

·论著·

硫酸软骨素酶ABC和环磷酸腺苷缓释组织工程支架的构建

姚军¹, 田东¹, 倪石磊², 张付意¹, 齐宏旭³

作者单位

1.泰山医学院附属成武县人民医院神经外科

山东 菏泽 274200

2.山东大学齐鲁医院神经外科

山东 济南 250012

3.清华大学化工系高分子研究所

北京 100084

基金项目

山东省医药卫生科技发展计划项目(No.2015WS0470)

收稿日期

2017-07-13

通讯作者

田东

yaojunaini@163.

com

摘要 目的:制备一种可生物降解有效安全的硫酸软骨素酶ABC(ChABC)和环磷酸腺苷(cAMP)缓释组织工程支架,使药物缓慢稳定释放,降低局部应用时对神经的刺激,促进中枢神经系统损伤后神经的修复和轴突的再生。**方法**:应用电纺丝技术制作的含ChABC及cAMP的聚碳酸亚丙酯及壳聚糖缓释组织工程支架,分析支架直径、载药量、包封率等参数,然后以磷酸盐缓冲液为体外释药介质观察组织工程支架的药物释放速度、药物的失活率及支架的降解速度。**结果**:ChABC和cAMP缓释组织工程支架在聚碳酸亚内酯质量浓度为8%、电压为10~15 kV、距离为15~20 cm时可以纺出纤维直径约3 μm的平滑支架,单纯聚碳酸亚内酯纤维光滑,直径均一,壳聚糖微粒光滑,聚碳酸亚内酯与壳聚糖混合后电纺丝形成的支架呈串珠样结构,其能缓慢持续释放有活性ChABC和cAMP,12 d后支架降解失重率约7%。**结论**:应用电纺丝方法成功制备含ChABC及cAMP的聚碳酸亚内酯及壳聚糖组织工程支架,其药物稳定释放,局部应用无神经刺激,可生物降解。

关键词 硫酸软骨素酶ABC;环磷酸腺苷;电纺丝;聚碳酸亚丙酯;壳聚糖

中图分类号 R741;R741.05 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssngcj.2018.07.002

Construction of Controlled Release Tissue Engineering Scaffolds Delivering Chondroitinase ABC and Cyclic Adenosine Monophosphate YAO Jun¹, TIAN Dong¹, NI Shi-lei², ZHANG Fu-yi¹, QI Hong-xu¹. 1. Department of Neurosurgery, Chengwu People's Hospital, Shandong 274200, China; 2. Department of Neurosurgery, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China; 3. The Laboratory of Advanced Materials and Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract Objective: To prepare an effective and biodegradable tissue engineering scaffold with controlled release for Chondroitinase ABC (ChABC) and cyclic adenosine monophosphate(cAMP) which can release drug slowly and steadily with low nerve stimulation and promote central nerve system recovery and regeneration. **Methods:** ChABC-and cAMP-loaded polypropylene carbonate (PPC) and chitosan (CS) scaffold for tissue engineering was prepared by electrospinning. Analysis was performed on scaffold diameter, drug load, and encapsulation efficiency. Drug release rate and drug inactivation rate was observed with phosphate buffer solution medium, and scaffold degradation rate was assessed. **Results:** ChABC and cAMP slow-release tissue engineering scaffolds in PPC possessed a mass concentration of 8% and voltage of 10~15 kV. At a length of 15~20 cm, it could be spun to a diameter of approximately 3 μm. The pure PPC fiber was smooth and displayed a uniform diameter. The chitosan microsphere was smooth. The scaffold spun with a PPC and chitosan blend showed a beaded structure and could slowly release active ChABC and cAMP; 12 days after construction, the scaffold showed a mass degradation rate of approximately 7%. **Conclusions:** Electrospinning method has been successfully applied to prepare PPC and CS tissue engineering scaffolds containing ChABC and cAMP; its advantages include stable drug release, local application without nerve stimulation, and biodegradability.

Key words chondroitinase ABC; cyclic adenosine monophosphate;electrospinning; polypropylene carbonate; chitosan

中枢神经系统损伤是一种严重危害人类生命健康的疾病,其发生率约为20~40/10万^[1],中枢神经系统损伤后的轴突再生和神经细胞的修复一直是神经科学领域的难题,其主要原因是中枢神经系统损伤后损伤部位抑制因素的存在及过多的表达和神经营养因素的缺乏。硫酸软骨素酶ABC(Chondroitinase ABC, ChABC)是来源于多种细菌的胞内酶,该酶能特异性降解硫酸

软骨素蛋白聚糖中的糖胺聚糖链,将硫酸软骨素蛋白聚糖分解成核心蛋白和碳水化合物短链^[2];环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)能减轻脊髓损伤后神经纤维变性坏死,联合应用ChABC和cAMP治疗中枢神经系统损伤能减弱胶质瘢痕的阻碍作用,提高细胞内cAMP的水平,从而促进中枢神经系统损伤后的轴突和神经细胞的再生修复^[3-8]。

ChABC 和 cAMP 在生物体内各种因素的综合作用下,失活较快,难以在中枢神经损伤处持续释放^[9]。通过蛛网膜下腔置管持续或分次给药的方法存在着操作复杂、创伤大、易感染等风险。含 ChABC 和 cAMP 的聚碳酸亚内酯及壳聚糖缓释组织工程系统在中枢神经系统中显示出良好的生物相容性和可控的缓释性。本研究以聚碳酸亚内酯及壳聚糖缓为缓释载体,用电纺丝方法制作出含聚碳酸亚内酯及壳聚糖缓的生物工程支架,目的是:实现缓慢平稳的释放药物;降低局部应用时对神经的刺激;满足应用聚碳酸亚内酯及壳聚糖缓治疗中枢神经损伤局部长期用药的要求。

1 材料与方法

1.1 材料

聚碳酸亚丙酯,购于内蒙古蒙西高新技术集团有限公司;ChABC,购于美国 Sigma 公司;壳聚糖、乙腈、三聚磷酸钠、聚乙烯吡咯烷酮购于北京化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 制备含 ChABC 的微球 准确称量壳聚糖粉末,放入 30 mm×50 mm 的称量瓶中,加入 1% 乙酸水溶液,搅拌 6 h,使其完全溶解,壳聚糖在溶液中的质量百分比为 0.5%,得到 A 溶液;配制 1% 的聚乙烯吡咯烷酮水溶液:准确称量聚乙烯吡咯烷酮粉末,将其加入水中,并微热搅拌 3 h,放入 4 ℃ 冰箱,得到 B 溶液;将 ChABC 加入 B 溶液,搅拌后得到 C 溶液;将 C 溶液与 A 溶液混合后搅拌均匀,得到 D 溶液;配制 1% 的多聚磷酸钠水溶液,得到 E 溶液;将 D 溶液缓慢滴加到 E 溶液中,滴完后持续搅拌 3 h,得到乳状浑浊液,将此浑浊液离心分离,离心力 2 000 g,并用蒸馏水洗两次,得到的沉淀冻干即含有 ChABC 微球。

1.2.2 制备含 ChABC 和 cAMP 的组织工程支架 将得到的含 ChABC 微球定量加入二氯甲烷中,进行超声

分散 10 min,然后加入聚碳酸亚内酯原料和 cAMP 粉末,搅拌至固体全部溶解,得到乳白色溶液。然后进行电纺丝加工操作,使用接地的平整锡箔纸作为接收装置。所取纺丝距离为 15 cm,纺丝电压为 10 kV,收集到载药纤维,得到电纺丝载药组织工程支架。

1.2.3 样品释放前扫描电镜观察 对纤维和微球样品镀金膜,在 20 kV 的条件下用扫描电镜(SEM)观察纤维膜的表面及微球形态。利用得到的电镜照片分析微球及纤维的直径分布数据。

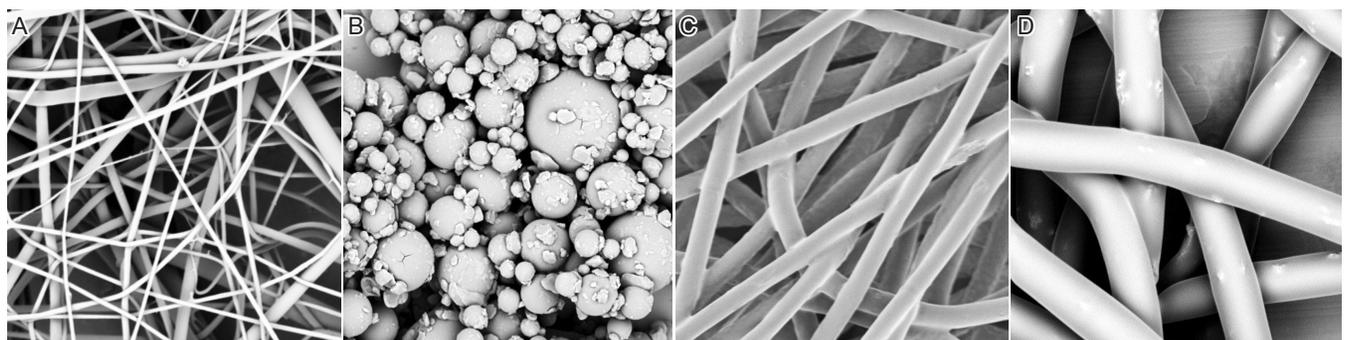
1.2.4 样品载药量的测定和包封率的计算 将含 ChABC 和 cAMP 的组织工程支架取样品称重后,研磨成粉,加入二氯甲烷搅拌 2 h,然后加入去离子水充分震荡萃取二氯甲烷层。取上层含 ChABC 和 cAMP 的水溶液,并过滤二氯甲烷溶液中的不溶物,用含 1% EDTA 的水溶液浸泡不溶物 3 h,使之完全消失,得到的溶液与萃取后的上层含 ChABC 和 cAMP 的水溶液合并,用于酶解分光光度计下浓度的检测。依据标准曲线得出含量,并计算载药量和包封率。载药量=纤维膜中药物的量/纺丝总质量×100%;包封率=纤维膜中药物的量/实验加入药物的量×100%

1.2.5 药物释放曲线及降解曲线的检测 准确称量样品,放入含磷酸缓冲盐溶液的离心管中并固定于水浴恒温摇床中,条件 37 ℃,100 r/min。从放入样品开始计时,经过 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、72 h、120 h、168 h、240 h 和 336 h 后,利用吸光度数值检测残余样品中 ChABC 和 cAMP 量,从而计算累计释药百分比,得到释放时间-累计释药百分比的药物释放曲线。

2 结果

2.1 ChABC 微球的形态

在 20 kV 的条件下扫描电镜观察,ChABC 微球表面光滑圆整,球体均匀,无粘连现象(图 1)。



注:A:单纯聚碳酸亚内酯电纺丝形成的纤维;B:含 ChABC 的壳聚糖微球;C:含 ChABC 的壳聚糖微球与聚碳酸亚内酯混合后电纺丝形成的缓释组织工程支架;D:含 ChABC 的纤维组织工程支架置于磷酸缓冲盐溶液中 12 d 后支架表面开始逐渐降解

图 1 ChABC 微球的形态

2.2 含ChABC和环磷酸腺苷的聚碳酸亚内酯及壳聚糖的缓释组织工程支架载药量和包封率的测定

ChABC的载药量为10 μg/样品, cAMP的载药量为50 μg/样品, ChABC和cAMP的包封率为62%。

2.3 含ChABC和cAMP的聚碳酸亚内酯及壳聚糖缓释组织工程支架释放曲线及降解曲线

测定1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、72 h、120 h、168 h、240 h和336 h的ChABC、cAMP的释放量及支架的重量(图2、3)。

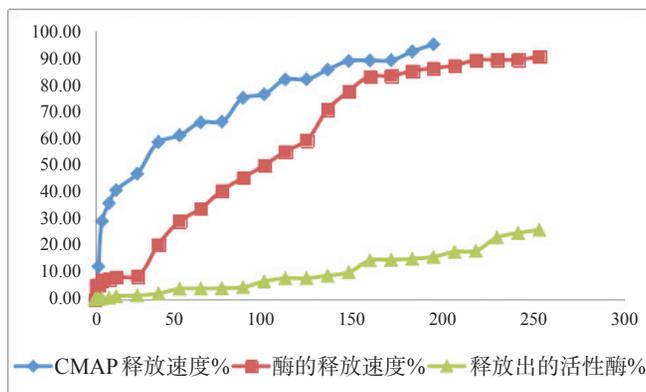


图2 ChABC及cAMP缓释组织工程支架累计释放CMAPA曲线、ChABC酶曲线及ChABC活性酶曲线

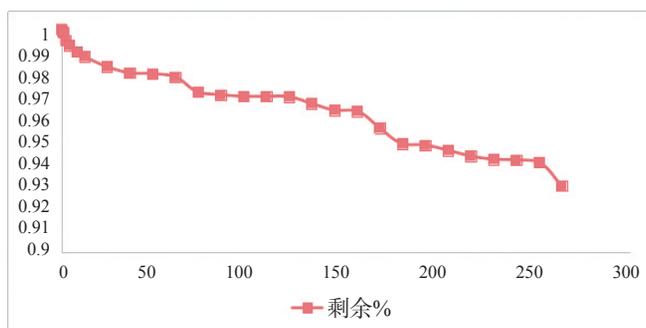


图3 ChABC及cAMP缓释组织工程支架在PBS中的逐渐降解失重曲线

3 讨论

中枢神经损伤后的轴突再生和神经细胞的修复一直是神经科学领域的难题,从已有的实验性治疗中枢神经损伤并取得疗效的文献中确认ChABC及cAMP治疗中枢神经损伤对损伤处的神经及血管无明显副作用^[10],有望用于中枢神经损伤的临床治疗。但目前采用最多的方法是通过蛛网膜下腔置管长期持续或间断给药,此方法虽能保持中枢神经损伤处较高的酶活性,但存在操作复杂、创伤大、易感染等风险。理想的给药方式是能够提供有效浓度药物的持续释放,且组织相容性好,局部刺激和神经毒性小。

关于ChABC局部缓释治疗中枢神经损伤的研究也较多,但联合应用ChABC和cAMP的局部缓释组织

工程支架的较少。本研究首先利用壳聚糖和ChABC制备成含硫酸软骨素酶的微球,然后利用电纺丝方法制备含ChABC和cAMP的纤维膜。其特点如下:①电纺丝方法是一种制备高分子纳米/微米纤维的有效方法^[11],制作的膜状材料具有很好的韧性,断裂伸长率高,满足对缓释系统的力学性能的要求;②电纺丝的制备过程条件温和,可比较精确地控制纤维膜的孔隙率、微观结构和组成,在空间结构上具有仿生性特点,很好地模拟了人体组织中细胞外基质^[12];③利用电纺丝技术形成的含硫酸软骨素酶的壳聚糖微球与聚碳酸亚内酯组织工程支架可生物性降解;④支架内含ChABC壳聚糖微球在聚碳酸亚内酯的纤维呈串珠样,具有单纯微球的缓释功能和支架的三维空隙的双重优点,有利于ChABC的缓释及神经轴突在支架内的生长和延长。

目前中枢神经损伤相关研究采用的生物可降解材料大多为人工合成材料如聚乳酸、聚乙醇酸及其共聚物,具有易于加工成型、力学强度高、理化性能可以在分子水平进行调控的优点,但亲水性较差,细胞的贴附力较弱,其分解产物为酸性产物,可能会引起无菌性炎症^[13]。而另一大类天然聚合物材料如纤维蛋白、胶原、藻酸盐,其生物相容性好,利于细胞粘附、增殖及分化,但往往缺乏机械强度、可塑性差、降解时间不好控制。含ChABC及cAMP的聚碳酸亚内酯及壳聚糖组织工程支架的优势的优势如下:①聚碳酸亚内酯是一种不释放酸性物质的新型聚合物^[14],最终降解产物为二氧化碳和水,大大地减少了材料对脑组织局部刺激的作用,而且与神经组织有很好的组织相容性^[15];②壳聚糖与神经细胞具有较好的生物相容性,可伴随神经再生而逐渐降解,且降解的速率和神经再生的速度相匹配;③药物经过壳聚糖负载后,不仅能达到缓释控释的目的,还能改变药物的给药方式,以此减少给药次数,降低药物的不良反应,提高药物的生物利用度^[16,17]。但本组织工程支架的缺陷有以下几点:本支架需要通过手术才能置于受损神经区域;会增加术后感染及神经再次受到创伤的风险。因此微创的无菌手术操作非常关键。制作ChABC及cAMP缓释组织工程支架时应该注意制备含ChABC的微球时溶液一定要搅拌均匀,使用接地的锡箔纸一定要平整。

ChABC和cAMP组织工程支架材料缓释的时间及缓释药物浓度应符合中枢神经损伤后神经修复的时间,若缓释时间过短则达不到治疗的目的,缓释时间过长则造成药物的浪费。因此实验中选择2~3周作为预

联合检测可用于评估TIA进展ACI具有重要的参考价值,对降低缺血性脑卒中发生率具有重要意义。未来研究应进一步扩大样本容量、并纳入规范化治疗方案,以便更好评估TIA进展缺血性脑卒中的风险。

参考文献

- [1] 柴永宏. ABCD2评分结合扩散加权成像、头颈部CT血管成像对短暂性脑缺血后发生脑梗死的预测价值[J]. 中国医学影像学杂志, 2014, 22: 572-575.
- [2] 张慧, 刘玉霞, 李继梅, 等. ABCD评分对短暂性脑缺血发作后早期卒中风险的预测[J]. 中华老年医学杂志, 2015, 34: 1119-1121.
- [3] Guarino M, Rondelli F, Favaretto E, et al. Short-and long-term stroke risk after urgent management of transient ischaemic attack: the Bologna TIA clinical pathway[J]. Eur Neurol, 2015, 74: 1-7.
- [4] 柴丽丽, 赵立军, 王彦丽, 等. 14种ABCD评分法预测短暂性脑缺血发作后7d内继发性脑梗死风险的价值[J]. 贵州医科大学学报, 2016, 41: 947-950.
- [5] Kiyohara T, Kamouchi M, Kumai Y, et al. ABCD3 and ABCD3-I scores are superior to ABCD2 score in the prediction of short- and long-term risks of stroke after transient ischemic Attack[J]. Stroke, 2014, 45: 418-425.
- [6] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组, 急性缺血性脑卒中诊治指南

- 南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南2010 [J]. 中华神经科杂志, 2010, 43: 146-153.
- [7] 吕敏, 吕琳, 温慧军, 等. ABCD2评分预测头昏患者发生缺血性脑血管事件风险的研究[J]. 卒中与神经疾病, 2016, 23: 164-166.
- [8] 张远锦, 樊东升, 张楠, 等. 短暂性脑缺血发作患者血清非对称性二甲基精氨酸与ABCD2评分的相关性[J]. 中华内科杂志, 2014, 53: 876-879.
- [9] 魏衡, 周瑞, 尹虹祥, 等. 炎性标志物联合ABCD3-I评分对短暂性脑缺血发作后短期进展为脑梗死风险的预测研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10: 3315-3319.
- [10] 李荣. 动脉粥样硬化的部分危险因素与进展性脑梗死的相关性分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11: 299-301.
- [11] 吕祥龙, 李婧. 短暂性脑缺血发作后缺血性脑卒中的危险因素[J]. 临床神经病学杂志, 2017, 30: 271-274.
- [12] 王莹莹, 郭娜, 何金婷, 等. 不同评分模型对短暂性脑缺血发作后脑梗死风险预测价值[J]. 吉林大学学报(医学版), 2014, 4: 851-854.
- [13] 李江坤, 张津华, 付志新, 等. 表现为短暂性脑缺血发作患者ABCD2评分与hs-CRP的相关性分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2017, 20: 78-80.
- [14] 李维帅, 谭斐. 评价ABCD2评分+颈动脉硬化程度评分预测短暂性脑缺血发作后早期(7d)卒中风险价值[J]. 临床与病理杂志, 2016, 6: 99-104.
- [15] 张磊, 罗国君, 唐春雷, 等. ABCD3评分结合血浆同型半胱氨酸测定评估短暂性脑缺血后短期卒中风险[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2016, 8: 197-199.

(本文编辑:王晶)

(上接第330页)

期的缓释和材料降解的时间。实验中改变壳聚糖微球的直径和聚碳酸亚内酯纤维的直径以及它们的比例可控制药物的缓释时间,下一步将ChABC和cAMP组织工程支架应用于大白鼠的动物实验中,具体验证药物缓释的时间与大白鼠中枢神经损伤后修复的时间的最佳对应关系,分析其对中枢神经损伤后治疗修复的优势,为中枢神经损伤的修复开辟新的治疗途径。

参考文献

- [1] 赵继宗, 周良辅, 周定标, 等. 神经外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 359-364.
- [2] Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, et al. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar[J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 22: 319-330.
- [3] Zuo J, Neuberger D, Graham J, et al. Regeneration of axon after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan[J]. Exp Neurol, 2002, 176: 221-228.
- [4] Zhang H, Uehimura K, Kadomatsu K. Brain keratan sulfate and glial Scar formation[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1086: 81-90.
- [5] Cafferty WB, Yang SH, Duffy PJ, et al. Functional Axonal Regeneration through Astrocytic Scar Genetically Modified to Digest Chondroitin Sulfate Proteoglycans[J]. J Neurosci, 2007, 27: 2176-2185.
- [6] Iaci JF, Vecchione AM, Zimmer MP, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans in spinal cord contusion injury and the effects of chondroitinase treatment[J]. J Neurotrauma, 2007, 24: 1743-1759.
- [7] Iwasato T, Inan M, Kanki H, et al. Cortical adenylyl cyclase 1 is

required for thalamocortical synapse maturation and aspects of layer IV barrel development[J]. J Neurosci, 2008, 28: 5931-5943.

- [8] Mladinic M. Changes in cyclic AMP levels in the developing opossum spinal cord at the time when regeneration stops being possible[J]. Cell Mol Neurobiol, 2007, 27: 883-888.
- [9] Chau CH, Shum DK, Li H, et al. Chondroitinase ABC enhances axonal regrowth through Schwann cell-seeded guidance channels after spinal cord injury[J]. FASEB J, 2004, 18: 194-196.
- [10] Olmarker K1, Strömberg J, Blomquist J, et al. Chondroitinase ABC (pharmaceutical grade) for chemonucleolysis. Functional and Structural evaluation after local application on intraspinal nerve structures and blood vessels[J]. Spine, 1996, 21: 1952-1956.
- [11] Su Y, Li X, Liu Y, et al. Encapsulation and Controlled Release of Heparin from Electrospun Poly(L-Lactide-co-ε-Caprolactone) Nanofibers[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2011, 22: 165-177.
- [12] Smith LA, Ma PX. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2004, 39: 125-131.
- [13] Agrawal CM, Athanasiou KA. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants[J]. J Biomed Mater Res, 1997, 38: 105-114.
- [14] Du LC, Meng YZ, Wang SJ, et al. Synthesis and degradation behavior of poly(propylene carbonate) derived from carbon dioxide and propylene oxide[J]. J Appl Polym Sci, 2003, 92: 1840-1846.
- [15] Sonabend AM, Velicu S, Ulasov IV, et al. A safety and efficacy study of local delivery of interleukin-12 transgene by PPC polymer in a model of experimental glioma[J]. Anticancer Drugs, 2008, 19: 133-142.
- [16] Berrada M, Serreji A, Dabbarh F, et al. A novel non-toxic camptothecin formulation for cancer chemotherapy[J]. Biomaterials, 2005, 26: 2115-2120.
- [17] Bhumkar DR, Joshi HM, Sastry M, et al. Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin[J]. Pharm Res, 2007, 24: 1415-1426.

(本文编辑:王晶)