

载荷壳聚糖微球的海藻酸钠水凝胶的制备*

赵名艳 李立华[△] 周长忍 周炬光

(暨南大学材料科学与工程系,人工器官与材料教育部工程中心 广东 广州 510632)

摘要 目的:在支架材料上引入具有控释行为的微球,旨在通过微球包裹生长因子,通过生长因子的缓慢释放从而促进种子细胞的生长分化。方法:本实验通过在海藻酸钠水凝胶中负载具有控释功能的壳聚糖微球,并通过在微球中包载溶菌酶从而达到控制壳聚糖降解速率的功效。实验研究了不同搅拌速度下壳聚糖微球的形貌及粒径大小,通过扫描电镜对壳聚糖微球及复合支架的形貌进行了观察,通过紫外光吸收法测试了微球的载药量及包封率,并研究了壳聚糖微球在体外的降解行为等。结果:制备的壳聚糖微球表面较光滑,溶菌酶的包封率在 25.78%-41.89%之间,载药量在 15.20%-24.44%之间。包封溶菌酶的微胶囊在降解 9 天后壳聚糖分子量下降了 70.40%,载荷微球的复合凝胶孔洞增多,孔洞大小均匀。结论:此复合材料有望作为载荷软骨相关生长因子的支架模型,从而解决软骨组织工程中种子细胞匮乏的问题。

关键字 壳聚糖微球 溶菌酶 海藻酸钠水凝胶 缓释控释系统

中图分类号:R318.08 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)11-2006-05

Preparation of Sodium Alginate Hydrogel Loaded With Chitosan Microsphere*

ZHAO Ming-yan, LI Li-hua[△], ZHOU Chang-ren, ZHOU Ju-guang

(Department of Material Science and Engineering, Engineering Research Center of Artificial Organs and Materials; Jinan University; Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT Objective: Microspheres with sustained release have been introduced into scaffolds to enclose the growth factors, by the slow-release of the growth factors to promote the growth and differentiation of seeded cells. In this study, Sodium alginate hydrogel integrated with sustained release chitosan microsphere has been prepared and lysozyme was introduced into the chitosan microsphere to control the degradation of chitosan. **Methods:** The research studied the morphology and grain sizes of the microsphere under different stirring speed. The morphology of the microsphere morphology and grain sizes of the microsphere under different stirring speed. The morphology of the microsphere and composite scaffolds were characterized with SEM, the drug loading rate and envelope efficiency were analyzed by Ultraviolet absorption method. **Results:** The surface of the microsphere were smooth, the drug loading and envelope efficiency of lysozyme were 26.83%-41.92% and 15.65%-24.48% respectively. In vitro degradation test revealed that the molecular weight of chitosan decreased 70.40% in 9 days. SEM demonstrated that the hole diameter of the composite gel with microsphere were uniform and increased compared with the controlled sample. **Conclusions:** Such composite scaffolds should be a suitable candidate scaffold model for loading cartilage related growth factors, which should solve the problem that cartilage tissue engineering is in lack of seeded cells.

Key words: Chitosan microsphere; Lysozyme; Sodium alginate hydrogel; Controlled-release system

Chinese Library Classification: R318.08 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2006-05

前言

软骨缺损在临床上非常常见,多由创伤、骨关节炎、以及骨软骨病引起,治疗较为困难,且软骨本身的再生和修复能力极其有限,严重影响了软骨缺损的愈合^[1-2]。近年来组织工程技术的出现为软骨损伤的修复带来了希望。聚合物水凝胶网络中含有大量的水分,具有了一种流体的性质,其性能与机体组织极其相似,柔软、润湿的表面以及与组织的亲和性大大减少了材料对周围组织的刺激性,使得聚合物水凝胶具有良好的生物

相容性,成为组织工程细胞支架的一大类材料^[3]。

海藻酸钠(Sodium Alginate,SA)是从天然褐藻中提取的一种多糖,是美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于生物医学领域的天然生物材料之一,遇二价金属离子能迅速结合形成凝胶^[4],并且具有良好的生物相容性,因此在组织修复材料、生化药物控制释放载体、细胞免疫隔离等组织工程领域越来越受到人们的关注^[5,6]。大量研究表明海藻酸钠水凝胶具有维持软骨细胞形态,促进软骨细胞增殖等潜能^[3,4,7-9],因而在软骨组织工程领域中倍受关注。然而,种子细胞来源匮乏已成为阻碍软骨组织工程

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30900307) 教育部博士点基金项目(200805590001) 广东省高等学校科技创新重点项目(CXZD1015)

作者简介:赵名艳(1985-),女,湖南邵阳人,在读硕士,师从周长忍教授,从事生物材料研究。

Tel: 13570446194 E-mail: mingyan985927@163.com

[△]通讯作者:李立华,Email: tlihuali@jnu.edu.cn

(收稿日期:2011-03-15 接受日期:2011-04-10)

临床应用的重大问题。

生长因子作为组织工程四大要素之一,在组织工程领域具有举足轻重的作用。负载缓释转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 微球壳聚糖支架在体外能够促进软骨细胞生长,且可以诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化,有望作为软骨缺损修复的组织工程材料^[10-11],体外软骨形态发生 (cartilage-derived morphogenetic protein CDMP)^[12]在软骨发育过程中发生重要的调控作用^[13]。并且 CDMP 具有诱导非软骨细胞成软骨的能力^[14-15]。因此,通过在支架内部载荷与软骨生长相关的生长因子即能促进非软骨细胞向软骨细胞的分化,从而解决软骨组织工程中种子细胞匮乏的问题。

本研究拟通过制备载荷壳聚糖微球的海藻酸钠水凝胶,并通过在壳聚糖微球中包载溶菌酶,从而调控壳聚糖的降解速率,通过壳聚糖的降解即可调控包载在其内的生长因子的释放速率。另外本实验通过对微球的形貌、其体外降解情况及复合水凝胶的形貌进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

海藻酸钠 (sigma 公司,分子量 12-19 万, M/G=1.56),壳聚糖 (MW $\sim 1 \times 10^5$,脱乙酰度 85%,自制),葡萄糖酸内酯 (sigma 公司),碳酸钙 (天津市光复精细化工研究所,优级纯,平均粒径 20 μ m),溶菌酶 (20000 U/mg 北京鼎国生物技术有限责任公司),大豆油 (医用级,广州环叶制药有限公司),KDC-160HR 型高速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司),754PC 型紫外可见分光光度计 (上海菁华科技仪器有限公司),其它化学试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 壳聚糖微球的制备 将一定量的医用大豆油及司班 80 加入至烧杯中,高速搅拌使其混合均匀。用一次性注射器将 2% 的壳聚糖溶液滴加至上述的混合液中。升温至 35 $^{\circ}$ C,调节转速,后开始滴加 1% 的多聚磷酸钠溶液, pH=5.00,以 1.7 mL/h 的速度滴加,继续搅拌 0.5 h,将产物倒入离心管中。静置 24 h 后,离心,倒去油状物,丙酮洗 2 次后再用无水乙醇洗 2 次,每次洗后离心分离产物。最后将洗后的产物真空干燥 4 h,得到壳聚糖微胶囊。制备壳聚糖微胶囊时,转速分别为 500 rpm, 600 rpm, 700 rpm, 800 rpm, 900 rpm。

制备壳聚糖包埋溶菌酶微胶囊,方法同上,其中将 2% 壳聚糖溶液换成滴加 2% 的壳聚糖和溶菌酶的混合溶液。通过利用激光粒度仪对样品粒径进行检测,每组平行测试三次。取少量不同转速下得到的壳聚糖微球及包载溶菌酶的壳聚糖微球,放入 EP 管中,滴加适量无水乙醇,超声使其分散均匀,用一次性注射器吸取适量溶液滴到玻璃片上,样品干燥喷金后,进行扫描电镜测试。

1.2.2 溶菌酶的载药量和包封率测定 实验首先得到溶菌酶浓度-吸光度的标准曲线。将真空干燥后的包载溶菌酶的壳聚糖微球溶于 2% 的乙酸溶液,磁力搅拌至其完全溶解。测定每个试样的吸光度,求其含量,每组平行测定三次,计算平均值。

溶菌酶的载药量 (LC) 和包封率 (EE) 计算式分别如下:

$$LC = (W/W_0) \times 100\% \quad EE = (W/W_0) \times 100\%$$

W: 被包载溶菌酶的质量 (即清液中溶菌酶的质量); W_0 : 缓释溶菌酶纳米微球的质量; W_0 : 溶菌酶的总投入质量。

1.2.3 壳聚糖微球的降解速率 精确称取纯壳聚糖微球及包载溶菌酶的壳聚糖微球各 0.005 g,溶于 0.1 mol/L 乙酸-0.2 mol/L 氯化钠溶液中,将样品置于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中,隔天取出一组样品利用乌氏粘度计进行黏度测试。并用外推法得到特性粘度,利用下面的公式计算壳聚糖的相对分子质量:

$$[\eta] = KM^a$$

从而得到不同时间段壳聚糖分子量的降解情况。

1.2.4 载荷壳聚糖微球的海藻酸钠水凝胶的制备 海藻酸钠凝胶制备方法参照我们以前的制备方法^[16]。称取一定量的海藻酸钠溶于去离子水中,终浓度为 2%,根据 f (钙离子与羧基的摩尔比)=0.5 的比例称取一定量的碳酸钙及质量比为 3:1 的壳聚糖微球 (分别为包载及未包载溶菌酶),超声分散后加入到海藻酸钠溶液中。按 n (葡萄糖酸内酯与钙离子的摩尔比)=0.6 的比例加入一定量的葡萄糖酸内酯溶液。搅拌 2 min 后倒入 24 孔板中成型。

冻干后的海藻酸钠水凝胶、壳聚糖微球/海藻酸钠复合水凝胶以及溶菌酶/壳聚糖微球/海藻酸钠复合水凝胶 (3 mm \times 3 mm) 样品,喷金后用 J SM26390LV 型扫描电镜观测表面形貌,扫面电压 20.0 kV。

2 结果

2.1 不同转速下微球的粒径大小

从图 1 中可以看到,包载溶菌酶的微球粒径与无包封溶菌酶的微球变化趋势一致,差别不大。随着转速的增大,微球的粒径呈现递减趋势。500 rpm 时微胶囊的粒径较大,粒径为 250 μ m 左右,转速为 600 rpm 时粒径下降很大,为 50-70 μ m,随着转速增加粒径变化不大。

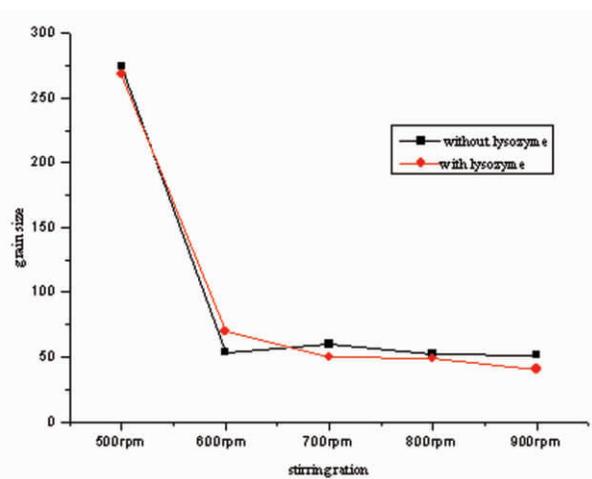


图 1 不同转速条件下微球粒径的变化

Fig.1 The change of the grain size of microsphere under different stirring ration

实验选用 7000 rpm 条件下的微球进行后续的研究。

从扫描电镜图可以看出 (图 2),不同转速下得到的微球的外貌都近乎球形,在 500 rpm 和 600 rpm 时得到的壳聚糖微球表面较粗糙,而 700 rpm 以后的壳聚糖微球表面较光滑。因此

实验后续采用 700 rpm 的转速进行微球的制备。图(d)为 700 rpm 转速下制备的溶菌酶 - 壳聚糖微球，呈球形，直径约为 50μm ,与图 1 所得的数据一致。

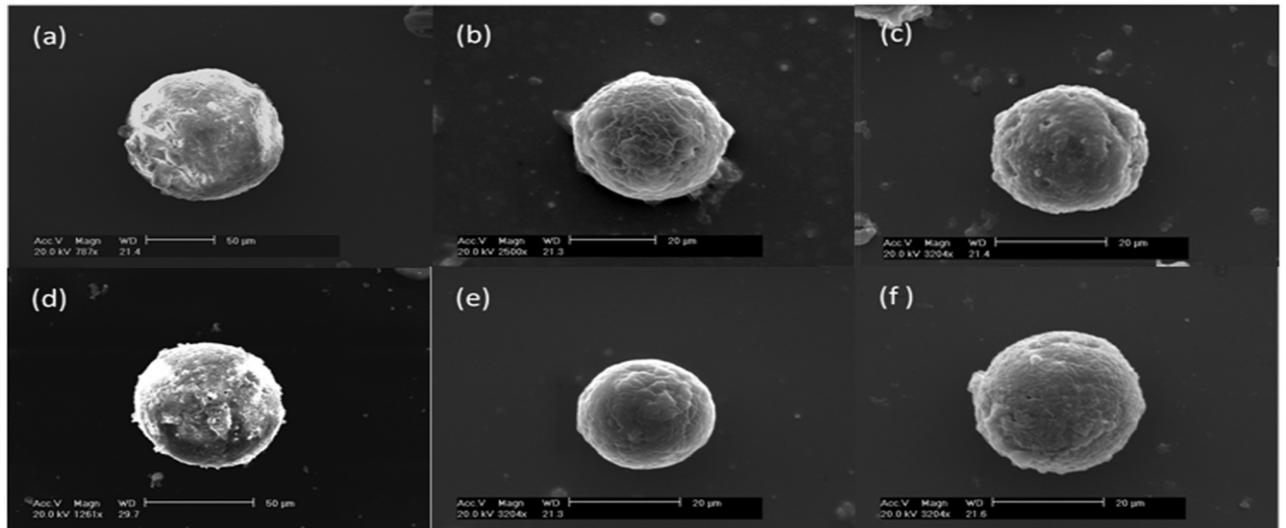


图2 壳聚糖微球 SEM 形貌图: a-c 分别为转速 500 rpm、600 rpm 和 700 rpm 制备的壳聚糖微球; d 为转速 700 rpm 制备的溶菌酶 - 壳聚糖微球; e-f 为 800 rpm 和 900 rpm 壳聚糖微球

Fig.2 SEM images of chitosan microsphere: the chitosan microsphere prepared under the stirring rate of 500rpm (a), 600rpm (b), 700rpm (c), 800rpm (e), 900rpm (f) respectively; the chitosan integrated with lysozyme under the stirring rate of 700rpm (d)

2.2 壳聚糖体外降解速率

从表 1 可以看出,9 天后,试验组(包载溶菌酶)分子量下降了 70.40%,而对照组(未包载溶菌酶)分子量只下降了

29.65%,由此可见溶菌酶的引进,显著地促进了壳聚糖的降解,因此通过控制溶菌酶的用量即可达到控制壳聚糖降解速率的效应。

表 1 壳聚糖在 NaCl-CH3COOH 溶剂中降解数据
Table 1 The degradation data of chitosan in NaCl-CH3COOH solution

Time(Day)	Intrinsic viscosity η(L/g)		Molecular weight (M)		Degradation ration (%)	
	Control	Experimental	Control	Experiment	Control	Experimental
0	0.043	0.043	103436.6	103436.6	0.00	0.00
1	0.041	0.029	99130.2	72766.7	4.16	29.65
3	0.037	0.022	90448.3	56860.7	12.56	45.03
5	0.034	0.017	83871.1	45168.5	18.92	56.33
7	0.031	0.013	77231.3	35547.8	25.33	65.63
9	0.029	0.011	72766.7	30622.1	29.65	70.40

图 3 是壳聚糖分子量的变化曲线图,由图中可以更直观地看出,溶菌酶对壳聚糖有明显的降解作用。试验组壳聚糖降解的第一天分子量下降的较快,随后下降缓慢并趋于平缓,而对照组中壳聚糖的分子量下降要缓慢得多。因此,由研究结果表明壳聚糖包封溶菌酶,不仅可以保持酶的活性,加速壳聚糖的降解,而且可以控制酶的含量来调节壳聚糖的降解速率,从而使得包载在其内的某些生长因子能够得以缓慢的释放,促进培养细胞的生长分化。另外,利用溶菌酶降解壳聚糖的性质,将壳聚糖包封溶菌酶制成微球,然后加入到海藻酸钠凝胶中,有可能提高凝胶的力学强度。

2.3 壳聚糖微球的载药量和包封率测定

通过对溶菌酶浓度 - 吸光度的标准曲线模拟,曲线方程为 $y = -0.453x^2 + 1.0143x + 0.012$,通过吸光度测量计算样品的溶菌酶浓度后,再根据公式计算得到壳聚糖微球的包封率在 25.78% - 41.89% 之间,载药量在 15.20% - 24.44% 之间。

2.4 海藻酸钠凝胶

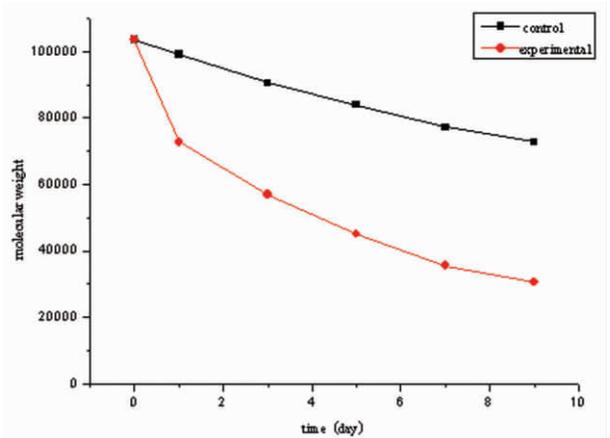


图 3 壳聚糖溶液试验组和对照组中,壳聚糖的分子量变化曲线
Fig.3 The change of molecular weight of chitosan between experimental and control group

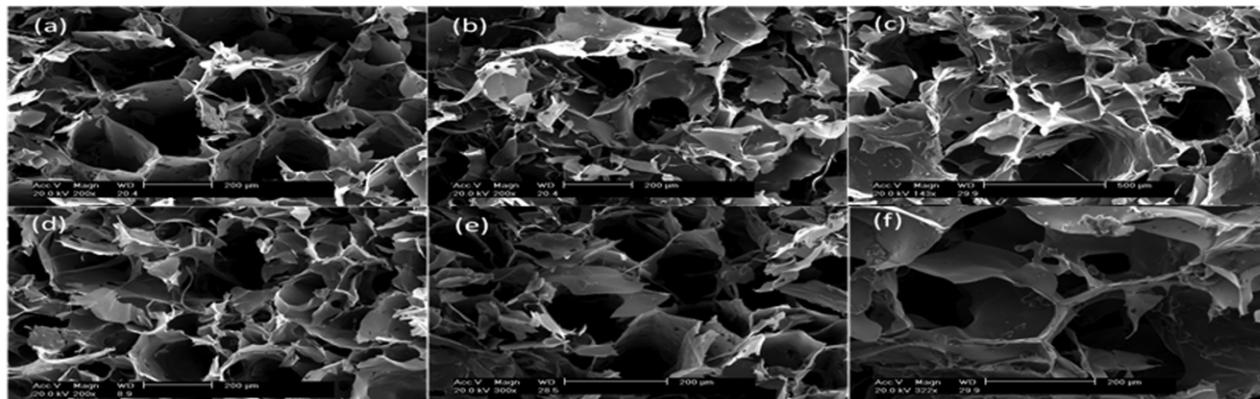


图4 海藻酸钠凝胶的 SEM 形貌观察: Alg 凝胶的横截面(a)和纵截面(b); Alg-CS 凝胶的横截面(c)和纵截面(d); Alg-CS- 溶菌酶凝胶的横截面(e)和纵截面(f)

Fig. 4 SEM images of sodium alginate: the cross (a) and lengthwise section (b) of Alg; the the cross (c) and lengthwise section (d) of Alg-CS; the cross (e) and lengthwise section (f) of Alg-CS-Lysozyme

图4为Alg凝胶、Alg-CS和Alg-CS-溶菌酶三种凝胶的横截面和纵截面扫描电镜观察图从图上可以看出冻干后三种材料均具有较好的相互连通的孔洞结构,孔径在 $100\sim 500\mu\text{m}$ 范围之间。载荷壳聚糖微球后的支架材料,孔洞数目增多,孔径大小较均匀,一方面孔隙率的增加有利于细胞的粘附和生长,同时也有利于更多细胞长入支架内部,促进再生器官的形成。另一方面孔隙有利于营养物质的运输和代谢废物的排出,且有利于新生血管的长入,一般来说, $100\sim 350\mu\text{m}$ 用作生长因子的载体,控制生长因子的释放速率,同时也使海藻酸钠水凝胶具有孔径利于骨的形成。因此,包载壳聚糖微球,不仅能够用于将来更适宜于细胞生长迁移的孔洞结构。

3 讨论

用大豆油作为油相体系,司班80作为乳化剂,当司班80乳化剂用量的增加,有助于产物成球的均匀性,降低产物粘度,减少产物微球的相互粘着现象,但也应在适当的用量范围。本实验所采用的油与乳化剂的比例为20:1。壳聚糖首先在油相中形成微乳液,继而同多聚磷酸钠交联,从而使形成具有一定的强度的微粒。壳聚糖在微球的表面形成一层聚电解质膜,从而使乳液滴收缩形成小球。溶菌酶-壳聚糖微球的形成机理同上。

搅拌速度对微球形貌有较大的影响,转速较低时,不能较好地分散乳液滴,使乳液滴在形成小球时表面出现粘着现象,使其表面不够光滑。当达到一定转速后,乳液滴能较好分散,形成小球时粘着现象较少,得到的小球表面相对较光滑。

溶菌酶催化壳聚糖降解是以内切方式作用于壳聚糖,断开糖链上的 β -1,4糖苷键的^[17]。反应后期,反应速率减慢,可能是由于反应的壳聚糖浓度降低,降解产物的生成而逐渐增大逆反应过程。壳聚糖在相同pH条件下,在醋酸中的降解比在含溶菌酶的醋酸中的降解要慢得多,其原因是壳聚糖在含溶菌酶的醋酸溶液中存在着溶菌酶和醋酸的催化降解作用,而在醋酸溶液中,只有酸的催化降解作用。

此外由于壳聚糖微囊的引进,使得载荷壳聚糖微球后的支架材料,孔洞数目增多,孔径大小较均匀。

4 结论

本文采用700rpm的搅拌速度,制备了具有较光滑表面的壳聚糖微球及包载溶菌酶的壳聚糖微球,实验比较了包载溶菌酶前后壳聚糖微球的降解速率,并且研究了壳聚糖微球的载药量及包封率。结果表明,由于溶菌酶的引进,壳聚糖微球的降解速率有了显著地提高,因此可以通过控制溶菌酶的用量从而达到控制壳聚糖微球降解速率的效应。另外实验通过将包载及未包载溶菌酶的壳聚糖微球添加至海藻酸钠水凝胶中,得到了载荷壳聚糖微球的海藻酸钠复合水凝胶。文中对复合水凝胶的形貌进行了扫描电子显微镜观察,结果显示,载荷壳聚糖微球后的支架材料,其孔洞数目增多,孔径大小较均匀。因此,包载壳聚糖微球,不仅能够用于将来用作生长因子的载体,控制生长因子的释放速率,同时也使海藻酸钠水凝胶具有更适宜于细胞生长迁移的孔洞结构。另外随着壳聚糖的降解,其降解产物可能与海藻酸钠发生交联,从而提高复合水凝胶的力学强度。

参考文献(References)

- [1] Jakobsen RB, Engebretsen L, Slaughterbeck JR. An analysis of the quality of cartilage repair studies [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2005, 87(10): 2232-2239
- [2] Kramer J, Böhrnsen F, Schlenke P, et al. Stem cell-derived chondrocytes for regenerative medicine [J]. *Transplant Proc*, 2006, 38(3): 762-765
- [3] 姚康德, 尹玉姬. 组织工程相关生物材料 [J]. *天津理工学院学报*, 2000, 16(4):1-5
Yao Kang-de, Yin Yu-ji. Biomaterials for tissue engineering [J]. *Journal of Tianjin Institute of Technology*, 2000, 16(4):1-5
- [4] 王彦君, 孔维佳, 毕胜斌. 自制天然软骨细胞外基质支架材料的生物相容性研究 [J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2004, 18(6):363-366
Wang Yan-jun, Kong Wei-jia, Bi Wei-bin. Compatibility research of self-designed scaffold biomaterials of nature extracellular matrix [J]. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology*, 2004, 18(6):363-366
- [5] Jeanie L, Drury, David J. Mooney. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(24):4337-4351
- [6] Catherine KK, Peter XM. Ionically crosslinked alginate hydrogels as

- scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(6): 511-521
- [7] L.C. van Susante, P. Buma, H. M. van Beuningen, et al. Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2000, 18(1):68-77
- [8] Guo JF, Jourdian GW, MacCallum DK. Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads [J]. *Connect Tissue Res*, 1989, 19(2):142-150
- [9] Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads [J]. *Plast. Reconstr. Surg*, 1991, 88(1):753-758
- [10] Kim SE, Park JH, Cho YW, et al. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor- β 1: Implications for cartilage tissue engineering [J]. *Journal of Controlled Release*, 2003; 91(10):365-374
- [11] Cai DZ, Zeng C, Quan DP, et al. Biodegradable chitosan scaffolds containing microspheres as carriers for controlled transforming growth factor- β 1 delivery for cartilage tissue engineering [J]. *Chin-Med J (Engl)*, 2007; 120(3):197-203
- [12] Forslund C, Rueger D, Aspenberg P. A comparative dose-response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP)-1, -2 and -3 for tendon healing in rats [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2003, 21(4):617-621
- [13] Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, et al. Erlacher. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 and protein-2 are endogenously expressed in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulate matrix synthesis [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2002, 10(5):394-401
- [14] Zalzal GH, Tomaski SM. Enlarged vestibular aqueduct and sensorineural hearing loss in childhood [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1995, 121(1):23-28
- [15] Alleyne KR, Galloway MT. Management of osteochondral injuries of the knee [J]. *Clin Sports Med*, 2001, 20(2):343-364
- [16] 赵名艳, 李立华, 周长忍, 等. 可注射海藻酸钙水凝胶的制备研究[J]. *功能材料* 2010, 41(8):1353-1356
Zhao Ming-yan, Li Li-hua, Zhou Chang-ren, et al. Preparation and characterization of calcium alginate hydrogels as injectable cartilage scaffolds [J]. *Journal of functional materials*, 2010, 41(8):1353-1356 (In Chinese)
- [17] Nordtveit RJ, Vårårum KM, Smidsrød O. Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme [J]. *Carbohydrate Polymers*, 1994, 23(4):253-260

(上接第 2033 页)

- [18] Zhou C, Yamaguchi M, Colohan AR, et al. Role of p53 and apoptosis in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(5):572-582
- [19] Napieralski JA, Raghupathi R, McIntosh TK. The tumor-suppressor gene, p53, is induced in injured brain region following experimental traumatic brain injury [J]. *Brain Res*, 1999, 71(1):78-86
- [20] McCullers DL, Sullivan PG, Sellef SW, et al. Mifepristone protects Cal hippocampal neurons following traumatic brain injury in rat [J]. *J Neurosci*, 2002, 109(2):219-230
- [21] Martinez-Lucas P, Moreno-Cuesta J, Sanchez-Sanchez F, et al. Relationship between the Arg72Pro polymorphism of p53 and outcome for patients with traumatic brain injury [J]. *Intensive Care Med*, 2005, 31(9):1168-1173