维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0169－04

纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 与人胚胎成纤维细胞的生物相容性研究

孟纯阳[1], 安　洪[1], 蒋电明[1], 刘永刚[2]

(1.重庆医科大学临床学院骨科;2.重庆医科大学组胚教研室,重庆　400016)

【摘　要】目的:研究新型骨修复重建复合材料纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(n－HA/PA66)对人胚胎成纤维细胞可能存在的细胞毒性,为该材料应用于临床提供实验依据。方法:采用人胚胎成纤维细胞,经材料及材料浸提液分别与细胞共培养等方式对 n－HA/PA66 进行细胞毒性测试,细胞形态观察法观察各组细胞在 24h、48h、72h、5 天各时相点的细胞形态学变化,细胞生长抑制法(MTT 比色法),测定各组 1,2,4,7 天细胞的相对增殖率。结果:材料表面的细胞黏附生长良好,各浸提液组和直接接触组分别与阴性对照组进行两两比较,各组对细胞的增殖均无显著影响($P>0.05$),各浸提液组和直接接触组分别与阳性对照组进行两两比较显示有显著差异($P<0.05$),材料的细胞毒性为 0～1 级。结论:体外试验结果显示,n－HA/PA66 与人胚胎成纤维细胞相容性好,符合 GB/T16886.5－1997－ISO 10993－5:1992 规定的医用材料相应标准[1]。

【关键词】纳米;羟基磷灰石;聚酰胺;复合材料;细胞相容性

【中国图书分类法分类号】R683　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－06－01

Study on biocompatability of nano－hydroxyapatite crystals and polyamide 66 composite with human embryonic fibroblast

MENG Chunyang, et al

(*Department of Orthopedics, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the biocompatability of nano－hydroxyapatite crystals and polyamide composite(n－HA/PA66) with the human embryonic fibroblast(HEFs), to provide an experimental evidence for its clinical application. *Methods*: The morphological observation was made and pictures of HEFs were taken 1d, 2d, 4d, and 7d after co－culture with extract of n－HA/PA66, and direct contact with n－HA/PA66. To determine absorbance of every hole under 500 nm with enzyme linked immunity instrument after 1d, 2d, 4d, and 7d of contact of n－HA/PA66 extract with HEF cells, and direct contact with n－HA/PA66. In the meanwhile calculate the relative multiplication rate of cells, and evaluate them by six degree tests for cytotoxicity. *Results*: The HEFs in direct contact culture with composite were attached and proliferated well on the materials surface. The growth and proliferation of cultured cells was not significantly inhibited between every composite group with the negative group ($P>0.05$). There was significant difference between every composite group with the positive group($P<0.05$). In this experiment the toxicity of n－HA/PA66 to HEF cells ranges from zero to one degree. *Conclusion*: n－HA/PA66 have good biocompatibility with human embryonic fibroblast(HEFs) in vitro, up to the standard of International Organization for Standardization(ISO).

【Key words】Nanometer; Hydroxyapatite; Polyamide; Composite; Cytocompatibility

外伤、肿瘤、感染、矫形等因素造成的骨缺损的修复,始终是困扰矫形外科医师的一大难题。李玉宝等[2]以新工艺将具有骨传导特性的纳米羟基磷灰石(n－HA)与有机高分子聚己二酰己二胺(PA66)进行共溶而制成的高分子聚合物 n－HA/PA66,是"十五"国家科技攻关计划研制出的具有我国自主知识产权和国际领先水平的新型纳米骨修复替代材料,它在形态、结构和组成上与人体骨中磷灰石纳米针晶相似;各种分析和前期实验表明[3,4],这是一种纳米晶类骨的高强柔韧复合材料,充分发挥了羟基磷灰石的骨传导生物活性,为获得结构和性质类似于人体骨组织的骨修复替代材料开拓了一条广阔的途

作者介绍:孟纯阳(1968－　),男,主治医师,博士,
主要研究方向:骨与关节损伤、骨修复替代材料。

基金项目:国家 863 项目资助课题,编号 2002AA326020。

维普资讯 http://www.cqvip.com

径。由于任何一种材料应用于人体内首先和机体组织液及细胞发生接触,因此,材料和细胞相容性问题,对每种植入机体的材料都是不容忽视的。为了给该新型材料应用于临床提供实验依据,本文参照 GB/T16886.5-1997-ISO 10993-5:1992 标准和规定,对 n-HA/PA66 进行细胞毒性研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

采用人胚胎成纤维细胞(重庆医科大学组胚教研室分离培养),实验用细胞为传代 48~72h 生长旺盛的细胞。

1.1.2 试验材料及试剂

n-HA/PA66 膜片,高密度聚乙烯膜片,苯酚,胎牛血清(PAA 公司),DMEM(Gibco 公司),0.25% 胰蛋白酶(Sigma 公司),MTT(Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO)。

1.1.3 复合材料浸提液制备

1.1.3.1 常温浸提液制备 将灭菌备用的 n-HA/PA66 膜片 2g 加入 10ml 生理盐水中,在 37℃ 下惰性容器中浸提 24h。

1.1.3.2 高温浸提液制备 将灭菌备用的 n-HA/PA66 膜片 2g 加入 10ml 生理盐水中,置入耐高温惰性玻璃容器中在 121℃ 下浸提 1h。

1.1.3.3 按 ISO 要求用高密度聚乙烯膜片作为材料的阴性对照,其大小与与 96 孔板孔底大小形状一致,灭菌备用;用苯酚作材料的阳性对照,浓度为 64g/L,过滤除菌备用。

1.2 试验分组和操作步骤

1.2.1 分组

将 96 孔细胞培养板分成三个组:常温浸提液组;高温浸提液组;材料直接接触组。三组均设置各自对应的阳性和阴性对照组。

1.2.2 操作步骤

用细胞培养基配制 1×10^4/ml 浓度的 HEF 细胞,分注于 96 孔培养板内,每孔 200μl,每组每观察期 8 孔,置含 5%(V/V)CO_2、37℃ 的恒温培养箱内,培养 24h 使细胞贴壁。

24h 后弃去原培养基,常温浸提液组加常温浸提液和培养基各 100μl;高温浸提液组加高温浸提液和培养基各 100μl;材料直接接触组加灭菌备用的膜状材料后加生理盐水和培养基各 100μl。阳性对照加浓度为 64g/L 的苯酚和培养基各 100μl;阴性对照加灭菌备用的高密度聚乙烯膜片后加生理盐水和培养基各 100μl。置含 5%(V/V)CO_2、37℃ 的恒温培养箱内。

将加入浸提液和材料并培养 24h、48h、72h 后各组样品分别在倒置相差显微镜下观察细胞在浸提液中及在材料边缘的形态变化及生长状况,并进行照相。

于 1,2,4,7 天每组各取出一块培养板,弃去培养板孔内的浸提液和培养基,加入 20μl/孔的 MTT 液,继续培养 6h,吸去原液,加入 200μl/孔的二甲基亚砜。震荡 10min,在酶标仪上以 500nm 波长测定吸光度值(OD 值)。

1.3 评价标准和统计处理

1.3.1 细胞的增殖度计算方法及细胞毒性评价标准

$$\text{细胞的增殖度(RGR)} = \frac{\text{实验组平均吸光度值}}{\text{阴性对照组平均吸光度值}} \times 100\%$$

分级标准见表 1。

表 1 反应分级标准

反应	相对增殖度(RGR≥)
0 级	≥100
1 级	75~99
2 级	50~74
3 级	25~49
4 级	1~24
5 级	0

1.3.2 细胞形态学变化观察法评价标准[1]

(1)无毒:细胞形态正常,呈梭形或不规则三角形,贴壁生长良好;

(2)轻度毒性:细胞贴壁生长好,但可见少数细胞圆缩,偶见悬浮细胞;

(3)中度毒性:细胞贴壁生长不佳,细胞圆缩较多,达 1/3 以上,见悬浮死细胞;

(4)重度毒性:细胞基本不贴壁,90% 以上为死细胞。

1.4 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件包,对实验测得的 OD 值具体数据进行组间配对 t 检验的统计学分析。

2 结 果

2.1 细胞形态观察

2.1.1 材料浸提液与细胞共培养组 24h 时观察常温浸提液、高温浸提液及阴性对照组、均见呈梭形、条形、折光性强旺盛生长的 HEF 细胞,细胞形态、数量,各实验组与阴性对照组无明显差异,但细胞间隙较大。而阳性对照组均为悬浮圆形、胞核固缩的死亡细胞(图 1、2);48h 细胞数量增加明显,细胞间间隙减小,细胞渐铺满视野。随时间延长细胞数量显著增加,72h 时观察细胞间间隙显著减小,细胞旺盛生长呈肩并肩紧密排列。

2.1.2 材料与细胞直接接触组 24h 时即见细胞附在材料上旺盛生长,在材料接触界面及材料上均可见与阴性对照组形态类似的 HEF 细胞生长旺盛(图 3)。48h 时界面及材料上细胞粘附数量显著增加,

维普资讯 http://www.cqvip.com

随时间延长细胞向界面和材料上蔓延面积扩大。72h 时观察细胞在材料上呈集落样生长。



图 1 常温浸提液与细胞共培养 24h 后观察见呈梭形、条形、折光性强旺盛生长的 HEF 细胞(×200)

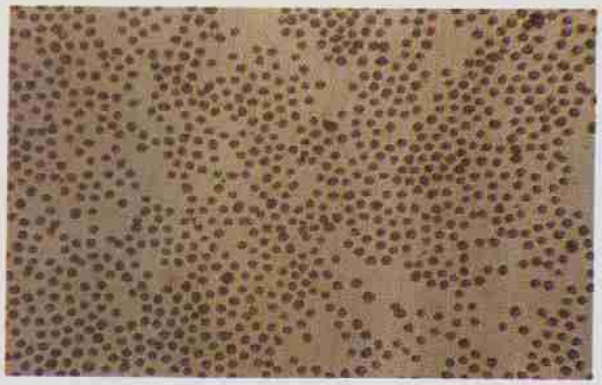


图 2 两阳性对照组与细胞共培养 24h 后均为悬浮圆形、胞核固缩的死亡细胞(×100)



图 3 材料与细胞共培养 24h 后在材料接触界面材料上均可见呈梭形、条形的 HEF 细胞生长旺盛(×200)

2.2 n-HA/PA66

各浸提液及材料组与细胞共培养各时相点吸光值及相对增殖度数据结果。见表 2。

2.3 统计学结果

各浸提液组和直接接触组分别与阴性对照组进行两两比较,各组对细胞的增殖均无明显影响($P>0.05$),各组与阳性对照组进行两两比较显示有显著差异($P<0.05$)。

表 2 n-HA/PA66 浸提液及材料与细胞共培养组 OD 值及增殖度、毒性分级

分 组	OD 值	RGR	细胞毒性分级
1 天			
阴性对照组	1.654±0.336	100	0
常温浸提液组	1.659±0.217	100.3	0
高温浸提液组	1.606±0.1075	97.1	1
材料直接接触组	1.68±0.216	98.4	1
阳性对照组	0.306±0.011	18.5	4
2 天			
阴性对照组	1.748±0.416	100	0
常温浸提液组	1.697±01801	97.08	1
高温浸提液组	1.656±0.223	94.7	1
材料直接接触组	1.668±0 013	95 4.1	1
阳性对照组	0.389±0.021	22.2	4
4 天			
阴性对照组	1.851±0.267	100	0
常温浸提液	1.854±0.071	100.2	0
高温浸提液组	1.738±0.114	93.9	1
材料直接接触组	1.792±0.213	96.8	1
阳性对照组	0.432±0.019	23.3	4
7 天			
阴性对照组	1.954±0.565	100	0
常温浸提液组	1.969±0.427	100.7	0
高温浸提液组	1.811±0.114	92.6	1
材料直接接触组	1.835±0.125	93.9	1
阳性对照组	0.465±0.017	23.7	4

3 讨 论

细胞毒性试验是利用体外细胞培养的方法来评价生物材料及医用装置,或其浸提液可滤出成分中潜在的细胞毒性,以此评价材料与细胞的生物相容性。1948 年 Rosen Bluth 等首次报道利用小鼠成纤维细胞培养来筛选聚合物,开创了以细胞毒性试验来评价生物材料细胞相容性科研工作的新纪元,随后在这一领域有大量的研究发现及对实验方法的不断改进,目前,以细胞毒性试验来评价生物材料生物相容性已得到公认[5]。鉴于此,国际标准化组织(ISO)制定了细胞毒性试验的标准,即 ISO 10993-5:1992《医疗器械生物学评价 细胞毒性试验 体外法》之评价标准和要求。标准中规定和推荐了很多制备浸提液的条件和方法,Oshima 等研究认为,不同浸提条件和方法所制备的浸提液在细胞敏感程度上差异无显著性[6]。作者参照 GB/T16886.5-1997 ISO 10993-5:1992《医疗器械生物学评价

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞毒性试验　体外法》之评价标准和要求[1]，选择了最常用且与材料应用条件类似的浸提介质及浸提温度和时间。

体外细胞与材料共培养时，一旦材料有毒性物质释放，细胞形态和增殖状态就会立即发生改变，同时可直接观察到细胞在材料表面的黏附情况及界面反应，可为材料的细胞相容性提供最直观的证据[7]。本试验结果显示，在 5%（V/V）CO_2、37℃的恒温培养箱内的常温浸提液，即在类似体内环境下，浸提液没有对细胞造成明显毒性，说明材料具有良好的细胞相容性。而在 121℃浸提 1h 获得的材料高温浸提液，对细胞也没有产生明显的毒性，说明 n－HA/PA66 即便在高温下仍具有较稳定的物理化学性质，基本上没有明显毒性成分浸出，能和手术器械一样，术前可用高温消毒方法灭菌，为临床应用提供了方便。

有报告显示直接接触法对材料的细胞毒性敏感性最高，可测出材料微弱的细胞毒性[8]。直接在 n－HA/PA66 上接种人胚胎成纤维细胞后，各观察期见细胞在材料上生长良好，表明该材料与细胞直接接触后各时相点，对细胞生长无明显影响，具有很好的细胞相容性。

本试验量化细胞毒性采取的评价方法是 MTT（四唑盐）比色法，该方法由 Mosmann 在 1983 年首先提出，目前已被国内外公认且广泛应用，其原理是线粒体琥珀酸脱氢酶能催化 MTT 形成蓝色结晶，结晶形成数目的多寡与活细胞数目和功能状态呈正相关，测定的生物学终点是细胞能量代谢最重要的细胞器—线粒体，它是细胞能量供应的工厂，在细胞增殖、代谢旺盛时增多，衰退时减少，无疑该方法能灵敏地反映出细胞被损害的程度[9]。从表 2 可以看出，各时相点高温浸提液组较常温浸提液组吸光度 OD 值降低，说明高温浸提液相对于常温浸提液组而言其中仍含有极微量的溶出物，这些溶出物对细胞生长代谢起到了微弱的抑制作用，正因为其毒性是轻微的，与常温浸提液组及阴性对照组间两两比较均未产生显著性差异（$P>0.05$），而各试验组和阴性对照组与阳性对照组比较均有显著性差异（$P<0.05$）。

生物材料中的易溶物质如原料单体、低分子聚合物、催化剂、溶剂、稳定剂、乳化剂等是引起局部炎症反应和组织反应的主要原因。Werner 等[10]试验显示羟基磷灰石具有良好的细胞相容性。n－HA/PA66 中除含纳米羟基磷灰石外，加入了高分子聚己二酰己二胺（PA66），PA66 是一种具有很高韧性的高分子聚合物材料，分子构形与自然骨中的胶原极其相似，已在临床上用于手术缝合线，但不具备生物活性。材料的组成决定性质，由于该复合材料中不含有不稳定、有毒性的成分，故在检测中发现其具有良好的细胞相容性。由于各试验组细胞毒性分级均在 0～1 级，按 ISO 标准属于安全范围，说明 n－HA/PA66 复合材料与人胚胎成纤维细胞具有良好的相容性。

参　考　文　献

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

[2] 李玉宝，顾　宁，魏于全. 纳米生物医药材料[M]. 北京：化学工业出版社，2004；3.

[3] 魏　杰，李玉宝. 纳米类骨磷灰石晶体的研制[J]. 功能材料，2003；4(34)：471－472.

[4] 郑　谦，周立伟，魏世成，等. 纳米羟基磷灰石－聚酰胺人工骨修复犬下颌骨体缺损的实验研究[J]. 中华口腔医学杂志，2004；39(1)：60－64.

[5] Sabita Stivastava, Stephen DG. Screening of in vitro cytotoxicity by the adhesive test[J]. Biomateials, 1990；11(3)：133－136.

[6] Oshima H, Nakamura M. A study on reference standard for cytotoxicity assay of biomaterial[J]. Biomed Mater, 1994；4(4)：327－329.

[7] Ioletti DP, Takei H, Lin T, et al. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast function[J]. Biomaterials, 2000；21(10)：1103－1114.

[8] 梁卫东. 细胞培养法评价生物材料生物相容性研究进展[J]. 生物医学工程学杂志，1999；16(1)：89.

[9] 吕晓迎，HF Koppent. 牙体材料细胞毒性评定的新方法 MTT[J]. 中华口腔医学杂志，1995；30(3)：337－338.

[10] Wemer J, Linner－Krcmar B, Friess W, et al. Mechanical properties and in vitro cell compatibility of hydroxyapatite ceramics with graded pore structure[J]. Biomaterials, 2002；23(21)：4285－4294.