

壳聚糖季铵盐包裹甲状旁腺激素相关肽制备纳米缓释颗粒★

罗菊英¹, 郭卫春¹, 赵胜豪¹, 赵正据², 唐 谨¹, 余 铃¹

Quaternary ammonium salt chitosan nanoparticles encapsulate parathyroid hormone-related peptide nanoparticles

Luo Ju-ying¹, Guo Wei-chun¹, Zhao Sheng-hao¹, Zhao Zheng-ju², Tang Jin¹, Yu Ling¹

Abstract

BACKGROUND: Small-scale studies have shown that low-dose, intermittent application of parathyroid hormone related peptide can effectively treat osteoporosis in postmenopausal women. But it is disadvantageous due to prone to degrade, short half-life and expensive cost, therefore it is necessary to modulate the release speed of parathyroid hormone related peptide using controlled-release system and to improve the biological efficiency.

OBJECTIVE: To prepare a novel nanoparticles for carrying drugs, and to investigate encapsulation efficiency and *in vitro* release characteristics of parathyroid hormone-related peptide.

METHODS: Quaternary ammonium salt of chitosan nanoparticles were prepared based on ionic gelation, and the characteristics were observed by fourier transform infrared spectroscopy and transmission electron microscopy, and the encapsulation efficiency and release characteristics *in vitro* of the nanoparticles were determined.

RESULTS AND CONCLUSION: Chitosan quaternary ammonium salt and sodium tripolyphosphate were mixed to form the nanoparticles when the quantity of chitosan quaternary ammonium salt and sodium tripolyphosphate was 5:1-2:1 under stirring at room temperature. The nanoparticles size was about 100-180 nm, regular sphere. With the increase of the parathyroid hormone-related peptide concentration, the drug encapsulation efficiency increased but the loading capacity reduced. The drug-loading nanoparticles showed slow release characteristics in PBS solution *in vitro*.

Luo JY, Guo WC, Zhao SH, Zhao ZJ, Tang J, Yu L. Quaternary ammonium salt chitosan nanoparticles encapsulate parathyroid hormone-related peptide nanoparticles. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(3):457-460. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 小范围研究显示, 低剂量、间歇性应用甲状旁腺激素相关肽能有效治疗绝经后妇女骨质疏松症。但其存在着易变性、半衰期短、价格昂贵等缺陷, 因此研制应用缓释系统控制甲状旁腺激素相关肽的释放速度, 提高其生物利用效率极为必要。

目的: 制备一种新型纳米载药颗粒, 探讨其对甲状旁腺激素相关肽的封装及体外释放特性。

方法: 采用离子交联法制备壳聚糖季铵盐纳米载药颗粒, 用傅里叶红外光谱、透射电镜等进行表征, 检测纳米颗粒的封装及体外释放特性。

结果与结论: 在常温磁力搅拌条件下, 当壳聚糖季铵盐与三聚磷酸钠投药量为 5:1~2:1 时可形成纳米颗粒, 粒径 100~180 nm, 为规则球形, 甲状旁腺激素相关肽投药质量浓度越高时封装率增大但载药量有所减少, 体外 PBS 溶液中纳米载药颗粒表现出缓慢释放特性。

关键词: 壳聚糖; 壳聚糖季铵盐; 纳米粒子; 甲状旁腺激素相关肽; 体外释放

doi: 10.3969/j.issn.1673-8225.2011.03.019

罗菊英, 郭卫春, 赵胜豪, 赵正据, 唐谨, 余铃. 壳聚糖季铵盐包裹甲状旁腺激素相关肽制备纳米缓释颗粒[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(3):457-460. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

壳聚糖由于其黏附性高, 生物相容性好, 无毒副作用, 被广泛用作药物载体和医用材料^[1]。但是壳聚糖在pH=6以上不能溶解, 限制了其广泛应用。N-(2-羟基)丙基-3-甲基氯化铵壳聚糖 (HTCC) 是壳聚糖的衍生物, 由壳聚糖和环氧丙烷-三甲基-氯化铵 (GTMAC) 反应制备, 其原始氨基被甲基所取代, 阻止了壳聚糖的氨基和羟基生成氢键, 提高了水溶性, 使其在中性和碱性条件下都能溶解^[2]。不仅如此, 壳聚糖季铵盐即便在中性条件下也有很强烈地提高上皮黏膜细胞透过性能, 可作为药物吸收的增强剂、基因的

转移工具、抗凝血剂、天然抗菌剂和药物释放载体^[3-4]。

甲状旁腺激素相关肽 (parathyroid hormone-related peptide, PTHrP) 是在研究恶性肿瘤引起高钙血症机制的过程中被发现的一种多肽类物质, 能有效促进骨骼合成^[5]。近来研究证实, PTHrP能促进成骨细胞或未成熟的成骨样细胞增生^[6]。活体动物实验也证实, PTHrP的不同肽段, 包括 PTHrP1-34, 1-36, 1-74均可以使骨质疏松大鼠的骨量及骨生物力学强度得到明显升高^[7]。PTHrP1-34促进骨骼合成代谢作用取决于低剂量及间歇给药方式, 而当PTHrP大剂量应用时, 一方面引起破骨细胞广泛活化, 另一方面成骨细胞内特异性转录因子、骨钙素、骨唾液

¹Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China; ²Department of Surgery, Clinical Hospital of Xianning College, Xianning 437100, Hubei Province, China

Luo Ju-ying★, Studying for master's degree, Lecturer, Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
yaotiao2003@yahoo.com.cn

Correspondence to: Guo Wei-chun, Doctor, Associate professor, Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
guoweichun@hotmail.com

Received: 2010-07-15
Accepted: 2010-08-25

¹ 武汉大学人民医院骨科, 湖北省武汉市 430060;
² 咸宁学院临床医学院外科, 湖北省咸宁市 437100

罗菊英★, 女, 1969年生, 湖北省咸宁市人, 武汉大学第一临床医学院生物医学工程专业在读硕士, 讲师, 主要从事护理教育研究。
yaotiao2003@yahoo.com.cn

通讯作者: 郭卫春, 博士, 副教授, 武汉大学人民医院骨科, 湖北省武汉市 430060
guoweichun@hotmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)03-00457-04

收稿日期: 2010-07-15
修回日期: 2010-08-25
(20100715022/M·Y)

蛋白和 I 型胶原蛋白的表达水平均有不同程度的下调, 反映了成骨细胞的功能受到抑制^[8]。小范围研究显示, 低剂量、间歇性应用 PTHrP 能有效治疗绝经后妇女骨质疏松症^[9]。但 PTHrP 存在着易变性、半衰期短、价格昂贵等缺陷, 因此研制应用缓释系统控制 PTHrP 的缓慢释放, 提高其生物利用效率极为必要。

本文采用壳聚糖季铵盐纳米粒子作为缓释载体, 制备壳聚糖季铵盐/PTHrP1-34 纳米缓释颗粒, 为多肽类药物的缓释提供一种新的尝试。

1 材料和方法

设计: 材料制备, 体外表征实验。

时间及地点: 实验于 2009-06/2010-02 在武汉大学人民医院中心实验室完成。部分指标检测在武汉大学物理学系纳米中心、武汉大学资源与环境学院海洋生物研究实验室、湖北省水生生物研究所等完成。

材料:

主要材料	来源
壳聚糖季铵盐(取代度为 0.85, 重均分子质量为 1.08×10^5)	武汉大学资源与环境学院海洋生物研究实验室
三聚磷酸钠(TPP)	国药集团化学试剂北京有限公司
PTHrP1-34	Sigma-Aldrich 公司
90-2 型磁力搅拌器	上海沪西分析仪器厂有限公司
超速离心机	贝克曼库尔特实验系统有限公司上海分公司
100 CXII 透射电镜	日本电子公司
170SX 傅里叶红外光谱仪	American Niolet Company

实验方法:

纳米粒子的制备: 参照文献[4]制备, 将壳聚糖季铵盐配制成不同质量浓度(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 g/L)的水溶液, 分别将 2 mL 不同质量浓度的 TPP 水溶液(0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/L)加入到 5 mL 的上述壳聚糖季铵盐水溶液中, 室温搅拌条件下, 可观察到 3 种现象: 沉淀、透明、胶体和清液, 使用透射电镜监测, 粒径为 100~120 nm 的粒子即为所要制备的纳米粒子。

将 PTHrP1-34 以不同质量浓度 10, 30, 40, 80, 120, 160 mg/L 溶于 5 mL 壳聚糖季铵盐水溶液, 分别加入 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/L TPP 溶液 2 mL, 室温搅拌条件下 PTHrP1-34 即可封装于纳米粒子中, 再将样品在 4 °C 下超速离心(20 000 g)30 min, 从水溶液中分离出纳米粒子, 置冷冻干燥机冷冻干燥。上层清液用 PTHrP1-34 试剂盒测定游离 PTHrP1-34 的量。纳米粒子对 PTHrP 的封装率 = [(总肽量 - 游离肽量) / 总肽量] × 100%, 载药量 = [(总肽量 - 游离肽量) / 载药颗粒总量] × 100%。每种试样同时测 4 个平行样, 报道平均值及其

均方差。

纳米粒子的表征: 红外光谱测试采用 170SX 傅里叶光谱仪(American Niolet Company), 用 KBr 压片法, 扫描范围 4 000~400 cm^{-1} 。用透射电镜观察粒子的形貌, 样品经 20 g/L 磷钨酸染色, 置于铜网上观察。

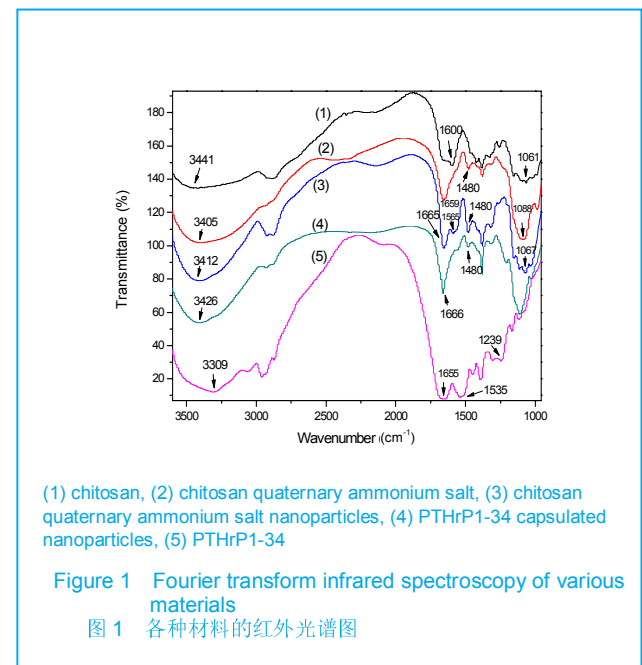
纳米粒子的体外释放^[4]: 将封装有 PTHrP1-34 的壳聚糖季铵盐纳米粒子置于含 10 mL PBS 缓冲液的试管中, 再将试管置于水浴锅中 37 °C 恒温处理, 一定时间后, 将样品在 4 °C 下超速离心 30 min, 取出 2 mL 上层清液, 用新鲜 PBS 缓冲液补充, 上清液用 PTHrP1-34 试剂盒测定 PTHrP1-34 的量, 绘制释放曲线, 每种试样同时测 4 个平行样, 报道平均值及其均方差。用未封装 PTHrP1-34 的纳米粒子做校正曲线。

主要观察指标: 纳米粒子的形貌特征及红外光谱吸收特性, 纳米粒子的封装率及体外释放特性。

设计、实施、评估者: 实验设计、资料收集、实施及评者均为第一作者。

2 结果与讨论

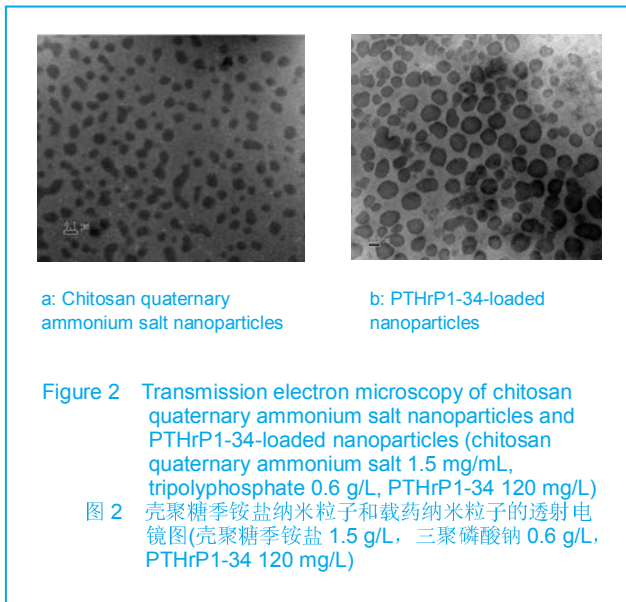
2.1 纳米粒子的表征 图 1 为壳聚糖(CS)、壳聚糖季铵盐(HTCC)、HTCC 纳米粒子、封装有 PTHrP1-34 的 HTCC 纳米粒子和 PTHrP1-34 的红外光谱。



由图 1 可见, 壳聚糖有 3 个典型的吸收峰: 3 441 cm^{-1} 、1 600 cm^{-1} 、1 061 cm^{-1} , 分别属于 $\nu(\text{OH})$ 、 $\nu(\text{NH}_2)$ 、 $\delta(\text{C-O-C})$ ^[10]。HTCC 1 600 cm^{-1} 处的氨基带 N-H 的弯曲振动消失, 同时出现新的吸收峰 1 480 cm^{-1} , 与文献[11]相符, 这是壳聚糖季铵盐分子结构中引入三甲基氨基引起的。与 HTCC 相比, 在 HTCC 纳米粒子的红外光谱中出现了新峰 1 565 cm^{-1} , 1 659 cm^{-1} 移至 1 665 cm^{-1} , 可能是

磷酸根作用到了壳聚糖氨基位点而引起的。因此可推测：TPP连接到了HTCC的氨基上。PTHrP1-34的特征吸收峰有乙酰氨基 u(NH₂) I 带 1 655 cm⁻¹, II 带 1 535 cm⁻¹, III 带 1 239 cm⁻¹。HTCC纳米粒子中的 δ(NH) 1 665 cm⁻¹ 与 PTHrP1-34 的乙酰氨基 I 带的 1 655 cm⁻¹ 重叠, 所以包封有 PTHrP1-34 的 HTCC 纳米粒子中, 峰 1 666 cm⁻¹ 较纯 PTHrP1-34 明显增强。

图2为纳米粒子的透射电镜图, 纳米粒子呈现出较规则的球形, 分散较均匀。图2 a为HTCC纳米粒子, 其内部结构实密, 球形形状较规整, 而且表面较光滑, 颗粒直径在90~100 nm; 图2b为包封有PTHrP1-34的纳米粒子, 直径100~180 nm, 基本为球形, 但不够规整, 结构比较松散, 可能是较多的PTHrP1-34吸附于纳米粒子表面导致的, 也可能是PTHrP1-34浓度较高, 妨碍了HTCC和TPP的交联, 使得载药颗粒的结构松散, 粒径增大。



2.2 HTCC纳米粒子对PTHrP的包封及体外释放 图3显示PTHrP1-34投药质量浓度对其载药量和包封率的影响。当PTHrP1-34的质量浓度由10 mg/L增加到160 mg/L, 包封率从84%下降至70%, 而载药量从8.5%增加至16.7%。PTHrP1-34价格极昂贵, 增加其投药浓度虽然提高了载药量, 但却大为降低药物的包封率。综合考虑, 选择PTHrP1-34投药质量浓度为80 mg/L, 包封率为78.4%、载药量为13.7%。

HTCC、TPP和PTHrP1-34三者的投药质量浓度均可影响纳米颗粒的形成及包封率, 当HTCC与TPP投药量为5:1~2:1时可形成纳米颗粒。当HTCC质量浓度过高(2.0~2.5 g/L), 无胶粒生成, TPP质量浓度过高(1.2 g/L)则生成粒径较大的沉淀。PTHrP1-34的投药质量浓度越高, 制备的纳米颗粒对PTHrP1-34的包封率也越高, 当c(HTCC)=1.5 g/L, c(TPP)=0.6 g/L时,

PTHrP1-34投药质量浓度从10 mg/L增加至160 mg/L, PTHrP1-34的包封率从84%下降至70%, 但载药量有所增加。

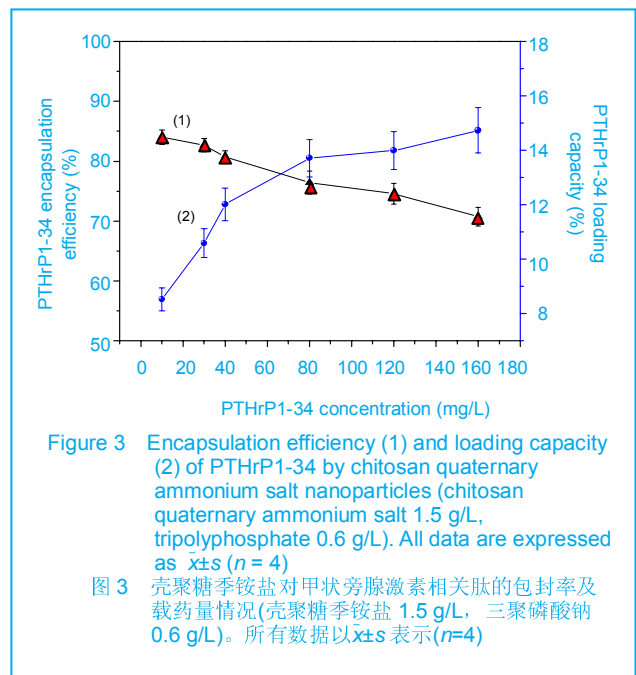
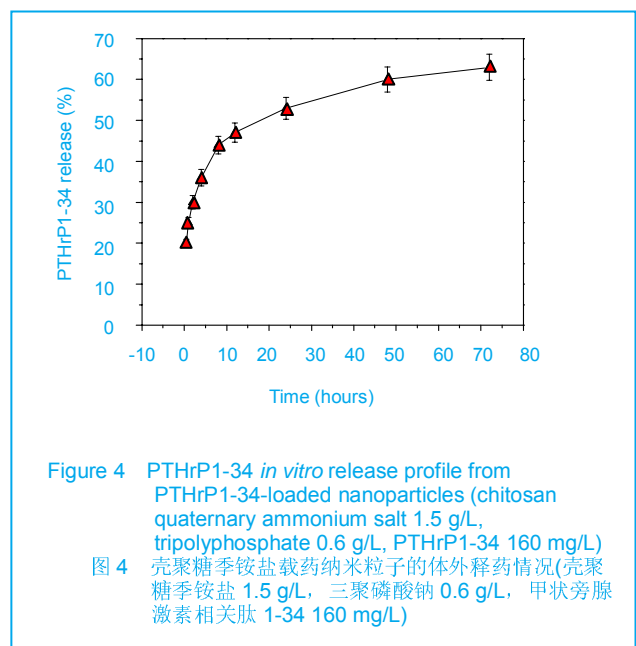


图4为PTHrP1-34-HTCC纳米粒子在PBS缓冲液中的释药情况, 前8 h内, 药物释放速率很快, 如图所示累积释放率增加明显, 10 h后累积释放率增加较慢, 表明药物释放速率变得缓慢, 3 d后累积释放率达63%, 4 d时累积释放率没有增加, 说明仍有部分PTHrP1-34没有完全释放。这一结果说明了PTHrP1-34在壳聚糖季铵盐纳米颗粒中释放具有连续性和缓慢性的特点。前8 h内药物释放速率很快, 主要是由纳米颗粒表面吸附的PTHrP1-34解吸引起的; 10 h后药物释放速率逐渐减慢, 可能是颗粒内部的PTHrP1-34逐渐释放的缘故。



3 结论

在中性环境和室温下, HTCC与TPP进行离子交联制备纳米颗粒, 粒径100~180 nm。加入PTHrP1-34制备HTCC/PTHrP1-34纳米颗粒, PTHrP1-34投药质量浓度为80 mg/L时, 包封率为78.4%、载药量为13.7%。载药纳米颗粒在PBS缓冲液中初期释放速率较快, 随后呈现缓慢而持续的释放, 为HTCC/PTHrP1-34纳米颗粒在体内应用于抗骨质疏松症提供理论依据, 相关体内实验和临床实验有待进一步研究。

4 参考文献

[1] Kato Y, Onishi H, Machida Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. *Curr Pharm Biotechnol.* 2003; 4(5):303-309.
 [2] Jia Z, Shen D, Xu W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydr Res.* 2001;333(1): 1-6.
 [3] Bhattarai N, Ramay HR, Chou SH, et al. Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(2):181-187.
 [4] Xu Y, Du Y, Huang R, et al. Preparation and modification of N-(2-hydroxy) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier. *Biomaterials.* 2003;24(27): 5015-5022.
 [5] Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev.* 1996;76(1):127-173.
 [6] Chen C, Koh AJ, Datta NS, et al. Impact of the mitogen-activated protein kinase pathway on parathyroid hormone-related protein actions in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29121-29129.

[7] Stewart AF, Cain RL, Burr DB, et al. Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893. *J Bone Miner Res.* 2000;15(8): 1517-1525.
 [8] Everhart-Caye M, Inzucchi SE, Guinness-Henry J, et al. Parathyroid hormone (PTH)-related protein(1-36) is equipotent to PTH(1-34) in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(1):199-208.
 [9] Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, et al. Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(2):569-575.
 [10] Yu JH, Du YM, Zheng H. Blend films of Chitosan-Gelatin. *J Wuhan Univ (Nat Sci Ed).* 1999; 45(4):440-444.
 [11] Qin CQ, Xiao L, Du YM, et al. A new cross-linked quaternized-chitosan resin as the support of borohydride reducing agent. *Reactive and Functional Polymers.* 2002; 50(2):165-171.

来自本文课题的更多信息——

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 采用粒子交联法制备壳聚糖季铵盐纳米粒子, 并首次将其用于包封甲状旁腺激素相关肽制备新型纳米粒子, 既有理论创新, 也有方法的创新。

课题评估的“金标准”: 本文涉及的实验指标, 如红外光谱图、透射电镜下直观图、粒径等都是运用公认的检查方法而得到的客观数据。

设计或课题的偏倚与不足: 体外释放模型尚不能真正反映在体情况。

提供临床借鉴的价值: 壳聚糖季铵盐可以作为一种载体运用于其他蛋白或基因等研究, 甲状旁腺激素相关肽载药缓释纳米粒子有望用于临床治疗骨质疏松症。

医学英语单词例句: 本刊英文部

Positive的用法

a. 肯定的, 积极的, 有把握的

[医]正的, 阳性的

[经]确定的, 肯定的, 可靠的

词义辨析

sure, certain, definite, positive

这些形容词均含“无疑的, 确信的”之意。

sure: 侧重主观上对某事确信无疑。

certain: 与 sure 同义, 但语气比 sure 强, 着重指有确切理由或不容置疑的证据所支持的确信。

definite: 指已毫无怀疑的余地。

positive: 语气强烈, 指对自己的看法或作的结论的正确性有不可动摇的信念。

英英解释

名词positive

1. a film showing a photographic image

whose tones correspond to those of the

original subject

形容词positive

1. greater than zero

2. characterized by or displaying affirmation or

acceptance or certainty, etc.

形容词positive

3. indicating existence or presence of a

suspected condition or pathogen

同义词: confirming

4. reckoned, situated or tending in the

direction which naturally or arbitrarily is taken

to indicate increase or progress or onward

motion

5. of or relating to positivism

同义词: positivistic, positivistic

6. impossible to deny or disprove

同义词: incontrovertible, irrefutable

7. having a positive electric charge

同义词: electropositive

8. involving advantage or good

同义词: plus

9. formally laid down or imposed

同义词: prescribed

本刊例句:

bFGF-positive cells were then quantified.