·基础研究·

BMP-2缓释型PLGA微囊作为引导骨再生支架的初步研究

王　莹[1,2,3],陈　晨[1,2,3*],陈　刚[2,3,4*]

[1]南京医科大学附属口腔医院牙体牙髓科,江苏　南京　210029;[2]南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室,江苏　南京　210029;[3]江苏省口腔转化医学工程研究中心,江苏　南京　210029;[4]南京医科大学附属口腔医院口腔修复科,江苏　南京　210029

[摘　要]　**目的**:探索双通道同轴微量注射法制备聚乳酸-聚乙醇酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid),PLGA]微囊用于引导骨再生。**方法**:用双通道微量注射泵制备包封骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2,BMP-2)的PLGA微囊。用光学显微镜、荧光显微镜及扫描电子显微镜(scanning electron microscopy,SEM)表征微囊形态及结构;PBS浸泡法表征微囊降解性能;CCK-8法及细胞Calcein/PI染色检测微囊细胞相容性;Transwell实验检测包封BMP-2的微囊作用24 h对MC3T3-E1细胞的趋化作用。**结果**:制备的PLGA微囊为规则且单一囊腔的球形,直径167.58 μm,可获得两种囊壁平均厚度[(23.82±7.10)μm和(35.31±5.55)μm]不同的微囊;微囊2个月内基本降解,CCK-8及细胞染色结果显示微囊细胞相容性好;Transwell实验证明微囊作用24 h即对细胞有趋化作用。**结论**:本研究制备的微囊可通过控制囊壁厚度来控制因子缓释,其表面利于细胞黏附,有望成为一种新型引导骨再生的支架材料。

[关键词]　PLGA微囊;引导骨再生;BMP-2;可控缓释

[中图分类号]　R783.1　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2022)09-1216-07

doi:10.7655/NYDXBNS20220903

Preliminary study of a BMP-2 releasing scaffold comprised of PLGA microspheres for guiding bone regeneration

WANG Ying[1,2,3],CHEN Chen[1,2,3*],CHEN Gang[2,3,4*]

[1]Department of Endodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; [2]Jiangsu Province Key Laboratory of Oral Diseases, Nanjing Medical University, Nanjing 210029; [3]Jiangsu Province Engineering Research Center of Stomatology Translation Medicine, Nanjing 210029; [4]Department of Prosthodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[**Abstract**]　**Objective**: This study invented a coaxial dual-channel micro-injection technique to prepare the poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA) microspheres for the first time, which can be used for guiding bone regeneration. **Methods**: A dual-channel microsyringe was used to prepare PLGA microspheres encapsulated bone morphogenetic protein 2(BMP-2). An optical microscope, a fluorescence microscopy, a scanning electron microscopy(SEM)were used to observe morphology and structure of the microspheres. The changes of morphology and mass loss of the microspheres soaked in PBS solution were recorded for degradation. Cytocompatibility of the microspheres was detected by CCK-8 and cell Calcein/PI staining kit. The effect of PLGA microspheres loading with BMP-2 on the chemotaxis of MC3T3-E1 cell in 24 hours was detected by Transwell cell migration assay. **Results**: The microspheres in this study showed regular mono cavity. The mean diameter of the microspheres was 167.58 μm. Two different mean thickness of microsphere shell [(23.82±7.10)μm and(35.31±5.55)μm] can be acquired. The microspheres degraded gradually in 2 months in PBS solution. The results of CCK-8 and ceu Calcein/PI staining test showed cells remained activity with PLGA microspheres. Transwell cell migration assay indicated PLGA microspheres loading with BMP-2 had chemotactic effect on cells in 24 hours. **Conclusion**: The microspheres in this study with releasing rate of BMP-2 controlled by the thickness of microspheres shell and its surface adhered by cells easily, have a

[基金项目]　国家自然科学基金(81970927);江苏省自然科学基金(BK20191348);江苏高校优势学科建设工程资助项目(2018-87)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:ccchicy@njmu.edu.cn;dchengangd@163.com

potential of guiding bone regeneration.

[**Key words**] PLGA microspheres; guided bone regeneration; BMP-2; controllable-release

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(09): 1216-1222]

严重牙槽骨缺损制约了口腔种植义齿技术的临床应用,利用引导骨再生的填充材料促进骨修复是一种备受期待的解决方法[1-2]。在修复少量骨缺损时,骨填充材料内部的细胞仅依靠周围组织血管的养分渗透即可正常生长[3-4],获得了较好的效果。但是支架材料若仅依靠周围养分的渗透,而缺乏充分的血管化,形成的正常骨质通常不会超过材料表面的1 mm[5],所以单纯用骨替代材料修复大范围骨缺损的效果仍不能满足临床要求。血管内皮细胞作为支架血管化的主要参与者,可以分泌成骨相关因子,如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP),对成骨细胞的增殖、迁移、分化甚至矿化都有直接的调控作用[6]。所以血管化不良的支架材料不但无法为内部细胞输送养分,也不能持续释放相关细胞因子募集周围细胞长入。

为解决这一问题,设计一种能持续释放相关因子的支架,促进其血管化和成骨能力,进而修复大范围的牙槽骨缺损,一直是研究者们努力的方向[7]。本研究前期制备了一种聚乳酸-聚乙醇酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]微囊支架并证明了其特殊结构非常利于早期的血管长入及后期的成骨[8]。前期利用传统乳液挥发法制备的微囊虽然具备载药缓释的潜力,但是所制得的微囊粒径分布过宽,存在大量不适合细胞培养的10 μm级别的过小微囊;内部囊腔大小、数量不规则,甚至存在不含囊腔的实心球体,整体包封率及释放性能可控性差[9]。因此,本研究开发了一种新的双通道微量同轴注射PLGA微囊的制备方法。在该方法中内外径不同的双通道同轴针头的外针连接装载PLGA溶液的注射器,内针连接装载细胞因子或药物的注射器,同轴针头置于收集装置的水相中。再将两支注射器分别固定于双通道微量注射泵的A、B通道。注射泵对双通道的注射速度精确控制,在收集装置内以一定速度旋转流动的水相内,得到一种新型的具备"壳-芯"结构的PLGA微囊,A通道的PLGA溶液形成为微囊的"壳",B通道的内容物形成微囊的"芯"。这种方法使得每一颗成品微囊都具有单个、圆形的规则内腔。与"批量成型"的乳液挥发法相比,新方法的工艺属于"单颗成型",无论如何改变各项工艺参数,都能对每颗微囊造成同样影响,得到均一性极高的产物。

本研究提出的PLGA微囊制备方法理论上通过改变同轴注射针头的内外径和注射泵双通道的注射速度,可精确控制微囊的外径和内径,即囊壁的厚度。在其他条件不变的情况下,不同囊壁厚度的微囊同步降解,囊壁越薄的微囊结构完整性越早破坏,囊腔内包封的内容物越早释放。替换B通道内的药物或因子,可方便地使微囊负载不同的内容物。本研究在微囊成型时同步载入BMP-2,并利用不同囊壁厚度控制BMP-2的缓释,初步验证了其对成骨细胞不同强度的趋化作用。

1 材料和方法

1.1 材料

微量注射泵(SP-2000,宁波安诺公司);磁力搅拌器(MS-H-Pro$^+$,北京大龙公司);同轴针头(A型:内径0.26 mm+外径0.85 mm;B型:内径0.16 mm+外径0.85 mm,合肥思品科技有限责任公司);荧光显微镜(Leica公司,德国);扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM, TESCAN MAIA3公司,捷克);超微量紫外分光光度计(Thermo Fisher公司,美国),恒温摇床(上海旻泉公司),激光粒度仪(Mastersizer 2000, Malvern公司,英国);PLGA(75:25,分子量12 kDa,济南岱罡生物工程有限公司);聚乙烯醇[Poly(vinyl alcohol), PVA,上海洵昱实业有限公司];小鼠颅骨成骨细胞系MC3T3-E1(上海中国科学院细胞库);胎牛血清(ScienCell公司,美国);α-MEM基础培养基(Gibco公司,美国);0.25%胰酶(Gibco公司,美国);CCK-8试剂盒(合肥Biosharp公司);荧光素钠(Sigma-Aldrich公司,美国);0.1%亚甲基蓝染色液(北京Solarbio公司);BMP-2(上海Novoprotein公司),Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天公司);PBS(Gibco公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 PLGA微囊的制备方法

取8 g PVA溶于400 mL去离子水制备成2%的PVA溶液,与磁力搅拌子一起盛于500 mL烧杯中置

于磁力搅拌器上备用，取1 g PLGA溶于10 mL二氯甲烷配置成10%的PLGA溶液置于50 mL注射器，将包封的内容物溶液装入20 mL注射器。将装有PLGA溶液的注射器与装有包封内容物溶液的注射器分别安装到微量注射泵的A、B通道，调整A通道注射速度为580 mL/h，B通道注射速度为80 mL/h，分别连接A型同轴针头的外针和内针入口，将同轴针头置于PVA溶液液面以下，调整磁力搅拌器转速为190 r/min，注射器排气后开始注射，注射结束后将针头从PVA溶液中取出，制备过程如图1。磁力搅拌器控制温度在39 ℃，搅拌8~12 h后，静置烧杯让PLGA微囊沉淀，随后弃大部分上清，加入无菌去离子水转移至50 mL离心管，震荡离心管以清洗微球，用离心机调整转速300 r/min离心3 min弃上清。重复清洗、离心过程3次。更换B型同轴针头，控制微量注射泵及磁力搅拌器的参数不变，重复微囊制备过程。

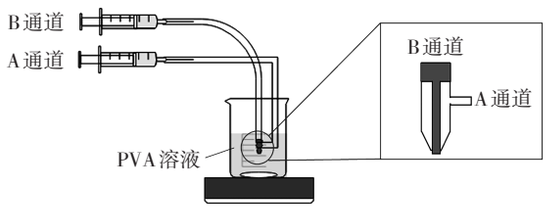


图1　PLGA微囊制备示意图

Figure 1　Schematic diagram of preparation of PLGA microspheres

1.2.2　PLGA微囊的形态及粒度分析

在B通道注射器内置入0.1%亚甲蓝染色液，按1.2.1中制备方法制备微囊并冷冻干燥，用光学显微镜及扫描电子显微镜在10 kV电压下观察PLGA微囊的形态。收集同一批次制备的所有微囊并用粒度分析仪测试微囊粒径，检测3批样本，取均值。

1.2.3　PLGA微囊囊壁厚度分析

按照1.2.1中PLGA微囊的制备方法，在B通道注射器内加入100 μg/mL的荧光素钠溶液，更换使用两种型号同轴针头，分别收集两种微囊并于正置荧光显微镜下观察，用图像处理软件Image J测量微囊囊壁厚度（n=286）并统计分析。

1.2.4　PLGA微囊的降解

冻干后两种囊壁厚度的PLGA微囊分别称取50 mg置于1.5 mL离心管中，每种厚度设5个离心管，每个离心管中加入1 mL PBS（PH=7.4），将离心管置于150 r/min恒温摇床，每隔1、3、7、14、21、28、35、42、49、70 d取出离心管并离心，去上清，冷冻干燥、称重，并用SEM观察PLGA微囊形态变化。

1.2.5　PLGA微囊细胞相容性检测

在B通道注射器内置入无菌生理盐水，按1.2.1制备方法制备空白微囊并冷冻干燥。取50 mg冷冻干燥的空白PLGA微囊于1.5 mL离心管，在75%乙醇中浸泡1 h，去除乙醇，用PBS漂洗3遍，加入完全培养基100 μL，置于37 ℃ 150 r/min恒温摇床5 d，离心取上清，用1 mL完全培养基稀释作为实验组浸提液培养基。将MC3T3-E1细胞按4×10^3个/孔的密度接种于96孔板，于37 ℃、5%CO_2和100%湿度的孵箱中进行培养，实验组用浸提液完全培养基，对照组用正常完全培养基，每组设5个孔，每2天换液，分别在培养第1、3、5、7天后，吸弃原培养液，每孔加入100 μL含10%CCK-8的完全培养基，避光孵育2 h，吸取90 μL液体置于另一96孔板，用酶标仪于450 nm波长下检测吸光度值。

取20 μL冷冻干燥的空白PLGA微囊，在75%乙醇中浸泡1 h，去除乙醇，用PBS漂洗3遍，置于6孔板中作为实验组，不加微囊组为对照组，每组3个孔。将MC3T3-E1细胞按1×10^4个/孔的密度接种于6孔板，于37 ℃、5%CO_2和100%湿度的孵箱中进行培养，每3 d换液，7 d后用Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒按照说明书对细胞进行染色，倒置荧光显微镜观察染色结果。

1.2.6　细胞趋化实验

按照1.2.1中PLGA微囊的制备方法，将B通道注射器替换为500 ng/mL的大鼠BMP-2，更换两种型号的同轴针头，获得并收集载有BMP-2的两种囊壁厚度的PLGA微囊。各取20 μL体积的两种PLGA微囊，在75%乙醇中浸泡1 h，去除乙醇，用PBS漂洗3遍后置于24孔板中Transwell小室的下室，并加入培养基700 μL，上室加200 μL培养基重悬后的MC3T3-E1细胞，接种密度为5×10^5个/室。不加微囊组为空白对照，每组3个孔，24 h后观察细胞迁移结果。

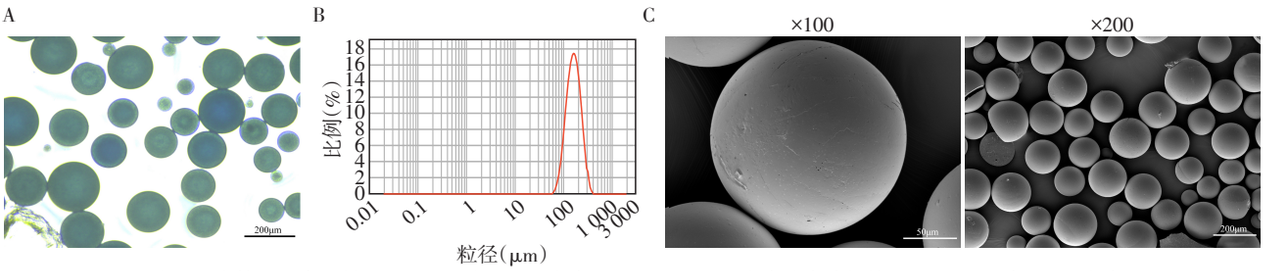
1.3　统计学方法

所有定量数据均采用统计分析软件SPSS 22.0进行独立样本t检验，结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　PLGA微囊的形态及粒度分析

同轴双通道注射法制备的PLGA微囊形态及粒度表征见图2，结果显示：该方法制备的两种厚度囊



A:光学显微镜下观察包封0.1%亚甲蓝的PLGA微囊(×100);B:PLGA微囊粒度分析结果;C:SEM观察PLGA微囊。

图2　双通道微量注射泵制备的PLGA微囊表征

Figure 2　The characterizations of PLGA microspheres prepared by dual-channel micro-syringe pump

壁的PLGA微囊大小均一,表面光滑,粒径均值无明显差异,约为167.58 μm。

2.2　PLGA微囊囊壁厚度分析

荧光显微镜下两组囊壁厚度的PLGA微囊(图3A、B),图像处理软件Image J测量微球囊壁厚度统计结果显示:A型同轴针头制备的PLGA微囊囊壁厚度为(23.82±7.10)μm;B型同轴针头制备的PLGA微囊的囊壁厚度为(35.31±5.55)μm,B型针头制备的PLGA微囊囊壁厚度明显大于A型同轴针头,差异具有统计学意义($P<0.001$,图3C、D)。

2.3　PLGA微囊的降解

两种厚度PLGA微囊均可在60 d左右基本降解,SEM观察其不同时间点的微囊形态变化,35 d后PLGA微囊在SEM镜下基本丧失其原本特征(图4A)。PLGA微囊降解动力学变化(图4B),随着时间的推移,PLGA微囊质量逐渐减少,最初20 d微囊降解速度较慢,20 d之后微囊降解速度加快,降解末期42 d以后降解速度减慢直至降解完成。降解全过程中囊壁厚薄不同未见对微囊的降解速率产生明显影响。

2.4　PLGA微囊细胞相容性检测结果

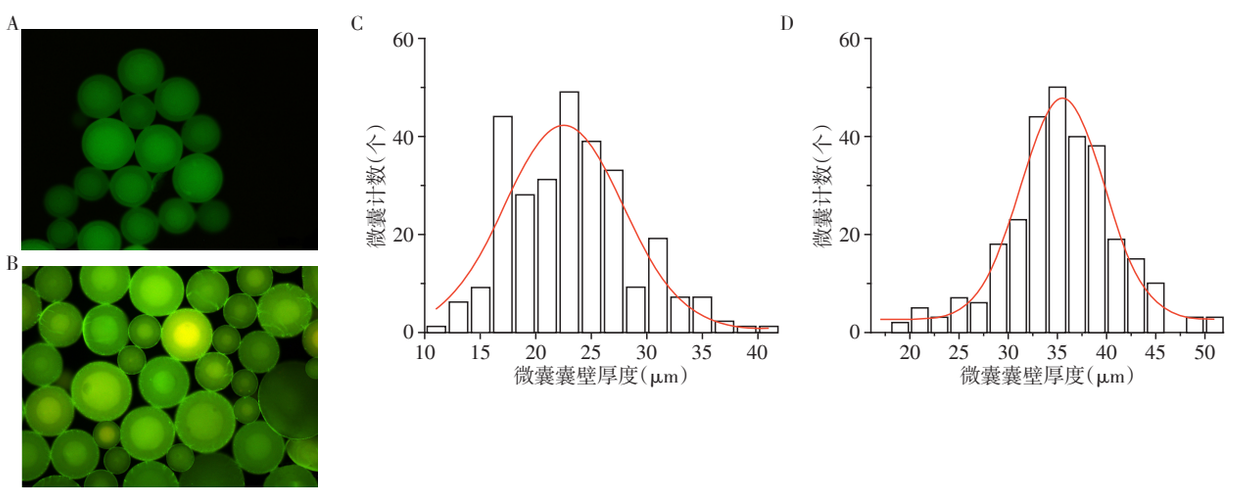
图5可见细胞培养第7天时加入PLGA微囊的实验组与对照组的细胞均能正常增殖,并且细胞可黏附到PLGA微囊表面;CCK-8实验结果显示细胞从1、3、5、7 d都表现出增长趋势,且加入PLGA微囊浸提液培养后细胞活力与对照组基本无差异(1、3、7 d时,$P>0.05$)。

2.5　细胞趋化实验

趋化实验结果显示(图6),与空白组相比,两组载有BMP-2的微囊作用24 h,诱导细胞迁移量明显增多,差异有统计学意义。而载有BMP-2的薄型PLGA微囊24 h内诱导细胞迁移的量也明显多于厚型PLGA微囊,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3　讨　论

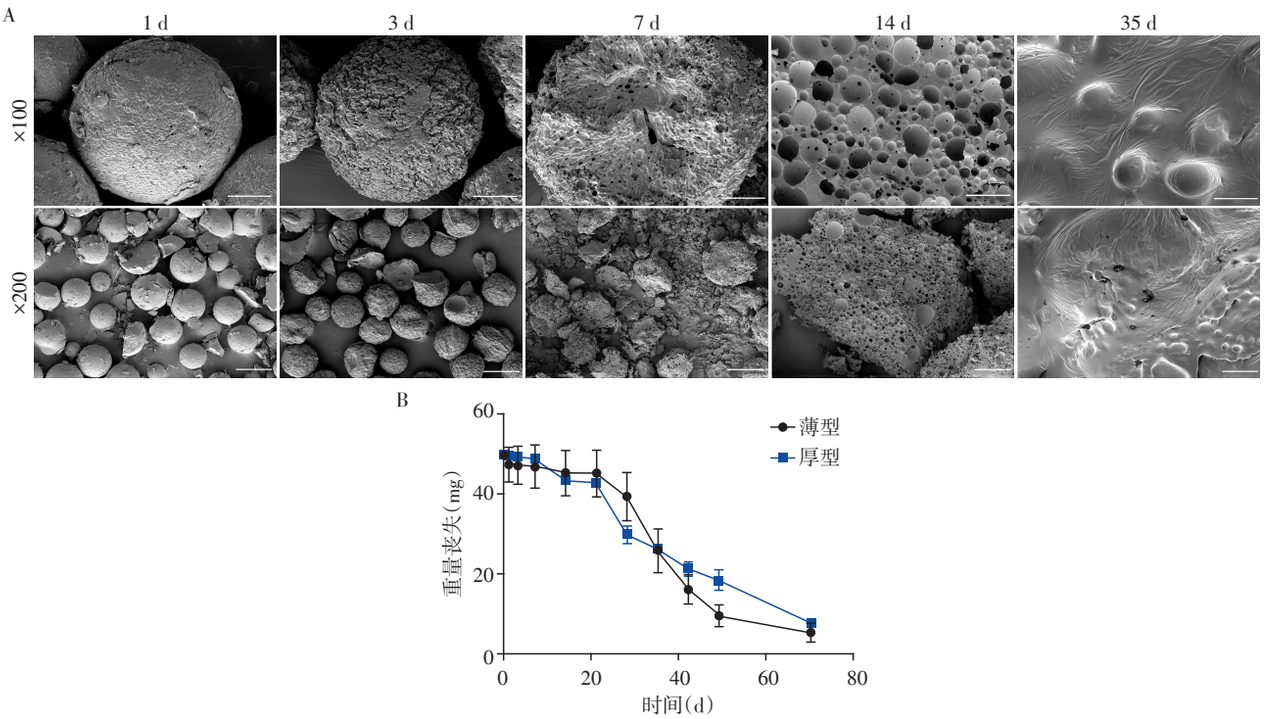
传统乳液挥发法制备的PLGA微囊多用作缓释



A:薄型PLGA微囊(×100);B:厚型PLGA微囊(×100);C:薄型PLGA囊壁厚度统计结果,厚度为(23.82±7.10)μm;D:厚型PLGA囊壁厚度统计结果,厚度为(35.31±5.55)μm。两组微囊囊壁厚度比较,$P<0.001$(n=286)。

图3　不同囊壁厚度的PLGA微囊

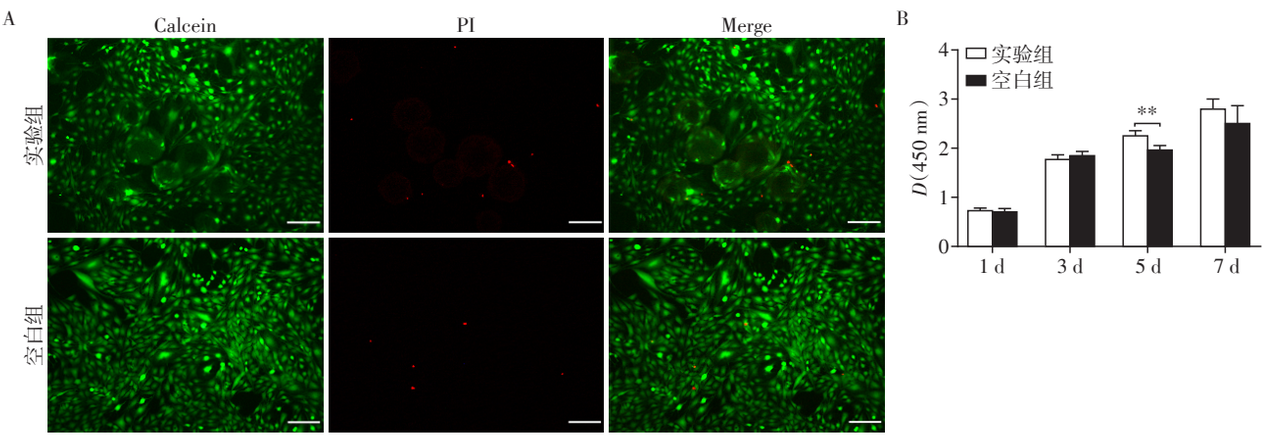
Figure 3　PLGA microspheres with different shell thickness



A：微囊降解1、3、7、14、35 d的SEM图；B：两种不同厚度的PLGA微囊降解过程中的质量丧失（n=5）。

图4　PLGA微囊的降解结果

Figure 4　The degradation results of PLGA microspheres



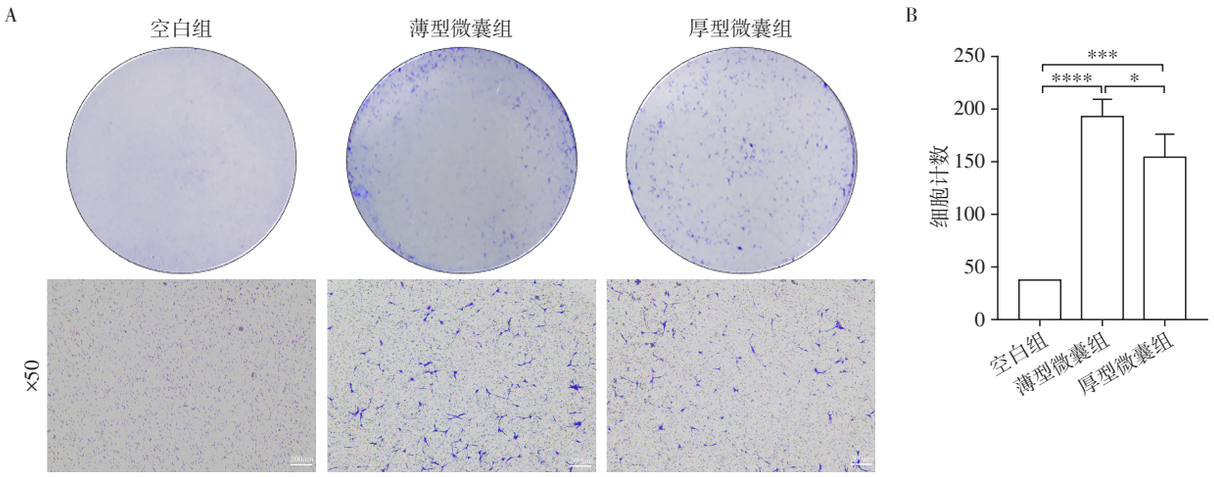
A：PLGA微囊作用下细胞Calcein/PI染色（×100）；B：CCK-8实验检测结果，两组比较，$^{**}P<0.01$（n=5）。

图5　PLGA微囊细胞相容性检测

Figure 5　Cell compatibility test of PLGA microspheres

药物的载体[10]，该工艺较易制备几十微米甚至更小粒径的微囊。然而PLGA微囊直径过小，表面积不足，不利于细胞黏附，其堆叠后作为骨填充物过于密实，微囊间孔隙太小，不利于细胞传导，此外微囊直径<10 μm容易被吞噬细胞吞噬，微囊直径>200 μm容易引起细胞免疫反应[11]，因此直径100~200 μm的微囊粒径较为理想。常用的乳液挥发法制备的微囊越小则越趋向于形成单一规则囊腔，若微囊直径越大则囊腔数量、分布越不规则，从无囊腔到数个甚至众多较小囊腔密集分布，如此则既无法控制药物载量也无法调控缓释[12]。所以传统工艺制备的PLGA微囊难以兼具百微米的较大直径和单一、规则并可控的囊腔[13-14]。

本研究中所制得的PLGA微囊为规则的球形，具有良好的生物相容性，表面适宜贴壁型细胞黏附生长，且微囊粒径分布集中度较高，平均为167.58 μm，



A:Transwell小室观察细胞迁移;B:各组细胞迁移数的定量分析,两组比较,$^{*}P<0.05$,$^{***}P<0.001$,$^{****}P<0.0001$(n=3)。

图6　包封BMP-2的PLGA微囊对成骨细胞的趋化作用

Figure 6　The chemotactic effects of PLGA microspheres encapsulated with BMP-2 on osteoblastcells

堆叠后形成的骨填充支架具备同样级别尺寸的高度连通的孔隙,使其整体呈现优良的细胞传导性。双通道微量同轴注射法在稳定获得大直径微囊的基础上,成功在单个微囊内获得了单一规则的囊腔,更为重要的是微囊囊壁的厚度可通过控制制备参数而改变。

实验结果表明两种微囊均可在60 d左右基本完成降解。不同囊壁厚度的微囊取同等质量用作降解实验,且二者的PLGA原料相同,所以降解速度无明显差别。而囊壁越薄的微囊越早破损,越早释出包封的内容物,因此理论上可以认为控制了囊壁的厚度等同于控制了微囊内因子的释出时间。囊壁越薄包封的细胞因子量越大,释放越早,也越能更早诱导周围组织中细胞向骨缺损区趋化。然而囊壁过薄必然带来微囊强度下降、降解时间过短以及因子突释等缺陷[12]。应用组织工程技术引导骨再生时骨填充物的空间维持能力是决定最终效果的一个重要因素,而空间维持能力又取决于材料的强度和降解速度[15]。填充材料强度过低或降解过快皆不利于骨修复空间的维持。所以本研究中所制备的缓释型PLGA微囊还需要根据最终应用场景的需求精确调整制备参数。

本研究首创的微量注射泵双通道同轴注射法制备的缓释型PLGA微囊相较于传统乳液挥发法微囊,制备方法简单,原材料的利用率大大提高,微囊粒径分布集中,且所获微囊在百微米直径的基础上具备单一规则的囊腔。新制备方法中的PLGA分子量、溶液浓度、双通道各自的注射速度及收集装置中液体的搅拌速度的变化,都会对最终微囊的直径和囊壁厚度产生影响[16]。本研究经过初步探索,在维持约167.58 μm粒径的基础上,稳定获得了两种不同囊壁厚度的微囊。Transwell细胞迁移实验提示载有BMP-2的PLGA微囊对成骨细胞具有诱导作用,且因薄型PLGA微囊早期因子释放量大于厚型微囊,趋化作用更明显。对该新方法各项制备参数的调控影响仍需进一步研究,也需要体内实验的进一步验证,本研究结果为开发可控性骨组织工程技术材料提供了一种新思路。

[参考文献]

[1] HO-SHUI-LING A, BOLANDER J, RUSTOM L E, et al. Bone regeneration strategies: engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives[J]. Biomaterials, 2018, 180: 143-162

[2] 杨祖坤,贾　璐,韩利萍,等. 3D打印PLGA支架修复大鼠上颚骨缺损的实验研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2020,40(8):1125-1129

[3] PERIĆ KAČAREVIĆ Ž, RIDER P, ALKILDANI S, et al. An introduction to bone tissue engineering[J]. Int J Artif Organs, 2020, 43(2): 69-86

[4] LIAN M F, SUN B B, HAN Y, et al. A low-temperature-printed hierarchical porous sponge-like scaffold that promotes cell-material interaction and modulates paracrine activity of MSCs for vascularized bone regeneration[J]. Biomaterials, 2021, 274: 120841

[5] SIEMINSKI A L, GOOCH K J. Biomaterial-microvasculature interactions[J]. Biomaterials, 2000, 21(22): 2232-2241

[6] LEE E J, JAIN M, ALIMPERTI S. Bone microvasculature: stimulus for tissue function and regeneration[J]. Tissue

Eng Part B Rev,2021,27(4):313-329
[7] YIN S,ZHANG W J,ZHANG Z Y,et al. Recent advances in scaffold design and material for vascularized tissue-engineered bone regeneration[J]. Adv Healthc Mater,2019,8(10):e1801433
[8] LIU J,CHEN G,XU H,et al. Pre-vascularization in fibrin Gel/PLGA microsphere scaffolds designed for bone regeneration[J]. NPG ASIA MATERIALS,2018,10:827-839
[9] VLACHOPOULOS A,KARLIOTI G,BALLA E,et al. Poly(lactic acid)-based microparticles for drug delivery applications:an overview of recent advances[J]. Pharmaceutics,2022,14(2):359
[10] SU Y,ZHANG B,SUN R,et al. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery:recent advances in research and application[J]. Drug Deliv,2021,28(1):1397-1418
[11] HAN F Y,THURECHT K J,WHITTAKER A K,et al. Bioerodable PLGA-based microparticles for producing sustained-release drug formulations and strategies for improving drug loading[J]. Front Pharmacol,2016,7:185
[12] YOO J,WON Y Y. Phenomenology of the initial burst release of drugs from PLGA microparticles[J]. ACS Biomater Sci Eng,2020,6(11):6053-6062
[13] DING D W,ZHU Q D. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl,2018,92:1041-1060
[14] BUTREDDY A,GADDAM R P,KOMMINENI N,et al. PLGA/PLA-based long-acting injectable depot microspheres in clinical use:production and characterization overview for protein/peptide delivery[J]. Int J Mol Sci,2021,22(16):8884
[15] JIN S E,XIA X,HUANG J H,et al. Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration[J]. Acta Biomater,2021,127:56-79
[16] PARK K,OTTE A,SHARIFI F,et al. Formulation composition,manufacturing process,and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles[J]. J Control Release,2021,329:1150-1161

[收稿日期] 2021-12-15
(本文编辑:陈汐敏)

欢迎关注我刊微博、微信公众号!