

科学研究

基于 W/O/W 溶剂挥发复乳法的载药 纳米微球合成及其作用研究

宋远见^{1,2} 刘红芝² 温相如² 张芳² 刘志安² 裴冬生³ 宗志敏¹ 魏贤勇^{1*}

(1. 中国矿业大学煤炭加工与高效洁净利用教育部重点实验室, 徐州 221116;

2. 徐州医学院神经生物学实验室, 徐州 221002;

3. 徐州医学院肿瘤生物治疗重点实验室, 徐州 221002)

摘要 以乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)、聚乙二醇(PEG)和乳铁蛋白(lactoferrin, Lf)为原料, 采用复乳法制备荷载 JNK3-shRNA 表达质粒的纳米微球, 同时制备空载纳米微球作为对照, 将它们分别通过尾静脉注射至大鼠体内, 采用 HE 染色法检测其对脑缺血再灌注后 5 天时海马 CA1 区神经元的保护作用, 纳米微球 Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA 构建成功, 它能够显著提高神经元的存活率, 在脑中风中, 成功构建的 Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA 纳米微球能够对神经元起到明显的保护作用。

关键词 载药纳米微球, Lf, PLGA, JNK3, 海马

Synthesis of drug-loaded nano-microspheres Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA by W/O/W evaporated solvent double emulsion and study on the effect of it

Song Yuanjian^{1,2} Liu Hongzhi² Wen Xiangru² Zhang Fang² Liu Zhian²
Pei Dongsheng³ Zong Zhimin¹ Wei Xianyong¹

(1. Key Laboratory of Coal Processing and Efficient Utilization (Ministry of Education),
China University of Mining & Technology, Xuzhou 221116;

2. Laboratory of Neurobiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002;

3. Laboratory of Biological Cancer Therapy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002)

Abstract The nano-microspheres loaded JNK3-shRNA expression plasmid and no-loaded as the control were made from poly (lactic-co-glycolic acid), polyethylene glycol and lactoferrin by modified double emulsion method. The nano-microspheres were respectively injected into rats through their tail vein injection, and then HE staining was performed to examine their protective effects on the neurons in hippocampal CA1 region at 5 days of reperfusion after cerebral ischemia in rats. The nano-microspheres Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA which can significantly improve the survival rate of neurons were successfully constructed. In stroke, the Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA nanospheres were successfully constructed and played significant neuronprotective role.

Key words drug-loaded nano-microspheres, Lf, PLGA, JNK3, hippocampus

乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)是一种生物相容性极好的材料, 目前已获得美国 FDA 认证, 能作为原材料生产手术缝合线及注射用微球、微囊、埋植剂等^[1]。采用溶剂挥发复乳法, 以 PLGA 为原料合成载药纳米微球, 能够使水溶性药物包载其中, 免受血液或组织中酶的破坏。基因治疗是一种新型

的疾病治疗方式, 是指将外源治疗基因导入靶细胞, 以纠正或补偿因基因缺陷或异常引起的疾病, 在临床上具有广泛的应用前景^[2]。基因药物多为水溶性, 如果直接通过静脉、肌肉或口腔给药, 将会在药物到达病灶前被各种酶破坏。如果将其包装在 PLGA 纳米微球中再通过以上方式给药, 将会大大减

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800446, 30800309); 江苏省高校自然科学基金项目(09KJB310016); 江苏省“青蓝工程”项目资助

作者简介: 宋远见, 男, 33 岁, 讲师, 博士研究生, 从事纳米药物载体的研究工作。

联系人: 魏贤勇。

少药物在体内运输过程中不必要的损耗。另外, PLGA 纳米微球表面可以通过带有活性基团的聚乙二醇(PEG)连接上靶向配体,使药物在体内的运输具有靶向性,可显著提高病灶处的药物浓度,增强药物疗效^[3-4]。

本研究拟将合成荷载基因药物 JNK3-shRNA 表达质粒(JNK3, c-Jun 氨基末端激酶; shRNA, 小发夹 RNA)的 PLGA 纳米微球,以乳铁蛋白(Lf)为配体将其靶向功能化修饰,并研究其对缺血诱导神经元损伤的作用。

1 实验部分

1.1 原料与设备

HO-PLGA-COOH, 济南岱罡生物科技有限公司; NH₂-PEG-Mal, 北京键凯科技有限公司; Lf, 日本 Wako 公司; Ellman's 试剂, 美国 Sigma 公司; JNK3-shRNA 的表达质粒, 由本实验室成功构建; SK3200H 超声波清洗器, 上海科导超声仪器有限公司; FD-1 真空干燥机, 北京博医康技术有限责任公司; 高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; DF-101S 型集热式磁力搅拌器, 巩义市科华仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 纳米微球的制备和表征

称取 5mg HO-PLGA-COOH 溶解于 1mL 二氯甲烷中作为有机相。取 150 μ L JNK3-shRNA 表达质粒溶液(150 μ g 质粒溶解于 150 μ L 的 TE buffer 中)作为内水相, 3000r/min 磁力搅拌辅助下将内水相缓慢滴入有机相中制得 W/O 型初乳。分别称取 100mg NH₂-PEG-Mal 和 100 mg 吐温-80, 同时溶解于 20mL 双蒸水中, 搅拌混匀制得外水相。1000r/min 磁力搅拌辅助下将初乳滴入外水相, 制得 W/O/W 型复乳纳米混悬溶液。使用 2-亚氨基氯化硫醇将 Lf 巯基化, 并通过 Ellman's 试剂测定其巯基化程度, 保证每个 Lf 上约带上 2 个巯基^[5]。室温条件下, 将复乳与巯基化的 Lf 避光摇混 12h, 并挥发有机溶剂, 离心分离, 用双蒸水洗 3 次后, 置真空干燥箱干燥至恒重为止, 即制得 Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA 纳米微球。合成 PEG-PLGA/JNK3-shRNA 纳米微球: 复乳纳米混悬溶液不与 Lf 结合, 其它步骤同上。合成空载纳米微球: 用同体积的 TE buffer 代替质粒溶液, 其它步骤同上。将制得的纳米微球用双蒸水稀释 10 倍, 用粒度/Zeta 电位仪检测其粒径和 Zeta 电位。

1.2.2 纳米微球的包封率和载药量

将制得的 W/O/W 型复乳纳米混悬溶液置于高速离心机中以 15000r/min 离心 15min, 取上清液, 用 PicoGreen 荧光检测试剂盒测定上清液中的质粒浓度。包封率 = 100% × [质粒总投入质量 - (上清液体积 × 质粒浓度)] / 质粒总投入质量。载药量 = 100% × [质粒总投入质量 - (上清液体积 × 质粒浓度)] / 纳米微球的总质量。

1.2.3 载药纳米微球 Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA 对缺血诱导神经元损伤的作用

参照本实验室成熟方法^[6], 制作成年 Sprague-Dawley 大鼠脑缺血模型。缺血之前 1d 尾静脉注射纳米微球, 于缺血 15min 再灌注 5d 时, 以水合氯醛(350mg/kg)麻醉动物, 4% 多聚甲醛灌注预固定, 取脑后置于 4% 多聚甲醛后固定 24h。取

材后用石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光学显微镜下观察大鼠海马 CA1 区 1mm 长度内神经元的存活数, 以评价载药纳米微球的疗效。假手术组只制作缺血模型, 不做结扎血管的处理, 其它步骤同上。

1.2.4 数据统计学处理

采用统计学软件 SPSS11.0 对所得数据进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用方差分析进行比较。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 纳米微球的表征、包封率和载药量的计算

PEG-PLGA/JNK3-shRNA 纳米微球连接 Lf 后, 粒径有所增加, 但增加不明显。另外, Zeta 电位、包封率和载药量在连接 Lf 前后皆没有明显变化, 结果如表 1 所示。通过溶剂挥发复乳法制得纳米微球的包封率皆在 80% 左右, 说明以 PLGA 为原料, 通过该方法合成基因载药纳米微球有望达到较好的药物运输效果。合成纳米微球的过程中, 所选材料不是一般的 PLGA, 其末端被羧基化, 即为 HO-PLGA-COOH。这样, 制得的初乳表面有较多裸露的羧基。外水相中的 PEG 两端分别带有氨基和马来酰亚胺, 即为 NH₂-PEG-Mal。初乳中的羧基与外水相中 PEG 上的氨基结合, 使 PEG 连接到 PLGA 上。每个 Lf 有 2 个活化的巯基, 该基团可以与微球表面 PEG 中的马来酰亚胺发生特异性反应, 将 Lf 连接于微球表面。Lf 可以与脑微血管内皮细胞膜上的 Lf 受体特异性结合^[7], 介导微球被细胞内吞, 从而使整个微球透过血脑屏障, 进入脑实质发挥药物效果。

表 1 纳米微球的粒径、Zeta 电位、包封率和载药量

项目	PEG-PLGA/ JNK3-shRNA ($\bar{x} \pm s$)	Lf-PEG-PLGA/ JNK3-shRNA ($\bar{x} \pm s$)
粒径/nm	136.1 ± 43.6	152.8 ± 51.2
Zeta 电位/mV	5.3 ± 0.9	5.9 ± 0.6
包封率/%	81.5 ± 8.7	79.8 ± 7.2
载药量/%	2.14 ± 0.03	1.99 ± 0.02

2.2 载药纳米微球 Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA 的作用

A 组神经元存活良好, B 组和 D 组神经元损伤严重, 结果如图 1 和表 2 所示。相对 B、D 两组, C 组神经元存活数明显增多, 说明载药纳米微球 Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA 对大鼠海马 CA1 区神经元起到了显著的保护作用。B 组神经元没有得到保护的原因是 PEG-PLGA/JNK3-shRNA 没能透过血脑屏障进入脑实质。从以上结果可以推测到, Lf 的介导作用是纳米微球透过血脑屏障进入脑实质的关键。前期研究发现^[8], JNK3 的激活是脑中风诱导神经元凋亡的重要分子机制, 抑制其表达或活性是减轻神经元损伤的关键。JNK3-shRNA 表达质粒能够在细胞内不断表达, 对 JNK3 起到持续的抑

制作用,进而显著减轻由于 JNK3 激活引起的神经元损伤。(A 组:假手术组;B 组:缺血+ PEG-PLGA/JNK3-shRNA 组;C 组:缺血+ Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA 组;D 组:缺血+空载球组)(相对 B、D 组, * P<0.05)

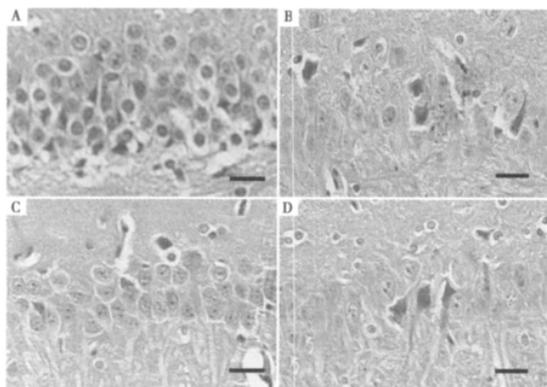


图 1 HE 染色示纳米微球的作用(标尺=10 μm)

表 2 细胞计数示纳米微球对海马 CA1 区神经元的作用

海马 CA1 区中 1 mm 长度内的神经元数($\bar{x} \pm s$)	
A 组	206.2 ± 23.6
B 组	37.4 ± 6.5
C 组	112.8 ± 18.1*
D 组	28.3 ± 5.2

3 结论

以末端带有羧基的 PLGA、两端分别带有氨基和马来酰亚胺的 PEG-巯基化的 Lf 为原料,采用溶剂挥发复乳法成功合成了 Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA 载药纳米微球。3000r/min 高速搅拌使制得的初乳颗粒较小,1000r/min 低速搅拌能够防止内水相外泄,使微球达到了较高的药物包封率和载药量。最终制得纳米微球的粒径较为均匀,多在 150nm 左右,能够满足在动物体内有效运输药物的需要。

以大鼠脑缺血模型为基础,Lf-PEG-PLGA/JNK3-shRNA 载药纳米微球经尾静脉给药后,对缺血诱导的海马 CA1 区神

元损伤起到了显著的抑制作用,说明该纳米微球能够透过血脑屏障进入脑实质,有效抑制 JNK3 的表达,阻止了促细胞凋亡信号通路的持续激活。然而,PEG-PLGA/JNK3-shRNA 载药纳米微球没有起到类似效果,原因在于缺少 Lf 的介导作用,纳米微球不易透过血脑屏障进入脑实质。由此,可以推测出 Lf 介导的细胞内吞作用是纳米微球能否发挥有效作用的关键。

参考文献

[1] Jain R A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices [J]. Biomaterials, 2000, 21(23):2475-2490.

[2] Hallaj-Nezhadi S, Lotfipour F, Dass C R. Delivery of nanoparticulate drug delivery systems via the intravenous route for cancer gene therapy[J]. Pharmazie, 2010, 65(12):855-859.

[3] Park E J, Tak T H, Na D H, et al. Effect of PEGylation on stability of peptide in poly(lactide-co-glycolide) microspheres [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(7):1111-1116.

[4] 路娟,刘清飞,罗国安,等. 药物的聚乙二醇修饰研究进展[J]. 有机化学,2009,29(8):1167-1174.

[5] Huang R, Ke W, Liu Y, et al. The use of lactoferrin as a ligand for targeting the polyamidoamine-based gene delivery system to the brain[J]. Biomaterials, 2008, 29(2):238-346.

[6] Pei D S, Song Y J, Yu H M, et al. Exogenous nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase activation via inhibiting endogenous NO-induced S-nitrosylation during cerebral ischemia and reperfusion in rat hippocampus[J]. J Neurochem, 2008, 106(4):1952-1963.

[7] 黄容琴,柯伟伦,蒋晨,等. 脑靶向非病毒基因递释系统的研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2010,37(1):36-39.

[8] Guan Q H, Pei D S, Zong Y Y, et al. Neuroprotection against ischemic brain injury by a small peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase (JNK) via nuclear and non-nuclear pathways[J]. Neuroscience, 2006, 139(2):609-627.

收稿日期:2011-03-24

修稿日期:2011-05-12

(上接第 41 页)

[2] Chen J H, Jang C, Xiao S D, et al. Intrinsic and extrinsic performance limits of graphene devices on SiO₂[J]. Nat Nanotechnol, 2008, 3: 206-209.

[3] Berger C, Song Z M, Li X B, et al. Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene[J]. Science, 2006, 312: 1191-1196.

[4] Service R F. Carbon sheets an atom thick give rise to graphene dreams[J]. Science, 2009, 324: 875-877.

[5] Balandin A A, Ghosh S, Bao W Z, et al, Lau C N. Superior thermal conductivity of single-layer graphene[J]. Nano Lett, 2008, 8: 902-907.

[6] Naarmann H, Hanack M, Matter R. A high yield easy method for the preparation of alkoxy-substituted triphenylenes [J]. Synthesis, 1994, 5:477-478.

[7] Krebs F C, Schiodt N C, Batsberg W, et al. Purification of 2, 3, 6, 7, 10, 11-hexamethoxytriphenylene and preparation of hexakiscarbonylmethyl and hexakis cyanomethyl derivatives of 2,3,6,7,10,11-hexahydropyrene[J]. Synthesis, 1997,1285-1290.

[8] 傅玲,刘洪波,邹艳红,等. Hummer 法制备氧化石墨时影响氧化程度的工艺因素研究[J]. 炭素, 2005, 4: 10-14.

[9] Yu X, Tang X Z, Pan C Y. Synthesis, characterization and self-assembly behavior of six-armed star block copolymers with triphenylene core[J]. Polymer, 2005, 46:11149-11156.

[10] 丁运生,王增山,汪涛. 抗静电聚丙烯的制备研究[J]. 塑料工业, 2004, 32(5): 37-52.

收稿日期:2010-11-02

修稿日期:2010-12-10