

壳聚糖修饰的 Lysozyme-PLGA 阳离子纳米药物的制备与表征

阎晓霏 陈劲春*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 通过二环己基碳二亚胺将聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)活化, 又与溶菌酶进行化学键合, 再采用单乳化-溶剂挥发技术制备表面带正电荷的壳聚糖(CHS) PLGA 纳米微球。对纳米微球制备条件进行了优化。结果表明在 $\rho(\text{CHS}) = 3 \text{ mg/mL}$, $\rho(\text{PLGA}) = 5 \text{ mg/mL}$, 溶菌酶与 PLGA 的质量比为 0.2 的条件下, 得到的纳米微球包封率为 87.8%, 载药量为 14.7%。微球粒径 φ 可控制在 $(450 \pm 50) \text{ nm}$ 之间, 在 $\text{pH} = 4$ 时, 纳米微球表面 ζ 电位为 42.5 mV。SEM 图像显示经 CHS 修饰的 Lysozyme-PLGA 的纳米微球形状规整。药物释放试验显示纳米微球在 20 d 后释放达到 70%, 且释放曲线规整。

关键词: PLGA; 壳聚糖; 化学键合; 纳米微球; 阳离子

中图分类号: R943; R944.9

引言

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微粒广泛用于蛋白、多肽、核酸等生物大分子给药^[1-2]。由于 PLGA 纳米微球表面缺乏可用于共价修饰的基团, 所以难以在表面负载生物活性物质如 DNA、配体和疫苗等^[3-4], 不易于通过受体或抗体进行靶向给药。因此, 人们尝试用不同方法将 PLGA 表层包裹不同的聚合物以达到物理改性 PLGA 微球表面的目的。如阳离子表面修饰是基于 PLGA 表层负电荷而设计的, 这种方式使 PLGA 的表面活化成为可能^[5]。将壳聚糖(CHS)选做纳米微球表面修饰材料是因为它具有阳离子电荷, 生物可降解, 黏膜黏附性等特性^[6]。壳聚糖包裹的颗粒尤其适于生物大分子的传递^[7]。壳聚糖强大的正电荷会对细胞黏膜产生危害, 而壳聚糖包裹在纳米微球表面上只占加入壳聚糖量的很小一部分^[8], 所以将壳聚糖包裹在 PLGA 纳米微球表面相对于直接利用壳聚糖作为载药纳米微球对细胞的伤害要小很多。

Kumar 等^[9-10]已成功利用 CHS 修饰 PLGA 制备阳离子纳米微球并用于负载 DNA 分子。官习鹏等^[11]也利用此方法制备了阳离子 PLGA 纳米微球,

用于负载 DNA 分子。Yamamoto 等^[12]利用此方法制备了此种纳米微球用于黏附型肺黏膜降钙素给药, 并且证明可以促进药物的吸收并且增加药物作用时间。壳聚糖修饰的阳离子 PLGA 纳米微球, 并以化学键合的方式用于负载水溶性蛋白药物的纳米微球的报道尚未出现。

本文以溶菌酶为模型蛋白, 将改性 PLGA 与溶菌酶通过化学键结合并以 CHS 修饰得到一种新型阳离子纳米微球, 达到增大纳米微球的包封率、载药量并促进蛋白类药物吸收的目的。

1 实验部分

1.1 原料和仪器

溶菌酶, 18000 U/mg 浙江长兴艾格生物制品有限公司; 溶壁微球菌, 中科院微生物所; PLGA(聚乳酸与羟基乙酸物质的量比 50:50, 分子量 8000), 分析纯, 济南岱罡生物科技有限公司; PVA-124(水解度 99%, 聚合度 2400 ~ 2500), CHS(平均分子量 360000 脱乙酰度大于 90%), 分析纯, 北京化学试剂公司; 二环己基碳二亚胺(DCC), 分析纯, 上海化学试剂公司。

UV-2000 分光光度计, Unico; 78-1 磁力搅拌器, 江苏金坛市亿通电子有限公司; LGJ10-C 冷冻干燥机, 北京四环科学仪器厂; GL-20G-II 冷冻离心机, Anke。

1.2 Lysozyme-PLGA 的制备

溶菌酶与 PLGA 的结合是通过碳二亚胺活化的

收稿日期: 2009-04-24

第一作者: 女, 1982 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: jingchunchen@hotmail.com

过程^[13]。将 1 g PLGA 溶于 3 mL DMSO 加入 9 mg DCC 于室温活化 2 h。将活化后的 PLGA 慢慢滴入含有 200 mg 溶菌酶的 5 mL DMSO 溶液中,继续反应 4 h 低温保存待用。

1.3 纳米微球的制备

1.3.1 单乳化法

取 240 μL 的 Lysozyme - PLGA 的 DMSO 溶液,配成 6 mL, PLGA 质量浓度为 5 mg/mL 的油相溶液, DMSO (40%)、二氯甲烷 (43.5%) 和 丙酮 (16.5%), 后将油相溶液加入到 24 mL 含 1% 的 PVA, 0.3% CHS 的水相溶液中^[9-11], 冰浴间断超声 (每 5 s 间断 5 s) 20 次 250 W 分散后置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 磁力搅拌 1.5 h 之后用去离子水高速离心清洗干净, 冻干保存。

1.3.2 双乳化法

将 6 mg 溶菌酶溶于 1 mL 0.1 mol/L 的 PBS 溶液中形成内水相, 加入油相中冰浴间断超声 (每 5 s 间断 5 s, 15 次 250 W) 形成初乳, 其他步骤与单乳化法相同。

在制备没有被壳聚糖修饰的单乳化法、双乳化法纳米微球时, 外水相不添加壳聚糖。

1.4 纳米微球药物释放试验

将 10 mg 干燥的纳米微球分散于 10 mL pH4.2 醋酸醋酸钠缓冲液中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 低速搅拌, 20 d 内每天取样。取样时将纳米微球分散液高速离心, 然后再以相同条件分散微球, 清液冷冻干燥浓缩后测量溶菌酶活性^[14]。

1.5 纳米微球的表征

将冻干后的纳米微球用去离子水分散后涂于玻片上, 干燥后喷金处理, 用 S-4700 冷场发射扫描电子显微镜观察。

取 10 mg 冻干后的纳米微球, 分别以不同 pH 值缓冲液 10 mL 分散, 之后取 3 mL 在粒度 Zeta 电位分析仪上测表面 ζ 电位以及粒度分析。

1.6 纳米微球包封率载药量的测定

将 10 mg 冷冻干燥后的纳米微球溶于 4 mL DMSO, 以不同浓度溶菌酶的 DMSO 溶液做标准, 测量 280 nm 光吸收。

2 结果与讨论

2.1 纳米微球的外形观察

Lysozyme - PLGA/CHS 纳米微球的电镜照片如图 1 所示。纳米微球呈球形, 表面圆整, 分散性良

好, 不聚合粘连, 粒径较为均一。

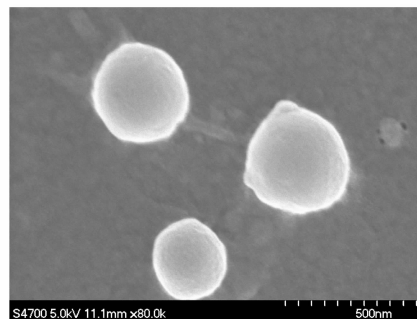


图 1 纳米微球的扫描电子显微镜照片

Fig. 1 SEM micrograph of the nanospheres

2.2 纳米微球表面 ζ 电位

图 2 为外水相不同 pH 值对 ζ 电位的影响。当纳米粒处于 pH4.2 的环境中, ζ 电位可达到 42.5 mV, 并且, ζ 电位随着 pH 的升高而下降, 当 pH7.0 时, 达到 13.5 mV, 当纳米球处于 pH8 的环境下, 发生团聚, 说明此时 ζ 电位接近零点, 体系处于不稳定状态。所得最高 ζ 电位低于官习鹏^[11] 试验中所得结果, 推测原因应为所用壳聚糖分子量不同。有研究表明, 随着 CHS 分子量的降低, ζ 电位呈下降趋势, 当分子量小于 16000 时, ζ 电位在 pH4.2 左右时下降至 34.6 mV^[11]。Guo 等的研究表明, 壳聚糖的质量分数也会影响表面 ζ 电位, 随着壳聚糖的质量分数增大, 表面 ζ 电位逐渐增大, 当增大到一定质量分数时, ζ 电位达到最高值, 之后 ζ 电位不会随壳聚糖质量分数增大而增大。达到最大 ζ 电位的最小质量分数在 0.3% 左右, 出现位置与壳聚糖分子量有一定关系^[8]。所以本文选用 0.3% 为壳聚糖用量。通过 CHS 的修饰作用, 使纳米微球表面负载正电荷而增大了体系的稳定性, 从而极大降低了纳米

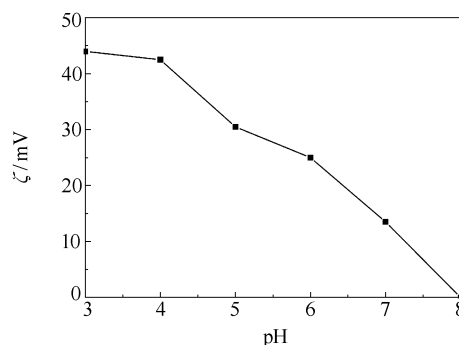


图 2 外水相不同 pH 值 ζ 电位的变化

Fig. 2 Variation of the ζ potential of the nanospheres with the pH of the aqueous phase

微球的团聚现象。

2.3 纳米微球粒度分析及制备条件的优化

纳米微球粒度分析结果如图 3 所示。试验中所得纳米微球粒径 φ 分布在 (450 ± 50) nm 之间,分布较为均一。

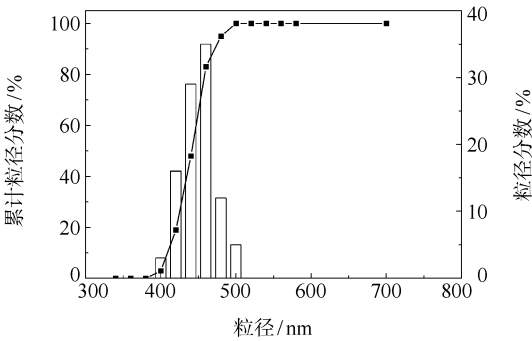


图 3 纳米微球粒度分析结果

Fig. 3 Nanosphere particle size analysis

很多因素都可以对纳米微球的粒径 φ 产生影响。外水相中 PVA 质量分数的增大,会影响纳米微球的粒径,使其越来越小,当 PVA 增大为 6% 时,纳米微球的粒径减小为原大小的一半,但高质量分数的表面活性剂会在搅拌时出现大量气泡,不利于固化过程中有机溶剂的挥发^[15]。所以本文选用 1% 为 PVA 的质量分数。

油相中影响成球的因素主要有 PLGA 质量浓度、DMSO 的体积分数、丙酮的体积分数。选用 3 因素 2 水平正交表进行试验设计正交试验的各因素水平见表 1。以 CHS - Lysozyme - PLGA - NP 粒径为评价指标,对工艺进行分析结果如表 1 所示。从表 1 极差数据可知,3 个自变量对应变量的影响从大到小依次为 $\varphi_{\text{丙酮}} > \varphi(\text{DMSO}) > \rho(\text{PLGA})$ 。当 DMSO 体积分数低于 40% 时, Lysozyme - PLGA 不能完全

溶解,而油相中丙酮体积分数过大会导致微球团聚。各因素最佳水平分别为 DMSO 占油相体积分数为 40%, 丙酮为 16.5%, PLGA 油相质量浓度为 5 mg/mL。按照优化的条件重复试验,所制得 CHS - Lysozyme - PLGA - NP 粒径平均为 450 nm 符合要求。综上,油相溶液黏度越低所得微球粒径越小,这与 Yang 等^[16]的研究结果相同。

2.4 纳米微球的包封率与载药量

以优化了的条件制得的纳米微球包封率为 87.8% 载药量为 14.7%,而以双乳化法方法制备的纳米微球,其他条件与本试验相同的情况下所得包封率仅为 41.0%。壳聚糖的修饰对包封率和载药量的影响不显著。

在以双乳化法方法制备 PLGA 纳米微球的情况中,影响包封率与载药量的因素有很多,如水相油相的比例、PLGA 的质量浓度、油相中个溶剂含量的不同、药物与 PLGA 的质量比等都会影响纳米微球的包封率和载药量^[17]。而本文通过单因素对比实验发现,影响药物包封率的因素只有药物与 PLGA 的质量比这一个因素,推测其原因是蛋白与 PLGA 结合的程度直接决定了纳米微球的包封率。

当蛋白与 PLGA 的质量比达到 0.2 时,随着质量比的增大,载药量不会再继续增长(如表 2 所示)。这个现象表明 PLGA 与蛋白的结合会达到一个饱和值,达到饱和后随着蛋白用量的增加载药量不会再增加。

表 2 包封率载药量随 Lysozyme 与 PLGA 质量比的变化
Table 2 Variation of loading efficiency and encapsulation efficiency with mass ratio of lysozyme and PLGA

$m(\text{Lysozyme}):$ $m(\text{PLGA})$	载药量/%		包封率/%
	理论	实际	
0.05/1	4.8	4.4	92.5
0.1/1	9.1	8.3	90.8
0.15/1	13.0	11.5	88.7
0.2/1	16.7	14.7	87.8
0.25/1	20	15.1	75.5

2.5 纳米微球的释放曲线分析

以往研究表明,通过 PLGA 纳米微球载药,可以得到持续稳定的释放曲线,并且可以根据需要,选用不同分子量的 PLGA,低分子量的 PLGA 可以延长释放时间^[12]。由于以双乳化法方法制备的 PLGA 纳米微球其释放后期主要影响因素为 PLGA 溶蚀和囊

表 1 正交直观分析表

Table 1 Details of the orthogonal analysis experiments

实验号	$\varphi(\text{DMSO})/$ %	$\rho(\text{PLGA})/$ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\varphi_{\text{丙酮}}/$ %	平均粒径/ nm
1	50	10	16.5	1200
2	50	5	0	3900
3	40	10	0	2800
4	40	5	16.5	450
均值 1	2550	2000	825	
均值 2	1625	2175	3350	
极差	925	175	2525	

泡的破裂,所以释放速度不规律的问题一直都没有得到解决。本文所制得的纳米微球在 20 d 内累计释放量达到 71%,35 d 后取剩余纳米微球检测残留蛋白约为 10%,证明此纳米微球具有明显缓释作用,释放速度稳定,并显示出很强的规律性。在双乳法条件下制备的纳米微球释放 10 d 后所得药物残留不足 5%,且由于此种方法所制备的纳米微球内部结构不均一,导致影响释放的因素复杂,释药不规律,突释现象严重(见图 4)。本试验中,壳聚糖的修饰对药物释放的影响不显著。

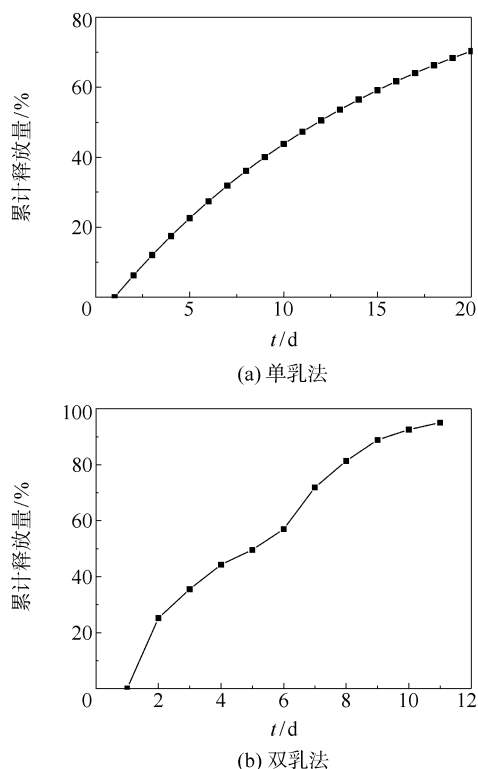


图 4 不同方法制备的纳米微球累计释放曲线对比图

Fig. 4 Cumulative release of lysozyme from nanospheres prepared by different method

3 结论

在 $\rho(\text{CHS}) = 3 \text{ mg/mL}$, $\rho(\text{PLGA}) = 5 \text{ mg/mL}$, 溶菌酶与 PLGA 的质量比为 0.2 的条件下所得纳米微球粒径 φ 可控制在 $(450 \pm 50) \text{ nm}$ 之间,在 $\text{pH} = 4$ 时,纳米微球表面 ζ 电位为 42.5 mV。包封率为 87.8% 载药量为 14.7%。其释放曲线表现出很好的规律性。

参考文献:

[1] Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles

for drug and gene delivery to cells and tissue[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55(3): 329 – 347.

- [2] Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 47(1): 39 – 54.
- [3] Keegan M E, Whittum-Hudson J A, Saltzman W M. Biomimetic design in microparticulate vaccines[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(24): 4435 – 4443.
- [4] Keegan M E, Falcone J L, Leung T C, et al. Biodegradable microspheres with enhanced capacity for covalently bound surface ligands [J]. *Macromolecules*, 2004, 37(26): 9779 – 9784.
- [5] Singh M, Kazzaz J, Ugozzoli M, et al. Charged polylactide co-glycolide microparticles as antigen delivery systems[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2004, 4(4): 483 – 491.
- [6] Kumar M N V R, Muzzarelli R A A, Muzzarelli C, et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives [J]. *Chemical Reviews*, 2004, 104(12): 6017 – 6084.
- [7] Prabakaran M, Mano J F. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems [J]. *Drug Delivery*, 2005, 12(1): 41 – 57.
- [8] Guo C Q, Gemeinhart R A. Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly (lactide-co-glycolide) particles [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 70: 597 – 604.
- [9] Kumar M N V R, Bakowsky U, Lehr C M. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(10): 1771 – 1777.
- [10] Haas J, Kumar M N V R, Borchard G, et al. Preparation and Characterization of Chitosan and Trimethyl-chitosan modified Poly-(ϵ -caprolactone) Nanoparticles as DNA Carriers[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2005, 6(1): 22 – 30.
- [11] 官习鹏, 全大萍, 廖凯荣, 等. 壳聚糖修饰 PLGA 阳离子型纳米微球的制备与表征[J]. *高等学校化学学报*, 2006, 27(10): 1965 – 1968.
- Guan X P, Quan D P, Liao K R, et al. Preparation and characterization of cationic chitosan-modified poly (D, L-lactide-co-glycolide) copolymer nanosphere[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2006, 27(10): 1965 – 1968. (in Chinese)
- [12] Yamanoto H, Kuno Y, Sugimoto S, et al. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary

- delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions[J]. *Journal of Controlled Release*, 2005, 102: 373 – 381.
- [13] Nam Y S, Park T G. Protein loaded biodegradable microspheres based on PLGA-protein bioconjugates[J]. *Journal of Microencapsulation*, 1999, 16(5): 625 – 637.
- [14] 李德海, 迟玉杰. 溶菌酶活力的简易测定[J]. *中国乳品工业*, 2002, 30(5): 128 – 129.
- Li D H, Chi Y J. Facility detection of lysozyme activity [J]. *China Dairy Industry*, 2002, 30(5): 128 – 129. (in Chinese)
- [15] 杜丽娜, 郭庆东, 刘燕, 等. 牛血清白蛋白-PLGA 微球制备的单因素考察[J]. *中国药业*, 2005, 14(5): 49 – 50.
- Du L N, Guo Q D, Liu Y, et al. The single-factor research of BSA-PLGA microspheres' preparation[J]. *China Pharmaceuticals*, 2005, 14(5): 49 – 50. (in Chinese)
- [16] Yang C Y, Tsay S Y, Tsiang R C C. An enhanced process for encapsulating aspirin in ethylcellulose microcapsules by solvent evaporation in an O/W emulsion[J]. *Journal of Microencapsulation*, 2000, 17(3): 269 – 277.
- [17] Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 363: 26 – 39.

Preparation of chitosan coated lysozyme-poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) cationic nanospheres

YAN XiaoFei CHEN JinChun

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Biodegradable poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) was activated by N, N'-dicyclohexylcarbodiimide followed by chemical bonding to lysozyme. The resulting material was directly incorporated into nanospheres by an oil-in-water (O/W) single emulsion solvent evaporation method with its cationic surface modified by chitosan (CHS). The various conditions were optimized. The results showed that the diameter of the nanospheres can be controlled within a range of (450 ± 50) nm, and the ζ potential of the nanospheres can be as high as 42.5 mV when the pH was 4.2. The optimized conditions were as follows: $\rho(\text{CHS})$ of 3 mg/mL, $\rho(\text{PLGA})$ of 5 mg/mL, and a content ratio of lysozyme to PLGA of 0.2/1. The nanospheres obtained under the optimized conditions showed a loading efficiency and encapsulation efficiency of 14.7% and 87.8% respectively, while the encapsulation efficiency was only 41.0% for nanospheres prepared by a W/O/W method, with all other conditions the same as for the preparation using the O/W method. SEM micrographs showed that when lysozyme-PLGA nanospheres were modified with CHS, the regular spherical shape was retained. The material displayed a sustained release rate of 70% after 20 days of release and a regular sustained release curve, as compared with a release rate of 90% after 10 days for nanospheres prepared previously by W/O/W methods, demonstrating the superior sustained release properties of the new material.

Key words: PLGA; chitosan; chemical bond; nanospheres; cationic