

三层同轴电喷-去模板法制备核壳纳米颗粒 用于蛋白质药物输送*

曹丽华¹ 王红军^{1,2} 涂克华^{1,2} 蒋宏亮^{1,2} 王利群^{1,2**}

(¹ 浙江大学高分子科学与工程学系 ² 高分子合成与功能构造教育部重点实验室 杭州 310027)

摘 要 分别以聚乙二醇(PEG)、聚(丙交酯-乙交酯)(PLGA)和牛血清白蛋白(BSA)为冠、壳和核层材料,采用三层同轴电喷技术制备得到微米颗粒.激光共聚焦显微镜(LSCM)显示,该方法制备得到的微米颗粒呈现核-壳-冠结构.通过脱去该微米颗粒的PEG冠层(模板),得到包载有BSA的纳米颗粒.研究发现,随着壳层PLGA溶液进样速度的减慢,去模板后纳米颗粒的粒径从约146 nm减小到68 nm.BSA在纳米颗粒中的包埋率可高达78.3%,并且其释放没有显著的药物暴释现象.圆二色谱结果表明,同轴电喷过程对BSA二级结构影响很小.因此,利用三层同轴电喷-去模板法可制备得到粒径可调控的蛋白质纳米载体系统,并且该过程中蛋白质的结构基本维持不变.

关键词 同轴电喷, 纳米颗粒, 核壳结构, 蛋白质, 药物输送

随着基因技术和单克隆抗体技术的迅速发展,越来越多的蛋白质药物成为临床治疗疾病的首选^[1,2].但是蛋白质具有在生理环境中易变性、血液半衰期短、难以穿过生物屏障以及免疫原性等特点^[3],这些特性很大程度上制约了其临床使用.所以制备合适的药物载体系统成为拓展蛋白药物应用范围的关键.

目前已有很多方法可将蛋白药物负载到高分子载体颗粒中,如乳化-溶剂挥发法、自发乳化扩散法、纳米沉淀法等^[4~6],但是在蛋白包载过程中,这些方法不可避免地涉及到乳化剂、有机溶剂和高速搅拌等,易导致蛋白变性^[7,8].近年来,Wang等利用同轴电喷制备了蛋白药物的载体颗粒,为蛋白药物的包载提供了一个新的方法.而且他们的研究还发现电喷过程不会显著影响蛋白的二级结构和生物活性^[9].

但是,目前利用电喷技术还很难控制载体颗粒的尺寸,而且所制得颗粒的粒径普遍在微米到亚微米范围^[10~12].例如,Chang等通过调节电压、高分子溶液的浓度与进样速度等制备参数,电喷制得的颗粒粒径在860~275 nm的亚微米范围^[13].事实上,到目前为止,鲜有关于电喷方法制

备高分子载体颗粒其粒径小于100 nm的报道.而作为药物输送载体,颗粒粒径是影响其体内转运与分布的关键因素之一^[14],它还影响细胞对颗粒的摄取效率和摄取机制^[15~17].大量研究表明,相比于微米颗粒,纳米颗粒具有更好的生物黏附性,可显著提高药物的生物利用度^[18,19].

本文利用一种“三层同轴电喷-去模板法”,制备得到了包载有蛋白药物的纳米颗粒.该方法包括以下两个步骤:第一步,通过三层同轴电喷制备包载蛋白质的核-壳-冠微米颗粒;第二步,选择合适的溶剂将微米颗粒冠层脱除,从而将微米级载药颗粒的粒径降到100 nm以下.本文还研究了蛋白载药系统的微结构、纳米颗粒尺寸的调控以及药物的体外释放行为.

1 实验部分

1.1 原料和仪器

聚乙二醇(PEG, $M_n = 20 \times 10^3$),国药集团化学试剂有限公司;聚(D, L-丙交酯-乙交酯)(PLGA, $M_n = 37 \times 10^3$, LA:GA = 75:25),自制;牛血清白蛋白(BSA),华美生物科技有限公司;异硫氰酸荧光素(FITC),Sigma Aldrich公司;透析袋,

* 2014-01-07 收稿,2014-02-27 修稿;国家自然科学基金(基金号 21174125, 21074112)资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: lqwang@zju.edu.cn

doi:10.11777/j.issn1000-3304.2014.13479

上海源叶生物科技有限公司,截留分子量 1×10^5 ;其余药品试剂均为分析纯。

扫描电子显微镜 (SEM), 日本日立公司, 型号 Hitachi S-4800;透射电子显微镜 (TEM), 日本 JEOL 公司, 型号 JEM-1230; 原子力显微镜 (AFM), 日本精工电子科技有限公司, 型号 SPI-3800N;激光共聚焦显微镜 (LSCM), 德国徕卡公司, 型号 SP5 II; 纳米粒度电位分析仪, 英国马尔文公司, 型号 ZSEC; 紫外分光光度计 (UV), 日本岛津公司, 型号 UV1800; 多功能圆二色性谱仪 (CD), 法国比奥罗杰公司, 型号 MOS-450。

1.2 纳米颗粒的制备与表征

同轴电喷装置主要包括 4 部分: 自制的三层同轴喷射头, 高压直流电源, 注射泵和接收平台。冠层溶液为 0.1 kg/L PEG, 溶剂为三氟乙醇 (TFE); 壳层溶液为 0.03 kg/L PLGA, 溶剂为 *N,N'*-二甲基甲酰胺 (DMF) 和氯仿混合溶剂 ($V/V = 3/7$); 核层溶液为 0.01 kg/L BSA, 溶剂为水。将 3 种溶液通过独立的注射泵同时进样到喷射头处, 在适当电压的作用下, 溶液拉伸, 随后断裂形成液滴, 溶剂挥发, 固化形成颗粒。固定核层和冠层溶液的进样速度为 0.06 和 1.0 mL/h, 调节壳层溶液进样速度从 1.2 mL/h 依次降低到 0.5 mL/h。以平铺铝箔纸作为颗粒接收平台, 固定喷口与接收平台间的距离为 16 cm, 电压为 17 ~ 18 kV。用扫描电镜表征电喷颗粒的形貌, 并通过电镜照片用软件统计颗粒的粒径 (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Inc., $n = 100$)。

将上述得到的电喷颗粒转移到菌种瓶, 加入去离子水, 室温搅拌, 使颗粒的冠层材料 PEG 充分溶解。慢速定量滤纸过滤 (孔径 1 ~ 3 μm), 用纳米粒度电位分析仪检测滤液中颗粒的粒径。将溶液滴于铝箔纸、铜网和云母片上, 室温干燥, 用扫描电镜、透射电镜和原子力显微镜表征脱除 PEG 冠层后颗粒的大小与形貌。

为了表征颗粒的内部微结构, 将荧光染料 FITC 分别加入到冠层 PEG 和核层 BSA 溶液中。核层、壳层和冠层溶液的进样速度分别为 0.06, 0.8 和 1.0 mL/h。采用激光共聚焦显微镜观察电喷颗粒的结构。

1.3 BSA 的包埋和体外释放

为了提高 BSA 的载药量, 将 BSA 溶液的浓度增加到 0.02 kg/L, 其余溶液浓度不变。核层、壳层和冠层溶液进样速度分别为 0.06, 0.8 和 1.0

mL/h, 电喷制备载药颗粒, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。颗粒溶于二氯甲烷, 抽真空除去溶剂, 加入一定体积的磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.1 mol/L, pH = 7.4), 用考马斯亮蓝法测量 BSA 的浓度^[20], 并计算 BSA 的载药量和包埋率。

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{药物质量}}{\text{载药纳米颗粒质量}} \times 100\%$$

$$\text{包埋率}(\%) = \frac{\text{纳米颗粒中药物的质量}}{\text{投入药物质量}} \times 100\%$$

为了跟踪 BSA 的体外释放, 将颗粒置于含有 2 mL PBS 的透析袋内 (截留分子量 1×10^5), 将透析袋浸入 30 mL PBS 释放液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡。在预定时间点将释放液全部取出, 加入同体积新鲜 PBS, 用考马斯亮蓝法测量释放液中 BSA 的浓度, 并计算其累积释放量。

1.4 圆二色性谱表征 BSA 二级结构

为了考察电喷过程对蛋白质二级结构的影响, 用圆二色性谱仪表征电喷前后的 BSA。收集 1.3 节中制备的载药颗粒, 平均分成 2 份, 加入 PBS 溶液, 分别置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱和 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡箱 72 h。过滤, 圆二色性谱仪检测滤液, 每组至少测量 3 遍。

1.5 统计分析

所得数据以 mean $\pm$ SD 表示, 用 Student's *t*-检验分析各组数据之间的统计差别, $P < 0.05$ 时认为有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 纳米颗粒的制备

采用三层同轴电喷-去模板法, 制备核-壳纳米载蛋白质颗粒。由于 PEG 具备良好的生物相容性和水溶性, 易于溶解脱除, 被选作冠层材料; PLGA 具有良好的生物相容性、生物可降解性和疏水性, 将其用作壳层材料; 牛血清白蛋白作为模型蛋白质用作核层材料。

用三层同轴电喷法可以制备得到表面光滑的球形颗粒, 如图 1(a) 所示。当 BSA、PLGA、PEG 溶液的进样速度分别为 0.06、0.8 和 1.0 mL/h 时, 所得颗粒平均粒径为 $(1.8 \pm 0.8) \mu\text{m}$ 。同时, 发现颗粒粒径分布较宽, 这可能是由于核层 BSA 水溶液的导电率较大 (456 $\mu\text{S}/\text{cm}$), 影响电喷时喷口处的溶液形成“cone-jet”喷射模式^[21]。有研究认为, 只有在“cone-jet”这种稳定的喷射模式条件下, 溶液才能电喷形成粒径均一的颗粒^[22]。三层

同轴电喷所得颗粒的内部结构如图 1(b) 所示, 颗粒冠层由于混入 FITC 而产生明亮的绿色荧光, 而核层由于溶液进样速度慢, 荧光物质少, 产生的荧

光弱, 壳层没有荧光物质而呈现暗层. 颗粒内部层与层之间界限清晰, 具有典型的核-壳-冠的结构.

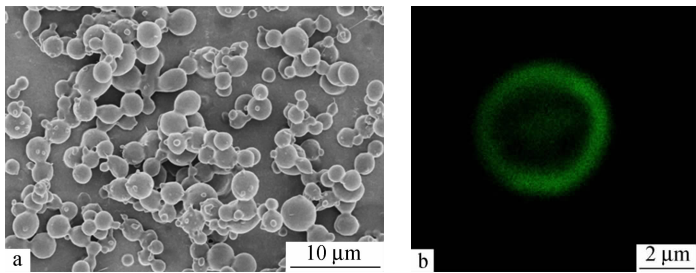


Fig. 1 (a) SEM image and (b) LSCM image of BSA/PLGA/PEG core-shell-corona microparticles
The feed rates of core, shell and corona fluids were fixed at 0.06, 0.8 and 1.0 mL/h, respectively.

通过水洗, 将颗粒冠层模板材料 PEG 脱除, 得到的颗粒形貌如图 2 所示. SEM 照片显示, 颗粒较好地保持了球形, 且表面光滑, AFM 照片也证实了这一点. 由图 1(b) 所知, 三层同轴电喷制备得到的颗粒为三层结构, 冠层材料是水溶性很好的 PEG, 其溶液浓度和进样速度都较壳层

PLGA 溶液大, 所以在脱除冠层 PEG 模板后, 颗粒粒径大幅度降低. 经动态光散射测试得到, 模板脱除后颗粒的平均粒径为 (94 ± 8) nm (图 3(a)), 与 TEM (图 3(b)) 结果基本一致, 同时还可观察到模板脱除后颗粒的粒径分布较宽, 这与模板移除前颗粒粒径的宽分布相对应. 根据制备微球时

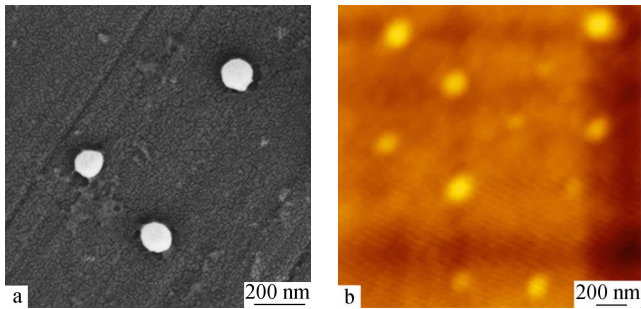


Fig. 2 Morphology of the nanoparticles after water treatment: (a) SEM image and (b) AFM image
The feed rates of core, shell and corona fluids were fixed at 0.06, 0.8 and 1.0 mL/h, respectively.

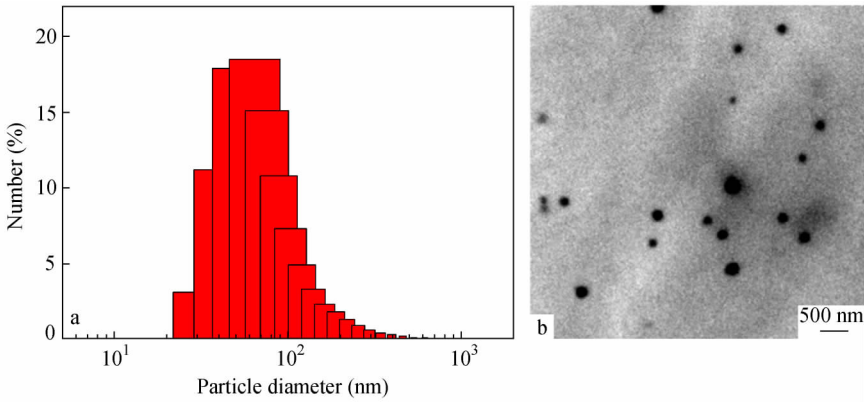


Fig. 3 Particle size and size distribution of the nanoparticles after water treatment: (a) particle size characterized by nano particle potential analyzer and (b) TEM image
The feed rates of core, shell and corona fluids were fixed at 0.06, 0.8 and 1.0 mL/h, respectively.

各层溶液的浓度和进样速度,计算得微米颗粒的内两层与冠层的质量比约为 1:4,若各层的密度接近,推算脱除模板前后颗粒的粒径比约为 1.72:1.但是,实际测得脱除模板后颗粒的粒径明显小于推算的粒径,这可能是由于在三层同轴电喷过程中,各层溶剂不同、材料表面张力差异以及受层与层之间界面作用力影响等多方面因素,导致形成的微米颗粒外壳大而内部颗粒粒径较小.

2.2 壳层溶液进样速度对颗粒粒径的影响

为了考察壳层溶液流速对颗粒粒径的影响,固定核冠两层溶液的流速,改变壳层 PLGA 溶液的进样速度 (1.2 ~ 0.5 mL/h),通过三层同轴电喷制备得到微米颗粒,所得颗粒形貌与图 1(a) 相似.经统计分析,壳层溶液的进样速度对微米颗粒平均粒径影响较小,均在 1.6 ~ 1.8 μm 之间(图 4);但模板脱除后的纳米颗粒粒径随壳层进样速度的减慢从 (146 ± 10) nm 减小到 (68 ± 8) nm (图 4).这可能是因为,在电喷过程中,冠层溶液对所得微米颗粒的大小起到了主导作用,内部溶液的进样速度影响较小^[23].Kim 等研究发现,同轴电喷所得多层结构颗粒其层厚与相应层溶液的进样速度呈正相关^[24].本文中降低壳层溶液进样速度,即减小了壳层的层厚,同时核层溶液进样速度不变,这导致移除冠层模板后,所得纳米颗粒粒径减小.当壳层溶液的进样速度减小到 0.5 mL/h 时,得到的纳米颗粒的平均粒径为 (68 ± 8) nm.而通过电喷法很难制备得到尺寸低于 100 nm 的高分子颗粒,据我们所知,目前还鲜见相关报道.

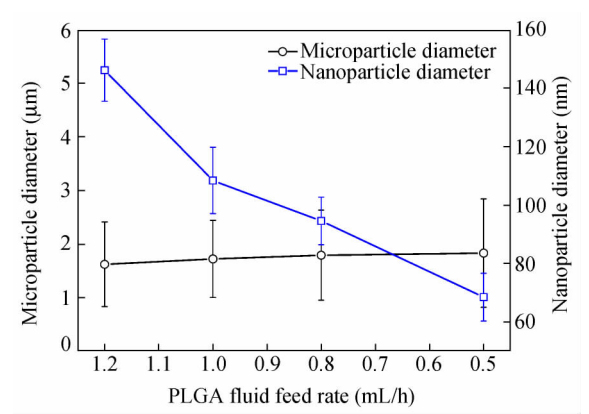


Fig. 4 Effect of PLGA fluid feed rate on average size of the particles before and after removing PEG corona
The feed rates of core and corona fluids were fixed at 0.06 and 1.0 mL/h

2.3 模型蛋白 BSA 的体外释放及二级结构表征

BSA 作为模型蛋白包载于颗粒核层,其载药量和包埋率分别为 (3.7 ± 1.2)% 和 (78.3 ± 5.3)%,明显高于通常乳液溶剂扩散法和纳米沉淀法所能达到的蛋白质包埋率^[4, 6].BSA 体外释放曲线如图 5 所示,呈现典型的蛋白质双相释放行为.在释放初期的 10 h,65% 的蛋白质进入释放介质,之后缓慢释放,维持到 60 h 左右.Gao 等^[25]通过纳米沉淀法制备得到纳米颗粒,其粒径约 200 nm,略大于本文制备的颗粒粒径,其蛋白质持续释放时间也相应有所延长,为 4 天左右.

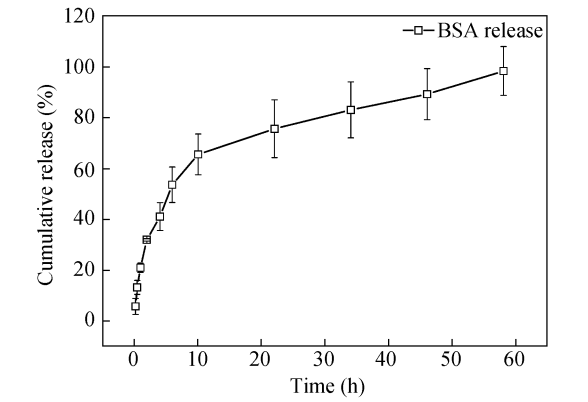


Fig. 5 *In vitro* release profile of BSA from the nanoparticles
The feed rates of core, shell and corona fluids were fixed at 0.06, 0.8 and 1.0 mL/h, respectively.

维持包载和释放过程中蛋白质的结构和功能是蛋白质输送领域的一大挑战.本文用圆二色性谱仪考察了电喷前后 BSA 二级结构的变化,结果如图 6 所示.经三层同轴电喷后在 4 ℃ 和 37 ℃ 释放的蛋白质都基本保持了原来蛋白质的二级结构,在 208 和 222 nm 处有明显的 α 螺旋的特征肩峰,与 Wang 等测得的圆二色性谱图相似^[9].这就表明同轴电喷技术可以很好地保持蛋白质的二级

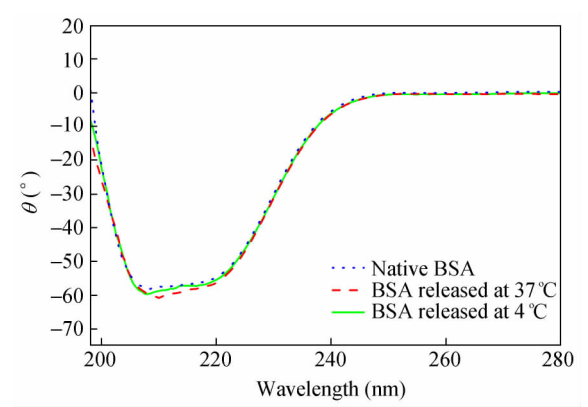


Fig. 6 CD spectra of BSA released from the nanoparticles

结构,进而保持所载蛋白的功能,提高药物输送效率.

3 结论

利用三层同轴电喷-去模板法可制备得到纳米尺寸的蛋白质药物载体. 纳米载药系统的粒径

可以方便地通过改变壳层溶液的进样速度进行调控. 蛋白质从纳米颗粒中的释放呈现典型的双相释放行为,没有明显的暴释现象. 释放出的蛋白质较好地保持了原有蛋白的二级结构. 三层同轴电喷-去模板法可高效地将蛋白药物包载在纳米载体系统中,并实现蛋白药物的缓释.

REFERENCES

1 Watanabe N,Nihon R. Jpn J Clin Med,1992,50(8):1973 ~ 1977

2 Yang Zhenzheng(杨臻峥),Xia Haijian(夏海建). Progress in Pharmaceutical Science(药学进展),2012,36(7):333 ~ 336

3 Dombu C Y,Betbeder D. Biomaterials,2013,34(2):516 ~ 525

4 Karnchanajindanun J,Srisa-ard M,Bairnark Y. Carbohydr Polym,2011,85(3):674 ~ 680

5 Mukerjee A,Pruthi V. J Biomed Nanotechnol,2007,3(1):68 ~ 74

6 Gao H,Wang Y N,Fan Y G,Ma J B. J Biomed Mater Res A,2007,80A(1):111 ~ 122

7 Weert M,Hoechstetter J,Hennink W E,Crommelin D J A. J Controlled Release,2000,68(3):351 ~ 359

8 Ghaderi R,Carlfors J. Pharmaceut Res,1997,14(11):1556 ~ 1562

9 Xie J,Ng W J,Lee L Y,Wang C H. J Colloid Interface Sci,2008,317(2):469 ~ 476

10 Chen H Y,Zhao Y,Jiang L. Chinese Sci Bull,2009,54(18):3147 ~ 3153

11 Nie H M,Dong Z G,Arifin D Y,Hu Y,Wang C H. J Biomed Mater Res A,2010,95A(3):709 ~ 716

12 Zhou Yuanyuan(周圆圆),Xue Liwei(薛立伟),Mao Jifu(毛吉富),Cai Qing(蔡晴),Jin Riguang(金日光). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2010,(1):125 ~ 130

13 Chang M W,Stride E,Edirisinghe M. Langmuir,2010,26(7):5115 ~ 5121

14 Mitragotri S,Lahann J. Nature Mater,2009,8(1):15 ~ 23

15 Desai M P,Labhasetwar V,Walter E,Levy R J,Amidon G L. Pharmaceut Res,1997,14(11):1568 ~ 1573

16 Desai M P,Labhasetwar V,Amidon G L,Levy R J. Pharmaceut Res,1996,13(12):1838 ~ 1845

17 Canton I,Battaglia G. Chem Soc Rev,2012,41(7):2718 ~ 2739

18 Lamprecht A,Schafer U,Lehr C M. Pharmaceut Res,2001,18(6):788 ~ 793

19 Sigfridsson K,Nordmark A,Theilig S,Lindahl A. Drug Dev Ind Pharm,2011,37(2):185 ~ 192

20 Bradford M M. Anal Biochem,1976,72(1-2):248 ~ 254

21 Jaworek A. Powder Technol,2007,176(1):18 ~ 35

22 Widiyandari H,Hogan C J,Jr,Yun K M,Iskandar F,Biswas P,Okuyama K. Macromol Mater Eng,2007,292(4):495 ~ 502

23 Lee Y H,Bai M Y,Chen D R. Colloids Surf B,2011,82(1):104 ~ 110

24 Kim W,Kim S S. Polymer,2011,52(15):3325 ~ 3336

25 Gao X J,Zhang X G,Zhang X J,Cheng C,Wang Z,Li C X. Polym Bull,2010,65(8):787 ~ 805

**Core-Shell Nanoparticles Fabricated by Tri-capillary Coaxial
Electrospray and Template Removal Method for Protein Delivery**

Li-hua Cao¹, Hong-jun Wang^{1, 2}, Ke-hua Tu^{1, 2}, Hong-liang Jiang^{1, 2}, Li-qun Wang^{1, 2*}

(¹ *Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University,*

² *MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Hangzhou 310027*)

Abstract A coaxial tri-capillary electrospray and template removal method was proposed to produce nanosized core-shell particles for encapsulating of proteins. Polyethylene glycol (PEG) and poly(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) were used as corona and shell materials, while Bovine serum albumin (BSA), as a model protein, was entrapped in the core. Microparticles with smooth surfaces and distinct core-shell-corona structures were obtained by coaxial tri-capillary electrospray and nanoparticles with diameter about 100 nm were achieved by removing the corona PEG template from core-shell-corona microparticles. Moreover, the nanoparticle size could be modulated by adjusting the feed rate of shell fluid, and the diameter of nanoparticles could be reduced to (68 ± 8) nm when the shell fluid feed rate was decreased to 0.5 mL/h. The drug loading content and entrapment efficiency of BSA were 3.7% and 78.3%, respectively. It was also found that BSA released from nanoparticles in a typical bi-phased release profile and the process may last for 60 h. The second order structure of BSA released from particles was monitored with circular dichroism spectrum. The results showed that the electrospray process didn't affect the second order structure of proteins, implying that the denaturation of the protein didn't occur during the process of electrospraying encapsulation.

Keywords Coaxial electrospray, Nanoparticle, Core-shell, Protein, Drug delivery

* Corresponding author; Li-qun Wang, E-mail: lqwang@zju.edu.cn