

[文章编号] 1004- 0609(2001) 06- 0960- 06

金属毒性研究(I)^①

阮建明¹, M. H. Grant², 黄伯云¹

(1. 中南大学 粉末冶金国家重点实验室, 长沙 410083;

2. Bioengineering Unit, Strathclyde University In Glasgow, Glasgow G4 0NW, UK)

[摘 要] 采用体外细胞培养模式, 通过测定细胞碱式磷酸酶(ALP) 活性及细胞四甲基偶氮砷(MTT) 还原能力, 对构成金属和合金生物材料的金属离子(Al, Ni, Cr, V, Ag) 的毒性进行了定量评估, 探讨了金属离子或原子对人体组织的毒害和腐蚀作用。结果表明微量六价铬离子表现出强烈的细胞毒性。当溶液离子度高于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 钒和镍亦表现强烈毒性。银离子和三价铬离子浓度高于 500 $\mu\text{mol/L}$ 后表现毒性。构成老年痴呆病成因的金属铝离子的毒性具有双向性。

[关键词] 生物材料; 金属毒性; 细胞分子生物学

[中图分类号] Q 819; TG 14

[文献标识码] A

严格地讲, 几乎所有种类的物质都对生物细胞和有机生命组织产生毒性和腐蚀作用, 只是根据不同浓度, 表现出不同程度的反应。修复人体各类缺陷的植入材料对生命组织产生的毒性和腐蚀短期以排异、红肿、疼痛等临床现象体现^[1~3], 长时则以破坏和摧毁人体器官生理功能来体现, 如免疫功能破坏, 大脑功能障碍等^[4~8]。体内用生物材料潜在毒性是生物相容性评定的重要部分。银、铝、铬、钒和镍等是组成人工骨关节、牙、内固定器件材料的重要金属元素, 也是产生肌体毒性作用的原因。长期以来, 材料学科偏重力学性能选择生物材料, 忽略植入体与周围组织间的生化反应。一般地, 用电镜对动物切片进行微观分析体内实验只能给出定性描述。如需获得定量结果, 要求饲养大量动物。作者采取体外细胞模式, 应用细胞分子化学技术, 测试细胞增殖能力及代谢功能, 定量研究了生物材料与组织间的相互作用。探讨了几种常用金属的细胞毒性, 从方法上拓宽了生物材料相容性研究的内涵。特别是出于社会道德的原因, 在动物试验受到限制的今天, 用体外细胞培养模式考察材料生化性质已成为不可或缺的重要部分。

1 实验

1.1 细胞采取与培养

动物成骨细胞采自四周小鼠头盖骨, 人体成骨

细胞采自成年男性下颌骨组织, 细胞经初代培养之后, 由病毒基因(SV40DNA) 磷酸盐沉淀技术转染后, 获得永生性(Immortalization), 成为连续性细胞系^[9, 10]。本项研究对初代细胞引入病毒基因, 进行细胞转染的根本目的在于增加细胞生成时间, 保证在有效传代次数中, 细胞具有相同基本属性和正常生理功能。连续性细胞系易于在液氮中保存和复苏。为比较初代细胞与连续细胞系二者的增殖能力, 首先对两种细胞(转染前和转染后) 的 DNA 核酸合成能力进行放射性胸腺嘧啶脱氧核苷(Thymidine; Td) 同位素定量测量, 考察连续细胞系的实践性。

1.2 金属离子溶液制备

不同浓度的金属离子溶液分别从各自的金属盐溶液制得, 金属盐包括 NiCl_2 , AlCl_3 , AgNO_3 , VOCl_3 , CrCl_3 (三价铬), CrCl_2O_4 (六价铬)。这些金属离子溶液与细胞培养基混和。对于动物细胞使用依格尔复合培养基, 对于人骨细胞使用哈姆斯-10 培养基。培养基中的离子浓度范围在 0.1~ 1 250 kmol/L 。

1.3 细胞形态观察和细胞生化性能测量

细胞四甲基偶氮唑盐(MTT) 还原能力测定在 96 孔板上进行。对人骨细胞, 每井下种密度为 5×10^4 , 对动物细胞, 每井下种密度为 2.5×10^4 。下种

① [收稿日期] 2000- 11- 14; [修订日期] 2001- 01- 16

[作者简介] 阮建明(1956-), 男, 教授, 博士。

24 h 后, 正常的培养基为金属离子的培养基替代, 接着培养 48 h, 去掉含金属离子的培养基, 每井中加入 50 μL 含 10 mmol/L MTT 的缓冲液(PBS)。再经 4 h 培养之后, 用吸管去掉含 MTT 的缓冲液。细胞产生的 MTT 还原产物用 200 μL 二甲基亚砷(Dimethyl Sulphoxide, DMSO) 溶解。然后该溶解液的吸光系数用生物 450 读数仪在 540 nm 处记录下来。

与此类似, 细胞碱式磷酸酶活性亦在 96 井培养板中进行。种植密度也如上所叙。细胞经 24 h 培养之后, 去除正常培养基, 用含有金属离子的培养基接着培养 48 h, 将培养板扣在软纸上, 轻轻拍掉井中的培养液, 然后, 每井中加入 60 μL 碱式磷酸酶溶剂, 并立即在 450 读数仪上记录 405 nm 处的吸光值。在室温条件下放置 10 min 后, 再次记录 405 nm 处的吸光值。由于金属离子浓度不同, 对细胞碱式磷酸酶活性产生不同影响。通过细胞的作用, 碱式磷酸酶溶剂由黄色转变成粉红。细胞碱式磷酸酶活性越高, 颜色转变程度越大, 波吸收能力越强。实验时, 以不含金属离子的培养基作为对照组。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养, 培养气氛是含 5% CO_2 的空气。

1.4 实验数据统计

所有数据收集下来, 在图上表示成平均值 $\pm$ 标准偏差。应用单因素方差分析评估所有实验数据统计显著性。

2 实验结果

2.1 细胞转染与形貌观察

图 1 所示为经 SV40 病毒 DNA 转染, 分别经过 18 次和经过 50 次传代培养的人类成骨细胞(A)和动物成骨细胞(B)的相差显微镜(Phase Contrast Microscopy, PCM)形貌观察。细胞生长状态呈现为正常, 细胞直径约在 10~20 μm , 图中用星号标示的圆形细胞(实际为球形)正处于细胞核 DNA 合成状态, 即细胞生命周期中有丝分裂前期。细胞密集贴附在培养皿底盘上, 表现经 SV40 病毒 DNA 转染, 人类成骨细胞经 18 次传代, 动物成骨细胞经过 50 次传代后, 仍有很强的增殖能力。与人类成骨细胞相比, 动物成骨细胞的接触限制较小, 单位面积上的细胞数多于人类成骨细胞在底盘细胞个数。正是这种原因, 动物成骨细胞能够长满底盘, 人类成骨细胞则只能长满底盘面积的 75%~85%, 并且一旦生长密度大于这一数值时, 由于营养供应受阻,

细胞生长停滞, 甚至出现凋零。未经 SV40 病毒转染的细胞, 传代次数和生命时间受到限制。特别是人类成骨细胞, 进行到第 7 次传代时, 单个细胞的体积虽有蛋白质合成数倍于正常细胞体积, 但 DNA 合成能力下降, 细胞增殖几乎停止, 如图 2 所示。

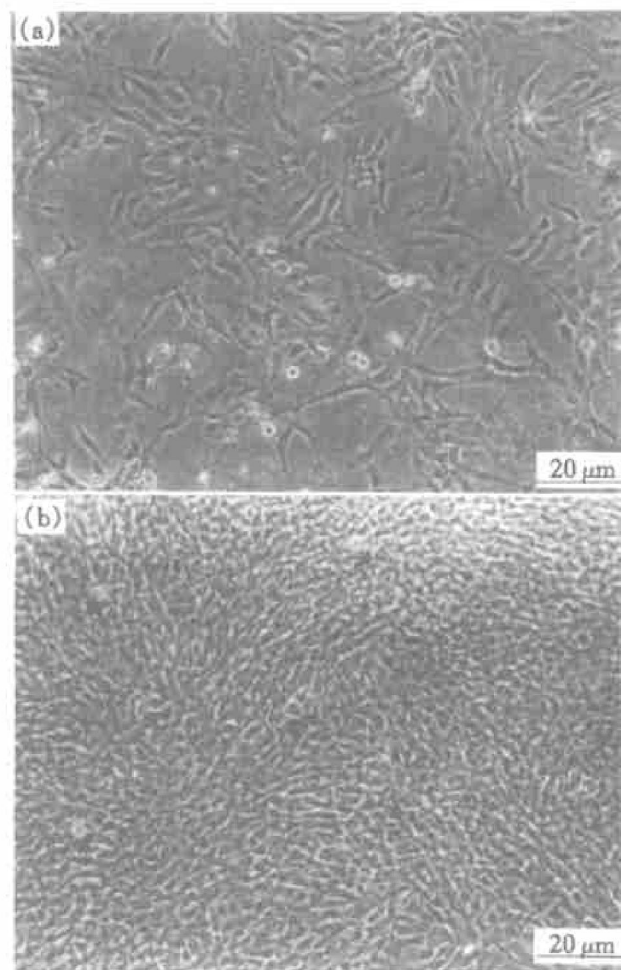


图 1 经病毒基因转染的人类成骨细胞(a)和动物成骨细胞(b)相差显微镜形貌观察(细胞培养在 24 井培养版中, 对于人骨细胞每井下种密度为 5×10^4 个, 对于动物细胞, 每井下种密度为 2.5×10^4 个。含 5% CO_2 的空气中培养 5 d)

Fig. 1 PCM morphologies of human (a) and rat (b) cells (after transfection)

图 3 所示是经 SV40 病毒转染和未经 SV40 病毒转染的细胞 DNA 合成定量分析, 表现细胞增殖能力。以放射性同位素胸腺嘧啶脱氧核苷(Thymidine; Td)组装进 DNA 中之后的单位时间内放射俘获点数(d. p. m.)表示。数值为平均值 $\pm$ 标准偏差, $n=10$ 。图中数据表明, 在前几次传代时, 未经病毒转染的细胞具有很强的 DNA 合成能力。随着传代次数增加, 增殖能力下降, 至第 7, 8 次传代后, 增殖几乎停止。经 SV40 病毒转染后的细胞具

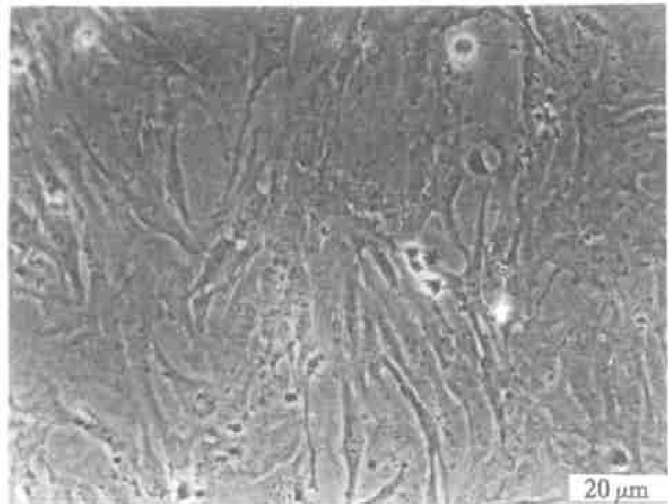


图2 未经病毒基因转染的人类成骨细胞相差显微镜形貌观察(细胞培养在24井培养版中,每井下种密度为 5×10^4 ,含5% CO_2 的空气中培养5 d)

Fig. 2 PCM morphology of human osteoblast cells (non-transfection)

有较均一的增殖能力。类似的情况出现在动物鼠骨细胞上,未经病毒转染的鼠骨细胞经第24次传代后,始出现显著的DNA合成下降。

2.2 ALP 活性

图4表现的是培养在含有不同金属离子浓度的培养基中人类成骨细胞(a)和动物成骨细胞(b) ALP 活性。图中ALP活性以活性百分率表达(增标),对照组被设定成100%。试验曲线特征显示,低浓度($< 10 \mu\text{mol/L}$) Al, Ni, Ag 离子都有促进细胞ALP活性增加的作用。在浓度小于 $100 \mu\text{mol/L}$ 之前,三价铬离子对细胞ALP活性影响不大,浓度大于 $100 \mu\text{mol/L}$,细胞ALP活性降低,三价铬离子的细胞毒性作用增加。浓度 $> 10 \mu\text{mol/L}$,金属镍离子的细胞毒性作用显著增加。浓度 $> 1 \mu\text{mol/L}$,金属钒离子的细胞毒性作用就有明显增强。六价铬离子的毒性最为显著。即使浓度 $< 1 \mu\text{mol/L}$,细胞毒性也无法避免。浓度小于 $500 \mu\text{mol/L}$,金属铝离子和金属银离子毒性微小。浓度大于 $500 \mu\text{mol/L}$,银离子毒性显著增加。只有当浓度接近 $1000 \mu\text{mol/L}$,Al离子毒性才变得显著。金属离子的毒性类似地反映在人类成骨细胞上,只是不如动物细胞那么显著。另一个差别是,低浓度的Al离子对人类成骨细胞ALP活性(191 ± 13)%的促进作用略高于动物细胞ALP活性(174 ± 12)%。低浓度的镍,银离子对人类成骨细胞ALP活性也存在促进作用,而且导致细胞毒性的镍离子浓度值上升($100 \mu\text{mol/L}$, (81 ± 9)%)。

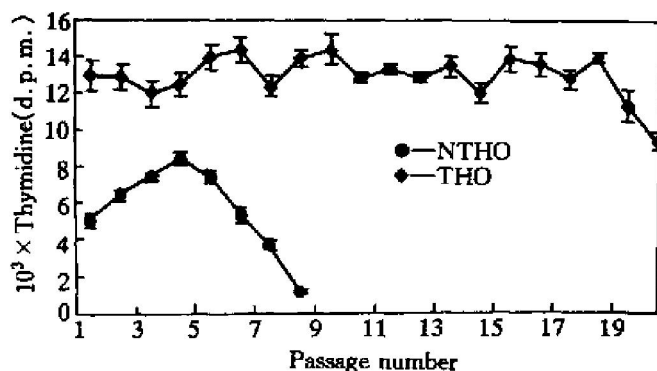


图3 经SV40病毒转染和未经SV40病毒转染的细胞DNA合成定量分析

Fig. 3 Measurements of cellular DNA syntheses, expressed by radioactive isotope Td incorporation into DNA

2.3 细胞 MTT

不同金属离子对鼠类成骨细胞MTT还原能力的影响如图5所示。表征细胞代谢能力随着金属离子浓度增加而降低。反映金属对生物系统的毒化效果。数值为平均值 $\pm$ 标准偏差, $n=10$,与细胞ALP活性相比,以细胞MTT还原反映细胞毒性,不是十分敏感。与金属离子对细胞ALP活性影响不同的是小浓度金属离子(Al, Ag, Ni, Cr(III))对细胞MTT还原能力的影响不显著,但是随着金属离子浓度增加,毒性增加,总的趋势亦相同。仍然是六价铬离子的毒性最为显著。金属钒离子浓度小于 $10 \mu\text{mol/L}$,即有毒性表现。当浓度大于 $50 \mu\text{mol/L}$,金属钒离子的毒性增加。镍离子浓度大于 $200 \mu\text{mol/L}$ 和银离子浓度大于 $500 \mu\text{mol/L}$ 后,有毒性。只有高浓度的铝离子(大于 $500 \mu\text{mol/L}$)对细胞MTT还原能力具有良好作用(107 ± 13)%,银(71 ± 12)%,镍(59 ± 9)%均无此种特性。这是基于不同细胞功能的表现,与ALP活性测定方法上存在差异。当铝离子大于 $1000 \mu\text{mol/L}$,也表现出细胞毒性(77 ± 11)%。不同金属离子对人类成骨细胞MTT还原能力的影响与对鼠类成骨细胞MTT还原能力的影响十分相似,实验结果在这里不再给出。

3 讨论

临床上许多应用发现由于体液的作用或机械摩擦,颗粒状金属可能从植入材料表面侵出脱落,或者是离子状态的金属从植入材料表面侵出,进入体液系统产生各种毒性反应。普遍的临床现象是金

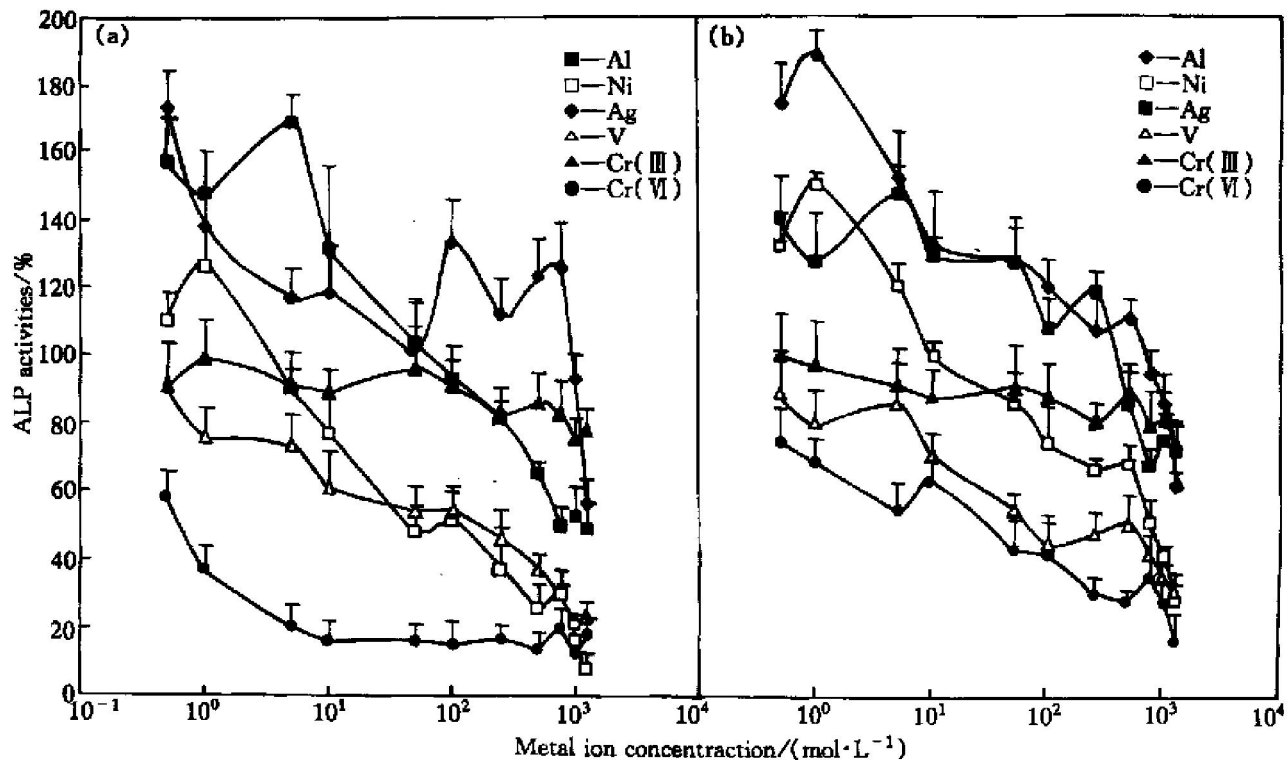


图 4 金属离子浓度对人类成骨细胞(a)和动物成骨细胞(b)细胞碱式磷酸酶活性的影响

Fig. 4 Effects of metal ion concentrations on cellular ALP activities

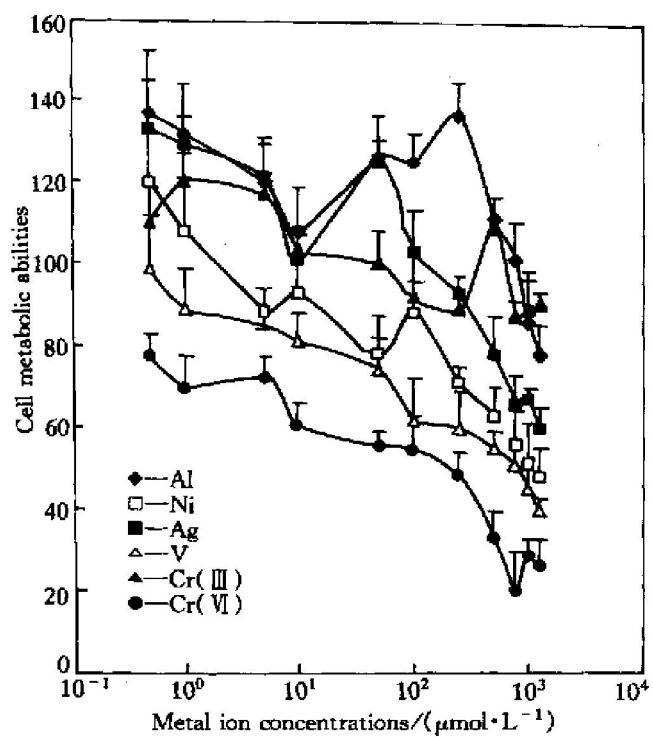


图 5 不同金属离子对鼠类成骨细胞 MTT 还原能力的影响

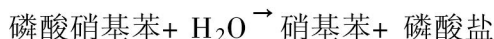
Fig. 5 Effects of metal ion concentrations on MTT reduce abilities of rat osteoblast

红血球中的铁原子, 将使血红细胞运载氧的能力减弱。有毒元素还可通过血液运载毒化神经系统。在微观水平上, 无论是血液毒性还是神经毒性, 最初的还是有毒物质被细胞吸收, 产生细胞毒性。由于涉及人文道德观念, 各种体内毒性研究在西方受到越来越大的限制, 体内定量研究也有其局限性。体外细胞毒性研究正走向国际化和标准化。本项研究涉及到的几种金属是目前构成临床应用合金生物材料的重要元素。如各类钛合金关节(Ti, Al, V), 316 不锈钢(Ni, Ti, Cr), 银镶牙(Ag, Hg), 心脏瓣膜, 血管扩张形状记忆合金(Ni, Cr)等, 虽然这些生物材料成功应用于修复各种软硬组织缺陷, 它们对生命肌体的潜在毒性的危险始终存在。危险程度取决于它们在生命体或在周围组织中的含量及其它因素的影响。体外细胞毒性研究应该正确反映体内情况, 保证数据可靠性, 要求细胞保留在体内的特征。初始细胞或传代次数较少的细胞能够较多地保留体内特征, 可是, 初始细胞传代次数非常有限, 而且不同代的细胞功能上存在差别, 导致实验数据误差。为获取大量数据, 也不可能采用同一代细胞。使用经病毒转染后成为连续细胞系的细胞较理想地解决了这一问题, 尽管连续细胞系的细胞在表型或表性与初始细胞存在差别(尚待研究)。本项研究首先考察了连续细胞系与初始细胞之间的增殖差异, 结果表明初始细胞老化快, 初始人类成骨细

属种植材料进入人体 2~ 3 a 之后, 围绕种植材料的周围软组织因毒蚀而变灰、变黑。进入体液的化学物质可对血液系统产生毒化作用。如有毒元素替代

胞只经几次传代,便出现增殖停滞和凋零现象,不利于重复实验。连续细胞系生存期延长,传代次数增加,不同代细胞增殖差异小,使用不同代细胞产生的误差小,有利于细胞长期保存和长期使用,以及获得可靠重复数据。值得注意的是,连续细胞系可能失去体内细胞的特征,如本研究观察到与初始细胞相比,连续细胞系细胞尺寸减小,细胞核与细胞质比例增大,生长速度加快等。

ALP 和 MTT 分析结果在细胞生物学上反映细胞生长,成熟和代谢活力。在含有金属离子的培养基中培养细胞,金属离子通透细胞膜,导致细胞功能障碍,使细胞增殖能力和代谢活力降低,体现金属离子对细胞的毒性作用。ALP 活性测量,是一种自动化程度很高的生化分析方法。在 ALP 的催化作用下,进行如下生物过程:



该水合反应吸收 405 nm 波,波的吸收强度正比于细胞的 ALP 活性,毒化后的细胞 ALP 活性降低以及成熟前的细胞毒化后凋零,细胞数量减少,使得 ALP 总量减少都可致使该水合反应放慢和不完全。因此细胞 ALP 活性分析能定量反映细胞毒性。

在细胞生物学过程中,MTT 测量显示活细胞内脱氢酶将四甲基氮偶唑盐还原成水溶性甲苷产物的能力,即细胞代谢能力。细胞代谢能力越强,代谢产物越多。中毒性细胞因代谢障碍,代谢能力下降,代谢产物减少。因此,细胞毒性及细胞数量与代谢产物量之间存在相应关系^[11]。在生化技术上进行代谢产物定量分析时,将代谢产物溶解,在溶解过程中或溶解之后,根据溶解液吸收某一特征波的强度与代谢产物在溶解液的浓度之间的对应关系,确定代谢产物的多少。一般地,在一定区间内,特征波吸收强度与溶液浓度间存在线性关系。与此同时,代谢产物的量与细胞数量相关。因此,MTT 测量也反映细胞增殖能力。

本项研究证明六价铬的细胞毒性最强,少量的铬即可导致细胞代谢能力下降,甚至直接导致细胞组织死亡。许多体内用生物材料和食物器皿用铬元素作为抗腐蚀,抗氧化成分,但对生物体毒性甚少研究。从机理上讲,对细胞功能产生毒害作用的是三价铬,然而六价铬的穿透细胞膜的能力高于三价铬。六价铬穿膜进入细胞后,还原成三价铬,破坏细胞功能,产生剧烈毒性^[12]。低浓度的镍(50 $\mu\text{mol/L}$)有限制糖蛋白合成的作用,同时还限制酶的催化活性,因此镍也表现较强的毒性。钒是 Ti-6Al-4V 钛中的主要合金元素,同样对细胞产生毒性。然

而,钒的细胞毒性机理至今尚未明了。铝的毒性机理比较特殊,铝是人类生活中接触最多的金属元素,铝的职业病研究发现,虽然铝元素在血液中、脾脏中,以及新生成骨的前锋部位含量较高,真正造成危害的是铝由转铁蛋白携带,穿过血脑屏障,在脑部神经中富集,导致神经功能障碍,临床表现为老年痴呆症^[4, 8]。本项研究表明微量的铝($< 5 \mu\text{mol/L}$)对细胞增殖有促进作用。本项研究还发现,贵金属银也存在毒性,而且产生毒性的银离子浓度($\approx 500 \mu\text{mol/L}$)还小于铝离子浓度($\approx 1\,000 \mu\text{mol/L}$)。有趣的是,人们根据贵贱和光泽,习惯上用银而不是用铝来包牙,镶牙,没有意识到银也是有毒的。

4 结论

1) 与未经病毒转染的初代细胞相比,连续细胞系表现出很强的 DNA 合成功能和增殖能力,细胞传代次数增加,老化过程显著延长。

2) 研究结果表明六价铬离子具有很强的细胞毒性,次之是镍和钒,三价铬离子的细胞毒性并不强烈。

3) 金属铝离子的细胞毒性具有双相特征。低浓度的铝离子促进细胞增殖,也促进细胞代谢功能。高浓度的铝离子则导致细胞毒性和细胞功能障碍。

4) 金属银离子的细胞毒性强度大于金属铝离子,提示人们对银的毒性应该有所警惕。

5) 从机理上就植入材料对周围组织的毒化,致使组织坏死,临床表现为排异、疼痛和炎症,提供了部分探讨和诠释。

[REFERENCES]

- [1] van Blitterswijk C A, Hesselink S C, Grote J J, et al. The biocompatibility of hydroxapatite ceramic—a study of retrieved human middle ear implants [J]. J Biomed Mater Res, 1990, 24: 433–453.
- [2] Nilsson K G, Cajander S, Karrholm. Early failure of hydroxyapatite coating on total knee arthroplasty—a case reported [J]. Acta Orthop Scand, 1994, 65: 212–214.
- [3] van Kooten T G, Klein C L, Hohler H, et al. From cytotoxicity to biocompatibility testing in vitro [J]. J Mater Sci: Med Mater, 1997, 8: 835–841.
- [4] Makoto O. Reassessment of long-term use of dense HA as dent implant—case report [J]. J Biomed Mater Res,

- 1998, 43: 318– 320.
- [5] Lugscheider E, Knepper M, Heinberg B, et al. Cytotoxicity investigation of plasma sprayed calcium phosphate coatings [J]. *J Mater Sci: Mater Med*, 1994, 5: 371– 375.
- [6] Linand O C C, Chao E Y S. *Perspective Biomaterials* [M]. Netherlands: Elsevier Publishers, 1995. 7– 33.
- [7] Leterrier J F, Langui D, Probst A, et al. A molecular mechanism for the induction of neurofilament bundling by aluminum ions [J]. *J Neurochem*, 1992, 58: 2060– 2070.
- [8] Mundy G R. Hormonal factors which regulate bone resorption [A]. Mundy and Martin T J. *Physiology and Pharmacology of Bone* [C]. Springer Verlag, 1995. 215– 247.
- [9] Macnair R A, Rodgers E H, Macdonald C, et al. The response of primary rat and human osteoblasts and immortalized rat osteoblast cell to orthopaedic materials — comparative sensitivity and several toxicity indices [J]. *J Mater Sci: Mater Med*, 1997, 8: 105– 111.
- [10] Ruan J, Rodgers E H, Grant M H. Distribution and proliferation of human osteoblasts on biomaterials [A]. *Proceedings of International Congress in Biological Technology* [C]. Edinburgh, 1998, 243– 247.
- [11] Sagouras D, Duncan R. Methods for the evaluation of biocompatibility of soluble synthetic polymers which have potential for biomedicine use — use of the tetrazolium-based colorimetric assay as a preliminary screen for evaluation of in vitro cytotoxicity [J]. *J Mater Sci: Mater Med*, 1990, 1: 61– 68.
- [12] Pelletier L, Druet P. Immunotoxicology of metals [A]. Goyer R A and Cherian M G. *Toxicology of Metals* [C]. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1995. 77– 92.

Approach of metal cytotoxicity(I)

RUAN Jian-ming¹, M. H. Grant², HUANG Bai-yun¹

(1. State Key Laboratory for Powder Metallurgy, Central South University,
Changsha 410083, P. R. China;

2 Bioengineering Unit, Strathclyde University, Glasgow G4 ONW, UK)

[Abstract] Cytotoxicity analysis is the critical testing of evaluating biomaterials in the ASTM, ISO standards. The approach has investigated in vitro the toxicity of metal ions (Al, Ni, Cr(III), Cr(VI), V, and Ag) that construct the metallic biomaterials. By measurements of cell alkaline activity (ALP) and reduction ability of cell MTT, the toxicity of prevalence metallic biomaterials has been studied, and furthermore, the poison and erosion of metal ions and atoms on human tissue are discussed. The results display that trace Cr(VI) shows serious cytotoxicity, and V as well as Ni is cytotoxicity if the ion concentration in culture medium is over 100 $\mu\text{mol/L}$. A strange phenomenon is that Ag is also cytotoxicity if the ion concentration is higher than 500 $\mu\text{mol/L}$. Al ions is biphasic in cytotoxicity. At low ion concentration ($< 10 \mu\text{mol/L}$), Al ions can stimulate cell proliferation, whereas concentration is over 1 000 $\mu\text{mol/L}$, cytotoxicity increases.

[Key words] biomaterials; metal toxicity; cell biological molecular

(编辑 黄劲松)