

# 海藻酸钠和壳聚糖聚电解质微胶囊及其 生物学应用<sup>\*</sup>

刘袖洞<sup>1,2</sup> 于炜婷<sup>1</sup> 王 为<sup>1</sup> 雄 鹰<sup>1</sup> 马小军<sup>1\*\*</sup> 袁 权<sup>1</sup>

(1. 中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023; 2. 大连大学环境与化学工程学院 大连 116622)

**摘 要** 本文综述了天然多糖聚电解质海藻酸钠和壳聚糖的结构与化学性能(包括凝胶性能、生物相容性、生物可降解性及温和反应性);微胶囊制备技术及其强度性能和膜渗透性评价方法;微胶囊作为细胞载体在体内分泌治疗性物质(如:胰岛素、多巴胺)或分解代谢毒性物质(如:尿素),作为三维药物筛选系统、干细胞增殖分化研究工具,以及药物释放载体等生物学领域的研究进展;最后讨论了天然多糖微胶囊在研究与应用中需要解决的问题。

**关键词** 海藻酸钠 壳聚糖 聚电解质 微胶囊 细胞移植 细胞培养 药物输送

**中图分类号**: O636.1; TB383 **文献标识码**: A **文章编号**: 1005-281X(2008)01-0126-14

## Polyelectrolyte Microcapsules Prepared by Alginate and Chitosan for Biomedical Application

Liu Xiudong<sup>1,2</sup> Yu Weiting<sup>1</sup> Wang Wei<sup>1</sup> Xiong Ying<sup>1</sup> Ma Xiaojun<sup>1\*\*</sup> Yuan Quan<sup>1</sup>

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

2. College of Environment and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622, China)

**Abstract** This review highlights the progress in the structure and chemical properties of natural polysaccharides (alginate and chitosan) including gel formation, biocompatibility, biodegradability and mild reaction ability; preparation technologies of microcapsules (polyelectrolyte complexation/polyelectrolyte layer-by-layer self assembly), and the evaluation methods on microcapsule's mechanical and permeable properties; microcapsules entrapping cells secreting therapeutics (such as insulin and dopamine) or decomposing toxic metabolites (such as urea) *in vivo*, microcapsules serving as three-dimensional drug screening systems and microenvironment for the proliferation and differentiation of stem cells, microcapsules serving as the drug carriers for controlled release. Finally, the challenge and problem for the development of microcapsules are discussed.

**Key words** alginate; chitosan; polyelectrolyte; microcapsule; cell transplantation; cell culture; drug delivery

## 1 引言

微胶囊(microcapsule)是以天然或合成高分子为材料制备的外部覆膜的球形小囊(图 1),其直径通常在 5—1 000  $\mu\text{m}$ ,可根据不同需求包封固体、液体

或气体物质,保护物质免受环境条件的影响,屏蔽物质味道、颜色和气味及控制释放活性物质等<sup>[1]</sup>。

20 世纪 60 年代,Chang<sup>[2]</sup>报道了半透膜微胶囊的制备,指出用其包埋蛋白质、酶等生物活性物质和细胞,可保持生物物质活性。半透性膜不仅将包封

收稿:2007 年 1 月,收修改稿:2007 年 5 月

\* 国家自然科学基金项目(No. 20736006、30472102)和国家重点基础研究发展计划(973)项目(No. 2002CB713804、2005CB522702、2007CB714305)资助

\*\* 通讯联系人 e-mail: maxj@dicp.ac.cn

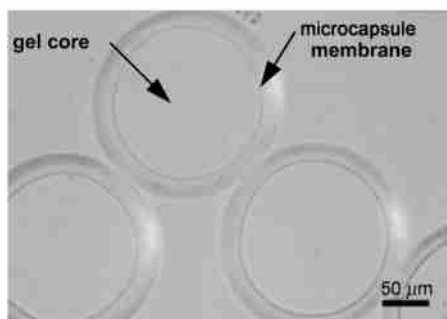


图 1 海藻酸钠/壳聚糖微胶囊,内部为海藻酸钙凝胶内核,外部为海藻酸钠/壳聚糖复合膜

Fig. 1 Alginate/chitosan microcapsule with inner calcium alginate gel core and outer microcapsule complexation membrane

物与外界环境隔离,起到储库的作用,而且可控制膜内外物质交换,既允许囊外低分子量物质(如细胞生存所需营养物、生长因子和氧气等)和囊内小分子产物(如细胞分泌的治疗性物质胰岛素)自由进出微胶囊,又阻止囊外大分子免疫物质(如免疫球蛋白、抗体、补体等)或免疫细胞(淋巴细胞、巨噬细胞等)进入微胶囊,以避免细胞被机体免疫系统攻击并杀死而丧失功能。20 世纪 80 年代初,Lim 和 Sun 针对组织/细胞功能缺损性疾病(如糖尿病),成功制备了海藻酸钠/聚赖氨酸(alginate/polylysine)半透膜微胶囊,包封 Wistar 大鼠胰岛细胞并移植入糖尿病 Wistar Lewis 大鼠体内,可克服机体免疫排斥反应,维持细胞生长,分泌释放胰岛素以调控血糖量<sup>[3]</sup>。由此推动了微囊化技术相关材料和制备方法研究的快速发展,在细胞移植、药物释放和基因治疗等生物医学领域的临床前研究中得到广泛应用<sup>[4-6]</sup>。

## 2 海藻酸钠和壳聚糖的化学性能及微胶囊制备技术

微胶囊包封细胞或生物大分子并在生物体内应用时,其制备材料必须具备很好的生物相容性,即在不引起或引起的生物体异常反应(宿主反应,如过敏/炎症反应及最终导致的排斥反应)很轻的情况下,发挥有效作用。目前,微胶囊制备材料主要有合成/半合成和天然高分子等数十种<sup>[4]</sup>。乳酸/乙醇酸共聚物(poly(lactic acid-co-glycolic acid), PLGA)和甲基丙烯酸甲酯及其衍生物分别是可降解和非降解合成聚合物的代表,表现出化学稳定性和成膜性好,易于规模制备的优点,但其生物相容性差。例如,PLGA 微胶囊制备过程残留溶剂的毒性可能导致囊内胰岛细胞分泌胰岛素能力下降<sup>[7]</sup>;而且 PLGA 降解产生

局部酸环境,既引起生物体刺激反应<sup>[8]</sup>,又影响包封蛋白质活性<sup>[9]</sup>。多糖(如海藻酸钠和壳聚糖)和蛋白质(如白蛋白和明胶)是天然材料的代表,通常无毒、免疫原性低。壳聚糖是由氨基葡萄糖和 *N*-乙酰氨基葡萄糖两种氨基多糖组成,*N*-乙酰氨基葡萄糖也是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的成分,它可与核心蛋白通过共价键连接成蛋白多糖,形成多孔亲水的凝胶结构,有利于水分及小分子的渗透,并调节细胞生长、分化与胶原形成。因此,壳聚糖在组成和结构上与 ECM 具有部分相似性,且生物相容性好。海藻酸钠是美国食品药品监督管理局(FDA)定义为“通常认为安全(generally regarded as safe, GRAS)”的一种化合物<sup>[10]</sup>,这些特点使得它们作为微胶囊制备材料的应用备受关注。

### 2.1 海藻酸钠和壳聚糖的化学性能

#### 2.1.1 海藻酸钠(sodium alginate)

目前,海藻酸钠(简称为 NaAlg 或 Alg)仍是最常用的微胶囊制备材料<sup>[11,12]</sup>。它是存在于褐藻类海洋生物中的线性阴离子天然多糖,由 *-D*-甘露糖醛酸(M)和 *-L*-古罗糖醛酸(G)通过(1-4)糖苷键聚合而成<sup>[13]</sup>(图 2)。海藻酸钠分子链中既有均相片段(如 MM、GG),也有非均相片段(如 MG),且 G 和 M 比例随原料产地和季节不同而变化。

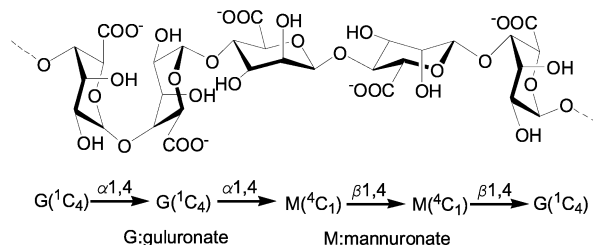
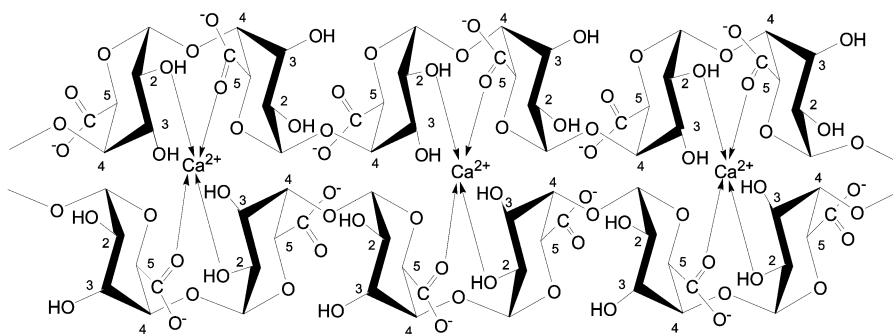


图 2 海藻酸钠分子结构式 G: 古罗糖醛酸, M: 甘露糖醛酸<sup>[6]</sup>

Fig. 2 Structure of sodium alginate, G represents guluronate and M represents mannuronate<sup>[6]</sup>

海藻酸钠的独特性质是从溶胶向含水量 > 95 % 的凝胶转变<sup>[14]</sup>: 当其遇见  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  等二价阳离子, 在离子移变作用下  $\text{Ca}^{2+}$  将  $\text{Na}^+$  置换出, 形成既有强度性能又有弹性的海藻酸钙凝胶。研究表明: 海藻酸钠分子链中只有 G 能与  $\text{Ca}^{2+}$  键合, 所以高 G 含量的海藻酸钠最适合形成海藻酸钙凝胶<sup>[15,16]</sup>。随着 G 与  $\text{Ca}^{2+}$  的键合, 古罗糖醛酸开始折叠堆积, 使得相邻的海藻酸钠分子链从自然伸展的卷曲状态向整齐有序的带状结构转变, 最终导致了海藻酸钙三维网状凝胶结构的形成, 通常被称作“蛋盒(egg-box)”结

图 3 海藻酸钙凝胶“蛋盒”结构形成示意图<sup>[18]</sup>Fig. 3 Schematic representation of the 'egg-box' structure of calcium alginate gel<sup>[18]</sup>

构<sup>[17]</sup>。进一步分析表明,“蛋盒”结构的形成是由于在 1 个  $\text{Ca}^{2+}$  与 2 个 GG 片段间形成了 4 个配位键,即 G 中 5-COO<sup>-</sup> 和 2-OH 参与了配位键的形成(图 3)<sup>[18]</sup>。这种温和的转变条件及提供的水环境对于保持微胶囊内包封的细胞或生物分子活性相当重要,而且三维网状凝胶结构利于细胞生长及代谢。

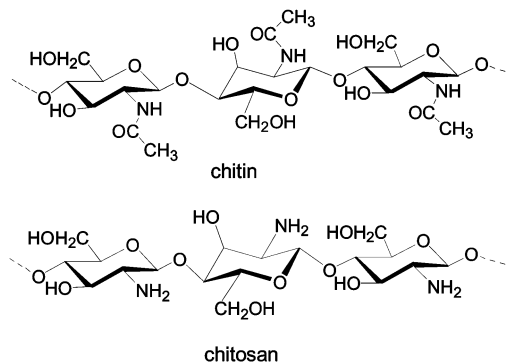
在生理条件下,海藻酸钙凝胶同样在离子移变作用下被  $\text{Na}^+$  或  $\text{K}^+$  置换出  $\text{Ca}^{2+}$ , 又转变为海藻酸钠溶胶,其分子链不会发生水解或酶解而断裂降解<sup>[19]</sup>,但是静脉注射 24h 后分子量( $M_w$ ) < 48 kDa 的海藻酸钠可被缓慢从生物体中代谢排出,高  $M_w$  海藻酸钠仍存在于血液循环系统并不易在任何组织中蓄积<sup>[20]</sup>。当移植入小鼠体内,高  $M_w$  海藻酸钠(259 kDa)失重少且弹性模量没有降低,而低  $M_w$  (< 50 kDa)海藻酸钠重量和弹性模量都显著降低<sup>[21]</sup>。

### 2.1.2 壳聚糖(chitosan)

海藻酸钙胶珠作为微胶囊的内核,在外部要包覆聚合物膜层才能最终形成微胶囊。聚赖氨酸,以碱性氨基酸——赖氨酸(lysine, Lys)为单体合成的阳离子聚合物,通过氨基与海藻酸钠分子链上的 G 和 M 羧基间静电作用<sup>[22]</sup> 形成海藻酸钠/聚赖氨酸微胶囊,是天然材料和合成材料混合应用的典型代表。但是,聚赖氨酸价格昂贵(300—400 US \$/g),再加上其固有的生物相容性差<sup>[23]</sup> 的缺点极大地限制了海藻酸钠/聚赖氨酸微胶囊在临床上的应用。

壳聚糖(简称为 Chi)是自然界中少见的直链阳离子聚合物,化学名为聚(1,4)-2-氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-葡聚糖,由甲壳素(chitin)经脱乙酰化反应脱去 50% 以上乙酰基制备而成(图 4)。甲壳素化学名为-(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡聚糖,也称为聚(N-乙酰基-D-葡糖胺),广泛存在于节足动物(蜘蛛类、甲壳类)的翅膀或外壳中<sup>[24]</sup> (如虾和螃蟹),也存在

于真菌和藻类细胞壁中<sup>[25]</sup>。因脱乙酰基不完全,在壳聚糖的分子链中通常含有(1-4)糖苷键连接的 2-乙酰氨基葡萄糖(acetyl-D-glucosamine)和 2-氨基葡萄糖(D-glucosamine)两种结构单元,两者的比例随脱乙酰化程度而异,反映了壳聚糖分子链中伯氨基的数目,脱乙酰度(degree of deacetylation, DD)越高,氨基数量越多。

图 4 甲壳素和壳聚糖分子结构式<sup>[6]</sup>Fig. 4 Structure of chitin and chitosan<sup>[6]</sup>

目前壳聚糖已经成为生物医学领域广泛应用的生物材料<sup>[26]</sup>,它无毒、生物相容、可生物降解<sup>[27]</sup>,在体内主要被广泛存在于体液和组织中的溶菌酶降解<sup>[28]</sup>,通过考察壳聚糖的失重、分子量及其分布和形态的变化,发现其体外降解速率受 DD、 $M_w$  和 pH 值的影响<sup>[29]</sup>,尤其是 DD 越高,壳聚糖降解速率越低。因此,设计不同 DD 壳聚糖的比例,可以调控其降解速率及结构形态<sup>[30]</sup>。另外,壳聚糖分子链中存在大量伯氨基,在稀酸溶液中(如乙酸)因氨基质子化而溶解,并荷正电成为阳离子聚合物,表现出良好的生物黏附性<sup>[31]</sup>,利于其黏附并跨越表面负电的疏水性细胞膜。重要的是它与聚赖氨酸结构相似,也可与聚阴离子海藻酸钠在静电作用下形成海藻酸钠/壳聚糖微胶囊(图 5),且具有很好的生物相容

性<sup>[32]</sup>。再加上壳聚糖产自海洋生物,资源相当丰富,因而价格便宜(0.018 US \$/g),这与价格昂贵的聚赖氨酸相比具有明显优势。因此,壳聚糖正逐渐成为合成材料聚赖氨酸的理想替代材料。

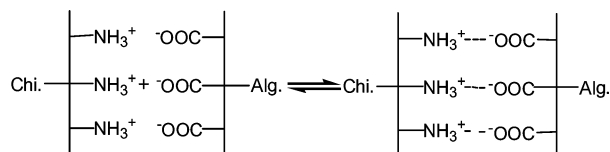


图 5 海藻酸钠与壳聚糖间静电作用示意图

Fig. 5 Schematic representation of electrostatic interaction between alginate and chitosan for polyelectrolyte complexation

## 2.2 海藻酸钠和壳聚糖聚电解质微胶囊制备技术

生物医学领域应用的微胶囊需要在温和工艺条件下制备,以尽量保持细胞或蛋白质的生物活性。目前,利用正、负电荷聚电解质之间的静电作用建立的聚电解质络合技术(polyelectrolyte complexation)是广泛应用的微胶囊制备技术。

### 2.2.1 液滴生成-聚电解质络合技术(droplet generation-polyelectrolyte complexation)

基于海藻酸钠的聚电解质微胶囊制备工艺分为两步:(1)离子移变作用下制备海藻酸钙凝胶珠,主要有液滴生成技术和乳化技术;(2)聚电解质络合成膜技术,将凝胶珠转入聚赖氨酸或壳聚糖溶液,利用静电作用形成聚电解质膜,再外覆一层海藻酸钠形成海藻酸钠/聚赖氨酸/海藻酸钠(APA)或海藻酸钠/壳聚糖/海藻酸钠(ACA)微胶囊。

聚电解质络合工艺中,海藻酸钠液滴成型及凝胶化技术直接决定了微胶囊的形状、尺寸及均匀度,并影响其物化性能。传统液滴生成技术是将海藻酸钠溶液直接滴入氯化钙溶液中形成海藻酸钙凝胶珠,凝胶珠球形度好、尺寸均匀,但受针头直径和海藻酸钠溶液黏度的限制,凝胶珠尺寸较大(数百 $\mu\text{m}$ —>1 mm),因此又相继出现了一些改进技术。

静电液滴生成技术(electrostatic droplet generation)<sup>[33—35]</sup>将静电场引入海藻酸钙凝胶珠制备过程。将装有海藻酸钠与细胞混悬液的注射器固定在注射器泵上,并接于静电发生器正极,作为凝胶浴的氯化钙溶液与负极连接,在针头和凝胶浴之间形成静电场。从而在注射器泵推动力和重力作用之外,又增加了电场力,可更容易地克服混悬液受到的针孔内壁的黏滞阻力及液滴自身的界面张力。通过调节参数可制备 100—200  $\mu\text{m}$  凝胶珠,与大尺寸胶珠相比,物质传递路径缩短,利于细胞吸收养分。

同向/轴流动(coflowing stream/coaxial flow)制备技术与针头同轴方向引入气流或液流<sup>[36]</sup>,同样起到了克服针孔内壁的黏滞阻力和界面张力的作用。同轴流动液滴发生器<sup>[37,38]</sup>主要包括针头组件,由橡胶管连接注射器泵的三通阀及连接于压力泵的过滤单元,可制备直径 20—400  $\mu\text{m}$  的微胶珠,且细胞活性保持率高达 98%。

微喷嘴阵列(micro-nozzle array)是采用光刻蚀技术(photolithography)和两步深度反应离子蚀刻技术(two-step deep reactive ion etching)在硅板上制备出的一种新型装置<sup>[39]</sup>,具有微射流装置的特点,即流体为层流流动,有明显的黏滞力,可在液滴形成时提供稳定的剪切力作用。制备的胶珠尺寸在 50—200  $\mu\text{m}$  且呈单分散分布。利用单个硅板上的 104 个微喷嘴,海藻酸钠液滴的生产能力可达到 214 ml/(cm<sup>2</sup> h),而且通过增大硅板面积或者多硅板并行可以很容易将产率放大 1 000 倍。

### 2.2.2 乳化/内部凝胶化-聚电解质络合技术(emulsification/internal gelation-polyelectrolyte complexation)

传统液滴法的另一个局限性在于产率较低(ml/h),不适于规模制备小尺寸海藻酸钙凝胶珠。乳化/内部凝胶化技术<sup>[40,41]</sup>(emulsification/internal gelation)先将海藻酸钠和难溶钙盐形成混悬液,再分散到油相中形成油包水(W/O)型乳化液,加入酸引发难溶钙盐中  $\text{Ca}^{2+}$  的解离,后者在乳化液滴内部与海藻酸钠作用生成海藻酸钙凝胶珠。因为  $\text{Ca}^{2+}$  的引入是来自液滴内部钙盐解离,故又称为内部凝胶化法。此技术经一次乳化即可成功制备出表面光洁、球形度好、尺寸在 200—1 000  $\mu\text{m}$  的海藻酸钙凝胶珠,通过控制制备过程物化参数可克服尺寸不均问题<sup>[42]</sup>,而且该技术在实现海藻酸钙凝胶珠的规模制备方面大有前途<sup>[43]</sup>。在此基础上,再与聚赖氨酸<sup>[44]</sup>或壳聚糖<sup>[45—47]</sup>通过聚电解质络合技术制备微胶囊。

膜乳化技术(membrane emulsification)具有液滴单分散性和稳定性好、条件温和、能耗低及易于规模化生产的特点<sup>[48,49]</sup>,且不存在高剪切力对生物物质活性的破坏作用,将其与内部凝胶化相结合得到膜乳化-内部凝胶化技术<sup>[50]</sup>(membrane emulsification-internal gelation)。海藻酸钠和钙盐颗粒悬浮液(水相)在压力作用下,通过具有一定孔径的膜管分散到油相中,与含有表面活性剂的油相形成油包水(W/O)型乳化液,加入酸引发凝胶化反应生成海藻酸钙

凝胶珠,再应用聚电解质络合技术可以制备相应的微胶囊。

乳化技术虽然实现了微胶囊的规模制备,但搅拌产生的剪切力(乳化)和膜孔挤压分散(膜乳化)过程不适于包埋哺乳动物细胞,然而将其用于包埋酶<sup>[51]</sup>或者微生物细胞<sup>[52]</sup>的尝试,却预示着该技术有可能用于制备包埋基因工程微生物细胞、酶或药物的微胶囊,通过口服途径进入体内发挥作用。

### 2.2.3 聚电解质层层自组装技术 (polyelectrolyte layer-by-layer self assembly)

近年来,人们开发了聚电解质层层自组装技术 (polyelectrolyte layer-by-layer self assembly) 制备微胶囊,其实质也是聚电解质络合原理,但多以聚苯乙烯、聚乳酸等胶粒/微球为模板,将正、负电荷聚电解质通过静电作用层层交替组装在模板表面,构建纳米厚度的高质量有序结构多层膜,再通过溶解或熔融处理除去内部模板得到中空微胶囊<sup>[53-55]</sup>。

Qiu 等<sup>[56]</sup>在尺寸 5—40  $\mu\text{m}$  药物(布洛芬)微晶表面层层交替组装聚阳离子壳聚糖和聚阴离子葡聚糖硫酸盐或羧甲基纤维素或海藻酸钠,根据组装次数不同形成的膜层厚度在 20—60  $\mu\text{m}$ 。因为布洛芬在  $\text{pH} < 7$  微溶而在  $\text{pH} > 7$  易溶,所以它在  $\text{pH} = 1.4$  的模拟胃液中释放缓慢,而在  $\text{pH} = 7.4$  的模拟肠液中快速溶解释放,表明聚电解质多层膜是半透性的,且最终形成中空微胶囊。同样,Ye 等<sup>[57]</sup>在 5—10  $\mu\text{m}$  药物(消炎痛)微晶表面采用聚电解质层层自组装技术,沉积海藻酸钠层后表面电荷为 -41 mV 而沉积壳聚糖层后转变为 +20 mV,表明聚电解质膜层的形成。但是缺点是包封物在交替组装过程中的损失较大,通常在形成 10 层聚电解质膜时的损失率 > 50 %。另外,尽管增加聚电解质膜层可降低药物释放速率,但是药物还是会在较短时间内释放出来(通常在数秒—30 min,最长不超过 2 h),达不到缓释或控释效果,这也是该技术当前亟待解决的问题。

Ye 等<sup>[58]</sup>以三聚氰胺甲醛微粒(MF, 2.1  $\mu\text{m}$ )为模板,交替组装一层海藻酸钠和壳聚糖后形成聚电解质膜,置于  $\text{pH} = 1.2$  的盐酸溶液中溶解除去 MF 内核得到中空海藻酸钠/壳聚糖微胶囊。再将得到的中空微胶囊重新分散于不同  $\text{pH}$  的胰岛素溶液中载药,之后继续组装海藻酸钠和壳聚糖层形成聚电解质多层膜。利用 MF 溶解产物与第一层海藻酸钠形成负电复合物提供的静电引力<sup>[59]</sup>,实现低  $\text{pH}$  下正电胰岛素自囊外向囊内扩散而载药,一定程度上解决了载药率低的问题。同时,这种静电引力也使

胰岛素在  $\text{pH} = 1.4$  的人工胃液中释放缓慢(6 h 释放 14.2 %),在  $\text{pH} = 7.4$  的模拟肠液中较快释放,虽然延长了释药时间(10 h 达到 80 %),但存在着暴释效应(80 min 释放 50 %)。

## 3 海藻酸钠和壳聚糖聚电解质微胶囊性能评价

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<sup>[4,5,60,61]</sup>,是决定其能否成功应用的前提,其中以强度性能和膜的渗透性能更为关键。

### 3.1 微胶囊机械强度

微胶囊机械强度不仅决定其在制备过程中的稳定性,而且决定其在生物环境中应用期间能否保持基本完整,以保证囊内细胞或物质活性发挥反应功能。

现有的微胶囊机械强度评价方法可以分为两类,一类是将微胶囊置于各种作用力场中,考察微胶囊在作用力下破碎时所需力大小或者保持完整性的比率。典型的力场有:(1)引力场<sup>[62]</sup>,将与水银柱相连通的微量滴管伸到悬浮在水中的聚己撑癸二酰胺微胶囊表面上,通过改变汞柱高度的方法产生引力而将膜吸入微量滴管内,测定膜表面张力来表征膜的机械强度,其缺点是仅获得了微胶囊膜表面很小区域的局部信息;(2)压力场<sup>[63,64]</sup>,将微胶囊置于两水平探头间,施加单轴载荷,测定破碎微胶囊所需的力,但此方法针对单个微胶囊,且测定结果通常会有 1 个数量级的变化;(3)离心力场<sup>[65]</sup>,将微胶囊置于离心管中,在不同转速下和时间内统计破碎微胶囊的比率;(4)摩擦力场<sup>[66]</sup>,将微胶囊与玻璃珠混合后,通过摩擦作用破碎微胶囊使其释放包埋的染料,可获得破碎率值;(5)剪切力场<sup>[67]</sup>,将微胶囊置于一定流速下的流体中,统计在剪切力作用下破碎的微胶囊比率。

另一类评价方法基于如下认识:微胶囊膜机械强度是膜厚度和膜弹性的综合结果,相同条件下制备的微胶囊,其膜强度与膜厚度之间成正比关系,所以通过测定微胶囊膜厚度可表征微胶囊膜的强度<sup>[68,69]</sup>。在假设微胶囊尺寸均匀和膜内液体密度  $D_i$  与微胶囊密度  $D_w$  相等的情况下,可建立微胶囊湿态膜厚度的定量计算方法,

$$L = R \left[ 1 - \left( \frac{W_w - W_m}{W_w} \right)^{1/3} \right]$$

通过实验手段测定微胶囊总重  $W_w$ ,微胶囊湿态膜

重  $W_m$  和微胶囊平均半径  $R$ , 即可确定微胶囊湿态膜厚度  $L$ , 表征膜强度。另外, 利用微胶囊在缓冲液中的膨胀行为, 也可表征微胶囊膜机械强度<sup>[70,71]</sup>, 实验发现微胶囊的体积膨胀率 ( $S_w$ ) 与膜厚度之间成反比关系, 进而可以推出体积膨胀率与膜强度成反比关系, 定义体积膨胀率为下式:

$$S_w(\%) = 100 \left[ \frac{(V_t - V_0)}{V_0} \right]$$

式中  $V_0$  和  $V_t$  分别代表胶珠和微胶囊的体积。当胶珠为球形时, 上式可写为:

$$S_w(\%) = 100 \left[ \left[ \left( \frac{D_t}{D_0} \right)^3 - 1 \right] \right]$$

式中  $D_0$  和  $D_t$  分别代表胶珠和微胶囊的直径。通过实验手段测定  $D_0$  和  $D_t$ , 即可计算出体积膨胀率以表征膜强度, 体积膨胀率值越大, 意味着微胶囊膜耐膨胀性越差, 其强度也越低。此方法的优点是反映出了微胶囊在溶液环境下的机械性能, 更接近其体内应用时的条件, 因此, 该方法获得的结果对体内应用来说更有价值。

### 3.2 微胶囊膜渗透性

微胶囊膜的传质性能对于生物体内应用的微胶囊来说至关重要。体内环境中营养物质能否扩散进入微胶囊及流入速率大小, 细胞代谢产物能否扩散出微胶囊及排出速率大小, 微胶囊能否隔离具有杀伤性的抗体等性能, 都将影响微胶囊内细胞存活能力、功能及应用效果, 但是目前仍没有建立系统的评价方法以确定适合不同细胞类型的膜渗透性。

通过实验手段测定微胶囊膜截留分子量<sup>[72]</sup> (molecular weight cut-off, MWCO), 即: 不能渗透过膜的物质所具有的最低分子量, 仍是评价微胶囊膜渗透性能的主要方法, 采用的模型物质多为蛋白质和葡聚糖。

一种方法是将微胶囊置于模型物质溶液中, 对不同时间内自微胶囊外渗透进入微胶囊的物质定量, 当使用不同分子量的模型物质时, 即可测定膜的 MWCO。如采用异硫氰酸酯荧光素标记的不同分子量葡聚糖 (FITC-dextran), 可容易地测定海藻酸钠-烯丙胺-聚乙烯醇微胶囊膜的 MWCO 为 120 kDa<sup>[73]</sup>。或者采用不同分子量蛋白质, 如肌红蛋白 (分子量 16.9 kDa)、卵清蛋白 (分子量 45 kDa)、牛血清白蛋白 (分子量 67 kDa) 和  $\gamma$ -球蛋白 (分子量 157 kDa), 考察它们在海藻酸钙-氨丙基-硅酸酯微胶囊膜上的渗透性, 在一定条件下, 牛血清白蛋白和  $\gamma$ -球蛋白都被阻隔在微胶囊膜外, 而卵清蛋白可以渗透进入, 表

明微胶囊膜的 MWCO 大约为 60 kDa<sup>[74]</sup>。

另一种方法是将生产分泌不同分子量蛋白质的细胞或基因工程细胞包埋于微胶囊中, 对不同时间内自微胶囊内渗透排出微胶囊的物质定量, 从而测定微胶囊膜的 MWCO。如: 在微胶囊中分别包埋能够分泌不同分子量蛋白质的基因工程哺乳动物细胞 (如上皮细胞、成纤维细胞和成肌细胞), 其生产分泌的人生长激素 (分子量 22 kDa)、人因子 IX (分子量 57 kDa) 和鼠  $\alpha$ -葡糖苷酸酶 (分子量 300 kDa) 均能渗透通过微胶囊膜, 且速率相近, 意味着微胶囊膜的 MWCO 大于 300 kDa<sup>[75]</sup>。

微胶囊膜的 MWCO 只是一个相对的评价指标, 不同材料、制备技术以及不同过程参数下制备的微胶囊具有不同的 MWCO。而且, 在实验评价过程中, 模型物质在微胶囊膜表面的吸附会给测定结果带来一定的误差。

除了上述实验评价微胶囊膜渗透性的研究, 人们还建立了一些数学模型以描述物质通过微胶囊膜的渗透扩散行为<sup>[76]</sup>。Kwok 等<sup>[77]</sup>建立了海藻酸钠/聚赖氨酸微胶囊的物质扩散模型, 对物质跨膜传递现象做了理论预测。解玉冰等<sup>[78]</sup>利用膜相扩散系数、截留率、MWCO 等参数建立了非稳态球形渗透扩散模型, 认为 APA 微胶囊内外物质扩散阻力主要集中在膜上。何洋等<sup>[79]</sup>在非稳态球形渗透扩散模型基础上, 提出膜扩散阻力特性参数和膜内基质分配系数, 重新建立了蛋白质在 APA 微胶囊中的扩散数学模型, 既消除了原模型在编程差分拟合中需调整初值以防结果发散的问题, 利于大批数据处理; 又清晰地反映出制备条件对物质扩散性质的影响。慕文涛等<sup>[80]</sup>在溶质均匀地分布在囊内外介质, 但在膜相中非均匀分布的假设下, 根据化学势平衡建立数学模型, 研究了蛋白质扩散进出 APA 和 ACA 微胶囊的过程, 考察了成膜物质对蛋白质扩散的影响规律, 为微胶囊制备条件的优化提供了理论依据。

## 4 海藻酸钠和壳聚糖聚电解质微胶囊在生物医学领域的应用

### 4.1 微囊化细胞移植

通过手术、注射和口服等方式, 将生物相容和可生物降解天然多糖材料制备的细胞微胶囊移植入生物体内, 凭借膜的选择渗透作用, 在克服机体免疫排斥反应的同时发挥细胞生物功能, 可为神经/内分泌系统疾病 (如糖尿病、帕金森氏症、肝功能障碍等) 或者代谢障碍疾病 (如尿毒症) 的治疗提供一条有效的

新途径<sup>[81,82]</sup>。其功能主要体现在:一方面,以体内营养物为反应物,通过细胞或酶参与的生化反应合成治疗性物质,如:重组酪氨酸酶基因的细胞可在体内以酪氨酸为底物,反应生成多巴胺治疗帕金森氏病;另一方面,以体内代谢生成的有害物质或废物为反应物,如:尿素和氨等,通过生化反应将其分解为无害小分子产物,重组脲酶基因的细胞可在体内以尿素和氨作为其生长所需的氮源,清除尿毒症患者体内多余的尿素和氨(图 6)。

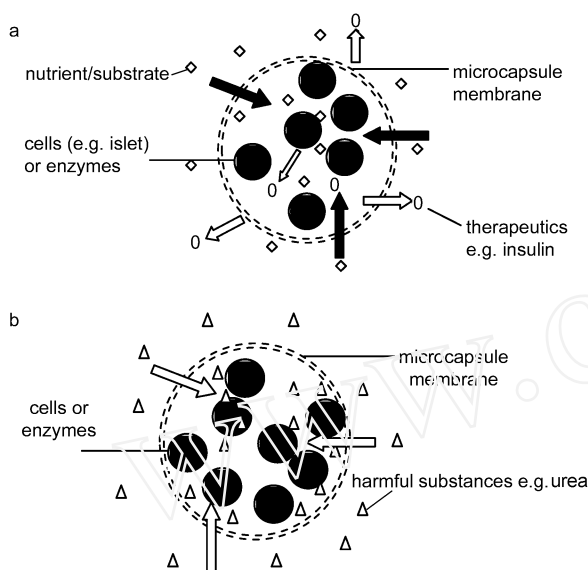


图 6 微囊化细胞移植功能示意图 (a) 合成和分泌治疗剂; (b) 分解有害物质

Fig. 6 Schematic representation of microencapsulated cell transplantation (a) synthesis and secrete therapeutics; (b) decomposing harmful substances

#### 4.1.1 合成分泌胰岛素——治疗糖尿病

糖尿病 (diabetes mellitus) 病因是人体胰腺内胰岛细胞不能正常分泌胰岛素,或分泌的胰岛素在靶细胞不能发挥正常生理作用,导致体内糖和蛋白质等代谢紊乱,最终出现多种并发症而危及生命。Lim 和 Sun 开创性地将微胶囊技术与胰岛细胞移植结合用于糖尿病治疗,推动了此领域的临床前研究<sup>[83-89]</sup>,包括大鼠和猴等糖尿病动物模型和细胞类型的应用,以及对微胶囊材料性能和制备技术的改进等方面。

微囊化细胞移植治疗糖尿病患者的临床研究同样获得了成功。Soon-Shiong 等<sup>[90]</sup>将人胰岛细胞包埋于海藻酸钠/聚赖氨酸微胶囊中 (20 000 胰岛/kg),注射入 1 位胰岛素依赖型糖尿病患者腹腔 (38 岁白人,糖尿病史 30 年且有严重并发症),微囊化胰岛细

胞可正常生长,分泌的胰岛素在注射后 24 h 内即可检测到,尽管其分泌量低于临床要求剂量,但在第 9 个月停用外源胰岛素的情况下,仍保持 24 h 血糖水平稳定,且持续时间超过 58 个月<sup>[91]</sup>。

为了提高微胶囊体内应用时的生物相容性,Chen 等<sup>[92]</sup>将引入 1 个氨基的甲氧基聚氧乙烯胺 (methoxypolyoxyethylene amine, PEGA1) 或 2 个氨基的聚氧乙烯二胺 (polyoxyethylene bis(amine), PEGA2) 的正电聚乙二醇 (PEG) 衍生物包覆到 APA 微胶囊表面,包埋大鼠胰岛并植入 BALB/c 小鼠腹腔,120 天后回收发现:对照组微胶囊表面纤维化反应严重且聚集成簇;而 PEG 修饰的微胶囊可自由流动且没有细胞过度生长现象,说明其不利于纤维细胞黏附,微胶囊生物相容性有所提高。在链脲霉素诱导的糖尿病小鼠腹腔内植入 PEG 修饰的微囊化胰岛,微胶囊中大鼠胰岛可很好地响应葡萄糖浓度变化而合成分泌胰岛素,在不使用免疫抑制剂的情况下维持血糖正常水平达 200 天以上。

#### 4.1.2 合成分泌多巴胺——治疗帕金森氏症

帕金森氏症病因是脑部黑质及纹状体内的神经元变性或过早死亡,黑质细胞大量消失,导致其负责合成分泌的多巴胺 (dopamine, 脑内控制运动的纹状体的抑制性神经递质) 减少,使人体运动协调机能遭到破坏,出现肢体震颤、运动迟缓/运动减少、肌强直和姿势障碍等一系列临床症状。

应用微胶囊包埋能合成分泌多巴胺的细胞并移植入帕金森氏症动物模型的纹状体,提供了治疗帕金森氏症的又一条途径<sup>[93,94]</sup>。Date 等<sup>[95]</sup>进行了微胶囊包埋 PC12 细胞 (源自大鼠嗜铬细胞瘤的细胞系) 移植治疗帕金森氏猴模型的长期实验。在移植 1 年后回收微胶囊,PC12 细胞仍然存活并合成释放 L-多巴和多巴胺。接受移植的帕金森氏猴身体状况良好、手功能明显改善,血液和脑脊髓液分析表明移植并未引起动物感染或免疫反应。

薛毅珑等<sup>[96,97]</sup>以偏侧旋转行为为特征的帕金森氏症大鼠和猴为模型 (单侧颈动脉内注射甲基-苯基-四氢吡啶, MPTP), 分别将 APA 微胶囊包埋的牛肾上腺嗜铬细胞 (bovine chromaffin cells, BCC)、BCC 和空微胶囊定向植入右侧脑纹状体内,植入的微囊化 BCC 能在动物脑内存活并合成分泌多巴胺等单胺类物质,纠正帕金森氏大鼠和猴的偏侧旋转行为,作用超过 10 个月;非囊化 BCC 仅能改变部分动物的偏侧旋转,且作用时间基本只能持续 1 个月;空微囊组则与对照组一样,症状没有改善。



#### 4.1.3 合成分泌抑瘤因子——治疗癌症

人们发现并实验证明了肿瘤细胞的生长和繁殖依赖于血管生成<sup>[98]</sup>,因此抑制这些血管生成过程将为肿瘤治疗提供强有力的手段。目前,人们已经分离得到多种抑瘤因子,如血管生成抑制因子(angiotatin)<sup>[99]</sup>和血管内皮细胞生长抑制因子(endostatin)<sup>[100]</sup>。在肿瘤动物模型的研究中,它们都表现出明显的抑瘤作用,但直接注射的抑制因子很快被从血液清除而达不到抑瘤效果,利用微胶囊将有望实现这些抑制因子在体内的长期合成及释放。

Joki 等<sup>[101]</sup>将表达人源 endostatin 的基因转入幼鼠肾细胞(BHK-21)得到工程细胞 BHK-endo,然后包埋于 APA 微胶囊。体外培养 6 周,采用酶联免疫法(ELISA)从每周收集的培养液中检测微胶囊内 BHK-endo ( $2 \times 10^5$  个细胞)合成分泌的 endostatin 浓度,其平均值为  $150.2 \pm 11.4$  ng/ml。将微胶囊包埋的 BHK-endo 细胞经皮下注射入荷瘤(人恶性胶质瘤)裸鼠,21 天后测量瘤体积,与对照组相比,瘤体积抑制率为 62.2%;处死裸鼠、回收肿瘤组织并称重,瘤重与对照组相比降低了 72.3%。同时将回收的微胶囊继续培养 2 周,western blot 分析仍能检测到 BHK-endo 细胞合成分泌的生物活性 endostatin。

中国科学院大连化学物理研究所马小军课题组与中国科学院上海生命研究院费俭课题组合作,将表达 endostatin 的基因转入中国仓鼠卵巢细胞系(CHO)得到工程细胞 CHO-endo,然后包埋于 APA 微胶囊。将微胶囊包埋的 CHO-endo 细胞注射入 B16 黑色素瘤鼠(C57BL/6)模型,15 天后测量肿瘤体积,与对照组相比,注射微胶囊的荷瘤鼠肿瘤体积明显缩小,抑瘤率达 60%(图 7)。

Grone 等<sup>[102]</sup>将分别分泌白介素-2 融合蛋白(interleukin-2 fusion protein, sFvIL-2)和 angiotatin 的基因工程细胞共同包埋于 APA 微胶囊内(共包囊),希望依靠两种基因工程细胞的共同作用以增强抑瘤效果。将包埋两种细胞、包埋 sFvIL-2 的表达细胞及 angiotatin 表达细胞的微胶囊移植入荷瘤鼠体内(B16-F0/neu tumor)后,分别在血清、肿瘤和腹腔器官内检测细胞合成分泌的产物,与单独应用 sFvIL-2 表达细胞的情况相比,共包囊组合成分泌的 sFvIL-2 在血清中增加近 5 倍,在肿瘤中增加更明显,在肾中增加 2 倍,在脾中却有所降低,在肝中没有差别;这意味着有更高水平的 sFvIL-2 向系统和肿瘤释放,表现出肿瘤和肿瘤相关内皮细胞凋亡的增加和宿主炎症反应的减轻。与单独应用 angiotatin 表达细胞的情

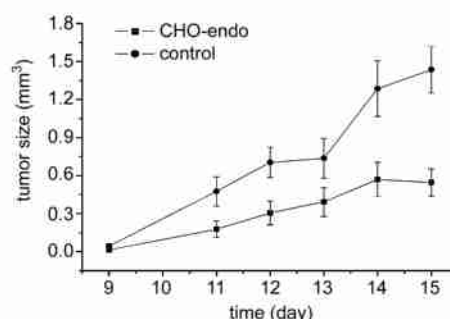


图 7 APA 微胶囊包埋基因工程 CHO-endo 细胞(上, 100 ×)及荷瘤鼠体内抑瘤效果(下)

Fig.7 APA microcapsule entrapping genetically modified CHO-endo cells (up, 100 ×) and the tumor suppression effect in tumor-bearing mice (down)

况相比,共包囊组合成分泌的 angiotatin 却没有显著差别,尽管它显著降低了不需要内皮细胞参与下的新血管生成水平,但是其总体治疗效果却降低了,这可能是由于分泌 angiotatin 的细胞遇到了转基因沉默作用,即“旁观者”效应(bystander effect)。上述结果也说明,共包囊虽然可以取得更好的抑瘤效果,但是并没有获得预期的两种细胞协同作用。

#### 4.1.4 分解代谢血清胆红素、血氨等有害物质——辅助治疗肝功能衰竭

肝脏是人体重要的分泌、排泄、生物转化(解毒)和屏障器官。如果肝脏受损,肝实质细胞(简称为肝细胞)会变性坏死,肝脏分泌、合成及转化(解毒)等功能受到影响,机体出现严重的代谢紊乱及毒性物质累积(如血清胆红素、血氨等),直至肝功能衰竭(hepatic failure, HF),后者反过来又影响肝细胞再生及功能恢复,形成恶性循环。由于肝脏具有强大的适应代偿能力,如果在发生轻度或局限性肝损伤时,以某种方式暂时辅助或取代受损的肝脏,清除肝功能衰竭所产生的各种有害毒性物质(积累的氨、胆红素等),补充蛋白质、凝血因子等必需物质,则有助于



肝脏自发性再生或作为肝脏移植前的过渡治疗。

Dixit 等<sup>[103,104]</sup>将分离自雄性 Wistar 大鼠的游离肝细胞( $5 \times 10^7$ )附着于胶原基质,再包埋于 APA 微胶囊中,然后与裸肝细胞( $5 \times 10^7$ )分别移植入先天胆红素血症的 Gunn 大鼠腹膜腔,对照组植入空微胶囊。移植后第一周,微囊化细胞、裸肝细胞和对照组中血清胆红素水平的平均最大降幅分别为 45.7%、18.6% 和 14.3%;1 个月后分别为 34.8%、13.5% 和 3.3%。而且与分解代谢胆红素能力相对应,微囊化肝细胞可保持正常超细结构达 1 个月。

Umehara 等<sup>[105]</sup>将分离自雄性 Wistar 大鼠的游离肝细胞( $4 \times 10^7$ )附着于胶原基质,再包埋于 APA 微胶囊中,在对 Wistar 大鼠施行全肝切除术前 4 天移植入腹膜腔,同时以空胶囊移植为对照。对照组大鼠在手术后 3 小时出现眼球突出症状并表现出 5 级肝性脑病,平均存活时间为  $3.7 \pm 0.1$  h;而移植微囊化细胞的大鼠肝性脑病的形成明显延缓,平均存活时间为  $17.3 \pm 3$  h。另外,对照组血氨浓度在全肝切除术后迅速增加,而移植微囊化细胞组的血氨浓度缓慢增加,仅为对照组的 60%,表明微胶囊中的肝细胞起到了分解代谢血氨作用。

#### 4.1.5 分解代谢尿素、氨等有害物质——治疗肾功能衰竭引起的尿毒症

肾脏同样是人体重要的排泄器官,主要功能是保持机体水和电解质平衡,调整酸碱浓度,过滤代谢产物,然后以尿的形式排出。当肾功能受损而衰竭时,则无法正常排泄一些代谢废物,如食物蛋白分解产物(尿素)、核酸降解产物(尿酸)和肌肉蛋白分解产物(肌氨酸酐)等,它们会积蓄于血液和身体组织中,浓度不断增加而导致尿毒症。

Prakash 等<sup>[106]</sup>对雄性 Wistar 大鼠施行肾切除术建立尿毒症大鼠模型,将表达尿素酶的基因工程大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5)包埋于 APA 微胶囊中,每天给尿毒症大鼠口服微囊化细胞,同时以正常大鼠及口服空微胶囊的正常大鼠和尿毒症大鼠作为对照。口服前,正常大鼠血浆尿素浓度为  $9.10 \pm 0.71$  mg/dl,尿毒症大鼠则为  $52.08 \pm 2.06$  mg/dl;口服后第 7 天,尿毒症大鼠血浆尿素浓度降至  $10.58 \pm 0.85$  mg/dl,并且在随后的两周一直保持稳定。如果停止口服,则尿毒症大鼠血浆尿素浓度会反弹升高至  $20.11 \pm 1.80$  mg/dl,并在第 7 天达到  $53.69 \pm 2.59$  mg/dl。在口服微胶囊分解代谢尿素的同时,检测表明尿毒症大鼠氨浓度也明显降低,从  $539 \pm 51$   $\mu$ mol/L 降至  $144 \pm 24.70$   $\mu$ mol/L,并在整个实验期间

保持稳定。上述结果清楚地表明,微胶囊内的基因工程大肠杆菌能在大鼠胃肠道内存活、合成分泌尿素酶,并以体内积累的尿素和氨为其复杂酶反应的底物,从而起到分解代谢尿素和氨的作用。而且经口服微胶囊处理的尿毒症大鼠体重与正常大鼠无明显差别,但是其寿命与未口服处理的尿毒症大鼠相比却得以延长<sup>[107]</sup>。进一步研究表明,包埋基因工程大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5)的 APA 微胶囊,还能够使尿毒症大鼠血浆中尿酸浓度从  $71.00 \pm 27.49$  mg/dl 降至  $20.33 \pm 17.92$  mg/dl,并在实验期间保持稳定<sup>[108]</sup>。

考虑到大肠杆菌体内安全性和材料的经济性,于炜婷等<sup>[109]</sup>用酵母菌替代大肠杆菌,采用乳化/内部凝胶化技术制备包埋酵母菌的海藻酸钠/壳聚糖微胶囊。研究表明:载酵母细胞微胶囊在人工胃液中略有收缩,在模拟肠液中明显膨胀;在模拟肠液中葡萄糖消耗量和乙醇产量均明显增加说明酵母细胞保持了良好代谢能力,而且,微囊化酵母细胞生存率比游离细胞增加 200 倍。

#### 4.2 微囊化细胞培养

##### 4.2.1 作为三维药物筛选系统

抗肿瘤药物开发一直是制药工业的重要研究课题。目前,药物活性高通量筛选过程是在体外微孔板中进行基于药物作用靶点的分子或细胞水平检测与评价,这种平面水平药物筛选难以反应体内真实情况(肿瘤是包含多细胞和血管的复杂三维结构),常因筛选结果的假阴性和假阳性造成药物的漏筛和误筛,导致动物实验可靠性降低、时间及费用的增加。张旭朗等<sup>[110]</sup>将人乳腺癌细胞 MCF-7 包埋于 APA 微胶囊中,建立了模拟肿瘤结构的多细胞三维药物筛选系统。微囊化细胞在培养过程中形成包括增殖、静止和坏死状态的三维多细胞肿瘤球(MMTS),位于瘤球外缘的细胞保持生物活性,模拟了体内靠近毛细血管的肿瘤细胞状态;而瘤球中心的细胞坏死区模拟了体内缺少血管供养支持的肿瘤坏死细胞;而且这种不同状态细胞群同心分布和三维生长模式比较接近于体内实体瘤初始无血管生成阶段。分别以 MMTS 和平面细胞为模型,加入血浆峰浓度为 10 的抗肿瘤药物丝裂霉素,相比于平面细胞 95.1% 的细胞抑制率,MMTS 系统为 68.1%,更接近于体内用药的肿瘤抑制水平,从而提供了一种新的、结果更为真实可靠的三维药物筛选系统。

##### 4.2.2 作为体内干细胞增殖分化研究工具

胚胎干细胞(ES)不仅可作为研究早期胚胎发育的体外模型,而且是潜在的可再生临床应用细胞

源。体内干细胞生长、增殖和分化依赖于其周围的微环境,内源性和外源性因子在调控干细胞命运的过程中发挥着重要作用。在体外干细胞培养时改变培养条件,人们已经确定了一些外源性调控因子<sup>[111]</sup>。但是由于异源干细胞植入体内易引起免疫排斥反应,体内微环境对干细胞命运影响的研究很少有人涉及。王秀丽等<sup>[112]</sup>利用微胶囊的免疫隔离特性开展了微囊化 ES 的体内研究。将小鼠 ES 包埋于 APA 微胶囊中并移植入小鼠腹膜腔。研究表明:体内微囊化 ES 明显快于体外微囊化 ES 培养;采用未分化小鼠 ES 的典型标记物胚胎抗原-1、碱基磷酸酶等,结合免疫染色和 RT-PCR 分析技术,发现体内培养时标记物表达量下调速率明显快于体外培养,说明体内微囊化 ES 多数已经分化为不同细胞类型,而体外培养微囊化 ES 尚处于未分化阶段。因此,微囊化 ES 培养不仅提供了研究干细胞增殖、分化规律和发育生物学的特殊手段,而且利用微囊化 ES 进行体内调控分化在组织工程和再生医学领域也有着潜在的应用前景。

#### 4.3 微囊化药物释放

传统药物和制剂在临床应用中多存在药物体内清除率高(药物有效性低)、具有毒副作用(药物安全性低)和需要频繁用药以维持药效(患者顺从性低)等问题。药物释放系统(drug delivery system)以药物性质为基础,通过合理设计载体,可以保护药物活性,实现以准确的剂量、可控及靶向释放和方便的给药途径治疗疾病的目标,从而提高临床用药的有效性、安全性和顺从性。材料的设计、载体制备技术和开发潜在的有效给药途径是药物释放系统研究的主要内容<sup>[113,114]</sup>。

由于天然多糖材料表现出良好生物相容性、生物降解性和黏附性,聚电解质络合技术条件温和(通常在近生理条件),微胶囊独特的选择渗透膜既可保护被包埋药物,又可控制物质扩散速率,因此,海藻酸钠/壳聚糖微胶囊已经被用作生化药物(如胰岛素<sup>[115,116]</sup>)的口服给药载体,以克服此类药物注射给药生物利用度低的问题。利用海藻酸钙凝胶的 pH 响应特性<sup>[117,118]</sup>,可在胃酸环境收缩时使药物释放速率降低(释放量 < 15%),但是较大的载体尺寸(1—5 mm)将不利于肠内释放药物的有效吸收;而且,药物尺寸及分布还会显著影响药物在组织和器官中的分布以及释放行为<sup>[119,120]</sup>。刘袖洞等开发了膜乳化/内部凝胶化技术制备出 50—100  $\mu\text{m}$  且分布均匀的海藻酸钙凝胶珠,包埋血红蛋白后载药率达 95%,覆

膜形成海藻酸钠/壳聚糖微胶囊,药物包封率 40%,初步实验表明血红蛋白在模拟肠液中释放缓慢,8 h 后释放率为 8%。同样,海藻酸钠/壳聚糖微胶囊也可用作抗生素(如克拉霉素,用于治疗幽门螺旋杆菌感染引起胃溃疡)的口服载体,以克服传统抗生素制剂快速过胃而不能有效到达细菌感染位点的问题<sup>[121]</sup>。郑建华等<sup>[122]</sup>利用壳聚糖的生物黏附特性、乙基纤维素的低密度和缓释性能,成功制备出包埋克拉霉素的乙基纤维素/海藻酸钠/壳聚糖胃内漂浮黏附微胶囊,克拉霉素包封率达 82.5%,体外研究表明微胶囊可漂浮于胃酸环境(漂浮率 90%)并黏附于胃黏膜,口服 4 h 后,微胶囊在胃中滞留率仍达 60%,从而延长了克拉霉素在胃中停留时间,这样可能利于药物穿过胃黏膜到达幽门螺旋杆菌感染位点发挥作用。

另外,以海藻酸钠/壳聚糖微胶囊作为脂溶性小分子抗肿瘤药物载体的尝试也获得了初步成功。-榄香烯( $\alpha$ -elemene)是从姜科植物温郁金(*Curcuma wenyujin*)根茎中提取的一种仅由碳、氢两种元素组成的倍半萜烯类脂溶性小分子化合物,对癌性胸、腹水和肺、肝等实体瘤的抑瘤率可达 75%<sup>[123]</sup>,目前临床应用主要是注射乳剂,释放快,易从血液中清除,因此,临床需求能在癌症手术缝合前进行原位喷洒的抗癌药物缓释剂,以抑制癌症复发和癌细胞转移,提高疗效。李胜等<sup>[124]</sup>以乳化/内部凝胶化技术将-榄香烯均匀包埋于平均尺寸 98.7  $\mu\text{m}$  的海藻酸钠/壳聚糖微胶囊中,药物包封率 70%,体外释放 7 天药物的释放率仅为 35%,表现出一定的缓释性能。

## 5 存在问题及展望

如上所述,天然多糖微胶囊包埋细胞或药物,在糖尿病、帕金森氏症、癌症、肝功能衰竭、尿毒症等疾病的治疗方面具有极大潜力。然而,目前研究还多为动物实验阶段(仅有极个别人体应用的例子),离真正进入临床实际应用的要求还有很大距离。除了伦理问题和进入临床应用要克服的政策法规障碍,微胶囊还面临着许多重要的技术问题<sup>[125]</sup>,如生物相容性材料的获得,安全的功能细胞的来源及大量可重复获得,具有机械、化学稳定性和适宜渗透性能的微胶囊膜制备技术,微囊化细胞在生物体内功能的稳定、长期发挥和临床应用的生物安全性等。

尽管基于海藻酸钠的微胶囊是目前应用最多、效果最好的体系,但是,海藻酸钠中含有的多酚、内毒素、热原和蛋白质等杂质成分使得其生物相容性

仍不理想,利用过滤、沉淀和萃取技术对海藻酸钠进行纯化<sup>[126,127]</sup>,能除去 63 % 的多酚、91.45 % 的内毒素和 68.5 % 的蛋白质<sup>[128]</sup>。挪威的 Pronova 公司已经生产出生物医药级/临床应用级的海藻酸钠,在应用中都明显改善微胶囊的生物相容性(宿主反应减轻)。但是,微胶囊在生物体内应用的时间仍然有限,且在部分(<10 %)回收的微胶囊表面还有纤维化细胞过度生长的现象<sup>[129]</sup>。除了杂质,海藻酸钠的组成对生物相容性也有一定影响<sup>[130]</sup>,研究表明,海藻酸钠中的甘露糖醛酸(M)比古罗糖醛酸(G)更容易刺激生物体组织中的抗体生成和纤维化反应发生<sup>[131,132]</sup>。因此,一方面可以选择不同产地及季节的褐藻作为原料来制备 G 含量高的海藻酸钠(如:褐藻 *Lessonia trabeculata* 叶柄的 G 含量高达 90 %<sup>[133]</sup>),另一方面,可以采用化学反应来改变其组成,如:用差向异构酶使甘露糖醛酸(M)转化为古罗糖醛酸(G),达到控制海藻酸钠化学组成及结构的目的<sup>[134]</sup>。

微胶囊的制备技术通常与制备材料的性质和特点密切相关。然而,无论是传统的液滴法,还是相继发展的静电液滴、同轴流动和微喷嘴阵列技术,都不能完全同时实现尺寸大小均匀、球形规整和表面光洁的海藻酸钙凝胶珠的规模制备,进而影响到具有机械、化学稳定性和适宜渗透性能的微胶囊制备。例如,尺寸大小不仅影响对胰岛细胞的包封率,而且影响微囊化细胞在大鼠体内调节血糖的功能<sup>[135]</sup>,而且在满足物质跨膜传递的前提下,小尺寸微胶囊比大尺寸微胶囊具有更高的机械稳定性;表面光洁的微胶囊在体内可以有效阻止成纤维细胞的附着、铺展和迁移<sup>[136]</sup>,从而避免纤维化反应对物质传递及囊内细胞生存的负面影响。另外,微胶囊制备仪还多为实验室自行研制的小型装置,不仅微胶囊产量较低(ml/h),而且仪器性能的稳定性有待提高。

从临床应用角度考虑,微胶囊技术的各环节(细胞分离或培养,生物相容性材料的选择、加工及纯化,微胶囊的制备,移植部位的选择,及在不同动物模型中的应用效果等)还存在着两个重要的共性制约因素:缺少重复性和缺少标准<sup>[125]</sup>。例如,海藻酸钠组成(G/M)和结构(G、M 片段排列方式)明显受褐藻产地、季节及提取工艺技术的影响,导致性能差异明显,造成制备的微胶囊在动物实验中的结果重复性差。另外,无论细胞、制备装置及技术,还是动物模型的建立、移植步骤及实验操作规程,都没有统一标准,这也是造成实验结果不具备重复性和可比性的重要原因。美国试验与材料学会(American Society

for Testing and Materials, ASTM)正在致力于建立组织工程相关医疗产品的标准和指南,尤其关注基质、支架和固定化生物材料的安全性、性能一致性和功能性。其中就包括海藻酸钠和壳聚糖的测试方法和安全标准方面的指南信息,从内毒素、蛋白质、重金属、微生物的含量,安全性和毒性,重复性生产等方面制定了要求和标准<sup>[137]</sup>。虽然它没有明确指出该标准和指南适用于微胶囊,但实际上指南中列出的应用范围涵盖了该领域,而且其重要意义在于对微胶囊的标准化具有借鉴价值。

我们有理由相信,随着天然多糖材料质量稳定性、重复性、生物相容性、安全性的不断提高;条件温和且易于规模化生产的制备技术、专项仪器设备的开发成功;微囊化细胞/药物体内应用环境中动态行为分析技术的完善;微胶囊膜内外物质传递规律及生物相容性的化学本质的认识更加深入,天然多糖微胶囊将有望更快地实现临床应用。

#### 参 考 文 献

- [1] 马小军(Ma XJ)编著. 微胶囊与人工器官(Microcapsule and Artificial Organs). 北京:化学工业出版社(Beijing: Chemical Industry Press), 2002
- [2] Chang T M S. Science, 1964, 146: 524—525
- [3] Lim F, Sun A M. Science, 1980, 210: 908—910
- [4] 刘袖洞(Liu XD), 何洋(He Y), 马小军(Ma XJ)等. 科学通报(Chinese Science Bulletin), 2000, 45(23): 2476—2485
- [5] Uludag H, de Vos P, Tresco P A. Adv. Drug Deliver. Rev., 2000, 42: 29—64
- [6] Wang W, Liu XD, Ma XJ, et al. J. Mater. Chem., 2006, 16: 3252—3267
- [7] Abalovich A, Jatimiansky C, Diegex E, et al. Transplant. Proceedings, 2001, 33: 1977—1979
- [8] Uhrich K E, Cannizzaro S M, Langer R S, et al. Chem. Rev., 1999, 99: 3181—3198
- [9] Fu K, Pack D W, Langer R S, et al. Pharm. Res., 2000, 17: 100—106
- [10] George M, Abraham T E. J. Control. Release, 2006, 114: 1—14
- [11] Jen A C, Wake M C, Mikos A G. Biotechnol. Bioeng., 1996, 50: 357—364
- [12] Orive G, Hernández R M, Pedraz J L, et al. Trends Biotechnol., 2004, 22(2): 87—92
- [13] Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. Trends Biotechnol., 1990, 8: 71—78
- [14] Gombotz W R, Wee S F. Adv. Drug Deliver. Rev., 1998, 31: 267—285
- [15] Sugawara S, Imai T, Otagiri M. Pharm. Res., 1994, 11: 272—277

- [16] Draget K I, Skjåk-Bræk G, Smidsrød O. Carbohydr. Polym., 1994, 25: 31—38
- [17] Rees D A. Pure Appl. Chem., 1981, 53: 1—14
- [18] 薛伟明 (Xue W M), 于炜婷 (Yu W T), 马小军 (Ma X J) 等. 高等学校化学学报 (Chemical Journal of Chinese Universities), 2004, 25(7): 1342—1346
- [19] Shoichet M S, Li R H, White M L, et al. Biotechnol. Bioeng., 1996, 50: 374—381
- [20] Al-Shamkhani A, Duncan R J. J. Bioact. Compat. Polym., 1995, 10: 4—13
- [21] Alsberg E, Kong H J, Mooney J J, et al. J. Dent. Res., 2003, 82: 903—908
- [22] Bystrycky S, Malovikova A, Sticzay T. Carbohydr. Res., 1990, 13: 283—294
- [23] Strand B L, Ryan T L, Veld P I, et al. Cell Transplant., 2001, 10: 263—275
- [24] Illum L, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, et al. Adv. Drug Deliver. Rev., 2001, 51: 81—96
- [25] 尹承慧 (Yin C H). 国外医药——合成药、生化药、制剂分册 (World Pharmacy), 2000, 21(2): 106—109
- [26] Illum L. Pharm. Res., 1998, 15(9): 1326—1331
- [27] Janes K A, Calvo P, Alonso M J. Adv. Drug Deliver. Rev., 2001, 47: 83—97
- [28] Temel A, Kazokoglu H, Taga Y. Ann. Ophthalmol., 1991, 23: 191—194
- [29] Ren D W, Yi H F, Ma X J, et al. Carbohydr. Res., 2005, 340: 2403—2410
- [30] Ren D W, Yi H F, Ma X J, et al. J. Membr. Sci., 2006, 280: 99—107
- [31] Ramdas M, Dileep K J, Anitha Y. J. Biomat. Appl., 1999, 13: 290—296
- [32] Bartkowiak A, Hunkeler D. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1999, 875: 36—45
- [33] Bugarski B, Li Q, Gosen M F A, et al. AIChE J., 1994, 40: 1026—1031
- [34] Gosen M F A, Al-Ghafri A S, El Mardi O, et al. Biotechnol. Prog., 1997, 13: 497—502
- [35] 任吉伦 (Ren J L), 马小军 (Ma X J), 何洋 (He Y). CN 00 253 538.6
- [36] Koch S, Schwinger C, Rainov N G, et al. J. Microencapsul., 2003, 20(3): 303—316
- [37] Hardikar A A, Risbud M V, Bionde R R. J. Biosci., 1999, 24(3): 371—376
- [38] Sakai S, Kawabata K, Ono T, et al. Biotechnol. Bioeng., 2004, 86(2): 168—173
- [39] Sugiura S, Oda T, Nakajima M, et al. Biomaterials, 2005, 26(16): 3327—3331
- [40] Lencki R W J, Neufeld R J, Spinney T. US 4 822 534, 1989
- [41] Poncelet D, Lencki R W J, Neufeld R J, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1992, 38: 39—45
- [42] Poncelet D, Desmet B P, Neufeld R J, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1995, 43: 644—650
- [43] Poncelet D, Babak V, Dulieu C, et al. Colloid Surface A, 1999, 155(2/3): 171—176
- [44] Esquisabel A, Hernandez R M, Pedraz J L. J. Microencapsul., 1997, 14: 627—638
- [45] Alexakis T, Boadi D K, Quong D, et al. Appl. Biochem. Biotechnol., 1995, 50: 93—106
- [46] Ribeiro A J, Neufeld R J, Arnaud P, et al. Int. J. Pharm., 1999, 187: 115—123
- [47] Vandenberg G W, de La Noë J. J. Microencapsul., 2001, 18: 433—441
- [48] Muramatsu N, Nakauchi K. J. Microencapsul., 1998, 15(6): 715—723
- [49] Joscelyne S M, Trägårdh G. J. Membr. Sci., 2000, 169: 107—117
- [50] Liu X D, Bao D C, Ma X J, et al. J. Appl. Polym. Sci., 2003, 87: 848—852
- [51] Yi Y Y, Kermasha S, Neufeld R J, et al. J. Mol. Catal. B-Enzym., 2002, 19/20: 319—325
- [52] Moslemy P, Guio S R, Neufeld R J. Enzyme Microb. Tech., 2002, 30: 10—18
- [53] 梁振鹏 (Liang Z P), 王朝阳 (Wang C Y), 孙启龙 (Sun Q L) 等. 化学进展 (Progress in Chemistry), 2004, 16(4): 485—491
- [54] An Z H, Tao C, Lu G, et al. Chem. Mater., 2005, 17: 2514—2519
- [55] An Z H, Möhwald H, Li J B. Biomacromolecules, 2006, 7: 580—585
- [56] Qiu X P, Leporatti S, Donath E, et al. Langmuir, 2001, 17: 5375—5380
- [57] Ye S Q, Wang C Y, Liu X X, et al. J. Control. Release, 2005, 106: 319—328
- [58] Ye S Q, Wang C Y, Liu X X, et al. J. Control. Release, 2006, 112: 79—87
- [59] Gao C Y, Donath E, Möhwald H, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2002, 114: 3789—3793
- [60] Li R H. Adv. Drug Deliver. Rev., 1998, 33: 87—109
- [61] Hunkeler D, Rehor A, Ceausoglu I, et al. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2001, 944: 456—471
- [62] Jay A W L, Edwards M A. Can. J. Physiol. Pharm., 1968, 46: 731—737
- [63] Matthew H W, Salley S O, Peterson W D, et al. Biotechnol. Prog., 1993, 9: 510—519
- [64] Zhao L, Zhang Z B. Artif. Cell Blood Substit. Immobil. Biotechnol., 2004, 32(1): 25—40
- [65] Dautzenberg H, Lukanoff B, Eckert U, et al. Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Phys. Chem. Chem. Phys., 1996, 100: 1045—1053
- [66] Leblond F A, Tessier T, Halle J P. Biomaterials, 1996, 17: 2097—2102
- [67] Lee C S, Chu I M. Artif. Organs., 1997, 21: 1002—1006
- [68] Ma X J, Vacek I, Sun A M. Artif. Cell Blood Substit. Immobil. Biotechnol., 1994, 22: 43—69

- [69] 马小军 (Ma XJ), 解玉冰 (Xie YB), 周丽 (Zhou L) 等. 中华器官移植杂志 (Chinese Journal of Organ Transplantation), 1995, 16(4): 159—161
- [70] 刘群 (Liu Q), 薛伟明 (Xue WM), 马小军 (Ma XJ) 等. 高等学校化学学报 (Chemical Journal of Chinese Universities), 2002, 23(7): 1417—1420
- [71] Liu X D, Xue W M, Ma X J, et al. Carbohydr. Polym., 2004, 56(4): 459—464
- [72] Gosen M F A, King G A, McKnight C A, et al. J. Membr. Sci., 1989, 41: 323—343
- [73] Kang I K, Moon J S, Jeon H M, et al. J. Mater. Sci. Mater. Med., 2005, 16(6): 533—539
- [74] Sakai S, Ono T, Iijima H, et al. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2001, 944: 277—283
- [75] Peirone M, Ross C J D, Chang P L, et al. J. Biomed. Mater. Res., 1998, 42(4): 587—596
- [76] Gosen M F A. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1999, 875: 84—104
- [77] Kwok W Y, Kiparissides C, Gosen M F A, et al. Can. J. Chem. Eng., 1991, 69: 361—370
- [78] 解玉冰 (Xie YB), 马小军 (Ma XJ), 王毓福 (Wang Y F) 等. 膜科学与技术 (Membrane Science and Technology), 1997, 17(4): 51—56
- [79] 何洋 (He Y), 解玉冰 (Xie YB), 马小军 (Ma XJ) 等. 高等学校化学学报 (Chemical Journal of Chinese Universities), 2000, 21(2): 278—282
- [80] Qi W T, Ma J, Ma X J, et al. J. Membr. Sci., 2006, 269: 126—132
- [81] Dove A. Nat. Biotechnol., 2002, 20: 339—343
- [82] Chang T M S. Artif. Organs, 2004, 28(3): 265—270
- [83] Sun Y L, Ma X J, Sun A M, et al. J. Clin. Invest., 1996, 98(6): 1417—1422
- [84] Gufinkel M R, Harland R C, Opara E C. J. Surg. Res., 1998, 76: 7—10
- [85] Lanza R P, Jackson R, Sullivan A, et al. Transplantation, 1999, 67(8): 1105—1111
- [86] Hamid M, McCluskey J T, Flatt P R, et al. Cell Biol. Int., 2001, 25(6): 553—556
- [87] De Vos P, van Hogmoed C G, van Zanten J, et al. Biomaterials, 2003, 24: 305—312
- [88] Calafiore R, Basta G, Luca G, et al. Biotechnol. Appl. Biochem., 2004, 39: 159—164
- [89] Schneider S, Feilen P J, Brunnenmeier F, et al. Diabetes, 2005, 54: 687—693
- [90] Soon-Shiong P, Heintz R E, Merideth N, et al. Lancet, 1994, 343: 950—951
- [91] Soon-Shiong P. Adv. Drug Delivery Rev., 1999, 35: 259—270
- [92] Chen J P, Chu I M, Shiao M Y, et al. J. Ferment. Bioeng., 1998, 86(2): 185—190
- [93] Winn S R, Tresco P A, Zielinski B, et al. Exp. Neurol., 1991, 113(3): 322—329
- [94] Lindner M D, Emerich D F. Cell Transplant., 1998, 7(2): 165—174
- [95] Date I, Shingo T, Yoshida H, et al. Cell Transplant., 2000, 9(5): 705—709
- [96] 薛毅珑 (Xue YL), 王振福 (Wang Z F), 李新建 (Li XJ) 等. 解放军医学杂志 (Medical Journal of People's Liberation Army), 1999, 24(4): 238—241
- [97] Xue Y L, Wang Z F, Zhong D G, et al. Artif. Cell Blood Substit. Immobil. Biotechnol., 2000, 28(4): 337—345
- [98] Hanahan D, Folkman J. Cell, 1996, 86: 353—364
- [99] O'Reilly M S, Holmgren L, Folkman J, et al. Cell, 1994, 79: 315—328
- [100] O'Reilly M S, Boehm T, Folkman J, et al. Cell, 1997, 88: 277—285
- [101] Joki T, Machluf M, Carroll R S, et al. Nat. Biotechnol., 2001, 19: 35—39
- [102] Cirone P, Shen F, Chang P L. Cancer Gene Ther., 2005, 12(4): 369—380
- [103] Dixit V, Darvasi R, Gitnick G, et al. Hepatology, 1990, 12(6): 1342—1349
- [104] Dixit V, Arthur M, Gitnick G. Biomater. Artif. Cells Immobil. Biotechnol., 1993, 21(2): 119—133
- [105] Umehara Y, Hakamada K, Seino K, et al. Surgery, 2001, 130(3): 513—520
- [106] Prakash S, Chang T M S. Nat. Med., 1996, 2(8): 883—887
- [107] Prakash S, Chang T M S. Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol., 1998, 26(1): 35—51
- [108] Prakash S, Chang T M S. Int. J. Artif. Organs, 2000, 23(7): 429—435
- [109] 于炜婷 (Yu W T), 雄鹰 (Xiong Y), 马小军 (Ma XJ) 等. 高等学校化学学报 (Chemical Journal of Chinese Universities), 2004, 25(7): 1381—1383
- [110] Zhang X L, Wang W, Ma X J, et al. Biotechnol. Prog., 2005, 21: 1289—1296
- [111] Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Cell, 2004, 116: 769—778
- [112] Wang X L, Wang W, Ma X J, et al. Biotechnol. Prog., 2006, 22: 791—800
- [113] Langer R, Tirrell D A. Nature, 2004, 428: 487—492
- [114] 刘袖洞 (Liu X D), 马小军 (Ma XJ), 袁权 (Yuan Q). 化工学报 (Journal of Chemical Industry and Engineering), 2005, 56: 955—961
- [115] Hari P R, Chandy T, Sharma C P. J. Appl. Polym. Sci., 1996, 59: 1795—1801
- [116] Ramadas M, Paul W, Dileep K J, et al. J. Microencapsul., 2000, 17: 405—411
- [117] Vandenberg G W, Drolet C, de la Noüe J, et al. J. Control. Release, 2001, 77: 297—307
- [118] Lin Y H, Liang H F, Sung H W, et al. Biomaterials, 2005, 26: 2105—2113
- [119] Jani P, Halbert G W, Florence A T, et al. J. Pharm. Pharmacol., 1990, 42: 821—826
- [120] Ritger P L, Peppas N A. J. Control. Release, 1987, 5: 23—36
- [121] Umamaheshwari R B, Jain S, Jain N K. Drug Delivery, 2003, 10: 151—160

- [122] Zheng J H, Liu C W, Ma X J, et al. J. Appl. Polym. Sci., 2006, 102(3): 2226—2232
- [123] 袁静 (Yuan J). 中国野生植物资源 (Chinese Wild Plant Resources), 1997, 16: 8—11
- [124] 李胜 (Li S), 许有威 (Xu Y W), 马小军 (Ma X J) 等. 中国医药工业杂志 (Chinese Journal of Pharmaceuticals), 2004, 35: 657—660
- [125] Orive G, Hernández R M, Pedraz J L, et al. Nat. Med., 2003, 9(1): 104—107
- [126] Klöck G, Frank H, Zimmermann U, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1994, 40: 638—643
- [127] Zimmermann H, Zimmermann D, Zimmermann U, et al. J. Mater. Sci. -Mater. Med., 2005, 16: 491—501
- [128] Orive G, Ponce S, Pedraz J L, et al. Biomaterials, 2002, 23: 3825—3831
- [129] De Vos P, de Haan B J, van Schifgaarde R, et al. Diabetologia, 1997, 40: 262—270
- [130] De Vos P, de Haan B J, van Schifgaarde R. Biomaterials, 1997, 18: 273—278
- [131] Kulseng B, Skjåk-Bræk G, Ryan L, et al. Transplantation, 1999, 67: 978—984
- [132] SoorShiong P, Otterlie M, Skjåk-Bræk G, et al. Transplant. Proceedings, 1991, 23(1): 758—759
- [133] Venegas M, Matsuhira B, Edding E. Botanica Marina, 1993, 36: 47—51
- [134] King A, Strand B, Rokstad A M, et al. J. Biomed. Mater. Res., 2003, 64: 533—539
- [135] De Vos P, de Haan B J, van Schifgaarde R. Transplantation, 1996, 62: 893—899
- [136] Zimmermann U, Thümer F, Jork A, et al. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2001, 944: 199—215
- [137] Dornish M, Kaplan D, Skaugrud O. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2001, 944: 388—397

www.cnki.net