

研究简报

交联透明质酸血管栓塞剂的制备及表征

朱剑锋*, 徐小慧, 施佳丽

(杭州协合医疗用品有限公司, 杭州 310000)

摘要:经化学改性的透明质酸不仅保留了天然透明质酸原本良好的生物相容性和可降解性,还赋予了独特的理化性质,如抗降解性、粘弹性等。利用这一特性,可将改性后的透明质酸用于血管栓塞治疗肿瘤疾病。本研究采用乳化交联法制备交联透明质酸钠微球栓塞剂,考察了透明质酸钠起始反应浓度、乳化剪切速度及油水相比比例各因素对微球成球性、粒径分布的影响,采用光学显微镜观察微球形态特征,并对微球的理化性质进行了分析。研究结果表明,制备的交联透明质酸钠微球表面光滑、球形态完整,具有良好的抗压缩形变能力,符合微球血管栓塞剂的基本要求,为体内实验的研究提供理论基础。

关键词:透明质酸; 栓塞剂; 微球

引言

血管栓塞治疗肿瘤疾病是介入治疗的常见手法,其关键技术在于选择合适的栓塞材料阻断肿瘤组织的供血。微球型栓塞剂是目前该领域研究的主要方向,据文献报道,微球型栓塞剂比普通不规则颗粒型栓塞剂能更有效地栓塞远端血管^[1~3]。目前国内已应用于临床的微球型栓塞剂有聚乙烯醇栓塞微球和海藻酸钠栓塞微球。

透明质酸(Hyaluronic acid,简称 HA)是一种生物大分子粘多糖,广泛存在于细胞外间质,可从人和动物的软结缔组织中以及一些微生物发酵中提取到,透明质酸具有良好的生物相容性和高粘弹性,无任何副作用,是在当今医学界深受欢迎的生物医学材料^[4]。普通的透明质酸在人体内的存留时间是2~7天左右,经化学改性后的透明质酸在抗降解性能提高的同时,也保留了天然透明质酸原本特有的性质。

目前大部分对透明质酸微球的研究主要集中在载药微球制剂中,血管栓塞用的微球区别于载药微球,最主要体现在粒径方面,栓塞用的微球粒径范围通常在200~2000 μm 之间。本实验以透明质酸钠为原料,经交联剂化学改性后制备具有中短期栓塞效果的交联透明质酸钠微球,研究各因素对微球成球性及粒径范围的影响,并对微球的理化性质进行分析,为进一步的体内实验提供理论基础。

1 实验

1.1 实验材料和仪器

透明质酸钠:60~160MDa,华熙福瑞达生物医药有限公司;1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE):优质纯,Sigma;Span80:分析纯,广东光华科技股份有限公司;液体石蜡:分析纯,江西省吉水县康明民本草药用油提炼厂;氢氧化钠:分析纯,广州光华科技股份有限公司;磷酸氢二钠:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;磷酸二氢钠:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;氯化钠:分析纯,江苏省勤奋药业有

10.14028/j.cnki.1003-3726.2018.09.007

收稿:2017-06-19;修回:2018-07-09;

基金项目:科技部国际合作项目(2015DF51010);

作者简介:朱剑锋(1988-),男,工程师,本科,从事可吸收生物材料方面的研究;

* 通讯联系人,E-mail:zhujf@hxxhe.com.

限公司;乙酸乙酯:分析纯,杭州双林化工试剂厂;无水乙醇:分析纯,广州光华科技股份有限公司。

搅拌机:HW30 型,上海恒川机械设备有限公司;乳化剪切机:T25 型,IKA 公司;显微镜图像分析仪:微纳 99D 颗粒图像仪,北京大恒图像视觉有限公司;傅里叶变换红外光谱仪:NicoletTM iSTM 5 型,Thermo Fisher Scientific 公司;真空干燥箱:DZF-6020 型,北京雅士林试验设备有限公司;各规格药用筛:80 目、30 目、24 目、18 目、14 目,浙江省上虞市道墟张兴纱筛厂。

1.2 交联透明质酸钠微球的制备

1.2.1 因素的考察 乳化法是目前制备透明质酸微球的主要方法,经过几次预实验,确定了以下几个主要因素对制备符合规定粒径范围的微球影响较大。

1.2.1.1 透明质酸钠起始反应浓度 聚合物的起始反应浓度在制备交联透明质酸过程中起重要作用,在乳化反应体系中,水相物质的浓度直接影响分散相的粘度,若聚合物起始反应浓度太低,凝胶含水量高,内部网状结构松散,形成 W/O 型乳液经脱水后得到的微球将是不规则形态的。本实验中,其它因素固定不变,分别研究了 3% g/mL、8% g/mL、15% g/mL 的透明质酸起始浓度。结果显示,当起始浓度为 3% g/mL 和 8% g/mL 时,形成乳白色均一的乳液,在去除油相及有机相的过程当中,微球逐渐团聚,颗粒之间相互粘连,且单个颗粒粒径在 $1\mu\text{m}$ 以内,不符合本实验预期要求;当起始浓度为 15% g/mL 时,获得的微球分散性较好,但收率较低,去除有机相后仍有少部分微球粘连,提高起始浓度可减少微球发生粘连。因此,在 W/O 型乳液中,高起始反应浓度的透明质酸凝胶有助与形成粒径较大的透明质酸微球。本实验选择一个 $>15\%$ g/mL 的相对较高的起始反应浓度。

1.2.1.2 乳化剪切速度 乳化机的剪切搅拌速度是一个物理作用,搅拌速度太快,容易破坏已形成的 W/O 型乳液的稳定性,使微球间相互粘连;搅拌速度太慢,则不足以使在油相中起始浓度较高、粘稠度较大的透明质酸凝胶水相物质分散开来,因此必须确定一个合适的搅拌速度范围。本实验中,其它因素固定不变,分别研究了 500rpm、1000rpm、2000rpm 的乳化剪切速度对微球的形态和粒径分布的影响。结果显示,当乳化剪切速度为 500rpm 时,油相中的透明质酸钠凝胶无法分散开;当乳化剪切速度为 1000rpm 时,油相中的透明质酸钠凝胶大部分被分散开,微球粒径分布较大;当乳化剪切速度为 2000rpm 时,获得的微球粒径几乎都在 $100\mu\text{m}$ 以下。因此,本实验选择乳化剪切速度的范围在 1000~1500rpm 为合适些。

1.2.1.3 油水相比比例 乳化体系中的油水相比比例影响乳液的稳定性及分散性。本实验中,其它因素保持不变,分别研究了油水重量比例为 2:1、1:1、1:2 对乳液的稳定性及微球分散效果的影响。结果表明,当油水比例为 1:2 时,乳液稳定性较差,乳化剪切结束后油水相即分层,导致下层的水相微球相互粘连;在油水比为 2:1 和 1:1 时,乳液表现出相对较好的稳定性,两相分层缓慢,微球间相互粘连少,这对后续交联反应非常有利。故本实验选择的油水相比比例为 2:1~1:1 之间。

1.2.2 交联透明质酸钠微球的制备 称取透明质酸钠与氢氧化钠溶液配制成质量百分浓度为 20% g/mL 的透明质酸钠碱液凝胶,将其加入至含 Span80 的液体石蜡中(油水重量比 2:1),经乳化剪切(剪切速度 1200rpm)后加入交联剂 1,4-丁二醇二缩水甘油醚进行交联反应;反应结束后依次用乙酸乙酯、无水乙醇、磷酸盐缓冲液反复洗涤微球,筛分后分为 $250\sim 500\mu\text{m}$ 、 $500\sim 700\mu\text{m}$ 、 $700\sim 880\mu\text{m}$ 及 $880\sim 1000\mu\text{m}$ 四个规格。装入注射器后经 $F_0=15$ 湿热灭菌。

1.3 交联透明质酸钠微球的红外鉴定

用低温冷冻法将适量的交联透明质酸钠微球干燥,用溴化钾研磨、压片后进行红外扫描。

1.4 交联透明质酸钠微球理化性质的考察

1.4.1 微球表面形态观察 取部分微球利用光学显微镜对交联透明质酸钠微球形态进行观察。

1.4.2 溶胀度 溶胀度与交联透明质酸钠微球的交联度存在一定的关系,溶胀度越低,交联度越高,溶胀度越高,则交联度越低。根据 1.2.2 投料比配方,其它参数保持不变,分别制备透明质酸钠与交联剂重量体积比为 6:1、4:1、3:1 三组交联透明质酸钠微球。

每组各取微球约 5.00g,用吸水纸去除游离的水分。精密称定微球(记为 m_1),直接加在事先已干燥

至恒重的滤纸(记为 m_2)上,然后加 3 倍无水乙醇放置在烧杯上浸润脱水 1h,用玻璃棒适当搅拌,最后将滤纸取出过滤得白色沉淀。将该滤纸放入干燥箱中,105℃干燥至恒重(记为 m_3)。根据以下公式计算溶胀度:

$$\text{溶胀度} = (m_1 - m_3 + m_2) / (m_3 - m_2)$$

1.4.3 压缩变形率 以压缩变形率来表征微球的弹性性能。取 1.4.2 制备的不同交联度的微球分三组,分别测量其压缩变形率,各组微球的粒径分别为 500~700 μm 、700~880 μm 及 880~1000 μm 三个规格。微球放置在游标卡纸外测量爪两端,测量初始直径 d_1 ,随后使量抓缓慢挤压微球至破裂为止,此时记录破裂瞬间的直径 d_2 。根据以下公式计算,考察不同交联度及不同粒径的微球在弹性性能上的区别。

$$\text{压缩变形率} = (d_1 - d_2) \times 100\% / d_1$$

1.5 性能测定

取 500~700 μm 范围内的微球与生理盐水混合后装入至注射器中,注射器外接 4F 微导管(管长 15cm),缓慢推注并观察推出后的微球是否有破损。

2 结果与讨论

2.1 结构表征

如图 1 所示,交联透明质酸钠微球在 3275 cm^{-1} ~3500 cm^{-1} (O—H 伸缩振动)、1615 $\text{cm}^{-1} \pm 6\text{cm}^{-1}$ (CH₃CO—NH—的 C=O 伸缩振动)、1410 $\text{cm}^{-1} \pm 6\text{cm}^{-1}$ (—COOH 的 C—O 伸缩振动)、1377 $\text{cm}^{-1} \pm 6\text{cm}^{-1}$ (—COO—的 C=O 对称伸缩振动)、1150 $\text{cm}^{-1} \pm 6\text{cm}^{-1}$ (糖环的 C—O—C 和 C—O—H 的 C—O 伸缩振动)、1077 $\text{cm}^{-1} \pm 6\text{cm}^{-1}$ (糖环的 C—O—C 和 C—O—H 的 C—O 伸缩振动)、1045 $\text{cm}^{-1} \pm 6\text{cm}^{-1}$ (C—H 变形振动)处有特征峰,说明产物为交联透明质酸钠。

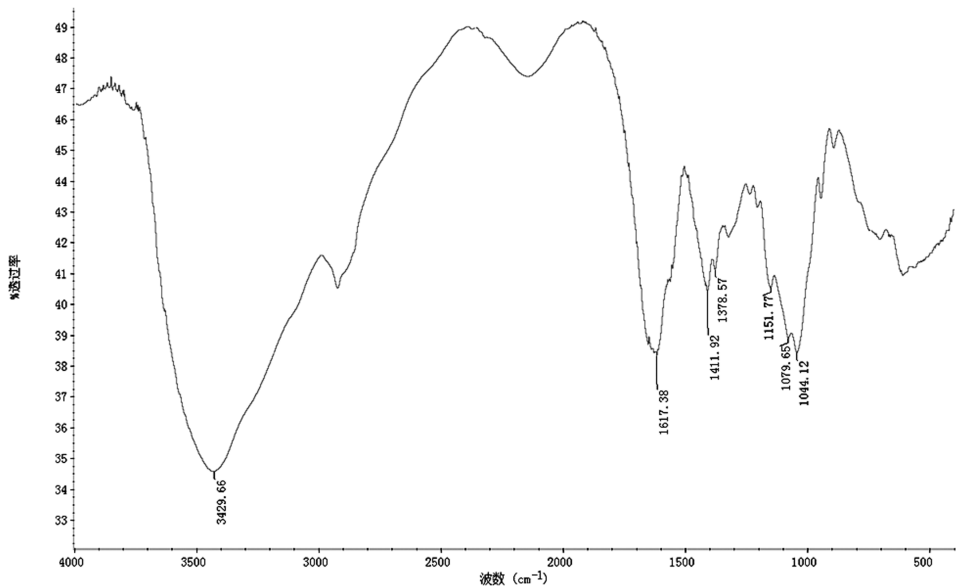


图 1 微球在 3429.66 cm^{-1} , 1617.38 cm^{-1} , 1411.92 cm^{-1} , 1378.57 cm^{-1} , 1151.77 cm^{-1} , 1079.65 cm^{-1} , and 1044.12 cm^{-1} 处有特征峰。

Figure 1 The microspheres were characterized at 3429.66 cm^{-1} , 1617.38 cm^{-1} , 1411.92 cm^{-1} , 1378.57 cm^{-1} , 1151.77 cm^{-1} , 1079.65 cm^{-1} , and 1044.12 cm^{-1} .

2.2 形态观察

微球外观呈无色透明状,具有完整的球形态,表面光滑平整。

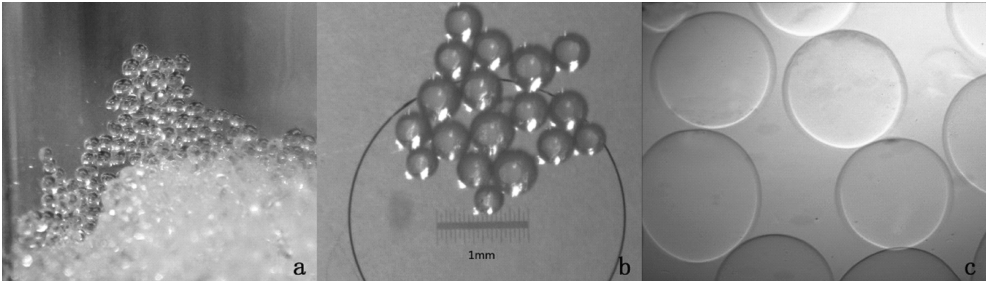


图 2 (a)微球呈无色透明状;(b)微球的粒径大多在 1000 微米以内;(c)显微镜下观察微球呈规则的球形状。
Figure 2 (a) The microspheres are colorless and transparent; (b) the particle size of the microspheres is mostly within 1000 microns; (c) the microspheres showed spherical morphology under light microscope.

2.3 溶胀度

三组交联透明质酸钠微球表现出不同的溶胀度。随着交联剂用量的增加,微球的溶胀度逐渐降低,交联度逐渐提高。通过改变微球的交联度来控制微球在体内的降解时间,除了交联剂用量,还可以通过其它方法,如通过改变透明质酸钠起始反应浓度、透明质酸溶液的 pH 值、交联反应温度、透明质酸钠分子量等因素来改变微球的交联度。

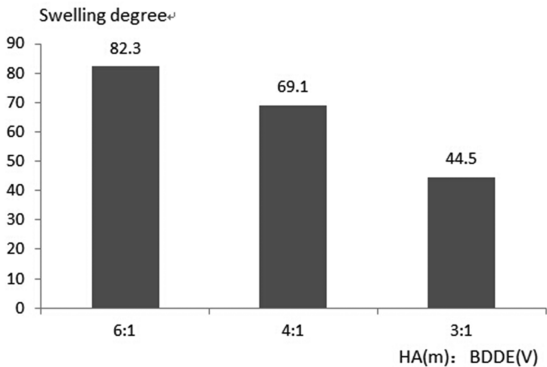


图 3 当 HA(m):BDDE(V)为 6:1时,微球的溶胀度为 82.3;4:1为 69.1,3:1为 44.5。
随着 BDDE 用量的增加,微球的溶胀度逐渐减小,交联度逐渐增大。

Figure 3 When HA(m):BDDE(v) is 6:1, the swelling ratio of the microspheres is 82.3, 4:1 is 69.1 and 3:1 is 44.5. With the increase of BDDE, the swelling degree of microspheres decreases gradually, and the degree of crosslinking increased gradually.

2.4 压缩变形率

通过检测分析,微球最高的压缩变形率可达 52.4%,同组内不同粒径范围的微球其压缩变形率无明显差异。随着交联剂用量的增加,交联度提高,微球的压缩变形率呈下降趋势。三组不同粒径分布的微球均表现出良好的压缩变形能力,交联透明质酸钠微球优异的弹性性能可使微球能够有效地变形通过注射器及微细导管,且能恢复到原状。

2.5 性能测定

微球能顺利通过微导管,微球均无破碎,且形状保持不变。推注时前段部分顺畅,后段部分稍有阻力,这跟微球在生理盐水中的悬浮性能有关。

3 结论

自 2000 年以来,国内逐步扩大了透明质酸在医疗领域的应用,先后开发了用于眼科粘弹剂、防粘连产品、关节润滑剂、注射用整形等产品。透明质酸在介入栓塞治疗领域中,目前未检索到类似产品的研究

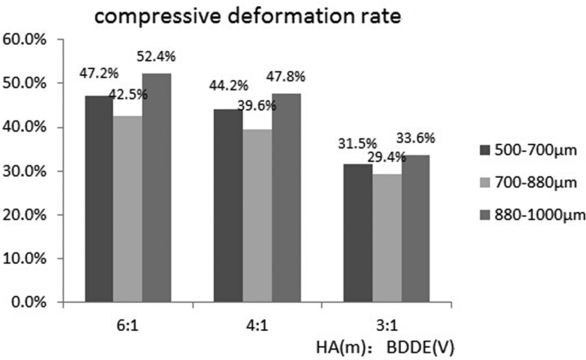


图 4 不同粒径范围内微球的压缩变形率无显著性差异,而微球的交联程度越高,其压缩变形率就越低。
Figure 4 There were no significant differences in the compressive deformation rate of microspheres in different size ranges, and the obvious trend is that the higher the degree of crosslinking, the lower the compressive deformation rate of the microspheres.

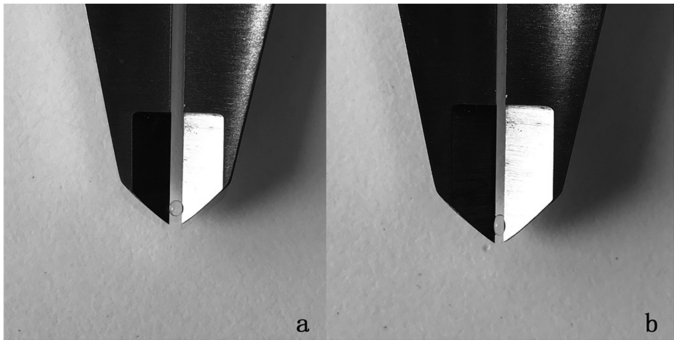


图 5 微球被挤压变形后,仍能恢复到原来状态。
Figure 5 The microspheres can still recover to original condition after extrusion deformation.

及相关文献的报道,本实验通过对透明质酸钠改性获得交联透明质酸钠微球,大部分微球粒径分布在200~1500μm之间。通过对本实验制备的交联透明质酸钠微球理化性能的分析,微球规则的球形态及光滑的表面符合微球血管栓塞剂的基本要求,良好的弹性保证了微球能够顺利通过微导管,同时可通过改变交联度来控制微球在体内的降解周期。如何确定一个合适的降解周期及微球的降解方式仍需进一步的体内实验来观察确定。

目前已有大量研究证实透明质酸在肿瘤微环境中高表达,与其受体 CD44 分子结合,促进恶性肿瘤的侵袭与转移,透明质酸依赖 CD44 介导的细胞骨架蛋白的信号传导过程被认为是肿瘤细胞扩散和转移的重要机制之一^[5~7]。目前透明质酸被用来作为药物载体与紫杉醇等抗癌药物的结合来治疗肿瘤疾病。可根据这一特性,对透明质酸进行改性的同时结合一些抗肿瘤药物,在达到了血管末梢性栓塞的作用又起到了药物靶向缓释的局部化疗作用。

参考文献：

[1] Laurent A. Tech Vasc Interv Radiol, 2007, 10(4):248~256.
[2] Pelage JP, Laurent A, Wassef M, Bonneau M, Germain D, Rymer R, Flaud P, Martal J, Merland JJ. Radiology, 2002, 224(2): 436~445.
[3] Tomashefski JF Jr, Cohen AM, Doershuk CF. Hum Pathol, 1988, 19(5):555~561.
[4] 凌沛学, 贺艳丽, 白若琬, 李小平, 张天民. 中国生化药物杂志, 2000, 21(3):152.
[5] Auvinen P, Tammi R, Kosma V, Sironen R, Soini Y, Mannermaa A, Tumelius R, Uljas E, Tammi M. International Journal of

Cancer, 2013, 132(3):531~539.

[6] Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. Cell, 1990, 61(7):1303~1313.

[7] Toole BP, Wisht TN, Tammi MI. J Biol Chem, 2002, 277(7):4593~4596.

Preparation and Characterization of Cross-linked Hyaluronic Acid for Embolization

ZHU Jian-feng* , XU Xiao-hui, SHI Jia-li

(Hangzhou Singclean Medical Products Co. , Ltd. , Hangzhou 310000, China)

Abstract: The chemically modified hyaluronic acid not only retains good biocompatibility and biodegradability, but also obtains unique properties, such as anti-degradation, viscoelasticity and so on. Using this property, cross-linked hyaluronic acid can be used for vascular embolization. In this study, The microspheres was prepared by emulsion cross-linking technique. The effect of the initial reaction concentration, emulsifying shearing speed and the ratio of oil and water on pellet formation and size distribution was investigated, light microscope were used to observe the microspheres, the physical and chemical properties of the microscope were studied. The results show that the surface of the microspheres is smooth, the shape of the spheres is complete, and the microspheres have good compressive deformation resistance. It meets the requirements of microsphere embolization and provides the theoretical basis for the experimental study in vivo.

Key words: Hyaluronic acid; Microspheres; Embolization