

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.02.0194

· 论 著 ·

外科植入引导牙周组织再生载药 PLGA/CS/nHA 复合膜的制备及表征

李欣, 张潇, 解斯羽, 何祥一*, 郭文巧, 杨罗, 陆玉莹

兰州大学口腔医学院, 兰州 730000

[摘要] **目的** 制备聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)/壳聚糖(CS)/纳米羟基磷灰石(nHA)多孔性载药膜,用于外科植入牙周引导组织再生,并评价其体外性能。**方法** 按照 PLGA/CS 的质量比将实验设为 4 组:分别为 100/0、90/10、80/20、70/30,采用冷冻干燥法制备 PLGA/CS/nHA 复合膜,并用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)作为致孔剂。依据孔隙率、吸水率、力学性能、体外降解率筛选出最优质量比的 PLGA/CS/nHA 复合膜作为药物载体,制备克林霉素缓释膜。采用扫描电子显微镜观察 PLGA/CS/nHA 复合膜的表面形貌,无水乙醇液体置换法检测复合膜的孔隙率,质量干湿度比考察复合膜的吸水率,电子万能材料试验机测试复合膜的湿态力学性能,质量损失考察膜的降解率,紫外分光光度法考察载药膜的体外药物释放特性。体外实验:在载药膜上接种牙周膜成纤维细胞(PLFs),培养 1~7 d,采用 CCK-8 法测定细胞活性和增殖情况。**结果** PLGA/CS 质量比为 90:10 时制备的 PLGA/CS/nHA 复合膜最为理想,孔隙率为 $(28.66 \pm 1.35)\%$,吸水率为 $(108.65 \pm 2.27)\%$,拉伸强度为 (2.36 ± 0.04) MPa,断裂伸长率为 $(203.64 \pm 3.89)\%$,断裂力为 (45.98 ± 2.46) N,30 d 时降解率为 $(17.60 \pm 0.86)\%$,最大每日释放量为 $150 \mu\text{g/mL}$,平稳释放药物并维持有效药物浓度时间 >15 d,载药膜能促进牙周膜成纤维细胞的增殖。**结论** 本研究制备的载药 PLGA/CS/nHA 复合膜孔隙率适中,体外降解与组织生长相适应,力学测试结果能够创造和维持牙周引导组织生长特定的空间,在一定时间内能持续稳定释放药物。

[关键词] 聚乳酸-羟基乙酸共聚物;壳聚糖;冷冻干燥法;多孔隔离膜;牙周引导组织再生;牙周膜成纤维细胞

[中图分类号] R 783.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2017)02-0194-07

Preparation and characteristics of drug loaded PLGA/chitosan/nano-hydroxyapatite membrane for guided periodontal tissue regeneration in surgical implanting

LI Xin, ZHANG Xiao, XIE Si-yu, HE Xiang-yi*, GUO Wen-qiao, YANG Luo, LU Yu-ying

School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

[Abstract] **Objective** To prepare the porous drug-containing membrane by poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)/chitosan (CS)/nano-hydroxyapatite for guided periodontal tissue regeneration in surgery, and to evaluate its performance *in vitro*. **Methods** The samples were divided into four groups by different mass ratios of the PLGA to CS (100 : 0, 90 : 10, 80 : 20 and 70 : 30). The PLGA/CS/nano-hydroxyapatiteporous films were prepared by freeze-drying process, with polyvinylpyrrolidone (PVP) used as porogen. The best ratio was chosen by detecting the porosity, water absorption, mechanical properties and degradation of the films; and then it was used as drug carrier to prepare membrane material for clindamycin controlled release. The morphology of membrane was observed by scan electronmicroscope, the porosity was detected by anhydrous ethanol liquid displacement method, water absorption was determined by ratio of wet to dry weight of the film, the wet mechanical performance was tested by electronic universal material testing, the degradation was determined by weight loss and swelling degree, and the release character was investigated by ultraviolet spectrophotometric method. In the *in vitro* experiments, periodontal ligament fibroblast cells (PLFs) were cultured in the membrane for 1-7 days, and cell proliferation was measured by CCK-8. **Results** The optimal porosity and degradation were found when the mass ratio of PLGA to CS was 90 : 10, with the porosity being $(28.66 \pm 1.35)\%$, water absorption being $(108.65 \pm 2.27)\%$, tensile strength being (2.36 ± 0.04) MPa, elongation at break of films

[收稿日期] 2016-05-29 **[接受日期]** 2016-08-20

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项基金(lzujbky-2014-161). Supported by Fundamental Research Funds for Central Universities (lzujbky-2014-161).

[作者简介] 李欣, 硕士, 讲师. E-mail: lixin@163.edu.cn

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0931-8915051, E-mail: hexy@lzu.edu.cn

being (203.64±3.89)%, breaking power being (45.98±2.46) N, and degradation being (17.60±0.86)%. The maximum drug release was 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, and the effective drug release concentration lasted for 15 d, which could promote the proliferation of PLFs. **Conclusion** The porous PLGA/CS/nano-hydroxyapatite film prepared in the present study has optimal porosity, its degradation *in vitro* fit well with the tissue growth, and can create and maintain a specific space for guided periodontal tissue regeneration, allowing for steady drug release for a certain period of time.

[Key words] poly(lactic-co-glycolic acid); chitosan; freeze drying; porous barrier membrane; periodontal guided tissue regeneration; periodontal ligament fibroblasts

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(2): 194-200]

引导组织再生(guided tissue regeneration, GTR)是为恢复因牙周病导致丧失的牙周支持组织的特殊技术,其在牙周和种植方面的作用越来越受到重视^[1]。在组织学愈合过程中,如果牙周膜细胞(PDL-C)接触牙根面结缔组织就会形成,所以其中屏障膜材料是GTR的关键因素^[2]。目前,生物可降解膜材料省去了二次取出膜材料的手术过程,具有生物相容性好和降解产物无毒性作用等特点^[3],研究和应用广泛。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)具有良好的降解性能、生物相容性、无毒性 and 结构可变性,广泛应用于药物、医学组织工程等领域^[4]。通过在制备过程中调整聚乳酸和聚乙醇酸的比例,可以调整PLGA的降解性能^[5],为药物的持久释放提供了可能^[6]。壳聚糖(CS)有良好的生物相容性和降解性,还具有抗菌、止血、阻止组织粘连、加速愈合等特性^[7]。对于口腔常见病原菌,研究人员通过体外实验证实较低浓度的CS能够抑制放线杆菌和变形链球菌^[8]。纳米羟基磷灰石(nHA)是人体硬组织的主要组成部分,因为其置入人体后能和软骨组织紧密结合,而被广泛用作骨替代物^[9];其化学成分与天然骨中的矿物成分非常相近,其生物活性能够支持必要的骨组织再生^[10]。然而,PLGA等高分子材料在体内发生水解时会产生轻微炎症,虽然对人体无害,但会影响GTR的效果^[11-12];CS膜加工性能差且脆性大,限制了其在GTR等生物医学领域的应用。将PLGA与CS混合制成复合材料,可以将合成高分子材料的理化性能和加工性能与天然高分子材料的生物相容性结合在一起,克服单一聚合物的缺点。在其中添加nHA可进一步增加复合材料的生物活性。

本研究旨在采用冷冻干燥法,按CS和PLGA以不同的质量比制备成牙周GTR载药PLGA/CS/nHA

复合膜,并检测其表征、药物缓释及细胞相容性。

1 材料和方法

1.1 实验设备、材料及试剂 磁力搅拌器(常州华冠仪器有限公司);FD-1CE冷冻干燥机(北京德天佑科技发展有限公司);S-4800型扫描电子显微镜(日本日立公司);电子万能材料试验机(WDW-2C,无锡建仪实验器材有限公司);紫外分光光度计(U-3900H,日本日立公司)。乙醇酸-羟基乙酸共聚物(乙醇酸与羟基乙酸体积比为75:25,长春圣博玛生物材料有限公司);医用级CS(脱乙酰度>90%,南通兴成生物制品厂);聚乙烯吡咯烷酮(PVP-K30,相对分子质量10 000,天津光复精细化工研究所)。nHA(20 nm,兰州旋光化学技术有限公司)。克林霉素(批号H20031253,西安力邦制药有限公司)。

1.2 优化分组 按照PLGA与CS质量比100:0、90:10、80:20、70:30分为4组,并按CS所占的质量分数分别标记为C₀、C₁₀、C₂₀、C₃₀,每组加入nHA 1 g。PLGA、CS总量与致孔剂的质量比约为1:1。

1.3 PLGA/CS/nHA复合膜的制备 PLAG 37℃真空干燥24 h,分别配制PLGA的丙酮溶液和CS的冰醋酸溶液,分别按照PLGA/CS质量比为90:10、80:20、70:30这3种比例混合,磁力加热搅拌2 h。对照组为未加CS的原溶液。配制10%的nHA水溶液10 mL,超声混合均匀。精密称取100 mg克林霉素溶于蒸馏水,并将致孔剂PVP分别缓慢逐滴加入到上述溶液中,继续磁力搅拌2 h,超声波振荡1 h,停止反应;缓慢倾倒入培养皿中,形成厚度为1 mm的凝胶,将制得的凝胶置于25℃恒温24 h,使其中丙酮挥发,再于-80℃预冻12 h,冷冻干燥24 h,获得PLGA/CS/nHA膜。将膜用2%的

NaOH 溶液浸泡除酸,大量去离子水反复清洗去除致孔剂后,二次冷冻干燥,得到 PLGA/CS/nHA 克林霉素复合药膜。

1.4 PLGA/CS/nHA 复合膜的性能考察

1.4.1 孔隙率 采用无水乙醇液体置换法检测其孔隙率。将制备的膜干燥后剪裁成 $10\text{ mm}\times 10\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的小片,浸入装有无水乙醇的量筒中,其中无水乙醇的体积为 V_1 。将量筒置于真空干燥器中 5 min,抽真空,将材料孔隙内空气抽空,使乙醇进入材料孔隙内,至无气泡溢出为止,此时总体积计为 V_2 。将材料取出后,剩余乙醇体积计为 V_3 。材料孔隙率 $\epsilon(\%)=(V_1-V_3)/(V_2-V_3)\times 100\%$ 。设置 3 组平行样品,取其平均值作为孔隙率测试结果。

1.4.2 吸水率 将制备的膜干燥后剪裁成 $10\text{ mm}\times 10\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的小片,称其干质量(W_0)后置于水中 4 h,取出用滤纸将膜表面的水分吸去,称其湿质量(W_{wet})。吸水率 $(\%)=(W_{\text{wet}}-W_0)/W_0\times 100\%$ 。

1.4.3 力学性能 将制备的膜干燥后用标准的哑铃试样裁制成大约 $30\text{ mm}\times 120\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的薄片,将样条浸入 $\text{pH}=7.4$ 的 PBS 中 3 min,取出后将试样表面水分用滤纸吸干,立即进行湿态力学性能测试。测试条件:温度 21°C ,相对湿度 45%,拉伸速率 5 mm/min 。各组样品测试 3 次取平均值。

1.4.4 体外降解 将制备的膜干燥后剪裁成 $10\text{ mm}\times 10\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的小片,真空干燥后称量其干质量 W_0 ,将其放入装有 20 mL 模拟体液(SBF)的离心管中,然后将离心管放置在 37°C 100 r/min ($r=5\text{ cm}$)的摇床上进行降解。每 5 d 取出 1 次,更换离心管中的 SBF;分别在第 5、10、15、20、25、30 天将膜取出,用滤纸吸干膜表面的水分,再将其放入到 40°C 烘箱中烘 12 h,称量干质量 W_{dry} 。膜的质量损失率 $(\%)=(W_0-W_{\text{dry}})/W_{\text{dry}}\times 100\%$ 。

1.5 紫外光谱测定克林霉素线性关系 参考文献[13]。

1.6 体外药物释放实验 取含克林霉素的药膜,裁成 $10\text{ mm}\times 10\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的小片,分别在 5 mL 盐酸溶液、 37°C 恒温条件下进行 14 d 体外释放实验,每隔 24 h 取出 4 mL 用 1.5 项下方法测得其光密度(D)值,同时再补充 4 mL 介质,根据标准曲线求得其每日的释药量,并对释药时间作图。

1.7 牙周膜成纤维细胞培养和增殖 将购于 Cyagen Biosciences Inc. 的牙周膜成纤维细胞复苏,加入 5 mL DMEM 培养液(20%胎牛血清,青霉素 100 U/mL,链霉素 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$)置 CO_2 培养箱(5% CO_2 ,95%空气,100%湿度, 37°C 恒温)中培养,隔天换液,传至第 3 代备用。

将牙周膜成纤维细胞种植在支架上,将涂有不同比例 PLGA/CS/nHA 薄膜的方形玻璃片放入 24 孔培养板中,以涂 PLGA 薄膜和未涂膜的玻璃片为对照组,选取 3 个观察时间点(1、4、7 d),每组 3 个平行样,紫外光照 2 h;将培养的第 3 代牙周膜成纤维细胞经 0.25%胰蛋白酶消化,计数,按每孔 3.5×10^4 的密度接种牙周膜成纤维细胞, 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 7 d,隔天换液,倒置显微镜每天观察细胞生长情况。

1.8 扫描电子显微镜观察细胞的生长形态 支架置入细胞 7 d 后在 2.5%戊二醛中固定 24 h,用 PBS 冲洗 3 次,在乙醇中梯度脱水(分别为 30%、50%、70%、90%、100%),干燥、喷金,扫描电子显微镜观察。

1.9 CCK-8 测试细胞活性和扩增情况 牙周膜成纤维细胞分别浸在 20%胎牛血清的完全培养基支架上培养 1、4、7 d。将 200 μL 上清液的等分试样用移液管移到 96 孔板,加入 10% CCK-8 溶液,于 5% CO_2 37°C 孵育 4 h,酶标仪(Infinite M200,TECAN,Swiss)测 450 nm 处 D 值。

1.10 统计学处理 所有实验重复 3 次,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 软件对数据进行分析,以 t 检验进行组间比较。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 PLGA/CS/nHA 复合膜的性能考察结果

2.1.1 孔隙率 C_0 、 C_{10} 、 C_{20} 、 C_{30} 组复合膜的孔隙率分别为 $(10.26\pm 0.38)\%$ 、 $(28.66\pm 1.35)\%$ 、 $(38.28\pm 2.11)\%$ 、 $(40.02\pm 1.33)\%$ 。可见与纯 PLGA 膜相比,添加 CS 后复合膜的孔隙率增加,溶出致孔剂 PVP 后 PLGA/CS/nHA 复合膜的孔隙率为 28%~40%。

2.1.2 吸水率 由图 1 可见, C_0 、 C_{10} 、 C_{20} 、 C_{30} 组复合膜均在最初的 30 min 内吸水率升高很快,但在随后的 30 min 内吸水率增加有所减缓,60 min 后各组复合膜均基本达到吸水平衡。

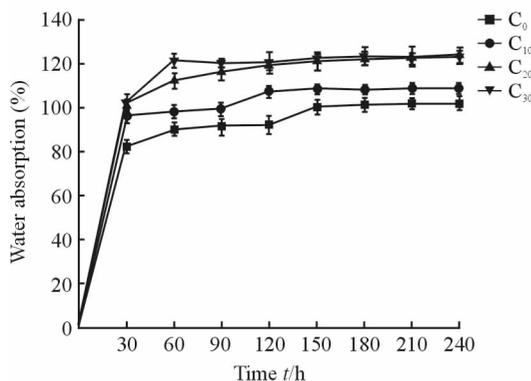


图1 各组 PLGA/CS/nHA 复合膜随时间变化的吸水率

Fig 1 Water absorption changes of PLGA/CS/nHA composite membranes

PLGA/CS/nHA: Polylactic-*co*-glycolic acid/chitosan/nano-hydroxyapatite. C₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 100 : 0; C₁₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 90 : 10; C₂₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 80 : 20; C₃₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 70 : 30. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

2.1.3 力学性能 由表1可见各组 PLGA/CS/nHA 复合膜在湿态条件下的拉伸强度为 1.43~2.36 MPa,断裂伸长率为 185.06%~224.32%,断裂力为 33.04~45.98 N。

表1 各组 PLGA/CS/nHA 复合膜的湿态力学性能

Tab 1 The mechanical properties of PLGA/CS/nHA composite membranes under wet conditions

Group	Tensile strength	Elongation	Breaking
	<i>P</i> /MPa	(%)	power <i>F</i> /N
C ₀	2.23 ± 0.12	185.06 ± 3.11	40.06 ± 2.23
C ₁₀	2.36 ± 0.04	203.64 ± 3.89	45.98 ± 2.46
C ₂₀	1.79 ± 0.08	214.36 ± 3.97	37.28 ± 2.11
C ₃₀	1.43 ± 0.05	224.32 ± 4.02	33.04 ± 1.92

PLGA/CS/nHA: Polylactic-*co*-glycolic acid/chitosan/nano-hydroxyapatite. C₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 100 : 0; C₁₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 90 : 10; C₂₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 80 : 20; C₃₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 70 : 30

2.1.4 体外降解 从图2可以看出,C₃₀组复合膜在20d左右完全降解,这是因为CS降解较快,使复合膜的溶胀度随着CS含量的增加而增大。C₂₀组复合膜在降解至30d时失去强度,C₁₀降解30d时降解率为(17.60 ± 0.86)%,仍具有部分强度。理想的GTR材料膜发挥功能时间最好为6周;体外降解显示组别C₁₀降解与组织生长相适应,能够创造和维持牙周引导组织生长特定的空间,是一种理想的牙周GTR屏障膜。

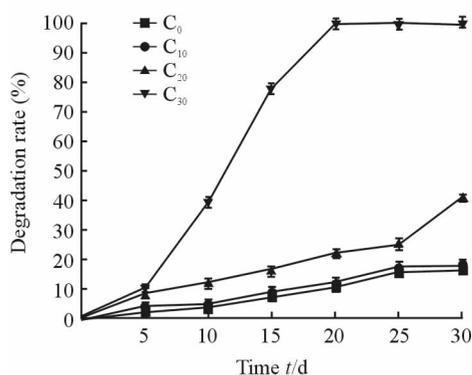


图2 各组 PLGA/CS/nHA 复合膜在模拟体液中的降解曲线

Fig 2 The degradation rates of PLGA/CS/nHA composite membranes in simulated body fluid solution

PLGA/CS/nHA: Polylactic-*co*-glycolic acid/chitosan/nano-hydroxyapatite. C₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 100 : 0; C₁₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 90 : 10; C₂₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 80 : 20; C₃₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 70 : 30. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

2.2 PLGA/CS/nHA 载药复合膜的体外药物释放 以药物释药量为纵坐标、药物释放时间为横坐标分别绘制药膜每日缓释曲线(图3)。图3显示,不同PLGA/CS质量比的载药膜均有突释现象,直到2d后载药膜的药物缓释量才趋于平稳,并可维持有效释药量10d以上。由图3可知,C₁₀组复合膜第1天药物释放量为150 μg/mL,高于C₀组(75 μg/mL)、C₂₀组(93 μg/mL)及C₃₀组(110 μg/mL)。C₁₀组复合膜可维持有效药物浓度时间 > 15 d,而其他组复合膜可维持有效药物浓度的时间均达到10 d。

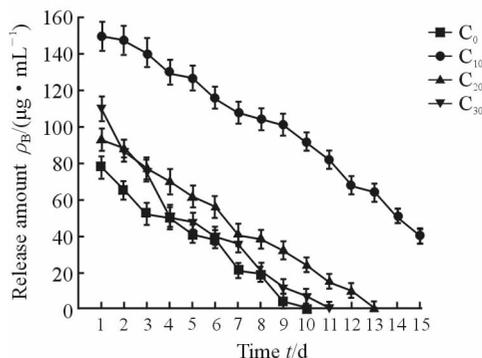


图3 各组 PLGA/CS/nHA 复合膜的每日释药曲线

Fig 3 The daily drug release curves of PLGA/CS/nHA composite membranes

PLGA/CS/nHA: Polylactic-*co*-glycolic acid/chitosan/nano-hydroxyapatite. C₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 100 : 0; C₁₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 90 : 10; C₂₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 80 : 20; C₃₀: *m*(PLGA) : *m*(CS) = 70 : 30. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

2.3 细胞形态学观察 如图4示,牙周膜成纤维细

胞单独培养 7 d 后可见细胞增殖明显,细胞质开始彼此接触(图 4A)。牙周膜成纤维细胞在 C₁₀ 组支架上培养 7 d 后,细胞增殖明显,彼此相连并聚集,支架上单个细胞难以看见且已经长入孔中,细胞层和细胞外基质层继续增厚并将支架基本覆盖,而且细胞基质层表面光滑(图 4C)。C₀、C₂₀、C₃₀ 组支架上可见散在的细胞分布,细胞间相互接触较少,未将支架

表面覆盖(图 4B、4D、4E)。

2.4 细胞增殖情况 如图 5 示,随着培养时间的延长,牙周膜成纤维细胞在各支架材料上均呈现出良好的增殖状态,表明 4 种材料对牙周膜成纤维细胞均有良好的生物相容性。牙周膜成纤维细胞在 C₁₀ 组复合材料上呈现出最高的增殖能力,与其他 3 组间的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

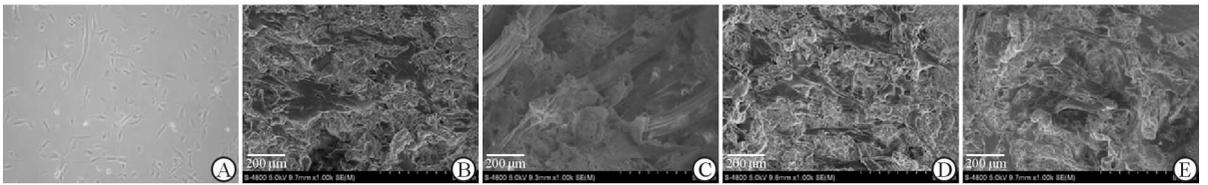


图 4 倒置相差显微镜下 PLFs(A)和 SEM 多孔 PLGA/CS/nHA 复合膜(B~E)

Fig 4 The PLFs under inverted phase contrast microscope (A) and porous PLGA/CS/nHA composite membrane under SEM (B-E)

A: PLFs cultured for 7 days (Original magnification: $\times 100$); B: PLFs cultured on C₀ group for 7 days; C: PLFs cultured on C₁₀ group for 7 days; D: PLFs cultured on C₂₀ group for 7 days; E: PLFs cultured on C₃₀ group for 7 days. PLFs; Periodontal ligament fibroblasts; SEM; Scanning electron microscope; PLGA/CS/nHA; Poly-lactic-co-glycolic acid/chitosan/nano-hydroxyapatite

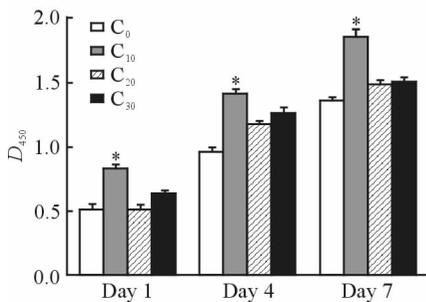


图 5 CCK-8 法检测多孔 PLGA/CS/nHA 复合膜上 PLFs 的增殖情况

Fig 5 The proliferation of PLFs in porous PLGA/CS/nHA composite membranes with CCK-8 method at 450 nm

PLGA/CS/nHA: Polylactic-co-glycolic acid/chitosan/nano-hydroxyapatite. C₀: $m(\text{PLGA}) : m(\text{CS}) = 100 : 0$; C₁₀: $m(\text{PLGA}) : m(\text{CS}) = 90 : 10$; C₂₀: $m(\text{PLGA}) : m(\text{CS}) = 80 : 20$; C₃₀: $m(\text{PLGA}) : m(\text{CS}) = 70 : 30$. * $P < 0.05$ vs other three groups. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

近年来兴起的牙周 GTR 疗法可在一定程度上使牙周膜、牙槽骨等牙周组织再生^[14]。1976 年, Melcher 提出 PDL-C 能分化出牙骨质细胞、牙槽骨细胞和牙周膜纤维细胞,若 PDL-C 先接触牙根面进行增殖分化则产生理想的牙周再生,这一理论即是 GTR 的基础。GTR 通过膜屏障阻挡牙龈上皮和结缔组织与牙根面接触,阻止成纤维细胞与上皮细

胞进入需要引导再生的部位,从而能够使新的组织再生。

理想的牙周 GTR 屏障膜应该允许组织液通过,隔离牙龈上皮和结缔组织,为牙周组织再生提供空间。而本研究使用 PVP 作为致孔剂,PVP 是一种水溶性高分子化合物,极易溶于水,它具有优异的溶解性能和生理相容性。孔隙率太高会影响膜的力学性能,孔隙率在 30% 左右的复合膜结构稳定,为骨再生提供生长空间^[15],所以 C₁₀ 组复合膜的孔隙率较为理想。牙周 GTR 屏障膜置入人体后在湿态环境下发挥作用,从本研究中可看出,PLGA/CS/nHA 复合膜在湿态环境下具有一定的力学强度,足够支持牙龈结缔组织,防止牙龈上皮细胞和结缔组织细胞进入牙周组织再生的区域。说明 PLGA/CS/nHA 复合膜能够创造并维持引导牙周组织再生的独特空间,为分隔开牙龈组织、结缔组织提供了良好的条件,其中 C₁₀ 组复合膜的拉伸强度及断裂力优于其余 3 组。此外,PLGA/CS/nHA 复合膜具有一定的拉伸强度和可塑性,能够满足临床医师根据患者牙周状况的不同而制作成不同形状膜载体的要求^[16],有利于牙周疾病的治疗,减轻牙周疾病治疗过程中的治疗创伤。

牙周组织再生是在湿态环境下进行的,所以为保持组织再生区域的湿润,屏障膜需要有一定的吸

水率,PLGA/CS/nHA 复合膜的吸水率随着 CS 含量的增加而增大,这是因为 CS 具有亲水性的羟基和氨基。纯 PLGA 复合膜中结晶较多,分子与分子间链缠结紧密,水分子很难进入,因而吸水率不高。

Shin 等^[17]认为,一般的牙周组织再生时间为 4~6 周,屏障膜在体内存在的时间过长则会影响引导牙周组织再生的效果,过短则不能发挥屏障膜的作用,无法使牙龈结缔组织隔离。所以,生物可降解性是牙周 GTR 屏障膜的重要性能,其要求膜材料的降解速率与新生组织形成速率相匹配,使缺损处的牙周组织再生的同时阻止牙龈上皮和结缔组织的进入。本实验结果显示 C₁₀ 组复合膜的体外降解速率与新生组织再生的速率相适应,可以为组织再生提供空间。并且 CS 的降解产物呈弱碱性,与 PLGA 降解出的弱酸性产物中和,调节局部 pH,减少了局部炎症的发生概率。

牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)是革兰阴性厌氧菌,是主要的牙周致病菌之一,在引发牙周组织破坏过程中发挥重要作用^[18],研究发现,卟啉单胞菌对克林霉素敏感^[19]。克林霉素能明显改善牙周炎的临床症状^[20]。PLGA/CS/nHA 复合膜的载药量与以下条件有关:结晶度越高载药量越高,本实验中 C₁₀ 组复合膜的结晶程度较高;PLGA 含量越高载药量越高^[21],本实验 4 组中 C₁₀ 组复合膜中 PLGA 的含量最高。C₁₀ 组复合膜的释药最稳定,由此可见,PLGA/CS/nHA 载药膜在 CS 含量为 10% 时降解速率最慢,结晶区的药物释放缓慢,因此维持药物浓度的时间最长。不同 PLGA/CS 质量比的载药膜均有突释现象,可能是因为载药复合膜浸泡于介质中,其接近表面的克林霉素快速释放到介质中造成药物突释。本研究仅可观察到载药复合膜的释药大体趋势,具体效果还需进行进一步研究,并且药物突释问题也有待解决。

对于大面积的牙周组织缺损和老年牙周炎患者,牙周 GTR 技术并不能有效地使其牙周组织再生和重建,这主要由患者牙周缺损区域组织再生的细胞活力较低或来源受限^[22-23]所致。Amar 等^[24]认为将牙周 GTR 技术与牙周膜细胞结合起来是未来的研究方向,这样可弥补单纯的牙周 GTR 技术的不足。因此将组织工程与牙周再生结合起来,将种子细胞与组织工程支架共同培养,并作为隔离膜材料

置入牙周缺损区域,在激发组织自身再生的同时增加缺损区域的细胞数量和活性,这一方法提高了牙周 GTR 的治疗效果。基于上述观点,我们对载药复合膜的细胞相容性进行了研究。本实验采用扫描电子显微镜和 CCK-8 检测法观察了 1、4、7 d 3 个时间点的细胞生长增殖情况。在 7 d 的细胞培养过程中 4 组支架上的细胞活力均持续增加,在 1、4、7 d C₁₀ 组支架上的细胞密度高于另 3 组($P < 0.05$);这与 C₁₀ 组支架的高孔隙率及孔与孔之间存在大量微孔的高贯通性有关。细胞需要孔隙来维持它们生长、增殖和分化,营养物质和废物的迁移以及新生血管的生长,高孔隙率有助于细胞更有效地黏附在支架上以及发生细胞反应,从而促进细胞更好地生长增殖。

综上所述,PLGA 与 CS 质量比为 90/10 时,载药 PLGA/CS/nHA 复合膜是较为理想的牙周 GTR 屏障,其体内实验有待进一步研究,为 GTR 膜的临床应用提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 刁晓悦,柳忠豪. 牙周组织再生治疗方法研究进展[J]. 中国口腔种植学杂志,2014,19:34-37.
- [2] BEHRING J, JUNKER R, WALBOOMERS X F, CHESSNUT B, JANSEN J A. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review[J]. Odontology, 2008, 96: 1-11.
- [3] 葛柳莹,赵利芬,段开文. 牙周引导组织的再生膜材料[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14:7895-7898.
- [4] LÜ J M, WANG X, MARIN-MULLER C, WANG H, LIN P H, YAO Q, et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2009, 9: 325-341.
- [5] SHIVE M S, ANDERSON J M. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1997, 28: 5-24.
- [6] MAKADIA H K, SIEGEL S J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier[J]. Polymers, 2011, 3: 1377-1397.
- [7] 顾其胜,陶伟栋,蒋丽霞. 壳聚糖基复合材料类新型生物医用材料[J]. 上海生物医学工程,2007,28:31-35.

- [8] CHOI B K, KIM K Y, YOO Y J, OH S J, CHOI J H, KIM C Y. *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 18: 553-557.
- [9] 郭恩言,王峰,赵萍,储新宏,姜倩. 纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合材料的制备及发展趋势[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14: 500-504.
- [10] KIM H W, SONG J H, KIM H E. Nanofiber generation of gelatin-hydroxyapatite biomimetics for guided tissue regeneration[J]. *Adv Func Mater*, 2005, 15: 1988-1994.
- [11] ZELLIN G, GRITLI-LINDE A, LINDE A. Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes; an experimental study in rats[J]. *Biomaterials*, 1995, 16: 601-609.
- [12] ZHAO S, PINHOLT E M, MADSEN J E, DONATH K. Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2000, 28: 116-122.
- [13] 张萍,吴捷. 盐酸克林霉素胶囊溶出度测定方法研究[J]. *现代医药卫生*, 2009, 25: 2607-2609.
- [14] 万蕾蕾,钮晓勇,宋萌. 牙周引导组织再生技术在牙周病治疗中的应用[J]. *口腔医学*, 2006, 26: 73-74.
- [15] GENTILE P, CHIONO V, TONDA-TURO C, FERREIRA A M, CIARDELLI G. Polymeric membranes for guided bone regeneration [J]. *Biotechnol J*, 2011, 6: 1187-1197.
- [16] 艾合麦提·玉素甫,陈统一,陈中伟,刘大鹏,王振斌. 可降解聚己内酯修复骨缺损的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19: 439-442.
- [17] SHIN S Y, PARK H N, KIM K H, LEE M H, CHOI Y S, PARK Y J, et al. Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration[J]. *J Periodontol*, 2005, 76: 1778-1784.
- [18] 潘亚萍,刘静波. 牙龈卟啉单胞菌研究进展[J]. *国际口腔医学杂志*, 2011, 38: 125-127.
- [19] 张雄. 克林霉素治疗牙周炎的临床观察[J]. *广东牙病防治*, 2004, 12: 290-291.
- [20] 唐明,章锦才,肖晓蓉,朱珠,刘豫蓉. 常用抗厌氧菌药物对牙龈卟啉单胞菌的体外抗菌活性研究[J]. *重庆医学*, 2001, 30: 200-202.
- [21] 孙美丽,班俊峰,黄思玉,吕竹芬. PLGA 微球载药量和包封率的影响因素及控制[J]. *广东药学院学报*, 2011, 27: 643-648.
- [22] PONTORIERO R, LINDHE J. Guided tissue regeneration in the treatment of degree III furcation defects in maxillary molars [J]. *J Clin Periodontol*, 1995, 22: 810-812.
- [23] BRATTHALL G, SÖDERHOLM G, NEIDERUD A M, KULLENDORFF B, EDWARDSOON S, ATTSTRÖM R. Guided tissue regeneration in the treatment of human infrabony defects. Clinical, radiographical and microbiological results; a pilot study [J]. *J Clin Periodontol*, 1998, 25 (11 Pt 1): 908-914.
- [24] AMAR S, CHUNG K M. Clinical implications of cellular biologic advances in periodontal regeneration [J]. *Curr Opin Periodontol*, 1994: 128-140.

[本文编辑] 魏学丽,尹 茶