

文章编号:1000-582X(2006)12-0111-05

## bFGF 药物缓释系统的构建\*

李绍洪<sup>1</sup>,蔡绍哲<sup>1</sup>,刘彬<sup>1</sup>,麻开旺<sup>1</sup>,李苑<sup>1</sup>,李校堃<sup>2</sup>

(1. 重庆大学生物工程学院,重庆 400030;2. 暨南大学基因药物工程研究中心,广州 510632)

**摘要:**此研究的目的是为药物 bFGF 构建一个缓释系统,此系统可用于修复损伤的外周神经、损伤脊髓,或作为某些需要长效释放的药物的载体.制备此载药系统的方法是:先制备含 bFGF 的明胶微球,再在此微球表面包覆一层疏水材料 PLGA(聚乳酸乙醇酸),采用此方法制备的复合微球的直径在 5-18 $\mu\text{m}$ ,bFGF 封装率达到 80.5%,释药实验显示该复合系统能持续长时间的释放 bFGF 并保护其生物活性.

**关键词:**PLGA(聚乳酸乙醇酸);明胶;bFGF(碱性成纤维细胞生长因子);微球;持续释放

**中图分类号:**R944.2

**文献标识码:**A

bFGF 在体内容易被酶水解,其半衰期只有 3~10 min<sup>[1]</sup>,所以其利用率很底,其物理化学性质和生物学性质也不同于传统药物.这些性质包括分子大小、生物半衰期、构型的稳定性和可容性以及给药量等.对于传统药物释放良好的系统不一定适合于 bFGF 药物.因此,必须为其设计一种合适的释放系统,因为不可降解性材料的诸多缺点,人们都把目光转向良好的生物可降解性材料的研究.生物可降解性聚合物系统大体可以归结为两类,一类是亲水性材料,如明胶微粒<sup>[2-3]</sup>另一类是疏水性聚合物系统,如 PLGA 微粒<sup>[4-6]</sup>.但这两种系统对于 bFGF 药物的缓慢释放都不太理想.各有其优点和缺点,例如亲水性材料具有很好的生物相容性,其一般不会破坏多肽或者蛋白质药物的生物活性,但不能达到持续长久释放的目的<sup>[7]</sup>,当这种材料吸水后药物就会很快释放出来.相比较下疏水材料具有缓慢释放药物的功能,但其和 bFGF 药物的生物相容性不是很好,其降解后产生的酸性物质容易破坏 bFGF,且容易导致 bFGF 药物的解聚<sup>[8-9]</sup>.为了克服这两种材料的缺点,我们将两种材料复合在一起制作了一种新颖的复合微粒.

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料及仪器的准备

明胶(bloom strength, 225; pI, 4.7),bFGF,PLGA

(D,L-乳酸:乙醇酸,75:25)均购自 Sigma 化学品有限公司(USA).CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(AR)和硅油(350cs)购自科龙化学品有限公司(中国),其它药品及仪器由重庆大学生物工程学院教育部重点实验室提供.

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 含 bFGF 明胶微粒球的制备

明胶微粒球的制备按照文献<sup>[3]</sup>报道的方法制作.20%的明胶水溶液中加入 4 ml bFGF(2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )水溶液,将此混合溶液加入到 350 ml 的植物油中(植物油水浴预热到 37  $^{\circ}\text{C}$ ).将以上三种混合液体在乳化机上搅拌 10 min(10 000 r/min)形成一个油水乳液.将此乳液放冰箱中冷冻到 -20  $^{\circ}\text{C}$ .将此乳液取出放入冷冻离心机中分离(2 000 r/min)10 min.沉淀物用丙酮洗涤四次除去植物油和水.收集的微粒球冷冻干燥过夜.筛分备用.

##### 1.2.2 明胶-PLGA 复合微粒球的制备

PLGA 明胶复合微粒球的制备采用一种改进的相分离法<sup>[8]</sup>.0.22 g PLGA 溶解于 5 g CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,1 000 r/min 搅拌下向其中加入 0.6 g 含 bFGF 的明胶微粒球.将此固体和液体的混合物在搅拌下逐渐倒入 10 mL 硅油中,形成均匀的乳液后,将此乳液在搅拌下倒入 200 mL 的正己烷液体中,过滤后装入真空瓶中真空冷冻干燥过夜.筛分并保存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用.

\* 收稿日期:2006-07-27

基金项目:重庆大学生物工程学院与暨南大学合作项目(0221002605002)

作者简介:李绍洪(1978-),男,云南威信人,重庆大学硕士研究生,主要从事有机合成、生物制药工程及工艺研究.

### 1.2.3 PLGA 微球的制备(只含 bFGF)

只含 bFGF PLGA 微球的制备跟前面复合微球的制备方法一样,这批微球目的是作为对照. 1  $\mu\text{g}$  bFGF 冻干份分散于 3 ml PLGA 的二氯甲烷溶液中,然后的操作步骤和前面一样.

### 1.2.4 微粒的形态学观察

光学显微镜(Olympus CKX41,日本)用于观察各种微粒的表面性质.

### 1.2.5 粒径和粒径分布

激光粒径分布仪(Horiba LA-300,日本)用来检测各种微球的粒径分布.

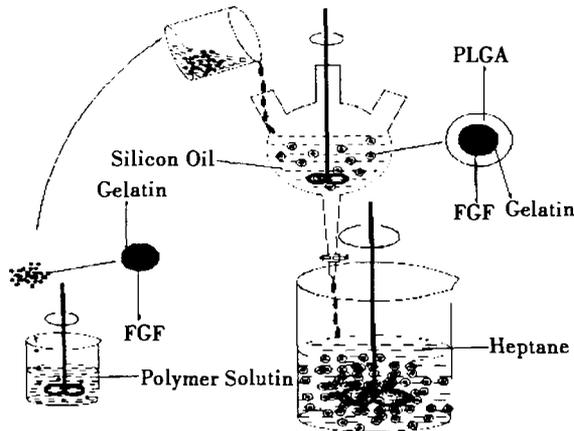


图1 PLGA-明胶复合微球制备示意图

### 1.2.6 bFGF 封载率的测定

PLGA-明胶复合微球中 bFGF 的含量通过将其中的 bFGF 用水溶液浸出后测定,测定三次. 准确称取干燥的复合微球 20 mg 倒入分液漏斗中,然后加入 10 mL 二氯甲烷溶液,PLGA 溶解后加入 5 mL 磷酸缓冲溶液,将此混合液体放在摇床上振荡 12 h,等有机相和水相完全分层后收集水相用于检测 bFGF. 毛细管电泳仪(P/ACE5 000 Beckman 公司)用于检测水相中 bFGF 的浓度,用磷酸缓冲溶液作为流动相,采用紫外分光光度计,bFGF 的封载率计算公式如下<sup>[9-12]</sup>:

$$\text{bFGF}_{\text{封载率}} = \frac{M_{\text{actual}}}{M_{\text{theoretical}}} \times 100\%$$

其中  $M_{\text{actual}}$  是复合微球中的实际量,  $M_{\text{theoretical}}$  是复合微球中的理论量.

### 1.2.7 各种微球中药物的体外释放曲线

药物体外释放实验进行三次. 准确称取明胶-PLGA 复合微球 100 mg 溶解于 20 mL 磷酸缓冲溶液中. 将此溶液放在摇床上一并放入 37  $^{\circ}\text{C}$  的孵箱中振荡(40 r/min). 隔一段固定的时间从表面取 1 mL 液体进行检测并加入 1 mL 新鲜的磷酸缓冲溶液. 检测方法同上. 复合微球中 bFGF 的累计释放量用以下公式计算:

$$\text{bFGF}_{\text{累计释放量}} = \frac{\sum_{t=0}^t M_t}{M_{\text{actual}}} \times 100\%$$

其中  $M_t$  是  $t$  时的释放量,  $M_{\text{actual}}$  是药物的实际理论总量.

## 2 结果和讨论

### 2.1 两种微球的显微镜观察

图2是明胶微球的显微镜观察的图象,可以看出此微球具有光滑的表面且粒径分布均匀. 图3是明胶-PLGA 的复合微球,也具有光滑的表面和较均匀的粒径分布,但其粒径比明胶微球稍大.

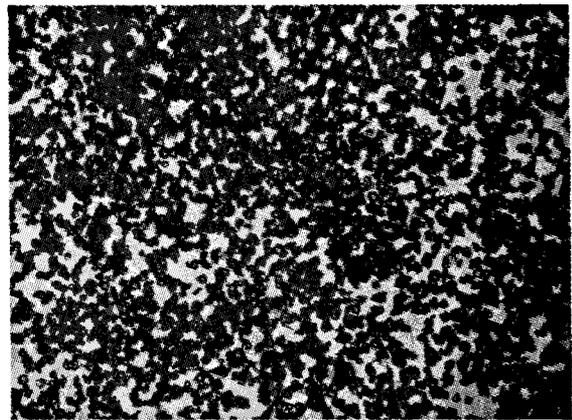


图2 含 bFGF 明胶微球



图3 PLGA-明胶复合微球

### 2.2 微球的粒径分布

粒径的大小是微球药物释放系统一个重要的指标之一. 一个原因在于如果是注射用的微球,其粒径不能太大,否则将不能通过针头. 另一个原因是微球的粒径对于药物的释放特性有较大的影响<sup>[14]</sup>. 从图4中我们可以看到明胶微球具有正常的 Guassian 粒径分布. 明胶微球的大小基本决定了复合微球的大小. 明胶微球和明胶-PLGA 复合微球的平均粒径分别主要在 8  $\mu\text{m}$  和 10  $\mu\text{m}$  左右. 在明胶微球的制备过程中,乳化仪器的搅拌速率对于微球的大小是个关键因素<sup>[15]</sup>. 在实验

中,当速率在 3 000 r/min 时,微球和复合微球的平均粒径分别在 20  $\mu\text{m}$  和 25  $\mu\text{m}$  左右,当转速提高到 10 000 r/min 的时候,分别为 8  $\mu\text{m}$  和 10  $\mu\text{m}$  左右.此外,明胶溶液的浓度对于微球的大小也是个重要因素.复合微球的直径也会受到 PLGA 溶液中 PLGA 浓度的影响.PLGA 的浓度增大会使复合微球的直径增大.

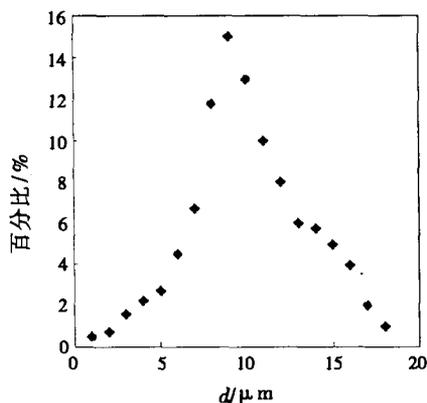


图 4 明胶微球大小分布

### 2.3 微球中 bFGF 的装载率

复合微球中 bFGF 的封载率通过以上方法计算后大概在 80.50%. 相分离方法的每个步骤都是在有机相中进行的. 在这个方法中没有水. 考虑到药物的封载率,所以采用这个方法制备明胶 - PLGA 复合微球.

### 2.4 bFGF 的缓释

复合微球和 PLGA (只含 bFGF) 微球中 bFGF 的释放分成两个阶段:快速释放阶段(大约 30% 图 5)和连续的缓慢释放阶段. 复合微球中药物的快速释放可能是因为有的明胶微球暴露在表面的缘故,缓慢释放的机理相对较复杂,可能涉及到以下几个原因<sup>[2]</sup>:(1) PLGA 的降解.(2) bFGF 从曲折的 PLGA 空隙中逐渐的溶出.(3) bFGF 分子通过溶胀的明胶微球逐渐扩散出来.(4) 水穿过 PLGA 空隙并被明胶吸收才能将 bFGF 溶出.

相比较之下,只含 bFGF 的 PLGA 微球释放 bFGF 非常快(图 5). 在大约 10 d, 80% 的 bFGF 已经被溶出. 这种暴释限制了 PLGA 微球用做长期的多肽类药物的释放系统<sup>[16]</sup>. 而复合微球克服了这个问题,在 18 d 的时间后,大约释放了 50%, 42 d 后仍然有药物释放出来,并且只释放了 65%. 但释放速率相对较慢. 此复合系统很好的限制了微球中药物的暴释,可用于多肽或蛋白质类药物的长期释放.

### 2.5 多肽药物的完整性

多肽类药物容易变性或失去生物活性. 多肽类药物的变性包括以下几个方面<sup>[3]</sup>:聚集,降解,解聚(分

子构型发生变化). 所有这些变性使得变性后的分子与原来的分子构型不一样或者结构发生变化. 分子的构型或结构的变化可以用仪器检测出来. 毛细管电泳具有很多潜在的用途,例如用来分析和纯化物质. 毛细管电泳的分离机理是建立在物质的荷/质比例不一样的基础上的. 这种不同的荷/质比导致了不同物质不同的电泳淌度. 被分析物质的流动速率不仅受到其本身所带电荷的影响,同时也受到流动相总体流量的影响. 这些流动相包括电渗流,这是在阴极板上引起的. 对于熔融硅毛细管,其电渗流对被分析物的流动速率具有较大的影响. 在本实验中的毛细管电泳分析系统在注射端是阳极. 在 pH 10.3 的磷酸缓冲溶液中 bFGF 带负电荷. 在高电压下,带负电荷的 bFGF 会向着阳极流动,这样具有较高荷/质比的带负电荷的物质将会具有较长的停留时间,那些具有较小荷/质比的物质只有较短的停留时间. 在明胶 - PLGA 复合微球的制备和保存的过程中,有害的环境可能会导致多肽类药物的变性. 如聚集、降解、或分子构型的解聚. 这些有害的环境包括与有机溶剂的接触,暴露在疏水物质中和 PLGA 降解产生的酸性环境,以及机械搅拌等. 多肽或蛋白质的变性会引起其表面荷/质比的变化. 这样就会导致明显不同的毛细管电泳峰. 可以看到从单纯的 PLGA 微球中释放的 bFGF 在 8.32 min 和 9.51 min 的时间段内呈现了变形的状况. 这可能意味着在某种程度上药物已经发生了变性. 相比较下,从明胶 - PLGA 复合微球中释放的 bFGF 显示了一个正常的 bFGF 峰,此峰与原始的 bFGF 峰几乎完全吻合. 药物的总量可以从峰围成的面积中采用软件计算出来. 从表 1 中可以看到随着时间的延长,更多的 bFGF 失去了其完整性. 而复合微球中的 bFGF 在释放 25 d 都还保持较好的完整性. 因此可以看出 PLGA 中的明胶在微球的制备和保存过程中以及的释放过程中具有保持药物的完整性和防止药物变性的作用.

表 1 PLGA 微球和 PLGA 复合微球中 bFGF 完整性变化

t/d	bFGF 失活率/ %	
	复合微球(含 bFGF)	明胶微球(含 bFGF)
5	2	4.0
10	3	8.2
15	3.6	10.2
20	4.0	20.3
25	4.8	32.7

和相同的停留时间内的曲线变化. A) 溶解于 PBS 溶液中的 bFGF. B) 从 PLGA - 明胶复合微球中释放的 bFGF. C) 从 PLGA 微球中释放的 bFGF.

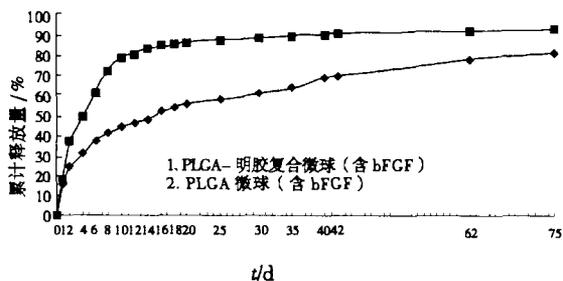


图5 采用相分离法制备的PLGA-明胶复合微球中bFGF释放曲线

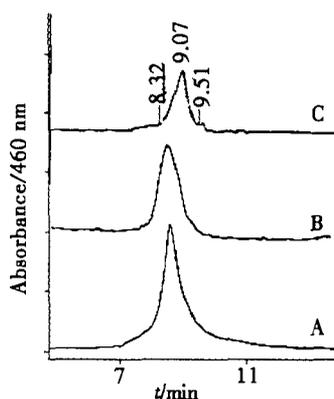


图6 显示bFGF在不同的样品

### 3 结论

本文采用了一种新颖的方法开发了一种适合药物缓慢释放或控制多肽/蛋白质类药物释放的给药系统。此系统特别适合FGFs类药物。此系统是采用亲水物质(明胶)和疏水物质(PLGA)的复合物。明胶制作成含药物的微球,PLGA用做包附微球的材料。实验结果显示PLGA成功的包附在含药物的明胶微球表面。复合微球是采用相分离的方法制备的。复合微球的粒径主要分布在5-18 μm之间。复合微球中bFGF包封率达到了80.5%。体外释放实验显示复合微球在两个月后药物仅释放了70%。此药物释放系统对于多肽类药物具有缓慢释放的功能,对于保持药物的完整性和防止药物变性也表现了良好的作用。

#### 参考文献:

[1] DUAN H, SHEN B, HE Q, PEI Fuxing, CHEN Jian. Preparation of bFGF - PLGA Stained Release Microspheres and Studies on Their Release Characteristics and Biologic Activity in Vitro[J]. Chin Pharm J, 2004, 39(13): 196 - 198.

[2] JIA K LI, NUO WANG, AND XUE S. WU. A Novel Biodegradable System Based on Gelatin Nanoparticles and Poly (lactic - co - glycolic acid) Microspheres for Protein and Peptide Drug Delivery[J]. Journal of Pharmaceutical Sci-

ences, 1997, 86(8): 891 - 895.

- [3] TABATA, Y., Ikada, Y. Synthesis of Gelatin Microspheres Containing Interferon[J]. Pharm Res, 1989, (6): 422 - 427.
- [4] RUIZ J M, BENOIT J P. In Vivo Peptide Release from Poly (DL-lactic acid-co-glycolic acid) Copolymer 50/50 Microspheres[J]. J. Controlled Release, 1991, (16): 177 - 186.
- [5] HEYA T, OKADA H, OGAWA Y. Toguchi, H. Factors Influencing the Profiles of TRH Release from Copoly (d, l - lactic/glycolic acid) Microspheres[J]. Int J Pharm, 1991, (72): 199 - 205.
- [6] COHEN S, YOSHIOKA T, LUCARELLI M, et al. Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly (lactic/glycolic acid) Microspheres[J]. Pharm Res, 1991, (8): 713 - 720.
- [7] LI J K, WANG, N WU, X S. Gelatin Nanoencapsulation of Protein/peptide Drugs Using an Emulsifier - free Emulsion Method[J]. J Microencapsulation, in press.
- [8] WANG N, WU X SH. A Novel Approach to Stabilization of Protein Drugs in Poly (lactic - co - glycolic acid) Microspheres Using Agarose Hydrogel[J]. International Journal of Pharmaceutics, 1998, (166): 1 - 14.
- [9] 董标,董方霆,梁月琴,等. 毛细管电泳测定阿片肽方法的探索[R]. 军事医学科学院国家生物医学分析中心. 中国人民解放军第307医院, 2005.
- [10] LIANG H, WANG ZH G, GU J L, et al. A Peptides Migration Model in Capillary Zone Electrophoresis[J]. Journal of Beijing Institute of Technology, 1996, 5(1): 35 - 39.
- [11] GUO W Y, BAI XIUZHEN, ZHOU LIN, et al. Capillary Zone Electrophoresis & Protein and Peptides Determination[J]. Jin Zhou medicine college transaction, 1995, 16(3): 56 - 58.
- [12] CUI B, CHENG Y H, ZHONG Q P. Application of Capillary Electrophoresis in Separation and Detection of Polypeptide[J]. Food & Machinery, 2004, 20(3): 45 - 47.
- [13] LIU H, FENG N, YUAN X B, et al. Preparation and Release Study of Anticancer Drug Loaded PLA - gelatin Nanospheres[J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2003, 22(2): 178 - 182.
- [14] WU X S. Preparation, Characterization, and Drug Delivery Applications of Microspheres Based on Biodegradable Lactic/glycolic Acid Polymer[A]. In Encyclopedic Handbook of Biomaterial and Bioengineering[C]. New York: Marcel Dekker, 1995. 1 151 - 1 250.
- [15] WANG, H T, PALMER, H, LINHARDT R J, et al. Degradation of Poly(ester) Microspheres. Biomaterials, 1990, (11): 679 - 685.
- [16] 冯秀萍, 田清影, 曲红艳, 等. bFGF活性稳定性的研究[J]. 生物技术, 2003, 13(4): 32 - 33.

## Construction of Sustained Drug Delivery System for bFGF

LI Shao-hong<sup>1</sup>, CAI Shao-xi<sup>1</sup>, LIU Bin<sup>1</sup>, MA Kai-wang<sup>1</sup>, LI Yuan<sup>1</sup>, LI Xiao-fang<sup>2</sup>

- (1. Key Laboratory for Biomechanical & Tissue Engineering Under the State Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China;  
2. Gene Medicine Engineering Research Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** This study is to construct a sustained drug release system for bFGF. Microsphere composite is first prepared by encapsulating bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) into gelatin particle, then PLGA [ Poly ( Lactic-co-Glycolic Acid) ] as its outer-coating. With this special system bFGF can be used to repair the injury peripheral nerve, injury spinal cord, or as a carrier for some drugs which need released over a long time. The average diameter of the gelatin particle-PLGA microsphere composite is 5-18  $\mu\text{m}$ , and bFGFs loading efficiency is up to 80.5%. bFGFs releasing experiment indicates this new composite system can release bFGF continuously and protect bFGF from denaturation.

**Key words:** PLGA; gelatin; bFGF; microsphere; sustained release

(编辑 张小强)

(上接第103页)

## Numerical Simulation of Dynamic Response of Suspension Insulator String

ZHENG Jia-yan<sup>1,2</sup>, YAN Bo<sup>1</sup>, LIU Xiao-hui<sup>1</sup>, CHEN Zhi-da<sup>3</sup>, LIU Zhong-quan<sup>3</sup>

- (1. College of Resource and Environmental Science, Chongqing University, Chongqing 400030, China;  
2. College of Engineering and Technology, Southwest University, Chongqing 400716, China;  
3. Southwest Electric Power Design Institute, Chengdu 610021, China)

**Abstract:** Finite element method is applied to analyze the windage of suspension insulator strings under dynamic wind loads. The dynamic response of a suspension insulator string of 500 kV high voltage transmission line is numerically simulated with ABAQUS software, and results demonstrate that the windage angle of suspension insulator string is larger than that calculated by the conventional design code, which might be one of the main reasons of the frequently happened windage flashover accidents.

**Key words:** high voltage transmission line; insulator string; dynamic wind loads; windage; finite element method

(编辑 陈移峰)