

◆ 实验研究

Impact of PEG-thiol modification on the colloidal stability and anti-phagocytic capacity of GoldMag nanoparticles

GONG Ming-fu, YANG Hua, ZHANG Song, ZOU Li-guang*, ZHANG Dong, SHU Tong-sheng
(Department of Radiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the impact of PEG-thiol modification on the magnetic property, colloidal stability and anti-phagocytic capacity of GoldMag nanoparticles in vitro. **Methods** GoldMag nanoparticles were modified using PEG-thiol, and the magnetic property of PEG-GoldMag and GoldMag were tested with FSE sequence T2WI, GRE sequence T2*WI and T2 mapping. Zeta potential of the two nanoparticle solutions were tested with Zeta potential instrument, while the absorbance was tested with UV-visible spectrophotometer at different time points. Mouse monocyte-macrophage RAW 264.7 was labeled with GoldMag and PEG-GoldMag and stained with Prussian blue buffer in order to calculate the labeling rate. Intracellular iron content of the RAW 264.7 labeled with two different nanoparticles was measured with ICP-OES to assess the influence of PEG-thiol modification on anti-phagocytic capacity of GoldMag. **Results** The Zeta potential of GoldMag and PEG-GoldMag solution was -18.3 mV and -39.5 mV, respectively. After standing at room temperature for 100 min, the relative absorbance of GoldMag and PEG-GoldMag solution was 50% and 88.5%, respectively. When standing for 200 min, the relative absorbance of the two nanoparticle solutions dropped to 17%—18% and 80%, respectively. Prussian blue staining showed that both the two kinds of nanoparticles could label RAW 264.7 cells, and the label rate of GoldMag and PEG-GoldMag was $(85.3 \pm 2.1)\%$ and $(23.6 \pm 1.3)\%$, respectively. The intracellular iron content of RAW 264.7 cells labeled with GoldMag and PEG-GoldMag was (21.6 ± 2.3) pg/cell and (8.7 ± 1.2) pg/cell, respectively. On T2WI, GRE T2*WI and T2 mapping, the differences of signal intensity and T2 relaxation time between PEG-GoldMag and GoldMag nanoparticle solutions at various concentrations were not statistically significant (all $P > 0.05$). **Conclusion** PEG-thiol modification can significantly improve the suspension stability and anti-phagocytic clearance capacity of GoldMag nanoparticles in vitro without obvious alteration of magnetic properties.

[Key words] GoldMag; PEG-thiol; Suspension stability; Anti-phagocytic capacity; Magnetic resonance imaging

PEG-thiol 修饰对金磁微粒胶体稳定性和抗吞噬能力的影响

龚明福, 杨 华, 张 松, 邹利光*, 张 冬, 舒通胜

(第三军医大学新桥医院放射科, 重庆 400037)

[摘要] **目的** 探讨 PEG-thiol 修饰对 GoldMag 的磁学性能、体外悬浮稳定性和抗吞噬能力的影响。**方法** 用 PEG-thiol 对 GoldMag 进行表面修饰, 采用 MR FSE 序列 T2W、GRE 序列 T2*W 和 T2 mapping 分别检测 PEG-GoldMag 和 GoldMag 的磁学性能; 以 Zeta 电位仪检测两种纳米粒溶液的 Zeta 电位, 紫外-可见分光光度计检测两种纳米粒溶液不同时间点的吸光度, 评估其悬浮稳定性。分别用两种纳米粒对小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 进行体外标记, 以普鲁士蓝染色检测两种纳米粒的细胞标记率, ICP-OES 检测两种不同纳米粒标记的 RAW 264.7 细胞的细胞内铁含量, 评估 PEG

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071197)、国家“十二五”科技支撑计划课题项目子课题(2012BAI23B08-4)。

[作者简介] 龚明福(1986—), 男, 湖南益阳人, 在读硕士。研究方向: 磁共振分子影像。E-mail: hummer198625@sina.com

[通讯作者] 邹利光, 第三军医大学新桥医院放射科, 400037。E-mail: zoulg@tmmu.edu.cn

[收稿日期] 2012-10-06 **[修回日期]** 2013-05-20

修饰对 GoldMag 纳米粒体外抗吞噬能力的影响。**结果** GoldMag 和 PEG-GoldMag 溶液的 Zeta 电位分别为 -18.3 mV 和 -39.5 mV。室温下静置 100 min 后, GoldMag 和 PEG-GoldMag 溶液的相对吸光度分别为 50% 和 88.5%; 静置 200 min 后两种溶液的相对吸光度分别为 17%~18% 和 80%。两种纳米粒均能标记 RAW 264.7 细胞, GoldMag 和 PEG-GoldMag 对 RAW 264.7 细胞的标记率分别为 (85.3±2.1)% 和 (23.6±1.3)%。GoldMag 和 PEG-GoldMag 标记的 RAW 264.7 细胞的铁含量分别为 (21.6±2.3)pg/细胞和 (8.7±1.2)pg/细胞。在 T2WI、T2*WI 和 T2 mapping 三种图像上, 各浓度下 PEG-GoldMag 和 GoldMag 纳米粒凝胶的信号强度和 T2 值差异无统计学意义 (P>0.05)。**结论** PEG-thiol 修饰能显著改善 GoldMag 的悬浮稳定性和抗吞噬清除能力, 且对其磁学性能无明显影响。

[关键词] 金磁微粒; 巯基聚乙二醇; 悬浮稳定性; 抗吞噬能力; 磁共振成像

[中图分类号] R445.2; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2013)07-1053-05

金磁纳米微粒 (GoldMag) 是由胶体金壳和超顺磁性氧化铁纳米粒 (superparamagnetic iron oxide nanoparticle, SPIO) 内核构成的具有壳/核结构同时具有胶体金和 SPIO 性质的新型纳米材料, 既能在纳米粒表面耦联特异性抗体, 又具有超顺磁性, 在靶向 MR 分子成像领域有很好的应用前景^[1]。未经表面修饰的 GoldMag 的悬浮稳定性较差, 在磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 中易聚集沉淀, 在生理环境中易被网状内皮系统识别、吞噬并清除, 使其体内应用受到很大限制。聚乙二醇 (polyethyleneglycol, PEG) 是一种无毒、pH 中性、水溶性较好的亲水性多聚物, 且能降低被修饰物的免疫原性和抗原性, 已被食品和药物管理局 (food and drug administration, FDA) 批准作为体内注射药用聚合物^[2]。本实验采用 O-[2-(3-巯基丙酰基氨基)乙基]-O'-甲基聚乙二醇 (PEG-thiol) 作为表面活性剂, 对 GoldMag 纳米粒进行表面修饰, 以期在不影响其磁学性能的基础上提高其体外悬浮稳定性和抗细胞吞噬能力。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 GoldMag (陕西北美基因有限公司), 平均粒径 50 nm, 浓度 5 mg/ml。PEG-thiol 和溴化十六烷基三甲基铵 (CTAB, Sigma); ATCC 小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7; Hyclone RPMI-1640 培养基、胎牛血清和青霉素-链霉素双抗溶液; 浓硝酸和浓盐酸 (国药集团化学试剂有限公司) 均为工艺超纯; 马尔文 Zetasizer Nano Series 90 高灵敏纳米粒度分析仪, Beckman Coulter DU800 紫外-可见光分光光度计, ICP-OES 电感耦合等离子体发射光谱仪。

1.2 GoldMag 的 PEG 修饰 将 25 mmol/L CTAB 溶液 1 ml 和等体积 GoldMag 纳米粒混合, 缓慢振荡 20 min, 以 0.5T 永久性磁体分离悬液, 去上清液; 重复 3 次, 去掉多余的 CTAB。用 1 ml 双蒸水将分离出来的 GoldMag 纳米粒重悬, 并加入 1.25 mmol/L 的 PEG-thiol 溶液 1 ml, 于室温下振荡 4 h, 0.5T 永久性

磁体分离 3 次, 去掉多余的 PEG-thiol。最后得到的 PEG 修饰的纳米粒重悬于双蒸水中待用。

1.3 MRI 及图像后处理 采用 GE Signa HDx 3.0T MR 仪。用 1% 琼脂糖凝胶将 PEG-GoldMag 和 GoldMag 纳米粒按照 GoldMag 质量浓度进行梯度稀释, 得到质量浓度分别为 0、10、25、50 μg/ml 的 PEG-GoldMag 和 GoldMag 纳米粒凝胶溶液。按照图 1 所示顺序将装有各浓度纳米粒凝胶的 EP 管固定于 EP 管架上, 置于膝关节表面线圈内行轴位 2D 多层 MR 成像, FOV 16 cm×16 cm, 层间距 0~0.5 mm, 层厚 2~3 mm。成像序列和参数: FSE T2W (TR 2000 ms, TE 43.7 ms), GRE T2*W (TR 400 ms, TE 12 ms, 翻转角 20°) 和 16 回波 T2 mapping (TR 1025 ms, TE 2.4~60.5 ms)。将图像传输至 AW 4.4 工作站, 选取各

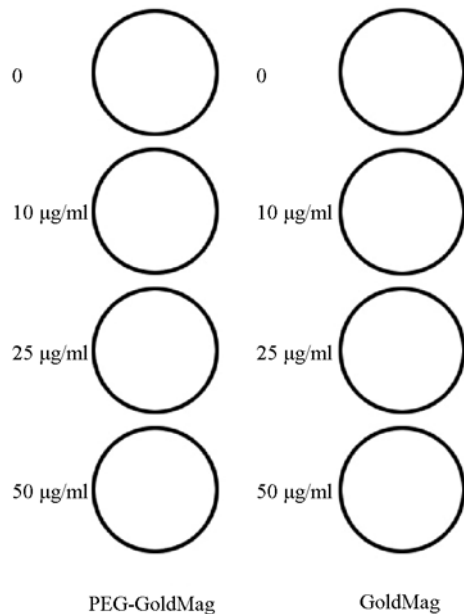


图 1 不同浓度纳米粒凝胶 EP 管排放顺序

序列的最佳测量层面,测量不同 EP 管内纳米粒凝胶的信号强度, ROI 为 10 mm²。用工作站自带 R₂ 软件测量各浓度凝胶的 T2 值,对两种纳米粒不同浓度凝胶的 T2 值倒数进行线性回归,将得到的直线斜率定义 r₂ 值(横向弛豫效能)。

1.4 Zeta 电位的测量和体外悬浮稳定性 将 PEG-GoldMag 和 GoldMag 用 PBS 稀释成 40 μg/ml,调节 pH 值,以 Zeta 电位仪分别测量其 Zeta 电位,测定温度为 25℃;用 PBS 将 PEG-GoldMag 和 GoldMag 稀释成

80 μg/ml,置于紫外-可见分光光度计中测量吸光度,每隔 5 min 测量 1 次,直至两种纳米粒溶液的吸光度值处于一个稳定的值。

1.5 RAW 264.7 细胞的培养和纳米粒标记 用含 10%胎牛血清和青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养基常规培养 RAW 264.7 细胞,当细胞达到 80%融合时进行传代培养。将含 1×10⁵ 个细胞/ml 的细胞悬液 1 ml 加入含有盖玻片的 6 孔板中,同时将 4 ml 细胞悬液加入 25 cm² 培养瓶中,置于 37℃ 孵箱中培养。当细胞达到对数期时,分别加入 PEG-GoldMag 和 GoldMag 纳米粒溶液,使其 GoldMag 的终浓度为 10 μg/ml,置于细胞培养箱中继续培养 24 h。

1.6 普鲁士蓝染色 取出 6 孔板中的盖玻片,以 PBS 洗涤后置于 4%多聚甲醛中室温固定 10 min,普鲁士蓝染液染色 30 min,中性红染色 10 min,常规透明干燥后封片,倒置显微镜下观察、摄片。每张玻片任意取 20 个高倍视野进行细胞计数,计算标记率:标记率=视野内标记细胞数/视野内细胞总数×100%。

1.7 细胞内铁含量的测量 以 0.25%胰酶消化收集 25 cm² 培养瓶中标记了的 RAW 264.7 细胞,细胞计数后 1000 转/分,离心 5 min 后去上清液,0.5 ml 水

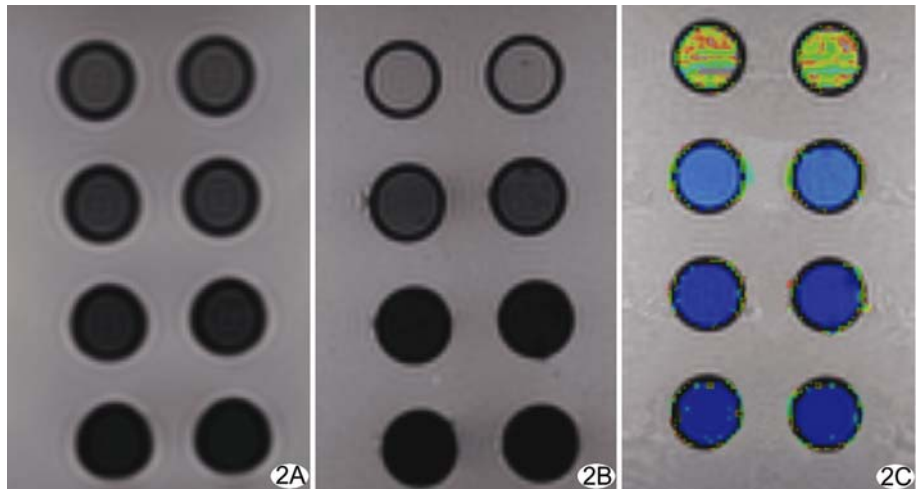


图 2 PEG-GoldMag 和 GoldMag 纳米粒凝胶 MRI(管的顺序见图 1) A. T2WI; B. T2* WI; C. T2 mapping

溶解标记细胞团,密封好后 37℃ 培养过夜,超纯水稀释 20 倍后进行 ICP-OES 检测,测量细胞的铁含量。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件包,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用两个独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PEG-GoldMag 和 GoldMag 的 T2WI、T2* WI 及 T2 mapping 图像和信号强度值见图 2、表 1。T2WI 及 T2* WI 上,两种纳米粒凝胶的信号变化趋势一致,均随浓度增大而降低,浓度相同时两种纳米粒凝胶的信号强度差异无统计学意义 (*P* > 0.05);两种纳米粒凝胶的 T2 时间均随着浓度增大而降低,浓度相同时 T2 值差异无统计学意义 (*P* > 0.05),同时两种纳米粒的横向弛豫效能基本一致,PEG-GoldMag 和 GoldMag 的 r₂ 为分别为 7.00 ml/(μg·s) 和 7.03 ml/(μg·s)。

2.2 PEG-GoldMag 和 GoldMag 纳米粒溶液的 Zeta 电位分别为 -39.5 mV 和 -18.3 mV。两种纳米粒的悬浮稳定性见图 3。GoldMag 溶于 PBS 后迅速沉淀,其溶液的吸光度迅速下降,静置 100 min 后相对吸光度下降至 50%,静置 200 min 后溶液基本稳定,相对吸光度为 17%~18%。而 PEG-GoldMag 溶于 PBS 后

表 1 不同浓度 PEG-GoldMag 和 GoldMag 纳米粒凝胶的信号强度和 T2 值 ($\bar{x} \pm s$)

浓度 (μg/ml)	T2WI			T2* WI			T2 mapping(ms)		
	PEG-GoldMag	GoldMag	<i>P</i> 值	PEG-GoldMag	GoldMag	<i>P</i> 值	PEG-GoldMag	GoldMag	<i>P</i> 值
0	1034.52±4.88	1036.00±68.00	0.54	1224.99±411.03	1215.99±5.42	0.27	87.47±4.98	87.64±0.76	0.96
10	839.68±3.18	858.30±16.01	0.11	607.85±3.99	611.37±4.62	0.37	8.75±0.12	8.80±0.01	0.48
25	572.93±6.62	572.90±4.35	0.99	199.26±1.39	197.07±2.56	0.26	4.93±0.04	4.80±0.07	0.07
50	302.07±8.01	310.06±3.88	0.19	47.13±1.07	47.26±1.05	0.89	2.84±0.13	2.59±0.13	0.08

悬浮稳定性较好,吸光度下降较慢,静置 100 min 时相对吸光度为 88.5%,静置 200 min 后溶液进入相对稳定期,连续观察 30 min,相对吸光度约为 80%;室温下静置达到 72 h 后,大部分 PEG-GoldMag 纳米粒沉降至比色杯底,相对吸光度降至 21.6%。

2.3 成功培养 RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞,细胞呈圆形,部分细胞两侧伸出伪足(图 4)。普鲁士蓝染色表明两种纳米粒均能对 RAW 264.7 细胞进行标记,GoldMag 和 PEG-GoldMag 的

细胞标记率分别为(85.3±2.1)%和(23.6±1.3)%,且 GoldMag 标记的 RAW 264.7 细胞内的蓝色颗粒多于 PEG-GoldMag 标记的 RAW 264.7 细胞。ICP-OES 显示 GoldMag 标记的 RAW 264.7 细胞的铁含量为(21.6±2.3)pg/细胞,明显高于 PEG-GoldMag 标记 RAW 264.7 细胞的铁含量(8.7±1.2)pg/细胞。

3 讨论

基于 MRI 的靶向分子成像不仅依赖于探针的弛豫效能,还依赖于探针在体内逃避网状内皮系统的吞噬和清除、稳定存在足够长时间的能力,以实现其在体内的主动靶向。由于优越的磁学性能和良好的生物相容性,SPIO 是目前在 MRI 分子影像领域中应用最广的纳米探针^[3-4]。但是,SPIO 本身易被氧化而失去超顺磁性,且具有较高的比表面能,易在溶液中聚集,需经过表面修饰才能应用于生物医学领域^[5]。本实验所采用的 GoldMag 纳米粒是由纳米金颗粒包裹 SPIO 而成,由于金具有相对惰性的化学性质,能保护其内的 SPIO 不被氧化;但纳米金存在胶体稳定性差、易受环

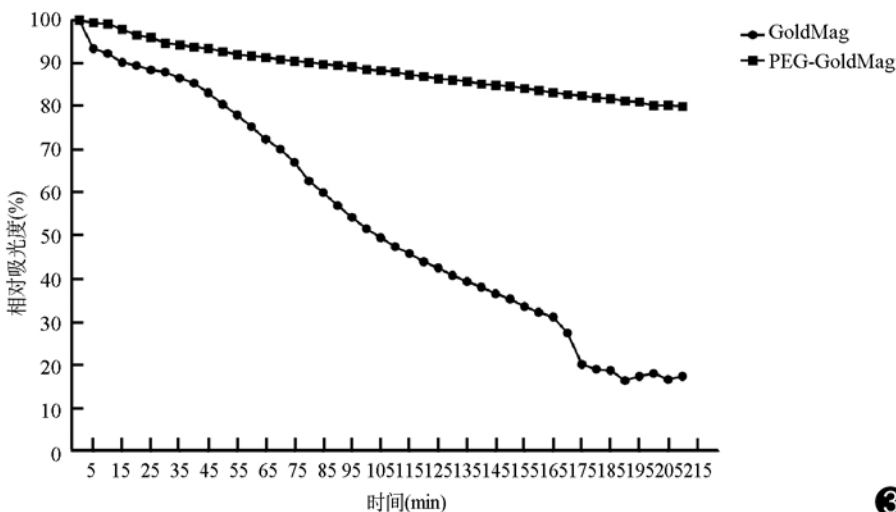


图 3 PEG-GoldMag 和 GoldMagPBS 溶液的相对吸光度

境影响而聚集的问题,将其应用于人体内复杂的生理环境时,极易被网状内皮系统吞噬清除^[6]。

纳米粒的表面修饰改性可为纳米粒的体外胶体稳定性和体内的药代动力学带来很大改善;基于不同目的,一般对不同纳米粒采用不同表面修饰分子及修饰方法,常用修饰物分子包括 PEG、聚乳酸、葡聚糖和聚己内酯等^[6-7]。PEG 是一种无毒、水溶性很高的亲水性聚合物,呈 pH 中性,由环氧乙烷聚合而成,具有良好的生物相容性,已在药剂学领域得到广泛应用。大量实验^[2,6,8-9]证明,PEG 不仅能提高药物的溶解性,改善药物在体内的药代动力学,延长半衰期,还能在很大程度上降低药物的毒性、免疫原性和抗原性,从而降低免疫反应的水平。

本实验采用 PEG 对 GoldMag 进行表面修饰改性,增加其水性溶液的胶体稳定性,改善其在体内的药代动力学,减少网状内皮系统的吞噬清除。由于金与巯基较易形成强的 Au-S 共价键,为简化表面改性的操作过程,本实验选择巯基活化的 PEG 对 GoldMag

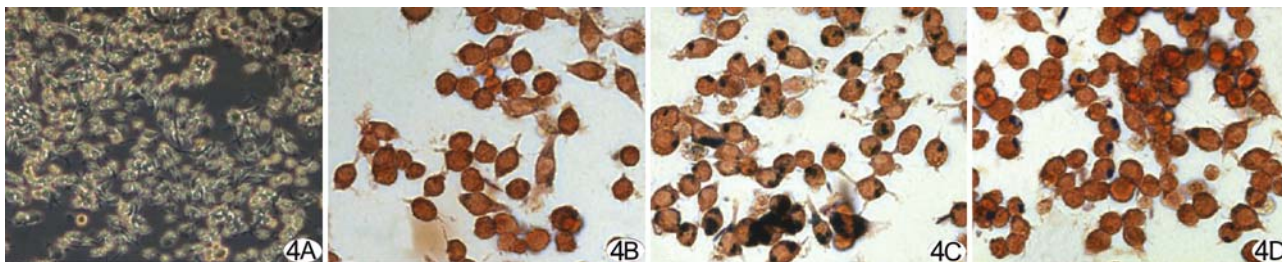


图 4 RAW 264.7 细胞的培养和纳米粒标记 A. RAW 264.7 细胞倒置显微镜图(×100); B~D. RAW 264.7 细胞的普鲁士蓝染色图(×400),分别为未标记细胞(B)、GoldMag 标记细胞(C)、PEG-GoldMag 标记细胞(D)

进行表面改性^[9],结果表明 PEG 的修饰使得 GoldMag 的 Zeta 电位显著提高,体外悬浮稳定性和抗单核巨噬细胞吞噬的能力明显改善。这是因为修饰后的 GoldMag 纳米粒表面带有一层 PEG 链,PEG 具有良好的水溶性,使 PEG 链能充分地延伸到水性溶剂中,可大幅提高被 PEG 修饰的 GoldMag 在水性溶液中的胶体稳定性;同时,GoldMag 表面形成的 PEG 弹性聚合层能推离靠近的大分子调理蛋白,起到“分子刷”的作用,使其能逃避单核巨噬细胞的吞噬^[6,9-10]。

本实验通过对两种纳米粒凝胶进行 MRI 检测,发现 PEG 修饰对 GoldMag 的磁学性能无明显影响;浓度相同时,两种纳米粒凝胶 T2WI 及 T2*WI 信号强度和 T2 mapping 上的 T2 值差异均无统计学意义 ($P>0.05$),两种纳米粒的横向弛豫效也基本相同。根据 Burtea 等^[11]的理论,MR 对比剂的增强效应主要取决于对比剂本身的弛豫效能,而弛豫效能与对比剂的化学结构、粒径及溶剂和对比剂的可亲性有关^[12]。本实验中修饰后的 GoldMag 纳米粒表面带有一层 PEG 链,水溶性极好的 PEG 链充分地延伸到水性溶剂中,GoldMag 表面与水分子充分接触,且 PEG 修饰没有改变 GoldMag 的磁性粒径,使 PEG-Gold 和 GoldMag 的磁学性能无显著差异。

综上所述,本实验成功应用巯基活化的 PEG-thiol 对 GoldMag 进行了表面修饰改性,在不影响 GoldMag 磁学性能的基础上大幅提高了 GoldMag 纳米粒在水性溶液中的胶体稳定性和抗单核巨噬细胞吞噬的能力,为 GoldMag 纳米粒的体内靶向 MR 分子成像提供了充实的实验基础。

[参考文献]

- [1] Ren J, Wang F, Wei G, et al. MRI of prostate cancer antigen expression for diagnosis and immunotherapy. *PLoS One*, 2012, 7(6):e38350.
- [2] Luo X, Pan S, Feng M, et al. Stability of poly (ethylene glycol)-graft-polyethylenimine copolymer/DNA complexes: Influences of PEG molecular weight and PEGylation degree. *J Mater Sci Mater Med*, 2010, 21(2):597-607.
- [3] Amstad E, Textor M, Reimhult E. Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale*, 2011, 3(7):2819-2843.
- [4] Li YG, Wei JN, Lu J, et al. Labeling and tracing of bone marrow mesenchymal stem cells for tendon-to-bone tunnel healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011, 19(12):2153-2158.
- [5] Huang G, Zhang C, Li S, et al. A novel strategy for surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for lung cancer imaging. *J Mater Chem*, 2009, 19:6367-6372.
- [6] Qiao R, Yang C, Gao M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: From preparations to in vivo MRI applications. *J Mater Chem*, 2009, 19(35):6274-6293.
- [7] 杜凯,朱艳红,徐辉碧,等.多功能磁性纳米粒的合成,修饰及生物医学应用. *化学进展*, 2011, 23(11):2287-2298.
- [8] 路娟,刘清飞,罗国安,等.药物聚乙二醇修饰研究进展. *有机化学*, 2009, 29(8):1167-1174.
- [9] 吴超,郭红燕,胡家文.巯基聚乙二醇 5000 修饰的金溶胶的稳定性:从 DLVO 稳定到空间稳定. *化学学报*, 2009, 67(14):1621-1625.
- [10] Ji X, Shao R, Elliott AM, et al. Bifunctional gold nanoshells with a superparamagnetic iron oxide-silica core suitable for both MR imaging and photothermal therapy. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, 2007, 111(17):6245.
- [11] Burtea C, Laurent S, Vander Elst L, et al. Contrast agents: Magnetic resonance. *Handb Exp Pharmacol*, 2008(185 Pt 1): 135-165.
- [12] Lee JH, Huh YM, Jun YW, et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med*, 2007, 13(1):95-99.