

A549 细胞对壳寡糖及其纳米粒的摄取作用

万丽卿, 胡富强*, 袁弘

(浙江大学药学院, 浙江杭州 310031)

摘要: 目的 研究壳寡糖及其纳米粒的 A549 肺上皮细胞摄取作用, 探讨壳寡糖纳米粒作为药物载体的可能性。方法 溶剂扩散法制备壳寡糖纳米粒, 以 A549 肺上皮细胞评价壳寡糖及其纳米粒的细胞毒性, 由荧光倒置显微镜、流式细胞仪研究 A549 细胞对壳寡糖及其纳米粒的摄取作用。结果 壳寡糖及其纳米粒的细胞毒性均较低, IC_{50} 分别为 944.36 和 643.16 $mg \cdot L^{-1}$ 。壳寡糖及其纳米粒的细胞摄取作用与其浓度及细胞孵育时间相关; 在同一孵育时间壳寡糖纳米粒的摄取量比等浓度的壳寡糖增加 0.49 ~ 13.9 倍。结论 壳寡糖及其纳米粒的细胞毒性较低。壳寡糖形成纳米粒后, 可显著增加 A549 细胞的摄取作用。

关键词: 壳寡糖; 纳米粒; A549 细胞; 细胞毒性; 细胞摄取

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2004)03 - 0227 - 05

Study of the uptake of chitosan oligosaccharide nanoparticles by A549 cells

WAN Li-qing, HU Fu-qiang*, YUAN Hong

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: **Aim** To study the cellular uptake of chitosan oligosaccharide nanoparticles by A549 cells and evaluate the possibility of chitosan oligosaccharide nanoparticles used as a potential drug carrier. **Methods** Chitosan oligosaccharide (CSO) was obtained by ultrafiltration separation after regulation of the condition of chitosanase degradation. The molecular weight of CSO was determined by gel permeation chromatography (GPC). Chitosan oligosaccharide nanoparticles (CSO NPs) were prepared by a novel solvent diffusion method in an oil system after the carrier material grafted fluorescein isothiocyanate (FITC) and the particle size distribution and zeta potential were determined by light scattering and electrophoretic mobility. The cytotoxicity and uptake of FITC-labeled CSO NPs in A549 cells following various incubation periods were studied by the MTT method and fluorescence microscopy, flow cytometric analysis, respectively. **Results** The molecular weight (M_w) of CSO was 18 678 u and the particles sizes of CSO NPs were 133.3 nm (number average) and 368.2 nm (volume average), respectively. The IC_{50} of CSO and CSO NPs were 944.36 and 643.16 $mg \cdot L^{-1}$, respectively, and the result showed low cytotoxicity. Cellular uptake of CSO and CSO NPs were relative to the concentration and the incubation time. Internalization of CSO NPs increased 0.49 - 13.9 times more than that of the CSO with the same incubation time. **Conclusion** CSO and CSO NPs have low cytotoxicity. CSO NPs can significantly improved the uptake of CSO NPs by A549 cells compared to the same molecular weight of CSO.

Key words: chitosan oligosaccharide; nanoparticles; A549 cell; cytotoxicity; cellular uptake

具有良好生物相容性、低毒性和可生物降解^[1]的壳聚糖, 目前已应用于药物的缓释或控释^[2]、促进难溶性药物吸收^[3], 以及携带质粒 DNA 的基因治疗

研究^[4]。但常用的壳聚糖分子量大、粘度高, 无法在生理 pH 条件下溶解^[5]; 消化道内水解 β 糖苷降解的壳聚糖酶^[6]的缺乏, 也导致作为药物载体组成部分的壳聚糖分子在人体消化道吸收的困难。因此, 研究壳寡糖(chitosan oligosaccharide, CSO)作为药物载体材料具有重要意义。

收稿日期: 2003-05-09.

* 通讯作者 Tel: 86 - 571 - 87217327,

E-mail: pharmnet@cps.zju.edu.cn

受体生物酶或细胞物理屏障影响,大分子药物很难被吸收。通过荷正电的壳聚糖连接荷负电的生物大分子形成壳聚糖纳米粒技术,人们已开始了相关基因、疫苗和抗肿瘤药物给药系统的研究^[1]。纳米粒载体参与药物的吸收过程,导致了纳米粒空间结构、载体材料理化性质等因素对细胞摄取机理与程度的直接影响。很少有揭示壳聚糖纳米粒上皮细胞转运机理的定量研究报道。

以大分子药物荧光标记为代表的荧光标记技术,可简单快速地进行细胞摄取的定量研究。但这种技术不能系统阐述给药载体本身的细胞转运过程。采用物理包裹荧光物质的方法,存在转运过程中荧光物质的丢失问题,导致研究结果的定量困难^[7]。选用载体材料的直接荧光偶联方法可以解决这些问题。

本研究拟采用生理 pH 环境可溶的壳寡糖,偶联异硫氰基荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC), 用溶剂扩散法制备壳寡糖纳米粒,以 A549 肺上皮细胞为模型细胞,定量研究壳寡糖及其纳米粒的细胞转运机理,探讨壳寡糖载体材料及其纳米粒的潜在价值。

材料和方法

1 实验材料和仪器

壳聚糖(浙江玉环海洋生物化学有限公司,平均分子量 45 万);壳聚糖酶(Chemical Industries LTD, Japan);异硫氰基荧光素(Acros Organics, USA);RPMI Medium 1640,胰蛋白酶(Gibco, BRL Life Technology, Grand Island, NY, USA);HEPES, MTT(上海生工生物工程技术有限公司);超级新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);司盘 85(中国医药集团上海化学试剂公司);其他试剂均为分析纯。

超滤器(Labscale TFF system, Millipore, USA);凝胶色谱测定仪(Agilent 1100 Series, Hewlett-Packard, USA);粒度及表面电位分析仪(Zetasizer 3000HS, Malvern, UK);酶联检测仪(DG-3022A, 国营华东电子管厂);荧光倒置显微镜(DML, Leica Microsystems Ltd, Germany);流式细胞仪(BD LSR, BD Ltd, USA)。

2 实验方法

2.1 壳聚糖酶水解与分子量测定

壳聚糖酶水解 壳聚糖 6 g 加至 1.25% (v/v) 盐酸溶液 200 mL 中,55 ~ 60 °C 水浴条件下搅拌溶解。按壳聚糖酶:壳聚糖 0.5:100 (w/w) 比例加入壳聚糖酶,50 °C 水浴酶解,控制反应时间。酶解溶液以

1 788.8 × g 离心 10 min,上清液过 0.45 μm 滤膜预处理。滤液分别以 3 万和 1 万截留分子量超滤膜(Millipore Pellicon XL Biomax 30K and Millipore Pellicon XL Biomax 10K, Millipore, USA)超滤分级,取 2 个分子量之间的超滤液,冷冻干燥,得壳寡糖。

分子量测定 凝胶渗透色谱条件 检测器:示差检测器(GI 362A, Agilent, USA);色谱柱:TSK-gel G3000SW(7.5 mm ID × 30 cm, Agilent, USA);流动相:0.1 mol·L⁻¹ 醋酸钠(用 1% 醋酸调 pH 至 6.0);柱温:25 °C;检测器温度:35 °C;进样量:10 μL;流速:0.8 mL·min⁻¹。

测定法 取分子量分别为 5.9 × 10³, 1.18 × 10⁴, 2.28 × 10⁴, 4.73 × 10⁴, 1.12 × 10⁵ 和 2.12 × 10⁵ u 的葡聚糖标样(SAC-10, Part Number: 2090-0100, Polymer Laboratories Ltd, USA),加双蒸水溶解,控制终质量浓度为 0.5 g·L⁻¹,进样后得标样的洗脱曲线。CSO 加流动相溶解,使终质量浓度为 1.0 g·L⁻¹,进样测定。按标样的洗脱曲线,计算 CSO 分子量。

2.2 壳寡糖与异硫氰基荧光素的偶联

取异硫氰基荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC) 9.6 mg 和 CSO 0.64 g,分别溶于 50% 乙醇溶液 16 与 20 mL。在冰浴、避光与磁力搅拌(400 r·min⁻¹)下,将 CSO 溶液滴加到 FITC 溶液中,同条件下反应 24 h。加入无水乙醇 50 mL。混悬液以 1 788.8 × g 离心 20 min,沉淀用无水乙醇洗涤 2 次,每次 10 mL,得 CSO 的 FITC 标记物(FITC labeled chitosan oligosaccharides, FITC-CSO),干燥器中保存备用。

2.3 纳米粒的制备与理化性质测定

2.3.1 纳米粒的制备 将 FITC-CSO 80 mg,溶于 1% 醋酸溶液 8 mL。于 45 °C 水浴及磁力搅拌(400 r·min⁻¹)下,将 FITC-CSO 溶液滴加至含乙醇 20 mL 和司盘 85 80 mL 的溶液中。在 45 °C 及磁力搅拌下,抽真空除去水分,反应液在 4 °C 以 35 329 × g 离心 30 min,石油醚洗涤沉淀 2 次(每次 10 mL),除去残留的司盘 85。继续加入 10 mL 双蒸水分散,在冰浴条件下,超声处理 90 次,得 FITC-CSO 纳米粒(CSO nanoparticles, CSO NPs)混悬液,4 °C 保存备用。

2.3.2 纳米粒的理化性质测定 纳米粒混悬液加双蒸水稀释 20 倍,用粒度及表面电位分析仪测定粒径及 Zeta 电位。

2.4 细胞毒性与细胞摄取研究

2.4.1 细胞培养 取人 II 型肺上皮细胞 A549(购

自中科院上海细胞所), 在含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中连续培养 (5% CO₂, 37 °C 孵箱)。取对数生长期细胞, 胰酶消化后用 RPMI 1640 稀释, 按每孔 1 × 10⁵ 个细胞的密度接种 24 孔培养板 (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA), 孵箱内预培养 24 h。

2.4.2 细胞毒性测定 试验采用四唑盐比色法 (MTT Assay)。于 24 孔培养板中的细胞贴壁生长后, 分别加入不同浓度的 FITC-CSO 溶液及其纳米粒混悬液 (终质量浓度分别为 8, 16, 32, 64, 128, 256 和 512 mg·L⁻¹), 并设对照孔, 每组重复 3 次, 孵育 48 h, 每孔加入 MTT 60 μL, 孵育 4 h, 弃去上清液, PBS 溶液冲洗 2 次, 每孔加入 DMSO 500 μL, 终止反应, 将培养板水平振荡 10 min, 用酶联检测仪在 570 nm 处测定吸光度, 按(1)式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = A_{570(\text{样品})} / A_{570(\text{对照})} \times 100\% \quad (1)$$

其中 A_{570(样品)} 为加入载体后细胞的吸光度, A_{570(对照)} 为空白对照细胞的吸光度。

2.4.3 荧光倒置显微镜观察 24 孔培养板中的细胞贴壁生长后, 分别加入 FITC-CSO 溶液及其纳米粒混悬液 (终浓度分别为 32, 64 和 128 mg·L⁻¹), 于孵育 0.5, 1, 4, 12 和 24 h 后, 用 PBS 冲洗细胞 3 次, 荧光倒置显微镜观察并拍照。

2.4.4 流式细胞仪测定 取 2.4.3 部分得到的细胞, 经胰酶消化, 收集细胞, 流式细胞仪测定。

结果

1 壳聚糖分子量

用凝胶渗透色谱法可以测得数均分子量 (M_n)、重均分子量 (M_w) 和 Z 均分子量 (M_z)。实际测得的 CSO 分子量结果见表 1, 该分子量的 CSO 能够溶解于生理 pH 值的 PBS 溶液中。

Table 1 Determination results of chitosan oligosaccharide molecular weights (u)

	M _n	M _w	M _z
	9 950.8	18 678	26 427

Table 2 Particles size and zeta potential of chitosan oligosaccharide nanoparticles (CSO-NPs)

Area	Particles size / nm							Zeta potential / mV
	Number average / nm			Volume average / nm				
	Mean	Width	Average/nm	Area	Mean	Width	Average/nm	
93.7 %	114.0	60.7	133.3	24.1 %	142.6	79.0	368.2	54 ± 3
6.3 %	420.3	100.7		75.9 %	439.8	132.9		

2 壳寡糖与异硫氰基荧光素的偶联

壳寡糖主链上的部分氨基与 FITC 的异硫氰基加成反应, 形成偶联物 FITC-CSO, 结构式见图 1。

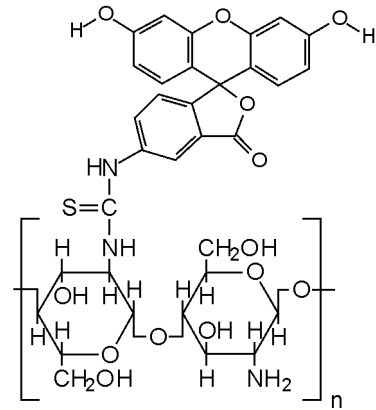


Figure 1 Chemical structure of FITC-CSO

3 纳米粒粒径与表面电位

制得的纳米粒结构示意图见图 2。用粒度及表面电位分析仪测得壳寡糖纳米粒粒径分布见表 2。将两个粒径分布区域的数量平均值和体积平均值分别计算, 得到粒径的数量平均值 133.3 nm, 粒径的体积平均值 368.2 nm, zeta 电位 53.9 mV。测定结果表明, 壳寡糖纳米粒混悬液荷正电, 电位大于 30 mV, 体系相对稳定。

4 细胞毒性

MTT 试验测得的细胞活力显示, 随着 FITC-CSO 及其纳米粒浓度的增加, A549 细胞存活率降低, 浓度为 512 mg·L⁻¹ 时细胞的存活率分别为 (55.3 ± 2.2) % 和 (48.9 ± 1.8) %。采用直线回归法推算壳寡糖及其纳米粒混悬液的 IC₅₀ 分别为 (944 ± 129) 和 (643 ± 77) mg·L⁻¹。

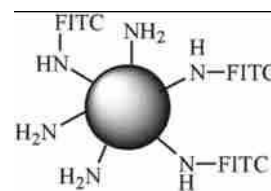


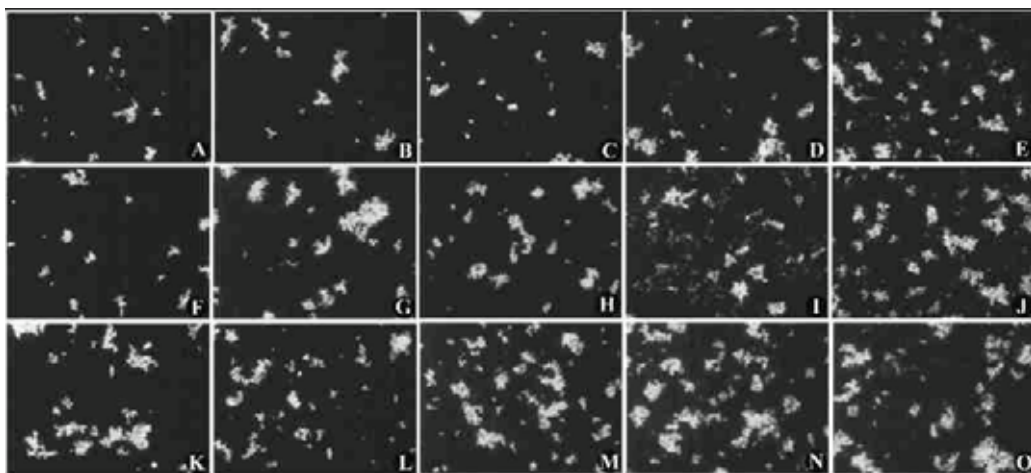
Figure 2 Schematic illustration of FITC-CSO nanoparticle

5 荧光倒置显微镜观察细胞摄取实验

荧光倒置显微镜观察结果显示, FITC-CSO 作用于 A549 细胞后的荧光强度较弱, 未能在荧光倒置显微镜下明显显示, 而相同分子量壳寡糖构成的纳米粒与 A549 细胞作用后显示出较强的荧光(图 3)。低浓度($32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 FITC-CSO 纳米粒, 在与 A549 细胞共同孵育 0.5, 1 和 4 h 时, 已经显示出明显的点状荧光聚集(图 3A, B, C); 当孵育时间增加到 12 和 24 h, 荧光强度进一步增加, 并开始出现片状荧光聚集(图 3D, E)。中等浓度($64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 FITC-CSO 纳米粒, 在与 A549 细胞共同孵育 0.5 h 后即呈现明显的点状荧光聚集(图 3F), 随着孵育时间增

加(1, 4, 12 和 24 h), 荧光聚集由点状转变为片状(图 3G, H, I, J)。高浓度($128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 FITC-CSO 纳米粒, 在与 A549 细胞共同孵育后, 其荧光强度呈现更高的大片状荧光聚集(图 3K, L, M, N, O), 并与孵育时间明显正相关。

由荧光倒置显微镜结果, 可获取壳寡糖纳米粒被 A549 细胞摄取的明确信息。壳寡糖纳米粒经细胞摄取后的荧光强度, 与孵育时间和纳米粒浓度存在比较典型的依赖性; 而相同分子量的壳寡糖分子, 在荧光倒置显微镜下未能观察到明显的细胞摄取作用。



A: $32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.5 h; B: $32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 1 h; C: $32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 4 h; D: $32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 12 h; E: $32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h; F: $64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.5 h; G: $64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 1 h; H: $64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 4 h; I: $64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 12 h; J: $64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h; K: $128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.5 h; L: $128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 1 h; M: $128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 4 h; N: $128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 12 h; O: $128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h

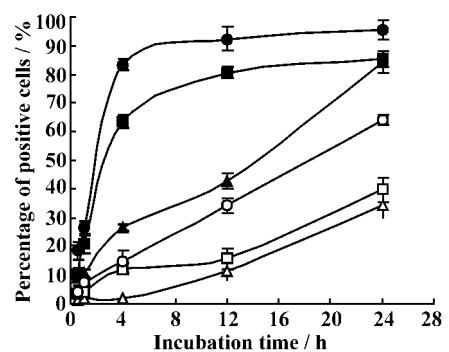
Figure 3 Fluorescent staining of cellular uptake of CSO NPs after incubation with A549 cell with different time

6 流式细胞仪分析细胞摄取实验

流式细胞仪的测定结果与荧光倒置显微镜结果基本一致(图 4), 由于检测灵敏度提高, 得到了 FITC-CSO 分子与 A549 细胞相互作用后的细胞阳性率数据。

不同浓度的 FITC-CSO 溶液 ($32, 64$ 和 $128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (图 4), 短时间共同孵育 ($\leq 4 \text{ h}$) 的细胞阳性率比较低 ($< 15\%$); 当孵育时间延长到 12 h 和 24 h 时, 阳性细胞百分数有显著的增加, 且浓度呈现明显的时间依赖性, 其中高浓度 FITC-CSO ($128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 孵育 24 h 后的阳性细胞百分数接近 65%, 证实这种分子量的壳寡糖分子可以被 A549 细胞摄取。

壳寡糖纳米粒也呈现相同的变化趋势(图 4)。有报道^[8]认为聚阳离子纳米粒主要通过纳米粒表面的正电荷与细胞表面带负电荷的蛋白多糖非特异性静电结合被吞噬进入细胞, 这种内吞作用取决于纳

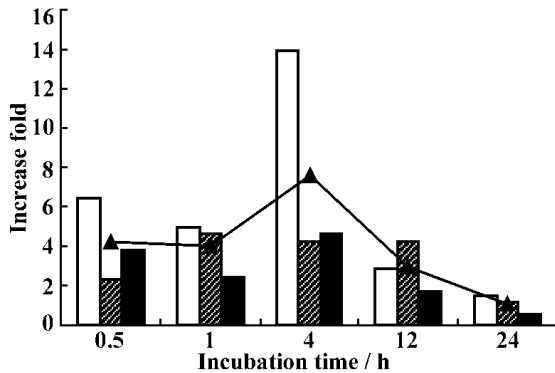


△—△ FITC-CSO ($32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); □—□ FITC-CSO ($64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); ○—○ FITC-CSO ($128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); ▲—▲ CSO NPs ($32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); ■—■ CSO NPs ($64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); ●—● CSO NPs ($128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

Figure 4 Time courses of positive cells after incubated with FITC-CSO and FITC-CSO nanoparticles at various dosing concentration (32 to $128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) by A549 cells ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

米粒表面正电荷的总数量和细胞膜上带负电荷的蛋白多糖的密度。当壳寡糖纳米粒浓度较低时,细胞摄取的数量与纳米粒的浓度亦即正电荷的数量成正比;随着壳寡糖纳米粒浓度的增加,当其正电荷数量接近于细胞表面负电荷数量时,细胞的摄取数量快速增加,然后趋于平缓呈饱和状态。

在各个不同的细胞孵育时间点,纳米粒的阳性细胞百分率明显高于相同浓度的 FITC-CSO 溶液(图 5)。其中以低浓度($32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)增加比例最为显著,最大值为增加 13.9 倍;在各个时间观察点的结果比较中,以 4 h 时增加的平均倍数最高(7.61 倍)。



□ $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ▨ $64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ■ $128 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ▲ —▲ mean

Figure 5 The increased multiple of FITC-CSO nanoparticles compared with FITC-CSO on the percentage of positive cells after incubated different time

结果

本文采用生物酶解技术,得到了在生理 pH 环境下可以溶解的壳寡糖,发现其细胞毒性明显低于分子量较大的壳聚糖^[9]。A549 细胞的摄取研究表明,壳寡糖分子可以被细胞所摄取;由壳寡糖分子组成的纳米粒,其细胞摄取作用明显高于等浓度的壳

寡糖分子,并存在明显的浓度和时间的依赖性,揭示壳寡糖纳米粒作为生物大分子药物载体的潜在功能。

References :

- [1] Illum L, Jabbal GI, Hinchcliffe M, *et al.* Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **51**(1-3):81-96.
- [2] Chen F, Tan J, Yang XJ. Applications of chitosan and its derivatives [J]. *J Southwest University for Nationalities • Natural Science Edition*, 2002, **28**(1):40-44.
- [3] Schipper NGM, Varum KM, Stenberg P, *et al.* Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 3: Influence of mucus on absorption enhancement [J]. *Eur J Pharm Sci*, 1999, **8**(4):335-343.
- [4] Liu WG, Yao KD. Chitosan and its derivatives — a promising non-viral vector for gene transfection [J]. *J Controlled Release*, 2002, **83**(1):1-11.
- [5] Kristoffer T, Magnus KH, Kjell MV, *et al.* Preparation and characterization of chitosans with oligosaccharide branches [J]. *Carbohydrate Res*, 2002, **337**(24):2455-2462.
- [6] Weiner M. An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients [A]. Brine CJ, Sandford PA, Xikakis JP. *Advanced Chitin and Chitosan* [M]. London: Elsevier Applied Science, 1992.663-672.
- [7] Suh K, Jeong B, Liu F, *et al.* Cellular uptake study of biodegradable nanoparticles in muscular smooth cells [J]. *Pharm Res*, 1998, **15**(9):1495-1498.
- [8] Kircheis R, Wightman L, Wagner E. Design and gene delivery activity of modified polythelenimines [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **53**(3):341-358.
- [9] Begona CG, Ruth D. Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres [J]. *Int J Pharm*, 1997, **148**(2):231-240.