

关^[3,4]。本研究结果提示 TNF- α 和 IL-6 在高原地区肺心病右心衰竭患者中是激活的,且随着心功能恶化,其浓度增高。TNF- α 和 IL-6 分别与左心室射血分数、右心室射血分数和肺动脉收缩压呈显著正相关,进一步证实细胞炎症因子在肺心病心力衰竭的发生、发展中有重要的病理作用,血中 TNF- α 和 IL-6 增高是心功能恶化的重要生物学标志。

2. 肺心病右心衰竭患者内皮素的关系:ET-1 是一种生物活性多肽,其在肺部有着广泛的生物学效应,不仅有收缩气管、支气管和血管平滑肌以及促平滑肌细胞、成纤维细胞增生作用,而且还有促进腺体分泌、炎性介质释放等多种作用,肺脏既是内皮素作用的靶器官,又是 ET-1 合成、分泌、代谢的主要场所。ET-1 作为一种血管活性物质,可以反应血管内皮功能,且与心力衰竭密切相关。有研究表明组织缺血、缺氧及酸中毒情况下,ET-1 释放增多,且机体对其反应性增强,ET-1 促使血管内皮强烈收缩,参与肺心病肺动脉高压形成,血 ET-1 水平在心力衰竭病人中升高,并与症状及血流动力学的严重程度相关。ET-1 是心力衰竭患者病死率的独立预测因子^[5,6]。本文结果提示 ET-1 与高原地区肺心病心力衰竭患者的心功能显著相关,ET-1 水平随着 NYHA 分级升高而升高,证明它不仅是预后因素还反映疾病的严重程度。

3. 肺心病右心衰竭患者内皮素与细胞炎症因子的关系:本文结果提示高原地区肺心病右心衰竭患者的细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6 与 ET-1 呈显著正相关,可能 ET-1 释放增多致血管内皮细胞产生缺血性坏死,从而使血管内皮细胞本身释放 TNF- α 、IL-6 等细胞因子增加,而 TNF- α 、IL-6 等反过来对血管内皮细胞产生细胞毒性作用,又进一步加重了血

管内皮的损伤^[7,8]。

在高原地区,高寒缺氧,慢性肺源性心脏病为高原内科临床常见病、多发病,反复的气道感染和持续的低氧血症,更易并发心力衰竭。细胞炎症因子和血管内皮功能的变化与慢性肺源性心脏病右心衰竭患者心功能恶化密切相关,TNF- α 、IL-6、ET-1 的检测对慢性肺源性心脏病右心衰竭患者病情的了解和指导治疗有一定意义。

参考文献

- 1 陈灏珠,林果为.实用内科学[M].13版,北京:人民卫生出版社,2009:1371-1372
- 2 Bradham WS, Moe G, Wendt KA, *et al.* TNF alpha and myocardial matrix metalloproteinases in heart failure: relationship to LV remodeling. *American journal of physiology* [J]. *Heart Circ Physiol*, 2002, 282(4): 288-295
- 3 Fujita M, Shannon JM, Irvin CG, *et al.* Over expression of tumor necrosis factor - alpha produces an increase in lung volumes and pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280: L39-L49
- 4 Dinh W, Füh R, Nickl W, *et al.* Elevated plasma levels of TNF - alpha and Interleukin - 6 in patients with diastolic dysfunction and glucose metabolism disorders. *Cardiovasc Diabetol*, 2009, 8(1): 58
- 5 Pullamsetti SS, Schermuly RT. Endothelin receptor antagonists in pre-clinical models of pulmonary hypertension. *Eur J Clin Invest*. 2009, 39(7): 630
- 6 Isnard R, Pousset F, Trochh J, *et al.* Prognostic value of neurohormonal activation and cardiopulmonary exercise testing in patients with chronic heart failure [J]. *Am J Cardiol*, 2000, 86(4): 417-421
- 7 Sharma R, Coats AJ, Anker SD, *et al.* The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin 1 [J]. *Int J Cardiol*, 2000, 72(2): 175-186
- 8 Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest*, 2009, 135(1): 173-180

(收稿:2009-11-27)

(修回:2009-12-30)

生长激素-海藻酸钠-壳聚糖微胶囊的制备及药物释放性能研究

赛佳明 张亦军 黄勇 张增方 江晓路

摘要 目的 研究生长激素-海藻酸钠-壳聚糖微胶囊的制备及其释放性能。**方法** 本课题采用脉冲电场法制备生长激素-海藻酸钠-壳聚糖微球。根据单因素试验和正交试验结果,优化工艺条件和处方组成。观测其形态、尺寸,鉴别其组分,测定生长激素含量、包封率和回收率,并进行体内、外释放实验。**结果** 选择 450 μ m 锐孔直径、2cm 液面距、1.5% 海藻酸钠浓

基金项目:青岛市 2008 年度医药科研指导计划(2008-wszd126)

作者单位:266021 青岛市骨伤科医院(赛佳明、张亦军、黄勇、张增方);266000 青岛,中国海洋大学(江晓路)

度、8ml/h 推进速度、2% Ca^{2+} 浓度作为最佳工艺条件。光学显微镜观察可见得到的微胶囊具有很好的圆形形态,平均粒径尺寸为 $47.93\mu\text{m}$ 。微胶囊的平均包封率为 94%,他莫昔芬平均含量为 11.24%。体外模拟胃液中,微球不溶胀而且所载生长激素基本不被释放;在模拟肠液中,微球溶胀而且所载生长激素被缓释出来,并且在 12h 后被完全释放出来。体内实验证实生长激素微球组的血药浓度在 8h 时到达峰值(98.59ng/ml)。体内、外释放证实能够达到延缓释放的目的。**结论** 生长激素-海藻酸钠-壳聚糖微球具有良好的圆形形态和较好缓释效果。

关键词 生长激素 海藻酸钠 壳聚糖微胶囊 微胶囊 模拟胃、肠液 体内、外药物释放

Preparation of Growth Hormone - Chitosan - Alginate Microcapsules and the Release Profile. Sai Jiaming, Zhang Yijun, Huang Yong, Zhang Zengfang, Jiang Xiaolu. Qingdao Orthopedics and Traumatology Hospital, Qingdao 266021, China

Abstract Objective To study the preparation and the *in vitro* and *in vivo* release profile of GH - Chitosan - Alginate microcapsules. **Methods** GH - Chitosan - Alginate microcapsules were prepared through impulsive electrostatic technique. The interrelated factors influencing the diameter and sphericity were studied through orthogonal experiments, and finally the statistic analysis made sure the optimum conditions to prepare microspheres. The morphology and size of the microcapsules were observed, and the content, encapsulation efficiency and recovery efficiency of the microcapsules were measured. Moreover, their *in vitro* and *in vivo* release experiments were carried out. **Results** The results showed that the diameter of needle was the most significant factor to the diameter of microspheres. The optimum conditions for the least diameter of microspheres were $450\mu\text{m}$ diameter of needle, 2cm from needle tips to the gelation surface, 1.5% alginate concentration, 8ml/h speed of flowing - liquid and metal containers. The microcapsules had good sphericity morphology and distribution. The size of the microcapsules was in the range of $10 - 25\mu\text{m}$ with an average size of $47.93\mu\text{m}$. The encapsulation efficiency and GH - load of the microcapsules were 94% and 11.24% respectively. The release kinetics of microcapsules was studied in false gastric and intestines juice. In false gastric juice, the GH of microcapsules was not released; in false intestines juice, it was released well, and TAM was completely released after about 12h. *in vivo* release profile made sure that the serum GH level of GH microcapsule group was at the highest value (98.59ng/ml) at 8h. The release profile was fitted well in both *in vitro* and *in vivo* conditions. **Conclusion** GH - Chitosan - Alginate Microcapsules have good morphology and sustained release effect.

Key words Growth hormone (GH); Chitosan; Alginate; Microcapsule; False gastric and intestines juice; *in vitro* and *in vivo* release profile

随着科技的发展出现了很多种新的药物传递体系,如脂质体、胶束、乳剂、聚合物微米或纳米颗粒等。这些新的药物传递体系,使得控制给药和靶向给药更容易实现^[1-4]。近年来,由于具有很好的生物相容性和生物可降解性,聚合物微米颗粒作为药物传递体系的研究取得了很大的进展。常用的制备聚合物微米或纳米颗粒的聚合物有明胶、壳聚糖、海藻酸盐、聚乙醇酸、聚乳酸、聚乳酸-乙醇酸共聚物等^[5-6]。人生长激素(human growth hormone, hGH)能影响几乎所有类型的组织和细胞,主要功能是刺激骨和软骨细胞的生长和分化;促进蛋白合成,同时减少蛋白的消耗,调理脂和糖的代谢。但是目前,国内市场仅有 hGH 针剂,其半衰期较短,存在用药不便等问题。

本实验的目的是通过将生长激素包裹在壳聚糖和海藻酸盐中得到一种新的生长激素口服剂型——生长激素微胶囊。本实验还对所得微胶囊的形态、粒径尺寸进行了观察计算,并测定了其他莫昔芬含量、包封率、回收率及体内、外释放速率。

材料与方法

1. 药品及试剂:壳聚糖,浙江玉环县海洋生物化学有限公

司,平均相对分子质量 = 476kDa,脱乙酰度 91.18%。海藻酸钠,化学纯。重组人生长激素注射液,长春金赛药业有限责任公司,生产批号: S20050025。氯化钙、氢氧化钠、醋酸、甲醛、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙醇、硫酸钠均为分析纯。新西兰大白兔,购于青岛康大试验动物中心,合格证号 Scxk(鲁)2007-0023,雄性,体重 1.5kg。

2. 仪器:电子恒速搅拌机,上海申生科技有限公司。恒温磁力搅拌器,上海闵行虹浦仪器厂。DZF-6050 型真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司。PHS-3C 精密 pH 计,上海雷磁仪器厂。FA 型系列电子分析天平,上海恒平科学仪器有限公司。756M 型紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司。JSM-T300 型扫描电子显微镜,日本电子。

3. 生长激素微胶囊的制备:精密量取生长激素注射液(10U/ml),生长激素注射液与海藻酸钠溶液以 1:4 体积比混合均匀后装入注射器中。使脉冲电场制备仪的正极与注射器金属锐孔连接,负极与置于凝胶浴 20mg/ml CaCl_2 溶液(pH 值 5.3)中的金属导电圈连接,在锐孔和凝胶浴之间形成了脉冲静电场。脉冲电场装置指示电压 380V、脉冲频率 120Hz、脉宽 2ms。当注射器泵将液体推出时,电场力克服海藻酸钠溶液固有的黏滞力和表面张力,使溶液呈一定粒径的雾滴喷射至凝胶浴中,固化一定时间后,得到生长激素海藻酸钙微球。将微球滤出,并与成膜液(不同浓度壳聚糖溶液)混合,170r/

min 振荡 15min 后,微球表面形成均匀半透性薄膜。将以上制备的载生长激素微球在 -75°C 超低温冰箱中预冻 2h,在真空度 $3 \times 10^3 \text{ Mbar}$ 、温度 -45°C 冷冻干燥 24h。

4. 微胶囊的形态观察和粒径的测定:对所得微胶囊的形态进行观察,并测定微胶囊的粒径尺寸范围,计算平均粒径尺寸。

5. 生长激素含量、包封率测定:绘制生长激素标准曲线并应用提取-水解法检测生长激素微球载药率和包封率。精密称取冷冻干燥的微球 20mg,用 5ml 模拟肠液溶解微球后,在 $1 \times 10^4 \text{ r/min}$ 条件下离心 10min,保留上清液。沉淀加入 pH 值为 7.4 的 PBS1.0ml 重新分散,离心后保留上清液;沉淀溶于 10 ml 0.1mol/L 氢氧化钠,充分混合后离心;分离出上清液,与前步上清液合并;用 0.1mol/L 盐酸中和混合的上清液。混合上清液中的生长激素含量根据《中华人民共和国药典》Ⅲ部(2005 年版)附录 VIB 蛋白测定法(Lowry 法)测定。微球的包封率按下列公式计算。包封率 = (实测载生长激素量/理论载生长激素量) $\times 100\%$;载药量 = (微球中生长激素量/称取的微球质量) $\times 100\%$

6. 单因素及正交实验优化制备工艺:经过单因素试验,表明海藻酸钠浓度、 Ca^{2+} 浓度、锐孔孔径、推进速度、液面距等因素对包封率或粒径影响的显著性。然后,借助正交助手软件生成正交表并通过正交实验对以上主要影响因素进行优化。

7. 药物体外释放实验:人工模拟胃液的配制:取 9ml 的浓盐酸,加 800ml 蒸馏水,10g 胃蛋白酶, pH 值约为 1.2,混匀后备用^[7]。人工模拟肠液的配制:用磷酸盐配置 pH 值 6.8 的缓冲液^[7]。利用 RCZ-8A 型药物溶出度测定仪进行微胶囊在人工模拟胃、肠液中的释放实验,并计算其药物累积释放量。控制转速为 100r/min,温度为 $36.5 \sim 37.5^{\circ}\text{C}$,将适量生长激素微胶囊放进 250ml 圆底烧瓶中,加入人工模拟胃、肠液,定时取样 5ml,用微孔滤膜过滤,并补入等量介质。将滤液用体积分数 95% 乙醇定容至 100ml,用紫外分光光度计测在 280nm 的吸光度值,代入标准曲线得出质量浓度,然后计

算出累积释放量百分率并绘制释放曲线。

8. 生长激素微球的体内缓释研究:载生长激素微球经胃管灌胃给药后监测血药浓度的变化,并与生理盐水组、空白微球组和生长激素注射剂组比较,以检测载生长激素微球在体内对生长激素的缓释作用。生长激素注射剂组:取体重为 1.5kg 的新西兰大白兔 20 只,分别于颈背部皮下注射上述 0.46U/kg hGH(人 0.2U/kg;人与兔之间用药剂量换算)。载生长激素微球组:取体重为 1.5kg 的新西兰大白兔 20 只,经胃管给予载生长激素微球组(参照海藻酸钠-壳聚糖微球载药生物利用率约 30%,以及包封率 94%,此组给药按照 1.63U/kg 生长激素注射剂制备的微球给予灌胃)。空白微球组:取体重为 1.5kg 的新西兰大白兔 20 只,经胃管给予载空白微球组。生理盐水组:取体重为 1.5kg 的新西兰大白兔 20 只,分别经胃管给予生理盐水。给药前及给药后不同时间从新西兰大白兔耳缘静脉取血 0.5ml,在 4°C 放置 1h 后 5000r/min 离心 2min 搜集血清,于 -20°C 冰箱避光保存。由青岛市市立医院检验科协助完成生长激素含量的检测。以时间为横坐标,以血药浓度为纵坐标绘制血药浓度-时间曲线。所得数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验做统计学检验。

结 果

1. 生长激素微胶囊的形态和粒径尺寸:冻干前生长激素微胶囊的整体形态,形态圆整、球形度良好。图 1 为冻干后载生长激素微球的显微照片,体现了通过脉冲电场装置制备的载生长激素壳聚糖-海藻酸钠微球的粒径分布较为均匀,分散性好。图 2、图 3 是扫描电镜条件下微球的表面结构,从中可看到,制得的微球并非光滑的球体,表面有许多微小孔洞,这有利于药物分子从微球内部缓慢释放并防止胃肠道中消化酶进入微球中对生长激素的破坏。所得微胶囊的直径在 $39 \sim 55 \mu\text{m}$,500 个微胶囊的平均粒径为 $47.93 \mu\text{m}$ 。

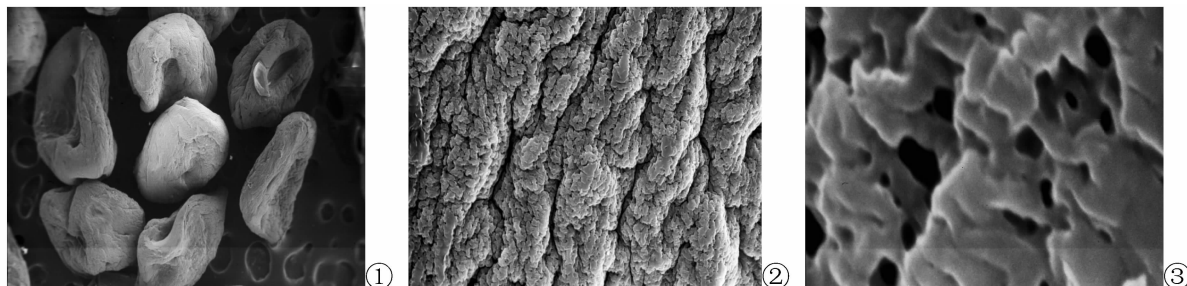


图 1 微球冻干品扫描电镜照片

①微球冻干品局部表面扫描电镜照片($\times 40$);②微球冻干品局部表面扫描电镜照片($\times 2000$);③微球冻干品局部表面扫描电镜照片($\times 40000$)

2. 实验结果:经过单因素试验,表明海藻酸钠浓度、 Ca^{2+} 浓度、锐孔孔径、推进速度、液面距 5 个因素对包封率或粒径的影响显著。我们通过正交实验对

以上 5 个条件进行优化,确定正交实验中考察的 5 因素、3 水平(表 1)。

表 1 正交试验因素和水平

因素	海藻酸钠浓度(%)	锐孔孔径(μm)	推进速度(ml/h)	液面距(cm)	Ca ²⁺ 浓度(%)
水平 1	1	700	8	1	0.5
水平 2	1.5	600	25	2	1
水平 3	2	450	50	5	2

借助正交助手软件生成正交表,需要制作 18 组微球。计算出 18 组微球的粒径平均值,输入正交表,做直观分析,由极差分析得 5 因素的显著性排序:锐孔直径、液面距、海藻酸钠浓度、推进速度、Ca²⁺ 浓度。我们的目标是制取粒径尽可能小而包封率高的微球,因此从正交表读出制备最小粒径微球的工艺条件是:450μm 锐孔直径、1cm 液面距、1.5% 海藻酸钠浓度、50ml/h 推进速度、0.5% Ca²⁺ 浓度。但是,在微球制备过程我们发现,当推进速度太快,达到 50ml/h 时,常常出现放电现象。在高压电弧的作用下,液体飞散,产生大量带尾小微球,而且其中的大微球容易破裂,形状不规则;电弧还会破坏生长激素的活性。因

此,我们选择 450μm 锐孔直径、2cm 液面距、1.5% 海藻酸钠浓度、8ml/h 推进速度、2% Ca²⁺ 浓度作为最佳工艺条件。此时,生长激素微球的包封率和载药量分别为(94±3.49)%和(11.24±0.48)%。

3. 药物体外释放实验:以时间为横坐标,累积释放百分率为纵坐标,绘制生长激素微胶囊在人工模拟胃液中的释放曲线,可见 24h 内微胶囊中生长激素几乎不被释放。生长激素微胶囊在人工模拟肠液中的释放曲线,可见微胶囊在 1h 内释放了全部药量的 8.57%,微胶囊需要 8h 才释放 75.33%;微胶囊中生长激素接近完全释放的时间超过 12 h(表 2、图 2)。

表 2 生长激素微胶囊体外缓释结果

	1h	2h	4h	6h	8h	10h	12h
模拟胃液(%)	0.36±0.03	0.37±0.04	0.39±0.04	0.43±0.04	0.56±0.6	0.67±0.7	0.73±0.7
模拟肠液(%)	8.57±0.84	15.66±1.63	22.63±2.34	43.11±4.39	75.33±7.79	87.18±8.22	93.75±9.74

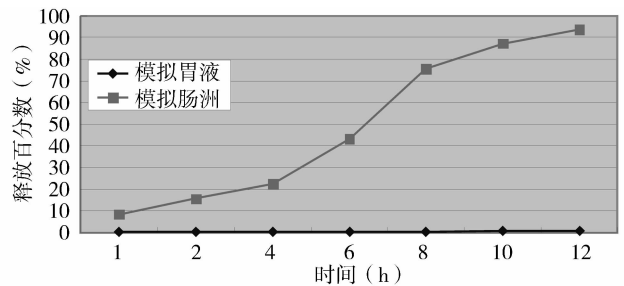


图 2 生长激素微胶囊体外缓释结果

4. 生长激素微球的体内缓释研究:血药浓度数据显示,生长激素注射组血药浓度在给药后 1h 时已经达到 89.35ng/ml,随后浓度快速下降,至 6h 只能检测到极低的药物浓度。生理盐水组和空白微球组的大鼠,其血药浓度始终保持很低的水平(小于 6ng/ml)。载生长激素微球组新西兰大白兔血样中的生长激素浓度在 4h 后开始明显增高,血药浓度在 8h 时达到 98.59ng/ml,随后血药浓度缓慢下降,表明所制备的生长激素微球能够达到延缓释放的目的(表 3、图 3)。

表 3 生长激素微胶囊体内缓释结果

时间	1h	2h	4h	6h	8h	10h	12h
生理盐水组	4.39±0.43	5.23±0.51	4.94±0.49	5.29±0.53	4.94±0.50	4.72±0.45	4.84±0.47
空白微球组	4.93±0.47	5.37±0.57	4.84±0.43	4.99±0.49	4.88±0.47	4.91±0.48	4.97±0.53
生长激素注射组	89.35±9.79	45.85±4.48	18.87±1.94	9.51±0.99	5.69±0.57	5.07±0.53	4.85±0.47
生长激素微球组	4.50±0.43	7.10±0.74	18.57±1.97	85.85±8.43	98.59±9.79	78.04±7.87	39.79±3.56

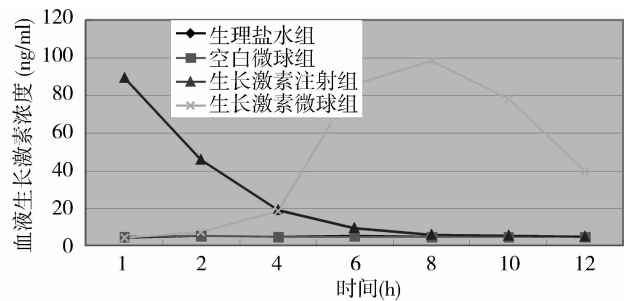


图 3 生长激素微胶囊体内缓释结果

讨 论

人生长激素是由人脑下垂体前叶分泌的一种肽类激素,相对分子质量约为 22kDa。作为一种具有广泛生理功能的生长调节素,hGH 能影响几乎所有类型的组织和细胞,主要功能是刺激骨和软骨细胞的生长和分化;促进蛋白合成,同时减少蛋白的消耗,调理脂和糖的代谢。最初获得的用于临床治疗的生长激素主要从牛垂体中提取。目前广泛用于临床治疗的重组 hGH 是由生物工程获取,其分子结构与人体内

源性 hGH 完全一致,与天然 hGH 具有相同的药效学和药代动力学。hGH 最先作为替代疗法用于治疗儿童 hGH 缺乏性侏儒症,后来的研究表明,它具有明显的节氮效应,因而广泛用于烧伤、感染及严重创伤,并取得了良好疗效。hGH 也涉及调节骨的生长和新陈代谢,可直接刺激成骨细胞的增生和分化,激活碱性磷酸酶,增加基质中钙离子浓度;此后,进一步研究表明 hGH 能促进胰岛素样生长因子(IGF)的形成进而促进骨折愈合,使其应用范围进一步扩大^[8-10]。

虽然人生长激素临床应用广泛,但由于它是蛋白质多肽类药物,受体液中酶的降解和肾脏的排泄,在体内的半衰期短,因而治疗上述疾病一般都需要长期用药。目前,国内市场目前仅有 hGH 的针剂,只能采取注射的方式给药。频繁注射给药容易导致患者的顺应性降低,另外也加重了其经济负担。针对 hGH 用药周期长,且使用不方便的特点。由于人生长激素剂型和半衰期的局限,影响了它在临床的广泛应用。通过本课题我们研究制备了人生长激素口服剂型,并达到缓释的作用,为 hGH 长效口服制剂的研究与开发及蛋白多肽类药物长效口服微球制剂技术平台的建设奠定基础,为 hGH 进一步的临床应用提供了科学依据。

对蛋白多肽类药物非注射给药的研究很多,这类药物的给药途径趋向多元化方向发展,比较成熟的有口服、鼻腔、口腔黏膜、肺部以及透皮吸收等给药途径。对于口服给药比较常用的是对药物进行必要的结构修饰、加入吸收促进剂,或加入抑制药物酶解的酶抑制剂来进行。目前研究较多、较为成熟的是以下几种方式:生物黏附剂的应用;定位释药;亚微粒载药系统的开发。我们采用的是通过微囊技术定位释药,这也是目前国内外学者最常采用的方法,微囊技术工艺也比较成熟,这种技术和给药方式在很多蛋白多肽类药物口服给药的研究中得到肯定,开发的药物有些已经进入临床应用^[11-14]。

微囊技术常用的壁材是壳聚糖和海藻酸钠。海藻酸钠和壳聚糖都是天然多糖,具有生物相容和生物降解的特点。海藻酸钠与多价阳离子(如钙离子)接触时瞬时凝胶化,从而在温和条件下实现了对蛋白质药物的包埋。这一简单的制备过程避免了高温、有机溶剂及其他有害的条件,有助于保持蛋白质的生物活性。壳聚糖具有独特的阳离子特性,可以与海藻酸钠(聚阴离子)通过正、负电荷吸引作用,在海藻酸钠微囊表面复合一层聚电解质半透膜。从而提高微囊的稳定性和载药量,并可调节药物释放速度。所以海藻酸钠/壳聚糖微球应用于多肽蛋白质的给药具有独特

的优越性。另外,壳聚糖-海藻酸钠微囊具有 pH 的敏感性,根据药物的吸收特点,调节壳聚糖和海藻酸钠的浓度,使其在不同 pH 值膨胀释放药物,以达到药物的最佳吸收利用^[15-20]。这个特点也利于我们对 hGH 定位控释的要求。

口服载生长激素微球发挥药效的关键因素之一是微球的有效吸收,必须优化微球的制备工艺,获得小球径、高包封率、药物高活性的微球,以利于人体有效吸收。另外,球形度、球径分布会影响药物的释放速率,是优选制备工艺的重要参数。为此,确定影响球径、包封率的因素有海藻酸钠浓度、锐孔直径、原料液流速、液面距、 Ca^{2+} 浓度和壳聚糖浓度。在此基础上,确定主要影响因素并进行 5 因素、3 水平的正交实验以粒径为主要指标,参考球形度和球径分布,优选出制备载生长激素微球的最佳工艺条件。当推进速度太快,达到 50ml/h 时,常常出现放电现象。在高压电弧的作用下,液体飞散,产生大量带尾小微球,而且其中的大微球容易破裂,形状不规则;电弧还会破坏生长激素的活性。海藻酸钠溶液浓度为 2% 时容易在固化液中聚结,且球形度较差,甚至难以制备出规则的微球。这些不规则的微球口服后,易发生药物突释现象,不利于血药稳定。我们需要排除以上不利条件,对正交表生成的最佳工艺进行修正,对于推进速度和海藻酸钠浓度都选择次优条件。因此,从正交表读出制备最小的微球工艺条件是 450 μm 锐孔直径、2cm 液面距、1.5% 海藻酸钠浓度、8ml/h 推进速度、2% Ca^{2+} 浓度。

通过模拟胃、肠液研究载生长激素微球体外缓释及体内缓释实验研究证实:体外模拟胃液中,微球不溶胀而且所载生长激素基本不被释放;在模拟肠液中,微球溶胀而且所载生长激素被释放出来。由此表明微球溶胀的 pH 敏感性以及药物是以扩散机制释放的,冻干的微球在未溶胀的情况下表面存在许多皱折及较小孔洞,其将微球中的药物以及外界的消化酶隔离开;当进入肠液后,微球发生溶胀,微球表面的皱折消失而且空洞打开,这为溶出介质的渗入和药物的扩散提供了通道,使生长激素得到有效缓释。

本课题综合国内外研究现状,利用高压静电场法制得口服生长激素-海藻酸钠-壳聚糖微球,并对微球进行冷冻干燥工艺处理,考察其活性及其在体外模拟胃肠液中对生长激素的缓释作用,选取包封率高、活性高以及缓释效果好的微球冻干剂进行缓释实验,为生长激素口服制剂的研究奠定基础。

参考文献

- 1 Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for

- drug delivery: design, characterization and biological significance [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2001, 47(1):113-131
- 2 Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery [J]. J Controlled Release, 2004, 100(1):5228
- 3 Somoos S, Moreira JN, Fonseca C, *et al.* On the formulation of pH-sensitive long circulation times [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2004, 56(7):947-965
- 4 Lis, Lix R, Hou XP. Preparation of sodium alginate-chitosan microcapsules containing drugs and the nature of research [J]. Chin Clin Med, 2002, 3(14):123
- 5 Panyam J, Labhastewar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2003, 55(3):329-347
- 6 Jilek S, Merkle HP, Walter E. DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2005, 57(3):377-390
- 7 Yes Y, Wang S L, Gao S. The stability of recombinant human epidermal factor in gastric and intestinal juice [J]. Acad J Sec MiliMed Univ, 2003, 24(7):810-811
- 8 Hardin DS. Treatment of short stature and growth hormone deficiency in children with somatotropin (rDNA origin) [J]. Biologics, 2008, 2(4):655-661
- 9 Voskaridou E, Terpos E. Pathogenesis and management of osteoporosis in thalassemia [J]. Pediatr Endocrinol Rev, 2008 (Suppl 1):86-93
- 10 Kokoszko A, Lewiński A, Karbownik - Lewińska M. The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in oxidative processes [J]. Endokrynol Pol, 2008, 59(6):496-501
- 11 Suksamran T, Opanasopit P, Rojanarata T, *et al.* Biodegradable alginate microparticles developed by electrohydrodynamic spraying techniques for oral delivery of protein [J]. J Microencapsul, 2009, 26(7):563-570
- 12 Amin WM, Al-Ali MH, Salim NA, *et al.* A new form of intraoral delivery of antifungal drugs for the treatment of denture-induced oral candidosis [J]. Eur J Dent, 2009, 3(4):257-266
- 13 Iqbal Z, Jain N, Jain GK, *et al.* Dental therapeutic systems [J]. Recent Pat Drug Deliv Formul, 2008, 2(1):58-67
- 14 Yang W, Wiederhold NP, Williams RO. Drug delivery strategies for improved azole antifungal action [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5(11):1199-1216
- 15 Nagarwal RC, Pandit JK. Phase transition system; novel oral in-situ gel [J]. Curr Drug Deliv, 2008, 5(4):282-289
- 16 Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2008, 60(15):1638-1649
- 17 d'Ayala GG, Malinconico M, Laurienzo P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches [J]. Molecules, 2008, 13(9):2069-2106
- 18 George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan-a review [J]. J Control Release, 2006, 114(1):1-14
- 19 Pandey R, Khuller GK. Polymer based drug delivery systems for mycobacterial infections [J]. Curr Drug Deliv, 2004, 1(3):195-201
- 20 Bernkop-Schnürch A. Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2005, 57(11):1569-1582

(收稿:2009-12-04)

(修回:2009-12-25)

上皮钙黏蛋白及 α/γ 连环蛋白的表达与垂体腺瘤侵袭性的关系

刘 坤 蒋宇钢

摘 要 **目的** 探讨 E-cad、 α -cat、 γ -cat 在垂体腺瘤中的表达与侵袭性的关系。**方法** 采用 SABC 免疫组化方法,检测 E-cad、 α -cat 和 γ -cat 在 27 例侵袭性垂体腺瘤和 18 例非侵袭性垂体腺瘤中的表达,分析 3 者的表达与垂体腺瘤的分泌激素功能情况,有无卒中、坏死和囊性变,肿瘤大小等生物学行为的关系。**结果** 27 例侵袭性垂体腺瘤中 16 例表现为 E-cad、 α -cat 和 γ -cat 一致性低表达。E-cad、 α -cat 在侵袭性垂体腺瘤和非侵袭性垂体腺瘤之间的表达差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.551$, $P < 0.01$; $\chi^2 = 7.872$, $P < 0.01$)。 γ -cat 在侵袭性垂体腺瘤的表达较非侵袭性垂体腺瘤中表达量低,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。E-cad 在无激素分泌功能垂体腺瘤组较有激素分泌功能垂体腺瘤组表达量低,两组之间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.020$, $P < 0.05$);而 α -cat 和 γ -cat 在两组间的表达无统计学意义 ($P > 0.05$)。 γ -cat 在伴有瘤卒中、坏死、囊性变组较不伴有组表达量低,两组之间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.294$, $P < 0.05$);而 E-cad 和 α -cat 在两组间的表达无统计学意义 ($P > 0.05$),但两者在高级别垂体腺瘤组中的表达较低级别垂体腺瘤组低,通过单向方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** E-cad、 α -cat 及 γ -cat 的低表达与垂体腺瘤的侵袭性有关。

关键词 上皮钙黏蛋白 连环蛋白 垂体腺瘤 侵袭性