复合材料学报 Acta Materiae Compositae Sinica
第 26 卷 第 4 期 8 月 2009 年
Vol. 26 No. 4 August 2009

文章编号：1000-3851(2009)04-0059-04

# β-偏磷酸钙/聚乳酸复合骨折内固定材料的细胞相容性

廖 立[1]，尹光福*[2]，谢克难[1]，康云清[2]，龙 沁[1]，赖雪飞[1]

(1. 四川大学 化学工程学院，成都 610065；2. 四川大学 材料科学与工程学院，成都 610064)

**摘 要：** 对采用"两步模压法"制备的β-偏磷酸钙(β-CMP)晶须/聚乳酸(PLLA)复合骨折内固定材料进行细胞安全性研究，为其应用提供生物学依据。将成骨细胞与复合材料共孵育，用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT)法分析成骨细胞的增殖情况，并通过倒置显微镜和 SEM 观察成骨细胞在复合材料上的粘附、生长情况。β-CMP/PLLA 复合材料对成骨细胞黏附、生长没有抑制作用而且能促进成骨细胞的增殖。β-CMP/PLLA 复合材料具有良好的细胞相容性。

**关键词：** 聚乳酸(PLLA)；β-偏磷酸钙(β-CMP)；骨折内固定复合材料棒；细胞相容性

**中图分类号：** TB332 **文献标志码：** A

## Cellular compatibility of β-calcium metaphosphate(β-CMP)/poly-*L*-lactide(PLLA) fracture innerfixation composites

LIAO Li[1], YIN Guangfu*[2], XIE Kenan[1], KANG Yunqing[2], LONG Qin[1], LAI Xuefei[1]

(1. School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;
2. School of Materials Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** To investigate the cellular compatibility of β-calcium metaphosphate (β-CMP)/poly-*L*-lactide(PLLA) fracture innerfixation composites prepared by a two-step method, and to provide a biological evidence for the application of the composites, the osteoblasts proliferation and adhesion on β-CMP/PLLA composite were analyzed by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) and SEM, respectively. The cytology experiments show that β-CMP/PLLA composite can promote cells growth and osteoblasts adhered and spread well on the materials. The new fracture innerfixation material, β-CMP/PLLA composite, has good cytocompatibility in vitro.

**Keywords:** poly-*L*-lactide(PLLA); β-calcium metaphosphate(β-CMP); fracture innerfixation composite rod; cellular compatibility

聚乳酸(Poly-*L*-lactide，PLLA)具有良好的生物活性和生物降解性，是一种有应用前景的医用可降解吸收高分子材料[1-2]。但单纯以 PLLA 为原料制备的骨折内固定物，价格昂贵、局部有无菌性炎症反应，还存在制作工艺复杂、强度衰减过快等缺点[3]。β型偏磷酸钙(β-calcium metaphosphate，β-CMP)生物陶瓷材料具有良好的生物相容性，其成分与骨的矿物质组成类似[4-5]，但存在脆性大、韧性差、模量过高等缺陷，限制了其在骨科方面的临床应用[6]。因此，PLLA 和 β-CMP 单独使用都不能满足骨折内固定材料的力学性能和生物学性能要求，而两者的复合受到了广泛的关注[7]。本文中采用β-CMP 晶须来增强 PLLA 基体材料制备 β-CMP/PLLA 复合内固定材料[8-10]，在改善其力学性能的同时，调整其降解性能；利用 β-CMP 晶须溶解产物中和 PLLA 体内降解的弱酸性环境，抑制无菌性炎症的产生，提高内固定材料的生物相容性。本研究中将成骨细胞和复合材料共孵育，用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT)法分析成骨细胞的增殖情况，通过倒置显微镜和 SEM 观察成骨细胞在复合材料上的粘附、生长情况来评价 β-CMP/PLLA 复合材料的细胞相容性，为进一步的

**收稿日期：** 2008-06-30；**收修改稿日期：** 2008-10-22
**基金项目：** 国家"863"高技术项目(2002AA326080)；四川大学青年科学基金(07048)
**通讯作者：** 尹光福，教授，研究方向：生物医学材料 E-mail：nic0700@scu.edu.cn

实验研究和临床应用提供生物学依据。

## 1　实验部分

### 1.1　实验材料

β-CMP/PLLA 复合内固定材料(自制)，大鼠成骨细胞(四川大学华西生物医学工程实验室)，DMEM(LG)培养基(Gibco 公司，美国)，胎牛血清(FBS)(Gibco 公司，美国)，胰蛋白酶(Sigma 公司，美国)，MTT(Sigma 公司，美国)，DMSO(Facro Chemical Supples，美国)，YJ－875 清洁超净工作台(上海设备总厂)，倒置显微镜(Olympus 公司，日本)，$CO_2$培养箱(Heraeus 公司，德国)，深低温冰箱(三菱公司，日本)，超声清洗仪(Branson 公司，美国)，台式离心机(北京医用仪器厂)，微量震荡器(IKA 公司，美国)。

### 1.2　实验方法

1.2.1　材　料

将不同β-CMP晶须质量分数(0、15%、25%、35%、45%，共 5 组，每组 3 个)的复合材料压制成圆柱状 ($\Phi=5$ mm，$h=2$ mm)，紫外线照射 30 min，75%酒精消毒 30 min，PBS 浸泡清洗 3 次，每次 1 h，用含血清的 F－12 培养液孵育过夜。对照组不加 β-CMP/PLLA 复合材料。

1.2.2　成骨细胞的培养

将成骨细胞的细胞系冰冻复苏后，转入培养瓶，达到 $5\times10^6\sim6\times10^6$ 密度后取出，消化、离心、浸提液重悬、孵箱中孵育细胞，空白对照为不放浸提液的 DMEM 培养基培养。

1.2.3　β-CMP/PLLA 材料与细胞复合培养

将材料置于 24 孔板内。消化第 3 代成骨细胞，以 $2.4\times10^5$/mL 等量接种于材料表面，静置于 37℃、5%$CO_2$孵箱中孵育培养。对照组采取同样的处理措施，对照组为单纯材料，加入培养液孵育；MTT 实验中，对照组为没有与材料复合的成骨细胞，仅加入培养液培养。

1.2.4　MTT 法检测

将 24 孔板内每孔加入新鲜配置的 MTT (5 mg/mL)100 μL，37℃孵育 4 h，间断震荡，弃上清，每孔加入 DMSO 200 μL，微量振荡器上振摇 10 min，取等量液体置于新孔板内，490 nm 测吸光度，连续测 7 天。

1.2.5　荧光显微镜观察

分别取培养第 3 天和第 7 天的材料-细胞复合物，0.01%吖啶橙染色 10 min，PBS 洗 3 次后用荧光显微镜观察。

1.2.6　扫描电镜(SEM)观察

于培养 7 天后取出 24 孔板内的材料，PBS 洗 3 次后，2.5%戊二醛固定，50%～100%的乙醇梯度脱水，$CO_2$临界点干燥，喷金，日立 S－450 型扫描电镜扫描分析。

## 2　结果与讨论

### 2.1　MTT 分析

图 1 为成骨细胞与不同 β-CMP 晶须含量的 β-CMP/PLLA复合材料共孵育后的 MTT 分析结果。可以看出，随着复合材料中 β-CMP 晶须含量的增加，OD 值增大。成骨细胞与 β-CMP 晶须含量为 15 wt%、25 wt%、35 wt%和 45 wt%的复合材料共孵育 3 天和 7 天后，OD 值明显高于对照组，表明复合材料能促进成骨细胞的增殖。

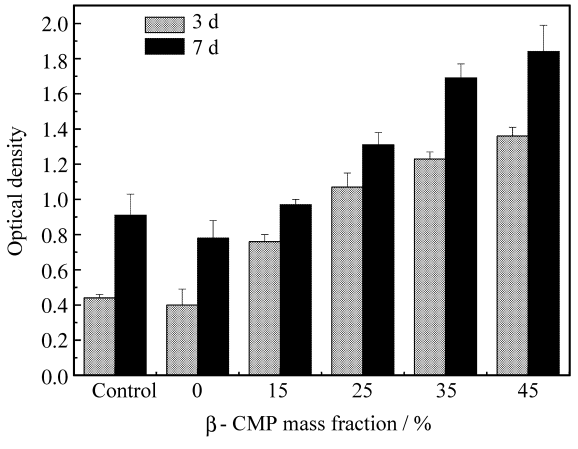



图 1　β-CMP/PLLA 材料与细胞复合培养 3 天和 7 天后的 MTT 分析结果

Fig. 1　Results of MTT of composite rod with different mass fractions of β-CMP in different times of cell culture using osteoblasts

MTT 分析结果表明，复合材料能促进成骨细胞的增殖，并且复合材料中 β-CMP 晶须含量越高，越有利于成骨细胞的增殖。

### 2.2　细胞形态与生长状态

2.2.1　荧光显微照片分析

细胞培养实验对含有 25%β-CMP 晶须的 β-CMP/PLLA复合材料上培养的细胞进行了荧光显微照片分析，其结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出，成骨细胞在形态上呈各种形

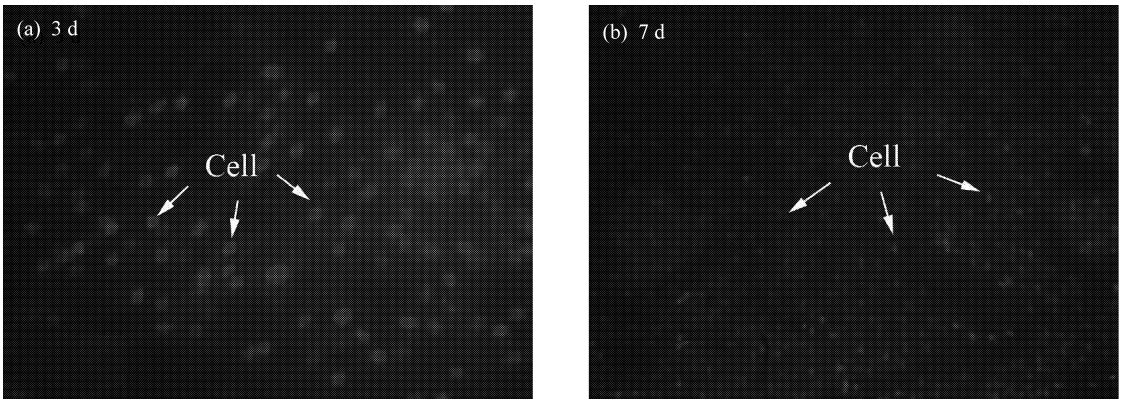
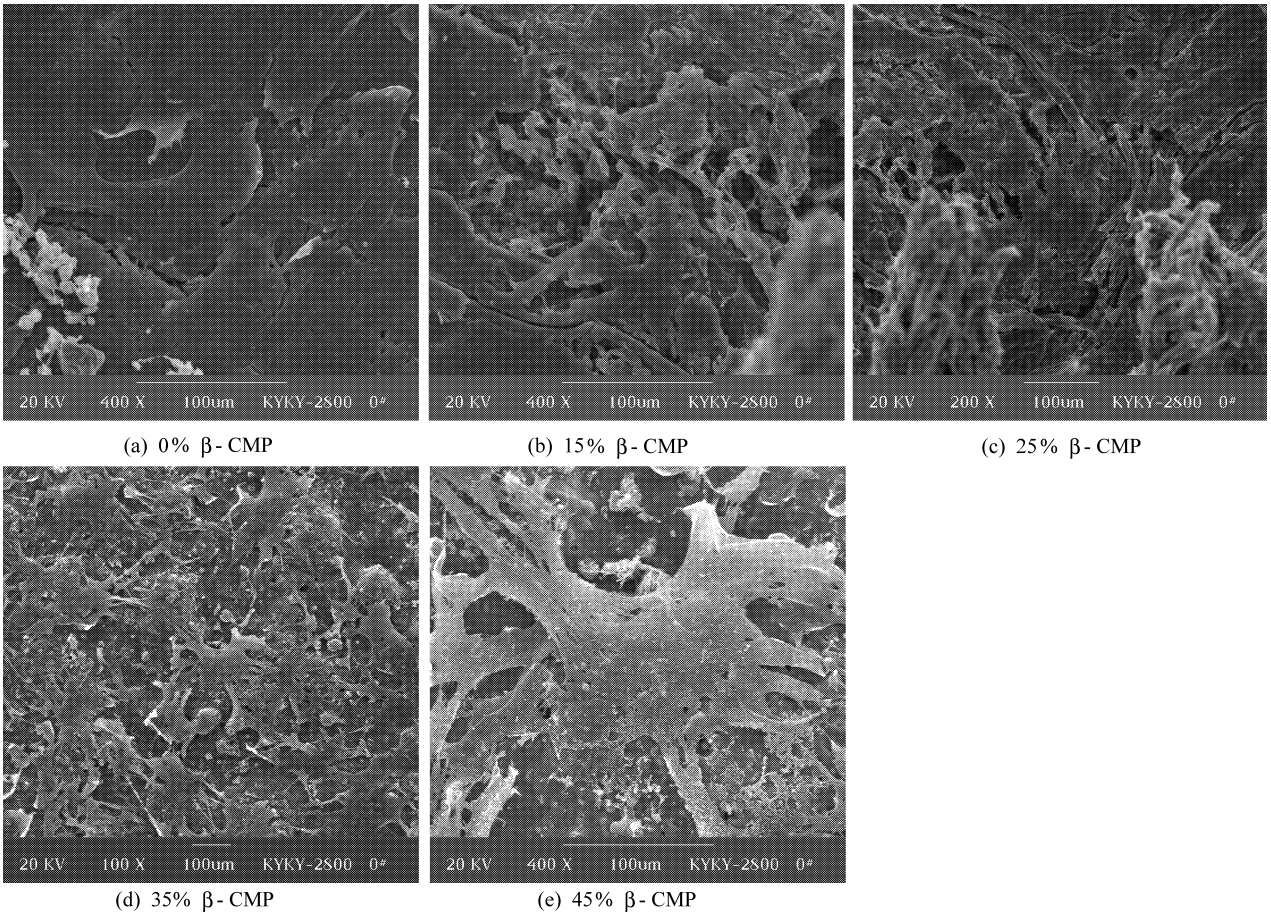



图 2　复合材料细胞培养的荧光照片

Fig. 2　Fluorescence pictures of composites for cell culture




(a) 0% β-CMP　(b) 15% β-CMP　(c) 25% β-CMP

(d) 35% β-CMP　(e) 45% β-CMP

图 3　复合材料细胞培养的 SEM 照片

Fig. 3　SEM pictures of composites for cell culture

状，细胞的形态基本正常，呈密集型贴壁生长，无明显接触抑制。说明 β-CMP/PLLA 复合材料用于培养细胞时，能较好地适合细胞生长、增殖，对细胞生长无抑制作用。

2.2.2　扫描电镜照片分析

细胞培养实验对 β-CMP/PLLA 复合材料上培养的细胞进行了扫描电镜照片分析，其结果如图 3 所示。

从图 3 可以清楚地看到，成骨细胞与复合材料培养 7 天后，在各种 β-CMP 晶须含量的复合材料上已经能很好地黏附，细胞和细胞外基质呈膜状，与材料黏附紧密，细胞表面有大量绒毛突起，并且

细胞已伸出许多伪足，整体呈多边形形态存在，表明细胞功能良好。

## 3 结　论

（1）β-CMP/PLLA 复合材料能促进成骨细胞的增殖，并且复合材料中 β-CMP 晶须含量越高，越有利于成骨细胞的增殖。

（2）复合材料对成骨细胞黏附、生长没有抑制作用。

（3）β-CMP/PLLA 复合材料具有良好的细胞相容性，可以满足骨折内固定的要求。

## 参考文献：


[1] 李玉宝. 生物医学材料 [M]. 北京：化学工业出版社，2003：1-6.

[2] 俞耀庭，张兴栋. 生物医用材料 [M]. 天津：天津大学出版社，2000：2-5.

[3] Bostman O，Pihlajamaki H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation：A review [J]. Biomaterials，2000，21(24)：2615-2621.

[4] Jung Y，Kim S S，Kim Y H，et al. A poly (lactic acid)/calcium metaphosphate composite for bone tissue engineering [J]. Biomaterials，2005，26(32)：6314-6322.

[5] 陈　琳，廖　立，康云清，等. β-偏磷酸钙生物陶瓷晶须研究 [J]. 材料导报，2007，21(10)：147-149.
Chen Lin，Liao Li，Kang Yunqing，et al. Research on β-calcium metaphosphate ceramic whiskers with biological activity [J]. Material Review，2007，21(10)：147-149.

[6] Jaw K S. The effects on the devitrification mechanism for a certain composition of $CaO/P_2O_5$ glass with additives of HAp，TCP，and $\beta$-$CaP_2O_6$ whisker [J]. J Therm Anal Cal，2006，83(1)：151-156.

[7] Bleach N C，Nazhat S N，Tanner K E，et al. Effect of filler content on mechanical and dynamic mechanical properties of particulate biphasic calcium phosphate-polylactide composites [J]. Biomaterials，2002，23(7)：1579-1585.

[8] 陈　琳，廖　立，康云清，等. β-偏磷酸钙晶须增强左旋聚乳酸材料的体外降解 [J]. 复合材料学报，2007，24(6)：100-104
Chen Lin，Liao Li，Kang Yunqing，et al. In vitro degradation behavior of β-calcium metaphosphate whiskers/ poly *L*-lactide composite [J]. Acta Materiae Compositae Sinica，2007，24(6)：100-104.

[9] Liao Li，Chen Lin，Chen Aizhen，et al. Preparation of β-calcium metaphosphate (β-CMP) whiskers [J]. Key Engineering Materials，2007，330/332：15-18.

[10] 陈　琳，廖　立，康云清，等. 卵磷脂改性 β 型偏磷酸钙晶须研究 [J]. 化工新型材料，2007，35(2)：43-44.
Chen Lin，Liao Li，Kang Yunqing，et al. Study of β-calcium metaphosphate (β-CMP) whiskers modified with phosphatidyl cholines [J]. New Chemical Materials，2007，35(2)：43-44.