

## 组织工程骨表面微观形貌和生物矿化的实验研究

宁寅宽 李 强 蔡伟良 武成聪 陈佳滨 石正松

**摘要** 目的 用绿色荧光蛋白(GFP)标记结合扫描电镜和X射线能谱分析(SEM/EDS)技术对组织工程骨的表面微观形貌和生物矿化进行观测,以评价脱钙骨(DBM)支架体外构建组织工程骨的生物性能。方法 用重组腺病毒介导GFP基因转染兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)进行示踪标记,细胞与DBM复合经成骨诱导后,通过倒置荧光显微镜对细胞生长情况进行即时观察,结合SEM/EDS技术,观测组织工程骨的表面微观形貌和生物矿化。结果 在倒置荧光显微镜下见细胞在DBM支架上能较好的黏附、重叠生长和增殖,体外培养至14 d时,细胞内GFP有较高水平瞬时表达。SEM见DBM呈疏松多孔结构,孔隙直径为300~600 μm,孔隙率达90%。SEM下观察组织工程骨,见细胞在DBM网孔内表面贴壁生长,分泌基质旺盛,并可见粗糙的生物矿化物覆盖支架。EDS显示其表面为钙、磷沉积物,其钙磷比(Ca/P)为1.46。结论 DBM体外构建组织工程骨有非常好的生物性能,GFP标记结合SEM/EDS技术可以作为DBM体外构建组织工程骨较好的评价手段。

**关键词** 重组腺病毒;绿色荧光蛋白;骨髓间充质干细胞;脱钙骨基质;能谱分析

中图分类号 R 687.34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0168-05

### 骨组织工程概念的提出为骨组织缺损的再生修

2014-09-30 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31160199)

作者单位:桂林医学院附属医院四肢创伤手外科 桂林 541001

作者简介:宁寅宽,男,硕士研究生;

李 强,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: li.q12251970@163.com

复提供新的治疗手段。种子细胞、支架材料和生长因子是骨组织工程的3大要素,也是组织工程骨移植到体内发挥功能的重要因素<sup>[1]</sup>。松质骨经过脱脂、脱钙等处理后,内含有骨形态形成蛋白生长因子<sup>[2]</sup>,与骨髓间充质干细胞(bone-marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)复合可体外构建组织工程骨。但是在构建组织工程骨及其生物活性进行深入研究时,对BMSCs在支架上的黏附、分布和生长情况无较理想的即时观测方法<sup>[3]</sup>,对脱钙骨(demineralized bone matrix, DBM)体外构建组织工程骨的表面矿化研究,国内外也鲜有报道。该实验用重组腺病毒介导绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因转染兔BMSCs进行示踪标记,结合扫描电镜和X射线能谱分析(scanning electron microscope and energy dispersive spectrometer, SEM/EDS)技术,观测组织工程骨的微观形貌和生物矿化,以评价DBM体外构建组织工程骨的生物性能,为后期组织工程骨体内植入实验奠定理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

**1.1.1 腺病毒载体** Ad-GFP表达载体由美国英捷捷基(上海)贸易有限公司构建、鉴定和提供。采用免疫法检测腺病毒滴度,病毒滴度为 $2 \times 10^{10}$  pfu/ml。

**1.1.2 兔BMSCs制备** 本课题组前期实验已完成了兔BMSCs的获取、培养及鉴定,并取第5代细胞加入冻存保护液,程序降温后液氮保存备用<sup>[4]</sup>。本

The surface of Wiltse space was covered by the erector spinae aponeurosis, which was constituted by the tendons of longissimus pars thoracis. After the potential space was separated bluntly between the thoracic semispinalis tendons and the first medial tendon of longissimus (83%, 15 sides), or between the first and the second tendon of longissimus additionally (17%, 3 sides). The Wiltse space in all the thoracolumbar spine was exposed clearly. Through the Wiltse space, the multifidus, T11-T12 transverse process, L1-L2 articular process were exposed. After the accurate entry points of pedicle screw were shown, the pedicle screw fixation was simulated, and the pedicle screws were inserted into pedicle and vertebral body successfully. The location of the pedicle screws were assured by post-operation CT, and the multifidus remained intact. **Conclusion** In-depth understanding of the anatomy of Wiltse space in the thoracolumbar spine will contribute to the improvement of the minimally invasive pedicle screw fixation in this area.

**Key words** thoracolumbar spine; paraspinous intermuscular space; pedicle screw fixation; anatomy

次实验细胞为第 5 代冻存细胞复苏后传代至第 10 代的 BMSCs。

**1.1.3 实验动物** 健康雄性新西兰大白兔 1 只, 6 月龄, 3.2 kg, 清洁级, 购于桂林医学院动物实验中心, 实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

**1.1.4 主要仪器和试剂** 低糖 DMEM、胰蛋白酶、胎牛血清(美国 Hyclone 公司); 维生素 C、 $\beta$ -磷酸甘油、地塞米松(韩国 BIOSHARP 公司); 脱钙液(浓盐酸 15 ml、氯化钠 175 g、蒸馏水 1 000 ml)、戊二醛(美国 Sigma 公司); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司); 生物安全柜(中国苏净安泰公司); 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); 场发射 SEM(荷兰飞利浦公司); EDS 仪(英国牛津公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 DBM 制备** 参考文献<sup>[5]</sup>方法制作 DBM 基质。将健康雄性新西兰大白兔麻醉后处死, 取四肢骨干骺端、椎体及髂骨松质骨, -80 °C 冰箱冻存 3 d。除去附着肌肉和骨膜, 放入脱钙液中脱钙 3 d。再将骨块置于乙醚、无水乙醇中脱脂各 1 d, 以无菌蒸馏水反复冲洗、浸泡, 至浸泡液呈中性。脱钙松质骨自然晾干, 剪成大小约 2 mm × 3 mm × 5 mm 块状, 环氧乙烷消毒, 4 °C 保存备用。

**1.2.2 兔 BMSCs 的复苏、传代培养及转染** 将待复苏的兔 BMSCs 冻存管迅速解冻, 转移至含有 3 倍于冻存保护液体积的 L-DMEM 离心管中 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。细胞沉淀中加入 5 ml 完全培养基, 充分吹打细胞悬液至细胞分布均匀, 以含 15% 血清的 L-DMEM 完全培养基(含 100 IU/ml 青霉素、100 IU/ml 链霉素)接种于 25 cm<sup>2</sup> 塑料培养瓶, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度环境中培养, 细胞复苏 24 h 后换液。各代 BMSCs 体外培养至单层细胞汇合约 80%, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 行 1:2 ~ 3 传代培养, 细胞传至第 10 代细胞进行实验。设置转染复数(MOI = 100), 用重组腺病毒 Ad-GFP 转染细胞, 转染 24 h 后换液。

**1.2.3 转染后兔 BMSCs 与 DBM 复合构建组织工程骨** 将转染后的细胞重悬, 用细胞计数板计数每个 25 cm<sup>2</sup> 塑料培养瓶细胞数目, 收集  $1 \times 10^8$  个数量细胞。用离心机低速离心(1 500 r/min, 5 min)后, 弃上清液, 用 1 ml 完全培养基再次重悬细胞, 以调整细胞密度为  $1 \times 10^7$  个/ml, 与 DBM 基质复合, 次日更换骨诱导培养液(含 10 nmol/L 地塞米松、15

mmol/L 维生素 C、10 mmol/L  $\beta$ -磷酸甘油、pH = 7.3) 孵育 1 周后, 更换完全培养基培养。在倒置荧光显微镜下逐日观察细胞在 DBM 上的黏附、分布和增殖情况。

**1.2.4 DBM 和组织工程骨在 SEM 下的表面微观形貌及 EDS 分析** 将构建的组织工程骨在体外培养 2 周后, 用 2.5% 戊二醛固定, 梯度丙酮脱水, 并与 DBM 同时真空干燥, 喷金镀膜, 在 Quanta 200 FEG 场发射环境 SEM 和 EDS 仪上进行测试。在 SEM 下观察 DBM 和构建的组织工程骨表面微观形貌, 应用计算机图像处理系统计算 DBM 的孔径和孔隙率。随机获取检测微区, 用 EDS 仪测定微区主要元素(C、O、Ca、P)的重量百分比和原子百分比含量, 重复 3 次。EDS 技术指标: 电压 10 kV, 电子束 6.0, 工作距离为 9.0 mm。

## 2 结果

**2.1 组织工程骨在倒置荧光显微镜下的观察** 参考本课题组前期实验方法<sup>[5]</sup>, 测定细胞黏附率为 71%。细胞黏附 DBM 后, 在倒置荧光显微镜下选择同一部位观察, 在不激发蓝光的情况下, 见不透光的脱钙骨支架, 支架边缘较薄处, 显微镜微调下可见三维孔隙结构。蓝光激发后, 荧光显微镜下能观察到绿色荧光, 呈满天星样, 细胞在 DBM 支架上能较好的黏附、重叠生长和增殖, 细胞内 GFP 有较高水平瞬时表达。见图 1。并随着培养时间的延长, 绿色荧光逐渐增强, 培养至 14 d 到最亮强度, 培养至 21 d 后, 荧光逐渐减弱至消失。

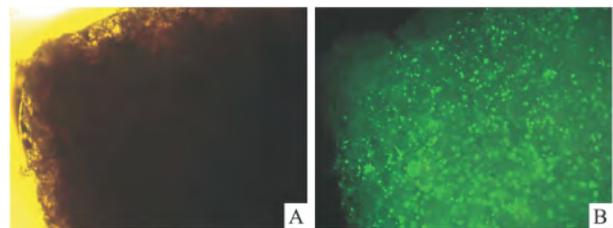


图 1 组织工程骨在倒置荧光显微镜下的观察 ×40  
A: 不激发蓝光的情况下; B: 蓝光激发后 相同观测点

**2.2 DBM 和组织工程骨在 SEM 下的观察及 EDS 分析** SEM 下, DBM 表面粗糙, 呈疏松多孔结构, 孔径大小不等, 形状不规则且相互交通; 其孔隙直径为 300 ~ 600  $\mu$ m, 平均为 360  $\mu$ m, 孔隙率达 90%, 见图 2。组织工程骨在 SEM 下观察, 可见细胞在 DBM 网孔内表面黏附、伸展良好, 贴壁生长, 呈成纤维细胞

形态,叠瓦状分布,并可见细胞基质分泌旺盛,几乎充满支架孔隙。见图3。体外培养14 d后的组织工程骨在SEM下可粗糙的生物矿化物覆盖。用EDS检测DBM和组织工程骨分别得出分析图谱。见图4。同时计算机由谱峰强度自动换算为所测主要元素的相对含量。见表1。数据显示组织工程骨体外培养14 d后,表面钙元素含量较DBM约高3.38倍,磷元素重量百分比从无增加到0.43。组织工程骨钙磷比(Ca/P)为1.46,接近羟基磷灰石钙磷比1.67,说明其表面有钙、磷沉积物产生,可能为磷酸钙盐。

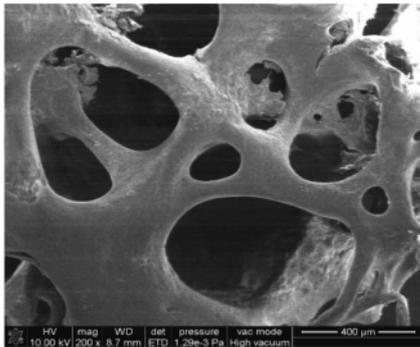


图2 SEM下DBM

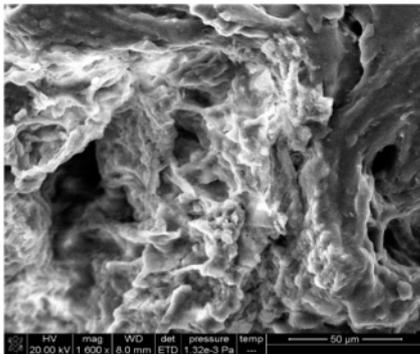


图3 组织工程骨SEM下细胞在DBM网孔内表面贴壁生长

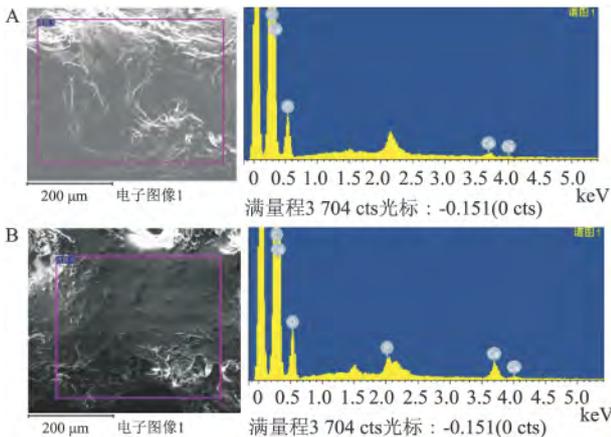


图4 SEM/EDS分析图谱

A: DBM; B: 组织工程骨

表1 DBM和组织工程骨表面元素分析

| 元素   | DBM    |        | 组织工程骨  |        |
|------|--------|--------|--------|--------|
|      | 原子质量   | 原子个数   | 原子质量   | 原子个数   |
|      | 百分比(%) | 百分比(%) | 百分比(%) | 百分比(%) |
| C、K  | 1.76   | 31.14  | 2.19   | 27.17  |
| O、K  | 5.11   | 67.74  | 7.28   | 67.75  |
| Ca、K | 0.21   | 1.12   | 0.81   | 3.01   |
| P、K  | 0.00   | 0.00   | 0.43   | 2.06   |
| 总量   | 7.08   | 100.00 | 10.71  | 99.99  |

### 3 讨论

SEM/EDS在观测样品表面微观形貌的同时还能进行微观元素分析,了解样品微观结构变化与其元素组成变化的关系;这是一种高度灵敏的超微量表面分析技术,国内外大量学者已将其运用于生物矿化材料领域研究<sup>[6]</sup>。EDS是目前常用的分析物质成分的方法。当能量大于原子电离临界激发能量的入射电子打到样品上时,能将原子电离,激发出特征性的X射线。一种元素发射出的特征性X射线强度与该元素在样品中的含量呈正比例关系,因此利用EDS仪测量出样品中各种特征性X射线的强度,再利用定量模型计算出元素的绝对含量或相对含量,可了解一种新物质的基本成分及其理化性质<sup>[7]</sup>。但EDS技术的应用仍有局限性,是对样品表面元素相对含量的分析,如相对质量、相对原子个数,无法完全代表绝对含量变化<sup>[8]</sup>。本实验初步尝试将SEM/EDS技术应用于以DBM为支架材料体外构建组织工程骨研究,观测其表面微观形貌和生物矿化。

生物矿化作用是在生物有机物质的控制或影响下,将溶液中的离子转变为固相矿物的作用<sup>[9]</sup>。细胞是矿化的主角<sup>[10]</sup>。本实验将兔BMSCs与DBM复合后经成骨诱导液诱导培养14 d后,在SEM下观察到粗糙的生物矿化物覆盖。通过EDS仪测量钙、磷元素显示,其表面为钙、磷沉积物,钙磷比(Ca/P)接近羟基磷灰石钙磷比,说明沉积物可能为磷酸钙盐,提示这是组织工程骨表面矿化沉积的结果。组织工程骨矿化形成过程可能与兔BMSCs体外经成骨诱导后其成骨分化标志物碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、I型胶原蛋白、钙结节形成有关。成骨细胞高表达ALP,促进骨间质矿化,其分泌的I型胶原蛋白是构成骨组织的蛋白支架,对骨的矿化起重要作用。分泌的胶原纤维与钙盐亲和,形成钙结节,促进钙盐沉积<sup>[11]</sup>。骨组织的矿化过程实质上就是磷酸钙盐在骨组织内沉积的积累过

程 整个骨组织矿化过程始终伴随着钙、磷等元素的变化。

DBM 经过脱脂、脱钙等处理后,具有天然的立体孔隙结构,同时 DBM 内含有骨形态形成蛋白,使其具有骨诱导性<sup>[12]</sup>。本课题组在前期体外实验<sup>[5]</sup>观察 DBM 的降解性能、孔隙率以及 BMSCs 和 DBM 的黏附性,证实 DBM 的降解曲线和 BMSCs 的增殖曲线相一致,具备良好的孔隙率和黏附率,提示 DBM 可成为比较理想的生物支架材料。在本实验中,制备的 DBM 在 SEM 下有较好的三维孔隙结构,孔隙直径为 300~600  $\mu\text{m}$ ,孔隙率达 90%;EDS 显示 DBM 保留了适当含量的钙离子,可作为新生骨再钙化的核心,为磷酸钙的矿化沉积提供晶核。SEM 和 GFP 标记显示细胞在 DBM 支架上黏附、伸展良好。但是 DBM 作为骨组织工程支架材料仍存不足之处,如机械强度差、降解快、供受体差异的缺点,以及 DBM 的制备方法等因素都可能影响 DBM 的质量,使其应用受到限制<sup>[13]</sup>。

GFP 基因标记是一种细胞示踪技术,可观察细胞在体外支架上的形态和分布<sup>[14]</sup>。重组腺病毒是一种安全、高效的基因载体,能够高水平瞬时表达外源基因,克隆的细胞不表达目的基因<sup>[15]</sup>。本实验用成骨诱导液诱导兔 BMSCs 向成骨方向分化和增殖,使细胞能在 DBM 有限的三维空间内重叠生长,不发生接触抑制。GFP 标记显示细胞在 DBM 支架上能较好地黏附、重叠生长和增殖。组织工程骨在体外培养至 14 d 时,绿色荧光最亮,说明细胞内 GFP 仍有较高水平瞬时表达。培养至 21 d 后,荧光逐渐减弱至消失,可能是 GFP 表达减弱和细胞大量增殖、重叠生长的共同结果。因此,应用外源基因转染细胞体外构建组织工程骨时,需要在目的基因较高水平瞬时表达之前植入体内,才能发挥其生物学功能。

综上所述,DBM 体外构建组织工程骨有非常好的生物性能。其次,利用 GFP 标记结合 SEM/EDS 技术观测组织工程骨的体外构建,评价支架材料体的生物性能,以利于筛选更好的支架,为体外构建组织工程骨积累实验依据。

### 参考文献

- [1] 年争好,孙凯,李瑞欣等.组织工程骨研究背景与进展[J].中华损伤与修复杂志,2013,8(5):525-8.  
[2] 马艳红,刘茜,梅予锋.脱钙骨基质的骨修复功能及其在口

- 腔临床医学中的应用前景[J].口腔生物医学,2012,3(2):94-7.  
[3] 侯天勇,边巴罗布,罗飞等.绿色荧光蛋白标记结合激光共聚焦显微镜三维重建技术观测组织工程骨的构建和体内移植[J].中国修复重建外科杂志,2010,24(7):11-5.  
[4] 武成聪,李强,陈佳滨等.短期冻存兔骨髓间充质干细胞对其生物特性的影响[J].重庆医学,2014,3(4):459-61,64.  
[5] 李强,孙正义,严冬雪等.脱钙骨基质材料的生物学表现:降解性能、孔隙率及其黏附性能特征[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(31):6121-4.  
[6] Chang H H, Cheng C L, Huang P J, et al. Application of scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: FE-SEM, ES-EM-EDS, and EDS mapping for studying the characteristics of topographical microstructure and elemental mapping of human cardiac calcified deposition[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(1): 359-66.  
[7] Sessa C, Vila A, Garcia J F. Determination of detection limits for SEM-EDS and m-FTIR analysis of artwork [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(7): 2241-51.  
[8] Sebök B, Kiss G, Szabó P J, et al. SEM and EDS investigation of a pyrolytic carbon covered C/C composite maxillofacial implant retrieved from the human body after 8 years [J]. J Mater Sci Mater Med, 2013, 24(3): 821-8.  
[9] Chow W Y, Rajan R, Muller K H, et al. NMR spectroscopy of native and *in vitro* tissues implicates polyADP ribose in biomineralization [J]. Science, 2014, 344(6185): 742-6.  
[10] Du R, Wu T, Liu W, et al. Role of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in driving tricalcium silicate-induced proliferation and biomineralization of human dental pulp cells *in vitro* [J]. J Endod, 2013, 39(8): 1023-9.  
[11] Price P A, Toroian D, Chan W S. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is required for the calcification of collagen in serum: a possible mechanism for biomineralization [J]. J Biol Chem, 2009, 284(7): 4594-604.  
[12] Ozdemir M T, Kir M C. Repair of long bone defects with demineralized bone matrix and autogenous bone composite [J]. Indian J Orthop, 2011, 45(3): 226-30.  
[13] Saraf S K, Yadav A, Nagwani S, et al. Decal bone matrix as a local antibiotic delivery vehicle in a MRSA-infected bone model: An experimental study [J]. Indian J Orthop, 2010, 44(3): 246-51.  
[14] Duan Z, Li Q, He L, et al. Application of green fluorescent protein-labeled assay for the study of subcellular localization of Newcastle disease virus matrix protein [J]. J Virol Methods, 2013, 194(1-2): 118-22.  
[15] Hamada K, Desaki J, Nakagawa K, et al. Carrier cell-mediated delivery of a replication-competent adenovirus for cancer gene therapy [J]. Mol Ther, 2007, 15(6): 1121-8.

## RIP1 增强顺铂诱导食管癌细胞的凋亡

章余妹<sup>1</sup> 吴 萍<sup>1</sup> 张林杰<sup>1</sup> 吕 磊<sup>2</sup> 杨守梅<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨受体相互作用蛋白 1 (RIP1) 增强顺铂 (DDP) 诱导食管癌细胞凋亡的敏感性。方法 单溶液细胞增殖分析 (MTS) 法检测不同浓度 DDP 对食管癌细胞株 KYSE510、KYSE410 的增殖抑制作用; Annexin V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡; Western blot 法检测 RIP1、半胱天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase-3)、PARP 的蛋白表达。结果 DDP 诱导食管癌细胞凋亡具有剂量和时间相关性。凋亡率随剂

量增加和时间延长升高, RIP1 蛋白的表达升高, DDP 联合 RIP1 特异性抑制剂处理食管癌细胞后, 较敏感的 KYSE510 凋亡率明显减少。结论 RIP1 可能参与了 DDP 诱导食管癌细胞凋亡的作用。

**关键词** 食管癌; RIP1; 顺铂; 凋亡

中图分类号 R 735.1; R 329.25

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0172-05

2014-10-23 接收

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2011A167)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学免疫学教研室, 合肥 230032

<sup>2</sup>安徽省肿瘤医院肿瘤内科, 合肥 230001

作者简介: 章余妹, 女, 硕士研究生;

张林杰, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zlj33@vip.sina.com

食管癌是国内外常见的消化道恶性肿瘤之一, 据统计, 全球每年新发食管癌 48 万例, 每年约有 40 万人因此死亡, 我国是食管癌高发国家<sup>[1]</sup>。辅助化疗是治疗食管癌的一种重要手段, 但其预后的改善进展却很缓慢<sup>[2]</sup>。因此, 研究增强食管癌对药物治疗敏感性的策略, 发现新的治疗靶点至关重要。受体相互作用蛋白 1 (receptor-interacting protein 1,

## Experimental study on surface microscopic morphology and biological mineralization of tissue engineering bone

Ning Yinkuan, Li Qiang, Cai Weiliang, et al

(Dept of Limb Trauma Surgery, The Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001)

**Abstract Objective** Green fluorescent protein (GFP) labeling, scanning electron microscope and energy dispersive spectrometer (SEM/EDS) were applied to observe surface microstructure and biological mineralization of tissue engineering bone for the purpose of evaluating the decalcified bone matrix (DBM) scaffold materials of biological properties in tissue engineering bone. **Methods** The rabbit bone-marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were marked by Ad-GFP. Real-time growth of the cells was observed by an inverted fluorescence microscope after the osteoinductive culture on to DBM, and surface microstructure and biological mineralization of tissue engineering bone were observed by SEM/EDS. **Results** The cells on surface of DBM had a good adhesion, overlap growth, as observed by an inverted fluorescence microscope, and a higher level of transient expression of GFP was confirmed after 14 days *in vitro* culture. SEM image showed that DBM had a porous structure, with pore diameter ranging from 300 to 600  $\mu\text{m}$ , and a porosity rate was around 90%. The tissue engineering bone showed that cells grew adherently on the surface of DBM, matrix secretion was strong, and the DBM was covered by rough biological mineralization. X-ray photoelectron spectroscopy showed that the surface of rough biological mineralization consisted of Calcium, Phosphorus sediment and its Calcium and Phosphorus ratio (Ca/P) was 1.46. **Conclusion** Tissue engineering bone constructed by DBM scaffold materials *in vitro* has excellent biological properties, and combined application of GFP labeling, SEM and X-ray photoelectron spectroscopy is a feasible method for evaluating DBM scaffold material in tissue engineering bone.

**Key words** adenovirus; green fluorescent protein; bone-marrow mesenchymal stem cells; decalcified bone matrix; X-ray photoelectron spectroscopy