

[文章编号] 1000-1182(2009)03-0248-04

壳聚糖缓释膜的制备及性能研究

季娟娟 丁仲鹃 杨雪莲

(昆明医学院附属口腔医院 口腔修复科, 云南 昆明 650031)

[摘要] 目的 探索壳聚糖膜的制备及该膜的缓释、降解性能, 并研究该膜对成骨细胞的毒性作用。方法 以溶胀度为评价指标, 设计正交实验, 确定制备壳聚糖膜的最佳参数。检测该膜对牛血清白蛋白的释放率及膜在溶菌酶作用下的降解率。使用噻唑蓝(MTT)法检测该膜对成骨细胞的毒性。结果 当稀醋酸浓度为1%、壳聚糖浓度为2 mg/mL、三聚磷酸钠浓度为6%、交联时间为1 h时, 膜的溶胀度最小。该膜8 d时释放率达33.13%, 4周内可降解36.73%。该膜对胎鼠成骨细胞的毒性作用为0级或1级。结论 用最佳参数制备的膜具有良好的缓释能力、可降解性, 对胎鼠成骨细胞无毒性。

[关键词] 壳聚糖膜; 缓释; 降解; 成骨细胞; 细胞毒性

[中图分类号] R730.21 **[文献标识码]** A

Preparation and properties of chitosan film as a drug sustained-release system Ji Juan-juan, DING Zhong-juan, YANG Xue-lian. (Dept. of Prosthodontics, The Affiliated Stomatological Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

[Abstract] **Objective** To develop a best chitosan film for using as a drug sustained-release system through the evaluation of the sustained-release property, degradation property, and cytotoxicity to osteoblast. **Methods** Orthogonal experiments were designed to determine the best combination of chitosan film preparations. Drug release rate was determined with Coomassie brilliant blue G250. In a separate study, chitosan films were placed into the test tubes with buffer solution and 10^7 U/L lysozyme. The degradation rate was calculated. Osteoblasts derived from fetal rat calvarial were cultured on chitosan films. Cell proliferation was tested by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. The relative growth rate was calculated and the cytotoxicity was graded. **Results** The best processing condition was 1% acetic acid, chitosan concentration of 2 mg/mL, 6% sodium tripolyphosphate(STPP) concentration, and cross-linking time of one hour. The resulting chitosan film released 33.13% of bovine serum albumin(BSA) within 8 d, 36.73% of BSA within four weeks and the cytotoxicity grade was 0 or 1. **Conclusion** This chitosan film possesses good sustained release property, and a good degradation rate.

[Key words] chitosan film; drug sustained-release; degradation; osteoblast; cytotoxicity

在钛种植体表面附着促骨生长因子可加速种植体的早期愈合, 提高骨结合率, 但由于生长因子是多肽类物质, 其应用受到很多限制。因此需要引入载体或缓释系统, 使其既能保护生长因子的生物活性, 又能在一定时间内持续释放生长因子促进新骨的形成。壳聚糖以其良好的生物相容性、可降解性、黏附性^[1-3]等优点成为开发研制的热点。本实验采用溶剂蒸发法制备壳聚糖膜, 并选用无生物毒性的三聚磷酸钠对膜进行物理交联, 制备适合蛋白质药物缓释的壳聚糖膜, 对影响膜制备的主要参数进

行探索, 并研究该膜的降解性、缓释性和细胞毒性。

1 材料和方法

1.1 材料

SD胎鼠(昆明医学院动物实验中心), 壳聚糖(浙江金壳生物化学有限公司), 考马斯亮蓝G250、溶菌酶、噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、胰酶(Amres公司, 美国)。

1.2 壳聚糖膜的制备

将壳聚糖溶于30 mL稀醋酸中, 离心去除不溶物和气泡, 37 ℃的干燥箱中干燥24 h后取出, 用三聚磷酸钠溶液交联, 室温干燥后即得到壳聚糖膜。

1.3 溶胀度的测定及影响溶胀度的多因素正交实验

将膜称重(m_0)后浸泡于30 mL pH为7.4的PBS缓

[收稿日期] 2008-12-02; [修回日期] 2009-04-26

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目(2006C0001R)

[作者简介] 季娟娟(1981-), 女, 上海人, 硕士

[通讯作者] 丁仲鹃, Tel: 0871-5338944

冲液中，再将试管放入37℃的振荡培养箱中24 h，取出膜并用滤纸拭干膜表面的水分后称重(m_1)。按照公式：溶胀度= $(m_1-m_0)/m_0\times 100\%$ 来计算该膜24 h的溶胀度。最佳参数为溶胀度最小组。

实验安排四因素四水平的 $L_{16}(4^4)$ 正交实验，四因素分别为稀醋酸浓度(A)、壳聚糖浓度(B)、交联时间(C)和三聚磷酸钠浓度(D)。探索所选范围内的最佳参数组合，在同一实验条件下设置3个样本量。因素水平表具体见表1。

表 1 因素水平表
Tab 1 Factors level

因素代号	A(%)	B(mg/mL)	C(h)	D(%)
水平1	2	4	1	8
水平2	1	1	2	6
水平3	0.5	8	0.5	10
水平4	1.5	2	4	4

1.4 壳聚糖膜的性能

1.4.1 壳聚糖膜的释放率 按所确定的最佳参数制备含1 mg/mL牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的壳聚糖膜5块。将制备好的膜分别放入30 mL pH为7.4的PBS缓冲液中，再将试管放入37℃的振荡培养箱中，第1、2、4、6、8天用考马斯亮蓝法测定该膜的释放率。

1.4.2 壳聚糖膜的降解率 按本实验所确定最佳参数制备壳聚糖膜20块，随机分为4组，每组5块，并称重(m_0)。将每块膜放入30 mL含 10^7 U/L溶菌酶的PBS缓冲液中(pH7.4)，再将试管放入37℃的振荡培养箱中，第1、2、3、4周任意取出1组，室温干燥12 h后称重(m_1)。按照公式：降解率= $(m_1-m_0)/m_0\times 100\%$ 来计算降解率。

1.5 改良MTT法检测膜对成骨细胞的毒性作用

无菌条件下取SD胎鼠颅盖骨，采用组织块法于5%CO₂、饱和湿度、37℃恒温培养。实验分为3组，分别为阴性对照组(含80 mL/L FBS的DMEM培养液和成骨细胞，孔内无膜)、阳性对照组(含80 mL/L FBS的DMEM培养液和成骨细胞及8 mL/L苯酚溶液10 μL)、实验组(含80 mL/L FBS的DMEM培养液和成骨细胞，孔内有膜)，每组设5复孔。取第4代的成骨细胞，以2.5 g/L胰酶消化制成细胞悬液，调整细胞密度为每毫升 1×10^5 个，于所需的孔内加入100 μL悬液，每3 d换液1次。培养至第0.5、1、2、3、5天时取出1块培养板，每孔内加入10 μL MTT(5 g/L)溶液，培养箱培养4 h后取出，每孔加入三联液100 μL，再次置于培养箱内，培养12 h后取出。三联液能溶解细胞中的紫色结晶物，用酶联免疫检测仪在570、630 nm双波长下测定各孔光密度值(A)。

计算细胞相对增殖率(relative growth rate, RGR)公式为： $RGR=(\frac{\text{实验组A值}}{\text{阴性对照组A值}})\times 100\%$ 。根据RGR值来评定材料毒性程度级别，评分标准为：1)0级，RGR为 $\geq 100\%$ ；2)1级，RGR为75%~99%；3)2级，RGR为50%~74%；4)3级，RGR为25%~49%；5)4级，RGR为1%~24%；6)5级，RGR为0。结果评价标准为：1)0或1级为合格；2)2级反应的应结合细胞形态分析作综合评价；3)3~5级反应为不合格。采用倒置显微镜观察成骨细胞在壳聚糖膜表面生长状况，采用扫描电镜观察成骨细胞在壳聚糖膜表面黏附形态。

2 结果

2.1 正交实验结果

正交实验结果见表2。影响壳聚糖膜溶胀度的因素主次顺序为A>D>B>C，其最佳因素组合为A₂B₄C₁D₂，即稀醋酸浓度为1%、壳聚糖浓度为2 mg/mL、交联时间为1 h、三聚磷酸钠浓度为6%。

表 2 壳聚糖膜制备的 $L_{16}(4^4)$ 正交实验结果

Tab 2 $L_{16}(4^4)$ orthogonal experiments of chitosan film preparation

项目	A(%)	B(mg/mL)	C(h)	D(%)	误差
均值1	294.4	219.7	207.9	220.0	217.6
均值2	187.3	257.6	246.2	215.7	251.7
均值3	190.4	245.3	225.7	267.3	227.1
均值4	259.8	209.4	252.1	228.9	235.6
极差	107.1	48.2	38.3	51.6	34.1

2.2 壳聚糖膜的释放率

对壳聚糖膜释放率与释放时间作一元线性回归分析，回归方程为： $Y=19.233+1.821X$ ，Y为释放率，X为释放时间(图1)。统计学分析回归方程有意义($P=0.002$)。壳聚糖膜释放BSA的量随时间增加而增加，第1天释放的蛋白质质量最多，为20.01%，而后随着时间的增加，BSA的释放量缓慢增加，第8天的释放量为33.13%。

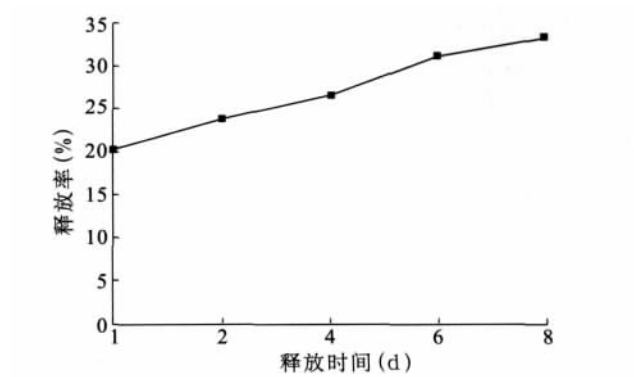


图 1 壳聚糖膜的释放率
Fig 1 Drug release rate of chitosan film

2.3 壳聚糖膜的降解率

壳聚糖膜各周降解率随时间的增加而增加，第1周为13.67%，第2周为18.92%，第3周为22.35%，第4周为36.73%(图2)。

2.4 壳聚糖膜对成骨细胞的毒性作用

培养0.5、1、2、3、5 d后各组材料的光密度值、RGR及材料毒性分级见表3、4。从MTT实验结果可知，成骨细胞第0.5、2、3、5天的RGR均在100%以上，毒性分级为0级，即无毒性；第1天的RGR也在90%以上，毒性分级为1级，属于合格范围。提示壳聚糖膜无细胞毒性。

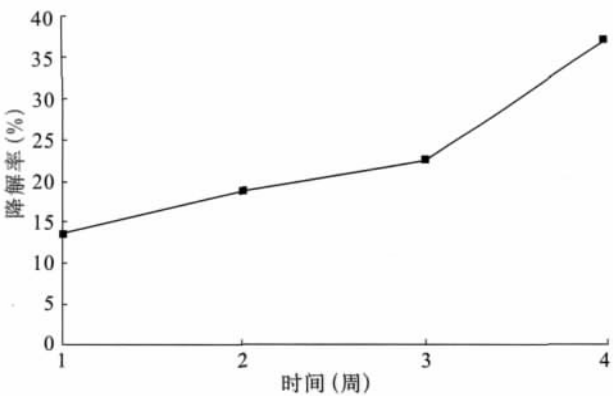


图 2 壳聚糖膜的降解率
Fig 2 Degradation rate of chitosan film

表 3 培养0.5、1、2、3、5 d后各组材料的光密度值(n=5, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 0.5, 1, 2, 3, 5 days after the groups' training materials absorbance value(n=5, $\bar{x}\pm s$)

分组	光密度值				
	0.5 d	1 d	2 d	3 d	5 d
实验组	0.113±0.018	0.097±0.047	0.138±0.041	0.182±0.019	0.223±0.017
阴性对照组	0.110±0.011	0.107±0.006	0.136±0.031	0.177±0.013	0.218±0.025
阳性对照组	0.004±0.002	0.003±0.002	0.004±0.003	0.006±0.005	0.013±0.011

表 4 培养0.5、1、2、3、5 d后RGR及材料毒性分级

Tab 4 0.5, 1, 2, 3, 5 days after the groups' relative growth rate and the relative toxicity of material grading

分组	0.5 d		1 d		2 d		3 d		5 d	
	RGR(%)	分级	RGR(%)	分级	RGR(%)	分级	RGR(%)	分级	RGR(%)	分级
阴性对照组	100.00	0	100.00	0	100.00	0	100.00	0	100.00	0
阳性对照组	3.63	4	2.80	4	2.94	4	3.39	4	5.96	4
实验组	102.73	0	90.65	1	101.47	0	102.82	0	102.29	0

本实验制备的壳聚糖膜为透明、无色、均质膜，平均厚度约为3.5 μm。倒置显微镜下观察成骨细胞在壳聚糖膜表面的生长状况可见，成骨细胞伸出伪足，细胞重现梭形、三角形、多边形等正常形态(图3)。

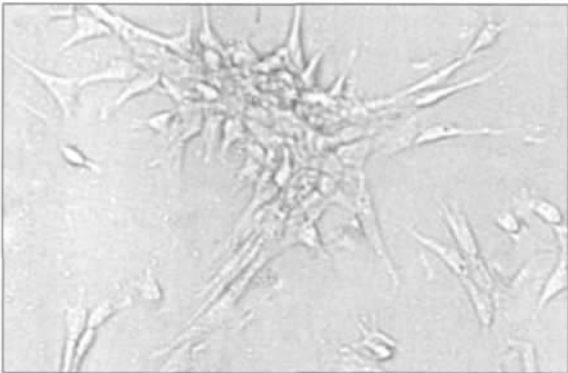


图 3 成骨细胞在壳聚糖膜表面的生长状况 倒置显微镜 ×100
Fig 3 The growth of osteoblast in the chitosan film inverted microscope ×100

扫描电镜观察成骨细胞在壳聚糖膜表面的黏附形态可见，成骨细胞在壳聚糖膜表面普遍伸展较

好，细胞片足和丝足结构呈放射状从胞体向四周伸展，细胞呈梭形、三角形、多边形(图4)。

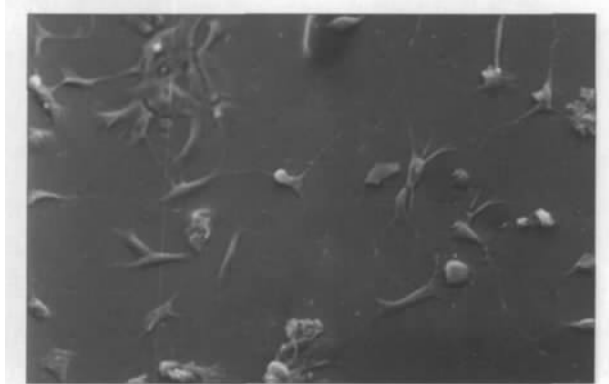


图 4 成骨细胞在壳聚糖膜表面的黏附形态 SEM ×300
Fig 4 The osteoblast adhered to the chitosan film SEM ×300

3 讨论

由于壳聚糖分子内、分子间氢键的存在和分子的规整性，晶相区所占的重量百分比比较高，有很稳定的物理化学性质及成膜性^[4]。本实验用溶剂蒸发

法制膜,并用三聚磷酸钠溶液在非均相介质中对膜进行交联,制备的膜的孔洞适合蛋白质药物的释放。溶胀度是有微孔膜的最重要的物理性能之一,它代表从开始溶胀到溶胀极限过程中释放药物的能力^[5]。制备的膜预计用于种植体表面生物化学改性,而骨结合的时间为3~6个月,因此选择溶胀度最小时各因素的值最佳指标。

本实验选取膜制备过程中4个主要的参数(稀醋酸浓度、壳聚糖浓度、三聚磷酸钠浓度、交联时间)作为研究对象。单因素实验不能全面的考察各因素间的相互作用,正交实验^[6]能在所有实验方案中均匀地挑选出代表性强的少数实验方案,而所得到的较优方案往往不包含在这些少数实验方案中。所以本实验安排了四因素四水平的 $L_{16}(4^4)$ 正交实验确定所选范围内最佳制备参数组合,实验过程严格按照随机要求进行。

壳聚糖具有优异的生物粘接性,被普遍应用于多肽蛋白药物的缓释制剂中^[7],且壳聚糖膜与三聚磷酸钠交联、包埋药物的过程非常温和,有助于保持药物的活性。从微观上看,药物在壳聚糖膜中的扩散是通过聚合物内部的孔隙进行的^[8]。实验中,载药膜第1天释放率达20.01%,这是因为部分BSA吸附或沉淀在膜的浅表面,迅速地溶解和扩散出来。而大部分药物则分散地包埋在膜的骨架中,通过骨架中的孔隙缓慢释放出来。释放率和释放时间成一线性回归关系,即除第1天外,其他时间的释放量按恒定大小递增,提示该膜有良好的缓释作用。

壳聚糖降解的本质是壳聚糖在体液和各种酶的作用下 β -1,4糖苷键断裂,使大分子转变为小分子的过程^[9]。溶菌酶是人体体液中含量较高的一种抗菌物质,是体内降解壳聚糖的主要酶。因此,本实验采用溶菌酶,并模拟体液pH值、温度等以研究壳聚糖膜体外的降解情况。实验结果显示,壳聚糖膜的质量随时间增加而减少,膜在4周时间降解了36.73%,提示有良好的降解性能。

应用于人体的材料要求无毒、无刺激、无致畸性及致敏性。本实验所制备的壳聚糖膜预备用于牙种植体的表面改性,所以选择骨形成过程中的主要

功能细胞成骨细胞,采用细胞增殖度法、直接接触实验对壳聚糖膜的细胞毒性进行评价,结果表明,成骨细胞第0.5、1、2、3、5天的毒性分级为0级或1级,提示该壳聚糖膜对成骨细胞有良好的生物相容性。

综上所述,实验所制备的壳聚糖膜有良好的缓释性能和降解性能,这为下一步以其为载体进行实验研究奠定了基础,说明该膜在种植体表面改性方面有很好的应用前景。

[参考文献]

- [1] 亢凯,张其清. 组织工程中控释生长因子载体的研究进展[J]. 国际生物医学工程杂志, 2005, 28(6) 348-351.
KANG Kai, ZHANG Qi-qing. Progress in carrier for growth factor controlled release in tissue engineering[J]. Foreign Medical Bio-medical Engineering Fascicle, 2005, 28(6) 348-351.
- [2] Meng S, Liu ZJ, Zhong W, et al. Phosphorylcholine modified chitosan: Appetent and safe material for cells[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 70(1) 82-88.
- [3] Subramanian A, Lin HY, Vu D, et al. Synthesis and evaluation of scaffolds prepared from chitosan fibers for potential use in cartilage tissue engineering[J]. Biomed Sci Instrum, 2004, 40: 117-122.
- [4] Vila A, Sánchez A, Tobío M, et al. Design of biodegradable particles for protein delivery[J]. J Control Release, 2002, 78(1/3): 15-24.
- [5] Schneider A, Vodouhê C, Richert L, et al. Multifunctional poly-electrolyte multilayer films: Combining mechanical resistance, biodegradability, and bioactivity[J]. Biomacromolecules, 2007, 8(1): 139-145.
- [6] 刘文卿. 实验设计[M]. 北京:清华大学出版社, 2005 2.
LIU Wen-qing. Design of experiments[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2005 2.
- [7] Zhang H, Alsarra IA, Neau SH. An *in vitro* evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon[J]. Int J Pharm, 2002, 239(1/2): 197-205.
- [8] Al-Musa S, Abu Fara D, Badwan AA. Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate[J]. J Control Release, 1999, 57(3) 223-232.
- [9] Harish Prashanth KV, Kshama L, Shambla TR, et al. Biodegradation of chitosan-graft-polymethylmethacrylate film[J]. Int Biodeterioration Biodegradation, 2005, 56(2): 115-120.

(本文编辑 王晴)

《国际口腔医学杂志》被美国《化学文摘》(CA)数据库收录

美国《化学文摘》数据库(chemical abstracts, CA),简称CA数据库,创建于1907年,由美国化学文摘服务社编辑出版。每年收录文献量50万,是涉及学科领域最广、收集文献类型最全、提供检索途径最多、部卷也最为庞大的一部著名的世界性检索工具。《国际口腔医学杂志》2009年被CA数据库收录。

《国际口腔医学杂志》编辑部