

水凝胶复合载辛伐他汀蛋白微球对成骨细胞增殖分化的影响

柳晓琳¹, 穆新月², 马子雨³, 刘树泰⁴, 王文龙⁵, 韩晓谦¹, 董志恒⁶

<https://doi.org/10.12307/2023.033>

投稿日期: 2021-11-24

采用日期: 2022-01-13

修回日期: 2022-03-17

在线日期: 2022-04-22

中图分类号:

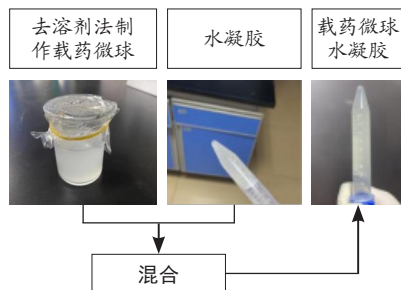
R459.9; R318.08; R783.1

文章编号:

2095-4344(2023)07-00998-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 制备装载辛伐他汀牛血清白蛋白微球复合水凝胶材料



透射电镜及扫描电镜观察

药物包封率、载药率及体外释放检测

采用碱性磷酸酶检测细胞活性

采用 CCK-8 法检测细胞增殖

文题释义:

辛伐他汀: 属于他汀类药物, 临床中主要应用于降低患者胆固醇水平。近年的研究发现辛伐他汀能够促进骨的再生, 抑制牙龈链球菌的生物活性, 从而达到抑制牙周炎、促进牙周骨组织形成的目的。

水凝胶: 具有良好的三维结构, 能够为细胞生长提供空间; 具有控释作用, 能够缓释药物; 具有流动性能, 能够更加贴合缺损部位的形态; 具有可注射性, 能够方便操作和储存; 具有良好的力学性能、稳定性和抗扩张性。

摘要

背景: 牙周炎患者逐年增加, 采用传统的牙周治疗方法并不能恢复牙周软硬组织, 因此需要制备出一种药物缓释材料辅助治疗牙周炎, 恢复牙周破坏的软硬组织。

目的: 制备装载辛伐他汀的牛血清白蛋白微球复合水凝胶材料, 检测其对辛伐他汀的双重缓释作用, 并进一步研究此释药复合材料对成骨细胞黏附、增殖的影响。

方法: ①采用去溶剂法制备载辛伐他汀的牛血清白蛋白微球, 采用透射电镜、扫描电镜观察微球的形态, 测量其粒径, 采用酶标仪检测载药微球的包封率、载药率及体外药物释放; ②将载药微球负载到明胶水凝胶中, 采用酶标仪检测水凝胶的体外药物释放, 扫描电镜观察复合材料的形态; 利用该水凝胶浸提液培养MC3T3-E1细胞, 采用CCK-8法检测细胞增殖, 碱性磷酸酶试剂盒检测细胞碱性磷酸酶的表达。

结果与结论: ①透射电镜显示, 载药微球呈光滑的圆球形, 较为分散, 未见明显聚集, 微球粒径也较为均匀, 80%的微球粒径在0.2-0.8 μm之间; 扫描电镜显示, 载药微球光滑, 呈圆球形, 分散性较好, 粒径分布较为均匀, 粒径在0.2-0.8 μm之间; ②载药微球的包封率为68.9%-87.5%, 载药率为0.95%-1.21%; ③载药微球中辛伐他汀的释放曲线是温和的持续释放过程, 载药水凝胶中辛伐他汀的释放曲线为前期释放速度快后期缓慢的持续释放过程, 其中载药水凝胶比载药微球能更快释放并达到药物的作用浓度, 在后期缓慢释放维持药物的作用浓度; ④扫描电镜显示, 载药水凝胶呈多孔条状结构, 适合成骨细胞的黏附和生长, 在水凝胶表面可以看到圆球形的载药微球; ⑤载药水凝胶可促进MC3T3-E1细胞的增殖与碱性磷酸酶表达; ⑥结果表明, 缓释辛伐他汀微球水凝胶复合材料具有良好的生物相容性, 能够促进成骨细胞的增殖与成骨分化。

关键词: 辛伐他汀; 药物缓释; 微球; 水凝胶; 成骨细胞; 增殖与分化

Effect of hydrogel-loaded simvastatin microspheres on osteoblast proliferation and differentiation

Liu Xiaolin¹, Mu Xinyue², Ma Ziyu³, Liu Shutai⁴, Wang Wenlong⁵, Han Xiaoqian¹, Dong Zhiheng⁶

¹Department of Prosthodontics, ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, ³Department of Children's Stomatology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256600, Shandong Province, China; ⁴Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining 272007, Shandong Province, China; ⁵Binzhou Medical College, Yantai 264000, Shandong Province, China; ⁶Periodontal Department, Yantai Stomatological Hospital, Yantai 264000, Shandong Province, China

Liu Xiaolin, Master candidate, Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256600, Shandong Province, China

Corresponding author: Han Xiaoqian, Master, Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256600, Shandong Province, China

滨州医学院附属医院, ¹口腔修复科, ⁵口腔颌面外科, ⁶儿童口腔科, 山东省滨州市 256600; ²济宁医学院附属医院口腔内科, 山东省济宁市 272007; ³滨州医学院, 山东省烟台市 264000; ⁴烟台市口腔医院牙周科, 山东省烟台市 264000

第一作者: 柳晓琳, 女, 1995年生, 汉族, 山东省烟台市人, 滨州医学院在读硕士, 主要从事口腔牙周病研究。

通讯作者: 韩晓谦, 硕士, 滨州医学院附属医院口腔修复科, 山东省滨州市 256603

并列通讯作者: 董志恒, 硕士, 滨州医学院附属医院儿童口腔科, 山东省滨州市 256603

<https://orcid.org/0000-0002-2885-891X> (柳晓琳)

基金资助: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (ZR2019PH075), 项目负责人: 王文龙; 滨州医学院科技计划项目 (BY2019KJ15), 项目负责人: 韩晓谦

引用本文: 柳晓琳, 穆新月, 马子雨, 刘树泰, 王文龙, 韩晓谦, 董志恒. 水凝胶复合载辛伐他汀蛋白微球对成骨细胞增殖分化的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(7):998-1003.



Co-corresponding author: Dong Zhiheng, Master, Department of Children's Stomatology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256600, Shandong Province, China

Abstract

BACKGROUND: The number of patients with periodontitis increases year by year, and the use of traditional periodontal treatment cannot restore the periodontal soft and hard tissue. Therefore, it is necessary to prepare a drug sustained-release material to assist the treatment of periodontitis and restore the damaged soft and hard tissues of periodontitis.

OBJECTIVE: To prepare bovine serum albumin microspheres composite hydrogel material, detect the dual sustained release effect on simvastatin, and further study the effect of the composite material on the adhesion and proliferation of osteoblasts.

METHODS: (1) Bovine serum albumin microspheres loaded with simvastatin were prepared by solvent removal method. The morphology of microspheres was observed by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy and the particle size of microspheres was measured. The encapsulation rate, drug loading rate and *in vitro* release of microspheres were detected by a microplate analyzer. (2) Simvastatin albumin microspheres were loaded into the prepared hydrogel, and *in vitro* drug release from hydrogels was detected using a microplate reader. The morphology of the composite material was observed by scanning electron microscopy. The hydrogel extract was used to culture MC3T3-E1 cells. The proliferation of osteoblasts was detected by CCK-8 assay. The alkaline phosphatase expression in osteoblasts was detected by alkaline phosphatase kit.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Transmission electron microscopy showed that bovine serum albumin microspheres and blank microspheres loaded with simvastatin were smooth, spherical and dispersed, with no obvious aggregation. The particle size of bovine serum albumin microspheres was uniform, and 80% of the microspheres had a particle size between 0.2 μm and 0.8 μm . Scanning electron microscopy showed that the microspheres were smooth and spherical with good dispersion and uniform particle size distribution, ranging from 0.2 μm to 0.8 μm . (2) The encapsulation rate and drug loading rate of simvastatin microspheres were 68.9%–87.5% and 0.95%–1.21%, respectively. (3) Drug-loaded microspheres had the performance of gentle and sustained release of simvastatin. The release curve of simvastatin in the drug-loaded hydrogel is a fast release in the early stage and a slow sustained release process in the later stage, in which the drug-loaded hydrogel can release faster than the drug-loaded microspheres and reach the effective concentration of the drug. The slow release in the later stage maintains the concentration of the drug. (4) Scanning electron microscopy showed that the drug-loaded hydrogel had a porous strip-like structure, which was suitable for the adhesion and growth of osteoblasts, and spherical drug-loaded microspheres could be seen on the surface of the hydrogel. (5) The drug-loaded hydrogel can promote the proliferation and alkaline phosphatase expression of MC3T3-E1 cells. (6) Simvastatin microspheres hydrogel composite had good biocompatibility and could promote the adhesion and proliferation of osteoblasts.

Key words: simvastatin; sustained drug release; microsphere; hydrogel; osteoblasts; proliferation and differentiation

Funding: Shandong Provincial Medical and Health Science and Technology Development Project, No. ZR2019PH075 (to WWL); Science and Technology Planning Project of Binzhou Medical College, No. BY2019KJ15 (to HXQ)

How to cite this article: LIU XL, MU XY, MA ZY, LIU ST, WANG WL, HAN XQ, DONG ZH. Effect of hydrogel-loaded simvastatin microspheres on osteoblast proliferation and differentiation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(7):998-1003.

0 引言 Introduction

牙周炎是口腔常见病之一，并且发病率逐年增加，是由菌斑、牙石等众多因素引起的牙周组织的慢性炎症，早期的自觉症状不明显，但后期随着炎症的发展，牙周软硬组织吸收，从而导致牙龈出现炎症、牙齿松动等。传统的治疗方法无法促进牙周软硬组织的恢复，作者设想制作一个缓释药物材料，在牙周组织周围缓慢释放药物辅助治疗牙周炎，达到促进牙周软硬组织恢复、抑制牙周炎症的目的。

研究发现他汀类药物具有抑制破骨、抑制炎症、促进成骨等作用。牙龈链球菌是牙周炎重要的致病菌，将辛伐他汀应用到牙周中时能够抑制牙龈链球菌的生物活性，促进牙周膜干细胞的再生，从而抑制牙周炎症、促进牙周组织的再生^[1-2]。辛伐他汀通过降低白细胞介素6和白细胞介素8的表达、抑制肿瘤坏死因子 α 的表达、促进白细胞介素10的表达，抑制牙周炎症^[3-5]。多项研究发现辛伐他汀提高了骨形态发生蛋白2、 $\alpha 5$ 整合素的表达，从而促进成骨^[6]。同时，辛伐他汀阻断了核因子配体受体激活因子的作用，降低了破骨细胞的生物活性^[7-10]。

为了局部应用辛伐他汀并使之持续缓慢地释放，需要将药物装载到聚合物载体中。以往的研究发现，白蛋白微球、聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球等具有良好的包封率和载药率、良好的生物相容性，并能够使药物持续缓慢地释放^[11-13]。水凝胶可以装载载药微球，能够发挥水凝胶良好的光学性能、独特的三维结构、优越的力学性能，并且具有良好的控释作用和生物相容性，能够在短时间内使药物释放到作用浓度，随后缓慢释放维持药物的作用浓度，同时水凝胶具有良好的

流动性，能够更好地贴合组织形态，达到良好的效果^[14-17]。

实验设计通过去溶剂法制备装载辛伐他汀的壳聚糖稳定的牛血清白蛋白微球，并将其装载到水凝胶中，达到辛伐他汀的双重缓释作用，实现辛伐他汀在牙周炎的局部应用。水凝胶的立体结构有利于成骨细胞的附着及增殖，辛伐他汀的局部持续缓释能够促进成骨细胞的成骨及增殖，并且能够抑制牙周炎症，从而达到辅助治疗牙周炎的作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 观察及体外细胞学实验，组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于2021年4-10月在滨州医学院临床医学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 主要药品与试剂 辛伐他汀($M_w=418.56$)、牛血清白蛋白(上海麦克林生化科技有限公司);壳聚糖(美国Sigma公司);明胶(国药化学试剂有限公司);甘油(国药试剂);胎牛血清、 α -MEM培养基、青霉素/链霉素、胰蛋白酶(大连美伦生物技术有限公司);CCK-8检测试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3.2 主要仪器与设备 pH仪及天平(瑞士METTLER TOLEDDO公司);磁力搅拌器(金坛区西城新瑞仪器厂);超净工作台(美国Thermo Electron公司);微量注射泵(康康医疗);酶标仪(SpectraMax M2, Molecular Devices, 美国)。扫描电镜(HT7700, 日立, 日本);激光共聚焦显微镜(莱卡, 德国)。

1.3.3 主要细胞 MC3T3-E1细胞购自济南卓凌经贸有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 载药微球的制备 ①采用磁力搅拌器搅拌 10 mL 去离子水和 100 mg 牛血清白蛋白 30 min, 测量溶液 pH 值, 以氢氧化钠溶液和盐酸溶液调节 pH 值到 8 左右; 向其中加入 1 mg 辛伐他汀, 持续搅拌 8 h; 使用微量注射泵以 30 mL/h 的速度向其中泵入 40 mL 无水乙醇, 继续搅拌 8 h, 得到溶液称之为 A 液。②将 3 mL 冰醋酸和 47 mL 去离子水搅拌配成稀醋酸, 取 50 mL 稀醋酸与 50 mg 壳聚糖搅拌 30 min, 得到的溶液称之为 B 液。③使用微量注射泵以 30 mL/h 的速度将 40 mL B 液泵入 A 液中, 并搅拌至少 8 h。④将最后搅拌得到的混合溶液倒入离心管中, 12 000 r/min 离心 15 min, 倒出上清液(将每次得到的上清液收集起来), 加入无水乙醇和去离子水各 10 mL 洗涤, 使用超声波清洗器震荡 20 min, 重复 3 次, 得到最终的沉淀。将沉淀冻干即可得到壳聚糖稳定的装载辛伐他汀的牛血清白蛋白微球冻干粉, 见图 1。同理制备不含辛伐他汀的牛血清白蛋白微球。



图 1 | 载药微球冻干粉

Figure 1 | Lyophilized drug loading microspheres

1.4.2 载药微球的载药率与包封率检测 精密称取辛伐他汀 1 mg, 用 5 mL PU 水和 5 mL 无水乙醇溶解, 配置 100 mg/L 的辛伐他汀标准储备液, 采用全波长酶标仪检测各波长下的数值, 得出辛伐他汀的检测波长 230 nm(为辛伐他汀的最大吸收波长)。用 100 mg/L 的辛伐他汀标准储备液, 配置质量浓度为 2, 4, 6, 8, 10, 12 mg/L 的标准溶液, 采用酶标仪测定各标准溶液在 230 nm 处的吸光度值, 以吸光度值为纵坐标, 以辛伐他汀浓度为横坐标, 计算出线性回归方程。

将载药微球 PU 水和无水乙醇混合溶液离心后的上清液全部收集起来, 采用全波长酶标仪测(波长 230 nm)上清液的吸光度值。计算溶液上清液药物的含量, 基于微球所包封辛伐他汀的量(S_1)和微球所添加总的辛伐他汀量(S_2)计算微球的包封率, 基于冻干获得的载辛伐他汀微球的量(S)和包封的辛伐他汀量(S_1)计算载药量。

$$\text{包封率}(\%) = S_1/S_2 \times 100\%$$

$$\text{载药量}(\%) = S_1/S \times 100\%$$

1.4.3 载药水凝胶的制备 取 0.4 g 明胶、2 mL 甘油、4 mL 去离子水, 混合并用磁力搅拌器于 37 °C 搅拌 1 h 成均匀水凝胶。保持 37 °C 恒温, 将水凝胶分别抽吸灌装于 1.0 mL 注射器中, 成为可注射性水凝胶, 凉至室温后密封。经 ^{60}Co 照射 1.5 min 以消毒灭菌, 保存在 4 °C 中。倒置试管, 若所装载的溶液在 30 s 之内不流动, 则认定该溶液为凝胶状态。

在无菌条件下, 在水凝胶材料中加入装载辛伐他汀的牛血清白蛋白微球, 制作载药水凝胶。

1.4.4 微球与水凝胶的微观形貌

透射电镜观察: 收集离心纯化的空白微球及载药微球沉淀, 分别加入 1 mL 去离子水和 1 mL 无水乙醇, 用超声清洗器充分混匀 5 min, 取 2 μL 未稀释的液体滴到碳铜网(230 目)上, 晾干, 透射电镜下观察。

扫描电镜观察: 在冻干的空白白蛋白微球及载辛伐他汀的白蛋白微球表面喷金, 采用扫描电镜观察微球形态及粒径。将载药水凝胶与未载药水凝胶放到液氮中冷冻, 在 -80 °C 中冷冻干燥得到冻干的水凝胶, 脆断后在水凝胶断端均匀喷金, 扫描电镜下观察。

1.4.5 载药微球与载药水凝胶的体外药物释放 将冻干后的载药微球与载药水凝胶分别放入 5 mL 离心管中, 加入 2 mL 无菌 PBS 溶液, 置于 37 °C 恒温摇床上, 以 150 r/min 持续振荡。1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d 时, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 1 mL 上清液, 并向管中加入等量的无菌 PBS 溶液, 使用全波长酶标仪检测上清液在 230 nm 处的吸光度值。建立校准曲线, 根据校准曲线计算每个时间间隔释放的辛伐他汀量。

1.4.6 载药水凝胶的细胞相容性

水凝胶浸提液的制备: 将载药水凝胶浸泡于完全培养基(含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 α -MEM 培养基)中, 置于 37 °C 细胞培养箱中培养 48 h, 水凝胶与培养基的比例为 0.2 g/1 mL。浸提液用紫外线照射 4 h 消毒。

碱性磷酸酶活性检测: 将 MC3T3-E1 细胞进行培养和传代。取对数生长期的 MC3T3-E1 细胞, 胰蛋白酶消化后, 按照 $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种到 24 孔板, 实验组每孔加入含体积分数 25% 水凝胶浸提液、成骨诱导液(β -甘油磷酸钠 10 mmol/L、维生素 C 50 mg/L、地塞米松 1×10^{-8} mol/L)的完全培养基 1 mL, 对照组每孔加入含成骨诱导液的完全培养基 1 mL, 每组 3 个副孔。培养 1, 4, 7 d 后, PBS 冲洗 2 次, 每孔加入 200 μL 细胞裂解液, 充分裂解; 4 °C 下 12 000 r/min 离心 3 min; 取上清液 120 μL , 接种到 96 孔板, 根据碱性磷酸酶试剂盒的要求操作, 采用酶标仪测定 405 nm 波长处的吸光度值。

细胞增殖检测: 取对数生长期的 MC3T3-E1 细胞, 按照 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种 96 孔板中, 实验组每孔加入含体积分数 25% 水凝胶浸提液的完全培养基 100 μL , 对照组每孔加入完全培养基 100 μL , 放入培养箱中培养。培养 1, 4, 7 d 后, 每孔加入 80 μL 的 CCK-8 溶液, 放于培养箱中培养 2 h, 再吸到 96 孔板中, 通过酶标仪在 405 nm 处检测吸光度值。

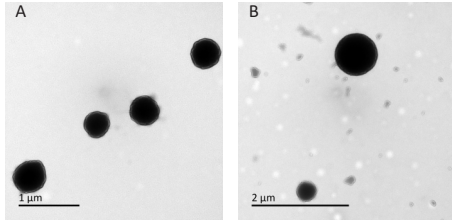
1.5 主要观察指标 载药微球与载药水凝胶的体外药物释放, 以及载药水凝胶的细胞相容性。

1.6 统计学分析 所有实验均重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式展示。采用 SPSS 21.00 统计软件进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析, 且 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经滨州医学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 空白与载药微球的微观形貌

透射电镜观察：将空白白蛋白微球及载辛伐他汀的白蛋白微球滴到铜网后，透射电镜下观察，发现两组微球均为光滑的球形，分散性好，无明显聚集现象，微球的粒径也较为均匀，80% 的微球粒径在 0.2–0.8 μm 之间，见图 2。

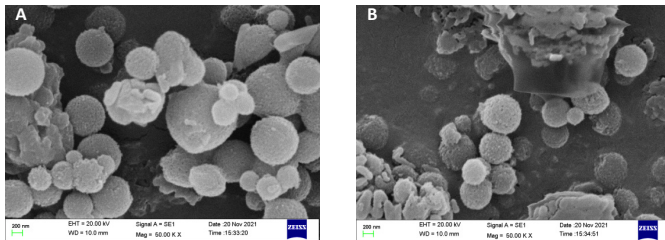


图注：A 为空白白蛋白微球，B 为装载辛伐他汀的白蛋白微球，两种微球为圆球形，表面均匀包裹一层壳聚糖

图 2 | 透射电镜下观察空白及载辛伐他汀白蛋白微球

Figure 2 | Transmission electron microscope observation of blank and simvastatin-loaded microspheres

扫描电镜观察：两组微球均呈光滑的球形，分散性好，微球的粒径较为均匀，80% 的微球粒径在 0.2–0.8 μm 之间，见图 3。

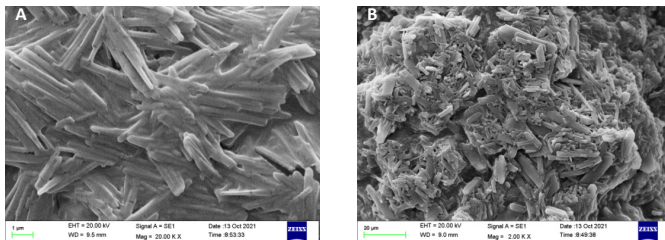


图注：A 为空白白蛋白微球，B 为载辛伐他汀白蛋白微球，两种微球呈光滑的圆球形，分散性较好。标尺 = 200 nm

图 3 | 扫描电镜下观察空白及载辛伐他汀白蛋白微球

Figure 3 | Scanning electron microscopy observation of blank and simvastatin-loaded microspheres

2.2 空白与载药水凝胶的微观形貌 见图 4。



图注：A 为空白水凝胶，呈多孔条状结构，各孔之间连通性较好，标尺 = 1 μm ；B 为载药水凝胶，呈多孔条状结构，各孔之间连通性较好，并且水凝胶表面有均匀分布的球形白蛋白微球，标尺 = 20 μm

图 4 | 扫描电镜下观察空白及载药水凝胶

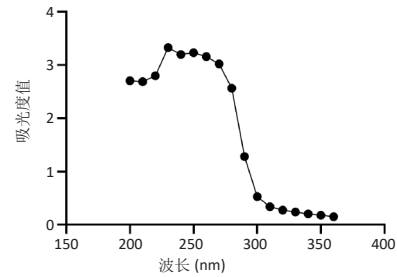
Figure 4 | Blank hydrogel and drug-loaded microsphere hydrogel observed by scanning electron microscope

高倍镜下，空白水凝胶组显示为多孔条状结构，各孔之间连通性较好，呈现出相互联通的三维结构，有利用细胞的黏附和生长；载药水凝胶组表面有均匀分布的球形白蛋白微球，这些微球与图 3 所示微球的形貌相近，部分白蛋白微球被水凝胶覆盖，部分白蛋白微球被水凝胶包裹，水凝胶表面

支架结构适合细胞黏附和生长。

2.3 载药微球的载药率、包封率

2.3.1 辛伐他汀全波长检测结果 如图 5 所示，采用全波长酶标仪检测辛伐他汀标准品，结果显示辛伐他汀的检测波长为 230 nm。

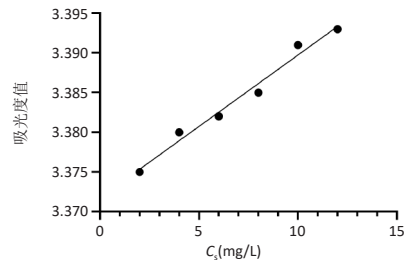


图注：在 230 nm 时辛伐他汀的吸光度值最高

图 5 | 辛伐他汀标准品在各波长下的吸光度值

Figure 5 | Absorbance values of simvastatin standard at different wavelengths

2.3.2 辛伐他汀线性回归方程结果 见图 6 所示，辛伐他汀的线性回归方程为： $A=0.0018 \times C+3.372$ ， $R=0.9804$ ，表明辛伐他汀在 2–12 mg/L 范围内线性良好。



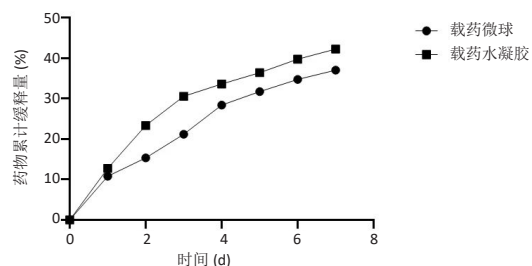
图注：辛伐他汀标准品在 230 nm 的线性回归方程为 $A=0.0018 \times C+3.372$ ， $R=0.9804$

图 6 | 辛伐他汀标准品的线性回归方程曲线

Figure 6 | Linear regression equation curve of simvastatin standard

2.3.3 载药微球的载药率、包封率 载药微球的包封率为 68.9%–87.5%，载药率为 0.95%–1.21%。

2.4 载药微球与载药水凝胶的体外药物释放 基于建立的标准方程，计算各时间点辛伐他汀累积释放量，见图 7 所示，载药微球中辛伐他汀的释放曲线是温和的持续释放过程，而载药水凝胶的释放曲线为前期释放速度快后期缓慢的持续



图注：载药微球中辛伐他汀的释放曲线是温和的持续释放过程，而载药水凝胶的释放曲线为前期释放速度快后期缓慢的持续释放过程

图 7 | 载药微球及载药水凝胶的累积辛伐他汀释放曲线

Figure 7 | Cumulative simvastatin release curves of drug-loaded microspheres and hydrogels

释放过程。载药微球在前期释放较快，前 3 d 药物释放达到 21.19%，而载药水凝胶在前期释放更快，前 3 d 药物释放达到了 30.56%，体现了辛伐他汀短时间内爆发式的释放；后期两者均放缓释放速度，表明微球及水凝胶的缓释使药物的半衰期有所延长，早期的爆发式释放能够在短时间内使药物达到有效的作用浓度，后期释放速度变慢，能够使药物维持的作用浓度，并延长作用时间，显示了载药微球及载药水凝胶能较好地实现辛伐他汀持续缓慢的释放。

前期水凝胶的药物释放更快，推测由于水凝胶是一种三维网状结构，释放的介质进入孔隙中，使凝胶在降解的同时微球也在降解，从而加快了微球中药物的释放。从结果来看，载药水凝胶比载药微球能更快地释放并达到药物的作用浓度，后期缓慢地释放，维持药物的作用浓度，因此载药水凝胶的载药和释放效果更好。

2.5 载药水凝胶的细胞相容性

碱性磷酸酶表达：培养 1 d 时，两组细胞碱性磷酸酶表达比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)；培养 4, 7 d 时，实验组细胞碱性磷酸酶表达高于对照组 ($P < 0.01$)，见图 8，说明载药水凝胶能够促进成骨细胞碱性磷酸酶的表达，促进细胞的矿化。

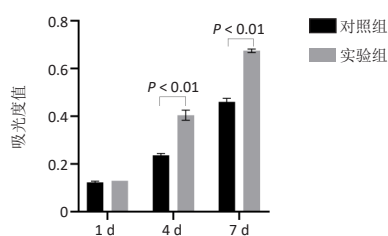


图 8 | 载药微球水凝胶对成骨细胞碱性磷酸酶表达的影响
Figure 8 | Effect of drug-loaded microspheres hydrogel on alkaline phosphatase expression in osteoblasts

细胞增殖：培养 1 d 时，两组细胞增殖吸光度值比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)；培养 4, 7 d 时，实验组细胞增殖吸光度值高于对照组 ($P < 0.01$)，见图 9，说明载药水凝胶促进了成骨细胞的增殖。

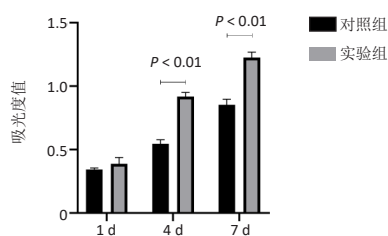


图 9 | 载药微球水凝胶对成骨细胞增殖的影响
Figure 9 | Effect of drug-loaded microsphere hydrogel on osteoblast proliferation

由细胞碱性磷酸酶活性检测与增殖检测结果可知，载药水凝胶具有良好的细胞相容性。

3 讨论 Discussion

辛伐他汀作为他汀类药物之一，临床中主要用于降低胆

固醇水平，近年研究发现他汀类药物尤其是辛伐他汀能够抑制炎症、降低破骨细胞的生物活性并促进成骨细胞的成骨分化，从而为治疗牙周炎提供了可能性。众多研究表明，辛伐他汀通过降低白细胞介素 8 和白细胞介素 6 的表达、促进白细胞介素 10 的表达，从而抑制炎症的发生和发展。牙龈链球菌是牙周炎重要的致病菌，将辛伐他汀应用到口腔生物膜时可抑制牙龈链球菌的活性；将辛伐他汀应用到牙周炎患者时，患者龈沟液中单核细胞金属蛋白酶 1 的表达受到了抑制，从而抑制了牙周炎的进展。高剂量的辛伐他汀反而会抑制基因的表达，使患者出现不良的肌肉反应^[18]。辛伐他汀的浓度在 1×10^{-6} mol/L 时效果最佳^[19]。研究表明局部注射是辛伐他汀良好的给药方式，而口服他汀类药物可能导致不良反应^[20]。同时应注意辛伐他汀的神经毒性等不良反应。此次实验选择了他汀类药物中的辛伐他汀作为研究药物，辛伐他汀抑菌和促进成骨的机制尚未完全探明，需要更多的实验来探究。

与传统应用材料的相比，白蛋白微球等具有良好的性能并经过了广泛的研究和应用。研究发现经过壳聚糖稳定的牛血清白蛋白微球具有良好的形态和结构，具有持续缓释药物的作用，并且具有良好的生物性能^[21-22]。研究发现微球制备过程中的众多因素，如聚合物的种类、分子质量等都能够对微球的性质产生作用，如载药量、大小及形态等。水凝胶具有良好的缓释作用和良好的生物相容性，并经过了广泛的研究及应用^[23]。根据水凝胶的扫描电镜图片可以看出，其具有良好的三维结构和孔隙，适合细胞的黏附和增殖^[24]。目前有很多学者利用水凝胶的良好性能并将其应用到细胞及动物实验^[25]。将药物装载到水凝胶中，使药物缓慢持续地释放，并且在短时间内的突释后能较快地达到药物的作用浓度，并维持药物的作用浓度，同时延长了作用时间^[26-27]。将微球装载到水凝胶中，使药物达到双重缓释的作用，并且结合了微球的性能和水凝胶的三维立体结构，更好地发挥作用^[28]。将辛伐他汀加载到白蛋白微球及水凝胶中，辛伐他汀的释放类似于药物的零级释放动力学，可以保证药物在短时间内到达并维持作用浓度，延长药物的作用时间。需要更多的实验确定微球及水凝胶制备过程中的影响因素，来统一控制微球及水凝胶的性能。此次实验将辛伐他汀装载到白蛋白微球中，并将载药微球放入水凝胶中，观察其载药、释药及其对成骨细胞增殖和分化的影响。

此次课题制备了装载辛伐他汀的牛血清白蛋白微球，并将其装载在水凝胶中，成功制备出辛伐他汀双重缓释材料。实验结果表明，装载辛伐他汀的白蛋白微球颗粒均匀，呈圆球形，分散性较好，装载到水凝胶中时保持基本的形态不变，并通过扫描电镜观察水凝胶，发现水凝胶具有良好的立体结构，各孔之间连通性较好，呈现出相互联通的三维结构，有利于成骨细胞的黏附和增殖。CCK-8 实验结果显示，载药微球水凝胶具有良好的细胞相容性，释放的辛伐他汀能够更好地促进成骨细胞的增殖。碱性磷酸酶活性实验检测结果显示，载药微球水凝胶对碱性磷酸酶活性的促进作用明显，说明能

够更好地促进成骨细胞分化。此次实验完成了辛伐他汀微球水凝胶的制备及细胞实验,初步验证了此载药微球促进成骨细胞增殖和成骨分化的效果,为后续如何更好地控制载药微球水凝胶的性能,并将其应用到动物中甚至动物牙周炎模型中提供经验。后续将继续探究辛伐他汀局部给药系统的制备及优缺点,并研究其治疗牙周炎的可能性和治疗效果,为后续的实验、研究及临床应用提供理论基础。

作者贡献: 柳晓琳及韩晓谦、董志恒共同构思设计编写文章,穆新月负责采集数据、整理分析数据,马子雨负责统计分析数据,刘树泰负责设计论文架构、修订论文,王文龙负责调研整理文献,韩晓谦、董志恒及马子雨共同审核,柳晓琳对文章负责。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- CHANG PC, TAI WC, LUO HT, et al. Core-Shell poly-(D,L-Lactide-co-Glycolide)-chitosan Nanospheres with simvastatin-doxycycline for periodontal and osseous repair. *Int J Biol Macromol*. 2020;158:627-635.
- ZHAO B, CHEN J, ZHAO L, et al. A simvastatin-releasing scaffold with periodontal ligament stem cell sheets for periodontal regeneration. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2020;18:2280800019900094.
- GROVER HS, KAPOOR S, SINGH A. Effect of topical simvastatin (1.2 mg) on gingival crevicular fluid interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-10 levels in chronic periodontitis- A clinicobiochemical study. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2016;6(2):85-92.
- BAHAMMAM MA, ATTIA MS. Effects of Systemic Simvastatin on the Concentrations of Visfatin, Tumor Necrosis Factor- α , and Interleukin-6 in Gingival Crevicular Fluid in Patients with Type 2 Diabetes and Chronic Periodontitis. *J Immunol Res*. 2018;2018:8481735.
- SHAO PL, WU SC, LIN ZY, et al. Alpha-5 Integrin Mediates Simvastatin-Induced Osteogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):506.
- FENG C, XIAO L, YU JC, et al. Simvastatin promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in rat model of osteoporosis through BMP-2/Smads signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(1):434-443.
- XU R, SHI G, XU L, et al. Simvastatin improves oral implant osseointegration via enhanced autophagy and osteogenesis of BMSCs and inhibited osteoclast activity. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(5):1209-1219.
- SUTHANTHIRAN T, ANNAMALAI S, CHELLAPANDI S, et al. Gingival Crevicular Fluid Levels of RANKL and OPG After Placement of Collagen Membrane With Simvastatin in the Treatment of Intrabony Defects in Chronic Periodontitis. *J Pharm Bioallied Sci*. 2019;11(Suppl 2):S301-S304.
- SHAHEEN M, BASUDAN A, NIAZY A, et al. Impact of single or combined drug therapy on bone regeneration in healthy and osteoporotic rats. *Tissue Eng Part A*. 2020;10:1089.

- XU R, SHI G, XU L, et al. Simvastatin improves oral implant osseointegration via enhanced autophagy and osteogenesis of BMSCs and inhibited osteoclast activity. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(5):1209-1219.
- ZHU K, ZHAO F, YANG Y, et al. Effects of simvastatin-loaded PLGA microspheres on treatment of rats with intervertebral disk degeneration and on 6-K-PGF1 α and HIF-1 α . *Exp Ther Med*. 2020;19(1):579-584.
- LI Y, ZHANG Z, ZHANG Z. Porous Chitosan/Nano-Hydroxyapatite Composite Scaffolds Incorporating Simvastatin-Loaded PLGA Microspheres for Bone Repair. *Cells Tissues Organs*. 2018;205(1):20-31.
- JIN H, JI Y, CUI Y, et al. Simvastatin-Incorporated Drug Delivery Systems for Bone Regeneration. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021;7(6):2177-2191.
- LIU K, CHEN Y, ZHAO XQ, et al. Research progress on polysaccharide/protein hydrogels: Preparation method, functional property and application as delivery systems for bioactive ingredients. *Food Res Int*. 2021;147(147):110542-110542.
- LI P, FENG Z, YU Z, et al. Preparation of chitosan-cu²⁺/NH₃ physical hydrogel and its properties. *Int J Biol Macromol*. 2019;133:67-75.
- AROKIANATHAN JF, RAMYA KA, JANEENA A, et al. Non-proteogenic amino acid based supramolecular hydrogel material for enhanced cell proliferation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;185:110581.
- LI QT, XU S, FENG Q, et al. 3D printed silk-gelatin hydrogel scaffold with different porous structure and cell seeding strategy for cartilage regeneration. *Bioact Mater*. 2021;6(10):3396-3410.
- NANTAVISAI S, RODPRASERT W, PATHANACHAI K, et al. Corrigendum to "Simvastatin enhances proliferation and pluripotent gene expression by canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells (cBM-MSCs) in vitro". *Heliyon*. 2019;5(11):e02805.
- PEI YC, JUI SS, YANG HT, et al. Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway. *Nutr Res*. 2010;30(3):191-199.
- DEREN ME, EHTESHAMI JR, DINES JS, et al. Simvastatin Exposure and Rotator Cuff Repair in a Rat Model. *Orthopedics*. 2017;40(2):e288-e292.
- WANG X, JIA Z, ALMOSHARI Y, et al. Local Application of Pyrophosphorylated Simvastatin Prevents Experimental Periodontitis. *Pharm Res*. 2018;35(8):164.
- 张金明, 刘宝会, 欧阳昭广, 等. 纳米银杂化的载辛伐他汀 PLGA 微球合成及性质研究 [J]. *国家生物医学工程杂志*. 2020;43(3):199-206.
- CISNEROS K, CHOWDHURY N, COLEMAN E, et al. Long-Term Controlled Release of Simvastatin From Photoprinted Triple-Networked Hydrogels Composed of Modified Chitosan and PLA-PEG Micells. *Macromol Biosci*. 2021;21(8):e2100123.
- YAN S, REN J, JIAN Y, et al. Injectable Maltodextrin-Based Micelle/Hydrogel Composites for Simvastatin-Controlled Release. *Biomacromolecules*. 2018;19(12):4554-4564.
- FARGHALY ALY U, ABOU-TALEB HA, ABDELLATIF AA, et al. Formulation and evaluation of simvastatin polymeric nanoparticles loaded in hydrogel for optimum wound healing purpose. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:1567-1580.
- FARUQ O, SAYED S, KIM B, et al. A biphasic calcium phosphate ceramic scaffold loaded with oxidized cellulose nanofiber-gelatin hydrogel with immobilized simvastatin drug for osteogenic differentiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(4):1229-1238.
- CHEN N, REN R, WEI X, et al. Thermoresponsive Hydrogel-Based Local Delivery of Simvastatin for the Treatment of Periodontitis. *Mol Pharm*. 2021;18(5):1992-2003.
- LI X, LIU X, NI S, et al. Enhanced osteogenic healing process of rat tooth sockets using a novel simvastatin-loaded injectable microsphere-hydrogel system. *J Craniomaxillofac Surg*. 2019;47(7):1147-1154.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)