

羧甲基壳聚糖季铵盐的制备、表征及其对 HeLa 细胞的影响

孙立苹^{a*} 陈 效^b 杜予民^c

(^a浙江林学院环境科技学院 临安 311300

^b浙江工业大学生物与环境科学学院 杭州; ^c武汉大学资源与环境科学学院 武汉)

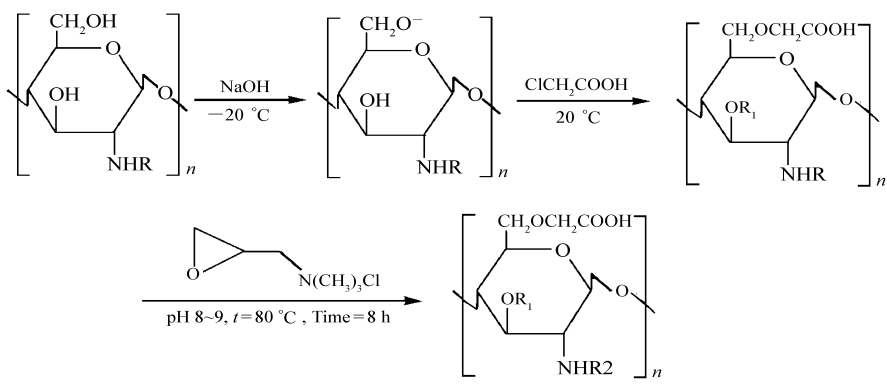
摘 要 采用氯乙酸为羧甲基化试剂制备了羧甲基壳聚糖,以 3 氯-2 羟丙基三甲基氯化铵为季铵阳离子化试剂,合成了羧甲基取代度为 0.73 季铵化取代度为 0.59 分子量为 1.1×10^4 的羧甲基壳聚糖季铵盐。采用傅立叶变换红外光谱、X 射线衍射、核磁共振等分析技术对其分子结构进行了表征。研究了羧甲基壳聚糖季铵盐 (CMQ) 对人宫颈癌 HeLa 细胞的影响。结果表明,CMQ 能抑制 HeLa 细胞增殖,诱导 HeLa 细胞发生凋亡。
关键词 羧甲基壳聚糖季铵盐, 结构表征, HeLa 细胞

中图分类号: O636.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2008)06-0734-04

前文^[1~4]报道了羧甲基壳聚糖以及壳聚糖季铵盐的结构与活性,但是在同一壳聚糖分子链上同时引入羧甲基和季铵盐 2 种基团的研究目前还少有报道。由于两性高分子的链节上同时含有正负 2 种电荷基团,通过控制 2 种基团取代度的大小可以得到不同电荷密度的产物。受在纤维素分子链上同时引入两性基团制备水溶性两性纤维素衍生物^[5],在淀粉分子链上同时引入含季铵阳离子和磷酸阴离子的水溶性的两性淀粉^[6]以及引入含季铵阳离子和羧甲基阴离子的水不溶性两性淀粉研究^[7]的启发,本文以来源丰富的壳聚糖为原料,利用其大分子链上羟基和氨基的反应活性,以氯乙酸为羧甲基化试剂,以 3 氯-2 羟丙基三甲基氯化铵为季铵阳离子化试剂,合成了羧甲基壳聚糖季铵盐,并初步研究了羧甲基壳聚糖季铵盐对人宫颈癌细胞的作用。合成流程如下:



R: H, COCH₃; R₁: H, CH₂COOH; R₂: H, COCH₃, CH₂CH(OH)CH₂N(CH₃)₃Cl
Scheme 1 Synthesis of quaternized carboxymethyl chitosan

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

壳聚糖 (CS), 分子量为 4.5×10^5 , 脱乙酰度为 0.87; 氯乙酸, 异丙醇, 三甲胺, 环氧氯丙烷, 氢氧化钠均为分析纯试剂。

2007-07-07 收稿, 2007-11-01 修回
通讯联系人: 孙立苹, 女, 博士, 讲师; E-mail: sunlp1106@163.com; 研究方向: 再生资源化学生物学

FTR8201 型傅立叶变换光谱仪 (日本岛津公司), KB 压片法; Lab XRD-6000 型 X 射线衍射仪 (日本岛津公司), $CuK\alpha$ 射线源, 管电压 40 kV 管电流 50 mA DS/SS0.5°, 扫描速率 $4^\circ/\text{min}(2\theta)$, 扫描范围为 $8^\circ\sim 40^\circ$, 测试温度 20°C ; Mercury VX-300 型核磁共振仪 (美国 Varian 公司), 以 D_2O 为溶剂, DSS 为参照物; NOEC XS402 型荧光显微镜 (江南光电股份有限公司); JS350 型台式紫外分析仪 (上海金达生化仪器有限公司)。

1.2 羧甲基壳聚糖季铵盐的制备

1.2.1 6-O 羧甲基壳聚糖的制备 在 5 mL 质量分数为 50% NaOH 溶液中加入 10 g CS 冷冻放置过夜, 自然解冻后转入三口烧瓶, 依次加入 100 mL 异丙醇 (作溶剂) 及 12 g 氯乙酸, 室温反应 4 h 调节 $\text{pH}=7.0$ 透析, 干燥。

1.2.2 3 氯-2 羟丙基三甲基氯化铵的制备 在 4°C 下将 0.1 mol HC 滴加于 0.1 mol 三甲胺中, 10 min 后于 31°C 下加入 0.086 mol 环氧氯丙烷, 搅拌均匀后加热至 51°C , 然后缓慢滴加 0.1 mol NaOH 溶液, 再搅拌 2 h 后, 减压蒸馏, 纯化。

1.2.3 羧甲基壳聚糖季铵盐的制备 将制得的 5 g 羧甲基壳聚糖置于三口烧瓶中, 加入 200 mL 蒸馏水, 搅拌, 升温。加入 5 g 3 氯-2 羟丙基三甲基氯化铵, 80°C 下反应 8 h 产物经沉淀, 过滤, 透析, 浓缩, 干燥。电位滴定法测得羧甲基取代度^[8]为 0.73 容量滴定法测得季铵盐的取代度^[9]为 0.59。

1.3 羧甲基壳聚糖季铵盐对 $HeLa$ 细胞的作用

1.3.1 Hoechst 33342 染色法检测细胞核形态 $HeLa$ 细胞传代培养后接种于 6 孔板中, 培养 12 h 将羧甲基壳聚糖季铵盐转染进入细胞, 继续培养 24 和 48 h 用磷酸缓冲液 (PBS) 清洗, 加入体积分数为 1% 的 Hoechst 33342 溶液, 37°C 下避光染色 30 min 观察染色细胞核形态。

1.3.2 凋亡 DNA 的抽提和琼脂糖凝胶电泳 参照 Watson Biotechnologies 的凋亡 DNA (少量) 抽提试剂盒的操作方法抽提 DNA 并分别收集实验组及对照组细胞进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外观察并拍照。

2 结果与讨论

2.1 红外光谱

图 1 为壳聚糖 (CS)、羧甲基壳聚糖 (CM)、羧甲基壳聚糖季铵盐 (CMQ) 的 IR 图。图中可见, 在 CS 红外图谱中的 1655 、 1593 、 1323 和 1381 cm^{-1} 处吸收峰分别为酰胺 I 带、II 带、II 带和 $-CH_2-$ 的伸缩振动峰^[10]。在 CM 和 CMQ 的红外图谱中, 位于 1605 和 1419 以及 1603 和 1415 cm^{-1} 2 处的强吸收峰分别属于 $COO-$ 的不对称和对称伸缩振动峰。在 CM 的红外图谱中, 原来壳聚糖分子上位于 1030 cm^{-1} 处伯位羟基的 $C-O$ 伸缩振动峰消失了, 证明 6 位羟基上的高度羧甲基化。位于 1080 cm^{-1} 处仲羟基的特征吸收峰没有明显改变。CMQ 红外图谱中, 在 1593 cm^{-1} 处 CS 的 $N-H$ 吸收已经消失, 但在 1480 cm^{-1} 处出现了 1 个新的强吸收峰, 这是三甲基季铵离子中的甲基吸收峰, 羧甲基壳聚糖与 3 氯-2-

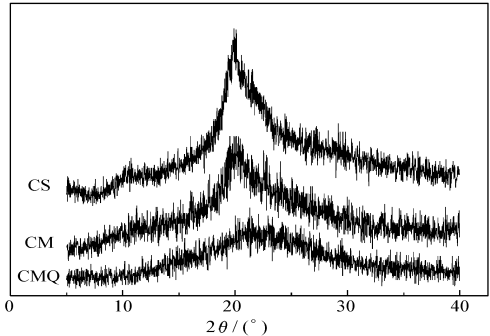
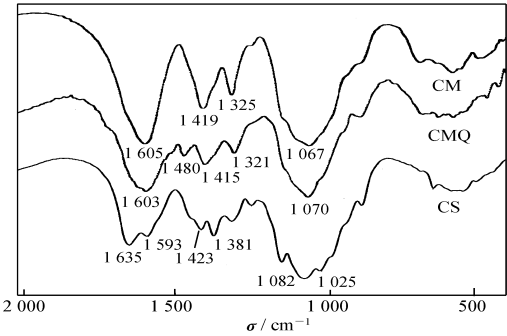


图 1 壳聚糖 (CS)、羧甲基壳聚糖 (CM)、羧甲基壳聚糖季铵盐 (CMQ) 的红外谱图

Fig 1 FT-R spectra of CS, CM and CMQ

图 2 壳聚糖 (CS)、羧甲基壳聚糖 (CM)、羧甲基壳聚糖季铵盐 (CMQ) 的 X 衍射谱图

Fig 2 X-ray diffraction patterns of CS, CM and CMQ

羟丙基三甲基氯化铵作用时发生的是亲核取代反应,即羧甲基壳聚糖分子中的氨基为亲核试剂^[11]。结果表明,产物为 6 位被羧甲基取代的 N-(2 羟基-3 三甲基丙基)氯化铵壳聚糖季铵盐。

2.2 X射线衍射谱图

图 2 为壳聚糖(CS)、羧甲基壳聚糖(CM)、羧甲基壳聚糖季铵盐(CMQ)的广角 X 衍射谱图。图中可见,CS 在 2θ 为 12° 和 21° 处出现 2 个特征峰,呈现“L-2 polymorph”晶型衍射图^[12-13]。由于羧甲基的取代反应使得在 CM 图谱中 2θ 为 10° 处峰强度显著减弱。随着季铵化反应的发生,CMQ 谱图中 2θ 为 20° 处的峰变得更宽,整个分子变成无定形态。

2.3 ^{13}C NMR 和 ^1H NMR 谱图

图 3 为羧甲基壳聚糖季铵盐(CMQ)的 ^{13}C NMR 谱图。图中可见, $\delta 54.3$ 处峰非常强,为三甲铵基中碳(C-d)的吸收; $\delta 178$ 处为羧基在 6 位取代的特征峰。而在 $\delta 101.5$ 、 62.6 、 72.4 、 77.9 、 74.9 和 60.8 处的峰分别归属于 C-1、C-2、C-3、C-4、C-5 及 C-6。在 $\delta 51.7$ 及 68.7 处的峰则可归属于 C-a 及 C-c; $\delta 64.4$ 峰可归属为 C-b 而 $\delta 22.5$ 处则是壳聚糖分子中残留乙酰基中的甲基碳。其中季铵盐结构中峰的归属与 Loubak 等^[11]报道一致。

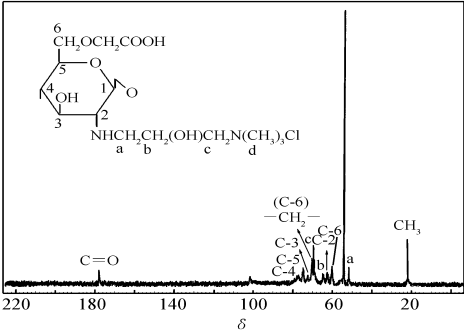


图 3 羧甲基壳聚糖季铵盐(CMQ)的 ^{13}C NMR 谱图
Fig.3 ^{13}C NMR spectrum of CMQ

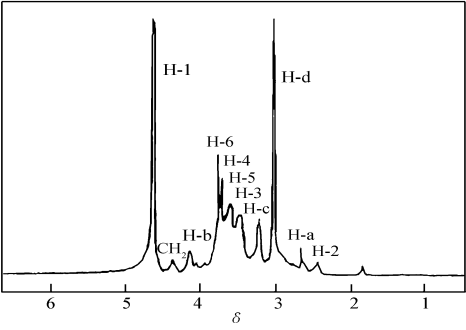


图 4 羧甲基壳聚糖季铵盐(CMQ)的 ^1H NMR 谱图
Fig.4 ^1H NMR spectrum of CMQ

图 4 为羧甲基壳聚糖季铵盐(CMQ)的 ^1H NMR 谱图。图中可见, $\delta 1.83$ 处的强峰归属于壳聚糖分子中残留乙酰基中的甲基氢。最强峰 $\delta 3.04$ 归属于季铵基中甲基上的氢; $\delta 4.58$ 、 2.66 、 3.52 、 3.71 、 3.59 和 3.74 分别归属于 H-1、H-2、H-3、H-4、H-5 及 H-6; $\delta 4.37$ 处的吸收峰归属于羧甲基 CH_2 上的氢; 而 $\delta 2.42$ 、 4.14 和 3.23 则分别归属于 H-a、H-b 及 H-c。这些结果与文献^[11]值一致。

2.4 Hoechst 染色后细胞核的形态

图 5 a 为未经 CMQ 处理的 HeLa 细胞形态,细胞始终为多角形,梭形,贴壁牢固,极少见到凋亡细胞和凋亡小体。图 5 b 和图 5 c 为经过羧甲基壳聚糖季铵盐处理不同时间后的 HeLa 细胞形态。图中可见,

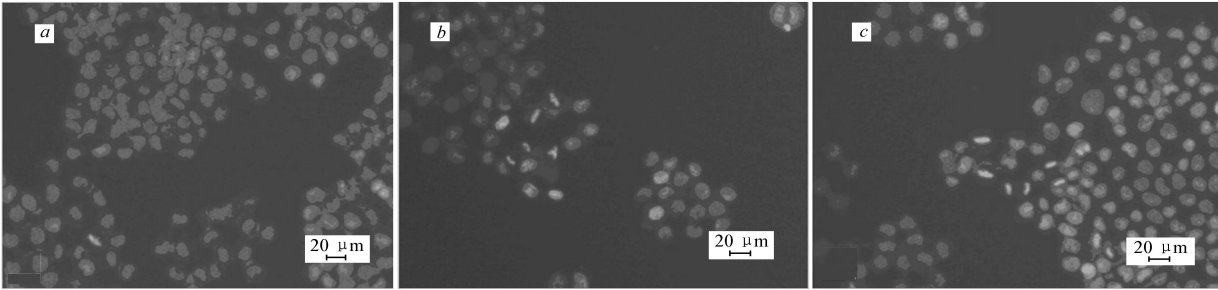


图 5 经 CMQ 处理不同时间的 HeLa 细胞形态
Fig.5 Morphology of HeLa cells treated with CMQ for different times
Time/h: a 0, b 24, c 48

24 h后细胞变圆, 体积缩小, 细胞核发生分裂, 但细胞膜完整; 48 h后有较多凋亡细胞, 表现为细胞体积变小, 细胞浆密度增大, 颜色变深, 染色质致密固缩聚集于细胞核, 核膜呈境界分明的块状或新月形小体, 细胞核裂解。凋亡小体内有完整的细胞器。细胞染色质皱缩, 聚集在核膜边缘或贴近核膜, 出现细胞凋亡的特征性改变。

2.5 DNA凝胶电泳

经羧甲基壳聚糖处理后, HeLa细胞 DNA断裂, 细胞电泳图(图 6)上出现凋亡细胞的拖尾带, 处理 48 h后拖尾现象尤为严重。

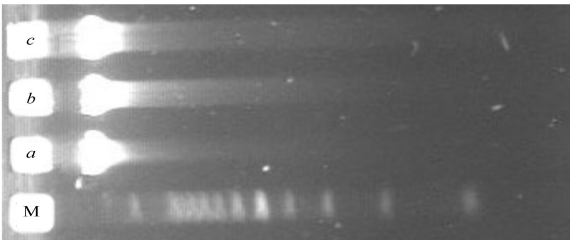


图 6 细胞 DNA凝胶电泳
Fig 6 DNA fragmentation of HeLa cells(M: DNA Marker
Time stained by CMQ/h: a 0 b 24 c 48

参 考 文 献

1 Chen LY, Du YM. Biomaterials J, 2004 25 3 725
2 Sun L P, DU YM. Acta Polym Sin J, 2004 2 191
3 Li H B, Du YM. Colloid and surfaces B: Physicochem Eng Aspects J, 2004 242 1
4 Xu YM, Du YM. Biomaterials J, 2003 24 5 015
5 ZHANG Li Ming(张黎明), LI Zuo Mei(李卓美). Chinese J Appl Chem(应用化学)[J], 1998 15(4): 5
6 Xu SM, Zhang S F, Lu R W. J Appl Polym Sci J, 2003 89 263
7 Chan W C. J Appl Polym Sci J, 1993 50 1 733
8 Muzzarelli R A A, Giacomelli G. Carbohydr Polym J, 1987 7 87
9 Muzzarelli R A A, Tanfani F, Emanuelli M. Carbohydr Res J, 1984 126 225
10 Zong Z, Kimura Y, Takahashi M. Polymet J, 2000 41 899
11 Loubak i E, Qurevitch M, Sicsic S. Eur Polym J J, 1991 27 311
12 Sato H, Tabeta R. Macromolecules J, 1987 20 2 424
13 Kim JH, Lee YM. Polymet J, 1993 34 1 952

Synthesis, Characterization of Quaternized Carboxymethyl Chitosan and its Effect on HeLa Cells

SUN LiPing*, CHEN Xiaob, DU YuMin^c

(^a School of Environmental Science and Technology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300

^b College of Biology and Environmental Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou

^c College of Resources and Environmental Science, Wuhan University, Wuhan)

Abstract A new approach to preparation of chemically modified carboxymethyl chitosan(CM) derivatives was reported, where CM was prepared from chitosan with chloroacetic acid as the carboxymethyl reagent first and then N-quaternary ammonium group was introduced by the reaction of CM with 2,3-epoxypropyl trimethyl ammonium. The degree of substitution(DS) of carboxymethyl group was 0.73 and the DS of the quaternization group was 0.59. The mass averaged molecular weight of CMQ was 1.1×10^4 . The structures of the derivatives were characterized by FT-IR, XRD and ¹³C NMR. The effect of the CMQ on the human cervical carcinoma HeLa cells showed that CMQ can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HeLa cells.
Keywords quaternized carboxymethyl chitosan, structure characterization, HeLa cells