技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001303

石墨烯/纳米羟基磷灰石/聚酰胺66复合材料的生物相容性研究

阳淇名，张施洋，赵维康，蒋电明
（重庆医科大学附属第一医院骨科，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：评价新型三元复合材料石墨烯(graphene，G)/纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite，n-HA)/聚酰胺66(polyamid66，PA66)的生物相容性。**方法**：通过溶液共混法制备G/n-HA/PA66复合材料，按照《医疗器械生物学评价试验指南与标准》制备材料浸提液，分为实验组、阴性对照组(DMEM/F12培养基或生理盐水浸提液)、阳性对照组(苯酚)，行体外毒性试验[CCK-8、流式细胞学检测细胞凋亡及周期变化(n=5)]、全身急性毒性实验(n=10)、溶血实验(n=5)、热源实验(n=3)与皮内刺激实验(n=30)评价该复合材料的生物相容性。**结果**：体外毒性试验：细胞形态与生长状况良好，细胞增殖OD值各实验组与阳性对照组比较有明显统计学差异(P=0.000)，材料不会影响G_2/M+S期的比例(P=0.889)，不会促进细胞凋亡(P=0.988、P=0.919、P=0.781)；全身急性毒性实验：材料浸提液注射入小鼠腹腔后一般情况良好，实验组体质量[(33.30±3.81) g]与对照组[(31.08±2.91) g]相比无统计学差异(P=0.166)；溶血实验：材料浸提液溶血率为(0.97±0.36)%，满足小于5%的评价标准(P=0.000)；热源实验：实验动物体温升高数为(0.25±0.12) ℃，符合小于0.6 ℃的评价标准(P=0.035)；皮内刺激实验：实验组与对照组注射点周围皮肤无红肿现象，原发刺激指数(primary irritation index，PII)评分为极轻微刺激。**结论**：G/n-HA/PA66复合材料具有优良的生物相容性，可以安全地用于骨内固定植入物。

【关键词】石墨烯；纳米羟基磷灰石；聚酰胺；复合材料；生物相容性
【中图分类号】R318.08；R322.71；R329.24 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-12-08

Biocompatibility of graphene/nano-hydroxyapatite/polyamide 66 composite material

Yang Qiming, Zhang Shiyang, Zhao Weikang, Jiang Dianming
(*Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To evaluate the biocompatibility of graphene/nano-hydroxyapatite/polyamide 66 composite material. ***Methods***: G/n-HA/PA66 composite was prepared by solution blending method. Material extract solution was extracted as specified by GB/T 16886.5-2003/ISO 10993-5:2009. The experiments were divided into 3 groups: experimental group, negative control group, and positive control group. The biocompatibilities of G/n-HA/PA66 composite were evaluated according to in vitro cytotoxicity test, acute systemic toxicity test, hemolysis test, pyrogen test and intradermal stimulation test. ***Results***: In vitro cytotoxicity test showed that the cell morphology and proliferation had a good condition and there was a significant statistical difference between each experimental group and positive group (P=0.000). The cell cycle of C3H10T1/2 in G_2/M and S period could not be affected by composite material (P=0.889). The cell apoptosis could not be promoted by composite material (P=0.988, P=0.919, P=0.781). Acute systemic toxicity test showed that the mice weight of experimental group[(33.30±3.81) g] had no statistical significance with control group[(31.08±2.91)g] (P=0.166) and there was no death and toxicity effect in mice. Hemolysis test showed that the hemolysis rate of G/n-HA/PA66 composite was (0.97±0.36)%, which fitted the evaluation criteria of less than 5% (P=0.000). Pyrogen test showed that the increased temperature of experimental animal was (0.25±0.12) ℃, which fitted the evaluation criteria of less than 0.6 ℃ (P=0.035). Intradermal stimulation test showed that the phenomena such as erythema and edema were not observed around the injection point in the experimental group and control group, and the PII scores indicated the most slightly stimulation. ***Conclusion***: G/n-HA/PA66 composite had excellent biocompatibility and practicability as a bone fixation implant.

【Key words】graphene; nano-hydroxyapatite; polyamide; composite material; biocompatibility

作者介绍：阳淇名，Email：kakachobits@126.com，
研究方向：脊柱外科与生物工程材料。
通信作者：蒋电明，Email：jdm571026@vip.163.com。
基金项目：国家自然科学基金面上资助项目(编号：81179685)；重庆市卫计委重点资助项目(编号：2013-0-011)。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170609.1108.016.html (2017-06-09)

随着社会机械工业的不断进步，因各种意外所导致的骨折情况屡见不鲜，如何选择一种良好的内固定物是一直以来研究的热点[1]。现常用的骨折内固定物材料有可降解材料与钛合金材料，钛合金材料的高弹性模量会导致严重的应力遮挡效应，引起骨萎缩、骨质疏松，甚至发生再骨折等并发症；而可降解的生物材料虽然避免了应力遮挡效应，减轻了植入物二次手术取出的痛苦，但是材料在体内的降解速率不可控与植入物周围组织严重的炎症反应也制约了该类材料的运用[2-4]。因此本研究试图研制出一种具有一定生物活性，能够满足骨折内固定要求，具有适当的力学强度的生物复合材料。本课题组在前期与四川国纳科技公司共同研究制备出纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(nano-hydroxyapatite/polyamid66，n-HA/PA66)复合材料，拥有良好的生物相容性，但其力学强度与生物活性的不足使其临床应用受到限制。石墨烯(graphene，G)是最近研究的热点，其较大的比表面积能促进成骨细胞的粘附，粗糙表面让细胞与石墨烯颗粒充分接触，促进细胞的增殖，同时也具有优异的力学性能[5-8]。

本课题组在 n-HA/PA66 复合材料的基础上加入石墨烯，制备出 G/n-HA/PA66 复合材料，该复合材料的力学强度和生物活性的增强已得到证实[6]。但其生物相容性尚待论证，本文按照《医疗器械生物学评价试验指南与标准》[9-10]，选取体外细胞毒性试验、全身毒性实验、溶血实验、热源实验及皮内刺激实验对此种新合成的复合材料进行生物相容性及安全性的初步评价。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

1.1.1 G/n-HA/PA66 复合材料的制备 G/n-HA/PA66 复合材料是通过溶液共混法制备出材料原浆，然后再通过模具注塑成型。首先将 n-HA(上海梅兰化工科技公司)与 PA66(Ludwigshafen 公司，德国)按 3:9 的比例加入甲酸中，将混合物剧烈搅拌；石墨烯(苏州恒球石墨烯科技有限公司)按 1%浓度单独加入甲酸后，进行超声分散 30 min，之后剧烈搅拌 30 min。待所有溶质溶解分散完全后，用乙醇沉淀溶液中的纳米复合物并将其过滤出来，在 20 ℃真空烘箱内干燥 24 h，冷却至室温后得到 G(1%)/n-HA(30%)/PA66 复合材料，环氧乙烷灭菌后备用。

1.1.2 复合材料浸提液的制备 按照参考文献[11-12]方法，使用生理盐水和含 FBS(10%)的 DMEM/F-12 培养基为浸提介质，将复合材料按照 0.2 g/mL 的剂量加入到不同浸提介质中，在恒温 37 ℃条件下持续浸提 72 h，将其中一部分含 FBS(10%)的 DMEM/F-12 培养基的浸提液倍比稀释成 50%的材料浸提培养液，然后用 0.22 μm 一次性滤器将浸提液过滤除菌，4 ℃放置备用。

1.1.3 试剂与动物 DMEM/F-12 培养基(Hyclone 公司，美国)，FBS(Corning 公司，美国)，CCK-8 试剂盒(Sigma-Aldrich 公司，美国)，AnnexinV-FITC/PI 双染试剂(Sigma-Aldrich 公司，美国)，流式细胞检测仪(Becton-Dickinson 公司，美国)，荧光酶标仪(Bio-Rad 公司，美国)，健康昆明小鼠(普通级)40 只，雌雄各半，体质量 29~32 g；健康新西兰大白兔 6 只，雌雄不限，体质量 2.0~2.3 kg(重庆医科大学动物实验中心)。

1.2 体外细胞毒性试验

1.2.1 CCK-8 法测定细胞增殖活性 采用小鼠骨髓间充质干细胞系(C3H10T1/2，购买于上海生科院细胞库)进行细胞毒性试验。将细胞复苏后接种于细胞培养瓶中，使用含 FBS(10%)的 DMEM/F-12 培养基进行培养，传代 2 次后，将处于对数生长期的 C3H10T1/2 细胞用 0.25%的胰蛋白酶消化并离心，之后用细胞培养基吹打为细胞悬液并计数，按 3×10^4 个/mL 吸取 100 μL 接种于 96 孔板中(3 000 个/孔)，孔板四周边缘孔不接种细胞，另加入 100 μL 细胞培养基，置于 37 ℃、5%CO_2 敷箱中培养 12 h。待细胞贴壁后，弃孔内原培养基，按实验分组更换培养液：①100%G/PA66/n-HA 复合材料浸提液组，加入 100%G/PA66/n-HA 复合材料浸提液 200 μL/孔；②50% G/PA66/n-HA 复合材料浸提液组，加入 50%G/PA66/n-HA 复合材料浸提液 200 μL/孔；③空白对照组，加入含 FBS(10%)的 DMEM/F-12 细胞培养基 200 μL/孔；④阳性对照组，加入含 FBS(10%)的 DMEM/F-12 细胞培养基 100 μL/孔和 64 g/L 的苯酚溶液 100 μL/孔；每组 8 个复孔。将 96 孔板放入 37 ℃、5%CO_2 敷箱中继续培养。于 1、3、5、7 d 各取一孔板，在倒置相差显微镜下观察细胞形态，随后每孔加入 20 μL CCK-8 试剂，继续在 37 ℃敷箱内培养 4 h 后，在酶标仪上测定波长为 450 nm 处的吸光度(absorbance，A)值，并计算细胞相对增殖度(relative growth rate，RGR)。根据参考文献[11-12]评价复合材料细胞毒性大小。

$$RGR=\frac{\text{实验组平均 A 值}}{\text{空白对照组平均 A 值}}\times100\%$$

1.2.2 AnnexinV-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡 重复上述细胞培养步骤，分为实验组与阴性对照组，于 24、48、96 h 3 个时间点处，用胰蛋白酶消化细胞，加入预冷 PBS 混悬离心，重复操作 1 次，然后加入 Binding 缓冲液 200 μL 重悬，加入 AnnexinV-FITC 溶液 10 μL 与 PI 溶液 5 μL，震荡混匀，避光反应 20 min，最后再加入 Binding 缓冲液 300 μL，用流式细胞仪检测，观察各组细胞凋亡数量。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期 重复上述操作步骤，在相应时间点处，用胰酶消化细胞，加入 PBS 混悬离心，重复操作 2 次，加入已预冷的 75%乙醇 1 mL，4 ℃条件下固定 24 h。然后以 1 000 r/min 离心 5 min，加入 PBS 重悬，取悬液 100 μL，加入 PI 溶液 200 μL，震荡混匀，避光反应 20 min，用流式细胞仪检测，并用 Muticycle 软件分析各组细胞周期情况。

1.3 全身急性毒性实验

按照参考文献[13-14]方法，选取健康普通级昆明小鼠 40 只，雌雄各半，体质量 25~30 g。完全随机分为 G/PA66/n-HA 复合材料浸提液实验组和生理盐水阴性对照组，各组 20 只，雌雄分笼喂养，并作好标记。适性饲养 1 d 后，记录各组小鼠原始体质量，实验组将复合材料生理盐水浸提液注射入小鼠腹腔内，每只 50 mL/kg；对照组注射等量生理盐水。在 1 周内每天观察小鼠的一般情况，毒性体征及死亡数量。分别于注射后 1、2、3 d 分别记录各组小鼠的体质量变化。在 7 d 后，处死所有小鼠，随机选取其中各组 3 只，取其肝、肾切片作 HE 染色。

1.4 溶血实验

按照参考文献[15-16]方法，取健康新西兰大白兔 1 只，适性培养 1 周后，经其耳缘静脉取新鲜兔血 10 mL，立即加入 20 g/L 草酸钾溶液 0.5 mL，制备成抗凝兔血，取部分抗凝兔血稀释为 80%浓度备用。以复合材料生理盐水浸提液组为实验组，生理盐水组为阴性对照组，蒸馏水为阳性对照组；各组分别加入 10 mL 生理盐水浸提液、生理盐水与蒸馏水进 15 mL 离心管，置于 37 ℃恒温水浴箱内，水浴 30 min。加入稀释兔血 0.2 mL，轻摇混匀后继续置于水浴箱内水浴 60 min，取出离心(2 500 r/min)5 min，取上清液于紫外分光光度计上测定波长为 545 nm 处的 A 值。根据以下公式进行溶血率的计算：

$$活血率(\%)=\frac{A_{材料浸提液组}-A_{阴性对照组}}{A_{阳性对照组}-A_{阴性对照组}}\times 100\%$$

若溶血率≤5%，则该复合材料符合溶血实验要求；溶血率>5%，提示该材料具有溶血作用，不符合本实验要求。

1.5 热源实验

按照参考文献[17-18]方法，取健康新西兰大白兔 3 只，雌雄不限，体质量 2.0~2.5 kg，适性培养 1 周。实验前禁食 2 h，测量实验动物肛温，隔 30 min 重复测量 1 次，共测量 3 次，取体温平均值作为正常体温。将复合材料生理盐水浸提液置于 37 ℃水浴箱内，水浴 1 h，将已预热的浸提液按 10 mL/kg 浓度沿耳缘静脉注射入实验动物体内。注射后 1、2、3 h 分别测量肛温，3 次肛温测量最高者减去平均正常体温即为体温增高数。单只实验兔体温升高数<0.6 ℃即符合实验要求。

1.6 皮内刺激实验

按照参考文献[17-18]方法，取健康新西兰大白兔 3 只，雌雄不限，体质量 2.1~2.4 kg。实验前 4 h 除去实验动物脊柱两旁区域被毛，避免损伤皮肤。在脊柱两旁各取 15 个点(n=30)，随机分为 3 组，每组 10 个点，分别在各点皮内注射 0.2 mL 材料生理盐水浸提液、0.2 mL 生理盐水及 0.2 mL 20%乙醇。于注射后 24、48、72 h 观察注射局部皮肤及周围组织反应，按照皮肤反应记分系统评定原发刺激指数(primary irritation index，PII)，并进行分级。

1.7 统计学方法

实验中所有数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析，计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，若方差不齐时，采用对数转换后，方差齐同。CCK-8 法检测细胞增殖，流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期，小鼠体质量测量采用重复测量设计资料的方差分析，其两两比较采用 LSD-t 法，每个时间点上的分组比较采用多变量方差分析，小鼠体温变化及溶血率检测采用单样本均数 t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 体外细胞毒性

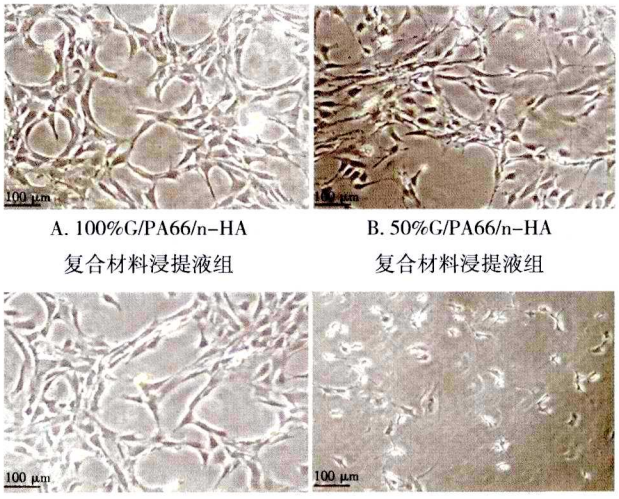
2.1.1 CCK-8 检测结果 在倒置显微镜下观察细胞形态，见各实验组细胞贴壁良好，形态饱满，呈梭形生长，细胞间通过伪足相连，与阴性对照组无明显差别；阳性对照组细胞数量减少，贴壁不良，胞体变小，有圆形高折光度死细胞漂浮，如图 1 所示。100%G/n-HA/PA66 组与阴性对照组相比，在各时间点处 A 值并无统计学差异(P=0.615、P=0.917、P=0.699，P=0.214)。而阳性对照组的 A 值在各时间点明显低于各实验组与阴性对照组，差异有统计学差异(P=0.000)，见表 1。根据评价标准 100%G/PA66/n-HA 材料浸提液实验组与阳性对照组细胞毒性为 0 级，50%G/PA66/n-HA 材料浸提液实验组组细胞毒性为 0~1 级，阳性对照组为 4 级，表明该复合材料符合体外细胞毒性实验要求。

表 1 各组不同时间点 A 值及 RGR 结果

Tab.1 A value and relative growth rate(RGR) of each group at different time points

组别		1 d	3 d	5 d	7 d
100%G/n-HA/PA66	A	1.557 ± 0.026[ab]	2.187 ± 0.120[ae]	2.641 ± 0.224[ad]	3.583 ± 0.180[ae]
	RGR(%)	100.84	96.61	95.63	96.12
50%G/n-HA/PA66	A	1.549 ± 0.041[a]	2.207 ± 0.196[a]	2.635 ± 0.193[a]	3.588 ± 0.136[a]
	RGR(%)	100.32	97.48	95.40	96.26
DMEM/F-12	A	1.544 ± 0.036[a]	2.264 ± 0.181[a]	2.762 ± 0.022[a]	3.728 ± 0.064[a]
	RGR(%)	100.00	100.00	100.00	100.00
Phenol	A	0.321 ± 0.006	0.271 ± 0.126	0.218 ± 0.014	0.216 ± 0.015
	RGR(%)	20.79	11.97	7.89	5.74

注：分组因素 F=1 478.796，P=0.000；时间因素 F=1 454.849，P=0.000；两者交互作用 F=233.885，P=0.000。a：与 Phenol 组比较，P=0.000；b：与 DMEM/F-12 组比较 P=0.615；c：与 DMEM/F-12 组比较，P=0.917；d：与 DMEM/F-12 组比较，P=0.699；e：与 DMEM/F-12 组比较，P=0.214



A. 100%G/PA66/n-HA 复合材料浸提液组　　B. 50%G/PA66/n-HA 复合材料浸提液组

C. DMEM/F-12 完全培养基阴性对照组　　D. 苯酚阳性对照组

图 1　倒置相差显微镜观察各组与 C3H10T1/2 细胞共培养 96 h 细胞形态变化(100×)

Fig.1　Morphological of C3H10T1/2 cells observed by Inverted phase contrast microscope(100×)

2.1.2　AnnexinV-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡结果　各时间点实验组早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞与坏死细胞和正常细胞与对照组比较无明显统计学差异(P=0.988、P=0.919、P=0.781)，见表 2。

2.1.3　流式细胞仪检测细胞周期结果　各时间点实验组与对照组比较无统计学差异(P=0.889)，复合材料浸提液与 C3H10T1/2 细胞共培养 48 h 后，处于 G_2/M 与 S 期的细胞较 24 h 减少(P=0.001、P=0.028)，且共培养 96 h 后，细胞在 G_2/M 期和 S 期数量明显减少(P=0.000)，见表 3。

2.2　全身急性毒性实验结果

在观察期内，实验组与对照组小鼠均未见到毒性反应，也未出现死亡情况。小鼠精神良好，反应敏捷，进食量正常，体质量呈稳步上升趋势，各时间点的体质量增加情况见表4。实验组小鼠的体质量增加情况与对照组相比无明显统计学差异(P=0.166)。7 d 后处死小鼠，暴露腹腔见各脏器外观大小正常，未发现腹水、脏器粘连、水肿、出血、渗出等异常表现。取肝、肾进行 HE 染色，实验组与对照组均未见明显病理改变(图 2)。

表 2　各组不同时间点细胞凋亡检测结果(%)

Tab.2　Cell apoptosis of each group at different time points(%)

检测指标	组别	24 h	48 h	96 h	时间因素		组别因素		交互作用	
					F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
早期凋亡细胞	实验组	1.70 ± 1.04	1.20 ± 0.35	1.67 ± 0.43	0.751	0.488	0.000	0.988	0.260	0.775
	对照组	1.53 ± 0.57	1.44 ± 0.45	1.62 ± 0.25						
晚期凋亡细胞及坏死细胞	实验组	10.03 ± 4.00	14.01 ± 3.67	15.74 ± 4.81	5.010	0.02	0.011	0.919	0.153	0.859
	对照组	9.90 ± 2.08	15.25 ± 3.52	14.98 ± 4.05						
正常细胞	实验组	86.27 ± 4.66	79.31 ± 1.77	76.43 ± 3.05	27.346	0.000	0.083	0.781	0.031	0.969
	对照组	86.30 ± 2.83	79.05 ± 1.91	75.75 ± 3.29						

表 3　各组不同时间点细胞周期检测结果(%)

Tab.3　Cell cycle of each group at different time points(%)

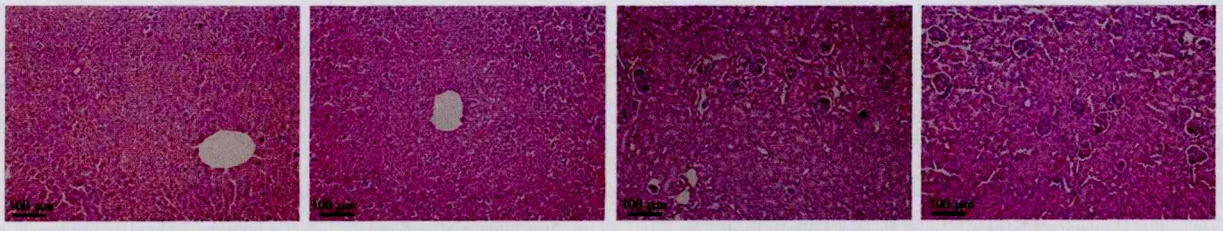
检测指标	组别	24 h	48 h	96 h	时间因素		组别因素		交互作用	
					F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
G_2/M+S 期	实验组	56.89 ± 3.76	48.17 ± 2.46[a]	10.73 ± 3.17	627.569	0.000	0.021	0.889	1.201	0.327
	对照组	54.30 ± 3.25	49.35 ± 1.15	11.61 ± 4.20						

注：a，与 24 h 时间点比较，P=0.001；b：与 48 h 时间点比较，P=0.000

表 4　各时间点复合材料对小鼠体质量影响情况(kg，n=10)

Tab.4　Mouse weight of each group at different time points(kg，n=10)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
实验组	30.80 ± 3.68	31.81 ± 3.74	32.40 ± 3.83	33.30 ± 3.81	199.972	0.000
对照组	28.60 ± 2.76	29.62 ± 3.09	30.32 ± 2.97	31.08 ± 2.91		
F 值		2.088			0.179	
P 值		0.166				0.910



A. 材料浸提液组小鼠肝脏　B. 生理盐水组小鼠肝脏　C. 材料浸提液组小鼠肾脏　D. 生理盐水组小鼠肾脏

图 2　小鼠肝肾组织病理学观察(HE，100×)

Fig.2　Pathological observation of liver and kidney in mice(HE，100×)

2.3　溶血实验结果

根据 GB/T 16886.4-2003/ISO 10993-4:2002 标准，本实验复合材料溶血率为(0.97 ± 0.36)%(n=5)，小于 5%(t=-25.055，P=0.000)的实验标准。

2.4　热源实验结果

实验中大白兔体温增高数为(0.25 ± 0.12) ℃(n=3)，小于 0.6 ℃(t=-5.167，P=0.035)，符合国家医疗器械生物学评价标准。

2.5　皮内刺激实验结果

在各时间点，复合材料浸提液组与阴性对照组的注射点周围皮肤未见明显红斑、水肿及焦痂等情况出现，阳性对照组注射点周围皮肤出现轻微水肿及明显红斑。根据皮肤反应系统评价标准进行评分，计算出原发刺激指数为(0.010 ± 0.004)，为极轻微刺激。

3　讨　论

人类骨骼拥有复杂的层次结构，主要是由胶原、纳米羟基磷灰石和水构成[19]。当发生骨折时，临床上常用的金属内固定物虽然可以使骨折端达到坚强的固定，但是其生物活性的缺乏与高弹性模量的存在常导致愈合缓慢，甚至发生再骨折。G/n-HA/PA66 复合材料中拥有与组成天然骨相同的纳米羟基磷灰石成分，是一种能够模仿体内平衡的生物替代物，拥有与松质骨接近的弹性模量，不会导致应力遮挡效应。石墨烯作为最近材料学研究的热点，其优良的机械性能与生物活性受到极大的关注。本实验在 n-HA/PA66 复合材料的基础上加入石墨烯，主要利用其优异的生物活性，促进成骨细胞的增殖与粘附，增加骨折愈合速度。由于体内植入材料在体内可能出现各种不良反应，甚至影响生命安全，所以本实验按照《医疗器械生物学评价试验指南与标准》对新制备的 G/n-HA/PA66 复合材料进行生物相容性检测。

体外细胞毒性实验是材料生物相容性评价的重要组成部分之一，它能够直观地观察到材料对细胞的毒性作用和程度，当材料植入体内与组织细胞相接触，细胞的生长、粘附与增殖都是重要的评价指标[11-12]。本实验选取 C3H10T1/2 细胞系作为标准细胞对 G/PA66/n-HA 复合材料进行细胞毒性评价，因为本材料的最终目的是作为内固定物植入体内，而骨折处的骨髓间充质干细胞是骨折自我愈合的重要因素，C3H10T1/2 细胞系可以模拟体内环境，观察材料是否影响 MSC 的形态、增殖分化。CCK-8 法是常用于测定细胞增殖或毒性，是一种高灵敏度、无放射性的比色检测法。相比于 MTT 法，拥有检测液不用配置、Formazan 晶体不用溶解等优点[20]。本实验说明该复合材料不会对细胞的形态及增殖产生毒性作用。

Annexin V-FITC/PI 双标记法是目前检查细胞凋亡的常用方法，在本实验中用于检测复合材料是否会导致细胞凋亡。Annexin V 可以在钙离子存在的条件下与细胞表面外翻的磷脂酰丝氨酸结合，而磷脂酰丝氨酸的外翻是细胞凋亡的早期事件；PI 是一种 DNA 染料，当细胞凋亡的晚期，细胞膜通透性增加，PI 进入细胞核与 DNA 结合[21]。本实验结果发现，实验组与对照组在各时间点正常细胞含量居多，凋亡细胞较少，细胞生长状态良好，随时间的增长，2 组晚期凋亡细胞增多，这可能是因为培养基内的营养物质随着培养时间的延长被逐渐消耗的结果。因此 G/PA66/n-HA 复合材料不会促进细胞的凋亡。同时，用流式细胞仪检测细胞周期，常用 G_2/M 期与 S 期相加所占的比例表示增殖指数，用以评价细胞的增殖能力[22]。在本实验中，24 h 时间点处，处于 G_2/M+S 期较多，细胞增殖能力强，随时间的延长，G_2/M+S 期细胞数目所占比例逐渐下降，大部分细胞处于静止状态。这可能与培养板细胞密度增高、生

存空间受限有关。实验结果提示 G/PA66/n-HA 复合材料不会影响细胞的 DNA 复制与分裂。

植入材料的生物相容性是一个复杂的整体评价过程，体外试验已被证明拥有良好生物相容性的生物材料在植入体内后，也可能发生机体免疫排斥反应[23]。所以，进行体内的生物相容性评价实验至关重要。全身毒性实验反映了材料在植入体内后机体会不会出现毒性反应，可分为急性、亚急性和慢性毒性实验，但是由于实验条件及时间的限制，我们选取全身急性实验作为评价标准，观察材料浸提液在注射入小鼠腹腔后，短时间内会不会出现毒性反应。实验结果证明材料对机体无急性毒性效应。热源实验与皮内刺激实验结果表明该材料无过敏原，不会导致体内出现体温上升，皮肤红斑、水肿等免疫排斥反应，证明材料对机体刺激性极低。复合材料植入体内后首先会与血液相接触，所以材料的溶血率的测定是必不可少的。材料的溶血率是通过材料与抗凝血液接触后，检测血液中红细胞与血红蛋白的改变来测定的，本实验材料符合评价标准，可以认为该材料不会导致溶血反应。

综上所述，该复合材料符合《医疗器械生物学评价试验指南与标准》评价要求，体内试验与体外试验结果一致，具有良好的生物相容性，为后期骨内固定物的开发与临床运用提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties[J]. Biomaterials, 2003, 24(13): 2161-2175.

[2] Qiao B, Li J, Zhu Q, et al. Bone plate composed of a ternary nano-hydroxyapatite/polyamide 66/glass fiber composite: biomechanical properties and biocompatibility[J]. Int J Nanomedicine, 2014, 9: 1423-1432.

[3] Su B, Peng X, Jiang D, et al. In vitro and in vivo evaluations of nano-hydroxyapatite/polyamide 66/glass fibre(n-HA/PA66/GF) as a novel bioactive bone screw[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68342.

[4] Rajesh R, Ravichandran YD. Development of a new carbon nanotube-alginate-hydroxyapatite tricomponent composite scaffold for application in bone tissue engineering[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10(s1): 7-15.

[5] Dresselhaus MS, Araujo PT. Perspectives on the 2010 Nobel Prize in physics for graphene[J]. ACS Nano, 2010, 4(11): 6297-6302.

[6] Zhang S, Yang Q, Zhao W, et al. In vitro and in vivo biocompatibility and osteogenesis of graphene-reinforced nanohydroxyapatite polyamide66 ternary biocomposite as orthopedic implant material[J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 3179-3189.

[7] Elkhenany H, Amelse L, Lafont A, et al. Graphene supports in vitro proliferation and osteogenic differentiation of goat adult mesenchymal stem cells: potential for bone tissue engineering[J]. J Appl Toxicol, 2015, 35(4): 367-374.

[8] Mehrali M, Moghaddam E, Seyed Shirazi SF, et al. Mechanical and in vitro biological performance of graphene nanoplatelets reinforced calcium silicate composite[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e106802.

[9] Organization IS. Biological evaluation of medical devices[S]. ISO 10993. USA: Information Handling Services, 2006.

[10] 国家医疗器械生物学评价标准化技术委员会. 医疗器械生物学评价[S]. GB/T 16886. 北京：中国标准出版社，2001.

[11] 国家医疗器械生物学评价标准化技术委员会. 医疗器械生物学评价第 5 部分——体外细胞毒性试验[S]. GB/T 16886.5-2003. 北京：中国标准出版社，2003.

[12] Organization IS. Biological evaluation of medical devices Part 5: tests for in vitro cytotoxicity[S]. ISO 10993-5: 2009. USA: Information Handling Services, 2009.

[13] 国家医疗器械生物学评价标准化技术委员会. 医疗器械生物学评价第 11 部分：全身毒性试验[S]. GB/T 16886.11-2011. 北京：中国标准出版社，2011.

[14] Organization IS. Biological evaluation of medical devices Part 11: tests for systemic toxicity[S]. ISO 10993-11: 2006. USA: Information Handling Services, 2006.

[15] 国家医疗器械生物学评价标准化技术委员会. 医疗器械生物学评价第 4 部分：与血液相互作用试验选择[S]. GB/T 16886.4-2003. 北京：中国标准出版社，2003.

[16] Organization IS. Biological evaluation of medical devices Part 4: selection of tests for interactions with blood[S]. ISO 10993-4; 2002. USA: Information Handling Services, 2002.

[17] 国家医疗器械生物学评价标准化技术委员会. 医疗器械生物学评价第 10 部分：刺激与迟发型超敏反应试验[S]. GB/T 16886.10-2005. 北京：中国标准出版社，2005.

[18] Organization IS. Biological evaluation of medical devices Part 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity[S]. ISO 10993-10: 2006. USA: Information Handling Services, 2006.

[19] Venkatesan J, Kim SK. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering-a review[J]. J Biomed Nanotechnol, 2014, 10(10): 3124-3140.

[20] 熊建文，肖 化，张镇西. MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较[J]. 激光生物学报，2007, 16(5): 559-562.

[21] 张 伟，梁智辉. Annexin V-FITC/PI 双标记与 Hoechst33342/PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡的比较[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2014, 30(11): 1209-1212.

[22] 高 燕，林莉萍，丁 健. 细胞周期调控的研究进展[J]. 生命科学，2005, 17(4): 318-322.

[23] Nuss KM, Von Rechenberg B. Biocompatibility issues with modern implants in bone--a review for clinical orthopedics[J]. Open Orthop J, 2008, 2(1): 66-78.

（责任编辑：张辉洁）