论著

文章编号:1000-5404(2010)21-2294-06

# 纳米羟基磷灰石/聚氨基酸复合材料生物安全性评价

代震宇[1],李 军[1],赵增辉[1],敖晓晓[2],蒋电明[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院骨科[1],400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院重症监护室[2])

【摘要】 目的 初步评价新型骨修复材料纳米羟基磷灰石/聚氨基酸(nano-hydroxyapatite and poly-amino acid,n-HA/PAA)的生物安全性。方法 按照ISO10993-1标准中规定以自制n-HA/PAA为实验组进行以下实验:①体外细胞毒性实验:采用L929成纤维细胞,完全培养基为阴性对照,苯酚为阳性对照,通过细胞形态学、MTT试验以及流式细胞进行细胞毒性评价;②全身急性毒性实验:以生理盐水为阴性对照组观察2组小鼠腹腔注射材料浸提液和生理盐水后72 h内有无中毒和死亡现象;③致敏试验:白化豚鼠30只均分3组,以生理盐水为阴性对照组、二硝基氟苯丙酮溶液为阳性对照组观察各组动物致敏区有无红肿和红斑,并记分;④溶血实验:生理盐水作为阴性对照组,灭菌蒸馏水为阳性对照组,分别加入抗凝兔血后计算溶血率;⑤热源实验:新西兰大白兔3只,按10 ml/kg注射材料浸提液,测量正常体温与注射后连续3 h内每小时体温的差值;⑥遗传毒性实验:KM小鼠30均分3组,分别按100 g/kg间隔24 h注射材料浸提液、环磷酰胺及生理盐水2次,观察骨髓嗜多染红细胞及含微核小体的骨髓嗜多染红细胞,并计算微核率。结果 体外细胞毒性实验观察材料对细胞形态与生长无明显影响,MTT检测实验组细胞毒性为1级,流式细胞仪检测材料不会引起细胞凋亡;全身急性毒性实验显示实验组动物无中毒及死亡;致敏试验显示致敏区无水肿及红斑;溶血实验表明材料溶血率为0.71%,符合小于5%的实验标准;热源实验显示实验动物无明显体温升高;遗传毒性实验显示材料微核试验阴性,无遗传毒性。结论 n-HA/PAA复合材料具有良好的生物安全性。

【关键词】 纳米羟基磷灰石;聚氨基酸;L929;细胞毒性;凋亡;生物安全性
【中图法分类号】 R318.08;R608 【文献标志码】 A

# Biological safety of nano-hydroxyapatite and poly-amino acid compound

Dai Zhenyu[1], Li Jun[1], Zhao Zenghui[1], Ao Xiaoxiao[2], Jiang Dianming[1] ([1]Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, [2]Intensive Care Unit, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the biological safety of nano-hydroxyapatite and poly-amino acid (n-HA/PAA) compound. Methods A n-HA/PAA compound was prepared according to the ISO10993-1 standards to carry out the following experiments. ① *In vitro* cytotoxicity test: L929 fibroblasts were divided into negative physiological saline group and positive phenol group. Morphologic change was observed and cytotoxicity was detected by MTT assay and flow cytometry. ②Systemic acute toxic test: intoxication and death were observed in mice injected with a solution of n-HA/PAA compound extraction and physiological saline. ③Sensitization test: thirty mice were randomly divided into negative physiological saline group and positive dinitrofluorobenzene group. Edema and erythema were observed and scored. ④Hemolytic test: mice were divided into negative physiological saline group and positive phenol group. Hemolytic rate of n-HA/PAA compound was calculated after anticoagulant rabbit blood was added. ⑤Pyrogen test: 3 rabbits were injected with a solution of n-HA/PAA compound extract at the dose of 10 ml/kg. Difference in normal body temperature and temperature 3 h after injection of the solution was detected. ⑥Genetic toxicity test: 30 mice were randomly divided into three groups and injected with physiological saline, cyclophosphamide solution, and solution of n-HA/PAA compound extract, at the dose of 100 g/kg, respectively. Bone marrow polychromatic erythroblasts and polychromatic erythroblasts containing micronuclei were detected and the micronuclei rate was counted. Results *In vitro* cytotoxicity test showed that n-HA/PAA compound had no obvious effect on the morphology and growth of L929 fibroblasts. MTT assay revealed that the extract of n-HA/PAA compound could not inhibit the proliferation and

【基金项目】 "十一五"国家科技支撑计划(2007BAE13B00);重庆市科委重点攻关项目(CSTC2009AB5080)
【通信作者】 蒋电明,电话:(023)89011212,E-mail:jdmdianmingjiang@yahoo.com.cn

intoxication of L929 fibroblasts. The apoptosis of L929 fibroblasts was not obvious. Systemic acute toxic test showed that n-HA/PAA compound could not cause intoxication and death of mice. Sensitization test demonstrated no edema and erythema. The hemolytic rate of n-HA/PAA compound was 0.71% (<5%). Ppyrogen test showed no obvious temperature increase. Genetic toxicity test displayed no micronuclei and no genetic toxicity of n-HA/PA compound. **Conclusion** The biological safety of n-HA/PAA compound is rather good.

**[Key words]** nano-hydroxyapatite; poly-amino acid; L929; cytotoxicity; apoptosis; biological security

Supported by the "Eleventh Five-year Plan" of National Key Technology R&D Program (2007BAE13B00) and the Key Tackling Program of Chongqing Science and Technology Commission (CSTC2009AB5080). Corresponding author: Jiang Dianming, Tel: 86-23-89011212, E-mail: jdmdianmingjiang@yahoo.com.cn

纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite,n-HA)因具有良好的生物相容性和生物活性而广泛应用于骨组织的修复与替代材料[1,2]。但是因为纳米磷灰石陶瓷本身的力学性能较差,制约了其进一步应用。因此制备组成和结构相似的羟基磷灰石/聚合物仿生复合生物材料成为当今骨组织修复材料研究的热点[3-6]。聚氨基酸(poly-amino acid,PAA)是近年来逐渐受到广泛研究和应用的一种高分子材料。PAA与天然胶原蛋白分子结构类似,具有良好的生物相容性和生物降解性,其降解产物氨基酸对人体无毒害作用[7]。由此,有学者在总结现有PAA和聚酰胺材料以及其他现有医用高分子的基础上,设计了一种新型PAA高分子材料[8,9]。这类高分子由6-氨基己酸为主链,将人体所含有的α-氨基酸作为共聚单元,其中,6-氨基己酸赋予聚合物良好的力学性能和可加工性能,而其他共聚天然氨基酸单体可调节聚合物材料物理、化学性能,如亲、疏水性能、降解速率、降解产物及pH值等。

单一的高分子无生物活性,磷酸钙陶瓷材料则缺乏韧性,而将高分子和磷酸钙陶瓷复合后得到的复合材料则可克服单一材料的缺点而兼具各自的优点。因此,将PAA复合n-HA得到的复合材料(n-HA/PAA)可望成为一种具有广泛应用前景的生物材料。

本实验参照国际标准化组织(ISO)发布的医疗器械和生物材料生物学评价试验指南(ISO10993-1)和我国卫生部制定的《生物材料和医疗器械生物学评价标准》(1997),采用体外细胞毒性实验、溶血实验、致敏实验、急性毒性实验、热原实验以及遗传毒性实验来初步评价自制n-HA/PAA复合材料的生物安全性,为临床应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 n-HA与n-HA/PAA复合材料准备 n-HA/PAA复合材料由四川国纳科技有限公司通过原位聚合法制备并提供。复合材料中n-HA质量分数为30%,PAA包括6种氨基酸:6-氨基己酸、甘氨酸、L-丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-赖氨酸。所有成品材料均使用环氧乙烷消毒后备用。材料浸提液制备按0.2 g/ml生理盐水浸提,37 ℃下惰性容器中恒温浸提72 h。

1.1.2 细胞及试剂 采用ISO推荐的标准L929细胞系(小鼠成纤维细胞,北京协和医科大学细胞中心);RMPI1640培养基、10%胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(美国Gibco公司);四氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、Annexin V-FITC/PI双染试剂(美国Sigma公司)。

### 1.2 体外细胞毒性实验

采用ISO10993-5体外细胞毒性试验标准进行细胞形态学观察、四氮唑盐(MTT)比色测试以及流式细胞仪细胞凋亡检测。

1.2.1 细胞形态学观察 L929细胞采用含10%胎牛血清的RMPI1640完全培养基37 ℃,5% $CO_2$恒温培养箱培养,取传代72 h生长旺盛的细胞。实验分完全培养基阴性对照组、64 g/L苯酚溶液阳性对照组以及n-HA/PAA复合材料实验组。以完全培养基制成$1\times10^4$个/ml细胞悬液分注于96孔培养板,每孔100 μl,阴性对照、阳性对照以及实验组各24孔,放置37 ℃,5% $CO_2$恒温培养箱24 h,待细胞贴壁后,弃去各试管内上清液,阴性对照组用完全培养基交换,阳性对照组用64 g/L苯酚溶液交换,实验组用50%完全培养基加50% n-HA/PA复合材料浸提液进行交换培养。分别于第24、48、96小时倒置相差显微镜下观察细胞生长情况并照相。细胞形态观察评价参照《医疗器械生物学评价标准实施指南》相关标准[10]。

1.2.2 四氮唑盐(MTT)比色测试 重复上述L929细胞形态观察过程,分别于细胞培养第24、48、96小时3个时间点,弃去各组培养皿中的浸提液和完全培养基,加入20 μl/孔的MTT液(浓度为5 mg/ml溶液于PBS中),继续培养6 h,吸去原液,加入150 μl/孔二甲亚砜,振荡10 min,在免疫酶标仪上以500 nm波长测定吸光度,并计算细胞的相对增殖度(RGR)。

$$RGR=\frac{\text{实验组平均吸光度值}}{\text{阴性对照组平均光密度值}}\times100\%。$$

RGR分级参照《组织工程学实验技术》中相关标准[11]。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI双标记流式细胞仪检测细胞凋亡 重复上述L929细胞形态观察步骤,于第96小时,吸除完全培养基阴性对照组及复合材料实验组细胞上清液,胰酶消化细胞,加入1 ml PBS,轻轻振荡,使细胞悬浮,1 000 r/min离心5 min,弃上清;重复PBS清洗2次,将细胞重悬于200 μl Binding缓冲液,加入10 μl Annexin V-FITC和5 μl PI,轻轻混匀,避光室温反应15 min,加入300 μl Binding缓冲液,在1 h内用流式细胞仪检测,光源为488 nm氩离子激光器。观察两组细胞流式仪散点图,并计算各组正常、早期凋亡、晚期和坏死细胞含量。

### 1.3 全身急性毒性实验

采用ISO10993-11推荐系统毒性实验。标准健康普通级

KM小鼠20只,雌雄不限,体质量20~23 g,购自重庆医科大学实验动物中心。实验分n-HA/PAA复合材料浸提液实验组和生理盐水对照组,每组10只。实验组按50 ml/kg剂量标准,无菌条件下将浸提液注射入小鼠腹腔内;对照组注射等量的生理盐水。分别于注射后24、48、72 h分别观察各组小鼠一般状态、毒性表现和死亡动物数,并称量记录两组小鼠的体质量。

### 1.4 致敏实验

采用ISO10993-10推荐最大剂量耐受法。健康、初成年白化豚鼠30只,体质量200~250 g,雌雄不限,购自重庆医科大学实验动物中心。实验前1 d,剔除豚鼠背部4 cm×6 cm区域毛发。实验分3组,每组10只。实验时在剔除区作6点对称皮内注射,实验组为n-HA/PAA复合材料浸提液,阴性对照为无菌生理盐水,阳性对照为二硝基氯苯丙酮溶液。皮内注射后1周,在第一阶段实验背部再次去毛,十二烷基硫酸钠石蜡液预处理局部皮肤,24 h后将3 cm×5 cm滤纸浸入各组液体中至饱和,将其敷贴于对应组豚鼠背部注射部位,封闭固定48 h。诱导完成后14 d,在豚鼠腹部剃毛,将2 cm×2 cm滤纸浸入各组液体中至饱和,将其敷贴于豚鼠腹部剃毛区,封闭固定24 h。将敷贴取下后,于24、48、72 h观察各组动物敷贴部位皮肤的红斑和水肿程度,并记分[12]。

### 1.5 溶血实验

采用ISO10993-4推荐溶血实验法。新西兰大白兔1只,体质量2.5 kg,购自重庆医科大学实验动物中心。以材料浸提液为实验组、灭菌蒸馏水为阳性对照组、生理盐水为阴性对照组。将新采集兔血20 ml加2%草酸钾溶液1 ml,制成新鲜抗凝兔血。取新鲜抗凝兔血8 ml,加入生理盐水10 ml稀释。各实验组分别取20 ml材料浸提液、灭菌蒸馏水、生理盐水以每支10 ml分装于6支15 ml离心管,37 ℃保温30 min。再加入兔血0.2 ml,轻摇,37 ℃保温60 min。每组设6个平行样本。1 000 r/min离心5 min,取上清液移入比色皿中,在721型分光光度计上测定545 nm波长处的吸光度。

溶血率(%)=(Dt-Dnc)/(Dpc-Dnc)×100%

Dt试验样品的吸光度;Dnc阴性对照的吸光度;Dpc阳性对照的吸光度。溶血率小于5%符合生物组织工程支架材料溶血实验要求,大于5%则显示材料有溶血作用。

### 1.6 热源实验

采用ISO10993-10推荐热源实验法。新西兰大白兔3只,体质量2.0~2.5 kg,雌雄不限,购自重庆医科大学实验动物中心。实验前每隔30 min测量实验动物肛门内测体温3次,取其平均值作为正常体温。测定正常体温后15 min以内,自耳缘静脉按10 ml/kg比例缓慢注入预热至37 ℃的复合材料浸提液,注射后每隔1 h测体温1次,共测3次,3次体温中最高的一次减去正常体温,即为该兔体温升高度数。

### 1.7 遗传毒性实验

采用ISO10993-3推荐遗传毒性实验法(骨髓微核试验)。健康普通级KM小鼠30只,雌雄不限,体质量约20~23g,购自重庆医科大学实验动物中心。实验分n-HA/PAA复合材料浸提液实验组、生理盐水阴性对照组及环磷酰胺阳性对照组,每组10只。各组分别按12.5 ml/kg小鼠腹腔注射材料浸提液、生理盐水及环磷酰胺溶液。间隔24 h后各组重复同等剂量注射1次。末次注射后6 h用颈椎脱臼法处死小鼠,取胸骨骨髓,15% Giemsa染液染色30 min,冲洗晾干后每只动物显微镜下观察1 000个嗜多染红细胞(PCE),记录出现微核的PCE数;计数200个PCE,同时计数正红细胞数,并计算PCE占正红细胞的比例[13]。

### 1.8 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件进行统计学处理,结果以$\bar{x}\pm s$表示,计量资料采用$t$检验。

## 2 结果

### 2.1 体外细胞毒性

2.1.1 细胞形态学观察 24 h时倒置相差显微镜下观察苯酚阳性对照组几乎无活细胞,多为悬浮、细胞核固缩的死亡细胞;阴性对照组及实验组见L929细胞贴壁生长良好,多已充分伸展,呈梭形或不规则三角形,2组细胞数量、形态无明显差异,细胞间隙稍大(图1);48 h时实验组与阴性对照组细胞数量明显增加,形态正常,细胞间隙减少(图2);96 h时实验组与阴性对照组细胞均生长旺盛,呈密集排列,两组细胞间隙显著减少(图3)。

2.1.2 MTT检测 各组细胞光密度值、相对增殖率及细胞毒性分级结果见表1。

**表1 MTT法检测各组细胞光密度值[$D$(500)]、相对增殖率(RGR)及细胞毒性分级($n$=5)**

| 组别 | 培养时间(h) | $D$(500)($\bar{x}\pm s$) | RGR(%) | 细胞毒性分级 |
|---|---|---|---|---|
| 实验组 | 24 | 1.65±0.06[a] | 98.8 | 1 |
| | 48 | 1.74±0.03[a] | 98.86 | 1 |
| | 96 | 2.08±0.12[a] | 89.66 | 1 |
| 阴性对照组 | 24 | 1.67±0.05 | 100 | 0 |
| | 48 | 1.76±0.07 | 100 | 0 |
| | 96 | 2.32±0.27 | 100 | 0 |
| 阳性对照组 | 24 | 0.20±0.02[b] | 11.98 | 4 |
| | 48 | 0.15±0.04[b] | 8.52 | 4 |
| | 96 | 0.04±0.04[b] | 1.72 | 4 |

a:$P$>0.05,与阴性对照组比较;b:$P$<0.05,与阴性对照组和实验组比较

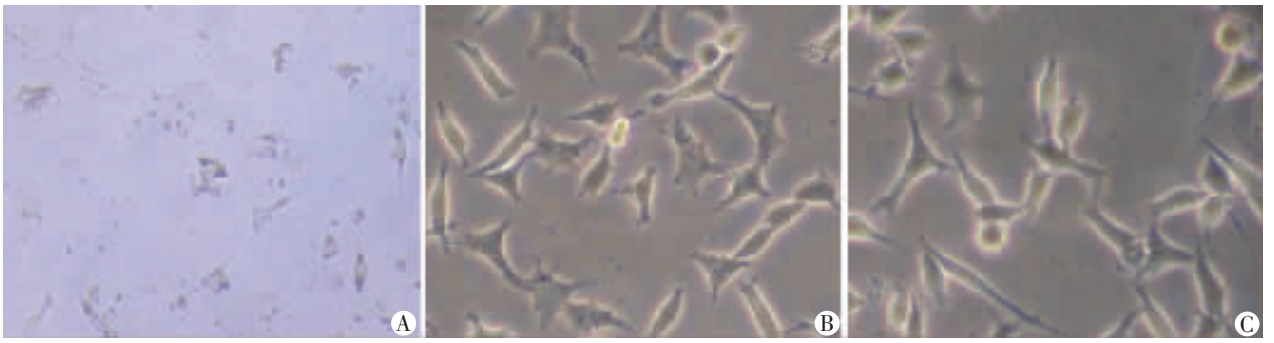
由表1可知,苯酚阳性对照组与实验组及阴性对照组D值各时间点分别比较差异均有显著性($P$<0.05),苯酚阳性对照组细胞毒性为4级;实验组与阴性对照组浸提液各时间点D值比较无显著性差异($P$>0.05),2组细胞毒性分别为1级和0级,根据评价标准为n-HA/PAA复合材料MTT实验合格。

2.1.3 Annexin V-FITC/PI双标记流式细胞仪检测结果 各组流式细胞仪散点图结果见图4。图中可见,实验组与阴性对照组均为大量活细胞集中于左下象限,实验组和阴性对照组各自活细胞分别为(92.76±1.81)%和(93.08±2.71)%。实验组与阴性对照组活细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡和坏死细胞数量比较差异无显著性($P$>0.05,表2)。

**表2 各组细胞悬浮液流式细胞仪检查结果(%,$n$=5)**

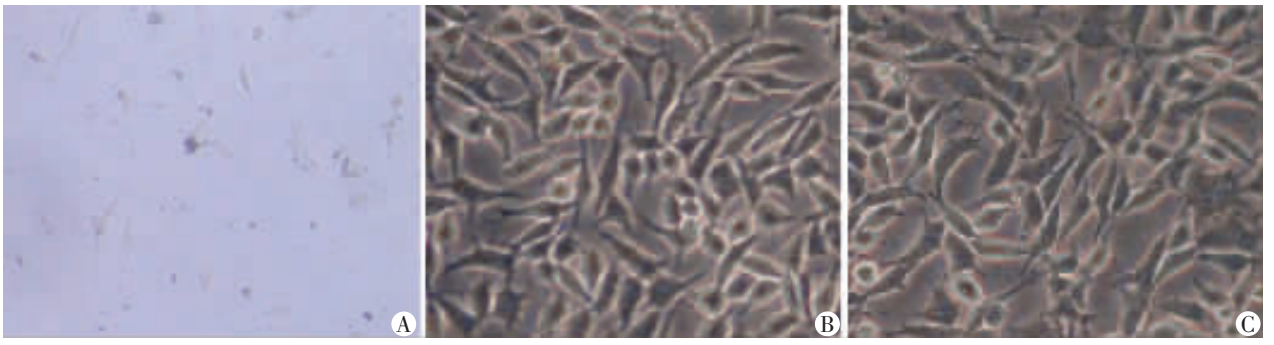
| 组别 | 正常细胞 | 早期凋亡细胞 | 晚期凋亡+坏死细胞 |
|---|---|---|---|
| 实验组 | 92.76±1.81[a] | 6.65±2.08[a] | 4.16±1.47[a] |
| 阴性对照组 | 93.08±2.71 | 6.75±1.82 | 4.40±1.57 |

a:$P$>0.05,与阴性对照组比较



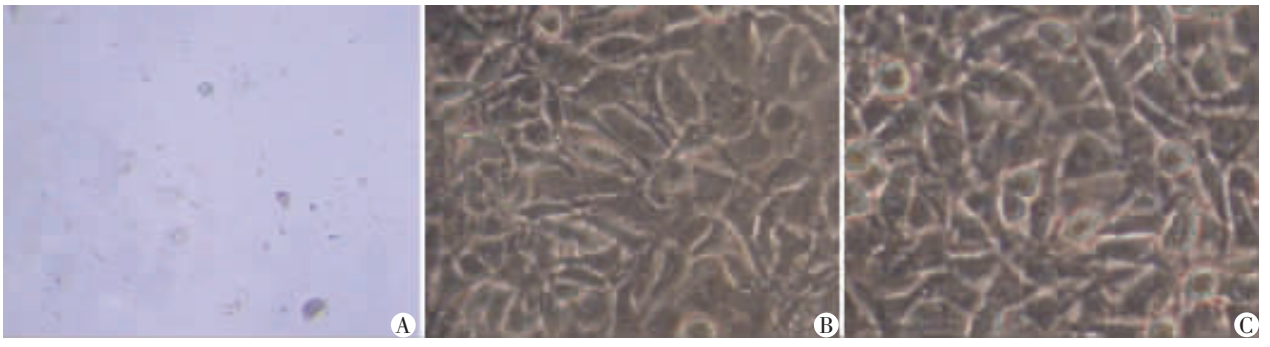

A:苯酚阳性对照组;B:完全培养基阴性对照组;C:材料浸提液实验组

**图 1　倒置相差显微镜观察各组与 L929 共同培养 24 h 时细胞形态变化　(×100)**



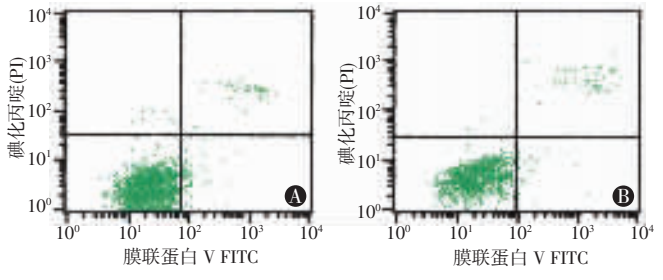

A:苯酚阳性对照组;B:完全培养基阴性对照组;C:材料浸提液实验组

**图 2　倒置相差显微镜观察各组与 L929 共同培养 48 h 时细胞形态变化　(×100)**




A:苯酚阳性对照组;B:完全培养基阴性对照组;C:材料浸提液实验组

**图 3　倒置相差显微镜观察各组与 L929 共同培养 96 h 时细胞形态变化　(×100)**




A:阴性对照组;B:材料浸提液实验组

**图 4　流式细胞仪检测 2 组与 L929 共同培养 96 h 后的结果**

## 2.2　全身急性毒性实验结果

观察期内 2 组小鼠一般情况良好,未见中毒症状及死亡。注射后 24、48、72 h 测量体质量增加值变化见表 3,实验组比较对照组比较差异无显著性($P>0.05$)。

**表 3　全身急性毒性实验小鼠体质量增加值变化(g,$n=10$)**

| 组别 | 24 h | 48 h | 72 h |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 0.82±0.21 | 1.85±0.41 | 2.87±0.42 |
| 实验组 | 0.80±0.16[a] | 1.92±0.31[a] | 2.86±0.34[a] |

a:$P>0.05$,与对照组比较

## 2.3　致敏试验结果

弃去敷贴物后,分别于 24、48、72 h 观察发现阳性对照组 6 只动物 24 h 后在激发部位出现红斑,4 只出现轻度水肿;48 h 出现水肿有所加重并有 1 只出现轻度焦痂;72 h 红斑进一步加重,呈重度红斑状态。而阴性对照组和实验组动物各时间点皮肤均无红斑和水肿反应,记分为 0。

## 2.4　溶血实验结果

本实验中实验组吸光度为 0.016,阴性对照组吸光度为

0.011，阳性对照组为0.701。材料溶血率为0.71%，远小于5%，符合溶血实验标准要求。

2.5 热源实验结果

3只实验兔的体温升高分别为0.17、0.2、0.15 ℃，均在0.5 ℃以下，且3只兔体温升高总数在1.5 ℃以下，n-HA/PAA复合材料符合热源实验要求。

2.6 遗传毒性实验结果

经骨髓涂片微核计数，实验组与阴性对照组比较，微核率及嗜多染红细胞与正红细胞比例未见明显统计学差异（$P>0.05$，表4），n-HA/PAA复合材料骨髓微核实验为阴性，无遗传毒性。

**表4 小鼠骨髓微核试验微核率结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）**

| 组别 | 嗜多染红细胞数 | 含微核嗜多染红细胞数 | 微核率（‰） | 嗜多染红细胞数/正红细胞 |
|---|---|---|---|---|
| 阳性对照组 | 1 000×10 | 158 | 15.8 | $0.69\pm0.08^{a}$ |
| 阴性对照组 | 1 000×10 | 16 | 1.6 | $1.26\pm0.32^{b}$ |
| 实验组 | 1 000×10 | 18 | 1.8 | $1.22\pm0.28$ |

a：$P<0.05$，与阴性对照组和实验组比较；$P>0.05$：阴性对照组与实验组比较

## 3 讨论

体外细胞毒性实验是新型医用材料生物安全性测试中一个很重要的组成部分，它可以了解细胞和受试材料接触后发生的生长抑制、功能改变、溶解、死亡或其他毒性反应，预测受试材料最终体内应用时的组织细胞反应，在短期内较经济、简便的检测出受试材料的细胞毒性。

目前ISO对材料浸提的时间规定为24～72 h，通常材料在浸提24 h后即可以浸提出其所有的有毒或无毒溶出物，至多不超过72 h，所以本实验中选择浸提时间为72 h。L929成纤维细胞作为非植入部位的细胞，可以充分反映出材料可能存在的毒性物质的反应，它具有传代稳定、繁殖迅速、易保存、体外培养条件低、对生长环境因素比较敏感等优点，是目前检测材料细胞毒性实验中应用最早及使用最广泛的细胞，也是ISO 10993-5推荐为细胞毒性实验标准中的标准细胞。因此，本实验选用L929成纤维细胞对新型n-HA/PAA骨组织修复材料的体外细胞毒性进行评价。

细胞形态学观察可以为材料的细胞相容性提供最直观的证据，当材料在体外与细胞共培养后，一旦材料有毒物质释放，细胞的形态和增殖状态就会立即发生变化[14]。本实验通过倒置相差显微镜观察发现n-HA/PA复合材料浸提液与L929细胞共同培养后96 h内与完全培养基组L929细胞生长类似，细胞贴壁生长良好，并且随着材料与细胞共同培养时间的增加，L929细胞生长明显，形态正常，初步显示出该材料具有良好的细胞相容性。MTT比色法由于操作简便、可重复性好而成为检测细胞增殖实验的首选方法，是目前国内外公认且广泛用于量化细胞毒性的评价方法。本实验MTT结果发现实验组与阴性对照组在各时间点吸光度值均无明显差异（$P>0.05$），且随着培养时间增加，2组细胞均增殖明显，RGR分别为1或0级，细胞毒性评定结果均为合格。在材料与细胞的共同培养过程中，细胞凋亡的发生通常与材料的性质或构成密切相关。对细胞凋亡的分析有助于了解组织与材料的相互作用，从而评估材料的生物学性能。Annexin V-FITC/PI双标记是检测细胞膜成分变化的一种流式细胞仪检测法，是目前评价生物材料细胞毒性实验中较为理想的检测细胞凋亡法[15]。由本实验散点图观察发现，实验组和阴性对照组显示大量的细胞集中于左下象限，说明2组细胞凋亡发生少，而正常细胞含量高，提示细胞的生长状态良好。分别比较两组之间活细胞、早期凋亡、晚期凋亡及坏死细胞的含量，亦未见明显统计学差异（$P>0.05$）。因此可见同阴性对照组细胞完全培养基下生长环境结果类似，n-HA/PA复合材料不会促进细胞的凋亡。

n-HA/PAA复合材料的最终目的是作为体内植入物应用于临床。因此，除上述体外细胞毒性评价以外，本研究又选用全身急性毒性实验、致敏实验、溶血实验以及热源实验对该复合材料的生物安全性检测进行补充评价。在本实验中，n-HA/PAA复合材料浸提液注射入实验动物体内72 h内无任何中毒和死亡现象，体温无明显升高，致敏试验未出现皮肤红肿和红斑，且对血液溶血率仅为0.71%，远低于5%的标准要求。另外，成功的骨组织修复植入材料在体内存留至少数月，长则可达数年甚至数十年，所以分析检测材料潜在的遗传毒性、致癌性和生殖毒性等危害也是十分必要的。然而，对这一系列实验开展完全检测大多耗时耗资巨大，普及开展这些检测项目并不符合我国国情。同时，与生物安全性评价标准的其他项目相比，遗传毒性、致癌性和生殖毒性的评价方法并不完善，对组织工程支架材料进行检验的有效性也未得到很好的确认。因此，我们选用ISO标准中推荐的短期遗传毒性实验做初步筛选，如短期遗传毒性实验阳性者则考虑进行致癌实验，如为阴性者可暂不进行之。本实验短期的骨髓微核试验证实了n-HA/PAA复合材料同生理盐水结果一致，不会引起微核增加，无潜在的遗传毒性，故未再增加致癌实验和生殖毒性实验检测。

综上，本实验依据ISO 10993标准要求，结合体内外常用的生物安全性检测指标对自制材料进行了初步的综合评价，结果证实该复合材料体内外实验均在安

全范围内，体内实验符合体外实验结果。表明该新型n-HA/PAA复合材料具有良好的生物安全性能，从而为材料的后期功能研究及临床应用提供了科学依据。

## 参考文献：

[1] Gentile P, Chiono V, Boccafoschi F, *et al*. Composite films of gelatin and hydroxyapatite/bioactive glass for tissue-engineering applications [J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2010, 21(8/9): 1207-1226.

[2] Roohani-Esfahani S I, Nouri-Khorasani S, Lu Z, *et al*. The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite-PCL composites [J]. Biomaterials, 2010, 31(21): 5498-5509.

[3] Kim S S, Sun-Park M, Jeon O, *et al*. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2006, 27(8): 1399-1409.

[4] 赵建华，廖建宏，刘鹏，等. 消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质人工骨修复兔桡骨大段骨缺损的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(21)：1943-1946.

[5] 梁勇，蒋电明. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺66椎间融合器对山羊颈椎的融合效果研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(24)：2333-2335.

[6] Ye X, Chen M, Yang M, *et al*. In vitro corrosion resistance and cytocompatibility of nano-hydroxyapatite reinforced Mg-Zn-Zr composites [J]. J Mater Sci Mater Med, 2010, 21(4): 1321-1328.

[7] Matsumura Y. Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(8): 899-914.

[8] 严永刚，李鸿，吕国玉，等. 聚合物形式的组织修复材料及制备方法：中国，CN101342383[P]. 2009-01-14.

[9] 严永刚，李鸿，吕国玉，等. 多组分氨基酸聚合物形式的组织修复材料及制备方法：中国，CN101385869[P]. 2009-03-18.

[10] 郝和平. 医疗器械生物学评价标准实施指南[M]. 北京：中国标准出社，2002：100-110.

[11] 裴国献，魏宽海，金丹. 组织工程学实验技术[M]. 北京：人民军医出版社，2006：177-178.

[12] 裴国献，魏宽海，金丹. 组织工程学实验技术[M]. 北京：人民军医出版社，2006：180.

[13] 孙立魁，施燕平，黄经春，等. 用微核试验评价生物羊膜遗传毒性的研究[J]. 中国医疗器械信息，2008，14(11)：31-33.

[14] Rizzi S C, Heath D J, Coombes A G, *et al*. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts [J]. J Biomed Mater Res, 2001, 55(4): 475-486.

[15] 雷晓，余佩武. 双标记流式细胞术定量分析5-FU诱导胃癌细胞早期凋亡[J]. 第三军医大学学报，2002，24(7)：855-857.

（收稿：2010-06-21 修回：2010-07-14）

（编辑 王 红）

（上接2285页）

### 1.3 统计学处理

应用SPSS 11.5软件进行统计，计数资料采用$\chi^2$检验。

## 2 结果

治疗组56耳：痊愈9耳(16.1%)；显效17耳(30.4%)；有效8耳(14.3%)；总有效34耳(60.8%)；无效22耳(39.2%)。对照组96耳：痊愈2耳(2.1%)；显效15耳(15.6%)；有效22耳(22.9%)；总有效39耳(40.6%)；无效57耳(59.4%)。2组总有效率比较差异有统计学意义($\chi^2=5.72$，$P<0.05$)。

## 3 讨论

耳鸣是一种听觉紊乱现象，由听觉传导通路的任一环节异常放电引起[2]。主观性耳鸣主要与内耳及大脑皮层有关。研究表明，耳蜗的损伤可以引起耳鸣。耳鸣多采用综合治疗：包括病因治疗、药物治疗、习服疗法、掩蔽疗法、心理治疗、电刺激治疗等。而药物治疗主要以改善内耳的微循环、营养耳神经为主。

地塞米松具有抑制炎症反应和神经保护作用，全身大剂量用药存在禁忌证并产生很多副作用，我们经外耳道中耳鼓膜穿刺途径直接用药到内耳。动物实验[3]证实：地塞米松经鼓室给药能有效的经圆窗膜渗透到外淋巴液，外淋巴液中的药物浓度明显高于全身给药血浆中的浓度，且不对豚鼠耳蜗结构和功能产生影响[4]。我们对治疗组56耳在常规口服药物治疗的基础上加用中耳灌注地塞米松治疗。中耳灌注地塞米松后，地塞米松直接通过圆窗膜作用于内耳，在内耳体液中达到较高浓度，并与内耳的激素受体结合，发挥其抑制炎症反应和神经保护作用，调节内耳的电解质平衡和淋巴液稳定，从而达到改善耳鸣的作用。56耳总有效率为60.8%，明显高于对照组总有效率40.6%，明显提高了治疗效果。

采用经鼓膜穿刺将地塞米松注入中耳，无需特殊设备，门诊即可完成，操作简单。中耳注入地塞米松，不经过全身代谢，从而避免全身副作用，用药安全。与心理治疗，各种声信息等治疗比较，费用低廉。经鼓膜穿刺中耳注药56耳除1例发生一过性眩晕外，无其他不良反应。

综上所述，中耳灌注地塞米松能有效提高主观性耳鸣的治疗效果，且具有简单、安全、费用低等优点。

## 参考文献：

[1] 王洪田，李明，刘蓬，等. 耳鸣的诊断和治疗指南(建议案)[J]. 中华耳科学杂志，2009，7(3)：185.

[2] 薛飞，李泽卿，王秋萍. 耳鸣诊断与治疗的研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2009，23(7)：630-631.

[3] 吴皓，杨军，侯东明，等. 地塞米松圆窗和全身给药后在豚鼠外淋巴液及血浆中的代谢动力学特征[J]. 听力及言语疾病杂志，2005，13(4)：260-263.

[4] 刘建宏，董明敏，迟放鲁. 地塞米松经鼓室给药对豚鼠耳蜗结构和功能的影响[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂，2005，40(6)：440-443.

（收稿：2010-07-14 修回：2010-07-31）

（编辑 吴培红）