

doi:10.3969/j.issn.1001-3539.2023.03.001

TPU/ β -榄香烯气道支架3D打印制备及药物释放测试

张依¹, 潘均安², 蓝佳琳², 卓志宁², 欧阳阅翰³, 阳范文², 杨博涵², 廖甜甜², 熊梓帆², 田秀梅², 朱继翔²

(1. 广州医科大学药学院, 广州 511436; 2. 广州医科大学生物医学工程学院, 广州 511436; 3. 广州医科大学金域检验学院, 广州 511436)

摘要: 采用熔融沉积3D打印制备热塑性聚氨酯(TPU)气道支架并装载 β -榄香烯, 研究支架表面孔洞数量和打印挤出率对 β -榄香烯释放行为的影响, 探究超高效液相色谱法测试 β -榄香烯方法。采用安捷伦C18柱, 在流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(93:7)条件下测试 β -榄香烯的分离度大于1.5, 理论塔板数 $\geq 19\,000$ 。打印挤出率不变时, 支架表面孔洞越多, 药物释放量越大, 0孔洞、4孔洞、8孔洞支架的药物累计释放量分别为25.88%, 31.02%和34.41%; 但前期容易出现爆释, 4孔洞和8孔洞支架持续释放时间 ≤ 6 d。支架表面0孔洞时, 挤出率越大, 药物释放速率越低, 80%, 100%, 125%挤出率支架的药物累计释放量分别为67.76%, 38.07%和26.08%。采用超高效液相色谱法可准确测试支架中 β -榄香烯的释放速率, 通过调整3D打印的挤出率可调控支架的药物释放行为, 该研究可为载药支架的产品研发和临床应用提供指导。

关键词: 热塑性聚氨酯; β -榄香烯; 气道支架; 3D打印; 药物释放

中图分类号: TQ323.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3539(2023)03-0001-06

3D Printing Manufaction and Drug Release Test of TPU/ β -elemene Airway Stent

Zhang Yi¹, Pan Junan², Lan Jialin², Zhuo Zhining², Ouyang Yuehan³, Yang Fanwen², Yang Bohan²,

Liao Tiantian², Xiong Zifan², Tian Xiumei², Zhu Jixiang²

(1. School of Pharmaceutical Science, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China; 2. College of Biomedical Engineering, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China; 3. KingMed School of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

Abstract : Thermoplastic polyurethane (TPU) airway stent was prepared by 3D printing of molten deposition, then the β -elemene was loaded. The effect of the surface pores and the print extrusion ratio on release behavior of β -elemene was researched. Testing method of β -elemene concentration was explored by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC). The resolution of β -elemene was more than 1.5 and the number of theoretical plates was more than 19 000 when the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (93:7) with the Agilent C18 column. The cumulative drug release of 0, 4, and 8 holes of the stents are 25.88%, 31.02%, and 34.41% respectively, which is characterized with explosive release of the drug in the early stage. Continuous release time of the stents with 4 and 8 holes are less than 6 days. The drug release rate is decreased with the increase of the higher printing extrusion rate for the stent without miro-hole. The cumulative drug release of 80%, 100% and 125% extrusion rate of airway stents are 67.76%, 38.07% and 26.08% respectively. The release rate of β -elemene in the stent can be accurately measured by UHPLC, and the drug release behavior of the stent can be adjusted by adjusting the extrusion rate of 3D printing, which can provide guidance for product development and clinical application of drug loaded stents.

Keywords : thermoplastic polyurethane ; β -elemene ; airway stent ; 3D printing ; drug release

基金项目: 国家自然科学基金项目(82272160), 2022年度广东省攀登计划项目(pdjh2022b0424), 广州医科大学2023-2024年度大学生科技创新项目(2022 A086)

通信作者: 阳范文, 教授, 主要研究方向为生物医学高分子材料和3D打印

收稿日期: 2023-01-13

引用格式: 张依, 潘均安, 蓝佳琳, 等. TPU/ β -榄香烯气道支架3D打印制备及药物释放测试[J]. 工程塑料应用, 2023, 51(3): 1-6.

Zhang Yi, Pan Junan, Lan Jialin, et al. 3D printing manufaction and drug release test of TPU/ β -elemene airway stent[J]. Engineering Plastics Application, 2023, 51(3): 1-6.

气道狭窄指各种原因导致的气管、支气管等有效通气面积缩小,临床表现为胸闷、咳嗽、呼吸困难,严重者可发生呼吸衰竭而危及生命。气道支架置入是治疗气道狭窄的一种微创介入疗法,可立即解除患者呼吸困难,提高生活质量^[1-3]。然而,临床治疗发现支架植入后刺激气道容易引发再狭窄,严重影响患者预后,研究新型载药气道支架并通过药物辅助治疗有望解决上述难题。

热塑性聚氨酯(TPU)是一种力学强度高、加工性能好和生物相容性能优良的高分子材料,在医学领域得以广泛应用^[4-5]。以TPU为材料、采用3D打印技术构建个性化的气道支架在气道狭窄和气道重建方面具有良好的应用潜力^[6-7]。 β -榄香烯是从姜科姜黄属植物温郁金中提取分离出来的一种天然抗癌植物药物^[8],对多种癌细胞都具有显著的抑杀作用,还能诱导成纤维细胞凋亡及坏死^[9-15]。洪苓苓^[16]发现榄香烯对人原代气道肉芽成纤维细胞的生长有剂量依赖的抑制效应、没有时间依赖的抑制效应,说明榄香烯可有效抑制气道肉芽成纤维细胞增生。Jesse^[17]研究了紫杉醇硅胶气道支架用于预防中心气道病变中肉芽组织生长和肺癌复发,证明了载药支架治疗气道狭窄的优势。采用3D打印技术制备个性化的榄香烯气道支架,目前尚未见相似报道。个性化气道支架可与患者的气道精准匹配,控制支架中榄香烯的释放行为有望持续抑制气道肉芽成纤维细胞增生,减少气道瘢痕形成,从而降低再狭窄风险。因此,开展TPU/ β -榄香烯气道支架的研究具有良好的临床应用前景。

笔者以TPU为材料,采用3D打印制备不同结构的气道支架,然后装载 β -榄香烯,探索超高效液相色谱测试支架浸提液中药物浓度的方法,研究支架表面孔洞数量和打印挤出率对 β -榄香烯释放行为的影响,为载药气道支架的产品研发和临床应用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 主要原材料

TPU:TPU LA85,医用级,山东雷德新材料有限公司;

β -榄香烯对照品:纯度 $\geq 97\%$,上海源叶生物科技有限公司;

乙腈、甲醇:色谱级,美国BCR试剂公司;

磷酸:色谱级,山东西亚化学工业有限公司;

聚乙二醇(PEG):PEG 200,分析纯,北京酷来搏科技有限公司;

磷酸盐缓冲液(PBS):广州捷倍斯生物科技有限公司;

十二烷基硫酸钠(SDS):分子生物级,上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 主要仪器与设备

3D打印机:TT1型,广州畅德科技有限公司;

3D打印线材实验机:SESI-20/28型,广州普同实验分析仪器有限公司;

超高效液相色谱仪:1290 Infinity II型,美国安捷伦科技有限公司;

超纯水机:Milli-Q Direct 8型,美国Merck公司;

电子天平:TLE104E型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

实验室pH计:FE20型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

数控超声波清洗器:KQ-500DE型,昆山超声仪器有限公司;

气浴恒温振荡器:THZ-92 A型,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;

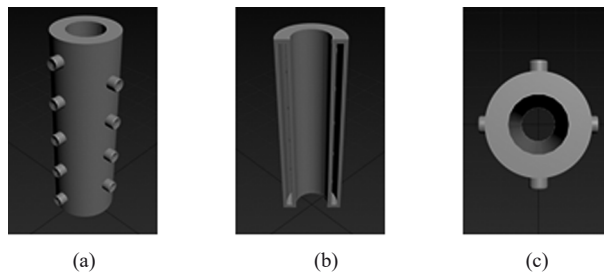
体视显微镜:SZ680型,重庆奥特光学仪器有限公司。

1.3 3D打印线材的制备

TPU在真空干燥箱中80℃下干燥48 h后,采用3D打印线材实验机在温度190℃、主机转速为40 r/min条件下制备线材,线材直径为 (3.00 ± 0.05) mm。

1.4 气道支架的3D建模

采用3Dmax软件构建内有中层空腔结构、外表面设计钉状凸起的气道支架3D模型,其外形及横截面图见图1。气道支架外径16 mm,内径9 mm,壁厚1 mm,高为50 mm,钉状凸起半径为1.5 mm,高为3 mm,钉状凸起可防止移位。



a—主视图; b—横截面图; c—俯视图

图1 气道载药支架3D模型

1.5 载药气道支架的制备

采用熔融沉积3D打印制备气道载药支架:喷头温度为225℃、热床温度为50℃、打印速度为35 mm/s、移动速度为45 mm/s、回退速度为40 mm/s,打印挤出率按不同要求分别设置为80%,100%和125%。

精密称量 β -榄香烯对照品0.1071 g,用7 mL PEG 200溶解,超声30 min使充分混匀,得质量浓度为15.30 mg/mL的 β -榄香烯样品溶液。将注射器刺穿气道支架上端面并注入0.6 mL上述溶液,然后用热焊枪封闭针孔制得载药支架。

1.6 榄香烯标准曲线的测定

精密称量 β -榄香烯对照品0.1125 g,置于10 mL棕色容量瓶中,加色谱级甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为11.25 mg/mL的 β -榄香烯储备液。依次量取 β -榄香烯储备液10,20,50,100,200,500,1000 μ L,置于100 mL棕色容量瓶中,加色谱级甲醇稀释定容,制得质量浓度为1.125,2.25,5.625,11.25,22.5,56.25,112.5 μ g/mL的 β -榄香烯标准溶液。

采用超高效液相色谱法测定标准溶液并建立标准曲线。色谱柱为安捷伦ZORBAX Eclipse Plus C18柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(93:7);流速为1.0 mL/min;柱温为25℃;检测波长为210 nm;进样量为10 μ L;色谱记录时间为15 min。绘制 β -榄香烯浓度-峰面积回归曲线,建立 β -榄香烯的液相色谱标准曲线。

1.7 支架的载药释放测试

称取20 g PBS(25℃时pH=7.4)和20 g SDS,置于2 L容量瓶中,用超纯水溶解并稀释至刻度,摇匀,配制1%的PBS-SDS溶液。

将载药支架放入50 mL的离心管,加入30 mL的1% PBS-SDS溶液进行浸提。浸提条件是温度37℃,振摇频率为100 r/min。浸提3 h后取出制得3 h释放液,将支架取出再放入装有30 mL 1% PBS-SDS新溶液的离心管中,按上述操作依次浸提6,9,12 h,1 d,2 d……20 d制得不同浸提时间的释放液,采用液相色谱测试其浓度。

2 结果与讨论

2.1 榄香烯的超高效液相色谱标准曲线研究

(1) 专属性试验。

在打印好的支架中装载0.6 mL PEG并按1.7所

述方法浸提3 h制得空白释放液,取上述空白释放液和1.7制备的3 h释放液各10 μ L,依次注入液相色谱仪,按1.6所述的色谱条件进行测定,结果见图2。从图2可知,空白释放液不会干扰 β -榄香烯的检出,该方法专属性良好。

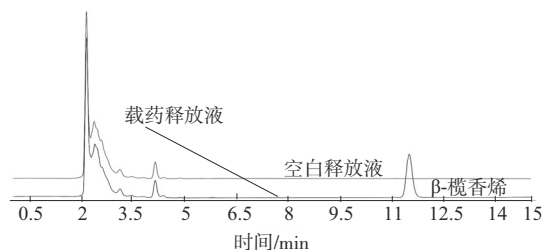


图2 专属性试验超高效液相色谱图

(2) 适用性试验。

精密吸取3 h释放液和112.5 μ g/mL的 β -榄香烯标准溶液各10 μ L,注入超高效液相色谱仪进行测定,结果见图3。从图3可知, β -榄香烯的分离度大于1.5,基线分离良好;理论塔板数以 β -榄香烯计不小于19 000。

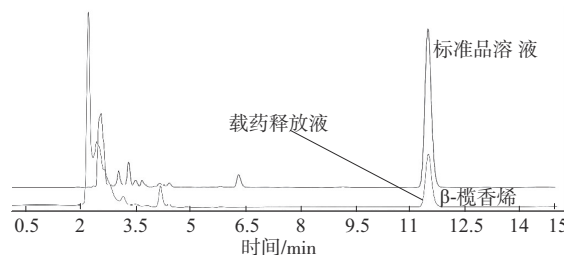


图3 适用性试验超高效液相色谱图

(3) 线性关系考察。

分别精密吸取1.6中制备的标准溶液各10 μ L,注入超高效液相色谱仪进行测定,记录峰面积。以 β -榄香烯对照品的质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归。 β -榄香烯的标准曲线及线性回归方程见图4。

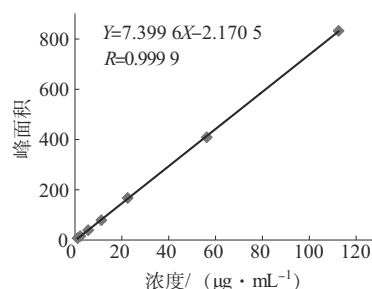


图4 β -榄香烯标准曲线

从图4可知,榄香烯在1.125~112.5 μ g/mL范围内的线性关系良好,可满足支架中榄香烯的释放速

率测试。

2.2 表面孔洞对支架药物释放行为的影响

为了研究支架表面孔洞对药物释放的影响,在支架表面分别设计0孔洞、4孔洞和8孔洞(孔径0.2 mm,图中针头的位置间隔90°设置一个),按1.5所述方法和挤出率125%的条件下制备载药支架,样品照片如图5所示,连续8 d的药物释放结果见图6。

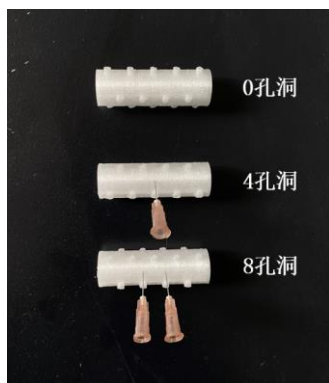
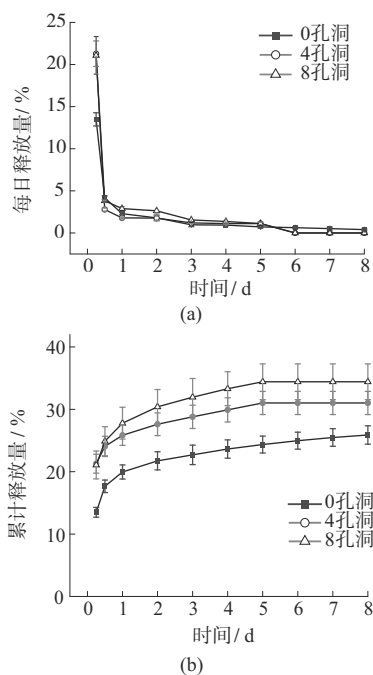


图5 不同孔洞下的气道支架



a—每日释放曲线;b—累计释放曲线

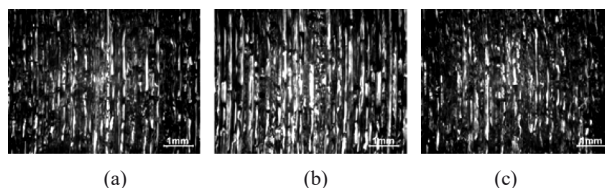
图6 不同孔洞气道载药支架的释药曲线

由图6可知,浸提时间为3 h,0孔洞、4孔洞和8孔洞气道支架中 β -榄香烯的释放量分别为13.49%、21.28%和21.08%,即出现了爆释;随后释放速率逐步下降,4孔洞和8孔洞气道支架第6天时已检测不到药物的释放,说明这两种支架无法长期持续释放药物。0孔洞、4孔洞和8孔洞支架中药物8天的累计释放量分别为25.88%、31.02%和34.41%,说明支

架表面孔洞越多,药物释放量越大;但前期容易出现爆释,持续释放时间短。0孔洞支架第8天还能检测到药物释放,说明无需特意制造孔洞,药物也能从支架中释放出来,其原因可能是3D打印的支架表面本身就存在微孔洞。

2.3 打印挤出率对药物释放行为的影响

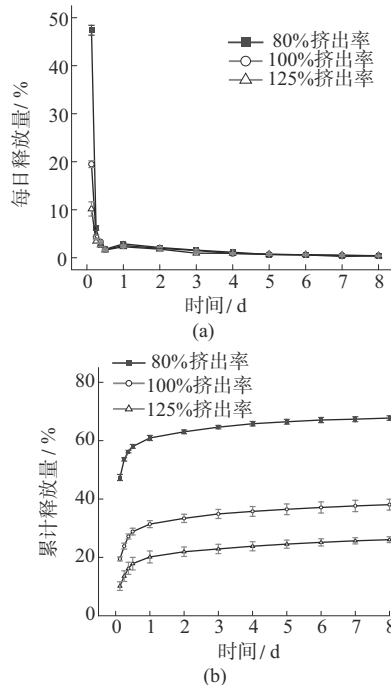
为了验证3D打印的支架表面存在的微孔洞可为药物释放提供通道,支架表面设计0孔洞,改变打印机的挤出率分别为80%、100%和125%,分别打印三种支架,并采用体视显微镜放大20倍对支架的表面进行观察,其照片如图7所示。按1.5所述方法在支架中装载药物,药物浓度和载药量相同,三种支架的药物释放曲线如图8所示。



(a) (b) (c)

挤出率:a—80%; b—100%; c—125%

图7 不同挤出率的气道载药支架体视显微镜图



a—每日释放曲线;b—累计释放曲线

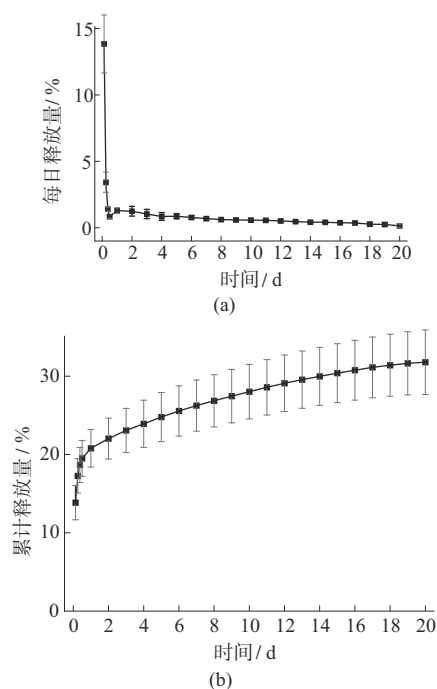
图8 不同挤出率气道载药支架的释药曲线

由图7和图8可知,挤出率越大,表面的细丝排列越紧密,微孔直径减小,数量减少。支架浸提3 h时,挤出率80%、100%和125%的支架中 β -榄香烯释放量分别为47.38%、19.49%和10.17%。说明挤出率越小,药物释放速率越高,累积释放量越大。其

原因在于熔融沉积3D打印过程中,TPU熔融后从喷嘴中流出并逐点打印,由于喷嘴的直径为0.2 mm,在点与点、丝与丝堆积过程中出现孔洞,孔洞的尺寸和数量与挤出率密切相关。降低挤出率所产生的孔洞对药物释放的影响与特意设计的微孔洞效果一致,在第6天后释放速率降低,每日释放量不到1%。挤出率分别为80%,100%,125%的支架药物平均累计释放量分别为67.76%,38.07%和26.08%。

2.4 气道载药支架的药物释放行为

为了进一步验证打印挤出率对药物释放速率和累积释放量的影响,并评估不同支架的药物释放速率波动范围,设定3D打印机的挤出率110%不变,打印0孔洞支架7个,其中1个作为空白载药,6个平行载药,20 d的药物释放结果如图9所示。



a—每日释放曲线;b—累计释放曲线

图9 气道载药支架的释药曲线

由图9可知,支架中 β -榄香烯的释放速率呈现前快后慢的趋势,3 h时平均释放量为13.85%,然后迅速下降;第1天平均累计释放量达到了20.79%,占了20天总释放量的65.42%;第4天开始药物释放趋于平缓,每日释放量为0.85%;到20天时,每日释放量降低到0.14%、累计释放量达到31.78%,再次验证了提高挤出率会降低药物释放速率和累积释放量。

综上所述,3D打印气道支架的挤出率直接影响

支架表面的微孔洞尺寸和数量,挤出率越低,表面微孔尺寸大,前期药物释放速率快,持续释放时间短,但累积释放量不完全取决于气道支架表面微孔直径和数量。要进一步提高后期释放速率和累积释放量,需对打印挤出率、药物载体和支架材料进一步改进和优化才能实现。

3 结论

(1)采用安捷伦C18色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m),流动相为乙腈-水(含0.1%磷酸)(93:7),流速1.0 mL/min,柱温25 $^{\circ}$ C,检测波长210 nm的条件下榄香烯的标准曲线线性关系良好,可检测气道载药支架中 β -榄香烯的释放量。

(2)在打印挤出率不变的条件下,支架表面微孔数量增多,药物前期释放速率增大,累积释放量增加,但前期出现爆释现象。

(3)支架表面无微孔时,降低3D打印的挤出率,支架表面微孔直径增大、数量增加,药物释放速率提高,累积释放量增大。

参考文献

- [1] 李首卓,雷玉洁,赵光强,等.气管支架植入在气道狭窄中的研究新进展[J].中国医学创新,2022,19(27):171-175.
Li Shouzhao, Lei Yujie, Zhao Guangqiang, et al. New progress of tracheal stent implantation in airway stenosis[J]. Medical Innovation of China, 2022, 19(27):171-175.
- [2] 王勇,朱海东,郭金和.支架植入治疗恶性气道狭窄的研究进展[J].介入放射学杂志,2015,24(2):172-176.
Wang Yong, Zhu Haidong, Guo Jinhe. Tracheal stent implantation for the treatment of malignant airway obstruction: Recent progress in research[J]. Journal of Interventional Radiology, 2015, 24(2): 172-176.
- [3] Hai Z, Jun Z, Kan Z, et al. A narrative review of new research progress regarding the use of airway stents in benign airway stenosis[J]. Expert Review of Respiratory Medicine, 2022, 16(6):651-659.
- [4] 张迅韬,张兆鑫,黄娇,等.热塑性聚氨酯基导热纳米复合材料的制备及性能研究进展[J].工程塑料应用,2021,49(3):161-165.
Zhang Xuntao, Zhang Zhaoxin, Huang Jiao, et al. Research progress on preparation and properties of thermoplastic polyurethane thermal conductive nanocomposites[J]. Engineering Plastics Application, 2021, 49(3):161-165.
- [5] 曾娇,汪艳,何峻涛,等.3D打印具有形状记忆效应的TPU/PCL复合材料研究[J].工程塑料应用,2021,49(9):77-81.
Zeng Jiao, Wang Yan, He Juntao, et al. Research on 3D printing TPU/PCL composite material with shape memory effect[J]. Engineering Plastics Application, 2021, 49(9):77-81.
- [6] Jung S Y, Lee S J, Kim H Y, et al. 3D printed polyurethane prosthesis for partial tracheal reconstruction: A pilot animal study[J].

- Biofabrication, 2016, 8(4). DOI:10.1088/1758-5090/8/4/045015.
- [7] 李荣荣,潘均安,阳范文,等.个性化多层结构气道支架设计与3D打印[J].工程塑料应用,2021,49(2):55-60.
- Li Rongrong, Pan Junan, Yang Fanwen, et al. Design and 3D printing of personalized multi-layer airway stent[J]. Engineering Plastics Application, 2021, 49(2):55-60.
- [8] 麻杰,陈娟,赵冰洁,等.抗癌药物 β -榄香烯及其衍生物的研究进展[J].中草药,2018,49(5):1 184-1 191.
- Ma Jie, Chen Juan, Zhao Bingjie, et al. Advance in research on anti-cancer drug β -elemene and its derivatives[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(5):1 184-1 191.
- [9] Hong L, Zeng Y, Yang D. Inhibitory effect of β -elemene on human airway granulation tissue in vivo and in vitro[J]. Respiration, 2016, 92(5):329-338.
- [10] Yu X, Xu M, Li N, et al. β -elemene inhibits tumor-promoting effect of M2 macrophages in lung cancer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 490(2):514-520.
- [11] Zhang H, Xu F, Xie T, et al. β -elemene induces glioma cell apoptosis by downregulating survivin and its interaction with hepatitis B X-interacting protein[J]. Oncology Reports, 2012, 28(6):2 083-2 090.
- [12] 王峥嵘,郭洁,范焕芳,等. β -榄香烯增强紫杉醇对卵巢OVCAR3细胞凋亡的促进作用[J].中国临床药理学杂志,2020, 36(18):2 861-2 868.
- Wang Zhengrong, Guo Jie, Fan Huanfang, et al. β -elemene enhances paclitaxel-induced apoptosis of ovarian cancer cell OVCAR3[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2020, 36(18):2 861-2 868.
- [13] Pan Y, Wang W, Huang S, et al. Beta - elemene inhibits breast cancer metastasis through blocking pyruvate kinase M2 dimerization and nuclear translocation[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2019, 23(10):6 846-6 858.
- [14] 周琴飞,龚黎燕,鲍关爱,等. β -榄香烯对骨癌痛大鼠吗啡耐受的影响及作用机制研究[J].中草药,2020, 53(10):3 070-3 077.
- Zhou Qinfei, Gong Liyan, Bao Guanai, et al. Effect of β -elemene on morphine tolerance in rats with bone cancer pain and its molecular mechanism[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 53(10):3 070-3 077.
- [15] 郭金苗,孙玉姣,付慧. β -榄香烯抗肿瘤药理作用机制及药物递送系统研究进展[J].药物评价研究,2022, 45(10):2 133-2 137.
- Guo Jinmiao, Sun Yujiao, Fu Hui. Research progress on antitumor pharmacological mechanism and drug delivery system of β -elemene[J]. Drug Evaluation Research, 2022, 45(10): 2 133 - 2 137.
- [16] 洪玲玲. β -榄香烯对气道肉芽、成纤维细胞的作用及机制的探索[D].福州:福建医科大学,2016.
- Hong Lingling. To explore the elemene's effects and mechanisms on airway granulations and fibroblasts[D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2016.
- [17] Jesse X, Hui X O, Daniela T, et al. Paclitaxel-eluting silicone airway stent for preventing granulation tissue growth and lung cancer relapse in central airway pathologies[J]. Expert Opinion on Drug Delivery, 2020, 17(11):1 631-1 645.