

碱性成纤维细胞生长因子制剂稳定性的研究*

刘士德 余少文** 张建华 余玉雯 张小云
(深圳大学生命科学学院 深圳 518060)

摘要 本研究通过MTT法检测bFGF的活性,研究了不同温度下四种制剂中bFGF的稳定性。结果得到,bFGF在2.0mol/L NaCl,0.05mol/L PB溶液(pH7.2)中,-20℃下贮藏6个月活性没有明显的下降;bFGF水剂贮藏于4℃下,bFGF活性随贮藏时间延长逐步下降,单位活性bFGF用量由0.4ng/mL下降为0.9 ng/mL,室温下bFGF的活性丧失快于4℃下贮藏,3个月后bFGF单位活性用量由0.4ng/mL下降为1.0 ng/mL。而乳霜剂和胶束剂中的bFGF在两种温度下贮藏一个月后,均检测不到对细胞生长的刺激作用。说明低温有利于制剂中bFGF的稳定,乳霜剂和胶束剂中的bFGF稳定性不好。

关键词: bFGF 制剂 稳定性 MTT

1984年Boston儿童医院的Shing等发现一种分子量为14.8kD的肿瘤衍生因子,可以与肝素高度亲合,并能刺激血管内皮细胞的增生^[1]和刺激鸡胚生长出新的血管^[2]。1984年,Bohlen等^[3]和Gospadorowicz等^[4]分别从牛的脑垂体和牛脑中分离得到了该蛋白,并根据其等电点(pI=9.6)和生物作用命名为碱性成纤维细胞生长因子(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)。bFGF有多种分子量形式,其中分子量最低的一种为18 kD。bFGF广泛存在于人体各种组织和细胞中^[5],具有广泛的细胞生物学作用^[6]。bFGF活性通常以刺激成纤维细胞最大增殖一半时所用的bFGF浓度作为指标。bFGF的生物学功能主要有,促进新生血管形成;促进创伤愈合与组织修复;促进组织再生和参与神经再生等^[7]。在我国,基因重组碱性成纤维细胞生长因子(r-bFGF)已通过国家一类生物制品审批,并获得一类新药证书。bFGF可应用于药品和化妆品,但对其制剂的稳定性研究还处在不断的完善中;bFGF剂型稳定性研究对bFGF应用具有重要意义。本实验将bFGF制备成水剂、乳霜剂、胶束剂三种剂型,并对这三种剂型的bFGF稳定性进行研究。

材料与方 法

1. 材料与试剂

基因重组牛bFGF,由中国康复研究中心基础所提供,为N-末端含有17个氨基酸的融合肽,分子量为18kD,等电点为9.6。小鼠Balb/c 3T3细胞,购自卫生部药品生物制品检定所。其他试剂为,PRMI1640(GIBCO BRL)、小牛血清

(Hyclone)、MTT(Amersham life science)、胰蛋白酶(trypsin,天象人生物工程公司);bFGF剂型制备用试剂为国产分析纯试剂。

2. 几种bFGF制剂的制备

1)储液:bFGF溶于2mol/L NaCl,0.05mol/L PB溶液(pH7.2)中,储于-20℃下,作为阳性对照品。2)水剂:按质量比,1.2-丙二醇12.5%,甘露醇5%,甘油12.5%,氯霉素0.25%,聚乙二醇6000 3%,EDTANa₂ 0.01%,0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2)66.75%,121℃高压灭菌30min,冷却后加bFGF至终浓度1μg/g制剂。3)乳霜剂(水包油):按质量比,硬脂酸10%,十六烷醇4%,蜂蜡5%,EDTANa₂ 0.02%,0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2)80.98%,用高速匀浆器乳化后,121℃高压灭菌30min,冷却后加bFGF至终浓度1μg/g制剂。4)胶束剂(油包水):按质量比,橄榄油96%,EDTANa₂ 0.01%,0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2)3.99%,用高速匀浆器乳化后,121℃高压灭菌30min,冷却后加bFGF至终浓度1μg/g制剂。

3. 用于活性检测的bFGF样品制备

1)储液和水剂的bFGF活性检测样品,可直接用1640培养基(含0.5%小牛血清)将样品稀释至100 ng bFGF/mL,再稀释至不同的检测浓度。2)乳霜剂和胶束剂中bFGF含量太低,用常规方法无法检测其回收率。实验中采用含1mg/mL BSA的乳霜剂和胶束剂作为参照,以BSA回收率作为bFGF回收率的参考指标稀释从乳霜剂(回收率32%)和胶束剂(回收率15%)中提取的bFGF。制备乳霜剂和胶束剂的bFGF活性检测样品时,需先用1640培养基(含0.5%小牛血清)按100 ng/mL bFGF在无菌条件下与样品

本文2003年1月15日收到,5月2日接受。

*深圳大学校科研基金资助项目。

**通讯联系人。E-mail: yuw@szu.edu.cn

充分混合后,在4℃、15 000g下离心15分钟,取水相,再稀释至不同的检测浓度,设无bFGF的乳霜剂和胶束剂抽提液为空白对照。

4. bFGF制剂活性检测

参照Mosmann^[8]和Alley^[9]的方法进行。该方法是基于黄色的MTT可以被代谢活跃的细胞裂解为紫色的甲月替结晶,随着活细胞的增加,对应形成的紫色结晶也会增加^[10]。取处于对数生长期的Balb/c 3T3细胞用1640培养基(含10%小牛血清)稀释成 $5-6 \times 10^4$ 的悬液,用微量加样器接种于96孔培养板中,每孔100 μ L,边缘孔中不加细胞,仅加培养基作为无细胞空白,37℃,5%CO₂培养箱中培养8小时,使细胞贴壁;之后用1640培养基(0.5%小牛血清)洗96孔板细胞两次,加100 μ L 1640培养基(0.5%小牛血清)培养48小时,通过血清饥饿法使细胞处于静止状态^[11]。期间用1640培养基(0.5%小牛血清)换液一次;弃培养液,加入用含不同浓度bFGF的1640培养基(0.5%小牛血清),37℃,5%CO₂培养箱中培养16小时后每孔加20 μ L 10mg/mL MTT液再培养4小时,弃上清液,每孔加入100 μ L二甲亚砜至细胞完全分散,15min后,在BIO-RAD550酶标仪上测样品的OD₅₉₅值。

5. bFGF制剂稳定性实验条件

设置4℃和室温作为bFGF制剂的两个温度条件,每15-30天测定一次bFGF制剂的活性,以观察几种制剂中的bFGF活性在贮藏温度下随时间变化的规律。

6. 实验结果的统计分析

活性检测时,每个检测样品设三个重复,检测数据采用Excel软件处理,并绘制bFGF浓度与细胞净增殖关系曲线。以曲线最大OD值一半所对应的bFGF浓度作为一个活性单位所需要的bFGF浓度。一个活性单位所需要的bFGF浓度越大,说明bFGF活性越低。

结果与讨论

1. bFGF稳定性实验结果

bFGF在不同制剂中的稳定性实验结果见图1和图2。图1为bFGF制成不同制剂1天后的活性检测结果。与溶于2.0mol/L NaCl 0.05mol/L PB溶液(pH7.2)、贮于-20℃的bFGF活性经6个月贮存没有显著变化的结果相比,混合于水剂、胶束剂和乳霜剂中的bFGF活性随贮藏时间依次下降。而且在室温和4℃两种温度下贮藏一个月后,胶束剂和乳霜剂中的bFGF活性均完全丧失,说明在胶束剂和乳霜剂中的bFGF活性不稳定。

存在于水剂中的bFGF是几种制剂中稳定性较好的,在4℃下贮藏6个月单位活性bFGF用量由0.4ng/mL下降到0.9ng/mL;而贮于室温下活性损失速度较快(见图2),经3个月贮藏后,单位活性

bFGF用量由0.4ng/mL下降到1.0ng/mL,但仍然可以满足使用要求(国家标准为单位活性bFGF用量不高于5ng/mL)。说明温度对bFGF稳定性的影响较大。

综上所述我们可以看出,bFGF制剂中含有有机试剂不利于bFGF活性的保持,糖类物质有利于bFGF活性的保持;低温有利于bFGF活性保持稳定;但室温下,水剂中的bFGF经半年贮藏仍然可以满足使用要求。bFGF的结构研究表明,该蛋白具有 β -折叠桶式三维空间结构,有4个半胱氨酸,在其114-123位氨基酸为肝素高亲和力区,其他部位则有低亲和力区。bFGF羧基末端较氨基末端稳定,如果氨基末端截取少于25个氨基酸时并不影响其生物学活性^[12,13]。研究还表明肝素对维持bFGF的稳定性和活性有着至关重要的作用^[14]。bFGF的立体结构为 β -折叠桶,等电点为9.6。肝素可以保持bFGF的稳定性,并对其生物活性有刺激作用。因此,在制备bFGF制剂时需考虑环境因素对bFGF

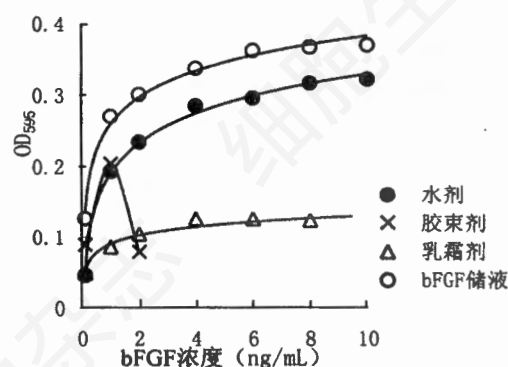


图1 MTT法测定的不同制剂中bFGF浓度与细胞生长关系曲线

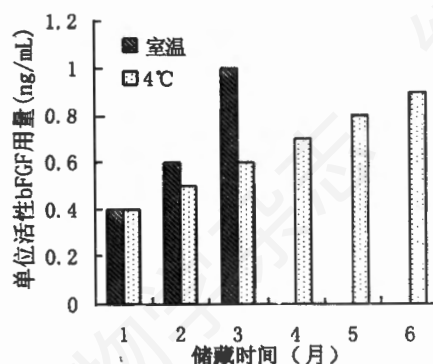


图2 不同储藏温度对水剂中单位活性bFGF用量的影响

活性及稳定性的影响。据我们在实验中的观察,低盐缓冲液容易导致 bFGF 的凝聚,而在 2mol/L NaCl 溶液中则稳定性很高。过高和过低 pH 的缓冲液容易导致 bFGF 的水解。实验中我们主要选择糖类(如:1,2-丙二醇、甘露醇、甘油、聚乙二醇 6000)作为制剂的添加剂,并使溶液的 pH 保持在中性范围内。这些添加剂都富含羟基,有些与肝素有相同的基团,由于黏度很高,在溶液中可以阻止 bFGF 的凝聚,有利于维持 bFGF 的结构与活性。加 ED-TANa₂ 的目的是为了螯合重金属离子可能对 bFGF 的立体结构及活性的破坏。

2. 影响活性检测结果的几个实验因素

细胞培养湿度对活性检测的影响。在 bFGF 活性检测过程中我们发现,细胞培养板四周最边缘培养的细胞由于水分的蒸发原因,使培养液的盐浓度提高,导致了细胞生长受到了影响。因此在实验过程中,四周培养的细胞不作为实验对象。也可以采取在培养箱中加水的办法解决实验中由于水分蒸发对细胞生长的影响因素。

细胞接种数量的影响。bFGF 活性检测过程中培养板初始加入细胞的数量也是影响检测结果准确性的一个主要的因素。在不同批次的实验中应尽可能使初始加入细胞的数量保持一致(5×10^4 细胞/mL)。

细胞裂解液的影响。影响 bFGF 活性检测结果另一个因素是酶标仪测定时细胞破碎与混合是否均

匀。有的研究采用三氯乙酸或盐酸/异丙醇裂解细胞并吹打混合 MTT,结果都不理想。后来我们采用先用胰蛋白酶(0.125%, w/w)消化细胞,再加盐酸/异丙醇裂解并吹打混合的办法收到了较好的结果。本实验选择了二甲基亚砷作为裂解剂,该试剂可以迅速的使细胞裂解并使样品充分混合,省去了吹打步骤。

参 考 文 献

- [1] Shing Y. et al., 1984, *Science*, **223**: 1296 - 1298.
- [2] Hing Y., et al., 1985, *J Cell Biochem.*, **29**: 275 - 287.
- [3] Bohlen P., et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5364 - 5368.
- [4] Gospadorowicz D., et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sc. i USA*, **81**: 6963 - 6967.
- [5] Bikfalvi A., et al., 1997, *Endocrine Rew.*, **18**: 26 - 45.
- [6] Gospadorowicz, D., et al., 1987, *Endocrine Rev.*, **8** (2): 95 - 114.
- [7] 沈林南等,1999,生物工程进展,19(1):25 - 28.
- [8] Mosmann T., 1983, *J. Immunol. Methods*, **65**: 55 - 63.
- [9] Alley MC., et al., 1988, *Cancer Res.*, **48**: 589 - 601.
- [10] Slater TF., et al., 1963, *Biochem. Biophys. Acta.*, **77**: 383 - 393.
- [11] Morla AO., et al., 1989, *Cell*, **58**: 193 - 203.
- [12] Gospadorowicz et al., 1987, *J Cell Physiol.*, **5**: 25 - 26.
- [13] Gospadorowicz D., 1990, *Clin. Orthop.*, **257**: 231 - 248.
- [14] Gospadorowicz D, and Cheng J., 1986, *J Cell Physiol.*, **128**: 475 - 484.

THE STABILITY OF bFGF ACTIVITY IN DIFFERENT CHEMICAL PREPARATION*

LIU Shi De YU Shao Wen** ZHANG Jian Hua YU Yu Wen ZHANG Xiao Yun
(The College of Life Science Shenzhen University, Shenzhen 518060 China)

ABSTRACT The stability of bFGF activity in four different chemical preparations changed with the time and temperature were assayed by MTT. The activity of bFGF which stored at -20°C in 2.0mol/L NaCl in 0.05mol/L PB solution (pH7.2) didn't have significant change after 6 months; at the same time, the activity of bFGF in heparin stored at 4°C decreased less than stored at room temperature. The activity of bFGF which was mixed in two forms of cream (water in oil and oil in water) had lost absolutely after one month storage, but the stability of bFGF activity in the former form showed a little better than that of the latter.

Keywords: bFGF Stability MTT

* Supported by Science Research Foundation of Shenzhen university

** Corresponding author. E-mail: yuw@szu.edu.cn