

doi:10.3969/j.issn.1673-0364.2009.06.004

酸性可调的聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球的制备

谢淑君 岑莲 朱勃 崔磊 刘伟 曹谊林

【摘要】 目的 制备具有酸性自中和能力的聚乳酸-羟基乙酸共聚物[Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]微球,用于可注射组织工程支架材料或药物释放。方法 用二次乳化的方法,将具有缓冲能力的三聚磷酸盐(TPP)包埋于PLGA微球内,制备出PLGA/TPP的复合微球。结果 PLGA与TPP以64:1的摩尔比混合时,所制备的PLGA/TPP微球在降解过程中能很好地维持pH值中性,在降解28d后周围pH值仍为6.93,远高于同样条件下单纯PLGA降解时周围的pH值6.66 ($P<0.05$)。TPP盐颗粒的量对PLGA微球的降解影响很大,当TPP的量增加到12:1时,降解时的酸性要比单纯PLGA微球更为严重,在降解28d后的pH值低于纯的PLGA微球,仅为6.35 ($P<0.05$)。结论 具有缓冲能力的TPP的适量加入,能够有效地调节PLGA微球在降解过程中所产生的酸,从而缓解周围环境pH值下降的问题,但当TPP的量超过一定值时,反而加快PLGA微球的降解。

【关键词】 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 聚磷酸盐 包埋 降解

【中图分类号】 R318.08 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-0364(2009)06-0314-04

Construction of PLGA Release Microspheres with Adjustable Acidic Degradation Properties XIE Shujun^{1,2}, CEN Lian², ZHU Qing¹, CUI Lei², LIU Wei², CAO Yilin². 1 Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2 Shanghai Tissue Engineering Research and Development Center, Shanghai 200235, China.

【Abstract】 Objective To construct poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) micro-spheres with adjustable acidic degradation properties for application as an injectable scaffold in tissue engineering and carriers of drug release. **Methods** Sodium tripolyphosphate (TPP) was encapsulated by using W/O/W double-emulsion solvent evaporation method into PLGA micro-spheres. **Results** When the mixing molar ratio of PLGA to TPP was 64:1, the pH value of the solution containing PLGA/TPP micro-spheres could be well maintained at a neutral condition during the degradation of PLGA. The pH value of the resulting solution after being degraded for 28 days was 6.93, significantly higher than that of the respective one containing the pristine PLGA micro-spheres under the same condition ($P<0.05$). The amount of TPP could render a dramatic effect on the degradation behaviors of PLGA. When the molar ratio of PLGA to TPP was increased into 12:1, the pH value of the solution containing those PLGA/TPP micro-spheres would decrease to 6.35 after being degraded for 28 days, significantly lower than that of the pristine PLGA micro-spheres at the same time point (pH=6.66) ($P<0.05$). **Conclusion** The addition of such kind of salt with strong buffering capacity can efficiently neutralize the acid produced from the degradation of PLGA micro-spheres so as to prohibit the decrease in the pH value of the surrounding environment. However, if too much salt were used, the degradation of PLGA micro-spheres would also be accelerated.

【Key words】 PLGA; Polyphosphate salt; Encapsulation; Degradation

目前用作组织工程支架的材料主要有人工合成和天然材料两大类。其中人工合成的可降解高分子聚酯类生物材料(主要有聚羟基乙酸或聚乙醇酸,聚乳酸,和聚乳酸-羟基乙酸共聚物等)在组织工程领

域中应用非常广泛,是目前公认的最具应用潜力的高分子支架材料,同时这些材料也非常适合于作为药物缓释载体^[1]。

聚羟基乙酸或聚乙醇酸(Polyglycolic acid, PGA)生物相容性非常好,但是降解速度较快^[2]。聚乳酸(Polylactic acid, PLA)的力学性能良好,相对PGA而言,由于疏水基团的作用,PLA的降解速度相对缓

作者单位:310014 浙江省杭州市 浙江工业大学(谢淑君、朱勃);200235 上海市 上海组织工程研究与开发中心(谢淑君、岑莲、崔磊、刘伟、曹谊林)。

通讯作者:岑莲,朱勃。

慢,生物相容性则逊于PGA。

作为PLA、PGA的共聚物,PLGA既保留了PGA生物相容性好的优点,又改进了材料的降解速度和力学性能,并且能通过两个组分的配比调整来进一步针对具体应用而量身定做。目前,PGA、PLA和PLGA都已获得美国FDA的批准而用于临床。大量的文献亦可证明此类材料在组织工程骨^[3]、软骨^[4]、血管^[5]、神经及皮肤等组织的构建中具有不可替代的作用。

虽然PGA、PLGA类生物材料在组织工程中的应用相当广泛,但是其降解原理主要为水解,即酯键断裂,形成末端为羧基的低聚体,并进一步降解为酸性单体。对于所形成的羧基末端的低聚物,还具有催化其他酯键水解,促进并加快降解的能力,即自催化作用^[6-8]。已有研究证明此类材料在降解过程中可使周围pH值降至3左右,甚至更低。

支架材料降解过程中产生的酸堆积,不仅会影响黏附在其上的细胞的生长,分化和胞外基质的合成,而且会造成组织的局部炎症反应,严重影响组织修复效果。对于体积较小的缺损,其需要的支架材料也较小,那么形成的酸性产物可以及时排出,不容易发生堆积,材料内部及表面的降解速度能相对一致。但是对于体积相对较大的支架材料来说,刚开始发生降解时,材料内部和表面降解的速度较为一致,但随着降解的进行,其内部积累的酸性低聚物,想要释放就变得相对困难^[9],从而催化材料内部进一步加快降解,造成材料内部的酸性高于表面,材料内部的自催化作用高于表面,最终导致材料内部的崩解现象发生,从而严重限制材料的应用。本研究通过采用聚磷酸盐(TPP)对PLGA进行改性,从而得到PLGA/TPP复合微球,考察不同TPP含量对复合微球降解过程中酸性的控制。

1 原料与方法

1.1 原料

PLGA[Poly(lactic-co-glycolic acid),济南健宝开元生物有限公司];三聚磷酸盐(TPP,美国Sigma公司);聚乙烯醇(PVA,美国Sigma公司),二氯甲烷(上海化学试剂有限公司)。

1.2 PLGA/TPP复合微球的制备

采用W/O/W双乳化及溶剂蒸发的方法制备PLGA/TPP复合颗粒。主要步骤如下:将一定量的PLGA溶解在二氯甲烷溶液中,形成0.05 g/mL的PLGA溶液。充分溶解后加入不同量的TPP水溶液

(PLGA对TPP的比率是根据PLGA和TPP的摩尔比来确定的,实验中选取比例分别为64:1和12:1,并将其命名为PT-64及PT-12),超声乳化2 min,再将一次乳化的液体加入到2%的PVA水溶液中,再超声3 min。室温条件下高速搅拌过夜,直至溶剂二氯甲烷完全挥发。离心收集颗粒(4 000 r/min,10 min)后冷冻干燥48 h,得到不同PLGA/TPP微球。在同样条件下制备单纯PLGA微球,作为实验对照。

1.3 PLGA/TPP颗粒的性能表征

1.3.1 扫描电镜观察

不同条件下制备的微球经离子溅射仪喷金镀膜后,表面结构采用JXA-8100(JEOL,日本)扫描电镜进行观察。主要是为了观察微球的外观形貌和粒径大小。

1.3.2 透射电镜观察

将制备好的PLGA/TPP微球分散于铜网后,置于透射电镜(HITACHI H-800)下观察。主要是为了观察TPP盐颗粒的尺寸及在PLGA微球内部的分布。

1.3.3 热重分析

PLGA/TPP的热重分析是为了证明TPP的存在及不同含量的TPP对PLGA的热稳定性的影响。

1.3.4 体外降解

体外降解实验主要是为了验证不同复合微球的降解性能和降解过程中周围溶液pH值变化。降解条件为:在37℃下,将不同的30 mg的PLGA/TPP微球分别置于3 mL的PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)中。分别选取1 d、2 d、4 d、7 d、10 d、14 d、21 d、28 d作为8个时间点,离心收集上清,测量溶液的pH值。

2 结果

2.1 微球的表面形貌

未包埋的PLGA颗粒和已包埋的PLGA/TPP颗粒,均表面光滑,且无明显差异(图1)。这表明,TPP这种缓冲盐的加入,不会对PLGA颗粒的表面形貌产生影响。且颗粒的直径大致分布在1~5 μm。

2.2 TPP在PLGA微球内的尺寸及分布

TPP盐颗粒大小大致在几十纳米之间,且相对均匀的分布在PLGA微球内(图2)。结果表明,TPP盐颗粒经重结晶后,比未经处理的TPP原料小。

2.3 热重分析

随着TPP量的增加,颗粒的热稳定性在不断地减小(图3)。减小的趋势正好和TPP增加的趋势相

吻合。从热重性能看,不仅证明了 TPP 的存在,也证明了 TPP 盐颗粒的增加,会造成 PLGA/TPP 微球热稳定性的降低。表 1 分别给出了 3 种不同颗粒在起始,DTG 峰值及终止这三个时间点的温度。随着 TPP 量的增加,起始温度,DTG 峰值及终止温度都有显著降解的趋势。

2.4 不同 PLGA 微球体外降解时溶液的 pH 值变化

图 4 为 3 种不同的 PLGA 微球在 28 d 的降解过程中溶液 pH 值变化的曲线。对未进行包埋的

PLGA 颗粒来说,在降解过程中始终保持着相对稳定的降解速率,pH 值匀速下降,在 28 d 后,pH 值下降为 6.66。对于 PT-12 来说,降解到第 4 天时,pH 值出现一个回升的现象,可能是由于 TPP 的释放。随后,pH 值以较快的速率下降,可能是 TPP 释放后增加了微球的空隙率和比表面积,从而加快了降解。28 d 后,pH 仅为 6.35。PT-64 微球在整个降解过程中,都以相对平稳的速率进行降解,在 28 d 后,pH 值为 6.93,是 3 种材料中溶液 pH 值保持最为中性的。

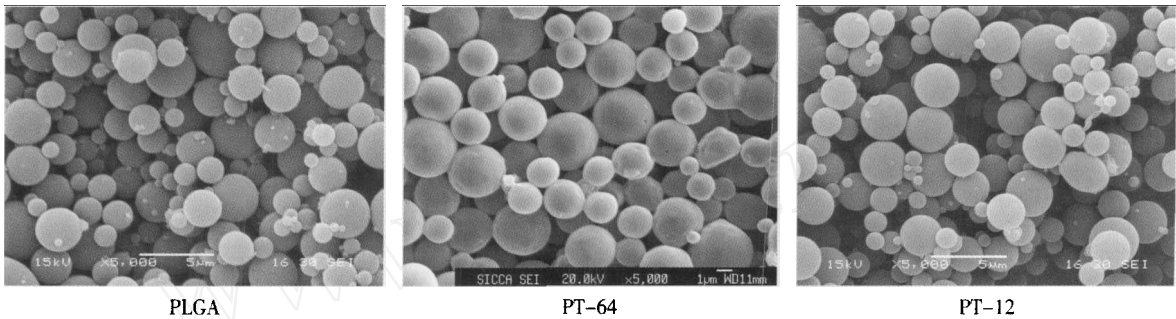


图 1 不同 TPP 含量的 PLGA 微球的 SEM 照片

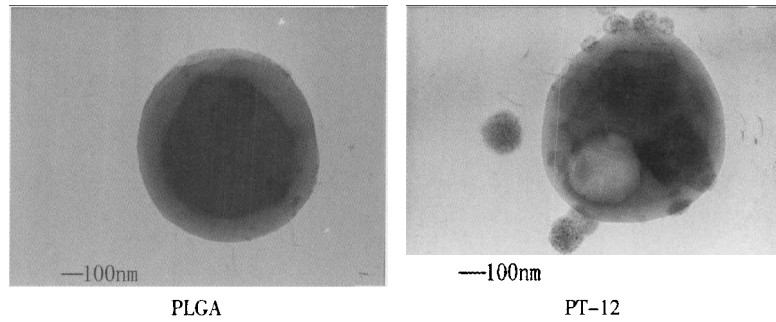


图 2 PLGA 与 PT-12 微球的透射电镜照片

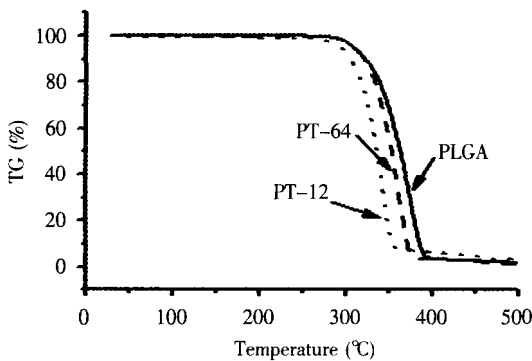


图 3 不同 PLGA 微球的热失重曲线

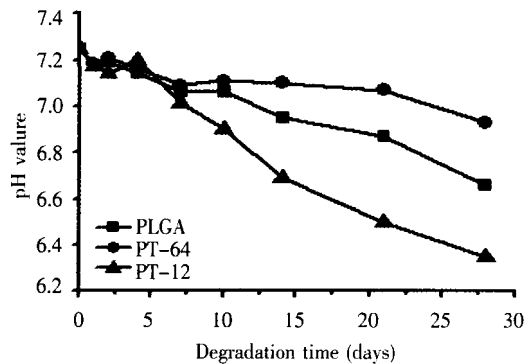


图 4 不同 PLGA 微球在体外降解时溶液 pH 值变化曲线

表 1 不同 PLGA 微球在 3 个不同时间段的温度

样品	TG 起始温度(°C)	DTG 峰值温度(°C)	TG 终止温度(°C)
PLGA	335.4	372.3	388.4
PT-64	330.7	362.6	373.8
PT-12	314.3	314.3	346.6

3 讨论

PLGA、PGA 等聚酯类材料作为组织工程常用的生物可降解支架,其应用非常广泛。它不仅广泛应用于各种组织构建,而且还作为很多药物缓释的载体。但是,虽然对它们的降解性能有着广泛的研究,但是对于降解过程中的酸性问题,即如何控制降解时产生的酸却少有报道。本研究受药物缓释启发,将 TPP 盐颗粒成功的包埋进 PLGA 微球中,通过 PLGA 的降解,将 TPP 缓慢释放出来,在释放的同时对降解过程中的酸起到缓冲作用,以实现稳定降解过程中溶液 pH 值的目的,并最终调节了材料的降解过程。采用双乳化溶剂蒸发的方法可以将 TPP 盐颗粒以纳米粒径包埋进 PLGA 微球中,且 TPP 盐颗粒的加入不会改变 PLGA 微球的表面形貌。3 种不同 PLGA 微球表面都非常光滑,未见明显的空隙。包埋于 PLGA 微球内的 TPP 颗粒,尺寸大致在几十个纳米左右,且在微球内部分布较为均匀。随着 TPP 盐颗粒的增加,PLGA 微球的热稳定性逐渐降低,但仍能在较高温度下保持稳定状态。从最后的体外降解实验可以发现,适量 TPP 盐颗粒(PT-64)的加入,能对溶液降解时产生的酸性起到有效的中和,较好地控制了材料的酸性降解。但是,必须控制 TPP 的量。当 TPP 加入达到 1/12 时,周围溶液的 pH 值不但没有得到控制,反而加速了 PLGA 的降解。这主要是由于 TPP 盐颗粒的加入,有两个作用,一是对 pH 值的稳定作用,二是增加了 PLGA 微球的亲水性。当 TPP 加入量很少时,稳定 pH 值占主导作用;但当 TPP 盐颗粒的量增加到一定量时,亲水作用的增加成了主导因素,导致了加速 PLGA 微球的降解。

4 结论

本研究显示,可以采用双乳化溶剂蒸发的方法制备酸性降解性能可控的 PLGA/TPP 复合微球。在一定范围内,TPP 盐颗粒的加入可以有效地控制 PLGA 微球在降解过程中产生的酸性。为了能进一步调节微球的性能,还需对制备条件进一步优化,使 PLGA 微球大小更加均匀。

参考文献

- [1] Michael KN, Stephany YT, Adam MH, et al. Poly(lactic-co-glycolic acid) nanospheres and microspheres for short- and long-term delivery of bioactive ciliary neurotrophic factor [J]. *Biotechnology & Bioengineering*,2008,100(5):1010-1019.
 - [2] 曹德君,曹谊林,刘伟.肌腱构建与组织工程技术研究新进展[J]. *生物医学工程与临床*.2002,6(3):166-169.
 - [3] Yuan J, Cui L, Zhang WJ, et al. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous b-tricalcium phosphate [J]. *Biomaterials*.2007,28(6):1005-1013.
 - [4] Kyeongsoon P, Ji Sun P, Dae GW, et al. The use of chondrogenic differentiation drugs to induce stem cell differentiation using double bead microsphere structure [J]. *Biomaterials*,2008,29:2490-2500.
 - [5] Xu ZC, Zhang WJ, Li H, et al. Engineering of an elastic large muscular vessel wall with pulsatile stimulation in bioreactor [J]. *Biomaterials*,2008,29:1464-1472.
 - [6] Pitt CG, Gratzl MM, Himmel GL, et al. Aliphatic polyesters. The degradation of poly(DL-lactide), poly(1-caprolactone) and their copolymers *in vivo* [J]. *Biomaterials*,1981,2:215-220.
 - [7] Pitt CG. Non-microbial degradation of polyesters: mechanisms and modifications.//Vert M, Feijen J, Albertsson A, et al. *Biodegradable polymers and plastics* [M]. London: Royal Society of Chemistry, 1992,7-19.
 - [8] Huffman KR, Casey DJ. Effects of carboxylic endgroups on hydrolysis of polyglycolic acid [J]. *J Polym Sci Polym Chem Ed*,1985,23:1939-1954.
 - [9] Li SM. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999,48(3):342-353.
- (收稿日期:2009年8月23日;修回日期:2009年10月16日)
-
- (上接第 306 页)
- [45] Vu HL, Panchal J, Levine N. Combined simultaneous distraction osteogenesis of the maxilla and mandible using a single distraction device in hemifacial microsomia [J]. *J Craniofac Surg*.2001,12(3):253-258.
 - [46] McCormick SU, McCarthy JG, Grayson BH, et al. Effect of mandibular distraction on the temporomandibular joint//Part 1: canine study [J]. *J Craniofac Surg*,1995,6(5):358-363.
 - [47] Stelnicki EJ, McCormick SU, Rowe N, et al. Remodeling of the temporomandibular joint following mandibular distraction osteogenesis in the transverse dimension [J]. *Plast Reconstr Surg*,2001,107(3):647-658.
 - [48] Fredericks DC, Piehl DJ, Baker JT, et al. Effect of pulsed electromagnetic field stimulation on distraction osteogenesis in the rabbit tibial leg lengthening model [J]. *J Pediatr Orthop*,2003,23:478-483.
 - [49] Kitakoji T, Takashi S, Ono Y, et al. Effect of hyperbaric oxygenation treatment on lengthened callus [J]. *Undersea Hyperb Med*,1999, 26:165-168.
 - [50] Sakurakichi K, Tsuchiya H, Uehara K, et al. Effects of timing of low pulsed ultrasound on distraction osteogenesis [J]. *J Orthop Res*, 2003,22:395-403.
 - [51] Bouletreau PJ, Warren SM, Longaker MT. The molecular biology of distraction osteogenesis [J]. *J Craniofac Surg*,2002,30(1):1-11.
 - [52] Mizumoto Y, Moseley T, Drews M, et al. Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-7 [J]. *J Bone Joint Surg Am*,2003,85:124-130.
- (收稿日期:2009年8月29日;修回日期:2009年11月20日)