

沉淀聚合制备粒径可控的温度响应型蛋白纳米胶囊*

魏炜^{1,2} 杜娟娟² 李颖² 刘阳² 阎明²
诸静¹ 胡祖明^{1**}

(¹东华大学材料科学与工程学院 上海 201620) (²加州大学洛杉矶分校化工与生物分子工程系 美国 洛杉矶 90095)

摘要 以牛血清蛋白(BSA)为模型蛋白,*N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)为单体,*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)为交联剂,采用原位沉淀聚合法制备了单分散的温度响应型蛋白纳米胶囊(nBSA).通过调整单体与蛋白的比例制备了粒径大小不同的含有单个蛋白分子的BSA纳米胶囊.采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)、透射电镜(TEM)和动态光散射仪(DLS)等对BSA蛋白的修饰度,nBSA的形貌和结构,以及温度响应性能进行了表征,并用HeLa细胞对nBSA的体外安全性进行了初步评价.结果表明,在一定范围内,随着单体和蛋白比例的升高,蛋白纳米胶囊的粒径也逐渐增大,且在7.4~17 nm之间可控,而nBSA的响应温度则逐渐减小在33~41℃之间可控;制备的nBSA单分散性较好;nBSA具有温度响应性能,当环境温度高于其响应温度时,nBSA的粒径可显著增大16~33倍,且这种变化随温度呈现可逆性,并通过对nBSA细胞毒性的初步考察,评价将其用于生物领域的潜力.

关键词 温度响应, 纳米颗粒, *N*-异丙基丙烯酰胺, 蛋白包裹

聚*N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)是最常见的温敏性聚合物之一,其低临界溶解温度(LCST)约为32~34℃^[1-3],并且通过与其他单体的共聚等途径可以调控其LCST至人体的生理温度(37℃)附近^[4-6],使得PNIPAM在生物医药领域具有很大的应用潜力,因此得到广泛的关注和研究.其中,将PNIPAM与蛋白、多肽以及核酸等生物分子相结合,作为功能载体用于药物缓释和蛋白分离方面的研究更成为相关研究中的热点^[7-9].早期研究集中在将温度响应的PNIPAM类水凝胶用于蛋白和多肽的装载和控制释放^[10,11],但是水凝胶会因其凝胶网络孔径较大等因素,装载后容易发生目标运输分子的泄漏而难以满足医药实际应用中的需求.而伴随着纳米科技的发展,近年对于基于PNIPAM的纳米微球^[12]、微凝胶^[13,14]和胶束^[15]的研究开始增多,这些应用形式在很好的利用了其温度响应特性的同时,在一定程度上改善了传统水凝胶形式的不足.但是,这些传输体系也多是在制备相应形态的载体以后,再将目标生物分子装载其中,通过温度响应来开启或者关闭目

标功能,这样既难以从根本上改变目标分子因为环境变化容易泄漏的问题,还受限于制备方法等因素难以制备粒径小于100 nm的纳米传输体系.

为了改善传统药物载体的不足,一些以牛血清蛋白(BSA)作为药物载体或者模型蛋白的研究显示出一定的优势.例如,采用去溶剂法制备BSA微胶囊作为药物载体^[16],采用层层自组装的方法制备具有pH响应性能的BSA纳米颗粒^[17],且通过对其表面的修饰与调控可以获得在人体生理条件下稳定性更好的BSA纳米颗粒^[18]等.此外,一种新型基于原位纳米胶囊化技术来制备蛋白纳米胶囊的方法的提出^[19],也为构建新的蛋白纳米结构应用体系提供了可能.该方法首先将可聚合基团修饰于蛋白分子表面,然后在室温条件下引发自由基聚合反应,在每个蛋白质分子周围形成聚合物网络将蛋白包裹其中,从而获得稳定性显著提高且粒径大小为十几纳米的单蛋白纳米胶囊.此类蛋白纳米胶囊的表面存在富余的氨基,因而可以对其进行后续的修饰和功能化,用于制备具有生物活性的复合材料.与传统的包埋法固定蛋

* 2012-09-14 收稿,2012-11-12 修稿; 国家高技术研究发展计划(863 计划,项目号 2012AA03212)、国家重点基础研究发展计划(973 计划,项目号 2011CB606103)和中央高校基本科研业务费专项资金(项目号 11D10625)资助项目.

** 通讯联系人,E-mail:hzm@dhu.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2013.12294

白相比,在蛋白分子表面的修饰会使得酶蛋白的活性降低,且如果聚合物层较厚则会阻碍埋于其中的酶蛋白与体积较大的底物分子之间的作用.为了弥补这些不足,研究人员提出另一种通过静电力吸附作用对原酶蛋白进行包裹的方法来制备蛋白纳米胶囊^[20].采用该方法制备的酶蛋白纳米胶囊在很好的保持酶活性的同时,也允许酶的小分子底物可以有效的穿透聚合物层,而对于体积较大的底物则可以通过引入可降解的聚合物或者交联剂,制备可降解的外层聚合物壳层,实现将目

标蛋白从纳米胶囊中释放的目的^[19-21].

新型纳米胶囊技术的开发为实现蛋白质的应用提供了新的可能.如果将刺激响应性能引入此类新型的蛋白纳米胶囊体系,制备对外界环境条件变化响应的蛋白纳米胶囊将进一步拓宽其应用领域.本研究基于以上研究背景,以牛血清蛋白(BSA)作为模型蛋白,引入温敏单体 NIPAM,首次采用原位沉淀聚合的方法制备了粒径大小可控的温度响应型单蛋白纳米胶囊,实现了对单个目标蛋白的精细化固定(如图 1 所示).

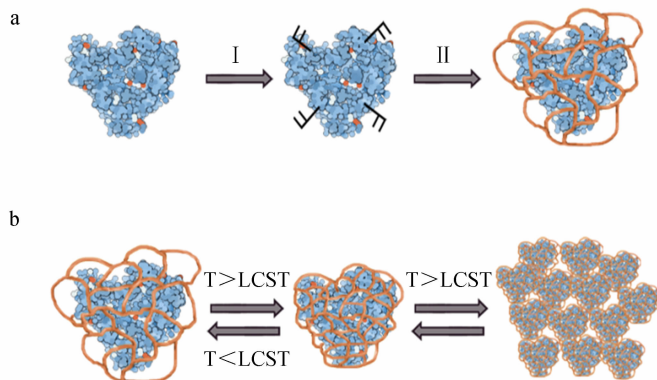


Fig. 1 Schematic showing (a) the construction of thermoresponsive nanocapsules and (b) their temperature responsive property

I Attaching polymerizable vinyl groups onto the protein surface; II Forming a layer of polymer shell around the protein by *in situ* precipitation polymerization

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

牛血清蛋白(BSA),纯度 $\geq 96\%$ (MW *ca.* 66×10^3),美国 Equitech-Bio 公司; *N*-羟基琥珀酰亚胺丙烯酸酯(NAS),纯度 $\geq 90\%$; *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAM),纯度 $\geq 99\%$; *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(BIS),纯度 $\geq 99.5\%$; 过硫酸铵(APS),纯度 $\geq 98\%$; 四甲基乙二胺(TEMED),纯度约为 99% ; 二甲基亚砜(DMSO),纯度 $\geq 99.9\%$; 细胞培养干粉(DMEM)和促生长小牛血清(BGS),以上实验试剂均购于 Sigma Aldrich(美国)公司. 实验用增殖表皮癌细胞(HeLa),加州大学洛杉矶分校生物实验室; 磷酸盐缓冲溶液(10 mmol/L, pH 7.4); 硼酸盐缓冲溶液(10 mmol/L, pH 8.4); 标准 PBS 缓冲液(pH 7.4).

7X7 CER 型控温搅拌台(美国 VWR 公司); Voyager DE-STR 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF,美国 Applied Biosystems 公司); DU® 730c 紫外-可见分光光度计(美国

Bechman Coulter 公司); Biological LP 型液相色谱(美国 Bio-Rad 公司); Nano-ZS 型纳米粒度分析仪(英国 Malvern 公司); EM-120 型透射电镜(美国 Philips 公司); BAS-5000 型酶标仪(日本 Fujifilm 公司).

1.2 蛋白的预处理

首先,称取一定量的 BSA 在 4°C 温度条件下,用 10 mmol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析纯化. 每 2 h 更换一次透析液,透析过夜后,换 20 mmol/L pH 8.5 硼酸盐缓冲液再透析 2 h. 用 UV-Vis 分光光度计测试其在特征波长 278 nm 下的吸收,并根据摩尔消光系数来计算样品中 BSA 的浓度. 其次,采用 *N*-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(NAS)对 BSA 蛋白表面侧链上的赖氨酸残基进行丙烯酰化修饰. 在室温下,按照 BSA: NAS 摩尔浓度比 1:20 ~ 1:200 投料,磁力搅拌反应 2 h 后,将反应溶液转移入截留分子量为 10×10^3 的透析袋中,在 4°C 温度条件下,采用 10 mmol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析,更换 3 次透析液后,再次用紫外分光光度法测定预处理后 BSA 的浓度,样品备用.

1.3 温度响应型单蛋白纳米胶囊的制备

在控温搅拌台上搭建恒温水浴,反应过程中温度控制在 37℃. 将 NAS 修饰后的 BSA 和 NIPAM 混合后,向溶液中缓慢通入氮气 10 min 除氧,然后依次加入交联剂 BIS,引发剂 APS 和 TEMED 引发反应,可以观测到反应体系由透明转为白色乳浊液状态. 聚合反应的投料比为:NIPAM 和 BSA 的质量比分别为 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, BIS 和 NIPAM 的质量比为 1:20, APS 和 BSA 的质量比是 1:1, APS 和 TEMED 的质量比是 1:2. 在 37℃ 温度条件下,原位沉淀聚合 2 h 后,用液相色谱结合 Sephadex G-75 分离纯化,得到 BSA 纳米胶囊(nBSA).

以浓度已知的未经修饰的 BSA 作为对照,采用 BCA 法确定所制备的 BSA 纳米胶囊的浓度. 在含有 25 mmol/L BCA, 3.2 mmol/L 硫酸铜, pH 11.25 的酒石酸盐缓冲溶液中加入稀释的 nBSA, 在 60℃ 温度条件下孵育 30 min 后冷却至室温,在酶标仪上测定其在 562 nm 的吸光度值,计算出 nBSA 的浓度.

1.4 蛋白纳米胶囊的形貌和结构表征

1.4.1 DLS 表征

取 500 μ L 浓度为 0.1 mg/mL 的 nBSA 样品装入一次性样品池中,放入纳米粒度分析仪,设置检测温度为 25℃,测试样品的粒径大小和分布.

1.4.2 TEM 表征

分别在室温和 60℃ 条件下,采用 1% pH = 7.0 的磷钨酸(PTA)将 nBSA 样品染色. 在 EM120 型透射电镜上,放大倍率为 1×10^5 倍条件下,观测 BSA 纳米胶囊在响应温度前后的形貌变化.

1.5 蛋白纳米胶囊的温度响应性能

取 300 μ L 浓度为 0.1 mg/mL 的 nBSA 样品,装入一次性样品池中,放入纳米粒度中进行测试. 测试条件设置如下:温度范围 25 ~ 45℃ 或 25 ~ 51℃,升温/降温间隔为 2℃,每次温度变化后稳

定 30 min 再采集数据,每个温度下采集 6 次测试结果. 首先测试升温条件下粒径大小的变化,当测试温度达到最高值时,稳定 2 h 后,再测试降温时粒径随着温度的变化情况. 对采集数据处理后,绘制粒径-温度变化曲线.

1.6 细胞毒性测试

取对数生长期的 HeLa 细胞,用含 10% BGS 的 DMEM 完全培养基调整细胞悬液浓度为 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔细胞培养板内 5000 个/孔 (100 μ L/孔),培养 24 h. 待细胞贴壁后用移液器吸去孔中培养液,加入新的培养液. 实验组分别加入不同浓度的 nBSA,依次为:2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 和 200 μ g/mL,每组浓度 4 个复孔;空白对照组给予等体积的 PBS. 然后,将细胞培养板放置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养 24 h. 终止培养前 3 h,加入终浓度为 0.1 mg/mL Resazurin 10 μ L/孔. 结束培养时,吸弃培养上清液,用 PBS 清洗 3 次,每孔内加入 150 μ L DMSO,微型振荡器振荡 5 min 后,在酶标仪上,选择激发波长 550 nm,发射波长 595 nm 条件下测定每孔溶液的吸光度. 以对照组的值作为 100%,实验组与对照组相比,计算出温度响应型蛋白纳米胶囊的细胞毒性.

2 结果与讨论

2.1 蛋白修饰度的可控性

采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)对未经修饰的 BSA 和按照不同 NAS:BSA 比例修饰获得的 BSA-NAS 进行表征. 如图 2 所示,随着 NAS:BSA 比例的增大,丙烯酸酯化后 BSA 的分子量逐渐增加. 具体的分子量变化见表 1. BSA 的蛋白序列中含有 607 个氨基酸残基,其中赖氨酸(Lysine, K)个数为 59 个^[22]. 如表 1 所示,当 NAS 和 BSA 的比例升高到 80:1 时,已经有 54.5 个氨基残基被修饰,而当升高比例到 160:1 时,已有约 58.2 个氨基残基被修饰,当继续

Table 1 Molecular weight of BSA before and after modification with *N*-acryloxysuccinimide (measured with MALDI-TOF mass spectrometer)

Name	Molecular weight (MALDI-TOF MS)	Mole ratio (reagent to protein)	Molecular weight increase	Number of vinyl groups
Native BSA	66659	—	—	—
BSA modified with NAS	67791	20	1132	21.0
	68577	40	1918	35.5
	69601	80	2942	54.5
	69803	160	3144	58.2
	70103	200	3444	63.8

升高比例至 200:1 时, 计算得出已经被修饰的氨基酸残基数为 63.8, 这可能是因为蛋白表面的部分其他氨基酸残基也被修饰. 由实验结果可以看出, 在一定范围内通过调整 NAS 和蛋白的比例, 可以实现对蛋白酰胺化修饰程度的控制. 这对以后设计和制备具有活性的酶蛋白纳米胶囊具有重要的意义.

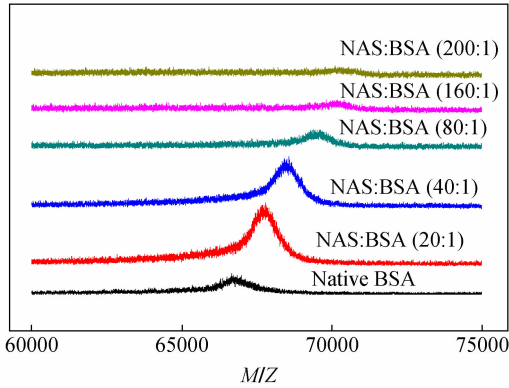


Fig. 2 MALDI-TOF mass spectra of BSA before and after modification with *N*-acryloxysuccinimide (NAS)

2.2 蛋白纳米胶囊的合成

通过 DLS 表征后, 获得了如图 3 所示的 BSA 纳米胶囊的粒径大小结果. 可以看出, 通过改变单体和蛋白之间的比例, 实现了对 BSA 蛋白纳米胶囊粒径大小的控制. 基于前文对蛋白修饰度可控性的讨论, 我们选择在 NAS 和 BSA 摩尔比为 80:1 条件下, 对 BSA 进行丙烯酰化修饰, 然后再通过原位沉淀聚合制备 BSA 蛋白纳米胶囊. 通过调整 NIPAM 和 BSA 的质量比, 由 2:1 依次逐渐提高到 6:1 来进行聚合反应, 制备了粒径大小依次分别是 7.4, 8.8, 10.8, 12.9 和 17 nm 的 BSA 纳米胶囊.

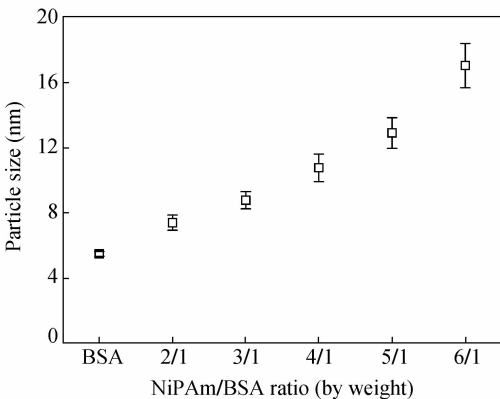


Fig. 3 Particle sizes of nBSAs synthesized at different monomer/protein ratios

结果表明, 在对蛋白进行较高的丙烯酰化修饰后, 在一定的范围内, 可以通过调控单体与蛋白之间的比例来实现对蛋白纳米胶囊粒径大小的控制.

根据早期 Dilgimen 等^[23] 相关的研究, 我们可以推测所制备的 nBSA 是以 BSA 居于核心, PNIPAM 包裹在外形成聚合物保护层的结构形式存在. Dilgimen 等曾用水溶性碳二亚胺型缩合剂将 BSA 与 P(NIPAM-AA) 通过多肽缩合反应连接, 并考察了蛋白和聚合物的比例对所制备的聚合物-蛋白质偶联体的影响. 其研究结果显示, 当蛋白/聚合物质量比 < 1 时, 在聚合物-蛋白质偶联体中蛋白分子被聚合物紧密包裹, 与外界水环境隔绝; 当蛋白/聚合物质量比 > 1 时, 聚合物-蛋白质偶联体的结构相对不稳定, 蛋白易暴露于溶剂中而失活. 这里, 本研究所选择的单体/蛋白比例范围为 2 ~ 6, 符合制备聚合物完全包裹蛋白结构的条件. 此外, Yan 等^[19] 曾经报道采用自由基聚合制备了辣根过氧化物酶 (HRP) 纳米胶囊, 并用大小为 1.4 nm 的金量子点对单个 HRP 纳米胶囊进行标记. 经 TEM 表征后, 其结果显示 HRP 纳米胶囊呈现球形的核壳结构, 且每个纳米胶囊中仅含有一个金量子点. 由于单个 HRP 分子为 5 nm 左右, 而其制备的 HRP 纳米胶囊在 15 nm 左右, 因此平均每个纳米胶囊中只含有一个 HRP 分子, 即成功制备了单核的蛋白纳米胶囊, 简称单蛋白纳米胶囊. 而本研究所采用的单个 BSA 分子为 5.6 nm 比 HRP 略大, 制备的 BSA 纳米胶囊的大小在 7.4 ~ 17 nm 之间. 因此, 可以推测这里所制备的 BSA 纳米胶囊也是单蛋白纳米胶囊, 即每一个 nBSA 由 PNIPAM 聚合物包裹着一个 BSA 分子构成. 如图 4 所示, 所制备的 nBSA 的形貌多数呈现为球形. TEM 表征结果显示 nBSA 的粒径大小 (ca. 10 nm) 稍小于 DLS 的检测结果 (ca. 12.9 nm). 这种粒径大小的差异可能是由于在制备 TEM 样品过程中, nBSA 的外层聚合物干燥收缩使得其粒径相比 DLS 测试的水环境下的粒径要小.

2.3 蛋白纳米胶囊的温度响应性能

通过 DLS 的辅助控温设置, 实现了对所制备的 BSA 蛋白纳米胶囊的温度响应性能的测试. 如图 5 所示, 将按照不同单体/蛋白比例所制备的 nBSA, 将测试环境温度由 25°C 升温到 51°C, 研究其对温度的响应性能. 图 5 中, 将 NIPAM 和 BSA 质量比为 2:1 条件下制备的 BSA 蛋白纳米胶囊缩

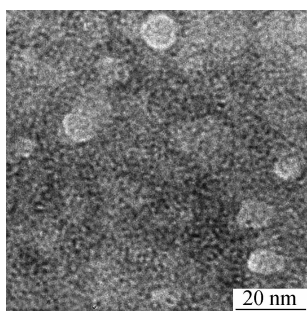


Fig. 4 Representative TEM image showing the formation of BSA nanocapsules (NIPAM: BSA = 5:1, by weight) with spherical core-shell morphology

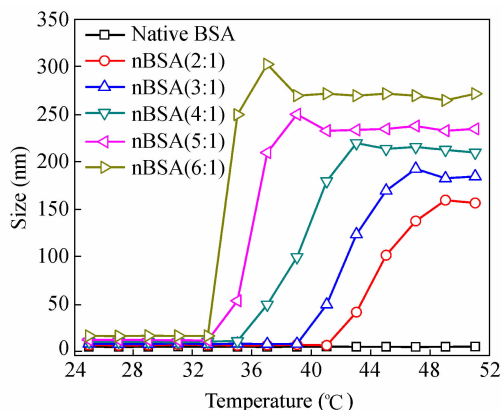


Fig. 5 Temperature responsive property study of BSA nanocapsules fabricated from different NIPAM/BSA ratios by DLS

写为 nBSA (2:1), 其他比例条件下制备的蛋白纳米胶囊也按照此法进行缩写. 测试结果显示, 随着单体和蛋白比例的升高, 所制备的蛋白纳米胶囊的响应温度逐渐降低, 也越接近 PNIPAM 的 LCST 值. 这说明随着蛋白纳米胶囊外 PNIPAM 壳厚度的增大, nBSA 体现出近似 PNIPAM 的温度响应性质, 并且其响应温度的区间更窄, 也更快速地完成粒径大小的响应变化. 由图 5 可见, 当 NIPAM 和 BSA 质量比从 2:1 逐渐升至 6:1 时, 其对应的初始响应温度从 41°C 降低至 33°C. 而且, 可以看出在 BSA 蛋白纳米胶囊中, 当蛋白含量较高时, nBSA (2:1) 对于温度的响应是在一个温度区间内完成的, 并不是在一个温度点迅速完成了所有转变. 这主要是因为 PNIPAM 与蛋白之间是共价键连接, 增加了 PNIPAM 的亲水性, 不仅提高了其相转变温度, 而且缓和了整个转变过程. 与此相对应的, nBSA (6:1) 的响应温度从 33°C 开始, 并在更短的温度区间内完成粒径大小的变化, 这是由于 nBSA (6:1) 中, PNIPAM 比例较高, 蛋白纳米胶囊

更体现出 PNIPAM 的温度响应性能. 因此, 通过调控单体和蛋白的比例, 可以实现对制备的蛋白纳米胶囊的响应温度的调控, 从而设计和制备符合实际温度响应需求的蛋白纳米胶囊.

图 6 是将所制备的 nBSA (5:1) 样品在 60°C 条件下发生温度响应后制样, 而获得的 TEM 照片. 由图可见, 温度响应后 nBSA 呈现球形, 其观测粒径大小在 200 nm 左右, 这与 DLS 的检测结果基本符合. 对比图 4 和图 6, 同一蛋白纳米胶囊样品在室温条件下和高温条件下的 TEM 照片, 可以看出 nBSA 在不同环境温度条件下呈现出显著的粒径大小的响应变化. 这主要是因为当环境温度高于 nBSA 的响应温度时, 每个 nBSA 的 PNIPAM 聚合物外层在疏水作用下收缩, 与此同时, 多个 BSA 单蛋白纳米胶囊也在疏水作用下相互聚集形成粒径更大的 BSA 蛋白纳米胶囊的聚集体. TEM 照片的对比也直观地证明了所制备的 BSA 纳米胶囊的确具有温度响应性能.

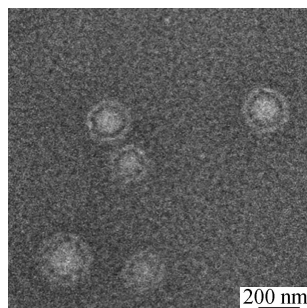


Fig. 6 Representative TEM image showing the formation of thermoresponsive BSA nanocapsules (NIPAM: BSA = 5:1, by weight) with spherical core-shell morphology during heating up to 60°C

2.4 离子强度对蛋白纳米胶囊响应的影响

为了进一步评价 BSA 蛋白纳米胶囊的温度响应性能, 本文还考察了溶液离子强度对蛋白纳米胶囊响应温度的影响. 如图 7 所示, 在相同测试条件下, 将 nBSA 分散于不同离子强度的溶液中, 即浓度为 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (pH = 7.4) 与 1 × PBS 缓冲液中. 测试结果显示, 随着溶液中离子强度的增大, nBSA 的响应温度向温度更低的方向偏移, nBSA 在出现温度响应后, 其在高温区的粒径明显减小. Liao 等^[24] 最近报道的关于 PNIPAM 的凝胶动力学研究结果显示, PNIPAM 微凝胶的临界凝胶温度 (critical gelation temperature) 和体积相转变温度 (volume phase transition temperature) 随着溶液中 NaCl 浓度的升

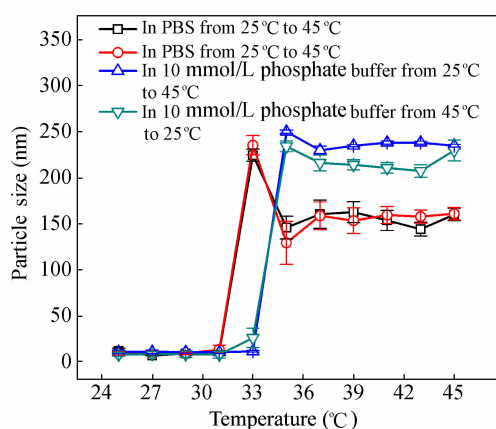


Fig. 7 Temperature responsive property study of nBSA (NIPAM: BSA = 5: 1, by weight) in different ionic strength solutions

高而呈线性降低. 盐浓度不仅影响渗透压作用, 还会改变聚合物链周围的水分子, 并影响到氢键作用和疏水作用. 随着溶液中盐浓度增大, 渗透压的作用减弱, 氢键作用减弱, 导致 PNIPAM 的收缩作用增强, 从而使得转变温度降低. 这也解释了本实验观测到的以上结果.

2.5 蛋白纳米胶囊的安全性

长期以来, 将基于 PNIPAM 的材料用于生物体, 人们一直都存在安全性的顾虑, 因此对这类材料进行安全性的评价具有重要意义. Wadajkar 等^[25] 曾用 MTT 检测的方法, 考察了 NIPAM 单体和粒径大小分别为 100, 300 和 500 nm 的 PNIPAM 纳米颗粒对纤维细胞、平滑肌细胞和血管内皮细胞的毒性. 其研究结果显示 NIPAM 单体具有明显的细胞毒性, 但是 3 个不同粒径大小的 PNIPAM 纳米粒子仅具有较低的细胞毒性, 特别是粒径大小为 100 nm 的 PNIPAM 粒子在其浓度达到 5 mg/mL 时, 即使连续孵育 96 h, 依然可以使得细胞活性保持在 90% 左右.

这里我们为了评价所制备的温度响应型蛋白纳米胶囊的生物应用潜力, 也对其细胞毒性进行了初步考察. 选取在 NIPAM 和 BSA 的质量比为 5:1 条件下制备的 nBSA (5:1), 按照浓度梯度分别是 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加样, 考察 24 h 内其对 HeLa 细胞的毒性. 结果如图 8

所示, 细胞培养液中 (细胞 5000 个/孔) nBSA 浓度达到 0.05 mg/mL 时, HeLa 细胞活性可以保持在 98% 左右; 当升高 nBSA 的浓度达到 0.1 mg/mL 时, 细胞活性仍然可以保持在 93% 左右; 当继续升高 nBSA 的浓度到 0.2 mg/mL 时, 细胞活性依然可以保持在 80% 左右. 由此可见, 采用原位沉淀聚合制备的 BSA 蛋白纳米胶囊具有较小的细胞毒性, 将在蛋白药物的传输领域具有很大的开发潜力.

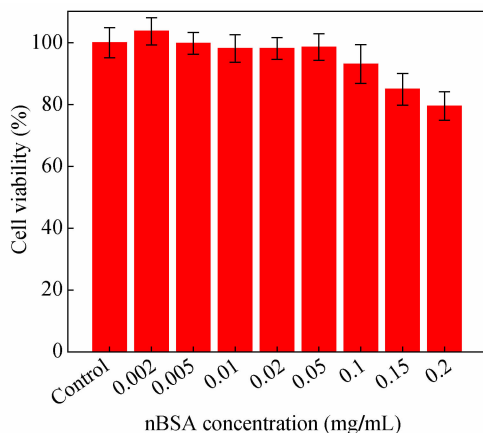


Fig. 8 HeLa cell viability after incubation with nBSA at different concentrations for 24 h, showing low cytotoxicity of nBSA

3 结论

采用原位沉淀聚合法制备粒径大小可控的温度响应型蛋白纳米胶囊. 研究表明, 通过改变 NAS 和 BSA 的比例, 可以在一定范围内实现对蛋白丙烯酸酯化程度的控制和优化; 通过调节 NIPAM 和 BSA 的比例, 可以实现对 BSA 纳米胶囊粒径大小的控制, 制备了粒径大小在 7.4 ~ 17 nm 之间可控的蛋白纳米胶囊; 所制备的 BSA 纳米胶囊具有温度响应性能, 其响应温度在 33 ~ 41°C 之间可调; 当环境温度高于响应温度时, 蛋白纳米胶囊出现粒径剧增的响应现象, 其粒径大小会较响应前增大 16 ~ 33 倍; 温度响应型 BSA 纳米胶囊的细胞毒性实验结果显示其具有较低的细胞毒性, 有应用于开发新型一体化的温度响应型蛋白药物的潜力.

REFERENCES

- 1 Heskins M, Guillet J E. *J Macromol Sci Chem*, 1968, 2: 1441 ~ 1455
- 2 Tiktopulo E I, Bychkova V E, Ricka J, Ptitsyn O B. *Macromolecules*, 1994, 27: 2879 ~ 2882
- 3 Schild H G. *Prog Polym Sci*, 1992, 17: 163 ~ 249
- 4 Ghugare S V, Mozetic P, Paradoss I G. *Biomacromolecules*, 2009, 10(6): 1589 ~ 1596
- 5 Luo Qiaofang(罗巧芳), Guan Ying(关英), Zhang Yongjun(张拥军). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2010, (6): 793 ~ 796
- 6 Fei Zhengdong(费正东), Wan Lingshu(万灵书), Zhong Mingqiang(钟明强), Xu Zhikang(徐志康). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2012, (4): 404 ~ 409
- 7 Zhang K, Wu X Y. *Biomaterials*, 2004, 25(22): 5281 ~ 5291
- 8 Zhu X, DeGraaf J, Winnik F M, Leckband D. *Langmuir*, 2004, 20(24): 10648 ~ 10656
- 9 Annaka M, Matsuura T, Kasai M, Nakahira T, Hara Y, Okano T. *Biomacromolecules*, 2003, 4(2): 395 ~ 403
- 10 Liu Feng(刘峰), Zhuo Renxi(卓仁禧). *Polym Mater Sci Eng(高分子材料科学与工程)*, 1998, 14(2): 54 ~ 57
- 11 Shim W S, Kim J H, Kim K, Kim Y S, Park R W, Kim I S, Kwon I C, Lee D S. *Int J Pharm*, 2007, 331(1): 11 ~ 18
- 12 Zhang Youwei(张幼维), Jiang Ming(江明), Zhao Jiongxin(赵炯心), Wang Jiaye(汪佳烨). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2007, (2): 136 ~ 142
- 13 Smith M H, Lyon L A. *Macromolecules*, 2011, 44(20): 8154 ~ 8160
- 14 Johansson C, Gernandt J, Bradley M, Vincent B, Hansson P. *J Coll Int Sci*, 2010, 347: 241 ~ 251
- 15 Cavalieri F, Postma A, Lee L, Caruso F. *ACS Nano*, 2009, 3(1): 234 ~ 240
- 16 Zhu Y, Tong W J, Gao C Y, Möhwald H. *J Mater Chem*, 2008, 18: 1153 ~ 1158
- 17 Xie L L, Tong W J, Yu D H, Xu J Q, Li J, Gao C Y. *J Mater Chem*, 2012, 22: 6053 ~ 6060
- 18 Xie L L, Tong W J, Xu J Q, Gao C Y. *Chinese J Polym Sci*, 2012, 30: 719 ~ 726
- 19 Yan M, Du J J, Gu Z, Liang M, Hu Y F, Zhang W J, Priceman S, Wu L, Zhou Z H, Liu Z, Segura T, Tang Y, Lu Y F. *Nature Nanotech*, 2010, 5: 48 ~ 53
- 20 Gu Z, Biswas A, Zhao M, Tang Y. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(7): 3638 ~ 3655
- 21 Gu Z, Yan M, Hu B L, Joo K, Biswas A, Huang Y, Lu Y F, Wang P, Tang Y. *Nano Lett*, 2009, 9(12): 4533 ~ 4538
- 22 Majorek K A, Porebski P J, Dayal A, Zimmerman M D, Jablonska K, Stewart A J, Chruszcz M, Minor W. *Mol Immunol*, 2012, 52: 174 ~ 182
- 23 Dilgimen A S, Mustafaeva Z, Demchenko M, Kaneko T, Osada Y, Mustafaev M. *Biomaterials*, 2001, 22: 2382 ~ 2392
- 24 Liao W, Zhang Y J, Guan Y, Zhu X X. *Macromol Chem Phys*, 2011, 212: 2052 ~ 2060
- 25 Wadajkar A S, Koppolu B, Rahimi M, Nguyen K T. *J Nanopart Res*, 2009, 11: 1375 ~ 1382

FABRICATION OF THERMOSENSITIVE PROTEIN NANOCAPSULES *via* PRECIPITATION POLYMERIZATION

Wei Wei^{1,2}, Juan-juan Du², Jie Li², Yang Liu², Ming Yan², Jing Zhu¹, Zu-ming Hu¹

(¹ College of Material Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620)

(² Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA)

Abstract Thermoresponsive protein nanocapsules were prepared *via in situ* precipitation polymerization using protein bovine serum albumin (BSA) as the model protein, *N*-isopropyl acrylamide (NIPAM) as the monomer, and *N,N'*-methylene bis-acrylamide (BIS) as the crosslinker. To synthesize such nanocapsules, BSA was first attached with polymerizable groups through reacting with *N*-acryloxysuccinimide (NAS), and the degree of reaction was examined using MALDI-TOF mass spectrometer. By adjusting the NIPAM/BSA ratio, BSA nanocapsules (nBSA) with different sizes (7.4 nm to 17 nm) were synthesized successfully and confirmed by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). Thermoresponsive behavior of nBSA was studied by monitoring the size-temperature trending test through DLS. Reversible thermoresponsive property of obtained nBSA was observed from DLS test, with responsive temperatures ranging from 33°C to 41°C accordingly of different sized protein nanocapsules synthesized from various NIPAM/BSA ratios. There is an obvious particle size increase of all synthesized BSA nanocapsules after their exposure to higher temperatures above their responsive ones. The observed particle sizes of nBSA at higher temperatures were increased by 16 to 33 times accordingly. By observing the HeLa cell viability after incubation with the nanocapsules at different concentrations for 24 h, the result shows the nanocapsules exhibit low cytotoxicity. This work provides a new synthesis method of thermoresponsive protein nanocapsules for various applications.

Keywords Thermoresponsive, Nanoparticle, *N*-isopropylacrylamide, Protein encapsulation