

基础医学

硼硅酸盐生物玻璃的生物活性测试及其细胞相容性*

宁佳¹, 姚爱华¹, 付海罗¹, Qiang Fu², 王德平¹, 黄文岳¹, M N Rahaman², 刘欣¹

Bioactivity and cytocompatibility of borosilicate bioglass

Abstract

AIM: To determinate the bioactivity and cytocompatibility of borosilicate bioglass, and develop a new kind of bioglasses which mainly contain boron as glass network former in the structure.

METHODS: The experiment was carried out in the laboratory of School of Materials Science and Engineering of Tongji University from October 2005 to August 2006. By introducing B₂O₃ into silicate glass (45S5 glass), the borosilicate bioglasses used for bone tissue engineering scaffolds, were prepared at different boron contents (15.4, 30.7, 46.1 mol%). The bioactivity of these borosilicate glasses was evaluated by the formation rate of hydroxyapatite (HAp) crystals with X-ray diffraction method. Taking 45S5 glass as a control, the cytocompatibility to osteoblast cells of these borosilicate glasses was assessed by contact and attachment tests using optical microscope and scanning electron microscope, which were performed at the Biomaterials Research Group at the University of Missouri-Rolla.

RESULTS: Bioactivity: The formation rate of HAp on the samples increased with the increasing of boron content, so did the crystallinity of HAp. The bioactivity improved with increasing of boron content. Cytocompatibility: Comparing with 45S5 bioglass, the borosilicate glass with high content boron did have certain inhibition on the growth of osteoblast cells, but osteoblast cells which attached on the borosilicate glass plate surface or the ones near the interface of glass plate still presented good growth on the whole.

CONCLUSION: Borosilicate bioglasses may serve as a promising scaffold material for bone tissue engineering. They not only have great bioactivity, but also have a good cytocompatibility to osteoblast cells.

Ning J, Yao AH, Fu HL, Qiang Fu, Wang DP, Huang WH, Rahaman MN, Liu X. Bioactivity and cytocompatibility of borosilicate bioglass. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2007;11(35):7041-7043(China)
[www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/07-35/35k-7041(ps).pdf]

摘要

目的: 测定硼硅酸盐玻璃的生物活性及其细胞相容性, 开发一类以硼作为玻璃结构网络主要形成体的生物活性玻璃。

方法: 实验于2005-10/2006-08在上海同济大学材料科学与工程学院实验室完成。在硅酸盐生物玻璃, 45S5玻璃, 中引入B₂O₃, 制备不同硼含量(摩尔百分比为15.4, 30.7, 46.1)的用于骨组织工程材料硼硅酸盐玻璃。以45S5玻璃为对照, 通过X射线衍射方法确定生成羟基磷灰石晶体的速度, 来评价硼硅酸盐的生物活性; 在美国密苏里-罗拉大学生物实验室作成骨细胞在玻璃片上的接触实验和黏附试验, 并通过扫描电镜和光学显微镜评价硼硅酸盐玻璃对成骨细胞的相容性。

结果: 生物活性: 随着硼含量提高, 硼硅酸盐玻璃的羟基磷灰石生成速度加快, 结晶度增加, 说明它们的生物活性逐渐提高。

细胞相容性: 与45S5玻璃相比, 硼含量高的玻璃, 对成骨细胞生长有抑制作用; 但在玻璃片界面附近或玻璃片表面的成骨细胞, 总体上仍然有较高的存活率, 呈现出良好的生长形态。

结论: 硼硅酸盐玻璃是一类很有发展前景的骨组织工程支架材料, 它不仅具有良好的生物活性, 而且对成骨细胞具有较好的细胞相容性。

关键词: 硼硅酸盐玻璃; 生物活性; 细胞相容性; 生物材料

宁佳, 姚爱华, 付海罗, Qiang Fu, 王德平, 黄文岳, M N Rahaman, 刘欣. 硼硅酸盐生物玻璃的生物活性测试及其细胞相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(35):7041-7043 [www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/07-35/35k-7041(ps).pdf]

0 引言

组织工程是采用生命科学与工程原理及方法构建一个生物装置来维护、增进人体细胞和组织的生长, 以恢复受损组织或器官功能的技术。理想的组织工程材料应满足的最重要的条件为^[1]: 良好的生物活性。良好的细胞相容性。完全的生物降解性。目前, 45S5生物玻璃不可完全降解^[2], 且羟基磷灰石生成速度较慢^[3]。为此, 本实验以45S5生物活性玻璃为基体, 掺入可加快材料的降解和羟基磷灰石的生成速度的元素硼^[4], 制备一种可用于骨组织工程支架材料的硼硅酸盐玻璃。本文初步测试其生

物活性, 观察成骨细胞在玻璃周围的生长情况。

1 材料和方法

设计: 对比观察。

单位: 同济大学材料科学与工程学院生物工程与信息技术材料研究所。

材料: 实验于2005-10/2006-08在上海同济大学材料科学与工程学院实验室完成, 同时在美国密苏里-罗拉大学作相应的实验。仪器: D/max2550VB3+/PC型X射线衍射仪(日本Rigaku International Corporation公司), S-2360型扫描电镜(东京仪器设备公司)。试剂: 二氧化硅(分析纯, 中国上海爱建现成试剂厂);

¹Institute of Bioengineering and Information Technology Materials, Tongji University Materials College, Shanghai 200092, China; ²Biomaterials Research Group, University of Missouri-Rolla, Rolla, Mo 65409, USA

Ning Jia, Master, Institute of Bioengineering and Information Technology Materials, Tongji University Materials College, Shanghai 200092, China
mengyuan-36@163.com

Correspondence to: Huang Wen-hai, Master, Professor, Institute of Bioengineering and Information Technology Materials, Tongji University Materials College, Shanghai 200092, China
whuang@mail.tongji.edu.cn

Supported by: Basic Key Program of Shanghai Science Committee, No. 05DJ14006*

Received: 2007-04-07
Accepted: 2007-06-15

¹同济大学材料学院生物与信息材料研究所, 上海市200092; ²密苏里-罗拉大学生物材料研究中心, 罗拉市, 密苏里州, 美国MO 65409

宁佳, 女, 1982年生, 湖南省衡阳市人, 汉族, 2007年同济大学毕业, 硕士, 主要从事生物医用材料方面的研究。
mengyuan-36@163.com

通讯作者: 黄文岳, 教授, 硕士, 同济大学材料学院生物与信息材料研究所, 上海市200092
whuang@mail.tongji.edu.cn

上海市科委基础重大项目资助(05DJ14006)*

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225(2007)35-07041-03

收稿日期: 2007-04-07
修回日期: 2007-06-15
(07-50-4-2145/Y-Y)

碳酸钙(化学纯,上海泗联化工厂);二水磷酸氢钙(分析纯,上海试剂四厂);碳酸钠(分析纯,江苏强盛化工有限公司);硼酸(分析纯,上海申博化工有限公司)。羊骨髓基质细胞第3代(美国密苏里-罗拉大学生物材料研究中心)。

设计、实施、评估者:均为全部作者。

技术路线:

材料的准备:以45S5玻璃的摩尔百分比为基础,用不同比例的 B_2O_3 取代45S5玻璃中的 SiO_2 ,设计成 B_2O_3 的摩尔百分比含量分别为15.4, 30.7和46.1的硼硅酸盐玻璃。按这些不同的玻璃组成,称取二氧化硅、碳酸钙、二水磷酸氢钙、碳酸钠和硼酸混合均匀,在不同温度下熔融,浇注得到无定形块状玻璃,加工成符合下列各项试验的样品。

体外生物活性测试:粉碎玻璃块,取得尺寸为150~300 μm 的玻璃颗粒,1g玻璃颗粒浸泡在100 mL的0.02 mol/L K_2HPO_4 溶液(其 $[PO_4]^{3-}$ 的浓度是生物模拟液的20倍)中,考察在相同浸泡时间内,不同硼含量的玻璃形成羟基磷灰石的能力。

成骨细胞的细胞相容性实验:将不同硼含量的玻璃加工成厚度为1 mm左右的玻璃片。经高压灭菌后的玻璃片转移到培养皿中,然后加入5 mL浓度为 $6 \times 10^7 L^{-1}$ 的骨髓基质(MC3T3-E1)细胞悬液,在标准 CO_2 培养箱中培养,分别于1, 3 d后在光镜下观察玻璃片边缘的溶液里细胞生长情况,并以45S5玻璃片为对照组。另外一组试样,在培养2 d后,将玻璃取出,固定在玻璃表面上的细胞,作扫描电镜观察。

主要观察指标:不同硼含量的硼硅酸盐玻璃颗粒于37 $^{\circ}C$ 下,在 K_2HPO_4 溶液中浸泡7 d后,以X射线衍射仪分析羟基磷灰石晶体生长情况;在光镜下观察不同硼含量玻璃片周围的培养液里成骨细胞的形态和在电子显微镜下观察玻璃片表面上成骨细胞的附壁生长情况。

2 结果

2.1 不同硼含量的硼硅酸盐玻璃的生物活性比较见图1。

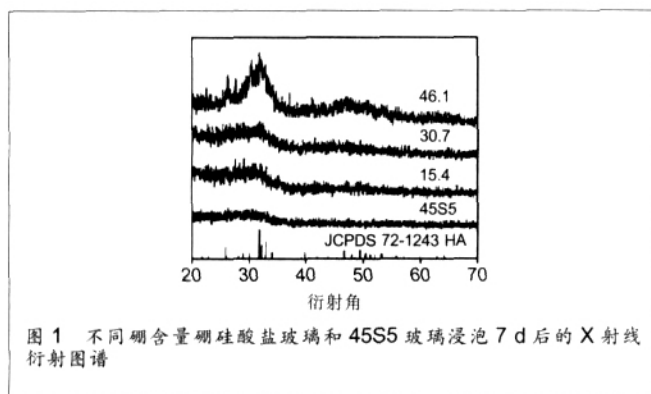


图1结果表明,浸泡7 d后,硼含量越高的样品转化为羟基磷灰石的速度越快,生成的羟基磷灰石的峰型越尖锐,说明羟基磷灰石的结晶度越高。而45S5玻璃作为对照组,羟基磷灰石的峰型最不明显,说明45S5玻璃的反应速度最慢。硼元素的引入在一定程度上加快了活性反应的进行,在形成羟基磷灰石的同时,玻璃有失重现象发生,说明硼硅酸盐玻璃本身也被溶解^[5]。参考文献[6]对玻璃的溶解作了计算,硼含量最高的玻璃完全溶解,玻璃全部转化成羟基磷灰石,其他硼硅酸盐玻璃也有不同程度的溶解,即对这类玻璃而言,生物活性与生物降解性是并存的。换言之,此类硼硅酸盐玻璃不仅具有良好的生物活性,而且还具有卓越的生物降解性。对于另一类相似的硼硅酸盐玻璃的生物活性和生物降解性在国际上也有相类似的报道^[7]。

2.2 不同硼含量的硼硅酸盐玻璃和纯硅酸盐45S5玻璃对成骨细胞生长状况的比较 成骨细胞在45S5玻璃和不同硼含量硼硅酸盐玻璃培养液中的生长情况见图2,即玻璃片与溶液界面间的活细胞的多寡可显示硼硅酸盐玻璃的细胞相容性。

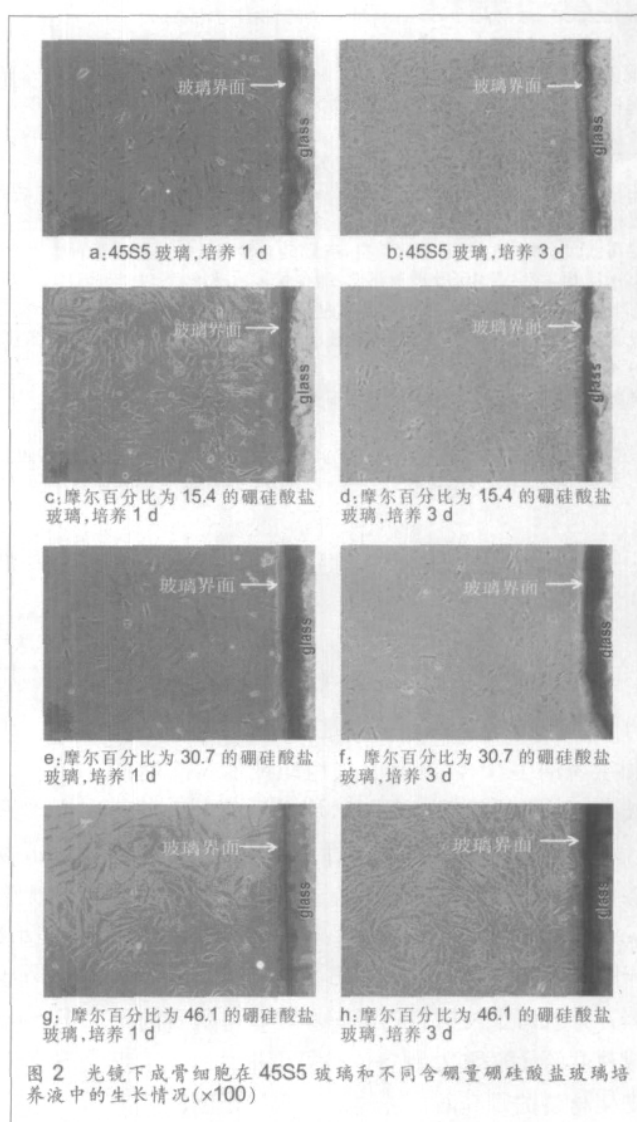


图2结果表明,虽然随着硼含量的增加,玻璃片界面附近的细胞生长数量有所下降,但是含硼量最多的玻璃片与溶液的界面处仍然有大量细胞存活。这说明硼元素的引入在提高玻璃生物活性的同时,对细胞生长的抑制作用没有预想的那么大。

2.3 扫描电镜下成骨细胞在45S5玻璃和摩尔百分比为46.1的硼硅酸盐玻璃表面的附壁生长情况 见图3。

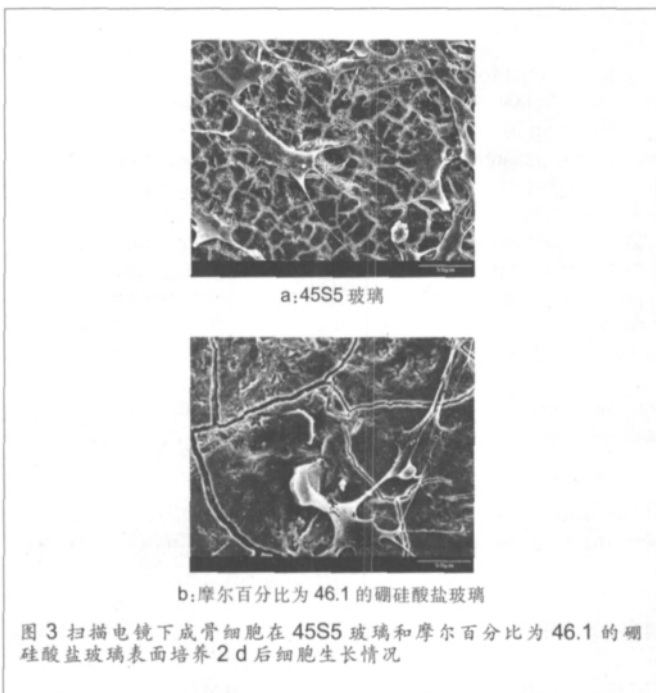


图3结果表明,培养2 d后成骨细胞在45S5玻璃表面大量生长(图3a),虽然硼元素对细胞生长有一定的抑制作用,但从图3b来看,成骨细胞在摩尔百分比为46.1的硼硅酸盐玻璃表面铺展开来,呈现出扁平的细胞形态,细胞边缘清晰完整,尺寸正常,细胞伪足清晰可见。这说明硼硅酸盐玻璃对细胞生长的抑制作用在可接受的范围内。

3 讨论

根据玻璃结构理论,由于B-O的结合单键键能很高,能形成B-O三配位或B-O四配位,因此 B_2O_3 也是很好的玻璃网络结构形成体。在硅酸盐生物玻璃中引入 B_2O_3 ,当 B_2O_3 含量在玻璃中超过 SiO_2 的含量时,玻璃结构的网络主体,逐渐由以硅为网络主体,转化为以硼为主体。在国际上将硼硅酸盐系统用作生物材料鲜有报道^[8],据作者占用资料来看,将硼硅酸盐系统用作生物玻璃,在国内尚无报道。 B_2O_3 的引入使硅酸盐玻璃

结构,增加了三面体,使网络空间连接程度降低,从而使构成网络的离子在生理模拟液中易被侵蚀,即玻璃的溶解速度增加,生物降解性增加,与之同时,钙、磷等离子溶出速度的增加,加速了羟基磷灰石的沉积,使玻璃的生物活性有一定程度的提高^[9]。

从接触细胞实验来看,与45S5玻璃相比,硼元素的加入虽然对细胞的生长有一定的抑制作用,但是,硼元素对细胞生长的影响并不是很大。动物体对硼有很高的忍受剂量^[10],同时硼在动物体中不会积累,其半衰期小于24 h^[11,12]。从细胞黏附实验结果来看,成骨细胞在含硼较多的硼硅酸盐玻璃表面仍能正常的伸展开来,这说明硼元素对细胞的毒性,不似人们想象的那么大,适当的引入硼元素并不会产生太大的毒性。如果考虑硼不会在人体中积累,那么硼硅酸盐生物玻璃所造成的毒性会比此实验所显示的更小。

在硅酸盐生物玻璃中引入硼,不仅能调节生物活性,还能调节生物降解性,而生物降解性恰恰是目前硅酸盐生物玻璃在临床应用中遇到的十分棘手的问题^[2]。此外,硼硅酸盐生物玻璃有很高的可加工性,容易制成形状复杂的三维连通的孔支架,具有较高的强度。总之,由于硼硅酸盐玻璃有以上的特点,它们有可能是一类很有前途的骨组织工程支架材料。

4 参考文献

- 1 高春华,黄新友.组织工程与生物材料[J].上海生物医学工程,2003,24(4):46-49
- 2 Hamadouche M, Meunier A, Greenspan DC, et al. Long-term in vivo bioactivity and degradability of bulk sol-gel bioactive glasses. *J Biomed Mater Res* 2001;54(4):560-566
- 3 和峰,刘昌胜.骨修复用生物玻璃研究进展(续)[J].玻璃与搪瓷,2004,32(5):45-50
- 4 Day DE, White JE, Brown RF, et al. Transformation of borate glasses into biologically useful materials. *Glass Technol* 2003; 44:75-81
- 5 宁佳,王德平,黄文昆,等.硼硅酸盐生物玻璃的制备及其体外生物活性和降解性[J].硅酸盐学报,2006,34(11):1326-1330
- 6 Huang W, Day DE, Rahaman MN. Kinetics and mechanism of conversion of silicate (45S5) borate and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions. *J Mater Sci Mater Med* 2006; 17:583-596
- 7 Song JH, Koh YH, Kim HE. Fabrication of a Porous Bioactive Glass-Ceramic Using Room-Temperature Freeze Casting. *J Am Ceram Soc* 2006; 89(8):2649-2653
- 8 Huang WH, Rahaman MN, Day DE. Conversion of bioactive silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solution. *Ceram Eng Sci Proc* 2006;27(6):131-140
- 9 Ning J, Yao AH, Wang DP, et al. Synthesis and in vitro bioactivity of a borate-based bioglass. *Mater Lett* 2007; doi: 10.1016/j.matlet.2007.04.089
- 10 钟炳南.硼在生命科学中的作用及对人体健康的影响[J].世界元素医学,2005,12(1):49-50
- 11 刘大森,单安山,谢小来,等.停喂硼砂后绵羊瘤胃及饲喂硼砂绵羊消化道不同部位脲酶、氨和尿素水平的变化[J].畜牧与兽医,2004,36(6):17-18
- 12 邢小茹,魏复盛,吴国平,等.人体硼暴露及其代谢的研究进展[J].安全与环境学报.2006,6(1):131-135