

囊型宫内节育器避孕材料的细胞毒性研究

钟兴明¹, 韦相才¹, 朱国平¹, 李艳秋¹, 伍园园¹, 李志才²,
郭建华², 曾幸荣²

(1. 广东省计划生育科学技术研究所, 广州 510600; 2. 华南理工大学材料科学与工程学院, 广州 510500)

[摘要] 目的:对囊型宫内节育器避孕材料的细胞毒性的潜在性作出评价。方法:采用研制的硅橡胶材料与高密度聚乙烯材料作为对照,根据GBT 16886.5—2003 医疗器械生物学评价第5部分标准,设立空白对照组、阴性对照(高密度聚乙烯)浸提液组、阳性对照液(含6.3%苯酚的RPMI1640完全培养液)组、100%、50%和25%材料(硅橡胶)浸提液组共6个组;用RPMI 1640完全培养液培养L-929细胞,每组加入100 μL的空白对照液、阴性对照浸提液和25%、50%、100%的材料浸提液及阳性对照液,观察细胞形态和增值率。结果:空白对照组、阴性对照浸提液组、阳性对照组、100%、50%和25%浓度材料浸提液组的细胞毒性级别分别为:0级、1级、4级、2级、2级、1级。100%、50%和25%材料浸提液组培养72 h后细胞增值率分别是(66.2±4.3)%、(72.4±6.1)%、(81.1±4.2)%;阴性对照浸提液组、100%、50%、25%材料浸提液组和阳性对照浸提液组OD(optical density)值与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组、100%、50%材料浸提液和阳性对照液组OD值与阴性对照浸提液组差异有统计学意义($P < 0.05$);25%材料浸提液OD值和与阴性对照浸提液组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:根据GBT 16886.5—2003 医疗器械生物学评价第11部分标准,所测硅橡胶材料细胞毒性评价符合要求。

[关键词] 宫内节育器;硅橡胶材料;细胞毒性;动物实验;鼠

[中图分类号] R318.08 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2015)06-0008-05

1 前言

放置宫内节育器(IUD)是我国育龄妇女最常用的避孕方法之一,约占40%左右^[1]。我国是一个人口大国,计划生育是一项长期的基本国策,近年来全国IUD使用的流行病学调查显示IUD使用后的一些副反应如子宫异常出血和不适感等副反应仍未能较好地解决^[2]。如何消除或减轻放置IUD后所产生的各种副作用、增加使用者的舒适程度,是一个迫切需要解决的难题。本研究根据囊型IUD^[3]的设计特点,笔者研制出新配方的硅橡胶材料用于囊

型IUD的制作。为了评价这种高分子聚合材料的细胞毒性,为临床的安全使用提供依据和资料,本实验对此材料的细胞毒性进行了研究,现报道如下。

2 资料和方法

2.1 实验材料与主要试剂

1)实验材料:硅橡胶材料^[4](配方:100质量份乙烯基硅油;40质量份气相二氧化硅;10质量份六甲基二硅氮烷)由华南理工大学材料学院提供;高密度聚乙烯由广州华粤行仪器有限公司提供。

[收稿日期] 2015-04-25

[基金项目] 广东省科技厅基金资助项目(2010B031600175);广东省人口与计划生育委员会基金资助项目(2010201)

[作者简介] 钟兴明,1973年出生,女,贵州赤水市人,硕士,主任医师,主要从事计划生育、生殖内分泌和宫内节育器研制方面的工作;

E-mail: xingmingzh@126.com

2) 实验溶剂: RPMI1640 完全培养液(含 RPMI1640 培养液、青霉素/链霉素,胎牛血清);批号: 8112835、12110511、NWJ0473;级别:细胞级;有效期至:2013-06-19;生产单位:GIBCO、杭州吉诺生物医药有限公司、Hyclone。

2.2 实验动物及细胞培养

采用小鼠成纤维细胞 L-929。来源:中山大学实验动物中心细胞库。于广东省医学实验动物中心细胞室,37℃、饱和湿度和 5%二氧化碳的环境培养。于 100 mm 培养皿加入 10 mL RPMI1640 完全培养液。待细胞长至 80%~90%汇合时,弃去原培养液,磷酸盐缓冲溶液(PBS)液洗涤 2 次,0.25%胰酶消化 1 min,吸弃胰酶,加入 RPMI1640 完全培养液。

2.3 细胞检查

对传代细胞观察 3 d。期间每日检查细胞一次,细胞未见异常,培养液未见异常,该株细胞纳入实验。

2.4 剂量设计与分组

细胞毒性:依据 GBT 16886.5—2003《医疗器械生物学评价第 5 部分体外细胞毒性试验》,设立空白对照组、阴性对照浸提液组、阳性对照液组、100%、50%和 25%浓度的材料 A 浸提液组,共 6 个组。

2.5 浸提液的制备

1) 供试品浸提液的制备:称取 4.0 g 材料,用纯净水冲洗干净,用滤纸吸干后,制成 10 mm×50 mm 块状,进行 115℃高压灭菌 30 min,以含 RPMI1640 完全培养液为浸提介质,按照 0.2 g 样品/mL 浸提介质,37℃振荡浸提 24 h,分别制备出浸提液 20 mL。取上清液作为 100%样品浸提液,然后用 RPMI1640 完全培养液配成 50%和 25%浓度。

2) 阴性对照液提液的制备:准确称取 2.0 g 高密度聚乙烯材料,用纯净水冲洗干净,用滤纸吸干后,剪成约 10 mm×50 mm 块状,进行 Co60 辐照灭菌,以含 RPMI1640 完全培养液作为浸提介质,按照 0.2 g 样品/mL 浸提介质,37℃振荡浸提 24 h,制备出浸提液 10 mL。

3) 阳性对照液提液的制备:含 6.3%苯酚的 RPMI1640 完全培养液。

4) 空白对照液提液的制备:不含供试品材料的 RPMI1640 完全培养液。在浸提期间,置于与供试品材料同样的容器中并采用同样的浸提条件。

2.6 实验方法及结果评价

1) 实验方法:用 RPMI1640 完全培养液培养 L-929 细胞,当细胞达到其对数生长期末细胞趋于融合时,用消化液消化细胞,用细胞培养液制成 1×10^4 个/mL 的细胞悬液;将细胞悬液接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ L,轻轻水平转动培养板使细胞均匀地分散在皿孔表面;置 37℃、5%二氧化碳培养箱中培养 24 h;弃去原培养液,每组加入 100 μ L 的空白对照液、阴性对照浸提液、25%、50%和 100%浓度的材料 A 浸提液、阳性对照液,每组设 8 孔(不使用边缘孔,边缘孔用 PBS 填充);置 CO₂ 培养箱中继续培养 72 h,显微镜下观察细胞形态;每孔加入 噻唑兰(MTT)溶液 20 μ L,继续培养 4 h。弃去孔内液体,每孔加二甲基亚砷(DMSO)150 μ L,轻轻振荡 10 min;用酶标仪测定每孔的吸光度,测定波长为 570 nm,参考波长为 630 nm。

2) 结果评价:a. 细胞相对增值率(RGR)的计算:

$$RGR = \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{空白对照组 OD 值}} \times 100\%$$

b. 显微镜观察细胞毒性分级标准。细胞毒性分级标准:0 级,无反应,细胞形态正常,贴壁生长良好,胞浆内有离散颗粒,无细胞溶解;1 级,反应极轻,至多 20%的细胞呈圆形,疏松贴壁,偶可见细胞溶解;2 级,反应轻微,至多 50%的细胞呈圆形,无胞浆内颗粒,明显可见细胞溶解和细胞间空间;3 级,反应中度,至多 70%的细胞呈圆形或溶解;4 级,反应重度,细胞层几乎完全破坏。

3) RGR 与细胞毒性分级的关系判断标准:0 级,RGR $\geq 100\%$;1 级,RGR 为 80%~99%;2 级,RGR 为 50%~79%;3 级,RGR 为 30%~49%;4 级,RGR 为 0%~29%(要求阴性对照组的反应不大于 1 级,阳性对照组反应大于 3 级)。

3 结果

3.1 各组的细胞毒性级别

6 组的细胞毒性如下所示。空白对照组:0 级;阴性对照浸提液组:1 级;阳性对照组:4 级;100%浓度材料浸提液组:2 级;50%浓度材料浸提液组:2 级;25%浓度材料浸提液组:1 级。

3.2 各组的细胞增殖率测定

100%浓度材料浸提液组、50%浓度材料浸提液组、25%浓度材料浸提液组培养 72 h 后细胞 OD 值分别是 0.694 ± 0.045 、 0.759 ± 0.0364 和 $0.850 \pm$

0.044;RGR值分别是(66.2±4.3)%、(72.4±6.1)%、(81.1±4.2)%。阴性对照浸提液组(OD值为0.914±0.065,RGR为(87.2±6.2)%)、100%浓度材料浸提液组、50%浓度材料浸提液组、25%浓度材料浸提液组和阳性对照浸提液组(OD值为0.190±0.011,RGR为(18.1±1.1)%与空白对照组(OD值为1.047±0.053,RGR为(100.0±5.1)%比较,差异有统计学意义($t=2.78,P<0.05$);空白对照组、100%浓度材料浸提液组、50%浓度材料浸提液组和阳性对照液组OD值与阴性对照浸提液组比较,差异有统计学意义($t=3.04,P<0.05$)。

3.3 细胞毒性光学显微镜下观察结果

在细胞培养24 h、48 h、72 h后分别倒置显微镜观察可见:空白对照组细胞贴壁生长,数量逐渐增加,折光性强,多为长梭形和多角形,并见圆形分裂状态细胞;在培养72 h后,阴性对照浸提液组约85%以上的细胞形态正常、贴壁生长良好、胞浆内有离散颗粒,偶见细胞溶解;阳性对照液组细胞数量明显减少,细胞变圆缩小、甚至崩解;25%材料浸提液组从培养48 h后开始有细胞圆缩,可见一小部分的细胞溶解,在培养72 h后,约有20%的细胞呈

圆形或溶解;50%、100%材料浸提液组从培养48 h后开始有细胞圆缩,明显可见细胞溶解和细胞间空间,在培养72 h后,约有30%、35%的细胞呈圆形或溶解(见图1)。

4 讨论

放置IUD是目前公认的一种放置时间较长、安全可靠、长效简便、经济和可逆的避孕方法。经数代研究者努力,IUD的有效性和安全性都有了显著的提高,大大提高了育龄妇女对IUD的接受性。国内外研制出的不同类型的IUD,各有优劣:如活性IUD的避孕效果好于惰性IUD,失败率降低;IUD的铜面积越大,避孕失败率越低;含孕激素IUD虽避孕失败率低,但易出现闭经等副反应;新型无支架的GyneFix在降低脱落率、妊娠率方面优于Tcu380A IUD,但放置失败率较高^[5]。目前,众多类型的仍存在脱落、妊娠、出血、疼痛等副反应^[6],影响了IUD的推广使用。通过对IUD使用的流行病学调查发现,IUD的质量及在子宫腔中面积大小和类型与放置IUD后月经失血量的多少、疼痛、脱落和意外妊娠有关^[7]。为了适应子宫在静止或收缩时的

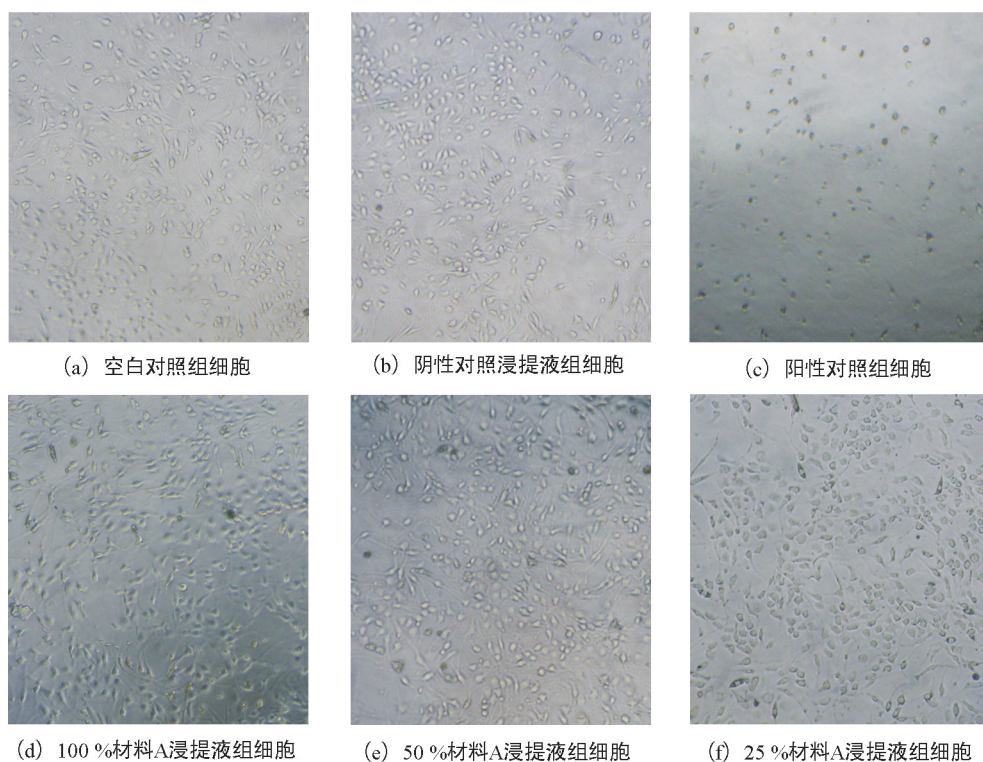


图1 6组细胞培养72 h光学显微镜图片

Fig. 1 Optical microscope images of six groups of cell to culture 72 h

形态,增强宫腔对IUD的适应性,人们发明了多种形态各异的IUD,但是仍然不能完全摆脱上述副作用的困扰。目前使用较多的圆型、元宫型及T型IUD等都是以金属或塑料为支架,加上铜套或铜线,放置到子宫内发挥其避孕作用。随着妊娠病理、生理的深入研究和相关学科的发展,人们对IUD避孕原理的认识进一步加深,要求对IUD形态和材料进行相应的改进和革新。因此,研制一种新型宫内节育器,在不影响IUD避孕效果的基础上减轻IUD的副反应具有显著的临床意义。

笔者根据IUD与宫腔有效接触可阻止妊娠的原理,利用球囊的可变形性和可扩张性,一方面使之与子宫内膜有尽可能大的接触面积从而阻碍胚胎的着床,有效阻止妊娠;另一方面也增加IUD在宫腔内的顺应性,使IUD的形状和大小与宫腔的形态尽可能相适应,从而减少脱落及不适感的发生。硅橡胶对人体无刺激具有良好的生物相容性,作为长期植入体内的材料已经得到广泛的应用。其性质主要与直链聚硅氧烷的化学结构有关,其分子主链由Si—O—Si链组成,具有优良的热氧化稳定性,在用于人体的时候表现出了无毒及生理惰性,与皮肤接触不引起刺激,具有选择透气性、缓释的功能。利用其这一特点,设想利用特殊的硅橡胶制作成IUD置入宫腔可以有效地减轻IUD对子宫内膜的刺激,避免现有IUD的副作用。在参考目前常用的植入人体的医用材料基础上,笔者研制出特定配

方的医用硅橡胶材料用于囊型IUD的制作,此种材料具有重量轻、软硬适中、具有一定的弹性、耐腐蚀性和一定控释性等性能,这样一方面不增加IUD本身的质量,另一方面又可以减轻对子宫的刺激。笔者研究在对囊型IUD的形态与规格进行合理设计的基础上,对研制的高分子硅橡胶材料性能进行测试,对其细胞毒性的潜在性作出评价。选用小鼠成纤维细胞L-929,通过不同浓度的供试材料浸提液培养细胞后观察细胞形态和细胞增值率。结果根据GBT 16886.5—2003 医疗器械生物学评价第11部分标准判定,所测囊型宫内节育器避孕材料细胞毒性分别为2级、2级、1级,为临床的安全使用提供依据。

参考文献

- [1] 邹燕,雷贞武. 宫内节育器的流行病学研究近况[J]. 实用妇产科杂志, 2003, 19(6): 321-323.
- [2] 吴尚纯. 宫内节育器的开发和应用状况[J]. 实用妇产科杂志, 2003, 19(6): 323-324.
- [3] 朱国平,袁林静,伍园园. 囊型宫内节育器:中国. 200920236648.3 [P]. 2009-09-29.
- [4] 李志才,郭建华,方伟镇,等. 模拟宫腔液对加成型液体硅橡胶性能的影响[J]. 合成材料老化与应用, 2014, 43(5): 5-8.
- [5] 彭祥焯,胡姗姗,熊承良. 宫内节育器材料与应用研究进展[J]. 数理医药学杂志, 2012, 25(2): 222-225.
- [6] 钟兴明,朱国平,韦相才,等. 影响宫内节育器放置次数的各种因素分析[J]. 中国综合临床, 2009, 25(4): 23-25.
- [7] 朱国平,钟兴明,韦相才,等. 广东省12种宫内节育器致子宫异常出血的对比研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2009(9): 38-40.

Study on cytotoxicity of contraceptive materials of scrotiform intrauterine device

Zhong Xingming¹, Wei Xiangcai¹, Zhu Guoping¹,
Li Yanqiu¹, Wu Yuanyuan¹, Li Zhicai², Guo Jianhua²,
Zeng Xingrong²

(1. Guangdong Family Planning Research Institute, Guangzhou 510600, China; 2. School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510500, China)

[Abstract] Objective: To evaluate the cytotoxicity of contraceptive materials of scrotiform intrauterine device (IUD). Method: Make a cytotoxicity experiment with the additional liquid sil-

icone rubber newly developed (formula: vinyl silicone oil, hydrogen silicone oil, and 1-ethynylcyclohexanol) in accordance with Part 5 of *GBT 16886.5—2003 Biological Evaluation of Medical Devices*. Six groups in total including blank control group (with no RPMI1640 complete culture solution of the experimental material), negative control extract solution group (high density polyethylene material), positive control solution group (with RPMI1640 complete solution of 6.3% phenol), 100%, 50% and 25% material extract group were set. Cultivate L-929 cell with RPMI1640 complete culture medium; add 100 μ L blank control solution, negative extract solution and 25%, 50% and 100% material extract solutions, and observe cellular morphology under the microscope; and measure OD (optical density) value with a microplate reader and observe proliferation rate of the cells. Results: Blank control group, negative control extract solution group, positive control solution group, 100%, 50%, 25% material extract group's cell cytotoxicity of experimental materials are in level 0, 1, 4, 2, 2 and 1 respectively. After 72 hours, 25%, 50% and 100% material extract solution had $(66.2 \pm 4.3)\%$, $(72.4 \pm 6.1)\%$, and $(81.1 \pm 4.2)\%$ cell proliferation. The OD value differences of negative control extract solution group, 100%, 50%, 25% material extract solution group and positive control extract solution group own statistical significance ($P < 0.05$), the OD value differences of blank control group, 100%, 50%, 25% material extract solution group and negative control extract solution group own statistical significance ($P < 0.05$); the OD value difference of 25% material extract solution group and negative control extract solution group does not own statistical significance ($P > 0.05$). Cell cytotoxicity of experimental materials are in level 2, 2 and 1 respectively. Conclusion: Accordance with Part 11 of *GBT 16886.5—2003 Biological Evaluation of Medical Devices*, experimented silicone rubber material complies with the requirements for cell cytotoxicity experiment of biological materials and medical devices.

[Key words] intrauterine device; silicone rubber material; cytotoxicity; animal experiment; mouse