文章编号:1000-5404(2012)20-2075-03

论著

mPEG-PLA-NGF 缓释微球的制备及体外释放实验研究

刘 民[1,2],张 纲[1],谭颖徽[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院口腔科[1];266071 山东 青岛,解放军401医院口腔科[2])

[摘要] **目的** 自行设计合成一种以骨缺损修复为目的的神经生长因子缓释微球,并进行理化性能和体外释放实验。**方法** 复乳法制备 mPEG-PLA-NGF 缓释微球,并观察其大小形态,用 ELISA 法测定微球包封率及载药量,用动态透析释药法测定体外释放率。**结果** 微球表面光滑圆整,球体大小较均匀。微球粒径为(74.2±21.3)μm,粒径分布范围较窄。包封率和载药量分别为(77.3±1.8)%和[(2.13±0.24)×10^{-5}]%,体外释放实验中,没有发现突释现象,24 h 释放率为27.36%,微球在21 d后释放度达72.34%。**结论** mPEG-PLA-NGF 缓释微球具有良好的物理特性和缓释效果。

[关键词] 微球;缓释;神经生长因子;单甲氧基聚乙二醇聚乳酸;体外释放
[中图法分类号] R943;R944.9;R977 [文献标志码] A

Preparation of sustained release microspheres of mPEG-PLA-nerve growth factor and their sustained release *in vitro*

Liu Min[1,2], Zhang Gang[1], Tan Yinghui[1] ([1]Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Stomatology, No. 401 Hospital of PLA, Qingdao, Shandong Province, 266071, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare and investigate the characteristic of biodegradable mPEG-PLA microspheres as carriers for controlled nerve growth factor (NGF) delivery, and the sustained release rate *in vitro*. **Methods** mPEG-PLA was utilized as delivery material to prepare the NGF microspheres by multiple emulsion method. The physical surface of microspheres was detected, and the content of NGF in the microspheres was evaluated by ELISA. Dialysis was used to examine the *in vitro* drug release. **Results** The microspheres were spherical in shape, and had a smooth surface. The particle size was uniform with a size of (74.2±21.3) μm. Drug-loading amount was [(2.13±0.24)×10^{-5}]% and the entrapment rate was (77.3±1.8)%. There was no burst release found *in vitro*. The release rate was 27.36% of total amount in 24 h. The accumulative sustained release rate was 72.34% in 3 weeks. **Conclusion** mPEG-PLA-NGF microspheres have a good physical performance and sustained release character *in vitro*.

[**Key words**] microspheres; controlled release; nerve growth factor; mPEG-PLA; release *in vitro*

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30973334, 81271098) and the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2009BB5334).
Corresponding author: Tan Yinghui, E-mail:tanyh1962@yahoo.com.cn

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是一种最早被发现的神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs)家族成员,不仅在神经系统的发育、修复过程中有着重要的作用[1],而且在骨折修复等过程中也扮演着重要角色[2]。NGF 可以通过直接增强成骨细胞活性,引导神经长入骨痂,促进P物质(substance P, SP)、降钙素基因相关肽(calcitonin generelated peptide, CGRP)等神经肽的释放等方式来促进骨的愈合。但是由于 NGF 生物活性半衰期较短,在体内很快就会失活,因此有必要研究1种缓释载体,来持续释放 NGF,以发挥更大的作用。目前 NGF 的应用途径大多仅仅局限于局部注射[3],虽然也有着一些 NGF 缓释载体的研究,但大多是以神经修复为目的的应用[4],比如 NGF 缓释导管、缓释膜等。这些剂型在骨折及骨缺损区的应用很不方便。本研究以骨缺损修复为目的研制了一种 NGF 缓释载体,并进行了体外释放实验。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

单甲氧基聚乙二醇聚乳酸(mPEG-PLA,济南岱罡生物科技有限公司;mPEG∶PLA=1∶20,重均相对分子质量为100×10^3)、聚乙烯醇(PVOH,Fluka 公司,相对分子质量67×10^3)、NGF(Peprotech 公司,相对分子质量13.5×10^3);NGF ELISA 试剂(Peprotech 公司)、磷酸盐缓冲液(PBS,武汉博士德生物材料公司)、聚氧乙烯聚氧丙烯醚(泊洛沙姆407,POX,上海医药公司,平均相对分子质量11.5×10^3)、海藻酸钠(Sigma 公司,黏度

[基金项目] 国家自然科学基金(30973334,81271098);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5334)
[通信作者] 谭颖徽,E-mail:tanyh1962@yahoo.com.cn

100-300cP)、二氯甲烷、丙酮、甘油(均为重庆化工公司,分析纯)。

1.2 仪器

Starorious 1721型电子天平(德国Siemens公司)、JY92-Ⅱ型超声细胞粉碎机(宁波新芝科学仪器研究所)、TGL-16B台式高速离心机(上海医用分析仪器厂)、UV-2000型紫外可见光光度计(日本岛津公司)、扫描电子显微镜(捷克Tescan公司)、HTS700酶标分析仪(美国PE公司)、CR21 G低温冷冻高速离心机(日本Hitachi公司)。

1.3 方法

1.3.1 mPEG-PLA-NGF缓释微球的制备 ①称取各组分,将20 μg NGF溶于2 ml的磷酸盐缓冲液中,制成0.001%的水相溶液。②将0.6 g的mPEG-PLA溶于20 ml的二氯甲烷:甘油=3:1的混合溶剂中,制成3%的油相溶液。③将上述水相溶液、油相混合溶液,制备油包水型乳液,将0.8 g重均相对分子质量为$(40\sim60)\times10^3$的海藻酸钠溶于80 ml磷酸缓冲液,与所述油包水型乳液混合后冰浴超声分散1 min,制成乳液(该实验操作在冰块上进行)。④将步骤③得到的乳液在室温下低速搅拌3~5 h,通过自然挥发,除去有机溶剂二氯甲烷即得NGF缓释微球胶体溶液。⑤将上述NGF微球胶体溶液在低于20 ℃的温度下,边搅拌边加入一定量的泊洛沙姆,使之溶解,制备成低温4~5 ℃下为可流动的胶体,20~38 ℃下为凝胶的mPEG-PLA-NGF缓释微球凝胶制剂。⑥重复步骤①~④,将所制微球胶体溶液,再加入10%的氯化钙溶液搅拌5 min。过滤、异丙醇分散、冻干,称量。

1.3.2 mPEG-PLA-NGF缓释微球的大小及形态 取mPEG-PLA-NGF缓释微球胶体溶液10 μl,用光学显微镜观察微球的表面形态;将微球置于载玻片上,用气球轻吹,尽量对微球进行分散后,在扫描电镜200倍视野下随机选取1个视野进行拍照,以照片上的标尺为依据对每个微球的直径进行测量。每5微米为单位,(直径±2.5)μm的全部计入。

1.3.3 mPEG-PLA-NGF缓释微球的包封率 微球包封率的测定:按照NGF ELISA试剂盒说明书要求,建立光密度值与浓度的标准曲线。取10 ml上述mPEG-PLA-NGF缓释微球胶体溶液在4 ℃、40 000 r/min条件下离心,2 h后分离样品中上清液,取上清液,在λ=278 nm处测定光密度。根据标准曲线,由光密度换算成浓度,测定NGF浓度,分别计算NGF的载药量和包封率。载药量公式:实际负载的NGF质量=投入NGF的质量-实测NGF的质量;载药量=(实际负载的NGF质量/微球总质量)×100%;包封率=(实际负载的NGF质量/加入的NGF总质量)×100%。

1.3.4 体外释放实验 取20 mg mPEG-PLA-NGF缓释微球,置于透析袋中,加入3 ml PBS缓冲液(pH=7.4),密封后置于盛有300 ml PBS的大烧杯中,模拟体内环境在水浴箱中恒速振荡[(37±1)℃,20 r/min]。分别于2、4、8、12 h及1、2、4、6、10、14、21 d时取出,高速低温离心机上以1 500 r/min离心3 min后,取上清液2 ml放入-20 ℃冰箱冷冻保存,其余连同沉淀并补充等量的新鲜PBS液后放回缓释装置中。用ELISA法测定不同时点样品上清液的光密度值并根据前述标准曲线转换成NGF含量。计算每次取样时释放的NGF总量,以上步骤重复6次,取其平均值,制作NGF缓释微球体外释药曲线。

2 结果

2.1 mPEG-PLA-NGF缓释微球的大小及形态

用扫描电镜观察微球的表面形态,微球表面光滑圆整,球体大小较均匀。微球粒径为(74.2±21.3)μm,粒径分布范围较窄。见图1。

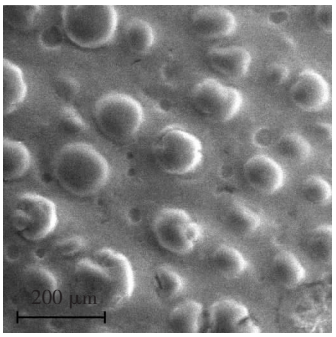


图1 扫描电镜观察mPEG-PLA-NGF缓释微球形态

2.2 微球包封率和载药量测定结果

包封率和载药量分别为(77.3±1.8)%和[(2.13±0.24)×10^{-5}]%。

2.3 体外释放实验结果

微球在14 d内不仅一直持续释放NGF,而且所释放出的NGF浓度可以保持在一定的水平[(54.67~76.81)(65.74±11.07) fmol/μl]。经检测表明,mPEG-PLA-NGF缓释微球的24 h内释放量为27.36%,21 d后释放率达72.34%。以累积释放率和时间进行拟合,制作mPEG-PLA-NGF缓释微球体外释药曲线。见图2。

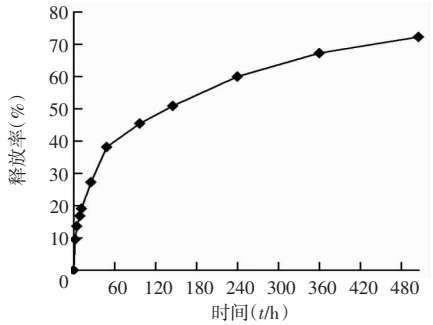


图2 mPEG-PLA-NGF缓释微球体外释药曲线

3 讨论

NGF在骨缺损愈合过程中具有重要作用,可能通过以下途径对骨折愈合产生促进作用:①诱导神经纤维长入,促进骨愈合;②刺激多种神经肽类物质的释放影响成骨活动;③对骨折局部细胞的直接作用促进骨愈合;④增加局部血供促进骨再生;⑤对骨折愈合过程中炎性细胞的调节促进骨愈合。因此在骨缺损区域保持一定的NGF浓度[5],对骨愈合过程起着积极作用。

在治疗周围神经损伤及骨折愈合过程中,很多学者探索了各种不同的给药方式,如直接肌肉注射或静

脉注射[6]、通过肌肉周围的血管进行吸收、将NGF注射于损伤神经和骨折区域的局部[3]或者将NGF注入周围神经缺损桥接管内,具有一定效果。但是在实际应用过程中,由于NGF生物活性半衰期较短,在水溶液中很快就会失活,而且容易受到湿度、酸碱度等多种因素的影响,在神经再生及骨折愈合的整个漫长过程中,NGF不能长时间持续发挥促再生作用,全身应用被快速灭活,局部穿刺分次给药又无法保证每次释药部位的准确性,因此限制了其临床应用[7]。

控制释放就是将药物或其他生物活性物质和基材结合在一起使药物通过扩散等方式在一定时间、以某种速率释放到环境中。以生物降解材料为载体的可控制释放系统,可通过体内载体缓慢逐渐释放药物而发挥其最佳疗效[8]。在神经修复的应用研究中,NGF微球一般制成管状或膜状剂型,对于神经的修复还起着支持引导作用[4];而对于骨缺损愈合的应用,要求微球便于放置,有一定的黏附作用,不容易被血液等溶解、稀释。

PLA在组织工程领域被广泛应用[9]。但PLA与蛋白质和亲水性药物的相容性较差,仅通过调控相对分子质量及相对分子质量分布来调节其降解速度有很大的局限性。因此许多研究通过接枝等方法引入亲水性基团,来改善PLA的亲水性,使之更适合用作药物的载体[10]。mPEG-PLA是一种两亲嵌段共聚物,可以通过自组装形成胶束状微球,将药物包裹于其中,从而达到药物控释的目的。随着PLA在体内的降解,载药微球的结构变得疏松,内含药物从中溶解,扩散的阻力减小,药物释放速度加快。当药物释放速度的加快刚好与含药量的减少所引起的释药速度变慢一致时,就实现了药物的长期衡量释放。

mPEG-PLA-NGF微球的降解产物乳酸、乙醇酸能够迅速降低释放介质PBS的pH值,这是造成药物失活、微球累积释放不全的重要原因。因此,在体外释药试验中,我们将微球和少量PBS置于一定规格的透析袋中[11],再悬置于PBS液中。这样,微球降解产物不断通过透析膜扩散至透析袋外大量的PBS中,而NGF从微球中释放后滞留于pH恒定的透析袋中,避免了生物活性的丧失。本实验中,在第3周时的mPEG-PLA-NGF缓释微球累积释放率为72.34%,较文献[12]报道结果有所提高。此外,这一释药模型在微球降解速度方面也更好地模拟了体内情况,不会对微球的降解速度产生影响。

将mPEG-PLA-NGF制备成凝胶的目的是为了方便在骨愈合区域的用药。凝胶在医药界已经得到广泛使用,尤其在皮肤科和口腔科外用药物方面,具有操作方便、药物持续时间长的优点。本研究通过筛选和校正,决定采用20% POX作为凝胶的生成剂。POX本身为一种非离子表面活性剂和蛋白质稳定剂,作为药物的添加剂被广泛使用,而且其生物安全性和致畸性等研究已经得到实验和临床证实,是美国FDA批准的可以对人体进行静脉注射的试剂[13]。

本实验以mPEG-PLA为载体材料,以复乳法制备mPEG-PLA-NGF缓释微球,以微球形态、粒径、包封率等为评价指标,利用透析袋来模仿体内的环境[8],并通过ELISA法考察其体外释药性质。结果证明这种mPEG-PLA-NGF缓释微球具有良好的物理特性和缓释效果。mPEG-PLA是一种较为理想的生长因子载体材料,虽然通过ELISA法证实了微球可以充分负载NGF,且具有良好的缓释性能,但NGF在制备过程中是否有活性改变仍需在进一步的实验中证实。

参考文献:

[1] Brown A, Ricci M J, Weaver L C. NGF mRNA is expressed in the dorsal root ganglia after spinal cord injury in the rat[J]. Exp Neurol, 2007, 205(1): 283-286.
[2] Asaumi K, Nakanishi T, Asahara H, *et al*. Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing[J]. Bone, 2000, 26(6): 625-633.
[3] 莫勇军, 杨志, 赵劲民, 等. NGF促进骨折愈合的适宜浓度初步研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(5): 575-581.
[4] Johnson P J, Skornia S L, Stabenfeldt S E, *et al*. Maintaining bioactivity of NGF for controlled release from PLGA using PEG[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 86(2): 420-427.
[5] Cao J, Wang L, Lei D L, *et al*. Local injection of nerve growth factor *via* a hydrogel enhances bone formation during mandibular distraction osteogenesis[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2012, 113(1): 48-53.
[6] 王东, 刘宁. 神经生长因子在脑挫裂伤救治中的应用[J]. 中华神经医学杂志, 2010, 9(4): 416-418.
[7] Wang L, Zhou S, Liu B, *et al*. Locally applied nerve growth factor enhances bone consolidation in a rabbit model of mandibular distraction osteogenesis[J]. J Orthop Res, 2006, 24(12): 2238-2245.
[8] 张纲, 谭颖徽, 卢来春, 等. bFGF-PLA缓释纳米微球的制备及体外释药的研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(11): 1002-1004.
[9] Xu W, Yang Y. Relationship between drug release and some physical parameters of drug sorption onto PLA fibers[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2010, 21(4): 445-462.
[10] Vasudev S S, Ahmad S, Parveen R, *et al*. Formulation of PEG-ylated L-asparaginase loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of Pegylation on enzyme loading, activity and *in vitro* release [J]. Pharmazie, 2011, 66(12): 956-960.
[11] 王慧娟, 宋洪涛, 彭碧文, 等. 环孢素A眼用亚微乳含量测定及其体外释放度的考察[J]. 解放军药学学报, 2008, 24(1): 72-75.
[12] 曾晗冰, 徐华梓, 李万里, 等. 改良复乳法制备神经生长因子微球及其体外释药性能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(42): 8286-8290.
[13] Robinson S N, Chavez J M, Blonder J M, *et al*. Hematopoietic progenitor cell mobilization in mice by sustained delivery of granulocyte colony-stimulating factor[J]. J Interferon Cytokine Res, 2005, 25(8): 490-500.

(**收稿**:2012-08-27;**修回**:2012-09-19)
(编辑 张 维)