论著

文章编号:1000-5404(2013)10-0988-04

负载转化生长因子β3微球的壳聚糖三维支架的制备

蒋 科,熊 雁,余 江,王子明,王爱民 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所骨科)

[摘要] **目的** 探讨制备负载转化生长因子β3微球的壳聚糖三维支架的可行性。**方法** 利用冻干法制备壳聚糖三维支架,扫描电镜观察并测定其水结合率及孔隙率。利用乳化交联法制备负载转化生长因子β3的壳聚糖微球,检测负载微球的体外缓释情况及吸水膨胀率。制作负载转化生长因子β3微球的壳聚糖三维支架,扫描电镜观察支架形态特征。**结果** 壳聚糖三维支架孔隙较为一致,孔隙直径(180.4±35.3)μm,孔隙率(83.2±0.6)%,与水的结合能力为(123±5)%。电镜观察微球表面光滑,分散性好,粒径(28.5±5.1)μm。对壳聚糖微球体外缓慢释放TGF-β3连续监测7 d,总释放率为(46.2±0.3)%。负载TGF1-β3微球的壳聚糖三维支架观察见微球在支架中分布均匀。**结论** 负载TGF-β3微球的壳聚糖三维支架的制备技术成熟,理化性质稳定,微球缓释TGF-β3效果理想,可作为理想的组织工程材料。

[关键词] 壳聚糖;转化生长因子β3;微球

[中图法分类号] R318.08;R944.9 [文献标志码] A

Preparation of controlled-released three-dimensional chitosan scaffold loading with TGF-β3 microspheres

Jiang Ke, Xiong Yan, Yu Jiang, Wang Ziming, Wang Aimin (Department of Orthopedics, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare a three-dimensional chitosan scaffold loading with transforming growth factor-β3 (TGF-β3) microspheres. **Methods** Three-dimensional chitosan scaffold was prepared by lyophilization, and water bonding capacity and porosity were measured. TGF-β3 loaded chitosan microspheres were prepared by emulsion-crosslinking method. The controlled release of TGF-β3 was monitored for 7 d and the swelling index was measured. At last, the three-dimensional chitosan scaffold loading with TGF-β3 microspheres was prepared and observed by scanning electron microscope (SEM). **Results** SEM images showed the morphology of porous scaffold was uniform, and the mean diameter of interconnected pores was 180.4±35.3 μm. The porosity was (83.2±0.6)% and swelling index of microspheres was (123±5)%. The microspheres were spherical and smooth, and the mean diameter of the microspheres was 28.5±5.1 μm. The accumulated release of TGF-β3 reached (46.2±0.3)% within 7 d. Most microspheres were uniform in the scaffold. **Conclusion** The method for preparing three-dimensional chitosan scaffold loading with TGF-β3 microsphere is feasible, and the sustained release of TGF-β3 is realized.

[**Key words**] chitosan; transforming growth factor-β3; microsphere

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81000807). Corresponding author: Wang Aimin, E-mail: trauma2@163.com; Xiong Yan, E-mail: xiongyandoctor@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81000807)

[通信作者] 王爱民,E-mail:www.trauma2@163.com

熊 雁,E-mail:xiongyandoctor@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130106.1001.005.html(2013-01-06)

屈指肌腱损伤后愈合发生粘连是手外科术后常见并发症。目前临床上预防术后肌腱粘连的措施主要是尽量减少腱鞘的损伤和炎性反应、术后早期功能锻炼等,但这些措施效果有限,需要进一步寻找更好的治疗方法[1]。近年来,转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)在肌腱愈合过程中的作用越来越被重视,TGF-β家族被认为是瘢痕形成、肌腱损伤后粘连的关键因子[2]。TGF-β3在抑制瘢痕形成过程中发挥了积极的作用,但在体外TGF存在半衰期短、易失活等缺点,因此需要寻找载体使其减少体外因素的干扰达到缓慢释放,使其生物学活性得以保存。壳聚糖在自然界中广泛存在,其溶液中带有高密度的正电荷,可以与多种水溶性的阴离子物质结合,该性能可以用来制备壳聚糖微球、纤维和多孔支架[3]。壳聚糖具有良好的生物相容性和生物可降解性,在组织工程支架材料、药物缓释系统和基因治疗载体方面表现出了良好的前景[4]。本实验利用壳聚糖作为组织工程支架材料和细胞生长因子的缓释系统,为进一步研究减少肌腱愈合后瘢痕形成打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

壳聚糖[相对分子质量=(1~2)×10^6,脱乙酰度≥95%,黏度≤200 mPa·s],span-80、液体石蜡、冰醋酸(上海阿拉丁公司),液状TGF-β3(0.1 mg/mL,Abcam公司),TGF-β3 ELISA试剂盒由R&D公司提供,磁力搅拌器(84-1A,江苏金坛科技公司),冷冻干燥机(TF-FD-IPF型,上海田枫公司),酶标仪(Model-680型,Bio-RAD公司),扫描电镜(JSM-6510LV,JEOL Ltd.,Tokyo,Japan),恒温振荡器(THZ-C型,太仓市豪诚实验仪器有限公司)。

1.2 壳聚糖微球的制备及其吸水膨胀实验

壳聚糖120 mg溶于2%的醋酸水溶液6 mL,配成2%的壳聚糖溶液,静置除气泡后待用。在烧杯中加入80 mL液体石蜡,1 500 r/min,滴加乳化剂Span-80 4 mL。用无菌注射器将壳聚糖溶液逐滴加至持续搅拌的液体石蜡溶液中,搅拌乳化30 min至呈均匀乳白色后加入0.3 mL的50%戊二醛溶液与壳聚糖交联搅拌固化30 min,静置固化30 min。倾去油相,石油醚洗涤3次,水洗3次。收集壳聚糖微球-20 ℃预冻1 h后-40 ℃冷冻干燥。冻干的微球Co^{60}照射12 h后封存冷冻待用。

壳聚糖微球的吸水膨胀实验:精确称量冻干后的壳聚糖微球20 mg(Ww),置于EP管中,加入PBS(pH=7.4,0.01 mol/L)1 mL,置于摇床(37 ℃,135 r/min)。每间隔1 h离心(5 000 r/min,1 min)去除上清液,称量微球吸水后的质量(Wd),补充1 mL PBS,动态观察12 h。根据公式计算各时间点的壳聚糖微球吸水膨胀率。吸水膨胀率=(Ww-Wd)/Wd×100%

按以上相同方法,在壳聚糖溶液中加入TGF-β3溶液5 μg(0.1 mg/mL)制成含TGF-β3的壳聚糖微球低温保存,扫描电镜下观察壳聚糖微球的形态,随机测量100个微球的直径。

1.3 载TGF-β3的壳聚糖微球的体外缓释实验

精确称量含TGF-β3壳聚糖微球20 mg,置于EP管,加入1 mL的PBS(pH=7.4,0.01 mol/L),EP管置于摇床(37 ℃,135 r/min),2 h后离心,-20 ℃保存离心液。将微球重悬于1 mL的PBS中,继续置于摇床。于实验开始后2、4、6、12、24、36 h及2、3、4、5、6、7 d重复上述操作。将各次收集的液体作为待测样品,用ELISA试剂盒检测样品光密度值,先按照试剂盒标准孔数值推导直线回归方程,再把所测各个时间点的光密度值代入方程推导浓度、计算释放量,最后绘制缓释标准曲线图。

1.4 壳聚糖膜三维支架的制备、形态学观察及水结合能力的测定

壳聚糖300 mg溶于2%的醋酸溶液20 mL,配制成1.5%的壳聚糖溶液,静置除气泡后待用。将3.0 mL溶液浇入直径9 cm培养皿中,37 ℃恒温箱干燥12 h形成致密膜。再将6 mL的壳聚糖溶液倾入培养皿,-20 ℃预冻2 h后-40 ℃冷冻干燥形成多孔层。冻干后的壳聚糖膜在1 mol/L的NaOH溶液中浸泡30 min,三蒸水漂洗至中性后再次冻干,可裁成需要的形状,Co^{60}照射后待用。扫描电镜观察壳聚糖不对称膜的表面及截面形态学特征。

壳聚糖不对称膜的孔隙率测定:将壳聚糖不对称膜裁成面积(S)为1 cm^{2}的方形膜片10片,用电子天平称质量(W,每片称3次,取平均值),电镜观察并测量不对称膜厚度(d,选取截面3处,取平均值),V=S×d,代入下列公式计算每片壳聚糖膜的孔隙率,并取平均值,无孔壳聚糖膜的密度ρ=0.942 g/cm^3[5]。孔隙率=[V-(W/ρ)]/V×100%

壳聚糖不对称膜的水结合能力测定:取干燥的壳聚糖不对称膜10片,每片精确称量记为W_0,将其置入10 mL PBS(pH=7.4,0.01 mol/L),37 ℃、24 h后取出,滤纸吸去表面水分,称质量记为W_1,根据公式分别计算每片壳聚糖不对称膜的水结合能力后取平均值。水结合率(%)=[(W_1-W_0)/W_0]×100%

1.5 载TGF-β3的壳聚糖缓释膜的制备

壳聚糖不对称膜裁成直径为1 cm的圆片,准确称量TGF-β3壳聚糖微球0.5 mg悬于100 μL PBS(pH=7.4,0.01 mol/L),加入壳聚糖膜多孔层,使微球均匀吸附到壳聚糖膜的孔隙中。再次冻干制成载TGF-β3的壳聚糖缓释膜待用。扫描电镜下观察载TGF-β3的壳聚糖缓释膜的形态学特征。

2 结果

2.1 壳聚糖支架的形态特征及孔隙率、水结合率

用冻干法制备的壳聚糖三维支架呈白色,不易折断,可随

意剪切成所需形状。大体观见背面致密层表面光滑,多孔层质地松软,扫描电镜观察(图1)所制备的支架孔隙较为一致,孔隙直径为(180.4±35.3)μm,孔隙率为(83.2±0.6)%。冰晶形成的条件不同使得形成的孔径大小不同,膜厚约300 μm,与水的结合能力为(123±5)%,与水结合未见支架破裂、溶解、变形、变性,干燥后仍然保持疏松结构及形态。

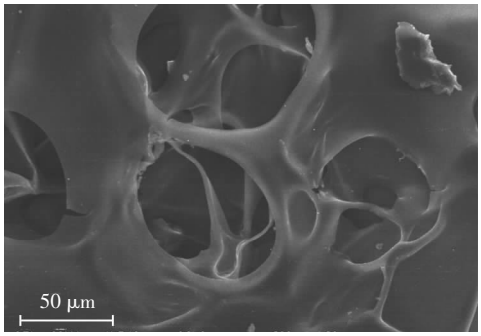


图1 扫描电镜观察壳聚糖三维支架形态特征

2.2 负载TGF-β3的壳聚糖微球的形态及大小、吸水膨胀率

大体观壳聚糖微球呈淡黄色粉末状,干燥,分散性好。扫描电镜下观察(图2),可见壳聚糖微球呈球状,分散较好,粒径较均匀,表面光滑,无裂纹。对100个微球的直径进行测量和统计得出微球粒径为(28.5±5.1)μm,微球中TGF-β3的含量为(294.4±3.2)ng/mg,吸水膨胀率为(126±7)%,微球吸水24 h后观察未见明显膨大或溶解,干燥后仍维持粉末状微球形态。

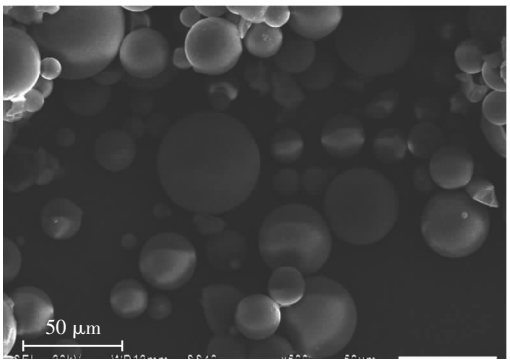


图2 扫描电镜观察负载TGF-β3的壳聚糖微球形态特征

2.3 负载TGF-β3的壳聚糖微球的体外缓释检测

对壳聚糖微球缓慢释放TGF-β3连续监测7 d,根据ELISA检测结果绘制TGF-β3的体外缓释曲线(图3)。在最初的3 d,TGF-β3的释放呈现快速释放的趋势,在最初24 h释放量较大,约3 d后开始趋于平缓,进入平台期,保持稳定。7 d的总释放率为(46.2±0.3)%。

2.4 负载TGF-β3微球的壳聚糖三维支架的形态特征

大体观察微球均匀分布于壳聚糖支架的孔隙中,支架形态稳定,未见卷曲及破碎。扫描电镜观察(图4),可见微球均匀分布于支架中,由于支架孔隙的三维结构,每个孔隙中可包含多个微球,并且微球和支架之间的孔隙较大。

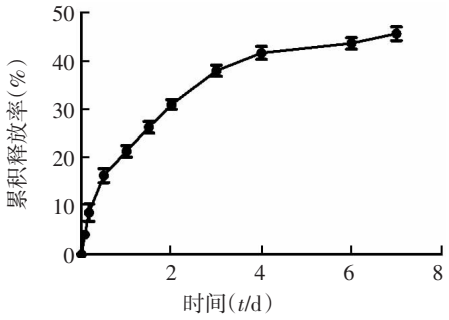


图3 TGF-β3壳聚糖微球的体外缓释曲线

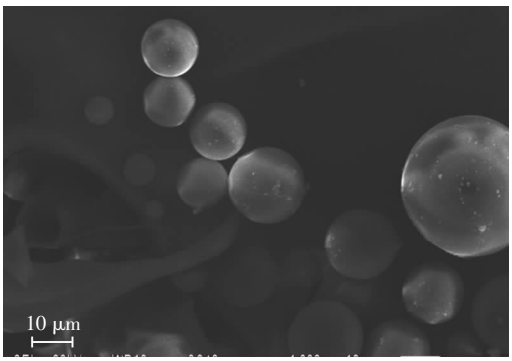


图4 扫描电镜观察负载微球的壳聚糖三维支架形态特征

3 讨论

尽管手术技术在提高,术后康复手段在改进,但屈指肌腱损伤后粘连仍是手外科领域的难题。壳聚糖不仅可以作为载药体系,也可以制作成三维支架作为细胞生长的载体参与组织修复[6]。本实验电镜扫描观察见支架三维结构理想,孔隙直径(180.4±35.3)μm,孔隙率为(83.2±0.6)%,微球粒径为(28.5±5.1)μm,在1个支架孔隙中可以容纳多个微球,给微球提供了很好的附着载体。壳聚糖支架24 h水的结合能力为(123±5)%,物理特性稳定,没有出现溶解、变形、变性。本实验中支架分两步制作完成,分致密层和多孔层。致密层在外层,作为一层物理屏障,可在一定程度上抵御外界物理化学因素对内层细胞及各种细胞因子的影响。随着浇灌壳聚糖溶液量的不同,支架的厚度会随着变化,但是太厚则透光性较差,不利于倒置显微镜观察支架附着细胞的生长情况,太薄则有效负载的微球量较少。本实验得出300 μm的厚度利于显微镜透光观察及负载微球。

目前国内外在减少肌腱损伤愈合后粘连的研究集中在生长因子及组织工程材料上。前者以TGF家族为代表,后者有聚四氟乙烯膜、透明质酸及透明质酸

膜、聚乙烯醇水凝胶等。研究[7]发现,在皮肤损伤愈合过程中,加入TGF-β1、2的中和抗体或增加TGF-β3的量能有效减少瘢痕的形成。作为TGF-β1、2的天然抗体,甘露糖-6-磷酸和核心蛋白聚糖能有效减少屈指肌腱损伤后粘连[8-9]。一项临床实验研究[10]发现TGF-β3在治疗减少皮肤瘢痕形成中是有效和方便的。同时,在现有研究结果中,低剂量外源性的TGF-β3不会导致肿瘤的发生[11],目前商品化的TGF-β3制剂已经上市[12],这些因素可以利用TGF-β3作为防止肌腱粘连的细胞因子。为了保护TGF-β3不被水解及体内自身中和抗体中和,同时保证其活性能在一定时间内缓慢释放,需要为其寻找一个合适的载体[13]。有研究[14-16]成功研制出了负载TGF-β1的壳聚糖缓释微球,并ELISA检测证明体外缓释效果理想。本实验中微球的物理、化学特性稳定,吸水膨胀率在合理范围之内,不至在体内微环境中发生大的性状改变。TGF-β3累计7 d的缓释达到(46.2±0.3)%,前3 d有明显的释放,并于约3 d后达到一个平台。此结果和文献报道[14-16]前24 h的突释现象有区别,分析原因本实验是直接把液状TGF-β3加入壳聚糖溶液中制成微球,并保证在室温下短时间内完成制作并低温保存,微球中的TGF-β3实际负载量较大,同时用戊二醛为交联剂可能使微球表面结构更致密延缓了释放。

壳聚糖是药物、细胞贴附生长、细胞因子等的理想载体[17]。本实验利用壳聚糖微球作为TGF-β3的缓释载体,同时利用壳聚糖三维支架作为微球的载体,给肌腱损伤防粘连的研究提供了一种新方法。

参考文献:

[1] Khanna A, Friel M, Gougoulias N, *et al*. Prevention of adhesions in surgery of the flexor tendons of the hand: what is the evidence? [J]. Br Med Bull, 2009, 90: 85-109.

[2] Klass B R, Rolfe K J, Grobbelaar A O. *In vitro* flexor tendon cell response to TGF-beta1: a gene expression study[J]. J Hand Surg Am, 2009, 34(3): 495-503.

[3] Kato Y, Onishi H, Machida Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2003, 4(5): 303-309.

[4] Cai D Z, Zeng C, Quan D P, *et al*. Biodegradable chitosan scaffolds containing microspheres as carriers for controlled transforming growth factor-beta1 delivery for cartilage tissue engineering[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(3): 197-203.

[5] Wan Y, Wu H, Xiao B, *et al*. Chitosan-g-polycaprolactone copolymer fibrous mesh scaffolds and their related properties[J]. Polym Adv Technol, 2009, 20(10): 795-801.

[6] Kim S E, Park J H, Cho Y W, *et al*. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: implications for cartilage tissue engineering[J]. J Control Release, 2003, 91(3): 365-374.

[7] Jorgensen H G, McLellan S D, Crossan J F, *et al*. Neutralisation of TGF beta or binding of VLA-4 to fibronectin prevents rat tendon adhesion following transection[J]. Cytokine, 2005, 30(4): 195-202.

[8] 熊雁, 张正治, 傅晓岚. 核心蛋白聚糖对兔肌腱细胞增殖及细胞周期的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(17): 1761-1764.

[9] Bates S J, Morrow E, Zhang A Y, *et al*. Mannose-6-phosphate, an inhibitor of transforming growth factor-beta, improves range of motion after flexor tendon repair[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(11): 2465-2472.

[10] Ferguson M W, Duncan J, Bond J, *et al*. Prophylactic administration of avotermin for improvement of skin scarring: three double-blind, placebo-controlled, phase Ⅰ/Ⅱ studies[J]. Lancet, 2009, 373(9671): 1264-1274.

[11] Laverty H G, Wakefield L M, Occleston N L, *et al*. TGF-beta3 and cancer: a review[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(4): 305-317.

[12] Wu J L, Liao C Y, Zhang J, *et al*. Incorporation of protein-loaded microspheres into chitosan-polycaprolactone scaffolds for controlled release[J]. Carbohydr Polym, 2011, 86(2): 1048-1054.

[13] Wadhwa M, Dilger P, Hamill M, *et al*. The 1st International standard for transforming growth factor-β3 (TGF-β3)[J]. J Immunol Methods, 2012, 380(1/2): 1-9.

[14] 李芳, 赵守亮, 亢彦强. 转化生长因子β1壳聚糖不对称膜的制备及其对小鼠成牙本质细胞增殖的影响[J]. 北京口腔医学, 2006, 14(2): 95-98.

[15] 杨亚东, 张文元, 房国坚. 包裹转化生长因子β1壳聚糖缓释微球的研制[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(38): 7481-7484.

[16] 陈思, 董念国, 史嘉玮, 等. 转化生长因子β1缓释壳聚糖微球制备及体外的细胞相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(32): 6243-6246.

[17] Bian L, Zhai D Y, Tous E, *et al*. Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF-beta3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels *in vitro* and *in vivo*[J]. Biomaterials, 2011, 32(27): 6425-6434.

(**收稿**:2012-11-01;**修回**:2012-12-06)

(编辑 龙 亮)