

不同分子量 *N*-琥珀酰壳聚糖的制备及其与 K562 肿瘤细胞间亲和性的初步探讨*

王银松 李英霞** 宋 妮

(海洋药物教育部重点实验室 中国海洋大学海洋药物与食品研究所 青岛 266003)

摘 要 用化学降解法制备不同分子量的壳聚糖,以其为原料合成了系列 *N*-琥珀酰壳聚糖,然后用异硫氰酸荧光素进行荧光标记,再与 K562 肿瘤细胞共孵育,通过流式细胞仪检测细胞的荧光强度来确定不同分子量 *N*-琥珀酰壳聚糖与 K562 肿瘤细胞间亲和性的强弱,为靶向抗肿瘤药物载体的研究提供初步的参考.结果表明 *N*-琥珀酰壳聚糖和 K562 肿瘤细胞间有较强的亲和性,随着分子量的增加,其亲和性逐渐减弱.

关键词 壳聚糖,琥珀酰壳聚糖,肿瘤细胞,靶向抗肿瘤药物载体

壳聚糖及其衍生物具有良好的生物相容性和生物可降解性,将其作为药物的缓释及靶向载体已成为近年来的研究热点之一.壳聚糖虽然溶于酸性水溶液,分子中含有大量游离的氨基和羟基,但在生理 pH 条件下,溶解度较低,在体内的降解速度快,因此将其用作药物载体受到一定的限制.生物学研究结果表明水溶性 *N*-琥珀酰壳聚糖较壳聚糖具有更低的毒性、更长的体内半衰期,而且能够有效蓄积于肿瘤组织,即对肿瘤组织具有被动靶向性,可作为抗肿瘤药物的缓释及靶向载体^[1,2]. Song^[3] 等曾报道了丝裂霉素与 *N*-琥珀酰壳聚糖偶连物的毒性、药物释放性质和抗肿瘤活性,结果表明,偶连物对正常小鼠的毒副作用较丝裂霉素显著降低,对植入 P388 肿瘤细胞小鼠体的抗癌活性明显增强,这进一步证明了 *N*-琥珀酰壳聚糖对肿瘤组织的靶向性.但关于不同分子量的 *N*-琥珀酰壳聚糖与肿瘤细胞间的作用以及在体内的降解和释药特征尚少见报道.

基于以上的研究结果,我们采用过氧化氢降解法制备了不同分子量的壳聚糖,合成了系列 *N*-琥珀酰壳聚糖,然后用异硫氰酸荧光素(FITC)进行荧光标记,通过流式细胞仪研究不同分子量的 *N*-琥珀酰壳聚糖和肿瘤细胞间的亲和性强弱,确定最适分子量,为其作为抗肿瘤药物的靶向载体提供初步的参考.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

壳聚糖(青岛利中甲壳质公司,分子量 6.28×10^5 Da,脱乙酰度 88%),丁二酸酐(中国医药集团上海试剂公司),异硫氰酸荧光素(FITC, Sigma),其它试剂均为分析纯.

透析膜(截留分子量为 1.2×10^4), Nicolet Nexus 470 红外波谱仪, JEOL JNM-ECP 600 核磁共振波谱仪, FACS Vantage 流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国); CO₂ 培养箱(Nuair, 美国), BT-2 型荧光显微镜(Olympus, 日本).

1.2 壳聚糖的降解

1.2.1 不同分子量壳聚糖的制备 将 30 g 原料壳聚糖溶于 2% 醋酸溶液(600 mL)中,过滤除去不溶性杂质,于 65℃ 剧烈搅拌下滴加 H₂O₂, 定时取样,用 5% 的氢氧化钠溶液中和反应液至 pH = 8~10,抽滤收集析出的白色沉淀,用蒸馏水洗至 pH 中性,用乙醇浸洗,80℃ 下干燥,得到样品.当 H₂O₂ 与糖单元的摩尔比为 0.5 时,得到 7 个粘均分子量为 $0.2 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ Da 的壳聚糖样品.当 H₂O₂ 与糖单元的摩尔比为 0.05 时,得到 7 个粘均分子量在 $1.0 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^5$ Da 的壳聚糖样品.

1.2.2 壳聚糖粘均分子量的测定 采用粘度法^[4]测定各降解壳聚糖的粘均分子量(M_v).以 0.1 mol/L CH₃CO₂Na/0.2 mol/L CH₃CO₂H 为溶剂,

* 2003-05-19 收稿, 2003-08-21 修稿; 青岛市科技攻关项目(2002); ** 通讯联系人

将壳聚糖配成不同浓度的溶液,于 30℃ 用乌氏粘度计测定各样品的特性粘度 $[\eta]$,带入下列 Mark-Houwink 方程式,计算各样品的粘均分子量。 $[M_\eta] = KM_\eta^\alpha$ ($K = 6.598 \times 10^{-3}$, $\alpha = 0.88$)。

1.2.3 壳聚糖脱乙酰度 (*D.D*) 的测定 称取 0.200 g 壳聚糖样品置于 100 mL 锥形瓶中,用移液管加入 0.1 mol/L 的标准盐酸溶液 20.00 mL,蒸馏水 10 mL,电磁搅拌,溶液澄清后滴加 3 滴甲基橙指示剂,然后用 0.1 mol/L 的氢氧化钠标准溶液滴定至试液从红色变成橙黄色为终点,壳聚糖的脱乙酰度 (*D.D*) 按下式进行计算:

$$D \cdot D = \{(N_1 V_1 - N_2 V_2) / (W \times 1000 / 161)\} \times 100\%$$

 N_1, V_1 为盐酸标准溶液的浓度及滴加的体积;
 N_2, V_2 为氢氧化钠标准溶液的浓度及滴加的体积;
 W 为样品称量。

1.3 *N*-琥珀酰壳聚糖的制备

从上述降解的产物中选取 6 个具有代表性的样品,其粘均分子量为 0.19×10^5 、 0.52×10^5 、 0.75×10^5 、 1.28×10^5 、 2.02×10^5 、 3.35×10^5 Da,分别取 1.0 g 样品 (6.0 mmol 糖单元) 溶于 4.8% 的乳酸溶液 (20 mL) 中,用 80 mL 甲醇稀释,然后加入丁二酸酐 (3.0 g, 30 mmol),室温下搅拌反应 20 h,再用 5% 的 NaOH 溶液调节至反应溶液的 pH 约为 5,过滤收集沉淀,用 50 mL 水溶解,再用 5% 的 NaOH 溶液调节至 pH = 10 ~ 12,蒸馏水透析,冷冻干燥即得产物 *N*-琥珀酰壳聚糖的钠盐。

1.4 *N*-琥珀酰壳聚糖分子中琥珀酰基取代度的测定

琥珀酰基的取代度采用传统的灰化酸碱滴定法进行测定,称取 0.200 g 钠型的 *N*-琥珀酰壳聚糖置于 30 mL 瓷坩埚中,灰化处理后放入马福炉中,逐渐升温至 700℃,灼热 1 h 后关闭电源,冷却后取出,用 20 mL 蒸馏水将瓷坩埚中的剩余物全部转移到 100 mL 的锥形瓶中,滴加 3 ~ 4 滴甲基橙指示剂,准确加入 10 mL 硫酸标准溶液,溶液颜色呈红色,电炉上加热溶液至沸腾,10 min 后用氢氧化钠标准溶液滴定至溶液颜色由红变黄,记下用去的氢氧化钠溶液的体积,琥珀酰基的取代度 *D.S* (*SUC*) 按下式进行计算:

$$D.S(SUC) = 0.1662 \times B / (1 - 0.123 \times B),$$

$$B = (2M_1V_1 - M_2V_2) / W$$

M_1, V_1 为硫酸标准溶液的摩尔浓度及滴加的体积;
 M_2, V_2 为氢氧化钠标准溶液的摩尔浓度及滴

加的体积;
 W 为样品称量。

1.5 *N*-琥珀酰壳聚糖的溶解性实验^[5]

取 100 mg *N*-琥珀壳聚糖分散于 20 mL 蒸馏水中,观察溶解情况,然后用 0.1 mol/L 的盐酸调节溶液的 pH = 1,再用 0.1 mol/L 的氢氧化钠回滴至溶液的 pH = 14,观察回滴过程中的溶解情况。

结果表明 *N*-琥珀壳聚糖易溶于 pH = 1 ~ 14 的水溶液。

1.6 *N*-琥珀酰壳聚糖的荧光标记

将 100 mg *N*-琥珀酰壳聚糖溶于 5 mL pH 约为 8.3 的碳酸氢钠缓冲溶液,5 mg FITC 溶于 5 mL 相同缓冲液中,然后加入到上述反应液中,室温下避光反应 24 h 后减压浓缩至 2 mL,加入乙醇沉淀产物,反复用水溶、醇沉处理以除去大量游离的 FITC,再蒸馏水透析处理至透析液无荧光,冷冻干燥即得荧光标记的 *N*-琥珀酰壳聚糖,避光冷冻保存。荧光基团的含量用可见分光光度法于 490 nm 波长处进行检测。

1.7 *N*-琥珀酰壳聚糖与肿瘤细胞间的亲和性实验

取对数生长期的 K562 肿瘤细胞置于培养瓶中,分别设两组:空白对照组 (培养基)、加药组 (荧光标记的 *N*-琥珀酰壳聚糖,终浓度 100 mg/L),细胞数为 1×10^5 个/瓶,加药后将培养瓶置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 48 h 后,收获细胞,用 PBS 洗 3 次,上流式细胞仪,设门收集细胞 10 000 个进行检测。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖的降解

目前常用的壳聚糖的降解方法有酸降解、超声波降解、氧化降解、生物降解以及辐射降解等,本文采用过氧化氢氧化降解法制备了不同分子量的壳聚糖,它的优点在于反应时间短、条件可控、重现性好,且不会改变壳聚糖的脱乙酰度。在一定的温度下通过控制过氧化氢的加入量和降解反应持续的时间,可以得到粘均分子量在 $0.2 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^5$ Da 范围内的壳聚糖降解产物,其粘均分子量 (M_η) 与降解时间之间的关系见表 1。

Table 1 Degrading time and the molecular weight (M_η) of the chitosan

Time (h)	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00	1.50	2.00
$M_\eta (\times 10^5, R^* = 0.5)$	6.28	1.42	0.75	0.52	0.26	0.19	0.17
$M_\eta (\times 10^5, R^* = 0.05)$	6.28	4.82	3.35	2.54	2.02	1.53	1.28

H₂O₂: Unit of chitosan (in molar ratio)

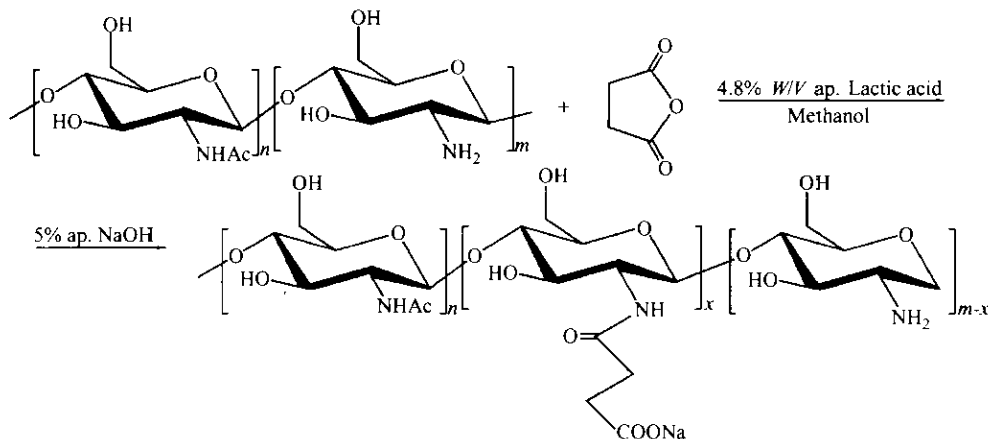
2.2 *N*-琥珀酰壳聚糖的制备及波谱数据

作为抗癌药物的靶向载体,分子量不仅影响其理化性质,而且也影响其在体内的生物学特性.分子量太大,存在体内吸收及其分布的问题,还可能会引起体内的免疫反应;分子量太小,在体内代谢速度较快,不适宜用作药物的缓释载体或没有靶向性.因此,为了制备不同分子量的 *N*-琥珀酰壳聚糖,Kato^[6]等采用了先合成高分子量 *N*-琥珀酰壳聚糖,然后用盐酸对其进行降解的方法,并考察了降解产物分子量和粘度之间的关系,但无法给出计算方程式,也无法得到分子量.

基于上述的研究结果,为了避免盐酸降解 *N*-琥珀酰壳聚糖的过程中部分琥珀酰基的脱落,加之目前还没有描述 *N*-琥珀酰壳聚糖的分子量及取代度和其粘度之间的经典方程式,无法准确获得 *N*-琥珀酰壳聚糖的粘均分子量,本论文先制备不同分子量的壳聚糖(粘均分子量 $0.2 \times 10^5 \sim 3.0$

$\times 10^5$ Da),从中选择具有代表性的 6 个样品(粘均分子量分别为 1.9×10^4 、 5.2×10^4 、 7.5×10^4 、 1.28×10^5 、 2.02×10^5 、 3.35×10^5 Da),然后合成系列 *N*-琥珀酰壳聚糖,反应方程式如反应式 1.

1~6 号产物的波谱数据基本一致,和文献[5]报道相符.¹R (KBr) cm^{-1} : 3386, 2926, 2873, 1655, 1571, 1402, 1308, 1153, 1069, 1032, 900. ¹H-NMR (D_2O , DSS 为内标, 60℃), δ 2.07 (s, $-\text{COCH}_3$), COC H_3) 2.40 ~ 2.68 (m, $-\text{NH}(\text{CO})-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{COONa}$), 3.20 ~ 3.25 (m, 氨基葡萄糖单元的 H-2), 3.50 ~ 3.95 (m, 氨基葡萄糖单元的 H-3、H-4、H-5、H-6), 4.98 (br, 氨基葡萄糖单元的 H-1). ¹³C-NMR: δ 24.8 ($-\text{NH}(\text{CO})-\text{CH}_3$), 35.2, 35.5 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 57.8 ~ 58.7 (C-2), 62.8 ~ 63.2 (C-6), 74.4 ~ 81.1 (C-3, C-4, C-5), 178.9 ($-\text{NH}(\text{CO})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 183.7 ($-\text{COONa}$).



Scheme 1

溶解性实验表明 *N*-琥珀酰壳聚糖水溶性较好.灰化酸碱滴定法测定的 *N*-琥珀酰壳聚糖分子中琥珀酰基的取代度数据如表 2 所示,1~6 号样品间无显著性差异,说明在该反应条件下,在研究的分子量范围内,取代度受分子量影响较小,重现性较好.

2.3 *N*-琥珀酰壳聚糖与肿瘤细胞的亲和性实验

FITC 分子中的异硫氰酸基易与氨基发生加成反应,本文将其用于 *N*-琥珀酰壳聚糖的荧光标记 (FITC-Suc-Chitosan),结构式如图 1 所示,用可见分光光度法测得 FITC 在 *N*-琥珀酰壳聚糖分子中的质量百分含量范围为 0.3% ~ 0.6% (如表 2),换算成取代度约为 0.1% ~ 0.3%,在此较低的

FITC 取代度的范围内,对 *N*-琥珀酰壳聚糖的性质影响较小,FITC 本身和 K562 肿瘤细胞间的作用可以忽略不计.

将上述荧光标记的 *N*-琥珀酰壳聚糖在体外和 K562 肿瘤细胞共孵育,然后用流式细胞仪检测细胞的荧光强度.流式细胞仪检测的平均荧光强度可以作为衡量这种作用力大小的参数,以此为基础来考察不同分子量的 *N*-琥珀酰壳聚糖在琥珀酰基取代度一致的情况下与肿瘤细胞间亲和性的强弱,探讨分子量对肿瘤细胞亲和性影响的规律性,确定将其用作抗肿瘤药物靶向载体的最适分子量.

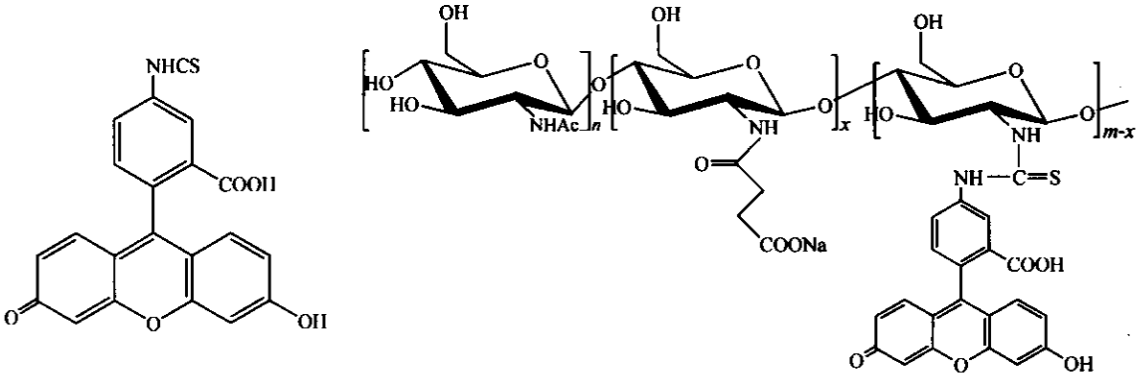


Fig. 1 Chemical structure of FITC (a) and FITC-Suc-Chitosan (b)

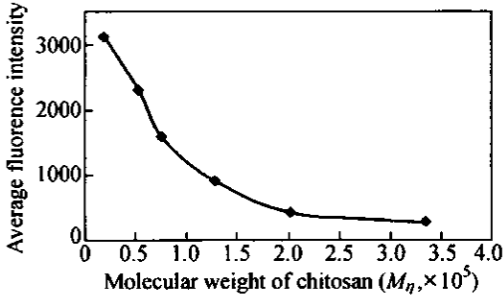


Fig. 2 Relationship between material molecular weight and binding of *N*-Succinyl-Chitosan

N-琥珀酰壳聚糖与 K562 肿瘤细胞间的亲和性(平均荧光强度)随原料壳聚糖粘均分子量的变化如图 2 所示,可以看出随着分子量的增加,*N*-琥珀酰壳聚糖和 K562 肿瘤细胞间的亲和性逐渐减弱.这可能是由于随着载体分子量的增加,其在溶液中逐渐由线性结构向一定的空间构象发生转变,从而削弱了载体和 K562 肿瘤细胞间的亲和性,要加以证实,还需进一步的药理实验.

通过荧光显微镜的观察(如图3),还发现在

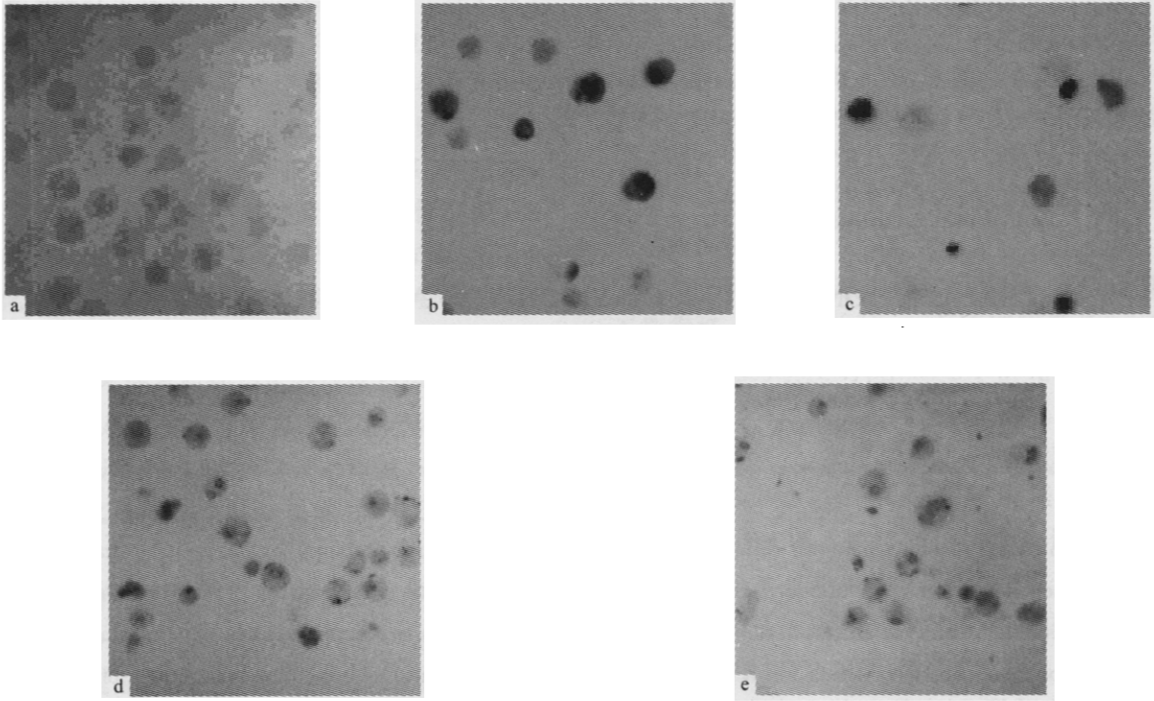


Fig. 3 Binding of *N*-succinyl-chitosan to K562 leukemia cells evaluated by fluorescence microscope ($\times 200$)
a) Control; b) $M_n = 0.19 \times 10^5$ Da; c) $M_n = 0.52 \times 10^5$ Da; d) $M_n = 2.02 \times 10^5$ Da; e) $M_n = 3.35 \times 10^5$ Da

分子量较小范围时,细胞表面整个呈现较强的黄绿色荧光,随着分子量的增加,表面荧光强度减弱

的同时出现点簇状分布的现象.

流式分析图如图 4 所示,当原料壳聚糖粘均

Table 2 Analytical data of *N*-succinyl-chitosan and FITC-labeled *N*-succinyl-chitosan

Sample	1	2	3	4	5	6
Molecular weight of chitosan($M_n, \times 10^5$)	0.19	0.52	0.75	1.28	2.02	3.35
Degree of <i>N</i> -succinylation(%)	28.9	27.8	28.3	26.1	29.6	27.2
FITC content(% W/W)	0.57	0.46	0.28	0.27	0.47	0.34
Fluorence intensity average	1775.18	1062.17	446.30	247.87	200.88	87.71
Fluorence intensity(FITC % = 1 %)	3 114.35	2309.07	1593.93	918.04	427.40	257.97

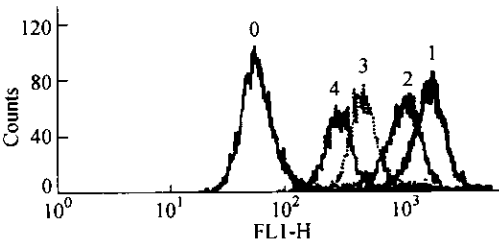


Fig. 4 Binding of *N*-succinyl-chitosan to K562 leukemia cells evaluated by flow cytometry
0: Control; 1 ~ 6: Sample 1 ~ 6(100 mg/L)

分子量在 $0.2 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ Da 范围内时,吸收峰均为单峰;当原料壳聚糖粘均分子量为 2.02×10^5 Da 时,吸收峰左侧出现一肩峰;而当原料壳聚糖粘均分子量为 3.35×10^5 Da 时,载体的荧光吸

收峰出现明显的双峰,这一现象和前面荧光显微镜的观察结果可能相关,在分子量较大的范围内出现异常现象.因此,综合上述试验结果,*N*-琥珀酰壳聚糖用作抗肿瘤药物的靶向载体时,壳聚糖分子量应选择在 2.02×10^5 Da 以下.
综上所述,本文制备了系列不同分子量的 *N*-琥珀酰壳聚糖,通过流式细胞仪对其和 K562 肿瘤细胞间的亲和性进行了探讨,获得了分子量对其活性影响的规律,为靶向抗肿瘤药物载体的研究提供了初步的参考,其他的相关药理实验正在进行中.

致谢 流式细胞仪分析数据由中国海洋大学海洋药物与食品研究所李静老师测定.

REFERENCES

1 Kamiyama K, Onishi H, Machida Y. Biol Pharm Bull, 1999, 22(2): 179 ~ 186
2 Sato M, Onishi H, Kitano M, Machida Y, Nagai T. Biol Pharm Bull, 1996, 19(2): 241 ~ 245
3 Youhua S, Hiraku O, Tsuneji N, Int J Pharm, 1993, 98: 121 ~ 130
4 Roberts G A F, Domsy J G. Int J Biol Macromol, 1982, 4: 374 ~ 377
5 Sashiwa H, Shigemasa Y. Carbohydr Polym, 1999, 39: 127 ~ 138
6 Kato Y, Onishi H, Machida Y. Carbohydr Res, 2002, 337: 561 ~ 564

PREPARATION OF *N*-SUCCINYL-CHITOSANS WITH DIFFERENT MOLECULAR WEIGHT AND THEIR AFFINITY FOR K562 LEUKEMIA CELLS

WANG Yinsong, LI Yingxia, SONG Ni

(Key Laboratory of Marine Drugs , Ministry of Education , Marine Drug and Food Institute , Ocean University of China , Qingdao 266003)

Abstract A series of chitosans with different molecular weight were first prepared by chemical degradation. They were then used to synthesize *N*-succinyl-chitosans(SUC-CS) labeled with a fluorescein FITC. They were incubated with K562 leukemia cells for affinity test. Fluorescence intensity of cells was determined by flow cytometry to assess the affinity of *N*-succinyl-chitosans for K562 leukemia cells. The results showed that the affinity of *N*-succinyl-chitosans for K562 leukemia cells was strong and declined with increasing their molecular weight, providing primary data of SUC-CS as targeting carrier of anti-tumor drugs.

Key words *N*-Succinyl-chitosan, K562 leukemia cells, Affinity, Targeting carrier of anti-tumor drugs