

以连续浸提法研究铜宫内节育器的大鼠致畸敏感期生殖毒性

张丹丹^{1,2}, 王溢¹, 王春仁¹, 王召旭¹(¹中国食品药品检定研究院, 北京市 100050; ²河南省医疗器械检验所, 河南省郑州市 450003)

文章亮点:

- 1 铜宫内节育器是一种放置在子宫腔内的第三类无源医疗器械。中国标准 GB/T 16886.3-2008 医疗器械生物学评价-第3部分: 遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验, 对铜宫内节育器的生殖毒性检测(致畸敏感期毒性试验)有要求。
- 2 实验创新性采用连续浸提法制作铜宫内节育器浸提液, 在致畸敏感期对大鼠尾静脉注射, 未见对妊娠母体的毒性作用, 对胎鼠外观、骨骼及内脏进行检查也未见形态结构异常。

关键词:

生物材料; 材料相容性; 铜宫内节育器; 浸提液; 大鼠; 生殖毒性; 连续浸提法

主题词:

宫内避孕器, 铜; 生殖毒性; 大鼠

基金资助:

国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAI22B01)

摘要

背景: 铜宫内节育器是目前中国常用的宫腔内植入避孕三类医疗器械, 在长期植入后意外怀孕或停止使用后短期内怀孕的情况下, 是否对胚胎或胎儿有影响尚无明确结论。

目的: 通过观察大鼠致畸敏感期尾静脉注射铜宫内节育器浸提液对孕鼠和胎鼠的影响, 评价铜宫内节育器的安全性。

方法: 将 60 只雌性妊娠 SD 大鼠随机均分为对照组、高剂量组、中剂量组与低剂量组, 高、中、低剂量组从妊娠的第 1 天开始分别尾静脉注射浸提比例为 0.2, 0.1, 0.05 g/mL 的铜宫内节育器浸提液, 每日注射量是 0.01 mL/g, 对照组给予同体积的生理盐水, 连续注射 20 d。20 d 后处死孕鼠, 测量体质量, 检查两侧子宫和内脏器官, 分离胎鼠, 记录子宫与胎鼠质量、黄体数、着床数、死胎、活胎和吸收胎等; 记录胎鼠体质量、身长、尾长、枕骨骨化程度及外观、骨骼、内脏的异常情况。

结果与结论: 高、中、低剂量组的窝数、着床数、活胎数、黄体数、活胎率、死胎率、子宫连胎质量、吸收胎数与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 各组孕鼠内脏无畸形及异常。高、中、低剂量组胎鼠身长、尾长、体质量、上枕骨骨化率与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 胎鼠外观、骨骼、内脏无畸形及异常。表明在致畸敏感期大鼠尾静脉注射铜宫内节育器浸提液后, 未见母体毒性、胚胎生长发育异常及胎鼠畸形及其他胚胎毒性。

张丹丹, 王溢, 王春仁, 王召旭. 以连续浸提法研究铜宫内节育器的大鼠致畸敏感期生殖毒性[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(34):5520-5524.

The reproductive toxicity of rat models implanted with copper-bearing intrauterine device at teratogenic sensitive period by continuous extraction method

Zhang Dan-dan^{1,2}, Wang Yi¹, Wang Chun-ren¹, Wang Zhao-xu¹ (¹National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; ²Henan Provincial Institute for Medical Device Testing, Zhengzhou 450003, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: At present, the copper-bearing intrauterine device, a kind of class III medical devices, is commonly used in China. However, there is no clear conclusion about whether it has impact on the embryo or fetus in some cases, such as unexpected pregnancy during long-term implantation and pregnancy in a short time after removing it.

OBJECTIVE: To evaluate the safety of copper-bearing intrauterine device by observing the influence of copper-bearing intrauterine device extracts on pregnant rats and rat fetuses by tail vein injection in the sensitive period of teratogenesis.

METHODS: A total of 60 fertilized rats were divided into control group, high dosage group, middle dosage group, and low dosage group. The copper-bearing intrauterine device extracts were prepared by the continuous extraction method. Different concentrations (0.2, 0.1, 0.05 g/mL) of copper-bearing intrauterine device extracts were injected by the tail vein at the 1st day of pregnancy in the latter three groups at a dosage of 0.01 mL/g per day. The control group was given the same amount of normal saline. The injection lasted for 20 days. Then, the pregnant rats were sacrificed to measure body mass, check both sides of the uterus and internal organs, isolate fetal rats, as well as record the quality of uterus and fetal rats, corpus luteum, implantation numbers, the number of

张丹丹, 女, 1987 年生, 河南省平顶山市人, 汉族, 2013 年武汉大学生命科学院毕业, 硕士, 实习研究员, 主要从事医疗器械检验方面(生物学评价)相关研究。

通讯作者: 王召旭, 研究员, 中国食品药品检定研究院生物材料与组织工程室, 北京市 100050

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.34.019
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)34-05520-05
稿件接受: 2014-06-25

Zhang Dan-dan, Master, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; Henan Provincial Institute for Medical Device Testing, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Corresponding author: Wang Zhao-xu, Investigator, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Accepted: 2014-06-25

stillbirths, then number of live births and the number of fetal absorption. The fetal rats were determined in the following aspects: body mass, body height, tail length, the ossification degree and appearance of the occipital bone, bone and visceral anomalies.

RESULTS AND CONCLUSION: The number of births, implantation numbers, the number of live births, the number of corpus luteum, the percentages of live births and stillbirths, the number of resorbed fetuses, and the weight of uterus and fetal rats in the control group showed no difference from those in the other three groups ($P > 0.05$). No malformation in the internal organs occurred. Compared with the control group, the high, middle and low dosage groups showed no difference in the height, tail length, body mass, and ossification degree of the occipital bone of fetal rats ($P > 0.05$). No malformation in the appearance, skeleton and internal organs occurred in the fetal rats. These findings indicate that there were no maternal toxicity, abnormal embryonic growth or rat fetus anomalies after injecting copper-bearing intrauterine device extracts into pregnant rats in sensitive period of teratogenesis.

Subject headings: intrauterine devices, copper; preconception injuries; rats

Funding: the Scientific Support Plan of China during the Twelfth Five-Year Period, No. 2012BAI22B01

Zhang DD, Wang Y, Wang CR, Wang ZX. The reproductive toxicity of rat models implanted with copper-bearing intrauterine device at teratogenic sensitive period by continuous extraction method. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(34):5520-5524.

0 引言 Introduction

宫内节育器最早用于避孕是在1909年,是一种放置在子宫腔内的医疗器械。世界卫生组织在2002年的调查显示,全世界已有1.56亿妇女使用宫内节育器,其中亚洲国家使用者占多数,中国使用者占全世界的半数以上^[1]。目前中国采取宫内节育器避孕的妇女占采取避孕措施育龄妇女的45%,占全世界使用宫内节育器的70%^[2-3]。宫内节育器用于临床是在20世纪30年代,70年代以前多为惰性宫内节育器,70年代后陆续出现含铜、含药(活性)、含孕激素的宫内节育器^[4]。当Zipper等发现铜离子有卓越避孕功能后,铜宫内节育器的研究和应用倍受瞩目。铜离子具有高效避孕功能,铜宫内节育器在宫腔内受腐蚀后释放出铜离子,使子宫环境抑制精子和受精卵的活力,杀伤精子,使其丧失受精能力,使受精卵、胚泡的着床能力下降,具有较好的避孕效果;多数研究证明,宫内节育器置入体内对子宫内微细结构的损伤(无细胞的严重破坏)也是避孕机制之一^[5-8]。但宫内节育器也有两面性,它既能避孕又会引起不良反应,如脱落、带器妊娠、月经量过多、月经期延长、不规则出血等^[9-10]。由于铜宫内节育器避孕效果良好,妊娠率和脱落率低等方面优于惰性金属宫内节育器,被广泛使用^[11]。铜宫内节育器的常见不良反应是月经量增多和出血,可能由于铜离子的释放致使宫腔内发生某些改变^[12-13]。铜宫内节育器置入初期可能会引起不良反应,如盆腔炎、疼痛、出血及月经量增多等,因此如何在保证避孕效果的前提下,有效解决铜离子的暴释(突释)现象是铜宫内节育器需解决的问题^[14]。目前虽无确凿证据表明铜的生物毒性对妇女有临床意义的伤害,但深入研究是必要的^[15]。随着铜宫内节育器被越来越广泛的使用,其安全性也引起人们的高度关注^[16]。

外源性环境因素不仅可能有胚胎毒性,可表现为胚胎死亡、胚胎生长迟缓、畸形及功能不全,而且可能对妊娠母体也有毒性作用。生殖毒性实验专门用于检测外源性环境因素对生殖功能,胚胎生长发育(致畸性)、出生前及出生初期生长发育等的潜在影响^[17-20]。

中国的生殖毒性试验为3段,按照生育周期分类,包括一般生殖毒性试验(I段)、致畸敏感期毒性试验(II段)和围产期毒性试验(III段);II段试验在器官发生期,使妊娠试验动物接触不同剂量的供试品,在预期的分娩日稍前处死妊娠动物,取出子宫,检查胚胎或胎儿死亡数、活胎数及畸形(外观畸形、骨骼畸形及内脏畸形)等发生情况,揭示母体孕期接触试验供试品对胚胎发育(致畸性)及胎儿和婴儿早期发育的潜在影响,为评价试验供试品在使用中的安全性提供信息参考^[17-20]。致畸试验作为评价生物材料和医疗器械生殖毒性的重要方法被广泛采用,是评定外源性因素是否具致畸作用的标准方法^[20]。

铜宫内节育器是一种放置在子宫腔内的第三类无源医疗器械。中国标准GB/T 16886.3-2008医疗器械生物学评价-第3部分:遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验,对铜宫内节育器的生殖毒性检测(致畸敏感期毒性试验)有要求,三类医疗器械对人体存在潜在危险,其安全性有效性必须加以严格控制,宫内节育器放入后长期与子宫接触,可能对母体和胚胎或胎儿有直接影响,需要进行生物学危害分析评价^[20]。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2013年6月至2014年5月在中国科学院遗传与发育生物研究所完成。

材料: 供试材料是由河南雅康药业有限公司生产的规格及型号为20 mm×22 mm(中号)的管状金属铜宫腔形宫内节育器。节育器按生产企业要求避光,干燥、密闭保存。

实验系统: 实验中使用《医疗器械生物学评价》中建议使用的大鼠。SD大鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001,实验动物使用许可证号:SYXK(京)2010-0037。从通过检疫的健康清洁级SD大鼠中,挑选鼠龄在70-77 d、健康性成熟未经交配生育的雌鼠60只和

雌鼠30只。要求雌鼠体质量在210–230 g之间, 雄鼠体质量在230–250 g之间。按照常规饲养条件喂养: 每个标准饲养盒2只, 光照时间为8:00–20:00, 室温21–27 °C, 湿度40%–70%。

实验方法:

实验分组: 将雌雄鼠以2:1同笼交配, 次日晨, 用生理盐水冲洗雌鼠阴道, 涂片, 显微镜观察, 发现残留精子视为交配成功, 将已交配的雌鼠称质量, 做好标记, 编号并记录交配日期, 然后随机分入对照组、高剂量组、中剂量组与低剂量组中。检测到精子当天定为妊娠期第零天(D₀), 第2天为妊娠期第1天(D₁), 依次类推。没有交配的雌鼠继续交配。如发现数日未交配者, 则将雌鼠取走移入其他雄鼠笼中继续交配。

给药方法: 采用连续浸提的方式制备铜宫内节育器浸提液。无菌操作取出铜宫内节育器, 根据需要准备充足的检品到浸提容器中, 用生理盐水做浸提介质, 按照0.2 g/mL的比例浸提; (37±1) °C, 浸提(24±2) h, 之后将浸提液用无菌注射器全部抽吸转移到其他容器中, 用于当日大鼠尾静脉注射, 制备后立即使用^[21]。然后, 加入同体积的介质到浸提容器中, 继续浸提, 制备次日注射需要浸提液。高剂量组尾静脉给予浸提比例为0.2 g/mL的溶液, 将此浸提液稀释2倍给予中剂量组动物, 稀释4倍给予低剂量组动物; 对照组动物给予同体积的生理盐水。每组雌性大鼠15只, 按0.01 mL/g给药^[21]。各组于妊娠期第1天开始给药, 每天1次, 连续给药至第20天, 给药途径为尾静脉注射。给药期间每3 d称体质量1次, 根据体质量变化调整给药量。

母鼠检查: 大鼠孕期为21 d, 妊娠第20天时处死母鼠。母鼠处死后立即称质量, 然后切开腹部暴露两侧子宫和内脏器官, 发现任何内脏有异常应作好记录, 必要时留取异常组织, 做好标记放入体积分数10%甲醛溶液中固定, 以便将来作组织病理学检查。切除子宫和分离胎仔, 称子宫与胎仔质量、计数黄体数, 然后纵向切开子宫, 分离出胎仔、记录死胎、活胎和吸收胎, 计数总着床数, 并记录活胎和胎盘质量。

胎鼠检查:

胎鼠外观检查: 按照头部、四肢、躯干、尾部的顺序对胎鼠进行检查; 对每只胎鼠肉眼检查, 如果肉眼不能确定某种畸形时, 将胎鼠放在解剖显微镜下进一步确定并照相。观察下列内容: 胎鼠头部有无露脑、脑膜膨出, 头部大小; 眼睛的有无, 眼所在部位及大小, 突眼或开眼等; 两耳、鼻和嘴外表是否正常和对称, 有无唇裂; 四肢有无多趾(指)、并趾、少趾、无趾、足内外翻、短肢等畸形; 躯干有无脐疝、腹裂(内脏膨出), 脊髓膨出、脊柱裂、脊柱侧突等; 有无短尾、卷尾、无尾和尾分叉等。

胎鼠骨骼检查: 将每窝1/2胎鼠放入体积分数95%乙醇中固定作为骨骼检查。①骨骼标本的制备: 每只胎鼠去内脏, 然后放入1% KOH溶液中浸泡2 d, 直至能很清

楚地看见骨骼为止, 必要时中间可更换1次KOH溶液。然后将骨骼标本放入茜素红应用液中染色16 h左右, 直至全部骨骼染成紫红色为止, 如必要可更换1次染液。染色以后, 用自来水冲净标本, 倒掉染液, 1%KOH脱色3–5 d, 将标本分别置于透明液A液(甘油20 mL, 1% KOH 6 mL, 蒸馏水74 mL)、B液(甘油50 mL, 1% KOH 6 mL, 蒸馏水44 mL)、C液(甘油75 mL, 蒸馏水25 mL)脱色一两天。若透明度不够满意, 可适当延长胎仔在透明液中的时间。如在前一透明液达到透明, 也可不再进入随后的透明液。

②骨骼检查: 颅骨是否完整, 有无骨化不全, 骨缝的宽窄, 枕骨的形状, 上枕骨骨化程度定级; 胸骨块数, 是否畸形; 有无多肋、少肋、肋骨分叉、融合、波状肋等畸形; 四肢骨的骨化程度、长短粗细等。

胎鼠上枕骨骨化程度的分级标准^[22]:

分级	表现
0级	上枕骨成片状或哑铃状, 两侧骨化点完全融合, 融合处宽度大于两侧的1/3
I级	上枕骨两侧骨化点相连, 相连处宽度小于两侧的1/3
II级	上枕骨两侧骨化点不相连, 但可清楚地见到两个较大的骨化点
III级	上枕骨两侧的骨化点不相连, 仅见小骨化点或仅见一侧骨化点
IV级	未见上枕骨骨化点

胎鼠内脏检查: 将每窝1/2胎鼠放入Bouin's液固定, 作为内脏检查。胎鼠内脏徒手切片检查: 将胎鼠从Bouin's液中取出, 自来水冲净。测量每只胎鼠身长及尾长。进行头部切片和内脏切片检查: 舌有无异常, 有无腭、唇裂, 鼻腔是否通, 鼻咽腔及眼球等有无异常, 大脑半球和侧脑室有无畸形和扩张, 间脑的III脑室检查这些部位有无异常; 判断性别, 各脏器有无异常。

结果统计与分析: 各组母鼠平均体质量, 胎鼠体质量、身长、尾长, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *t*检验进行显著性分析。活胎、死胎、畸形、吸收胎等计数资料用百分率表示, 采用 χ^2 检验进行显著性分析。

$$\text{活胎率(\%)} = \frac{\text{活胎数}}{\text{胎鼠数}} \times 100\%$$

$$\text{死胎率(\%)} = \frac{\text{死胎数}}{\text{胎鼠数}} \times 100\%$$

$$\text{吸收胎率(\%)} = \frac{\text{吸收胎数}}{\text{着床数}} \times 100\%$$

$$\text{畸形率(\%)} = \frac{\text{畸形仔鼠数}}{\text{受检胎鼠数}} \times 100\%$$

$$\text{孕鼠体质量净增长} = \text{解剖前体质量} - \text{受孕第6天体质量} - \text{子宫连胎质量}$$

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 60只孕鼠均进入结果分析。

2.2 孕鼠检查 孕鼠尾静脉注射铜宫内节育器浸提液, 连续给药20次未见动物异常反应。大鼠孕期无阴道流血、流产等异常现象。与对照组比较, 各受试组动物在孕期D₀、D₃、D₆、D₉、D₁₂、D₁₅、D₁₈、D₂₀体质量与对照组比较差异无显著性意义。计算孕鼠体质量净增长结果显示各实验

表1 尾静脉注射铜宫内节育器浸提液对孕鼠生殖功能的影响

Table 1 The reproductive function of the pregnant rats after tail vein injection of copper-bearing intrauterine device extracts

检查指标	对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
检测窝数	10	9	9	8
黄体数	142	123	130	116
窝平均黄体数($\bar{x}\pm s$)	14.2 \pm 3.9	13.7 \pm 2.9	14.4 \pm 2.4	14.5 \pm 1.2
总着床数	129	107	116	99
平均着床数($\bar{x}\pm s$)	12.9 \pm 4.5	11.9 \pm 4.4	12.9 \pm 2.1	12.4 \pm 3.6
活胎				
窝数	10	9	9	8
活胎数	127	107	116	99
窝平均数($\bar{x}\pm s$)	12.7 \pm 4.3	11.9 \pm 4.4	12.9 \pm 2.1	12.4 \pm 3.6
活胎率(%)	100	100	100	100
吸收胎				
窝数	3	1	0	3
吸收胎数	5	5	0	5
吸收胎率(%)	3.9	4.7	0	5.0
死胎				
窝数	0	0	0	0
死胎数	0	0	0	0
死胎率(%)	0	0	0	0
子宫连胎质量				
窝数	10	9	9	8
平均子宫连胎质量($\bar{x}\pm s$)	66.6 \pm 21.2	68.9 \pm 23.8	76.7 \pm 10.0	68.8 \pm 18.4

表注: 结果显示宫腔形宫内节育器浸提液对大鼠生殖功能无明显影响。

组与对照组比较差异无显著性意义。妊娠20 d处死孕鼠解剖检查, 未见各组孕鼠有特征性内脏畸形和异常。

铜宫内节育器对孕鼠生殖功能的影响: 由表1可见, 宫腔形宫内节育器浸提液受试组与对照组比较, 未见其对大鼠生殖功能有明显影响。3个受试组孕鼠的平均着床数、窝平均活胎数、平均黄体数、活胎率、死胎率及子宫连胎质量与对照组比较差异均无显著性意义($P > 0.05$)。各受试组吸收胎率与对照组比较未见显著升高。铜宫内节育器浸提液各受试组平均胎盘质量与对照组比较未见明显降低。

2.3 胎鼠检查

宫腔形宫内节育器对胚胎生长发育的影响: 由表2可见, 铜宫内节育器浸提液各组胎鼠身长、尾长与对照组比较未见显著性差异, 铜宫内节育器浸提液各组胎鼠平均体质量与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

对胎鼠外观、骨骼及内脏进行检查, 共443只。对照组和各受试组未见皮下出血和其他外观畸形。对224只胎鼠进行骨骼检查, 结果见表3。上枕骨检查结果显示, 各受试组与对照组骨化率比较差异无显著性意义, 实验结果表明宫腔形宫内节育器对胎鼠骨骼骨化无不良影响。

各组胎鼠外观、骨骼、内脏检查情况: 对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组检测窝数分别为10, 9, 9, 8, 胎鼠数分别为121, 107, 116, 99只, 异常数与异常率均为0(外观异常主要表现为皮下出血); 骨骼检查的胎鼠数分别为61, 56, 57, 50只, 异常数与异常率均为0(骨骼异常主要表现为第五胸骨缺失); 内脏检查的胎鼠数分别为60, 51, 59, 49

表2 尾静脉注射铜宫内节育器浸提液对胎鼠生长发育的影响

Table 2 The development of the rat fetus after tail vein injection of copper-bearing intrauterine device extracts into the pregnant rats

组别	受检窝数	身长($\bar{x}\pm s$, mm)	尾长($\bar{x}\pm s$, mm)	胎鼠质量($\bar{x}\pm s$, g)	平均胎盘质量($\bar{x}\pm s$, g)
对照组	10	5.70 \pm 0.16	1.50 \pm 0.06	3.50 \pm 0.30	0.57 \pm 0.09
低剂量组	9	5.80 \pm 0.07	1.50 \pm 0.05	3.80 \pm 0.19	0.62 \pm 0.27
中剂量组	9	5.80 \pm 0.17	1.50 \pm 0.06	3.80 \pm 0.26	0.54 \pm 0.04
高剂量组	8	5.80 \pm 0.12	1.50 \pm 0.04	3.70 \pm 0.10	0.51 \pm 0.04

表注: 结果显示铜宫内节育器对胚胎生长发育无影响。

表3 尾静脉注射铜宫内节育器浸提液对胎鼠上枕骨骨化程度的影响

Table 3 The ossification of supraoccipital bone in rat fetus after tail vein injection of copper-bearing intrauterine device extracts into the pregnant rats (n/%)

组别	受检胎鼠(n)	上枕骨骨化程度				
		0级	I级	II级	III级	IV级
对照组	61	58/95.1	3/4.9	0	0	0
低剂量组	56	53/94.6	3/5.4	0	0	0
中剂量组	57	54/94.7	3/5.3	0	0	0
高剂量组	50	49/98.0	1/2.0	0	0	0

表注: 结果显示铜宫内节育器对胎鼠骨骼骨化无不良影响。

只, 异常数与内脏畸形率均为0。内脏检查胎鼠共219只, 各组内脏未发现畸形。显著性检验各给药组外观、骨骼异常率、内脏畸形率与对照组差异无显著性意义($P > 0.05$)。

3 讨论 Discussion

致畸试验是评定外源性因素致畸作用的标准方法, 是评价医疗器械(材料)生殖毒性时的首选方法, 多年来一直被许多国家或机构推荐和使用; 它作为很重要的一段毒性试验, 主要用于评价供试品所诱发的胚胎毒性(死亡、畸形、迟缓生长和功能障碍)和致畸潜力^[19-20]。

像铜宫内节育器这样的三类医疗器械与生殖组织、胚胎或胎儿直接长期或永久性接触的器械要进行生殖发育毒性试验, 对其安全性、有效性必须加以严格控制^[23-24]。对其潜在的致畸性进行测定是很重要的, 为孕期接触医疗器械(材料)或其浸提液可能对胎儿造成的潜在危害提供信息^[20]。在本实验中, 用连续浸提的方法制备宫内节育器浸提液, 在致畸敏感期对大鼠尾静脉注射, 未见对妊娠母体的毒性作用, 对胎鼠外观、骨骼及内脏进行检查也未见形态结构异常。

有文章报道, 在模拟子宫液和模拟体液中浸提T型铜避孕器(TCu380A IUD)和宫内节育器(TCu220C IUD), 在不同时间跨度, 用原子吸收光谱测铜离子的释放速率, TCu380A IUD的最高腐蚀速率在第1天测到, 而TCu220C IUD的最高腐蚀速率在第3天测到。通过铜离子含量检测, 发现铜离子会在前3 d突释, 后来降低到较低水平并保持平稳^[6]。铜宫内节育器的避孕作用可以归因于铜离子释放, 有效避孕的铜宫内节育器生物材料能持续释放铜离子, 并出现

最初前3 d铜离子突释, 后来持续缓释^[6-7]。细胞内, 铜分布在所有细胞组分中, 包括细胞核、线粒体、内质网和细胞溶质; 在细胞中, 过量的铜被认为会与多种大分子非特异的相互作用, 改变它们的构象或引起位点特异性损伤, 由此产生基本细胞过程的破坏, 进而触发凋亡^[6-8]。

铜离子的毒性效应使细胞变圆, 最后从培养基平皿表面脱落, 对细胞生存能力、形态、凋亡、细胞周期有影响。国际标准ISO-10993-5推荐L929鼠成纤维细胞作为体外研究生物相容性使用的细胞。有研究者以L929鼠成纤维细胞为实验材料, 通过显微镜观察细胞形态和数目, 检测细胞活力(MTT法)、细胞凋亡和细胞周期, 研究铜离子浓度依赖的铜离子毒性效应; 最初几天的出现的铜离子突释, 使细胞处于接近致死铜离子浓度的环境中^[7]。显微镜下观察鼠成纤维细胞的发现, 与阴性处理(0% Cu)样品比较, 经铜宫内节育器24 h浸提液处理后细胞形态发生明显变化, 而且原本贴壁生长的细胞数目减少; 在流式细胞仪检测细胞凋亡的实验中, 观察到随着铜离子浓度的增加活细胞数量减小, 早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞数目增加^[7]。体内环境中铜离子可能会引起的广泛变质性病变^[5]。由此可见, 最初的铜离子突释会对细胞组织产生极强的副作用, 甚至致死^[6-8]。

宫内节育器是植入性医疗器械, 它在体内是同一个器械连续、持续在体内发挥作用的, 包括毒体作用。作者科室研究表明, 该类器械铜离子的释放是突释型的, 如果采用一般的浸提方法将会出现高于实际量的铜给入动物体内^[6-8]。连续浸提的方法, 能较真实地模拟宫内节育器的实际使用情况。作者科室研究表明, 含铜宫内节育器肌肉植入后出现严重化脓性炎症反应, 这一现象与材料特性相关, 不适合用肌肉植入法评价含铜宫内节育器的安全性^[5]。因此确定了实验采用连续浸提法, 浸提条件为(37±1) °C, (24±2) h, 因为宫内节育器这种医疗器械的临床使用时的环境温度约为37 °C。

为了保证医疗器械的安全、有效, 保障人体健康和生命安全, 对医疗器械进行检验时, 检验方法一定要参照相关法律法规和标准, 充分考虑生物材料特点、临床使用策略等各方面因素, 对试验方法进行尽可能的合理科学设计, 并严格进行试验。

致谢: 感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所助理工程师尹艳云在实验技术上的帮助。

作者贡献: 全体作者共同构思并设计、完成实验, 分析并解析数据, 起草论文, 经通讯作者审校, 通讯作者对本文负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验中对动物处置符合动物伦理学标准的条例。

学术术语: 宫内节育器-是一种放置在子宫腔内的避孕装置, 由于初期使用的装置多是环状的, 通常叫节育环。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和

专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 傅晓敏, 黄丽丽. 宫内节育器现状[J]. 中国妇幼保健研究, 2006, 17(3): 241-244.
- [2] Progress in Reproductive Health Research (SHR). China to upgrade its IUD technology. 2002;60:4.
- [3] 尉建霞, 韩丽晖. 含铜宫内节育器的远期安全性研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2007, 2(136): 122-123, 128
- [4] 吴尚纯. 宫内节育器的应用进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2009, 28(2): 75-77.
- [5] 张华, 王召旭. 含铜宫内节育器子宫角植入后局部反应的早晚期评价[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(8): 1407-1412.
- [6] Cao BM, Xi TF, Zheng YD. Release behavior of cupric ions for TCu380A and TCu220C IUDs. Biomed Mater. 2008;3(4): 044114(7pp).
- [7] Cao B, Zheng Y, Xi T, et al. Concentration-dependent cytotoxicity of copper ions on mouse fibroblasts in vitro: effects of copper ion release from TCu380A vs TCu220C intra-uterine devices. Biomed Microdevices. 2012;14(4): 709-720.
- [8] Cao BM, Xi TF, Zheng YD, et al. Cupric ion release and cytotoxicity for Yuangong Cu-IUDs and the release behavior of indomethacin for medicated 220 Cu-IUD. Chinese Sci Bull. 2009;54(18):3160-3166.
- [9] 黄江涛, 廖伟英, 王奇玲, 等. 3种含铜宫内节育器的临床效果及影响因素[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(10): 1508-1511.
- [10] 王兰, 杨翠. 三种含铜宫内节育器临床效果观察[J]. 中国医学创新, 2012, 9(9): 22-23.
- [11] 岳帮静. 含铜宫内节育器与金属宫内节育器的比较[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2006, 27(15): 1837.
- [12] 吴尚纯, 邹燕. 宫内节育器应用现状与研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2009, 25(10): 795-797.
- [13] 茹红瑞. 三种含铜宫内节育器的临床效果[J]. 职业与健康, 2011, 27(19): 2277-2278.
- [14] 曹变梅, 奚廷斐. 不同含铜宫内节育器在模拟宫腔液中的铜离子释放研究[J]. 中国药事, 2012, 26(1): 22-24, 34.
- [15] 楚光华, 吴尚纯. 含铜宫内节育器的生物安全性[J]. 中国计划生育和妇产科, 2013, 5(4): 24-26.
- [16] 曹变梅, 奚廷斐, 郑裕东. 含铜宫内节育器铜丝和铜套在模拟宫腔液中的腐蚀[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(29): 5691-5694.
- [17] 卫生部药政管理局, 生物材料和医疗器械生物学评价技术要求[Z]. 1997年11月04日.
- [18] 中华人民共和国卫生部药政局, 新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药理学、药理学、毒理学)[Z]. 1993年7月.
- [19] GB/T 16886.3-2008 医疗器械生物学评价-第3部分: 遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验.
- [20] 奚廷斐, 辛仁东, 薛淼, 等. 医疗器械生物学评价[M]. 北京: 中国质检出版社, 中国标准出版社, 2012: 1-49, 196-202.
- [21] GB/T 16886.12-2005 医疗器械生物学评价-第12部分: 样品制备与参照样品.
- [22] 吴德生, 董奇男, 衡正昌, 等. 在致畸研究中小鼠胎鼠发育迟缓的评价指标[J]. 四川医学院学报, 1984, 15(1): 59-63.
- [23] GB/T 16886.1-2001 医疗器械生物学评价-第1部分: 评价与试验的定义.
- [24] 国家食品药品监督管理局, 医疗器械注册管理办法[Z]. 2004; 局令第16号.