

中国生物医学工程进展

Advances
in Chinese Biomedical
Engineering

下册

张建保 卢虹冰 徐进 编

JIAOTONG
UNIVERSITY



西安交通大学出版社
XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY PRESS

中国生物医学工程进展

Advances in Chinese Biomedical Engineering

下册

张建保 卢虹冰 徐进 编

交通大学

JIAOTONG
UNIVERSITY



西安交通大学出版社
XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY PRESS

体外构建新型化妆品检测用皮肤 Inspectskin 的初步研究¹

程树军 焦红

广东出入境检验检疫技术中心 广州 510623

摘要: 探讨 ES 源表皮干细胞 (ESC) 与高分子材料构建人工皮肤 Inspectskin 的方法, 为化妆品皮肤毒性检验的替代模型奠定基础。将成纤维细胞放置于 3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸共聚物 (PHBV) 真皮支架内短暂体外培养, 表面再放置 ESC 细胞培养 5d, 观察其形态和进行免疫组化检测。结果表明成纤维细胞可在真皮支架内粘附, ESC 细胞可在支架表面增殖分化形成含基底层、棘层和角化层的复层表皮结构, 分化复层扁平上皮基底层呈 CK10、CK19 阳性。结果提示, 体外构建的 Inspectskin 替代皮肤是 ESC 细胞分化形成的角化复层表皮结构和 PHBV 真皮结构共同构成的全层皮肤模型。

关键词: 化妆品; 组织工程皮肤; PHBV

替代整体动物试验的人工皮肤模型越来越广泛的应用于皮肤毒性检验领域, 并已成为影响到化妆品进出口的技术壁垒。目前体外构建的皮肤多以角质形成细胞为种子细胞, 它只能分化为表皮, 不能分化为皮肤的附属结构^[1], 也不能用于慢性毒性的评价。我们先前的研究表明人羊膜可定向诱导小鼠或人的胚胎干细胞 (ES 细胞) 分化为表皮样干细胞, 后者于裸鼠皮下和腹腔微环境中均具有分化为表皮及皮肤附属结构的潜能^[2-4], 而且其与胶原海绵构建的皮肤在体外短暂培养仍保持未分化状态^[5]。但该细胞能否分化增殖构建组织工程皮肤。为此, 本研究以 ES 源表皮干细胞 (ESC) 为种子细胞与 PHBV 构建毒性检验替代皮肤 Inspectskin, 进行体外培养观察, 为下一步开发应用于化妆品皮肤刺激/腐蚀动物试验的替代模型奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 ES-E14 小鼠胚胎干细胞、人羊膜和 129 品系孕小鼠分别由中山大学附属第二医院、中山大学附属第一医院产房和中山大学实验动物中心提供。高糖 DMEM 培养基和小鼠白血病抑制因子 (LIF) 购自 GIBCO 公司。Hoechst 33342 为 SIGMA 公司产品。大鼠抗小鼠 $\beta 1$ 整合素为 Pharmingen 公司产品; 小鼠抗人 CK19, CK10 购自 DAKO 公司。生物素结合的羊抗大鼠 IgG, 生物素结合的大鼠抗小鼠 IgG, SABC 试剂盒, DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德公司。3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸共聚物 (poly[3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid], PHBV) 圆形支架由华南理工大学材料系制作, 孔隙率 >90%, 孔径 100-200 μm , 半径 0.5cm, 厚 0.2cm。经无水乙醇浸泡 1h, 紫外灯正反面各照射 2h 消毒。使用前经 DMEM 培养液浸泡过夜预湿。

1.2 ES 源表皮样干细胞的诱导和免疫组化 先将 ES 细胞进行核标记, 按文献方法^[4]将羊膜上皮面向上与小鼠 ES 细胞共培养, 诱导 ES 细胞定向分化为表皮样干细胞, 取诱导 4d 的表皮样干细胞克隆, 40g/L 多聚甲醛固定, 行 $\beta 1$ 整合素和 CK19 免疫组化染色。一抗工作浓度为 $\beta 1$ 整合素 1:50; 小鼠抗人 CK19 为 1:100, DAB 显色。将生长于 6 孔板的表皮样干细胞收集、离心, 以 0.125% 胰酶-EDTA 消化 1min, 使大部细胞克隆成为单个细胞, 调整细胞密度为 5×10^5 细胞/ cm^2 。

1.3 129 小鼠成纤维细胞的制备 取 17d 以后的 129 孕小鼠胚胎, 按文献方法^[6]制备成纤维细胞, 第 4 代以前的细胞可用于组织工程皮肤的构建。

1.4 ES 源表皮样干细胞维持培养基的配制 回收羊膜分泌液和成纤维细胞分泌液, 按一定比例与无 LIF 的 ES 细胞培养液混合, 再添加 EGF、BFGF 等生长因子构成表皮样干细胞维持培养基 (专利培养基)。

1.5 ES 细胞源的表皮样干细胞-PHBV-成纤维细胞组织工程皮肤的体外构建 将灭菌的 PHBV 平置于 6 孔板中, 加入 DMEM 培养液浸泡过夜, PBS 液冲洗, 取 1×10^5 细胞/ cm^2 密度的 129 胎鼠成纤维细胞, 以最小体积 (20 μl) 接种于膜表面, 置相对体积分数为 5% CO_2 37℃ 静置吸附 3-5h 后, 补充加

¹国家自然科学基金项目 (30670541); 广东省科技计划项目 (2005B32401010)

入 0.5ml DMEM 培养液, 12h 后加入足量的培养液继续培养。培养 2d 后, 吸出培养液, 翻转支架。取 5×10^5 细胞/cm² 密度的 ES 源表皮样干细胞, 以 20 μ l 的体积接种于支架表面。5% CO₂ 37℃ 静置吸附 3h 后, 更换指定的 ES 源表皮样干细胞维持培养基, 气-液界面继续培养 5d, 每 12h 半量换液。1.6 形态学观察 取体外培养 7 d 的人工皮肤, 40g/L 多聚甲醛固定。部分组织常规脱水, 石蜡包埋, HE 染色。部分组织冰冻切片, 检测 β 1 整合素、CK10 和 CK19 的表达。

2 结果

与羊膜共培养 4d 后, 贴附在羊膜表面的表皮样细胞呈集落生长, 集落呈大小不一的圆形或椭圆形, 边缘清晰 (图 1), 免疫组化检测, 呈 β 1 整合素强阳性 (图 2), CK19 阳性。PHBV 中的成纤维细胞粘附并增殖, 并有少量胶原纤维产生 (图 3)。气-液界面培养的 ES 源表皮干细胞与支架粘附牢固, 并在支架表面分化形成基底层、棘层和角化表皮层等结构, 分层排列, 表皮层核荧光标记明显 (图 4, 5)。免疫组化显示角化复层扁平上皮基底层细胞呈 CK10 阳性 (图 6)。

3 讨论

我们的结果表明经过体外短暂培养 7d 后, 成纤维细胞在 PHBV 支架内粘附、存活并开始增生和产生胶原纤维, ES 细胞源的表皮样干细胞也已粘附定居, 并开始分化、增殖形成复层表皮结构。替代皮肤中的种子细胞、成纤维细胞与支架结合共同构成了三维模型结构。平面培养的成纤维细胞和 ESC 细胞, 虽然增殖较快, 但它不能完全代表体内细胞的状态, 经三维培养的细胞虽然增殖速率稍慢, 但细胞活性良好, 具有组织样特性, 更好的模拟了细胞在体内的生理状态。

PHBV 是存在于微生物细胞中的天然脂肪族聚酯, 与生物组织相容性良好, 可用于神经修复导管和软骨组织培养支架材料^[7]。经过表面修饰的 PHBV 共聚物具有很好的高度相连的微细结构, 孔隙率达 0.85^[8]。我们研究证实 PHBV 在大鼠皮下组织相容性较好, 炎性反应轻微、降解速率适中, 皮下成纤维细胞在其上增殖速率快^[9]。但该材料用于毒理学检验用皮肤的构建还未见报道, 本研究证实, PHBV 可作为替代皮肤模型的真皮材料。

不同于烧伤、创伤等皮肤缺损病人的临床治疗, 本研究体外构建皮肤模型的目的是为了替代化妆品、化学品和药品的皮肤毒理学评价动物试验, 因此对皮肤模型的组织结构、表皮真皮连接、重要的分化标志、屏障功能以及稳定性、重复性等都有很高的要求。上述特性需要不断改进培养技术加以优化和提高, 本研究首次成功的将 ES 来源的 ESC 细胞用于替代皮肤模型的构建中, 为下一步进行分化表达增殖、细胞间相互作用等机理研究, 以及进行刺激/腐蚀评价试验、与正常组织的结构差异、与动物实验的可比性等应用研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Huang YC, Wang TW, Sun JS, et al. Cultured keratinocytes and dermal fibroblasts on a double-layer scaffold with bi-medium culture system. Biomed Sci Instrum, 2003, 39:500-5.
- [2] 张仁礼, 程树军, 李海标. 体外定向诱导胚胎干细胞分化为表皮样干细胞的研究. 解剖学报, 2004, 35 (1): 69-73.
- [3] 撒亚莲, 梁玉香, 李海标. hES 源的表皮样干细胞在裸鼠皮下分化潜能的初步研究. 中山大学学报, 2004, 25(1): 15-8
- [4] 程树军, 黄锦桃, 李海标. 胚胎干细胞源性表皮干细胞在腹腔微环境中分化潜能的初步研究. 中山大学学报(医学科学版), 2004, 25(2): 204-7
- [5] 程树军, 黄锦桃, 李海标. ES 细胞源表皮样干细胞与胶原海绵体外构建组织工程皮肤的研究. 中山大学学报(医学科学版), 2006, 27(1): 4-7
- [6] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [7] Kose GT, Kenar H, Hasirci N, et al. Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

matrices for bone tissue engineering. Biomaterials. 2003, 24(11): 1949-58.

[8] Hu SG, Jou CH, Yang MC. Protein adsorption, fibroblast activity and antibacterial properties of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) grafted with chitosan and chitoooligosaccharide after immobilized with hyaluronic acid. Biomaterials. 2003, 24(16):2685-93

[9] 程树军, 黄锦桃, 李卉等. 几种真皮支架的体内组织相容性比较. 中国比较医学杂志, 2006, 16(6):327-329

[10] McKenna D S, Samuels P, Zimmerman P D, et al. Interleukin-1 alpha, epidermal growth factor, and transforming growth factor-beta exhibit differential kinetics on endothelin-1 synthesis in amnion cells[J]. J Soc Gynecol Investig, 1998, 5(1):25-30

[11] Le Poole IC, Boyce ST. Keratinocytes suppress transforming growth factor-beta1 expression by fibroblasts in cultured skin substitutes[J]. Br J Dermatol, 1999, 140(3):409-16.

作者简介

程树军, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 体外毒理学与组织工程模型, 单位: 广东出入境检验检疫技术中心, 通讯地址: 广州市珠江新城花城大道 66 号

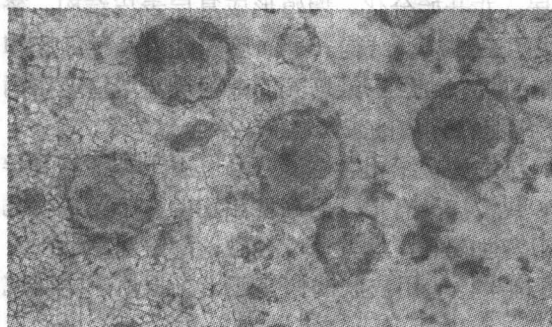


图1 ES源的表皮样干细胞克隆(倒置×200)

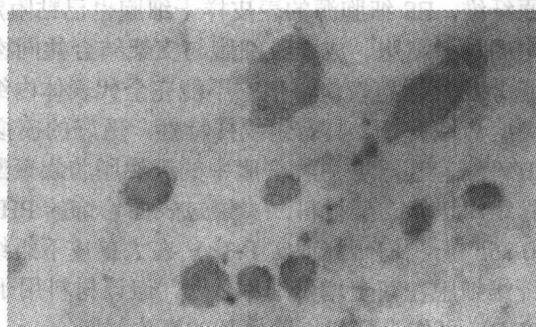


图2 ES源的表皮样干细胞β1整合素免疫组化(×200)

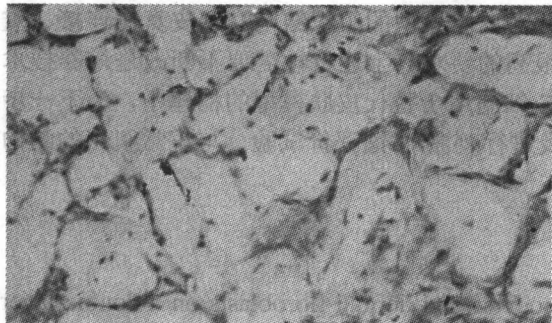


图3 培养2天的PHBV真皮结构(HE×100)

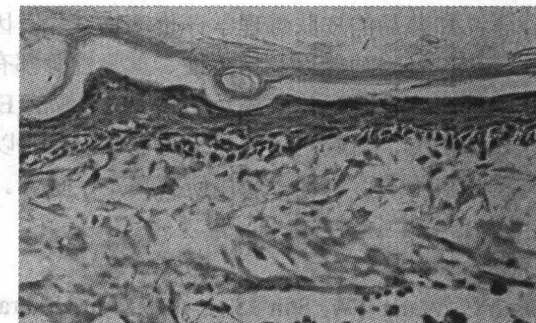


图4 培养7天的皮肤模型(HE×100)



图5 培养7天皮肤模型的核荧光标记(×100)

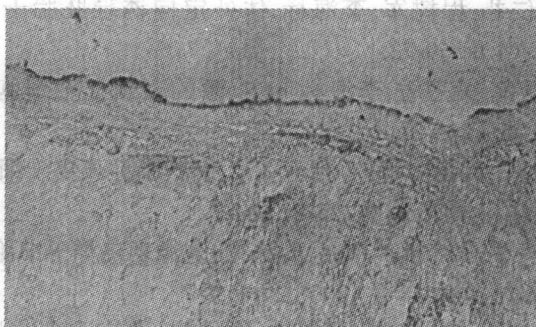


图6 培养7天皮肤模型的CK10免疫组化(×100)

碳化二亚胺改性脱细胞猪真皮基质的性能研究¹

但年华^{1,3} 但卫华^{1*} 曾睿³ 林海² 叶易春¹ 关林波¹ 汤全²

¹皮革化学与工程教育部重点实验室(四川大学), 四川成都 610065

²江阴奔翔生物科技有限公司, 江苏江阴 214400

³四川大学轻纺与食品学院, 四川成都 610065

摘要: 本文研究了 0mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、100mM 碳化二亚胺室温下改性猪脱细胞真皮基质的基本性能。研究结果表明: 随着 EDC 浓度的增高, 自由氨基含量递减, 收缩温度递增, 并趋于一定值, 产生了交联效应; 表面接触角基本增大, 吸水率和保水率趋于降低, 表明改性后亲水性能有所降低; 扫描电镜和孔率测定表明, 不同浓度改性对孔率未产生显著影响; 断裂伸长率降低, 材料脆性增强; 抗张强度先随浓度的增加而增加, 增至一定程度, 强度变化较小, 然后随浓度进一步升高而强度趋于降低。当浓度为 30mM 时具有最高的反应速率和较好的综合性能。

关键词: 碳化二亚胺; 脱细胞真皮基质; 改性; 性能

1 前言

脱细胞真皮基质 (acellular dermal matrix, ADM) 具有低抗原性、良好的生物相容性、可细胞化及血管化等性能, 可用作人工皮肤与组织工程支架材料^[1-5]。ADM 已除去大部分抗原成分, 经过冷冻干燥成为三维支架, 通过空间诱导和组织替代作用修复组织缺损。经过改性和交联可以进一步降低抗原性, 调节降解速率, 提高使用性能。1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 具有良好的水溶性, 改性时不引入外源物质, 且没有或仅有较少的细胞毒性^[6], 能提供有效交联, 显著增强 ADM 的抗降解能力。尽管有人认为也有潜在的钙化能力^[4], 但与戊二醛等材料相比, 仍是一种较理想的改性材料。

2 试验方法

(1) pADM 的交联: 将 1 克 pADM 浸入含 50mM MES (pH5.5) 的 40% (V:V) 的酒精溶液 20ml 中 30min, 加入 EDC 和 NHS 使两者浓度均为 (0、10、20、30、40、50、100mM), 在室温下交联 6 小时。再用 95% 的酒精清洗 20~30min 两次, PBS 清洗 24h 两次, 冷冻干燥后干燥器中保存。

(2) 自由氨基与改性指数的测定: 采用茚三酮比色法, 测定改性后各个样品的自由氨基含量, 计算出改性指数。改性指数=(改性前自由氨基含量-改性后自由氨基含量)/改性前自由氨基含量。

(3) 收缩温度的测定: 将试样制成 70mm×5mm, 收缩温度仪测定其发生收缩时的温度 (Ts)^[8]。

(4) 静态接触角的测定: 采取坐滴法, 以 6μl 蒸馏水的液滴滴于改性 pADM 上, 记录液滴与材料表面接触瞬间的图像, 测得其接触角, 每个样品选取 10 次测定的平均值。

(5) 机械强度的测试: 将材料用模具取样后空气调节 48h, 然后在拉力机上以 100mm/min 的拉伸速率测定材料的抗张强度和断裂伸长率^[8]。

(6) 表面形貌观察与孔隙率的测定: 通过扫描电镜观察材料的形貌。以甲苯为介质进行孔率的测定^[8]。将基质材料切片, 中性甲醛固定后, 碱性品红染色, 10 倍光镜下观察拍片, 采用 image-pro plus 图像分析软件进行分析, 计算出 10 张照片的平均孔率。

3 结果与讨论

2.1 自由氨基含量与 EDC 浓度的关系 EDC 是化学性质极为活泼的化合物, 能与 ADM 上的羧基反应生成 O-酰基脒中间体, NHS 能使这种不稳定的中间体变成稳定的中间体 NHS 酯, 再与 ADM 上的氨基反应形成酰胺键。表示如下:

¹ 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目资助 (2001AA326090)

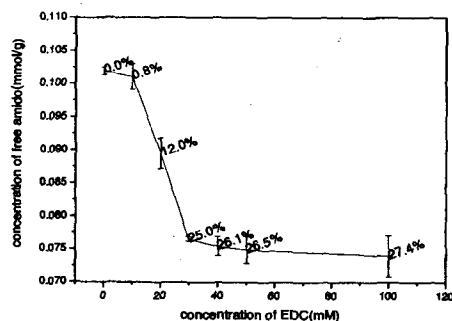
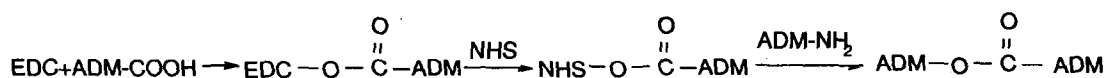


图1 自由氨基含量与 EDC 浓度的关系

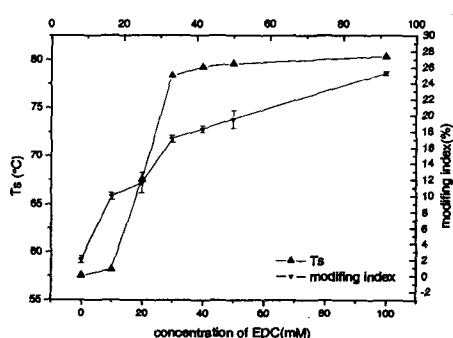


图2 收缩温度与 EDC 浓度的关系

由图 1 可见,随着 EDC 浓度的增加自由氨基的含量减少,改性指数增加。EDC 的量增加,反应向右进行,产物的量也增加, pADM 中的羧基与氨基生成酰胺键,从而自由氨基含量减少。当 EDC 浓度从 10mM 增到 30mM 时,改性指数由 0.8%增至 25.0%,自由氨基含量迅速降低,此后曲线逐渐趋于平缓。这是由于 pADM 中能羧基发生反应的自由氨基个数是有限的,它取决于两者的相对数量和两者间的距离,只有等量的且距离较近的自由羧基和氨基才能相互反应。EDC 浓度较低时,大部分均能参与反应,对应着曲线斜率较大的阶段,此时反应速率较高。当 EDC 过量到一定程度后,能够发生这种酰胺化反应的基团基本达到饱和,再增加的 EDC 较少促进酰胺化,反应速率降低。由于 ADM 中能参与反应的羧基和氨基数量是有限的,因而反应程度趋于一个极限值。此后虽继续增加 EDC 的浓度,自由氨基减少并不显著。

2.2 收缩温度与 EDC 浓度的关系 由图 2 可见,在湿热的条件下,随着 EDC 浓度从 0mM 增加到 100mM,改性 pADM 的收缩温度 (T_g) 从 59°C 明显上升到 79°C。从 0mM 到 30mM 收缩温度提高较迅速,40mM 以后趋于平缓,曲线形状与改性指数类似。从微观上讲,羧基与氨基反应生成酰胺键,加强了 ADM 之间的交联,使其结构更加稳固,宏观上表现为 EDC-pADM 具有更好的耐湿热能力。然而,氨基的减少量与 ΔT_g 之间并不存在简单的线性关系,也就是说同样的交联程度(表现为氨基的减少),并不能产生同样的 ΔT_g 。因为这与形成交联键基团的位点有关,不同的位点形成的酰胺键对 ADM 结构的稳定性贡献是不一样的。一般认为,短而强的键对 T_g 的提高是十分有利的^[9]。对于生成同样酰胺基的 EDC 改性来说,距离较近的羧基和氨基具有较高的反应性能,容易形成酰胺键且键长较短,结构度高。而相距较远的羧基和氨基形成酰胺键的机会相对较少,较难形成酰胺键。因此距离较近、较先形成的酰胺键对 ADM 的结构稳定性产生更重要的影响。受到 EDC 改性方法的限制,其 T_g 亦有一个极限值。

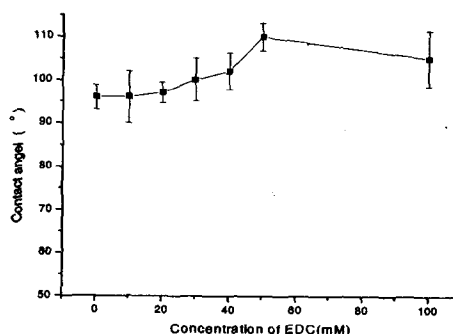


图3 接触角与 EDC 浓度的关系

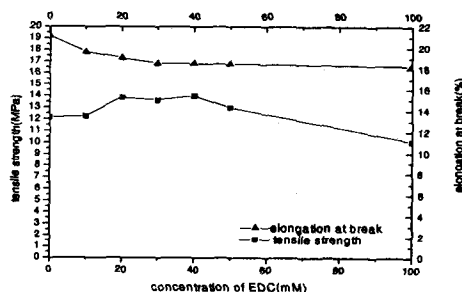


图4 EDC 浓度与抗张强度、断裂伸长率之间的关系

2.3 接触角与 EDC 浓度的关系 生物材料的表面状态对细胞的粘附起着很重要的作用。ADM 属于天然纤维编织而成,个体之间、部位之间具有较大的差异,加工方法等也对其均匀性产生较大影响。由图 3 可以看出,整体而言,接触角随着 EDC 浓度的增加而增加的趋势,在浓度较低时差别不大。由于 ADM 有一定的厚度,改性时试剂在渗透压的作用下由外向内扩散,同时伴随着化学反应。EDC 首先使 ADM 表面的活性基团反

应,此时 ADM 的浓度相对较高,极易使表面反应达到饱和。由于 EDC 是过量的,在不同浓度下,表面的羧基和氨基基本上均会反应完全。而内层的羧基和氨基则会因浓度的不同而存在一定差别。在水珠滴加的瞬间,由于 ADM 的亲水性而迅速渗入其中,由于内部的状态不同而产生少许差别。接触角的增加说明材料表面的亲水性降低,对材料性能产生了不利影响,因此有必要考虑其它方法改善表面性能,使其适应细胞的粘附和增殖的需要。

2.4 抗张强度、断裂伸长率与 EDC 浓度的关系 关于 EDC 改性材料的力学性能,意见尚不统一。有人认为^[10],EDC 改性能增加材料的抗张强度。因为改性形成了新的酰胺键,增加了材料内部的联结。也有人认为强度会降低^[6],一种解释为高浓度的 EDC 阻碍了材料的渗透,降低了改性效率;另一种解释为延伸率下降而导致的应力集中。由图 4 可以看出,EDC 浓度较低时(0~20mM),随着 EDC 浓度的增加,抗张强度增加,随后(20~40mM)基本保持相对恒定值,当浓度大于 40mM 时强度降低。从断裂伸长率可以看出,交联使断裂伸长率降低,延伸性减小,材料脆性增加。ADM 是由胶原纤维编织而成,具有各向异性的特点。当 EDC 浓度较低时,新键的生成对强度的影响占主导作用,改性增加了皮纤维之间的交联程度,使纤维纺织结构更加稳固,抵抗外力的能力增强,从而抗张强度增加。当浓度增加到一定程度之后强度反而下降,可以理解为在拉伸过程中,纤维缺乏足够的取向而产生局部应力集中现象,脆性增加对强度的影响占据主导地位而导致强度反而降低。

2.5 EDC-pADM 的表面形貌和孔率 由扫描电镜图可见,ADM 为天然胶原纤维编织的网状结构,纤维束彼此交错缠绕,纤维束之间存在大大小小的空隙,形状很不规则而难以测得其孔径。交联后的材料纤维束间有丝状物增加,但不显著。考虑到材料之间微观尺度上可能存在较大差别,这种差别不能断定为改性所致。一般而言,改性材料的孔率均会变小。光镜照片图像处理结果,0mM、30mM、50mM、100mM EDC 孔率分别为 36.44%、34.30%、36.49%、36.77%。甲苯法测得 0~100mM EDC-pADM 的孔率分别为 33%、36%、40%、36%、40%、36%、36%。其中 0mM 的孔率偏低,可能是由于没有 EDC 交联作用,在甲苯浸泡过程中发生了收缩。不同浓度 EDC 改性的 ADM 孔率差别不大,可能是因为近距离的交联为主要方式,从而未因 EDC 浓度的增加而产生明显收缩现象。该改性材料若作为支架孔率偏低,有必要在制作 ADM 过程中适当加强处理,以促进胶原纤维的分散,提高孔率。

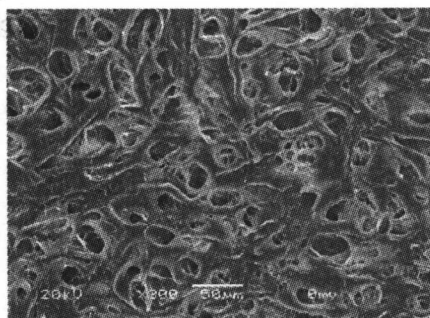


图 5 扫描电镜图 0mM

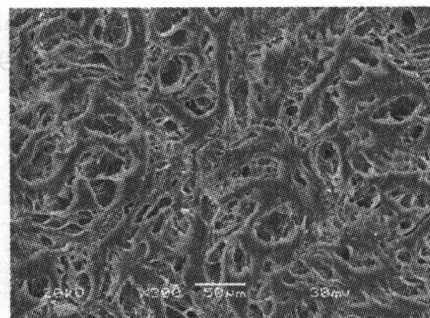


图 6 扫描电镜图 30mM

3 结论

通过对不同浓度下 EDC 改性 pADM 基本性能的比较发现,随着 EDC 浓度的增加,改性指数、收缩温度明显升高,说明胶原纤维间发生了交联反应。扫描电镜、光镜及孔率测定表明,不同浓度 EDC 改性后孔率差别不明显。吸水率、保水率的降低,接触角呈增大趋势,表明了 EDC 交联后的 ADM 亲水性

能有所降低,这对医用材料的应用产生不利影响。改性后材料断裂伸长率降低脆性增加,而抗张强度则是先增加后降低。无论是从亲水性和强度方面,还是毒性方面考虑,过多加入EDC是不可取的。本实验的结果表明,当浓度为30mM时具有最高的反应速率和较好的综合性能。由于EDC改性仅能产生短距离氨基与羧基间的酰胺化交联,因此改性程度有限。但是我们可以利用EDC活化羧基的特点,加入具有特定基团的物质,使交联能在远程氨基和羧基间发生。还有必要引入亲水性基团或进行表面处理,进一步改善EDC-ADM的亲水性能。

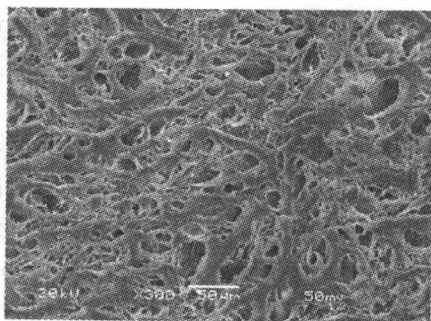


图7 扫描电镜图 50mM

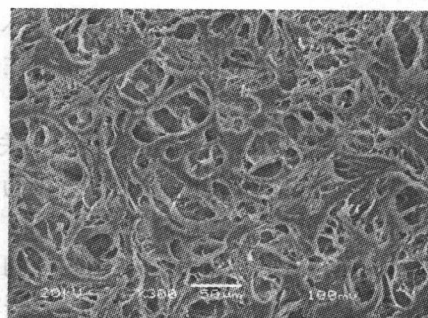


图8 扫描电镜图 100mM

参考文献

- [1] 张文斌.无细胞胶原基质的研究进展.国外医学生物医学工程分册,2004,27(2):127-130
- [2] 张立海,胡敏.异体脱细胞真皮基质的研究进展.国外医学生物医学工程分册,2005,28(4):241-245
- [3] 但卫华,李志强,廖隆理,等.皮胶原及其在组织工程中的应用.皮革化工,2004,21(5):24-29
- [4] 但卫华,王坤余,曾睿,等.胶原的医学应用及其发展前景.生物医学工程与临床,2004,8(1):45-48,52
- [5] Heather M.Powell,Steven T.Boyce. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. Biomaterials. 2006, 27: 5821-5827
- [6] Sung HW, Huang RN,Huang LL,et al.Feasibility study of a nature crosslinking reagent for biological tissue fixation[J].J Biomed Mater Res,1998,42(4):560-576
- [7] 但卫华,廖隆理,李志强,等.脱细胞真皮基质材料的制备方法.中国专利.ZL200410022506.9
- [8] 西北轻工业学院皮革教研室.皮革分析检测.中国轻工业出版社.1996
- [9] Anthony D Covington. The 1998 John Arthur Willson Memorial Lecture new tannages for the new millennium. JALCA, 1998, 93: 168-183
- [10] Zeeman R, Dijkstra PJ, Van Wachem PB, et al. Successive epoxy and carbodiimide crosslinking of dermal sheep collagen. Biomaterials, 1999, 20: 921-931



图9 扫描电镜图 50mM



图10 扫描电镜图 100mM

三元共聚磁性高分子微球的合成及表征

郭娜 潘兴华 吴道澄

西安交通大学生物信息中心, 陕西西安 710049

摘要: 本文引入超声预处理的工艺, 用表面活性剂聚乙二醇对 Fe_3O_4 磁性纳米粒子进行表面改性, 并预先吸附了引发剂(KPS)和单体苯乙烯, 采用改进的乳液聚合法制备了以苯乙烯、丙烯酰胺、丙烯酸三元共聚物为高分子外壳的微米级磁性高分子微球, 并用光学显微镜、扫描探针显微镜 (SPM)、傅立叶变换红外光谱仪 (FTIR)、振动样品磁强计 (VSM) 以及热重分析仪 (TGA) 对磁性微球的性能进行了表征。结果显示: 该法制备的磁性高分子微球形状规则, 单分散性好, 粒径范围为 $1\sim 6\mu\text{m}$, 平均粒径约 $3.7\mu\text{m}$; 磁响应性好, 饱和磁化强度为 11.962 emu/g , 磁含量高, 约 21% ; 表面具有高反应活性的酰胺基和羧基。

关键词: 磁性高分子微球; 三元共聚; 乳液聚合

1 引言

磁性高分子微球 (Magnetic Polymer Microspheres, PMMS) 作为一种新型的功能高分子材料, 是指通过适当的方法使有机高分子与无机磁性物质结合起来形成的具有一定磁性及特殊结构的微球。因其同时兼具普通高分子微球的众多特性和磁响应性, 在细胞学和生物工程、生物医学工程、分离工程、临床医学以及生物化学等诸多领域显示出广阔的应用前景, 而受到国内外学者的关注。在实际应用中, 磁性高分子微球需要与细胞、蛋白质、抗原、抗体、核酸等生物物质偶联, 因此需要对磁球进行表面修饰, 这必然增加操作的复杂度, 费时费力; 通过功能单体的共聚可以直接得到表面带有功能基的磁性高分子微球, 且经活化后可以直接与生物物质偶联, 此法操作简单, 因而成为研究的热点。目前, 已有表面带有羧基^[1]、羟基^[2]、醛基^[3]、氨基^[4]等功能基的磁性微球的相关报道。羧基容易活化, 但是羧基与生物物质的结合率太低; 羟基与生物物质偶联则需用交联剂, 操作复杂; 醛基反应活性高, 但是很不稳定。根据我们以前的研究^[5,6], 氨基具有反应活性高, 稳定且与生物物质的结合率高, 操作简单、快速等优点, 因此我们在三元共聚高分子微球的基础上, 制备了以 Fe_3O_4 磁性纳米粒子为核, 苯乙烯、丙烯酰胺、丙烯酸三元共聚物为壳的带有酰胺基和羧基的磁性高分子微球。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器 Fe_3O_4 粉末 (20nm, 油酸处理), 武汉珈源量子点公司提供; 苯乙烯 (St), CP, 上海国药集团化学试剂有限公司, 减压蒸馏除去阻聚剂; 丙烯酰胺 (AAM), AR, 进口分装 Amresco; 丙烯酸 (AA), AR, 天津化学试剂三厂; 过硫酸钾 (KPS), AR, 西安化学试剂厂; 聚乙二醇 4000 (PEG4000), LR, 进口分装 T.T.R.C; 十二烷基硫酸钠 (SDS), AR, Xiamen Sanland Chemicals Company Limited; 无水乙醇, AR, 西安三浦精细化工厂; NaCl, AR, 开封东大化工有限公司试剂厂; NaOH, AR, 天津市恒兴化学试剂制造; 所用水均为二次重蒸水。

超声清洗器 (KS-3200DE, 江苏昆山); 光学显微镜 (OLYMPUS BX40, 日本); 扫描探针显微镜 (NTEGRA Prima, 俄罗斯); 傅立叶变换红外光谱仪 (IRpresitge-21, 日本); 振动样品磁强计 (Lakeshaore 7307, 美国); 热重分析仪 (TGA/SDTA 851, 瑞士)。

2.2 磁性高分子微球的合成

2.2.1 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的预处理 将 0.2g Fe_3O_4 粉末同一定浓度的聚乙二醇水溶液混合, 超声分散 30min 后, 加入 4ml KPS 水溶液 (5%), 超声分散 5min, 放置 20h 左右, 加入几滴 1% 的 SDS 以及 St 的乙醇溶液, 超声至均匀, 备用。

2.2.2 磁性高分子微球的制备 按一定比例将乙醇和水加入三颈瓶中, 预热到 70°C , 通氮气, 在搅拌下加入 1g AAM、 0.1g KPS 和几滴 1% 的 SDS, 20min 后, 加入上述预处理过的混合液以及 0.2g NaCl,

搅拌速度 300rpm。30min 后, 加入 0.5gAA, 用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 溶液调节 pH 值至碱性, 保持 70°C 反应 10h。产物为棕黄色乳液, 磁分离除去上清液, 并用乙醇和二次蒸馏水反复洗涤, 用浓盐酸浸泡 24h 以除去未包裹的 Fe_3O_4 , 再用二次蒸馏水洗至中性后, 干燥, 贮存。

2.3 磁性高分子微球的表征

2.3.1 表面形态及其粒径的测定 用光学显微镜和 SPM 观察微球的表面形态及其分布并测定粒径大小。将磁性高分子微球的悬浮液滴在玻片上, 晾干后, 用光学显微镜及视频采集系统观察并拍照; 取适量干燥的磁球, 采用无水乙醇为溶剂, 用手摇匀, 取 $10\mu\text{L}$ 滴于云母表面, 室温干燥后, 用 SPM 观察。

2.3.2 结构及其表面功能基团的测定 用 FTIR (KBr 压片) 来表征磁性高分子微球的结构及其表面功能基团, 并测定了 Fe_3O_4 磁性纳米粒子以及 PSt/AAM/AA 高分子微球结构, 作为对照。

2.3.3 磁有机高分子 3 磁性能的测定 磁性高分子微球的磁化强度用振动样品磁强计 (VSM) 进行测试, 磁场强度变化为 $-10\text{KG} \sim 10\text{KG}$; 并用热重分析仪 (TGA) 测定了磁球中 Fe_3O_4 的含量, 在氮气气氛下, 从 25°C 升温到 700°C , 控制升温速度为 $10^\circ\text{C}/\text{min}$, 气流速度为 $30\text{ml}/\text{min}$ 。

3 结果与讨论

3.1 磁性高分子微球的形态、粒径大小及其分布 图 1 为磁球的光学显微镜照片 (左边) 以及 SPM 拍的俯视图 (右边), 从图中可以看出, 磁球形状基本规则, 呈球形, 表面光滑, 单分散性好。根据 SPM 测得的数据知, 粒径分布为 $1 \sim 6\mu\text{m}$, 平均粒径约 $3.7\mu\text{m}$ 。

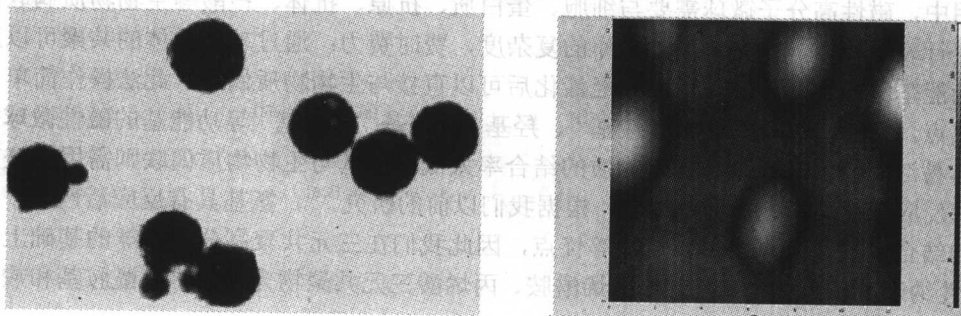


Fig. 1. Optical micrograph and SPM photograph of magnetic polymer microspheres

3.2 磁性高分子微球的结构及其表面功能基团 从图 2 (b) 中可以看到, 磁性高分子微球在 540cm^{-1} 处有一个吸收峰, 说明微球中含 Fe-O 键, 证明 Fe_3O_4 的存在, 而图 2 (a) 中则没有 Fe-O 的吸收峰, 图 2 (c) 为 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的 IR 谱图, 图中在 561cm^{-1} 处有一个强的 Fe-O 吸收峰。比较图 2 (a) 和图 2 (b), 可以看到, PSt/AAM/AA 磁性高分子微球除了在 540cm^{-1} 处有一个 Fe-O 吸收峰外, 其它峰的位置和强度与 PSt/AAM/AA 高分子微球基本相似, 说明磁球壳层的结构与高分子微球相同, 在 698cm^{-1} 和 756cm^{-1} 处有两个大的吸收峰, 这是苯环的 C-H 面外振动峰, 同时在 1450cm^{-1} 和 1490cm^{-1} 处也有较大的吸收峰, 这是苯环的骨架振动吸收峰, 在 2850cm^{-1} 和 2920cm^{-1} 处的吸收峰为饱和 C-H 的伸缩振动吸收峰, 在 3024cm^{-1} 、 3049cm^{-1} 和 3059cm^{-1} 处的吸收峰为不饱和 C-H 的伸缩振动吸收峰, 1727cm^{-1} , 1871cm^{-1} , 和 1938cm^{-1} 范围内一系列较弱的吸收峰为苯环 C-H 键弯曲振动的倍频和组频峰, 这都证明了苯乙烯的存在; 从图中还可以看到, 在 3462cm^{-1} 处有一个宽化的强吸收峰, 为 O-H 和 N-H 的重叠伸缩振动吸收峰, 1652cm^{-1} 处的强吸收峰为 C=O 的振动吸收峰, 表明羧基和酰胺基的存在。另外, Fe_3O_4 磁性纳米粒子的谱图中, 在 3462cm^{-1} 处也有一个宽化的吸收峰, 应该是表面吸附水的 O-H 伸缩振动吸收峰, 可能是由样品中所含水分引起的。

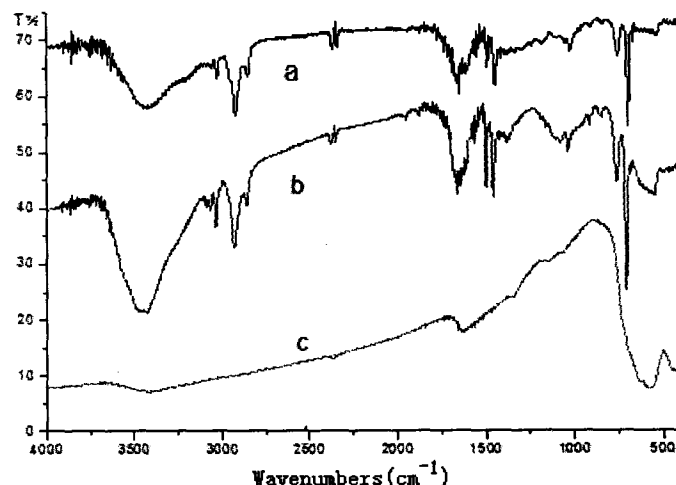


Fig. 2. FTIR spectra of (a) PSt/AAM/AA microspheres, (b) PSt/AAM/AA magnetic microspheres and (c) Fe_3O_4 magnetic nanoparticles

3.3 磁性高分子微球的磁性能

3.3.1 磁化强度 图3为 Fe_3O_4 磁性纳米粒子和磁性高分子微球的磁滞回线,从图3(a)中可以看到,磁性高分子微球的饱和磁化强度(M_s)为11.962 emu/g,剩余磁化强度和矫顽力接近于零,表明磁球具有较强的磁响应性和较好的超顺磁性;图3(b)中显示, Fe_3O_4 磁性纳米粒子的饱和磁化强度为50.391 emu/g,剩余磁化强度和矫顽力也接近于零,具有较好的超顺磁性。

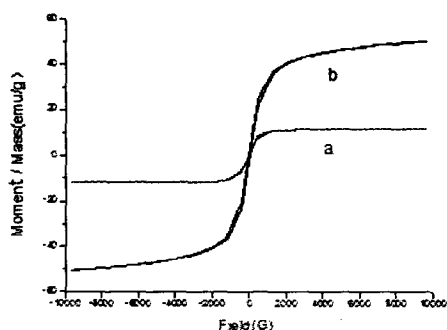


Fig. 3. Hysteresis loops of (a) PSt/AAM/AA magnetic microspheres and (b) Fe_3O_4 magnetic nanoparticles

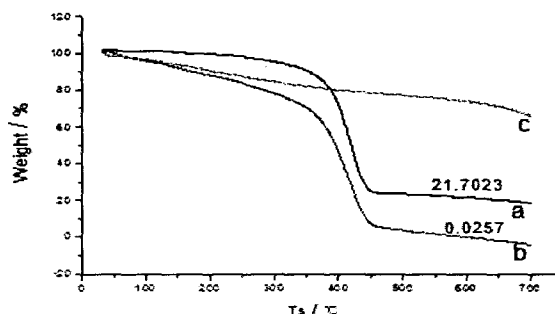


Fig. 4. TEG curves of (a) PSt/AAM/AA magnetic microspheres, (b) PSt/AAM/AA microspheres and (c) Fe_3O_4 magnetic nanoparticles

3.3.2 磁含量 从图4中的热失重曲线可以看到,曲线a与曲线b形状基本相同,其中350°C到450°C之间明显的失重段应该是PSt/AAM/AA共聚物热分解的结果,在599°C时,PSt/AAM/AA高分子微球的失重量已接近100%,而磁性高分子微球的失重量为79%,600°C以后曲线基本平稳;曲线c为 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的热失重曲线,可见失重量很小,理论上 Fe_3O_4 在室温到700°C范围内不会热分解,其中的失重量可能是由于样品中的水分造成的。根据上述分析可知,磁性高分子微球中的磁含量约为21%。

4 结论

本文以简化工艺,降低成本为原则,引入超声预处理的工艺,利用表面活性剂聚乙二醇直接对 Fe_3O_4 粉末进行表面改性;并利用超声作用,在 Fe_3O_4 磁性纳米粒子表面预先吸附了引发剂(KPS)和单体苯乙烯,从而确保单体的聚合反应在磁性粒子表面进行;采用改进的乳液聚合法成功制备了以 Fe_3O_4 磁性纳米粒子为核,苯乙烯、丙烯酰胺、丙烯酸三元共聚物为壳的微米级磁性高分子微球,并

对微球的表面形态、粒径大小及其分布、表面基团以及磁性能进行了表征。结果表明：此法制备的磁性高分子微球形状规则、单分散性好、粒径范围为 $1\sim 6\mu\text{m}$ ，具有很强的磁响应性和很高的磁含量，红外光谱显示表面具有活性基团酰胺基和羧基。

根据我们以前的研究^[5,6]，通过两步简单的化学反应即可在微球表面衍生出可与蛋白质迅速反应的叠氮羰基，此法简单、快速、结合蛋白率高。经初步的研究表明，该磁性高分子微球除了具有很好的分离提纯功能外，还具有磁共振造影的功能，因此，接下来我们将进一步研究磁性高分子微球在磁共振造影方面的应用，从而提高磁性高分子微球的应用价值。

参考文献

- [1] Gang Xie, Qiuyu Zhang, Zhengping Luo et al. Journal of Applied Polymer Science, 2003, 87: 1733~1738.
- [2] 李孝红, 丁小斌, 孙宗华. 功能高分子学报, 1995, 18(1): 73~78.
- [3] 李孝红, 孙宗华. 离子交换与吸附, 1996, 12(6): 486~492.
- [4] 刘学涌, 常昆, 王晓川等. 高分子学报. 2005, 4: 519~523.
- [5] 赵小宁, 刘有初, 吴道澄. 生物医学工程学杂志. 1994, 11(3): 247~251.
- [6] 吴道澄, 田小东, 刘有初等. 生物医学工程学杂志. 1995, 12(2): 101~105.

作者简介

郭娜, 女, 硕士, 研究方向: 磁性材料的合成及应用, Email: guona@stu.xjtu.edu.cn.

通讯作者: 吴道澄, 男, 教授, 西安交通大学, Email: wudaocheng@mail.xjtu.edu.cn.

Novel Delivery System Based on Sanguis Draxonis: Preparation and characteristics of the Insulin-loaded Sanguis Draxonis Nanocapsules

Zhenqing HOU Xinjuan WANG Shefang YE Qiqing ZHANG

Research center of biomedical engineering, Medical college, Xiamen university, 361005, P. R. China

Abstracts: The Sanguis Draxonis (SD), a traditional Chinese herb, have been proved to be a good material for oral insulin delivery system, the insulin-loaded Sanguis Draxonis nanocapsules (ISDN) elicits a long-term hypoglycemic effect significantly after oral administration in STZ-induced diabetic rats; however, the preparation of ISDN remains to be further improved. This study was performed to investigate the characteristics of ISDN obtained by the modification of deposit technique, the new method is avoid of costly step of ultracentrifugation via using the β -Cyclodextrin as excipient and dispersant. Results show that the average diameter and insulin-loading efficiency of ISDN were 134 ± 21 nm and 74.6%, respectively. ISDN demonstrated gastroresistance and disintegration in the intestinal fluid at 37°C. The in vitro ISDN exhibited a controlled insulin release for 2 days. In conclusion, ISDN prepared by our modified method had well defined characteristics and the new method is very easy and less costly way for the large scale of ISDN preparation.

Key words: drug delivery, Sanguis Draxonis, insulin, nanocapsules, preparation

1. Introduction:

A successful formulation for oral delivery of insulin would have to overcome two main barriers against the drugs: the enzymatic barrier of the gastrointestinal tract and the physical barrier made of the intestinal epithelium. For such a reason, the design of drug delivery systems, which allow for overcoming these problems, represents one of the most innovative aspects of modern pharmaceutical technology. In particular, micro- and nano-particles have been found to succeed in preparation of sustained drug delivery systems^[1, 2], many biomaterials have been evaluated for the development of insulin carrier for oral administration^[3-6].

In our previous work, we have developed an oral insulin formulation based on the Sanguis Draxonis (SD), a traditional Chinese herb also called Dragon's Blood or Resina Draconis processed from the resinous extract of *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S.C. Chen (Agavaceae) in China. we investigated the preparation of insulin loaded SD nanocapsules (ISDN) by deposit technique^[7], ISDN are shown to be promising candidates for oral insulin administration, the effectiveness of this system in delivering insulin was evident from the observed hypoglycemic effect upon oral administration of ISDN in the diabetic rat studies. The blood glucose levels in diabetic rats were lowered by up to 47.3% for more than 2-4 days. However, the process of preparation of ISDN include ultracentrifugation step, which often results in the adhering of ISDN, the aggregation of ISDN is difficult to redisperse in aqueous solution, because the outside shell of nanocapsules is made of SD, which shows a little bit of soft and sticky in the fresh prepared ISDN.

Aimed at resolving this problem, we select the β -Cyclodextrin as dispersant and excipient in order to prevent the aggregation of ISDN from each other. β -Cyclodextrins are torus-shaped cyclic oligosaccharides made up of several α -1,4-linked D-glucopyranose units. These molecules are capable of forming inclusion complexes resulting in increased aqueous solubility, enhanced drug stability, and masking of unwanted side effects. β -Cyclodextrins are also reported to convey controlled release properties to certain active

ingredients^[8].

2. Materials and Method

The Sanguis Draxonis (SD) was obtained from Xia'men Guanghua pharmaceutical company. Dextran-70 was from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Short-acting porcine insulin (26.8 IU/mg) was from Xuzhou biochemical plant (Xuzhou, China). β -Cyclodextrin purchased from Xi'an HongChang Pharmaceuticals Co., Ltd. All other chemical substances are of analytical grade.

ISDN was prepared by modification of deposition technique. In brief, SD powder (3 g) was dissolved in 100-ml ethanol (95%), and then filtered. Such SD ethanol solution (6 ml) was added slowly to a 100-ml milk-white colloid suspension (pH 5.6), a mixture of insoluble insulin nanoparticles (4 IU/ml), Dextran-70 (0.25% w/v) and Tween-20 (0.25% v/v). The gentle agitation was kept under room temperature and aseptic condition for 30 min followed by addition of 20% (w/v) of β -Cyclodextrin and further stirring for 5 min. The mixture froze at -20°C and lyophilized, then oral formulation of ISDN was obtained. Insulin-free SD particles were prepared in the same way in the absence of insulin and used as control.

The quantitative determination of insulin in ISDN was performed by reversed phase HPLC method. Chromatographic conditions included phenomenex C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) and mobile phase consisting of a mixture of 0.1 mol/l trifluoroacetic acid (pH 3.0) and acetonitrile in the ratio of 30:70. The detection wavelength was 210 nm at a flow rate of 1 ml/min. The temperature of column was 30°C. A standard curve was constructed for insulin in the concentration range of 5–200 μ g/ml. A good linear relationship was $Y = 19400X - 61400$ with correlation coefficient ($r = 0.9999$). The standard curve was used for estimating the content of insulin in the ISDN and the dissolution medium.

The insulin encapsulation efficiency was calculated as follows:

$$\text{Insulin encapsulation efficiency} = X_t/X_i \times 100\%$$

Where X_t is the total amount of insulin capsulated in nanocapsules; X_i represents the initial amount of insulin added in the suspension.

The average size of ISDN (sample is the ISDN solution before adding the β -Cyclodextrin) was estimated by using a laser particle size analyzer (LS-POP III). The morphology of the nanocapsules was observed by transmission electron microscopy (GEM-2000EX, Japan) after being stained with 3% (w/v) of the phosphotungstic acid.

The in vitro release of insulin from ISDN was carried out by using a shaker under physiologic conditions at 37°C with a shake frequency of 50 times/min. The lyophilized ISDN powder (1 g) was transferred to 100 ml volumetric flask containing 50 ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4). At appropriate time intervals (1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 96 h), the sample in 1 ml of aliquots were withdrawn, the flask was replenished with 1 ml of fresh aqueous phosphate buffer, each sample was ultracentrifugated at 20 000 rpm for 60 min. The supernatant was separated and assayed by HPLC for determining the amount of insulin released from ISDN. The following procedure was carried out according to the method mentioned above.

The stability of ISDN in simulated intestinal fluids was appraised by the amount of undegraded insulin in nanocapsules after 30-min incubation of ISDN in simulated intestinal fluids at 37°C. Three simulated intestinal fluids were prepared as follows: (i) pepsin (10 BAEE.U/ml) in 0.05 M glycine buffer, pH 1.4; (ii) trypsin (7500 BAEE.U/ml) in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.9; (iii) α -chymotrypsin (26 BAEE.U/ml) in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.9. Standard ISDN powder was dispersed in an equal volume of each enzymatic solution and incubated at 37°C for 30 min. The incubation mediums contained 15 IU/ml of insulin. The amount of undegraded insulin in nanocapsules was determined by HPLC method as previously mentioned. The result, the remaining amount of undegraded insulin, was expressed as a percentage of the

initial amount of insulin in nanocapsules and calculated as follow:

$$\text{Percentage of the initial amount of insulin} = Y_u/Y_i \times 100\%$$

Where Y_i represents an initial amount of insulin in nanocapsules; Y_u is the remaining amount of undegraded insulin in nanocapsules.

The free insulin mixed with insulin-free SD particles, considered as control, was dispersed in the same volume of each enzymatic solution at an insulin concentration of 15 IU/ml in the same experimental conditions as mentioned above.

The results were expressed as mean $\pm$ S.E.M. and were analyzed by Student's t-test or Dunnet's multiple comparison tests. Differences between groups were considered significant when $P < 0.05$.

3. Result and discussion

The nanocapsules were generally spherical in shape. The nanocapsule consisted of two components: the outside shell of nanocapsule and the sphere-like core (Figure was not shown), similar to those obtained by our primary method. The size measurements demonstrated a normal distribution profile characterized by a moderate size distribution. The average size of ISDN was 134 ± 21 nm with a range of 62 ± 13 nm as compared to 184 ± 24 nm with range of 69.6 ± 16 nm of ISDN obtained with our previous method ($p = 0.03$ $n = 3$). The insulin encapsulation efficiency was $74.6 \pm 10.8\%$ as compared to $69.6 \pm 5.6\%$ of results of our previous work ($p = 0.08$ $n = 3$), this fact could be explained assuming that the majority of ISDN prepared by the new method were single dispersed spheres, instead of being conglomerated together in the form of aggregation, because the new method is avoid of using ultracentrifugation step. Besides, the new method also omitted the step in which the deposits from ultracentrifugation were washed with an acidic aqueous solution (pH 3.0) to get rid of insulin nanoparticles, because the SD was added enough in our new method to encapsulate insulin nanoparticle completely.

The stability of ISDN was shown that free insulin mixed with insulin-free SD particles was markedly degraded after incubation with proteolytic enzymes for 30 min at 37°C . However, when ISDN powder was incubated in three enzymic solutions, majority (86.3-92.4%) of the initial amount of insulin was preserved ($n = 3$), which slightly higher the previously reported results, but no significant different indicating that ISDN was gastroresistance and disintegration in the intestinal fluid at 37°C and the insulin must be located in the core of ISDN and protected by the outside SD shell.

The release profile was characterized by a low burst release, with 4% released within 1 h, 10% within 2 h, 42% within 24 h, 84% within 48 h and near zero order drug release after a lag of 2-3 days ($n = 3$). The release is somewhat biphasic with an initial burst effect, followed by a subsequent slower release. The encapsulation efficiency of insulin was 74.6%, but the raw suspension was used without further purification for preparation of ISDN formulation. This means that the ISDN formulation contained 25.4% free insulin. The fast release during initial stages is attributed to free insulin attached to the surface of ISDN and the β -Cyclodextrin, which was different from the release characteristics of ISDN (no initial burst release) prepared by our previous method, this might be due to the reason that free insulin attached to the ISDN surface was washed away with an acidic aqueous solution (pH 3.0). Both release profiles of ISDN before and after storage did not show much variation suggesting the physical stability of the ISDN (data was not shown here).

4. Conclusion

In conclusion, the results of this work suggest that ISDN prepared by our modified method had well defined characteristics and the new method is an easy and fast way to improve the aggregation of ISDN,

using the β -Cyclodextrin as dispersant and excipient. The main advantage of using β -Cyclodextrin is capable of absorbing residual solvents concluding surfactant, so the lyophilization of ISDN solution was carried out very easily. Moreover, in the preparation of ISDN the ultracentrifugation step is not necessary, thus the process is less consuming in terms of time and energy compared to our previous method.

Acknowledgements

This work was supported by the Nature Science Foundation of Fujian Province (2006J0123) and the Xiamen University talent startup Project: Z03108

References

- [1]. Cleland J.L., Daugherty A., Mersny R., Curr. Opin. Biotechnol., **12**, 212–219 (2001).
- [2]. Okada H., Toguchi H., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., **12**, 1–32 (1995).
- [3]. Mariko M., Takahiro G., Nicholas, et al., Journal of Controlled Release, **97**, 115–124 (2004).
- [4]. Lopez J.E., Peppas N.A., Drug Dev. Ind. Pharm., **30**, 497–504 (2004).
- [5]. Musumeci T., Ventur C.A., Giannone I., et al., International Journal of Pharmaceutics, **325**, 172–179 (2006).
- [6]. Challa, R., Alka, A., Javed, A., Khar, R.K., AAPS Pharm. Sci. Tech., **6**, 43–46 (2005).
- [7]. Hou Z.Q., Zhang Z.X., Zhang C.X., et al., Journal of Controlled Release, **97**, 467–475 (2004).
- [8]. Barbara H., Thomas G., Armin M., et al., International Journal of Pharmaceutics, **137**, 103–110 (1996).

Corresponding author

Qiqing ZHANG : Tel.: 022-27451498; Fax: 022-87890868; E-mail address: zhangqiq@xmu.edu.cn