

## 型钠磷共转运子小分子干扰 RNA-壳聚糖纳米球的制备及性质分析

李 丹<sup>1</sup>,赵学智<sup>1\*</sup>,李国栋<sup>2</sup>,侯雪梅<sup>2</sup>,王 丽<sup>3</sup>

(1. 第二军医大学长征医院肾内科,上海 200003;2. 第二军医大学药学院药剂学教研室,上海 200433;3. 武警上海总队医院肾内科,上海 201103)

**[摘要]** 目的:制备 型钠磷共转运子小分子干扰 RNA(NaPi- siRNA)-壳聚糖纳米球,并考察其理化性质及体外释放情况。方法:将壳聚糖和 NaPi- siRNA 通过复凝聚方法制备 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球;透射电镜观察其形态,激光粒度分析仪测定其粒径分布,RNase 酶解实验观察其对 NaPi- siRNA 有无保护作用,并计算其包封率、载药量和对 NaPi- siRNA 的体外控释能力。结果:成功制备 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球。电镜观察发现纳米球呈球形,分布均匀;激光粒度分析仪测定其平均粒径为 173 nm;经 RNase 酶解后,纳米球混悬液  $D_{260}$  上升较单纯 NaPi- siRNA 溶液上升缓慢 ( $P < 0.05, t = 4.32$ );药剂学分析发现其载药量为 28.1%,包封率为 73.07%,12 h 内 NaPi- siRNA 的体外释放率不足 20%。结论:复凝聚方法制备的 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球包封率高、稳定性好、大小均匀,体外能显著延缓 NaPi- siRNA 释放,可以在一定程度上保护 NaPi- siRNA 免受酶解。

**[关键词]** 钠磷共转运子;RNA,小分子干扰;壳聚糖;纳米球

**[中图分类号]** R 914.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)11-1258-03

### Preparation and characterization of type sodium-phosphate cotransporter siRNA-loaded chitosan nanoparticles

LI Dan<sup>1</sup>, ZHAO Xue-zhi<sup>1\*</sup>, LI Guo-dong<sup>2</sup>, HOU Xue-mei<sup>2</sup>, WANG Li<sup>3</sup> (1. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Department of Nephrology, Hospital of Armed Police Force of Shanghai, Shanghai 201103)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To prepare type sodium-phosphate cotransporter (NaPi-) siRNA-loaded chitosan microspheres and to evaluate their physico-chemical properties and siRNA release *in vitro*. **Methods:** NaPi- siRNA was loaded into chitosan microspheres by using the complex coacervation method. The structure of the nanoparticles was observed under scanning electron microscope and their diameter distribution was measured by a laser grain analyzer. RNase assay was used to detect the efficacy of anoparticles in prevention of siRNA from degradation. Ultraviolet spectrophotometry and HPLC technique were used to determine the entrapment efficiency, loading capacity, and siRNA releasing rate *in vitro*. **Results:** The chitosan nanoparticles loaded with NaPi- siRNA were successfully prepared. The nanoparticles were spherical in shape and were well distributed, with an average diameter of 173 nm. After RNase treatment,  $D_{260}$  rose more slowly in chitosan nanoparticles-based siRNA suspension than in simple NaPi- siRNA solution ( $P < 0.05, t = 4.32$ ). Loading capacity of the nanoparticles was 28.1%, the encapsulation efficiency was 73.07%, and the total releasing rate of NaPi- siRNA was less than 20% within 12 hours. **Conclusion:** Chitosan nanoparticles loaded with NaPi- siRNA have been prepared through a complex coacervation method. The particles have high encapsulation efficiency and good stability and are homogeneous in size. They can obviously delay the release of NaPi- siRNA *in vitro* and therefore prevent NaPi- siRNA from degradation.

**[KEY WORDS]** sodium-phosphate cotransporter; RNA, small interfering; chitosan; nanoparticles

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11):1258-1260]

壳聚糖(chitosan, CS)是一种天然聚多糖,有良好的生物相容性和生物可降解性,其分子中的葡糖胺基荷正电,与基因药物可产生静电作用并凝聚为多聚复合物(polyplexes),形成结构相对致密的纳米级粒子。这种纳米粒子可以克服药物经黏膜吸收的生理学屏障,通过细胞内吞途径,抵达黏膜下淋巴组织<sup>[1]</sup>。

本研究采用钠磷共转运子(NaPi-)为模型药物,制备 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球,并研究其

**[基金项目]** 上海市科委重大基础项目(0452NM035)。Supported by Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (0452NM035)。

**[作者简介]** 李 丹,硕士。E-mail: danli-sh@tom.com

\* Corresponding author. E-mail: zh\_xz@tom.com

理化性质及体外释放情况,为进一步研究 RNA 干扰 NaPi- siRNA 的表达奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 壳聚糖,相对分子质量 450 000,脱乙酰程度 90 % (浙江玉环海洋生物公司); NaPi- siRNA (上海吉玛基因化学技术有限公司合成); NaPi- siRNA oligo: Sense 5'-GUC CUG UGC ACU UGU CUU ATT-3'; Anti-sense 5'-UAA GAC AAG UGC ACA GGA CCA-3'。

1.2 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球的制备 将 0.02 g 壳聚糖溶于 100 ml 的 0.3 % (V/V) 乙酸溶液中,搅拌溶解(磁力搅拌器),溶解后与 NaPi- siRNA 溶液(200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,含 0.004 g/ml 硫酸钠)各取等量体积(100 ml)混合,55  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min,迅速振荡混匀,涡流 10 min (QL-901 旋涡混合器,江苏海门麒麟医用仪器厂),自动形成壳聚糖纳米球混悬液。

1.3 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球的物理特性

1.3.1 形态观察 取少量纳米球混悬液滴至铺有碳膜的铜网上,静置 5 min,用滤纸吸干混悬液液滴,再滴加 2 % 磷钨酸染色 5 min,于透射电镜 (TEM-100 CX, 日本电子公司) 下观察纳米球形态。

1.3.2 粒径分析 取制备后静置 3 h 的 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球 10 ml,用蒸馏水稀释,用 Mastersizer 2000 激光粒度分析仪(英国马尔文有限公司)分析纳米颗粒的粒径。

1.4 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球的酶解实验 将 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球混悬液及等量未经包裹的 NaPi- siRNA 溶液用 0.1 U/ $\mu\text{l}$  RNase 缓冲溶液稀释至 260 nm 波长处光密度 ( $D_{260}$ ) 值约为 1.0,各自在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴摇床上孵育,分别于 0、20、40、60、80、120 min 时测定  $D_{260}$  值。

1.5 壳聚糖纳米球包封率和载药量 于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下,16 000 r/min 高速离心分离载 NaPi- siRNA 的纳米粒 30 min,在紫外可见分光光度计上检测上清液  $D_{260}$  (代表 RNA 的含量),以不含 NaPi- siRNA 溶液为空白对照。 $D$  值为 1 时相当于 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 NaPi- siRNA,据此计算纳米粒中的药物含量。纳米粒对 siRNA 的载药量 = (siRNA 的总质量 - 游离 siRNA 的质量) / 纳米粒的质量 (冻干)  $\times 100\%$ , 纳米粒对 siRNA 的包封率 = (siRNA 的总质量 - 游离 siRNA 的质量) / 加入 siRNA 的总质量  $\times 100\%$  [2]。

1.6 纳米球体外控释 NaPi- siRNA 的性能 将

包封有 NaPi- siRNA 的壳聚糖纳米粒(相当于 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  NaPi- siRNA)置于含 6 ml 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 7.4) 试管中,37  $^{\circ}\text{C}$  恒温磁力搅拌,适当间隙,样品在 15  $^{\circ}\text{C}$  下 65 000 r/min 超速离心 30 min,取出 4 ml 上层清液,用新鲜的 PBS 溶液补充,紫外分光光度法测定上清液  $D_{260}$ ,并做空白对照,计算各时间点 (0、12、24、36、48 h) siRNA 释放量,按下式计算释放百分率。释放百分率 = 上清液 siRNA 量 / 总投药量  $\times 100\%$ 。

1.7 统计学处理 组间比较采用成对  $t$  检验。

## 2 结果

2.1 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球的物理特性 电镜观察结果表明:NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球呈球形,分布均匀,如图 1 所示。粒度分析仪测定结果显示其平均粒径为 173 nm (图 2)。

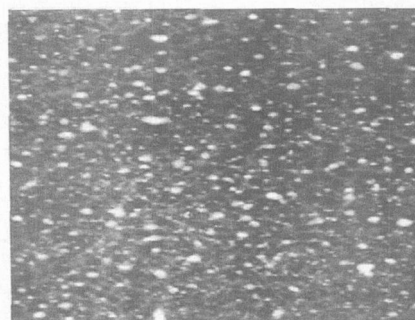


图 1 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球透射电镜图  
Fig 1 NaPi- siRNA chitosan nanoparticles under electron microscope ( $\times 50\ 000$ )

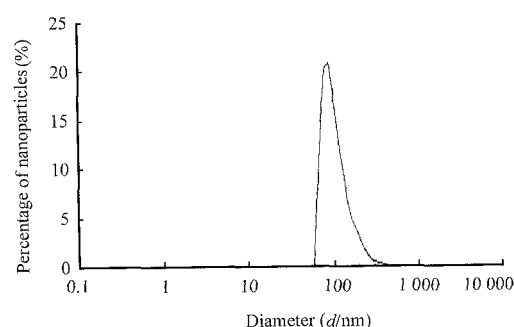


图 2 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球粒径分布图  
Fig 2 Distribution of NaPi- siRNA chitosan nanoparticle diameters

2.2 NaPi- siRNA-壳聚糖纳米球酶解实验 由图 3 可以看出与单纯 NaPi- siRNA 溶液相比纳米球混悬液  $D_{260}$  值升高缓慢 ( $P < 0.05$ ,  $t = 4.32$ ),说明纳米球对 siRNA 具有一定的保护作用。

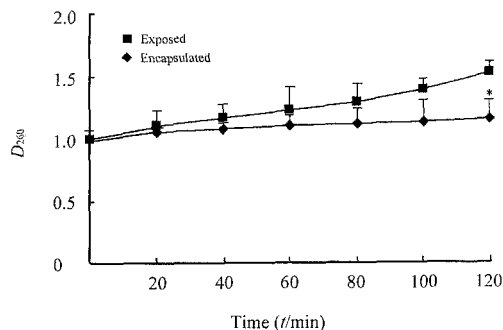


图3 纳米球混悬液及单纯 NaPi-siRNA 溶液 D<sub>260</sub> 随水解时间的变化趋势

Fig 3 Changes of D<sub>260</sub> of chitosan nanoparticles-based siRNA suspension and simple NaPi-siRNA solution with hydrolyzing time

\* P < 0.05 vs exposed group; n = 5,  $\bar{x} \pm s$

2.3 NaPi-siRNA-壳聚糖纳米球的包封率和载药量以及体外控释 siRNA 的性能 壳聚糖-siRNA 纳米球的载药量为 28.1%,包封率为 73.07%,12 h 内 siRNA 的体外释放不足 20%(图 4)。说明 siRNA 大部分与壳聚糖形成纳米球。

### 3 讨论

NaPi-siRNA 壳聚糖纳米球主要是以壳聚糖为骨架,在硫酸钠对壳聚糖的脱水作用和壳聚糖与 NaPi-siRNA 的静电作用下,壳聚糖分子将 siRNA 分子压缩并包裹,形成疏水颗粒并生成纳米粒混悬液。12 h 体外释放缓慢,说明 NaPi-siRNA 与壳聚糖复合体形成纳米颗粒,具备缓释效能,可延长 RNA 的作用时间。12 h 以后的释放量基本不

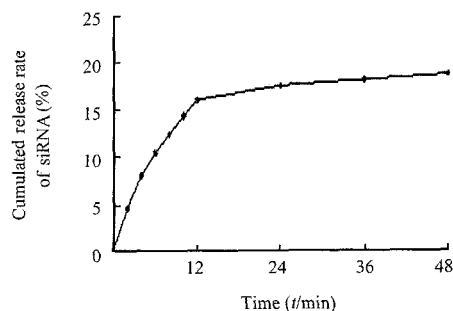


图4 NaPi-siRNA-壳聚糖纳米球累积释放率

Fig 4 Cumulated release rate of NaPi-siRNA chitosan nanoparticles

变,有可能是随着 RNA 的溶出,溶液中 RNA 浓度升高,浓度差减小而使溶出更加缓慢。在纳米粒形成过程中,脱水作用和静电作用究竟谁占主导有待进一步探讨。实验过程中,纳米粒很容易相互聚合进而形成沉淀,导致纳米粒失去作用,可以通过选择原材料,改进制备工艺,优化纳米粒的性质。

### [参考文献]

[1] Bozkir A, Saka OM. Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics[J]. Drug Deliv, 2004, 11: 107-112.  
 [2] Wang LY, Ma GH, Su ZG. Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug[J]. J Control Release, 2005, 106(1-2): 62-75.

[收稿日期] 2006-04-03

[修回日期] 2006-10-11

[本文编辑] 贾泽军,尹 茶

## 《实用中药注射剂学》已出版

中药注射剂是临床治疗常见病实用有效的注射制剂。本书由苗明三主编,详细介绍了 204 种常用中药注射剂,不仅详细说明了各种中药注射剂的规格、剂量、成分、功能主治和药理机制,还阐述了适用病种、不同年龄的剂量,并特别撰写了各种注射剂出现不良反应的病例。供广大临床各科中医师参考、阅读。

由第二军医大学出版社出版、发行,ISBN 7-81060-595-X,定价:75.00 元。

订购电话:021-65493093,地址:上海市翔殷路 800 号 第二军医大学出版社发行科,邮编:200433