

球形碳酸钙/羟基磷灰石的制备及药物控释

钟奇伟,蔡玉荣

(浙江理工大学材料与纺织学院,杭州 310018)

摘 要: 丝胶蛋白调控得到尺寸均一的球形碳酸钙颗粒,并以此为硬模板,辅以水热,制备羟基磷灰石微球。以盐酸阿霉素为药物模型,用合成的碳酸钙、羟基磷灰石球形颗粒对其分别进行有效负载和可控释放研究,并用体外实验评价载药颗粒对共培养细胞的影响。用场发射扫描电子显微镜(FE-SEM)、傅里叶红外吸收光谱(FT-IR)、X射线粉末衍射(XRD)、紫外分光光度计和荧光显微镜等对样品进行了检测。结果表明:丝胶有利于碳酸钙球霏石相的稳定,同时通过离子交换反应可将碳酸钙转化为羟基磷灰石,碳酸钙和羟基磷灰石对盐酸阿霉素最佳负载浓度分别为 $8\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$,羟基磷灰石对药物的控制释放能力更强。体外 Huh-7 肝癌细胞实验表明载药颗粒对细胞的增殖有明显抑制作用,证明所制颗粒的药物负载和释放功能。

关键词: 碳酸钙;羟基磷灰石;药物载体;负载及释放

中图分类号: TB34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851 (2016) 05-0685-06 **引用页码:** 090204

0 引 言

骨组织工程^[1]在治愈骨缺损时可以避免传统骨移植存在的供体有限,复杂手术和免疫排斥反应等问题^[2-3],因此得到广泛的研究。理想的支架材料不仅需要提供细胞黏附、增殖、分化的临时场所,而且有对生长因子的强吸附能力。目前研究较多的支架材料主要有生物活性玻璃^[4]、磷酸钙骨水泥^[5]、可注射水凝胶^[6]等。

羟基磷灰石(HAP)是脊椎动物天然骨和牙齿的主要无机成分,因此具有良好的生物相容性和骨传导性^[7],在骨组织工程中常被用作支架材料。同时,羟基磷灰石具有强吸附性,应用在催化、重金属吸附和药物缓释等领域^[8-10]。Kasuya 等^[11]发现羟基磷灰石和不同浓度的明胶(10%~15%)在动物体内实验中表现出优异的机械能力和生物降解性,并能促进新骨的生成。Jun 等^[12]将骨形态发生蛋白-2 负载在多孔羟基磷灰石上,在生长因子逐步释放下促进了新骨形成。

本实验利用丝胶蛋白作为有机调控剂,制备了尺寸均一的球形碳酸钙颗粒,并以此为硬模板,水热法合成多孔羟基磷灰石微球。盐酸阿霉素是一种高效抗癌药,利用碳酸钙和羟基磷灰石微球对盐酸阿霉素的负载和释放,与 Huh-7 肝癌细胞的共培养表征两种载体材料的药物控释能力。

1 实 验

1.1 实验试剂

丝胶蛋白(分子量 $\approx 8000\text{Da}$)来自湖州奥特丝生物化工有限公司;无水氯化钙(CaCl_2)、无水碳酸钠(Na_2CO_3)、氢氧化钠(NaOH)、十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、浓盐酸(HCl)、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、氯化镁(MgCl_2)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、无水乙醇等试剂均为分析纯,Dio 染色液、CCK-8 试剂盒等购于杭州米克化工仪器有限公司;盐酸阿霉素购于 Sigma 公司;肝癌 Huh-7 细胞为实验室冻存的细胞。

收稿日期:2015-11-16

基金项目:国家自然科学基金项目(51202219);浙江省自然科学基金项目(LY16E020013)

作者简介:钟奇伟(1990-),男,浙江湖州人,硕士研究生,主要从事生物材料方面的研究。

通信作者:蔡玉荣,E-mail: caiyr@zstu.edu.cn

1.2 碳酸钙微球的制备

室温条件下,将 0.2 M 的 CaCl_2 溶液缓慢滴加到 2 g/L 的丝胶蛋白溶液中,磁力搅拌混合均匀,用 1 M 的 NaOH 溶液调节溶液 pH 至 7。接着加入 0.2 M 的 Na_2CO_3 溶液,40 °C 水浴机械搅拌 180 min。反应结束后,将白色悬浊液用 0.22 μm 的滤纸抽滤,将所得滤饼用无水乙醇和去离子水各洗 3 次,最后将滤饼放入 60 °C 烘箱中干燥 48 h。

1.3 羟基磷灰石微球的制备

准确称取 5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 15 mL 去离子水,完全溶解后用 1 M NaOH 调节溶液 pH 至 9.5。然后加入 0.5 g 球形碳酸钙颗粒,磁力搅拌并超声 30 min,形成悬浊液后置于聚四氟乙烯反应釜中,在 140 °C 烘箱中分别反应 2、4、8、16 h。反应完成后,产物用 0.22 μm 的滤纸抽滤,将所得滤饼用无水乙醇和去离子水各洗 3 次,最后将滤饼放入 60 °C 烘箱中干燥 48 h。

1.4 碳酸钙和羟基磷灰石微球对盐酸阿霉素的负载

取浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的盐酸阿霉素溶液 20 mL,加入 10 mg 碳酸钙颗粒,37 °C 水浴,110 r/min 震荡速率下保持 24 h。负载完成后,将悬浊液高速离心,收集上清液,利用紫外可见分光光度计对上清液检测,差值法计算颗粒上负载上的盐酸阿霉素的量,用 Origin 软件作图,得出两种颗粒对药物的最佳负载浓度,实验设置 3 个平行样。羟基磷灰石负载实验方法和碳酸钙相同。

$$\text{载药量}/\% = \frac{M_{\text{总}} - M_{\text{上清中}}}{M_{\text{总}}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{载药能力}(\text{mg/g}) = \frac{M_{\text{总}} - M_{\text{上清中}}}{M_{\text{总}} + M_{\text{材料}}} \quad (2)$$

其中 $M_{\text{总}}$ 表示加入的总药量; $M_{\text{上清中}}$ 表示在离心后在上清液中的残余药量; $M_{\text{材料}}$ 表示载体材料的质量^[13]。

1.5 载药碳酸钙和羟基磷灰石微球的体外释放

将载有盐酸阿霉素的颗粒 20 mg 分散在 40 mL 的 0.01 M PBS 缓冲液中,37 °C 水浴,110 r/min 震荡速率下保持 24 h。在规定的时间内取出样品,在 8000 r/min 下离心 15 min,吸取 0.6 mL 上清液用紫外分光光度计测定上清液中盐酸阿霉素的含量,然后补充 0.6 mL 的 PBS。用 Origin 软件统计药物累积释放量。每个样品设置 3 组平行样。

1.6 载药碳酸钙和羟基磷灰石微球体外细胞实验

将碳酸钙和羟基磷灰石微球用紫外线照射 48 h 灭菌。然后准确称取两种载药颗粒各 10 mg 分别均匀平铺到 48 孔板底部。加入处于对数生长期的 Huh-7 细胞悬浊液,并补加新鲜完全培养基至每孔细胞浓度为 1.5×10^4 cell/mL,实验空白对照组为不加颗粒的情况下培养,每组实验设置 3 个平行样。用 DiO 细胞染色剂和 CCK-8 试剂盒表征。

DiO 是一种亲脂性膜染料,进入细胞膜后可以侧向扩散逐渐使整个细胞的细胞膜被染色,在倒置荧光显微镜下可以直观的观察细胞的形态和数量。

CCK-8 试剂盒是一种基于 WST-8 的快速高灵敏度的试剂盒,主要用于细胞增殖及细胞毒性的检测。就同一种细胞而言,其颜色深浅程度与细胞数量成线性关系,颜色越深,说明细胞的数量越多,材料毒性越小。

1.7 材料表征

样品分析:Hitachi 公司 S4800 场发射扫描电镜分析,Thermo Electron 公司 XTRA 型 X 射线粉末衍射仪分析,Thermo Electron 的 Nicolet 5700 型傅里叶变换红外光谱,Hitachi 公司的 U-2900 型紫外分光光度计,Bio-Rad 公司的 680 行酶标仪和日本 Nikon 公司的 C2 型激光共聚焦显微镜。

2 结果与分析

2.1 碳酸钙微球表征

图 1 是在丝胶蛋白浓度 2 g/L 条件下制备的球形碳酸钙颗粒。如图 1(a)扫描电镜所示,反应过程中加入丝胶蛋白时,制备了均一分散的球形碳酸钙颗粒,表面光滑,球形度好。高分辨率扫描电镜观察到颗粒的表面有很多小孔。图 1(b) XRD 所示,添加丝胶蛋白的体系中,碳酸钙的晶型有方解石型(JCPDS 47-1743),也有球霏石型(JCPDS 33-0268),表明丝胶蛋白有利于球霏石相的稳定。图 1(c) FT-IR 所示碳酸钙在 713 cm^{-1} 、877 cm^{-1} 和 1440 cm^{-1} 处吸收峰,分别表示方解石中 CO_3^{2-} 基团的 O—C—O 面内变形振动峰,O—C—O 面外变形振动峰和 C—O 反对称伸缩振动峰,1087 cm^{-1} 处为 CO_3^{2-} 基团称伸缩振动峰^[14],同时在 746 cm^{-1} 处出现的吸收峰是球霏石中 O—C—O 面内变形振动峰。

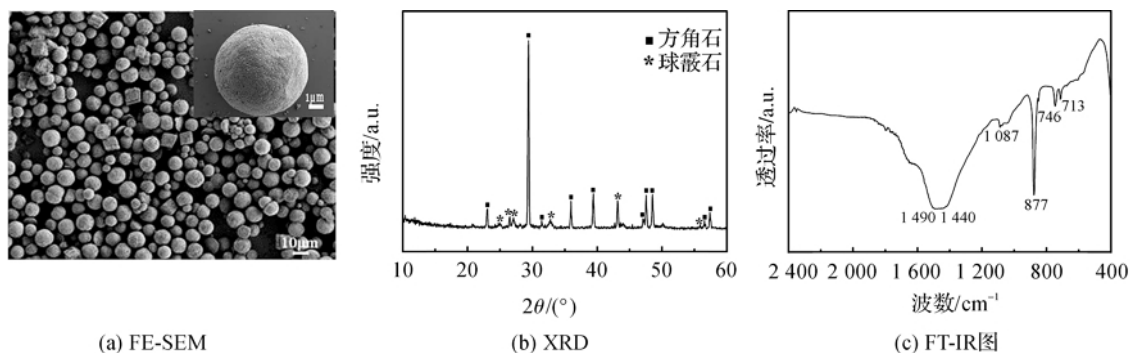


图1 碳酸钙微球表征

2.2 羟基磷灰石微球的表征

羟基磷灰石微球是以球形碳酸钙为模版,在pH值为9.5的磷酸氢二钠溶液中通过水热反应,用 PO_4^{3-} 取代碳酸钙中的 CO_3^{2-} ,逐步转换成羟基磷灰石。模板法合成羟基磷灰石能保持碳酸钙粒子的尺寸和形貌。

如图2所示,随着反应时间从2 h增加到16 h,颗粒始终保持良好的球形度,尺寸分布在 $5\ \mu\text{m}$ 左右。随着反应时间的增加,微球表面的粗糙程度增加,由致密变成疏松多孔状,16 h时微球表面变得凹凸不平。因此,高温高压下延长水热反应时间可以增加羟基磷灰石表面粗糙度,增大比表面积。

图3(a)表示不同水热反应时间下得到的羟基磷灰石微球的XRD图。由方解石型(JCPDS 47-1743)和羟基磷灰石标准卡片(JCPDS 09-0432)可得,反应2 h后,有部分碳酸钙逐渐转化成羟基磷灰石。反应时间进一步增加,羟基磷灰石的衍射峰更加明显,结晶度高。达到16 h时,绝大部分的碳酸钙已经转化成羟基磷灰石,还有极少量的方解石残留。图3(b) FT-IR所示,在 $1039\ \text{cm}^{-1}$ 处的最强

吸收峰表示 PO_4^{3-} 的伸缩振动峰(ν_3)、 $567\ \text{cm}^{-1}$ 、 $603\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 PO_4^{3-} 基团的弯曲振动峰(ν_4)。713 cm^{-1} 出吸收峰为未反应完全的方解石相。由于 CO_3^{2-} 嵌入羟基磷灰石的 PO_4^{3-} 晶格中从而发生 β 取代,使得红外光谱中在 $877\ \text{cm}^{-1}$ (ν_2)、 $1440\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1490\ \text{cm}^{-1}$ (ν_3)处出现了 CO_3^{2-} 吸收峰,表明颗粒为碳酸化的羟基磷灰石^[15]。

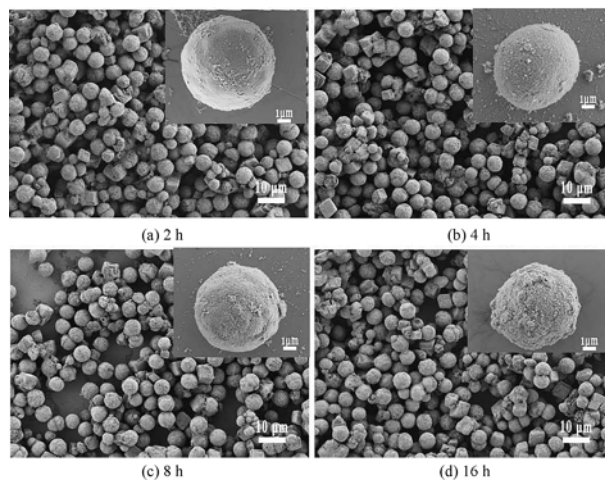


图2 不同水热时间下制备的羟基磷灰石微球 FE-SEM 图

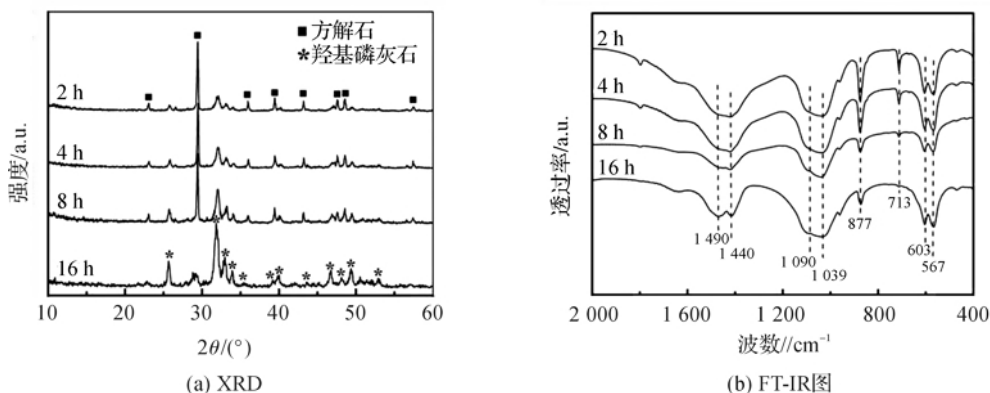


图3 不同水热时间下制备的羟基磷灰石微球

2.3 药物在碳酸钙和羟基磷灰石微球上的负载行为

图4为盐酸阿霉素在300~650 nm的波长范围内的吸光度分布曲线,可知药物的最大吸收波长为480

nm。然后分别配制一系列不同浓度的盐酸阿霉素溶液,测定其在480 nm下的吸光度值,计算得到标准工作曲线方程为 $Y=0.01987X-0.00129$, $R^2=0.99903$ 。

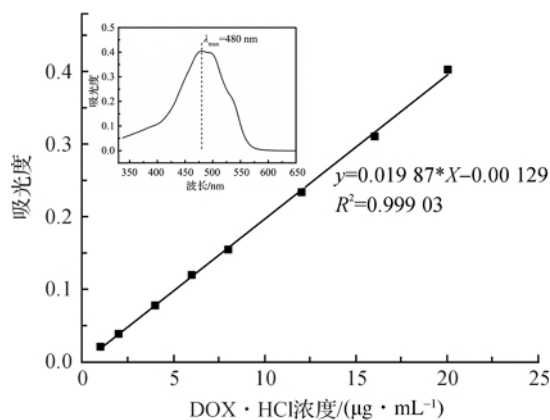


图4 盐酸阿霉素标准工作曲线

在骨修复治疗中,使用的药物高效但昂贵,必须提高药物的有效使用率,所以定量研究载体材料的吸附能力十分必要。载药量和载药能力是评价载体材料负载能力的两大指标。如图5所示,对于10 mg的碳酸钙颗粒,当盐酸阿霉素的浓度从1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加到20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,载药量从95%左右快速降至25%。同时,药物浓度从1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加到8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,载药能力直线式上升。浓度继续增加到20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,载药能力逐渐处于定值。综合载药能力和载药量,10 mg的碳酸钙负载8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸阿霉素是最高效的。

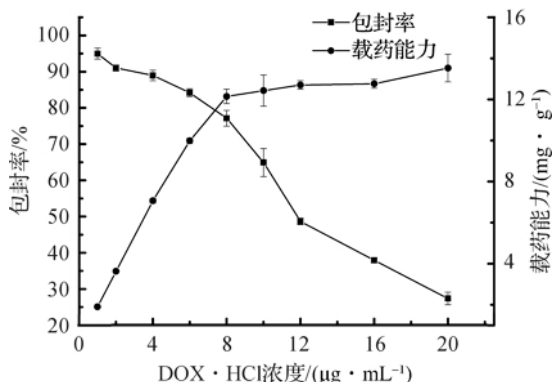


图5 盐酸阿霉素的浓度对碳酸钙药物载药量和载药能力的影响

如图6所示,对于10 mg的羟基磷灰石颗粒,当盐酸阿霉素的浓度从1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增至10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,羟基磷灰石微球载药量保持在90%以上,缓慢下降,载药能力快速上升。当药物浓度继续增至20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,载药量快速下降至50%,载药能力变化趋于稳定。综合载药能力和载药量,10 mg的羟基磷灰石负载10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸阿霉素是最高效的。

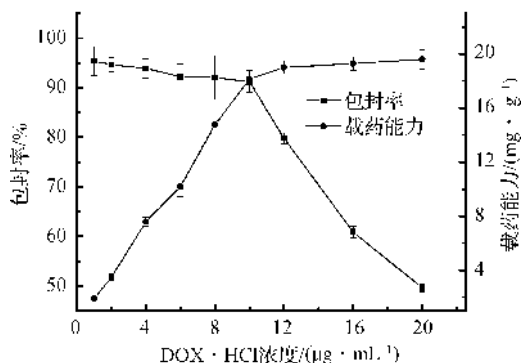


图6 盐酸阿霉素的浓度对羟基磷灰石药物载药量和载药能力的影响

以上分析可知羟基磷灰石对药物负载能力要强于碳酸钙。由于羟基磷灰石中含有大量的 OH^- 和 PO_4^{3-} 等,而盐酸阿霉素分子结构中含有带负电荷的 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}_2$ 等化学基团,而且还含有 H^+ , 通过静电或者氢键对药物具有更优的吸附性能。此外,羟基磷灰石微球表面的多孔结构使其有更大的比表面积,能为药物提供更多的附着位点。

2.4 药物在碳酸钙和羟基磷灰石微球上的释放行为

图7为盐酸阿霉素在碳酸钙和羟基磷灰石微球上的累积释放量随时间变化曲线。盐酸阿霉素在碳酸钙微球上的释放可分为两个阶段:前期突释和后期缓慢释放。释放开始至12 h,药物释放量迅速达到60%,平均释放速率为18.3 $\mu\text{g}/\text{h}$,有明显的突释现象。到168 h,药物释放速度逐渐下降至稳定,平均释放速率为1.5 $\mu\text{g}/\text{h}$,最终释放量达到89.7%。对于羟基磷灰石微球,释放开始至12 h,平均释放速度为12.3 $\mu\text{g}/\text{h}$,释放量达到36.8%。至96 h,药物释放速度相对变缓,平均释放速率为2.1 $\mu\text{g}/\text{h}$,释放量达到44.3%。到168 h时释放量基本达到稳定,最终释放了84.3%。当释放时间点12 h,两者的释放量有显著差异($p < 0.05$),羟基磷灰石的突释行为要小的多。如果要进一步减少前期突释,可以对微球进行表面改性,增加对药物的吸附能力。

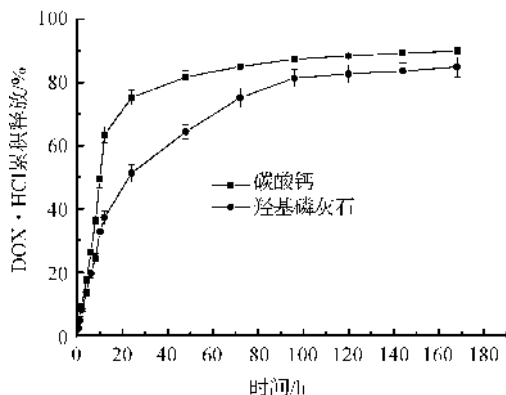
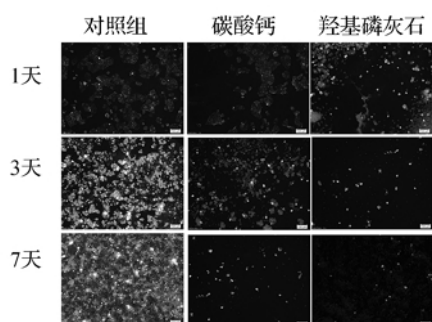


图7 载药碳酸钙和羟基磷灰石体外释放曲线

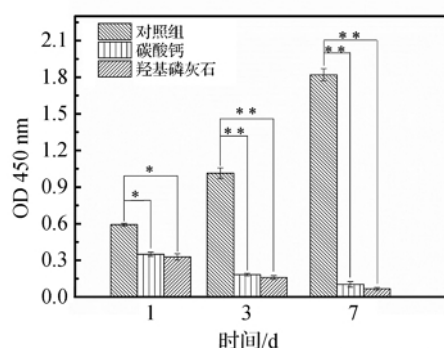
2.5 载药颗粒的体外细胞实验

图8为Huh-7细胞与载药碳酸钙和羟基磷灰石微球共培养1、3、7d增殖实验。如图,在培养初期Huh-7细胞轮廓呈椭圆形,没有伪足和触角。培养1d后,碳酸钙和羟基磷灰石上的细胞绿色荧光稍弱。3d后,基本只能看到星星点点的亮光,碳酸钙上的细胞数量要多于羟基磷灰石。7d后,实验组荧光强度非常弱,细胞基本凋亡。图8(b)是用CCK-8试剂盒定量表征Huh-7细胞的增殖数量。与对照组相比,载药颗粒对Huh-7细胞的生长有明显抑制作用。1d后,空白对照组的细胞数量比载药颗粒

上细胞数量多($p < 0.05$)。3d后,Huh-7细胞在获得充足的营养后迅速增殖,载药颗粒共培养的细胞数量减少,因为在释放的盐酸阿霉素作用下被杀死($p < 0.01$)。7d后,空白对照组的细胞数量进一步增加,而颗粒上的细胞进一步凋亡($p < 0.01$)。其中,在每个时间点,载药羟基磷灰石对肝癌细胞的抑制效果要好于碳酸钙,主要有两个原因:一是羟基磷灰石负载的药物量大于碳酸钙,药物释放量大,对细胞的抑制作用明显;二是羟基磷灰石能够更好的保持药物的活性,对Huh-7肝癌细胞的杀伤力更大。



(a) 细胞经DiO染色后的荧光图



(b) 细胞在1、3、7d后数量增殖变化

图8 载药颗粒对Huh-7细胞增殖的影响

3 结论

a) 在丝胶蛋白的调控下,得到尺寸均一的球形碳酸钙颗粒。以其为硬模板,在磷酸根离子过饱和条件下合成了结晶度好、纯度高的多孔羟基磷灰石微球。

b) 羟基磷灰石的负载能力要强于碳酸钙。且药物释放过程中,碳酸钙有突释,而羟基磷灰石与药物通过氢键或者静电作用结合,控制药物释放能力较强。

c) 载药颗粒与Huh-7肝癌细胞共培养7d发现,两种载药颗粒都对肝癌细胞增殖产生抑制,且羟基磷灰石的抑制作用更明显。

参考文献:

- [1] PETITE H, VIATEAU V, BENSARD W, et al. Tissue-engineered bone regeneration [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(9): 959-963.
- [2] SANTO V E, GOMES M E, MANO J F, et al. Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering-part I: recapitulation of native tissue healing and variables for the design of delivery systems [J]. Tissue Engineering Part B: Reviews,

2013, 19(4): 308-326.

- [3] SUN X, KANG Y, BAO J, et al. Modeling vascularized bone regeneration within a porous biodegradable CaP scaffold loaded with growth factors [J]. Biomaterials, 2013, 34(21): 4971-4981.
- [4] YANG S, GUO Q, SHORES L S, et al. Use of a chondroitin sulfate bioadhesive to enhance integration of bioglass particles for repairing critical-size bone defects [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2015, 103(1): 235-242.
- [5] VENTURA M, SUN Y, CREMERS S, et al. A theranostic agent to enhance osteogenic and magnetic resonance imaging properties of calcium phosphate cements [J]. Biomaterials, 2014, 35(7): 2227-2233.
- [6] NI P Y, DING Q X, FAN M, et al. Injectable thermosensitive PEG-PCL-PEG hydrogel/acellular bone matrix composite for bone regeneration in cranial defects [J]. Biomaterials, 2014, 35(1): 236-248.
- [7] WANG J Q, ZHANG X D, NIE M, et al. Exotic spartina alterniflora provides compatible habitats for native estuarine crab sesarma dehaani in the yangtze river estuary [J]. Ecological Engineering, 2008, 34(1): 57-64.
- [8] JIANG S D, YAO Q Z, ZHOU G T, et al. Fabrication

- of hydroxyapatite hierarchical hollow microspheres and potential application in water treatment [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2012, 116(7): 4484-4492.
- [9] MIZUGAKI T, NAGATSU Y, TOGO K, et al. Selective hydrogenation of levulinic acid to 1, 4-pentanediol in water using a hydroxyapatite-supported Pt-Mo bimetallic catalyst [J]. Green Chemistry, 2015, 17(12): 5136-5139.
- [10] MAEHARA H, SOTOME S, YOSHII T, et al. Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) [J]. Journal of Orthopaedic Research, 2010, 28(5): 677-686.
- [11] KASUYA A, SOBAJIMA S, KINOSHITA M. In vivo degradation and new bone formation of calcium phosphate cement-gelatin powder composite related to macroporosity after in situ gelatin degradation [J]. Journal of Orthopaedic Research, 2012, 30(7): 1103-1111.
- [12] JUN S H, LEE E J, JANG T S, et al. Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded hybrid coating on porous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2013, 24(3): 773-782.
- [13] LIANG Y H, LIU C H, LIAO S H, et al. Cosynthesis of cargo-loaded hydroxyapatite/alginate core-shell nanoparticles (HAP@Alg) as pH-responsive nanovehicles by a pre-gel method [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2012, 4(12): 6720-6727.
- [14] SORIANO-SOUZA C A, ROSSI A L, MAVROPOULOS E, et al. Chlorhexidine-loaded hydroxyapatite microspheres as an antimicrobial delivery system and its effect on in vivo osteoconductive properties [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2015, 26(4): 1-15.
- [15] GUO Y J, WANG Y Y, CHEN T, et al. Hollow carbonated hydroxyapatite microspheres with mesoporous structure: Hydrothermal fabrication and drug delivery property [J]. Materials Science and Engineering: C, 2013, 33(6): 3166-3172.

Preparation of CaCO_3 and Hydroxyapatite Microsphere and Its Potential Application in Drug-Controlled Release

ZHONG Qiwei, CAI Yurong

(College of Materials and Textiles, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Spherical CaCO_3 particles were fabricated in the presence of the silk sericin and then hydroxyapatite (HAP) microspheres were prepared by taking spherical CaCO_3 particles as the hard template via hydrothermal method. The load and controlled release of DOX · HCl were performed by using doxorubicin hydrochloride as drug model and applying the obtained CaCO_3 and HAP spheres as carries respectively. The influence of drug-loaded particles on cell culture was evaluated through in-vitro experiment. Field emission scanning electron microscope (FE-SEM), Fourier infrared absorption spectrum (FT-IR), X-ray diffraction pattern (XRD), UV spectrophotometer and confocal laser scanning microscopy were applied to characterize the samples. Results show that vaterite phase of CaCO_3 can be stabilized by silk sericin, and CaCO_3 can be transformed to HAP by the ion-exchange reaction. For the loading of drug, the optimum concentrations of DOX · HCl for CaCO_3 and HAP are 8 and 10 $\mu\text{g/mL}$ separately. HAP has stronger ability for controlled release of drugs. In vitro cell experiment shows an obvious inhibition role of loaded-DOX · HCl particles for Huh-7 cells and potential application as drug carriers. This proves drug loading and releasing functions of the particles.

Key words: CaCO_3 ; hydroxyapatite; drug carrier; loading and release

(责任编辑: 许惠儿)