

纳米级壳寡糖/DNA 复合物的制备和性能研究 Preparation and Performance of Chitosan-oligosaccharides/DNA complex Nanoparticles

钱君律¹, 朱融融², 黄 进², 汪世龙^{2*}, 孙晓宇²

QIAN Jun-Lü¹, ZHU Rong-Rong², HUANG Jin², WANG Shi-Long^{2*} and SUN Xiao-Yu²

1 同济大学化学系, 上海 200092

2 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092

1 Department of Chemistry of Tongji University, Shanghai 200092, China

2 School of Life Science and Technology of Tongji University, Shanghai 200092, China

摘 要 同甲壳素和壳聚糖这种生物大分子相比, 壳寡糖具有许多独特的功能性质, 如水溶性、保湿性、抗菌性、抗肿瘤和免疫促进性等。以数均分子量为 5000 的壳寡糖作为研究模型, 根据凝胶电泳和紫外光谱分析, 提出纳米级壳寡糖与 pEGFPC-1 质粒能通过静电结合或物理包裹形成复合物从而对 DNA 进行保护, 同时证明形成壳寡糖/DNA 复合物后, 壳寡糖能够极大地提高 DNA 的贮存稳定性和结构稳定性, 而 DNase I 酶解实验也显示纳米级壳寡糖在合适比例下 DNA 有良好的保护作用, 使其不被 DNase I 降解, 证明了纳米级壳寡糖应用于基因治疗载体的可行性与安全性。

关键词 纳米级壳寡糖, pEGFPC-1 质粒 DNA, 基因载体, 凝胶电泳法, 紫外光谱法

中图分类号 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)04-0741-05

Abstract Comparing to Chitosan, Chitosan-oligosaccharides have several special functions, such as water-soluble, antitumor activity, immunostimulating effects, and antimicrobial activity. The chitosan-oligosaccharide, the molecular weight of which was about 5000, was used as research model. According to the agarose gel electrophoresis and UV spectrophotometer it was proved that electrostatic interaction was playing a very important role in the formation process of chitosan-oligosaccharide/DNA complex. The potential of adsorbing DNA on chitosan-oligosaccharide was analyzed by gel electrophoresis and UV spectrophotometer, and it was indicated that chitosan-oligosaccharide can improve the storage and structure stability of DNA. To check its protection ability to DNA by DNase I digestive experiment, the result showed that chitosan-oligosaccharide could load with plasmid effectively and protect DNA from being digested by DNase I. It was proved that chitosan-oligosaccharide was safe and effective for gene delivery and will have a very good future in the field of gene therapy.

Key words chitosan-oligosaccharide, pEGFPC-1 plasmid DNA, gene delivery, gel electrophoresis, UV spectrophotometer

1995 年, Mumper 等^[1]首次报道壳聚糖溶液与 DNA 以自聚集的方式沉淀能得到一种粒径大小为 150 ~ 500nm 的复合物, 壳聚糖/DNA 复合物的平均

粒径与所用壳聚糖分子量有关(108 ~ 540kD), 而与缓冲液组成无关, 初步认为壳聚糖有用于基因治疗载体的潜质。从载体递送基因的释放角度看^[2], 壳

Received: December 25, 2006; Accepted: February 12, 2007.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Fund (No. 50572074) and Nano special fund of Shanghai (No. 0552nm028).

* Corresponding author. Tel: +86-21-65982595; E-mail: wsl@mail.tongji.edu.cn

国家自然科学基金(No. 50572074)和上海市纳米专项基金(No. 0552nm028)资助项目 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

聚糖/DNA 复合物的粒径大小尤为重要,尺寸的变化将严重影响复合物在体内的循环时间、靶向细胞的进入以及在体内的效用。虽然有许多有关壳聚糖转染的相关报道,但是关于壳聚糖/DNA 复合物的尺寸与转染率的关系,不同研究者所得的结论似乎是矛盾的。一般情况下,纳米粒子粒径在 100nm 以下能够很好的保证细胞对粒子的内吞^[3]。Illum 等^[4]合成出粒径为 20~500nm 壳聚糖/DNA 复合物,实验表明粒径越小的复合物越容易被细胞内吞或者胞饮,因而转染效率就越高。但是 Nakanishi 等^[5]的研究表明中等粒径大小为 0.4~1.4 μ m 的壳聚糖/DNA 颗粒具有最高的转染率,而小于 400nm 的复合物的转染率反而降低。壳寡糖是由甲壳素和壳聚糖经过降解产生的一类低聚合度的糖类化合物,或者称之为壳寡糖,其聚合度为 1~10 的寡糖。同甲壳素和壳聚糖这种生物大分子相比,壳寡糖具有许多独特的功能性质,如水溶性、保湿性^[6]、抗菌性^[7]、抗肿瘤^[8,9]和免疫促进性等。本文分子量为 5000 左右的壳寡糖作为载体探讨纳米级壳寡糖应用于基因治疗的可行性与安全性,通过紫外光谱分析和凝胶电泳分析纳米级壳寡糖对 DNA 的结合和保护能力。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

凝胶电泳仪及凝胶电泳成像系统(Bio-Rad),紫外-可见光谱仪(Varian Cary50),PCS(Beckman Coulter LS230)酶标仪(Tecan),DNase I(TAKARA),壳寡糖($M_w = 5000$),脱乙酰度为 91.5%,由济南海得贝海洋生物工程有限公司馈赠,质粒 pEGFP-C1 由本实验室自行构建。

1.2 实验方法

1.2.1 壳聚糖的细胞毒性实验:分别配制不同浓度的壳寡糖进行体外细胞实验,壳寡糖的浓度为 0.125mg/mL、0.25mg/mL、0.5mg/mL、1mg/mL、2mg/mL,293T 细胞以 2×10^4 个每孔加入 96 孔板,过夜贴壁后,每孔加入 20 μ L 含不同浓度的样品,每板设 1 个空白细胞对照组和不同浓度样品组,每组设 3 个复孔,加样后置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的培养箱分别培养 24h、48h、72h 后,再进行 MTT 实验。

1.2.2 壳寡糖/DNA 复合物的制备:壳寡糖用 1% 的 HAc 洗涤,以除去不溶性的杂质。滤液用 0.22 μ m 的尼龙膜过滤,冷冻干燥得到纯化后的壳寡糖。采用复凝聚法^[10]制备壳寡糖/DNA 复合物,将用 pH7.4 的 PBS 溶液配制 0.4% 的纳米壳寡糖以及 18 μ g/mL

的 pEGFP-C1 质粒 DNA,分别于 50 $^{\circ}$ C 的温浴预热一定时间。将纳米壳寡糖加入 1.5mL EP 管中与质粒 DNA 溶液以一定体积比快速均匀地漩涡 30s 后,室温放置 1h 后,即可得壳寡糖/DNA 复合物纳米粒,并进行实验分析。

1.2.3 壳寡糖/DNA 复合物贮存稳定性研究:将已制备的壳寡糖/DNA 复合物以及相同浓度的质粒 DNA 放置于 37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中,分别以浓度减半的壳寡糖及空白的超纯水作为空白,用紫外-可见光谱仪测定 24h、48h、72h、96h、120h 后纳米壳寡糖/DNA 复合物以及裸质粒 DNA 的 DNA 200~400nm 的紫外吸收光谱。

1.2.4 壳寡糖/DNA 复合物的凝胶电泳分析:采用复凝聚法以不同体积比的 2%(W/V)壳寡糖与 36 μ g/mL DNA 制备不同 N/P 比的壳寡糖/DNA 复合物。用 TAE 缓冲液制备 1.0%(W/V)琼脂糖凝胶,向其中加入微量 EB,混合 20 μ L 样品和 4 μ L 溴酚兰电泳指示剂于点样孔中,在 80V 电压下恒压电泳 1h,用凝胶成像仪照相^[11]。

1.2.5 壳寡糖/DNA 复合物的酶保护分析:使用 DNase I 贮存液(20mmol/L NaAC-HAC buffer (pH = 5.0), 0.15mmol/L NaCl, 50% Glycerol)配制浓度为 2.5u/ μ L DNase I。将 DNA 溶液(38 μ g/mL)20 μ L,壳寡糖/DNA 复合物(含等量 DNA)分别加入 10u DNase I 进行酶解,反应时间设为 15min、30min,以 5 μ L 0.5mol/L EDTA 终止酶解反应,并分别设空白对照。反应完成,将上述 6 个样品进行凝胶电泳实验,在 75V 电压下恒压电泳 1h,用凝胶成像仪照相。

2 结果

2.1 纳米级壳寡糖的形态分析

图 1 为壳寡糖的粒径分布图,可以看出,壳寡糖的粒径分布绝大多数在 100nm 以下,但是由于其

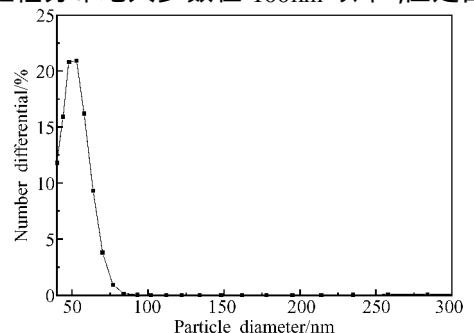


图 1 壳寡糖的粒径分布图

Fig. 1 Particles size distribution of chitosan-oligosaccharide complex measured by PCS

分子上的 NH₂ 容易在水中分子自组装而形成较大的颗粒,因此在 100nm 后溶液中仍然存在较大粒径的粒子,从图中看出有较长的拖尾现象,壳寡糖的数目平均值为 57nm。

2.2 壳寡糖的生物相容性

以 MTT 法而作的生长曲线如图 2 可以看出壳寡糖处理后的细胞生长繁殖正常,在不同浓度的壳寡糖体外细胞不同培养时间实验,壳寡糖对细胞的增殖作用与培养时间和壳寡糖的浓度存在比较典型的依赖性,在低浓度的时候,壳寡糖完全没有细胞毒性,仅在高浓度(1mg/mL)下,对细胞增殖有一定的抑制作用。

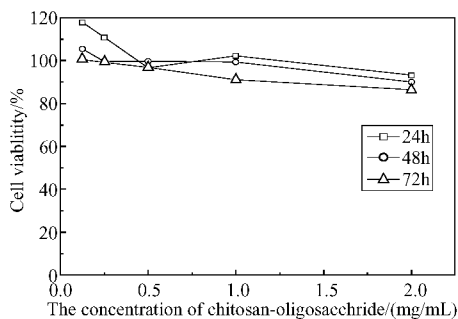


图 2 不同浓度壳寡糖的体外细胞毒性曲线
Fig. 2 The cytotoxicity of chitosan-oligosaccharide with the different concentration *in vitro*

2.3 壳寡糖/DNA 复合物的稳定性

组成 DNA 的嘌呤碱和嘧啶碱具有共轭双键,使 DNA 在 240~290nm 的紫外区有一强烈吸收峰,最大吸收波长在 260nm 附近。将 DNA 在 260nm 左右的强吸收峰作为其特征峰,来表征 DNA 在 37℃ 的 PBS 溶液中的稳定性(表 1)。

表 1 37℃ 下壳寡糖/DNA 复合物及裸 DNA 不同培养时间的紫外吸收光谱的重要参量

Table 1 UV λ_{max} absorption spectra of chitosan-oligosaccharide/DNA complex and naked DNA in 37℃

t/h	λ _{Chitosan-oligosaccharide/DNA complex} /nm	λ _{Naked DNA complex} /nm
24	259.1	258
48	258	257
72	259	256.9
96	259	-
120	260	-

从表 1 中可以看出裸 DNA 在 96h 后已经无最大吸收,说明质粒 DNA 已经断链降解,而壳寡糖/DNA 复合物中的 DNA 在 260nm 仍然有强吸收,吸光度变化很小,这是因为壳寡糖通过静电作用与 DNA 形成复合物从而对 DNA 起到保护作用,从而提高了

DNA 的贮存稳定性。

2.4 壳寡糖/DNA 复合物的凝胶电泳分析

图 3 为壳寡糖与质粒 DNA 在 37℃ 下反应 12h 后的电泳谱带。图中 11 个点样孔从左至右第一孔为裸质粒 DNA,最后一孔为壳寡糖,其余 9 孔依次代表壳寡糖与质粒 DNA 的体积比为 1:10, 1:5, 1:2, 1:1.25, 1:1, 2:1, 5:1, 8:1, 10:1。

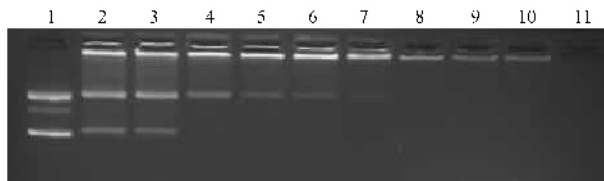


图 3 壳寡糖/DNA 复合物的凝胶电泳分析图

Fig. 3 Gel retardation assay of chitosan-oligosaccharide/DNA complex

1 : naked DNA ; 2 : V DNA : V Chitosan-oligosaccharide = 10 : 1 ; 3 : V DNA : V Chitosan-oligosaccharide = 5 : 1 ; 4 : V DNA : V Chitosan-oligosaccharide = 2 : 1 ; 5 : V DNA : V Chitosan-oligosaccharide = 1.25 : 1 ; 6 : V DNA : V Chitosan-oligosaccharide = 1 : 1 ; 7 : V DNA : V Chitosan-oligosaccharide = 1 : 2 ; 8 : V DNA : V Chitosan-oligosaccharide = 1 : 5 ; 9 : V DNA : V Chitosan-oligosaccharide = 1 : 8 ; 10 : V DNA : V Chitosan-oligosaccharide = 1 : 10 ; 11 : Chitosan-oligosaccharide.

用琼脂糖凝胶电泳来表征两种相反电荷的聚电解质复合物的形成,因为 DNA 的迁移速率除电荷效应外,凝胶介质还具有分子筛效应,使得分子大小和构象不同的核酸分子迁移率出现较大差异。当超螺旋 DNA 转变成开环或线性 DNA 时,电泳后呈现的迁移位置明显不同,从而获取 DNA 构象变化的信息。质粒 DNA (细菌质粒 DNA),它存在超螺旋、松散螺旋和线性三种空间构型,三者的泳动率明显不同。由于超螺旋分子最为紧密,线性最为松弛,因而在一般情况下,超螺旋分子位置最靠前,松散螺旋的次之,而线性结构最后。在壳寡糖与 DNA 作用后通过观察 DNA 迁移位置的变化来了解壳寡糖与 DNA 作用的特点。

在图 3 中,裸质粒 DNA 电泳后有三条明显的条带至上而下分别为超螺旋结构、松散螺旋结构和线性结构,随着纳米级壳寡糖与质粒 DNA 体积比的变大,即纳米级壳寡糖量的增加,从图 3 中可以看出质粒 DNA 随着壳寡糖量的增大而逐渐被阻凝在点样孔中而发亮,与裸质粒 DNA 相比超螺旋结构与线性结构条带的明亮程度随着壳寡糖量的增大却在逐渐地减弱,在壳寡糖与 DNA 体积比较大时,质粒 DNA 在电场的作用下仍然有部分迁移出孔形成条带,而在二者体积比为 1:1 时质粒 DNA 几乎完全被阻凝在点样孔中,说明质粒 DNA 几乎全部与壳寡糖以静

电结合而形成稳定的复合物,而纯壳寡糖在凝胶电泳上无任何显示。

通过凝胶电泳测定 DNA 在壳寡糖中的配合作用或者包裹程度,从而间接确定 DNA 的运载效率。使用凝胶电泳也考察了质粒 DNA 在纳米粒制备过程中的结构稳定性,结果表明质粒 DNA 的超螺旋结构与线性结构都基本没有改变,说明复合物的制备条件对质粒 DNA 并没有破坏作用。

2.5 壳寡糖/DNA 复合物的酶保护分析

由非病毒载体转运的 DNA 易于被 DNase I 降解, DNA 转运体系的一个重要参数就是载体材料对包裹 DNA 的 DNase I 降解保护作用(图 4)。

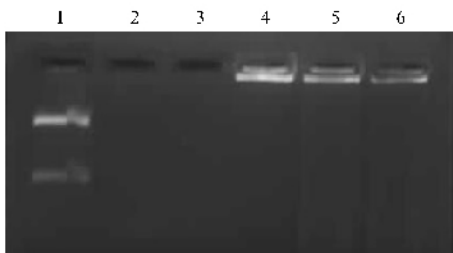


图 4 壳寡糖/DNA 复合物的 DNase I 保护凝胶电泳图

Fig. 4 Protection against DNase I digestion from chitosan-oligosaccharide

1: naked plasmid DNA + EDTA ; 2: naked plasmid DNA + DNase I (15min) + EDTA ; 3: naked plasmid DNA + DNase I (30min) + EDTA ; 4: chitosan-oligosaccharide/DNA complex + EDTA ; 5: chitosan-oligosaccharide/DNA complex + DNase I (15min) + EDTA ; 6: chitosan-oligosaccharide/DNA complex + DNase I (30min) + EDTA.

点样孔 1 裸质粒 DNA 为两条带,分别超螺旋结构和线性结构。

点样孔 2:裸质粒 DNA 加入 10u DNase I 作用 15min,质粒 DNA 已经完全降解,电泳后已经无法看到明显的片段。

点样孔 3:因为裸质粒 DNA 加入 10u DNase I 作用 15min,质粒 DNA 已经完全降解,因此反应 30min 后电泳同样无法看到明显的片段。

点样孔 4:壳寡糖/DNA 复合物,电泳后在点样孔中未发现明显的移动, DNA 完全被阻凝在孔内,这是由于 DNA 分子上的负电荷和带正电的壳聚糖结合后形成复合物,在电场的作用下 DNA 也不发生电泳,而停留在孔内。

点样孔 5:壳寡糖/DNA 复合物加入 10u DNase I 作用 15min 后, DNA 被阻凝在孔内发亮,未发生明显的降解,证明了 DNA 被壳寡糖保护而免受 DNase I 的降解。

点样孔 6:壳寡糖/DNA 复合物加入 10u DNase I 作用 30min 后, DNA 仍然阻凝在点样孔内发亮,但是

亮度较样品 4 和样品 5 暗,条带上方呈现较暗的彗星带,表明随着 DNase I 酶解时间的增长,壳寡糖仍然显示出对 DNA 强大的保护作用,即便有少量的 DNA 被酶解。

纳米级壳寡糖对 pEGFPC-1 质粒的保护作用的探讨:纳米 DNA 复合物通过循环系统到达组织细胞后,细胞将以吞噬或吞饮的方式将其摄入胞内,并通过克服一系列障碍而发挥作用。首先纳米 DNA 复合物与胞膜等形成核内体,核内体被溶酶体迅速吞噬。在溶酶体内基因如果不能被保护,并及时有效地被释放,则会被溶酶体酶降解。大多数研究者认为基因能否有效地从溶酶体内迅速逃离是影响基因转移效率的关键步骤。基因逃离溶酶体后能否在胞质内不被降解,并顺利进入到核内也同样影响着基因的表达和功能。甚至有研究者认为胞质内质粒 DNA 不被降解可能比基因从溶酶体逃脱更能决定基因的转移效率^[12]。作为一种基因转染载体,纳米级壳寡糖必须不仅能结合、浓缩 DNA,还要能有效保护 DNA,使其不被核酸酶降解,这样才能使 DNA 在胞内从溶酶体游离,并进入核内表达。

3 讨论

传统的非病毒载体,如裸 DNA、脂质体、阳离子多聚物等,虽然安全但基因传递效率极低难以获得有意义的基因表达^[13]。因此,发展基因治疗的关键在于开发安全、有效并具有优良特性的非病毒基因转载体系统。近年来发展起来的一种新型非病毒基因转载体——壳聚糖,除了具有可生物降解性和低细胞毒性等优越性之外,还具有独特的跨细胞膜能力而倍受关注^[14]。壳聚糖通过化学法、酶法等解聚而成低分子壳聚糖即壳寡糖(chitosan-oligosaccharide),和壳聚糖相比较,壳寡糖不仅水溶性大,而且具有多种生物学功能。

本实验根据凝胶电泳和紫外光谱分析,得出纳米级壳寡糖与 pEGFPC-1 质粒能通过静电结合或物理包裹形成复合物从而对 DNA 进行保护,同时证明形成壳寡糖/DNA 复合物后,壳寡糖能够极大地提高 DNA 的贮存稳定性和结构稳定性,而 DNase I 酶解实验也显示纳米级壳寡糖在合适比例下 DNA 有良好的保护作用,使其不被 DNase I 降解,证明了纳米级壳寡糖应用于基因治疗载体的可行性与安全性。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Mumper RJ, Wang J, Claspell JM, *et al.* Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Pro Int Symp Control Rel Bioact Mater*, 1995, **22**: 178 - 179.
- [2] Liu WG, Yao KD. Chitosan and its derivatives: a promising non-viral vector for gene transfection. *J Controlled Release*, 2002, **83** (1): 1 - 11.
- [3] Vinogradov SV, Bronich TK, Kabanov AV. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Adv Drug Deliver Rev*, 2002, **54** (1): 135 - 147.
- [4] Illum L, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, *et al.* Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, **51** (1 - 3): 81 - 96.
- [5] Nakanishi M, Noguchi A. Confocal and probe microscopy to study gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative. *Adv Drug Deliver Rev* 2001, **53** (3): 197 - 207.
- [6] Hu ZP(胡志鹏). Research advances in chitoooligosaccharides. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics* (中国生化药物杂志) 2003, **24** (4): 210 - 212.
- [7] Xia WS(夏文水), Wu YN(吴焱楠). Functional properties of Chito-oligosaccharides. *Journal of Wuxi University of Light Industry* (无锡轻工大学学报), 1996, **15** (4): 297 - 302.
- [8] Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of chitoooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimicrob Agents* 2001, **18** (6): 553 - 557.
- [9] Jeon YJ, Kim SK. Production of chitoooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* 2000, **41**: 133 - 141.
- [10] Karin C, Fatiha, L'Hocine Y, *et al.* Fernandes Mesenchymal Stem Cells, MG63 and HEK293 Transfection Using Chitosan-DNA Nanoparticles. *Biomaterials* 2003, **24** (7): 1255 - 1264.
- [11] Qiao JX(乔建军), Zhao H(赵红), Ge ZQ(葛志强), *et al.* 2-Dimensional gel electrophoresis on protein patterns from suspension cultures of *taxus cuspidate* induced by SA. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, **19** (1): 92 - 96.
- [12] Li BS. Study the preparation of chitosan nanoparticles loaded with pEGFP-C1 gene [Master's degree thesis]. Changsha: Central south University, 2004.
- [13] Hu YX(胡云霞), Yuan XB(原续波), Zhang XJ(张晓金), *et al.* Research progress of poly-cation nanoparticles gene delivery system. *Beijing Biomedical Engineering* (北京生物医学工程), 2003, **22** (4): 299 - 302.
- [14] Borchard G. Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, **53** (2): 145 - 150.