DOI:10.16016/j.2097-0927.202310033

氨基葡萄糖/DNA 复合纳米材料的构建及其对 Raw264.7 细胞功能的影响

徐宇航,陈 跃,向 青,张硕辛,龚道辉,吴 迪,王关嵩,钱 航 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院呼吸与危重症医学科

[摘要] **目的** 构建一种无镁离子组装的新型氨基葡萄糖/DNA 复合纳米材料,验证氨基葡萄糖能否介导组装 DNA 纳米管(nanotube,NT),并评价其对体外 Raw264.7 细胞功能的影响。**方法** 采用梯度退火法,使用 Y1、Y2 和 Y3 这 3 条 DNA 单链,以氨基葡萄糖(glucosamine,GlcN)为介质组装 DNA NT,构建氨基葡萄糖/DNA 复合纳米材料(NT^{GlcN})。使用原子力显微镜(atomic force microscopy,AFM)观察其纳米结构,激光动态光散射(dynamic light scattering,DLS)测量该纳米材料的尺寸。选用 Raw264.7 细胞系,采用 CCK-8 法测试氨基葡萄糖或 NT^{GlcN} 的细胞毒性,流式细胞术和激光共聚焦考察细胞对该纳米结构的摄取效率,RT-qPCR 测定 NT^{GlcN} 和 NT^{Mg}(镁离子介导组装的 DNA 纳米管)对脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)诱导的巨噬细胞炎症因子(IL-1β、IL-6)表达水平的影响。**结果** 氨基葡萄糖可以成功介导 NT^{GlcN} 的合成,稳定性较好。AFM 表征结果表明,NT^{GlcN} 为管状颗粒,均匀地分散在云母表面上;DLS 测量表明 NT^{GlcN} 的直径为(15.26±3.86) nm。细胞实验显示:较之 NT^{Mg},巨噬细胞对 NT^{GlcN} 有更高的细胞摄取效率,NT^{GlcN} 处理后细胞存活率更高($P<0.05$);NT^{GlcN} 处理后,LPS 诱导的巨噬细胞炎症因子表达降低($P<0.05$)。**结论** 本研究构建的氨基葡萄糖/DNA 复合纳米材料具有良好的稳定性、生物相容性和细胞摄取效率;能降低氨基葡萄糖的细胞毒性,并能通过降低 Raw 264.7 细胞炎症因子的表达来抑制细胞炎症反应。

[关键词] DNA 纳米结构;氨基葡萄糖;巨噬细胞
[中图法分类号] R914.2; R967; R977.6 [文献标志码] A

Construction of glucosamine/DNA composite nanomaterials and its effect on function of Raw264.7 cells

XU Yuhang, CHEN Yue, XIANG Qing, ZHANG Shuoxin, GONG Daohui, WU Di, WANG Guansong, QIAN Hang
Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medial University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] Objective To construct a new type of glucosamine/DNA composite nanostructure (NT^{GlcN}) assembled without magnesium, verify whether or not glucosamine can mediate the assembly of DNA nanotubes (NT) and assess its effect on the function of Raw264.7 cells. Methods Utilizing the gradient annealing method with 3 DNA single strands Y1, Y2, and Y3, glucosamine (GlcN) was employed to mediate the assembly of DNA NT, resulting in the formation of glucosamine/DNA composite nanostructures. Atomic force microscopy (AFM) was used to observe the surface structure of the nanomaterial and dynamic light scattering (DLS) was used to measure its size. RAW264.7 cells were used in cell experiments. The cytotoxicity of GlcN and NT^{GlcN} was assessed using CCK-8 assay. Flow cytometry and laser confocal microscopy were employed to investigate the cellular uptake efficiency of the nanostructures. The effects of NT^{GlcN} and

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxmX1179)
[通信作者] 钱 航,E-mail:hqian@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

NT^{Mg}(Mg^{2+}-assembled of DNA NT) on the expression levels of inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6) in macrophages induced by lipopolysaccharides (LPS) were evaluated using RT-qPCR. **Results** GlcN successfully mediated the synthesis of NT^{GlcN}, which exhibited good stability. AFM characterization results revealed that NT^{GlcN} formed tubular particles that were uniformly distributed on the surface of mica. DLS measurements indicated that the diameter of NT^{GlcN} was approximately 15.26±3.86 nm. Cell experiments demonstrated that, compared to NT^{Mg}, macrophages exhibited a higher cellular uptake efficiency for NT^{GlcN}, with a higher cell survival rate following treatment with NT^{GlcN} ($P<0.05$). After NT^{GlcN} treatment, the expression of inflammatory cytokines in LPS-induced macrophages was reduced ($P<0.05$). **Conclusion** The glucosamine/DNA composite nanostructures have been successfully developed, possessing excellent stability, biocompatibility and cell uptake efficiency. NT^{GlcN} is capable of reducing the cytotoxicity of GlcN and can suppress cellular inflammatory responses by decreasing the expression of inflammatory cytokines in RAW264.7 cells.

[**Key words**] DNA nanostructures; glucosamine; macrophages

Supported by the General Program of Natural Science Foundation in Chognqing (cstc2021jcyj-msxmX1179). Corresponding author: QIAN Hang, E-mail: hqian@tmmu.edu.cn

近年来,纳米材料被作为一种新的干预措施和技术来治疗一系列肺部炎症性疾病[1]。自组装 DNA 纳米材料是一种新型的生物兼容性纳米材料,DNA 为人体内的天然组分,具有生物兼容性良好、易于被生物降解和较好的可编程性等优点[2-4],在生物医学领域具有广泛的应用前景和较大的临床应用价值[5-7],是理想的药物递送载体。但传统的镁离子介导组装的 DNA 纳米材料存在一系列问题,如高浓度镁离子对特定条件下酶活性有潜在伤害、细胞摄取效率低下等,因此,利用带正电的小分子或药物替代镁离子,在镁离子条件下诱导组装 DNA 纳米结构并形成小分子/DNA 复合纳米材料,成为了一种更有前景的 DNA 组装策略。

氨基葡萄糖(glucosamine,GlcN)是人体内天然存在的氨基己糖,是糖蛋白和蛋白聚糖的重要组成部分[8],生理条件下携带正电荷,具有抗炎[9]、抗氧化[10-12]、抗肿瘤[13]和免疫调节[14]等药理作用,临床上常用于治疗骨关节炎[15]。研究表明,氨基葡萄糖可通过抑制炎症通路 NF-κB 和 MAPK 来改善肺部的炎症反应[16-17]。此外,一些动物体内研究已经证明,氨基葡萄糖能够减轻支气管炎、大肠结肠炎和大脑脑缺血等疾病中的炎症反应[18-20]。基于以上研究背景,我们推测,氨基葡萄糖可以通过静电相互作用介导 DNA 纳米材料的自组装,使其在生理条件下实现更好的生物相容性及理化性能。同时,氨基葡萄糖可作为一种药物,发挥其抗炎效应。本研究使用氨基葡萄糖去介导 DNA 纳米管(nanotube,NT)的“非传统”组装,构建一种 DNA 复合纳米材料平台,并在体外评价其对巨噬细胞 Raw264.7 释放炎症因子的影响,以期成为新型药物递送平台,继而应用于生物医学。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氨基葡萄糖盐酸盐、DNA 单链、Cy5 标记 DNA 单链、RT-qPCR 引物购自上海生工生物公司;脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)购自美国 Sigma 公司;DMEM 培养基、胰酶、胎牛血清、青-链霉素(双抗)购自美国 HyClone 公司;CCK-8 试剂盒购自北京博迈德生物公司;共聚焦培养皿购自美国 Corning 公司;TRIzol、反转录试剂盒、FastStart Essential DNA Green Master 购自瑞士 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 氨基葡萄糖/DNA 复合纳米材料(NT^{GlcN})的合成与表征 将 DNA 单链融于适量 DEPC 水中,DNA 纳米管三条单链按摩尔浓度比例 1∶3∶3配制,加入总体系 1/10 的氨基葡萄糖盐酸盐溶液,充分混匀,置于 PCR 仪中,梯度退火组装成氨基葡萄糖/DNA 纳米管。梯度退火程序如下:95 ℃ 5 min,65 ℃ 30 min,50 ℃ 30 min,37 ℃ 30 min,22 ℃ 30 min。然后将 NT^{GlcN} 加样于 6% 聚丙烯氨酰胺凝胶(PAGE)中,在室温下于 Bio-Rad 电泳装置上运行 60 min。各 DNA 单链序列见表 1。

1.2.2 原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)、激光动态光散射(dynamic light scattering,DLS)和 ZETA 电位测量 将新合成的 NT^{GlcN} 溶液稀释至 100 nmol/L 左右,取 5 μL 滴在新制备的云母片表面上。孵育 10 min 后确保材料完全贴附在云母片上,压

缩空气将多余液体排出,再用配置好的醋酸镁溶液20 μL进行冲洗,再次压缩空气将多余液体排出,重复2~3次后将待测样品放在样品台上进行测定。用Malvern Zetasizer激光粒度仪测量NT^{GlcN}的粒径和电位水平:将NT^{GlcN}溶液浓度用超纯水稀释至100 nmol/L,体积为1 mL,然后将样品滴加到石英比色皿中进行测定。

表1 合成DNA纳米管的ssDNA序列和RT-qPCR的引物序列

名称	序列(5′→3′)
Y1	AGGCACCATCGTAGGTTATTTAATCTTGCCAGGC-ACCATCGTAGGTTATTTAATCTTGCCAGGCACCA-TCGTAGGTTATTTAATCTTGCC
Y2	TAGCAACCTGCCTGAGCGCTTTTGCGCTGTGCAA-GCCTACGATGGACACGGTAACGAC
Y3	ACCGTGTGGTTGCTAGTCGTT
Actin	正向:CTACCTCATGAAGATCCTGACC 反向:GCACAGCTTCTCTTTGATGTCAC
IL-1β	正向:TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG 反向:TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG
IL-6	正向:CTCCCAACAGACCTGTCTATAC 反向:CTCCCAACAGACCTGTCTATAC

1.2.3 NT^{GlcN}的稳定性 低离子浓度稳定性:制备好300 mmol/L氨基葡萄糖介导组装的NT^{GlcN},加入DEPC水,以664×*g*离心20 min,从而润湿超滤离心管,然后加入300 μL的超纯水和300 μL的低浓度氨基葡萄糖溶液(3 mmol/L),溶液以664×*g*离心,直到上部试管中剩余溶液为30~60 μL,重复该过程3次。将洗涤后的样品加样于6% PAGE胶中,于Bio-Rad电泳装置上运行60 min,未洗的NT^{GlcN}、NT^{Mg}作为对照组;热稳定性:通过将电泳液加热至37 ℃后倒入电泳装置中,并将电泳装置放入37 ℃恒温水浴锅中,将NT^{GlcN}按前述方法加样并运行电泳装置,NT^{Mg}作为对照组。恒温自组装:制备未经梯度退火的NT^{GlcN}样品,将样品分别放置于4.0 ℃、22.0 ℃、37.0 ℃、45.0 ℃条件下孵育1 h,按照前述方法进行加样并运行电泳装置,将梯度退火方法制备的NT^{GlcN}作为对照组(Control);pH稳定性:将超纯水更换为pH值为6.0、7.0、8.0、9.0标定液去介导合成NT^{GlcN},按前述方法加样并运行电泳装置,NT^{Mg}作为对照组。

1.2.4 Raw264.7细胞培养 取10 mL完全培养基(500 mL DMEM、50 mL胎牛血清、5 mL青-链霉素双抗溶液混匀配置)置于10 cm细胞培养皿中,从液氮中取出Raw264.7细胞,离心弃上清后,将细胞沉淀重悬后转移至上述培养皿中,放入37 ℃细胞培养箱中,待其贴壁后使用。

1.2.5 激光共聚焦显微 Raw264.7在共聚焦培养皿中预培养过夜。将纳米管的1条单链M3的5'端用Cy5修饰,将携带Cy5的NT^{GlcN}/NT^{Mg}溶液加入细胞培养液中,孵箱孵育3 h,Cy5在细胞培养液里的浓度为300×10^{-9} mol/L。然后用预冷的PBS洗涤细胞3次,每次5 min,后用4%多聚甲醛固定15~20 min,再次用PBS清洗,方法同前,最后每皿加入10 μL含DAPI的抗荧光淬灭剂。通过激光共聚焦显微镜(尼康ECLIPSE TS4)成像。

1.2.6 流式细胞术 将Raw264.7接种在6孔板中,将携带Cy5的NT^{GlcN}溶液入细胞培养液中,孵箱孵育3 h,Cy5在细胞培养液里的浓度为300×10^{-9} mol/L。收集细胞,用PBS洗涤细胞3次,5 min/次,于流式细胞仪中分析。

1.2.7 CCK-8法 将Raw264.7于24孔板中过夜培养,细胞密度为1×10^5个/mL,加入不同浓度的氨基葡萄糖或NT^{GlcN},培养箱孵育24 h,吸弃培养基后用PBS洗涤细胞,避光条件下每孔加入50 μL WST-8和450 μL DMEM,继续在培养箱孵育1~4 h,然后用酶标仪在450 nm处读取吸光度值。

1.2.8 实时荧光定量PCR(RT-qPCR) 使用NT^{Mg},1、5、10 mmol/L NT^{GlcN}对Raw264.7细胞进行预处理,再加入1 μg/mL的LPS,孵育6 h,即为LPS+NT^{mg}组或LPS+NT^{GlcN}组,对照组(Control)不进行任何处理,NT^{GlcN}组只进行预处理未加入LPS,LPS组只加入LPS未进行预处理。加入TRIzol试剂提取RNA,使用反转录试剂盒将RNA反转为cDNA,用Nanodrop 2000测定RNA浓度,然后使用FastStart Essential DNA Green Master在Bio-Rad CFX 96实时荧光定量PCR仪上进行RT-qPCR。每个样品重复3个孔,Actin用作内部对照,根据实验结果得到相应的mRNA表达水平。各引物序列见表1。

1.3 统计学分析

运用SPSS 20.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,各组数据近似正态分布(正态检验),对于多组间差异比较采用单因素方差分析,检验结果有统计学意义后,两组间差异比较采用LSK法。检验水准$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 NT^{GlcN}纳米平台的设计

在氨基葡萄糖的介导下,3条DNA单链Y1、Y2、Y3按摩尔浓度比例1∶3∶3相互杂交,首先形成"Y"形三臂结构。2个三臂结构的臂弯曲90度二聚为管状结构NT^{GlcN}。DNA纳米管长度为13.9 nm,直径约为6.0 nm(图1)。

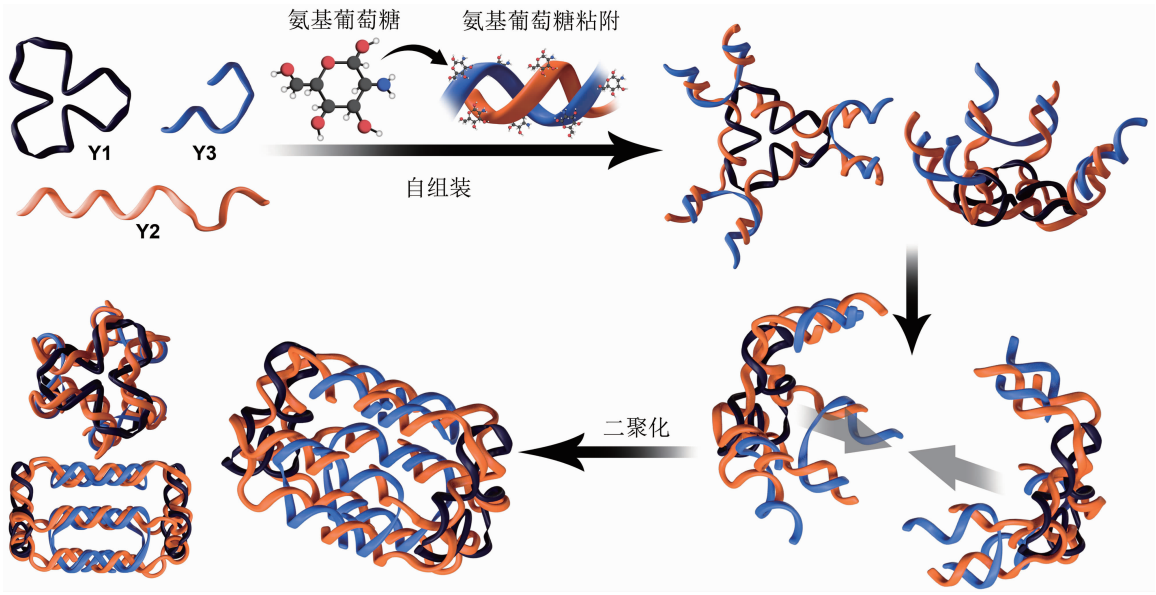


图 1　氨基葡萄糖诱导 DNA 纳米结构自组装的设计示意图

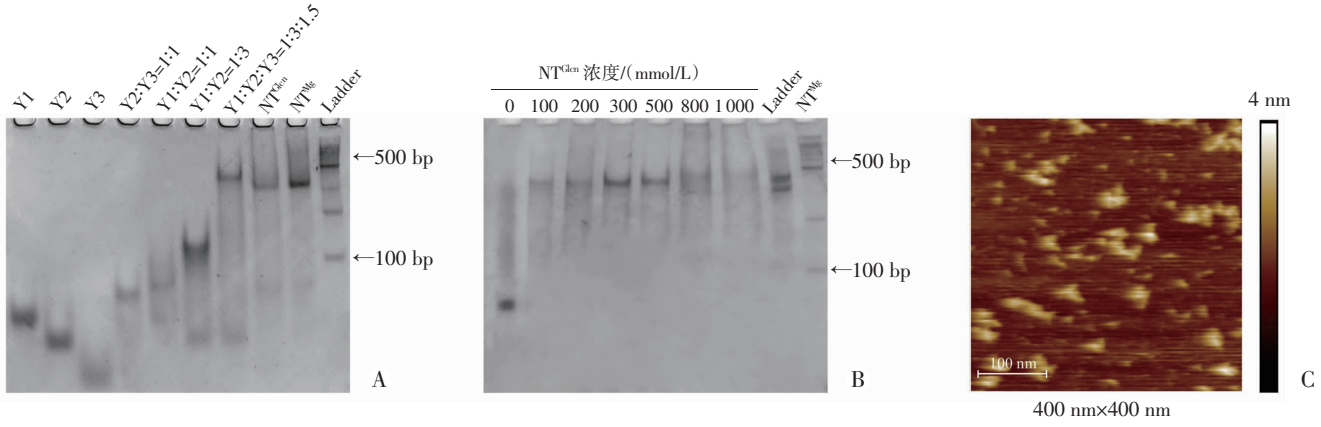
2.2　NT^{GlcN} 的合成与表征

2.2.1　NT^{GlcN} 的 PAGE 胶分析　　丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)结果表明,NT^{GlcN} 在 DNA 分子量标准品的 300~400 bp 区域形成一条明显的条带(图 2A)。NT^{Mg} 被合成并用作对照。

2.2.2　不同浓度的氨基葡萄糖对 DNA 纳米管自组装的影响　　如图 2B 所示,氨基葡萄糖在 100~800 mmol/L 之间可以成功介导 NT^{GlcN} 的合成,在 500 mmol/L 时介导的 NT^{GlcN} 达到最高产率。

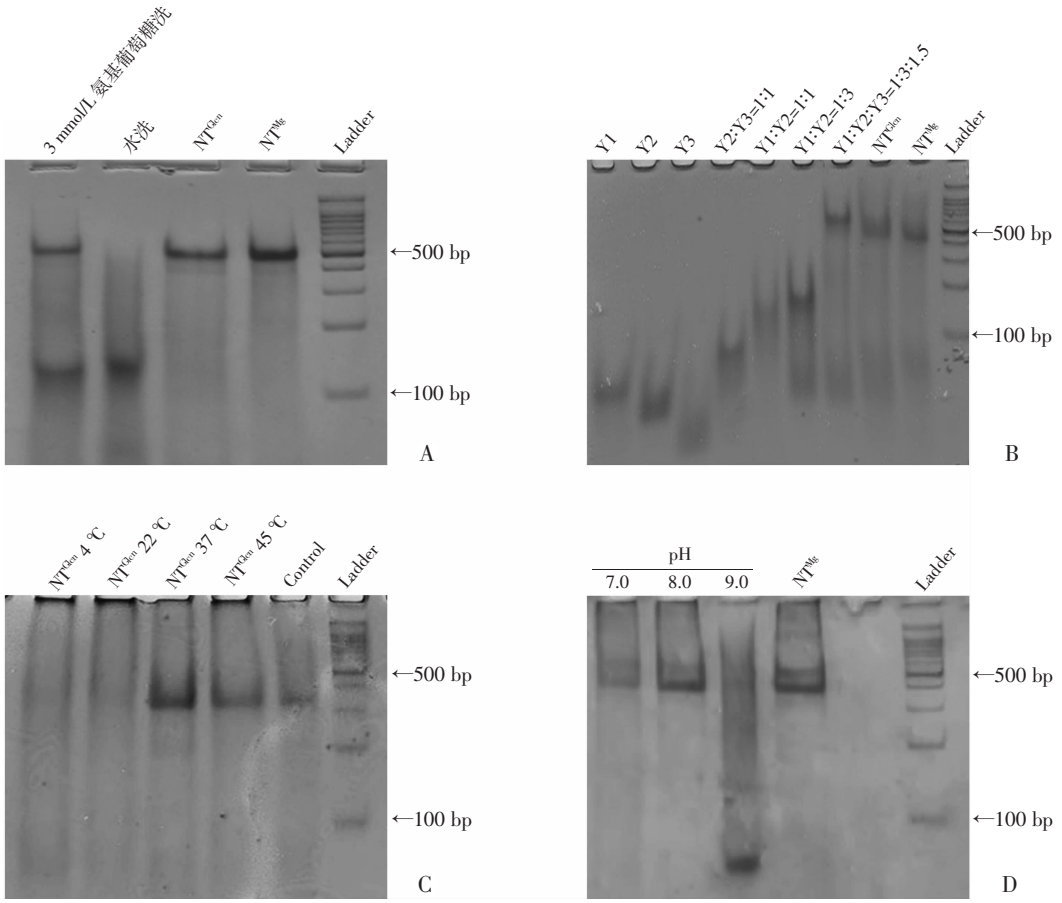
2.2.3　NT^{GlcN} 的 AFM 表征　　如图 2C 所示,NT^{GlcN} 颗粒均匀地分散在云母表面上。对于 DNA 纳米结构,较权威的表征方法为冷冻电镜(CryoEM)及单颗粒重构技术,课题组前期应用该技术证明了本研究中的 DNA 纳米管结构,DNA 纳米管长 13.9 nm,直径约为 6.0 nm,长径比约为 2.3。由于 AFM 本身固有的特性,故本研究中水平方向分辨率和 DNA 纳米管的长径均较低,所以 AFM 图像中难以观察到更为清晰的管状结构。

2.2.4　NT^{GlcN} 的 DLS 表征和 ZETA 电位测量　　DLS 测量表明:NT^{GlcN} 的直径为(15.26±3.86) nm,PDI 为 0.19,NT^{Mg} 的直径为(15.8±2.3) nm,PDI 为 0.81,二者没有明显差别。ZETA 电位测定:NT^{GlcN} 的电位为 13.62 mV,NT^{Mg} 的电位为-4.18 mV,提示非传统组装的 DNA 纳米结构的表面电位更正。说明氨基葡萄糖自组装的 DNA 纳米管尽管在尺寸上与传统组装结构相近,其表面性质(ZETA 电位)有所改变。



A:自组装 NT^{GlcN} 的 PAGE 胶分析　Y1、Y2、Y3:DNA 链简称;B:0~1 000 mmol/L 的氨基葡萄糖介导组装 NT^{GlcN};C:NT^{GlcN} 的 AFM 表征

图 2　NT^{GlcN} 的合成与表征



A:NT^{GlcN}在低离子浓度下的稳定性;B:NT^{GlcN}的热稳定性;C:NT^{GlcN} 的恒温自组装评估;D:NT^{GlcN} 的 pH 稳定性

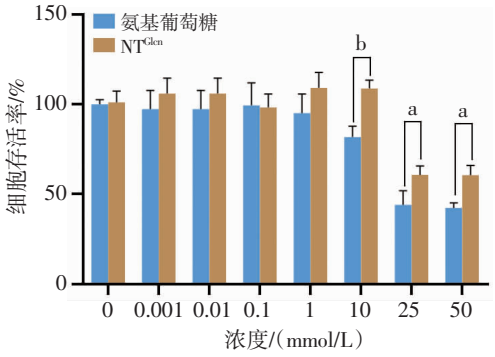
图 3 NT^{GlcN} 的稳定性测试结果

2.3 NT^{GlcN} 的稳定性

如图 3A 所示,在低浓度氨基葡萄糖溶液洗涤后,在 PAGE 胶上仍然显示出清晰的主条带,表明氨基葡萄糖和 DNA 链之间的结合较紧密,形成的 DNA 纳米结构较稳定;NT^{GlcN} 在 37 ℃生理条件下也能保持较好的结构(图 3B),具有良好的热稳定性;氨基葡萄糖在 37 ℃和 45 ℃条件下可以成功介导 NT^{GlcN} 的恒温自组装(图 3C);不同 pH 条件下 NT^{GlcN} 的合成情况结果表明,氨基葡萄糖在人体正常生理 pH 值条件下成功介导了 NT^{GlcN} 的合成(图 3D),适用于体内实验。

2.4 NT^{GlcN} 的生物相容性

CCK-8 法测试结果显示:在 10 mmol/L 浓度以下,未观察到氨基葡萄糖对 Raw264.7 细胞有明显的毒性;而用氨基葡萄糖介导组装的 DNA 纳米管,浓度达到 25 mmol/L 时,观察到较明显的细胞毒性(图 4)。表明 DNA 纳米材料可以显著降低氨基葡萄糖的细胞毒性。此外,在同等氨基葡萄糖浓度下(10、25、50 mmol/L),NT^{GlcN} 相较于单纯的氨基葡萄糖对 Raw264.7 的毒性显著降低。表明本研究构建的 NT^{GlcN} 在低浓度下的细胞毒性可忽略不计,在高浓度下可明显降低氨基葡萄糖细胞毒性。

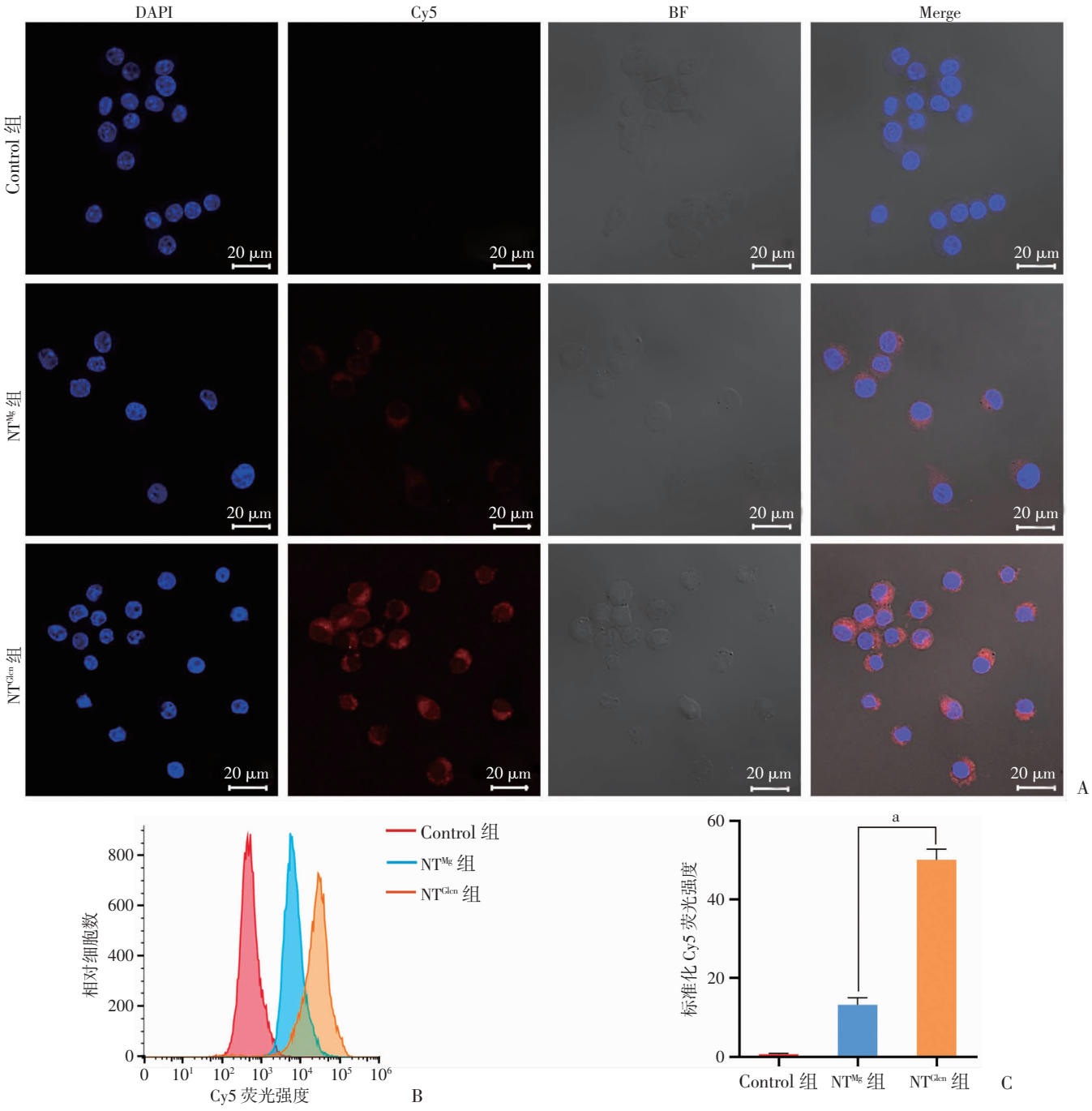


a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

图 4 不同浓度的氨基葡萄糖和 NT^{GlcN} 对 Raw264.7 的毒性($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.5　NT^{GlcN} 的细胞摄取

激光共聚焦扫描显微镜检测显示:37 ℃孵育 3 h 后,纳米颗粒被巨噬细胞 Raw264.7 吞入(未使用转染试剂)。Cy5 标记的 NT^{GlcN} 被吞噬后主要分布在细胞质中,NT^{GlcN} 组胞质内的红色荧光强度比 NT^{Mg} 组高,说明 Raw264.7 对 NT^{GlcN} 的摄取高于 NT^{Mg}(图 5A)。流式细胞术检测也证实了这个结论,NT^{GlcN} 的摄取效率约为 NT^{Mg} 的 3.79 倍(图 5B、C)。表明氨基葡萄糖介导组装的 DNA 纳米结构与传统镁离子组装 DNA 纳米结构比较,在细胞摄取效率上有所提高。



A:Raw264.7 摄取 NT^{GlcN} 的激光共聚焦图像　蓝色:细胞核,红色:Cy5 标注的 NT^{GlcN};B、C:Raw264.7 摄取 NT^{GlcN} 的流式分析和统计结果　a:$P<0.01$

图 5　激光共聚焦和流式细胞数检测 Raw246.7 细胞对 NT^{GlcN} 的摄取($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.6 NT^{GlcN} 体外抑制 LPS 诱导的巨噬细胞炎症

与对照组(Control)比较,单纯 LPS 组在 LPS 刺激后,IL-1β、IL-6 分别增加了 2 187.62、20 984.15 倍,说明 LPS 能成功诱导巨噬细胞炎症并释放大量炎症因子;LPS+NT^{Mg} 组的炎症因子水平与 LPS 组比较差异无统计学意义,即 NT^{Mg} 对炎症因子释放并没有明显的影响;而 LPS+(5 mmol/L) NT^{GlcN}、LPS+(10 mmol/L) NT^{GlcN} 组的 IL-1β、IL-6 表达水平较 LPS 组显著降低,且浓度越高,炎症因子水平下降越明显(表 3)。以上结果表明,NT^{GlcN} 可抑制巨噬细胞释放炎症因子,且在一定的浓度范围内,NT^{GlcN} 浓度越高,对巨噬细胞释放炎症因子的抑制作用越显著。

表 3 NT^{GlcN} 抑制 Raw264.7 细胞的炎症因子表达($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

组别	IL-1β 相对表达量	IL-6 相对表达量
Control	1.00±0.12^{c}	1.00±0.30^{b}
NT^{GlcN}	131.66±39.30^{b}	200.65±21.75^{b}
LPS	2 187.62±444.68	20 984.15±4 431.23
LPS+NT^{Mg}	1 689.60±481.66	18 435.21±871.73
LPS+(1 mmol/L) NT^{GlcN}	1 285.68±209.71^{a}	14 776.44±2 160.52
LPS+(5 mmol/L) NT^{GlcN}	1 091.18±56.96^{a}	11 248.02±1 294.09^{a}
LPS+(10 mmol/L) NT^{GlcN}	277.08±27.65^{b}	7 941.32±958.08^{b}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 LPS 组比较

3 讨论

自组装 DNA 纳米材料在疾病治疗中有着较大的应用前景[5-7],包括智能和受控的药物递送,以及疾病的诊断和治疗等。本课题组前期提出“非传统”组装 DNA 纳米结构概念,并成功采用一系列内源性生物大分子如亚精胺[21-22]、精氨酸[23]、鱼精蛋白[24]等,介导了 DNA 纳米结构的无镁离子组装。

氨基葡萄糖被广泛应用于合成各个类型的纳米材料[25-26],在生理条件下携带正电荷,在氨基葡萄糖/DNA 复合纳米材料中,则替代传统的金属阳离子,通过静电吸附作用与 DNA 骨架磷酸基团所携带的负电荷相结合,诱导组装 DNA 纳米结构。同时,氨基葡萄糖本身具有抗炎的效应[16-17],赋予了 NT^{GlcN} 抗炎的功能。本研究利用氨基葡萄糖,成功在无镁离子条件下,介导了 DNA 纳米管的非传统自组装,成功构建了氨基葡萄糖/DNA 纳米管复合纳米材料。该复合纳米材料有着良好的稳定性和生物相容性,能降低氨基葡萄糖的细胞毒性;RAW264.7 对 NT^{GlcN} 摄取效率相比传统的 NT^{Mg} 明显提高,该摄取效率提高现象可能归功于氨基葡萄糖的引入,改变了 DNA 纳米结构的表面性质。此外,为探究 NT^{GlcN} 能否成为治疗炎症性疾病的一种有前景的纳米材料平台,建立了急性炎症细胞模型,巨噬细胞被细菌 LPS 刺激后,能快速上调炎症因子,如 IL-1β 和 IL-6 的表达;实验结果表明,该复合纳米材料能够降低巨噬细胞 Raw264.7 的炎症因子 IL-1β、IL-6 的表达,从而抑制巨噬细胞的炎症反应,且在一定范围内,对炎症因子的抑制效应随着氨基葡萄糖的浓度增加而增强。

综上所述,本研究充分显示了 NT^{GlcN} 的作用优势,为后续开发新的基于 DNA 的纳米药物提供了工作基础。在未来的工作中,本课题组将在氨基葡萄糖/DNA 纳米平台的基础上,构建抗炎、抗菌等多功能且具有靶向能力的纳米材料药物,使其成为新一代高效、安全的多功能生物材料。

参考文献:

[1] QIAO Q, LIU X, YANG T, *et al*. Nanomedicine for acute respiratory distress syndrome: the latest application, targeting strategy and rational design[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(10): 3060-3091. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.04.023.

[2] MELA I, VALLEJO-RAMIREZ P P, MAKARCHUK S, *et al*. DNA nanostructures for targeted antimicrobial delivery[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2020, 59(31): 12698-12702. DOI: 10.1002/anie.202002740.

[3] ZHANG Y X, MA W J, ZHU Y, *et al*. Inhibiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by tetrahedral DNA nanostructure-enabled antisense peptide nucleic acid delivery[J]. Nano Lett, 2018, 18(9): 5652-5659. DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b02166.

[4] YANG L, YAO C, LI F, *et al*. Synthesis of branched DNA scaffolded super-nanoclusters with enhanced antibacterial performance[J]. Small, 2018, 14(16): e1800185. DOI: 10.1002/smll.201800185.

[5] HU Q Q, LI H, WANG L H, *et al*. DNA nanotechnology-enabled drug delivery systems[J]. Chem Rev, 2019, 119(10): 6459-6506. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00663.

[6] KELLER A, LINKO V. Challenges and perspectives of DNA nanostructures in biomedicine[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2020, 59(37): 15818-15833. DOI: 10.1002/anie.201916390.

[7] LU X H, LIU J B, WU X H, *et al*. Multifunctional DNA origami nanoplatforms for drug delivery[J]. Chem Asian J, 2019, 14(13): 2193-2202. DOI: 10.1002/asia.201900574.

[8] KELLY G S. The role of glucosamine sulfate and chondroitin sulfates in the treatment of degenerative joint disease[J]. Altern Med Rev, 1998, 3(1): 27-39.

[9] WU Y L, LIN A H, CHEN C H, *et al*. Glucosamine attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting ROS-sensitive inflammatory signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 69: 208-218. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.026.

[10] XING R E, LIU S, GUO Z Y, *et al*. The antioxidant activity of glucosamine hydrochloride *in vitro*[J]. Bioorg Med Chem, 2006, 14(6): 1706-1709. DOI: 10.1016/j.bmc.2005.10.018.

[11] MENDIS E, KIM M M, RAJAPAKSE N, *et al*. Sulfated glucosamine inhibits oxidation of biomolecules in cells *via* a mechanism involving intracellular free radical scavenging[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 579(1/2/3): 74-85. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.10.027.

[12] VALVASON C, MUSACCHIO E, POZZUOLI A, *et al*. Influence of glucosamine sulphate on oxidative stress in human osteoarthritic chondrocytes: effects on HO-1, p22 (Phox) and iNOS expression[J]. Rheumatology, 2008, 47(1): 31-35. DOI: 10.1093/rheumatology/kem289.

[13] RAJAPAKSE N, MENDIS E, KIM M M, et al. Sulfated glucosamine inhibits MMP-2 and MMP-9 expressions in human fibrosarcoma cells[J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15(14): 4891-4896. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.04.048

[14] YANG Y, LIU W S, HAN B Q, *et al*. The antioxidative and immunostimulating properties of D-glucosamine[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(1): 29-35. DOI: 10.1016/j.intimp.2006.06.003.

[15] ARDEN N K, PERRY T A, BANNURU R R, *et al*. Non-surgical management of knee osteoarthritis: comparison of ESCEO and OARSI 2019 guidelines[J]. Nat Rev Rheumatol, 2021, 17(1): 59-66. DOI: 10.1038/s41584-020-00523-9.

[16] CHUANG K H, PENG Y C, CHIEN H Y, *et al*. Attenuation of LPS-induced lung inflammation by glucosamine in rats[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(6): 1110-1119. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0022OC.

[17] HWANG J S, KIM K H, PARK J, *et al*. Glucosamine improves survival in a mouse model of sepsis and attenuates sepsis-induced lung injury and inflammation[J]. J Biol Chem, 2019, 294(2): 608-622. DOI: 10.1074/jbc.RA118.004638.

[18] WU Y L, KOU Y R, OU H L, *et al*. Glucosamine regulation of LPS-mediated inflammation in human bronchial epithelial cells[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 635(1/2/3): 219-226. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.02.044.

[19] YOMOGIDA S, KOJIMA Y, TSUTSUMI-ISHII Y, *et al*. Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide, suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in rats[J]. Int J Mol Med, 2008, 22(3): 317-323.

[20] HWANG S Y, SHIN J H, HWANG J S, *et al*. Glucosamine exerts a neuroprotective effect via suppression of inflammation in rat brain ischemia/reperfusion injury[J]. Glia, 2010, 58(15): 1881-1892. DOI: 10.1002/glia.21058.

[21] WANG D, LIU Q, WU D, *et al*. Isothermal self-assembly of spermidine-DNA nanostructure complex as a functional platform for cancer therapy[J]. ACS Appl Mater erfaces, 2018, 10(18): 15504-15516. DOI: 10.1021/acsami.8b03464.

[22] HUANG C W, YOU Q Y, XU J, *et al*. An mTOR siRNA-loaded spermidine/DNA tetrahedron nanoplatform with a synergistic anti-inflammatory effect on acute lung injury[J]. Adv Healthc Mater, 2022, 11(11): e2200008. DOI: 10.1002/adhm.202200008.

[23] WANG D, CHEN C F, LIU Q, *et al*. Functionalizing DNA nanostructures with natural cationic amino acids[J]. Bioact Mater, 2021, 6(9): 2946-2955. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.02.012.

[24] CHEN C F, LIU Q, YUAN Y, *et al*. Protein-mediated DNA self-assembly by controlling the surface charge in a molecular crowding environment[J]. Biomater Sci, 2022, 10(8): 2006-2013. DOI: 10.1039/D1BM02017J.

[25] WANG C, VÁZQUEZ-GONZÁLEZ M, FADEEV M, *et al*. Thermoplasmonic-triggered release of loads from DNA-modified hydrogel microcapsules functionalized with Au nanoparticles or Au nanorods[J]. Small, 2020, 16(22): e2000880. DOI: 10.1002/smll.202000880.

[26] MIKI K, ORIDE K, KIMURA A, *et al*. Influence of side chain length on fluorescence intensity of ROMP-based polymeric nanoparticles and their tumor specificity in *in-vivo* tumor imaging[J]. Small, 2011, 7(24): 3536-3547. DOI: 10.1002/smll.201101637.

(收稿:2023-10-08;修回:2023-12-01)

(编辑 栗 嘉)