

羟基磷灰石水泥的体外生物学安全性试验

上海医科大学附属中山医院骨科 王文波 陈中伟 陈统一
上海医科大学公共卫生学院环境卫生教研室 叶舜华 宋健
(上海 200032)

华东理工大学国家超细粉末工程研究中心 刘昌胜 胡黎明
(上海 200237)

Biological Safety Evaluation of Hydroxyapatite Cement

Wang Wenbo Chen Zhongwei Chen Tongyi

Department of Orthopaedics, Zhong Shan Hospital

Affiliated to Shanghai Medical University

(Shanghai 200032)

Ye Shunhua Song Jian

Research Section of Environmental Sanitation, Hygiene Public College

Affiliated to Shanghai Medical University

提要 羟基磷灰石水泥(HAC)是新型的羟基磷灰石类人工骨材料。1991年得到美国食品与药物管理局(FDA)的批准,在临床试用,用于颅骨缺损的填充治疗。华东理工大学最近研制出类似的 HAC。我们用它的生理盐水浸出液对其进行了生物学安全性试验,包括细胞培养毒性试验、全身注射毒性试验、Ames 试验、微核试验及 UDS 试验。结果表明 HAC 的浸出液对培养细胞的生长无抑制作用,对体细胞的遗传物质(染色体、DNA)无致突变作用。上述结果提示我们,HAC 用于人体是安全的。

关键词 羟基磷灰石水泥 生物学安全性 人工骨

ABSTRACT Hydroxyapatite cement (HAC) is a new - type hydroxyapatite artificial bone material. In 1991, HAC was approved by Food and Drug Administration in America for its investigation study in human subjects with cranial defects. A similar product has been produced by the Physical and Technological Institute of East China recently. Using the extracts of HAC by physiological saline, we carried on a biological safety evaluation of this HAC material. The evaluation tests included cell culture cytotoxicity, systemic injection acute toxicity, Ames test, micronucleus test and UDS(unscheduled DNA synthesis) test. The results showed that the extracts had no inhibitory effect on the growth or the cultured cells, no mutagenic effect on the DNA. These suggest us that applications of HAC in human subjects may be of safety.

KEY WORDS Hydroxyapatite cement Biological Safety Artificial Bone

羟基磷灰石水泥(Hydroxyapatite cement, HAC)是 Brown 等于 1985 年研制出来的新一代羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)类人工骨材料,它克服了传统的 HA 陶瓷烧结成形、修整困难的固有缺点,具有调和成形、制备简便、填充容易的优点。美国食品与药物管理局(FDA)于 1991 年正式批准了 HAC 的临床

试用,用于填充颅骨缺损。迄今已完成了第一期临床试用,效果满意。华东理工大学国家超细粉末工程研究中心亦研制出类似的 HAC,称为超细 HAC,它在某些材料特性方面优于国外报道的 HAC。我们对该材料进行了临床试用前的体外生物学安全性评价试验,报告如下。

材料、方法与结果

1、HAC 及 HAC 浸出液的制备

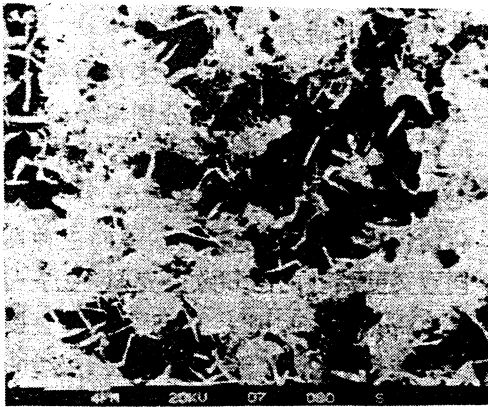


图 1 HAC 显微结构的 SEM, 可见短棒状或针状晶体结构及其间的微孔 (X8000)

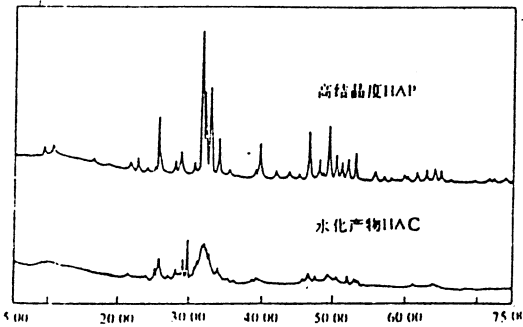


图 2 HAC 的 XRD 图, 与上方的高结晶度 HA 的 XRD 相比峰值较低

HAC 由粉末及固化液两部分组成。使用时将粉末与固化液充分调和。调和物呈膏体状, 此时即可用于骨缺损部位的填充。HAC 膏体在体内生理条件下, 发生固化反应, 于 4 小时后自然转变成含微孔的 HA 晶体。HAC 粉末主要为磷酸四钙和磷酸氢钙, 并含有少量的 HA 晶种和氟化钙。固化液主要为双蒸水或稀磷酸。固化反应的方程式为

$$\text{CaHPO}_4 + \text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$$

扫描电镜下, HAC 固化体主要由短棒状晶体构成, 其中的微孔直径 $< 10\mu\text{m}$ (图 1)。HAC 的 x-射线衍射分析 (XRD) 结果见图 2。

我们制备的 HAC, 体积密度为 $2.859\text{g}/\text{cm}^3$, 孔隙率为 29.4%, 抗压强度为 70MPa。

试验中使用 HAC 的生理盐水浸出液。浸出液的制备方法为: 将固化完全的 HAC, 在玛瑙研钵内研细, 分别过 20 目和 40 目筛。将颗粒分成大于 20 目和小于 20 目而大于 40 目两组 (以下简称 20 目组和 40 目组)。分别取两组颗粒物各 19 克均置于小烧杯中, 加入生理盐水 38ml, 各以锡纸封其开口, 置 37°C 恒温水浴内浸润 24 小时。经蔡氏漏斗过滤去菌得到灭菌的 HAC 浸出液, 其浓度为 $500\text{mg}/\text{ml}$, 进行以下试验。浸出液中钙、磷含量的测定见下表。

HAC 浸出液钙、磷含量测定

样品	pH	$\text{Ca}^{2+} \times 10^4 (\text{M/L})$	$\text{P} \times 10^5 (\text{M/L})$
40 目组	8.24	9.78	2.01
20 目组	8.40	15.58	5.66

2、全身注射毒性试验: 清洁级昆明种小鼠 (上海医科大学动物部提供), 体重 18 ~ 20g, 共 25 只, 分成对照组 5 只和实验组 20 只。每只小鼠腹腔注射 1ml 浓度为 $100\text{mg}/\text{ml}$ 的 HAC 浸出液 (相当于 $5000\text{mg}/\text{kg}$ 体重。对照组注射 1ml 生理盐水。

结果: 1 3 日、7 日后小鼠死亡情况

动物分组	样本数	3 日后死亡数	7 日后死亡数
对照组	5	0	0
雄 浸出液 20 目	5	0	0
性 浸出液 40 目	5	0	0
雌 浸出液 20 目	5	0	0
性 浸出液 40 目	5	0	0

结论: 腹腔注射 HAC 浸出液后, 小鼠无死亡, 表明浸出液对小鼠无毒性作用。

2 3 日、7 日后小鼠体重变化

动物分组	实验前体重	3 日后体重	7 日后体重
对照组	18.5 ± 2.4	24.9 ± 2.0	27.2 ± 2.9
浸出液 20 目	18.9 ± 2.3	24.5 ± 2.1	27.4 ± 3.1
浸出液 40 目	18.6 ± 2.1	24.7 ± 1.8	26.7 ± 2.6

结论:实验组的小鼠体重增长,与对照组的差别无显著性,证明浸出液对小鼠的生长无影响。

3、细胞培养毒性试验:采用中国仓鼠肺成纤维细胞(V₇₉细胞)、细胞浓度为40000个/ml。培养液为Eagle's MEM。每平皿内加入1ml的细胞悬液。浸出液浓度为1000 μ g/ml,每平皿内加入浸出液1ml。分别观察0、2、4、7天时细胞的生长情况。

结果:染毒2、4、7天后细胞增殖情况见下表。

染毒天数	每皿细胞数量		
	阴性对照	20目	40目
0	0.8×10^4	0.8×10^4	0.8×10^4
2	1.2×10^4	1.0×10^4	1.3×10^4
4	4.0×10^4	6.0×10^4	6.0×10^4
7	6.1×10^4	12.1×10^4	11.9×10^4

结论:试验组与对照组相比,未见细胞生长受抑制。

样本	浓度(μ g/皿)	TA100 + S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA98 - S9
生理盐水	0.00	128.6 \pm 1.5	118.7 \pm 2.1	30.0 \pm 1.0	26.7 \pm 1.5
>20目	1000.00	121.3 \pm 1.5	121.3 \pm 2.5	29.7 \pm 1.5	29.3 \pm 1.5
	2000.00	123.0 \pm 1.0	119.0 \pm 4.6	34.0 \pm 2.0	33.0 \pm 1.0
	5000.00	121.3 \pm 4.9	123.3 \pm 1.5	42.0 \pm 1.0	36.3 \pm 1.5
>40目	1000.00	118.7 \pm 1.5	119.0 \pm 2.0	29.7 \pm 2.1	26.0 \pm 2.6
	2000.00	121.3 \pm 3.1	125.7 \pm 3.0	33.3 \pm 2.1	32.3 \pm 3.2
	5000.00	125.0 \pm 5.2	123.7 \pm 5.5	39.0 \pm 1.0	38.3 \pm 2.1
SA	1.00	—	964.0 \pm 63.0**	—	—
2-AF	10.00	997.7 \pm 14.6**	—	931.6 \pm 30.1**	—
2,7-AF	100.00	—	—	—	918.3 \pm 48.3**

*: $> = 2 \times C$ **: $> = 3 \times C$

结论:Ames试验结果为阴性。HAC浸出液不引起鼠伤寒沙门氏菌回复突变数增加。

5、微核试验:40只体重为18~20g的健康雄性昆明种成年小鼠(清洁级,上医大动物部提供),随机分成8组,每组5只。以生理盐水为阴性对照,环磷酰胺(CTX)为阳性对照。试验组及阴性对照组每只小鼠分别按体

4、Ames试验:采用平板掺入法。使用TA98和TA100两个菌株。大鼠肝脏微粒体酶系(S9),由多氯联苯诱导,制成肝匀浆后在-80 $^{\circ}$ C冰箱内保存,使用时用BaP或2-氨基芴测定其活力。

样品浸出液用生理盐水作溶剂,两组样本(>20目和>40目)分别稀释成1000 μ g/0.1ml、2000 μ g/0.1ml和5000 μ g/0.1ml。阳性对照组选用2,7-二氨基芴(2,7-AF)、叠氮化钠(SA)和2-氨基芴(2-AF)三种具有不同致突变活性的已知致突变剂。2,7-AF配成100 μ g/0.1ml,用于TA98菌株的直接致突变活性指示(不加S9);SA配成1 μ g/0.1ml浓度,用于TA100菌株的直接致突变活性指示;2-AF配成10 μ g/0.1ml浓度,用于TA98、TA100菌株的间接致突变活性指示(加S9),空白对照用同样体积的生理盐水。

结果:Ames试验结果见下表。

重每次腹腔注射浸出液或生理盐水0.1ml/20g。阳性对照组按体重每次腹腔注射CTX80mg/kg,两次腹腔注射染毒间隔24h,第二次染毒6h后用颈椎脱臼法将小鼠处死。迅速用剪刀将小鼠的两条股骨取下,除去筋膜肌肉,剪去股骨两端。用注射器吸取1ml小牛血清插入骨髓腔中,将骨髓冲洗入离心

管中,反复冲洗至骨髓腔无血。然后以 1000rpm 的转速离心 5min,弃去上清液,用毛吸管轻轻打匀沉淀物,吸少许均匀涂片。每只小鼠涂片两张,待晾干后用甲醛固定,0.25% M-G 染液染色,再以 1:10Giemsa 染液染色 10min,用蒸馏水分色 30S,晾干后镜检。

高倍镜下选择细胞分布均匀、染色好的区域油镜下计数骨髓的嗜多染红细胞(PCE),PCE 在油镜下呈灰蓝色,无细胞核。微核直径相当于 PCE 的 1/20~1/5,呈圆形,边缘光滑,染色与其它有核细胞核质一样,呈紫红色或蓝紫色。每片计数 1000 个 PCE,共计数 2000 个 PCE 中含有微核的 PCE 数,一个 PCE 中出现两个以上的微核时,按一个微核细胞计。结果以%表示。

结果:浸出液对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率(%)的影响见下表。

样本	浓度		
	125mg/ml	250mg/ml	500mg/ml
20 目组	1.9±0.9	2.0±0.8	3.1±1.0
40 目组	2.1±1.2	3.1±0.9	3.3±0.5
阴性对照	2.6±0.8		
阳性对照	30.4±4.4**		

** :P<0.01

结论:HAC 浸出液与对照组相比未见有引起小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率升高的作用。

6、大鼠肝细胞程序外 DNA 合成(UDS)试验:肝细胞悬液的制备,按照我校环境卫生教研室的方法。制备的肝细胞悬液,用 DMEM (含 5% 小牛血清、0.2% 白蛋白、20mmol 羟基豚)稀释至浓度为 1×10^6 个/ml。

将 1×10^6 个/ml 的肝细胞悬液 1ml 分装至小试管中,在每个小试管中加入浓度为 500 μ g/ml、200 μ g/ml、100 μ g/ml 的 HAC 浸出液 5ml,各做 3 个平行样本。生理盐水做阴性对照,氮芥做阳性对照。每管加 $^3\text{H}-\text{TdR} 5\mu\text{Ci/ml}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴震荡培养 3h,然后用 2ml 冰生理盐水终止反应。用多头细胞仪收集细

胞至滤膜上,用蒸馏水抽吸两次,依次有 5% 三氯醋酸 1ml 固定,75% 及无水乙醇脱水,将滤膜 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,放入闪烁杯中,加入 0.5ml 闪烁液,在 Backman 液闪计数仪上测定 CPM 值。

结果:UDS 试验结果见下表:

样本	浓度($\mu\text{g/ml}$)	CPM($\bar{X} \pm \text{SD}$)	R
生理盐水(阴性对照)		814 ± 206	1
骨水泥浸出物	100	698 ± 105	0.86
	200	1206 ± 2	1.48
	500	1262 ± 296	1.55
氮芥(阳性对照)	50	6734 ± 1275	8.28**

** :P>0.01

结论:与对照组相比,HAC 浸出液未见有引起大鼠肝细胞程序外 DNA 合成增加的作用。

讨 论

1、HAC 与 HA 陶瓷的区别

HAC 在微观结构,理化性质及植入体内后的生物学行为等方面均不同于已广泛使用的 HA 陶瓷,其区别处在于:

(1)如前所述,HAC 是调和成形,制备方法简单,而 HA 陶瓷的制备则需要预先将 HA 颗粒粘结起来,塑成一定形状,然后在高温(1000 $^{\circ}$ 左右)下烧结形成(预制烧结)。(2)HAC 膏体充填骨缺损的操作简便,并可根据缺损处的解剖要求随意塑形、修整,达到完全地重建骨缺损。而 HA 陶瓷,植入缺损处时,需要高速磨钻磨削,加之陶瓷本身质脆易碎的特点,修整后的 HA 也很难适应缺损区的形状,骨与陶瓷之间的密接性差,间隙大,容易造成纤维组织的介入生长。(3)HAC 充填骨缺损亦优于颗粒状(granule)的 HA。以水、甘油或其它生物胶调和的 HA 颗粒植入骨缺损处后,稳定性差,易于移位、散失,需要待几个月后纤维组织长入其中,才能与宿主骨形成并非牢固的纤维性连结。HAC 膏体填入骨缺损后,稳定性较好,并由于与骨组织紧密接触,能很快地和新骨组织形成更稳定的骨性愈合,界面处无纤维包膜形成。(4)由于是

调和成形,并非烧结体,固化形成的 HA,结晶度低于 HA 陶瓷,其 XRD 图(图 2)中,虽然各个特征峰均存在,但其峰强度远低于高结晶度 HA 的 XRD 标准谱。这一方面体现在它的抗压强度低于 HA 陶瓷,为 70MPa,另一方面也使植入的 HAC 可以发生缓慢降解(HA 陶瓷几乎无降解)。Costantino^[1]综合多个实验结果显示,填充于动物颅面部骨缺损的 HAC,12 个月约 35% 的材料发生降解,降解处由纤维骨组织取代(其中骨成份占 75%),这显然有利于 HAC 最终被宿主骨的改造、替代。

基于 HAC 的独特优点,美国食品与药物管理局(FDA)于 1991 年批准 HAC 在一神经外科中心进行临床试用(IDE),用于修复颅骨缺损。目前已完成 100 例 182 处缺损的填充,效果非常满意^[1,2]。

2、目前对于生物材料的生物学安全性评价,我国尚未建立国家级标准,因此我们在制订 HAC 的生物学安全性试验时,主要参照《ISO》^[3]、《ASTM》^[4]中骨内植入材料的试验要求,并考虑到 HAC 的化学组成,理化性质及同类 HA 材料的临床应用报告,选择了上述试验项目。在检测的方法上,则主要参照毒理学的有关规定。其目的旨在尽可能较客观地评价 HAC 用于体内的安全性。

3、试验中并未使用 HAC 固化体进行直接接触法试验,而是采用 HAC 的生理盐水浸出液。从小鼠腹腔注射及离体细胞培养的结果看,HAC 浸出液对小鼠的生长、体重的增加均无任何毒性作用,对培养细胞的增殖亦无抑制作用,并且在培养 7 天后,两个试验组中细胞的数量几乎是对照组的 2 倍。

由于 HAC 反应物中磷酸四钙和磷酸氢钙是按等克分子数的比例混合而成,因而固化体中主要成份为 HA,并残留痕量的磷酸四钙^[5]。我们对浸出液中的钙、磷成份做了测定(见前述)。从中可以看出,HAC 固化体在生理盐水中确实存在一定的溶解度,并且 20 目组中钙、磷含量均高于 40 目组。对于前述

试验组中培养细胞数量明显增多的原因,考虑即可能为浸出液中游离的钙离子,对细胞的增殖起了促进作用。同时在体内植入实验中(另文发表),我们曾同时监测了术后 10 周内兔血钙、磷的变化。结果表明,HAC 植入体内后,局部释放的钙、磷,并未引起血液中钙、磷水平的明显波动。

4、对于医用材料的遗传毒理实验,即致癌、致畸实验,由于耗时耗资较大,目前除美国等少数国家外,多数国家均未要求进行这方面的检测,按我国目前的现状,亦难以普及。考虑到 HAC 与 HA 陶瓷的化学组成相似,而 HA 陶瓷自 70 年代初开始用于临床以来,尚未见有致遗传毒性作用的报道。因此我们在进行这方面试验时,采用了三种短期测试试验,即 Ames 试验、微核试验和 UDS 试验,分别从染色体、DNA 及基因角度,观察了 HAC 的作用。上述三个试验结果表明,HAC 浸出液对体细胞的遗传物质无损害作用,无致基因突变作用。

5、由于上述评价方法主要是离体试验的结果,而将这类实验结果外推到人,可能会存在不同程度的偏差。因此对羟基磷灰石水泥(HAC)人工骨的生物学安全性评价,应该只是完成了一部分,而真正的全面评价,只有待临床应用的效果,特别是远期效果的材料取得后,才应该是真正地完成。

参考文献

- 1 Costantino PD, Friedman CD. Synthetic bonegraft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am*, 1994; 27(5):1037
- 2 Kamerer KB, Hirsh BE, Synderman CH, et al. Hydroxyapatite cement: a new method for achieving watertight closure in transtemporal surgery. *Am J Otolaryngol*, 1994; 15(1):47
- 3 "ISO": Biological evaluation of medical devices. ISO 10993 - 1; 1992(E)
- 4 《ASTM》编著,奚延裴等译。《ASTM》标准年鉴 13.01 卷。成都科大出版社,1990;120~125.
- 5 Fujase Y, Takagi ES, Chow LC, et al. Setting reactions and compressive strengths of calcium phosphate cements. *J Dent Res*, 1990; 69(12):1892

(收稿日期:1996—09—14)