

# 干扰素 $\gamma$ 缓释微球的制备及对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和 I 型胶原合成的抑制作用研究

王金\*, 王晓军<sup>#</sup>(北京协和医院整形美容外科, 北京 100032)

中图分类号 R944.1;R978.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3510-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.20

**摘要** 目的:制备负载干扰素 $\gamma$ (INF- $\gamma$ )的可降解缓释微球,考察其体外缓释性能及对瘢痕疙瘩成纤维细胞(KFs)增殖和胶原合成的抑制作用。方法:采用改良的乳化交联法制备缓释微球,考察其粒径、平均载药量、平均包封率及体外累积释放率。取体外培养24 h的第3代KFs,分为空白对照组(A组,10%胎牛血清+DMEM培养基)、INF- $\gamma$ 组(B组,含500 u/ml的INF- $\gamma$ )、负载相同含量INF- $\gamma$ 的缓释微球组(C组,含500 u/ml的INF- $\gamma$ )及空白微球组(D组),分别进行相应处理后再分别培养5 d,MTT法考察各组KFs细胞增殖抑制率;免疫细胞化学法分析各组KFs细胞 I 型胶原蛋白的平均染色值判断蛋白合成受抑制情况。结果:负载INF- $\gamma$ 的微球平均粒径为 $(51.87 \pm 1.31) \mu\text{m}$ ,平均载药量为 $(53.64 \pm 3.52) \text{u/mg}$ ,平均包封率为 $(89.72 \pm 5.63)\%$ ;微球7 d内的累积释放率为91.35%;C组KFs细胞的增殖抑制率(60.75%)明显高于B组(33.88%)( $P < 0.05$ );B组KFs细胞 I 型胶原蛋白平均染色值(163.75)较A组(193.75)有统计学意义( $P < 0.05$ ),C组 I 型胶原蛋白平均染色值(150.25)较A组有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论:制备的INF- $\gamma$ 微球缓释性能良好,可持续释放达7 d;该微球可抑制人KFs细胞的增殖,减少其 I 型胶原蛋白的合成,较普通INF- $\gamma$ 具有更强的抑制能力。

**关键词** 干扰素 $\gamma$ ;微球;制备;缓释;瘢痕疙瘩成纤维细胞;增殖;抑制作用

## Preparation of Interferon- $\gamma$ Sustained-release Microsphere and Inhibitory Effects of It on the Proliferation of Keloid-derived Fibroblasts and the Synthesis of Type I Collagen

WANG Jin, WANG Xiao-jun (Dept. of Plastic and Aesthetic Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100032, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare the Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) degradable sustained-release microsphere, and to investigate its sustained-release performance and inhibitory effect of it on keloid-derived fibroblasts (KFs) and the synthesis of type I collagen. METHODS: The sustained-release microsphere was prepared by modified emulsion cross linking method. Mean particle size, mean drug-loading amount, mean entrapment efficiency and accumulative release rate *in vitro* were all investigated. Third generation *in vitro* 24 h cultured KFs were divided into negative control group (group A, 10% fetal bovine serum+DMEM culture medium), INF- $\gamma$  group (group B, 500 u/ml INF- $\gamma$ ), INF- $\gamma$ -loading sustained-release microsphere group (group C, including 500 u/ml INF- $\gamma$ ) and blank microsphere group (group D). They were given relevant treatment for 5 days. The inhibitory rate of KFs proliferation was measured by MTT method. Immunocytochemical staining method was used to investigate the average staining value of type I collagen protein of KFs for judging the inhibition of the synthesis of protein. RESULTS: The average diameter of INF- $\gamma$ -loading microsphere was  $(51.87 \pm 1.31) \mu\text{m}$  with the mean drug-loading amount of  $(53.64 \pm 3.52) \text{u/mg}$ . Average entrapment efficiency was  $(89.72 \pm 5.63)\%$ . 91.35% of INF- $\gamma$  was released from the microsphere during 7 days. The inhibitory rate of KFs proliferation (60.75%) in group C was significantly higher than in group B (33.88%) ( $P < 0.05$ ). Average staining value of type I collagen protein of KFs (163.75) in group B was significantly different from in group A (193.75) ( $P < 0.05$ ); that of type I collagen protein (150.25) in group C was significantly different from in group A ( $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Prepared INF- $\gamma$  microsphere shows good sustained-release performance, and constantly releases for 7 days. The microsphere can inhibit the proliferation of KFs, reduce the synthesis of type I collagen protein and has stronger inhibitory effect than normal INF- $\gamma$ .

**KEY WORDS** Interferon- $\gamma$ ; Microsphere; Preparation; Sustained-release; Keloid-derived fibroblasts; Proliferation; Inhibitory effects

病理性瘢痕是以胶原纤维等细胞外基质过度产生和沉积为特征的皮肤纤维化性疾病,包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩,轻者可影响容貌或功能,重者则可致毁容甚至使人丧失生活自理能力。病理性瘢痕的发生及发展机制迄今仍不明确,临床术后切除复发率高,目前仍缺乏可靠的药物治疗手段<sup>[1]</sup>。研究

显示,干扰素 $\gamma$ (INF- $\gamma$ )具有明确和广泛的抑制胶原合成、抗纤维化作用<sup>[2]</sup>,但多肽、蛋白质类药物因具有结构特异性、半衰期短、体内外不稳定性等突出特点,由此限制了其在临床的广泛应用。多肽类药物新型释药系统的研究一直是药学的重点,其中微球的研究发展迅速<sup>[3]</sup>。笔者制备负载INF- $\gamma$ 的微球系统,考察其体外缓释性能及对瘢痕疙瘩成纤维细胞(Keloid-derived fibroblasts, KFs)的增殖和胶原合成的抑制作用,以期为临床防治病理性瘢痕提供更多选择。

### 1 材料

\* 助理研究员,博士。研究方向:瘢痕治疗。电话:010-69158978。E-mail: wangjin0525@163.com

<sup>#</sup> 通信作者:教授,博士。研究方向:瘢痕治疗。电话:010-69152711。E-mail: xjwang100@hotmail.com

## 1.1 仪器

85-2型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂);LEO-1530型热场发射扫描电镜(日本Hitachi公司,20 kV);Master Sizer 2000型激光粒度分析仪(英国马尔文仪器公司);台式低温离心机(德国Heracus公司);RCO 5000D-5型CO<sub>2</sub>恒温培养箱(美国Revco公司);ECLIPSE50型光学显微镜(日本Nikon公司);ELX 800型酶标仪(韩国Bio-Tek公司)。

## 1.2 药品与试剂

IFN- $\gamma$ 缓释微球(自制);G6144明胶粉剂、司盘80(美国Sigma公司);25%戊二醛(分析纯)、液体石蜡(分析纯)、异丙醇(分析纯)、胎牛血清(FBS,已灭活,无细菌及内毒素)、DMEM(Deulbecco's modified eagle medium,DMEM粉末,含4 500 mg/L葡萄糖、L-谷氨酰胺110 mg/L,pH 7.4,含酚红,不含碳酸氢钠、丙酮酸钠和双抗)、胰蛋白酶(含0.05%胰酶,含0.53 mmol/L乙二胺四乙酸,含酚红,含Hank's缓冲液)均来自美国Gibco公司;注射用人重组IFN- $\gamma$ 冻干粉(上海克隆生物高技术有限公司,批号:060202,规格:每支100万u);人IFN- $\gamma$ 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(北京晶美生物工程有限公司);MTT(美国Amresco公司);二甲基亚砜(DMSO,北京化学试剂公司);兔抗人I型胶原一抗(浓缩液,武汉博士德公司);鼠抗波形蛋白单克隆抗体(工作液1.5 ml)、PV-9000二步法免疫组化检测试剂(即用型,包括3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>去离子水3 ml,1号试剂3 ml,2号试剂3 ml)均来自北京中杉金桥公司。

## 1.3 细胞

KFs由我科经人皮肤瘢痕疙瘩组织块法自行培养获得,试验中对该细胞进行了免疫组化检测鉴定和MTT生长曲线监测。

## 2 方法与结果

### 2.1 统计学方法

采用SPSS 14.0统计学软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验和方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 2.2 缓释微球的制备

取3.75 g明胶加入21.25 g去离子水中,50~60℃水浴溶解1 h;100 ml液体石蜡中加入1.0 g司盘80,预热至50~60℃;快速搅拌下将明胶水溶液滴加到含司盘80的液体石蜡中,保持水浴温度,继续搅拌2 h;加入1~2 ml戊二醛,室温下搅拌24 h;停止搅拌,使微球沉降,弃去上清液,用异丙醇清洗数次,再用去离子水清洗1次,以离心半径8 cm、500 r/min转速离心10 min,冷冻干燥,即得明胶微球裸球<sup>[1]</sup>。明胶微球经Co<sup>60</sup>照射消毒后,每100 mg干燥微球中加入 $1 \times 10^4$  u/ml的IFN- $\gamma$ 溶液600  $\mu$ l,pH 7.4时于4℃充分混匀、浸润、膨胀24 h后以离心半径8 cm、1 200 r/min离心15 min,收集微球后无菌状态下4℃封存。以0.9%氯化钠注射液(生理盐水)代替IFN- $\gamma$ 溶液同法制备空白微球。用激光粒度分布测试仪测定并计算微球的平均粒径。

共制备3批微球,每批3.5 g裸微球,其中负载IFN- $\gamma$ 微球500 mg,空白微球500 mg。裸微球电镜图见图1。

2.2.1 缓释微球的粒径及分布。激光粒度分析仪检测微球粒径<sup>[5]</sup>,结果平均粒径为 $(51.87 \pm 1.31)$   $\mu$ m,微球粒径呈正态分布,3批微球粒径分布范围较一致,详见图2。

2.2.2 微球的载药量、包封率测定。取100 mg新制备的负载IFN- $\gamma$ 的微球经超速冷冻离心(4℃,离心半径8 cm,1 200 r/

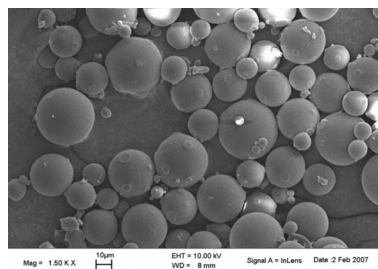


图1 裸微球扫描电镜图

Fig 1 Scanning electron micrograph of bare microspheres

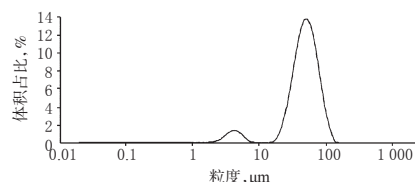


图2 微球的粒径分布

Fig 2 Particle size distribution of microspheres

min)15 min,分离上清液,定容至25 ml,ELISA法测定上清液中的IFN- $\gamma$ 质量浓度。按下式计算载药量和包封率:载药量=(投药量-上清液中药量)/微球质量;包封率=(投药量-上清液中药量)/投药量 $\times 100\%$ 。结果得所制备微球的平均载药量为 $(53.64 \pm 3.52)$  u/mg,平均包封率为 $(89.72 \pm 5.63)\%$ 。

2.2.3 微球的体外累积释放率测定。取10 mg IFN- $\gamma$ 微球置于离心管中,加入生理盐水至10 ml,置于37℃孵箱中,于0.5、1、2、3、5、7 d定时取样100  $\mu$ l,然后稀释至3 ml,ELISA法测定上清液中IFN- $\gamma$ 的质量浓度,取样后恢复体系原有体积<sup>[9]</sup>。体外累积释放率测定结果见表1。

表1 微球的体外累积释放率测定结果

Tab 1 Accumulative release rate of microsphere *in vitro*

项目	时间,d					
	0.5	1	2	3	5	7
释放量,u	28.23	61.59	94.95	200.17	264.33	492.73
释放率,%	5.23	11.42	17.60	37.11	49.00	91.35

### 2.3 对KFs细胞增殖和胶原蛋白合成的抑制作用考察

2.3.1 细胞培养。瘢痕疙瘩2例,供者年龄为13~23岁,均为女性,应用组织块法行KFs的原代培养<sup>[7]</sup>。

2.3.2 试验分组。分为空白对照组(A组)、含500 u/ml INF- $\gamma$ 组(B组)、含500 u/ml INF- $\gamma$ 的缓释微球组(C组)、空白微球组(D组)4组,每组均添加10%FBS和DMEM培养基。

2.3.3 考察指标。(1)增殖抑制率:取第3代KFs细胞,以 $1 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup>接种于96孔板,每孔200  $\mu$ l,5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱静置培养24 h后,按MTT法常规测定每孔光密度(OD)值(OD<sub>0</sub>);4组进行相应的处理后分别培养5 d,按MTT法测定4组的每孔OD值(OD<sub>5</sub>)。每个时相点设双复孔。细胞增殖抑制率按下式计算:增殖率=(OD<sub>5</sub>-OD<sub>0</sub>)/OD<sub>0</sub> $\times 100\%$ ,增殖抑制率=(对照孔增殖率-试验孔增殖率)/对照孔增殖率 $\times 100\%$ 。结果,B、C、D 3组KFs细胞的增殖抑制率分别为33.88%、60.75%、3.24%,B、C组间比较 $P < 0.05$ 。(2)KFs胶原蛋白染色值:在6孔板内预置无菌盖玻片,滴加200  $\mu$ l  $1 \times 10^5$  ml<sup>-1</sup>的第3代KFs细胞,5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱静置培养2 h,使细胞贴壁,补足培养液继续培养24 h。按试验分组换成不同的培养液,每例标本每组2张细胞片,5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱静置培养5 d。以免抗

人 I 型胶原为一抗,磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗作为阴性对照,制备免疫组化染色细胞玻片。光学显微镜下观察,每张细胞片按“米”字形选取 9 个视野( $\times 200$ ),随机观察 100 个细胞,按染色的深浅分为 3 级(i):深棕色为“3”,浅棕色为“2”,浅黄色为“1”。各级别百分比数记为 Pi,染色值= $\sum Pi \times i$ ,计算每例标本的染色值,每例标本每组 2 张染色片。染色值减少说明胶原蛋白合成减少。A、B、C、D 4 组 KFs 细胞的 I 型胶原蛋白染色值结果分别为 193.75、163.75、150.25、185.25,其中 A、B 组间比较  $P=0.025$ ,A、C 组间比较  $P=0.006$ 。

### 3 讨论

瘢痕疙瘩的治疗一直是临床的一大难题,尽管人们探索了多种治疗手段,如放射、激光、压迫、硅胶、糖皮质激素局部注射等,但目前能够获得明确治疗效果的手段很有限,主要还是靠手术切除加局部放疗,但也不能达到满意的早期防治效果。基于近年来对瘢痕疙瘩发病机制的研究,认为其形成与炎症反应、免疫失衡、凋亡失控等多种机制相关<sup>[1]</sup>。因此,应用细胞因子手段治疗瘢痕疙瘩前景广阔,必将成为未来的主要治疗方向。而 IFN- $\gamma$  在炎症反应、免疫调节、细胞凋亡等方面的广泛作用提示 IFN- $\gamma$  在瘢痕治疗方面将可能发挥积极作用<sup>[2]</sup>。

IFN- $\gamma$  半衰期短、易失去活性,限制了其临床应用。如何保证细胞因子的持续高效释放以提高蛋白类药物的治疗效果一直是研究的难点之一。应用微球系统控制释放多肽药物是目前较有前景的方法之一<sup>[8]</sup>。

明胶属于天然高分子生物材料,通常由动物胶原经水解提炼出来,表面存在精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)细胞黏附分子,机体内组织相容性好,能被组织吸收。其具有廉价易得、无抗原性、摩擦系数低、在体内可自然降解等优点。因而,明胶被广泛用作组织工程支架,并广泛用于多种药物剂型中<sup>[9]</sup>。干燥的明胶微球在水溶液中可浸润膨胀,吸水性强,水溶性细胞因子因此被大量吸附,并且微球可与荷电性相反的细胞因子通过离子间的相互作用结合,细胞因子被明胶微球吸附储存于微孔中<sup>[10]</sup>。明胶微球为实体微粒,被吸附药物释放相对缓慢,足以达到缓释要求。根据文献<sup>[11]</sup>报道,明胶微球的缓释时间在 7 d 左右,这与本试验的结果一致。利用明胶微球负载 IFN- $\gamma$  不仅可起到缓释作用,而且在冻干过程中,明胶还可以取代水而与多肽形成氢键来稳定多肽的天然构象,从而保护细胞因子活性<sup>[12]</sup>。

计算各组 KFs 增殖抑制率时,B 组以 A 组为对照,而 C 组以 D 组为对照,D 组以 A 组为对照。B 组和 C 组在 KFs 细胞培养 5 d 后,缓释微球对 KFs 增殖抑制率显著高于含相同 IFN- $\gamma$  质量浓度的 B 组;普通 IFN- $\gamma$  注射剂皮下注射的消除半衰期仅为 9.35 h,需每日或隔日注射,笔者推测 IFN- $\gamma$  在细胞培养环境中同样会较快失活,而 C 组 IFN- $\gamma$  的缓慢释放维持了培养液中一定量 IFN- $\gamma$  的持续存在;D 组微球本身对 KFs 细胞抑制作用微弱(3.24%),排除了微球本身对细胞增殖的影响。结果显示,B 组和 C 组对 KFs 细胞的胶原蛋白合成均有明确的抑制作用,其中两者较 A 组差异均有统计学意义( $P=0.025$ 、 $0.006$ ),但两者之间差异并无统计学意义( $P=0.197$ )。这说明作用 5 d 后两组对于本试验中 KFs 细胞胶原蛋白的合成具有同等程度的抑制能力。由于试验早期 C 组药物质量浓度必然低于 B 组,因此可能使药物短期效果差别不显著,而本试验观察时间有限(5 d),对于胶原蛋白合成的长期影响还有待进一步观察。在后续研

究中可通过聚合酶链式反应等手段检测 I 型前胶原 mRNA 水平是否存在差异。熊丽霞等<sup>[13]</sup>研究显示,IFN- $\gamma$  可抑制白细胞介素(IL)-13 对成纤维细胞的纤维化作用。在体内更为复杂的环境中,缓释微球的释放及生物学作用的途径、效果均有待研究。

本试验成功制备了具有缓释性能的、负载 IFN- $\gamma$  的明胶微球,微球中 IFN- $\gamma$  活性较高,但如何提高药物载量、延长药物持续释放时间及如何实现靶向作用等均有待进一步研究。同时,IFN- $\gamma$  的广泛作用也提示可以将这种活性微球应用于抗肿瘤、抗病毒、治疗免疫疾病、防治各种纤维化性疾病等方面,故预计其具有良好的临床应用前景。

### 参考文献

- [1] Huang C, Ogawa R. *Pharmacological treatment for keloids*[EB/OL]. (2013-08-13) [2013-08-22].<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Huang+C%2C+Ogawa+R.+Pharmacological+treatment+for+keloids>.
- [2] 杨生海,殷宏,刘永生,等.干扰素- $\gamma$  研究进展[J].生物技术通报,2010(8):29.
- [3] 张景环,朱坚.蛋白质、多肽类药物新型释药系统的研究[J].临床药物治疗杂志,2010,8(5):38.
- [4] Mladenovska K, Kumbaradzi EF, Dodov GM, et al. Biodegradation and drug release studies of BSA loaded gelatin microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2002, 242(1/2):247.
- [5] Kim SE, Park JH, Cho YW, et al. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor beta 1: implications for cartilage tissue engineering[J]. *J Control Release*, 2003, 91(3):365.
- [6] Aubert-Pouessel A, Venier-Julienne AC, Clavreuil A, et al. In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres[J]. *J Control Release*, 2004, 95(3):463.
- [7] 李惠斌,蔡景龙,潘博,等.成纤维细胞体外培养、冻存及复苏的实验研究[J].中国美容医学,2005,14(4):394.
- [8] Yamamoto M, Ikada Y, Tabata Y. Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2001, 12(1):77.
- [9] Teng S, Chen L, Guo Y, et al. Formation of nano-hydroxyapatite in gelatin droplets and the resulting porous composite microspheres[J]. *J Inorg Biochem*, 2007, 101(4):686.
- [10] 佃少娜,伍善广,李桃,等.肺靶向红霉素明胶微球的安全性评价[J].中国药房,2008,19(4):246.
- [11] 黄沙,金岩,吴红,等.制备复合生长因子的缓释微球并考察其对细胞的影响[J].上海生物医学工程,2004,25(4):22.
- [12] Kojima T, Inamura Y, Koide T, et al. Activity of gelatins to induce secretion of a variety of cytokines from murine peritoneal exudates macrophages[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2005, 20(4):417.
- [13] 熊丽霞,李文林,蔡震宇,等.干扰素 $\gamma$ 抑制 IL-13 对成纤维细胞的纤维化作用[J].中国病理生理杂志,2013,29(3):504.

(收稿日期:2013-08-19 修回日期:2013-08-22)