

可生物降解肝素钠/两性壳聚糖复合物 用于蛋白药物 pH 响应释放研究*

汪一娟 蒋宏亮** 胡应乾 朱康杰

(浙江大学高分子科学与工程系 杭州 310027)

摘 要 制备了一类可生物降解肝素钠/两性壳聚糖复合物(HP/ACS),并探索将其用于蛋白药物 pH 响应释放.两性壳聚糖由壳聚糖与丙烯酸加成反应得到,丙烯酸取代度可通过丙烯酸/壳聚糖投料比调控;用胶体与 pH 浊度滴定研究了肝素钠与两性壳聚糖的复合作用,发现两组分在一定 pH 范围内能通过静电相互作用形成复合物,复合转变临界 pH(pH_c)与两性壳聚糖中丙烯酸取代度有关,取代度越低, pH_c 值越高.以牛血清白蛋白(BSA)为模型,测定了其在复合物中包埋及不同 pH 介质中的释药行为.结果表明,BSA 可以在非常温和条件下有效包埋于复合物中,包埋率接近 100%;BSA 从复合物中释放具有很高的 pH 响应性,释放转变在很窄的 pH 范围内(<0.4 pH 单位)完成,释放转变临界 pH(pH_c')可由两性壳聚糖中丙烯酸取代度调控.复合物形成和蛋白质释放在对 pH 依赖性上存在很好的相关性.同时还发现,在中性介质中(pH 7.4),复合物对 BSA 具有很好的缓释作用,BSA 持续释放时间可达 15 天左右.

关键词 pH 响应水凝胶,聚电解质复合物,蛋白药物,聚电解质/蛋白质复合物

过去 20 多年中,pH 响应水凝胶在生物医学领域引起了人们广泛的重视,可实现药物在肿瘤、炎症、胃肠道以及细胞内涵体等能产生酸性微环境部位的定位给药^[1-5].由于上述组织或细胞器的 pH 环境与正常生理条件相差不大,对 pH 响应水凝胶研究的一个关键问题是提高药物释放的 pH 敏感性^[6].早期研究的是一些单组分聚电解质水凝胶^[7]或无特殊相互作用的聚电解质共混水凝胶^[8,9],但它们存在水凝胶溶胀转变 pH 范围宽以及药物释放 pH 响应性低等缺点.疏水性聚电解质水凝胶和大分子复合物水凝胶改进了这一缺点^[10,11],但它们一般以聚(甲基)丙烯酸为材料,在体内无法降解排出;同时,采用溶胀-收缩方式包埋药物,存在费时、药物包埋率低等缺点.我们课题组^[12,13]以聚阴离子/明胶复合物为蛋白药物载体,实现了这类药物高度 pH 敏感释放.但由于明胶的等电点为 5.0,复合物制备时所需 pH 值偏低,另外药物释放转变的临界 pH 也不可调.因而,获得一类可生物降解、等电点可调的两性聚电解质,代替明胶与聚阴离子复合,有望能克服上述载体的缺点.

壳聚糖具有良好的生物相容和生物降解性,被广泛应用于生物医学领域.对其进行化学改性,

可获得具有不同等电点的两性聚电解质;与未改性壳聚糖相比,两性壳聚糖水溶性与降解性质都得到改善^[14].目前,这类材料已被用作体内长时间循环高分子^[15]和磷酸钙的添加剂^[16].肝素是一种糖胺聚糖,同样具有良好的生物降解和生物相容性.另外,肝素和两性壳聚糖分别与动物结缔组织中主要成分透明质酸和胶原有着类似的电荷性质,这对蛋白药物活性的保持非常有利^[17].本文以肝素钠(HP)和两性壳聚糖(ACS)为材料,牛血清白蛋白(BSA)为模型蛋白,制备了肝素钠/两性壳聚糖复合物(HP/ACS),研究了 BSA 的包埋与释放行为.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

丙烯酸(化学纯),上海五联化工厂;壳聚糖(脱乙酰度为 85%, $M_w = 1.86 \times 10^5$)购自 Sigma,1%醋酸溶解提纯后使用;肝素钠($M_w = 1.1 \times 10^4$),取自猪的肠粘膜,由杭州九源基因公司提供;BSA,购自华义生物工程公司;实验所用水均为双蒸水.紫外-可见分光光度计(Cary-100, Varian);PHS-3C 型 pH 计,上海雷磁仪器厂;LGI-

10 冷冻干燥机,宁波新芝科器研究所。

1.2 ACS 的制备及表征^[14]

ACS 由丙烯酸接枝壳聚糖得到。具体制备过程为,0.5 g 的壳聚糖中加入一定量的丙烯酸和 25 mL 的蒸馏水,待壳聚糖完全溶解后,溶液在 50℃ 下磁力搅拌反应 3 天。反应停止后,用 1 mol/L NaOH 将反应液的 pH 值调到 10~12,使未反应的丙烯酸转变成钠盐。所得溶液用纤维素透析膜(分子量 3500 g·mol⁻¹)透析两天除去小分子盐后冷冻干燥,得到白色海绵状不同组成的 ACS。

ACS 化学结构通过红外光谱(IR)与核磁共振(¹H-NMR)表征。红外光谱仪为 Bruker Vector 22,聚合物经稀盐酸溶解后直接成膜于盐片上;¹H-NMR (NMX 500, Bruker)以 1% 氘代醋酸的氘代水溶液为溶剂,室温测定。

1.3 胶体滴定^[18]

所有胶体滴定实验均在室温下进行。以 ACS1 样品为例,25 mg 的 ACS 溶解在 25 mL 1% 的醋酸水溶液中,肝素钠直接溶解于水中(1 mg/mL),用 0.1 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L HCl 将两者 pH 调至 6.5。将肝素钠溶液滴加到磁力搅拌中的 ACS 溶液中,用紫外-可见分光光度计于 420 nm 处记录溶液透光度随肝素钠滴加量的变化,透光度最小处即表明两者完全复合。

1.4 pH-浊度滴定^[19]

所有浊度滴定实验均在室温下进行。肝素钠溶解于双蒸水中(1 mg/mL),ACS 溶于 1% (V/V) 的醋酸水溶液中(1 mg/mL),将两者按胶体滴定所测得比例混合,用 0.1 mol/L NaOH 调节上述混合体系 pH 至 11~12。以 0.1 mol/L HCl 逐渐滴加到溶液中以降低体系 pH 值,pH 计用来记录滴定过程中体系 pH 值的变化,紫外-可见分光光度计于 420 nm 处记录体系透光度随 pH 值变化情况。

1.5 HP/ACS 复合物的制备^[12,13]

BSA 与 HP 共溶于双蒸水中;ACS 溶于 1% 醋酸溶液中,两者 pH 均调整到胶体滴定时设定的值(ACS1、ACS2 与 ACS3 体系的 pH 分别为 6.5、6.0 和 3.85)。将 BSA/HP 溶液缓慢滴加到磁力搅拌的 ACS 溶液中,记录滴定过程中浊度变化直到滴定终点(最大浊度),得白色絮状复合物,离心分离后用双蒸水清洗 3 次,放入冷冻干燥器干燥,冰箱保存备用。

1.6 BSA 包埋量与包埋率测定

精确称取 20 mg 的 HP/ACS 复合物,加入 pH

7.4、0.5 mol/L 的 PBS 缓冲溶液,置于 37℃ 恒温振荡器中振荡,待复合物完全溶解后(约 1 天),用 Lowry 法测定溶解液中 BSA 含量。BSA 的包埋量为单位质量复合物中实际所含的 BSA 量,包埋率为复合物中 BSA 实际质量与 BSA 理论投入量的比值。

1.7 BSA 释放研究

称取等量(20 mg)的 HP/ACS 复合物,加入 2 mL 0.1 mol/L 不同 pH 值的缓冲溶液,放入 37℃ 的恒温振荡器中振荡,定期取出上清液,用 Lowry 法测定其中 BSA 的含量,并补充新鲜的缓冲液。

2 结果与讨论

2.1 ACS 的合成与表征

ACS 反应路线参照文献[14],产物结构用¹H-NMR 表征(图 1)。1.92 的化学位移为壳聚糖中乙酰胺甲基质子峰,丙烯酸与氨基加成得到的亚甲基质子峰位于 2.5 与 3.3 处,壳聚糖主链中质子为 3.07、3.5~4.1 以及 4.85 的宽峰,峰的详细归属见图 1。从核磁谱还可以看出,丙烯酸与壳聚糖的反应为壳聚糖氨基与丙烯酸碳碳双键之间的加

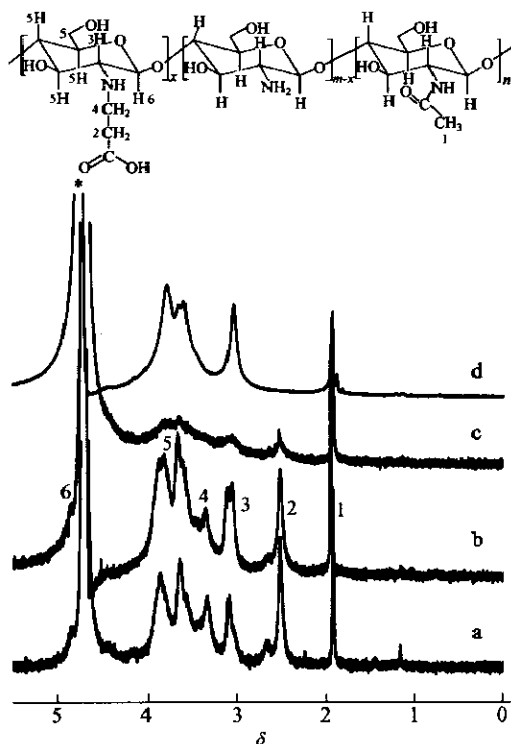


Fig. 1 ¹H-NMR spectra of amphoteric chitosan with different substitution degree of acrylic acid

a) ACS3; b) ACS2; c) ACS1; d) Chitosan
CD₃COOD/D₂O (1%) was used as a solvent.

成,不存在丙烯酸羧基与壳聚糖氨基之间的缩合,核磁谱图中仅存在加成反应新产生的亚甲基质子峰(2.5 与 3.3),而在 8.01 与 6.22 处观察不到丙烯酸与壳聚糖缩合作用后保留的不饱和双键质子峰.丙烯酸取代度根据 2.5 与 1.92 处峰面积比例计算得到,结果如表 1 所示.可见,随着丙烯酸与壳聚糖投料比增大,丙烯酸取代度也相应增加,例如当丙烯酸/壳聚糖投料比为 2.06 mL/g 时,丙烯酸取代度达到 45.3%.

Table 1 Synthetic conditions and substitution degree of acrylic acid					
Reaction condition	W_{chitosan} (g)	$V_{\text{acrylic acid}}$ (mL)	Temperature (°C)	Time (d)	Substitution degree(%)
ACS1	0.5	0.17	50	3	2.4
ACS2	0.5	0.69	50	3	38.7
ACS3	0.5	1.03	50	3	45.3

2.2 HP/ACS 的复合作用

图 2 是 3 种不同取代度的 ACS 与 HP 混合体系的浊度滴定曲线.起初体系为澄清透明,直到 pH 达到一临界 pH_0 ,溶液透光度急剧减小,透光度转变在很窄的 pH 范围内发生(<0.1 个单位),肉眼观察到溶液由澄清变成乳白色,随 pH 降低,体系逐渐有小颗粒产生;pH 继续降低到一定数值,体系透光度又逐渐变大.体系由澄清变混浊以及由混浊到澄清的临界 pH 值与 ACS 中丙烯酸取代度有关,取代度越大,临界 pH 越低.例如 HP/ACS1 体系在 pH 7.22 时浊度开始增大,而对 HP/ACS3 体系 pH_0 降为 6.2.上述现象可以归因于 HP/ACS 之间的静电复合作用.在等电点之上,

ACS 带负电,与 HP 不存在复合作用;pH 低于等电点时,ACS 带正电,与 HP 通过静电作用形成聚电解质复合物;当体系 pH 很低时,HP 中羧基的离子化被部分抑制,电荷密度减小,导致复合物部分解离,体系透光度增加.ACS 的等电点与丙烯酸取代度有关,丙烯酸取代度越高,等电点越低,浊度转变的临界 pH 值也越小.

2.3 HP/ACS 复合物制备与 BSA 包埋

HP/ACS 复合物制备与 BSA 包埋采用胶体滴定法^[18],HP/ACS1、HP/ACS2 与 HP/ACS3 复合物制备的 pH 分别为 6.5、6.0 和 3.85,对前两种复合物均在接近中性环境下制备,这对蛋白药物的活性保持非常有利.所有情况下 BSA 在复合物中的包埋率均接近 100%,BSA 的包埋量可通过改变 BSA/HP 的投料比调节.表 2 列出了不同制备条件下 BSA 的包埋率与包埋量,可见当 BSA/HP 投料比为 0.41 时,BSA 在复合物中的包埋量可达到 23%.上述结果跟以前肌红蛋白(Mb)在聚甲基丙烯酸(PMAA)/明胶复合物中包埋结果类似^[12,13].在使用胶体滴定法制备复合物时,体系中所有阴离子包括 HP 与 BSA 所带静负电荷均能与 ACS 中氨基形成离子键,并达到完全电中和,即在最终体系中 HP、ACS 以及 BSA 三者之间存在静电相互作用,而 HP/ACS 复合后形成沉淀,因而体系中所有 BSA 均能从溶液中吸附于复合物中,损失很少.与目前常用的蛋白药物控释载体例如聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)微球、水凝胶等相比,这种聚电解质复合物在包埋蛋白药物方面具有下列优点,(1)制备环境为水体系,避免使用有机溶剂;(2)制备条件非常温和(pH 接近中性,低速搅拌);(3)包埋过程中药物损失很少.

Table 2 Dependence of BSA entrapment on BSA/heparin feed ratio*

BSA/heparin weight ratio	0.072	0.135	0.255	0.41
Complex yield (%)	82.3	84.6	81.2	89.5
Entrapment (%)	5	9.02	15.76	23
Entrapment efficiency (%)	99.79	99.85	98.67	99.12

* ACS1 was used for preparing complex; Heparin/ACS1 = 25/9.06

2.4 BSA 从 HP/ACS 复合物中的释放行为

图 3 是 BSA 在不同 pH 缓冲溶液中从 HP/ACS1 复合物中释放曲线,可见 BSA 的释放强烈依赖于释放介质 pH 值.例如,在 pH 7.0 介质中于 315.5 h 时 BSA 释放量仅为 6.67%,而当释放介质 pH 为 7.4 时,BSA 的释放量达到 85.5%,释放转

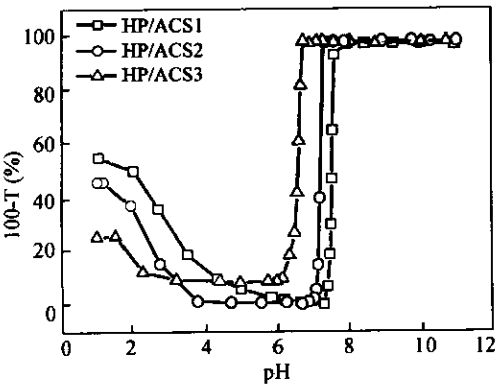


Fig. 2 Turbidity of heparin/ampholytic chitosan systems versus pH
Titrated with 0.1 mol/L HCl solution
Ampholytic chitosan concentration: 1 mg/mL; Heparin/ACS1 = 25/9.06, Heparin/ACS2 = 25/7.38 and Heparin/ACS3 = 25/9.42

变在 0.4 个 pH 单位内完成(图 4). 同时,从图 4 还可看出,BSA 释放转变的临界 pH(pH'_0)与 ACS 中丙烯酸取代度有关,取代度越大, pH'_0 值越低.例如,BSA 从 HP/ACS1 复合物中释放的 pH'_0 为 7.2,而 HP/ACS3 复合物则降为 6.2. 比较 BSA 从 HP/ACS 复合物中的释放(图 3)与 HP/ACS 复合曲线(图 2),可见蛋白质的释放与体系的复合在对 pH 的依赖性上存在很好的相关性.众所周知,复合物的形成是一个可逆过程,而蛋白质从复合物中的释放可归因于复合物的解离,当复合物稳定存在时,包埋其中的蛋白质与 HP 或 ACS 之间存在静电相互作用,通过扩散作用释放的量很低,因而,蛋白质释放的 pH 转变与 HP/ACS 之间的复合紧密相关.

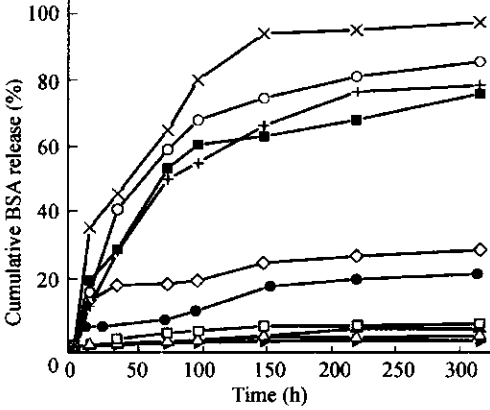


Fig. 3 Cumulative BSA release from heparin/ACS1 complexes in 0.1 mol/L buffer at 37°C
■ pH = 1.0; ● pH = 2.0; ▲ pH = 4.0; ▴ pH = 6.6; △ pH = 6.8; □ pH = 7.0; ◇ pH = 7.2; ○ pH = 7.4; + pH = 7.6; × pH = 8.0

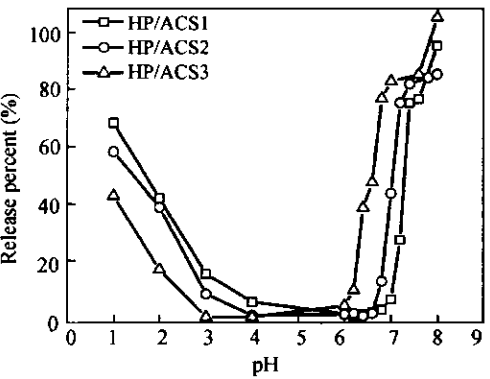


Fig. 4 Dependence of cumulative BSA release on pH
BSA release was tested at 219 h for HP/ACS1 complex, 105.5 h for HP/ACS2 and 75 h for HP/ACS3 complex

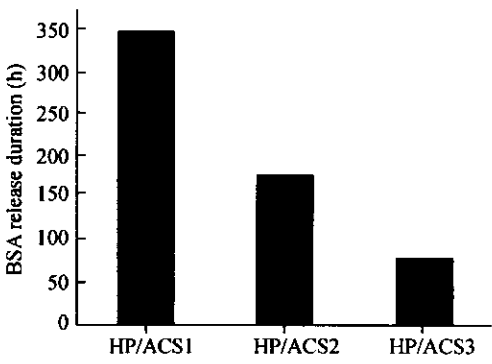


Fig. 5 BSA release duration from heparin/ACS complex with different substitution degree of acrylic acid

合物对 BSA 具有很好的缓释作用,BSA 从复合物中完全释放的时间与 ACS 中丙烯酸取代度有关,取代度越小,BSA 完全释放时间越长.例如,在 pH 7.4 释放介质中,BSA 从 HP/ACS3 复合物中完全释放时间约为 80 h,而在 HP/ACS1 复合物中,BSA 释放时间延长至约 350 h.与其它蛋白药物释放载体相比,BSA 从 HP/ACS 复合物中暴释量较低,释放速度相对平稳.复合物的解离是释放介质中小分子盐与大分子离子键之间的交换过程,其解离速度由聚电解质复合物溶胀、小分子盐扩散进入聚电解质复合物内部以及小分子盐与大分子离子键交换等过程决定.由于 ACS 分子量较高,在复合状态下分子链高度缠结,因而其溶胀、链运动速度均较慢,导致复合物解离需要一定时间.丙烯酸取代度越小,ACS 正离子电荷密度越高,与 HP 相互作用越强,解离所需时间也越长,在中性条件下 BSA 的释放速度也越慢.Dumitriu 等报道了聚阴离子多糖与未经改性的壳聚糖形成的复合物在中性条件下能稳定存在,包埋于其中的酶能完全固定化,不存在渗漏释放,这进一步证明了我们上面结果^[20].

综上所述,HP/ACS 在一定 pH 范围内能通过静电相互作用形成聚电解质复合物,两者开始复合的 pH 与 ACS 中丙烯酸取代度有关.BSA 可在温和条件下有效包埋于复合物中,包埋率达 100%,包埋量达 23%. BSA 从复合物中的释放存在很高的 pH 依赖性,释放的 pH 转变小于 0.4 个单位;通过调节丙烯酸的取代度,可改变 BSA 释放转变的临界 pH.此外,在中性条件下,HP/ACS 复合物对 BSA 的释放还具有很好的缓释作用,BSA 完全释放时间可达 15 天左右.综上,该类 HP/ACS 复合物体系具有制备简单、蛋白质包埋条

从图 5 还可看出,在中性条件下,HP/ACS 复

件温和、高度敏感的 pH 响应释放及中性条件下 物相容和生物降解性,可使该体系有望在蛋白药
释放速度可调等优点,再加上材料本身良好的生 物的 pH 响应释放与缓释方面得到应用。

REFERENCES

- 1 Yatvin M B, Kreutz W, Horwitz B A, Shinitzky M. *Science*, 1980, 210: 1253 ~ 1255
- 2 Lee E S, Na K, Bae Y H. *J Control Release*, 2003, 91: 103 ~ 113
- 3 Ponchel G, Touchard F, Wouessidjewe D, Duchene D, Peppas N A. *Int J Pharm*, 1987, 38: 68 ~ 70
- 4 Bulmus V, Woodward M, Lin L, Murthy N, Stayton P, Hoffman A. *J Control Release*, 2003, 93: 105 ~ 120
- 5 Yessine M A, Leroux J C. *Adv Drug Delivery Rev*, 2004, 56: 999 ~ 1021
- 6 Leroux J C. *Adv Drug Delivery Rev*, 2004, 56: 925 ~ 926
- 7 Kou J H, Amidon G L, Lee P I. *Pharm Res*, 1988, 5: 592 ~ 597
- 8 Gudeman L F, Peppas N A. *J Appl Polym Sci*, 1995, 55: 919 ~ 928
- 9 Lee Y M, Kim S H, Cho C S. *J Appl Polym Sci*, 1996, 62: 301 ~ 311
- 10 Siegel R A, Firestone B A. *Macromolecules*, 1988, 21: 3254 ~ 3259
- 11 Klier J, Scranton S A R, Peppas N A. *Macromolecules*, 1990, 23: 4944 ~ 4949
- 12 Jiang H L, Zhu K J. *J Appl Polym Sci*, 2001, 80: 1416 ~ 1425
- 13 Jiang H L, Zhu K J. *Pharm Develop Technol*, 2001, 6: 225 ~ 234
- 14 Sashiwa H, Yamamori N, Ichinose Y. *Macromol Biosci*, 2003, 3: 231 ~ 233
- 15 Kato Y, Onishi H, Machida Y. *Biomaterials*, 2000, 21: 1579 ~ 1585
- 16 Wang X H, Ma J B, Wang Y N, He B L. *Biomaterials*, 2001, 22: 2247 ~ 2255
- 17 Lapcik L Jr, Lapcik L, Smedt S De, Demeester J, Chabrec'ek P. *Chem Rev*, 1998, 98: 2663 ~ 2684
- 18 Kokufuta E, Takahashi K. *Polymer*, 1990, 31: 1177 ~ 1182
- 19 Mattison K W, Brittain I J, Dubin P L. *Biotechnol Prog*, 1995, 11: 632 ~ 637
- 20 Dumitriu S, Chornet E. *Adv Drug Delivery Rev*, 1998, 31: 223 ~ 246

BIODEGRADABLE HEPARIN/AMPHOLYTIC CHITOSAN COMPLEXES FOR pH-SENSITIVE RELEASE OF PROTEINS

WANG Yijuan, JIANG Hongliang, HU Yingqian, ZHU Kangjie

(Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract A series of biodegradable heparin/ampholytic chitosan (HP/ACS) complexes were developed for pH-sensitive release of protein drugs. ACS was synthesized by using acrylic acid (AA) and chitosan, and the substitution degree (SD) of AA can be modulated by the AA/chitosan feed ratio. The complexation between heparin and ACS was studied by colloid and turbidity titration. It was found that HP and ACS can form complexes within a certain pH range and the critical pH value for complexation (pH_ϕ) is related to the SD of AA. The larger the SD, the higher the pH_ϕ value. Bovine serum albumin (BSA) was selected as a model protein, and its entrapment and release behavior from HP/ACS complexes were investigated. The results show that the entrapment efficiency of BSA is very high ($\sim 100\%$), and the BSA release is extremely pH-dependent. The transition of BSA release can occur within a rather narrow pH range (< 0.4 unit). The critical pH value for the transition (pH'_ϕ) can also be modulated by SD. It seems that the BSA release transition is correlated with HP/ACS complexation. In addition, the sustained release of BSA from the complex can be achieved at pH 7.4 and the release duration can be up to 15 days.

Key words pH-Responsive hydrogel, Polyelectrolyte complex, Protein, Polyelectrolyte/Protein complex