海藻酸钠-壳聚糖微胶囊载体在组织工程研究中的应用

姜恒丽[1,2]，崔元璐[1,2]，齐学洁[1,2]，齐 云[3]，丁 舒[3] ([1]天津市现代中药重点实验室(国家重点实验室培育基地)，天津市 300193; [2]天津中医药大学中医药研究院，天津市 300193; [3]天津大学环境科学与工程学院，天津市 300193)

文章亮点：

1 此问题的已知信息：海藻酸钠与壳聚糖均是无毒、生物相容性好的天然高分子材料，得到广泛应用，如外科修复材料和透皮给药、眼部给药、缓释包衣、结肠给药、微球栓塞、人体器官和基因运载工具等，其中作为缓释制剂的骨架及包埋材料等尤为重要。

2 文章增加的新信息：影响海藻酸钠-壳聚糖微胶囊性能的因素主要是壳聚糖溶液的性质：壳聚糖的分子质量、壳聚糖溶液的pH值、浓度等，这些因素主要影响微胶囊的膜强度和控释性能。

3 临床应用的意义：海藻酸钠与壳聚糖通过聚电解质络合作用形成微囊，增强了其凝胶性能，克服了海藻酸钠单独作为药物释放载体时凝胶溶蚀现象严重、药物释放快以及作为组织工程材料时力学性能差不能很好的起到承载作用的问题，而且在海藻酸钠中添加壳聚糖，还能加强海藻酸钠凝胶的pH刺激响应性，为构建pH靶向载药系统提供了合适的载体。

关键词：
生物材料；缓释材料；海藻酸钠；壳聚糖；微胶囊；固定化技术；药物释放；组织工程；国家自然科学基金
主题词：
生物相容性材料；综述；壳聚糖；胶囊
基金资助：
国家自然科学基金项目(51108310)；教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20091210110003)；天津市科技兴海计划项目(KX2010-0005)

姜恒丽，女，1988年生，山东省烟台市人，汉族，天津中医药大学在读硕士，主要从事药物缓控释载体方面研究。

通讯作者：崔元璐，博士，研究员，博士生导师，天津中医药大学中医药研究院，天津市 300193

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.03.014
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344(2014)03-00412-08
稿件接受：2013-10-12

摘要

背景：用壳聚糖包裹海藻酸钠制备微囊，可以改善海藻酸钠水凝胶的力学性能，如何获得理想的海藻酸钠壳聚糖微囊以及该微囊体系的应用前景是这一研究的关键。

目的：探讨海藻酸钠壳聚糖微胶囊载体的制备方法、成型机制，分析影响微胶囊膜强度性能的几个重要因素及探讨海藻酸钠-壳聚糖微胶囊在固定化细胞技术、药物载体和组织工程方面的应用前景。

方法：由第一作者采用计算机检索PubMed数据库、Elsevier ScienceDirect、中国知网库、万方数据库1987至2013年有关海藻酸钠壳聚糖微囊制备方法、反应机制及应用前景的文章。

结果与结论：海藻酸盐水凝胶在药物释放和组织工程领域具有很多优势，但是凝胶溶蚀现象和力学性能缺陷限制了它的应用，壳聚糖与海藻酸钠通过静电相互作用形成聚电解质络合物，弥补了海藻酸钠凝胶的不足。通过控制壳聚糖溶液的性质-壳聚糖的分子质量、壳聚糖溶液的pH值和浓度制备膜强度高的微囊，海藻酸钠-壳聚糖微囊在固定化技术、药物释放和组织工程领域表现出了广阔的应用前景。

姜恒丽，崔元璐，齐学洁，齐云，丁舒. 海藻酸钠-壳聚糖微胶囊载体在组织工程研究中的应用[J].中国组织工程研究，2014，18(3):412-419.

Alginate-chitosan microcapsule in tissue engineering research

Jiang Heng-li[1,2], Cui Yuan-lu[1,2], Qi Xue-jie[1,2], Qi Yun[3], Ding Shu[3] ([1]Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine (State Key Laboratory), Tianjin 300193, China; [2]Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; [3]School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300193, China)

Abstract

BACKGROUND: Alginate-chitosan microcapsule can improve the mechanical property of sodium alginate hydrogels. How to obtain the ideal sodium alginate-chitosan microcapsule and the prospect for application of the microcapsule system is the key to this study.

OBJECTIVE: To investigate the preparation method and formation mechanism of alginate-chitosan microcapsules, to analyze several important factors affecting the strength of the microcapsule membrane, and to explore the prospects of alginate-chitosan microcapsules in immobilized cell technology, in tissue engineering and as a drug carrier.

METHODS: The first author searched PubMed, Elsevier ScienceDirect, CNKI and Wanfang database (1987/2013) to retrieve literatures about the preparation method, formation mechanism and application prospect of alginate-chitosan microcapsules.

RESULTS AND CONCLUSION: Sodium alginate hydrogels have many advantages in drug release and tissue

Jiang Heng-li, Studying for master's degree, Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine (State Key Laboratory), Tianjin 300193, China; Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Corresponding author: Cui Yuan-lu, M.D., Investigator, Doctoral supervisor, Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine (State Key Laboratory), Tianjin 300193, China; Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Accepted: 2013-10-12

engineering, but its application is limited by gel dissolution phenomena and deficiencies in its mechanical properties. Chitosan-alginate microcapsules make up for the deficiency of sodium alginate hydrogels by electrostatic interactions to form polyelectrolyte complexes. By controlling the nature of the chitosan solution--the molecular weight of chitosan, pH and concentration of chitosan solution, we can prepare the microcapsules with high film strength. Alginate-chitosan microcapsules have shown broad application prospects in immobilization technology, drug release and tissue engineering.

Subject headings: biocompatible materials; review; chitosan; capsules
Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 51108310; the Doctoral Fund of Ministry of Education of China, No. 20091210110003; the Scientific and Technological Plan for the Sea of Tianjin, No. KX2010-0005

Jiang HL, Cui YL, Qi XJ, Qi Y, Ding S. Alginate-chitosan microcapsule in tissue engineering research. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(3):412-419.

0 引言 Introduction

微胶囊是用天然或合成高分子材料把分散均匀的固体物质颗粒、液滴或气体完全包封在膜中的一种球状微型容器，外层的聚合物囊壳材料能保护囊芯物性质不受环境条件影响，被广泛用于细胞、微生物及酶的固定化、污水处理、药物控制释放和组织工程支架材料以及人工细胞等领域[1]。

目前研究最成熟的是海藻酸钠/聚赖氨酸微胶囊，但聚赖氨酸昂贵的价格、复杂的制备工艺严重限制了其应用；于是与其结构相似的壳聚糖成为聚赖氨酸的理想替代材料，壳聚糖无毒、无刺激性，具有良好的生物相容性，能为细胞生长提供所需的三维支架及类似软骨基质的细胞外环境；壳聚糖成膜性好，有一定强度和可塑性且在体内可被溶菌酶等分解成低聚糖，近年来在药物缓释载体及生物材料中的研究应用日益广泛。De等[2]讨论了壳聚糖-海藻酸钠纳米球的制备，并将海藻酸钠-壳聚糖微球体系与聚-L-赖氨酸-海藻酸钠作比较，发现Na^+与包埋的药物从纳米球中释放直接相关，其能更有效地取代聚-L-赖氨酸，因此壳聚糖-海藻酸钠纳米球中的药物释放比聚-L-赖氨酸的更缓慢，有利于作为药物释放载体使用。壳聚糖包裹海藻酸钠制备的微胶囊膜强度高及渗透性可调节，具有良好的生物相容性和pH敏感性，在固定化细胞和药物缓释载体领域显示了极大的潜力，该微胶囊具有很好的机械性能，是一种新的生物活性支架，在组织工程领域得到了广泛的应用。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

*检索人相关内容：*由第一作者于2013年5月完成检索。

*检索数据库：*PubMed数据库、Elsevier Sciencedirect、中国知网、万方数据库。

*关键词：*中文关键词为“海藻酸钠，壳聚糖，微胶囊，固定化技术，生物相容性，pH响应性，药物缓释，口服给药制剂，组织工程，生物活性支架”；英文关键词为“Sodium alginate, Chitosan, Microcapsule, Immobilization technology, Biocompatible, pH- sensitive, Controlled release,Oral administration, Tissue Engineering, Bioactive scaffolds”。

1.2 纳入与排除标准

*纳入标准：*①文章研究内容与海藻酸钠和壳聚糖的结构、制备方法、成型机制及微囊的应用前景密切相关。②同一领域或有重复的选择近期发表或者发表在权威杂志，尤其是SCI杂志上发表的文章。

*排除标准：*不相干文献和重复性研究

1.3 对纳入文献的评价

经检索共查到160余篇相关文献，通过初步筛选，去除与研究目的不相关和内容陈旧、重复的文章，纳入文献64篇进行综述评价。

2 结果 Results

2.1 海藻酸钠和壳聚糖的化学结构

2.1.1 海藻酸钠 海藻酸钠(**图1**)是从海藻中分离得到的天然多糖，由β-D-甘露糖醛酸(M)和α-L-古洛糖醛酸(G)连接形成的线性嵌段共聚物，两种结构单元通过α-1, 4糖苷键链接形成3种组合方式(MM段、GG段和MG段)[3](**图2**)。

海藻酸钠水溶液的一个突出特点是遇到一定浓度的二价金属离子(Ca^{2+}、Ba^{2+}、Zn^{2+}等)可以形成以螯合作用为主的凝胶[4-6]，其温和的溶胶凝胶过程、良好的生物相容性使海藻酸钙凝胶已被广泛应用于细胞三维培养、药物缓释系统、组织工程支架材料及人工细胞等领域[7]。

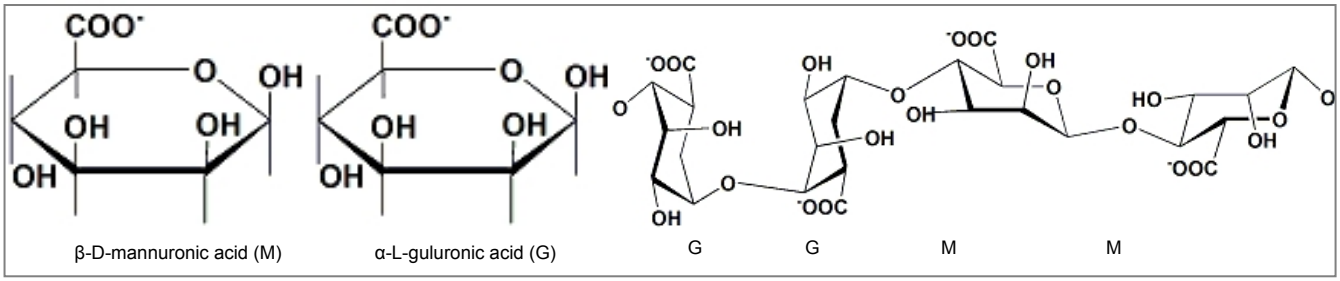

图 1 海藻酸钠分子结构式[3]

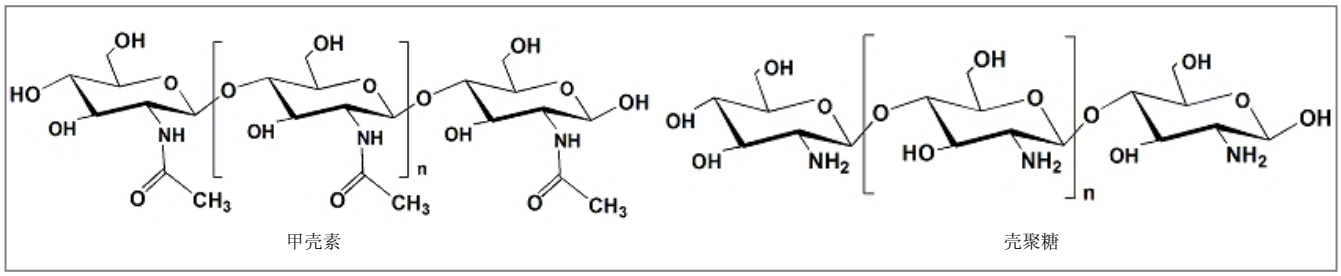

图 2　甲壳素和壳聚糖的分子结构式[8]

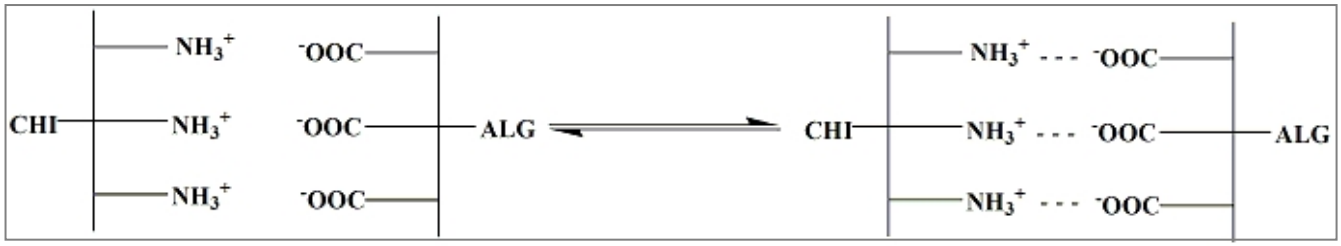

图 3　海藻酸钠与壳聚糖静电作用示意图[10]

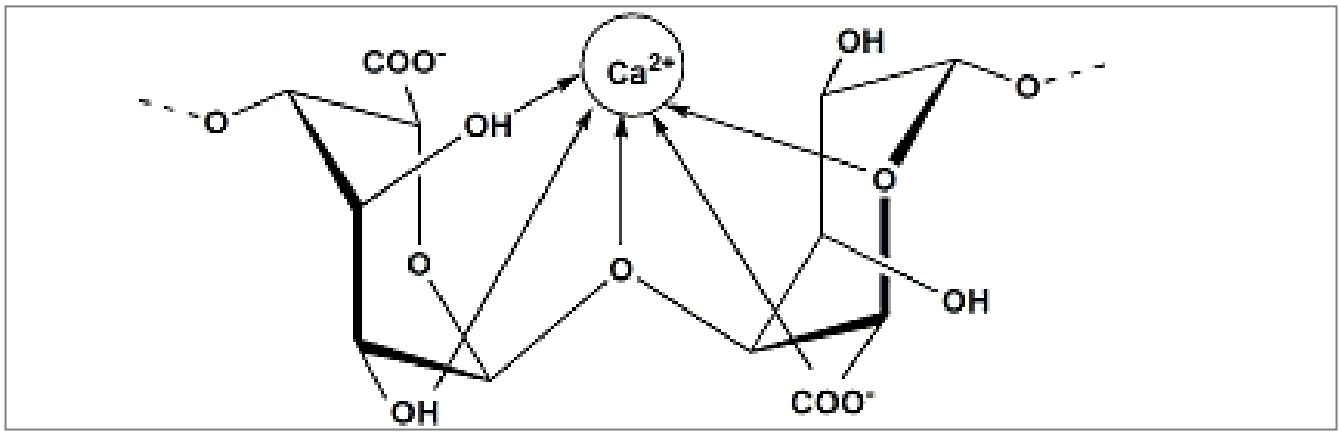

图 4　Ca^{2+}与海藻酸盐的结合方式[15]

2.1.2　壳聚糖　壳聚糖$(C_6H_{11}O_4N)n$是甲壳素脱乙酰化后得到的物质(**图2**)，是自然界惟一的聚阳离子碱性多糖，易溶于甲酸、乙酸、乳酸等有机酸和无机酸中，形成黏性溶液；其分子链上有很多游离伯氨基，在酸性溶液中结合质子，成为带正电荷的聚电解质[8-9]，表面高密度的正电荷有利于黏附表面带负电荷的细胞，而且壳聚糖的结构与细胞外基质成分糖胺聚糖(GAG_S)相似，其适于作为支架材料用于软骨组织工程的研究。

2.2　海藻酸钠-壳聚糖微胶囊的成型机制及制备

2.2.1　海藻酸钠-壳聚糖微囊成型机制　李沙等[10]借助差示扫描量热法考察了海藻酸钠-壳聚糖微囊成型机制，将用于制备微囊的3种组分海藻酸钠、壳聚糖与钙盐、等量物理混合物、不含壳聚糖的海藻酸钠与钙形成的空白微囊及海藻酸钠与壳聚糖胶凝反应生成的产物，作扫描量热分析以探讨微囊的成型机制。分析样品的扫描量热谱图认为海藻酸钠与壳聚糖通过静电相互作用形成微囊，壳聚糖单体分子上质子化的氨基与海藻酸钠M单元的羧基通过正负电荷吸引形成聚电解质膜(**图3**)。

2.2.2　海藻酸钠-壳聚糖微囊制备方法　通过聚电解质络合原理制备的海藻酸钠-壳聚糖微胶囊，是以聚电解质复合结构为囊膜，以海藻酸钠为囊芯物的微胶囊。目前，制备方法主要包括一步法、两步法和复合法[11-12]。

一步法是将壳聚糖和钙离子混合液滴入海藻酸钠溶液中反应，或反向操作将海藻酸钠溶液滴入壳聚糖和钙离子的混合溶液中形成外部依次为壳聚糖沉积层、壳聚糖/海藻酸钠络合层和海藻酸钙凝聚层，内部是液芯的微胶囊；两步法是将海藻酸钠溶液滴到钙离子溶液中钙化成核后用壳聚糖包覆成膜，最后用柠檬酸钠溶液进行液化处理得到微胶囊；复合法是指凝胶化海藻酸盐与壳聚糖反应制备海藻酸钠-壳聚糖微胶囊后以双功能团分子如戊二醛等对微胶囊的表面进行交联[13]。例如王家荣等[13]采用两步法制备了海藻酸钠-壳聚糖-海藻酸钠生物微胶囊，并考察了氯化钙浓度、海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度及其pH值，以及柠檬酸钠溶液pH值对微胶囊性能的影响。实验结果表明，胶囊粒径随氯化钙浓度和海藻酸钠浓度的增加而增大，胶囊的膜厚随壳聚糖浓度的

增加而增厚，随壳聚糖溶液pH值的增加而降低；而在胶囊液化处理过程中，柠檬酸钠溶液的pH值对微胶囊的机械强度有很大的影响。当氯化钙浓度为1.5%，海藻酸钠浓度为2%，壳聚糖浓度和pH值分别为1.5%和5.0及柠檬酸钠溶液的pH值为7.2时，可制得粒径为2.65 mm、机械强度为150 mN的海藻酸钠-壳聚糖-海藻酸钠生物微胶囊。

海藻酸钙水凝胶为离子包埋型水凝胶[14]，将海藻酸钠加入含钙离子介质中，只有 G 单元参与离子交联作用，两个均聚 G 嵌段通过协同作用结合，在中间形成钻石形的亲水空间，Ca^{2+}占据这些空间并与 G 单元上的多个氧原子螯合，海藻酸链与链间结合紧密并相互作用形成三维网络结构，Ca^{2+}像鸡蛋一样嵌于其中形成了“蛋盒结构”[15](**图 4**)，而均聚的 M 嵌段与 Ca^{2+}不能形成该结构由于其韧性大、易弯曲等特点。 GM 交替嵌段在生成水凝胶的过程中将各嵌段链接起来而并不具有直接作用。

氯化钙是Ca^{2+}交联海藻酸盐水凝胶体系常选用的交联剂，即将海藻酸钠滴入到含钙离子溶液中，钙离子就从液滴表面逐渐渗透进内部，这常被称作外部凝胶法[16]，其凝胶速率很难控制且凝胶化过程过快常产生呈梯度变化的交联密度和不均一性的结构，具有良好力学性能和形态的三维结构便无法获得；而内部凝胶法选用的是碳酸钙能制备粒径较小的凝胶微球，且可以实现工业化生产[17-18]。

通过荧光标记海藻酸钠，制备内部凝胶化及外部凝胶化海藻酸钙微球观察凝胶结构，并通过 Leica confocal software 分析凝胶内部的荧光分布可发现内部凝胶化呈现内外均一的凝胶结构[19]。例如于炜婷等[19]采用乳化-内部凝胶化技术制备粒径可控且分布较均匀的海藻酸钙凝胶微球，其工艺易于放大以实现工业规模生产，因而已被用于蛋白、多肽类药物的缓控释载体和酶的固定化研究。实验提出将乳化-内部凝胶化工艺用于微生物固定化培养的研究，以啤酒酵母 S.cerevisiae BY4741 为模型，重点考察了乳化-内部凝胶化工艺过程相关参数对微生物活性的影响规律，发现酸是影响其活性的主要因素。因此，从内部凝胶化的原理入手，确定了适合微生物包埋的工艺条件，制备过程中微生物活性可保持 77.0%，凝胶微球体积产率 93.5%。进而制备载细胞海藻酸钠-壳聚糖微胶囊，考察载细胞海藻酸钠-壳聚糖微胶囊固定化培养过程中啤酒酵母的生长动力学，结果表明在细胞增殖过程中，微胶囊形态保持良好，酵母菌的生长动力学明显优于游离培养组。因此，乳化-内部凝胶化工艺有望成为规模化微生物固定化培养和生产的新技术。

Liu 等[20]研究了通过外部凝胶化和内部凝胶化技术制备的海藻酸钠-壳聚糖微胶囊溶胀特性，借助激光扫描共聚焦显微镜对内部或外部凝胶化海藻酸钙进行结构分析，注意到内部凝胶化的膨胀率明显低于外部凝胶化微胶囊。

2.3 影响微胶囊性能的因素 影响海藻酸钠-壳聚糖微胶囊性能的因素主要是壳聚糖溶液的性质：壳聚糖的分子质量、壳聚糖溶液的 pH 值、浓度等，这些因素主要影响微胶囊的膜强度和控释性能。

2.3.1 壳聚糖分子质量对微胶囊性能的影响 壳聚糖分子量对微胶囊膜强度的影响机制主要包括：壳聚糖分子进入海藻酸钙凝胶网络的扩散速率和程度及壳聚糖分子与海藻酸钠分子之间的反应程度。分子质量大的壳聚糖具有较大的链节空间尺寸，因而扩散进入海藻酸钙凝胶网络的阻力也较大，从而扩散速率和程度都相对较低，因此成膜反应主要发生在海藻酸钙凝胶珠表面，即使其链节上荷正电的氨基数目较多，与海藻酸钠分子的反应程度仍然较低，形成的膜薄，抗膨胀能力较弱；分子质量低的壳聚糖空间位阻低，进入海藻酸钙凝胶网络很容易，进入的分子数目增多同时提供的氨基数目也随之增多，从而与海藻酸钠分子反应程度增大，生成的膜厚，抗膨胀能力较强。

Polk 等[21]研究发现：壳聚糖相对分子质量对微胶囊的强度和控释性的影响是很重要的。McKnight 等[22]研究了在膜形成过程中影响膜硬度和弹性的 3 个主要因素：壳聚糖的分子质量，反应基团离壳聚糖主链的距离及反应基团的类型。有研究采用亚硝酸盐氧化法制备了不同分子质量的壳聚糖，发现高分子质量壳聚糖制备的微囊膜薄接近透明，微囊十分脆弱，若悬浮液提供的浮力消失，微囊很容易在自身重力作用下破碎[23]；另一方面通过降低壳聚糖分子质量形成的微囊膜厚、弹性强，球形圆整，囊边缘光滑不变形。刘群等[24]以乳化/内部凝胶化法制备了海藻酸钠-壳聚糖微囊，以膨胀度为指标证明低分子质量壳聚糖制备的微胶囊膜厚度远远高于高分子质量，并且低分子质量壳聚糖成膜反应速率大于高分子质量壳聚糖。Daugulis 等[25]也发现随着壳聚糖相对分子质量的降低，制备的微胶囊强度提高。李会静等[26]研究了海藻酸钠-壳聚糖凝胶微囊制备及两相培养过程参数对酵母细胞生长及转化生产芳香醇的影响规律，结果证明制备参数(壳聚糖分子质量)与培养基-有机溶剂比例对酵母细胞生长及转化能力有明显影响；在两相体系中培养 24 h 后，微囊化酵母细胞浓度为 $7.41\times10^{11}L^{-1}$，底物转化率为 77.2%，产物芳香醇质量浓度可达 5.71 g/L。

2.3.2 壳聚糖溶液 pH 值对微胶囊性能的影响 海藻酸钠-壳聚糖囊膜由壳聚糖分子上质子化的氨基与海藻酸钠 M 单元的羧基通过静电相互作用形成，壳聚糖溶液的 pH 值直接影响两种天然高分子材料的电荷分布以及分子结构，当溶液的 pH 值与壳聚糖的 pKa=6.3 接近时，

此时壳聚糖分子几乎不带电，电荷密度显著降低，分子空间伸展小，分子扩散系数较高，能更深入地进入海藻酸钙凝胶网络中，发生的聚电解质络合程度深，所以膜厚。

杨唐仪等[27]采用响应面法优化海藻酸钠-壳聚糖-粉末活性炭生物微胶囊制备工艺，筛选出影响微胶囊机械强度的重要参数，利用 Box-Behnken design 确定了参数之一壳聚糖 pH 值的最佳水平为 6.0。但微胶囊作为动物细胞或微生物细胞的固定化载体时，pH 值对维持细胞活性至关重要。付颖丽等[28]的实验发现：不同 pH 值壳聚糖溶液制备的微胶囊对微生物的影响较大，微生物对 pH 值的要求较为苛刻。于炜婷等[29]探讨了不同 pH 条件对壳聚糖分子成膜深度、囊膜膨胀性能及通透性的影响规律，结合不同种类细胞的结构特点及对环境 pH 值的敏感特性，确定了制备动物细胞、微生物细胞培养用海藻酸钠-壳聚糖微胶囊的最佳 pH 值。

2.3.3 壳聚糖溶液浓度对微胶囊性能的影响 在相同条件下制备的海藻酸钙凝胶珠，当增加壳聚糖溶液的浓度时溶液与凝胶珠中的壳聚糖浓度梯度随之增大，致使壳聚糖分子的扩散推动力增大，扩散程度和反应程度也相应的增加，膜变厚，抗膨胀能力增强。不同方法制备的凝胶珠，导致其膜强度不同的主要因素是自身结构的差异。

王岸娜等[30]通过单因素实验和正交实验得出：壳聚糖浓度对微胶囊的包埋率和载药量有很大影响。王华明等[31]通过海藻酸钠与钙、壳聚糖反应制备海藻酸钙-壳聚糖凝胶微球，利用红外光谱和扫描电镜对其进行表征，探讨壳聚糖浓度对复合材料凝胶性能(如强度、含水率和溶胀度)的影响。结果表明，材料中的海藻酸钙和壳聚糖存在分子间相互作用(氢键)，在凝胶表面能形成很多网格，壳聚糖极大地改善了复合材料的凝胶性能。邢楠等[32]分别用激光共聚焦扫描显微镜和全自动型倒置生物显微镜观察标记异硫氰酸荧光黄的牛血清白蛋白由微胶囊外部向内部扩散的动态过程，对牛血清白蛋白在海藻酸钙-壳聚糖微胶囊中的双向通透性能进行了定性和定量初步研究，考察了壳聚糖、海藻酸钠溶液浓度及微胶囊组成成分对牛血清白蛋白通透性能的影响。

2.4 海藻酸钠-壳聚糖微胶囊的应用前景 随着生物技术和膜技术研究的不断深入，微胶囊制备方法不断完善，应用领域不断扩宽，微胶囊已被应用于细胞培养、细胞和酶固定化、药物缓控释、人工器官及基因运载工具、抗癌药物筛选等生物医学领域[33-35]。海藻酸钠-壳聚糖的高微囊强度及其可调节的渗透性，使其成为包埋活细胞和控制释放体系的理想载体[36]。

2.4.1 海藻酸钠-壳聚糖微胶囊在固定化细胞技术中的应用 固定化技术是指利用物理或化学手段，将游离细胞或酶与固态不溶性载体相结合，固定在限定的空间区域，保持细胞及其内酶的活性、并能够反复使用的方法[37-38]，主要包括固定化酶、固定化细胞及固定化藻技术。一方面，固定化细胞技术既不需纯化也不必把酶从细胞中提取出来，酶活力损失小，另外，固定化细胞技术是一种新型的废水处理技术，用于废水脱色是一种十分具有生物效益的策略[39]，因此，近年来，人们开始广泛研究利用微胶囊固定细胞。

Chandy 等[40]制备海藻酸钠-壳聚糖-聚乙二醇微胶囊，应用扫描电镜检测发现它的机械稳定性和蛋白扩散性能良好，用此胶囊包埋血红蛋白并观察血红蛋白的释放，没有溶血现象且稳定性和生物相容性很好。与此同时，付颖丽等[41]制备了海藻酸钠-壳聚糖微胶囊用于动物和微生物细胞的微囊化培养与移植，通过活体实验方法也进一步证明了海藻酸钠-壳聚糖微胶囊具有良好的生物相容性；于炜婷等[19]以啤酒酵母 S.cerevisiae BY4741 为模型，将乳化-内部凝胶化工艺用于微生物固定化培养的研究，制备了载细胞海藻酸钠-壳聚糖微胶囊，结果证明，在细胞增殖过程中微胶囊形态保持良好，酵母菌的生长动力学明显优于游离培养组。但是，微胶囊固定化细胞过程中也有许多细节因素需要考虑，Huguet 等[42]通过分析牛血清白蛋白、人血红蛋白及不同分子质量的 Dextran 在壳聚糖包被海藻酸钙微珠中的释放规律，考察了成囊材料对固定化细胞培养的影响。付颖丽等[28]通过考察大肠杆菌 DH5α 在海藻酸钠-壳聚糖胶囊内的生长、繁殖、代谢及死亡的动态过程，提出在固定化细胞过程中必须综合考虑 pH 值对细胞活性及微囊膜通透性能的影响，降低壳聚糖溶液的 pH 值，通透性能好，有利于细胞更容易的吸收营养物质，但是细胞对 pH 值的敏感性又意味着不能单纯考虑通透性的要求。细胞成囊技术通过控制细胞使其连续释放生物产品给宿主而能够治疗各类疾病，许多生物技术公司也将他们的注意力集中到这种技术上，然而目前微囊化细胞制备和培养研究仅限于小规模实验室范围，从临床到市场的一些问题如发展的科学问题、伦理问题、政府法规等问题仍未得到妥善解决[43]。

2.4.2 海藻酸钠-壳聚糖微胶囊在药物制剂中的作用 药物微囊化技术在制药领域的应用日益广泛，特别是在解决口服药存在的问题上，它一方面改善了药物的稳定性，另一方面延缓了药物释放，减少了不良反应，显示出了许多优势。自从在重组基因上获得支持后，蛋白质药物市场正在快速发展，传递这些药物最首选的路径-口服成为最大的挑战。在设计蛋白质和多肽的口服给药制剂方面，pH 敏感性水凝胶海藻酸钠和壳聚糖引起了人们的关注[44]。

Zhang 等[45]制备了壳聚糖-海藻酸钠载胰岛素微囊，研究了其制备过程、物理性能及胰岛素在模拟胃肠道条件下的释放行为。口服给药系统克服了胰岛素常规

给药途径注射法需要多次给药及产生多种不良后果的缺陷，制成微囊的工艺避免了胰岛素通过胃肠道时胃酸的破坏及胃肠道酶的降解作用，发展了一种口服胰岛素制剂。盐酸尼卡地平口服后能被快速完全吸收，半衰期很短，Takka 等[46-47]将其制成壳聚糖-海藻酸钙微粒，进一步探讨了海藻酸钠的类型及一些形式调控因素如聚合物的质量比、$CaCl_2$ 的浓度和固化时间对药物释放和药物包埋效率的影响。

微胶囊作为药物缓释载体能很好地控制药物释放，起到缓释作用。微囊中药物的释放机制一般认为有 3 种：一是物理过程-扩散，溶剂进入微球将药物溶解，药物经囊膜或材料及其中孔隙扩散进入介质，微球表面药物的溶解及扩散则容易形成释药的突释效应；二是物理化学过程-囊膜或材料的溶蚀，材料性质、介质组成、pH 值、体积和温度等决定了其溶解速率；三是囊膜及材料降解或在酶作用下酶解(化学反应及生化反应)，形成体内代谢产物，使药物释放出来，但仍需经溶解及扩散才能进入体液[48]。

Li 等[49]通过乳化交联技术制备载凝血酸海藻酸钠-壳聚糖微胶囊，在模拟体液中进行微胶囊的体外降解试验，在预定时间取出样品洗涤，冻干至恒质量，计算样品的质量损失比率。结果发现，在一开始降解速率较快，随后降解比率随时间的延长而缓慢升高，4 周以后降解比率也只达到 40%。Martinez 等[50]以它莫西芬为模型药物制备了海藻酸钠-壳聚糖纳米粒，药物释放研究在含 0.5% SDS 的 PBS 中进行，发现药物释放包括两个阶段，第一阶段时间短，药物释放最快，第二阶段药物释放变缓，而且比第一阶段时间长。研究发现在纳米粒表面的它莫西芬与纳米粒的相互作用较弱，在第一阶段便被释放出来，然后留在纳米粒内部的它莫西芬在第二阶段才被释放出来。研究还发现微粒的大小与纳米层的厚度也能调节药物的释放速率。

海藻酸钠与壳聚糖均是无毒、生物相容性好的天然高分子材料，得到广泛应用，如外科修复材料和透皮给药、眼部给药、缓释包衣、结肠给药、微球栓塞、人体器官和基因运载工具等，其中作为缓释制剂的骨架及包埋材料等尤为重要[51-52]。海藻酸钠单独作为药物释放载体曾引起了人们极大的兴趣，但凝胶溶蚀现象严重加速药物释放使其使用受到了限制[53]。另外，Østberg 等[54]也发现海藻酸盐凝胶珠作为控释系统时只可以用于大分子难溶性化合物，而对小分子可溶性药物不适用。Tamilvanan 等[55]发现用壳聚糖包覆海藻酸钠，可抑制凝胶珠的溶蚀，使药物释放速率显著减缓。Sezer 等[56-57]分别考察了承载大分子及小分子药物的海藻酸钠在包裹壳聚糖后的释放特征，充分证明在凝胶结构中添加壳聚糖能减慢药物从载体中的释放。王岸娜等[31]研究了复凝聚法制备碘微囊的工艺，考察了在模拟胃液环境下海藻酸钠-壳聚糖微胶囊的控释效果。海藻酸钠-壳聚糖微胶囊具有很好的 pH 响应性，卢凤琦等[58]的实验显示海藻酸钠-壳聚糖微囊在 pH 值 1.4 的缓冲液中缓释作用明显大于 pH 值 7.2 的缓冲液，因此，该微胶囊可用于对胃刺激性大的药物的剂型设计。肖莉等[59]的实验表明芦丁海藻酸钠-壳聚糖漂浮微囊在人工肠液中释放迅速，释放率是人工胃液中释放率的 10 倍，提示海藻酸钠-壳聚糖微囊可以制成 pH 值响应性的脉冲释放制剂。

值得注意的是，当通过海藻酸钠外面包覆壳聚糖膜来改善凝胶珠中的药物释放时，影响作用不仅仅取决于裹在微球表面的壳聚糖的密度，也与制备方法(一步法、两步法)及其他因素：包裹壳聚糖之前微球的状态(湿态还是干态)及参与反应的海藻酸钠浓度有关。总体来看，一步法制备的微囊比两步法中药物的突释作用厉害的多；另外，无论采用哪种制备方法，当海藻酸钠浓度从 1.5%增加到 3.0%或 5.0%时都能造成严重的突释，此时提高壳聚糖的浓度反而会导致微囊更严重的爆破，从而促进药物释放[60]。

2.4.3 海藻酸钠-壳聚糖微胶囊在组织工程中的应用前景 组织工程兴起于 20 世纪 80 年代，它借助工程学和生命科学的原理方法，在体内植入具有生物活性的体外人工取代物，对组织缺损进行修复，起到替代组织、器官的部分或全部功能的作用[61]。

陈文斌等[62]将负电性海藻酸钙微球与正电性壳聚糖微球通过静电作用贴附在一起制备自组装支架，小粒径壳聚糖微球贴附到海藻酸钙微球表面形成核壳结构状，克服了微球型注射支架存在的体内成型困难和微球游走等问题。Marsich 等[63]利用海藻酸钠和乳糖修饰壳聚糖制备了一种新的生物活性支架，其物理化学性能表明海藻酸钠-乳糖/壳聚糖水凝胶具有较好的机械性能。生物化学与生物学研究表明这些三维支架能维持软骨细胞表型，显著刺激促进软骨细胞生长和增殖。这项研究可以被看作是生物活性支架用于软骨细胞体外培养、扩增和细胞传递的第一步。覃昱等[64]制备壳聚糖海藻酸钠复合微球，将微球与骨髓基质细胞一起培养，研究此种复合物的生物相容性。结果表明，壳聚糖-海藻酸钠复合材料对骨髓基质细胞的增殖、分化及分泌功能无明显影响，验证其在组织工程领域作为骨支架材料的可行性。

3 讨论 Discussion

综上所述，海藻酸钠-壳聚糖微胶囊凭借其作为天然高分子材料的优越性：无毒、无刺激性、良好的生物相容性，已被广泛用于细胞培养、细胞和酶固定化、药物控释、人工器官与组织工程以及人工细胞等领域，并获得了一定的成就。近年来，海藻酸钠、壳聚糖应用于细胞培养的研究有了很大的进步，细胞培养作为一种评

价药效的有效手段，改善了一直以来通过大量动物实验来考察药效的现状，更符合伦理学。但是更有力的实验结果仍需要一定的动物实验加以验证。海藻酸钠-壳聚糖微囊的突出特点是具有良好的pH响应性，微囊在胃液中释放率较低，而在小肠液中能迅速释放，可以保护易受胃酸破坏的药物，有望用作胰岛素或其他肽类药物的口服制剂载体，而且可以被用来开发作为结肠定位给药系统。海藻酸钠、壳聚糖来源丰富，成本低廉，相信随着生物医学和材料学的深入研究，其作为药物载体材料和组织工程修复材料将具有更广阔的应用前景。

作者贡献：由全体作者共同完成。

利益冲突：文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求：无涉及伦理冲突的内容。

学术术语：微胶囊-用天然或合成高分子材料把分散均匀的固体物质颗粒、液滴或气体完全包封在膜中的一种球状微型容器，外层的聚合物囊壳材料能保护囊芯物性质不受环境条件影响。

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] 叶莉,王士斌.微囊化干细胞及其应用研究进展[J].生物工程学报,2010,26 (12) :1611-1617.

[2] De S, Robinson D. Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-l-lysine-alginate nanospheres.J Controll Release.2003;89 (1): 101-112.

[3] Hunt NC,Grover LM.Encapsulation and culture of Mammalian cells including corneal cells in alginate hydrogels.Methods Mol Biol.2013;1014:201-210.

[4] Lundqvist LC,Jam M,Barbeyron T,et al.Substrate specificity of the recombinant alginate lyase from the marine bacteria Pseudomonas alginovora.Carbohydr Res.2012;352:44-50.

[5] Gu F,Amsden B,Neufeld R.Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads.J Controll Release.2004;96(3): 463-472.

[6] Siddhesh NP,Pawar KE.Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications.Biomaterials. 2012; 33(11):3279-3305.

[7] 曹月龙,庞 坚,詹红生,等.海藻酸盐在软骨组织工程中的应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(48): 9777-9780.

[8] Vijay SY,Sadhana SR.Unprecedented chitin and chitosan: A Chemical Overview. J Polym Environ.2013;21(2): 606-614.

[9] Kim SK.Marine Biomaterials:Characterization,Isolation,and Application.CRC Press,2013:45-60.

[10] 李沙,侯新朴.海藻酸钠-壳聚糖微囊成型机理及其对大分子药物的载药、释药研究[J].药学学报,2003,38(5): 380-383.

[11] 何荣军,杨 爽,孙培龙,等.海藻酸钠/壳聚糖微胶囊的制备及其应用研究进展[J].食品与机械,2010,26(2):166-168.

[12] Alexakis T,Boadi DK,Quong D,et al.Micro encapsulation of DNA within alginate micro spheres and crosslinked chitosan membranes for in vivo application.Appl Biochem Biotechnol. 1995;50(1): 93-106.

[13] 王家容,金谊,刘望才,等.海藻酸钠-壳聚糖-海藻酸钠生物微胶囊的制备[J].宁波大学学报,2007,20(4):516-519.

[14] Eiselt P,Yeh J,Latvala RK,et al. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels.Biomaterials.2000; 21:1921-1927.

[15] Massimiliano B, Gudmund SB,Sergio P,et al.On the Initial Binding of Alginate by Calcium Ions. The Tilted Egg-Box Hypothesis.J Phys Chem B.2013;117(24): 7277-7282.

[16] Eva P,Marek B,Dusan C,et al.Method for preparation of planar alginate hydrogels by external gelling using an aerosol of gelling solution. Carbohyd Polym.2012;90(1):472-482.

[17] Song HY,Yu WT,Gao M,et al. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process.Carbohydr Polym.2013;96(1): 181-189.

[18] 林军章,于炜婷,徐小溪,等.乳化/内部凝胶化工艺制备海藻酸钙凝胶微球的研究[J]. 功能材料,2008,39(11):1879-1882.

[19] 于炜婷,林军章,刘袖洞,等.乳化-内部凝胶化工艺制备固定化酵母微胶囊[J].化工学报,2009,60(3):710-717.

[20] Liu XD,Xu WM,Liu Q.Swelling behaviour of alginate-chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technology. Carbohydr Polym. 2004;(56): 459-464.

[21] Polk A,Goosen M.Kinetics of protein diffusion from a poly(D,L-lactide) reservoir system.J Pharm Sci.1990;79(5): 407.

[22] McKnight CA,Ku A,Goosen MF.Synthesis of chitosan-alginate microcapsule membranes.J Bioact Compat Polym.1988; 10(3):334-355.

[23] Choi WS,Ahn KJ,Lee DW,et al. Preparation of chitosan oligomers by irradiation. Polym Deg Stab.2002;78: 533-538.

[24] 刘群,薛伟明,于玮婷,等.海藻酸钠-壳聚糖微胶囊膜强度的研究[J].高等学校化学学报,2002,23(7):1417-1420.

[25] Daugulis A,Faulkner P,Goosen M.Alginate - Polylysine microcapsules of controlled membrane molecular-weight cutoff for mammalian cell culture engineering.Biotechnol Prog.1987;3(4):231-240.

[26] 李会静,于玮婷,许冠哲.海藻酸钠-壳聚糖凝胶微囊固定化细胞非水相中催化性能[A]；中国化学会第28届学术年会第12分会场摘要集[C],2012.

[27] 杨唐仪,李朝霞,丁成,等. 响应面法优化海藻酸钠-壳聚糖-粉末活性炭生物微胶囊制备工艺[J].化学通报,2011,74(3): 252-258.

[28] 付颖丽,雄 鹰,刘袖洞,等.海藻酸钠/壳聚糖微胶囊固定化大肠杆菌的研究[J].生物工程学报,2002,18(2): 239-241.

[29] 于炜婷,刘袖洞,李晓霞,等.壳聚糖溶液 pH对载细胞海藻酸钠-壳聚糖微胶囊性能的影响[J].高等学校化学学报,2006,27(1): 182-186.

[30] 王岸娜,吴立根,周跃勇.壳聚糖海藻酸钠微胶囊制备研究[J].河南工业大学学报, 2007,28(6):19-23.

[31] 王华明,曹 阳,徐 龙,等.壳聚糖对藻酸钙凝胶性能的影响[C].二〇〇八全国功能材料科技与产业高层论坛论文集,2008.

[32] 邢楠,田丰,刘圣军,等.海藻酸钙-壳聚糖微胶囊组成对BSA通透性能影响的研究[J].化学学报,2007,65(24): 2952-2958.

[33] Huang XB,Zhang XY,Wang XG,et al.Microenvironment of alginate-based microcapsules for cell culture and tissue engineering. J Biosci Bioeng.2012;114 (1):1-8.

[34] Datta S,Christena LR,Sriramulu YR,et al. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. Biotech.2013;3(1):1-9.

[35] Hussein AS,Abdullah N,Ahmadun FR.Polymeric micro and nanoparticles as promising drug delivery vehicles: a review.Int J Nanoparticles.2012;5(4):316-337.
[36] Li ZL,Chen P,Xu XZ,et al.Preparation of chitosan-sodium alginate microcapsules containing ZnS nanoparticles and its effect on the drug release.Mater Sci Eng C.2009;29(7): 2250-2253.
[37] Yang XY,Tian G,Jiang N,et al.Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design.Energy Environ Sci.2012;(2):5540-5563.
[38] 魏小娜,李刚,吴波,等.固定化微生物处理模拟污染地表水[J].生态学杂志, 2012,31(7):1882-1886.
[39] Chen BY,Yen CY,Hsueh CC.Cost-effective biostimulation strategy for wastewater decolorization using immobilized-cell system.Bioresour Technol.2009; 100(12): 2975-2981.
[40] Chandy T,Mooradian DL,Rao GH.Evaluation of modified alginate chitosan polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation.Artif Organs.1999;23(10):894-903.
[41] 付颖丽,雄 鹰,于炜婷,等.海藻酸钠／壳聚糖微胶囊生物相容性的研究[J].自然科学进展,2002,12(8): 845-847.
[42] Huguet M,Dellacherie E.Calcium alginate beads coated with chitosan: effect of the structure of encapsulated materials on their release.Process Biochem.1996;31:745-751.
[43] Orive G,Hernández RM,Gascón AR,et al.Encapsulated cell technology: from research to market.Trends Biotechnol. 2002;20(9):382-387.
[44] Yang J,Chen J,Pan D,et al.pH-sensitive interpenetrating network hydrogels based on chitosan derivatives and alginate for oral drug delivery. Carbohydr Polym.2013;92(1):719-725.
[45] Zhang YL,Wei W,Lv PP,et al.Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin.Eur J Pharm Biopharm.2011;77(1): 11-19.
[46] Takka S, Acarturk F. Calcium alginate microparticles for oral administration: Ⅰ: Effect of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency. J Microencapsul. 1999;16(3):275-290.
[47] Acarturk F, Takka S. Calcium alginate microparticles for oral administration: II: effect of formulation factors on drug release and drug entrapment efficiency.J Microencapsul.1999;16(3): 291-301.
[48] 梅兴国.微载体药物递送系统[M].武汉:华中科技大学出版社, 2009:59-61.
[49] Li D,Li P,Zang J,et al.Enhanced hemostatic performance of tranexamic acid-loaded chitosan/alginate composite microparticles.J Biomed Biotechnol 2012.
[50] Martinez A,Arana P,Fernandez A,et al.Synthesis and characterization of alginate/chitosan nanoparticles as tamoxifen controlled delivery system.J Microencapsul. 2013; 30(4):398-408.
[51] 李红兵. 海藻酸作为新型药物转运载体的开发[J].高分子通报, 2006,5(8):39-43.
[52] Magedy WS.Chitosan-g-Copolymers: Synthesis, Properties, and Applications.Polysaccharide Based Graft Copolymers. 2013: 111-147.
[53] Almeida PF,Almeida AJ.Cross-linked alginate-gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol.J Controll Release.2004; 97 (3): 431-439.
[54] Østberg T,Lund EM,Graffner C. Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: IV. Release characteristics in different media. Int J Pharm.1994;112:241-248.
[55] Tamilvanan S,Karmegam S.In vitro evaluation of chitosan coated-and uncoated-calcium alginate beads containing methyl salicylate-lactose physical mixture.Pharm Dev Technol.2012;17(4):494-501.
[56] Sezer AD,Akbuğa J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. J Microencapsul.1999;16(2):195-203.
[57] Sezer AD, Akbuga J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads. J Microencapsul.1999;16(6):687-696.
[58] 卢凤琦,曹宗顺,赵焰.壳聚糖-海藻酸盐微囊对药物的缓释作用[J].中国医药工业杂志,1996,27(6):247-249.
[59] 肖莉,张韵慧,许建辰,等.芦丁壳聚糖-海藻酸钠漂浮微囊的制备研究[J].中草药, 2008,39(2): 209-212.
[60] Shu XZ,Zhu KJ.The release behavior of brilliant blue from calcium-alginate gel beads coated by chitosan: the preparation method effect.Eur J Pharm Biopharm.2002; 53:193-201.
[61] 崔俊峰,尹玉姬,何淑兰,等.骨组织工程支架材料研究进展[J].化学进展,2004,16 (2):300-307.
[62] 陈文斌,鲁路,焦延鹏,等.静电贴附海藻酸钙微球制备自组装支架[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(3):433-437.
[63] Marsich E,Borgogna M,Donati I,et al.Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: A bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation.J Biomed Mater Res A.2008; 84A(2):364-376.
[64] 覃昱,裴国献,谢德明,等.壳聚糖海藻酸钠微球与骨髓基质细胞相容性实验研究[J].中国矫形外科杂志,2003,11(13): 901-903.