

DOI:10.3969/j.issn.1005-202X.2021.11.018

生物力学与材料

加载PEDF的多聚体超声微泡研制及其特性

胡劼^{1,2}, 焦明克³, 刘立洁³, 张鹏³, 牛盈盈³

1. 新疆医科大学第四附属医院心脏超声科, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 重庆市渝北区人民医院超声科, 重庆 400000; 3. 新疆军区总医院医学工程科, 新疆 乌鲁木齐 830000

【摘要】目的:针对血管新生类疾病,研制与色素上皮源因子(PEDF)具有最大结合率的多聚体超声微泡,并明确其理化特性。**方法:**首先应用声空化方法制备多聚体超声微泡;然后将PEDF按浓度分为0.4、2.0、10.0和50.0 $\mu\text{g/mL}$ 组,应用跨膜按梯度法包裹入脂质体,使其与超声微泡结合,进而置于荧光显微镜下观察。应用流式细胞仪检测PEDF与超声微泡的最大结合率,采用荧光分光光度法测定载药超声微泡的包封率及体外释药特性。**结果:**成功制备了与PEDF最大结合率为 $(96.14\pm 1.21)\%$ 的多聚体超声微泡。脂质体对PEDF的包封率约为 $(79.20\pm 2.31)\%$,体外释药浓度于微泡击破后1 min内达到峰值,持续释放10 min后浓度显著减低。**结论:**与PEDF具有较高结合率的多聚体超声微泡可以作为合适的药物载体,靶向治疗血管新生类疾病。

【关键词】血管新生类疾病;色素上皮源因子;超声微泡;靶向治疗

【中图分类号】R318;452

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2021)11-1417-04

Preparation of PEDF-loaded polymer ultrasound microbubbles and its properties

HU Jie^{1,2}, JIAO Mingke³, LIU Lijie³, ZHANG Peng³, NIU Yingying³

1. Department of Echocardiography, the Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2. Department of Ultrasound, Yubei District People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400000, China; 3. Department of Biomedical Engineering, General Hospital of Xinjiang Military Region, Urumqi 830000, China

Abstract: Objective To develop the polymer ultrasound microbubbles with the maximum binding rate to pigm entepithelium-derived factor (PEDF) for angiogenic diseases, and to clarify the physical and chemical properties. **Methods** Polymer ultrasound microbubbles were prepared by acoustic cavitation method. After PEDF was divided into different groups (0.4, 2.0, 10.0 and 50.0 $\mu\text{g/mL}$) according to the concentration, it was encapsulated with liposomes using transmembrane gradient method, which enabled PEDF to bind to ultrasound microbubbles, and then the binding was observed under fluorescence microscope. The maximum binding rate of PEDF to ultrasound microbubbles was obtained by flow cytometry. Moreover, the efficiency of encapsulating PEDF into liposomes and the *in vitro* drug release characteristics of the drug-loaded ultrasound microbubbles were determined by fluorescence spectrophotometry. **Results** The polymer ultrasound microbubbles which had a maximum binding rate of $(96.14\pm 1.21)\%$ to PEDF was successfully prepared. The efficiency of encapsulating PEDF into liposomes was about $(79.20\pm 2.31)\%$. The *in vitro* drug release concentration reached the maximum in 1 min after the microbubble breaking, and the concentration was obviously reduced after the continuous release for 10 min. **Conclusion** The polymer ultrasound microbubbles with a high binding rate to PEDF can be used as a suitable drug loader for targeted treatment of angiogenic diseases.

Keywords: angiogenic disease; pigm entepithelium-derived factor; ultrasound microbubble; targeted treatment

前言

作为一种新兴药物载体,携载药物的靶向超声

微泡相对其他载体具有不具免疫性、可实现靶向爆破、稳定、减少药物副作用等优势,能够实现在超声波辅助下进行药物靶向无创治疗^[1-2]。血管新生类疾病,如癌症、动脉斑块等对机体造成病理侵蚀的疾病,是损害健康的无形杀手^[3-4],采用抑制血管形成因子、打破血管形成等血管新生阻断疗法是治疗血管新生类疾病的研究热点^[5-6]。色素上皮源因子(Pigm Entepithelium-Derived Factor, PEDF)被证实在所有抗

【收稿日期】2021-06-22

【基金项目】国家自然科学基金(81760313)

【作者简介】胡劼,硕士,副主任医师,主要从事电磁场及超声在医学方面的应用研究, E-mail: 361475086@qq.com

新生血管因子中作用最强,且能在体内拮抗多种血管新生因子,并完全抑制它们活性的发挥^[7-8],但 PEDF 无法直接有效地作用于病灶^[9]。为实现新生血管抑制因子 PEDF 在有效直达病灶治疗血管新生类疾病的同时,降低其不良反应,本实验首次将多聚体超声微泡与 PEDF 相结合,制备最大药物结合率的靶向超声微泡,并进一步研究该超声微泡的理化特性,以期为新生血管类疾病的治疗提供合适的药物载体,为形成靶向、无创、有效的新治疗方法奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及设备

本实验主要材料包括表面活性剂 Span 60、Tween 80、PBS、PEG、HPC、六氟化硫气体(SF_6)、PEDF 抗体(C1224MSDS, Sigma-Aldrich, USA)、氯仿、胆固醇和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 缓冲液。设备包括高强度超声处理器(VCX-750, Sonix, USA)、分光光度计(AquaMate 8000, Thermo-Fisher, USA)、库尔特粒度仪(Multisizer III, Bechman-Coulter, USA)、流式细胞仪及荧光显微镜等。

1.2 多聚体微泡的制备及保存

将 Span 60 和 Tween 80 混合表面活性剂与不同聚合度的 PEG 溶于 PBS 中,在磁力搅拌器上加热至 60 ℃,待完全溶解后,将所得溶液置于高压蒸气内进行消毒,进而再置于磁力搅拌器上持续搅拌,冷却至室温。设定高强度超声处理器功率为 400 W,采用声振法处理上述冷却后的非离子表面活性剂溶液 1 min,同时在溶液上方通入 SF_6 ,最终得到乳白色微泡悬浮液。用 50 mL 的 PBS 稀释 10 mL 的原始微泡,将微泡稀释液移入分液漏斗中静置 20 min,然后采用上浮法对微泡稀释液进行分级分离。在零下 4 ℃ 及室温下的不同时间段对微泡进行观察,并将制得的微泡在 4 ℃ 下分装于不同玻璃小瓶进行恒温保存。

1.3 包裹不同浓度 PEDF 脂质体的制备

以 3:1 的质量比将胆固醇与 HSPC(氢化卵磷脂)混合溶于氯仿中,制得 20 mg/mL 浓度的混合液。氯仿在容器底部形成一层脂质膜,通过旋转蒸发去除;然后用 300 mmol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 缓冲液进行水合得到脂质乳状液,进而依次用 800、400、200 和 100 nm 的挤出膜对乳状液进行挤出;最后将脂质体通过葡聚糖凝胶柱层析,得到跨膜铵梯度脂质体。将浓度分别为 0.4、2.0、10.0 和 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 PEDF 与跨膜铵梯度脂质体以 8:5 的体积比进行混合,在 65 ℃ 进行孵育 25 min,冰浴 45 min。

1.4 多聚体超声微泡-药物复合体的制备及最大结合率检测

分别将荧光和生物素标记的包裹不同浓度 PEDF 的脂质体与制备好的微泡进行混合,因微泡表面活性物质中含有具有一定粘附作用的 PEG,因此可以将脂质体黏附在其表面,从而形成多聚体超声微泡-药物复合体。采用 Multisizer III 对复合体的粒径进行测量,测量使用 30 μm 的小孔管和 300 通道。通过 Photoshop 图像分析软件对复合体浓度进行测定。应用荧光显微镜及流式细胞仪检测测定药物的有效加载情况,并确定药物与微泡的结合率。

1.5 脂质体对 PEDF 的封装率测定

针对测得具有最大超声微泡结合率的 PEDF 脂质体,取其混合液 200 μL 直接进行破乳,采用 AquaMate 8000 分光光度计进行吸光度检测,测得吸光度为 A_0 ;同时再取 200 μL 上述混合液上样置于 G-50 离心柱上,离心洗脱得到包裹有 PEDF 的脂质体,收集洗脱液破乳,测得吸光度为 A_1 ;最后通过式(1)得到脂质体对药物 PEDF 的封装率。

$$\text{封装率}(\%) = A_1/A_0 \times 100\% \quad (1)$$

1.6 PEDF 多聚体超声微泡体外释药特性

精密称取 50 mg 载药多聚体微泡悬浮于 10 mL 0.1 mol/L 的 PBS 中,并将该溶液置于透析袋内密封,在保持 37 ℃ 的情况下,应用超声体外击破微泡,在预定时间间隔 15、30、45、60、75、90、105 s 及 5、7、10 min,取出 1 mL 溶液,通过分光光度法测定 PEDF 的含量,同时补加等量的 PBS。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量数据采用均数 \pm 标准差表示,两组均数间比较采用 t 检验,多组均数间比较采用单因素方差分析和 SNK-Q 检验,以 $P < 0.05$ 作为显著性检验标准。

2 结果

2.1 多聚体超声微泡-药物复合体的粒径

应用 Multisizer III 和 Photoshop 图像分析软件得到该新型多聚体微泡的平均直径为 $(3.17 \pm 0.13) \mu\text{m}$,浓度为 $(3.00 \pm 0.11) \times 10^9/\text{mL}$ 。

2.2 不同浓度 PEDF 在多聚体超声微泡上的加载及结合率

在荧光显微镜下观察各组不同浓度 PEDF 与微泡结合情况,初步明确结合率与药物浓度的相关性。由图 1 可观察到 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 浓度实验组 PEDF 与超声微泡未见明显结合,2.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度实验组可观察到少量 PEDF 与微泡结合,10.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度实验组可见中量 PEDF 与微泡结合,50.0 $\mu\text{g/mL}$ 实验组可见大量密集 PEDF 与微泡结合。因此可基本判断 PEDF 与超声微泡的结合率随 PEDF 浓度的增加而逐渐增大。

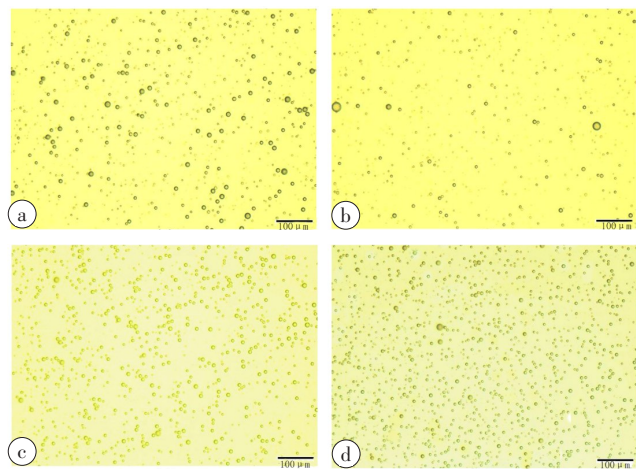


图1 荧光显微镜观察不同浓度PEDF与超声微泡结合情况
Fig.1 The binding of different concentrations of PEDF to ultrasound microbubbles was observed by fluorescence microscope
a:0.4 $\mu\text{g/mL}$ 组;b:2.0 $\mu\text{g/mL}$ 组;c:10.0 $\mu\text{g/mL}$ 组;d:50.0 $\mu\text{g/mL}$ 组

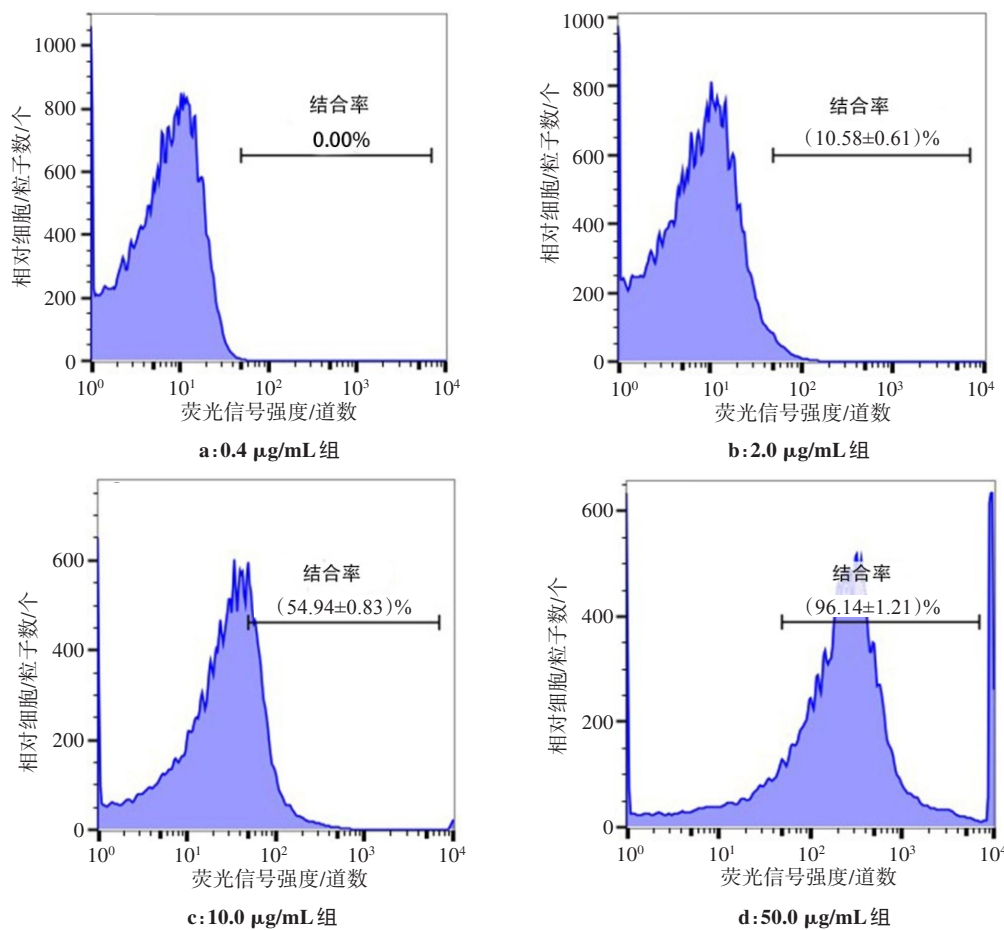


图2 不同浓度PEDF与微泡结合情况单参数直方图
Fig.2 Single parameter histogram of different concentrations of PEDF binding to ultrasound microbubbles

表明该PEDF超声微泡具有良好的载药包封特性,可以作为载药系统运载PEDF。超声作用下,在预定时间间隔15、30、45、60、75、90、105 s及5、7、10 min,对取出的等份PEDF多聚体微泡悬浮溶液,通过分光光度法测定PEDF的含量,绘制其体外释药特性曲线

(图3)。从图中可以看到从微泡被超声击破后第15 s开始观察到PEDF释放,在45~60 s药物浓度达到峰值(65±3)%,而在剩余的时间内,药物浓度略有升高,持续观察10 min后浓度开始显著降低,该结果说明PEDF超声微泡在短时间内具有连续释药特性。

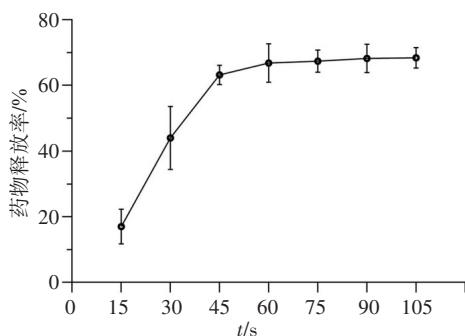


图3 PEDF多聚体超声微泡药物释放率

Fig.3 *In vitro* drug release rate of PEDF-loaded polymer ultrasound microbubbles

3 讨论

针对癌症、颈部动脉斑块等血管新生类疾病,研究表明直接在病变部位注射可以使药物表达效率提高,但该方法具有有创性,应用受到一定的局限^[10-11]。病毒载体是公认的高效转染的载体,但有免疫原性和潜在药物突变的危险^[12-13]。本实验首次将PEDF对新生血管因子的有效抑制作用与多聚体超声微泡载药靶向治疗的特性相结合,研制性能优异的PEDF多聚体超声微泡,利用微泡在超声介导下的空化效应,靶向传输药物,达到安全有效治疗的目的^[14-15]。

多聚体超声微泡与其他载体相比,其构成成分多为脂类、糖类以及可生物降解的多聚体,不具有免疫原性,体积小且较稳定,在不经受一定强度的超声声能照射的情况下可以在体内保持稳定,仅在超声照射区域内,即观测的病变部位破裂,从而可实现靶向释药,同时,超声介导微泡破坏还可促进其携带药物通过血管内膜屏障,释放到靶向组织和器官的血管外间质,增加靶细胞的药物浓度^[16-17]。本实验研制的多聚体微泡为人工合成医用多聚体高分子材料,其生物相容性好,在体内能自然降解成水和二氧化碳,对人体无任何毒副作用,免疫原性低,可通过肾脏排出体外,在体内不会有积累。

PEDF是重要的新生血管抑制因子^[18],本实验针对多项疾病由于新生血管形成影响疾病转归的问题,首次提出应用超声微泡作为载体,并结合新生血管抑制因子制备形成一个新型的药物复合体,且明确了PEDF与新型超声微泡载体的结合特性,并研制了具有最大药物结合率的超声微泡。对PEDF超声微泡包封率和释药特性的检测结果表明,PEDF超声微泡与其他已知性能优异的载药微泡具有相似的理化特性,如HCPT超声微泡、舒尼替尼超声微泡等^[19-20]。本研究虽然为实现采用多聚体微泡携带药物靶向治疗血管新生类疾病的研究奠定了基础,然而现仍处于基础阶段,多聚体微泡到达病灶部位在超声辅助下释放药物的疗效、作用机理以及相应的其他不可预知作用尚需进一步的研究验证。

【参考文献】

- [1] ZHOU S, CHEN Z, XUE L, et al. Targeted luteolin delivery via bevacizumab-modified polymer microbubbles to colon cancer cells [J]. *Nanosci Nanotech Let*, 2019, 11(2): 240-248.
- [2] 胡劫, 宗瑜瑾, 宋宏洋, 等. 新型多聚体微泡携带舒尼替尼抑制人肾癌GRC-1细胞生长及促凋亡的实验研究[J]. *中华超声影像学杂志*, 2012, 7: 621-624.
HU J, ZONG Y J, SONG H P, et al. Study of sunitinib-liposome-loaded microbubbles for growth inhibition and apoptosis induction of renal carcinoma cell strain GRC-1 [J]. *Chinese Journal of Ultrasonography*, 2012, 7: 621-624.
- [3] 郭庆敏, 孟旭霞, 胡选, 等. 缺氧诱导因子-2 α 在增生型糖尿病视网膜病变新生血管形成中的作用[J]. *中华眼底病杂志*, 2020, 36(2): 110-115.
GUO Q M, MENG X X, HU D, et al. The effect of hypoxia-inducible factor-2 α expressing in the neovascularization of the proliferative diabetic retinopathy [J]. *Chinese Journal of Ocular Fundus Disease*, 2020, 36(2): 110-115.
- [4] CARNEIRO-LOBO T C, SCALABRINI L C, MAGALHAES L D, et al. IKK β targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis *in vitro* and *in vivo*: a potential anti-angiogenic therapeutic target [J]. *Lung Cancer*, 2019, 130(9): 169-178.
- [5] MELINCOVICI C S, BOŞCA A B, ŞUŞMAN S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2018, 59(2): 455-467.
- [6] 黄亮瑜, 柯屹峰, 林婷婷, 等. 慢病毒介导聚噻啉结合蛋白相关剪接因子对氧诱导视网膜病变小鼠视网膜新生血管的抑制作用[J]. *中华眼底病杂志*, 2020, 36(1): 53-59.
HUANG L Y, KE Y F, LIN T T, et al. Lentivirus-mediated polypyrimidine bundle binding protein-associated splicing factor inhibits retinal neovascularization in mice of oxygen-induced retinopathy [J]. *Chinese Journal of Ocular Fundus Diseases*, 2020, 36(1): 53-59.
- [7] FARNOODIAN M, SORENSON C M, SHEIBANI N. PEDF expression affects the oxidative and inflammatory state of choroidal endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 314(4): 456-472.
- [8] HE X, CHENG R, BENYAJATI S, et al. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases [J]. *Clin Sci*, 2015, 128(11): 805-823.
- [9] SHEIBANI N, WANG S, DARJATMOKO S R, et al. Novel anti-angiogenic PEDF-derived small peptides mitigate, choroidal neovascularization [J]. *Exp Eye Res*, 2019, 188(11): 107798.
- [10] MARWAH H, GARG T, GOYAL A K, et al. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery [J]. *Drug Deliv*, 2014, 23(2): 564-578.
- [11] ROSA D D, CLAMP A R, COLLINSON F, et al. Antiangiogenic therapy for ovarian cancer [J]. *Curr Opin Oncol*, 2007, 19(5): 497-505.
- [12] NICOLE S F. Viral nanoparticles in drug delivery and imaging [J]. *Mol Pharmaceut*, 2013, 10(1): 1-2.
- [13] SHUKLA S, DORAND R D, MYERS J T, et al. Multiple administrations of viral nanoparticles alter *in vivo* behavior- insights from intravital microscopy [J]. *Acs Biomater Sci Eng*, 2016, 2(5): 829-837.
- [14] SENNOGA C A, KANBAR E, AUBOIRE L, et al. Microbubble-mediated ultrasound drug-delivery and therapeutic monitoring [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2017, 14(9): 1031-1043.
- [15] 郑文艺, 吴裕明, 郝轶. 超声靶向微泡破坏技术及其在乳腺癌治疗方面的应用 [J]. *基础医学与临床*, 2020, 40(4): 552-556.
ZHENG W Y, WU Y M, HAO Y. Ultrasound targeted microbubble destruction technology and its application in the treatment of breast cancer [J]. *Basic and Clinical Medicine*, 2020, 40(4): 552-556.
- [16] BO L, ALA B, MNLA B, et al. Functionalized polymer microbubbles as new molecular ultrasound contrast agent to target P-selectin in thrombus [J]. *Biomaterials*, 2019, 194(2): 139-150.
- [17] FOKONG S, THEEK B, WU Z, et al. Image-guided, targeted and triggered drug delivery to tumors using polymer-based microbubbles [J]. *J Control Release*, 2012, 163(1): 75-81.
- [18] WEN H, LIU M, LIU Z, et al. PEDF improves atherosclerotic plaque stability by inhibiting macrophage inflammation response [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 235(5): 37-41.
- [19] HU J, ZONG Y, LI J, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of targeted sunitinib-loaded polymer microbubbles against proliferation of renal cell carcinoma [J]. *J Ultrasound Med*, 2016, 35(3): 589-597.
- [20] 李思阳, 孔庆新, 王洋. 载10-羟基喜树碱超声微泡的制备、表征及其体外超声成像特性 [J]. *中成药*, 2014, 36(10): 2060-2064.
LI S Y, KONG Q X, WANG Y. Preparation, characteristics of imaging and *in vitro* release of 10-hydroxycamptothecin-loaded microbubbles [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2014, 36(10): 2060-2064.

(编辑:谭斯允)