

眼镜蛇毒细胞毒素缓释微球制备及体外性质研究

陈志奎¹, 林礼务¹, 林琦², 庄权权³, 何以敕¹, 薛恩生¹

(福建医科大学 1. 附属协和医院 超声科, 2. 医药生物工程中心, 3. 蛇毒研究所, 福建 福州 350004)

摘要:目的 研究眼镜蛇毒细胞毒素(Cytotoxin, CTX)聚乳酸/羟基乙酸缓释微球的制备方法, 考察其一般性质、体外释药特性及生物学活性。方法 采用色谱方法纯化眼镜蛇 CTX, MTT 方法检测细胞毒活性, 复乳-溶剂挥发法制备载药微球, 考察微球表面形态、粒径、包封率、载药率、体外释药行为及释放眼镜蛇 CTX 细胞毒活性。结果 纯化眼镜蛇 CTX 具有明显的细胞毒作用, 对肝癌 HepG2 细胞 12, 24 h 的 IC_{50} 分别为 1.43, 1.12 $\mu\text{g/mL}$, 对 L02 肝细胞 12, 24 h 的 IC_{50} 分别为 1.37, 1.01 $\mu\text{g/mL}$ 。微球表面光滑圆整, 粒径 2.1 ~ 7.8 μm , 包封率和载药率分别为 (74.10 $\pm$ 9.92) % 和 (0.72 $\pm$ 0.09) %, 30 d 药物累积释放 84.3 %, 释放眼镜蛇 CTX 保持较好的生物学活性。结论 采用复乳-溶剂挥发法可制备具有较高包封率, 良好缓释效果, 保持完整生物学活性的眼镜蛇 CTX 缓释微球。

关键词: 细胞毒素; 聚乳酸-羟基乙酸微球; 缓释

中图分类号: R944.9 文献标识码: A 文章编号: 1005-1678(2008)03-0161-04

Preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide acid) microspheres containing cytotoxin from Naja Naja Atra venom

CHEN Zhi-kui¹, LIN Li-wu¹, LIN Qi², ZHUANG Quan-quan³, HE Yi-mi¹, XUE En-sheng¹

(1. Department of Ultrasound, Union Hospital of Fujian Medical University, 2. Biomedical Engineering Center, 3. Venom Research Institute, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

Abstract: **Purpose** To explore the method of preparation of CTX-PLGA microspheres and to investigate their general properties, *in vitro* drug release characteristics. **Methods** CTX was purified by chromatography technique and cytotoxicity in HepG2 and L02 cells was analyzed by MTT. CTX-PLGA microspheres were prepared using double emulsion technique and the particle size, morphology, drug loading, encapsulation efficiency and *in vitro* drug release were investigated by means of scanning electron microscopy, laser light scattering particle size detector, and so on. **Results** Purified CTX showed excellent cytotoxicity effect on HepG2 and L02 cells. CTX-PLGA microspheres were spherical and they exhibited a smooth surface morphology with median size 4.2 μm in diameter. The drug loading and encapsulation efficiency reached 0.72 % and 74.10 %, respectively, and cumulative release of CTX in 30 days was 84.3 % *in vitro*. **Conclusion** The desirable microparticles containing relatively high concentration of CTX show sustained release effect *in vitro*.

Key words: cytotoxin; PLGA microspheres; sustained release

眼镜蛇毒细胞毒素(Cytotoxin, CTX)具有明显的抗肿瘤作用^[1], 但同大多数生物毒素一样, 眼镜蛇 CTX 抗肿瘤作用缺乏特异性, 全身用药常导致严重的毒副作用。本文采用复乳-溶剂挥发法制备肿瘤内注射用眼镜蛇毒 CTX-聚乳酸/羟基乙酸(PLGA)

微球, 并考察载药微球的形态、粒径、包封率、载药率、体外释放行为及生物学活性。

1 材料

1.1 试剂与仪器

PLGA (LA/GA = 50/50, M_n 10 000, 20 000, 40 000)、聚乙烯醇(PVA) 1788(中国科学院成都有机化学有限公司)。

AKTA explorer 蛋白纯化系统(瑞典 Pharmacia Biotech 公司); 冷冻真空浓缩系统(丹麦 Heto-Holten

收稿日期: 2007-10-24

作者简介: 陈志奎(1975-), 男, 福建惠安人, 在读医学博士, 主要从事缓释药物超声介入治疗肝癌研究, Tel: 13489024830; 林礼务, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: Jimchen2003@163.com。

公司);600E-2487 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);MICCRA D-1 分散机(德国 Art 公司);XL30ESEM 环境扫描电子显微镜(荷兰 Philips 公司);LS 230 激光粒度分析仪(美国贝克曼库尔特公司)。

1.2 细胞系

人肝癌 Hep G2 细胞(中国科学院上海细胞库);人肝细胞 L02(福建省肝胆外科研究所惠赠)。

2 方法

2.1 眼镜蛇 CTX 分离纯化、 M_r 及细胞毒性测定

参考许云禄^[2]方法并进行改良。广东产眼镜蛇毒经 Sephadex G-100 和 CM-Sephadose FF(16/20)纯化后,大鼠离体心脏毒性试验,收集眼镜蛇 CTX 上 Sephasil Peptide C_{18} 柱精细纯化,由 100%A(0.12% 三氟乙酸水溶液)到 100%B(0.10% 三氟乙酸乙腈溶液)直线梯度洗脱,收集主峰蛋白,SDS-PAGE (Tris-Tricine 系统)测定 M_r ,MTT 法测定眼镜蛇 CTX 对体外培养 Hep G2、L02 细胞生长抑制率。

2.2 复乳法制备 CTX-PLGA 缓释微球

采用复乳-溶剂挥发法制备微球^[3-4],5 mg/mL 眼镜蛇 CTX 0.2 mL 加入 M_r 10 000 的 PLGA(100 mg/mL 二氯甲烷)溶液 1 mL,冰浴下 10 000 r/min 匀浆 1 min;将乳化液迅速注入 3% PVA 溶液 10 mL 中,5 000 r/min 匀浆 2 min;加入去离子水 30 mL,400 r/min 磁力搅拌 4 h,使二氯甲烷完全挥发;去离子水洗涤 3 次,冷冻干燥后 4 保存。

2.3 微球表面形态与粒径测定

取适量 CTX-PLGA 微球冻干粉,置双面胶带上,均匀涂布,离子镀膜仪溅金后,扫描电子显微镜观察微球表面形态。取适量微球粉末分散于去离子水中,激光粒度分析仪测定微球粒径及分布。

表 1 不同浓度眼镜蛇毒细胞毒素对 Hep G2 和 L02 细胞生长的抑制率($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Cytotoxicity effect of CTX from *Naja naja atra* venom on Hep G2 and L02 cells($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	抑制率/ %				
	0.5 μ g/mL	1.0 μ g/mL	2.0 μ g/mL	3.0 μ g/mL	4.0 μ g/mL
12h Hep G2	16.7 $\pm$ 2.8	39.3 $\pm$ 5.1	68.5 $\pm$ 10.9	76.4 $\pm$ 13.1	89.7 $\pm$ 12.5
L02	19.3 $\pm$ 3.4	36.9 $\pm$ 4.9	64.2 $\pm$ 9.8	79.7 $\pm$ 11.9	83.2 $\pm$ 13.1
24h Hep G2	28.5 $\pm$ 2.6	45.2 $\pm$ 8.3	70.9 $\pm$ 11.3	81.2 $\pm$ 17.3	91.4 $\pm$ 15.3
L02	25.5 $\pm$ 3.9	49.8 $\pm$ 9.8	66.1 $\pm$ 11.4	89.7 $\pm$ 16.1	90.8 $\pm$ 14.8

3.2 CTX-PLGA 微球形态与粒径测定

CTX-PLGA 微球冻干后呈疏松白色粉末,扫描电镜下观察呈圆球形,表面光滑,分散良好,无粘连,见图 1。激光粒度分析仪测得微球粒径为 2.1~7.8 μ m,平均 4.2 μ m,见图 2。

2.4 微球包封率和载药率测定

称取微球 10 mg,加入装有 5% SDS 含(0.1 mol/L NaOH)溶液 1 mL 的瓶中,37 $^{\circ}$ C,220 r/min 振荡 30 h,10 000 r/min 离心 3 min,取上清液 0.5 mL 加 0.1 mol/L HCl 溶液 0.5 mL 中和后,BCA 法测蛋白浓度,计算微球载药率和包封率,载药率=(CTX 含量/微球质量) $\times$ 100%;包封率=(实际载药率/理论载药率) $\times$ 100%。

2.5 载药微球的体外释放

采用 M_r 10 000,20 000 与 40 000 的 PLGA 制备微球,观察不同 M_r PLGA 制备微球的体外释放行为的差异。分别称取各种 M_r PLGA 制备的微球 100 mg 于 5 mL 离心管中,加入磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.4,含 0.02% NaN_3)2 mL,于 37 $^{\circ}$ C 摇床 100 r/min 振荡,定时离心,取上清液 0.5 mL,BCA 法测蛋白浓度,同时补加 PBS 0.5 mL 继续振荡。

2.6 载药微球体外释放眼镜蛇 CTX 细胞毒性

称取载药微球 50 mg 于 100 mL 锥形瓶中,加入 PBS(pH 7.4,含 0.02% NaN_3)25 mL,于 37 $^{\circ}$ C 摇床 100 r/min 振荡,第 1,15,30 天分别离心收集上清液,对水透析 24 h 除去 NaN_3 ,浓缩过滤除菌后,MTT 法测定眼镜蛇 CTX 对体外培养的 Hep G2 细胞的毒性作用。

3 结果

3.1 眼镜蛇 CTX 分离纯化、 M_r 及细胞毒性测定

眼镜蛇毒经分子筛、阳离子交换、反相疏水 3 步分离纯化,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳证实为均一蛋白区带, M_r 为 7 325。眼镜蛇 CTX 具有明显的溶细胞作用,对 Hep G2 细胞的 IC_{50} 分别为 1.43,1.12 μ g/mL,对 L02 细胞 12,24 h 的 IC_{50} 分别为 1.37,1.01 μ g/mL,结果见表 1。

3.3 CTX-PLGA 微球的包封率、载药量、体外释放及细胞毒性测定

缓释微球的包封率和载药率分别为(74.10 $\pm$ 9.92)%和(0.72 $\pm$ 0.09)%。各种 M_r 的 PLGA 制备的微球均存在一定的突释行为,随着 PLGA M_r 增加,

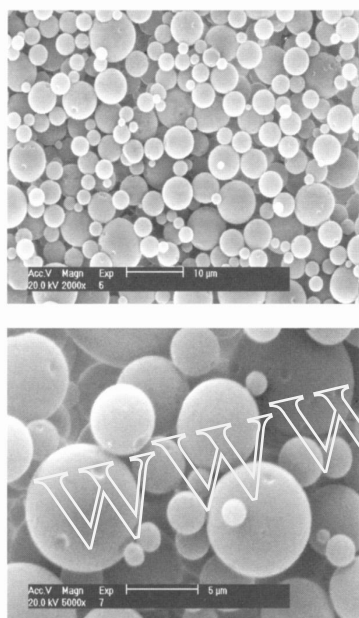


图1 CTX-PLGA 微球的扫描电镜图片

Fig 1 The scanning electron microscopy image of CTX-PLGA microspheres

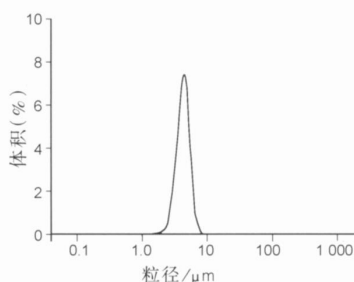


图2 CTX-PLGA 微球的粒径分布图

Fig 2 Particle size distribution of CTX-PLGA microspheres

药物体外释放周期逐渐延长,见图3。微球体外释放1,15,30 d的眼镜蛇CTX生物学活性无明显改变,对Hep G2细胞作用12 h的 IC_{50} 分别为1.49,1.51和1.45 $\mu\text{g/mL}$ 。

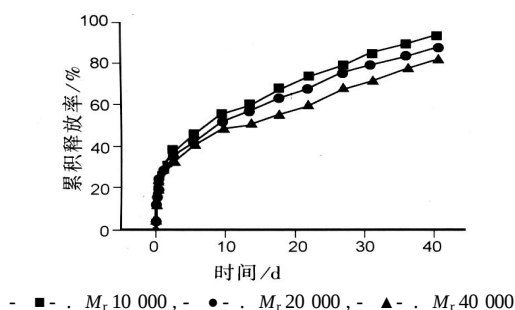


图3 CTX-PLGA 微球的体外释放曲线

Fig 3 *In vitro* release profile of CTX-PLGA microspheres

4 讨论

眼镜蛇CTX为小分子多肽, M_r 约7 000,等电点11~12,理化性质稳定,耐强酸强碱,在100 °C加热

15 min 仍不会失活。根据眼镜蛇CTX M_r 较小、等电点较高的特点,通过凝胶过滤、阳离子交换可将大部分杂蛋白去除。最后根据疏水性差异,利用高效液相色谱反相疏水方法精细纯化,可得到高纯度眼镜蛇CTX。体外细胞毒实验显示,眼镜蛇CTX具有显著的抗肿瘤活性,但对肝癌Hep G2细胞和肝细胞L02的 IC_{50} 大致相同,证明眼镜蛇CTX细胞毒作用的非选择性。体内实验表明^[5],眼镜蛇CTX全身给药抗肿瘤,抑瘤率随着药物剂量增加而增加,但毒副作用也明显增强,严重者可导致动物死亡。因此,寻找合适的药物剂型和给药途径是解决眼镜蛇CTX应用于临床抗肿瘤的重要突破口。

直接在肿瘤局部给予负载抗肿瘤药物的缓释剂,不仅可以解决全身给药靶向性差问题,而且能在局部持续长时间释放高浓度药物,达到提高抗肿瘤疗效,降低全身毒副作用的目的。近年来,微球、脂质体及在体凝胶系统等已经成为药物缓释载体研究的热点。其中,PLGA微球具有较长的释药周期,易于储存等优点,已经成为多肽类药物的常用缓释载体,如曲普瑞林、亮丙瑞林PLGA微球等已经上市。

复乳-溶剂挥发法是制备注射微球的最常用方法之一,通过调整内水相体积、药物浓度、PLGA M_r 、PVA浓度、复乳搅拌速度等各项参数,优化制备工艺可以有效控制微球质量。本实验制备的微球是用于肿瘤内直接注射,如果微球粒径太小则容易通过毛细血管进入血液循环,而微球太大容易堵塞针管,匀浆法制备的CTX-PLGA微球平均粒径4.2 μm ,符合瘤内注射的要求。

包封率是考察载药微球质量的重要指标。制备工艺的许多参数,如内水相体积、药物浓度、PLGA浓度等都会影响微球的包封率。当增加内水相体积和药物浓度时,微球的包封率降低,其原因可能为:在微球的形成过程中,药物由于内水相和外水相的浓度差而不断向外扩散,由菲克定律 $J = -D \Delta C / L$ (J 为扩散量, D 为扩散系数, ΔC 为不同介质间的浓度差, L 为扩散方向上的距离)可知扩散速度与浓度差成正比。当内水相药物浓度较高时,眼镜蛇CTX在两相间较大的浓度差导致扩散速度加快,内水相中眼镜蛇CTX浓度的增加可能无法补偿因高速药物扩散带来的损失,便造成了包封率的降低。

一般认为微球中的药物释放有两种机制:一为扩散机制,溶液经微球的孔隙进入微球内部,溶解药物后扩散到释放介质中,微球表面附着的药物溶解及扩散是造成突释效应的主要因素;第二为降解机

制,随着聚合物的降解,微球的骨架逐渐溶蚀,使药物释放出来,此过程仍需要药物的溶解及扩散。聚合物 M_r 与组成是影响聚合物降解速度的主要因素,聚合物 M_r 越低,其玻璃化相变温度也降低,释药速度加快,而在丙交酯和乙交酯等摩尔配比时,聚合物的降解速度最快^[6]。

眼镜蛇 CTX-PLGA 微球具有较好的缓释效果,并保持了完整的生物学活性,通过超声引导肿瘤组织内注射,可望提高肿瘤局部的药物浓度,减少全身毒副作用,具有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] Feofanov A V, Sharov G V, Dubinnyi M A, et al. Comparative study of structure and activity of cytotoxins from venom of the cobras *Naja oxiana*, *Naja kaoutha*, and *Naja haje* [J]. *Biochemistry*, 2004, 69 (10): 1148-1157.
- [2] 许云禄,杨丽娟,刘广芬. 舟山眼镜蛇毒细胞毒素的分离纯化及其体外抗肿瘤活性[J]. *中国生化药物杂志*, 2003, 24 (3): 127-140.
- [3] Yang Yilan, Chung Taishung, Ngee P N. Morphology, drug distribution, and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/ evaporation method[J]. *Biomaterials*, 2001, 22: 231-241.
- [4] Alicia J D, Constance R C, Nicholas I, et al. Controlled release of bioactive TGF- β 1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 1579-1585.
- [5] 许云禄,吴国土,林建忠. 舟山眼镜蛇毒细胞毒素 - F 的体内抗肿瘤作用[J]. *福建医科大学学报*, 2003, 37 (3): 298-230.
- [6] Homayoun P, Mandal T, Landry D. Controlled release of anti-cocaine catalytic antibody from biodegradable polymer microspheres[J]. *Pharm Pharmacol*, 2003, 55 (7): 933-938.

一株产纤溶酶菌株 BS-26 的分离和鉴定

牛术敏^{1,2}, 李术娜¹, 郭晓军¹, 袁洪水¹, 王世英¹, 朱宝成¹

(1. 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省保定第一中学, 河北 保定 071000)

摘要:目的 对纤溶酶产生菌株进行筛选和鉴定。方法 采用 LB-纤维蛋白平板初筛和摇瓶发酵复筛的方法进行筛选;通过对菌株形态和生理生化特征以及 16S rDNA 进行鉴定。结果 从土壤中分离得到 5 株纤溶酶高产菌株,其中菌株 BS-26 活性最高。其形态和生理生化特征与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 很相近。将所测得的 16S rDNA 序列用 BLAST 软件与 GenBank 数据库进行相似性分析,并用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。BS-26 菌株与 *Bacillus subtilis* 的相似性达到 99.63%。结论 BS-26 菌株鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 纤溶酶; 生理生化特征; 16S rDNA; 鉴定

中图分类号: Q93-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-1678(2008)03-0164-04

Isolation and identification of the fibrinolytic enzyme producing strain BS-26

NIU Shu-min^{1,2}, LI Shu-na¹, GUO Xiao-jun¹, YUAN Hong-shui¹, WANG Shi-ying¹, ZHU Bao-cheng¹

(1. School of Life Science, Agriculture University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. No. 1 Middle School of Baoding Heibei Province, Baoding 071000, China)

Abstract: **Purpose** To isolate and to identify strains producing fibrinolytic enzyme. **Methods** Strains producing fibrinolytic enzyme were isolated by LB-fibrin plate at first and secondly by shaking flask fermentation. Morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA were used to identify strain.

收稿日期: 2007-09-19

作者简介: 牛术敏(1979-),女,河北保定人,在读硕士生,主要从事微生物与生化药学研究;朱宝成(1962-),通信作者,教授,博士生导师, Tel: 0312-7528258, E-mail: zhu2222@126.com。