论著

文章编号:1000-5404(2009)05-0412-04

新型可注射性人工髓核的体外细胞毒性测试

程晓非[1],邹德威[1],吴继功[1],庹新林[2],王晓工[2],刘俊丽[3],马华松[1],张瑞娟[1],路浩军[3] ([1]解放军306医院骨科,全军脊柱外科中心,北京 100101;[2]清华大学化工系高分子研究所,北京 100084;[3]解放军306医院中心实验室,北京 100101)

摘 要:目的 检测前期制备的新型人工髓核材料的细胞毒性。**方法** 材料分为4组,编号为1~4。样品1组为合成的聚碳酸酯型聚氨酯;样品2组为在室温下由硅氢加成反应制成的缩合硅橡胶材料;样品3组是在2号样品中添加二氧化硅后制成;样品4组为室温下固化的聚醚型聚氨酯。采用细胞培养基作为阴性对照组。采用小鼠成纤维细胞(L929细胞)在材料浸提液中培养的方法检测其细胞毒性,使用3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四唑(MTT)比色法比较材料组与对照组间吸光度值和细胞相对增值率。**结果** 材料组的吸光度值和L929细胞相对增殖率相对于对照组没有明显差异($P>0.05$),在细胞毒性分级中处于0~1级,属于合格材料。**结论** 该材料没有细胞毒性,具有作为髓核替代材料的应用潜力。

关键词: 生物相容性材料;关节成形术;人工髓核;细胞毒性试验

中图法分类号: R318.08; R318.17; R991 **文献标识码:** A

Cytotoxicity of 4 novel injectable prosthetic nucleus pulposus in mice fibroblast cells

CHENG Xiao-fei[1], ZOU De-wei[1], WU Ji-gong[1], TUO Xin-lin[2], WANG Xiao-gong[2], LIU Jun-li[3], MA Hua-song[1], ZHANG Rui-juan[1], LU Hao-jun[3] ([1]Department of Orthopaedics, Spinal Surgery Center, [3]Central Laboratory, No. 306 Hospital of PLA, Beijing 100101; [2]Department of Chemical Engineering, Institute of Polymer Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Objective To evaluate the cytotoxicity *in vitro* of a novel prosthetic nucleus pulposus prepared in our previous work before *in vivo* application. **Methods** Prosthetic nucleus pulposus made by 4 different methods were prepared to check their cytotoxicity by culturing mice fibroblast L929 cells respetively with their leaching liquor. The control group was set by culturing L929 cells with culture media. The optical density (OD) and relative growth rate (RGR) of the experimental cells were measured by MTT colorimetric method. **Results** The OD and RGR of L929 cells in the 4 material groups and the control group showed no significant difference ($P>0.05$). The cytotoxicity of the 4 kinds of materials is at level 0 – 1 and they are qualified materials, according to the standard rank of cytotoxicity. **Conclusion** The neotype artificial materials show no cytotoxicity, of great potential as a substitute for nucleus pulposus.

Key words: biocompatible materials; arthroplasty; prosthetic nucleus pulposus; cytotoxicity test

对于椎间盘退行性疾病,通常的外科治疗方法是椎间盘髓核摘除术和腰椎融合术,随着对椎间盘结构和生物力学的深入了解,人们逐渐认识到单纯摘除髓核会带来椎间隙变窄、椎间压力增大、脊椎稳定性下降等一系列问题[1,2],并且椎间盘突出复发率也较高[3],而融合后临近节段退变也得到了很多研究结果的证实[4,5]。为了解决上述问题,一种新的治疗方法——人工髓核置换术应运而生。它能在缓解症状的同时,尽量保留解剖结构的完整性,维持椎间隙高度,保持脊柱节段的稳定性和自然活动范围,并减缓临近节段退变[6]。

作为新型的内植物,必须要对其生物安全性进行全面的评估,包括体外实验、动物实验和临床试验,体外细胞毒性测试就是其重要组成部分。本实验依据GB/T16886.5-2003标准[7],将材料浸提液与小鼠成纤维细胞(L929细胞)接触培养,进行细胞形态学观察,并使用3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02Z4D4)

作者简介: 程晓非,男,湖北省嘉鱼县人,硕士研究生,主要从事脊柱外科方面的研究。电话:(010)66356729-2525,E-mail:lionweeds@hotmail.com

通信作者: 邹德威,电话:(010)66356101, E-mail:zoudewei@vip.163.com

收稿日期: 2008-06-25;**修回日期:** 2008-07-30

唑(MTT)比色法对其细胞毒性进行评价。

1　材料与方法

1.1　实验材料及分组

新型人工髓核及其外包球囊材料样品由清华大学化工系高分子研究所提供,分为 4 组,编号为 1 ~ 4。样品 1 组为合成的聚碳酸酯型聚氨酯;样品 2 组为在室温下由硅氢加成反应制成的缩合硅橡胶材料;样品 3 组是在 2 号样品中添加二氧化硅后制成;样品 4 组为室温下固化的聚醚型聚氨酯。采用细胞培养基作为阴性对照组。

1.2　仪器和试剂

HERAcell150 型 CO_2 细胞培养箱(贺力氏公司,德国),IMT-2 型倒置相差显微镜(奥林巴斯公司,日本),550 型酶联免疫检测仪(BIO-RAD 公司,美国),L929 细胞株(北京口腔医学研究所,中国),DMEM 细胞培养基(GIBCO 公司,美国),胎牛血清(四季青公司,中国),青霉素、链霉素(华北制药公司,中国),二甲基亚砜(Dimethylsulphoxide, DMSO)(Sigma 公司,美国),MTT(Genview 公司,美国),96 孔培养板(Constar 公司,美国)

1.3　方法

1.3.1　细胞培养与传代　　取冻存 L929 细胞进行复苏,细胞培养基选用 DMEM,其中含有 10% 胎牛血清,并加入 20 万 U/ml 青霉素及链霉素,在 37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度条件的恒温培养箱内培养,根据生长情况定期传代,采用第 3 次传代后 48 h 的细胞进行实验。

1.3.2　材料浸提液的制备　　参考 GB/T16886.5-2003 标准中的方法并加以改进,将样品 1 与样品 4 裁剪成 3 cm × 4 cm 矩形,样品 2 与样品 3 分别称量并各切取 0.6 g,用蒸馏水振荡清洗 10 min,滤纸吸干水分,紫外线照射灭菌后放入无菌试管内。样品 1、4 按样品表面积与浸提介质(含 10% 胎牛血清的细胞培养基)比例为 6 cm^2/ml 加入 2 ml 浸提介质,样品 2、3 按样品质量与浸提介质比例为 0.2 g/ml 加入 3 ml 浸提介质,使液面完全浸没样品,密封后在 37 ℃无菌条件下浸泡 24 h 作为浸提液。

1.3.3　MTT 比色法测绘细胞生长趋势曲线[8]　　取浓度为 5×10^3 个/ml 的细胞悬液 200 μl,分别接种于 3 个 96 孔培养板上,每板接种 30 孔(包括 4 个样品组及阴性对照组,每组设 6 个重复),每孔细胞 10^3 个。另外,每板设 3 个空白组,加入不含细胞的相同培养基。置于 37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度条件恒温培养箱内培养。24 h 后使用含 10% 胎牛血清的细胞培养基将 4 组浸提液稀释 50%,舍弃各孔中原培养基,4 个样品组分别加入稀释后的浸提液,每孔 200 μl,阴性对照组及空白组加入含 10% 胎牛血清的细胞培养基 200 μl。重复以上操作对另外 2 个培养板进行置换。

将 3 个培养板置于恒温培养箱内继续培养,于 2、4、6 d 各取出 1 个培养板,显微镜下观察细胞形态,在每孔内加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl,继续培养 4 h,吸出培养孔内上清液,每孔加入 150 μl DMSO,经振荡混合器振荡 10 min,使用酶联免疫检测仪于 490 nm 处测定各孔吸光度[D(490)]值。以时间为横轴,各组 D(490)均值为纵轴,绘制细胞在材料浸提液中的生长趋势曲线。

1.3.4　相对增殖率(relative growth rate, RGR)的计算及细胞毒性评定　　根据公式[7]:RGR = [材料组 D(490)均值/阴性对照组 D(490)均值] × 100%,计算各样品组细胞 RGR 值,按以下标准把 RGR 值转化成 6 级反应以评定材料毒性程度:RGR ≥100% 为 0 级,RGR 75 ~ 99% 为 1 级,RGR 50 ~ 74% 为 2 级,RGR 25 ~ 49% 为 3 级,RGR 1 ~ 24% 为 4 级,RGR 0 为 5 级。其中 0 ~ 1 级反应为合格,2 级反应需结合细胞形态分析综合评定,3 ~ 5 级反应为不合格。

1.4　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件,对计量数据进行方差分析。

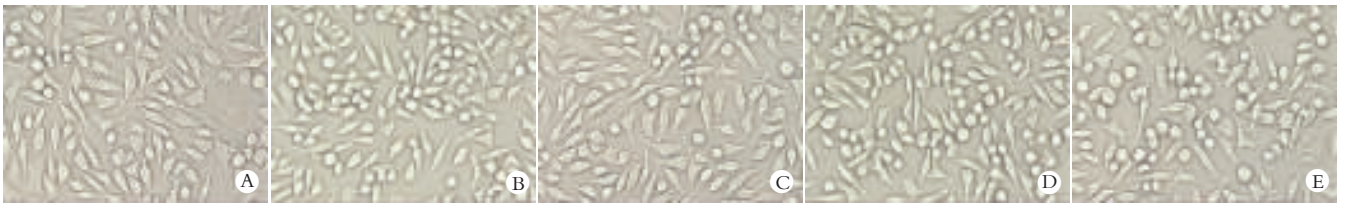
2　结果

2.1　细胞形态学观察

接种后约 6 h 细胞开始粘附至培养板底部,同时细胞变长成为梭形,并开始伸出突起。在 2、4、6 d 对各组细胞形态进行观察,可见细胞均贴壁生长,细胞形态多呈菱形或梭形,符合成纤维细胞形态特点。细胞散在生长,在同一时间点各组细胞密度相仿,并且都随时间推移逐渐增大。6 d 时镜下观察各组细胞分布均匀,样品 1、4 组细胞长满培养孔底部,部分细胞受压变圆(图 1 A、D),样品 2、3 组和对照组细胞密度更高,部分细胞堆积呈团块状,造成局部透光性下降,其中对照组还可见少量呈圆形的漂浮细胞(图 1 B、C、E)。各组细胞形态仍多为梭形,细胞中央有圆形或卵圆形核(图 1 A – E)。

2.2　细胞生长趋势曲线

随着培养时间的延长,各样品组细胞在浸提液中均获得不同程度的增殖。其中在 2 号样品浸提液中生长较快,在 4 号样品浸提液中生长较慢,而在 1、3 号样品浸提液中与对照组相似(图 2)。



A:样品 1 组; B: 样品 2 组; C: 样品 3 组; D: 样品 4 组; E: 对照组

图 1　6 d 时各组细胞形态学观察　(LM ×40)



A：收缩状态下的球囊；B：向球囊内注入液态单体；C：切开球囊可见单体已固化成形

图3 液态单体在球囊内扩张固化过程

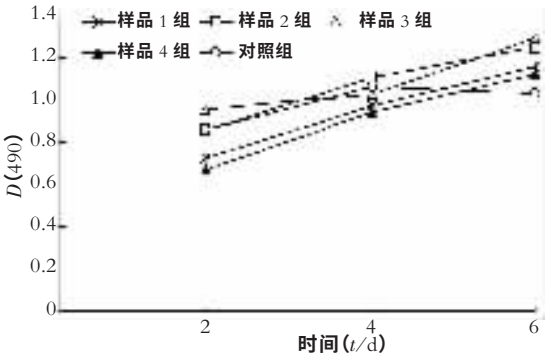


图2 L929细胞在材料浸提液中的生长趋势曲线

2.3 RGR的结果及细胞毒性评级

在2、4、6 d时，材料样品组1、2、3的细胞相对增值率均在85%以上，样品组4的细胞相对增值率偏低，但最低也在78%以上（表1）。根据前述分级标准，细胞毒性均为0～1级，说明材料浸提液对细胞基本没有毒性。

表1 细胞毒性实验结果（$\bar{x} \pm s, n=6$）

材料	2 d			4 d			6 d		
	吸光度值	相对增值率	分级	吸光度值	相对增值率	分级	吸光度值	相对增值率	分级
样品1组	0.73±0.08	85%	1	0.99±0.16	91%	1	1.19±0.18	114%	0
样品2组	0.86±0.11	101%	0	1.12±0.21	104%	0	1.28±0.32	122%	0
样品3组	0.96±0.26	112%	0	1.04±0.11	97%	1	1.33±0.23	127%	0
样品4组	0.67±0.09	78%	1	0.96±0.15	89%	1	1.15±0.18	110%	0
对照组	0.86±0.22	–	–	1.08±0.10	–	–	1.04±0.40	–	–

2.4 相对增值率分析

对实验数据使用SPSS10.0软件进行处理，通过转换数据达到正态分布且方差齐同，使用方差分析比较各组$D(490)$值之间的差异，结果显示在4、6 d时各组之间无显著性差异（$P>0.05$），2 d时各组间存在显著性差异（$P<0.05$），进一步采用S-N-K法进行两组间比较，结果表明差异来源于样品组3和样品组4（$P<0.05$），而4个样品组与对照组之间均无显著性差异（$P>0.05$）。

3 讨论

自从1962年Nachemson提出使用普通注射器注射硫化硅酮到椎间盘内来治疗椎间盘退变性疾病后，就不断有不同种类的人工髓核问世，它们大体上可分为预制型和注射型2类。预制型假体依赖材料内在的膨胀压力撑开椎间隙，由于置入前需要切除相应大小的纤维环，因此易出现植入物移位或被挤出的情况[9]。注射型是将液态前体注入椎间隙内，通过不同方法使之在原位聚合固化。这类假体通过很小的切口便能获得较大的植入体积，可在最大程度上与纤维环以及上下终板相匹配，从而更好地向周围传递负荷，使应力均匀分配，减少终板损伤的可能，而相对完整的纤维环则可以有效防止术后髓核假体的移位和脱出[10,11]。

但是，以往出现的注射型假体也存在一些问题，例如液态单体在注入过程中可能会发生泄漏；聚合过程中发热反应会在局部产生较高温度，损伤终板和纤维环；部分聚合物固化时间较长也会使手术时间延长[12]，另外，受此类型假体的强度和植入方式所限，其恢复椎间隙高度的能力也有限。此次我们研制的材料中，1号样品为耐高压的高强度高分子材料，作为人工髓核的外包球囊，其膨胀性能好，顺应性强，收缩状态下可由操作通道置入椎间隙（图3A），在可控压力下，注入液态单体使其扩张后（图3B），可占据髓核摘除所遗留的空腔，在有效撑开椎间隙的同时，不会因压力过大而损伤终板，并且在聚合过程中可防止其内部尚未固化的聚合物外渗。球囊的型号齐备，以满足不同空腔大小及形状的需求，通过在材料中加入显影剂还可使其在X线下显影，利于术中及术后透视定位。样品2、3、4由液态单体在催化剂作用下聚合固化制成，作为人工髓核的主体填充材料。混合液态单体可通过管道系统注射入球囊，在球囊内固化成形，填充髓核的缺损区（图3C）。通过研制过程中的反复测试，材料在弹性、柔韧性和机械强度等方面均表现优异；聚合时间长短适当，既能满足临床操作的要求，又不会因为固化过慢而延长手术时间；在聚合过程中局部温度没有升高，不会对周围组织造成损伤。通过与外包球囊的结合使用，该假体可有效避免以往注射型假体的弊病，达到良好的应用效果。

材料单体中无已知的有害物质，而在固化过程中需加入的催化剂则具有一定毒性和可溶性，材料的毒

性也来源于此。根据单体的不同,要分别采用相应的催化剂,其中样品 4 的催化剂毒性较强。由本实验可看出,样品 4 的细胞增殖度始终偏低,同时,统计结果也表明,材料组间差异来源于样品 3 和样品 4 之间,同样证实了样品 4 的毒性较大。细胞毒性实验作为初筛方法,其主要目的就在于对不同材料的生物安全性进行初步评价,根据本实验结果,在下一步测试中,细胞毒性偏大的样品 4(聚醚型聚氨酯材料)将被放弃。

MTT 比色实验是一种检测细胞存活和生长的方法,常被用于细胞毒性实验中,其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将 MTT 还原成难溶性的紫色结晶甲臜,并沉积在细胞中,而死细胞则无此功能。细胞中的甲臜可溶解于有机溶剂 DMSO 中,通过酶联免疫检测仪在 490nm 波长处检测其吸光度值[D(490)值]即可间接反映存活细胞数量。此方法具有灵敏度高、重复性好、操作简便、快速等特点,被广泛应用于细胞毒性实验中[13]。L929 细胞即小鼠成纤维细胞,其理论的倍增时间 25.49 h[14],通常情况 96 孔培养板单孔内贴壁细胞长满时约有 10^5 个细胞[8],本实验中每孔初始细胞为 10^3 个,理论上终止时细胞为 9.6×10^4 个,未超过上限。但在实验中发现 6 d 时对照组 D(490)值较 4 d 时略有下降,考虑为 L929 细胞增殖速度超过理论数值,造成对照组细胞密度过大,生长受抑制[8],并且细胞培养周期较长,本实验又不能更换培养基也会造成部分细胞缺乏营养而死亡。

本实验检测结果显示材料的细胞毒性分级在合格范围内,初步证明材料安全可靠,具有临床应用的潜力,本实验结果也为进一步的生物相容性测试奠定了基础。

参考文献:

[1] Fu T S, Lai P L, Tsai T T, *et al*. Long-term results of disc excision for recurrent lumbar disc herniation with or without posterolateral fusion [J]. Spine, 2005, 30(24):2830 - 2834.

[2] Hoogland T, van-den-Brekel-Dijkstra K, Schubert M, *et al*. Endoscopic transforaminal discectomy for recurrent lumbar disc herniation: a prospective, cohort evaluation of 262 consecutive cases[J]. Spine, 2008, 33(9): 973 - 978.

[3] Atlas S J, Keller R B, Wu Y A, *et al*. Long-term outcomes of surgical and nonsurgical management of sciatica secondary to a lumbar disc herniation: 10 year results from the maine lumbar spine study[J]. Spine, 2005, 30(8): 927 - 935.

[4] Carragee E J, Han M Y, Suen P W, *et al*. Clinical outcomes after lumbar discectomy for sciatica: the effects of fragment type and anular competence[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85-A(1):102 - 108.

[5] Carragee E J, Spinnickie A O, Alamin T F, *et al*. A prospective controlled study of limited versus subtotal posterior discectomy: short-term outcomes in patients with herniated lumbar intervertebral discs and large posterior anular defect[J]. Spine, 2006, 31(6):653 - 657.

[6] Bao Q B, Yuan H A. Prosthetic disc replacement: the future? [J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, (394):139 - 145.

[7] 由少华,王　昕,黄经春, 等. 医疗器械生物学评价. 第5部分: 体外细胞毒性试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2003:84 - 88.

[8] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2004: 250 - 251.

[9] Klara P M, Ray C D. Artificial nucleus replacement: clinical experience[J]. Spine, 2002, 27(12):1374 - 1377.

[10] Bao Q B, Yuan H A. New technologies in spine: nucleus replacement [J]. Spine, 2002, 27(11):1245 - 1247.

[11] Di-Martino A, Vaccaro A R, Lee J Y ,*et al*. Nucleus pulposus replacement: basic science and indications for clinical use[J]. Spine, 2005, 30(16 Suppl): S16 - S22.

[12] Goins M L, Wimberley D W, Yuan P S, *et al*. Nucleus pulposus replacement: an emerging technology[J]. Spine J, 2005, 5(6 Suppl): 317S - 324S.

[13] 房红莹, 顾冠彬, 杨珠英, 等. 医疗产品细胞毒性3种评价方法的比较[J]. 苏州大学学报:医学版, 2005, 25(4):605 - 608.

[14] 李　毅,李少萍. 聚乳酸-甲壳素接骨板的体外细胞毒性研究[J]. 南方医科大学学报, 2007,27(1):65 - 68.

(编辑　栾　嘉)

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是:凡是可以使用阿拉伯数字,而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字:

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如:公元前5世纪、20世纪90年代、1995年6月8日14时30分。

表示年份要写全称,1995年不能写成95年或95′年;1953 - 1958年不能写成1953 - 58年。年月日可以写成1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如:13时45分8秒可以写成13:45:08。

2　计数和计量(整数、小数、分数、百分数、均数)包括序数、编号　　4位和4位以上的数字采用三位分节法,不用"千分撇",节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙(如2,431改为2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节,也不加千分撇。尾数"0"多,5位以上的数字,可以用"万""亿"表示,但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示,例如3 579 000可写成357.9万但不能写成3百57万千或357万9千。

本刊编辑部