

磺化壳聚糖的制备及其对生长因子活性的保护作用*

吴兴杰 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 以壳聚糖为基材,分别以氯磺酸、三甲胺·三氧化硫和丙磺酸内酯为磺化试剂,制备了3, 6-*O*-磺化壳聚糖(OCS)、2-*N*-磺化壳聚糖(NCS)和2-*N*-磺丙基壳聚糖(PCS) 3种磺化壳聚糖.采用红外光谱、核磁共振谱证明了磺化壳聚糖的结构,元素分析测定了磺化壳聚糖的磺化率.以组织修复过程中一种重要的活性因子——碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)为目标因子,通过体外成纤维细胞培养实验,评价了不同磺化壳聚糖对bFGF活性的保护能力.结果显示,相对于未改性壳聚糖(CS),磺化壳聚糖对成纤维细胞的形态无显著影响.细胞活性检测结果显示,OCS和PCS对bFGF活性无明显的保护能力;NCS能有效提高bFGF促进成纤维细胞活性的能力,其对bFGF活性的保护能力可达肝素70%左右.磺化壳聚糖的bFGF活性保护能力不随磺化率的变化而变化.

关键词 磺化壳聚糖,碱性成纤维细胞生长因子,生物活性,肝素

组织或器官的缺损与功能丧失是影响人类生存的重大临床难题.具有良好生物相容性和降解性,特别是生物活性的再生医学材料,是实现组织再生与修复的关键与基础.围绕再生医学材料的生物活化,通过物理、化学方法,或载体化后复合的方法将生长因子、功能质粒和激素等生物活性物质引入再生医学材料的研究已有众多报道^[1~5].

生长因子作为生物体内重要的信号分子,在组织修复过程中起着重要的作用.然而,生长因子在溶液中的活性半衰期短,易因环境温度、pH值的变化以及酶的作用而失活.近年来,围绕生长因子活性保护难题,发展了共价接枝^[6~8]、微载体化(微粒、微凝胶)和肝素化保护等方法^[9~11].

肝素是一种广泛存在于人体不同组织器官中的一类多糖,可有效保护并提高多种生长因子的活性,如碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮细胞生长因子(EGF)等.研究表明,肝素-生长因子的特异性作用与肝素分子链上的磺酸基和生长因子中碱性氨基酸间的静电作用^[12]、磺酸基团含量等因素有关.近年来,通过生物材料的肝素化改性,可获得具有良好生长因子活性保护性能的材料体系^[13~18].

由于肝素只能从动物体内提取获得,存在引入其他病原体的危险,而且临床研究发现,肝素短期使用存在大出血的危险,而长期使用则会引起严重的骨质疏松^[19~22].此外,天然来源的肝素分子还存在结构不确定、磺酸基分布不均一、磺化位点多样性等问题^[12].为了克服肝素的上述问题,通过对壳聚糖等生物大分子的磺化改性,获得具有类肝素功能生物材料的研究得到广泛关注^[23~30].

目前研究制备的磺化壳聚糖种类众多,磺化位点和磺化率也不尽相同.对于磺化位点以及磺化率对磺化壳聚糖生长因子活性保护性能的影响等基本问题尚无统一的结论.本文制备了3种磺化位点不同的磺化壳聚糖,通过红外光谱、核磁共振图谱表征了磺化壳聚糖的结构.采用元素分析测定了各种磺化壳聚糖的磺化度,并通过调节磺化试剂用量和磺化时间,实现其磺化率的有效调控.以组织器官修复过程中的一种重要生长因子——bFGF为活性保护目标因子,通过成纤维细胞体外培养实验,检测不同培养条件下的细胞形态和细胞活性,考察磺化壳聚糖的磺化位点和磺化率对其bFGF活性保护能力的影响.

* 2011-07-08 收稿,2011-09-19 修稿;国家重点基础研究发展计划(973项目,项目号2011CB606203)和国家自然科学基金(基金号50873088)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: liema@zju.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2012.11230

1 实验部分

1.1 材料与试剂

壳聚糖(黏均分子量为 250 kDa,脱乙酰度 95%)购于青岛海得贝公司. 氯磺酸、三甲胺·三氧化硫(分析纯)和丙磺酸内酯(分析纯)购于 Alfar Aesar 公司. 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自 Pepro Tech 公司. 二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺等其他试剂都为分析纯.

1.2 磺化壳聚糖的制备

制备 3 种磺化位点不同的磺化壳聚糖(图 1),制备过程如下所述.

首先制备了 3, 6-*O*-磺化壳聚糖(OCS),其基本过程为:冰水浴条件下,将一定体积的氯磺酸加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌均匀制得磺化试剂. 称取 1.5 g 壳聚糖,将其均匀分散在 2% 二氯乙酸-甲酰胺混合溶剂,制得壳聚糖悬浮溶液. 在 60℃下,加入 5 mL 的氯磺酸/DMF 磺化试剂,反应 1~4 h. 然后,加入大量无水乙醇,收集沉淀物. 沉淀物经无水乙醇清洗若干次后,溶解于水中. 透析 4~5 天后,经冷冻干燥获得所制备产物. 通过改变氯磺酸/DMF 磺化试剂的加入量与反应时间制备不同磺化率的 OCS.

2-*N*-磺化壳聚糖(NCS)的制备过程是称取 1.5 g 壳聚糖,将其均匀分散在 100 mL 的 Na_2CO_3 溶液(pH $\approx$ 9)中. 称取三甲胺·三氧化硫 1.5 g,

加入上述壳聚糖分散液中,60℃ 条件下反应 4~12 h. 反应结束后,加入大量无水乙醇,收集沉淀物. 沉淀物经无水乙醇清洗若干次后,再次溶解在水中. 透析 4~5 天,冷冻干燥后所得产物即为 2-*N*-磺化壳聚糖. 改变三甲胺·三氧化硫的加入量和反应时间,可制备不同磺化率的 2-*N*-磺化壳聚糖(NCS).

2-*N*-磺丙基壳聚糖(PCS)的制备过程是称取 1.5 g 壳聚糖,溶解于 100 mL 3% 的乙酸溶液中,制得浓度为 1.5% 的壳聚糖溶液. 量取 0.16~0.64 mL 的丙磺酸内酯,将其加入壳聚糖的乙酸溶液中,60℃ 反应 12 h. 反应最终溶液于水中透析 4~5 天,冷冻干燥制得 2-*N*-磺丙基壳聚糖(PCS). 通过改变丙磺酸内酯:壳聚糖的投料比,获得不同磺化率的 PCS.

1.3 磺化壳聚糖的表征

磺化壳聚糖经充分干燥后,采用傅立叶红外光谱仪(BRUKER VECTOR22)对其结构进行表征. 将 3 种磺化壳聚糖溶解在氘代三氟乙酸(5%)和氧化氙的混合溶剂中,用核磁共振波谱仪(DMX-500, BRULCER Co.)对其进行 ^1H -NMR 测试. 磺化壳聚糖的分子量采用凝胶渗透色谱(GPC, WATERS 515)进行测定,其中色谱柱(TOSOH BIOSEP G4000SWXL 7.8 $\times$ 300 mm, Made in Japan)中流动相为 0.2 mol/L 醋酸钠溶液(用醋酸调 pH 为 4.5),用 Waters 2410 示差折

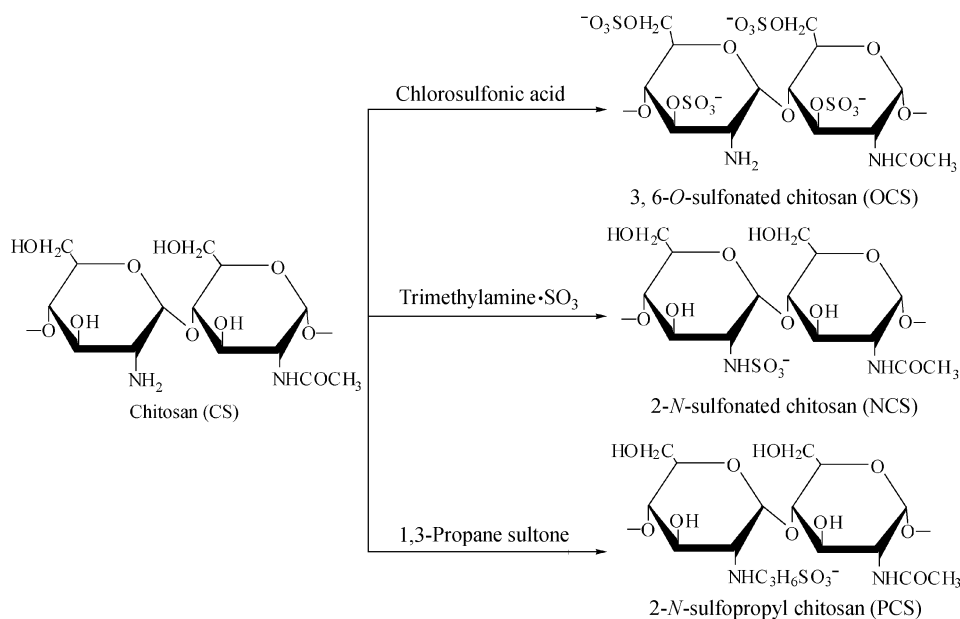


Fig. 1 Synthetic scheme of sulfonated chitosan

光检测器进行检测,以分子量为 2000000, 473000, 188000, 43200, 10500 的葡聚糖(美国 Sigma 公司)为标准样品. 磺化壳聚糖的磺化率采用元素分析仪(1ECO-CMNS932)测定.

1.4 成纤维细胞培养

本实验所用成纤维细胞取自包皮环切手术所得包皮组织(浙江大学第二附属医院烧伤科提供). 将提取的成纤维细胞种植于 9 cm 培养皿,加入一定量的完全培养液(DMEM + 10% 胎牛血清 + 100 单位/mL 青霉素/链霉素),于 37℃、5% CO₂ 的培养箱培养. 培养液每 3~4 天更换一次,细胞融合程度达 80%~90% 时进行传代. 实验所用细胞为 3~5 代的成纤维细胞.

用 PBS 配制 1 μg/mL 的 bFGF 溶液,用醋酸/醋酸钠缓冲液配制 1 mg/mL 的磺化壳聚糖溶液. 将磺化壳聚糖溶液和 bFGF 溶液混合,使磺化壳聚糖与 bFGF 的质量比达到 1000:1. 在无血清条件下,加入 DMEM 至磺化壳聚糖/bFGF 溶液中,使磺化壳聚糖和 bFGF 的最终浓度分别为 5 μg/mL 和 5 ng/mL. 以空白培养板、直接添加 bFGF 以及 bFGF 与未改性壳聚糖(CS)、肝素(Hep)复合组作为对照.

1.5 细胞形态学观察

将成纤维细胞以 10000 细胞/孔的密度种入六孔培养板,培养 24 h,待细胞贴壁后,吸去培养液,加入 2 mL 上述配制的各种复合培养液,培养 7 天后,吸去混合培养液,经 PBS 洗涤 3~5 次后,加入 4% 多聚甲醛,37℃ 固定 30 min. 经 PBS 再次清洗后,加入 1% 白蛋白(BSA)/PBS 溶液,室温反应 1 h 后,加入罗丹明标记鬼笔环肽(6.6 μmol/L 的甲醇溶液,再以 1:50 稀释于 1% BSA/PBS)和 100 ng/mL 的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI),避光孵育 30 min. PBS 清洗 3 次后,于荧光显微镜(LS55, Perkin Elmer)下观察细胞形态.

1.6 细胞活性检测

将成纤维细胞以 1000 细胞/孔的密度种植于 96 孔板中. 细胞贴壁后,吸去培养液,加入 200 μL 上述配置的复合培养液. 分别在培养 1、4、7 天后,吸去 96 孔板中的培养液,加入 100 μL 四甲基噻唑二苯基四溴盐(MTT)溶液,37℃ 下中孵育 4 h 后,加入 100 μL 二甲基亚砷(DMSO),振荡均匀后用酶标仪(MODEL 550, Bio Rad)测定紫色物质于 570 nm 处的吸光度.

2 结果与讨论

2.1 磺化壳聚糖的结构分析

图 2 为未改性壳聚糖和 3 种磺化壳聚糖的红外谱图. 由图可见,CS 在 1655 和 1596 cm⁻¹ 处出现壳聚糖典型的酰胺谱带,1078 和 1030 cm⁻¹ 为壳聚糖中 C—O 的伸缩振动. OCS 的红外光谱中出现了 1230 和 810 cm⁻¹ 2 个峰,其中 1230 cm⁻¹ 峰代表硫酸酯中 O=S=O 的非对称振动,810 cm⁻¹ 处峰代表 C—O—S 的对称振动,由此可以认定 OCS 中存在硫酸酯结构^[31]. NCS 产物的红外图谱中,分别在 1318、1158、和 1036 cm⁻¹ 处出现 3 个峰,其中 1318、1158 cm⁻¹ 两处的峰代表了 S=O 的吸收峰,1036 cm⁻¹ 的峰则代表了 O=S=O 的对称振动^[32],同时可以发现 NCS 图谱中 810 cm⁻¹ 处峰未出现,说明 NCS 的产物中不存在硫酸酯结构. 与 NCS 相类似,在 PCS 的红外图谱中,出现 1318、1158、和 1036 cm⁻¹ 处 3 个明显的峰,分别代表产物中 S=O 和 O=S=O 的对称振动吸收峰,证明了磺酸基团的存在^[33].

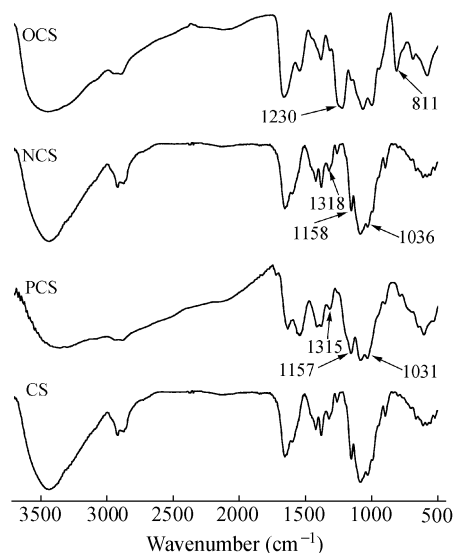


Fig. 2 FTIR spectra of CS and sulfated chitosans (with the sulfonation degrees of ~20%)

采用¹H-NMR 对磺化壳聚糖结构进行了表征(图 3). 由图 3 可见,CS 由低场至高场依次为 δ = 4.7 (aH, —CH), 3.51~3.75 (c~f H, —CH), 3.07 (bH, —CH), 1.93 (壳聚糖中乙酰基, —COCH₃). 在磺酸基团拉电子的作用下,OCS 中 c~f 位 H 向低场移动,在 δ = 4.18 处形成了新的宽峰,由于同样的原因,NCS 中 bH 也向低场移

动. 此外, 由于磺酸基团上的活泼氢与氧化氘中的氘发生了交换, OCS 和 NCS 在 $\delta = 1.95$ 和 2.63 处分别出现了新峰. PCS 的 $^1\text{H-NMR}$ 中, 分别在 δ

$= 3.48, 2.67, 1.60$ 出现新的峰, 对应于 PCS 结构中磺丙基的 3H 、 1H 和 2H , 结合红外光谱结果, 证明壳聚糖结构中引入了磺丙基.

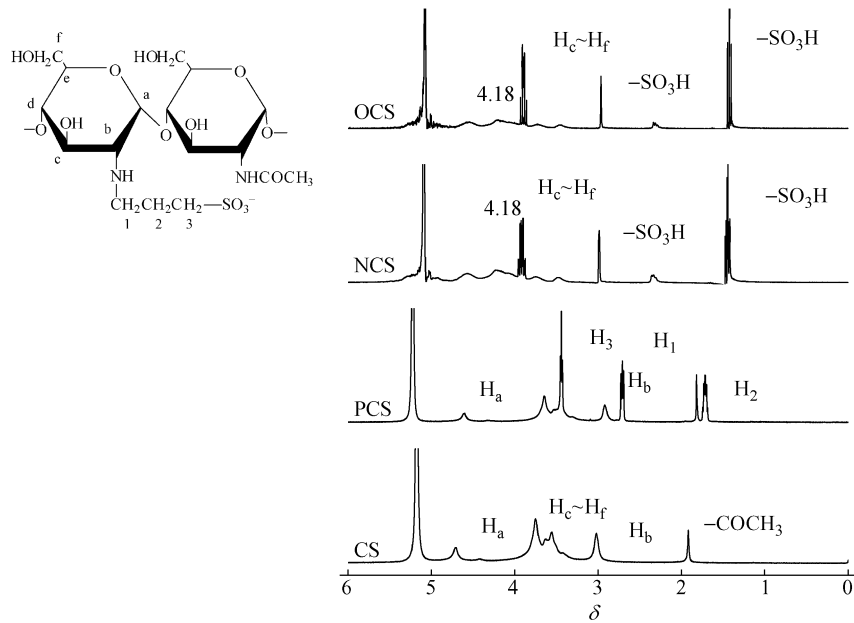


Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ spectra of CS and sulfated chitosans (with the sulfonation degrees of ca. 20%)

2.2 磺化壳聚糖磺化率的调控

为了研究磺化壳聚糖的磺化率对 bFGF 活性保护性能的影响, 制备了一系列具有不同磺化率的磺化壳聚糖 (表 1). 壳聚糖分子中每个糖单元有 1 个 N 原子, 通过元素分析测定磺化壳聚糖分子中的 S 元素和 N 元素的摩尔含量, 以 S 元素和 N 元素的摩尔比定义为产物的磺化率, 即每 100 个糖单元含磺酸基团的比例. 由表 1 可见, 通过改变磺化反应时间或磺化试剂用量等方法, 3 种磺化壳聚糖的磺化率都可实现有效调控. 特别需要指出的是, 由于 OCS 糖单元上 C3、C6 位上羟基都可能与磺化试剂反应形成硫酸酯结构, 因此 OCS 的磺化率可能超过 100%. 比较磺化壳聚糖的分

子量可以发现, 磺化反应对壳聚糖的分子量有显著的影响, 相对于未改性壳聚糖, 3 种磺化壳聚糖的数均分子量和重均分子量都有 1 个数量级的降低, 且分子量分布非常宽. 对于 OCS, 随着产物磺化率的提高, 分子量逐步降低. 导致分子量变小的主要原因是由于磺化试剂 (如氯磺酸、三氧化硫) 的强氧化性, 以及反应温度和碱性反应条件等导致壳聚糖分子发生不同程度的降解; 此外, 磺化改性可提高壳聚糖的水溶性, 从而降低溶液中壳聚糖分子由于分子间氢键而形成分子聚集体的程度. 因此, 磺化壳聚糖制备过程中, 产物的磺化率和分子量需综合考虑, 追求过高的磺化率往往难以保证产物具有合适的分子量.

Table 1 The sulfonation degree and molecular weight of sulfonated chitosan

	Sulfonation degree (%)	$M_n \times 10^{-3}$	$M_w \times 10^{-3}$	PDI
CS	0	329.5	1198	3.6
	13	48.7	770.7	15.8
OCS	22	20.8	651.7	31.4
	104	22.1	141.2	6.4
NCS	20	22.6	184.7	8.2
	59	27.3	40.0	1.5
PCS	25	19.8	30.0	1.5
	36	20.0	598.2	29.9
	64	44.0	822.8	18.7

2.3 磺化位点对碱性成纤维细胞生长因子活性的影响

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是 FGFs 家族的重要成员,对成纤维细胞有丝分裂、中胚层细胞生长、血管形成等都具有明显的促进作用,被广泛应用于创伤修复等领域. bFGF 属于肝素结合类生长因子,往往通过与肝素分子的结合才能有效发挥其功能. 本文以 bFGF 作为目标保护因子,选择磺化率约为 20% 的 3 类磺化壳聚糖,通过研究不同培养条件下成纤维细胞的形态和细胞活性,考察磺化壳聚糖的磺化位点对生长因子活性的影响.

2.3.1 成纤维细胞形态

采用鬼笔环肽和 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)分别对成纤维细胞的细胞骨架和细胞核进行染色,考察不同培养条件下成纤维细胞的形态(图 4). 如图所示,经过 7 天培养后,不同培养条件下的成纤维细胞都可观察到清晰的细胞轮廓

和细胞骨架结构(红色部分),细胞核(蓝色部分)都呈现规则的卵圆形. 进一步比较不同培养条件下的细胞形态可发现,空白组细胞核的轮廓相对不明显,细胞多呈现多角形. 与之相对应,添加 bFGF 后,细胞核轮廓更为清晰. 其中, bFGF/OCS、bFGF/NCS 和 bFGF/PCS 组的细胞多呈现纺锤形或多角形, bFGF/Hep 组的细胞则以纺锤形和星形形态为主.

细胞周长、面积以及长宽比被称作细胞形状指数(cell shape index)^[34],可有效反映细胞的黏附、铺展以及特定基因表达等性能^[35]. 在图 4 基础上,应用 Image J 软件对所得图像进行处理,采用轮廓提取法分别计算成纤维细胞的周长、面积以及长宽比(图 5). 由图 5(a)可见,和其他各组相比, bFGF/Hep 组细胞的周长最长,达 $(392 \pm 130) \mu\text{m}$. bFGF 组与 bFGF/CS、bFGF/OCS 以及 bFGF/PCS 组的细胞周长无显著差异,而 bFGF/NCS 组的细胞周长最小 $((174 \pm 62) \mu\text{m})$. 图 5

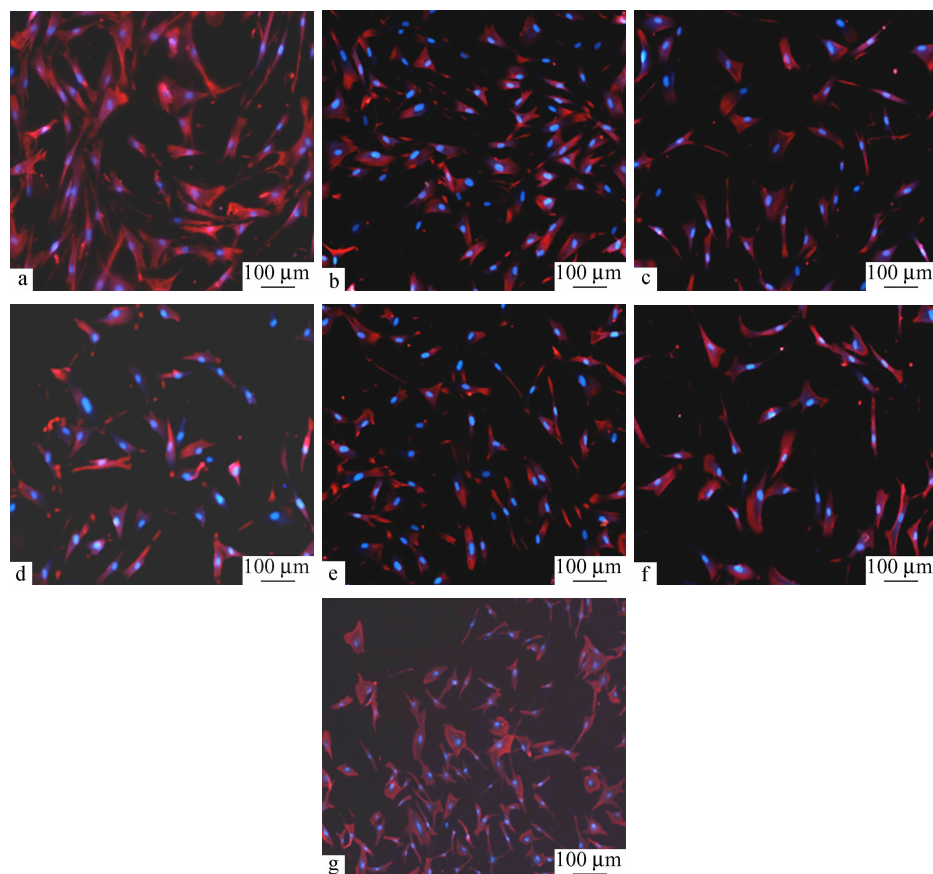


Fig. 4 Fluorescence microscope images of fibroblasts cultured in different conditions for 7 days: (a) blank, (b) bFGF, (c) bFGF/CS, (d) bFGF/OCS, (e) bFGF/NCS, (f) bFGF/PCS and (g) bFGF/Hep

White and grey (corresponding blue and red in the colorful print) indicate nuclei and cytoskeleton of fibroblasts, respectively. The sulfonation degrees of the used sulfonated chitosans are of ca. 20%.

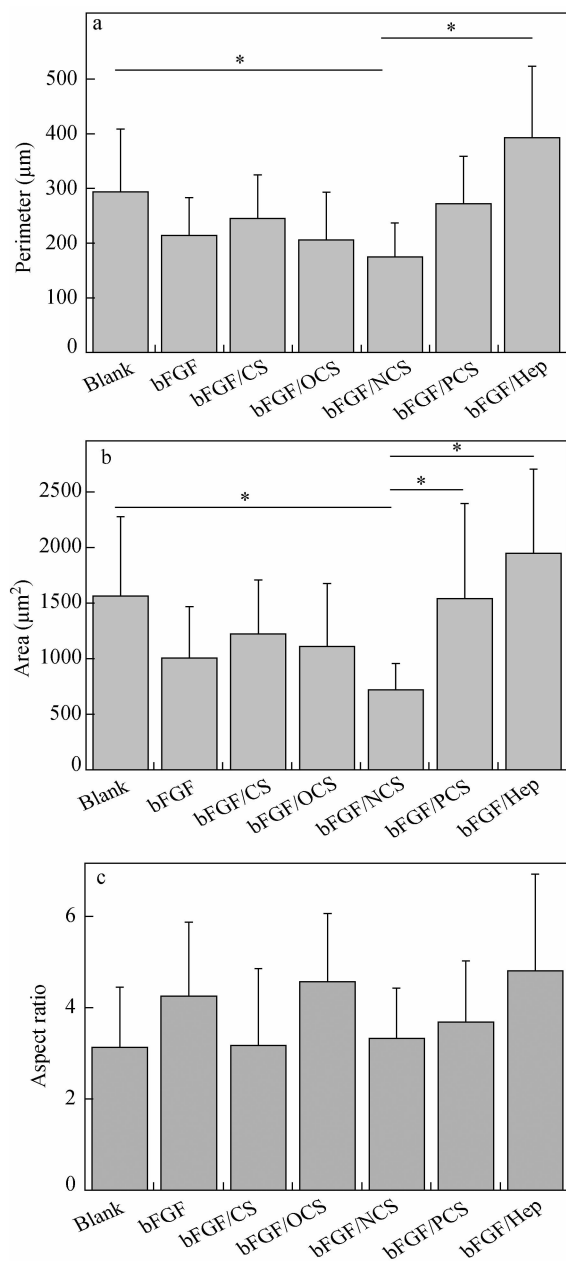


Fig. 5 Shape analysis of fibroblasts cultured in different conditions for 7 days (a) perimeter, (b) area and (c) Aspect ratio indicate significant difference ($n = 15$, $P < 0.05$)

(b)比较了不同培养条件下细胞的铺展面积.与细胞周长的结果相类似,相对于空白样品组($(1562 \pm 715) \mu\text{m}^2$),直接添加 bFGF 或添加 bFGF/OCS、bFGF/NCS 条件下,成纤维细胞的面积都相应减小,其中 bFGF/NCS 组只有 $(717 \pm 240) \mu\text{m}^2$,仅为空白组的一半左右;值得注意的是,在肝素保护下,细胞的铺展面积达到最大($(1948 \pm 756) \mu\text{m}^2$).相对于 bFGF 组,不同的磺化壳聚糖存在下,细胞的长宽比都在 3~5 之间,未见显著影响.

2.3.2 成纤维细胞活性

如图 6 所示,空白组、bFGF 组间的细胞活性无显著性差异,说明直接添加到溶液中的 bFGF,其活性难以保持,无法达到促进成纤维细胞增殖活性的作用.此外,比较 bFGF 与 bFGF/CS 的结果可知,未磺化改性的壳聚糖对 bFGF 的活性无明显的保护功能.相对于 bFGF/CS,加入不同磺化壳聚糖后,bFGF 促进成纤维细胞活性的能力也有所不同.其中,bFGF/OCS 和 bFGF/PCS 的成纤维细胞活性与 bFGF/CS 无显著性差异,说明 OCS 和 PCS 的 bFGF 活性保护能力与 CS 相当.而 bFGF/NCS 的成纤维细胞活性仅次于 bFGF/Hep,达到其细胞活性的 70%,说明 NCS 具有最接近肝素的生长因子活性保护性能. bFGF 对细胞功能的调节过程中,首先通过与细胞膜表面 FGF 受体的特异性作用,然后经 FGF 受体与胞内细胞外信号调节蛋白激酶 2 (ERK-2) 相互作用,从而提高细胞分裂活性^[35~37].研究表明肝素分子中 2-N 和 2-O 位的磺酸基团对肝素与 bFGF 的特异性结合起决定性作用;而 6-O 位的磺酸基团则在 bFGF 子与其受体相互结合后,对促进 bFGF 调控 ERK-2 能力起关键作用^[38~40].图 6 结果也证明,2-N 位的磺酸基团能更好地保持 bFGF 的活性,进而促进成纤维细胞的活性,而通过磺丙基连接到 2-N 位的磺酸基团则无显著的作用.由此可见,肝素对生长因子活性的保护性能,不仅与磺酸基团的电荷作用、磺酸基团在分子链上的位点有关,而且与磺酸基团的连接方式有关.可能的原因是,间接磺

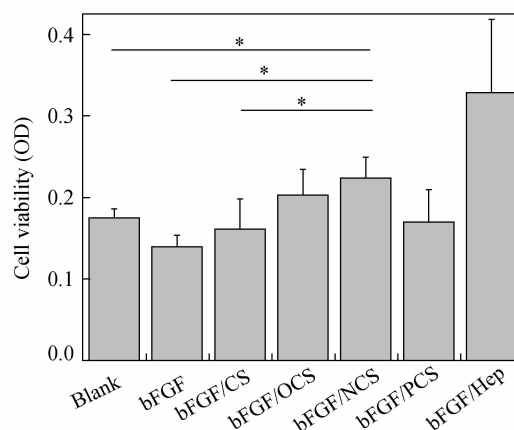


Fig. 6 Viability of fibroblasts cultured in different conditions for 7 days

* Indicate significant difference ($n = 5$, $p < 0.05$); The sulfonation degrees of the used sulfonated chitosans are of ca. 20%.

化引入的磺酸基团的运动柔顺性要高于直接磺化引入的磺酸基团,从而改变磺化壳聚糖有效作用域的空间构象,进而影响其对生长因子的保护性能.值得注意的是,一般认为 bFGF 的主要功能是促进细胞增殖,对细胞的黏附和铺展作用不明显.图 5 和图 6 结果显示,在肝素保护作用下,bFGF 不仅能促进成纤维细胞的活性而且能提高细胞的铺展面积,而在 NCS 保护作用下,bFGF 只表现出促进细胞活性的性能,细胞周长和面积等参数反而减小,这可能与材料本身对细胞黏附的影响相

关.

为了研究磺化壳聚糖的磺化率对 bFGF 活性保护性能的影响,图 7 比较了成纤维细胞活性在不同培养条件下随培养时间的变化.结果显示,随着培养时间的延长,在所有培养条件下,成纤维细胞的活性都呈现逐步上升的趋势,在培养 7 天后,各种条件下培养的成纤维细胞都具有最高的活性.但是,未见磺化壳聚糖的磺化率对成纤维细胞活性有显著的影响.

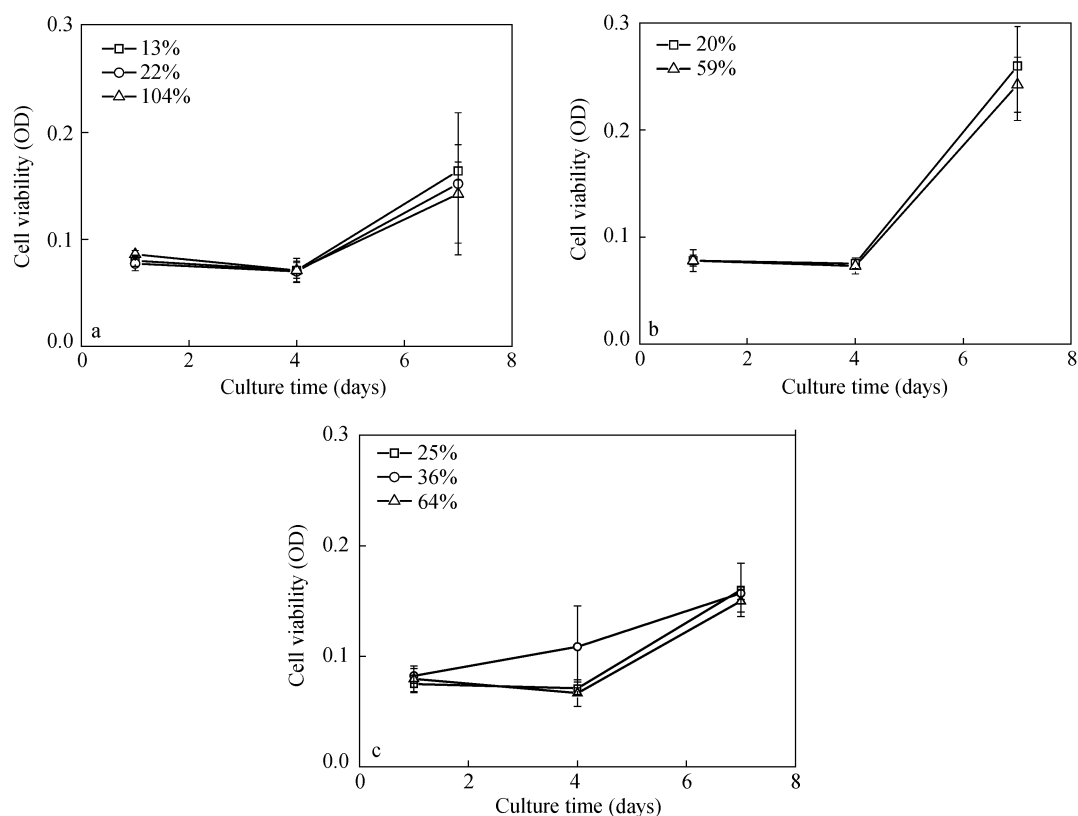


Fig. 7 The effect of sulfonation degree on fibroblasts viability

Fibroblast cultured in 96-well plates with a density of 1000 cell/well: (a) OCS, (b) NCS and (c) PCS ($n = 5$)

3 结论

采用不同磺化反应路线制备了 OCS、NCS 和 PCS,红外光谱、核磁共振谱证明了磺化壳聚糖的结构.改变磺化试剂用量或磺化反应时间,实现了磺化壳聚糖磺化率的调控.以 bFGF 为目标保护因子,体外成纤维细胞形态结果证明,各种磺化壳聚糖存在下,bFGF 对成纤维细胞形态无显著的影

响.细胞活性检测结果显示,OCS 和 PCS 对 bFGF 活性无明显的保护能力,NCS 能有效保护 bFGF 促进成纤维细胞活性的能力,其 bFGF 活性保护能力可达肝素的 70% 作用.磺化壳聚糖的磺化率对 bFGF 活性无明显影响.上述结果证明,磺化位点是决定磺化壳聚糖的生长因子活性保护能力的关键因素.

REFERENCES

- 1 Baraniak P R, Nelson D M, Leeson C E, Katakam A K, Frize J L, Cress D E, Hong Y, Guan J, Wagner W R. *Biomaterials*, 2011, 32:3062 ~ 3071
- 2 Nguyena H N, Wey S P, JH, Sonajea K, Hod Y C, Chuang E Y, Hsu C W, Yen T C, Lin K J, Sung H W. *Biomaterials*, 2011, 32:2673 ~ 2682
- 3 Sheng R, Luo T, Zhu Y, Lia H, Sun J, Chen S, Sun W, Cao A. *Biomaterials*, 2011, 32:3507 ~ 3519
- 4 Zhang X, Abdelghani M O, Zelkin A, Wang Y, Haikeld Y, Mainarde D, Voegel J C, Caruso F, Benkirane-Jessel N. *Biomaterials*, 2010, 31:1699 ~ 1706
- 5 Cooke M J, Wang Y F, Morshead C M, Shoichet M S. *Biomaterials*, 2011, 32:1 ~ 10
- 6 Miyagi Y, Chiu L Y, Cimini M, Weisel R D, Radisic M, Li R K. *Biomaterials*, 2010, 32:1280 ~ 1290
- 7 Shen Y H, Shoichet M S, Radisic M. *Acta Biomater*, 2008, 4:477 ~ 489
- 8 Choi J S, Leong K W, Yoo H S. *Biomaterials*, 2008, 29:587 ~ 596
- 9 Kolambkar Y M, Dupont K M, Boerckel J D, Huebsch N, Mooney D J, Hutmacher D W, Guldberg R E. *Biomaterials*, 2011, 32:65 ~ 74
- 10 McCall J D, Lin C C, Anseth K S. *Biomacromolecules*, 2011, 12:1051 ~ 1057
- 11 Lim J J, Hammoudi T M, Bratt-Leal A M, Hamilton S K, Kepple K L, Bloodworth N C, McDevitt T C, Temenoff J S. *Acta Biomater*, 2011, 7:986 ~ 995
- 12 Capila I, Linhardt R J. *Angew Chem—Int Edit*, 2002, 41:390 ~ 412
- 13 Duo J, Stenken J. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399:783 ~ 793
- 14 Yung-Te H, Hiroyuki I, Shunichi M, Takafumi K, Takayuki T, Shinji S, Koei K J. *Biosci Bioeng*, 2010, 110:208 ~ 216
- 15 Kim S E, Song S H, Yun Y P, Choi B J, Kwon I K, Bae M S, Moon H J, Kwon Y D. *Biomaterials*, 2011, 32:366 ~ 373
- 16 Zieris A, Prokoph S, Levental K R, Welzel P B, Grimmer M, Freudenberg U, Werner C. *Biomaterials*, 2010, 31:7985 ~ 7994
- 17 Shen H, Hu X, Yang F, Bei J Z, Wang S G. *Biomaterials*, 2011, 32:3404 ~ 3412
- 18 Singh S, Wu B M, Dunn C Y. *Biomaterials*, 2011, 32:2059 ~ 2069
- 19 Street J T, McGrath M, O' Regan K, Wakai A, McGuinness A, Redmond H P. *Clin Orthop Rel Res*, 2000, 381:278 ~ 289
- 20 Griffith C C, Nichols G, Asher J D, Flanagan B. *Ann Intern Med*, 1965, 193:91 ~ 94
- 21 Miller D E, DeWolfe V G. *Cleve Clin Q*, 1966, 33:31 ~ 34
- 22 Nelson-Piercy C. *Scand. J. Rheumatol.*, Suppl 1998, 107:68 ~ 71
- 23 Zhou H J, Qian J C, Wang J, Yao W T, Liu C S, Chen J G, Cao X H. *Biomaterials*, 2009, 30:1715 ~ 1724
- 24 Ho Y C, Wu S J, Mi F L, Chiu Y L, Yu S H, Panda N, Sung H W. *Bioconjugate Chem*, 2010, 21:28 ~ 38
- 25 Liu H F, Li X M, Zhou G, Fan H B, Fan Y B. *Biomaterials*, 2011, 32:3784 ~ 3793
- 26 Yamada T, Sawada R, Tsuchiya T. *Biomaterials*, 2008, 29:3503 ~ 3513
- 27 Wenk E, Murphy A R, Kaplan D L, Meinel, Merkle H P, Uebersax L. *Biomaterials*, 2010, 31:1403 ~ 1413
- 28 Freeman I, Kedem A, Cohen S. *Biomaterials*, 2008, 29:3260 ~ 3268
- 29 Huang Aibing(黄爱宾), Guo Rui(郭瑞), Xu Shaojun(徐少骏), Ma Lie(马列), Gao Changyou(高长有). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2009, (2):111 ~ 117
- 30 Shi Xiaowen(施晓文), Li Xiaoxia(李晓霞), Du Yumin(杜予民). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2009, (1):1 ~ 11
- 31 Xing R, Liu S, Yu H, Guo Z Y, Lia Z, Lia P C. *Carbohydr Polym*, 2005, 61:148 ~ 154
- 32 Holme K R, Perlin A S. *Carbohydr Res*, 1997, 32:7 ~ 12
- 33 Tsai H S, Wang Y Z, Lin J J, Lien W F. *Appl Polym Sci*, 2010, 116:1686 ~ 1693
- 34 Thakar R G., Cheng Q, Patel S, Chu J, Nasir M, Liepmann D, Komvopoulos K, Li S. *Biophys J*, 2009, 96:3423 ~ 3432.
- 35 Thomas H, Collier H, Sfeir S, Healy E. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:1972 ~ 1977
- 36 Beenken A, Mohammadi M. *Nature*, 2009, 36:235 ~ 253
- 37 Rifkin D B, Moscatelli D. *J Cell Biol*, 1989, 109:1 ~ 6
- 38 Lundin L, Larsson H, Kreuger J, Kanda S, Lindahl U, Salmivirta M, Claesson-Welsh L. *J Cell Biol*, 2000, 275:24653 ~ 24660
- 39 Pye DA, Vives R R, Turnbull J E, Hyde P, Gallagher J T. *J Cell Biol*, 1998, 273:22936 ~ 22942
- 40 Guimond S, Maccarana M, Rapraeger B. *J Cell Biol*, 1993, 286:23906 ~ 23914

REPARATION OF SULFONATED CHITOSAN AND ITS ABILITY TO PROTECT bFGF ACTIVITIES

Xing-jie Wu, Lie Ma, Chang-you Gao

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

Abstract Three kinds of sulfonated chitosans, *i. e.* 3,6-*O*-sulfonated chitosan (OCS), 2-*N*-sulfonated chitosan (NCS) and 2-*N*-sulfopropyl chitosan (PCS) were synthesized. Their chemical structures were verified by FTIR and ^1H -NMR. The sulfonation degree of the sulfonated chitosan, which was determined by elemental analysis, could be varied by changing the amount of sulfonation reagent or the reaction time. To evaluate the growth factor-protective ability of sulfonated chitosans, basic fibroblast growth factor (bFGF), which is one of the most important growth factors in tissue repair, was used as the target protein. By *in vitro* cell culture, the morphology of fibroblasts cultured in different conditions was observed by the costaining of cytoskeleton and cell nuclei, according to which the cell shape indexes such as perimeter, area and aspect ratio were analyzed. The results showed that bFGF/Heparin has the highest values in all cell shape indexes. However, compared to the pristine chitosan (CS), the combination of bFGF with all sulfonated chitosan did not show any effect on the fibroblasts morphology. By cell viability test, the influence of sulfonated chitosan on protecting bFGF activity was studied. Similar to the results of cell morphology, heparin also showed the strongest ability to promote bFGF activity. However, the sulfonated chitosans showed different protecting ability. For OCS and PCS, no significantly effect on bFGF activity was observed. However, NCS could promote the bFGF activity effectively, since the cell viability was significantly higher than that of bFGF/CS, and reached about 70% of bFGF/Hep. Meanwhile, the effect of sulfonation degree was also studied, showing that the cell viability was not affected by the sulfonation degree of chitosan. All these results indicate that the sulfonation position is the key point of the growth factor-protective ability of sulfonated chitosans.

Keywords Sulfonated chitosan, bFGF, Bioactivity, Heparin