

· 基础研究 ·

壳聚糖携载质粒纳米微球体外转染兔关节软骨细胞的实验研究 *

赵晶鑫¹ 范宏斌¹ 吴 红² 樊向利¹ 张春礼^{3△}

(1 第四军医大学西京骨科医院全军骨科研究所 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学药理学系化学教研室 陕西 西安 710032;

3 第四军医大学西京骨科医院运动损伤科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究携载质粒的不同分子量的壳聚糖纳米微球的包裹率和保护 DNA 的能力,镜下观察其大小和形态,观察其对原代兔关节软骨细胞的转染效率。方法:利用酶消化法消化 3 周龄新西兰大白兔的关节软骨,贴壁培养原代兔关节软骨细胞。购买相对分子量在 5K 和 800K 之间的八种壳聚糖,利用表达增强型绿色荧光蛋白的质粒(pEGFP)作报告基因,通过复合凝聚法制备壳聚糖-质粒纳米微球。琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度计分析不同 N/P 比值对不同分子量壳聚糖和质粒的结合能力及包封率的影响;纳米粒度仪、透射电子显微镜和环境扫描电子显微镜考察纳米微球的粒径分布和形态;荧光显微镜观察壳聚糖纳米微球介导 pEGFP 在体外培养的兔关节软骨细胞中的表达情况;流式细胞仪计算具体转染效率。结果:①N/P 值为 4 及 4 以上时,各分子量的壳聚糖可完全包裹质粒成球;N/P 值为 2 时,分子量为 5K、50K、85K 仅部分包裹质粒,其余可完全包裹;N/P 值为 1 时,各壳聚糖均与质粒部分包裹;N/P 值为 0.25 时,各壳聚糖均与质粒完全分离。②纳米粒度仪分析得出:N/P 值为 4 时,各分子量的壳聚糖纳米微球的平均粒径均在 1 微米以下,③透射电子显微镜和扫描电子显微镜均可观察到球形或不规则形的大小不同的微球。荧光显微镜可大致观察到绿色荧光蛋白在软骨细胞内表达的表达式。④流式细胞仪得出具体转染效率,分子量为 170K、250K 和 800K 的壳聚糖纳米微球的转染效率均高于 5K、50K 和 85K 的壳聚糖纳米微球,其中 800K 的壳聚糖纳米微球与脂质体相当(差异有统计学意义, $P<0.05$)。结论:与脂质体相比,N/P 比值为 4 时,相对分子量为 800k 的壳聚糖纳米微球可高效转染原代培养的兔关节软骨细胞,可以作为今后进一步体外、体内实验的首选转染载体。

关键词:兔关节软骨细胞;壳聚糖纳米微球;转染

中图分类号:Q95-3,Q75,Q78,R318 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-201-06

Research on chitosan-pEGFP nanoparticles in transfection of primary rabbit articular chondrocytes*

ZHAO Jing-xin¹, FAN Hong-bin¹, WU Hong², FAN Xiang-li¹, ZHANG Chun-li^{3△}

(1 Xijing Orthopaedic Hospital, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

2 Department of Chemistry, College of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

3 Division of Sports Injury, Xijing Orthopaedic Hospital, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

ABSTRACT Objective: To investigate the DNA-loading efficiency and the capability of protecting the plasmid of the nanoparticles with different molecular weights, to observe their shape and size using electron microscope and to detect the transfection efficiency of rabbit articular chondrocytes in primary culture using chitosan-pEGFP nanoparticles. **Methods:** The articular cartilage of 3-week old rabbit was digested by different enzymes, primary chondrocytes were cultured adherently in bottles. Eight kinds of chitosans with molecular weights between 5k and 800k were used. Chitosan-pEGFP nanoparticles were prepared by complex coacervation process with the report gene of plasmid expressing enhanced green fluorescence protein (pEGFP-C1). The DNA-loading efficiency of the nanoparticles with different molecular weights was detected by agarose gel electrophoresis and ultraviolet spectrophotometer when N/P ratio was changed. The particle size distribution was detected by nano zetasizer, and the shape was observed under transmission electron microscope and scanning electron microscopy. The expression of EGFP of CS-pDNA nanoparticle transfected chondrocytes was detected by fluorescence microscope, and the transfection efficiencies of different CS-pDNA nanoparticles were detected by flow cytometry. **Results:** ①The plasmid can be integrated totally with chitosans of all molecular weights when the N/P ratio was 4; The plasmid can be integrated partially with chitosans of molecular weights of 5K, 50K and 85K and can be integrated totally with others when the N/P ratio was 2; The plasmid can be integrated partially with chitosans of all molecular weights when the N/P ratio was 1; The plasmid was totally detached with chitosans of all molecular weights when the N/P ratio was 0.25. ② The average diameters of chitosan-pEGFP nanoparticles with all molecular

* 基金项目:国家自然科学基金(30900311)

作者简介:赵晶鑫(1984-),男,硕士研究生,研究方向:软骨组织工程,电话:15029972142, E-mail:zhaojingxin1984@yahoo.com.cn

范宏斌(1975-),男,副教授,研究方向:软骨组织工程,电话:13572987228, E-mail:fanhb75@yahoo.com.cn

△通讯作者:张春礼(1964-),男,教授,研究方向:关节镜外科,电话:13319250398, E-mail:zhangcl@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-10-07 接受日期:2010-10-31)

weights were below 1 μ m. ③ Different shapes of sphere or irregular pattern were observed by transmission electron microscope and scanning electron microscopy. The high expression of EGFP in transfected chondrocytes could be observed under fluorescence microscope. ④ Detected by flow cytometry, the transfection efficiencies of CS-pDNA nanoparticles with molecular weights between 170k and 800k were higher than those with molecular weights between 5k and 85k significantly with $P < 0.05$, of which the CS-pDNA nanoparticle with molecular weight of 800k had the highest transfection efficiency similar to positive control of Lipofectamine 2000. **Conclusion:** Compared with Lipofectamine 2000, transfection efficiency of rabbit articular chondrocytes was high using CS-pDNA nanoparticle with molecular weight of 800k, which can be the first choice of the gene carrier in further transfection experiments in vivo or in vitro.

Key words: rabbit articular chondrocyte; chitosan nanoparticle; transfection

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q75, Q78, R318 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-201-06

前言

由创伤或骨性关节炎导致的软骨损伤和退变仍是临床上无法有效解决的问题,尽管国外已有一些组织工程产品面世,但其效果仍然不尽如人意。其中再生软骨退变是罪魁祸首^[1-2]。转基因技术似乎为我们解决这一棘手问题带来曙光。通过基因转染,可以将可能有效阻止再生软骨退变的分子或基因转染入体外培养的软骨细胞,试图修复缺损软骨。

基因转染技术的关键在于保证高效的转染效率,其中转染载体的选择显得尤为重要。目前主要有病毒载体和非病毒载体两类^[3]。由于病毒载体有较强的免疫原性、潜在的感染性,因此使用受限。作为更为安全的替代物,非病毒载体无免疫原性,靶向性更好,更便于储存和生产。其中,多聚阳离子聚合物与脂质体相比,有更好的生物相容性和可降解性、更小的细胞毒性、并且更稳定^[4-5]。

壳聚糖(chitosan,CS)是近年来基因转染载体的研究热点之一。兼具一切多聚阳离子聚合物优点的壳聚糖来源于甲壳动物的外壳,是一种纯天然、无毒、可降解和生物相容性好的多聚糖^[4-6]。在酸性环境中,带正电荷的壳聚糖的氨基可与带负电荷的DNA的磷酸基相互吸引,进而形成聚合物,聚合物的表面呈正电荷,而细胞膜的双层磷脂结构使其表面带负电荷^[4-5,7-8]。因此,壳聚糖聚合物与带细胞膜由于静电相互吸引,当聚合物的大小达到一定的亚细胞或亚微米级别时,可被细胞吞入胞。

本实验旨在制备出能高效转染体外培养的兔关节软骨细胞的壳聚糖-pDNA纳米微球,并通过辅助仪器研究和观察微球的各项技术指标,为今后进一步实验研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 兔关节软骨 取自3周龄新西兰大白兔,由西京骨科医院全军骨科研究所动物房提供。

1.1.2 主要试剂 壳聚糖(CS,相对分子量为5K、170K、800K,脱乙酰度90%)购自山东青岛金壳生物公司;壳聚糖(相对分子量为40K和85K的,脱乙酰度85%)购自浙江玉环生物公司;壳聚糖(相对分子量为250K的,脱乙酰度80%)购自美国Sigma公司;胎牛血清、青霉素-链霉素-非必需氨基酸购自美国Hyclone公司;II型胶原酶、DMEM-LG购自美国Gibco公司;胰蛋白酶购自北京科昊生物技术公司;DNase I购自日本TaKaRa公司;脂质体2000购自美国Invitrogen;壳聚糖酶、溶

菌酶、HEPES、MES购自美国Sigma公司;表达增强型绿色荧光蛋白的质粒C1(pEGFP-C1)、DH5 α 大肠杆菌由第四军医大学神经生物教研室邓斌硕士馈赠;其余试剂为分析纯。

1.1.2 主要仪器 低温高速离心机(Sigma,美国);相差倒置显微镜(Leica,德国);WH-2涡旋振荡器(金坛,浙江金华);TE2000-E倒置荧光显微镜(Nikon Eclipse,日本);二氧化碳孵箱(Heraeus,德国);JSM-6700冷场发射扫描电子显微镜(日本电子);JEM-2100超高分辨率透射电镜(日本电子);Zetasizer纳米粒度分析仪(Malvern,英国);CCK-8试剂盒(Dojindo Laboratories,日本);Elite流式细胞仪(Beckman Coulter,美国);MK-3 Wellcan全自动酶标仪(Labsystems Dragon,芬兰);质粒中提试剂盒(Promega,美国);紫外凝胶成像系统(Bio-Rad,美国)

1.2 方法

1.2.1 pEGFP-C1的转化、扩增、提纯和鉴定 pEGFP-C1转化于DH5 α 大肠杆菌内,按试剂盒说明书步骤扩增、提纯,用0.8%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计(A260/A280)鉴定,并根据260nm的吸光值计算质粒浓度。

1.2.2 壳聚糖-pDNA纳米微球的制备利用复合凝聚法^[9]不同相对分子量的壳聚糖均分别溶解于缓慢加热的1%乙酸溶液,待完全溶解后用NaOH调节pH值到5.5,再将溶液稀释到壳聚糖浓度为0.02%(w/v),乙酸浓度为5 mmol/L,并0.22 μ m滤器过滤。pEGFP-C1溶解于5 mmol/L Na₂SO₄中浓度为100 μ g/ml。将等体积的壳聚糖和pDNA溶液分别加热至55℃后迅速混合,最大转速涡旋30 s后静止30 min,即得N/P=4的CS-pDNA纳米微球。不需其他处理即可进行检测和进一步实验。

1.2.3 凝胶电泳阻滞实验 凝胶电泳阻滞实验检测CS-pDNA纳米微球的形成情况,以及纳米微球抵抗DNA酶和壳聚糖酶的能力^[4,8]。保持质粒DNA(plasmid DNA,pDNA)浓度,将不同分子量的CS与pDNA之间的N/P值调为4、2、1、0.5和0.25,成球后在的经EB染色的0.8%琼脂糖凝胶上,80V电压下,缓冲液为TAE,电泳45 min。紫外凝胶成像仪观察并照相。另取N/P值为4的不同分子量的CS-pDNA微球各16 μ L,均与5 μ L浓度为10 μ g/ml的DNase I在37℃下反应30 min,加碘乙酸终止反应后,再加入10 mg/L壳聚糖酶和3 mg/L溶菌酶5 μ L,在37℃下反应12h,最后在经EB染色的0.8%琼脂糖凝胶上,80V电压,电泳45 min。紫外凝胶成像仪观察并照相。

1.2.4 壳聚糖-pDNA纳米微球粒径和包裹率的检测 Zetasizer纳米粒度分析仪测定微球粒径,连续测试3次,取平均值。将制

备好的微球置于高速离心机(4℃, 10000 转), 紫外分光光度计测定上清液中 pDNA 的含量。根据公式: 包裹率(%) = $(W_{\text{总}} - W_{\text{上清}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$ (其中 $W_{\text{总}}$ 为总的 pDNA 量, $W_{\text{上清}}$ 为上清液中的 pDNA 量), 计算纳米微球的 DNA 包裹率^[10]。

1.2.5 透射电子显微镜、扫描电子显微镜观察微球形态 10 μL 体积 CS-pDNA 纳米微球悬液滴于铜网支持膜上, 5min 后多余的液体用滤纸吸处, 待铜网晾干后, 样品置于 JEM-2100 超高分辨率透射电镜, 于 100KV 工作电压下观察并照相。10 μL 体积 CS-pDNA 纳米微球悬液滴于锡箔纸上, 待液体晾干后置于 JSM-6700 冷场发射扫描电子显微镜下观察并照相, 工作电压为 5KV。

1.2.6 兔关节软骨细胞体外分离和原代培养 将兔髌、膝关节软骨面切成 1 mm³ 大小后, 用 PBS 缓冲液冲洗至洁净并移入离心管内。加 5 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶消化 1h 后更换成 0.25% II 型胶原酶, 每隔 4h 收集一次上清液, 离心后 PBS 洗涤沉淀的细胞、接种入培养瓶。37℃、5% CO₂ 细胞培养箱内培养。

1.2.7 体外转染实验 培养瓶内的原代软骨细胞用胰酶消化后, 按 5×10^4 个细胞 / 孔接种入 24 孔板, 每孔添加 500 μL 含 10% 血清的 DMEM 培养液, 37℃、5% CO₂ 培养 24h 后软骨细胞生长达 50-70%, 更换培养液为含有 CS-pDNA 纳米微球的 DMEM, 总体积为 500 μL 。脂质体 2000 作为阳性对照, 细胞未接受转染的空白组为阴性对照, 每组设 3 个复孔。37℃、5%

CO₂ 培养 4h 后更换脂质体组的培养液, 6-8h 后更换其余实验组的培养液。

1.2.8 转染效果和效率的观察 转染完成后, 荧光显微镜下观察并照相。随后利用胰酶消化、制造细胞悬液, 利用流式细胞仪计数 10000 个细胞, 激发波长为 488 nm, 荧光发射波长为 525 nm, 通过荧光通道 1 (FL1), 并计数荧光细胞的百分比。

1.2.9 统计学分析 采用 SPSS18 统计软件包进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 壳聚糖 -pDNA 纳米微球的形成及其理化性质

通过复合凝聚法^[4], 制作出不同 N/P 比值的 CS-pDNA 纳米微球, 通过观察其理化性质, 凝胶阻滞电泳可以大致看出两种成分的结合情况。图 1、2 显示的是不同分子量的 CS 与 pDNA 在不同 N/P 时的成球情况, 可见: N/P 值为 4 及 4 以上时, 各分子量的壳聚糖可完全包裹质粒成球, 停留于点样孔内; N/P 值为 2 时, 分子量为 5K、50K、85K 仅部分包裹质粒, 部分质粒可跑出电泳条带, 其余分子量的 CS-pDNA 微球可完全包裹; N/P 值为 1 时, 各壳聚糖均仅部分包裹质粒, 均有质粒条带跑出; N/P 值为 0.25 时, 各壳聚糖均与质粒完全分离, 各点样孔内均不可见样品。

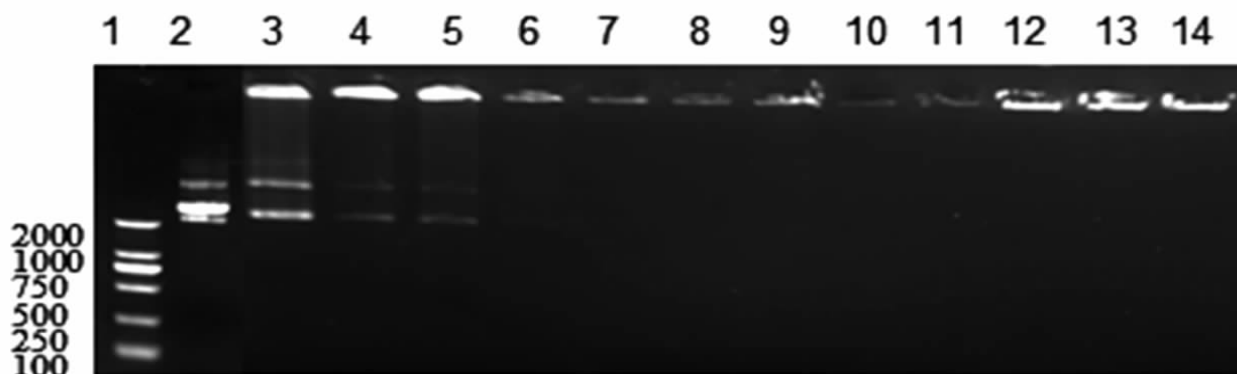


图 1 包裹率的观察。固定质粒含量, 调整壳聚糖溶液浓度。1 号孔为 DNA marker (DL2000, 各条带大小已标出, 单位 /bp), 2 号孔为裸质粒 C1, 3-8 号孔内为 N/P=2/1 时由小到大各分子量的纳米微球, 9-14 号孔内为 N/P=5/1 时由小到大各分子量的纳米微球

Fig. 1 the observation of the binding efficiency of the nanoparticles when the concentration of the plasmid was fixed while changing the concentration of the chitosan solution. The DNA marker was located in the first hole, the blank plasmid was located in the second hole, 3rd -8th represent the nanoparticles when the N/P ratio is 2/1, 9th -14th represent the nanoparticles when the N/P ratio is 5/1



图 2 1 号孔内为 DNA marker (DL2000, 各条带大小已标出, 单位 /bp), 2 号孔内为空白质粒 C1, 3-8 号孔内为 N/P=1/4 时由小到大各分子量的纳米微球, 9-14 号孔内为 N/P=1/2 时由小到大各分子量的纳米微球, 15-20 号孔内为 N/P=1/1 时由小到大各分子量的纳米微球

Fig. 2 The DNA marker was located in the first hole, the blank plasmid was located in the second hole, 3rd -8th represent the nanoparticles when N/P ratio is 1/4, 9th -14th represent the nanoparticles when N/P ratio is 1/2, 15th -20th represent the nanoparticles when N/P ratio is 1/1

经 Zetasizer 纳米力度分析仪测量,紫外分光光度计测量计算,各分子量 CS-pDNA 纳米微球在 N/P 值为 4 时的平均粒径及 pDNA 包裹率见表 1, 再次证实了电泳结果。为了检测 CS-pDNA 纳米微球是否能抵抗体内各种酶类的干扰, 顺利将 DNA 递送到细胞内, 我们设计了 DNA 酶 - 壳聚糖酶序贯消化法^[8], 即先用 DNA 酶消化样品、以期消化分解掉未被纳米微球

包裹的游离 DNA, 此时行凝胶电泳观察, 结果见图 3 左, 可见点样孔内的样品依然存在, 并未被消化; 再用壳聚糖酶消化, 使纳米微球内被包裹的 DNA 游离, 最后凝胶电泳分析, 结果见图 3 右。可见当 N/P=4 时, 所有分子量的 CS-pDNA 纳米微球均能有效包裹 DNA, 并保证其完整性。

表 1 各 CS-pDNA 纳米微球在 N/P 值为 4 时的平均粒径及 pDNA 包裹率

Table 1 the average diameters and binding efficiency of CS-pDNA nanoparticles with different molecular weights when N/P=4

Molecular Weight/dalton	5k	40k	85k	170k	250k	800k
Average Diameter/nm	654.4± 142.3	457.6± 57	430.4± 68.9	306± 158.4	254.4± 58.2	445.2± 86.5
Binding Efficiency/%	90.3± 2.4	92.5± 0.8	94.3± 1.2	95.2± 2.2	93.5± 1.7	95.8± 1.5

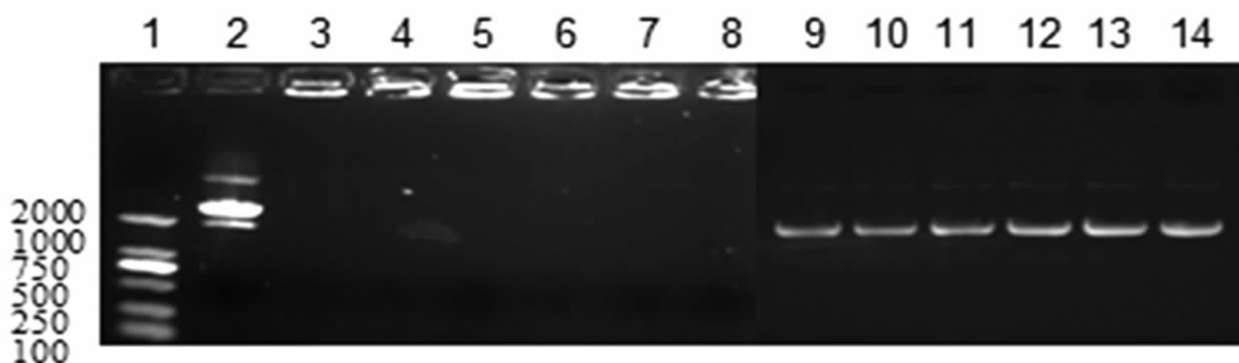


图 3 纳米微球保护 pDNA 的能力的观察。第 1 孔内为 DNAmarker(DL2000, 各条带大小已标出, 单位 /bp), 第 2 孔内为空白质粒 C1, 分子量 5k、40k、85k、170k、250k 和 800k 的 CS-pDNA 纳米微球接受 DNA 酶消化后的结果为 3-8 孔, 被 DNA 酶消化后再接受壳聚糖酶消化的结果为 9-14 孔

Fig. 3 the observation of the capability of the nanoparticles protecting the plasmid. The DNAmarker was located in the first hole, the blank plasmid was located in the second hole, the CS-pDNA nanoparticles with the molecular weights of 5k, 40k, 85k, 170k, 250k and 800k after digested by the DNase was located in 3rd - 8th hole one by one. After digested by the chitosanase, the CS-pDNA nanoparticles digested by the DNase with the same molecular weights was located in 9th - 14th hole one by one.

图 4 显示的是透射电子显微镜观察到的 CS-pDNA 纳米微球的形态, 可见粒径大小约为 400 nm 的球形微球。由于, 不同分子量、不同 N/P 比值的 CS-pDNA 纳米微球的形态类似, 故仅挑选其中一张分子量为 85K 的 CS-pDNA 纳米微球展示。图

5 显示的是扫描电子显微镜观察到的分子量为 800K 的 CS-pDNA 微球形态, 可见数个粒径在 200 到 500 nm 之间的微球散在分布。

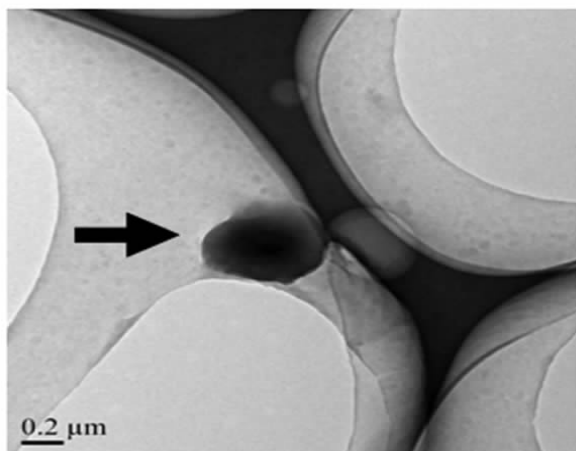


图 4 FEI QUANTA200 超高分辨率透射电镜, 箭头所指为壳聚糖纳米微球

Fig. 4 the image of the high resolution transmission electron microscope of FEI QUANTA200, and the CS-pDNA nanoparticle was pointed by the black arrow.

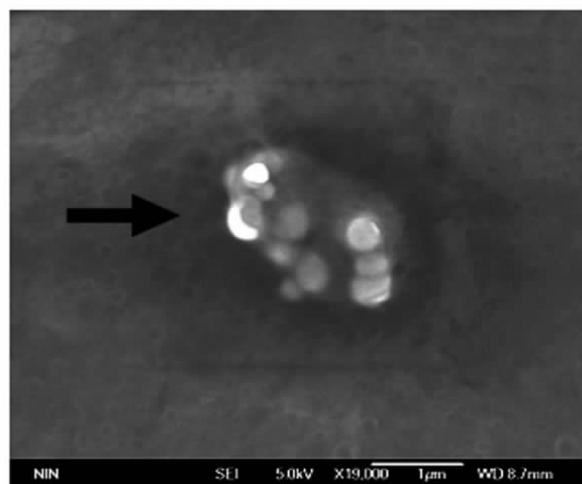


图 5 JSM-6700 冷场发射扫描电子显微镜, 箭头所指为壳聚糖纳米微球

Fig. 5 the image of scanning electron microscopy JSM-6700 with cold field emission, and the CS-pDNA nanoparticle was pointed by the black arrow

2.2 壳聚糖-pDNA 纳米微球转染原代兔关节软骨细胞

图 6 显示的是分子量为 800K 的 CS-pDNA 微球转染兔软骨细胞 48h 后的表达情况, pEGFP-C1 转染入细胞后表达出的绿色荧光蛋白清晰可见。本实验进行了 N/P 比值为 4 时, 转染试剂 pH 值为 7 和 6.5 时, 由 5K 到 800K 六个不同分子量的 CS-pDNA 纳米微球转染细胞的实验。图 7 显示了转染试剂 pH 值为 7 和 6.5 时, 流式细胞仪分析的转染结果, 可以看到, pH 值为 7 时, 5K、40K、85K 的 CS-pDNA 纳米微球的转染效率均大致相当, 在相对较低的水平, 其组间无统计学差异; 而 170K、250K 和 800K 的转染效率处在较高水平, 其中分子量最大的 800K 的 CS-pDNA 纳米微球的转染效率最高, 与 170K、250K 组有统计学差异 ($P < 0.05$), 170K、250K 组间无统计学差异; 另外, 800K 组与脂质体 2000 的转染效率相当, 两者间无统计学差异。pH 值为 6.5 时, 流式细胞仪分析的转染结果, 其趋势大致与 pH 值为 7 时的相当, 但各组的转染效率均有所下降, 且各组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

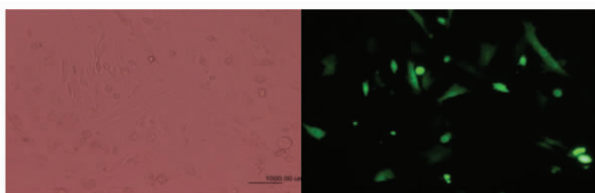


图 6 纳米微球转染后表达绿色荧光蛋白的软骨细胞, 24 孔板 (300×)

Fig. 6 The expression of EGFP of CS-pDNA nanoparticle transfected chondrocytes in 24-well plate (300×)

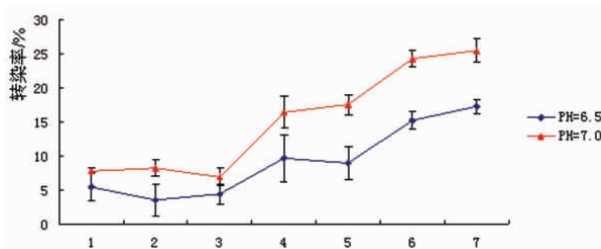


图 7 流式细胞仪分析的转染效率的对比, 1-6 分别代表由 5k 到 800k 六种分子量 CS-pDNA 纳米微球, 7 代表 LP2000

Fig. 7 the transfection efficiency of different CS-pDNA nanoparticles detected by flow cytometry, 1st -6th represent CS-pDNA nanoparticles with the molecular weights of 5k, 40k, 85k, 170k, 250k and 800k, 7th represent LP2000

3 讨论

影响转染效率的因素有多方面, 包括细胞类型、转染试剂的 pH 值、有无血清、壳聚糖分子量的大小、DNA 浓度等等^[9, 12-13]。Zhao X^[9]认为, 分子量为 800 的 CS-pDNA 纳米微球在 N/P 值 1.2 以上时, pDNA 即可完全被包裹在微球内, 他们制作出的微球大小范围在 150-300 nm 之间。Kiang T^[11]等人则研究了脱乙酰度对分子量为 390K 的 CS 与 pDNA 成球的影响, 发现脱乙酰度分别为 90%、70%和 62%的 CS 与 pDNA 完全成球时所需

的 N/P 比值分别为 3.3:1、5:1 和 9:1。我们的实验中 N/P 小于等于 1 时, 各分子量的纳米微球都出现较大幅度的分离, 得出的结论与 Zhao X 的有所出入。

虽然以往的研究表明血清有抑制脂质体转染的作用, 但此后的实验则说明血清对壳聚糖微球的转染有促进作用, 而含有 10%的血清可模拟人体内的生理环境, 促进微球转染^[3-4, 9, 14], 因此我们的实验中使用的 DMEM 培养基和转染试剂均含有 10%血清。

Zhao X^[9]在 pH=6.8 和 7.2, 用 800K 的 CS-pDNA 纳米微球达到了 50%的转染效率。而 Sato T^[14]则认为 pH=6.9 时的转染效率比 7.6 时高出许多。Nimesh S^[12]用 10K 的 CS-pDNA 纳米微球, 发现的转染新方法认为, 在微球转染细胞阶段将转染试剂定在 pH=6.5, 之后的表达阶段更换 pH=7.4 的培养液, 会得到最佳转染效果。他们认为 pH=6.5 时, CS-pDNA 纳米微球的表面正电荷最大, 与细胞之间的吸附力最强, 而 pH=7.4 时转染试剂的 pH 值更接近生理状态, 细胞毒性最小。本实验选择转染试剂的 pH 为 6.5 和 7.0 进行转染, 结果与 Zhao X 类似, pH=7.0 时的转染效率比 6.5 时高, 但与 Nimesh S 所说的转染试剂 pH 为 6.5 时可得较高的转染效率略有不同。

另一个影响转染效率的主要因素是壳聚糖的理化性质, 最主要的有两方面: 壳聚糖的相对分子量和脱乙酰度。Huang M^[8]研究了相对分子量为 10-213k、脱乙酰度 46-88%的 CS-pDNA 纳米微球对细胞转染的综合影响, 认为脱乙酰度 88%、分子量 213K 的 CS-pDNA 纳米微球的转染效率最高, 而同样分子量、脱乙酰度 46%所得出的转染效率最低。Sato T^[14]则认为 15K 和 52K 的 CS-pDNA 纳米微球的转染效率比 100K 的高出许多, 不过在他们的实验中, 不同细胞类型产生的转染结果也略有不同。Zhao X^[9]在比较了六种分子量的 CS-pDNA 纳米微球的转染效率后认为, 较之其他, 85K 和 800K 的可产生显著较高的转染效率。张淑芸^[15]比较了 5K、173K 和 425K 的壳聚糖微球的转染效率后, 认为 5K 的 CS-pDNA 纳米微球可获得高达 30%的转染效率, 明显高于其他。Ishii T^[10]则认为 40K 和 84K 的壳聚糖纳米微球具有较高的转染效率。Morris VB^[16]用 50K 的 CS-pDNA 纳米微球, 在 N/P 比值为 5、pH=6.5 时转染率较高。Lavertu M^[17]对壳聚糖的分子量和脱乙酰度进行综合考量, 研究了脱乙酰度为 98%、92%、80%和 72%、相对分子量为 150、80、40 和 10K、N/P=5 和 10、pH=6.5 和 7.1 时的共 64 种成球情况。发现当 pH=6.5 时, 分子量 10K、脱乙酰度 92%、N/P 比值为 5 和分子量 10K、脱乙酰度 80%、N/P 比值为 10 时, CS-pDNA 纳米微球均可获得与阳性对照最大转染效率相当的转染效率。本实验就是基于以往的实验结果来选择壳聚糖的相对分子量, 所得结果却与前人的出入很大, 在他人实验中得出较高转染效率的 40K 和 84K 的壳聚糖纳米微球在我们的实验中却表现欠佳, 只有 800K 的可产生显著高的转染效率, 并与脂质体相当。由 Huang M 的实验结果可知, 脱乙酰度选择在 90%显然最有利于转染。此外, 不同细胞对转染效率的影响也不容忽视, 以往只有 Zhao X^[9]和 Zhang X^[13]使用的是兔关节软骨细胞, 前者得出的转染效率高达 50%, 而后者则只有 10%, 本实验中最高的转染效率介于两者之间。

4 结论

由此可知,分子量范围在 5K 与 800K 之间的壳聚糖均能与质粒形成纳米微球,并可有效转染兔关节软骨细胞。与其他分子量的 CS-pDNA 纳米微球相比,N/P 比值为 4 时,相对分子量为 800K、脱乙酰度 90%的壳聚糖与质粒形成的纳米微球能较高效的转染原代培养的兔关节软骨细胞,转染效率与脂质体 2000 相当,达到了我们的实验目的,可以作为今后进一步体外、体内实验的首选转染载体。

参考文献(References)

- [1] Niemeyer P, Pestka JM, Kreuz PC, et al. Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint[J]. *Am J Sports Med*, 2008,36:2091-9
- [2] Wood JJ, Malek MA, Frassica FJ, et al. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006,88:503-7
- [3] Ishii T, Okahata Y, Sato T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001,1514:51-64
- [4] Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency [J]. *J Control Release*, 2001,70:399-421
- [5] Li XW, Lee DK, Chan AS, Alpar HO. Sustained expression in mammalian cells with DNA complexed with chitosan nanoparticles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003,1630:7-18
- [6] Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation[J]. *Pharm Res*, 2004,21:344-53
- [7] Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005,44:65-73
- [8] Huang M, Fong CW, Khor E, Lim LY. Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation[J]. *J Control Release*, 2005,106:391-406
- [9] Zhao X, Yu SB, Wu FL, Mao ZB, Yu CL. Transfection of primary chondrocytes using chitosan-pEGFP nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2006,112:223-8
- [10] 杨晓容, 宗莉, 袁喜英. 壳聚糖纳米粒作为基因载体的研究:粒径对转染效率的影响[J]. *药学报*, 2007,774-9
Yang Xiao-rong, Zong Li, Yuan Xi-ying. Chitosan nanoparticles as gene vector: effect of particle size on transfection efficiency [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica* 2007,42(7):774-779 (In Chinese)
- [11] Kiang T, Wen J, Lim HW, Leong KW. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection [J]. *Biomaterials*, 2004,25:5293-301
- [12] Nimesh S, Thibault MM, Lavertu M, Buschmann MD. Enhanced Gene Delivery Mediated by Low Molecular Weight Chitosan/DNA Complexes: Effect of pH and Serum [J]. *Mol Biotechnol*, 2010,46(2): 182-96
- [13] Zhang X, Yu C, Xushi, Zhang C, Tang T, Dai K. Direct chitosan-mediated gene delivery to the rabbit knee joints in vitro and in vivo[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006,341:202-8
- [14] Sato T, Ishii T, Okahata Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency[J]. *Biomaterials*, 2001,22:2075-80
- [15] 张淑芸, 袁喜英, 杨晓容, 宗莉. 壳聚糖纳米粒作为基因载体的研究:影响转染效率的因素[J]. *中国新药杂志*, 2008,1507-11
Zhang Shu-yun, Yuan Xi-ying, Yang Xiao-rong, Zong Li. Chitosan nanoparticles as gene vector: factors affecting in vitro transfection efficiency [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2008, 17 (17),1507-11(In Chinese)
- [16] Morris VB, Neethu S, Abraham TE, Pillai CK, Sharma CP. Studies on the condensation of depolymerized chitosans with DNA for preparing chitosan-DNA nanoparticles for gene delivery applications [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009,89B:282-92
- [17] Lavertu M, Methot S, Tran-Khanh N, Buschmann MD. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation[J]. *Biomaterials*, 2006,27:4815-24