

# 脐静脉内皮细胞与双向羟基磷灰石联合培养的初步研究

毛新展<sup>1</sup>, 周江南<sup>2</sup>, 胡建中<sup>2</sup>, 倪江东<sup>1</sup>, 王万春<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅二医院骨科, 湖南 长沙 410011; 2. 中南大学湘雅医院骨科)

**摘要** 目的: 研究脐静脉内皮细胞在双向羟基磷灰石(BPM)的生长情况, 为组织工程材料研究提供实验基础。方法: 人脐静脉内皮细胞来源于永生细胞系, BPM 紫外线照射 30 min, 700 ml/L 乙醇洗涤 60 min, 无菌滤纸吸干, 用磷酸缓冲盐水洗涤 3 遍, 每次 30 min, 而后用无菌滤纸吸干, 将处理过的 BPM 材料泡入 DMEM 培养基(DMEM) + 20 ml/L 胎牛血清中过夜, 使用前用无菌滤纸吸干。应用人脐静脉内皮细胞(HUVECs)和 BPM 进行混合培养, 应用光学显微镜、荧光显微镜及扫描电子显微镜对其进行观察, 并应用 MTT 测定细胞增殖情况。结果: 人脐静脉内皮细胞在 BPM 表面生长、增殖良好, 并可观察到细胞长入基质材料微孔内的改变。在培养的第 3 天, 采用 MTT 法测定对照组与双向羟基磷灰石组的光吸收值, 对照组为  $0.616 \pm 0.017$ , 双向羟基磷灰石组为  $0.638 \pm 0.018$ , 两组比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。结论: 双向羟基磷灰石(BPM)可作为细胞移植的载体。

**关键词** 脐静脉; 羟基磷灰石类; 细胞培养

**Experimental study of human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) co cultured with biphasic phosphate matrix** MAO Xirzhan\*, ZHOU Jiangnan, HU Jiarzhong, NI Jiandong, WANG Wan-chun. \* Department of Orthopedic Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central-South University, Hunan Changsha, 410011, China

**Abstract Objective:** To investigate the feasibility of biphasic phosphate matrix(BPM) as scaffold material in bone tissue engineering. **Methods:** Human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) were co cultured with the biphasic phosphate in vitro. The cell matrix complex was observed under light microscope, fluorescent microscope and scanning electronic microscope in order to evaluate the interaction between cells and matrix. At the third day, the cells proliferation was detected by MTT method. **Results:** Human umbilical vein endothelial cells showed good biocompatibility with BPM matrix scaffold, and the matrix scaffold had no effect on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. **Conclusion:** The biphasic phosphate is a good scaffold material for bone tissue engineering.

**Key words** Umbilical veins; Hydroxyapatites; Cell culture

骨缺损修复一直是骨科领域的难题之一, 目前常用的有人工合成替代物、异体骨移植、自体骨移植等方法, 存在一定的问题。近年来, 组织工程的研究为骨缺损的修复提供了全新的思路和方法, 是研究的热点。双向羟基磷灰石(BPM)是一种新型的植骨材料, 由羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)和少量磷酸三钙(tricalcium phosphate, TCP)构成, 在骨缺损的修复中已广泛应用, 而其作为骨组织工程支架材料

的研究较少。本文应用人脐静脉内皮细胞和双向羟基磷灰石联合培养, 在体外观察细胞与材料间的相互作用。

## 1 材料和方法

**1.1 双向羟基磷灰石(BPM)的来源及处理** BPM 为圆形, 直径 7 mm, 空隙率 60%, 孔径 100~ 500  $\mu\text{m}$ (国家粉末重点实验室提供)。紫外线照射 30 min; 700 ml/L 乙醇洗涤 60 min, 无菌滤纸吸干; 用磷酸缓冲盐水洗涤 3 遍, 每次 30 min, 而后用无菌滤纸吸干; 将处理过的 BPM 材料泡入 DMEM 培养基(dulbecco's modified eagle's medium, DMEM) + 20 ml/L

基金项目: 湖南省科技厅科研项目(项目号: 1013-21), 省医药卫生科研计划课题(课题号: 00029)

通讯作者: 毛新展 Tel: 013975806781 E-mail: docmxz@sina.com

胎牛血清中过夜,使用前用无菌滤纸吸干<sup>[1]</sup>。

## 1.2 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)来源与性能

人脐静脉内皮细胞来源于永生细胞系,ECV304。该系细胞为自发转化脐静脉内皮细胞,其特征为高度增殖性、无特殊细胞因子依赖性和贴壁生长接触抑制<sup>[2]</sup>。

**1.3 HUVECs 与 BPM 的联合培养及观察法** 复合材料首先置入 24 孔培养板内,人脐静脉内皮细胞以  $5 \times 10^4$  浓度加在材料的表面,而后加入 1.0 ml 完全培养基。①荧光显微镜观察:将人脐静脉内皮细胞和 BPM 联合培养 6 d 后,用 10% 中性福尔马林固定 48 h,1% 溴乙啶染色 1 h, PBS 冲洗,而后用荧光显微镜(Olimpus, Japan)观察、照相。②扫描电镜观察:培养 1 周后将 BPM 取出,2% 戊二醛固定,系列脱水,乙酸异丙酯置换,临界点干燥,表面喷金后用扫描电镜(JSM-5600LV, Japan)观察。

**1.4 MTT 分析人脐静脉内皮细胞在 BPM 表面的增殖能力** ①制作标准曲线:准备细胞悬液,从每孔中  $5 \times 10^6$  细胞/200  $\mu$ l 开始在 96 孔板中倍比稀释至

每孔  $10^3$  细胞,每个稀释度三孔细胞,培养板置 37  $^{\circ}$ C 培养 4 h 后细胞贴壁,每孔中加入 20  $\mu$ g MTT 继续培养 4 h,然后吸出 150  $\mu$ l 培养液,加入等量二甲基亚砷(DMSO),37  $^{\circ}$ C、20 min,490 nm 处测定吸光度,采用 SPSS 分析软件制图。②  $3 \times 10^4$  细胞接种到 BPM 表面培养 3 d,加入 MTT (5 mg/ml) 50  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h,加入 DMSO 1 ml,使甲瓚充分溶解,选择 490 nm 波长比色,测定光吸收值<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

**2.1 倒置显微镜和荧光显微镜观察** 人脐静脉内皮细胞为建系的细胞株,细胞增殖旺盛,应用小牛血清即可生长良好。培养瓶内细胞培养 3 d 后在倒置显微镜下呈贴壁生长,上皮样外观(图 1),传代后细胞快速贴壁,增殖活跃。进行荧光染色后,观察到细胞在 BPM 材料表面上生长增殖旺盛,呈“堆积样”,并可见细胞向孔内生长(图 2)。

**2.2 扫描电镜观察** 扫描电镜可见 HUVECs 在材料表面生长良好,并长入材料的微孔内(图 3)。

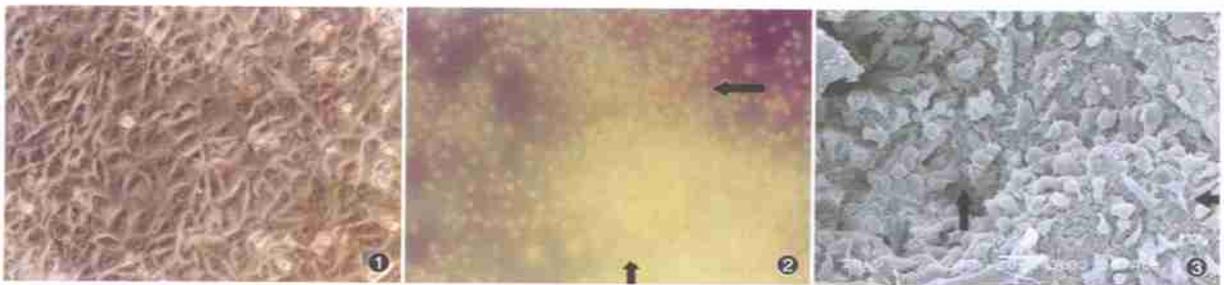


图 1. HUVECs 培养 3d, 倒置显微镜观察呈一致的蚕豆样外观 ( $\times 200$ ) 图 2. HUVECs 与 BPM 联合培养 6d, 荧光显微镜大体观 (—示表面, ↑示孔内; 溴乙啶染色法,  $\times 40$  倍) 图 3. HUVECs 与 BPM 联合培养 7d, 扫描电镜观察 (—示表面, ↑示孔内,  $\times 600$  倍)

Fig1. Under light micrograph of HUVECs for 3 days, presents an uniform, cobble-like cells ( $\times 200$ ) Fig2. Fluorescence micrograph of HUVECs on BPM for 6 days (—presents growth on surface, ↑ presents growth into holes; thidium bromide staining,  $\times 40$ ) Fig3. Scanning electronic micrograph of HUVECs on BPM for one week. (—presents growth on surface, ↑ presents growth into holes,  $\times 600$ )

**2.3 脐静脉内皮细胞在材料上的增殖实验** 在培养第 3 天,采用 MTT 法测定两组 ( $n=12$ ) 的光吸收值,对照组吸光度值为  $0.616 \pm 0.017$ ,双向羟基磷灰石组为  $0.638 \pm 0.018$ ,成组资料  $t$  检验,  $P=0.316$ ,  $P>0.05$ ,两组比较无统计学差异。

## 3 讨论

陶瓷材料在重建骨科中的主要作用是骨传导支架,这些材料很少在临近的组织内引起免疫反应。安洪等<sup>[4]</sup>采用多孔双向羟基磷灰石(由羟基磷灰石(HA)和少量磷酸三钙(TCP)制成的一种人工骨材

料)治疗 49 例骨缺损患者,取得良好的效果,作者认为多孔双向羟基磷灰石是成熟的骨修复材料,适合于腔洞型或非负重部位的骨修复。

血管的形成与骨的生长、修复和塑型密切相关。研究已经证实,在骨形成的过程中内皮细胞和成骨样细胞有双向的功能调节,全身性激素和旁分泌激素在其间起着重要作用。血管形成需要一系列生长因子诱导,血管内皮细胞生长因子(VEGF)可能是最重要的一个。人骨髓基质细胞(HBMSCs)和 HUVECs 联合种植在生物复合材料上构建组织工程化骨,为

骨组织工程提供新的思路。作者在前期的研究中证实 HBM SCs 在双向羟基磷灰石表面生长良好, 双向羟基磷灰石对碱性磷酸酶的升高无促进作用<sup>[5]</sup>。这为体外这两种细胞在双向羟基磷灰石表面的联合培养奠定了基础。

参考文献

- 1 胡建中, 毛新展, 吕红斌, 等. 羟基磷灰石和磷酸三钙复合材料成骨细胞载体的体外实验研究. 中国临床康复, 2003, 7(6): 916-925.
- 2 Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, et al. Spontaneous transformation

and immortalization of human endothelial cells. In Vitro Cell Dev Biol, 1990, 26(3): 265-274.

- 3 金丹, 裴国献, 王前. 骨髓基质细胞与生物活性玻璃陶瓷和聚乳酸生物相容性的实验研究. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(1): 39-43.
- 4 安洪, 柯银强, 蒋电明, 等. 多孔双向羟基磷灰石人工骨治疗四肢骨缺损 49 例. 中华创伤杂志, 2000, 16(6): 347-349.
- 5 胡建中, 毛新展, 吕红斌, 等. 骨髓基质细胞与双向羟基磷灰石联合培养的实验研究. 中国现代医学杂志, 2002, 12(24): 10-12.

(收稿日期: 2004-08-10 本文编辑: 李为农)

•手法介绍•

# 手法治疗产后骨盆环损伤综合征 21 例

## Manipulative treatment of pelvis ring injury syndrome after partum in 21 patients

李钰鑫

LI Yuxin

关键词 产伤; 骨盆; 骨科手法 **Key words** Birth injuries; Pelvis; Orthopedic manipulation

产后骨盆环损伤综合征是以妇女在分娩后出现耻骨联合或骶髂关节处疼痛、活动受限为主要特征的病症。自 1999 年 6 月- 2003 年 10 月我院应用手法治疗本病 21 例, 取得满意疗效, 现报告如下。

### 1 临床资料

本组 21 例女性患者, 年龄 22~ 30 岁; 前错位 12 例, 后错位 9 例; 左侧 8 例, 右侧 13 例; 病程 18~ 60 d。患者下腰部及骶髂关节处髂后下棘下角持续钝痛, 骶髂关节或耻骨联合处有深压痛及叩击痛, 患侧站立时下肢时有放射痛不能负重, 坐位时以健侧负重。双下肢不等长, 前错位患肢稍长, 后错位患肢稍短。下腹胀闷不适, 肛门胀坠, 尿频尿急。骶髂关节扭转试验阳性, 单髋后伸试验阳性, 4 字试验阳性, 骨盆挤压分离试验阳性。骨盆正位 X 线片显示: 患侧髂嵴及耻骨联合下移、闭孔纵径高度缩短, 患侧髂嵴及耻骨联合上升、闭孔纵径高度延长, 耻骨联合面间距大于 5 mm (耻骨联合分离者)。分型标准: ①前错位。髂后上棘比对侧凹陷, 髂后上棘至后中线距离增宽, 髂嵴水平下降, 耻骨联合下移, 闭孔纵径高度缩短; ②后错位。髂后上棘比对侧高凸, 髂后上棘至后中线距离变窄, 髂嵴水平上升, 耻骨联合上移, 闭孔纵径高度增长。

### 2 治疗方法

患者俯卧位, 术者以常规手法松解患侧骶髂关节周围的肌肉及软组织, 重点在条索状结节痉挛的区域。①后错位: 患者俯卧位, 术者立于患侧, 一手向下压住患侧骶髂关节处, 一手托住患肢膝前部, 患肢伸直, 术者两手对抗用力, 使患肢后伸至最大限度, 再骤然用力扳动, 此时可听到复位的弹响声; ②前错位: 患者仰卧位, 患肢屈髋 30°, 屈膝, 术者立于患侧, 一

手托住患肢小腿后侧, 一手顶住患肢膝前部, 使其前屈, 沿股骨干方向骤然用力上推, 常可听到复位的弹响声。以上治疗每天 1 次, 10 d 为 1 疗程。

### 3 治疗结果

疗效标准: 痊愈, 症状与阳性体征消失, 功能恢复正常, 随访 3 个月无复发; 显效, 症状与阳性体征基本恢复正常, 劳累后轻度酸胀; 好转, 主要症状与阳性体征好转, 中等程度以上劳动后症状加重; 无效, 症状与阳性体征无变化。本组疗程 6~ 20 d, 随访 4 周~ 3 个月。痊愈 16 例, 其中前错位 9 例, 后错位 7 例; 显效 5 例, 其中前错位 3 例, 后错位 2 例。

### 4 讨论

本病的手法整复是逆受伤机制而矫正骶髂关节错位畸形的。由于骶髂关节活动度小, 直接力臂短, 难以产生有效的复位力矩。临床上将下肢作为间接力臂传导有效的复位力, 延长了力臂, 增强了复位力矩。直、间接力臂间力的传导是手法成功的基础, 而髋关节的锁定是保证力有效传导的关键。前错位型手法复位成功的关键是髋关节屈曲内收位锁定 (坐骨韧带为其锁)。临床操作中屈髋屈膝保持坐骨韧带紧张, 瞬时锁定髋关节, 传导屈髋力至髂骨。卧床时髋骨相对固定, 运用此法易使髂骨后旋, 而矫正前旋畸形。后错位型手法复位成功的关键是髋关节过伸位锁定 (股韧带即锁)。在复位时, 下肢过伸使髂韧带及前侧关节囊处于紧张状态, 瞬时锁定髋关节, 传导下肢背伸力至髂骨, 同时按压髂后上棘向前, 使髂骨前旋, 而矫正后旋畸形, 使其恢复正常解剖关系, 达到最佳治疗效果。

(收稿日期: 2004-03-03 本文编辑: 王宏)