

doi:10.3969/j.issn.1672-4348.2019.06.007

载麦冬皂苷的明胶微球对成骨细胞的调控作用

杨春蓉

(福建工程学院 材料科学与工程学院, 福建 福州 350118)

摘要:以麦冬甙体皂苷为模型药物,以明胶为载体原料制备载药微球,并研究其对成骨细胞的调控作用。首先采用双乳化-化学交联技术构建载药明胶微球,再对其释药特点、调控成骨细胞生理功能的效应等方面开展研究。结果发现构建的载药微球不仅有效缓解药物突释现象并延长药物释放时间,而且可以有效刺激成骨细胞增殖、碱性磷酸酶分泌及矿化,促其向骨组织分化。

关键词:明胶;麦冬皂苷;微球

中图分类号: TB34

文献标志码: A

文章编号: 1672-4348(2019)06-0545-05

Regulation effects of ophiopogonin-loaded gelatin microspheres on osteoblasts

YANG Chunrong

(School of Materials Science and Engineering, Fujian University of Technology, Fuzhou 350118, China)

Abstract: Ophiopogonin was used as the model drug and gelatin as the carrier material to prepare drug-loaded microspheres, whose regulatory effects on osteoblasts were studied. Firstly, the drug-loaded gelatin microspheres were constructed by double emulsification-chemical crosslinking technology, and then the drug release characteristics and the effects on regulating the physiological function of osteoblasts were studied. Results show that the microspheres could not only effectively alleviate drug burst release and prolong its release time, but also stimulate the proliferation of osteoblasts, and the secretion and mineralization of alkaline phosphatase, and promote cell differentiation towards bone tissue.

Keywords: gelatin; ophiopogonin; microspheres

目前甙体皂苷类化合物的应用及研究领域主要集中在中枢神经损伤的治疗方面,甙体皂苷类化合物应用于骨缺损治疗领域的研究报告还很少见。江洋珍等^[1]研究了薯蓣皂苷元(麦冬甙体皂苷的主要水解产物,分子式: $C_{27}H_{42}O_3$,相对分子质量:414.63Da)对大鼠成骨细胞增殖、分化的影响。研究发现,在培养液中添加质量浓度(0.015~0.150 $\mu\text{g/mL}$)的薯蓣皂苷元后,成骨细胞增殖、分泌碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的水平明显提高。

与此同时,构建具有时空控制释放特点的载药

微球已成为一个新的研究方向^[2-3]。连续梯度的化学信号能引起浓度依赖性的细胞特异类型反应,从而引起不同的生物学作用^[4]。这种微球对于骨缺损的修复具有较好的药物缓释作用。微球可直接植入骨缺损部位以刺激骨细胞的增殖。此外,这种尺寸可控的载药微球也可以注射的方式修复损伤组织,从而避免手术创伤。因此,这种治疗方式可有效提高骨细胞的生物活性并刺激骨再生。

基于此,本实验尝试以麦冬甙体皂苷为模型药物,以明胶为载体构建缓释系统并研究其对小鼠成骨细胞的生物效应。

收稿日期: 2019-09-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51702052);福建省自然科学基金面上项目(2018J01625);福建工程学院科研发展基金项目(GY-Z15093)

作者简介: 杨春蓉(1977-),女,湖北枝江人,副教授,博士,研究方向:生物医用材料。

1 材料与方法

本实验以从麦冬提取物中分离得到的甾体皂苷类化合物(相对分子质量介于 771-962Da)作为模型药物,应用新型乳化-化学交联技术,制备载药明胶微球。微球在制备过程中,麦冬-明胶溶液与油相形成 W/O 型乳剂,再经 EDC/NHS 固化交联处理形成微球。

具体过程如下:

(1)配制药物-明胶溶液。将 0.3 g 麦冬皂苷溶于 100 mL 水中,超声处理,配制成饱和溶液后,称取明胶溶液,配制成适宜浓度的麦冬皂苷-明胶溶液。

(2)乳化。在三口瓶中加入 250 mL 液体石蜡,然后加入 3.1 mL Span80,搅拌使液体石蜡与 Span80 混匀。并在搅拌下缓慢滴加含药明胶溶液,控制一定的搅拌速度,适时取样,用显微镜进行观察。水相与油相体积比控制为 1:5,石蜡与 Span80 的体积比控制为 80:1。并调控乳化时间为 40 min。

(3)交联阶段和后处理。当液滴完全分散均匀形成 W/O 型乳剂后,立即转移至冰水浴中;待乳剂温度降至 5℃左右时,加入 2.5 mg/mL 的 EDC 交联固化 40 min,随后加入异丙醇约 50 mL,继续搅拌至有大量固体颗粒析出(约 15 min),抽滤,用异丙醇洗涤 3 次,用石油醚洗涤 3 次,直至抽干,放在表面皿上,拿到真空干燥箱里真空干燥 12 h,即可得粉末状麦冬-明胶微球。

2 载药明胶微球的性能检测

2.1 载药明胶微球的微观结构观察及粒径分析

利用扫描电子显微镜(SEM)观察载药明胶微球的表面形态和微观结构,并在光学显微镜下测量 100 个微球粒径,绘制粒径分布图。

2.2 载药明胶微球的药物释放动力学和质量变化分析

采用紫外分光光度计检测载药微球在 PBS 中的释放动力学,绘制体外药物释放曲线;并称量释药前后微球的质量变化,绘制降解曲线。

2.3 载药明胶微球对细胞的生物效应检测

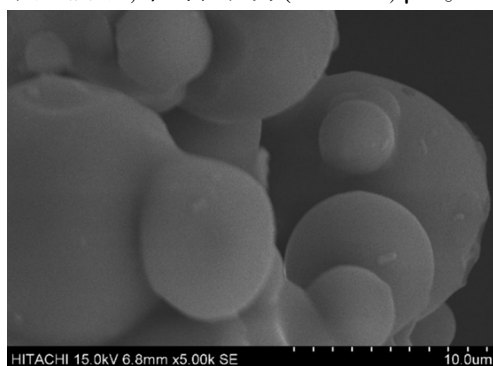
用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养成骨细胞。成骨细胞足够多时,加入 0.25%的胰酶消化成骨细胞,1~2 min 后弃除胰酶,加入培养液

中止消化,冲下贴壁的成骨细胞,吹打均匀制成细胞悬液,于红细胞记数板上记数。根据细胞记数结果,将细胞悬液密度稀释成 1×10^4 个/mL 和 2×10^4 个/mL 两种,备用。之后,将 20 mg 经 γ 射线消毒后的微球置于培养板中,用培养液浸泡 24~48 h。之后,除去培养板中培养液,加入配制好的细胞悬液,隔天换新的培养液。细胞与微球组装一定时间后,采用四唑盐(MTT 法)比色法检测细胞生长的情况,采用铁氰化钾法检测细胞的碱性磷酸酶活性,并采用相差显微镜观察细胞的矿化特征,评价明胶微球释放的甾体皂苷药物对成骨细胞的生理活性。

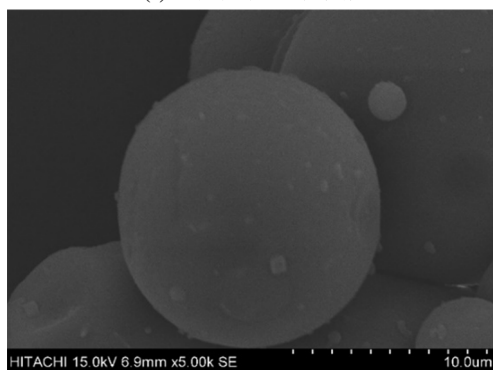
3 载药明胶微球的性能特征

3.1 载药明胶微球的微观形貌及粒径分析

图 1 为包裹了麦冬甾体皂苷药物和未载药明胶微球的扫描电镜形貌图。从图 1 可以看出未载药的微球表面更光滑,而包裹了药物的微球表面较粗糙。微球粒径在 1 μm 到 9 μm 之间,粒径分布如图 2 所示,平均粒径为 $(7.5 \pm 0.8) \mu\text{m}$ 。



(a) 包裹了药物的明胶微球



(b) 纯明胶微球

图 1 明胶微球的扫描电镜形貌图

Fig.1 Scanning electron micrographs of the gelatin microspheres

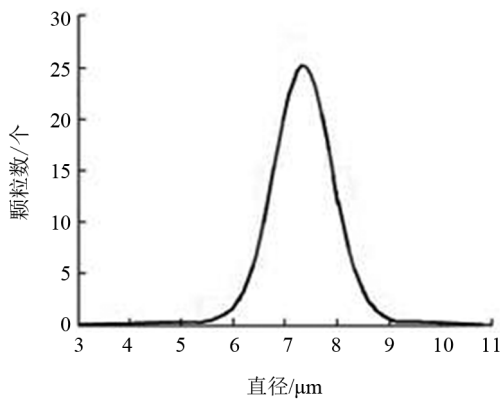


图 2 明胶微球的粒径分布图

Fig.2 Particle size distribution of gelatin microspheres

采用的双乳化技术可以通过控制表面活性剂浓度和混合转速来控制明胶微球的粒径。但是,这种技术也存在局限性。在乳化过程中,有机介质对明胶的流体力学作用会破坏明胶的螺旋结构,并降低其力学强度,从而导致药物从明胶基质中快速扩散出来。为了改善这种缺陷,本实验对明胶微球进行了交联处理。此外,通过交联,也可以对明胶构建最佳密度的纤维网络,这对于药物的缓释进而促进骨传导具有极其重要的作用。

3.2 载药明胶微球的药物缓释特征

图 3 为载药微球溶液经高速离心后,紫外分光光度计进行吸光度测定所得曲线。药物在波长 274 nm 处的吸收峰为麦冬甙体皂苷的特征吸收峰,表明微球载药成功。

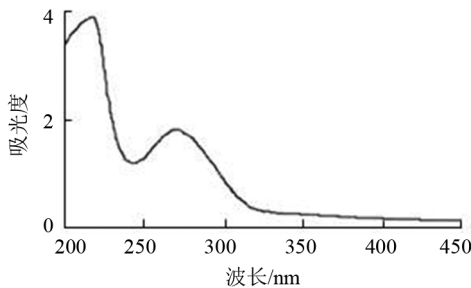
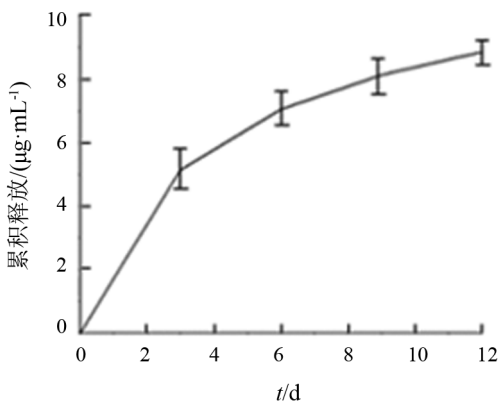


图 3 药物明胶微球的吸光度曲线

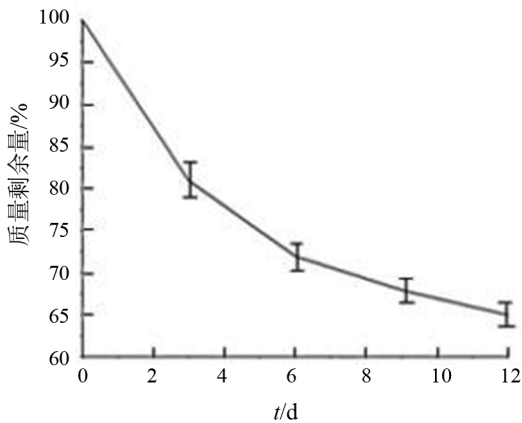
Fig.3 Absorbance curve of the gelatin microspheres

本实验研究了载药明胶微球在 PBS 溶液中的药物缓释特征。图 4 为明胶微球的药物释放特征和降解速率曲线。从图 4(a)可以看出,在起初的 6 d,药物具有较快的释放速率。随后,释放速率减慢并保持在相对平稳状态。药物在 0~3、4~

6、7~9、10~12 d 的释放量分别是 5.15、1.93、1.07、0.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



(a) 药物释放曲线



(b) 微球降解曲线

图 4 明胶微球在 PBS 溶液中的药物释放曲线和降解曲线

Fig.4 Drug release curve and degradation curve of gelatin microspheres in PBS solution

另外,从图 4 也可以看出,明胶微球在 PBS 中的降解曲线与药物释放曲线的变化趋势非常类似。表明在微球降解过程中,药物释放速率与明胶降解速率相一致。而且微球的药物突释现象并不太明显,具有较好的释放特征。事实上,甙体皂苷从微球中释放既包含扩散机制,也有生物侵蚀的原因。明胶微球的释放曲线主要取决于明胶的降解,而甙体皂苷的持续释放可以被解释为明胶的降解。明胶在 PBS 中可以快速降解,但是本实验的交联处理减缓了明胶的降解速率,并延长了药物的释放时间。

3.3 载药明胶微球对成骨细胞生理功能的调控作用

3.3.1 载药明胶微球对成骨细胞增殖率的调控作用

图 5 显示了成骨细胞 MC3T3-E1 分别与纯明胶微球、载药明胶微球复合培养时的增殖率。

从图 5 可以看出,当与载药明胶微球复合培养时,细胞增殖数量更多($P<0.05$)。这表明药物在成骨过程中具有重要作用,可很好地促进成骨细胞繁殖。

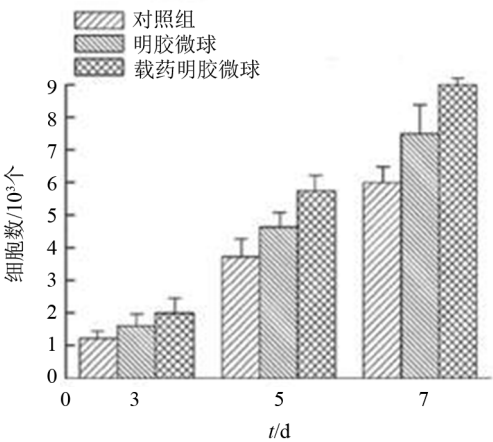


图 5 细胞分别与纯明胶微球、载药明胶微球复合培养时的增殖率

Fig.5 Proliferation rate of MC3T3-E1 cells co-cultured with pure gelatin microspheres and drug-loaded gelatin microspheres

3.3.2 载药明胶微球对成骨细胞分泌 ALP 的调控作用

细胞与两种微球复合培养 7 d 后分泌的 ALP 水平如图 6 所示。在本实验中,细胞分别以两种初始浓度(1×10^4 个/mL 和 2×10^4 个/mL)种植在 20 mg 的微球上。从图 6 可以看出,在两种浓度情况下,细胞与载药微球复合培养时分泌的 ALP 水平更高。而且,细胞初始浓度越高,ALP 增加的越多。这表明药物能很好的激发细胞分泌成骨因子。

明胶微球释放的甾体皂苷药物及微球材料均对细胞的粘附、增殖及分泌具有重要作用。因此,这种复合微球可构建具有生理活性肽片段的亲水表面,并以此作为细胞表面受体的配体。

3.3.3 载药明胶微球对成骨细胞矿化的调控作用

采用相差显微镜观察细胞的矿化,进一步评价明胶微球释放的甾体皂苷药物的生理活性。从图 7(a)可以看出,细胞与载药明胶微球复合培养 10 d 后有尖棱状矿化晶体形成。

作为对照同时研究了未载药的明胶微球对细胞矿化的影响。从图 7(b)可以看出,这些微球与

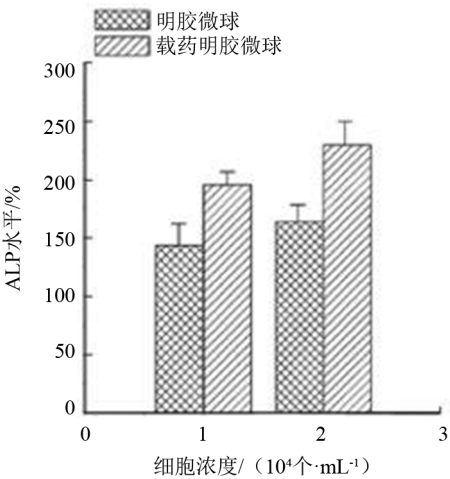


图 6 细胞分别与纯明胶微球、载药明胶微球复合培养 7 d 后分泌的 ALP 水平

Fig.6 Level of ALP of secreted by cells after 7 days of co-culturing with pure gelatin microspheres and drugs-loaded gelatin microspheres respectively

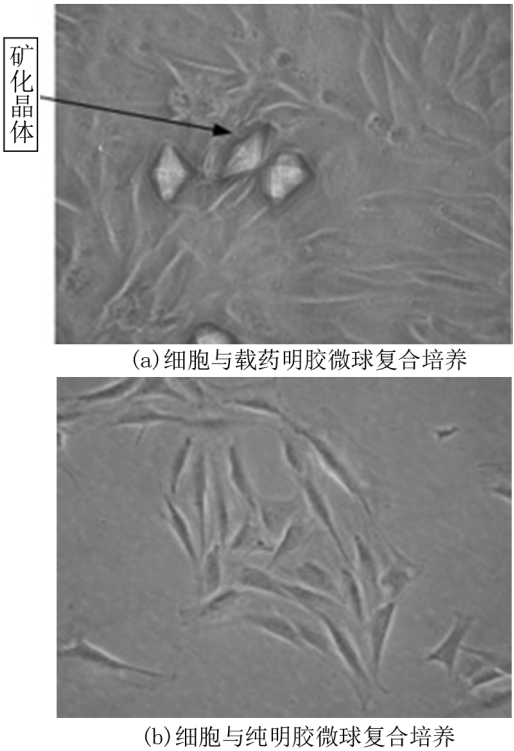


图 7 细胞分别与载药明胶微球和纯明胶微球复合培养 10 d 后的矿化形貌图($\times 200$)

Fig.7 Mineralization topography ($\times 200$) of cells co-cultured with drug-loaded gelatin microspheres and pure gelatin microspheres for 10 days respectively

细胞联合培养后,细胞未矿化形成晶体。由此也可以证实甬体皂苷药物对细胞矿化的生理活性。

究其原因,可推测为甬体皂苷药物对成骨细胞内的护骨素(osteoprotegerin, OPG)和核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)mRNA表达具有影响。可通过显著上调成骨细胞内 OPG/RANKL 比值来调节成骨细胞的生理活性。因此,这种具有骨诱导功能的载药微球可被注射或移植到骨缺损处以刺激成骨细胞向骨组织分化,有效促进新骨形成。

参考文献:

- [1] 江洋珍, 王俊俊, 梁继超, 等. 薯蓣皂苷元对大鼠成骨细胞增殖、分化及 OPG/RANKL mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(1): 134-136.
- [2] KIM S, SAH H. Merits of sponge-like PLGA microspheres as long-acting injectables of hydrophobic drug[J]. Journal of Biomaterials Science(Polymer Edition), 2019, 30(18): 1725-1743.
- [3] RUDNIK-JANSEN I, SCHRIJVER K, WOIKE N, et al. Intra-articular injection of triamcinolone acetonide releasing biomaterial microspheres inhibits pain and inflammation in an acute arthritis model[J]. Drug Delivery, 2019, 26(1): 226-236.
- [4] ANDHARIYA J V, JOG R, SHEN J, et al. Development of Level A in vitro-in vivo correlations for peptide loaded PLGA microspheres[J]. Journal of Controlled Release, 2019, 308: 1-13.

4 结论

1) 选用麦冬的有效提取物甬体皂苷类化合物为模型药物构建的载药明胶微球可有效缓解药物突释现象并延长药物释放时间。

2) 该载药微球对成骨细胞生物学功能有干预作用,载药微球释放的药物可有效提高成骨细胞的增殖率和分化水平,促其矿化形成晶体。

3) 未来需进一步研究该载药微球,揭示其在骨缺损修复中的生物效应和成骨机制。

(责任编辑:方素华)