

异种去细胞角膜基质浸提液对 CHL 细胞毒性的实验研究^{*}

刘先宁,汪 耀,肖湘华,潘士印,银 勇,安 娜,朱秀萍

(陕西省眼科研究所,陕西省眼科学重点实验室,西安市第一医院,西安 710002)

摘要:**目的** 通过鸵鸟去细胞角膜基质浸提液对中国仓鼠肺纤维细胞(CHL)毒性的实验观察,筛选出浸提液的最大无毒浓度,为进一步完成该去细胞角膜基质材料的染色体畸变实验奠定基础。**方法** 采用细胞培养的方法,将鸵鸟去细胞角膜基质材料制备成浸提液,用浸提原液、1:2,1:4 稀释的浸提液与传代培养的 CHL 细胞共同培养,同时设立阴性、阳性对照,参考 MTT 比色法评价 24 h 后对细胞生长的影响。**结果** 1:4 稀释的浸提液既无毒性,又具有促进细胞生长的作用。**结论** 采用 CHL 细胞进行细胞毒性试验,依据分级结果并结合细胞形态学特征可筛选出鸵鸟去细胞角膜基质浸提液进行 CHL 细胞染色体畸变实验的基准无毒浓度。

关键词:鸵鸟去细胞角膜基质浸提液;细胞毒性试验;基准无毒浓度

中图分类号:R779.65;R392.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)01-112-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.032

Research on the Cytotoxicity of the Heterogeneous Acellular Corneal Stromal Leaching Solution on the CHL Cells

LIU Xian-ning, WANG Yao, XIAO Xiang-hua, PAN Shi-yin, YIN Yong, AN Na, ZHU Xiu-ping

(*Shaanxi Institute of Ophthalmology,*

Shaanxi Key Lab of Ophthalmology, Xi'an First Hospital, Xi'an 710002, China)

Abstract:**Objective** To select the largest non-toxic leaching solution concentration through the experimental observation of the cytotoxicity of the ostrich acellular corneal stromal leaching solution to the Chinese hamster lung fibroblasts cells(CHL) for the further chromosome distortion experiment. **Methods** The leaching solution made from the ostrich acellular corneal stromal material was diluted with concentrate of 1:2, 1:4 and the original concentration were used to culture with the CHL cells, the negative and positive control were also set up at the same time, to evaluate the impact on cell growth after 24 hour by MTT colorimetric method. **Results** The leaching solution diluted with 1:4 was non-toxic, and could promote the growth of the cells. **Conclusion** Combined with the results of classification and cell morphological features, this cytotoxicity test can be used to screen the best benchmark non-toxic concentrations for the chromosome aberration test of the CHL cells.

Keywords: ostrich acellular corneal stroma; leaching solution; cytotoxicity test; the benchmark non-toxic concentration

角膜移植手术是治疗角膜盲患者的唯一手段。但苦于角膜材料来源极度匮乏,致使数以万计的患者因得不到角膜材料而延迟甚至无法获得治疗。陕西省眼科研究所通过前期大量的研究工作,筛选出与人眼解剖、组织结构、光学特性非常接近的鸵鸟角膜,并研制出脱细胞角膜基质材料。经相关实验证实其生物相容性好,抗原性低^[1,2]。为保证其最终临床应用的安全性,我们拟采用体外培养的哺乳动物细胞株中国仓鼠肺纤维细胞(CHL)进行染色体畸变实验。根据前期相关预实验结果提示,在做染色体畸变实验前,必需筛选出该材料浸提液对 CHL 细胞的基准无毒浓度,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 经钴 60 照射灭菌的干燥脱水法保存的鸵鸟去细胞角膜基质材料均为陕西省眼科研究所自行研制;中国仓鼠肺纤维细胞株(CHL 细

胞株)购自通派上海生物科技有限公司。

1.2 试剂和仪器 1640 培养液(GIBCO 公司);胰蛋白酶(GIBCO 公司);二甲基亚枫(DMSO)、MTT 试剂(sigma 公司);苯酚、CO₂ 培养箱(美国 NuAire 公司);酶联免疫检测仪(美国 Thermo 公司);倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS);96 孔培养板(美国 Costar 公司)。

1.3 方法

1.3.1 材料浸提液的制备:取经钴 60 照射灭菌的干燥脱水法保存的鸵鸟去细胞角膜基质材料 24 cm²,放入 9 cm 无菌平皿中,加入无菌生理盐水复水 20 min 取出,再放入 15 ml 离心管中加入 1640 培养液 4 ml,于 37℃培养箱中浸提 72 h,制得样品浸提液,实验前加入 100 ml/L 胎牛血清。

1.3.2 配制的培养液及染液:培养液及阴性对照液(含 100 ml/L 胎牛血清、100 000 u/L 青霉素、链

^{*} 基金项目:陕西省科技统筹创新工程计划项目(2012KTCQ03-11)。

作者简介:刘先宁(1965—),女,本科,研究员,主任检验技师,西安市有突出贡献的青年专家,主要从事眼病的基础研究及实验室诊断工作,E-mail:lxn65@sina.com。

霉素的1640培养液);阳性对照液(含64 g/L苯酚的1640培养液):MTT染液(5 g/L MTT)。

1.3.3 细胞的消化及传代:取生长状态良好的CHL细胞一满瓶,弃去培养液后,加入2.5 g/L胰蛋白酶0.5 ml于瓶底消化细胞,约2 min后,平放倒置显微镜下观察,消化至细胞开始收缩后即加入培养液停止消化,用吸管吹打细胞后,经离心洗涤,传代于新培养瓶中,加入新鲜培养液,直至传至所需要细胞数量后,待用。

1.3.4 细胞毒性实验步骤及参考判定标准^[3]:取96孔培养板一块,每组4孔,每孔分别加入100 μl的细胞混悬液(接种密度为4×10⁴个/ml),置37℃ CO₂培养箱中培养24 h,取出培养板,弃去原培养液。按以下每组(4孔)进行加液,每孔100 μl。浸提原液组,1:2浸提液组,1:4浸提液组,阴性对照培养液组,苯酚阳性对照液组。24 h后取出培养板,倒置显微镜下观察记录各组细胞形态后,每孔加入20 μl的MTT溶液,置37℃培养箱中继续孵育4 h,倒置显微镜下观察记录各组细胞

着色状态,然后小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入200 μl二甲基亚砷,振荡10 min,选择570 nm波长测定吸光度,分别测定各孔吸光度。细胞毒性判定标准0级或1级为反应合格,2级应结合细胞形态分析,综合评价;结果为3~5级反应为不合格。相对增殖度(RGR%)=实验组平均吸光度/阴性对照组平均吸光度值×100。分级标准:反应为0级RGR≥100;1级RGR为75~99;2级RGR为50~74;3级RGR为25~49;4级RGR为1~24;5级RGR为0。

2 结果

2.1 培养24 h,倒置显微镜下各组细胞形态的比较 见图1。阴性正常对照组,细胞呈梭形,卵圆形,不规则形,具宽扁胞质突起,胞质近中央处有椭圆细胞核,胞体贴壁铺展。浸提原液组,细胞变小、圆、大部分死亡。与正常对照组相比,1:2浸提液组,细胞形态大致正常,1:4浸提液组细胞生长状态良好,64 g/L苯酚阳性对照组,细胞形态多数变圆,死亡。

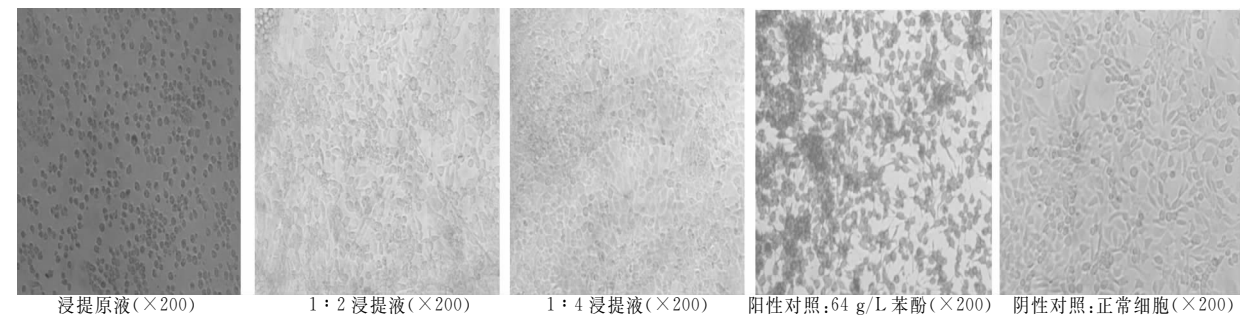


图1 培养24 h,倒置显微镜下各组CHL细胞形态

2.2 培养24 h,加入MTT后倒置显微镜下各组细胞着色状态的比较 见图2。MTT作用后,染色原理为活的CHL细胞内形成蓝紫色针状结晶甲瓚。浸提原液组,细胞内未见针状结晶;1:2浸

提液组,大部分细胞内有针状结晶;1:4浸提液组,几乎所有细胞内均有针状结晶。64 g/L苯酚阳性对照组未见蓝紫色针状结晶甲瓚。

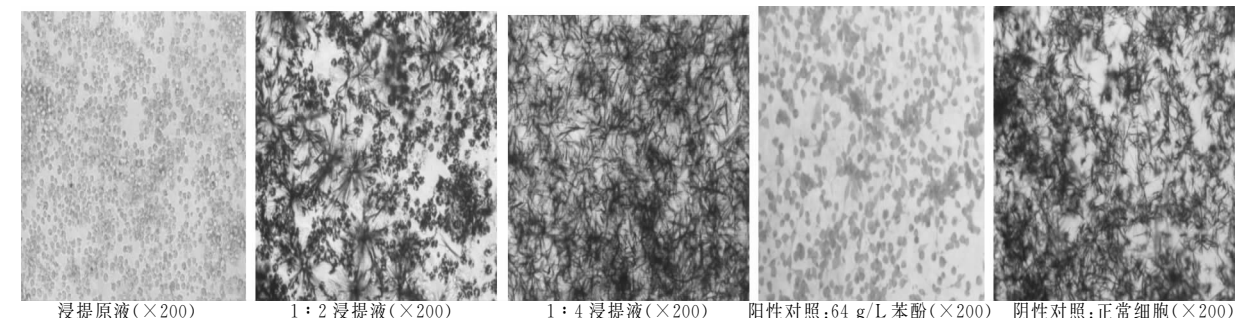


图2 培养24 h,加入MTT后,倒置显微镜下各组CHL细胞着色状态

2.3 实验组及对照组细胞相对增殖度(RGR)值转换成6级反应评定结果 依据细胞毒性判断标准,1:4浸提液组细胞毒性级别为0级;1:2浸提液组细胞毒性级别为1级,见表1。结合细胞形态及MTT染色后细胞特征筛选出浸提液的基准无毒浓度(最大无毒浓度)应为1:4。

3 讨论 随着组织工程学的进展,生物材料的研究及应用已愈来愈广泛。为了确保材料进入临床的安全性,必须对其理化性、生物相容性、安全性等进行全面评价。染色体畸变试验是重要的安全性评价方法之一,正式实验前必须对浸提液的最佳无毒基准浓度(最大无毒浓度)进行研究确认。

表 1 实验组及对照组细胞相对增殖度(RGR)值及转换成 6 级反应评定结果

结果	阳性对照	浸提原液	1 : 2 浸提液	1 : 4 浸提液	阴性对照
吸光值($\bar{x}\pm s$)	0.116±0.009	0.129±0.01	1.164±0.22	1.363±0.107	1.133±0.14
RGR(%)	10.2	11.3	88	120	100
分级	4 级	4 级	1 级	0 级	0 级

细胞毒性试验是一种在体外状态下,模拟生物体生长环境,检测药物、生物材料及制品或其浸提液对细胞溶解、细胞死亡、抑制细胞生长和其它毒性作用的方法。

在 ISO10093-5:1999 中该项试验可分为浸提液法、直接接触法和间接接触法 3 种。鉴于目前绝大多数医疗器械及材料是通过浸提液来进行检测的,故本研究参照 GB/T16886.12 ~ 2005/LSO 10993~12:2002 医疗器械生物学评价第 12 部分制备浸提液。

MTT 比色法是较常用的浸提液试验,通过材料的浸提液与培养细胞广泛接触,可分析材料中各组成成分及其浓度对细胞的毒性影响。比色法的基本原理是存在于活细胞线粒体呼吸链上的琥珀酸脱氢酶能脱下琥珀酸的氢原子,而死细胞没有这一性质,黄色的 MTT 接受氢原子,还原成蓝色的甲瓚结晶,用二甲基亚枫溶解,在波长 490 nm 下,用酶标仪测定反映甲瓚量的吸光度值,就能定量反映细胞数与细胞活性的变化。比色法因其检测所需的细胞量相对较少,实验步骤相对简便,误差小,检测周期短等优点,是一种常用的体外细胞毒性试验的测定方法^[4]。

本研究以浸提液进行 MTT 试验,同时结合各组细胞染色前后的形态特征成功的筛选出了最佳无毒基准浓度为 1 : 4。在此浓度下,不仅对细胞无毒性,而且细胞增殖能力优于正常对照组,推测其原因,可能是由于角膜基质内含有多种细胞因子,虽经物理或化学方法处理,仍有部分保留,这样的微环境更有利于细胞的生长和增殖。

浸提原液组为什么会出现细胞“毒性”?究其原因,可能因为制备的去细胞角膜基质材料为胶原纤维,具有三股螺旋、端肽、前肽微区,三条 α -肽螺旋缠绕而成,每条链上有千余个氨基酸,它的等电点在 4.8~5.2。在 37℃ 偏碱性的 1640 液中,经过长达 72 h 的浸泡,部分胶原发生水解、降解产生明胶、D-氨基酸或外消旋氨基酸等产物,这些成分虽不是有毒物质,但浓度较大时,可改变细胞培养的渗透压等微环境,从而导致细胞死亡。在眼科临床,干燥保存的人角膜材料使用前仅进行常规、常温复水 20 min 便可进行移植。本项研究,我们参阅相关资料^[5,6],制备异种去细胞角膜基质浸提液,采用 37℃ 长达 72 h 的浸泡方法,是否浸提时间过

长,有待以后进一步研究探讨。

总之,本研究结果表明,采用 MTT 比色法并结合培养后细胞形态,可完成异种角膜基质浸提液基准无毒浓度的确认。该方法加以推广,将在各类药物、生物材料、医疗器械等的研究评价中具有较高的应用价值。

参考文献:

[1] 刘先宁,朱秀萍,银 勇,等.以干燥脱水法保存的异种角膜基质为载体构建人工生物角膜上皮组织[J].国际眼科杂志,2008,8(11):2214-2216.
Liu XN, Zhu XP, Yin Y, et al. Constructing artificial biologic cornea epithelial tissue on the carrier of heterogenic corneal stroma stored with desiccation and dehydration method[J]. International Journal of Ophthalmol, 2008, 8(11): 2214-2216.

[2] 刘先宁,吴 洁,肖湘华,等.鸵鸟去细胞异种角膜基质载体异位移植对 BALB/c 小鼠外周血 T 细胞亚群的影响[J].中华实验眼科杂志,2014, 32(7): 617-620.
Liu XN, Wu J, Xiao XH, et al. Effect of ostrich acellular heterogeneous corneal stroma ectopic transplantation on T lymphocyte subsets in peripheral blood of BALB/c mice[J]. Chinesnal Journal of Experimental Ophthalmology, 2014, 32(7): 617-620.

[3] 孙 蕾,张富强,高益鸣,等.二步烧结牙科氧化锆陶瓷细胞毒性评价[J].口腔颌面修复学杂志,2008, 9(1):1-4.
Sun L, Zhang FQ, Gao YM, et al. Initial evaluation of biological safety of twice sintered machinable nanometer zirconia ceramic for dental use[J]. Chinese Journal of Prosthodontics, 2008, 9(1): 1-4.

[4] 刘先宁,朱秀萍,吴 洁,等.干燥脱水保存鸵鸟脱细胞角膜基质载体材料的细胞毒性[J].中国组织工程研究,2013,17(33):5995-6000.
Liu XN, Zhu XP, Wu J, et al. Cytotoxicity of dehydrated ostrich acellular corneal stromaas of carrier material[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2013, 17(33): 5995-6000.

[5] 胡燕平,郭 隽,宋 捷,等.脱细胞异体真皮基质的遗传毒性研究[J].中国医疗器械信息,2012,18(3): 36-39.
Hu YP, Guo J, Song J, et al. Genotoxicity study of acellular allogeneic dermal matrix[J]. China Medical Device Information, 2012, 18(3): 36-39.

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 医疗器械生物学评价第 12 部分:样品制备与参照样本[S]. 北京:ISO10993-12: 2002.
General Administration of Quality Supervision Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Biological evaluation of medical devices-Part12: Sample preparation and reference materials[S]. Beijing: ISO10993-12: 2002.