DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.014
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1165-04

论著

组织工程人工神经诱导管的制备及其在体外与大鼠体内降解性能研究

张文捷,李兵仓,王建民,王建忠,陈建梅 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第六研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 以构成比不同的聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(PLGA)为原料制备人工神经诱导管,并对其体内外降解性能变化进行观测。方法 ①以0.2 mol/L PBS(pH 7.4)为人工降解液,观测PLGA(85:15)和PLGA(50:50)管12周体外降解期间吸水率、失重率及生物降解率变化,并以扫描电镜观察其微结构变化;②采用肌肉包埋方法,观测PLGA(85:15)和PLGA(50:50)管8周体内生物降解率变化。结果 ①体内外降解条件下,PLGA(50:50)管吸水率、失重率及生物降解率显著高于PLGA(85:15)管;②两种材料样品体内生物降解率显著高于体外降解率;③扫描电镜观察显示,随降解时间延长,材料样品表现为特征性的虫蚀样破坏并逐渐加重,以PLGA(50:50)管尤为明显。结论 共聚物的构成比以及降解环境是影响聚乳酸—聚羟基乙酸共聚物生物降解性能的重要因素。

关键词:聚乳酸—聚羟基乙酸共聚物;生物降解;人工神经诱导管
中图法分类号:R-322;R318.08;R338 文献标识码:A

Fabrication and biodegradation of poly(DL-lactide-co-glycolide) conduit in rats

ZHANG Wen-jie, LI Bing-cang, WANG Jian-ming, WANG Jian-zhong, CHEN Jian-mei (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 6, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To fabricate artificial nerve conduits with two different copolymer proportions of poly(DL-lactide-co-glycolide)(PLGA)[(85:15) or (50:50)] and to investigate the degradation behaviors *in vitro* and *in vivo*. Methods Changes in water absorption, weight loss, and degradation of PLGA conduits at the proportions of 85:15 and 50:50 during the 12-week period in pH 7.4 phosphate-buffered saline (PBS) at 37 ℃ and the changes in their *in vivo* biodegradation following implantation in rat dorsal muscle for up to 8 weeks were observed. Results Compared with PLGA conduit at the proportion of 85:15, significant changes in weight, water absorption, morphology and degradation rate of PLGA conduit at the proportion of 50:50 were found during 12 weeks of incubation with PBS. Both two types of PLGA conduits [(85:15) and (50:50)] showed significantly faster degradation rate *in vivo* than that *in vitro*. Conclusion The copolymer proportion and environmental condition have significant effects on the degradation behaviors of PLGA conduits.

Key words: Poly (DL-lactide-co-glycolide); biodegradation; artificial nerve conduit

周围神经组织工程的起源可以追溯到20多年前,但直到近年来,随着材料科学以及生物学技术的进展,此项研究才得到广泛的关注和发展。

生物可降解吸收材料在组织工程制备技术中起着十分重要的作用,它与种植细胞共同构成组织工程的核心部分。目前取得较好效果并已广泛应用于周围神经组织工程的支架材料,主要是由含α-羟基酸及其衍生物合成的脂肪族聚酯,如:聚乳酸(polylactic acid, PLA)、聚羟基乙酸(polyglycolic acid PGA)及聚乳酸与聚羟基乙酸的共聚物[poly(lactide-co-glycolide) PLGA],通常加工成管道状支架材料以桥接神经的远近断端(可称为人工神经或神经诱导管)[1]。

作为周围神经组织工程的支架材料,其基本要求包括:① 良好的生物相容性:即支架材料及其降解产物对组织细胞无毒性和致突变作用,植入体内无抗原性和致畸作用;② 良好的表面活性:即材料表面能使细胞良好的粘附和生长;③ 生物可降解吸收性:即材料在细胞生长、繁殖和组织再生过程中能逐渐降解吸收;④ 可塑性和适宜的力学性能:即易于加工成型,能够在体内外承受一定的压力,并在一定时限内保持其外形和结构的完整性[1]。

在本研究中应用两种共聚比率不同的PLGA为原料,制备管道状支架,对其生物降解性能及其微结构变化进行观测,为下一步实验构建组织工程化人工神经提供理论基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170960);国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054206)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170960) and the National Foundation for "973" Projects (G1999054206)
作者简介:张文捷(1969—),男,江西省鹰潭市人,博士,主治医师,主要从事周围神经损伤及修复方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)65202587
收稿日期:2003-04-23;修回日期:2003-08-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 原材料

PLGA[poly(DL-lactide-co-glycolide)](85:15)

PLGA[poly(DL-lactide-co-glycolide)](50:50)

外消旋聚乳酸—聚羟基乙酸共聚物(Sigma-Aldrich 公司 Mw 5 000~7 500)

1.2 动物

Wistar 品系健康成年大鼠 50 只,体质量 180~200 g,雌雄不拘,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。

1.3 方法

1.3.1 组织工程人工神经诱导管的制备 参考王身国等[2]报道,将 PLGA 用三氯甲烷配制成 10% 溶液,用注射器注入预制模具中,室温下三氯甲烷自然挥发 48 h,期间适时脱模,制作成 1 长 15 mm、内径 1.5 mm、壁厚 0.3 mm 的导管,干燥机内真空(20 L/h,-0.1 Mpa)抽提溶剂 24 h,于真空干燥机内保存备用。

1.3.2 PLGA 管体外生物降解性能检测及微结构变化观察 参考 Lu 等[3]、陈建海等[4]报道方法,将材料样品真空干燥至恒重后,放入 15 ml 100% 乙醇试管中于恒温振荡箱内(100 r/min,1 h)预湿,测重量后,置于 20 ml 0.2 mol/L PBS(pH 7.4)恒温振荡箱内(60 r/min,37 ℃),于 2、4、6、8、10 和 12 周(每时相点 5 个样品)分别取出材料样品,测湿重后,室温下空气干燥 48 h;干燥机内真空干燥 24 h,测干重。(30±0.5) ℃恒温水浴中乌氏粘度计检测材料样品特性粘数[η](g/dl)。按下列公式计算材料样品吸水率、失重率及体外生物降解率变化;切取不同降解时段材料样品,临界点干燥,喷金,扫描电子显微镜观察材料微结构变化。

材料体外降解失重率=(降解前重量-降解后重量)/降解前重量×100%

材料体外降解吸水率=(降解后湿重-降解后干重)/降解后干重×100%

材料体外生物降解率=(降解前特性粘数-降解后特性粘数)/降解前特性粘数×100%

1.3.3 PLGA 管体内生物降解性能观测 将材料样品真空干燥至恒重,环氧乙烷熏蒸灭菌,置于 100% 乙醇试管中预湿 1 h,并浸入无菌 0.9% 氯化钠溶液内 24 h(每 6 h 更换液体 1 次)后,将材料样品通过手术植入大鼠背部椎旁肌内;根据植入材料不同分为 PLGA(85:15)和 PLGA(50:50)组,1、2、4、6 和 8 周为观察时相点(每时相点 5 个样本),术后按时相点处死大鼠。取出材料样品,材料样品在用蒸馏水清洗和真空干燥至恒重后,同 1.3.2 方法检测特性粘数,按下列公式计算

材料样品体内生物降解率:

材料体内生物降解率=(降解前特性粘数-降解后特性粘数)/降解前特性粘数×100%

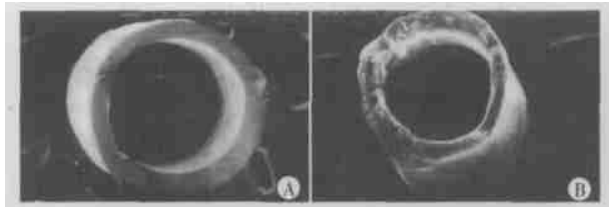
1.4 统计学处理

采用 SPSS(10.0)统计分析软件,单因素方差分析 Turkey 法进行多样本均数的两两比较。

2 结果

2.1 大体观察

采用组织工程技术制备的 PLGA 管,内外腔壁光滑,淡灰色半透明状(图 1),体外人工降解条件下,浸泡的两种 PLGA 管随时间延长呈现逐渐吸水膨胀外观,管壁锐缘变钝,颜色逐渐向灰白转变(图 1)。到观察后期,PLGA(50:50)管出现部分降解吸收现象的同时,其管状结构出现部分破损,12 周时,管壁结构大部分破坏,局部呈现明显碎裂现象,致使相关指标无法测定,而 PLGA(85:15)管整个观察期内,管壁结构始终保持完好,无明显破裂现象。



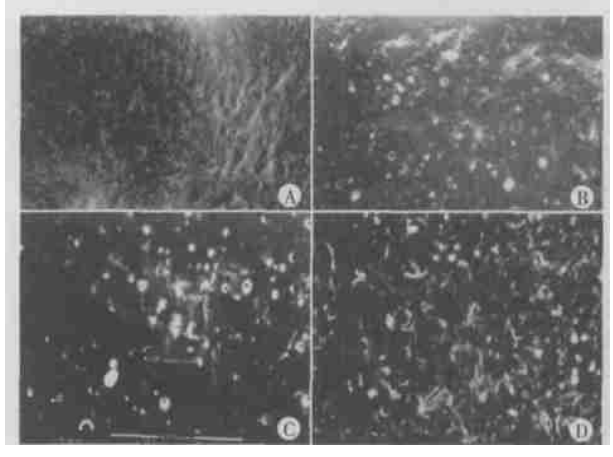
A: Scanning electron micrograph; B: Dilatating appearance *in vitro* degradation

图 1 PLGA 管扫描电镜相

Fig 1 Scanning electron micrographs of PLGA conduit

2.2 PLGA 管材料样品体外降解条件下扫描电镜观察微结构变化

正常未经体外降解液处理的 PLGA 管为内外腔壁光滑,无明显孔隙均质的管状结构。体外降解条件下,2~4 周两种 PLGA 管即表现有一定程度的吸水膨胀外观,并表现一定程度的泡状隆起外观,以 PLGA(50:50)管较为明显;或有见到片絮状斑块,可能为 PLGA 降解脱落的产物。但大体的均质样外观并没有明显的改变;6~8 周时扫描电镜可观察到 PLGA 管降解条件下的特征性外观:管壁呈虫蚀样破坏,形成较均匀分布的并较规则的破裂圆孔,这在 PLGA(50:50)管尤为明显;8~12 周,这种特征性虫蚀样破坏进一步加重,在 PLGA(50:50)管,破裂孔常出现延伸并相互接连,从而常导致管壁的整体结构的破坏。而 PLGA(85:15)管在整个降解期间大体结构始终保持完整(图 2)。



A: At 8 week PLGA conduit erosion leading to hollow structures in its wall; B: PLGA (50:50) conduit is more significant; C: At 12 week erosion of PLGA conduit becomes more significant; D: In PLGA (50:50) also leading to breakage of its wall

图 2 扫描电镜观察材料样品体外降解条件下微结构变化 (SEM×500)

Fig 2 Scanning electron micrographs of PLGA conduits *in vitro* degradation (SEM×500)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 PLGA 管材料样品体内外降解条件下吸水率、失重率及生物降解率变化

2.3.1 PLGA 管材料样品体外降解吸水率变化　体外人工降解条件下, 2～4 周时两种 PLGA 管材料的吸水率就有明显增高, 随时间延长吸水率增高愈加显著。PLGA(85∶15)管 2、4、6、8、10 和 12 周吸水率(%)分别为(10.2±0.08)、(19.7±1.9)、(26.6±3.4)、(34.1±3.1)、(48.9±2.2)和(66.56±3.5); PLGA(50∶50)管 2, 4, 6, 8 和 10 周吸水率(%), 分别为(29.2±3.4)、(28.7±3.0)、(69.7±2.9)、(108.2±2.8)和(148.6±5.4), 其中 PLGA(50∶50)管的变化尤为明显, 8～10 周时, 吸水率的增高使得总重量超过自身重量的 1 倍多, 这与观察到的显著的吸水膨胀外观相符。与 PLGA(85∶15)管吸水率相比, 差异有非常显著性意义($2、4、6、8$ 和 10 周 P 值均<0.01), 到 12 周时, PLGA(50∶50)管出现明显的管壁破碎现象, 致使相关指标无法测定, 而 PLGA(85∶15)管整个降解过程大体结构始终保持良好。

2.4 PLGA 管材料样品体外降解失重率变化结果

体外人工降解条件下, PLGA(50∶50)管 2～4 周即出现重量的丧失, 6 周后失重率的增高愈见明显, 6、8、10 周与 2 和 4 周相比, 差异有非常显著性意义(P 值均<0.01)2、4、6、8 周失重华(%)分别为(2.0±1.1)、(2.6±1.3)、(9.9±0.4)、(21.0±1.4)和(31.9±1.4)。而 PLGA(85∶15)管除 12 周时出现较轻度的失重外, 材料干重始终保持恒定。2、4、6、8、10 和 12 周失重率(%)分别为(0.7±0.6)、(2.5±1.1)、(3.0±1.4)、(2.4±0.6)、(3.0±1.0)和(4.4±2.2)。两种材料 2、4、6、8 和 10 周相比, 差异有非常显著性意义(P 值均<0.01)。

2.5 PLGA 管材料样品体内外降解条件下生物降解率结果

根据表 1 中所示, 两种材料样品, 不论体外抑或体内降解条件下, 生物降解率均呈显著增高趋势(各时相点间相比 $P<0.05$ 或 0.01)。其中体外降解条件下, PLGA(50∶50)管的生物降解率在 2、4、6 和 8 周与 PLGA(85∶15)管相比, 差异有非常显著意义($P<0.01$); 体内降解条件下, PLGA(50∶50)管的生物降解率在 2、4、6 和 8 周与 PLGA(85∶15)相比, 差异有显著意义($P<0.01$、0.05、0.05 和 0.01); 对某一材料而言, PLGA(50∶50)管或 PLGA(85∶15)管材料样品的生物降解率, 体内降解条件下均高于体外条件($P<0.01$)。

表 1　PLGA 管材料样品体内外生物降解率变化(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes in biodegradation rate of PLGA conduits during *in vivo* and *in vitro* degradation (%, $\bar{x}\pm s$)

Group	2 week	4 week	6 week	8 week	10 week	12 week
PLGA(50∶50) *in vitro*	15.2±1.8△△☆☆	27.3±3.6△△☆☆	46.5±7.5△△☆☆	54.2±4.0△△☆☆	64.1±2.5☆☆	70.1±1.3☆☆
PLGA(50∶50) *in vivo*	28.8±1.4★★	43.8±11.0★★	62.4±1.5★★	69.7±1.2★★		
PLGA(85∶15) *in vitro*	5.2±1.4▲▲	10.8±2.0▲▲	24.7±3.5▲▲	30.7±0.6▲▲	43.2±3.5	52.3±0.9
PLGA(85∶15) *in vivo*	13.7±1.6	22.9±0.6	32.44±1.2	46.2±1.1		

△△: $P<0.01$, *vs* PLGA(50∶50) *in vivo*; ▲▲: $P<0.01$, *vs* PLGA(85∶15) *in vivo*; ☆☆: $P<0.01$, *vs* PLGA(85∶15) *in vitro*; ★★: $P<0.01$, *vs* PLGA(50∶50) *in vivo*

3　讨论

PLGA 属于 α-羟基酸(α-hydroxy acid)衍生的脂肪族聚脂, 这类聚合物是目前研究最多以及应用最广泛的一种生物可降解材料。其降解主要是通过化学水解(酯键的断裂), 而对酶性溶解不敏感, 表现以本体降解(bulk degradation)为主的降解方式, 因此降解特性和过程不会因个体差异而不同, 降解产物为无毒的代谢产物, 可通过正常代谢途径予以清除[5,6]。

由于材料的生物降解性能, 可因化学结构、降解条件、分子量大小、几何形状等因素的差异而有所不同[7～10], 因此本实验对自制的人工神经诱导管的相关性能进行了观测。PLGA 是由结晶态的 PLA 和 PGA 发生共聚而形成的无定形(非结晶性)聚合物, 其中 PGA 的亲水性较强, 但机械性能较弱, 而 PLA 则相反。因此共聚物中的 PLA 和 PGA 的构成比与材料的生物降解率及其机械性能密切相关[5,6]。

本实验的结果显示, PLGA 共聚物的共聚比例从 85∶15 到 50∶50 的改变, 显著加快了体内或体外降解的速率, 表现为重量的丧失和特性粘数的降低, 这种现象显然是由于 PLGA(50∶50)增加了亲水性的羟基乙酸组份, 而有利于水的吸收和弥散, 从而加强了酯键的水解, 这也是导致 PLGA(50∶50)吸水率显著高于 PLGA(85∶15)的重要原因。

聚酯类聚合物中不稳定化学键为大分子主链结构的一部分, 其降解主要通过主链区的随机性断裂引起。水解后产生较低分子量的聚合物碎片[5], 同时由于聚合物分子量的大小与降解速度成反比[11], 这些低分子聚合物的形成将导致吸水量的大大增加, 从而导致本实验结果中材料吸水率随时间延长而显著增高的趋势。

实验的另一个结果显示, 两种材料的降解速率体内条件下显著高于体外条件。分析原因, 可能与以下机制有关: ①酸性降解产物的自动催化效应: PLGA 降解的加速被认为与低聚物和链断裂产物中游离羧基的增多及伴发的 PLGA 基质 pH 值的降低所引发, 从而导致降解速率随时间延长的显著增高, 即所谓自动催化效应(autocatalytic effect)[12,13]。体内降解条件下, 聚合物基质释出酸性降解产物, 并聚集于植入物的周围而促进了自动催化效应的产生。而体外条件下, 由于频繁的换液而极大程度地降低了这种效应。②体内外降解条件的差异: 本实验中 PLGA 材料体外降解是以 0.2 mol/L PBS(pH 7.4)为人工降解液的较单一的条件下进

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

行的，此过程没有酶或其它因素的催化，而仅仅是不稳定键的简单水解，而体内降解条件并不完全相同，体液中电解质以及酸性或碱性物质及酯酶等对聚合物均具有催化作用。因此体内环境下降解条件更为复杂，降解途径也有增多。

参考文献：

[1] Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion[J]. Biomaterials, 1996, 17(1): 103－114.
[2] 王身国，侯建伟，贝建中，等. 聚 d, l-乳酸及其对 20 毫米断缺神经诱导修复的研究[J]. 高分子通讯，2000, 10(8): 15－18.
[3] Lu L, Perter S J, Lyman M D, *et al*. *In vitro* degradation of porous poly (L-lactic acid) foams[J]. Biomaterials, 2000, 21(15): 1595－1605.
[4] 陈建海，马德安，来永毅，等. 可吸收性生物材料 PCL 在体外与动物体内降解机制的研究[J]. 生物医学工程学杂志，1997, 14(4): 334－337.
[5] Kissel T. Advanced drug delivery review[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 50(1): 99－134.
[6] Seal B L, Otero T C, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration[J]. Mat Sci Eng, 2001, 34(2): 147－230.
[7] Kim B S, Mooney D J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(4): 224－230.
[8] Agrawal C M, Huang D, Schmitz J P, *et al*. Elevated temperature degradation of a 50: 50 copolymer of PLA-PGA[J]. Tissue Engineering, 1997, 3(4): 345－352.
[9] Zhang Y, Zale S, Sawyer L, *et al*. Effects of metal salts on poly (DL-lactide-co-glycolide) polymer hydrolysis[J]. J Biomed Mater Res, 1997, 34(4): 531－538.
[10] Mikos A G, Thorsen A J, Czerwonka L A, *et al*. Preparation and characterization of poly (L-lactic acid) foams[J]. Polymer, 1994, 35(6): 1068－1077.
[11] 平其能. 现代药剂学[M]. 北京：中国医药科技出版社，1998. 777－790.
[12] Grizzi I, Garreau H, Li S, *et al*. Hydrolytic degradation of devices based on poly (DL-lactic acid) size-dependence[J]. Biomaterials, 1995, 16(4): 305－311.
[13] Vert M, Mauduit S, Li S. Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity[J]. Biomaterials, 1994, 15(15): 1209－1213.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)13-1168-01

儿童腭部外伤 48 例临床分析

Clinical analysis of 48 cases of palate injury in children

李登远 （重庆市第九人民医院口腔科，重庆 400700）

随着各式各样儿童玩具的增多，儿童腭部外伤的发生率有增加的趋势。近 5 年来，我科收治儿童腭部外伤 48 例，现报告如下。

1 临床资料

我科于 1998 年 8 月至 2003 年 8 月共收治儿童腭部外伤 48 例，其中男 37 例（约占 77%），女 11 例（约占 23%）；年龄 2～13 岁，以 4～7 岁居多（共 34 例，约 71%）。

1.1 外伤类型及部位

撕裂伤 29 例，刺伤 14 例，穿通伤 5 例；软腭伤 31 例，硬腭伤 17 例。

1.2 致伤原因

口含硬物顶戳致伤 46 例，外伤性上颌骨骨折伴硬腭中缝伤 2 例。

1.3 合并伤情况

共 9 例，其中鼻腔穿通伤 5 例，腭大动脉损伤 2 例，上颌骨骨折 2 例。

作者简介：李登远（1965－），男，四川省自贡市人，主治医师，主要从事口腔外科方面的研究，发表论文 6 篇。电话（023）68282123

收稿日期：2003-09-17；修回日期：2003-11-18

2 治疗方法及结果

一般清创缝合 37 例，伤口修补术 4 例，其它 7 例；伤口Ⅰ期愈合 39 例，Ⅱ期愈合 9 例。

3 讨论

儿童喜欢将玩具、棒棒糖等硬物放入口内，易因摔跌或碰撞顶戳伤及腭部，是腭部外伤多见于儿童的主要原因。

因上腭解剖及组织结构的特点，且儿童往往不配合，故儿童腭部外伤的治疗较为困难。根据我们的经验，可采取以下方法：

3.1 检查及约束

对不配合患儿，让其最亲近的成人将其抱紧并约束上下肢，头枕放于持抱人右上胸部，取头后仰位；检查人左手压患儿额颞部并向后固定，右手持口镜柄从一侧后牙间隙插入撬开牙关，下压舌背暴露上腭。亦可采用仰卧位，以被单裹束肢体，术者取头顶位，助手侧位，上弓形开口器打开口腔并固定。

3.2 局部麻醉及伤口处理

约束及暴露创面后，即可行局部麻醉。在充分止血、吸引积液和良好照明下，结合病史检查伤口，清除异物，彻底止血。

（下转 1174 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net