

The Study on the Drug Delivery of Galactosylated Histidine Chitosan Nanoparticles

Shujie Miao

Department of Genetics and Genetic Engineering, School of Life Science, Fudan University, Shanghai
Email: 652230986@qq.com

Received: Jan. 2nd, 2019; accepted: Jan. 21st, 2019; published: Jan. 28th, 2019

Abstract

Galactose modified chitosan-histidine conjugate (GCH) was developed in this study as cationic vector for the delivery of vascular endothelial growth factor (VEGF) siRNA (siVEGF). The physico-chemical properties, profile of siRNA release and cytotoxicity of copolymers were characterized. The nanoparticles were proved to be stable with low cytotoxicity and expected to be applied to gene drug delivery.

Keywords

Chitosan, Histidine, Galactose, siRNA Delivery

半乳糖修饰组氨酸壳聚糖衍生物靶向给药系统研究

苗淑杰

复旦大学生命科学学院遗传学和遗传工程系, 上海
Email: 652230986@qq.com

收稿日期: 2019年1月2日; 录用日期: 2019年1月21日; 发布日期: 2019年1月28日

摘要

本文以半乳糖基化壳聚糖-组氨酸衍生物经离子交联法包载VEGF干扰RNA (siRNA)制备纳米粒(NP), 研究其理化性质, 体外释放特性及细胞毒性, 研究表明功能基团修饰NP递送载体稳定性好、细胞毒性低, 有望应用于基因药物递送。

关键词

壳聚糖, 组氨酸, 半乳糖, siRNA递送

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

癌症是人类健康的头号杀手, 复发率和死亡率较高。手术切除、化学药物治疗、放射治疗作为常见的基础疗法, 对癌细胞有一定的杀伤、抑制作用, 但同时也摧毁了正常的免疫系统。肿瘤具有转移性强、复发率高的特性, 在缺乏有效治疗手段的情况下, 难以彻底根除[1] [2]。基因治疗是利用分子生物学方法将外源基因导入人体靶细胞或组织中, 以纠正基因的缺陷或者发挥治疗作用[3]。基因药物特异性强、药理活性强[4] [5] [6], 但其易被酶解、摄取效率低、透膜吸收差[7], 因此需要借助安全且高效的递送载体才能充分发挥治疗功效。

壳聚糖为天然阳离子聚合物, 生物相容, 生物可降解, 广泛用作药物和基因的递送载体。但壳聚糖溶解性差, 作为递送载体时缺乏靶向性, 体内应用受限。氨基酸侧链携带多种功能基团, 可改善递送载体的理化性质, 提高递送效率。Zheng 等[8]分别合成了组氨酸(His)、精氨酸(Arg)和半胱氨酸(Cys)修饰的壳聚糖衍生物, 可显著增加质粒 DNA (pDNA)的稳定性, 促进细胞摄取, 提高 pDNA 的体内外转染效率和功效。肿瘤细胞代谢异常, 细胞表面过量表达多种与细胞生长密切相关受体, 如叶酸受体、去唾液酸糖蛋白受体等。半乳糖可特异性识别去唾液酸糖蛋白受体, 促进纳米粒(nanoparticle, NP)经受体介导的内吞入胞。Han 等[9]制备了乳糖酸修饰壳聚糖衍生物 NP, 包载 pDNA 和 siRNA, 可显著增强 NP 的靶向性, 提高细胞摄取效率, 介导高效的体内外基因沉默功效。

本文以酰胺化反应制备了乳糖酸和组氨酸双修饰壳聚糖衍生物(GCH), 考察其理化性质和细胞毒性。以 siRNA 为模型基因, 小分子化合物三聚磷酸钠(TPP)为阴离子交联剂, 考察不同聚合物/TPP 质量比对 NP 粒径和 Zeta 电势的影响, 测定 NP 的稳定性和 siRNA 体外释放。

2. 实验部分

2.1. 主要材料和试剂

壳聚糖(脱乙酰度: 85%, 相对分子量: 50 kDa, 浙江金壳药业有限公司); Boc-组氨酸(Boc-His, 上海迈瑞尔化学技术有限公司); 1-(3-二甲氨基丙基)3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS) (上海源叶生物科技有限公司); VEGF siRNA 及 FAM 标记 NC siRNA (上海吉玛制药技术有限公司); GelSafe 核酸染料(原平皓(天津)生物技术有限公司); 核糖核酸酶 A(RNase A, Worthington, 美国); 琼脂糖 (Biowest, 法国); 噻唑蓝(MTT, MP, 美国); 三聚磷酸钠(TPP) (上海实验试剂有限公司); 透析袋(MWCO: 3,500 Da, 上海绿鸟科技发展有限公司); 实验用水为二次蒸馏水。

2.2. 主要仪器

AVANCE DMX600 型核磁共振仪(Bruker, 德国); ZetaNanoSizer 型电位及粒度测定仪(Malvern, 英国); FR-180B 电泳槽、FR-200A 型凝胶成像仪(上海复日科技有限公司); VARioSKAN Flash 荧光多功能酶标仪(Thermo Fisher, 美国)。

2.3. 聚合物的合成与表征

2.3.1. 聚合物的合成及表征

参考文献[10]合成 His 修饰壳聚糖。称取 0.1 g Boc-His, 加 10 mL 水溶解, 加入两倍 His 摩尔质量的 EDC 和 NHS, 1 mol/L HCl 调节 pH 至 4.8, 室温搅拌反应 2 h; 称取 0.2 g 壳聚糖, 加 20 mL 1%醋酸溶液溶解, 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.0; 混合上述两种溶液, 1 mol/L HCl 调节 pH 至 4.8, 室温、避光搅拌反应 72 h, 水透析 3 天(MWCO: 3,500 Da), 冷冻干燥, 制得壳聚糖 - 组氨酸共聚物(CH), -20°C 保存。

合成半乳糖基化组氨酸 - 壳聚糖(GCH)。称取 0.1 g 乳糖酸, 加 5 mL 10 mmol/L TEMED/HCL 溶液(pH 5.0)溶解, 加入两倍乳糖酸摩尔质量的 EDC 和 NHS, 室温反应 2 h; 称取 0.1 g CH, 加入 5 mL 10 mmol/L TEMED/HCL 溶液(pH 5.0)搅拌溶解; 混合上述溶液, 1 mol/L HCL 调节 pH 至 5.0; 室温、避光搅拌反应 72 h, 水透析 3 天(MWCO: 3,500 Da), 冷冻干燥, 制得半乳糖基化壳聚糖 - 组氨酸共聚物(GCH), -20°C 保存。同样方法合成半乳糖化壳聚糖共聚物(GC)。

以氘水和氘代盐酸混合溶液为 CS 的溶剂, 氘水为 CH、GC 和 GCH 的溶剂, 四甲基硅烷(TMS)为内标, 测定样品的 ^1H NMR 图谱。KBr 压片测定 CS、CH、GC 和 GCH 的傅立叶变换红外光谱(FTIR)图谱。

2.3.2. His 修饰度测定

标准曲线:

精密称取 100 mg His, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并定容至刻度, 得 1 mg/mL 贮备液; 分别精密量取 0.5 mL、1 mL、2 mL、4 mL、5 mL 贮备液, 置 10 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 得浓度分别为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的工作液; 分别量取 2 mL 工作液, 加 0.5 mL 0.2 mol/L PBS (pH 8.0)和 0.5 mL 2% (w/v)茚三酮溶液(以无水乙醇配制), 沸水浴 15 min, 冰浴 10 min; 以水为对照, 测定 570 nm 处的吸光值。以浓度 C ($\mu\text{g}/\text{mL}$)对吸光值(A)进行线性回归, 制备标准曲线。

样品测定:

量取 2 mL 2 mg/mL CH 和 GCH 水溶液, 加 0.5 mL 0.2 mol/L PBS (pH 8.0)和 0.5 mL 2% (w/v)茚三酮溶液(以无水乙醇配制), 沸水浴 15 min, 冰浴 10 min; 以水为对照, 测定 570 nm 处的吸光值。由标准曲线计算 His 浓度。

2.3.3. 酸碱滴定

称取 2 mg CS、CH、GC 和 GCH, 分别加 10 mL 水溶解, 0.1 mol/L HCl 调节 pH 至 3.0; 搅拌下逐滴加入 0.1 mol/L NaOH, 至 pH 7.0 时停止滴加, 记录滴定体积和相应的溶液 pH 值。

2.3.4. MTT 试验

以 1×10^4 细胞/孔的密度接种 QGY-7703 细胞至 96 孔板, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h, 每 6 孔为一组, 每组分别加入浓度为 0.01 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.8 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL 的 CH、GC 和 GCH 溶液, 以 0.2 mol/L PBS (pH 7.4)的孔为对照, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h, 吸弃孔中上清液, 每孔加 200 μL 新鲜 DMEM 和 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL, 以 0.2 mol/L PBS (pH 7.4)配制), 37°C 、5% CO_2 培养 3 h, 吸弃孔中上清液, 每孔加 200 μL DMSO, 37°C 、100 rpm 振荡孵育 30 min 以使甲瓩晶体完全溶解, 酶标仪测定 570 nm 处的吸光值。对照组的吸光值记为 100%, 计算各试验组的相对细胞存活率(%)。

2.4. NP 的制备与表征

以 DEPC 处理水配制 2 mg/mL CH、GC 和 GCH 溶液、0.2 mg/mL TPP 溶液及 0.2 mg/mL VEGF siRNA

溶液；以 1%醋酸溶液配制 2 mg/mL 的 CS 溶液，1 mol/L NaOH 调节 pH 至 6.0；TPP 溶液与 VEGF siRNA 溶液按质量比 10:1 混匀，聚合物溶液与 TPP 溶液分别按质量比 8:1、10:1、12:1、15:1、18:1 和 20:1 混匀，滴加一定体积的 siRNA 溶液至聚合物和 TPP 的混合溶液中，涡旋混匀，37°C 温育 30 min，制得各 NP，分别命名为 CSNP、CHNP、GCNP 和 GCHNP，测定粒径和 Zeta 电势。

2.5. 凝胶阻滞

按 2.4 项下方法制备不同聚合物/TPP 质量比的 CSNP、CHNP、GCNP 和 GCHNP 溶液，取一定体积(含 100 ng siRNA)加至 4%琼脂糖凝胶的上样孔中，50 V 电泳 1 h，GelSafe 核酸染料显色，凝胶成像仪观察 siRNA 条带并拍照。

2.6. NP 的稳定性

2.6.1. 核酶稳定性

按 2.4 项下方法制备聚合物/TPP 质量比为 15:1 的 CSNP、CHNP、GCNP 和 GCHNP(以下试验无特殊说明外均用该聚合物/TPP 质量比)，加入 RNase A 溶液(5 U)，37°C、100 rpm 振荡孵育 6 h，加 2.5 μ L 0.2 mol/L EDTA 溶液，80°C 水浴 5 min 以终止酶活反应，加肝素钠溶液(5 mg/mL)，室温静置 2 h，样品溶液加至 4% (w/v)琼脂糖凝胶上样孔中，50 V 电泳 1 h，GelSafe 核酸染料显色，凝胶成像仪观察 siRNA 条带并拍照。以未加 RNase A 溶液的 siRNA 溶液为阴性对照，以加等体积 RNase A 溶液的 siRNA 溶液为阳性对照。

2.6.2. 肝素钠解离

量取一定体积的 NP 溶液，加入终浓度分别为 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、1 mg/mL 的肝素钠溶液，室温静置 2 h 后加至 4% (w/v)琼脂糖凝胶上样孔中，50 V 电泳 1 h，GelSafe 核酸染料显色，以裸 siRNA 溶液为对照，凝胶成像仪观察 siRNA 条带并拍照。

2.6.3. 抗稀释和离子强度稳定性

按 2.4 项下方法制备聚合物/TPP 质量比为 15:1 的 CSNP、CHNP、GCNP 和 GCHNP，分别以水和 0.2 mol/L PBS (pH 7.4)稀释 100 倍，测定 NP 的粒径和 Zeta 电势。

2.7. 体外释放

标准曲线的制作：精密量取 0.5 mL 0.2 mg/mL FAM-NC siRNA 溶液，置 10 mL 量瓶中，加 DEPC 处理水稀释至刻度，制得 10 μ g/mL FAM-NC siRNA 贮备液；分别精密量取 0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL 至 10 mL 量瓶中，加 DEPC 处理水稀释至刻度，制得 0.1 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.3 μ g/mL、0.4 μ g/mL、0.5 μ g/mL FAM-NC siRNA 标准溶液，酶标仪测定溶液的荧光强度($\lambda_{ex} = 545$ nm, $\lambda_{em} = 575$ nm)。以浓度 C (μ g/mL)对荧光强度(I)进行线性回归。

按 2.4 项下方法制备载 FAM-NC siRNA 的 NP，量取一定体积 NP 溶液(含 1 μ g FAM-NC siRNA)，加 1 mL 0.2 mol/L PBS (pH 7.4)分散 NP，37°C、100 rpm 振荡温育。分别于 0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h 13300 rpm 离心 10 min，精密量取上清液 200 μ L，酶标仪测定 FAM-NC siRNA 荧光强度($\lambda_{ex} = 545$ nm, $\lambda_{em} = 575$ nm)，每次取样后补加 200 μ L 0.2 mol/L PBS (pH 7.4)，分散沉淀，继续温育。由标准曲线计算 FAM-NC siRNA 含量，计算累积释放量(%)。

3. 结果与分析

3.1. 聚合物的制备和表征

图 1 为 GCH 的合成路线图。在 EDC/NHS 催化作用下，壳聚糖的氨基与组氨酸的羧基发生酰胺化反

应, 得到 CH。经 EDC/NHS 催化乳糖酸共价接枝至 CH 制得 GCH。

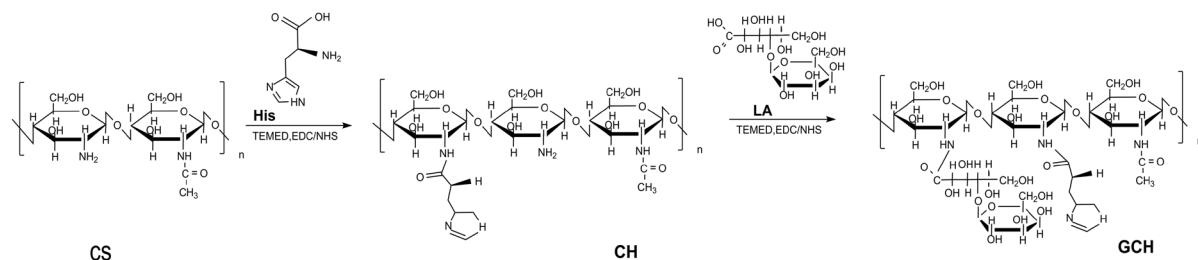


Figure 1. The synthetic scheme of GCH conjugate

图 1. GCH 的合成路线图

图 2 为 CS、GC、CH 和 GCH 的 ^1H NMR 图谱。2.0 ppm 处信号峰为壳聚糖乙酰基上甲基质子峰, 3.1 ppm 处为壳聚糖骨架的质子峰。CH 和 GCH 的 ^1H NMR 图谱中, 7.4 ppm 处出现新的质子峰, 为 His 中咪唑环的特征氢峰[11] [12] [13] [14], 表明 His 成功接枝至 CS 和 GC。茚三酮显色法测得 CH 和 GCH 中 His 的接枝度分别为 $17.3 \pm 1.7\%$ 和 $20.9 \pm 0.3\%$ 。GC 和 GCH 的 ^1H NMR 图谱中位于 4.5 ppm 处的信号峰为乳糖酸的次甲基氢峰[15], 表明乳糖酸成功接枝至 CS 及 CH。计算半乳糖环次甲基氢峰与壳聚糖乙酰基甲基氢峰的峰面积比值, 得 GC 和 GCH 的半乳糖修饰度分别为 12.3% 和 13.1%。

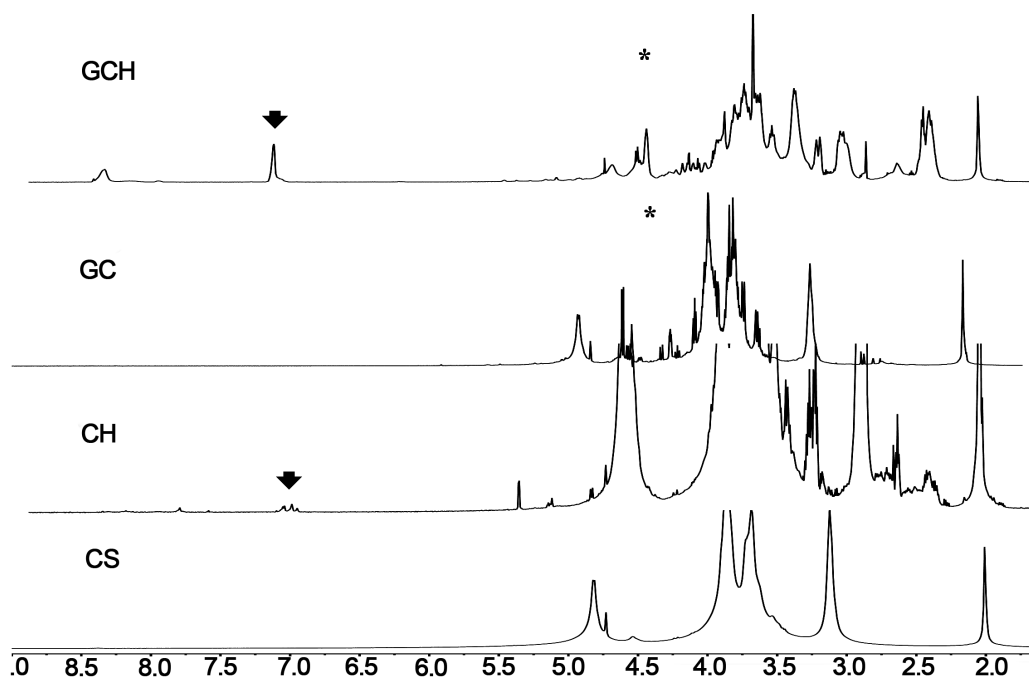


Figure 2. ^1H NMR spectra of CS, CH, GC and GCH

图 2. CS、CH、GC 和 GCH 的 ^1H NMR 图谱

3.2. 聚合物缓冲能力

图 3 为 CS、CH、GC 和 GCH 的缓冲能力测定结果, 可见在 pH 3.0 至 7.0 范围内, CH 和 GCH 的缓冲能力明显强于 CS。这是由于 CH 和 GCH 中的咪唑基团的 pKa 为 6.0, 可在酸性条件下吸附大量质子[16], 因此缓冲能力较强。

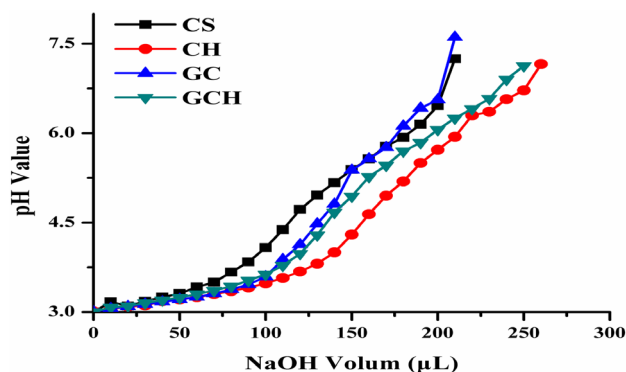


Figure 3. Acid-base titration curves of polymers
图 3. 聚合物的酸碱滴定曲线

3.3. NP 的制备与表征

荷负电的阴离子 TPP 可交联阳离子聚合物成稳定的 NP，常作为小分子交联剂用于基因递送。VEGF siRNA 经 TPP 交联与阳离子聚合物形成 NP，表 1 所示为聚合物/TPP 质量比为 15:1 时 NC 的粒径和 Zeta 电势，可见 NP 的粒径为 160 nm~220 nm，多分散性指数(PDI)接近于 0.3，粒径分布均匀，Zeta 电势为 21 mV~23 mV。

Table 1. Particle sizes and Zeta potentials of nanocomplexes at polymer/TPP weight ratio of 15

表 1. 聚合物/TPP 质量比为 15:1 时 NP 的粒径和 Zeta 电势

Sample	Particle size (nm)	Zeta Potential (mV)
CSNP	167.3 ± 4.1 (0.291)	21.8 ± 1.1
CHNP	215.0 ± 11.9 (0.359)	21.0 ± 2.4
GCNP	166.5 ± 6.3 (0.323)	21.4 ± 0.7
GCHNP	189.3 ± 4.3 (0.244)	22.1 ± 0.6

注：括号中的值表示多分散性指数(PDI)的值。各组值为平均值±SD 值(n=3)。

图 4 所示为 CS、CH、GC 和 GCH 在不同聚合物/TPP 质量比时形成 NP 的粒径和 Zeta 电势，可见聚合物/TPP 质量比为 8:1 至 20:1 时，各聚合物均可形成纳米尺度颗粒，且多分散性良好(PDI 均小于 0.3)。NP 的 Zeta 电势随着聚合物/TPP 质量比增加而上升，这是由于随着聚合物/TPP 质量比的增加，NP 表面正电荷量也随之增加。

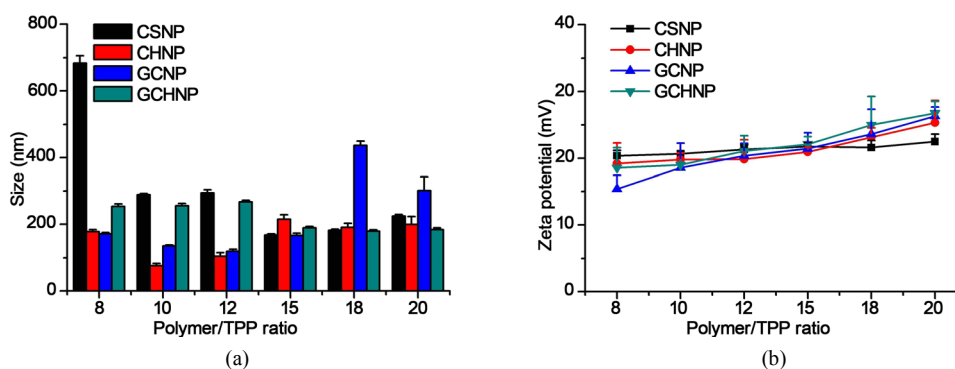


Figure 4. Particle sizes (a) and Zeta potentials, (b) of NP at different polymer/TPP ratio

图 4. 不同聚合物/TPP 质量比时 NP 的粒径(a)和 Zeta 电势(b)

3.4. 凝胶阻滞

荷负电的 siRNA 在电场作用下向正极迁移，产生明显的电泳条带，经阳离子聚合物缩合形成 NP 后可经静电吸附和物理缠绕负载 siRNA 于 NP 内部，使 siRNA 滞留在加样孔中无法移动，阻碍 siRNA 的电泳迁移。故以琼脂糖凝胶电泳试验定性考察阳离子聚合物与 siRNA 的结合能力。图 5(a)所示为凝胶阻滞试验结果，GCHNP 在聚合物/TPP 质量比为 8:1 至 20:1 的范围内，均能有效阻滞 siRNA 的电泳迁移。图 5(b)所示为聚合物/TPP 质量比为 15:1 时各 NP 的凝胶阻滞试验结果，可见裸 siRNA 有明显的电泳条带，而各 NP 组均被阻滞在上样孔中，表明当聚合物/TPP 质量比为 15:1 时，CSNP、CHNP、GCNP 和 GCHNP 均可有效缩合 siRNA，完全阻滞 siRNA 的电泳行为。

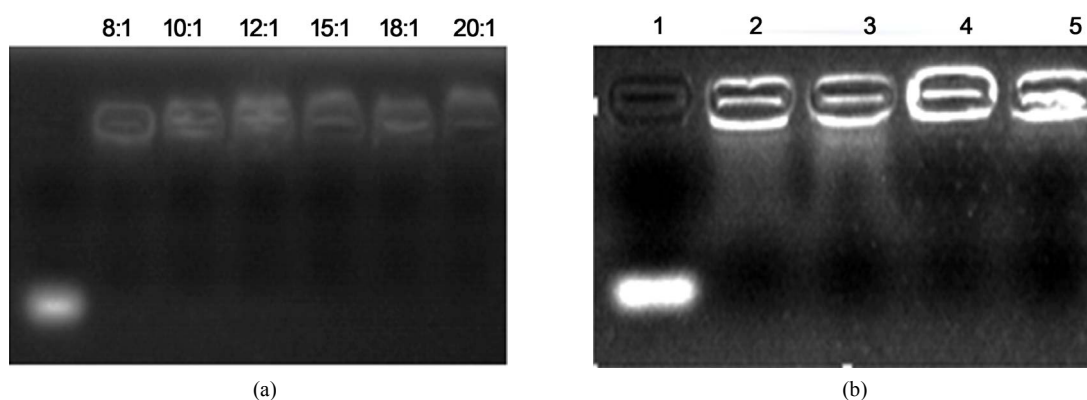


Figure 5. (a) Agarose gel retardation assay of siRNA loaded GCHNP at different Polymer/TPP weight ratio, (b) Qualitative analysis of association efficacies of various NP towards siRNA by gel retardation assay. Lane 1-5 represented naked siRNA, CSNP, CHNP, GCNP and GCHNP at Polymer/TPP weight ratio of 15, respectively

图 5. (a) 不同 GCH/TPP 质量比时 GCHNP 的凝胶阻滞图, (b) 聚合物/TPP 质量比为 15:1 时, 各 NP 组的凝胶阻滞图。1~5 分别代表裸 siRNA、CSNP、CHNP、GCNP 和 GCHNP

3.5. NP 的稳定性

3.5.1. 核酶稳定性

NP 在递送过程中需要抵抗核酶对 siRNA 的破坏，以保证 siRNA 在到达肿瘤细胞时结构完整，因此需借助合适的递送载体。图 6 所示为 NP 与核酶共孵育后的琼脂糖凝胶电泳图，可见裸 siRNA 经 RNase A 处理后无电泳条带，而 CSNP、CHNP、GCNP 和 GCHNP 组可见清晰电泳条带，表明 CS、CH、GC 和 GCH 均可有效保护 siRNA 免遭核酶降解。

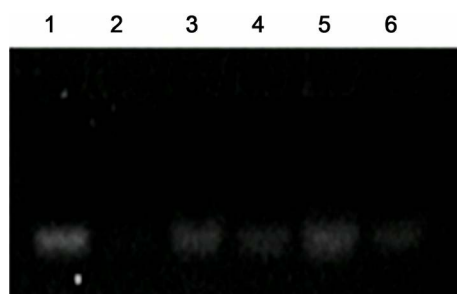


Figure 6. Agarose gel electrophoresis of siRNA loaded NP after incubation with RNase A. Lane 1 represented naked siRNA and lane 2 - 6 represented naked siRNA, CSNP, CHNP, GCNP and GCHNP incubated with RNase A, respectively.

图 6. 载 siRNA 聚合物 NP 分别与 RNase A 共孵育后的琼脂糖凝胶电泳图。1 代表未经 RNaseA 处理的裸 siRNA。2~6 分别代表经 RNase A 处理后的裸 siRNA、CSNP、CHNP、GCNP 和 GCHNP

3.5.2. 肝素钠解离

肝素钠可模拟体内荷负电物质对 NP 的解离作用，抵抗高浓度肝素钠解离一定程度可说明聚合物 NP 在体内可抵抗荷负电物质的解离作用。图 7 所示为 NP 经不同浓度肝素钠处理后的凝胶电泳图，可见 CSNP、CHNP、GCNP 和 GCHNP 肝素钠完全解离浓度分别为 1 mg/mL、0.4 mg/mL、0.4 mg/mL 和 0.4 mg/mL，表明 siRNA 与壳聚糖衍生物的结合力较壳聚糖减弱，可能是由于壳聚糖上的氨基被取代引起的。

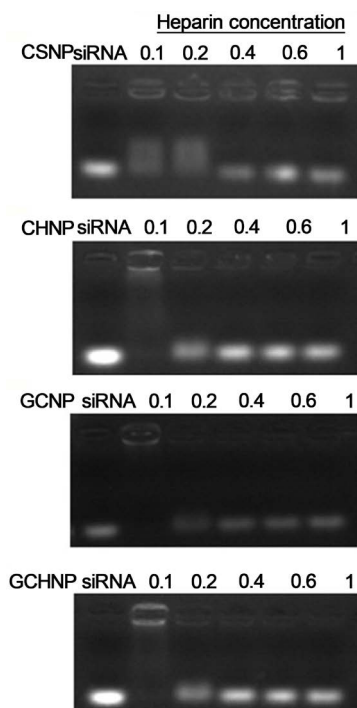


Figure 7. Agarose gel electrophoresis of siRNA loaded NP after incubation with different concentration of heparin
图 7. 载 siRNANP 经肝素钠解离后琼脂糖凝胶电泳图

3.5.3. 抗稀释和离子强度稳定性

NP 在递送过程中需要对抗体液稀释和高强度离子变化对 NP 结构的破坏，为保证 siRNA 在到达肿瘤细胞时结构完整，因此需借助合适的递送载体。以水和 PBS 分别稀释 NP100 倍，测定 NP 的粒径和 Zeta 电势，考察 NP 的稳定性。表 2 所示为水和 PBS 稀释后 NP 的粒径和 Zeta 电势，可见稀释后 CSNP、CHNP、GCNP 和 GCHNP 粒径稍增加，Zeta 电势降低，这是由于高离子强度的稀释介质可产生“静电屏蔽效应”，减弱阳离子聚合物与 siRNA 间的结合力，使 NP 粒径增大、Zeta 电势降低[17] [18]。

Table 2. Particle sizes and Zeta potentials of nanoparticles after dilution by water and PBS

表 2. NP 经水和 PBS 稀释 100 倍后的粒径和电势

Sample	Dilution by water at 100 folds		Dilution by PBS at 100 folds	
	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
CSNP	204.9 ± 5.3	23.6 ± 3.2	216.1 ± 3.41	1.4 ± 0.5
CHNP	228.6 ± 2.8	19.7 ± 1.0	217.2 ± 4.6	2.3 ± 0.3
GCNP	215.3 ± 10.2	19.6 ± 1.0	226.2 ± 3.7	2.7 ± 0.7
GCHNP	209.0 ± 8.8	19.0 ± 3.1	214.2 ± 6.4	2.0 ± 0.7

3.6. 细胞毒性

基因递送载体应具备良好的安全性，以 MTT 试验考察聚合物细胞毒性。图 8 所示为不同浓度聚合物与 QGY-7703 细胞共培养 24 h 后的 MTT 试验结果，可见聚合物浓度为 0.01 mg/mL~2 mg/mL 时，各组细胞存活率均超过 90%，表明聚合物的细胞毒性较小，安全性较好。

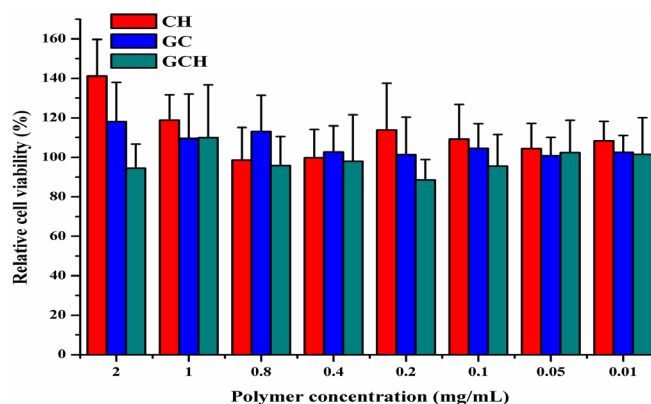


Figure 8. Relative cell viabilities following exposure to different polymers at the concentration of 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1 and 2 mg/mL for 24 h. Indicated values were mean \pm SD (n = 6)

图 8. 在聚合物浓度为 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1 和 2 mg/mL 溶液中细胞暴露 24 h 后的相对存活率

3.7. 体外释放

siRNA 释放的标准曲线为: $I = 36.601C - 0.5733$, $r = 0.997$, 表明在 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~0.5 $\mu\text{g/mL}$ 范围内荧光强度(I)与 FAM-NC siRNA 浓度(C, $\mu\text{g/mL}$)线性关系良好。图 9 所示为 NP 在 0.2 mol/L PBS(pH 7.4)中的 siRNA 释放曲线，可见 CSNP、CHNP、GCNP、GCHNP 的 12h 累积释放量分别为 20.9%、84.6%、75.9% 和 69.3%，表明各 NP 均可有效释放 siRNA，且 CHNP、GCNP 和 GCHNP 的 siRNA 的释放快于 CSNP，这可能是由于壳聚糖与 siRNA 的结合力较强所致，与肝素钠解离试验结果一致。

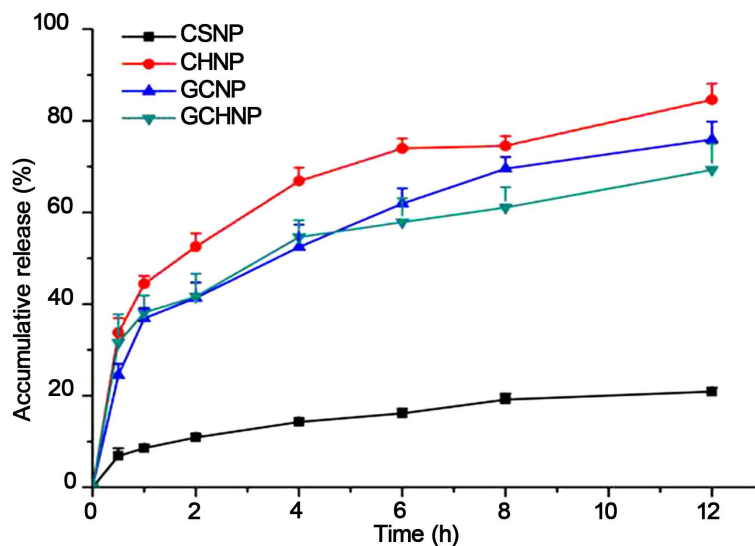


Figure 9. *In vitro* release profiles of FAM-siRNA from CSNP, CHNP, GCNP and GCHNP in 0.2 mol/L PBS (pH 7.4) at 37°C. Indicated values were mean \pm SD (n = 3)

图 9. 浓度为 0.2 mol/L 的 PBS (pH 7.4) 在 37°C 时，溶液中 CSNP、CHNP、GCNP、GCHNP 的 siRNA 释放曲线

4. 小结

壳聚糖分别经 His 和乳糖酸修饰制备 CH、GC 和 GCH。经测定 CH 和 GCH 中 His 的修饰度分别为 $17.3 \pm 1.7\%$ 和 $20.9 \pm 0.3\%$ ，GC 和 GCH 的半乳糖修饰度分别为 12.3% 和 13.1%。以 TPP 为交联剂制备载 siRNANP，当聚合物/TPP 比为 15:1 时，NP 的粒径为 160 nm~220 nm，Zeta 电势为 21 mV~23 mV，NP 的稳定性较好，可有效保护 siRNA 免于核酶降解，体外条件下可有效释放 siRNA，为 siRNA 的体内外递送提供指导。

参考文献

- [1] Pichon, C., Billiet, L. and Midoux, P. (2010) Chemical Vectors for Gene Delivery: Uptake and Intracellular Trafficking. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 640-645. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.07.003>
- [2] Brannon-Peppas, L. and Blanchette, J. (2012) Nanoparticle and Targeted Systems for Cancer Therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**, 206-212.
- [3] 李燕, 阳俊, 刘桂英, 张欣. 基因治疗药物递送系统的研究现状及发展趋势[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(10): 998-1007.
- [4] Prosen, L., Markelj, B., Dolinsek, T., Music, B., Cemazar, M. and Sersa, G. (2014) Mcam Silencing with RNA Interference using Magnetofection has Antitumor Effect in Murine Melanoma. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, **3**, e205.
- [5] Xiao, B., Zhang, M., Viennois, E., Zhang, Y., Wei, N., Baker, M., et al. (2015) Inhibition of MDR1 Gene Expression and Enhancing Cellular Uptake for Effective Colon Cancer Treatment Using Dual-Surface-Functionalized Nanoparticles. *Biomaterials*, **48**, 147-160. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.014>
- [6] Juliano, R., Bauman, J., Kang, H. and Ming, X. (2009) Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA Oligonucleotides. *Molecular Pharmaceutics*, **6**, 686-695. <https://doi.org/10.1021/mp900093r>
- [7] Liang, S., Yang, X., Wang, H., Li, H., Liu, W., et al. (2015) Optimizing the Size of Micellar Nanoparticles for Efficient siRNA Delivery. *Advanced Functional Materials*, **25**, 4778-4787. <https://doi.org/10.1002/adfm.201501548>
- [8] Zheng, H., Tang, C. and Yin, C. (2015) Oral Delivery of shRNA Based on Amino Acid Modified Chitosan for Improved Antitumor Efficacy. *Biomaterials*, **70**, 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.024>
- [9] Han, L., Tang, C. and Yin, C. (2015) Dual-Targeting and pH/Redox-Responsive Multi-Layered Nanocomplexes for Smart Co-Delivery of Doxorubicin and siRNA. *Biomaterials*, **60**, 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.001>
- [10] Zheng, H., Tang, C. and Yin, C. (2015) Exploring Advantages/Disadvantages and Improvements in Overcoming Gene Delivery Barriers of Amino Acid Modified Trimethylated Chitosan. *Pharmaceutical Research*, **32**, 2038-2050. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1597-7>
- [11] Qiu, Y., Ma, Z.w., Zhao, Y.m., Zhang, J.c., Guo, Q., Gou, Z.r. and Gao, C.y. (2012) Polycaprolactone Scaffold Modified with Galactosylated Chitosan for Hepatocyte Culture. *Macromolecular Research*, **20**, 283-291. <https://doi.org/10.1007/s13233-012-0056-8>
- [12] Ding, J., He, R., Zhou, G., Tang, C. and Yin, C. (2012) Multilayered Mucoadhesive Hydrogel Films Based on Thiolated hyaluronic Acid and Polyvinylalcohol for Insulin Delivery. *Acta Biomaterialia*, **8**, 3643-3651. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.027>
- [13] Azari, F., Sandros, M. and Tabrizian, M. (2011) Self-Assembled Multifunctional Nanoplexes for Gene Inhibitory Therapy. *Nanomedicine-UK*, **6**, 669-680. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.23>
- [14] Jiang, H.L., Kwon, J.T., Kim, Y.K., Kim, E.M., Arote, R., Jeong, H.J., Nah, J.W., Choi, Y.J., Akaike, T., Cho, M.H. and Cho, C.S. (2007) Galactosylated Chitosan-Graft-Polyethylenimine as a Gene Carrier for Hepatocyte Targeting. *Gene Therapy*, **14**, 1389-1398. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302997>
- [15] Li, Y.Y., Zhang, S.S., Meng, X.J., et al. (2011) The Preparation and Characterization of a Novel Amphiphilic-cleoyl-Carboxymethyl Chitosan Self-Assembled Nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, **83**, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.030>
- [16] Katas, H. and Alpar, H. (2006) Development and Characterization of Chitosan Nanoparticles for siRNA Delivery. *Journal of Controlled Release*, **115**, 216-225. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.07.021>
- [17] Ren, Y., Jiang, X., Pan, D. and Mao, H. (2010) Charge Density and Molecular Weight of Polyphosphoramidate Gene Carrier Are Key Parameters Influencing Its DNA Compaction Ability and Transfection Efficiency. *Biomacromolecules*,

11, 3432-3439. <https://doi.org/10.1021/bm1009574>

- [18] Chowdhury, D.K., Sarker, H. and Schwartz, P. (2018) Regulatory Notes on Impact of Excipient on Drug Products and the Maillard Reaction. *AAPS PharmSciTech*, **19**, 965-969. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0878-y>

Hans 汉斯

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2160-7613, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ms@hanspub.org