

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.006

携量子点靶向高分子微泡造影剂制备及体外细胞实验研究

郝 兰, 王志刚, 骆 杰, 张群霞, 郑元义
(重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

【摘要】目的:制备一种量子点(quantum dots, QDs)标记单抗赫赛汀修饰的靶向高分子微泡 $MB_{QDs/PLGA/Her}$, 并考察其在人乳腺癌细胞 MCF-7 靶向性实验中的应用。**方法:**双乳化法(W1/O/W2)联合共价偶联法(EDC/NHS)制备 $MB_{QDs/PLGA/Her}$, TEM 表征 QDs 装载标记, MTT 法比较细胞毒性, 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrum, FT-IR)检测 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 与抗体的连接情况, 荧光显微镜观察 QDs 荧光标记性能。**结果:** $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 平均粒径为 (584.7 ± 20.2) nm, TEM 显示 QDs 在聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-glycolic acid, PLGA)微粒包埋, FT-IR 表明赫赛汀氨基与 PLGA 羧基的共价偶联。 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 细胞毒性小于 QDs 试剂($P < 0.05$)。细胞识别实验表明 QDs 标记的红色微泡 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 紧密黏附在人乳腺癌细胞 MCF-7 周围。**结论:**成功制备 $MB_{QDs/PLGA/Her}$, QDs 包裹在高分子微气泡核内既改善其细胞毒性且保持 QDs 荧光标记性能。

【关键词】量子点; 高分子微气泡; 抗体; 标记**【中国图书分类法分类号】**R318**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-04-09

Preparation of targeted high molecular polymer microbubble encapsulating quantum dots and cell experiment study in vitro

HAO Lan, WANG Zhigang, LUO Jie, ZHANG Qunxia, ZHENG Yuanyi
(Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To prepare a high molecular polymer microbubble $MB_{QDs/PLGA/Her}$ marked by quantum dots (QDs) and modified by single antibody Herceptin and to study its application in targeted experiment of human breast cancer cells MCF-7. **Methods:** $MB_{QDs/PLGA/Her}$ targeted microbubble was produced by the double emulsion method (W1/O/W2) and covalent coupling technique (EDC/NHS). Its physical properties (loading mark of QDs, cytotoxicity, connection of $MB_{QDs/PLGA/Her}$ to antibody, fluorescent marking performance of QDs) were determined by methods of TEM, MTT, Fourier transform infrared spectrum (FT-IR) and fluorescence microscope respectively. **Results:** $MB_{QDs/PLGA/Her}$ average diameter was (584.7 ± 20.2) nm. TEM imaging showed that QDs was loaded in recombinant human tissue-type plasminogen activator poly lactic-glycolic acid (PLGA) particles and FT-IR spectrogram confirmed covalent coupling between Herceptin's amino and PLGA's carboxyl. Cell toxicity of $MB_{QDs/PLGA/Her}$ was less than that of QDs reagents ($P < 0.05$). Red microbubble $MB_{QDs/PLGA/Her}$ marked by QDs was connected round human breast cancer cells MCF-7. **Conclusions:** $MB_{QDs/PLGA/Her}$ microbubble is prepared successfully. Targeted microbubble cell toxicity is improved and QDs fluorescent marking performance is kept by loading QDs into polymer microbubble.

【Key words】quantum dots; high molecular polymer microbubble; antibody; labeling

量子点(quantum dots, QDs)^[1]是由少量的原子所构成, 直径在 1~10 nm, 外观恰似极小的点状物, 在激发光诱导下 QDs 会产生荧光。QDs 超强的荧光稳定性明显优于传统有机染料分子, QDs 的特性: ①能够承受多次的激发和光发射, 而有机分子却会分解。持久的稳定性可以让研究人员更长时间地观

测细胞和组织, 并毫无困难地进行界面修饰连接。②有丰富的颜色。生物体系的复杂性经常需要同时观察几种组分, 如果用有机染料分子染色, 则需要不同波长的光来激发, 而 QDs 则不存在这个问题, 使用不同大小(进而不同色彩)的纳米晶体来标记不同的生物分子。使用单一光源就可以使不同的颗粒能够被即时监控。这些特性使 QDs 成为了一种理想的体外和体内细胞/组织荧光成像诊断试剂^[2]。然而 QDs 的生物毒性一直是其未能进入临床试验的瓶颈。高分子膜材羧基端乳酸/羟基乙酸共聚物, 因其生物相容性和可生物降解性, 获 FDA 批准应用于

作者介绍: 郝 兰, Email: lanhao5@163.com,

研究方向: 功能成像剂研究。

通信作者: 张群霞, Email: zhangqunxia2000@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81130025, 81161120548, 30970752)。

药物控释制剂材料,膜材上端羧基是化学偶联靶向配基的有效位点。人源化单克隆抗体赫赛汀能够抑制人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2,HER-2),是第 1 个针对 HER-2 阳性乳腺癌且靶向癌基因的治疗药物,临床常用术后辅助治疗^[3]。以赫赛汀为主的治疗有赖于对 HER-2 的准确检测,而对 HER-2 水平的检测尚无无创、简便的检测技术。本实验旨在采用具备优良荧光成像性能的水溶性 QDs 装载与聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-glycolic acid,PLGA)纳米微粒中,经由化学共价偶联将抗体赫赛汀修饰到纳米微粒表面,制备一种装载 QDs 携赫赛汀的靶向高分子微泡造影剂 MB_{QDs/PLGA/Her},为进一步研究抗体赫赛汀与抗原的结合机制和乳腺癌分子影像的诊断研究打下实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

羧基端乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA-COOH,聚合比例为 50:50);抗体赫赛汀(Genentech,美国);MES 缓冲液(0.1 mol/L,pH=5.5;0.1 mol/L,pH=8.0);EDC/NHS(Sigma,美国);傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrum,FT-IR)仪(PerkinElmer,英国),MTT(Sigma 分装);奥利巴斯倒置荧光显微镜(CKX41,日本);马尔文激光粒径测量仪(3000 SSA 型,美国);人乳腺癌细胞 MCF-7(重庆医科大学基础研究所),其余药品、试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 水溶性 QDs CdTe-MPA 的制备 CdTe 纳米粒子的制备方法已有文献进行报道^[4],用 1 mol/L NaOH 溶液调节含有巯基丙酸(为稳定剂)的 CdCl₂ 溶液的 pH 值为 9.2,在保证体系密闭,通入高纯 N₂ 进行脱氧、保护。然后在搅拌下向溶液中加入新制备的无氧 NaH₂Te 溶液(通过 Te 粉和硼氢化钠反应制备),CdCl₂、巯基丙酸和 NaH₂Te 的摩尔比率为 2:3:1。将此反应液油浴加热到 160 ℃,回流 1~2 h,即可得到尺度较均一的 CdTe-MPA QDs 溶液。所制 CdTe-MPA QDs 发射波长为 615.0 nm 左右,在紫外灯和荧光显微镜下都可见高荧光强度的红色荧光。

1.2.2 装载 QDs 高分子造影剂 MB_{QDs/PLGA-COOH} 的制备 称量 100 mg 的 PLGA-COOH,在烧杯中将其充分溶解于 2 ml 二氯甲烷溶剂中(作连续相),然后在其中加入 200 μl 巯基丙酸修饰的水溶性 QDs(CdTe-MPA,5 mg/ml)(为分散相),声振仪声振 30 s,成乳白色乳化液(W1/O 微球)。将乳化液(分散相)倒入适量 10 ml 4% PVA 溶液中(连续相),均质机中均质 5 min(W1/O/W2 微球)。然后加入 20 ml 2%异丙醇溶液,室温下磁力搅拌 2~3 h,使微球表面固化。然后加入双蒸水以

3 000 r/min,5 min,多次离心洗涤,至离心清液检测无荧光后,收集微球,冷冻干燥 48 h 后充入全氟丙烷气体,即得 MB_{QDs/PLGA-COOH} 微气泡造影剂冻干粉,放入 4 ℃冰箱中保存。

1.2.3 靶向高分子造影剂 MB_{QDs/PLGA/Her} 的制备 将上述步骤制备得的高分子造影剂 MB_{QDs/PLGA} 冻干粉 0.4 g 分散溶解在 MES 缓冲液中(pH=6.0),加入 3 倍量的偶联活化剂 EDC/NHS,常温孵育 30 min,然后用 MES 缓冲液中(pH=6.0)离心(离心速度 3 000 r/min,5 min),漂洗 3 次去除未反应的 EDC/NHS。将离心后羧基被活化的高分子造影剂 MB_{QDs/PLGA-R} 分散溶解在 MES 缓冲液中(pH=8.0),并加入适量抗体赫赛汀混匀,于室温孵育 30~60 min。用 MES 缓冲液(pH=8.0)漂洗离心 3 次,收集得到靶向高分子微气泡造影剂 MB_{QDs/PLGA/Her} 分散溶解在 MES 缓冲液中待用。

1.2.4 MB_{QDs/PLGA/Her} 微气泡造影剂一般性质检测 光镜下观察微泡的形态、形貌,马尔文激光测径仪检测其粒径大小和分布。

1.2.5 QDs 装载于 PLGA 中表征 负染透射电镜观察 QDs 在 PLGA 微粒中的装载。Zeta 电位仪测定 QDs 溶液和超声造影剂 MB_{QDs/PLGA} 水溶液电位值。

1.2.6 抗体赫赛汀偶联在 MB_{QDs/PLGA} 表面确认 取 10 μg 真空干燥后的样品,于玛瑙研钵中研成细粉,溴化钾压片,FT-IR 4 000~400 cm⁻¹ 波数检测。

1.2.7 MB_{QDs/PLGA/Her} 细胞毒性实验检测 用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,放置 37 ℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养,细胞长满培养瓶后,加入 0.25%胰酶,37 ℃消化,加培养液吹打,传代。当细胞达对数生长期时,进行 MTT 和靶向识别实验。

MCF-7 细胞悬液按每孔 300 μl 移入 96 孔培养板中,4 组,6 复孔,分别加入 100 μl QDs(5 × 10⁻³ mg/ml)、MB_{QDs/PLGA}(8 × 10⁷ 个/ml)、MB_{QDs/PLGA/Her}(8 × 10⁷ 个/ml)和 PBS 对照组(pH=6.0),继续培养 24 h,弃去上清液后,立即加入 MTT(5 mg/ml)20 μl/孔,再培养 4 h,弃去培养基,每孔加二甲亚砜 200 μl 振荡孵育 10 min,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度 A 值,实验重复 3 次。

细胞毒性(细胞生长抑制率)(%)=(对照组 A_{490 nm} 值-实验组 A_{490 nm} 值)/对照组 A_{490 nm} × 100%

1.2.8 MB_{QDs/PLGA/Her} 体外寻靶能力检测 MCF-7 细胞悬液每孔 1 ml 移入 6 孔培养板中,贴壁后,用 4%多聚甲醛固定 15 min,0.1%PBS 溶液洗涤 3 次,每次 5 min,3%BSA 封闭 10 min,然后加入 100 μl 靶向高分子造影剂 MB_{QDs/PLGA/Her},4 ℃孵育过夜,次日用 0.1%PBS 溶液洗涤 3 次后,荧光显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学处理

用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。计量数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。4 组数据行单因素方差分析,*F* 检验,组间两两比较用 *LSD-t* 检验(方差齐时)或 *Dunnett-t* 检验(方差不齐时)。检验水准 α=0.05,以 *P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微泡 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 形态、形貌检测

本实验所制备出的靶向高分子微泡造影剂 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 为白色粉末状物质,生理盐水复溶后,光镜下观察,微泡造影剂形态规则,分散均匀,微泡间无明显聚集现象。马尔文激光测径仪检测其平均粒径大小为 (584.7 ± 20.2) nm(图 1)。

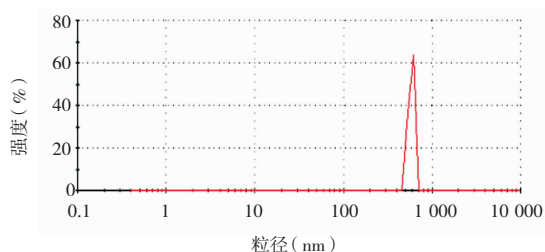
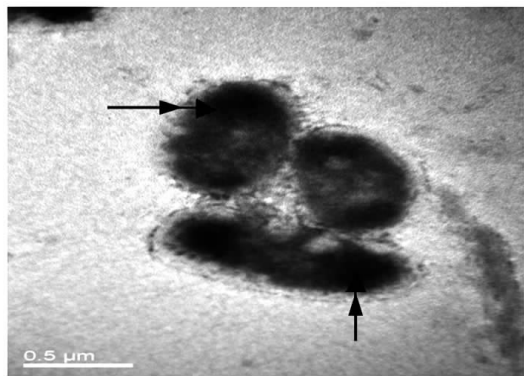


图 1 马尔文激光粒径图

Fig.1 Zetasizer image of diameter of $MB_{QDs/PLGA/Her}$

2.2 QDs 在 PLGA 微粒装载表征

TEM 检测结果(图 2)显示 QDs 在 MB_{PLGA} 微粒内成功装载。QDs 水溶液电位值为 -17.32, $MB_{QDs/PLGA-COOH}$ 水溶液电位值为 -0.79,也间接说明 QDs 包埋在 MB_{PLGA} 核内。



黑色箭头表示 QDs 成功装载高分子造影剂核内

图 2 TEM 图 $MB_{QDs/PLGA-COOH}$ (7 500 ×)

Fig.2 TEM image of $MB_{QDs/PLGA-COOH}$ (7 500 ×)

2.3 赫赛汀偶联 $MB_{QDs/PLGA-COOH}$ 红外光谱检测

图 3 中,a 是活化后 $MB_{QDs/PLGA-COOH}$ 谱图,b 是 $MB_{QDs/PLGA-COOH}$ 谱图,c 是 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 谱图。谱图 a 和谱图 b 比较,b 中 $\nu_{OH}=3427.94$ cm^{-1} PLGA 羧基振动吸收峰消失,说明 PLGA 羧基被活性酯成功活化;谱图 c 和谱图 a 对照比较出现 $\nu_{C=O}=1635.84$ cm^{-1} 羰基伸缩振动吸收峰(赫赛汀抗体结构中的肽键的羰基)及 $\nu_{NH}=3443.94$ cm^{-1} 的特征吸收峰(酰胺键),保留 $\nu_{C=O}=1761.70$ cm^{-1} 酯羰基特征吸收峰(归属 PLGA),对照分析表明赫赛汀抗体以形成酰胺共价键偶联到 PLGA 微粒表面。说明通过碳二亚胺法成功的将赫赛汀连接到了 $MB_{QDs/PLGA-COOH}$ 微粒表面。

2.4 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 细胞毒性检测

MTT 检测数据分析结果显示:4 实验组吸光度值存在差

异,差异有统计学意义($F=144.574, P=0.000$);以 PBS 为对照组其他 3 组对细胞生长抑制率存在差异,QDs 组抑制率最大,差异有统计学意义($F=50.350, P=0.000$)。 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 及 $MB_{QDs/PLGA}$ 组与 QDs 组间比较细胞生长抑制率均小于 QDs 组且差异均有统计学意义(a, P 均 <0.05),表明 QDs 包裹在 PLGA 核内明显降低了 QDs 的细胞生物毒性。而 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 与 $MB_{QDs/PLGA}$ 组间细胞生长抑制率差异无统计学意义(b, $P>0.05$),这表明在本实验条件下,靶向配基偶联到微泡表面对细胞毒性的影响不显著(表 1)。

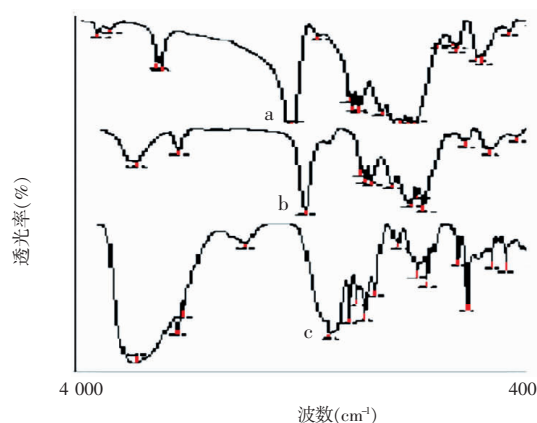
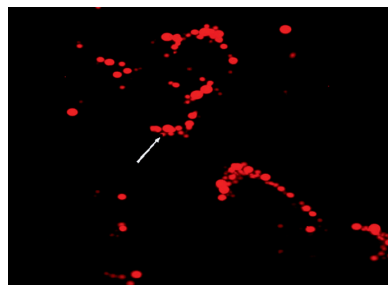


图 3 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 的 FT-IR 谱图

Fig.3 FT-IR spectra of $MB_{QDs/PLGA/Her}$

2.5 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 体外寻靶能力检测

前期实验^[5]中用免疫荧光法和流式细胞术测定检测了携赫赛汀靶向造影剂与 MCF-7 细胞识别性能。400 倍荧光显微镜下可见,黏附在 MCF-7 细胞周围的 QDs 标记靶向造影剂呈明亮红色荧光(图 4)。



白色箭头表示呈现红色荧光的靶向微泡 $MB_{QDs/PLGA/Her}$

图 4 倒置荧光显微镜下黏附在 MCF-7 细胞周围的靶向微泡 $MB_{QDs/PLGA/Her}$ 荧光图 (400 ×)

Fig.4 Image of the targeted $MB_{QDs/PLGA/Her}$ attached around MCF-7 cell under converted fluorescence microscope (400 ×)

3 讨论

肿瘤的靶向疗法是利用特异性载体,将药物或其他杀伤肿瘤的物质选择性地运送到肿瘤部位、选

表 1 包裹 QDs 微泡和 QDs 对 MCF-7 细胞生长抑制比较

Tab.1 Comparison of inhibitory effect on MCF-7 cell growth between microbubble coated with QDs and QDs

实验组别	例数 (n)	吸光度值 ($A_{490\text{nm}}, \bar{x} \pm s$)	细胞生长抑制率 (%)	t 值		P 值	
				a	b	a	b
QDs	6	0.336 50 ± 0.033 33	47.28 ± 6.04	...	...	...	...
MB _{QDs/PLGA}	6	0.528 50 ± 0.027 70	19.60 ± 5.36 ^a	8.440	...	0.000	...
MB _{QDs/PLGA-Her}	6	0.538 50 ± 0.022 53	18.04 ± 5.61 ^b	8.919	0.476	0.000	0.641
PBS对照组	6	0.685 20 ± 0.023 51	...	...	...	...	...

注:细胞生长抑制率 (%) = (对照组 $A_{490\text{nm}}$ 值 - 实验组 $A_{490\text{nm}}$ 值) / 对照组 $A_{490\text{nm}}$ × 100%; a. QDs vs. MB_{QDs/PLGA-Her} 与 MB_{QDs/PLGA}; b. MB_{QDs/PLGA-Her} vs. MB_{QDs/PLGA}; ..., 没有数据

择性地杀伤肿瘤细胞以提高治疗效果的一种治疗方法。靶向治疗效果取决于靶标的早期和准确诊断。近十几年来 QDs 生物探针与肿瘤标志物结合,在肿瘤诊断、监测、治疗等研究成为热点,临床应用前景广阔^[6]。Nida 等^[7]认为宫颈癌发生部位表浅,将高表达表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的宫颈癌细胞 SiHa 与生物素化的抗 EGFR 单克隆抗体结合,然后采用 QD-亲和素制备的探针识别抗体,在激光共聚焦显微下观察到细胞表面的荧光强度。Weng 等^[8]报道了在脂质体膜外表面共价连接 QD 的方法标记免疫脂质体 QDILs。首先制备含有末端氨基修饰的 PEG-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 NH₂PEG-DSPE 的阿霉素载药脂质体,将表面为羧基的水溶性 QD 作为荧光探针,HER-2 作为靶向修饰分子,分别和 NH₂PEG-DSPE 基共价连接制备 QDILs,共聚焦显微镜和流式细胞检测均证实该 QDILs 对 HER-2 过度表达的 SK-BR3 和 MRF-7/HER2 细胞的靶向特异性。研究证明 QD 探针可在分子水平上检测肿瘤的发生、发展。高分子 PLGA 为 FDA 批准有较好的生物相容性、可生物降解性药物控释制剂膜材,用高分子膜材制备出的造影剂粒径范围可控制在纳米级,可通过肿瘤血管内皮间隙,实现对肿瘤细胞的分子显影和高效靶向治疗^[9]。Kim 等^[10]成功制备出了包裹阿霉素的高分子多功能微泡造影剂,具有较好的显影效果。

本实验选择高分子材料 PLGA 为膜材,通过双乳化和碳二亚胺化学连接法,得到的 MB_{QDs/PLGA-Her},细胞毒性得到改善,QDs 的荧光显像和标记性能很好保持,这为进一步研制携赫赛汀与药物的高分子成像剂以及体内实验奠定了良好基础。Wu 等^[11]在大鼠乳房表面癌细胞受体 HER-2 结合化学疗法来治疗乳腺癌研究中指出,只有癌细胞表面的 HER-2 受体超过 25%才能对治疗产生反应,医生要知道病人是否具有高浓度的 HER-2 表达,依赖于准确的检测手段。QDs 尽管比有机荧光染料有诸多优势,但在诊断癌症的实际应用还有待于改进,需要更多工作去证实和诊断与癌变相关的有效标记点。

参 考 文 献

- [1] Smith A M, Duan H, Mohs A M, et al. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60(11): 1226-1240.
- [2] Delehanty J B, Mattoussi H, Medintz I L. Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 393(4): 1091-1105.
- [3] Slamon D J, Leyland-jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2[J]. N Engl J Med, 2001, 344(11): 783-792.
- [4] Mingyuan G, Stefan K, Helmuth M, et al. Strongly photoluminescent CdTe nanocrystals by proper surface modification[J]. J Phys Chem B, 1998, 102(43): 8360-8363.
- [5] 骆 杰, 王志刚, 张群霞, 等. 携 Herceptin 靶向高分子造影剂的制备及体外寻靶能力研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2010, 19(8): 723-726.
- [6] Luo J, Wang Z G, Zhang Q X, et al. Preparation and targeting study of Herceptin loaded PLGA-COOH-targeted ultrasound contrast agent[J]. Chinese Journal of Ultrasonography, 2010, 19(8): 723-726.
- [7] 蒋飞荣, 贾文婷, 张兴桑, 等. 荧光量子点探针及其标记技术[J]. 生命科学, 2010, 22(4): 391-395.
- [8] Jiang F R, Jia W T, Zhang X S, et al. Fluorescent quantum dots probes and their biological labeling[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2010, 22(4): 391-395.
- [9] Nida D L, Rahman M S, Carlson K D, et al. Fluorescent nanocrystals for use in early cervical cancer detection[J]. Gynecol Oncol, 2005, 99(s3): 89-94.
- [10] Weng K C, Noble C O, Papahadjopoulos-Sternberg B, et al. Targeted tumor cell internalization and imaging of multifunctional quantum dot-conjugated immunoliposomes in vitro and in vivo[J]. Nano Lett, 2008, 8(9): 2851-2857.
- [11] 冉海涛, 任 红, 王志刚, 等. 包裹阿霉素的高分子材料微泡声学造影剂制备及显影效果实验研究[J]. 临床超声医学杂志, 2005, 7(4): 217-220.
- [12] Ran H T, Ren H, Wang Z G, et al. Research on fabrication of high molecular polymer ultrasound contrast agent for drug delivery[J]. Journal of Ultrasound in Clinical Medicine, 2005, 7(4): 217-220.
- [13] Kim C, Qin R, Xu J S, et al. Multifunctional microbubbles and nanobubbles for photoacoustic and ultrasound imaging[J]. J Biomed Opt, 2010, 15(1): 010510.
- [14] Wu X, Liu H, Liu J, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(1): 41-46.

(责任编辑:冉明会)