

基于胶原蛋白的多孔微球制备及应用研究进展

熊新^{1,2,3}, 李炜钊^{1,2,3}, 杨育灿^{1,2,3}, 张灿华^{1,2,3}, 周郁斌^{1,2,3}, 彭新生^{1,2,3}

(1. 广东医科大学药学院, 广东 东莞 523808; 2. 生物医药产业化协同创新中心, 广东 东莞 523808;

3. 广东医科大学海洋医药研究院, 广东 湛江 524023)

摘要: 胶原蛋白是一种天然生物高分子材料, 具有良好的生物相容性、生物可降解性及低免疫原性, 广泛应用于生物医用材料领域。基于胶原蛋白制得的多孔微球, 不仅对组织有良好亲和性, 还具有比表面积大、密度低、细胞黏附性好等优良特性, 是一种细胞培养与药物递送系统的极佳选择。文中综述了胶原蛋白的生理性能、多孔微球的制备工艺、多孔微球用于细胞培养和药物递送的优点, 总结了近十年来基于胶原蛋白的多孔微球在药物载体和细胞培养中的实际应用, 并对其未来发展进行了展望。

关键词: 胶原蛋白; 多孔微球; 制备工艺; 药物载体; 细胞培养

中图分类号:

文献标识码: A

文章编号: 1000-7555(2022)11-000

组织工程是20世纪80年代末由Langer等^[1]提出概念随后逐步发展起来的一门新兴学科, 细胞培养技术是组织工程最基础、最重要的环节。组织工程的目的旨在建立细胞与生物材料的三维空间复合体, 对病损组织进行形态、结构与功能的重建并达到永久性替代^[2]。支架材料作为组织工程的三大要素之一, 其性能对移植治疗效果起直接作用。良好的支架不仅具有良好的生物相容性, 还要能够吸附种子细胞, 使其在支架上增殖分化, 并且能够分泌生长因子或者吸附外源生长因子^[3]。相比一般的生物材料, 组织工程中要求的支架材料在性能要求上更高, 除了具备生物可降解性, 还要保证其降解产物对机体无毒无害^[4]。胶原蛋白为细胞外基质组成成分, 作为一种天然高分子材料被广泛应用于组织工程。

胶原蛋白(Collagen)简称胶原, 是一种最古老、含量最丰富的细胞外基质蛋白^[5]。天然的胶原是由3条肽链形成的螺旋形纤维状蛋白质。作为自然界中最丰富的蛋白质之一, 胶原是一种白色纤维性生物高分子物质, 相对分子质量为 3×10^5 , 具有特殊的三螺旋结构特征^[6]。胶原来源广泛, 不仅存在于陆地动物的韧带和肌腱中, 在海洋动物与植物中也

有报道, 目前发现并命名的胶原已达到29种, 并主要分为I, II, III, IV, V这5大类型^[5,7]。作为天然的高分子生物材料, 拥有特殊三螺旋纤维式结构并具有生物相容性、生物可降解性及较低的免疫原性等优良性质的胶原^[8], 是组织工程和药物输送系统的理想生物材料。胶原不仅能塑造成海绵、凝胶、膜敷料、微球等支架形式用于药物递送系统, 还可作为细胞培养基质用于组织工程领域。

粒径范围在1~250 μm 的多孔微球(Microspheres)^[9]往往具有相互连通的外孔和内孔、极低的质量密度以及巨大的比表面积, 可构建细胞增殖良好微环境, 且具有优异的吸附性能^[10,11], 可作为细胞大量增殖的3D细胞载体^[12]; 对于大分子药物如核酸、蛋白质、细胞及生长因子等, 微球也是一种理想的载药体系^[13]。

1 胶原蛋白的生物学特性

1.1 生物相容性好

胶原是生物体结缔组织中的重要成分, 具有优良生物相容性, 可以诱导细胞增殖、分化。胶原分子水平上特殊的三螺旋结构为细胞外基质构建了网络支架, 能对细胞起到锚定和支持的作用, 提

供了增殖分化的良好微环境^[14]。

1.2 低免疫原性

在1954年以前,胶原被认为是不具备抗原性的,但研究表明,胶原具有3类抗原决定簇,分别是由完整三螺旋结构、三螺旋结构中的氨基酸序列以及位于胶原蛋白非螺旋末端区的端肽引起的^[15]。而端肽是引起胶原免疫原性的主要因素,常使用蛋白酶来去除端肽,以降低其免疫原性^[16]。

1.3 可生物降解性

胶原是一种可生物降解的物质,在相关蛋白酶的特异性作用下,胶原的肽链被切割,三螺旋结构受到破坏后使得胶原被降解成各种片段,被切割的胶原片段则通过2种方式进一步降解^[17]:一种是在体温条件下自发变性,变性的胶原蛋白片段被酶降解成寡肽或氨基酸,最后被机体重新利用或代谢排出;另一种是通过结缔组织细胞和炎症细胞的吞噬作用,将胶原片段吞噬,并通过溶酶体进一步降解。

1.4 止血与修复性能

胶原具有良好的止血作用,胶原可通过与血小板结合促进血小板聚集,也可通过激活内源性凝血途径直接促进凝血^[18]。此外,胶原还是组织创面愈合的主要结构蛋白,对肉芽组织生成具有促进作用,可加速伤口创面的愈合。

1.5 力学性能

胶原是一类由3条左手螺旋的多肽链相互缠绕形成右手超螺旋结构的高分子蛋白质,这种特殊的三螺旋结构对胶原的力学性能有着重要影响,使得胶原具有一定的力学强度,同时胶原分子内和分子间的各种次级键也对维持胶原的稳定性起着非常重要的作用^[19]。此外,还可通过外源化学、物理和生物交联修饰胶原的分子结构,以最大限度地提高其

机械稳定性^[20]。

2 多孔微球在细胞培养与药物递送中的特点

2.1 在细胞培养中的优点

组织工程中往往需要大量的种子细胞,但从人体自身获得的细胞数量有限,所以一般需要在体外对细胞进行扩增。常采用单层培养法,其具有培养简单、易操作、费用低等优点;但单层培养法无法模拟细胞在体内的微环境,导致细胞形态发生改变,甚至细胞功能也会出现变异。1967年,Wezel^[21]首次采用球形微载体大规模培养动物细胞,采用多孔微球培养细胞具有以下优点:(1)相对于细胞的单层培养,多孔微球培养能够模拟细胞在体内增殖和生长的三维环境,为细胞最佳生长、分化提供所需的各种条件;(2)多孔微球的表面及内部具有多孔结构,导致其比表面积增加,可为贴壁依赖性细胞的增殖生长提供大的表面积,有利于细胞的大量黏附;(3)相对传统的单层培养,多孔微球培养细胞由于自身具有的低密度、高比表面积等优点,可兼具单层培养和悬浮培养的优势,具有均相培养的特点。

2.2 在药物递送中的优点

核酸、蛋白质、细胞及细胞因子等大分子药物为治疗癌症、心血管疾病等提供了新的治疗方案。微球递送大分子药物具有以下优点:(1)微球对某些药物本身的不良气味及稳定性能起到相应的掩盖和稳定作用;(2)具有缓释控释作用,可避免出现血药浓度峰谷现象,提高疗效而减小毒副作用;(3)微球可全身给药,也可直接注射至靶区达到靶向给

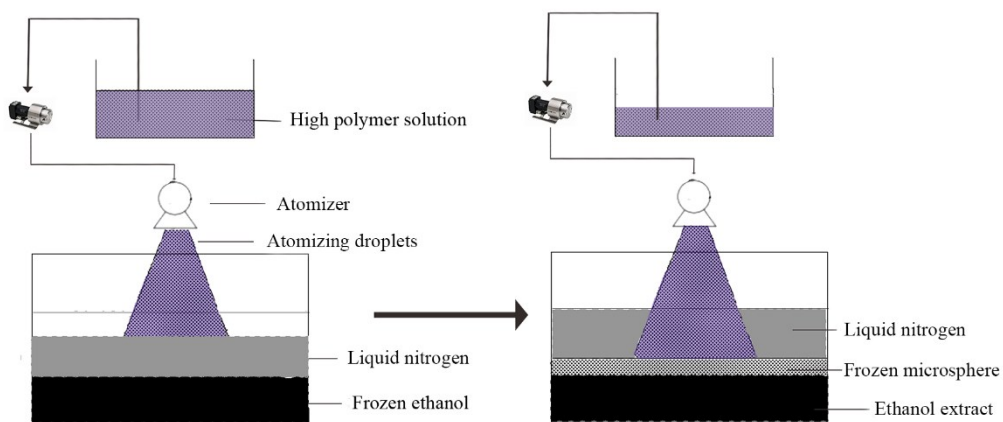


Fig.1 Flow chart of microspheres prepared by spray drying method

药的效果。

3 多孔微球的一般制备方法

目前,多孔微球的制备方法较多,但大多是从喷雾干燥法、相分离法和乳化-溶剂挥发法这3种方法改进而来^[22]。

3.1 喷雾干燥法

如 Fig.1 所示,将分散均匀的聚合物溶液利用雾化器在惰性气体形成的热气流中喷雾,溶解在聚合物中的溶液迅速挥发,聚合物收缩成壳后便得到粒径均匀的微球^[23]。聂华丽等^[24]利用喷雾干燥法制备了大小较为均一、形貌完整的胶原/壳聚糖复合微球,将其加工成含该微球的保湿面膜,不仅可有效锁住水分,还具有具有良好的生物相容性。该法操作简便、条件温和、可用于多孔微球的大规模制备,但操作环境中的高温条件,对热敏性药物进行了限制。近年来,将喷雾干燥与冷冻干燥结合起来的低温喷雾干燥技术,便可实现降低温度的目的,但仍需对微球粒径可控化进一步研究。

3.2 相分离法

如 Fig.2 所示,在药物与聚合物材料形成的混合溶液中,通过向其中加入无机盐、非溶剂物质等适当的手段降低材料的溶解度,自溶液中产生一个凝聚相,这种微球的制备方法便被称为相分离法^[25]。

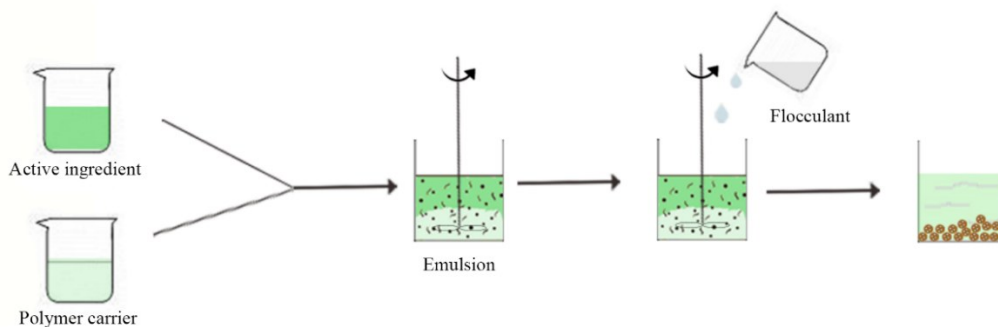


Fig.2 Flow chart of the preparation of microspheres by phase separation

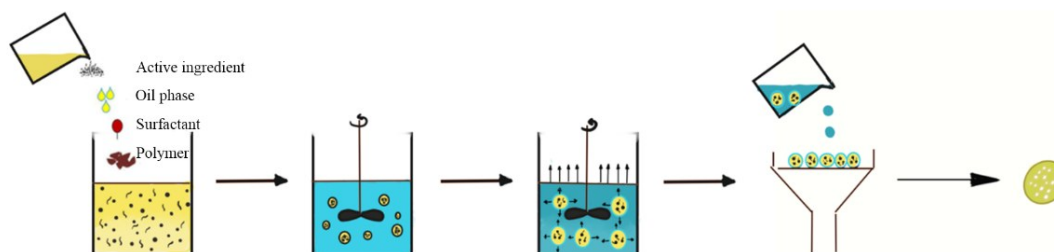


Fig.3 Flow chart of microspheres prepared by emulsion solvent volatilization

该法适用于亲水性药物的微球制备,但易受凝聚剂和溶剂残留的影响,产生生物毒性、环境污染等问题。Keshaw 等^[26]基于相分离的热诱导相分离(TIPS)工艺制备出了多孔胶原微球,该微球具有良好的生物活性,微球与肌成纤维细胞一起培养比细胞单独培养时更能刺激并增加血管内皮生长因子(VEGF)的分泌。

3.3 乳化溶剂挥发法

对于微球制备来说,乳化溶剂挥发法是常用的方法,如 Fig.3 所示将不相混溶的2种液体通过机械搅拌或超声乳化方式制成 O/W, W/O, W/O/W, O/W/O 等类型乳剂,被分散成乳滴的液体为内分散相,分散乳滴的液体为外连续相,然后使内分散相溶剂在一定条件下挥发除去,成球材料析出固化后便得到微球^[11, 27]。该法制得的微球形状优良,结构紧密。Matsuhashi 等^[9]利用 W/O 乳液技术制备的类似于天然组织胶原束微结构的纤化胶原微球(FCM),研究发现在 FCM 上形成的细胞网络使得以 FCM 为支架构建三维组织样结构成为可能。但制备过程繁琐在一定程度上限制了其推广使用,当前选择添加交联剂,可加快微球成型速度,还可获得不同性能,但对绿色交联剂的选择与其它交联方式的研究,仍需进一步探讨。

4 基于胶原的多孔微球的应用

4.1 细胞培养

基于胶原的多孔微球,不仅保持了胶原的优良性质,同时还具有多孔微球的优势,在细胞的体外培养中有着广泛的应用。

相比细胞的传统培养,多孔微球培养不仅能保持细胞表型,还能促进细胞的黏附与增殖能力。Yuan 等^[28]利用胶原微球对兔髓核(NP)细胞进行培养,与单层培养对比,胶原微球可维持 NP 细胞存活并保持其表型特征;Kim 等^[29]制备的胶原/磷灰石复合微球,对大鼠来源的间充质干细胞(MSCs)便具有良好的黏附和生长作用;Zhang 等^[30]将胶原(CoI)、细菌纤维素(BC)、骨形态发生蛋白-2(BMP-2)制备的 CoI/BC/BMP-2 三维多孔微球,微球表面粗糙、孔隙丰富,实验显示该微球能有效促进小鼠 MC3T3-E1 细胞的黏附和增殖,此外,其制备的 CoI/

BC 多孔微球^[31]也对 MC3T3-E1 细胞的增殖起到了促进作用。

微球培养除了对细胞达到增殖作用,也可促进细胞分化。Liu 等^[32]制备的胶原水凝胶微球,与细胞颗粒和胶原水凝胶块状相比,在体外培养诱导 MSCs 显示具有更好的软骨分化潜能;Barbara 等^[33]将 MSCs 微囊化为胶原/MS C 微球,该微球在接触和非接触共培养中均能诱导 MSCs 向成骨细胞分化;Khatami 等^[34]将胶原、海藻酸钠和纳米二氧化硅制成的复合微球,与海藻酸钠/纳米二氧化硅微球相比可提高人成骨细胞的成骨潜能;Mansouri 等^[35]通过胶原/海藻酸钠复合微球(CAM)培养小鼠胚胎干细胞研究其向可能的原始生殖细胞(PGCs)分化的能力,与海藻酸钠微球相比,在 CAM 中的胚胎干细胞向 PGCs 分化的潜能更高;Li 等^[36]将 MSCs 包埋在基于胶原纳米纤维网状结构组成的固体微球中,该微球

Tab.1 Selection of microsphere culture and application of different types of cells

Cell	Microsphere types	Microsphere action	Source
Myofibroblast	Collagen microspheres	Stimulates and significantly increases the secretion of VEGF	[26]
	Collagen hydrogel microspheres	Inducing cartilage differentiation of MSC	[32]
	Collagen microspheres	Induce osteogenic differentiation of MSC	[33]
MSCs	Collagen/apatite composite microspheres	Promote MSC adhesion and growth	[29]
	Collagen solid microspheres	Promote the proliferation and differentiation of MSC and reduce the risk of treatment	[36]
MG-63	Collagen/sodium alginate/nano-silica composite microspheres	Improve the osteogenic potential of human osteoblasts	[34]
mESCs	Collagen/sodium alginate composite microspheres	Improve the potential of mESCs to differentiate into PGCs	[35]
NP	Collagen microspheres	Maintain the survival and phenotype of NP	[28]
	CoI/BC/BMP-2 3D porous microsphere	Promote cell proliferation and adhesion	[30]
MC3T3-E1	CoI/BC porous microsphere	Promote cell proliferation	[31]
HEK293	Collagen microspheres	Increase the GDNF production of cells	[37]
Chondrocytes	Collagen hydrogel microspheres	Promote organizational repair and integration capabilities	[38]
hOACs	Collagen microspheres	Maintain cell phenotype and can be used as an in vitro model for drug screening	[39]
LF	Collagen microspheres	As a disease microenvironment model for disease research	[40]

不仅支持 MSCs 附着、存活、增殖、迁移、分化和基质重塑, 将其输注至椎间盘, 还可很好地维持动态力学性能, 显著降低骨赘形成的风险。

用于细胞培养的微球, 还应促进相关生长因子的分泌, 以更好应用于组织工程中。Wong 等^[37]报道了一种用于分泌胶质细胞源性神经生长因子(GDNF)的 HEK293 细胞的 3D 胶原微球培养系统, 与单层培养相比, 细胞的 GDNF 产量明显增加, 且在第 10 d 达到高峰时分泌的 GDNF 依旧具有生物活性; Yu 等^[38]利用胶原水凝胶微球与同种异体软骨细胞构建人工软骨颗粒(ACPs), 将 ACPs 用于体内修复兔骨软骨缺损, 结果显示 ACPs 具有较好的软骨修复效果和宿主组织的整合能力。

此外, 也可将相关细胞包裹在胶原微球中, 通过细胞的培养构建相关疾病模型, 对疾病治疗进行药物筛选。Yeung 等^[39]将人骨关节炎软骨细胞(hOACs)微囊化为胶原微球, 与传统的单层培养和 3D 颗粒培养相比, 胶原/hOAC 微球更好地保持了 hOACs 的表型, 可作为骨关节炎疾病改良剂筛选平台的体外模型; Cummins 等^[40]将肺成纤维细胞包裹在胶原微球中, 建立了一个纤维化微环境的高保真模型, 用于肺纤维化疾病的研究。

综上所述, 基于胶原的多孔微球虽然在促进细胞增殖、分化、相关因子释放等方面取得了成功(见 Tab.1), 但 3D 系统的复杂性随着众多参数的考虑也

逐渐变得明显, 其中包括如何进一步模拟优化体内环境、对不同支架材料的选择、细胞的来源及如何在支架上分布更均匀等, 仍需深入研究。

4.2 药物递送

具有高比表面积的多孔微球, 内外孔隙可提高药物的载药量, 释放时可通过对空间和控制时间的控制增强药物包封的有效性、耐受性及患者依从性, 长期以来广泛应用于药物递送系统^[41]。

胶原基微球往往可增加药物的载药量。Seong 等^[42]制备的多孔磷酸钙(BCP)/胶原复合微球, 通过绿色荧光蛋白(GFP)进行载药量实验, 结果显示该微球比 BCP 微球载药量更高; 通过 BMP-2 进行药物释放实验, 结果显示由于胶原的药物滞留作用, BCP/胶原复合微球初始释放度达到 57% 后便进行相对恒定的释放, 且该微球释放的药物总量(4.9 μg) 约为 BCP 微球释放量(2.6 μg) 的 2 倍, 表明胶原的存在提高了载药效率。Kozłowska 等^[43]制备的负载胶原/明胶微球的三维多孔胶原/明胶/羟乙基纤维素基质, 对金盏花提取物进行载药, 结果显示含有该微球的基质的载药量比不含该微球的基质高, 微球的加入提高了基质的载药量。

微球还可起到控释缓释的作用。Nagai 等^[44]制备的直径在 1~30 μg 的可注射胶原微球, 将其用于组织工程中重组人血管内皮生长因子(rhVEGF)的递送, 持续释放了 4 周, 表明胶原微球具有持续释放

Tab.2 Selection and application of microspheres of different drugs

Drug	Microsphere types	Microsphere action	Source
GFP	BCP/collagen composite microspheres	Increase the drug loading of GFP	[42]
BMP-2		Increase the total amount of drug release	
Marigold extract	Collagen/gelatin microspheres	Improve the drug loading and release performance of the matrix	[43]
rhVEGF	Collagen microspheres	Collagen microspheres release rhVEGF continuously for 4 weeks.	[44]
Curcumin	Collagen microspheres	Microspheres have sustained release effect	[45]
BOE	Collagen microspheres	The maximum drug loading of BOE was 89%, and the release rate in vitro reached 78% within 125 h	[46]
SS	Collagen microspheres	The release of SS lagged obviously, and the higher the collagen content, the longer the release curve	[47]
Doxorubicin	Collagen/poly (3- acrylamidophenylboric acid) nanospheres	Microspheres have sustained release and selective release from tumor site	[48]
Astrocytic cell	Collagen microspheres	Transporter cells in the treatment of damaged nerve tissue	[49]
¹³¹ I labeling	Collagen/chitosan composite microspheres	Improve stability and tumor killing effect	[50]

rhVEGF 的潜力。殷丹^[45]制备的包载姜黄素的胶原微球,微球整体形态呈圆整球型,粒径分布在 50~80 μm ,体外药物释放度试验表明负载姜黄素的胶原微球具有明显的缓释作用;Muthukumar 等^[46]制备胶原微球负载 *Bixa orellana* 植物提取物(BOE),BOE 的载药量最大达到 89%,体外释放度在 125 h 内达到 78%;Yang 等^[47]开发了一种基于胶原微球的甾体皂苷(SS)制剂,优化后的 SS/胶原微球平均粒径为 $(8.68\pm 0.34) \mu\text{m}$,包封率为 $67.63\%\pm 1.31\%$,体外释药表明 SS 的释放明显滞后,且胶原含量越高,释药曲线越长;蒋海燕等^[48]制备的负载阿霉素的胶原蛋白/聚(3-丙烯酰胺基苯硼酸)纳米微球,体外释放结果显示该微球具有很好的缓释作用和肿瘤部位选择性释放的特性。

微球也可用作某些细胞疗法的细胞载体,直接或间接对疾病进行治疗。Berndt 等^[49]制备的包裹星形胶质细胞的胶原微球,研究证明了该微球可作为细胞的载体,促进受损神经组织的神经再生。此外,修饰微球自身也可达到治疗的目的。李林等^[50]等制备的表面光滑、分散良好且平均粒径在 $(5.1\pm 1.2) \mu\text{m}$ 的胶原/壳聚糖复合微球,运用氯胺 T 法对其进行 ¹³¹I 标记,得到的放射性核素微球用于肝癌的治疗,经动物实验表明该复合微球具有很高的 ¹³¹I 标记率和体内外稳定性及良好的肿瘤杀伤效果。

对于药物递送,微球虽然在提高药物递送效率、挖掘药物治疗潜力等方面可圈可点(见 Tab.2),但仍存在不足。如何使载药量更高、提高包封率、优化控释缓释药物行为等缺点,都使得研究人员在今后的研究中需要对胶原进行进一步的修饰或复合其它材料,优化微球的制备技术,从而加大微球的应用。

5 结论与展望

胶原蛋白作为一类天然的高分子生物材料,具有良好的生物相容性、生物可降解性和极低的免疫原性。而基于胶原蛋白制备的多孔微球,在保持其对组织良好亲和性的同时,还具有很高的比表面积、较低的密度及细胞吸附性,是一种理想的 3D 细胞培养和药物递送载体材料。目前,胶原在美容、创面止血、保健等方面应用广泛,但基于胶原蛋白微球在药物递送与细胞培养系统中的研究尚处于初期阶段。而随着生物技术的发展与“复合材料”、“合成微球”的进一步研究,胶原蛋白的应用前景应该更加广阔。

参考文献:

- [1] Langer R. Tissue engineering [J]. *Molecular Therapy*, 2000, 1: 12-15.
- [2] Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering [J]. *Science*, 1993, 260: 920-926.
- [3] O'Brien F J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering [J]. *Materials Today*, 2011, 14: 88-95.
- [4] Nuelle C W, Cook J L, Gallizzi M A, *et al.* Posterior single-incision semitendinosus harvest for a quadrupled anterior cruciate ligament graft construct: determination of graft length and diameter based on patient sex, height, weight, and body mass index [J]. *Arthroscopy*, 2015, 31: 684-690.
- [5] Sorushanova A, Delgado L M, Wu Z, *et al.* The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31: 1801651.
- [6] Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55: 1531-1546.
- [7] Koopmans G, Hasse B, Sinis N. Chapter 19 the role of collagen in peripheral nerve repair [J]. *International Review of Neurobiology*, 2008, 87: 363-379.
- [8] Kirkness M W, Lehmann K, Forde N R. Mechanics and structural stability of the collagen triple helix [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 53: 98-105.
- [9] Matsuhashi A, Nam K, Kimura T, *et al.* Fabrication of fibrillized collagen microspheres with the microstructure resembling an extracellular matrix [J]. *Soft Matter*, 2015, 11: 2844-2851.
- [10] Ghosh Dastidar D, Saha S, Chowdhury M. Porous microspheres: synthesis, characterisation and applications in pharmaceutical & medical fields [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 548: 34-48.
- [11] Cai Y, Chen Y, Hong X, *et al.* Porous microsphere and its applications [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8: 1111-1120.
- [12] Lastra M L, Gomez Ribelles J L, Cortizo A M. Design and characterization of microspheres for a 3D mesenchymal stem cell culture [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 196: 111322.
- [13] Zhai J, Ou Z, Zhong L, *et al.* Exenatide-loaded inside-porous poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres as a long-acting drug delivery system with improved release characteristics [J]. *Drug Delivery*, 2020, 27: 1667-1675.
- [14] Fields G B. The collagen triple-helix: correlation of conformation with biological activities [J]. *Connective Tissue Research*, 1995,

- 31: 235-243.
- [15] Lynn A K, Yannas I V, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2004, 71: 343-254.
- [16] Chvapil M. Collagen sponge- theory and practice of medical applications [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1977, 11: 721-741.
- [17] Bailey A J. The fate of collagen implants in tissue defects [J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2010, 8: 5-12.
- [18] Shi X, Fang Q, Ding M, *et al.* Microspheres of carboxymethyl chitosan, sodium alginate and collagen for a novel hemostatic in vitro study [J]. *Journal of Biomaterials Applications*, 2015, 30: 1092-1102.
- [19] Shoulders M D, Raines R T. Collagen structure and stability [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78: 929-958.
- [20] Gu L, Shan T, Ma Y X, *et al.* Novel biomedical applications of crosslinked collagen [J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37: 464-491.
- [21] Wezel A L V. Growth of cell- strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture [J]. *Nature*, 1967, 216: 64-65.
- [22] Okada H T. Biodegradable microspheres in drug delivery [J]. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1995, 12: 1-99.
- [23] Burke P A, Klumb L A, Herberger J D, *et al.* Poly(lactide- co- glycolide) microsphere formulations of darbepoetin alfa- spray drying is an alternative to encapsulation by spray-freeze drying [J]. *Pharmaceutical Research*, 2004, 21: 500-506.
- [24] 聂华丽, 宋旻, 刘琳, 等. 一种含壳聚糖/胶原蛋白微球的保湿面膜的制备方法: 中国, 105560081A[P]. 2016-05-11
- [25] Yeo Y, Basaran O A, Park K. A new process for making reservoir-type microcapsules using ink- jet technology and interfacial phase separation [J]. *Journal of Controlled Release*, 2003, 93: 161-173.
- [26] Keshaw H, Thapar N, Burns A J, *et al.* Microporous collagen spheres produced via thermally induced phase separation for tissue regeneration [J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6: 1158-1166.
- [27] Ogawa Y, Yamamoto M, Okada H, *et al.* A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic- glycolic) acid [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1988, 36: 1093-1103.
- [28] Yuan M, Leong K W, Chan B P. Three- dimensional culture of rabbit nucleus pulposus cells in collagen microspheres [J]. *The Spine Journal*, 2011, 11: 947-960.
- [29] Kim H W, Gu H J, Lee H H. Microspheres of collagen-apatite nanocomposites with osteogenic potential for tissue engineering [J]. *Tissue Engineering*, 2007, 13: 965-973.
- [30] Zhang W, Wang X C, Li X Y, *et al.* A 3D porous microsphere with multistage structure and component based on bacterial cellulose and collagen for bone tissue engineering [J]. *Carbohydrate polymers*, 2020, 236: 116043.
- [31] Zhang W, Wang X C, Wang J J, *et al.* Drugs adsorption and release behavior of collagen/bacterial cellulose porous microspheres [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 196-205.
- [32] Liu J, Yu C, Chen Y, *et al.* Fast fabrication of stable cartilage-like tissue using collagen hydrogel microsphere culture [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5: 9130-9140.
- [33] Chan B P, Hui T Y, Wong M Y, *et al.* Mesenchymal stem cell-encapsulated collagen microspheres for bone tissue engineering [J]. *Tissue Engineering*, 2010, 16: 225-235.
- [34] Khatami N, Khoshfetrat A B, Khaksar M, *et al.* Collagen-alginate- nano- silica microspheres improved the osteogenic potential of human osteoblast- like MG- 63 cells [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120: 15069-15082.
- [35] Mansouri V, Salehi M, Omrani M D, *et al.* Collagen- alginate microspheres as a 3D culture system for mouse embryonic stem cells differentiation to primordial germ cells [J]. *Biologicals*, 2017, 48: 114-120.
- [36] Li Y Y, Diao H J, Chik T K, *et al.* Delivering mesenchymal stem cells in collagen microsphere carriers to rabbit degenerative disc: reduced risk of osteophyte formation [J]. *Tissue Engineering Part A*, 2014, 20: 1379-1391.
- [37] Wong H L, Wang M X, Cheung P T, *et al.* A 3D collagen microsphere culture system for GDNF- secreting HEK293 cells with enhanced protein productivity [J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 5369-5380.
- [38] Yu C, Liu J, Lu G, *et al.* Repair of osteochondral defects in a rabbit model with artificial cartilage particulates derived from cultured collagen- chondrocyte microspheres [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6: 5164-5173.
- [39] Yeung P, Cheng K H, Yan C H, *et al.* Collagen microsphere based 3D culture system for human osteoarthritis chondrocytes (hOACs) [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 12453.
- [40] Cummins K A, Bitterman P B, Tschumperlin D J, *et al.* A scalable 3D tissue culture pipeline to enable functional therapeutic screening for pulmonary fibrosis [J]. *APL Bioengineering*, 2021, 5: 046102.

- [41] Lengyel M, Kállai- Szabó N, Antal V, *et al.* Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery [J]. *Scientia Pharmaceutica*, 2019, 87: 20.
- [42] Seong Y J, Song E H, Park C, *et al.* Porous calcium phosphate-collagen composite microspheres for effective growth factor delivery and bone tissue regeneration [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 109: 110480.
- [43] Kozłowska J, Stachowiak N, Sionkowska A. Collagen/gelatin/hydroxyethyl cellulose composites containing microspheres based on collagen and gelatin: design and evaluation [J]. *Polymers*, 2018, 10: 456.
- [44] Nagai N, Kumasaka N, Kawashima T, *et al.* Preparation and characterization of collagen microspheres for sustained release of VEGF [J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2010, 21: 1891-1898.
- [45] 殷丹. 胶原的性质与姜黄素胶原微球的制备及质量研究 [D]. 武汉:湖北中医学院, 2006.
- Yin D. Study on the properties of collagen and the preparation and quality of curcumin collagen microspheres[D]. Wuhan: Hubei College of Chinese Medicine, 2006
- [46] Muthukumar T, Sankari D, Tamil Selvi A, *et al.* Preparation, characterization, and in vitro bioactivity of Bixa orellana extract-impregnated collagen microspheres [J]. *Journal of Materials Science*, 2014, 49: 5730-5737.
- [47] Yang C, Wu H, Wang J. Formulation and evaluation of controlled-release of steroidal saponins-loaded collagen microspheres [J]. *Materials Technology*, 2019, 34: 534-539.
- [48] 蒋海燕, 奚庆华, 祁雷,等. 一种新型负载阿霉素的胶原蛋白-聚(3-丙烯酰胺基苯硼酸)的纳米级药物载体及其制备方法: 中国, 105616348A[P]. 2016-06-01.
- [49] Berndt M, Li Y, Seyedhassantehrani N, *et al.* Fabrication and characterization of microspheres encapsulating astrocytes for neural regeneration [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017, 3: 1313-1321.
- [50] 李林, 蔡华伟, 庞富文,等. 一种放射性碘标记的可生物降解壳聚糖#胶原复合微球药物的制备方法及应用, 中国, 106344939A[P]. 2017-01-25.

Preparation and Application of Porous Microspheres Based on Collagen

Xin Xiong^{1,2,3}, Weizhao Li^{1,2,3}, Yucan Yang^{1,2,3}, Canhua Zhang^{1,2,3}, Yubin Zhou^{1,2,3}, Xincheng Peng^{1,2,3}

(1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. Biomedical Innovation Center, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 3. Marine Biomedical Research Institute, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

ABSTRACT: Collagen is a kind of natural biopolymer material, which has good biocompatibility, biodegradability and low immunogenicity, so it was widely used in the field of biomedical materials. Porous microspheres based on collagen not only have good affinity to tissue, but also have excellent properties such as large specific surface area, low density and good cell adhesion, so they are an excellent choice for cell culture and drug delivery system. In this paper, the physiological properties of collagen, the preparation technology of porous microspheres and the advantages of porous microspheres in cell culture and drug delivery were reviewed. The practical applications of porous microspheres based on collagen in drug carriers and cell culture in recent ten years were summarized, and their future development was prospected.

Keywords: collagen; porous microsphere; preparation process; drug carrier; cell culture