

PLGA/ 型胶原/壳聚糖复合人工硬脊膜生物相容性及力学性能的实验

张卫红,王新伟¹,王长峰²

(济宁医学院附属医院脊柱外科,山东 济宁 272029;¹上海第二军医大学附属长征医院骨科,上海 20003;²江苏省武警总医院骨科,江苏 扬州 225003)

[摘要] 目的:研究经 型胶原、壳聚糖改性的 PLGA 膜的生物相容性及力学特性,研制出新型人工硬脊膜替代材料。方法:制作 PLGA 膜(膜)、PLGA/ 型胶原/复合膜(膜)、PLGA/ 型胶原/壳聚糖(9:1)复合膜(膜)、PLGA/ 型胶原/壳聚糖(5:5)复合膜(膜),并行接触角、吸水率、细胞毒性实验及材料力学实验的研究。结果:接触角:膜 < 膜 < 膜 < 膜, P < 0.01;吸水率:膜 < 膜 < 膜 < 膜, P < 0.01;细胞毒性实验示:第 1 天,各膜组间 OD 值差异无统计学意义, P > 0.05。第 3、7 天,膜 与 、 各组间,膜 与膜 组间差异有统计学意义, P < 0.05。PLGA 膜经 型胶原和壳聚糖改性后,可以促进细胞在膜上的黏附、贴壁能力。各膜的力学性能比较,膜 与膜 、 之间差异有统计学意义, P < 0.05,膜 、 和 组间的差异无统计学意义。结论:PLGA 膜的表面复合 型胶原/壳聚糖(9:1)可以提高复合膜的生物相容性和力学特性。

[关键词] PLGA; 硬脊膜; 壳聚糖; 型胶原; 生物相容性

[中图分类号] R681.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2009)06-0836-04

Experimental research on the biocompatibility and Mechanical properties of PLGA/Type-collagen/ Chitosan composite membrane as artificial spinal dura mater

ZHANG Wei-hong, WANG Xin-wei¹, WANG Chang-Feng²

(Department of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining 272029; ¹Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 20003; ²Department of Orthopaedics, Jiangsu Province Corps Hospital of Forced Policed Army, Yangzhou 225003, China)

[Abstract] **Objective:**To study the biocompatibility and mechanical properties of PLGA membrane modified by Type- collagen and Chitosan, and to develop a novel tissue engineering materials as artificial spinal dura mater. **Methods:**PLGA membrane (membrane), PLGA/ Type- collagen composite membrane (membrane), PLGA/ Type- collagen/ Chitosan (9:1) composite membrane (membrane) and PLGA/ Type- collagen/ Chitosan (5:5) composite (membrane) were produced through a certain process. Contact angle, absorption rate, cytotoxicity study and determination of mechanical properties were used to research all type membranes. **Results:**Contact angle:membrane < membrane < membrane < membrane, P < 0.01; Absorption rate:membrane < membrane < membrane < membrane, P < 0.01; Cytotoxic experiment (MTT method):at the 1st day, the OD value between each group didn't have significant difference, P > 0.05. At the 3rd and the 7th day, there was significant difference between membrane and or, membrane and, P < 0.05. After being modified by Type- collagen and Chitosan, PLGA membrane striking enhanced the adhesion and proliferation of L929 cell, and the comparison between all type membranes showed that there was significant difference between membrane and other type membranes, P < 0.05, and there was no significant difference between membrane, and. **Conclusion:**With type- collagen and Chitosan(9:1) appending to the exterior, PLGA can enhance the biocompatibility and Mechanical properties of membrane.

[Key words] PLGA; spinal dura mater; Type- collagen; Chitosan; biocompatibility; Mechanical properties

[Acta Univ Med Nanjing, 2009, 29(06): 836-839]

各种原因如创伤、手术入路需要及组织粘连等原因造成硬脊膜损伤越来越常见。由于自体组织、异体组织、动物来源的硬脊膜替代材料从材料的质地、排斥反应及传染病的播散等原因,都难以达到理想的替代修复,而人工硬脊膜替代材料的生物相容性差是不能广泛应用于临床主要原因,因此研制出质地满意、无毒、生物相容性佳、可降解的材料是目前需要急待解决的。聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(poly-D,L-lactic-co-glycolic acid, PLGA)是重要的脂肪族聚酯类生物可降解高分子材料。主要应用于组织工程领域和药物缓释系统的载体^[1-2]。由于 PLGA 具有可吸收、细胞毒性小及硬度可调性的特点,符合作为人工硬脊膜材料的基本条件。型胶原是人体硬脊膜组织的主要成分,是细胞外基质的主要成分,对细胞的黏附和增殖有明显促进作用。而壳聚糖具有良好的生物相容性和特殊机械性能^[3-5]。本实验使用 PLGA、型胶原及壳聚糖为原料,做成多孔 PLGA 膜、PLGA/ 型胶原膜和 PLGA/ 型胶原/壳聚糖复合膜,研究其对细胞生物相容性及力学性能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

多孔 PLGA 膜(济南岱罡生物科技有限公司提供),型胶原蛋白(Sigma C9879,美国),壳聚糖(上海其胜生物制剂医疗器械公司),L929 小鼠成纤维细胞(中科院上海生命科学院细胞所提供),电子天平(瑞士 Mettler AE240-I-0.2 mg),接触角仪(SL-200,上海),海鸥 37XA 倒置相差生物显微镜,CO₂ 培养箱(INCUBATOR B5060EK/CO₂ 型,德国 Heraeus 公司),QJ211 电子万能试验机(上海倾技公司)。

1.2 方法

1.2.1 多孔 PLGA 膜(膜)的制作

PLGA 支架的制作:取 0.5 g 的 PLGA 溶解于 5 ml 氯仿中,待聚合物完全溶解后,加入粒径为 80~100 μm 的 NaCl 晶体,搅拌均匀后浇注于模具中。静置 48 h,脱模后真空干燥 24 h。在搅拌作用下用双蒸水浸泡 48 h,脱去 NaCl,取出后空气干燥 48 h,真空干燥 48 h,直至恒重。Co⁶⁰ 照射消毒,剂量为 25 kGy。

1.2.2 多孔 PLGA/ 型胶原复合膜(膜)的制作

在 10℃ 环境下将 20 g/L 型胶原蛋白溶液倒入底层铺有多孔 PLGA 膜的模具中。层流清洁台内 40℃ 下风干,用 0.25% 戊二醛溶液交联处理 24 h,真空

干燥 24 h, PBS 液反复浸泡、漂洗,其余步骤同膜。

1.2.3 多孔 PLGA/ 型胶原/壳聚糖复合膜(膜和膜)的制作

型胶原蛋白液中加入 20 g/L 壳聚糖溶液,两者的体积比分别为 9/1 和 5/5,将混合液倒入底层铺有多孔 PLGA 膜的模具中,其余的制作流程同上,分别制作出膜和膜。

1.2.4 吸水率测定

将各种膜用电子天平称重后,浸于 37℃ 蒸馏水中,4 h 后将其取出并快速拭干称重,其吸水率根据下式计算(每个数据测 5 组,取其平均值):吸水率=(吸水后质量-吸水前质量)/吸水前质量×100%。

1.2.5 接触角测定

用接触角仪测定,测定温度 20℃,双蒸水滴在样品表面,取相互距离 5 mm³ 点,用悬滴法测定,用影像分析 Q/2 切线法计算接触角。

1.2.6 细胞毒性实验

将各种膜材料裁成直径 6 mm 的圆片,放进 96 孔培养板,分为 5 组,膜、膜、膜、膜和空白对照组,每组标本 6 个,膜上加入 L929 细胞(4.0 × 10³ mL)。各孔加入 RPMI1640 细胞悬浮培养液、10% 胎牛血清。在 37℃ 和 5% CO₂ 培养箱内孵育 1、3、7 天,1、3、5 天时更换新的培养液,镜下观察成纤维细胞形态、贴壁及大体增殖情况。吸出原培养基后每孔加入 1640 培养基 200 μl 及 MTT40 μl,37℃ 孵育 4 h,选择波长 490 nm 在酶联免疫检测仪上测定吸光度(A)值。

1.2.7 力学性能测定

将系列膜作成细条状的待测样品,用千分尺测定样品的厚度和宽度。在 QJ211 万能电子拉力实验机上测出被测样的抗张强度(δb)、断裂伸长率(εb)。拉伸速率为 20 mm/min。抗拉强度、断裂伸长率按下式计算:

$$\delta b = F/A$$

$$\epsilon b = (I - I_0) / I_0 \times 100\%$$

注:F:材料最大拉力,A:材料截面面积;I:最长延伸长度,I₀:初始长度

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件行统计学分析,对数据进行单因素方差分析及 3×6 析因设计方差分析。检验水准为双侧 α=0.05。

2 结果

2.1 吸水率测定

吸水率:膜 <膜 <膜 <膜, 各组间吸水率的差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 系列膜的吸水率及接触角

Tab 1 The result of Contact angle and Contact angle of series membrane

Membrane	吸水率(%)	接触角(度)
膜	16.37 ± 4.37	87.30 ± 10.98
膜	30.70 ± 5.51	71.05 ± 6.54
膜	28.90 ± 4.80	73.04 ± 9.88
膜	24.23 ± 3.82	79.54 ± 8.02

2.2 接触角测定

接触角:膜 <膜 <膜 <膜, 各组间接触角的差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

2.3 细胞培养镜下形态学观察

L929 成纤维细胞在各膜上不同培养时间点的细胞贴壁生长不同, 膜、膜、膜接种后约 3 h 开始贴壁, 6 h 大量细胞贴壁, 细胞分布均匀, 伸展及

形态良好, 24~28 h 完全贴壁生长, 细胞片状融合铺满各膜上面。膜约 4 h 开始贴壁, 8~10 h 大量贴壁生长, 36 h 完全贴壁生长。

2.4 细胞毒性试验

系列膜的细胞培养 MTT 检测结果: 第 1 天, 膜各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。第 3 天, 膜与膜、膜、膜组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 对照组与膜、膜组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与其他两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。第 7 天, 膜与膜、膜组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 膜、膜组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 2)。

2.5 力学性能测定

抗拉强度:膜与其他膜比较, $P < 0.05$; 膜、膜与膜组间差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。伸长率: 系列膜各组间差异无统计学意义, $P > 0.05$ (表 3)。

表 2 系列膜 MTT 的 A 值各组间比较

Tab 2 Group compcwison of optical density of MTT of series membrane

	膜	膜	膜	膜	control
1	1.07 ± 0.19	1.50 ± 0.23	1.48 ± 0.20	0.98 ± 0.26	1.53 ± 0.22
3	1.66 ± 0.37	1.99 ± 0.29	2.32 ± 0.31	1.62 ± 0.14	2.41 ± 0.27
7	1.95 ± 0.39	2.35 ± 0.30	2.42 ± 0.28	2.02 ± 0.26	2.78 ± 0.25

表 3 材料抗拉强度与伸长率

Tab 3 Tensile strength and Elongation of materials

Membrane	抗拉强度 (N/mm ²)	伸长率 (%)
膜	0.3793 ± 0.0725	512.18 ± 74.25
膜	2.1312 ± 0.6687	553.77 ± 149.99
膜	2.4934 ± 0.2393	597.66 ± 140.14
膜	2.7863 ± 0.4292	594.65 ± 99.02

3 讨论

组织工程技术的发展为硬脊膜的修复与重建提供了一种新的途径, 支架材料的制备是该技术的一个关键点, 理想的硬脊膜组织工程支架应具有满意的力学强度、柔韧性、良好的生物相容性、可控可降解性、材料的三无特性(无毒、无致癌、无致畸形)及不传播疾病等条件。如何提高其生物相容性是当前研究的热点。合成高分子材料聚乳酸/乙醇酸共聚物(PLGA)是目前人工硬脊膜支架组织工程研究的热点^[6-7]。课题以 PLGA 为主要原料制成强度及柔软性满意的人工硬脊膜, 其可在坚实的硬膜替代组织形成以前不被降解, 避免了迟发性脑脊液漏的可

能性, 膜的表面及内部有空隙, 便于成纤维细胞的黏附及爬行, 在体内有较长的降解时间。本研究在 PLGA 膜的表面复合壳聚糖和型胶原层以使其改性, 研究改性后对细胞黏附、增殖的影响。型胶原是构成硬脊膜的主要成分, 具有其他合成材料无法比拟的生物相容性、降解性及生物活性, 并具有细胞识别信号, 可诱导细胞的黏附与生长^[7]。但单一胶原成膜的机械强度低、降解时间快^[8]。壳聚糖即壳聚糖是由广泛存在于自然界虾、蟹外壳中的天然高分子化合物几丁质为原料制成, 其化学名称为 N-乙酰氨基葡萄糖多聚体, 经脱乙酰基后, 衍生为氨基葡萄糖。它是具有良好的成膜性、力学强度, 并具有一定的亲水性和吸水率, 是一种组织相容性良好的可吸收降解的体内植入生物材料。Shin SY 等研究认为壳聚糖材料的微纤维膜对兔骨肉瘤 MG63 细胞的生物相容性佳, 没有发现明显的炎症反应, 并有促进颅骨缺损新骨的再生修复的作用^[9]。除此以外, 它还具有促进上皮细胞生长、抑制成纤维细胞生长、防粘连及抗菌等功能^[10-11]。大量的壳聚糖可以抑制成纤维细胞的生长, 机制可能与壳聚糖膜表面大量

氨基存在有关。因此笔者设想通过 PLGA 表面复合不同比例的胶原和壳聚糖成分,以期改善膜的生物相容性,增加 PLGA 表面胶原的降解时间,促进成纤维细胞在膜上的贴附、爬行及增殖的能力。

细胞与材料的相互作用即生物相容性研究是组织工程研究的主要方面。细胞在材料上黏附是细胞迁移、分化和增殖的基础。吸水率可以间接反应材料的亲水性,吸水率和材料的亲水性成正比。吸水率越高,亲水性越大。同时,吸水率和材料的空隙率及材料的孔径大小亦呈正相关。本实验结果表明,膜 <膜 <膜 <膜 的吸水率,且各组间的差异均为 $P < 0.01$,笔者认为这与 型胶原>壳聚糖>PLGA 材料的吸水能力不同有关^[12]。

材料的亲水性和湿润性还可以接触角大小来验证。接触角指材料表面和液滴与材料的切线之间的夹角。通常接触角越小,润湿性也就越好。本实验提示接触角:膜 <膜 <膜 <膜,各组间的差异均为 $P < 0.01$ 。接触角的大小与材料的表面能、表面的清洁程度及液滴的表面张力等因素有关。膜的接触角较大可能与其表面有大量的孔结构、表面粗糙以及高分子聚合物的较大的表面自由能有关。膜的表面均为 型胶原,因此它的接触角与纯胶原相近为 71.345° ,笔者认为角度较纯胶原稍大的原因与膜的表面较为粗糙有关^[12]。复合膜表面材料中复合了不同比例的壳聚糖后,其接触角均有增高,壳聚糖含量较高则接触角较高。

细胞毒性实验结果显示, 型胶原和壳聚糖材料均可以改善早期 L-929 细胞在膜的黏附率及缩短完全黏附时间;从 MTT A 值结果来分析:与膜 相比较,膜 可以促进 L-929 细胞的第 3、7 天的增殖,膜 可以明显促进第 1 天的增殖,但第 3、7 天而抑制细胞的生长。笔者认为这可能与 5:5 壳聚糖和 I 型胶原材料的表面存在大量的壳聚糖的氨基、羟基等极性基团抑制了成纤维细胞的后期生长有关。因此在对 PLGA 膜改性的过程中,应考虑到壳聚糖在复合膜表面材料含量,选择满意的 型胶原和壳聚糖的比例对复合膜生物相容性的改善有重要意义。

拉伸试验可测定材料的一系列强度指标和塑性指标。强度通常是指材料在外力作用下抵抗产生弹性变形、塑性变形和断裂的能力。材料在断裂前所达到的最大应力值,称抗拉强度(Tensile Strength)或强度极限^[13-14]。伸长率(Elongation),是指材料试样受拉伸载荷折断后,总伸长度同原始长度比值的百分数,用表示。本实验研究表明 PLGA 表面复合交

联的胶原和壳聚糖后可以明显的增加材料的抗拉强度,然而对材料的伸长率的影响较小,这样就更有利于复合膜接近人工硬脊膜的要求。

[参考文献]

- [1] Singh L, Kumar V, Ratner BD. Generation of porous microcellular 85/15 poly(DL-Lactide-co-glycolide) foams for biomedical application[J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (13): 2611-2617
- [2] 李宏卫, 张栋华, 祁兵, 等. 组织工程化人口腔黏膜的构建 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2005, 25 (6): 392-394
- [3] Mori T, Okumura M, Quzza A, et al. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts *in vitro* [J]. *Biomaterials*, 1997, 18 (13): 9451
- [4] Ueno H, Nakamura F, Murakami M, et al. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(15): 2125-2130
- [5] 周静艳, 孙卫斌, 王娟, 等. 壳聚糖对转染 hBMP2 基因的 NIH3T3 细胞相容性研究[J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2006, 26(9): 780-783
- [6] 李立华, 焦延鹏, 李志忠, 等. 聚乳酸/壳聚糖复合支架材料的生物相容性研究 [J]. *中国生物医学工程学报*, 2005, 24(4): 503-506
- [7] 杨淑野, 查振刚, 王双利, 等. 纳米壳聚糖-胶原纤维支架的生物相容性 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(1): 161-165
- [8] Ma Z, Gao C, Gong Y, et al. Immobilization of natural macromolecules on poly-L-lactic acid membrane surface in order to improve its cytocompatibility [J]. *Biomed Mater Res*, 2002, 63(6): 838-847
- [9] Shin SY, Park HN, Kim KH, et al. Lee MH, Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration[J]. *Periodontol*, 2005, 76(10): 1778-1784
- [10] Chen G, Sato T, Ohashi H, et al. Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2559-2566
- [11] Muzzarelli R, Baldassarre V, Conti F, et al. Biological activity of chitosan: ultrastructural study [J]. *Biomaterials*, 1988, 9(3): 247-252
- [12] 王迎军, 赵晓飞, 卢玲, 等. 角膜组织工程支架壳聚糖-胶原复合膜的性能[J]. *华南理工大学学报*, 2006, 34(8): 1-5
- [13] 马晓莉, 姚子华, 徐伟伟, 等. 医用多孔壳聚糖膜的制备及性能研究[J]. *功能高分子学报*, 2005, 18(3): 434-440
- [14] 王昆, 朱蕾, 曾春, 等. 生物型人工韧带的制备及体外检测[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12 (6): 1170-1174

[收稿日期] 2008-12-25