

载 BSA 壳聚糖纳米纤维体外缓释的研究*

徐瑞芬¹, 赵清侠¹, 陈欣¹, 郑星星¹, 冯旭阳²

(1. 陕西省人民医院麻醉科, 西安 710068;

2. 第四军医大学附属西京医院心脏内科, 西安 710032)

摘要:目的 探讨体外不同因素对载 BSA 壳聚糖纳米纤维缓释的影响。方法 利用层层自组装技术, 制备壳聚糖及壳聚糖-有机累托石纳米纤维, 以 BSA 为模型蛋白, 探讨 pH 值、自组装层数及加入有机累托石对复合材料药物缓释的影响。结果 最初 1 h 只有少量的 BSA 释放, 8 h 达到最高峰。在相同的自组装层数以及测试时间点, PBS 溶液中 BSA 的缓释量要大于盐酸溶液中的释放量。pH 1.2 和 pH 7.4 条件下, 自组装 5, 5.5 层与 10, 10.5 层相比较, 蛋白的释放量差异无统计学意义($t=0.651\sim 1.324, P>0.05$)。加入 OREC 后, BSA 释放量明显增加($t=2.264\sim 2.305, P<0.05$)。结论 BSA 的释放受到环境的 pH 值、自组装层数、释放时间, 以及是否加入 OREC 等因素的综合影响。

关键词:壳聚糖; 纳米纤维; 缓释

中图分类号: R318.08 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)04-119-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.034

Study on the Sustained Release of BSA from Chitosan-OREC/BSA Films Coated Mats in Vitro

XU Rui-fen¹, ZHAO Qing-xia¹, CHEN Xin¹, ZHENG Xing-xing¹, FENG Xu-yang²

(1. Department of Anesthesia, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China;

2. Department of Cardiology, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the sustained release of BSA from chitosan-OREC/BSA films coated mats in vitro. **Methods** The negatively charged cellulose acetate (CA) fibrous mats were modified with multilayers of the positively charged chitosan or chitosan-OREC intercalated composites and the negatively charged bovine serum albumin (BSA) via electrostatic layer-by-layer (LBL) self-assembly technique. The adsorption and rinsing steps were repeated until the desired number of deposition bilayers was obtained. The in vitro BSA encapsulation and release experiments demonstrated that OREC could affect the degree of protein loading capacity and release efficiency of the LBL films coating. **Results** In the pH-gradient release assay, only a small amount of BSA was released from the mats in 1 h. As the time increased, the release rate of BSA of all the samples gradually went up to the maximum data within 8 h. For the samples with identical number of bilayers and record time, obvious increasing of the release amount could be seen in pH 7.4, in comparison with pH 1.2. Besides, doubling bilayers film-coated mats generally. Meanwhile, it was slightly distinguishable between 5 and 5.5 as well as 10 and 10.5 bilayers ($t=0.651\sim 1.324, P>0.05$). Interestingly, it could be seen that protein release of the chitosan-OREC/BSA films coated mats remarkably increased compared with that of chitosan/BSA films coated mats ($t=2.264\sim 2.305, P<0.05$). **Conclusion**

The release of protein in the initial time could be controlled by adjusting the number of deposition bilayers, the outmost layer and the composition of coating bilayers.

Keyword: chitosan; nanofibrous; sustained release

纳米纤维在纳米科技领域有着重要的地位, 纳米纤维技术已进入应用发展阶段, 广泛应用于各个领域, 包括组织工程支架、免缝合支架、药物缓释、生物传感器、人工皮肤替代物等。利用纳米管的电刺激, 可以精确地释放单个药物或是生物活性分子, 也可以实现靶向治疗^[1~3]。纳米材料和技术使生物医学检测发生了根本的变化, 极大提高了检测

的灵敏度、特异度和速度等性能, 对检验医学产生了深远的影响^[4,5]。本实验利用层层自组装(layer-by-layer self-assembly, LBL)技术, 制备壳聚糖(chitosan, CS)纳米纤维以及壳聚糖-有机累托石(CS-OREC)插层纳米复合纤维, 利用牛血清清蛋白(BSA)为模型蛋白, 探讨不同因素对复合材料药物缓释的影响, 以期提供新的检验方法与技术。

* 作者简介: 徐瑞芬(1975—), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 纳米技术的生物医学应用, E-mail: 858215318@qq.com。

通讯作者: 冯旭阳(1973—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 纳米技术的生物医学应用, E-mail: fengxuyang001@sohu.com。

1 材料与方法

1.1 研究对象 壳聚糖(浙江玉环海洋生物化学有限公司),海藻酸钠(上海化学试剂公司),钙基累托石(湖北名流累托科技股份有限公司),牛血清清蛋白(美国 Roche Diagnostics Co 公司)。

1.2 试剂与仪器 醋酸纤维素(美国 Sigma-Aldrich 公司);N,N-二甲基乙酰胺(阿拉丁试剂公司);丙酮(天津富宇精细化工有限公司);盐酸(西安化学试剂厂);乙酸酐(国药集团化学试剂上海有限公司);冰醋酸(西安市化学试剂六厂);UV-1800 紫外分光光度计(日本岛津公司);酶标仪(美国 BIO-RAD 公司);DW-P303-1ACD8 型高压电源(天津东文高压电源厂);双通道注射泵(河北保定兰格恒流泵有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 醋酸纤维素纳米纤维的制备:醋酸纤维素(cellulose acetate, CA)纳米纤维膜的制备方法如下:将一定量的醋酸纤维素粉末溶解在质量比为 2:1 的丙酮和 N,N-二甲基乙酰胺(DMAC)混合溶液中,于磁力搅拌器上充分搅拌 4 h,制得质量分数为 15% 的醋酸纤维素溶液。将制备好的溶液置入带有金属针头的 10 ml 一次性注射器中,并将注射器固定在双通道注射泵上。将注射器针头接上高压电源的正极(天津东文高压电源, DW-P303-1ACD8),纤维接收于均匀覆盖有铝箔纸的接收板上。高压电源电压为 16KV,针头到接收板的距离为 18cm,环境温度控制在 25℃,相对湿度为 45%。制备的醋酸纤维素纳米薄膜置于 80℃ 真空干燥箱中干燥 24 h,以除去残余的溶剂。将干燥好的醋酸纤维素纳米薄膜置于 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液中,常温水解 7 天,得到纤维状膜,真空干燥,保存待用。

1.3.2 层层自组装纤维素纳米复合膜的制备:将大小适中的纤维素纳米膜浸入盛有壳聚糖溶液的烧杯中,适当晃动烧杯并用玻璃棒轻微翻动纤维素膜,20 min 后取出纤维膜,浸入到盛有 NaCl 溶液的烧杯中浸洗 2 min,取出,放入下一个盛有 NaCl 溶液的烧杯中 2 min,如此重复清洗 3 次。之后,将

纤维膜置入盛有 BSA 溶液的烧杯中,用同样的步骤组装和清洗。组装了一次壳聚糖和一次 BSA 后,记作完成了一个双层组装。此时沉积在纤维素纤维表面的 CS/BSA 称为一个双层。重复静电组装和浸洗步骤,直到得到实验所需要的组装层数为止。在此,为了方便标识产物,用(CS/BSA) n 来标记 LBL 结构的纤维复合膜,其中, n 代表(CS/BSA)双层的数量。本实验中,当 $n=5.5$ 或 10.5 时,表示组装到纤维膜上的最外层是 CS;当 $n=5$ 或 10 时,则表示组装到纤维膜表面的最外层是 BSA。所得的样品均在 80℃ 的真空干燥箱中干燥 24 h 备用。

CS-OREC 溶液的浓度为 1 mg/ml, pH 值为 5,根据以往的实验研究结果,CS 与 OREC 的质量比为 12:1 时,插层效果最佳,因此设定组装溶液中的 CS:OREC=12:1,制备方法同上。

1.3.3 BSA 的体外释放:复合纳米纤维对 BSA 的释放分别在 0.1 mol/L HCl(pH=1.2)和 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)中进行,检测 24 h。100 mg 纳米纤维置于 100 ml 上述溶液中,37℃,100 r/min 振荡一定时间后,取 1 ml 上清液,采用考马斯亮蓝法,595 nm 测定 BSA 含量,同时补充相同体积的新鲜缓冲液。所有释放测试都以三个平行样本同时进行,在图中报道平均值及其平均方差。

1.4 统计学分析 实验结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, n 表示实验的次数。反复测量数据采用单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同 pH 条件下 BSA 纳米纤维的缓释结果 pH1.2 盐酸溶液中的缓释结果见表 1, pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液中的缓释结果见表 2。可以观察到,pH 值 1.2 时,最初 1 h 只有少量的 BSA 释放,随着时间的延长,BSA 的释放逐渐增多,8 h 达到最高峰 38%~50%。pH 值 7.4 时,最初 1 h BSA 就迅速释放 31%~39%,8 h 可达到 62%~84%。

表 1 BSA 在 pH1.2 盐酸溶液中不同时间点的释放

时间点 (h)	(CS/BSA)				(CS-OREC/BSA)			
	5	5.5	10	10.5	5	5.5	10	10.5
1 h	21.47±0.57	22.59±0.65	24.81±0.59	25.30±0.82	26.89±0.80	26.81±0.75	26.45±0.81	27.12±0.99
2 h	31.92±0.63	32.81±1.05	31.77±0.80	32.36±0.46	35.71±0.82	34.10±0.97	35.10±0.69	36.87±0.38
4 h	42.75±0.71	42.83±0.82	41.51±0.68	40.62±0.96	46.40±0.78	46.88±0.99	46.39±0.63	46.78±0.80
8 h	45.50±1.02	44.11±0.98	40.26±0.99	41.41±0.87	47.98±0.88	49.02±1.05	49.24±0.94	48.43±1.09

表 2 BSA 在 pH7.4 磷酸盐缓冲溶液中不同时间点的释放

时间点 (h)	(CS/BSA)				(CS-OREC/BSA)			
	5	5.5	10	10.5	5	5.5	10	10.5
1 h	34.30±0.75	38.72±0.83	33.41±0.62	34.44±0.43	34.70±0.79	35.76±0.91	31.26±0.83	32.95±0.70
2 h	42.47±0.92	43.09±1.23	44.95±1.01	42.56±1.05	51.88±0.39	50.43±0.97	50.54±0.82	49.33±0.62
4 h	53.70±0.75	59.68±0.39	59.91±0.79	60.28±0.81	62.88±1.21	67.37±1.33	67.50±0.92	68.81±1.20
8 h	64.27±1.20	69.03±1.33	63.76±1.18	65.34±1.09	79.68±1.39	82.12±1.72	72.47±1.22	74.90±1.41

2.2 自组装层数对缓释的影响 见图 1。pH1.2 和 pH7.4 条件下,自组装纳米纤维 5 或 5.5 层,BSA 释放量通常较少。自组装 5,5.5 层与 10,10.5 层相比较,BSA 释放量的差异无统计学意义($t=0.651\sim1.324, P>0.05$)。在相同的自组装层数以及测试时间点,磷酸盐缓冲溶液中 BSA 的缓释量要多于盐酸溶液中的释放量,差异有统计学意义($t=3.126\sim3.640, P<0.05$)。

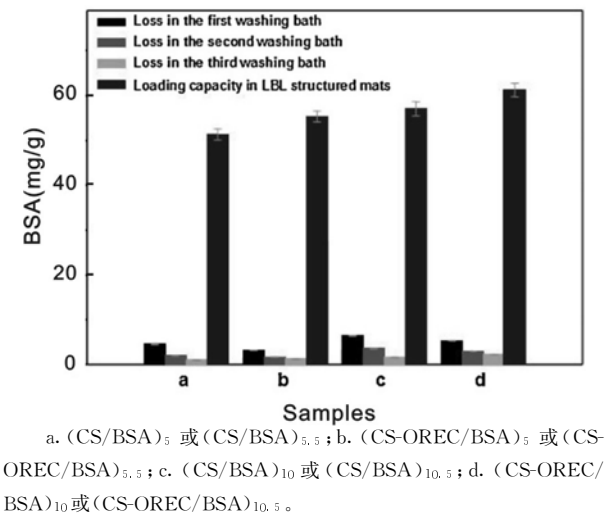


图 1 BSA 在缓冲液中的丢失量及纳米纤维载药量

2.3 加入 OREC 对缓释的影响 结果显示,无论 pH1.2 或是 pH7.4 条件下,加入 OREC 后,BSA 释放量明显增加;2 h 与 8 h 时释放量显著增多,在 PBS 溶液中差异尤其明显($t=2.264\sim2.305, P<0.05$)。

3 讨论 静电纺丝制备纳米纤维技术是近来材料科学与纳米科技的研究热点领域,科学家进行了广泛深入的研究。研究的内容包括以下几个方面:①应用新材料制备静电纺丝纳米纤维,主要包括生物材料、有机小分子以及无机材料;②不同微观形貌结构的制备,如多孔微球、多孔微管等;③有序排列纳米纤维的制备。由于传统静电纺丝制备的纳米纤维是随机排列的无纺布,在一定范围内的应用受到了限制,因此研究发展了一些制备有序排列纳米纤维的方法^[6~9]。最近,有研究者还进行了三维

结构的探索。壳聚糖是自然界第二大天然物质资源,而且是自然界唯一存在的阳离子碱性聚多糖,具有良好的生物相容性、生物可降解性、抑菌性、低毒性,以及成型可控性^[10,11]。

模型蛋白 BSA 的缓释受到释放环境的 pH 值、自组装层数、释放时间,以及是否加入 OREC 等综合因素的影响。在 pH1.2 的盐酸溶液中,带电荷分子间的静电吸引力增强,疏水性增大,抑制蛋白质的快速释放,从而改善纳米纤维的控释功能;而在 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,带电基团去质子化,引起纳米纤维的分解,BSA 的释放增加。

无论 pH1.2 还是 pH7.4 条件下,随着层层自组装层数的增加、载药量增多,但药物的释放可能是受到致密结构的影响,释放反而减少。

加入有机累托石,CS-OREC 的插层结构负载了更多的蛋白,也有利于介质溶入多层的纳米纤维,同时使 BSA 更容易扩散如溶质。另一方面,OREC 扩大层间距,增加了比表面积,也有利于 BSA 的释放。

纳米技术将生物物质的研发、利用生物大分子进行分析与检测技术进行优化,目前医学检验已进入微观、快速、动态、功能性和智能化的领域,纳米技术在医学检验领域中的应用将成为未来医学发展的必然^[12]。壳聚糖纳米纤维是良好的蛋白质载体,具有进一步的临床应用前景。

参考文献:

[1] Xu Y, Cui WG, Zhang YX, et al. Hierarchical micro/nanofibrous bioscaffolds for structural tissue regeneration[J]. Adv Healthc Mater, 2017, 1601457.

[2] Sebe I, Ostorházi E, Bodai Z, et al. In vitro and in silico characterization of fibrous scaffolds comprising alternate colistin sulfate-loaded and heat-treated polyvinyl alcohol nanofibrous sheets[J]. Int J Pharm, 2017, 523(1):151-158.

[3] Bian J, Olesik SV. Surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of small drug molecules and high molecular weight synthetic/biological polymers using electrospun composite nanofibers[J]. Analyst, 2017, 142(7):1125-1132.

- [4] Wu Y, Lin W, Hao H, et al. Nanofibrous scaffold from electrospinning biodegradable waterborne polyurethane/poly(vinyl alcohol) for tissue engineering application[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2017, 28(7):648-663.
- [5] Deng Y, Yang Y, Wei S. Peptide-decorated nanofibrous niche augments in vitro directed osteogenic conversion of human pluripotent stem cells[J]. Biomacromolecules, 2017, 18(2):587-598.
- [6] 李红霞, 国汉邦, 周伟燕, 等. 血清高、低密度脂蛋白胆固醇标准物质的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4):10-13.
- Li HX, Guo HB, Zhou WY, et al. Preparation of serum reference materials for high- and low- density lipoprotein cholesterol[J]. J Mod Lab Med, 2011, 26(4):10-13.
- [7] Chang SH, Lin HT, Wu GJ, et al. pH effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 134:74-81.
- [8] Ma J, Xin C, Tan CJ. Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus* residue[J]. International Journal of Biological Macromolecule, 2015, 80:547-556.
- [9] Pradhan C, Dash S, Swain SK, et al. Barrier properties of nano silicon carbide designed chitosan nanocomposites[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 134:60-65.
- [10] Hassani S, Laouini A, Fessi H, et al. Preparation of chitosan-TPP nanoparticles using microengineered membranes-effect of parameters and encapsulation of tacrine[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2015, 482(5):34-43.
- [11] Jiang P, Li D, Xiao Y, et al. Preparation and characterization of chitosan-based core-shell microcapsules containing clove oil [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2015, 15(1):600-605.
- [12] Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, et al. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications[J]. Progress in Polymer Science, 2011, 36(8):981-1014.

收稿日期:2017-04-19

修回日期:2017-05-29