技术方法

文章编号:1000-5404(2010)20-2260-02

NF-κB 圈套核苷酸-聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备及评价

胡 娟,罗 艳 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院检验科)

【摘要】 目的 制备 NF-κB 圈套核苷酸(decoy ODNs)-聚氰基丙烯酸正丁酯(PBCA)纳米粒(NF-κB decoy ODNs-PBCA-NP)。**方法** 用 DEAE-Dextran 作为稳定剂,通过乳液聚合法制备带正电荷的 PBCA-NP 运载 NF-κB decoy ODNs,检测其形态、粒径、负载率、物理稳定性及细胞毒性。**结果** 制备的纳米粒大小均匀,空白纳米粒平均粒径为 70 nm,zeta 电位为 +21.6 mV,负载率为 97.49%,复合纳米粒平均粒径为 150 nm,在 150 ng/μl 以下浓度几乎观察不到细胞毒性。**结论** 该方法制备了负载率高、大小均匀的、细胞毒性小的 NF-κB decoy ODNs-PBCA 纳米粒。

【关键词】 NF-κB 圈套;聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒;乳液聚合法

【中图法分类号】 Q782 **【文献标志码】** B

核因子-κB(NF-κB)是一种细胞转录因子,它与多种疾病的发生和发展密切相关[1],被认为是这些疾病的新型治疗靶点。NF-κB 圈套策略(NF-κB decoy strategy)是采用人工合成的高亲合力寡核苷酸(oligonucleotide,ODNs)作为圈套来转染细胞,竞争结合转录因子,从而抑制内源性基因表达[2,3]。但 ODNs 细胞膜通透性差,进入细胞内尤其是细胞核内的量少,且易被核酸酶降解。本研究以氰基丙烯酸正丁酯(BCA)为原料,阳离子复合物二乙胺基乙基(diethylaminoethyl)-葡聚糖(DEAE- dextran)做稳定剂,用乳液聚合法制备了 PBCA-NP,以 decoy ODNs 为模型基因制备出核因子-κB 圈套核苷酸-聚氰基丙烯酸正丁酯-纳米粒(NF-κB decoy ODNs-PBCA-NP),研究其负载率、耐酶解能力、细胞毒性及转染细胞的能力,希望为基因治疗和基因调控提供新的手段。

1 材料与方法

1.1 主要材料

BCA(浙江金鹏化工股份有限公司),DEAE-Dextran500000(Sigma 公司),Dextran6000(Sigma 公司),Zetasizer4700(英国马尔文公司),荧光显微镜(日本 Olympus),凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad),透射电子显微镜 HITACHI-600(日本日立)。

1.2 NF-κB decoy ODNs 的合成

NF-κB decoy ODNs 单链(上海生工生物工程技术服务有限公司)序列为:5′-pCGGAAAGTCCCTTTTTTTTAGGGACTTTC-CGCTGGGGACTTTCCTTTTTTTGGAAAGTCCCCAG-3′。将 ODN 单链溶解于 SSC 溶液中,经过退火、复性得到 decoy ODNs。

1.3 DEAE-PBCA 纳米粒的制备

取 30 ml 蒸馏水,用 HCl 调节至 pH 为 2,将 DEAE-dextran 0.12 g、Dextran 0.18 g 加入,待溶解后,将 0.3 g BCA 单体缓慢加入,用 NaOH 调节 pH 值至 6,再搅拌 1 h 即可。

【基金项目】 国家自然科学基金(30271267)

【通信作者】 罗 艳,电话:(023)89012211,E-mail:luoyany@163.com

1.4 NF-κB decoy ODNs-DEAE-PBCA 复合纳米粒制备

将 ODNs 与 NP 分别溶解在等体积的培养液中,再将两者充分混合,室温静置 30 min 即可。

1.5 纳米粒的形态学观察及电位测定

将制成的纳米粒取少量稀释,滴至铜网上,钨酸染色后在透射电镜下观察;另取少量加双蒸水稀释后用纳米粒度仪测定电位。

1.6 负载率测定

制得的纳米粒离心后取上清液稀释,用紫外分光光度计测量光密度值。

负载率 = $(C_0 - C)/C_0 \times 100\%$

其中 C_0 为投入 ONDs 量,C 为上清液中的 ODNs 量。

1.7 物理稳定性及体外耐酶解实验

1.7.1 物理稳定性考察 将 PBCA-NP 悬液密封,一段时间后观察。另取 NP 分别加入不同介质中,观察是否出现凝集。

1.7.2 体外耐酶解实验 将复合纳米粒加入磷酸二酯酶溶液中,同时以不含 NP 的 decoy ODNs 作为对照,于 700 r/min 分别振荡 1、4、8、16 h 后各管加入 NaOH,放置 12 h 后进行凝胶电泳分析。

1.8 细胞毒性实验

接种脑微血管内皮细胞数为 1×10^4/孔,于 5% CO_2,37 ℃孵箱中培养 24 h,用 PBS 冲洗细胞 2 次。加入培养液及不同浓度的纳米粒(每组 3 个复孔,并设空白对照),培养 6 h 后弃上清液,加入培养液培养 48 h,用 MTT 法检测细胞活性。

1.9 体外细胞转染实验

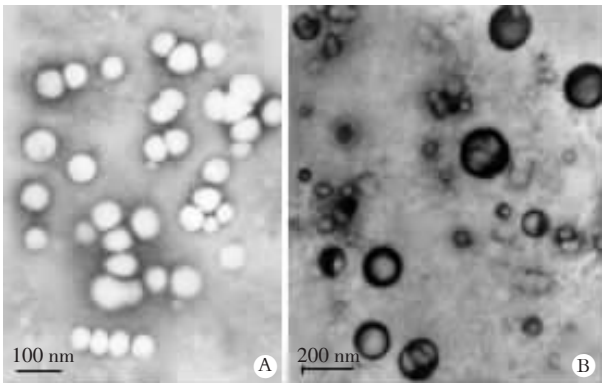
接种脑微血管内皮细胞数为 5×10^4/孔,培养 24 h 后用 PBS 冲洗 2 次。将 PBCA-NPs 同荧光标记的 decoy ODNs、Tween80 混匀;往各培养孔加入配置好的复合物,分别在 30 min、6、12、24 h 收集长有细胞的玻片,荧光显微镜检测。

2 结果

2.1 纳米粒形态及 zeta 电位

PBCA-NP 和载 decoy ODNs 的 NP 呈表面圆形(图 1),大小较均匀,粒子包封完整;经测量空白纳米粒的粒径为 70 nm,复

合纳米粒的粒径为 150 nm。纳米粒度仪测得 PBCA-NP zeta 电位为 21.6 mV,说明该纳米粒表面带有正电荷。



A:空白 NP;B:复合 NP

图 1　透射电镜观察 NP 的形态

2.2　负载率测定

当反应 pH 值为 2 和 7 时,纳米粒的负载率较高;因细胞生存条件接近中性,故将后续反应 pH 值定为 7;而 decoy/PBCA 质量比为 1∶10 时,纳米粒负载率较高,达 97.49%。

2.3　纳米粒的物理稳定性及体外耐酶解实验

2.3.1　物理稳定性考察　　PBCA-NP 加入各种介质之后,我们观察到:加入 PBS 缓冲液及 Tris-HCl 缓冲液的纳米粒发生了显著的凝集;加入 DMEM 培养液的纳米粒有轻微凝集;加入含有小牛血清的 DMEM 培养液及生理盐水的纳米粒未见凝集。封存的纳米粒放置 3 个月后,瓶底有少许沉淀,水浴超声后颗粒能重新分散,粒径无明显变化。

2.3.2　体外耐酶解实验　　凝胶电泳显示 PBCA-NP 结合的 decoy ODNs 即使被磷酸二酯酶消化了 16 h 仍能保持结构的完整,而裸 decoy ODNs 在同样条件下 1 h 已被降解。

2.4　纳米粒的细胞毒性

我们以不同浓度的纳米粒转染细胞,通过 MTT 法检测发现,只有在≥150 ng/μl 的较高浓度才观察到细胞毒性。

2.5　体外细胞转染实验

制得的纳米粒能有效的转染脑微血管内皮细胞。0.5 h 后在细胞内即可观察到绿色荧光,随着转染时间增加,荧光逐渐增多,6~8 h 达到高峰(图 2)。荧光信号开始主要分布在细胞外及细胞质内,随后逐渐进入细胞核内。

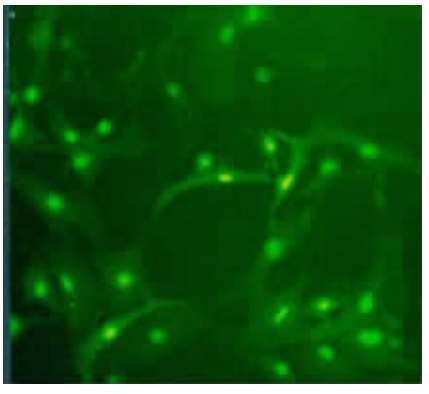


图 2　荧光标记的 ODNs 转染入内皮细胞 6 h 的荧光显微镜观察　(×200)

3　讨论

近年来,非病毒纳米载体以其转染效率高、安全低毒、无免疫原性的特点引起越来越多的关注。本研究选用的 PBCA 纳米粒对细胞无毒性、可提高细胞对寡核苷酸摄入率[4],且经表面活性剂修饰后可携带药物透过血脑屏障[5],可作为许多药物的脑靶向载体[6,7]。由于 ODNs 与 PBCA 均具有阴离子特性,二者之间难以吸附,故需加入阳离子复合物形成带正电荷的纳米粒,以促进两者结合。制备阳离子纳米粒时常用的阳离子聚合物有 CTAB 和 DEAE-dextran,但体外实验发现,DEAE-dextran 所修饰的载 ODNs 纳米粒的稳定性优于 CTAB 所修饰的 ODNs 纳米粒[8]。DEAE-dextran 以镶嵌、吸附等方式在纳米粒的表面形成一个有层次的吸附网,通过自身的阳离子吸附上带阴离子的 ODNs,提高纳米粒的负载率。

通过实验我们再次证实了 PBCA-NP 作为基因载体的优势:制备工艺安全、低廉、反应条件温和、对环境友好;制得的纳米粒大小均匀,负载率高,能保护 ODNs 免受核酸酶的降解。在基因治疗方面,展示出广阔而诱人的前景。

参考文献:

[1] Isomura I, Morita A. Regulation of NF-kappa B signaling by decoy oligodeoxynucleotides[J]. Microbial Immunol, 2006, 50(8):559-563.

[2] Fichtner-Feigl S, Fuss I J, Preiss J C, *et al*. Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappa B decoy oligonucleotides[J]. J Clin Invest, 2005, 115(11):3057-3071.

[3] Wang H, Hu Y, Guo T, *et al*. Inhibition of tissue factor expression in brain microvascular endothelial cells by nanoparticles loading NF-kappa B decoy oligonucleotides[J]. Int J Mol Sci, 2008, 9(9):1851-1862.

[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] Park S I, Lim J H, Hwang Y H, *et al*. *In vivo* and *in vitro* antitumor activity of doxorubicin-loaded magnetic fluids[J]. Physica Status Solidi C Conferences, 2007, 12(4):4345-4351.

[6] Kuo Y C, Chen H H. Effect of nanoparticulate polybutylcyanoacrylate and methylmethacrylate- sulfopropylmethacrylate on the permeability of zidovudine and lamivudine across the *in vitro* blood-brain barrier[J]. Im J Pharm, 2006, 327(1/2):160-169.

[7] Kuo Y C, Su F L. Transport of stavudine, delavirdine, and saquinavir across the blood-brain barrier by polybutylcyanoacrylate, methylmethacrylate- sulfopropylmethacrylate, and solid lipid nanoparticles[J]. Int J Pharm, 2007, 340(1/2):143-152.

[8] Lambert G, Fattal E, Couvreur P. Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 47(1):99-112.

(收稿:2010-04-24 修回:2010-07-14)
(编辑　王小宴)