论著

文章编号:1000-5404(2013)10-0992-04

壳聚糖纳米微粒荧光探针的制备及特性研究

陈 侠[1],李 磊[2],谢 琳[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:眼科[1],第一研究室[2])

[摘要] **目的** 制备出壳聚糖纳米微粒荧光探针,对其物理特性进行研究,并观察其靶向性及细胞毒性。**方法** 使用离子交联法制备出壳聚糖纳米微粒荧光探针(chitosan-nanoparticles-fluorescein isothiocyanate,CS-NP-FITC)。Zeta 粒径分析仪观察其粒径及表面电位情况;扫描电镜观察其形态特点;接着用靶向转化生子因子 βⅡ型受体(TGF-β receptor Ⅱ,TβRⅡ)的核酸适配子 S58 标记 CS-NP-FITC,作用于人 Tenon's 囊成纤维细胞(human Tenon's capsule fibroblasts,HTFs),观察其靶向结合特异性受体的情况;用 LDH 释放实验检测其细胞毒性。**结果** 制备出的壳聚糖纳米微粒荧光探针 CS-NP-FITC 的平均粒径为 274.6 nm,平均表面电位为 +24.3 mV,扫描电镜下可观察到呈球形的微粒,分布均匀;激光共聚焦显微镜下观察到适配子 S58 标记的 CS-NP-FITC 能够与 TβRⅡ特异性结合;LDH 释放试验证实 CS-NP-FITC 的使用浓度在 0.18 ~18 mg/mL 时,细胞毒性很小,具有良好的生物相容性。**结论** 壳聚糖纳米微粒荧光探针 CS-NP-FITC 经适当的适配子或抗体标记后具有靶向结合特异性受体的能力,且细胞毒性小,具有应用于生物成像中的潜力。

[关键词] 纳米技术;分子探针;壳聚糖;核酸适配子;转化生子因子 βⅡ型受体;Tenon's 囊成纤维细胞
[中图法分类号] R318.08;R394;R446.9 [文献标志码] A

Preparation and characterization of fluorescent chitosan nanoprobe

Chen Xia[1], Li Lei[2], Xie Lin[1] ([1]Department of Ophthalmology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To synthesize a novel chitosan-nanoparticles-fluorescein isothiocyanate fluorescent nanoprobe (CS-NP-FITC), and to explore its physical properties, targeting ability and cytotoxicity. **Methods** CS-NP-FITC was synthesized by ionic cross-linking. A Zetasizer Nano ZS instrument was used to measure the diameter and zeta potential of CS-NP-FITC. The morphology of CS-NP-FITC was examined using a scanning electron microscope. CS-NP-FITC was labeled by aptamer S58 targeting transforming growth factor-β receptor Ⅱ (TβRⅡ) to test the targeting ability to specific receptors in human Tenon's capsule fibroblasts. At last, the cytotoxicity of CS-NP-FITC was studied by LDH cytotoxicity assay. **Results** The mean diameter of CS-NP-FITC was 274.6 nm, and the zeta potential of CS-NP-FITC was +24.3 mV. The spherical particles were uniformly distributed shown by the scanning electron microscopy. CS-NP-FITC labeled by aptamer S58 could specifically bind to TβRⅡ under a laser scanning confocal microscope. LDH cytotoxicity assay showed that CS-NP-FITC at concentration between 0.18 mg/mL to 18 mg/mL had low cytotoxicity and fine biocompatibility. **Conclusion** Our study reveal that CS-NP-FITC labeled by suitable aptamer or antibody can specificly bind to target receptors. Due to its low cytotoxicity, CS-NP-FITC has the potential to be applied in bio-imaging.

[**Key words**] nanotechnology; molecular probes; chitosan; aptamer; TGF-β receptor Ⅱ; human Tenon's capsule fibroblasts

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81170852) and the General Program of "Twelfth-Five year Plan" of Medical Research of PLA (CWS11J137). Corresponding author: Xie Lin, Tel: 86-23-68757796, E-mail: xielin793@yahoo.cn

近年来,关于纳米微粒荧光探针的研究越来越多,纳米微粒荧光探针主要应用于生物成像中,如肿瘤的诊断性成像[1]、干细胞的标记[2]以及病变细胞的成像[3]等。荧光量子点[4]以及载染料的硅胶纳米粒[5]已在体外实验中广泛用于标记细胞及组织。这些纳米荧光探针具有良好的光稳定性、高度的敏感性等特点,甚至能够用于胞内成分的实时成像中。但是,这些探针如要用于在体研究,还将受到很多限制。例如荧光量子点由于重金属的存在,具有细胞毒性[6];载染料的硅胶纳米粒不具备生物降解性,这些都阻碍了纳米

[基金项目] 国家自然科学基金(81170852);军队"十二五"计划面上项目(CWS11J137)
[通信作者] 谢 琳,电话:(023)68757796,E-mail:xielin793@yahoo.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130125.1140.009.html(2013-01-25)

荧光探针用于临床研究。壳聚糖(chitosan)作为一种天然的可生物降解的线性聚合物,来源丰富,理化性质相对稳定,因为其良好的生物降解性、生物相容性、较低的免疫原性,以及突出的大分子黏附能力,近年被广泛应用于大分子、核酸、蛋白质的载体研究中[7]。异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)的生物相容性好、毒性小,其异硫氰基团能与壳聚糖的伯胺基结合,具有荧光强度高、对光稳定及不易脱离等特点[8],在生物染色、酶联免疫反应以及生物芯片中被广泛应用[9]。因此,本研究将壳聚糖与FITC共同作用,制备出壳聚糖纳米微粒荧光探针chitosan-nanoparticles-FITC(CS-NP-FITC),观察其物理特性,并用靶向转化生长因子βⅡ型受体(TGF-β receptor Ⅱ, TβRⅡ)的核酸适配子S58标记,作用于人Tenon's囊成纤维细胞(human Tenon's capsule fibroblasts, HTFs),观察其靶向性及细胞毒性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 本研究中所用细胞由该课题组前期原代培养的人Tenon's囊成纤维细胞传代而来[10],取第4~10代对数生长期的细胞用于实验。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、双抗、HBSS购自美国Hyclone公司;壳聚糖(平均相对分子质量15×10^4,脱乙酰度>90%)、三聚磷酸盐(TPP)购自上海生工生物工程公司;FITC购自英国Molecular Probes公司;透析膜(截留相对分子质量1 000)购自美国Spectrum公司;LDH试剂盒购自北京中生生物工程公司;核酸适配子S58(5′-ACATTGCTGCGTGATCGCCTCACATGGGTTTGTCTGGTCGATTTGGAGGTGGTGGGTGGC-3′)由上海生工生物工程公司合成。扫描电镜(日本Hitachi公司);Zeta激光粒径分析仪(美国Marvern公司);激光共聚焦显微镜(美国Leica公司);紫外分光光度计(日本Shimadzu公司)。

1.2 方法

1.2.1 壳聚糖纳米微粒荧光探针CS-NP-FITC的制备 参考文献[11]的方法并做了一些细微修改。5 mg的FITC溶于20 mL的DMSO中,再于磁力搅拌下(200 r/min)将DMSO缓慢加入到10 mL(1.8 mg/mL)的壳聚糖溶液中,继续在避光条件下搅拌过夜。次日将反应产物缓慢倒入过量丙酮中,充分混合后于高速离心机中3 000 r/min离心10 min。弃上清液,将沉淀用新的丙酮反复离心洗涤数次。每次洗涤后,将洗脱液置于激光共聚焦显微镜下观察有无荧光信号。直至在洗脱液中观察不到荧光信号,洗脱步骤完毕。最后一次洗涤之后,将沉淀溶于双蒸水,使用透析膜于去离子水中避光透析3 d。袋内所得便是FITC标记的壳聚糖溶液。将上述所得溶液用双蒸水定容至10 mL,再于持续磁力搅拌下(200 r/min),将0.9 mg/mL的交联剂TPP溶液用5号针头逐滴滴入其中,滴加速度为40~50滴/min,此过程中溶液将出现白色乳光,即标志壳聚糖纳米微粒荧光探针CS-NP-FITC制作成功。之后再加入适量分散剂,双蒸水定容,室温孵育30 min。最后用0.22 μm一次性针头式滤器过滤后,置于无菌小瓶,4 ℃避光冷藏备用。

1.2.2 CS-NP-FITC的粒径及表面电位检测 取100 μL CS-NP-FITC溶液,用去离子水稀释10倍后置于激光粒度分析仪中,检测粒径及Zeta电位。

1.2.3 CS-NP-FITC的形态观察 取2 μL CS-NP-FITC溶液,滴于云母片上,用氮气吹干后喷金,行扫描电镜观察。

1.2.4 核酸适配子标记的CS-NP-FITC靶向结合特异性受体的情况 参照文献[12]的分组方法。首先按壳聚糖与适配子摩尔比20∶1,将对应量的靶向转化生子因子βⅡ型受体(TβRⅡ)的核酸适配子S58加入到10 μL CS-NP-FITC溶液中,于漩涡震荡仪上震荡30 s,之后室温孵育30 min,即得核酸适配子标记的CS-NP-FITC(CS-S58-NP-FITC)。乱序的S58($S58^*$)用做对照,按相同方法制备出CS-$S58^*$-NP-FITC。将上述产物加入到贴壁1 d的第4代人Tenon's囊成纤维细胞(HTFs)中,于37 ℃二氧化碳孵箱中共同培养2 h。2 h后使用PBS于摇床上洗涤3遍,每遍10 min,再加入固定细胞,封片液封片。最后于激光共聚焦显微镜下观察核酸适配子标记的CS-NP-FITC与TβRⅡ的结合情况。

1.2.5 LDH释放实验检测CS-NP-FITC对HTFs的细胞毒性 取第4代HTFs,按1×10^4/孔接种于96孔培养板中,含10%胎牛血清的DMEM培养基培养24 h;24 h后更换为无血清培养基,PBS冲洗3次,加入CS-NP-FITC浓度分别为0.18、1.8、18 mg/mL,阳性对照组加入0.1% Triton X-100,阴性对照只加入DMEM,培养24 h,每组设3个复孔;24 h后按LDH试剂盒说明收集细胞培养液,紫外分光光度计波长440 nm处测光密度值。LDH相对释放率=($A_{实验组}-A_{阴性对照组}$)/($A_{阳性对照组}-A_{阴性对照组}$)×100%。LDH相对释放率越高,表示细胞膜受损越严重,细胞毒性越大。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行组间独立样本t检验。

2 结果

2.1 CS-NP-FITC的粒径及表面电位

Zeta激光粒径分析仪检测出CS-NP-FITC的平均粒径为274.6 nm,CS-NP-FITC的平均表面电位为+24.3 mV。

2.2 CS-NP-FITC的形态

扫描电镜下可观察到呈球形的微粒,分布均匀,粒径大部分在200~400 nm。见图1。

2.3 核酸适配子标记的CS-NP-FITC靶向结合特异性受体的情况

激光共聚焦显微镜下能够观察到适配子S58标记的CS-NP-FITC呈绿色荧光,并且与细胞排列相一致;而$S58^*$(乱序S58)标记的CS-NP-FITC几乎无荧光信号(图2)。说明壳聚糖纳米微粒荧光探针经适当的适配子或抗体标记后,能够靶向结合特异性受体。

2.4 细胞毒性实验

随着CS-NP-FITC使用浓度的增加,细胞毒性有所增加,但都维持在较低的水平,作用12 h和24 h,LDH相对释放率无统计学差异($P>0.05$),说明CS-NP-FITC的使用浓度在0.18~18 mg/mL时,细胞毒性很小,具有良好的生物相容性。见图3。

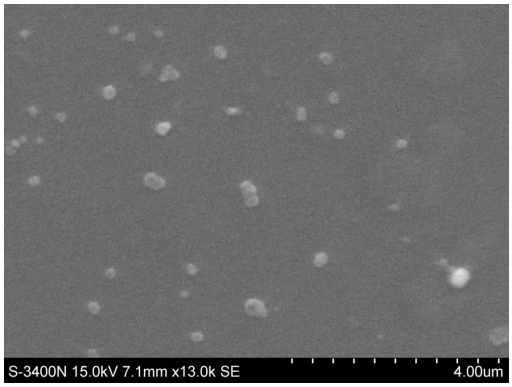


图1 扫描电镜下观察 CS-NP-FITC 形态

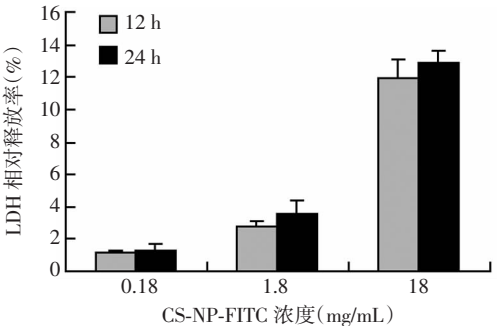
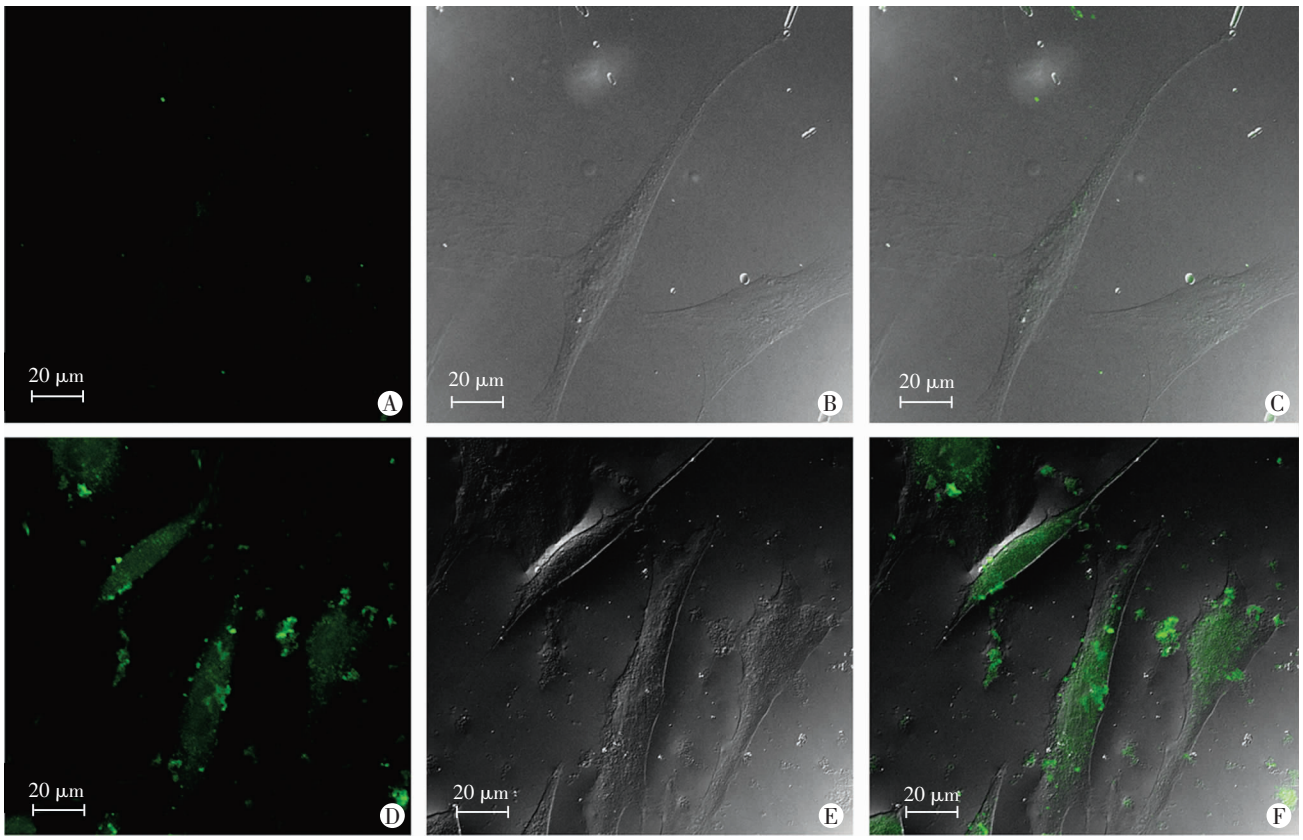


图3 LDH 释放实验检测 CS-NP-FITC 的细胞毒性

3 讨论

常见的荧光探针如 fluo-3/AM、fluo-4/AM 都对光漂白敏感,而壳聚糖纳米微粒荧光探针抗光漂白能力强。有研究[13]显示壳聚糖纳米微粒荧光探针经光照 1 h 以后,荧光发射强度为初始强度的75%,而纯 FITC 经光照 1 h 以后,荧光发射强度仅为初始强度的30%。壳聚糖纳米微粒荧光探针稳定性的提高可能由于荧光团以共价方式均匀地分散在壳聚糖多糖结构中,避免了与外界体系中溶解氧的接触,并且减少了荧光团移动、自聚或泄漏情况的发生。由于壳聚糖细胞毒性很小,所以壳聚糖纳米微粒荧光探针较新型的量子点及硅胶纳米粒具有更好的细胞相容性。量子点在使用过程中,会释放出重金属离子,从而导致细胞活性下降。Mahto 等[14]报道 GA/TOPO-CdSe/ZnS 量子点会导致小鼠胚成纤维细胞存活率下降 60%。尽管通过对量子点进行表面修饰(如外延生长 ZnS 壳、硅包覆等)可以一定程度上缓解其细胞毒性问题,但是这些表面修饰方法通常都需要繁琐的步骤。壳聚糖纳米微粒荧光探针在光稳定性及细胞毒性方面显示出特有的优势。



A ~ C:CS-S58 * -NP-FITC;D ~ F:CS-S58-NP-FITC 与 TβR Ⅱ 的结合情况;A、D:荧光图像;B、E:透射图像;C、F:合成图

图2 激光共聚焦显微镜观察核酸适配子标记的 CS-NP-FITC 靶向结合特异性受体的情况

纳米微粒的粒径及形态是影响其运输及体内分布的重要因素[15],微粒是否达到纳米级别是能否与细胞结合的关键[16]。本研究发现,CS-NP-FITC 的平均粒径为 274.6 nm。扫描电镜结果也显示,纳米微粒呈球形,分布均匀,粒径大部分在 200~400 nm。证明了 CS(S58)-NP 具有与细胞结合的形态结构。纳米微粒的表面电位也是影响其与细胞结合的一个重要因素。带正电的微粒更易于带负电的细胞结合。本研究结果显示,CS-NP-FITC 的平均表面电位为 +24.3 mV,具有与细胞结合的电位基础。

我们用核酸适配子标记了 CS-NP-FITC。适配子来源于本课题组前期通过 SELEX 技术筛选得到的靶向转化生子因子 βⅡ型受体(TGF-β receptor Ⅱ, TβRⅡ)的核酸适配子——S58[17]。适配子 S58 及乱序适配子 S58* 标记 CS-NP-FITC 以后与人 Tenon's 囊成纤维细胞共同作用以后,在激光共聚焦显微镜下能够观察到适配子 S58 标记的 CS-NP-FITC 呈绿色荧光,并且与细胞排列相一致;而乱序 S58* 标记的 CS-NP-FITC 几乎无荧光信号。直观地说明了壳聚糖纳米微粒荧光探针经适当的适配子或抗体标记后,能够靶向与相应受体相结合。另外,TβRⅡ表达于所有人体正常细胞表面。已有研究发现 TβRⅡ的表达减少甚至缺失与多种肿瘤的发生有关联。Malkoski 等[18]的研究显示 TβRⅡ缺失小鼠的肺腺癌和肺鳞状细胞癌发生率明显增高;Biros 等[19]的研究发现人腹主动脉瘤的发生与 TβRⅡ基因突变高度相关。所以通过检测 TβRⅡ的缺失对部分肿瘤的诊断具有参考价值。目前虽然已有用于检测 TβRⅡ的抗体,但 CS-S58-NP-FITC 直接免疫荧光的原理,较现有的 TβRⅡ抗体需要通过间接免疫来实现,省去了不少繁琐步骤,因此具有潜在的应用价值。

乳酸脱氢酶(LDH)是细胞能量代谢(糖酵解)中的一个重要的酶,可以催化乳酸生成丙酮酸,同时产生 ATP。如果细胞死亡,胞膜破裂,那么 LDH 也就从胞浆中释放出来,因此 LDH 是胞膜完整性的标志,也是检测细胞损伤的指标,LDH 升得越高就说明细胞损伤得越严重,可反映药物的细胞毒性[11]。我们的实验证明,随着 CS-NP-FITC 使用浓度的增加,细胞毒性有所增加,但都维持在较低的水平,作用 12 h 和 24 h,LDH 相对释放率无统计学差异($P > 0.05$),说明 CS-NP-FITC 的使用浓度在 0.18~18 mg/mL 时,细胞毒性很小,具有良好的生物相容性。

本研究使用平均相对分子质量 15×10^4,脱乙酰度 >90% 的壳聚糖与 FITC 通过离子交联法,能够制备出纳米级别的,带正电荷的壳聚糖纳米微粒荧光探针 CS-NP-FITC,经适配子标记以后具有良好的靶向性,且对细胞的毒性很小。我们将在下一步研究中,进行 CS-NP-FITC 的动物实验。

参考文献:

[1] Nie S, Xing Y, Kim G J, *et al*. Nanotechnology applications in cancer [J]. Annu Rev Biomed Eng, 2007, 9: 257-288.
[2] Solanki A, Kim J D, Lee K B. Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging [J]. Nanomedicine (Lond), 2008, 3(4): 567-578.
[3] Zhao X, Hilliard L R, Mechery S J, *et al*. A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(42): 15027-15032.
[4] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, *et al*. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics [J]. Science, 2005, 307(5709): 538-544.
[5] Wang L, Wang K M, Santra S, *et al*. Watching Silica Nanoparticles Glow in the Biological World [J]. Anal Chem, 2006, 78(3): 646-654.
[6] Derfus A M, Chan W C W, Bhatia S N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots [J]. Nano Lett, 2004, 4(1): 11-18.
[7] Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, *et al*. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA *in vivo* [J]. Gene Ther, 2005, 12(5): 461-466.
[8] Huang M, Ma Z, Khor E, *et al*. Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells [J]. Pharm Res, 2002, 19(10): 1488-1494.
[9] Wu J, Wei W, Wang L Y, *et al*. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system [J]. Biomaterials, 2007, 28(13): 2220-2232.
[10] 朱晓燕, 李磊, 鲜光军, 等. 人眼 Tenon 囊成纤维细胞体外培养及生长特性的比较 [J]. 局解手术学杂志, 2012, 21(3): 233-235.
[11] Vllasaliu D, Exposito-Harris R, Heras A, *et al*. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: comparison with chitosan solution [J]. Int J Pharm, 2010, 400(1/2): 183-193.
[12] Tallury P, Kar S, Bamrungsap S, *et al*. Ultra-small water-dispersible fluorescent chitosan nanoparticles: synthesis, characterization and specific targeting [J]. Chem Commun (Camb), 2009, (17): 2347-2349.
[13] Zhao J Y, Wu J M. Preparation and Characterization of the Fluorescent Chitosan Nanoparticle Probe [J]. Chin J Anal Chem, 2006, 34(11): 1555-1559.
[14] Mahto S K, Park C K, Yoon T H, *et al*. Assessment of cytocompatibility of surface-modified CdSe/ZnSe quantum dots for BALB3T3 fibroblast cells [J]. Toxicol in Vitro, 2010, 24(4): 1070-1077.
[15] Schiffelers R M, Woodle M C, Scaria P. Pharmaceutical prospects for RNA interference [J]. Pharm Res, 2004, 21(1): 1-7.
[16] Liu G, Molas M, Grossmann G A, *et al*. Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation [J]. J Biol Chem, 2001, 276(37): 34379-34387.
[17] Zhu X, Li L, Zou L, *et al*. A novel aptamer targeting TGF-β receptor Ⅱ inhibits transdifferentiation of human tenon's fibroblasts into myofibroblast [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(11): 6897-6903.
[18] Malkoski S P, Haeger S M, Cleaver T G, *et al*. Loss of transforming growth factor beta type Ⅱ receptor increases aggressive tumor behavior and reduces survival in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(8): 2173-2183.
[19] Biros E, Walker P J, Nataatmadja M, *et al*. Downregulation of transforming growth factor, beta receptor 2 and Notch signaling pathway in human abdominal aortic aneurysm [J]. Atherosclerosis, 2012, 221(2): 383-386.

(**收稿**:2012-11-19;**修回**:2013-01-04)
(编辑 汪勤俭)