

O-硬脂酰化壳聚糖作为 DNA 的递送载体材料

苏均乐¹, 徐 瑾¹, 吕玉明², 谢德明¹

(1. 暨南大学生物医学工程系, 广东 广州 510630; 2. 广州医学院附属第三医院, 广东 广州 510200)

[摘 要] 以邻苯二甲酰基预先保护壳聚糖分子中-NH₂, 以硬脂酰氯进行可控酯化, 制备 O-硬脂酰化壳聚糖. 通过超声振荡与溶剂结合制备 O-硬脂酰化壳聚糖/ λ DNA 复合物, 采用动态激光散射及原子力显微镜分析复合物的粒径分布及形态. 凝胶电泳考察该载体与 λ DNA 的结合能力. L929 细胞培养对 O-硬脂酰化壳聚糖进行细胞毒性评估. FT-IR 和 ¹H NMR 结果表明, 可以成功制备不同酯化度的 O-硬脂酰壳聚糖; O-硬脂酰化壳聚糖与 λ DNA 结合可形成不规则球形复合物, 平均粒径可达到 86 nm, 并且对 DNase 显示高稳定性. 同时 O-硬脂酰化壳聚糖具有促 L929 细胞增殖能力, 安全性较高, 可作为一种新型的非病毒型基因载体.

[关键词] O-硬脂酰化壳聚糖; 载体; 基因递送

[中图分类号] R943.3 [文献标识码] A [文章编号] 1000-9965(2009)05-0548-05

O-stearoyl-chitosan as DNA delivery vectors

SU Jun-le¹, XU Jin¹, LÜ Yu-ming², XIE De-ming¹

(1. Department of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510630, China;
2. The Third Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510200, China)

[Abstract] Using phthalic anhydride to selectively protect the -NH₂ groups of chitosan molecules, the O-stearoyl-chitosan compounds were successfully prepared with different esterification degree by changing the ratios of stearoyl chloride and chitosan in the reactions. O-stearoyl-chitosan / λ DNA complexes were harvested by sonication technology combined with organic solvents. Laser scatter analysis and atom force microscopy were used to give the results of O-stearoyl-chitosan / λ DNA complexes particles size and distribution, particle morphology respectively. The conjunctive ability of O-stearoyl-chitosan with λ DNA was evaluated by agarose gel electrophoresis analysis, and the cellular toxicity experiment was examined by MTT using L929 cells. FT-IR and ¹H NMR results demonstrated the formation of different esterification degree of modified chitosan. The shape of the complexes were irregular sphere, and the particles could reach 86 nm and have high stability under DNase conditions. The O-stearoyl-chitosan could make L929 cells proliferation as well. So, O-stearoyl-chitosan will become a new effective non-virus DNA carrier.

[Key words] O-stearoyl-chitosan; carrier; DNA delivery

基因治疗是近年来新兴的一种治疗手段, 其中最关键的问题是如何将治疗 DNA (目的基因) 转入到靶细胞核之中, 实现基因的有效表达. 基因治疗载体应具备易进入细胞、靶向性、稳定性、安全性和

[收稿日期] 2008-10-28

[基金项目] 教育部生物医用高分子材料重点实验室(武汉大学)资助; 广东省自然科学基金项目(07002690); 广东省医学科学技术研究基金项目(WSTJJ20061103)

[作者简介] 苏均乐(1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物材料. 通讯作者: 谢德明, 博士, 副教授. E-mail: tdmxie@jnu.edu.cn

易制备等特点^[1]. 介导基因传递的载体主要分为病毒型载体和非病毒载体^[2], 病毒载体转染率高, 但作为一种改造的病毒, 其价格昂贵, 容易引发机体强烈的免疫反应并可能致癌, 其安全性也不高, 临床应用还很困难^[3]. 非病毒载体材料主要有脂质体载体材料和聚合物载体材料两类, 具有价格低、操作简单、安全性高等特点, 因此得到广泛研究和应用^[4]. 其中, 阳离子聚合物由于其能有效地浓缩 DNA 形成复合物, 保护 DNA 进入细胞等特点得到了研究学者的青睐. 阳离子聚合物包括聚-L-赖氨酸^[5]、聚乙烯亚胺^[6]、聚(α -(4-氨基丙基)-L-乙醇胺)^[7]、壳聚糖及其衍生物^[8-11]等. 壳聚糖分子中的葡糖胺基荷正电, 能与带负电的 DNA 通过静电作用凝聚为多聚复合物, 而且, 根据分子质量和脱乙酰度的不同, 使 DNA 压缩成结构相对致密的稳定的纳米级粒子, 保护 DNA 免受核酸酶降解^[12]. 然而, 壳聚糖载体的转染率不高. 为了提高壳聚糖的递送性能, 人们纷纷对其进行改性、修饰, 如季胺化壳聚糖载体^[13]、尿酸化壳聚糖^[14]、叶酸化壳聚糖^[15]等. 本研究以壳聚糖为基本原料, 引入硬脂酰基, 制备两亲性的改性壳聚糖载体材料, 以期改善其作为基因载体的性能, 并通过激光散射检测复合物的粒径和利用琼脂糖凝胶电泳试验考察 O-硬脂酰化壳聚糖是否会降低壳聚糖的结合 DNA 的能力. 并对材料进行细胞毒性测试, 为进一步的体外体内研究奠定基础.

1 材料与仪器

壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$, 自制); N,N-二甲基甲酰胺(DMF, AR)、邻苯二甲酸酐(AR)、硬脂酸(AR)、氯化亚砷(CP)、水合肼(CP)、吡啶(AR)、 CHCl_3 (AR)、乙醚(AR)、四氢呋喃(THF, AR)、十二烷基磺酸钠(SDS, AR)均购买于广州辛氏实验器材有限公司; DNase、琼脂糖、溴化乙啶(EB)均购买于北京鼎国生物工程公司; λ DNA 购买于华美生物工程公司.

核酸电泳仪 DYY-10C 型北京市六一仪器厂; 红外吸收光谱 EQUINOX-55 BRUKER; 核磁共振氢谱 UNITY INOVA 500NB NMR VARIAN USA; Axiovert200 倒置显微镜 ZEISS 公司; 原子力显微镜, 美国热电公司.

2 实验方法

2.1 O-硬脂酰化壳聚糖的制备

壳聚糖与邻苯二甲酸酐按物质的量 1:3 配比反

应. 壳聚糖于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中 100 °C 溶胀 2 h. 邻苯二甲酸酐预溶于少量 DMF 中, 加入壳聚糖悬浮液中, 加热至 120 ~ 130 °C 反应 7 h, 所得产物为浅黄色黏性溶液, 4 000 \times g 离心 5 min, 上清液注入冰水中析出沉淀, 离心, 收集沉淀物经水洗除去 DMF, 乙醇洗涤除去残余邻苯二甲酸酐, 60 °C 干燥后得产物 N-邻苯二甲酰化壳聚糖^[16].

邻苯二甲酰化壳聚糖溶于少量 DMF 中, 加入不同比例($n_{\text{OH}}:n_{\text{S-Cl}} = 2.5:1, 1:1, 1:2.5, 2:6.5, 1:4$; n_{OH} :表示反应物中壳聚糖分子中-OH 的物质的量, $n_{\text{S-Cl}}$ 为反应物中硬脂酰氯的物质的量, 以下同)的硬脂酰氯, 于 100 °C 下反应 20 h, 所得产物水洗, 冷冻干燥.

将上述 N-邻苯二甲酰-O-硬脂酰化壳聚糖在 $V_{\text{水合肼}}:V_{\text{水}} = 1:2$ 的溶液中加热至 100 °C 反应 15 h^[17]. 产物离心, 加 HCl 中和至中性, 水洗, 离心, 冻干. 冻干后产物溶于 CHCl_3 , 过滤, 收集滤液烘干, 产物用乙醚萃取, 除去残留的硬脂酸, 50 °C 烘干, 得纯化的 O-硬脂酰壳聚糖.

2.2 产物的分析与表征

FT-IR 谱图采用 EQUINOX-55 型红外光谱仪(FTIR)测定, 波数范围 4 000 ~ 400 cm^{-1} , 分辨率 2 cm^{-1} . ^1H NMR 采用 Varian Unity Invoa 500 测定, CDCl_3 作溶剂, 26 °C, 500 MHz.

2.3 O-硬脂酰壳聚糖/DNA 复合物的形成以及在 DNase 酶作用下的稳定性

10 mg O-硬脂酰壳聚糖溶于 2 mL THF 中, λ DNA 溶液(每 300 μL 含 100 μg 纯 DNA)用 0.01 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Na_2SO_4 稀释为 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 取两种溶液同样体积(50 或 100 μL)迅速混匀, 形成复合物, 于超声振荡下逐滴加到去离子水中分散, 质量浓度为 0.01、0.05 mg/mL .

取复合物 5 μL 固定于清洁的云母片上, 用 N_2 吹干, 于原子力显微镜下观察纳米粒形态; 于激光散射仪固定扫描角 90°, pH = 7, 25 °C 下测定其粒径分布.

复合物和裸 λ DNA 分别于适量 Dnase(比活力为 2 000 u/mg)使 $m_{\text{DNA}}:m_{\text{DNase}} = 1:1, 37$ °C 作用 60 min, 然后加入 100 μL 的 2 \times 反应终止液(0.4 mol/L NaCl, 80 mmol/L EDTA, 1% SDS, 在室温 SDS 可从溶液中析出, 用时要稍微加热溶解)终止反应. 采用琼脂糖凝胶电泳观察其降解结果. 琼脂糖凝胶电泳条件:体积分数 1% 琼脂糖(含 0.2 $\mu\text{g/mL}$ EB 作染色剂), 1 \times TAE 缓冲液, 100 V 水平电泳 60

min,然后在紫外透射仪下观察结果.

2.4 O-硬脂酰化壳聚糖的细胞毒性评价

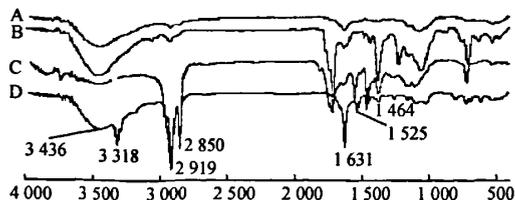
将 L929 细胞经复苏、传代后,经体积分数 0.25% 胰蛋白酶消化制成 1×10^4 / mL 的细胞悬液,接种于 3 块 96 孔培养板,每孔 100 μ L. 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2 , 24 h 后至细胞贴壁,更换培养液. 24 h 后加入不同浓度不同酯化度的 O-硬脂酰化壳聚糖样品和对照组(纯水),100 μ L 培养液继续孵育,于 1 d、4 d、7 d 各取出一块培养板,每孔加入 20 μ L MTT 液,6 h 后终止孵育,吸弃孔内培养液,加入 150 μ L 二甲基亚砜 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,于 490 nm 波长测定吸光度(A 值),按照下式计算相对增值率(RGR):

$$\text{RGR} = \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值} \times 100\%$$

3 结果

3.1 O-硬脂酰化壳聚糖的制备与表征

(1) FT-IR 分析 图 1 中, A 为纯净的壳聚糖红外光谱图;与 A 比较, B 在 1 710、1 770 cm^{-1} 处存在一个明显的邻苯二甲酰基双峰, 720 cm^{-1} 处出现苯环特征吸收峰,且 3 400 cm^{-1} 附近羟基的吸收峰并没有明显减弱,证实壳聚糖分子中引入了邻苯二甲酰基. C 在 2 920 和 2 850 cm^{-1} 处存在明显的甲基、亚甲基 C-H 伸缩振动的特征吸收峰和 1 750 cm^{-1} 处出现酯基特征吸收峰,且 3 400 cm^{-1} 附近羟基峰明显减弱,证实羟基位置上引入了部分硬脂酰基. D 与 B 比较,在 1 710、1 777 和 720 cm^{-1} 处邻苯二甲酰基和苯环特征吸收峰消失,证实已脱去氨基上结合的邻苯二甲酰基保护基,同时在 3 300 cm^{-1} 附近出现较强的 -NH_2 吸收峰,表明得到了 O-硬脂酰化壳聚糖. 另外, FT-IR 分析表明,随着硬脂酰化壳聚糖制备过程中加入硬脂酰氯的比例增加,壳聚糖的酯化程度明显不同,当壳聚糖单元与硬脂酰氯的摩尔比为 1:8 时,糖环上的羟基可基本上酰化完全.



A: 壳聚糖 B: N-邻苯二甲酰化壳聚糖 C: N-邻苯二甲酰-O-硬脂酰化壳聚糖 D: O-硬脂酰化壳聚糖

图1 壳聚糖与改性壳聚糖的红外光谱图

(2) $^1\text{H-NMR}$ 分析 图 2 为 O-硬脂酰化壳聚糖的核磁共振氢谱图,其中 0.88 左右的三重峰归属于硬脂酰基中末端 -CH_3 的共振峰;1.25 ~ 1.28 处可以看到明显的长链 -CH_2 的特征信号,在 2.12 ~ 2.16 可以看到糖环 -CH 的特征信号,由于采用 CDCl_3 溶剂测定,致使糖环中质子的共振峰非常弱,在 6.67 和 7.26 处可以看到残留苯环上 C-H 特征信号. 结果对照目标产物 O-硬脂酰化壳聚糖,符合其分子结构特征.

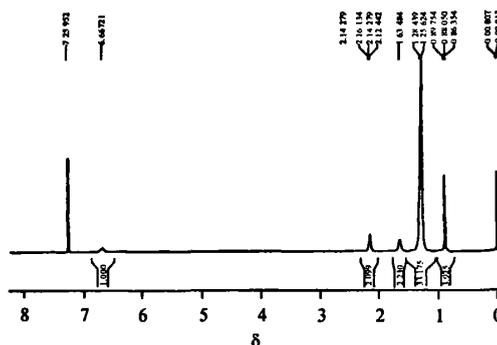


图2 O-硬脂酰化壳聚糖的氢谱谱图

3.2 O-硬脂酰化壳聚糖/DNA 复合物的形态以及粒径分布

采用 AFM 获取复合物的表面形貌图像, DNA 链状结构图像不可见. 载体材料能与 DNA 分子形成复合物,呈现出规则的球状结构(图 3).

表 1 为采用激光散射分析技术测得的 O-硬脂酰化壳聚糖与 DNA 形成的复合物粒子的粒径分析结果. 大多数哺乳动物细胞的内存作用局限于粒子

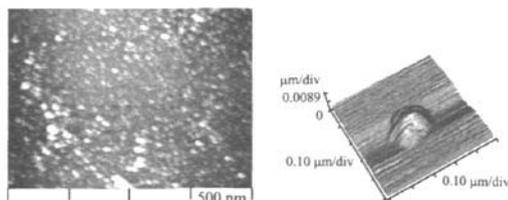


图3 O-硬脂酰化壳聚糖/DNA 复合物的原子力显微镜图像

表1 激光散射测定的复合物粒径¹⁾

载体类型	$\rho_{\text{载体}} / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$V_{\text{DNA}} / \mu\text{L}$	$d_{\text{复合物}} / \text{nm}$
A	0.01	50	86
B	0.03	50	151
C	0.03	200	192
D	0.05	200	223

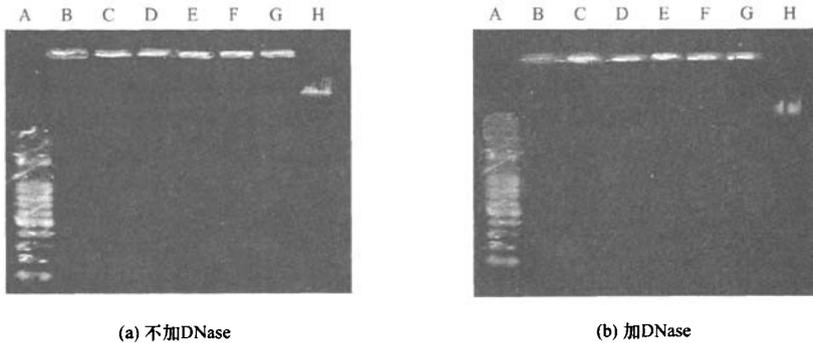
1) A, B, C, D 中的 $n_{\text{OH}}: n_{\text{S-Cl}} = 2.5:1$; λ DNA 质量浓度为 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

尺寸 150 nm 以下^[18],由表 1 可以看出,O-硬脂酰壳聚糖/DNA 复合粒子随着浓度和应加 DNA 量的增加粒径也相应的增大.当 O-硬脂酰壳聚糖质量浓度选择 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,DNA 加入量为 $50 \mu\text{L}$ 时,获得的复合物粒径为 86 nm,能够通过细胞的内存作为进入细胞质,适合于转染外源基因.

3.3 琼脂糖凝胶电泳试验

图 4 所示为 O-硬脂酰化壳聚糖与 λ DNA 复合物的凝胶电泳实验结果.其中 A 条带为 Mark 带,B~G 分别表示 O-硬脂酰化壳聚糖与 DNA 的质量比

为 7、21、35、3.5、10.5、17.5 时的电泳谱带;H 表示单纯的 λ DNA 电泳谱带.图 4(a)为不加 DNase 的情况,B-G 条带没有发生迁移;图 4(b)为加入 DNase 降解 60 min 后的电泳图谱,由图可见,B-G 条带同样没有发生迁移,H 条带由于没有载体材料的保护迁移明显且条带模糊,说明其已被 DNase 降解.由此可见,O-硬脂酰壳聚糖能够很好的结合 DNA,并且其复合物能够避免 DNase 的降解,显示出较高的稳定性.



(A 条带为 DNA Mark 带, B~G 分别表示 O-硬脂酰化壳聚糖与 DNA 的质量比为 7、21、35、3.5、10.5、17.5 时的复合物的电泳谱带)

图 4 载体/DNA 复合物的琼脂糖凝胶电泳图谱

3.4 载体材料的毒性评价

采用 MTT 法研究 O-硬脂酰化壳聚糖对 L929 细胞的(成纤维细胞)毒性作用.加入含 O-硬脂酰壳聚糖的培养液于细胞中孵育 1、4、7 d,于酶标仪测定细胞存活率.结果见图 5 及表 2.

从图 5 中可以看出,酯化程度相同的载体材料,随着其质量浓度的增加细胞数量相应地减少,至第 4 天的细胞数量差别最明显.第 1 天和第 7 天相对持平.同一质量浓度不同酯化程度的 O-硬脂酰化壳聚糖载体,随着壳聚糖与硬脂酰氯的投料比例的减少(对应于酯化程度的增加),细胞存活率略有减

少.这可能是因为酯化度越高,脂肪基作用点越大,对细胞膜的损伤越大.

阳离子型聚合物载体的毒性机制迄今尚未阐明.目前主要有两种代表性的观点,其一认为毒性的产生主要是阳离子聚合物的正电荷与细胞膜的相互作用而对细胞产生损伤或引起细胞的凝聚,另外一种则认为阳离子聚合物进入细胞后激活细胞内信号转导系统导致的.

由表 2 可知,O-硬脂酰化壳聚糖载体的 RGR 值均大于 100,说明 O-硬脂酰化壳聚糖在一定程度上起着促进细胞增殖的作用,显示出无明显细胞毒性.

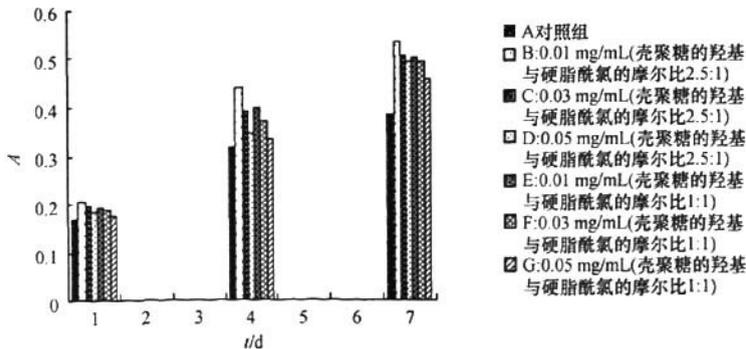


图 5 细胞毒性实验,光密度 A 值直方图

表2 各样品 RGR 值 %

∕d	对照组	A	B	C	D	E	F
1	100	120	118	111	114	111	104
4	100	139	123	108	126	117	105
7	100	140	132	130	131	129	120

壳聚糖分子存在很强的分子内和分子间氢键作用,在中性及弱酸性介质中难溶解,在缓冲溶液中与DNA分子的结合不稳定^[19];其次,细胞膜是由极性头部朝内,疏水性非极性尾部朝外的磷脂双分子层组成,为疏水性的,而壳聚糖是亲水性的,从而导致以壳聚糖作为基因载体的穿膜效率低下,进而导致转染效率低下。

本研究以壳聚糖为原料,通过保护C-2位氨基,羟基引入硬脂酰基,然后脱去-NH₂保护基,成功制备O-硬脂酰化壳聚糖,对成纤维细胞作用显示出相对无毒性。而硬脂酰壳聚糖与DNA结合形成纳米复合物后,硬脂酰基可在复合物表面形成“核-壳”结构型胶束,起到乳化的效果;另外,以长链脂肪基为亲脂尾部,增强复合物对细胞膜的亲和性,降低细胞膜的稳定性,更有利于复合物进入细胞。而且复合物在水中分散性好,接近球形纳米粒子,粒径大约为70~200 nm。琼脂糖凝胶电泳试验表明,O-硬脂酰化壳聚糖可以很好的保护DNA不受DNase降解,其保护效果较壳聚糖有明显的改善。研究表明,质量浓度为0.01 mg/mL投料比为2.5:1的O-硬脂酰化壳聚糖最适合于作为DNA复合载体材料。

[参考文献]

- [1] 杨雪琴,李雁. 基因治疗中非病毒载体研究进展[J]. 武汉大学学报:医学版, 2008, 29(2): 279-282.
- [2] LUO D, WOODROW-MUMFORD K, BELCHEVA N, et al. Controlled DNA delivery systems[J]. *Pharm Res*, 1999, 16(8): 1300-1308.
- [3] VERMA I M, SOMIA N. Gene therapy promises, problems and prospects[J]. *Nature*, 1997, 389(6648): 239-242.
- [4] POUTIN C W, SEMOUR L W. Key issues in non-viral gene delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 34(1): 3-19.
- [5] CHOI Y H, LIU F, PARK J S, et al. Lactose-poly-(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell targeted gene carrier[J]. *Bioconjug Chem*, 1998, 9(6): 708-718.
- [6] BOUSSIF O, LEZOUALCH F, ZANTA M A, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(16): 7297-7301.
- [7] LIM Y B, HAN S O, KONG H U, et al. Biodegradable polyester, poly[alpha-(4-aminobutyl)-L-glycolic acid], as a non-toxic gene carrier[J]. *Pharm Res*, 2000, 17(7): 811-816.
- [8] MACLAUGHLIN F C, MUMPER R J, WANG J, et al. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery[J]. *J Control Release*, 1998, 56(1-3): 259-272.
- [9] MAO H Q, ROY K, TROUNG-LE V L, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency[J]. *J Control Release*, 2001, 70(3): 399-421.
- [10] CHEW J L, WOLFOWICZ C B, MAO H Q, et al. Chitosan nanoparticles containing plasmid DNA encoding house dust mite allergen[J]. *Der p 1 for oral vaccination in mice. Vaccine*, 2003, 21(21-22): 2720-2729.
- [11] ZHU D W, BO J G, ZHANG H L, et al. Synthesis of N-methylene phosphonic chitosan (NMPCS) and its potential as gene carrier[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2007, 18(11): 1407-1410.
- [12] MARIE MORILLE, CATHERINE PASSIRANI, ARNAUD VONARBOURG, et al. Progress in developing cationic vectors for nonviral systemic gene therapy against cancer[J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 3477-3496.
- [13] ZHENG F, SHI X W, YANG G F, et al. Chitosan nanoparticle as gene therapy vector via gastrointestinal mucosa administration: Results of an in vitro and in vivo study[J]. *Life Sci*, 2007, 80(4): 388-396.
- [14] KIM T H, IHM J E, CHOI Y J, et al. Efficient gene delivery by urocanic acid-modified chitosan[J]. *J Control Release*, 2003, 93(3): 389-402.
- [15] SANIA M, YAN G, FRANCOISE W, et al. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy[J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 2060-2065.
- [16] 马宁,汪琴,孙胜玲,等. 甲壳素和壳聚糖化学改性研究进展[J]. *化学进展*, 2004, 16(4): 69-72.
- [17] SHI-ICHIRO, NISHIMURA, OSANMU KOHGO, et al. Chemospecific manipulations of a rigid polysaccharide: syntheses of novel chitosan derivatives with excellent solubility in common organic solvents by regioselective[J]. *Chemical Macromolecules*, 1991, 24: 4745-4748.
- [18] GUY J, DRABEK D, ANTONIOU M. Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy[J]. *Biotechnol*, 2003, 103(1995): 237-248.
- [19] 张未,潘仕荣,张璇,等. 聚乙二醇-壳聚糖共聚物作为基因递送载体的体外研究[J]. *药学报*, 2008, 43(8): 848-854.

[责任编辑:黄建军]