

混合交联剂制备海藻酸盐微囊及其性能研究

童粤生 沈德勇 王士斌 白 燕 陈爱政

摘 要 目的 以氯化钙和氯化钡混合盐溶液为交联剂,制备海藻酸盐微囊并考察其性能。方法 采用高压静电法制备胶珠,以几丁聚糖为膜材制备微胶囊,考察了海藻酸盐胶珠和微囊的形态、粒径分布、膨胀率、振荡破损率及膜蛋白渗透性。结果 以 $[Ba^{2+}]:[Ca^{2+}]$ 为 7:3 作为混合交联剂制备的微囊粒径最小为 $309\mu m$,膨胀率最小为 14.7%,振荡破损率为 2.6%。各组微囊膜厚度均小于 $20\mu m$ 。两种蛋白渗透曲线表明,胰蛋白酶能渗透进入各组微囊膜,而牛血清清蛋白则不能进入微囊。结论 混合交联剂制备的微囊粒径分布较均一,膜强度较高,可广泛应用于各种生物活性物质如蛋白、细胞等的包埋。

关键词 微胶囊 混合并联剂 膨胀率 膜厚度 蛋白通透性

Preparation and Properties Evaluation of Alginate – chitosan Microcapsules Cross – linked by Mixed Metal Ions. Tong Yuesheng, Shen Deyong, Wang Shibin, Bai Yan, Chen Aizheng. Department of Bioengineering and Biotechnology, College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Fujian 361021, China

Abstract Objective The alginate – chitosan microcapsules were prepared, and mixed metal ions ($Ba^{2+} + Ca^{2+}$) were selected as cross linkers. **Methods** Microcapsules were prepared by electrostatic combination on the high – voltage electrostatic droplet generator, and their size distribution, film thickness, breakage rate and protein permeability were compared. **Results** We found that when the ration of $[Ba^{2+}]:[Ca^{2+}]$ was 7:3, the microcapsules showed the maximum value of average sized ($309\mu m$) and the minimum number of dilatability (14.7%). The film thickness of all five kinds of microcapsules was lower than $20\mu m$. Results of trypsinase and BSA permeability showed that the transmission percent of trypsinase (24kDa) was nearly 50% and BSA could be intercepted by five different microcapsules. **Conclusion** Microcapsules prepared by mixed metal ions ($Ba^{2+} + Ca^{2+}$) cross linkers had uniform size and high intensity, and could be widely applied for embedding various bio – active substances such as proteins and cells.

Key words Microcapsules; Mixed cross linkers; Dilatability; Breakage rate; Protein permeability

微胶囊是利用天然或合成高分子材料,将分散的物质包裹起来,形成具有特定几何结构的微型容器,直径一般为 $1 \sim 1000\mu m$ 。由于微胶囊化可以使芯材与外界隔离,保持物理性质(如颜色、溶解性等),提高稳定性,具有物质控释性,释放靶向性,生物相容性及可降解性等特点^[1],该技术的应用已经涵盖化工、食品、药物、生物制品、医学等诸多领域,它在具有高附加值的生物医学尤其在移植包埋上应用最为广泛,例如用于治疗甲状腺功能减弱、血友病、帕金森病、糖尿病、肝功能障碍、肿瘤等多种疾病。天然多糖制备的海藻酸钠 – 壳聚糖 – 海藻酸钠 (alginate – chitosan

– alginate, ACA) 微胶囊具有较温和、生物相容性好及免疫原性低等优点,已成为继海藻酸钠 – 赖氨酸 – 海藻酸钠 (alginate – polylysine – alginate, APA) 后的重要生物微胶囊载体^[2]。微胶囊性能,如强度性能、膜渗透性能、生物相容性、对包埋细胞或酶的保护性能等,是决定其能否成功应用的前提。海藻酸盐与阳离子聚合物静电结合形成微囊前,须与金属离子交联剂凝胶化,形成网状“蛋格”结构,该过程能够改善微囊的膜强度和渗透特性^[3,4]。不同金属离子与海藻酸盐的交联凝胶作用各不相同,微囊的物化性能也会存在差异。研究表明,海藻酸盐对不同二价阳离子的亲和力为: $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} > Mn^{2+}$;目前,微囊的制备大多采用单一金属离子为交联剂,两种或两种以上金属离子混合交联剂制备微囊的研究较少,混合交联剂微囊相比具有许多优点,如膨胀率较小、膜强度较高等^[5,6]。本研究以 $BaCl_2$ 和 $CaCl_2$ 为混合交联剂制备 ACA 微囊,比较了不同浓度比例的 Ba^{2+} 与 Ca^{2+} 微囊的粒径

基金项目:国家 863 计划(2006AA02A118);国家自然科学基金资助项目(30370415);福建省自然科学基金(C0710034、2009J01253)资助项目。

作者单位:361021 厦门,华侨大学化工学院生物工程与技术系(童粤生、沈德勇、王士斌、白燕、陈爱政);华侨大学制药工程研究所(王士斌、陈爱政)

通讯作者:王士斌,电子信箱:sbwang@hqu.edu.cn

分布、膨胀率、膜厚度、微囊膜蛋白通透性等。

材料与方法

1. 材料与仪器:海藻酸钠 (Alg), 黏度 (25℃, 2% 溶液黏度 250mPa·s) (Sigma); 几丁聚糖 (Chi) (低相对分子质量: 50kDa), 医用级 (浙江金壳生物化工有限公司); 胰蛋白酶, 生化试剂 (amresco); BSA (牛血清清蛋白), 生化试剂 (上海楷洋生物技术有限公司); 其他如氯化钙、氯化钡等均为市售分析纯试剂。高压微胶囊成型装置, WJN-50, 上海理工; AJ5805 微量注射泵, 安吉电子设备 (上海) 有限公司; 生物显微镜 (带 OLYMPUS PM-10AD), BH-2, 日本欧林巴斯光学工业株式会社; 紫外可见分光光度计, SP-2102UV, 上海光谱仪器有限公司; 回转式恒温调速摇床, HYG-II a, 上海欣蕊自动化设备有限公司; 紫外可见分光光度计, T6, 北京普析通用仪器有限责任公司。

2. 实验方法: (1) 不同浓度比例海藻酸盐-几丁聚糖微囊的制备: 配制浓度为 1.5% (w/v) 及 0.15% (w/v) 的海藻酸钠溶液, 搅匀后经 0.80μm, 0.45μm, 0.22μm 微孔滤膜 3 级过滤; 配制二价阳离子总浓度为 100mmol/L 的氯化钙和氯化钡的混合溶液, A 组为 $[Ba^{2+}]:[Ca^{2+}] = 9:1$, B 组为 $[Ba^{2+}]:[Ca^{2+}] = 7:3$, C 组为 $[Ba^{2+}]:[Ca^{2+}] = 5:5$, D 组为 $[Ba^{2+}]:[Ca^{2+}] = 3:7$, E 组为 $[Ba^{2+}]:[Ca^{2+}] = 1:9$; 用 1% (v/v) 醋酸溶液将几丁聚糖溶解配制成 0.5% (w/v) 几丁聚糖 (5kDa) 溶液 (pH 5.5); 然后用高压微囊成型装置, 将海藻酸钠溶液滴入离子交联剂中, 凝胶化后制备出海藻酸钙凝胶珠, 胶珠制备条件为: 电压 $8.0 \times 2/3kV$, 液面距 20mm, 注射泵推进速度 50mm/h, 5° 平针头^[7]。将胶珠用蒸馏水快速洗涤 3 次, 置于几丁聚糖溶液 (0.5%) 中成膜 15min; 成膜后用蒸馏水洗涤, 置于 0.15% (w/v) 的海藻酸钠溶液 (pH 5.5) 中双层覆膜 5min; 覆膜后用蒸馏水洗涤, 置于柠檬酸钠溶液 (pH 5.5) 中液化胶珠核心 5min; 液化洗涤后将微囊保存于原交联剂溶液中。 (2) 不同浓度比例海藻酸盐-几丁聚糖微囊的形态、粒径大小与分布比较: 取少量胶珠或微囊置于载玻片中, 通过显微镜观察形态, 随机读取 50 个胶珠粒径, 取算术平均值为该批胶珠的平均粒径。根据 2000 年版《中华人民共和国药典》中粒径分布的测量方法, 在光学显微镜下观测不少于 500 个的粒径, 将所测得的粒径分布数据, 以粒径为横坐标, 以各粒径范围的频率对各粒径范围的平均值做粒径分布曲线。胶珠经 20%、40%、60%、80%、100% 乙醇梯度脱水, 真空冷冻干燥后, 电镜扫描观察其表面形态。 (3) 不同浓度比例海藻酸盐-几丁聚糖微囊的膜强度比较: 微囊制备的液化反应过程中, Na^+ 与海藻酸钙凝胶中的 Ca^{2+} 之间发生离子交换作用, 使凝胶逐渐转变为液体而产生体积膨胀, 可利用微胶囊的体积膨胀度与膜强度成反比关系来表征膜强度。定义微囊膨胀率 = (微囊体积 - 胶珠体积) / 胶珠体积 × 100%, 在微胶囊制备过程中, 在倒置显微镜下随机读取 50 个海藻酸钙凝胶珠粒径, 取算术平均值即为该批凝胶珠的粒径, 定义为 D_0 , 将微胶囊在柠檬酸钠液化过程中的粒径采用相同读取方法, 定义为 D , 由此计算

出微囊膨胀率 S_w 。将微囊置于回转式恒温摇床中低速震荡, 通过测定破囊率也能表征微囊的膜强度。实验过程为: 分别制备不同离子交联型微囊 6ml, 分装于 3 支离心管中 (各取约 2ml 空微囊), 置于回转式恒温摇床, 参数设置为恒温 37℃, 转速 150 r/min, 时间 48h, 分别在不同时间 (0h、8h、16h、32h、40h、48h) 取约 200 个微囊, 观察微囊形态并计算破囊率。破囊率计算公式为: 破囊率 (Rrup%) = 破囊个数 / 微囊总数 × 100%^[8]。 (4) 不同浓度比例海藻酸盐-几丁聚糖微囊的膜厚度比较: 参考相关文献^[8], 定义微囊膜厚度为: $L = R \{1 - [(W_w - W_m)/W_w]^{1/3}\}$, 其中 L 为微囊膜厚度, R 为微囊平均半径 (μm), W_w 为微囊湿重, W_m 为微囊湿膜重。测定过程为: 取 1ml 微囊置于预先称重离心管内, 离心移除上清, 室温下平衡湿度 1h 后称重得微囊湿重 W_w ; 加入柠檬酸钠溶液用超声破碎法使微囊全部破碎, 超声条件为: 工作时间 5s, 间隔时间 5s, 工作效率 800W; 然后静置以溶解微囊内外非膜物质离心移除上清; 插入定量滤纸静置 48h 后, 移走滤纸并室温放置 1h 称重, 得到微胶囊湿膜重 W_m ; 最后计算得出微囊湿膜厚度 (注: 称重时必须在同温同湿下进行; 操作过程中不得丢失任何微胶囊及其碎片)。 (5) 不同浓度比例海藻酸盐-几丁聚糖微囊的蛋白通透性比较: 分别称取定量蛋白, 配制成浓度为 1.2mg/ml 胰蛋白酶, 0.6mg/ml BSA 溶液。取 2ml 蛋白液加入 2ml 湿微囊中混匀, 置于 50r/min 摇床上, 分别于 1min、2min、4min、8min、16min、32min、64min 和 128min 各时取蛋白微囊混合液上清, 在紫外分光光度计上测定 280nm 处 OD 值。以各时刻吸光值 A 为纵坐标, 对时间作图, 得到以蛋白质溶液的吸光度随时间变化的曲线, 由于在实验范围内蛋白质溶液的浓度与吸光度成正比 ($R^2 = 0.999$), 因此可以用吸光度曲线代替浓度曲线。

结 果

本实验以不同浓度氯化钙和氯化钡混合溶液为离子交联剂, 采用高压静电法制备了海藻酸盐微囊, 制备的微胶囊直径范围为 200~400μm, 微囊形态见图 1, 微囊粒径大小与分布见表 1 与图 1, 可知 B 组 $[Ba^{2+}]:[Ca^{2+}]$ 为 7:3 时制备的微囊的粒径较集中且膨胀率较低, 破损率也较小; 各组微胶囊的膜厚度均小于 20μm, 振荡 48h 后微囊破损率均低于 10%, 结果见图 2、图 3 微囊的蛋白透性实验表明, 相对分子质量为 24kDa 的胰蛋白酶在 20min 内能够完全进入微囊, 达到平衡浓度, 且当 Ca^{2+} 浓度较高时, 渗透速率较快, 而相对分子质量为 67kDa 的 BSA 则在 128min 内上清 OD 值基本保持不变, 表明微囊膜对 BSA 具有截留作用。

讨 论

1. 不同浓度比例海藻酸盐-几丁聚糖微囊的形态、粒径大小与分布比较: 由表 1 及 135 页彩图 2 可

知,采用不同浓度钙离子和钡离子混合液作为交联剂制备的各组微囊,球形度良好,表面光滑,折光性强。由各组微囊粒径分布图可知当钙离子和钡离子浓度都大于30mmol/L时,随着钙离子浓度的降低和钡离子浓度的升高,微胶囊的粒径逐渐增大;其中B组微胶囊粒径大小较集中且平均粒径最小,D组微胶囊的平均粒径最大,C组微胶囊粒径分布范围最广。测定各组微囊的膨胀率发现B组膨胀率最小,为14.7%。造成微囊膨胀率不同的原因可能为:钡离子结合海藻酸盐的能力强于钙离子,因此在凝胶化过程中,钡离

子起主导作用,当钡离子浓度较低时,微囊的网状“蛋格”结构较为松散,膨胀率也相应较高。

表1 不同浓度比例微胶囊的粒径及膨胀率

组别	胶珠粒径(μm)	胶囊粒径(μm)	微囊膨胀率 S_w (%)
A	304	345	42.4
B	296	309	14.7
C	304	352	55.9
D	305	358	60.9
E	307	342	38.4

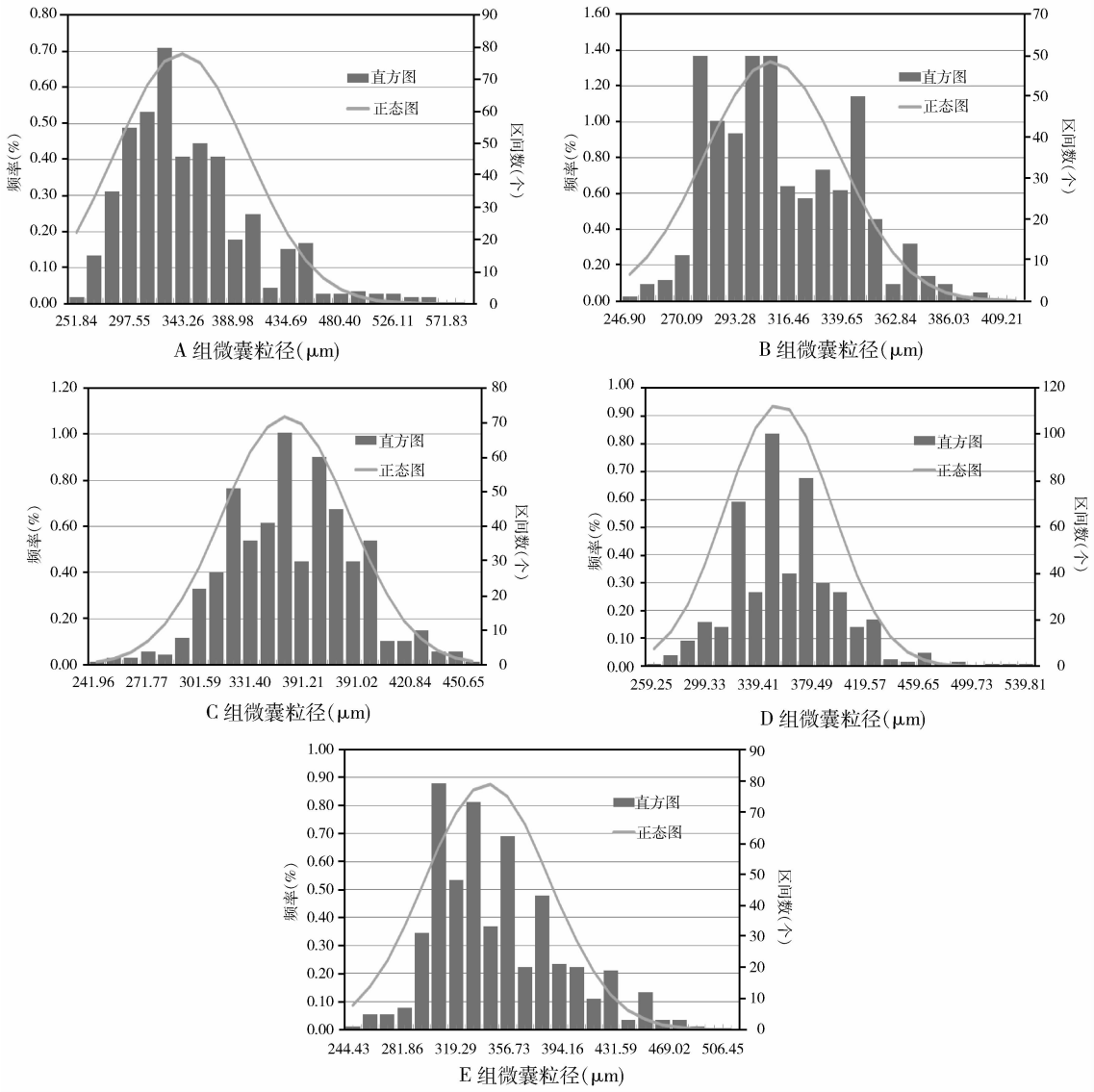


图1 A、B、C、D、E组不同比例混合交联剂制备的微囊粒径正态分布图

2. 不同浓度比例海藻酸盐-几丁聚糖微囊的膜厚度及破损率比较:由图2可知,A、B、C、D、E 5组微囊的膜厚度均小于20μm;其中B组膜厚度最小,为

14.4μm;图3为用恒温振荡仪振荡48h后的微囊破损率结果,可知5组微囊破损率均不高于6%,B、C组破损率低于2%。微囊用于包埋细胞类生物活性

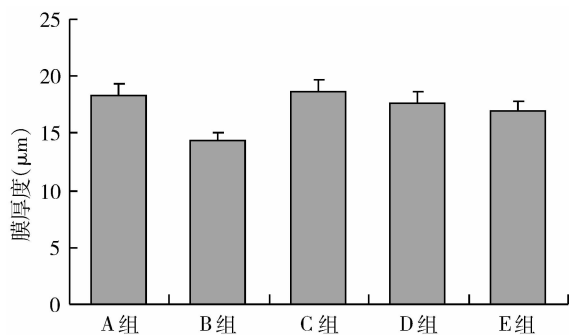


图2 不同比例混合交联剂制备的微囊膜厚度

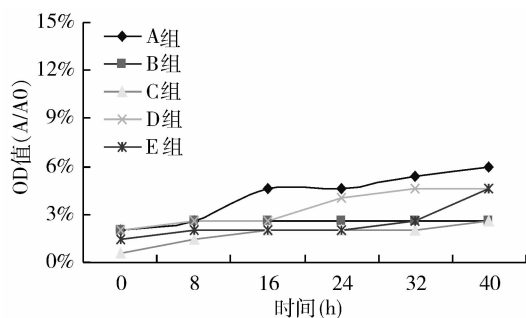


图3 不同浓度比例微囊振荡 48h 后的破囊率

物质时,要求微囊具有较小膜厚度,才有利于微囊内外细胞代谢物的交换,较高的机械膜强度高意味着微囊内细胞不会因微囊破碎而溢出,减少了免疫排斥反应,微囊的生物相容性也相应提高,因此可作为生物载体移植入体内发挥功效^[9]。

3. 不同浓度比例海藻酸盐-几丁聚糖微囊的蛋白通透性比较:微囊的主要功能是保护膜内物质和控制物质渗透,因此微囊膜渗透分离特性是微囊的重要性能指标。目前,国际上通用截留相对分子质量作为微胶囊膜渗透性表征。截留相对分子质量反映了微囊膜对不同相对分子质量溶质的阻隔能力。本节选取两种不同相对分子质量蛋白,即胰蛋白酶(相对分子质量 24kDa),BSA(相对分子质量 67kDa),考察不同浓度比例交联剂微囊对它们的渗透特性。现有研究表明,蛋白质在微胶囊膜上是先吸附后渗透的过程^[10]。由胰蛋白酶渗透曲线可知(图4、图5),随着时间的延长,5组微囊与蛋白混合液上清 OD 值逐渐降低,表明胰蛋白酶均能渗透进入微囊膜,D、E组渗透速率在 8min 时趋于平衡,快于 A、B、C 组,表明 D、E 组微胶囊膜渗透速度较快。分析原因可能为 D、E 组交联剂中,钡离子浓度较低,钙离子浓度较高,因此凝胶化形成的微囊膜网状“蛋格”结构较松散,微囊孔隙较大,渗透速度也相应较快。从不同微浓度比例

微囊膜对 BSA 的渗透曲线图可知,BSA 与微囊共混后,上清 OD 值基本保持不变,表明该蛋白并未穿过微囊膜进入微囊内部,即微囊膜对 BSA 具有截留作用^[11]。

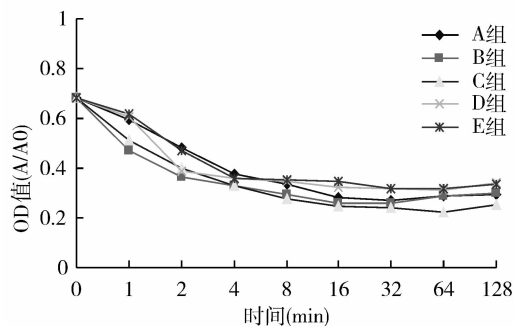


图4 不同浓度比例微囊膜的胰蛋白酶渗透曲线

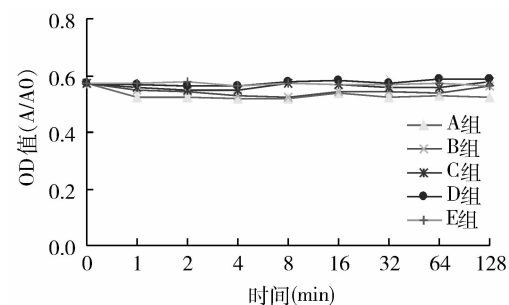


图5 不同浓度比例微囊膜的 BSA 渗透曲线

结 论

本实验以不同浓度氯化钙和氯化钡混合溶液为离子交联剂,采用高压静电法制备了海藻酸盐微囊,制备的微胶囊直径范围为 200 ~ 400 μm,其中 B 组 $[Ba^{2+}]:[Ca^{2+}]$ 为 7:3 时制备的微囊的粒径较集中且膨胀率较低,破损率也较小;各组微胶囊的膜厚度均小于 20 μm;微囊的蛋白渗透性实验表明,相对分子质量为 24kDa 的胰蛋白酶在 20min 内能够完全进入微囊,达到平衡浓度,且当 Ca^{2+} 浓度较高时,渗透速率较快;而相对分子质量为 67kDa 的 BSA 则在 128min 内上清 OD 值基本保持不变,表明微囊膜对 BSA 具有截留作用。由于生长因子、激素等生物活性物质的相对分子质量多在 20kDa 以下,因此该类微囊应可以满足囊内细胞存活的营养需要和细胞分泌物的释放,且可起到有效的免疫隔离屏障作用。

参考文献

- Wang S B, Liu Y G, Weng L G, et al. Effect of molecular weights of poly-L-arginine (PLA) on membrane strength and permeating property of PLA group microcapsule [J]. Macromolecular Bioscience, 2003, 3: 347-350

- 2 Wang S B, Xu F H, He H S, *et al.* Novel Alginate - Poly (L - Histidine) Microcapsules as Drug Carriers: In Vitro Protein Release and Short - Term Stability [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2005, 5 (5) : 408 - 414
- 3 徐飞海, 王士斌, 黄晓楠, 等. 海藻酸钙 - 几丁聚糖微胶囊的形态与粒径 [J]. *膜科学与技术*, 2006, 26 (6) : 12 - 16
- 4 刘袖洞, 于炜婷, 王为, 等. 海藻酸钠和壳聚糖聚电解质微胶囊及其生物医学应用 [J]. *化学进展*, 2008, 20 (1) : 126 - 139
- 5 Wikstrom J, Elomaa M, Syvajarvi H, *et al.* Alginate - based micro-encapsulation of retinal pigment epithelial cell line for cell therapy [J]. *Biomaterials*, 2008, 29 : 869 - 876
- 6 Morch YA, Donati I, Strand BL, *et al.* Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on Alginate Microbeads [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7 : 1471 - 1480
- 7 陈爱政, 王士斌, 刘源岗, 等. 高压微胶囊成型装置制备用于成囊的海藻酸钙胶珠 [J]. *山东生物医学工程*, 2002, 21 (4) : 21 - 24
- 8 马小军, 解玉冰. APA 生物微胶囊的制备条件与膜强度的关系 [J]. *中国器官移植杂志*, 1995, 16 (4) : 156 - 158
- 9 李保国, 华泽钊, 张洪德, 等. 胰岛移植用免疫隔离微胶囊的牢固度_生物相容性和通透性研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2001, 17 (3) : 85 - 88
- 10 刘映薇, 于炜婷, 刘袖洞, 等. 海藻酸钠 - 壳聚糖 - 海藻酸钠 (ACA) 微胶囊的蛋白质通透性研究 [J]. *中国生物医学工程学报*, 2006, 25 (3) : 370 - 374
- 11 Inha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery [J]. *Journal of Controlled Release*, 2003, 90 (3) : 261 - 280

(收稿 : 2010 - 01 - 12)

(修回 : 2010 - 04 - 07)

经肛门括约肌入路的直肠外科手术

邱辉忠 牛备战

摘 要 **目的** 探讨经肛门括约肌路径的手术在直肠外科中的应用。**方法** 回顾性分析 1990 年 8 月 ~ 2009 年 12 月 170 例中下段直肠疾病患者施行 Mason 手术的经验。**结果** 170 例中直肠绒毛状腺瘤 90 例, 早期直肠癌 53 例, 进展期直肠癌 10 例。以直肠类癌为主的黏膜下结节 26 例。直肠肿瘤中行直肠部分切除术 136 例, 直肠节段切除术 10 例。直肠阴道/尿道瘘 21 例, 其中一次修补成功者 17 例 (81%)。术后伤口积液感染 7 例 (4.1%), 直肠 - 皮肤瘘 6 例 (3.5%)。早期直肠癌的肿瘤局部复发率为 3.9% (2/51)。其中存活超过 5 年者 45 例, 占 88.2% (45/51)。170 例术后未发生肛门失禁。**结论** Mason 手术具有手术进路直达, 术野表浅和显露良好的特点, 适用于可行局部手术治疗的中下段直肠良恶性疾病。

关键词 直肠肿瘤 腺癌 局部切除术 外科手术

Transsphincteric Surgery of the Rectum. Qiu Huizhong, Niu Beizhan. *Department of Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China*

Abstract Objective To explore the role of transsphincteric operation (Mason operation) in the rectal surgery. **Methods** Retrospective study was used to analyze the experience of Mason operation for 170 patients with mid and low rectal disease between Aug 1990 to Dec 2009. **Results** There were villous adenoma in 90 cases, early rectal cancer in 53 cases and advanced rectal cancer in 10 cases. Submucosal tumor included carcinoid was in 26 cases. Of the 146 patients with rectal tumor, 136 underwent partial rectectomy, 10 underwent segmental rectectomy. There were rectovaginal fistula or rectourethral fistula in 21 cases and success of repair was in 17 cases (81%). Seven patients (4.1%) developed wound infection. Six patients (3.5%) were complicated with recto - cutaneous fistula. Two patients (3.9%) had local recurrence and 88.2% (45/51) patients were survival above five years after operation in group of early rectal cancer. No patient suffered from incontinence of stool when he was discharged from hospital. **Conclusion** Mason operation is satisfactory with good exposure and simple access to the rectum, which was suitable for those lesions that could be locally resected on mid and low rectum.

Key words Rectal tumor; Adenocarcinoma; Local excision surgery

对于生长在直肠中下段某些只需局部切除即能

治愈的直肠良恶性肿瘤, 通常有多种局部切除术可供选择。如经腹部途径的切除或经肛门和骶后途径的切除等, 但这些方法均有这样或那样的不足和缺憾, 它们或是损伤过大或是术野显露太差。经肛门括约肌途径的切除术 (以下简称 Mason 术) 则弥补了这几

基金项目: 民政部“十一五”老年医学科科研项目 (47 - 2 - 17)

作者单位: 100730 中国医学科学院/北京协和医学院 北京协和医院

通讯作者: 邱辉忠, 电子信箱: Qiuhezpume@yahoo.com.cn