

Preparation of BMP-2-PLLA Microspheres and Its Maintenance for Bioactivity of BMP-2

Yan Bai*, Wei Xiao

College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing
Email: *baiyan1226@163.com

Received: Jul. 5th, 2016; accepted: Jul. 25th, 2016; published: Jul. 28th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The preparation conditions of poly-L-lactide (PLLA) microspheres, release characteristics and bioactivity of Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) were studied. Bovine serum albumin (BSA)-loaded PLLA microspheres were prepared with a double emulsion method. The effects of the molecular weight and concentration of PLLA, the molecular weight of PEG on the particle size, loading capacity and entrapment efficiency were studied. Then, the optimal conditions were selected to prepare BMP-2-loaded PLLA microspheres, and the bioactivity of BMP-2 was investigated by production of cell Alkaline Phosphatase (ALP). The results showed that the BMP-2-PLLA microspheres were spherical shape with diameters of 4.815 μm . The encapsulation efficiency of the BMP-2 in PLLA microspheres was 70.88%, and the loading capacity was $2.28 \times 10^{-3}\%$. The residual amount of methylene chloride in BMP-2-PLLA microsphere was 0.0041%. BMP-2-loaded PLLA microspheres had excellent drug sustained-release performance, which would control release BMP-2. BMP-2 biological activity indicated that the biological activity was not effected after emulsion process. The bioactivity of growth factors released from PLLA microspheres was more durable and effective. PLLA microspheres prepared can be used to load growth factors to control their release and maintain their biological activity.

Keywords

Poly-L-Lactide, Microspheres, Bone Morphogenetic Protein-2, Sustained Release, Bioactivity

*通讯作者。

BMP-2-PLLA缓释微球的制备及其对BMP-2活性的维持

白燕*, 肖唯

重庆医科大学药学院, 重庆
Email: baiyan1226@163.com

收稿日期: 2016年7月5日; 录用日期: 2016年7月25日; 发布日期: 2016年7月28日

摘要

本研究探索载骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)的左旋聚乳酸(PLLA)载药微球的制备条件, 并检测BMP-2-PLLA微球中BMP-2的释放规律和生物活性。采用乳化法制备载牛血清白蛋白(BSA)的聚乳酸(PLLA)载药微球, 考察PLLA分子量、PLLA浓度、PEG分子量对PLLA载药微球粒径、包封率和载药量的影响, 选择优化条件制备载BMP-2的PLLA微球, 通过细胞合成ALP检测BMP-2的活性。实验制备的BMP-2-PLLA微球表面光滑, 粒径为 $4.815\ \mu\text{m}$, 载药量为 $2.28 \times 10^{-3}\%$, 包封率为70.88%, 二氯甲烷残留量为0.0041%。BMP-2-PLLA微球有效实现了BMP-2长期稳定缓慢释。乳化过程未对BMP-2活性产生显著影响, 且BMP-2-PLLA微球中释放的BMP-2对细胞合成ALP的诱导作用较BMP-2溶液更加显著。实验制备的PLLA微球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

左旋聚乳酸, 微球, 骨形态发生蛋白, 缓释, 生物活性

1. 引言

由创伤、感染、肿瘤引起的骨缺损是临床常见的病症。骨缺损的再生和修复过程需要多种生长因子的协同调控, 适时适量补充外源性生长因子能够有效地促进骨缺损的修复。其中, 骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)是目前已知效应最强、应用最广泛的骨生长因子[1]。而且是唯一一种能够启动成骨分化并作用于整个成骨分化形成过程的细胞活性蛋白。BMP-2能够促进细胞外基质组成成分的合成且促进细胞的增殖。BMP-2表达水平的高低直接影响间充质干细胞分化和骨量产生的水平。但是, 直接应用BMP-2存在诸多问题, 如半衰期较短, 缺乏长期稳定性和组织选择性等, 难以在局部持久有效的发挥作用[2]。利用药物缓控释技术将BMP-2载入微球中, 可使其缓慢、持久地释放, 并且能够长期维持生长因子的生物活性。

聚乳酸(PLA)以其优越的生物相容性、生物安全性和可降解性, 在生物医学工程领域得到广泛的研究和应用[3]。PLLA的最终降解产物是 H_2O 和 CO_2 , 中间产物乳酸也是体内正常糖代谢产物, 不会在重要器官聚集。在各种缓控释系统的制备过程中, 可以根据药物的性质、给药途径和释药时间, 选用不同的PLLA, 通过调整PLLA的组成、分子量等来调控微球的载药量及粒径的大小, 从而调控药物的释放速率[4]。本研究采用BSA为模型蛋白, 利用乳化法制备BSA-PLLA微球, 研究PLLA分子量、PLLA浓度、PEG分子量对PLLA载药微球的影响, 根据优化条件制备BMP-2-PLLA微球, 对其进行表征并检测BMP-2的释放规律和生物活性。

2. 材料与方法

2.1. 材料

PLLA (济南岱罡生物工程有限公司), 聚乙烯醇(PVA, Sigma 公司), 聚乙二醇(PEG, 成都市科龙化工试剂厂) BCA 试剂盒(南京建成), BMP-2 (Peprotech), BMP-2-ELISA 试剂盒(RD 进口分装)

2.2. PLLA 微球的制备

采用乳化法制备 PLLA 微球[5]。称取适量 PLLA 和 PEG 溶于 5 mL 二氯甲烷中组成有机相, 待其完全溶解后, 缓缓加入 250 μ L 1 mg/mL 的 BSA 溶液, 至于磁力搅拌器上高速搅拌 2 分钟, 形成初乳(W/O)。再加入 10 mL 1% PVA, 磁力搅拌器上高速搅拌 5 分钟形成复乳(WO/W)。将乳浊液加入 400 mL 0.1% PVA 中室温下搅拌 4 小时, 500 r/min, 有机溶剂挥发后得到微粒的混悬液。将所得微粒的混悬液 5000 r/min 离心 10 分钟, 用蒸馏水洗涤 3 次, 真空冷冻干燥 24 小时得到 BMP-2-PLLA 载药微球。

2.3. 制备条件对 PLLA 载药微球的影响

分别采用分子量为 10、50、100 KDa 的 PLLA 制备载 BSA 的 PLLA 微球, 其它条件不变, 考察 PLLA 分子量对 PLLA 微球的影响。

分别采用浓度为 50 mg/mL、100 mg/mL、150 mg/mL 的 PLLA 制备载 BSA 的 PLLA 微球, 其它条件不变, 考察 PLLA 浓度对载药微球的影响。

分别采用分子量为 400、1000、4000 的 PEG 制备载 BSA 的 PLLA 微球, 其它条件不变, 考察 PEG 分子量对载药微球的影响。

2.4. PLLA 微球的表征

PLLA 载药微球的形貌通过扫描电镜观察, 取一定微粒用导电胶粘在载物台上, 喷金后观察。微球粒径大小及粒径分布采用激光粒度仪测定。一定量的样品加入样品池, 经超声分散后启动仪器循环泵, 自动分析软件即可获得微粒粒径大小及粒径分布。

2.5. PLLA 微球的包封率和载药量

精确称量适量的 BSA-PLLA 载药微球, 加入二氯甲烷适量, 磁力搅拌直至聚乳酸完全溶解, 再加入定量高纯水, 搅拌同时缓慢升温, 待二氯甲烷挥发完全, 溶液经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 采用 BSA 试剂盒测试 BSA 浓度。BMP-2 含量的测定采用酶联免疫吸附法定量检测试剂盒。根据 2010 年版《中华人民共和国药典》规定, 载药量和包封率分别按以下公式计算:

$$\text{载药量} = \text{微粒中所含的药重量} / \text{微粒的总重量} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \text{微粒中包封的药量} / \text{微粒中包封与未包封的总药量} \times 100\%$$

2.6. PLLA 微球体外释放检测

精密称取 BSA-PLLA 60 mg 置于预先处理好的透析袋中, 在袋中加入 2 mL 磷酸缓冲液(pH 7.2)溶液, 封口后将透析袋浸没于盛有 PBS 的试剂瓶中。试剂瓶置于 37 $^{\circ}$ C 水平恒温振荡器(频率 100 r/min), 开始计时。在预定的时间取样 1 mL, 同时补加 1 mL 空白 PBS, 采用 BSA 试剂盒测试 BSA 浓度。BMP-2 含量的测定采用酶联免疫吸附法定量检测试剂盒。用标准曲线求出药物浓度并换算成不同时间的计算累积释放率, 绘制累计释放量与时间的曲线。

2.7. PLLA 载药微球中二氯甲烷残留量的检测

精密称取 PLLA 载药微球 100 mg, 以二氯甲烷标准品为对照, 采用气相色谱顶空法检测其二氯甲烷残留量。

2.8. BMP-2-PLLA 微球中 BMP-2 生物活性的检测

BMP-2-PLLA 微球释放出的 BMP-2 的生物活性通过其对成骨细胞(MG63)碱性磷酸酶(ALP)合成的影响进行考察。将细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 置于 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱培养 24 小时, 然后按照实验分组: 1) 对照组: 仅加入培养基, 2) Free-BMP-2 组: 培养基中直接加入 BMP-2, 3) BMP-2-PLLA 组: 培养基中加入 BMP-2-PLLA 微球。培养 7 天, 采用 ALP 检测试剂盒检测细胞分泌 ALP 的浓度。

3. 结果

3.1. 不同制备条件对 PLLA 载药微球的影响

3.1.1. PLLA 分子量对 PLLA 载药微球的影响

不同 PLLA 分子量对 PLLA 载药微球粒径、载药量、包封率的影响见表 1。随着 PLLA 分子量的增大, 微球粒径逐渐增大, BSA 包封率逐渐减小而载药量逐渐增大。

3.1.2. PLLA 浓度对 PLLA 载药微球的影响

不同 PLLA 浓度对 PLLA 载药微球粒径、载药量、包封率的影响见表 2。随着 PLLA 浓度的增大, 微球粒径逐渐增大, BSA 包封率逐渐增大而载药量逐渐减小。

3.1.3. PEG 分子量对 PLLA 载药微球的影响

不同 PEG 分子量对 PLLA 载药微球粒径、载药量、包封率的影响见表 3。随着 PEG 分子量的增大, 微球粒径逐渐减小, BSA 包封率和载药量都逐渐增大。

3.2. BMP-2-PLLA 微球的表征

根据不同制备条件对 PLLA 载药微球粒径、载药量、包封率的影响, 为了制备大小适宜、包封率和载药量较高的 PLLA 载药微球, 最终选择分子量为 10 KDa, 浓度为 50 mg/mL 的 PLLA, 分子量为 4000 的 PEG 来制备 BMP-2-PLLA 微球。由图 1 可见, BMP-2-PLLA 微球的形态规则, 表面光滑, 大小均一。BMP-2-PLLA 微球的平均粒径为 4.815 μm, BMP-2-PLLA 微球的理论载药量为 $3.99 \times 10^{-3}\%$, 实际载药量为 $2.28 \times 10^{-3}\%$, 包封率为 70.88%。

3.3. PLLA 载药微球中二氯甲烷残留量

本研究以二氯甲烷标准品为对照, 采用顶空法测得 BMP-2-PLLA 微球中二氯甲烷残留为 0.0041%, 远低于中华人民共和国药典(2010)限度规定(0.06%)。由此可见, 本实验中所采用的制备方法和条件可以制得有机溶剂残留量低的常用的高分子微球。

3.4. PLLA 载药微球的体外释放检测

分别制备 BMP-2-PLLA 和 BSA-PLLA 载药微球, 在不同时间点检测溶出介质 PBS 中 BMP-2 和 BSA 的浓度, 计算累计释放率, 如图 2。24 小时, BMP-2 和 BSA 的累计释放率分别为 55.797% 和 45.976%; 7 天时, BMP-2 和 BSA 的累计释放率分别为 87.357% 和 77.789%; 14 天时, BMP-2 和 BSA 的累计释放率分别为 93.104% 和 83.451%; 21 天时, BMP-2 和 BSA 的累计释放率分别为 94.395% 和 90.268%。

3.5. 细胞合成 ALP 的检测

采用 ALP 检测试剂盒检测 MG63 细胞合成 ALP 的情况, 见图 3。细胞培养 1 天后, BMP-2-PLLA 载药微球中释放出的 BMP-2 较空白对照组和直接在培养液中加入 BMP-2 组, 显著促进 MG63 细胞合成 ALP ($P < 0.05$), 直接在培养液中加入 BMP-2 组与空白对照组没有显著差异。培养 7 天后, 直接在培养液中加入 BMP-2 和 BMP-2-PLLA 载药微球中释放出的 BMP-2 都能够显著促进 ALP 合成, 且 BMP-2-PLLA 微球中释放的 BMP-2 对 MG63 细胞合成 ALP 的诱导作用更加显著($P < 0.01$)。

Table 1. Mean size, drug loading and encapsulation efficiency of BSA-PLLA microspheres prepared in different PLLA Mw
表 1. 不同分子量 PLLA 制得的 BSA-PLLA 载药微球的粒径、载药量、包封率

PLLA Mw	10 KDa	50 KDa	100 KDa
粒径(μm)	2.409	4.771	45.825
载药量(%)	0.181	0.161	0.113
包封率(%)	76.201	78.101	78.573

Table 2. Mean size, drug loading and encapsulation efficiency of BSA-PLLA microspheres prepared in different PLLA concentrations
表 2. 不同浓度 PLLA 制得的 BSA-PLLA 载药微球的粒径、载药量、包封率

PLLA (mg/mL)	50	100	150
粒径(μm)	2.512	5.001	10.49
载药量(%)	0.164	0.135	0.109
包封率(%)	73.596	77.291	77.937

Table 3. Mean size, drug loading and encapsulation efficiency of BSA-PLLA microspheres prepared in different PEG Mw
表 3. 不同分子量 PEG 制得的 BSA-PLLA 载药微球的粒径、载药量、包封率

PEG Mw	400	1000	4000
粒径(μm)	6.550	2.989	2.583
载药量(%)	0.103	0.105	0.110
包封率(%)	58.881	75.291	76.948

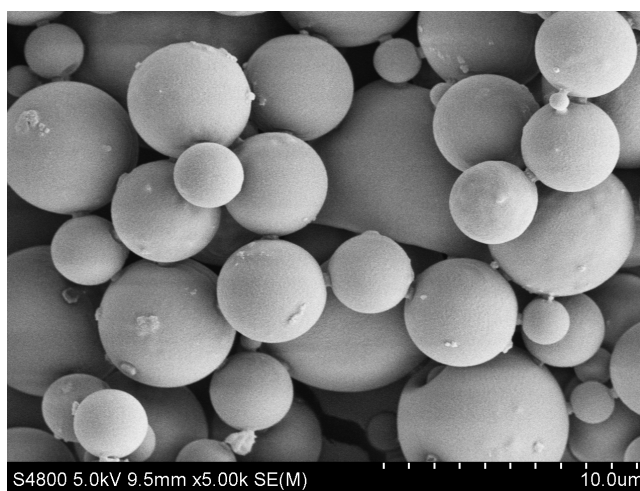


Figure 1. SEM photographs of BMP-2-PLLA
图 1. BMP-2-PLLA 载药微球的扫描电镜图

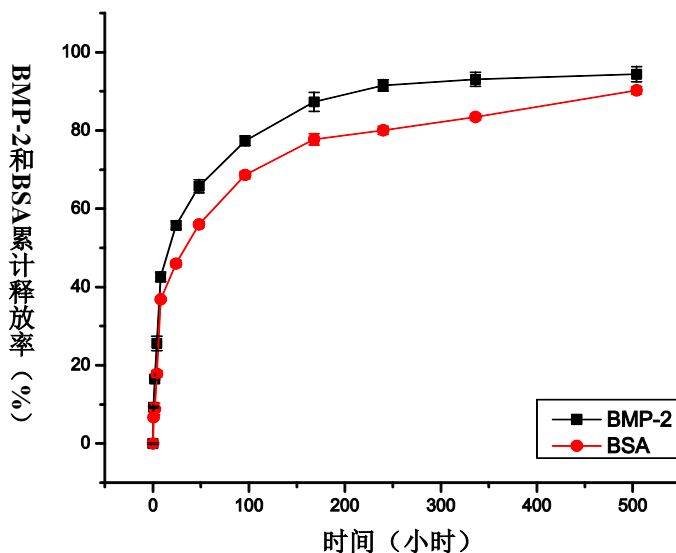


Figure 2. Drug release curves of BMP-2-PLLA, BSA-PLLA microspheres

图 2. BMP-2-PLLA、BSA-PLLA 载药微球的释放曲线

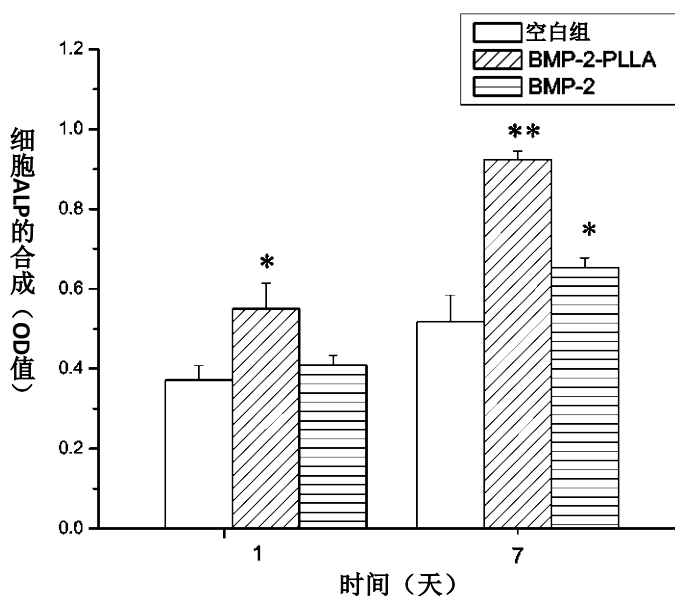


Figure 3. Biology activity of BMP-2 released from BMP-2-PLLA microspheres

图 3. BMP-2-PLLA 载药微球中释放出的 BMP-2 的生物活性

4. 讨论

利用具有骨诱导活性的人工骨促进大段骨缺损的修复和再生是近年来研究的热点[6]。将生长因子载入生物材料结合构建生长因子缓释微球应用于骨组织的再生和修复, 可以长期维持生长因子的生物活性和稳定性, 提高生物利用度, 降低给药频率, 使其在局部组织更好的更充分的发挥作用。利用 PLLA 作为生长因子缓释微球的主要制备材料, 不但具有良好的生物相容性, 对机体无毒无刺激, 而且制备的药物缓释载体稳定、可控、重复性好。

实验考察了乳化法制备 PLLA 载药微球过程中影响微球粒径、蛋白药物载药量和包封率的几个主要因素。结果表明, BSA-PLLA 微球的平均粒径与 PLLA 的相对分子量的大小有关。在实验考察范围内, BSA-PLLA 微球的平均粒径随着聚乳酸相对分子量的增大而增大。这是由于 PLLA 在二氯甲烷中溶解性良好, 相对分子量越低结晶度相对较低, 溶解度较大。在微球形成过程中, 随着二氯甲烷的挥发, 相对分子量低的 PLLA 沉积速率较慢, 成球速度较慢, 相对分子量较高的聚乳酸结晶度相对较高, 沉积速率快, 但随着分子量的增大, 但在乳化过程中油相的粘度就越大, 在其他条件相同的情况下, 致使乳化过程的分散程度降低, 增加了溶剂挥发过程中乳液液滴碰撞发生聚集的可能性, 从而产生一些粒径较大的微球[7]。载药量和包封率检测结果表明, 载药量 PLLA 相对分子量的增大而减小, 包封率随着 PLLA 相对分子量的增大而增大。原因是由于聚乳酸是一种疏水性高分子化合物, 其分子量越大, 疏水性越强, 水分子渗透引起药物流失的程度越小, 因此微球包封率相对增高[8]。另外, PLLA 浓度对微球的粒径、包封率和载药量的影响比较明显, 在一定范围内, 随着 PLLA 浓度的增大, 微球的粒径和包封率增大。PLLA 浓度的增大使得乳化过程中油相的粘度较大, 乳化过程的分散程度降低, 使微球的粒径增大。当 PLLA 浓度大于 100 mg/mL 后, 增加材料的用量对包封率的提高并不明显, 说明材料内加载的蛋白已达到极限。从 PEG 分子量对微球的影响可以看出, PEG-400 制备的 PLLA 载药微球粒径最大, PEG-1000 制备的胰蛋白酶 - 聚乳酸载药微球粒径最小。当 PEG 分子量大于 400 后所制备的微球粒径随着 PEG 分子量增大而增大。载药量和包封率随着 PEG 分子量的增大而增大。综合以上结果, 选择分子量为 10 KDa, 浓度为 50 mg/mL 的 PLLA, 分子量为 4000 的 PEG 来制备 BMP-2-PLLA 微球。制备的微球表面光滑, 形态规则, 大小均一。

理想的药物缓释载体应具有稳定的药物释放速率, 以达到药物最大的生物学性能[9]。从 PLLA 微球中 BMP-2 和 BSA 两种蛋白的累积释放曲线可以看出, 24 小时, BMP-2 和 BSA 的累计释放率分别为 55.797% 和 45.976%, 蛋白的释放都存在一定的突释现象。随后蛋白的释放持续且稳定, 7 天时, BMP-2 和 BSA 的累计释放率分别为 87.357% 和 77.789%; 然后, 蛋白的释放速率逐渐减慢, 14 天时, BMP-2 和 BSA 的累计释放率分别为 93.104% 和 83.451%。21 天时, BMP-2 和 BSA 的累计释放率分别为 94.395% 和 90.268%。BMP-2-PLLA 微球能够对生长因子起到缓释的作用, 且有效实现了 BMP-2 长期稳定缓慢释放。另有研究制备了载有 FGF-2 的 PLGA 缓释微球[10], 其蛋白的累计释放率在 13 天时约为 12%, 本研究中的蛋白释放速率较快。

保持生长因子的生物活性是本研究的关键。在 BMP-2-PLLA 微球的制备过程中, 需使用少量的有机溶剂, 但微球经过低温搅拌和反复洗涤后, 充分挥发去除了制备过程使用的二氯甲烷, 大大降低二氯甲烷的残留量, 减少或避免了有机溶剂可能带来的毒副作用, 最终制得有机溶剂残留量非常低的 PLLA 微球。从细胞 ALP 合成的结果可知, BMP-2-PLLA 对细胞 ALP 的合成具有显著地促进作用, 证明制备过程保持了 BMP-2 的生物活性。而且, BMP-2-PLLA 对细胞合成 ALP 的诱导作用较直接应用 BMP-2 水溶液更显著, 原因是 BMP-2-PLLA 中持续释放 BMP-2, 充分发挥了 BMP-2 的生物活性。

本研究制备的 BMP-2-PLLA 微球简单易行, 且能够持续缓慢释放 BMP-2 并有效地维持其的生物活性, 为构建多因子缓释系统, 发挥它们之间的协同调控作用奠定基础。

基金项目

国家自然科学基金资助项目(编号: 81401535)。

参考文献 (References)

- [1] Del, R.C., Rodriguez-Évora, M., Reyes, R., *et al.* (2015) BMP-2, PDGF-BB, and Bone Marrow Mesenchymal Cells in a

- Macroporous β -TCP Scaffold for Critical-Size Bone Defect Repair in Rats. *Biomedical Materials*, **10**, 045008.
- [2] Buchmann, S., Sandmann, G.H., Walz, L., *et al.* (2015) Growth Factor Release by Vesicular Phospholipid Gels: *In-Vitro* Results and Application for Rotator Cuff Repair in a Rat Model. *BMC Musculoskeletal Disorders*, **16**, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1186/s12891-015-0542-1>
- [3] Qi, Z.R., Zhang, Q., Tan, L.L., *et al.* (2014) Comparison of Degradation Behavior and the Associated Bone Response of ZK60 and PLLA *in Vivo*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **102**, 1255-1263. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.34795>
- [4] Bai, Y., Yin, G.F., Huang, Z.B., *et al.* (2013) Localized Delivery of Growth Factors for Angiogenesis and Osteogenesis in Tissue Engineering. *International Immunopharmacology*, **2**, 214-223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.04.001>
- [5] Han, F., Zhou, F., Yang, X., *et al.* (2014) Facile Preparation of PLGA Microspheres with Diverse Internal Structures by Modified Double-Emulsion Method for Controlled Release. *Polymer Engineering & Science*, **55**, 896-906. <http://dx.doi.org/10.1002/pen.23957>
- [6] Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M. and Ramirez-Vick, J.E. (2014) Scaffold Design for Bone Regeneration. *Journal of Nanoscience & Nanotechnology*, **14**, 15-56. <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2014.9127>
- [7] 马爱洁, 张玉祥, 陈卫星. 复相乳液法制备聚乳酸/胰岛素缓释微胶囊[J]. 西安工业大学学报, 2009, 29(4): 341-344.
- [8] 张万国, 胡晋红, 蒋雪涛, 等. 聚乳酸相对分子量对利福平微球及其药物分布状态的影响[J]. 解放军药理学学报, 2001,17(2): 59-61.
- [9] Maekawa, T. (2011) Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*, **2011**, 609-618.
- [10] 李素铠, 欧阳斌, 徐晓秋, 等. PLGA 纳米药物递送系统的建立及其对 bFGF 生物学活性的维持[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(11): 1319-1324.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>