

. 实验研究 .

碳纤维复合材料人工颅骨板急性期生物相容性的研究

张梦杰 周春鹏 陈华辉 张刚利

【摘要】目的 评价碳纤维复合材料人工颅骨板在急性期的生物相容性。**方法** 制作碳纤维复合材料、含重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)的碳纤维复合材料、钛网、MEM 培养基、含有 0.64% 苯酚的 MEM 培养基的浸出液,用于测试。采用 L929 小鼠成纤维细胞进行细胞毒性试验,采用健康 ICR 小鼠进行急性毒性试验,采用新西兰大白兔耳静脉血进行急性溶血试验,采用白化豚鼠进行皮肤致敏试验。**结果** 碳纤维复合材料、含 rhBMP-2 的碳纤维复合材料、钛网浸提液对 L929 细胞的相对增殖率均在 75% 以上,细胞毒性 1 级,无明显细胞毒性;小鼠腹腔注射相应材料的浸提液后,均活动良好,均无不良反应,均无明显急性毒性;碳纤维复合材料、含 rhBMP-2 的碳纤维复合材料、钛网浸提液溶血率均小于 5%,均不引起溶血反应;碳纤维复合材料、含 rhBMP-2 的碳纤维复合材料、钛网浸提液不引起致敏性。**结论** 碳纤维复合人工颅骨板急性期生物相容性良好。

【关键词】 碳纤维复合材料;生物相容性;人工颅骨板

【文章编号】 1009-153X(2019)06-0356-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; R 651.1*1

Acute study of biocompatibility of carbon fiber composite artificial skull plate

ZHANG Meng-jie¹, ZHOU Chun-peng², CHEN Hua-hui¹, ZHANG Gang-li³. 1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Department of Neurosurgery, Zhengzhou Municipal Seventh People's Hospital, Zhengzhou 450000, China; 3. Department of Neurosurgery, Affiliated People's Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

【Abstract】 Objective To evaluate the biocompatibility of carbon fiber composite artificial skull plate(CFCASP) in acute phase. **Methods** The biocompatibility of CFCASP was observed by cytotoxicity test, acute toxicity test in mice, acute hemolysis-test in rabbits and sensitization test in guinea pigs. **Results** ①The relative proliferation rates of L929 cells cultured in the media containing the extracts from carbon fiber composite material, recombinant human bone morphogenetic protein-2 containing carbon fiber composite material and titanium net for 24~72 hours were over 75% and, there was insignificant difference in the relative proliferation rates among the three groups ($P>0.05$) and the cytotoxicity was grade I, which indicated no obvious cytotoxicity. ② The activities were well and no adverse reactions and obvious acute toxicity were observed in the mice 4, 24, 48 and 72 hours after intraperitoneal injection of the extracts of the above-mentioned three materials and physiological saline. ③The acute hemolysis test showed that the hemolysis rates of the extracts from the above-mentioned materials all were less than 5% in the New Zealand white rabbits, and there was insignificant difference in the hemolysis rate among the three materials ($P>0.05$). ④ No any sensitive reactions were observed in the guinea pigs receiving intracutaneous injection of the extracts from the above-mentioned materials. **Conclusions** CTCASP has good biocompatibility and meets the clinical application standards of domestic medical materials.

【Key words】 Biocompatibility; Carbon fiber composite material; Artificial skull plate

目前,应用于临床的颅骨修复材料种类多样,各有利弊,最适宜的修复材料仍未达成共识^[1]。传统颅骨修复材料已很少使用,例如同种异体骨、有机玻璃板、硅橡胶等。自体骨仍然是修复颅骨缺损的“金标准”,但术后存在骨瓣吸收问题,且骨瓣来源有限,不易保存。钛合金目前被广泛应用于临床。Williams 等^[2]研究认为使用钛合金修补颅骨缺损术后外观满意,但对电磁波干扰与外界温差无法控制,在极度炎

热和寒冷的环境中感到不适。颅骨组织工程技术可以弥补现有修复材料的缺陷,解决术后并发症和材料老化的问题^[3]。碳纤维复合材料是一种新型组织工程的支架材料,具有良好的生物相容性、稳定性和可靠性。本文采用细胞毒性试验、急性毒性试验、急性溶血试验、致敏试验等测试碳纤维复合材料急性期生物相容性,为其临床应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 碳纤维复合材料(60%碳纤维和 40%改性聚乳酸)由中北大学材料学院提供;重组人骨形态发生蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)购自美国 Pepro Tech 公

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.06.012

作者单位:030001 太原,山西医科大学(张梦杰、陈华辉);450000,郑州市第七人民医院神经外科(周春鹏);030001 太原,山西医科大学附属人民医院神经外科(张刚利)

通讯作者:张刚利, E-mail: zhanggangli1973@163.com

司;钛网购自美国 BiometMicrofixation 公司;MEM 培养基、10%马血清购自 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒购自博士德生物公司;完全弗氏佐剂、环磷酰胺、瑞士染液、Giemsa 染液、秋水仙素购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验细胞和动物 L929 细胞购自北京协和细胞资源共享平台;ICR 小鼠,体重约 20 g,雌雄不限;清洁级新西兰大白兔,体重约 2 kg,雌雄不限;健康豚鼠,体重约 300 g,雌雄不限。

1.3 测试方法

1.3.1 浸提液的制备 高压灭菌后,将 10 g 碳纤维复合材料和 5 g 钛网放入不同的容器中,样品与生理盐水的质量体积比为 0.2 g/ml,分别加入 50、25 ml 生理盐水,并置于 37 ℃恒温水浴箱中 72 h,并通过 0.22 μm 过滤器过滤除菌备用。将样品浸入含有 10%马血清 MEM 培养基中制备细胞毒性试验的浸出液,其中 rhBMP-2 的浓度为 1.0 μg/ml。

1.3.2 细胞毒性试验 分组:A 组,碳纤维复合材料;B 组,含 rhBMP-2 的碳纤维复合材料;C 组,钛网;D 组,阴性对照组, MEM 培养基;E 组,阳性对照组,含有 0.64%苯酚的 MEM 培养基。收集浓度约为 5×10⁴/ml 的 L929 小鼠成纤维细胞悬浮液并接种到三个培养板中,每板 30 孔,每组 6 孔,每孔接种 100 μl。A、B 和 C 组添加 100 μl 浸提液,D 组添加 100 μl MEM 培养基,E 组添加 0.64%苯酚的 MEM 培养基 100 μl,继续培养 12、24 h,在显微镜下观察细胞形态及生长情况并照相。24、48、72 h 取出培养板,CCK-8 试剂盒检测细胞增殖。

1.3.3 急性毒性试验 将 20 只健康 ICR 小鼠随机分为 4 组:A 组,碳纤维复合材料;B 组,含 rhBMP-2 的碳纤维复合材料;C 组,钛网;D 组,阴性对照组,生理盐水;每组 5 只。A、B、C 组小鼠腹腔注射 50 ml/kg 相应材料的浸提液,D 组注射相同体积的生理盐水。观察注射后即刻及 4、24、48、72 h 小鼠症状并评分。

1.3.4 溶血试验 A 组,碳纤维复合材料;B 组,含 rh-BMP-2 的碳纤维复合材料;C 组,钛网;D 组,阴性对照组,生理盐水;E 组,阳性对照组,蒸馏水。使用 EDTA 抗凝管从新西兰大白兔的耳静脉收集 5 ml 血液,混合均匀后,取 4 ml 新鲜抗凝血,加入 5 ml 生理盐水。取 15 支干净试管分为 5 组。A、B、C 组加入 5 ml 相应的浸提液,D 组加入 5 ml 生理盐水,E 组加入 5 ml 蒸馏水。37 ℃恒温水浴箱中孵育 30 min,加入 0.1 ml 稀释的抗凝兔血,再置于 37 ℃水浴箱中孵育 60 min。将每根试管溶液 2 000 转/min 离心 5 min,观察是否存在溶血。

1.3.5 致敏试验 将 50 只白化豚鼠随机分为 5 组,每组 10 只:A 组,碳纤维复合材料;B 组,含 rhBMP-2 的碳纤维复合材料;C 组,钛网;D 组,生理盐水;E 组,5%甲醛。溶液配制:a 液,完全弗氏佐剂与生理盐水以 1:1 混合;b 液,A、B、C、D、E 组分别对应的浸提液、生理盐水和 5%甲醛溶液;c 液,a 液与 b 液 1:1 混合。在背部毛发去除区域完全消毒后,在脊柱两侧取 3 个对称点,每个点之间的距离 1.5 cm,各对称点间距 2.5 cm,各组 a、b、c 液分别注射于 1、2、3 点,每点皮内注射溶液 0.1 ml。第 6 天,在每个注射点通过按摩将 10%十二烷基硫酸钠引入皮肤。第 7 天,将一次性中单浸透 b 液后贴敷于注射点部位,于中单外覆盖一层塑料薄膜并用医用绷带固定,48 h 后除去包扎带和贴敷片。2 周后,将浸透 c 液的一次性中单贴敷在豚鼠腹部剃毛区,中单外覆盖一层塑料薄膜并用医用绷带固定,并在第 15 天取下包扎带和贴敷片。观察除去一次性中单后 6、24、48、72 h 动物激发部位皮肤致敏情况,取腹部激发区域皮肤进行病理检查。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 22.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 *t* 检验;*P* < 0.05 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞毒性试验 L929 细胞培养 12、24 h 观察发

表 1 L929 细胞在不同材料浸提液中的相对增殖率

分组	光密度	相对增殖率	细胞毒性分级
24h			
A 组	1.336±0.389	78.6%*	1
B 组	2.145±0.021	126.0%*	0
C 组	1.526±0.145	89.8%*	1
D 组	1.699±0.105	100%*	0
E 组	0.033±0.008	1.9%	4
48h			
A 组	2.150±0.160	119.0%*	0
B 组	2.028±0.468	112.0%*	0
C 组	1.956±0.131	108.0%*	0
D 组	1.798±0.082	100.0%*	0
E 组	0.006±0.013	0.3%	5
72h			
A 组	1.780±0.321	101.0%*	0
B 组	1.698±0.461	96.0%*	1
C 组	2.259±0.117	128.0%*	0
D 组	1.757±0.113	100.0%*	0
E 组	0.012±0.011	0.6%	5

注:与 E 组相应比值,* *P* < 0.05

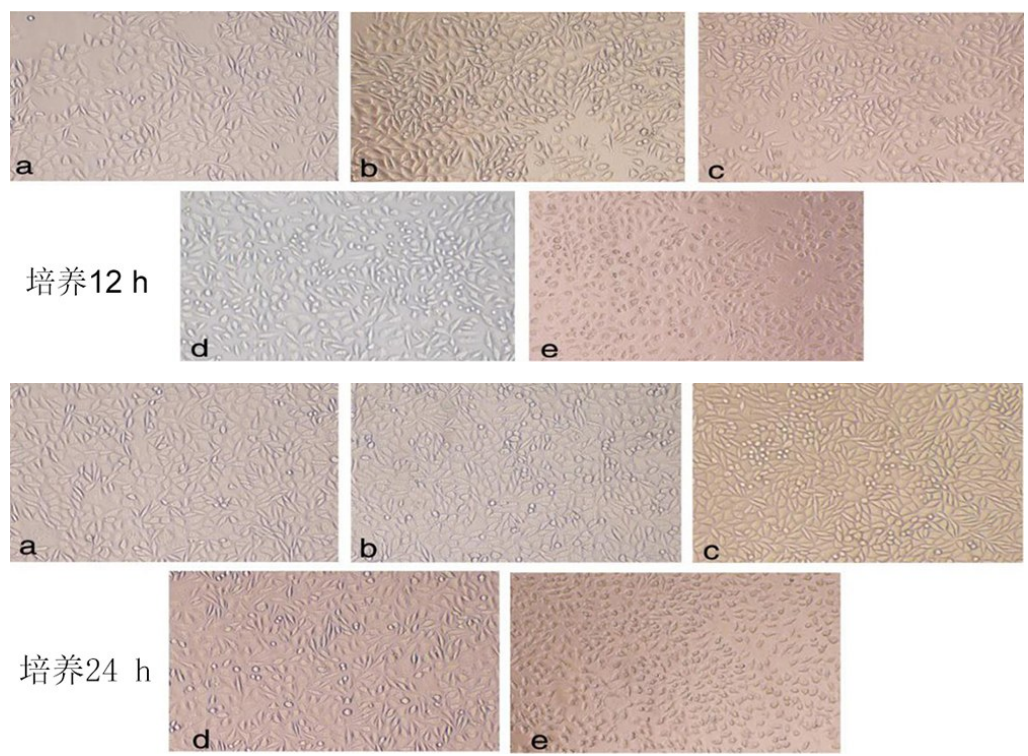


图1 L929细胞在不同材料浸提液的培养基中培养12、24 h细胞形态(×100)
a. 碳纤维复合材料;b. 含rhBMP-2的碳纤维复合材料;c. 钛网;d. MEM培养基;e. 含有0.64%苯酚的MEM培养基

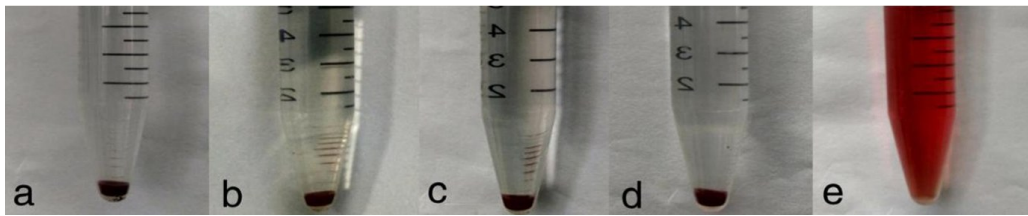


图2 不同材料浸提液与新鲜抗凝血混合后反应
a. 碳纤维复合材料;b. 含rhBMP-2的碳纤维复合材料;c. 钛网;d. 生理盐水;e. 蒸馏水

现:A、B、C、D组细胞贴壁生长良好,均呈长梭形,分布均匀,未见坏死、衰老和异常分化(图1);E组细胞形态不均一,多数细胞呈椭圆形或者圆形,细胞间距增大,有大量细小颗粒分布于细胞表面和细胞间(图1)。培养24、48、72 h,A、B、C组细胞相对增殖率均大于75%,A、B、C组均明显大于E组($P<0.05$,表1),而A、B、C组之间比较无统计学差异($P>0.05$,表1)。

2.2 急性毒性反应 A、B、C、D组动物进食良好,体重稳定,呼吸和大小便正常,无呕吐及腹泻,无步态失衡,无惊厥及死亡发生。

2.3 溶血反应 A、B、C、D组试管上层透明,下层由血细胞组成;E组试管呈均匀透明红色,管未分层,管底无血细胞沉积。见图2。

2.4 致敏试验 腹部致敏区域皮肤组织切片观察结果显示:A、B、C、D组正常;而E组在表皮、真皮和血管周围有大量单核细胞浸润,皮肤棘细胞层水肿明

显。见图3、4。

3 讨论

根据ISO10993和我国《医疗器械生物学评价标准 GB/T16886》^[4],评价新型修复材料的生物相容性主要包括细胞毒性试验、急性毒性试验、微核试验、染色体畸变试验、皮内刺激试验、热原反应试验、溶血试验、致敏试验等。组织反应可能与材料本身相关,也可能与有创操作和动物个体差异等因素有关。因此,在评估材料植入后的组织相容性时,通常需要将其与阴性对照材料相比^[5]。Cowan等^[6]研究表明rhBMP-2可在短时间内诱导干细胞向成骨细胞和软骨细胞分化,并促进新生骨的生长,因此,本文设立含rhBMP-2的碳纤维复合材料为对照组。钛网具有优良的组织相容性,因此,使用钛网作为对照试验,检测碳纤维复合材料急性期的组织相容性。本

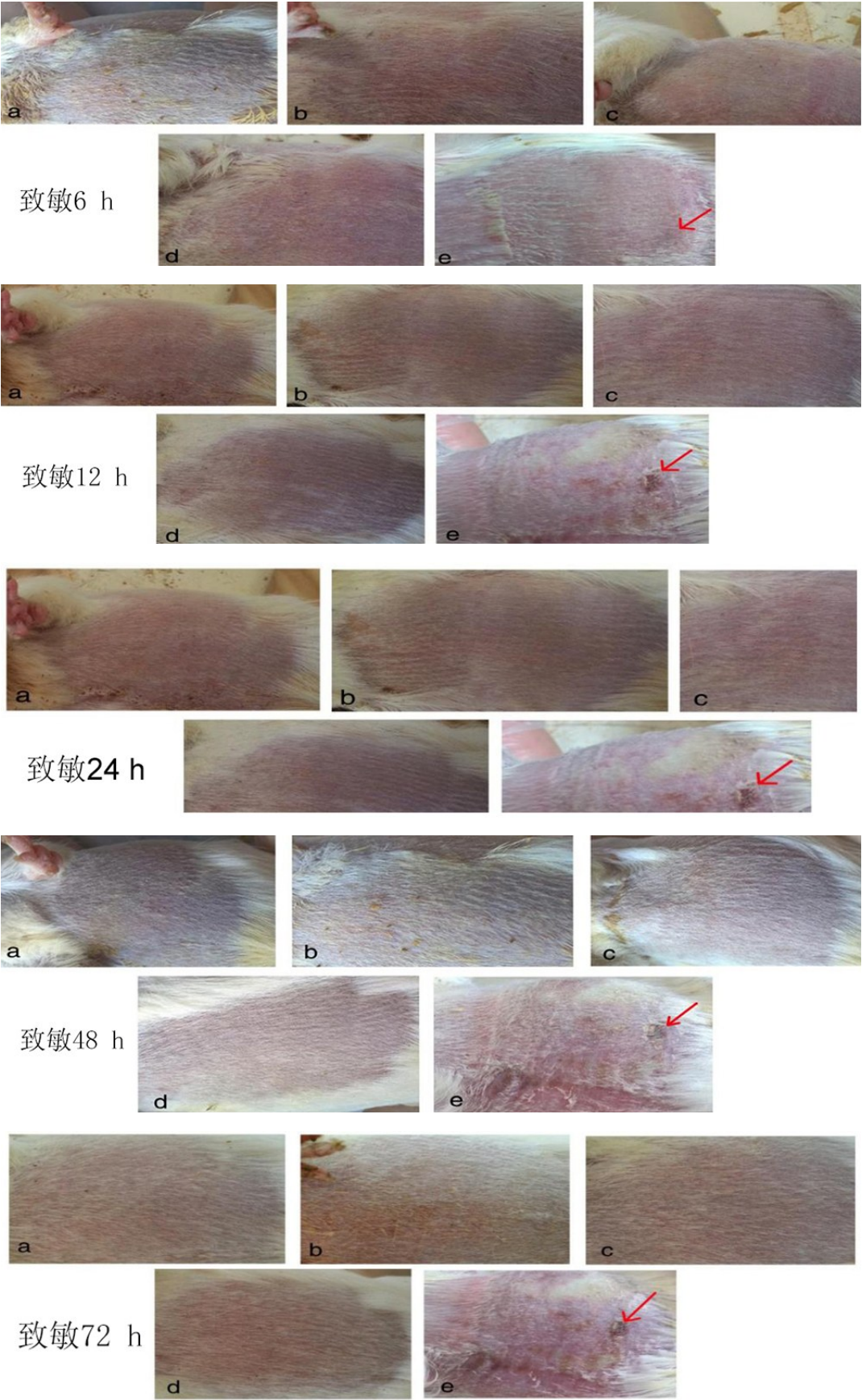


图3 不同材料浸提液注入豚鼠皮肤后6、12、24、48、72 h致敏情况
a. 碳纤维复合材料;b. 含rhBMP-2的碳纤维复合材料;c. 钛网;d. 生理盐水;e. 5%甲醛;红色↑示水肿

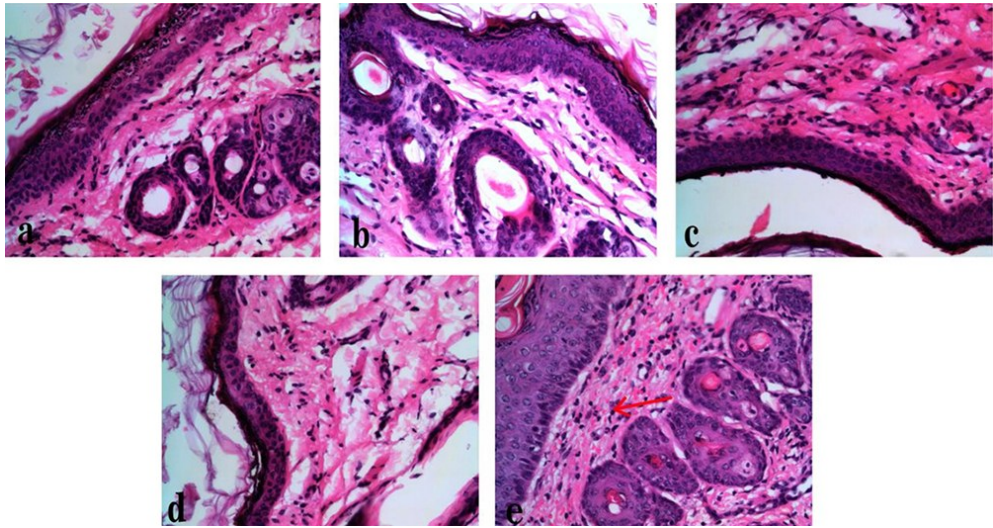


图4 不同材料浸提液注入豚鼠皮肤后病理检查(×100,瑞氏染色)

a. 碳纤维复合材料;b. 含rhBMP-2的碳纤维复合材料;c. 钛网;d. 生理盐水;e. 5%甲醛,红色↑示大量单核细胞浸润

文结果表明碳纤维复合材料、含有rhBMP-2的碳纤维复合材料及钛网均无明显细胞毒性、均无急性毒性、均不引起急性溶血、均无皮肤致敏性。

近年来,多数学者认为良好的生物材料不仅具有良好的生物相容性,还应具有生物活性,修复材料表面可以诱导骨形成,并且可以与骨组织呈化学结合,而不仅仅是物理上的紧密接触^[7]。Aoki等^[8]研究发现将碳纤维网与rhBMP-2复合物植入小鼠背部肌肉,短时间内可形成新的异位骨,观察到纤维直接整合到骨基质中,表明碳纤维材料是用于组织工程的理想支架材料。Richard等^[9]认为碳纤维不仅刺激骨基质的形成,而且进一步促进软组织附着,具有与自体骨相当的导电性、导热性,提供强大的骨结构支持及优异的骨整合。魏杰等^[10]研究发现,碳纤维复合材料的性能已达到临床要求,是新型骨组织工程的理想生物材料。

本文结果表明,碳纤维复合材料对人体无明显毒性,不会引起溶血,对皮肤没有致敏性,具有优异的组织相容性,是替代金属骨植入物的新型先进材料^[11],符合国家临床应用标准,具有与目前纯钛相当的力学性能,聚合物加工允许矿物和药物的结合,为未来的主要组织工程潜力。

【参考文献】

[1] 毛小炎,归 来. 颅骨缺损的临床修复进展[J]. 中国美容整形外科杂志,2017,28(3):184-186.
[2] Williams LR, Fan KF, Bentley RP. Custom-made titanium cranioplasty: early and late complications of 151 craniop-

lasties and review of the literature [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2015, 44(5): 599-608.
[3] 王 蕾,张 毅. 现代颅骨修补材料的临床应用分析[J]. 神经损伤与功能重建,2018,13(7):355-357.
[4] 由少华. 解读GB/T16886《医疗器械生物学评价》系列标准[J]. 中国医疗器械信息,2005,11(1):15-19.
[5] 向 健,杨立峰,田胜慧,等. 新型3D打印骨修复体的骨组织相容性研究[J]. 中国医学工程,2018,26(10):26-29.
[6] Cowan CM, Aalami OO, Shi YY, *et al.* Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment, and bone turnover [J]. Tissue Eng, 2005, 11(4): 645-658.
[7] 朱丽丽,姜 华. 羟基磷灰石涂层钛合金材料生物相容性研究初探[J]. 生物医学工程与临床,2014,8(4):323-326.
[8] Aoki K, Usui Y, Narita N, *et al.* A thin carbon-fiber web as a scaffold for bone-tissue regeneration[J]. Small, 2010, 5 (13): 1540-1546.
[9] Petersen RC. Titanium implant osseointegration problems with alternate solutions using epoxy/carbon-fiberreinforced composite [J]. Metals (Basel), 2014, 4(4): 549-569.
[10] 魏 杰,李利军,彭芳辰. 热固性乙烷基酯树脂基碳纤维复合材料骨内固定物的生物安全性研究[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2012,6(4):907-911.
[11] Bagheri ZS, Giles E, Sawi IE, *et al.* Osteogenesis and cytotoxicity of a new Carbon Fiber/Flax/Epoxy composite material for bone fracture plate applications [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015, 46: 435-442.

(2019-03-04收稿,2019-04-28修回)