

免疫金纳米笼对人乳腺癌细胞靶向光热治疗作用

田开亮¹, 朱立新¹, 许小亮², 尹乃强², 黄乾鹏¹, 赵红川¹, 耿小平¹

摘要 目的 基于金纳米笼的光热转换特性, 观察经抗体修饰的免疫金纳米笼对人乳腺癌细胞 MCF-7 的靶向光热效应, 探讨其对肿瘤细胞的杀伤效果及其细胞毒性。方法 由银(Ag)立方纳米晶与次氯金酸(HAuCl_4)置换反应得到金纳米笼, 经 Anti-CK19 抗体修饰后制成具有生物靶向性的免疫金纳米笼。实验组(A组): 将金纳米笼-抗体探针链接细胞后, 由功率密度为 1.5 W/cm^2 、波长为 808 nm 的激光照射 30 min; 对照组(B组)分为 2 组: B I 组经相同光照强度和波长的激光单纯光照 30 min; B II 组为单纯加金纳米笼无光照。观察 A、B 组温度随时间变化情况, 通过荧光终止剂细胞染色及流式细胞术检测免疫金纳米笼的光热杀伤效应, 应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法观察其细胞毒性。结果 A 组温度升高明显, 达 48°C , 而 B 组温度无明显变化, 维持在 35°C 左右。荧光终止剂细胞染色及流式细胞术显示 A 组细胞大量凋亡, 而 B 组细胞活性基本未受影响($P < 0.05$)。MTT 法显示细胞毒性较小($P < 0.05$)。结论 免疫金纳米笼对 MCF-7 细胞具有靶向杀伤作用, 被用于光热治疗。

关键词 光热治疗; 金纳米笼; 乳腺肿瘤; 治疗

中图分类号 R 737.9; R 456.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)02-0164-04

肿瘤的光热治疗是近几年发展起来的一种温和、高效的非介入性疗法。随着纳米科学技术的发展, 金纳米颗粒被应用于肿瘤的诊断和治疗^[1], 笼状金纳米颗粒基于在近红外区域(650~900 nm)^[2]的可控调谐, 吸收入射光后可将光能高效的转化为热能, 使肿瘤细胞很快升温致蛋白质变性死亡^[3-4]。由于恶性肿瘤细胞表面存在很多抗原, 表面连接有抗体的金纳米笼能够特异性地结合到肿瘤细胞部位, 正常细胞只结合少量的金纳米颗粒或不结合, 从而达到选择性杀死肿瘤细胞, 最大限度减少正常细胞的损伤^[5-6]。该研究拟从免疫金纳米笼的制作、

靶向链接 MCF-7 细胞进行光热作用方面研究其热疗效应, 以为金纳米颗粒后期进一步动物活体研究及应用于肿瘤患者的热疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); Hoechst33258 荧光终止剂(南京凯基生物科技有限公司); Anti-CK19 抗体(上海瑞齐生物有限公司); WSY-4T 针式测温计(北京恒奥德仪器仪表有限公司); ST-LPLD20 半导体激光驱动电源(北京凯普林光电科技有限公司); Heras 150 CO_2 培养箱、Eppendorf 5417R 台式高速冷冻离心机(德国 Germa 公司); BHF-342 荧光显微镜(日本 Olympus 公司); ELX-800 酶标仪(美国 BioTek 公司); EpicsXL-MCL 流式细胞仪(美国 Coulter 公司)。

1.2 细胞培养及传代 人乳腺癌细胞株 MCF-7 由安徽医科大学基础医学院病理生理学细胞实验室惠赠, 细胞在含 10% 胎牛血清、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 mg/L)的高糖 DMEM 培养液中置于 37°C 、5% CO_2 的恒温培养箱内培养, 隔日换液, 4~5 d 0.25% 胰蛋白酶消化传代一次。实验细胞处于对数生长期, 活细胞数达 95%~100%。

1.3 免疫金纳米笼的制作过程 通过银(Ag)立方纳米晶与次氯金酸(HAuCl_4)在水溶液中置换反应得到金纳米笼, 其表面等离子体共振峰调节到 810 nm, 与二极管激光器的中心波长 808 nm 匹配。金纳米笼表面用聚乙二醇进行修饰, 此种聚乙二醇一端是巯基, 而另一端是甲氧基。经过聚乙二醇化后的金纳米笼加入 Anti-CK19 溶液中, 在 4°C 环境中过夜, 9 000 r/min 离心 5 min, 移走自由抗体, 溶解在 1 ml PBS 缓冲液中, 最终得到连有抗 CK19 抗体的免疫金纳米笼的浓度为 10 mg/ml。此制作过程由中国科技大学物理系纳米功能材料实验室协助完成。

1.4 细胞链接免疫金纳米笼及光热治疗 细胞传代接种于 12 孔板中, 密度为 1×10^5 个/ml, 置入培养箱中培养至细胞贴壁后, 实验组(A组): 每孔加

2013-08-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 51272246, 81171082)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院普通外科, 合肥 230022

² 中国科学技术大学物理系纳米功能材料实验室, 合肥 230026

作者简介: 田开亮, 男, 硕士研究生;

朱立新, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lx-zhu@163.com

入 100 μl 免疫金纳米笼, 对照组(B组)分为2组: B I 组不加金纳米笼单纯光照; B II 组加入同等剂量金纳米笼不照射。温箱孵育 30 min 后弃去培养液, PBS 洗 2 遍, 洗去未链接到细胞上的金纳米笼, 后加入细胞培养液进行光热治疗。激光功率密度为 1.5 W/cm^2 、波长为 808 nm 秒表记录时间, 探针式测温剂测量温度变化, 记录温度值。

1.5 细胞染色法检测光热治疗效应 经过激光照射后的 A 组和 B 组细胞弃去上层培养液, 分别加入荧光终止剂进行细胞染色, 染色后在荧光显微镜下观察并拍照。死细胞呈现黄色, 活细胞呈现绿色。

1.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 MCF-7 细胞凋亡 A 组光照后, 收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个 MCF-7 细胞, 加入 500 μl 结合缓冲液悬浮细胞, 加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后室温避光反应 15 min, 再加入 5 μl PI 混匀, 30 min 内进行流式细胞仪检测, 重复 4 次。检测结果的判定: 荧光染色中正常细胞 Annexin V-FITC(-)、PI(-); 早期凋亡细胞 Annexin V-FITC(+)、PI(-); 晚期凋亡细胞 Annexin V-FITC(+)、PI(+); 死亡细胞 Annexin V-FITC(-)、PI(+)

1.7 MTT 实验检测免疫金纳米笼毒性 胰酶消化对数期生长的 MCF-7 细胞, 终止后 2 000 r/min 离心收集, 制成细胞悬液, 细胞计数调整其浓度至 $5 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4/\text{ml}$ 。轻轻混匀, 接种于 96 孔培养板, 每孔加入 100 μl 细胞悬液, 培养 24 h 待细胞贴壁、进入对数生长期后, 换液, 每孔加入 90 μl 培养液和 10 μl 金纳米笼。实验设空白对照组、洗白对照组、溶剂对照组和加药组, 每组设 4 个复孔。加药组中加入不同浓度的金纳米笼, 其浓度分别为 2.5、5、10、15、20、25 mg/ml, 分别培养 18、24、30 h, 各孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl , 继续培养 4 h, 在酶标仪 630 nm 波长下检测各孔的吸光度值(A_{630})。各组实验重复 3 次, 按下列公式计算细胞增殖抑制率: 增殖抑制率 = (对照组 A_{630} - 实验组 A_{630}) / 对照组 A_{630} $\times$ 100%。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用 t 检验、方差分析, 样本间率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 免疫金纳米笼光热治疗温度变化 加入免疫金纳米笼进行光照的 A 组温度升高明显, 照射时间

为 30 min, 从照射开始至 5 ~ 6 min 时温度上升较快, 达 46 ~ 48 $^{\circ}\text{C}$, 此后温度基本达到平衡, B I 组经同样的时间及激光强度照射后温度上升并不明显, 达 35 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 且温度上升较平缓, 而 B II 组温度无变化, 见图 1。说明免疫金纳米笼对人乳腺癌细胞 MCF-7 具有靶向的光热治疗效应, 且在开始照 5 min 左右温度上升较快, 此后达到平衡。

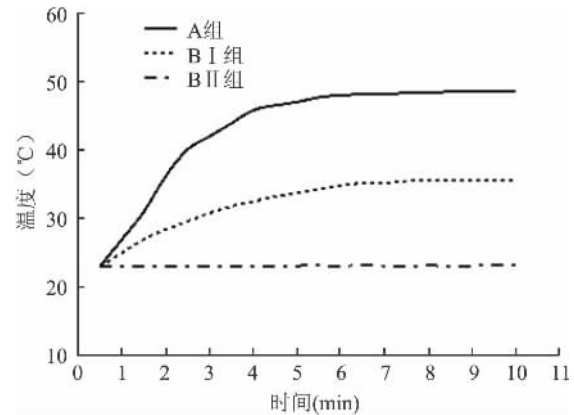


图1 实验组与对照组温度变化曲线图

2.2 免疫金纳米笼对 MCF-7 细胞光热杀伤作用

通过激光照射后的 A 组和 B 组细胞洗去细胞培养液, 分别加入荧光终止剂进行细胞染色, 在荧光显微镜下观察并拍照。结果显示加入金纳米笼照射后的细胞染色后变成黄色, 未加入纳米笼单纯光照组及只加金纳米笼组细胞染色后呈绿色, 活性基本未受影响, 见图 2。说明免疫金纳米笼对 MCF-7 细胞具有杀伤作用, 而未加纳米笼激光照射后对细胞活性影响不大。

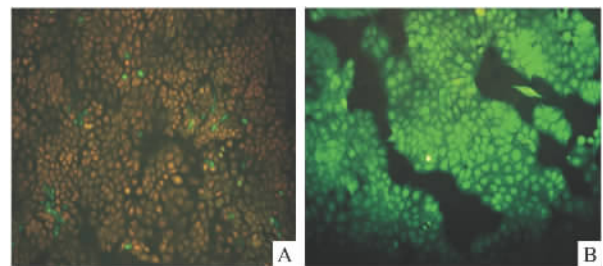


图2 光照 30 min 细胞染色后显微镜下成像 $\times 200$
A: 实验组; B: 对照组

2.3 免疫金纳米笼光热治疗对 MCF-7 细胞凋亡的影响 A 组加入免疫金纳米笼经光照处理后的细胞与 B I 组相比细胞的凋亡百分比显著增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 3。

表1 金纳米笼作用于 MCF-7 细胞的抑制率($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

用药 时间(h)	药物浓度(mg/ml)					
	2.5	5	10	15	20	25
18	5.12 ± 3.54	9.06 ± 3.78	12.67 ± 5.83	19.36 ± 10.54	22.17 ± 4.25	21.14 ± 4.63
24	7.16 ± 3.08	14.38 ± 3.74	21.44 ± 6.10	27.56 ± 7.46	29.41 ± 2.62	32.94 ± 3.12
30	9.71 ± 3.46	18.53 ± 1.56	29.91 ± 10.24	45.46 ± 8.21	56.05 ± 2.79	61.24 ± 5.75

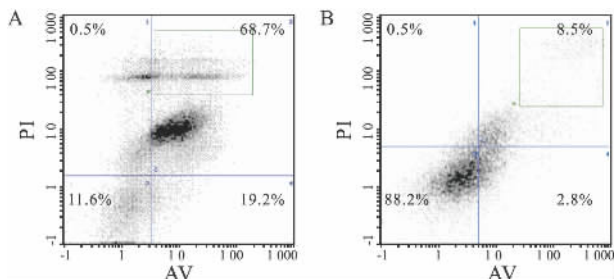


图3 人乳腺癌细胞株 MCF-7 流式细胞仪分析

A: 实验组; B: 对照组; 1: 机械损伤细胞; 2: 晚期凋亡和坏死细胞; 3: 正常细胞; 4: 早期凋亡细胞

2.4 免疫金纳米笼对 MCF-7 细胞毒性大小 经方差分析同一时间不同浓度的金纳米笼各组间的细胞增殖抑制率差异有统计学意义($P=0.001$); 金纳米笼浓度相同而作用时间不相同的各组间细胞增殖抑制率差异有统计学意义($P=0.005$), 说明在一定范围内随着剂量的增高和作用时间的延长, 金纳米笼对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用均增强。当孵育时间为 30 h, 达到 IC_{50} 的金纳米笼浓度为 17.6 mg/ml, 其他各时间点的抑制率均未达到 50% ($P=0.01$)。见表 1。

3 讨论

随着纳米科学技术的发展, 热疗技术的研究也获得了突破性进展, 逐渐成为肿瘤治疗的新热点之一。免疫金纳米笼是将生物分子(抗体)链接到金纳米笼的表面, 使金属具有靶向性, 能特异地聚集在肿瘤细胞处, 用近红外激光照射肿瘤部位, 通过激光辐射, 由于金属颗粒的局域表面等离子体共振特性, 金属强烈的吸收入射光, 把光能转换为热能, 将肿瘤细胞杀死。在近红外透明窗口(650 ~ 900 nm), 近红外光能够穿透进入组织可达十几厘米, 克服了可见光组织穿透性弱的缺点, 可实现对深部肿瘤细胞进行选择性治疗。金纳米颗粒热疗具有靶向、温和、微创的优点。

研究者将与抗表皮生长因子受体(EGFR)抗体耦合的金纳米笼注入乳腺癌细胞系 SK-BR-3 中, 经功率密度为 1.5 W/cm² 激光辐射 5 min, 温度升高

到 52 °C, 足以杀死肿瘤细胞, 而未注入金纳米笼的对照组细胞经激光辐照后温度几乎不变^[7]。Wang et al.^[8] 将 200 μl 聚乙二醇修饰的免疫金纳米笼与等量生理盐水分别静脉注入无胸腺小鼠左右臀部的肿瘤部位, 分别用激光强度为 1.2 W/cm² 照射 10 min, 注入金纳米侧温度在 5 min 内达(48.7 ± 3.5) °C, 而注入生理盐水侧温度低于 37 °C, 表明金纳米笼具有显著的光热疗效。本研究中免疫金纳米笼链接乳腺癌 MCF-7 细胞后, 经波长为 808 nm、1.5 W/cm² 强度的近红外激光照射, 温度从 21 °C 上升到 48 °C, 6 min 后达到平衡。而对照组温度最高升至 35 °C。激光照射后的细胞经荧光终止剂染色发现: 实验组细胞大量死亡, 而对照组细胞活性影响很小。说明免疫金纳米笼能够靶向选择性地杀死肿瘤细胞。进一步做细胞流式, 实验组细胞坏死率高达 88%, 对照组未见明显细胞凋亡。说明单纯激光照射以及金纳米笼本身对细胞活性影响较少。目前, 金纳米笼的光热效应研究仍处于初级阶段, 大部分还局限于细胞实验, 治疗过程中颗粒浓度、激光功率还需要进一步优化。文献^[7-9]报道金纳米笼实验中应用的激光功率包括 0.7、1.2、1.5 W/cm², 本组实验使用激光功率为 1.5 W/cm² 得到满意的温度变化曲线。Skrabalak et al.^[10]通过乳腺癌细胞系 SK-BR-3 研究证实激光功率为 1.5 W/cm² 是金纳米笼光热治疗的阈值, 低于此数值无法起到光热治疗作用。关于金纳米颗粒的生物学毒性机制尚未明确, 可能在细胞培养过程中金纳米笼颗粒释放重金属金离子(Au⁺)的原因, 对细胞造成毒性^[11]。

总之, 国内关于光热治疗方面的研究还很少, 仅有少量的金纳米球和纳米棒的研究, 而金纳米笼结构的研究尚未见报道。而国外关于金纳米笼结构光热治疗的研究工作也还处于初级阶段, 其生物修饰、生物毒性等问题尚需深入探讨。

参考文献

- [1] Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity [J].

- Chem Soc Rev, 2009, 38(6): 1759–82.
- [2] Smith C A, Cohen A E. The stanford automated mounter: Enabling high-throughput protein crystal screening at SSRL [J]. JALA Charlottesville Va, 2008, 13(6): 335–43.
- [3] Melancon M P, Lu W, Yang Z, et al. *In vitro* and *in vivo* targeting of hollow gold nanoshells directed at epidermal growth factor receptor for photothermal ablation therapy [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(6): 1730–9.
- [4] Hasan W, Stender C L, Lee M H, et al. Tailoring the structure of nanopramids for optimal heat generation [J]. Nano Lett, 2009, 9(4): 1555–8.
- [5] Dees C, Harkins J, Petersen M G, et al. Treatment of murine cutaneous melanoma with near infrared light [J]. Photochem Photobiol, 2002, 75(3): 296–301.
- [6] Goodrich G P, Bao L, Gill-Sharp K, et al. Photothermal therapy in a murine colon cancer model using near-infrared absorbing gold nanorods [J]. J Biomed Opt, 2010, 15(1): 018001.
- [7] Chen J, Wang D, Xi J, et al. Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells [J]. Nano Lett, 2007, 7(5): 1318–22.
- [8] Wang Y, Black K C, Luehmann H, et al. Comparison study of gold nanohexapods, nanorods, and nanocages for photothermal cancer treatment [J]. ACS Nano, 2013, 7(3): 2068–77.
- [9] Chen J, Glaus C, Laforest R, et al. Gold nanocages as photothermal transducers for cancer treatment [J]. Small, 2010, 6(7): 811–7.
- [10] Skrabalak S E, Au L, Lu X, et al. Gold nanocages for cancer detection and treatment [J]. Nanomedicine (Lond), 2007, 2(5): 657–68.
- [11] Zhang Q, Cobley C M, Zeng J, et al. Dissolving Ag from Au-Ag alloy nanoboxes with H_2O_2 : A method for both tailoring the optical properties and measuring the H_2O_2 concentration [J]. J Phys Chem C Nanomater Interfaces, 2010, 114(14): 6396–400.

Immuno gold nanocages on human breast cancer cells targeted photothermal therapy

Tian Kailiang¹, Zhu Lixin¹, Xu Xiaoliang², et al

(¹Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Physics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract Objective Based on the solar-thermal conversion characteristics of the gold nanocages, we investigated the photothermal effect and cell toxicity of immune gold nanocage in a human breast cancer cell MCF-7. **Methods**

Gold nanocages were obtained through the replacement reaction between silver (Ag) cubic nanocrystalline and chloroauric acid ($HAuCl_4$). Then the nanoparticles were modified with anti-CK19 antibody to have gold biological targeting characteristics. In experimental group, gold nanocage-antibody probe was applied to the cell, and then treated with the power density 1.5 W/cm^2 , the wavelength of 808 nm laser for 30 min; in control group, gold nanocage-antibody probe was applied to the cell, but no light treatment, or cells were treated with light only. At the end of each treatment, MCF-7 cells were collected for fluorescence termination agent cell staining and flow cytometry assay for the photothermal effect. The cytotoxicity was examined by colorimetric method of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). **Results** The temperature increased significantly to $48\text{ }^\circ\text{C}$ in control group, but not in control group (remained $35\text{ }^\circ\text{C}$). Cells in experimental group showed significant apoptosis in fluorescent termination agent cell staining and flow cytometry assay, while the cells in control group showed no apoptosis ($P < 0.05$). MMT experiments showed that cytotoxicity of this method was small ($P < 0.05$). **Conclusion** Immuno gold nanocages have a specific targeting killing effect on MCF-7 cell, and be used for photothermal therapy.

Key words photothermal therapy; gold nanocages; breast cancer; treatment