

• 药剂学 •

重组人表皮生长因子凝胶剂的研制

陆 兵, 谢英华, 程度胜, 朱厚础(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要: 目的: 研制用于创伤修复的重组人表皮生长因子(recombinant human epidermal growth factor, rhEGF)凝胶剂。方法: 以卡泊姆为水溶性凝胶基质制备 rhEGF 的凝胶剂, 并以大鼠皮肤急性创伤模型和大鼠皮肤烫伤模型评价了 rhEGF 凝胶剂在创伤修复中的效果。结果: 所得 rhEGF 凝胶剂制备工艺简单、质量可靠、使用方便, 对于大鼠皮肤急性创伤和大鼠皮肤烫伤具有明显的疗效。结论: rhEGF 凝胶剂可望应用于临床。

关键词: 表皮生长因子; 卡泊姆; 凝胶剂; 创伤修复

中图分类号: R944.1⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2001)03-0143-03

Development of recombinant human epidermal growth factor gels

LU Bing, XIE Ying-hua, CHENG Du-sheng, ZHU Hou-chu (Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE: To develop recombinant human epidermal growth factor(rhEGF) gels for external application to wound healing. **METHODS:** Carbopol[®] was used as water-soluble matrix to prepare rhEGF gels. The wound healing effects of rhEGF were evaluated in acute traumatic rats and scalded rats. **RESULTS:** rhEGF gels could be manufactured easily with reliable quality. They could also be applied conveniently to accelerate wound healing in acute traumatic rats and scalded rats. **CONCLUSION:** Such rhEGF gels could be developed for the clinical application.

KEY WORDS: recombinant human epidermal growth factor; carbomer; gels; wound healing

人们对表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)在创伤愈合中的作用已经有共识, 尤其对于难愈合创面的修复, 其作用更为明显^[1~6]。目前, 古巴的重组人表皮生长因子(recombinant human EGF, rhEGF)与磺胺嘧啶银的复方制剂已经上市, 国内也有数家单位正处于研发阶段^[7,8], 有的已获国家药品监督管理局的批准。本单位的 rhEGF 冻干粉剂已于 2000 年 4 月获得国家一类新药证书(2000S-11 号), 为了更好地满足临床用药的需要, 我们选择以 Carbopol 为主要基质来制备 rhEGF 的凝胶剂, 以期研制一种临床使用方便、药效持久、稳定性良好的外用制剂, 并用两种动物模型——大鼠皮肤急性创伤模型和大鼠皮肤烫伤模型——来进行药效学试验, 初步评价了 rhEGF 凝胶剂对于创伤治疗的效果。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

FT-646A 微机单头放免仪(北京核仪器厂); ZRS-8 型智能溶出试验仪(天津大学无线电厂); F-10 型酸度计(北京无线电技术研究所)。

rhEGF(纯度: > 98%, 比活性: > 1 × 10⁶IU/

mg。军事医学科学院生物工程研究所微生物工程室); 人表皮生长因子放射免疫分析药盒(北京海科锐生物技术中心); 不同型号 Carbopol[®](美国 BF-Goodrich 公司惠赠); Albumin Bovine, Fraction V(98~99% Albumin, 美国 SIGMA 公司); 透明质酸(上海南源化妆品辅料厂); 尼泊金丙酯、曲拉通 X-100 为化学纯。其余试剂为分析纯。

1.2 动物

二级 Wistar 大鼠 30 只, ♂。其中用于急性创伤模型 18 只, 体重 224 ± 16g(190g~245g); 用于烫伤模型 12 只, 体重 226 ± 23g(177g~252g)。

1.3 凝胶剂的制备与质量控制

凝胶剂制备: 称取透明质酸 0.05g、乙二胺四乙酸二钠 0.05g、焦亚硫酸钠 0.10g、添加剂适量, 加水约 80ml, 搅溶后加入甘油 5.00g 和复方尼泊金酯乙醇溶液(每 100ml 含尼泊金甲酯 10g、尼泊金丙酯 1g) 1.00ml, 搅匀后加入 Carbopol[®]940NF 2.00g, 搅拌并放置至溶胀均匀后, 加入含 1.2mg 的 rhEGF 溶液 2ml, 迅速搅匀后加入三乙醇胺适量使中和成透明凝胶, 再加水至 100g。

凝胶剂 pH 测定: 凝胶 1g 加水 20ml, 溶解均匀后用酸度计测定 pH 值。

凝胶剂的均匀性: 凝胶 5g 置于 5ml 离心管中, 以 2500rpm 离心 30min, 观察是否分层。

凝胶剂的铺展性和可洗除性^[9]: 将凝胶均匀涂在手背上, 观察能否涂抹均匀, 并在水龙头下冲洗 30 秒钟, 观察能否洗除。

凝胶剂的无菌试验: 按《中国生物制品规程(一部)》(1990 年版)的“生物制品无菌试验规程”进行。

凝胶剂含量测定: 标准曲线按人表皮生长因子放射免疫分析药盒说明书制作, 当凝胶中 rhEGF 的浓度为 0.1、1 和 10 μ g/g 时, 回收率分别为(90.30 \pm 6.11)%、(95.04 \pm 6.09)% 和 (101.61 \pm 9.63)%。含量测定时, 精密称取 rhEGF 凝胶约 50mg, 加 5ml 缓冲液使溶解均匀后, 继续用缓冲液分两次稀释 100 倍(使样品液中 rhEGF 浓度约为 1ng/ml)后, 取 0.1ml 样品液, 采用 RIA 法测定样品液中 rhEGF 的浓度, 并计算凝胶剂中 rhEGF 浓度及含量。

凝胶剂的体外释放: 参照 DiBiase 等^[10]的方法进行。释放池孔径 25mm, 深 5mm。体外释放条件: 释放介质 200ml, 浆叶转速 50rpm, 水浴温度 32 $^{\circ}$ C。

凝胶剂的稳定性: 凝胶剂适量置于密闭离心管中, 分别于 60 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、室温和冰箱冷藏室(4 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C)保存, 定时检查凝胶剂的外观、失水、酸碱度及霉败等现象, 并取样测定凝胶剂中 rhEGF 含量。

1.4 创伤治疗动物试验

急性创伤模型的建立: 大鼠用复方氯胺酮麻醉后, 背部局部用脱毛剂去毛。脱毛大鼠正常喂养 2d, 麻醉后于去毛处消毒铺巾后, 用龙胆紫在大鼠背部中央注明相距约 2cm 的两处致伤部位(直径 1.8cm、面积 2.54cm²的圆形), 然后用手术剪在注明部位将皮肤全层剪除, 制成 2 个圆形创面。

烫伤模型的建立: 同上法脱毛的大鼠正常喂养 2d, 麻醉后于去毛处用恒温至 80 $^{\circ}$ C 的盛水试管(直径 1.8cm)按尽可能相同的程度(角度、力量、时间)制成约 1.5cm²的烫伤面, 每只大鼠背部制成三个独立烫伤面, 伤口呈三角形分布, 间距约 4cm。

创伤大鼠的处理: 两组创伤模型的大鼠分别随机分成四组(分别为不同药组、空白凝胶剂组、rhEGF 溶液组和 rhEGF 凝胶剂组), 自第 2 天起隔日 1 次按 0.2 μ g/cm² 的剂量给予不同剂型的 rhEGF 或相应量的空白成份, 直至创面愈合。每日进行动物行为及创面外观的常规观察, 隔日测定动物体重和创面面积。创面愈合后, 大鼠颈椎脱位处

死, 将创伤部位及周围 0.5cm 的全皮连同筋膜一起分离, 用 10% 福尔马林固定后, 制备石蜡组织切片, HE 染色, 光镜观察组织学特征。

2 结果和讨论

2.1 rhEGF 凝胶剂质量检查

rhEGF 凝胶剂为水溶性无色透明、质地均匀的凝胶剂, 无细菌污染, 铺展性和可洗除性良好, 凝胶剂的粘度适合于临床使用。rhEGF 凝胶剂的 pH 值为 7.43 \pm 0.05($n=3$), 含量为标示量的(102.9 \pm 2.0)%($n=3$)。体外释放符合零级动力学模式。

不同温度下的稳定性试验表明, rhEGF 凝胶剂置于密闭离心管中 60 $^{\circ}$ C 保存 8d、37 $^{\circ}$ C 保存 3mo 以及室温和冰箱保存 6mo 时, 凝胶剂几乎没有失水(重量减少 $<$ 5%), 没有霉败, 外观、pH 均无变化。室温和冰箱保存 3mo, rhEGF 凝胶剂的残留活性分别为(72.81 \pm 6.62)% 和(101.63 \pm 6.53)%。

2.2 急性创伤大鼠治疗结果

大鼠制成急性创伤模型后, 基本活动正常, 少量大鼠偶而出现饮食减少, 并表现为体重下降, 据分析并非使用 rhEGF 造成。所制创面清洁无感染, 第 2 天观察时创面干燥, 并已形成完整包裹(凝块)。创面愈合过程符合一般创伤愈合的规律, 治疗期间大鼠体重增加(88 \pm 21)g。总的观察表明, 创伤手术、手术所形成的创面以及使用 rhEGF 治疗等均对大鼠的正常生长没有影响。

创伤治疗结果(表 1)采用 SAS 软件包分析, 急性创伤大鼠的平均 50% 创面愈合时间和终点愈合时间不同组之间存在显著性差别($P < 0.05$), 其中 50% 创面愈合时间 rhEGF 溶液组与不用药组相比、终点愈合时间 rhEGF 溶液组和凝胶剂组与不用药组和空白凝胶剂组相比均显著缩短($P < 0.05$), 其它各组两两之间不存在显著性差异。

创面愈合后皮肤的组织学检查发现, 空白组和治疗组大鼠均可见表皮细胞增生活跃, 表皮层增厚, 真皮层见大量胶原纤维和成纤维细胞, 并与表面平行排列, 有毛囊及皮脂腺长入, 偶见少量炎细胞存在。但不同处理组大鼠间无明显差异。

表 1 不同治疗组急性创伤大鼠创面愈合时间($\bar{x} \pm SD$, d)

	不同药组	空白凝胶剂组	rhEGF 溶液组	rhEGF 凝胶剂组
50% 创面愈合时间	9.6 \pm 1.3	8.6 \pm 1.4	8.1 \pm 0.9*	9.0 \pm 1.2
终点创面愈合时间	24.6 \pm 2.6	24.7 \pm 2.0	23.0 \pm 2.3**	23.3 \pm 2.6**

* 与不用药组相比有显著性差异($P < 0.05$);

** 与不用药组和空白乳膏剂组相比有显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 烫伤大鼠治疗结果

大鼠经烫伤后日常活动及饮食未见异常。1d 内可见烫伤部位形成水泡,但烫伤面无明显界限。第 3 天见烫伤面颜色加深,界限明显,并逐渐形成深色硬痂。随着治疗的进行,烫伤面逐渐缩小至完全愈合。

所有大鼠在制备烫伤模型及随后的治疗过程中,其体重除第 1 天因为烫伤所引起的一系列组织反应而略为下降外,以后均正常增长,治疗期间体重平均增加(78±19)g。结合日常行为观察表明,大鼠经制成烫伤模型以及随后的治疗对大鼠的正常生长未见异常影响。

烫伤治疗结果(表 2)采用 SAS 软件包分析,50% 创面愈合时间不同治疗组烫伤大鼠之间存在显著性差别($P < 0.05$),其中 rhEGF 溶液组和凝胶剂组与不用药组相比均显著缩短($P < 0.05$)。而平均终点愈合时间虽然 EGF 治疗组与两个空白处理组相比平均缩短了 1.6d,但不同处理组之间没有显著性差别($P > 0.05$)。究其原因,我们分析是因为在烫伤模型制备时由于是人为控制,导致烫伤深度相互间变异增大,而使得烫伤治疗时的终点愈合时间组内差异也增大。因此提示我们,在 rhEGF 创伤治疗的动物试验和临床试验中,一方面要有足够的样本数,另一方面还应注意创伤程度的均一性。

表 2 不同治疗组烫伤大鼠烫伤面愈合时间($\bar{x} \pm SD, d$)

	不同药组	空白凝胶组	rhEGF 溶液组	rhEGF 凝胶组
50% 愈合时间	8.9±0.9	7.8±1.6	7.3±1.1*	6.8±1.4*
终点愈合时间	15.8±2.8	14.7±3.4	13.3±1.9	13.9±2.0

* 与不用药组相比有显著性差异($P < 0.05$);

取烫伤后 3 天大鼠的烫伤面皮肤进行组织学考察,皮肤表面可见大量的炎细胞浸润和血浆蛋白渗出,炎细胞以中性粒细胞为主,致伤累及真皮浅层,判定为 II 度烧伤。

烫伤愈合后创面皮肤的组织学检查发现,所有样本均可见表皮细胞增生活跃,皮肤表皮下层见大

量的成纤维细胞和胶原纤维,其间有少量的炎细胞、毛囊及皮脂腺存在。rhEGF 凝胶剂组同其它各组相比,表皮细胞、毛囊及皮脂腺结构更趋正常,真皮层胶原纤维和纤维细胞也近似正常组织结构。相比较而言,采用 rhEGF 凝胶剂治疗后的创面皮肤与正常皮肤的组织结构更接近,表明提高了热烫伤模型的愈合质量。

3 结论

在 rhEGF 粉剂的基础上研制了 rhEGF 亲水性凝胶剂。该凝胶剂制备工艺简单、质量可靠、使用方便,符合外用亲水性凝胶剂的一般质量要求。采用大鼠皮肤急性创伤模型和大鼠皮肤烫伤模型考察了 rhEGF 凝胶剂在创伤治疗中的效果,结果使用 rhEGF 凝胶剂可以缩短动物创伤的终点愈合时间,改善愈合质量。该凝胶剂可望应用于临床。

参考文献:

- [1] Brown GL, Nanney LB, Griffen J, et al. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor[J]. New Eng J Med, 1989, 321(1): 76.
- [2] Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, et al. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors(PDWHF) [J]. Ann Surg, 1986, 204(3): 322.
- [3] 周学武,胡德耀,吴炎,等. EGF、磺胺嘧啶锌单用及伍用促进犬后肢枪伤部组织增生的作用[J]. 中华创伤杂志, 1995, 11(3): 153.
- [4] 王世岭,郭振荣,周一平等. 重组人表皮细胞生长因子促进慢性创面的愈合[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(6): 348.
- [5] 谷庆阳,崔彩彬,高亚兵,等. 外源性 rhEGF 对放射复合创伤伤口愈合的促进作用[J]. 解放军医学杂志, 2000, 25(2): 103.
- [6] 张祥明,周和平. 细胞活素(rhEGF) II 期临床研究总结报告[J]. 数理医药学杂志, 1999, 12(1): 22.
- [7] 王世岭,郭振荣,周亮,等. 重组人表皮生长因子对促进烧伤创面的愈合作用[J]. 中国临床药理学杂志, 1998, 14(3): 150.
- [8] 钟静芬,欧阳辉. 表面活性剂在药学中的应用[M]. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社, 1996. 258~ 288.
- [9] DiBiase MD, Rhodes CT. Investigations of epidermal growth factor in semisolid formulations[J]. Pharm Acta Helv, 1991, 66(5-6): 165.

收稿日期: 2000-11-29

告读者:

CNKI 中国期刊网已为我刊主页改版上网成功。

http://www.YXSJ.chinajournal.net.cn

E-mail: YXSJ@chinajournal.net.cn

欢迎广大读者踊跃上网点击,并通过信箱与我刊交流,投稿。并提出宝贵意见!