

# PLA/MSM 缓释微球的制备及生物活性

王鑫众<sup>1,2</sup>, 刘建国<sup>1</sup>, 唐宇锋<sup>1,2</sup>, 王宇<sup>2</sup>, 章培标<sup>2</sup>, 陈学思<sup>2</sup>

(1. 吉林大学第一医院, 长春 130021; 2. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022)

**摘要** 采用膜乳化-液中干燥法制备出担载二甲基砷(MSM)的聚乳酸(PLA)微球(PLA/MSM), 并研究了膜孔径、搅拌转速和 MSM 浓度对载药微球形貌、尺寸、载药量、体外释放及细胞活性的影响; 采用场发射环境扫描电子显微镜(ESEM)观察微球形貌、尺寸及分布, 用等离子体发射光谱(ICP-AES)法检测 PLA/MSM 微球载药量、包封率及体外释放, 采用 ESEM 观察微球内部结构, 并通过体外细胞培养和噻唑蓝(MTT)法检测 MC-3T3-E1 细胞的增殖能力. 研究表明, 膜乳化法制备的载药微球规整, 呈典型的圆球状, 表面光滑, 内部有多孔结构. 当膜孔径为 5.1  $\mu\text{m}$  且搅拌转速为 500 r/min 时, PLA/MSM 微球大小更为均一; 当体系中 MSM 质量分数为 8.6% 时, 载药量可达到 77.43%. 随着膜孔径减小及药物浓度的增加, 体外释放速率加快, 但初期均无明显突释现象, 约 10 d 后累积释放量达到 89.2%. 细胞实验结果显示, 在膜孔径为 5.1  $\mu\text{m}$  且 MSM 质量分数为 8.6% 的条件下, 制备的载药微球在细胞培养 7 d 时表现出明显的促增殖作用.

**关键词** 膜乳化; 聚乳酸; 二甲基砷; 微球; 生物活性

**中图分类号** O631

**文献标志码** A

二甲基砷(MSM)是一种有机硫化物, 是合成人体胶原蛋白的必要物质. 同时, 作为一种常用的保健药品, 主要用于皮肤、毛发、骨及软骨等的修复治疗, 在临床上主要用于骨性关节炎的治疗<sup>[1~3]</sup>. Brien 等<sup>[4]</sup>发现, MSM 与其它治疗骨性关节炎药物有协同作用, 但药物稳定性差, 其分子量较小, 经口服给药后易代谢排除, 机体利用率有限. 临床应用中单次口服剂量较大, 且需多次服用, 增加了患者的负担.

聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)及其共聚物 PLGA 是一类具有良好的生物相容性、可生物降解及可吸收等特性的高分子材料, 在环境保护、组织工程、骨折内固定和药物控释等领域应用广泛<sup>[5~8]</sup>. PLA 首先作为外科缝线材料进入市场<sup>[9]</sup>. 20 世纪 70 年代, Yolles 等<sup>[10]</sup>将 PLA 应用于药物载体研究, 制备了担载纳曲酮的 PLA 复合物, 在 35 d 时体外释放率为 67%, 动物实验结果表明, 复合物对吗啡有明显的阻断作用. Ruan 等<sup>[11]</sup>利用 PLA 及其共聚物在体内可生物降解的特性, 采用溶剂挥发法制备了包裹紫杉醇的 PLA-PEG-PLA 微球, 微球分布均匀, 内部为多孔结构, 在有机相中加入丙酮后进一步增加了微球的多孔结构并促进了药物释放, 30 d 时体外释放率达到 49.6%, 延长了药物在体内的作用时间, 提高了药物疗效. 目前, 人们已经用 PLA 制备了微球<sup>[12]</sup>、微囊<sup>[13]</sup>、静电纺丝纤维<sup>[14]</sup>等, 用于药物的担载和缓释. 一般采用乳化法制备 PLA 微球, 但传统的乳化方式如高压均质机、胶体磨及超声乳化等均难以控制微球粒径, 微球的均一性很差, 不利于进一步应用. 与传统乳化方法相比, 膜乳化法制得的液滴大小均一可控, 且能耗较低, 剪切力较小, 因此被广泛用于单分散高分子微球的合成<sup>[15]</sup>. 采用膜乳化制备 PLA 微球具有粒径可控和大小均一等优点<sup>[16]</sup>.

20 世纪 90 年代初期, Nakashima 等<sup>[17]</sup>提出了膜乳化法, 首次利用一种火山灰烧结的多孔玻璃(SPG)膜制备了粒径均一的煤油/水及水/煤油的乳液滴. 此后, 膜乳化技术作为一种崭新的乳化技术备受关注, 并广泛应用于食品、化妆品、医药和生物分离等领域<sup>[18]</sup>. 根据乳液制备过程中膜乳化的原理, 膜乳化技术可分为直接膜乳化和快速膜乳化两大类<sup>[19]</sup>. 2001 年, 马光辉等<sup>[20]</sup>用膜乳化-溶胀聚合

收稿日期: 2012-12-07.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 51273081, 51273195)资助.

联系人简介: 刘建国, 男, 博士, 教授, 主要从事人工关节及组织工程研究. E-mail: jgliu.2005@yahoo.com.cn

章培标, 男, 博士, 副研究员, 主要从事组织工程和生物医用高分子研究. E-mail: zhangpb@ciac.jl.cn

法制备了粒径为 10  $\mu\text{m}$  的 PMMA 中空微球. 溶胀聚合法受分散介质、稳定剂、引发剂及反应温度等因素的影响, 聚合过程复杂, 操作时间长. 马小军等<sup>[21]</sup>采用膜乳化-液中干燥法制备单分散的 PS 微球, 膜乳化法可制备出粒径可控、单分散微球, 而液中干燥法不涉及化学变化、过程温和及操作简单. 本文采用膜乳化方法制备油/水(O/W)型乳状液, 再通过液中干燥法<sup>[22]</sup>制得单分散负载 MSM 的 PLA 微球, 考察了 SPG 膜孔径、搅拌速度和药物浓度对 PLA/MSM 微球粒径大小及分布、载药量、包封率和体外释放的影响, 并通过细胞实验, 检测其对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

二甲基砷(MSM), 吉林佳丽有限公司; 聚乳酸(PLA), 分子量 30000, 特性黏度 1.1 dL/g, 中国科学院长春应用化学研究所; 盐酸异丙醇溶液, 分析纯, 北京化学试剂公司; MC3T3-E1 细胞, 中国医学科学院基础医学研究所; 噻唑蓝(MTT)、DMEM 培养基、胎牛血清及胰蛋白酶, 美国 Gibco 公司; 磷酸盐缓冲溶液(PBS)自制, 0.1 mol/L(pH 7.4); 聚乙烯醇(PVA), 聚合度 1750 $\pm$ 50, 醇解度 99%, 中国医药集团上海化学试剂公司; 十二烷基硫酸钠(SDS), 化学纯, 中国医药集团上海化学试剂公司; 丙酮和三氯甲烷, 分析纯, 北京化学试剂公司; SPG 膜, 日本早稻田大学; 日本早稻田大学外压式微型膜组件. 日本 AS ONE 公司 HPS-100 型高速磁力搅拌器; 德国 Sigma 公司 3K30 型冷冻离心机; 北京四环科仪厂 LGJ-18 型冷冻干燥机; 荷兰飞利浦公司 XL30ESEM-FEG 型场发射环境扫描电子显微镜(ESEM); 美国 Thermo Scientific 公司 ICAP6300 型等离子体发射光谱(ICP-AES)仪; 哈尔滨东联电子技术开发有限公司 HZQ-X100 型恒温振荡培养箱; 日本 Nikon 公司 TE2000-U 型荧光倒置显微镜; 日本 Nikon 公司 DXM1200F 型数码摄像系统; 日本 Sanyo 公司 MCO-18AIC(UV)型 CO<sub>2</sub>培养箱; 广东省顺德市索奇实业有限公司 ZGD-50B-7 型紫外灭菌箱; 美国 Thermo 公司 Multiskan MK3 型全自动酶标仪.

### 1.2 PLA/MSM 微球的制备

将一定量的 PLA 和 MSM 分别溶于 10 mL 氯仿和 20 mL 丙酮中并充分搅拌, 共混后均匀超声制得分散相, 溶液中 PLA 质量分数为 2.7%, MSM 质量分数为 4.5%; 将一定量的 SDS 和 PVA 加入到 300 mL 去离子水中, 水浴加热充分搅拌溶解制得连续相, 其中 SDS 和 PVA 的浓度分别为 2 和 1 g/L. 将分散相加入储存器中, 在外加压力 0.045 MPa 作用下, 通过 SPG 微孔膜将分散相压入连续相中, 得到单分散的 O/W 型乳状液.

将 O/W 型乳状液转移至 15  $^{\circ}\text{C}$  恒温槽中, 以转速 500 r/min 搅拌 6~8 h, 随着有机溶剂三氯甲烷及丙酮的挥发, 最终固化成微球. 将 PLA/MSM 微球悬浮液以 8000 r/min 离心 30 min, 用去离子水洗涤 3 次, 冷冻干燥后转移至真空干燥器中备用.

### 1.3 微球的表征

取少量微球悬浮于蒸馏水中, 超声分散, 取少量滴在硅片上, 使其均匀摊开, 自然晾干. 用双面胶将硅片固定在样品台上, 真空条件下喷金处理后, 用扫描电子显微镜(SEM)观察微球的形貌. 通过统计扫描电子显微镜照片上 200 个微球的粒径得到微球的平均粒径和粒径分布. 平均粒径  $D_n = (\sum d_i) / n$ , 其中  $d_i$  为第  $i$  个微球的直径,  $n$  为统计的微球数量; 分散性  $CV = \text{标准差 (SD)} / \text{平均粒径} (D_n)$ .

3 种膜孔径制备的载药微球总质量分别为 590, 620 和 790 mg, 3 种 MSM 浓度制备的载药微球总质量分别为 470, 520 和 710 mg. 准确称取每种冻干微球 20.0 mg, 将样品完全溶解于 10 mL 硝酸中, 用 ICP-AES 分析其中硫元素含量, 通过 MSM 中硫元素所占分子量计算 MSM 含量, 每组微球设 3 个平行样. 微球载药量及包埋率按下式计算: 载药量 = (微球中 MSM 的含量 / 微球的质量)  $\times$  100%; 药物包埋率  $EE = (\text{载药量} \times \text{微球总质量} / \text{微球中 MSM 理论质量}) \times 100\%$ .

准确称取 10.0 mg 冻干微球, 加入 1.5 mL PBS 缓冲液, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡器中以 120 r/min 速度进行振荡孵育, 模拟生理条件下的体外药物释放. 于 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10 和 21 d 离心分离溶液, 取 1.0 mL 上清液, 同时补入 1.0 mL 新鲜 PBS 缓冲液. 用 ICP-AES 测定上清液中 MSM 浓度, 将释药率对时间作曲线. 每组样品每个时间点设 3 个平行样, 取平均值.

采用溶剂挥发法制备聚乳酸薄膜,真空干燥后,称重放入 30 mL PBS 缓冲液中,分为 5 组(5 个时间点),每组设 3 个平行样品,每个样品单独放置,于 37 °C 进行降解实验.每隔 2 d 取出 1 组样品,干燥,称重,计算失重率.

取少量微球分散于液氮中,用刀片切割微球,真空干燥后用 SEM 观察微球的内部结构.

#### 1.4 载药微球对 MC3T3-E1 细胞的增殖实验

对质量分数为 0.99% 的纯 MSM、空白微球和 MSM 质量分数分别为 0.9%、4.5%、8.6% 的载药微球(5.1  $\mu\text{m}$  膜孔径制备的微球)及膜孔径分别为 0.6、5.1 和 10.1  $\mu\text{m}$  (MSM 质量分数为 4.5%) 载药微球进行了细胞培养实验.

MC3T3-E1 细胞,以 DMEM 培养液培养扩增至足够数量.在 DMEM 培养液中加入纯 MSM 进行细胞培养.将不同组微球放入 24 孔培养板中,每组样品每个时间点设 3 个平行样,紫外光照射灭菌 40 min 后接种 MC3T3-E1 细胞,密度为每孔  $1 \times 10^4$  个细胞,于 37 °C 和 5% (体积分数)  $\text{CO}_2$  条件下培养.微球用量为每孔 20 mg.

在分别培养 1, 3, 7 d 时取出 24 孔培养板,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  MTT 溶液,放入培养箱继续培养 4 h.吸弃培养液,每孔加 750  $\mu\text{L}$  盐酸异丙醇溶液(0.4 mol/L),于培养箱内孵育 15 min,吹打混匀后每孔取 200  $\mu\text{L}$  移入 96 孔培养板中,用全自动酶标仪在 540 nm 处检测各孔光吸收值.

#### 1.5 统计学处理

使用统计学软件 Origin8.0 (OriginLab corporation 美国)进行统计学分析.不同组别间使用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$  为具有显著统计学意义.

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同膜孔径对 PLA/MSM 微球尺寸、载药量和包封率的影响

膜孔径分别为 0.6、5.1 和 10.1  $\mu\text{m}$  的微球 SEM 形貌如图 1 所示.可见 PLA/MSM 微球规整,呈圆球状,表面光滑,大小均一.随着膜孔径的增大,载药微球的粒径也随之变大.3 种膜孔径的载药微球平均尺寸分别为 4.78, 26.24 和 35.18  $\mu\text{m}$ ,其 CV 值分别为 26.35%, 8.65% 和 3.24%,可见后两种膜孔径制得的载药微球比第一种膜孔径制得的载药微球更为均一.SP<sub>2</sub>膜是一种非常均一的玻璃膜,由亲水性的  $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$  构成<sup>[16]</sup>.实验所用的膜孔径一般在 0.05 ~ 14.00  $\mu\text{m}$  之间.当膜孔径增大时,乳



Fig. 1 SEM images of PLA/MSM microspheres fabricated with different membrane diameter

Pore size/ $\mu\text{m}$ : (A) 0.6; (B) 5.1; (C) 10.1.

状液平均粒径随之增大,从而获得不同尺寸的微球.膜乳化得到的乳状液滴大小与微孔膜平均孔径大小呈线性相关: $D_d = nD_p$ ,其中  $n = 2 \sim 10$ ,  $n$  为常量<sup>[23]</sup>.可见,膜孔径对乳状液滴粒径和微球的大小具有决定性的影响<sup>[21]</sup>.本文制得的载药微球平均尺寸约为膜孔径的 3 ~ 7 倍.

不同膜孔径的载药量和包封率列于表 1.由表 1 可见,由不同膜孔径制得的 PLA/MSM 载药微球

Table 1 Effect of membrane diameter on microsphere size, drug loading (DL) and entrapment efficiency (EE)

Pore size/ $\mu\text{m}$	$d/\mu\text{m}$	DL(%)	EE(%)
0.6	$4.78 \pm 1.25$	$26.65 \pm 4.51$	$10.50 \pm 1.77$
5.1	$26.24 \pm 2.27$	$42.83 \pm 10.38$	$22.54 \pm 4.29$
10.1	$35.18 \pm 4.66^*$	$59.56 \pm 2.17^*$	$24.63 \pm 1.14^*$

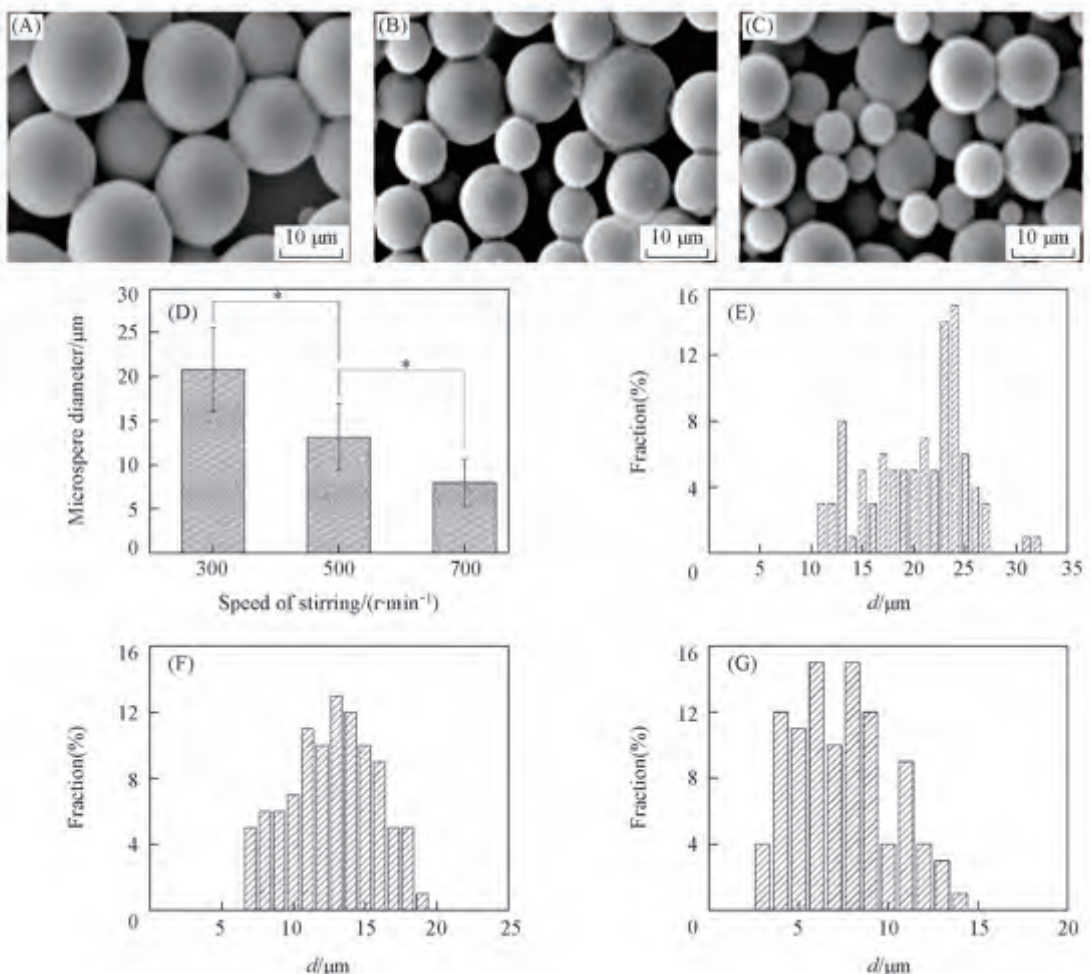
\*  $P < 0.05$  compared to other groups. Each value represents the mean  $\pm$  S. D. ( $n = 3$ ).



的载药量为 26.65% ~ 59.56%, 包封率为 10.50% ~ 24.63%。随着膜孔径的增大, 包封率和载药量均逐渐增加, 并且具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。随着膜孔径的增大, 乳液粒径增大, 其比表面积随之减小, 在制备过程中药物由于释放而损失的量也减少, 导致微球中 MSM 的载药量和包封率增加。

## 2.2 不同搅拌转速对 PLA/MSM 微球形貌和粒径的影响

固定其它制备条件, 选择膜孔径为 5.1  $\mu\text{m}$ , 考察搅拌转速对载药微球的影响。由图 2 可见, 当转速分别为 300, 500 和 700 r/min 时, 微球平均粒径[图 2(D)]分别为 20.80, 13.12 和 7.96  $\mu\text{m}$ , 说明随着转速的增加, 微球尺寸逐渐变小, 并且 300 与 500 r/min, 300 与 700 r/min 及 500 与 700 r/min 之间均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。粒径分布统计结果[图 2(E) ~ (G)]显示, 搅拌转速为 500 r/min 时, 微球粒径均一性较好, 接近于正态分布。一般来说, 搅拌转速必须超过一定的临界值, 才能使壁面剪切力克服膜表面液滴的界面张力, 从而使液滴脱离膜表面。液滴从膜表面分离主要受两种机制的影响: 一种是受剪切力诱导的分离机制(简称 SHE 机制), 一种是基于自发变形的分离机制(简称 STB 机制)<sup>[24]</sup>。剪切力诱导的分离机制是指液滴的形成受到连续相在膜表面产生的剪切力作用, 而基于自发变形的分离主要依靠表面自由能的改变而使液滴自发形成。研究发现, 在 STB 机制下得到的液滴粒径均一性要优于在 SHE 机制下得到的乳液液滴<sup>[25]</sup>。在搅拌转速较低时, 连续相在膜表面产生的剪切力作用比较小, 对液滴的形成过程影响小, 液滴的形成主要受 STB 机制控制, 因此得到的液滴粒径较大, 分布较窄。随着搅拌转速的提高, 连续相在膜表面产生的剪切力作用也随之增大, 液滴的形成主要受 SHE 机制控制, 液滴的粒径变小, 分布变宽。当搅拌转速或膜壁剪切力超过一定值后, 液滴粒径不再受搅拌转速影响并达到最小, 而粒径均一性则随着搅拌转速增大而变差。因此, 本文选择搅拌转



**Fig. 2 SEM images(A—C), average diameter(D) and size distribution(E—G) of PLA/MSM microspheres fabricated with different stirring speed**

(A), (E) 300 r/min; (B), (F) 500 r/min; (C), (G) 700 r/min. \*  $P < 0.05$ .

速为 500 r/min.

### 2.3 不同 MSM 含量对 PLA/MSM 微球尺寸、载药量和包封率的影响

固定其它制备条件, 选择膜孔径为 5.1  $\mu\text{m}$  制备载药微球. 由图 3 可见, 当溶液中 MSM 的质量分数不同时, 微球尺寸也发生了变化. MSM 质量分数分别为 0.9%, 4.5% 和 8.6% 时, 微球平均粒径分别为 28.64, 26.24 和 20.58  $\mu\text{m}$ , 说明随着 MSM 浓度的增加, 微球尺寸会逐渐变小, 但均一性变差. 这可能是因为, 随着 MSM 质量分数的增加, 改变了乳液液滴的稳定性及药物在液滴内的分布, 加快了溶剂挥发速度, 缩短了微球固化时间, 使液滴间发生再团聚的几率变小, 从而改变了微球的尺寸和均一性.

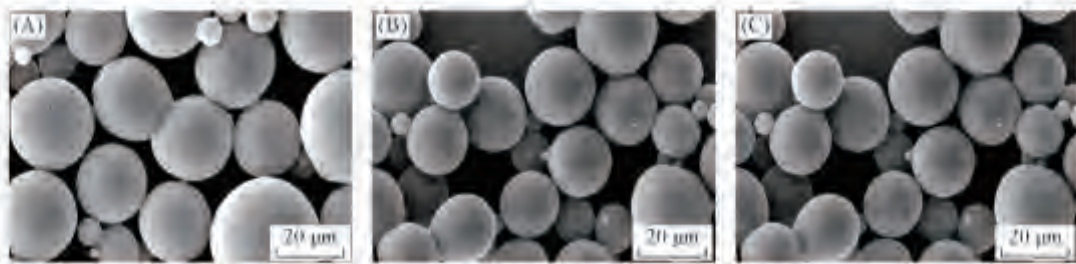


Fig. 3 SEM images of PLA/MSM microspheres fabricated with different MSM mass fraction

Mass fraction of MSM(%): (A) 0.9; (B) 4.5; (C) 8.6.

由表 2 可见, 随着溶液中 MSM 质量分数的增加, 微球的载药量随之增加, 但包封率却明显降低, 并且具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). 当溶液中 MSM 质量分数为 0.9% 时, MSM 载药量最低, 而包封率最高, 包封率为 48.88%; 而当溶液中 MSM 质量分数为 8.6% 时, 微球的载药量最高, 可达 77.43%, 但包封率却降至 18.32%. 因此包封率的改变与微球的形貌、内部结构、比表面积等因素密切相关.

Table 2 Effect of MSM concentration on microsphere size, drug loading and entrapment efficiency

$w(\text{MSM})/(\%)$	$m(\text{PLA})/m(\text{MSM})$	$d/\mu\text{m}$	DL(%)	EE(%)
0.9	1:3	28.64 $\pm$ 1.74	31.20 $\pm$ 2.24	48.88 $\pm$ 3.52*
4.5	5:3	26.24 $\pm$ 2.27	45.35 $\pm$ 1.88	15.74 $\pm$ 0.65
8.6	10:3	19.98 $\pm$ 5.63*	77.43 $\pm$ 3.54*	18.32 $\pm$ 0.84

\*  $P < 0.05$  compared to other groups. Each value represents the mean $\pm$ S. D. ( $n=3$ ).

### 2.4 载药微球的体外释放

考察了不同的膜孔径及 MSM 浓度制备的载药微球的释药性能, 其体外释药曲线见图 4. 在释放初期的 24 h 时, 膜孔径为 0.6, 5.1 和 10.1  $\mu\text{m}$  的载药微球及 MSM 质量分数分别为 0.9%, 4.5% 和 8.6% 的微球均没有明显的突释现象, 达到了控制释放的理想要求. 在体外释放 10 d 时, 膜孔径为 0.6  $\mu\text{m}$  的载药微球和质量分数为 8.6% MSM 的载药微球其累积释放率分别为 87.9% 和 89.2%. 表明微

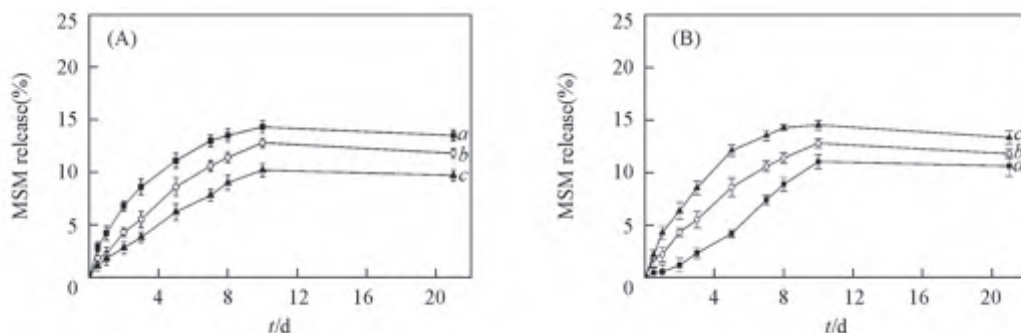


Fig. 4 Drug release curves of PLA/MSM microspheres fabricated with different membrane diameter (A) and different MSM concentration (B)

(A) Diameter of membrane/ $\mu\text{m}$ : a. 0.6; b. 5.1; c. 10.1. (B) Mass fraction of MSM in PLA(%): a. 0.9; b. 4.5; c. 8.6. Each value represents the mean $\pm$ S. D. ( $n=3$ ).

球的释药速率随膜孔径的降低和 MSM 质量分数的增高而加快. 这与微球尺寸、比表面积和内部结构有关. 微球表面经过溶蚀而形成的微小孔洞有利于内部的药物扩散释放, 同时组成微球的高分子材料 PLA 也逐渐降解, 促进药物向微球外扩散. 可见体外释放是由扩散过程与降解过程共同控制的.

## 2.5 聚乳酸的降解

聚乳酸的降解实验结果如图 5 所示. 可以看出, 聚乳酸在降解前期, 随着时间的延长质量不断减少, 之后降解趋于平缓. 在降解前 6 d, 失重率较大, 但在降解 8 d 时其质量损失逐渐趋于平缓. 这是由于在水解初期, 聚合物酯键水解断裂是随意的, 链的分子被酸碱水解的位点多, 另外由于降解过程中会生成羧基末端的链段, 增加了其酸性, 进一步加快了降解速率, 故质量下降较快. 进一步说明在药物释放过程中, 药物扩散和材料的降解同时发生.

## 2.6 微球的内部结构

图 6 为不同 MSM 质量分数的 PLA/MSM 微球内部结构. 微球内部为多孔结构, 随着 MSM 浓度的增加, 其孔结构是不同的. 当 MSM 质量分数为 4.5% 时, 微球孔结构趋于均匀, 并且产生中空结构; 当 MSM 质量分数为 8.6% 时, 孔结构趋于致密, 载药量也在增加(从 31.20% 到 77.43%), 这种结构可能是由于制备过程中溶剂的挥发造成的.

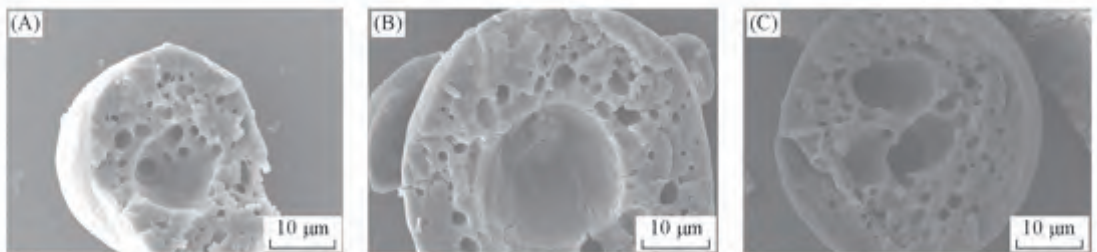


Fig. 6 SEM images of the PLA/MSM microspheres cross-section with different MSM mass fraction

Mass fraction of MSM(%): (A) 0.9, (B) 4.5, (C) 8.6.

## 2.7 细胞增殖特性

细胞增殖情况如图 7 所示. 随着培养时间的延长, 各组的细胞个数逐渐增加. 在培养 1 d 时, 膜孔径为 5.1  $\mu\text{m}$  的载药微球与 0.6  $\mu\text{m}$  的相比有显著性差异( $P < 0.05$ ), 与 10.1  $\mu\text{m}$  的载药微球相比有增殖的趋势, 但无显著性差异. 在培养 3 d 时, 5.1  $\mu\text{m}$  膜的载药微球与 0.6 和 10.1  $\mu\text{m}$  膜的载药微球相比有增殖的趋势, 但无显著性差异. 当培养 7 d 时, 5.1  $\mu\text{m}$  膜的载药微球与 0.6 及 10.1  $\mu\text{m}$  膜的载药微球相比增殖趋势更为明显, 并且有显著性差异( $P < 0.05$ ), 说明 5.1  $\mu\text{m}$  膜的载药微球的细胞增殖情况优于其它两种膜. 而 MSM 质量分数为 8.6% 的载药微球, 其细胞增殖情况优于其它 MSM 浓度的载药微球. 培养 1 d 时, 质量分数为 0.99% 的纯 MSM 组和空白微球组, 与质量分数为 0.9% MSM/PLA 组相比有增殖趋势, 并且有显著性差异( $P < 0.05$ ). 4.5% MSM/PLA 组和纯 MSM 组相比有增殖趋势但没有明显差异, 但和 0.9% MSM/PLA, 8.6% MSM/PLA 分别有显著性差异( $P < 0.05$ ), 说明在培养 1 d 时, 质量分数为 0.99% 的纯 MSM 组比 0.9% MSM/PLA 组对细胞增殖作用明显, 但没有 4.5% MSM/PLA 组对 MC3T3-E1 细胞增殖作用明显. 培养 3 d 时, 细胞增殖情况随着药物浓度的增加有增殖趋势, 但无显著性差异. 但在培养 7 d 后, 细胞有明显的增殖趋势, 0.9% MSM/PLA 组与质量分数为 0.99% 的纯 MSM 组相比有显著性差异, 并且 8.6% MSM/PLA 组与空白微球组, 质量分数为 0.99% 的纯 MSM 组、0.9% MSM/PLA 组、4.5% MSM/PLA 组分别有显著性差异. 结果表明, MC3T3-E1 细胞在含有载药微球的培养液中, 其增殖能力和细胞活性优于单纯的 MSM 培养液. 因此可推断出 MSM 促进了

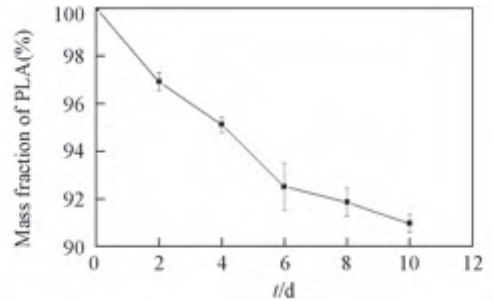
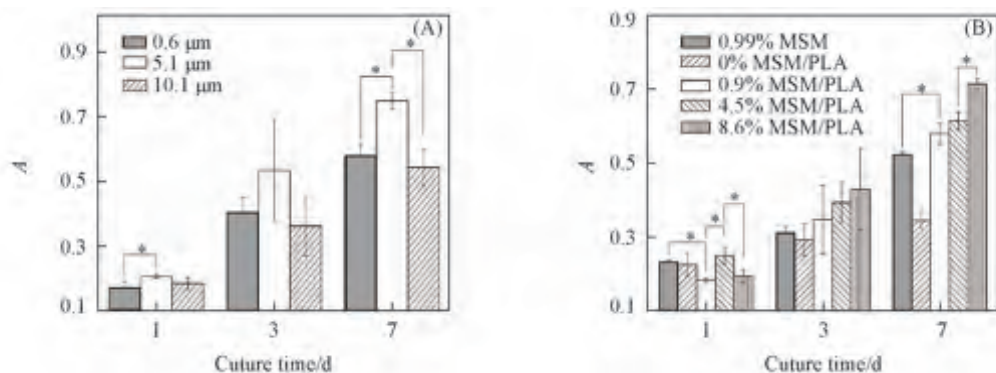


Fig. 5 Curve of PLA mass fraction vs. time of degradation in PBS

Each value represents the mean  $\pm$  S. D. ( $n=3$ ).



MC3T3E1 细胞的生长繁殖, 并且增强了细胞活力, 表现了很好的生物活性, 载药微球达到了缓释效果。



**Fig. 7 MTT test histogram of osteoblasts growing in the medium treated with PLA/MSM microspheres of different membrane diameter(A) and MSM concentration(B) at different time intervals**

Each value represents the mean $\pm$ S. D. ( $n=3$ ).

综上所述, 本文采用膜乳化法制得了负载 MSM 的 PLA 微球, 经条件优化后(膜孔径为 5.1  $\mu\text{m}$ , 搅拌速度为 500 r/min)制备的载药微球大小更为均一, 其载药量最高可达到 77.43%, 并具有明显的缓释效应, 初期没有明显突释现象, 且可以明显促进细胞的增殖。该 PLA/MSM 微球显示了良好的医学应用前景, 不仅可以作为 MSM 的缓释制剂解决病人多次大剂量服药带来的毒副作用等问题, 还具有组织工程方面的研究和应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Kim L. S., Axelrod L. J., Howard P., *OsteoArthritis and Cartilage*, **2006**, 14, 286—294
- [2] Brien S., Prescott P., Bashir N., *Osteoarthritis and Cartilage*, **2008**, 16, 1277—1288
- [3] Angela Notarnicola., Silvio Tafuri, Lucrezia Fusaro, *Adv. Ther.*, **2011**, 28(10), 894—906
- [4] Brien S., Prescott P., Lewith G., *Evid Based Complement and Alternat Med.*, **2011**, 528403
- [5] Yang Y. G., Liu D., Xia Y., Zhou Y. H., Zhong X. Y., Liu J., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2011**, 27(3), 345
- [6] Wu H. T., Yu T., Zhu Q. S., *Chem. J. Chinese Universities*, **2011**, 32(5), 1181—1187( 邬海涛, 于婷, 朱庆三. 高等学校化学学报, **2011**, 32(5), 1181—1187)
- [7] Wang X. Q., Chen Q. H., Hou Y. C., Lu Z. H., Wang C. X., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2012**, 28(5), 912—915
- [8] Zhao T. Y., Zhao J. P., Lei L. Y., *Chem. J. Chinese Universities*, **2013**, 34(1), 236—241(赵天倚, 赵继鹏, 雷莉妍. 高等学校化学学报, **2013**, 34(1), 236—241)
- [9] Soppimatha K. S., Aminabhavia T. M., Kulkamia A. R., *J. Controlled Release*, **2001**, 70, 1—20
- [10] Yolles S., Leafe T. D., Woodand J. H., *J. Pharm. Sci.*, **1975**, 64(2), 348—349
- [11] Ruan G., Feng S. S., *Biomaterials*, **2003**, 24(27), 5037—5044
- [12] Duncanson Wynter J., Figa Michael A., Kevin H., *Biomaterials*, **2007**, 28(33), 4991—4999
- [13] Liu R., Ma G. H., Wan Y. H., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2005**, 45, 144—153
- [14] Bae G. Y., Jang J., Jeong Y. G., *Journal of Colloid and Interface Science*, **2010**, 344(2), 584—587
- [15] Ito F., Honnami H., Kawakami H., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2008**, 67(1), 20—25
- [16] Mu R., Deng A. M., Omi S., *Polymer Materials Science & Engineering*, **2003**, 19(4), 82—84
- [17] Nakashima T., Shimizu M., Kukizaki M., *Key Eng. Mater.*, **1991**, 61(62), 513—516
- [18] Wang L. Y., Ma G. H., Su Z. G., *Controlled Release*, **2005**, 106, 62—75
- [19] Lambrich U., Schubert H., *J. Membr. Sci.*, **2005**, 257(1/2), 76—84
- [20] Ma G. H., Nagai M., Omi S., *J. Appl. Polym. Sci.*, **2001**, 79(13), 2408—2424
- [21] Bao D. C., Zheng J. H., Zhao Y. Jun., *Journal of Functional Materials*, **2006**, 8(37), 1289—1291(包德才, 郑建华, 赵燕军. 功能材料, **2006**, 8(37), 1289—1291)
- [22] Bao D. C., Zhang Q. G., Liu X. D., *Acta Physico-Chimica Sinica*, **2004**, 20(2), 178—181(包德才, 张琼钢, 刘袖洞. 物理化学学报, **2004**, 20(2), 178—181)
- [23] Joscelyne S. M., Tragardh G., *J. Membr. Sci.*, **2000**, 169(1), 107—117

- [24] Yasuno M., Nakajima M., Iwamoto S., *J. Membr. Sci.*, **2002**, 210(1), 29—37
- [25] Hao D. X., Gong F. Ling., Hu G. H., *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **2008**, 47, 6418—6425

## Preparation of Controlled-release PLA Microspheres Loading Methylsulfonylmethane and Its Biological Activity

WANG Xin-Zhong<sup>1,2</sup>, LIU Jian-Guo<sup>1\*</sup>, TANG Yu-Feng<sup>1,2</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>,  
ZHANG Pei-Biao<sup>2\*</sup>, CHEN Xue-Si<sup>2</sup>

(1. First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

**Abstract** Polylactic acid (PLA) microspheres carrying methylsulfonylmethane (MSM) were prepared by membrane emulsification. The effects of membrane pore size, stirring speed and MSM concentration on microspheres morphology, size, drug loading and *in vitro* release, as well as cell biological activity were studied using environmental scanning electron microscope (ESEM), inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP-AES), *in vitro* culture of MC3T3-E1 cell and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. The study will provide references for the study of the long-acting release agent of MSM. The results showed that the drug-loaded microspheres prepared with membrane emulsification were typical spherical with smooth surface and the internal porous structure. The size and morphology of the microspheres could be affected by membrane pore size, stirring speed and MSM concentration. The drug-loaded microspheres prepared with the membrane pore size of 5.1  $\mu\text{m}$  and a stirring speed of 500 r/min were more uniform in size than others. When the mass fraction of MSM solution was 8.6%, the drug loading of microspheres could be up to 77.43%. The *in vitro* release rate of MSM could be sped up when the membrane pore size was reduced and the MSM concentration was increased, but the initial burst release for all samples was not obvious, and it reached up to 89.2% after 10 d. The cell experiments showed that cell proliferation of MC3T3-E1 was improved at 7 d cell culture using MSM-loaded microspheres with the membrane pore size of 5.1  $\mu\text{m}$  and MSM mass fraction of 8.6%. The research indicates that the PLA/MSM drug-loaded microspheres has good controlled release characteristics and biological activity, which can be used as a long-acting release formulation of MSM for the treatment of osteoarthritis and application in bone and cartilage tissue engineering.

**Keywords** Membrane emulsification; Polylactic; Methylsulfonylmethane; Microsphere; Biological activity  
(Ed.: W, Z)