

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.38.008 [http://www.crter.org]

须建, 彭坤, 甘晓玲, 王易振, 段巧玲, 李永刚. D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物的生物安全性和细胞相容性[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(38):6753-6758.

D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物的生物安全性和细胞相容性***

须建², 彭坤^{1,2}, 甘晓玲², 王易振², 段巧玲², 李永刚¹ (重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程中心, 重庆市 400030; ²重庆医药高等专科学校医学技术学院, 重庆市 401331)

文章亮点:

文章的特色在于依据国内《生物材料和医疗器材生物学评价技术要求》规定, 从内毒素实验、致敏实验、小鼠急性毒性实验及细胞相容性实验等方面对 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物进行了生物安全性和细胞相容性评价。证实 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物无细菌污染状况, 符合生物安全标准, 无致敏性及毒性, 并且具有较好的细胞相容性。

关键词:

生物材料; 材料生物相容性; D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物; 生物安全性; 细胞相容性; 省级基金

主题词:

生物相容性材料; 组织相容性; 聚合物; 急性毒性试验

基金资助:

重庆市教委项目(KJ112501)*, 重庆市卫生局项目(2012-2-257)*, 重庆医药高等专科学校重点科研项目(2012103)*

摘要

背景: 课题组前期实验研制了输卵管避孕器材料 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物, 依据国内《生物材料和医疗器材生物学评价技术要求》规定, 植入体内的组织工程材料必须进行生物安全评价和细胞相容性实验。

目的: 观察 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物的生物安全性。

方法: ①内毒素实验: 在鲎试剂中分别加入聚合物浸提液、内毒素工作标准品溶液和细菌内毒素检查用水。

②致敏实验: 在昆明小鼠肩胛骨内侧分别注射聚合物浸提液+弗氏完全佐剂+生理盐水、弗氏完全佐剂+生理盐水, 通过皮内诱导、局部诱导和激发阶段, 观察动物激发部位皮肤红斑和水肿反应程度。③急性毒性实验: 分别在昆明小鼠腹腔注射 100%, 50%, 25% 聚合物浸提液及生理盐水。④细胞增殖 MTT 实验: 直接法为将人脐静脉内皮细胞分别接种于聚合物膜、聚乳酸与玻璃片上; 间接法为将人脐静脉内皮细胞分别接种于聚合物浸提液、丙烯酰胺溶液及 1640 培养液。

结果与结论: D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料无细菌污染状况, 符合生物安全标准, 无致敏性及毒性, 并且具有较好的细胞相容性。

Shape-memory polymer based on D,L-poly(lactic acid): Biosecurity and cytocompatibility

Xu Jian², Peng Kun^{1,2}, Gan Xiao-ling², Wang Yi-zhen², Duan Qiao-ling², Li Yong-gang¹ (¹Research Center of Bioinspired Material Science and Engineering, Department of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China; ²Department of Medical Technology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous experiments have prepared shape memory polymer based on D,L-poly(lactic acid). According to domestic technical requirements for biologically evaluating biomaterials and medical equipments, tissue-engineered grafts must be subjected to preclinical experiment for biosecurity and cytocompatibility evaluation.

OBJECTIVE: To observe the biosecurity of the shape memory polymer based on D,L-poly(lactic acid).

METHODS: (1) Bacterial endotoxin test: polymer extract, endotoxin working standard solution and checking standard water were added into limulus reagent, respectively. (2) Sensitization test: Polymer extract + Freund's complete adjuvant + physiological saline and Freund's complete adjuvant + physiological saline were injected into the scapula of Kunming mice. After induction by intradermal injection, local induction and excitation, stimulate skin erythema and edema degree were observed in animals. (3) Acute toxicity test: Kunming mice received intraperitoneal injection of 100%, 50%, 25% polymer leaching solution and physiological saline, respectively. (4) 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay for cell proliferation: The direct method was that human umbilical cord vascular endothelial cells were inoculated onto the polymer film, lactic acid and glass, respectively; the indirect method was that human umbilical cord vascular endothelial cells were inoculated into

须建, 男, 1955 年生, 江苏省无锡市人, 汉族, 1979 年原重庆药剂学校毕业, 副教授, 主要从事医学检验与生物材料方面的研究。

通讯作者: 彭坤, 在读博士, 讲师, 重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程中心, 重庆市 400030; 重庆医药高等专科学校医学技术学院, 重庆市 401331
pk3001@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)38-06753-06

收稿日期: 2013-06-25
修回日期: 2013-07-11
(201304182/GW - W)

Xu Jian, Associate professor, Department of Medical Technology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China

Corresponding author: Peng Kun, Studying for doctorate, Lecturer, Research Center of Bioinspired Material Science and Engineering, Department of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China; Department of Medical Technology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China
pk3001@163.com

Received: 2013-06-25
Accepted: 2013-07-11

the polymer leaching solution, acrylamide solution and 1640 culture solution.

RESULTS AND CONCLUSION: This shape memory polymer based on D,L-poly(lactic acid) is free of bacterial contamination in compliance with the biosecurity standards, and it has no allergenic and toxicity but has good cytocompatibility.

Subject headings: biocompatible materials; histocompatibility; polymers; acute toxicity tests

Funding: the Project of Chongqing Educational Committee, No. KJ112501*; Project of Chongqing Health Bureau, No. 2012-2-257*; the Major Scientific Research Project of Chongqing Medical and Pharmaceutical College, No. 2012103*

Xu J, Peng K, Gan XL, Wang YZ, Duan QL, Li YG. Shape-memory polymer based on D,L-poly(lactic acid): Biosecurity and cytocompatibility. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(38):6753-6758.

0 引言 Introduction

D, L-聚乳酸生物可降解形状记忆材料有望作为一种智能型的输卵管避孕器材料,并且它是属于与机体组织直接接触的植入器械。因此,该类材料的生物安全性和细胞相容性是在设计与制造中首先需要考虑的问题,它也是生物材料应用于组织工程的先决条件。按照《生物材料和医疗器材生物学评价技术要求》的有关规定^[1],生物医用材料在植入体内前必须进行生物安全评价和细胞相容性实验。参考评价生物医用材料的系列标准(如GB/T16886, ISO10993),实验对D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料进行了内毒素实验、材料致敏实验、急性毒性实验,观察其对细胞黏附、铺展和增殖的影响,从而评价D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料是否生物安全性评价和细胞相容性的技术要求,为其应用于临床提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机分组,对比观察动物实验。

时间及地点: 实验于2012年6月至2013年4月在重庆大学生物工程学院和解放军第三军医大学大坪医院动物实验中心完成。

材料:

实验动物: 实验选用SPF级6-9周龄昆明种小鼠,雌雄各半,体质量(200±20)g,由解放军第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,许可证号:SCXK 2002008。

D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物生物安全性和细胞相容性实验的主要材料:

试剂及仪器	来源
D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物	重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程中心
2A 内毒素工作标准品溶液	中国药品生物制品检定所
弗氏完全佐剂、胰蛋白酶、1640 培养液	美国 Sigma 公司
人脐静脉内皮细胞	重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程中心
聚乳酸	实验室自制
Model 550 酶标仪	百乐科技有限公司
丙烯酰胺溶液	重庆化学试剂有限公司

实验方法:

制备D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料浸提液: 将4 g D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料加入20 mL生理盐水中, 37 °C水浴箱保温72 h, 制备标准浸提液。用0.22 μm微孔过滤器过滤除菌, 置于4 °C冰箱保存待用。

D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料内毒素实验^[2-3]: 实验中选取规格为0.1 mL/支鲎试剂安瓿4支: 样品管抽取2支, 分别加入0.1 mL上述浸提液; 阳性对照管抽取1支, 加入2λ内毒素工作标准品溶液0.1 mL; 阴性对照管抽取1支, 加入细菌内毒素检查用水0.1 mL。将试管中溶液轻轻混匀后封闭管口, 垂直放入(37±1) °C水浴中保温(60±2) min。在保温和取试管过程中须避免试管受震动而造成假阴性结果。

结果评定: 将试管从水浴中轻轻取出, 缓缓倒转180°时管内凝胶不变形、不从管壁滑脱者为阳性, 记录为阳性(+); 凝胶不能保持完整并从管壁滑脱者为阴性, 记录为阴性(-)。

D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料致敏实验^[4-5]: 在皮内诱导阶段, 选取昆明种小鼠6只, 通过去毛后于肩胛骨内侧对完成皮内注射0.1 mL。①按体积比为50:50混合弗氏完全佐剂与选定的溶剂生理盐水。②实验组皮内注射浓度为50%聚合物浸提液, 对照组仅注射相应体积生理盐水。③实验组皮内注射, 按体积比为50:50将聚合物浸提液(浓度同上)与弗氏完全佐剂及溶剂配成乳化剂进行; 对照组仅注射佐剂和溶剂配成的乳化剂。

在局部诱导阶段, 须在局部诱导前1 d对待实验部位进行预处理。通过按摩法将浓度为10%的十二烷基硫酸钠石蜡导入皮肤组织。相同方法处理对照组动物。将20 mm×20 mm滤纸置于浸提液中, 充分浸透后, 在皮内诱导结束后7 d, 在实验动物肩胛骨内侧的诱导注射点贴敷滤纸并固定。2 d后除去包扎带和滤纸。相同方法处理对照组动物。

在激发阶段, 局部诱导结束后14 d, 用聚合物浸提液原液对实验动物和对照动物进行激发。浸透滤纸片局部贴敷于实验动物的单侧腹部, 并用封闭式包扎带进行固定。在(24±2) h后, 除去包扎带和滤纸。

结果评定: 除去敷贴物后24, 48, 72 h观察实验组和对照组动物激发部位皮肤红斑和水肿反应程度。

D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料急性毒性实验^[6-9]: 急性毒性实验是指在24 h内一次或多次通过包括经口、经皮肤、经腹腔和经静脉等途径, 大剂量给予机体外来化学物后发生的有害作用。通过不同的给予方法可从不同角度了解样品进入机体后的全身代谢和对造成的毒性影响, 从而评价生物材料的急性毒性作用。实验选取昆明种小鼠作为实验动物, 执行给药量1 mL/20 g的标准, 通过腹腔注射途径给药。实验组聚合物浸提液的浓度分别为100%, 50%, 25%; 空白对照组采用生理盐水, 每组8只小鼠, 雌雄各半。

结果评定: 连续观察14 d, 对实验小鼠的毒性反应和死亡情况做详细记录。对死亡动物进行解剖学检查, 观察脏器的病理变化。

D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物对人脐静脉内皮细胞黏附效率和铺展的影响^[10-14]:

人脐静脉内皮细胞在膜上的黏附效率: 将D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物膜置于紫外灯下, 充分照射30 min, 彻底灭菌。随后放入24孔板中, 按照密度为 2×10^4 每孔, 在膜上接种人脐静脉内皮细胞。培养4 h后, 在显微镜下观察细胞状态, 并用相机拍照记录。将未贴壁的细胞吸出, 用PBS清洗后, 采用胰蛋白酶对贴壁细胞进行消化, 加入培养液吹打细胞, 使其完全脱落, 吹打均匀, 计数板计数。以接种于玻璃及聚乳酸为对照。细胞黏附效率(A)采用下面的公式计算:

$$A = \frac{(N_1 - N_0)}{N_0} \times 100\%$$

其中 N_1 为黏附后的细胞数目, N_0 为初始细胞数目。

人脐静脉内皮细胞在膜上的形态与铺展: 人脐静脉内皮细胞接种后将其培养4 h, 在显微镜下观察细胞形态, 用相机拍照。

测定细胞增殖能力^[15-19]: 在细胞生物学研究中MTT法是一种应用广泛的分析细胞活性、增殖及毒性作用等的方法。实验步骤: ①直接法: 将聚合物材料膜经预处理后, 放置于24孔板上, 接种人脐静脉内皮细胞(密度 1×10^4 /孔), 以接种于玻璃及D, L-聚乳酸为对照。细胞接种2, 4, 6 d后在各组中每次取5个, 用MTT法测定细胞增殖能力。在Model 550酶标仪上读取吸光度值, 检测波长490 nm。②间接法: 将细胞接种到96孔板(密度为5 000/孔), 实验组培养介质为100%, 50%, 25%的聚合物材料浸提液, 阳性对照组为0.7%的丙烯酰胺溶液, 阴性对照组为1640培养液。细胞接种2, 4, 6 d后在各组中每次取5个, MTT法测定细胞增殖能力。在Model 550酶标仪上读取吸光度值, 检测波长490 nm。

$$\text{细胞相对平均增殖速率} = \frac{(\text{后一检测点 A 值}) - (\text{前一检测点 A 值})}{(\text{前一检测点 A 值}) \times \text{间隔天数}} \times 100\%$$

根据公式可得出细胞在不同时间段内的细胞相对平均增殖速率。细胞毒性分级评估标准: 0级, 细胞相对增殖率 $\geq 100\%$; 1级, $80\% \leq$ 细胞相对增殖率 $< 100\%$; 2级, $50\% \leq$ 细胞相对增殖率 $< 80\%$; 3级, $30\% \leq$ 细胞相对增殖率 $< 50\%$; 4级, $0 \leq$ 细胞相对增殖率 $< 30\%$ 。

主要观察指标: D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物内毒素实验、致敏实验、小鼠急性毒性实验及细胞增殖能力实验结果。

统计学分析: 对实验结果进行单因素方差分析, 均数间的两两比较采用最小显著差法(Least-significant difference, LSD), $P < 0.05$ 代表差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物内毒素实验结果
实验采用D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液进行内毒素实验, 结果见图1所示: 在阳性对照管内可见管内已形成凝胶且坚硬不易变形物质, 见图1A; 在阴性对照管内无明显凝胶形成, 见图1B; 在样品管中内, 2支管均无明显凝胶形成, 见图1C, 表明D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液内毒素实验结果为阴性。



A: 在鲎试剂中加入内毒素工作标准品溶液的阳性对照管

B: 在鲎试剂中加入细菌内毒素检查用水的阴性对照管



C: 在鲎试剂中加入 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液的样品管

注: 在阳性对照管内已形成凝胶且坚硬不易变形物质, 阴性对照管内无明显凝胶形成, 2支样品管均无明显凝胶形成, 表明D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液内毒素实验结果为阴性。

图 1 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物内毒素实验结果

Figure 1 The results of endotoxin test for shape-memory polymer based on D,L-poly(lactic acid)

2.2 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料致敏实验结果
在致敏实验过程中将D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料浸提液注入实验用小鼠皮下组织, 分别于注入后1, 2,

3 d观察实验现象并记录实验结果, 均未发现红斑或水肿等皮肤致敏性反应症状。实验结果表明D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料无致敏性。

2.3 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料急性毒性实验结果 见表1。

表 1 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物急性毒性实验结果

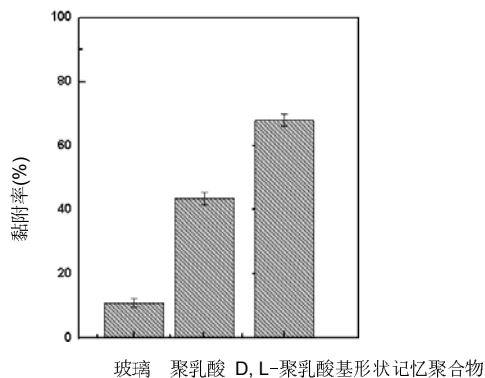
Table 1 The results of acute toxicity test for shape-memory polymer based on D,L-poly(lactic acid)

组别	动物数(n)	观察天数(d)	死亡率(%)
对照组	8	14	0
25%材料浸提液组	8	14	0
50%材料浸提液组	8	14	0
100%材料浸提液组	8	14	0

注: 对照组、25%, 50%, 100%材料浸提液组分别在昆明小鼠腹腔注射生理盐水、100%, 50%, 25% D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液。4组均未见中毒症状, 也无动物死亡, 说明 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物无毒性。

数据表明, 从25%到100%剂量为实验用小鼠给药后, 连续观察14 d发现存活动物体质量无明显变化, 均未出现死亡情况。

2.4 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物对人脐静脉内皮细胞黏附效率和铺展的影响 细胞的黏附与材料表面的物理化学性质密切相关, 它是评价生物材料细胞相容性的一个重要指标。图2为细胞在玻璃、聚乳酸和D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物膜表面的黏附效率, 从图中可以看出, 其黏附率的大小为: D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物>聚乳酸>玻璃。

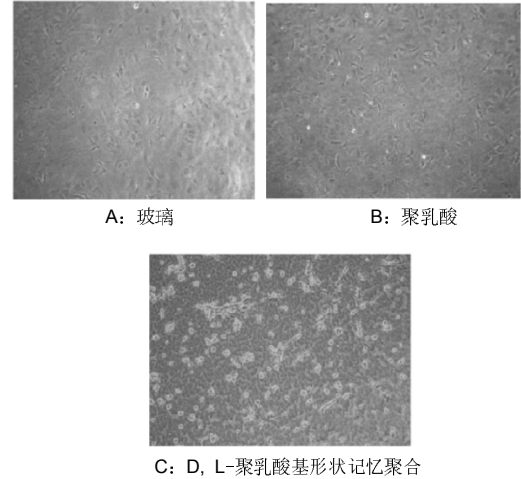


注: 其黏附率的大小为: D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物>聚乳酸>玻璃, 表明 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物膜表面更有利于细胞的黏附。

图 2 人脐静脉内皮细胞在不同材料表面黏附 4 h 后的黏附率

Figure 2 Attachment efficiency of human umbilical cord vascular endothelial cells in different sample surfaces after 4 h seeding

图3为人脐静脉内皮细胞在玻璃、聚乳酸和D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料膜表面的贴壁和黏附状态, 从图中可以看出, 在培养4 h后细胞在聚乳酸上大部分为圆点, 未进行贴壁, 而在D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料上黏附状态都较好, 表现出一定的铺展, 周围出现半透明光晕。



注: 在聚乳酸上大部分细胞为圆点, 未进行贴壁, 而在 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料上细胞黏附状态都较好, 表现出一定的铺展, 周围出现半透明光晕。

图 3 人脐静脉内皮细胞培养于不同材料 4 h 后的黏附形态 (×100)

Figure 3 The morphology of human umbilical cord vascular endothelial cells cultured by different materials after 4 h seeding

2.5 细胞增殖能力评价结果

直接法评价: 实验中在D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料上直接培养人脐静脉内皮细胞, 并采用MTT法评价D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物的细胞增殖活性, 结果见表2。

表 2 人脐静脉内皮细胞接种于不同种材料表面的MTT实验结果

Table 2 Absorbance (A) values by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay on three kinds of materials (x±s, n=5, A)

组别	0 d	2 d	4 d	6 d
玻璃	0.130±0.015	0.395±0.042	0.703±0.019	0.812±0.029
D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物	0.130±0.015	0.267±0.035	0.529±0.028	0.785±0.046
聚乳酸	0.301±0.015	0.221±0.027	0.414±0.017	0.672±0.012

注: 细胞的增殖活力大小依次为聚乳酸<D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物<玻璃(P<均0.05), 表明 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物使得细胞更容易黏附在其表面, 进而有效促进了细胞增殖行为。

对表2中实验数据进行单因素方差分析, 结果表明组间数据差异有显著性意义, 3种材料上细胞的增殖活力大小依次为聚乳酸<D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物<玻璃($P < 0.05$), 且细胞在D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物上的增殖能力要高于聚乳酸。很明显, 伴随着培养时间的延长, 各组材料上的细胞数量均在增加。可能是因为D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物本身具有良好的亲水性, 使得细胞更容易黏附在其表面, 进而有效促进了细胞增殖行为, 见表3。

表3 人脐静脉内皮细胞在不同材料表面的相对平均增殖速率

Table 3 The average proliferating rate of human umbilical cord vascular endothelial cells cultured on three kinds of materials (%)

样品	0→2 d	2 d→4 d	4 d→6 d
玻璃	97.0	35.3	13.6
D,L-聚乳酸基形状记忆聚合物	60.9	49.8	16.5
聚乳酸	32.7	45.5	32.7

注: 培养前 2 d, 玻璃组高于 D,L-聚乳酸基形状记忆聚合物组与聚乳酸组 ($P < 0.05$); 第 2-6 天, D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物组与聚乳酸组高于玻璃组 ($P < 0.05$), 且在培养前 4 d 聚乳酸组低于 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物组 ($P < 0.05$), 说明 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物的细胞相容性好于聚乳酸。

对表3中实验数据进行单因素方差分析, 结果表明组间数据差异有显著性意义($P < 0.05$)。可以得出, 培养前2 d, 玻璃组的细胞增殖率为97%, 均高于D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物组与聚乳酸组($P < 0.05$), 而第2-6天时间内, D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物与聚乳酸组的细胞增殖率高于玻璃组($P < 0.05$), 且在培养前4d聚乳酸组的细胞增殖率低于D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物($P < 0.05$), 这说明D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物的细胞相容性好于聚乳酸。

间接法评价: 在培D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料的浸提液中培养人脐静脉内皮细胞, 实验通过MTT法检测细胞增殖情况, 结果见表4, 图4。

对表4中实验数据进行单因素方差分析, 结果表明组间数据差异有显著性意义($P < 0.05$)。实验中采用的D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液浓度分别为25%, 50%, 100%。实验结果表明, 阴性对照组中的细胞生长情况好于在材料浸提液中的生长情况, 且不同浓度D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液对细胞的生长行为有一定影响。但细胞在3种浓度的浸提液分别培养6 d后, 细胞相对增殖率仍均能达到94%以上, 且细胞毒性为0或1级。

从理论上分析, 可能是由于D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料在降解过程中生成了寡聚体或小分子物

质, 导致D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液对细胞增殖有一定影响。同时实验结果还表明, 随着浸提液浓度的逐渐增大, 其对细胞增殖的影响作用也在逐渐增大。但是值得庆幸的是D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料已经达到生物材料医用标准。因此, 实验认为D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料已具备良好的细胞相容性。

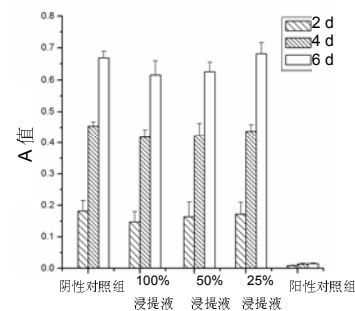
表4 MTT 实验检测不同培养介质培养人脐静脉内皮细胞的吸光度值和毒性级别

Table 4 Absorbance value and cytotoxicity grade by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (n=5)

组别	吸光度值($\bar{x} \pm s$)				细胞相对增殖率 (%)	毒性分级
	0 d	2 d	4 d	6 d		
A	0.059±0.016	0.158±0.030	0.426±0.029	0.619±0.037	94.7	1
B	0.059±0.016	0.174±0.057	0.446±0.028	0.621±0.021	95.2	1
C	0.059±0.016	0.162±0.048	0.423±0.023	0.672±0.035	101.0	0
D	0.059±0.016	0.197±0.036	0.482±0.138	0.688±0.025	100.0	0
E	0.059±0.016	0.008±0.001	0.015±0.002	0.015±0.001	2.3	4

注: A: 100%D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液; B: 50%D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物; C: 25%D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物; D: 1640 培养液; E: 丙烯酰胺溶液。

结果表明不同浓度D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液对细胞的生长行为有一定影响, 但细胞在3种浓度的浸提液中分别培养6 d后, 细胞相对增殖率仍均能达到94%以上, 且细胞毒性为0或1级。



注: 阳性对照以丙烯酰胺溶液培养细胞, 阴性对照以 1640 培养液培养细胞。不同浓度 D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液组细胞 A 值与阴性对照组比较差异无显著性意义, 但两组均高于阳性对照组 ($P < 0.05$)。

图4 在不同浓度 D,L-聚乳酸基形状记忆聚合物浸提液中人脐静脉内皮细胞的吸光度值

Figure 4 Absorbance values of human umbilical cord vascular endothelial cells in different concentrations of polymer extract solutions

3 讨论 Discussion

内毒素是评价材料生物安全性的常用指标。迄今为止,鲎试验是用于内毒素检查的一种灵敏度高且专一性强的实验方法。由于革兰阴性细菌含有的内毒素可以结合鲎血细胞的溶解物,最终生成便于分辨的凝胶状物质,从而判定待测物质是否含有内毒素^[20-22]。

D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料的主链部分由具有良好生物相容性的聚乳酸等构成,决定了D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料本身并不存在致敏性单体。同时,在合成D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料的过程中,已经采取了纯化处理,完全清除了反应体系中包含的小分子物质。另外,随着时间的延长,D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料将降解为乳酸等小分子物质,再经新陈代谢最终生成二氧化碳和水。因此,从理论上分析D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物材料长期应用并不存在致敏反应^[23]。

该D, L-聚乳酸基形状记忆聚合物内毒素试验结果为阴性,说明形状记忆材料无细菌污染和热源反应状况,符合生物安全标准。该材料浸提液和对照品处理动物后24, 48, 72 h时间点均未出现红斑、水肿等皮肤反应,表明该材料无致敏性,在致敏性方面具有良好的生物安全性。通过腹腔注射浸提液进行急性毒性实验,各剂量均未见中毒症状,也均未见明显的脏器有病理改变,同时该材料具有较好的细胞相容性。

致谢:感谢解放军第三军医大学大坪医院动物实验中心的支持。

作者贡献:实验设计为第一作者,具体实施为第二、三、四作者,资料收集为第五作者,实验评估为第六作者。第二作者成文,第一作者审核。

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。

学术术语:急性毒性实验是指在24 h内一次或多次通过包括经口、皮肤、腹腔和静脉等途径,大剂量给予机体外来化学物质后发生的有害作用。

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 References

[1] 奚廷斐.医疗器械生物学评价[J].中国医疗器械信息,1999,5(3):4.

[2] GB/T16886.12-2003.医疗器械生物学评价第12部分:样品制备与参照样品.

[3] GB/T16886.10-2000.医疗器械生物学评价第10部分:刺激与致敏试验.

[4] GB/T16886.11-1997.医疗器械生物学评价第11部分:全身毒性试验.

[5] 胡平.组织工程用外科植入物——高分子材料的加工、改性及应用[J].中国医疗器械信息,2006,12(7):13-21.

[6] Wu K,Zhao Y,Liu BH,et al.RRR- α -tocopheryl succinate inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest. World J Gastroenterol.2002;8(1):26-30.

[7] Andrade LS,Santos DB,Castro DB,et al.Absence of antimutagenicity of Cochlospermum regium (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. Braz J Biol.2008;68(1):141-147.

[8] Oliveira-Martins CR,Grisolia CK.Determination of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated topically with different lubricant oils and cyclophosphamide. Genet Mol Res.2007;6(3): 566-574.

[9] 王雪梅,黄绪亮,赵克森.一种新型医用功能敷料的全身和细胞毒性反应[J].医疗卫生装备,1998,5(1): 6-8.

[10] 张梅霞,姚瑶,李妙,等.四种新型仿生骨组织工程支架材料生物安全性评价[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(19):3641-3644.

[11] Harmand MF,Bordenave L,Bareille R,et al.In vitro study of biodegradation of a Co-Cr alloy using a human cell culture model.J Biomater Sci Polym Ed.1995;6(9): 809-814.

[12] Lee JH,Jung HW,Kang IK,et al.Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups.Biomaterials.1994;15(9): 705-711.

[13] 郝和平.医疗器械生物学评价标准实施指南[M].北京: 中国标准出版社,2000: 102,285-295,334-347.

[14] 王雪梅,黄绪亮,赵克森.一种新型医用功能敷料的全身和细胞毒性反应[J].医疗卫生装备,1998,5(1): 6-8.

[15] Chauhan LK,Kumar M,Paul BN,et al.Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoprothuron on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells.Environ Mol Mutagen.2007;48(8): 636-636.

[16] Bonassi S,Fenech M,Lando C,et al.Human Micronucleus Project: International Database Comparison for Results. Environ Mole Mutagen.2001;37(1): 31-35.

[17] 卢玲,游文玮,王迎军,等.生物活性玻璃的表面修饰及其细胞相容性[J].复合材料学报,2011,28(1):114-118.

[18] 周庆翰,林娟.天然氨基酸生物材料的自组装与细胞相容性研究[J].生物医学工程学杂志,2012,29(5):898-908.

[19] 黄江鸿,王大平,刘建全,等.新型聚乳酸复合纳米羟基磷灰石人工骨的细胞相容性[J].实用骨科杂志,2012,18(4):323-326.

[20] 李春民,董建德,谷涌泉,等. ϵ -己内酯/L-丙交酯聚合物组织工程血管支架材料的生物相容性研究[J].中国修复重建外科杂志,2010,24(8):988-992.

[21] 魏丽,李德超,王静,等.聚乳酸-壳聚糖纤维/羟基磷灰石-硅酸钙复合支架材料的细胞相容性[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(8):1397-1401.

[22] 陈达,计剑,沈家骢.功能化聚乳酸微球改性聚乳酸膜片表面及其细胞相容性[J].高分子学报,2004,48(6):826-829.

[23] 周辉,梁瑜.多种生物材料细胞生物相容性及其安全性的系统评价[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(38):7559-7562.