

文章编号: 1006-2858(2012)12-0917-06

PEG 化聚乳酸羟基乙酸纳米粒的抗黏性及 HeLa 细胞摄取

秦利芳¹, 林东海^{1*}, 李刚², 谢鑫鑫¹, 王俊腾¹, 闻真¹

(1. 烟台大学药学院, 山东烟台 264005; 2. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005)

摘要: 目的 制备单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸纳米粒(monomethoxy polyethylene glycol-poly-lactide-co-glycolic acid-nanoparticles, mPEG-PLGA-NPs) 并研究其理化性质及体外抗黏性能, 考察人宫颈癌细胞 HeLa 对 mPEG-PLGA-NPs 的摄取能力。方法 采用溶剂扩散法制备 mPEG-PLGA-NPs, 测定其平均粒径和 zeta 电位。采用黏蛋白结合法, 考察 mPEG-PLGA-NPs 的体外抗黏性能。以香豆素-6(coumarin 6) 为荧光标记物, 通过共聚焦显微镜及 HPLC 法进行 HeLa 细胞的体外摄取研究。结果 mPEG-PLGA-NPs 的平均粒径为(106.2 ± 4.3) nm, Zeta 电位为(-12.40 ± 0.11) mV。PLGA-NPs 的抗黏蛋白黏附率为 35.5%, 而 mPEG-PLGA-NPs 的抗黏蛋白黏附率为 92.5%, 比 PLGA-NPs 高 3 倍左右。相同孵育时间内, HeLa 细胞对 mPEG-PLGA-NPs 的摄取量是 PLGA-NPs 的近 2 倍, HeLa 细胞对 PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs 的摄取量与孵育时间成明显的依赖关系。结论 mPEG-PLGA-NPs 具有较强的抗黏性; HeLa 细胞对 mPEG-PLGA-NPs 的摄取明显高于 PLGA-NPs ($P < 0.01$), 表现出更好的细胞亲和性。

关键词: 单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸; 纳米粒; 抗黏性; HeLa 细胞; 细胞摄取
中图分类号: R 94 文献标志码: A

子宫颈癌是由人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV) 感染引起的妇科最常见的恶性肿瘤之一, 占女性生殖器官癌症的首位, 手术、放疗或化疗是其主要的治疗方式。手术治疗复发率高且伴有较多的并发症, 放疗对全身正常组织损伤较大, 对中晚期患者的治疗效果不佳。常规的口服、静脉注射等给药途径使得药物较均匀地分布到全身各脏器, 到达宫颈的药物浓度不高。因此, 一些疫苗及抗病毒药物疗法致力于直接传递药物至女性生殖器官的黏膜表面。黏膜给药可以诱导全身性的和黏膜表面的体液免疫, 是一种比免疫传递等给药更有益的局部给药途径^[1]。

女性宫颈黏膜表面覆盖着厚度达几十微米的黏液层。这种由黏蛋白等组成的, 具有黏附性和高黏弹性的黏液凝胶层, 可以防止病原体及各类毒素入侵黏膜上皮细胞, 具有机械、免疫、化学、生物屏障功能; 同时也可以通过黏附作用和空间阻碍迅速捕捉药物微粒载体, 并随着黏液的更新而清除, 使得黏膜给药的生物利用度较低^[2]。通过黏液黏附增加药物在黏膜滞留时间的黏膜黏附制

剂(mucoadhesive) 由于缺乏黏膜黏附的特异性, 易过早地随着黏液的更新而被清除。因此, 增强黏液穿透能力对于药物微粒载体在黏液中的均匀有效扩散有着很重要的意义。近来国外学者发现聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG) 修饰可以降低微粒载体的黏附性, 提出了一种能够迅速穿过黏液层到达黏膜上皮细胞的药物微粒传递系统—穿透黏液粒子(mucus penetrating particles, MPP), 进而改善药物在黏膜的吸收及局部治疗作用^[3-6]。

本文作者以聚乳酸-羟基乙酸(poly-lactide-co-glycolic acid, PLGA) 及 PEG 共价键修饰的 PLGA 为载体材料研究制备了纳米粒子(nanoparticles, NPs)—PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs, 采用黏蛋白结合法^[7]考察了纳米粒的体外抗黏性能; 通过共聚焦显微镜等方法, 研究了香豆素-6(coumarin 6) 为荧光探针的 PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs 被人宫颈癌 HeLa 细胞摄取的能力, 为研制能够避免宫颈黏液黏附, 到达黏膜上皮细胞进而被细胞摄取的药物微粒载体奠定实验基础。

收稿日期: 2012-06-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973949); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2009CM012)

作者简介: 秦利芳(1988-), 女(汉族), 山东莱芜人, 硕士研究生, E-mail qlf_hi@126.com; * 通讯作者: 林东海(1954-), 男(汉族), 广东普宁人, 副教授, 主要从事药物传递系统研究, Tel. 0535-6706022, E-mail ldh@ytu.edu.cn。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Nicomp 380ZLS 激光粒度仪(美国 PSS NICOMP 公司), JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所), S-4800 冷场发射扫描电镜(日本株式会社), Olympus FV1000 共聚焦显微镜、1 × 71 倒置显微镜(日本 Olympus 公司), B × 51 荧光显微镜(日本 Nikon 公司), Micro 21R 高速离心机(美国 Thermo 公司), Forma Series II 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司), Synergy HT 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司), 多孔板(美国 Nalge Nunc 公司)。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA, $M_r = 18\ 000$, $m(\text{LA}) : m(\text{GA}) = 75 : 25$), 单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物(mPEG-PLGA, mPEG 相对分子质量 2 000, 济南岱罡生物科技有限公司), 福林-酚试剂、猪胃黏蛋白(pig gastric mucin, PM)、香豆素-6(美国 Sigma 公司), RPMI Medium 1640、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司), MTT(上海生工生物工程技术有限公司), 超级新生小牛血清(兰州民海生物工程有限公司), 人宫颈癌细胞 HeLa(中国科学院上海细胞库), 其他所用试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 纳米粒子的制备

精密称取 mPEG-PLGA 25 mg 溶解于 2 mL 丙酮中作为有机相, 搅拌滴加至 30 mL 质量分数为 0.2% 的吐温溶液中, 60 °C 搅拌挥去有机溶剂, 制备得到 mPEG-PLGA-NPs(PLGA-NPs)。有机相中加入 0.1 mg 香豆素-6 同法制备荧光标记纳米粒子。

2.2 粒径分布、表面电位及香豆素-6 包封率测定

分别取适量的 mPEG-PLGA-NPs(PLGA-NPs) 混悬液用纯化水稀释, NICOMP 380 ZLS 粒径电位测定仪测定其粒度分布与 Zeta 电位。葡聚糖凝胶柱离心法^[8]测定香豆素-6 的包封率。

2.3 扫描电镜(SEM)观察

将 PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs 混悬液稀释 50 倍, 滴至铝片表面, 40 °C 烘干, 喷铂金后置 S-4800 冷场发射 SEM 观察纳米粒的外观及形态。

2.4 纳米粒子的体外抗黏性实验

2.4.1 黏蛋白含量测定

采用福林-酚法测定猪胃黏蛋白(PM)的含量。分别配制溶液 A(含硫酸铜 $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和酒石酸钾钠 $10\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 与溶液 B(含碳酸钠 $20\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和氢氧化钠 $4\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 用前以体积比 1:50 混合成溶液 C。以 PM 为标准品, 配制成 50、100、200、300、400、500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列标准溶液。依次加入 C 溶液和福林-酚试剂, 室温放置 20 min 后在酶标仪测量 750 nm 处的吸光度。以吸光度对 PM 浓度进行线性回归, 得到标准曲线方程。取样品 1 d 内测定 3 次, 计算测定方法的日内精密性, 连续测定 3 d, 计算测定方法的日间精密性。

2.4.2 黏蛋白黏附实验

分别取 PLGA-NPs、mPEG-PLGA-NPs 1 mL(浓度为 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 加入含 PM 1 mg 的 PBS 溶液 1 mL 混匀。37 °C 孵育 1 h, 混悬液离心(4 °C, 40 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 min), 收集上清液, 采用福林-酚法测定未黏附的 PM 质量。以(1)式计算纳米粒子的抗 PM 黏附率。

$$\text{抗黏蛋白黏附率}(\%) = \frac{\text{未黏附的 PM 的质量}}{\text{PM 的初始加入质量}} \times 100\% \quad (1)$$

2.5 荧光标记纳米粒子的体外泄漏实验

分别精密量取同批制备的荧光标记纳米粒子 1 mL(质量浓度为 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 于一系列 2 mL 磷酸盐缓冲液中(pH 7.4), 并于 37 °C 振荡(60 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 于 0、1、2、4、6、8、12、24 h 定时取样 1 mL, 超速离心(14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 °C) 1 h。取沉淀纳米粒子经甲醇破乳, 离心, 取上清进样, HPLC 测定香豆素-6 的含量, 将泄漏百分率与时间进行回归分析, 探究其稳定性^[9]。

$$\text{泄漏百分率}(\%) = \frac{\text{香豆素-6 泄漏质量}}{\text{纳米粒子中香豆素-6 总质量}} \times 100\% \quad (2)$$

2.6 细胞摄取研究

2.6.1 纳米粒子对 HeLa 细胞增殖的影响

采用四唑盐比色法(MTT assay)检测纳米粒子对 HeLa 细胞增殖的影响。将 HeLa 细胞培养于含有质量分数为 10% 的小牛血清的 RPMI 1640 培养液中(体积分数为 5% 的 CO_2 , 37 °C 孵育箱)。取对数生长期细胞, 胰酶消化后加培养液稀释, 按每孔 3×10^4 个细胞的密度接种 96 孔培养板, 孵育箱培养 24 h 后, 分别加入 PLGA-NPs、mPEG-

PLGA-NPs 及包载香豆素-6 的纳米粒子混悬液 5、10、20、25、40、50、100 μL (纳米粒子的浓度分别为 25、50、100、125、200、250、500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及正常对照), 每组设 3 孔平行, 实验重复 3 次。继续培养 24 h 后, 每孔加入 MTT (10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 溶液 10 μL , 孵育 4 h 后弃去上清液, 每孔加入二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 150 μL , 将培养板水平振荡 10 min, 用酶联检测仪在 490 nm 处测定吸光度值, 按下式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{样品组吸光度值}}{\text{正常对照组吸光度值}} \times 100\% \quad (3)$$

2.6.2 HeLa 细胞摄取纳米粒子的激光共聚焦实验

取对数生长期 HeLa 细胞, 胰酶消化后加培养液稀释, 按每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于含圆形盖玻片 (Lab - Tek $\text{\textcircled{R}}$) 的 24 孔培养板, 孵育箱培养 24 h。

细胞贴壁生长后, 分别加入包载香豆素-6 的 PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs 混悬液 100 μL (纳米粒子的浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 相当于 C6 的浓度为 0.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。孵育 1、2、4、6 h 后, 取出盖玻片, PBS 洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 取出盖玻片晾干, 激光共聚焦显微镜 (488/520 nm, 激发波长/发射波长) 观察 HeLa 细胞对纳米粒子的摄取情况。

2.6.3 HeLa 细胞对纳米粒子的定量摄取实验

同“2.6.2”接种 HeLa 细胞培养 24 h, 细胞贴壁生长后, 分别加入包载香豆素-6 的 PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs 混悬液 200 μL (纳米粒子的量为 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 相当于 C6 的量为 0.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。孵育 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 h 后, 吸走培养液, PBS 洗涤 3 次, 每孔 0.2 mL 胰酶消

化 0.4 mL PBS 洗涤 2 次收集细胞, 一部分进行细胞蛋白含量测定, 一部分裂解, HPLC 测定香豆素-6 的摄取量。

Bradford 法测定细胞蛋白含量, 具体方法如下。

标准曲线的制作: 96 孔板中分别加入 BSA 标准液 1.25、2.50、3.75、5.00、6.25、7.50、10 μL (含 BSA 分别为 0.625、1.250、1.875、2.500、3.125、3.750、5.000 μg)。再用生理盐水补充使每孔液体体积为 10 μL , 空白孔只加生理盐水 10 μL , 慢慢摇匀后, 分别各加 CBB 显色液 200 μL , 室温放置 5 min 后, 在酶联免疫测定仪 595 nm 直接测定吸光度, 将吸光度对 BSA 标准量作线性回归。

细胞蛋白含量的测定: 留取的细胞样品加入 200 μL 细胞裂解液, 超声裂解细胞, 以 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液测定。96 孔板中加细胞组织裂解液样品 5 μL , 生理盐水 5 μL , 混匀后加 CBB 显色液 200 μL , 室温放置 5 min 后, 595 nm 测定其吸光度。由线性方程计算细胞蛋白的含量。

HeLa 细胞对纳米粒子的摄取量按下式计算。

$$\text{摄取量质量分数}(\%) = \frac{\text{香豆素-6 摄取量}}{\text{细胞蛋白含量}} \times 100\% \quad (4)$$

3 结果与分析

3.1 纳米粒子的粒径、zeta 电位及香豆素-6 的包封率

激光粒度仪测得的 PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs 粒径、zeta 电位以及香豆素-6 的包封率如表 1 所示。

Table 1 Physico-chemical properties and PM anti-adhesive rate of nanoparticles ($n=3 \bar{x} \pm s$)

表 1 纳米粒子的理化性质和抗 PM 结合率表征 ($n=3 \bar{x} \pm s$)

Formulation	d/nm	Polydispersity index	$V_{\text{zeta}}/\text{mV}$	EE/%	PM anti-adhesive rate/%
PLGA-NPs	135.0 ± 5.25	0.112 ± 0.001	-25.79 ± 0.28	74.53 ± 1.83	35.5 ± 1.9
mPEG-PLGA-NPs	106.2 ± 4.3	0.094 ± 0.002	-12.40 ± 0.11	80.65 ± 2.62	92.5 ± 1.4

结果表明, mPEG-PLGA-NPs 的粒径减小, 粒径分布较均匀, 这是因为 PEG 链的存在, 使得 mPEG-PLGA 亲水性增加, 在制备过程中聚合物和水的表面张力降低, 导致纳米粒子的粒径变小;

mPEG-PLGA-NPs 的 zeta 电位比 PLGA-NPs 低 10 mV 左右, 这是由于纳米粒子表面呈电中性的 PEG 链屏蔽了纳米粒子表面的部分电荷。微柱离心法所测得香豆素-6 的包封率均 $> 70\%$, 说明

所制备的纳米粒子包载效果良好。

3.2 纳米粒子的扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)图

SEM 观察 mPEG-PLGA-NPs 的形态,从图 1 可以看出 mPEG-PLGA-NPs 呈球形,粒径在 100 nm 左右,形态规整,表面光滑,分散性好。与 Nicomp 380ZLS 激光粒度仪所测定的粒径和分散指数结果相近。

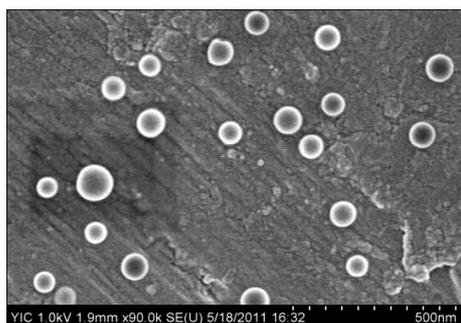


Fig. 1 SEM images of mPEG-PLGA nanoparticles

图 1 mPEG-PLGA 纳米粒子的 SEM 图

3.3 纳米粒子的体外抗黏性实验

PM 在 50 ~ 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好,线性回归方程为 $A = 0.0004\rho + 0.0045$, $r^2 = 0.9994$ 。测定法方的日内精密度 RSD 值为 0.5%, 日间精密度 RSD 值为 1.1%。测定方法精密度良好。黏蛋白黏附实验结果如表 1 所示,PLGA-NPs 体外抗 PM 黏附率为 35.5%, 而 mPEG-PLGA-NPs 抗 PM 黏附率为 92.5%, 是 PLGA-NPs 的 3 倍左右, mPEG-PLGA-NPs 表现了明显的体外抗黏性能。

3.4 荧光标记纳米粒子的体外泄漏实验

由 HPLC 测定的不同时间内香豆素-6 从纳米粒泄漏的量,计算泄漏百分率,绘制曲线(图 2)。

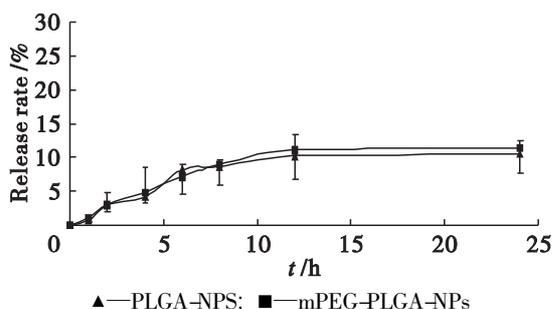


Fig. 2 In vitro release of coumarin-6 loaded PLGA and PEG-PLGA nanoparticles ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

图 2 香豆素-6 标记的 PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs 的体外泄漏曲线 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

结果表明 PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs 在 24 h 内香豆素-6 的泄漏百分率 < 12%, 在摄取的 6 h 内泄漏百分率 < 8%, 表明香豆素-6 能够较稳定的包载于纳米粒子中,不易泄漏,无突释现象,因此可以作为荧光标记物准确地示踪纳米粒子的细胞摄取行为。

3.5 纳米粒子对 HeLa 细胞增殖的影响

以 MTT 法测得不同浓度的 PLGA-NPs、mPEG-PLGA-NPs 及包载香豆素-6 的纳米粒子作用于 HeLa 细胞 24 h 时的细胞活性结果如图 3 所示。

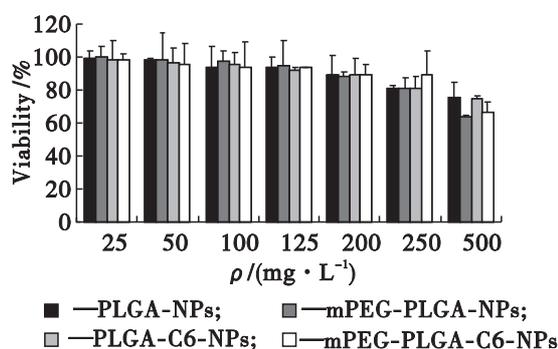


Fig. 3 In vitro inhibition of PLGA and mPEG-PLGA nanoparticles in HeLa cells ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

图 3 PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs 对 HeLa 细胞的抑制作用 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

随着浓度的增加,纳米粒对 HeLa 细胞的抑制作用增强,但细胞存活率均接近 80%, 显示出较低的细胞抑制作用。当纳米粒子浓度为 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, HeLa 细胞在 24 h 内的细胞存活率 > 90%, 证明纳米粒子对细胞无明显的抑制作用。

3.6 HeLa 细胞摄取纳米粒子的激光共聚焦结果

如图 4 所示, HeLa 细胞对香豆素-6 溶液几乎不摄取,对两种纳米粒子的摄取速率存在较大的差异: PLGA-NPs 在 2 h 内经 HeLa 细胞摄取的荧光强度较弱,激光共聚焦显微镜下无明显显示,而 mPEG-PLGA-NPs 与 HeLa 细胞作用后在细胞质中显示出较强的荧光,表明 mPEG-PLGA-NPs 比 PLGA-NPs 更易被 HeLa 细胞摄取;当孵育时间增加到 4 h 和 6 h, 荧光强度明显增加,说明摄取率与孵育时间存在明显的依赖关系。这一结果与 HeLa 细胞摄取荧光的定量分析结果一致。

3.7 HeLa 细胞摄取纳米粒子的定量分析结果

BSA 在 0 ~ 5 μg 线性关系良好,线性回归方程为 $A = 0.0697m + 0.7125$, $r^2 = 0.9988$ 。测定

方法精密度良好。HeLa 细胞对纳米粒子的摄取量结果如图 5 所示。

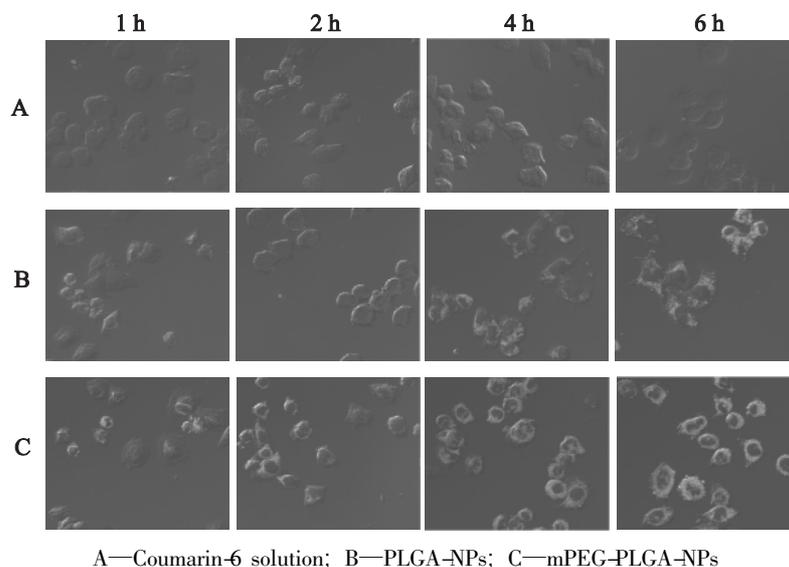


Fig. 4 Confocal images of HeLa cells coincubated with nanoparticles

图 4 HeLa 细胞摄取 PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs 的激光共聚焦照片

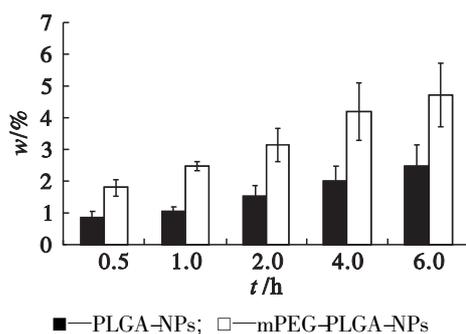


Fig. 5 Uptake of PLGA and mPEG-PLGA nanoparticles in HeLa cell line ($n=3 \bar{x} \pm s$)

图 5 HeLa 细胞对 PLGA-NPs 和 mPEG-PLGA-NPs 的摄取结果 ($n=3 \bar{x} \pm s$)

如图 5 所示,相同孵育时间内,HeLa 细胞对 mPEG-PLGA-NPs 的摄取量明显高于 PLGA-NPs。6 h 时 HeLa 细胞对 PLGA-NPs 的摄取量质量分数为 2.49%,对 mPEG-PLGA-NPs 的摄取量质量分数为 4.71%,是 PLGA-NPs 的近 2 倍;细胞摄取量与孵育时间存在明显的依赖关系。

4 讨论

a. mPEG-PLGA-NPs 的抗黏蛋白黏附率明显高于 PLGA-NPs,表现出良好的体外抗黏性能。这主要是因为 PEG 链增加了纳米粒表面的亲水性并屏蔽了纳米粒表面的部分电荷,减轻了黏蛋白疏水作用力的黏附及由黏蛋白寡糖的羧基和硫酸基负电荷所引起的多价黏附相互作用力^[10],从而使得 mPEG-PLGA-NPs 能够避免黏液中黏蛋白

的黏附,能够穿透黏液层到达黏膜上皮细胞。

b. mPEG-PLGA-NPs 对细胞的毒性较低,体现了较好的生物相容性。同时 HeLa 细胞对 mPEG-PLGA-NPs 的摄取速率及摄取量明显高于 PLGA-NPs,表现出良好的细胞亲和性。这一结果与国内外文献报道一致^[11-13]。其可能的原因是由于 PEG 的修饰作用,改变了聚合物纳米粒的表面化学性质(增加了亲水性和屏蔽部分表面电荷),增加了与细胞膜的亲和性;存在于载体表面的 PEG 链增加了与细胞膜磷脂双分子层外侧亲水部分之间的“相容性”和渗透性,从而促进了微粒载体转运进入细胞^[14]。

参考文献:

- [1] CU Y, BOOTH C J, SALTZMAN W M. *In vivo* distribution of surface-modified PLGA nanoparticles following intravaginal delivery [J]. *J Control Release*, 2011, 156 (2): 258-264.
- [2] 林东海, 孙秀燕, 李刚. 药物微粒载体在黏膜给药中的黏液屏障与传递策略 [J]. *国际药学研究杂志*, 2010, 37(6): 435-438.
- [3] LAI S K, O'HANLON D E, HARROLD S, et al. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 2007, 104(5): 1482-1487.
- [4] CU Y, SALTZMAN W M. Controlled surface modification with poly(ethylene) glycol enhances diffusion of PLGA nanoparticles in human cervical mucus [J]. *Molecu-*

- lar Pharmaceutics 2009 6(1): 173–181.
- [5] YONCHEVA K ,LIZARRAGA E ,JRACHE J M. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) : preparation and evaluation of their bioadhesive properties [J]. Eur J Pharm sci ,2005 ,24 , 411–419.
- [6] YANG M ,LAI S K ,HANES J ,et al. Biodegradable nanoparticles composed entirely of safe materials that rapidly penetrate human mucus [J]. Angew Chem Int Ed , 2011 ,50 ,2597–2600.
- [7] 尹雅姝 ,陈大为 ,乔明曦 ,等. 凝集素修饰乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及体外黏附性能评价 [J]. 药学学报 2007 42(5) : 550–556.
- [8] 李淑斌 ,刘丹 ,宁红 ,等. 紫杉醇固体脂质纳米粒封装率的测定 [J]. 中国药学杂志 2008 43(21) : 1665–1668.
- [9] 李晓芳 ,马艳结 ,陈钢 ,等. 包载荧光探针香豆素-6 的 PLGA 纳米粒的制备 [J]. 中国现代应用药学 , 2011 28(8) : 740–744.
- [10] CONE R A. Barrier properties of mucus [J]. Adv Drug Deliv Rev 2009 61(2) : 75–85.
- [11] PAMUJULA S ,HAZARI S ,BOLDEN G. Cellular delivery of PEGylated PLGA nanoparticles [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2012 64(1) : 61–67.
- [12] 丁建潮 ,胡富强 ,袁弘. A549 细胞对单硬脂酸甘油酯固体脂质纳米粒的摄取作用 [J]. 药理学报 , 2004 39(11) : 876–880.
- [13] SADZUKA Y ,KISHI K ,HIROTA S ,et al. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain on cell uptake of PEG-Modified liposomes [J]. Journal of Liposome Research 2003 ,13(2) : 157–172.
- [14] ZHANG Y ,KOHLE R N ,ZHANG M Q. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake [J]. Biomaterials ,2002 , 23(7) : 1553–1561.

Anti-adhesive activity and uptake by HeLa cells of mPEG-PLGA nanoparticles

QIN Li-fang¹ , LIN Dong-hai^{1*} , LI Gang² , XIE Xin-xin¹ , WANG Jun-teng¹ , WEN Zhen¹
(1. School of Pharmacy ,Yantai University ,Yantai 264005 ,China; 2. School of Life Sciences ,Yantai University ,Yantai 264005 ,China)

Abstract: Objective To prepare mPEG-PLGA nanoparticles ,discuss its properties and *in vitro* anti-adhesive activity and investigate the cellular uptake of them in human cervical cancer cells (HeLa) . **Methods** mPEG-PLGA-NPs were prepared by a solvent diffusion method. The particle size distribution and Zeta potential of nanoparticles were measured by light scattering. The anti-adhesive activity of nanoparticles was evaluated by pig gastric mucin (PM) binding experiments. Coumarin 6 was incorporated into nanoparticles as fluorescent marker. The cellular uptake of PLGA-NPs and PEG-PLGA-NPs by HeLa cell lines were determined by laser scanning confocal microscope and HPLC. **Results** The mean size of mPEG-PLGA-NPs was (106. 2 ± 4. 3) nm Zeta potential was - (12. 40 ± 0. 11) mV. The PM anti-adhesive rate of PLGA-NPs and PEG-PLGA-NPs was 35. 5% and 92. 5% , respectively. The anti-adhesive activity of mPEG-PLGA-NPs was three times higher than PLGA-NPs. All nanoparticles showed low cytotoxicity. At the same incubation time ,the uptake of mPEG-PLGA-NPs was two times higher than that of unmodified PLGA-NPs. The cellular uptake of PLGA-NPs and mPEG-PLGA-NPs was dependent on the incubation time. **Conclusions** mPEG-PLGA-NPs has much higher anti-adhesive activity. The uptake of mPEG-PLGA-NPs by HeLa cells is much higher compared to the PLGA-NPs (*P* < 0. 01) . The mPEG-PLGA-NPs shows better cell affinity than PLGA-NPs.

Key words: mPEG-PLGA; nanoparticle; anti-adhesive activity; HeLa cell line; cellular uptake