

# Paper Title Preparation and Evaluation of PLGA Microspheres Containing Bone Morphogenetic Protein for Controlled Release

Zhi-hong Li, Ji-min Wu, Peng-fei Wang, Xue-zhong Chen, Shu-jie Huang, Jing Guan, Xi-zheng Zhang

*Institute of Medical Equipment, Academy of Military and Medical Sciences, Tianjin 300161, China*

*Email: lizhihong1003@tom.com; Wandong Road 106, Hedong district, Tianjin China, P.O.300161*

**Abstract:** The method of water in oil in water ( $w_1/o/w_2$ ) was utilized to prepare BMP/PLGA microspheres. Various preparing parameters, including polymer concentration in oil phase, volume ratio of inner water phase to oil phase, emulsification concentration in external water phase were altered during the microspheres production. The effects of these changes on the size of the microspheres, drug loading, encapsulation efficiency were examined. And the morphological characteristics, drug-releasing function of the microspheres were investigated. The results show that the BMP/PLGA microspheres is good at morphology with the particles diameter at  $0.5\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$ , the envelopment ratio 76.1%, and the ratio of drug loading 1.14%. However, the initial burst release of the microspheres occurred. The initial BMP burst release exceeded 18% within 1.5 days, and approximately 75% of the drugs was released within 43.5 days was observed for BMP from BMP-loaded microspheres and followed the Higuchi matrix model. So, the release behavior of microspheres showed the feasibility of BMP-loaded microspheres as controlled release devices.

**Keywords:** Bone Morphogenetic Protein; Poly (lactic-co-glycolide); Microspheres; Double-emulsion solvent evaporation method

## BMP/PLGA 缓释微球的制备与体外释放性能

李志宏, 武继民, 汪鹏飞, 陈学忠, 黄姝杰, 关静, 张西正

军事医学科学院 卫生装备研究所, 天津, 中国, 300161

Email: lizhihong1003@tom.com, 天津市河东区万东路 106 号

**摘要:** 采用复乳化-溶剂挥发法制备 BMP/PLGA 微球, 探讨 BMP/PLGA 微球的制备可行性, 重点考察 PLGA 浓度、 $V(W_1)/V(O)$ 、乳化剂浓度等因素对微球粒径、包封率、载药量的影响, 并对微球形态、粒径及释药特性进行研究。结果显示: BMP/PLGA 微球的成球性较好, 大小较均匀, 直径大致在  $0.5\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$ 。所制备的微球包封率为 76.1%, 载药量为 1.14%。但其释放方程存在突释期、持续释放期两部分。在释放 1.5 天时, 释放率可达 18%, 其后为持续释放期, 到 43.5 天时约释放 75%, 其释放轨迹能较好的满足 Higuchi 方程。

**关键词:** BMP; PLGA; 微球; 复乳化-溶剂挥发法

### 1 引言

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 在骨的形成和修复中具备调节细胞的分化和功能的特性, 其应用研究一直是组织修复再生和组织工程领域最活跃的课题之一<sup>[1]</sup>。骨的修复重建过程正是骨细胞在 BMP 等生长因子的调控下, 在支架材料上黏附、增殖、分化, 并消化吸收支架材料, 重新构建成骨的过程。

在骨修复的不同阶段有大量生长因子表达, 其中骨形成蛋白在骨修复重建过程中具有决定性的作用<sup>[2-3]</sup>。在骨修复材料中引入一定的生长因子尤为重要。但其在体内的半衰期短, 全身和局部应用很快被稀释代谢, 达不到所期望的生物效应, 因此国内外学者进行了大量的缓释载体的研究<sup>[4-10]</sup>。其中, PLGA 具有生物相容性好、无免疫反应、降解时间可调节等特点, 而且可以通过调节聚乳酸和聚乙醇酸而单体的比例得到不同降解时间的载体, 因而被广泛用作药物载体材料。本实验以复乳-溶剂挥发法( $W_1/O/W_2$ )制备 BMP/PLGA 载药微球, 采用

资助信息: 天津市自然科学基金面上项目(09JCYBJC14100); 国家自然科学基金(10832012, 30970724); 军事医学科学院重大项目(2008ZD009)

单因素实验法,重点考察了 PLGA 浓度、 $V(W_1)/V(O)$ 、乳化剂浓度等因素对微球粒径、包封率、载药量的影响,用 SEM 观察微球的形态,表面电位粒径仪测定微球粒径分布,并检测了其释药特性。

## 2 材料和方法

### 2.1 试剂及仪器

BMP(牛源,天津中津生物科技有限公司); PLGA(75/25, Mw 50000, 山东医疗器械研究所); Elisa 试剂盒(Bovine BMP ELISA Kit, Esblab.com); 聚乙烯醇(PVA, 纯度: 96%~98%, 水解度: 98%, 聚合度: 1750±50, 中国医药集团上海化学试剂公司)。

X-520 型高速匀浆机, 美国科尔-帕默; 冷冻干燥机, LABCONCO 公司; CR22G 型超速冷冻离心机, 日本日立; SHZ-88 水浴恒温振荡器, 江苏金坛市医疗仪器厂; BDL-B 型表面电位粒径仪, 上海市检测技术所上立检测仪器厂。SHA-CA 型水浴恒温振荡器, 江苏金坛市医疗仪器厂。MULTISKAN MK3 全自动多功能酶标仪(美国)。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 BMP/PLGA 微球的制备

采用  $W_1/O/W_2$  溶剂挥发法制备微球。具体方法为, 将一定浓度和体积的 BMP 溶液加入 PLGA 的二氯甲烷溶液中, 浸于冰水浴中在高速匀浆条件下乳化成白色乳状液, 立即倒入 PVA 溶液中用匀浆机分散均匀, 磁力搅拌 4h, 使二氯甲烷完全挥发后, 离心, 所得微球以蒸馏水洗涤 3 次, 冷冻干燥, 于 4℃ 保存。在制备过程中, 通过改变 PLGA 浓度、PVA 浓度、PVA 体积等条件来考察其对微球粒径、表面形态、包封率等性质的影响。

#### 2.2.2 BMP/PLGA 微球表面形态观察

将少量的微球粉末放在贴有双面胶的载玻片上, 制成相应的扫描电镜样品, 喷金后利用 SEM 观察微球表面形态。

#### 2.2.3 BMP/PLGA 微球大小分布检测

取少量微球置于乙醇溶液, 超声分散, 取适量溶液分散于载玻片上, 由表面电位粒径仪测定粒径分布, 每次测量不少于 500 个。

#### 2.2.4 BMP/PLGA 微球包封率的检测

称取干燥微球约 10mg 精密定溶于  $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$  溶液(含 5%SDS)2ml 中, 于 37℃ 下恒温震荡 24h, 然后离心, 用 Elisa 试剂盒测定上清液 BMP 含量。其中 Elisa

严格按照说明操作, 并以浓度为 0、7.8、15.6、31.2、62.5、125、250、500ng/ml 标准品浓度为横坐标, 以酶标仪所测 A 值为纵坐标, 作图建立 BMP 的标准曲线并得出标准方程。然后根据样品 A 值在该曲线图上查出 BMP 浓度。其标准方程为:  $y=2E-08x^3 - 2E-05x^2 + 0.0099x + 0.1673$ ,  $R^2=0.9993$ 。

微球包封率=微球中的 BMP 量/投料量

### 2.2.5 BMP/PLGA 微球体外释放试验

精确称取一定量微球置于透析袋中, 紧密封口, 然后置于 10ml 作为缓释介质的 PBS 缓冲溶液(pH=7.4)中, 37℃ 条件下以 100 r/min 的速率恒温恒速振荡。分别在第 0.5、1、1.5、2.5、4.5、7.5、11.5、16.5、21.5、28.5、35.5、43.5d 定时移去 1ml 释放介质于离心管中标号冻存待测并补充同样体积的新鲜缓冲液。用 Elisa 试剂盒测定 BMP 含量。释放率%= $W_1/W_2 \times 100\%$ , 式中  $W_1$  为微球在缓冲液中溶出 BMP 的量,  $W_2$  为微球中 BMP 的总量。

## 3 结果和讨论

### 3.1 BMP/PLGA 微球表面形貌

BMP/PLGA 微球扫描电镜结果如图 1 所示。SEM 观察显示采用复乳法-溶剂挥发法制备的 BMP/PLGA 微球的成球性较好, 微球表面较光滑, 大小较均匀, 直径大致在  $0.5\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$ 。所制备的微球冻干后呈疏松白色粉末, 再分散性良好, 可方便分装, 利于以后使用。

### 3.2 BMP/PLGA 微球大小分布

BMP/PLGA 微球粒径分布如图 1 所示。微球粒径主要集中在  $0.5\mu\text{m} \sim 12\mu\text{m}$  范围内, 以纳米小球居多。

### 3.3 成球工艺对微球性能的影响

$W_1/O/W_2$  复乳化-溶剂挥发法是制备多肽、生长因子等蛋白质药物 PLGA 微球的经典方法, 微球形成的过程中, 生物可降解材料的有机溶剂可作为内、外水相间

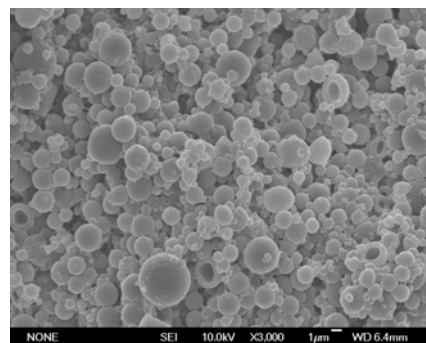


Figure 1 Scanning electron microscopy photograph of BMP/PLGA microspheres

图 1 BMP/PLGA 微球扫描电镜图

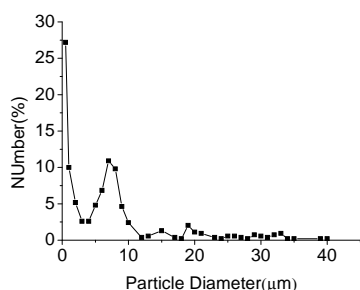


Figure 2. Particle distribution of BMP/PLGA microspheres  
图 2. BMP/PLGA 微球粒径分布图

的疏水性屏蔽, 避免或减少药物因扩散而泄漏至外水相, 使包封率降低。因此, 如何建立一种较为理想的疏水性屏蔽, 并快速有效的阻断药物的扩散对提高微球的包封率尤为重要。

$W_1/O/W_2$  复乳化-溶剂挥发法制备微球时, PLGA 浓度、乳化剂浓度、 $V(W_1)/V(O)$ 、乳化搅拌速度、外水相盐浓度等因素对内外水相间的疏水性屏蔽性能及药物的扩散性能产生重大影响, 进而影响微球的性能及包封率。实验重点考察了 PLGA 质量浓度、PVA 质量浓度、 $V(W_1)/V(O)$  比例 3 个因素对微球包封率及平均粒径 (Image J 计算的平均粒径) 的影响, 具体实验参数及结果见表 1。

### 3.3.1 PLGA 浓度对微球包封率的影响

表 1 中的 A、B、C、D 为聚合物浓度对包封率的影响。从表 2 可看到, PLGA 浓度的增加有利于提高包封率, 当其浓度从 0.01g/ml 提至 0.04g/ml, 包封率从 59.6% 升至 77.4%, 这可能是由于高浓度的聚合物会形成了高黏度的油相溶液, 也增加了药物从聚合物初乳液中扩散出来的阻力<sup>[11, 12]</sup>, 阻止了  $W_1$  中的 BMP 向  $W_2$  中扩散, 另外随着聚合物浓度的提高, 聚合物在分散相表面固化

Table1 Preparation parameters and entrapment efficiency of microspheres

表 1 PLGA 浓度、乳化剂浓度、 $V(W_1)/V(O)$  对微球包封率的影响

序号	PLGA 浓度 /g·ml <sup>-1</sup>	PVA 浓度 /g·ml <sup>-1</sup>	$V(W_1)/V(O)$	粒径大小 /μm	包封率/%	载药量 /%
A	0.01	0.02	1:10	1.97±0.53	59.6	1.7882
B	0.02	0.02	1:10	3.27±0.61	72.1	1.0814
C	0.03	0.02	1:10	3.94±0.87	74.5	0.745
D	0.04	0.02	1:10	5.21±1.32	77.4	0.5806
E	0.02	0.02	1:5	1.83±0.78	58.7	1.761
F	0.02	0.02	1:15	4.23±0.97	73.5	0.735
G	0.02	0.02	1:20	4.87±0.86	74.1	0.5558
H	0.02	0.005	1:10	4.31±0.96	57.1	0.8566
I	0.02	0.01	1:10	3.82±0.78	68.4	1.0266
J	0.02	0.03	1:10	3.13±0.72	74.7	1.1206
K	0.02	0.04	1:10	2.68±0.64	76.1	1.1414

速度加快, 阻止了药物的扩散从而使微球的包封率得到提高。但随着 PLGA 浓度的增加, 微球的粒径也随着增大, 而且其分散性能也有所降低。

### 3.3.2 $V(W_1)/V(O)$ 对微球包封率的影响

表 1 中 E、B、F、G 为  $V(W_1)/V(O)$  对包封率的影响。随着油相比例的增大, 微球包封率呈增大的趋势。这是因为随着油相比例的增大, 有机溶剂挥发、乳液液滴硬化成球后就会形成较厚的壳层, 使  $W_1$  中的 BMP 向  $W_2$  中扩散的难度加大, 从而在很大程度上阻止了  $W_1$  中的 BMP 向  $W_2$  中扩散, 提高了微球的包封率。另外油相增加而 PLGA 浓度不变, 相当于增加了 PLGA 用量, 使微球的粒径也迅速增大, 同时也导致微球载药量急剧下降。

### 3.3.3 乳化剂浓度对微球包封率的影响

表 1 中 H、I、B、J、K 为乳化剂 PVA 浓度对包封率的影响。结果显示, 乳化剂质量浓度 0.005、0.01、0.02、0.03、0.04g/mL, 所对应的包封率分别为 57.1%、68.4%、72.1%、74.7% 和 76.1%, 随着 PVA 浓度的增大, 微球的粒径有所降低, 包封率显著提高。这是由于随着 PVA 浓度的提高,  $W_2$  的黏度增大, 形成的乳液越稳定, 限制了内水相向连续相的移动<sup>[13]</sup>, 使  $W_1$  中的 BMP 不易扩散到  $W_2$  中, 从而使 BMP 更多地被包裹<sup>[14]</sup>, 微球的包封率得到提高。而  $W_2$  黏度的增大, 其成球时剪切力也增大, 从而使微球粒径有所降低。因此适当增大乳化剂浓度有利于粒径的降低和包封率的提高, 但乳化剂浓度过大易引起洗涤等后处理的不便, 微球分散性能的降低。

## 3.4 BMP/PLGA 微球体外释放性能

微球的释放见图 3。体外释放结果显示 BMP/PLGA 微球能实现长期稳定的释放, 具有明显的缓释作用。其释放方程存在突释期、持续释放期两部分。在释放 1.5 天时, 释放率可达 18%, 其后为持续释放期, 微球能够持续释放 BMP, 释放浓度比较稳定, 到 43.5 天时约释

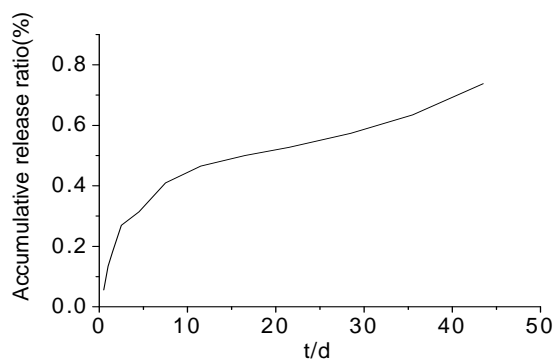


Figure 3. In vitro release profile of BMP/PLGA microspheres  
图 3. BMP/PLGA 微球的体外释药曲线

放约 75%。其释放轨迹能较好的满足 Higuchi 方程。其线性回归方程为： $y = 0.1096x - 0.0011$ ， $R^2 = 0.9966$ 。其中，BMP/PLGA 微球的突释效应可能是微球表面 BMP 的溶解及扩散形成的，而后面的持续释放期可能是 PLGA 微球缓慢降解和药物的溶解扩散共同决定的。

#### 4 结论

(1) 通过成球工艺参数的改变，可以制备出成球性较好，大小较均匀，直径大致在  $0.5\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$  的 BMP/PLGA 微纳米球。

(2) PLGA 浓度、 $V(W_1)/V(O)$ 、乳化剂浓度等因素对微球包封率都有一定的影响。其中 PLGA 浓度的增加也有利于提高包封率，当其浓度从  $0.01\text{g/ml}$  提至  $0.04\text{g/ml}$ ，包封率从 59.6% 升至 77.4%，但浓度的提升也引起了其成球性能的下降；提高  $V(O)/V(W_1)$ 、乳化剂 PVA 的浓度均有利于提高微球包封率；但乳化剂浓度过高易引起洗涤等后处理的不便。

(3) 体外释放结果显示 BMP/PLGA 微球具有明显的缓释性能，能实现长期稳定的释放。

#### References (参考文献)

- [1] Vogelin E, Jones NF, Huang JI, et al. Healing of a Critical-Sized Defect in the Rat Femur with Use of a Vascularized Periosteal Flap, a Biodegradable Matrix, and Bone Morphogenetic Protein. *J Bone Jt Surg Am* 2005;87(6):1323-31.
- [2] Urist MR. Bone-Formation by autoinduction. *Science* 1965, 150 (3698):893-899.
- [3] Groeneveld E.H.J., Burger E.H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrin* 2000, 142 (1):9-21.
- [4] N. Saito, T. Okada, H. Horiuchi, et al. Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers. *Bone* 32 (2003) 381-386
- [5] Kun Na, Sung won Kim, Bo Kyung Sun, et al. Osteogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells in thermo-reversible hydrogel constructs containing hydroxyapatite and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Biomaterials* 28 (2007) 2631-2637
- [6] Dennis P. Linka, Juliette van den Doldera, Jeroen J. van den Beucken, et al. Bone response and mechanical strength of rabbit femoral defects filled with injectable CaP cements containing TGF- $\beta$ 1 loaded gelatin microparticles. *Biomaterials* 29 (2008) 675-682
- [7] FEI Zheng-qi HU Yun-yu WU Dao-cheng et al. Preparation and osteogenic activity of rhBMP-2 loaded/poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere[J]*Biomedical Engineering And Clinical Medicine*,2006,10(3):121-124 费正奇,胡蕴玉,吴道澄,等. rhBMP-2\_聚乳酸与聚乙醇酸共聚物载药微球的制备及成骨活性研究. *生物医学工程与临床*,2006,10(3):121-124
- [8] Saito N, Murakami N, Takahashi J, et al. Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins, *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1037-48.
- [9] S. Kokubo, M. Mochizuki, S. Fukushima, T. Ito, K. Nozaki, T. Iwai, K. Takahashi, S. Yokota, K. Miyata, N. Sasaki, Long-term stability of bone tissues induced by an osteoinductive biomaterial, recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a biodegradable carrier, *Biomaterials* 25(2004)1795-1803.
- [10] M.Yamamoto, Y.Takahashi, Y.Tabata, Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel, *Tissue Eng.* 12 (2006)1305-1311.
- [11] Cho M, Sah H. Formulation and process parameters affecting protein encapsulation into PLGA microspheres during ethyl acetate-based microencapsulation process [J]. *J Microencapsul* , 2005, 22 (1) : 1 -12.
- [12] Zhang JX, Zhu KJ , Chen D. Preparation of bovine serum albumin loaded poly (D , L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by a modified phase separation technique[J] . *J Microencapsul* , 2005, 22 (2) :117 - 126
- [13] Wang Xiangpin. Research On Peptide And Protein Drugs Encapsulation Efficiency And Release[J]*Foreign Medical Sciences(Section Of Pharmacy)* , 2006, 33(3): 219-222 王襄平. 多肽及蛋白类药物微球包封率和释放的研究进展[J]. *国外医学药学分册*, 2006, 33(3): 219-222
- [14] Y.Y. Yang, T.S.Chung, Bai X.L, Chan W.K, Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein prepared by double emulsion method[J], *Chem. Eng. Sci.* 2000,55: 2223-2236.