

大鼠成骨细胞在聚乳酸、马来酸酐改性聚乳酸表面的粘附性能研究*

潘君 王远亮** 曹雪波 苏兰 秦建 卢晓 蔡绍哲

(重庆大学生物工程学院, 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044)

摘要 采用微管吸吮装置对大鼠成骨细胞, 在聚乳酸和马来酸酐改性聚乳酸材料表面的粘附性能进行了研究. 目的是评价材料的粘附性能和改性方法, 并筛选材料. 研究表明: 与玻璃材料相比, 成骨细胞在聚乳酸表面的粘附力更大, 经化学结构改性后, 聚乳酸对成骨细胞 24 h 的粘附性能提高了近 2 倍. 成骨细胞在改性聚乳酸材料表面的 24 h 组的粘附力是 15 min 组的 1.3 倍 (测量时间为 3 h), 而在聚乳酸上则差别不明显. 实验证实, 改性聚乳酸是一种更利于成骨细胞粘附的支撑材料, 采用的改性方法可行.

关键词 聚乳酸, 改性, 成骨细胞, 粘附性能

学科分类号 Q954.6-33+1

聚乳酸在组织工程方面有着广阔的应用前景. 作为组织工程支撑材料, 除了要求它具有良好的生物相容性、易加工成三维多孔结构和在某些应用中的力学性能外, 更要求它能够支持目标细胞的粘附、生长和分化功能. 可以这么说, 组织工程成功的关键之一就在于细胞在支撑材料表面的粘附程度. 因此定量研究细胞在支撑材料表面上的粘附性能不仅可以作为表征组织工程材料的一个重要指标, 还可以作为筛选材料的一种重要手段^[1].

材料的表面特征, 包括它的 Top 结构、化学性质, 表面能都对细胞的粘附性能有影响. 其中, 采用化学方法改性, 调控细胞在材料上的粘附性能在许多细胞工程和组织工程中有着巨大的应用潜力^[2,3].

聚乳酸是可生物降解的材料, 细胞的粘附性能不仅与它的表面化学性质有关, 还与它的本体化学结构有关^[4,5]. 本文以大鼠成骨细胞为种植细胞, 选择本实验室合成的聚乳酸和经过化学结构改性的聚乳酸为研究对象, 采用微管吸吮装置^[6]研究了细胞在材料表面接种 15 min 和 24 h 的粘附性能.

1 材料与方法

1.1 材料

外消旋性聚乳酸 (PLA) 和马来酸酐改性聚乳酸 (MPLA) 均为本实验室合成 (曹雪波等, 待发表); 乙酸乙酯: 分析纯, 北京化学试剂厂; DMEM-F₁₂ 培养液, 小牛血清购自 Hyclone 公司、

谷氨酰胺购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 聚乳酸、马来酸酐改性聚乳酸薄膜的制备: 用乙酸乙酯溶解使形成 50 g/L 的溶液, 并用 0.5 mol/L 的 NaOH 中和改性聚乳酸溶液. 将溶液滴于自制的玻璃小腔中 (在载玻片上粘一段约 20 mm × 20 mm × 20 mm 塑料针筒, 用小刀从上到下切一段形成 90° 的断裂带, 其下方留 2 mm 的距离), 待溶剂挥发后, 放于紫外灯下灭菌备用.

1.2.2 大鼠成骨细胞的培养: 采用贴壁法, 将 1 ~ 2 天龄的大鼠头盖骨取下, 充分洗去血污并剥去骨膜后, 用眼科剪修成约 1 mm × 1 mm 的碎块, 置于培养瓶中. 贴壁 12 h 后加液培养, 培养液由 DMEM-F₁₂, 20% 小牛血清, 10 U/L 胰岛素, 0.3 g/L 谷氨酰胺组成. 约 3 d 后可见细胞, 经检验为成骨细胞.

1.2.3 粘附性能测定: 将原代成骨细胞接种在表面为不同材料的小腔内, 按培养细胞相同的成分加液, 在培养箱中经 15 min 和 24 h 的孵化后. 采用微管吸吮装置测量单个细胞的粘附性能. 测量时间为 3 h 实验, 以没有涂覆材料的玻璃为对照. 微管吸吮测量系统由三部分组成: 微管控制系统、微操作系统和数据处理系统. 图 1 为微操作系统的示意图.

* 国家自然科学基金资助项目 (19732003、19872080) 和教育部重点科技资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 023-65102508, E-mail: bio@cqu.edu.cn

收稿日期: 2000-10-18, 接受日期: 2000-12-12

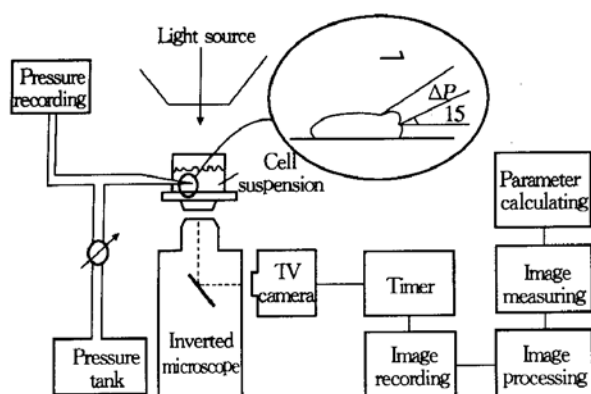


Fig. 1 Schematic diagram for micropipette aspirating system

其操作过程为微管控制器上, 加工前端内径 (D_p) 为 $5.5 \sim 6.5 \mu\text{m}$ 的微管, 并用微量进样器灌满培养液, 微管后端接于水压控制的微操作手上, 并连于自动控制系统中. 室温下录相记录整个过程. 定义拉脱细胞的最小压力为临界粘附力. 临界粘附力 (F) 以下式计算:

$$F = \frac{\Delta P \times \pi \times (D_p/2)^2}{\cos \alpha}$$

D_p 为微管内径, ΔP 为临界粘附压力, α 为微管与材料表面的水平夹角. 实验中因 α 控制在 $< 15^\circ$ 的范围内, 且始终保持某一角度, 所以该公式可简化为 $F = \Delta P \times \pi \times (D_p/2)^2$. 实验过程经连续摄象, 采用 Imagetool 2.0 软件分析录象得到实验数据. F 的大小可反映细胞在材料表面粘附力.

1.3 统计检验

实验结果以平均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 实验结果

表 1 列出了接种后孵化 15 min 和 24 h 的临界粘附力测量结果.

Table 1 Comparison of adhesion property of Wistar rat osteoblasts on PLA and modified-PLA

Incubation time	Material	$F/10^{-10}\text{N}$	n
15 min	Glass	310 ± 115	25
	PLA ¹⁾	706 ± 118	38
	MPLA ¹⁾²⁾	1065 ± 386	40
24 h	Glass ³⁾	710 ± 175	14
	PLA	720 ± 347	14
	MPLA ¹⁾²⁾³⁾	1386 ± 196	15

F : Critical adhesion force; n : sample amount; ¹⁾ Compared with control (glass) in the same incubation time: $P < 0.05$; ²⁾ Compared with PLA in the same incubation time: $P < 0.05$; ³⁾ Compared with 15 min on the same material: $P < 0.05$.

3 讨论

组织工程支撑材料的选择直接关系到工程组织的结果. 本研究以化学方法改性, 期望得到更适应的组织工程材料, 同时以生物学手段表征改性材料的性能, 赋予传统化学材料表征新概念. 我们认为这一思路在组织工程支撑材料的制备和筛选中是可行的, 而且方便快捷.

本研究采用微管吸吮装置测量细胞在材料表面的临界脱附压力, 它与细胞在材料表面的粘附力成正比^[3]. 实验测量的是不与其他细胞粘附的单个细胞, 测量时间为 3 h, 且一直保温于 37°C . 在上一批实验中, 三个样品选择的细胞都是同一只大鼠的原代成骨细胞. 实验重复了 2~3 次. 在孵化 15 min 组的测量过程发现, 从测量开始到约 45 min 的时间段内, 细胞粘附力是增加的趋势, 且增幅较大, 之后的粘附力值趋于稳定. 从形态学观察, 在整个测量过程中细胞一直处于没有完全铺展的球形或椭圆形. 因此 15 min 组的数据是细胞从接种孵化 15 min 到测量 3 h 这一时间段内的粘附力平均值, 它反映的是细胞的早期粘附性能. 孵化 24 h 组的细胞已经完全铺展, 细胞的粘附力测量结果在整个测量时间段内差别不大.

实验采用的三种材料表面都不具有细胞的粘附受体, 细胞在材料表面的粘附过程分两步进行: 首先是细胞借助于材料表面吸附的培养介质成分, 如血清中的白蛋白等, 介导细胞粘附. 这里的吸附反应是一个动态过程, 反应速度较快, 它受溶液的 pH 值、离子组成、温度、蛋白质官能团和材料性质的影响. 本研究中除材料不同以外, 其他条件都相同. 其次是粘附在材料表面的细胞分泌表达自身的粘附受体和基质成分, 调节粘附状况. 细胞分泌表达所需时间比吸附反应长^[2,7,8]. 因此根据实验现象可推断: 从接种到约 45 min 的时间段内, 介导细胞粘附的第一步: 吸附反应接近平衡; 24 h 和 15 min 组的粘附力差别是由于粘附细胞分泌表达自身粘附受体的结果.

根据以上的结果和讨论可以作如下的推论: 从三种样品 15 min 和 24 h 组的数据来看, 聚乳酸和改性聚乳酸对成骨细胞的粘附力比玻璃大, 改性聚乳酸的粘附力比聚乳酸大, 因此聚乳酸是成骨细胞的一种性能较好的支撑材料, 改性后性能增强; PLA 上 15 min 和 24 h 组的数据无显著差异, 推断成骨细胞在 24 h 内在 PLA 表面上还没有调整到分

泌表达的状态; 而 MPLA 的 15 min 和 24 h 组的数据差异显著, 即细胞在 24 h 内在 MPLA 表面上可能已经开始分泌表达自身的粘附受体。因此, 成骨细胞在 MPLA 表面的适应能力较快, 这种优势来源于它不同的表面化学结构。实验结果证实, 本研究所采用的改性方法可行, 当然, 对成骨细胞在材料表面的生长和功能表达情况我们仍将陆续报道。

参 考 文 献

- 1 Ishang-Riley S L, OKun L E, Praclo G, *et al.* Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films. *Biomaterials*, 1999, **20** (23): 2245~ 2256
- 2 Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 2000, **21** (7): 667~ 681
- 3 Cargill R S, Dee K C, Malcdm S. An assessment of VG108-15 cell adhesion to chemically modified surfaces. *Biomaterials*, 1999, **20** (24): 2417~ 2425
- 4 Schwartz Z, Boyan B D. Underlying mechanisms at bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem*, 1994, **56** (2): 340~ 347
- 5 Windeler A S, Bonewald L F, Khare A G, *et al.* The influence of sputtered bone substitutes on cell growth and phenotypic expression. In: Davies JE. Eds. *The Bone-Biomaterial Interface*. Toronto: Toronto Press, 1991. 205~ 213
- 6 吴泽志, 邵开峰, 宋关斌, 等. 肝癌细胞在 IV 型胶原被衬表面的粘附特性. *中华医学杂志*, 1999, **79** (5): 369~ 372
Wu Z Z, Shao K F, Song G B, *et al.* *Natl Med J China*, 1999, **79** (5): 369~ 372
- 7 Bizios E. Osteoblasts "An *in vitro* model of Bone-implant interaction". *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, **43** (6): 582~ 585
- 8 Bergman A J, Zygorakis K. Migration of lymphocytes on fibronectin-coated surfaces: temporal evolution of migratory parameters. *Biomaterials*, 1999, **20** (23): 2235~ 2244

Study of Adhesion Property of Wistar Rat Osteoblasts on Polylactide and Maleic Anhydride Modified Polylactide*

PAN Jun, WANG Yuan-Liang**, CAO Xue-Bo, SU Lan, QIN Jian, LU Xiao, CAI Shao-Ji
(Biological Engineering College, Key Laboratory for Biomechanics & Tissue Engineering of the Education Ministry of China, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract Micropipette-aspiring system was selected to test the adhesion property of Wistar rat osteoblasts on polylactide (PLA) and maleic anhydride modified polylactide (MPLA) made in our laboratory. The aims were evaluating one of the material's suitability for tissue engineering-adhesion property and the modification method. The results showed that osteoblasts had better adhesion property on PLA than on glass. The adhesion force of osteoblasts on PLA at 24 hour increased about 2 times after modification. The 24 hour adhesion force of osteoblasts on MPLA was 1.3 times more than that of 15 minute. But there was no significant difference on PLA. The research demonstrates that MPLA is a better scaffold for osteoblasts adhesion and the modification method is suitable for tissue engineering.

Key words polylactide, modification, osteoblast, adhesion property

* This work was supported by grants from the National Nature Science Foundation of China (19732003, 19872080) and the Key Project of Science and Technology of the Education Ministry of China.

** Corresponding author. Tel: 86-23-65102508, E-mail: bio@equ.edu.cn

Received: October 18, 2000 Accepted: December 12, 2000