

# 同时缓释骨形态发生蛋白和氯己定的功能性壳聚糖温敏凝胶的制备 Preparation of Functional Chitosan Thermosensitive Hydrogel for Slow Release both rhBMP-2 and Chlorhexidine

马志伟<sup>1\*</sup>, 王 荣<sup>2</sup>, 吴织芬<sup>1</sup>, 陈 栋<sup>1</sup>, 张邦乐<sup>3</sup>, 何 炜<sup>3</sup>, 王晓娟<sup>2</sup>, 刘 青<sup>1</sup>, 许 杰<sup>1</sup>, 朱 浩<sup>1</sup>

MA Zhi-Wei<sup>1\*</sup>, WANG Rong<sup>2</sup>, WU Zhi-Fen<sup>1</sup>, CHEN Dong<sup>1</sup>, ZHANG Bang-Le<sup>3</sup>, HE Wei<sup>3</sup>, WANG Xiao-Juan<sup>2</sup>, LIU Qing<sup>1</sup>, XU Jie<sup>1</sup> and ZHU Hao<sup>1</sup>

1 第四军医大学口腔医学院牙周黏膜病科 西安 710032

2 第四军医大学口腔医学院药剂科 西安 710032

3 第四军医大学药理学系 西安 710032

1 Department of Periodontology and Mucosal Diseases, College of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

2 Department of Pharmacology, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

3 School of Pharmacy, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

**摘 要** 壳聚糖温敏凝胶是一种新型的可注射、在体固化的载体材料,该材料在室温条件下呈生理中性的溶液状态,在 37℃ 左右可由溶液转变成水凝胶。该水凝胶对大分子药物具有良好的缓释效能,但对小分子药物缓释效能极差。为制备同时缓释生长因子重组人骨形态发生蛋白-2 (recombined human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2) 和抗菌药物氯己定的功能性壳聚糖温敏凝胶,将小分子药物氯己定先与  $\beta$ -环糊精制备成包结物,再将 rhBMP-2 与  $\beta$ -环糊精/氯己定包结物共混于壳聚糖温敏凝胶中,通过 HAAKE 粘度测量仪,对比加入目标药物前后系统的流变学性质,并且分别通过高效液相 (high performance liquid chromatography, HPLC) 和酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 方法测量目标药物的体外释放性质,温敏凝胶系统的流变学性质几乎未受加入药物的影响。而氯己定从凝胶系统中释放的速度大大减慢,药物持续释放可保持 1 月以上。同时, rhBMP-2 也获得较好的缓释效果。通过先行环糊精包结共混的方法,成功制备同时缓释 rhBMP-2 和氯己定的功能性温敏凝胶。

**关键词** 温敏凝胶 壳聚糖  $\beta$ -环糊精 重组人骨形态发生蛋白-2 氯己定 缓释

中图分类号 R318.08 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1049-06

**Abstract** The chitosan thermosensitive hydrogel is liquid at room temperature but gels rapidly when heated to body temperature. This hydrogel are wildly used for cell encapsulation, drug delivery or tissue-engineered scaffolds. The system can sustain the release of macromolecules over a period of several hours to a few days. However, with low-molecular-weight compounds, the release is generally completed within 24 h. To prepare a functional chitosan thermosensitive hydrogel for slow release both broad-spectrum antibiotic chlorhexidine and growth factor recombined human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), The  $\beta$ -

Received: December 13, 2006; Accepted: February 26, 2007.

This work was supported by the grant from the Shaanxi Science and Technology Research and Development Projects (No. 2006K14-G3).

\* Corresponding author. Tel: +86-29-84776093; E-mail: mazhiweifmmu@gmail.com

陕西省科学技术研究发展计划项目 (No. 2006K14-G3) 资助。

cyclodextrin was used to prepare an inclusion complex with chlorhexidine , and then the latter was incorporated into the chitosan thermosensitive hydrogel system. Simultaneously , rhBMP-2 was added into the hydrogel system. By HAAKE viscosity measuring instrument , we contrasted the viscoelastic properties of system with or without objective factors. And the *in vitro* release kinetics of chlorhexidine and rhBMP-2 was investigated by HPLC( high performance liquid chromatography ) and ELISA( enzyme-linked immunosorbent assay ) respectively. The results showed that the addition of chlorhexidine/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex to the thermosensitive solution did not change the gelling behavior of the thermosensitive system. Further , the *in vitro* release profiles demonstrated that the release rate of chlorhexidine and rhBMP-2 from hydrogel became slower , controlled delivery over at least 1 month. By first preparing chlorhexidine/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex , and then mixing the IC and rhBMP-2 into the chitosan thermosensitive hydrogel , a functional chitosan thermosensitive hydrogel system with ability of slow release both rhBMP-2 and chlorhexidine is successfully made.

**Key words** thermosensitive hydrogel , chitosan ,  $\beta$ -cyclodextrin , rhBMP-2 , chlorhexidine , slow release

同时缓释生长因子和抗生素对许多环境的组织再生有特别的意义。例如 ,口腔医学领域的牙周组织再生 ,既需要生长因子长效发挥作用促进牙周膜细胞的增殖分化 ,同时 ,因为牙周组织所处的环境在口腔 ,易受细菌的干扰 ,也需要抗生素发挥作用。有研究表明 ,局部应用抗生素 ,能够减少牙周组织再生手术的感染 ,从而提高牙周组织再生手术的成功率。这样的组织再生环境还有烧伤的创面、骨髓炎等。

材料的使用方法是否简便、能否方便地应用于多个领域同样影响材料的开发前景。壳聚糖-甘油磷酸钠温敏凝胶系统是一种使用方便、可在多个领域应用的优异的给药系统 ,近年来受到高度关注<sup>[1-8]</sup>。该系统于 2000 年由加拿大蒙特利尔的多聚体应用研究中心和当地的 BIOSYNTECH 公司的研究人员最早提出<sup>[1]</sup>。其主要成分是天然高分子材料壳聚糖 ,室温条件下该系统呈生理中性的溶液 ,当温度升高到 37℃ 时 ,该系统可以迅速发生相转变 ,成为半固态的水凝胶。该载体材料已经被研究用于关节修复、肿瘤治疗、长效镇痛等<sup>[4]</sup>。该凝胶系统对大分子药物可以发挥较好的缓释效果 ,可以预计其对生长因子具有一定的缓释效能 ,但对小分子的药物不具有缓释效能<sup>[5,6]</sup> ,所以对抗生素 ,其缓释效能将很差。如何针对该缺点进行改进 ,学者进行了有益的探索 ,例如 ,E. Ruel-Gariepy 等利用脂质体包裹小分子药物羧基荧光素( 5( and-6 )-carboxyfluorescein , CF ) ,使该药物释放的速率明显减慢 ,2 周时仅释放了 26% ~ 72% ,突释的时间小于 1 天。而直接在凝胶中混入 CF ,该药物在 1 天之内即释放完毕<sup>[6]</sup>。这个方法取得了不错的结果 ,但制备相对麻烦。

$\beta$ -环糊精分子是具有环状空筒特殊结构的环状低聚多糖 ,含 7 个葡萄糖分子( 图 1a  $\beta$ -环糊精分子结构式 ) ,是一种良好的新型药物包合材料。近年来

$\beta$ -环糊精在药物缓控释方面的应用越来越多<sup>[9]</sup>。将小分子物质包结于环糊精后再共混于壳聚糖温敏凝胶 ,是否可赋予壳聚糖温敏凝胶系统缓释小分子物质的能力 ,本研究对此进行了探索。

我们将氯己定选做小分子物质的模型 ,是因为氯己定是对葛兰氏阳性细菌、葛兰氏阴性细菌、真菌、病毒都有杀灭作用的广谱杀菌剂 ,应用非常的广泛、安全<sup>[11]</sup>。并且 ,由于其分子结构特殊 ,可方便的通过紫外分光等方法检测( 图 1b 氯己定分子结构式 )。我们同时对加入凝胶的大分子物质重组人骨形态发生蛋白  $\alpha$  ( rhBMP-2 ) 的释放进行检测。rhBMP-2 是具有确切诱导成骨活性的生长因子 ,其主要生物学作用是诱导未分化的间充质细胞分化形成骨和软骨 ,在修复骨缺损和促进骨愈合方面有重要作用 ,但单独局部使用疗效并不理想。因此 ,通常情况下 ,都是与各种形式的载体复合应用。本实验的结果可为载药凝胶系统的体内使用奠定基础。

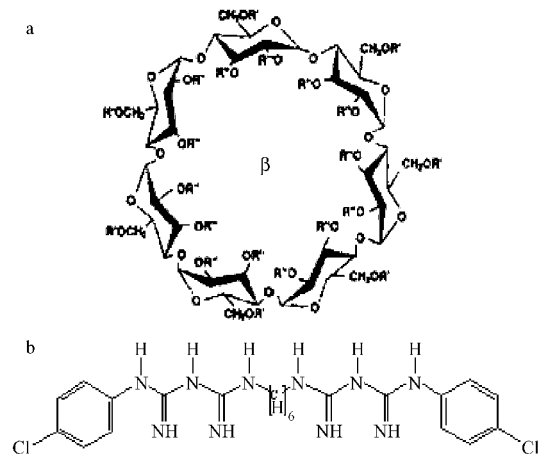


图 1  $\beta$ -环糊精( a )和氯己定( b )分子结构式

Fig.1 Molecule structures of  $\beta$ -CD( a ) and chlorhexidine( b )

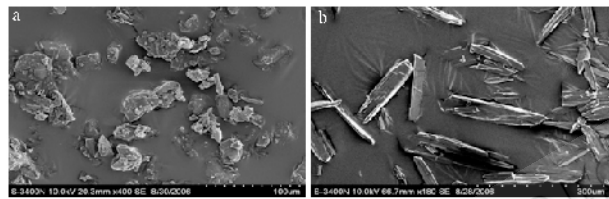


SPSS10.0 软件(第四军医大学统计教研室),显著性差异设为  $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1  $\beta$ -环糊精/氯己定包结物(IC)的制备与鉴定

最终产物为淡黄色的细小结晶颗粒。扫描电镜观察到包结物为细针形结晶颗粒,这与  $\beta$ -环糊精的镜下形态( $\beta$ -环糊精镜下形态表现为不规则的类立方体)明显不同(图 2a、2b)。红外光谱扫描显示(图 3),包结物中氯己定苯环的基团特征区吸收峰相对原药在此区域发生红移,氯己定结构中非极性的苯环进入了  $\beta$ -环糊精空穴中,形成了新的物相,表明氯己定与  $\beta$ -环糊精在反应条件下确实形成了包结物。包结物紫外扫描图谱与氯己定原药的图谱一致,说明包结物中氯己定未发生化学变化,仅为物理包合作用(紫外扫描分析结果未列出)。DL 值测定为  $(40.11 \pm 4.28)\%$ 。



2  $\beta$ -环糊精(a,  $\times 400$ )和  $\beta$ -环糊精/氯己定包结物(b,  $\times 180$ )  
扫描电镜照片

Fig.2 SEM photograph of  $\beta$ -CD(a,  $\times 400$ )  
and IC(b,  $\times 180$ )

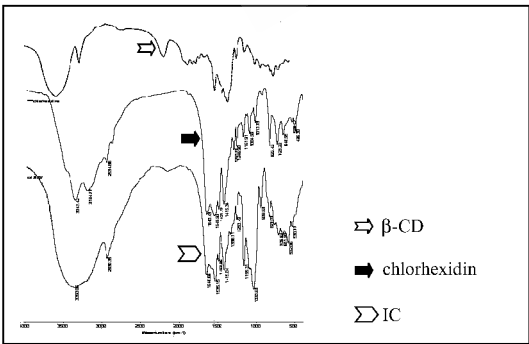


图3  $\beta$ -环糊精、氯己定及包结物的红外扫描图谱

Fig.3 IR of  $\beta$ -CD, chlorhexidin and IC

2.2 壳聚糖温敏凝胶及载药凝胶系统制备

单纯壳聚糖温敏凝胶溶液透明,在  $37^\circ\text{C}$  孵箱内可于 8min 左右形成稳定的凝胶,呈淡乳白色,凝胶形态良好。加载包结物后,溶液微浑浊,略带黄色,在  $37^\circ\text{C}$  孵箱内可于 8min 左右形成稳定的凝胶,凝胶略带黄色,状态良好(见图 4a、4d)。

载药凝胶的扫描电镜照片见图 5a、5b,可见凝

胶的多空隙结构。

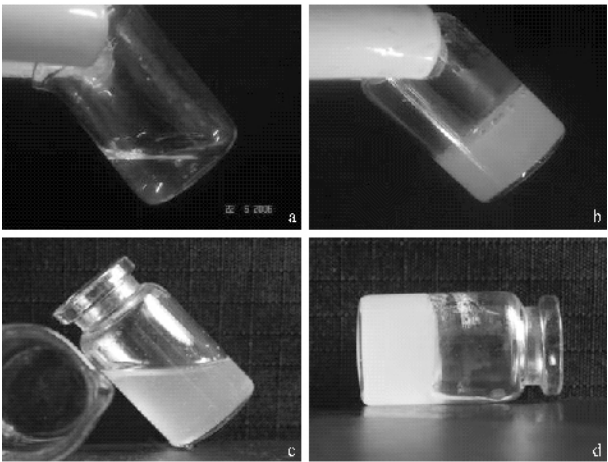


图4 壳聚糖温敏凝胶溶液状态(a),壳聚糖温敏凝胶凝胶状态(b),共混  $\beta$ -环糊精/氯己定包结物的壳聚糖温敏凝胶溶液状态(c),共混  $\beta$ -环糊精/氯己定包结物的壳聚糖温敏凝胶凝胶状态(d)

Fig.4 The photo of thermosensitive hydrogel at liquid state (a), thermosensitive hydrogel at gel state (b), thermosensitive hydrogel with IC loaded at liquid state (c), and thermosensitive hydrogel with IC loaded at gel state (d)

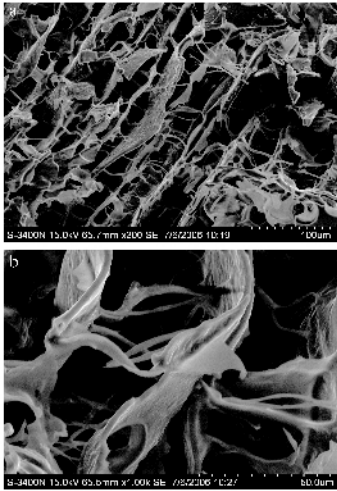


图5 功能性凝胶的扫描电镜照片(a:  $\times 300$  b:  $\times 1000$ )

Fig.5 SEM photograph of functional hydrogel  
(a:  $\times 300$  b:  $\times 1000$ )

2.3 流变学测定

三组凝胶的黏性系数随温度及时间的变化曲线如图 6a 和 6b,数据经统计分析,并无显著性差异(数据未列出)。测定过程中,测定样品中观察到絮状产物,但并未形成凝胶。这是由于凝胶形成需要一个稳定的环境,仪器桨片的搅动会阻止凝胶的形成。载药凝胶系统与单纯的凝胶系统在流变学变化趋势上并未出现显著性差异,可以认为,本研究中的加药条件并未对凝胶系统形成凝胶的性质产生影

响。

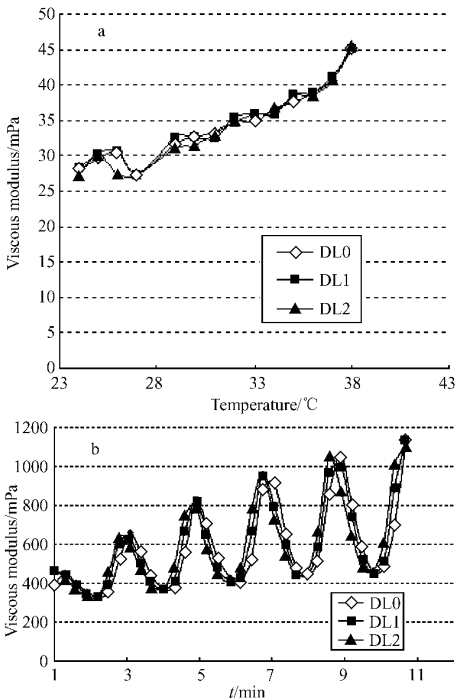


图 6 温度升高(1℃/min)过程中凝胶黏度的变化(a)以及恒温 37℃下凝胶黏度随时间的变化(b)

Fig.6 Change of viscosity with temperature varied at the rate of 1℃/min(a) and the change of viscosity with time at 37℃(b)

2.4 稳定性测定

空白凝胶溶液状态的外观和  $OD_{600}$  在一月内并无显著变化,加载环糊精包结物后,溶液变的浑浊,但温度升高到 25℃,溶液可恢复清亮。4℃下放置 24h 可观察到轻度分层现象,3d 后明显分层。37℃条件下,无论是否加载药物,溶液都在 8min 左右形成稳定的凝胶,凝胶外观在一月内无明显变化,从第二天起,可观察到有少量液体从凝胶周围析出。

2.5 体外释放测定

氯己定药物直接加入壳聚糖温敏凝胶,实验条件下,大约 12h 即释放完毕(图 7, DL3),因此,壳聚糖温敏凝胶不能直接作为氯己定药物的缓释载体;但是,与环糊精形成包结物后再加入凝胶,则氯己定释放速度大大减慢,可缓释达 40d。包结物的浓度影响其缓释效果,本实验中,低浓度组(DL1)含 3g/L 的包结物,40d 时,氯己定累积释放  $(60 \pm 4.1)\%$ ;高浓度组 DL2 组含 6g/L 的包结物,40d 时,氯己定累积释放  $(97 \pm 3.8)\%$ 。可见,低浓度的包结物将使氯己定释放的更慢。

rhBMP-2 释放曲线如图 7。DL4 组含 0.1mg/L 的 rhBMP-2;DL5 组含 0.2mg/L 的 rhBMP-2;DL6 组含

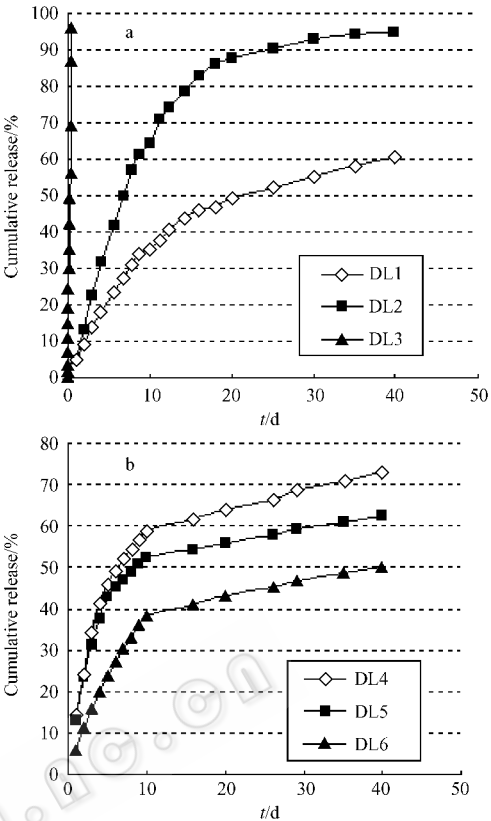


图 7 氯己定(a)和 rhBMP-2(b)体外释放曲线图

Fig.7 In vitro cumulative release of chlorhexidine (a) and rhBMP-2 (b)

0.4mg/L 的 rhBMP-2;10d 时,三组分别释放药物的  $(60 \pm 3.3)\%$ 、 $(52 \pm 4.1)\%$ 、 $(36 \pm 3.6)\%$ ;40d 时,分别释放药物的  $(74 \pm 3.6)\%$ 、 $(63 \pm 4.3)\%$ 、 $(50 \pm 3.8)\%$ 。rhBMP-2 的浓度影响其缓释效果,本实验中,高浓度的 rhBMP-2 从凝胶中释放的速度较慢。可见,大分子的生长因子与较小分子的环糊精包结物从凝胶中释放的特性是有差别的。

3 讨论

壳聚糖-甘油磷酸钠温敏凝胶系统只对大分子药物有很好的缓控释效果,对小分子药物缓释作用较差。这是因为这种温敏凝胶含水量大,具有较大的孔道,小分子药物容易从孔道中逸出。据研究,相对分子质量为 1.2 万 ~ 1.48 万的药物在此系统中能缓慢释放数天,而分子质量小于 1000 的小分子亲水性药物在此系统中数小时就完全释放。本实验中凝胶的扫描电镜照片显示了这种多空隙结构。

氯己定是应用广泛的广谱杀菌药,在口腔医学领域更备受重视。适当合理的应用氯己定可控制牙周炎症,提高牙周手术的成功率<sup>[12,13]</sup>。氯己定分子量为 505.45,将其直接混入壳聚糖-甘油磷酸钠温敏

凝胶系统,不能获得药物的缓释。本研究的结果也证明了这一点。既然直接加入不能达到缓释目的,那么考虑先将氯己定药物进行处理。

环糊精包结物是新型药物制剂,其用途之一就是调节药物释放速率。这是因为环糊精分子结构内部是一个具有一定尺寸的疏水空腔。利用疏水作用力、氢键和范德华力等作用力可与多种有机物和无机物结合,形成包结物。包结物中的药物释放出来,需通过与环糊精解离的过程,或者体内淀粉酶将环糊精水解开裂后药物客体才能游离出来,从而实现药物缓释。 $\beta$ -环糊精因为空腔大小适中,应用最为广泛。 $\beta$ -环糊精与氯己定药物形成包结物以缓释该药物在过去几年中已有研究<sup>[13]</sup>。本研究中,我们同样制备出 $\beta$ -环糊精/氯己定包结物,并通过扫描电镜观察、红外光谱、紫外光谱扫描证实了包结物的形成。

在凝胶系统中共混入 $\beta$ -环糊精/氯己定包结物,通过体外释放实验,证明可以明显减缓氯己定药物的释放。10d时,低浓度组大约释放35%的氯己定,相当于局部浓度为0.42g/L,高浓度组释放的局部浓度为1.56g/L;30d时,低浓度组释放的局部浓度为0.66g/L,高浓度组释放的局部浓度相当于2.28g/L。我们发现高浓度包结物组释放氯己定药物的速率更快,这与高浓度包结物的加入使得凝胶体系稳定性降低,包结物和药物易于释放到凝胶体系之外有关。凝胶系统中同时加入rhBMP-2,其缓释该生长因子的能力符合预期。对于rhBMP-2,浓度对其释放速率的影响与包结物不同,高浓度的rhBMP-2相对于低浓度的rhBMP-2更难从凝胶体系中释放出来,这可能与大分子物质rhBMP-2与凝胶的支架分子(壳聚糖)具有高的亲合能力有关。对目标分子在体释放动力学的详细了解有待进一步的研究,初步的体外释药结果为进一步进行该系统的体内释药研究奠定了良好的基础。

流变学测定未观察到加入实验量的包结物对凝胶系统产生明显影响,但加入包结物后,壳聚糖-甘油磷酸钠温敏凝胶系统的溶液在低温时不稳定,易出现分层现象,这与环糊精在低温时溶解度低有关,因此提示,共混环糊精包结物的凝胶系统应当在配制后短期内使用。

## 4 结论

通过先行制备氯己定/ $\beta$ -环糊精包结物,再与壳聚糖-甘油磷酸钠温敏凝胶系统共混的方法成功制

备了能同时缓释氯己定和rhBMP-2的功能性凝胶,并且,获得的载药功能性凝胶系统保持原凝胶系统的流变学性质。对其作为可注射、在体凝固的功能性凝胶系统的应用研究将进一步展开。

致谢 本研究化学鉴定部分得到了陕西师范大学王明珍老师的大力帮助,流变学测定得到了西安石油大学王满学老师的大力帮助,在此表示感谢。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Chenite A, Chaput C, Wang D, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels *in situ*. *Biomaterials*, 2000, **21**(21): 2155.
- [2] Berger J, Reist M, Chenite A, et al. Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application. *Int J Pharm*, 2005, **296**(1~2): 162.
- [3] Ruel-Gariepy E, Chenite A, Chaput C, et al. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. *Int J Pharm*, 2000, **203**(1~2): 89.
- [4] Molinaro G, Leroux JC, Damas J, et al. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an *in vivo* experimental approach to injectable biomaterials. *Biomaterials*, 2002, **23**(13): 2717.
- [5] Ruel-Gariepy E, Shive M, Bichara A. A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, **57**(1): 53.
- [6] Ruel-Gariepy E, Leclair G, Hildgen P, et al. Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules. *J Control Release*, 2002, **82**: 373.
- [7] Jaepyoung Cho, Marie-Claude Heuzey, André Bégin, et al. Physical gelation of chitosan in the presence of  $\beta$ -glycerophosphate: the effect of temperature. *Biomacromolecules*, 2005, **6**: 3267.
- [8] Wu Y(吴燕), Qu B(曲波), Zhao J(赵瑾) et al. Study of chitosan/glycerol phosphate complexes gel. The Fifth National Conference on Functional Materials and Applications conference(第五届中国功能材料及其应用学术会议论文集) 2004.
- [9] Jia W(贾伟), Gao WY(高文远). The New Controlled-release Drug Formulations. Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2005.
- [10] Zhang JC(张建春), Yang J(杨建), Shi Y(施瑛), et al. Investigation on complex of famotidine- $\beta$ -cyclodextrin(法莫替丁- $\beta$ -环糊精包结物的研究). *Chinese New Drugs Journal*(中国新药杂志), 2005, **14**(2): 184.
- [11] Carolina Ferreira Franco, André Luiz Pataro, Leandra Cristina Ribeiro e Souza, et al. *In vitro* effects of a chlorhexidine controlled delivery system. *International Society for Artificial Organs*, 2003, **27**(5): 486.
- [12] Yue IC, Poff J, Cortes ME, et al. A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease. *Biomaterials*, 2004, **25**(17): 3743.
- [13] Qi H, Nishihata T, Rytting JH. Study of the interaction between beta-cyclodextrin and chlorhexidine. *Pharm Res*, 1994, **11**(8): 1207.