

HA-P 软腭植入材料的研制及细胞毒性检测

付晓燕^{1,2} 汪建^{1,2} 张余² 熊敏²

(¹ 广州医学院, 广东 广州 510182; ² 广州军区广州总医院耳鼻咽喉科, 广东 广州 510010)

摘要 目的: 研制一种新的治疗鼾症的软腭植入系统微创手术的生物材料并于体外检测其细胞毒性, 探讨将其应用于软腭植入系统的可能性。**方法:** 将羟基磷灰石颗粒 (HA)、聚乳酸-三亚甲基碳酸酯 P(LA-TMC) 按一定比例复合, 利用有机溶剂注模法, 制备重组软腭植入材料; 并采用 MTT 检测法, 将不同浓度的 HA-P 浸提液与 NH-3T3 成纤维细胞接触 1、3、5 d 检测细胞的增殖活性, 计算细胞的相对增殖度, 用 6 级毒性法进行评级。**结果:** 研制不同浓度的 HA-P 材料浸提液在不同的时间点培养的细胞均正常增殖 ($P > 0.05$), 毒性级别为 0~1 级。**结论:** 研制的 HA-P 材料具有良好的细胞相容性, 可能是一种良好的软腭植入系统材料。

关键词 软腭植入; 羟基磷灰石; 聚乳酸-三亚甲基碳酸酯; 细胞毒性; NH-3T3 小鼠成纤维细胞

中图分类号 R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-1836(2006)06-0014-04

Development and Cytotoxicity Assessment of Palatal Implant Material Made from Hydroxyapatite and Poly(lactide-co-trimethylene carbonate)

FU Xiaoyan^{1,2}, WANG Jian^{1,2}, ZHANG Yu², XIONG Min²

(¹ Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182; ² Dept of ENT, General Hospital of Guangzhou Military Division, Guangzhou 510010, China)

Abstract Objective To explore a new material for palatal implant system and evaluate its cytotoxicity. **Methods** organic solvent molding of hydroxyapatite and poly(lactide-co-trimethylene carbonate) proportionally mixed was performed to obtain palatal implant material. NH-3T3 rat fibroblasts were exposed to different doses of HA-P extracts. After 1, 3, 5 days, cell proliferation and relative multiplication rate were calculated with MTT assay. Cytotoxicity was assessed by a 6-scale system. **Results** cell proliferation was normal in the different extract at different time points. Levels of toxicity ranged from 0 to 1 grade. **Conclusion** The HA-P material is compatible with tested cells and therefore can be used for palatal implant system.

Key words palatal implant; hydroxyapatite; poly(lactide-co-trimethylene carbonate); cytotoxicity; NH-3T3 rat fibroblasts

鼾症是一种常见的疾病, 在中老年、体形肥胖、嗜烟酒、患有高血压的男性人群中患病率高达 28%~67%, 成年人中有 20% 的人有习惯性打鼾^[1]。Walker 等^[2]认为 70% 的鼾症患者系软腭的异常抖动而产生鼾声。鼾症和阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征近年来受到广泛关注, 治疗方法很多, 各有优缺点, 近年提出的微创手术——软腭植入系统^[3]在国外已应用临床, 国内尚刚刚起步。但该手术关键的内植入材料价格昂贵, 有轻度排斥反应, 降解速率不可控以及远期生物学效应尚不肯定。为了研制理想的软腭系统植入材料, 根据软腭植入材料治疗鼾症的原理, 本研究选择近年来国内外研究比较活跃的两种材料——羟基磷灰石 (hydroxyapatite) 和聚乳酸-三亚甲基碳酸酯 poly(lactide-co-trimethylene carbonate) 简称 HA-P, 利用有机溶剂注模法组合软

腭系统植入材料, 并对其细胞毒性进行了检测。

本研究参照 GB/T16886.5—2003/ISO 10993—5:1991^[4] 标准对 HA-P 材料进行细胞毒性试验。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 羟基磷灰石由广州军区广州总医院医学实验科生物人工骨实验室研制, 经水热反应 24 h 聚乳酸-三亚甲基碳酸酯 (质量比 70/30) 由济南岱罡生物科技有限公司提供, 粘度 0.6 RPM I 1640 培养液 (美国 Sigma)、新生小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司)、胰蛋白酶、二甲基亚砷 (DMSO)、MTT、苯酚 (美国 Sigma)。

1.1.2 仪器 DZF-6021 型真空干燥箱 (上海一恒科技有限公司)、电子天平、国家标准检验筛 (浙江上虞县哨百鸣五金筛厂)、倒置光学显微镜、超净工作台、CO₂ 培养箱、蒸汽灭菌器、电热恒温水浴锅、96 孔培养板、酶标仪。

1.2 方法

基金项目: 广东省自然科学基金资助 (5000131)。

作者简介: 付晓燕 (1981.3-), 女, 硕士研究生。

研究方向: 软腭植入系统生物医学材料研究。

1.2.1 HA-P 的制备 羟基磷灰石、聚乳酸-三甲基碳酸酯 = 1:1 (质量比), 其中羟基磷灰石经研磨过筛后选择孔径为 0.5 mm 的小颗粒, 高温高压消毒处理; 聚乳酸-三甲基碳酸酯 37 °C 环氧乙烷消毒灭菌 12 h。按配方将称量好的聚乳酸-三甲基碳酸酯加入到三氯甲烷中, 密封静置 12 h 配成浓度为 20% 的溶液。聚乳酸-三甲基碳酸酯完全溶解后, 将定量的羟基磷灰石颗粒加入到溶液中, 充分搅拌, 直至肉眼见羟基磷灰石颗粒均匀分散于聚乳酸-三甲基碳酸酯溶液中, 此时混合物呈凝胶状^[5]。将此混合物倾注于本实验室自行设计的直径为 2 mm, 长 18 cm 的圆柱形模具中, 置于 37 °C 恒温真空干燥箱中任三氯甲烷挥发 24 h 混合物自行固化。将 HA-P 取出, 切割成长 18 mm, 直径 2 mm。以上操作均在超净工作台完成。

1.2.2 浸提液的制备 浸提介质为含体积分数为 10% 的新生小牛血清的 RPMI 1640 培养液 (新鲜配置, pH = 7.2)。按照 HA-P 的重量: 浸提介质 = 0.2 g: 1 mL 比例配置, 37 °C, 体积分数为 5% CO₂ 培养箱中浸提 72 h 备用。

1.2.3 NH-3T3 成纤维细胞的培养 取生长旺盛的 NH-3T3 成纤维细胞 (小鼠成纤维细胞, 由广州军区广州总医院医学实验科提供) 经传代培养 72 h 后, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化单层培养细胞, 体积分数为 10% 的小牛血清 RPMI 1640 培养液终止消化, 稀释, 将细胞按密度 2×10^3 cell/mL 接种到 96 孔培养板, 每孔 200 μ L, 重复 6 遍, 培养 24 h。

1.2.4 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 检测法 将浸提液按浓度 100% 的原液依次进行 2^{-1} 倍比稀释至 2^{-4} , 阳性对照为体积分数为 0.64% 的苯酚, 阴性对照为 RPMI 1640 培养液, 空白对照为培养液, 不接种细胞。细胞贴壁 24 h 后, 弃去培养液。取上述实验组分别加入不同浓度的浸提液 200 μ L, 37 °C, 体积分数为 5% CO₂ 培养箱培养 1, 3, 5 d 后^[3], 每孔加入 MTT 溶液 20 μ L, 置入含体积分数 5% CO₂ 培养箱内, 在 37 °C 温度下培养 4 h 弃去孔内液体, 每孔分

别加入 150 μ L DMSO, 将培养板震荡 10 min, 酶标仪 492 nm 波长下测定各孔的吸光度 (A 值), 计算细胞相对增殖率 (RGR) 及显微镜下观察各试样培养区细胞的生长情况。RGR (%) = (材料组吸光度 - 空白对照度) / (阴性对照吸光度 - 空白对照吸光度) $\times 100$ 。

1.2.5 HA-P 的毒性分级评定及细胞毒性的形态判定标准 HA-P 毒性分级按 6 级毒性分级法评定表^[4]及细胞毒性的形态学判定标准, 见表 1。

表 1 6 级毒性分级法

Tab 1 Classification of toxicity

Relative growth rate	100	75~99	50~74	25~49	1~24	0
Toxicity level	0	1	2	3	4	5

2 结果

2.1 HA-P 复合材料的外观

HA-P 复合材料外观呈黄白色, 质地均匀且柔软而有弹性, 肉眼见外表光滑, 见图 1。



图 1 HA-P 复合材料的外观

Fig 1 The appearance of HA-P

2.2 HA-P 复合材料浸提液的细胞毒性结果

显微镜下观察各试样形态学, 通过荧光显微镜对细胞生长的各个时期情况进行观察, 见浸提液组和阴性对照组成纤维细胞形态正常, 生长良好, 细胞均呈菱形、梭形或类圆形, 未见异常核分裂相, 成纤维细胞数量随时间的延长而逐渐增多, 到第 5 天已基本全部布满培养板孔底, 见表 2 表 3 和图 2。

表 2 细胞毒性的形态学判定标准

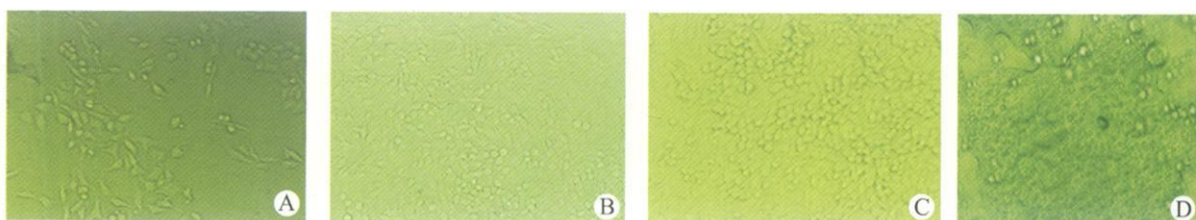
Tab 2 The morphological criterion of cytotoxicity

Toxicity level	No toxicity	Mild toxicity	Moderate toxicity	Severe toxicity
Cell morphology	The cell grows along the wall well shaped	The cell grows along the wall well but there are a few atrophic cells with rhombic or irregular shapes and suspended dead cells occasionally	The cell grows along the wall not well there are few suspended dead cells and some atrophic cells up to 1/3	The cell doesn't grow along the wall basically there are 90% suspended dead cells at least

表 3 MTT法检测 HA-P材料浸提液对 NH-3T3细胞毒性实验结果

Tab 3 The MTT result of HA-P toxicity on NH-3T3 cell

The concentration of HA-P	day 1			day 3			day 5		
	$\bar{x} \pm s$	RGR	Toxicity level	$\bar{x} \pm s$	RGR	Toxicity level	$\bar{x} \pm s$	RGR	Toxicity level
100%	0.688 ± 0.100	108	0	1.491 ± 0.168	99	1	1.562 ± 0.264	97	1
50%	0.674 ± 0.126	105	0	1.481 ± 0.117	99	1	1.562 ± 0.264	107	0
25%	0.600 ± 0.191	90	1	1.580 ± 0.170	106	0	1.600 ± 0.344	100	0
12.5%	0.600 ± 0.144	90	1	1.340 ± 0.110	88	1	1.602 ± 0.201	97	0
6.67%	0.672 ± 0.146	104	0	1.413 ± 0.210	93	1	1.554 ± 0.123	100	1
Negative group	0.648 ± 0.090	100	0	1.500 ± 0.192	100	0	1.604 ± 0.178		0
Blank group	0.152 ± 0.019			0.182 ± 0.0135			0.118 ± 0.021		
Positive group	0.149 ± 0.014	1	4	0.192 ± 0.019	1	4	0.133 ± 0.017	1	4



A: D1 of cell toxicity test B: D3 of cell toxicity test C: D5 of cell toxicity test D: Positive group

图 2 荧光显微镜下各式样细胞的形态

Fig 2 The morphous of cell at different time point (×10)

随着时间的延长,成纤维细胞的数量逐渐增多,相同时间点不同浓度的浸提液与阴性对照组细胞增殖差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 HA-P复合材料构成成分

羟基磷灰石是一种磷酸钙无机材料,其化学成分、晶体结构、物理化学性能与人体正常骨的无机成分相似。珊瑚经过“热液交换反应”,保持其原有高孔隙率和三维多孔结构不变的情况下,成分转变成了羟基磷灰石。研究发现,反应如大于 24 h 由于碳酸钙含量的变化,羟基磷灰石较稳定,降解非常缓慢。国内外研究表明羟基磷灰石具有良好的生物相容性,生物安全性,且可复合生物载体或者细胞因子,重组复合材料。目前作为骨修复材料,广泛应用于骨科,眼科,耳鼻喉科,颌面外科,牙周科等。

聚乳酸-三亚甲基碳酸酯是聚乳酸-三亚甲基碳酸盐的共聚物,是近年来新发现的较理想的可降解的聚合物。它是聚乳酸与三亚甲基碳酸盐单体所形成的无规共聚物,除保留聚乳酸某些良好的特性外,如生物相容性较好,可吸收性,而且当加入少量的碳酸盐,共聚物会变得柔软而有弹性。LA-TMC

经 FDA 认证,具有良好的生物相容性、可降解等特性的生物医学材料^[6-8]。

上述两种生物材料中,羟基磷灰石是一种无机材料,聚乳酸-三亚甲基碳酸酯是人工合成的有机材料,这两种材料不仅生物相容性良好,而且来源丰富,具有较大的开发潜力。本研究通过有机溶剂注射模法将这两种材料组合在一起,利用聚乳酸-三亚甲基碳酸酯良好的柔韧性和可塑性,可以赋予重组材料适宜的柔软性和弹性,并可以根据需要任意塑形。另一方面,羟基磷灰石良好的孔隙率和三维多孔结构,是软腭植入材料治疗鼾症的关键所在;同时羟基磷灰石中的少量碳酸钙成分是一种弱碱性物质,理论上可以中和聚乳酸的酸性产物,从而避免或者减轻该产物积聚所导致的无菌性炎症,提高材料的安全性。

3.2 HA-P复合材料的细胞毒性实验

生物材料的细胞毒性研究是评价材料生物相容性的重要基础。本实验选用生长增殖能力极强的 NH-3T3 小鼠成纤维细胞,运用了 MTT 试验法,对羟基磷灰石/聚乳酸-三亚甲基碳酸酯复合材料的细胞毒性进行了评价。NH-3T3 小鼠成纤维细胞作为非植入部位的细胞,可以充分反应出材料可能存

在的毒物质的反应。MTT 试验是通过对活细胞数量的检测和其代谢活性进行评价的一种方法^[9-10]。本实验结果表明各浓度 HA-P 材料浸提液培养的 NH-3T3 细胞在不同时间点均正常增殖,未产生毒性反应,毒性 0~1 级。实验组和阴性对照组 MTT 测定值差异无统计学意义。说明该材料基本符合生物人体生物材料的细胞毒性要求。

综上所述,软腭植入材料 HA-P 的构成成分生物相容性良好,且各成分间取长补短,材料的柔韧性,弹性符合软腭植入材料的要求,具备了软腭植入材料的基本特点。因此 HA-P 复合材料有望成为理想的软腭植入材料。但该材料的实际效果如何,本研究将进一步进行 HA-P 复合物理性能表征和动物安全性评价。

参考文献

[1] LaFrentz JR, Brietzke SE, Mair EA, et al Evaluation of palatal snoring surgery in an animal model [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2003, 129(8): 343-352

[2] Walker RP, Levine HL, Hopp ML, et al Palatal implants A new approach for the treatment of obstructive sleep apnea Otolaryngol Head Neck Surg, 2006, 135, 549-554

[3] Nordgard S, Wormdal K, Bugten V, et al Palatal implants A new method for the treatment of snoring [J]. Acta Otolaryngol, 2004, 124(15): 970-975

[4] 医疗器械生物学评价标准编辑室. GB/T 16886.5-2003

医疗器械生物学评价. 第 5 部分: 体外细胞毒性实验. 医疗器械生物学评价标准汇编 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 80-88

[5] 刘金标, 陈建庭. 珍珠层聚乳酸重组人工骨的研制及其相关性能检测 [J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 236-238

[6] Cai Qing Wan Yuqing Bei Jianzhong et al Synthesis and characterization of biodegradable polylactide dextran and its application as compatilizer [J]. Biomaterial, 2003, 24(20): 3555-3559.

[7] Vaccaro AR, Singh K, Haid R, et al The use of bioabsorbable implants in the spine [J]. The Spine Journal 2003, 3(3): 227-237.

[8] Chen JG, Luo YX, Bai XQ. The experimental research of poly(lactide-co-trimethylene carbonate) bioresorbable tube used in nerve defect treatment [J]. Journal of Tongji Medical University, 1999, 28(5): 421-427.

[9] Marica Theiszová, Soňa Jantová, Jana Dragúňová, et al Comparison the cytotoxicity of hydroxyapatite measured by direct cell counting and MTT test in murine fibroblast NH-3T3 cells [J]. Biomedical Papers (Olmouc), 2005, 149(2): 393-395.

[10] Marica Theiszová, Soňa Jantová, Jana Dragúňová, et al Cytotoxicity of synthetic barium hydroxyapatite [J]. Biomedical Materials and Engineering, 1996, 6(6): 405-413
(收稿日期 2006-10-31)

• 简讯 •

本校“呼吸内科”学科设置广东省高等学校“特聘教授”岗位

为了促进学科建设及人才队伍建设,实现本校“人才兴校”、“学科兴校”两大战略,本校人事处按照学校领导的指示,在学校学科办、科研处、研究生部等及各二级学院大力支持和配合下,积极向省教育厅申请在本校的呼吸内科学、神经病学、内科学、外科学、卫生毒理学等五个学科设置广东省高等学校“特聘教授”(也称“珠江学者”)岗位。经过省教育厅组织专家评审,于 2006 年 12 月 28 日发文同意本校“呼吸内科”学科设置广东省高等学校“特聘教授”岗位。

广东省高等学校“特聘教授”岗位是广东省教育厅为贯彻落实“科技兴粤”战略,配合高等学校“211 工程”建设,培养和造就一批在国内外处于领先水平的中青年学科带头人,促进我省高等学校的学科建设,在全省高等学校国家级、省级重点建设学科中设置的特殊岗位,基本上是进入“211 工程”建设的院校才有设置。目前我省只有中山大学等九所院校设有省高等学校“特聘教授”岗位。本校“特聘教授”岗位的设置,是广东省市属高校在这方面零的突破,这既是省教育厅对本校学科建设水平的认可,也是广州市及本校的一大荣誉。

按照《关于实施广东省高等院校特聘教授岗位计划的通知》(粤高教人[1999]4号)有关要求,本校将面向海内外,积极做好“特聘教授”的招聘工作,力争“特聘教授”岗位尽快有高水平的学术带头人上岗。