

·研究简报·

包埋于 PLGA 膜中的 BSA 海藻酸钙微球的制备及其释放行为*

张汉威 蔡 晴 贝建中 王身国**

(中国科学院化学研究所 高分子物理与化学国家重点实验室 北京 100080)

关键词 海藻酸钙微球, 牛血清白蛋白(BSA), 聚乳酸与羟基乙酸共聚物(PLGA), 释放行为

在组织工程中,为了促进和调节细胞在细胞支架上的增殖和分化,一些特殊的生物活性分子(生长因子(Growth Factor,简称GF)),必须引入支架.这些生长因子是一类具有诱导和刺激细胞增殖、维持细胞存活等生物效应的多肽蛋白类物质,因此,在组织工程研究中,生长因子是三个重要因素之一.但是生长因子很容易失去生物活性,尤其是在有机溶剂中会迅速失活^[1,2].由于在制备细胞支架的过程中往往会使用一些有机溶剂,因此,如何在细胞支架中引入生长因子,保护生长因子的生物活性,是生长因子在细胞培养过程中成功的发挥作用的关键所在.

本文采用微球包裹保护法,尝试将具有生物活性的分子引入支架内.试验中选用海藻酸钠为微球的基材,牛血清白蛋白(BSA)为蛋白类物质的模型进行包裹试验.海藻酸盐是一种从褐藻中提取的阴离子型聚多糖,由于分子主链上带有羧基侧基,它可以与多种二价、三价或多价的阳离子(例如 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Fe^{3+})络合而形成水凝胶.利用海藻酸盐的这种特性,可以包裹很多水溶性的药物,尤其是水溶性的蛋白质及多肽类物质^[3,4].海藻酸钙微球可以在有机溶剂中稳定存在,因此可以有效地避免有机溶剂对蛋白质活性的破坏.文献中报道,海藻酸钙微球有很多制备方法,包括乳化法及滴加法^[4-6],采用乳化法制备微球,往往需要有机溶剂作分散介质,因此不适于本试验包裹活性蛋白类物质;使用滴加法可以不接触有机溶剂,但粒径一般比较大,只有使用特殊的滴加法才可以制备出粒径较小的微球.文献报道曾有人采用高压静电成囊装置制备粒径较小的微球^[7],它是依靠高压直流电分散液滴,从而得到粒径较小

的微球,但这种装置比较复杂,一般用于制备少量的微球.而本文中采用的是一种比较简洁的方法,压缩空气分散液滴法,即利用压缩空气分散液滴,可以很容易制备不同粒径的微球.本文研究了制备条件对微球粒径的影响,并用SEM观察了微球的细致结构,制备了不同粒径的包裹BSA的海藻酸钙微球,研究BSA在海藻酸钙微球中的释放行为及粒径对BSA的释放速度的影响.聚乳酸与羟基乙酸共聚物(PLGA)是一种合成降解高聚物,在组织工程中,PLGA是制备细胞支架最广泛的生物可降解材料,因此本文选PLGA作为制膜的材料,将包裹BSA的微球包埋在PLGA致密膜中模拟生长因子负载于支架上,进行其释放行为的研究.

1 主要试剂及处理

海藻酸钠,北京试剂公司;BSA, Sigma公司,直接使用;L-丙交酯、乙交酯, Purac公司(Netherlands),乙酸乙酯重结晶纯化;异辛酸亚锡, Sigma公司,直接使用.

2 微球的制备及扫描电镜(SEM)观察

一定质量的海藻酸钠溶解在去离子水中,配成浓度2 wt%溶液,滤去不溶杂质,滤液在100℃回流1 h,并在冰箱中保存^[6].海藻酸钙微球的制备,首先将10 mL上述海藻酸钠溶液加入注射器中,通过11G的针头在压缩空气的作用下,加到100 mL的 CaCl_2 3%溶液中(如图1所示), CaCl_2 溶液的pH值由4 mol/L的盐酸调节到4~5,钙化15 min, CaCl_2 溶液被倾出.然后将预交联的微球转移至100 mL 5%的 CaCl_2 溶液中继续钙化15 min(pH=4~5),钙化后的微球用去离子水清洗3次,冷冻干燥制备成多孔的海藻酸钙微球.包裹BSA的微球的制备是将50 mg BSA与10 mL 2%海藻酸钠

* 2003-10-31 收稿, 2003-12-26 修稿; 国家重点基础研究资助项目(项目号 973G199054306); ** 通讯联系人

溶液混合均匀,其余操作相同.

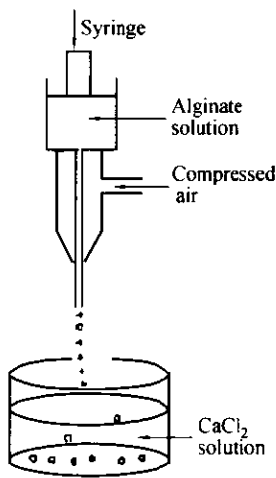


Fig. 1 Schematic of the spray device

微球粒径统计与分析由计算机辅助的显微图象分析系统完成,每个样品分析 3 组,每组 100 个粒子.微球的表面及内部结构通过扫描电镜观察.利用环氧树脂包埋固化,采用超薄切片的方法将微球切开,在扫描电镜下观察微球的断面结构.

3 负载包埋有 BSA 的微球的 PLGA 膜的制备

PLGA(L-丙交酯/乙交酯:85/15 摩尔比)的制备及纯化按文献所述^[8]. PLGA 的重均 (M_w)及数均 (M_n)分子量由 GPC 测得 ($M_w = 86000$, $M_n = 67000$).将 PLGA 溶解于氯仿中形成 8% 聚合物溶液,取 20 mg 包裹 BSA 的海藻酸钙微球分散在 5 g PLGA 溶液中,混合均匀,浇铸在四氟乙烯的模具中,在室温下挥发掉大部分有机溶剂,然后将膜从模具中取出,在真空干燥箱(37℃)中干燥 48 h 备用.

4 BSA 的负载量的测定及释放试验

微球内包裹的 BSA 的含量采用下述方法测定.将 20 mg 包裹 BSA 的微球放入 10 mL NaOH 的溶液中,微球全部破坏,BSA 完全溶解于溶液中,取出一定量的释放液,用紫外分光光度计在波长 500 nm 下测定.

微球的负载率及包裹率由以下公式计算:
负载率(%) = L/M 包裹率(%) = L/L_0
其中 L 为微球内 BSA 的实际重量, L_0 为 BSA 的

投料量, M 为负载 BSA 的微球的质量.

微球及负载微球的 PLGA 膜内 BSA 的释放采用相同的方法,即将 20 mg 微球(或包埋 20 mg 微球的 PLGA 膜)置于 10 mL 磷酸缓冲溶液中,将其放置在 37℃的,50 r/min 的摇床中进行释放实验,每隔一定的时间,取 0.5 mL 释放液,紫外分光光度计在 500 nm 波长下,测得吸收数据,根据 BSA 含量与紫外光吸收标准曲线,计算出 BSA 的含量.

5 海藻酸钙微球的粒径控制及结构表征

海藻酸钙微球采用压缩空气离散液滴法,在 $CaCl_2$ 水溶液里钙化成微球,制备过程始终没有接触有机溶剂,适宜于包埋生物活性大分子.微球的粒径通过调节压缩空气的压力来控制,当压缩空气进入滴加装置,在针头的周围形成一个环绕气流,当有海藻酸盐溶液从针头挤出时,被气流吹成小液滴,分散在 $CaCl_2$ 溶液中钙化成球,因此,当空气压力一定时,就可以得到一定粒径的微球.从表 1 看出,采用直接滴加制备海藻酸钙微球的粒径是毫米级(2.5 ~ 3 mm),随着空气压力的增加,微球的粒径也就越来越小,直到几百个微米.试验中选用了粒径 300 ~ 500 μm , 500 ~ 800 μm 的海藻酸钙微球做包裹及释放试验.

海藻酸钙微球钙化交联,经冷冻干燥后,内部的结晶水被升华,从而形成了如图 2 所示的内外结构.表面(如图 2a, b)是凹凸不平的致密结构,可以有效的将被包裹的蛋白质类物质与外界环境隔离,起到保护作用.而内部是多孔的结构,(图 2c, d 微球断面结构),孔在微球内占有相当大的体积,孔的直径一般在几十 μm 左右,可以包裹大量药物.微球的这种结构对于蛋白质的包裹、保护及释放均非常有利.

6 微球的负载量及释放行为的研究

包裹 BSA 的微球的制备也是采用压缩空气离散液滴法,将 BSA 与海藻酸钠的混合溶液直接喷射在 $CaCl_2$ 溶液中钙化成球.在此制备过程中,必须尽量减少制备过程中 BSA 的损失.Haguest 和 Dellacherie 的研究^[9]表明,溶液的 pH 值会影响蛋白质的形态和与海藻酸盐的结合,他们提出包裹蛋白质类物质时,将 $CaCl_2$ 溶液的 pH 值调到蛋白

Table 1 Dependence of size of alginate microspheres on air pressure

Air pressure (MPa)	0	0.3 ~ 0.5	0.7 ~ 0.9	1 ~ 1.2	1.2 ~ 1.5
The size of microspheres (μm)	2500 ~ 3000	1500 ~ 2000	1000 ~ 500	500 ~ 800	300 ~ 500

* The standard of needle is 11 G, and the concentration of alginate solution is 2 wt% .

质的等电点值时,会显著减少蛋白质在包裹时的损失.由于 BSA 的等电点值为 5.1,为了避免包裹

BSA 时的不必要的损失,试验中 CaCl_2 溶液的 pH 值均调节为 4~5 左右.

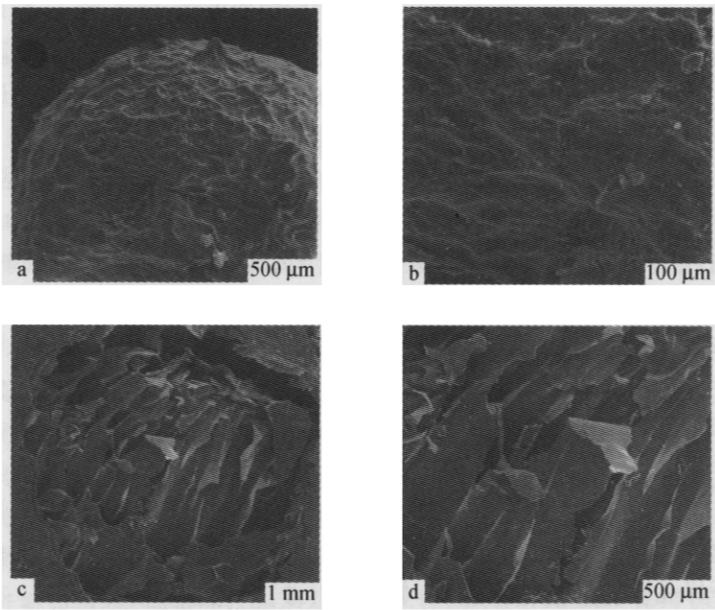


Fig. 2 Scanning electron micrographs of Ca-alginate microspheres
The surface:magnification a) $\times 100$; b) $\times 500$
The inner-structure: magnification c) $\times 50$; d) $\times 100$

制备了两种不同粒径的包裹 BSA 的微球,分别测得它们的实际包裹率和负载率.列于表 2.

Table 2 The encapsulating of BSA in Ca-alginate microspheres					
Size (μm)	Theoretical loading (mg)	BSA-loading microspheres weight(mg)	Measured loading (mg)	Encapsulating efficiency (%)	Loading efficiency (%)
300 ~ 500	4	20	2.20	55	11
500 ~ 800	4	20	2.56	64	12.8

从表中可以看到,粒径大的微球的包裹率略高于粒径小的微球,500~800 μm 的微球的包裹率可以达到 64%.300~500 μm 的微球的包裹率为 55%.由此可见,两种粒径的海藻酸钙微球均对 BSA 有很高的包裹率,从而可以实现对 BSA 的包裹及保护作用.

通过微球的释放试验,研究了微球的粒径对 BSA 释放的影响,图 3 是包裹 BSA 的微球的释放曲线图.

如图 3 所示,在 pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液中,BSA 可以持续地、完全地从海藻酸钙微球中释放出来,但粒径不同,其释放行为也不同,在释放初期,两种不同粒径微球释放速度相同,随着释放进行,粒径小的释放较快,粒径大的释放较慢.BSA 的释放速度是受其从微球中扩散过程所控制,释放初期,两种微球的 BSA 均从粒子表面扩散到介

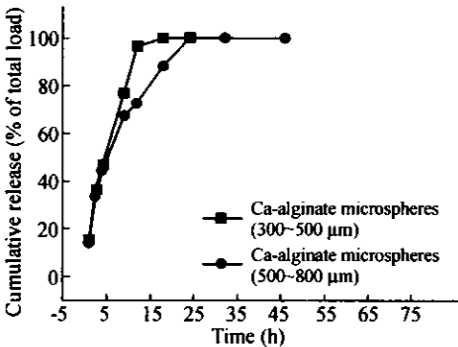


Fig. 3 BSA release curve from the microspheres

质中,因此释放速度相同,随后,粒子内部的 BSA 扩散距离随粒径大小而变化,粒径大的扩散距离大,释药速度慢,释放时间也就相应的延长.两种粒径的微球均可以将包裹的 BSA 以一定速度完全释放出来.在释放过程及释放完成后,微球的外观,形态无任何变化.因此,可以实现对蛋白质类物质的保护和控制释放.

7 负载包裹 BSA 微球的 PLGA 膜的释放行为的研究

PLGA 是组织工程中应用最广泛的细胞支架材料之一.为此,我们选用 PLGA(85/15)的聚合物作为负载 BSA 微球的材料,进行膜内释放的研究以模拟组织工程支架上的生长因子的释放.释放

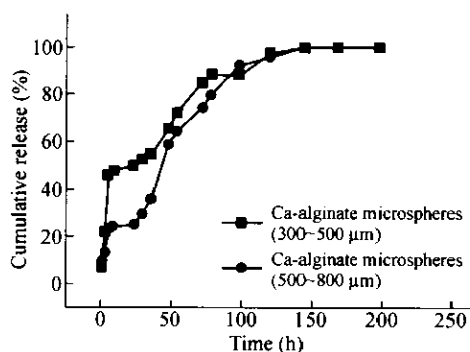


Fig. 4 BSA release curves of the films embedded alginate microspheres

曲线如图 4 所示。

如图 4 所示,BSA 也可以从负载 BSA 的微球

的 PLGA 膜内持续、完全地释放出来,比较从微球中直接释放,其速度慢了很多,如 BSA 从粒径为 300 ~ 500 μm 微球中释放出 50% 所用时间仅为 5 h,而在膜中释放出来相同含量的 BSA 要用 36 h. 造成这种差别的原因可能是 BSA 在释放过程中不仅要透过微球,还要透过 PLGA 膜才能释放到缓冲液中的缘故,但这种负载微球的膜中较为缓慢的释放行为更有利于细胞在支架上的生长. 结果表明,在浇模过程中,海藻酸钙微球可以在有机溶剂中稳定存在,从而可以避免 BSA 接触有机溶剂,保持了其生物活性,并且在之后的释放试验中,微球内包裹的 BSA 也可以持续的、完全的释放出来,从而达到了预期的效果。

REFERENCES

- 1 Lam X, Duenas E, Daugherty L, Levin N, Cleland L. *J Control Release* 2000, 67: 281 ~ 292
- 2 Edelman E, Mathiowitz E, Langer R. *Biomaterials*, 1991, 12: 619 ~ 626
- 3 Pomershein R, Schrezenmeir J V. *Macromol Chem Phys*, 1994, 195: 1557 ~ 1567
- 4 Wagne R Gombotz, Wee Siow Fong. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, 31: 267 ~ 285
- 5 Gheorghe F, Claudio N, Adrian C, Jacques D, Marguerite R. *Biomaterials*, 1999, 20: 1427 ~ 1435
- 6 Whealey M A, Chang M, Park E, Langer R. *J Applied Polym Sci*, 1991, 43: 2123 ~ 2135
- 7 Li B G, Hua Z Z, Liu Z J. *J University of Shanghai for Science and Technology*, 2000, 22: 189 ~ 193
- 8 Cai Q, Bei J Z, Wang S G. *J Biomed Sci Polym Ed*, 2000, 11: 273 ~ 288
- 9 Huguest M L, Dellacherie E. *Process Biochemistry*, 1996, 31: 745 ~ 751

THE PREPARATION OF PLGA ENCAPSULATED Ca-ALGINATE MICROSPHERES LOADED WITH BSA AND THE RELEASE BEHAVIOR OF BSA

ZHANG Hanwei, CAI Qing, BEI Jianzhong, WANG Shenguo

(State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract Alginate microspheres were formed by coagulation of sodium alginate in CaCl_2 solutions, followed by lyophilization which could create the porous structure. Bovine serum albumin (BSA) was incorporated into the microspheres by mixing BSA with sodium alginate prior to coagulation. The release behavior of BSA from the Ca-alginate microspheres was studied. Further, the alginate microspheres loaded with BSA were embedded in PLGA films by mixing the alginate microspheres with PLGA solutions in order to study the sustained release of BSA from the PLGA film, which is widely used as cell scaffold materials in tissue engineering. The release behavior of BSA from the PLGA film embedded alginate microspheres indicated potential application for keeping the bioactivity of the growth factor.

Key words Ca-alginate microspheres, Bovine serum albumin (BSA), Poly(L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA), Release behavior