

·基础研究·

doi: 10.3969/j.issn.1009-7090.2010.02.002

可显影软腭植入材料纤维化实验研究

汪 建, 张天翔, 陈 亮, 付晓燕

摘要:目的 比较自行研制的可显影 HA-P 软腭植入材料与 Pillar 软腭植入材料(即 PET)的纤维化效果。方法 普通大白兔 20 只分为 2 组,第一组肌层内植入 1 根 PET,另一组植入 HA-P 材料,于术后第 7、15、30、60、90 天 2 组分别处死实验动物 2 只,将埋植材料连同周围组织完整取出,制成标本并做石蜡切片行组织学检查,然后采用图像分析软件对纤维层厚度进行测量。结果 两组材料纤维层厚度均随时间延长而增加,早期 PET 纤维化程度更好,术后 90 d 实验组纤维层厚度为 $(16.7 \pm 4.4) \mu\text{m}$,对照组为 $(17.9 \pm 4.1) \mu\text{m}$,两组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 自行研制的可显影 HA-P 软腭植入材料与 Pillar 材料有相似的纤维化效果。

关键词:软腭植入;聚乳酸;羟基磷灰石;聚对苯二甲酸乙二酯;纤维化

中图分类号:R318.1

文献标识码:A

文章编号:1009-7090(2010)02-0096-04

Experimental study on displayed palatal implants fibrosis in rabbits WANG Jian, ZHANG Tian-xiang, CHEN Liang, FU Xiao-yan (Department of Otolaryngology, General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010, Guangdong, China)

Abstract: Objective To compare the fibrosis effects of polyethylene terephthalate(PET) and HA-P implants on the histologic structure of the palatal tissue in rabbit model. **Methods** Twenty rabbits were implanted PET and HA-P in muscle divided into 2 groups respectively. The animals were sacrificed after implantation at 7 days, 15 days, 30 days, 60 days and 90 days, 2 animals for each time. Specimens were collected for HE staining. Image Tool for Windows version 3.0 was applied to measure the thickness of capsule at different time intervals and the dynamic alteration in histology was observed. **Results** Histologic analysis demonstrated that thicker fibrosis developed in all specimens. At the beginning, more fibrosis was observed in PET. At the end of the experiment, the formation of capsule in PET implant ended up with a thickness of $(17.9 \pm 4.1) \mu\text{m}$, slightly thicker than that of HA-P [$(16.7 \pm 4.4) \mu\text{m}$] ($P > 0.05$). There were no obvious distinction between 2 groups. **Conclusion** It is demonstrated that PET and HA-P material stiffen the soft palate in same results.

Key words: palatal implant; polylactic- acid; hydroxyapatite; polyethylene terephthalate; fibrosis

软腭植入(Pillar™ palatal implants)是近年来提出治疗鼾症和阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS)的新型技术。目前临床使用的植入材料为聚对苯二甲酸乙二酯(polyethylene terephthalate, PET), 又称涤纶(Dacron), 该材料纤维化效果良好, 降解性能稳定, 但昂贵的价格限制了其临床推广。笔者选用羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA) 和聚乳酸-三甲基碳酸酯[(poly(lactide-co-trimethylene) carbonate, PLTC), 利用溶液共混法研制出了一种新型的软腭植入材料(HA-P), 前期的生物相容性评价良好^[1], 但其治疗效果尚未通过实验认证。笔者通过白兔模型研究 HA-P 与 PET

植入到体内后纤维化程度的比较, 探讨 HA-P 软腭植入材料治疗 OSAHS 的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

20 只清洁级普通大白兔, 体质量 1.5 ~ 2.5 kg, 由广州军区广州总医院实验动物中心提供。

HA 由广州军区广州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; PLTC(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; 医用硫酸钡(BaSO₄); Pillar™ palatal implants 材料, 由美国 Restore 公司生产。

1.2 实验仪器

高温高压水热合成装置(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); Image Tool for Windows version 3.0 图像处理软件; 普通光学显微镜(BX260, Olympus)。

作者单位: 广州军区广州总医院耳鼻咽喉科, 广东广州 510010

收稿日期: 2009-10-09; 修回日期: 2009-11-03

作者简介: 汪建(1961-), 男, 四川成都市人, 博士, 主任医师, 主要从事鼾症、鼻内镜手术的研究。

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(5000131)

1.3 方法

1.3.1 材料制备

HA-P 的制备: BaSO₄: HA: PLTC = 0.15: 1: 1 (质量比), 其中 HA 经研磨过筛后选择孔径为 0.5 mm 的小颗粒, 做高温、高压消毒处理; PLTC 在 37 °C 条件下用环氧乙烷消毒灭菌 12 h。按配方将称量好的 PLTC 加入到三氯甲烷中, 密封静置 12 h, 配成浓度为 20% 的溶液。待 PLTC 完全溶解后, 将定量的 HA 与 BaSO₄ 颗粒加入到溶液中, 充分搅拌, 直至肉眼见固体颗粒均匀分散于 PLTC 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 2 mm、长 10 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 的小棒。以上操作均在超净工作台完成。

对照组材料: 临床使用 Pillar™ palatal implants 材料即 PET 10 根, 由美国 Restore 公司生产。

1.3.2 实验步骤

将普通大白兔 20 只随机分为 2 组, 用氯氨酮溶液肌内注射麻醉, 于双侧股部外侧备皮, 常规消毒、铺巾, 以软腭植入传输器于第 1 组 (实验组) 白兔股部肌层内植入 1 根 HA-P, 第 2 组 (对照组) 植入 1 根 PET, 左右随机, 待动物清醒后常规饲养。于术后第 7、15、30、60、90 天每组分别处死 2 只大白兔, 将植入材料连同周围包膜组织整块取出, 置于 10% 甲醛溶液固定, 常规脱水, 石蜡固定, 制成 5 μm 厚切片行苏木精-伊红染色。用普通光学显微镜 (BX260, Olympus) 观察, 同时拍照。由高年资病理科医师采取盲法测量图片中包膜的厚度。每个标本取连续切取的 3 张切片进行观察, 每个切片取 3 个部位进行包膜厚度测量。

1.4 统计学方法

计量资料数据用均数 ± 标准差表示, 采用 SPSS 12.0 软件行配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

术后动物自然苏醒, 所有动物均存活, 无并发症, 进食、活动未见异常, 手术部位未见红肿、出血及渗液。伤口 期愈合, 无感染和窦道形成。取材过程顺利。

2.2 纤维层形成过程中的组织学变化

术后 7 d 两组标本均以典型的急性炎症反应为特征, 表现为在植入材料周围出现一层以中性粒细胞、淋巴细胞和吞噬细胞为主的细胞成分, 成纤维细

胞少见, 未出现可见纤维组织, 实验组炎症反应较对照组重。

术后 15 d, 两组炎性细胞仍然较丰富, 但对照组在细胞成分外围出现疏松的成条索状分布的胶原纤维, 其间夹杂有相当数量的成纤维细胞, 纤维包膜开始形成, 其最外层可见明显的新生血管。实验组 HA-P 与周围界限清晰, 肌肉组织肿胀, 周围有炎性肉芽组织增生, 肉芽组织中可见毛细血管扩张, 局部有多量淋巴细胞及单核细胞浸润, 炎症反应仍较对照组重, 见少量成纤维细胞, 未见多核巨细胞。见封二插图图 1。

术后 30 d, 炎性细胞数目显著下降, 对照组薄而连续的纤维囊已基本形成, 成纤维细胞成为最主要的细胞成分, 此时仍可见少量吞噬细胞, 无中性粒细胞浸润。实验组中, HA-P 与组织界限渐趋模糊, 周围有大量淋巴细胞及单核细胞浸润, 纤维细胞增生, 已有网状纤维组织长入材料植入区, 材料-组织界面形成由 1~2 层成纤维细胞组成的纤维膜包围, 纤维组织较薄且疏松, 纤维层厚度不及对照组 ($P < 0.05$)。见封二插图图 2。

术后 60 d, 对照组的纤维囊与前相比厚度基本稳定, 纤维层组织主要由致密平行排列的胶原纤维组成, 成纤维细胞丰富。相比较, 实验组炎性细胞减少, 仅见少量淋巴、单核细胞浸润, 纤维组织层增厚, 但仍较对照组低 ($P < 0.05$)。见封二插图图 3。

术后 90 d, 两组可见少量吞噬细胞浸润纤维层组织中, 对照组的纤维包膜厚度稳定, 成纤维细胞较之前无明显变化。实验组大量纤维细胞增生, 厚度较前有所增加, 少量吞噬细胞夹杂其中, 呈慢性炎症改变。纤维层基本接近对照组 ($P > 0.05$)。见封二插图图 4。

2.3 纤维层厚度的变化

图像分析软件测量结果和镜下观察结果基本一致: 两组纤维层厚度在整个实验阶段都呈现出与时间成正相关关系, 只是对照组在术后早期纤维层厚度的增加较为明显和活跃, 从术后 30 d 开始测量至术后 60 d, 对照组纤维层厚度均较实验组厚, 其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。但后期两组纤维化效果已基本相当, 术后 90 d, 两组纤维层厚度已接近 ($P > 0.05$), 提示在两组材料的纤维化效果最终基本相当。实验组未见骨化现象。具体结果如表 1 所示。

3 讨论

OSAHS 是以睡眠时鼾声响亮, 吸气性呼吸困难, 晨起后头痛、嗜睡、精神不振为特征性疾病。睡眠中常

表 1 对照组与实验组各实验阶段纤维层厚度的比较
Table 1 Fibrous layer thickness comparison between 2 groups in every period

纤维层厚度	植入时间		
	30 d	60 d	90 d
PET/ μm	14.7 ± 2.9	17.1 ± 3.5	17.9 ± 4.1
HA-P/ μm	10.3 ± 4.2	13.5 ± 3.7	16.7 ± 4.4
<i>t</i>	3.66	3.00	0.85
<i>P</i>	<0.05	<0.05	>0.05

伴有多次的呼吸暂停,它是一种常见的疾病,不但给大多数人带来不便,而且有显著的医学暗示。成年人中有 20% 的人有打鼾习惯^[2]。过去对于该病的认识仅限于睡眠时鼾声大,影响同床者的休息,但是随着医学研究的进步,发现该疾病可导致血氧饱和度降低,心脏负荷加重,进而造成低氧血症、高血压、心脏病、脑卒中、记忆力减退和神经精神症状,严重威胁人类寿命和生活质量,近年来已引起广泛重视。随着对该病认识的深入,治疗手段也日渐增多。但由于其病因的复杂性,目前尚无一种方法能彻底、有效地治愈 OSAHS。软腭植入即是近年来提出的一种新型技术,它就是用一种特殊的输送器将一根长 18 mm、直径 1.2 mm 的圆柱形植入材料(目前主要使用的是 PET),分 3 次将 3 根材料平行植入软腭肌层内,诱导局部组织对异物产生排斥反应,形成纤维层,包绕及穿透植入材料,以达到硬化软腭、减少振动、提高咽腔的关闭压、缓解呼吸道阻塞的目的。其高效、微创的优势得到了大量临床研究的支持^[3-6]。然而 PET 价格昂贵,寻找新型、廉价、高效的植入材料,受到了国内外众多学者的关注和研究,HA、聚乳酸是其中具有代表性的生物材料之一^[1]。笔者已成功尝试将两种材料混合制成新型软腭植入材料,该材料生物相容性好、机械强度适中。软腭植入是通过诱导的纤维组织和材料本身的硬度发挥作用,前期实验证明 HA-P 材料的机械性能与 PET 相近^[1]。因此,探讨两者的纤维化有助于了解 HA-P 材料的治疗效果。

PET 是 1940 年由英国化学家 Dupont 发明,商品名为“涤纶”,至今已有几十年的历史。其结构上的疏水芳香族基团和高结晶度使其具有高度稳定性^[7],正是 PET 良好的生物稳定性,目前在医学领域有广泛应用,主要包括缝线、假体血管、心脏瓣膜、人工韧带等。

PET 另一个重要特点是组织诱导性^[8]、持久性^[9],主要是指慢性炎症反应,纤维囊形成及肉芽组织增生,纤维囊 4 周左右形成,且伴随材料终生。同时 PET 柱状材料本身的多孔矩阵,鼓励组织生长,组织的长

入阻止了材料与周围组织的移动,这种牢固结合也有助于材料发挥其本身的作用,大量的动物实验均证明这种诱导反应。软腭植入就是通过 PET 良好的诱导反应联合本身硬度而发挥其生物力学作用的,同时光滑的边缘亦使得完整取出植入的材料成为可能,高效、微创性已得到大量研究的证明。

HA 是人体骨基质的主要成分,长期应用表明其有良好的相容性,聚乳酸属聚乳酸类可吸收材料,其代谢产物为人体正常代谢产物,亦具有良好的组织相容性^[10]。笔者新研制 HA-P 复合材料,HA 颗粒均匀地嵌在复合材料中,材料植入体内后,引起周围组织的排异反应,瘢痕组织形成,使软腭组织硬度增加,有效治疗打鼾。另一方面,与 PET 植入材料相似,HA-P 也具有高孔隙率和三维多孔结构,且结构形态上孔隙之间互相连通。当支架被植入软组织中时,HA 外形成一致密结缔组织包膜,自体组织能长入 HA 微孔内,将其固定,使 HA 最终与生物体融为一体^[11]。

该实验再一次证明了 PET 良好的生物相容性和组织诱导性,在植入早期,即能引起组织明显的纤维化反应和纤维囊形成。HA 在临床上应用已多年,但用于软组织的报道不多,笔者实验表明,HA-P 植入到软组织后,早期炎症反应较重,淋巴细胞和巨噬细胞较多,纤维层形成较晚,其原因可能与材料的化学组成与表面生物降解有关^[12]。HA 主要由钙、磷元素组成,这 2 种元素是细胞活动最基本的调节递质,材料植入体内后受到周围组织的压力和机械摩擦,引起表面碎裂、溶解,离子析出而致炎症反应^[13]。而 PET 具有耐热、耐寒、无毒、耐生物老化、生理惰性、对机体组织反应极小的特性^[8],植入体内组织后周围组织炎症反应较轻。另一方面,制作材料时使用的三氯甲烷挥发不完全也可刺激局部组织,诱发炎症反应。改进制作工艺或添加几丁质^[14]等抑制炎症反应的材料可望改善此现象。实验后期,HA-P 组亦达到了与 PET 相似的纤维化效果,呈现慢性炎症状态,在局部稳定存在,同时无可见的骨诱导效应。参照同类实验^[15-16],局部纤维组织的沉积,即可起到硬化软腭、治疗 OSAHS 的目的。笔者研究为寻找新型植入材料提供了理论依据,同时对于进一步研究软腭植入的治疗机制有一定启示。

参考文献:

- [1] WANG Jian, FU Xiao-yan, XIONG Min, *et al.* Preparation of a new material for palatal implant: Physical performance and animal safety assessment[J]. Journal of Clinical Rehabilitative

- Tissue Engineering Research, 2007, 11(44): 8849-8851.[汪建, 付晓燕, 熊敏, 等. 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): 8849-8851.]
- [2] Littlefield PD, Mair EA. Snoring surgery: which one is best for you[J]? Ear Nose Throat J, 1999, 78(7): 861-868.
- [3] Frideman M, Schalch P, Lin H, *et al.* Palatal implants for the treatment of snoring and obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2008, 138(2): 209-216.
- [4] Saylam G, Korkmaz H, Firat H, *et al.* Palatal implants really reduce snoring in long-term follow-up[J]? Laryngoscope, 2009, 119(1): 1-5.
- [5] Gillespie B, Smith JE, Clarke J, *et al.* Effectiveness of Pillar palatal implants for snoring management [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2009, 140(3):363-368.
- [6] Maurer JT, Hein G, Verse T, *et al.* Long-term results of palatal implants for primary snoring [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2005, 133(4):573-578.
- [7] Greenwald D, Shumway S, Albear P, *et al.* Mechanical comparison of 10 suture materials before and after *in vivo* incubation[J]. J Surg Res, 1994, 56(3): 372-377.
- [8] Feldman D, Hultman S, Colaizzo R, *et al.* Electron microscope investigation of soft tissue ingrowth into Dacron velour with dogs[J]. Biomaterials. 1983, 4 (2):105.
- [9] Schreuders P, Salthouse T, von Recum AF. Normal wound healing compared to healing within porous Dacron implants [J]. J Biomed Mater Res, 1988, 22(1):121-135.
- [10] WANG Xin-yu, SHAN Xue-zhi, WEI Ming, *et al.* Bioactivity and biocompatibility of hydroxyapatite/DL-poly(lactic acid) composite: *in vivo* implantation[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineer Research, 2007, 11(35): 7094-7097. [王欣宇, 单学智, 韦明, 等. 羟基磷灰石/外消旋聚乳酸复合材料生物活性和生物相容性的体内实验[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(35): 7094-7097.]
- [11] Triglia JM, Scheiner C, Gouvernet J, *et al.* Hydroxyapatite in experimental laryngotracheal reconstruction[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1993, 119(1): 87-91.
- [12] Orly I, Gregoire M, Menanteau J, *et al.* Chemical changes in hydroxyapatite biomaterial under *in vivo* and *in vitro* biological conditions[J]. Calcif Tissue Int, 1989, 4(1):20-26.
- [13] TENG Li, WU Guo-ping, YANG Zhi-hui, *et al.* Biocompatibility study of hydroxyapatite-silicone composite[J]. Journal of Plastic Reconstructive Surgery, 2005, 2(4): 221-223. [滕利, 吴国平, 杨志惠, 等. 羟基磷灰石硅胶复合材料的生物相容性研究[J]. 整形再造外科杂志, 2005, 2(4): 221-223.]
- [14] YIN Qing-shui, ZHANG Yu, LI Zhao-lin, *et al.* Preparation of composite coralline hydroxyapatite as a bone graft substitute and its effect of osteoinduction[J]. Chinese Journal of Orthopaedic Trauma, 2004, 6(1): 92-94. [尹庆水, 张余, 李兆麟, 等. 复合珊瑚羟基磷灰石人工骨的研制及其成骨效应[J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6(1): 92-94.]
- [15] Courey MS, Fomin D, Smith T, *et al.* Histologic and physiologic effects of electrocautery, CO₂ laser, and radiofrequency injury in the porcine soft palate[J]. Laryngoscope, 1999, 109(8): 1316-1319.
- [16] Poyrazoglu E, Dogru S, Saat B, *et al.* Histologic effects of injection snoreplasty and radiofrequency in the rat soft palate[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2006, 135(4): 561-564.

· 信息动态 ·

第二届京津冀体外循环学术交流会在天津召开

为了进一步加强区域间体外循环专业领域的学术交流, 2010 年 1 月 16 日, 由天津市生物医学工程学会体外循环专业委员会主办, 天津市塑料研究所承办的第二届京津冀体外循环学术交流会在天津市泽铭酒店召开, 来自北京市、天津市和河北省体外循环、心脏外科及麻醉界各个医院约 200 多名医技人员参加了会议。

泰达国际心血管病医院体外循环科主任王中主持了会议, 天津市生物医学工程学会秘书长李涛、天津市塑料研究所所长曹常在、中国生物医学工程学会体外循环分会主任委员龙村、《中国体外循环杂志》编辑部主任李加春、北京市体外循环分会主任委员黑飞龙及河北省体外循环分会主任委员赵砚丽相继发言。

会议对两个主题进行了讨论, 主题一为进一步加强相邻地区间体外循环学术交流活动, 并尽可能将交流区域进行扩大, 为体外循环从业人员提供更为广泛的交流机会, 王中主任提议在年内召开环渤海地区体外循环学术交流会, 该提议得到与会人员积极响应。主题二为学术讨论, 重点讨论了体外膜肺氧合 (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) 技术的临床应用, 龙村主任对 ECMO 技术进行了全面介绍, 有鉴于患者对医疗救治水平要求的日益提高, 会议重点关注了 ECMO 在心跳骤停患者急救、H1N1 重症患者的救治及孕妇 ECMO 技术的应用, 对 ECMO 的应用指征、ECMO 期间的管理及 ECMO 应用方式的选择方面进行了热烈的讨论。