技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1840-03

纳米羟基磷灰石/聚氨基酸复合材料的生物相容性研究

李 军[1],代震宇[1],赵增辉[1],苏 深[1],严永刚[2],安 洪[1] 蒋电明[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016;2.四川大学纳米生物材料研究中心,成都 610064)

【摘 要】目的:评价新型骨内固定生物材料纳米羟基磷灰石(Nanohydroxy apatite,nHA)/聚氨基酸的生物相容性。方法:对 nHA/聚氨基酸复合材料生物相容性进行体外及体内评价,分别进行以下实验:①细胞毒性试验,材料与兔骨髓间充质干细胞共同培养,倒置相差显微镜观察细胞生长,CCK-8 检测细胞增殖情况。②急性毒性试验,KM 小鼠 20 只,雌雄不限,体重 20~23 g,分两组(n=10),分别按 50 g/kg 注射材料浸提液及生理盐水,观察小鼠毒性表现。③溶血试验,分 3 组,分别取 10 ml 材料浸提液、灭菌蒸馏水、生理盐水,各加入 0.2 ml 新鲜抗凝兔血测溶血率。④热源试验,新西兰大白兔 3 只,雌雄不限,体重 2.3~2.5 kg,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。⑤微核试验,KM 小鼠 30 只,雌雄不限,体重 20~23 g,分 3 组(n=10),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,计算微核率。结果:nHA/聚氨基酸复合材料对骨髓间充质干细胞无毒性,无急性毒性,溶血率正常,无致热源,无微核试验遗传毒性。结论:nHA/聚氨基酸复合材料具有良好的生物相容性,有望用作骨内固定材料。

【关键词】聚氨基酸;纳米羟基磷灰石;复合材料;生物相容性

【中图图书分类法分类号】R318.08 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-20

Biocompatibility of nanohydroxyapatite/polyamino acid composite

LI Jun, et al

(*Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the biocompatibility of nanohydroxyapatite/polyamino acid composite. *Methods*: In vivo and vitro experiment were estimated for the biocompatibility of nanohydroxyapatite/polyamino acid as follows. ①cytotoxinic test, bone marrow mesenchymal stem cell (BMMSCs) were incubated with the composite, the morphology of the cells was observed by inverted phase contrast microscope, CCK-8 were tested to analyze the proliferation of cell. ②acute toxic test was divided into 2 groups (n=10) including 20 KM mice weighted 20~23 g, the extracts and physiological saline were injected to mice with 50 g/kg, the toxicity manifestation were observed. ③hemolytic test consist 3 groups, 0.2 ml anticoagulant diluted fresh rabbit blood was added to 10 ml extracts, sterile distilled water and physiological saline each, the percentage of hemolysis was examined. ④pyrogen test, 3 rabbits weighted 2.3~2.5 kg were injected in vain with 10 ml/kg extracts, the difference in temperature between the normal body temperature tested and the ones per hour in the next continues 3 hours. ⑤bone marrow micronucleus test, 30 KM mice weighted 20~23 g were divided into 3 groups, extracts, cyclophosphamide and physiological saline were injected to mice with 100 mg/kg twice at 24 hours intervals, the numbers of micronucleated polychromatic erythrocytes and polychromatic erythrocytes were observed, the frequency of micronucleus was calculated. *Results*: nanohydroxyapatite/polyamino acid had good biocompatibility with rabbit BMMSCs, and the composite was of no acute toxicity, no pyrogern, no hemolytic effect and no genotoxicity by mouse bone marrow mircronucleus test. *Conclusion*: nanohydroxyapatite/polyamino acid has good compatibility, can be used as internal fixation material in orthopedics in future.

【Key words】Polyamino; Nanohydroxyapatite; Composite; Biocompatibility

纳米羟基磷灰石(Nanohydroxyapatite,nHA)具有良好的生物相容性及骨传导性,作为骨修复重建的材料已得到广泛应用。聚氨基酸具有良好的生物活性,降解速率可以调节。严永刚将两种材料通过复合,研制出高强度骨内固定聚氨基酸 nHA 生物复合材料。在该复合材料中,nHA 质量比为 30%,而聚氨基酸包括 4 种氨基酸 6- 氨基已的、r- 氨基丁酸、L- 氨脯酸、赖氨酸。该材料具有良好的力学性能,有望替代金属内固定物而得到广泛应用,从而避免金属内固定物存在的应

作者介绍:李 军(1985-),男,硕士,
研究方向:骨科生物材料。

通讯作者:蒋电明,男,教授,E-mail: jdm571026@vip.163.com。

基金项目:重庆市科委重点攻关资助项目(编号:CSTC,2009AB5080)。

力遮挡、需二次手术取出等问题[1-3]。根据医疗器械生物学评价标准要求[4],任何生物材料用于临床都必须通过体外及体内评价。本试验通过兔骨髓间充质干细胞与复合材料共同培养,急性毒性试验,溶血试验,热源试验,微核试验来验证材料的体外及体内安全性与相容性[5],为今后进一步的研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

健康新西兰大白兔 5 只,雌雄不限,体重约 2.3 ~ 2.5 kg。健康普通级 KM 小鼠 50 只,雌雄不限,体重约 20~23 g。以上动物均由重庆医科大学实验动物中心提供。nHA/聚氨基酸复合材料,为直径 5 mm,厚度 2 mm 圆片状,经环氧乙烷灭菌,由四川国际纳米科技有限公司提供。DMEM,胎牛血清(Hyclone),胰蛋白酶,吉姆萨染液,721 型分光光度计,酶标仪,倒置相差显微镜(Nikon)。

浸提液制备:按 0.2 g/ml 比例将圆片状材料放入生理盐水中制备浸提液,37℃浸提 72 h。每天准备新鲜的浸提液用于试验,4℃无菌封存备用。

1.2 方法

1.2.1 nHA/聚氨基酸复合材料与兔骨髓间充质干细胞相容性研究

1.2.1.1 兔骨髓间充质干细胞原代培养 采用密度梯度离心法分离[6]。无菌条件下切取兔双后肢的股骨,暴露骨髓腔并反复用 PBS 液冲洗,收集骨髓冲洗液于离心管。加入 Percoll梯度液后 2 000 r/min 离心 30 min,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基重悬后置于 37℃,5%CO_2 培养箱中培养。隔日换液,细胞生长融合至 80% ~ 90%用 0.25%胰蛋白酶消化传代。选取生长状态良好的第 3 代细胞进行实验。

1.2.1.2 兔骨髓间充质干细胞与复合材料共同培养 将圆片状复合材料在完全培养基内浸泡 24 h 后,置于 24 孔板内,加入培养基 1 ml,另设 24 孔不加复合材料的对照组。按 1×10^6 个的密度将第 3 代兔骨髓间充质干细胞接种到培养板内。置入 37℃,5%CO_2 培养箱内培养,隔日换液。

1.2.1.3 细胞形态学观察 在细胞接种后,每天用倒置相差显微镜观察各组细胞贴壁情况、细胞大小、形态及在材料周围生长情况。

1.2.1.4 材料的细胞粘附率测定 分别在接种后 1、4 h 每组取 4 个样本,PBS 漂洗出悬浮的细胞后,0.25%胰酶消化,计数贴壁细胞数,从而计算各组细胞粘附率。细胞粘附率 = 贴壁细胞数/接种总细胞数 × 100%。

1.2.1.5 CCK-8 法测定细胞生长曲线 细胞接种后 7 d,每天每组各取 4 个孔,加入 CCK-8 试剂 10 μl,将待检液移入 96 孔板后,用酶标仪检测吸光度值,并绘制生长曲线。

1.2.2 全身急性毒性试验 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。每组 10 只 KM 小鼠。注射后 24、48、72 h 分别观察其一般状态、毒性表现和死亡动物数,并称量记录 2 组小鼠的体重。

1.2.3 溶血试验 从兔耳中动脉采血 10 ml,加 2%草酸钾溶液 0.5 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。各取 20 ml 材料浸提液、灭菌蒸馏水(阳性对照)、生理盐水(阴性对照)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。式中: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。

1.2.4 热源试验 取新西兰大白兔 3 只,每隔 30 min 用精密度为 0.1℃的肛温计插入兔肛门内测量体温 3 次(插入深度为 6 cm,时间不少于 1.5 min),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 比例缓缓注入预热至 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 1 次减去正常体温,即为该兔体温升高度数。

1.2.5 微核试验 取健康 KM 小鼠 30 只,体重在 20 ~ 23 g,共 3 组,每组 10 只。试验组按 12.5 ml/kg 小鼠腹腔注射浸提液,阴性对照组和阳性对照组按同等剂量小鼠腹腔注射生理盐水和环磷酰胺溶液。24 h 后各组再次按同等剂量注射 1次。末次注射后 6 h 用颈椎脱臼法处死小鼠,取胸骨骨髓,滴于胎牛血清里涂片,甲醇固定 30 min 后取出晾干。用 15%Giemsa 染液染色 30 min,冲洗后晾干。先在低倍镜下观察,选择分布均匀、染色好的区域在油镜下观察,嗜多染红细胞呈灰蓝色,正红细胞呈橘红色,微核为紫红色小体。若 1 个嗜多染红细胞内出现 2 个或 2 个以上微核,仍按 1 个微核计数。每只小鼠骨髓图片计数 1 000 个以上嗜多染红细胞 ,估算含微核的嗜多染红细胞与嗜多染红细胞的比值即微核率[7]。

1.3 统计学方法

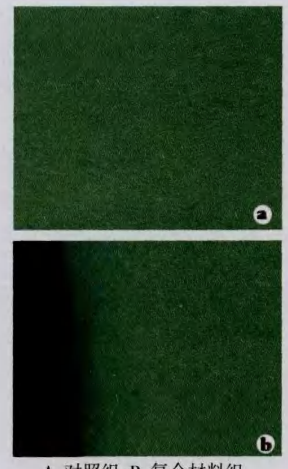
采用 SPSS13.0 统计软件包对数据进行分析,所有计量资料以均数 ± 标准差表示。细胞粘附计数与 CCK-8 测定细胞生长增殖采用析因设计资料的方差分析,小鼠体重变化采用重复测量设计资料的方差分析,微核试验采用卡方检验分析。P 值 <0.05 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 兔骨髓间充质干细胞与复合材料共同培养

2.1.1 细胞形态学观察 24 h 后复合材料组与对照组绝大部分细胞已经贴壁,呈长梭形、扁圆形,形态均匀,排列成鱼群状。骨髓间充质干细胞在复合材料周围生长状态良好。细胞的数量随着时间的均有所增加,2 组无明显差异。

2.1.2 材料细胞粘附率测定 细胞接种到复合材料 1 h 后粘附率为 23.1%,对照组为 23.3%,接种 4 h 后粘附率分别为 61.7%和 62.0%。2 组粘附率无明显差异(P>0.05)。



A. 对照组;B. 复合材料组

图 1 对照组与复合材料组培养 24 h 后细胞形态(倒置相差显微镜×200)

表 1 接种后 1、4 h 两组细胞粘附计数($\bar{x}\pm s$)×10^5

组别	1 h	4 h
复合材料组	2.31 ± 0.15 [a]	6.17 ± 0.22
对照组	2.33 ± 0.18	6.20 ± 0.32

注:[a]P>0.05,与对照组比较

2.1.3 CCK-8 法测定细胞生长曲线 细胞接种后的生长曲线可以看出,材料组与对照组骨髓间充质干细胞均随时间延长正常增殖生长,2 组之间差异无统计学意义(P>0.05)。

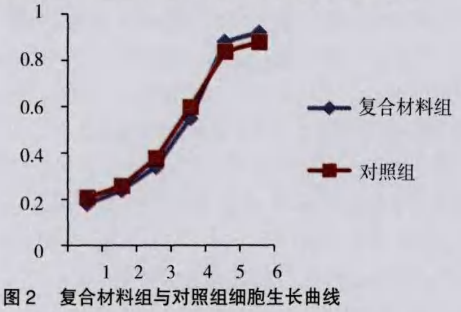


图 2 复合材料组与对照组细胞生长曲线

2.2 全身急性毒性实验结果

观察期内 2 组小鼠未见中毒症状及死亡,体重均有增加,在注射后 24、48、72 h 测量体重增加见表 2,2 组数据无明显统计学差异(P>0.05)。

表 2 全身急性毒性实验小鼠体重增加(g)

组别	24 h	48 h	72 h
试验组	0.84 ± 0.26 [a]	1.84 ± 0.38	2.88 ± 0.33
对照组	0.80 ± 0.14	1.96 ± 0.30	2.96 ± 0.30

注:[a]P>0.05,与对照组比较

2.3 溶血试验溶血率测定

溶血试验检测材料浸提液对血液的作用。本试验中材料浸提液组吸光度值为 0.016,阳性对照组吸光度值为 0.752 内,材料溶血率为 1.4%。试验材料浸提液符合溶血试验溶血率<5%的要求。

2.4 热源试验体温变化

热源试验目的是检测材料浸提液本身导致的热源反应。试验中每只兔体温升高<0.6℃,3 只兔体温共升高<1.4℃,符合生物材料热源试验检测要求(见表 3)。

2.5 微核试验微核率测定

微核试验用来检测材料的体内遗传毒性。与阴性对照组比较,材料浸提液组微核率无明显差异(P>0.05)。材料浸提液组与阳性对照组微核率差异有统计学意义(P<0.05)(见表 4)。

表 3 热源试验兔体温变化

组别	正常体温	最高体温	升高体温
1	38.6	38.8	0.2
2	38.7	38.9	0.2
3	38.6	38.9	0.3

表 4 微核试验微核率

组别	PCE	MNPCE	Frequency
试验组	10000	8	0.780‰
阴性对照组	10000	5	0.495‰
阳性对照组	10000	98	9.31‰

3 讨 论

骨内固定材料不仅需要良好的力学性能、弹性模量、降解速率,同时其生物相容性也要符合要求。nHA 具有良好的生物相容性及骨传导性,但其力学性能较差、降解速率较慢。聚氨基酸通过 α-氨基酸以肽键合成,降解产物为氨基酸、H_2O,同时其降解速率可以调节,具有良好的生物活性[8-10]。

目前普遍使用的金属内固定物,其弹性模量远远高于人体正常骨组织,使载荷不能很好的由材料传递到骨组织而出现应力遮挡,使材料与骨组织之间出现骨吸收,进而引起局部骨质疏松[18]。因此,金属内固定物必须二次手术取出,这无疑加大了医疗负担。通过将 nHA 与聚氨基酸复合,希望可以使其具有良好的骨传导性,同时还具有良好的降解性能,其与骨组织弹性模量差距较小,可以有效的减小应力遮挡的作用。同时其良好的生物活性可以促进骨愈合。其降解速率可以调节,最终使其降解速率与骨重建相匹配,这也正是所有生物材料学研究者所追求的最佳骨内固定治疗方案[11]。

生物材料相容性研究包括体外及体内实验几个部分。前期通过 L929 细胞毒性试验研究,我们发现复合材料细胞毒性 0 级,具有良好的细胞相容性。本次试验通过密度梯度离心法原代分离培养兔骨髓间充质干细胞,将第三代细胞与复合材料以直接接触法共同培养,通过形态学观察、CCK-8 测定细胞增殖,观察到材料与细胞相容性良好。进一步根据 ISO 医疗器械评价标准,我们发现全身急性毒性试验两组小鼠体重增加无明显差异,未发现全身急性毒性,符合相关标准。复合材料浸提液的溶血率 <5%,没有引起溶血反应,达到溶血试验标准。热源试验结果表明材料复合热源试验检查要求。微核试验中,复合材料浸提液与阴性对照嗜多染红细胞/红细胞总数无明显差异,没有出现遗传毒性的迹象,同时可以结合 Ames 试验、染色体畸变试验等综合评价遗传毒性的

技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1843-04

间断给药 DEN 诱导大鼠肝癌模型建立及病理研究

朱艳志[1],孔宪炳[1],颜 朗[2]
(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立间断给药二乙基亚硝胺(Diethylmitrosamine,DEN)诱导 SD 大鼠肝癌模型,探讨与人类肝细胞癌相似的动物肝癌模型病理形态变化。方法:取体重为 170~210 g 雄性 SD 大鼠 63 只,随机分为实验组(48 只)和对照组(15 只),实验组采用 0.01%DEN 溶液间断喂养 SD 大鼠诱发肝癌,对照组自由喂养,常规病理 HE 染色并动态观察肝癌发生的不同时相。结果:设立间断 DEN 给药诱导 SD 大鼠肝癌,病理证实大鼠肝癌为肝细胞癌,诱癌率 88.9%(32/36),其末期成功率高,在整个诱癌过程中经历了肝细胞损伤再生→增生 - 硬化→癌变 3 个阶段。结论:该造模方法容易、诱癌成功率高、大鼠存活率高。同时,该肝癌模型可以作为研究人类肝癌发生、发展变化病理形态的一种理想动物模型。

【关键词】二乙基亚硝胺;肝癌;动物模型;病理改变
【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-28

Establishment of hepatocarcinoma rat modelinduced by diethylmitrosamine discontinuously and pathological study

ZHU Yan-zhi, et al
(*Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish hepatocarcinomas rat model by DEN-induced and investigate the pathologic and morphologic changes during hepatocarcinogenesis, and this model was similar to the development of human hepatocellular carcinomas. *Methods*: sixty-three male spraque-dawley(SD)rats, weighing 170 to 200g were randomly devided into experimental group(48)and control group(15). The intermission in 0.01% DEN was adminstrated to

作者介绍:朱艳志(1981-),男,硕士,
研究方向:肝癌综合治疗与肝移植。
通讯作者:孔宪炳,男,副教授,E-mail:qj900313@Yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局 2008 年度医学科研项目计划(编号:08-02-40)。

可能。

通过上面的试验我们发现,nHA/聚氨基酸复合生物材料与细胞相容性良好,无全身急性毒性、无致溶血性、无致热源、无微核试验遗传毒性。符合医疗器械评价标准要求。因此,nHA/聚氨基酸复合生物材料有望成为骨科新型内固定材料得到广泛应用。

参 考 文 献

[1] Guo H,Su J C,Wei J.Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering[J].Acta Biomaterialia,2009,5(1):268-278.

[2] Peng L,Gao Y,Xue Y N.Cytotoxicity and in vivo tissue compatibility of poly (amidoamine) with pendantaminobutyl group as a gene delivery vector[J].Biomaterials,2010,31(16):4467-4476.

[3] Eng D,Caplan M,Preul M. Hyaluronan scaffolds:A balance between backbone functionalization and bioactivity[J].Acta Biomater,2010,6(7):2407-2414.

[4] 郝和平,奚廷斐,卜长生.医疗器械监督管理和评价第二章医疗器械安全性评价[M].北京:中国医药科技出版社,2000.74-190.

[5] Sandeman S R,Jeffery H,Howell C A.The in vitro corneal biocompatibility of hydroxyapatite-coated carbon mesh[J].Biomaterials,2009,30(18):3143-3149.

[6] 许 勇,朱立新,田 京.纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合材料与兔骨髓间充质干细胞的生物相容性[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(8):1423-1426.

[7] 孙立魁,施燕平,黄经春.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.

[8] Becker S T,Douglas T,Acil Y. Biocompatibility of individually designed scaffolds with human periosteum for use in tissue engineering[J].J Mater Sci Mater Med,2010,21(4):1255-1262.

[9] 孟纯阳,安 洪,蒋电明.新型纳米骨重建和修复材料羟基磷灰石/聚酰胺体内植入的生物相容性及安全性[J].中国临床康复,2004,8(29):6330-6333.

[10] Douglas T,Liu Q,Humpe A.Novel ceramic bone replacement material CeraBall seeded with human mesenchymal stem cells[J].Clin Oral Implants Res,2010,21(3):262-267.

[11] Teixeira S, Fernandes H, Leusink A. In vivo evaluation of highly macroporous ceramic scaffolds for bone tissue engineering[J].J Biomed Mater Res A,2010,93(2):567-575.

(责任编辑:冉明会)