

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.03.011 [http://www.crter.org]

邱岗峰, 石春芝, 周金生, 麦卫馨, 欧阳君君, 吴三强, 丘渭遥. 复合水凝胶人工角膜裙边支架材料的生物相容性评价[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(3): 445-451.

复合水凝胶人工角膜裙边支架材料的生物相容性评价*

邱岗峰², 石春芝¹, 周金生¹, 麦卫馨¹, 欧阳君君¹, 吴三强², 丘渭遥²

1 深圳大学化学与化工学院, 广东省深圳市 518060

2 深圳大学深圳国家生化工程技术开发中心, 广东省深圳市 518060

文章亮点:

- 1 文章要点: 通过急性全身毒性、迟发型超敏反应、体外细胞毒性和皮内反应等实验, 可评价多孔 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料生物相容性。
- 2 关键信息: 实验研制的多孔 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料具有良好的生物相容性。
- 3 结果显示: 参考 GB/T 16886.10-2005、行业标准 YY/T 0127-2、国标 GB/T 16886.5-2003、及行业标准 YBB 0006-2003, 以迟发型超敏反应、体外细胞毒性和皮内反应及急性全身毒性反应对 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料进行严格的生物相容性检验, 可确保医用材料使用的安全性。
- 4 研究之不足: 实验通过迟发型超敏反应、急性全身毒性、体外细胞毒性及皮内反应 4 个方面评价多孔 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料的生物相容性性能虽已较为全面, 但作为用于眼内植入的材料, 应测定其遗传毒性, 以便进一步提高安全性。

关键词:

生物材料; 材料生物相容性; β -磷酸三钙; 聚乙烯醇; 水凝胶; 人工角膜; 体外细胞毒性; 急性全身毒性; 皮内反应; 迟发型超敏反应; 其他基金

摘要

背景: β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶具有高含水量、良好柔软性优点, 有利于成纤维细胞生长及胶原沉积, 适用于做人眼角膜裙边支架材料。

目的: 评价 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料的生物相容性。

方法: ①迟发型超敏反应: 在豚鼠脊柱两侧皮内由头到尾分别注射 A 液(完全弗氏佐剂与生理盐水等体积混合液)、B 液(β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶浸提液或生理盐水或 2-巯基苯并噻唑)、C 液(A 液与 B 液等体积混合稳定性乳化剂), 并进行局部诱导及激发。②急性全身性毒性实验: 由昆明小鼠尾静脉分别注射生理盐水与 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶浸提液。③体外细胞毒性实验: 分别以 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶浸提液、细胞培养液及含苯酚的细胞培养液培养 MRC-5 细胞。④皮内反应: 在兔脊柱皮内分别注射 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶生理盐水(或芝麻油)浸提液、生理盐水及芝麻油。

结果与结论: β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料的迟发型超敏反应分级为 0-1 级, 急性全身毒性实验结果为正常无症状, 体外细胞毒性均为 0 级或 1 级, 皮内反应为极轻微。表明 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料生物相容性指标达到生物植入医用材料的要求。

Biocompatibility of a hydrogel skirt scaffold in artificial cornea

Qiu Gang-feng², Shi Chun-zhi¹, Zhou Jin-sheng¹, Mai Wei-xin¹, Ouyang Jun-jun¹, Wu San-qiang², Qiu Wei-yao²

邱岗峰, 女, 1964 年生, 江西省永丰县人, 汉族, 江西中医学院毕业, 副主任药师, 主要从事药理研究、药物分析研究。
zjs055@126.com

通讯作者: 石春芝, 硕士, 副教授, 深圳大学化学与化工学院, 广东省深圳市 518060
shic2001@szu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)03-00445-07

收稿日期: 2012-07-19
修回日期: 2012-08-01
(20120612013/GW · W)

Qiu Gang-feng, Associate chief pharmacist, Biochemical Center, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, China
zjs055@126.com

Corresponding author: Shi Chun-zhi, Master, Associate professor, College of Chemistry and Chemical Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, China
shic2001@szu.edu.cn

Supported by: the Science and Technology Plan of Shenzhen University, No. 20074SCZ*

Received: 2012-07-19

Accepted: 2012-08-01

1 College of Chemistry and Chemical Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, China

2 Biochemical Center, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Beta-tricalcium phosphate/poly (vinyl alcohol) hydrogel (β -TCP/PVA-H) composite is a material with high water content, good softness, which is beneficial to the fibroblasts growth and collagen deposition.

OBJECTIVE: To study the biocompatibility of β -TCP/PVA-H composite as an artificial cornea skirt material.

METHODS: Delayed-type hypersensitivity: Both sides of the spinal skin of the guinea pig from beginning to end were injected with A solution (the mixture of complete Freund's adjuvant and normal saline), B solution (extraction of β -TCP/PVA-H composite or normal saline or 2-Mercaptobenzothiazole), C solution (mixture of A and B solutions at equal volume), followed by local induction and inspire. The acute systemic toxicity test: Kunming mouse tail vein was injected with normal saline and β -TCP/PVA-H composite extraction. *In vitro* cytotoxicity assays: MRC-5 cells were cultured by β -TCP/PVA-H composite extraction, cell culture medium and phenol-containing cell culture medium. Intradermal reaction: The extracts of β -TCP/PVA-H composite, normal saline was injected intradermally into the rabbit spine by normal saline (or sesame oil), normal saline and sesame oil.

RESULTS AND CONCLUSION: The biocompatibility experiments of β -TCP/PVA-H composite showed that delayed-type hypersensitivity was graded 0-1, acute systemic toxicity test showed no symptoms, *in vitro* cytotoxicity was graded 0 or 1, and skin irritations were very slight. The experiments are agreed with the relative national standards, and β -TCP/PVA-H composite skirt as artificial cornea scaffold is a qualified medical material.

Key Words: biomaterials; material biocompatibility; beta-tricalcium phosphate; poly (vinyl alcohol); hydrogel; artificial cornea; *in vitro* cytotoxicity; acute systemic toxicity; intradermal reaction; delayed-type hypersensitivity; other grants-supported paper

Qiu GF, Shi CZ, Zhou JS, Mai WX, Ouyang JJ, Wu SQ, Qiu WY. Biocompatibility of a hydrogel skirt scaffold in artificial cornea. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(3): 445-451.

0 引言

人工角膜是指用异质成形材料制成的一种用于植入患眼取代混浊角膜组织的装置, 主要采用柱镜-裙带结构, 即包括透明光学镜柱和不透明裙边支架两部分^[1-4]。人工角膜移植存在的主要问题是裙边支架材料生物相容性较差引起的人工角膜异常脱出及相关并发症。裙边支架材料性能直接关系到人工角膜植入的成败, 因而是人工角膜研究的关键。

许凤兰等^[5-7]利用纳米羟基磷灰石与聚乙烯醇制备成有机/无机复合水凝胶用于人工角膜支架材料, 其生物相容性实验表明无眼刺激性, 细胞毒性 ≤ 1 级, 无致敏反应, 无遗传毒性, 植入6个月后宿主组织无炎性反应, 材料形状无明显变化。动物实验表明, 术后6个月支架材料孔隙中有大量角膜胶原细胞填充, 近中央光学部, 孔隙中多被中央光学材料填充, 见少量孔隙中为胶原纤维细胞, 角膜上皮及内皮结构保持完整。

β -磷酸三钙无毒、无刺激性, 具有良好的生物活性、较高的机械强度及化学性质稳定等特点^[8-10]; 聚乙烯醇则具有良好的机械性能, 高度的亲水性、韧性、成膜性和黏接性^[11-12]。然而单纯的无机相或有机相由于各自的不足, 不能满足许多方面的应用。将 β -磷酸三钙与聚乙烯醇复合, 形成的有机/无机复合生物材料不仅具有二者的优点, 而且由于材料间的协同作用赋予复合生物材料优异的力学性能, 也可提高材料的生物活性, 有利于成纤维细胞生长和胶原沉积。

实验以 β -磷酸三钙与聚乙烯醇为原料采用物理交联法制备多孔 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料, 通过急性全身毒性、迟发型超敏反应、体外细胞毒性和皮内反应等实验评价其生物相容性。

1 材料和方法

设计: 对照观察性实验。

时间及地点: 于2011年7月至2012年4月在深圳大学化学与化工学院实验室, 深圳大学深圳国家生化工程技术开发中心实验室完成。

材料: β -磷酸三钙, 医用级, 由上海凯川化工提供; 聚乙烯醇, 医用级, 由上海润捷化学试剂有限公司提供。

实验动物: 雄性白化豚鼠24只, 体质量250–350 g; 昆明小鼠20只, 雌雄不拘, 体质量17–21g; 新西兰白兔2只, 雌雄不拘, 体质量2.2–2.5 kg; 以上动物均购自广东医学实验动物中心, 许可证号: SCXK(粤)2008-0002。实验过程中对动物的处置符合国家科技部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

人工角膜裙边支架材料生物相容性实验的试剂与仪器:

Main reagents and instruments used for a biocompatibility experiment about artificial corneal skirt scaffolds:

试剂及仪器	来源
苯酚, AR 级	天津市大茂化学试剂厂
生理盐水	四平巨能药业有限公司
H-DMEM、FBS	GIBCO 公司
MTT	美国 Sigma 公司
人胚肺成纤维细胞 MRC-5	中国科学院上海细胞生物学研究所
倒置显微镜	上海长方光学仪器有限公司
酶标检测仪	上海麦莎生物科技有限公司
完全弗氏佐剂	Sigma 公司 F5881
芝麻油	武汉福达食用油有限公司

实验方法:

β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料制备: 首先, 制备5 mL聚乙烯醇水凝胶; 其次, 在聚乙烯醇水凝胶中加入2 g β -磷酸三钙, 经2 h恒温搅拌制得 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶; 再次, 加入15 g的致孔剂, 经1 h恒温搅拌, 倒入模具中经冷冻成型; 最后, 通过去离子水浸泡除去致孔剂从而得到多孔裙边支架材料。

β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料生物相容性实验: 参照相关国家标准, 通过急性全身毒性、迟发型超敏反应、体外细胞毒性和皮内反应等实验评价 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材

料的生物相容性^[13-17]。

迟发型超敏反应实验^[17]:

浸提液的制备: 以生理盐水为浸提介质, 在无菌条件下, 取支架样品表面积60 cm², 加入浸提介质20 mL, 置37 °C浸提72 h, 0.2 μ m滤膜除菌, 得到样品浸提液。以无检测样品的浸提介质为阴性对照, 4 g/L 2-巯基苯并噻唑为阳性对照。

动物实验包括皮内诱导、局部诱导及激发。①皮内诱导: 将24只豚鼠剪去背部区域毛发, 分为实验组12只、阴性对照组6只、阳性对照组6只。常规消毒后在每只豚鼠脊柱两侧从头向尾分3对(3个点)进行皮内注射, 注射液分别为A液(取完全弗氏佐剂与生理盐水1:1等体积混合成稳定乳化剂, 完全弗氏佐剂是含有灭活分枝杆菌的矿物油佐剂, 能够增强豚鼠的诱导效应)、B液(样品浸提液或阴性对照液或阳性对照液), C液(A液与B液等体积混合成稳定性乳化剂, 辅佐剂以改变浸提液的物理状态而延长其在体内的滞留时间, 使抗原缓慢释放, 增强动物的诱导效果), 每点注射0.1 mL。②局部诱导: 皮内注射后6 d, 各注射部位用10%十二烷基硫酸钠按摩导入, 24 h后按组贴敷于B液浸泡至饱和的纱布(4–8 cm²), 半封闭用胶带固定并留置48 h。③激发: 局部诱导后14 d, 脱去腹部区域毛发, 24 h后常规消毒腹部脱毛区域, 按组贴敷于C液中浸泡至饱和的纱布(4–8 cm²), 固定并留置24 h。除去贴敷物后24, 48 h观察贴敷区皮肤的红斑、水肿等反应。

评价标准: 按Magnusson和Kligman分组标准, 记录各观察点激发部位的红斑和水肿的反应分级。0级, 无明显改变; 1级, 散发性或斑点状红斑; 2级, 中度融合性红斑; 3级, 严重红斑和水肿。

急性全身毒性实验^[18]:

浸提液的制备: 样品浸提液以生理盐水为浸提介质, 在无菌条件下, 取样品表面积60 cm²加入浸提介质20.0 mL, 置37 °C浸提72 h。

动物实验: 将20只昆明小鼠随机分成实验组和对照组, 每组各10只, 实验前称质量并记录, 样品浸提液用0.22 μ m滤膜过滤; 对照组每只小鼠尾静脉注射生理盐水1 mL, 实验组每只小鼠尾静脉注射样品浸提液1 mL。

观察指标: 经静脉注射后24, 48, 72 h观察小鼠的状态、运动、体质量、毒性表现和死亡动物数量。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两个独立样本均数比较应用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

急性全身毒性实验评价标准:

Evaluation criteria for acute systemic toxicity test:

反应程度	症状
正常, 无症状	注射后无毒性症状
轻微	注射后有轻微症状但无运动减少、呼吸困难或腹部刺激
中度	注射后出现明显的腹部刺激症状、抽搐、俯卧、呼吸困难、运动减少、眼睑下垂或腹泻
重度	注射后出现虚脱、发绀、震颤或严重腹部刺激症状、腹泻、眼睑下垂或呼吸困难(体质量急剧下降, 一般低于 15 g)
死亡	注射后死亡

体外细胞毒性实验^[19-25]:

材料处理: 浸提原液组在无菌条件下, 取样品人工角膜表面积 18.5 cm^2 , 加含体积分数10%胎牛血清的H-DMEM细胞培养液6.0 mL, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 浸提24 h; 50%浸提液组将样品浸提原液稀释1倍制成; 阳性对照组取含5 g/L苯酚的细胞培养液5.0 mL, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 放置24 h; 空白对照组取5.0 mL细胞培养液, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 放置24 h; 以上各组均经过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤备用。

细胞培养: 将MRC-5细胞接种于25 mL培养瓶中, 常规培养在含有体积分数10%胎牛血清和双抗(100 U/mL青霉素, 100 U/mL链霉素)的H-DMEM培养基中, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 、饱和湿度的恒温培养箱中, 每三四天更换培养基1次, 细胞达融合状态时传代。冻存细胞使用前至少传代培养3次。

细胞悬液制备: 将正常传代培养的MRC-5细胞经消化液消化制成浓度为 $1\times 10^7\text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液, 接种于96孔板, 200 μL /孔, 每组6孔, 置 CO_2 培养箱内培养。上述细胞悬液培养24 h后, 弃去原细胞培养液, 供试样品组分别用浸提原液 $3\text{ cm}^2/\text{mL}$ 或50%浸提液 $1.5\text{ cm}^2/\text{mL}$ 交换; 空白对照组和阳性对照组用相应的对照液交换; 交换后于 CO_2 培养箱内继续培养48-72 h(在对数生长期末, 约80%细胞汇合为宜)。四周边缘孔加入H-DMEM培养液200 μL /孔。

MTT实验: 检测时每孔加入5 g/L的MTT 20 μL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 保温4 h翻转, 弃去上清液, 每孔加入DMSO 150 μL 并振荡10 min, 在酶标仪上测定吸光度A值, 测定波长为570 nm, 参考波长为630 nm, 通过公式计算细胞相对增殖率。

$$\text{细胞相对增殖率} = \frac{\text{样本组 A 值}}{\text{空白对照组 A 值}} \times 100\%$$

细胞相对增殖率评价: 根据细胞相对增殖率均值, 按体外细胞毒性评分标准对样品细胞毒性程度进行评

价。0级, 细胞相对增殖率 $\geq 100\%$; 1级, 细胞相对增殖率80%-99%; 2级, 细胞相对增殖率50%-79%; 3级, 细胞相对增殖率30%-49%; 4级, 细胞相对增殖率0-29%。

皮内反应实验^[26]:

材料处理: 实验样品组在无菌条件下, 取样品表面积 30 cm^2 , 分别加入生理盐水、芝麻油各10.0 mL, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 浸提72 h; 阴性对照组在无菌条件下, 取生理盐水、芝麻油各10.0 mL, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 放置72 h; $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤备用。

动物实验: 取新西兰白兔2只, 在兔脊柱两侧用儿童脱毛器脱毛。用体积分数为75%乙醇消毒皮肤, 在脊柱两侧各选择10个点, 每点间隔2 cm, 每点皮内注射0.2 mL。一侧前后5点分别注射实验样品生理盐水浸提液和阴性对照生理盐水; 另一侧前后5点分别注射实验样品芝麻油浸提液和阴性对照芝麻油。注射后分别在24, 48, 72 h观察注射局部及周围皮肤组织反应。

皮肤反应记分系统:

Scoring system of intradermal reactions:

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

兔皮内刺激反应类型: 0-0.4分, 极轻微; 0.5-1.9分, 轻度; 2-4.9分, 中度; 5-8分, 重度。

将实验组和阴性对照组的全部红斑和水肿的记分相加 $[2(\text{动物数})\times 3(\text{观察点})\times 2(\text{记分类型})]$, 再除以总观察数, 计算出实验组和阴性组的综合平均记分。

主要观察指标: β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料的生物相容性。

2 结果

2.1 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架迟发型超敏反应实验结果 见表1。

表1 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架迟发超敏反应激发实验后豚鼠皮肤致敏分级

Table 1 Skin sensitization grading after delayed hypersensitivity reaction followed by provocation test in guinea pigs (n)

组别	n	6 h				24 h				48 h			
		0级	1级	2级	3级	0级	1级	2级	3级	0级	1级	2级	3级
阴性对照组	6	0	6	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0
阳性对照组	6	0	6	0	0	0	4	2	0	0	4	2	0
实验组	12	0	12	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0

注: 实验组、阴性对照及阳性对照分别以 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶材料浸提液、生理盐水、2-巯基苯并噻唑进行迟发型超敏反应实验; 实验组 6 h 致敏分级均为 1 级, 24, 48 h 的致敏分级均为 0 级, 属无症状现象

表1数据表明阴性对照组豚鼠6 h致敏分级为1级, 24, 48 h致敏分级均为0级, 属无症状现象。阳性对照组豚鼠6 h致敏分级均为1级, 24, 48 h致敏分级均有4只为1级和2只为2级, 属于致敏现象。实验组6h致敏分级均为1级, 24, 48 h的致敏分级均为0级, 属无症状现象。

2.2 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架急性全身毒性实验结果 实验组和对照组实验后体质量变化结果见表2。

表2 实验组和对照组注射前后体质量变化的比较

Table 2 Body mass changes in the experimental group and different control groups before and after injection ($\bar{x}\pm s$, $n=10$, $t_{0.05}=1.82$, g)

组别	注射前	注射 24 h 增加值	注射 48 h 增加值	注射 72 h 增加值
阴性对照	19.13 \pm 1.09	1.87 \pm 0.49	3.35 \pm 0.89	4.20 \pm 1.05

注: 对照组与实验组在昆明小鼠尾静脉分别注射生理盐水与 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶材料浸提液; 两组注射前体质量差异无显著性意义; 两组注射 24, 48, 72 h 增加体质量值差异均无显著性意义($t=0.000$ 5, 0.036 6, 0.611, P 均 $>$ 0.05)

实验组小鼠精神、饮食良好, 未见明显毒性反应, 无死亡, 与对照组比较未见明显差异。样品浸提液注射后24, 48, 72 h, 实验组与对照组体质量比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.3 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架体外细胞毒性实验结果 见表3。

表3 浸提原液组、50%浸提液组、阳性对照组及阴性对照组细胞 A 值的比较

Table 3 Absorbance (A) values in different groups (n=6, A 值)

组别	1孔	2孔	3孔	4孔	5孔	6孔	$\bar{x}\pm s$
	浸提原液组	0.401	0.420	0.388	0.349	0.359	
50%浸提液组	0.365	0.493	0.427	0.441	0.392	0.387	0.418 \pm 0.042
空白对照组	0.357	0.423	0.408	0.364	0.384	0.339	0.379 \pm 0.029
阳性对照组	0.129	0.088	0.115	0.106	0.095	0.106	0.106 \pm 0.013

注: 浸提原液组、50%浸提液组、空白对照及阳性对照分别以 100% β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶材料浸提液、50% β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶材料浸提液、细胞培养液及含苯酚的细胞培养液培养人胚肺成纤维细胞 MRC-6; 浸提原液组、50%浸提液组与空白对照组 A 值均明显高于阳性对照组($P < 0.01$), 且前 3 组间 A 值差异无显著性意义

表3结果表明, 阳性对照组与其余各组的A值之间均有差异非常显著性意义($P < 0.01$); 样品浸提原液与50%浸提液之间的A值差异无显著性意义, 两组与空白对照组之间的A值差异均无显著性意义。

样品浸提原液与50%浸提液的细胞相对增殖率分别为99.74%, 110.29%, 均 $>$ 80%, 按照国标中的评价标准, 样品的体外细胞毒性均为0级或1级。阳性对照组为27.97%, 体外细胞毒性均为4级。

2.4 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架皮内反应实验结果 见表4。

表4 实验组与阴性对照组皮内反应情况与反应类型

Table 4 Intradermal reaction and reaction types in the experimental group and negative control group

组别	n	观察点	反应情况	原发性刺激平均记分			反应类型
				24 h	48 h	72 h	
阴性对照	2	10	无红斑, 无水 肿	0	0	0	极轻微
实验组	2	10	无红斑, 无水 肿	0	0	0	极轻微

注: 实验组、阴性对照组在兔脊柱皮内分别注射 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶生理盐水(或芝麻油)浸提液、生理盐水(或芝麻油); 实验组与阴性对照组实验情况基本一致

表4结果表明阴性对照组实验兔2只, 观察点10个, 均无红斑、无水肿情况, 皮内反应为极轻微级; 实验组实验兔2只, 观察点10个, 实验组与阴性对照组实验情况基本一致, 均无红斑、无水肿情况, 皮内反应为极轻微

级。

3 讨论

由 β -磷酸三钙与聚乙烯醇制备的多孔 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜裙边支架材料是一种具有高含水量、良好柔软性、高生物活性的复合水凝胶,比其他生物材料更像人体组织。多孔裙边支架与角膜组织能充分地达到生物性愈合,从而使人工角膜支架部分与角膜组织的结合更牢固、更稳定,并能起到支持光学部分和人工角膜长期存留的作用。但任何生物材料在应用于人体之前,必须经过严格的生物相容性检验,以确保医用材料使用的安全性^[27]。实验主要通过材料的迟发型超敏反应、急性全身毒性、体外细胞毒性和皮内反应进行相关实验评价材料实际的生物相容性。

迟发型超敏反应是采用一种适宜的模型测定器械、材料或其浸提液潜在的接触致敏性,常用实验方法包括豚鼠最大剂量法和封闭斑贴法^[28]。主要实验方法参考GB/T 16886.10-2005进行。实验结果表明阴性对照组及阳性对照组均出现预期的结果,而实验组中6 h有6只豚鼠实验致敏分级均为1级,24, 48 h的致敏分级均为0级,属无症状现象,符合“GB/T 16886.10-2005医疗器械生物学评价:刺激与迟发型超敏反应”的要求,说明 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶材料无迟发型超敏反应。

急性全身毒性是在24 h内一次或多次将材料、器械或其浸提液作用于一种动物,测定其潜在的危害作用,主要实验方法参考行业标准YY/T 0127-2。实验主要使用静脉注射浸提液的方法,并于24, 48, 72 h观察小鼠经静脉注射后的状态、运动、体质量、毒性表现和死亡动物数量。实验发现实验组小鼠精神、饮食良好,未见明显毒性反应,无死亡,与对照组比较未见明显差异,符合行业标准“YY/T 0127-2”要求,说明 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶材料急性全身毒性合格。

体外细胞毒性是采用细胞培养技术测定由材料、器械或其浸提液造成的细胞溶解以及对细胞生长的抑制和对细胞的其他影响。实验主要参考国标GB/T 16886.5-2003要求,采用MTT法测试材料的体外细胞毒性。MTT法又称MTT比色法,是一种检测细胞存活和生

长的方法,具有敏感性高、操作简便、经济等特点。实验发现阴性及阳性参照均出现预期结果,实验系统成立。浸提原液体外细胞毒性结果为1级与50%浸提原液体外细胞毒性结果为0级,材料无明显细胞毒性,符合“GB/T 16886.10-2005医疗器械生物学评价:体外细胞毒性”的要求,说明 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶材料体外细胞毒性合格。

皮内反应主要通过皮内注射方法注射浸提液,观察皮内注射后局部皮肤的反应,评价样品对接触组织的潜在刺激性,具体测试方法按照行业标准“YBB 0006-2003皮内刺激检查法”进行。皮内注射法较皮肤刺激实验相比具有较高的敏感性。实验发现实验组与对照组无明显差异,符合行业标准“YBB 0006-2003皮内刺激检查法”要求,说明 β -磷酸三钙/聚乙烯醇复合水凝胶材料皮内反应合格。

基金资助: 深圳大学科技计划项目(20074SCZ)。

致谢: 感谢罗仲宽老师、周莉老师在本文工作中的悉心指导与帮助,感谢范志恒等同学在实验中的辛勤付出。

作者贡献: 邱岗峰主要负责实验计划拟定工作;石春芝负责实验指导工作,周金生负责资料收集及实验实施工作,麦卫馨及欧阳君君负责实验实施工作,吴三强及丘渭遥负责实验评估工作,周金生、欧阳君君及麦卫馨负责成文工作,邱岗峰及石春芝审校,邱岗峰对文章负责。

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] Yan T, Ao NJ, Tan BH, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(10):1904-1905. 严拓,敖宁建,覃百花,等.人工角膜及其相关材料[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(10):1904-1905.
- [2] Chen JJ, Huang ZP, Guoji Yanke Zazhi. 2008;8(3):561-564. 陈佳佳,黄振平.人工角膜研究进展[J].国际眼科杂志,2008,8(3):561-564.
- [3] Li N, Zhou W, Sun H, Yixue Zongshu. 2009;15(4):575-578. 李娜,周伟,孙恒.人工角膜的研究进展[J].医学综述,2009,15(4):575-578.

- [4] Zhang X, Li XY, Zhong YY, MZ, et al. Zhongguo Shiyong Yanke Zazhi. 2010;28(12):1279-1284.
张旭, 李效岩, 中原由木子, 等. 人工角膜研究进展[J]. 中国实用眼科杂志, 2010, 28(12):1279-1284.
- [5] Xu FL. Sichuan: Sichuan Daxue. 2005.
许凤兰. 纳米羟基磷灰石/水凝胶人工角膜研究[D]. 四川: 四川大学, 2005.
- [6] Xu FL, Li YB, Yao XM, et al. Fuhe Cailiao Xuebao. 2005;22(1):27-31.
许凤兰, 李玉宝, 姚晓明, 等. 纳米羟基磷灰石/聚乙烯醇复合人工角膜材料[J]. 复合材料学报, 2005, 22(1):27-31.
- [7] Yao XM, Deng HW, Li YB, et al. Zhongguo Shiyong Yanke Zazhi. 2004;22(8):667-669.
姚晓明, 邓宏伟, 李玉宝, 等. 多孔纳米羟基磷灰石-聚乙烯醇水凝胶人工角膜的实验研究[J]. 中国实用眼科杂志, 2004, 22(8):667-669.
- [8] Jia SC. Sichuan: Sichuan Daxue. 2007.
贾舜宸. 原位聚合法制备DL聚乳酸、 β -磷酸三钙复合骨修复材料及性能研究[D]. 四川: 四川大学, 2007.
- [9] Gong L. Chongqing: Chongqing Daxue. 2007.
龚立. 多孔 β -磷酸三钙/明胶复合支架的制备及性能研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2007.
- [10] Zhang SH. Anhui: Hefei Gongye Daxue. 2002.
张士华. β -磷酸三钙粉末和多孔 β -磷酸三钙生物陶瓷的研制[D]. 安徽: 合肥工业大学, 2002.
- [11] Guo DG, Xu KW. Shengwu Yixue Gongchengcue Zazhi. 2005;22(3):602-605.
郭大刚, 徐可为. 聚乙烯醇在生物医学工程中的应用研究进展[J]. 生物医学工程杂志, 2005, 22(3):602-605.
- [12] Liu K, Li Y, Xu F, et al. Graphite/poly(vinyl alcohol) hydrogel composite as porous ringy skirt for artificial cornea. Mat Sci Eng. 2009;29(1):261-266.
- [13] Fang JY, Lin ZM, Ling JQ, et al. Zhonghua Kouqiang Yixue Yanjiu Zazhi. 2010;4(6):540-547.
房俊艳, 林正梅, 凌均策, 等. 低收缩性树脂封闭剂的研制及其生物相容性研究[J]. 中华口腔医学研究杂志, 2010, 4(6):540-547.
- [14] Zhou Y, Cheng GG, Yu XG, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(8):1401-1406.
周岩, 程钢戈, 余新光, 等. 具有生物活性的高导复合支架材料制备表征及其生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(8):1401-1406.
- [15] Su B, Jiang DM, Yan YG, et al. Disan Junyi Daxue Xuebao. 2011;33(1):40-44.
苏保, 蒋电明, 严永刚, 等. 氨基酸聚合物/硫酸钙生物工程骨的生物相容性研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(1):40-44.
- [16] Li R, Wang QS. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(29):5471-5474.
李瑞, 王青山. 生物材料生物相容性的评价方法和发展趋势[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(29):5471-5474.
- [17] 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[S]. 2005:1-39.
- [18] YY/T 127.2-2009 口腔医疗器械生物学评价, 第2单元: 试验方法急性全身毒性试验: 静脉途径. [S]. 2009:1-2.
- [19] GB/T 16886.5-2003 医疗器械生物学评价, 第5部分: 体外细胞毒性试验[S]. 81-88.
- [20] Yan JH, Sun HM, Shang HW, et al. Jilin Nongye Daxue Xuebao. 2011;33(5):522-526.
闫继红, 孙海梅, 尚宏伟, 等. 可注射性壳聚糖基温敏性凝胶的制备及其生物相容性[J]. 吉林农业大学学报, 2011, 33(5):522-526.
- [21] Ye X, Zhu L, Tang GX, et al. Zhonghua Shenjing Waikie Jibing Yanjiu Zazhi. 2011;10(6):543-547.
叶迅, 朱琳, 唐光昕, 等. 纯钛表面梯度生物活性涂层材料生物相容性研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2011, 10(6):543-547.
- [22] Shen LJ. Hunan: Hunan Daxue. 2011.
申林静. 生物材料的生物相容性研究[D]. 湖南: 湖南大学, 2011.
- [23] Deng JH. Guangxi: Guangxi Yike Daxue. 2011.
邓建华. 京尼平生物型人工食管生物相容性的实验评价[D]. 广西: 广西医科大学, 2011.
- [24] Wang LX. Hunan: Hunan Daxue. 2010.
汪兰香. 二茂铁羧酸、醇、酯的合成及细胞毒活性研究[D]. 湖南: 湖南大学, 2010.
- [25] Zhang YB, Jiang M, Hu P, et al. Zhonghua Shiyong Zhenduan yu Zhiliao Zazhi. 2011;25(10):944-946.
张燕搏, 姜明, 胡平, 等. 聚氨酯不同低温等离子体改性及生物相容性评价[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(10):944-946.
- [26] 国家食品药品监督管理局. YBB0006-2003 皮内刺激检查法[S]. 2003:18-19.
- [27] GB/T 16886. 1-2001 医疗器械生物学评价, 第1部分: 评价与试验[S]. 2001:21-33.
- [28] Guan J, Gao P, Huang MK, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(12):2227-2231.
关静, 高萍, 黄妹杰, 等. 聚乙烯醇水凝胶的生物相容性评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(12):2227-2231.