

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00220

· 短篇论著 ·

# 新型生物降解材料 PHBV 动物体内的组织相容性

## Evaluation on *in vivo* histocompatibility of a novel biodegradable material-PHBV

费强<sup>1,2</sup>, 尚龙安<sup>1,2\*</sup>, 范代娣<sup>2</sup>, 傅容湛<sup>2</sup>

1. 浙江大学宁波理工学院生物与化学工程分院, 宁波 315100

2. 西北大学化工学院, 西安 710069

**[摘要]** **目的:**通过动物体内实验研究羟基丁酸-羟基戊酸共聚物(PHBV)在小鼠体内的降解行为和组织相容性,进一步探讨生物可降解材料 PHBV 作为生物医用材料的应用。**方法:**将 PHBV(其中 HV 含量为 9.5%)和对照材料聚乳酸(PLA)植入 28 只 KM 小鼠皮下,分别于术后 1、2、4、6、8 及 13 周取出 2 组植入材料,一组行肉眼观察,取组织切片后行 H-E 染色,然后在光学显微镜下观察;另一组进行扫描电镜(SEM)观察。**结果:**PHBV 组在植入 56 d 后动物体内炎症反应已经消失,组织相容性较同期 PLA 组良好。90 d 内机体未对 PHBV 膜造成严重的侵蚀和破坏,而且在植入 PHBV 材料的部位均无脓肿形成及组织坏死发生。**结论:**PHBV 在动物体内降解速率缓慢,具有良好的组织相容性。

**[关键词]** 羟基丁酸-羟基戊酸共聚物;组织相容性;生物相容性材料

**[中图分类号]** R 318.08 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)02-0220-04

组织工程技术是材料工程学与生命科学结合而产生的一项新技术,即是将生物材料、种子细胞及细胞因子相结合,修复受损组织的技术。随着组织工程技术在医学领域的发展,近年来在骨缺损修复领域得到了广泛的关注与应用。它改变了传统的以损伤修复创伤的治疗模式,并表现出明显优势。目前所用植骨材料主要有自体骨、同种异体骨、经特殊处理的异种骨和人工骨材料等。但是自体骨存在来源有限以及术后取骨点疼痛的缺点,且自体骨术后并发症可达 8%;同种异体骨也存在免疫原性和致病性等缺点。所以它们并不是最理想的骨修复材料。聚羟基脂肪酸酯(PHAs)材料是一类具有广泛应用前景的医用生物高分子材料,越来越受到医学、药学和材料学界的重视。

医用材料应用于人体后就处于人体新陈代谢的复杂生物环境中,而目前体外实验测试条件并不能完全模拟人体环境,必须进行体内试验。近年来,国外对 PHAs 材料进行了较多的生物体内试验。主要研究了它的生物相容性<sup>[1-4]</sup>,以及它作为手术缝线<sup>[5]</sup>、组织支架<sup>[6-7]</sup>、表面修饰<sup>[8]</sup>等方面的初步应用试探研究。然而国内目前大量对 PHB 和羟基丁酸-羟基戊酸共聚物(PHBV)的研究都是在体外进行的,其中包括细胞毒性评估和模拟体内生物相容性研究<sup>[9-13]</sup>,但对 PHBV 材料的体内组织相容性和体内生物降解性的研究甚少。本研究组先前已经通过四甲基偶氮唑盐比色法(MTT assay)对 PHBV 的细胞毒性进行了评价<sup>[13]</sup>,实验结果表明,PHBV 材料的

细胞毒性程度为 0 级,表现出良好的体外生物相容性。但由于许多复杂以及不可预见的因素会涉及到生物组织对高分子材料植入后的反应,所以有必要对 PHBV 材料在生物体内组织中的影响进行测试,并对它在医学植入领域上的应用获得更深入的了解。

本实验通过将加工的 PHBV 薄膜植入小鼠皮下,经过 90 d 以上时间的观察,以考察该种材料是否会在生物体内产生不良反应及其在生物体内的降解情况。同时利用图像分析技术研究材料周围形成的组织包膜厚度并结合形态学观察来研究组织反应的程度,旨在为该类材料的进一步生物医学应用研究提供基础依据。

### 1 材料和方法

1.1 材料 PHBV(羟基戊酸含量 9.5%)粉末为本实验室自制品。采用流延法制备 PHBV 膜片,即将 1 g PHBV 粉末溶于 50 ml 氯仿中,待完全溶解后,浇铸到平板玻璃槽中,室温静置 14 d,氯仿完全挥发且 PHBV 薄膜完全结晶后,得到厚度为 0.2 mm 的膜片;聚乳酸(PLA)膜由西北工业大学化工系提供,采用相同的流延法制成厚度为 0.2 mm 膜片。分别将 PHBV 膜片、PLA 膜片制成 1 cm<sup>2</sup> 的膜片,用蒸馏水清洗,再用 75%乙醇洗 2 次,然后加 10 倍量蒸馏水摇洗 2 次沥干后备用。所用实验手术器械均用蒸汽高压锅灭菌消毒。实验小鼠由第四军医大学动物实验中心提供。

**[收稿日期]** 2008-07-22 **[接受日期]** 2008-09-11

**[基金项目]** 国家高科技研究发展计划(“863”计划,2006AA02Z246),宁波市自然科学基金(2006A610043),浙江省钱江人才计划(2007R10020)。Supported by National High-tech R&D Program(“863 Program”,2006AA02Z246), Natural Science Foundation of Ningbo(2006A610043) and the Qianjiang Talent Program of Zhejiang Province(2007R10020)。

**[作者简介]** 费强,硕士生。E-mail:johannfei@gmail.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:0574-88130138, E-mail:lashang@nit.zju.edu.cn

1.2 动物 4 周龄健康雌性昆明(KM)小鼠 28 只,体质量为 17~22 g。28 只小鼠随机分为对照组及实验 1、2 组,对照组( $n=4$ )不埋植任何材料,切口后即予缝合;实验 1 组( $n=12$ )植入 PHBV 膜;实验 2 组( $n=12$ )植入 PLA 膜。埋植均在乙醚麻醉小鼠后进行,剪去小鼠背毛,常规消毒手术视野,无菌条件下切开背部皮肤,钝性分离皮下组织,在小鼠皮下埋植已制好的实验材料,严密缝合皮肤,无外力包扎,饲养。在整个实验过程中,未对小鼠进行任何抗生素注射。

1.3 观察方法 对照组小鼠于术后 1、2、4、13 周各处死 1 只,实验组分别于术后 1、2、4、6、8、13 周每组随机处死 2 只小鼠,仔细切取样品周围约 0.5 cm 范围的组织,置入甲醛溶液中固定,将固定好的组织经乙醇梯度脱水、透明、浸蜡、包埋后制成蜡块,并切出厚约 4  $\mu\text{m}$  切片,行 H-E 染色,在光学显微镜下观察;将另外一块组织包裹的材料取出,利用扫描电镜观察材料的形态。

## 2 结果

### 2.1 皮下包埋实验

2.1.1 大体观察 所有小鼠术后活动正常,进食好,伤口无感染。对照组术后 1 周,个别小鼠筋膜层下有少量淤血,手

术区充血、红肿;术后 2 周,手术区仍有红肿但已减轻;术后 4 周手术区红肿消失,已有瘢痕组织替代,基本完全恢复。

PHBV 组:1 周时材料体外可触及,轮廓清晰,质地硬,易与组织分离,未被皮下纤维膜包裹,PHBV 外观无明显变化。2 周时材料体外可触及,纤维包膜较厚,易与组织分离,表面有洞状降解吸收现象,与其下肌肉分界不清。4、6、8 周时材料同 2 周时相比,进一步降解吸收现象不明显,纤维包膜较薄且不易与材料分离。13 周时材料仍为膜片状,透明度降低呈不均匀乳白色外观,表面有细小的洞状降解吸收现象,包膜较薄,材料周围组织均无坏死、脓肿。H-E 染色后的光镜观察结果见图 1A~1F。

PLA 组:1、2 周时材料体外可触及,纤维膜较厚,易与材料分离,与其下肌肉分界不清,外观无明显变化。4 周时材料有轻度变形扭曲,表面出现轻微的洞状降解吸收现象。6 周时包膜变薄,与 PLA 结合紧密,PLA 膜变形、扭曲,表面明显有洞状降解吸收现象。8 周时材料小部分被降解,但仍基本保持膜状结构,散布于组织中,包膜进一步变薄,与材料结合紧密。13 周时材料变得很脆软,材料周围均无坏死、脓肿。H-E 染色后的光镜观察结果见图 1G~1L。

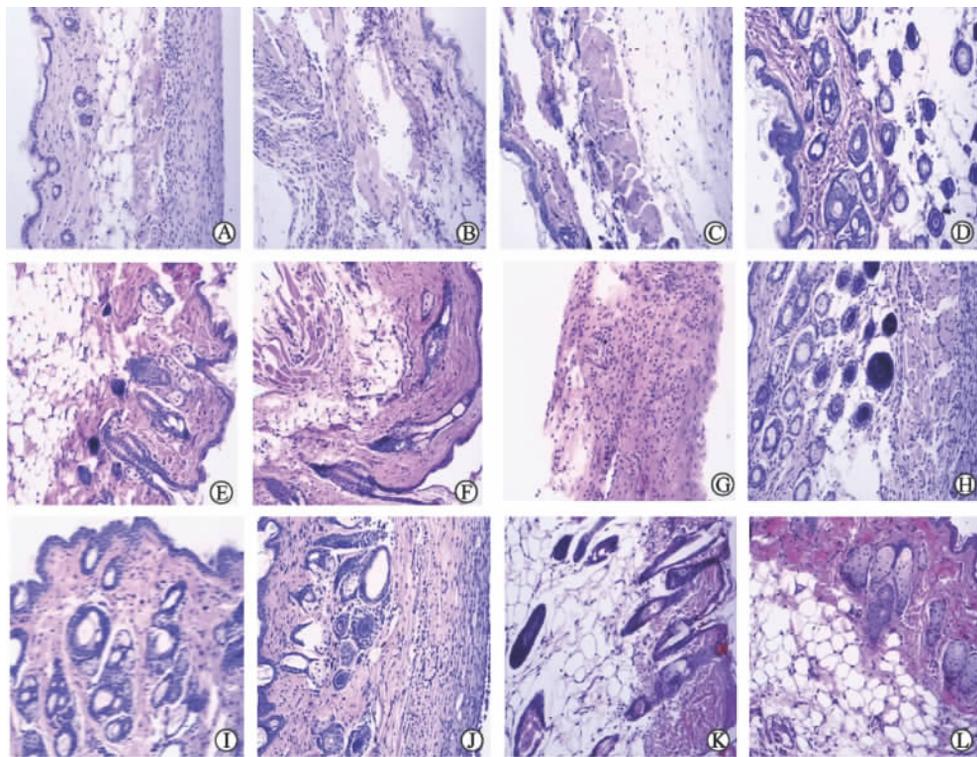


图 1 植入小鼠皮下 PHBV 和 PLA 薄膜表面上不同时期的细胞组织形态(H-E 染色)

A~F:分别为 7、14、28、42、56、90 d PHBV 组;G~L:分别为 7、14、28、42、56、90 d PLA 组

2.1.2 组织学检测 PHBV 组:1 周时皮肤组织轻度慢性炎,表皮下间质内血管轻度扩张、充血,有少量淋巴细胞浸润(ISO 标准组织学分级 $\leq$ III)。2 周时包膜纤维疏松,与其下肌肉组织分界不清,PHBV 材料表面有疏松纤维组织生长,以中性粒细胞和淋巴细胞为主,有少量淋巴细胞浸润(组

织学分级 $\leq$ II)。4 周时皮肤组织基本正常,表皮下间质内血管轻度扩张、充血伴有个别淋巴细胞浸润,材料包膜结缔组织较 2 周时致密(组织学分级 $\leq$ I)。6 周(组织学分级 $\leq$ I)和 8 周时表皮下间质内个别淋巴细胞浸润。13 周时皮肤组织炎症完全消失,包膜纤维十分紧密。

PLA组:1周时皮肤组织中度慢性炎,表皮下间质内淋巴细胞浸润(组织学分级 $\leq$ IV)。2周时包膜结缔组织疏松,伴中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞浸润和成纤维细胞弥漫性增生,见多核巨细胞(组织学分级 $\leq$ III)。4周同2周时相比,表皮下间质内血管轻度扩张、充血(组织学分级 $\leq$ III)。6周时包膜变薄,表皮下间质内少量淋巴细胞浸润伴囊肿形成(组织学分级 $\leq$ II)。8周时材料包膜较6周时薄,炎性细胞明显减少,表皮下间质内有个别淋巴细胞浸润,成纤维细胞转变为梭形的纤维细胞(组织学分级 $\leq$ I)。13周时皮肤组织炎症完全消失。

2.2 材料的降解性能

2.2.1 PHBV组 将小鼠处死后,将材料与组织分离开,然后对材料进行了扫描电镜的观察。术后7 d,PHBV膜形态发生明显变化,在PHBV膜出现许多直径很小的凹坑,但其

深度很浅,说明PHBV膜在小鼠机体内有轻微降解;术后28 d,PHBV膜上的凹坑的直径和深度都略有增加,但薄膜形态依然完好;术后56 d,PHBV膜上凹坑直径稍有增大,薄膜表面已经开始变为粗糙不平,质地稍有变脆,薄膜在小鼠机体内的降解加剧;术后90 d,PHBV膜外观形态尚完好,折叠较植入前易断裂,扫描电镜下发现薄膜表面十分粗糙不平,腐蚀降解加剧,有一些极小的碎片脱落,但PHBV膜并没有出现严重的破损,见图2A~2F。

2.2.2 PLA组 术后7 d,PLA膜形态完好,但局部表面已经出现降解现象;术后28 d,膜表面上的孔径增大及变深;术后56 d,PLA膜表面大部分出现了严重的降解现象,有降解物脱落,PLA膜质地变得很脆;术后90 d,PLA膜形态已不完整,易破碎,扫描电镜下明显地观察到PLA膜表面降解严重,有大量腐蚀降解后脱落的碎片,见图2G~2L。

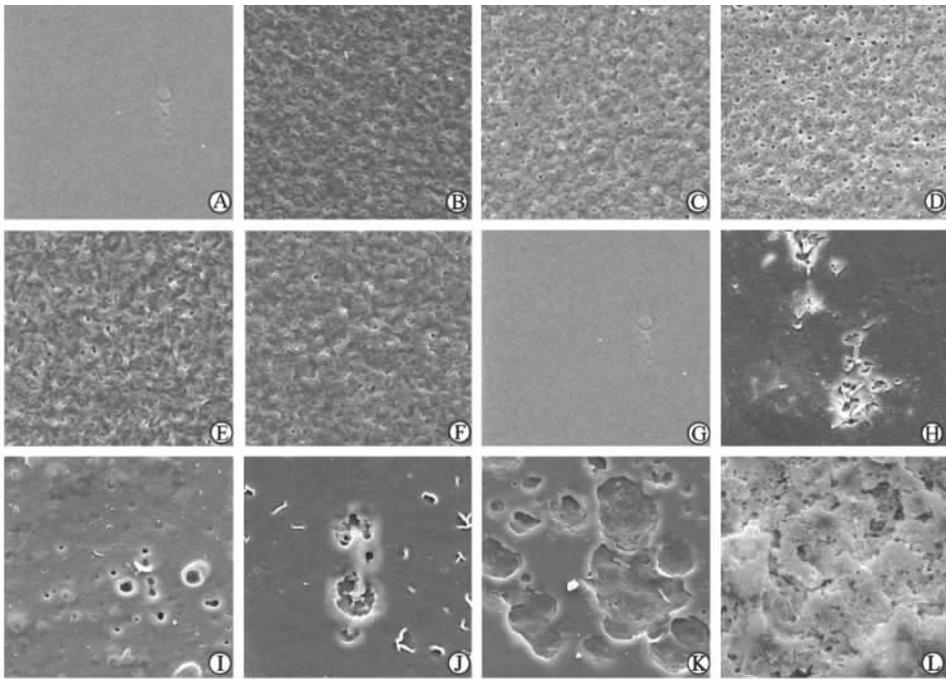


图2 PHBV和PLA薄膜在体内降解后的表面电镜图片

A~F:分别为0、7、14、28、56、90 d PHBV组;G~L:分别为0、7、14、28、56、90 d PLA组

3 讨论

3.1 PHBV的生物相容性 1992年,国际标准组织(ISO)颁布ISO10993关于医用装置组织相容性评价标准,包含的内容很多,如皮肤刺激试验、溶血试验、急性毒性试验、细胞毒性试验、染色体畸变试验、畸胎试验和长期埋植试验等。其中动物皮下植入试验是目前国际上通用的评价医用材料对组织毒性刺激的一种重要的体内试验方法,炎症反应是机体对局部创伤的防御性应答<sup>[14]</sup>。PLA是一种被公认为具有良好的生物相容性无毒无抗原的医用高分子材料,在实验中我们选择PLA作为实验的对照材料。在90 d的动物体内包埋试验中,植入小鼠体内的PHBV共聚物没有造成1只小鼠的非自然死亡。由组织学观察可以发现,小鼠组织对PHBV的反应符合一般生物相容性材料的组织反应。植入14 d后,组

织反应处于急性炎症反应的末期和慢性炎症反应的进行期。28 d后,炎细胞数目和包膜厚度明显降低,炎症反应明显减轻。之后,包膜继续变薄并纤维化。56 d后炎症消失,恢复为正常的皮肤组织,这一结果与Volova等<sup>[15]</sup>的实验结果相似。在研究中已发现PLA的酸性降解产物会引起局部的炎症反应。事实上PHBV材料在降解的过程中也会释放出酸性产物,但从上述实验结果看,PHBV材料降解非常缓慢,降解后形成的酸性产物浓度会很低,而且降解产物中3-羟基丁酸为动物体内血液本身所固有成分<sup>[16]</sup>。因此2种材料相比较会发现,同期PLA组比PHBV组炎症较重,且恢复相对较慢。这可以说明PHBV的组织相容性优于PLA,更适合作为医用高分子材料在医学领域应用。

3.2 PHBV的体内降解性 高聚酯降解包括水解、酶解、细菌降解。PHBV在动物体内的降解主要经体液浸润水解,使

酯键被动断裂;以及动物体内微量的酯酶主动破坏酯键;同时,巨噬细胞侵蚀对材料裂解也有促进作用。本实验为皮下植入试验,采用 SEM 测试 PHBV 膜表面降解情况。观察到植入动物体内 90 d 后的 PHBV 膜表面较植入前明显粗糙不平,表面有大量小凹坑形成,材料表面出现腐蚀降解现象,但薄膜形态依然完好。Miller 等<sup>[17]</sup>在研究中发现 PHBV 在动物体内数年才完全降解。根据本实验中 PHBV 膜在小鼠体内的降解情况,PHBV 材料降解速度远远小于 PLA 材料,从膜表面降解情况观察可知,PHBV 材料能够满足骨缺损再生至少应有 8 周的无干扰期这一要求。周栋等<sup>[18]</sup>的研究发现,PHBV 材料在植入大白兔皮下 10 周后,PHBV 材料在生物体内即可完全降解吸收。这可能是由于不同生物体内分解出的 PHBV 降解酶的含量以及 PHBV 的成分比例的差异造成的。我们在体外降解实验中发现随着 PHBV 降解酶的加入量和材料中 HV 单体含量的提高,PHBV 膜在磷酸缓冲溶液中的降解速度会加快。

本实验对自制的 PHBV 共聚物和 PLA 2 种高分子材料在小鼠皮下包埋后的组织相容性和生物体内降解性进行了对照试验研究。在 90 d 的动物体内包埋试验中,植入小鼠体内的 PHBV 共聚物没有造成 1 只小鼠的非自然死亡,并且在植入体内 56 d 后其体内炎症反应已经消失,较同期的 PLA 组的生物相容性好。同时,PHBV 共聚物在体内降解过程表现出降解速率缓慢的特点,再加之其良好的组织相容性,使它更适合作为骨组织工程材料或支架材料。

#### [参考文献]

- [1] Shishatskaya E I, Khlusov I A, Volova T G. A hybrid PHB hydroxyapatite composite for biomedical application; production, *in vitro* and *in vivo* investigation[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2006, 17: 481-498.
- [2] Kunze C, Edgar Bernd H, Androsch R, Nischan C, Freier T, Kramer S, et al. *In vitro* and *in vivo* studies on blends of isotactic and atactic poly (3-hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material[J]. Biomaterials, 2006, 27: 192-201.
- [3] Sombatmankhong K, Sanchavanakit N, Pavasant P, Supaphol P. Bone scaffolds from electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend[J]. Polymer, 2007, 48: 1419-1427.
- [4] Luklinska Z B, Schluckwerder H. *In vivo* response to HA-polyhydroxybutyrate/polyhydroxyvalerate composite [J]. J Microsc, 2003, 211(Pt 2): 121-129.
- [5] Shishatskaya E I, Volova T G, Puzyr A P, Mogilnaya O A, Efremov S N. Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures[J]. J Mater Sci Mater Med, 2004, 15: 719-728.
- [6] Sevastianov V I, Perova N V, Shishatskaya E I, Kalacheva G S, Volova T G. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2003, 14: 1029-1042.
- [7] Shishatskaya E I, Volova T G. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for *in vitro* cell cultures[J]. J Mater Sci Mater Med, 2004, 15: 915-923.
- [8] Tesema Y, Raghavan D, Stubbs J III. Bone cell viability on collagen immobilized poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) membrane; effect of surface chemistry[J]. J Appl Polym Sci, 2004, 93: 2445-2453.
- [9] 杨松林, 谷涌泉, 汪忠镛, 陈兵, 王连才, 姜明, 等. 三种人工合成可降解血管支架材料体外生物相容性及表面改性研究[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27: 400-404.  
Yang S L, Gu Y Q, Wang Z G, Chen B, Wang L C, Jiang M, et al. *In vitro* evaluation of biocompatibility and surface modification of 3 kinds of artificial graft material[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27: 400-404.
- [10] Qu X H, Wu Q, Zhang K Y, Chen G Q. *In vivo* studies of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers; biodegradation and tissue reactions[J]. Biomaterials, 2006, 27: 3540-3548.
- [11] 郑裕东, 王迎军, 陈晓峰, 任耀彬, 吴刚. PHBV/Sol-gel Bioglass 多孔材料在模拟生理溶液中的化学反应研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24: 1325-1328.
- [12] 张晓凯, 陈晓峰, 刘玮, 于胜吉, 张梅梅. BG/PHBV 复合多孔组织工程支架材料的动物植入实验观察[J]. 电子显微学报, 2004, 23: 221-224.
- [13] 费强, 尚龙安, 范代娣, 王德伟. 生物可降解材料 PHBV 的细胞毒性评价的研究[J]. 安全与环境学报, 2005, 5: 47-51.
- [14] DeLee, Charnley J. Radiological demarcation of cemented stocks in total hip replace[J]. Clin Orthop Relat Res, 1976(121): 20-32.
- [15] Volova T G, Shishatskaya E I, Sevastianov V I, Efremov S, Mogilnaya O. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers[J]. Biochem Eng J, 2003, 16: 125-133.
- [16] Holmes P A. Application of PHB—a microbial produced biodegradable thermoplastic[J]. Phys Technol, 1985, 16: 32-36.
- [17] Miller N P, Willaiams O F. On the biodegradation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate homopolymer and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers[J]. Biomaterials, 1987, 8: 129-137.
- [18] 周栋, 胡平, 汪钢, 赵东镗, 高百顺. 聚羟基丁酸及其共聚物在体内组织相容性和降解率的实验研究[J]. 武警医学, 2003, 14: 210-212.

[本文编辑] 尹茶