

实验研究

镁钙合金的细胞毒性研究

李子剑* 张克* 娄思权* 郑玉峰**



摘要 目的 观察镁钙合金对体外细胞生长的影响,对镁钙合金的生物相容性进行评价。**方法** 根据 ISO 10993 - 5:1999 及 GB/T 16886.5 - 2003 标准,将不同浓度镁钙合金浸提液与 L - 929 细胞接触培养,进行细胞的形态学观察及四甲基偶氮唑盐(MTT)比色,评价镁钙合金的细胞毒性。**结果** 细胞形态学观察显示,阳性对照组细胞脱落、死亡,其余各组细胞贴壁生长,形态正常。MTT 显示镁钙合金浸提液对细胞的毒性 0 级,无明显细胞毒性。**结论** 镁钙合金的细胞毒性为 0 级,符合临床应用的要求。

关键词 镁钙合金;镁合金;细胞毒性;生物材料

A Cellular Study on Cytotoxicity of Magnesium - calcium Alloy

Li Zijian, Zhang Ke, Lou Siqun, et al. Department of Orthopaedics, Peking University Third Hospital, Beijing, 100083

Abstract Objective To investigate the cytotoxicity of magnesium - calcium alloy that will be used as a degradable biomaterial and to provide experiment basis for clinical application. **Methods** The extracting solution with the L - 929 cells was mixed and the cytotoxicity of the magnesium - calcium alloy was evaluated by cell morphological observation and MTT assay. **Results** The cells morphology was normal. The level of cytotoxicity was grade 0. **Conclusion** Magnesium - calcium alloy has a good biocompatibility. It accords with the biomaterial cytotoxicity for human implant.

Key words Magnesium - calcium alloy; Magnesium alloy; Cytotoxicity; Biomaterial

镁合金相比目前临床上普遍采用的钛合金具有质量轻、弹性模量更加接近正常骨组织、避免应力遮挡等优点,同时具有无磁性、可加工性强等特点,是具有临床应用前景的一种新型金属材料^[1]。镁和钙是人体内必需金属,镁是细胞新陈代谢中各种酶系统的重要活化剂,激活许多重要酶类^[2],理应具备良好的生物相容性,但目前尚无镁钙合金细胞毒性的研究报道。一种新的生物材料在进入临床之前必须进行生物相容性的评价,完整的生物学评价包括初级急性毒性筛选、动物体内应用和临床试用三级试验,体外细胞实验是初级急性毒性筛选的一个重要方面。细胞毒性试验的定义为“用细胞培养方法进行毒理学风险评价”。

本组依据 ISO 10993 - 5:1999 及 GB/T 16886.5 - 2003 标准^[3],将不同浓度镁钙合金浸提液与 L - 929 细胞接触培养,进行细胞的形态学观察以及四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法对镁钙合金的细胞毒性进

行评价。

1 材料与方 法

1.1 实验分组及材料来源 实验设 5 组:RPMI 1640 液阴性对照组,不同浓度实验组 3 组,0.64% 苯酚阳性对照组。实验用镁钙合金由北京大学力学与工程系郑玉峰教授提供的 Mg - 1Ca(含 1% 钙)合金,仓鼠 L - 929 成纤维细胞株由香港科技大学生物系龙李瑞梅教授惠赠。

1.2 实验材料及设备 RPMI 1640 培养液(天润善达,中国,含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml),MTT(碧云天,中国)。CO₂ 培养箱(D - 63450, Heraeus, Germany),倒置相差显微镜(CK - 40, Olympus, Japan),自动酶标测试仪(Elx - 800, bio - Tek instruments, Inc, American),96 孔培养板。

1.3 实验方 法

1.3.1 镁钙合金浸提液的制备 将 5 枚长、宽、厚度分别为 10、10、1 mm 的镁钙合金块经环氧乙烷消毒灭菌,置于无菌培养瓶中,按浸提液与试样表面积之比为 3 cm²/ml 的比例加入 RPMI 1640 培养液,置于 37℃、95% 相对湿度、5% CO₂ 培养箱中 72 h,得到材料浸提液原液,密封,4℃ 冰箱保存备用。

1.3.2 浸提液与细胞接种培养及结果观察 将 L - 929 细胞

基金项目:国家自然科学基金研究项目(30670560)

* 北京大学第三医院骨科 北京市 100083 ** 北京大学工学院先进材料与纳米技术系

复苏、传代后,于生长旺盛期用胰酶消化,悬浮于完全培养液中,调整细胞浓度为 5×10^4 /ml,接种于 96 孔板上,每组 5 孔,每孔 100 μ l。培养 24 h 使细胞贴壁,弃培养液。阴性对照组加入单纯培养液,试验组加入不同浓度的 RPMI 1640 浸提液(浸提原液、50%浸提液、10%浸提液),阳性对照组加入含 0.64% 苯酚的培养液。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,分别于 2、4、7 d 后各取出 1 块培养板,在倒置相差显微镜下观察活细胞的形态并摄影。在每孔加入 10 μ l MTT,继续培养 4 h,在每孔中加入 formazan 溶解液 100 μ l,继续培养直至普通光学显微镜下 formazan 全部溶解。震荡 5 min,然后用酶标仪 570 nm 下测定每孔吸光度值(OD 值)。

1.3.3 实验数据分析 计算细胞相对增值率(RGR),并参照六级毒性评级标准作毒性评定。细胞相对增值率(RGR) = (实验组 OD 值/阴性对照组 OD 值) \times 100%。

2 结果

培养 2 d:阳性对照组中,贴壁生长的细胞呈梭形或多角形,部分细胞脱落,悬浮的细胞呈圆形或不规则形,胞膜增厚,胞质内出现空泡及颗粒状物质,胞核致密。其余各组的细胞几乎全部贴壁生长,细胞轮廓清晰,呈菱形、长梭形或多角形,核质比例正常,胞质均匀。

培养 4 d:阳性对照组中,脱落的细胞增多,细胞收缩变小,胞膜变厚,核质增多,胞核固缩。其余各组贴壁的细胞形态正常,可见少许悬浮的衰老细胞,其胞质内可见空泡或颗粒物。

培养 7 d:阳性对照组中,大部分细胞脱落,细胞变圆、变小,胞质、胞核浓缩,可见许多质膜崩解、核膜破裂的死亡细胞。其余组内细胞较前更为成熟,细胞突起较长,大部分继续贴壁生长,细胞密度有所降低,可见少量悬浮退化细胞及个别死亡细胞。

培养 7 d 细胞生长状况见图 1~4,各实验组吸光度值及材料毒性评价见表 1。

3 讨论

目前临床上常用的生物材料主要包括医用金属材料 and 聚合物材料,医用金属材料包括医用不锈钢、钴基合金和钛基合金等,聚合物有聚羟基乙酸和聚乳酸等。金属材料由于其弹性模量是骨组织弹性模量的数倍,而容易发生应力遮挡,造成骨质吸收或影响骨折愈合^[4]。同时现有金属材料中大多含有镍、铬等元素,对人体有致敏反应,可诱导机体发生癌变^[5]。而聚合物由于其强度低、引发非特异性炎症反应的缺点未能得到广泛应用。镁及镁合金具有密度低、比强度和比刚度较高、弹性模量接近正常骨组织、生物可降解吸收性等特点,具有成为新型生物材料的潜

力^[1]。镁钙合金的材料学特点更加符合当今骨折治疗的 BO 原则^[6]。



图1 培养7 d后阴性对照组倒置相差显微镜下细胞形态($\times 10$)



图2 培养7 d后镁钙原液组倒置相差显微镜下细胞形态($\times 10$)



图3 培养7 d后50%镁钙组倒置相差显微镜下细胞形态($\times 10$)



图4 培养7 d后阳性对照组倒置相差显微镜下细胞形态($\times 10$)

表1 各组 OD、RGR 和细胞毒性分级

培养 天数	分组	OD($\bar{x} \pm s$)	RGR(%)	毒性 分级
2 d	阴性对照组	0.3238 \pm 0.01089	100.00	0
	镁钙原液组	0.6008 \pm 0.01365	185.55	0
	50 % 镁钙组	0.3878 \pm 0.01665	119.77	0
	10 % 镁钙组	0.3286 \pm 0.02109	101.48	0
	阳性对照组	0.3036 \pm 0.01090	93.76	1
4 d	阴性对照组	0.7848 \pm 0.05974	100.00	0
	镁钙原液组	1.2884 \pm 0.19425	164.17	0
	50 % 镁钙组	0.9716 \pm 0.10351	123.80	0
	10 % 镁钙组	0.8014 \pm 0.02450	102.12	0
	阳性对照组	0.2502 \pm 0.01303	31.88	3
7 d	阴性对照组	0.4888 \pm 0.05028	100.00	0
	镁钙原液组	0.7806 \pm 0.20417	159.70	0
	50 % 镁钙组	0.5294 \pm 0.13503	108.31	0
	10 % 镁钙组	0.5166 \pm 0.07851	105.69	0
	阳性对照组	0.3588 \pm 0.04730	73.40	2

一种新的生物材料要应用于人体,其生物相容性必须预先通过生物学评价。体外细胞毒性试验是生物相容性评价的重要部分。Heublein 等^[7]将镁铝合金的冠状动脉支架植入实验动物猪的冠状动脉中,显示镁合金血管支架是永久性金属支架的一个可供选择的替代物。高家诚等^[8]进行了纯镁的细胞毒性研究,将小鼠骨髓细胞与纯镁试样直接接触培养,发现纯镁没有对小鼠骨髓细胞的增殖产生明显的毒副作用。目前尚无镁钙合金体外细胞毒性研究的报道。

细胞形态学观察可以直观的看到外来因素作用后细胞形态和结构的改变以及细胞增殖与死亡的情况,可以对材料的细胞毒性做出初步判断。MTT法(四甲基偶氮唑盐比色法)是由 Mosroam 在 1983 年提出,该方法的原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶

能催化四甲基偶氮唑盐(MTT)形成深蓝色的物质——甲甲赞(formazan),形成数目的多寡与活细胞数目和功能状态呈正相关。该法操作简便、敏感性高^[9]。通过计算 RGR 值可对材料的细胞毒性做定量评价,按分级标准规定把 RGR 值转换成 0~ 级以评定材料毒性程度:RGR 100 %为 0 级;75 %~ 99 %为 级;50 %~ 74 %为 级;25 %~ 49 %为 级;1 %~ 24 %为 级;0 为 级。

本组依据 ISO 10993 - 5:1999 及 GB/ T 16886.5 - 2003 标准,对不同浓度镁钙合金浸出液的细胞毒性进行细胞形态学的定性观察以及 MTT 法的定量分析,结果显示镁钙合金浸出液没有表现出细胞毒性作用,呈现了良好的细胞相容性,符合临床应用的要求。

参考文献

- 1 Mark P Staiger ,Alexis M Pietsk Jerawala Huadmai ,et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials :a review. *Biomaterial* ,2006 , 27 :1013
- 2 黄琴,梁惠,杜凤沛. 镁的生理与临床应用. *微量元素与健康研究* , 2005 ,22(2) :61
- 3 由少华,王昕,黄经春等 主编. *医疗器械生物学评价标准汇编*. 北京:中国标准出版社,2003. 80
- 4 刘振东,范清宇. 应力遮挡效应——寻找丢失的钥匙. *中华创伤骨科杂志* ,2002 ,4 :62
- 5 International Agency for Research on Cancer (IARC). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Vol. 49 ,Chromium , Nickel and Welding ,IARC Scientific Publications ,Lyon ,1990 ,257
- 6 王亦聰. BO 与 AO 的不同之处. *骨与关节损伤杂志* ,2002 ,17(1) :3
- 7 Heublein B ,Rohde R ,Kaese V , et al. Biocorrosion of magnesium alloys : a new principle in cardiovascular implant technology ? *Heart (British Cardiac Society)* ,2003 ,89(6) :651
- 8 高家诚,李龙川,王勇. 纯镁的细胞毒性和溶血率试验研究. *功能材料* ,2004 ,35 :2265
- 9 杨晓芳,奚廷斐. 生物材料生物相容性评价研究进展. *生物医学工程杂志* ,2001 ,18(1) :123

(收稿:2007-03-22)