

复合转化生长因子- $\beta 1$ 的磺化壳聚糖/聚赖氨酸纳米粒子的制备及其体外诱导干细胞分化性能*

李菲菲 王秋雯 马列** 高长有

(教育部高分子合成与功能构造重点实验室 浙江大学高分子科学与工程学系 杭州 310027)

摘要 采用共沉淀法制备了复合转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 的磺化壳聚糖/聚赖氨酸纳米粒子 (SCS/PLL/TGF- $\beta 1$), 研究了磺化壳聚糖的浓度对纳米粒子粒径和表面电位的影响. 所得纳米微粒的粒径在 240 ~ 290 nm、表面电位在 -0.4 ~ -1.3 mV 之间可调. 采用透射电子显微镜表征了磺化壳聚糖/聚赖氨酸 (SCS/PLL) 和 SCS/PLL/TGF- $\beta 1$ 纳米粒子的形貌. 通过体外骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 培养实验, 分别考察了 SCS/PLL/TGF- $\beta 1$ 纳米粒子对 BMSCs 的增殖、氨基葡聚糖 (GAGs) 分泌和 II 型胶原基因表达的影响. 结果显示, 相对于等量的 SCS/PLL 或同浓度的自由 TGF- $\beta 1$, SCS/PLL/TGF- $\beta 1$ 纳米粒子可有效保护 TGF- $\beta 1$ 的活性, 促进 BMSCs 向软骨细胞分化, 可望应用于软骨修复材料等领域的研究.

关键词 磺化壳聚糖, 转化生长因子- $\beta 1$, 纳米粒子, 骨髓间充质干细胞, 分化

软骨组织不含血管和淋巴管, 损伤后几乎不能自发修复, 在生理负荷下容易发生退行性病变, 严重时最终发展成骨性关节炎^[1]. 围绕软骨修复难题, 基于组织工程与再生医学原理的软骨修复材料获得了广泛的发展^[2-6]. 其中, 骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 因其多分化潜能, 可诱导分化为软骨细胞, 被广泛应用于软骨修复研究^[7].

BMSCs 在软骨修复中应用的关键是如何有效调控其向软骨细胞分化. 调控 BMSCs 分化的因素很多, 包括生物活性因子^[8-10]、基因^[11]、材料表面拓扑形貌及模量^[12]等. 其中, 生物活性因子是生物体细胞间通讯的重要信号分子, 可有效调控细胞的增殖、迁移、分化及功能表达等诸多行为, 在组织的再生与修复过程中具有重要的作用^[13, 14]. 转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 是由 2 个结构相同或相近、分子量为 12.5×10^3 的亚单位通过二硫键连接的双体, 具有调节细胞生长、分化和免疫功能的作用. TGF- $\beta 1$ 通过与 BMSCs 膜表面的 I 型和 II 型跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体复合物相结合, 导致 Smads 通路和有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 通路被激活, 只需 ng/mL 级浓

度即可有效诱导 BMSCs 向软骨细胞分化^[15-17], 在软骨修复、关节炎治疗及免疫抑制治疗等方面应用广泛.

但是, TGF- $\beta 1$ 价格昂贵, 而且在溶液中的活性半衰期短, 容易受环境温度、pH 值以及酶的影响而失活. 因此, 如何有效保护 TGF- $\beta 1$ 的活性成为制约其应用的关键. 为了提高 TGF- $\beta 1$ 等因子的活性, 目前已发展了共价接枝^[18, 19]、肝素化^[20]和微载体等方法^[21-23]. 近年来, 基于肝素对生物活性因子的特异性保护作用, 通过对肝素分子组成和结构的模拟, 一类经磺化改性的生物大分子如磺化壳聚糖被广泛应用于生物活性因子的保护^[24-26]. 研究表明, 通过磺化壳聚糖上带负电的磺酸基团和生物活性因子上的带正电的赖氨酸残基或精氨酸残基间的相互作用, 可以有效保持生物活性因子的构象, 延长其活性^[27, 28]. 我们的前期研究发现, 在磺化壳聚糖的保护作用下, 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的活性得到良好保持, 可有效促进成纤维细胞的增殖, 其活性保护能力可达肝素的 70% 左右^[26]. Liu^[27] 等的研究表明 2, 6-O-磺化壳聚糖可以有效地保护骨形成蛋白

* 2012-12-24 收稿, 2013-02-25 修稿; 国家自然科学基金 (基金号 20934003, 51120135001)、国家重点基础研究发展规划项目 (973 计划, 项目号 2011CB606203) 和浙江省科技计划 (项目号 2009C14003) 资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: liema@zju.edu.cn

(BMP)的活性,促进干细胞向骨细胞分化。

本研究针对软骨修复过程中 BMSCs 定性诱导分化难题,围绕诱导分化所用 TGF- β 1 的活性保护问题,采用共沉淀法制备了复合 TGF- β 1 的磺化壳聚糖/聚赖氨酸纳米粒子 (SCS/PLL/TGF- β 1),研究了磺化壳聚糖浓度等制备参数对纳米粒子的粒径和表面电位的影响。通过表征 BMSCs 的增殖、氨基葡聚糖 (GAGs) 分泌和 II 型胶原基因表达等性能,系统评价了 SCS/PLL/TGF- β 1 纳米粒子诱导 BMSCs 向软骨细胞分化的能力。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

壳聚糖 (M_n 为 250×10^3 , 脱乙酰度 95%) 购于青岛海得贝公司。聚赖氨酸 (PLL, M_n 为 $30 \times 10^3 \sim 70 \times 10^3$) 购于 Sigma 公司。重组人转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 购于 Pepro Tech 公司。氯磺酸、二氯乙酸和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 等均为国药集团产品。

3,6-*O*-磺化壳聚糖 (SCS) 的制备方法如下^[29]:称取 1.5 g 壳聚糖加入到 60 mL 的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,再加入 2 mL 二氯乙酸,搅拌过夜,得到壳聚糖悬浮溶液。冰水浴条件下,将 5 mL 氯磺酸加入到 20 mL DMF 中制备磺化试剂。将磺化试剂缓慢加入到壳聚糖悬浮溶液中,60 °C 反应 1.5 h,分别用无水乙醇和水洗涤,经透析和冷冻干燥制得 SCS。

1.2 复合转化生长因子- β 1 的磺化壳聚糖/聚赖氨酸纳米粒子的制备与表征

通过共沉淀法制备复合 TGF- β 1 的磺化壳聚糖/聚赖氨酸纳米粒子 (SCS/PLL/TGF- β 1)。具体制备过程如下:将 20 μ L 1 μ g/mL 的 TGF- β 1 溶液 (采用 0.1% 牛血清白蛋白/PBS 溶液配置) 和 100 μ L 0.1% 的 PLL 水溶液混合均匀后,取一定量加入到等体积的不同浓度的 SCS 水溶液中,涡旋震荡 30 s,室温静置 30 min,得到 SCS/PLL/TGF- β 1。采用未添加 TGF- β 1 的 PLL 水溶液,经相同制备过程,可制备未复合 TGF- β 1 的磺化壳聚糖/聚赖氨酸纳米粒子 (SCS/PLL)。

采用粒径分析仪 (Brookhaven, USA) 和 zeta 电势分析仪 (DelsaTM, Beckman Coulter, USA) 分别测定 SCS/PLL/TGF- β 1 的粒径和表面电位;采用透射电子显微镜 (TEM, JEOL JEM-1200EX) 观察 SCS/PLL 和 SCS/PLL/TGF- β 1 的形貌。

1.3 骨髓间充质干细胞的培养

实验所用 BMSCs 由新西兰兔骨髓中分离获得,具体的分离步骤如下^[30]:抽取一定量的兔骨髓,用 DMEM 培养基稀释后于 2000 r/min 离心 2 次,每次 20 min,去除上清液。将离心后得到的细胞种植于 9 cm 培养皿,加入一定量的完全培养液 (DMEM + 10% 胎牛血清 + 100 U/mL 青霉素 + 100 μ g/mL 链霉素),于 37 °C,5% CO₂ 的培养箱中培养,一周后换液;然后每隔 3~4 天换液,细胞融合程度达 80%~90% 时传代,采用第 2 代细胞用于后续研究。

1.4 细胞数目检测

将 BMSCs 以 3000 细胞/孔的密度种入 12 孔培养板,培养 24 h 待细胞贴壁后,吸去培养液,加入 1.5 mL 新鲜培养液。以空白作为对照,分别加入 55 μ L 3% 的 SCS/PLL 和 SCS/PLL/TGF- β 1 溶液 (若纳米粒子中 TGF- β 1 完全释放,其最终浓度为 3 ng/mL),以及 3 ng/mL 自由的 TGF- β 1 溶液,每周换液 2 次,分别在培养 1,3,7 和 14 天时收集细胞,并置于 -80 °C 保存。待样品收集完全,消化细胞,采用 DNA 试剂盒 (Molecular Probes, USA) 检测细胞数目。

1.5 氨基葡聚糖 (GAGs) 分泌检测

BMSCs 的种植和培养方法如 1.4 节所述,分别在 7 天和 14 天收集细胞,并置于 -80 °C 保存。待样品收集完全,采用二甲基亚甲基蓝 (DMMB) 比色法定量检测细胞氨基葡聚糖 (GAGs) 含量^[8],以硫酸软骨素为标准样品。

1.6 II 型胶原基因表达测定

BMSCs 的种植和培养方法如 1.4 节所述,培养 14 天时收集细胞。II 型胶原基因表达量的详细测试方法如文献所述^[30]。采用总 RNA 提取试剂盒提取,并经 PCR 基因扩增仪 (Bio-Rad) 扩增获得 1 μ g 的 RNA 样品,采用 iQTM5 多重实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, USA) 检测 II 型胶原基因的表达。表 1 为引物序列,以 GAPDH 为内标。

Table 1 PCR primers and product sizes

Gene	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
Collagen type II	Forward: GACTGCCTGAGCCCCGAGAT	95
	Reverse: CTGCCCTTTGTCTCTGGTTTC	
GAPDH (Rabbit)	Forward: GACGGACCAGAGCGAAAGC	119
	Reverse: CGCCAGTCGGCATCGTTTATG	

2 结果与讨论

2.1 纳米粒子的表征

2.1.1 粒径和表面电位

表 2 为磺化壳聚糖的浓度对 SCS/PLL/TGF- β 1 粒径和表面电位的影响. 当磺化壳聚糖的浓度为 0.3% 时, SCS/PLL/TGF- β 1 的粒径约为 240 nm. 随着磺化壳聚糖浓度的提高, 纳米粒子的粒径逐渐增大, 但粒径随浓度增大的程度并不显著. 当磺化壳聚糖浓度提高 10 倍, 即达到 3% 时, 所制备粒子的粒径增大为 290 nm. 纳米粒子的表面电位则呈现相反的变化规律, 即随着磺化壳聚糖浓度的增加, 表面电位逐渐变小. 一般认为, 共沉淀法制备的聚电解质纳米粒子的粒径和表面电位与体系中正负电荷比密切相关. 当磺化壳聚糖浓度为 0.3% 时, 所获得的纳米粒子表面电位接近电中性, 表明体系中正负电荷总量基本相当. 随着磺化壳聚糖浓度增大, 体系中的负电荷量进一步增多, 从而使更多的磺化壳聚糖沉淀形成纳米粒子, 并导致粒径有所增大. 然而, 由于体系中 PLL/TGF- β 1 的含量一定, 即正电荷量一定, 可平衡沉淀的负电荷物质总量有限, 因此纳米粒子的粒径变化程度并不显著, 而且由于单个粒子中磺化壳聚糖的相对量增多, 粒子的表面电位进一步降低. 考虑到纳米粒子的稳定性和 TGF- β 1 的负载量, 后续实验选择 3% 磺化壳聚糖制备的 SCS/PLL/TGF- β 1 纳米粒子.

Table 2 Influence of the sulfated chitosan concentration on the size and ζ -potential of SCS/PLL/TGF- β 1 nanoparticles

Sulfated chitosan (%)	Size (nm)	ζ -potential (mV)
0.3	240 \pm 14	-0.48 \pm 0.28
1.5	274 \pm 13	-1.02 \pm 0.29
3	288 \pm 7	-1.23 \pm 0.46

2.1.2 纳米粒子形貌

采用透射电子显微镜 (TEM) 对 SCS/PLL 和 SCS/PLL/TGF- β 1 的形貌进行了表征 (图 1). 2 种纳米粒子均呈现相对规则的圆球形貌, 粒子大小分布不均, 分散性较大. 粒子内部物质分布均匀, 未见明显的核壳结构, 表明 TGF- β 1 可在纳米粒子中获得较好分散. 统计分析结果显示, SCS/PLL 的粒径为 (177 \pm 26) nm. 复合 TGF- β 1 后, 由于体系中正电荷总量相对增加, 所制备的 SCS/PLL/TGF- β 1 的粒径增大为 (195 \pm 35) nm. 与表 2 粒径分析仪检测结果比较可见, SCS/PLL/TGF- β 1 的

干态粒径要明显小于其在水溶液中的粒径, 证明该粒子在水溶液中能发生一定程度的溶胀.

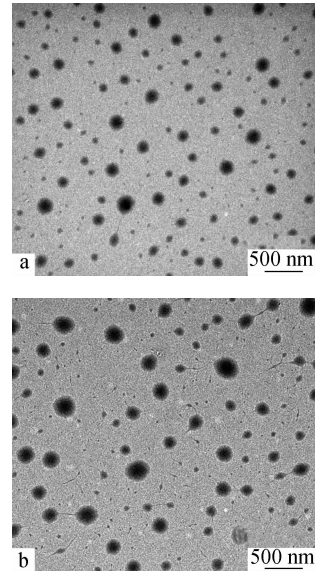


Fig. 1 TEM images of SCS/PLL (a) and SCS/PLL/TGF- β 1 nanoparticles (b)

2.2 细胞增殖行为

通过检测 BMSCs 数量随培养时间的变化, 考察了 BMSCs 单独培养 (blank), 以及与 SCS/PLL, TGF- β 1 和 SCS/PLL/TGF- β 1 共培养条件下的增殖行为 (图 2). 总体而言, 随着培养时间的延长, 4 种不同条件下培养的 BMSCs 数量均逐步增多, 但增殖速率不同. 培养 3 天后, 各组的细胞数目无明显差异. 培养 7 天和 14 天后, TGF- β 1 和 SCS/PLL/TGF- β 1 组的细胞数量要明显少于 Blank 和

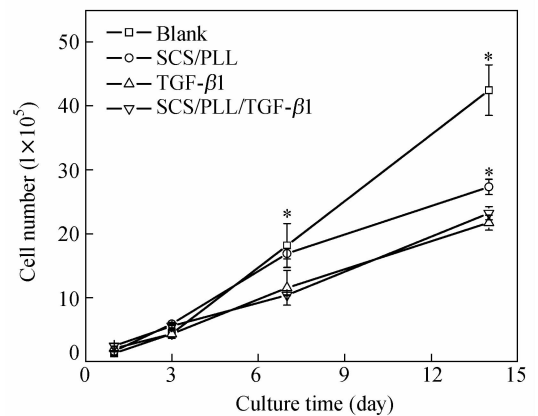


Fig. 2 The number of BMSCs cocultured without and with TGF- β 1, and SCS/PLL and SCS/PLL/TGF- β 1 nanoparticles over a period of 14 days

Data are expressed as mean \pm SD ($n = 4$); * Denotes significant difference at $p < 0.05$ compared with SCS/PLL/TGF- β 1 group at the corresponding culture time.

SCS/PLL 组,证明添加 TGF- β 1 对 BMSCs 的增殖有明显的延缓作用.与 Blank 组相比,SCS/PLL 组的细胞数量在前 7 天都无明显的区别;但培养至 14 天时,Blank 组的细胞数量要明显高于 SCS/PLL 组,这可能与纳米粒子和细胞间相互作用有关.在整个培养时间内,TGF- β 1 组和 SCS/PLL/TGF- β 1 组中 BMSCs 的增殖行为无明显的区别.有研究表明,TGF- β 1 具有促进 BMSCs 增殖和分化的作用,但由于细胞的增殖和分化行为相互影响,当细胞处于分化状态时,其增殖行为会受到相应的抑制^[16,31].因此,加入 TGF- β 1 后细胞增殖变缓主要是由于在 TGF- β 1 的作用下,BMSCs 表现出较强的分化倾向,进而抑制了细胞的增殖.

2.3 GAGs 分泌检测

氨基聚葡萄糖(GAGs)是软骨组织中主要的细胞外基质之一,GAGs 分泌是表征 BMSCs 向软骨细胞分化的一个重要指标^[11].图 3 考察了 BMSCs 单独培养(blank),以及与 SCS/PLL, TGF- β 1 和 SCS/PLL/TGF- β 1 共培养条件下 GAGs 的分泌量.由图可知,培养 7 天后,相比于 Blank 组、SCS/PLL 组和 TGF- β 1 组,SCS/PLL/TGF- β 1 可促进 BMSCs 分泌更多的 GAGs.培养 14 天后,各组的 GAGs 分泌量都有所增加,但相对于其他 3 组,SCS/PLL/TGF- β 1 组仍然保持最高的 GAGs 分泌量.在各时间点,SCS/PLL 组的 GAGs 分泌量与 Blank 组都没有明显的区别,这说明单一的 SCS/PLL 纳米粒子对 BMSCs 向软骨细胞分化无明显的作用.此外,相对于 Blank 组和 SCS/PLL 组,在 7 天和 14 天,加入自由的 TGF- β 1 对 BMSCs 的 GAGs 分泌都未见显著的促进作用,这可能与自由状态下

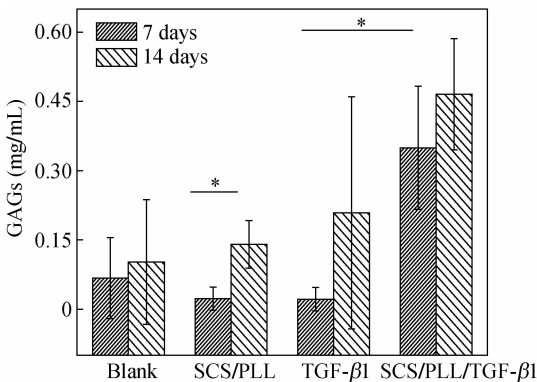


Fig. 3 Quantitative analysis of GAGs content secreted by BMSCs
Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). * Denotes significant difference at $p < 0.05$.

TGF- β 1 的活性难以保持有关.相比于添加同浓度的自由 TGF- β 1, SCS/PLL/TGF- β 1 可以促进 BMSCs 分泌更多的 GAGs,说明 SCS/PLL/TGF- β 1 比同浓度的自由 TGF- β 1 更能促进 BMSCs 向软骨细胞分化,同时也证明以 SCS/PLL/TGF- β 1 纳米粒子的形式可以有效保护 TGF- β 1 的活性.

2.4 II 型胶原的基因表达

II 型胶原基因的表达是表征 BMSCs 向软骨细胞分化的另外一个重要指标^[30].通过检测 14 天时 II 型胶原基因的相对表达量,考察了 BMSCs 单独培养(blank),以及与 SCS/PLL, TGF- β 1 和 SCS/PLL/TGF- β 1 共培养条件下 BMSCs 向软骨细胞分化的趋势(图 4).相比于未添加 TGF- β 1 的 Blank 组和 SCS/PLL 组, TGF- β 1 组和 SCS/PLL/TGF- β 1 组均具有较高的 II 型胶原基因表达量.与 GAGs 的定量结果不同,添加自由的 TGF- β 1 对 BMSCs 表达 II 型胶原基因量也有一定程度的促进作用.这可能与 qRT-PCR 方法的特点有关,其扩增和多重循环检测步骤赋予该方法极高的灵敏度.相比于 TGF- β 1 组, SCS/PLL/TGF- β 1 组具有更高的 II 型胶原基因表达量.这是由于复合在纳米粒子中的 TGF- β 1 具有更好的生物活性,能延长 TGF- β 1 对 BMSCs 的作用时间,从而更有效地促进 BMSCs 向软骨细胞分化.

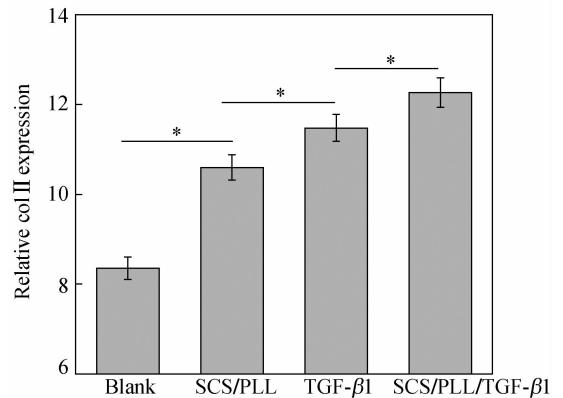


Fig. 4 qRT-PCR analysis for collagen type II gene expression of BMSCs after being cultured for 14 days
Results were presented as relative quantity compared to GAPDH gene expression. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). * Denotes significant difference at $p < 0.05$.

3 结论

通过共沉淀法制备了粒径为 240 ~ 290 nm, 表面电位为 -0.4 ~ -1.3 mV, 呈球形形貌的磺

化壳聚糖/聚赖氨酸/转化生长因子- $\beta 1$ 纳米粒子 (SCS/PLL/TGF- $\beta 1$)。随磺化壳聚糖浓度的增大, SCS/PLL/TGF- $\beta 1$ 的粒径逐步增大, 而其表面则呈现更强的负电性。采用体外纳米粒子与骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 共培养方法, 研究了不同条件下 BMSCs 的增殖和分化行为。结果显示, 加入 TGF- $\beta 1$ 和 SCS/PLL/TGF- $\beta 1$ 会抑制 BMSCs 的增

殖行为。相对于 Blank, SCS/PLL 和自由 TGF- $\beta 1$ 组, 添加 SCS/PLL/TGF- $\beta 1$ 实验组可有效促进 BMSCs 的 GAGs 分泌和 II 型胶原基因的表达。上述结果证明, SCS/PLL/TGF- $\beta 1$ 纳米粒子可以有效保护 TGF- $\beta 1$ 的活性, 延长 TGF- $\beta 1$ 的作用时间, 从而有效促进 BMSCs 向软骨细胞分化。

REFERENCES

- Xu Rongyao(许荣耀), Zhang Shou(张寿). Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research(中国组织工程研究与临床康复), 2011, 15(41): 7747 ~ 7750
- Cheung H Y, Lau K T, Lu T P, Hui D. Composites: Part B, 2006, 38(2007): 291 ~ 300
- Deplaine H, Lebourg M, Ripalda P, Vidaurre A, Sanz-Ramos P, Mora G, Prosper F, Ochoa I, Doblare M, Gomez J L, Izal-Azcarate I, Ferrer G. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2013, 101(1): 173 ~ 186
- Fu Huili(付慧莉), Cheng Sixue(程巳雪), Zhuo Reixi(卓仁禧). Acta Polymeric Sinica(高分子学报), 2009, (2): 97 ~ 103
- Wang W, Li D, Wang M, Li Y, Gao C. Chinese J Polym Sci, 2011, 29(2): 233 ~ 240
- Shi Xiaowen(施晓文), Li Xiaoxia(李晓霞), Du Yumin(杜予民). Acta Polymeric Sinica(高分子学报), 2011, (1): 1 ~ 11
- Khan W S, Johnson D S, Hardingham T E. Knee, 2010, 7(6): 369 ~ 374
- Park J S, Na K, Woo D G, Yang H N, Park K H. Biomaterials, 2009, 30(27): 4796 ~ 4805
- Whitaker M J, Quirk R A, Howdle S M, Shakesheff K M. J Pharm Pharmacol, 2001, 53(11): 1427 ~ 1437
- Kopesky P W, Vanderploeg E J, Kisiday J D, Frisble D V, Sandy J D, Grodzinsky A J. Tissue Eng Part A, 2011, 17(1-2): 83 ~ 92
- Wang W, Li B, Li Y, Jiang Y, Ouyang H, Gao C. Biomaterials, 2010, 31(23): 5953 ~ 5965
- Chatterjee K, Gibson S L, Wallace W E, Parekh S H, Lee Y J, Cicerone M T, Young M F, Simon Jr C G. Biomaterials, 2010, 31(19): 5051 ~ 5062
- Puceat M. Cardiovasc Res, 2007, 74(2): 256 ~ 261
- Attur M G, Palmer G D, Al-Mussawir H E, Dave M, Teixeira C C, Rifkin D B, Appleton C T, Beier F, Abramson S B. FASEB J, 2009, 23(1): 79 ~ 89
- Kingsley D M. Genes Dev, 1994, 8(2): 133 ~ 146
- Blaney D E, Vitters E L, Berg W B, Kraan P M. Arthritis Res Ther, 2006, 8(3): 65
- Yang Guan(杨冠), Yang Xiao(杨晓). Hereditas(遗传), 2008, 30(8): 953 ~ 959
- Shen Y H, Shoichet M S, Radisic M. Acta Biomater, 2008, 4(3): 477 ~ 489
- Choi J S, Leong K W, Yoo H S. Biomaterials, 2008, 29(5): 587 ~ 596
- Zhao B, Katagiri T, Toyoda H, Takada T, Yanai T, Fukuda T, Chung U, Koike T, Takaoka K, Kamijo R. J Biol Chem, 2006, 281(32): 23246 ~ 23253
- Bian L, Zhai D Y, Tous E, Rai R, Mauck R L, Burdick J A. Biomaterials, 2011, 32(27): 6425 ~ 6434
- Go D P, Gras S L, Mitra D, Nguyen T H, Stevens G W, Cooper-White J J, Connor A J. Biomacromolecules, 2011, 12(5): 1494 ~ 1503
- Zhang Hanwei(张汉威), Cai Qing(蔡晴), Bei Jianzhong(贝建中), Wang Shenguo(王身国). Acta Polymeric Sinica(高分子学报), 2004, (3): 454 ~ 457
- Peschel D, Zhang K, Fischer S, Groth T. Acta Biomater, 2012, 8(1): 183 ~ 193
- Huang Aibin(黄爱宾), Guo Rui(郭瑞), Xu Shaojun(徐少骏), Ma Lie(马列), Gao Changyou(高长有). Acta Polymeric Sinica(高分子学报), 2009, (2): 111 ~ 117
- Wang H, Yuan L, Zhao T, Huang H, Chen H, Wu D. Chinese J Polym Sci, 2012, 30(6): 893 ~ 899
- Wu Xingjie(吴兴杰), Ma Lie(马列), Gao Changyou(高长有). Acta Polymeric Sinica(高分子学报), 2012, (4): 418 ~ 426
- Zhou H, Qian J, Wang J, Yao W, Liu C, Chen J, Cao X. Biomaterials, 2009, 30(9): 1715 ~ 1724
- Xing R, Liu S, Yu H, Guo Z, Li Z, Li P. Carbohydr Res, 2004, 339(15): 2515 ~ 2519
- Wang W, Li B, Yang J, Xin L, Li Y, Yin H, Qi Y, Jiang Y, Ouyang H, Gao C. Biomaterials, 2010, 31(34): 8964 ~ 8973
- Mauck R L, Yuan X, Tuan R S. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(2): 179 ~ 189

PREPARATION OF SULFATED CHITOSAN/POLYLYSINE/TRANSFORM GROWTH FACTOR- β 1 NANOPARTICLES AND THEIR ABILITY TO INDUCE CHONDROGENESIS DIFFERENTIATION OF BMSCs

Fei-fei Li, Qiu-wen Wang, Lie Ma, Chang-you Gao

(MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract To protect the activity of transform growth factor- β 1 (TGF- β 1), the sulfated chitosan/polylysine/TGF- β 1 (SCS/PLL/TGF- β 1) nanoparticles were prepared by a co-precipitation method. Along with the increase of sulfated chitosan concentration, the nanoparticles with larger size and more negatively-charged surface were obtained. Both the SCS/PLL and SCS/PLL/TGF- β 1 nanoparticles had a round morphology observed by transmission electron microscopy (TEM), with a dry size of (177 ± 26) nm and (195 ± 35) nm, respectively. *In vitro* cell culture was performed to evaluate the differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) induced by the SCS/PLL/TGF- β 1 nanoparticles. The result of cell proliferation showed that the addition of TGF- β 1 either in a free state or as nanoparticles could block the proliferation of BMSCs to some extent. However, compared to the blank, SCS/PLL and free TGF- β 1 groups, the SCS/PLL/TGF- β 1 group secreted the highest amount of glycosaminoglycans (GAGs). Moreover, the results of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) also showed that the BMSCs seeded with the SCS/PLL/TGF- β 1 nanoparticles expressed significantly higher amount of collagen type II gene at day 14. All these results confirm that the bioactivity of TGF- β 1 can be largely preserved in the form of SCS/PLL/TGF- β 1 nanoparticles, leading to the preferential differentiation of BMSCs toward chondrocytes.

Keywords Sulfated chitosan, TGF- β 1, Nanoparticles, BMSCs, Chondrogenesis