

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00028

## 重组人血管内皮抑制素的聚集稳定性及其 PLGA 缓释微球的制备与体外释放

王明娟<sup>1</sup>, 张 翮<sup>1</sup>, 鲁 莹<sup>1</sup>, 邹 豪<sup>1</sup>, 张 锋<sup>2</sup>, 陈华江<sup>2</sup>, 王江峰<sup>1</sup>, 钟延强<sup>1\*</sup>

- 1. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433
- 2. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003

**[摘要]** **目的:**制备重组人血管内皮抑制素(rh-endostatin, rh-Endo)的聚乳酸-羟基乙酸[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]微球, 并对微球的体外释放特性进行考察。**方法:**以聚乳酸-羟基乙酸为载体, 采用复乳法制备重组人血管内皮抑制素聚乳酸-羟基乙酸微球, 建立了高效液相色谱法测定 rh-Endo 含量和体外释药量。**结果:**微球外观圆整, 平均粒径 122.7 μm, 载药量为 1.28%, 封装率为 38.65%, 250 μg/ml 的 rh-Endo 标准溶液 4℃、室温条件下放置 108 h 后, 溶液仍呈现较好的稳定性。28 d 的体外释放可达 67.37%。**结论:**以可生物降解的 PLGA 作为载体材料, 能够将 rh-Endo 制成缓释微球。

**[关键词]** 重组人血管内皮抑制素; 稳定性; 聚乳酸-羟基乙酸; 微球

**[中图分类号]** R 943.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)01-0028-04

### Stability of rh-endostatin and fabrication/release test of rh-endostatin loaded PLGA microspheres

WANG Ming-juan<sup>1</sup>, ZHANG He<sup>1</sup>, LU Ying<sup>1</sup>, ZOU Hao<sup>1</sup>, ZHANG Feng<sup>2</sup>, CHEN Hua-jiang<sup>2</sup>, WANG Jiang-feng<sup>1</sup>, ZHONG Yan-qiang<sup>1\*</sup>

- 1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 2. Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003

**[ABSTRACT]** **Objective:** To prepare rh-endostatin loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres and to evaluate their release behavior *in vitro*. **Methods:** Rh-endostatin PLGA microspheres were prepared by W/O/W process. The content and *in vitro* cumulative release was determined by a HPLC method. **Results:** The prepared microspheres were well-shaped, with a mean diameter of 122.7 μm. The drug loading and encapsulation efficiency were 1.28% and 38.65%, respectively. The rh-Endo solution (250 μg/ml) showed good stability after placed at 4℃ and 25℃ for 108 h. The cumulative *in vitro* release was up to 67.37% in 28 days. **Conclusion:** The rh-Endo can be encapsulated in microspheres to yield sustained release using biodegradable polymers PLGA as the carrier material.

**[KEY WORDS]** rh-endostatin; stability; poly(lactic-co-glycolic acid); microspheres

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(1):28-31]

重组人血管内皮抑制素 (rh-endostatin, rh-Endo) 是一种在大肠杆菌中表达的用于治疗肿瘤的生物大分子药物<sup>[1]</sup>, 相对分子质量约 21 000, 是一种特异的血管内皮细胞生长抑制因子。其抗肿瘤作用机制是通过抑制肿瘤血管内皮细胞生长, 阻止肿瘤新生血管的形成和肿瘤细胞的扩散, 切断肿瘤细胞血液的供应, 使肿瘤细胞营养缺失而萎缩以至消失。其特点是高效、低毒、无耐药性、治疗靶向明确, 在具有抗肿瘤作用的同时, 对正常细胞的生长无抑制作用, 可以与其他化疗药物联合使用, 有很好的临床应用前景。

聚乳酸-羟基乙酸[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]是由乳酸(LA)和羟基乙酸(GA)以不同比例嵌段共聚而成的一种高分子材料, 具有良好的生物相容性和可降解性, 其最终降解产物是二氧化碳和水, 因此长期使用在体内无蓄积, 此外还具有易于合成、质量稳定、良好的可塑性等优点, 在载蛋白、多肽等缓控释制剂中得到了广泛的应用。

由于 rh-Endo 与 NP 化疗方案联合给药时, 在治疗周期的第 1~14 日需要每日给药, 给药次数比较频繁, 降低了患者的依从性。利用 PLGA 将 rh-Endo 制备成微球, 不仅能达到延长药物在体内的作用

**[收稿日期]** 2008-07-10 **[接受日期]** 2008-10-13

**[作者简介]** 王明娟, 硕士生. E-mail: wmj\_110@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81874591, E-mail: yqzhong68@163.com

时间,降低给药频率,而且可以维持有效的血药浓度,提高治疗效果。本研究在对 rh-Endo 的聚集稳定性初步考察的基础上采用复乳法制备载 rh-Endo 的 PLGA 缓释微球,并对其理化性质和体外释放特性进行了研究。目前临床上使用的是 rh-Endo 注射剂,对于缓释给药系统的研究国内外未见报道。

## 1 材料

PLGA(50/50,黏度:20 ml/g,山东医疗器械研究所);rh-Endo(山东先声麦得津生物制药有限公司,10 mg/ml 原液,批号:YY2007048);聚乙烯醇(PVA,北京有机化工厂);乙腈(HPLC级,SCRC 国药集团化学试剂有限公司);叠氮钠(纯度>99.0%,Amresco 分装);V55C 型冷冻干燥机(美国 Virtis 公司);FA1004 型万分之一电子天平(上海天平仪器厂);SHZ-88 台式水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂);JY92-II DN 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);VTX-3000L 涡旋混合器(日本 LMS 公司);Centrifuge 5424 离心机(德国 Eppendorf 公司);ROTANTA 460 R 高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司);RW20DZMn 电子恒速搅拌器(德国 IKA 公司);Hitachi 高效液相色谱仪系统(日本日立公司);Concentrator 5301 真空离心浓缩仪(德国 Eppendorf 公司),日立 S-520 扫描电镜(日本 Hitachi 公司);Beckman Counter(美国 Beckman 公司)。

## 2 方法和结果

2.1 微球的制备 参考文献<sup>[2]</sup>,采用复乳法制备微球,精密称取 PLGA 300 mg 溶于 1 ml 二氯甲烷中作为油相,将 10 mg rh-Endo 溶于 40  $\mu$ l 水中作为内水相,将油相加入到内水相中,在冰浴条件下超声乳化形成初乳,室温,搅拌(800 r/min)下将初乳缓慢滴至 30 ml 2%PVA 水溶液中,2 min 后改用较低转速搅拌 4 h 以挥去二氯甲烷,离心(转速 1 600  $\times$  g, 10 min)收集微球,经蒸馏水洗涤,冷冻干燥得 rh-Endo 微球。同法制备不含 rh-Endo 的 PLGA 空白微球。

2.2 微球的粒径及形态 取 rh-Endo 微球适量,用日立 S-520 电子扫描显微镜观察,发现微球圆整,无粘连(图 1)。用 Beckman Counter 测得 rh-Endo 微球平均粒径为 122.7  $\mu$ m。

### 2.3 PLGA 微球中 rh-Endo 含量测定

2.3.1 色谱条件 参考文献<sup>[3]</sup>确定。色谱柱:Ulti-

mate<sup>TM</sup>XB-C<sub>4</sub>, 5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  250 mm(Welch Materials, Inc.);流动相:0.05% 三氟乙酸-乙腈(A)、0.05% 三氟乙酸-水(B);流速:1.3 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10  $\mu$ l;流动相中的 A 在 15 min 内从 36% 上升到 85%。

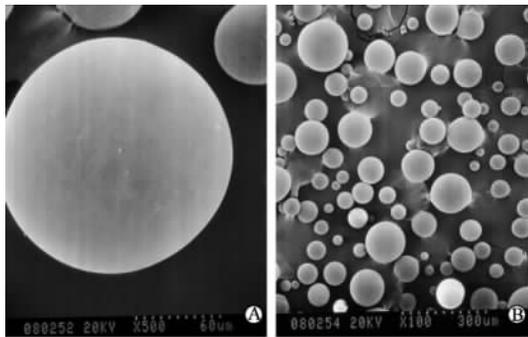


图 1 rh-Endo 微球的扫描电镜照片

Fig 1 Morphology of rh-Endo loaded microspheres by scanning electron microscope

Original magnification:  $\times$ 500(A),  $\times$ 100(B)

2.3.2 标准曲线制备 精密吸取 rh-Endo 原液 1 ml(10 mg/ml)置 10 ml 量瓶中,加水定容,再稀释成 50、100、150、200、250、300、350 和 400  $\mu$ g/ml 系列溶液,HPLC 法分别测定峰面积(A),以 A 对浓度(C)进行线性回归,得标准曲线方程  $A = 539.21C - 7\ 685.6$ ,  $r = 0.9997$ 。表明 rh-Endo 浓度在 50~400  $\mu$ g/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

取上述浓度为 150、250、350  $\mu$ g/ml 的 rh-Endo 标准溶液,测得日内 RSD( $n = 3$ )分别为 1.36%、0.71%、0.95%;日间 RSD( $n = 3$ )分别为 0.52%、0.30%、0.62%;回收率为(99.52  $\pm$  0.23)%,符合方法学要求。

2.3.3 载药量和包封率的测定方法 参考文献<sup>[4]</sup>,精密称取含药微球 10 mg,加 1 ml 丙酮,涡旋,20 238  $\times$  g 离心 5 min,弃去上清液,重复 3 次后酶浓缩仅挥干丙酮,沉淀加丙酮和水(1:10) 1 ml 溶解,过滤,进样,根据标准曲线计算 PLGA 微球中 rh-Endo 的含量。载药量(%) = 微球中 rh-Endo 质量/微球总质量  $\times$  100%,包封率(%) = 微球中 rh-Endo 质量/rh-Endo 投药量  $\times$  100%。

精密称取空白微球 10 mg,分别加入 150、250、350  $\mu$ g rh-Endo 冻干粉( $n = 3$ ),以上述提取方法处理后 HPLC 法测定,根据标准曲线计算微球中 rh-Endo 含量,计算提取方法回收率。结果显示,低、中、高 3 种浓度的回收率分别为(90.41  $\pm$  0.33)%、

(101.79±0.47)%、(93.11±0.13)%。rh-Endo 微球的载药量和包封率分别为 1.28% 和 38.65%。HPLC 图谱见图 2。

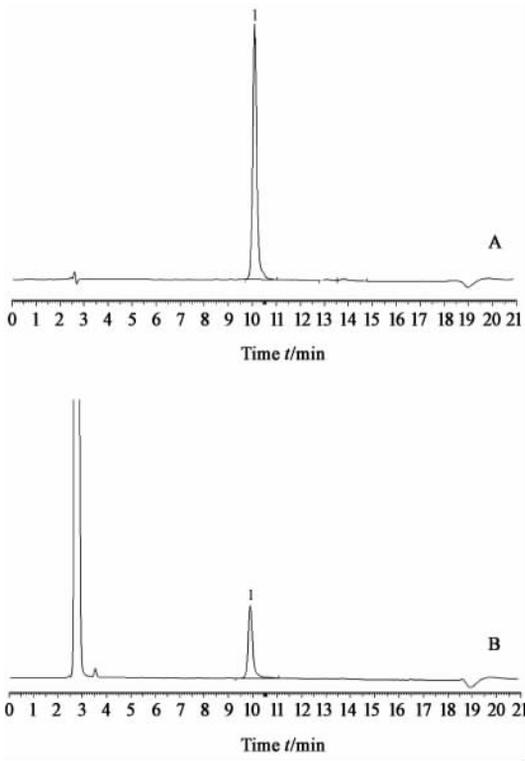


图 2 rh-Endo 标准液(A)及样品(B) HPLC 图谱  
Fig 2 Chromatogram of rh-Endo standard solution (A) and sample solution (B)  
1: rh-Endo

### 2.4 rh-Endo 微球的体外释药

2.4.1 聚集稳定性考察 取浓度为 250 μg/ml 的 rh-Endo 标准溶液 3 批, 每批溶液的放置温度分别为 4℃、室温(25℃)、37℃, 考察溶液在不同放置时间下的稳定性, 用 HPLC 法进行测定, 以所测数据与原溶液浓度的比值(%)表示。结果(图 3)发现在 4℃、室温条件下放置 108 h 后, 溶液仍呈现较好的稳定性, 几乎没有变化; 在 37℃ 水浴条件下放置 36 h 后, rh-Endo 溶液发生了聚集, 说明在此条件下放置 36 h 后, 样品不稳定, 因此体外释放实验通过间接测定微球中残余 rh-Endo 的量来计算体外释放百分率。

2.4.2 体外释放实验 参考文献<sup>[5-6]</sup>, 精密称取含药微球 25 mg 置 10 ml 具塞刻度试管, 共 21 份, 分别加入 10 ml pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(含 0.02% 叠氮钠作为抑菌剂, 0.02% F-68 作为润湿剂), 置于 37℃、100 次/min(振幅 20 mm) 恒温水浴摇床测定其释放。分别在 1、3、7、10、14、21、28 d 取出离心管 (n=3), 离心(1 600×g, 5 min), 弃上清液, 挥干水

分; 按 2.3.2 项下方法测定, 计算累积释放率, 见图 4。结果表明微球具有一定的缓释效果, 在 1 d 内的突释为 21.72%, 28 d 累积释放达到 67.37%。

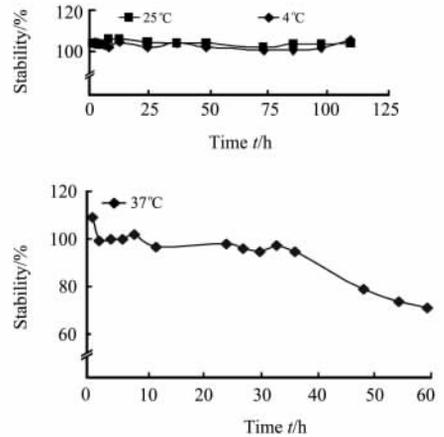


图 3 rh-Endo(250 μg/ml) 在 4℃、室温(25℃) 及 37℃ 时的稳定性变化  
Fig 3 Stability of rh-Endo(250 μg/ml) standard at 4℃, 25℃, and 37℃

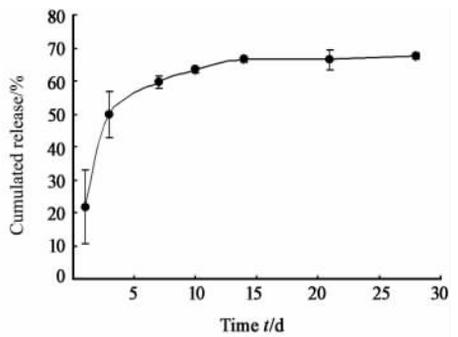


图 4 rh-Endo 微球在 pH7.4 的磷酸盐缓冲液中的体外释放曲线  
Fig 4 *In vitro* release curve of rh-Endo loaded microspheres in pH 7.4 phosphate buffer  
n=3,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

重组人血管内皮抑制素具有广谱抗血管生成活性, 其作用机制是通过抑制形成血管的内皮细胞迁移而抑制肿瘤新生血管的生成, 阻断肿瘤的营养供给, 从而抑制肿瘤增殖或转移的目的。在骨肿瘤的临床治疗过程中, 将缓释微球分散在磷酸钙骨水泥(calcium phosphate bone cement, CPC)中手术后用药<sup>[7-9]</sup>, 可以借助微球的缓释作用和磷酸钙骨水泥的骨架支撑作用实现长期抑制骨肿瘤生长的目的。本实验采用复乳法制备了 rh-Endo-PLGA 微球, 电镜观察表明微球外观圆整, 大小均一, 不粘连, 平均粒

径为 122.7  $\mu\text{m}$ 。同时建立了 HPLC 法测定重组人血管内皮抑制素的含量,实验发现在流动相中加入三氟乙酸可以明显改善峰形,这是由于三氟乙酸与蛋白中的正电荷、极性基团相结合,减少了极性保留,把蛋白带回到了疏水的反相表面所致。在制备过程中,由于内、外水相的渗透压相差较大,造成了微球载药量及包封率比较低,可以考虑调节外水相的 pH 值使其接近蛋白的等电点、在外水相中加入盐、内水相和油相中加入小分子有机物等来提高载药量和包封率。稳定性实验发现,在 4 $^{\circ}\text{C}$  及室温条件下放置 108 h 后, rh-Endo 含量与原浓度基本一致,在 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴条件下放置 36 h 后, rh-Endo 含量降为 177.129 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,这是由于随着温度的升高,蛋白质发生了变性,因此体外释放实验通过测定微球内部残余药量来考察释放。体外释放实验结果表明,微球缓释效果明显,28 d 累积释放达到 67.37%。

对于 rh-Endo-PLGA 微球在骨水泥中的体内外释药和体内抑制肿瘤生长特性有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 常国栋,李壮林,秦加阳,马翠卿,罗永章,许平. 重组人血管内皮抑制素(rh-Endostatin)大肠杆菌表达体系发酵条件的优化[J]. 生物工程学报,2005,21:662-666.
- [2] 朱艳,鲁莹,钟延强. 胸腺肽  $\alpha 1$  缓释注射微球的研究[J]. 药学学报,2007,42:211-215.
- [3] Zhang H Y, Han Q W, Xu Y F, Fan Y R, Dai Q M, Xu J M, et al. The methods for determining the purity and *in vitro* or *in vivo* activity of recombinant human endostatin[J]. Cancer Biol Ther, 2005, 4: 207-212.
- [4] 郑彩虹,梁文权,虞和永. 乳酸羟乙醇酸共聚物微球中蛋白包封率的测定[J]. 中国医院药学杂志,2005,25:34-37.
- [5] Kang J, Schwendeman S P. Comparison of the effects of  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  and sucrose on the stability of bovine serum albumin encapsulated in injectable poly (d, l-lactide-co-glycolide) implants[J]. Biomaterials, 2002,23:239-245.
- [6] 朱艳,鲁莹,陈文娅,钟延强. 胸腺肽  $\alpha 1$  微球的制备及其评价[J]. 药学服务与研究,2005,5:248-250.
- [7] Barroug A, Kuhn L T, Gerstenfeld L C, Glimcher M J. Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: *in vitro* controlled adsorption and release[J]. J Orthop Res, 2004, 22: 703-708.
- [8] Zhang W, Walboomers X F, Jansen J A. The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta1[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 85: 439-444.
- [9] Fei Z, Hu Y, Wu D, Wu H, Lu R, Bai J, et al. Preparation and property of a novel bone graft composite consisting of rhBMP-2 loaded PLGA microspheres and calcium phosphate cement[J]. J Mater Sci Mater Med, 2008, 19: 1109-1116.

[本文编辑] 尹茶

#### · 消息 ·

### 我校新药评价中心陆国才、毛煜获第二届药明康德生命化学研究奖

第二届“药明康德生命化学研究奖”颁奖仪式于 2008 年 12 月 7 日在人民大会堂隆重举行,我校基础部新药评价中心陆国才主任、毛煜副教授分别获得二、三等奖。

药明康德新药开发有限公司设立的“药明康德生命化学研究奖”经中华人民共和国科技部国家科学技术奖励办公室批准,旨在奖励国内从事化学、生命科学、医学、药学以及相关科技领域的研究并取得突出成就的中国籍优秀学子和中青年科技人才。该奖项代表了中国生命化学领域的极高荣誉。

第二届“药明康德生命化学研究奖”评奖领域为药物临床前药理毒理学。我校基础部新药评价中心陆国才主任的论文“Sixty-day repeated dose toxicity of sinafloxacin in rats and dogs”荣获二等奖,毛煜副教授的论文“Subchronic toxicity and toxicokinetics of LZB, a new proton pump inhibitor, after 13-week repeated oral administration in dogs”荣获三等奖,体现了我校在新药药理毒理研究方面较强的科研实力,为学科进一步发展起到了推动性作用。