论著

文章编号:1000-5404(2008)14-1334-04

界面聚合法制备反义核酸氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的研究及稳定性考察

徐 越[1],柯以铨[1],杨西晓[2],阎玺庆[3],王建奇[1],黄乐松[2] (南方医科大学:[1]珠江医院神经外科,广州 510282,[2]南方医院药学部,广州 510515;[3]深圳清华大学研究院中药中心,广东 深圳 518057)

摘 要:目的 优化制备包裹反义寡核苷酸a-氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(ASODN in NP)并考察稳定性。**方法** 以氰基丙烯酸正丁酯(butyleyanoacrylate,BCA)为载药材料,采用界面聚合法制备ASODN in NP;在单因素考察的基础上,采用正交设计优化处方和制备工艺;用透射电镜观察其形态;马尔文激光粒度分析仪测定粒径;高效液相色谱法测定载药量和包封率;用含7 mol/L尿素的20%聚丙烯酰胺凝胶电泳考察载药纳米粒在体外血清中的稳定性。**结果** 按优化工艺条件,制得的载药纳米粒,其形态规整、无黏连、大小均匀,平均粒径为94.9 nm,包封率和载药量分别为96.7%、10.1%,在体外血清中稳定性好并优于传统的吸附法制备的纳米粒。**结论** 本实验制备的ASODN in NP具有较好的稳定性,较高包封率和载药量。

关键词: 反义寡核苷酸;氰基丙烯酸正丁酯;纳米粒;稳定性;界面聚合法

中图法分类号: R943; R944.9; R979.1 **文献标识码:** A

Preparation of antisense oligodeoxynucleotides-loaded butylcyanoacrylate nanoparticles by interfacial polymerization and their stability

XU Yue[1], KE Yi-quan[1], YANG Xi-xiao[2], YAN Xi-qing[3], WANG Jian-qi[1], HUANG Le-song[2] ([1]Department of Neurosurgery, Zhujiang Hospital, Guangzhou 510282; [2]Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515; [3]Centre of Traditional Chinese Herbs, Shenzhen Research Institute of Tsinghua University, Shenzhen 518057, China)

Abstract: Objective To optimize the preparation of nanoparticles encapsulating antisense oligodeoxynucleotides in a-butyleyanoacrylate carrier (ASODN in NP) and investigate their stability. **Methods** ASODN in NP were prepared by interfacial polymerization of butyleyanoacrylate (BCA). The formulation and technology of the prepared NP was optimized by using orthogonal design based on the single-factor experiment. The morphology of NP was examined by transmission electron microscope; The size and size distribution of NP were determined by Malvern laser granularity equipment; The encapsulation efficiency and drug loading were determined by HPLC; The ability of protecting oligodeoxynucleotides from serum was investigated on a 20% polyacrylamide-7 Murea sequencing gel (PAGE). **Results** The nanoparticles in the optimal conditions were of regular spherical surface and discrete. The average size was 97.1 nm, the average encapsulation efficiency and drug loading of ASODN in NP were 96.7% and 10.1% respectively; The oligonucleotides were more efficiently protected from degradation by nucleases than by oligonucleotides adsorbed into nanospheres. **Conclusion** ASODN in NP has good stability, encapsulation efficiency, drug loading and great potential for ASODN delivery.

Key words: antisense oligodeoxynucleotides; butyleyanoacrylate; nanoparticles; stability; interfacial polymerization

目前,研究已证实端粒与端粒酶是细胞分裂和增殖的基础,端粒酶活性与肿瘤的发生、发展、恶性程度及瘤细胞的永生化等密切相关,所以,端粒酶的活化可能是细胞永生化或恶化的共同通道[1]。因此,抑制端粒酶的活性就可有效的抑制恶性肿瘤的发生和发展。目前有多种方法可抑制端粒酶,其中以反义核酸技术尤为突出,但反义寡核酸(antisense oligodeoxynucleotides, ASODN)不易透过细胞膜、并在转运过程中还易被核酸内切酶迅速降解,为此需要一种载体来协助运载保护。

纳米粒(nanoparticles, NP)作为新型给药体系,由于具有尺寸效应、表面效应、易吸收等生物优势[2],可作为ASODN的载体,调整ASODN在体内的行为。通过这种技术,可将ASODN包裹在NP子之中或吸附、耦合在其表面。国内外已有多种方法将ASODN连接在纳米粒表面,但这些方法在蛋白质生物培养基中已

基金项目:广东省自然科学基金(05004763)
Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (05004763)

作者简介:徐 越,男,江西省南昌市人,硕士研究生,主治医师,主要从事纳米药物治疗胶质瘤方面的研究。E-mail:xupeixkq@163.com

通信作者:柯以铨,电话:13380092263

收稿日期:2007-07-17;修回日期:2007-10-19

被证实存在极大的可逆性。本实验以可降解的高分子材料 a-氰基丙烯酸正丁酯(butyleyanoacrylate,BCA)为制备纳米粒的载体,采用界面聚合法,在单因素考察的基础上以正交实验设计优化制备工艺,并考察了按优化工艺制备的载药纳米粒在体外血清中的稳定性。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　仪器　　H-7500-TEM 透射电镜(日本日立公司),激光粒度分析仪-3000 HS (英国 Malvern 公司),3-18K 超速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),高效液相色谱仪(Agilent 100),FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂),Orion 828 型精密酸度计(美国 Thermo Orion 公司)。

1.1.2　药品与试剂　　ASODN(5′-GTTAGGGTTAGACAA-3′),每条 ASODN 两端各 2 个碱基进行硫代磷酸修饰(上海生工生物工程技术服务有限公司),BCA(广州市白云医用胶有限公司),辛酸癸酸甘油三酯(GTCC)(浙江兰溪物美化工有限公司),小牛血清(北京海克隆生物化学制品有限公司),其他试剂均为分析纯。

1.2　方法

1.2.1　高效液相色谱条件[3]　　检测器 DAD,流动相:Buffer A-Buffer B = 84∶16(Buffer A:乙腈 100 ml,三乙胺 13.9 ml,冰醋酸 2.8 ml,加水至 1 000 ml; Buffer B:乙腈 200 ml,三乙胺 6.95 ml,冰醋酸 5.73 ml 加水至 500 ml),进样量:20 μl,柱温:20 ℃,流动相流速:1.0 ml/min,检测波长:260 nm。

1.2.2　标准曲线的制备　　首先配制标准溶液,将 ASODN 精密配成 0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000、10.000 μmol/L 等不同浓度,各取 20 μl 在上述色谱条件下进样分析,以浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,采用 SPSS 11.5 统计软件进行线性回归,求回归方程。

1.2.3　回收率的测定　　取 ASODN 用去离子水精密配成 0.200、4.000、8.000 μmol/L 浓度的标准液,作为低、中、高 3 种浓度,每个浓度 5 份,按上述色谱条件测定面积,代入回归方程,计算 ASODN 的浓度,以测定量和真实量之比计算回收率。

1.2.4　精密度及重现性试验　　取上述低、中、高 3 种浓度的标准液,分别于每天不同时间按照标准曲线方法测定精密度和重现性,连续测定 5 d。

1.2.5　ASODN in NP 的制备　　本实验以 NP 的粒径和粒径分布为主要控制指标,通过相关文献和预实验确定单因素,考察 ASODN 浓度、pH 值、BCA 的用量、BCA 的滴加速度、Tween-80 的用量、搅拌速度与时间等对粒径、粒径分布和包封率的影响。根据单因素试验结果,优选 ASODN 浓度、pH 值及 GTCC 与 Tween-80 比值 3 个主要因素,每个因素选择 3 个水平,因素和水平见表 1。

表 1　正交设计试验因素和水平表

水平	因素		
	ASODN 浓度(A)	pH 值(B)	GTCC:Tween-80(C)
1	4.0 μmol/L	7.0	6.40
2	5.0 μmol/L	7.5	5.30
3	6.0 μmol/L	8.0	4.58

按正交试验设计原理用正交设计表 $L_9(3^4)$ 安排试验,以粒径、载药量、包封率为考察指标,优化 NP 的制备工艺,确定最优制备条件。

1.2.6　专属性考察　　分别取 ASODN 溶液、空白 NP 混悬液按 1.2.1 色谱条件进行色谱分析。

1.2.7　包封率和载药量　　将制得的纳米混悬液离心,所得的上清液取出,按前述高效液相法测定上清中 ASODN 的浓度,按以下公式分别计算包封率(EE)和载药量(DL)。

$$包封率(\%) = (W_2 - W_1)/W_2 \times 100\%$$

$$载药量(\%) = (W_2 - W_1)/W_{NP} \times 100\%$$

式中 W_1 为上清液中游离的 ASODN 的含量,W_2 为所加 ASODN 总量,$W_2 - W_1$ 即为被 NP 载带的药物量,W_{NP} 为 NP 的总重量。

1.2.8　ASODN in NP 的体外血清中稳定性考察　　按照最优制备工艺方法制备 ASODN in NP,同时将传统的 ASODN 吸附在 NP 表面(NS + Dextran + ASODN)[4] 和游离 ASODN(FREE ASODN)作为对照。上述溶液各取 150 μl 与 350 μl 的小牛血清混合,置于恒温水浴箱中 37 ℃水浴 30 min;后立即放入70 ℃的水浴箱中恒温水浴以灭活血清酶;为使 ASODN 从 NP 中释放出来,ASODN in NP 内加入 4 mmol/L 的 NaOH 溶液适量,37 ℃恒温水浴 15 min。然后采用含 7 mol/L 尿素的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行电泳分析,用 EBS 进行染色后,将凝胶置于紫外光下,显影照相。

1.3　统计学分析

正交实验统计学数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件对各组数据进行正交设计资料的方差分析。

2　结果

2.1　标准曲线

按色谱条件下,线性回归所得回归方程:A = 126.566C - 19.34C(r = 0.999 9),可见 ASODN 在浓度 0.125×10^{-6} ~ 10.000×10^{-6} mol/L 范围内,C 与 A 线形关系良好。

2.2　回收率、精密度及重现性试验结果

此方法的回收率为 98.74% ~100.27%,RSD 1.184%。连续测定 5 d,日内回收率为(98.98 ±0.41)%, RSD 为 0.41%,日间回收率为(100.02 ±0.38)%,RSD 为 0.38%。

2.3　正交设计试验表及结果

在文献调查及单因素考察的基础上选定:ASODN 是主药;Tween-80 为表面活性剂; GTCC 为基本脂质膜材;BCA 为载药载体。正交实验方差分析及直观分析结果见表 2、3。

我们采用直观分析法对正交实验结果进行分析,比较 R 值大小可以看出不同因素在试验中所起作用不同,R 值越大,说明此因素对所考察指标的影响越大;比较 K 值大小可了解该因素的不同水平对试验结果的影响的程度,对粒径而言,K 值越小的水平越理想,而对载药量和包封率而言,K 值越大的水平越理想。因此根据上述计算结果可以看出,3 因素对粒径影响的主次顺序为:A > B > C,最优水平组合是:A2B3C1;影响载药量的关键因素是 B,最优水平是 B3;对包封率来说,影响的关键因素 A,最优水平是 A2,其他为次要因素。

表 2 $L_9(3^4)$正交设计试验结果

No.	ASODN 浓度	pH 值	GTCC: Tween-80	粒径 (nm)	载药量 (%)	包封率 (%)
1	1	1	1	135.7	9.8	92.7
2	1	2	2	143.2	6.9	88.9
3	1	3	3	122.5	9.2	93.0
4	2	1	2	123.1	7.7	95.4
5	2	2	3	105.0	7.2	95.2
6	2	3	1	98.8	10.5	96.1
7	3	1	3	140.1	8.5	92.3
8	3	2	1	137.7	8.4	97.0
9	3	3	2	129.3	9.7	94.3

表 3 正交实验结果分析

	粒径(nm)			载药量(%)			包封率(%)		
	ASODN 浓度	pH 值	GTCC: Tween-80	ASODN 浓度	pH 值	GTCC: Tween-80	ASODN 浓度	pH 值	GTCC: Tween-80
K1	401.4	398.9	372.2	25.9	26.0	28.7	274.6	280.4	285.8
K2	326.9	385.9	395.6	25.4	22.5	24.3	286.7	278.6	278.6
K3	407.1	350.6	367.6	26.6	29.4	24.9	283.6	283.4	280.5
R	80.2	48.3	28.0	0.7	6.9	4.4	12.1	4.8	7.2
P	0.026	0.080	0.194	0.576	0.040	0.080	0.296	0.871	0.544

R:为极差

为避免试验误差对结果准确性的影响,将粒径、载药量、包封率分别用 SPSS 11.5 软件处理,进行方差分析检验,结果见表3。从表中方差分析结果可知,ASODN 浓度对粒径有显著性影响($P<0.05$), pH 值对载药量有显著性影响($P<0.05$),3 个考察因素对包封率均无显著影响。综合结果,选定最佳工艺条件为 A2B2C1。即 ASODN 浓度为 5.0×10^{-6} mol/L、pH 值为 8.0 及 GTCC 与 Tween-80 比值为 6.4。

综合直观分析和方差分析结果,最终确定最佳处方和制备工艺为:将 ASODN 用去离子水精密配成 5.0×10^{-6} mol/L 的浓度,取 800 μl 量,加适量无水乙醇,用 0.1 mol/L 的 NaOH 精密调节 pH 至 7.5,在分散机分散过程中,将上述液体 1 ml 加入 8 g GTCC +1.25 g Tween-80 中,持续搅拌作用下,缓慢加入 100 μg 的 BCA,持续搅拌 4.5 h 后聚合作用完成;精密移取上述混悬液 700 μl 入离心管内,加去离子水适量,混匀,冷冻超速离心 29 700×*g*,4 ℃条件下离心 30 min,后去除油相、界面、水相,沉淀重新悬浮于适量去离子水中,旋涡搅拌 1 min,超声水浴 30 s,为去除残余的油,再次冷冻离心 1 次,条件同上,去除残余后,沉淀再次悬浮于 700 μl 的去离子水中,即得 NP 混悬液。

2.4 专属性考察结果

结果显示 ASODN 溶液出峰时间为 2.5 min、空白 NP 混悬液出峰时间为 4.7 min,说明混悬液其他基质辅料成分不干扰 ASODN 的测定。

2.5 最佳工艺验证

按照最优条件所制备 3 批 NP 混悬液为均为半透明状分散系,体系略带乳光,EE、DL 分别为(96.7±1.5)%、(10.1±0.35)%;取 NP 混悬液适当稀释后,用激光粒度分析仪测定三批样本的 NP 的平均粒径为(94.9±7.7) nm, 多分散度为 0.05,说明粒径分布均匀,粒径分布(Zetasizer 3000-Advanced Pcs V1.61 软件分析)见图 1。

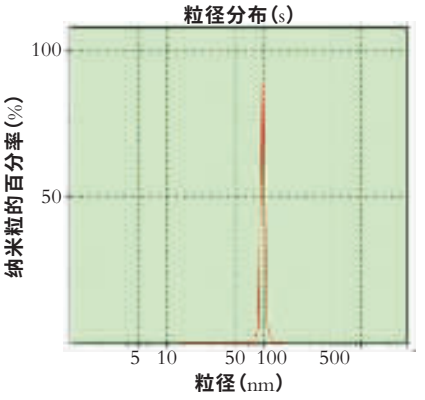


图 1 ASODN in NP 粒径分布图

透射电镜测定 ASODN in NP 的形态,取 NP 混悬液适量,加去离子水稀释后,滴加在覆盖碳膜的铜网上,室温(25 ℃)下以 2.0% 的磷钨酸钠液负染,透射电镜下观察,见粒子形状规则,大小均匀,无黏连。见图 2。

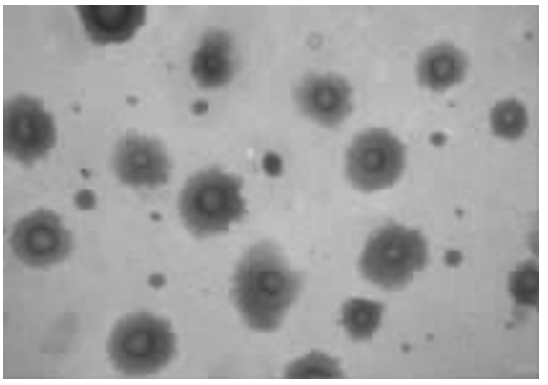


图 2 透射电镜下 ASODN in NP 形态观察 (×60 000)

2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

从电泳结果我们观察到,在血清的样品中,第二包裹 ASODN 样品有明显的亮条带,亮条带为游离的 ASODN,第三游离 ASODN 则没有亮条带,第一 NS + Dextran + ASODN 样品,亮度不及第二样品,同时在样本灌胶处,也出现亮带,为 NP 上结合的部分 ASODN 所致;未加血清的 4 ~ 6 对照样品均出现亮带。由上表明第三游离 ASODN 样品已降解,而包裹 ASODN 能有效的保护 ASODN。见图 3。



1: ASODN 传统吸附组; 2: 包裹 ASODN 组; 3:游离 ASODN 组; 4: 游离ASODN 组; 5: 包裹 ASODN 组; 6: ASODN 传统吸附组(1 – 3 为加血清的样品,4 – 6 为未加血清的对照样品)

图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

3　讨论

ASODN 是一类经人工合成或构建的反义表达载体表达的寡核苷酸片段,其特有的核苷酸序列决定了它能与靶 DNA 或靶 RNA 的碱基互补,阻止这些异常基因的表达,已有大量体内外研究表明,ASODN 在体外和瘤内的注药有明显的抑制肿瘤细胞,促其凋亡作用,并能增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,降低副作用等功效[5-7],但由于 ASODN 为多聚阴离子,而细胞膜上带一定的负电荷,因而具有不易透过细胞膜、并在转运过程中还易被血液和脑脊液中的核酸内切酶迅速降解等,故现在仍无法直接应用于临床,虽然国内外已有不少研究文献报道,将 ASODN 吸附镶嵌在 NP 表面来增加起稳定性,但体内给药后,效果并不理想,原因可能是血清的降解作用。

目前最理想的方法是将 ASODN 包裹在纳米聚合物的内部,从而对其起到保护作用。理想制备的 NP 应具备以下性质: 具有较高的载药量; 具有较高的包封率,如大于 80%; 有适宜的制备及提纯方法; 载体材料可生物降解,毒性较低或没有毒性; 具有适当的粒径与粒形。当前已有研究表明,BCA 载体对细胞属无毒级、无溶血性、生物降解性好、缓释性、对周围组织无明显炎症反应等优势,以此作为载体安全可靠[8,9],近来还有实验表明,以 BCA 包裹抗肿瘤药物制备的 NP 可明显增强药物对肿瘤细胞的靶向作用[10]。因此本研究优选 BCA 作为 ASODN 纳米载体,并引入粒径、载药量、包封率等几个关键指标进行综合评价。

本实验采用界面聚合法制备 NP, 界面聚合法是两种反应单体分别溶于互不相溶的两种溶剂中,而在两相界面发生的聚合反应,该法在制备 NP 药物的有效性已有实验证实[11]。在单因素基础上结合正交试验设计优化制备工艺,确定每个因素的取值。优化制得的 NP 形态规整、大小均匀,无黏连,载药量、包封率理想。而且本方法制备的 NP 不需要以传统的带正电荷的化合物如 CTAB(十六烷基三甲基溴化胺)和 DEAF-Dextran 等来起连接作用,因而也避免了其相关的毒副作用。

我们从电泳实验的情况来看,在血清酶的作用下,样品三游离的 ASODN 迅速降解,样品一和对照六在灌胶处也出现亮条带,考虑为吸附较多 ASODN 的 NP 所受阻力大,难以发生位移,滞留所致,样品二 ASODN 因为有了聚合体外膜的保护,而缓慢的彻底的释放出来。由此可见,ASODN 被包裹制备的 NP 能够有效的保护 ASODN 不被血清中的核酸酶降解,这种保护作用明显优于传统的通过离子相互作用将 ASODN 吸附在聚合物表面制备的 NP。

本实验结果表明,以 BCA 为 NP 的载药载体,通过优化工艺制备的 ASODN in NP,能对 ASODN 起到良好的保护作用,避免给药后药物快速减少,本制备工艺,提供了 DNA 传递方法的一个有意义的尝试,当然我们还将继续深入研究该药物在体外细胞实验和体内给药时的效能。

参考文献:

[1] Meeker A K, De-Marzo A M. Recent advances in telomere biology: implications for human cancer[J]. Curr Opin Oncol, 2004, 16(1): 32-38.

[2] Nel A, Xia T, Madler L, *et al*. Toxic potential of materials at the nanolevel[J]. Science, 2006, 311(5761): 622-627.

[3] Deguchi K, Ishikawa M, Yokokura T, *et al*. Enhanced mass detection of oligonucleotides using reverse-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrum, 2002, 16(22): 2133-2141.

[4] 刘　伟, 张红岭, 周天洋 等. 反义寡核苷酸聚氰基丙烯酸丁酯纳米粒的制备及载药研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(17): 1312-1315.

[5] 程迎新, 高　原, 唐文渊 等. 垂体瘤转化基因反义寡核苷酸抑制胶质瘤增殖的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(19): 1962-1964.

[6] Tao Z, Chen S, Wu Z, *et al*. Targeted therapy of human laryngeal squamous cell carcinoma *in vitro* by antisense oligonucleotides directed against telomerase reverse transcriptase mRNA[J]. J Laryngol Otol, 2005, 119(2): 92-96.

[7] 陈丽莉, 郑　伟, 陈学军, 等. 端粒酶 RNA 反义寡核苷酸对人绒毛膜癌裸鼠移植瘤的生长抑制作用[J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27(2): 90-92.

[8] Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, *et al*. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(4): 519-548.

[9] 杨西晓, 陈建海, 郭　丹. 聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的生物相容性研究[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(10): 1261-1263.

[10] Reddy L H, Sharma R K, Murthy R S. Enhanced tumour uptake of doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in mice bearing Dalton's lymphoma tumour[J]. J Drug Target, 2004, 12(7): 443-451.

[11] Chen J H, Ling R, Yao Q, *et al*. Enhanced antitumor efficacy on hepatoma-bearing rats with adriamycin-loaded nanoparticles administered into hepatic artery[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(13): 1989-1991.

(编辑　栾　嘉)