

一种新型软腭植入系统材料的制备:物理性能及其动物安全性评价[☆]汪建¹,付晓燕¹,熊敏¹,张余²¹Department of Otolaryngology, ²Department of Orthopaedics, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Area Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, ChinaWang Jian [☆], Professor, Doctor, Chief physician, Department of Otolaryngology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Area Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China
iamxiaoyanfu@yahoo.com.cnSupported by: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 5000131^{*}Received: 2007-07-20
Accepted: 2007-09-04**Preparation of a new material for palatal implant: Physical performance and animal safety assessment****Abstract****AIM:** The present commonly used palatal implant has side effects on polyethylene terephthalate, including slight rejection and uncontrollable degradation rate. This article is intended to search for a new material curing snoring for palatal implant, evaluate its physical properties and animal safety.**METHODS:** The experiment was performed at the Laboratory of Biological Artificial Bone, Department of Medical Research, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Area Command of Chinese PLA from June 2006 to January 2007. ①Organic solvent molding of hydroxyapatite and poly(lactide-co-trimethylene carbonate) (HA-P) (1:1) that proportionally mixed was performed to obtain palatal implant material. ②The mechanical behavior of the material was studied such as the modulus of elasticity, tensile strength, compress intensity and shaoshi hardness. Animal safety was evaluated by acute toxicity test, Hemolysis test, Sensitization test and Pyrogen tes further. Animal experiment met the animal ethical standard.**RESULTS:** ①The new material was prepared with an average modulus of elasticity of 100.35 MPa, tensile strength of 2.24 MPa, compressive intensity of 0.41 MPa deformed by 10%, shaoshi hardness of 89.4. ②Systemic acute toxicity test indicated that the animals had no toxic symptom after injecting infusion. Hemolysis test indicated that the material was consistent its criteria with hemolysis ratio of 3.09%. Sensitization test demonstrated it did not cause any hypersensitive reaction. Pyrogen test demonstrated its result corresponded to its assessment criteria; fervecence was below 0.4 °C, and total increased degree was below 0.9 °C.**CONCLUSION:** The new HA-P material basically satisfies with the desire of palatal implant, which has certain elasticity, toughness and hardness and the animal safety.Wang J, Fu XY, Xiong M, Zhang Y. Preparation of a new material for palatal implant: Physical performance and animal safety assessment. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2007;11(44):8848-8851(China)
[www.zgckf.com/zgckf/ejournal/upfiles/07-44/44k-8848(ps).pdf]**摘要****目的:**目前常用的软腭植入材料对苯二甲酸乙二醇酯具有轻度排斥反应、降解速率不可控等缺陷,所以探索一种新的治疗轻中度鼾症的软腭植入材料,并评价其相关物理性能及动物安全性。**方法:**实验于2006-06/2007-01在解放军广州军区总医院医学实验科生物人工骨实验室完成。①将羟基磷灰石颗粒、聚乳酸-三亚甲基碳酸酯按质量比1:1的比例复合,利用有机溶剂注模法重组羟基磷灰石/聚乳酸-三亚甲基碳酸酯复合材料。②测试羟基磷灰石/聚乳酸-三亚甲基碳酸酯复合材料的弹性模量、拉伸强度、压缩强度、邵氏硬度等性能参数,并对材料进行急性毒性实验、溶血实验、致敏实验及热源实验等动物安全性评价。实验中对动物处置符合动物伦理学标准。**结果:**①物理性能:新的软腭植入系统材料羟基磷灰石/聚乳酸-三亚甲基碳酸酯的弹性模量为100.35 MPa,拉伸强度为2.24 MPa,变形10%压缩强度为0.41 MPa,邵氏硬度为89.4。②安全性评价:全身急性毒性实验结果显示动物注射浸提液后无毒性症状;溶血实验结果显示材料的溶血率为3.09%,符合溶血实验的评价标准;致敏实验表明该材料无致敏作用;热源实验结果显示在每种材料初试的新西兰兔中,体温升高均在0.4 °C以下,并且体温升高总度数在0.9 °C以下,符合热源实验的评价标准。**结论:**羟基磷灰石/聚乳酸-三亚甲基碳酸酯软腭植入材料的弹性模量、拉伸强度、压缩强度、硬度等性能基本符合软腭植入的要求,并且具备基本的动物安全性。**关键词:**软腭植入;羟基磷灰石;聚乳酸-三亚甲基碳酸酯;生物相容性解放军广州军区广州总医院,¹耳鼻喉喉科,²骨科,广东省广州市 510010汪建[☆],男,1960年生,四川省成都市人,汉族,教授,博士,主任医师,主要从事鼾症、鼻内窥镜手术的研究。
iamxiaoyanfu@yahoo.com.cn广东省自然科学基金资助项目(5000131)^{*}中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:1673-8225(2007)44-08848-04收稿日期:2007-07-20
修回日期:2007-09-04
(07-50-7-3935/N-Q)

汪建,付晓燕,熊敏,张余.一种新型软腭植入系统材料的制备:物理性能及其动物安全性评价[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(44):8848-8851 [www.zgckf.com/zgckf/ejournal/upfiles/07-44/44k-8848(ps).pdf]

0 引言鼾症在中老年、体形肥胖、嗜烟酒、患有高血压的男性人群中发病率较高,达28%~67%,单纯软腭源性的病例约为70%。近年提出一种新的微创介入治疗:软腭植入系统治疗腭源性鼾症,该手术在局麻下门诊一次性完成,效果显著^[1]。但该治疗的关键性植入材料聚对苯二甲酸乙二醇酯(poly(ethyleneterephthalate),PET)有轻度排斥反应^[2],降解速率不可控而且远期生物学效应尚不肯定等缺点^[3]。本实验即根据该植入材料的治疗原理探索新的软腭植入材料羟基磷灰石/聚乳酸-三亚甲基碳酸酯(HA-P),并对该材料的物理性能和生物安全性进行评价。**1 材料和方法****设计:**开放性实验。

单位:解放军广州军区广州总医院。

材料:实验于 2006-06/2007-01 在解放军广州军区总医院医学实验科生物人工骨实验室完成。①实验材料:羟基磷灰石由解放军广州军区总医院医学实验科生物人工骨实验室研制,经水热反应 24 h;聚乳酸-三亚甲基碳酸酯(质量比 70:30)由济南岱罡生物科技有限公司提供,黏度为 0.6。②动物:清洁级昆明系小白鼠 10 只,体质量 18~22 g(动物合格证号:0020644);健康新西兰家兔 3 只,体质量 1.7~3.0 kg(动物合格证号:0019276);普通级豚鼠 20 只,体质量 180~320 g(动物合格证号:0020287),均由广州中医药大学实验动物中心提供。实验中对动物处置符合动物伦理学标准。③主要仪器:高温高压水热水热合成装置(江苏省石油科研仪器厂),LGJ-12 冷冻干燥机(北京松源化科技发展有限公司),Sartorius 公司 BS 214D 电子天平,微机控制电子万能试验机 WDW-10(济南试金集团有限公司),邵氏 LY-A 型机(江都市天瑞实验机械厂)。

设计、实施、评估者:均为第一、二、三作者,全部经系统培训,未实行盲法评估。

方法:

HA-P 的制备:羟基磷灰石:聚乳酸-三亚甲基碳酸酯 =1:1(质量比),其中羟基磷灰石经研磨过筛后选择孔径为 0.5 mm 的小颗粒,高温高压消毒处理;聚乳酸-三亚甲基碳酸酯 37 °C 环氧乙烷消毒灭菌 12 h。按配方将称量好的聚乳酸-三亚甲基碳酸酯加入到三氯甲烷中,密封静置 12 h,配成浓度为 20% 的溶液。待聚乳酸-三亚甲基碳酸酯完全溶解后,将定量的羟基磷灰石颗粒加入到溶液中,充分搅拌,直至肉眼见羟基磷灰石颗粒均匀分散于聚乳酸-三亚甲基碳酸酯溶液中。此时混合物呈凝胶状。将此混合物倾注于自行设计的直径为 2 mm,长 18 cm 的圆柱形模具中,置于 37 °C 恒温真空干燥箱中任三氯甲烷挥发 24 h,混合物自行固化。将 HA-P 取出,切割成长 18 mm,直径 2 mm。以上操作均在超净工作台完成。

HA-P 的性能检测:①弹性模量和拉伸强度:在温度 23 °C,空气湿度 55% 的条件下,将用本实验室自制的直径 10 mm,标距 15 mm 的哑铃形模具制备的 3 个样品在微机控制电子万能试验机上以拉伸速度 2 mm/min

测试材料的弹性模量和拉伸强度,并计算出样品的平均值。②变形 10% 压缩强度:与弹性模量和拉伸强度的检测同条件,同一测试机,将 3 个圆柱体样品以压缩速度 2 mm/min 测试材料变形 10% 压缩强度。③邵氏硬度:与弹性模量和拉伸强度的检测同条件,在 3 个制成平板样的样品上选取 12 个点,在邵氏 LY-A 型机上测试材料的邵氏硬度,去掉最大值和最小值,计算出样品的平均值。

HA-P 材料动物安全性评价^[4,5]:首先制备 HA-P 材料浸提液,按照 HA-P 的质量:浸提介质(无菌生理盐水)=0.2 g:1 mL 比例配置,37 °C,体积分数为 0.05 的 CO₂ 培养箱中浸提 72 h。然后做以下实验。

全身急性毒性实验:将 10 只昆明系小白鼠随机分为实验和对照两组,每组 5 只。实验组动物由腹腔注射材料生理盐水浸提液 50 mL/kg;对照组动物由腹腔注射相同剂量的浸提液同批号的生理盐水。于注射后 4,24,48,72 h 观察两组动物的一般状态、毒性表现和死亡动物数,称量记录动物的体质量^[6,7]。

溶血实验:抽取健康家兔新鲜血 8 mL,肝素抗凝,再加 10 mL 生理盐水稀释。实验分为实验组、阴性对照和阳性对照 3 组,将实验组 3 管,每管加 5 mL 浸提液;阴性对照 3 管,每管加同批号生理盐水 5 mL;阳性对照 3 管,每管加蒸馏水 5 mL。全部试管浸入 37 °C 水浴内 30 min 后,全部试管每管加稀释兔血 0.2 mL,轻轻混匀后置于 37 °C 水浴内继续保温 60 min。1 200 r/min 离心 5 min,吸取上清液移入比色皿,分光光度计 545 nm 波长处测定吸光度^[8]。按下公式计算溶血率^[9]:

$$\text{溶血率}(\%) = \frac{\text{样品组吸光度} - \text{阴性对照组吸光度}}{\text{阳性对照组吸光度} - \text{阴性对照组吸光度}} \times 100\%$$

热源实验:经体温筛选合格的健康新西兰家兔 3 只,饲养条件一致。与浸提液接触的所有器具均在电热干燥箱内 180 °C 干烤 2 h。肛温计测其体温 2 次,1 次/h,两次体温之差不超过 0.2 °C,两次体温的平均值为正常体温。测温后 15 min 内自耳缘静脉注射 38 °C 的浸提液,剂量为 5 mL/kg,注射完毕后每隔 1 h 测温一次,共 3 次,以 3 次中体温最高的 1 次减去正常体温,即为该兔体温升高的度数。

致敏实验:①分组:实验分为 3 组,实验组(HA-P 材料浸提液)、阴性对照组(同批号浸提介质)和阳性对照组(体积分数为 0.05

课题背景:本课题拟通过生物医学与材料学研究结合的方法,在原有的“天然矿物材料改造合成人工骨研究”的基础上,寻找出理想的软腭植入系统材料,摸索其合成条件、方法等规律;并通过材料的成分及结构的分析、相应的生物学模型的建立、计算机模拟研究的引入,并经过三者的互动研究,对植入材料进行检测、筛选、验证,并研制出适合该手术操作的相应的器械。在研究过程中,探索该材料的生物学效应机制、生物过程的分级结构和材料相容性。

创新要点:实验成功制备了羟基磷灰石/聚乳酸-三亚甲基碳酸酯复合材料,并证实其生物相容性好,复合的新材料的弹性、硬度顺应软腭组织的解剖弯曲,且无毒性、无致敏性、无热源性。本文结果为羟基磷灰石/聚乳酸-三亚甲基碳酸酯复合材料作为软腭组织的内植入材料用于临床奠定了基础。

的甲醛溶液)各 10 只豚鼠。②含浸提液或浸提介质的完全弗氏佐剂的制备:用注射器分别抽取 1.5 mL 浸提液或浸提介质和 1.5 mL 完全弗氏佐剂混合,用力搅拌至乳化完全。阳性对照+完全弗氏佐剂同法配制。③皮内诱导:实验前 24 h,剃除豚鼠背部 4 cm×6 cm 区域毛发;体积分数为 0.7 的乙醇清洁去毛区,在每只豚鼠脊柱两侧 6 点对称皮内注射,各点相距 2 cm,每点注射 0.1 mL。记录动物注射后的异常反应。④局部斑贴:皮内注射后 1 周,在豚鼠去毛区再度剃毛,体积分数为 0.7 的乙醇清洁,各注射部位以医用轻质液状石蜡涂布,24 h 后将用材料浸提液、阴性、阳性对照液浸至饱和的 2 cm×4 cm 滤纸片 3 层贴敷于注射部位,依次覆盖 3 cm×3 cm 大小的塑料薄膜和纱布,固定并留置 48 h。记录观察动物贴敷后的异常反应。⑤激发:局部斑贴后 14 d,将豚鼠腹部一侧毛发剃除,体积分数为 0.7 的乙醇清洁,在腹侧去毛区贴敷如上处置的滤纸片,如上固定并留置 24 h。除去贴敷物后 24, 48, 72 h 观察激发部位反应,按皮肤反应分级标准记录每一观察时间和每一激发部位红斑和水肿反应分级^[10, 11]。

主要观察指标:①HA-P 的弹性模量、拉伸强度、变形 10% 压缩强度和邵氏硬度。②HA-P 材料动物全身急性毒性实验、溶血实验、热源实验和致敏实验结果。

统计学分析:由第二作者应用 SPSS 10.0 软件进行分析,所有均数均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 HA-P 复合材料的外观 材料外观呈黄白色,质地均匀且柔软而有弹性,肉眼见外表较光滑,如图 1 所示。

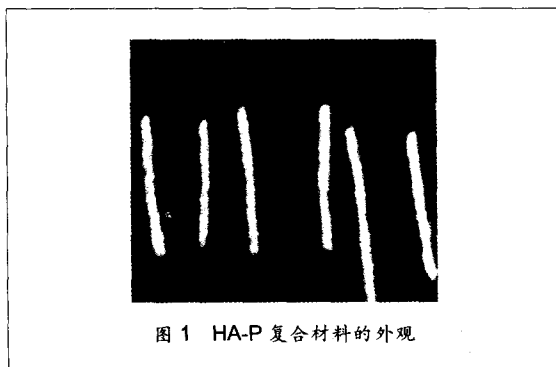


图 1 HA-P 复合材料的外观

2.2 HA-P 材料的主要性能参数 HA-P 复合

材料的弹性模量为 100.35 MPa、拉伸强度为 2.24 MPa、变形 10% 压缩强度为 0.41 MPa、邵氏硬度为 89.4。

2.3 全身急性毒性实验结果 在 72 h 观察期内,小白鼠无死亡,无毒性症状出现。实验组实验前、后平均体质量为 (20.2±0.8), (22.6±1.1)g;对照组实验前后平均体质量为 (20.8±0.8), (22.8±1.2)g, 两组体质量均无明显变化。

2.4 溶血实验结果 HA-P 组、阴性对照组和阳性对照组的 A 值分别为 0.036 0±0.002 6, 0.003 7±0.003 8, 1.039 0±0.077 2, HA-P 材料浸提液的溶血率为 3.09%, 不大于 5%, 说明该材料符合医用材料的溶血实验要求。

2.5 热源实验结果 实验动物注射 HA-P 材料浸提液后每只体温升高在 0.4 °C 以下,并且 3 只家兔体温升高的总数在 0.9 °C 以下,符合热源实验的要求。注射 HA-P 材料浸提液后兔体温变化情况见表 1。

表 1 注射羟基磷灰石/聚乳酸-三亚甲基碳酸酯材料浸提液后兔体温变化 (°C)

动物编号	实验前	实验后 1 h	实验后 2 h	实验后 3 h	体温升高度数
1	38.9	39.0	39.0	39.0	0.1
2	38.9	39.1	39.0	39.1	0.2
3	38.7	38.8	39.0	39.1	0.4

2.6 致敏实验结果 阳性对照组 10 只豚鼠均有清晰的皮肤红斑或中度红斑,48 h 后观察到焦痂,记分为 4;实验组 10 只豚鼠皮肤部分有轻度红斑反应,平均记分为 0.5;阴性对照组中 10 只豚鼠皮肤部分亦有轻度红斑反应,平均记分为 0.5。说明 HA-P 材料无致敏作用。

3 讨论

打鼾主要是有软腭振动引起的,并已证明,使软腭组织绷紧后,能够缓解和减少打鼾。2002 年获得 FDA 论证的软腭植入系统正是通过在软腭中植入 3 个弹性细棒以增强软腭的强度,同时植入物周围组织的纤维化也增加了软腭的硬度,从而降低,甚至消除鼾声。但是目前该手术远期效果不确定,植入物脱出等缺点。

本研究选用羟基磷灰石与聚乳酸-三亚甲基碳酸酯制成复合材料用作软腭植入的内植入材料。羟基磷灰石是一种磷酸钙无机材

同行评价:实验针对软腭植入系统治疗腭源性鼾症的治疗原理探索新的软腭植入材料-羟基磷灰石/聚乳酸-三亚甲基碳酸酯,并对该材料的物理性能和生物安全性进行评价,为新材料的应用提供了可靠的实验数据,在临床医学上具有重要意义。

料,其化学成分、晶体结构、物理化学性能与人体正常骨的无机成分相似,与人体生物相容性良好^[12],用于骨替代材料已有百年的历史^[13]。羟基磷灰石可以根据需要制成多种形状,如:长条形、圆柱体、小颗粒等。羟基磷灰石生物性能稳定,其特有的网络多孔三维立体结构具有促进组织长入的能力,但羟基磷灰石质地坚硬,脆,成型较为困难^[14]。聚乳酸-三亚甲基碳酸酯是聚乳酸与三亚甲基碳酸盐单体所形成的无规共聚物,除保留聚乳酸某些良好的特性外,如生物相容性较好,可吸收性,而且当加入少量的碳酸盐,共聚物会变得柔软而有弹性^[15-17]。但该共聚物也有一个缺点,降解产物呈酸性,可能导致局部组织的炎症反应。

上述两种材料不仅生物相容性良好,而且来源丰富,价格便宜。通过特定的方法将两种材料复合在一起后,利用聚乳酸-三亚甲基碳酸酯良好的弹性和可塑性,可以赋予重组材料适宜的柔韧性;并且羟基磷灰石中少量的碳酸钙成分是一种弱碱性的物质,一定程度上可以中和其酸性降解产物所导致的无菌性炎症。

软腭组织是一肌性器官,具有一定的生理弯曲。作为软腭组织的内植入材料,材料的弹性应顺应软腭的生理弯曲,且具有一定的硬度更佳。本实验制备的 HA-P 复合材料的性能测试显示其能够顺应软腭组织的生理弯曲,一定的硬度可以加强软腭的硬度,起到治疗鼾症的作用。

对于体内长期植入的材料,根据国际标准化组织(ISO)的规定,须进行生物相容性评价。本实验参考 GB/T16886.5—2003 医疗器械生物学评价标准进行。急性毒性实验是一种特异急性毒性实验,本实验的结果显示 HA-P 材料浸提液对实验动物未产生任何毒性反应,更未影响到动物的生存;溶血实验的结果显示溶血率为 3.09%,符合医用材料的溶血实验要求;热源反应实验结果显示每只家兔体温升高均在 0.4℃ 以下,并且 3 只家兔体温升高的总数在 0.9℃ 以下,符合热源实验的要求;过敏实验的结果说明 HA-P 材料无致敏作用。上述结果说明本实验制备的 HA-P 材料无毒性、无致敏物质,无所含热源均符合生物体的要求,无溶血性,具有良好的生物相容性。

综上所述,HA-P 的制备原材料生物相容性好,各成分间扬长避短,复合的新材料的弹性、硬度顺应软腭组织的解剖弯曲,且无毒性、无致敏性,无热源性等,有望作为软腭组织的内植入材料使用。

4 参考文献

- Maurer JT, Verse T, Stuck B, et al. Palatal implants for primary snoring: Short term results of a new minimally invasive surgical technique. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132(1):125-131
- Mehta BC, Holman DW, Grzybowski DM, et al. Characterization of arachnoidal cells cultured on three-dimensional nonwoven PET matrix. *Tissue Eng* 2007;13(6):1269-1279
- Nimchua T, Punnapayak H, Zimmermann W. Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. pisi. *Biotechnol J* 2007;2(3):361-364
- Ryu HS, Hong KS, Lee JK, et al. Magnesia-doped HA/beta-TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility. *Biomaterials* 2004;25(3):393-401
- Wang J, Chen W, Li Y, et al. Biological evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic vertebral laminae. *Biomaterials* 1998;19 (15):1387-1392
- Van Genderen E, Gensemer R, Smith C, et al. Evaluation of the Biotic Ligand Model relative to other site-specific criteria derivation methods for copper in surface waters with elevated hardness. *Aquat Toxicol* 2007;84 (2):279-291
- Lee KW, Raisuddin S, Hwang DS, et al. Acute toxicities of trace metals and common xenobiotics to the marine copepod *Tigriopus japonicus*: Evaluation of its use as a benchmark species for routine ecotoxicity tests in Western Pacific coastal regions. *Environ Toxicol* 2007;22(5):532-538
- Perez-del-Pulgar S, Lopez M, Gensana M, et al. Possible alternative to European Pharmacopoeia's method of analysis Test for Fc Function of Immunoglobulin (2.7.9) by using tetanus toxoid as antigen. *Pharmeur Sci Notes* 2006;2006(1):23-26
- Barrey E, Mucher E, Robert C, et al. Gene expression profiling in blood cells of endurance horses completing competition or disqualified due to metabolic disorder. *Equine Vet J Suppl* 2006;(36):43-49
- Basketter DA, McFadden J, Evans P, et al. Identification and classification of skin sensitizers: identifying false positives and false negatives. *Contact Dermatitis* 2006 55(5):268-273
- Arfsten DP, Azadi S, Butterworth LF, et al. Hydrocarbon-based weapons maintenance compounds produce evidence of contact hypersensitivity in BALB/c mice. *Cutan Ocul Toxicol* 2006;25(3):185-194
- GB/T 16175-1996. 医用有机硅材料生物学评价实验方法 // 医疗器械生物学评价标准汇编[M].北京:中国标准出版社,2003:1-19
- Nazhat SN, Joseph R, Wang M, et al. Dynamic mechanical characterization of hydroxyapatite reinforced polyethylene: effect of particle size. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11(10):621-628
- Asplund B, Sperens J, Mathisen T, et al. Effects of hydrolysis on a new biodegradable co-polymer. *J Biomater Sci Polym Ed* 2006;17(6):615-630.
- Cai Q, Wan Y, Bei J, et al. Synthesis and characterization of biodegradable poly(lactide dextran) and its application as compatilizer. *Biomaterial* 2003;24(20):3520-3555
- Vaccaro AR, Singh K, Haid R, et al. The use of bioabsorbable implants in the spine. *Spine J* 2003;3(3):227-237
- 陈继革,罗永湘,白祥军,等.聚乳酸-三亚甲基碳酸酯可吸收性导管治疗周围神经缺损的实验研究[J].同济医科大学学报,1999,28(5):421-424