

RGD-tTF 水基磁流体的制备及其活性研究

颜江华¹, 黄志平², 王生育¹, 王勇军², 李文珠²

(厦门大学 1. 医学院 抗癌研究中心, 2. 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 探讨 RGD-tTF 水基磁流体通过磁场和 RGD 多肽在体外对内皮细胞双靶向的功能。方法 通过化学沉淀法以柠檬酸钠为表面活性剂制备水基磁流体 ($MnFe_2O_4$), 弱酸改性后与重组的 RGD-tTF 融合蛋白结合, 利用 H-600 透射电镜观测纳米粒径, 以 SQUID 鉴定磁性, 用 MTT 法、因子 X 活化检测和流式细胞仪检测 RGD-tTF 磁流体生物活性。结果 成功制备出的水基磁流体能在磷酸盐缓冲液中稳定分布且具有生物兼容性, 实验表明 RGD-tTF 与水基磁流体结合后对 RGD 和 tTF 生物活性均无显著影响, 并证实在磁场的作用下能实现了水基磁流体对 RGD-tTF 的定位作用。结论 一种具有内皮细胞双靶向功能的 RGD-tTF 水基磁流体已制备成功。

关键词: 水基磁流体; 生物兼容; 靶向; 内皮细胞

中图分类号: R392.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-1678(2008)04-0229-04

Studies of preparation and properties of RGD-tTF water-based ferrofluids

YAN Jiang-hua¹, HUANG Zhi-ping², WANG Sheng-yu¹, WANG Yong-jun², LI Wen-zhu²

(1. Cancer Research Center of Medical College, 2. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: **Purpose** To study the property of RGD-tTF water-based ferrofluids double targeting EC304 cells *in vitro* by magnet and RGD peptide. **Methods** Water-based ferrofluids ($MnFe_2O_4$) were prepared by chemical precipitation method using citrate as surfactant, dispersed in weak acid to create surface charges, and coated with recombinant RGD-tTF protein. Proteins coated ferrofluids were characterized by H-600 transmission electron microscopy (TEM) and Superconducting Quantum Interference Device (SQUID), and its biological activities were analyzed by MTT assay, factor X activating test, and flow cytometry. **Results** The water-based ferrofluids were biocompatible, and can be stably distribute in PBS solution. After RGD-tTF protein binding ferrofluids, the biological activities of the RGD-tTF protein have not been changed significantly. The RGD-tTF ferrofluids can be delivered and localized selectively *in vitro* by magnet. **Conclusion** RGD-tTF water-based ferrofluids with double targeting had been successfully prepared.

Key words: water-based ferrofluids; biocompatible; targeting; endothelial cells

磁性药物载体是近年来研究的 1 种新型靶向给药系统。在足够强的外磁场作用下, 载体携带药物通过血管注入到滋养肿瘤组织中, 使药物以受控的方式从载体中释放, 然后在肿瘤组织的细胞或亚细胞水平上发挥作用, 而对正常组织细胞的影响较小, 从而发挥选择性治疗作用, 降低毒副作用。磁流体 (ferrofluids) 是直径约为 10 nm 的超微强磁性纳米粒子表面包覆表面活性剂, 并均匀地分散于基液 (水、

油、醚或酯等) 中形成的 1 种稳定的磁性胶体溶液, 它具有液体的流动性, 而在外加磁场的作用下, 又能呈现固体磁粒的磁性, 是 1 种新型的功能材料。

在新生血管内皮细胞表面, 整合素 α_3 呈上调状态, 而在正常组织的血管含量极少, 可作为肿瘤血管内皮细胞膜特异性标记物^[1]。RGD-4C (ACD-CRQDCFCG) 是 Ruoslahti 等^[2]用噬菌体表面展示肽库技术成功筛选出的对整合素 α_3 有高亲和力的配体。并已作为化学药物的载体成功用于肿瘤血管的靶向治疗^[3]。截短组织因子 (truncated Tissue Factor, tTF) 是外源性凝血通路的促发因子, 已被作为效应因子用于诱发肿瘤血管栓塞^[4]。本抗癌中心利用基

收稿日期: 2007-12-10

基金项目: 教育部和厦门大学出国留学人员启动基金资助

作者简介: 颜江华 (1963-), 男, 福建德化人, 博士, 副教授, Tel:

0592-2180587, E-mail: jhyan@xmu.edu.cn.

因工程技术构建表达了载体 RGD-4C 与效应因子 tTF 的融合蛋白^[5],发现 RGD-tTF 融合蛋白可以选择性诱发肿瘤血管栓塞,但由于 RGD 与受体($\alpha_v\beta_3$)的亲合力相对较低,其融合蛋白的抗肿瘤效果并不理想。为克服这一缺点,本文制备 RGD-tTF 水基磁流体,利用磁流体独特性质(流动性、磁响应性、靶向可控性)和 RGD-4C 多肽与整合素受体($\alpha_v\beta_3$)的选择性结合能力,实现对肿瘤血管内皮细胞物理靶向和药物靶向的双重定位。

1 材料

Mn(NO₃)₂ (50%)、FeCl₃·6H₂O 和柠檬酸三钠,均为分析纯,上海生物工程公司;永久性钕铁硼磁铁,厦门市永是磁电有限公司提供;Spectrozyme F a (S2222),美国 Diagnostica Inc.;冻干人凝血酶原复合物,华兰生物工程有限公司;tTF 和 RGD-tTF(带有 RGD 序列的截短组织因子),由厦门大学医学院抗癌研究中心构建表达。

MGC-803(人胃癌细胞株)和 EC304(人脐静脉内皮细胞株)由厦门大学医学院抗癌研究中心保存,培养于含 10% 新生牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中。

78-1A 磁力加热搅拌器,杭州仪表电机有限公司;HF16 二氧化碳培养箱,Heal Force Development Co.,Ltd;Biofuge stratos 冷冻高速离心机,Heraeus Co.,Ltd;EPICS XL 流式细胞仪,COULTER Co.,Ltd;OLYMPUS I ×71 荧光显微镜,OLYMPUS Co.,Ltd;Model 3550 酶标仪,Bio-Rad Co.,Ltd;MPMS XL-7 超导量子干涉磁强计(SQUID),Quantum Design Co.,Ltd;H-600 透射电镜,日本日立公司

2 方法

2.1 水基磁流体的制备

将 50% Mn(NO₃)₂ 溶液 3 mL 和 FeCl₃·6H₂O 3.02 g 溶于盛有双蒸水 30.0 mL 和吐温 80 1.0 mL 的烧杯中,75℃,搅拌均匀;缓慢滴入 0.5 g/mL NaOH 溶液 5.0 mL。保温搅拌 30 min,2 500 r/min 离心 15 min,沉淀用双蒸水和无水乙醇各洗涤 2 次,双蒸水复洗。将沉淀置于 2 mol/L 乙酸中,75℃ 搅拌 1 h。离心后置于 0.5 mol/L 柠檬酸钠中。得水基磁流体初制品,将其装于透析袋中,磷酸盐缓冲液(pH 7.2)透析 48 h,去除多余杂质和乙酸。样品使用前均超声波处理 10~15 min,用 0.22 μm 滤膜过滤,使纳米粒子分布更均匀。与蛋白结合后通过磁铁吸附聚集,换液去除多余蛋白。

2.2 样品的性能表征

采用 H-600 型透射电子显微镜观测样品的形貌,图片分析软件 Image-Pro Plus 6.0 计算粒径;MPMS XL-7 超导量子干涉磁强计研究磁流体的磁性能。

2.3 MTT 比色分析法检测磁流体的细胞毒性

MGC-803 和 EC304(5×10^5 /mL)接种于 96 孔培养板中,培养贴壁。加入不同浓度的磁流体,各浓度设 3 个平行组。培养 24 h 后,磷酸盐缓冲液清洗 2 次,加入培养液 180 μL 和 MTT(7.5 g/L)20 μL 继续培养 4 h 后,加二甲基亚砜 100 μL,完全溶解后以酶标仪测定在波长 570 nm 处的吸光度(A),并计算抑制率(%)。实验重复 3 次,取平均值。抑制率 = $(1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

2.4 一步法测定 tTF 的促凝血活性

将 tTF 和 RGD-tTF 磷脂化,取一定量磷脂化后的 tTF 和 RGD-tTF 与磁流体结合,然后将不同浓度的磁流体、tTF、RGD-tTF、MnFe₂O₄ + tTF 或 MnFe₂O₄ + RGD-tTF 加入正常人血浆中并加入 25 mmol/L CaCl₂ 100 μL,以单加 CaCl₂ 组为对照,记录凝血时间^[6-7]。

2.5 F 活化实验

在 96 孔板依次加入不同浓度的 tTF、MnFe₂O₄、MnFe₂O₄ + tTF、RGD-tTF 和 MnFe₂O₄ + RGD-tTF,人凝血酶原复合物溶液(取 0.1 mol/L Tris-CaCl₂ 缓冲液 100 mL,加入冻干人凝血酶原复合物 100 U,将其制成 1 U/mL 的溶液),S2222 (2.0 mg/mL) 各 100 μL,37℃ 保温 30 min,以相同浓度的牛血清白蛋白(BSA)作为对照,用酶标仪(405 nm)测定吸光度^[8]。

2.6 磁流体与 RGD 双定位鉴定

2.6.1 流式细胞仪分析 收获对数生长期的 EC304 细胞,甲醛溶液重悬固定,取细胞悬液(约含 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞)1 mL,分别加入不同浓度标记好的 FITC 的 tTF 和 RGD-tTF,4℃ 避光反应 24 h,每步间以冰冷的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤 2 次;用 EPICS XL 流式细胞仪分析各样品的相对荧光强度。

2.6.2 荧光显微镜检测 将处理后的盖玻片置于 6 孔板中,取适量 EC304 细胞种板,均匀贴壁长至 60% 左右后,以甲醛固定,将磁铁置 6 孔板下;分别加入不同浓度 MnFe₂O₄ + RGD-tTF-FITC,4℃ 避光反应 24 h;荧光显微镜下观察,并拍摄相关图片。

2.7 数据处理

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,以统计软件 SPSS 14.0 进行方差分析。

3 结果

3.1 透射电子显微镜(TEM)分析

图 1 为制备的 MnFe₂O₄ 水基磁流体的 TEM 照

片,磁粒子呈球形,图片分析软件 Image-Pro Plus 6.0 计算粒径集中分布在 10~25 nm 之间。

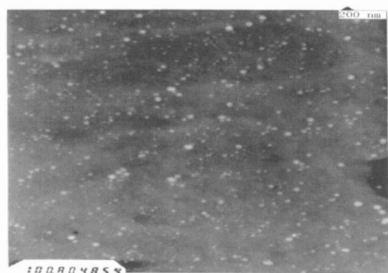


图 1 磁流体的 TEM 图片 (20 万倍)

Fig 1 TEM images of the ferrofluids

3.2 SUQID 磁性鉴定

从磁滞回线 (图 2) 可以看出,所制成的纳米 $MnFe_2O_4$ 粒子饱和磁化强度为 2.5 emu/g 左右,且剩余磁化强度和矫顽力都非常小,说明该粒子为顺磁性。此外,在 600 emu/g 的外界磁场下,纳米 $MnFe_2O_4$ 粒子在 30 s 内可从水溶液吸附到离心管壁上,具有很高的磁响应性^[9]。

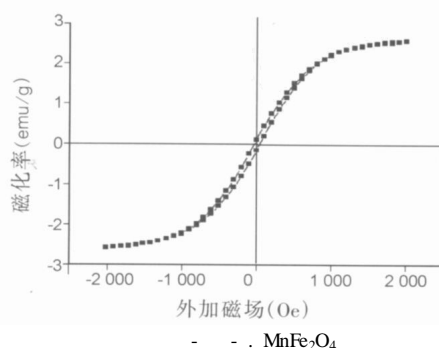


图 2 $MnFe_2O_4$ 的磁滞回线

Fig 2 Hysteresis loops of $MnFe_2O_4$

3.3 MTT 比色分析法

MTT 比色分析法结果 (图 3) 表明高浓度的磁流体会在一定程度上抑制细胞的生长 ($P < 0.05$)。但用在与蛋白结合的浓度 (约 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 2 种细胞影响甚小,具有相当的生物兼容性。

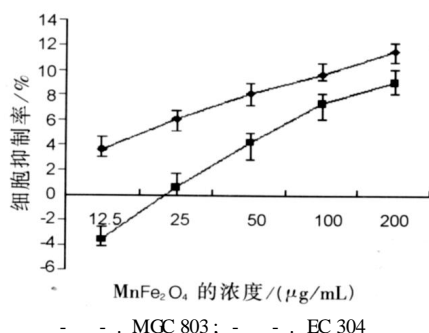


图 3 MTT 法分析磁流体对细胞生长的影响

Fig 3 The cytotoxic effect of ferrofluids on cancer cells growth

3.4 一步法凝血实验

一步法测定 tTF、 $MnFe_2O_4 + tTF$ 、RCD-tTF 和 $MnFe_2O_4 + RCD-tTF$ 的促凝血活性结果见表 1, Duncan 检验分析表明,各实验组与对照组间的差异均为异常显著 ($P < 0.01$); 且其凝血时间组间差异并不显著 ($P > 0.05$), 表明与磁流体的结合对 tTF 和 RCD-tTF 的促凝血活性基本没有影响。

表 1 tTF、 $MnFe_2O_4 + tTF$ 、RCD-tTF 和 $MnFe_2O_4 + RCD-tTF$ 的凝血活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 1 Procoagulation activity of tTF、 $MnFe_2O_4 + tTF$ 、RCD-tTF and $MnFe_2O_4 + RCD-tTF$ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品 (浓度均为 20 $\mu\text{mL}/\text{L}$)	凝血时间/s
CaCl ₂ (对照)	364 \pm 20.5
tTF	121 \pm 8.4 ¹
$MnFe_2O_4 + tTF$	118 \pm 9.0 ¹
RCD-tTF	130 \pm 10.6 ¹
$MnFe_2O_4 + RCD-tTF$	120 \pm 5.2 ¹
$MnFe_2O_4$	354 \pm 14.1

与对照组比较:¹ $P < 0.01$

Compared with control group:¹ $P < 0.01$

3.5 F 活化实验

F 活化实验结果 (图 4) 表明,实验组在 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 以上均能有效活化 F 因子,使得 S2222 分解而增强 405 nm 处吸收峰; 且实验组组间差异不显著 ($P > 0.05$), 而加入相同浓度的 BSA 和 $MnFe_2O_4 + BSA$ 两对照组其吸收峰则无明显变化。此外,实验组蛋白浓度的升高均能增强对 F 的活化能力,这与前人报道^[10]相符。说明与磁流体的结合不影响 tTF 和 RCD-tTF 活化 F 的能力。

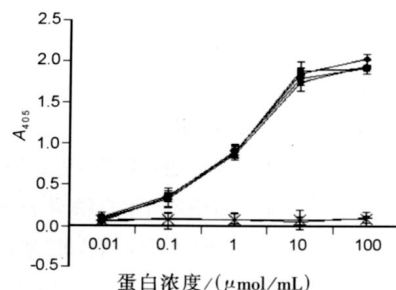


图 4 F 活化能力的比较

Fig 4 Comparison of activation F properties with or without ferrofluids

3.6 流式细胞仪检测结果

流式细胞仪检测结果表明,与磁流体的结合对 RCD-tTF 在内皮细胞表面结合率无明显影响 ($P > 0.05$)。

3.7 磁流体对 RCD-tTF 在内皮细胞分布的影响

在 600 emu/g 外加磁场的作用下磁流体聚集于下侧,使得相应的内皮细胞荧光明显增强。说明可通过外加磁场实现水基磁流体对 RGD-tTF 的局部定位作用。

4 讨论

医用磁流体的结构组分(磁性纳米颗粒、表面活性剂和载液)必须具有生物兼容性和生物降解性。因此其载液一般为水或生理盐水,其表面活性剂是长链脂肪酸或多糖等^[11],其磁性纳米颗粒材料为 Fe_3O_4 或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 。然而 Fe_3O_4 很容易被氧化,在较低的氧化温度下,形成磁化强度稍低的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$,氧化温度升高,会形成几乎无磁性的 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 。采用 MnFe_2O_4 可提高其抗氧化能力^[12]。李海群^[13]以共沉淀法制备磁性 MnFe_2O_4 纳米粒子后以 HNO_3 改性修饰,所得颗粒能在水溶液中稳定分布,但加入蛋白质则出现沉淀,无法作为蛋白药物载体使用。本文采用乙酸对磁性颗粒 MnFe_2O_4 进行改性后加入柠檬酸^[14],大大提高了磁性颗粒的稳定性。由于电荷排斥作用在磷酸盐溶液中与蛋白结合后仍能稳定分布。

磁流体中的磁性纳米颗粒粒径应小于其单畴尺寸(如: Fe_3O_4 为 30 nm),呈顺磁性^[15]。当磁流体受到外加磁场作用时,其中的磁性颗粒沿磁场方向排列成链状,使得表观黏度增大,表现出类似固体磁的性质,流动性消失。能完全阻断或部分阻断血管内的血液流动^[16]。一旦去掉磁场,流体的表观黏度又回到原来的状态,均匀分散在载液中,无磁滞现象^[17]。Chang 等^[16]采用磁流体与溶解在其中的纤维蛋白酶合剂用于肿瘤栓塞治疗,并借助外加磁场使药剂由血液流入堵塞的血管分支,经淤血区吸到血栓处,得到较好的栓塞效果。

本文制备 RGD-tTF 水基磁流体初步研究表明,水基磁流体对 RGD-tTF 融合蛋白的整体活性无明显影响,且在外加磁场下实现 RGD-tTF 水基磁流体对体外内皮细胞的局部靶向定位。预期 RGD-tTF 水基磁流体在今后体内研究中,利用磁流体的区域性物理导向和 RGD 序列的选择性药物靶向,可促使的效应因子 tTF 在肿瘤组织血管快速、高浓度的分布,更

有效地促发外源性凝血通路,导致肿瘤血管血栓性栓塞,肿瘤细胞缺血坏死,发挥更好的抗肿瘤效果。

参考文献:

- [1] Zetter B R. One target with tumor blood vessel markers [J]. Nat Biotechnol, 1997, 15: 1243-1244.
- [2] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries [J]. Nature, 1996, 380(6572): 364-366.
- [3] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model [J]. Science, 1998, 279(5349): 377-380.
- [4] Huang X M, Molema G M, King S, et al. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature [J]. Science, 1997, 275(5299): 547-550.
- [5] 杨桂旺, 庄国洪, 王阶平, 等. 用于肿瘤血管靶向治疗的 RGD/tTF 融合蛋白的表达及活性鉴定 [J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(4): 71-74.
- [6] Davie E W, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade initiation maintenance and regulation [J]. Biochemistry, 1991, 30: 10363-10370.
- [7] O'Brien D P, Giles A R, Tate K M, et al. Factor Xa-bypassing activity of bovine tissue factor using the canine hemophilic model [J]. J Clin Invest, 1988, 82: 206-211.
- [8] Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey J H, et al. Phospho-lipid-independent and-dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 2158-2166.
- [9] 吕元, 倪赞明, 关明. 一种测定组织因子活性的简便方法 [J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(5): 275-277.
- [10] Santra S, Taped R, Theodoropoulou N, et al. Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: the effect of nonionic surfactants [J]. Langmuir, 2001, 17: 2900-2906.
- [11] Rheinlander T, Roessner D, Weitschies W, et al. Comparison of size-selective techniques for the fractionation of magnetic fluids [J]. J Magn Magn Mater, 2000(3): 269-275.
- [12] 朱以华, 胡英, 罗美芳. 强制混合共沉淀法制备纳米 $\text{Mn}_x\text{Fe}_{1-x}\text{O}_4$ 粒子及结构表征 [J]. 过程工程学报, 2004, 4(3): 233-238.
- [13] 李海群. 共沉淀法制备的磁性 MnFe_2O_4 纳米粒子的性质 [J]. 磁性材料及器件, 2005, 36(4): 31-33.
- [14] Liz-Marzan L M, Giersig M, Mulvaney P. Synthesis of nanosized gold-silica core-shell particles [J]. Langmuir, 1996, 12: 4329-4335.
- [15] Moghimi S M, Hunter A C, Murray J C. Long circulating and target-specific nanoparticles: theory to particle [J]. Pharmacol Rev, 2001, 53: 283-318.
- [16] Chang Yue, Su zhixing. Preparation and characterization of thermosensitive magnetic particles [J]. Mater Sci Eng, 2002, 333: 155-159.
- [17] Berkovsky B M, Medvedev V F, Krakov M S. Magnetic fluids-engineering applications [M]. Oxford: Oxford Univ Press, 1993.