技术与方法

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.017

pshRNA-survivin脂质体的制备及初步稳定性考察

李耀威[1]，孙江川[1]，常淑芳[1]，张　勇[1]，陈　佳[1]，王志刚[2]
（1. 重庆医科大学附属第二医院妇产科；2. 重庆医科大学附属第二医院超声影像研究所，重庆　400010）

【摘　要】目的：制备包封率高、粒径均匀、稳定性好的 pshRNA-survivin 脂质体，并对其质量进行评价。方法：采用逆相蒸发法制备 pshRNA-survivin 脂质体；正交设计优选制备处方；考察脂质体的粒径分布、zeta 电位；用超滤离心法测定脂质体的包封率；离心加速实验与渗漏率的测定考察脂质体的稳定性。结果：所得优化处方为磷脂与药物比为 100:1，油水比为 4:1，磷脂与胆固醇之比为 1.5:1，旋转蒸发温度为 37℃；以优化处方制得的脂质体平均粒径为 123.4 nm，zeta 电位为（-8.42 ± 0.88）mV，平均包封率达 77.9%。结论：选用逆相蒸发法优化 pshRNA-survivin 脂质体处方合理，工艺简便可行，包封率高，稳定性好。

【关键词】pshRNA-survivin 脂质体；正交设计；超滤离心法；包封率；稳定性
【中国图书分类法分类号】R943　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-05-27

Preparation of pshRNA-survivin liposome and preliminary study on its stability

LI Yao-wei[1], *SUN Jiang-chuan*[1], *CHANG Shu-fang*[1], *ZHANG Yong*[1], *CHEN Jia*[1], *WANG Zhi-gang*[2]
(*1. Department of Gynaecology and Obstetrics; 2. Institute of Ultrasound Imaging, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare pshRNA-survivin liposome with high entrapment efficiency and good stability, and evaluate its quality. *Methods*: pshRNA-survivin liposome was prepared by the reversed-phase evaporation method. The optimum formation was selected by means of orthogonal design of experiment; particle size, zeta potential and stability of the liposome were evaluated. Entrapment efficiency was determined by centrifugal ultrafiltration. Centrifugal acceleration experiment and determination of leak rate were served to prove the liposome stability. *Results*: The optimum formula was as follows: the ratio of lecithin to pshRNA-survivin was 100 : 1; oil-water ratio was 4:1; lecithin:cholesterol was 1.5:1; temperature of steaming was 37℃; the average diameter and zeta potential of pshRNA-survivin liposome were 123.4 nm and (-8.42 ± 0.88) mV. The average entrapment efficiency for pshRNA-survivin was 77.9%. *Conclusion*: The selected formulation and preparation technique of pshRNA-survivin liposome is reasonable in prescription, practicable in techniques, high in encapsulation efficiency and good in stability.

【Key words】pshRNA-survivin liposome; orthogonal design; centrifugal ultrafiltration; encapsulation efficiency; stability

Survivin是细胞内凋亡抑制蛋白家族的一个新成员，它可以通过有丝分裂促进细胞增殖，抑制细胞凋亡[1]。RNA 干扰（RNA interfering，RNAi）技术是较成熟的基因治疗手段。研究发现 RNAi 抑制目的基因的作用强于反义核苷酸[2]。基因治疗的重要目标是获得遗传物质在转导细胞中的持久整合及稳定的表达，因此除目的基因外，载体的选择也是关键问题之一，传统的病毒载体转基因效率高，但具有免疫原性和细胞毒性，而纳米级的脂质体可有效包载基因片段而且无毒，无免疫原性，可实现外源基因稳定持久的表达。重组质粒 pshRNA-survivin 是利用 RNAi 技术设计合成的针对 survivin 编码基因的 siRNA（Small interfering RNA）与质粒 pTZU6+1 载体连接而成。

本研究设计将 pshRNA-survivin 包裹于脂质体中，以包封率为指标，采用正交实验筛选并优化其处方和制备工艺，旨在探索包封率高，稳定性好的 pshRNA-survivin 脂质体。

1　仪器与试剂

1.1　仪器

NanoDrop 2000 分光光度计（Thermo Scientific）；RE-52 型真空旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；enppendorf Centrifuge 5415R-通用台式冷冻离心机（北京中西远大科技有限公司）；KQ2200B 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公

作者介绍：李耀威（1985-），男，硕士，研究方向：肿瘤的基因治疗。
通信作者：常淑芳，女，副教授，Email：shfch2004@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30801228）；重庆市自然科学基金资助项目（编号：CSTC，2008BB5405）；重庆市卫生局资助项目（编号：2011-1-39）。

司）；Microcon®超滤管（Millipore，美国）；Zetasizer Nano ZS 分析仪（英国马尔文公司）；孔径为 0.8、0.45、0.22 μm 的聚碳酸膜（Whatman 公司）；漩涡混合器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；日立 H-7500 透射电镜仪（日本）；FA2104A 电子天平（上海精天电子仪器有限公司）等。

1.2 试剂

大豆卵磷脂（Lipoid S 100，德国 Lipoid GmbH，批号 790636-11），胆固醇（美国 sigma 公司）；DSPE-PEG2000（美国 Avanti 公司）；pshRNA-survivin 重组质粒（3.2 kb，重庆医科大学病毒性肝炎研究所）；其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 pshRNA-survivin 脂质体和空白脂质体的制备

精密称取大豆卵磷脂、DSPE-PEG2000、胆固醇适量，加入含有 7.5 ml 氯仿的圆底烧瓶中，手摇使其充分溶解，37℃全真空减压旋转，蒸发除去有机溶剂，成均匀薄膜，取下圆底烧瓶用氮气吹 15 min，使溶剂除尽；加入 8 ml 氯仿，再加入 2 ml 含 pshRNA-survivin 重组质粒的磷酸盐缓冲液（Phosphate buffered saline，PBS，pH 为 7.3）。振摇，10℃超声水浴 5 min（40 W），形成稳定的 O/W 相；37℃半真空旋转至凝胶状，再继续减压蒸发凝胶转相呈液态，补充一定量的 PBS，超声处理，即得脂质体混悬液，依次通过 0.8、0.45、0.22 μm 的微孔滤膜，滤液分装至西林瓶中，置于 4℃冰箱避光保存备用。采用上述方法制备空白脂质体，4℃冰箱避光保存备用。

2.2 pshRNA-survivin 脂质体包封率的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密量取 pshRNA-survivin 标准液（216.3 μg/ml）4 ml 置于 10 ml 容量瓶中，加 PBS 并定容至刻度，混匀，即得浓度为 86.52 μg/ml 的标准贮备液。

2.2.2 紫外吸收波长的选择 pshRNA-survivin 系短的双链 RNA 片段与质粒 pTZU6+1 重组而成，根据核酸的性质，在 260~280 nm 区域 pshRNA-survivin 有一紫外吸收峰，峰尖在 260 nm 左右。将 pshRNA-survivin 对照品溶液用 PBS 稀释。分别取空白脂质体混悬液和 pshRNA-survivin 脂质体混悬液 0.5 ml，各加入 1 ml 10%Triton x-100 水溶液破膜后，在 200~800 nm 范围内进行全波长扫描。结果表明，pshRNA-survivin 溶液在 260 nm 处有最大吸收，而空白脂质体在此处无吸收，即空白脂质体在 260 nm 处对 pshRNA-survivin 紫外吸收无干扰。详见图 1。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密吸取上述 pshRNA-survivin 标准品储备液 20、40、60、80、100、120、140 μm，加至 5 ml 容量瓶中，PBS 稀释并定容至 5 ml 刻度，混匀即得浓度为 0.346、0.692、1.038、1.384、1.730、2.076、2.423 μg/ml 的 pshRNA-survivin 标准液。以 PBS 为空白，260 nm 处测以上各溶液的吸光度。以吸光度（A）对 pshRNA-survivin 浓度（C）进行线型回归，回归方程为：A=0.020 3C+0.059 6，r=0.998 9（n=7，t_r=49.945 > $t_{0.01(5)}$=4.032，P<0.01）结果表明，pshRNA-survivin 溶液在 0.346~2.423 μg/ml 范围内线性关系良好。

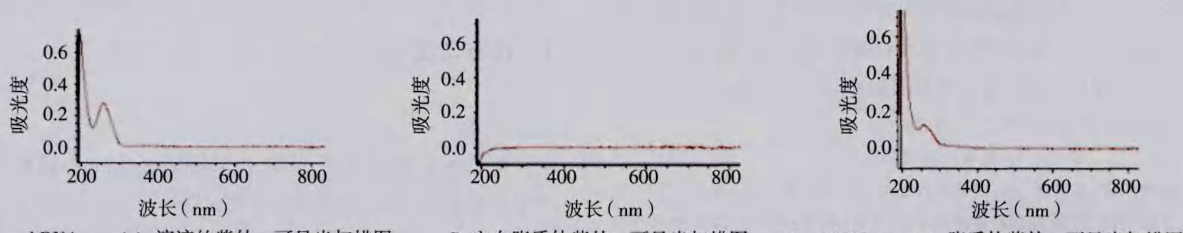
2.2.4 精密度试验 取标准曲线制备项下 pshRNA-survivin 不同质量浓度的标准溶液置 4℃避光条件下放置，以 PBS 为空白，于日内不同时间、日间分别在 260 nm 紫外吸收峰处测定吸光度，连续测定 5 d，计算日内精密度和日间精密度（表 1）。

表 1 紫外分光光度法测量 pshRNA-survivin 溶液的精密度实验结果（n=6）

标准浓度（μg/ml）	日内		日间	
	实测浓度（μg/ml）	精密度（%）	实测浓度（μg/ml）	精密度（%）
0.346	0.346 ± 0.001	0.23	0.345 ± 0.001	0.25
1.384	1.384 ± 0.003	0.17	1.384 ± 0.003	0.19
2.423	2.422 ± 0.005	0.16	2.423 ± 0.005	0.18

2.2.5 超滤膜对脂质体的截留率试验 取空白脂质体混悬液置于 Microcon®超滤管，经 4℃，4 000 r/min 离心 15 min，收集离心液，加入 PBS 适量冲洗，按上述条件离心、洗涤，重复 3 次，收集并合并离心洗涤液。另取等量的空白脂质体混悬液，用 PBS 稀释至上述滤液的体积。通过测量脂质体中磷脂含量[3]（脂质体中磷脂按投料量计算）计算超滤膜对脂质体的截留率，截留率=(A_0-$A_{滤}$)/ A_0×100%，式中 $A_{滤}$为滤液中所含脂质体磷脂的吸光度，A_0为未超滤的空白脂质体磷脂的吸光度。超滤膜对空白脂质体的截留率的测定对照组的吸光度为 2.315，滤液的吸光度为 0.008，截留率为 99.65%，表明该超滤膜能完全截留脂质颗粒。

2.2.6 超滤膜对 pshRNA-survivin 的回收率的测定 将 3 种不同质量浓度的pshRNA-survivin 溶液置于Microcon®超滤管中，经 4℃，4 000 r/min 离心 15 min 后，在 260 nm 处测得吸光度，按标准曲线方程求得 pshRNA-survivin 的量，分别与未超滤的 pshRNA-survivin 相比较，计算回收率，回收率=$C_{滤}$/C_0 × 100%，式中 $C_{滤}$为滤液中 pshRNA-survivin 的质量浓度，



A. pshRNA-survivin 溶液的紫外－可见光扫描图　B. 空白脂质体紫外－可见光扫描图　C. pshRNA-survivin 脂质体紫外－可见光扫描图

图 1 3 种不同样品的紫外－可见光吸收光谱图

C_0 为未超滤 pshRNA-survivin 溶液的质量浓度。结果表明，平均回收率达到 98.20%，精密度为 0.34%；表明该超滤膜能较好的滤过游离的 pshRNA-survivin（表 2）。

表 2 pshRNA-survivin 溶液回收率及精密度测定结果（n=3）

pshRNA-survivin的质量浓度（μg/ml）		回收率（%）	均数 ± 标准差	精密度（%）
离心前	离心后			
48.67	47.55	97.70		
21.63	21.24	98.20	98.20 ± 0.51	0.34
5.41	5.34	98.71		

2.2.7 脂质体包封率的测定 吸取适量 pshRNA-survivin 脂质体的混悬液，定量稀释后，置于Microcon®超滤离心管，4℃，4 000 r/min 离心 15 min，收集超滤液。再用 PBS 洗涤，按上述条件，重复 3 次，分别收集并合并超滤液，测定超滤液在 260 nm 处的吸光度，按标准曲线方程求出超滤液中pshRNA-survivin 的量，计算总的游离 pshRNA-survivin 的量（C_f）。根据以下公式计算 pshRNA-survivin 脂质体的包封率。$EN\%=(1-C_f/C_t)\times100\%$，式中 C_t 为脂质体悬液中 pshRNA-survivin 的总量。

2.3 正交实验

2.3.1 因素和水平的确定 在单因素实验的基础上采用正交实验优化 pshRNA-survivin 脂质体的处方和制备工艺，以脂质体的包封率为考察指标。选择影响脂质体包封率的主要因素：O/W 相体积比（A），磷脂与胆固醇的重量比（B），磷脂与药物的重量比（C）和旋转蒸发温度℃（D），每个因素取 3 水平，按 L9(34)正交表安排实验（见表 3）。

表 3 因素水平表

水平	因素			
	A	B	C	D
1	2.5:1	2:1	40:1	20
2	3:1	1.5:1	80:1	30
3	4:1	1:1	100:1	37

2.3.2 正交实验结果 对表 3 结果进行直观分析，由极差 R 可知对包封率的影响因素大小为 C>A>B>D，再从各因素水平对脂质体包封率的影响来看，因素 A 为 K3>K2>KI，因素 B 为 K2>K3>K1，因素 C 为 K3>K2>K1，因素 D 为 K3>K2>K1。故最佳处方工艺组合应该为 C3A3B2D3，即选择磷脂与药物比为 100:1，油水比为 4:1，磷脂与胆固醇之比为 1.5:1，旋转蒸发温度为 37℃（见表 4）。

2.3.3 结果验证 为了验证“2.3.2”项中所得处方 C3A3B2D3 是否为最佳方案，按该处方制备 pshRAN-survivin 脂质体 3 批；批号为 20110411，20110415，20110417。包封率分别为 77.8%、78.3%、77.6%，平均包封率为 77.9%，表明该处方确实为最优方案，脂质体包封率最高，且重现性良好。

2.4 pshRNA-survivin 脂质体粒径分布、zeta 电位及电镜图像

取最优处方 C3A3B2D3 制备的 pshRNA-survivin 脂质体适量，用 PBS 稀释后用 Zetasizer Nano ZS 分析仪测定。从图 2

表 4 正交试验方案及结果（n=3）

序号	A	B	C	D	包封率（%）
1	1	1	1	1	51.2
2	1	2	2	2	66.5
3	1	3	3	3	73.6
4	2	1	2	3	64.2
5	2	2	3	1	74.2
6	2	3	1	2	56.5
7	3	1	3	2	74.8
8	3	2	1	3	73.4
9	3	3	2	1	72.3
K1	63.77	63.40	60.37	65.90	
K2	64.97	71.37	67.67	65.93	
K3	73.50	67.47	74.20	70.40	
R	9.73	7.97	13.83	4.50	

可以看出，所制得 pshRNA-survivin 脂质体经多次滤膜后粒径分布在 150 nm 左右，平均粒径为 123.4 nm（多分散系数 PDI 为 0.167），粒径分布均匀，符合正态分布规律。zeta 电位为（-8.42 ± 0.88）mV。见图 3。从电镜图片中可以看到（图4），脂质体的形态呈均匀圆形，粒径分布一致。

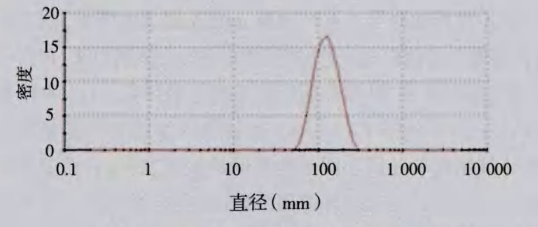


图 2 pshRNA-survivin 脂质体粒经分布

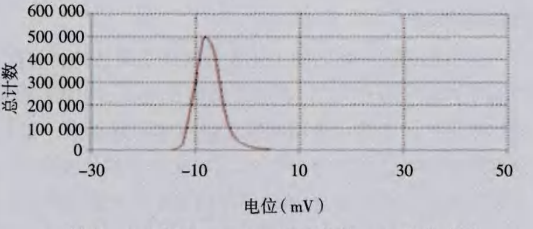


图 3 pshRNA-survivin 脂质体的 zeta 电位分布

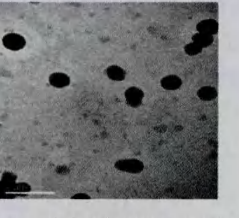


图 4 pshRNA-survivin 脂质体的透射电镜照片（80 kV，20 000×）

2.5 初步稳定性考察

2.5.1 离心加速实验 将最优方案制备的 pshRNA-survivin 脂质体进行离心加速实验（4℃，1 000 r/min，离心 5 min），用分光光度计测定脂质体离心前后 260 nm 处吸光度的变化，根据公式 $K_E=(|A-A_0|)\times100\%$，求稳定性参数 K_E。A_0：脂质体离

心前的吸光度值，A：脂质体离心后的吸光度值[4]。由表 5 实验数据可见，K_E 变化小，脂质体稳定性良好。

表 5 pshRNA-survivin 脂质体离心加速实验结果

样品批次	A_0	A	K_E
20110411	0.276 9	0.255 6	0.021 3
20110415	0.272 3	0.289 1	0.016 8
20110417	0.275 4	0.253 7	0.021 7

2.5.2 渗漏率的测定 将最优方案制备的 pshRNA-survivin 脂质体在 4℃，30℃ ± 3℃、避光条件下于当天、3、6、9、12、15 d 后检测渗漏率。精密量取 pshRNA-survivin 脂质体混悬液 0.5 ml，按“2.2.7”项包封率测定项下处理，并按下式计算贮存过程中的渗漏率。$P=[(W_{包}-W_{储})/W_{包}]\times100\%$，其中，$W_{包}$、$W_{储}$分别为制备时包封率和贮存一定时间后的包封率。结果见表6。

3 讨 论

Survivin 是迄今发现的最强的凋亡抑制因子，survivin 在恶性肿瘤中的表达量很高，而在正常组织中表达很低[1]，因此，survivin 是一个较理想的诱导肿瘤凋亡的靶基因。RNA 干扰（RNAi）是自然界生物体的一种遗传现象，其主要是利用双链 RNA 特异性介导其互补同源 mRNA 序列的降解，从而特异性抑制目的蛋白的表达，抑制作用强[5]。自发现以来，已广泛应用于基因功能、肿瘤和病毒性疾病等的研究。小发夹结构 RNA（Small hairpin RNA，shRNA）转染入细胞的多寡是影响 RNAi 抑制相关基因功能效能高低的关键之一，它需要载体的介导。脂质体是携带外源基因进行细胞转染的常用非病毒载体，具有无免疫原性和细胞毒性小的优点。但目前脂质体对目的基因的包封率较低、径粒较大，从而限制了其对细胞的转染效率[6-9]。

本实验通过一系列的工艺优化得到了最佳的材料配比，使脂质体粒径分布均匀、表面带微量负电荷，增加了脂质体胶体粒子之间的排斥进而减缓了脂质体的絮凝[4,10]。通过对众多脂质体制备方法的比较，本实验采用逆相蒸发法进行处方和制备工艺的筛选。在确定了逆相蒸发法为基本制备方法、通过前期实验阶段在以单因素分析（序贯分析）考察了决定脂质体性状基本条件的基础上，进行正交设计选择处方和优化制备工艺，得到了包封率较高的 pshRNA-survivin 脂质体。

本文选用的超滤离心法可以简便测定脂质体包封率，兼备了离心法的快速和透析法的精确，其回收率、精密度考察亦均较高。考虑到 pshRNA-survivin 重组质粒分子量较大，超滤前将脂质体混悬液稀释数倍，防止脂质体溶液中未被包封的部分因分离不完全而影响包封率测量的准确性，测得的平均包封率为 77.9%。初步稳定性考察证实 4℃、避光环境为贮存 pshRNA-survivin 脂质体的最佳条件，短期内脂质体无絮凝现象、包封率亦无明显变化。

本研究为下一步制备具有主动靶向性的免疫 pshRNA-survivin 脂质体、更好地利用重组质粒 pshRNA-survivin 沉寂 survivin 基因进而介导肿瘤细胞的凋亡提供了实验基础。

参 考 文 献

[1] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.

[2] Aoki Y, Cioca D P, Oidaira H, et al. RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003, 30(1/2): 96-102.

[3] Roger R C N E W. Liposomes: A practical approach[M]. New York: Oxford University Press, 1990. 108-109.

[4] 林巧平，郭仁平，许向阳，等. 注射用姜黄素脂质体的制备及其质量评价[J]. 中国天然药物，2007，5(3)：207-210.

[5] McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(10): 737-747.

[6] Wang S L, Yu F B, Jiang T Y, et al. Design and synthesis of novel galactosylated polymers for liposomes as gene drug carriers targeting the hepatic asialoglycoprotein receptor[J]. J Drug Target, 2008, 16(3): 233-242.

[7] 厉 周，黄宗海，崔大祥，等. 聚酰胺-胺型树枝状高聚合物介导 survivin 反义寡核苷酸抑制结直肠癌裸鼠皮下移植瘤生长的作用[J]. 南方医科大学学报，2008，28(11)：1935-1938.

[8] Han S E, Kang H, Shim G Y, et al. Novel cationic cholesterol derivative-based liposomes for serum-enhanced delivery of siRNA[J]. Int J Pharm, 2008, 353(1/2): 260-269.

[9] Suh M S, Shim G, Lee H Y, et al. Anionic amino acid-derived cationic lipid for siRNA delivery[J]. J Control Release, 2009, 140(3): 268-276.

[10] 赵 浩，王任直，王 菲，等. 脑靶向基因转运免疫脂质体的制备[J]. 药学学报，2009，44(11)：1285-1290.

（责任编辑：冉明会）

表 6 比较不同贮存条件下 pshRNA-survivin 脂质体的外观及渗漏率

储藏时间	外观		渗漏率（%）	
	4℃	30℃ ± 3℃	4℃	30℃ ± 3℃
0 d	混悬液稳定，外观透明，无絮状沉淀	混悬液稳定，外观透明，无絮状沉淀	0	0
3 d	混悬液稳定，外观透明，无絮状沉淀	混悬液稳定，外观透明，无絮状沉淀	0.14	7.24
6 d	混悬液稳定，外观透明，无絮状沉淀	混悬液外观欠透明，无絮状沉淀	0.17	13.67
9 d	混悬液稳定，外观透明，无絮状沉淀	混悬液外观混浊，出现絮状沉淀	0.48	15.82
12 d	混悬液稳定，外观透明，无絮状沉淀	混悬液外观混浊，絮状沉淀明显	0.77	18.84
15 d	混悬液稳定，外观透明，无絮状沉淀	混悬液外观混浊，大量絮状沉淀	1.23	23.56