

新型人工髓核材料果胶/聚乙烯醇复合水凝胶生物相容性研究

姚女兆¹, 王文军¹, 金大地²

(1. 南华大学第一附属医院 脊柱外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南方医科大学第三附属医院 骨科)

摘要: **目的** 对新型人工髓核材料果胶/聚乙烯醇复合水凝胶(Pectin/PVA composite hydrogel, CoPP) 进行生物组织相容性评价。**方法** 按照国家标准 GB/T16886 的评价要求, 对 CoPP 人工髓核材料进行致敏试验和遗传毒性试验等毒理学测试。**结果** 注射 CoPP 材料浸提液豚鼠各观察时点均未见皮肤出现红斑、水肿等皮肤刺激反应, 表明 CoPP 髓核材料浸提液对皮肤无致敏性。CoPP 人工髓核材料浸提液各剂量组对 TA97、TA98、TA100、TA102 的回变菌落数, 在加与不加大鼠肝微粒体酶(S9) 条件下, 均与自发回变数相近, 也未呈现剂量反应关系。CoPP 髓核材料浸提液各剂量组中微核出现率和染色体畸变率与阴性对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** CoPP 人工髓核材料无致敏性和遗传毒性, 具有良好的生物相容性。

关键词: CoPP; 人工髓核; 生物相容性

中图分类号: R681.5

文献标识码: A

文章编号: 2095-1116(2011)04-0399-04

Evaluation of the Biocompatibility of the Pectin/PVA Composite Hydrogel as a New Prosthetic Nucleus Material

YAO Nv-zhao, WANG Wen-jun, JIN Da-di

(Department of Spinal Surgery, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the biocompatibility of a new kind of prosthetic nucleus—Pectin/PVA composite hydrogel(CoPP). **Methods** According to China national standard GB/T16886 documents, the toxicity of CoPP prosthetic nucleus material is investigated by the sensitization test, Ames test, mice marrow micronucleus test and chromosome aberration test of mammalian cell in vitro. **Results** The mice had no allergic reaction after they were injected with the extract of CoPP. The results of *Salmonella typhimurium* reverse mutation test showed that there were no significant effect on the number of histidine revertants of TA97, TA98, TA100 and TA102 strains after CoPP was added. The micronucleus rate of bone marrow cell were less than 5%, there were no significant difference compared with the negative control group($P > 0.05$). The positive rate of chromosome aberration test was less than 5%, no significant difference was seen between CoPP with negative group. **Conclusions** The CoPP prosthetic nucleus has a good biocompatibility and can be used clinically.

Key words: CoPP; prosthetic disc nucleus; biocompatibility

腰椎人工髓核置换术由于在治疗腰椎退行性疾病的同时保留了脊柱的运动功能, 理论上可以克服腰椎融合术的缺点, 近年来国内外学者进行了深入

的研究, 随访结果显示这种方法的短期临床疗效较好, 但部分患者出现软骨终板损伤及假体下沉, 可能与髓核假体弹性模量过高有关^[1,2]。为寻求更理想

的髓核材料,本课题组研制了一种新型人工髓核材料——果胶/聚乙烯醇复合水凝胶 (Pectin/PVA composite hydrogel, CoPP)。通过对该材料的力学性能、溶胀性能等相关研究发现 CoPP 水凝胶是一种软而韧、缓冲载荷能力较强、渗透性好的粘弹性材料,力学特性更接近人体正常髓核,弹性模量约为 2.8 Mpa,有望成为理想的人工髓核材料^[3,4]。为达到临床应用,在初步完善细胞毒性和植入实验后^[5],本课题组对果胶/聚乙烯醇复合水凝胶进行了生物组织相容性的相关研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料

按照本课题已掌握的果胶/聚乙烯醇复合水凝胶的合成方法制备 CoPP 人工髓核材料^[4],并制成厚度为 1 mm 的圆形薄片,封装后环氧乙烷消毒备用。以生理盐水为浸提介质,70℃ 浸 24 h 制备材料浸提液,受试材料表面积与浸提质体积比例为 0.2 g/mL。按照国内医疗器械生物学评价国家标准 GB/T16886 的要求^[6],对 CoPP 人工髓核材料进行致敏试验、遗传毒性试验等生物学评价。

1.2 致敏试验

1.2.1 动物选择与分组 健康、初成年豚鼠 20 只,雌雄不分,体重 300 ~ 500 g,分成 3 组。CoPP 组:10 只豚鼠;0.9% 生理盐水阴性对照组:5 只豚鼠;5% 甲醛溶液阳性对照组:5 只豚鼠。

1.2.2 方法 (1)试验前 1 天,将豚鼠背部毛发剔除干净。

(2)皮内诱导阶段:70% 乙醇清洁豚鼠去毛区,在每只豚鼠脊柱两侧 6 点对称皮内注射,各点相距 2 cm,每点注射剂量为 0.1 mL。

(3)局部诱导阶段:皮内诱导后 7 天,试验组动物将 20 mm × 40 mm 滤纸片在 CoPP 浸提液浸透后,贴敷于各注射点。用包扎带固定,48 h 后除去包扎带和滤纸片。对照组动物使用溶剂同法操作。

(4)激发阶段:局部诱导后 14 天,用材料浸提液对全部实验动物和对照动物进行激发。将在材料浸提液中浸透的滤纸片局部贴敷于每只动物的单侧腹部。用包扎带固定,24 h 后除去包扎带和滤纸片。

1.2.3 动物观察 除去帖敷物后 24、48 和 72 h 观察实验组和对照组动物激发部位皮肤情况。按分类系统,描述每一激发部位和每一观察时间皮肤红斑和水肿反应程度。

1.2.4 结果评价标准 阴性对照组动物皮肤反应小于 1,实验组动物反应分级为 1 或大于 1 时认为致敏;阴性对照组动物反应分级为 1 或大于 1,实验组动物反应超过对照组中最严重的反应则认为致敏。

1.3 遗传毒性试验

1.3.1 鼠伤寒沙门菌回复突变试验 (Ames 试验) 采用平板掺入法,选用组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门杆菌 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株。试验组设原液、1/2、1/4、1/8 和 1/16 原液 5 个剂量,并设空白对照。阴性对照采用生理盐水,阳性对照采用敌克松 (Dexon)、二氨基茆 (2 - AF)、叠氮钠、1,4 - 二羟基蒽醌。各组均做 3 个平板,试验重复 2 次。

1.3.2 微核试验 选用健康性成熟 NIH 雄性小鼠 50 只,雌雄各半,体重 21 ± 3 g,随机分成 5 组:(1) CoPP 材料生理盐水浸提液组 (6 000 mg/kg);(2) CoPP 材料生理盐水浸提液组 (3 000 mg/kg);(3) CoPP 材料生理盐水浸提液组 (1 500 mg/kg);(4) 生理盐水阴性对照组 (50 mL/kg);(5) 环磷酰胺阳性对照组 (40 mg/kg),每组各 10 只。在处死动物前 48 h 和 24 h 各经腹腔给药 1 次,处死后取骨髓、制片、固定、Giemsa 染色。每只小鼠镜下观察 1 000 个胞浆完整嗜多染红细胞 (PCE),计算微核出现率并作统计学处理 (检验)。

1.3.3 哺乳细胞体外染色体畸变试验 包括不加 S9 非活化组和加 S9 的代谢活化组两部分试验。采用的细胞株为中国仓鼠肺成纤维细胞 (CHL)。试验组 3 个剂量分别为 46.0、23.0 和 11.5 mg/mL。非活化组阳性对照药物选用丝裂霉素 C,剂量为 0.2 μ g/mL;代谢活化组阳性对照药物选用环磷酰胺,剂量为 40 g/mL。阴性对照组为二甲基亚砜 (DMSO)。非活化组的细胞加入试验液培养 24 和 48 h 后收获细胞。代谢活化组加入试验液和 S9 混合液培养 6 h,更换新的培养基,继续培养 18 h 后收获细胞。在收获前 4 h 加秋水仙素。按常规法制片、染色。每剂量组观察 100 个中期分裂相染色体的结构异常和数目异常情况,并计算其染色体的畸变率。

2 结 果

2.1 致敏试验结果

阳性对照组实验动物在激发后 24 h 激发部位出现局限性红斑并轻微水肿,72 h 后红斑明显加重呈鲜红色水肿明显,反应分级为 3。注射 CoPP 材料

浸提液豚鼠各观察时点均未见皮肤出现红斑、水肿等皮肤刺激反应,表明 CoPP 髓核材料浸提液对皮肤无致敏性。

2.2 Ames 试验结果

CoPP 人工髓核材料浸提液各剂量组对 TA97、

TA98、TA100、TA102 的回变菌落数,在加与不加大鼠肝微粒体酶(S9) 条件下,均与自发回变数相近,也未呈现剂量反应关系(表 1)。表明在本实验条件下,CoPP 髓核材料浸提液对组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门菌无致突变性。

表 1 CoPP 人工髓核 Ames 试验结果

组别	TA97		TA98		TA100		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CoPP 原液	140 ± 10	146 ± 20	40 ± 3	37 ± 3	139 ± 22	151 ± 21	272 ± 23	284 ± 19
1/2 CoPP 原液	145 ± 35	147 ± 19	39 ± 6	41 ± 8	146 ± 16	173 ± 21	258 ± 23	272 ± 24
1/4 CoPP 原液	107 ± 6	106 ± 3	24 ± 5	23 ± 5	187 ± 15	165 ± 17	272 ± 23	274 ± 28
1/8 CoPP 原液	112 ± 17	150 ± 26	6 ± 6	44 ± 6	145 ± 34	172 ± 29	250 ± 7	283 ± 22
1/16CoPP 原液	130 ± 40	138 ± 26	39 ± 6	40 ± 3	145 ± 16	145 ± 24	275 ± 32	280 ± 17
溶剂对照组	124 ± 39	147 ± 19	42 ± 6	42 ± 7	154 ± 25	159 ± 16	273 ± 25	281 ± 26
自发突变组	142 ± 34	146 ± 20	39 ± 8	42 ± 6	141 ± 11	152 ± 14	261 ± 15	275 ± 21
阳性对照								
Dexon	1120 ± 37		1007 ± 21			954 ± 32		
NaN3				1584 ± 27				
1,4 - OA							997 ± 57	
2 - AF		1159 ± 62		1004 ± 19		1564 ± 64		

2.3 微核试验结果

CoPP 髓核材料浸提液各剂量组中微核出现率与阴性对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$),表明该材料未诱发小鼠骨髓多染红细胞核增加(表 2)。

2.4 染色体畸变试验结果

CoPP 髓核材料浸提液的各剂量组,无论加或不加大鼠肝微粒体(S9),染色体畸变率与阴性对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$),且各剂量组畸变率均小于 5%(表 3)。表明在本实验条件下,CoPP 髓核材料浸提液对 CHL 细胞的染色体无诱变作用。

表 2 CoPP 人工髓核小鼠骨髓细胞微核试验结果($n = 10\ 000$)

组别	CoPP 剂量 (mg/kg)	微核嗜多 染红细胞	微核嗜多染红 细胞率(%)
阴性对照组		13	1.3 ± 1.1
阳性对照组		501	50.1 ± 8.0 ^a
CoPP 组	6 000	21	2.1 ± 1.3
	3 000	19	1.9 ± 1.4
	1 500	16	1.6 ± 1.5

a:与阴性对照组比较, $P < 0.01$

表 3 CoPP 人工髓核哺乳细胞(CHL)体外染色体畸变试验结果

组别	CoPP 浓度 (mg/mL)	S9 (+/-)	时间 (h)	畸变类型					畸变数	畸变率 (%)
				破碎	裂缝	环状中心	三倍体	多倍体		
阴性对照组		-	24	2	1	0	0	0	3	3
		-	48	3	0	0	0	0	3	3
		+	24	1	0	0	0	1	2	2
阳性对照组		-	24	20	1	1	0	4	26	26
		-	48	36	0	0	0	0	36	36
		+	24	18	0	0	0	2	20	20
CoPP 组	46.0	-	24	3	0	0	1	0	4	4
	46.0	-	48	4	0	0	0	0	4	4
	46.0	+	24	1	0	0	0	0	1	1
	23.0	-	24	2	0	0	0	1	3	3
	23.0	-	48	1	0	0	0	1	2	2
	23.0	+	24	2	0	0	0	0	2	2
	11.5	-	24	1	0	0	0	0	1	1
	11.5	-	48	2	0	0	0	0	2	2
	11.5	+	24	1	0	0	0	2	3	3

人工髓核置换术是治疗早、中期椎间盘退行性病变的有效方法,是近年来骨科研究的热点之一,且取得了一些进步。人工髓核主要包括预成形人工髓核、原位灌注成形人工髓核和半成形人工髓核。半成形人工髓核是目前临床应用的主流,其特点是假体以脱水状态下植入,在体内吸收水分成形,在周期载荷下能够吸收和释放水分以恢复椎间盘的生理功能^[7]。目前临床应用最多的半成形人工髓核假体是由 Ray 等设计并由美国 Raymedica 公司研制的 PDN,临床研究证明,其近期疗效满意^[8]。但随访发现,部分患者出现假体移位、下沉等并发症^[5]。许多学者对此展开了深入的研究,认为与髓核假体材料的力学特性及其外形有关^[6]。因此,研制组织相容性好、适宜弹性模量且与软骨终板相匹配的解剖形髓核假体,实现人工髓核国产化有重要意义。由金大地等^[2]研制的果胶/聚乙烯醇复合水凝胶 (Pectin/Poly vinyl alcohol composite hydrogel, CoPP),通过对该材料的力学性能、溶胀性能等相关研究发现,CoPP 水凝胶是一种软而韧、缓冲载荷能力较强、渗透性好的粘弹性材料,力学特性更接近人体正常髓核,弹性模量约为 2.8 Mpa,有望成为理想的人工髓核材料。

生物材料必须有良好的生物相容性,以确保临床应用的安全性。根据国际标准化组织 (ISO) 和中国卫生部的规定,对于长期植入机体的材料必须进行生物安全性评价^[3]。人工髓核作为长期植入机体的 C 类材料,根据医疗器械生物学评价国家标准 GB/T16886 的要求必须进行生物安全性评价,其基本评价试验包括细胞毒性试验、致敏试验、遗传毒性试验与植入试验;而遗传毒性试验又包含 Ames 试验、微核试验和染色体畸变试验 3 项。细胞毒性试验和植入试验已完成,试验证实 CoPP 人工髓核细胞毒性不超过 I 级,植入 SD 大鼠体内局部炎症反应轻。本文继续进行 CoPP 材料的致敏试验、遗传毒性试验,完善 CoPP 人工髓核材料的生物安全性评价,为其临床应用提供安全依据。

致敏试验是通过皮内诱导、局部诱导和激发 3 个阶段来观察生物材料浸提液对实验动物的潜在致敏性。CoPP 组实验动物在除去贴敷物后 24、48、72 h 观察期间,无红斑及水肿反应,结果同生理盐水阴性对照组,反应分级为 0,符合结果评价标准,不致敏。

在检测材料致突变作用的遗传毒性试验中,本研究选用了 Ames 试验、微核试验和染色体畸变试验。它们分别反映了基因水平和染色体水平的变化,比较

全面地反映出材料对遗传毒性的影响。后两个试验均采用哺乳动物细胞作为靶细胞,使试验结果更接近于人体实际情况。Ames 试验测试说明 CoPP 人工髓核材料浸提液各剂量组对 TA97、TA98、TA100、TA102 的回变菌落数,在加与不加大鼠肝微粒体酶 (S9) 条件下,均与自发回变数相近,也未呈现剂量反应关系。表明在本实验条件下,CoPP 髓核材料浸提液对组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门菌无致突变性。微核试验测试人工髓核材料浸提液各剂量组中微核出现率与阴性对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$),表明该材料未诱发小鼠骨髓多染红细胞核增加。染色体畸变试验测试中,CoPP 人工髓核材料浸提液各剂量组,无论加或不加大鼠肝微粒体 (S9),染色体畸变率与阴性对照组相差异无显著性 ($P > 0.05$),且各剂量组畸变率均于 5‰。表明在本实验条件下,CoPP 人工髓核材料浸提液对 CHL 细胞的染色体无诱变作用。

总之,本实验通过致敏试验、Ames 试验、微核试验和染色体畸变试验等研究 CoPP 材料的生物学性能,结果显示 CoPP 复合材料具有良好的生物相容性,初步证明了 CoPP 的生物安全性。

参考文献:

- [1] Sehoemayr R, Sach B, Lotz C. Prosthetic disc nucleus implants: four year Patient follow-up. Dallas, Preeedings of AAOS 2002 Annual Meeting. 2002; 280.
- [2] 金大地, 赵亮, 瞿东滨, 等. 腰椎间盘突出人工髓核置换术后中期疗效分析[J]. 中华骨科杂志, 2007, 27(5): 326-330.
- [3] 黄曹, 瞿东滨, 赵卫东, 等. 果胶/聚乙烯醇复合水凝胶的生物力学评价[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(1): 60-63.
- [4] 黄曹, 卢玲, 瞿东滨, 等. 新型人工髓核材料——果胶/聚乙烯醇复合水凝胶的制备及其溶胀性能[J]. 复合材料学报, 2008, 25(1): 69-74.
- [5] 黄曹, 金大地, 张忠民, 等. 新型人工髓核材料——果胶/聚乙烯醇复合水凝胶的生物相容性评价[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(3): 453-456.
- [6] 国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国国家标准——医疗器械生物学评价[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003. 1-6.
- [7] Allen MJ, Schoonmaker JE, Bauer TW, et al. Preclinical evaluation of a poly (vinyl alcohol) hydrogel implant as a replacement for the nucleus pulposus [J]. Spine, 2004, 29(5): 515-523.
- [8] Jin D, Qu D, Zhao L, et al. Prosthetic disc nucleus (PDN) replacement for lumbar disc herniation: preliminary report with six months follow-up [J]. J Spinal Disord Tech, 2003, 16(4): 331-337.

(此文编辑 朱雯霞)