DOI:10.16016/j.1000-5404.201601019

PLGA 纳米药物递送系统的建立及其对 bFGF 生物学活性的维持

李素铠[1],欧阳斌[1],徐晓秋[2],李 培[1],甘翼博[1],王利元[1],涂 兵[1],周 强[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院骨科,全军矫形外科中心[1],药学院药剂学教研室[2])

[**摘要**] **目的** 探索聚(乳酸乙醇酸)[poly(DL-lactide-co-glycolide),PLGA]纳米粒的制备条件,并进一步验证该纳米粒对碱性成纤维细胞因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的负载效率和活性维持。**方法** 采用复乳法制备牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的 PLGA 纳米粒,研究 PLGA 浓度、PLGA/BSA 质量比、水油体积比及内水相溶剂对纳米粒粒径、蛋白包封效率的影响,然后选择优化条件制备负载 bFGF 的 PLGA 纳米粒,通过细胞增殖实验验证 bFGF 的活性。**结果** 采用优化条件制备的纳米粒对蛋白的包封率达到 70.0%,粒径(373 ± 12) nm,Zeta 电位(27.1 ± 0.6) mV。蛋白得以缓慢释放,突释现象不明显。负载 bFGF 的 PLGA 纳米粒有较好的活性,对细胞的促增殖作用优于 bFGF 溶液组。**结论** 采用复乳法制备的 PLGA 纳米粒可用于负载生长因子实现缓释,并能较好地维持其生物学活性。

[**关键词**] 聚(乳酸乙醇酸);牛血清白蛋白;纳米粒;碱性成纤维细胞生长因子;缓释
[**中图法分类号**] R912; R945; R977.6 [**文献标志码**] A

Establishment of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle drug delivery system and its maintenance for bioactivity of basic fibroblast growth factor

Li Sukai[1], Ouyang Bin[1], Xu Xiaoqiu[2], Li Pei[1], Gan Yibo[1], Wang Liyuan[1], Tu Bing[1], Zhou Qiang[1] ([1]Department of Orthopaedics, Center of Orthopaedic Surgery, Southwest Hospital, [2]Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the preparation conditions of poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles, and validate the entrapment efficiency and activity of basic fibroblast growth factor (bFGF) loaded by PLGA nanoparticles. **Methods** Bovine serum albumin (BSA)-loaded PLGA nanoparticles were prepared with a double emulsion method. First, the effects of the concentration of PLGA, mass ratio of PLGA and BSA, volume ratio of water phase and oil phase, and type of internal water phase on the particle size and entrapment efficiency were studied. Then the optimal conditions were selected to prepare bFGF-loaded PLGA nanoparticles, and the activity of bFGF was validated by proliferation of mesenchymal stem cells (MSCs). **Results** Under the optimal conditions, the entrapment efficiency of BSA-loaded PLGA nanoparticles was 70.0%, the particle size was 373 ± 12 nm, and the Zeta potential was 27.1 ± 0.6 mV. The protein was sustained-released, and the phenomenon of burst release was not obvious. Biological activity of bFGF loaded by PLGA nanoparticles was maintained, and the bFGF-loaded PLGA nanoparticles could better promote the proliferation of MSCs than bFGF solution. **Conclusion** PLGA nanoparticles prepared with the double emulsion method can be used to load growth factors to control their release and maintain their biological activity.

[**Key words**] poly(DL-lactide-co-glycolide); bovine serum albumin; nanoparticle; basic fibroblast growth factor; sustained release

Supported by the Key Project of Logistic Scientific Research of PLA (BWS13C014) and the Pre-research Foundation of Military Medicine (SWH2013JS04).
Corresponding author: Zhou Qiang, Tel: 86-23-65340297, E-mail: zq_tlh@163.com

[**基金项目**] 军队后勤科研计划重点项目(BWS13C014);军事医学预研基金(SWH2013JS04)
[**通信作者**] 周 强,电话:(023) 65340297,E-mail: zq_tlh@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160322.1500.014.html(2016-03-22)

因各种创伤、肿瘤等所致的骨缺损在骨科临床十分常见,常常需要进行植骨,自体骨和异体骨因其自身缺陷在临床上的使用受到限制,因而,研制出能批量生产的理想人工骨修复材料一直是该领域的热点,大量的人工骨也不断涌现。但目前市场上的人工骨因不具有成骨活性而仅作充填植骨,起到骨传导作用而无骨诱导作用,找到一种能赋予人工骨良好成骨活性的方法已成为目前人工骨研究的一大趋势。

众所周知,骨修复过程是一个多种生长因子协调作用的复杂过程,补充外源性生长因子已经被证实可以促进骨缺损的修复。其中,bFGF 具有强大的促细胞增殖、迁移的作用,在骨缺损修复的过程中发挥着重要作用[1-2]。如果将 bFGF 装载在人工骨支架上,就可能会提高其成骨能力。但是,bFGF 在体内半衰期极短,仅为数分钟或数十分钟,且极易被体液稀释、扩散,难以在局部发挥持久有效的作用。为了让 bFGF 在体内达到缓慢、持久的释放,各种类型的缓释系统不断涌现。包括物理吸附[3]、化学交联[4-5]、微球包裹[6-7]等。随着可降解材料和制备技术的发展,采用微球包裹的缓释系统越来越多。其中,聚(乳酸乙醇酸)因其具有生物相容性较好,降解可控,无毒等优点而得到美国 FDA 的批准用于临床[8]。采用 PLGA 为主体材料对各类生长因子、药物进行包裹可以实现对生长因子活性的维持和缓慢释放。本研究采用 BSA 为模型蛋白,对复乳法制备 PLGA 纳米粒缓释系统的条件进行优化,根据优化条件制备 bFGF /PLGA 纳米粒并验证 bFGF 的生物学活性,从而证实该缓释系统的有效性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PLGA(Sigma Inc.,50∶50,相对分子质量 24 000 ~ 38 000),BSA(Sigma Inc.),聚乙烯醇(ACROS ORGANICS,相对分子质量 20 000 ~ 30 000),扫描电镜(Hitachi S3400-N Ⅱ),粒径分析仪(Zetasizer V7.02),BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),bFGF(RND systems),bFGF ELISA 检测试剂盒(Sigma Inc.)。

1.2 PLGA 纳米粒的制备

将一定量的 BSA 溶解于 0.1 mol/L 磷酸缓冲盐溶液(PBS)或去离子水中,一定量的 PLGA 溶解于二氯甲烷中,将 BSA 溶液逐滴加入 PLGA 溶液中,冰浴下超声后形成初乳,再将初乳逐滴加入到 1% 聚乙烯醇(PVA)溶液中,冰浴下超声制成复乳,立即将复乳加入到 0.3% PVA 溶液中,温和磁力搅拌 4 h 后,16 000 r/min 离心 10 min,将获得的沉淀用去离子水洗涤 3 次,冻干,获得 PLGA 纳米粒。制备包裹 bFGF 的纳米粒时将 BSA 溶液换成 bFGF 溶液即可。

1.3 PLGA 纳米粒的制备及条件优化

1.3.1 PLGA 浓度的影响 将等量的 BSA 溶液加入到浓度分别为 50、100、200、300 mg/mL 的 PLGA 有机溶液中,其他条件不变,制备纳米粒。

1.3.2 BSA/PLGA 质量比的影响 按 BSA/PLGA 质量比分别为 1∶5、1∶10、1∶20、1∶40、1∶60 进行纳米粒的制备,保持 PLGA 溶液和 BSA 溶液体积及其他制备条件不变。

1.3.3 内水相与油相体积比的影响 按内水相/油相体积比分别为 1∶5、1∶10、1∶20 进行纳米粒的制备,其他条件不变。

1.3.4 内水相不同类型溶剂的影响 将 BSA 分别溶解在去离子水和 PBS 中,其他条件不变,制备纳米粒。

1.4 PLGA 纳米粒的表征

将一定量的 PLGA 纳米粒均匀分散在去离子水中,制成悬液,用粒径分析仪测试其粒径和 Zeta 电位,并取适量纳米粒置于贴有双面胶的云母片上,喷金后在扫描电镜下观察其外观形态。

1.5 PLGA 纳米粒中蛋白的包封率和载药率的测定

蛋白包封率及载药率的测定参照 Diwan 等[9]报道的方法。称取一定量的 PLGA 纳米粒冻干粉,加入到乙腈中,超声分散后离心,弃去上清,将沉淀加入到 PBS 中充分分散,过夜,再次离心,留上清。将沉淀加入到 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中,超声分散,48 h 后离心,留上清,用盐酸将其 pH 值调至 7.0,2 次上清蛋白含量相加,即可计算出被包封蛋白(BSA 或 bFGF)的总量、包封率及载药率。其中,BSA 含量的测定采用 BCA 法,具体方法简述如下:首先按比例配制适量 BCA 工作液,充分混匀,然后配制预定浓度的标准品溶液,加入一定体积的标准品溶液及样品溶液于 96 孔板中,设复孔,最后加入 BCA 工作液于相应孔中,置于孵箱中孵育 30 min 后测各孔在 562 nm 处的光密度值[$D(562)$],做出标准曲线,计算各样品浓度。bFGF 含量采用 ELISA 试剂盒测定,具体方法简述如下:首先配制标准品溶液,按照实验计划在酶标板预定孔中加入一定体积的标准品溶液及样品溶液,混匀后室温下孵育 2 h,取出酶标板,倒出溶液,PBS 清洗 4 次后加入生物素化抗 bFGF 试剂,混匀后室温下孵育 1 h,再次如前述清洗,加入辣根过氧化物酶工作液,室温下孵育

30 min,清洗,加入比色剂,并设空白比色剂孔对照,室温下避光孵育 30 min 后加入终止液,立即测定各孔在 450 nm 处的光密度值[$D(450)$],做出标准曲线,计算各样品浓度。蛋白的包封率及载药率计算公式如下。

$$包封率=\frac{包封蛋白总量}{蛋白的总投入量}\times 100\%$$

$$载药率=\frac{纳米粒中蛋白的总量}{纳米粒的质量}\times 100\%$$

1.6 PLGA 纳米粒的体外释放测定

称取一定量的负载 BSA 的 PLGA 纳米粒冻干粉置于离心管中,用 1 mL PBS 制成悬液,37 ℃恒温摇床中 100 r/min 振荡,在预定的时间点离心后,取上清 0.5 mL,再加入 0.5 mL 新鲜 PBS 溶液混匀后,继续置于恒温摇床振荡,所取样品的蛋白含量用 BCA 法进行测定,具体操作方法详见 1.5。同样将一定量的负载 bFGF 的 PLGA 纳米粒冻干粉置于离心管中,用 3 mL PBS 制成悬液,37 ℃恒温摇床中 100 r/min 振荡,在预定的时间点离心后,取上清,加入 3 mL 新鲜的 PBS 溶液重悬,继续置于恒温摇床震荡,所取样品的蛋白含量用 ELISA 试剂盒进行测定,具体操作方法详见 1.5。

1.7 细胞培养

BALB/c 小鼠骨髓间充质干细胞购自赛业生物科技有限公司。在无菌条件下复苏后将细胞接种在 25 cm^2 的培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育,融合度达到 80% 以上时用 0.25% 胰酶消化,计数并传代,供以后实验用。

1.8 细胞增殖实验

实验分 3 组,未处理组、bFGF 溶液组和负载 bFGF 的纳米粒缓释液组。细胞悬液按 2.0×10^3/孔接种于 96 孔板中,用含 10% 胎牛血清的培养基培养。次日,更换新鲜培养基,按照实验方案在相应孔中加入 bFGF 溶液及纳米粒缓释液。然后在 37℃,5% CO_2 培养箱中孵育,在第 1、3、7 天分别取样,采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较行单因素方差分析,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同制备条件对纳米粒理化性能的影响

2.1.1 PLGA 浓度对纳米粒性能的影响 将等量的 BSA 加入到浓度分别为 50、100、200、300 mg/mL 的 PLGA 有机溶液中,制备的纳米粒粒径、Zeta 电位、载药率、包封率见表 1。随着 PLGA 浓度的增加,粒径逐渐增大,Zeta 电位绝对值逐渐减小,蛋白包封率逐渐提高,但载药率相应地下降。

表 1 不同 PLGA 浓度对纳米粒性质的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)

PLGA 浓度 (mg/mL)	粒径 (nm)	Zeta 电位 (mV)	包封率 (%)	载药率 (%)
50	218 ± 4	−33.4 ± 0.5	37.6 ± 0.9	3.8 ± 0.1
100	256 ± 3	−30.3 ± 0.5	44.0 ± 1.2	2.2 ± 0.1
200	371 ± 3	−28.4 ± 0.5	62.5 ± 1.9	1.6 ± 0.0
300	514 ± 22	−8.0 ± 0.2	64.3 ± 2.8	1.1 ± 0.0

2.1.2 BSA/PLGA 质量比对纳米粒性能的影响

按 BSA/PLGA 质量比分别为 1∶5、1∶10、1∶20、1∶40、1∶60 制备的纳米粒粒径、Zeta 电位、载药率、包封率见表 2。随着 BSA/PLGA 质量比的逐渐减小,粒径与 Zeta 电位无明显变化;包封率呈现升高的趋势,载药率则逐渐下降。

表 2 不同 BSA/PLGA 质量比对纳米粒性能的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)

BSA 与 PLGA 质量比	粒径 (nm)	Zeta 电位 (mV)	包封率 (%)	载药率 (%)
1∶5	234 ± 2	−21.3 ± 0.4	38.9 ± 0.9	7.8 ± 0.2
1∶10	238 ± 5	−23.0 ± 0.2	41.3 ± 1.1	4.1 ± 0.1
1∶20	256 ± 3	−30.3 ± 0.5	44.0 ± 1.2	2.2 ± 0.1
1∶40	233 ± 6	−23.7 ± 1.3	53.5 ± 1.3	1.3 ± 0.0
1∶60	244 ± 1	−25.1 ± 0.2	54.9 ± 2.4	0.7 ± 0.0

2.1.3 不同内水相与油相体积比对纳米粒性能的影响 按内水相/油相体积比分别为 1∶5、1∶10、1∶20 所制备的纳米粒粒径、Zeta 电位、载药率、包封率见表 3。可以看出,随着内水相与油相比例的减小,粒径逐渐减小,Zeta 电位绝对值逐渐增大。当体积比为 1∶10 时,包封率及载药率最高。

表 3 不同内水相和油相体积比对纳米粒性能的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)

内水相与油相体积比	粒径 (nm)	Zeta 电位 (mV)	包封率 (%)	载药率 (%)
1∶5	264 ± 2	−31.4 ± 0.5	35.8 ± 0.7	1.8 ± 0.0
1∶10	256 ± 3	−30.3 ± 0.5	44.0 ± 1.2	2.2 ± 0.1
1∶20	208 ± 1	−35.9 ± 0.6	14.9 ± 2.5	0.7 ± 0.0

2.1.3 内水相不同溶剂类型的影响 将 BSA 分别溶解在去离子水和 PBS 中所制备的纳米粒粒径、Zeta 电位、载药率、包封率见表 4。当内水相为去离子水

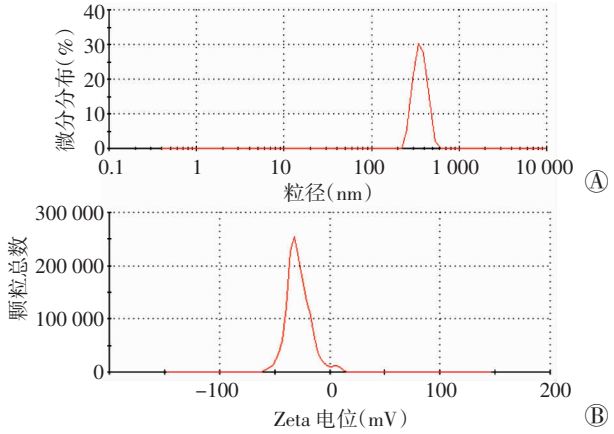
时,获得的纳米粒粒径相对较小,Zeta 电位绝对值减小,包封率和载药率均提高。

表 4　不同内水相溶剂对纳米粒性能的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)

内水相溶剂类型	粒径(nm)	Zeta 电位(mV)	包封率(%)	载药率(%)
去离子水	235±2	−27.4±0.2	52.8±1.3	2.6±0.1
PBS	256±3	−30.3±0.5	44.0±1.2	2.2±0.1

2.2　PLGA 纳米粒的表征

根据上述不同制备条件对纳米粒理化性能的影响,为了获得大小分布较均一、较高包封率的纳米粒,最终选择 BSA/PLGA 质量比为 1∶40、PLGA 浓度 200 mg/mL、水油比 1∶10、内水相使用去离子水来制备 PLGA 纳米粒。所得的纳米粒粒径及 Zeta 电位见图 1。粒径基本呈正态分布,为(373±12) nm,Zeta 电位(27.1±0.6) mV。其中,BSA 的包封率为 70.0%,载药率 1.8%。图 2 为纳米粒的扫描电镜图,可见纳米粒呈规则球形,表面光滑致密。



A:PLGA 纳米粒的粒径分布;B:PLGA 纳米粒的 Zeta 电位分布

图 1　PLGA 纳米粒粒径及 Zeta 电位分析图

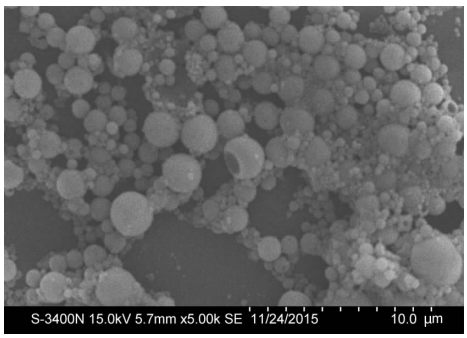


图 2　PLGA 纳米粒扫描电镜图　(×5 000)

2.3　PLGA 纳米粒负载蛋白的体外缓释结果

采用优化条件分别制备 BSA/PLGA 纳米粒及 bFGF/PLGA 纳米粒,将一定量的纳米粒用 PBS 重悬,在预定时间点离心取上清,测得各时间点的上清所含包封蛋白的浓度,由此得出蛋白的累积释放率。如图 3 所示,第 1 天 BSA 累积释放率为(3.9±0.9)%,bFGF 的累积释放率为(5.1±0.4)%,前 13 d BSA、bFGF 的累积释放率分别为(12.3±3.8)%、(15.7±2.5)%,前 31 d BSA、bFGF 的累积释放率分别为(38.5±5.0)%、(35.3±1.1)%。

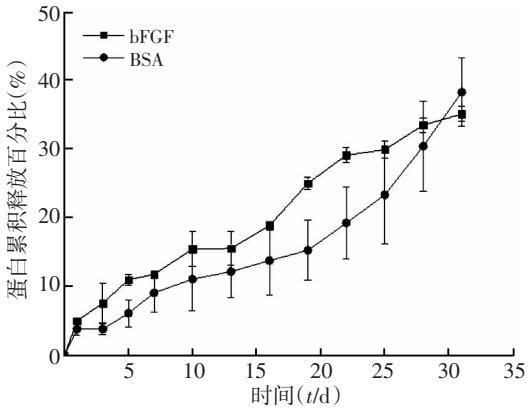
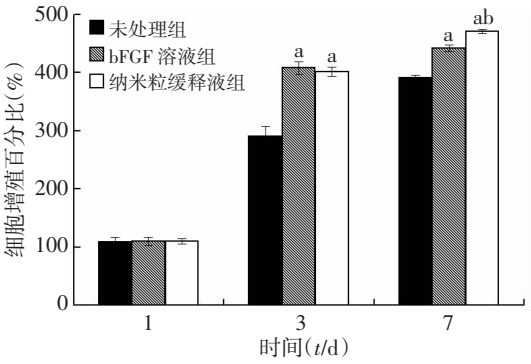


图 3　PLGA 纳米粒负载蛋白的累积释放曲线

2.4　细胞增殖实验结果

将 bFGF/PLGA 纳米粒的缓释液加到 BALB/c 小鼠骨髓间充质干细胞中,采用 CCK-8 测定细胞增殖情况,结果见图 4。在细胞培养的第 3、7 天,bFGF 溶液组、纳米粒缓释液组细胞增殖速度明显较未处理组快($P<0.05$)。在第 3 天,bFGF 溶液组与纳米粒缓释液组间增殖速度差异无统计学意义($P>0.05$)。但在第 7 天,纳米粒缓释液组与 bFGF 溶液组间差异有统计学意义($P<0.05$),纳米粒缓释液组对细胞的促增殖作用强于 bFGF 溶液组。



a:$P<0.05$,与未处理组比较;b:$P<0.05$,与 bFGF 溶液组比较

图 4　bFGF/PLGA 纳米粒对小鼠间充质干细胞的促增殖作用

3 讨论

理想的人工骨修复材料应具有良好的骨传导能力和骨诱导能力。近年来,各种人工骨修复材料不断涌现,包括羟基磷灰石[10]、磷酸钙[11]等,但这些骨修复材料均无骨诱导活性。为了赋予人工骨强大的成骨诱导活性,负载成骨相关生长因子成为该领域的一个主要趋势。生长因子对干细胞的增殖、成骨分化、血管形成等起到至关重要的作用,但直接使用生长因子的水溶液在体内难以充分发挥作用,用量大,使用效率低下。使用纳米粒将生长因子包封递送,可以实现缓慢释放,更重要的是,纳米粒可以保护生长因子的活性,降低了用量,节约了成本。大量的材料都可以制备成微球或纳米粒来负载生长因子,如壳聚糖[12]、胶原[13]等。但这些材料降解太快,突释明显,难以匹配骨缺损的愈合时程。而人工合成的高分子材料中,PLGA 的安全性已经得到证实并在临床上广泛使用,其制备的药物递送系统安全、稳定、可调控、可重复性好。因此,本研究选择 PLGA 作为制备纳米粒的主要材料。

采用复乳法制备纳米粒是目前常用的方法之一。本研究初步探索了制备过程中影响蛋白载药率、包封率的几个因素。可见 PLGA 浓度对粒径和包封率的影响比较明显,在一定范围内,随着浓度的增加,可获得较高的包封率,但达到 200 mg/mL 后,再增加材料的投入,包封率的提升并不明显,说明材料对蛋白的包裹已达到一个极限值。同样地,当 PLGA/BSA 为 1∶40 时,获得的包封率和载药率最理想。水油比是另外一个重要影响因素,在复乳法制备纳米粒的过程中,初乳对包封率的影响极大,而对粒径影响较小,这是因为生长因子均为亲水性药物,在制备过程中极易渗透到水相中而难以被包裹。本研究最终确定 1∶10 为最佳水油比,可以获得较高的包封率。内水相的类型亦对蛋白包封率有影响,主要是因为内外水相渗透压差的缘故。Zhang 等[14]对内外水相渗透压差对 BSA 包封率的影响进行了研究,在外水相加入 5% 氯化钠可将包封率从 25.2% 提高到 76.6%,而加入 15% 的葡萄糖则可将包封率从 25.2% 提高到 89.3%,且缓解了蛋白的突释现象。本研究外水相为 PBS 溶液,内水相为去离子水时,由于加大了内外水相的渗透压差,蛋白的包封率亦有所提高。综上所述,我们选择了 PLGA 浓度 200 mg/mL,蛋白和材料的质量比 1∶40,水油体积比 1∶10,内水相为去离子水为条件制备纳米粒。制备的纳米粒外表光滑、完整,呈规则球形,粒径(373 ± 12) nm,包封率达到 70.0%。

成功的药物递送系统应具有理想的药物释放速度。从 BSA 的累积释放曲线可以看出,蛋白的释放大致分为 3 个阶段:突释期、稳定释放期、加速释放期。蛋白在第 1 天累积释放了(3.9 ± 0.9)%;从第 2 ~ 13 天累积释放了约 8.4%,为稳定释放期;从第 13 天后逐渐进入加速释放期,从第 14 ~ 31 天累积释放了约 26.2%。初期的突释主要是负载在纳米粒表面的蛋白在第 1 天逐渐释放,之后释放速度减慢,而在后期的加速释放期则主要是因为材料开始降解,将包封的蛋白逐渐大量释放的缘故。这和 Wang 等[15]的研究结果基本相同。但本研究中的突释并不明显,第 1 天的累积释放率仅为(3.9 ± 0.9)%,到第 1 周也仅累积释放(9.2 ± 2.8)%。同样的结果亦可在 bFGF/PLGA 纳米粒的释放中看到,bFGF 在第 1 天的累积释放百分率为(5.1 ± 0.4)%,突释现象也不明显。

在制备纳米粒的过程中,需使用到少量的有机溶剂,部分有机溶剂对蛋白特别是生长因子的活性是有较大影响的。从细胞增殖实验可以看出,bFGF/PLGA 纳米粒的缓释液对干细胞的促增殖作用比较明显,说明 bFGF 的生物学活性得到保持。而缓释液的促增殖作用在第 7 天较 bFGF 溶液组明显,原因是纳米粒缓释液组 bFGF 在培养基中持续存在,对细胞的促增殖作用也就更为明显,同时也说明该递送系统的高效性。

本研究所建立的纳米药物递送系统制备过程简单,易于消毒、保存,实现了对 bFGF 的有效负载和缓慢释放,突释现象不明显,且很好地保护了 bFGF 的生物活性。但需要强调的是,本研究未涉及 PLGA 的嵌段比例、相对分子质量对蛋白的包封率及缓释动力学的影响。通过使用不同的 PLGA 来制备负载生长因子的纳米粒,可以实现对不同生长因子缓释动力学的调控,从而使其释放的速度和时间与机体所需相匹配,可以以此构建多因子的缓释系统,发挥相互之间的协同作用。这将进一步体现 PLGA 缓释系统的优势,未来可能在人工骨修复材料中得到广泛应用。

参考文献:

[1] Kottakis F, Polytarchou C, Foltopoulou P, *et al*. FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway[J]. Mol Cell, 2011, 43(2): 285 - 298. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.06.020

[2] Inui K, Maeda M, Sano A, *et al*. Local application of basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of seg-

mental bony defects in rabbits[J]. Calcif Tissue Int, 1998, 63(6): 490 - 495.

[3] Komaki H, Tanaka T, Chazono M, *et al*. Repair of segmental bone defects in rabbit tibiae using a complex of beta-tricalcium phosphate, type I collagen, and fibroblast growth factor-2 [J]. Biomaterials, 2006, 27(29): 5118 - 5126.

[4] Wu J M, Xu Y Y, Li Z H, *et al*. Heparin-functionalized collagen matrices with controlled release of basic fibroblast growth factor[J]. J Mater Sci Mater Med, 2011, 22(1): 107 - 114. DOI: 10.1007/s10856-010-4176-4

[5] Ho Y C, Mi F L, Sung H W, *et al*. Heparin-functionalized chitosan-alginate scaffolds for controlled release of growth factor[J]. Int J Pharm, 2009, 376 (1/2): 69 - 75. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.04.048

[6] Shen B, Pei F X, Duan H, *et al*. Preparation and *in vitro* activity of controlled release microspheres incorporating bFGF [J]. Chin J Traumatol, 2008, 11(1): 22 - 27.

[7] Chung H J, Kim H K, Yoon J J, *et al*. Heparin immobilized porous PLGA microspheres for angiogenic growth factor delivery[J]. Pharm Res, 2006, 23(8): 1835 - 1841.

[8] Singh L, Kumar V, Ratner B D. Generation of porous microcellular 85/15 poly(DL-lactide-co-glucolide) foams for biomedical applications[J]. Biomaterials, 2004, 25(13): 2611 - 2617.

[9] Diwan M, Park T G. Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres[J]. J Control Release, 2001, 73(2/3): 233 - 244.

[10] He F, Zhang J, Yang F, *et al*. In vitro degradation and cell response of calcium carbonate composite ceramic in comparison with other synthetic bone substitute materials[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2015, 50: 257 - 265. DOI: 10.1016/j.msec.2015.02.019

[11] Kane R J, Weiss-Bilka H E, Meagher M J, *et al*. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties[J]. Acta Biomater, 2015, 17: 16 - 25. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.01.031

[12] Rajam M, Pulavendran S, Rose C, *et al*. Chitosan nanoparticles as a dual growth factor delivery system for tissue engineering applications[J]. Int J Pharm, 2011, 410(1/2): 145 - 152. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.065

[13] Chang S J, Kuo S M, Manousakas I, *et al*. Preparation and characterization of hyaluronan/collagen Ⅱ microspheres under an electrostatic field system with disc electrodes[J]. Acta Biomater, 2009, 5(1): 101 - 114. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.08.002

[14] Zhang J X, Zhuan K J. An improvement of double emulsion technique for preparing bovine serum albumin-loaded PLGA microspheres[J]. J Microencapsul, 2004, 21(7): 775 - 785.

[15] Wang J, Wang B M, Schwendeman S P. Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres[J]. J Control Release, 2002, 82(2/3): 289 - 307.

(**收稿**: 2016-01-05;**修回**: 2016-03-12)

(编辑 黄 超)