·临床研究·

含有糖皮质激素的聚碳酸丁二醇酯鼓膜支架的制备、表征和生物相容性研究

严降雨，吴淋蓉，崔翔，张小琴，沈志森，张军军

【摘要】目的　制备含有地塞米松（DXM）和倍他米松（BTM）的聚碳酸丁二醇酯（PBC）鼓膜支架，并对其进行物理性能表征和生物相容性研究。**方法**　制备纯 PBC、DXM-PBC 和 BTM-PBC 3 组支架，通过扫描电子显微镜（SEM）观察各组支架的微形态，采用傅里叶变换红外光谱仪对各组 PBC 支架进行官能团测定，用接触角测量仪测量各组支架表面的水接触角。通过细胞毒性试验检测各组支架对细胞的毒性，利用溶血试验检测各组支架的溶血率。**结果**　成功制备出含有 DXM 和 BTM 的鼓膜支架，在 PBC 中加入激素后未产生新的化学结构，其亲疏水性未发生明显改变。各组 PBC 支架的细胞毒性较低，其溶血率均在 5%以下。**结论**　含有糖皮质激素的 PBC 鼓膜支架经检测后发现具有良好的物理性能和生物相容性，这为后续的进一步研究奠定了基础。

【关键词】　慢性中耳炎；鼓膜穿孔；倍他米松；地塞米松

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.04.009

【中图分类号】　R318.08　**【文献标志码】**　A　　**【文章编号】**　1671-0800(2024)04-0455-04

鼓膜是中耳的保护屏障，鼓膜穿孔后如不能及时愈合，外界细菌就会侵入中耳引发反复感染导致慢性中耳炎（COM）[1]。COM 会引发一系列严重或危及生命的并发症，如乳突炎、胆脂瘤、面神经麻痹、迷路炎、脑膜炎、血栓性静脉炎和脑脓肿等[2]。鼓膜修补手术是 COM 最主要的治疗手段[3-4]。在鼓膜修补手术中，需要用到修补材料作为支架，穿孔周围的上皮细胞会沿着支架爬行迁移，最终使鼓膜愈合[5]。目前最常用的修补材料是自体颞肌筋膜和软骨片，但是这些在获取时需要额外做手术切口，对患者造成一定创伤，而且取材十分有限，因此有必要研发人工鼓膜支架来替代自体材料。

目前一些新兴的聚合物材料，如聚乳酸[6]、聚乙二醇酸和聚己内酯[7-8]等，因具有良好的生物相容性，已用于鼓膜支架的研究。脂肪族聚碳酸酯因其为可生物降解聚合物而受到越来越多的关注。聚碳酸丁二醇酯（PBC）是一种由二氧化碳等原料合成的可降解脂肪族聚碳酸酯，具有生物降解性能好、重量轻、机械性能好、热塑性好及无污染等优点[9]。鼓膜修补术后会建议患者使用含有糖皮质激素的滴耳液，如地塞米松（DXM）、倍他米松（BTM）等，其作用于鼓膜和中耳可减轻局部炎症和肿胀，促进鼓膜的愈合。本研究初步制备含有 DXM 和 BTM 的 PBC 鼓膜支架，并对其进行物理性能表征和生物相容性研究，为开发一种新型的鼓膜修补材料提供一定的理论依据，现报道如下。

1　资料与方法

1.1　材料及仪器

1.1.1　材料　DXM（CAS：50-02-2，≥98%，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）、BTM（CAS：378-44-9，≥98%，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）。PBC 原料（中国科学院宁波材料技术与工程研究所），CCK8 试剂盒（eBioscience，美国），大鼠红细胞悬浮液（SBJ-RBC-RAT003 4%，南京森贝伽生物科技有限公司）。

1.1.2　仪器　扫描电子显微镜（SEM）（S-4800，日本日立），傅里叶变换红外光谱仪（cary600，美国安捷伦），接触角测量仪（OCA25，德国德飞），多功能酶标仪（Evolution200，美国赛默飞），细胞培养箱（C170i，德国艾本德），离心机（Micro17，美国赛默飞）。

基金项目：　宁波市临床医学研究中心（2022L005）；浙江省医药卫生科技计划项目（2024KY1481）

作者单位：　315040 宁波，宁波市医疗中心李惠利医院（宁波大学附属李惠利医院）（严降雨、吴淋蓉、崔翔、沈志森）；中国科学院宁波材料技术与工程研究院（张小琴）；宁波市鄞州区第二医院（张军军）

通信作者：　张军军，Email：604988147@qq.com

Modern Practical Medicine, April 2024, Vol.36, No.4

1.2 方法

1.2.1 激素支架的初步制备 取一定量的 PBC 原料，共制备 3 组 PBC 鼓膜支架，纯 PBC 组，PBC 原料中加入 DXM（最终 DXM 浓度为 1.6 wt%）为 DXM-PBC 组，PBC 原料中加入 BTM（最终 BTM 浓度为 1.3 wt%）为 BTM-PBC 组，分别溶解在三氯甲烷中，磁力搅拌 24 h，充分混合后将溶液倒入长 10 cm、宽 6 cm、深 5 mm 的聚四氟乙烯模具中，等三氯甲烷挥发后成膜并干燥 48 h，最后制备成厚度约 100 μm 的薄膜。

1.2.2 形态表征 在 25 ℃室温和 50%相对湿度下，将 PBC 膜切割成 0.5 cm×0.5 cm 的正方形，喷金后用 SEM 观察。以 2 000 倍拍摄各组 PBC 支架的微形态。

1.2.3 傅里叶变换红外光谱 采用傅里叶变换红外光谱仪对 PBC 支架进行官能团测定，测试光谱范围为 4 000 ～ 400 cm^{-1}。

1.2.4 水接触角测量 采用接触角测量仪通过坐滴法测量 PBC 支架表面的水接触角。在室温下，将样品切成小片并用双面胶带黏贴放置在载玻片上，将去离子水（2 μl）滴在样品表面测量角度。

1.2.5 细胞毒性检测 将各组灭菌后支架剪成直径为 14 mm 的圆片放在 24 孔板上，加入细胞培养基后在细胞培养箱中预培养过夜。次日更换孔内培养基，并将生长状态良好的人成纤维细胞分别接种在各组支架上，在细胞培养箱中培养 3 d。待细胞贴壁生长后，每隔 24 h 检测细胞活力。另外设置一个对照组，在对照组中不加入 PBC 材料。本实验采用 CCK8 试剂盒检测细胞活力。在指定时间点（1、2、3 d）将每孔的原培养基去掉后，用磷酸盐缓冲液润洗 2 次，随后每孔加入 10 μl 的 CCK8 工作液，在细胞培养箱中孵育 1 h。孵育完成后，从细胞培养箱中取出 24 孔板，轻轻摇晃孔板使孔内液体显色均匀，然后吸出孔内液体至 96 孔板中，并用多功能酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度。

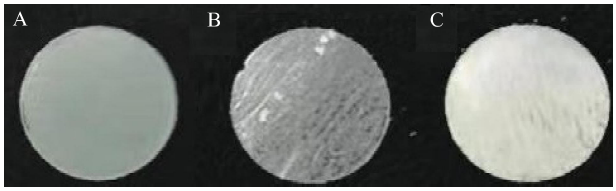
1.2.6 溶血实验 取 4%大鼠红细胞悬浮液和直径为 6 mm 的圆形样品薄膜放入 1.5 ml 离心管中，然后在 37 ℃恒温细胞培养箱中培养 4 h。孵化后，在离心机中以 2 000 r/min 的转速下离心 15 min，取适量上清液于 96 孔板，用多功能酶标仪测定其在 545 nm 波长的 OD 值。运用如下公式计算溶血率，溶血率（%）=（$OD_{样品}$ − $OD_{阴性}$）/（$OD_{阳性}$ − $OD_{阴性}$）×100%，其中阳性样品为 1%TritonX-100，阴性样品仅含红细胞和 0.9%氯化钠注射液。

2 结果

2.1 不同类型 PBC 支架的制备 初步制备纯 PBC 组支架、DXM-PBC 组支架和 BTM-PBC 组支架，纯 PBC 组支架表面较光滑，见图 1。

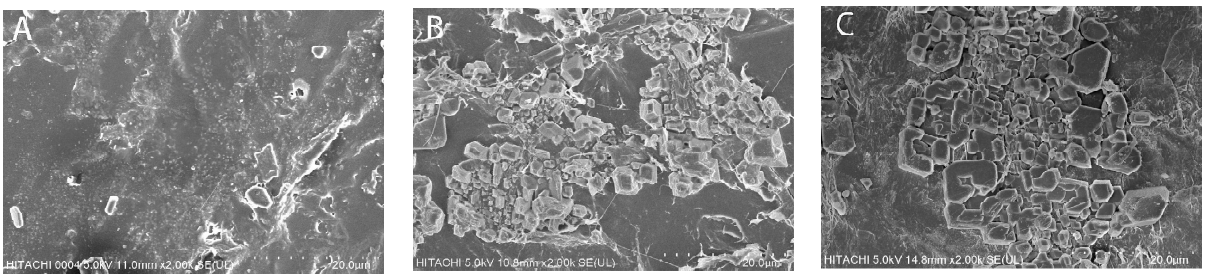
2.2 形态表征 纯 PBC 组 SEM 图像显示支架表面光滑局部略有颗粒感，考虑可能是杂质，见图 2A。在加入激素后，SEM 观察到 DXM 和 BTM 以块状晶体颗粒的形态存在于 PBC 支架上，颗粒大小不等，见图 2B 和 2C。

2.3 红外光谱 在 790 和 900 cm^{-1} 处的伸缩振动分别属于 C-O 键和 C-H 键，1 226 cm^{-1} 处的伸缩振动属于 C-O 或 C-C 键。在 1 403 cm^{-1} 处是 C-O 或 C-C 伸缩振动，1 700 cm^{-1} 处通常与 C=O 键的伸缩



注：A 为纯聚碳酸丁二醇酯（PBC）组支架，B 为地塞米松-PBC 组支架，C 为倍他米松-PBC 组支架

图 1 各组 PBC 支架裁剪成直径 6 mm 的圆形图（×2 000）



注：A 为纯聚碳酸丁二醇酯（PBC）支架，B 为地塞米松-PBC 支架，C 为倍他米松-PBC 支架

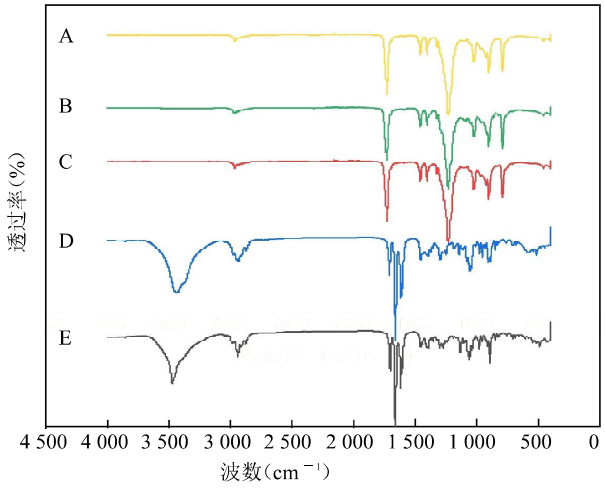
图 2 各组 PBC 支架的电子显微镜图像（×2 000）

振动相关，这是 PBC 比较重要的特征峰。在 3 000 ～ 2 750 cm^{-1} 处可观测到 O-H 伸缩振动波。在 3 500 cm^{-1} 附近的峰值主要是由 N-H 和 O-H 的伸缩振动叠加引起。3 种 PBC 支架的红外光谱条曲线几乎相同，见图 3。

2.4　水接触角测量　纯 PBC 组支架接触角为（101.69±0.37）°，见图 4A；DXM-PBC 组支架为（102.73±0.28）°，见图 4B；BTM-PBC 组支架为（99.48±0.67）°，见图 4C；均为疏水性材料。

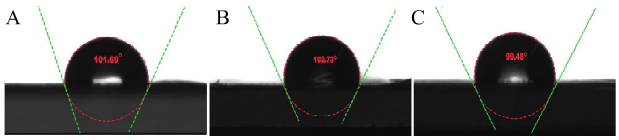
2.5　细胞毒性试验　与支架共培养第 1 天各组细胞 OD 值相近，细胞活力良好。随着培养时间的延长，各组的 OD 值不断增加，见图 5。

2.6　溶血实验　3 组支架的溶血率均在 5%以下，见图 6。



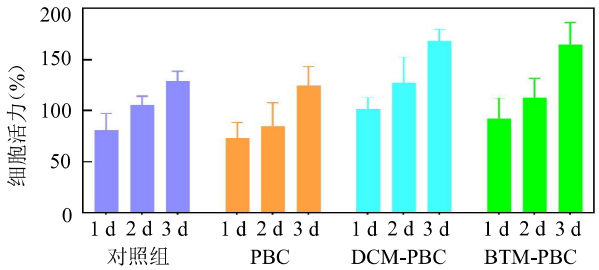
注：A 为纯聚碳酸丁二醇酯（PBC）支架，B 为地塞米松（DXM）-PBC 组支架，C 为倍他米松（BTM）-PBC 组支架，D 为 BTM，E 为 DXM

图 3　各组材料的红外光谱



注：A 为纯聚碳酸丁二醇酯（PBC）组支架，B 为地塞米松-PBC 组支架，C 为倍他米松-PBC 组支架

图 4　各组支架的水接触角测量值



注：PBC 为纯聚碳酸丁二醇酯，DXM 为地塞米松，BTM 为倍他米松

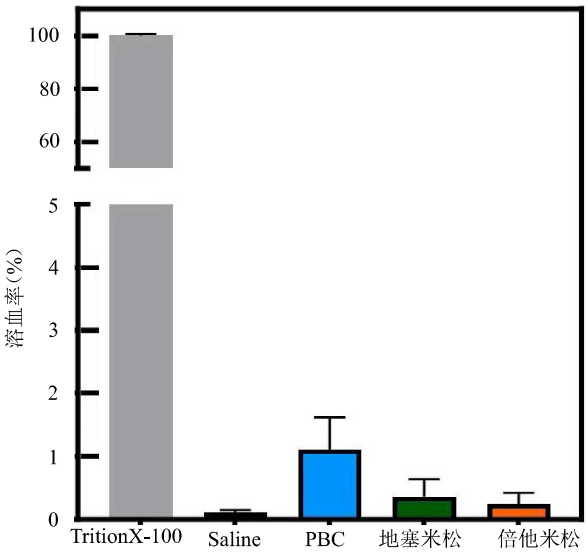
图 5　各组成纤维细胞的细胞活力测试结果

3　讨论

人类鼓膜的厚度在 0.1 ～ 0.2 mm，这种厚度使鼓膜容易振动，能够更高效地将声波传递至内耳[10]。鼓膜支架也应该相对较薄，这样可以更好地与残余鼓膜贴合，减少声波的损失。在鼓膜修补操作过程中鼓膜支架不可避免会触碰到听骨链，薄的鼓膜支架质量也相对较轻，可以减少对听骨的振动。本研究制备的 PBC 支架厚度约为 0.1 mm，符合用作鼓膜支架的要求。

有研究报道鼓膜修补术后局部使用抗生素和类固醇滴剂有利于鼓膜愈合[11]。局部使用糖皮质激素可以减轻手术后鼓膜区域及中耳黏膜的炎症反应，促进组织愈合和修复，加速鼓膜损伤部位的愈合，提高手术成功率。另一研究表明，明胶海绵与皮质类固醇结合可减少中耳纤维化[12]。本研究在鼓膜支架中混合一定量的 DXM 和 BTM，以期也能达到抗炎和促进愈合的作用。在 SEM 上可以观察到激素以晶体的形式附着在 PBC 膜上。在本研究中，DXM-PBC 组支架中 DXM 的浓度为 1.6 wt%，BTM-PBC 组支架中 BTM 的浓度为 1.3 wt%，但对于激素混合的比例目前尚处于研究中，需要细胞和动物实验进一步论证。

红外光谱分析表明 PBC 加入激素后未产生明显新的化学结构，这意味着在制备激素 PBC 复合支架过程中，激素和 PBC 材料并未发生显著化学反应，或者说没有形成新的化合物。这表明激素 PBC 支



注：PBC 为纯聚碳酸丁二醇酯，Saline 为 0.9%氯化钠注射液

图 6　各组 PBC 支架的溶血率

架中的激素和PBC材料仍然保持着各自的特性，发挥各自作用。此外，DXM-PBC组支架和BTM-PBC组支架中没有检测到DXM和BTM的特征峰，这也可能是由于含量低，以致特征峰无法检测到。

水接触角测试表明添加DXM及BTM后，支架仍是疏水性材料。研究表明疏水性材料可用作支持细胞生长和组织再生的材料[13]。这些材料提供了良好的生物相容性和机械性能，同时控制细胞行为，有助于组织修复和再生。疏水性支架不易被液体侵蚀，可以保持支架的形状和稳定性，减少支架在穿孔愈合过程中发生形变。此外，支架表面不易润湿还可以减少细菌附着和繁殖，降低感染风险。

鼓膜支架应当有良好的细胞相容性，人成纤维细胞是鼓膜再生过程中最重要的细胞。本研究结果显示成纤维细胞随着与支架共培养时间的延长，各组OD值均不断增大，这表明细胞在各支架上均具有较高的细胞活力和较强的增殖能力，证实PBC支架材料无细胞毒性。一定浓度的糖皮质激素可能会抑制细胞的增殖，导致细胞周期阻滞，减缓细胞的增殖速率[14]。本研究表明实验组的激素浓度并未对细胞的增殖产生影响。

溶血试验在评估血液相容性方面很有价值。当红细胞遇到水或外来物质时，由于渗透压力，它们可以溶解并释放血红蛋白等生物分子，受损的红细胞会吸引血小板，加速凝血，阻碍组织再生。理想的生物材料应保持红细胞完整性，避免在组织愈合的同时引发凝血。本研究各组支架的溶血率不到5%，远远低于阳性对照组，表现出良好的血液相容性。

综上所述，PBC材料具有可降解、无毒及生物相容性好等优点。本研究将糖皮质激素与PBC混合制备成鼓膜支架，以期在鼓膜修补中既能起到支撑作用，又能在术后起到抗炎的作用，从而促进鼓膜的修复和愈合。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 严降雨、吴淋蓉：实验操作、论文撰写；崔翔、张小琴、张军军：数据整理、统计学分析；沈志森：经费支持

参 考 文 献

[1] 王冰,舒易来,陈兵.鼓膜修补材料的研究进展[J].听力学及言语疾病杂志, 2020,28(3):339-342.

[2] THAI A, AARON K A, KAUFMAN A C, et al. Long-term health utilization and outcomes in chronic suppurative otitis media[J]. Otolaryngol Head Neck Surg,167(2):341-349.

[3] CAYE-THOMASEN P, NIELSEN T R, TOS M. Bilateral myringoplasty in chronic otitis media[J]. Laryngoscope,2007,117(5):903-906.

[4] ONAL K, ARSLANOGLU S, SONGU M, et al. Functional results of temporalis fascia versus cartilage tympanoplasty in patients with bilateral chronic otitis media[J]. J Laryngol Otol,2012,126(1):22-25.

[5] 方振,赵海亮.人工鼓膜修补材料的新进展[J].医学综述,2017,23(10):1950-1953.

[6] LHAN E, ULAG S, SAHIN A, et al. Fabrication of tissue-engineered tympanic membrane patches using 3D-Printing technology[J].J Mech Behav Biomed Mater,2021,114:104219.

[7] YAMANAKA T, SAWAI Y, HOSOI H. A new supporting material for fascia grafting during myringoplasty: polyglycolic acid sheets [J]. Otolaryngol Head Neck Surg,2013,149(2):342-344.

[8] BENECKE L, CHEN Z, ZEIDLER-RENTZSCH I, et al. Development of electrospun, biomimetic tympanic membrane implants with tunable mechanical and oscillatory properties for myringoplasty[J]. Biomater Sci,2022,10(9):2287-2301.

[9] FENG J, LI J, FENG J, et al. Synthesis of aliphatic polycarbonates from diphenyl carbonate and diols over zinc (II) acetylacetonate[J]. Molecules,2022,27(24):8958.

[10] ZHOU Q, JIN L, SONG X, et al. Endoscopic type 1 tympanoplasty: comparison of the effects of three different thicknesses grafts[J]. Acta Otolaryngol,2022,142(5):375-380.

[11] STARKWEATHER A, FRIEDIAN R A. Effect of ciprodex on graft healing in tympanoplasty[J]. Adv Ther,2007,24(2):427-435.

[12] BARATI B, GHAZIZADEH M, MEHRPARVAR G. Effect of local estrogen on repairing tympanic membrane perforation[J]. Iran J Otorhinolaryngol,2020,32(113):337-342.

[13] PENG X, LI Y, LI T, et al. Coacervate-derived hydrogel with effective water repulsion and robust underwater bioadhesion promotes wound healing[J]. Adv Sci(Weinh),2022,9(31): e2203890.

[14] KIM S, YANG S, KIM J, et al. Glucocorticoid receptor down-regulation affects neural stem cell proliferation and hippocampal neurogenesis[J]. Mol Neurobiol,2023,21(3):25-32.

收稿日期：2023-12-25

（本文编辑：陈志翔）