

rhBMP-2 微球温敏型凝胶剂的药剂学特征 及对人 PDLCs 增殖的影响*

郭家平** ,王虎中 ,符旭东

(广州军区武汉总医院口腔科 湖北 武汉 430070)

[摘要] 目的 观察 rhBMP-2 微球温敏型凝胶的药剂学特征及对人牙周膜细胞(PDLCs)增殖的影响。方法 采用 W/O/W 型乳化溶剂挥发法以聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)为材料制备空白微球,通过吸附法制备 rhBMP-2 载药微球。以单甲基聚乙二醇-羟基乙酸共聚物(MPEG-PLGA)为材料制备凝胶,采用夹心酶联免疫吸附法测定释药速度。采用四唑盐比色法(MTT)及酶动力学法测定细胞增殖和碱性磷酸酶活性。结果 rhBMP-2 微球呈规则球形,表面多孔,粒径为(19.6±2.3)μm,微球凝胶剂相转变温度为 36℃左右,微球凝胶剂体外释药曲线符合 Higuchi 方程,28 d 的累积释药度为 80%。rhBMP-2 微球凝胶剂能明显促进牙周膜细胞的增殖和提高 ALP 活性,随时间推移在第 10 d 时 rhBMP 微球凝胶促 PDLCs 生长的作用明显强于 rhBMP 溶液。结论 rhBMP-2 微球温敏型凝胶剂具有明显的缓释特征,与溶液剂相比促进 PDLCs 增殖作用更持久。

[关键词] 骨形成蛋白;微球;温敏性凝胶;牙周膜细胞

[中图分类号] Q813.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1003-1634(2009)04-0212-03

Characteristics of recombinant human bone morphogenetic protein-2 Loaded microspheres/ thermosensitive hydrogels complex and its effects on proliferation of human periodontal ligament cells. GUO Jia-ping ,WANG Hu-zhong FU Xu-dong. Wuhan General Hospital of Guangzhou Command ,Hubei Wuhan 430070 ,China.

[Abstract] **Objective** :To study the characteristics of rhBMP-2 loaded microspheres / thermosensitive hydrogels complex and it effects on proliferation of human periodontal ligament cells. **Method** Blank microspheres were prepared with W/O/W emulsion solvent evaporation method. RhBMP-2 loaded microspheres was prepared with absorption method. Thermosensitive hydrogels were prepared with MPEG-PLGA. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine drug content and in vitro release rate. MTT method and enzyme dynamics method were used to observed PDLCs proliferation and ALP activity. **Result** rhBMP-2 microspheres possessed regular spheres with many posity on their surface ,the average diametes were (19.6±2.3)μm. The phase transformation temperature was about 36℃. The in vitro release profile of rhBMP-2 loaded microspheres / thermosensitive hydrogels complex conformed with Higuchi equation ,the cumulative release percentage was about 80% at day 28. RhBMP-2 loaded microspheres / thermosensitive hydrogels complex could significant promoted the prolifcation and improve ALP activity of PDLCs. The actions at day 10 of rhBMP-2 loaded microspheres / thermosensitive hydrogels complex was significant stronger than that of rhBMP-2 solution. **Conclusion** :RhBMP-2 loaded microspheres / thermosensitive hydrogels have distinct sustained release characteristic and it could prolong the action of promoting the proliferation and ALP activity of PDLCs compared with rhbmp-2 solution.

[Key words] bone morphogenetic protein ;microsphere ;thermosensitive hydrogel ;PDLCs

牙周组织再生的基础是牙周膜细胞(PDLCs),但在牙周损伤部位 PDLCs 的来源非常有限,以致牙周组织很难达到有效地再生和重建。骨形成蛋白(bone morphogenetic protein ,BMP)是目前发现的唯一能在体内诱导骨与软骨形成的细胞因子,业已证实 BMP 能够促进 PDLCs 增殖及牙周组织的修复^[1],但是 BMP 在体内温度和酶的作用下非常容易代谢失活,寻找适宜的递送系统一直是 BMP 的研究热点之一^[2]。聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)是聚酯类高分子材料,具有良好的

生物可降解性和组织相容性,以 PLGA 制备的微球或纳米粒剂作为 BMP 牙周袋局部治疗的载体受到青睐,但是这种给药系统存在明显的突释^[3,4],而且微粒剂用于牙周袋局部给药还存在使用不便等缺点。笔者以 PLGA 为材料制备 BMP 微球,将制备的微球分散在以聚乙二醇单甲醚 / 聚乳酸-乙醇酸共聚物(MPEG-PLGA)为材料制备的凝胶中,可降低 rhBMP-2 的突释,更好地控制药物的释放。本文主要报道了微球凝胶剂的制备、体外释药特征以及对牙周膜细胞增殖的影响。

* 基金项目 湖北省科技攻关计划(2005AA301C38)

** 通讯作者 郭家平 Tel / Fax (027)68878567

E-mail guojiaping1216@yahoo.com.cn

材料和方法

1 材料和仪器

人重组骨形成蛋白-2(rhBMP-2,北京环亚泰克生物医学技术有限公司) 端羧基聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA-COOH, 乳酸-羟基乙酸比例为 50:50, 分子量为 10000, 山东省医疗器械研究所) 聚乙二醇单甲醚/聚乳酸-乙醇酸共聚物(MPEG-PLGA) (LA:GA:EO 的比例是 8:2:1, 分子量 4000~5000, PEG 分子量 1000, 济南岱罡生物技术有限公司) 聚乙烯醇(PVA-124, 日产进口分装, 北京化学试剂公司) ;BMP-2 ELISA 试剂盒(武汉博士德试剂公司) ;DMEM(Gibco 公司, 美国)。

数显式电动搅拌机(上海司乐仪器有限公司) ;JY9202D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司) ;S-450 扫描电镜(Hitachi 公司, 日本) ;ALPHA1-4 冷冻干燥机(Christ, 德国) ;HTS7000 荧光紫外多孔板测定仪(意大利) ;HT2 酶标仪(Diocell 公司, 澳大利亚)。

2 实验方法

2.1 rhBMP-2 BMP 微球的制备

空白微球采用 W/O/W 乳化溶剂挥发法制备。取 0.4 ml 水加入到 2 ml 含有 200 mg PLGA-COOH 的二氯甲烷中, 冰浴条件下超声 30 s, 然后将其倒入 15 ml 3% 的 PVA 溶液中, 冰浴条件下 600 r/min 搅拌 10 min 后, 将转速降至 300 r/min 加入 35 ml 水, 在室温下继续搅拌 4 h, 然后过滤, 洗涤, 真空五氧化二磷干燥 48 h。

rhBMP-2 微球通过吸附法载药, 将 10 mg 空白微球混悬在 100 μ l 含 50 μ g/ml 的 rhBMP-2 2.5% 甘氨酸缓冲液中, 4 $^{\circ}$ C 下平衡 24 h 后冷冻干燥。

2.2 BMP 微球凝胶的制备

称取 MPEG-PLGA 4 g 置于 20 ml 0.1 mol/L pH=7.4 PBS 溶液中, 搅拌后静置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中, 并时时振荡, 待 MPEG-PLGA 充分溶胀后, 即得 20% MPEG-PLGA 水凝胶。取 10 mg 载药微球, 加入 0.5 ml 凝胶, 充分混匀, 即得 1%(w/v) rhBMP-2 的微球凝胶。

2.3 BMP 微球及微球凝胶剂体外释放度的测定

精密量取 0.1 ml rhBMP-2 微球凝胶若干份, 分别置于 1 ml 的离心管中, 加入 1 ml pH=7.4 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 置于恒温振荡器中, 振荡速度为 100 r/min、温度为 (37 \pm 1) $^{\circ}$ C, 分别在 0.5 h、1 d、3 d、5 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d 取样测定体外释放度。2000 r/min 离心 10 min 后, 弃掉上清液, 沉淀物中加入 1 ml PBS, 超声 15 min, 2000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液 0.1 ml 按 1:10 比例稀释后, 采用夹心酶联免疫吸附法测定样品中残留的药物, 通过标准曲线计算 BMP 的含量, 该方法的检测范围 62.5~4000 pg/ml, 每份样品平行测定 3 次。

2.4 微球粒径及表面形态观察

用光学显微镜及扫描电镜观察微球的外观形态, 测定不少于 200 个粒径, 计算算术平均粒径。

2.5 rhBMP-2 微球以及微球凝胶相转变温度的测定

采用文献报道的试管倒转法测定凝胶剂发生相转变的温度^[5]。取 1 ml 微球凝胶剂置于玻璃试管中, 水浴加热, 从 15 $^{\circ}$ C 开始逐渐升温, 当溶液变成近乳白色, 将试管取出记录温度, 倒转观察试管中液体的形态, 如果 30 s 中没有液体滑落, 就认为溶液已

经胶凝, 平行测定 3 次。

2.6 rhBMP-2 溶液和微球凝胶剂对人 PDLCs 增殖的影响

2.6.1 人 PDLCs 的体外培养 承蒙武汉大学口腔医学院惠赠第三代人牙周膜细胞, 接种于培养瓶中, 加入 10% FCS 的 DMEM 培养液, 在含 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养, 每 2 d 换液 1 次。当 PDLCs 长满瓶壁的 80% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化液进行传代, 取 5~7 代细胞用于实验。

2.6.2 rhBMP-2 溶液和微球凝胶剂对人 PDLCs 增殖的影响

取生长良好的第 5 代人 PDLCs, 将细胞浓度调整至 2 \times 10⁴/ml, 取 96 孔培养板每孔接种细胞悬液 100 μ l, 在饱和湿度、5% CO₂、空气、37 $^{\circ}$ C 标准环境下以含 10% FCS 的 DMEM 培养液孵育 48 h, 弃去培养液及未贴壁的 PDLCs。实验组分为三组: ① rhBMP 溶液组(含 BMP 200 ng/ml 的 2% FCS 的 DMEM); ② rhBMP-2 凝胶组(含 BMP 200 ng/ml 的 2% FCS 的 DMEM); ③ 对照组(不含 rhBMP-2 的 2% FCS 的 DMEM)。每组均取 6 孔, 每孔液量 200 μ l, 标准环境孵育。分别在 3 d、7 d 和 10 d, 每孔再加入 20 μ l MTT 溶液, 继续孵育 4 h。弃去培养液, 每孔加入 150 μ l 的二甲基亚砜并振荡 10 min, 在酶标仪选择 490 nm 测定吸光度 A。

2.6.3 rhBMP-2 溶液和微球凝胶剂对碱性磷酸酶活性的影响

在第 3 d、7 d 和 10 d 时, 各孔弃上清, Hank's 液冲洗 3 次, 吸干, 每孔加入 50 μ l 的 1 mol/L Triton-100, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜, 用吸管反复吹打, 镜下观察已无完整细胞结构后每孔加入标准底物液(含对硝基苯酯二钠盐和氯化镁) 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 30 min, 1 mol/L 氢氧化钠溶液终止反应, 在酶标仪上选择 405 nm 测定 A 值。

2.6.4 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验组与空白组差异比较采用 t 检验, $p < 0.05$ 为差异显著, $p < 0.01$ 为差异特别显著。

结 果

1 rhBMP-2 微球外观形态

微球球形规则, 表面多孔, 平均粒径在 (19.6 \pm 2.3) μ m (见图 1)。

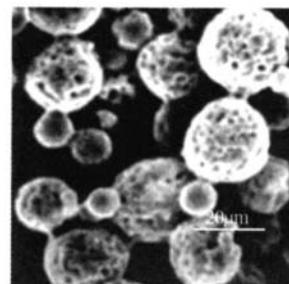


图 1 BMP 微球的扫描电镜照片

2 rhBMP-2 微球凝胶相转变温度

rhBMP-2 微球凝胶发生胶凝化的温度为 36 $^{\circ}$ C, 在此温度以下微球凝胶剂呈自由流动的液体状态。

3 rhBMP-2 微球以及微球凝胶复合系统的释药曲线

rhBMP-2 微球表现出三相释药模式^[6]：①.第 0~1 d 的快速释放期；②.第 1 d~5 d 的时滞期药物释放速度非常缓慢；③.第 5 d~14 d 后释药速度明显加快。BMP 微球凝胶剂没有表现出明显的三相释药模式，体外曲线符合 Higuchi 方程 $r=0.9884$ 。其突释明显低于微球剂(见图 2)。

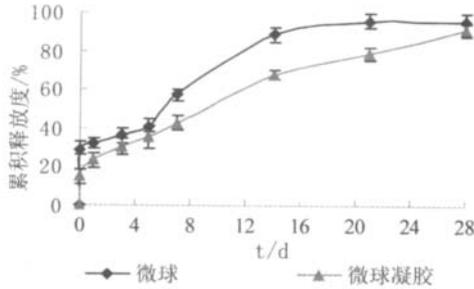
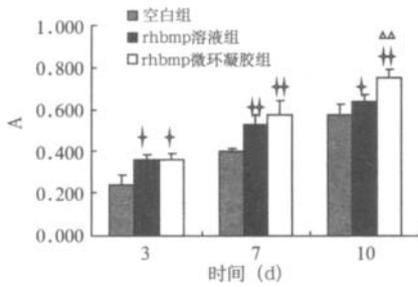


图 2 rhBMP-2 微球以及微球凝胶复合系统体外释药曲线

4 rhBMP-2 溶液和微球凝胶剂对人 PDLCs 的增殖作用

rhBMP 溶液和微球凝胶剂均能明显促进人 PDLCs 的生长 ($p < 0.05$)，但是随时间推移在第 10 d 时 rhBMP 微球凝胶促 PDLCs 生长的作用明显强于 rhBMP 溶液($p < 0.01$)(见图 3)。

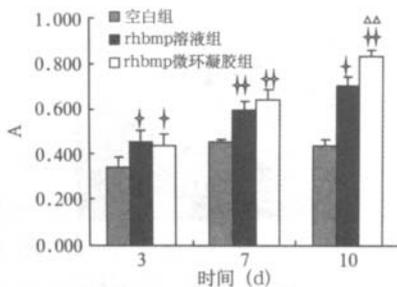


与空白组相比 $^{\dagger}p < 0.05$ $^{\ddagger}p < 0.01$;
与 rhbmp 溶液组相比 $^{\Delta}p < 0.05$ $^{\Delta\Delta}p < 0.01$

图 3 rhBMP-2 溶液和微球凝胶剂对人 PDLCs 增殖的影响

5 rhBMP-2 溶液和微球凝胶剂对人 PDLCs 和 ALP 活性的影响

rhBMP-2 溶液和凝胶在第 3 d 即可显著提高 ALP 活性 ($p < 0.05$)，在孵化 10 d 后 rhBMP-2 微球凝胶剂 ALP 活性明显高于 rhBMP-2 溶液($p < 0.01$)(见图 4)。



与空白组相比 $^{\dagger}p < 0.05$ $^{\ddagger}p < 0.01$;
与 rhbmp 溶液组相比 $^{\Delta}p < 0.05$ $^{\Delta\Delta}p < 0.01$

图 4 rhBMP-2 溶液和微球凝胶剂对人 PDLCs 的 ALP 活性的影响

讨 论

rhBMP-2 微球表面和内部多孔。由于 rhBMP-2 是通过吸附载药，这种多孔的结构有助于 rhBMP-2 溶液与微球充分接触，有利于药物被微球吸附。MPEG-PLGA 具有温敏性，20%的 MPEG-PLGA 水溶液在室温下为自由流动的液态，便于给药，在体温下可发生胶凝而起到控制药物释放的作用。

rhBMP-2 微球凝胶剂没有表现出明显的三相释药模式，体外曲线符合 Higuchi 方程，其突释明显低于微球剂。这是因为室温 20℃左右凝胶为自由流动的液体状态，微球与凝胶溶液混合时，凝胶溶液能很快渗透到微球内部，当温度升高至体温附近时，渗入微球内部的凝胶溶液发生胶凝，可阻止 BMP 在释药初期的突释。rhBMP-2 微球凝胶剂在 5~14 d 也没有像微球剂那样呈现快速释放的特征，是因为凝胶层阻止了水分的渗透，PLGA 降解速度减慢所致。

随着时间推移，rhBMP-2 微球凝胶组促 PDLCs 增殖作用和提高 ALP 活性的作用都明显强于溶液组，rhBMP-2 容易受温度和酶的作用而降解，将 rhBMP-2 包裹在微球并分散在凝胶中可以有效地降低 rhBMP 失活，其生物活性因此得以延长。

[参 考 文 献]

- [1] 林敏魁, 闫福华. 重组人骨形成蛋白-2 及其在牙周组织工程中的应用[J]. 国外医学口腔医学分册, 2004, 2(31):104-106.
- [2] 刘竟成, 孙磊. 骨形成蛋白缓释的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 2(11): 257-258.
- [3] Schrier JA, Deluca PP. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 binding and incorporation in PLGA microsphere delivery systems[J]. Pharm Develop and Tech, 1999, 4(4): 611-621.
- [4] Schrier JA, Deluca PP. Porous bone morphogenetic protein-2 microspheres polymer binding and in vitro release [J]. AAPS Pharm-scitech, 2001, 2(3): 17.
- [5] Chung Yong-Il, Ahn KM, Jeon SH et al. Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex [J]. J of Control Release, 2007, 121: 91-99.
- [6] Zolnik BS, Burgess DJ. Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres [J]. J Control Release, 2008, 21: 127(2): 137-145.

收稿日期 2008-12-10