

天然药物材料白及胶制备生物支架材料的实验研究

侯绪浩¹, 刘学蔚², 彭凤梅³, 刘逢芹^{3*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 山东大学口腔医学院, 山东 济南 250012

3. 山东省千佛山医院, 山东 济南 250014

摘要: **目的** 探索采用中药天然成分制备多孔支架材料用于骨缺损修复生物材料的可行性, 考察用于骨骼组织修复的白及胶支架材料的制备方法及其性能。 **方法** 从中药材白及中提取白及胶并精制, 然后进行醛基化反应, 与其他赋形剂共混、交联, 冷冻干燥得到支架材料。 **结果** 利用水提醇沉法及酶法精制纯化能得到较高纯度的白及胶; 经氧化后发生 Schiff 碱缩合反应, 形成良好的网状结构, 冷冻干燥制得多孔支架材料。 **结论** 以白及胶为主要原料制备的生物支架材料, 各项性能表征符合多孔支架材料要求。

关键词: 白及胶; 醛基化; 交联; 冷冻干燥; 生物材料

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)16-2230-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.16.007

Study on preparation of natural medicine gum-bletilla scaffolds

HOU Xu-hao¹, LIU Xue-wei², PENG Feng-mei³, LIU Feng-qin³

1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China

3. Qianfoshan Hospital, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To explore the feasibility of natural constituents in Chinese materia medica used for the preparation of porous scaffold material as bone repair biomaterials and for the tissue regeneration and to study the preparation method and the properties of gum-bletilla scaffolds. **Methods** Gum-bletilla was extracted from *Bletilla Rhizoma*, then purified, hydroformylated, mixed with other excipient, cross-linked, and lyophilized to get scaffolds. **Results** High-purity standard gum-bletilla could be obtained by water extraction, alcohol-precipitation, and enzymatic purification. After oxidation, the gum-bletilla had Schiff base condensation to form reticular conformation, which was made into porous materials by freeze-drying. **Conclusion** The scaffolds could be made of gum bletilla, which conforms to the requirements.

Key words: gum-bletilla; hydroformylation; cross-linking; freeze-drying; biomaterials

医学组织工程的技术关键是建立由细胞和生物材料构成的三维空间复合体, 为细胞的寄宿、生长、繁衍、新陈代谢、新组织的形成提供支持。理想的生物细胞支架材料应具有良好的生物相容性和可降解性, 并最终被机体代谢或吸收, 且支架的降解产物不会对细胞繁殖产生不利的影 响, 其降解速度与细胞的增殖速度相匹配; 材料本身所保留的成分具有引导或诱导组织再生的能力^[1]。

白及 *Bletillae Rhizoma* 为兰科植物的块茎, 性微寒, 味苦、甘、涩, 有收敛止血、消肿生肌的功效^[2]。现代药理研究表明白及块茎中含有大量的白及多糖, 即白及胶, 其主要成分为白及葡甘聚糖 (BsGM), 由 *D*-葡萄糖和 *D*-甘露糖组成。作为一种天然高分子材料, 白及胶是极具发展前途的生物材料^[3], 具有抗菌消炎、祛腐生肌、收敛疮口等作用, 适合作为药物载体, 具有缓释性、局部滞留性、良

收稿日期: 2013-02-26

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (2010ZRA02011)

作者简介: 侯绪浩 (1987—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为中药新药研发与炮制原理。E-mail: whhxh1214@163.com

*通信作者 刘逢芹, 主任药师, 研究方向为医院药学与药品质量控制。Tel: (0531)89268365 E-mail: lfq600@163.com

网络出版时间: 2013-07-05 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130705.1558.017.html>

好的生物相容性及自身降解性等特点,并能降低所载药物的毒性,且有抗炎、抗肿瘤等作用^[4-6]。本实验拟从药材白及中提取物及胶进行精制,通过氧化反应对白及胶改性,配以适量赋形材料共混和交联,制备成多孔支架材料,通过测定其孔隙率、机械强度、吸水性能及细胞相容性考察支架材料的性能,并利用生物学显微镜及扫描电镜表征支架材料的结构,来探讨采用中药天然成分制备多孔支架材料用于牙槽骨缺损修复的可行性。

1 仪器与材料

AB204—N 分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;DZF—6050 型真空干燥箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;CJJ791 型磁力加热搅拌器,江苏晓阳电子仪器厂;FD—1000 型冷冻干燥机,日本 Eyela 公司;Model550 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;培养箱(SHEL•LAB, USA)。95%乙醇,河北健宁医药化工厂;D-无水葡萄糖对照品(批号 1108332200302,中国药品生物制品检定所);中药白及饮片,山东宏济堂医药连锁有限公司中药饮片厂,由山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定为兰科白及属植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎的炮制品;羟丙基壳聚糖,南通绿源生物科技有限公司;珍珠层粉,广州海洋大学;木瓜蛋白酶、胰蛋白酶,美国 Sigma 公司;高碘酸钠,天津市大茂化学试剂厂;DMEM 培养基,美国 Hyclone 实验室。

2 方法与结果

2.1 支架材料的制备

2.1.1 白及胶的提取 称取 100 g 规格相同的白及饮片,加 9 倍量的水浸泡 1 h,加热回流提取 1.5 h,120 目筛滤过,重复操作 2 次。合并滤液浓缩至每毫升提取液相当于含药材 4 g,加入 95%乙醇 100 mL 使乙醇体积分数达 70%以上进行醇沉,抽滤,将析出沉淀物放入真空干燥箱 80 °C 干燥 24 h 后,冷却至室温,得到白及胶粗品^[7]。

2.1.2 白及胶的精制 称取 2 g 白及胶粗品,用蒸馏水溶解完全,加入 18 mg 木瓜蛋白酶(8~10 mg/g 底物),用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0~7.5,控制水浴温度 45~50 °C,酶解 130 min,水解液用醇沉法将白及胶析出,抽滤,将析出物放入真空干燥箱 80 °C 干燥 24 h 后,冷却至室温,得到纯化白及胶^[8]。

2.1.3 白及胶定量测定 精密吸取葡萄糖对照品溶

液(40 μg/mL) 0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL,各加水补至 2.0 mL,然后加入 6%苯酚 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL,静置 10 min,摇匀,室温放置 20 min 后于 490 nm 测吸光度(A)值。以葡萄糖质量浓度为横坐标(X)、A 值为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程为 $Y=0.0073X+0.0121$, $r=0.9996$,表明葡萄糖在 8~36 μg/mL 与 A 值呈良好的线性关系。吸取样品液 1.0 mL(白及胶质量浓度为 40 μg/mL)按上述步骤操作,测 A 值,以回归方程计算白及胶的量。经实验测定精制后白及胶的质量分数达 90%以上^[9]。

2.1.4 白及胶的氧化 称取 2 g 纯化白及胶,用 100 mL 蒸馏水溶解完全,配成 2%的溶胶。加入 2.2 g 氧化剂高碘酸钠,25 °C 下避光(避免发生超氧化)搅拌。反应 8 h 后,加入 2 mL 乙二醇终止反应,溶液用蒸馏水透析 48 h,抽滤除去溶液中沉淀的杂质,直接冷冻干燥得到氧化白及胶(OBsGM)^[10-11]。

2.1.5 多孔支架材料的制备^[12-13] 将 OBsGM、羟丙基壳聚糖分别溶于蒸馏水中,分别配成 2%、4%的溶胶,超声脱气,分别放置于 30 °C 水浴中预热 30 min,按一定的比例混合并加入一定量珍珠层粉,混匀,置于 50~55 °C 水浴中反应 30 min,冷冻干燥 48 h,得到复合支架材料。

2.2 支架材料的物理表征及生物学性能检测

2.2.1 生物显微镜及扫描电镜观察 利用生物显微镜及扫描电镜对材料的断面进行观察,每个样品随机取 3 个视野拍片,并对孔隙结构及孔隙间的交联进行观察。从图 1、2 所示的显微镜及扫描电镜照片中可以看出,冷冻干燥法制备的白及胶支架材料相互交联贯通的多孔结构,可为细胞的寄宿、生长、繁衍、新陈代谢、新组织的形成提供较为适宜的三维空间。

2.2.2 孔隙率的测定 在 25 °C 条件下测定,选用 1 个比重瓶,加满无水乙醇并称定质量(W_1);把质量为 W_0 的样品浸入乙醇中,抽真空,使样品中的

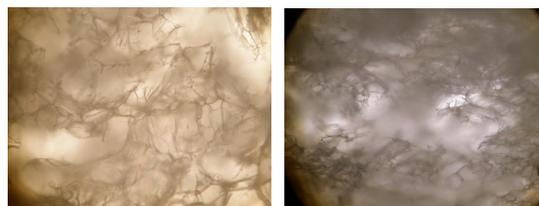


图 1 显微镜观察支架材料结构(左:×400,右:×40)

Fig. 1 Optical microscope photos of scaffolds (left: ×400, right: ×40)

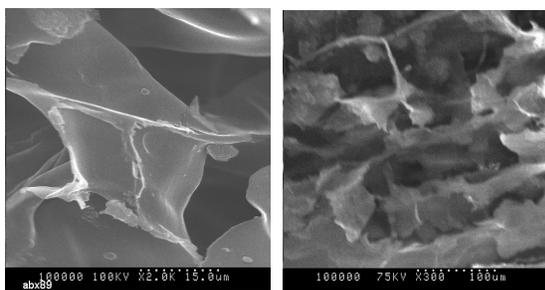


图 2 电镜扫描支架材料结构 (左: $\times 4\,000$, 右: $\times 600$)
Fig. 2 SEM photos of scaffolds (left: $\times 4\,000$, right: $\times 600$)

气体完全被乙醇取代, 待比重瓶补满乙醇后称定质量 (W_2); 将浸透了乙醇的样品取出, 称定剩余的乙醇与比重瓶的质量 (W_3)。按公式计算测得材料的孔隙率 (ε), 多孔材料的孔隙率取 3 次测试结果的平均值^[14]。经实验得出所制支架材料孔隙率在 84.25%~95.90%, 平均孔隙率为 91.74%, 表明所得支架材料的孔隙率符合要求, 可以为细胞的黏附、繁殖及新组织的生长提供空间。

$$\varepsilon = (W_2 - W_3 - W_0) / (W_1 - W_3)$$

2.2.3 机械强度分析 将多孔材料裁剪成直径为 20 mm, 高为 10 mm 的圆柱形样品, 在电子万能试验机上测出被测样品压缩 50% 时的抗压强度 (K)。压缩速率为 5 mm/min。按公式计算测得支架材料的 K [$K = F / A$, F 为压力 (N), A 为多孔材料横截面积 (m^2)], 多孔材料的机械强度取 3 次测试结果的平均值^[15], 经实验得出所制支架材料机械强度在 0.68~1.03 kPa, 平均机械强度为 0.83 kPa, 表明支架材料的机械强度良好, 可以保证支架材料植入体内的稳定性。

2.2.4 吸水性测定 将支架材料样品于 50 °C 真空干燥箱中干燥至恒定质量 (W_1), 然后将样品浸入盛有 PBS 缓冲溶液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 中, 室温静置吸水 1 h, 取出后用滤纸吸干表面的水分, 称定质量 (W_2), 按公式计算多孔材料的吸水率 (Q), $Q = (W_2 - W_1) / W_1$, 式中 W_1 、 W_2 分别表示多孔材料的干质量 (g) 和吸水后的质量 (g), 多孔材料的吸水性取 3 次测试结果的平均值^[15]。经实验得出所制支架材料吸水率在 876%~1 191%, 平均吸水率为 985%, 表明具有良好的吸水性, 植入体内可以保证细胞营养的获取及气体交换。

2.2.5 体外细胞相容性 将小鼠骨髓基质干细胞均匀接种在 96 孔板中, 接种细胞数量为 1×10^4 /孔, 对照组加入普通培养液, 实验组加入浸泡支架材料 48 h 的培养液, 置于 37 °C、5% CO_2 恒温培养箱中

培养, 分别在第 2、4、6、8 天后弃去原培养液, 加 20 μL 5 g/L MTT 溶液, 置于 37 °C、5% CO_2 恒温培养箱中 4 h 后, 加 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪测量波长 490 nm 处 A 值^[16-17], 结果第 2、4、6、8 天对照组和实验组的 A 值分别为 0.124、0.117、0.205、0.196、0.305、0.311、0.389、0.394。MTT 实验结果表明支架材料无毒副作用, 对细胞的正常生长无影响, 细胞相容性良好。

3 讨论

3.1 白及胶的提取纯化

水提醇沉法操作简便、稳定性好、成本较低, 是一种较为成熟的提取白及粗多糖方法, 但所得到的白及多糖纯度较低, 一般在 70%~80%, 色泽略显黄, 且带有药味, 作为医药材料还需要进行精制。

白及多糖粗品中所含的杂质除了蛋白质外, 很大一部分是植物的一些次生代谢物质, 这些非糖成分与白及的葡甘聚糖、蛋白质等形成复杂的缀合物, 难以用简单的方法脱除, 因此通过多次实验比较, 采用蛋白酶对白及多糖粗品中所含的蛋白质进行酶解处理, 并结合溶剂沉淀方法进行精制, 能够在很大程度上提高白及多糖的纯度, 且重现性良好。

3.2 白及胶的氧化

白及胶是由 D -葡萄糖和 D -甘露糖按一定物质的量比组成的复合多糖, 溶于水, 直接采用白及胶制备的支架材料降解速度过快, 抗压性较弱, 不能为细胞的生长、新组织的形成提供足够的时间与空间。本实验根据 Schiff 碱缩合反应原理, 用高碘酸钠氧化白及胶, 使其邻二醇结构中的 C-C 键断裂, 部分糖醛酸单元的羟基被氧化为反应活性较高的醛基, 由此生成的还原性多糖中的醛基易与含有大量伯胺基团的羟丙基壳聚糖发生交联反应, 短时间内即可形成理想的网状结构。由于反应中采用高碘酸钠氧化, 反应终止后会有碘酸根等离子存在, 如不能完全除去, 随醛基化白及胶制备的支架材料带入动物体内, 很可能导致感染等病变, 故采用长时间蒸馏水循环透析方法除去离子, 以保证所制支架材料的安全性。

3.3 珍珠层粉的骨诱导作用

珍珠层是软体动物珍珠贝科或蚌科动物的贝壳内层部分, 有学者采用珍珠层粉作动物实验, 证实其具有良好的生物相容性, 并具有骨诱导作用^[18-19]。杨春露等^[20]细胞学实验也已发现珍珠层水溶性提取物可以促进体外培养的人骨髓基质细胞成骨性分

化进程,证明珍珠层具有骨诱导作用。珍珠层粉的有机成分易于被机体组织吸收利用,具有一定的骨诱导和成骨作用;无机成分可转化为骨的成分,无免疫原性,是一种理想的天然成骨材料。本实验制备支架材料过程中加入一定量的珍珠层粉,并调节其比例,使支架材料在满足表征要求的情况下,提高其促进成骨作用,以达到更好的临床效果。

3.4 支架材料的性能

支架材料的孔隙率、机械强度和吸水性是评定三维材料的重要指标。支架材料拥有良好的孔隙率,才能为细胞的黏附、繁殖及新组织的生长提供空间;良好的机械强度是保证支架材料的稳定性,新组织形成的必备条件;吸水率一方面反映了材料的孔隙率对多孔材料吸水性能的贡献,另一方面也反映了材料中的组分对吸水性的影响,对细胞营养的获取、气体交换有重要作用。实验研究发现,支架材料孔隙率和吸水性都随着制备材料溶液浓度的增大而减小,是由于多孔材料中材质本身所占的实际体积增大,孔隙所占的空间减小所致,且由于珍珠层粉不溶于水,随着珍珠层粉量的增大,二者都减小。通过细胞体外培养 MTT 检测结果表明支架材料具有良好的细胞相容性,为该多孔材料作为牙槽骨缺损的修复生物材料的进一步研究提供了依据。

本实验是将现代材料学与传统的中医药学相结合,利用中药天然成分对复合材料的性能进行改进,增强材料的生物活性,为中医药与组织工程的结合提供了研究思路。

参考文献

[1] 王海江,陈启富.组织工程支架材料的研究进展[J].中国现代医生,2012,50(1):27-29.
[2] 肖培根.新编中药志[M].北京:化学工业出版社,2002.
[3] 彭锐,李胜利,邹阳,等.明胶白及胶/血竭多孔材料的生物相容性评价[J].中国中医骨伤科杂志,2007,15(1):38-40.
[4] 孙达锋,史劲松,张卫明,等.白及多糖胶研究进展[J].食品科学,2009,30(3):296-298.

[5] 王军,王春宏,任晓玲,等.白及胶的临床应用[J].中国医院药学杂志,2004,24(9):556-557.
[6] 赵文昌,宋丽军,许健煌,等.天然高分子白及多糖在药物制备中的应用[J].今日药学,2010,20(3):2-3.
[7] 刘逢芹,王作明,黄欣,等.白及胶制备工艺研究[J].齐鲁药事,2004,23(9):51-52.
[8] 孔俊豪,史劲松,孙达峰,等.白及多糖的酶法精制工艺条件研究[J].食品科学,2009,30(14):52-56.
[9] 魏绍云,齐慧玲,王继伦,等.苯酚-硫酸法测定白及多糖[J].天津化工,2000(3):35-36.
[10] 何淑兰,张敏,耿占杰,等.部分氧化海藻酸钠的制备与性能[J].应用化学,2005,22(9):1007-1011.
[11] 许东颖,莫德清,廖正福.双醛葡甘聚糖的合成及表征[J].安徽农业科学,2011,39(2):636-638.
[12] 樊李红,潘晓然,周月,等.羟丙基壳聚糖/氧化海藻酸钠水凝胶的制备及表征[J].武汉大学学报:理学版,2010,56(5):501-506.
[13] 孔俊豪.白及葡甘聚糖的酶法精制及交联化凝胶的制备[D].南京:南京农业大学,2009.
[14] 石桂欣,王身国,贝建中.聚乳酸与聚乳酸-羟基乙酸多孔细胞支架的制备及孔隙的表征[J].功能高分子学报,2001,14(1):7-11.
[15] 温普.天然多糖大分子多孔材料的制备及性能表征[D].天津:天津大学,2008.
[16] 刘鹏,王东,孙海钰,等.胶原-纳米羟基磷灰石复合支架的细胞相容性[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(42):7831-7834.
[17] 彭锐,郑启新,郝杰,等.明胶/白及胶多孔材料的细胞相容性研究[J].生物医学工程与临床,2004,8(4):189-191.
[18] Atlan G, Balmain N, Berland S, et al. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: Histological evidence for bone regeneration [J]. *C R Acad Sci III*, 1997, 320(3): 253-258.
[19] Lamghari M, Huet H, Laurent A, et al. A model for evaluating injectable bone replacements in the vertebrae of sheep: Radiological and histological study [J]. *Biomaterials*, 1999, 20(22): 2107-2114.
[20] 杨春露,陈建庭,金大地,等.珍珠层水溶性提取物对人骨髓基质细胞成骨性分化的诱导作用[J].中国临床解剖学杂志,2007,25(2):190-193.