

# 生物医用高分子微球的制备与应用

陈 瑜 陈明清\* 刘晓亚 杨 成

(无锡轻工大学化学与材料工程学院 无锡 214036)

**摘 要** 本文介绍了生物医用高分子微球的制备方法, 及高分子微球在生物技术和医学诊治中的应用。

**关键词** 高分子微球 生物医用 制备 应用

## Preparations and Applications of Biomedical Polymeric Microspheres

CHEN Yu, CHEN Mingqing\*, LIU Xiaoya, YANG Cheng

(School of Chemical and Material Engineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

**Abstract** Some preparation methods of biomedical polymeric microspheres were described in this paper, and the applications of the microspheres in biotechnology and medical diagnosis and therapy were also presented.

**Key words** Polymeric microspheres, Biomedicine, Preparation, Application

高分子微球以其分子结构的可设计性吸引了越来越多的科学工作者的兴趣, 进而更加快了其开发应用的步伐。美国等西方发达国家在这一研究领域起步较早, 技术力量已相当强。日本在这一研究领域中投入大量人力和财力, 获得了众多的成果与专利。近年来我国也有不少的科研人员开始从事该领域的研究, 并取得了一定的成果, 但总的来说与国外相比仍有差距。

高分子微球可以通过选择聚合单体和聚合方式从分子水平上来设计合成和制备, 并且可以比较方便地控制其尺寸的大小和均一性, 使之具有所需要的特定性能与功能。这种微观结构和性能的可设计性, 使得高分子微球在对材料特性要求较高的生物医学领域中显示出巨大的发展潜力。本文拟对近几年来报道的几种核-壳复合型高分子微球制备方法以及高分子微球在生物技术和医学诊治方面的应用加以综述。

### 1 生物医用高分子微球的制备方法

生物医用高分子微球通常为核-壳复合结构, 其中壳层具有生物活性或对特定环境有亲合性, 而核作为这类活性大分子的载体, 使微球具有一定的稳定性; 或者, 核为具有一定生物功能性的高分子, 而壳层作为保护层, 维持核内物质的活性。

#### 1.1 大分子单体法 (Macromonomer Method)

大分子单体具有确定的分子量和明确的结构, 所以近来被广泛地用来制备高分子微球。首先将某一单体聚合成有一定聚合度的低聚物, 再在低聚物上引入一具有聚合反应活性的基团 (如碳碳双键等), 制得具有确定分子量的大分子单体。然后在含有大分子单体的介质中加入第二单体、引发剂, 进行接枝共聚反应。若大分子单体为亲水的, 第二单体为疏水的, 则水相中的大

分子单体接枝到疏水性的第二单体上成双亲性接枝共聚物,并逐渐形成胶粒。疏水性单体可扩散到胶粒内,进一步参加共聚反应。亲水性的大分子链则起到了稳定作用,防止胶粒的凝聚。于是形成了核为疏水,壳为亲水的高分子微球(如图 1 所示)<sup>[1~4]</sup>。反之,也可用逆相乳液聚合的方法制备疏水性高分子微球。微球的大小及其分布可以通过溶剂组成和加入的单体及大分子单体的量来控制。其大小可从几十 nm 到几十  $\mu\text{m}$  的范围内变化。由于其形态的可控性及温和的聚合条件使得此类微球被广泛地应用于生物医学领域<sup>[5~7]</sup>。

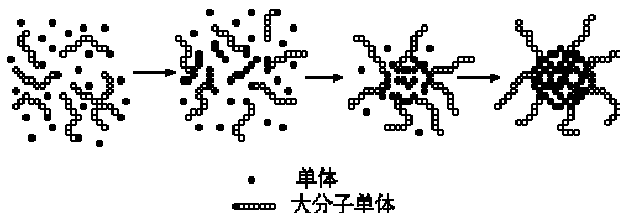


图 1 大分子单体法合成微球

### 1.2 种子聚合(Seeded Polymerization)与动态溶胀法(Dynamic Swelling Method)

首先在聚合单体中加入少量具有多官能团的单体(如对二乙烯苯等)合成交联型聚合物并作为种子,配制成单分散液。然后加入另一种单体、引发剂、交联剂,进行聚合反应。加入的单体聚合到种子乳胶粒表面,形成具有核-壳结构的微球<sup>[8,9]</sup>。种子聚合法制得的微球一般粒径较小,只有几  $\mu\text{m}$ 。为了制得粒径较大( $>5\mu\text{m}$ )的微球,可向含有种子聚合物微粒和某一单体的醇/水溶液中慢速连续地滴加水。在均匀搅拌下,处于单分散状态的种子微粒吸附了大量的分散于溶液中的单体及引发剂而溶胀。溶胀状态与单体量有关,若单体量较多,足够在短时间内增塑整个种子微粒,则单体在种子微粒中发生均相溶胀并聚合,形成分散均匀的复合微球;若单体量较少,则进行异相溶胀,聚合后得到近似于核-壳型的复合微球(如图 2 所示)<sup>[9~12]</sup>。动态溶胀法与种子分散聚合法的不同在于,前者体系中单体主要存在于种子微粒中,而后者单体主要分散在介质中。这两种方法均可用来制得生物活性高分子微球。

### 1.3 分步异相凝聚法(Stepwise Heterocoagulation Method)

首先用乳液聚合法分别合成带有正电荷的小粒径高分子微球和带有负电荷的大粒径微球。利用静电吸引,在溶液中将小微球吸附到大微球的表面,形成外表面较为粗糙的微球聚集体。加热溶液至小微球的玻璃化温度( $T_g$ )之上。这样,包附在大微球周围的小微球将凝结成连续层,整个微球体系的表面随着加热时间的增加而变得光滑,最终可制得核-壳型高分子微球(如图 3 所示)<sup>[13,14]</sup>。Okubo<sup>[15,16]</sup>等人用分步异相凝聚法制备了一系列亲水核-疏水壳的复合结构微球。该法制备的高分子微球大小一般从亚微米级到微米级不等。由于制备过程中往往加热温度较高,会导致活性物质的失活,所以此类微球一般只适合于作为生物活性物质的载体。

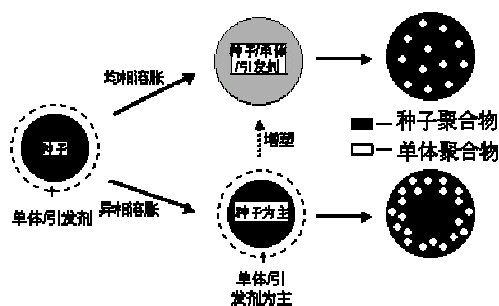


图2 动态溶胀法制备微球

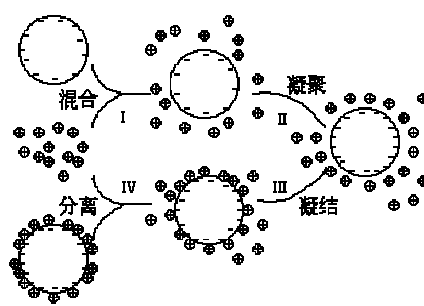


图3 分步异相凝聚法制备微球

#### 1.4 线-球转变法(Coil-to-globule Transition Method)

交联的聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAAm)水凝胶微球的流体动力学尺寸(hydrodynamic size)随温度变化而变化,同时微球表面的亲水/疏水性也随之发生变化。利用PNIPAAm的这一热敏特性,Qiu<sup>[17]</sup>等人合成了主链为PNIPAAm,支链为亲水性聚合物(如聚环氧乙烷PEO)的线状接枝共聚物。该线状共聚物在加热至PNIPAAm的低临界溶解温度(LCST)之上时,水溶液中的PNIPAAm链因脱水而聚集在一起,成为疏水核,而水溶性的PEO支链分布在核的周围,成为亲水壳层,于是形成了核-壳结构的高分子微球,亲水的PEO层对微球起着稳定作用;当温度重新降低至LCST之下后,微球回复到原来的线状状态。这一过程为可逆过程。线状共聚物也可以是嵌段共聚物,通过改变溶剂或温度来选择性地降低某一嵌段部分的溶解性,从而通过线-球转变制备核-壳结构微球<sup>[18]</sup>。用线-球转变法制备的微球常用作药物靶向的载体。

对于具有一定生物医学功能的单体,可以用上述几种方法直接制备出具有医用功能的高分子微球,而对一些没有这类功能的高分子微球,则可以通过对微球表面进行功能化处理而使微球表面带有功能基团(如-COOH, -NH<sub>2</sub>, -CHO等)。另外,为了得到特定形态的微球,还可以适当改变合成步骤和条件,或者对制备好的微球进行一些特殊处理,如为了得到多孔高分子微球,可以采用逐步碱/酸法<sup>[19]</sup>或碱/冷法<sup>[20]</sup>。

## 2 微球在生物技术中的应用

### 2.1 细胞功能测定

利用某些细胞(如巨噬细胞)对具有某种特定结构的异物的吞噬作用来测定细胞的功能。Wagner<sup>[21]</sup>等人发现颗粒状白血球细胞对聚苯乙烯(PS)微球和表面用血清蛋白覆盖的PS微球具有不同的吞噬能力,其中PS微球较容易被吞噬,从而可通过比较细胞对微球异物的吞噬能力来判断该细胞功能正常与否。具体方法是在微球上导入发色团,通过测定其发光度的变化加以判断。张文军<sup>[22]</sup>等人用有封闭活性的抗钙粘蛋白(N-cadherin)单抗包被的PS微球与表达钙粘蛋白的人胚肺细胞接触后,诱导细胞膜上的钙粘蛋白聚集在微球周围。通过分子免疫荧光定位分析,揭示细胞内粘着斑分子间相互作用的链条关系及相关的信号通路。这是一种将细胞内蛋白质定位与功能研究有机结合的新技术。

### 2.2 生物大分子的纯化分离

利用高分子微球对生物大分子的吸附/解吸来达到纯化分离的目的。PNIPAAm微球在其

LCST 上下流体动力学尺寸和亲水/疏水性发生变化, 这种热敏特性已被用来纯化分离一些生物大分子, 如肌红蛋白 (MG)、 $\alpha$ -乳清蛋白 (LA)、溶菌酶 (LZ) 和核糖核酸酶 A (RNase) 等。将含热敏性 PNIPAAm 的微球在温度低于 LCST 条件下加入到待分离的生物大分子 (如蛋白质) 混合液中, 此时微球因水合作用而膨胀, 然后升温至 LCST 以上, 微球又因脱水而收缩, 于是大量的生物大分子就吸附到微球上。将微球分离出来后, 再在 LCST 以下将吸附在微球上的生物大分子解吸下来。如此反复操作, 即可达到分离纯化生物大分子的目的<sup>[23]</sup>。

### 2.3 核酸杂交的固定

将固定在固相载体上的核酸作为探针进行核酸杂交在核酸技术中占有十分重要的地位。其原理是, 固定化的单链核酸在溶液中与具有互补碱基序列的多核苷酸片段冷却时形成双螺旋结构, 从而达到对特定 DNA 的检测和序列分析的目的。姚萍<sup>[24]</sup>等人将寡聚核苷酸的 5' 端定向联接到或直接将单链的 DNA 的 5' 端联接到表面带有甲胺基 ( $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ) 官能团的 PS 微球上, 制得了长链的 DNA 探针。这种探针在较高温度下仍有相当高的联接效率。所以功能化的高分子微球是一种较为理想的核酸杂交的固定载体。

### 2.4 酶的固定化

把酶固定在微球上有物理吸附和化学结合两种方式。通常化学结合有由共价键偶联和由多功能基化合物交联等, 而直接的物理吸附力比较弱, 通常还需用双功能基化合物 (如戊二醛,  $\epsilon$ -氨基己酸等) 交联。固定在功能性微球上的酶不仅具有较高的 pH 稳定性, 热稳定性和贮存稳定性, 而且易与反应物分离, 可以重复使用, 提高使用效率。同时, 多酶联合固定化的微球可以促进多酶反应。柏正武<sup>[25]</sup>等人用聚丁二酰亚胺和 3-氨基丙基硅胶制得微球, 用作固定化酶的载体, 其中聚丁二酰亚胺和 3-氨基丙基硅胶之间以共价键相连, 这种酶的固定化实用性强, 便于工业化。

## 3 微球在医学诊治中的应用

### 3.1 免疫细胞检查

利用表面带有  $-\text{COOH}$  官能团的高分子微球在较温和的条件下与免疫细胞物质中的  $-\text{NH}_2$  发生偶联的特性, 把抗原固定到单分散微球的表面, 然后加入抗体, 利用抗体使固定抗原的微球发生凝聚的原理, 再用分光光度计测定凝聚的有无和多少来测定免疫细胞量<sup>[26]</sup>。

### 3.2 病毒脱除

其原理与生物大分子的纯化分离类似。结合有一定生物活性分子的高分子微球对某些病毒具有很高的识别和亲和能力。利用这种特性, 就可以用它来分离除去一些较难用药物治愈的病毒。Akashi<sup>[5]</sup>等人利用功能性高分子微球用于脱除 HIV-1 病毒 (Human Immunodeficiency Virus-1, 又称爱滋病病毒), 发现脱除率可达 97%。脱除的方法是: 首先在微球表面引入带有羧基的高分子链, 进而通过缩合反应把伴刀豆球蛋白 A (Concanavalin A) 固定到其表面。利用 HIV-1 病毒表面的活性基与伴刀豆球蛋白 A 发生凝聚反应, 离心分离除去沉淀物, 达到脱除病毒的目的。

### 3.3 药物缓释

解决药物的持续稳定释放这一难题, 长期以来一直是用周期性服药的方法来维持药效。但仍不能避免药物浓度的波动而带来的毒副作用, 而且药物利用率低。用高分子微球结合或包裹

药物微粒可以使药物从微球中逐步释放出来,从而使受药体系能保持较为稳定的药物浓度,药性得到持续发挥。目前的热门课题是开发新型生物可降解微球,如聚乳酸、聚酯酰胺、聚 $\epsilon$ -己内酯、聚酸酐等或天然高聚物为材料的微球,通过控制微球的降解速率来实现药物的长期恒量释放,以更好地发挥疗效。

### 3.4 靶向给药

利用微球的结构特性和运载作用将药物运送到特定的受药部位,再将其慢慢释放出来而达到治疗效果。尤其对一些毒副性比较强的药物,为了最大程度地发挥药效和减少用药剂量,尽可能避免大剂量药物对其他正常组织的伤害,可利用靶向给药来提高对病变部位的治疗效果。骨质疏松症的治疗主要是通过药物降低体内血液中的钙离子含量,增强自身造骨功能。常用的药物是一种缩氨酸——鲑鱼降血钙素(salmon calcitonin 简称 sCT),它是亲水性的,若采用直接口服的方法,在胃中因酶的作用会很快分解而失去治疗效果。通过用表面带有亲水 PNIPAAm 支链的 PS 微球作为载体,利用 PNIPAAm 的保护作用,把 sCT 直接运送到小肠中,使之被小肠直接吸收,达到与注射同样好的治疗效果<sup>[6,7]</sup>。用 PNIPAAm 为壳,PS 为核的微球(胶粒)作为抗癌药物亚德里霉素的载体来进行靶向给药在实验室试验中已取得了较好的效果,具有广阔的应用前景<sup>[18]</sup>。

## 4 结语

高分子微球具有微观材料的诸多优点,如体积效应、表面效应等。其微观可设计性使之在生物学中的应用得到了飞速发展,从而极大地推动了生物技术和医疗水平的迅速提高。高分子与金属、陶瓷等其它材料结合的新型复合型功能微球和兼有热、光、压力、磁、pH 等多响应性的功能高分子微球的研究开发也将进一步展现其应用潜力,如具有生物医用功能的磁性高分子微球,由于其能在外加磁场的作用下方方便快捷地分离出来而倍受青睐<sup>[27]</sup>。

### 参考文献

- [1] Akashi M, Yanagi T, Yashima E et al. *J Polym Sci, Part A, Polym Chem*, 1989, 27: 3521~3530.
- [2] Chen M-Q, Kishida A, Akashi M. *J Polym Sci, Part A, Polym Chem*, 1996, 34: 2213~2220.
- [3] Ishizu K, Yamashita M, Ichimura A. *Polymer*, 1997, 38(21): 5471~5474.
- [4] Chen M-Q, Kishida A, Serizawa T et al. *J Polym Sci, Part A, Polym Chem*, 2000, 38: 1811~1817.
- [5] Akashi M, Niikawa T, Serizawa T. *Bioconjugate Chem*, 1998, 9(1): 50~53.
- [6] Sakuma S, Ishida Y, Sudo R et al. *Int J Pharm*, 1997, 159: 181~189.
- [7] Sakuma S, Suzuki N, Kikuchi H et al. *Int J Pharm*, 1997, 158: 69~78.
- [8] Makino K, Yamamoto S, Fujimoto K et al. *Colloid Interface Sci*, 1994, 166: 251~257.
- [9] Okubo M, Hosotani T, Yamashita T. *Colloid Polym Sci*, 1996, 274: 279~284.
- [10] Okubo M, Yamashita T, Suzuki T et al. *Colloid Polym Sci*, 1997, 275: 288~292.
- [11] Okubo M, Yamashita T, Shiozaki M. *J Applied Polym*, 1996, 60: 1025~1031.
- [12] Okubo M, Miyachi N, Lu Y. *Colloid Polym Sci*, 1994, 272: 270~275.
- [13] Serizawa T, Taniguchi K, Akashi M. *Polym Prepr Japan*, 1997, 46: 382~387.
- [14] Taniguchi K, Serizawa T, Akashi M. *Polym Prepr Japan*, 1997, 46: 3329~3334.
- [15] Okubo M, Lu Y. *J Applied Polym*, 1998, 69: 2221~2228.
- [16] Okubo M, Lu Y. *Colloid Polym Sci*, 1996, 274: 1020~1024.
- [17] Qiu X, Wu C. *Macromolecules*, 1997, 30: 7921~7926.
- [18] Cammas S, Suzuki K, Sone C et al. *Controlled Release*, 1997, 48: 157~164.
- [19] Okubo M, Ito A, Hashiba A. *Colloid Polym Sci*, 1996, 274: 428~432.
- [20] Okubo M, Ito A, Kanenobu T. *Colloid Polym Sci*, 1996, 274: 801~804.
- [21] Wagner D D, Hynes R O. *Exp Cell Res*, 1982, 144: 373~375.

- [22] 张文军, 林仲翔, 胡颖. 科学通报, 2000, 45 (7): 756~760.
- [23] Fujimoto K, Mizuhara Y, Tamura N et al. J Intelligent Mate Systems Structures, 1993, 4: 184~189.
- [24] 姚萍, 江明, 段宏伟等. 聚苯乙烯微球共价联接核酸杂交探针的方法研究. '99 高分子学术论文报告会论文集. 上海: 中国化学会, 1999: e22~23.
- [25] 柏正武, 周宜开, 任恕. 一种固定化酶载体. 中国: 1216776, 1998/11/10.
- [26] 岸田晶夫, 明石 满. 高分子加工, 1995, 44 (6): 242~247.
- [27] 丁小斌, 孙宗华, 万国祥. 化学通报, 1997, (1): 1~5.