

文章编号:1000-582X(2005)10-0108-03

海藻酸钠微囊对蛋白质控制释放的分析*

贾云¹,戴传云²,赵宏伟²,刘火安^{1,2}

(1. 重庆科技学院 化学与生物工程学院, 重庆 400050; 2. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400030)

摘要:研究一种蛋白质类药物的控缓释系统的工艺条件及其体外释放行为;以牛血清白蛋白(BSA)为模型药物,海藻酸钠(Alg)为包埋材料制备微囊,研究不同的阳离子、不同BSA浓度时,测定微囊的形态、粒径和包埋率的影响,并对该微囊包埋前后的完整性和体外溶出速度进行了测定;用Ba²⁺制备的微囊成型稳定,粒径均一,具有良好的包埋率;发现微囊在制备过程中,BSA没有受到破坏,BSA蛋白分子保持了结构的完整性;用海藻酸钠作为包埋材料对蛋白有一定的缓释效果,突释效应也并不十分明显。

关键词:海藻酸钠;微囊;蛋白质;控缓释

中图分类号:R944.9

文献标识码:A

海藻酸钠(Alg)是从褐藻或细菌中提取出的天然多糖,由 α -L-古洛糖醛酸(G段)与其立体异构体 β -D-甘露糖醛酸(M段)2种结构单元,以3种方式(MM段、GG段和MG段)通过(1-4)糖苷键链接而成的一种无支链的线性阴离子共聚物。Alg是无毒、生物相容性好、可降解的天然生物高分子材料。当Alg溶液滴入多价阳离子溶液时,很容易形成水凝胶,该过程在非常温和的环境进行,并且是无毒反应^[1-2]。因此,Alg的这种良好的成型和成膜特性,使其适于作为释放或包埋药物、蛋白^[3]与细胞的微囊。

在理论上,Alg可以和许多阳离子形成水凝胶,如Al³⁺,Ba²⁺和Ca²⁺等阳离子^[4]。很多研究表明,不同阳离子形成的Alg水凝胶,影响该凝胶的孔径、膨胀行为和生物相容性^[5-6]。但研究不同阳离子对蛋白的释放特性,还未见报道。所以,笔者以BSA为模型药物蛋白,研究Al³⁺,Ba²⁺和Ca²⁺等多价离子和药物蛋白浓度对微囊的包埋率的影响,同时,对微囊的形态、大小、蛋白的完整性以及体外释放行为进行了研究。

1 实验部分

1.1 主要材料

海藻酸钠(1%水溶液粘度不少于0.2 Pa,上海化学试剂公司分装厂);牛血清白蛋白(BSA, Sigma, 纯度98%);其余试剂均为分析纯。紫外分光光度计(UV755B,上海精密科学仪器有限公司);冷冻离心机

(Eppendorf 5810,德国);电泳仪(Bio-Rad, Mini-protein, 美国)。

1.2 Alg微囊的制备

取7 mL 2.5%的Alg溶液,加入5 mL BSA溶液,搅拌混匀,置冰箱30 min除去气泡,用5号针的注射器,缓缓地推入(速度为1~3滴/min)多价阳离子中,静置0.5~1 h,Alg微囊即形成,蒸馏水反复冲洗,除去未包埋的BSA,微囊真空干燥。

1.3 蛋白质包埋率的测定

称取100 mg干燥Alg微囊,加入5 mL 10%的EDTA溶液,超声至微囊完全破碎,于4 000 r/min离心30 min,取上清液,沉淀加5 mL蒸馏水,合并上清液,定容至50 mL,于280 nm下测蛋白质含量,包埋率计算公式为:

$$\text{包埋率} = \frac{\text{微囊中含药量}}{\text{微囊和介质中的总含药量}} \times 100\%$$

1.4 体外释放实验

称取100 mg干燥Alg微囊置于10 mL生理盐水(含0.01%叠氮化钠),每隔一定时间取5 mL溶液,用紫外分光光度计法测定蛋白质的含量,同时加入等量新鲜释放液保持恒定体积。

1.5 微囊中BSA的完整性分析

将未经包埋的BSA和从微囊中抽提的BSA,同时用12%的聚丙烯酰胺凝胶进行SDS-PAGE电泳;电

* 收稿日期:2005-06-20

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC:2004BB5122)

作者简介:贾云(1957-),男,重庆人,重庆科技学院副教授,硕士,从事药用高分子材料的研究。

泳仪为 Bio - Rad 公司的 Mini - protein 系统. 比较电泳后的蛋白质谱带以判断包埋前、后 BSA 结构的完整性.

2 实验结果

2.1 不同多价离子对微囊形态的影响

用浓度为 2% 的 CaCl_2 、 BaCl_2 和 AlCl_3 实验结果表明, Ca^{2+} (见图 1(a)) 和 Ba^{2+} (见图 1(b)) 成凝胶比较容易, 大小均一, 形状为圆形, 而 Al^{3+} (见图 1(c)) 成凝胶速度较慢, 且凝胶之间易粘附, 形状多为扁椭圆形, 干燥后的 Ba^{2+} 制备的微囊粒径分布如图 2 所示, 微囊的大小在 0.2 mm 左右.

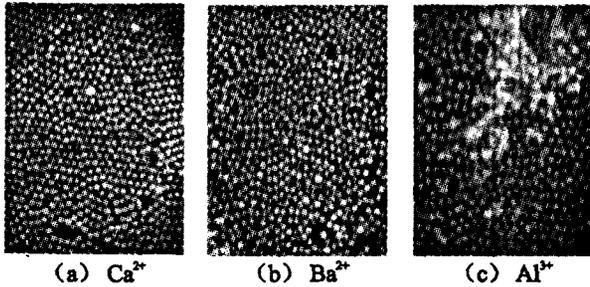


图1 不同多价阳离子对微囊的形态的影响

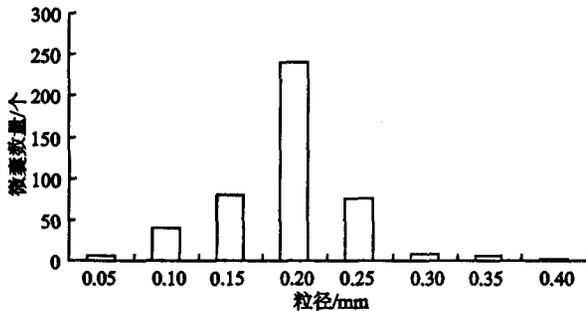


图2 微囊粒径大小分布

2.2 不同多价离子对微囊包埋率的影响

实验结果如图 3 所示, 3 种阳离子对制备的微囊包埋率中, Ba - Alg 微囊中蛋白的包埋率最高, 为 44.9%, Ca - Alg 微囊次之, 而 Al - Alg 微囊最低.

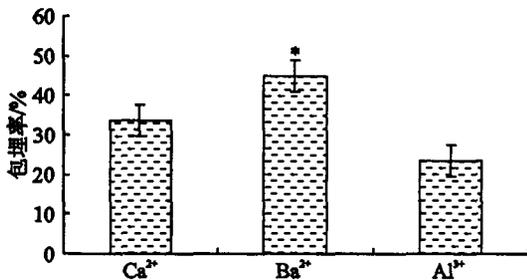


图3 不同多价阳离子制备对微囊包埋率的影响(n=3)

2.3 BSA 浓度对微囊包埋率的影响

分别取不同浓度的 BSA, 按上述相同的方法制备微囊, 检测它们的包埋率, 结果表明(如图 4 所示), 随着模型药物浓度的升高, 微囊的包埋率增加, 3 mg/mL BSA 包埋率为 76.10%, 2 mg/mL BSA 包埋率为 73.49%.

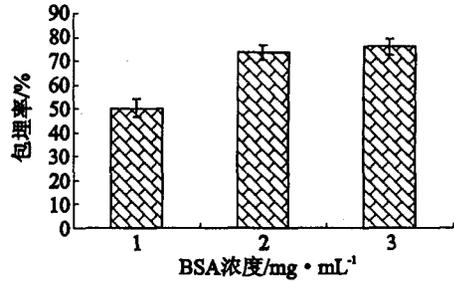


图4 模型蛋白药物浓度对微囊包埋率的影响(n=3)

2.4 微囊包埋后 BSA 的完整性

经 SDS - PAGE 电泳, 从微囊内抽提的 BSA 和未经包埋的 BSA 具有相同的谱带(如图 5 所示), 说明在微囊制备过程中 BSA 没有受到破坏, BSA 蛋白分子保持了结构的完整性.

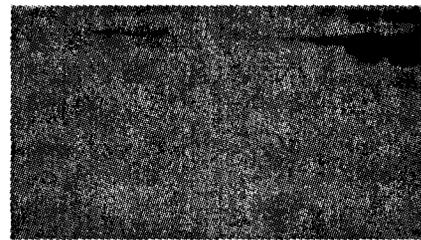


图5 微囊中 BSA 释放前后的电泳图
3,4为释放前的 BSA; 9,10为释放后的 BSA

图5 微囊中 BSA 释放前后的电泳图

2.5 Ba - Alg 微囊溶出速度

Ba - Alg 微囊中模型药物释放如图 6 所示, 在前 9 d 内, 大约 43% 的药物蛋白被释放, 前 18 d 内, 约 80% 的药物蛋白被释放, 30 d 内, 仍然有 15% 的药物蛋白没有被释放.

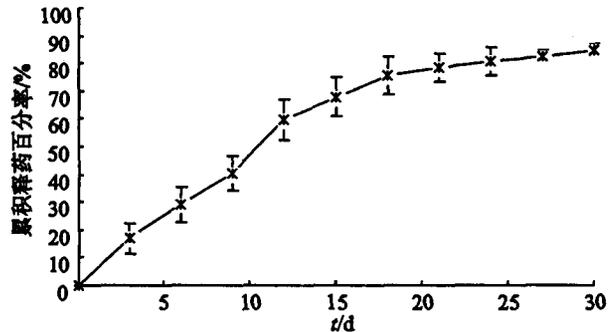


图6 微囊中 BSA 的体外释放行为

3 讨论

Alg 是一种天然的无毒和无免疫原性的制囊材料, 带负电荷, 具有较高的生物相容性^[7]. 当遇到二价或三价阳离子时, 形成水凝胶, 利用该特性, 被广泛应用于食品、药品等领域. 笔者以 BSA 为模型药物, Alg 为封装材料制备微囊, 研究结果发现, 不同阳离子对成囊形态、包封率有一定的影响, Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 成凝胶比较容易, 大小均一, 形状为圆形, 而 Al^{3+} 成凝胶速度较慢, 且凝胶之间易粘附. 它们所制备的微囊包埋率也不一样, Ba - Alg 微囊中蛋白的包埋率最高, 为

44.9%, Ca-Alg 微囊次之, 而 Al-Alg 微囊最低. 3种阳离子与 Alg 成囊机制相似, 所以, 可能的原因是由于不同阳离子大小差异, Ba^{2+} 在溶液中的大小比其它2种阳离子大, 为 $0.135\text{ nm}^{[8]}$, 大的阳离子与 Alg 的羧基结合, 形成更紧密的水凝胶结构.

模型药物的浓度对微囊的包埋率也有一定的影响, 实验结果表明, 微囊的包埋率随浓度的升高而增加, 但当浓度增加到 3 mg/mL 时, 与 2 mg/mL 比较, 包埋率增加不是很明显, 为 76.10% 和 73.49%, 从经济角度来考虑, 取 3 mg/mL 模型药物制备微囊时, 药物浪费更多, 所以易选用的浓度为 2 mg/mL .

微囊包埋后的 BSA, 经 SDS-PAGE 电泳, 与未包埋的 BSA 电泳谱带相比, 谱带相同, 说明微囊制备过程中 BSA 没有受到破坏, BSA 蛋白分子保持了结构的完整性. 对该微囊的体外溶出速度测试, 在前 9 d 内, 大约 43% 的药物蛋白被释放, 前 18 d 内, 约 80% 的药物蛋白被释放, 30 d 内, 仍然有 15% 的药物蛋白没有被释放. 说明该微囊具有一定的缓释效果, 突释效应也不明显.

综上所述, 笔者利用荷相反电荷的天然聚电解质高分子材料间的静电相互作用为成型机理, 在温和的条件下, 以 BSA 为蛋白模型药物制备了粒径均一, 分散性及载药性能均好的微囊. 实验表明, BSA 海藻酸钠具有一定的缓释作用, 可见 Alg 微囊是一类好的蛋白药物载体.

参考文献:

- [1] LEE B, MIN G, KIM T. Preparation and in Vitro Release of Melatonin Loaded Multivalent Cationic Alginate Beads[J]. Arch Pharm Res, 1996, 19:280-285.
- [2] MUSA S, ABUFARE D, BADWAN A A. Evaluation of Parameters Involved in Preparation and Release of Drug Loaded in Crosslinked Matrices of Alginate[J]. J Control Rel, 1999, 57:223-232.
- [3] GOMBOTZ W R, WEE S F. Protein Release from Alginate Matrices[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, 31:267-285.
- [4] GRANT G T, MORRIS E R, REES D A, et al. Biological Interactions Between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg-Box Model[J]. FEBS Lett, 1973, 32:195-198.
- [5] MARTINSEN A, STORRO I, SKIAK-BRAEK G. Alginate as Immobilization Material(III): Diffusional Properties[J]. Biotechnol Bioeng, 1992, 39:186-194.
- [6] TANAKA H, MATSUMURA M, VELIKY I A. Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-Alginate Gel Beads[J]. Biotechnol Bioeng, 1984, 26:53-58.
- [7] THOMAS M, SWI C. Artificial Cells and Bioencapsulation in Bioartificial Organs[J]. Annals New York Aca Sci, 1998, 832:249-259.
- [8] GHAZIZADEH S, CARROLL J M, TAICHMAN L B. Repression of Retrovirus-Mediated Transgene Expression by Interferons[J]. Implications for Gene Therapy J Virol, 1997, 71: 9 163-9 169.

Analysis on Sustained Release of Protein from Microcapsule Prepared by Alginate

JIA Yun¹, DAI Chuan-yun², ZHAO Hong-wei², LIU Huo-an^{1,2}

(1. College of Chemistry and Biology, Chongqing Polytechnic College, Chongqing 400050, China;

2. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: The paper studies a drug delivery system for protein and find the optimum preparation condition. Cross-linked alginate (Alg) microcapsule was used to prepare microcapsule for protein, using bovine serum albumin (BSA) as a model drug. Effect of different cations and content of protein on configuration, size and enveloped rate of microcapsule were investigated. It is shown that Ba-Alg microcapsule has steady configuration, homogeneous size and high-enveloped rate. Also electrophoresis of native BSA before microencapsulation and after microencapsulation is measured by SDS-PAGE, it is found that no significant change is observed BSA integrity. Release of BSA from microcapsule in vitro presents sustained release in some extent, and initial burst effect is significantly obvious. Microencapsulation drug in alginate will be a wishful drug delivery system.

Key words: alginate; microcapsule; protein; sustained release