

文章编号: 1004-0609(1999)03-0651-04

羟基磷灰石溶胶及其对 瘤细胞增殖的影响^①

冯凌云 李世普 陈闻杰 闫玉华

(武汉工业大学 生物材料与工程研究中心, 武汉 430070)

摘 要: 用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 饱和溶液在超声波作用下制备出稳定的羟基磷灰石溶胶(HAP-sol)。X射线衍射, TEM 和电子衍射测试表明溶胶中的 HAP 由针状微晶组成。体外细胞培养实验发现 HAP-sol 对 W-256 癌肉瘤细胞和艾氏腹水瘤细胞的增殖均具有较强的抑制作用, HAP-sol 与上述瘤细胞接触 24 h 后其半数有效抑制浓度分别为 189 mg/L 和 210 mg/L。

关键词: 羟基磷灰石溶胶; 瘤细胞; 半数有效抑制浓度

中图分类号: R730.53

文献标识码: A

羟基磷灰石陶瓷由于其优良的生物相容性, 已用于骨修复的临床^[1~3]。1992年, Kano等^[4]通过湿法制备出羟基磷灰石微晶, 不经过烧结成陶瓷, 而是直接将这种羟基磷灰石微晶制备成羟基磷灰石溶胶(HAP-sol), 将它作为一种有效的药物载体应用于临床。在我们的工作中发现 HAP-sol 对多种癌细胞具有抑制作用^[5], 但 HAP-sol 容易聚沉。为了解决 HAP-sol 的稳定性问题以及探讨它对其他癌细胞的作用, 利用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 饱和溶液在超声波作用下制备出稳定的 HAP-sol, 研究它对 W-256 癌肉瘤细胞和艾氏腹水瘤细胞增殖的影响。

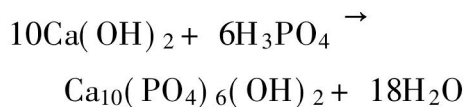
1 实验材料和方法

1.1 HAP-sol 的制备

在蒸馏水中加入过量的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (AR 纯) 粉末后密封, 保存一天, 于冰水混合物的容器中冷却 1 h, 快速抽过滤, 待滤液温度上升至室

温再过滤一次, 所得的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 饱和溶液保存在容量瓶中待用。

室温下将 H_3PO_4 溶液按 5 mL/min 的滴加速度加入到 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 饱和溶液中, 滴定过程中用磁力搅拌器 (89HW-1 型) 搅拌, 同时测试溶液中 pH 值的变化, 控制反应结束时溶液的 pH 值为 8.2。反应产物经过滤、清洗后, 分散到蒸馏水中, 用超声波 (KQ-250 型, (40±2) kHz, 250 W) 作用, 直至溶胶稳定。其化学反应式如下:



1.2 X射线衍射和电子衍射图谱测试

将溶胶置于真空干燥箱室温下干燥, 所得高浓度的溶胶用作 TEM 和电子衍射测试, 仪器为日本 HITACHI 公司产的 H-600 STEM/EDX PV9100 型。干燥的 HAP 颗粒用玛瑙钵磨细, 用于 XRD 测试 D/MAX-RB 型。

1.3 细胞培养

1.3.1 仪器和试剂

① 国家自然科学基金资助 39770225 收稿日期: 1998-08-26; 修回日期: 1998-10-02

冯凌云(1966-), 男, 讲师, 工学硕士

CO₂ 培养箱, OLYMPUS 台式显微镜 RP-MI-1640 型; 胎牛血清为美国 SIGMA Σ 公司产, 胎盼兰 0.02%。

1.3.2 各种浓度 HAP-sol 的配制

将 HAP-sol 稀释为 400 mg/L, 200 mg/L, 100 mg/L 和 50 mg/L 四种浓度备用。

1.3.3 细胞培养

W-256 癌肉瘤细胞和艾氏腹水瘤细胞分别由中国医学科学院药物研究所和同济医科大学药理学系引进。两种癌细胞分别接种于 WISTAR 大鼠和昆明种小鼠腹腔内连续传代。实验时无菌抽取腹腔内瘤细胞, 以 PBS 洗涤 2 遍后, 用含 100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素、10% 灭活胎牛血清的 PRMI-1640 培养液调整成一定浓度的细胞悬液, 置 CO₂ 培养箱中于 5% CO₂ 与 37 °C 及充分理化条件下培养 24 h。生长良好的 W-256 癌肉瘤细胞和艾氏腹水瘤细胞分别接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ L, 加入一定浓度的 HAP-sol 20 μ L (对照组加入生理盐水); 于 5% CO₂, 37 °C, 充分理化条件下培养 24 h。

1.3.4 细胞数的测定

在培养板上, 于每个孔内加入 0.02% 胎盼兰染液 50 μ L, 染色 2 min, 在显微镜下计数死活细胞数并计算抑制率, 重复 3 次, 求其平均值。

2 实验结果与讨论

2.1 制备 HAP 过程中 pH 值的变化

图 1 是在 Ca(OH)₂ 饱和溶液中滴加 H₃PO₄ 溶液过程中 pH 值的变化。从图可见, 在反应过程中, 随 H₃PO₄ 滴加量的增加, 开始时 pH 值变化不大, 并比较平稳地下降; 当滴加量达到 50 mL 时, 随滴加量的增加, pH 值降低较快, 存在一个突跃, 当滴加量达到 95 mL 时 pH 值又逐渐平稳下来。反应结束时溶液的 pH 值为 8.2。pH 值与反应产物密切相关, Aoki^[1] 在采用 Ca(OH)₂ 悬浮液制备 HAP 时发现 pH 值与 Ca/P 比具有线性关系, 而且

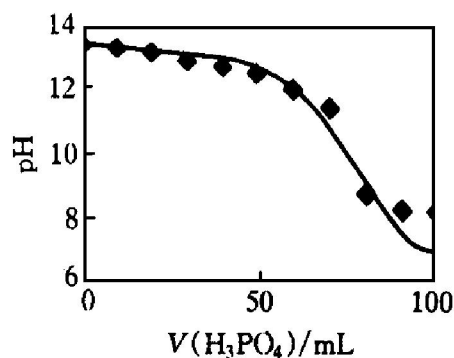


图 1 Ca(OH)₂ 饱和液中 pH 值
随 H₃PO₄ 滴加量的变化

Fig. 1 Change of pH of Ca(OH)₂ saturated solution with addition of H₃PO₄

Ca/P 比不同, 最终的产物也会不同, 在反应过程的后, 特别是突跃点后必须控制滴加速度, 以使反应完全, 从而得到纯的羟基磷灰石产物。

2.2 溶胶中 HAP 的特征

图 2 是溶胶颗粒的 TEM 照片, 由于使用

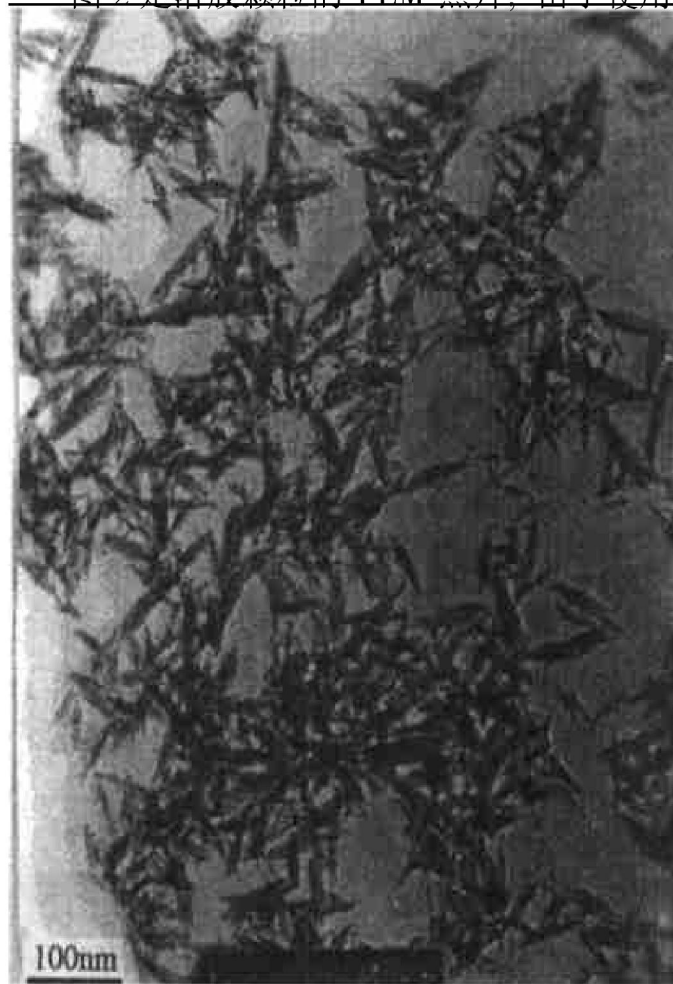


图 2 溶胶颗粒的 TEM 照片

Fig. 2 TEM photograph for HAP-sol particles

了超声波进行分散, 颗粒分布比较均匀, 呈针状, 长度在 20~ 100 nm 之间。图 3 是反应完毕所得固相的 XRD 图谱, 说明是 HAP, 但结晶发育不完好。这也可从图 4 的电子衍射图谱

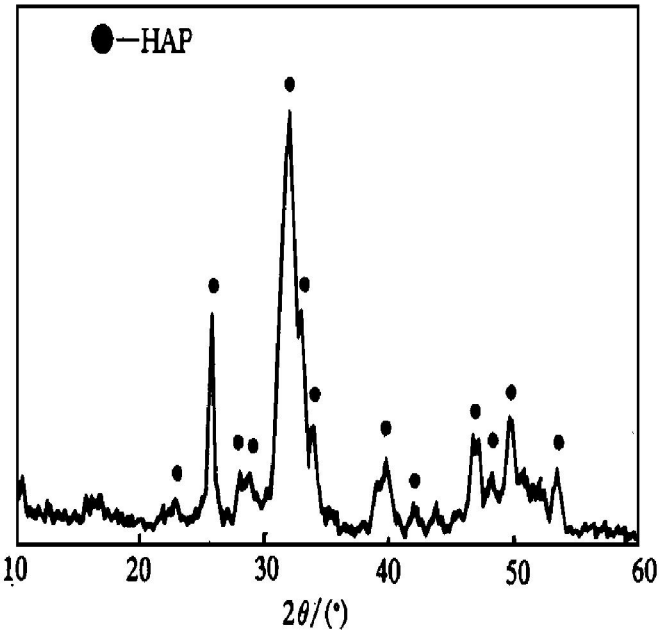


图 3 固相的 XRD 图谱

Fig. 3 XRD spectra for HAP solid state



图 4 溶胶颗粒的电子衍射照片

Fig. 4 Electron diffraction photo for HAP-sol particles

得到验证。溶胶中 HAP 的这些特征使其具有很高的活性。

2.3 HAP-sol 对细胞增殖的影响

表 1 是 HAP-sol 与细胞接触 24 h 后, 对 W-256 癌肉瘤细胞和艾氏腹水瘤细胞增殖的抑制率。从表中可以看出, 当 HAP-sol 的浓度为 400 mg/L 时, 对两种瘤细胞的增殖抑制率均超过 70%, 具有较强的抑制作用。根据直线回归法^[7]求出抑制率为 50% 时所对应的浓度, 即半数有效抑制浓度分别为 189 mg/L 和 210 mg/L, 说明这两种细胞对 HAP-sol 是敏感的, 而且溶胶浓度与增殖抑制率之间具有一定的相关性。在急性毒性研究中得到 HAP-sol 的半数致死剂量为 13.43 g/L^[6]。本文研究中所使用的剂量远远小于其半数致死量, 因此这种剂量在使用过程中对实验对象不存在任何危害。HAP-sol 的这种特性与其生物活性有关, 但作用机理有待进一步研究。

表 1 HAP-sol 对 W-256 癌细胞和艾氏腹水瘤细胞的增殖抑制率(n = 3)

Table 1 Inhibition rate of HAP-sol on W-256 and Aishi sorcoid tumor cells(n = 3)

$\rho(\text{HAP-sol})$ $/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	W-256 inhibition rate/ %	Aishi inhibition rate/ %
50	17 ± 3.92	13.33 ± 3.22
100	33 ± 4.56	28.75 ± 3.44
200	55 ± 7.32	48.65 ± 4.77
400	77 ± 5.34	73.45 ± 5.52

3 结论

- (1) 用超声波可制备出稳定的羟基磷灰石溶胶(HAP-sol), 溶胶中的 HAP 由针状微晶组成。
- (2) HAP-sol 对 W-256 癌肉瘤细胞和艾氏腹水瘤细胞的增殖具有较强的抑制作用。24 h 后对这两种瘤细胞的半数有效抑制浓度分别为 189 mg/L 和 210 mg/L。

REFERENCES

- 1 Aoki H. Science and Medical Applications of Hydroxyapatite. Jpn Asso Apatite Sc, 1991: 179.
- 2 Li Shipu(李世普) and Chen Xiaoming(陈晓明). Bioceramics(生物陶瓷). Wuhan: Wuhan University of Technology Press, 1989: 74.
- 3 Ohnishi M. Bioceramics, 1989, 1(1): 108.
- 4 Kano S, Akao M and Aoki H. Bio-Med Mater Engng, 1994, 4(4): 283.
- 5 Zhang Shicheng(张士成) and Li Shipu(李世普). Journal of Wuhan University of Technology(武汉工业大学学报), 1996, 18(1): 5.
- 6 Lingyun F, Yuhua Y, *et al.* Synthesis of HAP-sol by Ultrasonic Irradiation and Its Acute Toxicity Research. In: Xingdong Z and Yoshito I (Eds). Biomedical Materials Research in the Far East(III), Japan: Kobunshi Kankokai Press, 1997: 158.
- 7 Zhou Jiwei(周季微). Elementary Biostatistics(生物统计学入门). Kunming: Yunnan People Press, 1985: 198.

Preparation of hydroxyapatite-sol and its effect on proliferation of tumour cells

Feng Lingyun, Li Shipu, Chen Wenjie, Yan Yuhua

Biomedical Materials and Engineering Center,

Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, P. R. China

Abstract: The Hydroxyapatite-sol(HAP-sol) was synthesized by ultrasonic irradiation. The detections of XRD, TEM and electron diffraction showed that the hydroxyapatite in HAP-sol consisted of needle-like microcrystals. The cell culture experiments in vitro indicated that HAP-sol strongly inhibited the proliferation of W-256 and Aishi abdomen sarcoma cells. Its half effective inhibition concentrations were 189 mg/L and 210 mg/L respectively after HAP-sol was in contact of 24 h with tumour cell.

Key words: hydroxyapatite-sol; tumour cell; half effective inhibition concentration

(编辑 吴家泉)