

· 论 著 ·

不同灭菌法对组织工程支架降解性和力学特性的影响

秦廷武 杨志明 张姝江 李秀群 刘军

【摘要】目的 研究不同灭菌方法对组织工程聚合物支架的灭菌效果以及灭菌处理对聚合物支架降解性和力学特性的影响。**方法** 选择聚合物支架 PGA 编织网和 PLGA 纤维,经环氧乙烷、紫外线、75% 酒精浸泡和 γ 射线照射 4 种方法灭菌后,用细菌培养检测灭菌效果;用粘度法测定聚合物粘度,以观察聚合物的降解性;用拉伸实验测定聚合物支架的力学特性。**结果** 经 4 种方法灭菌后,聚合物支架 PGA 编织网细菌检测均为阴性,都可达到灭菌目的。辐射剂量为 15kGy 的 γ 射线照射和紫外线照射灭菌都可导致 PLGA 粘度下降,且均具有显著性差异 ($P < 0.05$),即这两种灭菌方法使 PLGA 的降解明显;相反,75% 酒精和环氧乙烷灭菌对 PLGA 粘度下降的影响没有显著性意义 ($P > 0.05$),即降解不明显。各种灭菌方法处理后支架的断裂伸长率差异无显著性意义 ($P > 0.05$);经 15kGy 的 γ 射线照射和紫外线灭菌后,支架的最大载荷、断裂能量及抗拉强度均降低,差异具有显著性意义 ($P < 0.05$);经环氧乙烷和酒精浸泡灭菌方法处理的支架其最大载荷、断裂能量、抗拉强度均无明显改变,差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。**结论** 环氧乙烷和酒精浸泡灭菌对支架降解性和力学特性影响均较小,是可降解聚合物支架较理想的灭菌方法。

【关键词】 组织工程支架; 灭菌; 降解; 力学特性

Effect of different sterilization techniques on degradation and mechanical properties of tissue engineering scaffolds QIN Tingwu, YANG Zhiming, ZHANG Shujiang, LI Xiuqun, LIU Jun. Institute of Reparative and Reconstructive Surgery, The West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】Objective To elucidate the effect of different sterilization methods on degradation and mechanical properties of tissue engineering scaffolds. **Methods** PGA meshes and PLGA fibers were sterilized with ethylene oxide, ultraviolet exposure, alcohol and gamma irradiation from a ^{60}Co source, respectively. The bacterial culture, polymer viscosity and mechanical properties of the scaffolds were examined. **Results** Negative bacterial cultivation was noted for all the scaffolds after sterilization with each of the 4 sterilization methods. The reduction of viscosity, or degradation of scaffolds after gamma irradiation (15 kGy) or ultraviolet exposure was significantly greater than that sterilized with ethylene oxide or 75% alcohol ($P < 0.05$). In addition, scaffolds sterilized with ethylene oxide or 75% alcohol almost maintained their normal maximum load, energy at break and tensile strength. However, the irradiation with gamma ray or ultraviolet exposure of the scaffolds resulted in significant decline of maximum load, energy at break and tensile strength ($P < 0.05$). **Conclusion** The results suggest that among the 4 different sterilization methods, the sterilization with ethylene oxide or 75% alcohol may be the better methods for the degradable polymers.

【Key words】 Tissue engineering scaffolds; Sterilization; Degradation; Mechanical properties

组织工程 (tissue engineering, TE) 是应用生命科学与工程学的原理与技术,设计构造、改良、培养活组织,以修复或重建组织器官的结构、维持或改善其功能的一门新兴的交叉学科^[1]。有关组织工程的研究目前已成为热门研究课题之一。

组织工程支架材料是组织工程学研究的重要内容之一。这些材料要直接或间接与细胞或人体组织接触,如若附着病原体、微生物等,就会在细胞培养中引

起细胞死亡或在人体内增殖,继而引发人体组织局部或全身性疾病,故组织工程支架材料必须经过消毒与灭菌方可应用。组织工程支架材料的灭菌处理在杀灭材料中的一切微生物的同时,不能破坏支架材料的生物降解性及力学特性。组织工程支架材料的灭菌方法有多种^[2-4],包括环氧乙烷、 γ 射线、酒精及紫外线等,但有关其灭菌方法,尤其是灭菌处理对组织工程支架材料降解性和力学特性的影响,目前鲜有报道。本文采用目前组织工程研究中较为常用的两种可降解支架材料,运用不同灭菌方法,以观察其对支架材料降解性、力学特性的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30070199),四川省青年基金资助项目 (2001-19-0132)

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院修复重建外科研究室

材料与方法

一、材料

选用聚羟基乙酸(polyglycolic acid, PGA), 以及聚乳酸(poly-lactic acid, PLA) 与 PGA 的共聚物(Poly-DL-Lactide-co-Glycolide, 85:15, PLGA)。将 PLGA 纺成直径为 20 μm ~ 500 μm 的纤维; 将 PGA 制成多股纤维编织网。PLGA 纤维用聚乙烯袋密封包装(酒精和紫外线灭菌组待灭菌后密封包装), 每袋 100 mg; 将 PGA 编织网剪成 3.5 cm $\times$ 1.0 cm 或 1.0 cm $\times$ 1.0 cm 的小片, 用聚乙烯袋密封包装(酒精和紫外线灭菌组待灭菌后密封包装)。

二、灭菌方法

1. 环氧乙烷灭菌方法: 采用浓度为 500 mg/L 的环氧乙烷, 温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度控制在 30% ~ 40%, 灭菌 12 h(成都市消毒服务中心)。灭菌后将材料置于空气中静置 5 d 以上, 以清除残留的环氧乙烷。

2. γ 射线灭菌方法: 采用具有微机自动控制及旋转辐照台的 γ 射线辐照装置灭菌。支架材料吸收剂量为 15 kGy, 辐照场温度 15 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

3. 紫外线灭菌方法: 在相对湿度为 50% ~ 70% 的条件下, 采用辐射值 $\geq 100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的 30 W 紫外线灯, 在超净工作台内照射 2 h 以上。无菌包装, 待用。

4. 酒精灭菌: 用 75% 酒精浸泡支架材料 30 min 以上, 然后用 10 ml 无菌青霉素瓶密封包装, 待用。

三、灭菌效果测试

经环氧乙烷、紫外线、酒精浸泡和 γ 射线 4 种方法灭菌的 PGA 编织网, 用细菌培养定量检测灭菌效果。检测时, 在无菌试管中加入 1 ml 已消毒灭菌的普通肉汤, 将经上述 4 种方法灭菌的材料和未经灭菌的材料各取一片分别放入试管中, 充分混匀。把试管放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 4 h; 将肉汤均匀涂布于 MH 琼脂平板上, 置于室温大约 1 h, 然后将平板放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 18 ~ 24 h, 计算活菌数。用无菌肉汤作阴性对照。

四、聚合物粘度测定

聚合物粘度测定采用粘度法。分别称取 100 mg 的 PLGA 纤维样品 18 个, 每种灭菌方法选 3 个样品。实验分组方法如下: 分别测定样品经环氧乙烷灭菌、紫外线灭菌、酒精灭菌、 γ 射线灭菌后的粘度, 与未作任何处理的样品(未灭菌组)作对照。用聚合物粘度作为衡量其降解性的指标。

五、力学性能测定

将 PGA 编织网(厚度为 0.2 mm)剪成 35 mm $\times$ 6 mm 的小块, 将其分为 5 组, 其中未灭菌组 8 块, 实验组每组各 4 块。实验组分别经环氧乙烷、紫外线、酒精浸泡和 γ 射线 4 种方法灭菌处理, 未灭菌组不作任何

处理。所有样品均经 INSTRON8874 型液压伺服材料力学试验机进行单轴拉伸试验, 加载速度 5.0 mm/min, 当载荷下降 100% 时, 停止加载, 拉力传感器量程 10 kN。记录每个样品的断裂载荷和伸长值, 测定其抗拉强度和断裂伸长率。测量温度 15 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$; 相对湿度 50% ~ 75%。

六、统计学分析

所有定量资料均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 统计学方法采用 t 检验。

结 果

一、不同灭菌方法的灭菌效果

对经不同灭菌方法处理后的 PGA 编织网进行细菌培养, 其结果见表 1。未灭菌组污染菌落为 486 ± 11 个/ cm^2 , 表明材料加工过程细菌污染严重。实验各组编织网经 4 种方法灭菌后, 各组检测均为阴性。单纯肉汤亦无细菌生长。

表 1 不同方法灭菌后各组细菌数抽检结果比较($\bar{x} \pm s$)

灭菌方法	抽检材料数 (n)	细菌数(个/ cm^2)	阳性率 (%)
未灭菌组	5	486 ± 11	100
环氧乙烷组	4	0	0
紫外线组	4	0	0
酒精浸泡组	4	0	0
γ 射线组	4	0	0

二、不同灭菌方法对 PLGA 降解性的影响

经采用不同灭菌方法处理后 PLGA 的粘度改变结果见图 1。同未灭菌组的 PLGA 相比较, 酒精灭菌后 PLGA 的粘度下降约 7%; 环氧乙烷灭菌后粘度下降约 8%; 经辐射剂量为 15 kGy 的 γ 射线照射灭菌后, 粘度下降约 19%; 紫外线照射 4 h, 粘度下降约 34%。 γ 射线照射和紫外线辐射灭菌导致 PLGA 粘度的下降, 差异具有显著性($P < 0.05$), 即这两种灭菌法使 PLGA 的降解明显; 相反, 酒精和环氧乙烷灭菌对 PLGA 的粘度下降没有显著性意义($P > 0.05$), 即对 PLGA 降解的影响不明显。

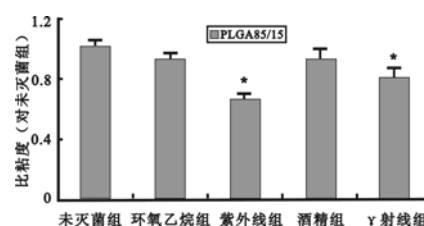


图 1 不同灭菌方法对 PLGA 粘度的影响

注: * 表示与未灭菌组比较 $P < 0.05$

三、不同灭菌方法对 PGA 力学特性的影响

经不同灭菌方法处理的支架力学特性测试结果见

表 2。各种灭菌方法对支架的断裂伸长率影响无显著性差异($P>0.05$)；经紫外线或 γ 射线灭菌后, 支架的最大载荷、断裂能量、抗拉强度均降低, 差异具有显著

性($P<0.05$)；经环氧乙烷和酒精浸泡灭菌处理的支架其最大载荷、断裂能量及抗拉强度均无明显改变, 差异无显著性($P>0.05$)。

表 2 经不同灭菌方法处理后支架抗拉强度与断裂测试结果比较($\bar{x} \pm s$)

灭菌方法	n	最大载荷(N)	断裂能量(mJ)	抗拉强度(MPa)	断裂伸长率(%)
未灭菌组	8	167.49 ± 17.97	704.58 ± 98.60	139.58 ± 14.98	62.54 ± 5.82
环氧乙烷组	4	155.94 ± 20.29	672.57 ± 112.09	129.95 ± 16.91	58.69 ± 3.90
紫外线组	4	136.62 ± 13.23 *	551.65 ± 66.18 *	109.84 ± 14.27 *	58.21 ± 4.89
酒精浸泡组	4	164.93 ± 8.67	680.18 ± 62.25	137.45 ± 7.22	59.26 ± 2.08
γ 射线组	4	150.59 ± 7.44 *	568.64 ± 29.02 *	125.49 ± 6.20 *	58.44 ± 2.24

注: * 与未灭菌组比较, $P<0.05$

讨 论

本实验结果表明, 经环氧乙烷、紫外线、酒精浸泡和 γ 射线 4 种灭菌方法处理后, 聚合物支架均可达到灭菌目的, 但不同的灭菌方法对聚合物支架材料降解性和力学特性的影响存在较大差异。辐射剂量为 15 kGy 的 γ 射线和紫外线照射导致 PLGA 降解明显; 而 75% 酒精和环氧乙烷灭菌对 PLGA 降解则没有明显影响。经各种灭菌方法处理后, 支架的断裂伸长率改变较小, 但经 15 kGy 的 γ 射线辐照和紫外线灭菌后, 支架的最大载荷、断裂能量及抗拉强度均明显降低; 而环氧乙烷和酒精浸泡灭菌处理对支架的力学特性影响较小。因此, 针对不同组织工程支架材料, 应选择不同的灭菌方法。

由于 75% 的消毒酒精对含有 PLA 或 PLGA (当 PLA 比例较高时) 的薄膜、纤维或微球有轻微的溶解作用^[6], 因此不宜对 PLGA 薄膜、纤维或微球支架采用酒精灭菌。但由于 PGA 或 PGA 含量较高的 PLGA 聚合物支架不溶于一般的溶剂, 可采用酒精灭菌。本实验表明, 经酒精灭菌后, 其降解性和力学特性没有明显改变, 是组织工程支架材料最简便的灭菌方法之一。环氧乙烷是经常使用的气体灭菌剂, 它对各种类型微生物的杀灭作用都很强, 能和多种基团反应, 是一种广谱杀菌剂。本实验表明, 经环氧乙烷灭菌处理的可降解聚合物支架, 其降解性和力学特性都没有明显改变, 是较理想的灭菌方法。由于环氧乙烷穿透力较强, 消毒后材料表面必然留有部分残余, 因此, 对组织工程支架材料灭菌后一般均需在真空下脱除环氧乙烷, 或置于空气中以清除残留的环氧乙烷。辐射消毒常用紫外线和 γ 射线。当采用紫外线直接照射材料时, 应注意使材料各处都能有 $0.06 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 以上的能量辐射, 否则影响消毒效果。本研究表明, 紫外线照射引起聚合物降解性和力学特性的改变最大; 而且由于采用紫外线照射时, 容易受污染, 因此, 对组织工程支架材料的消毒不宜采用此法。 γ 射线灭菌具有穿透力强、效果好,

可在常温下进行, 不必考虑材料的耐热问题, 消毒过程可连续自动化, 可靠性高。但聚合物材料经 γ 射线辐照后其降解性和力学特性均有明显改变, 这可能是由于可降解的高分子材料经灭菌辐射处理后, 产生了无规律的键分裂现象, 改变了机械性能, 降低了抗拉强度。

综上所述, 环氧乙烷和酒精浸泡对支架降解性及力学特性的影响均较小, 是理想的灭菌方法。因 γ 射线或紫外线易引起支架降解和力学特性的明显改变, 故实际中不宜采用。如果在材料设计中提高聚合物的原始分子量, 使辐照后的保留分子量仍能达到所需要的水平, γ 射线辐射仍可用于支架灭菌。利用环氧乙烷与 γ 射线的高穿透性, 可将支架材料先用聚乙烯薄膜或纸包装好后, 再行灭菌, 方法简便易操作, 且不易造成污染, 安全性高。

致谢: 感谢四川大学华西医院传染科分子生物学实验室吕小菊博士、四川大学纺织研究所叶光斗及李守群研究员对本文工作的帮助。

参 考 文 献

- 1 Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science, 1993, 260: 920-925.
- 2 Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Cultivation of cell-polymer tissue constructs in simulated microgravity. Biotech Bioeng, 1995, 46:306-313.
- 3 Johnson KA, Rogers GJ, Roe SC, et al. Nitrous acid pretreatment of tendon xenografts cross-linked with glutaraldehyde and sterilized with gamma irradiation. Biomaterials, 1999, 20:1003-1015.
- 4 Moreau MF, Gallois Y, Basle MF, et al. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. Biomaterials, 2000, 21:369-376.
- 5 Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM, et al. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. Biomaterials, 1996, 17: 93-102.
- 6 Tracy MA, Ward KL, Firouzabadian L, et al. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro. Biomaterials, 1999, 20:1057-1062.

(收稿日期: 2002-05-20)

(本文编辑: 易 浩)