

人工血管管壁涂层生物材料的生物相容性评价

王康, 史宏灿, 陆世春, 孙超, 贺建胜, 裴昶
(扬州大学 临床医学院胸心外科, 扬州 225001)

摘要:对人工血管管壁涂层的生物材料进行生物相容性的实验评价。按照国际标准,对相关单个和混合材料进行急性全身毒性试验、热源试验、溶血试验和细胞毒性试验。结果表明:本实验涉及的生物材料胶原蛋白、聚乳酸以及混合组分材料均符合生物相容性评价实验的安全标准。说明胶原蛋白和聚乳酸作为复合型人工血管管壁涂层材料具有生物相容性和安全性,可为临床产品的研制提供依据。

关键词:人工血管涂层材料;生物材料;生物相容性;胶原蛋白;聚乳酸

中图分类号:R318;Q527 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-6278 (2009)01-0043-05

Evaluation for Biocompatibility of the Biomaterials Coated on the Vascular Prosthesis Surface

WANG Kang, SHI Hongcan, LU Shichun, SUN Chao, HE Jiansheng, PEI Chang

(Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, the Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract: To make evaluation for biocompatibility of the materials which is covered on the vascular prosthesis surface. With the international standardizations, some experiments for the materials were done, include acute systemic toxicity test, pyrogen test, hemolysis test and cytotoxicity test. Results showed that the collagen protein, L - polylactic acid and the mixed materials were all consistent with the safety control. It proves that the collagen protein and L - polylactic acid are with biocompatibility and safety for coating on the surface of vascular prosthesis.

Key words: Convergence of vascular prosthesis; Biomaterial; Biocompatibility; Collagen protein; L - polylactic acid

1 引言

人工血管主要与血液接触,因此生物材料的血液相容性是最关键的问题。另外,蛋白质^[1]、粒-单系细胞^[2]、补体和细胞因子^[3]等对于生物材料的相容性也有一定程度的影响。表面特性对于接触血液形成血栓的影响最为关键,例如外形、表面粗糙程度、可湿性、亲水性等^[4]。此外,血液的流态影响也是血栓形成的一个方面。寻找两个方面彼此适应的契合点被认为是最好的解决方法。因此,表面涂层技术被运用于改善人工血管的生物相容性。将材料表面覆盖上一层其他生物相容性好的物质,将材料与体液环境分隔开,避免接触,从而达到减少甚至避

免排斥反应。

2 试验方法

试验所有标准均符合《医疗器械生物学评价》GB/T 16886.1—1997 国家标准相关规定。胶原蛋白由黑龙江卫世医药有限公司提供,L-聚乳酸由济南健宝开元生物材料有限公司提供。混合材料制备方法:将液状胶原蛋白与聚乳酸等体积混合,充分均匀搅拌,置4℃冰箱中凝固成固体状备用。

2.1 急性全身毒性试验

2.1.1 试验原理 将试验材料或材料浸提液通过动物静脉或腹腔注射到动物体内,观察动物的生物学反应,以判定材料的急性毒性作用。

通信作者 Email:wangkang1971@hotmail.com

2.1.2 材料浸提液 将受试材料制成 20 mm × 10 mm、厚 1 mm 的立方体长条薄片。按照浸提介质:试样表面积 = 1 ml : 3 cm² 制成,浸提介质为 0.9% 生理盐水,浸提条件为 37 ℃, 72 h。0.22 μm 的微孔滤器灭菌,4 ℃ 冰箱保存备用。阴性对照采用 0.9% 生理盐水。

2.1.3 实验动物 选取体重 20 ~ 27 g 的健康昆明系小鼠,雌雄分笼同养,分六个实验组,每组 5 只。

2.1.4 实验方法 (1) 浸提液及阴性对照液,置于 37 ℃ 恒温水浴箱中复温。(2) 将浸提液以及对照液按 50 ml/kg 剂量由小鼠尾静脉缓慢注入。

2.1.5 评价方法 记录注射后实验动物在 24 h, 48 h, 72 h 的体重变化,观察其一般状态、毒性表现及死亡情况。材料毒性程度根据中毒症状分为无毒、轻度毒性、中度毒性、重度毒性和死亡。所有数据均采用 SPSS10.0 统计学处理系统软件进行数据分析,统计学处理采用 *t* 检验。

2.2 热源试验

2.2.1 试验原理 将材料浸提液由耳缘静脉注入家兔体内,在规定时间内观察家兔体温升高情况,以判断浸提液中所含热源的限度是否符合规定。

2.2.2 材料浸提液 将材料制成 10 mm × 20 mm、厚 1 mm 方形薄片。按浸提介质:试样表面积 = 1 ml : 3 cm² 制成,浸提介质为 0.9% 生理盐水,浸提条件为 37 ℃, 72 h。0.22 μm 的微孔滤器灭菌。阴性对照采用 0.9% 生理盐水。

2.2.3 实验动物 健康新西兰大白兔,2.3 ~ 2.8 kg,雌雄不限,3 只为一实验组。

2.2.4 实验方法 (1) 将肛门体温计插入家兔肛门,深度约 6 cm,时间约 3 min;试验前禁食 2 h,间隔 30 min 分别测 3 次体温,取其平均值为正常体温值。(2) 材料浸提液 37 ℃ 恒温箱预热后,沿耳缘静脉缓慢注入,剂量为 10 ml/kg。(3) 注射后每隔 1 h 测量 1 次,共测 3 次,以 3 次中体温最高值减去正常体温,即为体温升高度数。

2.2.5 评价标准 如果每一实验组体温升高均在 0.6 ℃ 以下,且体温升高总数在 1.4 ℃ 以下,可认为试验材料浸提液符合热源检查要求;如每一实验组中体温升高 0.6 ℃ 的动物数超过 1 只,或在复试的 3 只兔中,体温升高 0.6 ℃ 动物数仍有 1 只或以上;或初、复试体温升高总数超过 3.5 ℃,则认为材料浸提液不符合热源检查要求。

2.3 溶血试验

2.3.1 试验原理 通过试样材料或其浸提液在体

外与动物血液直接接触,根据测定红细胞释放的血红蛋白量来评价该材料是否对红细胞的功能和代谢造成不良影响,对材料是否具有溶血反应进行客观评价。

2.3.2 实验动物及材料 健康新西兰兔 1 只,体重 2.57 kg。阴性对照采用 0.9% 生理盐水,阳性对照采用蒸馏水。

2.3.3 实验方法 (1) 将试样材料制成 2.5 cm × 2 cm 小条状,置于生理盐水 40 ml 中,置 37 ℃ 恒温水浴箱中保温 30 min。(2) 试样组、阳性、阴性对照组各设平行样品试管 5 个,每管加相应浸提液 4 ml。(3) 将肝素一支(12 500U)溶于 50 ml 生理盐水中,使用时按照 1 ml 血配 25U 肝素的比例使用。(4) 心脏采血 20 ml,加入 2% 肝素 1 ml,制成新鲜抗凝血,然后按新鲜抗凝血:生理盐水 = 4:5 的比例制成稀释兔血。(5) 每试管加稀释兔血 0.2 ml,混匀,37 ℃ 恒温水浴箱保温 60 min。(6) 所有试管经 1 500 rpm,离心 5 min,取上清在 545 nm 波长测其吸光度。

2.3.4 评价方法 溶血率(%) = (试样组吸光度 - 阴性组吸光度) / (阳性组吸光度 - 阴性组吸光度) × 100%。评判标准:阴性对照管吸光度 < 0.03,阳性对照管吸光度为 0.8 ± 0.30 时实验结果有效,当溶血率 5% 时,可判断该材料不具溶血作用。

2.4 细胞毒性试验

2.4.1 试验原理 利用细胞体外培养的方法来评价医用材料及装置或其浸提液可滤出成分中潜在性的细胞毒性。

2.4.2 实验方法 (1) 细胞形态观察法 将不同受试材料以及阳性、阴性参照材料分别置于培养皿内,然后加入 5 × 10⁴ /ml 的 L - 929 细胞悬液 3 ml 于培养皿内,每组设平行样品 5 个,加入新鲜培养液,放入 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱内培养。培养过程中定时通过倒置显微镜观察受试材料表面及边缘的细胞,根据其形态和生长状况把毒性分级分为无毒、轻度、中度、重度毒性。

(2) MTT 比色法 取 96 孔培养板,加入 5 × 10⁴ /ml L - 929 细胞悬液 100 μl/孔,开放培养。24 h 后,每孔加入试样浸提液 100 μl,空白对照组加入 100 μl 新鲜培养液。置 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱内分别连续培养 2 d、4 d 和 7 d。观察时,每孔加入 MTT (5mg/ml) 50 μl,继续培养至 6 h 后,弃原培养液,加入 DMSO 150 μl/孔,室温轻度振荡 15 min。使用酶联免疫测定仪测试其吸光度值。测试波长为 490 nm,参考波长为 550 nm。计算细胞相对增值率

(relative growth rate, RGR) = 实验组吸光度均值/空白对照组吸光度均值) ×100 %。然后根据 6 级毒性评分标准转换成毒性分级(0 - 5 级):大于 100 % 为 0 级,75 % ~ 99 % 为 1 级,50 % ~ 74 % 为 2 级,25 % ~ 49 % 为 3 级,1 % ~ 24 % 为 4 级,0 为 5 级。

3 试验结果

3.1 急性全身毒性试验

所有实验小鼠均无死亡,活动、进食及大小便均正常,精神状态良好,无惊厥、抽搐、瘫痪、呼吸抑制等毒性反应。不同观察时间内动物体重均有一定程度的增加,但是在正常范围之内(见表 1)。结果阴性对照组比较未见明显差异($P > 0.05$),表明两种受试材料均属无毒级生物材料。

表 1 急性全身毒性试验小鼠体重增加结果

Table 1 The weight gaining of acute systemic toxicity testing mice

受试材料	时间(h)		
	24 h	48 h	72 h
胶原蛋白组	0.26 ±0.07	0.44 ±0.05	0.76 ±0.05
聚乳酸组	0.24 ±0.05	0.46 ±0.04	0.64 ±0.04
混合材料组	0.26 ±0.05	0.46 ±0.05	0.66 ±0.04
阴性对照组	0.24 ±0.04	0.48 ±0.04	0.72 ±0.05
P 值	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

3.2 热源试验

结果见表 2。各试验组动物注射材料浸提液后,体温升高均在 0.6 以下,且温度升高总数在 1.4 以下,符合热源检测有关规定,表明受试材料及其浸提液不含致热源物质,材料植入体内后无热源作用。

表 2 人工血管涂层材料试样热源试验结果

Table 2 The pyrogen test for the coating material of vascular prosthesis

分组	体重(w/kg)	基础体温(℃)	注射后体温(℃)			体温升高(℃)
			1 h	2 h	3 h	
胶原蛋白组	2.55	39.7	39.8	39.9	39.9	0.2
聚乳酸组	2.57	39.5	39.6	39.8	39.8	0.3
混合材料组	2.48	39.7	39.9	40.0	39.9	0.3
阴性对照组	2.53	39.6	39.5	39.6	39.6	0

3.3 溶血试验

结果见表 3。本实验中,试样管离心后上层均为清亮无色液体,下层为红细胞沉淀物,涂片镜检未见红细胞破裂或凝聚。阴性对照管的吸光度小于

0.03,阳性对照管吸光度在 0.8 ±0.3 范围内,符合国家标准。根据非直接接触血液的医用生物材料性能测试所提出的溶血率小于 5 % 标准,判定两种受试材料体外试验不引起溶血反应。

表 3 人工血管涂层材料试样溶血试验结果

Table 3 The hemolysis test of the coating material

分组	N1	N2	N3	N4	N5	吸光度均值	溶血率(%)
胶原蛋白组	0.012	0.010	0.012	0.011	0.010	0.0110 ± 0.0004	0.20
聚乳酸组	0.010	0.011	0.011	0.012	0.010	0.0108 ± 0.0004	0.18
混合材料组	0.010	0.010	0.012	0.010	0.011	0.0106 ± 0.0004	0.15
阴性对照组	0.008	0.010	0.010	0.010	0.009	0.0094 ± 0.0004	0
阳性对照组	0.831	0.779	0.817	0.771	0.793	0.7982 ± 0.0113	100

3.4 细胞毒性试验

3.4.1 细胞形态观察 见图 1、图 2、图 3、图 4、图 5。

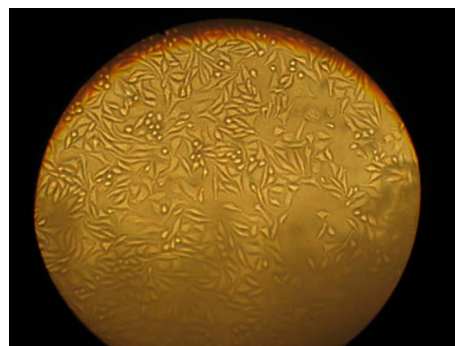


图 1 胶原蛋白组(×200)

Fig 1 Collagen protein

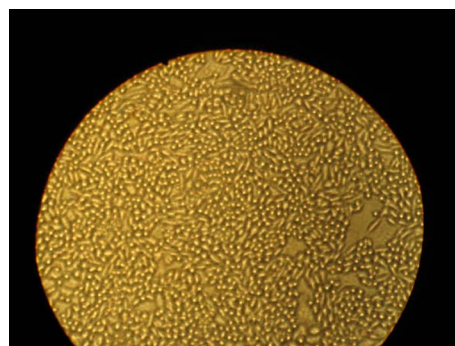


图 2 聚乳酸组(×100)

Fig 2 L - polyactic acid

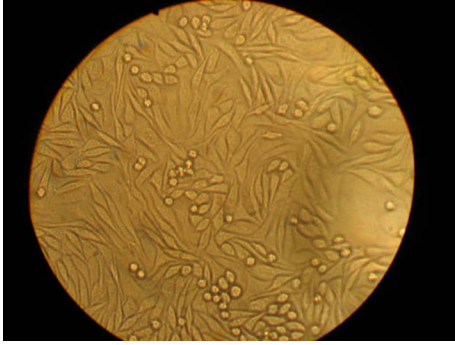


图 3 混合材料组(×400)

Fig 3 Mixed materials

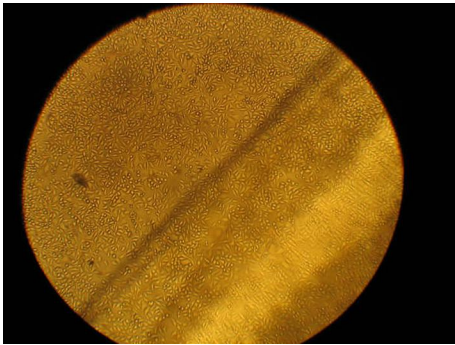


图 4 阴性材料组(×100)

Fig 4 The negative control materials

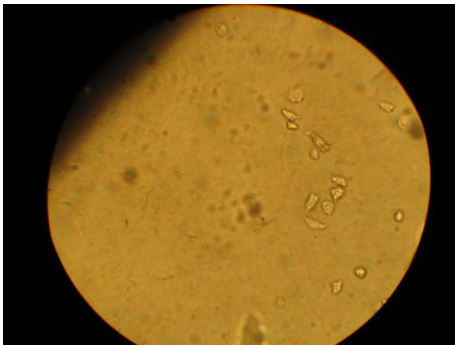


图 5 阳性材料组(×200)

Fig 5 The positive control materials

3.4.2 MTT 法 试样材料 MTT 法检测结果见表 4、表 5、表 6。

表 4 MTT 法培养 2 天的试验结果
Table 4 The result cultured 2d by MTT

材料	OD 值	RGR(%)	分级
胶原蛋白组	0.4153 ±0.0165	104.56	0
聚乳酸组	0.3520 ±0.0249	88.61	1
混合材料组	0.4019 ±0.0389	101.19	0
阴性对照组	0.3972 ±0.0236	100	0
阳性对照组	0.3427 ±0.0193	86.27	1

表 5 MTT 法培养 4 天的试验结果

Table 5 The result cultured 4d by MTT

材料	OD 值	RGR(%)	分级
胶原蛋白组	0.6736 ±0.0876	109.64	0
聚乳酸组	0.5880 ±0.0655	95.7	1
混合材料组	0.6488 ±0.0542	105.6	0
阴性对照组	0.6144 ±0.0690	100	0
阳性对照组	0.4492 ±0.0627	73.12	2

表 6 MTT 法培养 7 天的试验结果

Table 6 The result cultured 7d by MTT

材料	OD 值	RGR(%)	分级
胶原蛋白组	1.3432 ±0.1420	135.1	0
聚乳酸组	1.0698 ±0.0892	107.6	0
混合材料组	1.1140 ±0.0280	112.05	0
阴性对照组	0.9942 ±0.0522	100	0
阳性对照组	0.4248 ±0.0173	43.23	3

4 讨论

急性全身毒性试验是一种非特异性急性毒性试验。本实验采用小鼠腹腔注射途径,结果显示,72 h 内所有实验组小鼠均无死亡,活动正常,精神状态良好,没有毒性反应。与阴性对照组比较没有明显差异($P > 0.05$),表明两种材料均属无毒级的生物材料,而且材料混合后也没有产生另外的毒性物质,符合生物材料的安全性标准。

生物材料在制备过程中可能残留的单体、辅助添加剂或被内毒素污染等都会含有致热源物质,在植入体内后会引发恒温动物体温的异常上升。热源试验^[5]过程中应该尽量杜绝室温、注射液温度、惊吓等影响因素对实验结果的干扰。本实验结果表明,两种材料均不含致热源物质;并且组份材料混合后也未产生新的致热源物质。

溶血试验^[6]可以作为体外细胞毒性试验的一个重要补充。如果材料有溶血作用,则提示材料可能具有细胞毒性。实验结果表明,阴性对照管的吸光度小于 0.03,阳性对照管吸光度在 0.8 ± 0.3 范围内,符合国家标准。两种材料溶血率分别为 0.20%、0.18%,混合材料组的溶血率为 0.15%,均符合医用生物材料的应用要求。可以认为这两种材料没有溶血作用。

细胞毒性是指利用生物材料及其浸提液与细胞进行体外培养的方法来评价医用材料及装置或其浸

提液可滤出成分中潜在性的细胞毒性。目前,几乎所有生物材料都必须通过相关试验检测其是否具有细胞毒性。聚全氟乙丙烯是已知并通过实验论证的无毒聚合材料,已经被广泛应用于医疗用品的生产制备,本实验作为阴性对照材料;聚氯乙烯则为已知有毒材料,本实验用作阳性对照材料。从图 1~5 可以看出,两种材料以及混合材料组的细胞形态均正常,贴壁生长良好,与阴性对照组无明显差别;而阳性对照组中大部分细胞变成圆形,胞核固缩,凋亡细胞明显增多,材料表面细胞稀少,基本不贴壁。根据已知的细胞形态分析标准,人工血管两种涂层材料均不具备细胞毒性。

MTT 比色法的生物学终点是线粒体活性的检测。细胞生命活动旺盛时,线粒体数量就增多,衰退时则减少。本实验中我们发现,聚乳酸组 L-929 细胞在体外共同培育时,2 d、4 d 时细胞毒性均为 1 级,RGR 分别为 88.61%和 95.7%,而在 7 d 时细胞毒性评级^[7-8]就转评为 0 级,并且 RGR 处于逐渐升高状态,这种现象可能与随着培养时间的延长,轻度受损后的细胞其活力得到一定的恢复有关。胶原蛋白、混合材料和聚全氟乙丙烯与 L-929 细胞在体外共同培育时,细胞毒性评级一直处于 0 级水平。阳性对照组的细胞 RGR 在培育期间呈逐渐下降趋势,其细胞毒性分级在 2 d 时为 1 级,而在 4 d 为 2 级,7 d 时则增加到 3 级。试验结果表明,两种受试材料表现出了良好的细胞相容性。

5 结论及展望

随着心脏血管外科技术的成熟与发展,处理好

生物材料在体内生物相容性的问题,会对新材料的研制和开发产生重要的影响。

参考文献:

- [1] Allen Lorcan T, Toretto Miriam, Miller Ian S, et al. Surface - induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction[J]. *Biomaterials*, 2006, 27 (16) : 3096 - 3108.
- [2] Wataha John C, Ratanasathien Sonjin, Hanks Carl T, et al. In vitro IL - 1 and TNF - release from THP - 1 monocytes in response to metal ions[J]. *Dental Materials*, 1996, 12(5 - 6) : 322 - 327.
- [3] Grubel M B, Scifon M V. Biomaterial - associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(26) : 5681 - 5703.
- [4] Spijker Hetty T, Bos Rolf, Busscher Henk J, et al. Platelet adhesion and activation on a shielded plasma gradient prepared on polyethylene[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(3) : 757 - 766.
- [5] Park Chul - Yong, Jung Seung - Ha, Bak Jong - Phil, et al. Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide [J]. *Biologicals*, 2005, 33(3) : 145 - 151.
- [6] Higa O Z, Rogero S O, Machado L D B, et al. Biocompatibility study for PVP wound dressing obtained in different conditions[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 1999, 55(5 - 6) : 705 - 707.
- [7] Jansen K, Weff J F A van der, Wachem P B van, et al. A hyaluronan - based nerve guide: in vitro cytotoxicity, subcutaneous tissue reactions, and degradation in the rat[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(3) : 483 - 489.
- [8] Silva C Guedes e, Higa O Z, Bressiani J C. Cytotoxic evaluation of silicon nitride - based ceramics[J]. *Materials Science and Engineering*, 2004, 24(5) : 643 - 646.

(收稿日期:2008 - 10 - 08)

美开发出加速骨骼生长新技术

据《每日科学》报道,美国加州大学圣迭戈分校的研究人员开发出一种基于钛氧化物纳米管培植干细胞的加速骨骼生长新方式,可为骨科病人更快更好康复奠定基础。

此项研究首次将干细胞与钛氧化物纳米管植入物相关联。研究人员利用纳米生物技术将人间叶系干细胞放置在超薄的钛氧化物纳米管上,以控制细胞的分化路径,成为造骨细胞或成骨细胞。人间叶系干细胞与胚胎干细胞有所不同,可从病患自身的骨髓中直接提取。

研究人员表示,如果人们不慎在滑雪中摔坏了自己的膝盖或腿,骨科医生会为其植入一个钛棒,在未来的 3 个月中病患将与拐杖为伴。而通过将干细胞与钛氧化物纳米管相结合,有望显著增快病人的愈合速度,患者可在一个月内恢复行走。

据相关数据表明,使用钛氧化物纳米管进行植入治疗,可有效减少骨骼松动。而这正是骨科治疗的主要问题之一,一旦发生松动,需要对植入物进行再次手术,对老年患者而言存在着极大的健康风险和不便,从成本的角度来说也是不可取的。