

# 可降解新型聚乳酸膜在引导骨组织再生中的应用

胡雅瑄 马子涵 王将凌 汪永跃

口腔疾病防治全国重点实验室 国家口腔医学中心 国家口腔疾病临床医学研究中心  
四川大学华西口腔医院种植科 成都 610041

**[摘要]** **目的** 探索一种可降解新型聚乳酸膜 (PDLLA/PLLA) 在引导骨组织再生中的应用效果。**方法** 新西兰大白兔 24 只, 体重 2.5~3.0 kg, 在动物一侧下颌骨体部近下颌骨下缘处制备 10 mm×5 mm×3 mm 箱状骨缺损, 然后将动物随机分为实验组、对照组和空白组, 每组 8 只。实验组动物骨缺损处填 Bio-oss 骨粉后将 PDLLA/PLLA 覆盖于缺损表面, 对照组动物骨缺损处填 Bio-oss 骨粉后将 Guidor 聚乳酸可吸收膜覆盖于缺损表面, 空白组动物不作处理。术后 8、12 周采集缺损处标本, 进行大体观察、Micro-CT 检查和组织病理学观察。**结果** 实验期间各组实验动物均未发生炎症和排异反应, 各组创口愈合良好, 成骨活跃。大体观察显示, 术后 8 周实验组动物成骨量较多, 材料降解较少, 对照组动物成骨量较实验组少, 材料降解完全; 术后 12 周实验组动物和对照组动物成骨量相当, 实验组材料进一步降解, 空白组动物成骨量少于实验组和对照组。术后 8、12 周, Micro-CT 可以观察到实验组和对照组缺损区域新生骨明显多于空白组。术后 8、12 周, 实验组动物和对照组动物新生骨相对骨体积分数 (BV/TV)、骨密度 (BMD) 和骨小梁数量 (Tb.N) 均显著高于空白组动物 ( $P<0.05$ ), 且术后 8 周实验组动物新生骨 BV/TV 高于对照组 ( $P<0.05$ ); 但在术后 12 周时实验组与对照组新生骨 BV/TV、BMD 和 Tb.N 比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。组织切片观察显示, 术后 8 周实验组动物新生骨小梁周边细胞生长活跃, 并可见少量成骨细胞及破骨细胞; 术后 12 周实验组动物骨小梁周围可见大量成骨细胞及破骨细胞, 骨缺损部位骨组织密度接近周边正常骨组织。**结论** 与对照组和空白组相比, PDLLA/PLLA 呈现出了良好的生物相容性和骨传导性, 可以明显促进缺损处愈合。

**[关键词]** 聚乳酸; 复合材料; 骨组织修复工程; 下颌骨; 缺损; 动物实验

**[中图分类号]** R782.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2024030



开放科学 (资源服务)  
标识码 (OSID)

## Application of degradable new polylactic acid membrane in guiding bone tissue regeneration

Hu Yaxuan, Ma Zihan, Wang Jiangling, Wang Yongyue

State Key Laboratory of Oral Diseases & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Dept. of Implantology, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Correspondence: Wang Yongyue, Email: wangyy516@163.com

**[Abstract]** **Objective** This work aimed to explore the application effect of a new biodegradable polylactic acid membrane (PDLLA/PLLA) in guiding bone tissue regeneration. **Methods** A total of 24 New Zealand white rabbits, weighing 2.5~3.0 kg, were prepared at the lower edge of the mandible near the body of the mandible on one side of the animal. The dimensions of the bone defect were 5 mm×3 mm. The animals were randomly divided into the experimental group, control group, and blank group, with eight animals in each group. The experimental group animals were filled with Bio-oss bone powder, and PDLLA/PLLA was covered on the defect surface. The control group animals were filled with Bio-oss bone powder, and a Guidor polylactic acid membrane was covered on the defect surface. The blank group animals were not treated. At 8 and 12 weeks after the operation, specimens of the defect were collected for gross observation, micro-CT

examination, and histopathological observation. **Results** During the experiment, no inflammation and rejection reaction occurred in the experimental animals in each group, and the wounds in each group healed well

**[收稿日期]** 2023-05-24; **[修回日期]** 2023-12-20

**[作者简介]** 胡雅瑄, 医师, 硕士, Email: 18706402213@163.com

**[通信作者]** 汪永跃, 教授, 博士, Email: wangyy516@163.com

and osteogenesis was active. The gross observation showed that the animals in the experimental group had more bone formation and less material degradation at 8 weeks after the operation, whereas the animals in the control group had less bone formation and complete material degradation compared with the experimental group. At 12 weeks after the operation, the amount of bone formation of animals in the experimental group and the control group was the same, but the materials in the experimental group were further degraded. The amount of bone formation of animals in the blank group was less than that in the experimental group and the control group. At 8 and 12 weeks after the operation, micro-CT revealed that the new bone in the defect area of the experimental group and the control group was significantly more than that of the blank group. At 8 and 12 weeks after the operation, the bone volume/tissue volume (BV/TV), bone mineral density (BMD) and trabecular number (Tb.N) of the new bone in the experimental group and the control group were significantly higher than those in the blank group. Histological analysis demonstrated that the cells surrounding the new bone trabeculae in the experimental group grew actively at 8 weeks after the operation, and a small amount of osteoblasts and osteoclasts were visible. At 12 weeks after the operation, a large number of osteoblasts and osteoclasts were found around the bone trabeculae of the experimental group animals, and the bone tissue density at the bone defect site was close to the surrounding normal bone tissue. **Conclusion** Thus, the new polylactic acid membrane (PDLLA/PLLA) has good biocompatibility and bone conductivity, and it can significantly promote the healing of defects.

**[Key words]** polylactic acid; compound material; bone tissue repair engineering; mandible; defect; animal experiment

目前引导骨再生术 (guided bone regeneration, GBR) 是最常用的骨增量方法之一, 它解决了临床上很多骨量不足的问题。GBR屏障膜对促进种植体周围新生骨的形成有重要作用。理想的GBR屏障膜应具有足够的刚性, 能承受覆盖软组织的压迫, 可为硬组织形成提供空间又能被机体降解<sup>[1]</sup>。人工合成的高分子材料聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 由于优异的生物相容性和机械性能, 被广泛用于组织工程中受损组织的功能恢复<sup>[2-4]</sup>。与此同时, PLA材料在诸如体液之类的水性环境中能靠酯键的简单水解而进行降解, 降解的产物能够被人体新陈代谢最终生成CO<sub>2</sub>和水排出体外, 避免二次手术取出给患者带来痛苦<sup>[5]</sup>。PLA根据旋光性的不同可分为左旋聚乳酸 (L-PLA, PLLA)、右旋聚乳酸 (D-PLA, PDLA) 和外消旋聚乳酸 (DL-PLA, PDLLA)。其中PDLLA为非晶态, 可塑性强, 但降解较快、强度低; PLLA有较高的结晶度和机械强度, 降解较慢<sup>[6-7]</sup>。本实验选用PDLA和PLLA共聚形成的一款新型PLA膜, 两种材料的优缺点互补。PDLLA的高韧性和柔韧性能够提高PLLA膜的抗撕裂性能, 而PLLA的高结晶度和光稳定性能够提高PDLLA膜的物理和化学稳定性。此外, 这种新型PLA膜具有较好的可塑性, 能够更好地适应不同形状的骨缺损, 更好地贴合组织表面, 与各种骨替代材料联合使用形成所需的牙槽嵴形态, 提高了手术的精度和效果。为探究该型PLA膜的生物相容性、体内降解性、骨传

导性和引导骨组织再生能力, 本动物实验以同类型已上市的聚乳酸膜Guidor作为对照组, 为其将来应用于临床治疗提供一些实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

成年健康的新西兰兔24只, 雌雄各半, 体重2.5~3.0 kg, 均由四川大学实验动物中心提供。

### 1.2 实验主要材料试剂与仪器

PDLLA/PLLA膜由广州市弘健生物医用制品科技有限公司提供, 将其制成15 mm×20 mm大小, 厚度0.2 mm, 特性黏数2.4 dl/g, 拉伸强度10.94 Mpa, 经钴60辐照灭菌 (Φ: 0.5 mm×0.2 mm, 美兰标记)。Guidor可吸收基质屏障膜 (Sunstar公司, 美国)、Bio-oss骨粉 (Geistlich公司, 瑞士)、3%戊巴比妥 (中国医药集团上海化学试剂公司)、HH-420型恒温水浴锅 (常州国宇仪器制造有限公司)、RM2016型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司)、DM2500型硬组织切片机、DM2500B正立显微镜 (Leica公司, 德国)。

### 1.3 动物模型建立和分组处理

实验动物称重, 用3%戊巴比妥钠按体重1 mL/kg经兔耳缘静脉注射行全身麻醉。常规术区备皮, 消毒铺巾。麻醉起效后, 随机选取兔一侧下颌骨, 平行于下颌骨下缘逐层切开皮肤分离筋膜、咬肌、骨膜, 注意保护神经, 充分显露后在

咬肌前缘下颌骨颊侧,距下颌骨下缘上3 mm处,在大量生理盐水冲洗降温下,用细裂钻在制备长×宽×深为10 mm×5 mm×3 mm的箱状骨缺损。

将24只实验动物随机平均分为实验组、对照组和空白组,每组8只。所有动物缺损处充分止血,实验组动物于骨缺损处填Bio-oss骨粉,然后将PDLLA/PLLA膜覆盖于缺损表面,严密缝合组织;对照组动物于骨缺损处填Bio-oss骨粉,然后将Guidor聚乳酸膜覆盖于缺损表面,严密缝合组织;空白组动物制备骨缺损后不作处理。术后所有动物给予常规颗粒饲料,分笼喂养,每日肌肉注射庆大霉素40 000 U预防感染,连续3 d。

#### 1.4 标本采集与检测

1.4.1 标本采集 术后8、12周两个时间点,分别安乐死3组动物各4只,下颌骨完整分离后固定于中性甲醛溶液24 h。

1.4.2 标本检测 1) 大体观察。观察实验区下颌骨新生骨组织的颜色、质地,骨缺损周围有无炎症坏死及软硬组织生长愈合情况。2) Micro-CT检查。标本固定后进行Micro-CT扫描,层厚设置为10  $\mu\text{m}$ ,设置下颌骨标本缺损区为感兴趣区(region of interest, ROI)取缺损区最完整的层面约100层,进行三维重建并定量分析测量缺损区新生骨的相对骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨密度(bone mineral density, BMD)和骨小梁数量(trabecular number, Tb.N)。3) 组织学检查和计算机图像分析。取下颌骨于10%的中性甲醛溶液固定后脱钙3个月,沿骨缺损矢状面切开露出骨愈合界面,然后常规脱水,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin, HE)染色。

#### 1.5 数据处理和统计学分析

采用SPSS 23.0统计学软件对实验结果进行统计学分析,计量资料均用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,在数据满足正态性分布的条件下采用配对 $t$ 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大体观察

实验动物全部存活,术后1 d即可正常进食,局部伤口未出现感染化脓。所有实验动物均按时分批处死并获得标本。

术后8周,实验组可见PDLLA/PLLA膜与植入前颜色一致表面光滑呈透明状,边缘略有吸收,与周围组织界限较清,连接紧密;骨缺损区新生骨组织与周围正常骨质界限模糊,颜色为较浅的红色,表面粗糙,充填大半骨缺损区。对照组膜材料已降解完全,骨缺损深度变浅,骨缺损直径无明显改变。空白组骨缺损区内有纤维组织充填。术后12周,实验组可见PDLLA/PLLA膜颜色呈白垩色半透明状且表面粗糙有点凹状吸收,膜边缘进一步吸收,整体较完整,质韧;骨缺损区基本愈合,新生骨与正常骨组织边界难以区分,新生骨颜色较正常骨组织偏红。对照组骨组织也基本愈合,新生骨组织高度略低于正常骨,表面软组织易分离。空白组骨缺损变浅但较前两组深,软组织不易分离。

### 2.2 Micro-CT 三维重建分析及骨微观参数比较

Micro-CT对感兴趣区域进行三维重建,可以观察到实验组和对照组缺损区域新生骨明显多于空白组(图1)。

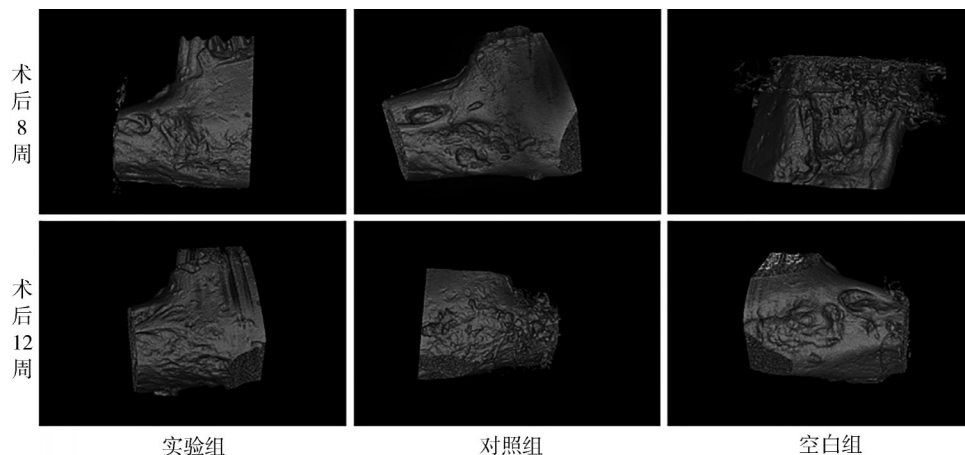
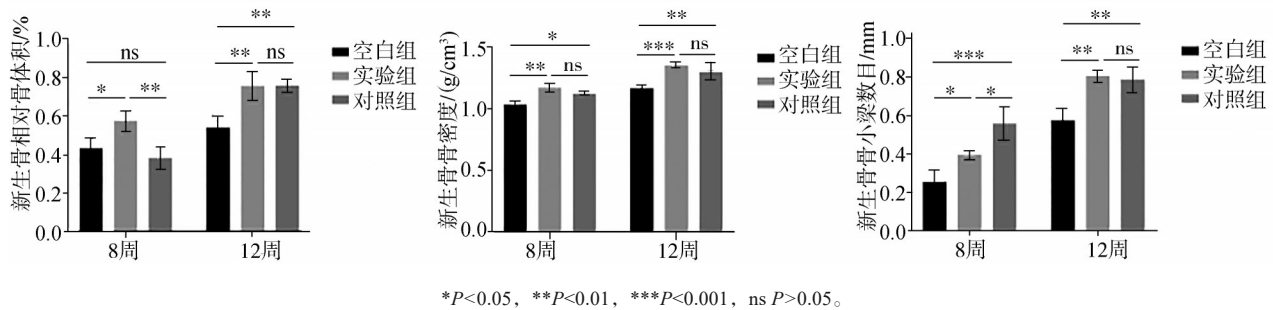


图 1 Micro-CT 三维重建分析

Fig 1 Micro-CT 3D reconstruction analysis

术后8周，实验组和对照组新生骨BV/TV、BMD和Tb.N显著高于空白组 ( $P<0.05$ )，且实验组新生骨BV/TV显著高于对照组 ( $P<0.05$ )。术后12周，实验组和对照组新生骨BV/TV、BMD和Tb.N

显著高于空白组 ( $P<0.05$ )，但是实验组与对照组新生骨BV/TV、BMD和Tb.N比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ) (图2)。



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , ns  $P>0.05$ 。

图 2 术后8、12周骨微观参数比较

Fig 2 Comparison of bone microscopic parameters at 8 and 12 weeks after surgery

### 2.3 组织切片观察

实验组下颌骨缺损区域经HE染色显示，骨缺损区骨小梁的量远远大于空白组，且骨小梁间排列紧密。具体表现为：术后8周，缺损区有伪足状或钉突状新生骨小梁长入其中，新生骨小梁周边

细胞生长活跃，并可见少量成骨细胞及破骨细胞；术后12周，骨小梁周围可见大量成骨细胞及破骨细胞，骨缺损部位骨组织密度接近周边正常骨组织 (图3)。

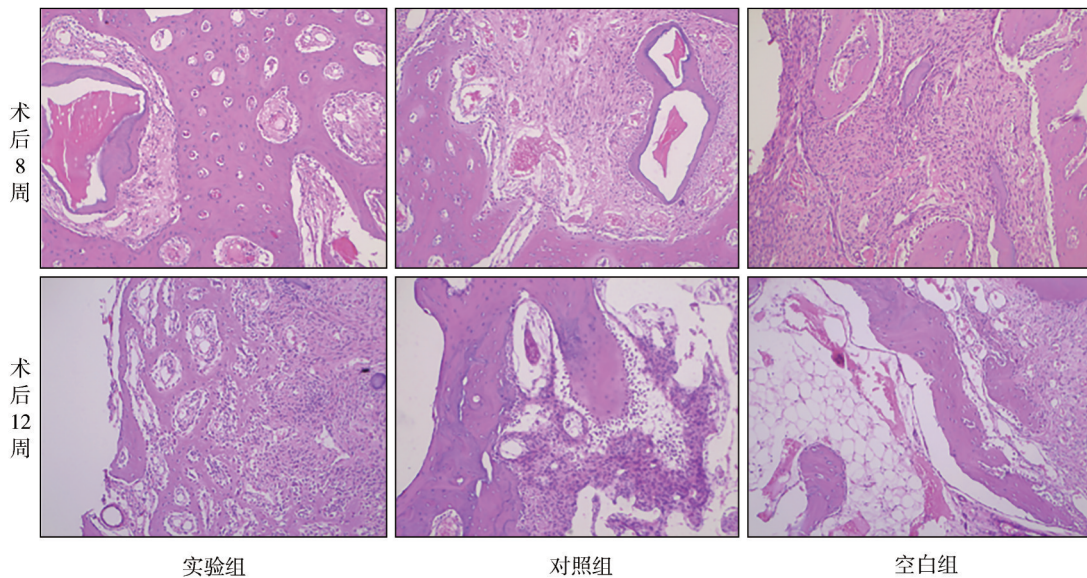


图 3 骨缺损区组织切片观察 HE × 10

Fig 3 Observation of tissue section of bone defect area HE × 10

### 3 讨论

近年来，引导骨再生的外科手术已经比较成熟，屏障膜材料的选择和使用是GBR的关键。Scantlebury<sup>[8]</sup>提出，应用于口腔中引导骨再生的膜材料应满足以下5个条件，即生物相容性、细胞阻挡性、维持骨生成空间、组织亲和性和临床上易

操作性。目前临床上应用较多的屏障膜材料是可吸收胶原膜，其有利于创口愈合和血管的再生，但是由于巨噬细胞和多形核白细胞的快速酶降解导致胶原膜的机械性能下降和屏障功能下降，屏障膜的过早降解可能会影响骨再生的结果，不利于较大骨缺损的临床应用<sup>[9-10]</sup>。现有的其他高分子可吸收屏障膜通常由合成聚合物组成，如聚丙烯交酯、聚己内酯，这些材料普遍存在机械强度差、

对空间维持能力欠缺、膜植入后易移位或塌陷等问题。以上屏蔽膜材料存在的问题可能是由于膜的降解速率过快,导致刚性不足有关,这类屏蔽膜通常需要额外的支撑,可能会限制新骨的形成。如何克服现有材料的缺点,研制出效果更佳的高分子可吸收材料膜是该领域的发展趋势和亟待解决的问题。

PLA因其具有较好的生物相容性、生物降解性、机械强度以及可加工塑形的特点,被广泛用于生物医学领域,如药物递送、植入物、缝合和组织工程等<sup>[2]</sup>。Annunziata等<sup>[11]</sup>肯定了PDLLA材料的理化及生物学特性,并初步应用到引导骨再生技术中,展现了PDLLA膜操作简单、无恢复期、良好的可塑性和软组织反应等特点,但现有的临床数据较少。PLA的一些材料特性,如刚性、渗透性、结晶度、热稳定性、疏水性/亲水性等,可以通过共聚、共混和生产聚合物复合材料等工艺得到改善,使其适合于牙科或骨科植入物的潜在用途<sup>[12]</sup>。本研究中实验组使用的新型PLA膜即是由PLA的两种不同构型PDLLA和PLLA共聚而成。廖凯荣等<sup>[13]</sup>对PDLLA/PLLA共聚物的力学性能及体外降解特性进行了研究,结果显示共聚物有较高力学强度,且由于共聚物的总结晶度降低,其降解速度相比于PLLA增大,说明共聚物的生物相容性更好。除此之外,有研究<sup>[14-15]</sup>显示通过调节PDLLA和PLLA两种材料的比例和控制其结晶度,使其前期具有较好的完整性,为骨缺损部位提供机械支持、为成骨及破骨细胞等提供附着位点,在治疗的后期,材料的降解速率与骨组织的修复速率相匹配,有效减少了对骨愈合过程的干预。本研究所使用的新型PLA膜相比较于传统屏障膜拥有较好的可塑性,能够使其更好地适应牙槽骨缺损,从而有助于形成再生骨的轮廓外形。此外,新型PLA膜具有一定的机械强度,能够承受一定的外力和压力,不易破裂或变形。壳样塑形能够为再生骨组织提供支撑和保护作用,防止其移位或受损,即使在软组织或者机械力的压迫下,新型PLA膜依然为预期的骨再生提供合适的空间,促进组织的愈合和修复。

本研究以目前临床常用的Guidor可吸收膜作为对照,探究PDLLA/PLLA膜在引导骨组织再生中的效果。Guidor可吸收膜的主要成分也是PLA,其膜屏障功能至少维持6周,降解产物不影响组织愈合与再生,具有良好的韧性和贴服性,广泛应

用于GBR手术<sup>[16]</sup>。结果显示,手术后8周Guidor可吸收膜已经完全降解,而PDLLA/PLLA膜仅边缘略有吸收,12周骨缺损区基本愈合时PDLLA/PLLA膜中心部分仍完好,也未引起实验动物出现炎症反应,提示PDLLA/PLLA膜降解速度相对更慢,能在缺损区愈合过程中提供良好的支撑屏蔽和成骨空间而不引起炎症反应,安全性较好。Micro-CT三维重建结果显示,手术后8周和12周,实验组动物和对照组动物缺损区域新生骨多于空白组,骨微观参数BV/TV、BMD和Tb.N明显高于空白组,证明PLA膜能促进下颌骨骨缺损愈合。手术后8周,实验组动物新生骨BV/TV、BMD高于对照组动物,且随着时间推移至手术后12周时,实验组动物和对照组动物新生骨的成骨量有显著性的增加,提示PLA膜有明显的刺激成骨作用,有利于促进骨创愈合。手术后12周时两组BV/TV、BMD和Tb.N无显著差异,提示PDLLA/PLLA膜的促进骨创愈合效果与目前临床广泛应用的Guidor可吸收膜相当。组织学HE染色观察到,手术后8周、12周实验组动物缺损区新生骨小梁周围细胞多于空白组动物,且实验组动物缺损区观察到血管生成,提示PDLLA/PLLA膜具有良好的促成骨细胞、破骨细胞和血管生成的作用。但同时,HE染色也观察到在12周时,实验组动物缺损区中央仍能見到少量未降解完全的PDLLA/PLLA膜材料,其降解速率比预期稍慢,因此需要做进一步调整,如调整PDLLA和PLLA混合比例或加入改性剂等。同时,相比于Guidor膜,PDLLA/PLLA膜具有更好的可塑性,方便根据骨缺损出情况进行塑形,使之与骨缺损处更加贴合。

需要指出的是,PLA膜的成骨机制是主要是骨传导作用,一般认为可降解生物材料其本身结构或降解产物所产生的骨诱导效果微乎其微,主要起骨诱导作用的是生长因子、激素和药物。因此,以PLA膜为载体应用于GBR手术的效果值得研究。总的说来,本研究对可降解新型PDLLA/PLLA膜进行了初步动物体内实验研究,证实该材料具备良好的生物相容性和骨传导性,维持了骨缺损空间,促进了骨缺损修复,但作为膜材料用于临床还有待进一步研究。

综上所述,PDLLA/PLLA膜呈现出了良好的生物相容性和骨传导性,是一种良好的屏障膜材料,具有临床应用前景。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

## 4 参考文献

- [1] Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, et al. Polymeric membranes for guided bone regeneration[J]. *Bio-technol J*, 2011, 6(10): 1187-1197.
- [2] Singhvi MS, Zinjarde SS, Gokhale DV. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications[J]. *J Appl Microbiol*, 2019, 127(6): 1612-1626.
- [3] de França JOC, da Silva Valadares D, Paiva MF, et al. Polymers based on PLA from synthesis using D, L-lactic acid (or racemic lactide) and some biomedical applications: a short review[J]. *Polymers (Basel)*, 2022, 14(12): 2317.
- [4] Ilyas RA, Sapuan SM, Harussani MM, et al. Polylactic acid (PLA) biocomposite: processing, additive manufacturing and advanced applications[J]. *Polymers (Basel)*, 2021, 13(8): 1326.
- [5] Zaaba NF, Jaafar M. A review on degradation mechanisms of polylactic acid: hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation[J]. *Polym Eng Sci*, 2020, 60(9): 2061-2075.
- [6] Annunziata M, Nastri L, Borgonovo A, et al. Poly-D-L-lactic acid membranes for bone regeneration [J]. *J Craniofac Surg*, 2015, 26(5): 1691-1696.
- [7] Yan WJ, Yang FH, Liu ZN, et al. Anti-inflammatory and mineralization effects of an ASP/PLGA-ASP/ACP/PLLA-PLGA composite membrane as a dental pulp capping agent[J]. *J Funct Biomater*, 2022, 13(3): 106.
- [8] Scantlebury TV. 1982-1992: a decade of technology development for guided tissue regeneration[J]. *J Periodontol*, 1993, 64(Suppl 11S): 1129-1137.
- [9] Stoecklin-Wasmer C, Rutjes AWS, da Costa BR, et al. Absorbable collagen membranes for periodontal regeneration[J]. *J Dent Res*, 2013, 92(9): 773-781.
- [10] Ramires GAD, Helena JT, Oliveira JCS, et al. Evaluation of guided bone regeneration in critical defects using bovine and porcine collagen membranes: histomorphometric and immunohistochemical analyses[J]. *Int J Biomater*, 2021, 2021: 8828194.
- [11] Annunziata M, Nastri L, Cecoro G, et al. The use of poly-D, L-lactic acid (PDLA) devices for bone augmentation techniques: a systematic review[J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2214.
- [12] Castro-Aguirre E, Iñiguez-Franco F, Samsudin H, et al. Poly(lactic acid)-mass production, processing, industrial applications, and end of life[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 107: 333-366.
- [13] 廖凯荣, 全大萍, 高建文, 等. PLLA/PDLA 共混物的力学性能及体外降解特性研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2002, 41(1): 51-54.
- Liao KR, Quan DP, Gao JW, et al. The mechanical properties and degradation behavior *in vitro* of PLLA/PDLA blends[J]. *Acta Sci Natur Univ Sunyatseni*, 2002, 41(1): 51-54.
- [14] 徐高祥, 张鲁鲁, 高华丽, 等. 不同比例 PLLA/PDLA/5% HA 复合物体外降解性能的研究[J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(6): 1067-1071.
- Xu GX, Zhang LL, Gao LH, et al. Study on *in vitro* degradation performance of PLLA/PDLA/5% HA complex with different proportions[J]. *Chin J Lab Diagn*, 2017, 21(6): 1067-1071.
- [15] Sitompul JP, Setyawan D, Nabila AG, et al. Synthesis of nanocomposite materials for biodegradable food packaging[J]. *J Oil Palm Res*, 2019, 2(1): 33-45.
- [16] Friedmann A, Stavropoulos A, Bilhan H. GTR treatment in furcation grade II periodontal defects with the recently reintroduced guidor PLA matrix barrier: a case series with chronological step-by-step illustrations[J]. *Case Rep Dent*, 2020, 2020: 8856049.

( 本文编辑 王姝 )