文章编号:1000-5404(2011)02-0119-05

论著

灭菌对聚氨基酸/硫酸钙复合材料理化性能的影响

赵增辉[1],蒋电明[1],权正学[1],李 军[1],李 鸿[2],严永刚[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院骨科[1];610064 成都,四川大学物理科学与技术学院物理系[2])

[摘要] **目的** 探讨高温高压、γ射线、低温等离子、环氧乙烷及紫外线等不同灭菌方式对新型复合生物材料——聚氨基酸/硫酸钙[poly(amino acids)/calcium sulfate, PAA/CS]理化性能的影响。**方法** 采用熔融缩聚法制备PAA/CS材料,按照不同灭菌方式灭菌后进行浸提液L929细胞毒性、材料结构X射线衍射分析、材料力学性能测试,并与灭菌前作对照。**结果** 环氧乙烷、紫外线灭菌及阴性对照组细胞生长良好,各时间点细胞相对增殖率在90%以上,细胞毒性0~1级。其余各组细胞24 h内基本死亡,细胞相对增殖率均在50%以下,细胞毒性3~4级。X射线衍射分析显示相对于灭菌前,各灭菌组材料结晶峰数目及形态无明显变化。低温等离子及高温高压灭菌组材料抗压强度分别为(250±4)、(187±17) MPa,较灭菌前明显下降($P<0.05$),其余各组无明显变化($P>0.05$)。**结论** 环氧乙烷及紫外线灭菌对PAA/CS复合材料理化性能无明显影响,可作为该材料的灭菌方法。

[关键词] 灭菌方式;聚氨基酸/硫酸钙复合材料;理化性能;细胞毒性
[中图法分类号] R187;R318.08 **[文献标志码]** A

Influence of sterilization on physiochemical features of poly(amino acids)/calcium sulfate composite

Zhao Zenghui[1], Jiang Dianming[1], Quan Zhengxue[1], Li Jun[1], Li Hong[2], Yan Yonggang[2] ([1]Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]School of Physical Science and Technology, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610064, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of different sterilization methods, autoclave, gamma-irradiation, hypothermal plasma, ethylene oxide and ultroviolet, on the physiochemical features of a new composite biomaterial-poly(amino acids)/calcium sulfate (PAA/CS). **Methods** PAA/CS composite was synthesized by melt polycondensation process. After the composite was sterilized by the aforementioned methods, L929 cells toxicity, structure analysis by X-ray diffraction and mechanical capacity of the composite were studied, and compared with before sterilization. **Results** The L929 cells in ethylene oxide, ultroviolet and negative control group were in well growth, cell relative growth rate (RGR) was beyond 90%, and cytotoxicity grading was between 0 and 1. Cells in other groups almost died in 24 h. The RGRs were below 50%, and cytotoxicity grading was between 3 and 4. The X-ray diffraction test demonstrated the number and morphology of crystallization peak of the composite had no visible change after sterilization. The compressive strength of the composite in the ethylene oxide and ultroviolet group was apparently decreased than that of the composite before sterilization ($P<0.05$), but the decrease was not seen in other group ($P>0.05$). **Conclusion** Ethylene oxide and ultroviolet have no apparent influence on the physiochemical features of the PAA/CS composite, therefore can be used to sterilize the composite.

[Key words] sterilization method; Poly(amino acids)/calcium sulfate composite; physiochemical features; cytotoxicity

Supported by the "Eleventh Five-year Plan" of National Key Technology R&D Program (2007BAE13B00) and the Key Tackling Program of Chongqing Committee of Science and Technology (CSTC2009AB5080). Corresponding author: Jiang Dianming, E-mail: jdm571026@vip.163.com

聚氨基酸/硫酸钙复合材料[poly(amino acids)/calcium sulfate, PAA/CS]是新近开发的一种骨修复替代材料,其中聚氨基酸由6-氨基己酸和5种α-氨基酸聚合而成。该复合材料具有良好的降解性能,降解速度可调,降解产物对环境pH无明显影响,是一类具有

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2007BAE13B00);重庆市科委重点攻关课题(CSTC2009AB5080)
[通信作者] 蒋电明,E-mail:jdm571026@vip.163.com

良好应用前景的生物活性复合材料[1-2]。任何植入材料在临床使用之前必须灭菌,对于高分子生物医用材料而言,材料的灭菌可能对材料性能产生重要影响,如材料力学性能、降解性能和组成与结构等[3]。生物材料常用的灭菌方式有环氧乙烷、γ射线、紫外线、高温高压等,不同灭菌方式对具有肽键等结构的氨基酸聚合物理化性能有否影响不得而知。本研究旨在探讨5种灭菌方式对该复合材料理化性能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

6-氨基己酸、甘氨酸、L-丙氨酸(石家庄凯瑞杰氨基酸公司),L-脯氨酸、L-苯丙氨酸、L-赖氨酸(上海实验试剂有限公司),硫酸钙(Sigma公司,美国),F-1640培养基(HyClone公司,美国),FBS(四季青,中国),0.25% 胰酶-EDTA(HyClone,美国),CCK-8(碧云天,中国),倒置相差显微镜(Olympus公司,日本),X射线衍射仪(Philips公司,荷兰),REGER-3050力学性能实验机(瑞格尔,深圳)。

1.2 PAA/CS的制备

PAA/CS按文献[2]描述的熔融缩聚法进行合成,首先将6种原料氨基酸按一定比例加入三颈瓶中,加入50 ml水,搅拌,200 ℃脱水,之后升温至210 ℃。待单体熔融后升温至220 ℃开始聚合反应,此时加入无机相硫酸钙(占复合物质量的30%),保持220 ℃反应2 h。然后升温至230~240 ℃,继续反应2 h。全程氮气保护,冷却至室温后即得到复合材料。分别制成为10 mm×10 mm×15 mm大小的圆柱状和颗粒状(5~10目),环氧乙烷灭菌后备用。

1.3 材料灭菌方法

1.3.1 γ射线灭菌 吸收剂量25 kGy,辐照场温度15~25 ℃。委托四川省原子能研究所辐射工程中心完成。

1.3.2 高温高压灭菌 将样品置入带泡沫塞的玻璃管中,在高温高压蒸汽灭菌锅内121 ℃灭菌30 min。

1.3.3 低温等离子灭菌 将样品用包布包好,置入等离子消毒锅内,时间60 min。

1.3.4 环氧乙烷灭菌 采用浓度为800 mg/L的环氧乙烷,温度为55 ℃,相对湿度控制在50%~55%,灭菌8 h。委托成都万安消毒服务中心完成。

1.3.5 紫外线灭菌 在相对湿度为45%~55%的条件下,采用辐射值≥100 μW/cm^{2}的30 W紫外线灯,在超净工作台内照射3.5 h。

1.4 材料浸提液制备

将按照不同灭菌方式灭菌后的颗粒状材料置入无菌惰性容器中,按照2 g/10 ml加入无菌生理盐水,置于37 ℃恒温培养箱中浸提72 h。浸提完毕后,将浸提液采用微孔过滤器过滤,标记好后4 ℃保存备用。

1.5 细胞培养

采用ISO规定的小鼠成纤维结缔组织细胞(L929细胞,购自重庆医科大学分子生物学实验室)。将细胞复苏后接种于培养瓶中,加入10% FBS的1640培养基,置入5% CO_2,37 ℃培养箱中培养。倒置显微镜观察细胞形态及生长情况,每2天换液1次,待细胞生长融合达90%以上,胰酶消化,按1∶3传代培养。

1.6 实验分组和操作步骤

1.6.1 实验分组 将96孔细胞培养板分为3组,A组:实验组,加入浸提液,又分为5组:高温高压灭菌组(A1组)、γ射线灭菌组(A2组)、低温等离子灭菌组(A3组)、环氧乙烷灭菌组(A4组)、紫外线灭菌组(A5组);B组:阴性对照组,加入生理盐水;C组:阳性对照组,加入64 g/L苯酚溶液。每组6个复孔。

1.6.2 操作步骤 用细胞培养基配制1×10^4/ml L929细胞分别接种于96孔培养板内,每孔200 μl,置于5% CO_2,37 ℃培养箱中进行培养,24 h细胞贴壁生长后弃去原培养基,A组加入材料浸提液和培养基各100 μl;B组加入生理盐水和培养基各100 μl;C组加入苯酚溶液和培养基各100 μl,继续置于5% CO_2,37 ℃培养箱中进行培养。分别在培养后24、48 h及96 h进行观察和指标检测。

1.6.3 细胞形态学观察 在相应时间点取出培养板,在倒置相差显微镜下观察细胞形态并照相。

1.6.4 细胞活力鉴定 取1滴细胞悬液与1滴胎盘蓝溶液混合后,滴入细胞计数板,在显微镜下计数,阳性蓝染细胞为死亡细胞,拒染透亮的细胞为活细胞,重复3次计数,计算活细胞比例,绘制细胞生长曲线。

1.6.5 CCK-8测定细胞增殖活性 在相应时间点取出1块培养板,每孔加入20 μl CCK-8溶液,继续培养3~4 h后在酶标仪上以490 nm波长测定光密度值[D(490)]。相对增殖度(RGR)=实验组D(490)/阴性对照组D(490)×100%,根据细胞毒性评定标准[4]评价材料浸提液细胞毒性大小。

1.7 材料结构测定

材料灭菌前和灭菌后分别进行X射线衍射分析(XRD),通过结晶峰的变化判断不同灭菌方式对材料结构的影响。

1.8 材料力学性能测试

采用REGER-3050力学性能实验机,对灭菌前和灭菌后的圆柱状材料进行垂直方向加载,加载速度5 mm/min,在载荷强度达到最大值时停止加载,记录最大载荷强度,即为材料的压缩强度。

1.9 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,数据以$\bar{x} \pm s$表示,组间比较行t检验。

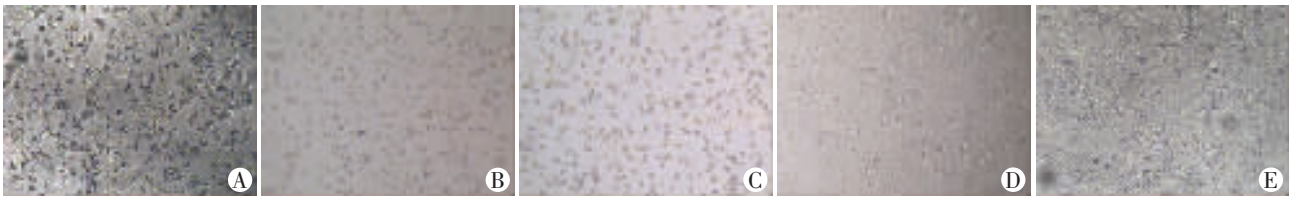
2 结果

2.1 细胞形态观察

光镜观察A1、C组培养24 h时大部分细胞核空泡化、死亡,仅有少许细胞形态尚好(图1A),48 h后细胞基本全部死亡,偶可见存活细胞;A2、A3组培养24 h时,所有细胞圆缩、死亡(图1B、C);A4、A5、B组培养24 h时,细胞形态正常呈梭形和三角形,细胞生长良好(图1D、E),96 h观察细胞已完全长满板底,融合成片,第5天时细胞开始死亡。

2.2 活细胞计数

材料浸提液与细胞共培养后,A1、A2、A3及C组活细胞数目在24 h内明显下降,48 h时基本无细胞存活。A4、B组活细胞数目随时间逐渐增加,在96 h后达到高峰(图2)。



A：A1 组；B：A2 组；C：A3 组；D：A4 组；E：A5 组

图 1　各灭菌组与 L929 共培养 24 h 后细胞形态学观察（LM ×100）

表 1　各组在不同时间点的光密度值（$n=6, \bar{x} \pm s$）

组别	D(490)			RGR(%)			细胞毒性分级		
	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h
A1	0.55 ± 0.04[a]	0.68 ± 0.08[a]	0.62 ± 0.05[a]	33.25[a]	36.75[a]	22.04[a]	3	3	4
A2	0.38 ± 0.06[a]	0.42 ± 0.05[a]	0.34 ± 0.05[a]	23.18[a]	22.55[a]	12.06[a]	4	4	4
A3	0.39 ± 0.01[a]	0.38 ± 0.02[a]	0.33 ± 0.03[a]	23.26[a]	20.48[a]	11.49[a]	4	4	4
A4	1.59 ± 0.06	1.68 ± 0.06	2.56 ± 0.27	96.18	91.15	90.71	1	1	1
A5	1.55 ± 0.05	1.60 ± 0.07	2.49 ± 0.08	93.35	87.06	88.40	1	1	1
B	1.66 ± 0.05	1.84 ± 0.02	2.82 ± 0.06	100.00	100.00	100.00	0	0	0
C	0.40 ± 0.05	0.39 ± 0.01	0.19 ± 0.01	23.87	21.10	6.81	4	4	4

a：$P<0.01$，与 B 组比较

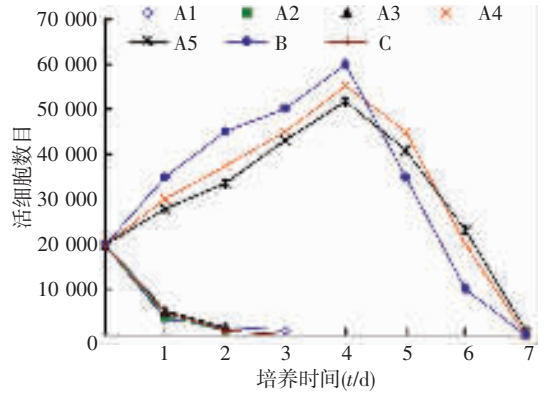


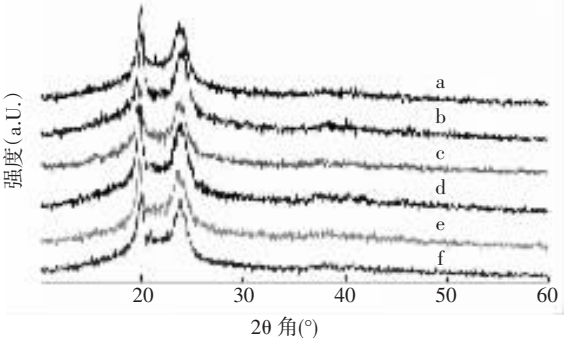
图 2　各组细胞生长曲线

2.3　细胞增殖活性检测

材料浸提液与细胞共培养后各时间点检测结果显示，A4、A5 组 D(490) 值与 B 组比较无统计学差异（$P>0.05$），RGR 达 85% 以上，细胞毒性为 1 级。其余各组 D(490) 值与 B 组相比具有统计学差异（$P<0.01$），细胞毒性为 3～4 级，与 C 组相当（表 1）。

2.4　XRD 分析

图 3 示，相对于灭菌前，各灭菌组材料没有新的结晶峰出现，各结晶峰形态无明显变化。



a：材料灭菌前；b：低温等离子灭菌后；c：紫外线灭菌后；d：高温高压灭菌后；e：环氧乙烷灭菌后；f：γ 射线灭菌后

图 3　聚氨基酸/硫酸钙灭菌前后 XRD 图谱

2.5　力学性能测试

PAA/CS 材料抗压强度为（290 ± 28）MPa，低温等离子及高温高压灭菌组材料抗压强度分别为（250 ± 4）、（187 ± 17）MPa，较灭菌前明显下降（$P<0.05$），表明此 2 种灭菌方法对 PAA/CS 抗压强度有明显影响；紫外线、环氧乙烷及 γ 射线灭菌组材料抗压强度分别（308 ± 11）、（297 ± 32）MPa 和（312 ± 17）MPa，与灭菌前相比，无统计学差异（$P>0.05$），表明此 3 种灭菌方法对 PAA/CS 抗压强度无明显影响。

3　讨论

骨科手术操作中很多情况下，譬如严重创伤、骨肿瘤切除后遗留的骨缺损以及脊柱融合术等，都需要局部植骨以促进骨折愈合或脊柱节段融合[5]。作为“金标准”的自体骨移植依然有无可避免的缺点，如二次手术、供区并发症等[6]。异体骨能达到自体骨相当的修复效果，而且具有来源广泛，避免二次手术取骨的优点。但是其潜在的疾病传播危害、免疫原性及伦理学等问题，依然限制了其临床应用[7]。人工骨可以避免自体骨和异体骨移植的相应缺点，因此众多学者把目光转向人工合成骨修复材料方面的研究。人工骨材料在临床应用已有几十年的历史，在骨缺损修复中显示出了巨大优势[8]。

目前人工骨材料研究的一个重要方向就是模拟自然骨组织的胶原/磷酸钙盐双相复合结构，构建以有机聚合物/无机钙盐为主体结构的仿生复合生物骨材料[9-10]。PAA/CS 复合材料是新近开发出的一种新型仿生复合生物骨材料，由多元氨基酸聚合物和硫酸钙通过原位聚合反应形成。其中 PAA 是一种可降解的氨基酸聚合物，由 6-氨基己酸和甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸聚合而成[11]。6-氨基己酸分子具有较强的刚性和极性，构成高分子骨架，赋予 PAA

良好的力学性能,而其他天然氨基酸则可调节聚合物的降解性能以及生物活性[1]。无机成分硫酸钙作为骨缺损填充修复材料已经达百年之久,具有良好的骨传导性和生物相容性,在体内能够被降解吸收,降解产物无毒[12-13]。该复合材料通过调节多元氨基酸共聚物的降解速率控制整个复合材料的降解速率。体外降解实验表明该复合材料的在模拟体液中降解速率可在10%~100%进行调节。另外,降解后产生的碱性氨基酸赖氨酸可以使降解产物对周围环境pH的影响[1]。

高分子聚合材料的灭菌方式是一个值得关注的问题。常用的灭菌方法有环氧乙烷、γ射线、紫外线及高温高压等,不同的灭菌方式对聚合材料的性能会产生一定影响。研究[14-15]表明,灭菌对聚合物材料的降解性能和力学性能都会产生影响。本研究分别采用高温高压、γ-射线、低温等离子、环氧乙烷和紫外线5种灭菌方式对PAA/CS复合材料进行灭菌,并通过材料XRD分析、力学性能测试和L929细胞毒性实验评价不同灭菌方式对PAA/CS复合材料理化性能的影响。从XRD图谱中可以看出,相对于灭菌前,材料经5种不同的灭菌法灭菌后没有新的结晶峰出现,各结晶峰形态无明显变化,表明这5种灭菌方法对材料的基本结晶结构没有显著影响。材料经低温等离子和高温高压灭菌后,抗压强度下降较大,相对于未灭菌组具有显著性差异。这可能是由于氨基酸聚合物中的酰胺键具有强极性,吸收了环境中的水分子。水进入分子内部后起到增塑剂的作用,削弱了分子间范德华力,甚至破坏原来分子链之间的氢键而形成新的氢键,从而使原来紧密的结构变得疏松,分子链之间更容易滑动,因此导致材料的压缩强度下降[16]。本实验中,高温高压灭菌温度达到121 ℃,压力达到0.4 MPa,水蒸气更容易进入分子内部,因此导致材料的压缩性能显著下降。而低温等离子灭菌后同样使材料抗压强度降低,其原因可能与高温高压灭菌相同,灭菌环境中的水分子进入材料内部起到增塑作用。

L929细胞实验结果表明,PAA/CS复合材料经过高温高压、γ射线、低温等离子后,制备的浸提液与细胞共培养后24 h,细胞基本全部死亡,细胞毒性为3~4级。其原因可能为PAA中的化学键如肽键等结构在灭菌过程中遭受破坏而使PAA/CS复合材料发生结构变化。如高温高压灭菌条件为121 ℃,30 min,可能会显著破坏PAA中的肽键和空间结构。Rozema等[17]通过7种不同的蒸汽灭菌法对PLA灭菌后发现其相对分子质量均有一定程度下降,从而影响聚合物的降解速率。γ射线高能辐照可能会破坏高分子链中的化学键,有研究表明γ射线会引起PGA-PLA聚合物中分子链的断裂;此外,随着辐照剂量的增加,PGA的相对分子质量随之下降[18]。低温等离子虽为低温灭菌,但等离子体含有自由基HO、过羟自由基HO_2、激发态H_20_2、活性氧原子0、活性氢原子H等可直接氧化蛋白质中的氨基糖[19],可能因此而破坏PAA高分子链结构中的侧链基团。因而材料在浸提过程中析出毒性物质,影响L929细胞增殖,产生细胞毒性。

PAA/CS复合材料在经过环氧乙烷和紫外线灭菌后,其浸提液与L929细胞共培养后24、48、96 h,细胞生长良好,细胞相对增殖度与阴性对照组无统计学差异,细胞毒性为0~1级。可见,PAA/CS复合材料在经过环氧乙烷灭菌和紫外线灭菌后,其浸提液对L929细胞生长无明显影响,材料不产生明显细胞毒性。环氧乙烷属于最有效的化学冷灭菌剂之一,近年来在医院怕湿怕热医疗器械灭菌中得到广泛应用。环氧乙烷杀菌原理为烷基化作用,对有机物质无损害[20]。紫外线为传统的消毒方法,其杀菌原理是使细菌DNA链上相邻的两个胸腺嘧啶共价结合成二聚体,改变DNA的分子构型,干扰DNA的复制和转录,最终导致细菌死亡[21]。本研究结果表明,环氧乙烷和紫外线灭菌对材料的结晶结构、抗压强度均无明显影响,材料浸提液亦不产生明显L929细胞毒性,可作为该复合材料的灭菌方法选择。

参考文献:

[1] Li H, Pei F X, Lv G Y, *et al*. Study on novel poly(amino acid) copolymers: preparation and *in vitro* degradation[C]// The 22nd International Symposium on Ceramics in Medicine, Daegu, Korea. 2009:900-904.

[2] Nan J T, Zhang Y F, Tu C Q, *et al*. Synthesis and *in vitro* degradation characteristics of amino acid copolymer and its two composites[C]// The 22nd International Symposium on Ceramics in Medicine, Daegu, Korea. 2009:627-630.

[3] Athanasiou K A, Niederauer G G, Agrawal C M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers[J]. Biomaterials, 1996, 17(2):93-102.

[4] 全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会. 中华人民共和国国家标准 GB/T16886.5-2003/ISO 10993-5:1999 医疗器械生物学评价——第5部分:细胞毒性试验体外法[S]. 北京:中国标准出版社, 2003:80-88.

[5] Erdemli O, Captug O, Bilgili H, *et al*. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the effects of demineralized bone matrix or calcium sulfate addition to polycaprolactone-bioglass composites[J]. J Mater Sci Mater Med, 2010, 21(1):295-308.

[6] Banwart J C, Asher M A, Hassanein R S. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation[J]. Spine (Phila Pa 1976), 1995, 20(9):1055-1060.

[7] Bonfiglio M, Jeter W S. Immunological responses to bone[J]. Clin Orthop Relat Res, 1972, 87:19-27.

[8] Hench L L, Polak J M. Third-generation biomedical materials[J]. Science, 2002, 295(5557):1014-1017.

[9] 代震宇, 李军, 赵增辉, 等. 纳米羟基磷灰石/聚氨基酸复合材料生物

安全性评价[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(21):2294 - 2299.
[10] 苏保, 蒋电明, 严永刚, 等. 氨基酸聚合酶/硫酸钙生物工程骨的生物相容性研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(1):40 - 44.
[11] 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.
[12] Oh C W, Kim P T, Ihn J C. The use of calcium sulfate as a substitute [J]. J Orthop Surg, 1998, 6(2):1 - 10.
[13] Walsh W R, Morberg P, Yu Y, *et al*. Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect[J]. Clin Orthop Relat Res, 2003, (406):228 - 236.
[14] 秦廷武, 杨志明, 张姝江, 等. 不同灭菌法对组织工程支架降解性和力学特性的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(12):747 - 749.
[15] Moreau M F, Gallois Y, Basle M F, *et al*. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells[J]. Biomaterials, 2000, 21(4):369 - 376.
[16] 张翔, 李玉宝, 左奕, 等. 灭菌处理对纳米羟基磷灰石增强聚酰胺 66 复合材料性能的影响[J]. 高分子材料科学与工程, 2007, 23(6):196 - 199.
[17] Rozema F R, Bos R R, Boering G, *et al*. The effects of different steam-sterilization programs on material properties of poly(L-lactide) [J]. J Appl Biomater, 1991, 2(1):23 - 28.
[18] Gilding D, Reed A M. Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers[J]. Polymer 1979, 20:1459 - 1464.
[19] 张文福. 医学消毒学[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2002:83 - 90.
[20] 黄靖雄. 环氧乙烷灭菌[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(12):1435 - 1439.
[21] 谢立新, 金玉怀, 张永红, 等. 影响紫外线杀菌的因素分析[J]. 华北煤炭医学院学报, 2005, 7(3):372 - 373.

(收稿:2010-08-20 修回:2010-09-20)
(编辑 王小宾)

(上接 115 页)

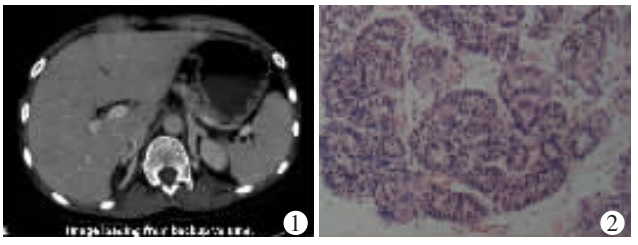


图 1 患者肾上腺 CT 检查
图 2 患者睾丸病理检查 (HE ×40)

2 讨论

17α-羟化酶缺陷属常染色体隐性遗传疾病,由编码该酶的 CYP17 基因突变引起。国人 17α-羟化酶基因突变类型以缺失突变 + 替代突变的复合类型为主[2]。其中 6 号外显子和 8 号外显子的突变占全部病例的 90%[3]。17α-羟化酶缺陷时肾上腺网状带、束状带、球状带类固醇激素的合成均可受影响。多数本症患者表现为低肾素、低醛固酮,是由于肾上腺球状带分泌过量的皮质酮和去氧皮质酮使得血容量扩张,因此产生高血压,同时抑制了肾素以及醛固酮。17α-羟化酶缺陷可导致睾酮、雌二醇减少。在男性,由于胚胎期的睾丸组织仍可正常分泌抗苗勒管激素,使副中肾管退化,无子宫、输卵管出现,内生殖器为男性,而睾酮合成不足,使外生殖器分化呈女性化[4]。17α-羟化酶缺陷时 17α-羟孕酮合成减少导致皮质醇的合成减少,失去皮质醇的负反馈 ACTH 增高,从而肾上腺皮质增生。但一般没有肾上腺皮质功能减退的表现。因为分泌增加的皮质酮有糖皮质激素活性[5]。本症主要临床表现:①性激素合成减少,男性患者多表现为假两性畸形,女性出生时正常,出生后则表现为第二性征不发育和原发性闭经。男、女患者几乎均无腋毛、阴毛生长。性激素水平低,骨龄落后。雌激素水平低可出现骨质疏松。②皮质酮增多,引起高血压、低血钾。若发现男性假两性畸形,女性第二性征不发育,原发性闭经,高血压伴低血钾,应疑及本病。

本例患者社会性别女性,高血压伴低血钾。结合体检特征考虑 17α-羟化酶缺陷男性假两性畸形可能性大。CT 提示双侧肾上腺明显增生,合并重度骨质疏松,染色体为 46,XY,结合性激素、血管紧张素、ACTH 结果,先天性肾上腺皮质增生 17α-羟化酶缺陷男性假两性畸形的诊断成立。该患血浆醛固酮水平正常。已有醛固酮水平正常甚至升高的病例报道[6-7]。醛固酮水平不低可能与实验室在测定中未进行标本的层析分离而直接进行测定有关,因此醛固酮的前体物质如皮质酮和去氧皮质酮有可能混杂在其中[8]。本例患者给予糖皮质激素治疗后在较短时间内即取得较显著效果。经腹腔镜腹腔探查找到两侧睾丸,结合病检结果,进一步支持先天性肾上腺皮质增生 17α-羟化酶缺陷男性假两性畸形的诊断。

参考文献:

[1] 廖二元, 莫朝晖. 内分泌学[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2007:841.
[2] 杨军, 李小英, 孙首悦, 等. 10 例 17α 羟化酶/17, 20 碳链裂解酶缺陷症临床和遗传学研究[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2006, 26(1):17 - 21.
[3] 姚凤霞, 韩娟娟, 刘勇, 等. 两例 17α-羟化酶/17, 20 碳链裂解酶缺陷症分子遗传学研究[J]. 医学研究杂志, 2007, 36(5):26 - 29.
[4] 张耀, 陆菊明, 窦京涛, 等. 17α-羟化酶缺陷症的九例临床分析[J]. 临床内科杂志, 2008, 25(6):377 - 379.
[5] 张咏言, 李莉, 韩萍. 17α-羟化酶缺陷症 2 例分析[J]. 中国实用内科杂志, 2009, 29(6):555 - 556.
[6] Yanase T, Simpson E R, Waterman M R. 17 alpha-hydroxylase/17, 20-lyase deficiency: from clinical investigation to molecular definition [J]. Endocr Rev, 1991, 12(1):91 - 108.
[7] 杨军, 李小英. 17α 羟化酶/17, 20 碳链裂解酶缺陷症研究进展[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2006, 26(1):13 - 16.
[8] 陶红, 陆召麟, 张波, 等. 17α-羟化酶/17, 20-裂解酶缺陷症的临床特点及长期随诊资料分析[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(6):442 - 445.

(收稿 2010-10-12 修回 2010-11-02)
(编辑 龙 亮)