

聚乳酸 / 甲壳素复合材料的制备及动物安全性评价

牟善松¹袁马安德²袁曙美¹袁李立华¹袁周长忍¹渊暨南大学生物医学工程研究所袁广东 广州 510632曰第一军医大学中心实验室袁广东 广州 510515冤

摘要目的 通过聚乳酸 / 甲壳素的复合制备一种具有较好生物相容性和生物可降解性的组织工程支架材料遥方法 采用溶液法将两种材料进行复合袁溶剂挥发后成型遥对此材料进行动物实验以评价其安全性遥结果 过敏实验结果显示袁动物对复合材料浸提液反应与阴性对照没有明显区别袁阳性对照的豚鼠外袁均未出现刺激反应曰热原实验结果显示袁在每种材料初试的 3 只新西兰白兔中袁体温升高均在 0.2 益以下袁并且体温升高总度数在 1.0 益以下袁符合热源实验的评价标准遥全身急性毒性实验显示袁兔子在注射浸提液后袁没有任何不安袁烦躁或其它萎靡不振等不健康行为遥结论 聚乳酸 / 甲壳素复合材料在生物学评价实验中符合评价标准袁可用作组织工程支架体的基质材料遥

关键词 聚乳酸 甲壳素 生物相容性

中图分类号 R318.08 文献标识码 B 文章编号院 000-2588渊003冤3-0245-03

Preparation of polylactic acid/chitin composite material and its safety evaluation by animal experiments

MOUShan-song¹, MAAn-de², TU Mei¹, LILi-hua¹, ZHOUC Chang-ren¹

¹Institute of Biomedical Engineering, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China; ²Central Laboratory, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To prepare scaffold material with good biocompatibility and biodegradability by compounding polylactic acid (PLA) and chitin. Methods After preparation of PLA from lactic acid, the compounding of PLA and chitin was carried out by dissolving these 2 materials in one solution for reaction. The composite material was obtained and molded after the solvent was evaporized, and the safety tests of this resultant material were conducted in guinea pigs and New Zealand rabbits, respectively. Results In allergic test, the guinea pigs responded to the digestion solution of the composite material in almost the same manner as normal saline (the latter serving as negative control), and no obvious allergic reaction was observed in the animals except those in positive control group. Pyrogenic test by injecting the digestion solution of the composite material in 6 rabbits found a raise in the body temperature less than 0.2 益 with the total increase (adding up the individual temperature raise) less than 1.0 益, to meet the accepted criteria for the pyrogenic test. In subsequent toxicity test, the rabbits showed no signs of agitation or inanimate behavior after injection. Conclusion PLA/chitin composite material conform to the ISO 10993-1, and can be used as a basic scaffold material in tissue engineering.

Key words: polylactic acid; chitin; biocompatibility

聚乳酸 (PLA) 是一种具有优良生物相容性和可降解性的聚合物袁经美国食品与药品管理局 (FDA) 批准可用作医用手术缝合线和注射用微胶囊、微粒及埋植剂等袁同时也可用于药物制剂和外科等方面的研究遥甲壳素及其衍生物是一种多糖类物质袁具有无毒性和无刺激性袁生物相容性、生物可降解性等优良性能遥本研究将甲壳素与 PLA 复合制备一种组织工程支架材料袁并对其生物相容性和安全性进行评价遥

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料

1.1.1 试剂 乳酸 (R 袁广州化学试剂厂) 冤 甲壳素 (渊上海化学试剂公司) 冤 0% 渊体积分数) 乙醇遥

1.1.2 实验动物 雌性豚鼠 9 只 (袁体质量 300~500 g) 袁 1~3 月龄遥健康成年雌性无孕新西兰兔 27 只 (袁体质量 2.5~3.0 kg) 遥

1.2 方法

1.2.1 聚乳酸的制备 将一定量的乳酸除水制成干燥乳酸袁真空加热后得到丙交酯袁然后用乙酸乙酯重结晶纯化遥向 20 ml 安瓿瓶中加入干燥的丙交酯 5 g 袁抽真空袁通氮气袁加入辛酸亚锡的甲苯溶液袁 30 益下反应 24 h 袁用三氯甲烷溶出聚合物袁在甲醇中将沉淀出的聚合物过滤袁真空干燥得到白色絮状聚乳酸遥

1.2.2 聚乳酸 / 甲壳素复合材料的制备 本实验采用溶液法制备复合材料遥室温下将甲壳素溶于溶剂后袁加入聚乳酸 (渊质量比为 10 颐 1) 和一定量的 40~60 目 NaCl 颗粒袁磁力搅拌 12 h 袁置于干净尧无菌尧粗糙

收稿日期 院 002-10-09

作者简介 院 牟善松 (1963- 袁男) 袁山东人袁 1988 年毕业于广州华南理工大学袁硕士袁助理研究员袁电话 院 20-85222062

通讯作者 院 周长忍

的聚四氟乙烯板袁在通风橱中待溶剂挥发后成型袁空干燥遥投入蒸馏水中袁搅拌袁出 NaCl袁真空干燥备用遥

1.2.3 动物安全性评价实验^响

1.2.3.1 过敏实验 实验样品为生理盐水浸提液曰以5%渊体积分数冤甲醛溶液为阳性对照曰生理盐水为阴性对照遥将材料生理盐水浸提液与完全弗氏佐剂等体积混合袁用力搅拌数分钟至完全乳化为止遥

9只豚鼠分为3组渊包括阴阳对照和实验组冤遥每组3只袁实验前24h剔除豚鼠背部4~6cm²毛发遥实验具体步骤如下述院

渊冤斑区内注射渊乙醇清洁暴露区域袁在每只豚鼠去毛区作6点对称的皮内注射袁各点相距1~2cm遥

渊冤局部斑帖院斑区内注射1周后袁在去毛区再剃毛袁乙醇清洁遥若未出现刺激反应袁每一实验区用10%十二烷基硫酸钠石蜡液渊LS冤预处理袁在局部斑点前24h用玻璃棒涂抹尧按摩袁使SLS进入皮肤以加强致敏作用遥24h后袁用SLS试液饱和2cm伊cm滤纸袁将其敷贴于豚鼠背部的注射部位袁7.5cm长的外科棉纱封闭固定48h遥

渊冤激发院于末次至致敏后14~48h袁在豚鼠左右腹侧未实验处剃毛袁乙醇清洁袁按上述制备方法袁将滴有被试液饱和的滤纸渊cm伊cm冤贴于剃毛区袁封闭保留24h遥

1.2.3.2 热原实验 实验新西兰兔在测量7d内体温均在(38.3~38.6)益遥在测量体温前7d应在同一环境条件下袁袁用同一种饲料袁在此期内体质量不减轻袁精神尧食欲尧排泄等无异常现象遥选用3组渊每组2只冤共6只符号要求的新西兰兔袁测定其正常体温后15min内袁将浸提液自耳静脉缓慢注入实验材料浸提液袁剂量为10ml/kg^{b.w.}袁液体温度为37益遥注射后每隔1h测量体温1次袁共测3次袁以3次中体温最高的一次减去正常体温袁即为该兔的体温升高度数遥

1.2.3.3 全身急性毒性实验 将实验材料的浸提液通过动物静脉注射到动物体内袁观察其生物学反应袁以评定材料的急性毒性作用遥选择未做过任何其他实验的新西兰兔3只袁腹腔分别注射复合材料浸提液以及生理盐水空白对照液遥注射后24尧8尧2h分别称量兔的体质量并观察其各种反应遥

1.2.3.4 兔皮下埋植实验

1.2.3.4.1 实验动物 选用未做过任何其他实验的新西兰兔18只袁随机分为3组袁每组6只袁观察期分别为2周尧个月尧个月遥饲养1周后进行实验遥实验前测体质量袁观察毛色尧活动尧进食等情况遥实验前1d行兔腹部备皮遥

1.2.3.4.2 植入材料 除前述方法制备的聚乳酸/甲

壳素复合材料外袁选用纯块状甲壳素作为对照植入材料袁均用手刀切割成10mm伊mm伊mm大小袁超声波震荡清洗袁煮沸消毒或高压蒸气消毒后备用遥

1.2.3.4.3 植入方法 用3%戊巴比妥钠经兔耳缘静脉行静脉麻醉袁术区用碘酒尧酒精消毒袁铺无菌单遥在上腹部正中线上各取一个长10cm的切口袁两切口相距5cm遥切开皮肤袁皮下向两侧潜行分离袁形成5cm长的皮下隧道袁取上述复合材料植入遥

1.2.3.4.4 标本制备 3组动物分别于术后2周尧个月尧个月以空气栓塞法处死袁将植入材料连同周围1cm范围内的组织一并取下遥将植入材料剥出袁观察周围组织与植入材料的植入情况袁是否容易剥出曰然后将周围组织以10%甲醛溶液固定袁经脱水尧透明尧包埋等处理后HE染色袁观察植入材料周围组织情况曰同时取心尧肝尧肾等组织制成病理切片并进行观察遥

2 结果

2.1 过敏实验结果

皮内注射1周袁在剃毛区再剃毛袁乙醇清洁遥阳性对照的豚鼠外袁均未出现刺激反应遥过敏实验数据是在局部斑帖尧激发之后袁敷帖物取下后的情况记录遥

过敏实验情况记录表明袁注射浸提液的3只实验组豚鼠在1h后袁均出现轻微红斑和水肿曰4h后一只豚鼠出现轻微红斑和极轻微水肿袁其余两只豚鼠的红斑和水肿基本消退曰8h后3只豚鼠的红斑和水肿全部消失遥阴性对照组的3只豚鼠在1尧4和48h后的过敏情况与注射浸提液的3只豚鼠基本相似遥阳性对照组的3只豚鼠致敏1h后袁均出现局限性红斑和轻微水肿袁4h后有2只豚鼠有局限性红斑和轻微水肿袁只发展到中度红斑和水肿曰8h后仍有1只有中度红斑袁且水肿程度加剧遥

2.2 热原实验结果

新西兰白兔在实验前1周内体温平均为渊8.3~38.6)益袁注射浸提液后体温变化情况见表1遥

表1 注射浸提液后兔体温的变化 渊益冤
Tab.1 Changes of the body temperature of the rabbits after digestion solution injection (益)

Groups No.	Beforeexperiment	Afterexperiment		
		1 h	2 h	3 h
1	38.4	38.6	38.8	38.6
2	38.6	38.6	38.4	38.5
3	38.6	38.5	38.6	38.6

2.3 全身急性毒性实验

将复合材料的浸提液注入到实验动物体内后袁所有动物均无死亡袁无惊厥尧瘫痪尧呼吸抑制等不良反应遥

2.4 皮下埋植实验

2.4.1 大体观察 兔分笼饲养活动正常日进食普通合成饲料食欲好体重逐渐增加遥未发现有烦躁不安抓鼻挠痒打喷涕等全身过敏反应的表现遥手术切口均一期愈合植入区局部皮肤无红肿破溃及材料外露遥材料在皮下均可触及与皮肤不粘连呈现可滑动性袁至6个月复合材料的大小和形状均无明显变化遥

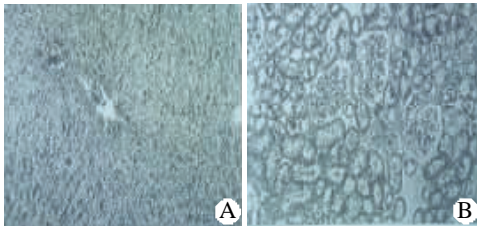


图1 兔皮下植入材料1个月后的周围组织显微照片 渊E,伊00渊
Fig.1 Microscopic observation of the tissues around chitin or its composite 1 month after their subcutaneous implantation in rabbits (HE staining, 伊00)
A: Chitin; B: Composite

3 讨论

从本研究的过敏实验可以看出豚鼠对复合材料浸提液反应与阴性对照没有明显区别遥除去敷贴物24h后袁只有1只豚鼠有轻微红斑和很轻微水肿遥8h后袁红斑和水肿完全消失袁与没有注射浸提液的豚鼠已无分别遥而阳性对照的豚鼠24h后出现局部性红斑和轻微水肿袁8h后加剧袁有1只出现轻度到中度的红斑袁而且水肿突出部位加大遥本材料致敏率为0袁属于玉级袁所以无致敏性遥

热源实验的数据表明袁在每种材料初试的3只新西兰白兔中袁体温升高均在0.2益以下袁并且体温升高总度数在1.0益以下袁符合热源实验的评价标准袁提示植被的复合材料所含热原均符合生物体的要求袁具有良好的生物相容性遥在制备材料的过程中虽然使用了六氟异丙醇尧三氯甲烷作为溶剂袁但它们具有很强的挥发性袁长时间的真空干燥后袁已经在多孔材料中完全消失袁所以也不会对生物体造成伤害遥

急性毒性实验结果显示袁兔子在注射浸提液后袁没有表现出任何不安尧烦躁或其他萎靡不振等不健康行为袁说明复合材料无急性毒性作用遥

兔皮下埋植实验表明袁聚乳酸/甲壳素复合材料能够很好地被宿主所接受袁动物生存好袁无材料感染尧排斥尧外露尧过敏反应等不良结果的发生遥组织切片观察结果表明袁聚乳酸/甲壳素复合材料无明显的炎症反应及异物反应袁能与植入区软组织很好地相容并进

2.4.2 HE染色光镜观察 术后各期植入材料周围组织的炎症反应均很轻微袁在植入材料周围均形成一个纤维囊袁以块状甲壳素周围为厚袁且内壁完整光滑袁而聚乳酸/甲壳素复合材料周围则较薄渊图1袁图2渊且内壁见剥出材料时撕扯断的纤维絮样组织遥纤维囊由大量的胶原纤维和纤维细胞尧纤维细胞构成袁未见骨样组织遥心尧肝尧肾等组织正常袁未见病理改变渊图2渊

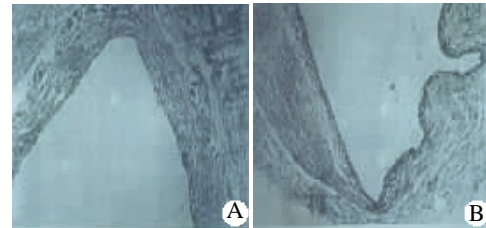


图2 兔皮下植入复合材料1个月后的肝和肾显微照片 渊E,伊00渊
Fig.2 Microscopic observation of the liver and renal tissues 1 month after subcutaneous implantation of chitin or its composite in rabbits (HE staining, 伊00)
A: Liver; B: Kidney

行结合遥这些结果均证明复合材料具有良好的生物相容性遥

复合材料的动物安全评价结果表明袁本研究的复合材料无明显毒性袁材料中不存在潜在致敏物质袁所含热原量符合生物体的要求袁且复合材料能与软组织很好地结合遥说明聚乳酸/甲壳素复合材料具有生物相容性袁可用作组织工程支架体的基质材料遥细胞培养尧长期毒性实验袁植入材料与骨组织结合等后续研究袁我们将陆续予以报道遥

参考文献

- 咱暂Albertsson AC., Lofgren A. Synthesis and characterization of poly(1,5-dioxepan-2-one-co-L-lactic acid) and poly(1,5-dioxepan-2-one-co-D-lactic acid) 咱暂 J Macromol Sci Part A: Pure and Applied Chemistry, 1995, A32(1): 41-59
- 咱暂Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage 咱暂 Biomaterials, 2000, 21(5): 431-40
- 咱暂Chu CF, Lua, Liszkowski M, et al. Enhanced growth of animal and human endothelial cells on biodegradable polymers 咱暂 Biochim Biophys Acta, 1999, 1472(3): 479-85.
- 咱暂张文涛, 卢世璧, 王继芳, 等. 组织工程软骨移植修复兔膝关节骨缺损 咱暂 中华外科杂志, 1998, 36(10): 591-3.
- Zhang WT, Lu SB, Wang JF, et al. Tissue engineering of hyaline cartilage 咱暂 Chin Surg, 1998, 36(10): 591-3.
- 咱暂Allan B. Artificial corneas 咱暂 BMJ, 1999, 318(7187): 821-2.
- 咱暂郝和平, 奚廷斐, 卜长生, 主编. 医疗器械监督管理和评价 咱暂 北京: 中国医药科技出版社, 2000. 221-7.