论著

文章编号:1000-5404(2009)19-1866-03

AEAPS与葡聚糖共修饰超顺磁纳米颗粒的制备及性质

邓 均[1],贺 娟[1],郑峻松[1],贾延辉[2],黄 辉[1],方立超[1],李 艳[1],蒋丽莉[1],李 平[1] (第三军医大学:[1]医学检验系暨药学院临床检验学教研室,[2]学员旅七队,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨以AEAPS及葡聚糖共修饰超顺磁纳米颗粒(superparamagnetic nanoparticles,SPION)的制备方法,并检测其物理和磁学性质。**方法** 共沉淀一步法制备葡聚糖包被的四氧化三铁纳米颗粒,然后在通氮、60 ℃、强力机械搅拌的条件下加入AEAPS,得到AEAPS与葡聚糖共修饰的SPION。采用透射电镜测量其大小及分布,用振动样品磁强计检测磁化率等参数,用普鲁士蓝染色的方法判断AEAPS/葡聚糖-SPION是否与抗体连接。**结果** 所得样品核心为四氧化三铁晶体,核心粒径不超过20 nm,包被葡聚糖后整体颗粒直径不超过25 nm,质量饱和磁场强度为67.364 88 emu/g Fe,AEAPS/ 葡聚糖-SPION与抗体结合,可对特异性抗原产生抗原-抗体结合,普鲁士蓝染色结果为阳性。**结论** 制备的样品具有粒径小,分散性好,超顺磁性等优点,能与单克隆抗体有效结合。

关键词: 超顺磁性氧化铁;AEAPS;纳米粒子;抗体偶联
中图法分类号: R913; R943; R981 **文献标识码:** A

Preparation and performance test for AEAPS/Dextran-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles

DENG Jun[1], HE Juan[1], ZHENG Jun-song[1], JIA Yan-hui[2], HUANG Hui[1], FANG Li-chao[1], LI Yan[1], JIANG Li-li[1], LI Ping[1] ([1]Department of Clinical Laboratory Sciences, College of Medical Laboratory, [2]7th Student Team, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore how to prepare N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilance (AEAPS)-Dextran-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) and test the physical and magnetic properties of the nanoparticles. **Methods** Dextran-modified SPION was obtained by "one step" co-precipitation method. Then, AEAPS was added to the resultant Dextran-SPION under the condition of N2 saturation and high-speed mechanical stirring at 60℃. The size and magnetic susceptibility of the nanoparticles were measured with the aid of transmission electron microscope and Vibrating Sample Magnetometer, respectively. **Results** The AEAPS-Dextran-modified SPION nanoparticles had core-shell diameter less than 25 nm with magnetic core of less than 20 nm in diameter. The mass saturation magnetic intensity was 65.82319 emu/g Fe. Antibody conjugated with AEAPS-Dextran-modified SPION could bind to its specific antigen and were positive to Prussian Blue staining. **Conclusion** The AEAPS-Dextran-modified SPION possess the characteristics of small size and good dispersion super-paramagnetic response, and could be to bind to monoclonal antibody for possible application in disease diagnosis and treatment.

Key words: superparamagnetic iron oxide nanoparticles; N-(2-aminoethyl)- 3-aminopropyltrimethoxysilance (AEAPS); nanoparticles; antibody conjugation

超顺磁纳米颗粒(superparamagnetic nanoparticles,SPION)作为磁共振(magnetic resonance,MR)对比剂已应用于临床。磁性纳米材料可结合各种功能分子,如蛋白质、细胞、DNA或RNA等,从而实现各种特殊的检查。由于磁性纳米粒子具有高比表面积、高比表面能,以及粒子各向异性的偶极距作用从而很容易聚集[1]。有些磁性粒子如Fe、Fe_3O_4很容易被氧化成γ-Fe_2O_3,从而导致粒子发生聚集和沉淀,不能形成稳定的分散体系,使其在生物医学中的应用受到了限制。通过对磁性纳米粒子的表面修饰可以降低其表面能,提高粒子的抗氧化能力,得到分散性好的纳米复合粒子;同时适当的表面修饰可以调节磁性纳米粒子与其他材料的相容性和反应特性。由于网状内皮系统的吞噬,SPION

基金项目: 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放课题(SKLKF200809) Supported by the Opening Projects of the State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (SKLKF200809)
作者简介: 邓 均,男,重庆市人,博士,副教授,主要从事纳米材料在肿瘤早期靶向诊断的应用方面的研究。电话:(023)68752309,E-mail:djtmmu@tom.com
通信作者: 郑峻松,电话:(023)68752310,E-mail:zhengjunsong@yahoo.com
收稿日期: 2009-01-15;**修回日期:** 2009-03-31

很难到达肽体远端。为此,本研究利用葡聚糖修饰 SPION,增加其生物相容性,再用 N-(2 氨基)-3 氨基丙基硅氧烷(N-(2-aminoethyl)- 3-aminopropyltrimethoxysilance, AEAPS)修饰 SPION,使其氨基硅烷化后能与单克隆抗体有效结合并可逃逸网状内皮系统的吞噬。

1　材料与方法

1.1　仪器和试剂

1.1.1　仪器　　Hitachi-600 透射电镜(日本日立公司),KDC-160HR 高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),T6-1 型电动搅拌机(上海标本模型厂),HL-2 恒流泵(上海泸西分析仪器厂有限公司),Multiskan Sepectrun 全波长酶标仪(Thermo),紫外分光光度计 DU-65(Beckman),HH-15 震动样品磁强计(南京大学仪器厂)。

1.1.2　试剂　　三氯化铁($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)、氯化亚铁($FeCl_2 \cdot 6H_4O$)、碳酸钠、碳酸氢钠、亚铁氰化钾、盐酸、氨水、冰乙酸、甲醇、甲苯、戊二醛、硫酸、盐酸羟胺、邻二氮菲等化学试剂均为国产分析纯,葡聚糖 T-10(BBI,相对分子质量 10 000),BSA,AEAPS(Alfa Aesar),甲胎蛋白单克隆抗体(天津),甲胎蛋白(博赛生物)。

1.2　方法

1.2.1　SPION 的制备　　通过共沉淀法制备外包葡聚糖的四氧化三铁超顺磁纳米颗粒(SPION),反应原理:$Fe^{2+} + 2\ Fe^{3+} + 8OH^- = Fe_3O_4 + 4H_2O$,具体步骤:称取 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 2.34 g、$FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.86 g、葡聚糖 T-10 2.5 g,在通氮条件下溶于 30 ml 三蒸水中,在 60 ℃和 1 000 r/min 机械搅拌下用恒流泵以 1 ml/min 滴加 25% 氨水 30 ml,反应 1 h 后得到黑色胶状物。自然冷却至室温,8 000 r/min 离心 10 min,弃去沉淀,收集上清液。将上清液用冰乙酸调 pH 值至 8.0,0.22 μm 滤膜过滤,分装后置于 4℃备用。

1.2.2　AEAPS 修饰 SPION　　在 Dextran-SPION 表面修饰 AEAPS,使其氨基硅烷化[2]。配制 AEAPS 溶液,取 3.5 mmol/L AEAPS 加入 10 ml 甲苯/甲醇(甲苯∶甲醇 = 1∶1)溶液。取 50 ml Dextran-SPION 溶液,加入 5 ml AEAPS 溶液,在通氮条件下,60 ℃和 1 000 r/min 机械搅拌下反应 4 h。0.22 μm 滤膜过滤,分装后置于 4 ℃备用。同时,选用传统的交联剂戊二醛修饰 Dextran-SPION。

1.3　样品性能检测

1.3.1　透射电镜观察 SPION 的形态和直径　　在铜网上制膜,将 SPION 溶液滴于铜网上,自然沉淀 5 min 后,用滤纸吸走边缘多余液体,透射电镜观察 SPION 的形态和直径。

1.3.2　SOPIN、AEAPS-SPION 中铁离子和葡聚糖含量的测定　　采用二价铁-邻二氮菲法[3]测定铁的含量;蒽酮-硫酸法[4]测定葡聚糖的含量。

1.3.3　磁学性质　　用振动样品磁强计进行磁化曲线检测,具体方法如下:真空烘干样品,逐渐加大磁场强度作用于样品,观察到样品的磁化强度不再增加时停止。记录磁化曲线相关数据,处理后获得样品的饱和磁化强度、比饱磁化强度、比剩余磁化强度和剩磁等参数。

1.3.4　AEAPS 与 Dextran-SPION 连接的检测　　为检测 AEAPS/Dextran 修饰的 SPION 是否可以有效连接 AFP 抗体,该抗体用来与 AFP 抗原反应。用冰乙酸将 AEAPS/Dextran-SPION 溶液调 pH 值至 6.0,加入 2.59 μg/ml anti-APF,4 ℃静止 24 h,使单克隆抗体与 AEAPS/Dextran-SPION 结合(Mab-APF-AEAPS/Dextran- SPION)。同样的方法将抗体与戊二醛(GA)修饰的 SPION 连接(Mab-APF-GA/Dextran- SPION)作为对照。阳性对照为 Dextran-SPION 溶液直接与铁染液进行普鲁士蓝反应。将 40 ng/ml APF 抗原 100 μl 包被酶标板,4 ℃包被过夜。用 200 μl 1% 的 BSA,37 ℃封闭 1.5 h。PBS 洗涤 3 次后,加入 Mab-APF-AEAPS /Dextran-SPION(38 mg/ml),37 ℃作用 1 h。PBS 洗涤 3 次后,加入铁染液(20% 的亚铁氰化钾 5 份和盐酸 1 份)进行普鲁士蓝反应,37 ℃作用 0.5 h。出现蓝色结果为阳性,用酶标仪测 D(490)值。

2　结果

2.1　透射电镜

在 210 000 倍透射电镜下观察,可见 AEAPS/Dextran-SPION 核心为高密度的圆形颗粒,表面为分散均匀的 AEAPS/Dextran 覆盖层,以透射电镜标尺 50 nm,估算出 AEAPS/Dextran-SPION 的核心粒径不超过 20 nm,整体粒径不超过 25 nm(图 1)。由图 2 可知,SPION 的平均粒径约为 15 nm。

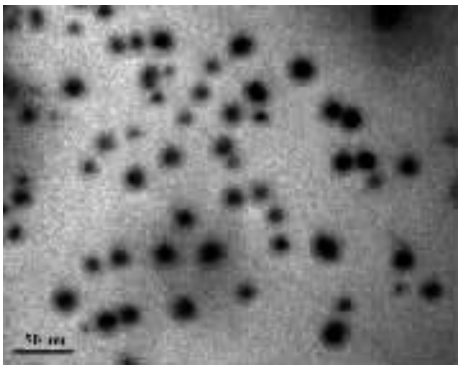


图 1　AEAPS /Dextran-SPION 的透射电镜观察

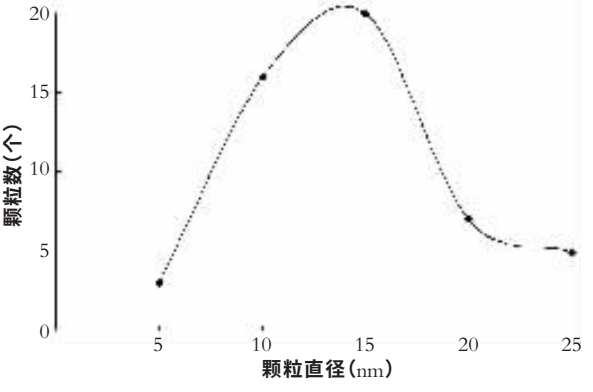


图 2　AEAPS/Dextran-SPION 颗粒数与粒径关系

2.2　AEAPS/Dextran-SPION 中铁离子和葡聚糖的含量

以标准铁溶液浓度 C 为横坐标,吸光度 D(510)为纵坐标,进行线性回归,得标准曲线回归方程:A = 0.001 2C + 0.040 5,r = 0.999 2。SPION 铁离子浓度为 0.71 mg/ml;AEAPS/Dextran-SPION 中铁离子浓度为 1.2 mg/ml;以葡聚糖溶液浓度 C 为横坐标,吸光度 D(625)为纵坐标,进行线性回归,得标准曲线回

归方程:A = 0.012 6C + 0.053 3,r = 0.999 4。SPION 中葡聚糖的浓度为 20.59 mg/ml,AEAPS/Dextran-SPION 葡聚糖的浓度为 19.37 mg/ml。

2.3 磁学性质

本实验结果显示,样品的磁化强度值随着外加磁场强度的增大而增大,当外加磁场增大到 3 000 Gs 时,继续增大外加磁场强度(本实验加大到 10 000 Gs),样品磁化强度值保持不变,即达到磁饱和。此外,磁化曲线为一条过原点的单一曲线,说明当外加磁场为 0 时,AEAPS/Dextran-SPION 样品几乎没有剩磁,具有超顺磁性(图 3)。

通过外推法求得所制备样品的饱和磁化强度为 67.364 88 emu/g Fe,比饱和磁化强度 69.821 51 emu/g,比剩余磁化强度为 32.547 2 emu/g,剩磁为 22.617 21 Gs(几乎为 0)。

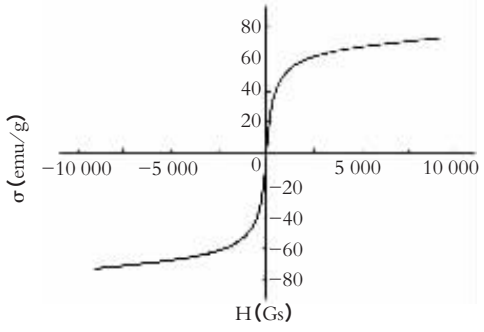


图 3 AEAPS/Dextran-SPION 的磁化曲线

2.4 AEAPS 与 Dextran-SPION 连接的检测结果

直接用 SPION 进行普鲁士蓝反应时的 D(490)值为阳性对照,D(490)为(1.002 ± 0.000 6)。当检测值 P 与空白 N[D(490)为 0.051 ± 0]的 P/N 值大于 2.1 时判断为阳性。结果显示 Mab-APF-AEAPS/Dextran- SPION 普鲁士蓝反应出现蓝色,D(490)为(0.120 ± 0.000 6),P/N 值为 2.4 大于 2.1,判定为阳性结果。而 AEAPS/Dextran-SPION[D(490)为(0.062 ± 0.002)]、GA/Dextran-SPION[D(490)为(0.006 0 ± 0.000 6)]、Mab-APF-GA/Dextran-SPION[D(490)为(0.072 ± 0.000 6)]结果 P/N 值均小于 2.1,判定为阴性结果。结果表明,AEAPS/Dextran 修饰的 SPION 可有效连接 AFP 抗体,并与 AFP 抗原发生特异性反应,而戊二醛修饰的 SPION 不能有效连接 AFP 抗体。同时结果也证实 AEAPS 与 SPION 结合成功。

3 讨论

采用化学共沉淀法制备纳米 Fe_3O_4 颗粒,其过程为:Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 分别与碱作用,先生成 $Fe(OH)_3$ 和 $Fe(OH)_2$,然后 $Fe(OH)_3$ 和 $Fe(OH)_2$ 再按 2∶1 的比例在碱性条件下反应生成 Fe_3O_4 纳米颗粒。按照反应方程式,铁离子与亚铁离子的配比应该是 2∶1。然而考虑到 Fe^{2+} 在反应中很容易被空气中的氧所氧化而成为铁离子,使 Fe^{2+} 减少,Fe^{3+} 增加,导致 Fe_3O_4 晶体中 Fe^{2+} 含量减少,晶体的结构发生变化,从而使其纯度发生变化,所以在配置的过程中适当提高 Fe^{2+} 所占的比例,以保证按照反应方程式中的比例将 Fe^{3+} 反应完全,生成纳米颗粒。

SPION 属于水基磁性液体,又称磁流体,是一种由纳米级氧化铁颗粒通过表面活性剂高度均匀分散于水相中而形成的稳定胶体溶液。制备 SPION 应满足粒径小、磁响应性强、悬浮稳定性好等条件,便于削弱磁偶极矩之间的静磁作用,使颗粒能在水相载体中作无规则的热运动。但是,由于纳米粒子的表面能高,缺少邻近的配位原子,相互之间容易产生吸附,解决团聚问题是制备中的一个难点。在纳米粒子的表面修饰生物相容性的、可溶于水的物质,既可以解决团聚问题,又可以增加 SPION 的生物相容性。Jain 等[5]在磁性材料表面修饰 pluronic 物质,该物质是 PEO-PPO-PEO 三嵌段共聚物,是一类具有生物相容性的、可溶于水的一种极其重要的非离子型大分子表面活性剂。MRI 结果表明与普通的磁性颗粒作为显影剂相比,T2 弛豫率显著提高。本实验中 AEAPS 可使 SPION 表面氨基硅烷化。氨基硅烷化的优点:首先硅烷化的 SPION具有生物相容性,且避免了铁元素的金属毒性;其次是硅烷化层能够减弱磁性颗粒间的磁偶相互作用,使得修饰后的磁性颗粒能够稳定的分散于水溶液中;最为重要的为 SPION 提供了一个非常容易功能化的表面,从而使其表面可以共价连接各种生物分子。与葡聚糖修饰的 SPION 相比较 AEAPS-葡聚糖共修饰的 SPION 结合抗体更加容易,原因是单纯的葡聚糖修饰的 SPION 首先需要醛化,然后再经还原方能与生物分子连接。而醛化过程需要使用高碘酸钠、戊二醛等化学试剂,一旦进行活体试验有可能对机体造成毒副作用。本研究下一步工作将在 AEAPS 修饰的 SPION 上连接肿瘤特异性抗体,并对抗体偶联和效价做进一步的探讨。由于网状内皮系统的吞噬,SPION 很难到达肢体远端,而氨基硅烷化后能与单克隆抗体有效结合并可逃逸网状内皮系统的吞噬。从而应用于恶性肿瘤的特异性靶向给药或早期诊断。

参考文献:

[1] Tartaj P, Serna C J. Synthesis of monodisperse superparamagnetic Fe/silica nanospherical composites[J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(51): 15754-15755.

[2] Liang S, Wang Y, Yu J, *et al*. Surface modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles: as a new carrier for bio-magnetically targeted therapy[J]. J Mater Sci Mater Med, 2007, 18(12):2297-2302.

[3] 匡 扶,朱照静,马俐丽,等. 葡聚糖 T20 作为白芨多糖含量测定标准品可行性研究[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(5): 570-574.

[4] 穆卫东,王 虹,杨晓明,等. 鱼腥草等七种中草药中铁元素的测定分析[J]. 广东微量元素科学,2006, 13(12): 47-49.

[5] Jain T K, Richey J, Strand M, *et al*. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: drug delivery and magnetic resonance imaging[J]. Biomaterials, 2008, 29(29): 4012-4021.

(编辑 栾 嘉)