

中国图书分类号 R392-33 文献标识码 A 文章编号 1004-5503(2007)01-060-02

【实验技术】

两种脂质体制备方法对碱性成纤维细胞生长因子活性的影响

陈妍^{1,2} 王振远³ 郭秀侠³ 田洪斌² 邓英杰¹

【摘要】目的 考察两种脂质体制备方法对碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)活性的影响。方法 采用薄膜分散法和冻干重建法制备 bFGF脂质体,MTT法检测两种方法制备的脂质体中 bFGF的活性。结果 薄膜分散法和冻干重建法制备的 bFGF脂质体活性分别为 1.99×10^7 和 1.94×10^7 U/ml,与对照 bFGF水溶液相比,两种脂质体制备方法均未降低 bFGF活性,且包封率与粒径差异无显著意义。结论 采用薄膜分散法和冻干重建法制备 bFGF脂质体,对其活性均无影响。

【关键词】碱性成纤维细胞生长因子;脂质体;蛋白活性

研究表明,碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)是一个由 146个氨基酸组成的阳离子多肽,相对分子质量 16 000,等电点为 9.6。bFGF是体内最有效的血管生成因子之一,生物活性和临床用途广泛^[1]。由于其体外稳定性差,对热、酸及有机溶剂敏感,56℃作用 5 min或酸性条件下(pH 2.0)作用 2 h可失活,因此制剂过程中能否保持 bFGF的原有活性是一个关键性问题,也是考虑其他评价指标的前提^[3]。同时,bFGF体内半衰期短,且无特异性作用靶点,因而研究具有缓释作用的 bFGF制剂尤为重要。

脂质体是目前研究较多的一类药物传递系统,可作为蛋白多肽类药物的理想载体^[2]。本文在前期对 bFGF活性稳定性研究的基础上,选择了冻干重建法和薄膜分散法制备 bFGF脂质体,并考察了这两种制备方法对 bFGF活性的影响,为 bFGF脂质体制剂的进一步研究奠定了基础。

材料与与方法

1. 仪器

GAST真空泵(美国 MFG公司);微孔滤膜(海亚东分离器材厂);旋转蒸发仪(上海医械专机厂);L IPEX-EXTRUDER挤出仪(Northern Lipids Inc.);冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);多功能酶标仪(SPECTR MAX250)。

2. 试剂

大豆卵磷脂(DEGUSSA);胆固醇(上海生化试剂厂);RM 11640培养基(GIBCO);胎牛血清(FBS)

(杭州四季青生物工程材料有限公司);噻唑蓝(MTT)(Sigma);bFGF原液(广州暨南大学);bFGF标准品(中国药品生物制品检定所);BaB 3T3细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所);实验用水为二次重蒸水,其他试剂均为分析纯。

3. 方法

3.1 MTT法测定 bFGF活性:按文献[4]方法进行。

3.2 bFGF原液的活性测定:将 bFGF原液以生理盐水稀释至 $113 \mu\text{g/ml}$,再用含 0.4% FBS的 1640培养液稀释 1 000倍,加入第 1孔,依次 4倍稀释,分别加入 28孔,标准品第 1孔为 100 U,依次 4倍稀释,按 3.1项下 MTT法测定 bFGF原液的活性。

3.3 对照 bFGF水溶液的活性测定:取适量 bFGF原液,加入 10%蔗糖水溶液,稀释至蛋白浓度为 $113 \mu\text{g/ml}$,活性测定时用含 0.4% FBS的 1640培养液稀释 1 000倍,加入第 1孔,依次 4倍稀释,分别加入 28孔,按 3.1项下 MTT法测定。

3.4 薄膜分散法制备的 bFGF脂质体的活性测定:将一定比例磷脂、胆固醇溶于氯仿中,减压旋转蒸发法在圆底烧瓶壁上形成均匀薄膜,加入蛋白浓度为 $113 \mu\text{g/ml}$ 的 10%蔗糖水溶液,室温下水化 30 min,形成半透明乳状液,室温挤出,过 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜 5次,进行整粒。活性测定时,用含 0.4% FBS的 RM 11640培养液稀释 1 000倍,加入第 1孔,依次 4倍稀释,分别加入 28孔,按 3.1项下 MTT法测定,考察薄膜分散法对蛋白活性的影响。

3.5 冻干重建法制备的 bFGF脂质体的活性测定:分别取适量 bFGF原液,加入 1 ml小单室空白脂质体(含 10%蔗糖作为冻干保护剂)中混匀,冷冻干燥。活性测定时,加 1 ml无菌水溶解,形成半透明乳状液,蛋白浓度为 $113 \mu\text{g/ml}$,然后用含 0.4% FBS的 1640培养液稀释 1 000倍,加入第 1孔,依次 4

基金项目:国家自然科学基金(30271548)资助项目。

作者单位:1沈阳药科大学药学院(沈阳 110016);2吉林大学生命科学学院(长春 130012);3长春生物制品研究所(长春 130062)。

通讯作者:邓英杰, E-mail: w. chenyan@263.net

倍稀释,分别加入 28孔,按 3.1项下 MTT法测定。

3.6 统计学方法:试验结果表示为 $\bar{x} \pm s$,组间差异性统计选用双侧 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

结 果

1. bFGF原液的活性测定

bFGF原液的效价为 1.90×10^7 U/ml,表明该 bFGF原液活性较好,可用来进行制剂研究。

2. bFGF脂质体的包封率及粒径

薄膜分散法及冻干重建法制备的 bFGF脂质体包封率分别为 $(79.7 \pm 2.3)\%$ 和 $(78.6 \pm 1.6)\%$ ($P > 0.05$),粒径分别为 (218 ± 24) nm 和 (236 ± 33) nm ($P > 0.05$),差异均无显著意义。因此对两种方法制备的 bFGF脂质体的活性进行测定时,包封率及粒径的影响因素可以忽略不计。

3. 两种脂质体制备方法对 bFGF活性的影响

薄膜分散法和冻干重建法制备的 bFGF脂质体及对照 bFGF水溶液的活性测定结果见图 1,3条活性曲线几乎重合。薄膜分散法及冻干重建法制备的 bFGF脂质体的效价分别为 1.99×10^7 U/ml 和 1.94×10^7 U/ml,与对照 bFGF水溶液相比,两种方法制备 bFGF脂质体对蛋白活性均无影响。

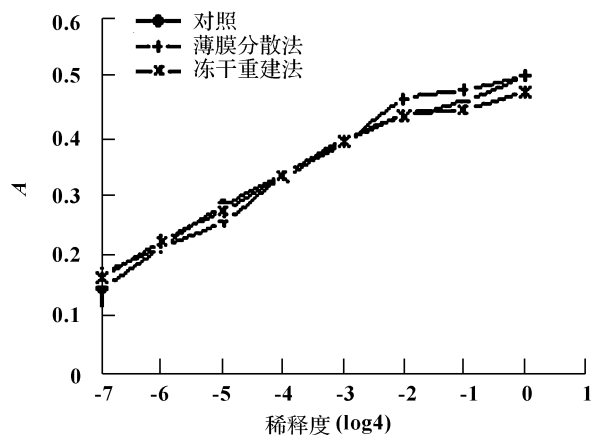


图 1 两种脂质体制备方法对 bFGF活性的影响

讨 论

蛋白多肽类药物主要包括酶、细胞因子等一些具有特殊功能的蛋白质,与小分子药物相比,其稳定性差,易被酶降解,生物半衰期短;而扩散差、分配系

数小的缺点又使其难以通过生物屏障及脂质膜。因此,蛋白多肽类药物的传递系统一直是国内外研究的热点之一。

目前,蛋白多肽类药物大多以注射用溶液或冻干粉针剂的形式应用于临床,但需频繁给药,治疗费用较高,患者顺应性较差。开发新型的缓控释制剂(如脂质体、纳米颗粒、微球、微囊等)是有效的解决方法之一。但像 bFGF 一样,许多蛋白多肽类生物活性物质存在着稳定性差、极易变性失活的缺点,有的甚至无法开发成为临床药物。制备过程中的温度、pH 值、离子强度、有机溶媒等工艺因素均会影响蛋白活性^[5],因此选择不影响蛋白活性的适宜制备方法是成功开发稳定、安全、有效的新制剂的前提。

前期对 bFGF 活性稳定性的研究表明,pH 值在 6.08.0 范围内,室温条件下保存 12 h,反复冻融 3 次,bFGF 水溶液活性的降低均不显著。本文在此基础上,选择薄膜分散法和冻干重建法制备 bFGF 脂质体。结果表明采用室温薄膜分散法制备 bFGF 脂质体,并在室温条件下挤出整粒,对蛋白活性几乎无影响。据文献报道^[6],bFGF 水溶液在冻干过程中活性显著降低,需加入肝素对其活性进行保护。但本文采用冻干重建法制备的 bFGF 脂质体的活性并无明显降低,可能是冻干过程中脂质体或磷脂的存在对 bFGF 起到了保护作用。本实验为 bFGF 脂质体制剂的进一步研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 郭庆,温进坤. 碱性成纤维细胞生长因子. 生命科学, 1997, 9 (1): 1518, 46
- [2] Crommelin DJA, Daemen T, Schephof GL, et al. Liposomes: vehicles for the targeted and controlled delivery of peptides and proteins. J Control Release, 1997, 46(1-2): 165-175.
- [3] Davies MJ, Mitchell CA, Maley MAL, et al. In vitro assessment of the biological activity of basic fibroblast growth factor released from various polymers and biomatrices. J Biomater Appl, 1997, 12(1): 31-56.
- [4] 饶春明,刘兰,丁有学,等. 重组牛碱性成纤维细胞生长因子国家标准品的研制. 中国生物制品学杂志, 2001, 14(2): 9496
- [5] Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. Int J Pharm, 1999, 185(2): 129-188.
- [6] 冯秀萍,田清影,曲红艳,等. bFGF 活性稳定性的研究. 生物技术, 2003, 13(4): 3233.

(收稿日期: 2006-02-21)