

# 海藻酸-磷脂微囊复合水凝胶的 制备、表征及毒理学分析

史占萍<sup>1,5</sup>, 史 迈<sup>1,5</sup>, 张文惠<sup>2</sup>, 申世刚<sup>1</sup>, 岳志莲<sup>3</sup>,  
杨 慧<sup>2,5</sup>, 丁 良<sup>2,5</sup>, 潘学峰<sup>2,4,5</sup>

(1. 河北大学化学与环境科学学院, 保定 071002; 2. 河北大学医学院, 保定 071000;

3. Intelligent Polymer Research Institute, AIIM Facility, University of Wollongong, Wollongong, NSW, 2522, Australia;

4. 北京理工大学生命学院, 北京 100081; 5. 保定市生物医学诊断工程研究中心, 保定 071015)

**摘要** 采用薄膜分散法合成磷脂微囊, 根据胶粒的双电层理论, 通过在微囊中加入氯化锰、氯化钙和氯化镁电解质溶液, 使微囊处于相对稳定的状态. 研究发现加入氯化锰和氯化钙溶液, 微囊胶体的粒径没有明显的变化, 但加入一定浓度氯化镁溶液, 其粒径明显变大. 为了进一步增加磷脂微囊稳定性, 将氯化锰、氯化钙、氯化镁磷脂微囊胶体分别与海藻酸钠(SA)溶液混合. 结果表明, 氯化镁与SA几乎不能形成水凝胶, 氯化钙与SA形成水凝胶能力强于氯化锰. 微囊胶体溶液中的磷脂酰丝氨酸(PS)可以与Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>键合形成PS-Ca<sup>2+</sup>和PS-Mg<sup>2+</sup>, 但不能与Mn<sup>2+</sup>键合形成PS-Mn<sup>2+</sup>. 对氯化钙磷脂微囊与海藻酸钠合成的复合水凝胶的形貌、溶胀率及细胞毒性进行了表征, 结果表明, 氯化钙与SA形成的水凝胶可以捕获胶体中磷脂微囊, 且形貌规整, 结构稳定, 无细胞毒性.

**关键词** 磷脂微囊; 热力学稳定性; 海藻酸钠; 水凝胶; 磷脂酰丝氨酸

**中图分类号** O636.1; O648.12; R972<sup>+</sup>.6 **文献标志码** A

磷脂微囊因具有无毒性<sup>[1,2]</sup>、靶向性<sup>[3,4]</sup>、保护性、缓释性和长效性<sup>[5-7]</sup>等诸多优点而备受重视. 但其应用范围因热力学不稳定性使其应用受到限制. 微囊在存储过程中容易氧化水解, 聚集, 融合, 从而使分子膜发生相变, 最终导致药物发生渗漏<sup>[8,9]</sup>. 由于微囊在血液中滞留时间较短, 容易被网状内皮系统识别、吸收、清除, 无法达到靶向位点<sup>[10]</sup>, 因此, 通过对微囊进行物理化学修饰及调整尺寸大小等提高其在体内外的稳定性. 目前已开发出各种较稳定的脂质体, 如长循环脂质体<sup>[11-13]</sup>及固体脂质纳米颗粒<sup>[14,15]</sup>等, 但其稳定性问题仍然存在.

海藻酸钠(SA)是由β-D-甘露糖醛酸(M)单元和α-L-古罗糖醛酸(G)单元通过(1,4)糖苷键链接而成的一种无规线型嵌段共聚物<sup>[16-19]</sup>, 其中G单元中钠离子与某些二价阳离子发生离子交换反应, 在温和的条件下迅速形成水凝胶<sup>[20-22]</sup>. 海藻酸钠无毒, 无免疫原性, 具有良好的生物降解性和相容性, 现已被大量用作药物的缓释和控释材料<sup>[23-27]</sup>. Ca<sup>2+</sup>在临床方面被普遍认为是安全无毒的, 因此, 它是应用最为广泛的交联剂<sup>[28]</sup>. 海藻酸钠与钙离子形成的水凝胶具有热不可逆性, 凝胶性能不受温度的影响, 因此, 可以用于包埋敏感性的药物<sup>[29]</sup>、蛋白质<sup>[30]</sup>、细胞<sup>[31]</sup>和酶<sup>[32]</sup>等活性物质. 但由于所制备纳米粒径较大, 对水溶性药物包封率较低而限制了其应用<sup>[33]</sup>. 磷脂酰丝氨酸(L-Phosphatidylserine, PS)与Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>能形成PS-Ca<sup>2+</sup><sup>[34-38]</sup>和PS-Mg<sup>2+</sup><sup>[39,40]</sup>, 而不能与Mn<sup>2+</sup>形成PS-Mn<sup>2+</sup><sup>[41]</sup>. 本文首先在磷脂微囊胶体中加入含有二价阳离子的电解质溶液(氯化锰、氯化钙、氯化镁), 确保胶体微囊处于较好的稳

收稿日期: 2016-12-21. 网络出版日期: 2017-04-11.

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题(批准号: 20160051)、京津冀新药研制协同创新计划项目和保定市莲池区科技局重点项目(批准号: 15J04)资助.

联系人简介: 潘学峰, 男, 博士, 教授, 主要从事生物化学、分子遗传学和分子诊断等研究. E-mail: xuefengpancam@aliyun.com

丁 良, 女, 博士, 教授, 主要从事药物化学等研究. E-mail: 345823685@qq.com

定状态. 然后将稳定的磷脂微囊体系与海藻酸钠结合形成 PS-X ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )-SA 复合水凝胶, 但由于  $\text{Mg}^{2+}$  与 SA 形成水凝胶的能力极弱<sup>[42]</sup>, 因此,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  与 SA 键合不能将微囊捕获, 而  $\text{Ca}^{2+}$  与 SA 键合可以将微囊捕获形成 PS- $\text{Ca}^{2+}$ -SA 磷脂微囊水凝胶. 对材料进行了扫描电子显微镜表征、溶胀率的测定及毒理分析. 扫描电镜图片显示氯化钙与海藻酸钠形成的水凝胶可以捕获胶体中磷脂微囊, 且形貌规整, 结构稳定. 克服了磷脂微囊在液体中的热力学不稳定性, 同时解决了传统水凝胶粒径较大和载药量较低等问题.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

磷脂酰胆碱 (*L*-a-Phosphatidylcholine, PC) 和磷脂酰丝氨酸 (*L*-Phosphatidylserine, PS), Avanti Polar Lipids 公司; HEPES ( $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ), 南京旋光科技有限公司; 海藻酸钠 [ $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na})_n$ ], Aladdin Industrial Corporation 公司; 实验所用的其它化学试剂均为分析纯, 实验用水为去离子水.

Delsa Nano C 纳米粒度仪及 Zeta 电位分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司); JSM-H 冷场发射扫描电子显微镜 (日本 JEOL 公司).

### 1.2 实验过程

1.2.1 磷脂微囊的合成 参照文献[43,44]方法, 采用薄膜分散法合成磷脂微囊, 分别将 192  $\mu\text{L}$  氯仿溶解的磷脂酰胆碱溶液 (25 mg/mL) 和 120  $\mu\text{L}$  磷脂酰丝氨酸溶液 (10 mg/mL) 置于塑料 EP 管中, 混匀, 于干燥器中用缓慢的氮气流吹干氯仿, 真空干燥 1 h. 取 5.00 mL 20 mmol/L HEPES 溶液将微囊分散, 用混匀仪混匀后, 于室温静置 1 h, 用细胞粉碎机超声 9 min, 经 0.45  $\mu\text{m}$  聚醚砜滤膜过滤后, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏保存.

1.2.2 粒度及 Zeta 电位的测定 在合成的磷脂微囊中加入不同浓度的电解质溶液 ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ), 混匀, 过滤. 先将适量的样品分别置于石英测量池和 Zeta 电位流动槽中, 然后将其置于纳米粒度及 Zeta 电位分析仪的样品池中, 测定其粒径和 Zeta 电位值, 每个样品平行测定 3 次取平均值.

1.2.3 海藻酸钠磷脂微囊水凝胶的合成 在微囊中加入电解质溶液后, 采用直接滴加法<sup>[45]</sup>和反滴法与海藻酸钠混合. 边滴加边混匀, 然后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏. 次日, 以 4500 r/min 离心 10 min, 底部形成水凝胶. 将水凝胶冷冻后, 置于低温真空干燥箱中冷冻干燥 16 h 以上, 得到干态水凝胶.

1.2.4 扫描电镜表征 将少量的干态水凝胶置于导电胶上, 进行喷金处理, 用冷场发射扫描电子显微镜观察. 同时设置空白对照.  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  溶液与海藻酸钠混合形成水凝胶的处理方法同上. 微囊胶体中加入  $\text{CaCl}_2$  溶液, 使体系中  $\text{CaCl}_2$  的浓度为 12.5 mmol/L, 用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏, 次日将其适当稀释, 取一滴于硅片上, 尽可能使液滴展开, 低温真空干燥, 喷金处理, 用扫描电镜观察形貌.

1.2.5 水凝胶溶胀率的测定 参照文献[46]方法对水凝胶溶胀率进行测定. 用分析天平称量含有微囊的氯化锰水凝胶和氯化钙水凝胶的干态质量 ( $m_0$ ), 然后将水凝胶放在塑料管中称其总重 ( $m_1$ ), 分别加入含有 6.00 mmol/L  $\text{MnCl}_2$  和 12.50 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  的 HEPES 溶液使其充分溶胀, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏保存 16 h, 达到溶胀平衡后, 去除多余液体, 准确称重 ( $m_2$ ), 按下式计算水凝胶的溶胀率 (Swelling ratio):

$$\text{Swelling ratio} (\%) = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $m_0$  为水凝胶的干重;  $m_1$  为干燥的水凝胶与塑料管的质量;  $m_2$  为水凝胶与塑料管的湿重.

同时设置空白对照, 测定不含微囊的氯化锰和氯化钙与海藻酸钠形成水凝胶的溶胀率.

1.2.6 水凝胶的毒理实验 按照 ISO10993 标准<sup>[47]</sup>, 将水凝胶浸于 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培养液中, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  及湿度为 100% 的恒温培养箱中培养 24 h, 离心, 过滤除菌, 得到浸提液. 将  $4 \times 10^4$  Cell/mL 的心肌细胞和  $1 \times 10^4$  Cell/mL 的内皮细胞分别接种于 96 孔培养板中, 同时设置空白对照、海藻酸钠、磷脂微囊、阳性对照和待测水凝胶组, 每组各设 6 孔, 每孔接种 100  $\mu\text{L}$  细

胞液. 于培养箱培养 24 h, 弃去原培养液, 空白对照组加入新鲜的培养液, 阳性对照组加入 5 g/L 的苯酚溶液, 海藻酸钠对照组加入 0.20% 的海藻酸钠, 磷脂微囊组加入微囊原液, 水凝胶组加入浸提液. 加入体积分别为 100 和 150  $\mu\text{L}$ , 置于培养箱中培养 24 和 48 h 后, 于显微镜下观察细胞形态. 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  5 g/L 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h 后终止培养, 小心洗去孔内培养液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜 (DMSO), 置于振荡器上振荡 10 min, 在酶标仪上于 570 nm 波长下测定吸光度.

## 2 结果与讨论

### 2.1 磷脂微囊的合成及电解质溶液对磷脂微囊胶体稳定性的影响

采用薄膜分散法合成磷脂微囊其形貌和粒径分布如 (图 1) 所示. 90% 的粒子粒径 (D90) 为 208.5 nm, 平均粒径为 100 nm. 根据胶粒双电层理论可知, 影响胶体稳定性的一个主要因素是在胶体中外加电解质溶液, 增加胶粒与同种电荷之间的相互排斥力, 从而提高胶体的稳定性. 微囊中加入氯化钠和氯化钾电解质溶液后, 微囊胶体的粒径没有明显的变化; 但 Zeta 电位值发生了一定的改变 [图 2(A) 和表 1]. 磷脂微囊的 Zeta 电位的绝对值随加入氯化钾浓度的增加而降低. 随着加入氯化钠浓度的增加, 其 Zeta 电位由原来的负电位转变成正电位, 并在加入 100 mmol/L 时出现最大值, 继续增加浓度, 其 Zeta 电位值急剧下降, 由最高正电位变成负电位. 这是由于加入高浓度的氯化钠电解质后, 钠离子发生了水合, 从而影响胶体的 Zeta 电位值.

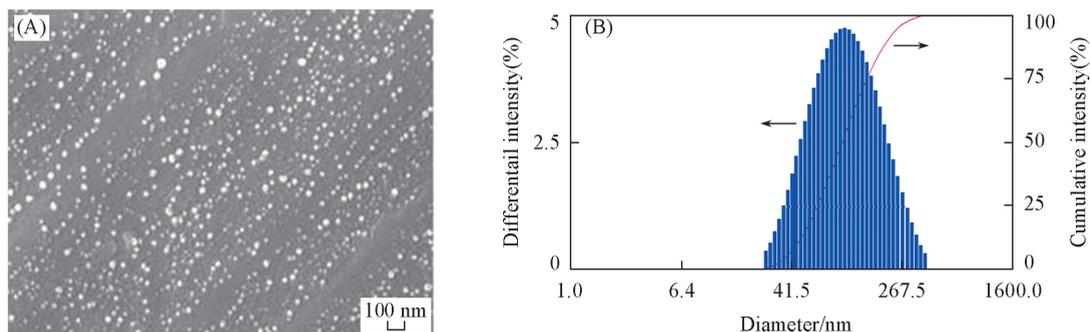


Fig.1 SEM image (A) and particle size distribution (B) of phospholipid microcapsules

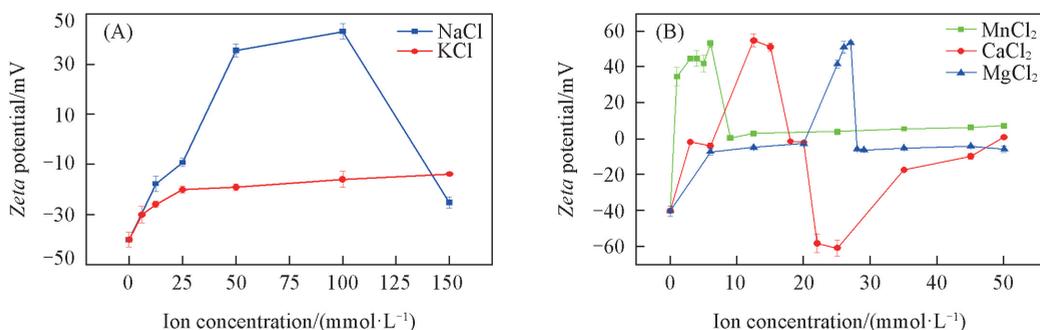


Fig.2 Zeta potential distribution of phospholipid microcapsules colloids by adding electrolyte solutions

(A) NaCl and KCl solutions; (B)  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  solutions.

Table 1 Diameter (D90) with different concentrations of NaCl/KCl added into the microcapsules colloids

Electrolyte solution	Concentration/ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Diameter (D90)/ nm	Electrolyte solution	Concentration/ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Diameter (D90)/ nm
NaCl	0	220.3 $\pm$ 14.7	KCl	0	220.3 $\pm$ 14.7
	12.50	217.0 $\pm$ 4.1		12.50	224.9 $\pm$ 10.2
	25.00	185.1 $\pm$ 18.4		25.00	191.4 $\pm$ 12.0
	50.00	180.5 $\pm$ 15.4		50.00	202.3 $\pm$ 6.2
	100.00	213.1 $\pm$ 5.8		100.00	207.7 $\pm$ 7.4
	150.00	223.1 $\pm$ 3.9		150.00	218.7 $\pm$ 9.1

微囊胶体的粒径随加入氯化锰和氯化钙浓度的增加没有明显变化;但随着加入氯化镁浓度的增加,微囊胶体的粒径逐渐变大.微囊胶体的 *Zeta* 电位值随加入氯化锰、氯化钙及氯化镁浓度的增加,在不同的浓度节点,均出现了较高的正电位[图 2(B)和表 2].这是由于随着二价阳离子浓度的增加,其与胶粒之间的排斥力增加,从而促使微囊胶体处于比较稳定的状态.微囊胶体 *Zeta* 电位的绝对值随加入氯化钙浓度的增加,出现了 2 个峰值,一个是体系中氯化钙浓度为 12.50 mmol/L 时, *Zeta* 电位为  $(54.85 \pm 3.65)$  mV;另一个是体系中氯化钙浓度为 25.00 mmol/L 时, *Zeta* 电位为  $(-60.64 \pm 4.55)$  mV.这是由于加入氯化钙浓度较低时,钙离子表现出和锰离子、镁离子相同的二价阳离子的性质.胶粒与二价阳离子之间的排斥力增加,胶体处于比较稳定的状态.但加入氯化钙浓度较高时,其 *Zeta* 电位值发生了逆转,这可能是由于微囊胶体对离子发生了选择性的吸附,使 *Zeta* 电位值出现最大负值.也可能是由于钙离子与酸性磷脂的极性头部作用而改变了双层结构<sup>[48]</sup>和磷脂本身的构象<sup>[49]</sup>,从而改变了胶体的电性.

**Table 2 Diameter(D90) with different concentrations of MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> in the microcapsule colloids**

MnCl <sub>2</sub> Concentration/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	Diameter(D90)/ nm	CaCl <sub>2</sub> Concentration/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	Diameter(D90)/ nm	MgCl <sub>2</sub> Concentration/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	Diameter(D90)/ nm
0	220.3±14.7	0	220.3±14.7	0	220.3±14.7
1.00	238.8±25.0	3.00	201.1±1.2	6.00	203.3±4.7
3.00	229.4±5.0	6.00	211.8±1.2	12.50	275.4±12.3
4.00	253.6±3.3	12.50	248.2±15.1	20.00	264.9±14.9
5.00	264.2±0.3	15.00	242.0±5.5	25.00	1019.2±73.9
6.00	208.6±10.3	18.00	243.3±9.0	26.00	874.0±49.6
9.00	221.3±7.6	20.00	223.2±4.2	27.00	761.4±17.4
12.50	238.5±0.2	22.00	217.3±3.5	28.00	810.4±87.1
25.00	225.3±1.1	25.00	235.7±3.6	29.00	771.8±53.8
35.00	212.2±20.9	35.00	205.6±5.94	35.00	466.4±28.2
45.00	223.6±0.8	45.00	219.3±11.1	45.00	214.6±15.8
50.00	253.9±2.0	50.00	210.1±0.8	50.00	224.7±10.4

## 2.2 海藻酸钠对磷脂微囊胶体稳定性的影响

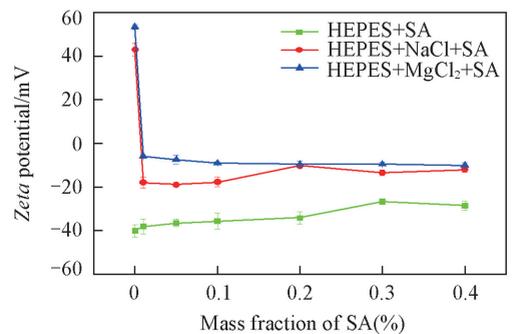
向磷脂微囊胶体中加入(氯化钠、氯化锰、氯化钙、氯化镁)电解质溶液后再加入海藻酸钠后发现,氯化钠与海藻酸钠不能形成水凝胶,氯化锰、氯化钙、氯化镁与海藻酸钠形成水凝胶的能力依次为  $Ca^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+}$  (极弱).微囊中加入氯化钠、氯化镁再加入海藻酸钠后,胶体的粒径均变大, *Zeta* 电位值迅速下降(图 3).这是由于海藻酸钠发生水合作用,选择性地吸附离子,使胶体电荷发生了翻转,由原来的正电转变成带负电,因此,胶体开始变得不稳定.

## 2.3 扫描电镜表征

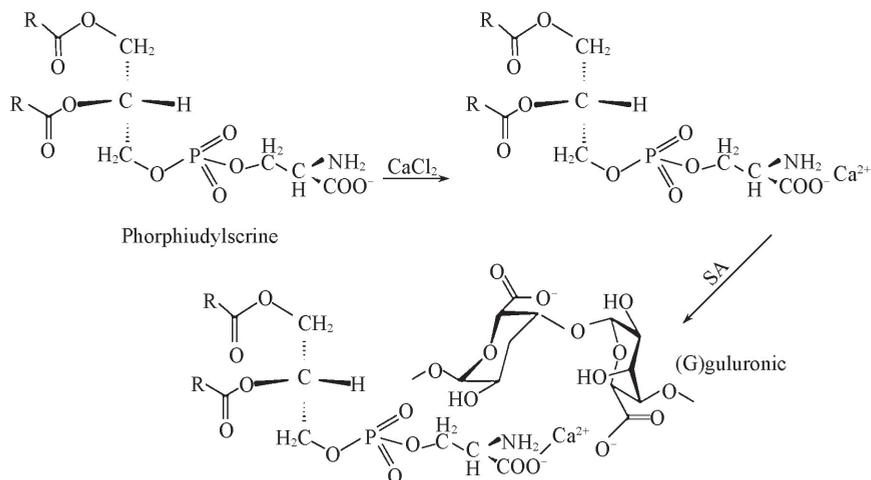
采用直接滴加法和反滴法将氯化钙磷脂微囊胶体与海藻酸钠混合形成水凝胶反应过程见 Scheme

1. 反应式见 Scheme 2. 其水凝胶的 SEM 照片如图 4(A)~(D)所示.可见,氯化钙与海藻酸钠形成水凝胶的密实程度强于氯化锰,这说明氯化钙与海藻酸钠形成水凝胶可将微囊捕获,而氯化锰不能.

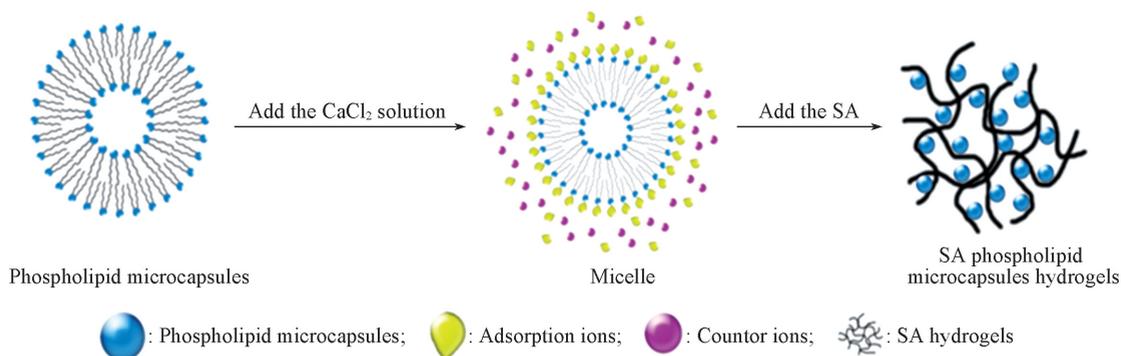
磷脂微囊胶体中加入氯化钙溶液的电镜照片如图 5(A)所示.可以看到,微囊独立存在且分布均匀,这说明磷脂微囊胶体中氯化钙的浓度为 12.5 mmol/L 时,微囊处于较为稳定的状态.氯化钙及其磷脂微囊胶体滴加到海藻酸钠溶液中形成水凝胶的 SEM 照片[图 5(B),(C)]表明氯化钙与海藻酸钠形成的水凝胶可以捕获磷脂微囊.利用  $PS-Ca^{2+}$  与 SA 交联形成  $PS-Ca^{2+}-SA$  水凝胶将磷脂微囊捕获,克服了磷脂微囊在液体中的热力学不稳定性.滴加方式不同,形成的水凝胶存在一定差异.将海藻酸钠溶



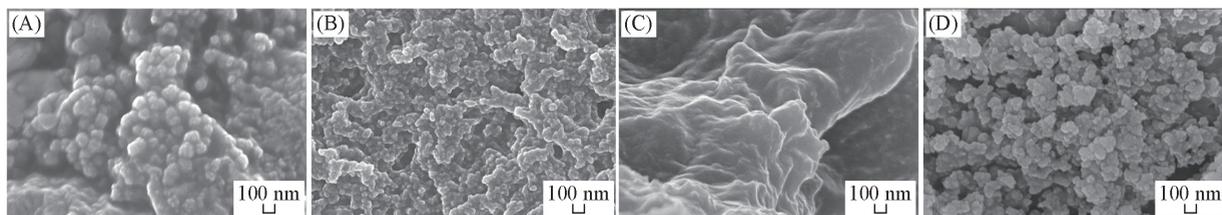
**Fig.3 Distributions of zeta potentials by adding sodium alginate into different colloidal dispersion systems**



**Scheme 1** Formation of alginate phospholipid microcapsules hydrogel

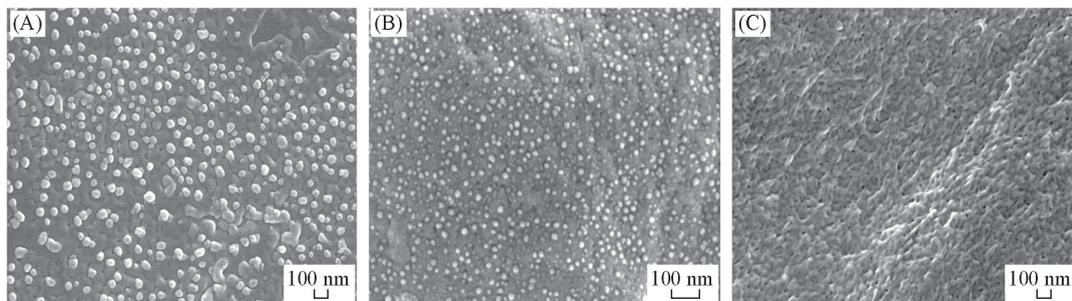


**Scheme 2** Schematic illustrations of PS- $\text{Ca}^{2+}$ -SA crosslinking



**Fig.4** SEM images of hydrogels

(A) 12.50 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  microcapsules colloidal+0.20%SA; (B)  $\text{CaCl}_2$ +SA; (C) 6.00 mmol/L  $\text{MnCl}_2$  microcapsules colloidal+0.10%SA; (D)  $\text{MnCl}_2$ +SA.



**Fig.5** SEM images of colloidal microcapsules stabilized using  $\text{CaCl}_2$  (A), SA +  $\text{CaCl}_2$  microcapsules colloidal (B) and  $\text{CaCl}_2$  solution form hydrogels (C)

逐滴加入到氯化钙磷脂微囊体系中,此时,  $\text{Ca}^{2+}$  过量,微囊和海藻酸钠共同竞争  $\text{Ca}^{2+}$  的概率很小,有些游离的  $\text{Ca}^{2+}$  直接和加入的海藻酸钠形成水凝胶,但是会出现离子间的替换和转移,导致形成的水凝胶部分有微囊的存在,如图 4(A) 所示,微囊分布不均匀;将氯化钙磷脂微囊逐滴加入到海藻酸钠溶液

中,  $\text{Ca}^{2+}$  不足量, 海藻酸钠争夺  $\text{Ca}^{2+}$  并且与微囊共享, 二者互利共存, 如图 5(B) 所示, 微囊分布均匀。但是, 无论采取哪种滴加方式, 氯化钙与海藻酸钠形成的水凝胶可以将微囊捕获, 相比而言, 反滴加方式更能体现我们的预设。

## 2.4 水凝胶的溶胀行为

水凝胶在溶胀过程中, 依靠溶剂渗入高聚物内体积膨胀和高聚物体积膨胀导致网状分子链向三维空间伸展产生的弹性收缩能的相互抵消, 达到溶胀平衡。采用溶胀平衡后水凝胶吸收的水分与干态固体材料之间的质量比来衡量水凝胶的溶胀程度。考察了氯化钙和氯化锰微囊胶体分别与海藻酸钠形成的水凝胶的溶胀率, 同时考察了空白氯化钙、氯化锰与海藻酸钠形成水凝胶的溶胀率(图 6)。在相同的条件下, 空白氯化钙、氯化锰与海藻酸钠形成水凝胶的溶胀率均高于氯化钙、氯化锰磷脂微囊与海藻酸钠形成的水凝胶, 这是由于微囊占据了水凝胶的网格, 使水凝胶的网络趋于紧密, 容纳水的相对空间减小, 所以溶胀率降低。氯化钙磷脂微囊与海藻酸钠形成水凝胶的溶胀率高于氯化锰磷脂微囊与海藻酸钠形成的水凝胶。这说明氯化钙与海藻酸钠形成的水凝胶的吸水性和柔韧性均优于氯化锰与海藻酸钠形成的水凝胶。

## 2.5 水凝胶的细胞毒理性分析

迄今为止, 细胞毒性试验在评价材料生物相容性和安全性中的地位已得到公认<sup>[50]</sup>。目前, 浸提液法是细胞毒性实验常用的方法之一。该法是将材料置于培养液或蒸馏水中在适当条件下进行浸泡, 制备出含有溶出物的浸提液, 再将浸提液加在含有细胞的培养皿中继续培养, 观察溶出物对细胞的影响。我们用心肌细胞和内皮细胞分别对材料进行细胞毒性实验(图 7)。浸提液的心肌细胞和内皮细胞的增殖率均大于 90%, 表明细胞毒性基本为零, 可以认为该材料具有良好的细胞相容性和生物安全性, 能用作生物医用材料。但是海藻酸钠对照组和磷脂微囊对照组对 2 种细胞的增殖率都有影响, 随着细胞培养时间的增加, 细胞增殖率降低, 表明单组分对细胞表现出一定的毒性, 这可能是由于使用对照组的浓度比较大干扰了细胞的生长及繁殖。

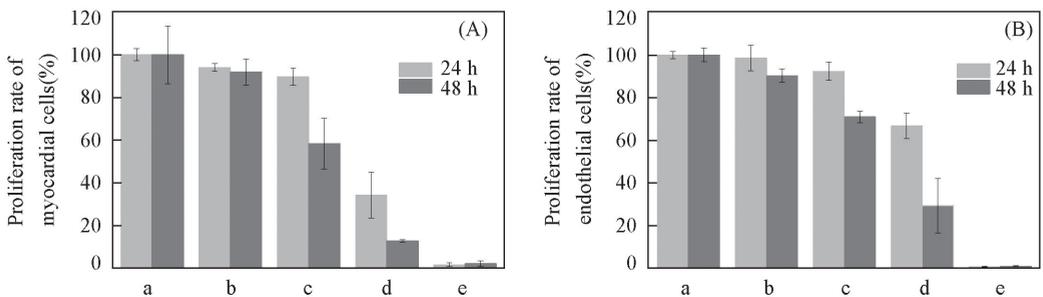


Fig.7 Effects of composite hydrogels on cell proliferations of myocardial cells(A) and endothelial cells(B)

a. Pure cells; b. extract solution; c. sodium alginate; d. phospholipid vesicles; e. phenol.

综上所述, 当磷脂微囊胶体中电解质溶液的浓度分别为 6.00 mmol/L  $\text{MnCl}_2$ , 12.50 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  和 27.00 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  时, 其 *Zeta* 电位值均可表现出较好的稳定性, *Zeta* 电位值分别为  $(53.11 \pm 2.14)$ ,  $(54.85 \pm 3.65)$ ,  $(53.52 \pm 1.05)$  mV; 将  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  和  $\text{MgCl}_2$  磷脂微囊胶体分别与 SA 混合,  $\text{MgCl}_2$  与 SA 几乎不能形成水凝胶,  $\text{CaCl}_2$  与 SA 形成水凝胶能力强于  $\text{MnCl}_2$ ; 利用 PS- $\text{Ca}^{2+}$ -SA 这种交联键合方式可以将微囊固定化, 且形貌规整, 结构稳定, 细胞毒性基本为零, 具有良好的细胞相容性和

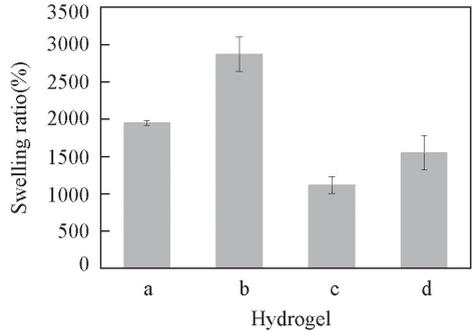


Fig.6 Comparisons of swelling ratios of different hydrogels

a. Dropping SA (0.20%) into microcapsules colloids stabilized by  $\text{CaCl}_2$ ; b.  $\text{CaCl}_2$  solution alone; c. dropping SA (0.10%) into microcapsules colloid stabilized by  $\text{MnCl}_2$ ; d.  $\text{MnCl}_2$  solution alone.

生物安全性. 而  $\text{MnCl}_2$  与 SA 形成的水凝胶不能将微囊捕获.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Salunkhe S. S., Pagar U. E., Bhatia N. M., Thorat J. D., *Am. J. Pharmtech Res.*, **2013**, 3, 493—510
- [ 2 ] Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S. W., *Nanoscale Res. Lett.*, **2013**, 8, 1—9
- [ 3 ] Li J. Q., Yang Z. Z., Meng T. T., Qi X. R., *J. Chin. Pharm. Sci.*, **2014**, 23, 667—673
- [ 4 ] Wong B. C. K., Zhang H. Q., Qin L., Chen H. B., Fang C., Lu A. P., Yang Z. J., *Drug Des. Devel. Ther.*, **2014**, 8, 993—1001
- [ 5 ] Chiou C. J., Tseng L. P., Deng M. C., Jiang P. R., Tasi S. L., Chung T. W., Huang Y. Y., Liu D. Z., *Biomaterials*, **2009**, 30, 5862—5868
- [ 6 ] Anderson L. J. E., Hansen E., Lukianova-Hleb E. Y., Hafner J. H., Lapotko D. O., *J. Control. Release*, **2010**, 144, 151—158
- [ 7 ] Manconi M., N cher A., Merino V., Merino-Sanjuan M., Manca M. L., Mura C., Mura S., Fadda A. M., Diez-Sales O., *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **2013**, 14, 485—496
- [ 8 ] Venugopalan P., Jain S., Sankar S., Singh P., Rawat A., Vyas S. P., *Die Pharmazie*, **2002**, 57, 659—671
- [ 9 ] Yaksh T. L., Provencher J. C., Rathbun M. L., Myers R. R., Powell H., Richter P., Kohn F. R., *Drug Delivery*, **2000**, 7, 27—36
- [ 10 ] Torchilin V. P., *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2005**, 4, 145—160
- [ 11 ] Woodle M. C., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1998**, 32, 139—152
- [ 12 ] Hong M. S., Lim S. J., Oh Y. K., Kim C. K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2002**, 54, 51—58
- [ 13 ] Pasut G., Paolino D., Celia C., Mero A., Joseph A. S., Wolfram J., Cosc D., Schiavon O., Shen H., F., Fresta M., *J. Controlled Release*, **2015**, 199, 106—113
- [ 14 ] Mehnert W., M der K., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2001**, 47, 165—196
- [ 15 ] Kakkar D., Dumoga S., Kumar R., Chuttani K., Mishra A. K., *Med. Chem. Comm.*, **2015**, 6, 1452—1463
- [ 16 ] Lee K. Y., Mooney D. J., *Prog. Polym. Sci.*, **2012**, 37, 106—126
- [ 17 ] Tran N. M., Dufresne M., Helle F., Hoffmann T. W., François C., Brochot E., Paullier P., Legallais C., Duverlie G., Castelain S., *PLoS One*, **2014**, 9, e109969
- [ 18 ] Van Tomme S. R., Storm G., Hennink W. E., *Int. J. Pharm.*, **2008**, 355, 1—18
- [ 19 ] Liu H.X., Wang C. Y., Gao Q. X., Liu X. X., Tong Z., *Int. J. Pharm.*, **2008**, 351, 104—112
- [ 20 ] Bajpai S. K., Sharma S., *React. Funct. Polym.*, **2004**, 59, 129—140
- [ 21 ] M rch Y. A., Donati I., Strand B. L., Skj k-Br k G., *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 1471—1480
- [ 22 ] Augst A. D., Kong H. J., Mooney D. J., *Macromol. Biosci.*, **2006**, 6, 623—633
- [ 23 ] Li Z. Q., Guan J. J., *Polymers*, **2011**, 3, 740—761
- [ 24 ] Hunt N. C., Shelton R. M., Henderson D. J., Grover L. M., *Tissue Eng. Part A*, **2012**, 19, 905—914
- [ 25 ] Rassu G., Salis A., Porcu E. P., Giunchedi P., Roldo M., Gavini E., *Carbohydr. Polym.*, **2016**, 136, 1338—1347
- [ 26 ] Strasdat B., Bunjes H., *Int. J. Pharm.*, **2015**, 489, 203—209
- [ 27 ] Kajjari P. B., Manjeshwar L. S., Aminabhavi T. M., *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **2012**, 13, 1147—1157
- [ 28 ] Lee K. Y., Mooney D. J., *Prog. Polym. Sci.*, **2012**, 37, 106—126
- [ 29 ] Grassi M., Colombo I., Lapasin R., *J. Controlled Release*, **2001**, 76, 93—105
- [ 30 ] Gombotz W. R., Wee S. F., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2012**, 64, 194—205
- [ 31 ] Lan S. F., Safiejko-Mroccka B., Starly B., *Toxicol. in Vitro*, **2010**, 24, 1314—1323
- [ 32 ] Blandino A., Mac as M., Cantero D., *Technol.*, **2000**, 27, 319—324
- [ 33 ] Reis C. P., Neufeld R. J., Vilela S., Ribeiro A. J., Veiga F., *J. Microencapsulation*, **2006**, 23, 245—257
- [ 34 ] Okada Y., Murayama F. M., *Experimental Cell Research*, **1966**, 44, 527—551
- [ 35 ] Papahadjopoulos D., Vail W. J., Newton C., Nir S., Jacobson K., Poste G., Lazo R., *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1977**, 465, 579—598
- [ 36 ] Papahadjopoulos D., Vail W. J., Pangborn W. A., Poste G., *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1976**, 448, 265—283
- [ 37 ] Tarafdar P. K., Chakraborty H., Dennison S. M., Lentz B. R., *Biochem. J.*, **2012**, 103, 1880—1889
- [ 38 ] Boettcher J. M., Davis-Harrison R. L., Clay M. C., Nieuwkoop A. J., Ohkubo Y. Z., Tajkhorshid E., Morrissey J. H., Rienstra C. M., *Biochemistry*, **2011**, 50, 2264—2273
- [ 39 ] Ohki S., *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1982**, 689, 1—11
- [ 40 ] D zg ne N., Nir S., Wilschut J., Bentz J., Newton C., Portis A., Papahadjopoulos D., *J. Membr. Biol.*, **1981**, 59, 115—125
- [ 41 ] Breisblatt W., Ohki S., *J. Membr. Biol.*, **1976**, 29, 127—146
- [ 42 ] Topuz F., Henke A., Richtering W., Grollet J., *Soft Matter*, **2012**, 8, 4877—4881
- [ 43 ] Popovska O., *Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res.*, **2014**, 3, 182—189

- [44] Pupo E., Padrón A., Santana E., Sotolongo J., Quintana D., Dueñas S., Duarte C., Rosa M. C. D. L., Hardy E., *J. Controlled Release*, **2005**, *104*, 379—396
- [45] Gao C. M., Liu M. Z., Chen S. L., Jin S. P., Chen J., *Int. J. Pharm.*, **2009**, *371*, 16—24
- [46] Saarai A., Kasparikova V., Sedlacek T., Saha P., *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **2013**, *18*, 152—166
- [47] 2003/ISO10993-5:1999BG7, *Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5: Test for in Vitro Cytotoxicity* (2003/ISO10993-5:1999BG7. 医疗器械生物学评价第5部分:体外细胞毒性试验)
- [48] Vanderwerf P., Ullman E. F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, *596*, 302—314
- [49] Hauser H., Phillips M. C., *Nature*, **1976**, *261*, 390—394
- [50] Stivastava S., Stephen D. G., *Biomaterials*, **1990**, *11*, 133—139

## Preparation, Characterization and Toxicological Analysis of Alginate-phospholipid Vesicle Composite Hydrogels<sup>†</sup>

SHI Zhanping<sup>1,5</sup>, SHI Mai<sup>1</sup>, ZHANG Wenhui<sup>2</sup>, SHEN Shigang<sup>1</sup>,  
YUE Zhilian<sup>3</sup>, YANG Hui<sup>2,5</sup>, DING Liang<sup>2,5\*</sup>, PAN Xuefeng<sup>2,4,5\*</sup>

(1. School of Chemistry and Environments, Hebei University, Baoding 071002, China;

2. School of Medicine, Hebei University, Baoding 071000, China;

3. Intelligent Polymer Research Institute, AIIM Facility, University of Wollongong, Innovation Campus, Northfields Avenue, Wollongong, NSW 2522, Australia;

4. School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;

5. Baoding Center for Biomedical Diagnostics Engineering, Baoding 071015, China)

**Abstract** Phospholipid vesicles were synthesized by thin-film dispersion. According to the electric double layer theory of micelles, the vesicles were stabilized by electrolyte solutions, including manganese chloride, calcium chloride and magnesium chloride. There are no significant changes in the particle sizes of the vesicles colloid by the additions of manganese chloride and calcium chloride solutions, respectively. However, the particle sizes of the vesicles were significantly bigger by adding a certain amount of magnesium chloride. To further increase the stability of the phospholipid vesicles, alginate-phospholipid vesical composite hydrogels were prepared by dropping sodium alginate (SA) solution into phospholipid vesicle colloids stabilized by manganese chloride, calcium chloride and magnesium chloride, respectively. The results show that magnesium chloride and SA hardly formed hydrogel, and calcium chloride and SA formed hydrogel much easier than manganese chloride did. The phosphatidylserine (PS) in the phospholipid vesicles bound to the Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> through forming PS-Ca<sup>2+</sup>, PS-Mg<sup>2+</sup>, respectively, however PS cannot interact with Mn<sup>2+</sup>, forming PS-Mn<sup>2+</sup>. The morphology, swelling ratio and cytotoxicity of the composite hydrogels made of alginate-phospholipid vesicles were characterized. The results show that a novel composite hydrogel could be prepared by calcium-crosslinking SA and the PS in the phospholipid vesicles colloid, forming stable and non-cytotoxic composite hydrogel.

**Keywords** Phospholipid vesicle; Thermodynamic stability; Sodium alginate; Hydrogel; L-Phosphatidylserine

(Ed.: D, Z)

<sup>†</sup> Supported by the Grants from Hebei Provincial Key Research Programs for Medical Science, China (No.20160051), the Collaborative Innovation Project for New Drug Development Between Beijing, Tianjin and Hebei Province, China and the Key Project of Baoding Lianchi District Science and Technology Bureau, China (No.15J04).