

载布地奈德可降解复合止血绵的生物学性能研究

王卢莎, 黄婷婷, 孙秀娟, 张秀强, 裘奇阳, 徐明

【摘要】目的 探究载布地奈德壳聚糖可降解止血绵(复合绵)的生物安全性、相容性及疗效。**方法** 将36只SD大鼠随机分为复合绵组、纳吸绵组和对照组,各12只。无菌开放上颌窦,分别植入复合绵、纳吸绵及不植入任何异物,2周后取心脏血及鼻窦黏膜组织。行苏木素-伊红染色观察各组大鼠黏膜组织,采用酶联免疫吸附实验及色谱法检测各组大鼠血清、黏膜内炎症因子的表达量及布地奈德浓度。**结果** 3组大鼠鼻窦黏膜稍有炎症细胞浸润及黏膜下腺体增生,其中复合绵组炎症细胞浸润及黏膜下腺体增生程度好于其他两组。复合绵组大鼠血清、鼻窦黏膜内白介素(IL)-5、IL-8、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等表达均低于纳吸绵组和对照组(均 $P < 0.05$),而3组皮质醇浓度没有明显改变。复合绵组大鼠术后不同检测时间血浆内布地奈德浓度都处于低水平。**结论** 复合绵性能优良,具有良好生物相容性及安全性,或可成为临床鼻窦术后填塞止血、抗炎的生物海绵。

【关键词】 慢性鼻窦炎;载药可降解止血绵;炎症因子;生物相容性;安全性

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.09.005

【中图分类号】 R765.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)09-1135-05

The properties investigation of a biodegradable budesonide-loaded haemostatic compound sponge

WANG Lusha, HUANG Tingting, SUN Xiujuan, ZHANG Xiuqiang, QIU Qiyang, XU Ming (The First Affiliated Hospital of Ningbo University, Ningbo 315010, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To explore the safety and efficacy of a biodegradable budesonide-loaded sponge. **Methods**

Thirty-six adult male rats were randomly divided into compound sponge group, nasopore group and control group with twelve rats in each group. The maxillary sinus was drilled and implanted with nasopore (nasopore group), compound sponge (compound sponge group), and the control group was not implanted with any foreign body. Collecting their heart blood and sinus mucosa after two weeks. The pathological reaction of mucosa was observed by hematoxylin-eosin staining. Inflammatory factors were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The concentrations of budesonide was calculated by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Results** Slight inflammatory cell infiltration and submucosal gland hyperplasia were found in the sinus mucosa of all three groups, the degree of inflammatory cell infiltration and submucosal gland hyperplasia in the compound sponge group were better than those in the other two groups. The expression of interleukin-5 (IL-5), IL-8 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum, sinus mucosa in compound sponge group were significantly lower than those in the other two groups (all $P < 0.05$), and there was no significant change in cortisol concentration. The concentration of budesonide in plasma of rats in the compound group was in low level range at different detection time. **Conclusions** The biodegradable budesonide-loaded sponge demonstrates its safety and efficacy, and it can be used as a biological sponge for clinical sinus post-operative tamponade, hemostasis and anti-inflammatory.

【Key words】 Chronic rhinosinusitis; Drug-loaded haemostatic sponge; Inflammatory factors; Biocompatibility; Safety

[Modern Practical Medicine, 2024, 36(9): 1135-1139]

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2021PY069);宁波市科技计划项目(2023S020)

作者单位: 315010 宁波, 宁波大学附属第一医院(王卢莎、黄婷婷、孙秀娟、张秀强、裘奇阳);宁波市中医院(徐明)

通信作者: 徐明, Email: fyxuming@nbu.edu.cn

慢性鼻窦炎(chronic rhinosinusitis, CRS)是一种鼻窦黏膜的慢性炎症性疾病。在我国, CRS 的患病率约为 8%, 给社会带来了巨大的经济负担^[1]。鼻内镜鼻窦手术(endoscopic sinus surgery, ESS)是治疗 CRS 主要的手术方式, 但术后常伴有鼻出血, 鼻腔粘连、狭窄等并发症, 而鼻腔填塞是预防这些并发症的有效措施^[2]。目前有很多生物填充材料在 ESS 术后起到中鼻道结构的支持作用, 以及预防术后出血和促进创面愈合的作用, 但这些产品均不能改善黏膜炎症^[3]。壳聚糖(CS)及透明质酸钠(SH)是天然可降解高分子材料, 具有良好的生物相容性, 常作为载药材料被使用; 而糖皮质激素具有强而多向性抗炎作用, 可促进鼻窦术后黏膜创面愈合^[4-11]。本研究组研发了一种以 CS 及 SH 为主要载体材料制备的含布地奈德(BUD)可降解止血绵(复合绵), 探究这种复合绵的生物安全性、相容性及疗效, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 主要试剂及仪器 环氧乙烷灭菌器(河南省三强医疗器械有限公司, 型号: SQ-H220), 日本岛津紫外分光光度计(日本岛津仪器有限公司, 型号: UV-2600), 恒温烘箱(上海一恒科学仪器有限公司, 型号: DHG-9030), CO₂ 恒温箱(赛默飞世尔科技公司, 型号: Heracell 150i), 酶标仪(无锡华卫德朗仪器有限公司, 型号: DR-3518G), 石蜡切片机(迪合光电科技有限公司, 型号: RM2235), 石蜡包埋机(迪合光电科技有限公司, 型号: EG1150)。白介素(IL)-1 β 检测试剂盒、IL-4 检测试剂盒、IL-5 检测试剂盒、IL-8 检测试剂盒、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、皮质醇(cortisol)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司); CCK-8 溶液、免疫染色固定液、免疫染色强力通透液、苏木素伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 无水乙醇(中国医药集团有限公司); 羧甲基壳聚糖、透明质酸钠、BUD 原药、泊洛沙姆(山东泰华生物科技有限公司)。

1.2 复合绵制备 取 1% 羧甲基纤维素溶液 120 ml, 加入 1.5 g 羧甲基 CS、0.5 g SH 搅拌均匀, 然后加入 15 mg BUD 原药和 0.5 g 泊洛沙姆 407 搅拌至 BUD 溶解, 接着加入戊二醛 0.15 g 持续搅拌 30 min, 最后倒入 4 cm \times 2 cm \times 1.5 cm (12 ml) 模具(每模具内含

BUD 1.5 mg)内, 冻干制成复合绵, 见图 1。

1.3 支架缓释药物实验 取复合绵(14.4 mg)装入透析袋内, 透析袋截留分子量为 14 000 Da。将透析袋置于 100 ml 的释放介质(pH 6.2, 磷酸盐缓冲液: 乙醇=80:20)中, 于 37.0 $^{\circ}$ C 慢速震荡下进行体外释放实验。在固定时间点取出 2 ml (并用相同体积释放介质替换), 采用紫外分光光度法, 在 248 nm 波长下测释放出的 BUD 含量。获得累积药物释放百分比随时间变化的曲线图, 以确定复合支架的体外药物释放情况。

1.4 细胞活力测定 取复合绵加成纤维细胞 L929 培养液 10 ml, 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱浸提 24 h 备用。在 96 孔板中每孔接种 100 μ l 细胞悬液。将培养板在 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO₂ 培养箱预培养 24 h。而后向培养板加入 10 μ l 浸提液, 培养箱中孵育 24 h。24 h 后向每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 再将培养板在培养箱内孵育 2 ~ 4 h。相同的实验方法测纳吸棉及无海绵对照实验, 用酶标仪测定孔板在 450 nm 处的吸光度, 且 96 孔板四周不放样品, 为空白孔板。相对细胞活力测定公式, 细胞活力(%)=AE/AN \times 100%, 其中 AN 为每组 0 h 的吸光度, AE 为每组 24 h 及 48 h 的吸光度。

1.5 动物实验 取 SPF 级体质量 300 ~ 400 g 的雄性 SD 大鼠 36 只(由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 已通过扬州大学实验动物伦理委员会审查), 许可证编号: SYXK(苏)2022-0044。随机分为对照组($n=12$)、纳吸绵组($n=12$)及复合绵组($n=12$)。大鼠全身麻醉后鼻背消毒, 磨开骨质, 钻一个直径约 1.5 mm 的小孔, 暴露上颌窦, 尽量保留窦内黏膜。用眼科镊将 1 mm \times 1 mm \times 2 mm 的复合绵或纳吸绵分别塞入纳吸绵组及复合绵组上颌窦内, 对照组上颌窦内不放入任何东西, 随后缝合切口, 充分消毒。14 d 后心脏取血处死大鼠取鼻窦黏膜组织, 部分鼻窦黏膜组织采用 HE 染色法染色观察, 采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-8、TNF- α 和皮质醇。通过固相萃取法提取血浆样品, 采用反相高效液相色谱法计算复合绵组中 BUD 浓度。

1.6 统计方法 采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 多组比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复合绵体外药物缓释情况 药物从复合绵中缓释3 d后达到平衡,未出现药物爆发性释放,见图2。

2.2 细胞活性 纳吸绵组和复合绵组成纤维细胞0、24及48 h细胞活力差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),对照组与复合绵组成纤维细胞0、24及48 h细胞活力差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见图3。

2.3 动物实验

2.3.1 鼻窦黏膜组织病理观察 对照组、纳吸绵组上皮细胞肿胀,细胞核大,多处受损或解体,上皮下层和固有层中大量炎性细胞浸润,包括中性粒细胞,嗜酸性粒细胞和淋巴细胞,并伴有黏膜下腺体肥大;复合绵组鼻窦黏膜上皮组织结构规则,排列整齐,黏膜下层未发现明显炎性细胞浸润,偶见少量的杯状细胞,见图4。

2.3.2 血清及鼻窦黏膜组织中炎症因子情况 复合绵组大鼠血清中IL-5、IL-8、TNF- α 表达量均低于对照组和纳吸棉组(均 $P < 0.05$),3组IL-1 β 、IL-4、皮质醇表达量差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见图5。复合棉组大鼠鼻窦黏膜组织中IL-8、IL-5、TNF- α 、IL-4表达量均低于对照组和纳吸绵组(均 $P < 0.05$),3组皮质醇、IL-1 β 表达量差异均无统计学意义(均 P

> 0.05),见图6。

2.3.3 BUD药物代谢动力学实验 复合绵组大鼠术后不同检测时间点血浆内BUD浓度均处于低水平状态,见图7。术后14 d上颌窦黏膜内BUD浓度为(7 038.3 \pm 1 732.3)ng/g,高于200 ng/g的最低治疗量。

3 讨论

因鼻腔解剖结构鼻用激素喷剂难以喷到鼻窦各区域,由于鼻腔黏液纤毛传输系统的作用致使药物无法长期停留在鼻腔鼻窦黏膜表面,长期每日喷鼻导致患者依从性差等因素,导致药物治疗的疗效显著下降^[6]。因此,本研究探讨含BUD可降解止血绵在ESS术后填塞止血及局部抗炎作用。

本研究细胞实验显示复合绵及纳吸绵同样具有良好的促进细胞增殖能力,无细胞毒性。本研究动物实验观察到复合绵植入上颌窦后第14天时已基本降解,使用吸引器便可完全清除,这表明复合棉具有良好的生物降解能力。黏膜HE染色显示复合绵组鼻窦黏膜上皮组织结构规则,排列整齐,偶见少量杯状细胞,黏膜下层未见明显炎性细胞浸润;对照组和纳吸绵组鼻窦黏膜上皮肿胀,细胞核大,多发病灶或解体,鼻黏膜上皮下层及固有层可见大量中性粒



图1 复合绵成品图

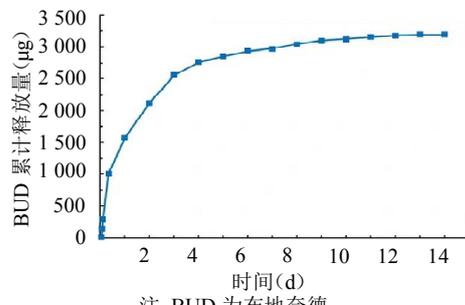


图2 复合绵内BUD体外缓释曲线图

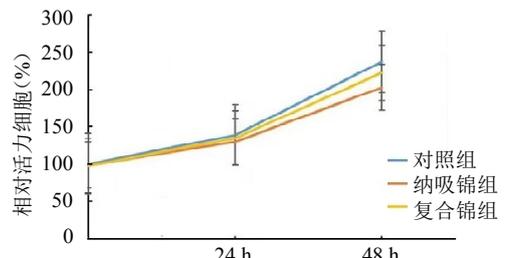
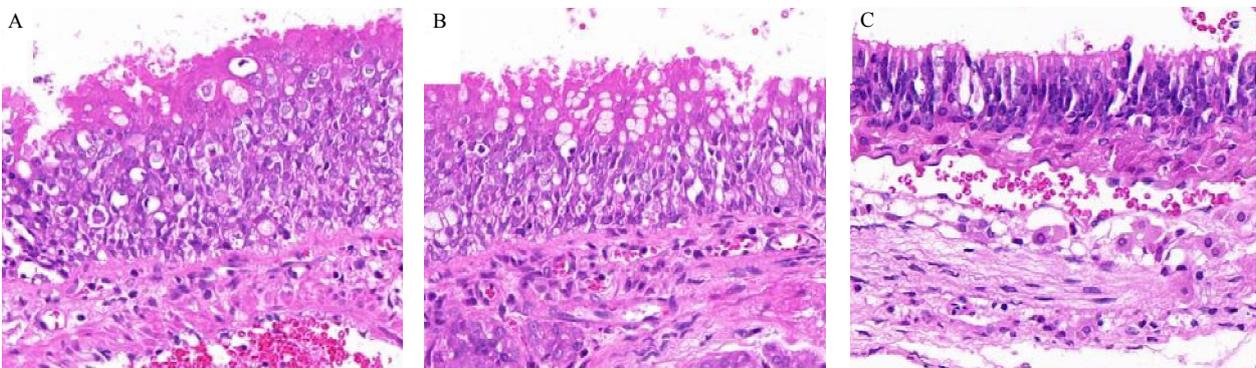
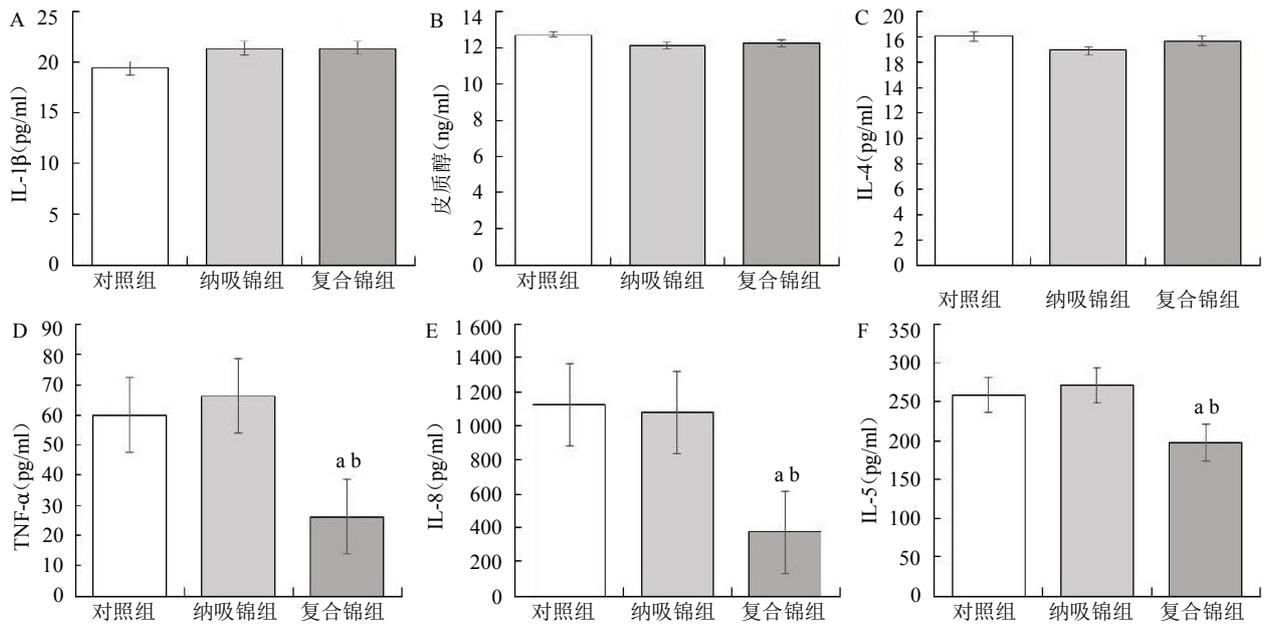


图3 复合绵组、纳吸绵组及对照组细胞活力图



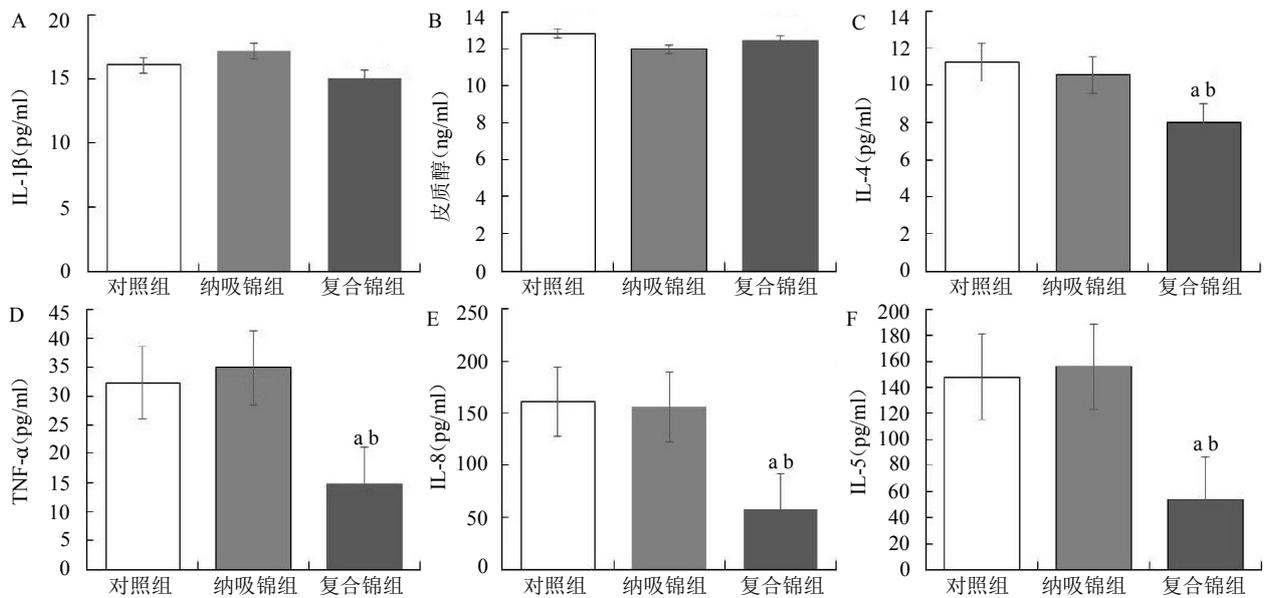
注:A为对照组,B为纳吸绵组,C为复合绵组

图4 鼻窦黏膜组织病理(HE染色, $\times 400$)



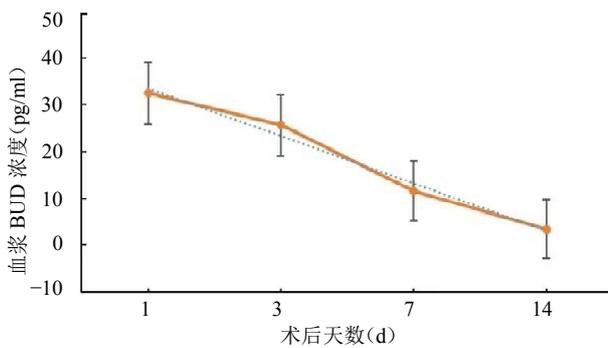
注: A 为 IL-1β 比较, B 为皮质醇比较, C 为 IL-4 比较, D 为 TNF-α 比较, E 为 IL-8 比较, F 为 IL-5 比较。IL 为白介素, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α。与对照组比较, aP < 0.05; 与纳吸锦组比较, bP < 0.05

图 5 3 组大鼠血清中炎症因子比较



注: A 为 IL-1β 比较, B 为皮质醇比较, C 为 IL-4 比较, D 为 TNF-α 比较, E 为 IL-8 比较, F 为 IL-5 比较。IL 为白介素, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α。与对照组比较, aP < 0.05; 与纳吸锦组比较, bP < 0.05

图 6 3 组大鼠鼻窦黏膜组织中炎症因子比较



注: BUD 为布地奈德

图 7 BUD 药物代谢动力学实验结果

细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润, 黏膜下腺体增生。这证明复合锦未对大鼠造成严重炎症反应。

CRS 的炎症反应状态与促炎细胞因子高表达水平有关, CRS 患者鼻窦黏膜中 IL-1β、IL-6、IL-5、IL-8 和 TNF-α 等因子水平都显著升高^[12]。炎性因子 IL-5 可调节各种炎症反应, 促进病原体的快速清除, 但它也参与慢性炎症的病理过程, 是 2 型嗜酸性粒细胞

炎症的关键介质^[13-14]。IL-8是一种促炎细胞因子,在嗜酸性粒细胞趋化中起重要作用^[15]。TNF- α 在细菌感染中起作用,但不参与抗原诱导的炎症反应。本研究结果显示,与纳吸绵组、对照组相比较,复合绵组大鼠血清及鼻窦黏膜组织内IL-8、IL-5、TNF- α 表达水平均明显下调(均 $P < 0.05$),IL-1 β 、IL-4表达量差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。这表明复合绵具有良好抗炎作用。在基线和随访时间点,血清皮质醇浓度均在正常范围内,这表明复合棉没有肾上腺抑制作用。

复合绵植入术后第1、3、7和14天时大鼠的血浆BUD浓度变化均在低浓度范围内,但术后第14天上颌窦黏膜内BUD浓度为(7 038.3 \pm 1 732.3)ng/g,显示在给药效果方面,复合绵能有效地将BUD局部递送到鼻窦黏膜组织。这提示复合绵具有良好的生物安全性。

综上所述,复合棉具有可靠的生物安全性、生物降解性和生物相容性,可用于临床鼻窦术后填塞。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 王卢莎、黄婷婷、孙秀娟:实验操作、论文撰写;王卢莎、裘奇阳:数据整理、统计学分析;徐明、张秀强、王卢莎:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] 姚银,曾明,刘争.慢性鼻窦炎伴鼻息肉的生物靶向治疗[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2022,57(2):231-236.
- [2] WANG T C, TAI C J, TSOU Y A, et al. Absorbable and nonabsorbable packing after functional endoscopic sinus surgery: Systematic review and meta-analysis of outcomes[J]. Eur Arch Oto Rhino Laryngol, 2015, 272(8): 1825-1831.
- [3] MASSEY C J, SUH J D, TESSEMA B, et al. Biomaterials in rhinology[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2016, 154(4): 606-617.
- [4] FOKKENS W J, LUND V J, HOPKINS C, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2020[J]. Rhinology, 2020, 58(Suppl S29): 1-464.
- [5] WANG C S, LOU H F, WANG X D, et al. Effect of budesonide transnasal nebulization in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 135(4): 922-929, e6.
- [6] 张罗.加强慢性鼻窦炎精准医疗的临床实践[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2019,54(3):161-165.
- [7] ZHANG Y, SUN T, JIANG C. Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering[J]. Acta Pharm Sin B, 2018, 8(1): 34-50.
- [8] 陈娜,谢铁民,张一凡,等.pH敏感壳聚糖与地塞米松磷酸钠纳米载药体系制备及炎症抑制作用[J].中国组织工程研究,2018,22(22):3550-3556.
- [9] WANG F, PANG Y, CHEN G, et al. Enhanced physical and biological properties of chitosan scaffold by silk proteins cross-linking[J]. Carbohydr Polym, 2020, 229: 115529.
- [10] SAVIETTO E, MARIONI G, MACULAN P, et al. Effectiveness of micronized nasal irrigations with hyaluronic acid/isotonic saline solution in non-polypoid chronic rhinosinusitis: A prospective, randomized, double-blind, controlled study[J]. Am J Otolaryngol, 2020, 41(4): 102502.
- [11] MONZANI D, MOLINARI G, GHERPELLI C, et al. Evaluation of performance and tolerability of nebulized hyaluronic acid nasal hypertonic solution in the treatment of chronic rhinosinusitis[J]. Am J Rhinol Allergy, 2020, 34(6): 725-733.
- [12] LENNARD C M, MANN E A, SUN L L, et al. Interleukin-1 beta, interleukin-5, interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in chronic sinusitis: Response to systemic corticosteroids[J]. Am J Rhinol, 2000, 14(6): 367-373.
- [13] DOUGAN M, DRANOFF G, DOUGAN S K. GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of cytokines: Regulators of inflammation[J]. Immunity, 2019, 50(4): 796-811.
- [14] AVDEEVA K, FOKKENS W. Precision medicine in chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2018, 18(4): 25.
- [15] KLEINJAN A, DIJKSTRA M D, BOKS S S, et al. Increase in IL-8, IL-10, IL-13, and RANTES mRNA levels (in situ hybridization) in the nasal mucosa after nasal allergen provocation[J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 103(3 Pt 1): 441-450.

收稿日期:2024-04-28
(本文编辑:孙海儿)