GTCTCTCTGGTTCATTTCCTTGGGTAAC-3'	294
	Anti-sense	5'-CACTACCTTATTCGCTCTGCTTGGAC-3'	
OPN	Sense	5'-CCAACGGCCGAGGTGATAG-3'	333
	Anti-sense	5'-CAGGCTGGCTTTGGAACTTG-3'	
GAPDH	Sense	5'-GCCACCCAGAAGACTGTGGAT-3'	477
	Anti-sense	5'-TGGTCCAGGGTTCTTACTCC-3'	

1.2.8 统计方法 :定量数据以均数 ± 标准差表示,组间两两比较采用 *t* 检验的方法。定性数据使用 χ^2 检验。

2 实验结果

2.1 材料的表征

制得的两种支架均为多孔海绵状,扫描电镜观察其孔壁表面微观结构(图 1)可见,壳聚糖支架的表面光滑,而复合支架的表面则均匀分布着大小为 70~100nm 的羟基磷灰石颗粒^[3]。

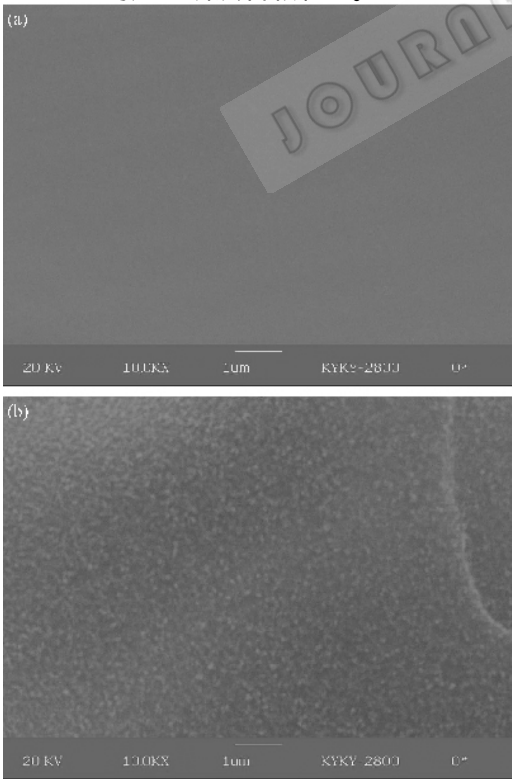


图 1 支架孔壁表面微观形貌

Fig.1 Microscopic morphologic images of scaffolds, original magnification 10000 ×
(a)chitosan scaffolds and (b)composite scaffolds.

2.2 细胞形态

光镜下湿态的支架呈现半透明的效果,可清晰地看到上面胞浆染成蓝色,胞核染成蓝紫色的细胞。生长在纯壳聚糖支架上的细胞分散分布,且多数为球形,未完全铺展。而生长在复合支架上的细胞聚集成片,为多角形或纺锤形,铺展良好(图 2)。

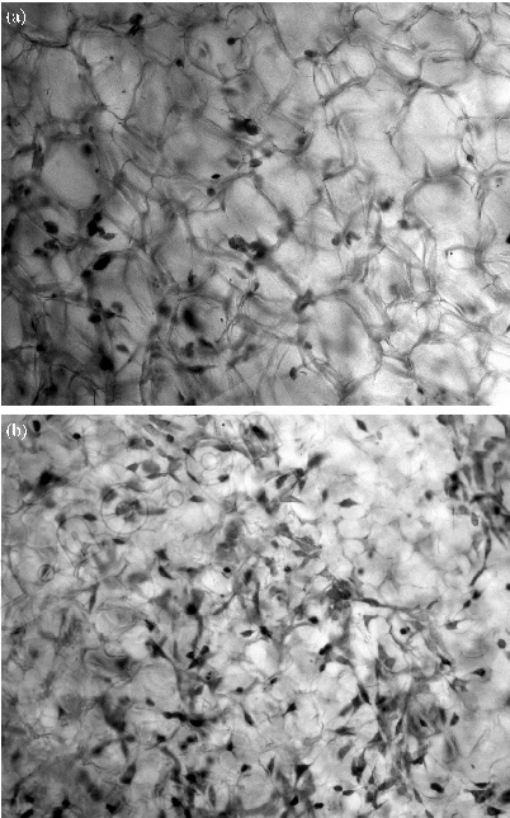


图 2 培养 3d 后支架上细胞形态

Fig.2 Morphology of cells cultured on scaffolds for 3d (Wright's stain), 100 ×
(a)cells on chitosan scaffolds (b)cells on composite scaffolds.

2.3 细胞增殖

同样的接种条件下,培养 7d 后,在纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合支架上的细胞增殖情况显著优于纯壳聚糖支架(图 3)。

2.4 细胞分化

2.4.1 碱性磷酸酶染色 :诱导培养基中培养 30d 后,两种支架的代表图片见图 4。纯壳聚糖支架上的细胞多数呈粉红色,少数细胞胞浆中有深蓝色沉淀。复合支架上的细胞胞浆中多数有较多深蓝色沉淀,甚至遮住胞核。两种支架各随机选取不同部位的照片观察比较细胞的阳性细胞数,结果表明,复合支架上细胞的碱性磷酸酶阳性水平明显高于纯壳聚糖支架上细胞的碱性磷酸酶水平。

2.4.2 碱性磷酸酶活性检测 :进一步定量检测,复合支架上所培养的细胞与纯壳聚糖支架培养上的细胞相比,碱磷酶活性提高了约 8 倍(图 5)。

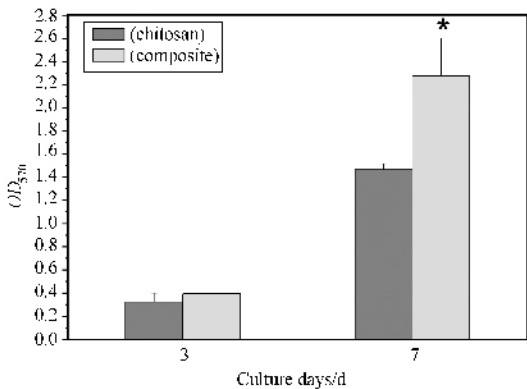


图 3 细胞在支架上培养的 MTT 实验结果

Fig.3 MTT assay of cells grown on chitosan and composite scaffolds

Chitosan : cells grown on chitosan ; Composite :cells grown composite scaffolds. Data represent the mean \pm SD for three samples. * $P < 0.05$ compared with cells grown on pure chitosan scaffolds.

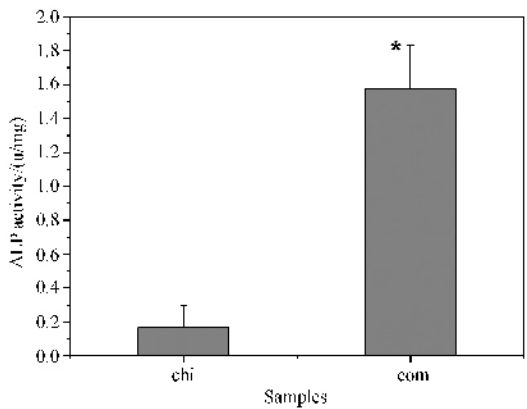


图 5 两种支架上培养细胞的碱性磷酸酶活性

Fig.5 Alkaline phosphatase activities of cells grown on chitosan and composite scaffolds

Chi :cells grown on chitosan ;com :cells grown composite scaffolds. Data represent the mean \pm SD for three samples. * $P < 0.05$ compared with cells grown on pure chitosan scaffolds.

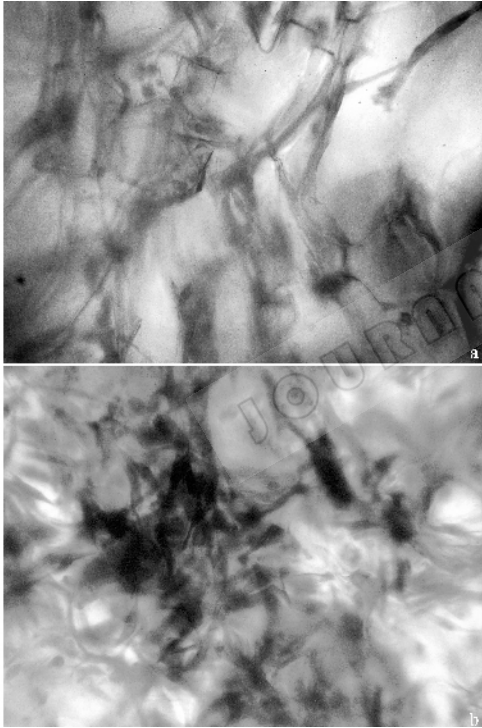


图 4 两种支架上培养细胞的碱性磷酸酶染色的代表图片

Fig.4 Representative images of alkaline phosphatase stain of cells grown on chitosan and composite scaffold.

a : chitosan scaffolds ; b : composite scaffolds. In the cells grown on composite scaffolds dark blue products of alkaline phosphatase nearly filled the cytoplasm and even covered the area of cell nucleus. In the cells grown on chitosan scaffolds little dark blue was observed and the red cell nucleus was still clear.

2.4.3 半定量 RT-PCR 检测基因表达 :成骨分化特异性基因 :骨桥蛋白(osteopontin , OPN)和骨钙素 (osteocalcin , OC)在复合支架及壳聚糖支架上的细胞中的表达情况见图 6 ,在看家基因 GAPDH 表达水

平基本一致的情况下 ,OPN 在两种支架上的细胞中均有表达 ,但是复合支架上的细胞的 OPN 表达水平显著高于纯壳聚糖支架上培养的细胞。而 OC 基因 则只在复合支架上培养的细胞中检测到表达 ,纯壳聚糖支架上的细胞则未检测到明显表达。

3 讨论

羟基磷灰石是骨的重要组成部分 ,具有很高的生物活性和良好的骨传导性 ,常常用于骨组织工程中。但是单独使用时又存在一些问题 ,如脆性大 ,不易塑型等。壳聚糖是来源于甲壳类动物的天然多糖 ,生物相容性好 ,容易成型 ,生物可降解 ,降解产物为无毒的氨基葡萄糖 ,广泛应用于医学中如术后防粘连膜 ,药物控释载体等的研究^[10,11]以及软骨、骨、皮肤及神经等组织工程研究^[12]中。但单独应用于骨组织工程支架时又缺乏成骨生物活性 ,所以将此二者复合制备成支架能够综合二者的优点而避开它们的缺点。为了得到更均一结构的支架 ,本实验室采用化学湿法合成纳米级羟基磷灰石 ,并将其原位复合于壳聚糖支架中^[3]。羟基磷灰石制备体系均匀分散于支架中 ,羟基磷灰石前体在 OH⁻ 的作用下原位生成磷酸钙盐 ,经过陈化后转化为羟基磷灰石 ,从而能够均匀分布于同时成型的壳聚糖基多孔支架的孔壁上。

纯壳聚糖支架和复合支架浸泡在溶液中 ,光镜下为半透明状态 ,所以可以在细胞染色后 ,光镜检查细胞形态。结果表明 ,在复合支架上细胞铺展更完全 ,呈纺锤形和多角形 ,而在单纯壳聚糖支架上的细胞则呈圆形 ,说明暴露在孔壁表面的羟基磷灰石颗粒增强了细胞的贴附与铺展。细胞的贴附是增殖的前

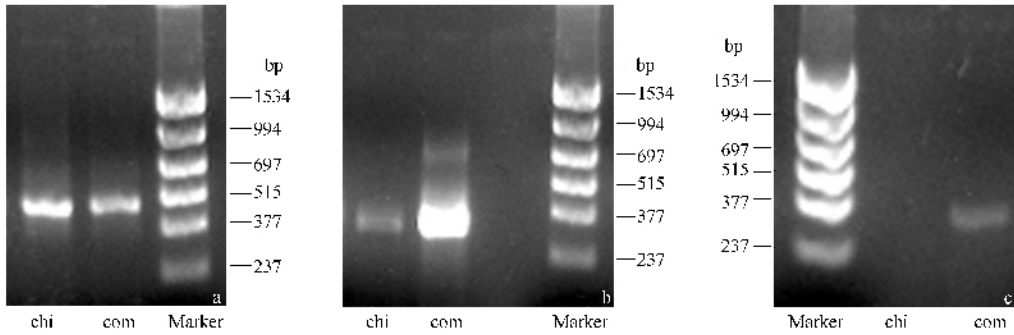


图6 诱导后细胞的基因表达情况检测(RT-PCR)

Fig.6 Gene expression examination using RT-PCR

a : expression of GAPDH ; b : Expression of OPN ; c : Expression of OC. chi :chitosan scaffolds ;com :composite scaffolds ; Under the condition of expression level of house keeping gene GAPDH was nearly same ,the expression level of OPN in cells grown on composite scaffolds was higher than that on chitosan scaffolds. The expression level of OC of cells grown on composite scaffolds was lower than that of OPN on composite scaffolds ,while there was no expression of OC was detected in cells grown on chitosan scaffolds.

提条件 ,进一步对细胞的增殖进行了 MTT 检测 ,结果表明 ,在同样的接种条件下 ,培养 7d 后 ,在复合支架上的细胞数量显著高于纯壳聚糖支架上的细胞数量。上述结果说明 ,羟基磷灰石的加入在细胞形态和细胞增殖两方面显示了其对支架生物相容性的提高。

在前成骨细胞分化的研究中 ,一般将 ALP ,骨钙素(OC)和骨桥蛋白(OPN)作为成骨细胞鉴定和功能状态的评价指标。ALP 由成骨细胞分化时分泌 ,其功能主要是在碱性条件下(pH7.6 ~ 9.9)水解多种磷酸酯 ,使局部无机磷浓度升高 ,促进磷酸钙沉淀 ,同时水解破坏焦磷酸、ATP 等生理性晶体生长抑制剂而启动和延续钙化过程^[13]。OPN 是一种分泌型糖基化的磷蛋白 ,在骨分化的早期开始表达 ,矿化启动后大量合成 ,能够调节羟基磷灰石晶体的生长 ,是成骨细胞分化的早期标志。其基因序列中含有 RGD 的细胞典型粘附序列 ,能结合于细胞和骨组织的羟基磷灰石表面起桥梁作用 ,并在矿化启动后可调控矿化晶体大小和形状。而 OC 是由骨形成细胞分泌的一种特异性非胶原蛋白 ,有着类似骨代谢调节激素的作用。其表达水平的提高是骨代谢细胞分化成熟 ,处于功能状态的标志^[14]。

本实验中 ,复合支架上细胞的碱性磷酸酶活性显著高于纯壳聚糖支架上细胞的碱性磷酸酶活性。并且 ,在壳聚糖支架上的细胞只有 OPN 的表达 ,而没有 OC 的表达 ,在复合支架上的细胞两种基因都有表达 ,其中 OPN 基因的表达水平远远高于壳聚糖支架上的细胞 ,说明壳聚糖支架上的细胞正处于骨分化的早期 ,而培养于复合支架上的细胞的分化水平则更高 ,分化更加成熟。复合支架中羟基磷灰石的加入在加速了 MC3T3-E1 细胞增殖的同时 ,也加速了其分化的进程 ,促进了 MC 3T3-E1 细胞向成骨

细胞的分化。

组织工程支架的生物相容性主要取决于其材料组成和表面结构 ,羟基磷灰石作为骨的主要无机成分 ,不仅生物相容性高 ,同时还具有骨传导性等骨生物活性 ,在植入人体后能与原骨形成生理结合^[15]。临床已经证明 ,羟基磷灰石粉体可以用于骨缺损部位做填充材料^[15]。但是其机械性能和塑型性的低下限制了它的应用。而壳聚糖塑型性良好 ,易于做成所需形状 ,并具备可以通过温度等条件来控制的多孔结构以适合组织工程的需要。本文正是扬长避短 ,将二者的结合 ,综合了两者的优点而制备出骨组织工程支架。暴露于孔壁上的纳米羟基磷灰石不仅仅促进了细胞的粘附和增殖 ,而且从其基因表达情况来看 ,与壳聚糖支架相比 ,复合支架上的细胞表达了标志分化更加成熟的标志基因 ,说明纳米羟基磷灰石的加入还加速了 MC3T3-E1 细胞向成骨细胞分化的进程 ,体现了其优良的骨生物活性。究其原因 ,大致是因为在复合支架中 ,羟基磷灰石能够与细胞直接接触而使得其生物活性得到了充分地发挥 ,所以复合支架表现出了优异的活性 ,促进了细胞的增殖和分化。

4 结论

复合支架中纳米羟基磷灰石的加入提高了支架的生物相容性 ,增强细胞增殖的同时 ,还促进了支架上细胞的成骨分化 ,是骨组织工程中的极具研究开发前景的一种支架材料。

REFERENCES(参考文献)

[1] Temenoff JS , Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials* , 2000 **21** (23) :2405 - 2412.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [2] Ao Q, Wang A, Cao W, *et al.* Manufacture of multimicrotubule chitosan nerve conduits with novel molds and characterization *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, **77** (1):11 – 18.
- [3] Kong L, Gao Y, Cao W, *et al.* Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/ chitosan composite scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2005, **75** (2) 275 – 282.
- [4] Wang A, Ao Q, Cao W, *et al.* Fiber-based chitosan tubular scaffolds for soft tissue engineering: fabrication and *in vitro* evaluation. *Tsinghua Science and Technology*, 2005, **10** (4) 449 – 453.
- [5] Zhang X, Cao W, Gong Y, *et al.* A method for the preparation of porous chitosan tube. China Patent patent No. 02149086.4. 2004.
- [6] Cao W, Cheng M, Ao Q, *et al.* Physical, mechanical and degradation properties, and schwann cell affinity of cross-linked chitosan films. *Journal of Biomaterials Science—Polymer Edition*, 2005, **16** (6) 791 – 807.
- [7] Zhao F, Yin Y, Lu WW, *et al.* Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials*, 2002, **23** (15): 3227 – 3234.
- [8] Hu Q, Li B, Wang M, *et al.* Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via *in situ* hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*, 2004, **25** (5) 779 – 785.
- [9] Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, *et al.* *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *The Journal of Cell Biology*, 1983, **96** (1):191 – 198.
- [10] Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, *et al.* Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 2004, **104** (12) 6017 – 6084.
- [11] Gu YH(古永红), Wang LY(王连艳), Tan TW(谭天伟), *et al.* Preparation of uniform-sized chitosan microspheres and application as carriers for protein drugs. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2006, **22** (1):150 – 155.
- [12] Ye F(叶芬), Yin YK(尹玉姬), Sun GJ(孙光洁), *et al.* The applications of chitosan scaffolds for tissue engineering. *Functional materials* (功能材料), 2002, **33** (5): 459 – 461.
- [13] Genge BR, Sauer GR, Wu LN, *et al.* Correlation between loss of alkaline phosphatase activity and accumulation of calcium during matrix vesicle-mediated mineralization. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, **263** (34):18513 – 18519.
- [14] Chai F(柴枫), Jin Y(金岩), Zhao YM(赵钺民), *et al.* Expression of osteopontin and osteocalcin mRNA in ectomesenchymal stem cells under induction of EMPs & EMD *in vitro*. *Journal of Oral Science Research* (口腔医学研究), 2004, **20** (3):243 – 245.
- [15] Li ZC(李洲成), Li NF(李年丰), Zhang YD(张阳德). Advancement in research of nano-hydroxyapatite and its composite materials. *China Medical Engineering* (中国医学工程), 2005, **13** (3): 257 – 259.
- © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>