

聚电解质逐层组装的微凝胶脉冲制剂的体内外释放研究

周闰臣^{1,2}, 鲁莹¹, 张翮¹, 俞媛¹, 陈琰¹, 张国庆², 孙治国¹, 黄景彬¹, 于菲菲¹, 邹豪^{1*}, 钟廷强^{1*}

1. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

[摘要] **目的** 制备聚电解质逐层组装的壳聚糖海藻酸钠微凝胶, 考察体外释放规律, 观察体内释放过程。**方法** 使用高压静电成囊机制备海藻酸钠壳聚糖微凝胶核心, 通过静电吸附原理将聚电解质逐层包裹在微凝胶表面形成包衣层; 考察不同物料比例、包衣层数对体外释药性能的影响; 小鼠皮下注射制剂后, 制备组织切片观察体内释放过程。**结果** 海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、聚电解质包衣层数影响脉冲释放时滞以及及时滞后释放速度。**结论** 聚电解质逐层组装的微凝胶脉冲制剂, 体外释药性能可灵活调控, 体内释药可见, 并且制剂安全, 生物相容性好。

[关键词] 聚电解质; 微凝胶; 脉冲释药; FITC-dextran

[中图分类号] R 943.41

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)11-1218-05

Pulsed release behavior of microgels coated layer-by-layer by polyelectrolyte *in vivo* and *in vitro*

ZHOU Gui-chen^{1,2}, LU Ying¹, ZHANG He¹, YU Yuan¹, CHEN Yan¹, ZHANG Guo-qing², SUN Zhi-guo¹, HUANG Jing-bin¹, YU Fei-fei¹, ZOU Hao^{1*}, ZHONG Yan-qiang^{1*}

1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To investigate the *in vitro* and *in vivo* release of chitosan-alginate microgels coated layer-by-layer by polyelectrolyte self-assembly. **Methods** The cores of the microgels were made by gelatinization using electrostatic microencapsulated and coated by polyelectrolytes using electrostatic attraction. The effects of different layers and ratios of polymer on the *in vitro* release of FITC-dextran were evaluated. Histological examination was carried out to observe the *in vivo* release process by injecting the coated microgels into mice. **Results** The results showed that alginate and calcium chloride concentrations and polyelectrolyte layers markedly affected the lag time of pulsed release and the releasing speed after lagging. **Conclusion** The release of microgels coated layer-by-layer by polyelectrolyte can be controlled *in vitro* and can be observed *in vivo*; meanwhile, the microgels are safe and have good biocompatibility.

[Key words] polyelectrolyte; microgels; pulsed drug delivery; FITC-dextran

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11):1218-1222]

随着生物药剂学的发展和某些疾病治疗的特殊性, 越来越需要一种能够准确定时、定量释放药物的释药系统, 它不仅适用于支气管哮喘、心肌梗死、心绞痛、风湿性疾病、胃溃疡、糖尿病、注意力缺陷综合征、胆固醇过多、高血压等具有明显时效药理学特征的疾病, 而且还适用于疫苗的输送^[1-6]。

以往的研究中, 我们设计了一种能够自主释放的新型脉冲释药系统^[7]。它由可生物降解高分子构成的可膨胀核心以及聚电解质包衣层组成, 当内部膨胀导致包衣破裂时, 药物大量释放出来。我们对

这种脉冲制剂在体外药物的定时、定量释放, 以及在体内的释放过程开展研究。另外根据临床治疗目的, 对该制剂的释放时滞以及时滞后的释放速度进行调整, 并对影响该制剂释放的影响因素进行分析。聚电解质包衣层是一种半透膜, 它只允许水分子通过, 而微凝胶核心的降解产物和药物分子不能通过, 使这种体系降解和膨胀压共同形成的脉冲制剂有一个药物不释放的时滞期。本研究考察了聚电解质包衣层对药物分子渗透性的影响, 将为药物和包衣层厚度的选择提供参考。

[收稿日期] 2011-07-21

[接受日期] 2011-09-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30801441)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30801441)。

[作者简介] 周闰臣, 硕士。E-mail: catzgc@163.com

* 通信作者(Corresponding authors)。Tel: 021-81871287, E-mail: mrzou@sina.com; Tel: 021-81871285, E-mail: yqzhong68@163.com

1 试剂和仪器

FITC 标记的葡聚糖 (FITC-dextran, 40 000, 250 000, 2 000 000, 美国 Sigma 公司); 聚烯丙基胺盐酸盐 (PAH, 56 000, 美国 Sigma 公司); 聚 4-苯乙炔磺酸钠 (PSS, 70 000, 美国 Sigma 公司); 罗丹明 (RBITC, 美国 Sigma 公司); 海藻酸钠 (化学纯, 国药集团化学试剂有限公司); 壳聚糖 (食品级, 浙江金壳生物有限公司)。SHZ-88 台式水浴恒温振荡器 (江苏太仓实验设备厂); 高压静电场微胶囊成型装置 (上海理工大学); F-7000 荧光分光光度计 (日本日立公司); 85-2 恒温磁力搅拌器 (上海闵行虹浦仪器厂); 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); TS5136MM 扫描电镜 (捷克 TESCAN 公司); Zetasizer nano ZS, Mastersizer2000 (英国 Malvern 公司)。实验用小鼠购自第二军医大学实验动物中心。

2 方法和结果

2.1 聚电解质包衣层的渗透性考察 将未包衣的微凝胶、(PSS/PAH)₂、(PSS/PAH)₄、(PSS/PAH)₆ 包衣的微凝胶, 置于 24 孔板中, 分别用不同相对分子质量 1 mg/ml 的 FITC-dextran 溶液孵育, 于摇床上以每分钟 100 转的速度振摇 30 min。分别于不同孔中取少量微凝胶, 在共聚焦显微镜下观察, 结果见图 1。

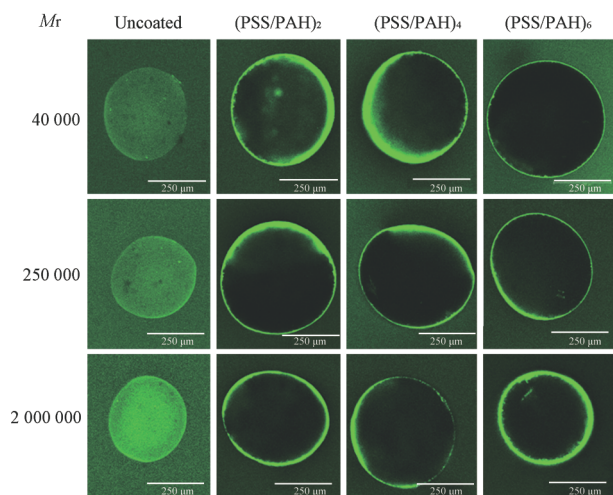


图 1 聚电解质包衣层的渗透性考察

Fig 1 Permeability of layers of coated microgels and uncoated microgels

微凝胶在 FITC-dextran 溶液中孵育 30 min 之后, 未包衣微凝胶内部已经充满 FITC-dextran, 随着聚电解质包衣层数的增多, 包衣层的渗透性逐渐降低。相对分子质量较低的 FITC-dextran 更容易通过聚电解质包衣层, 所以同样是 (PSS/PAH)₂ 或者 (PSS/PAH)₄ 包衣的微凝胶, 相对分子质量为 40 000 的药物

溶液扩散进入微凝胶的含量相比 250 000 和 2 000 000 较高。但是当包衣层数达到 12 层 (即 (PSS/PAH)₆ 包衣) 时, 低相对分子质量和高相对分子质量的 FITC-dextran 都无法通过聚电解质包衣层。

2.2 单因素考察微凝胶的膨胀性能和包衣微凝胶的释放行为

2.2.1 海藻酸钠浓度对微凝胶核心膨胀性能及聚电解质包衣微凝胶释放行为的影响 固定壳聚糖浓度为 0.2%, 壳聚糖相对分子质量为 100 000, 氯化钙浓度为 2%, 包衣材料浓度为 PSS 1 mg/ml (含 0.5 mol/L NaCl), PAH 1 mg/ml (含 0.5 mol/L NaCl), 包衣层数为 (PSS/PAH)₄, 改变海藻酸钠浓度 (1.5%, 2.0%, 2.5%) 分别制备未包衣微凝胶核心和包衣微凝胶, 见图 2A、2B。结果显示, 微凝胶核心的膨胀性能和聚电解质包衣微凝胶的释放行为变化规律有一定的相关性, 随着微凝胶中海藻酸钠浓度的增加, 微凝胶的膨胀性增大, 胀破外包衣层的时间缩短, 即时滞较短; 时滞后药物的释放速度差异有统计学意义 (*t* 检验, $P < 0.05$)。

2.2.2 壳聚糖浓度和相对分子质量对微凝胶核心膨胀性能及聚电解质包衣微凝胶释放行为的影响 固定其他制备条件, 改变壳聚糖浓度 (0.1%, 0.2%, 0.5%) 或相对分子质量 (20 000, 100 000, 200 000) 分别制备未包衣微凝胶核心和包衣微凝胶, 见图 2C~2F。结果显示, 壳聚糖浓度和相对分子质量对微凝胶核心的膨胀性能和药物的释放行为没有明显影响。

2.2.3 氯化钙浓度对微凝胶核心膨胀性能及聚电解质包衣微凝胶释放行为的影响 固定其他制备条件, 改变氯化钙浓度 (1%, 2%, 4%), 分别制备未包衣的微凝胶核心和包衣微凝胶, 见图 2G、2H。结果显示, 随着钙离子浓度的增加, 微凝胶的膨胀性能增大, 聚电解质包衣微凝胶的释放时滞减小 (*t* 检验, $P < 0.05$)。

2.2.4 包衣层数对聚电解质包衣微凝胶释放行为的影响 固定其他制备条件, 改变包衣层数制备包衣微凝胶, 见图 2I。结果显示, 随着聚电解质包衣层数的增多, 释放时滞延长 (*t* 检验, $P < 0.05$)。

2.2.5 包衣液中聚电解质与氯化钠含量比对聚电解质包衣微凝胶释放行为的影响 固定其他制备条件, 改变包衣液中聚电解质和氯化钠的比例分别为: 1:1 (PSS/PAH 1 mg/ml, 含 NaCl 1 mol/L)、2:1 (PSS/PAH 1 mg/ml, 含 NaCl 0.5 mol/L)、4:1 (PSS/PAH 1 mg/ml, 含 NaCl 0.25 mol/L) 制备包衣微凝胶进行体外释放实验, 见图 2J。结果显示, 改变包衣液中聚电解质和氯化钠浓度的比例, 释放行为变化不明显。

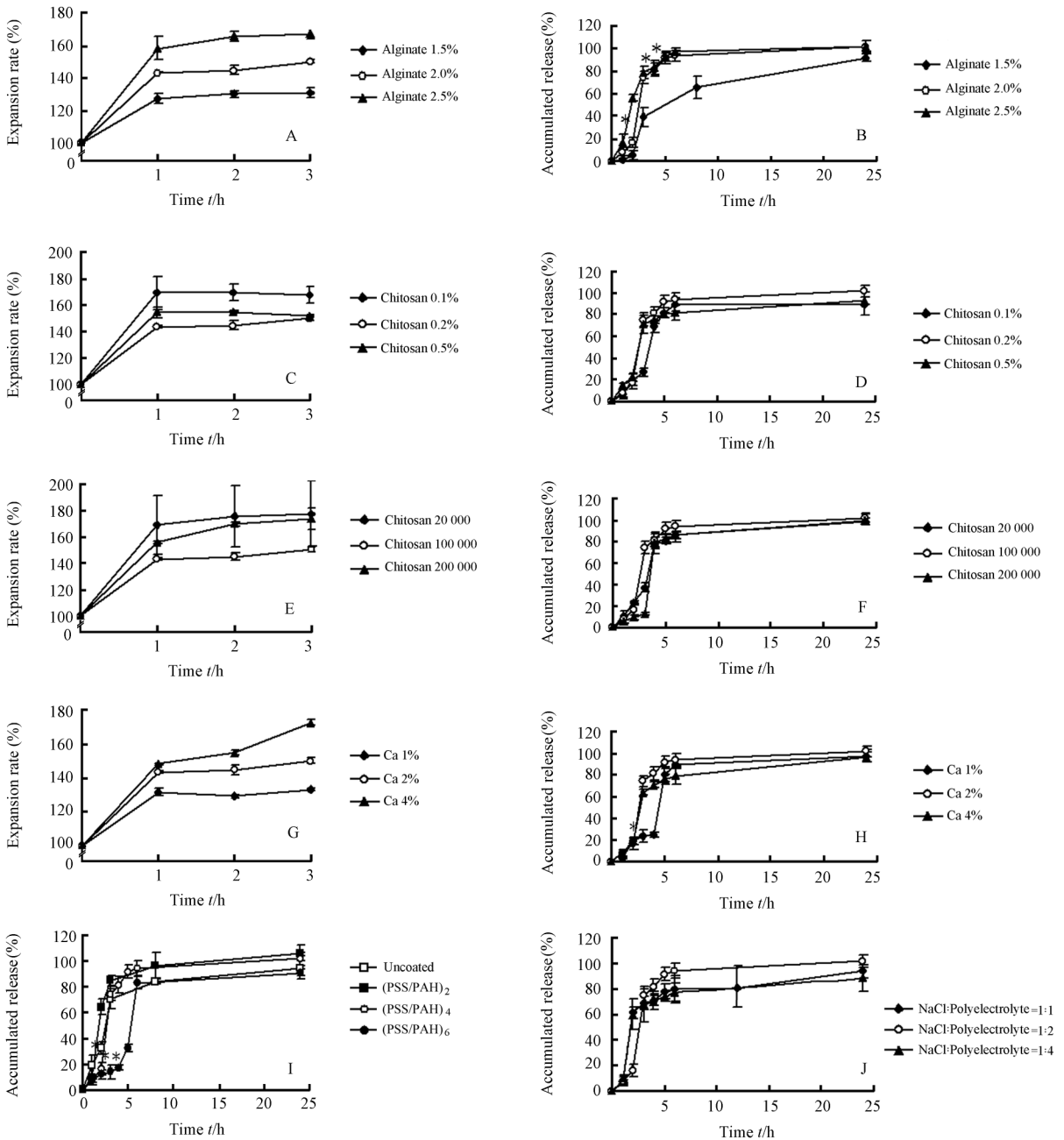


图2 不同因素对微凝胶原胀性能及聚电解质包衣微凝胶原体外释放行为的影响

Fig 2 Effects of various impact factors on expansion property and release behavior of FITC-dextran *in vitro*

A, B: Concentration of alginate, * $P < 0.05$ vs alginate 1.5%; C, D: Concentration of chitosan; E, F: Molecular weight of chitosan; G, H: Concentration of calcium chloride, * $P < 0.05$ vs calcium chloride 1%; I: Layers, * $P < 0.05$ vs uncoated; J: Ratio of NaCl and polyelectrolytes. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 聚电解质包衣微凝胶原体的体内释放过程观察^[8] 将载 FITC-dextran(2 000 000)包衣微凝胶原体[海藻酸钠浓度 2%,壳聚糖相对分子质量 100 000,壳聚糖浓度 0.2%,氯化钙浓度 2%,聚电解质浓度 1 mg/ml(含 NaCl 0.5 mol/L), (PSS-RBITC/PAH)₄]在紫外灯下辐照 15 min,用脱毛膏将小鼠的侧腹部脱毛,取 0.2 ml 包衣微凝胶原体注射于小鼠两

侧腹部皮下。在 1、3、4 h 后,各处死 1 只小鼠,立即取下包围在微凝胶原体周围的皮下组织,切成 8 μm 厚的冷冻切片,在激光共聚焦显微镜下观察聚电解质包衣微凝胶原体变化过程。6 h 后处死 1 只小鼠,取下包围在微凝胶原体周围的新鲜皮下组织,置于 4% 多聚甲醛中 4℃ 条件下保存 24 h。组织以梯度浓度的乙醇溶液脱水后,切成 4 μm 薄片,DAPI 染色,加 1 滴抗荧

光淬灭剂, 石蜡包埋, 在激光共聚焦显微镜下观察药

物的释放情况。结果见图 3。

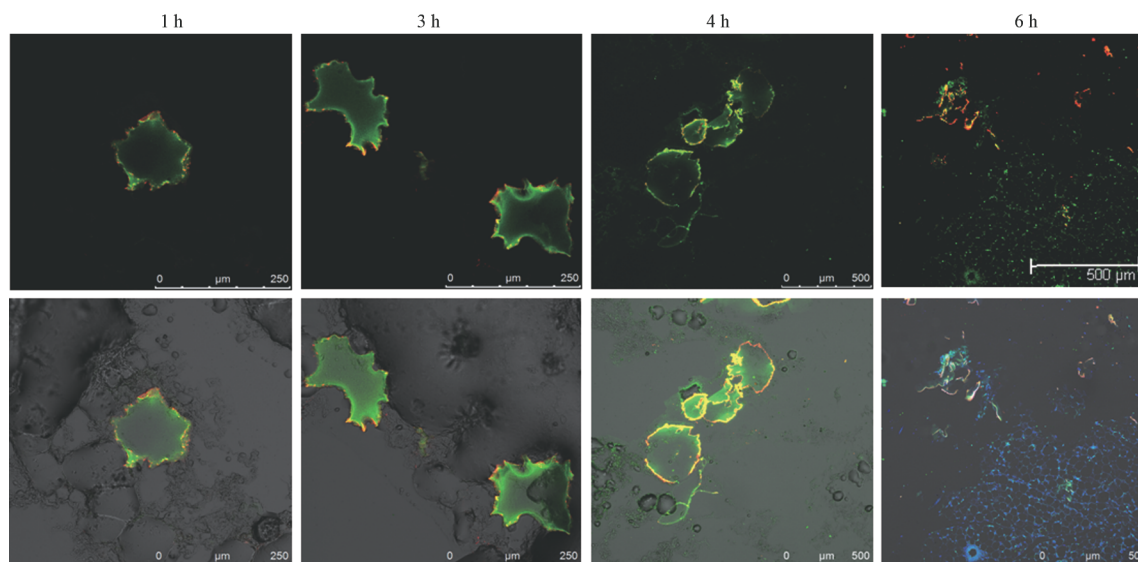


图 3 聚电解质包衣微凝胶注射至小鼠皮下后不同时间点的小鼠组织切片图

Fig 3 Confocal images of tissue sections taken at different time points after subcutaneous injection of microgels into mice

The blue fluorescence is due to DAPI, which selectively stains the cell nuclei. The microgels were loaded with 2 000 000 FITC-dextran (green colour) and the PAH was labelled with RBITC (red color). Upper: Confocal laser scanning microscope; Lower: The corresponding bright field microscope

图 3 可见, 聚电解质包衣微凝胶经小鼠皮下注射后, 1 h 时基本保持圆整形态; 3 h 后包衣微凝胶开始变形, 但是聚电解质膜结构仍然保持完整, 药物仍然储存在制剂内部; 4 h 时, 包衣微凝胶已经开始破裂, 并有少量药物释放, 推测体内释药时滞应该在 3~4 h; 6 h 后, 药物几乎全部释放, 聚电解质层破裂, 包衣微凝胶结构彻底坍塌, 药物释放到皮下组织中。

体内释放时滞(约 3~4 h)相比该处方的体外释放时滞(2.67 h)有所延迟, 基于微凝胶的软性胶体囊状结构, 分析此现象的原因可能是包衣微凝胶注射至体内初期, 受皮层及组织的外力挤压, 球体有所收缩; 而且体内的体液相对体外释放液较少, 使微凝胶经历了压缩失水, 再到膨胀的过程, 从而延迟了包衣微凝胶在体内膜胀破、药物释放的时间。

2.4 组织刺激性实验 将聚电解质包衣微凝胶注射于小鼠侧腹部皮下, 在 6 h 后处死小鼠, 立即取下包围在微凝胶周围的皮下组织, 置于 4% 多聚甲醛固定液中 4℃ 条件下保存 24 h, 组织依次以梯度浓度的乙醇溶液脱水, 然后切成 4 μm 薄片, 苏木精-伊红(H-E)染色, 石蜡包埋后于光学显微镜下观察。同时, 取另 1 只小鼠注射生理盐水作为对照组。结果见图 4。

图 4 中 A2 是已经破裂的包衣微凝胶, 此时药物已经释放。注射制剂部位的皮下细胞(A1)与注射生

理盐水的皮下细胞(B1)相比, 未出现任何异常, 给药部位周围组织未出现组织损伤和坏死, 也没有炎症反应以及血管增生, 说明制剂安全, 生物相容性好。

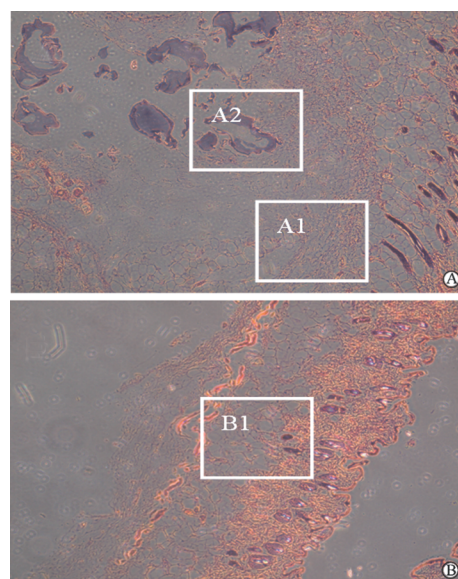


图 4 注射聚电解质包衣微凝胶(A)和生理盐水(B)6 h 后, H-E 染色的小鼠皮下组织切片图

Fig 4 H-E staining of tissue sections taken 6 h after subcutaneous injection of coated microgels (A) and normal saline (B)

A1: Morphology of cells around injection site of coated microgel; A2: Polyelectrolyte coated microgels; B1: Morphology of cells around injection site of normal saline. Original magnification: ×200

3 讨论

本研究考察了高分子材料、聚电解质包衣层数对微凝胶核心膨胀性能及聚电解质包衣微凝胶释放行为的影响。结果显示,膨胀压的变化规律和释放行为规律有相关性。能够产生较高膨胀压的微凝胶核心,更容易胀破外包衣层,产生的释放时滞相对较小。低相对分子质量的壳聚糖由于分子结构链较短,在与海藻酸钠成囊过程中更容易克服高分子之间的空间位阻,形成致密结构,一定程度上阻碍了微凝胶的膨胀,高浓度的壳聚糖也起到了同样的阻碍作用,但是壳聚糖本身具有膨胀性能,尤其是在 pH 7.4 环境中,壳聚糖的不溶解性增加了微凝胶的不稳定因素,更有文献证明,壳聚糖的加入使得微凝胶的膨胀性增加了 30%^[9-10]。因此对壳聚糖浓度以及相对分子质量考察的实验结果,受到以上 2 个因素的影响,在不同的情况下,二者的影响程度大小不同,难以找出明确的规律。钙离子浓度的增加,增大了微凝胶的膨胀性能,这是由于在体外释放实验中,钙离子有与 PBS 溶液中磷酸根离子结合成磷酸钙络合物的趋势。但是基于体内更复杂的环境,这种现象在体内释放实验中,尚待证实^[11-12]。由于聚电解质的机械强度,增加聚电解质包衣层的厚度,能明显延长时滞,但是相比之下包衣液比例的影响程度不明显,可能是由于氯化钠的离子强度变化也同时影响了聚电解质的吸附量。包衣层数和包衣液的比例都不是影响时滞而释放快慢的主要因素。这是由于药物储存于微凝胶核心中,药物与微凝胶中高分子网络结构的关系,影响了时滞后药物释放的快慢。

体内考察中,由于微凝胶是内部充满溶液的囊状结构,在制作切片过程中,应尽量减少脱水 and 切割等外力作用对其形态的影响,所以在微凝胶注射至皮下初期,为观察到真实形态,采取冷冻切片的方式。在聚电解质包衣微凝胶破裂释放后,为方便观察药物释放到皮下组织的位置,采用 DAPI 染色的石蜡切片。尽管如此,聚电解质包衣微凝胶注射至动物皮下初期,圆整程度依然受损,这是动物的运动、皮下组织挤压,以及手术取组织过程中的外力作用所致。制剂注射 3 h 后,由于体内酶、细胞、组织液等作用,微凝胶开始变形,但是聚电解质包衣层的机械刚性使得药物仍然大量贮存于制剂中。6 h 后,随着微凝胶内部压力的增大,外包衣层胀破,大量药物释放,并且药物深入至皮下细胞间隙以及细胞核。该过程验证了聚电解质包衣微凝胶的理论释放机制。

由于聚电解质包衣层是一种半透膜,对于大分子药物有很大的应用价值。不仅可以

根据治疗目的控制释放,而且可以保护大分子蛋白药物的活性。这一点,很适合疫苗药物的输送。但是对于相对分子质量 70 000 以下的较小分子药物来说有一定的局限^[13],它们可以透过聚电解质包衣层,这时需要调整包衣层的密度或者选择其他分子结构合适的包衣材料。

本实验从建立新型脉冲释药系统到确证其结构,再到验证其体内外释放行为,充分展示了该制剂不依赖外界因素触发,可定时定量自主释放药物的优点。

[参考文献]

- [1] Stubbe B G, De Smedt S C, Demeester J. "Programmed polymeric devices" for pulsed drug delivery[J]. *Pharm Res*, 2004, 21:1732-1740.
- [2] Mastiholimath V S, Dandagi P M, Jain S S, Gadad A P, Kulkarni A R. Time and pH dependent colon specific, pulsatile delivery of theophylline for nocturnal asthma[J]. *Int J Pharm*, 2007, 328:49-56.
- [3] Gazzaniga A, Palugan L, Foppoli A, Sangalli M E. Oral pulsatile delivery systems based on swellable hydrophilic polymers[J]. *Eur J Pharmaceut Biopharm*, 2008, 68:11-18.
- [4] De Geest B G, Stubbe B G, Jonas A M, Thienen T V, J. Hinrichs W L, Demeester J, et al. Self-exploding lipid-coated microgels[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7:373-379.
- [5] Stubbe B G, Horkay F, Amsden B, Hennink W E, De Smedt S C, Demeester J. Tailoring the swelling pressure of degrading dextran hydroxyethyl methacrylate hydrogels[J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4:691-695.
- [6] Stubbe B G, Braeckmans K, Horkay F, Hennink W E, De Smedt S C, Demeester J. Swelling pressure observations on degrading dex-HEMA hydrogels[J]. *Macromolecules*, 2002, 35:2501-2505.
- [7] 周闰臣, 鲁莹, 张翻, 俞媛, 陈琰, 张国庆, 等. 聚电解质逐层组装的微凝胶脉冲释药系统的研制[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32:1213-1217.
Zhou G C, Lu Y, Zhang H, Yu Y, Chen Y, Zhang G Q, et al. Preparation of polyelectrolyte layer-by-layer coated microgels for pulsed drug delivery[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2011, 32:1213-1217.
- [8] De Geest B G, De Koker S, Demeester J, De Smedt S C, Hennink W E. Pulsed *in vitro* release and *in vivo* behavior of exploding microcapsules[J]. *J Contr Rel*, 2009, 135:268-273.
- [9] Van Thienen T G, Horkay F, Braeckmans K, Stubbe B G, Demeester J, De Smedt S C. Influence of free chains on the swelling pressure of PEG-HEMA and dex-HEMA hydrogels[J]. *Int J Pharm*, 2007, 337:31-39.
- [10] Kiser P F, Wilson G, Needham D. Lipid-coated microgels for the triggered release of doxorubicin[J]. *J Contr Rel*, 2000, 68:9-22.
- [11] 胡波, 金仙华, 谭天伟. 敏感壳聚糖-海藻酸钠复合水凝胶的溶胀特性及应用[J]. *中国临床康复*, 2004, 8:2162-2163.
- [12] Aranaz I, Acosta N, Heras A. Encapsulation of an *Agrobacterium radiobacter* extract containing d-hydantoinase and d-carbamoylase activities into alginate-chitosan polyelectrolyte complexes preparation of the biocatalyst [J]. *J Mol Catalysis B Enzym*, 2009, 58:54-64.
- [13] De Geest B G, Sanders N N, Sukhorukov G B, Demeester J, De Smedt S C. Release mechanisms for polyelectrolyte capsules[J]. *Chem Soc Rev*, 2007, 36:636-649.