

离子交联法制备聚唾液酸/壳聚糖纳米粒

李丹¹, 吴剑荣^{1*}, 詹晓北¹, 朱莉²

(1. 江南大学 生物工程学院, 糖化学与糖生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏瑞光生物科技有限公司, 江苏 无锡 214125)

摘要:以聚唾液酸和壳聚糖为原料, 多聚磷酸钠为交联剂, 采用离子交联法制备聚唾液酸/壳聚糖纳米粒。结果表明: 当聚唾液酸质量浓度为 1.25 mg/mL, 壳聚糖质量浓度为 1.00 mg/mL, 壳聚糖与聚唾液酸质量比为 2:1, 多聚磷酸钠质量浓度为 0.15 mg/mL, 滴加速度为 1 滴/s 时, 所制备的聚唾液酸/壳聚糖纳米粒粒径最小, 平均粒径为 217.2 nm, 纳米粒粒径分散指数为 0.236。以牛血清白蛋白(BSA)为模型药物, 包封率为(44.95 ± 1.22)%, 载 BSA 率为(28.90 ± 0.78)%。离子交联法制备聚唾液酸/壳聚糖纳米粒操作简单快捷, 不使用有机溶剂, 所得纳米粒粒径较小, 有望成为蛋白类药物的载体。

关键词: 聚唾液酸; 壳聚糖; 纳米粒; 牛血清白蛋白

中图分类号: R943

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2014)06-0097-04

Preparation of polysialic acid/chitosan nanoparticles via ionic gelation

LI Dan¹, WU Jian-rong^{1*}, ZHAN Xiao-bei¹, ZHU Li²

(1. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Ray Hightech Co., Ltd., Wuxi 214125, China)

Abstract: Polysialic acid/chitosan nanoparticles are developed via ionic gelation of two polysaccharide-based molecules, negatively charged polysialic acid and positively charged chitosan. Sodium triphosphate is added as cross-linking agent. The minimum nanoparticle size can be achieved under the following conditions: 1.25 mg/mL of polysialic acid, 1.00 mg/mL of chitosan, 2:1 mass ratio of chitosan to polysialic acid, 0.15 mg/mL of triphosphate and 1 drop/s of drop acceleration. The average size of the nanoparticle is 217.2 nm with a particle size distribution of 0.236. Using bovine serum albumin as a model drug, the loading efficiency and loading capacity are 44.95% and 28.90%, respectively. Preparation of polysialic acid/chitosan nanoparticles via ionic gelation is simple, quick and free of organic solvent. Such kind of small size polysialic acid/chitosan nanoparticle is a potential vehicle for the delivery of drug proteins.

Key words: polysialic acid; chitosan; nanoparticle; bovine serum albumin

聚唾液酸(Polysialic acid)是由 *N*-乙酰神经氨酸以 α -2,8 或 α -2,9 糖苷键连接的同型聚合物。聚唾液酸具有非免疫原性、优良的生物相容性和生物可降解性^[1-2]。Gregoriadis 等^[3-6]提出聚唾液酸可替代聚乙二醇, 提高蛋白或多肽类药物在体内的稳定性, 简称聚唾液酸化(Polysialylation)。一些蛋白如过氧化氢酶^[7]、天冬酰胺酶^[8-9]、胰岛素^[10]、SOD 酶^[11]和 scFv 抗体^[12]被唾液酸化或聚唾液酸化。聚唾液酸修饰蛋白可提高蛋白的稳定性, 不改变蛋白的功能, 延长蛋白在体内的循环时间, 减少抗原性和免疫原性。此外, 由于 α -2,8 糖苷键连接的聚唾液酸与神经黏附分子(NACM)的聚唾液酸结构相同, 聚唾液酸还被应用于神经细胞组织工程的研究^[13-15]。

壳聚糖是目前已知的自然界中唯一存在的碱性多糖, 具有良好的生物相容性、可降解性、免疫原性小等特征, 且来源广泛、价格便宜, 是良好的药物输

送材料^[16]。

目前, 关于聚唾液酸的应用研究还比较少。为了进一步拓展聚唾液酸的应用, 以聚唾液酸、壳聚糖为原料, 多聚磷酸钠(TPP)为交联剂, 通过离子交联法制备聚唾液酸/壳聚糖(PSA/CS)纳米粒, 并研究其对模型药物-BSA 的包封和负载性能。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

壳聚糖(国药集团化学试剂有限公司生产, 脱乙酰度为 80%~95%, 相对分子质量为 594 000 Da); 聚唾液酸(本实验室发酵制备, 纯度 90% 以上, α -2,8 糖苷键连接, 相对分子质量为 100 000 Da); 多聚磷酸钠、冰醋酸等试剂除特殊注明外, 均为分析纯。

1.2 PSA/CS 微粒的制备

分别配制一定质量浓度的壳聚糖醋酸溶液、聚

收稿日期: 2014-01-22

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2011158)

作者简介: 李丹(1989-), 女, 硕士生, monalidan@sina.com; 吴剑荣(1976-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为工业微生物与糖生物技术, 通讯联系人, 0510-85918299, kinowu@jiangnan.edu.cn。

唾液酸多聚磷酸钠水溶液。在高速搅拌条件下,将聚唾液酸溶液逐滴滴入到壳聚糖溶液中,滴加完毕室温(25℃)继续搅拌 30 min。

1.3 微粒粒径测定及粒径分布

取适当浓度 PSA/CS 微粒水分散体系,用纳米粒度仪(Malvern Zetasizer Nano ZS 型, Malvern Instruments Ltd 生产)测定其平均粒径及分布。

1.4 PSA/CS 微粒的结构表征

将冷冻干燥的 PSA/CS 微粒于室温下 KBr 压片,利用傅里叶红外光谱仪(NICOLET NEXUS 470 型, Thermo Fisher Scientific 生产)测其红外光谱,同样制备壳聚糖、聚唾液酸样品进行对比。

1.5 载 BSA 纳米粒的制备

将一定量的 BSA 溶于聚唾液酸多聚磷酸钠水溶液中,其中聚唾液酸质量浓度为 1.25 mg/mL, TPP 质量浓度为 0.15 mg/mL。室温磁力搅拌下以 1 滴/s 的速度滴加入质量浓度为 1.00 mg/mL 的壳聚糖醋酸溶液中,持续搅拌 30 min。

1.6 纳米粒载 BSA 能力的测定

在 4℃ 下,将载 BSA 纳米粒分散体系高速离心(14 000 r/min)30 min,考马斯亮蓝法检测上清液中 BSA 含量^[17]。将白色沉淀在 -80℃ 的条件下冻干 48 h 后称重。纳米粒载 BSA 率和包封率分别为:

$$\text{载 BSA 率} = \left[\frac{\text{加入 BSA 质量} - \text{上清液中 BSA 质量}}{\text{纳米粒质量}} \right] \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{包封率} = \left[\frac{\text{加入 BSA 质量} - \text{上清液中 BSA 质量}}{\text{加入 BSA 质量}} \right] \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 影响 PSA/CS 微粒粒径大小的因素

2.1.1 聚唾液酸、壳聚糖质量浓度对微粒粒径的影响

聚唾液酸与壳聚糖的反应主要是聚唾液酸带负

表 1 不同质量浓度的聚唾液酸、壳聚糖溶液对液体性状的影响

聚唾液酸质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	壳聚糖质量浓度/(mg·mL ⁻¹)				
	0.20	0.50	1.00	1.50	2.50
0.10	▲	□	□	□	□
0.16	▲	○	○	○	○
0.31	▲	○	○	○	○
0.62	▲	○	○	○	○
1.25	▲	▲	○	○	○
2.50	▲	▲	▲	◇	◇

注:□—澄清溶液;○—纳米悬浮液;▲—大颗粒聚集物;◇—乳浊液。

电的羧基和壳聚糖带正电的氨基间的静电相互作用。二者的质量浓度不同,即反应体系中两基团的比例不同,会对形成的微粒粒径有较大的影响。所以,首先考察了不同质量浓度下壳聚糖与聚唾液酸反应生成微粒平均粒径的差异,结果见表 1。由表 1 可以看出,在不同的质量浓度范围内聚唾液酸与壳聚糖混合后分别可得澄清溶液、纳米悬浮液、大颗粒聚集物和乳浊液,因此要控制好壳聚糖与聚唾液酸的适当质量浓度。

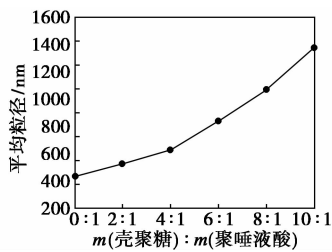
不同质量浓度的聚唾液酸溶液、壳聚糖溶液反应后,对其平均粒径进行测定,所得到的结果如表 2 所示。对比表 1 的液体性状研究结果,只有当两者质量浓度在一定范围时才能生成纳米粒悬浮液。在其他条件不变的情况下,微粒的平均粒径受聚唾液酸和壳聚糖的质量浓度的影响呈现出不太规则的变化,这说明 PSA/CS 微粒的粒径除与聚唾液酸、壳聚糖的质量浓度有关外,还与反应中的聚唾液酸与壳聚糖质量比、交联剂的质量浓度、滴加速度等有关。综合考虑减小粒径、由适当质量浓度的壳聚糖和聚唾液酸形成较多的纳米粒,以利于对药物的包封,因此选择聚唾液酸的质量浓度为 1.25 mg/mL、壳聚糖的质量浓度为 1.00 mg/mL 进行下一步研究。

表 2 聚唾液酸、壳聚糖质量浓度对微粒粒径的影响 nm

聚唾液酸质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	壳聚糖质量浓度/(mg·mL ⁻¹)				
	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50
0.16	182.4	276.1	411.3	514.7	760.0
0.31	179.0	395.5	538.3	779.0	1321.0
0.62	370.0	486.6	728.5	991.5	1345.0
1.25	3.2E+04	458.2	786.7	1068.0	1617.0
2.50	1.1E+04	5.2E+04	584.7	1433.0	2265.0

2.1.2 聚唾液酸、壳聚糖的质量比对微粒粒径的影响

由于聚唾液酸是带负电的聚合物,而壳聚糖是带正电的大分子,两者的质量比会影响正负电荷的反应,结果如图 1 所示。由图 1 可见,当 $m(\text{壳聚糖}):m(\text{聚唾液酸}) \leq 1:1$ 时,形成了大颗粒聚集物。这是由于当壳聚糖含量低时,壳聚糖分子上的正电荷被聚唾液酸分子中和,形成强烈反应,生成结构松散的聚集物。当 $m(\text{壳聚糖}):m(\text{聚唾液酸}) = 2:1$ 时,纳米粒平均粒径最小。之后随着壳聚糖比例的增加,纳米颗粒平均粒径逐渐增大。这是因为当壳聚糖含量增加时,增大了反应体系中粒子的碰撞机会,多个壳聚糖大分子通过聚唾液酸连接在一起而形成较大的微粒。



注: $m(\text{壳聚糖}):m(\text{聚唾液酸})$ 为0.5:1和1:1时形成了大颗粒聚集物。

图1 聚唾液酸、壳聚糖的质量比对微粒粒径的影响

2.1.3 TPP质量浓度对微粒平均粒径的影响

在聚唾液酸质量浓度为1.25 mg/mL,壳聚糖质量浓度为1.00 mg/mL, $m(\text{壳聚糖}):m(\text{聚唾液酸})=2:1$ 条件下,考察TPP质量浓度对微粒粒径的影响,结果如图2所示。

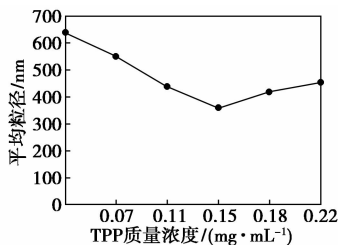


图2 TPP质量浓度对微粒粒径的影响

由图2可见,随着TPP质量浓度的增加,微粒的粒径呈现先减小后增大的趋势,在TPP质量浓度为0.15 mg/mL时微粒粒径最小。原因是交联剂的增加使PSA/CS微粒结合更紧密,微粒粒径随之减小;当交联剂继续增加时,微粒与微粒间的作用力增大,粒径较小的微粒会互相聚集或吸附在粒径较大的微粒表面。因此选择TPP质量浓度为0.15 mg/mL进行下一步研究。

2.1.4 聚唾液酸溶液滴加速度对微粒粒径的影响

当聚唾液酸质量浓度为1.25 mg/mL,壳聚糖质量浓度为1.00 mg/mL, $m(\text{壳聚糖}):m(\text{聚唾液酸})=2:1$,TPP质量浓度为0.15 mg/mL时,聚唾液酸溶液滴加速度对纳米粒粒径的影响如图3所示。由图3可以看出,聚唾液酸溶液的滴加速度越快,纳米粒的粒径就越大,当聚唾液酸溶液的滴加速度在0.2~1滴/s时,滴入溶液中的聚唾液酸和TPP在高速搅拌下能够很快地分散开,因此可以得到较小粒径的微粒,滴加速度对纳米粒的粒径影响不大。随着滴加速度的增大,滴加的聚唾液酸溶液不能快速的分散开,局部质量浓度过大,形成较大粒径的微粒;

当滴加速度 >5 滴/s时,溶液中出现大颗粒聚集体。考虑到操作的难易,选择适宜的滴加速度为1滴/s。

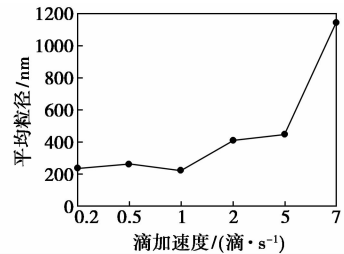


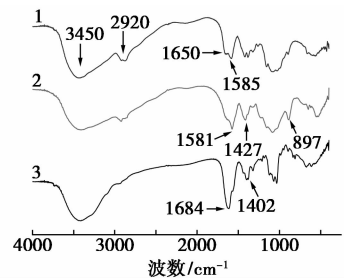
图3 滴加速度对微粒粒径的影响

2.2 PSA/CS纳米粒的粒径分布

当壳聚糖质量浓度为1.00 mg/mL,聚唾液酸质量浓度为1.25 mg/mL,TPP质量浓度为0.15 mg/mL,壳聚糖与聚唾液酸的质量比为2:1,滴加速度为1滴/s时,通过离子交联法制备的PSA/CS纳米颗粒分散性好,主要集中在180~340 nm,平均粒径为217.2 nm。该法制备纳米颗粒的操作简单,反应条件温和,不使用有机溶剂,得到的纳米颗粒粒径较小,分散性较好。

2.3 PSA/CS纳米粒的红外光谱分析

将制备得到的PSA/CS纳米粒冷冻干燥后,利用傅里叶红外光谱仪进行红外光谱分析,结果如图4所示。



1—壳聚糖;2—PSA/CS微粒;3—聚唾液酸

图4 壳聚糖、PSA/CS微粒、聚唾液酸的红外光谱图

壳聚糖在 3450 cm^{-1} 的峰是O—H的伸缩振动吸收峰与N—H的伸缩振动吸收峰重叠而成的1个宽峰,分别对应于壳聚糖上的羟基和氨基。这个宽峰说明羟基和氨基之间存在着强弱不同的分子内或分子间氢键,峰宽的差异反映了氢键的强弱。 2920 cm^{-1} 处的峰是壳聚糖上的甲基以及次甲基的C—H伸缩振动峰的特征吸收峰。 $1585\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ 区域是由壳聚糖的酰胺1(C=O)、酰胺2(N—H)以及氨基(1600 cm^{-1})变形振动峰所构成的一个较

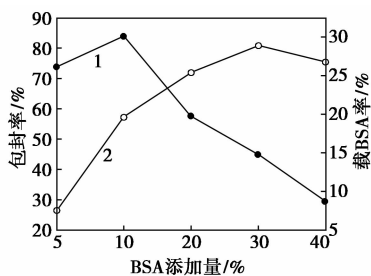
宽的混合吸收谱带,从这个区域的吸收峰的变化,可以推断壳聚糖上氨基的状态。

聚唾液酸在 $3\ 450\ \text{cm}^{-1}$ 处有强的吸收峰(O—H 的伸缩振动吸收峰与 N—H 的伸缩振动吸收峰);在 $1\ 684\ \text{cm}^{-1}$ 处有中强吸收峰(—COO—和 —NHCOCH₃ 中的 C=O 键的伸缩振动和非对称伸缩振动,以及 N—H 键的弯曲振动);在 $1\ 402\ \text{cm}^{-1}$ 处有中等吸收峰(—COO—中的 C—O 键伸缩振动和 C=O 的对称伸缩振动)。

PSA/CS 纳米粒在 $3\ 450\ \text{cm}^{-1}$ 处有强而宽的吸收峰,此处峰变宽说明聚唾液酸与壳聚糖结合后,增强了羟基和氨基之间的氢键,使吸收加强。在 $1\ 581\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 427\ \text{cm}^{-1}$ 处出现较强的吸收峰,而壳聚糖上 $1\ 585\sim 1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 较宽的混合吸收峰变窄,聚唾液酸上 $1\ 684\ \text{cm}^{-1}$ 强吸收峰消失, $1\ 402\ \text{cm}^{-1}$ 吸收峰发生迁移,说明聚唾液酸的羧基与壳聚糖的氨基以静电相互作用结合在一起。纳米粒在 $897\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了较强的吸收峰,此处是 β -吡喃糖苷键的特征峰,这是因为聚唾液酸的引入使壳聚糖的空间结构发生改变,使糖链能更好得伸展开来。

2.4 载 BSA 纳米粒的制备

以 BSA 为模型药物来研究用 PSA/CS 纳米粒作为蛋白药物载体的可行性。制备条件如下:壳聚糖质量浓度为 $1.00\ \text{mg/mL}$,聚唾液酸质量浓度为 $1.25\ \text{mg/mL}$,TPP 质量浓度为 $0.15\ \text{mg/mL}$,壳聚糖与聚唾液酸的质量比在 2:1,滴加速度为 1 滴/s,BSA 的添加量分别是聚唾液酸与壳聚糖总质量的 5%、10%、20%、30%、40%。纳米粒包封率和载 BSA 率的结果如图 5 所示。纳米粒的包封率与载 BSA 率与 BSA 的添加量有关,随着 BSA 添加量的增加,包封率先增加后减少,最高达到 83.95%;而载 BSA 率随 BSA 添加量先增加后减少,最高达到 28.90%。这是因为纳米粒对于 BSA 的负载能力是



1—包封率;2—载 BSA 率

图 5 BSA 添加量对于微粒包封率和载 BSA 率的影响

有一定限度的,即呈现饱和性。综合考虑包封率与载 BSA 率,BSA 的添加量为聚唾液酸与壳聚糖总质量的 30% 较为适宜,此时包封率为 $(44.95 \pm 1.22)\%$,载 BSA 率为 $(28.90 \pm 0.78)\%$ 。

3 结论

以壳聚糖、聚唾液酸为基本材料,TPP 为交联剂,利用壳聚糖在酸性环境中质子化的氨基与聚唾液酸在中性环境中去质子化的羧基间的静电吸引作用,通过离子交联法成功制备了 PSA/CS 纳米粒。在聚唾液酸质量浓度为 $1.25\ \text{mg/mL}$,壳聚糖质量浓度为 $1.00\ \text{mg/mL}$,壳聚糖与聚唾液酸质量比为 2:1,TPP 质量浓度为 $0.15\ \text{mg/mL}$,滴加速度为 1 滴/s 的条件下,所制备的 PSA/CS 纳米粒粒径最小,平均粒径为 $217.2\ \text{nm}$,纳米粒粒径分散指数为 0.236。以 BSA 为模型药物,BSA 添加量为聚唾液酸与壳聚糖总质量的 30% 时,包封率为 $(44.95 \pm 1.22)\%$,载 BSA 率为 $(28.90 \pm 0.78)\%$,为 PSA/CS 纳米粒成为蛋白类药物载体奠定基础。

参考文献

- [1] Zhang N, Bader R A. Synthesis and characterization of polysialic acid-N-trimethyl chitosan nanoparticles for drug delivery[J]. Nano LIFE, 2012, 2(03): 1241003.
- [2] Krieg A, Weber C, Hoogenboom R, et al. Block copolymers of poly(2-oxazoline)s and poly(meth)acrylates: A crossover between cationic ring-opening polymerization (CROP) and reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) [J]. ACS Macro Letters, 2012, 1(6): 776-779.
- [3] Gregoriadis G, Jain S, Papaioannou I, et al. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: A role for polysialic acids[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2005, 300(1): 125-130.
- [4] Bergfeld A K, Claus H, Vogel U, et al. Biochemical characterization of the polysialic acid-specific O-acetyltransferase NeuO of Escherichia coli K1 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(30): 22217-22227.
- [5] Gregoriadis G, McCormack B, Wang Z, et al. Polysialic acids: Potential in drug delivery [J]. FEBS Letters, 1993, 315(3): 271-276.
- [6] Mühlhoff M, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R. Polysialic acid: Three-dimensional structure, biosynthesis and function [J]. Current Opinion in Structural Biology, 1998, 8(5): 558-564.
- [7] Fernandes A, Gregoriadis G. Synthesis, characterization and properties of sialylated catalase [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1293(1): 90-96.
- [8] Fernandes A, Gregoriadis G. Polysialylated asparaginase: Preparation, activity and pharmacokinetics [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1997, 1341(1): 26-34.

烘箱温度分别为 100℃ 和 140℃, 然后取出水热釜自然冷却至室温; 通过离心分离收集白色沉淀物, 用去离子水洗后于 120℃ 烘箱中干燥, 干燥后的 ZnO 前驱体分别标记为 P100 和 P140; 经 500℃ 焙烧后的 ZnO 载体分别标记为 Z100 和 Z140。

1.2 催化剂的制备

焙烧后的 ZnO 作为载体, 采用硝酸钴 ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司生产) 水溶液等体积浸渍法制备催化剂, 室温浸渍 24 h 后, 于 120℃ 干燥 24 h, 再在 500℃ 焙烧 6 h, 得到 Co/ZnO 催化剂, 钴负载量为 5% 催化剂分别表示为 CZ100-5 和 CZ140-5, 钴负载量为 10% 的催化剂分别表示为 CZ100-10 和 CZ140-10。

1.3 催化剂表征

ZnO 形貌由日本 Hitachi S-4700 II 型扫描电子显微镜观察; 晶相结构由日本 Rigaku 公司的 Ultima IV 型 X-射线衍射仪分析; ZnO 载体的比表面积以及孔结构由美国麦克仪器 ASAP2020 型低温 N_2 -物理吸附仪测定。

1.4 催化剂活性评价

在固定床反应器(天津鹏翔科技有限公司生产)中评价催化剂费托合成反应性能, 先采用 H_2 在 250℃ 还原 6 h, 降至室温后切换为 $n(\text{H}_2):n(\text{CO}):n(\text{N}_2) = 6:3:1$ 的混合气升压至 2.0 MPa 进行反应, 温度和混合气空速分别为 220℃ 和 3 600 mL/(h·g-cat.)。产物分析方法参见文献[13]。

2 结果与讨论

2.1 ZnO 载体的形貌

不同水热温度下合成的 ZnO 前驱体和焙烧后

ZnO 载体的 SEM 图如图 1 所示。P100 由片状结构紧密堆积而成, 呈块状形态, 焙烧后形成 50 ~ 100 nm 片状聚集体; P140 由尺寸不等的片状结构松散组成, 于 500℃ 焙烧后仍保持片状形貌, 但产生了大量的孔洞。Wang 等^[19]也观察到片状沉淀在 400℃ 焙烧后出现 5 ~ 20 nm 大小的孔洞。

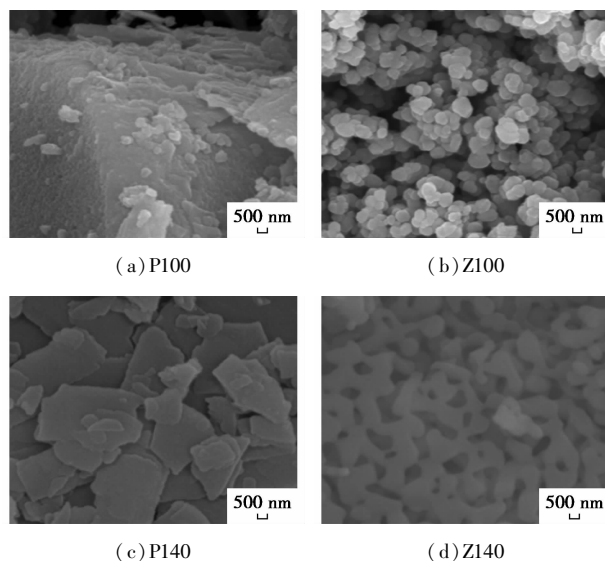


图 1 水热合成温度对 ZnO 形貌的影响

2.2 ZnO 载体的晶相结构

不同水热温度合成的 ZnO 晶相结构如图 2 所示。不同水热温度下合成的 ZnO 前驱体结构有很大差别, P100 的主要衍射峰归属为 ZnO 晶体 (PDF: 36-1451), 有少量 $\text{Zn}_5(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_6$ 晶体 (PDF: 19-1458) 共存; 而 P140 中的晶体包括 $\text{Zn}_5(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_6$ 和 ZnCO_3 (PDF: 08-0449) 2 类, 所含的 C 和 H 2 种元素在焙烧过程中会以 CO_2 和 H_2O 的形成逸出, 这是 Z140 中出现孔洞的原因, 参见图 1(d)。对于焙

(上接第 100 页)

- [9] Fernandes A, Gregoriadis G. The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: Implication in its pharmacokinetics [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 217(1): 215 - 224.
- [10] Jain S, Hreczuk-Hirst D H, McCormack B, *et al.* Polysialylated insulin: Synthesis, characterization and biological activity in vivo [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1622(1): 42 - 49.
- [11] Wu J R, Zhan X B, Lin Y, *et al.* Improvement of the CuZn-superoxide dismutase enzyme activity and stability as therapeutic agent by modification with polysialic acids [J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(12): 1939 - 1945.
- [12] Chen C, Constantinou A, Kerry A, *et al.* Glycoengineering approach to half-life extension of recombinant biotherapeutics [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2012, 23(8): 1524 - 1533.
- [13] Maarouf A E, Petridis A K, Rutishauser U. Use of polysialic acid in

repair of the central nervous system [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(45): 16989 - 16994.

- [14] Bruns S, Stark Y, Roker S, *et al.* Collagen biomaterial doped with colominic acid for cell culture applications with regard to peripheral nerve repair [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 131(3): 335 - 345.
- [15] Haile Y, Berski S, Drager G, *et al.* The effect of modified polysialic acid based hydrogels on the adhesion and viability of primary neurons and glial cells [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(12): 1880 - 1891.
- [16] Yang T C, Chou T C, Li C F. Preparation, water solubility and rheological property of the N-alkylated mono or disaccharide chitosan derivatives [J]. *Food Research International*, 2002, 35(8): 707 - 713.
- [17] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350 - 356. ■