科学通报 2009 年 第 54 卷 第 14 期: 2065 ~ 2070
论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

叶酸-磁性淀粉纳米颗粒的研制及其肿瘤靶向磁热疗效应分析

郑元青, 童春义, 王贝, 谢英, 廖红东, 李丹*, 刘选明*

湖南大学生命科学与技术研究院, 生物能源与材料研究中心, 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082
* 联系人, E-mail: lidanie@hotmail.com, sw_xml@hnu. cn

2008-12-13 收稿, 2009-04-29 接受
湖南省农业生物纳米技术重大专项基金(编号: 03NKY1001)和国家高校“985 工程”创新平台项目资助

摘要 采用反相微乳液法制备了包裹磁流体的淀粉纳米颗粒(StNP@Fe_2O_3), 再经叶酸活性物质(FA-PEG-NH2)修饰, 得到叶酸-磁性淀粉纳米颗粒(FA-StNP@Fe_2O_3),透射电子显微镜和激光粒度分析仪检测显示, 所得颗粒的平均粒径约为 250 nm;邻菲罗啉法检测 FA-StNP@Fe_2O_3 的含铁量为 2 mg/g. FA-StNP@Fe_2O_3 纳米颗粒在交变磁场下作用 30 min, 可使环境温度(37℃)升高到 42～43℃, 显示其具有一定的磁热效应. 将纳米颗粒分别与 HUEC-12 正常细胞和 Hela 肿瘤细胞共培养, 经交变磁场作用后, 通过四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)实验、Hochest-PI 双染色分析、流式细胞仪技术检测了纳米颗粒在细胞水平的生物学效应, 结果表明, FA-StNP@Fe_2O_3 纳米颗粒在未加磁场时, 在一定浓度范围内对细胞的增殖无明显影响; 而在一定交变磁场强度作用下则能有效地诱导 HeLa 细胞凋亡, 细胞凋亡率为 13.4%, 普鲁士蓝染色实验显示, 叶酸修饰有助于 FA-StNP@Fe_2O_3 纳米颗粒靶向识别 HeLa 细胞. 研究表明, FA-StNP@Fe_2O_3 纳米颗粒具有良好的肿瘤靶向磁热治疗效果, 可望应用于肿瘤的靶向治疗.

关键词
磁纳米颗粒
叶酸
肿瘤靶向性
磁热疗
细胞凋亡

近年来, 磁性纳米颗粒因其独特的性质被广泛应用于生物治疗和诊断等领域. 其具有的表面化学活性, 可以很容易地结合生物大分子, 通过在其表面修饰上特异性的配体使之成为很好的靶向性载体 [1,2]. 磁性微粒在交变磁场作用下能吸收电磁波能量转化为热能, 且可使热能局限于肿瘤组织, 当温度超过 41℃时可导致细胞的凋亡及坏死, 因而可实现对肿瘤的热疗 [3~5].

在临床治疗中, 药物的低毒和高效一直是人们研究的重点, 药物靶向传递的研究, 即如何发挥药物高效治疗的效果越来越受到研究者的重视. 叶酸是小分子量维生素, 相对于单分子抗体等蛋白质, 具有结构稳定、价格低廉、无免疫原性等特点, 而且叶酸与叶酸受体结合力强, 能被高效介导进入肿瘤细胞, 是一种很有应用价值的靶向物质 [6]. 根据叶酸受体在绝大多数恶性肿瘤细胞膜内有大量表达而正常细胞很少有表达这一特性, 人们将叶酸通过化学键连接到药物载体以及它们制成的纳米颗粒上 [7~9], 致使叶酸/叶酸受体介导靶向传递成为该领域的研究热点 [10].

磁纳米颗粒研究发展至今, 颗粒的尺寸、表面分子的修饰、靶向性等都成为人们所关注的重点 [11~13]. 为了进一步改善磁性纳米颗粒对细胞的亲和性和靶向性, 提高热疗效果, 本文以天然多糖淀粉为原料, 通过反相微乳液法制备了磁性淀粉纳米颗粒; 然后将结合有氨基的肿瘤细胞特异靶向分子叶酸对其表面进行生物学修饰, 以体外培养的细胞为研究对象, 对制备的叶酸-磁性淀粉纳米颗粒(FA-StNP@Fe_2O_3)

引用格式: 郑元青, 童春义, 王贝, 等. 叶酸-磁性淀粉纳米颗粒的研制及其肿瘤靶向磁热疗效应分析. 科学通报, 2009, 54: 2065~2070
Zheng Y Q, Tong C Y, Wang B, et al. Development and application of tumor-targeting magetic nanoparticles FA-StNP@Fe_2O_3 for hyperthemia. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0422-x

的细胞内磁热疗诱导细胞凋亡进行了研究. 实验结果证实了磁性纳米颗粒表面经过靶向分子的修饰可以达到对肿瘤细胞靶向识别和在细胞内富集的目的.

1 材料与方法

(ⅰ) 仪器与试剂. 透射电子显微镜(JEOL-1230, 日本), 激光粒度分析仪(Zeta-sizer, Malvern, 英国), 高速离心机(5810 R Eppendorf, 德国), 高速低温离心机(Himac CR 22G, Hitachi,日本), 紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器厂), 荧光倒置显微镜 (Nikon TE2000u, 日本), CO_2 细胞培养箱(Thermo 3110, 美国), 超纯水系统(Millipore, 美国), 酶标仪(Bio-Rad, 美国), 交变磁场发射器(80 Hz, 10 kA/m, 实验室自制).

磁流体γ-Fe_2O_3 参照文献 [14]制备, FA-PEG-NH_2 按照文献 [6]合成, RPMI 1640 培养基粉剂购自美国GIBCO公司, 小牛血清、青霉素和链霉素等均购自北京鼎国生物技术公司, Hochest-PI染色剂购自美国Invitrogen公司, 其他试剂均为国产分析纯. 人正常细胞株HUEC-12(人脐静脉内皮细胞)、肿瘤细胞株HeLa均购自中南大学湘雅医学院细胞库, 由本实验室进行常规培养.

(ⅱ) 磁性淀粉纳米颗粒(StNP@Fe_2O_3)的制备. 取 0.1 g/mL 淀粉溶液 1 mL, 沸水浴中加热至溶液澄清, 冷却至室温. 甲苯和氯仿体积比 3∶1 混合, 加入占总体积 2%的表面活性剂 Span80, 搅拌混匀. 淀粉液与磁流体混合, 加入到甲苯与氯仿的混合溶剂中($V_{油}/V_{水}=20/1$), 搅拌至形成微小的乳液. 加入占淀粉质量 0.01%的交联剂 $POCl_3$, 继续搅拌反应 1 h, 用丙酮和无水乙醇轮流洗涤乳液 3 次, 冷冻干燥, 得StNP@Fe_2O_3.

(ⅲ) StNP@Fe_2O_3 的表面修饰. 参照文献 [10]对StNP@Fe_2O_3 进行叶酸分子的表面修饰. 首先取 1 mg 的St-Fe_2O_3 完全分散于 1 mL PBS(pH 7.0)中, 然后加入适量的FA-PEG-NH_2, 振荡反应 6 h, 冷冻干燥后, 得到淡黄色粉末, 即为FA-StNP@Fe_2O_3 颗粒.

(ⅳ) FA-StNP@Fe_2O_3 的表征分析. 通过透射电子显微镜和 Zeta 电位-粒度分析仪对磁性纳米颗粒的大小、形貌以及粒度分布进行表征分析.

(ⅴ) 铁含量分析. 取 1 mg 磁性纳米颗粒悬浮于 1 mL 双蒸水中, 用α-淀粉酶消化除去淀粉, 37℃振摇 2 h, 经稀释 100 倍后加入邻菲罗啉染色液, 紫外可见分光光度计测定 510 nm 吸光度. 以分析纯 Fe_2O_3 为标准物质, 建立铁含量-吸光度标准曲线.

(ⅵ) 磁热效应分析. 先将含磁性纳米颗粒的培养液在 37℃恒温培养箱中孵育 1 h, 再在交变磁场下处理不同时间, 用精密温度计测量溶液温度. 考察了不同浓度磁纳米颗粒在磁场作用下的处理时间与环境温度的变化情况.

(ⅶ) 四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)实验. 选对数生长期的细胞, 以 10000 个细胞/孔的密度接种于细胞 96 孔板内, 每孔加入 100 μL 的完全培养基培养 24 h. 分别加入不同浓度梯度的 γ-Fe_2O_3, StNP@Fe_2O_3 和 FA-StNP@Fe_2O_3, 继续培养 24 h, 加入 20 μL MTT, 继续培养 4 h, 除去上层清液后, 用 DMSO 溶解沉淀, 分光光度计测定 570 nm 吸光度. 以空白处理细胞组为对照组, 计算细胞抑制率和成活率.

(ⅷ) Hochest-PI 双染色分析. 选对数生长期的细胞, 以 10000 个细胞/孔的密度接种于细胞 6 孔板内, 加入 2 mL 的完全培养基培养 24 h. 磁场处理(颗粒浓度 1 mmol/L; 作用时间 30 min), 收集细胞后与 Hochest-PI 染色液混匀, 避光染色 5 min, 用培养基洗去游离染色液, 重悬细胞, 细胞液滴在载玻片上, 用荧光显微镜进行荧光染色观察. 以空白处理细胞组为对照组.

(ⅸ) 流式细胞仪检测. 如 (ⅷ) 节的方法处理细胞后, 70%冷乙醇固定过夜. 次日用 PBS 洗 2 次, 室温下 PI 染色液(终浓度 50 μg/mL) 避光染色 30 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率. 以空白处理细胞组为对照组.

(ⅹ) 普鲁士蓝染色分析. 用(ⅷ)节的方法处理细胞后, 分别加入等铁含量的γ-Fe_2O_3, StNP@Fe_2O_3 和 FA-StNP@Fe_2O_3 在培养皿中, 并在磁场作用下分别处理 0.5 h. 除去上层清液, PBS 洗两次, 加入普鲁士蓝染液对处理细胞染色, PBS 洗两次, 除去多余的普鲁士蓝染色液, 显微镜下观察. 以空白处理细胞组为对照组.

2 结果与讨论

2.1 FA-StNP@Fe_2O_3 的形貌特征分析

图1(A), (B), (C)分别为磁流体 γ-Fe_2O_3 以及 FA-StNP@Fe_2O_3 纳米颗粒的透射电子显微镜图和粒径分布图. 由图可知, γ-Fe_2O_3 被包裹到淀粉纳米颗粒结构中, 颗粒呈核-壳结构, γ-Fe_2O_3 的平均粒径约为 6 nm,

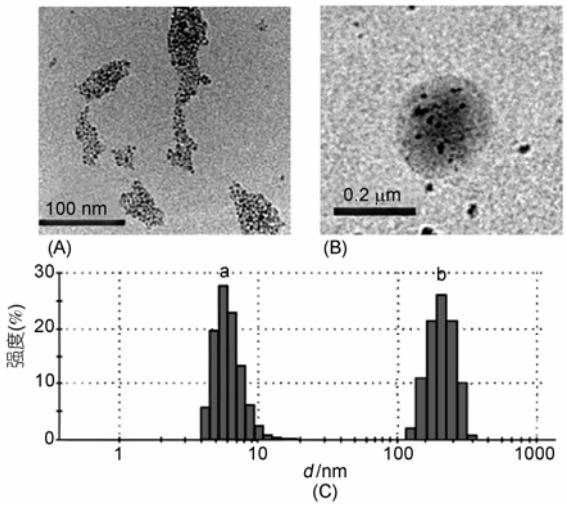

图 1　磁流体γ-Fe_2O_3 和 FA-StNP@Fe_2O_3 纳米颗粒的表征图

(A)、(B) 磁流体 γ-Fe_2O_3 和 FA-StNP@Fe_2O_3 纳米颗粒透射电子显微镜图; (C) 纳米颗粒的粒径分布图, a: 磁流体 γ-Fe_2O_3; b: FA-StNP@Fe_2O_3

分散系数为 0.342, FA-StNP@Fe_2O_3 粒径约为 250 nm, 分散系数为 0.422. 结果表明, 制备的 FA-StNP@Fe_2O_3 形态规则, 分散性好.

2.2　FA-StNP@Fe_2O_3 的铁含量分析

邻菲罗啉法测定铁含量标准曲线为A=196.05C + 0.0066, R_2=0.9996. 测定 FA-StNP@Fe_2O_3 纳米颗粒铁含量约为 2 mg/g, γ-Fe_2O_3 母液铁含量为 306 mg/g. 以下实验中均以铁含量折算的摩尔浓度表示纳米颗粒的使用浓度.

2.3　FA-StNP@Fe_2O_3 对细胞增殖的影响

磁热疗通常是建立在磁性纳米颗粒本身对细胞无毒或低毒性的基础之上. 在未加磁场作用下, 通过 MTT 实验考察纳米颗粒对细胞增殖的影响可反映纳米颗粒的细胞毒性. 由图 2 可知, 在较低浓度下(0.5, 1, 5 mmol/L), 纳米颗粒对共培养的 HeLa 细胞增殖的影响不明显. 而在较高浓度下(10, 20 mmol/L), 不同纳米颗粒的处理均使细胞的存活率有所下降. 说明纳米颗粒对细胞增殖率的影响存在一定的浓度依赖性.

2.4　FA-StNP@Fe_2O_3 磁热效应分析

图 3 分析了不同处理时间下各种磁纳米颗粒的磁热效应. 由图可知, 交流磁场作用 30 min, 含有磁性纳米颗粒的培养基温度从 37℃上升到 42~43℃, 说明磁性纳米颗粒均有明显的磁热效应. 其中磁流体

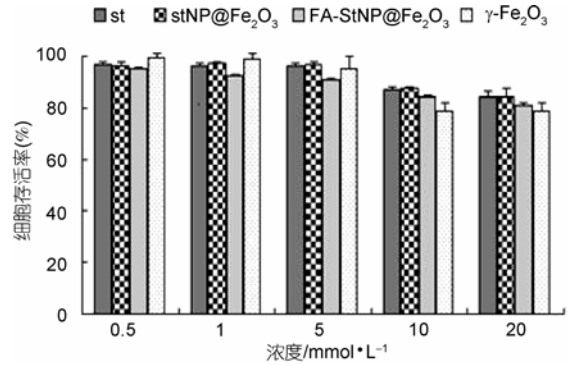

图 2　不同纳米颗粒作用下的细胞存活率

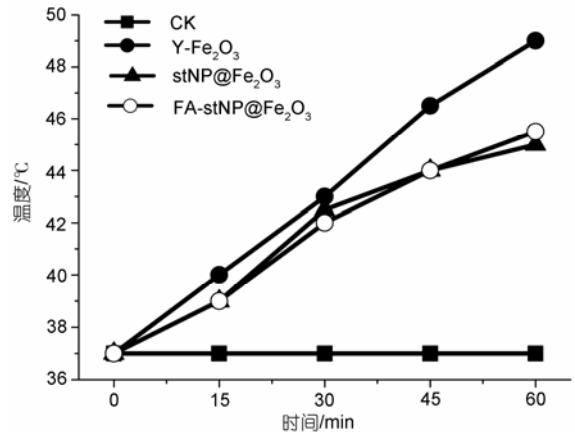

图 3　不同磁性纳米颗粒在交变磁场作用下的升温曲线图

的磁热效应要比包裹了磁流体的淀粉纳米颗粒强, 这可能是由于磁流体颗粒小, 分散性要比磁性淀粉纳米颗粒好的缘故. 对于细胞生长来说, 温度达到 42℃, 热作用即能诱导细胞凋亡, 从而发挥热疗的效果 [15].

基于 FA-StNP@Fe_2O_3 颗粒作用下的细胞成活率实验和磁热效应分析的结果, 在下面的实验中, 选择 1 mmol/L 的浓度、以交变磁场作用 30 min 来考察磁性纳米颗粒在细胞水平的生物学效应.

2.5　细胞凋亡检测

(ⅰ) Hochest-PI 双染色实验. Hochest-PI 双染色实验考察了不同纳米颗粒磁热疗诱导细胞凋亡的情况. 从图 4 可知, 在对肿瘤细胞 Hela 的处理实验中, 对照组细胞染色质均匀分布(图 4(a),(e)), 而经 γ-Fe_2O_3 和 FA-StNP@Fe_2O_3 磁性纳米颗粒处理后, 均有部分细胞出现月牙状蓝色荧光, 在叠加视场中可观察到染色质集中分布在细胞的一边, 呈明显的染色质浓缩现象(图 4(b)~(d),(f)~(h)), 说明不同的磁性纳米颗粒在交变磁场作用下均可诱导肿瘤细胞凋亡.

此外, 在图 4(b)和(f)中还观察到了红色荧光, 这提示在交变磁场的作用下, 经γ-Fe_2O_3 颗粒处理的细胞除发生了细胞凋亡外, 还出现了部分细胞坏死. 图 5 是不同纳米颗粒对人正常细胞 HUEC-12 的处理结果, 其中对照组细胞染色质均匀分布(图 5(a),(e)), 而经磁性纳米颗粒处理后, 大多数 HUEC-12 细胞无明显凋亡特征出现, 仅观察到极少数细胞有轻微的染色质浓缩现象(图 5(b)~(d),(f)~(h)), 提示磁性纳米颗粒在交变磁场作用下所导致的 HUEC-12 细胞凋亡现象没有其在肿瘤细胞中的作用显著.

(ii) 流式细胞仪分析. 采用流式细胞术定量分析了磁性纳米颗粒在交变磁场处理前后细胞凋亡水平和凋亡率的变化. 如图 6 所示, 不同磁性纳米颗粒在没有交变磁场作用时，不会引起 HeLa 细胞凋亡，其亚 G1 峰（即凋亡峰）值均在 1%以内，与对照组无统计学上的差异. 而在交变磁场作用下, 磁性纳米颗粒由于磁热效应可引起 HeLa 细胞凋亡, 均出现明显的亚 G1 峰. 其中叶酸介导的磁性淀粉纳米颗粒 FA-

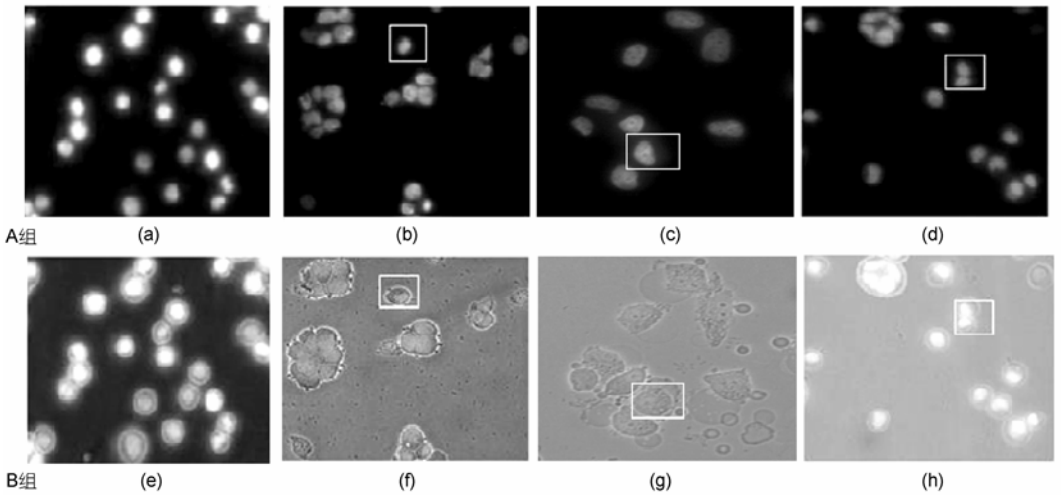

图 4 不同纳米颗粒磁场处理 HeLa 细胞后 Hochest-PI 染色结果(×200)

A 组为荧光视场效果图, B 组为明视场和荧光视场叠加的效果图. (a),(e): 空白组; (b),(f): γ-Fe_2O_3 组; (c),(g): StNP@Fe_2O_3 组; (d),(h): FA-StNP@Fe_2O_3 组

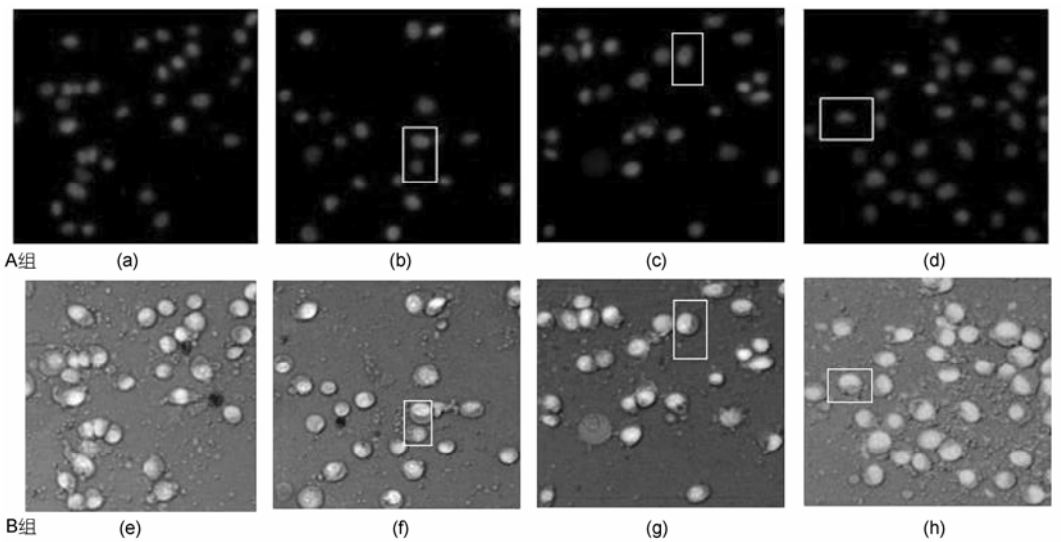

图 5 不同纳米颗粒磁场处理 HUEC-12 细胞后 Hochest-PI 染色结果(×200)

A 组为荧光视场效果图, B 组为明视场和荧光视场叠加的效果图. (a),(e): 空白组; (b),(f): γ-Fe_2O_3 组; (c),(g): StNP@Fe_2O_3 组; (d), (h): FA-StNP@Fe_2O_3 组

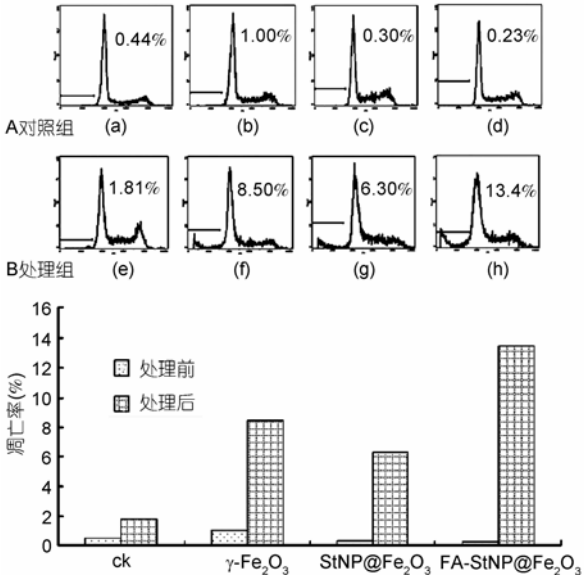

图 6　不同纳米颗粒经磁场处理前后对 HeLa 细胞凋亡的影响

(a)~(d): 对照组(即未处理组); (e)~(h): 处理组; (a), (e): 空白组. (b), (f): γ-Fe_2O_3; (c),(g): StNP@Fe_2O_3; (d),(h): FA-StNP@Fe_2O_3

StNP@Fe_2O_3 引起的凋亡率为 13.4%, 高于没有叶酸介导的γ-Fe_2O_3(8.5%)和 StNP@Fe_2O_3 磁性颗粒(6.3%). 结果表明, 通过叶酸修饰提高了磁性淀粉纳米颗粒的肿瘤细胞靶向识别作用, 增加了细胞凋亡数量, 增强了磁性纳米颗粒的磁热疗效果.

2.6　普鲁士蓝染色分析结果

为了进一步验证 FA-StNP@Fe_2O_3 纳米颗粒的靶向性, 用普鲁士蓝染色法分析了正常细胞和肿瘤细胞吞噬纳米颗粒前后的细胞表面和吞噬进胞内的铁含量. 如图 7 所示, 肿瘤细胞对照组没有加入磁铁颗粒, 经普鲁士蓝染色后未出现任何着色, 而其他 3 个加入磁性纳米颗粒的处理组均出现了明显的蓝色染色. 比较 3 个磁性纳米组, 发现经叶酸修饰的纳米颗粒 FA-StNP@Fe_2O_3 处理后的细胞染色程度要高于其他两组, 证明了 FA-StNP@Fe_2O_3 的肿瘤细胞靶向性使之能在细胞内有效地富集, 在磁场作用下可诱导较高的细胞凋亡率. 而正常细胞由于很少表达叶酸受体, 故只观察到较少的蓝色染色, 其中单纯磁流体由于其粒径小, 较易被细胞吞噬, 但正常细胞对经淀粉包裹之后的 StNP@Fe_2O_3 的吞噬则大大减少. 正常细胞对经叶酸修饰的淀粉纳米颗粒 FA-StNP@Fe_2O_3 的吞噬量也远远小于单纯磁流体的, 说明 FA-StNP@Fe_2O_3 的靶向热疗作用与其颗粒在细胞表面的吸附和细胞吞噬量有直接关系, 提示该颗粒对正常细胞的影响较小.

3　结论

近年来, 肿瘤的细胞内热疗已成为肿瘤治疗的一个热点. 热疗是通过加热肿瘤组织, 促进肿瘤细胞凋亡的过程, 而热疗的加热源有多种, 磁性材料是其中非常重要的一种. 本文成功制备了 FA-StNP@Fe_2O_3 纳米颗粒材料, 并通过一系列的生物学效应实验, 发现磁性纳米颗粒经过表面叶酸修饰可

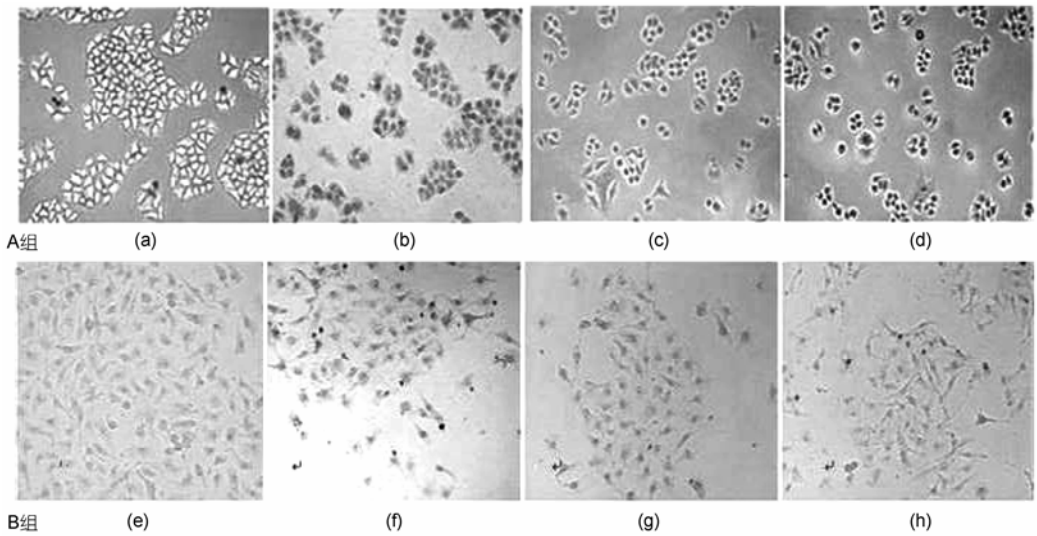

图 7　不同纳米颗粒进入细胞后的普鲁士蓝染色结果(×100)

A 组: Hela 细胞组. (a) 对照组, (b) γ-Fe_2O_3 组, (c) StNP@Fe_2O_3 组, (d) FA-StNP@Fe_2O_3 组. B 组: HUCE-12 细胞组. (e) 对照组, (f) γ-Fe_2O_3 组, (g) StNP@Fe_2O_3 组, (h) FA-StNP@Fe_2O_3 组

以实现对肿瘤细胞的靶向识别和细胞内的富集. 表明我们研制的 FA-StNP@Fe_2O_3 纳米颗粒具有良好的肿瘤靶向磁热治疗效果, 可望应用于肿瘤的靶向治疗.

致谢 作者由衷感谢王海刚、林奕婷、薛昌刚对本实验的贡献.

参考文献

1 Saini S, Sharma R, Baron R L, et al. Multicentre dose-ranging study on the efficacy of USPIO ferumoxtran-10 for liver MR imaging. Clin Radiol, 2000, 55: 690—695[doi]

2 Gupta A K, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials, 2005, 26: 3995—4021[doi]

3 马勇杰, 李红, 鄢祝兵, 等. 细胞内磁热疗诱导人肺腺癌细胞 SPC-A1 凋亡的体外实验研究. 生物医学工程学杂志, 2007, 24: 1305—1308

4 Xiao X X, He Q Q, Huang K L, et al. Possible magnetic multifunctional nanoplatforms in medicine. Med Hypotheses, 2007, 68: 680—682[doi]

5 Nanz D, Weishaupt D, Quick H H, et al. TE-switched double-contrast enhanced visualization of vascular system and instruments for MR-guided interventions. Magn Reson Med, 2000, 43: 645—648[doi]

6 肖苏尧, 童春义, 刘选明, 等. 肿瘤靶向性药物载体叶酸-淀粉纳米颗粒的研制与应用. 科学通报, 2006, 51: 1151—1155

7 Liang B, He M L, Xiao Z P, et al. Synthesis and characterization of folate-PEG-grafted-hyperbranched-PEI for tumor-targeted gene delivery. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367: 874—880[doi]

8 Ana G, Carmen R L, Edison L S, et al. Microspheres containing lipid/chitosan nanoparticles complexes for pulmonary delivery of therapeutic proteins. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 69: 83—93[doi]

9 张良珂, 侯世祥, 毛声俊, 等. 叶酸偶联白蛋白纳米粒肿瘤细胞靶向性研究. 四川大学学报(医学版), 2004, 35: 165—168

10 Sun H K, Ji H J, Cheol O J, et al. Folate receptor mediated intracellular protein delivery using PLL-PEG-FOL conjugate. J Control Release, 2005, 103: 625—634[doi]

11 Raynal I, Rrigent P, Peyramaure S, et al. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. Invest Radiol, 2004, 39: 56—63[doi]

12 Petri-Finka A, Chastellaina M, Juillerat-Jeanneretb F, et al. Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. Biomaterials, 2005, 26: 2685—2694[doi]

13 章林, 吴卫和, 王德平, 等. 纳米 MnZn 铁氧体微粒的磁热效应和细胞毒性. 中国生物医学工程学报, 2008, 27: 122—127

14 廖红东, 袁丽, 童春义, 等. 基于聚乙烯醇/Fe_2O_3 纳米颗粒的纤维素酶固定化. 高等学校化学学报, 2008, 29: 1564—1568

15 Zhang Y, Zhang J. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells. J Colloid Interface Sci, 2005, 283: 352—357[doi]