

• 研究论文 •

包埋 PLGA 微球壳聚糖支架的构建及其对蛋白释放的调节

韩 钢^{1,2}, 陈海靓¹, 孙晓译¹, 高建青¹, 梁文权^{1*}

(1. 浙江大学 药物制剂研究所, 浙江 杭州 310031; 2. 浙江大学 医学院 邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016)

摘要: 目的 制备能缓慢释放蛋白类药物的细胞生长支架。方法 采用冷冻干燥制备壳聚糖支架,测定支架的孔隙率和吸水率。以牛血清白蛋白(BSA)为模型药物,制备乳酸 羟乙醇酸共聚物(PLGA)微球,并包埋于壳聚糖支架中,用扫描电镜观察微球和支架的形态,考察药物在各种支架上的体外释放。结果 壳聚糖支架为多孔结构,当预冻温度为 -70℃时,支架的孔隙率和吸水率分别为 78.6% ±1.5%和 85.1% ±6.2%。PLGA微球能够较均匀地覆在壳聚糖支架上。单用壳聚糖支架,BSA在 24 h累积释放达 90%以上,制成 PLGA微球后,再包埋于壳聚糖支架中,则药物释放明显缓慢,168 h的累积释放量为 33.5%。通过改变壳聚糖的用量和 PLGA材料的型号,可以调控药物在复合支架上的释放。结论 包埋 PLGA微球的壳聚糖支架有望用于组织工程的支架材料和生长因子的缓慢释放。

关键词: 支架; 壳聚糖; PLGA微球; 牛血清白蛋白; 体外释放

中图分类号: R943.4 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)06 - 0493 - 05

Preparation and release behavior of chitosan scaffolds encapsulating proteins loaded in PLGA microspheres

HAN Gang^{1,2}, CHEN Hai-liang¹, SUN Xiao-yi¹, GAO Jian-qing¹, LIANG Wen-quan^{1*}

(1. Institute of Pharmaceutics, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China;

2. Affiliated Sir Run Run Shaw Hospital, Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

Abstract: **Aim** To prepare cells scaffolds with the characteristics of sustained release of proteins. **Methods** Chitosan scaffolds was prepared by freeze-drying. Porosity and water content of scaffolds were determined. Bovine serum albumin (BSA) was selected as a model protein. Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres were prepared by double emulsion solvent evaporation and encapsulated into chitosan scaffolds. The morphology of PLGA microspheres and various scaffolds were observed using scanning electron microscope. Release behavior of BSA from various chitosan scaffolds was investigated. **Results** The chitosan scaffold represents porous. At the -70℃ of quenching temperature, the porosity and water content of chitosan scaffolds were 78.6% ±1.5% and 85.1% ±6.2%, respectively. PLGA microspheres can be uniformly encapsulated into scaffolds without any morphology change. Significant sustained release of BSA from PLGA microspheres encapsulated into scaffolds was obtained. The cumulative release at 168 h was only 33.5%, while that of BSA from chitosan scaffolds at 24 h was above 90%. The release behavior can be controlled by adjusting the amount of chitosan in scaffolds and the type of PLGA. **Conclusion** The novel chitosan scaffolds encapsulating PLGA microspheres proved to be a promising cells scaffolds with controlling the release of growth factors in tissue engineering.

Key words: scaffold; chitosan; PLGA microsphere; BSA; *in vitro* release

收稿日期: 2005-09-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30171113).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 571 - 87217376, E-mail: wqliang@zju.edu.cn

组织工程的核心要素包括种子细胞、细胞支架和生长因子。其中,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。生长因子则诱导和刺激细胞增殖,维持细胞存活和促进组织的再生^[1]。壳聚糖(chitosan)是一种可生物降解、生物相容性好的阳离子多聚糖,与细胞具有很好的亲和性,已广泛用作细胞支架材料^[2]。然而,由于生长因子在人体内的半衰期大约为数秒至数分钟,很容易失去活性,单独应用壳聚糖支架材料时,生长因子释放较快,难以达到预期的生理效应,反而有可能表现出其全身性的作用^[3]。因此,实现生长因子在细胞支架中的可控释放是组织工程成功的关键之一。

乳酸-羟乙醇酸共聚物(PLGA)是一种能逐步降解而无毒性的高分子材料,已成功应用于蛋白类药物的缓释载体^[4]。由于目前应用于组织工程的生长因子种类繁多,但本质都是多肽蛋白质。因此,本文以牛血清白蛋白(BSA)作为模型,制成PLGA微球后包埋于壳聚糖中,形成复合细胞支架,以期获得能缓慢释放蛋白类药物的多孔细胞生长支架,并通过制剂技术调控药物在复合支架上的释放,以满足不同组织工程的需要。

材料与amp;方法

仪器与amp;设备 FJ 200高速分散均质机(上海标本模型厂);LGJO 5-II型冷冻干燥机(军事医学科学仪器厂);XL-30-ESEM扫描电镜(飞利浦公司);Elx-800型酶标仪(BIOTEC)

药品与amp;试剂 牛血清白蛋白(BSA,华美生物工程公司);PLGA(山东医疗器械研究所);壳聚糖(M_n 450,脱乙酰度 90%,青岛海盈生物科技有限公司);BSA测定试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所)。其余均为分析纯。

PLGA微球的制备及其性质

微球的制备^[5] 称取BSA 30 mg溶于水 200 μ L中,作为内水相;另称取PLGA(PLA:PGA = 50:50, M_n = 6 000) 330 mg溶于二氯甲烷 4 mL中作为油相,探头超声,充分乳化后加入 1% PVA溶液 40 mL,以 8 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速乳化 3 min,减压旋转除去有机溶剂,离心后用蒸馏水洗涤 3 次,收集微球,冷冻干燥,即得。另取PLGA(PLA:PGA = 50:50, M_n = 10 000)和PLGA(PLA:PGA = 70:30, M_n = 50 000),同法制备。

粒径 光镜下随机计数 200 个微球的粒径,计

算其平均值。

载药率 精密称取 3 种 PLGA微球各 10 mg,加乙腈 1 mL,涡旋溶解,离心(12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min),弃去上清液,再加乙腈 1 mL,重复上述操作。沉淀物真空干燥过夜,次日用 pH 7.4 的 PBS 溶液 1 mL 提取,离心后收集上清液。残余物加入 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 1 mL 水解,振摇过夜。收集上清液(d3),用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 水溶液 1 mL 中和。合并所有上清液,用微量法于 570 nm 处测定 BSA 含量^[6],计算载药率。

壳聚糖支架的制备及其表征

支架的制备^[7] 用 1% 醋酸溶液配成浓度为 1% 的壳聚糖溶液,取该溶液 0.3 mL,置 24 孔细胞培养板中,分别于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 、-70 $^{\circ}\text{C}$ 和液氮(-196 $^{\circ}\text{C}$) 条件下预冻过夜后,冷冻干燥 24 h,用 80% 乙醇固化,再次冷冻干燥,即得空白壳聚糖支架。

吸水率^[8] 将质量为 W_a 的干燥支架材料浸没于蒸馏水中,24 h 后小心取出,用滤纸吸干表面的水分,称重得 W_b ,计算不同预冻温度的支架吸水率,即吸水率 $X(\%) = [(W_b - W_a) / W_a] \times 100\%$ 。

孔隙率^[9] 用排液法测定多孔支架的孔隙率。在 10 mL 量瓶中装入乙醇,精密称取烘干至衡重的各种支架(W_1),抽真空至不再有气泡溢出。精密称定含有酒精和壳聚糖支架的量瓶(W_2),再将含有乙醇的支架取出,精密称定剩余乙醇和量瓶(W_3),则孔隙率为 $P(\%) = (W_2 - W_3 - W_1) / (W_2 - W_3) \times 100\%$ 。

含 BSA 和 PLGA 微球的壳聚糖支架的制备 用 1% 壳聚糖醋酸溶液配制质量浓度为 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BSA 溶液,取该溶液 0.3 mL 加入 24 孔细胞培养板中,以 -70 $^{\circ}\text{C}$ 预冻,按上述方法制备,即得含 BSA 的壳聚糖支架。另根据各种 PLGA 微球的载药率,称取含相同 BSA 量的微球,置 24 孔板中,加 1% 壳聚糖溶液 0.3 mL,搅拌均匀,同法制备,即得包埋 PLGA 微球的壳聚糖支架。

形态学 用扫描电镜观察 PLGA 微球、空白壳聚糖支架和包埋 PLGA 微球的壳聚糖支架的形态。

体外释放研究 精密称取一定量 PLGA(PLA:PGA = 50:50, M_n = 6 000)微球,含 BSA 的壳聚糖支架以及包埋不同 PLGA 微球的壳聚糖支架(BSA 的量均为 0.3 mg),以 pH 7.4 的 PBS 1 mL 作为释放介质,加入 0.01% 叠氮化钠作防腐剂。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡(100 $r \cdot \text{min}^{-1}$),每隔一定时间取出部分上清液,并补充定量的释放介质,用 BCA 法测定 BSA

含量,计算累积释放率。

结果

1 PLGA微球的粒径和载药率

以 3 种 PLGA(PLA:PGA = 50:50, $M_r = 6\ 000$; PLA:PGA = 50:50, $M_r = 10\ 000$; PLA:PGA = 70:30, $M_r = 50\ 000$)为材料制备的 BSA 微球的载药率分别为 7.85%, 7.90%和 7.49%;粒径分别为 $(5.45 \pm 0.36)\ \mu\text{m}$, $(4.39 \pm 0.45)\ \mu\text{m}$ 和 $(4.44 \pm 0.47)\ \mu\text{m}$ 。

2 壳聚糖支架的性质

表 1 是预冻温度对壳聚糖支架的孔隙率和吸水率的影响。当预冷冻温度为 $-20\ ^\circ\text{C}$ 和 $-70\ ^\circ\text{C}$ 时,支架的孔隙率和吸水率相接近,而当冷冻温度进一步降为 $-196\ ^\circ\text{C}$ 时,孔隙率和吸水率明显下降。

Table 1 Effect of quenching temperature (T_q) on the porosity and water content of chitosan scaffolds prepared by freeze-drying

| $T_q / ^\circ\text{C}$ | Porosity/% | Water content/% |
|------------------------|----------------|-----------------|
| -20 | 78.1 ± 1.2 | 88 ± 6 |
| -70 | 78.6 ± 1.5 | 85 ± 6 |
| -196 | $59 \pm 3^*$ | $64 \pm 4^{**}$ |

$n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs $-20\ ^\circ\text{C}$ group

3 支架的形态

图 1 和图 2 分别是扫描电镜下观察到的含 BSA 的 PLGA 微球和壳聚糖支架。由图可见,PLGA 微球呈圆形,表面光滑,不粘连,大小较均匀。用冷冻干燥法制得的壳聚糖支架具有多孔的结构,孔径大多在 $100\ \mu\text{m}$ 左右。

图 3 是在制备壳聚糖支架时,加入 PLGA 微球,再冷冻干燥后的扫描电镜。可见,PLGA 微球能够较均匀的覆在壳聚糖支架上(图 3A),微球的形态未

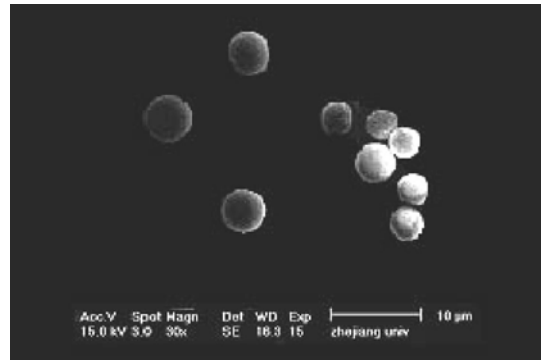


Figure 1 The scanning electron micrographs of PLGA microspheres. Scale bar: $10\ \mu\text{m}$

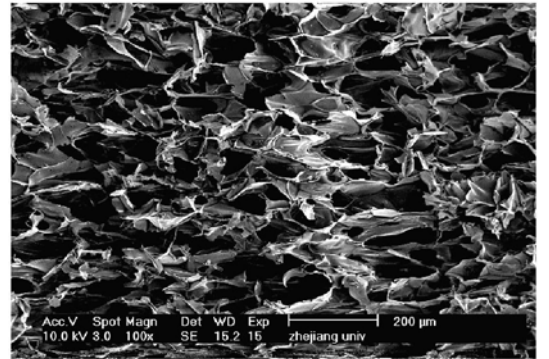


Figure 2 The scanning electron micrographs of porous chitosan scaffolds. Scale bar: $200\ \mu\text{m}$

发生变化(图 3B)。

4 体外释放

图 4 是 BSA 从壳聚糖支架、PLGA 微球和包埋 PLGA 微球的壳聚糖支架上的释放曲线。从图中可以看出,单独采用壳聚糖支架,药物释放较快,24 h 释放即达 90%以上。PLGA 微球能显著延缓药物的释放,因此,包埋于壳聚糖支架后药物也呈缓慢释放,168 h 的累积释放量为 $33.5\% \pm 0.9\%$ 。

图 5 是制备支架的壳聚糖用量对包裹相同 PLGA

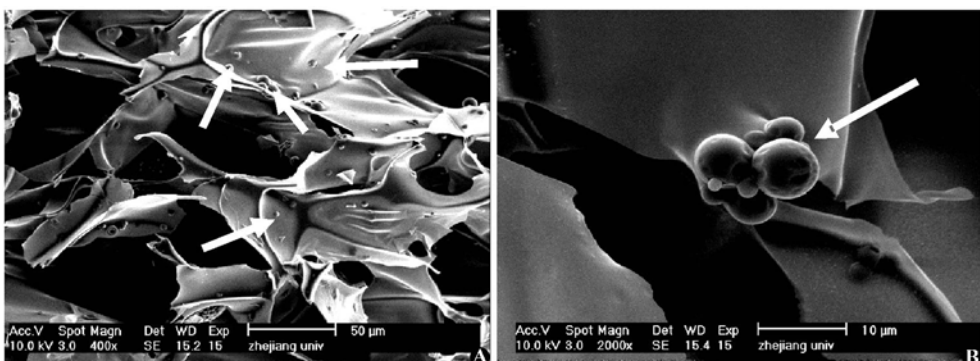


Figure 3 The scanning electron micrographs of PLGA microspheres encapsulated into chitosan scaffolds. Arrows indicates PLGA microspheres. A: Scale bar $50\ \mu\text{m}$; B: Scale bar $10\ \mu\text{m}$

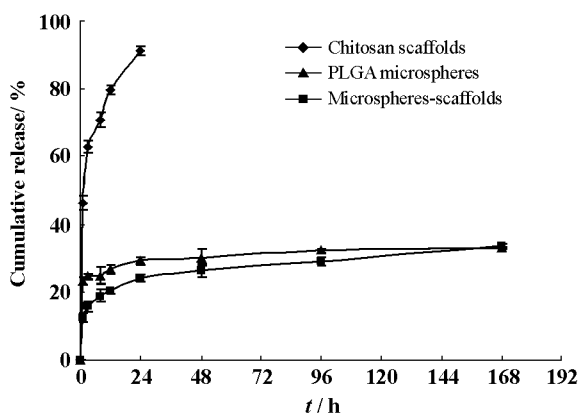


Figure 4 *In vitro* release profiles of BSA from chitosan scaffolds, PLGA (PLA:PGA = 50:50, $M_r = 6\ 000$) microspheres and PLGA microspheres encapsulated into chitosan scaffolds ($n = 3$)

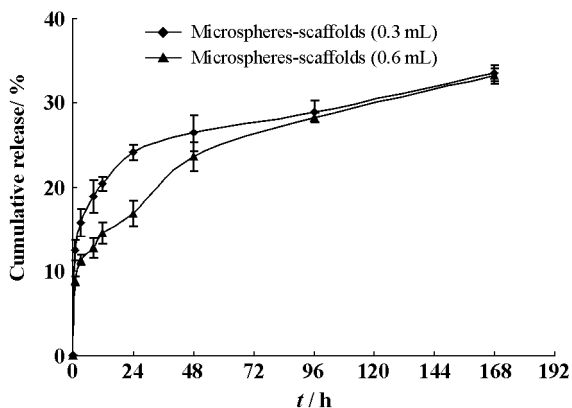


Figure 5 *In vitro* release profiles of BSA from PLGA (PLA:PGA = 50:50, $M_r = 6\ 000$) microspheres-scaffolds prepared by different amount of chitosan ($n = 3$)

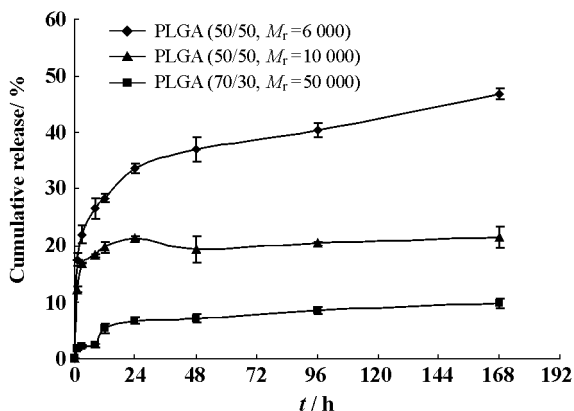


Figure 6 *In vitro* release profiles of BSA from microspheres-scaffolds prepared by different PLGA types ($n = 3$)

20.3%和 14.5%,至 168 h 的累积释放量分别为 33.5%和 33.2%。表明支架的用量对释放曲线的前期影响较显著,而后期差别不大。

当支架一定时,采用不同 PLGA 材料包埋微球的壳聚糖支架对 BSA 的释放曲线见图 6。由此可见,与普通 PLGA 蛋白微球的释放情况一致,包埋微球的壳聚糖支架随 PLGA 相对分子质量的增大释放减慢,当共聚物 PLA:PGA = 70:30 时,释放进一步减缓。

讨论

作为组织工程中的细胞支架生物材料,不仅应具有良好的生物相容性、生物可降解性和可塑性,而且为了使细胞更好地在支架材料上贴壁和生长,要求支架材料具有三维立体结构,即材料必须是多孔的,类似海绵状,有较高的孔隙率和吸水率。这样一方面有利于细胞的植入和黏附,另一方面有利于细胞营养成分的渗入与代谢产物的排出^[10]。采用冷冻干燥法制备壳聚糖多孔支架,预冻温度对支架的性质影响较大,这是因为结晶过程分两个阶段:即成核阶段和晶核生长阶段,过冷会引起较高的成核速率和较低的晶体生长速率,因而会有很多的小冰晶生成。所以,预冻温度越低,冻干材料孔越小,孔壁越薄。当预冻温度为 -20℃ 时,所需预冻时间较长,因此,后文研究均采用 -70℃ 作为预冻温度。通过细胞培养试验表明:本法制得的壳聚糖支架没有毒性,人原代肝细胞可以在支架表面和内部正常生长和增殖,而且支架易于修饰(另文发表)。

组织工程是一个周期较长的过程。一般原代细胞在支架上的贴壁生长需要数周,有时更长。为了促进细胞的生长和组织的再生,在支架中需要加入具有诱导和刺激细胞增殖、维持细胞存活等生物效应的蛋白类物质,即生长因子^[11]。若单独将生长因子混入壳聚糖支架,则相当于形成骨架型的药物释放体系。由于支架中壳聚糖的分子链段之间具有相当大的孔隙率和吸水性,使得蛋白类药物很容易通过支架中和外周水环境中形成的浓度梯度差释放出来,从而失去活性,不利于细胞在支架上的正常生长和繁殖。

为解决以上问题,本实验以 BSA 为模型蛋白,首先将其制成 PLGA 微球,以达到缓慢释放和保护的目的,然后进一步包裹于壳聚糖支架中。通过扫描电镜图可以证实已成功的构建了包埋 PLGA 微球的壳聚糖复合多孔支架,PLGA 微球能够较均匀地

微球的 BSA 释放影响。当制备支架的壳聚糖溶液用量为 0.3 和 0.6 mL 时,24 h 的累积释放量分别为

分布在支架中,复合支架保持原来壳聚糖支架的多孔性和 PLGA微球的形态。释放实验表明:与单用壳聚糖支架相比,包埋微球的复合支架能够显著地减缓药物的释放。进一步研究表明:通过改变支架的用量和 PLGA的材料性质,可以获得具有不同释药速率的释放曲线。因此,本实验设计的包埋微球的壳聚糖复合多孔支架有望在相当长的时间内保持生长因子的生物效应,而且通过对复合支架材料的调节,可以实现对生长因子的控制释放。

References

- [1] Tabata Y. The importance of drug delivery systems in tissue engineering [J]. Pharm Sci Technol Today, 2000, 3: 80 - 89.
- [2] Dhiman HK, Ray AR, Panda AK. Characterization and evaluation of chitosan matrix for *in vitro* growth of MCF-7 breast cancer cell lines [J]. Biomaterials, 2004, 25: 5147 - 5154.
- [3] Holland TA, Mikos AG. Advances in drug delivery for articular cartilage [J]. J Control Release, 2003, 86: 1 - 9.
- [4] Yeo Y, Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microsphere system [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27: 1 - 12.
- [5] Zheng CH, Liang WQ, Yu HY. Preparation of alginate-chitosan-poly (lactic-co-glycolic acid) composite microsphere and its regulation of protein release [J]. Acta Pharm Sci (药学学报), 2004, 40: 182 - 186.
- [6] Zheng CH, Liang WQ, Yu HY, et al. Evaluation of different methods to determine the loading of proteins in PLGA microspheres [J]. Pharmazie, 2004, 59: 232 - 233.
- [7] Madhally SV, Matthew HWT. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering [J]. Biomaterials, 1999, 20: 1133 - 1142.
- [8] Ma JB, Wang HJ, He PL, et al. A preliminary *in vitro* study on the fabrication and tissue engineering application of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts [J]. Biomaterials, 2001, 22: 331 - 336.
- [9] Wang J, Li XS, Zhao YQ, et al. Preparation and biological properties of porous chitosan scaffolds [J]. J Southeast Univ (Nat Sci Ed) (东南大学学报 自然科学版), 2004, 34: 67 - 71.
- [10] Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering [J]. Science, 1993, 260: 920 - 926.
- [11] Lee JE, Kim KE, Kwon IC, et al. Effects of the controlled-release TGF- β 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold [J]. Biomaterials, 2004, 25: 4163 - 4173.