

骨保护素-聚乳酸羟基乙酸缓释微球的制备及体外释药性能研究

刘华杰¹ 李亚磊¹ 魏 娇² 冯小琼¹ 马璞玉¹ 吴豪阳¹

摘要 目的 以聚乳酸羟基乙酸(PLGA)为载体构建载有骨保护素(OPG)的微球,筛选出缓释效果最佳的制备条件,并研究载药微球的体外释放特性。方法 采用复乳溶剂挥发法,以不同的搅拌速度、聚乙烯醇(PVA)浓度、PLGA浓度制备 OPG-PLGA 微球并测定其载药量和包封率,通过正交试验优化制备条件;以磷酸盐缓冲液作为释放介质考察载药微球的体外释放特性。结果 以 PLGA 聚合物浓度 400 mg/ml、搅拌速度 400 r/min、PVA 浓度 2% 为条件制备的载药微球具有最优的载药量和包封率,分别为 6.21×10^{-7} 和 75.10%,体外释药试验显示微球持续释放时间达到 30 d,具有良好缓释效果。结论 采用优化条件制备的 OPG-PLGA 微球具有较高的包封率和载药量,同时具有良好的缓释效果,为用于拔牙位点保存术的缓释药物研究提供了基础。

关键词 骨保护素;聚乳酸羟基乙酸;载药量;包封率;制备工艺

中图分类号 R 944; R 782.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1658-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.017

牙槽骨骨质和骨量是种植体植入后长期稳定的基础,但患牙拔除后常出现缺牙区骨组织吸收^[1]。破骨细胞活化成熟对骨吸收有重要作用,而破骨细胞的分化依赖其细胞表面的核因子 κ B 受体激活剂(receptor activator of nuclear factor κ B, RANK)与成骨细胞分泌的核因子 κ B 受体激活剂配体(RANK

ligand, RANKL)相结合。大量研究^[2-4]显示,骨保护素(osteoprotegerin, OPG)作为 RANKL 的诱骗受体,可竞争性的与 RANK 结合,从而抑制破骨细胞的成熟和功能,达到阻断骨吸收的作用。目前,应用 OPG 治疗骨质疏松、高钙血症已进入临床试验阶段^[5],但局部用于拔牙位点保存容易因药物流失快导致未达到有效浓度^[6]。

聚乳酸羟基乙酸(poly lactic acid glycolic acid, PLGA)等可降解聚合物在生物医学领域的应用为制备蛋白缓释制剂提供了有效载体^[6]。PLGA 是由乳酸和羟基乙酸按照特定比例聚合生成的高分子材料,具有理想的生物相容性及可调节的溶胀性和生物降解性^[7],已通过美国 FDA 认证并应用于临床。因此该实验采用 PLGA 作为药物载体,运用复乳-溶剂挥发法制备 OPG-PLGA 微球,通过对微球相关性质的评价,确定最佳的制备工艺,为后续的试验及将来临床应用于拔牙位点保存术提供前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂及仪器 OPG(以色列 Prospec 公司); PLGA 共聚物(分子量 30 000, LA:GA=50:50, 济南岱罡生物工程有限公司); 聚乙烯醇(汕头西陇化工有限公司); 二氯甲烷(分析纯, 天津化学试剂有限公司); 85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司); J2-21 型高速离心机(美国 Beckman 公司); FDU-1100 型冷冻干燥机(日本 EYELA 公司); SHZ-88 型水浴恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂)。

1.2 方法

2017-06-02 接收

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(编号: 201303096)

作者单位: ¹ 郑州大学第一附属医院口腔种植科, 郑州 450052

² 四川大学华西口腔医院粘膜科, 成都 610041

作者简介: 刘华杰, 男, 硕士研究生;

吴豪阳, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: why67@zzu.edu.cn

lated, the activity of caspase-1 and the secretion of mature IL-1 β increased. Furthermore, the results of LDH release increased and AO/EB staining orange fluorescence increase indicated that the damage of macrophage cell membrane induced by oxLDL is significantly worse after 3-MA treatments. **Conclusion** Simvastatin inhibit the oxLDL-induced macrophages pyroptosis, which may be associated with enhanced oxLDL-induced macrophage autophagy.

Key words pyroptosis; simvastatin; oxLDL; autophagy

1.2.1 负载 OPG 的 PLGA 微球的制备 依据复乳溶剂挥发法制备 OPG-PLGA 微球工艺流程图(图1)制备微球。将一定质量的 PLGA 溶于 5 ml 二氯甲烷中形成油相,在搅拌条件下加入 1 ml OPG 水溶液构成的内水相,得到初乳,将初乳液在快速搅拌下滴入聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)水溶液中并继续搅拌 3 min 形成复乳,然后倒入 0.5% PVA 溶液(含 5% 氯化钠),在室温下磁力搅拌器 800 r/min 搅拌 4 h,使体系中的二氯甲烷完全挥发。之后在恒定温度下以 3 500 r/min 的速度离心 20 min。蒸馏水将沉淀洗涤 3 次,冷冻干燥得到 OPG-PLGA 微球粉末。

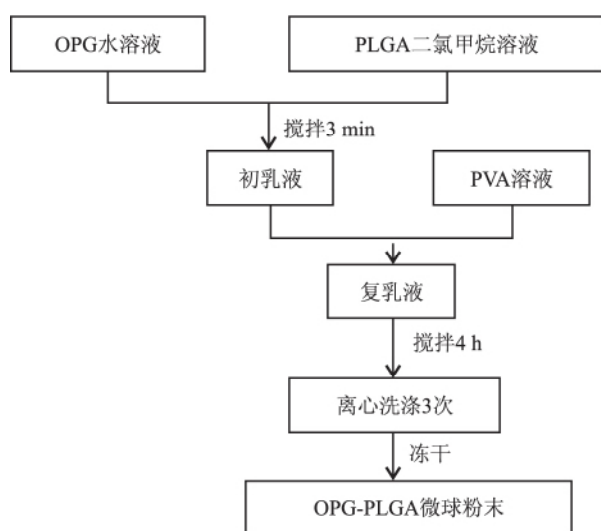


图1 复乳溶剂挥发法制备 OPG-PLGA 微球工艺流程图

1.2.2 微球包封率及载药量测定 标准曲线的建立:按照浓度梯度精确配置不同浓度 OPG 溶液,依据 ELISA 试剂盒说明书操作,并用酶标仪测定各个样品 OPG 含量,以吸光度 x 为横坐标,以样品浓度 y 为纵坐标绘制标准曲线,建立回归方程,得到如下标准曲线: $y = 0.5527x^2 + 0.0906x + 0.1215$, $R^2 = 0.9964$ 。包封率和载药量测定方法:取一定质量微球 W 溶于二氯甲烷后,加入定量双蒸水离心取上清测定 OPG 总量 $W_{\text{总}}$;再取等量微球加入双蒸水洗涤,离心后收集沉淀溶于有机溶剂,再加入定量双蒸水,离心取上清测定微球内包裹 OPG 含量 $W_{\text{包}}$ 。则包封率 = $W_{\text{包}}/W_{\text{总}} \times 100\%$, 截药量 = $W_{\text{总}}/W$ 。

1.2.3 OPG-PLGA 微球制备条件的优化 参考文献^[8]报道,以包封率和载药量为评价标准,选择影响制备 OPG-PLGA 微球的 3 个主要因素:PLGA 聚合物浓度、搅拌速度和 PVA 浓度为考察对象,每个

因素各取 3 个水平,见表 1。选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表,为方便统计分析,以空白列作为误差所在列,安排试验,见表 2。对正交试验结果进行直观分析和方差分析,从而确定最优制备方案。

表1 因素水平表

水平	PLGA 浓度 (mg/ml)	搅拌速度 (r/min)	PVA 浓度 (%)
1	150	4 000	0.5
2	300	8 000	1.0
3	400	10 000	2.0

表2 正交试验表

实验号	PLGA 浓度 (mg/ml)	搅拌速度 (r/min)	PVA 浓度 (%)	空白
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

1.2.4 OPG-PLGA 微球体外释药试验 依据最优制备方案制备载药微球,测定其包封率及载药量,随后在离心管中加入 30 mg 微球粉末,加入 PBS 缓冲溶液(pH = 7.4),37 °C 恒温水浴摇床内以 100 r/min 速度振荡,按一定的时间间隔 6、12 h、1、2、3、6、9、12、15、18、24、30 d,定时将溶液离心,取 5 ml 上清液用于检测,并补充等量 PBS。用 ELISA 试剂盒测定上清液中 OPG 含量,计算出药物的释放量和累积释药百分率,拟合药物释放曲线方程,最终以累积释药百分率为纵坐标,时间为横坐标,绘制 OPG-PLGA 微球的体外释放曲线。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件,利用正交设计方差分析法,以空白列作为误差所在列,对正交试验结果进行分析。采用 OriginPro 8 软件对体外释药结果进行非线性拟合。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正交试验结果 对影响 OPG-PLGA 微球包封率和载药量的因素进行正交试验考察并行直观分析(表 3),对实验结果用 SPSS 软件行方差分析(表 4)。

表3 OPG-PLGA 微球制备正交试验结果及直观分析表

实验号	PLGA 浓度 (mg/ml)	搅拌速度 (r/min)	PVA 浓度 (%)	空白	包封率 (%)	载药量 ($\times 10^{-7}$)
1	1	1	1	1	60.09	3.25
2	1	2	2	2	42.98	4.80
3	1	3	3	3	35.23	5.42
4	2	1	2	3	61.49	4.78
5	2	2	3	1	45.47	5.05
6	2	3	1	2	57.57	2.08
7	3	1	3	2	69.22	5.96
8	3	2	1	3	63.15	1.70
9	3	3	2	1	58.06	3.15
包封率(%)						
K ₁	46.10	63.60	60.27	54.54	-	-
K ₂	54.84	50.53	54.18	56.59	-	-
K ₃	63.48	50.29	49.97	53.29	-	-
极差	17.38	13.31	10.30	3.30	-	-
载药量($\times 10^{-7}$)						
K ₁	4.49	4.66	2.34	3.82	-	-
K ₂	3.97	3.85	4.24	4.28	-	-
K ₃	3.60	3.55	5.48	3.97	-	-
极差	0.89	1.11	3.13	0.46	-	-

表4 OPG-PLGA 微球制备正交试验方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 值	P 值
包封率(%)				
PLGA 浓度	452.93	2	27.20	<0.05
搅拌速度	348.04	2	20.90	<0.05
PVA 浓度	160.82	2	9.66	>0.05
误差	16.66	2	-	-
载药量($\times 10^{-7}$)				
PLGA 浓度	1.19	2	3.55	>0.05
搅拌速度	1.99	2	5.94	>0.05
PVA 浓度	14.95	2	44.58	<0.05
误差	0.34	2	-	-

注: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$

对于微球包封率的试验结果方差分析表明, PLGA 浓度、搅拌速度对微球包封率影响显著 ($P < 0.05$), PVA 浓度对包封率的影响差异无统计学意义。根据极差确定的主次因素顺序为 PLGA 浓度 > 搅拌速度 > PVA 浓度。其中 PLGA 的不同浓度对包封率的影响: $k_1 < k_2 < k_3$, 故选择 k_3 , 即 PLGA 浓度 400 mg/ml 作为微球的制备水平; 不同搅拌速度对包封率的影响: $k_3 < k_2 < k_1$, 因此选择 k_1 即搅拌速度 400 r/min 作为微球制备水平。因 PVA 浓度对包封率差异无统计学意义, 因此可选择任一水平。

对于微球载药量的试验结果方差分析表明, PVA 浓度对微球载药量影响显著 ($P < 0.05$), PLGA 浓度、搅拌速度对载药量差异无统计学意义。根据极差确定的主次因素顺序为 PVA 浓度 > 搅拌速度 > PLGA 浓度, 其中, 不同 PVA 浓度对载药量的影响:

$k_1 < k_2 < k_3$, 故选择 k_3 , 即 PVA 浓度 2% 作为微球的制备水平。PLGA 浓度、搅拌速度对微球载药量差异无统计学意义, 可选择任一水平。

为使包封率载药量均达到理想水平, 结合对微球包封率和载药量结果的分析, 可确定制备微球的因素水平为 PLGA 聚合物浓度 400 mg/ml, 搅拌速度 400 r/min, PVA 浓度 2%。

2.2 体外释药实验结果 以最优制备条件重新制备 OPG-PLGA 微球测定的包封率为 75.10%, 载药量为 6.21×10^{-7} 。以各个时间段 OPG 含量计算累积释放率, 以累积释放百分率 $Q(t)$ 为纵坐标, 缓释时间为横坐标, 使用 OriginPro8 拟合 Ritger-Peppas 方程, 并绘制药物体外释放曲线, 见图 2。由图可见, 微球在开始释放后 0.5 d 内有一个释放高峰, 药物释放了 31.34%, 形成突释现象, 在短时间内达到有效浓度; 在 6 d 后释放变缓, 30 d 后释放接近完全, 药物累积释放量为 93.12%, 具有良好的缓释效果。由拟合 Ritger-Peppas 方程结果可知, OPG-PLGA 微球体外释药方程为 $Q(t) = 38.18t^{0.26}$, 相关系数 R^2 为 0.999 7, 释药行为体现为开始释药较快, 一定时间后缓慢释药。推测释药机制主要是药物扩散和 PLGA 微球溶蚀的共同作用。

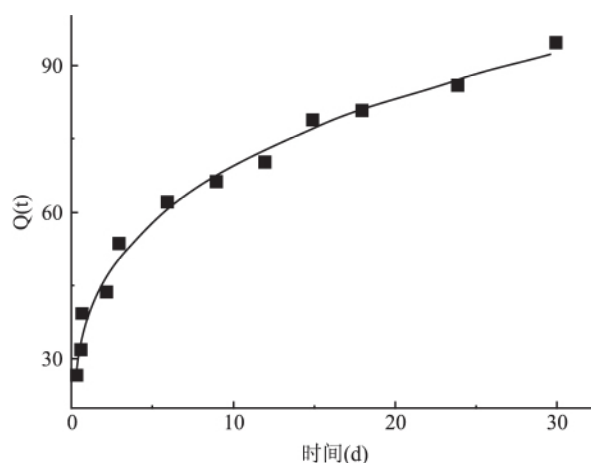


图2 OPG-PLGA 体外释药曲线图

3 讨论

OPG 是一种可溶性分泌型糖蛋白, 可以通过 OPG/RANK/RANKL 系统阻断破骨细胞的分化、成熟并诱导其凋亡来抑制骨吸收。研究^[9]表明, 敲除了 OPG 基因的小鼠会出现严重的骨质疏松等现象, 故 OPG 类药物已于 2012 年被批准使用。对于拔牙位点保存术来说, 局部缓释用药是最佳的选择, 用于蛋白质类缓释药物制备的方法有复乳化、相分离和

超临界流体 3 种方法^[10]。其中复乳法制备方法简单,重复性好,可大规模应用于药物生产。

影响 PLGA 微球性能的因素包括聚合物中 PLGA 的浓度、制备过程中搅拌时间及速度、外水相 PVA 的浓度、载体材料的分子量等^[11-13],本实验通过正交试验设计比较其中一些因素,得到制备 OPG-PLGA 微球的最佳参数组合,即 PLGA 聚合物浓度 400 mg/ml、搅拌速度 400 r/min、PVA 浓度 2%。随着 PLGA 浓度升高,有机相粘度升高,防止内层水相向外水相迁移,并使固化加速;而当搅拌速度升高时,初乳在外水相中受到过大的剪切力,降低了初乳的稳定性,因此一定范围内较高的 PLGA 浓度和较低的搅拌速度会提高 OPG 的包封率。当 PVA 浓度升高时,增加了外水相的粘度^[14],不仅能稳定乳滴,更能减少蛋白类药物的变性,增加了载药量。

体外释药试验检测 OPG-PLGA 微球,表明载药微球的突释为 31.34%,30 d 时 OPG 累计释放量达 93.12%。形成突释的原因是附着在微球表面或者微球内部微孔表面的药物,在微球接触水后溶解,形成药物浓度峰值;随后由于微球的降解,包裹在微球内的药物表现出持续释放的现象,使得用药局部的药物浓度得到保持,表现出良好的缓释能力。本实验不足之处在于无法验证体内释药的有效性,需要后续进行动物实验及临床应用研究。

参考文献

- [1] 李芳芳,高巍.拔牙位点保存在种植修复中的应用[J].中华口腔医学杂志,2013,48(7):444-6.
- [2] Clézardin P. The role of RANK/RANKL/osteoprotegerin(OPG) triad in cancer-induced bone diseases: physiopathology and clinical implications[J]. Bull Cancer, 2011 98(7): 837-46.
- [3] Schoppet M, Preissner K T, Hofbauer L C. RANK ligand and os-

teoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(4): 549-53.

- [4] Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system[J]. Endocrinology, 2001, 142(12): 5050-5.
- [5] Bekker P J, Holloway D, Nakanishi A, et al. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(2): 348-60.
- [6] Dorati R, Genta I, Montanari L, et al. The effect of gamma-irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin[J]. J Control Release, 2005, 107(1): 78-90.
- [7] 杨宗强,何胤,施建党,等. INH-PZA-PLGA 缓释微球制备及体外释药性能的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(1): 9-13.
- [8] 安森博,汪龙,胡懿邵. 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)载药微球性质及缓释行为的影响因素[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(13): 1140-4.
- [9] Charles C, Morony S, Warrington K, et al. Sustained antiresorptive effects after a single treatment with human recombinant osteoprotegerin(OPG): a pharmacodynamic and pharmacokinetic analysis in rats[J]. J Bone Miner Res, 2003, 18(5): 852-8.
- [10] Brannon-Peppas L. Protein delivery: physical systems[J]. Q Rev Biol, 1999, 74(3): 236-7.
- [11] Rawat A, Burgess D J. Effect of ethanol as a processing co-solvent on the PLGA microsphere characteristics[J]. Int J Pharm, 2010, 394(1-2): 99-105.
- [12] Singh D, Dixit V K, Saraf S, et al. Formulation optimization of serratiopeptidase-loaded PLGA microspheres using selected variables[J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2009, 63(2): 103-12.
- [13] 陈红丽,王永学,郭伟云,等.提高 PLGA 微球载蛋白多肽类药物稳定性添加剂的研究进展[J]. 国际生物医学工程杂志, 2012, 35(3): 185-8.
- [14] Fonte P, Soares S, Sousa F, et al. Stability study perspective of the effect of freeze-drying using cryoprotectants on the structure of insulin loaded into PLGA nanoparticles[J]. Biomacromolecules, 2014, 15(10): 3753-65.

Preparation and *in vitro* release properties of OPG-PLGA drug delivery system

Liu Huajie¹, Li Yalei¹, Wei Jiao², et al

(¹Dept of Oral Implantology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052;

²Dept of Oral Medicine, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041)

Abstract Objective To screen the optimal preparation conditions of sustained-release drug and reach the release characteristics of drug loaded microspheres, poly lactic acid glycolic acid(PLGA) was used as the carrier to construct the microspheres containing osteoprotegerin(OPG) in this study. **Methods** The OPG-PLGA microspheres were prepared by double emulsion solvent evaporation method at different stirring speed, polyvinyl alcohol(PVA) concentration and PLGA concentration. Drug loading and entrapment efficiency of the OPG-PLGA microspheres

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.018.html>

改构型酸性成纤维细胞生长因子 对体外培养肝细胞增殖活性的影响

徐雅玲¹, 黄巨恩²

摘要 目的 探讨改构型酸性成纤维细胞生长因子(MaFGF)对体外培养大鼠肝细胞增殖的影响。方法 采用“0.25%胰酶+0.1%胶原酶”消化法分离培养大鼠肝细胞并传代纯化扩增,取第3代细胞鉴定后实验:①形态学法观察在不同浓度MaFGF组中细胞的形态变化;②将实验随机分为对照组和MaFGF组,MaFGF组加入一系列浓度的MaFGF,MTT法测定不同浓度MaFGF组作用于肝细胞24、48、72 h的促增殖活性;③MTT法筛选出最适的MaFGF浓度,用此浓度和不加生长因子2种方式培养细胞,并绘制细胞生长曲线。结果 ①MaFGF对体外培养的肝细胞有一定的促增殖作用,但是与浓度不成正比;且实验表明24 h的增殖率较其它时间点显著增高($P < 0.05$);比较对照组和各组($4.68 \times 10^{-3} \sim 7.80 \times 10^{-3}$ mg/L MaFGF组)均差异有统计学意义($P < 0.05$),但各组间对肝细胞的促增殖作用的差异无统计学意义;②最适浓度(6.24×10^{-3} mg/L) MaFGF的第4天细胞数量较对照组明显增加($P < 0.05$);MaFGF组的第10天细胞数(12.4×10^4)是对照组(6×10^4)的2.1倍($P < 0.05$)。结论 在适宜浓度和时间内,MaFGF对肝细胞具有

一定的促增殖作用且不具有浓度依赖性。

关键词 改构型酸性成纤维细胞生长因子;肝细胞;细胞培养;增殖

中图分类号 R 965

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1662-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.018

改构型酸性成纤维细胞生长因子(modified acidic fibroblast growth factor, MaFGF)是通过人工改构酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)所致的变构体aFGF。虽然这种突变体失去了促分裂的性能,但是依然能够结合成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)受体,且将FGF受体作为媒介,使供体转移给受体表达c-fos,发生酪氨酸磷酸化,保留其非促分裂活性^[1]。Johnson et al^[2]证实MaFGF在促分裂检测中,拥有比aFGF更稳定的三维结构。至于MaFGF是否具有促增殖性尚存在疑问。刘华伟等^[3]报道在体外培养条件下,MaFGF不能刺激脾细胞增殖;刘华钢等^[4]研究证明MaFGF对肾小管上皮细胞及胃癌细胞有促增殖活性,但比aFGF弱。对于MaFGF是否对肝细胞有促增殖作用,至今国内外尚未有报道。该文应用3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐法(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)结合形态学观察法,探究MaFGF对肝细胞增殖作用的影响,为进一步探讨MaFGF在肝细胞增殖分化中的作用提供了实验依据。

2017-07-17 接收

基金项目: 2017年度广西高校中青年教师基础能力提升项目(编号: 2017KY0367); 2017年广西科技大学自然科学培育计划项目; 2016年度广西科技大学科学基金项目(编号: 校科自174514); 2016年广西科技大学科学基金项目培育专项基金

作者单位: ¹广西科技大学医学院健康评估教研室 柳州 545006

²广西医科大学生命科学研究院 南宁 530021

作者简介: 徐雅玲,女,讲师,硕士;

黄巨恩,男,教授,博士,硕士生导师,责任作者,E-mail:

hje5810@163.com

were measured, then the optimum preparation condition was achieved by employing the orthogonal test. The *in vitro* release characteristics of microspheres were investigated by using PBS as the release medium. **Results** The drug loaded microspheres with 400 r/min stirring rate, 2% PVA concentration and 400 mg/ml PLGA concentration had the best drug loading and encapsulation efficiency, which were 6.21×10^{-7} and 75.10%, respectively. Besides, *in vitro* release test showed that the drug loaded microspheres had a good sustained-release effect which sustained release time of 30 days. **Conclusion** The OPG-PLGA microspheres prepared by the optimized conditions has high drug loading and encapsulation efficiency, and has good sustained-release effect, which provide the basis for the study of the sustained release drugs used in alveolar ridge preservation.

Key words osteoprotegerin; poly lactic acid glycolic acid; drug loading; encapsulation efficiency; preparation process