

rhEGF 缓释微球对糖尿病皮肤溃疡创面修复的作用

董晓庆^①, 徐俊^②, 王伟财^①, 罗浩^①, 梁晓飞^①, 张磊^①, 王汉杰^①, 王鹏华^②, 常津^{①*}

① 天津大学材料学院, 纳米生物技术研究所, 天津 300072;

② 天津医科大学代谢病医院, 天津 300070

* 联系人, E-mail: jinchang@tju.edu.cn

收稿日期: 2007-05-28; 接受日期: 2008-05-20

国家自然科学基金(批准号: 50373033), 天津市应用基础研究重点基金(批准号: 05YFJZJC01001)和天津市国际合作基金(批准号: 05YFGHHZ20070)资助项目

摘要 采用 W/O/W 方法制备聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)载重组人表皮生长因子(rhEGF)缓释微球, 表征了缓释微球形貌和粒径分布, 研究了体外释放行为, 进行了细胞实验和动物实验. 结果显示: 微球形貌规则, 粒径均匀; 药物包封率达 85.6%; 缓释时间达 24 h. 细胞实验表明, 微球比 rhEGF 原液具有更好的促进细胞增殖作用; 通过观察动物实验中溃疡面积变化、组织病理切片和 PCNA 表达, 发现微球组治疗效果优于生长因子原液组和空白对照组, 并且具有显著性差异. 本研究为 rhEGF 缓释微球技术的临床应用提供了重要的科学依据.

关键词

缓释微球

糖尿病皮肤溃疡

重组人表皮生长因子(rhEGF)

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)

糖尿病皮肤溃疡病人由于缺乏胰岛素, 糖等代谢紊乱, 皮肤游离血糖高, 溃疡面细菌大量繁殖, 从而导致溃疡创面修复迟缓, 常数月或数年不愈, 因此糖尿病皮肤溃疡成为创面修复领域的一个重要研究课题^[1,2]. 目前利用重组人表皮生长因子(recombinant human epidermal growth factor, rhEGF)促进细胞分裂和增殖, 进行糖尿病皮肤溃疡治疗, 是加速溃疡修复和愈合的主要手段之一. 然而, rhEGF 作为生物多肽类药物, 具有稳定性差、易于酶解、生物半衰期短等缺点^[3], 目前临床上常采用反复大剂量给药的方法来克服 rhEGF 的这些缺点, 这不仅增加了病人的痛苦还造成了病人经济上的负担. 采用生物可降解材料制成药物微球, 可提高药物的稳定性、延长药物作

用时间、避免反复用药、实现药物缓释或控释, 在多肽类药物给药系统研究上显示出独特的优越性^[4-6].

本文选用聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)制备 rhEGF 生物可降解缓释微球. 因 PLGA 具有良好的生物相容性、可控的降解速率、可吸收、安全无毒等优良特性, 其被广泛应用于药物缓释微球制备领域^[6]. 采用 rhEGF 治疗慢性糖尿病皮肤溃疡已有广泛研究, 但目前尚无载 rhEGF 的 PLGA 缓释微球治疗糖尿病皮肤溃疡效果的全面报道. 本文通过细胞实验、动物实验, 建立全层的大鼠溃疡模型, 详细研究了载 rhEGF 的 PLGA 缓释微球促进糖尿病皮肤溃疡的愈合作用, 为 rhEGF 缓释微球技术的临床应用提供了重要的科学依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

PLGA(MW: 4500, LA/GA: 50/50)由山东医疗器械研究所生产; rhEGF 由深圳华生元基因工程有限公司生产; 人 EGF ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物制品公司(最小测量值 7 ng/mL); PCNA 染色试剂盒购自武汉博士德公司; 噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜购自北京鼎国生物制品公司; 小鼠成纤维细胞 L929 细胞系由天津医科大学泌尿外科研究所畅继武教授惠赠; SD 雄性大鼠购自中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心。

1.2 复乳法制备 rhEGF 缓释微球

将 250 μL 浓度为 2%的 rhEGF PBS 缓冲溶液作为内水相在超声分散条件下滴加到 500 μL 浓度为 5%的 PLGA 有机溶液中, 形成乳白色 W/O 初乳; 再将 W/O 体系在超声分散条件下加入 2 mL 浓度为 0.3%的 F-68 水溶液, 形成 W/O/W 复乳; 电磁搅拌, 使复乳中溶剂缓慢挥发, 4 h 后溶剂挥发完全, 将乳液离心分离, 用蒸馏水洗涤 3 遍, 冷冻干燥, 所得白色粉末即为 rhEGF 缓释微球。

1.3 rhEGF 缓释微球的粒径测定和形貌观察

取少量冷冻干燥后的微球放入去离子水中进行超声波分散, 用动态光散射激光粒度分布仪分析微球的粒径分布。用 3%磷酸钨酸溶液对微球进行负染色, 在透射电子显微镜(TEM)下观察微球的形貌。

1.4 rhEGF 缓释微球的包封率和体外释药测定

载药微球制备过程中上清液和洗涤液, 用酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 方法(操作严格按照说明书进行)在酶标仪上分别测其吸光度, 每样品测两孔取平均值, 通过与标准曲线比对, 可得到相应的 rhEGF 浓度, 进而用差减法定量微球中 rhEGF 含量。包封率通过下面公式测定:

$$\text{载入率} = \frac{\text{载入微球药量}}{\text{投放药量}} \times 100\%.$$

精确称取 rhEGF 缓释微球 5 mg, 装入离心管内, 加入 5 mL, pH 7.4 的 PBS 溶液。将离心管置于 37℃的

水浴恒温振荡器内(转速 72 r/min), 间隔一定时间取出离心管并离心沉淀缓释微球, 收集释放后的上清液, 用 ELISA 方法复孔测定 rhEGF 的含量, 绘制缓释微球释放曲线。

1.5 rhEGF 缓释微球对小鼠成纤维细胞增殖的影响

将 L929 细胞系细胞用完全培养液配成浓度为 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液, 接种在 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL 。37℃培养 24 h, 弃去完全培养液, 换成维持培养液, 37℃再培养 24 h, 弃去培养液, 分别取浓度为 1, 5, 10, 50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的 rhEGF 缓释微球 100 μL 注入 96 孔板, 每个浓度设 8 个平行孔, 同时设立 100 μL 培养液作为空白对照, 进行噻唑蓝比色分析 (MTT 实验)^[2], 测定不同浓度 rhEGF 缓释微球对小鼠成纤维细胞增殖的影响以得到最佳浓度。再次进行 MTT 实验, 比较最佳浓度微球与同浓度 rhEGF 原液的促进细胞增殖的作用。

1.6 动物实验

(1) 糖尿病溃疡动物模型建立。取 80 只 8 周龄雄性健康 SD 大鼠, 体重在 220~260 g 之间。用柠檬酸钠缓冲液溶解链尿佐菌素(STZ), 配成浓度为 2%溶液。以 45 mg/kg 浓度尾静脉注射 STZ, 正常喂养一周后测空腹血糖, 血糖浓度大于 16.7 mmol/L, 为糖尿病大鼠。用 300 mg/kg 浓度为 10%的水合氯醛溶液麻醉糖尿病大鼠, 使用打孔器在每只大鼠背侧制备直径为 1.9 cm, 面积为 2.54 cm^2 的圆形全层皮肤溃疡模型。

(2) 实验分组。把糖尿病溃疡模型大鼠随机分为 3 组, 每组 24 只, 分别为 rhEGF 缓释微球组、rhEGF 原液组和 PBS 对照组, 分别计为 A, B 和 C 组。每组内再随机分成 4 组, 分别记为 1, 2, 3 和 4 组, 分别在 3, 7, 14 和 21 天取材。实验动物均采取单笼喂养。

(3) 给药方式。将含 1 μg rhEGF 的缓释微球用无菌 PBS 溶解, 超声波分散后对 A 组局部给药, 将 1 μg (500 U) rhEGF 溶解在无菌 PBS 溶液中对 B 组局部给药, PBS 溶液使用量以每次给药完全浸润创面为准。所有糖尿病溃疡大鼠每 24 h 给药一次, 实验进行 21 天, 共计给药 21 次。

(4) 观察伤口愈合率。分别于第 3, 7, 14 和 21 天照相, 并用计算机图像分析系统, 计算溃疡创面未愈合面积。通过下面公式计算愈合率^[8]:

$$\text{愈合率} = \frac{\text{原始面积} - \text{未愈合面积}}{\text{原始面积}} \times 100\%$$

(5) HE 染色和免疫组化观察. 第 3, 7, 14 和 21 天分别处死各组中相应的 1, 2, 3 和 4 组大鼠, 取创面肉芽组织, 经中性福尔马林溶液固定, 常规石蜡包埋, 超薄切片机切成 5 mm 厚切片, HE 染色进行形态学观察. 采用即用型 PCNA 染色试剂盒, 进行免疫组织化学染色(严格按说明书操作), PCNA 阳性结果判定标准: PCNA 以细胞核为界呈清楚的棕色为阳性.

(6) 统计学处理方法. 用 SPSS15.0 软件对数据进行统计学处理, 所有数据均以 $\bar{x} \pm S$ 表示, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结果与讨论

2.1 rhEGF 缓释微球的包封率、粒径测定、表面形态和释药行为

通过高分子包裹人表皮生长因子制备的缓释微球, 具有安全无毒、药物缓释性良好、生长因子不易失活等优点^[9~11]. PLGA 是一种具有良好生物相容性和可生物降解性的聚合物^[12,13], 现已被美国食品与药物管理局(food and drug administration, FDA)批准, 可用作医用缝合线和注射用微胶囊、微球及埋植剂等制剂材料. 利用本实验室已发表的 W/O/W 复乳法^[14] 制备缓释微球, rhEGF 包封率为 85.6%. 动态光散射粒径分析仪, 测定缓释微球粒径及其粒径分布的结果如图 1 所示, 微球的平均粒径和分散系数分别为 193.5 nm 和 0.176. 通过透射电子显微镜可观察到, 微球大部分呈规则球形, 大小均匀, 微球之间无黏连

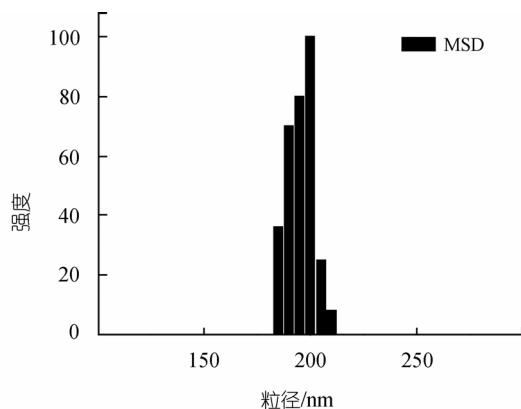


图 1 缓释微球粒径分布图

(图 2). rhEGF 缓释微球在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中的释放曲线如图 3 所示, 缓释微球在最初 1 h 有突释效应, 后期释放平稳, 累积释药时间达 24 h.

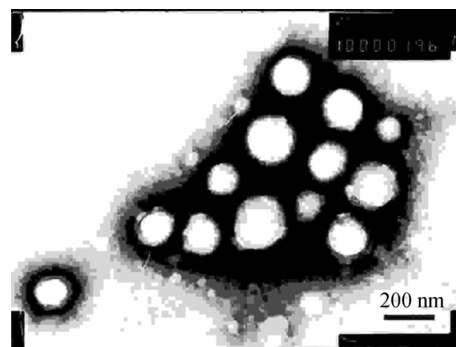


图 2 缓释微球透射电子显微镜观察

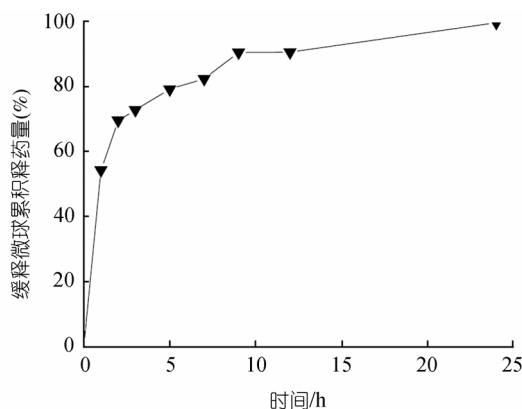


图 3 rhEGF 缓释微球在 PBS(pH 7.4)中释放

2.2 rhEGF 缓释微球对小鼠成纤维细胞增殖能力的影响

不同浓度的 rhEGF 缓释微球对小鼠成纤维细胞增殖能力的影响见表 1. 所有浓度微球的 A 值较 PBS 对照组明显增加, 说明 rhEGF 在微球中仍旧保持活性, 能够促进细胞增殖, 从表 1 可以看出, 当 rhEGF 浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 时, 细胞增殖能力最强, 24 h 细胞增长率达到 31.41%, 明显优于其他浓度, 由此确定其为最佳给药浓度.

以最佳给药浓度 10 $\mu\text{g/L}$ 的 rhEGF 缓释微球与相同含量 rhEGF 原液进行比较, 如表 2 所示, 发现 rhEGF 缓释微球促进细胞增殖的能力, 远远高于相同含量 rhEGF 原液, 24 h 后细胞增长率达 11.87%, 其

表 1 不同浓度 rhEGF 缓释微球对细胞增殖能力的影响^{a)}

rhEGF 缓释微球浓度 / $\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{L}$	A 值	增长率(%)
对照	0.2553 ± 0.022	
1	0.3013 ± 0.023	18.02
5	0.3020 ± 0.042	18.29
10	0.3355 ± 0.040	31.41
50	0.3100 ± 0.014	21.42
100	0.2970 ± 0.012	16.33

a) 方差齐性检验, $P>0.05$, 说明A值为正态分布计数资料

表 2 比较 10 $\mu\text{g/L}$ 的 rhEGF 缓释微球与相同含量 rhEGF 原液对细胞增殖作用的影响^{a)}

药品	A 值	增长率(%)
空白对照	0.3183 ± 0.067	
rhEGF 原液	0.3325 ± 0.018	4.46
RhEGF 缓释微球	0.3561 ± 0.018	11.87

a) 方差齐性检验, $P>0.05$, 说明A值为正态分布计数资料

原因是 rhEGF 原液生物半衰期短, 很短时间内就失去活性, 不再具有促进细胞增殖作用, 而缓释微球能够缓慢释放 rhEGF, 药物活性得以长期保持, 延长药物有效作用时间, 说明 rhEGF 通过高分子包裹制备成缓释微球能够改善治疗效果, 体现了缓释技术的优势.

2.3 rhEGF 缓释微球促进动物模型溃疡愈合的效果

(1) 溃疡面愈合率比较. 采用计算机图像分析软件, 记录不同方法处理后溃疡面积随时间变化情况, 计算各组愈合率, 结果如表 3 所示. 比较发现第 3 天, rhEGF 缓释微球组愈合率略低于空白对照组, 其原因可能有以下两个方面: (i) 在最初 3 天溃疡面处于炎症反应期, 作为异物的微球和生长因子引发了一定量的炎性细胞, 不利于溃疡面愈合; (ii) 已有研究发现 EGF 在创伤修复中的作用存在一定的时效性, 主要参与后期的再上皮化过程^[15]. 从伤后 7 天开

始, 缓释微球组愈合速度高于空白对照组, 在缓释微球组愈合率达 96.61% 时, 空白对照组愈合率仅为 89.70%, 具有显著性差异(17 天, $P<0.05$, 21 天, $P<0.01$), 这验证了 EGF 在治疗后期, 效果更加明显的理论. 同时, 从治疗开始, 缓释微球治疗组愈合速度一直高于 rhEGF 原液组, 且有显著性差异($P<0.05$), 说明应用 rhEGF 缓释微球治疗效果, 优于传统直接施用 rhEGF 原液的方法, 进一步验证了缓释微球具有长期保持药物活性、延长药物作用时间以及改善治疗效果的技术优势.

(2) 组织病理学观察. 通过 3, 7, 14 和 21 天组织病理切片观察不同组之间肉芽生长速度. 3 天时 A, B 组肉芽中毛细血管已经较多, 而 C 组毛细血管只能偶见, 7 天时 A, B 组肉芽以成纤维细胞为主, 毛细血管丰富, C 组与 A, B 组差异不明显. 图 4 给出 14 天时 A, B 和 C 组溃疡面组织病理图片, 由图中可以看出 A 组肉芽生长好于 B 组, 表现为肉芽组织中成纤维细胞更为丰富, 表皮结构完整, 胶原蛋白排列有序, 血管较多, 且血管壁厚, C 组肉芽组织相对幼稚, 内毛细血管丰富, 成纤维细胞不丰富. 21 天 A, B 组结构几乎接近正常上皮, C 组组织结构尚不完整.

总结发现 A, B 组肉芽形成和组织创建均比 C 组快一个阶段, A, B 组出现大量成熟成纤维细胞并分泌大量的胶原蛋白的时候, C 组肉芽组织还比较幼稚, 还充满了大量的毛细血管, 说明生长因子保持生物活性, 发挥了促进溃疡愈合的作用. 另外, 14 天后 A 组较 B 组成纤维细胞丰富, 表皮成熟快, 血管形成快, 说明缓释微球较传统 rhEGF 原液促进溃疡面愈合更快, 治疗效果更好.

(3) 免疫组化方法观察 PCNA 表达. PCNA 与细胞增殖和 DNA 合成有关, 可以反映细胞增殖程度和所处的周期. PCNA 实质上起调节 DNA 多聚酶 δ 活性的作用. PCNA 随细胞增殖周期的变化而变化,

表 3 不同时间溃疡面愈合率的比较(%)^{a)}

	3 天	7 天	14 天	17 天	21/天
A 组	44.86 ± 13.8	71.71 ± 5.54	91.36 ± 3.59	$93.78 \pm 1.84^{*b}$	$96.61 \pm 1.59^{*b}$
B 组	37.96 ± 14.7	70.96 ± 7.49	88.89 ± 2.85	89.33 ± 2.31	92.08 ± 4.33
C 组	59.17 ± 4.08	63.35 ± 10.2	86.03 ± 4.21	88.84 ± 3.73	89.70 ± 3.21

a) $\bar{x} \pm S$, *示与 C 组比, $P<0.05$; #示与 C 组比, $P<0.01$; b 示 A 组与 B 组比, $P<0.05$

G1 后期开始增加, S 期达到高峰, G2, M 期又降低, 其变化与 DNA 的合成相一致. PCNA 参与 DNA 的合成, 而 DNA 的合成又是细胞分裂增殖的必要条件. 因此, PCNA 与细胞增殖关系密切, 可评价细胞增殖情况^[16].

在 3, 7, 14 和 21 天应用免疫组化法观察不同组 PCNA 表达情况. 实验观察到在早期 PCNA 阳性细胞为单核细胞和成纤维细胞, 毛细血管的内皮细胞, 随着肉芽的成熟, 表皮层基底细胞甚至棘细胞层也有表达, 这一过程 A, B 组均快于 C 组. 虽然 C 组肉芽内有成纤维细胞, 但是 PCNA 呈阴性, 说明在糖尿病溃疡模型中, 机体自身分泌的 EGF 不足, 使得成纤维细胞不能都处于增殖的状态. A 与 B 组的差别主要表现在 14 天以后, 如图 5 所示, 当肉芽和上皮都大

量增殖时, A 组的肉芽组织较 B 组致密, PCNA 阳性细胞染色深, 提示增殖能力更强, 显示了缓释技术的优越性.

3 结论

本文成功地以高聚物 PLGA 为载体, 通过 W/O/W 方法制备了 rhEGF 缓释微球, 药物包封率高、粒径均匀无黏连, 持续释药时间达 24 h. 该缓释微球保持了生长因子活性, 可促进成纤维细胞增殖. 使用该缓释微球对溃疡面进行治疗, 愈合速度高于传统直接施加生长因子的方法, 在微观上, 通过组织病理学和 PCNA 表达观察, 缓释微球的治疗优势体现更明显. 本实验为人表皮生长因子缓释微球临床应用提供了重要的科学依据.

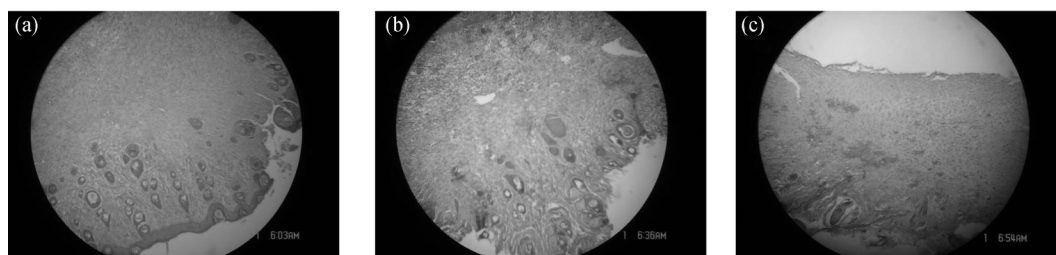


图 4 溃疡 14 天组织病理学观察溃疡面愈合情况
(a) rhEGF 缓释微球组; (b) rhEGF 原液组; (c) 空白对照组



图 5 溃疡 14 天免疫组化方法观察 PCNA 表达情况
(a) rhEGF 缓释微球组; (b) rhEGF 原液组; (c) 空白对照组

参考文献

- 1 Rathur H M, Boulton A J M. The diabetic foot. Clin Dermatol, 2007, 25: 109—120^[DOI]
- 2 Clarke-Moloney M, Lyons G M, Burke P E, et al. A review of technological approaches to venous ulceration. Crit Rev Biomed Eng, 2005, 33(6): 511—556
- 3 Okumura K, Kiyohara Y, Komada F, et al. Improvement in wound healing by epidermal growth factor (EGF) ointment. I. Effect of nafamostat, gabexate, or gelatin on stabilization and efficacy of EGF. Pharm Res, 1990, 7(12): 1289—1293^[DOI]

- 4 Couvreur P, Blanco-Prieto M J, Puisieux F, et al. Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides. *Adv Drug Deliver Rev*, 1997, 28(1): 85—96[DOI]
- 5 Jorgensen L, Moeller E H, van de Weert M, et al. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29: 174—182[DOI]
- 6 Freiberg S, Zhu X X. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm*, 2004, 282: 1—18[DOI]
- 7 Kishan V, Oliver D W, Dillis V V, et al. Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. *Tissue Eng*, 2006, 12(10): 2707—2716[DOI]
- 8 Kwon Y B, Kim H W, Roh D H, et al. Topical application of epidermal growth factor accelerates wound healing by myofibroblast proliferation and collagen synthesis in rat. *J Vet Sci*, 2006, 7(2): 105—109
- 9 Reis C P, Neufeld R J, Ribeiro A J, et al. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nat Med*, 2006, 2(2): 53—65
- 10 Kim T H, Lee H, Park T G. Pegylated recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) for sustained release from biodegradable PLGA microspheres. *Biomaterials*, 2002, 23: 2311—2317[DOI]
- 11 Cleland J L, Duenas E T, Park A, et al. Development of poly-(D,L-lactide – coglycolide) microsphere formulations containing recombinant human vascular endothelial growth factor to promote local angiogenesis. *J Control Release*, 2001, 72: 13—24[DOI]
- 12 Loo J S C, Ooi C P, Boey F Y C. Degradation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA) by electron beam radiation. *Biomaterials*, 2005, 26(12): 1359—1367[DOI]
- 13 Anderson J M, Shive S M. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Delivery Rev*, 1997, 28(1): 5—24[DOI]
- 14 刘晓燕, 常津, 郭艳霜, 等. 靶向抑制晶状体上皮细胞增殖的载药毫微球的研究. *中国生物医学工程学报*, 2004, 23(6): 583—588
- 15 孙同柱, 王亚平, 杨银辉, 等. 表皮细胞生长因子与碱性成纤维细胞生长因子促进创面修复效应的比较性研究. *中国修复重建外科杂志*, 1999, 13(5): 278—282
- 16 Prelich G, Tan C K, Kostura M, et al. Functional identity proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature*, 1987, 326: 517—520[DOI]