

## 载 VEGF 荧光 PLGA 亚微米缓释微球的制备及体外控释特性\*

周 山, 封建立, 高 瑾, 颜加强, 舒 勇, 刘元丰, 孙道冬<sup>△</sup>  
(中国人民解放军第三二四医院肾病泌尿科, 重庆 400000)

**[摘要]** 目的 制备生物可降解聚乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA)包裹的载血管内皮生长因子(VEGF)荧光缓释亚微米微球, 了解微球装载以及释放 VEGF 的效率, 体外观察荧光微球的降解。方法 采用双相溶剂挥发法制备 PLGA 载 VEGF 亚微米微球, 激光共聚焦及扫描电镜观察荧光微球体外降解, ELISA 法观察其载药效率及释药曲线。结果 双相溶剂挥发法成功制备了 PLGA 荧光载 VEGF 亚微米微球, 扫描电镜观察及激光共聚焦显微镜观察微球形态正常, 激光粒度分析仪观察粒径 0.5~1.0 μm, 分布均匀, 定量 ELISA 检测微球载 VEGF 率与包封率分别为 3.91% 和 51.42%, 荧光显微镜观察其缓慢降解, 定量 ELISA 检测 VEGF 释放平缓, 呈线性零级释放趋势。结论 直径 0.5~1.0 μm 的 PLGA 载 VEGF 荧光亚微米微球载药效率较高, 呈线性零级释放, 荧光能够直接观测。

**[关键词]** 血管内皮生长因子类; 亚微米微球; 聚乳酸羟基乙酸共聚物; 荧光; 缓释

**[中图分类号]** R944.9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)07-0938-03

### Preparation of VEGF-loaded PLGA fluorescent sub-micrometer spheres and in vitro controlled release characteristics\*

ZHOU Shan, FENG Jianli, GAO Jin, YAN Jiaqiang, SHU Yong, LIU Yuanfeng, SUN Daodong<sup>△</sup>  
(Department of Nephrology, 324 Hospital of PLA, Chongqing 400000, China)

**[Abstract]** **Objective** To prepare the biodegradable polylactic acid glycolic acid (PLGA) copolymer, encapsulated vascular endothelial growth factor (VEGF) loaded fluorescent controlled release sub-microspheres, to understand the efficiency of microspheres loading and releasing VEGF and to observe in vitro microspheres degradation. **Methods** VEGF-loading PLGA sub-microspheres were prepared by the two-phase solvent evaporation method, the in vitro degradation of fluorescent microspheres was observed by the laser confocal scanning electron microscopy. The drug loading efficiency and drug release curve were observed by ELISA. **Results** The VEGF loading PLGA fluorescent microspheres were successfully prepared by using the two-phase solvent evaporation method. The microspheres morphology was normal by using the scanning electron microscope and laser confocal microscope. The particle size was 0.5—1.0 μm with the laser particle size analyzer. The distribution was homogeneous. The VEGF loading rate and encapsulation rate detected by the quantitative ELISA were 3.91% and 51.42% respectively. The fluorescent microscope observed their slow degradation. The VEGF gentle release was detected by the quantitative ELISA, which showing linear zero order release trend. **Conclusion** The drug loading efficiency of VEGF-loading PLGA microspheres with 0.5—1.0 μm diameter is higher with linear zero order release, which can be directly observed by fluorescent light.

**[Key words]** vascular endothelial growth factors; sub micrometer spheres; polylactic acid glycolic acid copolymer; fluorescence; controlled-release

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种在体内诱导血管生成的细胞因子, 当其在组织局部应用, 能够增加缺血部位的微血管生成, 因此在缺血性疾病(如冠状动脉缺血)、组织工程支架等中有广泛应用<sup>[1]</sup>。但 VEGF 半衰期短, 体内降解速度快, 使其临床应用受到限制<sup>[2]</sup>。目前广泛采用的解决方案是使用载药缓释微球, 使 VEGF 在组织局部以恒定的释药速率释放, 保证组织修复过程中始终保持一定的 VEGF 水平, 从而促进新生微血管的形成。制备的载药微球尺寸由数十纳米至数百微米不等, 其中 0.5~1.0 μm 称为亚微米微球, 0.5 μm 以下称为纳米微球。体积越小, 在脱细胞真皮基质(acellular dermal matrix, ADM)中缓释时药物分布更均匀, 但同等材料下缓释时间会缩短, 并且制备难度更大<sup>[3]</sup>。目前国内少有亚微米聚乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA)微球的制备与性质研究, 本文提供一种 PLGA 载药亚微米制

作方法, 并在其中负载荧光物质, 实现微球追踪并研究其体外特性。

#### 1 材料与方法

**1.1 材料** PLGA(丙交酯:乙交酯=50:50;分子量 40.6×10<sup>3</sup>, Evonik, 德国), 异硫氰酸荧光素 4(LWABX021-139911, 宝曼生物, 中国), 重组人 VEGF 165 蛋白(600310, Abbiotec, 美国), VEGF-ELISA 试剂盒(ab100663, Abcam, 英国), 二氯甲烷(Adamas-01226780, Adamas, 中国), 聚乙烯醇(PVA, 0520224325, MP, 美国), T25 均质器(IKA-Laboratechnik, 德国), LS13 320 激光粒度分析仪(Beckman Coulter, 美国), 真空冷冻干燥仪(LDGZJ28, 北京松源华兴, 中国), 扫描电子显微镜(HT7700, 日立, 日本), 激光共聚焦显微镜(LSM510, Carl Zeiss, 德国)。

#### 1.2 方法

\* 基金项目:重庆市科技计划项目(cstc2013jcyjA30014)。 作者简介:周山(1983—), 主治医师, 博士, 主要从事泌尿外科组织工程的研究。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail:38169714@qq.com。

**1.2.1 PLGA 荧光载 VEGF 微球制备** 采用复乳溶剂蒸发法(W/O/W)制备 PLGA 亚微米微球<sup>[4]</sup>。0.4 g PLGA 溶于 10 mL 二氯甲烷作为油相(O),0.2 mg VEGF 加 2 μg 绿色荧光素溶于 2 mL 去离子水中作为内水相(W1),外水相(W2)为 50 mL 的 PVA(8%,w/v)。将 W1 倒入 O 中,在 15 000 r/min 速率下均质 5 min 后形成 W1/O,迅速倒入 W2 中形成复乳(W1/O/W2),磁力搅拌器固化 6 h(400 r/min)。固化后使用去离子水清洗数次,冻干,获得微球。

**1.2.2 微球粒径测量及形貌观察** 取少量制备好的 PLGA 微球悬浮于水中,振荡使其均匀分散,加入激光粒度分析仪样品池中,进行测量。Span 值表示粒径分布,Span 值越大表明颗粒尺寸越不均一。取适量冷冻干燥的 PLGA 微球溶于适量水中,吸取少量悬液滴于锡箔纸,晾干,表面喷金处理,扫描电子显微镜观察其形貌<sup>[5]</sup>。将 PLGA 微球悬浮于水中,在倒置相差荧光显微镜下观察 PLGA 微球尺寸,以及荧光强度,并在不同时间观察微球降解情况。

**1.2.3 包埋率及装载率测量** 称取 VEGF 缓释微球冻干粉 2 mg 溶解在 200 μL 二甲基亚砜(DMSO)中,萃取 VEGF,VEGF 的水平通过定量 ELISA 试剂盒测定。依据试剂盒说明书操作。VEGF 装载率和包埋率由以下公式计算<sup>[6]</sup>: VEGF 装载率(%)=(微球的 VEGF 质量/微球质量)×100%; VEGF 包埋率(%)=(测量 VEGF 装载率/理论蛋白装载率)×100%。

**1.2.4 体外 VEGF 释放研究** 精确称取微球 2 mg 装于 EP 管,以磷酸盐缓冲液(PBS,100 μL)作为释放介质,加入 0.1% BSA 作为稳定剂,0.8%(w/v)甘露醇作为湿润剂,37 °C 恒温振荡,分别在 1 h、6 h、1 d、2 d、4 d、7 d、14 d、21 d、28 d、35 d 收集上清液。上清液中的 VEGF 水平通过 VEGF-ELISA 试剂盒测定。计算出累计释放量,绘制载 VEGF-PLGA 微球累计释放曲线。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS13.0 软件行统计学分析,使用 Excel 制作图表。

**2 结 果**

**2.1 载 VEGF 荧光 PLGA 亚微米微球粒径与形貌观察** 在扫描电镜下,制备的微球呈圆球形,表面光滑,尺寸大小不一,但粒径分布范围较窄(图 1)。激光共聚焦显微镜可见微球荧光分布均匀,微球在水中分散度好,无粘连(图 2、3)。微球粒径分布见图 4,微球粒径为 0.72 μm,Span 值为 1.127,表明制备的微球粒径较为均匀。

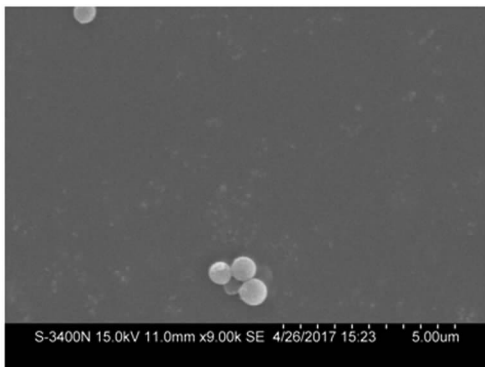


图 1 微球扫描电镜成像

**2.2 包埋率及装载率** 将 2 mg 载药微球完全溶解,萃取出全部 VEGF 并测量,由包入微球的 VEGF 总量与总 VEGF 量百分比计算出包封率为 51.42%,由包入微球内的 VEGF 量与微

球质量百分比计算出载药率为 3.91%。

**2.3 微球降解观察** 2 周之后,部分微球表面开始出现膨胀、侵蚀、变形,微球之间出现粘连,另有少量微球崩解,另一部分微球形状继续保持原状(图 5)。激光共聚焦显微镜下微球聚集严重,部分微球膨胀、崩解后导致荧光面积变大(图 6)。

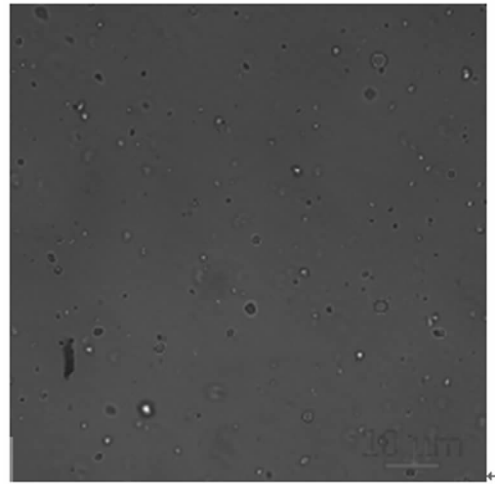


图 2 微球激光共聚焦显微镜扫描(白光)

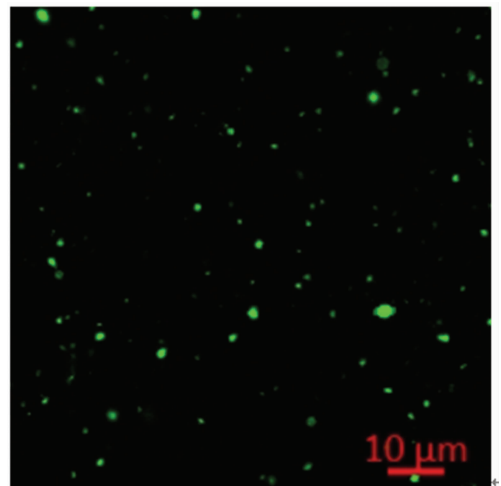


图 3 微球激光共聚焦显微镜扫描(绿色荧光)

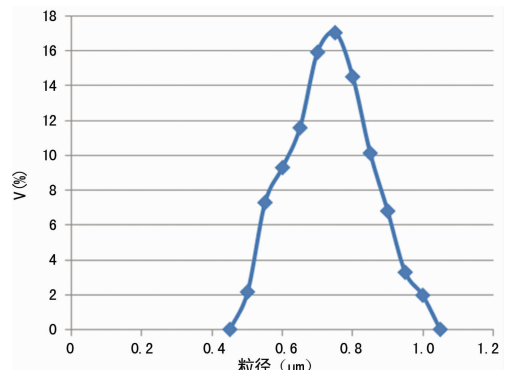


图 4 VEGF 微球粒径分布图

**2.4 微球体外 VEGF 释放研究** 将 PLGA 微球置于释放介质中,规定时间取出上清液,通过 ELISA 法测定 VEGF 水平,绘制出累积释放曲线(图 7)。可看出 PLGA 微球在 24 h 内没有出现突释效应,在 24 h 之后 VEGF 释放量缓慢地增加,1 周之后释放速度加快,到 21 d 进入平台期,到 35 d 累计释放量接

近 80%。

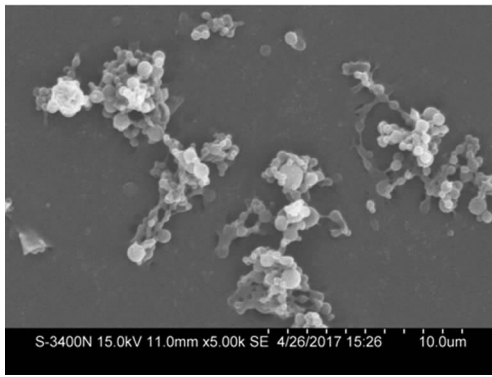


图 5 两周后微球崩解扫描电镜影像

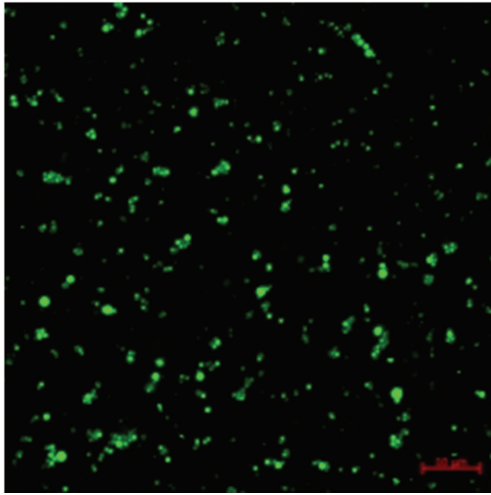


图 6 两周后微球崩解激光共聚焦影像

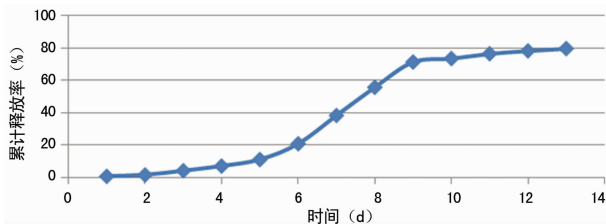


图 7 微球体外累计释放曲线

### 3 讨论

本研究所使用的细胞因子 VEGF 在生理条件下半衰期短,在体内降解速度过快,需要对 VEGF 进行缓释处理,使其在局部缓慢匀速释放,以达到临床应用的需[7]。本研究所采用的微球材料为 PLGA。PLGA 是缓释微球材料,其降解速率适中,性质稳定,具有良好的生物相容性与可降解性,无毒性、无致敏性、无致热性、无致畸致癌作用、无细胞毒性,被广泛应用[8]。

本研究成功制备的亚微米微球粒径约为  $0.72 \mu\text{m}$ ,观察其药物缓释时间长(30 d 左右),短期时间内未出现药物突释现象。根据文献报道,PLGA 制备的微球体积不一,可制备成纳米微球或微米微球,直径由数百纳米至数百微米不等,包裹药物或细胞因子后可使其延长释放达到 1~3 个月。其中  $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$  称为亚微米微球, $0.5 \mu\text{m}$  以下称为纳米微球。体积越小,在缓释时药物分布更均匀,但同等材料下缓释时间会缩短,并且制备难度更大[9]。

复乳溶剂蒸发法是目前制备 PLGA 微球的常用方法,它

不需要相分离剂,操作简单,工艺相对成熟[10]。W/O/W 型复乳可以有效阻碍水溶性药物进入连续相,能够提高药物的包封率。因此,本实验采用 W/O/W 法制备载 VEGF 的荧光 PLGA 微球。在实验中,多种条件可以影响最终制成的微球粒径,如 PLGA 浓度、PVA 浓度、均质化搅拌速度等。其中提高 PLGA 浓度,可以使内水相黏度变大,提高微球载药量与包封率,增大微球的粒径。而当 PVA 浓度增加,微球粒径缩小。搅拌速率同样影响较大,速度过低,剪切力小,使成球性差,速度过高会破坏乳液的稳定性,VEGF 流失量大[11]。本研究通过参考文献[4,12]以及调整上述试剂浓度[PLGA 40 mg/mL、PVA(8%,W/V),搅拌速度 15 000 r/min],最终制成粒径为  $0.72 \mu\text{m}$  左右的亚微球。

本研究 VEGF 释放结果表明,微球没有出现突释效应,并且随着时间 VEGF 逐渐释放,实现了缓释作用。一般情况下,载药微球的释放呈现三相释放模式,即扩散,持续释放以及平台期。I 相是指黏附于微球表面的细胞因子迅速释放;II 相是指随着微球的降解,细胞因子逐渐释放;III 相是指当大部分微球出现崩解,细胞因子释放基本完毕,速度趋于平稳。

因此,本研究制备的 PLGA 载 VEGF 亚微米微球,实现了所期望的微球粒径,有较好的包埋率与装载率,并在其中加入了绿色荧光,实现了微球可视,具有较好的研究与应用前景。

### 参考文献

- [1] YLÄ-HERTTUALA S,RISSANEN T T,VAJANTO I, et al. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine[J]. J Am Coll Cardiol,2007,49(10):1015-1026.
- [2] 刘云龙,李奇,林荔军,等. BMP-2 及 VEGF 双基因骨髓干细胞复合磷酸钙支架生物相容性的体外实验研究[J]. 重庆医学,2013,42(18):2060-2063.
- [3] 黄建文. 生长因子在泌尿系统组织工程中的可控释放策略研究进展[J]. 组织工程与重建外科,2013,9(3):173-176.
- [4] SALVADOR A,IGARTUA M,HERNÁNDEZ R M, et al. Combination of immune stimulating adjuvants with poly(lactide-co-glycolide) microspheres enhances the immune response of vaccines[J]. Vaccine,2012,30(3):589.
- [5] LAMPRECHT A,SCHÄFER UF,LEHR C. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate [J]. Eur J Pharm Biopharm,2000,49(1):1-9.
- [6] 黄建文. 生长因子在泌尿系统组织工程中的可控释放策略研究进展[J]. 组织工程与重建外科,2013,9(3):173-176.
- [7] KANG B S,CHOI J S,LEE S E, et al. Enhancing the in vitro anticancer activity of albendazole incorporated into chitosan-coated PLGA nanoparticles [J]. Carbohydr Polym,2017,159:39-47.
- [8] 赵锋,高永良. 聚乳酸微球生物降解机制和生物相容性研究进展[J]. 中国新药杂志,2002,11(1):67-71.
- [9] ACHARYA G,SHIN C S,VEDANTHAM K, et al. A study of drug release from homogeneous PLGA microstructures[J]. J Control Release,2010,146(2):201-206.
- [10] KING T W,PATRICK C W J R. Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth(下转第 943 页)

所有的样本进行热图分析,可看出样本主要分两类,结石和黏膜样本分别聚集在不同支,且在不同细菌类群上有明显差异分布。细菌分布较集中的是胆固醇结石,在大多数差异大的类群有较高的分布,而胆色素结石的细菌主要集中在 *Pseudomonas, stutzeri* 和 *Enterococcus* 类群,见图 3。

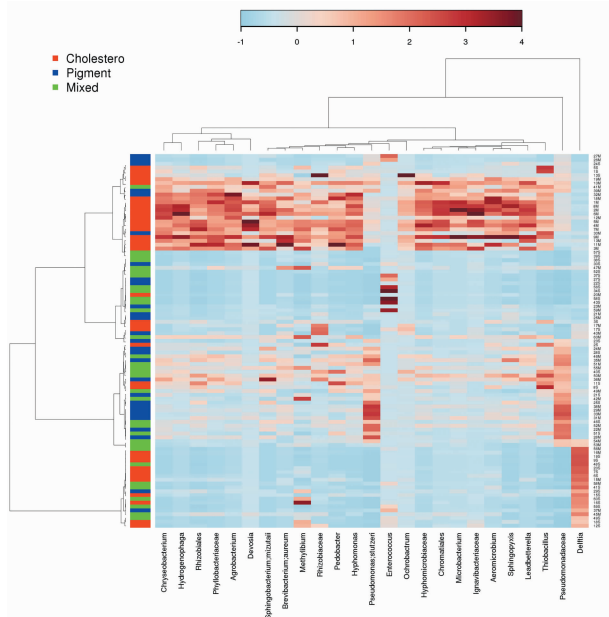


图 3 全部 OTU 水平进行热图分析

### 3 讨 论

本研究通过 Illumina Miseq 测序对胆囊内微生物群落样本进行分析,发现香农指数、Chao1 指数和 ACE 指数在不同类型结石组间,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且同一类型结石组黏膜和微生物群落 ACE 指数和 Chao1 指数差异也有统计学意义( $P < 0.05$ )。同一组内结石和黏膜样本,微生物群落菌群多样性都有明显的个体差异。总体规律为,在胆固醇结石和胆色素结石组胆囊黏膜样本的生物多样性指数显著高于其对应的结石样本,而混合性结石组则相反。

同一类型患者的结石和黏膜胆囊微生物群落多样性构成比较相似,而不同类型患者的结石和黏膜胆囊微生物群落多样性构成比差异较大。在微生物门、纲、目这些较高分类水平上结石和黏膜微生物群落多样性分布并不是很高,而在属种水平则表现出了丰富的多样性。笔者发现,由于稀有菌群比例较大,导致即使在胆固醇含量高于 90% 的胆固醇结石和黏膜中,胆囊微生物群落也显示多样性分布,且有极为复杂的群落分布。根据 Illumina Miseq 测序分析,由于个体变异性的存在可能导致胆囊微环境中的微生物群落有着极大的分散性和差异性。但由于样本量较小,还需大样本量去证实。而目前惟一能够肯定的是由于胆囊对胆汁的浓缩功能,胆汁中含有一些物质,如胆汁酸盐、胆固醇和微量元素,可作为电子受体或营养物

质支持细菌生长代谢,并使结石细菌群落表现出多样性<sup>[2-10]</sup>。

本研究尚有许多不足之处:(1)未将与胆囊微生物群落密切相关的肠道微生物群落纳入研究,进行关联分析。(2)未探讨胆囊结石形成过程中胆囊微生物群落的动态变化过程。(3)未涉及胆囊微生物群落与宿主的相互关系。

低浓度的微生物群落通过局部免疫机制对胆囊黏膜微环境产生影响,可进一步研究结石形成及发生、发展过程中胆囊微生物群落的生态作用。

### 参考文献

[1] PORTINCASA P, DI CIAULA A, WANG H H, et al. Medicinal treatments of cholesterol gallstones: old, current and new perspectives[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(12):1531-1542.

[2] TOLLER I M, NEELSEN K J, STEGER M, et al. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(36):14944-14949.

[3] SALAMA N R, HARTUNG M L, MUELLER A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(6):385-399.

[4] WU T, ZHANG Z G, LIU B, et al. Gut microbiota dysbiosis and bacterial community assembly associated with cholesterol gallstones in large-scale study[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1):669.

[5] 杨斌,张捷,刘斌,等.高通量测序分析胆囊结石患者基因表达谱差异[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2014, 20(9):683-685.

[6] 徐鹏,甘明宇,高谦.二代测序技术在结核分枝杆菌研究中的应用进展[J]. *微生物与感染*, 2015, 10(1):54-60.

[7] 黄飞燕,李莉,周燕,等.基于 denovo 测序分析 Bt 菌株 S3299-1 基因组特征[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 6(2):28-29.

[8] 陈重,李多云,程航,等.一株肠致病性大肠杆菌的全基因组序列分析[J]. *中国热带医学*, 2015, 15(5):525-528.

[9] 黄继续,黄浩南.胆道感染患者 196 例胆道细菌培养及耐药分析[J/CD]. *中华普通外科学文献(电子版)*. 2014, 6(12):14.

[10] 黄洁,丁绍晖,孙敏,等.胆囊结石患者结石成分及微生物群落结构的多样性[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 1(7):418-422.

(收稿日期:2017-06-25 修回日期:2017-08-26)

(上接第 940 页)

factor (VEGF)-loaded poly (DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol)microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique[J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(3):383-390.

[11] DANHIER F, ANSORENA E, SILVA J M, et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications[J]. *J Control Release*, 2012, 161(2):505-522.

[12] SALVADOR A, SANDGREN K J, LIANG F, et al. Design and evaluation of surface and adjuvant modified PLGA microspheres for uptake by dendritic cells to improve vaccine responses[J]. *Int J Pharm*, 2015, 496(2):371-381.

(收稿日期:2017-06-26 修回日期:2017-09-06)