

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2021.1.10

固体脂质纳米粒理化性质对纳米粒吸附蛋白的影响

孙玥, 周文忠*

(中国农业大学动物医学院 北京 100193)

[收稿日期] 2020-06-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 01-0061-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 蛋白载体在兽医药有特定的研究价值和应用前景,我们前期研究证实固体脂质纳米粒(Solid lipid particles, SLN)表面对不同蛋白有较强的吸附作用,是良好蛋白的载体。通过改变脂质材料、乳化时间或加入表面修饰材料等制备了不同性状的 SLN,并以 BSA 为标志蛋白进一步研究了纳米粒理化性质对蛋白吸附的影响。结果显示,纳米粒主要理化性质对蛋白吸附率有显著影响:不同脂质材料制备的纳米粒对蛋白的吸附率不同;小粒径纳米粒吸附能力更强;正电位纳米粒吸附率显著高于负电位纳米粒;但乳化剂浓度对吸附率无明显影响。研究结果可为固体脂质纳米粒作为蛋白载体的制备及组方优化提供依据,为提高载蛋白效率提供帮助。

[关键词] 固体脂质纳米粒;理化性状;表面吸附;蛋白载体

Effect of Physicochemical Properties of Solid Lipid Nanoparticles on its Surface Adsorption of Protein

SUN Yue, ZHOU Wen - zhong*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Corresponding author: ZHOU Wen - zhong, E - mail: zhouwz@cau.edu.cn

Abstract: The protein carrier has specific research value and application prospects for veterinary medicine. Our previous research confirmed that solid lipid nanoparticles (SLN) are promising protein carriers through surface adsorption. In this paper, SLNs with different properties were prepared by changing lipid materials, emulsification time, or adding surface modification materials. Using BSA as a marker protein, the effects of nanoparticle physicochemical properties on adsorption were further studied. The results showed that the main physicochemical properties of nanoparticles had significant effects on the adsorption rates. The adsorption rates of proteins on the nanoparticles prepared by different lipid materials were different. The adsorption capacity of smaller size nanoparticles was stronger than that of the larger ones. The adsorption rate of proteins on the positive potential nanoparticles was significantly higher than that of negative potential nanoparticles. But the emulsifier concentration has no significant effect on the adsorption rate. These results provide a basis for the preparation and optimization

作者简介: 孙玥, 兽医硕士, 从事动物医保工作。

通讯作者: 周文忠。E - mail: zhouwz@cau.edu.cn

of solid lipid nanoparticles as protein carriers, and could help to improve the efficiency of protein loading.

Key words: solid lipid nanoparticles; physicochemical properties; surface adsorption; protein carrier

固体脂质纳米粒(Solid lipid nanoparticles, SLN)是从 20 世纪开始逐步发展起来的一种新型纳米粒子载体^[1]。SLN 采用固态的合成的或者天然的类脂作为脂质材料,在乳化过程或乳化后可使蛋白以某种方式与脂质纳米相结合,其粒径范围一般在 10 ~ 1000 nm。SLN 拥有生理相容且耐受性好的特点,并且与传统的药物制剂相比具有较高的生物利用度^[2-3]、增加药物在体内吸收和靶向性^[4-5]、延缓药物释放度等优点。

制备 SLN 的脂质材料有许多种,由于饱和脂肪酸甘油酯、脂肪酸、混合脂质等材料如:三酰甘油类如单硬脂酸甘油酯、三棕榈酸甘油酯、二十二酸单、双、三甘油酯混合物、三硬脂酸甘油酯;脂肪酸类如棕榈酸、硬脂酸等;类固醇类如胆固醇等;蜡质类如鲸蜡醇棕榈酸酯、鲸蜡醇十六酸酯等。其中硬脂酸使用更频繁,硬脂酸属于长链饱和脂肪酸,是机体脂肪的重要组成成分和主要能量来源,理化性质稳定,在体内可以降解,是一种理想的脂质材料。此外在制备 SLN 时也可以混合加入几种不同的脂质材料,从而达到不同的制备目的如改变粒径、电位等。

与其它纳米载药系统相比,SLN 具有易于制备、成本低、可大规模生产、拥有良好的物理稳定性、无有机溶剂的情况下 SLN 无脂质载体系统的毒性等^[6-7]。SLN 已成为国内外药剂学领域的研究热点,如今已有 SLN 作为疫苗佐剂的相关研究,如 Himanshu Mishra 等利用 SLN 呈递乙肝病毒表面抗原^[8]。

蛋白附着到纳米颗粒可以通过简单的物理吸附或更复杂的方法,例如:化学结合或包封实现。吸附通常是基于电荷或疏水作用^[9]。包封,即在合成过程中蛋白与纳米粒子在纳米粒子制备过程中混合,蛋白进入纳米颗粒包封完成^[10],只有当纳米颗粒在体内被分解时才被释放。对于化学结合,是将蛋白化学交联到纳米粒子颗粒的表面^[11]。表面

吸附简单易行、使用方便、成本低,更适用于兽医药的应用。

本文研究的固体脂质纳米拥有毒性低、制备简单、易工业化大规模生产等特点,满足兽医药领域的需求。实验用热熔乳化超声技术制备固体脂质纳米粒,研究纳米粒理化性状对吸附率影响因素,揭示影响固体脂质纳米粒吸附性的主要因素,为固体脂质纳米-蛋白载体的研究和应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 单甘脂、十四酸、考马斯亮蓝(G-250)购于国药化学试剂有限,聚乙烯醇(Poly vinyl alcohol, PVA)和 BSA 购于 Sigma,双十八烷基二甲基氯化铵(Dimethyldioctadecyl ammonium chloride, DDAC)购于上海阿拉丁生化试剂有限公司。

1.2 固体脂质纳米粒制备 将 1 克脂质材料放入 50 mL 离心管中,置于沸水浴中加热使脂融化,再将融化的脂质混合物置于 55 °C 的水浴锅中放置 1 ~ 2 min。后加入 10 mL 在 55 °C 水浴锅中预热的 PVA 溶液,使用细胞破碎仪(VC X 750 超声波细胞破碎仪)直径 13 mm 探头,功率 35%,超声处理一定时间,分别加入 10 mL 冷却水后摇匀成纳米悬液。将各组固体脂质纳米悬液样品分别取 2 mL, 14000 r/min 离心 40 min,收集沉淀后再将沉淀悬浮至 2 mL 水中重复离心一次,收集底部沉淀后将其置于冻干机于 -49 °C、1 Pa 的条件下将水分抽干制成冻干粉,置于 -20 °C 储存备用,每组设置三个样品。

1.3 粒径、电位、多分散系数的检测 利用光子相关谱法(PCS)检测纳米粒子的粒径和分散度。分别取 200 μL 已制备好的固体脂质纳米悬液于 4 mL 离心管中,将检测样品稀释 12.5 倍,在样品池中加入 1400 μL 在 25 °C 条件下用纳米激光粒度仪 ZS90(Malvern Instruments, UK)检测纳米粒子平均粒径(mean diameter, MD)和多分散性系数(polydispersity index, PDI)。将上述检测样品继续

稀释 10 倍,取 800 μL 加入到导电样品池中检测表面电位(zeta potential, ZP)。

1.4 Bradford 法检测 BSA 标准曲线的制作 将 10 mg/mL 的 BSA 溶液用 PBS 稀释得到浓度分别为 100、80、60、40、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,取 500 μL 溶液分别与 2 mL 考马斯亮蓝混合反应 5 min 后用分光光度计测定 595 nm 处吸光值。实验每组三个重复,然后以 OD595 的三次平均值做横坐标,BSA 溶液的浓度做纵坐标,即得标准曲线。

1.5 吸附率检测 称取纳米粒冻干粉 12.5 mg,加入 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 至体积为 250 μL 。再加入生理盐水至总体积为 1 mL。将其置于离心机 14000 r/min 离心 40 min,将上清液取出 500 μL 与

2 mL 配制好的考马斯亮蓝溶液反应,反应 5 min 后在记录 595 nm 处 OD 值,重复此操作直到上清液与考马斯亮蓝反应呈现阴性,将数值带入标准曲线计算未被吸附的蛋白量,通过公式计算得出吸附率。

BSA 吸附率 = $\{(\text{加入总的蛋白量} - \text{未吸附的蛋白量}) / \text{加入的总蛋白量}\} \times 100\%$

2 结果与分析

2.1 固体脂质纳米理化性状 固体脂质纳米悬液外观呈乳白色,无味;颗粒大小均匀,分散性良好,无沉淀。不同制备方案制备的固体脂质纳米粒平均粒径(mean diameter, MD)、多分散性系数(polydispersity index, PDI)、表面电位(zeta potential, ZP)如表 1 所示。

表 1 不同条件制备的固体脂质纳米粒理化性状 (mean \pm S. D., $n = 3$)

Tab 1 Physicochemical properties of solid lipid nanoparticles prepared under different conditions (mean \pm S. D., $n = 3$)

	脂质材料	PVA 浓度	超声时间 (min)	MD (nm)	PDI	ZP (mv)
SLN1	单甘脂 0.2 g 十四酸 0.8 g	2%	2	300 \pm 3	0.506 \pm 0.012	-25.1 \pm 1.6
SLN2	单甘脂 0.2 g 十四酸 0.8 g	2%	10	100 \pm 5	0.485 \pm 0.01	-21.9 \pm 0.9
SLN3	单甘脂 0.2 g 十四酸 0.8 g DDAC 20 mg	2%	2	304 \pm 5	0.441 \pm 0.023	25.7 \pm 1.15
SLN4	单甘脂 0.2 g 十四酸 0.8 g	0.5%	10	152 \pm 3	0.459 \pm 0.028	-24.5 \pm 0.75
SLN5	氢化蓖麻油 1 g	2%	2	344 \pm 5	0.341 \pm 0.014	-17.4 \pm 1.27
SLN6	单甘脂 0.2 g 十四酸 0.8 g	2%	0.5	669 \pm 4	0.437 \pm 0.016	27.3 \pm 1.3

2.2 BSA 标准曲线 Bradford 法检测 BSA 标准曲线 BSA 在 1 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内呈现良好的线性关系, R^2 为 0.9921。

2.3 不同脂质材料纳米粒吸附率比较 如图 1 所示,SLN1 (单甘脂与十四酸) 的吸附率显著高于 SLN5 (氢化蓖麻油) 固体脂质纳米粒的吸附率 ($P = 0.023$)。

2.4 不同表面电位纳米粒吸附率的比较 由图 2 可知,正电位 SLN3 (25.7 \pm 1.15 mV) 的吸附率明显

高于负电位 SLN1 (-25.1 \pm 1.6 mV) ($P = 0.021$)。

2.5 不同粒径纳米粒吸附率的比较 如图 3 所示,不同粒径的固体脂质纳米颗粒的吸附性比较结果为:SLN1 (300 \pm 3 nm) 分别与 SLN2 (100 \pm 5 nm)、SLN6 (669 \pm 4 nm) 相比差异性不显著,但 SLN2 (100 \pm 5 nm) 与 SLN6 (669 \pm 4 nm) 相比较差异显著 ($P = 0.01$)。

2.6 不同脂质含量固体脂质纳米粒吸附率的比较 如图 4 所示,不同密度的纳米悬液中脂质含量不同

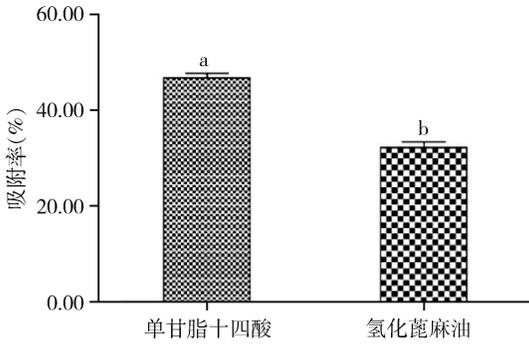


图 1 不同材料固体脂质纳米粒吸附率的比较

Fig 1 Comparison of adsorption rate of solid lipid nanoparticles with different materials

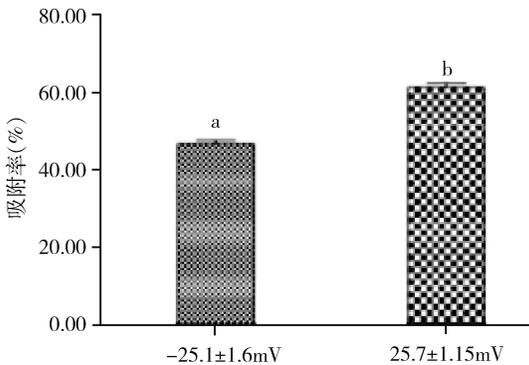


图 2 不同电位固体脂质纳米粒吸附率的比较

Fig 2 Comparison of adsorption rates of solid lipid nanoparticles with different potentials

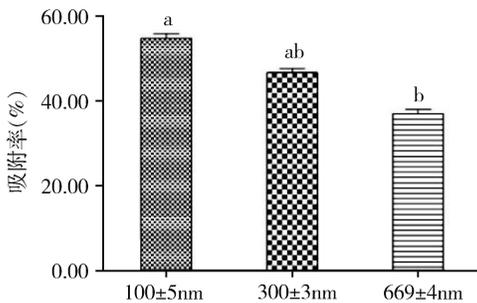


图 3 不同粒径固体脂质纳米粒吸附率的比较

Fig 3 Comparison of adsorption rates of solid lipid nanoparticles with different particle sizes

吸附率也不同,浓缩组和正常组的吸附率无显著差异,但稀释组的吸附率与浓缩组和正常组有显著差异,*P* 值分别为 0.028、0.027。

2.7 不同 PVA 浓度固体脂质纳米粒吸附率的比

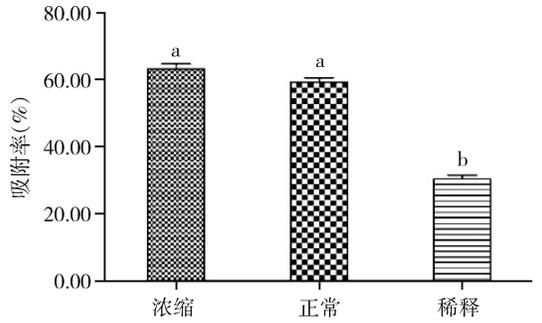


图 4 不同脂质含量固体脂质纳米粒吸附率的比较

Fig 4 Comparison of adsorption rates of solid lipid nanoparticles with different lipid contents

较 如图 5 所示,不同 PVA 浓度乳化的固体脂质纳米粒吸附率比较结果为 SLN2、SLN4 无显著差异。

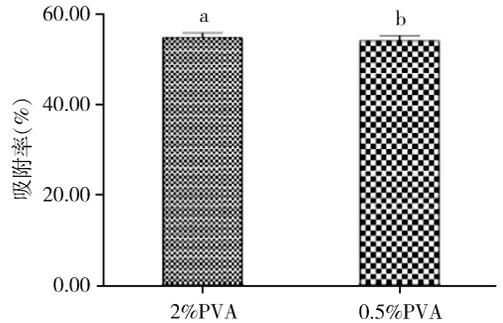


图 5 不同 PVA 浓度固体脂质纳米粒吸附率的比较

Fig 5 Comparison of adsorption rates of solid lipid nanoparticles with different PVA concentrations

3 讨论与结论

研究固体脂质纳米粒吸附性的影响因素的目的是为了增加蛋白的表面吸附、减少剂量、降低成本或提高安全性。无论是真核细胞还是原核细胞,纳米粒子第一步都是先吸附后再通过其他途径进入到细胞内发挥作用。通常正电位纳米粒子与负电位纳米粒子在静电作用下更容易吸附到表面负电位的细菌或细胞表面。细胞对于纳米粒子的粒径也有着严格的控制如:DCs 会优先摄取病毒大小的颗粒粒径约为 20 ~ 200 nm,巨噬细胞则优先摄取 0.5 ~ 5 μm 的颗粒^[12]。

氢化蓖麻油的吸附性与单甘脂十四酸混合材料制备的固体脂质纳米粒有显著差异。其原因可

能是由于在相同质量下十四酸的相对分子质量为 228,单甘脂为 358.57。而 HCO 为 938,相同质量下十四酸和单甘脂的分子个数多于氢化蓖麻油,产生的氢键也多于氢化蓖麻油。因此,范德华力更强,且十四酸中含有的羧基与 BSA 产生的范德华力强于 HCO 中的羟基,十四酸和单甘脂与 BSA 的吸附更牢固,吸附率更高。

粒径对于细胞摄取纳米粒有着很重要的因素,其对于抗原的吸附率也会产生一定程度的影响。为了制备不同的固体脂质纳米粒,将乳化时间延长,制备了粒径更小的纳米粒。结果表明,将不同粒径纳米粒子的吸附性进行检测粒径越小吸附性越高,但持续减小并无显著差异。粒径小吸附率高可能是由于小粒径的比表面积(即单位质量物料所具有的总面积)更大,与蛋白接触机会多,更易纳米粒子结合。

为了制备表面电位为正的固体脂质纳米粒,在脂质材料中加入了带有阳离子基团的双十八烷基二甲基氯化铵(DDAC)。DDAC 的量要适当,过多提高固体脂质纳米粒的表面电位可能会引起溶血等不良反应^[13]。将带有正、负不同表面电位的固体脂质纳米粒进行比较正电位的吸附率显著高于负电位。BSA 等电点为 4.8,在中性溶液中带负电,在静电作用下更易与正电位的固体脂质纳米粒结合。

适宜的脂质含量对制剂的使用也很重要,过多的脂质材料注入机体可能会对注射部位产生不良反应,对体内的代谢、抗原的缓释也有一定的影响^[14]。本实验中,纳米粒密度低时增加密度可以提高对蛋白的吸附率,这可能是由于纳米粒对 BSA 的吸附达到饱和状态,增加纳米粒可以吸附游离的蛋白。而进一步提高纳米量却没有显著增加吸附率,这可能由于游离吸附的 BSA 量达到了动态平衡,吸附率相对稳定。

我们的前期研究显示 PVA 浓度与 SLN 的粒径、电位、分散系数、包封率等均有关系^[15],但本研究显示 PVA 浓度对纳米粒吸附率没有明显影响,对乳化后固体脂质纳米粒的状态有一定影响。

固体脂质纳米粒对蛋白有普遍的吸附性,但影响吸附的因素很多,可针对不同蛋白通过改变材料、表面电位、粒径、脂质含量进行优化。

固体脂质纳米粒通过表面吸附作为蛋白载体在兽药如疫苗有一定的实用性,通过纳米粒制备组方优化能够更好地发挥纳米载体的功效。

参考文献:

- [1] Multer R H, Mehnert W, Lucks J S, *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLN) an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1995, 41(1): 62-69.
- [2] Weiss J, Decker E A, Mc Clements D J, *et al.* Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components [J]. *Food Biophysics*, 2008, 3(2): 146-154.
- [3] Esposito E, Fantin M, Marti M, *et al.* Solid lipid nanoparticles as e. delivery systems for bromocriptin [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(7): 1521-1530.
- [4] 韩静,李智,岑琴,等.紫杉醇固体脂质纳米粒的制备和质量评价[J].*中草药*, 2008, 39(7): 996-1000.
Han J, Li ZH, Cen Q, *et al.* Preparation and quality evaluation of paclitaxel loaded solid lipid nanoparticles [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2008, 39(7): 996-1000.
- [5] 许海玉,张铁军,赵平,等.中药缓控释制剂的研究现状及研发思路[J].*药物评价研究*, 2010, 33(1): 30-35.
Xu H Y, Zhang T J, Zhao P, *et al.* Research progress and ideas of sustained and controlled release preparation of traditional Chinese medicine [J]. *Drug Evaluation Research*, 2010, 33(1): 30-35.
- [6] Pardeshi C, Rajput P, Belgamwar V, *et al.* Solid lipid based nanocarriers: An overview [J]. *Acta Pharm* 2012; 62(4): 433-72.
- [7] Feng L, Mumper R J. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery [J]. *Cancer Lett* 2013; 334(2): 157-75.
- [8] Evaluation of solid lipid nanoparticles as carriers for delivery of hepatitis B surface antigen for vaccination using subcutaneous route [J]. *J Pharm Sci*. 2010; 13(4): 495-509.
- [9] Mody K T, Popat A, Mahony D, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles as antigen carriers and adjuvants for vaccine delivery [J]. *Nanoscale* 2013; 5: 5167-79.
- [10] He Q, Mitchell A R, Johnson S L, *et al.* Calcium phosphate nanoparticle adjuvant [J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory*

- Immunology 2000; 7: 899 - 903.
- [11] Slütter B, Soema P C, Ding Z, *et al.* Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen [J]. Journal of Controlled Release 2010; 143:207.
- [12] Pillai G J, Greeshma M M, Menon D. Share. Impact of poly (lactic - co - glycolic acid) nanoparticle surface charge on protein, cellular and haematological interactions [J]. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015 Dec 1; 136: 1058 - 66.
- [13] Xiang S D, Scholzen A, Minigo G, *et al.* Pathogen recognition and development of particulate vaccines; doessize matter [J]. Methods 2006; 40: 1 - 9.
- [14] L. Yildirimer, N.T. Thanh, M. Loizidou, *et al.* Toxicology and clinical potential of nanoparticles [J]. Nano Today 6 (2011) 585 - 607.
- [15] Dong Z, Xie S, Zhu L, *et al.* Preparation and *in vitro*, *in vivo* evaluations of norfloxacin - loaded solid lipid nanopartices for oral delivery [J]. Drug Deliv, 2011, 18(6): 441 - 450.

(编辑:陈希)