

# 基于荧光分析法的可降解微针药物传输性能评估

张鸣天<sup>1</sup>, 姚水洪<sup>1</sup>, 刘冉<sup>2</sup>

1. 北京化工大学管理科学与工程系, 北京 100029; 2. 清华大学生物医学工程系, 北京 100084

**【摘要】目的:**经皮给药是一种热点的递送方式, 目前由可降解材料构成经皮微针芯片使这种技术向临床应用更近一步。可降解材料微针芯片在动物皮肤上的刺入及溶解情况直接反映了药物递送的效率, 因此对微针在体内溶解情况和药物释放情况的研究十分重要。**方法:**文章利用荧光分析法实现对刺入小鼠体内微针的降解情况进行观测, 同时对其药物传输性能进行评估。**结果:**对不同长度的可生物降解微针刺入小鼠前后进行对比, 并得到其释放率。**结论:**长度为 800  $\mu\text{m}$  的微针在小鼠体内释放率比 500  $\mu\text{m}$  高, 并证明了丝素蛋白微针良好的可生物降解性。

**【关键词】**丝素蛋白微针; 生物降解; 荧光分析法; 药物传输

**【中图分类号】**TH789; R-331

**【文献标识码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2015)06-0768-04

## Drug delivery performance evaluation of dissolving microneedle based on fluorescence analysis method

ZHANG Ming-tian<sup>1</sup>, YAO Shui-hong<sup>1</sup>, LIU Ran<sup>2</sup>

1. School of Engineering and Management Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 2. School of Biomedical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**Abstract: Objective** Transdermal drug delivery is a hot way of delivery. And the recent percutaneous microneedle chips made of biodegradable material make this technique closer to clinical application. The insertion and dissolution situation of the dissolving microneedle chip in animal skin directly reflect the efficiency of drug delivery, which is important for researching on the situation of microneedle dissolution and drug-release *in vivo*. **Methods** Fluorescence analysis method was used to observe the dissolution situation of dissolving microneedle inserted into mice, and to evaluate its delivery efficiency. **Results** The release rates before and after dissolving microneedles with different lengths inserted into mice were evaluated and compared. **Conclusion** The release rate *in vivo* of 800  $\mu\text{m}$  microneedle is higher than that of 500  $\mu\text{m}$  microneedle, which proves the silk fibroin microneedle has a good biodegradability.

**Key words:** silk fibroin microneedle; biodegradable; fluorescence analysis method; drug delivery

## 前言

微针是一种微米级的类似注射针头的空心或实心针, 作为一种新型药物传输装置具有增加药物的

经皮渗透, 使进入系统的药量达到治疗所需水平的特点<sup>[1]</sup>。可生物降解微针可以使微针在体内降解的同时将药物释放到体内, 与传统微针进药相比, 其可生物降解的特点有效解决了微针在进药过程中断裂在体内难以解决的问题。国内外学者对微针在体内情况进行研究过程中运用了很多方法, 如 Gill 等<sup>[2]</sup>对微针插入人体的疼痛感进行研究, 并通过使用染色剂使微针通道可视化, 从而观察其渗透情况<sup>[3]</sup>; 光学相干层析技术(OCT)作为一种非接触、无损伤成像技术在微针研究领域也逐步被使用。Coulman 等<sup>[4]</sup>使用 OCT 技术对钢、硅、聚合物等微针插入人体内的情况进行研究, Donnelly 等<sup>[5]</sup>也利用该方法对水凝胶微

**【收稿日期】**2015-07-28

**【基金项目】**国家自然科学基金(81471749); 国家重大科学仪器专项(2011YQ030134); 清华大学自主研究计划(20131089190); 北京市生物医学技术与仪器实验室项目

**【作者简介】**张鸣天(1991-), 硕士研究生, 主要研究方向: 信息技术。Tel: 15210936488; E-mail: 15210936488@163.com。

姚水洪(1965-), 博士, 副教授, 主要研究方向: 项目管理, 战略管理。Tel: 13910139539; E-mail: yaoshh@163.com。

**【通信作者】**刘冉(1979-), 博士, 助理研究员, 主要研究方向: 微纳医学系统。Tel: 13681111216; E-mail: liuran@tsinghua.edu.cn。

针插入体内情况进行了观察。本文主要采用的是荧光分析法, 荧光分析法可以通过与标准荧光强度曲线的对比, 得到检测荧光物质的强度。在对微针的研究中, Peter等<sup>[6]</sup>采用荧光双标的方法, 在中空的可降解的微针中填充荧光颜色为绿色和红色的颗粒, 并刺入小鼠皮肤上, 用显微镜观测荧光物质的扩散情况从而判断微针的降解情况。其使用的聚乳酸-丙烯酸树脂(PLGA-PAA)复合微针可以应用于简单的经皮给药以及注射疫苗中, 也有使用荧光分析法对聚乳酸(PLGA)微球在小鼠中累积释放率的研究<sup>[7]</sup>。丝素蛋白作为一种纯天然高分子纤维蛋白, 在医学领域的研究十分悠久<sup>[8]</sup>, 而利用其生物可降解性制作微针的研究则很少<sup>[9]</sup>。丝素蛋白微针作为一种可降解生物材料, 对其在体内药物释放效率的评估显得尤为重要。

## 1 丝素蛋白微针

本研究中微针采用的材料是一种从蚕丝中提取出来的新型材料, 在生物材料应用中被广为使用和研究, 研究的蛋白质聚合物, 即丝素蛋白。

蚕体内绢丝腺所分泌出的丝液是构成蚕丝的主要成分, 蚕丝主要由两部分组成, 分别是丝素蛋白以及丝胶蛋白。占蚕丝质量70%~80%的丝素蛋白是蚕丝的主体, 是一种由乙氨酸、丙氨酸等18种氨基酸以多缩氨键连接而成的无生理活性的天然生物大分子, 通常认为其相对分子质量约为 $3.7 \times 10^5$ 。

丝素本身具有良好的机械性能和理化性质, 如良好的柔韧性和抗拉伸强度、透气透湿性、缓释性等, 而且经过不同处理可以得到不同的形态, 如纤维、溶液、粉、膜以及凝胶等。丝素蛋白与其他天然高分子相比有明显的优越性。研究表明它具有良好的生物相容性、无毒、无污染、无刺激性、生物可降解<sup>[10]</sup>。目前已有使用丝素蛋白材料进行伤口的缝合以及作为人工神经、皮肤、骨骼、血管、肌腱、韧带和角膜等生物医学材料的功能开发和研究, 表明其具有良好的生物相容性及可降解性。使用丝素蛋白作为制作可降解微针的材料具有广阔的前景和巨大的潜力。

## 2 实验方法与仪器

### 2.1 荧光分析法

荧光指物质分子因吸收外来辐射的光子能量而从基态激发至激发态, 再由第一电子激发单重态所产生的辐射跃迁返回到基态而伴随的发光现象。随

着荧光显微镜的普及和激光共聚焦显微镜及其技术的推广, 荧光染色的方法也被广泛运用, 尤其是配合荧光染色来进行荧光分析。这种方法是利用物质被短波长光激发后产生特征性波长较长的荧光来对物质样品进行定性或定量分析, 其优点主要有灵敏度高、选择性多以及检测限低等。由于能够通过自身发射荧光的物质相对较少, 而许多有机药物分子因为其所含基团可以吸收荧光光谱的特性, 从而使得荧光减弱甚至熄灭。此外, 常规荧光分析法的灵敏度和选择性也由于拉曼峰和散射光的背景干扰而受到影响。为了解决常规荧光分析法存在的诸多问题, 近年来发展了各种新型荧光分析技术<sup>[11]</sup>。

荧光分析法可以对物质进行定性及定量分析, 分为直接测定法和间接测定法两种。直接测定法主要针对测定本身可以发射荧光的物质, 利用物质自身发射的荧光进行测定分析。由于有些物质本身并不能发射荧光或荧光强度很弱, 这时就需要将不能发射荧光的物质转化为可以发射荧光的物质, 比如使用某些试剂(如荧光染料), 使其与不发生荧光的物质生成络合物, 各种络合物能发射荧光, 从而就可以测定了。因此荧光试剂的应用让一些原本自身不能发光的有机与无机物质也能够进行荧光分析, 从而使其分析的范围得到了进一步提升。标准工作曲线法无论是在直接测定还是间接测定中都应用的十分广泛, 标准工作曲线法首先取已知量的荧光物质配置成一系列标准溶液, 然后对配成的标准溶液进行荧光强度测定, 给出荧光强度对标准溶液浓度的工作曲线。最后保持仪器与实验条件不变, 对未知样品的荧光强度进行测试, 并与标准工作曲线进行对比, 从而查出未知样品的浓度。

荧光分析法具有经济、简便、灵敏度高和选择性好的优点, 是一种重要且用途广泛的光谱分析手段。随着新药物的不断出现以及生命科学的快速发展, 常规的荧光分析法面临着新的挑战, 开发更加高效、灵敏、自动化的新型荧光分析技术是药物分析工作的迫切需要。

### 2.2 实验仪器

采用荧光分析法对可降解丝素蛋白微针在小鼠体内进行定量分析, 所使用的仪器是清华大学生物医学测试中心的激光共聚焦显微镜 Zeiss710-3channel, 产自德国 Zeiss 公司, 型号 LSM710。显微镜为 Zeiss710 倒置共聚焦显微镜 Observer.Z1。3种激光器为 Ar 激光器, 458 nm、488 nm、514 nm; HeNe

橙色激光器, 594 nm; HeNe 红色激光器, 633 nm; 半导体激光器, 405 nm。物镜有 10 倍和 40 倍干镜以及 100 倍的油镜, 实验中主要使用的物镜是 10 倍干镜。LSM 710 的主要特点有: 灵敏度和信噪比更高, 图象对比更清晰; 激光搭配选择性更多, 实验应用范围更广; 更高的精确性与再现性。

### 2.3 实验步骤

荧光实验主要是采用荧光染色及荧光分析相结合的方法, 先用荧光染料将可降解的丝素蛋白微针染色, 刺入活体小鼠腹部一段时间后, 小鼠猝死, 取其刺入处皮肤在激光共聚焦显微镜 Zeiss710-3channel 下进行观测, 检测其荧光物质的荧光强度并与标准荧光强度曲线对比, 得出微针刺入小鼠皮肤部位的荧光物质含量, 从而对可降解丝素蛋白微针的药物传输率进行评估。

## 3 实验结果与分析

### 3.1 荧光强度对比

实验所用微针长度规格为 500  $\mu\text{m}$  和 800  $\mu\text{m}$ , 使用 HEX 荧光基团进行染色, 浓度为 1/1000, 激光器的激发波长为 543 nm, 为绿色荧光。

首先使用荧光方法对比 800  $\mu\text{m}$  微针刺入小鼠体内前后的荧光物质, 得到对比如图 1 所示。图 1a 为 800  $\mu\text{m}$  微针从针尖部位的荧光成像俯视图, 图 1b 为刺入小鼠体内后, 残留的荧光物质成像。观察范围为 1.4 mm $\times$ 1.4 mm 的正方形, 我们可以清楚的看到 XY 轴平面区域, 此区域内有一根针, 针的底端近似 0.3 mm $\times$ 0.3 mm 的矩形。通过对比可以看出, 小鼠体内残留的荧光物质明显少于未使用微针, 刺入的微针内所含的药量并未完全进入到小鼠体内。

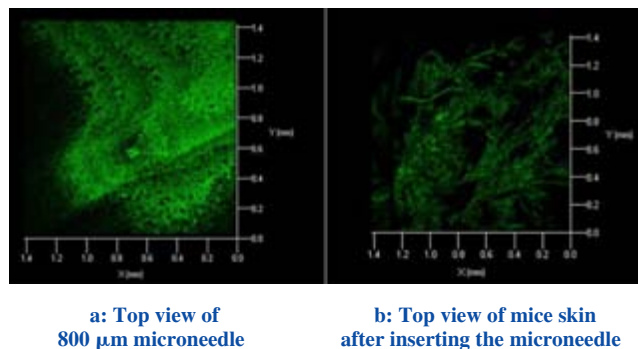
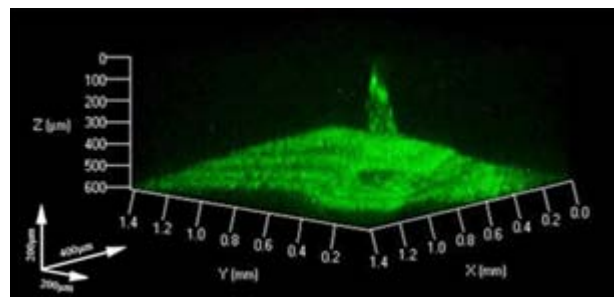


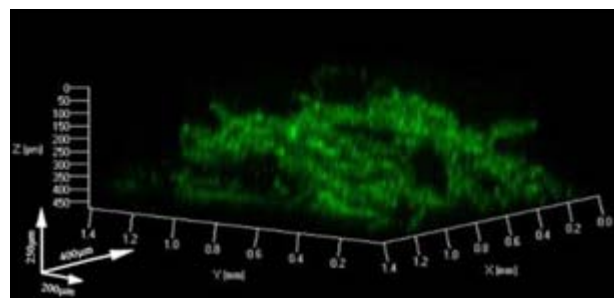
图 1 长度为 800  $\mu\text{m}$  微针刺入小鼠前后对比  
Fig.1 Before and after the insertion of 800  $\mu\text{m}$  microneedle

800  $\mu\text{m}$  微针刺入小鼠前后整体 3D 成像对比, 如图 2 所示。图中除 XY 轴平面外, 还展示了 Z 轴上的

数据。Z 轴方向的扫描层数为 20 层, 故图像略显模糊。图 2a 为 800  $\mu\text{m}$  微针整体的荧光物质成像, 图 2b 为微针刺入小鼠皮肤内部通过降解所残留的荧光物质成像。原本的微针长度只有 612  $\mu\text{m}$ , 没有达到 800  $\mu\text{m}$  的标准规格, 考虑微针在制作过程中其针尖及底端的损耗, 导致微针没有达到 800  $\mu\text{m}$  的长度。通过两图的对比可以看出, 微针在小鼠体内发生降解并使荧光物质发生了扩散, 深度达到了皮下 475  $\mu\text{m}$ 。



a: Side view of 800  $\mu\text{m}$  microneedle



b: Side view of mice skin after inserting the microneedle

图 2 长度为 800  $\mu\text{m}$  微针刺入小鼠前后高度对比图

Fig.2 Lateral view before and after the insertion of 800  $\mu\text{m}$  microneedle

### 3.2 荧光物质释放率计算

根据其荧光强度计算微针中荧光物质的释放率, 推断出其药物的释放率, 首先要检测不同浓度荧光溶液中荧光物质的强度并绘制出标准荧光强度表, 配置浓度分别为 0  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.1  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.2  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.4  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.6  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.8  $\mu\text{mol/mL}$  以及 1  $\mu\text{mol/mL}$  的 HEX 荧光染料溶液, 并在仪器上检测其荧光强度, 得到荧光强度与浓度关系的曲线, 如图 3 所示。

通过所获得的 7 个点进行拟合, 得出荧光强度与染料浓度之间的关系近似为正比例关系。分别将长度为 500  $\mu\text{m}$  及 800  $\mu\text{m}$  的微针刺入到小鼠中, 并取得皮肤样品在荧光显微镜下检测其强度, 通过 3D 投影获得整体的平均荧光强度, 各采集 5 组数据并绘制出释放比率图, 如图 4、图 5 所示。



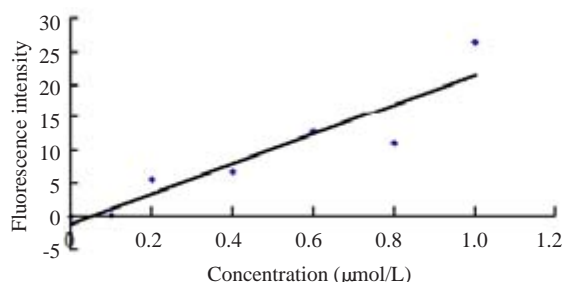


图3 HEX 荧光标准强度表

Fig.3 HEX fluorescent standard intensity

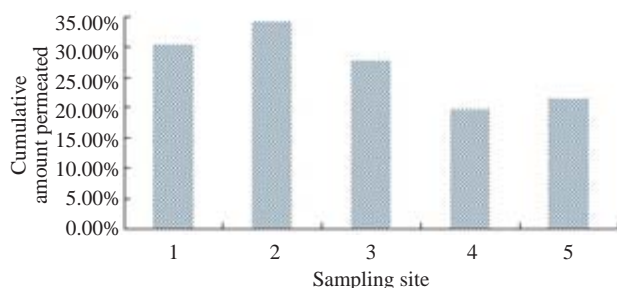


图4 长度为 500 μm 微米刺入小鼠荧光物质释放率

Fig.4 Fluorescent substance release rates of 500 μm microneedle inserted into mice

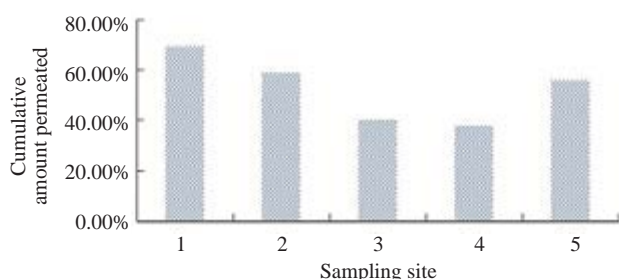


图5 长度为 800 μm 微米刺入小鼠荧光物质释放率

Fig.5 Fluorescent substance release rates of 800 μm microneedle inserted into mice

通过统计,可以看出长度为 800 μm 的丝素蛋白微针在小鼠体内的释放效果要比长度为 500 μm 的效果好,其平均释放率可以达到 50% 以上,而长度为 500 μm 微针的释放率大部分低于 30%。而且通过检测荧光物质所在深度可以发现,长度为 500 μm 微针刺入深度在 50 μm~150 μm,远远小于其 500 μm 的整个长度;而 800 μm 微针的刺入深度则可以达到 250 μm~450 μm,考虑到药物装载的经济性,显然长度为 800 μm 的丝素蛋白微针更适合于推广应用。

## 4 结论

通过采用荧光分析法对可生物降解微针在体内

的释放率进行了评估,并对长度为 500 μm 及 800 μm 的微针进行了对比。荧光分析法作为一种较为成熟的定量分析方法,其在药物传输率上的应用具有很广阔的前景,特别是在可降解微针的研究中,荧光分析法可以对其释放率进行有效评估。而丝素蛋白作为一种可生物降解的材料,实验也证实了其制作微针具有良好的生物相容性及可降解性,具有广阔前景和巨大潜力。不过本文只是在有限的范围内进行了研究,在未来还需进一步的工作,如对不同时间的释放率进行分析,以期得到丝素蛋白微针随时间变化在体内降解的释放过程。

## 【参考文献】

- [1] Rajaraman S, Henderson HT. A unique fabrication approach for microneedles using coherent porous silicon technology[J]. Sens Aetustols B Chem, 2005, 105(2): 443-448.
- [2] Gill HS, Denson DD, Burris BA, et al. Effect of microneedle design on pain in human volunteers[J]. Clin J Pain, 2008, 24(7): 585-594.
- [3] Haq MI, Smith E, John DN, et al. Clinical administration of microneedles: Skin puncture, pain and sensation[J]. Biomed Microdevices, 2009, 11(1): 35-47.
- [4] Coulman SA, Birchall JC, Alex A, et al. *In vivo*, in situ imaging of microneedle insertion into the skin of human volunteers using optical coherence tomography[J]. Pharm Res, 2011, 28(1): 66-81.
- [5] Donnelly RF. Hydrogel-Forming microneedle arrays can be effectively inserted in skin by self-application: A pilot study centred on pharmacist intervention and a patient information leaflet[J]. Pharm Res, 2014, 31(8): 1989-1999.
- [6] Peter CD, Wilfredo FG, Michelle LA, et al. Composite dissolving microneedles for coordinated control of antigen and adjuvant delivery kinetics in transcutaneous vaccination[J]. Maknals Views, 2013, 23: 161-172.
- [7] Ke CJ, Lin YJ, Hu YC, et al. Multidrug release based on microneedle arrays filled with pH-responsive PLGA hollow microspheres [J]. Biomaterials, 2012, 33: 5156-5165.
- [8] 朱良均, 姚菊明, 李幼禄. 蚕丝蛋白——功能性生物材料[J]. 中国蚕业, 1996, (4): 26-28.
- [9] Zhu LJ, Yao JM, Li YL. Fibroin-functional biological materials[J]. Journal of Sericulture in China, 1996, (4): 26-28.
- [10] Tsiaris K, Raja WK, Pritchard EM, et al. Fabrication of silk microneedles for controlled-release drug delivery[J]. Adv Funct Mater, 2012, 22(2): 330-335.
- [11] Hajime M, Masuhiro T. New silk protein: Modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials[J]. J Biotechnol, 2000, 74: 95-100.
- [12] 王永利, 张江伟, 王立华. 荧光分析法在药物分析中的应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 253-255.
- [13] Wang YL, Zhang JW, Wang LH. Application progress of fluorescence analysis in pharmaceutical analysis[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional, 2011, 17(12): 253-255.