

# 聚乙交酯-丙交酯泡沫材料的生物学评价\*

刘霞<sup>1,2</sup>, 王常勇<sup>3</sup>

(1 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000;

2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

3 军事医学科学院 组织工程研究中心, 北京 100850)

**[摘要]** 为了解聚乙交酯-丙交酯(PLGA)多孔聚合物支架材料进一步作为组织工程种子细胞支架材料的安全性,通过细胞毒性试验和肌肉植入试验,对PLGA的生物相容性和可降解性进行了检测和评价。结果表明,PLGA泡沫材料的毒级为0~1级,在体外细胞培养试验中显示了良好的细胞相容性;术后各时间点,材料植入处肌组织无明显炎症反应,随着时间推移,泡沫材料占位空间逐渐缩小,证实了植入材料的可降解性。说明PLGA可以作为组织工程研究的细胞外基质材料。

**[关键词]** PLGA 聚合物材料; 组织工程; 生物相容性

**[中图分类号]** R318.08

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2005)05-0023-04

近年来,对生物可降解聚合物的研究发展迅速,由于其在体内能够生物降解,且降解产物毒副作用小,因此在国外已经被广泛应用于临床,如可吸收缝线、药物的释放载体、接骨板等。随着组织工程学的兴起,应用生物可降解聚合物作为移植细胞支架材料的研究已受到科研人员的广泛关注<sup>[1~4]</sup>。组织工程支架材料主要采用聚酯类生物降解材料,包括聚丙交酯(PLA)、聚乙交酯(PGA)以及聚乙交酯-丙交酯(PLGA)等。

研究发现,通过组织工程技术建造的组织工程化人工组织的质量,与支架材料的生物相容性密切相关,细胞支架材料在构建组织的过程中起着至关重要的作用<sup>[5~9]</sup>。根据组织工程产品在体内植入后应具有安全性、有效性的原则,聚合物支架材料不仅需要具备临床所需的物理、化学性能,同时还需要具备良好的生物相容性,以保证临床使用的安全。因此,在支架材料应用于组织工程研究之前,对支架材料进行体内生物相容性和降解性的系统评价是非常必要的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

PLGA 多孔聚合物支架材料(中科院化学所),

胎牛血清和DMEM(Gibco,USA),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,北京中山生物技术有限公司),L929小鼠成纤维细胞,SD大鼠(军事医学科学院实验动物中心)。

### 1.2 方法

1.2.1 PLGA的细胞毒性试验 采用MTT比色法。将PLGA加工成直径5mm的圆片,真空干燥,<sup>60</sup>Co照射消毒后置于培养液中,37℃下保持24h,分别制备50倍、10倍、2倍、0.4倍和0.08倍标准浓度的5种浸提液(以10mL/cm<sup>2</sup>为标准浓度),阳性对照用纯铅。然后将L929细胞以1×10<sup>3</sup>/mL的浓度接种于96孔培养板内,每孔加0.1mL,放入体积分数5%CO<sub>2</sub>和37℃孵箱内培养24h后取出,加入浸提液0.1mL/孔,使孔内终浓度分别达到25倍、5倍、1倍、0.2倍和0.04倍标准浓度,每浓度浸提液加6孔,空白对照组加培养液0.1mL,再重新放入孵箱内,分别于2,4,6,8,10d时取出一块培养板,加MTT20μL/孔,6h后加DMSO150μL/孔,震荡10min,用免疫酶联检测仪测定其吸光值(MTT检测值)。数据经统计学处理,按6级毒性分级法(表1)计算相对增殖度(RGR)及毒级。

$$RGR/\% = \frac{\text{试验组的MTT检测值}}{\text{空白对照的MTT检测值}} \times 100\%$$

\* [收稿日期] 2004-07-21

[基金项目] 国家“863”高技术研究与发展计划项目(2002AA744064)

[作者简介] 刘霞(1970-),女,陕西延安人,讲师,在读博士,主要从事基础兽医学研究。本试验完成于军事医学科学院组织工程研究中心。E-mail: liuxiayidan@126.com

表 1 6 级毒性分级法

Table 1 Method of classification of toxicity

相对增殖度/% RGR	100	75~ 99	50~ 74	25~ 49	1~ 24	0
毒性评级 Level of toxicity	0	1	2	3	4	5

1.2.2 PLGA 的肌内植入试验 将 PLGA 泡沫材料加工成直径 5 mm、厚 2 mm 的圆片,精确称重、编号后用<sup>60</sup>Co 照射消毒,无菌条件下植入到健康成年 SD 大鼠脊柱两侧肌内(脊柱两旁各选 2 点,同侧试验点相距 3 cm),分别于术后 2, 4, 8, 12 周取出试件检测。通过以下指标观察聚合物支架材料在体内的组织相容性及生物降解情况:(1)植入部位组织反应程度。软组织标本在体积分数 10% 福尔马林固定液中固定 24 h,石蜡包埋,HE 染色,组织学观察。(2)生物降解率。用失重百分率表示。取出试件并清洁表面,真空干燥后,用电子天平称重,按下式计算:

$$\text{失重百分率}/\% = ((W_0 - W_T)/W_0) \times 100\%$$

式中, $W_0$  和  $W_T$  分别为试样的原始重量和植入残余

试样的干重。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞毒性试验

MTT 检测数据见表 2,细胞相对增殖度及毒性评级结果见表 3。由表 2 可见,各浓度组与空白对照间 MTT 检测数据均无显著差异,而与阳性对照组相比,除了 2 d 时无显著差异外,在其余培养时间各浓度组与阳性对照间均有显著差异。由表 3 可见,细胞在各浓度浸提液中培养时,相对增殖度均在 89.9% 以上,对细胞的毒性较低,毒级仅为 0~1 级。但是随着培养时间的延长,高浓度浸提液中细胞的增殖度还是有所下降,说明其对细胞有一定的影响。

表 2 细胞在 PLGA 浸提液中培养不同时间的 MTT 检测值( $X \pm SD$ )Table 2 Value of MTT of cells cultured in PLGA at different times ( $X \pm SD$ )

检测组 Tested groups	培养时间/d Times of cells cultured				
	2	4	6	8	10
25	0.29 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.59 ± 0.06	1.24 ± 0.05	1.69 ± 0.06
5	0.31 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.59 ± 0.05	1.35 ± 0.09	1.68 ± 0.11
1	0.31 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.60 ± 0.02	1.39 ± 0.03	1.71 ± 0.07
0.2	0.28 ± 0.02	0.40 ± 0.04	0.59 ± 0.01	1.44 ± 0.05	1.76 ± 0.02
0.04	0.30 ± 0.01	0.39 ± 0.03	0.64 ± 0.02	1.36 ± 0.02	1.81 ± 0.05
空白 Blank	0.30 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.59 ± 0.03	1.38 ± 0.10	1.75 ± 0.05
阳性 Positive	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.02**	0.34 ± 0.02**	0.40 ± 0.40**	0.55 ± 0.08**

注:检测样品数  $n=6$ ,检测组中数据为浸提液浓度,表 3 同; \*\* 表示阳性对照组与其余各组差异显著 ( $P < 0.01$ )。

Note: The number of tested sample is 6, data in tested groups represent concentration of steep of PLGA, Table 3 is the same; \*\* Stands for significant discrepancy between the positive and the rest groups ( $P < 0.01$ ).

表 3 细胞在 PLGA 浸提液中培养不同时间的相对增殖度与毒性评级

Table 3 Relative gain rate of cells and evaluation of toxicity cultured in PLGA at different times

检测组 Tested groups	2 d		4 d		6 d		8 d		10 d	
	RGR	毒级 Level of toxicity								
25	96.4	1	102.1	0	100.3	0	89.9	1	96.4	1
5	102.4	0	105.1	0	100.2	0	97.8	1	96.0	1
1	102.2	0	102.1	0	102.2	0	101.7	0	97.1	1
0.2	93.4	1	97.4	1	100.0	0	103.6	0	101.6	0
0.04	100.2	0	100.0	0	108.6	0	98.3	1	102.9	0

### 2.2 肌内植入试验

2.2.1 外形观察结果 术后动物进食、起居正常,伤口无红肿、感染,无材料排出现象。

2.2.2 组织反应观察结果 试样植入 2 周后,PLGA 试样肌肉组织周围均有点状淤血,材料周围

为纤维状物,但纤维包囊尚未形成。显微镜下观察其 HE 染色图片可见,植入物与组织界面有炎症细胞浸润,并可见少量多核巨细胞,纤维母细胞增生并分泌胶原纤维,开始形成疏松的纤维膜(图 1 中 A, B, C),但与周围肌肉分界不清,植入物附近肌肉组织

轻度水肿, 有散在出血点, 部分肌纤维染色变浅, 肿胀。植入4周后, PLGA 周围均可见包裹一薄层半透明纤维包囊, 显微镜下可见炎细胞开始减少, 而巨噬细胞和多核巨细胞相对增多, 排列在材料与组织界面上, 纤维膜增厚, 与肌肉分界清楚, 无微小脓肿形

成(图1中D, E, F)。8周后, 中性粒细胞和淋巴细胞相继减少, 纤维膜稍致密, 周围肌肉恢复正常。12周后, 纤维膜逐渐稳定, 中性粒细胞以及淋巴细胞仅存少量, 可见巨噬细胞。

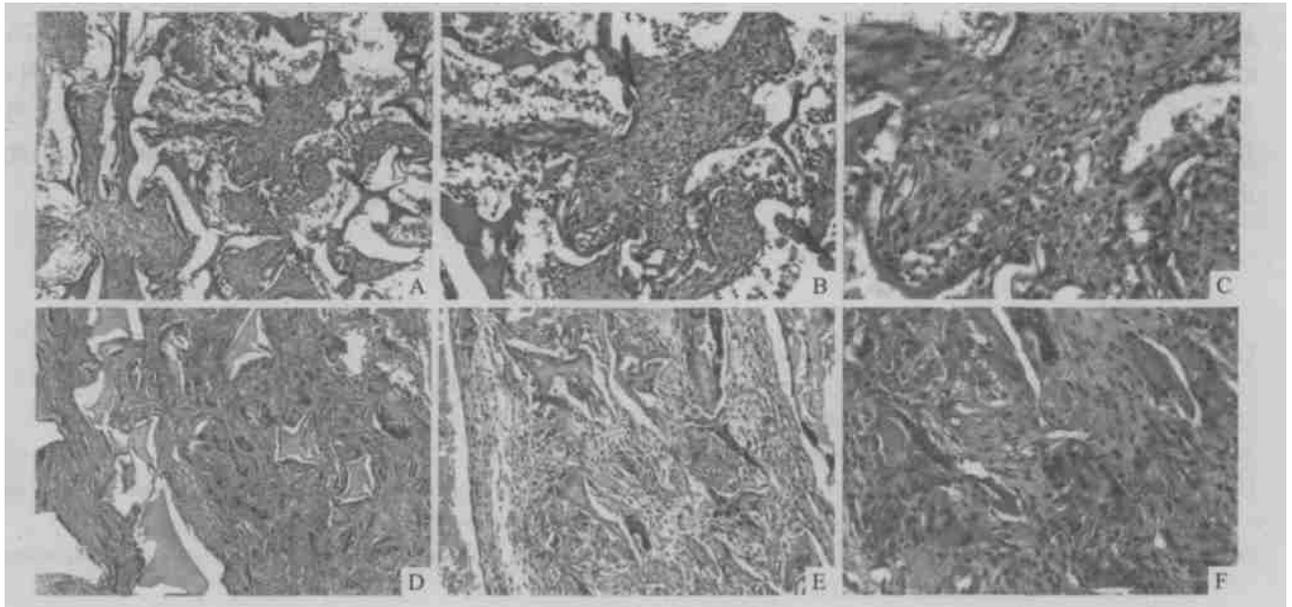


图1 PLGA 材料肌内植入结果(HE)

A~C. 植入术后2周(A.  $\times 50$ ; B.  $\times 100$ ; C.  $\times 200$ ); D~F. 植入术后4周(D.  $\times 50$ ; E.  $\times 100$ ; F.  $\times 200$ )

Fig 1 HE stain of intramuscular implantation of PLGA

A - C. 2 weeks after surgery (A.  $\times 50$ ; B.  $\times 100$ ; C.  $\times 200$ ); D - F. 4 weeks after surgery (D.  $\times 50$ ; E.  $\times 100$ ; F.  $\times 200$ )

2.2.3 PLGA 在体内的生物降解结果 术后2~4周, 试样外形无明显变化; 8~12周后, 试样开始变形, 并有逐渐散开的趋势。PLGA 试样植入后2, 4, 6, 8周的降解率分别为7.2%, 59.4%, 92.9%和96.8%。应用凝胶渗透色谱仪测定残余试样的分子量及其分布的结果表明, PLGA 支架分子量随其在体内埋植时间的延长而不断降低, 表明PLGA在不断降解。

### 3 讨论与结论

组织工程研究要求具备3个条件: (1)有足够数量且功能正常的种子细胞; (2)有适当的细胞外基质材料; (3)有调节细胞增殖、保持表型等特征的细胞因子。若没有适当的载体, 种植的细胞就会流失死亡, 因此细胞支架材料是组织工程研究的焦点之一。以往的研究发现, 作为移植细胞支架的三维多孔材料, 在构建组织的过程中起着至关重要的作用。对性能优良、生物相容性良好的聚合物支架的评价和筛选, 已成为组织工程研究过程中的重要组成部分, 并

逐渐引起人们的高度重视<sup>[10-12]</sup>。

细胞体外培养法是评价生物材料组织相容性的重要方法, 也是针对细胞支架材料进行生物学评价的首选方法。本试验采用PLGA的5种浓度浸提液进行测试, 能较全面地评价其毒性。从结果分析看, 各浓度组与空白对照间MTT检测数据均无显著差异, 但结合数据看, 高浓度对于细胞生长可能仍有一定影响。依据通常采用的六级毒性分级法, 本材料毒级为0~1级。另外, 本材料为多孔材料, 在根据表面积制备浸提液时, 只按表面积及周边面积计算, 而实际表面积要大得多, 因此浸提液的实际制备浓度较所列各浓度高。本试验结果表明, PLGA 泡沫材料在体外细胞培养试验中显示了良好的细胞相容性。

组织工程研究的最终目的, 是将组织工程化的人工组织或器官应用于人体组织或器官的修复和治疗, 因此对细胞支架材料体内组织相容性的检测具有重要意义。本研究通过泡沫材料肌内植入, 观察局部组织对植入材料的反应, 结果发现, 泡沫材料植入

处在术后各时间点,肌组织无明显的炎症反应。随着时间推移,泡沫材料占位空间逐渐缩小,证实了植入材料的可降解性。

从 PLGA 材料肌内植入的试验结果来分析,在植入的 3 个月内,局部肌组织的中性粒细胞、淋巴细胞等炎细胞浸润很少或没有发生,表明 PLGA 材料具有良好的生物相容性,无明显异物反应发生。术后 8~12 周,局部巨噬细胞、淋巴细胞浸润相对比较明显,但无中性粒细胞出现,说明不是炎症反应,可能是由于 PLGA 降解产物碎片的产生速度超过了体内组织的吞噬能力,使局部形成酸性降解物堆积而

导致 pH 值下降所引起。这一试验结果也提醒作者,需要调节聚合物的降解速度以进一步改善聚合物降解时的微环境。

细胞支架材料既应具有良好的生物相容性和生物可降解性,还应具有一定的生物降解速度。PLGA 植入体内后,逐渐降解成羟基乙酸和  $\alpha$ -羟基丙酸,并参加三羧酸循环,最终排出体外。通过调节 PLGA 的组成比例,可得到满足降解速度要求的支架材料。由于 PLGA 支架材料具有良好的生物相容性,又可通过调节组成比而具有适宜的生物降解速度,因此可以作为组织工程研究的细胞外基质材料。

### [参考文献]

- [1] 陈富林,毛天球,冯雪,等.兔关节软骨细胞的分离、纯化及鉴定[J].现代口腔医学杂志,1998,12(4):263-265
- [2] 刘鼎新,吕证实.细胞生物学研究方法与技术[M].北京:北京医科大学与中国协和医科大学联合出版社,1990
- [3] 王身国,侯建伟,贝建中.组织工程及周围神经修复[J].高技术通讯,1999,(2):60-62
- [4] 王身国.可生物降解的高分子类型、合成和应用[J].化学通报,1997,(2):45-48
- [5] Rotter N, Aigner J, Naumann A, et al. Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage[J]. J Biomed Mater Res, 1998, 42: 347-356
- [6] Cao Y L, Vacanti J P, Paige K T, et al. Transplantation of chondrocytes using a polymer-cell construction to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear[J]. Plast Reconstr Surg, 1997, 100: 297-302
- [7] Han D K, Park K D, Hubbell J A, et al. Surface characteristics and biocompatibility of lactide-based poly(ethylene glycol) scaffolds for tissue engineering[J]. J Biomater Sci Polymer Edn, 1998, 9(7): 667-680
- [8] Langer R S, Vacanti T P. Tissue engineering[J]. Science, 1993, 260: 920-925
- [9] Mikos A G, Sarakinos G, Letic SM, et al. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering[J]. Biomaterials, 1993, 14(5): 323-330
- [10] Zimmernann W H, Schneiderbanger K, Schubert P, et al. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct[J]. Circ Res, 2002, 90: 223-230
- [11] Humes H D. Tissue engineering of a bioartificial kidney: a universal donor organ[J]. Transplant Proc, 1996, 28: 2032-2035
- [12] Li R K, Yau T M, Weisel R D, et al. Construction of a bioengineered cardiac graft[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000, 119: 368-375

## Biological evaluation of PLGA polymer foams

LIU Xia<sup>1,2</sup>, WANG Chang-yong<sup>3</sup>

(1 College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Tissue Engineering Research Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** This study investigated the biocompatibility and biodegradable characters of PLGA foams. The experiments of cytotoxicity and intramuscular implantation of PLGA were carried out to test biological effects of polymer foams of PLGA. The primary results showed that polymer foams of PLGA had good biocompatibility *in vitro*, and there was no significant toxicity to body. These results exhibit that the novel porous PLGA foams may be used as a biodegradable scaffold for regeneration of cardiac tissue.

**Key words:** PLGA polymer foams scaffold; tissue engineering; biocompatibility