

生物可降解温度敏感性水凝胶用于甲状旁腺相关肽的可控释放*

李 聪¹ 张 喆³ 贺超良² 庄秀丽² 陈 莉³ 蔡 青¹
薛 妍¹ 张 宾¹ 王世振¹ 孟维艳^{1**} 陈学思^{2**}

(¹ 吉林大学口腔医学院 长春 130021)

(² 中国科学院长春应用化学研究所 生态环境高分子材料重点实验室 长春 130022)

(³ 东北师范大学化学学院 长春 130024)

摘 要 通过以两端带有碳碳双键的聚己内酯为生物可降解交联剂, *N*-异丙基丙烯酰胺为单体, 通过自由基共聚合成了生物可降解的温度敏感性水凝胶, 研究了此水凝胶体系在不同温度下的溶胀率及通过对其透光率的测试研究了水凝胶体系的温度响应性. 以此水凝胶体系作为载体研究了 PTHrP1-34 (甲状旁腺相关肽) 在不同温度下的体外药物释放行为. 体外模拟释放表明, 此水凝胶载药体系能够实现 PTHrP 1-34 长达 13 天的持续释放, 基于 PTHrP1-34 具有能够增加成骨细胞活性和数量并能促进骨形成的作用, 同时这种有益效果取决于低剂量及间歇给药的方式.

关键词 温度敏感性, 水凝胶, 控制释放, 甲状旁腺相关肽

甲状旁腺激素 (parathyroid hormone, PTH) 是甲状旁腺主细胞分泌的一种碱性单链多肽类激素, 可利用基因重组技术制备, 并与人体天然甲状旁腺素在结构和功能上基本一致. PTH 可以增加成骨细胞的活性和数量、促进骨形成、增加骨密度, 并能减少骨折的发生^[1,2]. 2002 年 PTH 被美国 FDA 批准作为骨质疏松的治疗药物.

甲状旁腺相关肽 (PTHrP) 是在研究恶性肿瘤引起的高钙血症机制过程中发现的一种多肽类物质. 其氨基末端的 36 个氨基酸的结构和功能与 PTH(1-34) 十分相似, 两者不仅一级序列同源、三级结构相似, 而且可以与同种受体结合. 近来研究表明, PTHrP 具有与 PTH 相同的促进成骨细胞或未成熟的成骨样细胞增生的作用. 活体动物实验表明 PTHrP 的不同肽段 (PTHrP1-34, 1-36 和 1-74) 均可使骨质疏松大鼠的骨量及生物力学强度明显提高^[3-5].

临床研究证实, 系统性骨质疏松对牙槽骨的矿物质含量和剩余牙槽骨体积都有明显影响^[6,7], 而牙槽骨质量和剩余牙槽骨体积都是决定口腔种植体初期稳定性的关键性因素. 因此, PTHrP 优异的成骨作用在口腔种植领域有广泛的

应用前景.

然而 PTHrP1-34 促进骨骼合成代谢作用取决于低剂量、间歇的给药方式, 大剂量的 PTHrP 既会引起破骨细胞的广泛活化, 又会引起成骨细胞内特异性转录因子、骨钙素、骨唾液蛋白和 I 型胶原蛋白的表达水平不同程度的下降, 使成骨细胞的功能受到了抑制. 而且 PTHrP 存在着易变性、半衰期短、价格昂贵等缺陷. 因此研制控制其缓释的载体, 并提高其生物利用效率极为必要.

水凝胶是由水溶性的高分子通过物理或化学交联而成的含水聚合物网络^[8-10]. 环境敏感性高分子水凝胶是智能型水凝胶的一种, 能够对外界刺激产生敏感响应^[11-15]. 由于温度与人体生理环境密切相关, 所以温度敏感性水凝胶的研究受到了广泛的关注^[16,17]. 温度敏感性水凝胶可以随着环境温度的变化改变其自身的亲疏水性和凝胶网络的尺寸及体积, 因而其作为药物载体时可随着温度的变化控制药物的释放速率^[18]. 目前研究最广泛的温度敏感性水凝胶是以聚 *N*-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAAm) 为温度敏感性材料的水凝胶, 其存在着一个最低临界溶解温度 (LCST) (32℃). 当温度低于 32℃ 时, 聚 *N*-异丙基丙烯酰

* 2012-01-20 收稿, 2012-03-15 修稿; 国家自然科学基金 (基金号 50973108, 51003103 和 21174142)、科技部国际合作与交流专项 (项目号 2010DFB50890) 和吉林省科技发展计划 (项目号 201101082 和 20110332) 资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: mengsitong66@163.com; xschen@ciac.jl.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2012.12013

胺亲水溶解于水中;而当温度高于 32℃ 时,聚 *N*-异丙基丙烯酰胺疏水析出。然而,大多数基于聚 *N*-异丙基丙烯酰胺的水凝胶是通过非生物降解的交联剂交联,因而限制了其医学应用。

本文以两端带有碳碳双键的聚己内酯为交联剂^[19-21],*N*-异丙基丙烯酰胺为单体,通过自由基共聚合成了一种生物可降解的温度敏感性水凝胶网络,并对其结构进行了表征,研究了此水凝胶体系在不同温度下的溶胀率,并通过对透光率的测试研究了水凝胶体系的温度响应性。另外,以此水凝胶体系作为载体研究了载有 PTHrP1-34 的凝胶在不同温度下的释放行为。模拟释放结果表明,该水凝胶体系能实现所载多肽类药物的持续释放,因而在口腔种植领域有良好的应用前景。

1 实验部分

1.1 实验材料与纯化

ϵ -己内酯、*N*-异丙基丙烯酰胺购自 Sigma 化学试剂公司;2-甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)与甲基丙烯酸(MAAc)购自北京化工厂,减压蒸馏以去除阻聚剂;辛酸亚锡($\text{Sn}(\text{Oct})_2$)、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)、三乙胺、丙烯酰氯购自上海化学试剂公司;甲状旁腺相关肽购自上海吉尔生化公司;甲苯和二氯甲烷用氢化钙回流干燥。

$^1\text{H-NMR}$ 采用 Bruker AM-300 核磁共振仪;SEM 采用 Micrion FEI PHILIPS 场发射扫描电子显微镜;FTIR 采用 BIO-Rad Win-IR 型付里叶红外光谱仪记录 FTIR 光谱;样品和 KBr 混合后研磨压片测试;紫外光谱采用紫外分光光度计(Shimadzu UV-2401PC)测定,并装有程序控温附

件(Shimadzu S-1700),测试波长设定为 500 nm。

1.2 甲基丙烯酸羟乙酯-聚己内酯-丙烯酸酯(HEMA-PCL-AC)大分子交联剂的合成

在装有磁力搅拌子的安培瓶中加入 0.5 mL HEMA、4 mL ϵ -己内酯、0.014 g 辛酸亚锡、0.067 g 对苯二酚以及 40 mL 甲苯,120℃ 反应 48 h。反应产物在乙醚中沉淀、过滤,并用乙醚反复洗涤沉降物,40℃ 真空干燥 24 h 后得到甲基丙烯酸羟乙酯-聚己内酯,产率为 81.7%。然后将 2.15 g 甲基丙烯酸羟乙酯-聚己内酯溶于 20 mL 二氯甲烷中,并加入 2 mL 三乙胺。再将 0.5 mL 丙烯酰氯溶于 10 mL 二氯甲烷慢慢滴入冰浴的甲基丙烯酸羟乙酯-聚己内酯二氯甲烷溶液中,反应 12 h,反应产物在乙醚中沉淀、过滤,并用乙醚反复洗涤沉降物,40℃ 真空干燥 24 h 后得到甲基丙烯酸羟乙酯-聚己内酯-丙烯酸酯,产率为 82.3%。甲基丙烯酸羟乙酯-聚己内酯-丙烯酸酯以氘代氯仿为溶剂进行 $^1\text{H-NMR}$ 测试以确定结构。甲基丙烯酸羟乙酯-聚己内酯-丙烯酸酯的合成路线如图 1(a)所示。

1.3 温度敏感的水凝胶的合成

水凝胶的投料比如表 1 所示。总质量为 500 mg 的 NIPAAm 和 MAA 溶于 4 mL DMSO 溶液中,加入 40 mg HEMA-PCL-AC 和引发剂过硫酸铵(APS),通氩气鼓泡 30 min 之后快速加入一定量 TEMED 并摇匀,静置反应 24 h。将所得水凝胶样品浸入去离子水中 3 天,每 12 h 至少换水 1 次,以去除未反应的单体、APS 及 TEMED。然后冷冻干燥,得到干燥的水凝胶样品。水凝胶合成路线如图 1(b)所示。水凝胶的形貌通过 SEM 进行观察。

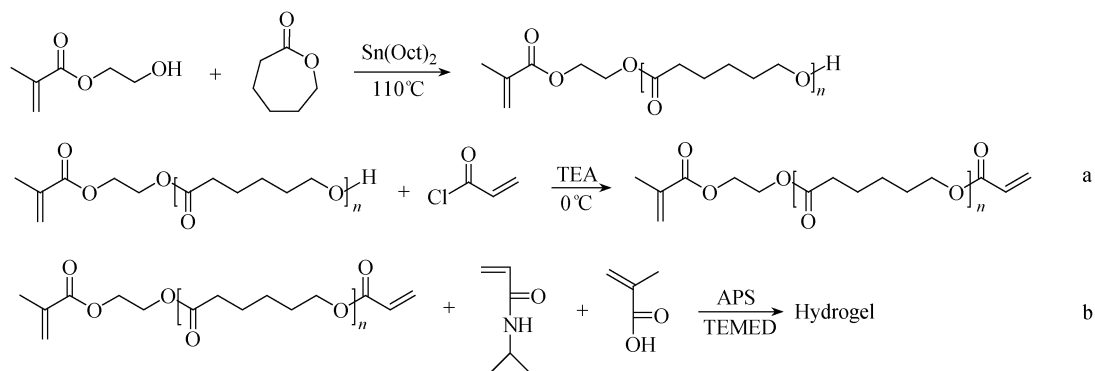


Fig. 1 Synthesis route of HEMA-PCL-AC and hydrogels

Table 1 Feeding ratio of hydrogel samples and initiator

Sample ID	NIPAAm (mg)	MAA (mg)	HEMA-PCL-AC (mg)	APS (mg)	TEMED (mg)	DMSO (mL)	PNIPAM ^a (wt%)
Gel 1	500	0	40	30	30	4	84.13
Gel 2	450	50	40	30	30	4	77.98

^a Estimated from the elemental analysis results

1.4 水凝胶的温度敏感性测试

将一定质量的水凝胶样品分别浸入 pH = 7.4 的磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液中, 在不同的温度下保持 12 h 使之达到溶胀平衡, 之后用滤纸吸干水凝胶表面的水分后称重. 水凝胶的溶胀率 SR 通过公式 (1) 计算得出:

$$SR = (W_s - W_0) / W_0 \quad (1)$$

其中 W_s 是溶胀水凝胶的重量, 而 W_0 是水凝胶的干重.

1.5 水凝胶最低临界转变温度 (LCST) 测定

将水凝胶放入 pH = 7.4 的磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液中充分溶胀, 取出充分溶胀的水凝胶放入比色皿中. 将装有水凝胶的比色皿放入紫外仪控温池架内, 控制池架温度以 0.5 K/min 逐渐升温时, 测定溶液在 500 nm 波长时的透光率, 当水凝胶的透光率为起始最大透光率的 50% 时, 则视此时温度为该溶液的 LCST.

1.6 水凝胶的体外药物释放

甲状旁腺相关肽通过溶胀-扩散的方法被载入水凝胶. 先将甲状旁腺相关肽溶于 0.01 mol/L、pH = 7.4 的 PBS 中, 配成 1 mg/mL 的溶液. 然后将一定质量的圆柱状水凝胶放入 5 mL 的甲状旁腺相关肽溶液中, 在 4℃ 下溶胀 1 天以使药物的扩散达到平衡. 接着将水凝胶取出, 37℃ 下用 PBS 冲洗其表面, 并将剩余的药物溶液和冲洗液合并, 以测定剩余的药物量.

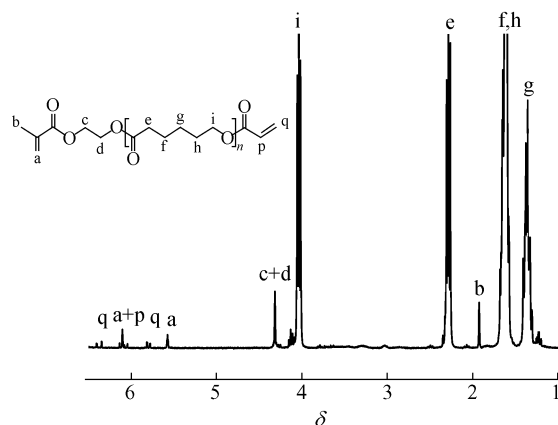
甲状旁腺相关肽的释放是将载药凝胶置于 3 mL 的 0.01 mol/L、pH = 7.4 的 PBS 溶液中, 并迅速置于 37℃ 或 20℃, 转速为 100 r/min 的震荡培养箱中, 在特定的时间间隔下, 取出 0.75 mL 的释放液并补入相同体积的原溶液. 药物浓度由甲状旁腺相关肽在 280 nm 处的紫外吸收值通过标准曲线求得.

2 结果与讨论

2.1 甲基丙烯酸羟乙酯-聚己内酯-丙烯酸酯 (HEMA-PCL-AC) 大分子交联剂的合成

HEMA-PCL-AC 的 ¹H-NMR 谱图及各个峰的

归属如图 2 所示, $\delta = 6.12$ 和 5.50 处的 2 个峰分别为甲基丙烯酸羟乙酯 (HEMA) 的双键上的 2 个质子的化学位移, $\delta = 6.45, 5.81$ 和 6.07 的 3 个峰分别为丙烯酸的双键上的 3 个质子的化学位移. $\delta = 2.15, 4.13, 1.21, 1.53$ 和 1.62 处的峰分别为聚己内酯主链的亚甲基 ($-\text{CH}_2-$) 上质子的化学位移. ¹H-NMR 结果证明了 HEMA-PCL-AC 的成功合成. 通过 HEMA-PCL-AC 核磁图中峰 a 和峰 e 的积分面积对比计算, AC-PCL-HEMA 的分子量约为 2000 左右.

Fig. 2 ¹H-NMR spectrum of AC-PCL-HEMA

2.2 水凝胶的合成

由图 3 的 Gel 1 和 Gel 2 的红外谱图可以看到在 1650 和 1545 cm^{-1} 处出现明显的 PNIPAAm 酰胺键的特征峰, 而在 1750 cm^{-1} 处可以看到聚

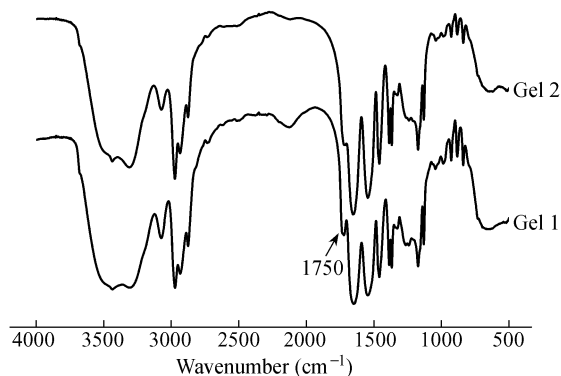


Fig. 3 FTIR spectra of Gel 1 and Gel 2

己内酯酯键的特征吸收峰,证明已合成了水凝胶.

2.3 水凝胶不同温度下平衡溶胀率的测试

图 4 是水凝胶样品在 0.01 mol/L, pH = 7.4 的 PBS 溶液中不同温度下的溶胀率变化曲线. 从图中可以看出, Gel 2 由于含有少量亲水性的聚甲基丙烯酸链段, 因而该水凝胶的 LCST 升高, 水凝胶溶胀率随温度升高缓慢降低, 并没有明显转变点. 而 Gel 1 由于没有甲基丙烯酸组分, 其溶胀率在 25℃ 至 31℃ 之间显著降低, 在温度高于 31℃ 以后, 水凝胶的溶胀率不再变化, 说明其 LCST 在 25℃ 至 31℃ 之间.

2.4 水凝胶 LCST 的测定

图 5 为水凝胶的透光率随着温度升高的变化曲线, 通常以透过率降至其初始透光率 50% 时的温度作为其 LCST. 如图所示, Gel 2 的透光率随着温度的升高缓慢降低, 60℃ 其透光率仍然为初始透光率的 80% 左右, 说明其 LCST 高于 60℃. 而 Gel 1 的透过率随着温度上升急剧减小, 31℃ 左右水凝胶的透光率降低到接近于 0, 表明水凝胶此时完全疏水收缩, 并在温度高于 31℃ 时会保持收缩状态. 水凝胶 Gel 1 的透光率降至 50% 的温度在 27℃ 左右, 低于 PNIPAAm 均聚物的 LCST (32℃), 这是由于 Gel 1 中疏水的聚己内酯的存在使得水凝胶的 LCST 降低. 水凝胶的透光率变化符合图 4 中水凝胶在不同温度下的溶胀率变化. 由此可以确定 Gel 1 的 LCST 在 27℃ 左右, 而 Gel 2 的 LCST 高于 60℃.

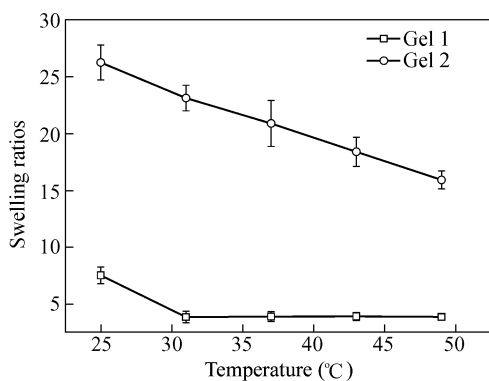


Fig. 4 Swelling ratios of hydrogels at different temperature (pH = 7.4)

2.5 水凝胶的形貌

水凝胶作为一种吸水材料, 它的溶胀性能与其孔隙率的大小密切相关, 其形貌可以通过扫描电子显微镜 (SEM) 观察. 在制样过程中为了保证样品能够反映出其实际的孔径大小, 采用了将充

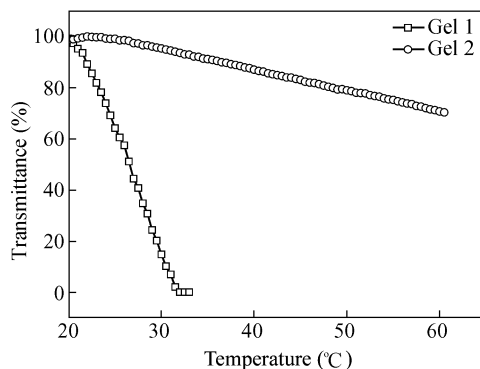


Fig. 5 Effect of temperature on the phase transition behavior of the hydrogels (pH = 7.4)

分溶胀的水凝胶样品液氮速冻的方法, 这样得到的水凝胶样品中的水不会形成较大的结晶而破坏水凝胶的原始形貌. 如图 6 所示, 水凝胶样品呈现出规则多孔的结构.

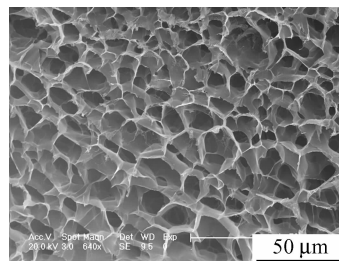


Fig. 6 SEM micrograph of Gel 1

2.6 水凝胶包载甲状旁腺相关肽的释放行为

由于甲状旁腺相关肽促进骨骼合成代谢作用取决于低剂量及间歇的给药方式, 所以水凝胶包载甲状旁腺相关肽的缓释效果是重点关注的对象. 由于水凝胶的载药率与其溶胀率有直接关系, 所以 Gel 1 的载药率为 2.41%, 而 Gel 2 的载药率为 10.78%. 如图 7 所示, 由于 Gel 2 的 LCST 高于

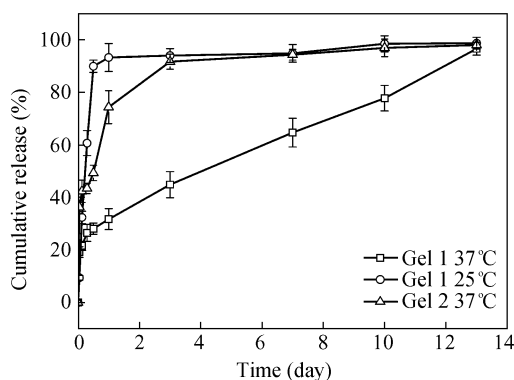


Fig. 7 Cumulative release of PTHrP from the hydrogels as a function of time

37℃,其在 37℃下处于溶胀状态,因而,凝胶所包载的甲状旁腺相关肽释放较快,约 90% 的药物在 3 天之内释放出来. Gel 1 的 LCST 在 27℃左右,水凝胶在 20℃下同样处于溶胀状态,因而其包载的甲状旁腺相关肽在一天时间内释放了约 90%. 而载有甲状旁腺相关肽的水凝胶 Gel 1 在 37℃时,由于水凝胶疏水收缩,孔隙较小,则可以有效的控制甲状旁腺相关肽的持续释放. 由图 7 中可见,在 37℃下, Gel 1 包载的甲状旁腺相关肽从该凝胶的持续释放达到 13 天. 由此可见,该温度敏感的水凝胶 Gel 1 能较好地实现甲状旁腺相关肽在生理温度下的长期持续释放,具有良好的潜在应用前景.

3 结论

通过以两端带有碳碳双键的聚己内酯为生物可降解的大分子交联剂, *N*-异丙基丙烯酰胺为主要单体,通过自由基共聚合成了生物可降解的温度敏感性水凝胶,并对其结构进行了表征. 研究了此水凝胶体系在不同温度下的溶胀率,并通过测试其透光率变化研究了水凝胶体系的温度敏感转变行为. 以此水凝胶体系作为载体包载甲状旁腺相关肽,并研究了其不同温度下的体外药物释放行为. 体外释放行为表明,该载有甲状旁腺相关肽的水凝胶体系能够实现药物在生理条件下的缓慢持续释放,因而在口腔种植领域有良好的应用前景.

REFERENCES

- 1 Philbrick W M, Wysolmerski J J, Galbraith S. *Physiol Rev*, 1996, 76: 127 ~ 173
- 2 Chen C, Koh A J, Datta N S. *J Biol Chem*, 2004, 279: 29121 ~ 29129
- 3 Stewart A F, Cain R L, Burr D B. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 1517 ~ 1525
- 4 Everhart-Caye M, Inzucchi S E, Guinness-Henry J. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81: 199 ~ 208
- 5 Horwitz M J, Tedesco M B, Gundberg C. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88: 569 ~ 575
- 6 Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. *J Dent Res*, 2007, 86: 52 ~ 57
- 7 Yang J, Farnell D, Devlin H. *J Dent*, 2005, 33: 123 ~ 129
- 8 Wylie R G, Ahsan S, Aizawa Y, Maxwell K L, Morshead C M, Shoichet MS. *Nature Materials*, 2011, 10: 799 ~ 806
- 9 Nagy K J, Giano M C, Jin A, Pochan D J, Schneider J P. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 14975 ~ 14977
- 10 Zhu Dongyu (朱东雨), Guo Jianwei (郭建维), Liang Liyan (梁利岩). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2010, (7): 857 ~ 863
- 11 He C L, Zhuang X L, Tang Z H, Tian H Y, Chen X S. *Adv Healthcare Mater*, 2012, 1: 48 ~ 78
- 12 Zheng Yunhua (郑云华), Liu Genqi (刘根起), Cheng Yongqing (程永清). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2009, (9): 922 ~ 928
- 13 Xia J L, Chen J, Tian H Y, Chen X S. *Sci China Chem*, 2010, 53: 502 ~ 507
- 14 Gao Xiaoye (高晓晔), He Chaoliang (贺超良), Zhuang Xiuli (庄秀丽), Zhao Changwen (赵长稳), Xiao Chunsheng (肖春生), Chen Xuesi (陈学思). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2011, (8): 883 ~ 888
- 15 Hawkins A M, Bottom C E, Liang Z, Puleo D A, Hilt J Z. *Adv Healthcare Mater*, 2012, 1: 96 ~ 100
- 16 Huang X, Lowe T L. *Macromolecules*, 2005, 41: 8339 ~ 8347
- 17 Zhang X Z, Zhuo R X, Cui J Z, Zhang J T. *Int J Pharm*, 2002, 235: 43 ~ 50
- 18 Tan Songwei (谭松巍), Han Chao (韩超), Wang Hongjun (王红军), Liu Dingrong (柳定荣), Tu Kehua (涂克华), Jiang Hongliang (蒋宏亮), Zhang Meihua (张梅华), Wang Liqun (王利群). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2011, (11): 1237 ~ 1243
- 19 Zhao C W, Zhuang X L, He P, Xiao C S, Sun J R, Chen X S, Jing X B. *Polymer*, 2009, 50: 4308 ~ 4316
- 20 Gan Z H, Yu D H, Zhong Z Y, Liang Q Z, Jing X B. *Polymer*, 1999, 40: 2859 ~ 2892
- 21 Wu D Q, Sun Y X, Xu X D, Cheng S X, Zhang X Z, Zhuo R X. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 1155 ~ 1162

BIODEGRADABLE THERMO-SENSITIVE HYDROGELS FOR CONTROLLED DELIVERY OF PARATHYROID HORMONE RELATED PEPTIDE

Cong Li¹, Zhe Zhang³, Chao-liang He², Xiu-li Zhuang², Li Chen³, Qing Cai¹, Yan Xue¹,
Bin Zhang¹, Shi-zhen Wang¹, Wei-yan Meng¹, Xue-si Chen²

(¹ School of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021)

(² Changchun Institute of Applied Chemistry, State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun 130022)

(³ College of Chemistry, Northeast Normal University, Changchun 130024)

Abstract A series of thermo-sensitive hydrogels were designed and synthesized *via* radical polymerization of *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) by using a biodegradable acryloyl-poly(ϵ -caprolactone)-2-hydroxyethyl methacrylate (AC-PCL-HEMA) as a cross-linker. The influence of temperature on the equilibrium swelling ratio and the optical transmittance of the hydrogel was studied. The *in vitro* release of parathyroid hormone related peptide (PTHrP) which can increase the number and viability of osteoblasts and promote bone formation, from the hydrogel was investigated. The release profiles indicated that the sustained release of PTHrP from the smart hydrogel was over 13 days, indicating that the materials have potential applications in the field of oral implantology.

Keywords Parathyroid hormone related peptide, Thermo-sensitive, Hydrogel, Controlled-release