

阳离子载基因 MePEG-PLGA 纳米粒的制备及优化处方的筛选

刘菲菲, 龙大宏

(广州医学院人体解剖学教研室, 广东 广州 510182)

【摘要】 目的 建立纳米粒沉淀法制备阳离子甲氧基封端的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸嵌段聚合物(MePEG-PLGA) 纳米粒的方法。方法 本研究利用单因素设计和正交实验选定最优实验方案,并对纳米粒的物理性质如表面形态,粒径分布、Zeta 电位、DNA 结合率,保护 DNA 能力进行考察。结果 最优条件制备得到的纳米粒粒径大小为 89.7 nm,表面电位为 28.3 mV,透射电镜下的纳米粒颗粒分散,大小均匀,表面光滑,呈球形分布,DNA 结合率为 80%,并能很好地保护所载基因不受核酸酶降解。结论 利用纳米粒沉淀法制备得到的阳离子纳米粒有望成为高效的基因载体。

【关键词】 聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物; 聚乙二醇; 十六烷基三甲基溴化铵; 纳米粒沉淀法

Preparation and selection of optimization of cationic gene loaded MePEG-PLGA nanoparticles LIU Fei-fei, LONG Da-hong. Department of Human Anatomy of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China

【Abstract】 Objective To develop a nanoprecipitation method for preparation of cationic monomethoxy (polyethylene glycol)-poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. **Methods** This studies aimed to select the best preparation solution of MePEG-PLGA nanoparticles by single factor investigation and orthogonal experiment, and to conduct investigations the physical properties such as surface morphology, particle size distribution, Zeta potential, DNA binding efficiency, DNA protection ability. **Results** The average particle size by optimal conditions was 89.7 nm, Zeta potential was 28.3 mV. Nanoparticles under the electron microscope were particles dispersed, size uniform, smooth, spherical distribution. DNA binding efficiency was 80%, and DNA-MePEG-PLGA-NPs may very well protect gene from nuclease degradation. **Conclusion** The preparation of cationic nanoparticles by nanoprecipitation were expected to be efficient gene vectors.

【Key words】 Poly (D,L-lactide-co-glycolide); Polyethylene glycol; Cetyl trimethyl ammonium bromide; Nanoprecipitation

研究发现, 神经营养因子类 (neurotrophic factors, NTFs) 药物有促进和维护神经元生长、存活、分化和执行功能的作用,能有效改善阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 症状。但目前 NTFs 药物未能在临床治疗中应用,因为 NTFs 难以通过血脑屏障,经常性的脑内注射给药有导致颅内新的损害或感染的可能。

转基因治疗已越来越多得受到人们的关注,但基因治疗的载体问题,以及载体相关的免疫反应、细胞毒性与安全性问题是限制基因治疗发展和临床应用的瓶颈^[1]。基因载体必须具备安全、稳

定、转染率高等特点。非病毒载体与病毒载体相比具有无免疫原性,无遗传毒性等优势^[2]。纳米载体由于其特有的优点如结构可设计性、粒径可控性、缓释性、具备较小粒径等,已越来越多地受到人们的研究和关注^[2-3]。研究表明,当纳米粒粒径小于 100 nm 时,其转染效率相对大于 100 nm 的纳米粒高 27 倍^[4]。

高分子聚合物聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物 [poly (D,L-lactide-co-glycolide), PLGA] 是经美国 FDA 批准用于人体的生物可降解、生物相容的材料^[5],广泛用于组织工程及药物载体研究中,具有支架和缓释的双重作用,有作为质粒 DNA 控释系统的潜在价值。然而,PLGA 的疏水性限制了它的优势。聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是非离子型亲水片段,是最常用亲水性修饰分子,生物相

基金项目:广东省自然科学基金(9151063101000016);广州市科技局应用基础研究计划项目(2009J1-C361-2)

通信作者:龙大宏, E-mail: dahonglong88@yahoo.com.cn

容性优良,亲水性较强,细胞穿透性较高,体内无毒,无免疫原性^[6],已被 FDA 批准用于人体。在疏水性 PLGA 分子中引入亲水性 PEG 链段可以改善聚合物的亲水性和柔顺性,增强粒子稳定性与抗酶活性,改良与细胞成分的相互作用。同时,PEG 形成的亲水微环境,可提高 DNA 装载效率,有利于基因类药物活性保持。十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)属阳离子表面活性剂,有良好的稳定性及生物降解性。利用 CTAB 修饰 MePEG-PLGA 纳米粒,可以使纳米粒表面带上正电荷,以便高效结合带负电荷的 DNA^[7-8]。

制备聚合物纳米粒的方法众多,本研究选取纳米粒沉淀法^[9-10]。这一方法不需要借助超声、高速剪切等外力,也不会引入高温、有毒有机溶剂等因素,有利于保持生物敏感大分子的生物活性^[11]。阳离子 MePEG-PLGA 纳米粒具有以下优点:属生物可降解材料,中间代谢产物(乳酸和乙醇酸)及最终降解产物(CO₂和 H₂O)对细胞也无毒性;无免疫原性,不会引起免疫反应;由于表面带正电荷,可以吸附并浓缩 DNA,并保护基因不被降解;较大的表面积,有利于 DNA 的吸附和解聚;较小的粒径,有望通过胞吞作用进入细胞。阳离子 MePEG-PLGA 纳米粒成为高效无毒的新型基因载体。本研究旨在考察不同因素对纳米粒粒径的影响,并选取最优方案,为下一步转染细胞做准备。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

琼脂糖(BIOWEST, 西班牙);MePEG-PLGA(山东岱罡生物科技有限公司);CTAB(Amersco, 美国);DNase I(Biosharp, 日本);恒温空气振荡浴(哈尔滨东明医疗);超声波细胞粉碎机(Scientz-D, 宁波新芝);磁力搅拌器(IKA, 德国);低温高速离心机(Sigma, 德国);透射电子显微镜(JEM-2010, 日本);粒度分析仪(Zetasizer Nano-ZS90, 英国马尔文公司);紫外分光光度计(HITACHI, 日本);微量移液器(eppendorf, 德国)。

1.2 阳离子 MePEG-PLGA 纳米粒的制备

采用纳米粒沉淀法^[12-13]制备阳离子 MePEG-PLGA 纳米粒(以下简称 MePEG-PLGA-NPs)。操

作如下:精密称取处方量的 MePEG-PLGA,超声溶于一定体积的丙酮中,将该聚合物溶液用 9 号针头以一定的流速滴加到磁力搅拌下的 20 mL 一定浓度的 CTAB 乳化剂水溶液中,室温下继续搅拌过夜,使有机溶剂挥发完全,15 000 r/min(约 20 000 g),20 ℃离心 20 min,双蒸水洗一次除去多余的乳化剂,后将沉淀悬浮于双蒸水中,5 000 r/min(约 2 200 g)离心 10 min,弃沉淀中的大颗粒,上清即 MePEG-PLGA-NPs 混悬液。

1.3 MePEG-PLGA 纳米粒最优处方的筛选

1.3.1 单因素考察 根据课题组以往的实验结果,选择可能影响纳米粒大小的因素,进行单因素分析:MePEG-PLGA 浓度(A, mg/mL, 在油相中),CTAB 浓度(B, w/v),注射速度(C, mL/min),磁力搅拌速度(D, r/min)和体积(E, mL),每个因素选 5 个水平(表 1)。

1.3.2 正交设计 根据单因素实验得到的结果,选择 MePEG-PLGA 浓度(A, mg/mL, 油相中),CTAB 浓度(B, w/v),注射速度(C, mL/min)和磁力搅拌速度(D, r/min)4 个因素,每个因素各取 3 个水平按照 L₉(3⁴)正交实验设计表设计实验,以纳米粒粒径为评价指标对各个处方进行综合评定,正交设计因素水平表见表 2。

1.3.3 重现性考察 按优化处方制备 3 批样品,分别测定其平均粒径和 Zeta 电位,考察优化处方的稳定性。

1.4 阳离子载基因 MePEG-PLGA 纳米粒的制备

1.4.1 载基因纳米粒的制备 精密量取适量 DNA 溶液和 MePEG-PLGA 纳米粒,使 DNA 与纳米粒质量比为 1:100,旋涡振荡 5 s 混合均匀,室温孵育 20 min,即得到阳离子载基因 MePEG-PLGA 纳米粒(以下简称为 DNA-MePEG-PLGA-NPs),0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 结合效果。

1.4.2 DNA 结合率的测定 精密量取 DNA-MePEG-PLGA-NPs 200 μL,低温高速离心(15 000 r/min, 20 000 g, 4 ℃)20 min 后,吸取上清 100 μL,采用紫外分光光度法测定上清液中游离 DNA 的浓度(以空白纳米粒上清液扣除空白),按公式“DNA 结合率=(总的 DNA 量-游离 DNA 量)/总的 DNA 量×100%”计算 DNA 结合率。

1.5 纳米粒的形态观察、粒径和表面电位的测定

采用透射电子显微镜观察纳米粒形态,具体方法:分别取制得的 MePEG-PLGA-NPs 和 DNA-

MePEG-PLGA-NPs 混悬液少许,滴至铺有碳膜的电镜铜网上,静置 40 s,用滤纸吸去余的混悬液,再滴加质量浓度为 2% 磷钨酸(溶于 PBS 中)负染 30 s,自然干燥后,放入透射电镜下观察纳米粒的形态并拍照。采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定纳米粒的粒径分布及 Zeta 电位:取纳米粒混悬液适量,经适当稀释后用 Zetasizer Nano-ZS90 粒度分析仪测定,动态光散射软件数据处理,记录平均粒径、多分散性指数及 zeta 电位。

1.6 DNA-MePEG-PLGA-NPs 抗核酸酶能力考察

保护质粒 DNA 免受核酸酶降解是基因载体有效的体内外基因传输的必要性质之一。精密量取 50 μ L DNA-MePEG-PLGA-NPs (含质粒 DNA 1 μ g),加入 5.5 μ L DNase I Buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂, pH 7.6),混匀,然后加入 0.05 U/ μ L DNase I 的 0.9% NaCl 溶液 2 μ L (0.1 U/ μ g DNA),混匀。另取裸 DNA 1 μ g,加入 5 μ L DNase I Buffer 以及 0.05 U/ μ L DNase I 的 0.9% NaCl 溶液 2 μ L (0.1 U/ μ g DNA),混匀。将混合体系置于 37 $^{\circ}$ C 空气浴恒温振荡器上孵育 30 min (100 r/min),之后加入 5 μ L EDTA (0.5 mol/L, pH 8.0) 室温放置 15 min 终止反应,纳米粒组加入终浓度为 0.1% 的肝素^[14-15]于 37 $^{\circ}$ C 水浴恒温振荡 3.5 h (100 r/min),置换抽提体系中的 DNA,与裸 DNA 同时进行琼脂糖凝胶 (0.8%) 电泳阻滞分析 (90 V, 25 min),分析纳米粒载体对所载基因的保护能力。

2 结果

2.1 单因素考察结果

单因素考察结果表明随着有机溶剂中 MePEG-PLGA 浓度的增大,纳米粒粒径逐渐增加。但聚合物材料用量过少时,纳米粒产量较低;用量过高时,纳米粒粒径较大,且易于出现团聚现象。CTAB 是一种阳离子表面活性剂,在一定范围内,提高 CTAB 浓度能够明显降低纳米粒的粒径,而进一步增加其浓度,纳米粒粒径会增大。纳米粒粒径随滴注速度的增加而增大,其中滴注速度为 1 mL/min 与 2.5 mL/min 时纳米粒粒径差异不大。磁力搅拌速度对纳米粒粒径有一定的影响,纳米粒粒径随磁力搅拌速度的增大而降低,然而,透射电镜下发现,搅拌速度达 300 r/min 以上时制得的纳米粒边缘有部分破损,形态不完整。处方中的丙酮用量显著影响纳米粒的粒径大小,但当丙酮体积由 5 mL 增加至 7 mL,纳米粒粒径降低不明显,且需要更长时间挥发有机溶剂,故选 5 mL 体积为最优条件。单因素考察实验各实验组纳米粒粒径结果见表 3。

2.2 正交设计结果

在单因素考察的基础上,采用正交设计对纳米粒处方进行优化,以制备粒径较小,正电荷适中的阳离子 MePEG-PLGA-NPs。根据极差 R,4 个因素对纳米粒粒径大小影响的顺序为 A > D > C > B,其中各因素水平分析结果为 A:3>2>1;B:3>2>

表 1 单因素考察水平表

	A(mg/mL)	B(% , w/v)	C(mL/min)	D(r/min)	E(mL)
1	5	0.1	1	50	0.5
2	10	0.25	2.5	100	1
3	15	0.5	5	200	3
4	20	1	7.5	300	5
5	25	2	10	400	7

表 2 正交设计因素与水平

	A(mg/mL)	B(% , w/v)	C(mL/min)	D(r/min)
1	10	0.25	2.5	100
2	15	0.5	5	200
3	20	1	7.5	300

1;C:1>2>3;D:1>2>3,最佳处方应为 A1B1C3D3。实验中发现,CTAB 的浓度不是影响纳米粒粒径大

小的关键因素,却显著影响着纳米粒 Zeta 电位。为了获得粒径较小且 Zeta 电位较高的阳离子 MePEG-PLGA-NPs,选定 CTAB 的浓度为 0.5%,这样得到的最优处方即为 A1B2C3D3。正交结果见表 4。按最优处方制备 3 批样品,分别测定其平均粒径和 Zeta 电位,结果表明,利用正交设计优化的最佳处方具有较好的处方稳定性。结果如表 5 所示。

表 3 单因素考察结果

(n = 3)

	The average size of the nanoparticles (nm)				
	A (mg/mL)	B (w/v)	C (mL/min)	D (r/min)	E (mL)
1	85.1±3.8	314.8±10.9	78.9±3.8	355.5±9.2	313.8±10.8
2	173.2±5.6	178.2±6.0	114.3±2.9	307.2±9.8	268.5±6.8
3	219.4±4.8	213.8±6.4	208.2±6.6	208.5±5.9	228.1±6.4
4	265.7±8.7	241.6±7.8	238.1±7.4	167.0±4.9	163.2±4.4
5	380.7±13.4	282.5±8.5	286.4±9.2	113.3±3.0	156.0±4.4

2.3 纳米粒形态、粒径和表面电位的测定

制备得到的纳米粒粒径分布见图 1, 平均粒径为 86.1 nm, 粒径分布均匀, 分布指数为 0.135, Zeta 电位为 27.9 mV, 表明纳米粒表面有较高的正电荷, 有望高效结合带有负电荷的质粒 DNA。吸

附质粒 DNA 后的纳米粒平均粒径为 103.3 nm, 分布指数为 0.222, Zeta 电位为 14.1 mV。MePEG-PLGA-NPs 和 DNA-MePEG-PLGA-NPs 的透射电镜照片如图 2 所示, 纳米粒形态呈规则的球体或接近球体。

表 4 L9(34) 正交实验设计表及结果

(n = 3)

Test NO.	A	B	C	D	Average size (nm)
1#	1	1	1	1	241.0±7.4
2#	1	2	2	2	170.4±5.9
3#	1	3	3	3	113.5±3.4
4#	2	1	2	3	214.6±6.4
5#	2	2	3	1	270.8±8.5
6#	2	3	1	2	304.1±10.3
7#	3	1	3	2	232.4±6.4
8#	3	2	1	3	279.7±10.0
9#	3	3	2	1	355.9±8.1
K1	175.0	229.4	275.0	289.3	
K2	263.2	240.3	247.0	235.6	
K3	289.3	257.8	205.6	202.6	
R	114.3	28.4	69.4	86.7	

2.4 DNA 结合率及凝胶电泳阻滞实验

采用紫外分光光度计测定并计算得到 DNA 结合率为 80.0%。电泳结果如图 3 所示, 质粒 DNA 与 MePEG-PLGA-NPs 结合后滞留在加样孔中, 前方几乎没有游离 DNA, 表明 DNA 与 MePEG-PLGA-NPs 结合比较完全, 并形成较为稳定的 DNA-MePEG-PLGA-NPs, 与紫外分光法测定

的 DNA 结合一致。

2.5 DNA-MePEG-PLGA-NPs 抗核酸酶能力

经肝素素抽提的纳米粒组与未经处理的裸质粒 DNA 同时进行凝胶电泳, 结果如图 4 所示, DNA-

表 5 优化处方的重复性实验结果

Batch	Average size (nm)	Zeta potential (mV)
1	85.1	27.9
2	86.1	27.9
3	89.7	28.3

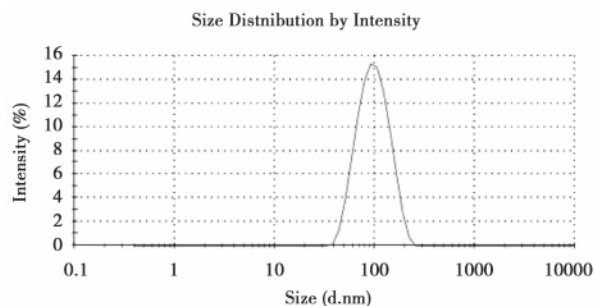


图 1 MePEG-PLGA-NPs 粒径分布图

MePEG-PLGA-NPs 在 37 °C 与 DNase I 孵育 30 min 后仍能保持较完整的结构, 而裸 DNA 被全部降

解, 这显示了 DNA-MePEG-PLGA-NPs 能较好得保护所载 DNA 不被 DNase I 降解。

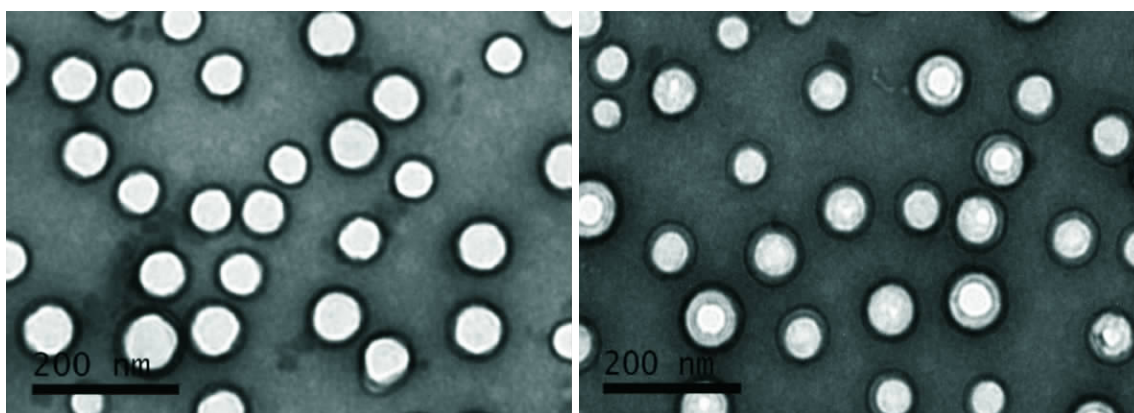


图 2 MePEG-PLGA-NPs 和 DNA-MePEG-PLGA-NPs 的透射电镜照片 ($\times 59000$)

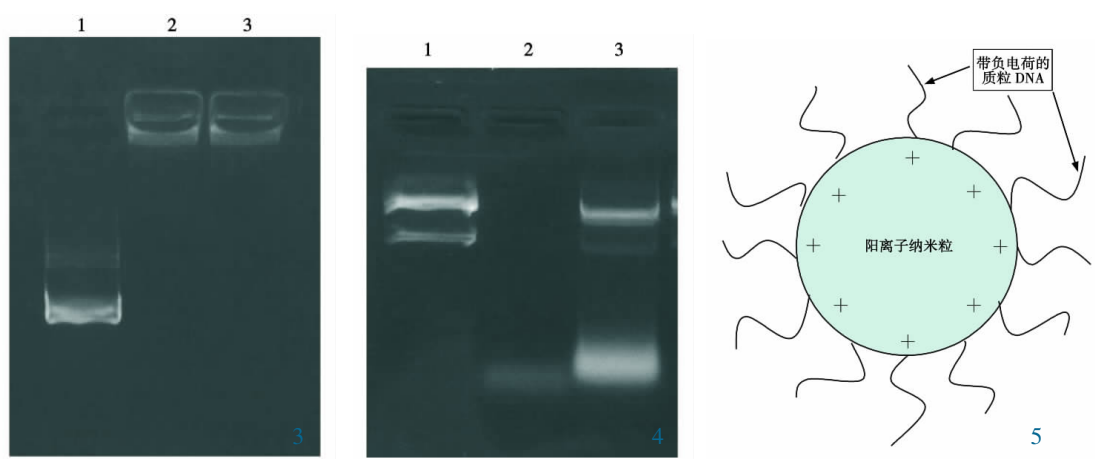


图 3 MePEG-PLGA-NPs 结合 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图

图 4 DNA-MePEG-PLGA-NPs 与 DNase I 孵育后的琼脂糖凝胶电泳图

图 5 DNA-MePEG-PLGA-NPs 结构原理图

3 讨论

利用纳米粒沉淀法制备的阳离子 MePEG-PLGA-NPs, 工艺简单, 粒径大小可控, 重现性好, 性能稳定, 并有一定的可能性来实现扩大生产。

单独使用丙酮作为有机溶剂, 与同时使用丙酮与二氯甲烷两种有机溶剂相比^[3], 不会引入有毒的二氯甲烷, 而且丙酮与水的界面张力较小, 当把混有 MePEG-PLGA 的丙酮在搅拌下注入 CTAB 水溶液中, 有机溶剂能迅速穿透界面, 有利于形成更小的乳滴, 而有机相中的聚合物也随之向界面迁移、沉淀, 最终形成更小的纳

米粒子。

与单独使用 PLGA 制备得到的纳米粒相比, MePEG-PLGA 分子有一个亲水端和一个疏水端, MePEG-PLGA-NPs 更稳定^[16]。MePEG 的嵌入改变了 PLGA 的亲水性的柔和性^[17], 可以在纳米粒表层形成一层亲水的壳层, 阻止纳米粒子的团聚, 增加稳定性。而且外围的 MePEG 分子保护 PLGA 的羟基不暴露纳米粒表面, 与 PLGA 纳米粒相比大大提高了纳米粒的表面电位, 纳米粒表面正电位越高就越有能力吸附带负电荷的 DNA。

阳离子表面活性剂 CTAB 修饰的 MePEG-PLGA-NPs 有较高的表面电位, 使纳米粒有能力吸

附更多带负电荷的质粒 DNA, 吸附 DNA 后的 DNA-MePEG-PLGA-NPs 表面也带有较高的正电荷, 使纳米粒易于与细胞表面的一些糖基磷酸基结合, 为 DNA-MePEG-PLGA-NPs 识别并进入细胞做准备。采用纳米粒沉淀法制备的纳米粒粒径大小与现在通常用的病毒颗粒载体接近, 这一特性使纳米粒通过胞吞作用进入细胞成为可能。另外, DNA 结合实验和保护 DNA 不被 DNase I 降解实验表明, 纳米粒的表面支架结构可以牢牢吸附并浓缩质粒 DNA, 并使 DNA 处于纳米粒支架结构内部, 不被核酸酶识别, 避免被降解。

阳离子 MePEG-PLGA-NPs 与质粒 DNA 结合后的结构可以用图 5 表示。带正电荷的纳米粒与带负电荷的质粒 DNA 构成核-壳结构, 纳米粒是核, 而 DNA 吸附在阳性纳米粒的表面形成一个外壳。另外, 在图 1 中也可以看到 DNA-MePEG-PLGA-NPs 有明显的核壳结构, 支持了这一推论。

另外, 在多次实验中发现, 温度对纳米粒的形成也有一定的影响。温度较高的时候, 形成的纳米粒形状不规则, 粒径大小不均, 有粘附和团聚现象, 推测原因可能是温度影响有机溶剂的疏水作用和挥发速度, 所以制备条件保持在一定温度以下对纳米粒的形成也是必备的。

参 考 文 献

1. 杨健, 朱敦皖, 冷希岗, 等. 非病毒型基因载体的生物安全性. 生物医学工程学杂志, 2008, 25(1): 215-219.
2. Luten J, van Nostrum CF, De Smedt SC, et al. Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery. *J Control Release*, 2008, 126(2): 97-110.
3. 梅林, 龙大宏, 黄婉丹, 等. 载牛血清蛋白的 PLGA 纳米粒制备工艺的优化及特性研究. 解剖学研究, 2010, 32(1): 1-5.
4. Prabha S, Zhou WZ, Panyam J, et al. Size dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm*, 2002, 244(1-2): 67-75.
5. Lemoine D, Francois C, Kedzierewicz F, et al. Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D, L-lactide) and poly(D, L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, 1996, 17(22): 2191-2117.
6. Chen J, Tian B, Yin X, et al. Preparation, characterization and transfection efficiency of cationic PEGylated PLA nanoparticles as gene delivery systems. *Biotechnology*, 2007, 130(2): 107-113.
7. Sumit C P, Ravikumar C, Ashok K V, et al. Enhanced immune response of DNA vaccine (VP1-pCDNA) adsorbed on cationic PLG for foot and mouth disease in guinea pigs. *Virus Genes*, 2008, 37: 81-87.
8. Ashwim B, Jagdish S. Poly(lactide-co-glycolide)-polymer-thacrylate nanoparticles for intramuscular delivery of plasmid encoding interleukin-10 to prevent autoimmune diabetes in mice. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26(1): 72-81.
9. Legrand P, Lesieur S, Bochot A, et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nano-precipitation. *Int J Pharm*, 2007, 344(122): 33-43.
10. Oster CG, Wittmar M, Bakowsky U, et al. DNA nano-carriers from biodegradable cationic branched polyesters are formed by a modified solvent displacement method. *J Controlled Release*, 2006, 111(3): 371-381.
11. Bilati U, Allemann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 24(1): 67-75.
12. 邹伟伟, 张娜. 纳米粒沉淀法制备阳离子载基因 MePEG-PLGA 纳米粒. 中国生化药物杂志, 2009, 30(1): 1-5.
13. Weiwei ZWW, Chunxi LCX, Na ZN, et al. Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA. *Nanoscale Res Lett*, 2009, 4: 982-992.
14. Maire'ad D, Bibby DC, Jones JC, et al. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. *Journal of Controlled release*, 2003, 92: 209-219.
15. Agarwal A, Vilensky R, Stockdale A, et al. Colloidally stable novel copolymeric system for gene delivery in complete growth media. *Journal of Controlled Release*, 2007, 121: 28-37.
16. Mainardes RM, Evangelista RC. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 290: 137-144.
17. 张勇, 袁超, 沈辉, 等. 改良自乳化溶剂挥发法制备 MePEG-PLGA 纳米粒的研究. 分析测试学报, 2008, 27(9): 960-963.

(收稿日期: 2010-11-10)