

PLGA- 型胶原—壳聚糖复合人工硬脊膜生物相容性的研究

张卫红^{1,2},袁文¹,王新伟¹,刘洋¹,韩竹¹

(1上海第二军医大学附属长征医院,上海 20003; 2 济宁医学院附属医院)

[摘要] 目的 观察聚乳酸—聚乙醇酸共聚物 (PLGA)- 型胶原—壳聚糖复合人工硬脊膜的生物相容性。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 A)、PLGA- 型胶原—壳聚糖 (5:5)复合膜 (膜 B),对其行接触角、吸水率测定及细胞毒性实验。结果 吸水率:膜 <膜 B <膜 A <膜, P均 <0.01;接触角:膜 <膜 A <膜 B <膜, P均 <0.01;细胞毒性实验:第 1天,各膜间 OD值比较, P>0.05;第 3、7天,膜与膜、膜 A,膜 A与膜 B比较, P均 <0.05。结论 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。膜 A在生物相容性方面基本符合人工硬脊膜的要求。

[关键词] 聚乳酸—聚乙醇酸共聚物;硬脊膜;壳聚糖; 型胶原;生物相容性

[中图分类号] R681 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1002-266X(2009)14-0014-03

Experimental research on the biocompatibility of PLGA-type- collagen-Chitosan composite membrane as artificial spinal dura mater

ZHANG Wei-hong¹, YUAN Wen, WANG Xin-wei, LIU Yang, HAN Zhu

(Changzheng Hospital, the 2nd Military Medical University, Shanghai 20003, P. R. China)

Abstract: Objective To observe the biocompatibility of PLGA-type- collagen-Chitosan composite membrane as artificial spinal dura mater **Methods** To produce PLGA membrane (M), PLGA-type- collagen composite membrane (M), PLGA-type- collagen-Chitosan(9:1) composite m (M A) and PLGA/-type- collagen-Chitosan(5:5) composite (M B). Contact angle, absorption rate and cytotoxicity study were used to research all type ms **Results** Contact angle: M <M A <M B <M, P <0.01; Absorption rate: M <M B <M A <M, P <0.01; Cytotoxic experiment: at 1st day, the OD value between each membrane didn't have significant difference, P >0.05. At 3rd and 7th day, there is significant difference between M and or A, (M A and B, all P <0.05. **Conclusions** After being modified by type- collagen and Chitosan, PLGA membrane could striking enhance the adhesion and proliferation of L929 cell On the whole, (M A can meet the biocompatibility as a type of material of artificial spinal dura mater

Key words: poly-D, L-lactic-co-glycolic acid; spinal dura mater; Chitosan; type- collagen; biocompatibility

硬脊膜损伤临床常见。由于自体组织、异体组织、动物来源的硬脊膜替代材料因质地欠佳、可诱发排斥反应及传播疾病等,均难以成为理想的修复替代材料,而人工硬脊膜替代材料的生物相容性较差。聚乳酸—聚乙醇酸共聚物 (PLGA)是脂肪族聚酯类生物可降解、毒性小、强度可调节的高分子材料,符合人工硬脊膜材料的基本条件^[1]。型胶原是人体硬脊膜组织和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^[2,3]。鉴此,2006年12月~2008年1月,我们以 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,观察其对细胞生物相容性的影响。

1 材料与方法

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公司),壳聚糖 (上海其胜生物制剂医疗器械公司),成纤维细胞 L929 (中科院上海生命科学院细胞所提供)。电子天平,接触角仪,海鸥 37XA 倒置相差生物显微镜, CO₂ 培养箱。

1.2 实验方法

1.2.1 实验用膜的制作 多孔 PLGA膜 (膜): 取 0.5 g 的 PLGA 溶解于 5 ml 氯仿中,待聚合物完

[基金项目] 上海市科研基金资助项目 (08411963800)。

全溶解后,加入粒径为 80~100 μm 的 NaCl 晶体,用磁力搅拌均匀后,浇注于模具中。静置 24~48 h,脱模后再静置,然后在真空干燥 24 h。在搅拌作用下用双蒸水浸泡 48 h,脱去其中的 NaCl,取出后沥干水,空气、真空干燥各 48 h,直至恒重,进行 PLGA 支架的制作。⁶⁰Co 照射消毒 (25 kGy)。多孔 PLGA- 型胶原复合膜 (膜) 的制作:在 10 环境下将 20 g/L 的 型胶原蛋白液倒入底层铺有膜的模具中。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。多孔 PLGA- 型胶原-壳聚糖复合膜 (膜 A 和膜 B) 的制作:型胶原蛋白液中加入 20 g/L 的壳聚糖液,两者的体积比分别为 9:1 (膜 A) 和 5:5 (膜 B),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 A 和膜 B。

1.2.2 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。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%。

1.2.3 接触角的测定 用接触角仪测定。测定温度为 20 ,双蒸水滴在样品表面,取相互距离 5 mm 3 点,用悬滴法影像分析 Q/2 切线法计算接触角。

1.2.4 细胞增殖实验 将 4 种膜材料裁成直径 6 mm 的圆片,放入 96 孔培养板,分别为膜、膜 A、膜 B 组,另设空白对照组 (膜 0 组),每组 6 个标本,膜上加入成纤维细胞 L929 (4.0 × 10³ ml)。各孔加入 RPM II 640 细胞悬浮培养液、10% 胎牛血清。在 37、5% CO₂ 培养箱内孵育 1、3、7 d,1、3、5 d 时更换新的培养液,镜下观察 L929 形态、贴壁及大体增殖情况。吸出原培养基后每孔加入 RPM II 640 培养基 200 μl 及噻唑蓝 (MTT) 40 μl,37 孵育 4 h,在酶联免疫检测仪上测定波长 490 nm 的光密度 (OD) 值 (代表细胞增殖情况)。细胞增殖情况佳,提示材料的细胞毒性小。

1.2.5 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件,对数据进行方差分析。P < 0.05。

2 结果

2.1 吸水率及接触角测定结果 吸水率:膜 < 膜 A < 膜 B < 膜 0, P < 0.01。接触角:膜 < 膜 A < 膜 B < 膜 0, P < 0.01。膜 吸水率为 16.37% ± 4.37%,接触角为 87.30° ± 10.98°;膜 A 分别为 30.70% ± 5.51%,71.05° ± 6.54°;膜 B 分别为 28.90% ± 4.80%,73.04° ± 9.88°;膜 0 分别为 24.23% ± 3.82%,79.54° ± 8.02°。

2.2 L929 形态学观察 膜、膜 A、膜 B 接种后约 3 h, L929 开始贴壁;6 h 大量贴壁,细胞分布均匀、伸展,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 约在接种 4 h, L929 开始贴壁,8~10 h 大量贴壁生长,36 h 完全贴壁生长。

2.3 细胞毒性实验结果 培养第 1 天时,膜、膜 A、膜 B 和膜 0 组的 OD 值分别为 1.07 ± 0.19, 1.50 ± 0.23, 1.48 ± 0.20, 0.98 ± 0.26, 1.53 ± 0.22 (P 均 > 0.05);第 3 天时,OD 值分别为 1.66 ± 0.37, 1.99 ± 0.29, 2.32 ± 0.31, 1.62 ± 0.14, 2.41 ± 0.27,膜组与膜、A 组,膜 A 组与膜 B 组比较, P 均 < 0.05;膜 0 组与膜、A 组比较, P > 0.05,膜 0 组与膜、B 组比较, P 均 < 0.05;第 7 天,OD 值分别为 1.95 ± 0.39, 2.35 ± 0.30, 2.42 ± 0.28, 2.02 ± 0.26, 2.78 ± 0.25,膜组与膜、A 组比较, P < 0.05;膜 A 组与膜 B 组比较, P < 0.01。

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、可控可降解性及无毒、无致癌、无致畸的三无特性和不传播疾病等条件。PLGA 是目前人工硬脊膜支架组织工程研究的热点。以 PLGA 为主要原料制成强度及柔软性满意的人工硬脊膜,在体内有较长的降解时间,可在坚实的硬膜替代组织形成前不被降解,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。

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。但单一胶原成膜的机械强度低、降解时间短^[5]。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。其具有良好的成膜性、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。有学者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,并有促进颅骨缺损后新骨的再生修复作用^[4]。此外,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^[7,8]。大量的壳聚糖可以抑制成纤维细胞的生长,机理可能与壳聚糖膜表面大量氨基存在有关。因此,我们设想通过 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、爬行及增殖能力。

细胞生物相容性研究是组织工程研究的主要方面。细胞在支架材料上黏附是细胞迁移、分化和增殖的基础。吸水率可以间接反映材料的亲水性,吸水率和材料的亲水性成正比。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。本研究中 4 种膜的吸水率比较是,膜 A < 膜 B < 膜 C < 膜 D ($P < 0.01$),这与 I 型胶原的吸水率 > 壳聚糖 > PLGA 有关^[9]。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。接触角越小,润湿性越好。习惯上我们把 $>90^\circ$ 为不润湿; 90° 为润湿。本实验结果提示,接触角为膜 A < 膜 B < 膜 C ($P < 0.01$)。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较大的表面自由能有关。膜 A 的表面均为 I 型胶原,因此它的接触角较纯胶原稍大,为 71.345° ;其原因与膜 A 的表面较为粗糙有关^[9]。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)。但我们认为,不能单纯以接触角的大小来衡量材料亲水性的高低,在干燥膜的情况下获得的结果,与体内湿润条件下所获得的结果可明显不同。

本研究中细胞增殖实验结果显示, I 型胶原和壳聚糖材料均可以改善早期 L929 在膜的黏附率,缩短完全黏附时间。与膜 A 比较,膜 B 可以促进 L929 第 3、7 天的增殖,膜 C 可以明显促进在第 1 天的增殖,但在第 3、7 天抑制细胞的生长。我们认为,这可能与 55 的壳聚糖和 I 型胶原材料的表面

存在大量的壳聚糖和氨基、羟基等极性基团,抑制了 L929 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 I 型胶原和壳聚糖的比例。膜 A 在生物相容性方面符合人工硬脊膜的要求,对复合膜生物相容性的改善有重要意义。

[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] Mori T, Okumura M. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro [J]. Biomaterials, 1997, 18 (13): 9451.
- [3] 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]. Biomaterial, 2001, 22 (15): 2125-2130.
- [4] Shin SY, Park HN, Kim KH, et al Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration [J]. Periodontol, 2005, 76 (10): 1778-1784.
- [5] Ma Z, Gao C, Gong Y, Ji J, 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.
- [6] 潘海陶, 郑启新, 郭晓东, 等. I 型胶原在 PLGA-(ASP-PEG) 表面修饰对兔骨髓基质干细胞生物力学的影响 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2006, 8 (10): 938-943.
- [7] 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.
- [8] Muzzarelli R, Baldassarre V, Conti F, et al Biological activity of chitosan: ultrastructural study [J]. Biomaterials, 1988, 9 (3): 247-252.
- [9] 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.

(收稿日期: 2009-02-11)

· 临床札记 ·

非霍奇金淋巴瘤误诊为大脑镰旁脑膜瘤 1 例报告

王 凯, 杨莎莎, 杨连松

(文登中心医院, 山东文登 264400)

患者女, 71 岁, 因头晕渐重伴左侧肢体乏力 20 d 于 2008 年 11 月入院。6 a 前曾行卵巢肿瘤切除术, 病理诊断为良性肿瘤, 术后恢复较好。查体: 患者神志清, 眼底水肿, 左侧肢体肌力 II 级, 余神经系统查体阴性。MR 示右侧额叶见形态不规则异常信号影, T1WI 及 T2WI 呈等信号, T1WI 见斑片状高信号影; 周围脑组织受压, 并见水肿信号, 中线左侧偏

移。增强扫描病灶明显均匀强化, $5.2\text{ cm} \times 5\text{ cm} \times 3.7\text{ cm}$, 边界清楚, 见脑膜尾征; 局部脑膜强化增厚, 侧脑室受压。胸部 CT 及腹部 B 超均未见异常。拟诊大脑镰旁脑膜瘤, 行肿瘤切除术, 术中见颅内压高, 给予甘露醇静滴及过度换气后好转。肿瘤呈紫红色、血运丰富、质脆易碎、位于大脑镰旁, 未侵犯硬脑膜与矢状窦, 肿瘤周围有出血, 右侧大脑前动脉被包绕于肿瘤中。分块切除肿瘤, 为完整保留右侧大脑前动脉, 残存少量包绕动脉的肿瘤组织。术后患者左侧肢体肌力基本恢复。病理示非霍奇金弥漫小 B 细胞淋巴瘤。修正诊断: 脑原发非霍奇金淋巴瘤。辅助化疗, 病情好转后出院。

讨论: 原发中枢神经系统淋巴瘤在颅内肿瘤中较罕见, 男性略多于女性, 就诊平均年龄约为 52 岁。本病单靠影像学资料而无细胞学和组织学检查诊断较困难。本例为高龄女性, 颅脑 MR 示有脑膜尾征, 结合发病部位及流行病学特点易误诊为大脑镰旁脑膜瘤。