

# PLGA 纳米/微球作为核酸载体的研究进展

王 刚 潘 丽 张永光\*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室  
农业部畜禽病毒学重点开放实验室 甘肃 兰州 730046)

**摘要:** 生物可降解材料[poly(lactide-co-glycolide acid), PLGA]颗粒在持续释放和定位递送各种药剂包括核酸有很大的研究和应用价值。本文综述了 PLGA 作为核酸载体的制备及其用于基因载体和疫苗佐剂的研究。

**关键词:** PLGA, DNA, 基因治疗, 疫苗佐剂

## Research Progress on PLGA Nanoparticles/Microspheres as DNA Carriers

WANG Gang PAN Li ZHANG Yong-Guang\*

(Key Laboratory of Animal Virology of Agriculture/State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

**Abstract:** Biodegradable PLGA [poly(lactide-co-glycolide acid)] have shown significant potential for sustained and targeted delivery of several pharmaceutical agents, including DNA. We reviewed the formulating approaches of PLGA nanoparticles/microspheres as DNA carriers and utilization for gene therapy and vaccine adjuvant.

**Keywords:** PLGA, DNA, Gene therapy, Vaccine adjuvant

生物可降解材料 PLGA 是乳酸(Lactic acid, LA)与羟基乙酸(Glycolic acid, GA)共聚合而成,有很好的稳定性,具有易于被吞噬细胞摄取,通过在颗粒表面吸附相应的配体可以定位到特定的组织或器官等优点,美国食品药品监督管理局(FDA)已认定 PLGA 有良好的生物相容性和安全性,已被广泛应用于人的临床医学<sup>[1,2]</sup>。

由于制备工艺不同, PLGA 分子量、LA 与 GA 的摩尔比、光学活性、链末端结构不同,都会影响 PLGA 的释放特性。PLGA 可以通过改变自身共聚物中 LA 与 GA 的比例而改变 PLGA 的物理化学性

质<sup>[3]</sup>。

DNA 包裹进 PLGA 有 4 个优点<sup>[4,5]</sup>: 1) 防止体内 DNA 降解; 2) 起到控制释放的作用,并长期刺激树突状细胞(Dendritic cell, DC); 3) 易于转化动物细胞,易于被 DC 细胞吞噬; 4) 在抗原存在时,能够刺激 Th1 型免疫反应。

### 1 载核酸 PLGA 颗粒制备及其对转化的影响

颗粒的直径和表面电势是两个重要的物理参数,它影响着核酸的包裹率、转化率。

基金项目: 欧盟项目 FMD-DISCONVAC(No. 226556); 家畜疫病病原生物学国家重点实验室自主研究课题(No. SKLVEB2008ZZKT008); 甘肃省自然科学基金(No. 0710RJZA082)

\* 通讯作者: Tel: 86-931-8342537; E-mail: zhangyg@public.lz.gs.cn

收稿日期: 2009-06-11; 接受日期: 2009-08-31

## 1.1 PLGA 颗粒的直径

PLGA 一般制备成微粒或纳米粒,而微粒或纳米粒是根据它的直径来分类的,微球的直径在 1  $\mu\text{m}$  到 250  $\mu\text{m}$ ,而纳米粒直径则在 1 nm 到 1000 nm<sup>[4]</sup>。纳米粒相对微粒有更高的吸收率,研究表明在人结肠腺癌细胞(Caco-2)中,100 nm 的纳米粒相对 1  $\mu\text{m}$  的微球吸收率提高 2.5 倍,相对 10  $\mu\text{m}$  微球的吸收率提高 6 倍<sup>[6]</sup>。在小鼠肠管原位模型中(A rat in situ intestinal loop model)也得到了相似的结果,100 nm 的纳米粒相对 1  $\mu\text{m}$  和 10  $\mu\text{m}$  微球的吸收率提高 15 到 250 倍<sup>[7]</sup>。当颗粒通过黏膜部位摄取时,小的颗粒能够穿过黏膜下皮层,而大的颗粒则定位于黏膜上皮层,且小的颗粒比大的颗粒有更高的转化效率<sup>[7,8]</sup>。一系列的研究表明,颗粒直径显著影响细胞和组织的吸收效率,且更小、更均一的粒径会使基因的表达效果提高。

## 1.2 制备技术对颗粒的影响

### 1.2.1 制备方法对颗粒的影响:制备微粒或纳米粒的方法很多,包括乳化溶剂挥发法(Emulsion solvent evaporation technique)<sup>[9]</sup>、乳化溶剂扩散法(Emulsion solvent diffusion method)<sup>[10,11]</sup>、喷雾干燥法(Spray drying),复乳化溶剂挥发法(Double emulsion solvent evaporation, DES-E)<sup>[12,13]</sup>、复乳化溶剂扩散法(Double emulsion solvent diffusion technique)<sup>[14]</sup>等。复乳化溶剂挥发法是最常用于制备 DNA 包裹 PLGA 的方法(图 1)。而这些方法的选择取决于所需要的颗粒直径和包裹率。以聚合物为原料制备微球最常用的方法是先制备成 O/W、W/O、W/O/W、O/W/O 等型乳液后,再根据具体的用途选择适当方法使液滴固化成微球。制备方法的选择对颗粒直径有直接的影响。

固化一般采用冷冻干燥或喷雾干燥的方法,发现喷雾干燥可以降低颗粒聚集,从而制备出直径更小的颗粒,因而喷雾干燥技术越来越被广泛采用。以冷冻干燥和喷雾干燥的方法制备含阳离子 PLGA,

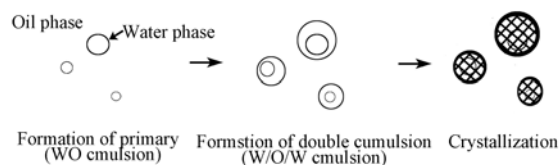


图 1 以 W/O/W 复乳化溶剂挥发法来制备载质粒 DNA 的 PLGA 纳米球<sup>[15]</sup>

Fig. 1 Preparation mechanism of pDNA loaded PLGA nanosphere by W/O/W emulsion solvent evaporation method<sup>[15]</sup>

比较其颗粒直径,结果显示喷雾干燥制备的纳米球显著小于冷冻干燥制备的纳米球<sup>[16]</sup>(表 1)。

载质粒 DNA 的 PLGA 颗粒可以通过两种方法来制备,一种是把 DNA 包裹在 PLGA 里<sup>[17,18]</sup>,另一种是把 DNA 吸附在 PLGA 颗粒的表面<sup>[19]</sup>。吸附 DNA 于 PLGA 颗粒上,可以增强 DNA 与 TLR 受体的作用,可以提高包裹效率<sup>[20]</sup>。

### 1.2.2 搅拌对颗粒的影响:在制备 PLGA 颗粒过程中,当有机相和水相混合后,需要使之混均匀,这时一般采用两种方法:超声波法(Sonication)和匀浆法(Homogenization)<sup>[4]</sup>。超声波的优点是能够制备相对较小且均一的颗粒,但是在包裹法制备 PLGA 颗粒时容易导致 DNA 的断裂和潜在的 24 h 内的突释效应。匀浆法是在表面活性剂存在时以高频振动来乳化聚合物和 DNA 混合物。和超声波法相比,匀浆法需要更高浓度的表面活性剂(5% vs. 1%)和添加复合溶剂。即使通过以上改进,匀浆法制备的颗粒仍然比超声波法制备的颗粒直径略大(~450 nm vs. ~280 nm),但却有更高的包裹率,通过匀浆法制备的颗粒比超声波法制备的颗粒有更慢、更一致的 DNA 释放模式<sup>[4]</sup>。使用匀浆法时,当增加匀浆速度时,颗粒直径相应减小,但当速度在 12000 rpm 以上时,变化很小<sup>[21]</sup>。

### 1.2.3 有机相与水相的比例对颗粒的影响:有机相与水相的比例对于颗粒的直径和表面电势都有很大

表 1 冷冻干燥或喷雾干燥前、后阳离子 PLGA 纳米球的平均直径和喷雾干燥后的电势  
Table 1 Mean particle diameter (D50) of PLGA nanospheres with cationic materials before and after freeze-drying or spray-drying, and zeta potential after spray-drying

阳离子聚合物 Cationic materials	干燥前 Before drying D50 (nm)	冷冻干燥 Freeze-dried D50 (nm)	喷雾干燥 Spray-dried D50 (nm)	电势 Zeta potential (mV)
PEI	99.8	342.6	124.1	57.2
CTAB	216.8	1281.2	219.1	-7.5

表 2 匀浆法和超声波法比较  
Table 2 Compare formulating method between sonication and homogenization

	颗粒直径 (nm) Particle diameter	包裹率 DNA-loading rate	释放模式 The pattern of release	DNA 稳定性 DNA stability
匀浆法 Homogenization	~450	高	慢, 一致	好
超声波法 Sonication	~280	低	快, 不一致	差

的影响, 当它们的比例从 2:1 到 1:1, 1:2 变化时, 颗粒直径变小, 而表面电势增大<sup>[8]</sup>。

### 1.3 PLGA 性质对颗粒的影响

PLGA 的 LA 与 GA 的比例对颗粒的直径和表面电势也有影响, 在相同的条件下, PLGA 75:25 比 PLGA 50:50 有更小的纳米颗粒直径, 更高的表面电势<sup>[22]</sup>。PLGA 50:50 的分子量(12 kD, 53 kD, 143 kD)越高, 制备的纳米颗粒直径越小, 表面电势越高<sup>[22]</sup>。用疏水的 PLGA(Mw 31000)比亲水的、小分子量(Mw 10000)的 PLGA 有较高的 pDNA-PLL 包裹率(46.2%)和 pDNA 的超螺旋结构(64.9%)<sup>[23]</sup>。含 pDNA-PLL 的小分子量和亲水 PLGA 微球在 38 天的体外释放率分别为 95.9%和 84.9%, 而疏水、高分子量的 PLGA 则为 54.2%<sup>[23]</sup>。PLGA 的浓度也影响颗粒的大小, 当浓度增加时, PLGA 纳米颗粒直径增大, 但对表面电势的影响很小<sup>[8]</sup>。

### 1.4 表面活化剂对颗粒的影响

利用聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol, PVA)和聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl pyrrolidone, PVP)作稳定剂, 当 PVA 浓度从 1%增加到 7%时, 颗粒直径从 6.6  $\mu\text{m}$  降低到 2.2  $\mu\text{m}$ <sup>[23]</sup>。在相同浓度稳定情况下, PVA 制备的微球 pDNA-PLL 包裹率是 46.2%, 而 PVP 为 24.1%<sup>[23]</sup>。在制备壳聚糖包被的 PLGA 纳米粒时, 以 PVA 作稳定剂, 同样随浓度增加颗粒的直径减小<sup>[8]</sup>。以 PEG 作为稳定剂, 可以提高 PLGA 纳米球中 DNA 的完整性和提高包裹效率<sup>[24]</sup>。

### 1.5 共聚物对颗粒的影响

添加一些阳离子共聚物如左旋聚赖氨酸 [poly(L-lysine), PLL]<sup>[25]</sup>、聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine, PEI)<sup>[26]</sup>、壳聚糖(Chitosan, CHI)<sup>[27]</sup>、溴棕三甲铵 (Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)<sup>[28-32]</sup>、聚乙二醇-聚赖氨酸<sup>[33]</sup>, 能够改变颗粒的表面电势, 能够提高颗粒的转化率。

### 1.6 pH 对颗粒的影响

质粒 DNA 的结构受 PLGA 降解的酸性微环境影响。质粒 DNA 结构的改变与其释放的时间点相

关, 大量的超螺旋质粒 DNA 在最初的突释期间释放<sup>[34]</sup>, 缺口 DNA 和超螺旋质粒 DNA 在随后释放, 这可能与质粒 DNA 置于 PLGA 颗粒的酸性微环境有关<sup>[35]</sup>。在制备过程中, PLGA 会降低液相溶液的 pH 值。低 pH 环境通过改变单链和双链 DNA 的平衡导致质粒 DNA 的降解<sup>[36]</sup>, 当 pH 值小于或等于 3 时, 就会大大影响转化效率<sup>[37]</sup>。低 pH 还会引起脱嘌呤作用。添加  $\text{NaHCO}_3$  能够起到缓冲作用, 添加一些阳离子聚化物也能起到保护作用。

## 2 PLGA 增强核酸递呈

包裹有 DNA 的 PLGA 颗粒可以通过多种途径被摄取, 如口腔、鼻腔、雾化后肺吸入、肌肉注射、皮下注射、静脉注射等。DNA 要到达靶细胞需要克服多重屏障, 如血脑屏障、胃肠黏膜、鼻黏膜、眼组织等。而研究表明, PLGA 可以提高穿过这些屏障的效率。

### 2.1 PLGA 及其共聚物增强核酸递呈

PLGA 颗粒通过阳离子聚合物来帮助其定向于吞噬性抗原递呈细胞, 并增强从吞噬体(Phagosomal)逃逸, 再进入细胞核, 从而提高转化效率<sup>[38]</sup>。由于阳离子能够结合和浓缩 DNA, 因而可以提高其包裹率<sup>[39]</sup>。

当制备的 PLGA 颗粒应用于疫苗免疫时, 颗粒直径在 1  $\mu\text{m}$ ~10  $\mu\text{m}$  时显示对于抗原递呈细胞如吞噬细胞、DC 细胞有更高的摄取率<sup>[40]</sup>, 相反, 如果定位于非吞噬细胞时, 当颗粒直径小于 300 nm 时可以通过网格蛋白介导的内吞作用来吞噬颗粒<sup>[41]</sup>。

研究发现, 带阳离子微球增强了单核细胞和树突状细胞的吞噬作用<sup>[42]</sup>。有 3 种方法可以获得阳离子 PLGA 颗粒, 1) 在 PLGA 中加入功能性分枝如 PLL<sup>[4,43]</sup>或共价连接阳离子物质如 PEI 到 PLGA 上<sup>[38]</sup>; 2) 阳离子物质和 PLGA 混合<sup>[44]</sup>; 3) 通过乳化作用从外层液相把阳离子表面活性分子吸附到颗粒表面, 如 PLL<sup>[25]</sup>、PEI<sup>[26]</sup>、壳聚糖<sup>[27]</sup>、CTAB<sup>[28-32]</sup>、聚乙二醇-聚赖氨酸<sup>[33]</sup>。第 3 种方法是最简单的, 但是这种方

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

法没有进行共价连接及解吸附作用,可能导致阳离子的下降。

**2.1.1 PLL 与 PLGA:** 由于聚赖氨酸具有压缩 DNA 和保护 DNA 不被核酸酶降解的特性,聚赖氨酸曾被广泛用于基因递送载体<sup>[45]</sup>。通过乳化作用从外层液相把 PLL 吸附到颗粒表面而制备的含 PLL 的 PLGA 微球,表明以低黏度的稳定剂制备的疏水性 PLGA 可以稳定 pDNA 的超螺旋结构和提高包裹效率<sup>[23]</sup>。有报道以 PLL 做主链,PLGA 做接枝链的双亲性共聚物被合成<sup>[43]</sup>。这些共聚物颗粒形成核-壳结构,由疏水的 PLGA 做为内核,而带正电核的 PLL 做外壳<sup>[43]</sup>。这种自组装形成的 PLGA-接枝-PLL 表明有良好的转化率和较低的细胞毒性<sup>[43]</sup>。根据不同的目的有针对性的添加 PLL,如作为疫苗就需要相应提高释放速率来诱导免疫反应,而作为编码组织再生的生长因子基因的质粒选择缓慢持续释放就很有必要<sup>[4,43]</sup>。

**2.1.2 CHI 与 PLGA:** 近年来,CHI 包被 PLGA 颗粒的制备研究很多,而且也取得比较好的效果。由于 CHI 的可降解性、生物相容性和黏膜吸附特性使其成为用于基因转化和表达的理想载体<sup>[46]</sup>。CHI 可以在 pH 为 7 时释放 DNA,而这是基因递送的必要条件<sup>[8]</sup>。吸附有 CHI 的 PLGA 纳米粒可以有效结合反义 RNA 并被细胞摄取<sup>[8]</sup>。一种新型的载 CHI 的泡沫状 PLGA 通过喷雾干燥和超临界二氧化碳发泡技术制备,可以持续释放 DNA 5~9 周,DNA 的完整性能很好地维持,添加 CHI 对于细胞吸附和细胞存活都有增强作用<sup>[47]</sup>。有研究表明,CHI 是通过打开细胞间的紧密连接来增加药物的吸附,而 CHI 包被 PLGA 应用于肠道、鼻黏膜、肺黏膜免疫都有报道,且能起到保护药物作用。

**2.1.3 PEI 与 PLGA:** 含 PEI 和 DNA 复合物的 PLGA 微粒在肌肉注射免疫后,能够促进 DNA 进入抗原递呈细胞,可引起相对裸露 DNA 2~3 个数量级的抗体反应。在体外能够持续释放完整、有渗透性的 PEI 和 DNA 复合物 2 周以上,且由于 PEI 的保护作用,质粒 DNA 不降解<sup>[48]</sup>。用吸附 DNA 的载 PEI 的 PLGA 微球来转染小鼠成纤维细胞 L929,可以被 L929 吸收<sup>[49]</sup>。分枝 PEI 和 PLGA 的共价连接可有效提高颗粒 DNA 疫苗的负载率,及增强吞噬细胞的转化率而不影响 PLGA 与细胞的相容性<sup>[50]</sup>。在肺黏膜组织中,在纤毛和黏液存在的情况下,载 PEI 的

PLGA 纳米粒可以穿越肺黏膜上皮细胞,经内化后,DNA 也能够进入溶酶体,并有一定比例的颗粒可以从溶酶体逃逸,并进入细胞核<sup>[51]</sup>。PEI 由于有以上特点,也被广泛研究,但是有研究报道它有一定的细胞毒性,因而限制了其应用。

**2.1.4 其他阳离子与 PLGA:** 含阳离子脂质体 DOTAP 和无唾液酸胎球蛋白(Asialofetuin, AF)的载 IL12 基因的 PLGA 纳米颗粒可以定位于表达唾液酸糖蛋白受体的肝细胞<sup>[52]</sup>。

## 2.2 细胞内定位(Intracellular trafficking)

细胞内定位是基因递送的又一个障碍,文献报道相对较少。基因载体从溶酶体逃逸后,通过被动扩散到过核周区需要数小时。有研究表明,以单核细胞增生李斯特菌的 ActA 蛋白修饰载核酸的 PLGA 纳米颗粒或微球,发现 ActA 可以使肌动蛋白聚合,起始肌动蛋白的慧尾推进(Actin comet-tail propulsion)<sup>[53]</sup>。

## 2.3 核定位(Nuclear localization)

有研究报道,通过共价连接一段核定位信号序列(Nuclear localization signal, NLS)到 PLGA 纳米球来加强基因的转化<sup>[54]</sup>。连接 NSL 的 PLGA 纳米球通过 PLGA 末端的顺丁烯二酰亚胺和 NSL 在顺丁烯二酰亚胺连接缓冲液中进行偶联反应,通过体外人表皮成纤维细胞表达萤光素酶基因,连接 NSL 的 PLGA 纳米球相对未连接的有 1.2~3.2 倍的转化效率。表明 NSL 可以增强核定位和 PLGA 纳米球的吸收,从而增强转化效率。

## 3 载核酸 PLGA 的应用

PLGA 的应用范围很广,被用于抗癌药物、质粒 DNA、蛋白或多肽、小分子量复合物的递送。而载核酸的 PLGA 则主要用于基因治疗、疫苗递送两方面。

### 3.1 PLGA 用于基因治疗

基因治疗的目的是通过在目标细胞导入治疗性基因来治疗各种遗传性疾病。为了在目标细胞导入外源基因,就需要载体。病毒载体比非病毒载体有更高的转化效率,但是存在一些缺点,如反转录病毒需要有丝分裂、载体的免疫原性、导入 DNA 长度限制、以及与野生型病毒发生重组等安全因素等。而非病毒载体有更低的载体免疫原性、易于放大培养、保存稳定、相对安全等优点。脂质体和 PEI 也

曾被用于基因治疗,但由于其储存的不稳定性和细胞毒性,而不能广泛应用。PLGA 则是一种有希望的可降解、生物相容性的生物材料,能够持续释放,所以被深入研究。

颗粒从溶酶体内腔(Endo-lysosomal compartment)向胞质的快速释放<sup>[55]</sup>和颗粒在细胞内的滞留表明包裹有 DNA 的 PLGA 颗粒可以作为一个有效的基因递送载体<sup>[56]</sup>。颗粒能否保护 DNA 而不被溶酶体酶降解决定颗粒的治疗效果。有研究表明 PLGA 包裹的 DNA 能够防止被核酸酶降解<sup>[57]</sup>。在细胞摄取、溶酶体释放后,颗粒缓慢释放 DNA 从而持续表达基因。在小鼠截骨模型中(A rat bone osteotomy),手术后 5 周即可在恢复组织观察到基因的持续表达,这个策略可以通过一些成骨蛋白基因用于骨愈合治疗<sup>[55]</sup>。

利用含碱性磷酸酶基因的 PLGA 乳液来包被肠缝合线(Coating gut suture),然后用来缝合小鼠骨骼肌。手术后 2 周,在缝合处的组织有基因的持续表达。编码生长因子如血管内皮细胞生长因子的包被基因缝合线可以帮助伤口愈合<sup>[58]</sup>。

非病毒生物载体也被用于癌症的治疗,有研究利用载聚羧乙烯(Carbopol)的 PLGA 纳米粒在体外转化 A549 人肺腺癌上皮细胞系时有相对高的转化率,可以作为潜在有希望的治疗癌症的载体<sup>[59]</sup>。在细胞毒性实验中,连接外周苯二氮卓受体配体的 PLGA 聚合物可以定向线粒体,引起 C6 胶质瘤细胞生长抑制<sup>[60]</sup>。PLGA/DOTAP/AF/IL-12 纳米颗粒可以有效治疗肝细胞癌,其中无唾液酸胎球蛋白 Asialofetuin (AF)通过与表达于肝细胞的唾液酸糖蛋白受体结合,起到定位作用<sup>[51]</sup>。在 B 细胞淋巴瘤的动物模型中,分枝 PEI 连接的 PLGA 颗粒在吞噬细胞中有增加的佐剂效应,提供了显著的抗癌效应<sup>[20]</sup>。

DNA 载体用于治疗有一个不利因素,就是表达载体的毒性,因此限制了 DNA 的用量<sup>[61]</sup>。通过 MTS 法细胞毒试验检测 PLGA 颗粒对血管平滑肌的影响,表明其在体内和体外都没有毒性<sup>[62]</sup>。在慢性血管再狭窄的猪和小鼠模型中,PLGA 纳米颗粒在动脉组织血管的吸收中没有表现出不良反应,表明其长期的组织相容性<sup>[63]</sup>。

在细胞内 PLGA 颗粒的慢速释放可能对于基因的持续表达有促进作用。持续可控的表达,对于特

定部位的疾病很重要,如表达促血管生长因子对于血管损坏引起的心脏或四肢血管缺血<sup>[64]</sup>。有研究表明,在治疗血管再生时过表达生长因子可能导致癌症形成<sup>[65]</sup>。最优的基因表达模式取决于不同疾病的需要,一些需要局部表达而另一些则需要全身表达。

### 3.2 PLGA 用于疫苗佐剂

PLGA 也可以作为疫苗佐剂, DNA 包裹或吸附于 PLGA 纳米粒或微球上,通过一些途径如肌肉注射、皮下注射、黏膜等途径来免疫动物,来提高免疫和减少免疫次数。PLGA 包裹蛋白质、肽段、核酸用于疫苗免疫,如包裹抗原蛋白、葡萄球菌 B 型肠毒素、破伤风类毒素等,都可起到较好的佐剂作用<sup>[66]</sup>。

载 PEI 的 PLGA 微粒在 HIV 免疫中也能引起相对裸 DNA 有 2~3 倍的血清抗体水平和有效的 CTL 反应<sup>[48]</sup>。小鼠免疫编码 HIV Gag 和 Env 基因且吸附于阳离子 PLGA 微粒的 DNA 疫苗能够分别增加相对裸露 DNA 疫苗 100 倍和 1000 倍的 CD8 + T 细胞和抗体反应<sup>[67]</sup>。

以 PLGA 微粒包裹编码口蹄疫多表位的核酸疫苗来免疫小鼠,结果表明可以增强体液与细胞免疫<sup>[68]</sup>。用吸附有编码口蹄疫 VP1 病毒 DNA 疫苗的阳离子 PLGA 微粒免疫豚鼠,可以引起和灭活疫苗一样的抗体滴度,攻毒保护实验结果显示与灭活疫苗一样能全部保护<sup>[69]</sup>。

PLGA 也用于乙肝疫苗,利用乙肝 DNA 疫苗吸附于含阳离子 CTAB 的 PLGA 微粒免疫小鼠,发现相对于裸露 DNA 有更高的抗体水平和增强的细胞免疫反应<sup>[70]</sup>。将编码丙型肝炎病毒胞内形式的 E1E2 包膜蛋白的 DNA 疫苗吸附于 PLGA 微粒,然后免疫小鼠,相对裸露 DNA 有较强的免疫作用<sup>[32]</sup>。用吸附有编码单核细胞增生李斯特菌的 DNA 的 PEI/PLGA 微粒免疫小鼠,表明 PEI/PLGA 微粒可以起到佐剂效应<sup>[49]</sup>。

PLGA 颗粒可以用于黏膜免疫,在口服投药后可以被肠淋巴集结(Peyer's patches)吸收或经鼻免疫后可以被鼻黏膜相关淋巴组织吸收。编码轮状病毒 VP6 的质粒 DNA 吸附于 PLGA 微粒,通过口服免疫小鼠,可以引起特异性抗体和 IgA<sup>[71]</sup>。载抗淋巴囊肿病毒质粒的 PLGA 微胶囊经口免疫牙鲆,结果显示相对注射裸露质粒经口免疫 PLGA 微胶囊有更

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

稳定、持久的免疫反应<sup>[72]</sup>。以编码禽偏肺病毒 F 蛋白的质粒初免和以重组 F 蛋白加强免疫,且均包裹于 PLGA 微粒中,经眼鼻免疫火鸡来抗禽偏肺病毒,结果表明可以引起体液和细胞免疫反应<sup>[73]</sup>。

#### 4 讨论

PLGA 作为一种有生物相容性、可降解性、安全性的生物材料,并可以通过添加一些共聚物来改善它的性能,因而被广泛研究和应用于基因治疗及疫苗佐剂。PLGA 能够装载相对多的 DNA,并能保护其在制备过程中不被降解,在体外阻止 DNA 酶的降解作用,且能够控制释放,所以备受关注。PLGA 已用于多种疫苗载体,如 HIV、乙肝、口蹄疫等。近年来,通过研究制备参数,添加不同的共聚物,以制备各种不同物理性质的颗粒,满足各种研究和应用需要。PLGA 作为核酸载体有继续研究的价值和广阔的应用前景。

#### 参 考 文 献

- [1] Julia Schnieders, Uwe Gbureck, Roger Thull, *et al.* Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement. *Biomaterials*, 2006, **27**: 4239-4249.
- [2] Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 2000, **23**: 2475-2490.
- [3] Franziska Gabler, Simone Frauenschun, Jochen Ringe, *et al.* Emulsion-based synthesis of PLGA microspheres for the *in vitro* expansion of porcine chondrocytes. *Biomolecular Engineering*, 2007: 1-6.
- [4] Blum JS, Saltzman WM. High loading efficiency and tunable release of plasmid DNA encapsulated in submicron particles fabricated from PLGA conjugated with poly-L-lysine. *J Control Release*, 2008, **129**(1): 66-72.
- [5] Waeckerle-Men Y, Uetz-von Allmen E, Gander B, *et al.* Encapsulation of proteins and peptides into biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres prolongs and enhances antigen presentation by human dendritic cells. *Vaccine*, 2006, **24**: 1847-1857.
- [6] Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, *et al.* The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res*, 1997, **14**: 1568-1573.
- [7] Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL, *et al.* Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm Res*, 1996, **13**: 1838-1845.
- [8] Nafee N, Taetz S, Schneider M, *et al.* Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine*, 2007, **3**(3): 173-183.
- [9] Vanderhoff JW, El-Aasser MS, Ugelstad J. Polymer emulsification process. *US Pat*, 1979, **4**(177): 177.
- [10] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, *et al.* Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J Control Release*, 1993, **25**(1-2): 89-98.
- [11] Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H, *et al.* Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *Int J Pharm*, 1999, **188**(2): 155-164.
- [12] Ogawa Y, Yamamoto M, Okada H, *et al.* A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly (lactic/glycolic) acid. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1988, **36**(3): 1095-1103.
- [13] Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, *et al.* Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J Control Release*, 1998, **50**(1-3): 31-40.
- [14] Einat Cohen-Sela, Michael Chorny, Nickolay Koroukhov, *et al.* A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J Control Release*, 2009, **133**: 90-95.
- [15] Tahara K, Yamamoto H, Takeuchi H, *et al.* Development of gene delivery system using PLGA nanospheres. *Yakugaku Zasshi*, 2007, **127**(10): 1541-1548.
- [16] Takashima Y, Saito R, Nakajima A, *et al.* Spray-drying preparation of microparticles containing cationic PLGA nanospheres as gene carriers for avoiding aggregation of nanospheres. *Int J Pharm*, 2007, **343**(1-2): 262-269.
- [17] Hedley ML, Curley J, Urban R. Microspheres containing plasmid-encoded antigens elicit cytotoxic T-cell responses. *Nat Med*, 1998, **4**(3): 365-368.
- [18] Luo D, Woodrow-Mumford K, Belcheva N, *et al.* Controlled DNA delivery systems. *Pharm Res*, 1999, **16**(8): 1300-1308.
- [19] Singh M, Briones M, Ott G, *et al.* Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(2): 811-816.
- [20] Pai Kasturi S, Qin H, Thomson KS, *et al.* Prophylactic anti-tumor effects in a B cell lymphoma model with DNA vaccines delivered on polyethylenimine (PEI) functionalized PLGA microparticles. *J Control Release*, 2006, **113**(3): 261-270.
- [21] Kwon HY, Lee JY, Choi SW, *et al.* Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsifica-

- tion-diffusion method. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2001, **182**: 123–130.
- [22] Prabha S, Labhasetwar V. Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression. *Pharm Res*, 2004, **21**(2): 354–364.
- [23] Capan Y, Woo BH, Gebrekidan, *et al.* Influence of formulation parameters on the characteristics of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres containing poly(L-lysine) complexed plasmid DNA. *J Contr Rel*, 1999, **60**: 279–286.
- [24] Mok H, Park TG. Direct plasmid DNA encapsulation within PLGA nanospheres by single oil-in-water emulsion method. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, **68**(1): 105–111.
- [25] Cui C, Schwendeman SP. Surface entrapment of polylysine in biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *Macromolecules*, 2001, **34**: 8426–8433.
- [26] Shakweh M, Besnard M, Nicolas V, *et al.* Poly(lactide-co-glycolide) particles of different physicochemical properties and their uptake by Peyer's patches in mice. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, **61**: 1–13.
- [27] Kumar NMVR, Bakowsky U, Lehr CM. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*, 2004, **25**: 1771–1777.
- [28] Singh M, Briones M, Ott G, *et al.* Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 811–816.
- [29] Briones M, Singh M, Ugozzoli M, *et al.* The preparation, characterization, and evaluation of cationic microparticles for DNA vaccine delivery. *Pharm Res*, 2001, **18**: 709–712.
- [30] Singh M, Ott G, Kazzaz J, *et al.* Cationic microparticles are an effective delivery system for immune stimulatory CpG DNA. *Pharm Re*, 2001, **18**: 1476–1479.
- [31] Denis-Mize KS, Dupuis M, Singh M, *et al.* Mechanisms of increased immunogenicity for DNA-based vaccines adsorbed onto cationic microparticles. *Cell Immunol*, 2003, **225**: 12–20.
- [32] O'Hagan DT, Singh M, Dong C, *et al.* Cationic microparticles are a potent delivery system for a HCV DNA vaccine. *Vaccine*, 2004, **23**: 672–680.
- [33] Faraasen S, Vörös J, Csúcs G, *et al.* Ligand specific targeting of microspheres to phagocytes by surface modification with poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) conjugate. *Pharm Res*, 2003, **20**: 237–246.
- [34] Sandor M, Mehta S, Harris J, *et al.* Transfection of HEK cells via DNA-loaded PLGA and P(FASA) nanospheres. *J Drug Target*, 2002, **10**: 497–506.
- [35] Aiman O Abbas, Maureen D, Donovan, *et al.* Formulating poly(lactide-co-glycolide) particles for plasmid DNA delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, **97**: 2448–2461.
- [36] Walter E, Dreher D, Kok M, *et al.* Hydrophilic poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. *J Control Release*, 2001, **76**: 149–168.
- [37] Walter E, Moelling K, Pavlovic J, *et al.* Microencapsulation of DNA using poly(D,L-lactide-co-glycolide): Stability issues and release characteristics. *J Control Release*, 1999, **61**: 361–374.
- [38] Kasturi SP, Sachaphibulkij K, Roy K. Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles for delivery of plasmid DNA vaccines. *Biomaterials*, 2005, **26**: 6375–6385.
- [39] Trimaille T, Pichot C, Delair T. Surface functionalization of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles with poly(ethylenimine) and plasmid DNA by the layer-by-layer approach. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2003, **221**: 39–48.
- [40] Tabata Y, Ikada Y. Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages. *Adv Polym Sci*, 1990, **94**: 107–141.
- [41] Marsh M, McMahon HT. Cell biology—The structural era of endocytosis. *Science*, 1999, **285**: 215–220.
- [42] Wischke C, Borchert HH, Zimmermann J, *et al.* Stable cationic microparticles for enhanced model antigen delivery to dendritic cells. *J Control Release*, 2006, **114**(3): 359–368.
- [43] Jeong JH, Park TG. Poly(L-lysine)-g-poly(D,L-lactide-co-glycolic acid) micelles for low cytotoxic biodegradable gene delivery carriers. *J Control Release*, 2002, **82**(1): 159–166.
- [44] Manuel WS, Zheng JI, Hornsby PJ. Transfection by polyethyleneimine-coated microspheres. *J Drug Target*, 2005, **9**: 15–22.
- [45] Laemmlli UK. Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, **72**: 4288–4292.
- [46] Dodane V, Amin Khan M, Merwin JR. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm*, 1999, **182**: 21–32.
- [47] Nie H, Lee LY, Tong H, *et al.* PLGA/chitosan composites from a combination of spray drying and supercritical fluid foaming techniques: new carriers for DNA delivery. *J Control Release*, 2008, **129**(3): 207–214.
- [48] Zhou X, Liu B, Yu X, *et al.* Controlled release of PEI/DNA complexes from PLGA microspheres as a potent delivery system to enhance immune response to HIV vaccine DNA prime/MVA boost regime. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, **68**(3): 589–595.
- [49] Oster CG, Kim N, Grode L, *et al.* Cationic microparticles consisting of poly(lactide-co-glycolide) and polyethyleneimine as carriers systems for parental DNA vaccination. *J Control Release*, 2005, **104**(2): 359–377.
- [50] Kasturi SP, Sachaphibulkij K, Roy K. Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- for delivery of plasmid DNA vaccines. *Biomaterials*, 2005, **26**(32): 6375–6385.
- [51] Bivas-Benita M, Romeijn S, Junginger HE, *et al.* PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, **58**(1): 1–6.
- [52] Díez S, Navarro G, de ILarduya CT. *In vivo* targeted gene delivery by cationic nanoparticles for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Gene Med*, 2009, **11**(1): 38–45.
- [53] Ng CP, Goodman TT, Park IK, *et al.* Bio-mimetic surface engineering of plasmid-loaded nanoparticles for active intracellular trafficking by actin comet-tail motility. *Biomaterials*, 2009, **30**(5): 951–958.
- [54] Oju Jeon, Hee-Won Lim, Minhyung Lee, *et al.* Poly(L-lactide-co-glycolide) nanospheres conjugated with a nuclear localization signal for delivery of plasmid DNA. *Journal of Drug Targeting*, 2007 **15**(3): 190–198.
- [55] Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, *et al.* Rapid endo-lysosomal escape of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J*, 2002, **16**: 1217–1226.
- [56] Labhasetwar V, Bonadio J, Goldstein SA, *et al.* Gene transfection using biodegradable nanospheres: results in tissue culture and a rat osteotomy model. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 1999, **16**: 281–290.
- [57] Hedley ML, Curley J, Urban R. Microspheres containing plasmid-encoded antigens elicit cytotoxic T-cell responses. *Nat Med*, 1998, **4**: 365–368.
- [58] Labhasetwar V, Bonadio J, Goldstein S, *et al.* A DNA controlled-release coating for gene transfer: transfection in skeletal and cardiac muscle. *J Pharm Sci*, 1998, **87**: 1347–1350.
- [59] Zou W, Liu C, Chen Z, *et al.* Studies on bioadhesive PLGA nanoparticles: a promising gene delivery system for efficient gene therapy to lung cancer. *Int J Pharm*, 2009, **370**(1-2): 187–195.
- [60] Laquintana V, Denora N, Musacchio T, *et al.* Peripheral benzodiazepine receptor ligand-PLGA polymer conjugates potentially useful as delivery systems of apoptotic agents. *J Control Release*, 2009, **137**(3): 185–195.
- [61] Clark PR, Hersh EM. Cationic lipid-mediated gene transfer: current concepts. *Curr Opin Mol Ther*, 1999, **1**: 158–176.
- [62] Davda J, Labhasetwar V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int J Pharm*, 2002, **233**: 51–59.
- [63] Labhasetwar V, Song C, Levy RJ. Nanoparticle drug delivery for restenosis. *Adv Drug Del Rev*, 1997, **24**: 63–85.
- [64] Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, *et al.* Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 1029–1034.
- [65] Lee WS, Jain MK, Arkonac BM, *et al.* Thy-1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines. *Circ Res*, 1998, **82**: 845–851.
- [66] Jayanth Panyam, Vinod Labhasetwar. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, **55**: 329–347.
- [67] O'Hagan D, Singh M, Ugozzoli M, *et al.* Induction of potent immune responses by cationic microparticles with adsorbed human immunodeficiency virus DNA vaccines. *J Virol*, 2001, **75**(19): 9037–9043.
- [68] Wang F, He XW, Jiang L, *et al.* Enhanced immunogenicity of microencapsulated multiepitope DNA vaccine encoding T and B cell epitopes of foot-and-mouth disease virus in mice. *Vaccine*, 2006, **24**(12): 2017–2026.
- [69] Choudary S, Ravikumar P, Ashok Kumar C, *et al.* Enhanced immune response of DNA vaccine (VP1-pCDNA) adsorbed on cationic PLG for foot and mouth disease in guinea pigs. *Virus Genes*, 2008, **37**(1): 81–87.
- [70] He X, Jiang L, Wang F, *et al.* Augmented humoral and cellular immune responses to hepatitis B DNA vaccine adsorbed onto cationic microparticles. *J Control Release*, 2005, **107**(2): 357–372.
- [71] Chen SC, Jones DH, Fynan EF, *et al.* Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles. *J Virol*, 1998, **72**(7): 5757–5761.
- [72] Tian J, Sun X, Chen X, *et al.* The formulation and immunisation of oral poly(D,L-lactide-co-glycolide) microcapsules containing a plasmid vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Int Immunopharmacol*, 2008, **8**(6): 900–908.
- [73] Liman M, Peiser L, Zimmer G, *et al.* A genetically engineered prime-boost vaccination strategy for ocular delivery with poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microparticles against infection of turkeys with avian Metapneumovirus. *Vaccine*, 2007, **25**(46): 7914–7926.