

透明质酸微针经皮递送胰岛素智能给药系统用于糖尿病治疗

肖永成¹, 王小斌², 谢德明¹

1 暨南大学 生物医学工程系, 广东 广州 510630

2 广州质量监督检测研究院, 广东 广州 511447

肖永成, 王小斌, 谢德明. 透明质酸微针经皮递送胰岛素智能给药系统用于糖尿病治疗. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3433-3442.

XIAO YC, WANG XB, XIE DM. Application of hyaluronic acid microneedles in insulin intelligent delivery system for the treatment of diabetes. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3433-3442.

摘要: 本研究通过共沉淀法制备了胰岛素 (insulin, INS)/Ca₃PO₄ 复合物和葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase, GOx)/Cu₃(PO₄)₂ 复合物, 得到的矿化胰岛素 (mineralized insulin, m-INS) 呈现不规则结晶团簇状, 矿化葡萄糖氧化酶 (m-GOx) 呈花球状形貌, 直径约 1–2 μm。体外模拟释放实验表明, m-INS 会随介质 pH 值降低而释放出 INS, pH 为 4.5 时其释放量达到 96.68%; 酶活力检测实验表明 m-GOx 的酶活力稳定性高于游离的 GOx, 在室温放置 10 d 后仍保持较高活力, 而 GOx 活力小于 60%。通过配制葡萄糖溶液模拟正常血糖 (5.6 mmol/L) 和高血糖 (22.2 mmol/L) 状态, 在葡萄糖溶液中加入 m-INS 和 m-GOx, INS 的释放量呈现显著的葡萄糖浓度依赖性, 即葡萄糖浓度越高, INS 释放量和释放速率越大。最后, 将 m-INS、m-GOx 与透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 溶液混合, 制备负载 m-INS 和 m-GOx 的 HA 微针阵列, 构建 1 型糖尿病模型鼠, 通过微针给药的方式评估载药 HA 微针对糖尿病大鼠的血糖控制效果。结果表明: 负载 m-INS/m-GOx 的 HA 微针能有效递送药物, 糖尿病大鼠的平均血糖浓度在 1 h 内下降到约 7 mmol/L, 并能维持 10 h 的正常血糖, 使血糖浓度低于给药前水平长达 36 h。与仅负载 INS 的 HA 微针相比, m-INS 微针具有更好的葡萄糖耐受性、更持久的控糖效果和更小的低血糖风险。相对于其他的缓释系统, 本研究中的核心成分制备流程简单、效率高和安全有效, 具备较大的商业化潜力。

关键词: 透明质酸微针; 透皮给药; 糖尿病治疗; 胰岛素智能释放

Application of hyaluronic acid microneedles in insulin intelligent delivery system for the treatment of diabetes

XIAO Yongcheng¹, WANG Xiaobin², XIE Deming¹

1 College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong, China

2 Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, Guangdong, China

Abstract: In this study, insulin (insulin, INS)/Ca₃PO₄ complex and glucose oxidase (glucose oxidase, GOx)/Cu₃(PO₄)₂ complex were prepared by coprecipitation method. The mineralized insulin (mineralized insulin, m-INS) showed irregular crystalline clusters, and the mineralized glucose oxidase (m-GOx) showed flower spherical morphology, with a diameter of about 1–2 μm. *In vitro* simulated release experiment showed that m-INS released INS as the pH value of the medium decreased. When the pH value was 4.5, the release amount reached 96.68%. The enzyme activity detection experiment showed that the enzyme activity stability of m-GOx was higher than that of free GOx. It still maintained high activity after 10 days at room temperature, while the activity of GOx was less than 60%. The glucose solution was prepared to simulate the state of normal blood glucose (5.6 mmol/L) and hyperglycemia (22.2 mmol/L). When m-INS and m-GOx were added to the glucose solution, the release amount of INS showed a significant glucose concentration dependence. The higher the glucose concentration, the greater the release amount and release rate of INS. Finally, m-INS, m-GOx and hyaluronic acid (HA) solution were mixed to prepare HA microneedle arrays loaded with m-INS and m-GOx. Type 1 diabetes mice were constructed to evaluate the effect of drug-loaded HA microarray on blood glucose control in diabetic rats. The results show that the HA microneedles loaded with m-INS/m-GOx could deliver drugs effectively. The average blood glucose concentration in diabetic rats dropped to about 7 mmol/L within 1 h, normal blood glucose concentration could be maintained for 10 h, and the overall blood glucose concentration was lower than the level before administration for 36 hours. Compared with HA microneedles loaded with INS only, m-ins microneedles showed better glucose tolerance, longer-lasting glucose control effect and less risk of hypoglycemia. Compared with other sustained-release systems, the preparation process of the core components in this study is simple, efficient, safe and effective, and has great commercial potential.

Keywords: hyaluronic acid microneedles; transdermal drug delivery; diabetes administration; intelligent release of insulin

2021 年全球约有 5.37 亿成年糖尿病患者，超过 670 万人死于糖尿病，且预计 2045 年糖尿病患者数量将达到 7 亿^[1]。目前治疗糖尿病的手段主要有两种：人工注射胰岛素和口服降糖药。口服降糖药容易让患者产生依赖性，药物的有效性和安全性较低^[2]，直接注射胰岛素则

容易出现低血糖和体重增加等问题，一天多次的注射过程让患者饱受痛苦，依从性不高^[3-4]。为了减少频繁注射以及更好的血糖控制，无创给药以及智能释放的方式受到了广泛关注。

近年来，微针贴片这种无痛的给药方式已经在美容领域获得应用。微针贴片由数十到数

百根,长度数百微米的细针阵列组成,透皮时几乎没有痛觉,也不会留下明显创口,是一种理想的透皮给药形式。微针分为固体微针^[5]、涂层微针^[6]、空心微针^[7]、水凝胶微针^[8]和可溶性微针等^[9]。可溶性微针因为制备相对简单、载药量高、材料来源广、生物相容性好等优势被认为在透皮给药方面最具研究潜力,其中的药物被整合到微针的针体内,随着微针的溶解而释放,药物利用率高,不产生医疗废物。然而,如果仅仅是将胰岛素整合到可溶性微针上,虽也能提高糖尿病患者的用药舒适性,却无法避免低血糖风险和频繁给药的麻烦。

本文设计制备了一种基于透明质酸的可溶性微针,通过负载矿化胰岛素(m-INS)和矿化葡萄糖氧化酶(m-GOx),组成一个智能释放系统,可以实现自主识别血糖浓度信号,并控制胰岛素的释放行为,通过胰岛素的有效释放以维持血糖正常,藉此实现糖尿病的有效治疗,具有广阔的临床应用前景。

1 材料与方 法

1.1 材 料

透明质酸钠(化妆品级,30 kDa,300 kDa),青州广裕生物科技有限公司;聚乙二醇(Mw=3 350,99%),购自广州健阳生物科技有限公司;考马斯亮蓝 G250 (AR),上海麦克林生化科技有限公司;猪胰岛素(BR)、葡萄糖(CP),购自大连美仑生物技术有限公司;葡萄糖氧化酶(BR),购自上海源叶生物科技有限公司;胰岛素定量试剂盒、链脲佐菌素,Solarbio;SD 雄性大鼠(4~6 周龄),购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 m-INS 和 m-GOx 的制备与表征

将 1 mg 胰岛素(msulin,INS) 加到 1 mL

PEG-3 350 (1%) 中混合均匀,室温搅拌 30 min。加入 0.5 mL 柠檬酸钠溶液(60 mmol/L)和 0.5 mL CaCl₂ 溶液(125 mmol/L),继续搅拌 15 min。最后缓慢滴加 1 mL Na₂HPO₄ 溶液(125 mmol/L),常温下避光反应 24 h。产物 6 000 r/min 离心 10 min,去掉上清,用超纯水洗涤 3 遍,得到矿化胰岛素(m-INS)。用透射电子显微镜观察产物表观形貌。将产物置于不同 pH 值的缓冲液中,37 °C 水浴 2 h,6 000 r/min 离心 10 min,用 Bradford 法检测上清中的 INS 含量。

将 3 mg 葡萄糖氧化酶(GOx) 加入到 6 mL PBS 缓冲液中,室温静置 30 min,加入 40 μL 硫酸铜溶液(120 mmol/L) 搅拌均匀,放入 4 °C 冰箱中孵育 72 h,将产物转移到离心管中 5 000 r/min 离心 10 min,去掉上清后用 PBS 缓冲液洗涤离心 3 遍,冷冻干燥得到矿化葡萄糖氧化酶(m-GOx)。在扫描电子显微镜下观察产物的表观形貌。用葡萄糖氧化酶活性检测试剂盒检测矿化后的葡萄糖氧化酶的酶活力稳定性。

1.2.2 葡萄糖响应体系的体外验证

分别用 1 000 mg/L 和 4 000 mg/L 的葡萄糖溶液模拟正常(5.6 mmol/L) 和高血糖(22.2 mmol/L) 两种状态,将 m-INS 和 m-GOx 投入到不同浓度的葡萄糖溶液中,混合均匀后 37 °C 水浴。于不同时间点取样,7 000 r/min 离心 5 min,吸取上清,用 Bradford 法检测样品中的胰岛素含量,分析 INS 在不同葡萄糖浓度环境中的释放情况。

1.2.3 载药微针的制备

将 300 kDa 和 30 kDa 分子量的透明质酸钠粉末按 2:8 质量比配成 8% (W/V) 的水溶液,超声振荡脱气。负压条件下将溶液倒入自制微针制造装置并使其充分流延,40 °C 烘干,得到 HA 微针(HA-MN)。在体式显微镜和扫描电子

显微镜下观察微针的形貌。按同样方法,将被 FITC 标记的 m-INS 和被 Cy5 标记 m-GOx 加入到 HA 溶液中混合均匀,制得负载药物的微针,在荧光显微镜下观察药物在微针中的分布。往小培养皿中加入 1 mL PBS,用镊子夹住 m-INS 微针边缘,将针体部分沾湿,约 1 min 后将溶胀后的针体刮下,待完全溶于 PBS 中后用 Bradford 法检测其 INS 含量。同样方法可测得 m-INS/m-Gox 微针中的 INS 和 Gox 含量。

1.2.4 1 型糖尿病大鼠模型的构建

为了在体内验证 HA 微针负载胰岛素智能给药系统用于稳定血糖的可行性,用链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 诱导建立 1 型糖尿病大鼠模型。4-6 周龄的 SD 雄性大鼠在 SPF 环境中饲养适应 10 d,用 2.1% 的柠檬酸溶液和 2.94% 的柠檬酸钠溶液按 1:1.32 比例混合得到的缓冲液溶解 STZ,配制 2% 浓度的 STZ 溶液,用 0.22 μm 滤器过滤除菌后避光 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,现配现用。对每只大鼠按 55 mg/kg 的量经腹腔注射 2% 的 STZ 溶液,之后每日用血糖仪检测尾静脉血的血糖浓度,称量体重,连续记录 11 d,选取血糖高于 16.7 mmol/L 的大鼠纳入实验(暨南大学实验动物伦理委员会;批准编号: IACUC-20210113-08)。

1.2.5 载药微针的降糖效果验证

将糖尿病模型大鼠随机分成 4 组,每组 3 只,用剃毛器去除背部的毛发,分别将负载不同药物成分的微针(纯透明质酸微针 HA/MN,负载胰岛素的微针 INS/MN,负载矿化胰岛素的微针 m-INS/MN,负载矿化胰岛素和矿化葡萄糖氧化酶的微针 m-INS/m-GOx/MN)贴在大鼠皮肤表面,针尖垂直于皮肤,施加一定的压力使微针刺入皮肤,用 PU 膜固定。每隔一段时间测量大鼠尾静脉血的血糖浓度,直到血糖重新上升并稳定在高水平。

1.2.6 葡萄糖耐受实验

将所有实验动物提前禁食不禁水处理 12 h,其中两组 6 只糖尿病鼠被随机均分并给以 INS 微针或 m-INS/m-GOx 微针处理,另外 3 只健康鼠给以空白微针处理。1 h 后给以每只大鼠 1.5 g/kg 的葡萄糖溶液经腹腔注射,每隔 20 min 检测血糖浓度。

分析数据应用 SPSS 16.0 软件,使用 Origin 2018 软件作图。Student *t* 检验来分析数据的显著性差异。显著性差异表示为*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 m-INS 和 m-GOx 的制备与表征

在透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 下,如图 1A 所示, m-INS 为不规则的聚集状晶簇,直径约 1 μm 。体外模拟释放实验如图 1B 所示, m-INS 在 pH 越低的缓冲液中 INS 释放量越多,而在中性环境中几乎不释放。说明 m-INS 确实具有感应环境 pH 变化的能力,同时释放出胰岛素。m-GOx 在扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 下的形貌如图 1C 所示,产物呈花球状,有较高的比表面积,直径约 1-2 μm 。酶活力稳定性实验结果如图 1D 所示, m-GOx 比游离的 GOx 具有更高的酶活力稳定性。

2.2 m-INS/m-GOx 响应释放 INS 的体外验证

将制备的 m-INS/m-GOx 置于葡萄糖溶液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温,于不同时间点取样,检测上清液中的 INS 浓度,如图 2A 所示。5.6 mmol/L 的葡萄糖溶液中胰岛素的释放比较缓慢,而 22.2 mmol/L 的葡萄糖溶液中释放较快,这表明高浓度的葡萄糖溶液中,由于 m-GOx 催化产生较多的葡萄糖酸而使 pH 快速下降,使得 m-INS 中的磷酸钙快速溶解,释放出 INS。图 2B 中,

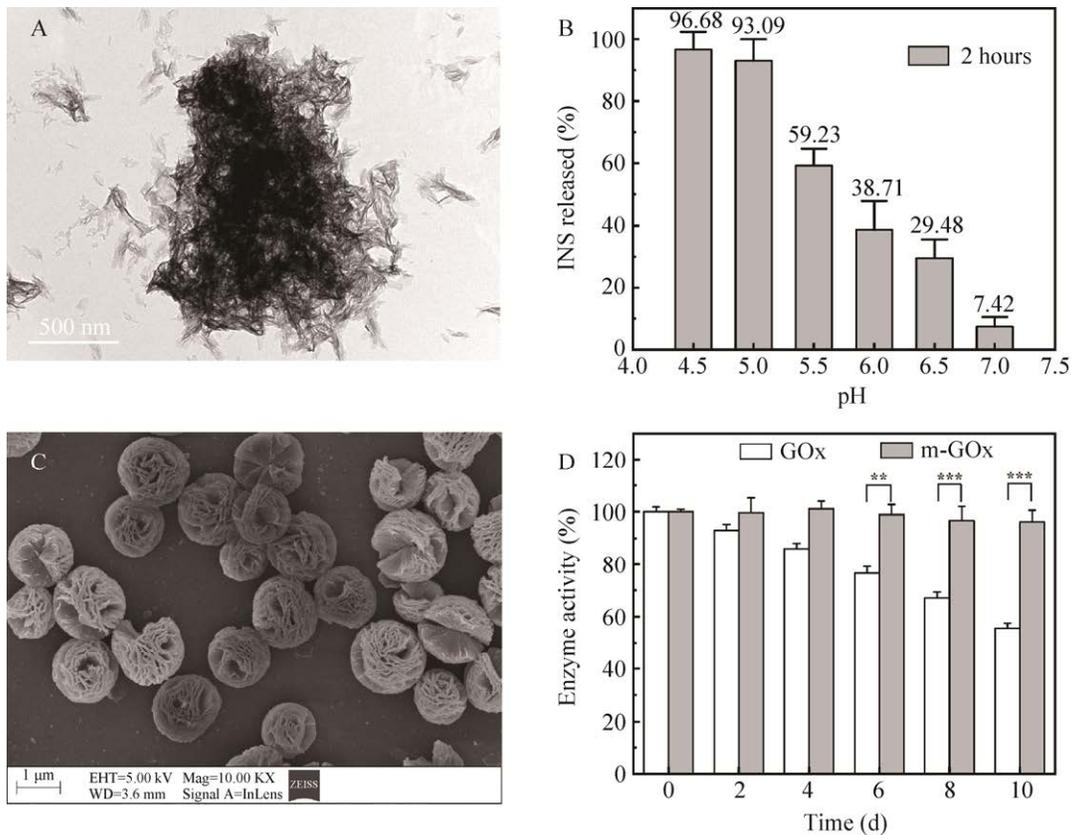


图 1 m-INS 和 m-GOx 的表观形貌及性能验证 A: m-INS 的 TEM 图; B: m-INS 在不同 pH 缓冲液下处理 2 h 的释放率; C: m-GOx 的 SEM 图; D: 室温下 m-GOx 和 GOx 的酶活力对比图

Figure 1 Apparent morphology and performance verification of m-INS and m-GOx. (A) TEM of m-INS. (B) The release rate of m-INS treated in different pH buffers for 2 hours. (C) SEM of m-GOx. (D) Comparison of enzyme activities of m-GOx and GOx at room temperature.

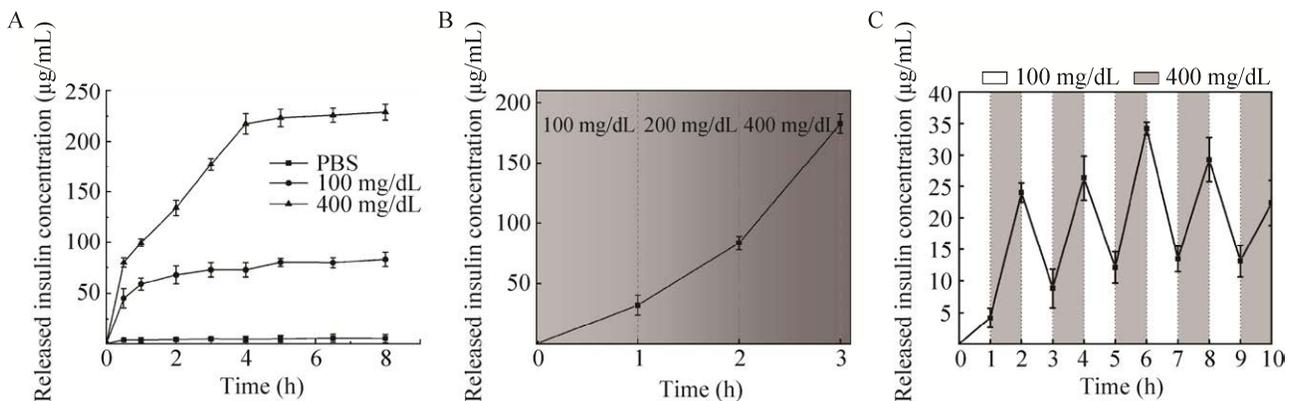


图 2 响应释放性能验证 A: m-INS 和 m-GOx 对不同葡萄糖浓度的响应释放情况; B: 随着葡萄糖浓度的升高体系释放出 INS 的情况; C: 葡萄糖浓度反复变化时体系释放出 INS 的情况

Figure 2 Response release performance verification. (A) Response and release of m-INS and m-GOx at different glucose concentrations. (B) Release of INS from the system when glucose concentration increases. (C) Release of INS from the system when glucose concentration changes periodically.

介质中葡萄糖浓度的升高, INS 释放越多, 释放速率越快。图 2C 中, 当该载药微针交替暴露在正常和高浓度葡萄糖两种状态下 1 h 时, 能对葡萄糖浓度的变化快速做出反应, 即在正常血糖状态下 INS 释放减缓, 在高血糖状态释放加速, 并且至少能维持 5 个周期。证明由 m-INS/m-GOx 组成的体系能有效识别介质中葡萄糖浓度, 在高糖状态时快速释放出 INS, 当糖浓度正常后, 体系封闭进入“OFF”状态, 葡萄糖浓度再次升高至一定水平后体系打开再次进入状态“ON”, 且能够较长时间内有效地将血糖控制在正常范围内, 实现葡萄糖浓度的动态调控。

2.3 HA 微针的制备

图 3A 所示为制备的 HA 微针阵列的体视显微镜照片。图 3B 所示为 HA 微针的电子显微镜

照片, 可见微针针体饱满, 形状均一, 针体高约 730 μm , 底宽约 356 μm , 针尖直径约 30 μm 。用万能试验机检测 HA 微针的机械强度, 每根针能承受约 0.33 N 的力, 与合成聚合物微针机械强度相当^[10-12], 足够刺穿皮肤。

用 1 mg INS 和 3 mg GOx 分别制备 m-INS 和 m-GOx, 将所得产物全部加入到 5 mL HA 溶液 (4%) 中混合均匀, 倒入模具中 -90 kPa 真空处理, 40 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 1 h, 然后加入 10 mL HA 溶液 (8%), -90 kPa 真空处理后 40 $^{\circ}\text{C}$ 干燥过夜。用 Bradford 法检测后得出, 每片载药微针贴片的针体部分含有约 0.012 mg m-INS 和 0.1 mg m-GOx, 万能试验机检测出载药微针的机械强度由纯 HA 微针的 0.33 N/针提高到了 0.43 N/针, 因为磷酸钙、磷酸铜结晶颗粒与 HA 分子之间的相

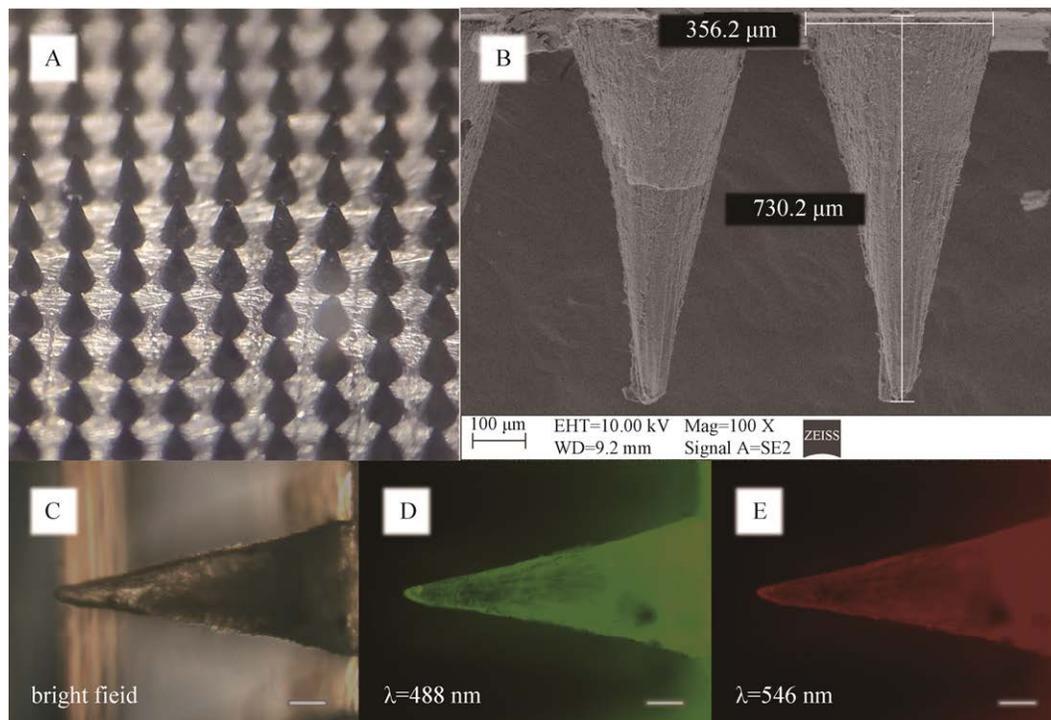


图 3 显微镜下的微针 A: 体式显微镜下的 HA 微针; B: 扫描电子显微镜下的 HA 微针; C-E: 负载 FITC 标记的 m-INS 和 Cy5 标记的 m-GOx 的 HA 微针 (bar=100 μm)

Figure 3 Microneedle under microscope. (A) HA microneedles under stereomicroscope. (B) HA microneedles under scanning electron microscope. (C-E) HA microneedles loading FITC-m-INS and Cy5-m-GOx (bar = 100 μm).

互作用增强了材料的强度^[13]。用 FITC 标记 INS, 用 Cy5 标记 GOx, 按同样步骤制备载药微针, 在倒置荧光显微镜下观察结果如图 3C–3E 所示, 微针针体饱满, 形态规则, 在 488 nm 激发波长下能看到强烈的绿色荧光, 在 546 nm 激发波长下能看到强烈的红色荧光, 表明 FITC-m-INS 和 Cy5-m-GOx 在微针中均匀分布。

2.4 负载 m-INS/m-GOx 的 HA 微针调控血糖

4–6 周龄雄性 SD 大鼠按 55 mg/kg 的量经腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 以建立 1 型糖尿病大鼠模型, 注射后大鼠的血糖持续升高, 10 d 后平均血糖稳定在 21.7 mmol/L 左右, 明显高于 3.9–6.1 mmol/L 的正常范围, 证明成功构建了 1 型糖尿病 SD 大鼠模型。

将糖尿病鼠随机分为 4 组, 每组 3 只, 分别给以 HA/MN、INS/MN、m-INS/MN 和 m-INS/m-GOx/MN 贴在大鼠皮肤表面。为了防止脱落, 微针刺入皮肤后用 PU 胶固定, 如图 4A 和 4B 所示。36 h 后观察大鼠皮肤表面无创口, 无红肿发炎等情况。如图 4C 所示, HA/MN 组和 m-INS/MN 组的大鼠血糖浓度几乎不变, INS/MN 组和 m-INS/m-GOx/MN 组的血糖均在 1 h 内下降到了 6–7 mmol/L, 说明 HA 微针成功地把胰岛素递送到了大鼠体内。INS/MN 组在 6 h 后血糖恢复到了 19.3 mmol/L。m-INS/m-GOx/MN 组在给药 10 h 后血糖仍维持在较低的 11.3 mmol/L, 在 36 h 内均低于对照组 (HA/MN), 说明相对于单纯的胰岛素给药来说, 由 m-INS 和 m-GOx 组成的胰岛素智能给药系统降糖药效更持久, 药物利用率更高。

2.5 m-INS/m-GOx/MN 给药后糖尿病大鼠的葡萄糖耐受性

INS/MN 和 m-INS/m-GOx/MN 分别作用于 3 只糖尿病大鼠, 1 h 后血糖接近正常范围后, 再给以 1.5 g/kg 的葡萄糖溶液腹腔注射, 健康

组 3 只被直接注射葡萄糖溶液。由图 5A 可以看出, 注射葡萄糖后大鼠血糖均出现升高, 其中健康组大鼠血糖在 20 min 达到峰值 14.0 mmol/L 后快速下降, 在 150 min 时恢复到了正常水平, m-INS/m-GOx/MN 组血糖在 40 min 时达到峰值 16.3 mmol/L, 然后缓慢下降并在 150 min 后维持在较低水平的 11.1 mmol/L 左右, 而 INS/MN 组血糖升高后则一直维持在较高的水平。图 5B 葡萄糖耐受实验 0–150 min 的血糖浓度曲线下面面积积分结果表明, 相对于 INS/MN 组, 健康组和 m-INS/m-GOx/MN 组的葡萄糖耐受性明显更强。

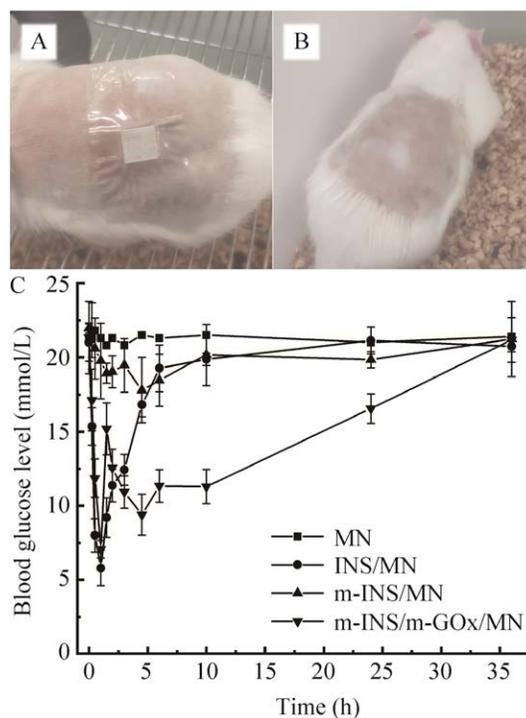


图 4 微针给药动物实验 A: 微针给药时的糖尿病大鼠照片; B: 微针给药 36 h 后的糖尿病大鼠照片; C: 负载不同药物成分的微针降糖效果

Figure 4 Animal experiments treated with microneedles. (A) Diabetic rats treated with microneedles. (B) Diabetic rats treated with drug-loaded microneedles for 36 hours. (C) Hypoglycemic effect of microneedle loaded with different drug components.

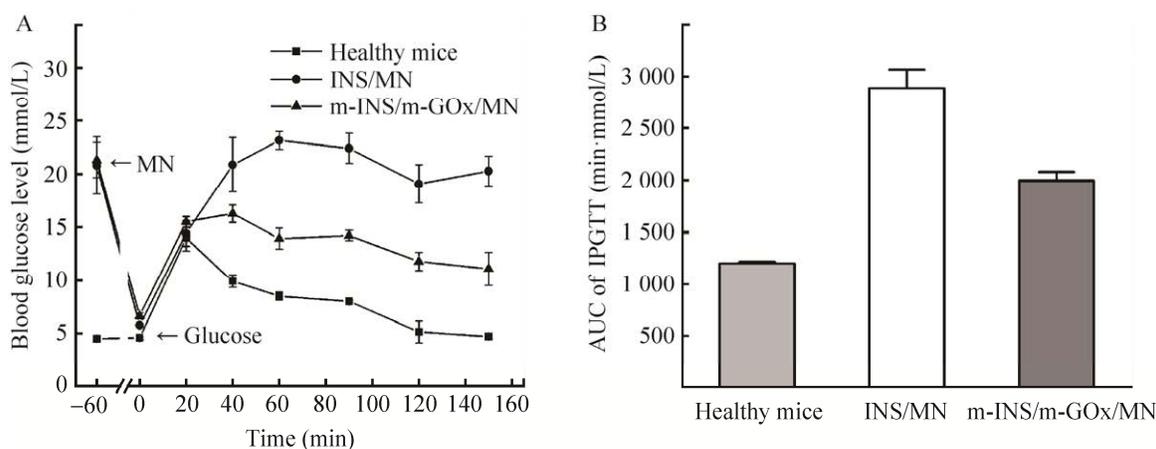


图5 腹腔内葡萄糖耐受实验 A: 血糖浓度变化曲线; B: 葡萄糖耐受实验的曲线下面积

Figure 5 Intraperitoneal glucose tolerance test. (A) Blood glucose concentration curve. (B) Area under the curve of the glucose tolerance test.

3 讨论

为了解决直接注射胰岛素所带来的问题,近年来,学者们提出了诸多方案,如将胰岛素封装在一个缓释体系中,通过微针递送药物,再根据血糖的变化来释放胰岛素的策略受到了人们的关注。但这些方案中的核心药物成分往往存在着成分过于复杂、合成过程繁琐、制备效率低、成本高等问题,难以实现产业化。本研究以一种简单的方法制备了一种具有酸响应能力的胰岛素-磷酸钙复合物,该复合物制备流程简单,药物利用率高,安全且有效,具备放大生产的商业化潜力。

其中,磷酸钙是一种 pH 敏感的生物材料,在酸性条件下能自发溶解^[14],也常常作为骨水泥的成分用于成骨修复^[15],具有良好的生物相容性。选择磷酸钙作为无机盐成分,利用胰岛素分子中含有的酸性氨基酸残基(8个谷氨酸 Glu, 2个天冬氨酸 Asp),在 Ca^{2+} 饱和的环境中酸性氨基酸残基中的羧基会与 Ca^{2+} 螯合^[16],当体系中引入磷酸根后,会在胰岛素分子表面形

成晶核,之后胰岛素被磷酸钙包裹进一步形成微晶^[17]。过饱和的环境使得磷酸钙晶体不断各向异性生长,小晶体之间不断集聚并沉淀析出矿化胰岛素。矿化胰岛素呈不定型的聚集状团簇,形成介晶,尺寸在稳定在 1–1 000 nm 之间^[18–19]。由此构建的 m-INS 具有良好的 pH 响应性能,在 pH 为 7.4 的生理环境中能保持稳定,同时在酸性环境中随着磷酸钙的溶解可有效地释放出 INS, m-INS 的这种酸响应特性在胰岛素智能释放系统中有很大的应用潜力。

类似地, m-GOx 由 GOx 和 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 组成“酶-无机杂化”的结构^[20],这种无机盐与酶共嵌入的策略既提高了酶的催化效率,又保持了酶的活性,常常用于酶的固定化,在催化、分析科学等领域得到了广泛应用^[21]。m-GOx 可将葡萄糖氧化成葡萄糖酸,从而将葡萄糖浓度信号转化成 pH 信号,进而调节 m-INS 释放,在模拟葡萄糖浓度环境中,该系统表现出来很强的葡萄糖浓度识别能力和良好的响应释放能力。

利用 HA 微针作为载体,可有效负载 m-INS

和 m-GOx, 通过皮肤穿刺后, HA 溶解于组织液中, 逐步暴露出负载的 m-INS 和 m-GOx。m-GOx 将从毛细血管中扩散出来的葡萄糖催化氧化生成葡萄糖酸, 使局部组织 pH 下降, 形成酸性环境, m-INS 中的胰岛素被释放出来, 胰岛素促进了机体对葡萄糖的摄取利用, 从而达到降低血糖浓度的效果。当血糖浓度恢复到正常范围后, 较低的葡萄糖浓度不足以形成酸性环境, 尚未反应的 m-INS 被保留下来, 直到下一次刺激信号的出现, 由此实现动态检测血糖的作用和多次按需给药的目标, 能较长时间动态监控和调节血糖浓度。相对于直接负载胰岛素的 HA 微针来说, 负载 m-INS 和 m-GOx 的微针体系具有更长的药效、更强的葡萄糖耐受性和更小的低血糖风险。

4 结论

可溶性透明质酸微针负载药物构建的具有血糖响应性的胰岛素智能释放系统应用于临床糖尿病治疗具有明显的优势。研究结果验证了由 m-INS 和 m-GOx 所构建的胰岛素给药系统具有良好的血糖浓度识别能力和响应释放能力。HA 微针能有效将胰岛素给药系统递送到大鼠皮下, 安全、有效地降低糖尿病大鼠的血糖浓度, 提高其葡萄糖耐受能力, 不至于引发低血糖风险, 具有替代注射胰岛素的方式应用于糖尿病治疗的潜力。

REFERENCES

- [1] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.
- [2] Valerón PF, de Pablos-Velasco PL. Limitations of insulin-dependent drugs in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin (Barc)*, 2013, 141(Suppl 2): 20-25.
- [3] Perreault L, Vincent L, Neumiller JJ, et al. Initiation and titration of basal insulin in primary care: barriers and practical solutions. *J Am Board Fam Med*, 2019, 32(3): 431-447.
- [4] Shah S, Sharma SK, Singh P, et al. Consensus evidence-based guidelines for insulin initiation, optimization and continuation in type 2 diabetes mellitus. *J Assoc Physicians India*, 2014, 62(7 Suppl): 49-54.
- [5] Hoang MT, Ita KB, Bair DA. Solid microneedles for transdermal delivery of amantadine hydrochloride and pramipexole dihydrochloride. *Pharmaceutics*, 2015, 7(4): 379-396.
- [6] Chong RHE, Gonzalez-Gonzalez E, Lara MF, et al. Gene silencing following siRNA delivery to skin via coated steel microneedles: *in vitro* and *in vivo* proof-of-concept. *J Control Release*, 2013, 166(3): 211-219.
- [7] Jun H, Han MR, Kang NG, et al. Use of hollow microneedles for targeted delivery of phenylephrine to treat fecal incontinence. *J Control Release*, 2015, 207: 1-6.
- [8] Caffarel-Salvador E, Tuan-Mahmood TM, McElnay JC, et al. Potential of hydrogel-forming and dissolving microneedles for use in paediatric populations. *Int J Pharm*, 2015, 489(1/2): 158-169.
- [9] Cole G, McCaffrey J, Ali AA, et al. Dissolving microneedles for DNA vaccination: improving functionality via polymer characterization and RALA complexation. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(1): 50-62.
- [10] Yu WJ, Jiang GH, Liu DP, et al. Fabrication of biodegradable composite microneedles based on calcium sulfate and gelatin for transdermal delivery of insulin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 71: 725-734.
- [11] Zhu ZZ, Luo HF, Lu WD, et al. Rapidly dissolvable microneedle patches for transdermal delivery of exenatide. *Pharm Res*, 2014, 31(12): 3348-3360.
- [12] Chen MC, Ling MH, Lai KY, et al. Chitosan microneedle patches for sustained transdermal delivery of macromolecules. *Biomacromolecules*, 2012, 13(12): 4022-4031.
- [13] Nonoyama T, Wada S, Kiyama R, et al. Double-network hydrogels strongly bondable to bones by spontaneous osteogenesis penetration. *Adv Mater*, 2016, 28(31): 6740-6745.

- [14] Alam MM, Han HS, Sung S, et al. Endogenous inspired biomineral-installed hyaluronan nanoparticles as pH-responsive carrier of methotrexate for rheumatoid arthritis. *J Control Release*, 2017, 252: 62-72.
- [15] 李晓玉, 李光大, 赵三团, 等. 载丹皮酚透钙磷石骨水泥的制备与表征. *中国组织工程研究*, 2018, 22(10): 1499-1505.
Li XY, Li GD, Zhao ST, et al. Preparation and characterization of paeonol loaded brushite calcium phosphate cement. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22(10): 1499-1505 (in Chinese).
- [16] Matsumoto N, Yoshida K, Hashimoto K, et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite using polymerized complex method by chelation of calcium ions with organic phosphonic acid. *J Ceram Soc Japan*, 2009, 117(1363): 249-254.
- [17] Tsubery H, Mironchik M, Fridkin M, et al. Prolonging the action of protein and peptide drugs by a novel approach of reversible polyethylene glycol modification. *J Biol Chem*, 2004, 279(37): 38118-38124.
- [18] Xu AW, Ma YR, Cölfen H. Biomimetic mineralization. *J Mater Chem*, 2007, 17(5): 415-449.
- [19] Cölfen H, Mann S. Higher-order organization by mesoscale self-assembly and transformation of hybrid nanostructures. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42(21): 2350-2365.
- [20] Ge J, Lei JD, Zare RN. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7(7): 428-432.
- [21] Sun JY, Ge JC, Liu WM, et al. Multi-enzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor. *Nanoscale*, 2014, 6(1): 255-262.

(本文责编 陈宏宇)