

Fabrication of Galactosylated Alginate Nanoparticles as Drug Delivery System for Hepatocellular Carcinoma

Zhengxiong Li, Xiaoying Wu*

State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai
Email: *13210700138@fudan.edu.cn

Received: Apr. 5th, 2016; accepted: May 14th, 2016; published: May 17th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The alginate derivative nanoparticles modified by galactose (HA-Gal) with various galactose (Gal) substitution degrees were synthesized to evaluate their potential for hepatocellular carcinoma (HCC) targeting. Their physicochemical characteristics were investigated. Doxorubicin hydrochloride (DOX) as a model antitumor drug was incorporated into the HA-Gal. The *in vitro* drug release and antitumor capability of DOX loaded HA-Gal (DOX/HA-Gal) with different Gal substitution degrees were evaluated. Negatively charged DOX/HA-Gal appeared monodisperse and spherical in shape with a size range of 180 - 250 nm, and their Zeta potentials were above 30 mV (absolute value). The size, Zeta potentials, encapsulation efficiency and *in vitro* cytotoxicity of HA-Gal were increased with the increment in Gal substitution degree.

Keywords

Hepatocellular Carcinoma, Alginate Nanoparticle, Galactose, Drug Delivery, DOX

半乳糖修饰的海藻酸纳米载体构建及其抗肿瘤功效

李政雄, 吴晓盈*

*通讯作者。

文章引用: 李政雄, 吴晓盈. 半乳糖修饰的海藻酸纳米载体构建及其抗肿瘤功效[J]. 纳米技术, 2016, 6(2): 23-32.
<http://dx.doi.org/10.12677/nat.2016.62004>

复旦大学生命科学学院，遗传国家重点实验室，上海
Email: 13210700138@fudan.edu.cn

收稿日期：2016年4月5日；录用日期：2016年5月14日；发布日期：2016年5月17日

摘要

本文设计制备肝靶向聚合物纳米粒 - 半乳糖(Gal)修饰海藻酸酯(HA-Gal)纳米粒，以阿霉素(DOX)为抗肿瘤模型药物制备载药纳米粒(DOX/HA-Gal)，研究DOX/HA-Gal的理化性质、载药与释药、体外细胞增殖抑制，考察不同Gal接枝比对体外抗肿瘤功效的影响。结果表明DOX/HA-Gal为大小均一的球形粒子，水合动力学粒径为180~250 nm，荷负电(<-30 mV)；随Gal接枝比的增大，DOX/HA-Gal的粒径增大，Zeta电势升高，包封率增加，肿瘤细胞杀伤率提高。

关键词

肝癌，海藻酸纳米粒，半乳糖，药物递送，DOX

1. 引言

肝癌为常见的恶性肿瘤之一，严重威胁人类健康[1]。目前临床用于治疗肝癌的药物多为细胞毒性药物，选择性差，毒副作用大；此外，多数抗肿瘤药物为疏水性药物，难以跨越生理屏障到达肿瘤细胞，严重影响治疗效果[2]。纳米递送系统可提高药物的体内稳定性和选择性，增强抗肿瘤功效，降低毒副作用[3]。海藻酸生物相容、生物可降解、无免疫原性，富含活性羧基和羟基，易于功能化修饰，已广泛应用于药物递送[4] [5]。海藻酸骨架引入长链烷基、芳基等疏水性基团制得两亲性聚合物，溶液中可自组装形成纳米粒包载难溶性药物，作为纳米药物递送系统[6]。根据不同类型的肿瘤组织特点，通过受体介导、抗原-抗体特异性相互作用可实现对肿瘤细胞的主动靶向[7] [8]。肝癌细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体可特异性识别半乳糖基团[9] [10]，故半乳糖修饰的纳米粒可主动靶向肝细胞。

本试验以海藻酸为亲水骨架、十六醇为疏水组分、半乳糖(Gal)为肝癌靶向分子制备两亲性聚合物，水中可自组装形成纳米粒(图 1)。以 DOX 为模型药物，研究不同 Gal 接枝比 HA-Gal 纳米粒理化性质，释药规律和肿瘤细胞生长抑制功效。

2. 仪器和试剂

Advance DMX 500 型核磁共振波谱仪(400 MHz, 德国 Bruker 公司); VEGA TS 5136MM 型可变真空扫描电子显微镜(捷克 TESCAN 公司); TGA 1 型热重分析仪(瑞士 Mettler Toledo 公司); Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度仪(英国 Malvern 公司); Varioskan Flash 3001 型酶标仪(美国 ThermoFisher 公司); Nexus 470 型傅立叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet 公司); Scientz-II D 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); HP6890(PLUS)型气象色谱仪(美国 HP 公司)。

十二烷基苯磺酸钠(SDS)、海藻酸钠(sodium alginate, NaAlg)、十六醇、4-二甲基氨基吡啶(4-(N,N-dimethylamino)pyridine, DMAP)、二甲基甲酰胺(dimethylformamide, DMF)、4-甲苯磺酸(p-toluenesulfonic acid, TSA) (国药化学试剂有限公司); 阿霉素(doxorubicin hydrochloride, DOX·HCl) (浙江海正药业股份有限公司); 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC·HCl)、N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS) (上海源聚生物科技有限公司);

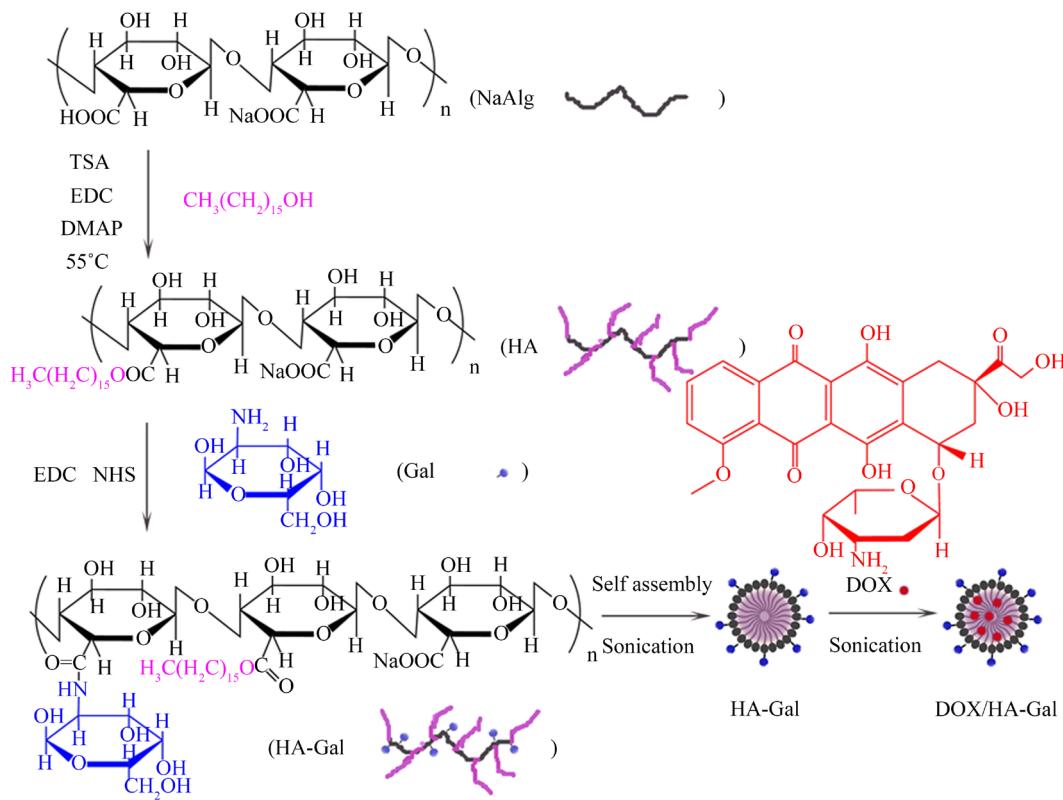


Figure 1. Synthetic route of HA-Gal copolymers and schematic representation depicting the formation of DOX/HA-Gal nanoparticle

图 1. DOX/HA-Gal 纳米粒的制备过程示意图

半乳糖胺盐酸盐(D-(+)-Galactosaminehydrochloride, Gal)、噻唑蓝(3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide, MTT)(美国 Sigma 公司); 透析袋(MWCO 3.5 kDa, 上海绿鸟科技发展有限公司)。

QGY-7703 细胞(人肝癌细胞, 中国科学院上海生命科学研究院)。

3. 方法与结果

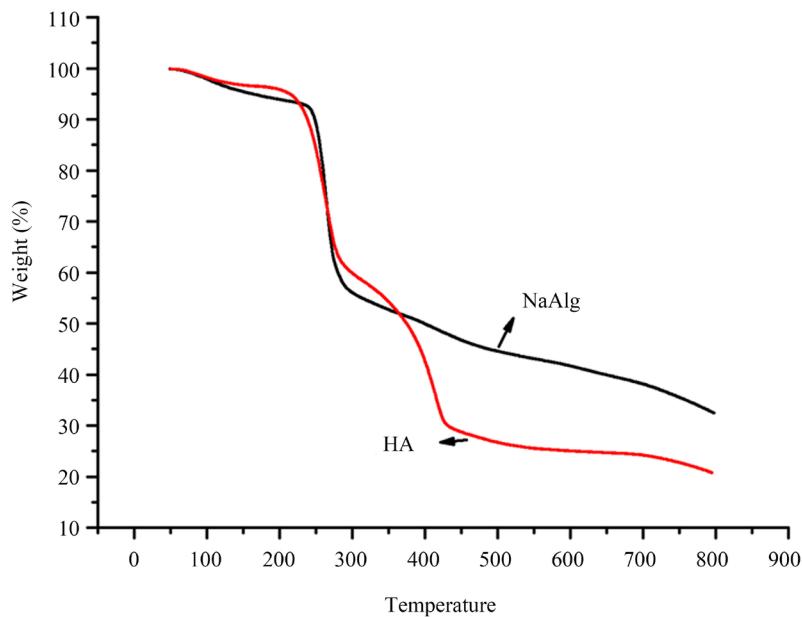
3.1. 两亲性海藻酸酯(HA)的制备

HA 的制备方法参照文献[6]: 称取 0.5 g NaAlg 和 0.5 g TSA, 加至 35 ml DMF, 55°C 搅拌 30 min, 依次加入 0.3 g EDC、3.0 g 十六醇, 55°C 反应 30 h; 加入 4 倍体积乙醇, 室温搅拌 30 min, 8000 r/min 离心 20 min 得到沉淀, 将沉淀用无水乙醇洗涤三次, 离心, 溶解, 透析 3 d, 冻干得产物 HA。图 2 为 NaAlg 和 HA 的热重分析(Thermogravimetric Analysis, TGA)曲线图。

由图可知: NaAlg 和 HA 均表现为两阶段失重过程, 第一阶段为 50°C~180°C, 这主要为分子中吸附和结合水脱除所致。NaAlg 第二阶段失重从 216°C 开始, 并持续到 270°C, 为羧基热分解脱去 CO_2 及相邻羟基脱水造成; 相比 NaAlg, HA 失重更明显, 是由于酯键受热分解释放 CO_2 、相邻羟基脱去水分子, 同时侧链受热分解成小分子, 说明十六醇成功接枝至 NaAlg。

3.2. 半乳糖(Gal)修饰的 HA (HA-Gal)制备

将 40 mg HA 溶于 10 ml 去离子水, 分别加入 4、8 和 16 mg 半乳糖胺, 加适量的 EDC 和 NHS ($n(\text{EDC})$: $n(\text{NHS})$: $n(\text{半乳糖胺}) = 1.2:1.2:1$), 于室温反应 24 h, 透析、冷冻干燥, 分别命名为 HA-Gal1、HA-Gal2 和

**Figure 2.** The TG analysis curves of NaAlg and HA**图 2. 标准试验系统结果曲线**

HA-Gal3。图 3 为 NaAlg、HA、HA-Gal1、HA-Gal2 和 HA-Gal3 傅里叶变换红外(Fourier Transform Infrared Spectrometer, FT-IR)图谱。

与 NaAlg 谱线相比, HA 谱线中出现了一些新的吸收峰, 1686 cm^{-1} 和 1296 cm^{-1} 处的小尖峰为酯基中的 C=O 和 C-O 伸缩振动峰, 说明 HA 合成。与 HA 相比, 由于 HA-Gal 中 N-H 的伸缩振动, HA-Gal 3430 cm^{-1} 处的宽峰发生红移; 1610 cm^{-1} 处的强峰为 C=O 和酰胺 I 相互叠加的结果。

图 4 为 HA、HA-Gal1、HA-Gal2 和 HA-Gal3 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱。3.6~5.1 ppm 处的信号峰为 NaAlg 的氢峰。HA 图谱中 1.6~2.0 ppm 处为 HA 侧链上亚甲基氢峰, 1.0~1.3 ppm 处为 HA 侧链上甲基氢峰, 亦说明 HA 合成。HA-Gal 图谱 3.0~4.0 ppm 处为半乳糖胺的特征峰。配制一系列标准浓度的 Gal 甲苯溶液, 通过气相色谱测定不同浓度溶液的峰面积, 然后进行线性拟合, 得到 Gal 的标准曲线(检测器: FID, 毛细管色谱柱: HP-INNOWAX, $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ mm}$)。汽化室温度: 250°C , 检测器温度: 280°C , 用高纯氮(99.99%)作为载气。色谱柱初温 120°C , 保持 1 min, 然后, 以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升至 230°C , 保持 3 min。分流比: 10:1, 进样量: 1 μl)。分别称取 10 mg HA-Gal 样品溶解在 1 mol/L 的 NaOH 溶液中, 60°C 下搅拌 24 h 然后加入适量甲苯, 再充分搅拌 1 h, 3000 rpm 分离, 移取上层有机相, 重复三次, 将上层液进行气相色谱分析。根据气相色谱得到的峰面积计算出甲苯中 Gal 的浓度, 最后计算得到 HA-Gal1、HA-Gal2 和 HA-Gal3 的 Gal 接枝比分别为 3.4%、7.8% 和 11.4% [11]。

3.3. 纳米粒的制备和表征

HA-Gal 水中可自组装形成以十六醇为疏水核心、海藻酸和半乳糖为亲水外壳的核-壳结构纳米粒, 疏水核心有利于包载难溶性药物。分别取 2 ml (2 mg/ml) HA、HA-Gal1、HA-Gal2 和 HA-Gal3 溶液, 超声(120 W) 15 min, 得纳米粒悬液, 加入 80 μl (10 mg/ml) DOX 溶液, 超声(120 W) 15 min, 即得载 DOX 纳米粒悬液, 分别记为 DOX/HA、DOX/HA-Gal1、DOX/HA-Gal2 和 DOX/HA-Gal3。分别离心, 收集上清, 测定吸光值, 计算 DOX 包封率(encapsulation efficiency, EE)和载药量(loader capacity, LC, 质量分数)。各载药纳米粒粒径、Zeta 电势、EE 和 LC 见表 1。

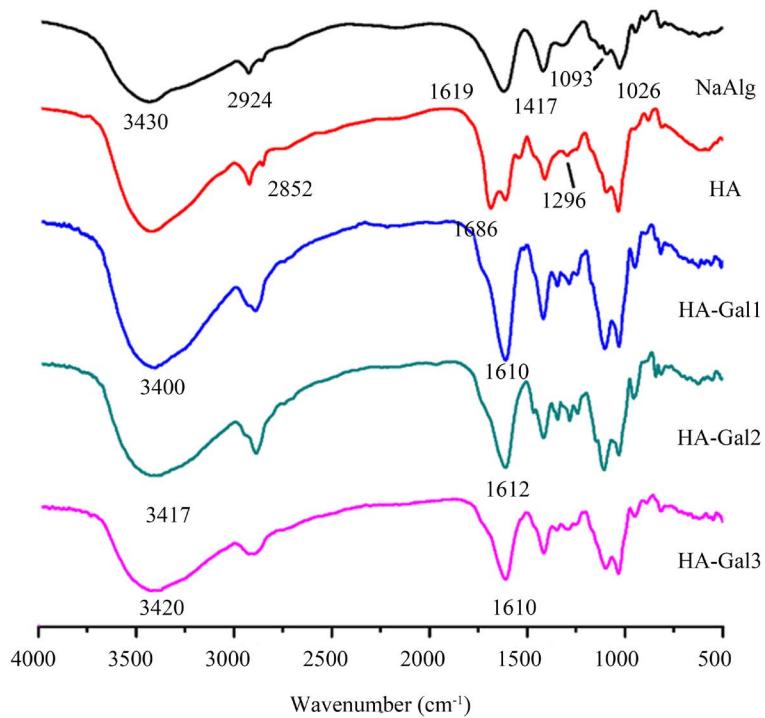


Figure 3. FT-IR spectra of NaAlg, HA, HA-Gal1, HA-Gal2 and HA-Gal3
图 3. NaAlg、HA、HA-Gal1、HA-Gal2 和 HA-Gal3 的 FT-IR 图谱

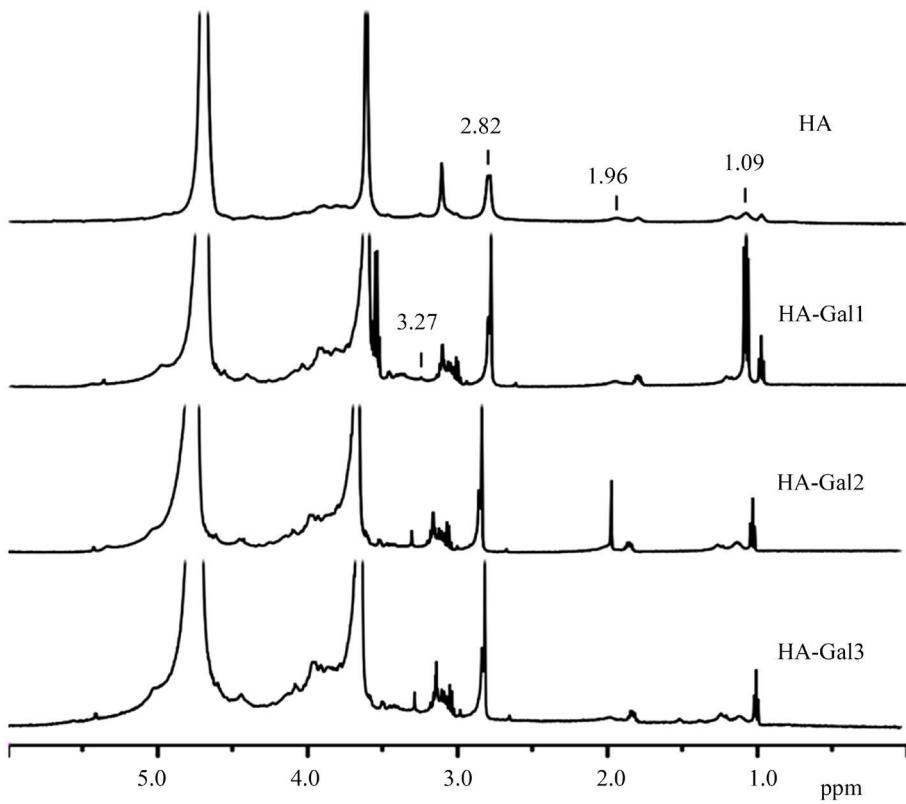


Figure 4. ^1H NMR spectra of HA, HA-Gal1, HA-Gal2 and HA-Gal3
图 4. HA、HA-Gal1、HA-Gal2 和 HA-Gal3 的 ^1H NMR 图谱

Table 1. Particle size, Zeta potentials, EE and LC of DOX/HA, DOX/HA-Gal1, DOX/HA-Gal2 and DOX/HA-Gal3 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

表 1. DOX/HA、DOX/HA-Gal1、DOX/HA-Gal2 和 DOX/HA-Gal3 的平均粒径、Zeta 电势、EE 和 LC ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

样品	粒径 (nm)		Zeta 电势(mV)	EE (%)	LC (%)
	空白纳米粒	包载 DOX			
DOX/HA	172.4 ± 1.7	183.4 ± 1.8	-53.7 ± 0.5	79.4 ± 0.7	13.7 ± 0.1
DOX/HA-Gal1	170.8 ± 1.2	211.2 ± 4.9	-50.0 ± 0.4	77.5 ± 1.4	13.4 ± 0.2
DOX/HA-Gal2	182.7 ± 7.4	231.4 ± 6.0	-37.1 ± 0.8	78.2 ± 0.6	13.5 ± 0.1
DOX/HA-Gal3	236.1 ± 6.3	245.3 ± 5.1	-29.8 ± 0.8	80.1 ± 0.3	13.8 ± 0.1

由表可知，随着 Gal 接枝比的增大，纳米粒粒径增大，这可能由于 Gal 修饰使表面亲水层增厚[12]；同时 Zeta 电势增加，可能由于海藻酸骨架游离的羧基随 Gal 接枝比增大而减少。以扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察其形貌，可见 DOX/HA-Gal2 成球形，大小约为 200 nm (图 5)。

3.4. 体外释放

分别量取 1 ml 1 mg/ml DOX/HA、DOX/HA-Gal1、DOX/HA-Gal2 和 DOX/HA-Gal3 纳米粒悬液(按“3.3”项下方法制备)，加至透析袋中(MWCO 3500 Da)，浸入 50 ml 0.2 mol/mL PBS (pH 7.4)，37°C、100 r/min 振荡温育。分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 和 48 h 取样 1 ml，测定荧光强度。每次取样后补加 1 ml 新鲜 PBS。由标准曲线得 DOX 含量，并计算累计释放量(%)。如图 6 所示，DOX 物理包埋于纳米粒后的释药行为呈二相性，即包括初期突释和后期的缓释；前期的突释可能为少量游离及纳米粒表面粘附的 DOX 快速释放所致，DOX/HA、DOX/HA-Gal1、DOX/HA-Gal2 和 DOX/HA-Gal3 的 DOX 48 h 累计释放分别达到 80%、82%、88% 和 93%。

3.5. 细胞摄取

按 2.3 项下方法制备含 DOX 的纳米粒。以 1×10^5 细胞/孔的密度接种 QGY-7703 细胞至 24 孔板，37°C、5% CO₂ 培养 24 h；每 3 孔为一组，按每孔 5 μg DOX 加入纳米粒，37°C、5% CO₂ 分别培养 0.5、2 和 4 h；吸弃孔内液体，以 0.2 mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤三次，加入 0.5 ml 0.5% (w/v) SDS 溶液(pH 8.0)，37°C、100 r/min 振荡培养 30 min 以裂解细胞；酶标仪测定细胞裂解液中 DOX 含量，Lowry 法测定蛋白质含量。摄取量以每 1 mg 蛋白质含 DOX 的量(μg)表示(μg/mg)。

纳米粒粘附至细胞表面后会被细胞内化，摄取入胞，细胞摄取效率和药物递送效率正相关[13]。

图 7 为 QGY-7703 细胞对纳米粒的摄取试验结果，可见在 QGY-7703 细胞中，纳米粒在 0.5~4 h 内可提高药物的细胞摄取量，且摄取量随 Gal 接枝比的增加而增加，其可能为靶向配体 Gal 修饰度和纳米粒的粒径、电势等物理性质共同作用的结果。

3.6. 细胞毒性试验

以 1×10^4 细胞/孔的密度接种 QGY-7703 细胞至 96 孔板，37°C、5% CO₂ 培养 24 h；更换新鲜培养基，每 3 孔为一组，加入终浓度分别为 25、50、250 和 500 μg/ml 的空白纳米粒，以加等体积 0.2 mol/L PBS (pH 7.4) 为对照，37°C、5% CO₂ 培养 48 h；MTT 法测定细胞存活率。

图 8 为 QGY-7703 细胞与不同浓度空白纳米粒共培养 48 h 的存活率，可见在 25~500 μg/ml 浓度范围内纳米粒对细胞活力无显著影响($p > 0.05$)，可确保后续体外细胞试验结果的准确性。

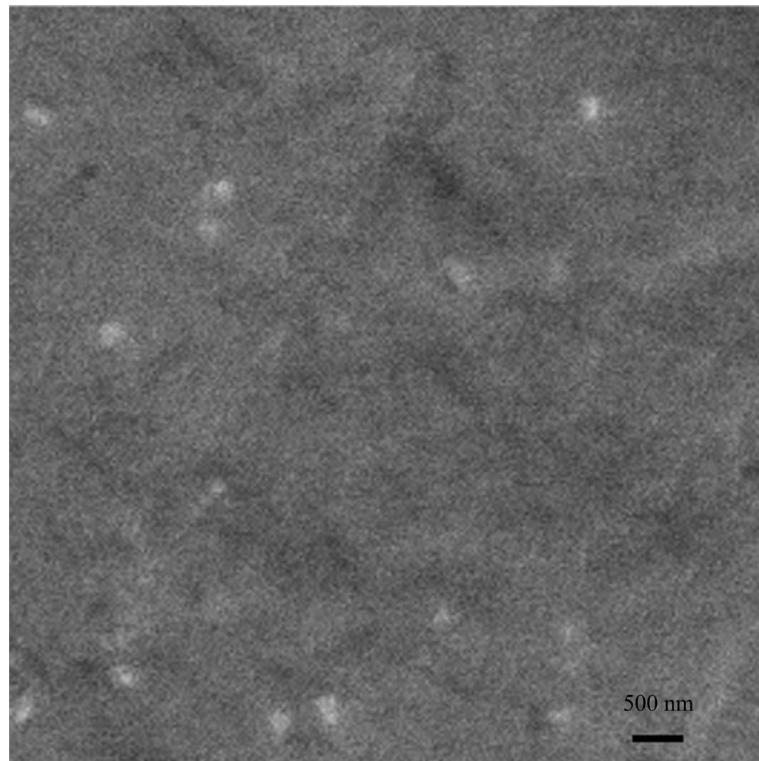


Figure 5. SEM images of DOX/HA-Gal2

图 5. DOX/HA-Gal2 的 SEM 照片

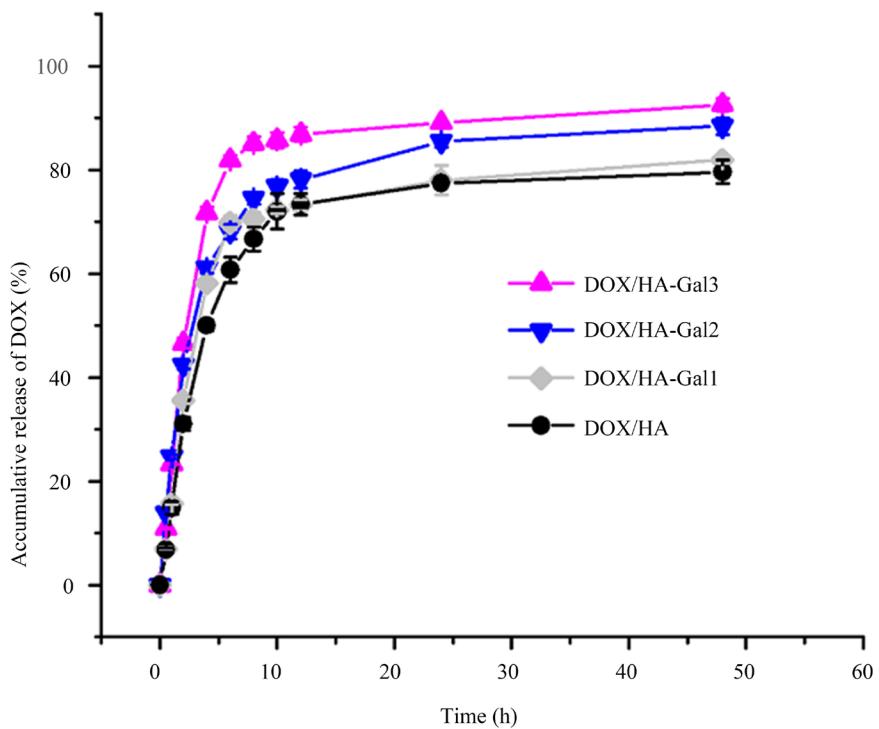


Figure 6. *In vitro* release of DOX/HA, DOX/HA-Gal1, DOX/HA-Gal2 and DOX/HA-Gal3 under neutral (pH 7.4) condition at 37°C ($n = 3$)

图 6. DOX/HA、DOX/HA-Gal1、DOX/HA-Gal2 和 DOX/HA-Gal3 体外释放曲线($n = 3$)

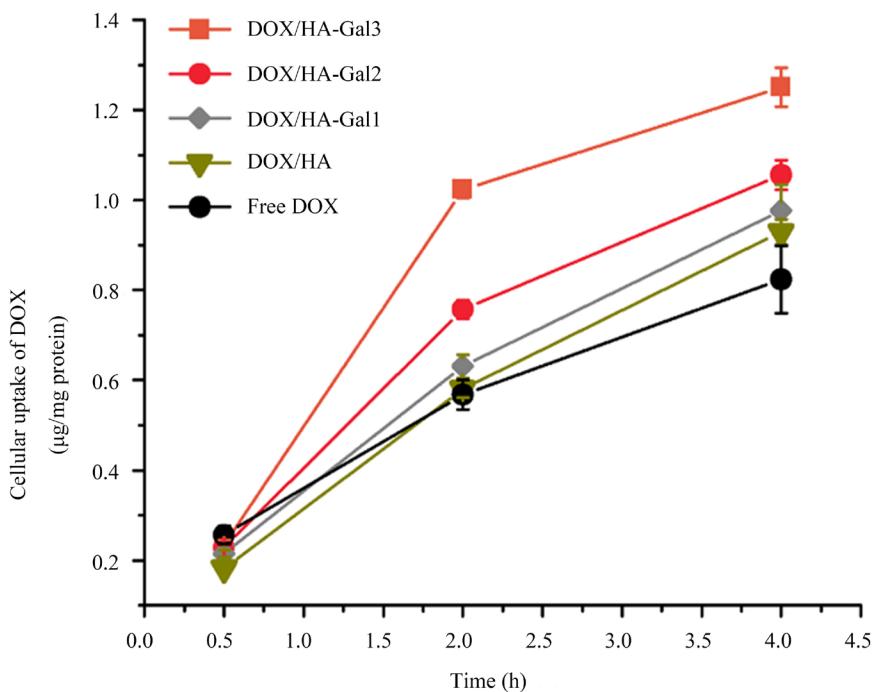


Figure 7. Cellular uptake of DOX in QGY-7703 cells following incubation for 0.5, 2, and 4 h at 37°C ($n = 3$)

图 7. QGY-7703 细胞对纳米粒的摄取($n = 3$)

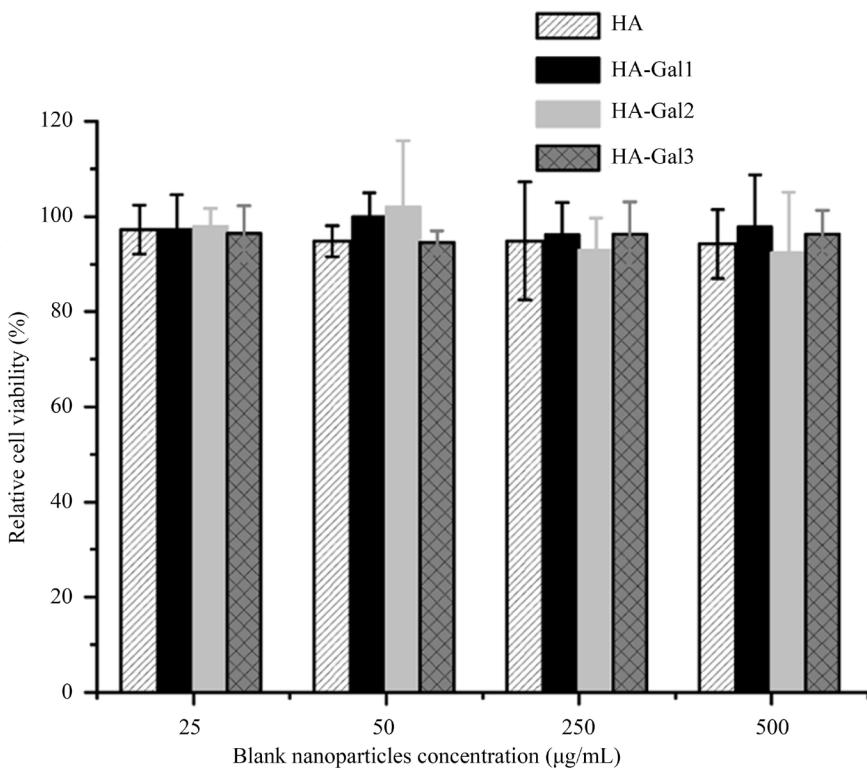


Figure 8. Viability of QGY-7703 cells after incubation with blank nanoparticles at various concentrations for 48 h ($n = 3$)

图 8. QGY-7703 细胞分别与空白纳米粒共培养 48 h 后的细胞存活率($n = 3$)

3.7. 体外细胞抑制

按 2.6 项下培养细胞, 每 6 孔为一组, 分别加入适量游离 DOX、DOX/HA、DOX/HA-Gal1、DOX/HA-Gal2 和 DOX/HA-Gal3 纳米粒悬液, 使孔内 DOX 终浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以加入 0.2 mol/L PBS (pH 7.4) 的细胞为阴性对照, 37°C、5% CO₂ 培养 48 h; 用 MTT 法测定各试验组相对细胞存活率, 计算半数抑制浓度(IC_{50})。

图 9 为 QGY-7703 细胞分别与游离 DOX 溶液和纳米粒共培养 48 h 后的细胞存活率, 可见细胞存活率随药物浓度升高而降低。DOX/HA、DOX/HA-Gal1、DOX/HA-Gal2 和 DOX/HA-Gal3 组的细胞存活率显著低于游离 DOX 组, 表明纳米粒可增强药物的肿瘤细胞抑制作用。游离 DOX、DOX/HA、DOX/HA-Gal1、DOX/HA-Gal2 和 DOX/HA-Gal3 的 IC_{50} 分别为 1.12、0.68、0.64、0.51 和 0.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表明体外抗增殖能力随着靶向配体接枝比的增加而增强, 与细胞摄取结果一致, 纳米粒提高了 DOX 的肿瘤细胞摄取效率, 更多药物入胞, 抑制肿瘤细胞增殖。

4. 讨论

用十六醇对海藻酸进行修饰, 制备得到两亲性 HA, 半乳糖胺的氨基与 HA 的羧基缩合形成酰胺键, 制得 HA-Gal, HA-Gal 水中自组装形成纳米粒, 超声条件下包载抗肿瘤药物 DOX, 得到具有纳米尺度的 DOX/HA-Gal。该纳米粒水化后粒径约为 200 nm, 具有良好的单分散性, 随 Gal 接枝比的增加, 纳米粒表面靶向配体与受体的结合能力增强, 通过特异性受体介导的内吞作用主动转运入胞, 实现纳米粒的主动靶向, 同时 Zeta 电势绝对值降低, 与荷负电的细胞表面静电排斥减弱, 更有利于细胞的摄取, 更多药物进入胞内, 抑制肿瘤细胞增殖。此外, Gal 修饰度高的纳米粒药物释放更快, 高效入胞后, 胞内药物浓度提高, 更有利于实现高效的细胞抑制。总之 DOX/HA-Gal3 具有更强的肿瘤细胞增殖抑制功效, 其可归因于表面靶向配体修饰度、纳米粒自身粒径、电势和药物释放等理化性质共同作用的结果, HA-Gal3 纳米粒有望作为理想的靶向抗肿瘤药物递送载体用于肿瘤治疗。

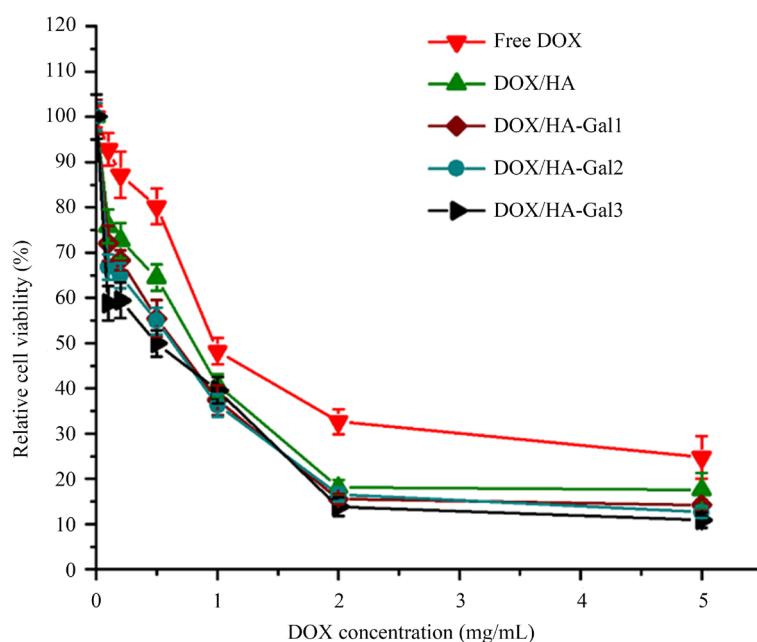


Figure 9. Viability of QGY-7703 cells after incubation with drug loaded nanoparticles at various concentrations for 48 h ($n = 6$)

图 9. QGY-7703 细胞分别载药纳米粒共培养 48 h 后的细胞存活率($n = 6$)

参考文献 (References)

- [1] Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D.M. (2010) Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, **127**, 2893-2917.
<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25516>
- [2] Ma, S., Jiao, B., Liu, X., Yi, H., Kong, D., Gao, L., Zhao, G., Yang, Y. and Liu, X. (2010) Approach to Radiation Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*, **36**, 157-163.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.11.008>
- [3] Ma, P. and Mumper, R.J. (2013) Anthracycline Nano-Delivery Systems to Overcome Multiple Drug Resistance: A Comprehensive Review. *Nano Today*, **8**, 313-331. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2013.04.006>
- [4] Yang, J.-S., Xie, Y.-J. and He, W. (2011) Research Progress on Chemical Modification of Alginic Acid: A Review. *Carbohydrate Polymers*, **84**, 33-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.048>
- [5] Li, Q., Liu, C.-G. and Yu, Y. (2015) Separation of Monodisperse Alginic Nanoparticles and Effect of Particle Size on Transport of Vitamin E. *Carbohydrate Polymers*, **124**, 274-279. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.007>
- [6] Yang, J.S., Zhou, Q.Q. and He, W. (2013) Amphiphaticity and Self-Assembly Behavior of Amphiphilic Alginic Esters. *Carbohydrate Polymers*, **92**, 223-227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.100>
- [7] Wang, M. and Thanou, M. (2010) Targeting Nanoparticles to Cancer. *Pharmacological Research*, **62**, 90-99.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2010.03.005>
- [8] Byrne, J.D., Betancourt, T. and Brannon-Peppas, L. (2008) Active Targeting Schemes for Nanoparticle Systems in Cancer Therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**, 1615-1626. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.005>
- [9] D'Souza, A.A. and Devarajan, P.V. (2015) Asialoglycoprotein Receptor Mediated Hepatocyte Targeting—Strategies and Applications. *Journal of Controlled Release*, **203**, 126-139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.022>
- [10] Zhang, X.Q., Wang, X.L., Zhang, P.C., Liu, Z.L., Zhuo, R.X., Mao, H.Q. and Leong, K.W. (2005) Galactosylated Ternary DNA/Polyphosphoramidate Nanoparticles Mediate High Gene Transfection Efficiency in Hepatocytes. *Journal of Controlled Release*, **102**, 749-763. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.10.024>
- [11] Yang, J.S. and He, W. (2012) Synthesis of Lauryl Grafted Sodium Alginate and Optimization of the Reaction Conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, **50**, 428-431.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.027>
- [12] Lin, A., Liu, Y., Huang, Y., Sun, J., Wu, Z., Zhang, M. and Ping, Q. (2008) Glycyrrhizin Surface-Modified Chitosan Nanoparticles for Hepatocyte-Targeted Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **359**, 247-253.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.03.039>
- [13] Huang, M., Fong, C.W., Khor, E. and Lim, L.Y. (2005) Transfection Efficiency of Chitosan Vectors: Effect of Polymer Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Journal of Controlled Release*, **106**, 391-406.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.05.004>