

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.51.011 [http://www.crter.org]
汤育森, 李强, 齐鹏, 练克俭. 强的松龙纳米微球缓释膜的生物安全性[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(51):8849-8855.

强的松龙纳米微球缓释膜的生物安全性

汤育森, 李强, 齐鹏, 练克俭(解放军第175医院骨科, 福建省漳州市 363000)

文章亮点:

周围神经损伤修复过程中瘢痕的形成会阻碍再生轴突长入受伤的部位, 影响再生的速度和质量, 有效的抑制神经损伤后瘢痕的快速形成, 成为神经功能恢复的关键。文章通过制备强的松龙纳米微球缓释膜剂为这一难题提供了一种解决方法, 并以严谨的实验验证了强的松龙纳米微球缓释膜所具有得良好的生物学相容性。

关键词:

生物材料; 纳米生物材料; 强的松龙; 纳米微球; 缓释膜; 周围神经; 生物安全性

主题词:

毒性试验; 组织相容性; 注射, 腹腔内; 瘢痕

基金资助:

漳州市科技基金(Z2010086)*

摘要

背景: 如何用药物去抑制神经修复后瘢痕的生长成为周围神经损伤后功能恢复的关键。课题组以往研究借鉴广泛应用于抗肿瘤药物局部释放的纳米微球缓释技术设计了一种强的松龙纳米微球缓释膜, 取得了良好的体外药物缓释效果。

目的: 制备强的松龙纳米微球缓释膜, 观察该膜的生物相容性及安全性。

方法: 采用反胶束乳化溶剂挥发法和球膜结合的方法制备强的松龙纳米微球缓释膜, 用细胞毒性实验、溶血实验、急慢性全身毒性实验对药膜的生物安全性进行初步评价。

结果与结论: 培养第7天, L929小鼠成纤维细胞相对增殖率为92.6%, 证实此膜无细胞毒性; 该膜对新鲜的抗凝兔血溶血率为0.59%, 无明显的溶血作用; 此缓释膜的浸提液腹腔注射小鼠未见明显的生物学行为的异常, 对大鼠肝肾功能无明显影响。结果证实, 强的松龙纳米微球缓释膜具有良好的生物相容性, 安全无毒性。

Biosafety of prednisolone implantable film

Tang Yu-sen, Li Qiang, Qi Peng, Lian Ke-jian (Department of Orthopedics, the 175 Hospital of PLA, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China)

Abstract

BACKGROUND: After peripheral nerve injury, to inhibit scar formation by drugs is the key to functional recovery. To reduce the amount of scar formation we designed a prednisolone-loaded film which can sustain drug release and good achievement in *in vitro* drug release test.

OBJECTIVE: To prepare the prednisolone implantable film and investigate its *in vivo* biocompatibility and safety.

METHODS: Prednisolone-loaded nanoparticles were first prepared with reverse micellar emulsion-solvent evaporation method, and the composite film and drug-loaded film were further prepared. Then, we investigated the *in vivo* biocompatibility of drug-loaded film through cell toxicity test, hemolysis test, acute systemic toxicity test, chronic systemic toxicity test.

RESULTS AND CONCLUSION: After cultured for 7 days, the relative growth rate of L929 mouse fibroblasts was 92.6%, showing no cytotoxicity. The hemolysis rate of the film was 0.59%, indicating that the material had no hemolysis action. No abnormal biological behaviors were seen in mice after intraperitoneal injection of film extracts, and there were no changes in liver and renal functions in rats. As illustrated above, we can safely come to a conclusion that prednisolone-loaded film possesses good biocompatibility and can be safely used in the experiment of reducing the scar at sites of peripheral nerve repair.

Subject headings: toxicity tests; histocompatibility; injections, intraperitoneal; cicatrix

Funding: the Science and Technology Foundation of Zhangzhou City, No. Z2010086*

Tang YS, Li Q, Qi P, Lian KJ. Biosafety of prednisolone implantable film. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(51):8849-8855.

汤育森, 男, 1981年生, 福建省华安县人, 汉族, 2005福建中医药大学毕业, 主治医师, 主要从事脊柱损伤及脊髓方面的研究工作。

306108982@qq.com

通讯作者: 练克俭, 主任医师, 解放军第175医院骨科, 福建省漳州市 363000

306108982@qq.com

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)51-08849-07

修回日期: 2013-10-28

(201306155/WJ·W)

Tang Yu-sen, Attending physician, Department of Orthopedics, the 175 Hospital of PLA, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China
306108982@qq.com

Corresponding author: Lian Ke-jian, Chief physician, Department of Orthopedics, the 175 Hospital of PLA, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China
306108982@qq.com

Accepted: 2013-10-28

0 引言 Introduction

周围神经损伤后修复过程主要包括轴突的退变、再生以及损伤部位瘢痕的形成过程, 且瘢痕的生长速度明显快于再生轴突的生长^[1-2]。瘢痕的形成对正常组织伤口的修复非常重要, 但是神经损伤后瘢痕组织反应性的快速增生将会阻碍再生的轴突长入受伤的部位^[3]。所以有效的抑制神经损伤后瘢痕的快速形成为促进周围神经再生的关键。

强的松龙是临床上广泛应用的具有强大抗炎作用的人工合成中效糖皮质激素, 该类药物已被证实具有下调成纤维细胞合成胶原蛋白的功能, 这种功能可能是通过调节转化生长因子 β 家族($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$)各种因子的表达实现的^[4], 具有抑制瘢痕形成的作用^[5], 中国学者已有应用强的松龙局部注射抑制周围神经断端瘢痕形成的研究^[6], 但其血浆半衰期仅为二三小时, 作用维持时间18-36 h, 且长期全身应用不良反应大, 从而影响了强的松龙的应用前景^[7]。

植入型药物运释系统(implantable drug delivery systems, IDDS)为一类经手术植入或经穿刺导入体内或皮下的药物缓释系统, 其具有局部给药、缩短用药次数及周期、减少给药剂量、长效缓释及立体定位给药等特点^[8], 特别适用于半衰期短、代谢快、不适合通过静脉或其他途径给药的药物。固体可降的药物植入剂是指药物以柱、棒、丸、片或膜剂等形式分散或包裹于生物可降解的载体材料中, 以手术方式局部植入的给药剂型。常被用作药物载体的生物可降解材料包括聚羟基乙酸、聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、聚天冬氨酸、聚乙酸内酯、谷氨酸多肽、聚己酸内酯、甲壳素和聚原酸酯等, 这类材料的共同特点是植入机体后可在体内经化学降解或酶解逐渐分解为可被机体代谢的小分子物质, 其中间代谢产物和最终产物无毒无害, 与机体有良好的生物相容性; 同时上述材料除用作固体植入剂的载体外, 还可制成微球或纳米球的形式来实现药物的精确缓释, 并可增加药物的应用方式(如纳米微球可供注射用), 扩大药物的应用范围^[9]。

本课题组前期实验中采用反胶束乳化溶剂挥发法和球膜结合的方法以聚乳酸羟基乙酸 (poly lactic-co-glycolic acid, PLGA) 为主要原料制备强的松龙纳米微球缓释膜, 聚乳酸-羟基乙酸共聚物是由两种单体——乳酸和羟基乙酸随机聚合而成, 是一种可降解的功能高分子有机化合物。在美国聚乳酸羟基乙酸通过了FDA认证, 被正式作为药用辅料收录进美国药典。聚乳酸羟基乙酸的降解产物是乳酸和羟基乙酸, 同时也是人代谢途径的副产物, 所当它应用在医药和生物材料中时不会有毒不良反应。聚乳酸-羟基乙酸共聚物因其良

好的生物相容性和生物降解性能且降解速度可控, 在生物医学工程领域有广泛的用途。目前已被制作为人工导管, 药物缓释载体, 组织工程支架材料等, 各种聚乳酸羟基乙酸药物微球的制备及应用多见报道^[10-11]。所以, 本课题拟引入聚乳酸羟基乙酸纳米微球控释技术, 以聚乳酸羟基乙酸纳米微球为药物载体制备强的松龙植入性膜剂, 并对其缓释特性和生物学相容性进行检测, 为后续该膜剂应用于抑制周围神经损伤后断端瘢痕形成的实验中做准备。

作者采用反胶束乳化溶剂挥发法和球膜结合的方法以聚乳酸羟基乙酸为主要原料制备强的松龙纳米微球缓释膜, 改变了强的松龙的药物作用时间及作用方式, 实现了强的松龙的有效缓慢释放, 具有良好的体外缓释效果。据此, 实验拟在以往研究的基础上对该缓释膜的生物学安全性进行初步探讨, 以初步探讨将该缓释膜应用于周围神经损伤后神经断端的可行性。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 生物相容性的动物实验及细胞实验。

时间和地点: 于2012年7月到2013年3月在厦门大学生物医学工程中心实验室内完成。

材料:

实验动物: 健康3月龄清洁级雄性SD大鼠76只, 体质量300-350 g; 清洁级新西兰大白兔 1 只, 体质量2.5-3.5 kg, 采集新鲜抗凝兔血用。实验动物均由厦门大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(闽)2010-0001。所有动物均饲养于厦门大学附属东南医院动物饲养间内, 饲养间内保持通风, 维持室温于(23±2) °C、湿度50%-60%, 饲养动物自由饮水、摄食。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[12]。

细胞: MTT实验细胞为L929小鼠成纤维细胞, 由厦门大学中心实验室提供; 新鲜抗凝兔血取自新西兰大白兔, 由厦门大学附属东南医院动物实验室提供。

强的松龙纳米微球缓释膜制备及鉴定的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
大豆卵磷脂(SPC)	广东环凯微生物科技公司分装
二氯甲烷(DCM)	汕头市达濠精细化学品公司
胎牛血清	杭州四季青公司
强的松龙(> 99%, 批号 041006)	浙江海正药业股份有限公司
消旋聚乳酸羟基乙酸(PLGA)	山东省医疗器械研究所
聚乙烯醇(PVA)	国药集团化学试剂有限公司
I型胶原、小牛血清、DMEM培养基、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、 ⁶⁰ Co- γ 射线装置	美国 Sigma 公司
OLMPUS 倒置相差显微镜	厦门万禾园辐照股份有限公司
Eppendorf 5810 离心机	OLYMPUS 公司
	Becton Dickinson 公司

实验方法:

强的松龙纳米微球缓释膜的制备:以反胶束乳化溶剂挥发法制备强的松龙纳米微球, 制备过程如下: 称取适量强的松龙和大豆卵磷脂, 使其溶解于二甲亚砷中并搅拌直至其完全溶解形成均一透明的溶液, 在冷冻干燥机中以 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 使其干燥制成磷脂复合物。将聚乳酸羟基乙酸溶解于二氯甲烷溶液中并将其加入该磷脂复合物中, 充分搅拌溶解形成均一的反胶束溶液, 形成油相。将该油相加入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 0.25% 聚乙烯醇溶液中高速搅拌($6\ 000\ \text{r/min}$)形成稳定的O/W型乳液, 于室温下低速搅拌 $4\ \text{h}$, $10\ 000\ \text{r/min}$ 离心收集纳米微球。将收集的纳米微球水洗3次后置于冷冻干燥中得到淡紫色粉末, 低温密闭储存。取适量胶原原液搅拌溶于PBS(pH 7.4)中; 取适量壳聚糖溶解于体积分数 1% 醋酸溶液中, 配制成体积分数 1% 壳聚糖溶液; 取适量SPC溶解于热乙醇溶液中。

将上述3种溶液按一定比例混合均匀(先将大豆卵磷脂溶液和壳聚糖溶液混合, 再与胶原溶液混合)。取适量制备好的载药纳米微球, 超声分散于PBS(pH 7.4)后与上述混合液混合均匀, 低速离心脱气泡后, 倒入聚四氟乙烯圆盘中并于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干, 即得强的松龙纳米微球缓释膜。

缓释膜的灭菌:体内植入制药膜在临床使用要求无菌。中国药典收录的灭菌方法主要有湿热灭菌法、干热灭菌法、除菌滤过法、辐射灭菌法和环氧乙烷灭菌法。由于实验所用材料聚乳酸羟基乙酸玻璃化温度较低($40\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$), 胶原和卵磷脂均不耐高温, 因此, 此法所制药膜不宜采用高压灭菌法或者气体灭菌法。辐射灭菌法系通过将最终产品暴露在由适宜放射源(通常用 ^{60}Co)辐射的 γ 射线或适宜的电子加速器发生的射线中, 达到杀灭细菌的目的^[13]。

尽管 γ 射线的频率高达 $3\times 10^{18}\text{--}3\times 10^{21}\ \text{Hz}$, 但被辐射分子、原子、离子及电子尚未极化, 不随电磁场变化而转动, 不产生热效应。所以, 不会引起被辐照品明显的温度升高, 适用于热敏物质灭菌^[14]。故实验所制药膜用于体内实验前均采用 $^{60}\text{Co}\ \gamma$ 射线辐照灭菌法灭菌。

但是, 由于高能 γ 射线通过与聚合物相互作用会影响聚合物的理化性质, 并进而改变药物的释放行为^[15], 因此辐照剂量的确定非常重要。有研究表明, $10\ \text{kGy}$, $15\ \text{kGy}$, $25\ \text{kGy}$ 共3个辐照剂量对聚乳酸羟基乙酸微球灭菌效果均良好, 且对微球的平均粒径、跨距、载药量以及药物的释放均无明显影响^[16], 说明灭菌剂量不大于 $25\ \text{kGy}$ 时, 高能 γ 射线没有改变聚乳酸羟基乙酸的性质。

胶原膜在低温下经 γ 射线($15\text{--}25\ \text{kGy}$)辐照处理后, 不仅能够增加胶原膜的交联度、胶原分子的有序性、抗胶原酶酶解能力以及稳定性, 而且当辐照剂量不超过

$25\ \text{kGy}$ 时, 胶原膜对细胞的黏附、生长和繁殖、细胞活性没有明显的不良影响^[17]。而利用 γ 射线辐照对壳聚糖进行改性研究, 更是得到了广泛的应用。辐射剂量在一定范围($10\text{--}20\ \text{kGy}$), 经 γ 射线辐照的壳聚糖薄膜的机械性能得到了明显地提高, 材料表面细胞培养实验表明辐照改性的壳聚糖薄膜有着良好的生物相容性。

由于考虑到不同时间制备的药膜的差异性, 确定照射剂量为 $20\ \text{kGy}$, 照射时间为 $1\ \text{h}$, 以确保最后药膜无菌, 符合药品的卫生学标准。

细胞毒性实验(MTT比色法^[18]):将经过灭菌处理的强的松龙纳米微球缓释膜按 $1\ \text{g}/5\ \text{mL}$ 的比例置入含有无菌生理盐水的密闭惰性容器中, 室温下浸提 $24\ \text{h}$, 取其浸提液待检; 阴性对照组选取符合用国际标准要求的经灭菌处理的聚乙烯膜; 阳性对照组选用经除菌过滤后的苯酚溶液。

用适当的细胞培养基对L929小鼠成纤维细胞进行传代培养, 选取处于对数生长期的第4代成纤维细胞悬液, 细胞浓度为 $1\times 10^8\ \text{L}^{-1}$, 以每孔 $200\ \mu\text{L}$ 的剂量分别注入96孔塑料培养皿中, 每组观察8孔; 将上述培养皿放置于含体积分数 $5\%\text{CO}_2$ 的空气培养箱中, 维持温度于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 $24\ \text{h}$ 后, 弃去原培养基, 用PBS洗涤2次, 备用; 其中实验组加入 $100\ \mu\text{L}$ 纳米微球缓释膜完全浸提液和新鲜培养基 $100\ \text{mL}$, 阴性对照组加入灭菌聚乙烯膜、生理盐水及 $100\ \mu\text{L}$ 相应的培养基, 阳性对照组加入苯酚和新鲜培养基 $100\ \text{mL}$, 实验共重复5次。

将培养皿放置于含体积分数 $5\%\text{CO}_2$ 的空气培养箱中, 维持温度于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件分别培养 $2, 4, 7\ \text{d}$; 在各时间点内培养期内各组分别取一个培养板, 丢弃各培养板中的缓释膜浸提液和细胞培养基, 每个培养皿中分别加入 $20\ \mu\text{L}$ 的MTT溶液, 继续培养 $6\ \text{h}$, 然后将培养皿中的原液吸除, 每孔分别加入 $150\ \mu\text{L}$ 的二甲基亚砷, 振荡 $10\ \text{min}$ 后, 以 $500\ \text{nm}$ 波长标准在免疫酶标仪上测定吸光度值; 按照细胞增殖度的测量方法计算出细胞的相对增殖率并对材料进行细胞毒性的结果评价, 可通过下列公式来计算细胞相对增殖率, 并按照美国药典中药物的毒性评级标准对材料的细胞毒性程度进行评价。

$$\text{细胞相对增殖率} = (\text{样本组吸光度值} / \text{阴性对照组吸光度值}) \times 100\%$$

血液相容性实验^[19]:实验所需血液制品采用新鲜的抗凝兔血; 实验所需材料浸取液的制备如下: 准确称取缓释膜 $5\ \text{g}$, 剪成 $5\ \text{mm}\times 3\ \text{mm}$ 的条状, 经青、链霉素处理后以无菌的生理盐水超声清洗 $10\ \text{min}$, 后将样品浸泡于体积分数 75% 乙醇中 $30\ \text{min}$, 复将样品以大量的无菌生理盐水反复洗涤、沥干, 装入试管中备用; 实验分2组, 实验组及阴性对照组分别设3支试管, 各管中加入生理盐水 $10\ \text{mL}$, 同时另设阳性对照组试管3支, 每管中加入蒸馏水 $10\ \text{mL}$; 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中将全部试管放入, 预

热30 min后取出; 各试管中加入新鲜的抗凝兔血0.2 mL(将8 mL新鲜兔血加入10 mL生理盐水中稀释所得), 于37 °C水浴箱中保温60 min后将各管中溶液在干燥的离心管中离心5 min(2 500 r/min), 取上清液在波长为545 nm处的分光光度计上, 测量各试管的吸光度值; 重复取该实验样品6个试样并取各式样吸光度值的均值, 按以下公式计算样品的溶血百分率:

$$\text{溶血率} = \frac{(\text{实验样品的吸光度} - \text{阴性对照的吸光度}) / (\text{阳性对照的吸光度} - \text{阴性对照的吸光度}) \times 100\%}{}$$

此公式中, 阳性对照吸光度值应为 0.8 ± 0.3 , 阴性对照组吸光度值应不大于0.03。

急性全身毒性实验^[20]: 选取3月龄的SD大鼠36只, 平均体质量约350 g, 随机分为2组, 实验组与阴性对照组各18只, 对照组按50 mL/kg的剂量腹腔注射生理盐水, 实验组将前述方法配制的强的松龙纳米微球缓释膜20%浸提液按50 mL/kg的剂量腹腔注射注入到各组SD大鼠中, 然后观察用药前及用药后24, 48及72 h内SD大鼠死亡率、体质量、及其他身体反应(如呼吸、体温变化、食欲, 一般情况及有无呕吐、腹泻、惊厥及运动减少等情况)的变化。

慢性全身毒性实验^[21]: 实验主要观察在强的松龙纳米微球缓释膜植入动物体内后动物肝肾功的变化, 以对缓释膜的慢性毒性反应进行初步评价。选取3月龄的SD大鼠40只, 平均体质量约300 g, 随机将SD大鼠分为2组, 20只/组, 实验组动物皮下植入前述缓释膜, 对照组动物不植入, 标记并分笼饲养。植入前每组SD大鼠分别股动脉取血2 mL做肝肾功检测, 记录数值。植入后12周, 两组SD大鼠再次股动脉取血2 mL做肝肾功检测, 记录数值, 并对肝脏进行病理检测。

主要观察指标: 纳米微球及缓释膜形态, 用药后大鼠行为学及生物相容性变化。

统计学分析: 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 13.0统计学软件进行数据分析。多样本各组间差异比较采用完全随机的单因素方差分析法, 组间数据的两两比较采用LSD检验。多样本组间不满足正态性的数据差异比较则采用非参数检验的Kruskal-Wallis检验; 两组配对资料服从正态分布, 采用配对t检验进行比较; 不满足正态性则采用Wilcoxon秩和检验进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 大鼠共76只, 急性全身毒性实验中, 实验组大鼠在植入后24 h内因感染死亡1只, 对照组大鼠因操作不当死亡1只。慢性全身毒性实验无大鼠死亡。最终74只大鼠进入结果分析。

2.2 纳米微球及缓释膜形态 扫描电镜下观察显示, 载药纳米微球为表面圆滑的球形结构, 微球的粒径均一, 分布良好; 透射电镜下观察显示, 单个载药纳米微球结构, 可见纳米微球为明显的一体结构, 药物分散均匀。见图1。

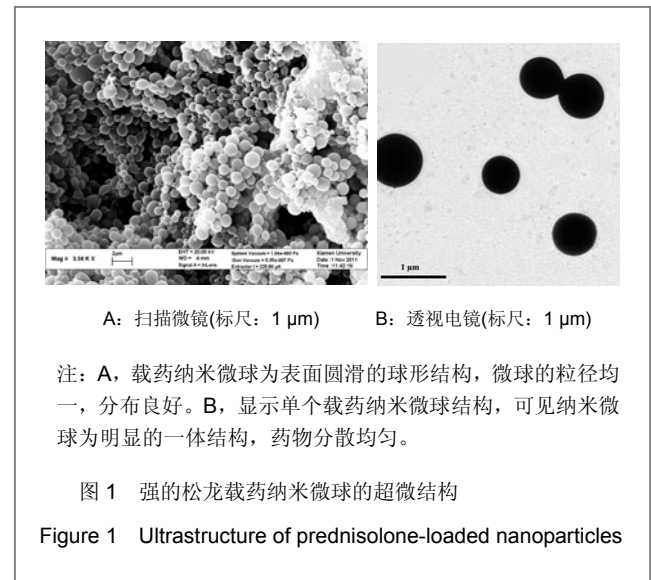
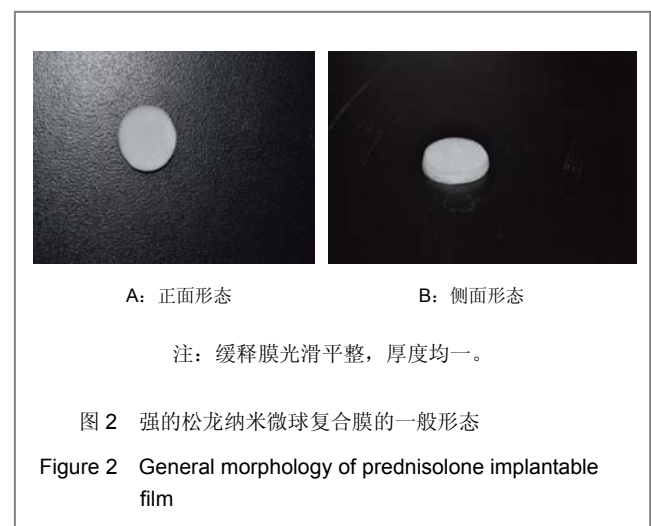


图2为制得的纳米微球缓释膜的照片, 图中可见制得的缓释膜光滑平整, 厚度均一, 具有较好的柔韧性、延展性及吸水性能。



2.3 纳米微球复合膜的细胞毒性变化 实验组在连续培养2, 4, 7 d后其相对增殖率分别为90.6%, 91.8%, 92.6%, 毒性评分均为1级, 未发现细胞毒性; 阴性对照组在培养2, 4, 7 d培养过程中相对增殖率均为100%, 显示无细胞毒性; 阳性对照组在第2, 4, 7天的连续培养过程中其细胞相对增殖度分别为14.0%, 10.9%, 7.6%, 细胞毒性评分均为4级, 显示具有细胞毒性。实验组吸光度值与阳性对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。见表1。

表 1 强的松龙纳米微球复合膜与 L929 细胞共培养后的吸光度值变化

Table 1 Absorbance values of L929 cells co-cultured with prednisolone implantable film (n=8)

培养时间	组别	吸光度值 ($\bar{x}\pm s, A_{500\text{nm}}$)	细胞相对增殖率 (%)	毒性 评分(分)
2 d	阴性对照组	0.415±0.109	100	0
	实验组	0.371±0.125	90.6	1
	阳性对照组	0.048±0.023 ^{ab}	14.0	4
4 d	阴性对照组	0.458±0.128	100	0
	实验组	0.419±0.137	91.8	1
	阳性对照组	0.031±0.019 ^{ab}	10.9	4
7 d	阴性对照组	0.534±0.188	100	0
	实验组	0.502±0.170	92.6	1
	阳性对照组	0.036±0.011 ^{ab}	7.6	4

与实验组相比, ^a $P < 0.05$; 与阴性对照组相比, ^b $P < 0.05$ 。

注: 实验组加入 100 μL 纳米微球缓释膜完全浸提液和新鲜培养基 100 mL, 阴性对照组加入灭菌聚乙烯膜、生理盐水及 100 μL 相应的培养基, 阳性对照组加入苯酚和新鲜培养基 100 mL, 实验共重复 5 次。实验组在连续培养 2, 4, 7 d 后其相对增殖度分别为 90.6%, 91.8%, 92.6%, 毒性评分均为 1 级, 未发现细胞毒性。

2.4 纳米微球复合膜的溶血率变化 表2中可看出实验组溶血率为0.59%, 阴性对照组溶血率为0%, 阳性对照组溶血率为100%。根据医用材料对溶血实验相关标准, 若生物材料的溶血率 $\leq 5\%$, 则说明该材料符合医用材料的溶血实验要求, 若溶血率 $> 5\%$ 则预示材料有溶血作用; 实验中强的松龙纳米微球缓释膜溶血率 $< 5\%$, 符合医用材料的溶血标准。

实验组吸光度值与阳性对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表 2 强的松龙纳米微球复合膜的溶血率变化

Table 2 Hemolysis rate of prednisolone implantable film (n=8)

组别	吸光度值($\bar{x}\pm s, A_{545\text{nm}}$)	溶血率(%)
实验组	0.013 1±0.001 1	0.59
阴性对照组	0.007 9±0.000 2	0
阳性对照组	1.015 0±0.069 0 ^{ab}	100

与实验组相比, ^a $P < 0.05$; 与阴性对照组相比, ^b $P < 0.05$ 。

注: 实验组加入 100 μL 纳米微球缓释膜完全浸提液和新鲜培养基 100 mL, 阴性对照组加入灭菌聚乙烯膜、生理盐水及 100 μL 相应的培养基, 阳性对照组加入苯酚和新鲜培养基 100 mL。实验组溶血率为 0.59%, 符合医用材料的溶血标准。实验组吸光度值与阳性对照组相比差异具有显著性意义。

2.5 急性全身毒性实验结果 将缓释膜的浸取液注入 SD 大鼠体内后的 24, 48, 72 h 内所有实验动物均未发现行为学的异常, 精神状态及活动正常, 未见大鼠出现

呼吸困难、畏寒、厌食、腹泻及体质量下降等症状。

2.6 慢性全身毒性反应结果 见表3。植入后12周实验组与对照组大鼠均未出现明显的行为学的异常, 未见自噬及生活特性的改变, 精神状态及活动正常, 未见大鼠出现呼吸困难、畏寒、厌食、腹泻及体质量下降等症状。两组植入前、植入后12周肝肾功能无异常。

表 3 缓释膜植入周围神经断端前后大鼠肝肾功能的变化

Table 3 Liver and renal function of rats before and after prednisolone implantable film was implanted into the peripheral nerve ends ($\bar{x}\pm s, n=10$)

肝肾功能指标		实验组	对照组
谷丙转氨酶 ($\mu\text{kat/L}$)	植入前	5 039.34±2 960.59	6 582.98±3 178.64
	植入后 12 周	5 527.77±3 758.75	7 183.10±1 963.06
谷草转氨酶 ($\mu\text{kat/L}$)	植入前	5 289.39±2 701.54	6 789.69±1 787.19
	植入后 12 周	5 094.35±1 621.32	7 019.74±1 168.40
尿微量蛋白 (g/L)	植入前	41.65±4.31	41.38±3.69
	植入后 12 周	43.76±4.28	42.41±2.39
球蛋白 (g/L)	植入前	4.02±2.61	5.59±1.56
	植入后 12 周	4.86±2.21	5.01±5.68
尿素氮 (mmol/L)	植入前	4.92±0.97	4.74±0.86
	植入后 12 周	4.41±1.19	4.76±0.79
肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	植入前	76.1±9.26	58.1±6.89
	植入后 12 周	68.0±14.16	57.1±8.58

注: 实验组加入 100 μL 纳米微球缓释膜完全浸提液和新鲜培养基 100 mL, 阴性对照组加入灭菌聚乙烯膜、生理盐水及 100 μL 相应的培养基, 阳性对照组加入苯酚和新鲜培养基 100 mL。实验组和对照组肝肾功能指标植入前后的差异具有显著性意义, 说明缓释膜的应用对实验动物的肝肾功能无影响。

2.7 生物相容性评价 上述各项实验结果中可看出, 在细胞毒性实验、溶血实验、急性毒性实验、慢性毒性实验中该缓释膜均显示出了较好的生物学相容性, 实验基本达到了预期的结果, 但是在作者对慢性毒性实验动物的取材中发现, 在缓释膜植入动物体内的初期, 大鼠局部仍然有一定程度的炎症反应出现, 且炎症反应的程度与缓释膜载药量相关, 但长期观察发现后期炎症反应逐渐消退, 因此在缓释膜的进一步研究中笔者将对缓释膜载药量与局部炎症反应方面进一步实验。

3 讨论 Discussion

植入型药物运释系统为一类经手术植入或经穿刺导入体内或皮下的药物缓释系统, 其具有局部给药、缩短用药次数及周期、减少给药剂量、长效缓释及立体定位给药等特点, 特别适用于半衰期短、代谢快, 不适合通过静脉或其他途径给药的药物^[22]。实验设计的强的松龙纳米微球缓释膜除具有上述植入型药物运释系统的优点外还具有: ①消除了因全身多次静脉给药或局部多次给药所产生的给药不均匀, 药物浓度的的峰谷现象, 并可以在局部或者病变部位以稳定的速度进行药物释

放, 维持局部的药物浓度, 明显减少了全身用药对机体正常生理功能的干扰及药物的不良反应, 并显著的减少了药物的应用剂量, 具有药物应用剂量小效果显著的优点; 同时药物缓释剂型的释药速率通常为限速过程, 因而能得到较平稳的血药浓度。②该缓释膜可直接在病变局部释放药物发挥治疗效用, 具有靶向给药作用, 不存在药物的吸收障碍, 药物的作用局限, 可避免对体内其它组织的不良反应。③缓释膜实现了强的松龙的控制释放, 延长药物的半衰期, 一定范围内控制了药物的释放剂量, 为缓释膜动物体内的应用打下了坚实的基础。

缓释膜应用于动物实验中除具有良好的缓释特性外, 还必须具有良好的生物学安全性^[21]。所谓生物相容性是指医用生物材料在植入人体后与机体内环境间的相互适应性, 医用生物材料在植入人体后要求材料必须对人体无毒、无致敏性、无刺激性、无遗传毒性和无致癌性, 对人体组织、血液及免疫系统不产生不良反应^[23]。因此, 缓释膜在应用于动物及人体前, 需要进行生物学安全性的检测。

该缓释膜的制作材料是无毒的。该缓释膜制作过程中主要的材料及药物载体为生物可吸收材料是聚乳酸羟基乙酸。聚乳酸羟基乙酸的降解产物是乳酸和羟基乙酸, 同时也是人代谢途径的副产物, 所当它应用在医药和生物材料中时不会有不良反应^[24-25]。目前利用聚乳酸羟基乙酸作为周围神经损伤后断端修复的管道修复坐骨神经缺损已经取得了一定的成果^[26], 同时有人将聚乳酸羟基乙酸管道进行处理后增加了管道的通透性, 使营养成分能够更好的渗透到神经损伤断端, 提高了该管道修复神经损伤的能力, 从而更有利于神经功能的恢复^[27]。叶震海等^[28]研究了聚乳酸羟基乙酸与雪旺细胞的生物学相容性, 发现许旺细胞可以在聚乳酸羟基乙酸膜上成功生长, 这说明聚乳酸羟基乙酸与雪旺细胞之间具有良好的生物相容性。本课题以聚乳酸羟基乙酸作为药物载体制成纳米微球应用到动物体内后, 其最大优点是它能在人体体液中逐渐降解, 且降解产物最终转化为二氧化碳和水, 与人体正常代谢产物相同, 故不会出现其他代谢产物的蓄积, 产生细胞的毒性^[29]; 同时将纳米微球与胶原膜及壳聚糖、软磷脂混合后制得复合膜, 不仅使纳米微球内药物的释放更加平稳, 增加了纳米微球的生物学特性, 同时也减少了聚乳酸羟基乙酸纳米微球降解时局部所产生的弱酸性环境, 使其具有更好的生物学相容性, 减少了局部无菌性炎症的发生。

该缓释膜经生物学安全性检测后证实具有良好的生物学特性。根据国家标准 GB/T16886.1 及 ISO10993-1 对医疗器械用品的评价标准要求实验进行了: 细胞毒性实验(MTT法)、溶血实验、急性全身毒性实验、慢性全身毒性实验对药膜的生物安全性进行初步评价。①细胞毒性实验(MTT法): MTT 是检测细胞增

殖的重要方法, 因其具有灵敏度高、可重复性好、操作简便以及经济迅速等优点已被广泛的应用于各种材料的生物学相容性评价中, 作为评价材料对细胞的毒性作用的重要指标; 实验中将缓释膜的浸提液加入L929小鼠成纤维细胞培养皿中, 培养第2天, 实验组L929小鼠成纤维细胞数量出现短暂下降, 但与对照组无明显差异, 培养第4, 7天与对照组相比均未出现细胞传代数量的明显下降; 细胞毒性实验结果表明, L929 小鼠成纤维细胞并没有因为缓释膜的加入而影响其正常的生理状态及功能, 未见明显的细胞增殖的减弱, 表明该缓释膜未产生细胞毒性, 具有良好的生物相容性。②血液相容性实验是评价材料的生物学安全性的又一重要指标, 溶血实验是血液相容性评价经典实验方法, 也是血液相容性评价方法中的惟一国家标准, 该方法主要是检测实验材料对血液中红细胞的溶血作用, 具有敏感、可靠、直观的数字量化等优点; 在本部分的血液相容性实验中, 在新鲜抗凝兔血中加入缓释膜的浸提液, 水浴箱中观察1 h后实验组抗凝兔血溶血率远低于阳性对照组, 平均溶血率小于5%的标准要求, 可见缓释膜浸提液的应用基本不会产生溶血反应, 满足材料应用于人体内的基本的溶血指标要求, 具有良好的血液相容性。③急性细胞毒性实验, 是较直接的检测材料毒性的实验, 其直接作用于动物体内, 具有快速、直接等优点, 是检测材料安全性的最直接的方法^[30]。实验的急性全身毒性反应实验中, 将缓释膜的浸提液直接注入SD大鼠腹腔体内, 观察SD大鼠在24, 48, 72 h 内未见明显的生物学行为的改变, 大鼠并未出现死亡、发热、呼吸急促、活动减少、腹泻等情况, 表明一定剂量的缓释膜浸提液无急性毒性反应发生。④慢性毒性实验是检测材料在植入动物体内后长期对肝肾功能的影响, 以验证其长期应用于动物体内的毒性反应。实验中将该缓释膜植入动物皮下后观察植入前与植入后12周的肝肾功能指标的变化, 由结果可看出实验组植入后12周肝肾功能各指标均差异无显著性意义, 且与对照组相比差异无显著性意义, 同一时间段内各指标与对照组相比亦无显著差异, 这表明该缓释膜的植入对动物的肝肾功能无明显的影响, 长期植入人体后对人体不会产生慢性的毒性反应。

综上所述, 强的松龙纳米微球缓释膜剂具有良好的生物学相容性, 可以安全的应用于动物体内, 并可以将该缓释膜应用于后续抑制周围神经断端瘢痕形成的动物实验中, 以观察该膜剂抑制周围神经损伤后断端瘢痕形成的作用。

致谢: 感谢解放军第 175 医院动物实验室各位老师的支持。

作者贡献: 练克俭教授负责实验的总体安排。汤育森、李强和齐鹏负责实验的实施, 其中汤育森负责动物实验, 李强和

齐鹏负责细胞培养及各实验的数据的采集和整理。

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。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2006 年《Ethical 中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

学术术语: 聚乳酸羟基乙酸-是由两种单体-乳酸和羟基乙酸随机聚合而成, 是一种可降解的功能高分子有机化合物。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Cui F, Shi K, Zhang L, et al. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *J Control Release*. 2006;114(2):242-250.
- [2] Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, Weis J, et al. Repairing injured peripheral nerves: bridging the gap. *Prog Neurobiol*. 2010;92(3):245-276.
- [3] Ijpma FF, Van De Graaf RC, Meek MF. The early history of tubulation in nerve repair. *J Hand Surg Eur Vol*. 2008;33(5):581-586.
- [4] Yates JM, Smith KG, Robinson PP. The effect of triamcinolone hexacetonide on the spontaneous and mechanically-induced ectopic discharge following lingual nerve injury in the ferret. *Pain*. 2004;111(3):261-269.
- [5] Azuma C, Tohyama H, Nakamura H, et al. Antibody neutralization of TGF-beta enhances the deterioration of collagen fascicles in a tissue-cultured tendon matrix with ex vivo fibroblast infiltration. *J Biomech*. 2007;40(10):2184-2190.
- [6] 赵永青, 苏衍萍, 韩风岳. 甲基强的松龙对急性脊髓损伤神经元保护作用的实验研究[J]. *中华神经外科杂志*, 2005, 21(6):367-370.
- [7] 张海英, 李玉珍. 糖皮质激素类药物的药理特性及合理应用[J]. *临床药物治疗杂志*, 2004, 2(3):36-42.
- [8] 王晓波. 药物运释系统[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2007.
- [9] Takezawa T, Takeuchi T, Nitani A, et al. Collagen vitrigel membrane useful for paracrine assays in vitro and drug delivery systems in vivo. *J Biotechnol*. 2007;131(1):76-83.
- [10] Bellamkonda RV. Peripheral nerve regeneration: an opinion on channels, scaffolds and anisotropy. *Biomaterials*. 2006;27(19):3515-3518.
- [11] Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*. 2007;82(4):163-201.
- [12] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
- [13] Fournier C, Hecquet B, Bouffard R, et al. Experimental studies and preliminary clinical trial of vinorelbine-loaded polymeric bioresorbable implants for the local treatment of solid tumors. *Cancer Res*. 1991;51(19):5384-5391.
- [14] Wang J, Ng CW, Win KY, et al. Release of paclitaxel from poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microparticles and discs under irradiation. *J Microencapsulation*. 2003;20(3):317-327.
- [15] Shameem M, Lee H, Burton K, et al. Effect of gamma-irradiation on peptide-containing hydrophilic poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Pharm Sci Technol*. 1999;53(6):309-315.
- [16] 林晓艳, 唐敏, 张兴栋. gamma射线低温辐照对胶原膜体外稳定性和细胞相容性的影响[J]. *生物医学工程学杂志*, 2006, 23(4):822-825.
- [17] 杨飞, 杨吟野, 李训虎, 等. gamma射线辐照对壳聚糖薄膜的改性研究[J]. *透析与人工器官*, 2003, 2(14):14-19.
- [18] Ruitter GC, Onyeneho IA, Liang ET, et al. Methods for in vitro characterization of multichannel nerve tubes. *J Biomed Mater Res A*. 2008;84(3):643-651.
- [19] Graham WP 3rd, Davis TS, Miller SH, et al. Efficacy of triamcinolone acetonide following neurotomy-an electroneuromyographic evaluation. *Ann Plast Surg*. 1982;9(3):230-237.
- [20] Nel A, Xia T, Madler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006;311(5761):622-627.
- [21] 陆兵, 袁本利, 徐国杰, 等. 纳曲酮植入剂不同动物体内的组织相容性和生物可降解性[J]. *中国药理学杂志*, 2000, 35(6):391-393.
- [22] Lee SH, Park M, Park CG, et al. Microchip for sustained drug delivery by diffusion through microchannels. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2012;13(1):211-217.
- [23] Ni S, Lin K, Chang J, et al. beta-CaSiO3/beta-Ca3(PO4)2 composite materials for hard tissue repair: In vitro studies. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85(1):72-82.
- [24] Schlapp M, Friess W. Collagen/PLGA microparticle composites for local controlled delivery of gentamicin. *J Pharm Sci*. 2003;92(11):2145-2151.
- [25] Jeong B, Bae YH, Kim SK, et al. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *J Control Release*. 2000;63(1-2):155-163.
- [26] Bini TB, Gao S, Xu X, et al. Peripheral nerve re-generation by microbraided poly (L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. *J Biomed Mater Res A*. 2004;68(2):286-295.
- [27] Chang C.J, Hsu. The effect of high outflow permeability in asymmetric poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 2006;27(7):1035-1042.
- [28] 叶震海, 顾立强. 雪旺细胞和聚乳酸材料的体外相容性研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2000, 2(4):306-307.
- [29] Liu P, Sun Y, Wang Q, et al. Intracellular trafficking and cellular uptake mechanism of mPEG-PLGA-PLL and mPEG-PLGA-PLL-Gal nanoparticles for targeted delivery to hepatomas. *Biomaterials*. 2014;35(2):760-770.
- [30] 张文元, 杨亚冬, 张科技, 等. 蚕丝-聚乳酸-聚羟基乙酸纤维混合编织绳状支架的生物力学性能[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(5):931-933.