

文章编号: 1671-0444 (2018)05-0749-06

丝素蛋白基药物缓释功能肠道支架的研制

谢旭升^{1a,1b}, 李刚^{1a,1b}, 王晓沁^{1a,1b}, 赵泽宇^{1a,1b}, 李翼², 兰平³

(1. 苏州大学 a. 纺织与服装工程学院; b. 现代丝绸国家工程实验室, 江苏 苏州 215123;

2. 曼切斯特大学 材料学院, 曼切斯特 M13 9PL 英国;

3. 中山大学 附属第六医院结直肠外科, 广东 广州 510655)

摘要: 临床上,对于急诊手术风险大或者多发转移等结直肠癌患者,放置肠道支架可解除梗阻,进行姑息治疗后再配合化疗等辅助治疗手段,是一个有效的治疗思路。开发了具有良好生物相容性、可降解、可局部给药等性能的新型复合肠道支架,其内层为采用纬编工艺制备的聚二氧六环酮(PDO)可降解裸支架,外层为采用烘干成膜工艺制备的丝素蛋白搭载姜黄素药膜。对该支架的力学性能,药膜的微观形貌、二级结构、晶体结构和药物缓释性能进行了研究。结果表明,最佳药膜的丝素蛋白质量分数为15%、聚乙二醇(PEG-400)与丝素蛋白溶液的质量配比为1:3(姜黄素的质量分数为0.125%)、温度为80℃。3种载药量不同的药膜在200h左右内持续释放,400h达到药物最高释放浓度,其中,药物最高累积释放质量浓度为(13.32±0.80)mg/L,最高累积释放率为(98.67±5.93)%。因此,丝素蛋白基药物缓释功能肠道支架在治疗结直肠患者过程中具备一定的潜在价值。

关键词: 结直肠癌; 支架; 聚二氧六环酮; 姜黄素; 丝素蛋白

中图分类号: TS 141.8

文献标志码: A

Study of Silk Fibroin-Based Colorectal Stents with Drug Delivery Function

XIE Xusheng^{1a,1b}, LI Gang^{1a,1b}, WANG Xiaoqin^{1a,1b}, ZHAO Zeyu^{1a,1b}, LI Yi², LAN Ping³

(a. College of Textile and Clothing Engineering; b. National Engineering Laboratory for Modern Silk,

1. Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. School of Materials, The University of Manchester, Manchester M13 9PL, UK;

3. Department of Colorectal Surgery, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510655, China)

Abstract: Clinically, stents combining radio-chemotherapy is an effective palliative treatment for colorectal cancer patients with advanced disease, high emergent surgical risk, multiple transfer rate and in poor general health. A new intestinal stent with good compatibility, degradability and local delivery ability was developed. The inner layer of the degradable stent was knitted by polydioxanone (PDO) monofilament; the outer was prepared by silk fibroin membrane with curcumin. The morphology, chemical structure, mechanical properties and in vitro drug release property of stents were studied, respectively. The result shows that the optimal model of silk fibroin mass fraction is 15%, the mass ratio of polyethylene glycol (PEG-400) to silk fibroin is 1:3 (mass fraction of curcumin was 0.125%) and

收稿日期: 2017-06-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51603140); 国际中德科学基金研究资助项目(GZ1094); 江省高校自然科学研究面上资助项目(16KJB540003); 苏州市科技计划重点产业技术创新资助项目(SYG201638); 江苏省自然科学基金资助(BK20150372)

作者简介: 谢旭升(1993—),男,安徽宿州人,硕士研究生,研究方向为生物纺织肠道支架, E-mail: 1069553115@qq.com

李刚(联系人),男,副教授, E-mail: tcligang@suda.edu.cn

temperature is 80°C. The drug released concentration of three films remains stably around 200 h, and reaches the highest at 400 h. In addition, the highest accumulative release concentration of drug film reach (13.32 ± 0.80) mg/L, while the highest cumulative release rate is $(98.67 \pm 5.93)\%$. The silk fibroin-based stents with drug delivery function have potentially significant value in the treatment of colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; stent; polydioxanone; curcumin; silk fibroin

结直肠癌是人类第三大高发病率和死亡率的癌症,且逐年增多,已经引起人们的广泛关注^[1-2]。其主要发病因素包括家族遗传和不良饮食习惯如高脂肪、低纤维以及吸烟饮酒等,外界环境因素包括血吸虫病、盆腔放射等^[3-5]。肠梗阻是结直肠癌的常见症状之一,其发生率达 5%~20%,有时甚至为其首发症状,如果不进行干预治疗,5 年内患者的死亡率为 80%~90%。针对肠癌患者,常用的治疗方法是手术配合放化疗治疗^[6-7]。然而,放化疗引起的全身副作用大,危害患者的正常身体健康,而且化疗药物经代谢后,肿瘤部位的有效药物浓度非常低,不能达到有效的治疗效果^[8-10]。对于肿瘤引起急性肠梗阻者,急诊手术风险大、不能耐受手术者以及多发转移和失去手术机会的晚期患者,放置肠道支架解除梗阻,进行姑息治疗后再配合化疗等辅助治疗手段,是一个有效的治疗思路^[11]。

支架植入作为一种新兴的治疗结直肠癌的有效辅助手段,据统计其理论与临床的成功率分别为 90%与 88%^[12-13]。病人在进行结肠镜检查后确定肠梗阻位置后,准确植入肠道支架,其不仅可以支撑扩张肠道、缓解梗阻,恢复病人排便功能;对于可以切除的肿瘤疾病,支架植入作为前期的辅助治疗方法,一定程度缓解病情,为后期的化疗或者放疗提供机会^[14-16]。

近年来,一种从植物中提取的化合物——姜黄素的出色抗癌功能越来越引起研究者的关注。姜黄素的分子结构(如图 1 所示)中的酚醛基侧链和中央的亚甲基碳基团都可以脱掉一个氢原子,形成稳定的无毒害的自由基,它能选择性地诱导癌细胞凋亡而对正常细胞作用很小^[17-19]。丝素蛋白是一种含有人体必需氨基酸的天然蛋白质,具有良好的生物相容性和力学性能,在体内降解缓慢,适合用于药物缓释载体材料^[20-23]。

本文开发一种新型丝素蛋白复合肠道支架,内层为采用纬编工艺制备的聚二氧六环酮(PDO)可降解裸支架,外层为采用烘干成膜工艺制备的丝素蛋白搭载姜黄素药膜,其制备流程如图 2 所示。将探讨裸支架的力学性能,以及药膜的微观形貌、二级结构、晶体结构和药物缓释性能,并分析其中的影响因素。

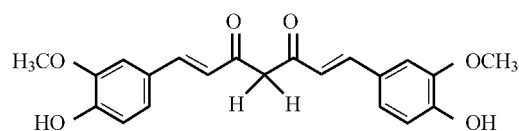


图 1 姜黄素分子结构式

Fig. 1 Curcumin molecular structure

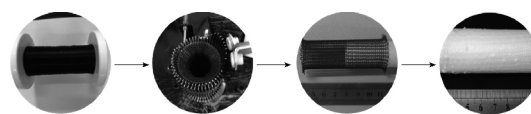


图 2 覆膜肠道支架的制备过程

Fig. 2 Preparation of covered intestinal stent

1 试验材料及方法

1.1 试验材料及仪器

桑蚕丝(购自嵊州市协和丝绸有限公司);PDO单丝(国标规格 3-0)(购自韩国三洋公司);聚乙二醇(PEG-400,相对分子质量为 400,优级纯,国药集团化学试剂有限公司);姜黄素(Sigma);其他所用试剂均为分析纯。

自制 ST-06SL 型小口径圆纬织机;日立 S 4800 型冷场发射扫描电子显微镜(FE-SEM);日本 Hitachi 公司;Thermo Nicolet 5700 型傅里叶变换红外光谱仪;美国尼高力仪器公司;X 射线衍射仪;荷兰飞利浦公司;Bio-Tek synergy H1 型酶标仪。

1.2 试验方法

1.2.1 内层 PDO 裸支架的制备

内层裸支架采用直径为 0.3 mm 的 PDO 单丝,选择小口径圆纬织机:针筒直径为 20 mm,针齿数为 22,织物张力为 2 N,弯纱深度为 3 mm,编织速度为 3 m/min。按照上述参数,编织 30 min 后得到长度为 60 mm、内径为 20 mm 的裸支架。将所制裸支架嵌套在直径为 20 mm 的管状模型上,进行热定型处理 15 min,热定型温度为 80 °C。

1.2.2 外层药膜的制备

室温下,经过溶丝、透析、离心及浓缩,得到质量

分数为 5%、10% 及 15% 的丝素蛋白溶液。姜黄素溶解于 PEG-400 中,再与丝素蛋白溶液均匀混合,通过磁力搅拌和超声分散,得到均匀稳定的混合液。

选择质量分数为 10% 的丝素蛋白溶液,质量分数为 40% 及 100% 的 PEG-400 溶液,质量浓度为 100、50、25、10 及 5 mg/mL 的姜黄素溶液,按上述操作依次混合,结果如图 3 所示,得到姜黄素的最佳

质量浓度为 5 mg/mL。

选择丝素蛋白溶液的质量分数为 5%、10% 及 15%,PEG-400 与丝素蛋白溶液的质量配比为 1:3 (姜黄素的质量分数为 0.125%)、1:6 (姜黄素的质量分数为 0.071%) 及 1:9 (姜黄素的质量分数为 0.056%),温度为 25、60 及 80 °C,设计 9 组正交试验,如表 1 所示,进行成膜试验。

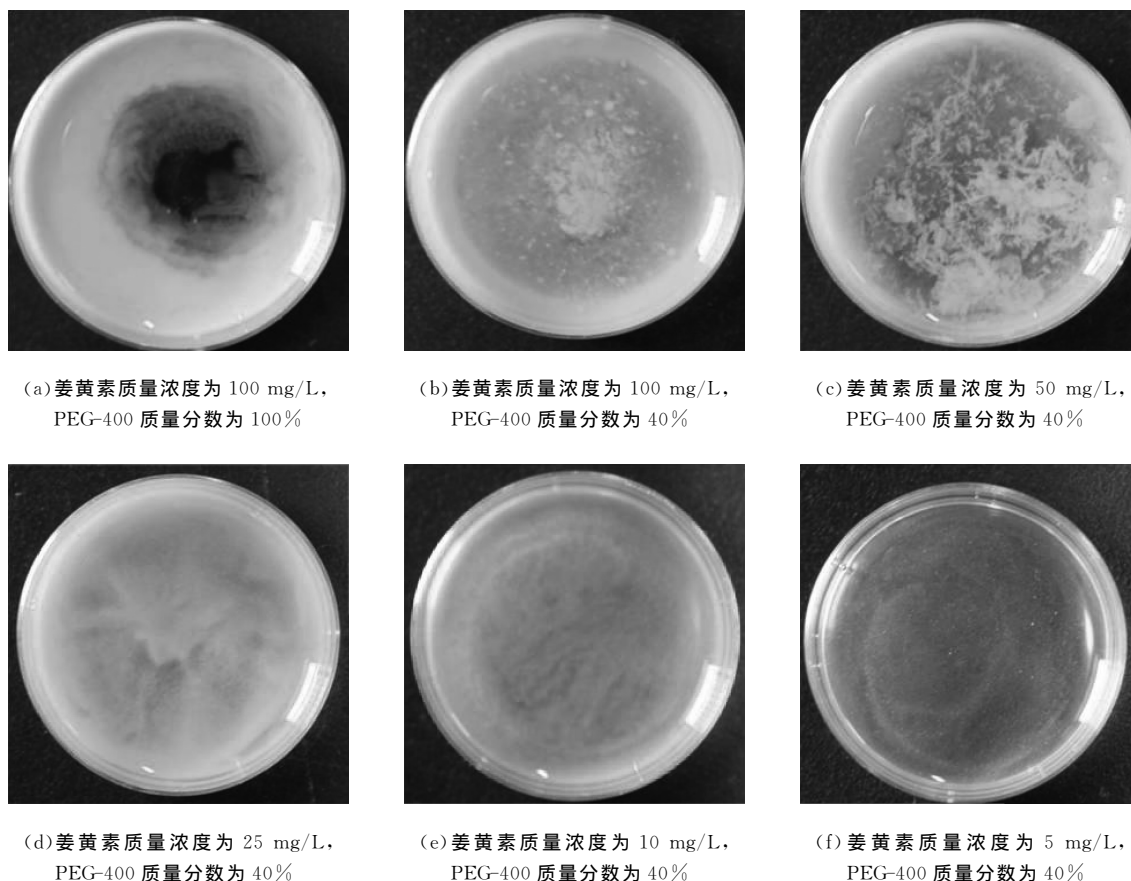


图 3 质量分数为 10% 的丝素蛋白溶液与不同质量浓度的姜黄素溶液和不同质量分数的 PEG-400 溶液的混合溶液

Fig. 3 The mixed solution of silk fibroin, curcumin with different concentrations and PEG-400 with mass fraction of 10% different mass fraction

表 1 外层药膜的正交试验参数

Table 1 The orthogonal experimental parameters of outer drug membrane

试验号	丝素蛋白			PEG-400 与丝素蛋白溶液的质量配比	温度/°C	
	A	B	C			
1#	1	1	1	5	1:3	常温
2#	1	2	2	5	1:6	60
3#	1	3	3	5	1:9	80
4#	2	1	2	10	1:3	60
5#	2	2	3	10	1:6	80
6#	2	3	1	10	1:9	常温
7#	3	1	3	15	1:3	80
8#	3	2	1	15	1:6	常温
9#	3	3	2	15	1:9	60

1.2.3 药膜形貌表征

随机选取外层药膜样品,并对其进行喷金处理 90 s,在日立 S 4800 型场发射扫描电子显微镜下观察药膜表面形态,放大倍数为 5 000。

1.2.4 二级结构表征

随机选取纯丝素膜和 9 组药膜样品,剪成粉末状,取 2 mg 样品和 20 mg 的溴化锂在玛瑙研钵中研磨,放入模具,压成薄片,利用 Thermo Nicolet 5700 型傅里叶变换红外光谱仪检测,分析其二级结构。

1.2.5 晶体结构表征

随机选取 PEG-400 与丝素蛋白溶液的质量配比为 1:3、1:6 及 1:9 的药膜样品,剪成粉末状,选用 150 目筛子筛选样品,进行下一步测试。利用

X 射线衍射仪和超能探测针计数器记录 $5^{\circ} \sim 45^{\circ}$ 之间的衍射强度曲线。

1.2.6 药物缓释表征

将不同载药量的药膜进行水蒸气处理 6 h,使其不溶于磷酸盐缓冲溶液($\text{pH}=7.4$)。精确量取药膜装于 5 mL 离心管内,加入 2 mL 磷酸盐缓冲溶液,密封后置于恒温摇床(37°C , 100 r/min)。一定时间间隔吸取 0.5 mL 待测液,同时滴加 0.5 mL 新鲜磷酸盐缓冲溶液,测定姜黄素(波长为 425 nm)的累积释放率。

2 结果及讨论

2.1 支架力学性能

支架管壁厚度为 0.3~1.5 mm,节距为 5~10 mm,轴向密度为 15~20 束/cm,单位质量为 0.03~0.06 g/cm。所获得支架经过热定型后,其径向支撑力为 30~240 cN,纵向拉伸强度大于 20 MPa,横向拉伸强度大于 10 MPa。

2.2 不同参数对药膜形貌的影响

外层药膜借助支架支撑力作用,直接贴合病灶部位,进行缓释治疗作用。因此,药膜表面平整度及空隙对于治疗效果至关重要^[24]。利用 PEG-400 诱导丝素蛋白成胶,然后风干成膜,得到了不溶于水的丝素蛋白膜,不同参数的药膜外观形貌如图 4 所示。从图 4 可以看出,7# 药膜透明度高,表面平整光滑,不存在空隙。因此,外层药膜的最佳成膜工艺参数为:丝素蛋白质量分数 15%,PEG-400 与丝素蛋白溶液的配比 1:3,温度 80°C 。

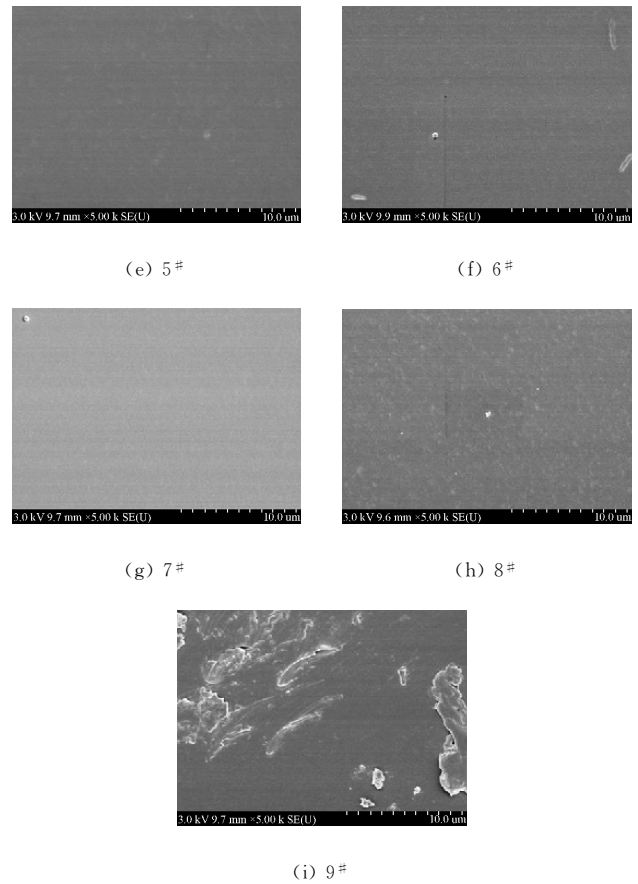
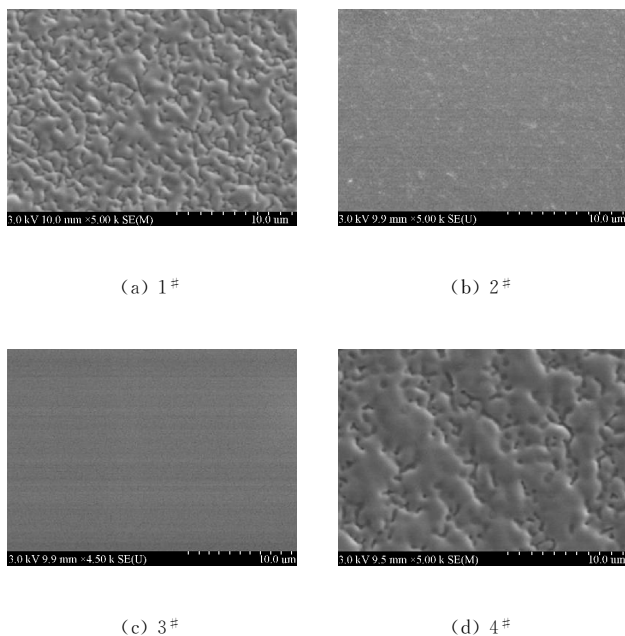


图 4 不同参数的药膜外观形貌
Fig. 4 Morphology of drug membrane with different parameters

2.3 红外光谱分析

文献^[25-26]研究表明,酰胺 I ($1600 \sim 1700\text{ cm}^{-1}$) 中, β -折叠的最大吸收峰在 $1616 \sim 1637\text{ cm}^{-1}$,无规卷曲的最大吸收峰出现在 $1638 \sim 1655\text{ cm}^{-1}$, α -螺旋的最大吸收峰在 $1656 \sim 1662\text{ cm}^{-1}$, β 转角的最大吸收峰在 $1663 \sim 1696\text{ cm}^{-1}$ 。纯丝素蛋白膜和不同参数条件下所制药膜的傅里叶变换红外光谱如图 5 所示。由图 5 可知,纯丝素蛋白膜主要以 silk I 的结构存在,而不同参数药膜的特征吸收峰发生了明显的偏移,说明丝素蛋白在处理发生了构象上的转变,由 silk I 结构转变为 silk II 结构。

2.4 X 射线衍射分析

纯丝素蛋白膜主要以 silk I 的结构存在,为了探究姜黄素的质量分数对丝素蛋白结构的影响,选取丝素蛋白质量分数为 15%,温度为 80°C , PEG-400 与丝素蛋白溶液的质量配比分别为 1:3、1:6 及 1:9^[27],观察不同配比情况下,药膜中丝素蛋白结构的转变。不同配比药膜的 X 射线衍射光谱结果如图 6 所示。由图 6 可知,药膜中丝素蛋白结构均转变成 silk II,在 20.16° 处出现了衍射峰,这种现象与

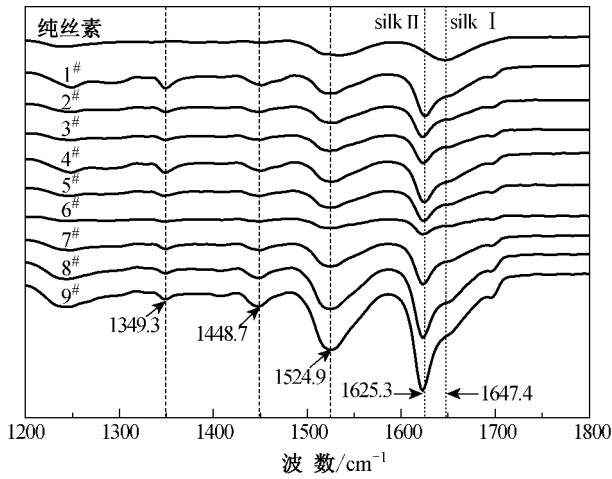


图 5 纯丝素膜及不同参数药膜的傅里叶变换红外光谱图
Fig. 5 FT-IR spectra of silk membrane and drug membrane with different parameters

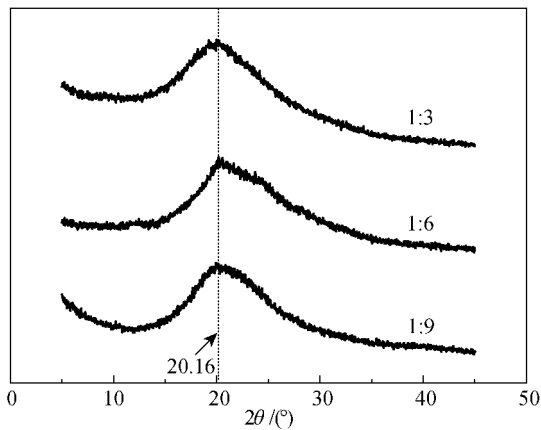


图 6 配比为 1:3、1:6 及 1:9 药膜的 X 射线衍射光谱图(丝素蛋白质量分数为 15%,温度为 80 °C)
Fig. 6 X-ray diffraction pattern of drug membrane with different ratio of 1:3, 1:6 and 1:9 (silk fibroin mass fraction was 15%, temperature was 80 °C)

FT-IR谱图显示的结果一致。

2.5 药物缓释分析

选取丝素蛋白质量分数为 15%,温度为 80 °C, PEG-400 与丝素蛋白的质量配比分别为 1:3、1:6 及 1:9 不同参数的药膜中姜黄素的释放曲线如图 7 所示。由图 7 可知,载药量越高,药物释放速率越大,累积释放率越高。载药量不同的药膜约在 200 h 内持续释放,400 h 达到药物最高释放浓度,其中,药物最高累积释放质量浓度为(13.32±0.80)mg/L,最高累积释放率为(98.67±5.93)%。由此说明所制药膜具备很好的药物缓释性能。

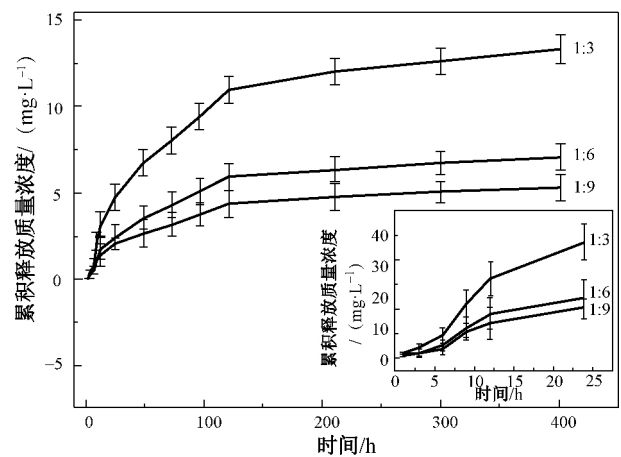
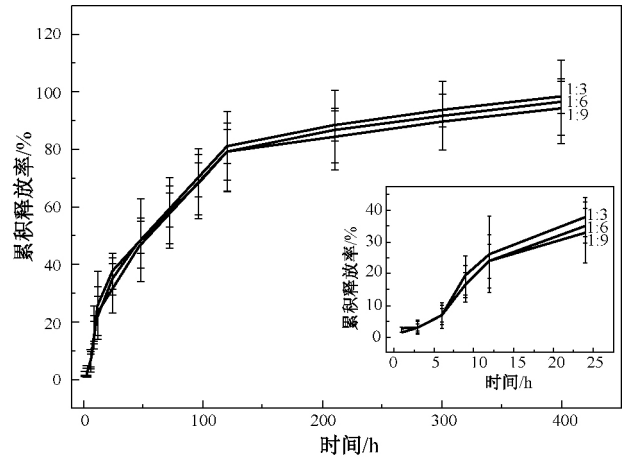


图 7 不同载药量药膜的姜黄素缓释曲线
Fig. 7 In vitro drug release profile of drug membrane with different composition

3 结 语

本文制备了一种新型丝素蛋白复合肠道支架,并探讨了内层支架力学性能,外层药膜的形貌结构、二级结构及药物缓释性能。研究表明:当丝素蛋白质量分数为 15%、PEG-400 与丝素蛋白溶液的质量配比为 1:3(姜黄素的质量分数为 0.125%)、温度为 80 °C 时,可以制备出最佳药膜;相较于纯丝素蛋白膜,药膜中的丝素蛋白的构象由 silk I 转变为 silk II。丝素蛋白搭载姜黄素纳米纤维可以实现药物的稳控释放,具备优良的药物缓释性能。因此,丝素蛋白基药物缓释功能肠道支架在治疗结直肠癌患者过程中具备一定的潜在价值。

参 考 文 献

[1] WEITA J, KOCH M, DEBUS J, et al. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2005,365: 153-165.
[2] RANSOHOFF D F, LANG C A, YOUNG G P. Colorectal

- cancer screening: Clinical guidelines and rationale [J]. *Gastroenterology*, 1997,113(4): 1423-1424.
- [3] CASIMIRO C. Etiopathogenic factors in colorectal cancer: Nutritional and life-style aspects [J]. *Nutricion Hospitalaria*, 2002,17(3): 128-138.
- [4] ZHOU X N, BERGQUIST R, LEONARDO L, et al. Schistosomiasis japonica control and research needs [J]. *Advances in Parasitology*, 2010,72: 145-178.
- [5] SIMMS I, EASTICK K, MALLINSON H, et al. Associations between mycoplasma genitalium, chlamydia trachomatis and pelvic inflammatory disease [J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2003,56: 616-619.
- [6] FOO K T, NG K C, RAUFF A, et al. Unusual small intestinal obstruction in adolescent girls: The abdominal cocoon [J]. *British Journal of Surgery*, 1978,65(6): 427-430.
- [7] JAFFE T A, MARTIN L C, THOMAS J, et al. Small-bowel obstruction: Coronal reformations from isotropic voxels at 16-section multi-detector row CT [J]. *Radiology*, 2006, 238: 135-142.
- [8] COOPER J S, PAJAK T F, FORASTIERE A A, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck [J]. *New England Journal of Medicine*, 2004,350(19): 1937-1944.
- [9] MEIROW D, NUGENT D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction [J]. *Human Reproduction Update*, 2001,7(6): 535-543.
- [10] LI G, LI F, ZHENG Z, et al. Silk microfiber-reinforced silk composite scaffolds: Fabrication, mechanical properties, and cytocompatibility [J]. *Journal of Materials Science*, 2016, 51(6): 3025-3035.
- [11] WU J, XIE X, ZHENG Z, et al. Effect of pH on polyethylene glycol (PEG)-induced silk microsphere formation for drug delivery [J]. *Materials Science & Engineering C*, 2017,80(1): 549-557.
- [12] COOK S, WENAWESER P, TOGNI M, et al. Incomplete stent apposition and very late stent thrombosis after drug-eluting stent implantation [J]. *Circulation*, 2007,115(18): 2426-2434.
- [13] YANO M, NATSUAKI M, MORIMOTO T, et al. Antiplatelet therapy and stent thrombosis after sirolimus-eluting stent implantation [J]. *Circulation*, 2009,119(7): 987-995.
- [14] RASHID T, FOLEY C L, BRIGGS T P, et al. Initial experience with full-length metal stent to relieve malignant ureteral obstruction [J]. *Journal of Endourology*, 2006, 20(5): 300-304.
- [15] 鱼建飞,白艳艳. 微生态制剂辅助治疗对小儿轮状病毒肠炎病程及肠道菌群的影响 [J]. *结直肠肛门外科*, 2016,22(3): 253-255.
- [16] 谢旭升,李刚,李翼,等. 生物医用纺织肠道支架研究进展 [J]. *产业用纺织品*, 2016,34(10): 1-10.
- [17] LI L, AHMED B, MEHTA K, et al. Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: Effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007,6(4): 1276-1282.
- [18] SANDUR S K, DEORUKHKAR A, PANDEY M K, et al. Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF- κ B activity [J]. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2009,75(2): 534-542.
- [19] CHAUHAN D P. Chemotherapeutic potential of curcumin for colorectal cancer [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8(19): 1695-1706.
- [20] HOFMANN S, FOO C T W P, ROSSETTI F, et al. Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery [J]. *Journal of Controlled Release*, 2006,111(1/2): 219-227.
- [21] UNGER R E, WOLF M, PETERS K, et al. Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: A potential for use in tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2004,25(6): 1069-1075.
- [22] MANDAL B B, KAPOOR S, KUNDU S C. Silk fibroin/polyacrylamide semi-interpenetrating network hydrogels for controlled drug release [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(14): 2826-2836.
- [23] XIE M, FAN D, CHEN Y, et al. An implantable and controlled drug-release silk fibroin nanofibrous matrix to advance the treatment of solid tumour cancers [J]. *Biomaterials*, 2016,103: 33-43.
- [24] LAWRENCE B D, MARCHANT J K, PINDRUS M A, et al. Silk film biomaterials for corneal tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2009,30(7): 1299-1308.
- [25] LEFEVRE T, RPUSSEAU M E, PEZOLET M. Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy [J]. *Biophysical Journal*, 2007, 92(8): 2885-2895.
- [26] HINO T, M T, S S. Change in secondary structure of silk fibroin during preparation of its microspheres by spray-drying and exposure to humid atmosphere [J]. *Journal of Colloid & Interface Science*, 2003,266(1): 68-73.
- [27] SANGAPPA, ASHA S, SOMASHEKAR R, et al. Quantification of degradation and surface morphology of NB7 silk fibers irradiated by 8 MeV electron beam using XRD and SEM techniques [J]. *Fibers and Polymers*, 2012,13(2): 224-230.

(责任编辑:徐惠华)