

# 作为细胞微载体的明胶基缓释微球的制备

王忆娟<sup>1</sup>, 刘守信<sup>1</sup>, 房喻<sup>1</sup>, 黄沙<sup>2</sup>, 金岩<sup>2</sup>, 姜宇<sup>1</sup>

(1. 应用表面与胶体化学教育部重点实验室, 陕西师范大学化学与材料科学学院, 西安 710062;

2. 第四军医大学口腔医学院组织工程中心, 西安 710032)

**摘要** 用改良的乳化冷凝法制备载牛血清蛋白(BSA)的大粒径明胶微球. 结果表明, 明胶水溶液的质量分数为25%、水相与油相体积比3:20、搅拌速度300 r/min、交联剂用0.1 mL质量分数为25%的戊二醛、表面活性剂用0.1 g span-80为制备平均直径约250 μm明胶微球的理想条件. 所制备微球的后处理方法不同, 则明胶微球的表面形貌也不同, 细胞粘附率不同. 空白明胶微球在体外可以完全降解, 载BSA的明胶微球对BSA具有良好的缓释性, 释放时间可长达30 d. 显微镜观察成纤维细胞在明胶微载体上生长良好.

**关键词** 明胶微球; 成纤维细胞; 缓释; 微载体

**中图分类号** O631; O636

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2007)09-1776-05

组织工程的核心是构建与细胞支架相结合的复合体, 其中由细胞和生物材料所构成的细胞支架是组织工程的三大要素之一. 细胞支架的功能是为细胞的增殖提供三维空间和新陈代谢的环境, 并决定新生组织、器官的形状和大小<sup>[1]</sup>. 明胶是一种来源丰富的天然高分子材料. 研究表明, 明胶微球具有良好的缓控释放生长因子的功能, 克服了生长因子易变性失活的缺点, 能更好地保证细胞的生长繁殖<sup>[2,3]</sup>, 因此明胶材料已广泛地应用于组织工程领域<sup>[4,5]</sup>. 有关可降解的高分子微球作为细胞微载体的报道已有很多, 其中聚乳酸(PLA)和乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球具有良好的生物降解性, 用于多能干细胞和平滑肌细胞的培养<sup>[6,7]</sup>, 但此类合成高分子材料表面具有较高的疏水性和生物惰性, 不利于细胞的粘附生长. 通过表面化学修饰和表面涂层等方法可以提高材料的细胞粘附性<sup>[8~11]</sup>. 另外也可以用壳聚糖等材料作为细胞微载体培养细胞<sup>[12]</sup>.

本文采用改良的乳化冷凝法制备出大粒径明胶微球<sup>[13]</sup>, 扫描电镜观察发现该微球在制备和后处理过程中没有破碎现象, 有一定强度和几何形状; 内部有孔径和互相沟通的三维孔道结构, 具有较好的缓释性, 能有效地促进成纤维细胞的粘附和增殖, 因此有望为组织工程中种子细胞的培养提供一种更为可行和有效的新途径. 并可作为微载体支架承载真皮细胞的单元微粒皮替代物<sup>[14]</sup>.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

明胶, Sigma公司, B型; 牛血清蛋白(BSA, 纯度96%), Sigma公司; span-80, Fluka公司, HLB = 4.3 ± 1.0; 液体石蜡, 天津科密欧化学试剂开发中心, 分析纯; pH = 7.4的磷酸缓冲液(PBS); 戊二醛质量分数 ≥ 25%; 氨基乙酸, 纯度 > 99%; 丙酮和异丙醇均为市购分析纯; 水为二次蒸馏水; 兔皮成纤维细胞, 由第四军医大学组织工程试验中心提供.

ALPHA1-2型冷冻干燥机, 德国CHRIST公司; TGL-16G型高速离心机; Quanta-200型扫描电镜, 荷兰Philips-FEI公司; TU-1901型紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; Olympus BX-41型显微镜.

### 1.2 明胶微球的制备

称取0.1 g span-80, 用30 mL液体石蜡充分搅拌均匀后倒入三口烧瓶中, 于60 °C高速搅拌. 将质

收稿日期: 2007-04-16.

基金项目: 国家“八六三”计划重大课题专项基金(批准号: 2002AA205041)资助.

联系人简介: 刘守信, 男, 博士, 教授, 主要从事敏感性高分子和软物质研究. E-mail: liushx@snnu.edu.cn

量分数为 25% 的明胶水溶液真空抽气泡, 取 4.5 mL 缓慢滴加到三口瓶中. 调节搅拌速度至 300 r/min, 搅拌 10 min, 溶液变浑浊, 形成乳状液后在保持搅拌速度不变的条件下迅速改为冰浴, 使体系温度低于 4 °C, 继续搅拌 15 min, 缓慢滴加戊二醛 0.1 mL, 在 300 r/min 下继续搅拌 2 h. 加入 20 mL 丙酮, 搅拌 3 min 后静置, 淡黄色微球沉淀在最下层, 倒掉上层溶液后将微球浸泡在 10 mL 丙酮溶液中, 于 4 °C 固化 24 h. 取出微球后用 1 mol/L 的氨基乙酸浸泡 30 min, 除掉未反应的戊二醛. 用丙酮、异丙醇、二次水反复洗涤, 待有机溶剂挥发后得到淡黄色粉末状明胶微球. 改变固化方法、水油相比、搅拌速度、交联剂、表面活性剂用量和洗球方法等制备大粒径明胶微球.

### 1.3 微球的表现形貌和吸水率的测定

将粉末状明胶微球喷金后用扫描电镜观察形貌, 并计算平均粒径. 用三种不同的方法进行明胶颗粒后处理: (1) 用丙酮洗涤 3 次后用水洗涤 1 次, 重复 3 次后再用丙酮处理, 待丙酮挥发; (2) 用丙酮洗涤 3 次后用异丙醇洗涤 1 次, 重复 3 次后再用异丙醇处理, 待异丙醇挥发; (3) 将用丙酮和水洗涤过的微球在二次水中充分溶胀后冷冻干燥得到干燥球. 用扫描电镜观察三种明胶微球的表面形貌.

由于明胶微球的亲水性及其三维网络结构, 使其在水中表现出良好的溶胀行为. 用称量法测定三种明胶微球的溶胀动力学曲线. 将质量为  $W_0$  的明胶微球浸入 25 °C 的生理盐水中溶胀, 每间隔一段时间离心分离, 倒掉多余的水分, 用滤纸吸去试样表面的水分, 称重, 得到明胶微球的湿重  $W_t$ <sup>[15]</sup>, 按式  $SR = (W_t - W_0) / W_0$  计算微球的吸水率, 重复 3 次实验, 取其平均值.

### 1.4 微球体外释放率和体外降解的测定

将牛血清蛋白 (BSA) 干燥后精确称取 260.4 mg, 加入去离子水溶解后定容至 250 mL, 得到质量浓度为 1 mg/mL 的 BSA 溶液. 用该溶液分别配制质量浓度为 0.75, 0.50, 0.25, 0.125, 0.625 和 0.312 mg/mL 的 BSA 标准溶液. 测定各标准溶液在 280 nm 下的紫外吸收值, 绘制 BSA 浓度-吸光度的标准曲线, 并拟合出线性回归方程.

精确称取一定量的经冷冻干燥处理后的明胶微球, 吸附 BSA 水溶液达到吸附平衡后离心, 测量上层清液中 BSA 的浓度, 通过 BSA 的减少量计算微球的载药量. 将离心的沉淀物用生理盐水洗涤 2 次后放入 100 mL 生理盐水中, 于 37 °C 摇床振荡, 间隔一定时间从上层清液中取出 1 mL, 并同时补加 1 mL 新鲜的生理盐水. 测定不同时刻释放出来的 BSA 浓度, 由所得结果绘制缓释微球体外 BSA 释放曲线.

将冷冻干燥处理后的微球筛分, 分别取直径范围为 250 ~ 300  $\mu\text{m}$  (65 ~ 50 目) 和 355 ~ 425  $\mu\text{m}$  (45 ~ 40 目) 的微球, 真空干燥后称重. 将质量为  $W_1$  的微球放入 5 mL 37 °C 的 PBS 中进行降解实验. 一定时间后取出微球, 用二次水洗涤后, 真空干燥至恒重, 称量结果为  $W_2$ . 质量残留量按公式  $MR = (W_2 / W_1) \times 100\%$  计算, 测定两种微球在不同时刻的质量, 绘制体外降解曲线.

### 1.5 细胞的培养

分离培养兔皮肤成纤维细胞, 实验用第二代细胞. 将经三种不同方法处理后的微球用 PBS 溶液浸泡过夜后转移到硅烷化的转瓶中, 高温消毒, 冷却后倒掉 PBS. 加入培养基, 放入培养箱中以 30 r/min 的转速搅拌过夜. 静置至微载体下沉后除去培养基, 再加入细胞接种密度为  $2 \times 10^6$  个/ $\text{cm}^3$  的新鲜培养基. 放入 37 °C, 含体积分数为 25%  $\text{CO}_2$  的饱和湿度的旋转细胞培养系统中以 30 r/min 的转速旋转培养, 分别于 8, 24 和 72 h 消化微载体上的细胞, 计算细胞数, 通过计算细胞粘附率了解细胞粘附情况. 将培养 72 h 的细胞微球按常规的 MTT 方法先后加入四甲基偶氮唑盐 (MTT) 和二甲基亚砜, 用酶标分析仪测定吸光度值, 检测波长为 570 nm, 重复 3 次实验<sup>[3]</sup>.

将旋转培养 72 h 的微载体按电镜需求制样后, 用倒置相差显微镜和扫描电镜观察细胞生长、基质形成及其细胞与微载体结合状况的变化.

## 2 结果与讨论

### 2.1 明胶微球的表现形貌

由扫描电镜照片可见 (图 1), 所制备的明胶微球呈圆球形, 大小较均匀, 微球粒径呈正态分布, 粒径在 50 ~ 500  $\mu\text{m}$  之间, 其中 78.3% 的明胶微球的粒径在 100 ~ 350  $\mu\text{m}$  之间. 平均粒径为 250  $\mu\text{m}$  左

右. 随着明胶浓度的增大、搅拌速度的降低及表面活性剂含量的降低, 明胶微球变大, 与文献[16,17]报道的结果一致. 图1是用三种处理方法所制得的明胶微球的形貌图. 由图1可以看出, 微球的形貌差异较大. 用丙酮和水洗涤所得微球的球表面光滑, 没有微孔和裂纹[图1(A)]; 用丙酮和异丙醇洗涤出的微球球表面皱褶, 并在皱褶处有少量的裂纹[图1(B)]; 经冷冻干燥后的微球有明显的孔道结构[图1(C)]. 明胶微球是一个具有大量孔道的三维网络结构, 在第一种处理方法中, 微球经丙酮除液体石蜡后, 再用水洗, 微球在水中会有所溶胀, 再经丙酮处理后微球体积有所收缩, 表面比较光滑致密, 无明显的孔道和孔隙; 在第二种处理方法中, 微球经丙酮除液体石蜡后, 再用异丙醇洗涤, 由于微球内部水分损失较快, 表面产生皱褶塌陷现象; 在第三种处理方法中, 微球经丙酮除液体石蜡, 用水洗后, 再在二次水中充分溶胀, 冷冻干燥后, 微球三维网络结构得到保持, 微球呈现非常典型的三维网络结构.

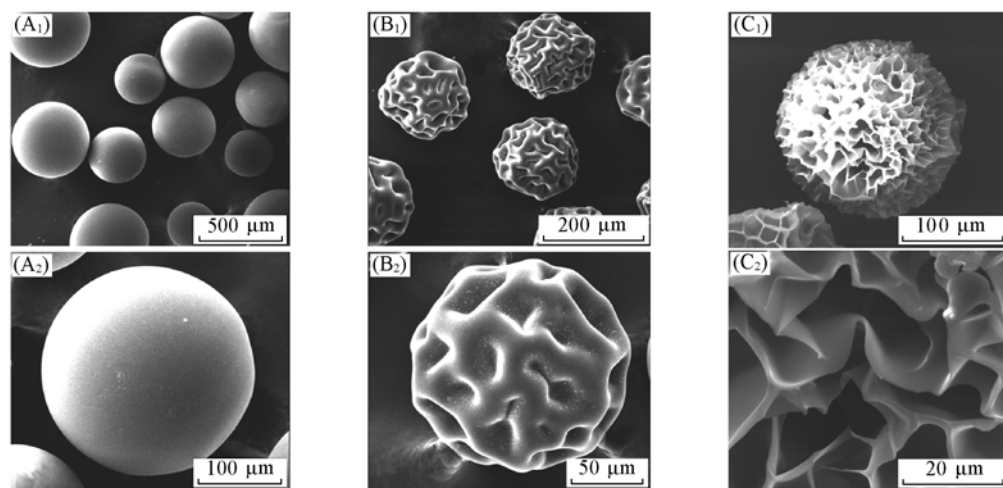


Fig. 1 SEM photographs of gelatin microspheres processed by three ways

(A<sub>1</sub>) and (A<sub>2</sub>): Gelatin microspheres processed by acetone and water; (B<sub>1</sub>) and (B<sub>2</sub>): gelatin microspheres processed by acetone and isopropyl alcohol; (C<sub>1</sub>) and (C<sub>2</sub>): gelatin microspheres processed by freeze drying.

## 2.2 明胶微球的溶胀性能

图2是明胶微球的溶胀动力学曲线. 由图2可以看出, 明胶微球具有良好的溶胀性能, 三种明胶微球在溶胀40 min后基本达到溶胀平衡, 但由于处理方法不同, 所得明胶微球的溶胀动力学曲线有所不同. 第三组微球是经冷冻干燥处理后的明胶微球, 其溶胀度和溶胀速率明显高于另外两种处理方法所得的明胶微球. 这是由于经冷冻干燥处理的明胶微球完全保持了明胶微球的三维网络结构, 这种结构使其容易溶胀, 吸水率较大. 而在用第一种和第二种处理方法中, 都采用有机溶剂挥发的方法得到干球, 使微球表面致密, 吸水率较小. 由图2还可以看出, 用第一种和第二种处理方法制得的明胶微球在溶胀初期溶胀度变化几乎相同, 但在溶胀后期用第二种处理方法制得的明胶微球的溶胀度明显高于第一种. 这是因为用第二种处理方法制得的明胶微球表面皱褶, 在溶胀后期, 其塌陷处会吸收大量的水, 使溶胀曲线在35 min后上升较快. 经过冷冻干燥后的微球, 其溶胀度和溶胀速率较高, 说明明胶微球的三维孔道结构与前面的实验结果相符.

## 2.3 明胶微球的体外缓释性能

图3是BSA的浓度-吸光度标准曲线. 拟合的线性回归方程为  $A = 0.60017\rho - 0.00354$ , 相关系数

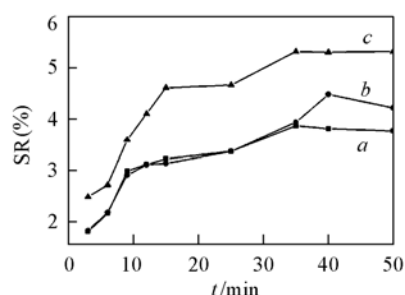


Fig. 2 Swelling curves of gelatin microspheres processed by three ways

- Gelatin microspheres processed by acetone and water;
- gelatin microspheres processed by acetone and isopropyl alcohol;
- gelatin microspheres processed by freeze drying.

$r=0.9999$ , BSA 的质量浓度在  $0.01 \sim 1 \text{ mg/mL}$  范围内符合线性关系. 载 BSA 明胶微球的平均载药量为  $11.22\%$ . 图 4 是复合 BSA 的明胶微球的体外累积释放曲线. 由图 4 可以看到, 在释放初期, BSA 的释放速度较快, 但没有明显的突释现象, 在释放 12 d 时释放量约为  $50\%$ . 随着时间的推移, 药物释放逐渐平缓, 到 30 d 时, BSA 的释放量达到约  $86.11\%$ . 明胶中色氨酸(几乎检测不到)和酪氨酸的含量较一般蛋白质少, 因此明胶在  $280 \text{ nm}$  处吸收度值远比 BSA 小<sup>[18]</sup>, 并且经过交联固化后的明胶微球水溶片段很少, 故明胶在  $280 \text{ nm}$  处的吸光度对释放实验结果影响不大.

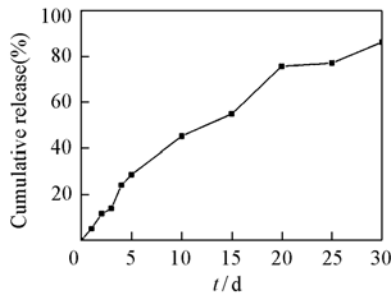


Fig. 4 Cumulative release curve of BSA-impregnated gelatin microspheres

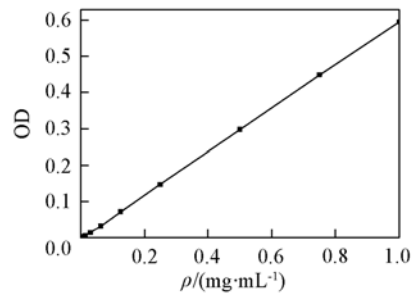


Fig. 3 Standard curve of BSA

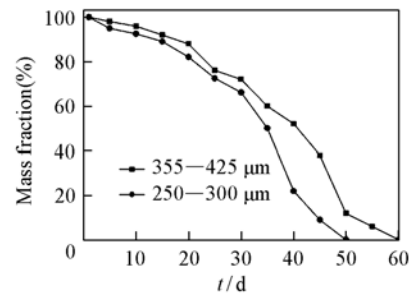


Fig. 5 *In vitro* degradation curves of gelatin microspheres

## 2.4 明胶微球的体外降解

图 5 是明胶微球的体外降解曲线. 由图 5 可以看出, 明胶微球在体外可以完全降解,  $355 \sim 425 \mu\text{m}$  的明胶微球完全降解的时间是 60 d, 而  $250 \sim 300 \mu\text{m}$  的明胶微球完全降解的时间为 50 d, 明胶微球的粒径越大, 降解所需要的时间越长. 明胶微球的降解主要是水解作用, 实验初期明胶吸水膨胀, 随着时间的延长, 产生胶解现象. 由本实验制得的明胶微球降解周期较长, 通过调节微球粒径的大小使其与皮肤重建周期相符, 达到组织工程的目的.

## 2.5 明胶微球作为微载体的可行性研究

图 6 是成纤维细胞在明胶微载体上的形态图. 由图 6(A) 可以看到, 细胞在微载体表面分布比较均匀, 贴壁状况良好; 由图 6(B) 可以看出, 细胞有活跃的细胞基质分泌, 表明微载体适合成纤维细胞的生长. 细胞粘附量随着时间的延长而逐渐升高, 72 h 后仍然具有较高的粘附量. 第一种处理方法得到的明胶微球在接种 8, 24 和 72 h 后细胞粘附率分别为  $(31.50 \pm 3.54)\%$ ,  $(37.38 \pm 4.66)\%$  和  $(44.83 \pm 3.18)\%$ . 第二种处理方法得到的明胶微球接种 8, 24 和 72 h 后细胞粘附率分别为  $(43.62 \pm 1.17)\%$ ,  $(62.58 \pm 2.37)\%$  和  $(65.40 \pm 2.84)\%$ ; 第三种处理方法得到的明胶微球接种 8, 24 和 72 h 细胞粘附率分别为  $(46.70 \pm 2.16)\%$ ,  $(66.32 \pm 4.60)\%$  和  $(72.56 \pm 2.98)\%$ . 同时, 用第三种处理方法得到的明胶微球表面的成纤维细胞 MTT 活性 (0.198) 高于第一组 (0.124) 和第二组 (0.182). 细胞粘附率和细胞活性的实验结果表明, 三种处理方法得到的明胶微球均符合细胞微载体的要求, 说明其作为细胞微载体是可行的, 其中以第三种处理方法得到的明胶微球效果最佳.

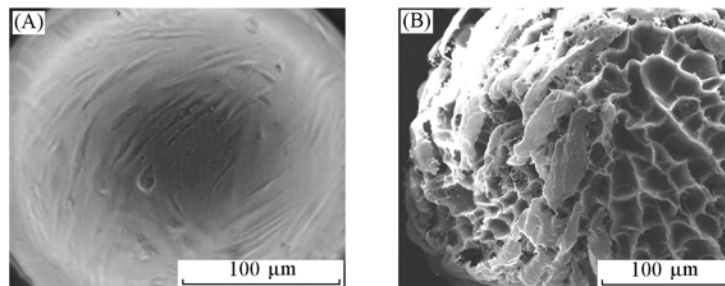


Fig. 6 Fibroblasts cultured on gelatin microspheres

(A) Optical microscope photograph of microspheres; (B) SEM photograph of microspheres.

综上所述, 制得的粒径约为  $250 \mu\text{m}$  的明胶微球, 其大小分布比较均匀, 分散性较好. 经冷冻干燥处理所得的明胶微球具有良好的孔道结构, 能为细胞的增殖提供三维空间和新陈代谢的环境. 明胶微

球对牛血清蛋白具有良好的缓释功能,并且在释放初期没有明显的突释现象,克服了部分同类产品释放初期浓度过大,短期内又迅速降低的现象.成纤维细胞在明胶微载体上生长情况良好,这种微载体具有促进细胞吸附增殖和保持细胞形态的特点,是良好的细胞生长微载体.

### 参 考 文 献

- [1] WANG Shen-Guo(王身国). Chin. J. Rehabil Theory Practice(中国康复理论与实践)[J], 2002, **8**(5): 267—269
- [2] Katsuya Kawai, Shigehio Suzuki, Yasuhiko Tabata, *et al.*. Biomaterials[J], 2000, **21**: 489—499
- [3] HUANG Sha(黄沙), JIN Yan(金岩), WU Hong(吴红), *et al.*. Journal of Biomedical Engineering Research(生物医学工程研究)[J], 2004, **23**(2): 107—110
- [4] LU Yang(陆扬). The Science and Technology of Gelatin(明胶科学与技术)[J], 2006, **26**(2): 57—68
- [5] GAO Chang-You(高长有), YUAN Jun(袁峻), GUAN Jian-Jun(管建均), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2002, **23**(6): 1210—1212
- [6] Kimberley D. Newman, Michael W. Mcburney. Biomaterials[J], 2004, **25**: 5763—5771
- [7] Senuma Y., Franceschin S., Hilborn J. G., *et al.*. Biomaterials[J], 2000, **21**: 1135—1144
- [8] Ki Woo Chun, Hyuk Sang Yoo, Jun Jin Yoon, *et al.*. Biotechnol. Prog.[J], *et al.*. 2004, **20**: 1797—1801
- [9] Hong Yi, Gao Chang-you, Xie Ying, *et al.*. Biomaterials[J], 2005, **26**: 6305—6313
- [10] HONG Yi(洪奕), GAO Chang-You(高长有), GONG Yi-Hong(龚逸鸿), *et al.*. Chinese Journal of Materials Research(材料研究学报)[J], 2005, **19**(6): 589—593
- [11] GUAN Xi-Peng(官习鹏), QUAN Da-Ping(全大萍), LIAO Kai-Rong(廖凯荣), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(10): 1965—1968
- [12] Chen Xi-Guang, Liu Cheng-Sheng, Liu Chen-Guang, *et al.*. Biochemical Engineering Journal[J], 2006, **27**: 269—274
- [13] DENG Rong(邓嵘), CHEN Ji-Min(陈济民), YAO Chong-Shun(姚崇舜), *et al.*. Acta Pharmaceutica Sinica[J], 2000, **35**(7): 539—543
- [14] Aditya V., Vashi B. E., M, Sc., *et al.*. Tissue Engineering[J], 2006, **12**(11): 3035—3043
- [15] TANG Qun-Wei(唐群委), LIN Jian-Ming(林建明), WU Ji-Huai(吴季怀), *et al.*. Journal of Functional Materials(功能材料)[J], 2006, **9**(37): 1510—1513
- [16] ZHAN Guo-Ping(詹国平), HAN Yan-Hong(韩彦红), XIE En-Wei(谢恩伟). China Medical Engineering(中国医学工程)[J], 2005, **13**(5): 483—488
- [17] CAI Meng-Jun(蔡梦军), ZHU Yi-Hua(朱以华), YANG Xiao-Ling(杨晓玲). The Chinese Journal of Process Engineering(过程工程学报)[J], 2005, **5**(6): 617—620
- [18] JIANG Ting-Da(蒋挺大). Collagen and Collagen Peptide(胶原与胶原蛋白)[M], Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 143

## Preparation of Sustained-release Gelatin Microspheres as the Cell Microcarrier

WANG Yi-Juan<sup>1</sup>, LIU Shou-Xin<sup>1\*</sup>, FANG Yu<sup>1</sup>, HUANG Sha<sup>2</sup>, JIN Yan<sup>2</sup>, JIANG Yu<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Applied Surface and Colloid Chemistry, Ministry of Education, School of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. Tissue Engineering Center, Stomatological College, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract** The BSA-impregnated large diameter gelatin microspheres were prepared with the improved and emulsified cold-condensation method. The results indicate that the gelatin solution 25% (mass fraction), volume ratio(3:20) of water phase to oil phase, stirring rate 300 r/min, glutaraldehyde 0.1 mL(25%, mass fraction), and surfactant span-80 0.1 g were an optimal condition to prepare the gelatin microsphere. The average diameter of microspheres was 250  $\mu\text{m}$ . By using three different ways to process the microspheres the gelatin microspheres with the different surface structures and cell adsorption ratio could be obtained. The blank microspheres can biodegrade absolutely *in vitro*. The BSA release from the BSA-impregnated gelatin microsphere can be sustained for 30 d. Fibroblasts grew well on the surface of gelatin microcarrier.

**Keywords** Gelatin microsphere; Fibroblast; Sustained-release; Microcarrier (Ed.: W, Z)