

分 类 号: R684  
研究生学号: 2010731029

单位代码: 10183  
密 级: 公 开



# 吉林大学 博士学位论文

PLA/MSM 缓释微球的制备及骨关节炎治疗

**Preparation of Controlled-release PLA/MSM Microspheres for  
the Therapy of Osteoarthritis**

作者姓名: 王鑫众

专 业: 外科学

研究方向: 缓释微球在骨科中的应用

指导教师: 刘建国 教授

陈学思 研究员

章培标 研究员

培养单位: 白求恩第一医院

中国科学院长春应用化学研究所

2013 年 4 月



PLA/MSM 缓释微球的制备及骨关节炎治疗

Preparation of Controlled-release PLA/MSM Microspheres  
for the Therapy of Osteoarthritis

作者姓名：王鑫众

指导教师：刘建国

学位类别：医学博士

论文答辩日期：2013年5月31日

授予学位日期： 年 月 日

答辩委员会主席：路来金

论文评阅人：聂林、白锦虹、闫景方、高忠礼  
庄秀丽

未经本论文作者的书面授权，依法收存和保管本论文学术版本、电子版本的任何单位和个人，均不得对本论文的全部或部分内容进行任何形式的复制、修改、发行、出租、改编等有碍作者著作权的商业性使用（但纯学术性使用不在此限）。否则，应承担侵权的法律责任。

#### 吉林大学博士（或硕士）学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：王海龙

2013年5月31日

## 前　　言

骨关节炎是一种常见的慢性关节疾病，又称骨关节病、退行性关节炎等。其特征是关节软骨原发性或继发性退行性变以及骨质增生。目前的治疗原则主要是对症治疗，非甾体镇痛消炎药（NSAIDs）由于其快速起效的镇痛作用和温和的抗炎特性已被广泛地用于治疗关节炎，但其副作用会出现胃溃疡<sup>[1]</sup>。二甲基砜（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、软骨等的修复治疗。在临幊上主要用于骨性关节炎的治疗。Brien S 等研究表明，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。临幊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）材料用作缓释系统给药材料，由于具有良好的生物相容性，生物降解性。近年来得到了广泛的关注。

关节腔是一个独立的解剖间室构成，允许局部注射给药。这种药物传递系统可将药物直接传递到局部治疗区域，避免了药物在运输时的生理代谢并且改变了药物在人体内的分布，这样可以有效地减少药物的剂量，从而最大限度地减少毒性。因此这种投递模式吸引了越来越多人的关注，在过去的几年里，很多学者都在研究关节腔内的长效制剂。然而，由于它们的化学结构，在关节腔里一些活性物质迅速被清除，因此需要多次的注射，这可能会导致感染或关节残疾。在这项研究中，我们制备了 PLA/MSM 缓释微球组合系统，以克服突释问题的和达到缓释的目的。有很多报道关于关节腔内缓释系统的给药研究，例如，担载了塞来昔布的壳聚糖微球，但是初期有明显的突释现象，并且在给药后的很短时间内微球会被吞噬细胞清除。又如，担载蛋白和双氯芬酸的 PLGA 微球，它也存在着最初的突释和在体内有限的缓释效果<sup>[2-3]</sup>。为了解决突释问题和获得关节腔内给药系统的缓释效果，有必要构建小分子药物的传递系统。因此，构建合适的载药缓释微球，能更好的促进骨关节炎的修复。而且，制备的载药微球能调整微球尺寸及载药量和缓释效果。并能结合高分子材料的生物相容性和生物活性。

一方面本研究利用膜乳化法制备了不同聚乳酸含量的空白微球，并用扫描电镜对其进行表征，并探讨了不同的表面活性剂浓度对微球结构的影响，及不同搅拌转速对微球尺寸的影响。本研究还制备了缓释微球，引入了具有生物活性的廉价易获得小分子化合物，二甲基砜。探讨了不同膜孔径和二甲基砜含量对微球尺寸、形貌、载药

量、包封率、释放行为和细胞增殖的影响。此外，近年来局部缓释给药系统由于独特的性能引起了学者相当大的关注，本研究还将制备的缓释微球用于兔骨性关节炎的治疗，评价其生物效应。为 PLA/MSM 缓释微球在临床的应用提供实验依据。

## 中文摘要

### PLA/MSM 缓释微球的制备及骨关节炎的治疗

近几十年来，缓释微球的进展，推动了软骨组织工程学的发展。制备微球的材料主要为天然材料和人工合成高分子材料，其中 PLA、PLGA 具有良好的生物相容性、可降解性及可吸收等特性，是公认的优良的生物可降解高分子材料，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>[4~7]</sup>。另外，二甲基砜(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、软骨等的修复治疗。在临幊上主要用于骨性关节炎的治疗<sup>[8~10]</sup>。因此，制备 PLA/MSM 载药微球具有良好的缓释特性及生物活性，可作为 MSM 的长效缓释制剂应用于骨性关节炎的治疗及骨、软骨组织工程研究。

由此，制备了具有生物活性的缓释微球，一方面本研究利用膜乳化法制备了不同聚乳酸含量的空白微球，并用扫描电镜对其进行了表征，并探讨了不同的表面活性剂浓度对微球结构的影响，及不同搅拌转速对微球尺寸的影响。本研究还制备了缓释微球，引入了具有生物活性的廉价易获得小分子化合物，二甲基砜。探讨了不同膜孔径和二甲基砜含量对微球尺寸、形貌、载药量、包封率、释放行为和细胞增殖的影响。此外，近年来局部缓释给药系统由于独特的性能引起了学者相当大的关注，本研究还将制备的缓释微球用于兔骨性关节炎的治疗，评价其生物效应。为 PLA/MSM 缓释微球在临幊的应用提供实验依据。

第一部分膜乳化法制备空白聚乳酸微球的研究。本实验无前期工作，完全独立探索各实验参数。利用膜乳化法制备了不同聚乳酸含量的空白微球，聚乳酸含量分别为 1% (w/v)、3% (w/v)、5% (w/v)。利用扫描电镜观察微球的表面形貌及粒径大小。不同连续相流速、压力及表面活性剂浓度对微球的形貌和尺寸的影响。连续相流速分别为 300、500、700、900rpm，表面活性剂浓度分别为 0.5、1、2、4、6g/l。结果显示：微球表面形貌光滑，大小均匀，分布较好。当聚乳酸含量为 3% (w/v) 时，显示了较好形貌及分布，微球尺寸随着连续相流速的增加而减小，压力与膜孔径的大小有关，膜孔径越大所需压力越大。

第二部分 生物活性 PLA/MSM 缓释微球的制备及表征。采用膜乳化-液中干燥法制备出担载二甲基砜(MSM)的聚乳酸 (PLA) 微球，比较膜孔径、搅拌转速和 MSM 浓度对载药微球的形貌、尺寸、载药量、体外释放及细胞活性的影响；采用 ESEM 观察其微球形貌、尺寸及分布，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 MTT 法检测 MC-3T3-E1 细胞的增殖能力，为 MSM 长效缓释剂的研究提供参考。研究结果表明，膜乳化制备的载药微球规整，呈典型的圆球状，表面光滑，内部多孔结构。膜孔径、搅拌转速及 MSM 药物担载量均可影响微球的尺寸和形貌。当膜孔径为  $5.1 \mu\text{m}$  和搅拌转速为  $500 \text{ r/min}$  时制备的载药微球大小更为均一；当体系中 MSM 浓度为  $8.6\text{wt.\%}$  时，其载药量可达到  $77.43\%$ 。随着膜孔径减小及药物浓度的增加，其体外释放速率加快，但在初期均没有明显突释现象，大约  $10 \text{ d}$  后达到  $89.2\%$ 。细胞实验结果显示，培养  $7 \text{ d}$  时，膜孔径为  $5.1 \mu\text{m}$  及  $8.6\text{wt.\%MSM}$  制备的载药微球对细胞有明显的促增殖作用。表明该 PLA/MSM 载药微球具有良好的缓释特性及生物活性，可作为 MSM 的长效缓释制剂应用于骨性关节炎的治疗及骨、软骨组织工程。

第三部分 PLA/MSM 缓释微球在兔骨性关节炎中的应用研究。前期工作中，制备了 PLA/MSM 缓释微球，本研究探讨不同 MSM 含量对软骨修复的影响。首先建立兔膝关节骨性关节炎模型，建立模型后  $4 \text{ w}$  采用核磁观察关节软骨改变，确认造模成功，然后将不同 MSM 含量的载药微球局部注射入兔膝关节腔内，每周给药一次。给药后  $9 \text{ 周}$  时空气栓塞处死动物，局部解剖膝关节大体评估软骨改变情况及修复能力，采用 Makin 评分及 Ink 评分进行评估，收集关节液进行吉姆萨染色观察，及用 ELISA 试剂盒进行透明质酸、白介素-1、肿瘤坏死因子 $\alpha$  检测，并对滑膜组织及软骨组织进行 HE 染色观察。结果显示：MSM 浓度为  $0.9\text{wt.\%}$  时显示了较好的修复能力，能有效的治疗早期骨关节炎。

关键词：

二甲基砜，聚乳酸，缓释微球，膜乳化，骨关节炎，软骨缺损，修复

## **Abstract**

### **Preparation of Controlled-release PLA/MSM Microspheres and for the Therapy of Osteoarthritis**

In recent decades, the progress of the release microspheres to promote the development of cartilage tissue engineering. Preparation of microspheres materials for natural materials and synthetic polymer materials, including PLA, PLGA has good biocompatibility, degradation and absorption characteristics, is recognized as an excellent biodegradable polymer materials, environmental protection, tissue engineering, fracture fixation and controlled drug release and other fields are widely used [4-7]. Further, methyl sulfonyl methane (MSM) is an organic sulfide, and the necessary material for synthetic human collagen. Meanwhile, as a common health drugs, mainly used for the repair treatment of the skin, hair, bone, cartilage, and the like. Mainly used in the clinical treatment of osteoarthritis [8-10]. Therefore, the preparation of PLA / MSM drug-loaded microspheres has good release properties and biological activity, as long-acting release formulation of the MSM is used in the treatment of osteoarthritis and bone and cartilage tissue engineering research.

The prepared bioactive release microspheres, on the one hand, this study different polylactic acid content of blank microspheres prepared by membrane emulsification, and were characterized by scanning electron microscopy, and to explore the different surfactant the impact of the concentration on the structure of the microspheres, and stirring speed on the size of the microspheres. The present study also prepared sustained-release microspheres, cheap and easy to obtain a small molecule compounds having biological activity is introduced, dimethyl sulfone. To explore the effects of different membrane pore size and dimethyl sulfone content on microsphere size, morphology, drug loading, encapsulation efficiency and release behavior and cell proliferation. In addition, in recent years, local sustained release drug delivery system caused due to the unique properties of the scholars of considerable concern, this study will also release microspheres prepared for rabbit osteoarthritis treatment, to evaluate the biological effects. PLA / MSM release microspheres provide experimental evidence for the clinical application and development of bioactive cheap cartilage tissue engineering scaffolds.

The first part of the film emulsion prepared blank polylactic acid microspheres. Preliminary work in this experiment, completely independent exploration of various experimental parameters. Membrane emulsification were prepared by varying the content of

the polylactic acid blank microspheres, polylactic acid content of 1 wt%, 3 wt%, 5 wt%, respectively. The surface morphology and particle size of the microspheres using scanning electron microscopy. Different continuous phase flow rate, pressure and concentration of surfactant on the morphology and size of the microspheres. Continuous phase velocity respectively 300,500,700,900 rpm, and the surfactant concentration respectively of 0.5,1,2,4,6 g / l. The results show that: the smooth surface morphology of microspheres of uniform size distribution better. When the polylactic acid content of 3 wt.%, Shows a better morphology and distribution, the size of the microspheres with the continuous phase velocity increases and decreases, the pressure and the size of the aperture of the film, the greater the membrane pore pressure increases required large.

The second part of the polylactic acid (PLA) microspheres carrying Methylsulfonylmethane(MSM) were prepared by membrane emulsification in this paper. 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 ESEM, ICP-AES, in vitro culture of MC3T3-E1 cell and 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 $\mu$ m and a stirring speed of 500rpm were more uniform in size than others. When the concentration of MSM solution was 8.6wt.%, 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 10d. Cell experiments showed that cell proliferation of MC3T3-E1 was improved at 7d cell culture using MSM-loaded microspheres of 5. 1 $\mu$ m and 8.6wt.%. The research indicate 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.

The third part of the PLA / MSM release microspheres in rabbit osteoarthritis.

Preliminary work to prepare the PLA / MSM release microspheres of this study was to investigate the impact of different the MSM content on cartilage repair. First, the establishment of rabbit knee osteoarthritis models to establish model 4 w MRI observation of articular cartilage changes confirm the success of the model, and then the local MSM content loaded microspheres injected into the rabbit knee joint cavity week to drugs. Air embolism nine weeks after the administration of the animals were sacrificed, the general assessment of cartilage defects and repair capacity of local anatomical knee, using the Makin ratings and Ink scores assessed, collected synovial fluid for Giemsa staining and ELISA kit hyaluronic acid, interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$  detection, and synovial tissue and cartilage tissue HE staining. The results show that: the MSM content is 0.9wt.% better repair capacity, can effectively promote cartilage repair.

**Key words:**

MSM, PLA, sustained-release microspheres, membrane emulsification, osteoarthritis, cartilage defects, repair

## 目 录

第 1 章 绪 论 .....	1
1.1 前    言 .....	1
1.1.1 骨关节炎的分类和病因 .....	1
1.1.2 骨关节炎发病率及常见部位 .....	1
1.1.3 骨关节炎症状和体征 .....	2
1.1.4 骨关节炎诊断和诊断依据 .....	3
1.1.5 骨关节炎治疗 .....	3
1.2 缓释微球材料 .....	7
1.2.1 可降解高分子材料 .....	7
1.3 载药微球的制备工艺 .....	12
1.3.1 复乳法 .....	12
1.3.2 相分离法 .....	13
1.3.3 喷雾干燥法 .....	13
1.3.4 超临界流体技术 .....	13
1.3.5 膜乳化法 .....	14
1.4 二甲基砜的研究概况 .....	15
1.5 聚乳酸载体的性能 .....	16
1.5.1 载体的可降解性 .....	16
1.5.2 载体的靶向性 .....	16
1.5.3 载体的控释性 .....	16
1.6 研究内容、目标及创新 .....	17
1.6.1 研究内容 .....	17
1.6.2 课题的研究目标 .....	17
第 2 章 PLA 微球的制备和表征 .....	19

2.1 实验仪器和材料.....	19
2.1.1 主要仪器及试剂.....	19
2.1.2 主要溶液的配制.....	20
2.1.3 PLA 微球的制备过程 .....	20
2.1.4 不同 PLA 浓度制备微球 .....	20
2.1.5 不同搅拌转速制备微球 .....	21
2.1.6 不同 SDS 浓度制备微球 .....	21
2.1.7 扫描电镜观察 .....	21
2.1.8 统计与分析 .....	21
2.2 结果.....	22
2.2.1 场发射扫描电镜 (ESEM) 观察 .....	22
2.2.2 不同搅拌转速对微球的影响 .....	24
2.2.3 不同 SDS 浓度对微球的影响 .....	25
2.3 讨论.....	28
2.3.1 PLA 微球的制备 .....	28
2.3.2 PLA 含量对微球形貌及粒径大小的影响.....	28
2.3.3 表面活性剂对微球的影响， .....	29
2.3.4 搅拌转速对微球的影响 .....	29
2.4 小结.....	30
第 3 章 生物活性 MSM/ PLA 缓释微球的制备及表征 .....	31
3.1 材料与方法.....	31
3.1.1 主要药品、仪器 .....	32
3.1.2 MSM /PLA 缓释微球制备 .....	32
3.1.3 场发射扫描电镜观察 .....	33

3.1.4 载药量及包封率检测 .....	33
3.1.5 释放试验 .....	33
3.1.6 不同搅拌转速、MSM 浓度、对 PLA/MSM 微球形貌和粒径的影响 .....	33
3.1.7 PLA 降解研究 .....	34
3.1.8 微球内部结构观察 .....	34
3.1.9 细胞增殖实验 .....	34
3.1.10 统计学分析 .....	35
3.2 结果 .....	35
3.2.1 场发射扫描电镜 (ESEM) 观察 .....	35
3.2.2 载药量及包封率 .....	36
3.2.3 体外释放 .....	37
3.2.4 不同搅拌转速对 PLA/MSM 微球形貌和粒径的影响 .....	38
3.2.5 不同 MSM 浓度对 PLA/MSM 微球的影响 .....	39
3.2.6 PLA 降解研究 .....	40
3.2.7 微球内部结构 .....	40
3.2.8 细胞增殖实验 .....	41
3.3 讨论 .....	44
3.3.1 MSM /PLA 缓释微球的制备 .....	44
3.3.2 不同搅拌转速对载药微球的影响 .....	45
3.3.3 不同 MSM 含量制备的 PLA/MSM 微球 .....	45
3.3.4 MSM 含量对体外释放、细胞增殖的影响 .....	45
3.3.5 膜孔径大小对体外释放、细胞增殖的影响 .....	46
3.4 本章小结 .....	46
第 4 章 PLA /MSM 缓释微球的细胞增殖和骨关节炎研究 .....	47

4.1 材料和方法 .....	47
4.1.1 实验材料 .....	47
4.1.2 细胞提取、培养及细胞种植 .....	49
4.1.3 载药微球对兔软骨细胞增殖能力的影响 .....	50
4.1.4 动物实验 .....	50
4.1.5 MRI 评估 .....	51
4.1.6 标本采集及大体标本观察 .....	51
4.1.7 关节液中 IL-1、TNF- $\alpha$ 和 HA 检测: .....	52
4.1.8 关节液涂片吉姆萨染色及滑膜组织观察及评价.....	53
4.1.9 统计学处理 .....	53
4.2 结果 .....	54
4.2.1 软骨细胞培养 .....	54
4.2.2 细胞增殖实验 .....	54
4.2.3 动物实验结果 .....	55
4.3 讨论 .....	68
4.3.1 PLA/MSM 缓释微球对兔软骨细胞增殖的影响.....	68
4.3.2 兔膝关节骨性关节炎造模方法 .....	68
4.3.3 MRI 评估 .....	69
4.3.4 关节内炎性因子和透明质酸的表达 .....	70
4.4 小结 .....	70
第 5 章 课题的特色与创新 .....	71
参考文献 .....	72
作者简介及在学期间所取得的科研成果 .....	86
致 谢 .....	87