

透明质酸的浓度对成纤维细胞黏附和增殖的影响

刘海峰, 常 津, 陈亦平, 姚康德

(天津大学材料科学与工程学院, 天津 300072)

摘要: 透明质酸广泛存在于细胞外基质、细胞表面和细胞内部, 其独特的理化特性使其具有多种生物学功能。透明质酸对细胞具有多种作用, 可以调控细胞生长因子和细胞因子的分泌, 抑制蛋白酶的分解, 影响细胞的黏附、生长、增殖和分化。本实验将不同浓度的透明质酸加入成纤维细胞培养液中, 考察了在培养液中透明质酸的浓度对成纤维细胞的黏附、DNA 合成量、糖胺聚糖分泌量和 MTT 活性的影响。实验结果表明, 当培养液中透明质酸的浓度小于 0.1% 时, 对成纤维细胞的黏附和生长增殖有明显的促进作用, 当培养液中透明质酸的浓度大于 0.1% 时, 对成纤维细胞的黏附和生长增殖有很强的抑制作用。

关键词: 透明质酸; 浓度; 成纤维细胞; 黏附; 增殖

引言

透明质酸(Hyaluronic acid, HA)是天然细胞外基质(ECMs)中糖胺聚糖(GAGs)的重要组成物之一。透明质酸与其它硫酸化粘多糖和胶原蛋白、弹性蛋白等纤维状蛋白质共同组成含大量水分的ECMs, 共同形成细胞外空间, 为细胞提供信息, 有利于营养物质的供应和代谢物的排放^[1,2]。透明质酸分子链上每一个二糖单元带有一个负电荷的羧基($-\text{COO}^-$), 它具有类似离子交换剂的作用, 能调节细胞周围阳离子的流动和浓度。透明质酸对细胞具有多种作用, 可在细胞表面形成细胞周分子笼蔽(pericellular molecular cage, PMC)^[3], 保护细胞免受溶胞物质、病毒等的攻击, 对氧自由基、白介素-1和植物凝集素的降解或侵害也有防护作用^[4], 还可以调控细胞生长因子和细胞因子的分泌, 抑制蛋白酶的分解, 影响细胞的黏附、生长、增殖和分化^[5-8]。

透明质酸可由天然资源提取或由微生物发酵制备, 其羟基可以酯化, 且与蛋白质在交联剂的作用下生成网络凝胶, 如意大利Fidia先进聚合物公司采用透明质酸酯制备角质形成细胞转载体系Laserskin, 为欧洲共同体批准的第一个组织工程装置, 目前已商品化。在我们以前的研究中, 采用表面修饰法和共混法两种不同的方法将透明质酸引入壳聚糖-明胶体系, 制备了壳聚糖-明胶-透明质酸复合薄膜, 考察了薄膜的理化性能和生物相容性。实验结果表明, 由于制备方法的不同使透明质酸在薄膜上的分布情况不同, 从而导致了其在薄膜上的局部浓度差异, 成纤维细胞在含透明质酸浓度较低的共混薄膜上的黏附和生长情况要明显好于表面修饰薄膜^[9], 该结果也同时揭示透明质酸的浓度可以影响到细胞的黏附和生长增殖等行为。本实验将不同浓度的透明质酸加入到成纤维细胞培养液中, 具体考察透明质酸的浓度对成纤维细胞的黏附和生长增殖行为的影响, 为透明质酸作为生物材料的进一步应用打下坚实的基础。

1 实验结果

1.1 成纤维细胞的黏附

将成纤维细胞接种到24孔板上4h后, 在不同培养液中生长的成纤维细胞的形态有很大的区别(见图2)。当透明质酸的浓度为0.01%~0.1%时, 成纤维细胞的贴壁情况良好, 贴壁的细胞都已伸展开, 呈

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(59883002, 50203007), 国家973项目(G199954305);

作者简介: 刘海峰(1976—), 博士后, 研究方向为组织工程生物材料。

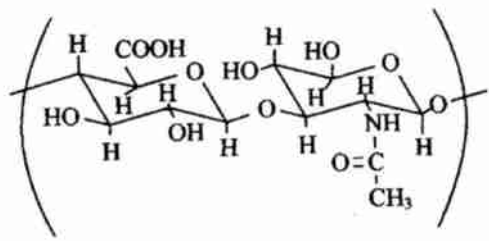


图 1 透明质酸的分子结构式

Figure 1 Molecular structure of hyaluronic acid

多突起的扁平星状或梭形，细胞间以细长的胞质突起相互连接，细胞之间的间隙不等，只是贴壁细胞的数量有所不同。当透明质酸浓度为 0.5% 和 1% 时，成纤维细胞的黏附受到了很大的抑制，贴壁的细胞数量很少，贴壁细胞的形态也很不舒展，尤其是透明质酸浓度为 1% 时，大部分细胞都呈亮球形聚集在培养板的底部，贴壁的细胞很少。

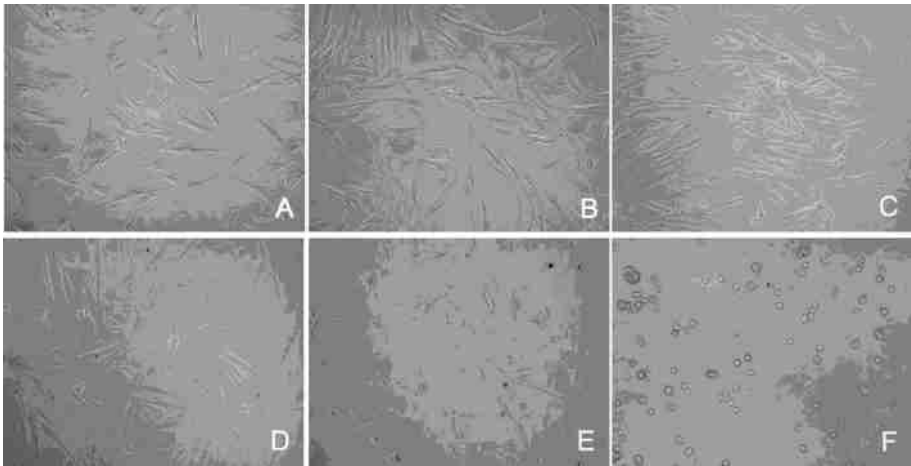


图 2 成纤维细胞在含有不同浓度透明质酸的培养液中培养 4h 的光学显微镜照片

HA 浓度分别为 A: 0%; B: 0.01%; C: 0.05%; D: 0.1%; E: 0.5%; F: 1% ($\times 100$)

Figure 2 The photographs of human fibroblasts cultured for 4 hours in the culture medium with different concentration of hyaluronic acid.

(A) 0%, (B) 0.01%, (C) 0.05%, (D) 0.1%, (E) 0.5% and (F) 1% ($\times 100$)

定量检测细胞的黏附情况，实验结果如图 3 所示。当 DMEM 培养液中的透明质酸浓度为 0.01% 和 0.05% 时，对成纤维细胞的黏附有明显的促进作用，尤其是透明质酸浓度为 0.01% 时，与空白对照相比有明显提高 ($p < 0.05$)；当透明质酸浓度为 0.1% 时，对成纤维细胞的黏附起到了抑制作用，贴壁的细胞数量与空白对照相比明显减少 ($p < 0.05$)；当透明质酸浓度为 0.5% 和 1% 时，成纤维细胞的黏附受到了很大的抑制，透明质酸的浓度为 1% 时，贴壁的细胞数量不及空白对照的 1/4。

1.2 DNA 合成量测定

成纤维细胞在含不同浓度透明质酸的培养液中的生长情况可以通过细胞新合成的 DNA 的量反映出来。通过溴代尿苷酶联免疫吸附测定 (BrdU ELISA) 在 DNA 合成过程中，5-溴-2'-脱氧尿苷 (BrdU) 掺入到细胞新合成的 DNA 中的量，可以得知成纤维细胞在不同培养液中的生长增殖情况。考察 18h 内在不同培养液中生长的成纤维细胞的 DNA 合成情况，实验结果如图 4 所示，当透明质酸的浓度为 0.01% 和 0.05% 时，成纤维细胞 DNA 的合成量要明显高于空白对照 ($p < 0.05$)；当透明质酸的浓度为 0.1% 时，DNA 的合成量与空白对照相比有明显下降 ($p < 0.05$)；当透明质酸的浓度为 0.5% 和 1% 时，成纤维细胞的 DNA 合成受到很大的抑制。

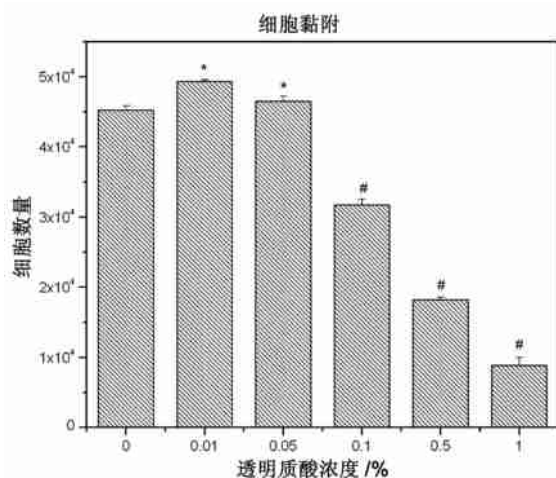


图3 透明质酸的浓度对成纤维细胞黏附的影响
(* $p < 0.05$, 促进作用; # $p < 0.05$ 抑制作用, 与不加透明质酸的空白对照相比)

Figure 3 Adhesion of human fibroblasts cultured in the culture medium with different concentrations of hyaluronic acid

(* $p < 0.05$, promoting # $p < 0.05$, inhibiting, compared to normal culture medium without hyaluronic acid)

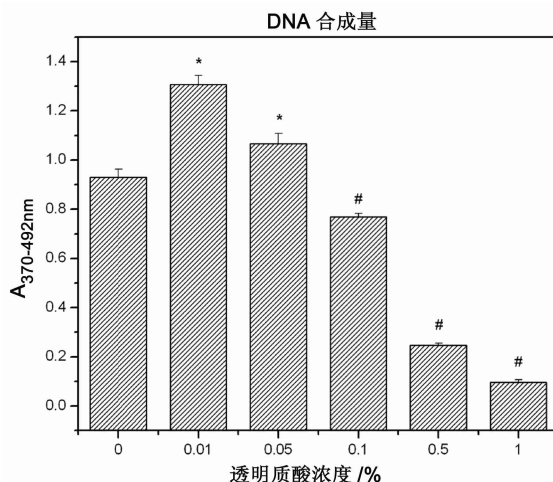


图4 透明质酸的浓度对成纤维细胞 DNA 合成的影响
(* $p < 0.05$ 促进作用; # $p < 0.05$ 抑制作用, 与不加透明质酸的空白对照相比)

Figure 4 DNA synthesis of human fibroblasts cultured in the culture medium with different concentrations of hyaluronic acid

(* $p < 0.05$, promoting; # $p < 0.05$, inhibiting, compared to normal culture medium without hyaluronic acid)

1.3 糖胺聚糖分泌量测定

通过定量测定在不同浓度透明质酸的培养液中生长的成纤维细胞合成分泌的糖胺聚糖, 可以用来评价成纤维细胞的功能。透明质酸的浓度为 0.01% 和 0.05% 时, 成纤维细胞糖胺聚糖的分泌量为 23.39 $\mu\text{g/mL}$ 和 21.65 $\mu\text{g/mL}$, 与空白对照 20.21 $\mu\text{g/mL}$ 相比没有明显差异 ($p > 0.05$); 当透明质酸的浓度大于 0.1% 时, 成纤维细胞糖胺聚糖的分泌量有了明显的下降 ($p < 0.05$); 透明质酸的浓度为 1% 时, 成纤维细胞糖胺聚糖的分泌量仅为 3.84 $\mu\text{g/mL}$ 。实验结果表明, 当透明质酸的浓度大于 0.1% 时, 对成纤维细胞糖胺聚糖的分泌有了明显的抑制作用。

1.4 成纤维细胞的生长增殖

成纤维细胞在含有不同浓度透明质酸的培养液中生长 7 天后, 通过光学显微镜进行观察 (见图 6)。当透明质酸的浓度为 0.01% 和 0.05% 时, 成纤维细胞在培养板表面生长良好, 紧密排列成束, 相互融合成片, 多呈长梭形, 细胞间隙狭窄, 呈指纹状结构; 当透明质酸的浓度为 0.1% 时, 培养板上的成纤维细胞的数量明显减少, 细胞间隙增大, 彼此没有融合成片; 当透明质酸的浓度大于 0.1% 时, 成纤维细胞的生长形态发生了很大变化, 细胞多呈三角形, 细胞间隙很大, 生长增殖特征不明显。

用 MTT 法检测成纤维细胞在含有不同浓度透明质酸的培养基中的生长增殖情况, 可以看出, 当 DMEM 培养液中的透

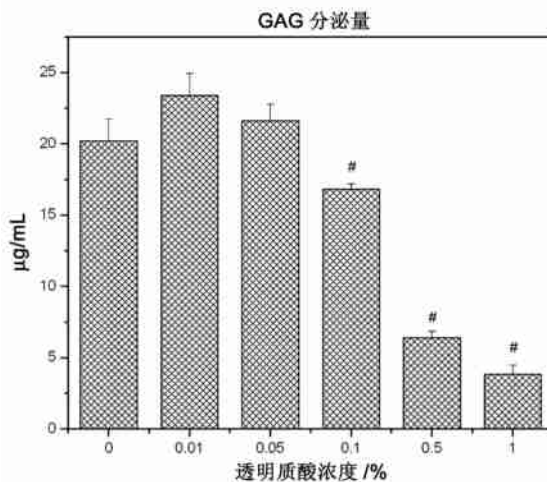


图5 透明质酸的浓度对成纤维细胞糖胺聚糖分泌的影响
(# $p < 0.05$, 抑制作用, 与不加透明质酸的空白对照相比)

Figure 5 GAG secreted by human fibroblasts cultured in the culture medium with different concentrations of hyaluronic acid
(# $p < 0.05$, inhibiting compared to normal culture medium without hyaluronic acid)

明质酸浓度为 0.01%和 0.05%时,对成纤维细胞的生长增殖有明显的促进作用,细胞活性与空白对照相比有明显提高($p<0.05$);当透明质酸浓度为 0.1%时,对成纤维细胞的生长增殖起到了抑制作用,但细胞还可以缓慢地生长,与空白对照相比有明显差异($p<0.05$);当透明质酸浓度为 0.5%和 1%时,成纤维细胞的生长增殖受到了很大的抑制,几乎停止了生长增殖行为。

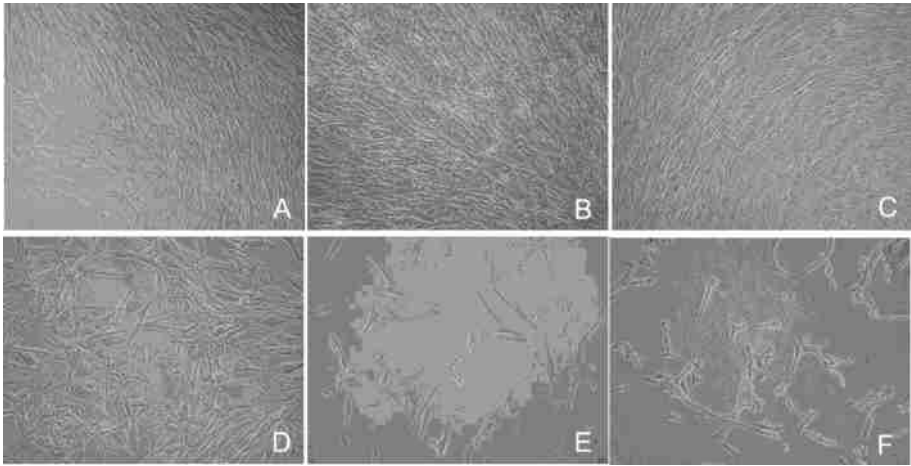


图 6 成纤维细胞在含有不同浓度透明质酸的培养液中培养 7 天后的光学显微镜照片
HA 浓度分别为 A: 0%; B:0.01%; C:0.05%; D: 0.1%; E: 0.5%; F: 1% (× 100)

Figure 6 The photographs of human fibroblasts cultured for 7 days in the culture medium with different concentration of hyaluronic acid

(A) 0%, (B) 0.01%, (C) 0.05%, (D) 0.1%, (E) 0.5% and (F) 1% (× 100)

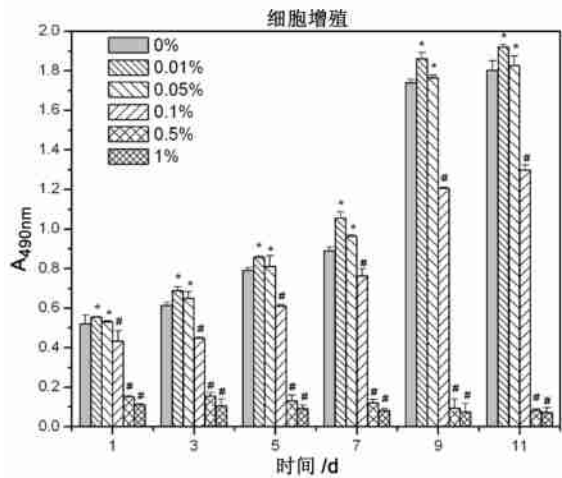


图 7 透明质酸的浓度对成纤维细胞生长增殖的影响

(* $p<0.05$, 促进作用; # $p<0.05$, 抑制作用, 与不加透明质酸的空白对照相比)

Figure 7 Proliferation of human fibroblasts cultured in the culture medium with different concentrations of hyaluronic acid

(* $p<0.05$, promoting; # $p<0.05$, inhibiting, compared to normal culture medium without hyaluronic acid)

2 讨论

Balazs 等^[11] 在研究透明质酸对细胞生长作用的一次实验中观察到透明质酸对细胞的移动具有影响。胚胎成纤维细胞培养时,若将其接种在 高分子量的透明质酸粘弹性溶液的表面,细胞将聚集在一起,既不移 动也不进行有丝分裂。若将透明质酸溶液进行稀释,抑制作用随着稀释度的增加而降低,最后消 失。Goldberg 等^[12] 考察了透明质酸对鼠 3T3 细胞、猴病毒转化的 3T3 细胞(simian virus transformed 3T3, SV-3T3)以及兔滑膜细胞增殖的影响。结果表明,当透明质酸的分子量大于 1×10^6 ,浓度达到 0.1mg/mL 时,

可抑制滑膜细胞和 3T3 细胞的增殖。对 SV-3T3 细胞,透明质酸的浓度则需要达到 0.25mg/mL 以上,才出现抑制作用。实验结果还表明,此抑制是源于减少进入细胞周期(cell cycle)的细胞数目,而不是减慢细胞周期的速度所引起的。曾推测透明质酸可能具有细胞毒性而抑制细胞增殖。实验表明,滑膜细胞和 3T3 细胞在透明质酸存在下,对 $[^5\text{I}]\text{C}_2$ 的释放率与对照组无差异^[13],蛋白质的合成反而比对照组高,说明并不是透明质酸有细胞毒性。为了排除透明质酸中杂质对细胞增殖的影响,将具有抑制作用的透明质酸用透明质酸酶降解,对所得的低分子量透明质酸进行研究,结果表明其抑制作用消失。由此可认为,透明质酸抑制细胞增殖作用与其所含杂质无关而与其分子量和浓度有关^[14]。

本实验将不同浓度的高分子量的透明质酸溶液加入成纤维细胞培养液中,考察在培养液中透明质酸的浓度对成纤维细胞的黏附、DNA 合成量、糖胺聚糖分泌量和 MTT 活性的影响。结果表明,当培养液中透明质酸的浓度小于 0.1% 时,对成纤维细胞的黏附、DNA 合成、糖胺聚糖分泌等生长增殖行为有明显的促进作用;当培养液中透明质酸的浓度为 0.1% 时,成纤维细胞的黏附、DNA 合成、糖胺聚糖分泌等生长增殖行为受到了一定程度的抑制;当培养液中透明质酸的浓度大于 0.1% 时,对成纤维细胞的黏附、DNA 合成、糖胺聚糖分泌等生长增殖行为有很强的抑制作用。

这是由于在细胞发生迁移前,其周围的透明质酸浓度必然明显升高,以改变糖蛋白与胶原纤维两个网状结构的平衡,使组织边界发生改变以提供更多的空间,将障碍细胞细胞迁移的胶原或紧密相连的细胞分离,为细胞的迁移提供一条高水合性通道,使细胞易于迁移。此外,细胞移动还需要通过膜上的透明质酸受体与周围的透明质酸发生作用,由此将细胞向前推动^[15~19]。大量研究表明,在细胞稀少、细胞增殖旺盛的区域将会出现透明质酸合成明显增多现象。当细胞稀少时,细胞周围的透明质酸浓度也很低,对细胞的增殖没有抑制作用,反而可促进细胞的移动、增殖和分化。但随着细胞的增殖,透明质酸的合成使细胞周围的透明质酸浓度达到一定的范围,对细胞增殖出现了抑制作用。通过以上的反馈调节机制,透明质酸可调节和维持细胞群在一定的密度范围内^[17~19]。这与本实验的研究结果是一致的。当培养液中透明质酸的浓度达到 0.1% 时,成纤维细胞周围的透明质酸浓度达到饱和浓度,对细胞的生长增殖起到抑制作用;当培养液中的透明质酸浓度低于 0.1% 时,透明质酸浓度远远低于饱和浓度,反而促进了成纤维细胞的黏附、DNA 的合成、糖胺聚糖的分泌和生长增殖等行为。

3 结论

将不同浓度的透明质酸加入成纤维细胞培养液中,当培养液中透明质酸的浓度小于 0.1% 时,对成纤维细胞的黏附、DNA 合成量、糖胺聚糖分泌量和 MTT 活性有明显的促进作用;当培养液中透明质酸的浓度大于 0.1% 时,对成纤维细胞的黏附和生长增殖有很强的抑制作用。

4 材料和方法

4.1 材料和仪器

透明质酸(分子量 $\approx 1.5 \times 10^6$)和 MTT (Sigma, USA); 10% 的胎牛血清、EDTA 和 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)培养基(Gibco Grand Island NY, USA);胰蛋白酶(华美生物工程公司);培养板,离心管(FALCON Franklin Lakes, NJ, USA); CO_2 培养箱 (Foma Scientific, Inc., USA);台式离心机 (Beckman, USA.);倒置显微镜 (Olympus, Japan);酶标仪 (TECAN SPECTRA IID)。

4.2 实验方法

4.2.1 成纤维细胞的体外培养 选用第二代的人成纤维细胞,当细胞培养达到 80% 左右融合状态以后,用 10mL 无钙镁离子的 PBS 冲洗两次,经胰蛋白酶 EDTA 37°C 消化 $5 \sim 10\text{min}$,倒置显微镜下见细胞变成透明圆球形,加入 10mL 胰蛋白酶抑制剂终止消化,用带橡胶头的弯头滴管搔刮、吹打使培养皿中的细胞呈单个细胞悬液,移入离心管中, 1000 rpm/min 离心 5min ,弃去上清,分别用含有不同浓度 (0% 、 0.01% 、 0.05% 、 0.1% 、 0.5% 和 1%) 透明质酸的 DMEM 培养液制备单细胞悬液,然后将成纤维细胞的单细胞悬液以 1×10^4 个细胞/孔的密度加入 24 孔培养板中,放入 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中培养,每隔 2 天分别用含

有不同浓度透明质酸的 DMEM 更换一次培养液。以不加透明质酸的培养液作为空白对照。

4.2.2 细胞的黏附情况 将成纤维细胞的单细胞悬液以 5×10^4 个细胞/孔的密度加入孔中, 在 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中培养 4h 后, 用滴管小心将培养液吸出, 用无菌的 PBS 溶液洗涤两次以除去处于游离态的细胞, 黏附细胞用福尔马林溶液在 4°C 固定 30min。黏附的细胞用 0.5% 结晶紫溶液染色 30min, 用 PBS 冲洗 3 次, 洗去未着色的多余染料。每孔加入 0.5 mL 的 2% 十二烷基磺酸钠(SDS)溶解细胞, 释放已经结合到细胞核的染料。用酶标仪测定 570 nm 波长处溶液的 OD 值, 计算黏附的细胞数量。

4.2.3 DNA 合成量测定 在 DNA 合成过程中, 5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)可以代替胸腺嘧啶脱氧核苷掺入到细胞新合成的 DNA 中。基于这个原理, 通过比色免疫测定的方法, 可以对在不同的培养液中生长的成纤维细胞进行定量分析。成纤维细胞在不同培养液中培养 7 天后, 加入 BrdU 使培养液中的终浓度达到 10^{-6} M 。继续培养 18h, 然后使用细胞增殖酶联免疫测试盒(Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit, Roche Molecular Biochemicals), 按照说明书进行操作, 通过比色法测定 DNA 的合成。利用酶标仪对新合成的 BrdU DNA 进行定量测定。

4.2.4 糖胺聚糖分泌量测定 成纤维细胞在不同的培养液中生长 7 天后, 测定细胞分泌的总糖胺聚糖量。用 1,9-二甲基亚甲基蓝法, 以鲨鱼硫酸软骨素 C 作为标准品。样本在含有 $0.1\text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $5\text{ mM Na}_2\text{EDTA}$ 和 $5\text{ mM cysteine}\cdot\text{HCl}$ 的 pH 值为 6.0 的缓冲液中, 用木瓜蛋白酶在 60°C 消化 6h。在 1 L 去离子水中加入 3.04 g 甘氨酸, 2.37 g 氯化钠, 95 mL 0.1 M 的盐酸和 16 ng 的二甲基亚甲基蓝, 配制染色液。每个样本取 $25\text{ }\mu\text{L}$ 木瓜蛋白酶消化液, 分别加入 96 孔板中, 然后加入 $250\text{ }\mu\text{L}$ 的染色液, 在 525 nm 波长处用酶标仪测定吸光度。

4.2.5 细胞的生长增殖情况 成纤维细胞的单细胞悬液以 1×10^4 个细胞/孔的密度加入 24 孔培养板中, 放入 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中培养, 每隔 2 天分别用含有不同浓度透明质酸的 DMEM 更换一次培养液, 分别于 1、3、5、7、9、11 天采集样本, 用无菌 PBS 溶液洗涤两次以除去死细胞, 根据 Mossman^[10] 的方法, 对黏附在薄膜表面的细胞进行 MTT 活性测试。

4.2.6 统计分析 所有各项实验数据, 每个试样均取 6 个平行样本($n=6$), 以平均值 $\pm$ 标准偏差(SD)表示。通过单向方差分析(One way ANOVA)来评价结果的统计差异性。以 Scheffé 法来衡量组间差异性, 取 $p < 0.05$ 为显著统计差异标准。

参考文献:

- [1] Giampaolo G, Paola R, Macro R, et al. *Biomaterials* 2000, 21: 2183~2189
- [2] Yoo H S, Lee E A, Yoon J J, et al. *Biomaterials* 2005, 26: 1925~1933
- [3] McBride W H, Bard J B. *J Exp Med* 1979, 149: 507~515.
- [4] Hakansson L, Hallgren R, Venge P. *J Clin Invest*, 1980, 66: 298~305
- [5] Mitchell M, Koen P V, Kelly R K, et al. *Biomaterials* 2000, 21: 31~36
- [6] Li Y P, Tsutomu N, Toshie T. *Biomaterials* in press
- [7] Park Y D, Nicola T, Jeffrey A H. *Biomaterials* 2003, 24: 893~900.
- [8] Andreutti D, Geinoz A, Gabbiani G. *I Submicrosc Cytopathol* 1999, 31: 173~177.
- [9] 刘海峰, 尹玉姬, 姚康德, 等. *生物医学工程学报*, 2005, 24 (3): 271~276
- [10] Mossman T. *J Immunol Methods* 1983, 65: 55~63.
- [11] Balazs E A, Darzynkiewicz Z. *Biology of fibroblast*. New York: Academic Press, 1973, 237~252
- [12] Goldberg R L, Toole B P. *Arthritis Rheum*, 1987, 30: 769~778.
- [13] MacDonald A L, Basin P K, Mikker R G. *Transplantation*, 1977, 23: 431~435.
- [14] Dahl L B, Dahl I M, Engstrom L A, et al. *Ann Rheum Dis*, 1985, 44: 817~822.
- [15] Camenish T D, Spicer A P, Brehm G T. *J Clin Invest*, 2000, 106: 349~360
- [16] Day A J, Prestwich G D. *J Biol Chem*, 2002, 277: 4585~4588.
- [17] Hall C L, Collis L A, Jing B A, et al. *Matrix Biol*, 2001, 20: 183~192
- [18] Weigel J A, Raymond R C, McGary C, et al. *J Biol Chem*, 2003, 278: 9808~9812.
- [19] Ella Z, Benjamin G, Lia A. *Biophysical*, 2002, 82: 1848~1857.

Influence of the Concentrations of Hyaluronic Acid on the Adhesion and Proliferation of Human Fibroblasts

LIU Hai feng, CHANG Jin, CHEN Yi ping, YAO Kang de

(School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Hyaluronic acid, a component of the glycosaminoglycans in extracellular matrix, has a special physicochemical properties and influences several cellular functions such as adhesion, migration, and proliferation. The object of this study was to investigate the relationship between the concentrations of hyaluronic acid solutions and the adhesion and proliferation behaviors of human fibroblasts. Hyaluronic acid solutions with different concentrations were added to cell culture medium separately. Results demonstrated that it was only the concentration of hyaluronic acid solutions in a certain range ($0.01\% \sim 0.1\%$), that could promote the cell adhesion, DNA synthesizing, GAG secreting and cell proliferation, while the concentrations of hyaluronic acid solutions were above 0.1% it would either reduce or even inhibit these behaviors.

Key words: Hyaluronic acid; Concentration; Fibroblasts; Adhesion; Proliferation

(上接第 67 页)

[10] 董炎明, 王勉, 吴玉松, 等. 纤维素科学与技术, 2001, 9(2): 42~56

[11] 王爱勤, 俞贤达. 功能高分子学报, 1998, 11(1): 83~86

[12] 吴玉松, 李强, 黄剑莹, 等. 物理化学学报, 2001, 17(11): 1049~1052

Preparation of Alkyl chitosan Nanoparticles and its Application as a Carrier System for Paclitaxel

DAI Zhao, SUN Duo xian, HUANG Weng qiang

(1. Key Laboratory of Functional Polymer Materials, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Alkyl chitosan, modified chemically by alkyl halide under alkaline condition, is soluble and spontaneously forms nanoparticles about 10-200 nm in diameters by Dynamic light scattering (DLS). It was found by X ray photoelectron spectroscopy (XPS) that the alkyl substitution reaction was mainly on amine groups of chitosan. After carrying paclitaxel, the sizes of the particles of alkyl chitosan were larger than before. In phosphate buffer solution (PBS, pH=7.4), the vitro release rate of paclitaxel from this system was delayed, and the equilibration release concentration of paclitaxel was decreased by the increase of carbon chain length in alkyl substituted chitosan.

Key words: Chitosan; Alkyl chitosan; Nanoparticles; Paclitaxel; Paclitaxel drug delivery