

新型可完全降解材料聚外消旋乳酸-三亚甲基碳酸酯聚合物体内降解行为和 组织相容性*☆

郭清奎¹, 吕志前¹, 张 祎¹, 李速明², 杨 建²

In vivo degradation behavior and histocompatibility of a novel fully biodegradable material: Poly trimethylene carbonate-Co-D, L-Lactide

Guo Qing-kui¹, Lü Zhi-qian¹, Zhang Yi¹, Li Su-ming², Yang Jian²

Abstract

¹Department of Cardio-thoracic Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China; ²Department of Materials Science, Fudan University, Shanghai 200235, China

Guo Qing-kui^{*}, Studying for doctorate, Attending physician, Department of Cardio-thoracic Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
gqk1978@126.com

Correspondence to: Lü Zhi-qian, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Cardio-thoracic Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
luzhiqian@163.com

Supported by: the Science and Technology Commission Item of Shanghai, No. 074107061*

Received: 2010-12-02
Accepted: 2011-01-28

BACKGROUND: Implantation of current used bare metal stent, metal drug-eluting stent, or alloy stent would result in local intimal hyperplasia, thrombosis and increase incidence of adverse cardiovascular event. Therefore, the development and preparation of high molecular polymer biodegradable stent has aroused increasing attention.

OBJECTIVE: To study the behavior and histocompatibility of novel fully biodegradable material of poly trimethylene carbonate-co-d, l-lactide (PDLLA/TMC) *in vivo*.

METHODS: The early-stage synthesized materials of PDLLA/TMC (50/50) were used in the experiment group and the PLLA/TMC (50/50) and PLLA in the control. The patches of each kind of the three polymers above were implanted into the subcutaneous tissue of the 144 Wistar mouse with equal gender, six months old. The polymers patches and their surrounding tissues were taken out and weighed and sliced for hematoxylin-eosin staining at the phases of different test time. Their biodegradable behaviors *in vivo* were tested by the methods of size exclusion chromatography (SEC), gel permeation chromatography (GPC), nuclear magnetic resonance (NMR) and environmental scanning electron microscope (ESEM), and their histocompatibility was evaluated by inflammation cells counting in quantity with light microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: In the first 60 days of implantation, there was no significant difference in the percentage of mass loss among the three groups, and their velocity of degradation was relatively slow, though it was slightly faster in the PDLLA/TMC than in the PLLA/TMC and PLLA. During the 60 days to 180 days, PDLLA/TMC degradation velocity accelerated obviously, and its percentage of mass loss was much higher than the other two polymers. At 180 days, most of the PDLLA/TMC degraded while the PLLA/TMC and PLLA degraded less. When the three polymers were implanted into the mouse body, at first their molecular declined rapidly, then the decline went into a slow stage gradually. With the time extended, their smooth and orderly superficial structure transformed into ruffle, twist, turbulent, full of hole and hollow, which was rather obvious in the polymer of PDLLA/TMC. Also, there were relative lower inflammation cells counting in the PDLLA/TMC and PLLA/TMC group at the phase of different test time, compared to the PLLA group the differences had statistic significance ($P < 0.05$), but there was no statistic significance between the PDLLA/TMC and PLLA/TMC group ($P > 0.05$). The polymer of PDLLA/TMC, which has favorable degradation performance and histocompatibility, is a novel fully biodegradable material and capable of manufacturing the implanted cardiovascular stent.

Guo QK, Lü ZQ, Zhang Y, Li SM, Yang J. In vivo degradation behavior and histocompatibility of a novel fully biodegradable material: Poly trimethylene carbonate-Co-D, L-Lactide. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(34): 6368-6374. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前应用于临床的金属裸支架、金属药物洗脱支架、合金支架等置入心血管后会导致局部血管内膜增生、血栓形成,增加心血管不良事件发生率。因此,应用高分子聚合物材料研发和制备完全生物可降解血管支架逐渐成为研究热点。

目的: 观察新型完全生物可降解材料聚外消旋乳酸-三亚甲基碳酸酯(PDLLA/TMC)(50/50)聚合物在机体内的降解行为和组织相容性。

方法: 以课题组前期合成并研究的聚合物 PDLLA/TMC(50/50)为实验对象,聚左旋乳酸-三亚甲基碳酸酯(PLLA/TMC)(50/50)和聚乳酸(PLLA)为对照,分别将其薄膜片植入 144 只 6 月龄 Wistar 大鼠,在不同的时间点,采用体积排除色谱、凝胶渗透色谱、核磁共振、环境扫描电镜研究其体内降解行为,并通过光镜下镜检及周围炎性细胞计数量化评价其组织相容性。

结果与结论: 在植入机体前 60 d, 3 组材料的失重率并没有太大的区别,降解速率均相对平稳缓慢,PDLLA/TMC 的降解速率略快于其他两组聚合物材料,60 d 后 PDLLA/TMC 的降解速率明显加快,其失重率显著高于另外两种聚合物材料,180 d 后 PDLLA/TMC 大部分被降解,其余两种聚合物降解很少。3 种聚合物材料包埋于生物体内即开始出现相对分子量下降,初期下降速率较快,而后逐渐趋缓。3 种材料的表面结构随着降解时间的延长,由初期的较为光滑整齐变为后期的皱褶、扭曲、紊乱、凹陷和孔洞,且 PDLLA/TMC 材料表面变化较明显。PDLLA/TMC 和 PLLA/TMC 与 PLLA 比较,各个时间点均有相对较低的炎症细胞计数,差异均有显著性意义($P < 0.05$);而 PDLLA/TMC 与 PLLA/TMC 比较,各个时间节点上的炎症细胞计数差异均无显著性意义($P > 0.05$)。证实 PDLLA/TMC 聚合物是一种新型的完全生物可降解材料,具有良好的降解性能和组织相容性。

关键词: 生物可降解; 聚合物; 血管内支架; 组织相容性; 聚外消旋乳酸-三亚甲基碳酸酯

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.34.024

郭清奎, 吕志前, 张祎, 李速明, 杨建. 新型可完全降解材料聚外消旋乳酸-三亚甲基碳酸酯聚合物体内降解行为和组织相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(34):6368-6374. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

冠状动脉血管内支架置入是治疗冠心病的主要方法之一^[1]。置入心血管狭窄部位的支架必须具备一定的横向和径向支撑力和弹性回缩力,才能保证其长期通畅率,支架降解过快则强度下降,不能起到有效支撑,降解过慢则引起支架内心血管内膜增生和血栓形成,导致管腔再狭窄^[2-8]。聚D, L-乳酸(poly d, l-lactide, PDLLA)、聚L-乳酸(poly l-lactide, PLLA)和聚三亚甲基碳酸酯(poly trimethylene carbonate, PTMC)等聚合物作为完全生物可降解高分子材料在生物医学工程领域中应用已久,其较低的生物毒性和免疫性已得到证实^[9-14]。事实上,单一成分的高分子聚合物材料很难同时具备上述两个特征,如何在降解速度和支撑力度两者之间找到平衡,是该领域的难题。课题组前期试验表明,通过改变共聚物材料成分比例而获得的复合材料PDLLA/TMC(50/50),具有优良的体外降解性能、机械性能和生物安全性^[15-17]。本文进一步研究PDLLA/TMC体内的降解行为以及组织相容性。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2009-10/2010-05在上海交通大学附属第六人民医院实验动物房和复旦大学材料科学系完成。

材料:

实验动物: Wistar大鼠144只, 6月龄, 体重180 g, 雌雄各半, 由上海实验动物养殖基地提供, 室内无菌恒温饲养。

实验试剂:

| 实验试剂 | 来源 |
|---|--------------------|
| D,L-乳酸、L-乳酸、1,3-丙二醇、AR级, 国药集团化学碳酸二乙酯、二甲苯、二丁基二月桂酸锡(DBTL)、金属钠、锌粉、锡粉、三氧化二锑 | 试剂有限公司 |
| 羟基乙酸 | AR级, 上海元越化工有限公司 |
| 乳酸锌 | Sigma Chemical Co. |
| 辛酸亚锡 | Aldrich Corp. |
| 乙酸乙酯、二氯甲烷、四氢呋喃 | AR级, 上海试剂一厂 |
| 丙酮、无水乙醚 | AR级, 上海马陆制药厂 |
| 甲醇 | AR级, 上海振兴一厂 |
| 2 g/L II型胶原酶、2.5 g/L胰蛋白酶 | 上海西唐生物科技有限公司 |

方法:

聚合物薄膜制备: 聚合物薄膜制备方法和过程见参考文献^[15-17]。聚合物薄膜呈方形, 厚0.4 mm, 长10 mm, 宽10 mm。真空干燥至恒质量, 紫外线消毒, 锡箔纸包裹, 4 °C冷藏真空保存。

聚合物的表征: ①聚合物的化学结构采用Bruker AV500核磁共振仪在室温下测定, 共振频率为500 Hz, 溶剂为DMSO, TMS作为内标。所得谱图的FID解析率为0.245 Hz/point, 扫描宽度为8 kHz, 采样时间为2.04 s。②使用Waters 410和RI检测器, 采用体积排除色谱(SEC)和凝胶渗透色谱(GPC)方法测定聚合物相对分子质量和相对分子质量分布, 聚乙烯标样校正, THF为流动相, 流速为1.0 mL/min; 每次分析采用1.0 %聚合物溶液, 过滤后注射量约为20 μL。③聚合物样品置于载物台上, 真空度为5 Torr, 采用Philips XL30环境扫描电镜观察, 进行表面形貌分析。

实验动物分组: 按性别和时间将大鼠分为6组: 2 d组、15 d组、30 d组、60 d组、90 d组、180 d组, 每组24只, 再分为3个亚组, 每组8只, 分别植入PDLLA/TMC、PLLA/TMC和PLLA聚合物薄膜, 每个亚组用于体内降解行为研究4只, 用于体内组织相容性研究4只。

聚合物薄膜片植入Wistar大鼠体内: 氯胺酮腹腔注射对Wistar大鼠进行麻醉, 剂量为100 mg/kg, 无菌操作下将PDLLA/TMC、PLLA/TMC和PLLA聚合物薄膜片分别静置于体积分数为75%乙醇溶液中15 min后取出, 以5% NaCl溶液中漂洗2 min, 于大鼠背部皮肤旁正中行纵切口, 并用血管钳于皮下游离约3 cm×5 cm袋形空间, 将材料薄片分别植入皮下, 远离植入部位2 cm缝合表皮切口。未应用抗生素, 清洁恒温环境下饲养、分别于2, 15, 30, 60, 90, 180 d各个时间节点处死各组大鼠取出标本。

计算PDLLA/TMC、PLLA/TMC和PLLA聚合物体内失重率: 将植入材料取出, 仔细剥离周围组织, 2.5 g/L胰蛋白酶和2 g/L II型胶原酶消化液中分别静置1 h后, 用去离子水冲洗两次后称重, 得到湿质量 m , 然后在真空干燥箱中干燥1周至恒质量, 再次称质量得到干质量 m_d 。聚合物样品的失重率按照如下公式计算:

$$\text{mass (\%) loss} = \frac{m - m_d}{m} \times 100\%$$

组织病理及其分析: 运用盲法请病理专家观察聚合物PDLLA/TMC、PLLA/TMC和PLLA薄

¹上海交通大学附属上海市第六人民医院胸心外科, 上海市 200233;
²复旦大学材料科学系, 上海市 200235

郭清奎☆, 男, 1978年生, 安徽省涡阳县人, 汉族, 上海交通大学医学院在读博士, 主治医师, 主要从事胸心血管外科, 研究方向为冠心病。
gqk1978@126.com

通讯作者: 吕志前, 教授, 主任医师, 博士生导师, 上海交通大学附属上海市第六人民医院胸心外科, 上海市 200233
luzhiqian@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2011)34-06368-07

收稿日期: 2010-12-02
修回日期: 2011-01-28
(20101202009/M·Z)

膜切片, 分析其体内组织相容性。取出薄膜及其周围包裹组织, 置入甲醛溶液中固定, 进行石蜡切片、苏木精-伊红染色, 分别于40倍及100倍光学显微镜下观察材料周围炎症反应。通过OLYMPUS CX31生物显微镜、图像采集卡、数码相机或CCD摄像机采集数字图像, 应用上海求为生物科技有限公司MIQAS医学图像定量分析系统和医学图像定量分析软件。3次随机计数切片材料周围组织面积0.017 mm²内炎症细胞数量, 取平均值为该切片炎症细胞数量。

统计学分析: 使用SPSS 17.0统计软件进行分析。所有数值均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用One Way ANOVA Analyses, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 动物一般情况 3种聚合物材料植入后所有大鼠当天开始进食, 活动正常, 无发热, 切口无明显红肿、出血和渗出, 术后7 d一期愈合, 无意外死亡。

2.2 失重率的变化 见图1。

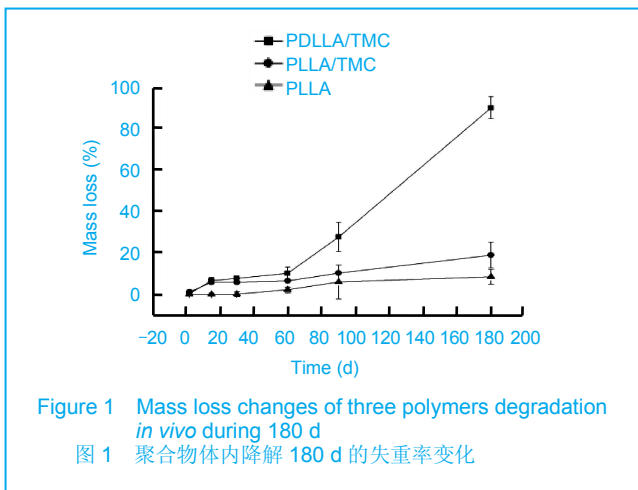


Figure 1 Mass loss changes of three polymers degradation in vivo during 180 d
图1 聚合物体内降解 180 d 的失重率变化

聚合物在体内的降解过程是由水降解及酶降解共同作用的结果, 而影响这两种降解机制的因素也有很多, 包括有化学键稳定性, 相对分子质量大小及分布, 晶体结构, 亲疏水性等。一般认为, 聚合物植入材料以水降解的机制为主, 由图1可以看出, PDLLA/TMC聚合物与其他2种聚合物材料在体内的降解行为有很大的区别。对比PLLA/TMC和PLLA可以发现, 前60 d中3组材料的失重率并没有太大的区别, 且都呈现降解速率相对平稳缓慢。PDLLA/TMC和PLLA/TMC在前15 d有一定程度的失重, 第15天分别损失原始质量的6.87%和6.11%, 而对比PLLA则没有上述的表现, 其第15天失重率为0.30%。3种聚合物在之后的45 d内均没有出现较大的失重表现, PDLLA/TMC, PLLA/TMC和PLLA的第60天失重率分别为10.23%, 6.74%和2.45%。PDLLA/TMC的降解速率略快于其他两组聚合物材料。在体内降解

60 d以后PDLLA/TMC的降解速率明显加快, 其失重率显著高于另外两组聚合物材料, 在第90天和第180天的失重率分别达到了27.58%和89.02%, 远高于PLLA/TMC的10.43%、18.97%以及PLLA的6.20%、8.73%。

2.3 相对分子质量的变化 见图2。

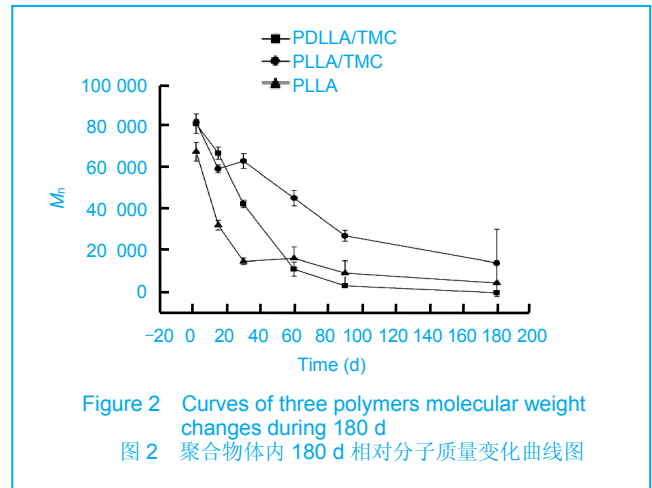


Figure 2 Curves of three polymers molecular weight changes during 180 d
图2 聚合物体内 180 d 相对分子质量变化曲线图

从图2中可以看出, 3种聚合物材料一经包埋于生物体内即开始出现相对分子质量下降, 且都呈现出初期下降速率较快, 而后逐渐趋缓的规律。其中PLLA均聚物的相对分子质量下降的最为快速, PLLA/TMC最为缓慢, 下降曲线最为平缓, PDLLA/TMC则介于两者之间。PDLLA/TMC和PLLA/TMC分别在第29天和第63天接近初测相对分子质量的一半。而3者相对分子质量下降到20 000左右的时间分别为: PLLA需要20 d左右, PDLLA/TMC需要50 d, 而PLLA/TMC则需要130 d。

2.4 形貌变化 见图3~6。

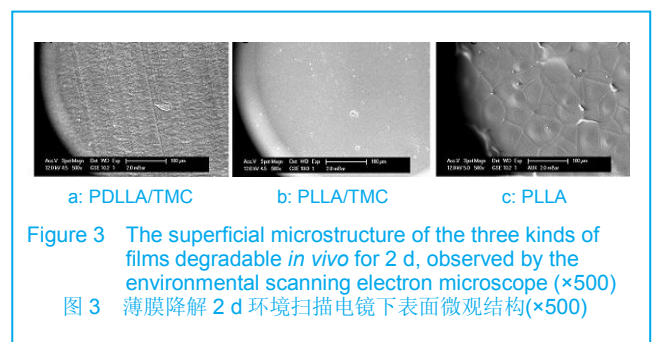


Figure 3 The superficial microstructure of the three kinds of films degradable in vivo for 2 d, observed by the environmental scanning electron microscope (x500)
图3 薄膜降解 2 d 环境扫描电镜下表面微观结构(x500)

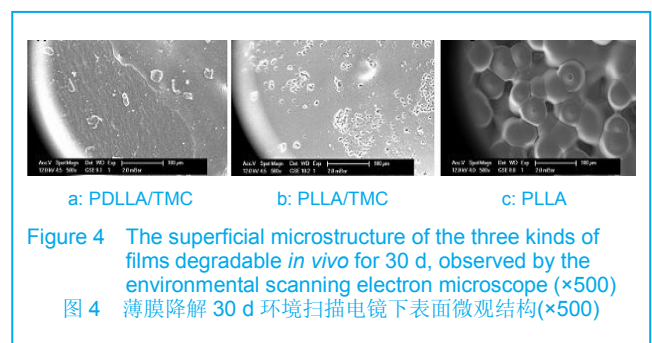
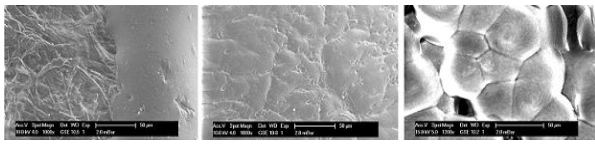
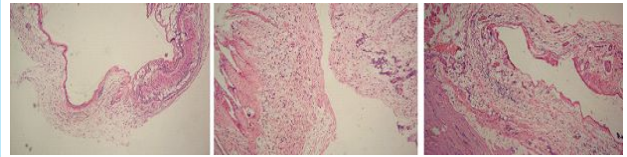


Figure 4 The superficial microstructure of the three kinds of films degradable in vivo for 30 d, observed by the environmental scanning electron microscope (x500)
图4 薄膜降解 30 d 环境扫描电镜下表面微观结构(x500)



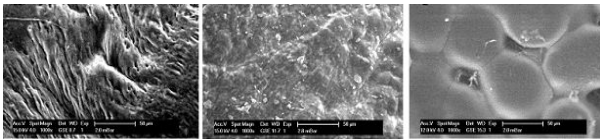
a: PDLLA/TMC b: PLLA/TMC c: PLLA

Figure 5 The superficial microstructure of the three kinds of films degradable *in vivo* for 90 d, observed by the environmental scanning electron microscope ($\times 1\ 000$)
图 5 薄膜降解 90 d 环境扫描电镜下表面微观结构($\times 1\ 000$)



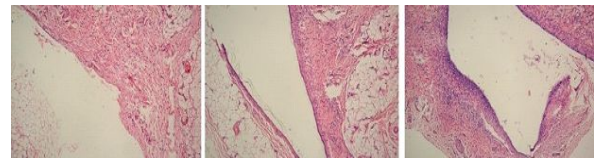
a: PDLLA/TMC b: PLLA/TMC c: PLLA

Figure 7 Hematoxylin-eosin staining of the three kinds of films degradable *in vivo* for 2 d ($\times 40$)
图 7 植入 2 d 组的薄膜组织切片苏木精-伊红染色($\times 40$)



a: PDLLA/TMC b: PLLA/TMC c: PLLA

Figure 6 The superficial microstructure of the three kinds of films degradable *in vivo* for 180 d, observed by the environmental scanning electron microscope ($\times 1\ 000$)
图 6 薄膜降解 180 d 环境扫描电镜下表面微观结构($\times 1\ 000$)



a: PDLLA/TMC b: PLLA/TMC c: PLLA

Figure 8 Hematoxylin-eosin staining of the three kinds of films degradable *in vivo* for 15 d ($\times 40$)
图 8 植入 15 d 组薄膜组织切片苏木精-伊红染色($\times 40$)

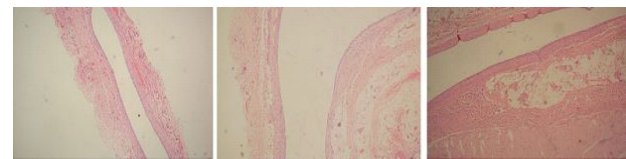
从图中可以看出, 3种材料的表面形貌遵循一定的规律, 随降解时间的延长, 其表面结构由初期的较为平整向后期的褶皱扭曲凹陷发展。PDLLA/TMC薄膜在降解 2 d和30 d其表面都没有出现了明显孔洞现象, 表面相对平整, 而PLLA/TMC和PLLA薄膜的表面或多或少都出现了孔洞结构, 但结构均相对整齐有序。在90 d, PDLLA/TMC材料表面呈现明显的裂隙褶皱, 结构紊乱, 至180 d更出现显著的凹陷, 而PLLA/TMC及PLLA薄膜虽也有空隙增多增大的表现, 但表面形态相对有序平整。

2.5 大体解剖学观察 2周时PDLLA/TMC, PLLA/TMC及PLLA聚合物薄膜周围组织未见明显充血水肿, 但有纤维状物增生, 未见成纤维囊包裹, 且均未出现形变。

1个月时3种聚合物薄膜周围均被一层薄而半透明的纤维膜包裹, 但粘连不紧密, 较易松散, 各薄膜未出现明显的变形扭曲或者崩解离散。

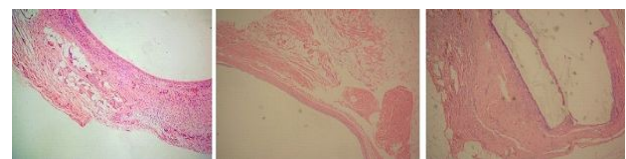
3个月时发现各聚合物周围包被的纤维膜有所增厚, 更为致密, 相对而言, PDLLA/TMC及PLLA/TMC与纤维薄膜更难于分离, PLLA则粘连较为疏松。PDLLA/TMC及PLLA/TMC聚合物薄膜出现扭曲变形, 表面皱缩, 而PLLA虽然没有出现形变但呈现不均匀乳白色, 表面光洁度下降。

6个月PDLLA/TMC及PLLA/TMC薄膜周围组织已长入材料内, 不易分离, PDLLA/TMC体积明显变小, 呈梭形或米粒形, 而PLLA则出现不同程度的折断碎裂。**2.6 苏木精-伊红染色薄膜组织切片观察** 见图7~16。



a: PDLLA/TMC b: PLLA/TMC c: PLLA

Figure 9 Hematoxylin-eosin staining of the three kinds of films degradable *in vivo* for 30 d ($\times 40$)
图 9 植入 30 d 组薄膜组织切片苏木精-伊红染色($\times 40$)



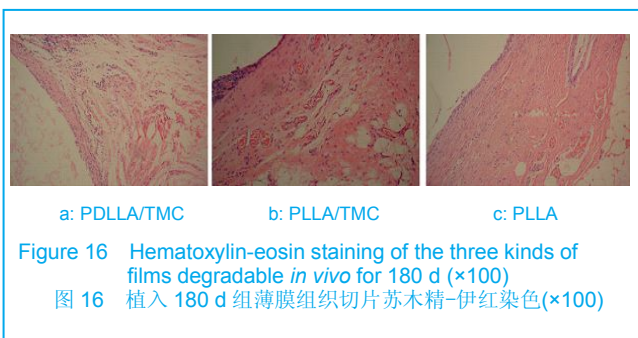
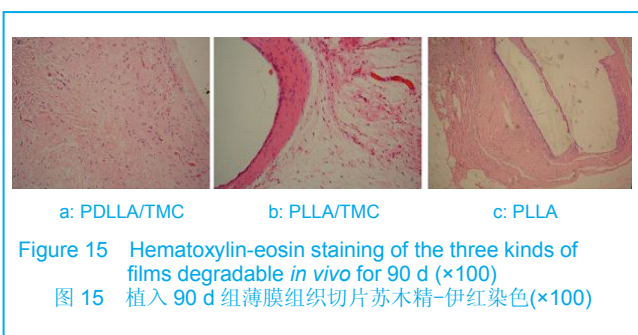
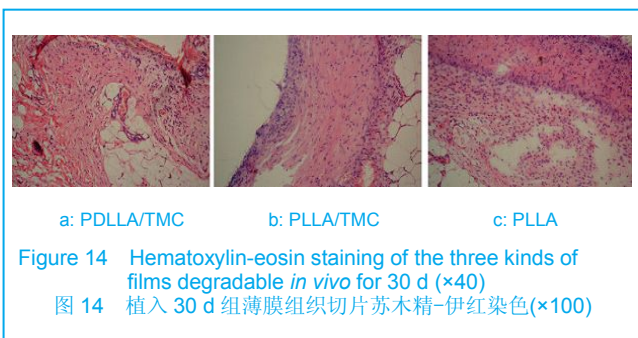
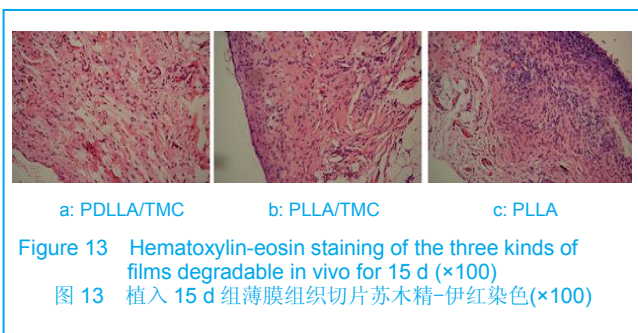
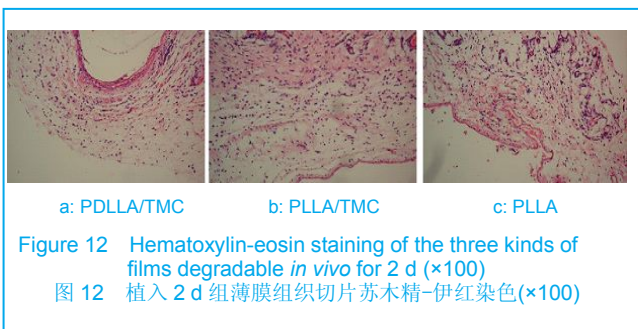
a: PDLLA/TMC b: PLLA/TMC c: PLLA

Figure 10 Hematoxylin-eosin staining of the three kinds of films degradable *in vivo* for 90 d ($\times 40$)
图 10 植入 90 d 组薄膜组织切片苏木精-伊红染色($\times 40$)



a: PDLLA/TMC b: PLLA/TMC c: PLLA

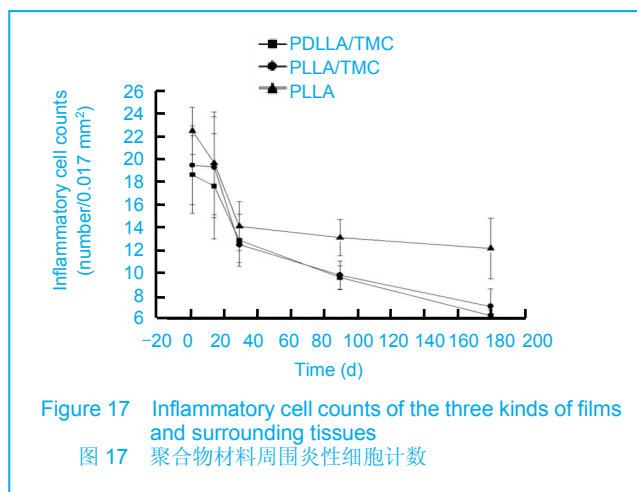
Figure 11 Hematoxylin-eosin staining of the three kinds of films degradable *in vivo* for 180 d ($\times 40$)
图 11 植入 180 d 组薄膜组织切片苏木精-伊红染色($\times 40$)



2 d及15 d, 3种薄膜材料周围可见较多的炎性细胞

浸润, 以中性粒细胞和淋巴细胞为主, 并可见少量巨噬细胞, 纤维母细胞增生, 并分泌胶原纤维, 但与周围结缔组织分界不清。30 d后, 炎性细胞数量减少, 胶原纤维仍较疏松, 可见大量成纤维细胞, 植入材料周围可见明显包裹的纤维结缔组织。90 d及180 d时, 可见炎性细胞数量进一步减少, 但程度较小, 以淋巴细胞为主, 胶原纤维致密。180 d组PDLLA/TMC聚合物材料薄膜表面与周围组织分界较为模糊, 胶原纤维致密变薄, 而PLLA/TMC和PLLA则可见较为清晰的纤维薄膜, 且与周围组织界限清楚, 各组切片均未见组织变性、坏死和异常增生。对比PLLA薄膜材料周围组织反应可以看到, PDLLA/TMC及PLLA/TMC具有相对较轻的炎症反应, 周围细胞排列较为规整, 包裹的纤维薄膜比较菲薄, 而两个聚乳酸-聚碳酸酯共聚物的炎症反应在光镜下则没有明显差异。

2.7 周围组织炎性细胞计数 见图17。



由图17可以看到PDLLA/TMC相对于PLLA均有相对较低的炎症细胞计数, 在90 d后尤为明显, 各个时间点差异有显著性意义($P < 0.05$), 而和PLLA/TMC对比中, 两种聚合物材料在体内组织相容性上几乎相同, 两者在各个时间节点上的炎症细胞计数差异均无显著性意义($P > 0.05$)。炎症细胞计数随时间变化趋势符合炎症反应基本规律, 也和大体观察基本一致。

3 讨论

由结果可以看出, 聚合物PDLLA/TMC薄膜的失重率随时间的变化曲线是符合一定规律的, 其变化可分为3个阶段。首先为快速增加阶段, 在最初的几天时间内, 有相对较快的失重, 考虑初期植入体内后, 创面分离和外来物刺激引起周围组织亚急性炎症反应, 出现炎性细胞增生以及渗出液增多, 造成初期的酶降解及水降解效应较大, 且薄膜于皮下相对运动也较多, 承受应力相对较强。其次为平稳阶段, 经过最初失重率的陡增后, 其

失重速率明显变缓, 失重率呈现一个缓慢增长的趋势, 周围组织经过约为14 d的亚急性炎症反应期, 薄膜逐渐被增生的组织纤维薄膜包裹, 炎症反应减弱, 进而屏蔽了参与降解的各个因素, 此时的材料微观结构及分子构成也相对比较稳定, 应为维持力学性能最佳的时期, 相对分子质量大多未下降到可以溶出本体的阶段, 因而没有明显的失重。最后为加速阶段, PDLLA/TMC的无规构型无法阻止水分子进入本体, 经由水降解的自体溶蚀, 本体相对分子质量逐渐下降, 酯键大部分断裂, 失去维持结构的能力, 组织生物酶则作用于薄膜表面, 使得其表面微观结构趋于崩解, 出现较大的孔隙、裂隙、窦道, 表面皱缩, 且聚合物相对分子质量进一步下降, 可以经由表面缝隙溶出本体, 并进一步加速本体的溶解, 因此聚合物在经历平稳期后, 失重率再次出现陡增现象。当作为血管支架材料植入血管并贴壁后, 很快被血管内皮细胞完整包裹, 避免血液流动快速的冲刷, 其降解速率和失重曲线将和本实验十分相近。

聚合材料的质量损失明显滞后于相对分子质量的损失, 这表明共聚物的降解过程大部分是同时发生于整个共聚物基体中的, 即属于酯键断裂的本体水解范围。当降解使得聚合物相对分子质量小到可以溶解于溶液的阶段, 才出现失重表现。共聚物的体内失重率和生物降解率变化趋势相近, 说明聚合物体内植入实验中其降解过程主要是水解过程, 但亦与体内酶、血液循环、应力等多种因素有关^[18-22]。

PDLLA/TMC薄膜在包埋皮下6个月的过程中达到接近90%的质量损失, 明显高于对照组PLLA/TMC和PLLA, 这是大部分归因于PDLLA中的乳酸单元是间同立构或者无规立构的, 聚合物不能结晶, 其无定形态使得水分子更容易进入, 进而接触到本体以及小相对分子质量齐聚物, 而完全是L型的PLLA中乳酸单元是全同立构的, 聚合物能够结晶, 即有相对更强的疏水性, 抑制了水分子的进入而使水解变得相当慢, 而如果排除水降解的因素, 即自体溶蚀的作用, 只剩下生物酶的表面溶蚀降解, 是导致PLLA聚合物材料降解较为缓慢的根本原因。对比相对分子质量下降可以发现, 聚合物的相对分子质量越低, 越易于作为溶质被溶解, 由于构型的无定形态使得PDLLA/TMC虽然较晚到达中低相对分子质量水平, 却最快出现较为明显的失重, 而PLLA/TMC和PLLA则因为其结晶的形态而具有相对大的疏水作用, 而无法得到满意的降解速率和降解时间。

比较同一时间点的PLLA/TMC和PLLA聚合物薄膜表面形貌, 可以看出PDLLA/TMC材料的表面形貌特征改变均较为明显, 更多的凹陷、孔洞, 裂隙相对较宽、较深, 表面形貌在后期更显无序混乱, 这与它失重率最大、降解最多相一致, 同时变形和失重开始增加相关, 说明聚合物表面已经被不同程度地溶蚀了。材料表面出

现小孔隙说明材料表面的小分子物质降解方式是本体剥离溶解。在取出材料过程中, 发现3种材料在皮下包埋2个月开始有不同程度的卷曲变形, 虽然PDLLA/TMC变化相对较小, 但是可能会影响其固有力学性能的维持。Venkataraman等^[23]通过改进工艺, 使PLLA支架的支撑力达到0.21~0.25 MPa, 而普通不锈钢支架的支撑力为0.20~0.22 MPa, 说明聚合物材料支架的力学性能足以和金属支架相媲美。通过改性技术, 改变PDLLA/TMC的成分、组成比例、相对分子质量和形态结构等, 可以在其机械性能和降解性能间找到平衡点, 从而使其达到制备完全生物可降解心血管植入支架的要求。

植入材料在体内炎症反应属于非特异性无菌性炎症反应, 初期薄膜周围组织反应为一种轻度的急性及亚急性无菌性炎症反应, 是因为手术和机械损伤刺激以及植入物共同引起, 而诸如材料降解的碎片、寡聚物、单体、聚合反应催化剂的释放均可引起周围炎症反应, 炎性细胞增多, 这种反应经时间延长和材料被纤维囊包裹而趋于平静, 炎症反应包括渗出红肿等也逐渐减轻, 实际上这是一种具有良好组织相容性的异物反应。

通过大体观察、切片镜检以及周围炎性细胞计数可以看到PDLLA/TMC比较相对于PLLA具有更轻的致炎症反应性, 而与PLLA/TMC比较则区别不大。PDLLA/TMC降解过程中, 材料表面产生更多缝隙, 孔径相对较大, 细胞更易侵入材料内部, 纤维连接更为紧密, 后期更难以与周围组织分离。PDLLA/TMC比较和PLLA/TMC薄膜植入皮下3个月后均有不同程度的卷曲变形, 有的包绕成梭形形状, 提示材料具有相对较差的刚性结构, 而弹性力学性能较好, 而PLLA薄膜材料则有相对强的刚性结构, 不易产生变形, 但因脆性较大, 薄膜在皮下经受外力摩擦碰触后, 产生折断和碎裂, 作为异物其碎片引起较明显的炎症反应, 因此, PLLA组薄膜周围组织炎症细胞多于其余两组。

聚合物降解产物的相对分子质量也是造成炎症反应的一个重要因素, 中相对分子质量的降解产物可增加非特异性无菌性炎症反应, 高相对分子质量的PLLA可延迟但不能消除这一反应的发生^[24-25]。这是由于PLLA聚合物为结晶形态, 其构型的相对疏水的特性虽然可以在早期延缓低分子降解产物溶出, 但却无法阻止这一过程, 同时结晶形态亦会加剧植入物与周围组织的摩擦, 造成炎症反应加重。早期PLLA相对分子质量下降相对快速, 大量中小相对分子质量的降解产物被溶出, 此时苏木精-伊红染色切片可以观察到周围组织发生无菌性炎症反应。PDLLA/TMC和PLLA/TMC降解出中小相对分子质量产物的时间远远落后于PLLA, 因而同期相比这两者的炎症反应较轻。另外, PLLA的降解产物在局

部累积, 改变了组织细胞生长微环境的pH, 可能会影响细胞的生长与功能, 对内皮细胞产生毒性作用, 甚至诱发细胞凋亡, 把碱性物质如碳酸钙、碳酸氢钙、碳酸氢钠、羟基磷灰石加入聚合物中, 代偿聚合物降解引起的局部酸性微环境, 有助于防止无菌性炎症的发生^[26-27]。PDLLA/TMC聚合物中的TMC可以缓解PDLLA降解产物的酸性环境, 从而可以减少其炎症反应, 组织病理结果显示其周围组织炎性细胞计数少于PLLA, 且差异有显著性意义, 说明PDLLA/PTMC具有良好的组织相容性。

4 参考文献

- [1] Sims EC, Rothman MT, Warner TD, et al. Coronary artery brachytherapy. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2002;14(4):313-326.
- [2] Martínez-Elbal L, Ruiz-Nodar JM, Zueco J, et al. Direct coronary stenting versus stenting with balloon pre-dilation: immediate and follow-up results of a multicentre, prospective, randomized study. The DISCO trial. Direct Stenting of COronary Arteries. Eur Heart J. 2002;23(8):633-640.
- [3] König A, Schiele TM, Rieber J, et al. Influence of stent design and deployment technique on neointima formation and vascular remodeling. Z Kardiol. 2002;91 Suppl 3:98-102.
- [4] Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, et al. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. J Am Coll Cardiol. 2006;48(12):2584-2591.
- [5] Kaiser C, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, et al. Incremental cost-effectiveness of drug-eluting stents compared with a third-generation bare-metal stent in a real-world setting: randomised Basel Stent Kosten Effektivitäts Trial (BASKET). Lancet. 2005;366(9489):921-929.
- [6] Lagerqvist B, James SK, Stenestrand U, et al. Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden. N Engl J Med. 2007;356(10):1009-1019.
- [7] Tang EW, Wong CK, Herbison P. Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) hospital discharge risk score accurately predicts long-term mortality post acute coronary syndrome. Am Heart J. 2007;153(1):29-35.
- [8] Hodgson JM, Stone GW, Lincoff AM, et al. Late stent thrombosis: considerations and practical advice for the use of drug-eluting stents: a report from the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions Drug-eluting Stent Task Force. Catheter Cardiovasc Interv. 2007;69(3):327-333.
- [9] Tamai H, Igaki K, Tsuji T, et al. A Biodegradable Poly-L-lactic Acid Coronary Stent in the Porcine Coronary Artery. J Interv Cardiol. 1999;12(6):443-450.
- [10] Yamawaki T, Shimokawa H, Kozai T, et al. Intramural delivery of a specific tyrosine kinase inhibitor with biodegradable stent suppresses the restenotic changes of the coronary artery in pigs in vivo. J Am Coll Cardiol. 1998;32(3):780-786.
- [11] Uurto I, Mikkonen J, Parkkinen J, et al. Drug-eluting biodegradable poly-D/L-lactic acid vascular stents: an experimental pilot study. J Endovasc Ther. 2005;12(3):371-379.
- [12] Büngrer CM, Grabow N, Sternberg K, et al. Sirolimus-eluting biodegradable poly-L-lactide stent for peripheral vascular application: a preliminary study in porcine carotid arteries. J Surg Res. 2007;139(1):77-82.
- [13] Pêgo AP, Poot AA, Grijpma DW, et al. Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. J Control Release. 2003;87(1-3):69-79.
- [14] Andronova N, Albertsson AC. Resilient bioresorbable copolymers based on trimethylene carbonate, L-lactide, and 1,5-dioxepan-2-one. Biomacromolecules. 2006;7(5):1489-1495.
- [15] Hua JJ, Gebarowska K, Dobrzynski P, et al. Influence of chain microstructure on the hydrolytic degradation of copolymers from 1,3-trimethylene carbonate and L-lactide. J Polym Sci Part A: Polym Chem. 2009;47(15): 3869-3879.
- [16] Yang J, Liu F, Yang L, et al. Hydrolytic and enzymatic degradation of poly(trimethylene carbonate-co-D,L-lactide) random copolymers with shape memory behavior. Eur Polym J. 2010;46(4):783-791.
- [17] Yang J, Liu F, Tu S, et al. Haemo- and cytocompatibility of bioresorbable homo- and copolymers prepared from 1,3-trimethylene carbonate, lactides, and epsilon-caprolactone. J Biomed Mater Res A. 2010;94(2):396-407.
- [18] Albertsson AC, Eklund M. Influence of molecular structure on the degradation mechanism of degradable polymers: In vitro degradation of poly(trimethylene carbonate), poly(trimethylene carbonate-co-caprolactone), and poly(adipic anhydride). J Appl Polym Sci. 1995;57(1):87-103.
- [19] Zhang Z, Kuijjer R, Bulstra SK, et al. The in vivo and in vitro degradation behavior of poly(trimethylene carbonate). Biomaterials. 2006;27(9):1741-1748.
- [20] Li SM, Garreau H, Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly alpha-hydroxy acids in aqueous media. Part 1: poly DL-lactic acid. J Mater Sci Mater Med. 1990;1(3):123-130.
- [21] Grizzi I, Garreau H, Li S, et al. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. Biomaterials. 1995; 16(4):305-311.
- [22] Buchholz B. Analysis and characterization of resorbable dl-lactide-trimethylene carbonate copolyesters. J Mater Sci Mater Med. 1993;4(4):381-388.
- [23] Venkatraman S, Poh TL, Vinalia T, et al. Collapse pressures of biodegradable stents. Biomaterials. 2003;24(12):2105-2011.
- [24] Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials. Science. 1994;263(5154):1715-1720.
- [25] Lam KH, Nieuwenhuis P, Molenaar I, et al. Biodegradation of porous versus non-porous poly L-lactic acid films. J Mater Sci: Mater Med. 1994;5(2):101-110.
- [26] Shi GQ, Chen YW, Qin YJ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(26): 5086-5089. 史国齐, 陈元维, 秦滢杰, 等. D,L-聚乳酸降解产物对内皮细胞生长影响的体外实验[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(26): 5086-5089.
- [27] Aunoble S, Clément D, Frayssinet P, et al. Biological performance of a new beta-TCP/PLLA composite material for applications in spine surgery: in vitro and in vivo studies. J Biomed Mater Res A. 2006;78(2):416-422.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 上海市科委项目(074107061), 项目名称: 采用可降解生物材料研发新型冠状病毒涂层支架。

作者贡献: 实验设计为吕志前, 实验实施为张祎、郭清奎和杨建, 实验评估为吕志前, 资料收集为郭清奎。郭清奎成文, 李速明审校, 吕志前对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性: 2009-02-28 由上海交通大学医学院信息资源中心查新, 检索关键词: 聚酯、可降解材料、材料性能、组织相容性。查新结论: 未见可降解高强度复合聚酯血管材料的报道。本实验表明聚外消旋乳酸-三亚甲基碳酸酯聚合物具有更好的降解性能和组织相容性, 作为一种新型高强度高分子聚合物材料, 能够达到冠状动脉支架涂层和制备完全生物可降解血管支架的组织相容性和降解性能的要求。