

# 新型纳米拓扑结构的生物相容性\*\*\*◆

刘继春<sup>1</sup>, 许鹏<sup>1</sup>, 余将明<sup>1</sup>, 浦东林<sup>2</sup>, 叶晓健<sup>1</sup>

## Biocompatibility of new nanotopography

Liu Ji-chun<sup>1</sup>, Xu Peng<sup>1</sup>, Yu Jiang-ming<sup>1</sup>, Pu Dong-lin<sup>2</sup>, Ye Xiao-jian<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** There are many studies about biological effect of nanotopography, but the research of safety evaluation of nanotopography has not been reported.

**OBJECTIVE:** To evaluate the biocompatibility of new nanotopography.

**METHODS:** The experiments of systemic toxicity, irritation and sensitization, and acute hemolysis of nanotopography were performed in Kunming mice, New Zealand rabbits and human according to "GB/T\_16886". The morphology and proliferation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells cultured on nanotopography were observed.

**RESULTS AND CONCLUSION:** All test animals were alive. Acute toxicity: there was no significant difference in weight before and after experiment. Tests for irritation and sensitization: there were no erythema or fester on surfaces of test animals, and the difference between the experimental group and control group was significant. Acute hemolysis: hemolytic reaction could not be observed in the experimental group, and hemolytic rate was less than 5% according to absorbance. Well cell morphology and adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells cultured on nanotopography were observed by experiments *in vitro*, and cell proliferation at 1 day was increased compared with that at 3 days. All the results suggested that nanotopography is no-biotoxicity and has a good biocompatibility. Therefore, it can be used as orthopedic substitute implant in clinic. However, its long-term effect of biotoxicity needs to be evaluated.

Liu JC, Xu P, Yu JM, Pu DL, Ye XJ. Biocompatibility of new nanotopography. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(3):467-470. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 国内外对纳米拓扑结构生物效应的探讨比较多, 而缺乏对纳米拓扑结构的安全性评估。

**目的:** 评价新型纳米拓扑结构的生物相容性。

**方法:** 依据 GB/T\_16886 中相关规定, 采用纳米拓扑结构材料对昆明小鼠、新西兰大白兔、人行全身毒性试验、刺激与致敏试验及急性溶血试验。分离培养兔骨髓间充质干细胞复合培养于纳米拓扑结构, 观察细胞的形态及增殖情况。

**结果与结论:** 全身毒性试验结果显示, 所有试验动物均无死亡, 试验前后体质量无明显差异; 刺激与致敏试验中, 所有试验动物局部皮肤均无红斑、溃烂等反应, 阳性对照组与试验组之间差异有显著性意义; 急性溶血试验结果显示, 试验组无明显溶血反应, 吸光度计检测吸光度, 溶血率符合小于 5% 的标准。体外细胞试验结果显示, 骨髓间充质干细胞在此纳米坑上表现出良好的黏附、细胞形态, 并且复合培养 3 d 较 1 d 细胞增殖明显。提示此纳米坑结构无生物学毒性, 具有良好的生物相容性, 可以作为骨科替代植入物用于临床, 但长期生物相容性仍需要全面的评测。

**关键词:** 纳米拓扑结构; 纳米生物材料; 生物相容性; 急性毒性试验; 刺激与致敏试验; 急性溶血试验; 体外细胞试验  
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.03.019

刘继春, 许鹏, 余将明, 浦东林, 叶晓健. 新型纳米拓扑结构的生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(3):467-470. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

<sup>1</sup>Shanghai Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200043, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Advanced Optical Manufacturing Technology, Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

Liu Ji-chun★, Master, Shanghai Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200043, China 3-9-8-1@163.com

Correspondence to: Ye Xiao-jian, Professor, Doctoral supervisor, Shanghai Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200043, China yexj2002@163.com

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81071477\*; Major State Basic Research Development Program, No. 2009CB930000\*

Received: 2011-07-01 Accepted: 2011-09-19

## 0 引言

随着纳米科学、技术和商业价值的不断被发掘, “纳米”已经和人们的生活息息相关, 尤其在医药方面应用正以更快的速度发展<sup>[1-3]</sup>, 同时纳米材料的潜在毒性逐渐引起人们的关注并成为阻碍纳米材料广泛应用的主要问题<sup>[4-7]</sup>。检测纳米材料生物安全性方法一般分为体内和体外试验, 国内外一般是根据《医疗器械生物学评价》和医疗行业的相关标准和要求进行<sup>[8-9]</sup>。体外细胞和纳米材料共培养的时候, 一旦纳米材料释放毒性物质, 细胞形态及黏附、增殖等行为会立即发生变化, 可以作为观察材料毒性的直接证据<sup>[10-12]</sup>。

作者根据相关标准对利用紫外干涉光刻技术制作的聚碳酸酯材质的纳米坑结构进行了急性毒性试验、刺激与致敏试验和急性溶血试验<sup>[8-9, 13-14]</sup>。并将纳米坑结构和兔骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 复合培养, 利用倒置相差显微镜观察细胞形态和增殖情况。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机分组设计, 对比观察试验。

**时间及地点:** 于 2011-05-11 在解放军第二军医大学生物医学工程研究所完成。

**材料:** 4 周龄昆明小鼠, 雌雄各半, 体质量 20~25 g; 3 月龄新西兰大白兔, 雌雄各半,

<sup>1</sup> 解放军第二军医大学长征医院, 上海市 200043;  
<sup>2</sup> 苏州大学先进光学制造技术重点实验室, 江苏省苏州市 215000

刘继春★, 男, 1983年生, 安徽省淮北市人, 汉族, 硕士, 现在解放军第184医院骨科工作, 主要从事脊柱外科方面研究。  
3-9-8-1@163.com

通讯作者: 叶晓健, 教授, 博士生导师, 副院长, 解放军第二军医大学长征医院, 上海市 200043  
yexj2002@163.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2012)03-00467-04

收稿日期: 2011-07-01  
修回日期: 2011-09-19  
(20110523006/G·L)

体质量 1.8~2.2 kg, 均由解放军第二军医大学动物中心(SCXK 沪 2007-0003)提供, 试验中关于动物的操作严格按照《关于善待动物的指导性意见》执行<sup>[15]</sup>。

**纳米拓扑结构:** 江苏省先进光学制作技术重点实验室提供。

**主要试剂及仪器:**

主要试剂及仪器	来源
原子力学显微镜(AFM)	VEECO Multimode & Dimension3100 & NanoScope3D Controller
754 型紫外可见分光光度计	上海菁华科技有限公司
TD5Z 台式低速离心机	湖南凯达科学仪器有限公司
SA-300VF 型高温高压消毒锅	STURDY industrial co.LTD
CKX41 型倒置相差显微镜	OLYMPUS
HF90 型 CO <sub>2</sub> 培养箱	Smart cell
SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台	苏州市苏纬净化设备有限公司
胎牛血清、Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)	GIBCO
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen

**试验方法:**

**纳米拓扑结构的表征:** 原子力学显微镜作为生物学中新兴的研究手段, 具有样品处理简便、损伤少等优点, 由于本次试验中样品的稀缺, 使得原子力学显微镜成为样品表征的首选<sup>[16]</sup>。

**细胞培养:** 麻醉 3 月龄健康新西兰大白兔后, 髂棘穿刺骨髓 3 mL, 1 000 U 肝素钠抗凝。DMEM+体积分数 10%FBS+1%双抗 10 mL 培养, 3 d 后首次换液 10 mL, 以后每隔 2 d 换液 5 mL, 10~14 d 细胞集落长出, 混匀继续培养, 待细胞 80%融合后传代<sup>[17]</sup>。

**浸提液的制备:** 按照 GB/T\_16886.12 中的规定, 使用氯化钠溶液作为浸提液, 采用样品面积与浸提液体积之比为 3 cm<sup>2</sup>/mL 的标准<sup>[18]</sup>, 在 37 °C 下浸泡 3 d, 高温高压消毒。

**急性毒性试验:** 选取昆明小鼠 20 只, 体质量 20~25 g, 按随机数字表法分组, 试验组按 50 mL/kg 的剂量腹腔内注射浸提液, 对照组按相同剂量腹腔内注射生理盐水, 分别于术后 1, 24, 48, 72 h 观察小鼠的基本生命体征、活动度, 并于术后 24, 48, 72 h 称其体质量, 分析数据<sup>[19]</sup>。

**刺激与致敏试验:** 选取健康初成年的大白兔 10 只, 体质量 2.0~2.5 kg, 试验前去除试验动

物背部脊柱两侧 10 cm×15 cm 区域的被毛, 取 0.5 mL 浸提液滴于 2.5 cm×2.5 cm 大小的吸收性纱布上, 纱布均匀敷于被毛空白区域, 半封闭性绷带固定 4 h, 接触期结束, 去除纱布, 温开水去除残留浸提液, 并标记。分别于 1, 24, 48, 72 h 观察皮肤反应, 参照 GB\_T\_16886.10-2005\_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中的评估标准进行评价<sup>[20]</sup>。

**皮肤反应记分系统:**

反应	原发性刺激记分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
极轻微红斑(勉强可见)	1
清晰红斑	2
中度红斑	3
重度红斑(紫红色)至焦痂形成	4
水肿形成	
无水肿	0
极轻微水肿(勉强可见)	1
清晰水肿(肿起, 不超出区域边缘)	2
中度水肿(肿起约 1 mm)	3
重度水肿(肿起超过 1 mm, 并超出接触区)	4
刺激最高记分	8

注: 记录并报告皮肤部位的其他异常情况

**兔刺激反应类型:**

平均记分	反应类型
0~0.4	极轻微
0.5~1.9	轻度
2~4.9	中度
5~8	重度

**急性溶血试验:** 将 2 000 U 肝素钠加入 10 mL 新鲜健康成人鲜血中制成抗凝人血。取 4 mL 抗凝人血加入 5 mL 生理盐水中, 再将 2.5 mL 生理盐水加入稀释抗凝人血中, 0.1 mL 稀释抗凝人血加入 5 mL 蒸馏水中并在分光光度计在 545 nm 处测的吸光度为 0.803, 符合吸光度在 0.8±0.3 的范围内。将样品浸泡于 5 mL 生理盐水制备浸提液为试验组, 设生理盐水为阴性对照, 蒸馏水为阳性对照, 各组均为 3 个试管, 另设底色组 1 个试管。置于 37 °C 水浴箱中保温 30 min。各试管(除底色组外)分别加入 0.1 mL 稀释抗凝血, 轻轻混匀, 37 °C 水浴箱中保温 60 min。所有试管在 3 000 r/min 离心 5 min, 取各试管上清液, 分别在 545 nm 处测吸光度, 同组 3 个试管平均值为该组吸光度(A)值。

$$Z = \frac{A_t - A_{nc}}{A_{pc} - A_{nc}} \times 100\%$$

注: Z 为溶血率,  $A_t$  为试验组的 A 值,  $A_{pc}$  为阳性对照组的 A 值,  $A_{nc}$  为阴性对照组的 A 值。

**体外细胞试验:** 使用第 3 代兔 BMSCs 按照 5 000~10 000 个/cm<sup>2</sup> 的细胞浓度接种到纳米坑结构上, 37 ℃、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 孵育 4 h 候待细胞贴壁后分别于 1, 3 d 利用倒置相差显微镜观察细胞形态和增殖情况。

**主要观察指标:** 急性全身毒性试验、刺激与致敏试验、急性溶血试验、体外细胞试验结果。

**统计学分析:** 由第一作者完成统计学处理, 分析软件为 SPSS V16.0, 计量资料比较采用 t 检验, 计数资料比较采用方差分析。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 急性毒性试验纳入实验动物 20 只, 分为 2 组, 全部进入结果分析, 无脱失。刺激与致敏试验纳入实验动物 10 只, 全部进入结果分析, 无脱失。

**2.2 纳米拓扑结构的表征** 原子力学显微镜证实样品为周期 200 nm、深度 200 nm、规则有序的纳米坑结构, 见图 1。

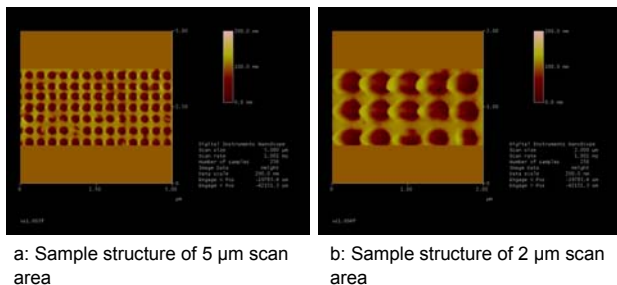


Figure 1 Microstructure of nanotopography under atomic mechanics microscope  
图 1 原子力学显微镜下样品微观结构

**2.3 急性毒性试验结果** 观察过程中, 所有试验动物无死亡, 无烦躁, 活动度正常, 体质量无明显下降。试验前后对体质量均值行 t 检验, 差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 与阴性对照组差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

Group	Before experiment	24 h after experiment	48 h after experiment	72 h after experiment
Experimental	22.99	23.04	23.13	23.2
Control	23.06	22.87	23.42	23.4

**2.4 刺激与致敏试验结果** 试验所有动物接触期内敷贴牢固、未脱落, 观察期内动物活动度好, 皮肤均未出现红斑、焦痂、水肿反应, 平均记分 < 0.4, 符合极轻微反应类型。说明此种纳米拓扑结构无皮肤致敏作用<sup>[19]</sup>。

**2.5 急性溶血试验结果** 试验组、阴性对照组上清液清亮, 无明显溶血反应, 阳性对照组上清液混浊、呈红色, 出现明显溶血反应, 见图 2。

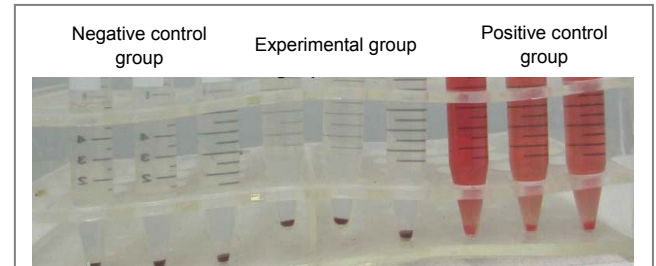


Figure 2 General observation of each group after hemolytic test  
图 2 溶血试验后各组大体对照

使用 754 型紫外可见分光光度计测上清液吸光度并计算得出试验组溶血率 0.21%, 符合小于 5% 的标准, 见表 2。试验组和阳性对照组差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 说明此种纳米坑结构无溶血反应。

表 2 各组吸光度值和溶血率比较  
Table 2 Comparison of absorbance (A) and hemolytic rate (n=3)

Group	A value			Mean (x±s)	Hemolytic rate (%)
	Test tube 1	Test tube 2	Test tube 3		
Leaching liquor		0.001		/	/
Sample	0.028	0.033	0.029	0.030±0.002 6	0.21
Negative control	0.029	0.032	0.027	0.029±0.002 5	0
Positive control	0.697	0.410	0.432	0.513±0.159 7	100

**2.6 组织学观察结果** 兔 BMSCs 在接种 4 h 时良好贴壁。观察周期内可见细胞形态好、呈倾向性生长; 孵育 3 d 后较孵育 1 d 细胞浓度明显增加, 说明兔 BMSCs 在纳米坑结构上增殖明显, 见图 3。

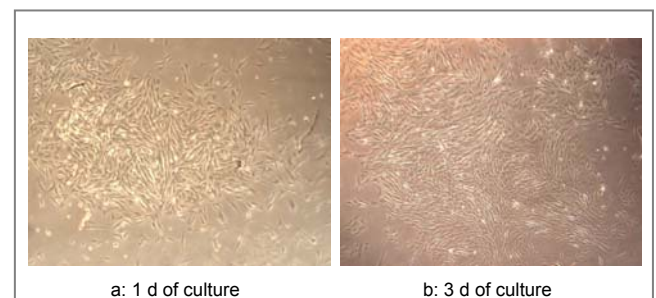


Figure 3 Morphology and proliferation of cells under inverted phase contrast microscope (×40)  
图 3 倒置显微镜下细胞形态和增殖情况(×40)



### 3 讨论

纳米材料因其良好的生物相容性,对成骨细胞、骨髓间充质干细胞黏附、增殖、分化的影响而成为现今研究的热点<sup>[21-24]</sup>,其中纳米材料的生物学毒性更值得关注<sup>[25]</sup>。当前对于纳米材料的毒性评价的研究远远落后于纳米材料的构建、应用,现行评价纳米毒性的方法多把材料化学毒性作为考量的重要因素,而纳米材料与众不同的物理化学性质对现有的评价方法和标准提出了挑战,为了应对这种情况,一些新的检测技术正在被采用并引起了人们的广泛讨论<sup>[26-28]</sup>,但如何在复杂的生物系统中直接观测和评价纳米材料的毒性仍缺乏合适的手段<sup>[29]</sup>。正因为如此,在应用某种纳米材料之前必须认真对待,选择多种考量方法,仔细评价。

在本课题中,纳米坑结构基底材料为聚碳酸酯,其在电子、建材、航天、生物学医学及信息领域中已经获得大量的应用,其低毒、低降解、稳定性好的特性已获得大量实践证实<sup>[30]</sup>。本实验中作者采用紫外干涉光刻的方法在聚碳酸酯上获得大区域纳米拓扑结构,在实验设计上针对不同种系(小鼠、兔),分别从全身、局部、器官、组织学方面,采用常用的试验方法对样品生物学毒性进行检测,初步证实此种纳米拓扑结构无生物学毒性,可以应用于下一步的研究及临床应用,为此种纳米坑结构在下一步的应用提供了一定的理论依据。

### 4 参考文献

[1] US demand for nanotechnology medical products to approach \$53 billion in 2011 Report. nanotechwire.com; 2007 [cited 2007 March 16]; Available from: <http://nanotechwire.com/news.asp?nid=4446>.

[2] Industry Statistics. PharmaMedDevice Bulletin 2008 [cited 2008]; Available from: <http://www.pharmameddevice.com/App/homepage.cfm?appname=100485&moduleID=3162&LinkID=23294>.

[3] Vo-Dinh T. Nanotechnology in Biology and Medicine: Methods, Devices, and Applications 1 edition ed. Hoboken, NJ: CRC Press; 2007.

[4] Oberdörster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. J Intern Med. 2010; 267(1):89-105.

[5] Boverhof DR, David RM. Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation. Anal Bioanal Chem. 2010;396(3):953-61.

[6] Ray PC, Yu H, Fu PP. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2009;27(1):1-35.

[7] McNeil SE. Nanomaterial safety. Bull At Sci. 2009;65(1):56-61.

[8] 医疗器械生物学评价. 国家食品药品监督管理局. GB/T\_16886.

[9] 口腔材料生物试验方法-溶血试验, YY-T\_0127.1-93.

[10] Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, et al. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. Part Fibre Toxicol. 2010;7:22.

[11] Davoren M, Herzog E, Casey A, et al. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. Toxicol In Vitro. 2007;21(3):438-448.

[12] Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. Nano Lett. 2006;6(4):662-668.

[13] Xu T, Zhao Y, Ma J, et al. Sub-diffraction-limited interference photolithography with metamaterials. Optics Express. 2008; 16(18):13579-13584.

[14] Shishido A, Divliansky IB, Khoo I, et al. Direct fabrication of two-dimensional titania arrays using interference photolithography. Applied Physics Letters. 2001;79:3332.

[15] 关于善待实验动物的指导性意见. 中华人民共和国科学技术部, 398号2006.

[16] Horber JK, Miles MJ. Scanning probe evolution in biology. Science. 2003;302(5647):1002-1005.

[17] Lennon DP, Caplan AI. Isolation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp Hematol. 2006;34(11):1606-1607.

[18] Yang CM. Zhongguo Yike Daxue. 2009.

[18] 杨春梅. Ames试验评价聚β-羟基丁酸酯(PHB)的生物相容性[D]. 中国医科大学, 2009.

[19] Wu TX, Yang WZ, Li YD, et al. hongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(21):4025-4028.

[19] 吴亭熹, 杨为中, 李亚东, 等. 双相磷酸钙/聚乳酸复合生物材料的生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(21):4025-4028.

[20] Chen XQ, Yin QS, Zhang Y, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(16):2899-2902.

[20] 陈旭琼, 尹庆水, 张余, 等. 镁铝合金最大剂量的致敏试验[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(16):2899-2902.

[21] Li J, Dou Y, Yang J, et al. Surface characterization and biocompatibility of micro- and nano-hydroxyapatite/chitosan-gelatin network films. Mater Sci Eng C. 2009;29(4):1207-15.

[22] Hudson SP, Padera RF, Langer R, et al. The biocompatibility of mesoporous silicates. Biomaterials. 2008;29(30):4045-4055.

[23] Vlacic-Zischke J, Hamlet SM, Friis T, et al. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGF[β]/BMP signalling in osteoblasts. Biomaterials. 2011;32(3):665-671.

[24] Mendonça G, Mendonça DBS, Simões LGP, et al. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. Biomaterials. 2009;30(25):4053-4062.

[25] Bello D, Isaacs JA. Safety Assessment of Nanotechnology Products. In: Charlene AM, editor. Comprehensive Toxicology. Oxford: Elsevier; 2010: 53-63.

[26] Baer DR, Gaspar DJ, Nachimuthu P, et al. Application of surface chemical analysis tools for characterization of nanoparticles. Anal Bioanal Chem. 2010;396(3):983-1002.

[27] Doak S, Griffiths S, Manshian B, et al. Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. Mutagenesis. 2009;24(4): 285.

[28] Stone V, Johnston H, Schins RPF. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. Crit Rev Toxicol. 2009;39(7):613-626.

[29] Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. Nat Nanotechnol. 2007;2(8):469-478.

[30] Li FS. Huagong Jinzhan. 2001;21(6):4.

[30] 李复生. 聚碳酸酯应用与合成工艺进展[J]. 化工进展, 2001, 21(6):4.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 国家自然科学基金(81071477), 名称: wnt/β-catenin 信号通路在纳米拓扑结构诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化中的作用和机理研究; 973 计划课题(2009CB930000), 名称: 面向组织修复与替代的纳米生物材料的研究。

**作者贡献:** 实验设计、评估由第一作者和通讯作者完成, 实验实施由第一、二、三、四作者完成。所有作者均经过正规培训。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 无涉及伦理冲突的内容。

**本文创新性:** 万方数据库主站点使用关键词“纳米拓扑结构”、“生物相容性”及“新型纳米拓扑结构的生物相容性”查询,未发现雷同研究,拓扑结构的生物研究也多局限于微米级别,而对于纳米级别的生物相容性研究较少。文章结果显示,纳米坑结构无生物学毒性,具有良好的生物相容性,可以作为骨科替代植入物试用于临床,但长期生物相容性仍需要全面的评测。