·研究原著·

骨髓间充质干细胞-海螵蛸复合支架的细胞毒性评估

彭　雅[1]，覃　裕[1]，易洪城[2]，顾春松[2]，李丽莉[1]([1]贵州省骨科医院骨内二科，贵州省贵阳市　550002；[2]贵阳中医学院第二附属医院骨二科，贵州省贵阳市　550002)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2102　**ORCID:** 0000-0002-0003-6228(彭雅)

彭雅，女，1986年生，江西省萍乡市人，汉族，2014年贵阳中医学院毕业，硕士，主治医师，主要从事中医骨伤学研究。

文献标识码:A
投稿日期：2019-08-23
送审日期：2019-08-26
采用日期：2019-10-09
在线日期：2020-04-07

文章快速阅读：

文章特点—
(1)以中药海螵蛸支架为载体，骨髓间充质干细胞为种子细胞，构建骨髓间充质干细胞-海螵蛸复合生物支架；
(2)参照《医疗器械生物学评价标准》，对骨髓间充质干细胞-海螵蛸复合生物支架进行细胞毒性测评，为其进一步临床治疗骨缺损打下实验基础。

L-929 细胞

实验组：骨髓间充质干细胞-海螵蛸生物复合支架材料浸提液培养。
阴性对照组：新鲜 DMEM 培养液培养。
阳性对照组：含苯酚的 DMEM 培养液培养

体外细胞毒性：
(1)培养 24，48，72 h，采用 MTT 法检测 L-929 细胞吸光度值，计算各组细胞的相对增殖率；
(2)评估复合支架毒性等级。

文题释义：
骨髓间充质干细胞复合海螵蛸支架：以中药海螵蛸为载体支架，骨髓间充质干细胞为种子细胞，二者共同培养构建复合生物支架，经过各项生物安全性测评后应用于骨缺损的治疗。制作过程为：选用第 3 代骨髓间充质干细胞，经 0.25%胰酶消化制成细胞悬液，将细胞浓度调整为 5×10^8 L^{-1}，用移液枪将骨髓间充质干细胞悬液缓慢逐滴滴加于 24 孔板中的海螵蛸上，200 μL/孔，分 2 次缓慢接种，尽量不使细胞从材料上溢出，置于培养箱中培养 4 h，待细胞充分黏附于海螵蛸支架材料后，缓慢逐滴加入培养液 700 μL，将支架与细胞复合培养 8 d，两三天换液 1 次。
细胞毒性评估：是采用受试物与细胞共同培养的方法，对样品进行毒理学风险评估。生物材料应用于体内后，可能与体内细胞的细胞膜、细胞器、蛋白质合成、DNA 合成等相互作用，产生细胞毒性。根据 ISO10993-5 标准，在复合支架应用于临床治疗前，需通过复合材料浸提液试验以测定其对细胞活性、功能、遗传的影响。

摘要
背景：作为骨组织工程的修复材料，应具有良好的生物相容性及降解吸收性，许多学者在此方面也做了较深入的研究，但中药复合细胞生物支架的研究较少。
目的：参照《医疗器械生物学评价标准》，对兔骨髓间充质干细胞-海螵蛸生物复合支架进行体外细胞毒性检测，评估复合支架的毒性等级，为临床应用生物支架提供实验依据。
方法：依照 ISO 标准按“材料面积：浸提介质体积=3-6 cm^2：1 mL”制作骨髓间充质干细胞-海螵蛸生物复合支架材料浸提液。制备 L-929 细胞悬液，将细胞浓度调整至 1×10^7 L^{-1}进行接种培养，设置阳性对照组(含苯酚的 DMEM 培养液)、实验组(材料浸提液)、阴性对照组(新鲜 DMEM 培养液)。培养 24，48，72 h 采用 MTT 法检测 L-929 细胞吸光度值，计算各组细胞的相对增殖率，评估复合支架毒性等级。
结果与结论：实验组、阴性对照组、阳性对照组吸光度值在不同时间点不完全相同($P=0.000 < 0.01$)，各时间点内比较，实验组与阴性对照组吸光度值均明显高于阳性对照组($P < 0.01$)；兔骨髓间充质干细胞-海螵蛸生物支架细胞毒性为 1 级。结果说明兔骨髓间充质干细胞-海螵蛸生物支架无明显毒性作用，符合生物材料应用要求。

关键词：
海螵蛸；兔骨髓间充质干细胞；复合支架；细胞毒性；生物复合支架
中图分类号：R459.9；R394.2；R318
基金资助：
贵阳市科技局 2013 社会发展与民生科技计划(筑科合同[2013103]40 号)，项目负责人：易洪城；贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教育 KY 发 920120040 号)，项目负责人：易洪城

Peng Ya, Master, Attending physician, Second Department of Osteopathy, Guizhou Orthopedics Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Cytotoxicity assessment of bone marrow mesenchymal stem cells-cuttlebone composite scaffold

Peng Ya[1], Qin Yu[1], Yi Hongcheng[2], Gu Chunsong[2], Li Lili[1] ([1]Second Department of Osteopathy, Guizhou Orthopedics Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China; [2]Second Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, Guizhou Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Repair materials for bone tissue engineering should hold good biocompatibility and degradability. There are various related studies, but the Chinese medicine composite cellular bioscaffolds are little reported.

OBJECTIVE: To detect the *in vitro* cytotoxicity of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells-cuttlebone bioscaffold based on the *Biological Evaluation of Medical Device*, and assess its cytotoxicity level in order to provide the theoretical support for its clinical application.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells-cuttlebone bioscaffold extract was prepared according to an ISO standard — material area: extraction medium volume = 3–6 cm^2:1 mL. L-929 cell suspension was prepared, and the cells were then cultured with a density of 1×10^7/L. There were three groups: positive group (DMEM medium containing phenol), experimental group (material extract), and negative group (DMEM culture medium). The absorbance value of L-929 cells was detected by MTT assay after 24, 48 and 72 hours of culture. The relative proliferation rate of cells was then calculated and the toxicity level was valued in each group.

RESULTS AND CONCLUSION: The absorbance values in the experimental, negative and positive groups were not exactly same at different time points (P=0.000 < 0.01). The absorbance values in the experimental and negative groups were significantly higher than those in the positive group (P < 0.01).The cytotoxicity of bone marrow mesenchymal stem cells-cuttlebone bioscaffold was grade 1. To conclude, the bone marrow mesenchymal stem cells-cuttlebone bioscaffold has no obvious toxic effects, and meets the requirements of biomaterial application.

Key words: cuttlebone; rabbit bone marrow mesenchymal stem cells; composite scaffold; cytotoxicity; composite bioscaffold

Funding: the Social Development and Livelihood Program of Guiyang Science and Technology Bureau in 2013, No. {2013103}40 (to YHC); the Nature Science Research Project of Guizhou Provincial Education Department, No. KY920120040 (to YHC)

0　引言　Introduction

随着生物科技的发展，骨组织工程为骨缺损治疗提供了新的可能性[1]，它结合了工程学、细胞学、组织生物学，通过培养构建复合支架，替代、修复组织的缺损部位，开辟了骨缺损修复的新思路[2-3]。

20世纪80年代，国际标准化组织(ISO)、国际牙科联合会(FDI)和美国食品与药品监督管理局(FDA)联合制定了组织工程支架的生物学安全性评估标准，随后结合上述标准，英国、加拿大、日本、中国根据各国国情，制定了相应的生物学评价方案实施标准。1997年，中国国家标准总局发布了《医疗器械生物学评价标准》[4]，提出了生物组织工程支架材料生物相容性评价的具体评定方法，从细胞学、组织学和整体动物学3个方面对支架材料进行评估，其中细胞毒性实验是评估生物相容性的重要体外实验，国内也对其进行了较多的研究[5-7]。

2005年，作者所在研究小组成员对兔自体骨髓、海螵蛸和玻璃酸钠联合修复兔桡骨缺损进行了基础研究[8-9]，结果表明，3者结合能有效促进兔桡骨缺损修复。但是，在临床应用复合支架之前，需要进行生物安全性测试及风险评估。此次实验在原有实验的基础上，参照《医疗器械生物学评价标准》探讨细胞/中药支架复合材料的细胞毒性[4]，为临床植入生物复合支架提供实验依据。

1　材料和方法　Materials and methods

1.1　*设计*　细胞材料学体外实验。

1.2　*时间及地点*　实验于2012年3月至2013年6月在贵阳中医学院中心实验室完成。

1.3　*材料*　骨髓间充质干细胞复合海螵蛸支架(课题组前期制备)[10]，见**图1**；L-929细胞(贵阳中医学院基础实验中心)；DMEM培养液(Hyclone公司)；胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(Gibco公司)；CO_2培养箱(美国 AHELDON公司)；苯酚(上海国药集团)；四甲基偶氮唑盐(天津Solarbio公司)；二甲基亚砜(天津Solarbio公司)；自动酶标检测仪器(美国BIOTEK公司)。

图1　骨髓间充质干细胞-海螵蛸复合支架
Figure1　Bone marrow mesenchymal stem cells-cuttlebone scaffold

1.4　*方法*

1.4.1　复合支架材料浸提液制备[11-12]　在超净工作台上，将复合支架放入无菌广口玻璃杯，依照ISO标准“材料面积：浸提介质体积=3–6 cm^2：1 mL”，加入适量的浸提介质(DMEM培养液)，置于培养箱浸提(72±2) h，获得用于细胞毒性测试的材料浸提液。该浸提液需在24 h内进行检测。

1.4.2　L-929细胞培养　取L-929细胞株培养传代48–72 h，并将细胞调整至旺盛的生长阶段。

1.4.3　实验分组　L-929细胞铺满培养瓶底单层融合达80%–90%，给予0.25%胰酶消化，制备L-929细胞悬液，并将细胞浓度调节至1×10^7 L^{-1}，接种于96孔塑料细胞培养板(100 μL/孔)，共接种3板。在每个培养板上设置3组：阳

性对照组(含苯酚DMEM培养液组)、实验组(材料浸提液组)、阴性对照组(DMEM培养液组)，每组设置12个复孔。

1.4.4 细胞毒性检测方法[13-15] 将3块培养板同时置于37 ℃、体积分数为5%CO_2培养箱，24 h后可见L-929细胞贴壁，弃去原培养基并用PBS清洗2遍，分组滴入培养液：实验组滴入材料浸提液，阴性对照组滴入新鲜DMEM培养液，阳性对照组滴入含苯酚的DMEM培养液(苯酚质量浓度64 g/L)，每孔200 μL，将培养板放回培养箱，依次于培养24，48，72 h进行检测。检测方法：取出相应培养板，吸弃各孔培养基，滴入5%MTT液(20 μL/孔)，置于培养箱培养4 h，吸出孔内液体，滴加二甲基亚砜，每孔150 μL，将培养板置于数显水浴恒温振荡器上振荡10−15 min，然后置于自动酶标仪检测490 nm波长处各孔吸光度(*A*)值，计算各组细胞相对增殖率(RGR)，公式如下：细胞相对增殖率=(实验组*A*值/阴性对照组*A*值)×100%。依据6级毒性评级标准作毒性级别评定[16]，见**表1**。

表1 细胞相对增殖率及毒性分级[21]

Table 1 Cell relative proliferation rate and toxicity grading

细胞相对增殖率(%)	细胞毒性分级	结果评定
≥100	0	合格
75−99	1	合格
50−74	2	进一步综合评估
25−49	3	不合格
1−24	4	不合格
0	5	不合格

1.5 主要观察指标 ①各组L-929细胞相对增殖率；②各组细胞毒性评级；③细胞毒性分级结果是否符合《医疗器械生物学评价标准》。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件进行统计学处理。数据用$\bar{x}\pm s$表示。同一观察指标在不同时间点上进行多次测量的比较采用多组重复测量设计资料方差分析，对于完全随机两组间比较用独立样本*t* 检验，不满足正态分布数据采用非参数检验，$P < 0.05$为差异有显著性意义。

2 结果 Results

细胞毒性实验结果见**表2**，**图2**。实验组、阴性对照组、阳性对照组在不同时间点吸光度值不完全相同($P=0.000 < 0.01$)，各时间点内比较，实验组和阴性对照组的吸光度值显著高于阳性对照组($P < 0.01$)；兔骨髓间充质干细胞−海螵蛸生物支架细胞毒性检测为1级，对细胞生长无明显毒性作用，符合生物材料应用要求。

3 讨论 Discussion

课题组将祖国传统中医药与前沿骨组织工程学相结合，寻求细胞/中药支架复合材料构建的可行性，课题组对兔骨髓间充质干细胞−海螵蛸复合支架材料做过系列研究[10，17]，检测出海螵蛸孔隙率>80%，孔径>100 μm有利

表2 兔骨髓间充质干细胞−海螵蛸复合支架细胞毒性实验结果 ($\bar{x}\pm s$，*n*=12)

Table 2 Cytotoxicity test results of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells-cuttlebone composite scaffold

时间点	组别	吸光度值	细胞相对增殖率(%)	毒性评级	结果评定
24 h	实验组	0.338±0.027[a]	91.85	1	合格
	阴性对照组	0.368±0.018[a]	100	0	合格
	阳性对照组	0.245±0.014	66.58	2	进一步综合评估
48 h	实验组	0.345±0.012[a]	91.03	1	合格
	阴性对照组	0.379±0.024[a]	100	0	合格
	阳性对照组	0.125±0.015	32.98	3	不合格
72 h	实验组	0.393±0.014[a]	96.09	1	合格
	阴性对照组	0.409±0.020[a]	100	0	合格
	阳性对照组	0.166±0.021	40.59	3	不合格

表注：各时间点内，与阳性对照组比较，[a]$P=0.000 < 0.01$

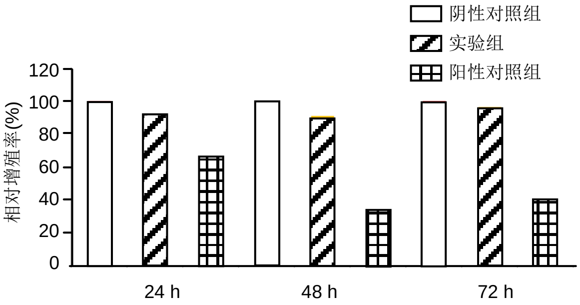

图2 不同时间点各组细胞相对增殖率

Figure 2 Relative proliferation rate of the cells in each group at different phases

于血管、营养物质的渗入及新生骨组织的形成，且其内部所含的甲壳素成分有利于材料本身的降解吸收。传统海洋类中药海螵蛸具有收敛止血、收湿敛疮、制酸止痛的作用[18]，归于肝肾二经，肾精充沛主骨生髓，对骨修复有促进作用。虽然目前国内对复合支架有较多的研究[19-21]，但以中药为载体的应用甚少，因此从海螵蛸自身的药用价值、物理特性及化学成分等方面看，选其作为支架材料具有较高的研究价值，且有别于以往的实验研究。

生物材料植入体内后可能与体内细胞的细胞膜、细胞器、蛋白质合成、DNA合成等相互作用，产生细胞毒性，根据ISO10993-5标准，应用于人体的天然或合成材料应在临床使用前进行生物学测试，对于长期植入体内的材料，植入物必须对人体无细胞毒性[22]。生物组织工程材料的生物学评价分为两大类[22]：体内实验和体外实验。细胞毒性实验选自《医疗器械生物学评价标准》的体外实验部分，它采用测试物与细胞共同培养的方法，通过复合材料浸提液实验以测定其对细胞活性、功能、遗传的影响，对样品进行毒理学风险评估。该实验通过体外模拟生物体内细胞生长环境，将L-929细胞与材料浸提液共同培养，在不同时间点用细胞生长抑制法(MTT比色法)观察支架浸提液对细胞增殖的影响，根据细胞增殖率进行毒性分级。L-929细胞系为细胞毒性实验国家标准推荐使用细胞系[23]，其细胞形

态较均一，生长状态较稳定。此项实验比较简便、经济地预测受试物应用于机体后将可能发生的细胞生长抑制、功能改变、溶解凋亡等毒性反应。

MTT比色法结果显示：复合支架材料浸提液培养的细胞在3个时间点的细胞相对增殖率均超过90%，明显高于阳性对照组。根据各组吸光度值可看出实验组和阴性对照组在不同时间点的细胞增殖情况均明显优于阳性对照组($P=0.000 < 0.05$)。根据各组细胞的相对增殖率计算毒性分级，结果显示兔骨髓间充质干细胞-海螵蛸复合支架浸提液细胞毒性为1级，在生物材料应用要求合格级别内。

结论：兔骨髓间充质干细胞-海螵蛸复合支架材料无明显细胞毒性，符合生物材料临床应用要求，可考虑作为骨组织工程生物替代材料应用于骨缺损的修复治疗。

作者贡献：实验设计为易洪城、彭雅，实验实施为易洪城、彭雅、顾春松，实验评估为易洪城、彭雅，资料收集为覃裕、李丽莉。

经费支持：该文章接受了“贵阳市科技局 2013 社会发展与民生科技计划[筑科合同{2013103}40 号]”“贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教育 KY 发 920120040 号)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：该研究的实施符合贵州省骨科医院的相关伦理要求。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过贵州中医药大学生物统计学专家审核。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] BRAN GM, STERN-STRAETER J, HÖRMANN K, et al. Apoptosis in bone for tissue engineering. Arch Med Res. 2008;39(5):467-482.

[2] 张迪峰,余霄,庞清江.骨组织工程支架及骨修补材料:复合型骨移植材料的前景更好[J].中国组织工程研究, 2018,22(26): 4253-4258.

[3] 金成哲.自体骨髓间充质干细胞外基质支架在软骨组织工程中的应用[J].中国组织工程研究,2015,19(48):7864-7866.

[4] 由少华.解读GB/T16886《医疗器械生物学评价》系列标准[J].中国医疗器械信息,2005,11(1):15-19.

[5] 梁妍,殷君,王永兰,等.聚乳酸-壳聚糖-明胶梯度孔径支架的细胞毒性研究[J].天津医科大学学报,2010,16(4):594-597.

[6] 郭宏磊,孙静雅,蔡梁婧,等.壳聚糖/明胶/卡拉胶支架材料的细胞毒性检测研究[J].武警后勤学院学报医学版, 2014,23(9): 725-728.

[7] 曹纬,吕海,周初松.脱细胞兔髓核支架的形态学及体外细胞毒性研究[J].实用医学杂志,2014,30(7):1041-1044.

[8] 易洪城,唐良华,张雪鹏.自体骨髓移植、海螵蛸与玻璃酸钠联合治疗骨缺损的试验研究[J].中国中西医结合杂志, 2011,31(8): 1122-1126.

[9] 张雪鹏.经皮自体骨髓移植、海螵蛸与玻璃酸钠联合治疗骨缺损的动物实验研究[D].贵阳:贵阳中医学院,2006.

[10] 彭雅,覃裕,顾春松,等.骨髓间充质干细胞复合海螵蛸支架的部分生物学安全性评估[J].中国生物医学工程,2016,35(5):555-561.

[11] ISO 10993-Biological evaluation of medical devices -Part 11: Tests for systemic toxicity[S].北京:中国标准出版社,2006.

[12] GB/T16886.11-1997.医疗器械生物学评价-第11部分:全身毒性试验[S].中华人民共和国国家标准,1997.

[13] 裴国献,魏宽海,金丹.组织工程学试验技术[M].北京:人民军医出版社,2006:176.

[14] 孟磊,甄平,梁晓燕.3D打印多孔：β-磷酸三钙负载聚乳酸羟基乙酸共聚物抗结核药物缓释微球复合材料:构建及细胞毒性评价[J].中国组织工程研究,2016,20(25):3705-3755.

[15] 张文元,杨亚冬,房国坚.壳聚糖-丝素支架材料的细胞毒性检测[J].中国卫生检验杂志,2010,20(10):2395-2397.

[16] 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.

[17] 彭雅,顾春松,易洪城.全骨髓贴壁培养兔骨髓间充质干细胞的初步研究[J].黔南民族医专学报,2013,26(3):157-161.

[18] 黄兆胜.中药学[M].北京:人民卫生出版社,2002:493-494.

[19] 屈华伟,韩振宇,卓越.骨组织工程多孔生物支架设计研究进展[J].机械工程学报,2019,55(15):71-80.

[20] 刘雷,韦庆军,肖仕辉.骨组织工程支架材料的选择及其细胞相容性[J].广东医学,2014,35(1):147-149.

[21] 刘晓南,李刚,何敏,等.生物材料与组织工程支架研究进展[J].工程塑料应用,2018,46(7):133-137.

[22] 裴国献,魏宽海,金丹.组织工程学常用的生物材料[D]//组织工程学实验技术[M].北京:人民军医出版社,2006:19-153,173-185.

[23] GB/T 16886-5.医疗器械生物学评价.第5部分：体外细胞毒性试验[S].中华人民共和国国家标准,2003.