

WSC-DTPA 纳米粒辐射防护作用的初步研究

刘蕴莹¹ 周效旺¹ 万建美² 胡丹飞¹ 张友九¹

¹ (苏州大学医学部放射医学与防护学院 江苏省放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

² (苏州大学医学部实验中心 苏州 215123)

摘要 为研究 WSC-DTPA (水溶性低分子量壳聚糖 WSC, 二乙烯三胺五乙酸 DTPA) 纳米粒的辐射防护作用, 采用 N-乙酰化反应和离子凝胶法制备不同游离氨基含量的 WSC-DTPA 纳米粒; MTT 法检测其对 6 Gy ⁶⁰Co γ 射线照射后 48 h BRL 细胞存活率的影响; 活细胞工作站观察 BRL 细胞摄取 FITC-WSC-DTPA 纳米荧光探针的情况。结果表明: 成功合成了游离氨基含量分别为 92.7%、74.3%、1.59% 的 WSC-DTPA 聚合物; WSC、WSC 纳米粒以及 WSC-DTPA 纳米粒 (氨基含量为 92.7%, 浓度在 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 以上), 随着药物浓度的增加, BRL 细胞存活率均显著高于单纯照射组, 差别有统计学意义 ($p < 0.05$), 而游离氨基含量为 1.59% 的 WSC-DTPA 纳米粒无辐射保护作用; 活细胞工作站检验结果显示 2 h 内 WSC 纳米粒、WSC-DTPA 纳米粒能够进入 BRL 细胞, 而非纳米化的 WSC-DTPA 聚合物无法进入细胞。

关键词 水溶性低分子量壳聚糖 (WSC), 二乙烯三胺五乙酸 (DTPA), 纳米粒, BRL 细胞, 辐射保护

中图分类号 R811.5, R93, Q2-33

随着核电和核技术应用的高速发展, 放射性核素内污染事故并不少见, 特别是 2011 年日本福岛核电站的核泄露, 让人们更关注放射性核素内污染对人体的危害。尽快鉴定污染的核素类型, 采用有效的促排剂, 可大大降低放射性核素内污染对人体的损害^[1]。针对无特效促排剂或核素种类不明的放射性核素, 若及时采用对多种核素都有效的广谱促排药物, 有可能减少危害。二乙烯三胺五乙酸 (DTPA) 作为广谱螯合剂已应用于临床, 不足的是 DTPA 为亲水性分子, 不能透过细胞膜, 仅能促排体液中溶解的放射性核素, 难以排出积聚在骨骼和肌肉中放射性同位素, 或肺内不溶性放射性同位素化合物^[2]。壳聚糖 (Chitosan, CTS) 能被人体吸收利用, 生物相容性好, 无毒, 具有生物降解性, 无免疫原性^[3], 特别是低分子量水溶性壳聚糖 (Water-soluble low-molecular weight chitosan, WSC) 有明显的消除自由基、保护机体免受辐射损伤的作用, 细胞毒性极低, 有可能成为良好的辐射损伤防护剂^[4]。本研究鉴于 WSC 及 DTPA 的各自特点, 旨在通过 N-乙酰化反应把 DTPA 连接到 WSC 上, 制备出能够透过细胞膜并具有防护效果的水溶性低分子量壳聚糖-二乙烯三胺五乙酸 (WSC-DTPA) 纳米粒, 为进一步研究其对内污染放射性核素的促排及防护作用奠

定基础。

1 实验材料和方法

水溶性低分子量壳聚糖 (分子量 ≤ 3000 , 脱乙酰度=92.3%, 南通兴成生物制品厂); 二乙烯三胺五乙酸 (DTPA, 苏州亚科化学试剂股份有限公司); 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDAC, 上海宝曼生物科技有限公司); 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS, 苏州亚科化学试剂股份有限公司); 多聚磷酸钠 (TPP, 化学纯, 国药集团化学试剂有限公司); 异硫氰酸荧光素 (FITC, 美国 molecule probe 公司); BRL 细胞株 (苏州大学药学院惠赠); RPMI 1640 培养基 (美国 GIBCO 公司); 胎牛血清 (加拿大 Wisent 公司); 其它试剂均为分析纯。

集热式磁力搅拌器 (DF101S, 金坛市鸿科仪器厂); 透析袋 1000 (F0132, 上海楷洋生物技术有限公司); 低速台式离心机 (TDL 40C, 上海安亭科学仪器厂); 真空冷冻干燥机 (FreeZone, 美国 Labconco 公司); 傅立叶变换红外光谱仪 (MagnaIR, 美国 Nicolet 公司); 超导核磁共振仪 (UNITY INOVA400, 美国 Varian 公司); 紫外分光光度计 (Spectrum V5.10.6, 上海光谱仪器有限公司); 酶标分析仪

江苏高校省级重点实验室开放研究课题 (KJS0829) 和江苏省优势学科资助

第一作者: 刘蕴莹, 女, 1984 年 6 月出生, 2008 年毕业于滨州医学院, 现为苏州大学 2009 级放射医学专业在读硕士研究生

通讯作者: 张友九, Email: yjzhang@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2011-11-25, 修回 2012-01-15

(POWERWAVE.XS, 美国 Bio-Tek 公司); 活细胞工作站 (Cell'R, 日本 Olympus)。

2 实验方法

2.1 WSC-DTPA 聚合物的合成^[5]

采用 N-乙酰化反应制备 WSC-DTPA 聚合物。称取 0.5 g WSC, 加入 50 mL 0.1 mol/L HCL 溶液, 在 30℃ 持续磁力搅拌使 WSC 充分溶解, 将 DTPA 按不同的量 (见表 1) 加入 50 mL WSC 溶液中, 然后调 pH 值至 6, 再加入 EDAC 至终浓度达 0.1 mol/L 作为缩合催化剂, 30℃ 持续磁力搅拌反应 12 h, 最后用去离子水、0.5 mol/L NaOH 溶液反复透析纯化, 经真空冷冻干燥后即得产物。

2.2 WSC-DTPA 聚合物游离氨基的检测^[6]

采用 TNBS 法检测聚合物游离氨基含量。准确吸取 1.0 g/L WSC 标准溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8 和 1.0 mL, 分别置于 9 个试管中, 去离子水补充至 1 mL, 分别加入 1 mL 4% NaHCO₃ 和 1 mL 0.1% TNBS 混匀, 37℃ 反应 2 h 后加入 1 mL 去离子水快速震荡, 室温下静置冷却后在 420 nm 测吸光度, 拟合 WSC 质量与吸光度值之间的标准曲线。将不同配比制备的 WSC-DTPA 聚合物配置成 10 g/L 的样品, 按上述方法测定吸光度, 通过标准曲线计算其游离氨基的含量。

2.3 WSC 及 WSC-DTPA 聚合物的红外光谱鉴定

采用傅里叶变换红外光谱扫描, 将 WSC 及 WSC-DTPA 聚合物分别与光谱纯 KBr 粉末混合研磨、压片, 扫描条件为: 波数范围 400–4000 cm⁻¹, 分辨率 1 cm⁻¹, 红外光谱能量 40 mW, 共 16 次扫描累积。

2.4 WSC 及 WSC-DTPA 聚合物的核磁共振氢谱检测

采用超导核磁共振仪扫描其核磁氢谱。将 WSC 及 WSC-DTPA 聚合物分别溶于 D₂O/CF₃COOD (体积比为 4:1) 中, 扫描条件为: 频率 400 MHz, 范围 0–14 μg/g。

2.5 WSC-DTPA 纳米粒的制备^[7]

采用离子凝胶法制备 WSC-DTPA 纳米粒。用 1% 的乙酸溶液制备终浓度为 0.5% 的 WSC-DTPA 聚合物冻干品, 超声处理 2 min, 用去离子水制备终浓度为 0.5% 的 TPP 溶液, 并将其分别用 0.22 μm

滤膜过滤; 室温磁力搅拌速度为 800±10 r/min 的条件下, 将 0.5% 的 TPP 水溶液逐滴加入到 WSC-DTPA 乙酸溶液中, WSC-DTPA 与 TPP 的质量比为 3:1, 滴速约为 2 滴/秒, 滴完后再继续搅拌 1 h 再进一步表征。

2.6 WSC-DTPA 纳米粒粒度测量

采用纳米激光粒度仪测 WSC-DTPA 纳米粒平均粒度。将制备的 WSC-DTPA 纳米粒溶液用去离子水稀释 10 倍后, 测量其平均粒径。

2.7 细胞

BRL 细胞的培养方法: RPMI1640 培养液内含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素, 置 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。

2.8 MTT 测细胞存活率^[8]

药物配制: 将 WSC、WSC 纳米粒、1:2.5 WSC-DTPA 纳米粒、1:20 WSC-DTPA 纳米粒溶于无血清培养基, 各个药物终浓度均分别为: 0、1.56、3.13、6.25、25.0、50.0 μg/mL, 各组药物名称分别以游离氨基含量命名为: 100%、100%-nano、92.7%-nano、1.59%-nano。

取对数生长期 BRL 细胞, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞浓度为 3×10⁴/mL, 接种于经辐照灭菌的 96 孔培养板中, 随机分为对照组 (未照射, 未加药)、加药组 (未照射, 加药)、照射组 (照射, 未加药)、照射加药组、空白组 (未加细胞, 只加培养液), 每组设 6 个平行孔, 每孔 100 μL, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁生长后, 弃去培养液, 加药组和照射加药组加入 100 μL 终浓度分别为 0、1.56、3.13、6.25、25.0、50.0 μg/mL 的药物, 其他组加入 100 μL 培养液, 置于培养箱中继续培养 24 h 后, 给予照射加药组和照射组 BRL 细胞 ⁶⁰Co γ 射线照射, 照射剂量为 6 Gy, 剂量率为 0.46 Gy/min; 继续培养 48 h, 实验终止前 4 h 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10 μL, 继续孵育 4 h, 测试前弃去上清液, 每孔加入 100 μL DMSO 后用酶标仪于 570 nm 波长处测定每孔的光吸收值 (OD)。按下式计算细胞的存活率。

细胞存活率 = (试验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%

2.9 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记^[9,10]

分别用 1% 的乙酸溶液溶解 WSC、WSC 纳米

粒、游离氨基含量为 1.59% WSC-DTPA 聚合物及其纳米粒的冻干品，终浓度为 10 mg/mL，充分振荡溶解后，用 5 mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 9，在室温、持续磁力搅拌的条件下，缓慢加入 10 mg/mL FITC 二甲基亚砷溶液，冻干品溶液与 FITC 二甲基亚砷溶液的体积比为 10:1，避光反应 10 h 后，再用去离子水透析 3 d，直至透析液中无荧光测出，将标记的探针冻干后备用，分别制得 FITC-WSC、FITC-WSC 纳米粒、FITC-1.59%WSC-DTPA 聚合物及 FITC-1.59% WSC-DTPA 纳米粒。

2.10 细胞摄取实验

取对数生长期 BRL 细胞，用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞浓度为 3×10^3 /mL，接种于经辐照灭菌的直径 35 mm 孔径 10 mm 玻底培养皿中，置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养，待细胞贴壁生长后，置于活细胞工作站中，调节焦距，

分别在镜下加入 FITC-WSC、FITC-WSC 纳米粒及游离氨基含量为 1.59% FITC- WSC-DTPA 纳米粒荧光探针，观察细胞 2 h，激发波长 485 nm，曝光时间：DIC 30 ms，FITC 30 ms，曝光强度 70.9%，拍照间隔 5 min。

2.11 统计分析

采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析，数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，统计界值为 0.05， $p<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 游离氨基测定

以 WSC 实际脱乙酰度 92.3%的样品的游离氨基含量为 100%，计算 WSC 连接 DTPA 后其游离氨基含量，结果如表 1。

Table 1 the remaining free amino groups of modified(WSC)-DTPA with different ratio of DTPA during the coupling reaction
(%, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

DTPA / g	Resulting polymer (mol/mol)	Remaining free amino groups /%
—	WSC HCL	100
24.43	Conjugate 1:20	1.59±1.23
12.22	Conjugate 1:10	14.1±2.5
6.11	Conjugate 1:5	74.3±1.7
3.05	Conjugate 1:2.5	92.7±3.5

TNBS 在偏碱性条件下与氨基酸的伯氨基反应时，先形成一带有等摩尔 SO₃²⁻的中间络合物，此中间体在光谱上有两个吸收值相近的峰，分别位于 355 nm 和 420 nm 附近。溶液酸化后，在 420 nm 处的吸收值就显著下降，此时中间络合物都转化成 TNP-氨基酸，在 350 nm 附近的吸收峰则蓝移至 340 nm 处^[11]。

据此可在 420 nm 或 340 nm 对氨基酸进行定量测定，随着 DTPA 量的减少，DTPA 上的-COOH 通过 N-酰化连接 WSC 上的-NH₂ 形成的酰胺键减少，游离氨基含量由(1.59±1.23)%上升至(92.7±3.5)%，但游离氨基含量与 WSC 和 DTPA 摩尔比不成正比，这可能与 DTPA 分子位阻或 DTPA 与 WSC 分子链交联有关^[12]。

3.2 红外光谱分析

将 WSC 与合成的不同游离氨基含量的 WSC-DTPA 聚合物干燥，与 KBr 压片进行红外扫描，见图 1。在 WSC 的红外光谱中，1588 cm⁻¹ 为 WSC 上游离-NH₂ 变形振动特征峰，1379 cm⁻¹ 为

WSC 上甲基的伸缩振动吸收峰，在 WSC-DTPA 的红外光谱图中，1634 cm⁻¹ 为 WSC 上的-NH₂ 与 DTPA 上的-COOH 通过 N-酰化连接的酰胺键的特征峰，而 2924 cm⁻¹ 和 1409 cm⁻¹ 分别为 WSC-DTPA 产物中-CH₂-及-COO-的特征峰^[13,14]，表明 DTPA 被成功地连接到了 WSC 上。

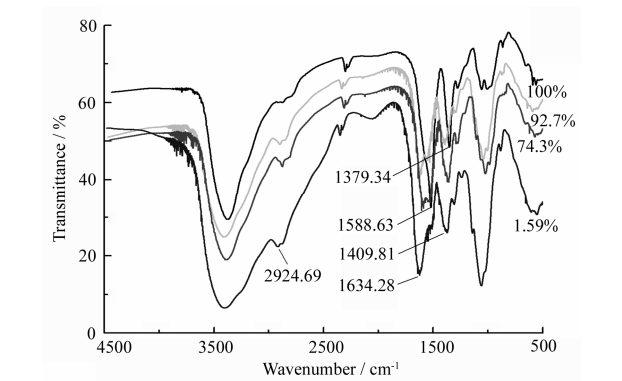


Fig.1 FTIR spectra of WSC-DTPA related with different content free amino groups

3.3 核磁共振氢谱鉴定

将 WSC 与合成的不同游离氨基含量的

WSC-DTPA 聚合物干燥, 用氘代试剂 D_2O / CF_3COOD (体积比为 4:1) 作为溶剂溶解后, 扫描其核磁共振氢谱, 结果见图 2。其中, δ 4.8 与 δ 1.0 左右为溶剂峰, 与 WSC 核磁氢谱相比, δ 2.6、 δ 3.3、 δ 10.4 分别为 DTPA 中与 $-COOH$ 相连的亚甲基的峰, 与 $-N$ -相连的亚甲基峰以及 DTPA 羧基中 H 的峰, 在 δ 5.0–9.0 之间的峰为 WSC 上的 $-NH_2$ 与 DTPA 上的 $-COOH$ 通过 N-酰化连接的酰胺键的峰^[15], 说明 DTPA 被成功接枝到了壳聚糖上。

3.4 粒度测量

采用纳米激光粒度仪测量 WSC-DTPA 纳米粒的平均粒径, 结果如图 3 所示, A 为 WSC 纳米粒, B 为游离氨基含量为 92.7% WSC-DTPA 纳米粒, C 为游离氨基含量为 74.3% WSC-DTPA 纳米粒, D 为游离氨基含量为 1.59% WSC-DTPA 纳米粒, 其平均粒径分别为 7.31 nm、8.42 nm、8.34 nm、14.53 nm, 且各个粒径测量值的 PDI 均小于 0.03, 说明制备的纳米粒子粒径分布均匀。

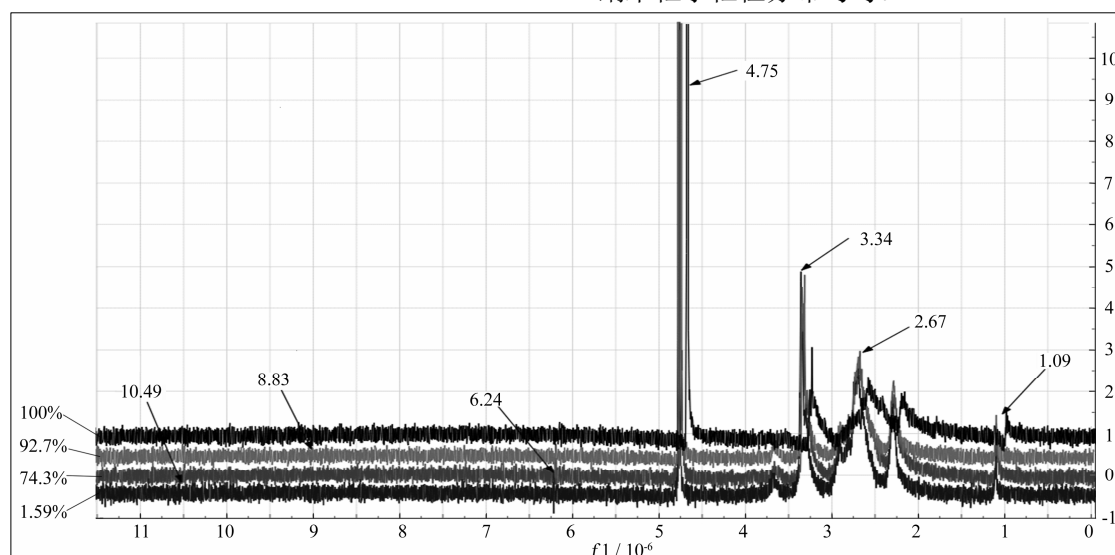


Fig.2 ^1H NMR spectra of WSC-DTPA related with different content free amino groups

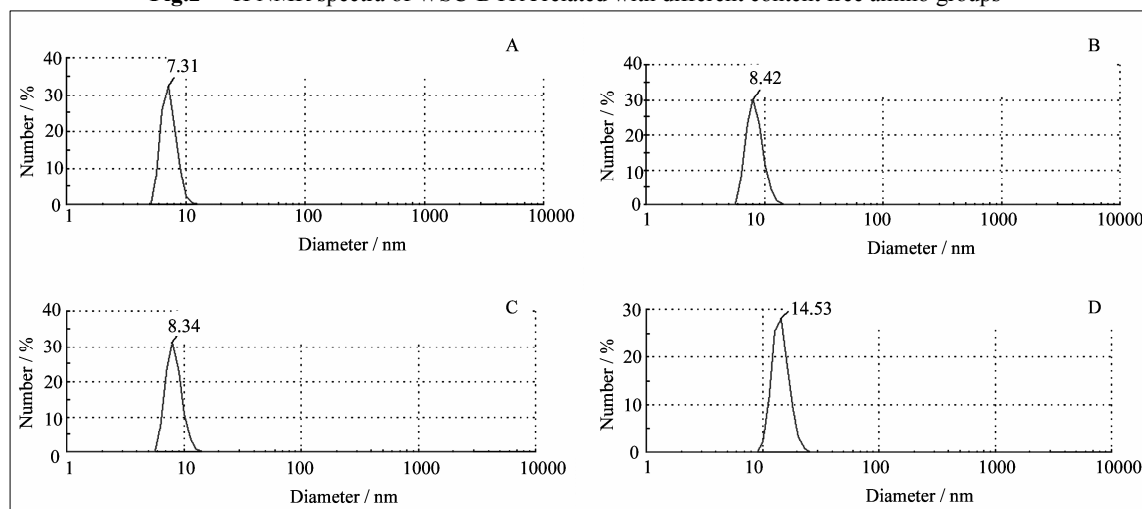


Fig.3 Particle size distribution of WSC-DTPA nanoparticles with different content free amino groups

3.5 MTT 测细胞存活率

6 Gy 照射 48 h 后 BRL 细胞的存活率曲线见图 4。与照射组 (照射, 未加药) 相比, 游离氨基含量为 1.59% WSC-DTPA 纳米粒加药组, BRL 细胞存活率没有明显差异; 而 WSC 加药组、WSC 纳米粒加药组及浓度在 $6.25 \mu g/mL$ 以上的游离氨基含量为

92.7% WSC-DTPA 纳米粒加药组, 随着药物浓度的增加, BRL 细胞存活率均显著增加, 提示 WSC、WSC 纳米粒及浓度在 $6.25 \mu g/mL$ 以上的游离氨基含量为 92.7% WSC-DTPA 纳米粒对 6 Gy ^{60}Co γ 射线照射的 BRL 细胞具有一定的辐射保护作用。

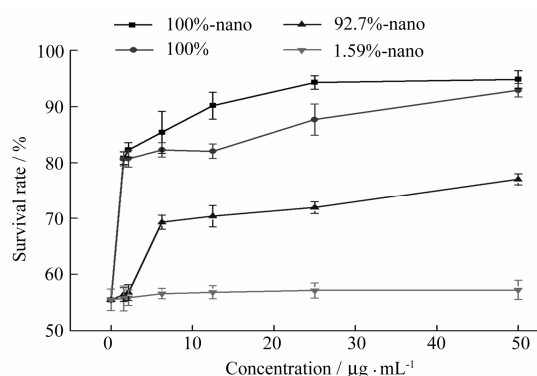


Fig.4 Survival rate curves of BRL cells treated with 6 Gy irradiation and WSC-DTPA nanoparticles

MTT 法是最常用的检测细胞存活和生长的方法,但因凋亡早期线粒体的结构保持完整,线粒体酶活性未完全丧失,仍能降解 MTT 使其变色,所以 MTT 法只能检测细胞的相对数和相对活力,不

能测定细胞的绝对数^[16]。因此,MTT 法仅用作细胞活力的测定来评价细胞毒性和用作药物筛选等^[17],不能作为细胞凋亡的评价指标,但可以为后续药物的辐射保护作用研究提供基础。

3.6 细胞摄取结果

活细胞工作站 (Live cell station, LCS) 是利用电脑控制的全电动显微镜,可用于活细胞的长时间动态观察。本实验将已贴壁的 BRL 细胞置于活细胞工作站显微镜下,调节适合焦距后,拍摄结果见图 5。图中 A 为 FITC-WSC 加药组, B 为 FITC-WSC 纳米粒加药组, C 为 FITC-1.59% WSC-DTPA 聚合物加药组, D 为 FITC-1.59% WSC-DTPA 纳米粒加药组;各组中分别拍摄了加药后 0、60、120 min 及 120 min 洗掉药物后的细胞情况。

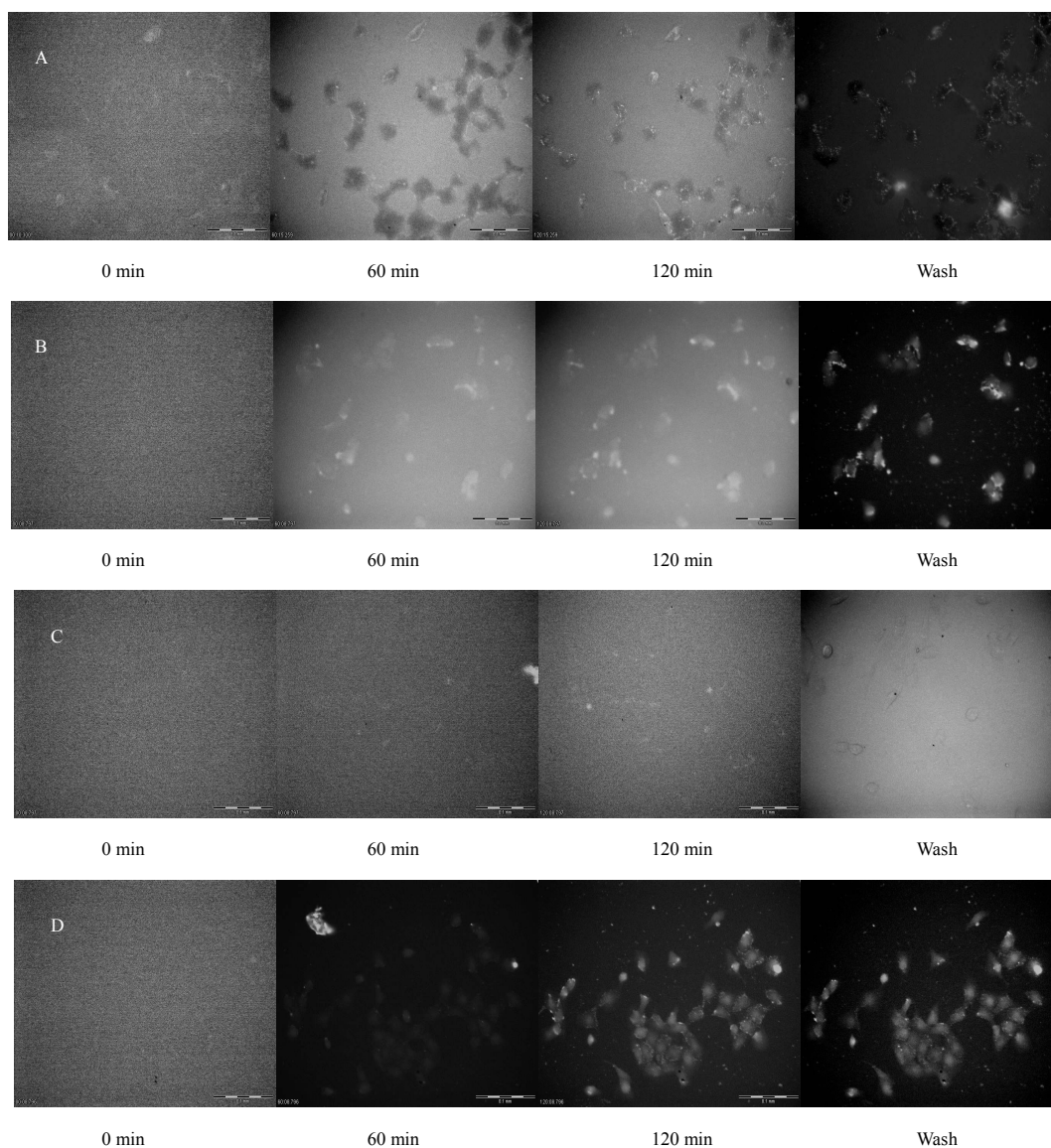


Fig.5 Live cell image of BRL cells treated with fluorescence probes at different time

从图5中可以看出,在加药60 min时B、D组细胞内可见较弱的荧光,A、C组细胞内未见荧光;在加药120 min时B、D组细胞内可见明显荧光,A组仅在细胞膜可见荧光,而C组细胞内未见荧光,洗掉药物背景后,此结果更为明显,说明纳米粒子能较快地进入细胞,并成功解决了DTPA不能通过细胞膜的缺点。

通常,亲水性分子很难通过细胞膜,而疏水性分子易透过细胞膜进入细胞。疏水性生物大分子和微粒物质进入细胞的主要途径是内吞,已确定的大分子内吞途径主要有:网格蛋白介导的内吞作用、小窝介导的内吞作用、大胞饮、非网格蛋白和非小窝介导的内吞作用^[18,19]。由于纳米粒的粒径很小,很容易被细胞通过胞饮吞噬所摄取,甚至可能直接进入细胞。纳米粒的理化性质,如颗粒大小,形状,分子量,表面电荷,都是决定细胞摄取纳米粒的因素,因而细胞摄取纳米粒的机制可能涉及更多因数^[20]。

4 结论

本研究采用N-乙酰化反应和离子凝胶法成功地制备出游离氨基含量分别为92.7%、74.3%、1.59%的WSC-DTPA纳米粒,MTT法证明了游离氨基含量为100%的WSC、WSC纳米粒及浓度在6.25 μg/mL以上的游离氨基含量为92.7% WSC-DTPA的纳米粒对6 Gy ⁶⁰Coγ射线照射的BRL细胞具有一定的辐射防护作用,而活细胞工作站观察到2 h内纳米粒可以透过细胞膜进入细胞。为下一步研究WSC-DTPA纳米粒的体内促排及防护作用提供基础。

参考文献

- 1 李蓉,栗永萍,徐辉. 促排剂的研究进展及在放射性突发事件中的应用. 中华放射医学与防护杂志, 2005, **25**(5): 488-491
LI Rong, SU Yongping, XU Hui. Research progress concerning the application of Chelating agents in the radiological emergencies. Chin J Radiol Med Prot, 2005, **25**(5): 498-491
- 2 Guillaume Phan, Amaury Herbet, Sophie Cholet, *et al.* Pharmacokinetics of DTPA entrapped in conventional and long-circulating liposomes of different size for plutonium decorporation. J Controll Rel, 2005, **110**: 177-188
- 3 Schipper NG M, Olsson S, Hoogstraate J A, *et al.* Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. Pharm Res, 1997, **14**(7): 923-929
- 4 Gulik E S, Kostashe Nla. Radioprotective efficacy of chitosan, dissolved in aqueous extract of Abies Sibirica. Radiats Biol Radioecol, 2004, **44**(5): 563-575
- 5 WU Zhenghong, PING Qineng, LI Jianying, *et al.* Effect of Liposome Double-Coated with Chitosan and Chitosan-EDTA Conjugates on Oral Absorption of Insulin. J Chin Pharm Sci, 2006, **15**(3): 139-146
- 6 Andreas Bernkop-Schnürch, Martina E. Krajicek. Mucosal adhesive polymers as platforms for peroral delivery and adsorption: synthesis and evaluation of different chitosan-EDTA conjugates. J Controll Rel, 1998, **50**: 215-223
- 7 GAN Quan, WANG Tao, Cochrane C, *et al.* Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. Colloids Surf B, 2005, **44**: 65-73
- 8 MAO Shirui, SHUAI Xintao, Unger F, *et al.* The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. International journal of pharmaceuticals. Int J Pharm, 2004, **281**: 45-54
- 9 HUANG Min, Khor E, LEE Yonglim. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: Effects of molecular weight and degree of deacetylation. Pharm Res, 2004, **21**(2): 344-353
- 10 赵佳胤, 郭建敏. 壳聚糖纳米粒子荧光探针的制备和表征. 分析化学研究报告, 2006, **34**(11): 1555-1559
ZHAO Jiayin, WU Jianmin. Preparation and characterization of the fluorescent Chitosan nanoparticle probe. Chin J Anal Chem, 2006, **34**(11): 1555-1559
- 11 刘涛, 张贵峰, 周卫斌, 等. 凝胶过滤色谱-多角度激光散射法测定琥珀酰明胶自由氨基修饰度. 分析化学研究报告, 2007, **1**(35): 43-48
LIU Tao, ZHANG Guifeng, ZHOU Weibin, *et al.* Determination of modification degree of succinylated gelatin by size exclusion chromatography coupled with multi angle Laser light scattering. Chin J Anal Chem, 2007, **1**(35): 43-48
- 12 Katsutoshi Inoue, Kazuharu Yoshizuka, Keisuke Ohto. Adsorptive separation of some metal ions by complexing agent types of chemically modified chitosan. Anal Chim Acta, 1999, **388**: 209-218
- 13 Akhlaghi M, Pourjavadi A. Preparation and primary evaluation of ⁶⁶Ga-DTPA-chitosan in fibrosarcoma bearing mice. Nukleonika, 2011, **56**(1): 41-47
- 14 TIAN Feng, LIU Yu, ZHAO Binyuan. Study of the de-

- polymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide. *Carbohydr. Polym.*, 2004, **57**: 31-37
- 15 Darras V, Nelea M, Winnik F M., *et al.* Chitosan modified with gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid for magnetic resonance imaging of DNA/chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym.*, 2010, **80**: 1137-1146
- 16 Madesh M, Anup R, Benard O, *et al.* Apoptosis in the monkey small intestinal epithelium: structural and functional alterations in the mitochondria. *Free Radical Bio-Med.*, 1999, **26**: 836-843
- 17 LIU Hongtao, LI Wenming, XU Gang, *et al.* Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells. *Pharm Res.*, 2009, **59**: 167-175
- 18 Khalil I A, Kogure K, Akita H, *et al.* Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery. *Pharmacol Rev.*, 2006, **58**: 32-45
- 19 Hae Yun Nam, Seok Min Kwon, Hyunjin Chung, *et al.* Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *J Controll Rel.*, 2009, **135**: 259-267
- 20 Chavanpatil A K M D, Panyam J. Nanoparticles for cellular drug delivery: mechanisms and factors influencing delivery. *J Nanosci Nanotechnol.*, 2006, **6**: 2651-2663

Study on radiation protection of WSC-DTPA nanoparticles

LIU Yunying¹ ZHOU Xiaowang¹ WAN Jianmei² HU Danfei¹ ZHANG Youjiu¹

¹(School Of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Jiangsu Province Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Suzhou 215123, China)

²(Experimental Center of Medical College, Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT To investigate the radiation protection of WSC-DTPA nanoparticles, N-acylation reaction and ion crossing-linking method were used to prepare nanoparticles in different remaining free amino groups. MTT assay was performed to evaluate their effects on the viability of the cells after γ -rays irradiation, while the capability of FITC-WSC-DTPA nanoparticles probe penetrating through cellular membrane was observed by Live Cell Station. The results show that WSC-DTPA polymers were successfully synthesized, in which the content free amino group is 92.7%, 74.3%, 1.59%, respectively. Compared with γ -rays alone group, it was shown that WSC, WSC nanoparticles and WSC-DTPA nanoparticles with the concentration more than 6.25 $\mu\text{g/mL}$ and the free amino group content around 92.7% have good efficacy in radiation protection to BRL cells from damage induced by 6 Gy ^{60}Co γ -rays by the higher survival rate, while WSC-DTPA nanoparticles with 1.59% free amino group content do not have radiation protection to BRL cells. The WSC nanoparticles and WSC-DTPA nanoparticles can penetrate into cellular within 2 h, while WSC-DTPA polymers could not pass through the membrane.

KEYWORDS Water-soluble low-molecular weight chitosan(WSC), Diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), Nanoparticles, BRL cells, Radiation protection.

CLC R811.5, R93, Q2-33