

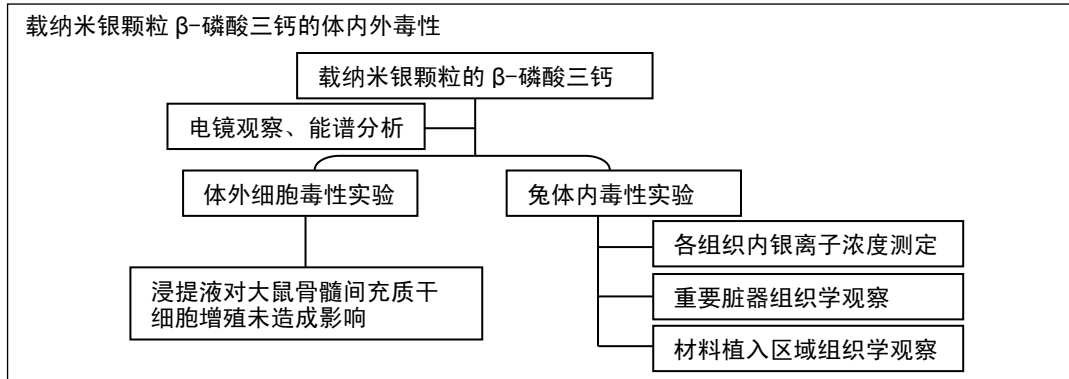
# 载纳米银磷酸三钙的体外细胞毒性及兔体内毒性

程 坚<sup>1,2</sup>, 张 军<sup>1,3</sup>, 管 捷<sup>1</sup>, 曾俊凯<sup>1</sup>, 赵 鑫<sup>1</sup>, 谢幼专<sup>1</sup> (<sup>1</sup>上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科, 上海市内植物重点实验室, 上海市 200011; <sup>2</sup>余姚市人民医院外五科, 浙江省余姚市 315400; <sup>3</sup>上海青浦区中心医院骨科, 上海市 200011)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1547

ORCID: 0000-0003-2101-7605(程坚)

文章快速阅读:



程坚, 男, 1979 年生, 浙江省余姚市人, 汉族, 上海交通大学医学院在读硕士, 副主任医师, 主要从事创伤、脊柱研究。

共同第一作者: 张军, 男, 1989 年生, 江西省鹰潭市人, 汉族, 2017 年上海交通大学医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事脊柱骨科研究。

通讯作者: 谢幼专, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科, 上海市内植物重点实验室, 上海市 200011

文献标识码:A

稿件接受: 2018-10-27

Cheng Jian, Master candidate, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Ninth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200011, China; Fifth Department of Surgery, Yuyao People's Hospital, Yuyao 315400, Zhejiang Province, China

Zhang Jun, Master, Physician, Department of Orthopedics, Ninth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200011, China; Department of Orthopedics, Qingpu Central Hospital of Shanghai, Shanghai 200011, China

Cheng Jian and Zhang Jun contributed equally to this work.

Corresponding author: Xie Youzhuang, Chief physician, Department of Orthopedics, Ninth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200011, China

## 文题释义:

**载纳米银磷酸三钙:**  $\beta$ -磷酸三钙是一种自固化型骨水泥, 具有与骨质无机质相似的化学组成, 是一种能够被生物降解的生物材料, 组织相容性好, 可被组织逐渐降解并能被骨组织逐渐长入其中微孔中, 还提供一定的机械力学稳定性; 研究将质量分数 10% 的具备抗菌作用的纳米银颗粒融解于  $\beta$ -磷酸三钙中, 形成含质量分数 10% 的载纳米银磷酸三钙。

**CCK-8 试剂:** CCK-8 试剂中含有 WST-8[化学名: 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2, 4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐, 它在电子载体 1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸二甲酯作用下被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲臞产物, 生成的甲臞物数量与活细胞数量呈正比。用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处测定其光吸收值, 可间接反映活细胞数量。该方法已被广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模抗肿瘤药物筛选、细胞增殖实验、细胞毒性实验及药敏实验等。

## 摘要

**背景:** 课题组前期研究发现, 负载 5% 纳米银颗粒  $\beta$ -磷酸三钙材料具有抗菌性和良好的生物相容性。

**目的:** 10% 纳米银颗粒  $\beta$ -磷酸三钙材料的体内外毒性。

**方法:** ①体外细胞毒性: 分别采用含质量分数 10% 纳米银颗粒  $\beta$ -磷酸三钙材料浸提液、多孔  $\beta$ -磷酸三钙材料浸提液、正常组织培养液培养 SD 大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供)骨髓间充质干细胞, 培养 1, 3, 5, 7 d, CCK-8 法检测细胞增殖; ②动物体内毒性: 取 20 只新西兰大白兔(上海市甲干生物科技有限公司提供), 在左侧股骨外髁制作直径 6 mm、深度 13 mm 的骨缺损, 随机分 2 组, 实验组缺损处植入含质量分数 10% 纳米银颗粒的  $\beta$ -磷酸三钙材料, 对照组植入  $\beta$ -磷酸三钙材料。植入后 12 周, 采用电感耦合等离子体质谱法检测血液和各组织器官内银离子浓度; 苏木精-伊红染色切片观察各组织器官病理状态; Van Gieson 染色切片观察材料植入区组织生长情况。

**结果与结论:** ① $\beta$ -磷酸三钙浸提液组、正常组织培养液组、含纳米银颗粒  $\beta$ -磷酸三钙材料浸提液组培养不同时间点的细胞增殖比较无差异( $P < 0.05$ ); ②实验组和对照组兔血液、心、肝、脾、肺、肾各脏器中的银离子浓度均小于  $0.1 \times 10^{-6}$ , 小于 WHO 规定的人体内银离子的最高浓度  $0.5 \times 10^{-6}$ ; ③实验组与对照组兔心、肝、脾、肺、肾组织切片均未见明显病理性改变; ④实验组与对照组材料轮廓可分辨, 材料周围可见被染成红色的新骨组织, 材料内部多孔结构内可见大量红染的新骨组织, 两组材料多孔结构内的新骨组织分布未见明显差异; ⑤结果表明, 含质量分数 10% 纳米银颗粒的  $\beta$ -磷酸三钙材料无明显细胞毒性与动物体内毒性, 具有良好的生物相容性。

## 关键词:

纳米银颗粒;  $\beta$ -磷酸三钙; 生物毒性; 骨缺损; 载纳米银磷酸三钙

## 主题词:

银; 磷酸钙类; 毒性试验; 组织工程

中图分类号: R459.9; [R318.06]

## 基金资助:

国家自然科学基金(81071453), 项目负责人: 谢幼专; 上海市科委基金(1441901700), 项目负责人: 谢幼专

## Silver nanoparticle-doped tricalcium phosphate: *in vitro* and *in vivo* toxicity in rabbits

Cheng Jian<sup>1,2</sup>, Zhang Jun<sup>1,3</sup>, Guan Jie<sup>1</sup>, Zeng Junkai<sup>1</sup>, Zhao Xin<sup>1</sup>, Xie Youzhuang<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Orthopedics, Ninth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200011, China; <sup>2</sup>Fifth Department of Surgery, Yuyao People's Hospital, Yuyao 315400, Zhejiang Province, China; <sup>3</sup>Department of Orthopedics, Qingpu Central Hospital of Shanghai, Shanghai 200011, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Previous studies by the research team found that 5% silver nanoparticle-doped  $\beta$ -tricalcium phosphate material has antibacterial properties and good biocompatibility.

**OBJECTIVE:** To study the biotoxicity of porous  $\beta$ -tricalcium phosphate containing 10% mass fraction of silver nanoparticles (10% SNPs-TCP) *in vitro* and *in vivo*.

**METHODS:** (1) *In vitro* cytotoxicity: Bone marrow mesenchymal stem cells from Sprague-Dawley rats (provided by Shanghai Xipuer-Beikai Animal Co., Ltd., China) were cultured with the extract containing 10% SNPs-TCP, porous TCP extract and normal tissue culture medium for 1, 3, 5, 7 days. Cell counting kit-8 method was used to detect cell proliferation. (2) *In vivo* toxicity: Twenty New Zealand white rabbits (provided by Shanghai Jiagan Biotechnology Co., Ltd., China) were used to make bone defects of the left femoral condyle (6 mm in diameter and 13 mm in depth), which were randomly divided into two groups. The experimental group was implanted with 10% SNPs-TCP, and the control group was implanted with single TCP. Twelve weeks after implantation, inductively coupled plasma mass spectrometry was used to detect the concentration of silver ions in the blood and tissues. Hematoxylin-eosin staining sections were made to observe the pathological changes of various tissues and organs. Van Gieson staining sections were used to observe the tissue growth in the implantation area.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) There was no difference in cell proliferation between the TCP group, normal culture group and 10% SNPs-TCP group at different time points ( $P < 0.05$ ). (2) The concentration of silver ions in the blood, heart, liver, spleen, lung and kidney of the experimental and control groups was less than  $0.1 \times 10^{-6}$ , which was less than the highest concentration of silver ions ( $0.5 \times 10^{-6}$ ) in the human body specified by the WHO. (3) There were no obvious pathological changes in the heart, liver, spleen, lung and kidney sections of the experimental and control groups. (4) The contours of the implantation materials in the experimental and control groups could be distinguished. New bone tissues stained with red were around the materials. A large amount of red-stained new bone tissues were visible inside the porous structure of the materials. There was no significant difference in the distribution of new bone tissue in the porous structure of the two groups of materials. To conclude, the 10% SNPs-TCP has no obvious cytotoxicity and toxicity in animals, and has good biocompatibility.

**Subject headings:** Silver; Calcium Phosphates; Toxicity Tests; Tissue Engineering

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81071453 (to XYZ); the Foundation of Shanghai Science and Technology Committee, No. 1441901700 (to XYZ)

## 0 引言 Introduction

骨感染是骨科临床治疗的棘手难题, 其治疗的基本原则是在抗生素治疗基础上进行彻底的病灶清除<sup>[1]</sup>。清创后形成的骨缺损往往需要进行骨移植, 但如果合并有活动性感染, 骨移植会因为新发感染的风险而被禁止植入<sup>[2-4]</sup>, 而待感染控制后二期进行骨移植则治疗周期长、医疗花费多<sup>[2, 5]</sup>。移植骨采用自体骨虽然是治疗的金标准, 但其来源有限并造成患者二次损伤。异体骨移植存在免疫组织排斥反应和潜在传播感染性疾病的风险。因此在临床上, 生物材料被广泛运用于治疗骨缺损。 $\beta$ -磷酸三钙具有与骨无机质相似的化学组成, 具有良好的生物相容性和骨传导性, 已被广泛应用于骨缺损治疗<sup>[6]</sup>。Wang等<sup>[7]</sup>通过前瞻性随机对照研究发现, 多孔 $\beta$ -磷酸三钙用于治疗骨囊肿优于同种异体骨, 它能促进纤维组织、血管组织及骨组织长入。Gan等<sup>[8]</sup>利用多孔 $\beta$ -磷酸三钙为载体富集自体干细胞, 促进了脊柱后外侧融合。Jiang等<sup>[9]</sup>运用多孔 $\beta$ -磷酸三钙填充跟骨骨折骨缺损获得了良好临床效果, 他还发现 $\beta$ -磷酸三钙可替代自体骨用于颈椎前路融合手术<sup>[10]</sup>, 减少自体骨供区并发症。

在治疗合并骨感染的骨缺损过程中, 需要长期全身应用抗生素, 而长期使用抗生素存在损伤全身脏器的风险, 同时容易造成细菌耐药问题。因此, 研究具有抗菌作用的生物材料成为了研究热点。纳米银颗粒具有广谱抗菌作用, 对革兰阳性菌群和革兰阴性菌群都具有良好的杀菌作用<sup>[11]</sup>,

而且动物研究表明, 在生物材料表面负载低剂量的纳米银颗粒就可产生抗菌效应<sup>[12-13]</sup>。目前纳米银产品已被开始应用于临床。张茹梅等<sup>[14]</sup>回顾性分析158例宫颈癌放射性阴道炎症患者的临床资料, 发现纳米银凝胶联合运用乳酸菌阴道胶囊具有较好的临床效果, 且患者满意度高。Burrar等<sup>[15]</sup>开发了世界上第1个商用含纳米银颗粒的创面敷料, 不仅抗菌, 还能促进伤口愈合, 减少瘢痕。但这些产品属于外用生物材料, 植入体内的含纳米银生物材料仍处于实验室研究阶段。Ashmore等<sup>[16]</sup>研究发现, 纳米银颗粒包被多聚物或者聚乙烯吡咯烷酮并不会影响其对大肠杆菌的抑制作用。课题组在前期研究中发现, 负载质量分数5%纳米银颗粒的 $\beta$ -磷酸三钙具有抗菌性和良好的生物相容性<sup>[17]</sup>。纳米银颗粒的抗菌效应不仅和纳米银颗粒有关<sup>[18]</sup>, 也与其在 $\beta$ -磷酸三钙中的浓度有关。增加其浓度可进一步提高其抗菌能力, 但也可能降低其生物相容性。文献表明, 载银生物材料可影响细胞的生长及增殖, 具有一定的细胞毒性<sup>[19]</sup>。因此, 研究在前期工作基础上, 制造含质量分数10%纳米银颗粒的多孔 $\beta$ -磷酸三钙, 通过体内外实验研究其生物相容性及毒性, 为研制具有更强抗菌性的生物材料提供依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年10月至2018年4月在上海贝奥路生物材料有限公司、中国科学院上海硅酸盐研究所

所、上海市甲干生物科技有限公司及上海市内植物重点实验室完成。

### 1.3 材料

**实验动物:** 10周龄成年雌性SD大鼠, 体质量150~200 g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK(沪)2013-0016。6月龄雄性新西兰大白兔20只, 体质量约为2.5 kg, 健康状况良好, 购自上海市甲干生物科技有限公司, 许可证号: SYXK(沪)2013-0087。

**实验主要材料、试剂与仪器:**  $\beta$ -磷酸三钙粉剂(Lucite International, 英国); 聚甲基丙烯酸甲酯颗粒(Lucite International 8FAC15, 英国); 纳米银颗粒(上海贝奥路生物科技有限公司); 丙酮(国药集团化学试剂有限公司); 恒温摇床(天津市欧诺仪器仪表有限公司); 环氧乙烷消毒柜(上海市内植物重点实验室); Van Gieson染色液(北京索宝生物科技有限公司); 胎牛血清(Gibco, 美国); CCK-8试剂盒(Dojindo, 日本); 台式离心机(Thermo Fisher, 美国); 2.5%硫喷托钠(上海市甲干生物科技有限公司); 高压蒸汽灭菌锅(Sanyo Labomls-3020, 日本); pH计(Mettler Toledo320, 瑞士); PBS(上海市内植物重点实验室); 移液枪(Eppendorf, 德国); 光学显微镜(Olympus, CKX41, 日本); 电感耦合等离子体质谱仪(NexION®300X, PerkinElmer, 美国); 扫描电镜(Hitachi S-4800, 日本)。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 材料制备** 采用高温煅烧法制备获得含质量分数10%纳米银颗粒的 $\beta$ -磷酸三钙和纯 $\beta$ -磷酸三钙柱状体( $\Phi 6\text{ mm}\times 12\text{ mm}$ ), 采用环氧乙烷消毒保存备用。具体制作方法如下: 采用聚甲基丙烯酸甲酯颗粒为造孔剂, 将其置入模具腔内后, 加丙酮进行固定成形, 然后用蒸馏水冲洗多余丙酮完成造模; 将65 g的 $\beta$ -磷酸三钙粉末溶解至100 g去离子水中, 制成 $\beta$ -磷酸三钙匀浆; 再将 $\beta$ -磷酸三钙匀浆分成2组, 一组不加纳米银粉, 一组加入3.25 g纳米银粉颗粒, 将两种匀浆分别导入模具中, 获得 $\beta$ -磷酸三钙胚体和含10%纳米银颗粒的 $\beta$ -磷酸三钙胚体; 胚体通过干燥、造孔剂气化排胶和烧结, 最终获得纯 $\beta$ -磷酸三钙陶瓷和含质量分数10%纳米银颗粒的 $\beta$ -磷酸三钙陶瓷。

#### 1.4.2 材料的表征

**扫描电镜观察:** 将两种陶瓷通过导电胶粘贴在电镜载物台上, 放入离子溅射仪中喷金, 使磷酸三钙截面形成一层导电的金属膜, 将喷金后的陶瓷放入扫描电镜中, 观察截面形貌。

**能谱分析:** 两种陶瓷的物相组成通过X射线光电子能谱(40 kV, 35 mA)测定, 将得到的X射线衍射图谱与标准图谱做比较, 确定其化学组成。

#### 1.4.3 体外细胞毒性实验

**大鼠骨髓间充质干细胞的分离和培养:** 选取成年SD大鼠, 用颈椎脱臼法处死, 双侧后肢用体积分数75%乙醇溶液消毒, 切开皮肤及肌肉, 剔除股骨骨膜及其周围肌肉组

织, 然后取出双侧股骨, 切除两侧骨端, 暴露股骨髓腔, 用含体积分数10%胎牛血清的培养基冲洗髓腔, 将冲洗液置于直径为10 cm培养皿中, 然后于细胞培养箱培养。每隔2 d换液1次, 通过显微镜观察细胞贴附及增殖情况, 待细胞的融合率达80%后, 用胰蛋白酶消化进行传代培养。选择第3~5代骨髓间充质干细胞用于后续实验。

**材料浸提液的制备:** 取两种陶瓷柱状体各1枚, 将其分别浸入装有200 mL组织培养液的培养瓶中, 然后将培养瓶放置在37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱, 72 h后取出并过滤培养液, 获得2种材料浸提液备用。

**细胞毒性实验:** 用2种材料浸提液和正常组织培养液分别制作骨髓间充质干细胞悬液, 细胞浓度为 $1\times 10^8\text{ L}^{-1}$ , 正常组织培养液细胞悬液作为空白对照。将3种悬液加入96孔板中, 每孔加100  $\mu\text{L}$ , 在37 °C细胞培养箱中分别培养1, 3, 5, 7 d, 每2 d更换浸提液, 各时间点每孔加入10  $\mu\text{L}$  Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂, 用酶标仪检测450 nm波长下各孔吸光度值。

#### 1.4.4 动物体内毒性观察

**动物分组干预:** 取20只新西兰大白兔, 采用2.5%硫喷妥钠溶液(0.6 mL/kg)进行肌注麻醉; 术中必要时通过静脉追加0.1 mL/kg的剂量进一步麻醉。麻醉成功后将大白兔仰卧位固定, 以左膝为中心进行剃毛, 采用5%聚维酮碘消毒、铺巾, 于左股骨外髁做约2 cm纵行切口, 逐层显露直至暴露股骨外髁, 采用直径为6 mm的电钻钻孔直径6 mm、深度13 mm的骨缺损, 随机分成2组, 每组10只: 对照组与实验组分别将 $\beta$ -磷酸三钙和含质量分数10%纳米银颗粒的 $\beta$ -磷酸三钙柱状体植入股骨骨缺损中, 逐层关闭切口。术后常规饲养。植入后4, 12周, 采用空气栓塞法处死每组兔5只, 取材。

**组织银离子浓度测定:** 植入后12周, 抽取两组兔静脉血抗凝备用, 处死后切除心、肝、脾、肺、肾, 然后切取各器官组织样品, 称质量后研磨匀浆, 加入等质量去离子水制成混合液。随后加入等体积的60%硝酸溶液, 放在60 °C水浴锅中恒温加热24 h。取混合液, 放入离心机13 000 r/min离心10 min, 取上层离心清液, 采用电感耦合等离子体质谱法进行银离子浓度测定。

**重要脏器组织学观察:** 剩余的心、肝、脾、肺、肾样本用40 g/L多聚甲醛液固定, 然后进行脱钙、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色, 观察分析脏器细胞组织形态情况, 评估是否存在脏器病理性损害。

**材料植入区组织学观察:** 植入后4, 12周时, 取下各组处死兔实验侧股骨髁, 剔除肌肉及软组织后, 用40 g/L多聚甲醛液固定2周。然后用PBS及蒸馏水清洗, 浸于EDTA脱钙液内。每周更换脱钙液, 脱钙时间为2个月。脱钙完成后, 将脱钙处理后的组织石蜡包埋、切片、Van Gieson(VG)染色, 光镜下观察组织长入情况。

### 1.5 主要观察指标 含质量分数10%纳米银颗粒 $\beta$ -磷酸

三钙材料的细胞毒性与兔体内毒性。

1.6 统计学分析 定量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用GraphPad Prism 7.0软件处理数据,用 $t$ 检验和单因素方差分析进行统计学检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 扫描电镜观察材料表面结构 低倍电镜下, $\beta$ -磷酸三钙材料截面可见许多大孔,大孔之间有内连接联通,位于表面的大孔边缘不平整,有隆起或凹陷;含质量分数10%纳米银颗粒的 $\beta$ -磷酸三钙结构与 $\beta$ -磷酸三钙相同。高倍电镜下, $\beta$ -磷酸三钙为致密的结晶样结构,颗粒大小不一,排列紧密;含质量分数10%纳米银颗粒 $\beta$ -磷酸三钙中的致密 $\beta$ -磷酸三钙晶体变得相对稀疏,出现了大小不一的孔隙,银表现为高亮的小颗粒,散在分布于 $\beta$ -磷酸三钙大颗粒晶体中,见图1。

2.2 材料能谱分析结果 能谱分析结果显示,含质量分数10%纳米银颗粒的 $\beta$ -磷酸三钙中Ag含量约8.179%, $\beta$ -磷酸三钙中Ag含量为0;两者的Ca、P、O含量相似,见图2,表1。

表1 不同材料的能谱分析结果 (%)

Table 1 Photoelectron spectroscopic results of  $\beta$ -tricalcium phosphate and 10% silver nanoparticle-doped  $\beta$ -tricalcium phosphate

材料	O	P	Ca	Ag
含质量分数 10% 纳米银颗粒 $\beta$ -磷酸三钙	36.562	18.374	36.884	8.179
$\beta$ -磷酸三钙	36.217	21.032	42.751	0

2.3 体外细胞毒性试验 与 $\beta$ -磷酸三钙材料浸提液和正常组织培养液相比,含质量分数10%纳米银颗粒 $\beta$ -磷酸三钙材料浸提液培养1, 3, 5, 7 d后的骨髓间充质干细胞增殖无明显差异( $P > 0.05$ ),即含质量分数10%纳米银颗粒的 $\beta$ -磷酸三钙对骨髓间充质干细胞无明显的细胞毒性,见图3。

2.4 兔体内实验组织银离子浓度测定 材料植入兔体内12周,实验组和对照组兔血液、心、肝、脾、肺、肾各脏器中的银离子浓度均小于 $0.1 \times 10^{-6}$  (电感耦合等离子体质谱仪设备检测最小值为 $0.1 \times 10^{-6}$ ,未能检出具体的值),见表2,即各组织银离子浓度均小于WHO规定人体内银离子的最高浓度 $0.5 \times 10^{-6}$ 。

表2 实验组与对照组材料植入后12周兔体内银离子含量 ( $\times 10^{-6}$ )  
Table 2 The concentration of silver ions in the rabbit detected by inductively coupled plasma mass spectrometry at 12 weeks after material implantation

组别	心	肝	脾	肺	肾	血液
实验组	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
对照组	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1

2.5 兔体内实验重要脏器组织学观察 兔股骨髁骨缺损植入2种材料12周后,光镜下观察心、肝、脾、肺、肾组织切片(苏木精-伊红染色)可见各组织均为正常的细胞与结构,均未见明显病理性改变,见图4。

2.6 兔体内实验材料植入区组织学观察 材料植入兔股骨髁骨缺损4周后VG染色显示,实验组可见黑色、不规则的银离子颗粒散在分布于 $\beta$ -磷酸三钙中,两组材料周围都只有极少量的红染纤维,呈线状分布,两组纤维组织分布未见明显差异;植入12周后,材料轮廓仍可分辨,材料周围可见被染成红色的新骨组织,材料内部多孔结构内可见大量红染的新骨组织,表明材料内部有骨长入,两组材料多孔结构内的新骨组织分布未见明显差异,见图5。

## 3 讨论 Discussion

羟基磷灰石和 $\beta$ -磷酸三钙是常见的钙磷陶瓷,具有良好的生物相容性,多孔结构使其具有一定的骨传导能力,而 $\beta$ -磷酸三钙能够在新骨形成过程中逐步降解,已被用于临床骨缺损治疗。对于感染性骨缺损,由于清创后局部仍然存在少量细菌,过去往往依靠全身应用抗生素来控制,而长期应用抗生素可造成肝肾等重要脏器损害及增加细菌耐药性。在生物陶瓷内添加抗菌金属(例如银),使其具有抗菌性能目前已取得了一定的实验进展<sup>[17, 19]</sup>,这种含银材料可避免长期应用抗生素引起的毒副作用。

纳米银直径小于100 nm,因此有独特的量子效应、小尺寸效应和极大的比表面积,可进入病原体内,通过3个方面产生抗菌作用:①通过结合菌体中酶蛋白的巯基,使酶失去活性,达到抗菌作用<sup>[18]</sup>。然而Li等<sup>[20]</sup>研究表明,纳米银可产生羟自由基并通过过氧化反应引起遗传毒性;②银离子还能与细胞壁的肽聚糖和质膜作用,破坏细胞膜,降低细胞内的ATP水平<sup>[21]</sup>;③进入病原体内的纳米银,还能与细菌DNA碱基结合并形成交叉链接,导致细菌DNA结构变性,阻碍细菌DNA复制<sup>[22]</sup>。因此纳米银均有广谱的杀菌作用,可杀死病毒、细菌、真菌、支原体、衣原体等病原微生物,被越来越多地应用到抗菌生物材料研究中<sup>[23]</sup>。Sharma等<sup>[24]</sup>研究表明,纳米银颗粒对多数细菌的抗菌性能强于微米银和 $Ag^+$ 。钙磷生物陶瓷的抗菌性随着载银量的增加而增强<sup>[25]</sup>,但其细胞毒性与载银量也呈正相关<sup>[26]</sup>,因此必须寻找合适的载银量,在获得最大的抗菌效应时不产生细胞毒性。此次实验在前期研究的基础上,向 $\beta$ -磷酸三钙中增加了1倍的纳米银量。体外理化表征显示增加纳米银后, $\beta$ -磷酸三钙的孔和孔连接等微结构均未见明显改变,仅在 $\beta$ -磷酸三钙致密晶体结构中出现一定程度的微孔,其晶体结构均匀,颗粒较 $\beta$ -磷酸三钙更加细密,表明添加纳米银颗粒后未对 $\beta$ -磷酸三钙多孔空间结构造成明显影响。

体外细胞毒性实验是评估生物材料相容性的基本方法之一。通过材料或材料的浸提液与细胞接触,材料释放的

毒性物质必然会对细胞增殖过程产生影响,通过细胞传代计数计算其相对增殖率,可灵敏地反映出材料是否存在毒性。既往研究表明,当纳米银颗粒质量浓度在10-100 mg/L范围时,细胞增殖率随着纳米银质量浓度的增加而减少,即细胞毒性随纳米银质量浓度增加而增大<sup>[27]</sup>。孙晋都等<sup>[28]</sup>研究发现,纳米银能在分散液中释放一定量的银离子,细胞可摄取纳米银和银离子,纳米银进入细胞后能进一步释放出银离子; Vrček等<sup>[29]</sup>利用人肝癌细胞研究发现相同银含量下,银离子比纳米银的细胞毒性作用更强,这就造成了纳米银的毒性。此次研究体外细胞毒性实验显示:与β-磷酸三钙相比,含10%纳米银颗粒的β-磷酸三钙并未对鼠骨髓间充质干细胞增殖产生明显影响,即含10%纳米银颗粒的β-磷酸三钙具有良好的生物相容性。

体外细胞毒性实验对生物材料的观察时间短,材料几乎没有降解过程。与体外实验不同,生物材料植入骨缺损后往往会发生新骨形成和材料降解,纳米银颗粒也会逐步被释放产生抗菌或毒性作用,因此通过动物实验了解含10%纳米银颗粒β-磷酸三钙的毒性显得十分必要。生物材料中的银离子释放后,必须通过血液循环到达重要脏器,并通过尿液排泄。检测血液中的银离子含量,有助于了解材料植入体内后银离子的释放情况。此外,过量银离子释放后,可在哺乳动物的重要脏器中累积,造成相应毒性。研究表明纳米银颗粒进入家兔体内后,在肝、肾、脾、肺等脏器中均有分布<sup>[30]</sup>。肝脏是重要的蓄积和毒性靶器官,用纳米银灌胃大鼠或者静脉注射,均可导致大鼠肝功能显著改变,肝脏炎症递质白细胞介素8、巨噬细胞炎性蛋白2、肿瘤坏死因子α表达增加,组织学上可看到胆管增生、淋巴细胞浸润<sup>[31-32]</sup>。通过豚鼠皮肤重复染毒发现,其肝脏枯否氏细胞增生,肝细胞萎缩,肝细胞索破坏;脾脏红髓炎细胞浸润,红囊变薄,骨髓萎缩<sup>[33]</sup>。研究在前期实验的基础上,制备了更高含量(10%)纳米银颗粒的β-磷酸三钙生物陶瓷并植入家兔股骨外髁骨缺损内,观察其在兔体内的毒性。含10%纳米银颗粒的β-磷酸三钙植入12周后,兔血液及各重要脏器(心、肝、脾、肺、肾)中银离子浓度均低于检测仪器的最小测试值( $<0.1 \times 10^{-6}$ ),远低于世界卫生组织规定的安全最低标准( $<0.5 \times 10^{-6}$ )。而且各重要脏器的组织切片均未观察到明显的器官或细胞损害病理学改变,表明该溶度纳米银β-磷酸三钙释放的银离子未在脏器中富集,未造成脏器损伤。

材料植入兔股骨髁骨缺损4周后VG染色显示,含纳米银和不含银的β-磷酸三钙孔隙内仅见纤维组织生长,此时材料内复合的纳米银颗粒可在原位发挥抗菌作用;植入12周后,材料明显降解,两组材料均可见新生骨组织长入孔内,且组间并未见明显差异。该结果表明β-磷酸三钙复合质量分数10%的纳米银颗粒后未影响β-磷酸三钙的骨传导作用。在材料降解、新骨形成过程中,可能导致复合的纳米银颗粒大量释放入血,引起脏器损害,但研究结果并未

发现这一毒副作用,可能与银离子未突释入血或释放后离子浓度低有关。

综上所述,在β-磷酸三钙中添加质量分数10%纳米银颗粒构建的含银钙磷陶瓷,并未对原有的β-磷酸三钙结构造成明显改变,其浸提液对骨髓间充质干细胞增殖未造成影响;植入兔股骨髁骨缺损后,该材料能够在植入12周后引导新骨的形成,释放的纳米银颗粒未在血液及心、肝、脾、肺、肾等重要脏器内蓄积引起毒性。体内外实验表明该材料具有良好的生物相容性,纳米银离子浓度的提高有望增强该材料的抗菌效果,为寻找更加合适的含纳米银钙磷陶瓷提供理论依据,其对骨感染缺损的治疗效果尚待进一步研究。

**作者贡献:** 程坚、张军进行实验设计,实验实施为程坚、张军、管捷、曾俊凯,实验评估为张军、赵鑫,资料收集为程坚、曾俊凯,程坚、张军成文,谢幼专审核。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金(81071453)、上海市科委基金(1441901700)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验经上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物伦理委员会审批,伦理号:HKDL[2017]291。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

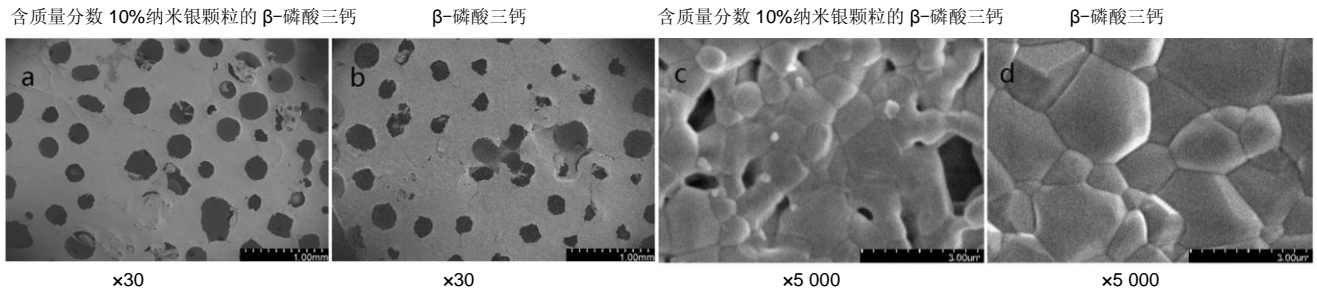
**生物统计学声明:** 该文统计学方法已经上海交通大学医学院生物统计教研室生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

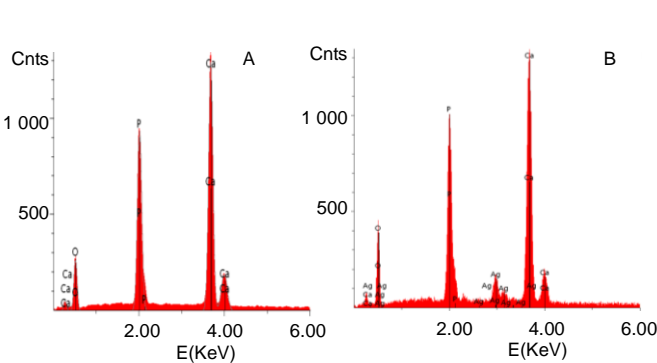
- [1] Wu H, Shen J, Yu X, et al. Two stage management of Cierny-Mader type IV chronic osteomyelitis of the long bones. *Injury*. 2017;48(2):511-518.
- [2] Badie AA, Arafa MS. One-stage surgery for adult chronic osteomyelitis: concomitant use of antibiotic-loaded calcium sulphate and bone marrow aspirate. *Int Orthop*. 2018;1-10.
- [3] Wagner C, Obst U, Häscher GM. Implant-associated posttraumatic osteomyelitis: collateral damage by local host defense? *Int J Artif Organs*. 2005;28(11):1172-1180.



图注: 低倍电镜下, 两种材料结构相同, 截面可见许多大孔, 大孔之间有内连接联通, 位于表面的大孔边缘不平整, 有隆起或凹陷。高倍电镜下,  $\beta$ -磷酸三钙为致密的结晶样结构, 颗粒大小不一, 排列紧密; 含质量分数 10% 纳米银颗粒  $\beta$ -磷酸三钙中的致密  $\beta$ -磷酸三钙晶体变得相对稀疏, 出现了大小不一的孔隙, 银表现为高亮的小颗粒, 散在分布于  $\beta$ -磷酸三钙大颗粒晶体中。

图 1 扫描电镜观察不同材料表面形貌

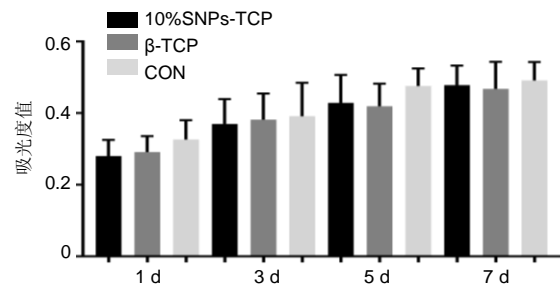
Figure 1 Surface topography of  $\beta$ -tricalcium phosphate and 10% silver nanoparticle-doped  $\beta$ -tricalcium phosphate under scanning electron microscope



图注: 图中 A 为  $\beta$ -磷酸三钙的能谱图, B 为含质量分数 10% 纳米银颗粒  $\beta$ -磷酸三钙的能谱图。

图 2 不同材料的 X 射线衍射能谱图

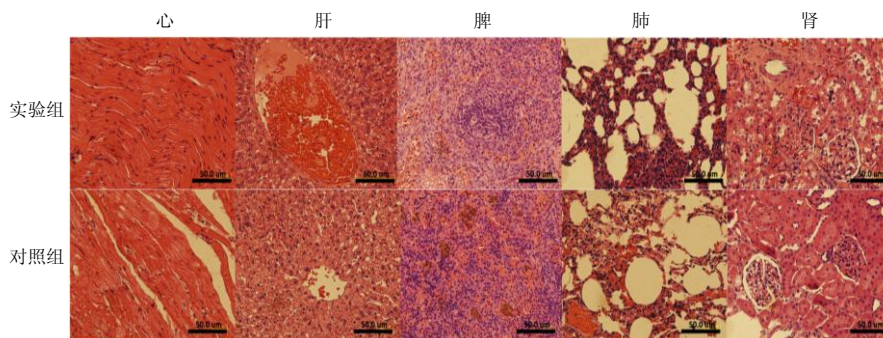
Figure 2 X-ray diffraction patterns of  $\beta$ -tricalcium phosphate and 10% silver nanoparticle-doped  $\beta$ -tricalcium phosphate



图注: CON 为正常组织液培养骨髓间充质干细胞,  $\beta$ -TCP 为  $\beta$ -磷酸三钙材料浸提液培养骨髓间充质干细胞, 10%SNPs-TCP 为含质量分数 10% 纳米银颗粒  $\beta$ -磷酸三钙材料浸提液培养骨髓间充质干细胞; 与  $\beta$ -磷酸三钙材料浸提液、正常组织培养液相比, 含质量分数 10% 纳米银颗粒  $\beta$ -磷酸三钙材料浸提液培养 1, 3, 5, 7 d 后的骨髓间充质干细胞增殖无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

图 3 含 10% 纳米银颗粒多孔  $\beta$ -磷酸三钙材料浸提液的体外细胞毒性实验

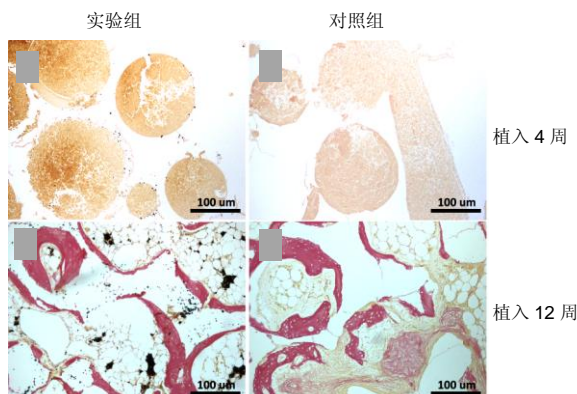
Figure 3 *In vitro* cytotoxicity of 10% silver nanoparticle-doped  $\beta$ -tricalcium phosphate extract



图注: 两组兔心、肝、脾、肺、肾组织切片未见明显病理性改变。

图 4 材料植入后 12 周各组兔重要脏器病理改变(苏木精-伊红染色,  $\times 40$ )

Figure 4 Histological observation of the vital organs 12 weeks after the implantation of  $\beta$ -tricalcium phosphate and 10% silver nanoparticle-doped  $\beta$ -tricalcium phosphate (hematoxylin-eosin staining,  $\times 40$ )



图注: 植入 4 周, 实验组可见黑色、不规则的银离子颗粒散在分布于  $\beta$ -磷酸三钙中, 两组材料周围都只有极少量的红染纤维, 呈线状分布, 两组纤维组织分布未见明显差异; 植入 12 周后, 材料轮廓仍可分辨, 材料周围可见被染成红色的新骨组织, 材料内部多孔结构内可见大量红染的新骨组织, 两组材料多孔结构内的新骨组织分布未见明显差异。

图 5 各组兔股骨缺损植入区切片 VG 染色 ( $\times 100$ )

Figure 5 Van Gieson staining of the femoral condyle defect after material implantation ( $\times 100$ )

- [4] Sanders J, Mauffrey C. Long bone osteomyelitis in adults: fundamental concepts and current techniques. *Orthopedics*. 2013;36(5):368.
- [5] Li Y, Liu L, Wan P, et al. Biodegradable Mg-Cu alloy implants with antibacterial activity for the treatment of osteomyelitis: In vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials*. 2016;106:250-263.
- [6] Ginebra MP, Espanol M, Maazouz Y, et al. Bioceramics and bone healing. *EFORT Open Rev*. 2018;3(5):173-183.
- [7] Wang Z, Guo Z, Bai H, et al. Clinical evaluation of  $\beta$ -TCP in the treatment of lacunar bone defects: a prospective, randomized controlled study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(4):1894-1899.
- [8] Gan Y, Dai K, Zhang P, et al. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials*. 2008;29(29):3973-3982.
- [9] Jiang SD, Jiang LS, Dai LY. Surgical treatment of calcaneal fractures with use of beta-tricalcium phosphate ceramic grafting. *Foot Ankle Int*. 2008;29(10):1015-1019.
- [10] Dai LY, Jiang LS. Anterior cervical fusion with interbody cage containing beta-tricalcium phosphate augmented with plate fixation: a prospective randomized study with 2-year follow-up. *Eur Spine J*. 2008;17(5):698-705.
- [11] Yamanaka M, Hara K, Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(11):7589-7593.
- [12] Angelo T, Carla Renata A, Agnese DA, et al. Antibiofilm activity of a monolayer of silver nanoparticles anchored to an amino-silanized glass surface. *Biomaterials*. 2014;35(6):1779-1788.
- [13] Mei S, Wang H, Wang W, et al. Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes. *Biomaterials*. 2014;35(14):4255.
- [14] 张茹梅, 鲁媛媛, 王静, 等. 纳米银凝胶联合乳酸菌阴道胶囊治疗放射性阴道炎的临床分析[J]. *解放军医药杂志*, 2018, 30(3):91-93.
- [15] Kumar SSD, Rajendran NK, Houreld NN, et al. Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications. *Int J Biol Macromol*. 2018;115:165-175.
- [16] Ashmore D, Chaudhari A, Barlow B, et al. Evaluation of *E. coli* inhibition by plain and polymer-coated silver nanoparticles. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018;60:e18.
- [17] 管捷, 程坚, 谢幼专, 等. 含纳米银颗粒的 $\beta$ -磷酸三钙复合支架的抗菌性和促成骨性的研究[J]. *生物骨科材料与临床研究*, 2018, 15(2):9-13, 82-83.
- [18] 施畅, 徐丽明, 邵安良. 纳米银的毒理学研究现状[J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(12):2025-2033.
- [19] 刘晶, 孙迎春, 曾妃菲. 载银磷酸锆可影响293T细胞的生长与增殖[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(21):3901-3906.
- [20] Li Y, Qin T, Ingle T, et al. Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Arch Toxicol*. 2017;91(1):509-519.
- [21] Jung WK, Koo HC, Kim KW, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(7):2171-2178.
- [22] Shrivastava S, Bera T, Roy A, et al. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2007;18(22):103-112.
- [23] 林晓华, 黎志超, 俞金龙, 等. 新型复合生物抗菌敷料的抗菌强度、吸湿能力及细胞毒性[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(16):2905-2912.
- [24] Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci*. 2009;145(1-2):83-96.
- [25] Ciobanu CS, Iconaru SL, Le Coustumer P, et al. Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanoscale Res Lett*. 2012;7(1):324.
- [26] Gopi D, Shinyjoy E, Kavitha L. Synthesis and spectral characterization of silver/magnesium co-substituted hydroxyapatite for biomedical applications. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2014;127:286-291.
- [27] 汤京龙, 王硕, 刘丽, 等. 纳米银颗粒的细胞毒性作用及机制初探[J]. *北京生物医学工程*, 2013, 32(5):485-489.
- [28] 孙晋都, 张帮勇, 李婷竹, 等. 纳米银的银离子释放及其对细胞的毒性作用[J]. *环境与职业医学*, 2017, 34(7):636-641.
- [29] Vrček IV, Žuntar I, Petlevski R, et al. Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. *Environ Toxicol*. 2016;31(6):679-692.
- [30] Lee Y, Kim P, Yoon J, et al. Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2013;7(6):1120-1130.
- [31] Gaiser BK, Hirn S, Kermanizadeh A, et al. Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes in vitro. *Toxicol Sci*. 2013;131(2):537-547.
- [32] Kim YS, Kim JS, Cho HS, et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol*. 2008;20(6):575-583.
- [33] Korani M, Rezayat SM, Gilani K, et al. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:855-862.