

PLA 及 PGA 生物可降解聚合物在骨科的研究应用

张亮 靳安民

(第一军医大学珠江医院全军骨科中心, 广东 广州 510282)

目前, PLA 及 PGA 的聚合物已被用来作为骨替代和骨生长因子或药物的载体, 并在动物及人体取得不同程度的成功。

1 生物相容性

Slidregt 等将大鼠上皮细胞、人成纤维细胞及骨肉瘤细胞分别植于聚合物支架上, 结果所有这些支架均表现出满意的组织相容性^[1]。Miko 将网状 PGA 纤维支架作为细胞培养支架, 细胞种植后 8h 已与 PGA 网表现出高程度的交流, 并且没有发生副作用。尽管大量的研究资料表明 PLA 及 PGA 聚合物的副作用几乎可以忽略, 但是也有相当多的资料提醒我们 PLA 及 PGA 聚合物的副作用应尽量避免^[2]。Verheyen 等将 L-PLA 种植至乳牛的胫骨, 术后发生淋巴结炎症, 淋巴结病检确定为 L-PLA 微粒^[3]。Bostman 等用 PLA-PGA 聚合物制成的螺丝治疗 120 例踝关节骨折病人, 有 6 例患者在治疗过程中出现窦道^[4]。PLA 及 PGA 聚合物副作用多与 PGA 有关, 单独由 PLA 引起的副作用较少。

2 在骨科实验研究中的应用

2.1 在神经修复过程中的应用

2.1.1 防止神经粘连 侯建伟等将大鼠坐骨神经完全离断后行单纯端端吻合, 吻合口处套以聚乳酸管, 于术后 8 周取出标本, 发现聚乳酸管可以有效地预防神经吻合口的粘连和疤痕组织对其产生的压迫, 提高周围神经损伤后的功能恢复率^[5]。

2.1.2 作为神经生长支架修复神经缺损 最近, 周围神经的修复研究聚焦于人造神经引导膜管引导神经再生。Hadlock 通过注模技术将具有独特理化性质的聚合物 PLLA、PLA-PGA 制成膜管状, 然后将经分离出来进行培养雪旺细胞后种植于其上。结果雪旺细胞极好地贴附在材料上并生长良好, 组织血、电镜等检查证明了神经再生的倾向。雪旺细胞在 PLLA、PLA-PGA 膜管上的成功培养使神经在体内的再生通过神经膜管引导成为可能^[6]。Hadlock 通过低压注模技术, 将 PLA-PGA 制成可通过一根神经的三维多孔膜管, 与肌苷复合后, 作为肌苷的载体, 用于桥接大鼠坐骨神经一段 7mm 长的缺损, 对照组的缺损则用没有复合肌苷的膜管桥接。结果发现 10 周时前者的神经组织通过率明显高于后者(前者为 44%, 后者为 36%), 前者的神经纤维明显大于后者($P < 0.05$)^[7]。

2.2 在软组织修复过程中的应用

2.2.1 防止肌腱粘连 张仲文等将兔比目鱼肌腱做部分游离, 横形切断其截面积的一半, 再将其吻合。实验组于吻合部位放置厚度为 40~60 μ m 的 PCL(聚-己内酯)/PLA 薄膜, 对照组只行吻合术, 石膏外固定 3 周。发现实验组腱外部可见

“假鞘样”结构形成, 其纤维组织增生程度较轻, 胶原纤维排列规则, 表面光滑; 而对照组无“假鞘样”结构形成, 腱周组织与肌腱外表面间有大量的纤维增生, 排列紊乱。生物力学测试结果表明, 实验组抗粘连阻力做功要明显小于对照组, 认为 PCL/PLA 薄膜具有可靠的物理屏障作用, 可防治肌腱粘连^[8]。

2.2.2 防止术后疤痕粘连 熊敏等选用家兔作 L₃、L₅ 椎板切除, 形成两个缺损, 一个缺损无任何覆盖, 作空白对照; 另一个缺损分别在硬膜外覆盖几丁糖、聚乳酸(PLA)膜及明胶海绵。术后不同时间段观察疤痕生长及硬膜外粘连情况。几丁糖组和 PLA 膜组硬膜外均光滑、无增厚, 硬膜外腔隙未见纤维组织增生或粘连, 而各组空白对照和明胶海绵组硬膜外纤维组织增生或粘连明显, 硬膜外腔隙基本消失。认为, 可生物降解吸收的 PLA 膜能有效地预防椎板切除术后疤痕粘连^[9]。

2.2.3 肌肉重建 Kim 等通过对比平滑肌细胞在 PLA、PGA 支架及 I 型胶原支架上细胞生长和细胞外基质的基因表达发现支架的化学性质决定细胞表型。在聚合物支架上培养的细胞的弹性蛋白含量明显高于在 I 型胶原支架上培养的细胞的弹性蛋白含量, 而后者胶原的含量高出前者。认为材料的性能直接影响细胞的反应, 从而影响组织形成的速度和质量, PLA、PGA 制成的支架是适合用来培养平滑肌细胞的^[10]。

2.3 在血管修复过程中的应用

Niklason 在体外将牛的主动脉血管细胞种植于 PLA-PGA 制成的管状支架, 放置于有一定压力和血液流动的管腔内培养, 初步的研究已在该生物可降解聚合物上获得满意密度的内皮细胞和平滑肌细胞^[11]。Park 将人体内皮细胞和平滑肌细胞一起种植到 PGA 支架上并移植于小鼠皮下, 移植 7d 多层平滑肌细胞与内皮细胞紧靠在一起, 14d 形成明显的腔, 28d 和 42d, 一个有规则的组织结构出现, 免疫组化证明与自然的血管系统相近^[12]。

2.4 骨感染治疗

Jacob 等将兔子行实验性胫骨骨折并用葡萄球菌污染, 而后分别用复合了头孢菌素的生物可降解聚合物微球(PLLA-PGA)、头孢菌素粉末、静脉静滴头孢菌素 7d, 对照组不用抗生素, 骨折用四孔钢板固定观察 8 周。结果发现对照组 86% 发生深部感染, 静滴头孢菌素 7d 组 60% 有感染, 局部用头孢菌素粉末组及复合了头孢菌素的生物可降解聚合物微球组均无感染。并且前者血中抗菌素浓度在植入后比后者高, 但其下降速度亦比后者明显快^[13]。Benoit 等将盐酸万古霉素涂在 PLA-PGA 聚合物(10%W/90%W)表面再植入体内治疗骨感染。并在体外通过实验评价抗生素的释放动力学。在体外

实验发现,对照组没有用 PLA-PGA 聚合物涂层的万古霉素第一天呈爆发性释放,其有效治疗剂量大约维持一周;实验组用涂层的方法使第一天爆发性释放明显降低,有效治疗剂量大约维持 5 周^[14]。随着微球技术的发展,药物的释放动力学将可被控制,将药物放置于微球内,植入骨感染处,疗效将进一步提高。

2.5 在骨缺损修复过程中的应用

2.5.1 以膜管的形式发挥骨引导作用 黄岚峰等制作兔桡骨中段骨缺损,缺损区分别给予 PCL(聚-己内酯)/PLA 膜包绕及不做处理。结果前者骨生长明显优于后者,材料呈明显的降解趋势,血清中 Ca、P、IgG、IgM、C₄ 值与正常及空白对照均无明显差异。认为,生物降解材料(PCL/PLA)在引导骨性组织再生中有良好的屏障作用,促进骨缺损的愈合^[15]。证明了新型骨生物降解材料有良好的生物降解性和生物相容性。

2.5.2 作为骨及软骨细胞培养支架 王德春等将三维多孔状 PGA 作为兔软骨细胞培养支架,培养 14d 形成 PGA-软骨细胞复合体,移植于同种异体兔膝关节全层软骨缺损,PGA 在术后 8 周完全降解吸收,术后 16 周在实验侧可见典型的软骨组织,电镜下为成熟的软骨细胞,而对照侧(仅制造软骨缺损)为纤维组织修复^[16]。Malekzadeh 等用胰岛素和胶原酶消化流产的胎儿头颅骨分离出类成骨细胞,培养三代后,移植至三维 PLA 支架培养,检测到碱性磷酸酶活性明显增高,电镜及组织学切片检查证明类成骨细胞在三维 PLA 支架内充满。在培养 33 天时细胞的密度是初始种植时的 20 倍。认为 PLA 支架是十分适合类成骨细胞生长的^[17]。

2.5.3 作为骨生长因子的载体 最早将 PLA 作为骨生长因子载体(如 BMP 载体)的尝试是将 PLA 和 BMP 混合,制成一个混合物植入体内观察骨修复情况,最近,Robinson 等将 PLA 制成多孔块状作为 BMP 的载体,其多孔率可达 90%^[18],从而在结构上有利于细胞之间的信息交流,有利于保证一定治疗剂量的 BMP 的运载,同时 BMP 的释放动力学也可很好地控制,有利于临床应用。

3 在临床骨科中的应用

一些可吸收型装置已开始在骨科临床应用,如 PGA 棒、L-PLA 钢板、螺丝钉、DL-PLA-PGA 缝线等。Hirvensalo 等使用直径为 2mm 的 PGA 棒固定第一跖骨骨折,78 例患者,平均观察时间为 14 个月,没有发现术后移位和紊乱,其中有 2 例术后 6 周出现迟发性炎症反应,聚合物塌陷,经治疗并未影响其后的病程^[19]。Barber 通过对比 L-PLA 制成的可降解内固定螺丝钉与金属螺丝钉用于前交叉韧带重建的疗效时,发现术后 1 年可吸收螺丝钉与金属螺丝钉发挥了同样的作用,认为这种情况下不需再次手术取出,使得前者更有吸引力^[20]。Stahelin 等在 6 个患者中使用并比较以下三种材料:L-PLA(1 例),85-15(DL-PLA)-PGA(2 例),DL-PLA(3 例),在 20 个月内 L-PLA 螺丝钉没有明显降解,而 DL-PLA 和 (DL-PLA)-PGA 螺丝钉在 10 个月及 12 个月已完全降解^[21]。总的来说由于聚合物的机械性能较金属差,一般用于松质骨处的固定。

4 结语

由于聚合物制成的内固定与金属相比它们的机械性能

差,并有一定的副作用发生,如无菌性炎症反应等,较大程度地限制了它们在临床的应用。但是随着材料制作技术的提高和材料的改进,这些不足将可避免或减轻,尤其是近年制孔技术的发展,三维多孔结构聚合物的孔径和孔隙率已可控制^[22]。从而使 PLA 及 PGA 聚合物在骨折固定、骨缺损的填充材料、组织工程中的应用前景越来越好。

参考文献

- [1] Sliedregt AV, Radder AM, Blitterswijk CAV, et al. In vitro biocompatibility testing of polylactides. Part 1: Proliferation of different cell types. *J Mater Sci Med*, 1992, 3: 365-370.
- [2] Miko AG, Bao Y, Cima LG, et al. Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *J Biomed Mater Res*, 1993, 27: 183-189.
- [3] Verheyen CCPM, Dewi jn JR, Vanblitterswijk CA, et al. Examination of poly(L-lactide) containing plugs: A case report. *J Biomed Mater Res*, 1993, 27: 1115-1118.
- [4] Bostman O, Hirvensalo E, Vainionpaa S, et al. Ankle fractures treated using biodegradable internal fixation. *Clin Orthop Rel Res*, 1989, 238: 195-203.
- [5] 侯建伟, 张铁良, 范正伟. 聚乳酸管对大鼠坐骨神经吻合口及其功能恢复的影响. *中医正骨*, 1996, 8(5): 3-4.
- [6] Hadlock T, Elisseff J, Langer R, et al. A tissue engineered conduit for peripheral nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1998, 124(10): 1081-1086.
- [7] Hadlock T, Sundback C, Koka R, et al. A novel, biodegradable polymer conduit delivers neurotrophins and promotes nerve regeneration. *Laryngoscope*, 1999, 109(9): 1412-1416.
- [8] 张仲文, 徐莘香, 周莉, 等. 聚己内酯/聚乳酸薄膜防治肌腱粘连的实验研究. *中华骨科杂志*, 1998, 18(1): 692-694.
- [9] 熊敏, 宋跃明, 刘立岷. 椎板切除术预防硬膜外瘢痕粘连的实验研究. *中国修复重建外科杂志*, 1998, 12(5): 272-275.
- [10] Kim BS, Nikolovski J, Bonadio J, et al. Engineered smooth muscle tissues: regulating cell phenotype with the scaffold. *Exp Cell Res*, 1999, 251(2): 318-328.
- [11] Niklason LE, Langer RS. Advance in tissue engineering of blood vessels and other tissues. *Transpl Immunol*, 1997, 5(4): 303-306.
- [12] Park HU, Yoo JJ, Kershen RT, et al. Reconstitution of human cor-poral smooth muscle and endothelial cells in vivo. *J Urol*, 1999, 162(3 Pt 2): 1106-1109.
- [13] Jacob E, Cierny G, Fallon MT, et al. Evaluation of biodegradable ce-fazolin sodium microspheres for the prevention of infection in rabbits with experimental open tibial fractures stabilized with internal fixation. *J Orthop Res*, 1993, 11(3): 404-411.
- [14] Benoit MA, Mousset B, Delloye C, et al. Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections. *Int Orthop*, 1997, 21(6): 403-408.
- [15] 黄岚峰, 刘建国, 徐莘香. 可生物降解共聚膜修复兔桡骨节段性缺损. *白求恩医科大学学报*, 1999, 25(4): 396-398.
- [16] 王德春, 陈峥嵘, 宋后燕, 等. 聚乙醇酸负载同种异体软骨细胞移植修复兔关节软骨缺损. *中华创伤杂志*, 1997, 13(4): 228-231.
- [17] Malekzadeh R, Hollinger JO, Buck D, et al. Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. *J Periodontol*, 1998, 69(11): 1256-1262.
- [18] Robinson B, Hollinger JO, Szachowicz E, et al. Calvarial bone repair

with porous D,L-poly lactide. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1995, 112:707-713.

[19] Hirvensalo E, Bostman O, Tormala P, et al. Chevron osteotomy fixed with absorbable polyglycolide pins. *J Foot Ankle*, 1991, 11: 212-218.

[20] Barber FA, Elrod BF, McGuire DA, et al. Preliminary results of an absorbable interference screw. *Arthroscopy*, 1995, 11:537-548.

[21] Stahelin AC, Weiler A, Rufenacht H, et al. Clinical degradation and biocompatibility of different bioabsorbable interference screws: A report of six cases. *Arthroscopy*, 1997, 13:238-244.

[22] Ishaug Riley SL, Crane Kruger GM, Yaszemski MJ, et al. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, 1998, 19(15):1405-1412.

(收稿:2000-04-24 修回:2000-06-26 编辑:李为农)

痛风性关节炎的分子生物学基础

张治宇¹ 方策² 王秀华² 于洪新³ 刘元禄⁴

(1. 辽宁中医学院研究生部, 辽宁 沈阳 110032; 2. 抚顺中医学院, 辽宁 抚顺; 3. 金州中医院, 辽宁 大连; 4. 辽宁中医学院, 辽宁 沈阳)

近年来国内外许多学者发现体内尿酸钠 (MSU) 晶体作用于血小板、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、T 细胞、滑膜细胞, 释放多种炎症介质, 如: C_{5a}、微血管增渗酶、组织胺、前列腺素、血小板活化因子和炎性细胞因子, 并且表明多种细胞因子通过自分泌和旁分泌来影响痛风性关节炎的发生^[1,2]。目前越来越多的证据显示痛风性关节炎的核心是中性粒细胞 (PMN) 介导的炎症^[3], 在正常情况下组织中少见 PMN, 而增强的中性粒细胞-内皮细胞黏连是急性痛风产生的本质^[3,4]。一般循环中 PMN 呈非活化状态, 而组织中 PMN 较循环中 PMN 重要^[5-7]。激活因子通过与 PMN 细胞膜表面相应受体结合, 把信号传递给 GTP 结合蛋白, 特异性磷酸酯酶激活磷脂酰肌醇, 并在此酶作用下产生一系列代谢产物, 激活蛋白激酶 C, 引起细胞内 Ca 浓度升高, 从而激活 PMN^[5,8]。激活因子包括细菌、内毒素、免疫复合物、补体、氧自由基、白介素类。有报道 E-选择素等黏附分子也有激活 PMN 的作用^[9]。激活的 PMN 在趋化因子作用下与血管内皮细胞 (VEC) 黏附并进入组织中, 这些趋化因子主要包括 C_{5a}、C_{3a}、LPS 及新近发现的一些小分子蛋白超基因家族趋化因子, 如 IL-8 等^[8,10]。而 PMN 黏附, 穿越 VEC 向炎症部位的游走是急性炎症损伤过程的重要特征, 其分子生物学基础在于 PMN 与 VEC 表面黏附分子的相互作用^[10]。

1 炎性细胞因子

近年来人们研究发现 IL-1、IL-8、TNF 等在痛风性关节炎的免疫及病理过程中, 发挥重要作用^[11-15]。

1.1 白细胞介素-8 (interleukin-8 IL-8) IL-8 由 KOWNATYKI 于 1986 年首先发现, 人 IL-8 有四种分子形式, 基因定位于第 4 号染色体上。主要由单核-巨噬细胞、中性粒细胞等产生^[10], 此外嗜酸性粒细胞、T 细胞、内皮细胞、上皮细胞及成纤维细胞也产生 IL-8。其生物学活性主要是趋化中性粒细胞 (PMN)、嗜酸 (碱) 性粒细胞、淋巴细胞等到炎症局部引起炎症或变态反应。另外, IL-8 还能激活 PMN、嗜碱性粒细胞, 扩张血管, 促进血管增生及粒细胞增生, 是一个有效的 PMN 激活和趋化因子^[8,10]。

Matsukwa 等证明 MSU 可诱导 IL-8mRNA 的高表达, 2h 达到第一次高峰, 12h 达到第二次高峰, IL-8 第一次高峰来自

被 MSU 刺激的滑膜内皮细胞, IL-8 第二次高峰来源于炎性浸润的 PMN。考虑其第二次高峰是由于 IL-8 激活并趋化 PMN 的募集而释放 IL-8。且 IL-8 的表达与 MSU 呈依赖性关系, 提示 IL-8 与痛风性关节炎急性发作相关^[16,17]。Nishimura 等^[13]认为 IL-8 在急性痛风性关节炎的致病过程中起到很重要作用。Hachica M, Matsukawa 等通过大量实验研究认为 MSU 晶体刺激外周血中单核细胞和中性粒细胞, 导致 IL-8 的释放并持续稳定升高到非正常水平, 并认为 IL-8 是中性粒细胞介导的关节滑膜炎的起始^[17,18]。Fujiwara, Jaeschke 等^[10,18]认为对于局部组织炎症反应而言 IL-8 起很重要作用是因 IL-8 不能被血清灭活, 故能在局部累积并持续发挥效应。

1.2 白细胞介素-1 (interleukin-1 IL-1) IL-1 是 GER Y 于 1972 年首先发现, IL-1 有两种类型: IL-1 及 IL-1 β , IL-1 基因定位于第二号染色体上, 主要由单核-巨噬细胞产生, 内皮细胞、成纤维细胞、T 细胞和 B 淋巴细胞, 中性粒细胞也可产生 IL-1^[8], 并且多存在血及组织液中。IL-1 的生物学活性为: 诱导血管内皮细胞表达细胞膜黏附分子。活化巨嗜细胞、粒细胞, 增强其活性。刺激单核-巨嗜细胞等合成 IL-1、IL-6、IL-8 及 TNF。增强 T、B 细胞对抗原和丝裂原刺激反应。致炎症反应^[14,19]。

Matsukawa 等在急性痛风性关节炎的动物实验模型中都检测出了 IL-1 mRNA 的高表达, IL-1 的活性及含量均较其他时期明显增高: 2h (0.28 \pm 0.03ng/joint, n = 20), 2 ~ 4h 开始减少, 9h 再次升高达 (0.23 \pm 0.02ng/joint, n = 18), 并认为浸润的 PMN 等细胞是 IL-1 的主要来源并在炎症反应的初始阶段介导了炎症的发生^[17]。Chapman 等证实 MSU 晶体刺激血液单核细胞和关节滑液中单核细胞及吞噬细胞引起 IL-1 的大量释放, 并认为 IL-1 是急性痛风性关节炎的一个炎性介质^[20]。Pugin 等也通过大量实验认为 MSU 是单核细胞产生 IL-1 的潜在刺激物, 认为其产生完全是由于 MSU 刺激被单核细胞介导的内皮细胞所致, 并引起急性炎症反应^[21]。Di Giovine^[22]认为 IL-1 是痛风性关节炎的一个重要炎症介质, 不论在急性和慢性痛风性关节炎中都起到重要作用。

1.3 肿瘤坏死因子 (tumour necrosis factor TNF) TNF 是