

乳液法静电纺丝 PLGA 组织工程缓释纤维的研究 *

高小寒¹ 魏蓓蓓¹ 田玲玲² 刘一浓¹ 秦明杰¹ 胡振华¹ 吴 飞^{1△}

(1 上海交通大学药学院 上海 200240 2 东华大学纺织学院 上海 201620)

摘要 目的: 研究 Dextran 对蛋白药物的释放影响。**方法:** 将模型蛋白 BSA 溶解于多糖溶液中, 通过 W/O 乳液法静电纺丝制备缓释纤维。采用 MicroBCA 法测定该纤维体外释放行为, 采用 SEC-HPLC 检测制备前后蛋白的聚集程度, 并与不含多糖的 BSA 纤维做对照。**结果:** 添加 Dextran 以后蛋白的包封率由 52.68 % 提高到 63.92 %, 第一天突释不大于药物载量的 15 %, 对蛋白单体的保持达到 85 % 以上。**结论:** Dextran 可以改善一般组织工程纤维中蛋白药物的释放, 提高蛋白药物在制剂、贮存、释放过程中的稳定性, 增加纤维的载药量。

关键词: 乳液法; 静电纺丝; PLGA; 组织工程; 葡聚糖

中图分类号: R318 R918 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)12-2224-03

Encapsulation of Proteins in PLGA fibers by Emulsion Electrospinning*

GAO Xiao-han¹, WEI Bei-bei¹, TIAN Ling-ling², LIU Yi-nong¹, QIN Ming-jie¹, HU Zhen-hua¹, WU Fei^{1△}

(1 Shanghai Jiao Tong University School of Pharmacy, Shanghai 200240; 2 Dong Hua University College of Textiles, Shanghai 201620)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of dextran on the releasing behavior of protein drug. **Methods:** BSA was dissolved in dextran solution, then the fibers was prepared by W/O emulsion electrospinning. The release behavior of the fibers in vitro was detected by MicroBCA method and BSA aggregation was determined by SEC-HPLC. The results were compared with the BSA fiber without dextran. **Results:** Drug loading for the experiment group reached 63.92 % while control group was only 52.68 %, with first day burst release less than 15 %, BSA monomer preserved more than 85 %. **Conclusion:** Dextran can improve release behavior of tissue engineering fibers, increase drug loading and drug stability during preparation, storation and release process.

Key words: Emulsion; Electrospinning; Poly (lactic-co-glycolic acid); Tissue Engineering; Dextran

Chinese Library Classification: R318 R918 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)12-2224-03

前言

静电纺丝纳米药物纤维在组织再生中的应用有极大前景, 它具有纳米级形态学和多孔性, 内部网络结构四通八达, 便于营养物质与废物和外界进行交换, 非常类似细胞外基质(ECM)^[1,2]。生物可降解高分子聚乳酸(PLA)和聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)可被制备成组织工程支架而被广泛运用于各种生物医学领域^[3-6]。研究表明乳液法静电纺丝可制备核壳结构纤维, 将水溶性蛋白药物包裹于纤维的核心^[7-9]。目前有关乳液法静电纺丝组织工程纤维支架的制备方法中, 普遍存在蛋白或多肽药物在体外的释放曲线突释现象严重^[10], 忽略对蛋白药物活性和构象的保护问题^[10,11]。2010 年 Li XQ 等^[11]提出采用 W/O 乳液法制备 BSA 和聚乳酸-己内酯共聚物(PLACL)缓释纤维。所得到的纤维体外释放曲线存在约 20 %-30 % 的突释, 没有达到理想的缓释效果。本研究在蛋白所在的水相中加入高分子多糖 Dextran, 旨在考察 Dextran 改善蛋白或多肽药物的释放曲线, 提高载药量, 并在制剂、贮存、释放过程中稳定蛋白或多肽药物的作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器厂); DZF-3 真空干燥箱(上海福玛实验设备有限公司); 85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司); 微量移液枪(Eppendorf 公司); MK3 酶标仪(芬兰 Thermo Labsystem 公司); Sartorius 电子天平(北京塞多利斯仪器系统有限公司); 96 孔酶标板(Costar[®], Corning 公司); HZ-8812S 恒温水浴摇床(太仓市科教器材厂); 液相色谱仪(韩国 YoungLin 公司); SEC-HPLC 色谱柱(TSK-GEL G2000SWXL, 7.8X300mm, TOSOH 公司); XW-80A 涡旋混合器(上海其特分析仪器有限公司); ULTRA55 扫描电镜(SEM, Zeiss 公司)。BSA(上海思吉生物制品有限公司); MicroBCA 蛋白浓度测定试剂盒(Pierce 公司); PLGA(Lakeshore 公司); Dextran(Sigma 公司); 二氯甲烷、氯仿、司班 80、磷酸氢二钠等其它试剂均为分析纯, 采购自国药集团。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 乳液法 PLGA 静电纺丝纤维支架的制备 称量 Dextran 固体粉末 50 mg, 充分溶解于超纯水 0.5 mL 中。随后称量 BSA 固体粉末 25 mg, 溶解于 Dextran 溶液中作为内水相。再将 750 mg PLGA 溶解于 DMF 和 CHCl₃ 等体积混合有机溶剂 2.5 mL

* 基金项目: “国家重大新药创制”针对生物技术药物的相关给药技术平台(2009ZX09310-007)

作者简介: 高小寒(1986-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 组织工程纤维支架

△通讯作者: 吴飞, 电话: +86(21) 3420-5072, E-mail: feiwu@sjtu.edu.cn

(收稿日期: 2010-01-08 接受日期: 2010-01-31)

中,加入 0.1 mL 助悬剂司班 80 作为外油相。随后内水相逐滴加至外油相中,采用磁力搅拌 1000 rpm,30 min,形成 W/O 乳液。将上述 W/O 乳液加入注射器中,加高压静电,使用微量注射泵和接收器,在室温静电纺织成纤维薄膜,制备自东华大学纺织学院丁辛课题组。将纤维薄膜在室温下静置晾干,得到乳液法静电纺丝组织工程纤维。纤维可塑性强,可依据需要塑造造成各种形状的纤维支架。空白对照组则用 BSA 水溶液代替内水相,其余步骤和体系中 BSA 质量比例均保持一致。

1.2.2 纤维支架体外释放实验 在纤维膜上均匀选取三处,每处精密称量 10 mg 纤维,加入 1 ml PBS 释放液,于 37 °C、60 rpm 气浴摇床培养,定时取出上清液并补加等体积 PBS(pH=7.4)释放液,取出样品采用 MicroBCA 方法测试 BSA 的含量,以时间为横坐标、释放量为纵坐标描绘释放动力学曲线。对照组操作步骤同上。

MicroBCA 方法具体步骤简述如下。将 BSA 固体粉末溶解于 PBS(pH=7.4)缓冲液中配制成一系列浓度($\mu\text{g/mL}$) 80、40、20、10、5、2.5。将 Micro BCA 试剂盒中试剂 A、B、C 按照 25 : 24 : 1 的体积比进行混合。在 96 孔板上每孔分别加入 150 μL 之前配制的不同浓度的 BSA 溶液,并用 PBS(pH=7.4)缓冲液做空白对照。再向每个孔中加入 150 μL 混合好的 MicroBCA 工作液,每个样品做两个复孔。37 °C 下反应 2 h 后,酶标仪 570 nm 下测定吸光度。以吸光度值对 BSA 标准品浓度进行线性回

归后得到标准曲线,最后依据标准曲线从样品吸光度值推算样品中 BSA 的释放量。包封率可通过用二氯甲烷洗去纤维中 PLGA 回收 BSA 后,以 MicroBCA 测量。

1.2.3 蛋白形态 SEC-HPLC 分析 色谱柱:凝胶 TSK-GEL G2000SWXL 柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μm);流动相:PBS 缓冲液(pH=7.4)(过滤,超声后使用)。流速:1.0 mL/min;检测波长:214 nm;柱温:室温;进样量:20 μL 。

纤维用二氯甲烷洗去 PLGA 后回收 BSA,溶于 PBS 后检测。

2 结果

2.1 BSA-PLGA 纤维形态和包封率

图 1(A)为实验组纤维的 SEM 照片,图 1(B)为空白对照组的 SEM 照片。图片中显示葡聚糖的存在与否基本没有改变纤维形态,纤维的直径分布在 200 nm 到 1 μm 之间。实验组和对照组的理论负载量均为 530 μg 。实验组的负载量为 338.78 μg ,包封率为 63.92%,对照组的负载量为 279.2 μg ,包封率为 52.68%。Dextran 可以明显提高纤维载药量。

2.2 BSA-PLGA 纤维体外累积释放情况

相对对照组,添加 Dextran 可以缓解突释情况,呈现平稳的缓释状态。

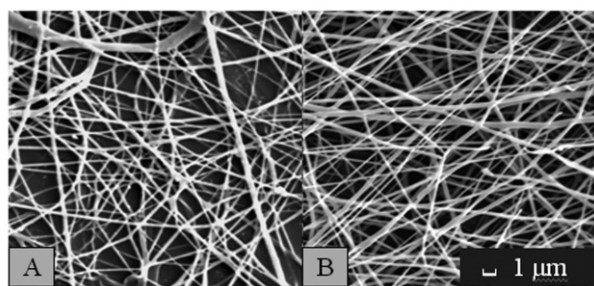


图 1 BSA-PLGA SEM 照片 (A)实验组 (B)对照组

Fig.1 SEM micrographs of BSA-PLGA fiber with(A) and without dextran(B)

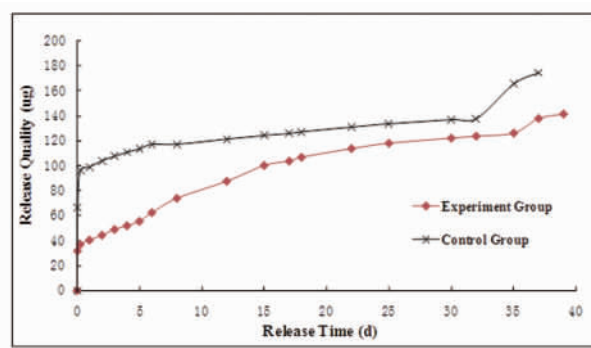


图 2 BSA-PLGA 纤维支架体外累积释放量

Fig.2 BSA-PLGA fiber cumulative in vitro release quality

2.3 蛋白形态 SEC-HPLC 分析

保留时间 6.5 min 左右的是 BSA 的单体峰,单体峰之前都有聚集峰。通过单体峰和聚集峰的积峰面积比值可看出,BSA 原液中单体的比例为 79.04%,实验组中单体比例为 72.87%,

对照组中单体比例为 62.12%。以 BSA 原液中单体的比例作为基数,Dextran 对蛋白单体的保持达到 85%以上,可以明显提高 BSA 在制剂过程中的稳定性。

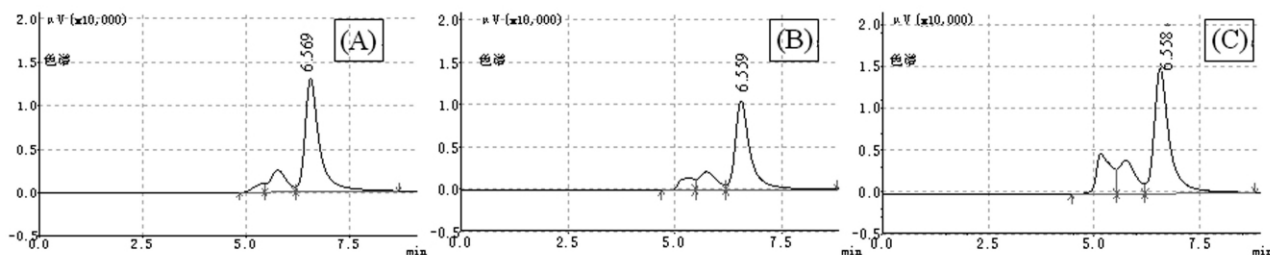


图 3 SEC-HPLC 色谱图 (A)BSA 原液 (B)实验组 (C)对照组

Fig. 3 SEC-HPLC charts (A) BSA solution (B) experiment group (C) control group

3 讨论

虽然静电纺丝已作为一个可行的聚合物处理技术应用在药物释放和组织工程,但其真正的潜力还没有得以实现。科学

家们尝试将药物混合到电纺纳米纤维中,制备骨架型控释给药系统。目前文献^[12-15]上多采用共混方法,在成纤的同时将药物载入纤维中。一般用药物与成纤材料的溶液或熔融液作纺丝液,

对稳定性差的药物或与纺丝材料没有共同溶剂的药物,一般采用乳液或悬浮液作为纺丝液。相对于后整理技术,共混药物纤维中药物分布在纤维内部,分散均匀,缓、控释效果较好。药物一般通过扩散机制不断从纤维表面渗出。一些研究者尝试用不同的聚合物的单体或混合物制备药物纤维以达到较好的缓、控释效果^[16]。由于需要将药物和聚合物溶解在相同的溶剂中,使用范围因此受到限制。而且简单地将药物和聚合物混合极易使蛋白变性失活,并且常导致药物在纤维表面聚集,出现初期突释效应。部分变性的细胞因子聚集会在体内产生严重的免疫反应,甚至使体内自行分泌的细胞因子也受到抗体的抑制。由此出现了同轴共纺技术。该技术可制备壳/芯结构的超细纤维,且壳、芯成分之间可以不相混溶。将药物引入超细纤维的芯层,壳层聚合物将起到屏障的作用,形成一种储库型药物释放系统。药物经口服或其他方式进入人体后,随着壳层材料在组织液作用下不断降解,芯层中的药物将缓慢释放出来^[17,18]。通过合理调节壳层材料的成分和加工参数将能够获得理想的控释效果。但是已有的相关报道大多忽略对蛋白药物在制剂过程中生物稳定性的考察。有国外的研究表明高分子多糖海藻酸盐对释放的调节作用以及对生物大分子的活性保持作用。1998年 Wayne RG 等^[19]发现高分子多糖海藻酸盐温和的凝胶化作用可将蛋白、细胞或 DNA 固定在海藻酸盐网络体系中,从而保持完整的生物学活性。2007年 Tilakaratne 等^[20]采用聚丙烯中空纤维包裹海藻酸钙凝胶和内皮细胞生长添加剂(ECGS),进行了体外 142 小时的短期释放。通过控制海藻酸钙的浓度为 1.5%、2%、3%,进行平行试验发现海藻酸钙浓度越大,蛋白的缓释情况越优,释放的总时间常数越大。随后,Tilakaratne 等选择 1.5% 海藻酸钙的浓度在路易斯老鼠模型中用聚丙烯纤维与聚砜纤维做对照实验,发现在 21 天的体内活性释放过程中,移植后 7 到 17 天,组织和纤维界面聚丙烯纤维的促血管新生作用几乎是聚砜对照组的两倍。本研究在研究高分子多糖 Dextran 缓释突释、调节释放的同时,重点考察了 Dextran 对蛋白形态的保护。以可降解高分子材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物为基质,有 Dextran 作为“内亲水相”,在内水相中加入 Dextran 可以和缓释高分子共同调节蛋白药物的释放速率,根据治疗需要控制释放速率,可以阻滞蛋白药物向外水相泄漏,从而提高纤维载药量;通过增大粘度降低蛋白药物分子的可动性,减少聚集现象的发生;高分子多糖与蛋白药物有很好的生物相容性,可以减少由于蛋白药物与高分子的直接接触而引起的吸附,可以提高蛋白药物在制剂、贮存、释放过程中的稳定性。本方法制得的纤维可以改善一般组织工程纤维中蛋白药物的释放曲线,提高蛋白药物在制剂、贮存、释放过程中的稳定性,增加纤维的载药量。可持续释放半个月至三个月且第一天突释不大于药物载量的 15%,对蛋白单体的保持达到 85%以上。今后的工作可进一步研究不同的多糖比例对释放、蛋白稳定性及载药量的影响。

参考文献(References)

- [1] Lakshmi SN, Cato T, Laurencin. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery [J]. *Advanced Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2006, 102: 47-90
- [2] Chung HG, Park TG. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59: 249-262
- [3] Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as

- orthopedic devices[J]. *Biomaterials*, 2000, 21: 2335-2346
- [4] Papkov SM, Agashi K, Laya A, et al. Polymer carrier for drug deliver and tissue engineering [J]. *Advanced Drug Delivery Review*, 2007, 59:187-206
- [5] Kohane DS, Langer R. Polymeric biomaterials in tissue engineering [J]. *Pediatric Research*, 2008, 63: 487-491
- [6] Kumbhar SG, Nukavarapu SP, James R, et al. Electrospun poly (lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2008, 29:4100-4107
- [7] Qi HX, Hu P, Xu J, et al. Encapsulation of drug reservoirs in fibers by emulsion electrospinning: morphology characterization and preliminary release assessment [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 2327-2330
- [8] Yang Y, Li XH, Qi MB, et al. Release pattern and structural integrity of lysozyme encapsulated in core-sheath structured poly(DL-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning [J]. *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics*, 2007, 69:106-116
- [9] Yang Y, Li XH, Cui WG, et al. Structural stability and release profiles of proteins from core-shell poly (DL-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning [J]. *Journal of Biomedical Materials*, 2007,86:374-385
- [10] Lara CL, Gregory CL, Brian JS, et al. An anisotropic nanofiber/microsphere composite with controlled release of biomolecules for fibrous tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2010, 31:4113-4120
- [11] Li XQ, Su Y, Liu SP, et al. Encapsulation of proteins in poly (l-lactide-co-caprolactone) fibers by emulsion electrospinning [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 75:418-424
- [12] Bianco A, Bertarelli C, Frisk S, et al. Electrospun polyalkylthiophene/polyethyleneoxide fibers: Optical characterization [J]. *Synthetic Metals*, 2007, 157:276-281
- [13] Kenawy ER, Bowlin GL, Mansfield K, et al. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly (ethylene-co-vinylacetate), poly (lactic acid), and a blend [J]. *Journal of Controlled Release*, 2002,81: 57-64
- [14] Xu XL, Yang LX, Xu XY, et al. Ultrafine medicated fibers electrospon from W/O emulsions [J]. *Journal of Controlled Release*, 2005, 108:33-42
- [15] Xu XL, Zhuang XL, Chen XS, et al. Preparation of core-sheath composite nanofibers by emulsion electrospinning [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2006, 27:1637-1642
- [16] Kim TG, Lee DS, Park TG. Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly (ϵ -caprolactone) and poly (ethylene oxide) [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 338:276-283
- [17] Huang ZM, He CL, Yang AZ, et al. Encapsulating drug in biodegradable ultrafine fibers through coaxial electrospinning [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2006, 77A(1):169-179
- [18] Han XJ, Huang ZM, He CL, et al. Coaxial electrospinning of PC (shell)/PU (core) composite nanofibers for textile application [J]. *Polymer Composites*, 2008, 29:579-584
- [19] Wayne RG, Siow FW. Protein release from alginate matrices [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, 31:267-285
- [20] Tilakaratnea HK, Stephen KH, Mark EA, et al. Characterizing short-term release and neovascularization potential of multi-protein growth supplement delivered via alginate hollow fiber devices [J]. *Biomaterials*, 2007, 28:89-98