维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0645-04

EGF 偶联牛血清白蛋白纳米载体的构建

王树斌[1],袁 飞[2],彭志平[1],孙世良[3],李少林[1],罗 弋[1],宋 琳[1]

(1. 重庆医科大学基础医学院放射医学教研室;2. 重庆医科大学基础医学院分子生物学教研室,重庆 400016;
3. 重庆市肿瘤医院放疗科,重庆 400030)

【摘 要】目的:制备表皮生长因子(Epidermal growth factor,EGF)偶联牛血清白蛋白纳米载体,作为多种高表达表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor,EGFR)的肿瘤细胞主动靶向给药的新途径。方法:采用二次超声乳化和溶剂挥发技术制备白蛋白纳米载体,通过化学交联试剂将 EGF 与白蛋白纳米载体偶联,制得 EGF 偶联白蛋白纳米载体并进行核素标记,通过葡聚糖凝胶柱及聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证偶联效果和 EGF 偶联的程度。结果:成功制备得到平均粒径为 34nm 的牛血清白蛋白纳米载体,而且 EGF 与白蛋白纳米载体偶联率较高,所得的 EGF-BSA 纳米载体室温稳定性和血清稳定性均较好。结论:成功制备得到体积较小的牛血清白蛋白纳米载体和 EGF 偶联牛血清白蛋白纳米载体,为进一步探讨其体外肿瘤细胞靶向性及体内分布规律奠定了实验基础。

【关键词】表皮生长因子;白蛋白;纳米载体;偶联
【中国图书分类法分类号】R73-3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-23

Construction of EGF coupling bovine serum albumin nano-carrier

WANG Shu-bin, et al

(*Department of Nuclear Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare EGF-coupling bovine serum albumin nano-carrier as a new way for initiative targeted drug delivery of epidermal growth factor receptor (EGFR) with broad range of expression in tumor cell. *Methods*: albumin nano-carrier was prepared by second phacoemulsification and solvent evaporation technology, and epidermal growth factor (EGF) was conjugated with albumin nano-carrier by chemical crosslinking reagents for EGF coupling bovine serum albumin nano-carrier. *Results*: The prepared nano-carrier then underwent isotope labeling, then the coupling effect of EGF and its coupling level were certified by sephadex column and polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). *Conclusion*: Success in the preparation of the smaller bovine serum albumin nano-carrier and EGF coupling bovine serium albumin nano-carrier establish the experimental foundation for further exploration of its targeting of tumor cells in vitro and distribution in vivo.

【Key word】EGF; Bovine serum albumin; Nano-carrier; Copling

纳米载体一般具有表面积/体积大、催化效率高、吸附能力强、易于进行表面修饰等优点。所以在纳米载体表面进行修饰以避免吞噬细胞的摄取,偶联或吸附适当的配体(包括抗体、半抗原、糖、外源凝集素、叶酸等),皆可以使纳米载体导向于特定的细胞,从而提高其靶向性,增加纳米载体在靶组织中的累积[1]。

EGFR 参与激活一系列复杂的细胞信号转导途径,广泛表达于上皮、间质及神经组织。在正常组织中调控细胞的生长、分裂、分化等重要生理过程,在发生异常的情况下可引起癌变,所以许多恶性肿瘤可出现一种或几种 EGFR 家族受体过表达和(或)突变。过表达和(或)突变在各种肿瘤组织中表达率不同,且与肿瘤的分化程度、恶性程度及侵润程度、放化疗敏感性、肿瘤耐药性及预后等密切相关[2]。EGFR 被认为是抗肿瘤治疗的重要分子靶点[3,4]。因此本研究以 EGFR 酪氨酸激酶为分子靶点,将肿瘤的分子靶向技术和纳米技术结合起来,构建出一种新的具有靶向作用的纳米载体。

1 材料和方法

作者介绍:王树斌(1980-),男,硕士,
研究方向:肿瘤的放射治疗和肿瘤药理。
通讯作者:李少林,男,教授,E-mail:shaolinli202@sina.com。
基金项目:国家自然科学基金项目(No.30070230,No.30424005)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 仪器,药品与试剂

1.1.1 仪器 HITACHI H-600 透射电子显微镜(日本)、Malvern -2000 型激光散射粒径分析仪(英国)、B3200S-T 超声波细胞破碎机(BRANSON 上海必能胜有限公司)、BS 210 S 电子天平(德国 Sartorius 公司)、90-2 型定时恒温磁力搅拌器(上海沪西分析仪器厂)。

1.1.2 药品与试剂 牛血清白蛋白(BSA)(美国 Amresco 公司,生物技术级)、表皮生长因子(EGF)(英国 PeproTech EC LTD)、25%戊二醛(美国 Sigma 公司)、^{125}I(成都中核高通同位素股份有限公司)、甲苯(重庆川东化工公司)、硫酸 -N- 羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-N-hydroxysucciinimide,Sulfo-NHS)(PIERCE 公司)、1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基碳二亚氨)(1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl carbodiimide,EDC)(Sigma-Aldrich 公司)、Emulsifier(OP-4),硅胶 60 薄层层析板(TLC-SG)(德国 Merck KGaA 公司),其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 BSANP 的制备及粒径和形态观察

1.2.1.1 BSANP 的制备 25%戊二醛水溶液与甲苯按 1∶5 体积比混合振荡,分层后取上层的甲苯层,得到戊二醛的甲苯溶液,经紫外分光光度法测定,其浓度为 0.221mol/L,备用。1ml 水相(20%的牛血清白蛋白生理盐水溶液)和 50ml 油相(环己烷,含 2%乳化剂 OP-4)在 600r/min 转速下搅拌混合 1h,再 120W 超声乳化 20min,加入一定量的戊二醛甲苯溶液后,搅拌固化 2h。

1.2.1.2 BSANP 的纳米粒的粒径和形态观察 纳米载体的粒径和形态分析采用激光粒径仪测定纳米载体的粒径大小和分布;通过透射电镜观察纳米载体形态。取纳米载体混悬液适量,加蒸馏水适量稀释,0.22μm 滤器过滤,用 1.5%(W/V)用醋酸双氧铀负染色,滴于镀膜的电镜铜网上,晾干后,置于透射电镜下观察,拍照。

1.2.2 EGF-BSANP 的制备及鉴定

1.2.2.1 EGF-BSANP 的制备 EGF 与 BSANP 通过可溶性交联剂 EDC 进行共价连结。取 BSA 纳米载体 1mg 加入到 0.1mol/L MES 溶液(pH6.0)1ml 中,加入 0.4mg EDC 和 0.6mg Sulfo-NHS,室温反应 15min,加入 EGF(100μg)室温搅拌 2h。连接反应中 EGF∶BSANP 的摩尔比为 1∶1。

1.2.2.2 EGF-BSANP 偶联程度的测定 ^{125}I 用氯胺 T 法标记 EGF,分离纯化后测定 EGF 放射比活度(580,400CPM/ml)。分别取 ^{125}I-EGF10μl、50μl、100μl、150μl、200μl 与 BSANP 50μl 进行连接反应,步骤同上,加入 10%三氯乙酸沉淀蛋白,离心后测沉淀放射性换算成 ^{125}I-EGF 的量,得单位质量 BSA 偶联 EGF 的偶连率。

$$偶联率(\%)=\frac{沉淀放射性计数}{加入的\ EGF\ 总放射性计数}\times 100\%$$

1.2.2.3 柱层析分离纯化 EGF-BSANP Sephadex G50 葡聚糖凝胶柱分离纯化 EGF-BSANP,取葡聚糖 3g,蒸馏水浸泡 2h,加入层析柱,葡聚糖柱长 20cm,用 0.01mol/LPBS 润洗 2~3min 后加入所制的样品。以 6~10 滴 /min 接取层析液,4 滴 / 管,进行分离纯化,收集先流出的有乳光部分,即 EGF-BSANP 溶液,测每管 cpm 值。

1.2.2.4 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳定性鉴定 EGF-BSANP 和 BSANP 取 10μl EGF-BSANP 和 BSANP 加入聚丙烯酰胺凝胶(分离胶为 10%、浓缩胶为 4%),100V 电泳 15min,120V 电泳 40min,考马斯亮蓝染色 2h,在脱色液中浸泡过夜,观察结果,数码成像。将二者的电泳条带与标准分子量的电泳条带进行比较,初步了解 EGF 与 BSANP 是否连接成功。

1.2.2.5 EGF-BSANP 的形态观察 将纯化 EGF-BSANP 溶液醋酸双氧铀负染色,透射电子显微镜观察形态,并拍照。

1.2.2.6 EGF-BSANP 的粒径大小分布测定 室温条件下,取纯化 EGF-BSANP 胶体混悬液适量,加入适量蒸馏水稀释,用激光散射粒径分析仪测定纳米载体的粒径及其分布。

1.2.2.7 EGF-BSANP 的稳定性的测定

1.2.2.7.1 室温稳定性的测定 500μl 纯化的 EGF-BSANP 靶向纳米粒室温放置 1h、6h、12h 和 24h,纸色谱层析(Paper chromatography,PC)测定放射化学纯度,在每个时间点吸取 10~20μl 溶液点样,流动相为 75%乙醇,测定 CPM,计算各时间点的放射化学纯度,并与第 1 个时间点的放射化学纯度(RCP)进行比较。以上步骤重复 3 次。

1.2.2.7.2 血清稳定性的测定 500μl 纯化的 25I-BSANP (40kBq)加入 2 倍体积新鲜人血清中,37℃分别孵育 0.5h、1h、2h、4h,TLC 测定放射化学纯度,在每个时间点吸取 10~20μl 溶液点样,展开剂同上,测定 CPM,计算放射化学纯度。以上步骤重复 3 次。

1.3 统计分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS11.5 软件进行单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结 果

2.1 EGF-BSANP 与 BSANP 的形态、粒径大小及分布

透射电镜观察,纳米载体形态圆整,大小较均匀见图 1、图 2。激光散射法测定的 BSANP 平均粒径为 34nm,90%的粒径小于 38nm。EGF-BSANP 平均粒径为 38nm,90%的粒径小于 40nm,粒径比 BSANP 略为增大。

2.2 靶向纳米载体的鉴定

2.2.1 EGF-BSANP 的柱层析图 图 3 洗脱曲线中第 1 个峰对应于纯化了的 EGF-BSANP,第 2 个峰对应于未反应的 BSANP,第 3 个峰对应于未标记上的游离 ^{125}I,由以上洗脱曲线可以清楚地看到 EGF- BSANP 与未反应的 BSANP 及其他杂质完全

维普资讯 http://www.cqvip.com

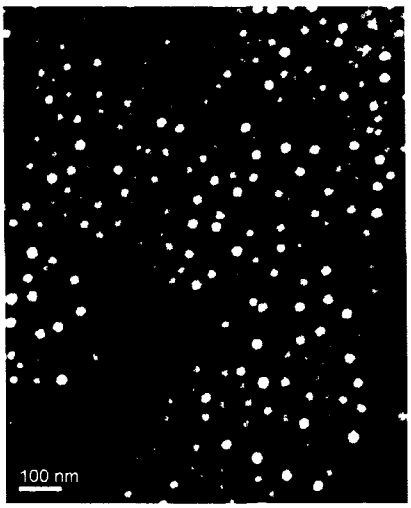


图 1 BSANP 的透射电镜照片
(×100 000 醋酸双氧铀负染)

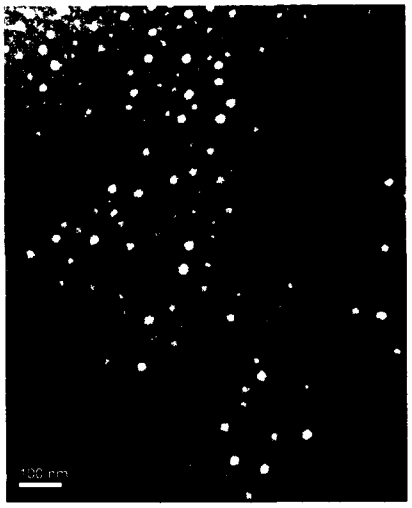


图 2 EGF-BSANP 的透射电镜照片
(×100 000 醋酸双氧铀负染)

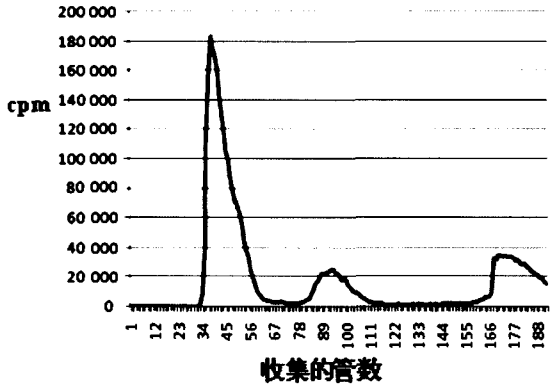
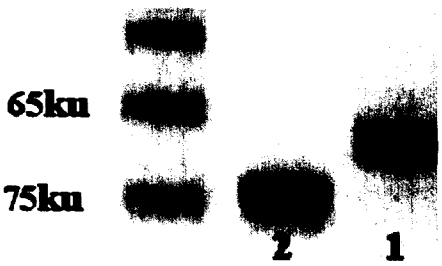


图 3 EGF-BSANP 在 Sephadex G50 葡聚糖凝胶柱上的柱层析分离图



1. BSANP 2. EGF-BSANP

图 4 EGF-BSANP SDS-PAGE 电泳图

分离。

2.2.2.1 SDS-PAGE 电泳 EGF-BSANP 对合成产品进行 SDS-PAGE 电泳,EGF 分子量为 6 200u,BSANP 的分子量为 69ku,EGF-BSANP 的理论分子量为 75ku。结果见电泳图 4,BSANP 样品电泳条带与 Marker 68ku 接近,而 EGF-BSANP 样品电泳条带与 Marker 75ku 接近,说明 EGF 与 BSANP 连接,形成 EGF-BSANP。

2.2.2.2 EGF-BSANP 偶联程度的测定 根据以上公式 5 组 BSANP 分子表面上 EGF 的偶联率分别为 89.4%、92%、91.2%、94.8%和 93.3%,换算成 1 μg BSANP 样品表面的 EGF 偶联量测定值分别为 0.013 μg、0.065 μg、0.128 μg、0.195 μg、0.243 μg。

表 1 EGF-BSA 靶向纳米粒在室温放置不同时间的化学纯变化(%,$\bar{x} \pm s$,n=3)

	1h	6h	12h	24h
EGF-BSANP	96.17 ± 2.60	92.40 ± 1.30	88.40 ± 1.77	86.00 ± 1.77

表 2 EGF-BSA 靶向纳米载体在血清放置不同时间的化学纯变化(%,$\bar{x} \pm s$,n=3)

	1h	6h	12h	24h
EGF-BSANP	95.30 ± 1.91	92.33 ± 1.88	87.07 ± 3.76	83.20 ± 2.10

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2.3 EGF-BSANP 稳定性的测定

2.2.3.1 EGF-BSANP 室温稳定性的测定 在室温放置 1h、6h、12h 和 24h 进行 TLC，见表 1。采用软件统计分析得：同一时间点组内无显著性($P<0.05$)，在 24h 内放化纯度差异有显著意义($P>0.05$)，做回归分析 F 值为 30.46 时间于放射纯度呈线性相关，回归方程为 $Y=99.37-3.451X$，R^2 为 0.942，$n=3$。结果显示，^{125}I-EGF-BSANP 在中性 pH 溶液中，室温 24h内具有较好的稳定性，^{125}I 不易脱落。

2.2.3.2 EGF-BSANP 血清稳定性的测定 在血清孵育放置 1h、6h、12h 和 24h 进行 TLC，见表 2。采用软件统计分析得：同一时间点组内无显著性($P<0.05$)，在 24h 内放化纯度差异有显著意义($P>0.05$)，做回归分析 F 值为 87.98 时间于放射纯度呈线性相关，回归方程为 $Y=99.86-4.156X$，R^2 为 0.981，$n=3$。结果显示，^{125}I-EGF-BSANP 在血清中，24h 内具有较好的稳定性，^{125}I 不易脱落。

3 讨 论

目前，白蛋白纳米载体制备有超声乳化法、去溶剂化法、pH- 凝聚法、快速膨胀超临界溶液法、机械研磨法等。本研究采用二次超声乳化和溶剂挥发技术[5]，在常规的实验条件下，用溶解在甲苯中的戊二醛作交联剂，制备白蛋白纳米载体，形态圆整，大小较均匀。

由于白蛋白分子有大量可以进行化学修饰的有效连接的表面活性氨基(Surface reactive am in ogroups，SRAG)，根据白蛋白纳米载体本身的特性结合机体在肿瘤发生时所产生的病理生理变化，制作出具有相应靶向特征的纳米载体，达到在特定机体环境中的靶向作用，所以我们设想先制备牛血清白蛋白纳米颗粒(Bovine serum albumin nanoparticles，BSANP)，通过羧和反应将与白蛋白纳米载体表面的活性氨基与 EGF 进行偶联反应，制备 EGF 偶联白蛋白纳米载体，EGFR 在多种肿瘤细胞表面高表达的特点，使其具有主动靶向作用，以期提高白蛋白纳米载体的肿瘤细胞摄取量。EGFR 介导的白蛋白纳米载体可用于治疗乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌等多种肿瘤，具有诱人的应用前景。本研究首次就 EGF 偶联白蛋白纳米载体(EGF conjugated bovine serum albumin nanoparticles，EGF-BSANP)的制备及其相关性质进行了研究，为进一步研究肿瘤细胞的摄取机理及体内分布规律奠定基础。

Maller 等[6]以羟丙基纤维素溶于二氯甲烷与甲醇混合液做乳剂，用溶有二氯甲烷的戊二醛交联，采用超声乳化技术获得了直径小于 200nm 的白蛋白纳米粒。本研究制得的纳米载体粒径比之还小，这是因为制备过程中采用了较大的超声功率(120W)和较长的超声时间(20min)，并选用了合适的乳化剂，所以交联后就得到了更小粒径的纳米载体。较小的体积和亲水性的表面可以减少调理反应，从而使其不易被巨噬细胞吞噬。纳米载体的粒径与蛋白的调理也有密切的关系，粒径越小，蛋白质和调理素吸收越少，巨噬细胞摄粒也随之减少。纳米载体如有理想的粒径并经表面亲水性基团修饰后，可有效避免网状内皮系统吞噬，在体循环中长时间存在，降低了药物对网状内皮系统的靶向性，增加了对病变部位的靶向性；还可以显著提高透过血脑屏障的量，将药物定向地输送到中枢神经系统而发挥作用靶向治疗一般都以肿瘤细胞表面高表达的分子作为靶向分子[7]。

纳米载体应用于肿瘤的诊断治疗中，由于肿瘤细胞本身吞噬能力较强，其周围新生毛细血管的通透性较大，基膜不连续甚至缺如，纳米载体依靠粒径较小的优势很容易进入并在瘤组织内聚集，从而可以提高疗效，减少给药剂量和毒性反应[8]。将 EGF 与 BSA 纳米载体偶联可以通过配体受体特异结合的生物靶向作用进一步提高 EGF-BSA 纳米载体的靶向性，使之能在高表达 EGFR 的肿瘤靶向治疗中发挥更好的靶向作用。

4 结 论

本研究首次成功制备得到体积较小的牛血清白蛋白纳米载体和 EGF 偶联白蛋白纳米载体，并且 BSA 纳米载体与 EGF 的偶联率较高，在室温和血清中的稳定性较好，为进一步探讨其体外肿瘤细胞靶向性及体内分布规律奠定了实验基础。

参 考 文 献

[1] Oyewumi MO，Mumper RJ. Comparison of cell uptake，biodistribution and tumor retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumor-bearing mice[J]. Control Rel，2004；95(3)：613-626.

(下转第 682 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

奋对梗死后心肌的毒性作用。

别嘌呤醇改善胶原重塑的细胞与分子生物学机制至今未明,可能与抑制缺血心肌产生大量 ROS 有关,包括超氧阴离子($\cdot O_2^-$)、羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)、单线态氧($^1O_2$)等,形成级联反应大量生成 ROS,可通过细胞内多条氧化还原信号通路[6],激活细胞炎症因子网络如 MAPKs,调节氧化还原敏感的转录因子如 NF-κB,激活基质金属蛋白酶,一方面刺激心肌细胞增殖肥大,另一方面大量溶解胶原,造成局部室壁变薄和室腔扩张。业已证实,直接清除·OH 可以改善心室重构和功能紊乱[2]。黄嘌呤氧化酶(XO)是心肌组织中产生 ROS 的主要酶源之一,在缺血心肌中表达增加和活性增强[3,4],而别嘌呤醇及其活性代谢物羟嘌呤醇(Oxypurinol)作为竞争性抑制剂能有效抑制黄嘌呤氧化酶活性,从而减少 ROS 的生成[7]。本研究用清除·O_2^- 和·OH 活力反映 ROS 的生成量,清除活力高则表明心肌组织中·O_2^- 和·OH 含量低;另测定 XO 活力及蛋白表达。结果别嘌呤醇治疗组心肌组织清除·O_2^- 和·OH 活力明显升高,XO 活性降低,蛋白表达与 MI 组比较无统计学差异。据此推测别嘌呤醇可能通过抑制 XO 活性,减少 ROS 的生成,从而抑制氧化应激介导的心室重构而发挥作用,而对 XO 蛋白的表达无明显影响。

别嘌呤醇作为降尿酸药物广泛应用于临床,其安全性已经得到认可,目前已用于治疗心衰伴高尿酸血症的患者[8]。本研究表明,心肌梗死应用别嘌呤醇治疗有利于改善心室重构,延缓心力衰竭。这种额外的药理机制将为临床治疗心肌梗死提供一条新思路。

参 考 文 献

[1] Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications[J]. Circulation, 1990; 81(4): 1161-1172.

[2] Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, et al. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress[J]. Circ Res, 2000; 87(5): 392-398.

[3] Cappola TP, Kass DA, Nelson GS, et al. Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. Circulation, 2001; 104(20): 2407-2411.

[4] Mellin V, Isabelle M, Oudot A, et al. Transient reduction in myocardial free oxygen radical levels is involved in the improved cardiac function and structure after long-term allopurinol treatment initiated in established chronic heart failure[J]. European Heart Journal, 2005; 26(15): 1544-1550.

[5] Delyani JA, Robinson EL, Rudolph AE. Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001; 281(2): H647-H654.

[6] Shah AM, Channon KM. Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease[J]. Heart, 2004; 90(5): 486-487.

[7] Minhas KM, Saraiva RM, Schuleri KH, et al. Xanthine oxidoreductase inhibition causes reverse remodeling in rats with dilated cardiomyopathy[J]. Circ Res, 2006; 98(2): 271-279.

[8] Doehner W, Schoene N, Rauchhaus M, et al. Effects of Xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from 2 placebo-controlled studies[J]. Circulation, 2002; 105(22): 2619-2624.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 648 页)

[2] Jose B. Why the epidermal growth factor receptor? The rational for cancer therapy[J]. Oncologist, 2002; 7(S4): 2-8.

[3] Josep T. The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents[J]. Molecular Cancer Research, 2007; 5(33): 203-220.

[4] Press MF, Lenz HJ. EGFR, HER2 and VEGF pathways: validated targets for cancer treatment[J]. Drugs, 2007; 67(14): 2045-2075.

[5] 王 恺,马光辉.白蛋白纳米球药物载体制备及表征[J]. 过程工程学报,2004;4(2):155-159.

[6] Muller BG, Leuenberger H, Kissel T. Albumin nanospheres as carriers for passive drug targeting: an optimized manufacturing technique[J]. PharmRes, 1996; 13(1): 32-37.

[7] Aboubraker M, Puisieux F, Couvreur, et al. Physicochemical characterization of insulin loaded poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization[J]. Int J Pharm, 1999; 183(1): 63.

[8] Davis SS. Biomedical application of nanotechnology-implications for drug targeting and gene therapy[J]. Trends of Biotechnol, 1997; 15(6): 217-224.

(责任编辑:冉明会)