

· 工艺与制剂 ·

## 不同交联方法制备的鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料对成骨细胞增殖的影响

朱文赫, 李亚巍, 沈楠, 张巍, 李妍, 吕士杰\*

(吉林医药学院, 吉林 吉林 132013)

**[摘要]** **目的:**检测不同交联方法制备的鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料的结构并考察其对成骨细胞增殖的影响。**方法:**将胶原蛋白溶液和壳聚糖溶液(9:1)充分混匀,分别采用真空干热交联法和0.25%戊二醛交联法制备含鹿茸多肽( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的复合材料。通过扫描电镜观察复合材料的空间构象,MTT试验检测不同交联法制备的复合材料对成骨细胞hFOB1.19增殖及碱性磷酸酶(ALP)活性的影响。**结果:**干热交联复合材料的结构仍处于不均匀分布状态,但孔径明显减小;而戊二醛交联复合材料呈规则的层状皱褶结构,支架内部孔径变大,且主要以片状结构为主。交联的复合材料组能促进成骨细胞增殖,显著优于对照组和复合材料组,戊二醛交联组对成骨细胞的增殖促进作用优于干热交联组。交联后的鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料能有效地提高成骨细胞ALP活性。**结论:**戊二醛交联法能有效提高鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料的性能,促进成骨细胞增殖和ALP酶活性升高。

**[关键词]** 鹿茸多肽;成骨细胞;骨折愈合;胶原蛋白;壳聚糖;碱性磷酸酶活性;戊二醛交联法;真空干热交联法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0005-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140005

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1139.001.html>

**[网络出版时间]** 2014-05-28 11:39

## Effects of Polypeptides from Cervi Cornu Pantotrichum-collagen/chitosan Composite Materials Prepared by Different Crosslinking Methods on Osteoblasts Proliferation

ZHU Wen-he, LI Ya-wei, SHEN Nan, ZHANG Wei, LI Yan, LV Shi-jie\*

(Jilin Medical College, Jilin 132013, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore structure of polypeptides from Cervi Cornu Pantotrichum-collagen/chitosan composite materials prepared by different crosslinking methods and investigate its effects on osteoblasts proliferation. **Method:** Mixed collagen and chitosan solution at the ratio of 9:1, vacuum thermo-crosslinking and 0.25% glutaraldehyde cross-linking method were used to prepare composite scaffolds which contained with  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of polypeptides from Cervi Cornu Pantotrichum. Structure of composite scaffolds was observed by scanning electron microscopy, MTT assay were used to test effects of different composite materials on osteoblast hFOB1.19 proliferation and activity of alkaline phosphatase (ALP). **Result:** Structure of thermo-crosslinking composite materials had uneven distribution but pore size significantly reduced; while glutaraldehyde cross-linking group had regular structure with layered folds, internal pore size became larger and it was mainly dominated by sheet

**[收稿日期]** 20131024(012)

**[基金项目]** 吉林省科技发展计划项目(20120941)

**[第一作者]** 朱文赫,博士,讲师,从事生物技术制药研究,Tel:0432-64560460,E-mail:huolizwh@163.com

**[通讯作者]** \*吕士杰,硕士,教授,从事辐射损伤防治研究,Tel:0432-64560991,E-mail:lvshijie-qr@163.com

structure. Cross-linked composite groups could facilitate osteoblast proliferation and it was significantly better than the control group and the composite materials group, anxo-action for osteoblast proliferation of glutaraldehyde crosslinking group was better than thermo-crosslinking group. Crosslinking composite materials could effectively improve ALP activity of osteoblast. **Conclusion:** Glutaraldehyde cross-linking method could effectively improve properties of polypeptides from Cervi Cornu Pantotrichum-collagen/chitosan composite materials, such as osteoblast proliferation promoted and ALP activity increased.

[**Key words**] polypeptides from Cervi Cornu Pantotrichum; osteoblast; fracture healing; collagen; chitosan; alkaline phosphatase activity; glutaraldehyde crosslinking; vacuum thermo-crosslinking

骨折愈合作为创伤愈合的一种特殊类型,是一个极复杂且高度有序的生物学修复过程,促进骨折损伤修复已成为当今创伤骨科面临的重要课题。利用体外或体内构建有生命的组织,将其植入机体可实现组织再生、愈合并参与机体的新陈代谢和各种生理功能,这是目前骨折愈合治疗的研究方向之一<sup>[1-3]</sup>。多肽、蛋白质在生命活动中起着相当重要的作用,是鹿茸的主要药效成分之一<sup>[4-5]</sup>。鹿茸多肽具有促进骨髓间质细胞分化及软骨细胞、表皮细胞、成纤维细胞增殖等作用,可明显加速骨组织、周围神经组织再生及创面愈合并可促进组织修复,但该成分存在不易通过生物屏障、在伤口及创面易被水解酶破坏等问题。故本实验采用不同交联方法制备鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料,考察该复合材料稳定性及其对成骨细胞增殖作用的影响,为鹿茸多肽的生物利用度提高和临床应用推广提供参考。

## 1 材料

Quanta200 型扫描电镜(荷兰 FHI 公司),550 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),UV-4802 型紫外-可见分光光度计(上海 UNICO 仪器有限公司),TGL-16G 型台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。鹿茸购自中国农业科学院左家特产研究所,经吉林医药学院吕士杰教授鉴定为鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon Temminck* 的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角;人成骨细胞株 hFOB1.19(美国培养物保存中心),I 型胶原蛋白、壳聚糖、二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司),DMEM/F<sub>12</sub>(高糖)培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 HyClone 公司),噻唑蓝(MTT,美国 Genview 公司),水为蒸馏水,试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

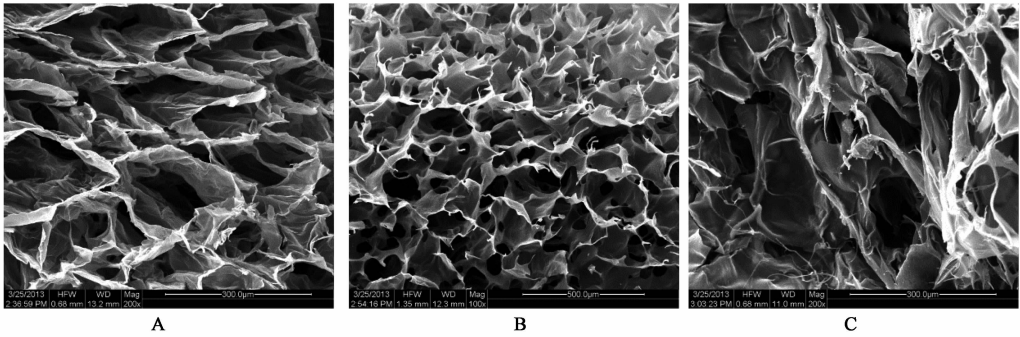
**2.1 鹿茸多肽的提取** 取梅花鹿鹿茸 200 g,剁成小块(约 1 cm<sup>3</sup>),用预冷的水(4 ℃)冲洗至无血色,粉碎,用胶体磨匀浆,不断添加预冷的匀浆液(pH 3.5 乙酸 1 L),离心(10 000 r·min<sup>-1</sup>,20 min,下

同),取上清液,加入 95% 乙醇使醇浓度达 65%,于 4 ℃ 放置并搅拌过夜,离心,取上清液,于 55 ℃ 减压回收乙醇,冻干,得粗提物。将粗提物加水溶解后灌入相对分子质量 1 kDa 的透析袋中,置水中透析除盐,冻干,得鹿茸多肽,于 -20 ℃ 冰箱贮存备用。

## 2.2 鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料的制备

取胶原蛋白和壳聚糖适量,分别加 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸配制 0.5% 的溶液,按胶原蛋白溶液-壳聚糖溶液(9:1)充分混匀,-20 ℃ 冷冻 12 h,置于冷冻干燥机中真空冷冻干燥 24 h,密封于无菌塑料袋中,制成厚约 1 mm 的多孔支架。将胶原蛋白-壳聚糖支架材料分成对照组、真空干热交联组和戊二醛交联组。复合材料冻干后不进行交联为对照组;将胶原蛋白-壳聚糖多孔支架置于 105 ℃ 真空烘箱(<20 Pa)中干热交联 24 h 为真空干热交联组;胶原蛋白-壳聚糖多孔支架真空干热交联后加 0.25% 戊二醛溶液于 4 ℃ 交联 24 h,加三蒸水充分漂洗,冻干得戊二醛交联组。将 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 鹿茸多肽加至 3 种复合材料上,真空冷冻干燥,得鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料。将试样切成小块并进行双重固定,清洗,加叔丁醇逐级脱水,真空冷冻干燥脱水和喷金导电处理后,做水平和垂直切片,运用扫描电镜观察支架材料表面及内部的微观结构,考察不同交联方法对材料性能的影响,见图 1。结果显示冻干后的各组鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料均呈白色海绵状,表面粗糙多孔,材料内部呈海绵状多孔隙结构;对照组为典型的多孔疏松结构,超微结构较为杂乱,孔径大小分布极不均匀;经干热交联后,材料结构仍处于不均匀分布状态,但材料孔径明显减小;与对照组相比,交联后复合材料表面光滑,孔径小且分布均匀,是生物材料理想的微观结构形式,而戊二醛交联组呈规则的层状皱褶结构,支架内部孔径变大,且主要以片状结构为主,这正是该材料具有最大拉伸强度的主要原因。

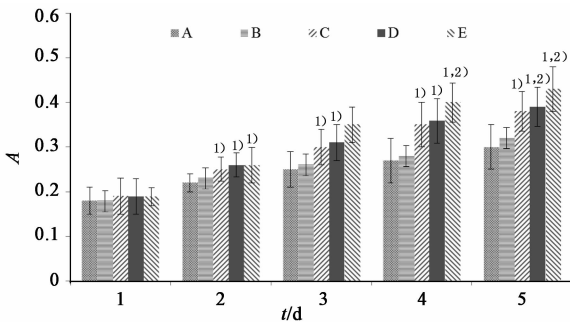
## 2.3 鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料对成骨



A. 对照组;B. 干热交联组;C. 戊二醛交联组

图1 鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料交联前后 SEM (×200 倍)

细胞增殖的影响 将人成骨细胞 hFOB 1.19 按常规方法培养传代,培养于 DMEM/F<sub>12</sub> 培养基,补充 10% 热灭活胎牛血清、2 μmol·L<sup>-1</sup> 谷氨酰胺、100 U·L<sup>-1</sup> 青霉素和 100 mg·L<sup>-1</sup> 链霉素,于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中饱和湿度下培养。取对数生长期的 hFOB1.19 细胞,计数细胞浓度 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL,于 96 孔板中每孔加入 200 μL,试验分为培养液对照组、复合材料组、含鹿茸多肽 (1.0 mg·L<sup>-1</sup>) 未交联组、含鹿茸多肽 (1.0 mg·L<sup>-1</sup>) 真空干热交联组和含鹿茸多肽 (1.0 mg·L<sup>-1</sup>) 戊二醛交联组,置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 1,2,3,4,5 d,每孔加入 MTT (5 g·L<sup>-1</sup>) 20 μL,继续培养 4 h,弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡 10 min,利用酶标仪于 570 nm 处测定吸光度,采用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据处理,见图 2。结果表明培养 1 d 内,各组 hFOB 1.19 细胞生长无明显差异;培养第 2 天,含鹿茸多肽的复合材料组能明显促进成骨细胞增殖,优于培养液对照组和复合材料组;培养第 3,4,5 天,交联复合材料组对细胞的增殖逐渐增强,显著优于对照组和复合材料



注:与培养液对照组相比<sup>1)</sup> P < 0.05,

与含鹿茸多肽未交联组相比<sup>2)</sup> P < 0.05 (图 3 同)。

A. 培养液对照组;B. 复合材料组;

C. 含鹿茸多肽未交联组;D. 含鹿茸多肽真空干热交联组;

E. 含鹿茸多肽戊二醛交联组

图2 鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料

对成骨细胞增殖的影响

组,戊二醛交联组对成骨细胞的增殖促进作用显著优于含鹿茸多肽未交联组。

2.4 碱性磷酸酶 (ALP) 活性测定 取对数生长期 hFOB 1.19 细胞,计数细胞,以 1 × 10<sup>4</sup> 个/孔加入 24 孔板,培养 24 h,分组同 2.3 项,每组均设 5 复孔,每 2 d 换液 1 次,培养 5 d 后收集细胞,超声破碎细胞,取上清液用全自动生化分析仪测定 ALP 活性,采用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据处理,见图 3。结果表明含鹿茸多肽的各复合材料组较培养液对照组均能使 hFOB 1.19 细胞 ALP 活性明显增高,且交联组的 ALP 活性均高于未交联组,说明交联后的胶原蛋白/壳聚糖-鹿茸多肽复合材料更能有效的提供成骨细胞 ALP 活性。

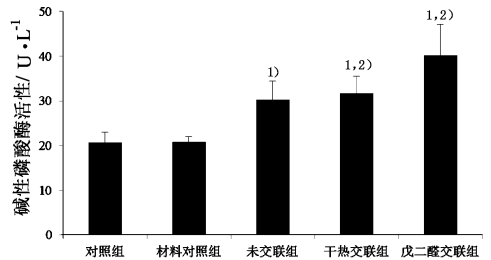


图3 鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料对 hFOB1.19 细胞碱性磷酸酶活性的影响

### 3 讨论

将鹿茸多肽加载至胶原蛋白/壳聚糖缓释系统中,使复合材料具备了载药和控释功能,克服了多肽类药物不易通过生物屏障等缺点,而且可持续、稳定、高效地控制鹿茸多肽的释放速度,延长半衰期,实现药物的靶向释放,大幅度提高药物的生物利用度,达到修复骨缺损与药物治疗的双重效果。

胶原蛋白具有组织相容性好、易生物降解、易被组织吸收、透水汽性能良好等优点<sup>[6]</sup>。胶原干燥后质地脆,难以成膜,而且胶原膜湿态时稳定性差。为解决上述问题,本文按体积比 9:1 将胶原蛋白溶液和壳聚糖溶液充分混匀,并通过干热及戊二醛对其

# 降脂灵片微波真空干燥工艺优选

刘世琪,董自亮\*,肖礼娥

(太极集团重庆涪陵制药厂有限公司,重庆 408000)

**[摘要]** 目的:优选降脂灵片的微波真空干燥工艺。方法:以浸膏相对密度、微波功率、干燥时间为自变量,大黄素、熊果酸、齐墩果酸提取量的总评“归一值”为因变量,通过 Box-Behnken 设计-响应面法优化降脂灵片的微波干燥工艺。采用 HPLC 测定大黄素、熊果酸和齐墩果酸含量,流动相依次为甲醇-0.1% 磷酸(80:20),乙腈-甲醇-0.5% 乙酸铵(67:12:21),检测波长分别为 254,210 nm。结果:最佳微波真空干燥工艺为将浸膏浓缩至相对密度 1.27 g·mL<sup>-1</sup>,微波功率 511 W,干燥时间 27 min;大黄素、熊果酸、齐墩果酸提取量分别为 0.321,0.548,0.118 mg·g<sup>-1</sup>,与三者的预测值 0.324,0.545,0.121 mg·g<sup>-1</sup> 非常接近。结论:优选的干燥工艺稳定可靠,与热风干燥工艺相比指标成分含量无显著性差异,值得在中药物料的干燥工序中推广应用。

**[关键词]** 降脂灵片;微波干燥;Box-Behnken 试验;大黄素;熊果酸;齐墩果酸

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0008-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014140008

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1334.015.html>

**[网络出版时间]** 2014-05-28 13:34

## Optimization of Microwave Vacuum Drying Process of Jiangzhiling Tablets

LIU Shi-qi, DONG Zi-liang\*, XIAO Li-e

(Chongqing Fuling Pharmaceutical Factory Co. Ltd, Taiji Group, Chongqing 408000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize microwave vacuum drying process of Jiangzhiling tablets. **Method:**

**[收稿日期]** 20131103(004)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09201-201-18)

**[第一作者]** 刘世琪,副主任药师,从事中药制剂新剂型、新技术及制剂质量评价研究,Tel:13896777396,E-mail:liushiqi2004@163.com

**[通讯作者]** \*董自亮,博士,工程师,从事中药制剂新剂型、新技术及制剂质量评价研究,Tel:18225129378,E-mail:dzldcutem@163.com

进行交联,以解决加工性能差、缺乏柔韧性、抗拉强度低的问题。

MTT 结果显示 3 种方法制备的鹿茸多肽-胶原蛋白/壳聚糖复合材料均能持续地促进成骨细胞的增殖,说明该复合材料能起到缓释释放鹿茸多肽的效果,且采用戊二醛交联法制备的复合材料对成骨细胞的增殖促进作用优于其他 2 种方法。

### [参考文献]

- [1] Landis B, Weis J A, Miga M I, et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(8):1887.
- [2] Garrison K R, Shemilt I, Donell S, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in

adults[J]. *J Hand Surg Eur*, 2010, 38(4):447.

- [3] Kidd L J, Stephens A S, Kuliwaba J S, et al. Temporal pattern of gene expression and histology of stress fracture healing[J]. *Bone*, 2010, 46(2):369.

- [4] Zhang Z Y, Liu X F, Duan L X, et al. The effects of velvet antler polypeptides on the phenotype and related biological indicators of osteoarthritic rabbit chondrocytes [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2011, 58(3):297.

- [5] 徐明,岳喜庆. 酶解法制备鹿茸多肽的研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(5):205.

- [6] 王碧,廖立敏,李建凤,等. 胶原蛋白/海藻酸/羧甲基纤维素共混膜的结构与性能[J]. *化学世界*, 2013, 54(3):155.

[责任编辑 刘德文]