

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.21.018 [http://www.crter.org]

段昕, 廖红兴, 邹华章, 张紫机, 张浩, 张志奇, 叶建东, 廖威明. 新型可注射可降解磷酸钙骨水泥的生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(21):3928-3936.

新型可注射可降解磷酸钙骨水泥的生物相容性*☆

段昕^{1,2}, 廖红兴¹, 邹华章³, 张紫机¹, 张浩¹, 张志奇¹, 叶建东⁴, 廖威明¹

1 中山大学附属第一医院关节外科, 广东省广州市 510080

2 广州市第一人民医院外科, 广东省广州市 510180

3 广州港湾医院骨科, 广东省广州市 510700

4 华南理工大学, 广东省广州市 510641

文章亮点:

1 国内外在组织工程的研究中, 修复骨缺损的骨替代材料是研究的热点之一, 实验根据国家 GB/T-16886/ISO-10993 标准对自制的新型可注射、可降解磷酸钙骨水泥, 进行生物学评价, 为材料的进一步应用提供实验依据。

2 实验在新型骨水泥配方中加入 10% 聚乳酸-羟基乙酸共聚物以增加骨水泥的孔隙率, 既利于细胞的黏附生长, 血管和神经的长入, 又有利于营养成分的渗入和代谢物的排出加快其降解速度。

3 新型磷酸钙骨水泥使用过程中不宜采取高温浸提方法, 所以本次实验所用浸提液除体外细胞实验外均为 37 °C 下浸提 72 h。

关键词:

生物材料; 材料生物相容性; 磷酸钙骨水泥; 可注射; 可降解; 生物相容性; 骨修复材料; 热原反应; 血液相容性; 生物安全性; 其他基金

摘要

背景: 体外实验已证实新型磷酸钙骨水泥有良好的可注射性、力学性能、抗溃散性及体外降解性能。

目的: 验证新型可注射、可降解磷酸钙骨水泥的生物相容性。

方法: ①急性毒性实验: 分别向昆明小鼠尾静脉注射新型磷酸钙骨水泥浸提液与生理盐水。②热原实验: 在新西兰兔耳缘静脉注射新型磷酸钙骨水泥浸提液。③溶血实验: 在兔抗凝血分别加入新型磷酸钙骨水泥浸提液、生理盐水及双蒸水。④迟发型超敏反应实验: 在豚鼠肩胛骨内侧部位分别注射可注射新型磷酸钙骨水泥浸提液与生理盐水, 并进行敷贴激发实验。⑤体外细胞毒性实验: 在 L929 系小鼠成纤维细胞培养液中分别加入可注射新型磷酸钙骨水泥浸提液、聚乙烯浸提液及苯酚溶液。⑥微核实验: 分别在昆明小鼠腹腔注射可注射新型磷酸钙骨水泥浸提液、生理盐水与环磷酰胺。⑦肌肉植入实验: 将新型磷酸钙骨水泥植入新西兰兔脊柱两侧肌肉内。

结果与结论: 新型可注射磷酸钙骨水泥无毒, 无刺激性及致敏性, 无热原反应, 具有良好的血液相容性, 植入动物肌肉后为非组织刺激物, 具有良好的生物相容性, 因而具有较好的生物安全性。

Biocompatibility of a novel injectable and degradable calcium phosphate cement

Duan Xin^{1,2}, Liao Hong-xing¹, Zou Hua-zhang³, Zhang Zi-ji¹, Zhang Hao¹, Zhang Zhi-qi¹, Ye Jian-dong⁴, Liao Wei-ming¹

1 Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

2 Department of General Surgery, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China

3 Department of Orthopedics, Gangwan Hospital, Guangzhou 510700, Guangdong Province, China

段昕☆, 男, 1984 年生, 河北省安国市人, 汉族, 广州市第一人民医院外科, 医师, 中山大学附属第一医院在读博士, 主要从事关节外科研究。
dlx8452@163.com

通讯作者: 廖威明, 教授, 博士生导师, 中山大学附属第一医院关节外科, 广东省广州市 510080
liaoweiming29@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)21-03928-09

收稿日期: 2012-07-14

修回日期: 2012-08-31

(20120626012/GW · W)

Duan Xin ☆, Studying for doctorate, Physician, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; Department of General Surgery, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China dx8452@163.com

Corresponding author: Liao Wei-ming, Professor, Doctoral supervisor, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China liaoweiming29@163.com

Supported by: the National Support Program during the Eleventh Five-Year Period, No. 2006BAI16B03*

Received: 2012-07-14
Accepted: 2012-08-31

4 South China University of Technology, Guangzhou 510641, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: A novel calcium phosphate bone cement has been proved to have good injectability, biomechanical properties, anti-collapsibility and in vitro degradability.

OBJECTIVE: To evaluate the biocompatibility of a novel injectable and degradable calcium phosphate cement.

METHODS: (1) In acute toxicity test, cement extracts were applied to mice by tail vein injection. (2) In pyrogen test, extracts were applied to rabbits by mainline. (3) In hemolysis test, extracts were added in the fresh anticoagulant blood of rabbits. (4) In delayed-type hypersensitivity test, two steps, induced and aroused were applied to guinea pigs. (5) In cytotoxicity test in vitro, extracts of cement, polyethylene, and phenol were added in L929 cells to evaluate cytotoxicity. (6) In mammal micronucleus test, extracts, normal saline and cyclophosphamide were applied to mice by intraperitoneal injection. (7) In muscular implantation test, muscle specimens were histologically evaluated.

RESULTS AND CONCLUSION: The cement-extracted liquid induced no acute toxicity in mice, no pyrogenic reaction in rabbits, no genetic toxicity in mice or allergic reaction in guinea pigs. This novel cement had a great biocompatibility and biological safety.

Key Words: biomaterials; material biocompatibility; calcium phosphate cement; injectable; degradable; biocompatibility; osteoinductive materials; pyrogen reaction; hematocompatibility; biological safety; other grants-supported paper

Duan X, Liao HX, Zou HZ, Zhang ZJ, Zhang H, Zhang ZQ, Ye JD, Liao WM. Biocompatibility of a novel injectable and degradable calcium phosphate cement. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(21): 3928-3936.

0 引言

目前临床上用于修复骨缺损的骨替代材料众多,各有其优缺点。新鲜自体骨是骨替代材料的“金标准”,但是供骨来源受到限制,并且增加了手术创伤^[1]。同种异体骨及异种骨虽然骨源较多,但可以引起排斥反应^[2-3]。而磷酸钙骨水泥作为一种骨替代材料具有优良的生物相容性、骨传导性特点,这与其植入体内后的主要产物羟基磷灰石结晶与机体骨矿相结构相同有关。但这也导致了一些不足之处:固化的产物羟基磷灰石降解缓慢,影响自体骨的长入^[4-6]。为解决以上问题,由华南理工大学、中山大学等单位合作开发了一种新型的可注射、可降解磷酸钙骨水泥,该材料以45%磷酸氢钙+45%部分结晶磷酸钙+10%聚乳酸-羟基乙酸共聚物为固相配方,添加碳酸钙以改善其显影效果,并采用变性淀粉改善抗溃散性。该新型磷酸钙骨水泥配方及抗溃散技术已申请发明专利。

既往体外实验已证明该新型骨水泥有良好的可注射性、力学性能、抗溃散性及体外降解性能^[7],但作为一种全新骨替代物,仍需进行生物相容性测试方可进一步行临床实验。实验针对该材料的生物相容性根据国家GB/T-16886/ISO-10993标准进行生物学评价,为材料的最终临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 随机分组设计,对比观察实验。

时间及地点: 于2011年6月在中山大学北校区动物实验中心完成。

材料:

实验动物: SPF级昆明小鼠购自中山大学实验动物中心;清洁级新西兰兔,雌雄不拘,体质量2.2~2.5 kg,购自广东省医学实验动物中心;同一远交品系普通级健康、初成年白化豚

鼠, 雌雄不拘, 购自广州中医药大学实验动物中心。

新型可注射及降解磷酸钙骨水泥生物相容性实验的试剂:

Experimental reagents:

试剂	来源
骨水泥材料的固相粉剂	华南理工大学
十二烷基硫酸钠(分析纯)	广州化学试剂厂
L929 系小鼠成纤维细胞株、 MTT 溶液、二甲基亚砜	南京凯基生物科技发展有限公司
胎牛血清	天津市灏洋生物科技发展有限公司
DMEM	上海英骏生物技术有限公司
环磷酸胺	山西普德药业

实验方法:

材料浸提液的制备: 将新型可注射可降解骨水泥材料的固相粉剂50 g与生理盐水按液固比0.5比例调和, 在糊状期制成直径6 mm, 高5 mm的圆柱形小块, 室温下固化24 h, 送华南农业大学行辐照灭菌。灭菌后按0.2 g/1 mL比例与生理盐水介质混合、密封, 置37 °C恒温箱中静置浸提72 h, 浸提过程中注意无菌操作。再小心地吸取上层浸提液移入另一无菌玻璃瓶中, 密封备用。同样方法取DMEM培养液(含体积分数10%胎牛血清), 37 °C下浸提24 h各行体外细胞毒性实验(作为阴性对照液)。

急性毒性实验: 取SPF级昆明小鼠20只, 体质量(20±3) g, 雌雄各半, 随机分为实验组和对照组, 每组10只。尾部常规消毒后, 用一次性注射器分别向实验组小鼠尾静脉内注射50 mL/kg的材料浸提液, 对照组小鼠注射50 mL/kg的生理盐水。使用注射器规格为2 mL, 精确度0.1 mL。分笼饲养, 观察注射后即刻、4 h、24 h、48 h和72 h后, 两组小鼠一般状况呼吸、进食、尿便排泄等一般状态及有无呕吐、惊厥、步态失稳、呼吸抑制等中毒表现并进行分级评估, 同时记录各组小鼠体质量变化。

注射后小鼠毒性反应情况及评估标准: ①正常无症状: 注射后小鼠未发现任何异常表现。②轻微: 注射后小鼠有轻微的活动减少, 呼吸困难或腹式呼吸等激惹症状。③中等: 注射后小鼠有明显的活动减少, 呼吸困难或腹式呼吸等激惹症状, 以及眼睑下垂、腹泻等。④显著: 注射后小鼠出现卧倒, 发绀, 震颤或严重的腹泻, 呼吸困难等。通常伴体质量显著下降, 低于15 g。⑤死亡: 注射后小鼠死亡。

热源实验: 在检查被试材料前3 d开始预测清洁级新西兰兔体温, 每隔30 min测体温1次, 共8次, 选取8次

体温均在38.0-39.6 °C内且最高与最低体温差不超过0.4 °C的作为可用于热源检查的合格动物。取合格动物3只, 材料浸提液注入前1 h及0.5 h各测体温1次。将材料浸提液以10 mL/kg自兔耳缘静脉缓缓注入, 每间隔30 min测量体温1次, 共测6次, 记录兔体温值。按《中国药典》二部(2005年版)中的评价标准, 兔体温升高值应低于0.6 °C, 且体温升高总和应小于1.4 °C。

溶血实验: 穿刺抽取健康新西兰兔心脏血10 mL, 立即加入到含有抗凝剂肝素钠的真空试管中, 混合抗凝。取抗凝兔血8 mL, 加入生理盐水10 mL, 稀释待用。取9只干净试管分为实验组、阴性对照组和阳性对照组, 每组3只。每只试管所加入试剂: 实验组加入10 mL材料浸提液, 阴性对照组加入10 mL生理盐水, 阳性对照组加入10 mL双蒸水。将全部试管放入37 °C水浴箱中预温30 min后, 分别加入稀释抗凝兔血0.2 mL, 继续37 °C水浴1 h后, 肉眼观察有无溶血。37 °C水浴1 h后, 管中溶液呈澄明红色, 管底无红细胞残留, 判断为有溶血。再将各管溶液置于干燥的离心试管中离心5 min, 800×g, 自每管取上清液测定各管在545 nm处的吸光度(美国产Synergy 2多功能酶标仪, 阳性吸光度值应为0.8±0.3, 阴性对照管吸光度应不大于0.03)并计算溶血率:

$$\text{溶血率(\%)} = \frac{\text{实验样品吸光度} - \text{阴性对照吸光度}}{\text{阳性对照吸光度} - \text{阴性对照吸光度}} \times 100\%$$

迟发型超敏反应实验: 选用普通级健康、初成年白化豚鼠20只, 实验开始时体质量为300-500 g, 随机分为实验组和对照组各10只。在豚鼠背部剪毛, 常规消毒后于肩胛骨内侧按图1所示(A, B和C), 在每只豚鼠去毛的肩胛骨内侧部位成对皮内注射0.1 mL试剂。

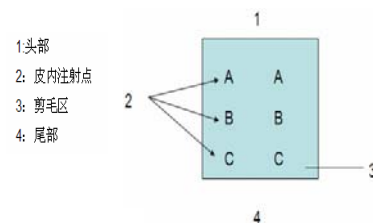


图1 豚鼠新型可注射及降解磷酸钙骨水泥迟发型超敏反应实验背部注射点

Figure 1 Injection point of the novel injectable and degradable calcium phosphate cement into the back of guinea pigs in delayed-type hypersensitivity test

新型可注射及降解磷酸钙骨水泥迟发型超敏反应实验各部位注射试剂:

Injection reagents:

部位	实验组	对照组
部位 A	弗氏完全佐剂与生理盐水体积比 1:1 比例混合的稳定性乳化剂	弗氏完全佐剂与生理盐水的稳定性乳化剂
部位 B	受试材料浸提液	生理盐水
部位 C	弗氏完全佐剂与浸提液 1:1 比例混合的稳定性乳化剂	弗氏完全佐剂与生理盐水的稳定性乳化剂

6 d后, 因实验组和阴性对照组未引起皮肤刺激, 在实验组和对照组的注射点用10%十二烷基硫酸钠进行预处理, 按摩导入皮肤。24 h后, 将处理部位擦净, 用面积约8 cm²以浸提液浸湿的敷贴片(滤纸)贴敷于实验组每只动物的肩胛内侧部位, 覆盖诱导注射点。用封闭式包扎带固定, 并于48 h后除去包扎带和滤纸片。14 d后, 在豚鼠腹部剪毛2 cm×4 cm, 消毒后, 用浸透C组试剂的敷贴片贴敷24 h。除去敷贴片后24 h和48 h观察实验组和对照组动物激发部位皮肤情况。

根据GB/T 16886.10-2005/ISO 10993-10:2002, 取Magnusson和Kligman分级标准对动物进行分级: 无明显改变为0级, 出现散发性或斑点状红斑为1级, 出现中度融合性红斑为2级, 出现重度红斑和水肿为3级。

体外细胞毒性实验^[8-10]: 采用推荐的L929系小鼠成纤维细胞株, 加入DMEM培养液中, 在37 °C、体积分数5% CO₂、100%湿度的培养箱中培养, 使其复苏、传代至敏感代, 再培养至对数生长期进行实验。将传代培养48 h生长旺盛的细胞加入胰酶消化后, 以吸管吹打均匀, 用含DMEM及含体积分数10%FBS的培养液稀释制成浓度约1×10⁸ L⁻¹的细胞悬液。将细胞悬液接种于96孔培养板(每孔接种100 μL)。置于37 °C、体积分数5%CO₂, 饱和湿度培养箱培养24 h。待细胞大部分贴壁后, 小心吸弃原培养基, 用PBS洗涤2次, 实验组加入100 μL的100%材料浸提液, 阴性对照组加入100 μL聚乙烯浸提液, 阳性对照组100 μL的0.64%苯酚溶液, 每组18个复孔。原条件下继续培养。分别于培养24, 48, 72 h后取各组6孔进行MTT实验。在各观察期弃取原培养液, 每孔加入MTT溶液20 μL, 37 °C继续孵育4 h后终止培养, 小心吸去上清液, 每孔加入100 μL二甲基亚砜振荡作用30 min, 使结晶充分溶解, 用酶标仪在570 nm波长下测定其光吸收值, 每孔测量3次, 取其平均值作为其吸光值结果。记录结果并计算细胞相对增殖率=实

验样品组吸光度/阴性对照吸光度×100%。根据细胞相对增殖率值判定实验样品的细胞毒性: ≥100%, 毒性为0级; 75%–99%, 毒性为1级; 50%–74%, 毒性为2级; 25%–49%, 毒性为3级; 1%–25%, 毒性为4级; 0, 毒性为5级。细胞相对增殖率≥75%表示无明显细胞毒性。另取3个6孔板, 将待测材料浸提液3 mL、阴性参照材料聚乙烯浸提液3 mL和阳性参照0.64%苯酚溶液3 mL, 分别置于不同的6孔板内, 各孔加入细胞浓度为1×10⁸ L⁻¹的L929细胞悬液3 mL, 置于37 °C、体积分数5%CO₂及饱和适度条件下细胞培养箱培养。通过倒置显微镜观察第1天细胞形态及生长情况并拍照, 进行细胞形态分析。

细胞形态分析标准:

Evaluation standards for cell morphology:

毒性级别	毒性级别细胞形态
无毒	细胞形态正常, 贴壁生长好, 细胞呈梭形或不规则三角形
轻度毒性	细胞贴壁生长好, 可见少数细胞圆缩, 偶见悬浮细胞
中度毒性	细胞贴壁生长不佳, 细胞圆缩较多(达 1/3 以上), 可见悬浮死细胞
重度毒性	细胞基本不贴壁, 90%以上为悬浮死细胞

哺乳动物红细胞微核实验: 取SPF级昆明小鼠30只, 雌雄各半, 体质量(20±3) g, 均衡性别后, 随机分为3组, 分别腹腔注射20 mL/kg的材料浸提液原液(实验组)、生理盐水(阴性对照组)和40 mg/kg环磷酰胺(阳性对照组)。采用2次给药法, 给药间隔24 h。最后一次给药18 h后, 处死动物, 切取每只动物双侧股骨, 剔去肌肉, 以干净纱布擦去血污和碎肉。剪去股骨头、股骨髁露出骨髓腔, 用吸有1 mL小牛血清的注射器从股骨一端插入针头, 将骨髓冲洗入离心管, 用滴管吹打骨髓团块, 使其成为细胞混悬液。将上述细胞悬浮液经离心10 min, 300×g。弃上清液, 留少量液体混匀, 取混悬液1滴置载玻片的一端, 涂片, 酒精灯烤干。待干后再置甲醇溶液中固定10 min, 取出晾干。用15%Giemsa染液染色10 min, 用pH值6–8的磷酸缓冲液反复冲洗, 再用蒸馏水冲洗后晾干。油镜下观察, 计算出微核的嗜多染红细胞的数目, 每只动物至少计算1 000个嗜多染红细胞中出现的微核, 用作遗传毒性的指示。同时计算嗜多染红细胞在总红细胞(嗜多染红细胞+嗜正染红细胞)中的比例(%), 嗜多染红细胞在总红细胞中比例不应低于20%。其中阴性对照中每只小鼠中每1 000个嗜多染红细胞中有微核嗜多染红细胞的数目不应超过4个, 阳性对照

组与阴性对照组计数结果的差别必须有统计学意义。

植入实验: 取清洁级新西兰兔9只, 术前24 h背部备皮、清洗。以30 mg/kg的3%戊巴比妥钠溶液耳缘静脉注射麻醉, 按常规手术要求以碘伏消毒手术区域。在兔脊柱中线两侧约2 cm处各选4个植入点, 间隔2.5 cm。切开皮肤与筋膜, 用止血钳沿肌纤维长轴钝性分离肌肉形成肌腔隙, 腔隙内植入被试材料(直径3 mm, 高10 mm圆柱体), 每侧各植入3个, 另留2处植入点为空白对照。分层缝合切口。术后动物每笼单只喂养, 连续3 d肌注庆大霉素预防感染, 观察动物的活动及进食情况, 创口感染情况。并于术后1, 4, 12周各处死3只动物取材, 切开, 肉眼观察有无化脓、水肿、材料排出以及包膜形成等; 再将标本固定, 脱钙, 石蜡包埋, 常规切片, 苏木精-伊红染色光镜下观察。

主要观察指标: 新型可注射磷酸钙骨水泥材料的急性毒性、细胞毒性、刺激性、致敏性、热源反应及血液相容性。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组独立数据间进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。多组数据间进行one-way ANOVA检验, 若方差齐, 则以LSD检验各组间差异, 若方差不是齐性时则以Tamhane's T2检验。微核实验结果选用卡方检验进行数据的统计分析。

2 结果

2.1 新型可注射及降解磷酸钙骨水泥的急性毒性实验结果 两组动物注射后即刻、4, 24, 48, 72 h均未出现运动减少、眼睑下垂、呼吸困难或腹泻症状, 无虚脱、发绀、震颤等症状, 无小鼠死亡。在72 h观察期内, 所有小鼠(包括实验组和对照组)体质量都有不同程度增加, 且两组的体质量增量差异经 t 检验差异无显著性意义($P < 0.05$), 见表1, 两项结果均表明该材料无急性全身毒性。

表1 实验组与对照组小鼠体质量增量及统计分析结果

Table 1 Increase of body weight and statistical analysis results ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, g)

组别	24 h	48 h	72 h
小鼠尾静脉注射生理盐水的对照组	1.22±0.48	1.90±0.34	1.44±0.47
小鼠尾静脉注射新型降解磷酸钙骨水泥浸提液的实验组	1.36±0.36	2.04±0.42	1.52±0.35
t 检验 Sig(2-tailed)	0.473	0.425	0.671

注: 结果表明新型可注射及降解磷酸钙骨水泥材料无急性全身毒性。

2.2 新型可注射及降解磷酸钙骨水泥的致热实验结果 实验的3只兔在注射后体温均未升高达0.6 °C, 且3只兔体温升高总和小于1.4 °C, 说明新型可注射可降解磷酸钙骨水泥材料的浸提液无致热作用, 见表2。

表2 新型可注射及降解磷酸钙骨水泥致热实验中3只兔的体温记录

Table 2 Body temperatures of rabbits in pyrogen test

动物序号	注射前体温(°C)	基础体温(°C)	体质量(kg)	注射后体温(°C)						最高升温(°C)	
				0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h		
1	38.8	38.7	38.75	2.6	38.5	38.8	38.7	38.8	38.6	38.6	0.05
2	39.1	39.2	39.15	2.5	39.2	39.3	39.2	39.1	39.3	39.1	0.15
3	38.9	38.7	38.80	2.8	38.6	38.8	38.6	38.7	38.9	38.8	0.10

注: 3只兔体外升高值总和为0.30 °C, 表明新型可注射可降解磷酸钙骨水泥材料的浸提液无致热作用。

2.3 新型可注射及降解磷酸钙骨水泥的溶血实验结果 37 °C水浴1 h后, 阳性对照组各管中溶液呈澄明红色, 管底无红细胞残留, 判断为有溶血。实验组和阴性对照组红细胞全部下沉, 上清液体无色澄清, 表明无溶血发生。各组均无红细胞凝聚发生。各组吸光光度值见表3, 计算得材料溶血率为0.47% < 5%。根据GB/T 16 886.4-2003/ISO 10 993.4-2002判定材料浸提液无溶血作用。

表3 新型可注射及降解磷酸钙骨水泥的溶血实验吸光度检测结果

Table 3 Absorbance (A) values in hemolysis test of the novel injectable and degradable calcium phosphate cement (A)

组别	1	2	3	\bar{x}	s
兔抗凝血中加入新型可注射及降解磷酸钙骨水泥浸提液	0.012	0.011	0.016	0.013	0.003
兔抗凝血中加入生理盐水	0.008	0.007	0.008	0.008	0.001
兔抗凝血中加入双蒸水	1.066	1.081	1.038	1.062	0.022

注: 计算得材料溶血率为0.47% < 5%。根据GB/T 16886.4-2003/ISO 10993.4-2002判定新型可注射及降解磷酸钙浸提液无溶血作用。

2.4 新型可注射及降解磷酸钙骨水泥的致敏实验结果 见表4。结果表明, 按Magnusson和Kligman分级标准, 对照组动物记分均<1, 实验组动物记分均<1, 所以在本项实验条件下, 新型骨水泥不会引起迟发型超敏反应, 无潜在皮肤致敏作用。

表4 新型可注射及降解磷酸钙骨水泥的致敏实验结果

Table 4 Results of delayed-type hypersensitivity test of the novel injectable and degradable calcium phosphate cement (n)

组别	24 h				48 h			
	0级	1级	2级	3级	0级	1级	2级	3级
皮内注射生理盐水组	5	0	0	0	5	0	0	0
皮内注射新型磷酸钙骨水泥浸提液组	10	0	0	0	10	0	0	0

注: 新型骨水泥未会引起迟发型过敏反应, 无潜在皮肤致敏作用。

2.5 新型可注射及降解磷酸钙骨水泥的体外细胞毒性实验结果 MTT实验结果见表5。

表5 实验组、阴性对照组及阳性对照组细胞相对增殖率及细胞毒性分级

Table 5 Relative growth rate and cytotoxicity of each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

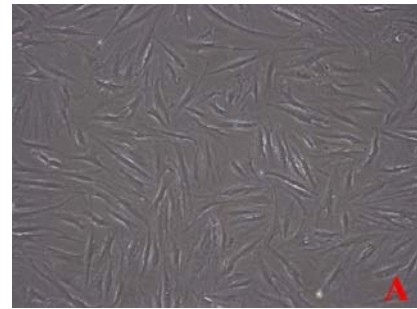
组别	24 h	48 h	72 h
实验组	0.416±0.019	0.474±0.026	0.538±0.028
阴性对照组	0.454±0.040	0.451±0.036	0.511±0.023
阳性对照组	0.341±0.032	0.154±0.019	0.133±0.034
实验组细胞相对增殖率(%)	91.63	105.10	105.29
实验组毒性级别	1	0	0

注: 以新型磷酸钙骨水泥浸提液培养的细胞为实验组, 以 DMEM 浸提液培养的细胞为阴性对照组, 以苯酚溶液培养的细胞为阳性对照组。结果表明可注射及降解磷酸钙骨水泥无细胞毒性。

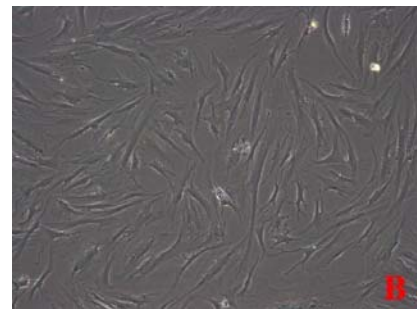
显微镜下观察阳性对照组可见细胞几乎完全破坏, 呈现明显的细胞毒性; 阴性对照细胞表现出形态均一, 呈长梭形, 贴壁生长良好, 胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解; 实验组细胞形态与阴性对照组基本相同。定量测试和镜下结果表明新型骨水泥有极轻微的细胞毒性, 见图2; 定量测试和镜下结果均表明该新型骨水泥无细胞毒性。实验组与阳性对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.6 新型可注射及降解磷酸钙骨水泥的肌内埋植实验结果 材料埋置12周, 所有动物无死亡, 伤口无红肿、渗出等现象, 愈合良好, 无感染及植入物排出现象。所有标本均无化脓、肌坏死等现象, 植入材料被薄层纤维包裹。组织学观察, 植入后1周, 光镜下见材料周围有

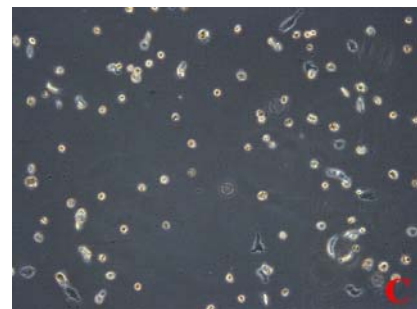
少量淋巴细胞浸润, 无坏死现象发生, 无纤维包裹形成, 肌肉内淋巴结无明显增生。植入后4周, 材料周围无明显炎性浸润, 有成血管细胞和成纤维细胞增殖, 可见多核巨细胞及钙盐沉着。植入后12周, 可见纤维包裹形成, 无明显炎性浸润, 见图3。空白对照标本组织结构排列正常。



A: 以新型磷酸钙骨水泥浸提液培养细胞的实验组



B: 以聚乙烯浸提液培养细胞的阴性对照组

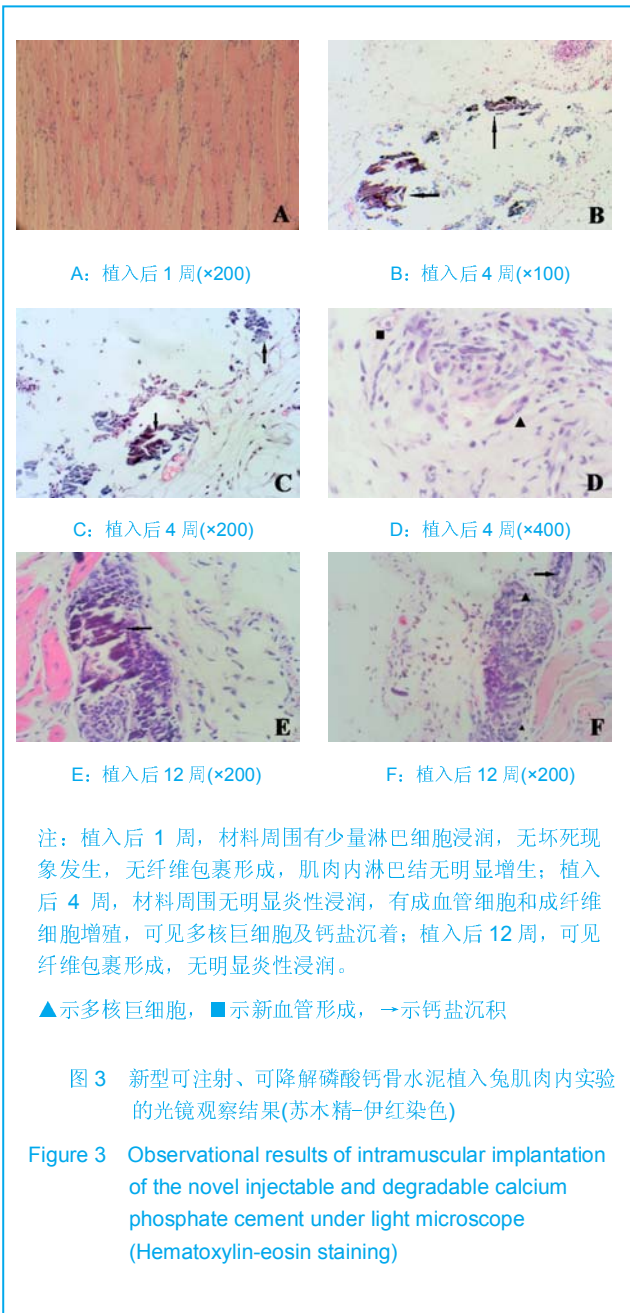


C: 以苯酚溶液培养细胞的阳性对照组

注: 阳性对照组细胞几乎完全破坏, 呈现明显的细胞毒性; 阴性对照细胞表现出形态均一, 呈长梭形, 贴壁生长良好, 胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解; 实验组细胞呈形态与阴性对照组基本相同。

图2 光镜下直接观察以新型磷酸钙骨水泥浸提液、聚乙烯浸提液及苯酚溶液培养72 h后L929细胞的形态变化($\times 400$)

Figure 2 Morphological changes of L929 cells cultured for 72 h with the novel injectable and degradable calcium phosphate cement, extracts of polyolefin, and phenol ($\times 400$)



2.7 新型可注射及降解磷酸钙骨水泥的微核实验结果

各组动物给药后一般状况均正常, 无死亡。计算各组中嗜多染红细胞占红细胞总数的比例均大于20%, 表明没有明显骨髓抑制作用。

以卡方检验分析各组微核率, 阳性对照雌雄两组与实验组雌雄两组比较差异有显著性意义(雌雄两组均为 $P=0$), 阴性对照组与实验组雌雄两组差异无显著性意义 ($P_{\text{雌性}}=0.803$, $P_{\text{雄性}}=0.797$), 见表6。

本次实验结果表明, 实验组没有出现细胞遗传毒性的迹象, 可以认为被测样品浸提液不会对小鼠产生遗传

毒性。

表 6 实验组、阴性对照组及阳性对照组嗜多染红细胞微核率的比较

Table 6 Comparison of frequency of micronucleus in each group

组别	性别	嗜多染红细胞(n)	有微核的嗜多染红细胞(n)	嗜多染红细胞/红细胞总数(%)
实验组	雄性	5 022	9	34.48
	雌性	5 039	9	43.16
阴性对照组	雄性	5 041	8	38.82
	雌性	5 035	7	40.42
阳性对照组	雄性	5 017	166	35.12
	雌性	5 034	157	37.70

注: 实验组向小鼠腹腔注射新型磷酸钙骨水泥浸提液, 阴性对照组向小鼠腹腔注射生理盐水, 阳性对照组向小鼠腹腔注射环磷酰胺。观察各组注射后骨髓细胞中出现微核的嗜多染红细胞数量, 实验组未对小鼠细胞产生遗传毒性。

3 讨论

生物材料临床应用的前提和基础是与机体组织具有良好的生物相容性和使用安全性。故在制备该新型骨水泥时, 实验均选用了生物相容性良好的活性材料, 其主要固相成分磷酸氢钙+部分结晶磷酸钙水化以后转化为弱结晶的羟基磷灰石, 与人骨中的无机质非常相似^[11]。聚乳酸-羟基乙酸共聚物是一种可降解的功能高分子有机化合物, 具有良好的生物相容性、无毒、良好的成囊和成膜性能, 被作为载体广泛应用于制药、医用工程材料和现代化工业领域。在美国聚乳酸-羟基乙酸共聚物已通过FDA认证, 被正式作为药用辅料收录进美国药典^[12-13]。研究表明在磷酸钙骨水泥中加入少量聚乳酸-羟基乙酸共聚物可加快羟基磷灰石在体内的降解速度但并不影响其生物力学强度^[14-15], 故实验在新型骨水泥配方中加入10%聚乳酸-羟基乙酸共聚物以增加骨水泥的孔隙率, 既利于细胞的黏附生长, 血管和神经的长入, 又有利于营养成分的渗入和代谢物的排出加快其降解速度, 达到了加快羟基磷灰石降解的目的。

然而, 既往对聚乳酸-羟基乙酸共聚物与骨水泥复合后的生物相容性方面却研究甚少^[16-17], 故实验中根据GB/T16886《医疗器械生物学评价》系列标准, 对于长期接触骨/组织的材料选用了急性毒性实验(GB/T

16886.11-1997)、热源实验(GB/T 16886.11-1997)、溶血实验(GB/T 16886.4-2003)、致敏实验(GB/T 16886.10-2005)、细胞毒性实验(GB/T 16886.5-2007)、微核实验(GB/T 16886.3-1997)、和肌内植入实验(GB/T 16886.6-1997)等系列体内外生物学实验研究,以进行有效的生物相容性和安全性评价。

对某种材料进行生物学评价时所选的供试样品最好是材料成品(终产品)或有代表性部分,但由于材料的形状与表面积对生物反应有很大的影响,所以对材料的生物学评价普遍采用材料的浸提液进行^[18]。根据GB/T16886标准中规定的37℃,24h浸提液适用于以含血清细胞培养液制备浸提液时,其他类型浸提介质如采用37℃浸提则应为72h。该新型磷酸钙骨水泥使用过程中均处于体温下且材料固化过程中无明显放热反应,不宜采取高温浸提方法。所以本次实验所用浸提液除体外细胞实验外均为37℃下浸提72h。

在植入实验中,该新型骨水泥在植入活体组织后,1周时可见局部组织有轻度的炎症细胞和巨噬细胞浸润,说明机体对植入的异物产生反应,同时与植入过程中的手术创伤刺激也有一定关系。而植入4周后,已无明显炎症细胞浸润,说明机体对材料本身并没有炎症反应,同时也可见多核巨噬细胞浸润及钙盐沉积,对于生物体内可吸收降解的材料而言,巨噬细胞和多核巨细胞的存在表明材料具有生物相容性,材料的吸收是由这种多核巨细胞介导的^[19-20]。随着植入的延长,材料周围逐渐形成纤维包裹,表明材料和机体组织间已经达到稳定状态。

在细胞毒性实验中,经新型骨水泥浸提液干预的细胞,从形态学上观察与阴性对照无差别,MTT检测发现其细胞毒性为0-1级,根据标准可认为其无细胞毒性,有良好的细胞相容性。而被试材料浸提液干预细胞1d时出现1级细胞毒性,分析其原因可能有以下几点:体外细胞培养对外界影响因素的敏感度高;多数医用材料都可能存在极弱的细胞毒性,但对机体代谢无明显影响,仍属测试标准的可接受范围;检测方法较为灵敏^[21-23]。

通过上述的一系列体内和体外的实验表明该新型可注射磷酸钙骨水泥无毒,无刺激性及致敏性,具有良好的血液相容性,植入后为非组织刺激物,具有良好的生物相容性,因而具有较好的生物安全性;其良好的短

期生物相容性和生物安全性使其可望成为一种新型骨缺损替代材料。但该新型骨水泥移植后降解的速度与程度、生物力学性能如何以及长期效果如何?这些问题还有待于长期体内植入实验的继续研究。

致谢:感谢中山大学北校区实验动物中心的陈凤英老师及解放军广州军区总医院病理科的陈晓东主任实验过程中给予的无私帮助和热情指导。

基金资助:国家十一五支撑计划项目(2006BAI16B03)。

作者贡献:第一、八作者进行实验设计,实验实施为第一、二、四、五、六作者,实验评估为全体作者,资料收集为第一、二、八作者,第一作者成文,第六、八作者审校,第一、八作者对文章负责。

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。

伦理要求:实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明:文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Smiler D,Soltan M,Lee JW.A Histomorphogenic Analysis of BoneGrafts Augmented With Adult Stem Cells. Implant Dent. 2007;16(1):42-53.
- [2] Schreurs BW,Bolder SB,Gardeniers JW,et al.Acetabular revision with impacted morsellised cancellous bone grafting and a cemented cup. A 15-to-20-year follow-up.J Bone Joint Surg Br.2004;86(4):492-497.
- [3] Schreurs BW,Busch VJ,Welten ML,et al.Acetabular reconstruction with impaction bone-grafting and a cemented cup in patients younger than fifty years old. J Bone Joint Surg Am.2004;86(11):2385-2392.
- [4] Liu CS,Wang W,Shen W,et al.Evaluation of the biocompatibility of a nonceramic hydroxyapatite.J Endon. 1997;23(8): 490-493.
- [5] Kelly CM,Wilkins RM. Treatment of benign bone lesions with an injectable calcium sulfate-based bone graft substitute.Orthopedics.2004;27(1 Suppl):s131-s135.
- [6] Theiss F,Apelt D,Brand B,et al.Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement.Biomaterials.2005; 26(21):4383-4394.
- [7] Qi X,Ye J,Wang Y.Improved injectability and in vitro degradation of a calcium phosphate cement containing poly(lactide-co-glycolide) microspheres. Acta Biomater. 2008; 4(6):1837-1845.
- [8] ISO TC WG.ISO 10993-5.Biological evaluation of medical devices part 5: Tests for in vitro cytotoxicity: Multiple.American National Standards Institute,2007.

- [9] Camilleri J. The biocompatibility of modified experimental Portland cements with potential for use in dentistry. *Int Endod J.* 2008;41(12):1107-1114.
- [10] van Dijkhuizen-Radersma R, Hesselting SC, Kaim PE, et al. Biocompatibility and degradation of poly(ether-ester) microspheres: in vitro and in vivo evaluation. *Biomaterials.* 2002;23(24):4719-4729.
- [11] Wang X, Ye JD, Wang Y. Hydration mechanism of a novel PCCP + DCPA cement system. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(2):813-816.
- [12] Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials.* 1996;17(2):93-102.
- [13] Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, et al. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials.* 1998;19(15):1405-1412.
- [14] Ruh PQ, Hedberg EL, Padron NT, et al. Biocompatibility and degradation of poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites. *J Biomed Mater Res A.* 2005;74(4):533-544.
- [15] Simon CG Jr, Khatri CA, Wight SA, et al. Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J Orthop Res.* 2002;20(3):473-482.
- [16] Habraken WJ, Wolke JG, Mikos AG, et al. Porcine gelatin microsphere/calcium phosphate cement composites: an in vitro degradation study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;91(2):555-561.
- [17] Zhao J, Ohba S, Komiyama Y, et al. Icarin: a potential osteoinductive compound for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(1):233-243.
- [18] You SH. *Zhongguo Yiliao Qixie Xinx.* 2005;11(1):15-19. 由少华. 解读GB/T 16886《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.
- [19] Zambuzzi WF, Oliveira RC, Pereira FL, et al. Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. *Braz Dent J.* 2006;17(4):274-278.
- [20] Jordan DR, Brownstein S, Dorey M, et al. Fibrovascularization of porous polyethylene (Medpor) orbital implant in a rabbit model. *Ophthalmol Plast Reconstr Surg.* 2004;20(2):136-143.
- [21] Qiu CH, Qu HF, Jiang H, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2007;11(18):3532-3535. 邱长虹, 翟弘峰, 姜华, 等. 胶原-壳聚糖复合材料的制备及生物安全性检测[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(18):3532-3535.
- [22] Guo H, Su J, Wei J, et al. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009;5(1):268-278.
- [23] Link DP, van den Dolder J, Wolke JG, et al. The cytocompatibility and early osteogenic characteristics of an injectable calcium phosphate cement. *Tissue Eng.* 2007;13(3):493-500.



ISSN 2095-4344 CN 21-1581/R 2013 年版权归《中国组织工程研究》杂志社所有

第十四届全国生物材料大会会议通知(第二轮)

中国生物医学工程学会生物材料分会(CSBME-BMB)将于2013年9月27-30日在西安召开第十四届学术年会。本次会议是我国生物医学材料界的一次高水平学术盛会。会议将汇集来自国内外不同大专院校、研究机构和工业企业等从事生物医学材料研究的专家学者,就目前我国生物医学材料研究的新理论、新方法、新材料、新装置、新发现以口头报告和墙报两种形式进行交流和研讨,充分反映我国目前生物医学材料研究及产业发展的最新动向。会议还将邀请国内外生物医学材料界知名的专家学者作大会及论坛邀请报告。通过本次大会,可使我国从事生物医学材料研究的团队和科技人员进行一次高水平的学术交流。欢迎从事生物医学材料研究开发、医疗器械设计生产及相关领域科研生产的专家、学者、专业技术人员、临床医生、学生等各类人士积极参加本次会议。

1. 本次会议主题: ①生物医用高分子材料; ②生物医用无机非金属材料; ③生物医用金属材料; ④生物医用复合材料; ⑤组织工程与干细胞; ⑥纳米生物材料及纳米技术; ⑦生物矿化与仿生制备; ⑧生物材料的表面修饰及其生

物应答特性; ⑨药物控释; ⑩生物医学材料的组织再生及临床应用研究; ⑪生物材料表征和生物相容性评价; ⑫骨科生物力学和力学生物学; ⑬生物材料及医疗器械的先进加工成型技术研究。

2. 会议论坛及展览: 本次会议将同期举行三场论坛(沙龙)和一个大型展览(100个展位), 专题讨论目前生物材料及器械的临床存在问题及应用需求, 以及生物材料研究的国际前沿技术与学科发展趋势。①“海内外先进生物医用材料”论坛(2013年28日下午)②“生命与健康”沙龙(2013年29日上午)③“第三届中澳生物材料及医疗器械加工双边论坛”(2013年29日下午)

3. 会议时间: 2013年9月27日报到, 9月28-29日开会, 9月30日参观。

4. 会议地点: 陕西省西安市陕西宾馆(丈八沟宾馆)。

5. 会议注册费: 学生800元, 其他人员1200元, 食宿自理。

6. 会议重要日期: 摘要提交截止日期: 2013.4.30, 全文提交截止日期: 2013.6.30。

7. 会议摘要格式要求: 请提交1-2页A4纸的论文摘要, 具体格式请登陆会议网站。

8. 论文出版: 本次会议将印制会议论文集和正式出版论文集。会议论文将择优在国内SCI收录的学术期刊(稀有金属材料与工程)发表。

9. 会议网址: www.biomaterials14.com, 会议投稿、参展和更多会议信息请登陆该网址。

10. 会议主办单位: 中国生物医学工程学会生物材料分会。

11. 会议承办单位: 西北有色金属研究院, 西安九洲生物材料有限公司。

12. 会议协办单位: 西安交通大学、第四军医大学、西北工业大学。

13. 会议联系人: 余森 13571813056 皇甫强 13259910110 汶斌斌 15029570396 田宇兴 15202985180 会议联系地址: 陕西省西安市未央路96号 西北有色金属研究院 邮编: 710016

电话: 029-86231084

传真: 029-86231103

邮箱: ninbrc@163.com