

## · 基础研究 ·

## 增塑淀粉生物安全性评价\*

徐小川<sup>1</sup>,姚源<sup>1</sup>,田伟<sup>2△</sup>,石锐<sup>2</sup>,陈大福<sup>2</sup>,张秀丽<sup>3</sup>

(1. 北京积水潭医院口腔科,北京 100035;2. 北京市创伤骨科研究所,北京 100035;

3. 北京市第六医院口腔科,北京 100007)

**摘要:**目的 评估新型诱导成骨可降解生物材料——增塑淀粉的生物安全性。方法 根据国家医药行业标准,通过急性全身毒性反应、溶血实验、短期全身毒性(经口途径)3种方法对其生物安全性进行初步评价,部分试验引入统计学方法。结果 材料溶血率为2.06%;急性全身毒性反应在考虑初始体质量影响后,实验组与对照组间24、48、72 h体质量变化比较差异无统计学意义( $P=0.1758, 0.1758, 0.3756$ );短期全身毒性灌胃1~6 d各时间点两组体质量比较差异无统计学意义,第7天时两组间体质量比较差异亦无统计学意义(实验组=411.67 g,对照组=429.67 g,  $t=-0.9251, P=0.3768$ ),将组别因素和时间因素共同考虑时两组比较差异无统计学意义( $F=1.42, P=0.2465$ ),停止灌胃后观察期的终末时间实验组与对照组间体质量比较差异也无统计学意义( $t=1.70, P=0.1135$ )。结论 增塑淀粉的上述试验结果符合相应的国家医药行业标准。

**关键词:**增塑淀粉;生物安全性评价;毒性;溶血性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.22.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)22-2626-03

## Biological evaluation of thermoplastic starch\*

Xu Xiaochuan<sup>1</sup>, Yao Yuan<sup>1</sup>, Tian Wei<sup>2△</sup>, Shi Rui<sup>2</sup>, Chen Dafu<sup>2</sup>, Zhang Xiuli<sup>3</sup>

(1. Stomatology Department of Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China; 2. Beijing Research

Institute of Traumatology &amp; Orthopaedics, Beijing 100035, China;

3. Department of Stomatology, Beijing No. 6 Hospital, Beijing 100007, China)

**Abstract:** Objective To evaluate the Biological properties of thermoplastic starch (TPS). Methods According the standard of the government, operate three biological evaluation (acute toxicity, haemocompatibility and short-time toxicity) compound with SPSS analyse. Results The rate of haemocompatibility was 2.06%, no more different weight between trail and control in acute toxicity or short-time toxicity in any key period time. Conclusion TPS is acceptable biology materials.

**Key words:** thermoplastic starch; biological evaluation; toxicity; haemocompatibility

海藻酸盐是从海洋褐藻中提纯的天然多糖,应用在制药和生物医学工程领域<sup>[1-3]</sup>,缺点是在生理环境下容易失去物理性状,而且对蛋白质吸附能力不佳,从而限制了其深入应用于上述领域;淀粉是陆生的天然多糖,其价格不足前者的1/10。增塑淀粉(thermoplastic starch)是北京市创伤骨科研究所参与研发的生物可降解材料,比普通淀粉的弹性和强度都有所增加。该材料具有分子量大、对小分子物质有超强包容性、凝胶化能力强等特点,因而可替代海藻酸盐作为可降解材料,若加入止血剂或骨形成蛋白等因子则可用作止血、诱导成骨等组织工程材料<sup>[4]</sup>,有望在生物医药、组织工程领域广泛应用<sup>[5]</sup>。

宿主微环境中物理、化学、生物因素对生物材料的降解和转归有很大影响,建立能模拟宿主体内微环境的研究平台,从事可重复、可控的体外实验,将使材料的评估更加客观<sup>[6]</sup>。但具体评价方法和指标尚无法达成共识<sup>[7]</sup>,因此,本实验依照医疗器械标准 YY/T 0127.2-93<sup>[8]</sup>、YY/T 0127.1-93 及 ISO/TR7405-1984<sup>[9]</sup>、YY/T 0244-1996<sup>[10]</sup>有关规定,从急性全身毒性反应、溶血实验、短期全身毒性试验3种方法对其生物安全性进行初步评价研究。

## 1 材料与方

1.1 急性全身毒性反应<sup>[8]</sup>

1.1.1 材料 增塑淀粉4 g(北京化工大学提供),置入有20

mL生理盐水的三角瓶,经37℃浸提72 h制成浸提液。小白鼠雌雄各10只,体质量17~23 g。

1.1.2 方法 小鼠雌雄随机分为实验组和对照组,每组10只。实验组小鼠腹腔恒速(不超过0.1 mL/s)注射浸提液50 mL/kg,对照组注射同批号灭菌生理盐水,于注射后24、48、72 h观察和记录实验组和对照组动物体质量、一般状态、毒性表现和死亡动物数。

1.1.3 统计与分析 通过SPSS13.0软件分析,考虑初始体质量、时间、组别进行具有一个协变量一个重复测量两因素定量资料方差分析。

1.2 溶血实验<sup>[8]</sup>

1.2.1 材料 增塑淀粉5 g,经清洗处理后置烧瓶中加入生理盐水10 mL作为实验组。阴性对照为同批号0.9%氯化钠注射液,阳性对照为蒸馏水,各准备3瓶待测。

1.2.2 方法 将实验组、阴性对照、阳性对照各组烧瓶置于37℃水浴中30 min。然后在各瓶中加入新鲜稀释兔血0.2 mL轻轻摇匀,在同温水浴中维持60 min,取上清液于545 nm波长测定吸光度。溶血率计算公式:溶血率(%)=[(实验样品的吸光度-阴性对照的吸光度)/(阳性对照的吸光度-阴性对照的吸光度)]×100%。

1.3 短期全身毒性试验 经口途径<sup>[8]</sup>。

**1.3.1 实验动物** 12 只 SD 大白鼠,体质量 420~480 g,随机分为对照组和实验组,每组 6 只,雌雄各半,并标记大鼠。

**1.3.2 灌胃剂制备** 将增塑淀粉制成浓度 20% 的混悬液,4 ℃ 环境保存待用。

**1.3.3 灌胃** 用连有灌胃针的注射器灌胃,给服剂量为每日 1 g/kg 体质量,对照组给服同体积的浸提介质(0.9% 生理盐水)。记录大鼠体质量并依此调节灌胃剂量,时间 7 d。停止灌胃后再连续测量体质量 5 d。

**1.3.4 结果判断及统计学处理** 观察大鼠的体质量变化、运动和呼吸状态以及死亡情况。采用 SPSS13.0 统计软件进行分析处理,采用 Wilcoxon 秩和检验、考虑连续灌胃第 7 天体质量、时间、组别进行具有一个协变量、一个重复测量两因素定量资料方差分析。

**2 结 果**

**2.1 急性全身毒性反应结果** 在 24、48、72 h 观察期内,两组动物状况良好,进食及运动如常,行动敏捷,无痉挛、运动障碍和死亡等毒性反应,体质量逐日增加。对两组初始体质量(20.80±1.40,19.60±1.58)采用 *t* 检验,结果显示两组比较差异无统计学意义( $t=1.80, P=0.09$ ),说明两组之间初始体质量具有可比性(表 1)。两组之间在 24、48、72 h 体质量比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

初始体质量在统计学上的意义重大( $F=15.21, P=0.0003$ )(见表 2),同一组各时间点之间有统计学差异( $F=10.19, P=0.0002$ ),组别与各时间点之间比较无交互作用( $F=0.11, P=0.8943$ )。考虑初始体质量影响后,实验组与对照组间 24、48、72 h 体质量变化无统计学意义( $P=0.1758, 0.1758, 0.3756$ ),见表 3。

**表 1 各组各时间点描述性统计分析结果体质量(g,  $\bar{x} \pm s$ )**

组别	初始	24 h	48 h	72 h
实验组	20.80±1.40	21.80±1.48	22.80±1.40	24.20±1.75
对照组	19.60±1.58	22.20±1.48	23.20±2.15	24.20±2.39

**表 2 考虑初始体质量、时间、组别进行具有一个协变量一个重复测量两因素定量资料方差分析结果**

项目	F	P
初始体质量	15.21	0.0003
组别	2.88	0.1268
时间	10.19	0.0002
组别 * 时间	0.11	0.8943

**表 3 考虑初始体质量影响后两组各时间体质量变化比较**

比较组别	统计量	P
24 h 实验组与对照组比较	-1.39	0.1758
48 h 实验组与对照组比较	-1.39	0.1758
72 h 实验组与对照组比较	-0.90	0.3756

**2.2 溶血试验结果** 见表 4。经计算增塑淀粉溶血率=2.06%。

**2.3 短期全身毒性试验(经口途径)结果** 见表 5。对灌胃后体质量变化分析如下(表 6):初始体质量在统计学上的意义重

大( $F=219.30, P<0.0001$ ),将组别因素和时间因素共同考虑时两组比较差异无统计学意义( $F=1.42, P=0.2465$ ),但各组间及各时间点间比较差异有统计学意义( $F=5.42, P=0.0449; F=5.88, P=0.0008$ )。停止灌胃后两组各时间点体质量变化见表 7。

**表 4 增塑淀粉溶血吸光度值**

组别	吸光度值			平均值
	1	2	3	
阴性对照组	0.127	0.041	0.013	0.027
阳性对照组	0.950	0.957	0.944	0.950
增塑淀粉组	0.060	0.036	0.043	0.046

**表 5 灌药 7 d 中两组各时间点体质量比较(g,  $\bar{x} \pm s$ )**

时间	实验组	对照组	t	P
第 1 天	436.33±34.72	443.67±31.23	-0.3847	0.7086
第 2 天	425.33±37.43	442.33±28.66	-0.8833	0.3992
第 3 天	423.00±32.81	441.67±30.81	-1.0159	0.3337
第 4 天	417.00±36.22	442.33±31.07	-1.3004	0.2233
第 5 天	416.33±34.30	438.67±33.03	-1.1489	0.2774
第 6 天	409.00±34.77	433.33±30.16	-1.2948	0.2250
第 7 天	411.67±34.86	429.67±32.51	-0.9251	0.3768

**表 6 连续灌胃第 7 天体质量、时间、组别进行具有一个协变量一个重复测量两因素定量资料方差分析**

项目	F	P
初始体质量	219.30	<0.0001
组别	5.42	0.0449
时间	5.88	0.0008
组别 * 时间	1.42	0.2465

**表 7 停止灌胃后两组各时间点体质量变化(g,  $\bar{x} \pm s$ )**

指标	实验组	对照组	t	P
第 1 天	412.60±32.83	424.67±36.54	1.36	0.1963
第 2 天	415.60±33.86	423.00±35.30	2.30	0.0386
第 3 天	417.00±35.16	423.33±36.98	2.50	0.0265
第 4 天	419.00±36.55	424.33±36.43	2.70	0.0181
第 5 天	420.67±35.72	431.00±40.77	1.70	0.1135

**3 讨 论**

对于接触人体或在体内使用的生物材料,其化学性能将会直接影响人体的安全性。因此,对材料中的残留单体、有害金属元素、各种添加剂应严格控制。只有通过生物学评价来进一步确认这些用品是否安全,以便决定是否可以在临床使用。一是动物体内实验,即将材料植入体内,分阶段将植入体与周围组织取出,做组织学观察;另一类为体外试验,即用材料或材料浸提液观察材料对组织细胞生长、代谢及增殖方面的影响<sup>[9]</sup>。1997 年国家医疗器械生物学评价标准 GB/T16886 等

采用 ISO10993-1992 标准,促进了中国生物医用材料研究的发展和水平的提高<sup>[10]</sup>。生物学评价流程为首先进行体外生物学评价(如溶血试验、细胞毒性试验),根据结果对产品提出改进建议,合格后再进行体内动物学评价(如急性全身毒性、短期全身毒性)和动物实体模拟试验,再根据体内试验结果对产品提出进一步改进的建议,最后进行临床研究。

血液相容性指标是针对植入物材料生物安全性的关键参数,但由于体内环境的复杂性及不确定性,目前尚无完善的评价标准。本实验遵照国家 YY/T0127.1-93 的要求,采用直接接触方法,测得材料的溶血率为 2.06%(表 4),指标在正常上限的 50%以下,提示该材料优于国家标准<sup>[8]</sup>。

在急性全身毒性和经口短期全身毒性中,除了动物体质量和死亡是可以明确判断的指标外其余均属于描述性语言,因而在动物零死亡且唯一的定量指标是“体质量”的情况下,引入统计学分析可以使结果更加有理可依。

急性全身毒性试验中选用的统计学方式除了考虑初始体质量外,如急性全身毒性试验初始体质量在统计学上的意义重大(表 2,  $F=15.21, P=0.0003$ ),还加入了组别及时间因素综合考虑,如同一实验中组别与各时间点之间比较无交互作用(表 2,  $F=0.11, P=0.8943$ ),在此基础上显示实验组与对照组间 24、48、72 h 体质量变化比较差异无统计学意义(表 3,  $P=0.1758, 0.1758, 0.3756$ ),避免了大量信息因统计学方法选择不当而丢失,所得结果可信度大大提高。

短期全身毒性——经口途径是医药行业标准中针对接触骨组织、血液组织所必须的评价实验<sup>[11]</sup>。采用 Wilcoxon 秩和检验并考虑连续灌胃 7 d 体质量、时间、组别进行具有一个协变量一个重复测量两因素定量资料方差分析。考虑组别和时间因素(表 6,  $F=1.42, P>0.05$ )提示增塑淀粉对实验动物未造成伤害。

停止灌胃 2~4 d 两组动物体质量有差异,可能的原因是对照组中一只动物灌胃致食道损伤引发体质量变化而产生偏倚,但在第 5 天体质量已无差别( $t=1.70, P=0.1135$ ),提示灌胃产生的损伤 2~3 d 才能恢复。

增塑淀粉作为替代海藻酸盐的可降解组织工程材料,在体外和体内实验中显示了较好的安全性能,有研究将其与聚乙烯

醇联合制备为引导组织再生膜<sup>[5]</sup>明显优于聚乳酸和聚乳酸-羟基乙酸共聚物膜,进一步的材料学改善将使增塑淀粉尽快进入临床试验。

#### 参考文献:

- [1] 张强,武凤兰.药剂学—缓释与控释技术[M].北京:北京医科大学出版社,2004:505-537.
- [2] 顾耕华,何虹,黄剑奇.海藻酸钙膜引导兔颌骨缺损骨再生的对照实验[J].现代口腔医学,2002,16(5):388-390.
- [3] 郭全义,卢世璧,张莉,等.藻酸钙凝胶为载体体外短期培养软针细胞的生物学性状[J].中国临床康复,2006,10(1):61-63.
- [4] Lourdin D, Bizot H, Colonna P. “Antiplasticization” in starch-glycerol films? [J]. J Applied Polymer Science, 1997,63(8):1047-1053.
- [5] 朱爱臣,石锐,陈大福,等.淀粉/聚乙烯醇复合生物膜的制备机器表征[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(8):1441-1447.
- [6] 闻学雷,张彩霞.生物材料体内外试验相关性的研究-体外白细胞趋化试验与体内肌肉埋植试验的相关性探讨[J].生物医学工程杂志,1999,16(3):263-266.
- [7] 翟建才,赵南明,张其清.生物材料与血液界面作用机制及相容性评价的研究技术[J].国外医学生物医学工程分册,1995,18(1):620.
- [8] 中国标准出版社第一编辑室.医疗器械标准汇编(口腔材料卷)[M].北京:中国标准出版社,2002.
- [9] 刘月辉,文三立,肖尊文.复合活性羟基磷灰石陶瓷的研制及其生物相容性研究[J].中国生物医学工程学报,2000,19(1):53-59.
- [10] 杨晓芳,奚廷斐.医疗器械临床试验概述[J].中国医疗器械信息,2006,12(7):47-51.
- [11] 刘梦冬.新型根管充填剂[D].青岛:青岛大学,2006.

(收稿日期:2013-03-19 修回日期:2013-04-22)

(上接第 2625 页)

- [5] Philip C, Spinella, John B, et al. Resuscitation and transfusion principles for traumatic hemorrhagic shock[J]. Blood Reviews, 2009, 23(6):231-240.
- [6] 刘良明.严重创伤性休克的液体复苏新进展[J].中国危重症急救医学,2003,15(5):314-316.
- [7] 刘大为.休克的分类及其临床意义[J].铁道医学,1998,26(2):2-3.
- [8] 刘卫丽.创伤性休克的院前急救护理[J].内蒙古医学杂志,2008,40(6):754-755.
- [9] 李琦.严重创伤性患者的急救护理[J].工企医刊,2006,19(6):77-78.
- [10] 王延国.现代创伤学研究的某些发展[J].中华创伤杂志,

1995,11(5):262-265.

- [11] 廖南波,卢洁,胡莉红.车祸致创伤性休克急救护理[J].实用中西医结合临床,2008,8(4):70-71.
- [12] 王海燕.急危重患者转运的不安全因素分析及对策[J].西南军医,2008,6(3):16.
- [13] 郭翼燕,刘淑珍.急性创伤患者的心理护理[J].黑龙江医学,2003,12(27):944-945.
- [14] 何燕,严丽丽.接受胃镜下治疗患者焦虑的心理干预[J].重庆医学,2007,36(15):1560-1561.
- [15] 范文超,方健.661 例颅脑损伤患者伤情特点和结局危险因素分析[J].中华创伤杂志,2012,7(28):584-587.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-22)