

骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球的制备及表征

马立坤, 叶鹏, 黄文良, 田仁元, 邓江(遵义医学院第三附属医院骨一科, 贵州省遵义市 563000)

文章亮点:

为延长重组人骨形态发生蛋白2在体内的半衰期, 实验以聚乳酸为药物载体材料, 采用乳化溶剂挥发法制备出具有良好的包封率及体外释药功能的重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球, 为下一步复合前期实验制备的丝素蛋白/壳聚糖/纳米羟基磷灰石构建的骨组织工程支架修复骨缺损研究奠定基础。

关键词:

生物材料; 缓释材料; 重组人骨形态发生蛋白2; 聚乳酸; 缓释微球; 包封率; 载药率

主题词:

生物相容性材料; 骨形态发生蛋白质类; 乳酸; 微球体; 迟效制剂

基金资助:

贵州省省长基金项目(2011(25)), 项目名称: rhBMP-2 缓释系统/自体松质骨复合生物支架修复骨缺损的研究; 贵州省科学技术基金项目(黔科合SY[2010]3101), 项目名称: SF-CS-nHA 支架与基因修饰后 BMSCs 构建人工骨种植体的成骨作用研究; 遵义市科技局、遵义医院联合科研项目(遵义市科合社字[2010]015号), 项目名称: RGD 表面修饰 SF/CS/n-HA 材料复合携带目的基因的 BMSCs 成骨性能研究

摘要

背景: 聚乳酸具有良好的生物相容性, 是优良的药物缓释载体。

目的: 制备重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球, 考察其理化特性。

方法: 采用复乳溶剂挥发法制备重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球, 进行扫描电镜、激光粒度、Zeta 电位、溶胀性能检测及采用 ELISA 试剂盒检测包封率、载药率及体外释药率。

结果与结论: 扫描电镜见重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球微球近似圆形, 形态较规则, 分散性较好, 表面光滑。激光粒度分析重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球微平均粒径 839.6 nm, Zeta 电位 (-32.93±3.74)mV, 微球溶胀系数 1.157±0.059, 包封率及载药率分别为(88.943±2.878)%, (0.026±0.001)%; 微球在第1天释药约 10.199%, 随后释药较恒定, 至第19天累计释药率为 54.643%。说明制备出的重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球的粒径达到中华人民共和国药典第10版二部关于亚微球的定义标准及包封率不低于80%的要求, 并且在体外具有很好的缓释功能。

马立坤, 叶鹏, 黄文良, 田仁元, 邓江. 骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球的制备及表征[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(3):395-400.

Preparation and characterization of recombinant human bone morphogenetic protein-2/poly lactic acid sustained release microspheres

Ma Li-kun, Ye Peng, Huang Wen-liang, Tian Ren-yuan, Deng Jiang (First Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Poly lactic acid as an excellent delivery has good biocompatibility.

OBJECTIVE: To prepare recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)/poly lactic acid (PLA) sustained release microspheres, and to study its physical and chemical properties.

METHODS: The rhBMP-2/PLA sustained release microspheres were prepared using w/o/w solvent evaporation method. Scanning electron microscopy, laser particle size, zeta potential, and swelling properties were detected. ELISA kit was utilized for measurement of encapsulation efficiency, drug-loading rate and *in vitro* drug release rate.

RESULTS AND CONCLUSION: Under the scanning electron microscope, rhBMP-2/PLA sustained release microspheres were approximately circle with excellent dispersion. The uniform spheres were visible with a mean particle size of 839.6 nm. The zeta potential were (-32.93±3.74) mV. The swelling coefficient was 1.157±0.059. The drug-loading rate and encapsulation efficiency of rhBMP-2/PLA sustained release microspheres were (88.943±2.878)% and (0.026±0.001)% respectively. The drug release rate at 1 day was about 10.199%, then the drug release was relatively constant, and till 19 days, the cumulative drug release rate was 54.643%. These findings indicate that the constructed rhBMP-2/PLA sustained release microspheres meet the requirement of the *Chinese Pharmacopoeia* (10th edition) that the encapsulation efficiency is not less than 80% and the microspheres have a good slow-release function *in vitro*.

马立坤, 男, 1984年生, 湖南省武冈市人, 汉族, 遵义医学院在读硕士, 医师, 主要从事骨与关节创伤方面的研究。

通讯作者: 邓江, 主任医师, 研究生导师, 遵义医学院第三附属医院骨科, 贵州省遵义市 563000

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.03.011
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)03-00395-06

稿件接受: 2013-10-24

Ma Li-kun, Studying for master's degree, Physician, First Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Deng Jiang, Chief physician, Master's supervisor, First Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Accepted: 2013-10-24

Subject headings: biocompatible materials; bone morphogenetic proteins; lactic acid; microspheres; delayed-action preparations

Funding: the Governor Fund of Guizhou Province, No. 2011(25); the Scientific Foundation of Guizhou Province, No. SY[2010]3101; the Joint Scientific Research Program of Guizhou Science and Technology Bureau and Zunyi Hospital, No. [2010]015

Ma LK, Ye P, Huang WL, Tian Ren-yuan, Deng Jiang. Preparation and characterization of recombinant human bone morphogenetic protein-2/poly lactic acid sustained release microspheres. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(3):395-400.

0 引言 Introduction

骨形态发生蛋白2是公认成骨活性最重要的骨生长因子^[1]。在骨形态发生蛋白2因子作用下能诱导骨髓间充质干细胞向成软骨、成骨细胞定向增殖分化,从而促进骨修复;重组人骨形态发生蛋白2较内源性骨形态发生蛋白2纯度高、活性强,例如有研究观察骨形态发生蛋白2和音猬因子在体外联合和单独应用促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的能力,实验将SD大鼠的间充质干细胞分离培养后分为4组,重组人骨形态发生蛋白2组加入100 mg/L重组人骨形态发生蛋白2,音猬因子组加入20 μg/L音猬因子,联合组加入100 mg/L重组人骨形态发生蛋白2联合20 μg/L音猬因子,对照组不加任何干预措施。结果显示:①间充质干细胞培养24 h后部分贴壁,贴壁细胞呈圆形或椭圆形,第7天左右细胞铺满瓶底,多为梭形。条件培养基培养3 d后,联合组细胞由长梭形转变为多角形,随后重组人骨形态发生蛋白2组细胞发生成骨样改变,音猬因子组细胞未见明显形态学改变。②相同时间点联合组、重组人骨形态发生蛋白2组、音猬因子组细胞吸光度均高于对照组($P < 0.05$)。联合组和重组人骨形态发生蛋白2组在各时间点碱性磷酸酶表达量均高于音猬因子组和对照组($P < 0.05$)。③间充质干细胞经诱导培养7 d后,碱性磷酸酶细胞化学染色联合组和重组人骨形态发生蛋白2组呈阳性,联合组可见胞质中棕黄色颗粒,音猬因子组和对照组阴性。诱导培养14 d后,I型胶原免疫荧光染色音猬因子组和对照组均为阴性,联合组和重组人骨形态发生蛋白2组为阳性,但联合组细胞数量明显增多,细胞间融合较好,重组人骨形态发生蛋白2组细胞融合欠佳。矿化沉积茜素红染色音猬因子组和对照组仍为阴性,联合组和重组人骨形态发生蛋白2组为阳性,联合组细胞间可见红色的钙结节。④蛋白免疫印迹分析显示,与对照组相比,联合组和重组人骨形态发生蛋白2组I型胶原蛋白表达增加,联合组尤其明显,音猬因子组与之接近;说明骨形态发生蛋白2和音猬因子在体外能明显促进间充质干细胞向成骨细胞分化,并且具有明显的协同相关性;但其半衰期短,难以维持有效生理浓度,使其不能持续作用于骨缺损区靶细胞^[2]。将重组人骨形态发生蛋白2应用于骨修复就需要大剂量应用或多次小剂量应用才能达到期望的成骨效应,因此研究制备生长因子缓释微球的工作将变得尤为重要^[3-4]。例如有研究采用复乳-溶剂挥发法制备重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸-聚乙醇酸共聚物载药微球,然后将微球与纤维蛋白胶复合制备出重组人骨形态

发生蛋白2/聚乳酸-聚乙醇酸共聚物/纤维蛋白胶复合材料,采用细胞培养及组织化学等方法观察微球对犬骨髓基质细胞的增殖与分化的影响。结果显示,重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸-聚乙醇酸共聚物/纤维蛋白胶微球对骨髓基质细胞的增殖无明显影响,但对细胞的分化功能有明显的促进作用,说明纤维蛋白胶复合重组人骨形态发生蛋白2微球能够提高骨髓基质细胞的体外成骨能力,可作为骨形态发生蛋白的良好载体。微球是指采用合适的高分子可降解材料为药物载体,通过一定的技术方法将药物包裹而成的直径达几百纳米到几百微米的微小球形实体,药物通过一定的载体材料制成微球系统能够提高药物利用率,持续缓释出药物以维持局部药物的浓度。目前,应用微球系统控制释放细胞因子是解决在体内半衰期短易被代谢的方法之一。例如有研究采用乳液冷冻干燥法制作含重组人骨形态发生蛋白2缓释系统的聚乳酸-聚乙醇酸共聚物支架,扫描电镜观察支架;采用高效液相色谱分析仪检测不同时间点释放液中重组人骨形态发生蛋白2的含量,进行累积释放量的动态观察;将缓释重组人骨形态发生蛋白2支架植入SD大鼠大腿股部肌袋内,分别在不同时间点进行组织学观察。结果显示支架材料表面呈多孔状,重组人骨形态发生蛋白2从支架中释放的动力学过程为第1天表现为爆发性释放(30.0%),以后缓慢持续释放,至1个月左右释放量达80.6%;活性评价结果显示,重组人骨形态发生蛋白2缓释支架组可见新生骨组织形成伴较多的骨母细胞排列,无重组人骨形态发生蛋白2支架组则无成骨现象;说明多孔聚乳酸-聚乙醇酸共聚物可作为重组人骨形态发生蛋白2的缓释载体并具有良好的生物活性,可作为骨组织工程研究中的新型支架。

关于开始聚乳酸的研究可追溯到20世纪30年代,直到20世纪80年代其在体内的降解产物及安全性被明确,聚乳酸就被美国食品药品监督管理局(FDA)批准应用的少数生物可降解高分子材料之一。聚乳酸最终代谢产物为H₂O和CO₂,对机体影响小,是很好的药物载体^[5]。以聚乳酸为载体制备的亮丙瑞林缓释微球于1989年在美国、日本获准上市,目前聚乳酸被广泛用于制备缓释药物的载体^[6]。制备聚乳酸缓释微球主要有乳化溶剂挥发法、相分离法、喷雾干燥法、超临界流体技术等,而复乳液中干燥法为最常用的微球制备方法^[7-8]。实验通过乳化溶剂挥发法制备重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球并考察其理化特性,为骨缺损局部应用提供可靠的实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 材料观察实验。

时间及地点: 实验于2013年1至7月在遵义医学院中心实验室完成。

材料:

骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球制备及表征实验的试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
重组人骨形态发生蛋白2冻干粉	上海瑞邦生物材料有限公司
聚乳酸(相对分子质量 30 000)	济南岱罡生物工程有限公司
二氯甲烷	重庆川江化学试剂厂
丙酮	成都市龙恒化工有限公司
聚乙烯醇	天津市科密欧化学试剂有限公司
人骨形态发生蛋白2ELISA试剂盒	R&D 进口分装
冷冻高速离心机、真空冷冻干燥机、酶标仪	Thermo, 美国
磁力搅拌器	郑州长城科工贸有限公司
纳米粒度及 Zeta 电位仪	英国马尔文仪器公司
扫描电镜	KYKY2800B 中国
50 万居里 ⁶⁰ Co 辐照装置	贵州金农辐照科技有限公司

实验方法:

重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球的制备^[9-10]:

称取0.03 mg的重组人骨形态发生蛋白2溶于1 mL双蒸水中,使其完全溶解作为水相。准确称取100 mg聚乳酸溶于4 mL二氯甲烷和1 mL丙酮有机溶剂中做为油相。取100 μL水相与油相相混合,在冰浴下超声分散(100 W, 1 min)形成初乳,用注射器将初乳缓慢加入25 mL 1%的聚乙烯醇溶液内,冰浴下超声(200 W, 3 min)形成复乳。然后将此复合体系在磁力搅拌器中低速搅拌(400 r/min)3-5 h,使其二氯甲烷、丙酮完全挥发,所得乳液冷冻高速离心(12 000 r/min, 20 min)收集重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球,用双蒸水洗3遍,冷冻干燥后⁶⁰Co辐照灭菌4 °C保存备用。

重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球扫描电镜观察:将冷冻干燥的重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球超声分散在双蒸水中,再滴到扫描电镜的样品板上,室温下干燥,在真空下喷金后,20 kV加速电压下观察。

重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球激光粒度和 Zeta 电位检测:取适量冷冻干燥的重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球超声分散在去离子水中,用纳米粒度& Zeta 电位仪检测其平均粒径和粒径分布及 Zeta 电位。

重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球溶胀性能检测:称取适量冷冻干燥的重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球,记为 m_d 。用双蒸水浸泡24 h,滤纸吸干水分,再称质量,记为 m_w 。溶胀系数 $Q=m_w/m_d$ 。

重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球的包封率、

载药率检测^[11]:准确称取10 mg缓释微球,在1 mL含50 g/L SDS的 0.1 mol/L NaOH EP管溶液中,37 °C水浴箱中平衡振摇24 h,取上清液骨形态发生蛋白2ELISA检测,具体操作按ELISA试剂盒说明进行,在450 nm处测定吸光度值,根据标准曲线的标准方程计算出上清重组人骨形态发生蛋白2浓度。包封率和载药率的计算公式为:包封率=重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球中重组人骨形态发生蛋白2的含量/放入的重组人骨形态发生蛋白2质量×100%,载药率=重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球中重组人骨形态发生蛋白2的含量/重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球质量×100%。

重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球体外释药特性检测:准确称取缓释微球30 mg,置于5 mL 0.01 mol/L的PBS中(pH=7.4)37 °C水浴箱中30 r/min平衡振摇。分别在1-19 d取上清液1 mL,并补充相应体积的缓冲液继续振摇,上清液中的重组人骨形态发生蛋白2浓度采用前述骨形态发生蛋白2 ELISA方法测定,测定值通过代入标准曲线的标准方程,计算出不同时间累计释药百分率,并作出释药时间曲线。

主要观察指标:重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球的激光粒度、Zeta电位、溶胀性能、包封率、载药率及体外释药率。

统计学分析:由第一作者采用SPSS 17.0统计软件处理分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果 Results

2.1 重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球一般特性通过扫描电镜观察见微球近似圆形,形态较规则,分散性较好,表面光滑,电镜图片见图1。

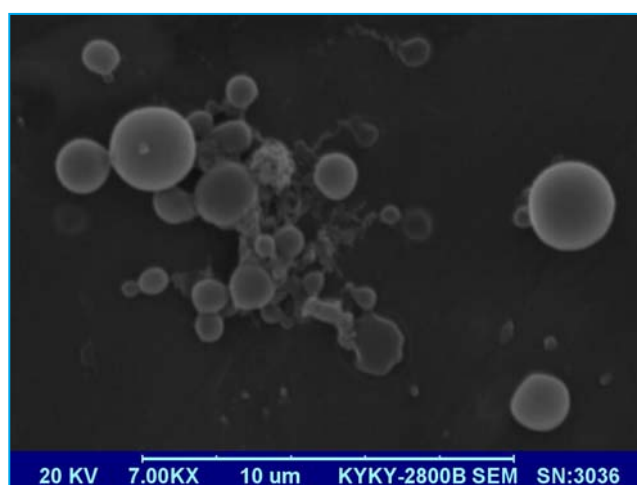


图1 重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球的扫描电镜图片(×7 000)

Figure 1 Scanning electron microscope observation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/poly lactic acid sustained release microspheres (×7 000)

图注:微球近似圆形,形态较规则,分散性较好,表面光滑。

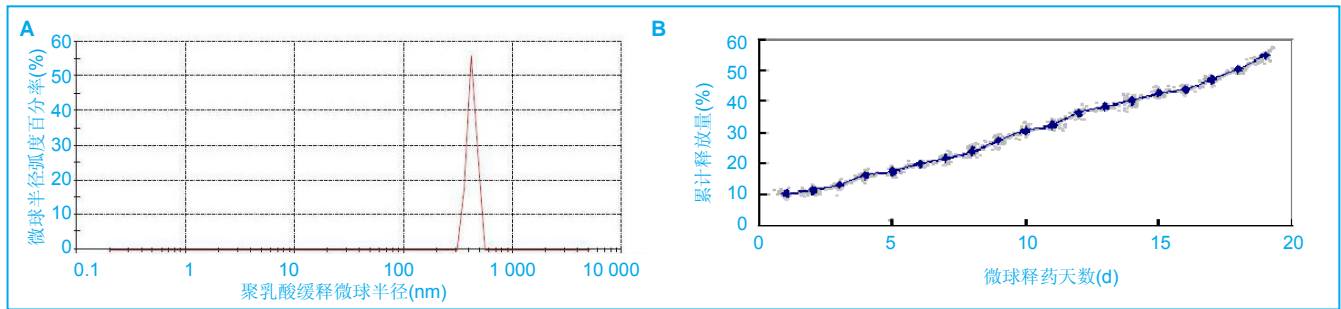


图2 重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释的微球激光粒径及体外释放曲线

Figure 2 Laser particle size and release curve of recombinant human bone morphogenetic protein-2/poly lactic acid sustained release microspheres

图注: 图中A为缓释微球粒径区间分布为712.6–955.4 nm, 主要粒径为825 nm, 占55.8%, 平均粒径839.6 nm, 并且分布范围较集中; B为缓释微球在第1天释放约10.199%, 后期释药稳定, 至第19天累计释药率为54.643%。

2.2 重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球激光粒度和Zeta电位检测结果 激光粒径检测缓释微球粒径区间分布为712.6–955.4 nm, 主要粒径为825 nm, 占55.8%, 平均粒径839.6 nm, 并且分布范围较集中, 粒径分析结果(图2A)所示。缓释微球Zeta电位为(-32.93±3.74) mV, 缓释微球表面带负电荷与其他文献研究结果相一致。

2.3 重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球溶胀性能检测结果 重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球吸水后体积增大, 质量增加, 经测定微球的溶胀系数为1.157±0.059。

2.4 重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球载药量、封装率结果 经检测重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球的封装率为(88.943±2.878)%, 载药率为(0.026±0.001)%。

2.5 重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球体外释药特性 重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球在第1天释放约10.199%, 后期释药稳定, 至第19天累计释药率为54.643%, 并由此绘制出释药曲线(图2B)。

3 讨论 Discussion

骨缺损修复研究是骨科的研究热点, 也是骨科医生致力解决的难题之一^[12], 多由于创伤、感染、肿瘤等原因所致。随着现代社会经济的发展由外伤导致骨缺损越来越多, 而复杂的骨折及大块骨缺损在临床上也很常见, 自体骨或异体骨移植是最常用的治疗手段, 自体骨移植是治疗骨缺损的金标准, 但面临供骨来源不足及二次损伤等缺点, 异体骨移植也难以及时获取移植骨, 即便经过冷冻处理仍有一定的免疫原性, 其免疫原性不仅会显著降低移植骨再血管化和爬行替代的速度, 而且也很可能是引起移植骨骨折和骨不连等并发症的原因^[13]。20世纪80年代美国Langer等^[14]学者提出了组织工程学概念, 并逐渐形成系统的组织工程学这门新学科, 1995年, Grane等^[15]在此基础上提出骨组织工程以来, 许多学者进

行了大量研究探索, 种子细胞、支架材料、生长因子成为当前骨组织工程的研究热点, 为骨缺损的治疗带来新思路、新方法。

骨缺损修复在骨的形成、吸收和重建过程需要骨形态发生蛋白、血管内皮细胞生长因子、血小板衍生长因子、胰岛素样生长因子、转化生长因子 β 、成纤维细胞生长因子等一系列细胞因子的共同调控, 其中以骨形态发生蛋白为促进骨修复首选重要因子^[16]。骨形态发生蛋白是1965年由Urist^[17]首次从成人骨组织中提取到的一种活性蛋白质, 并首先描述了骨诱导现象。骨形态发生蛋白最初是作为一种可在异位诱导骨和软骨形成的蛋白质被发现的, 但其具有许多生物学效应, 参与胚胎时期骨组织的发育、成年骨缺损修复及机体某些骨疾病的发生过程, 并且在脂肪、肾脏、肝脏、骨骼及神经系统发育中起一定作用。除了骨形态发生蛋白1外, 均属于转化生长因子 β 超基因家族。不同的骨形态发生蛋白有着不同的生物学效应, 其中以骨形态发生蛋白2研究最多, 大量研究证实骨形态发生蛋白2是骨缺损修复最重要的细胞因子^[18]。

骨形态发生蛋白2具有诱导骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞而促进成骨作用^[19-20]。例如侯锐等^[20]检测重组人骨形态发生蛋白2和重组人碱性成纤维细胞生长因子单独、联合及序贯作用对兔骨髓间充质干细胞分化作用的长期效应, 实验采用考马斯亮蓝测定法检测单独、联合及序贯施加重组人骨形态发生蛋白2和重组人碱性成纤维细胞生长因子后兔骨髓间充质干细胞在第2, 5, 7, 10天的蛋白质含量水平, 以反映对细胞分化作用的影响。结果显示, 重组人骨形态发生蛋白2能在较长时间内明显促进细胞的蛋白质含量增加, 而重组人碱性成纤维细胞生长因子则起抑制作用, 并且均呈浓度依赖性, 重组人骨形态发生蛋白2单独应用与两种生长因子联合应用的效应相近, 而且均高于重组人碱性成纤维细胞生长因子单独应用或两种因子序贯应用的效应; 说明重组人骨形态发生蛋白2和重组人碱性成纤维细胞生长因子的不同

应用方式对骨髓间充质干细胞分化作用的长期效应不同。但重组人骨形态发生蛋白2在体内半衰期短,在局部组织中易被降解或体液中快速扩散,这就要求持续给予骨形态发生蛋白2才能促进成骨^[21],因此构建能够持续释放出外源性重组人骨形态发生蛋白2的缓释微球对骨缺损修复具有重要意义^[22]。

制备缓释微球的包裹材料需要具有以下几点特征:有良好的生物相容性;具有生物降解性;有良好的载药性及定向性、细胞渗透性。当前用于制备缓释微球的包裹材料主要有天然衍生和人工合成的高分子材料,如壳聚糖、明胶、聚乳酸聚合物等。大量研究表明聚乳酸具有良好的生物相容性及可降解性,无致癌致畸性,可以植入人体,其合成原料为可再生资源^[23-24]。

聚乳酸有广泛的用途,主要用于外科手术可吸收缝合线、牙科植入材料、眼科植入材料、骨科植入材料、组织工程支架材料及药物缓释控制系统的载体材料等医学领域。例如有研究使用带无损缝针可吸收缝线单层单周连续缝合用于食管癌切除后消化道重建吻合;有研究观察以犬骨髓基质干细胞为种子细胞、黄芪-壳聚糖/聚乳酸为支架移植对水平型牙周骨缺损再生的影响,发现黄芪多糖具有促进牙周缺损部位骨形成作用,以骨髓基质干细胞为种子细胞、黄芪-壳聚糖/聚乳酸为支架的组织工程复合物修复水平型牙周骨缺损可获得部分的牙周组织再生;还有研究评价5-氟尿嘧啶聚乳酸微球防治增生性玻璃体视网膜病变的效果,发现5-氟尿嘧啶聚乳酸微球具有明显的缓释作用,玻璃体腔植入可有效防治巨噬细胞诱发的实验性增生性玻璃体视网膜病变。因此聚乳酸是包裹药物制成缓释微球的常用载体材料,并且可用于骨架材料治疗骨缺损^[25]。另有研究研制左旋氧氟沙星眼内缓释植片并观察其体外缓释效果。实验以重均分子质量为50 000 g/mol的DL-聚乳酸为载体,通过溶液分散法制备载药量分别为5, 10, 20%的DL-聚乳酸-盐酸左旋氧氟沙星眼内缓释植片。利用紫外分光光度法检测3种缓释植片30 d内在体外介质中释药含量,并将释放曲线进行Higuchi模型拟合,对缓释植片进行IR谱图分析比较。结果显示3种缓释植片30 d内累积释放量为28.6%~71.4%,在8-30 d释药后期药物释放平稳且缓慢;载药量较大的缓释片,释药早期突释现象较显著。3种缓释片的体外释放曲线均能较好的符合Higuchi模型,IR谱图显示缓释片中药物分散均匀。说明研制的聚乳酸左旋氧氟沙星眼内缓释植片在体外释药研究中表现出良好的药物缓释行为和表征,符合临床治疗时间需要。目前在临床上使用的以聚乳酸为材料制成的螺钉及接骨板,尚未发现其远期不良后果^[26]。例如有研究应用自身增强聚乳酸接骨板治疗颌面部骨折35例,均行坚固内固定手术治疗,术中共使用自身增强聚乳酸接骨板67块,下颌骨颏孔区骨折术后辅以牙弓夹板固定,术后观察并评价疗效。术后所有病例切口均一期愈合,骨折固定稳定,咬合关系良好,其疗效评

价优22例(62.86%),良13例(37.14%),无效果较差病例;远期随访未出现骨折移位、瘘管形成和固定材料排出等现象,提示自身增强聚乳酸接骨板可广泛应用于上颌骨骨折和下颌骨正中线性骨折。欧美等发达国家在聚乳酸微球制备的工艺及质量控制上进行了大量研究,其微球制备方法有乳化溶剂挥发法、相分离法、喷雾干燥法、超临界流体技术等。

目前,微球以聚乳酸为药物载体材料的制作方法多采用乳化法和相分离法,乳化法主要有水包油(W/O)、油包水(O/W)、水包油包水(W/O/W)乳化法等,W/O/W复乳法最常用于包裹蛋白质、多肽等微球,骨形态发生蛋白是一中酸性多肽,因此本实验采用复乳法溶剂挥发法制备出重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球。聚乳酸缓释微球的粒径及载药率可通过调整聚乳酸聚合物的分子量、聚乙烯醇浓度、搅拌速度及内外水相体积等参数调控^[27]。实验通过参考相关文献选用相对分子质量为30 000的聚乳酸、以二氯甲烷和丙酮为油相、1%的聚乙烯醇为外水相通过超声乳化法制备出重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸微球,采用激光粒度仪测定粒径区间分布为712.6-955.4 nm,平均粒径为839.6 nm,ELISA法测定出微球载药率为(88.943±2.878)%,包封率为(0.026±0.001)%。评价缓释微球制备工艺优劣的主要参数指标有微球的形态结构、包封率、载药率及体外释药率等,实验制备的重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球达到药典规定的粒径100-1 000 nm的亚微球标准及包封率不低于80%的要求^[28]。实验制备出的重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球在第1天释放约10.199%,后期释药稳定,至第19天累计释药率为54.643%,具有明显的缓释作用。目前认为缓释微球一般通过3种机制缓释出药物:扩散释放,载体材料的降解及溶蚀,载体材料表面药物的脱吸附^[29]。微球释药最初阶段主要通过载体材料表面药物脱吸附及扩散释放,随着载体材料的逐渐降解及溶蚀直至完全降解,药物才完全被释放出来^[30]。

由于实验中使用二氯甲烷有毒有机溶剂及使用高能超声乳化法,在制备微球的过程中必须充分搅拌使二氯甲烷及丙酮有机溶剂完全挥发,为避免在超声乳化时不至使重组人骨形态发生蛋白2失活,也必须在冰浴下进行超声乳化。

综上所述,实验通过W/O/W复乳法制备出的重组人骨形态发生蛋白2/聚乳酸缓释微球达到药典所规定的亚微球标准及包封率要求,具有很好的包封率及体外缓释作用,能够在体外持续缓释出重组人骨形态发生蛋白2维持一定量的重组人骨形态发生蛋白2浓度,可望用于骨组织工程细胞因子的缓释载体修复骨缺损,为下一步在动物体内进行骨缺损修复研究奠定基础。

致谢: 感谢遵义医学院中心实验室提供实验设备及实验技术

指导,感谢师兄郭元的帮助。

作者贡献: 第一、五作者进行实验设计,实验实施为第一、二作者,实验评估为第五作者,资料收集为第三、四作者,第一作者成文,第五作者审校,第一、五作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验未涉及与伦理冲突的内容。

学术术语: 微球-指采用合适的高分子可降解材料为药物载体,通过一定的技术方法将药物包裹而成的直径达几百纳米到几百微米的微小球形实体,药物通过一定的载体材料制成微球系统能够提高药物利用率,持续缓释出药物以维持局部药物浓度。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Rey-Rico A,Silva M,Couceiro J,et al. Osteogenic efficiency of in situ gelling poloxamine systems with and without bone morphogenetic protein-2. *Eur Cell Mater.* 2011;21(4): 317-340.
- [2] Davis HE,Leach JK.Designing bioactive delivery systems for tissue regeneration.*Ann Biomed Eng.*2011;39(1):1-13.
- [3] Talwar R,Di Silvio L,Hughes FJ,et al.Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo. *J Clin Periodontol.*2001; 28(4):340-347.
- [4] 姚爱华,徐为,艾凡荣,等.中空羟基磷灰石微球作为rhBMP-2缓释载体的研究[J].*无机材料学报*,2011,26(9):974-978.
- [5] Fournier E,Passirani C,Montero-Menei CN,et al. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials.* 2003; 24(19):3311-3331.
- [6] 冯岚,郭健新,平其能,等.亮丙瑞林缓释微球的研究[J].*中国新药与临床杂志*, 2004,23(10):680-683.
- [7] 张海龙,高玲美,邵洪伟.聚乳酸载药微球的制备及应用研究进展[J].*西北药学杂志*,2010,25(2):158-160.
- [8] 林丽丽.聚乳酸载药系统的研究进展[J].*广东化工*,2012,39(6): 90-91.
- [9] Wen J,Kim GJ,Leong KW.Poly(D,L-lactide-co-ethyl ethylene phosphate)s as new drug carriers.*J Control Release.*2003; 92(1-2):39-48.
- [10] Chen L,Liu L,Li C,et al.A new growth factor controlled drug release system to promote healing of bone fractures: nanospheres of recombinant human bone morphogenetic-2 and polylactic acid.*J Nanosci Nanotechnol.*2011;11(4): 3107-3114.
- [11] 费正奇,胡蕴玉,吴道澄,等. rhBMP-2/聚乳酸与聚乙醇酸共聚物载药微球的制备及成骨活性研究[J].*生物医学工程与临床*,2006, 10(3):121-124.
- [12] Reichert JC,Saifzadeh S,Wullschlegler ME,et al.The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research.*Biomaterials.* 2009; 30(12): 2149-2163.
- [13] Silva AM,Souza WM,Koivisto MB,et al.Miniplate fixation for the repair of segmental mandibular defects filled with autogenous bone in cats.*Acta Cir Bras.* 2011;26(3):174-180.
- [14] Langer R,Vacanti JP.Tissue engineering. *Science.*1993; 260 (5110):920-926.
- [15] Crane GM,Ishaug SL,Mikos AG.Bone tissue engineering. *Nat Med.*1995;1(12): 1322-1324.
- [16] 刘昊,张永刚.骨组织工程的研究应用与进展[J].*生物骨科材料与临床研究*, 2012,9(2):32-34.
- [17] Urist MR.Bone: formation by autoinduction. *Science.*1965; 150(3698):893-899.
- [18] 丁立峰,周振东,杨军,等.骨形态发生蛋白2基因转染的兔骨髓间充质干细胞复合聚乳酸-聚己内酯支架体外构建载基因仿生骨的实验研究[J].*中国矫形外科杂志*, 2013,21(9):918-923.
- [19] Zuk PA,Zhu M,Mizuno H,et al.Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.*Tissue Eng.*2001;7(2):211-228.
- [20] 侯锐,毛天球,陈书军,等.rhBMP-2及rhBFGF对兔骨髓间充质干细胞分化作用长期效应的实验研究[J].*医学研究生学报*,2004, 17(8):694-697.
- [21] Schmidmaier G,Schwabe P,Strobel C,et al.Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics.*Injury.* 2008; 39(Suppl 2):S37-S43.
- [22] Hong SJ,Yu HS,Kim HW.Tissue engineering polymeric microcarriers with macroporous morphology and bone-bioactive surface. *Macromol Biosci.* 2009;9(7): 639-645.
- [23] 张洁琼,曹健,李艳芳,等.聚乳酸的合成·生物降解及应用研究现状[J].*安徽农业科学*,2010,38(31):17384-17386.
- [24] 黄玲玲,姜志华.PLA的合成及改性研究进展[J].*合成树脂及塑料*, 2010,7(6): 65-69.
- [25] Mi FL,Shyu SS,Lin YM,et al.Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug delivery system: a new delivery system for protein.*Biomaterials.*2003; 24(27):5023-5036.
- [26] 曲昌锋,陆平,周晓南,等.自身增强聚乳酸接骨板在颌骨骨折中的临床应用体会[J]. *中国实用口腔科杂志*,2009,2(11):690-691.
- [27] Ogawa Y,Yamamoto M,Okada H,et al.A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid.*Chem Pharm Bull (Tokyo).*1988;36(3):1095-1103.
- [28] 中华人民共和国药典2010年二部[S].*国家药典委员会*,2009.
- [29] Suzuki K,Nakamura T,Matsuura H,et al.A new drug delivery system for local cancer chemotherapy using cisplatin and chitin.*Anticancer Res.*1995;15(2): 423-426.
- [30] Jule E,Nagasaki Y,Kataoka K.Lactose-installed poly(ethylene glycol)-poly(d,l-lactide) block copolymer micelles exhibit fast-rate binding and high affinity toward a protein bed simulating a cell surface. A surface plasmon resonance study.*Bioconjug Chem.*2003;14(1):177-186.