

应用 UDS 和微核试验评价磷酸镁骨黏合剂的遗传毒理效应

张秉文¹ 俞永林^{1△} 刘昌胜² 郭瀚² 陈红红⁴ 钟高仁³ 黄煌渊¹

¹复旦大学附属华山医院骨科 上海 200040; ²华东理工大学生物材料研究所 上海 200237;

³复旦大学药学院放射药理学研究室 上海 200032; ⁴复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

【摘要】 目的 从遗传毒理学角度探讨磷酸镁骨黏合剂(magnesium phosphate cement, MPC)的遗传毒理学特性,为其在骨缺损修复领域的临床应用提供依据。**方法** 将磷酸镁骨黏合剂制备浸提液,生理盐水作为阴性对照,采用程序外 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis, UDS)检测法,硫酸镍为阳性对照,对渗入氚标记的胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)的人外周血淋巴细胞液 DNA 做液体闪烁计数,测定³H-TdR 掺入量的每分钟放射计数(radio counting per minute, CPM)值;采用小鼠骨髓嗜多染红细胞核试验,阳性对照组为环磷酰胺(CPA),测试其对小鼠骨髓嗜多染红细胞的微核率。**结果** UDS 试验结果显示:实验组(MPC 浸提液)的 CPM 均值为 35.98,而阴性对照组的 CPM 值仅为 14.75,实验组不同浓度 MPC 浸出液的 CPM 值均略高于阴性对照组(生理盐水组),但差异无显著的统计学意义($P>0.05$)。然而,考虑实验组 MPC 浸提液的 CPM 均值(35.98)远低于阳性对照组(不同浓度 NiSO₄)的 CPM 均值(415.38),且有显著的统计学差异($P<0.01$)。因此,可以认为 MPC 浸提液不会引起 DNA 损伤。微核试验的结果显示:实验组引起股骨骨髓嗜多染红细胞的微核率与生理盐水阴性组比较,差异无显著意义($P>0.05$),而实验组与阳性组之间存在明显差异($P<0.05$)。**结论** 磷酸镁骨黏合剂不会引起人外周血淋巴细胞程序外 DNA 合成增加,也不会引起骨髓嗜多染红细胞微核率增加。提示此骨黏合剂不会引起 DNA 损伤,也不会引起骨髓细胞突变作用。

【关键词】 磷酸镁骨水泥; 骨黏合剂; UDS 试验; 微核试验; 遗传毒理

【中图分类号】 R 68; R 318.17 **【文献标志码】** A

Genetic toxicity evaluation of magnesium phosphate cement by UDS test and micronucleus test

ZHANG Bing-wen¹, YU Yong-lin^{1△}, LIU Chang-sheng², GUO Han²,

CHEN Hong-hong⁴, ZHONG Gao-ren³, HUANG Huang-yuan¹

¹Department of Orthopaedics, Huashan hospital, Fudan university, Shanghai 200040, China; ²Institute of Biomaterial, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; ³Department of Radiopharmacy, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China; ⁴Institute of Radiological Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To study the inherent toxicology of magnesium phosphate cement(MPC) for its clinical use. **Methods** The MPC diffusion was detected through unscheduled DNA synthesis (UDS) test. Physiological saline and NiSO₄ were used as the negative and positive control, respectively. The marker of observation was the radio counting per minute (CPM) in human peripheral blood lymphocyte, which contained ³H-TdR. Physiological saline and CPA were used in the micronucleis test as the negative and positive control, respectively. The marker of observation was the mutagenesis rate of murine typhoid salmonella (MR). **Results** The results of UDS test showed that the CPM of the negative control group (the saline group), was 14.75. However, the mean of CPM of different concentration MPC leachate in the experimental group was 35.98, a little higher than CPM in

the negative control group. There was no significant difference ($P > 0.05$) between the negative control group and the experimental group. Because the CPM of the experimental group (35.98) was much lower than the CPM of the positive control group (415.38). Therefore, we considered that MPC did not cause the damage of DNA. The micronucleus test showed that there was no significant difference between the mutagenesis rates of murine typhoid salmonella in different concentration MPC leachate and the negative control group ($P > 0.05$), while the MR showed significant difference between the positive control group and the experimental group ($P < 0.05$). **Conclusions** MPC does not cause the increase in the unscheduled DNA synthesis of human peripheral blood lymphocyte and the back mutation in murine typhoid salmonella, which showed that this cement would not cause gene mutation and DNA damage.

【Key words】 magnesium phosphate cement; adhesive cement of the bone; UDS test; micronuclei test; inherent toxicology

骨组织是人体最大、也是最容易引起损伤的组织器官。骨折严重地危害着人类的健康,是临床上最常见的疾病之一。不稳定骨折是其中数量较大、有时治疗很困难的骨折,尤其是粉碎性骨折,骨折后形成的细小碎片难以复位、固定,即使固定后也极易移位,有时还伴有骨缺损。对严重粉碎性骨折和骨缺损的治疗与修复一直是困扰临床骨科医生的难题之一。

由刘昌胜研制成功的磷酸镁骨水泥(magnesium phosphate cement, MPC),由于其骨黏合强度大,故又称磷酸镁骨黏合剂。是由氧化镁、磷酸盐、缓凝剂及固化液混合制备而成的一类反应型胶黏材料,在动物实验中较传统的磷酸钙骨水泥生物强度高,生物降解速度快。除本课题组已报道的研究成果外,仅有1篇相关报道^[1]。该研究成果已经获得中国发明专利和美国专利。

在获得专利前,对产品的细胞毒性、皮肤致敏、皮内刺激和急性全身毒性进行了检测。检测结果表明:各项检测全部合格,证明材料无毒,可以安全地用于动物体内开展后期的动物实验^[2]。

我们与刘昌胜合作,以家兔为动物实验。结果显示, MPC的黏结强度明显大于传统的磷酸钙骨水泥,可以对细小非负重区域的骨折片进行直接黏合;该材料生物相容性好,可与周围骨质紧密结合,而且材料可降解^[3],且无内脏毒性^[4]。

为了深入研究此产品的生物安全性,作者进行了 MPC的遗传毒理试验。采用 MPC的浸出液在体外做试验,试验项目包括 Ames 试验、微核试验及程序外 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis, UDS)试验。Ames 试验显示 MPC不会引起鼠伤寒沙门菌的回复突变数增加,提示磷酸镁骨黏合剂不会引起基因突变,已另文投稿。本文报道微核试验及 UDS 试验的结果。

材料和方法

检测材料 MPC的专利授权号为:ZL01105373.9(无机骨黏合剂的制备及其在硬组织修复中的应用), PCT国际专利:PCT/CN01/00282(无机骨黏合剂的制备及其在硬组织修复中的应用),刘昌胜为第一发明人。浸提液的制备:取50 g磷酸镁骨黏合剂于小烧杯中,加入生理盐水100 mL,以锡纸封口,置37℃恒温水浴浸泡72 h材料浸提液,过滤除菌后,该液在24 h内进行试验。

UDS 试验 采用新鲜人外周血(不分离淋巴细胞的全血),加入10 mL RPMI 1640 培养液(内含5%小牛血清,20 mmol/L 羟基脲和³H-TdR 20 uCi/mL),混匀后将以上含³H-TdR 标记物的外周血0.5 mL分装至试管中。实验组加入磷酸镁骨黏合剂浸出液2、5、10、25、100和200 μL(不满200 μL用生理盐水补到200 μL)。阴性对照组为生理盐水,200 μL。阳性对照组为硫酸镍(NiSO₄·6H₂O, 国药集团化学试剂有限公司,分析纯),加入0.01、0.1和1 mmol/L的NiSO₄溶液各200 μL。

在37℃恒温水浴中震荡4 h,然后用2 mL冰浴中冷冻的生理盐水终止反应。吸取终止的反应液到湿润的49型玻璃纤维滤纸上,真空抽滤,分别用蒸馏水6 mL×2次洗去游离的³H-TdR,3 mL 5%的三氯乙酸固定,3 mL 75%乙醇及无水乙醇脱水和除色。将滤膜37℃烘干后,滤膜片平置于闪烁杯底,加入1 mL 闪烁液(PPO 0.1%, POPOP 0.04%),在Backman 双道液体闪烁计数仪上测定每分钟放射计数(CPM)值,了解DNA修复合成情况。各做8个平行样本。

微核试验 取健康昆明种小鼠,体重在18~20 g,雌雄各半,共5组,每组10只。其中3组分别在腹腔内

注射 0.1 mL 的 MPC 浸提液(浓度分别为原液、1/2 原液浓度、1/4 原液浓度)。以注射 0.1 mL 生理盐水作为阴性对照组;以注射环磷酰胺(CPA)作为阳性对照组,药物浓度为 100 mg/kg。均采用 4 次给药法,每次间隔 24 h,于第 4 次给药后 6 h 处死动物。取股骨骨髓制片,Gimsa 染色。每只动物观察 1 000 个嗜多染红细胞中微核细胞数。

结 果

UDS 实验结果 方差分析结果表明:实验组

(不同浓度的 MPC 浸出液)的每分钟放射计数值有浓度依赖性,即随着加入磷酸镁骨黏合剂浸出液的浓度增加,其 CPM 值也逐步增加。但不管何种浓度,实验组的 CPM 值均远低于阳性对照组(不同浓度 NiSO₄)的 CPM 值,且有显著的统计学差异($P < 0.01$)。实验组(不同浓度的 MPC 浸出液)CPM 略高于阴性对照组(生理盐水组),但差异无显著性意义。说明磷酸镁骨黏合剂浸出液对人外周血淋巴细胞 DNA 无损伤作用。各组试剂 UDS 实验结果见表 1。

表 1 各组试剂对人外周血淋巴细胞³H-TdR 掺入量的结果

Tab 1 The content of ³H-TdR contained in peripheral blood lymphocyte in different groups

Positive control (Different density of NiSO ₄ , mmol/L)	CPM ($\bar{x} \pm s$)	Experimental group (Different density extracts of MPC, %)	CPM ($\bar{x} \pm s$)	Negative control (Physiological saline, %)	CPM ($\bar{x} \pm s$)
0.01	289.50 ± 145.41	1	24.63 ± 5.78	0.9	14.75 ± 3.11
0.10	461.52 ± 160.08	2.5	30.38 ± 8.93		
1.00	495.13 ± 127.89	5	34.63 ± 7.95		
Mean	415.38 ± 166.36	12.5	41.38 ± 13.28		
		50	43.13 ± 12.26		
		100	41.75 ± 10.31		
		Mean	35.98 ± 11.47		14.75 ± 3.11

微核试验结果 微核试验结果归纳于表 2。

表 2 各组微核试验结果

Tab 2 The results of micronuclei test in different groups

Name of group	Number of micronuclei
Negative control (Physiological saline)	3.2 ± 0.6
Positive control (Cyclophosphamide)	46 ± 3.1
25% density of extracts of MPC	2.9 ± 0.9
50% density of extracts of MPC	2.7 ± 0.7
100% density of extracts of MPC	2.9 ± 1.0

各组动物股骨骨髓嗜多染红细胞的微核率经过 χ^2 检验,试验组微核率与阴性对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),而实验组和阳性对照组差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明 MPC 对动物骨髓细胞无致突变作用。

讨 论

骨科医生在临床上常遇到不稳定骨折的患者,有时治疗很困难。尤其是粉碎性骨折,骨折后形成的细小碎片难以复位、固定,即使固定了也极易移位,有时还伴有骨缺损,对其治疗与修复一直是困扰临床骨科医生的难题之一。若能研制出一种理想的可降解的黏合材料直接黏合骨折,而且其黏合强度足以不用内固定,则可以使病患者免除再次手术取内固定物的痛苦。

我们在以往的研究中,将 1.5 g 磷酸镁骨黏合剂置入体重为(1.8 ± 0.3)kg 重的家兔股骨髓内,即置入量为 0.75 g/kg(体重)。而平时骨科手术中一般置入 5 g 左右的骨水泥,若人体重量以 60 kg 计算,仅置入 0.083 g/kg(体重)。也就是说,我们置入兔内的剂量是人体内实际用量的 9.04 倍。即使置入如此大的剂量后,我们测得的家兔肝、肾功能正常,心、脑、肝、肾病理检查阴性^[4]。所以我们认为,磷酸镁骨黏合剂应用于人体是安全的,无内脏毒性。

遗传毒理学一方面研究环境诱变剂的致突变作用机制及其与致癌、致畸作用的关系,另一方面又研究、开发新的测试方法用以鉴别、评价环境因子和新合成化学品的三致作用,以预防和减少它们对人类的危害。因此本学科的研究具有重要的理论与实践意义。遗传毒理学亦可视为毒理学的一个分支,从遗传学的改变观察毒理学效应。在经典毒理学中,更多关注的是短期毒理效应,而遗传毒理学则主要关注遗传毒性的远期效应。这包括致畸作用:环境因子主要作用于一定发育阶段的胚胎细胞,导致器官发育异常,形成畸形。致癌作用:一些环境因子在无明显毒性反应时,诱变肿瘤形成。诱变作用:低于毒性剂量的环境因子诱发基因突变和染色体畸变。这一过程如发生在生殖细胞,可增加后代遗传病的发病率^[5]。

因此,作为体内植入的可吸收性生物医用材料,

对其生物学特性要求极为严格。在一种新型材料临床应用前,须完成其毒理学特性检测,综合评定其生物学特性是否符合医用要求^[6]。由于生物材料长期接触或植入体内,应进行上述的三致试验(即致癌、致畸、致基因突变试验)^[7]。

在短期试验中,UDS 试验通过测量受损 DNA 的切除修复合成,反映了理化因素对 DNA 分子损伤作用的程度。UDS 试验操作简单,特异性好,生物学意义高,目前已成为检测化学物质致癌性或致突变性的快速、短期筛选的试验之一。UDS 试验是指与 DNA 修复有关的合成过程,它不同于细胞在 S 期进行的 DNA 半保留复制,无论原核细胞还是真核细胞,都具有一系列酶学修复机制,可使由外源性理化因素所致的 DNA 损伤得以修复。这种 DNA 修复合成是发生在 S 期以外的,故称为程序外 DNA 合成。该过程的加强是 DNA 损伤的表现之一。DNA 损伤是细胞癌变的关键步骤,损伤修复的失败可使机体产生肿瘤。

本次的 UDS 试验是将氚标记的胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入到非 S 期的人外周血淋巴细胞新合成的 DNA 中,对受处理的细胞 DNA 做液体闪烁计数,测定在 DNA 修复合成时³H-TdR 的掺入量,与对照进行比较,以评价受试物致 DNA 损伤的效应。因此,UDS 试验通过测量受损 DNA 的切除修复合成,反映了理化因素对 DNA 分子损伤作用的程度。

本试验结果显示(表 1),实验组(MPC 浸提液)的 CPM 均值为 35.98,而且不同浓度 MPC 浸出液的 CMP 值均略高于阴性对照组(生理盐水组),而阴性对照组的 CPM 值仅为 14.75,但差异无显著性意义($P>0.05$)。然而,考虑实验组 MPC 浸提液的 CPM 均值(35.98)远低于阳性对照组(不同浓度 NiSO₄)的 CMP 均值(415.38);且有显著的统计学差异($P<0.01$)。因此,我们仍然可以认为,MPC 浸提液不会引起 DNA 损伤。说明磷酸镁骨黏合剂用于体内植入是安全的,为进一步动物实验及临床应用提供了生物安全性依据。

微核试验是公认的检测染色体异常的简便方法。微核是真核类生物细胞中的一种异常结构,往往是细胞经辐射或化学药物的作用而产生的。在细胞间期,微核呈圆形或椭圆形,游离于主核之外、大小为主核的 1/3 以下。微核的形成是细胞受遗传毒物作用后的一种遗传学终点。以观察细胞中微核的形成来检测遗传毒物,称为微核试验。该试验因其快速、简便成为广泛使用的遗传毒理学试验之一。特别是应用小鼠骨髓红细胞微核检测方法,目前已成为一种能获得大量客观数据的化学物质遗传毒性评价体系。

微核试验是用短期遗传毒性试验来评价 MPC

的遗传毒性。小鼠骨髓嗜多染红细胞核试验是目前应用最为广泛的微核试验^[8]。与人类实际暴露剂量比较,小鼠 MNT 所给药剂量常更高。经腹腔给予的待测物,经门脉系统入血,并进入肝脏代谢转化。骨髓中的红细胞经过数次分裂,最后脱核成为成熟红细胞。脱核后早期,红细胞内血红蛋白的主要成分球蛋白的合成旺盛,因此胞质中存在大量的 RNA,形成嗜多染红细胞,随着球蛋白合成完毕,RNA 完全分解,嗜多染红细胞逐渐形成成熟的正染红细胞。红细胞最后一次脱核时,胞质中的微核并不能通过脱核而排出,仍然残留在细胞质中,形成极易判别的、仅含有微核的嗜多染红细胞。

微核试验与染色体畸变试验有良好的相关性^[9,10]。有学者比较了数十种化合物,其中 80% 两种实验是一致的。因此 MPC 在本次的微核试验中与生理盐水阴性对照组之间无显著差异,与阳性对照物之间存在显著差异,说明 MPC 浸提液对生物骨髓细胞无遗传毒性。

但是微核试验仍存在不足之处。有研究发现尽管微核率与患癌率有较好的相关性,但实验数据重复性并不高,报道差别也较大,一些学者认为不产生断片的稳定染色体结构改变(如平衡易位)对致癌更有意义,但常规微核试验无法测出。近年来非遗传毒性诱癌物已被发现,突变不是致癌的充分条件,而且突变也不一定致癌。评判诱癌性必须将多种试验结合,单用微核试验价值有限,仍需结合其他遗传毒理学试验^[11]。

综上所述,尽管学者们努力改变磷酸钙骨水泥的性能^[12,13],但磷酸镁骨黏合剂与磷酸钙骨水泥相比,具有凝结快,生物降解速度快等特性,其水化过程放热速率可以通过调节酸碱组分活性及加入缓凝剂来控制,水泥浆体具有良好的塑性和胶黏性,水化产物为磷酸镁铵之类的产物,生物相容性高。诸多优良的特性使其有望用于不稳定骨折的黏合治疗及人工关节假体的黏结固定。如果这一新型无机骨黏合剂的研制获得成功,将彻底改变骨折内固定术的治疗面貌,给骨折的治疗带来一场革命。这不仅具有很大的社会效益和经济效益,而且对推动生物材料的发展有着重要的学术价值。

参 考 文 献

- [1] Waselau M, Samii VF, Weisbrode SE, et al. Effects of a magnesium adhesive cement on bone stability and healing following a metatarsal osteotomy in horses[J]. *Am J Vet Res*, 2007, 68(4): 370-378.