

多功能化纳米材料络合物体外特异性结合和调控结肠癌细胞的研究

谢静静, 赵蓉莉, 陈红宁, 解晓东, 贾力

福州大学化学学院肿瘤转移的预警和预防研究所, 福州 350002

摘要 循环肿瘤细胞(CTCs)因携带原发肿瘤的一些生物特性以及自身独特的生物学功能,在癌症的诊断、治疗和转移预防方面发挥着重要作用。但外周血中CTCs的低含量使其检测、分离和富集有一定技术难度。本文选取结肠癌HT29细胞为CTCs模型,以表面高表达的EpCAM为生物标记物,选取纳米级高分子聚合物G6 PAMAM dendrimers为基质,多价络合针对EpCAM的抗体来构建络合物,实现体外对HT29细胞的特异性捕获及活性调控。应用红外、动态光散射、紫外和荧光等方法表征络合物的理化特性,荧光分析法考察络合物对HT29细胞的识别和捕获,MTT、荧光拍照、流式分析法显示络合物对捕获的HT29细胞的活性调控。结果表明,制备的络合物可以高特异性地识别和结合贴壁的和悬浮的HT29细胞,从而对捕获的细胞产生一定的活性下调作用,但不产生严重的细胞毒效应。可见,利用具有多价络合效应的纳米材料来共价连接针对CTCs表面标记物的靶向抗体,有望实现在病人血中对CTCs的特异性捕获和活性调控。

关键词 循环肿瘤细胞;PAMAM dendrimers;抗体络合;细胞捕获;活性调控

中图分类号 R73-37

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.34.002

Specificity of Capturing and Restraining Colon Cancer Cells *in Vitro* by Multifunctional Nanomaterial Conjugates

XIE Jingjing, ZHAO Rongli, CHEN Hongning, XIE Xiaodong, JIA Lee

Cancer Metastasis Alert and Prevention Center, College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China

Abstract Circulating tumor cells (CTCs) have great significance in cancer diagnosis, therapy and metastasis prevention, owing to their biological characteristics derived from themselves and primary tumor. However, low concentrations of CTCs in peripheral blood made their detection, isolation and enrichment technically challenging. In this study, we selected colon cancer HT29 cell as a CTC model and took the nanoscale G6 PAMAM dendrimers as scaffolds for multivalent conjugation with antibody against EpCAM to realize the specific capture and activity regulation at HT29 cells *in vitro*. FTIR, DLS, UV and fluorescence measurements were made to show the physicochemical properties of conjugates. Microscopic analysis was performed to indicate the recognition and capture behaviors to target cells. MTT, fluorescence and flow cytometric analyses were made to demonstrate the regulation on the viability of captured cells. Our results showed that the prepared conjugates were able to specifically recognize and bind the adherent and floating HT29 cells, and down-regulate the activity of captured cells without producing significant cytotoxic effects. The present study may provide promise for capturing and restraining the rare CTCs in patient blood by using nanomaterials multivalently conjugated with targeting antibodies against biomarkers on CTC surface.

Keywords circulating tumor cells; PAMAM dendrimers; antibody conjugation; cell capture; cell activity regulation

收稿日期:2014-09-26;修回日期:2014-10-28

基金项目:国家自然科学基金项目(81273548)

作者简介:谢静静,博士研究生,研究方向为多功能纳米材料及应用,电子邮箱:xiejing910016@163.com;贾力(通信作者),教授,研究方向为肿瘤转移的预警和预防,电子邮箱:pharmlink@gmail.com

引用格式:谢静静,赵蓉莉,陈红宁,等.多功能化纳米材料络合物体外特异性结合和调控结肠癌细胞的研究[J].科技导报,2014,32(34):26-32.

癌症是威胁人类健康的一大杀手,而由循环肿瘤细胞所诱发的癌症转移则是癌症不可治愈的根源^[1-3]。研究表明,循环肿瘤细胞是从原始肿瘤脱落下来后进入血液中,一旦被微环境所激活则可黏附到远端组织,进而形成转移灶引发转移的一系列级联反应^[2,4]。循环肿瘤细胞在血液中的含量极低,通常为造血细胞的 10^{-6} ~ 10^{-35} ^[6],而恰恰是这些微量的细胞携带了原发肿瘤的一些生物特性^[7,8],并且因其表面独特的生物标记物而在后期癌症病人的诊断治疗中发挥着重要作用^[9]。循环肿瘤细胞数目的增加常常与癌症病人的转移进程和存活期长短紧密相关^[10],因此高效灵敏地从血液中检测、分离和富集循环肿瘤细胞成为癌症转移研究的关键步骤^[11,12]。

近年来,研究者探索了各种手段来分离和检测循环肿瘤细胞。而这些研究主要集中在两大类:一类是利用细胞的物理特性,诸如大小、密度、可塑性和黏附性等;另一类则是利用细胞表面的标记物进行亲和结合,诸如抗体-抗原、配体-受体间的结合等。尽管这些研究取得了一些进展,但由于原发肿瘤细胞和循环肿瘤细胞的异源性,研究中还存在一些局限和不足,诸如较低的捕获效率和纯度^[13]、不完全的细胞收集^[14]、有限的细胞表面特性表征^[15]、费时费力的分离捕获工具的制备^[16,17]等。为了克服这些局限性,以纳米技术为主的研究手段开发出用于高效的循环肿瘤细胞的捕获。纳米材料因其较高的比表面积,良好的尺寸和生物学效应被广泛用于生物医学^[18],而聚酰胺-胺型高分子树枝状聚合物(PAMAM dendrimers)则是其中的一类。这类纳米材料尺寸在10 nm以内,表面功能化基团丰富,分枝状空腔结构负载量高,生物相容性和降解性良好,常被作为药物载体^[19]和基因载体^[20]等用于癌症的治疗方面。近期研究表明,dendrimers可以包被针对肿瘤细胞表面高表达受体的特异性抗体或配体来靶向肿瘤细胞,如用dendrimers偶联针对人类表皮生长因子受体-2(HER2)的抗体来识别HER2高表达的乳腺癌细胞^[21]或偶联针对前列腺特定膜抗原(PSMA)的抗体来定位前列腺癌细胞^[22]。但这些络合方式都采用了异功能的交联剂sulfo-LC-SP-DP和sulfo-SMCC为中间体,且为单一络合。这种连接方式不仅浪费了dendrimers的高负载特性,且不能实现高效的靶向捕获癌细胞。文献[23]报道,dendrimers有多价络合效应,可以络合多个抗体或配体分子来实现在体外模拟环境中灵敏高效地对血液中微量乳腺癌细胞的捕获^[24],但这个研究仅限于捕获癌细胞的作用,未对其捕获的癌细胞的活性机制进行探讨。

本文在对dendrimers和癌细胞表面特性综合把握的基础上,选取上皮细胞生长因子(EpCAM)高表达的结肠癌细胞株HT29为循环肿瘤细胞模型。利用G6 PAMAM dendrimers特有的多价络合效应来共价连接多个EpCAM抗体(aEpCAM)分子,从而得到具有高亲和力的G6-aEpCAM络合物,实现体外对结肠癌细胞株HT29的高识别和捕获特性,并进一步对捕获的HT29细胞进行活性调控。

1 方法

1.1 G6 PAMAM dendrimers-aEpCAM络合物的合成

G6 PAMAM dendrimers表面首先进行羧基化反应合成衍生物,即完全羧基化的G6(CC G6)。其自由基端则与抗体或荧光标记的抗体进行共价络合反应。具体反应过程如下:取60 mg的G6,加入10倍摩尔比的丁二酸酐(SA)(246 mg, 660 μmol)于2 mL DMSO中激烈搅拌过夜反应。将所制备的G6衍生物用透析袋(10000 MWCO)在超纯水中透析2 d,除去未反应的小分子和有机溶剂后进行冷冻干燥。

将得到的CC G6与针对癌细胞表面EpCAM的靶向抗体(aEpCAM)相偶联制备G6-aEpCAM络合物,该反应过程采用EDC/NHS络合方法。合成的纳米材料——单抗络合物根据反应时反应物的物质的量之比(CC G6:aEpCAM)分别命名为G6-3aEpCAM和G6-5aEpCAM。具体过程如下:取0.55 μg 的CC G6(7.9 pmol)溶解在2 mL的磷酸盐缓冲液(PBS)中,将其羧基端用50倍过量的等物质的量之比的EDC(395 pmol, 75.7 ng)和NHS(395 pmol, 45.46 ng)进行活化1 h。活化的CC G6平均分到2管中,一管中加入3倍物质的量的aEpCAM(11.85 pmol)合成单抗络合物G6-3aEpCAM,另一管中加入5倍物质的量的aEpCAM(19.75 pmol)合成单抗络合物G6-5aEpCAM。荧光标记的G6-aEpCAM络合物则用aEpCAM-PE代替aEpCAM采取上述类似的反应步骤合成,并相似地命名为G6-3aEpCAM-PE和G6-5aEpCAM-PE。上述所有合成反应均激烈搅拌过夜,合成的络合物用截留量为10000的透析膜透析过夜后进行冷冻干燥。

1.2 络合物的理化性质表征

采用傅里叶变换红外光谱分析仪(FTIR)对络合物的结构进行鉴定;采用原子力显微镜(AFM)分析其形貌特征,采用光动态散射仪(DLS)确定其水溶性粒径大小和表面电势;采用UV和荧光光谱判断抗体或荧光标记的抗体是否与G6 PAMAM dendrimers偶联成功。

1.3 络合物对目标癌细胞的特异性识别、结合和捕获

首先考察荧光标记的G6-aEpCAM络合物对贴壁细胞HT29的识别和结合作用。采用激光共聚焦显微镜分析其结合情况。将处于对数生长期的HT29细胞以 $10^5/\text{mL}$ 的密度接种在35 mm的激光共聚焦专用皿上,待细胞贴壁后,用含1%牛血清白蛋白(BSA)的PBS液悬浮封闭30 min,反复洗涤后,分别与荧光标记的抗体(aEpCAM-PE)或浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的荧光标记的络合物(G6-3aEpCAM-PE和G6-5aEpCAM-PE)在37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 的培养箱中共培养1 h。最后洗去未结合的络合物或抗体,用固定剂固定后,加入含核染色剂DAPI的PBS溶液避光染色15 min。染色后,反复洗涤,最后用无血清无酚红的培养基覆盖并于激光共聚焦显微镜 λ_{ex} 550 nm, λ_{em} 570~610 nm模式下拍照分析。

进一步考察荧光标记的G6-aEpCAM络合物对悬浮细胞HT29的识别和捕获情况。采用荧光显微镜对其进行定性分

析。取处于对数生长期的HT29细胞,胰酶消化后,每管取HT29细胞量 10^6 个,先用Hoechst 33258染色液染色15 min对细胞核进行标记,用PBS洗涤后再用1% BSA的PBS液封闭30 min除去非特异性结合。最后,每管加入1 mL荧光标记的抗体(aEpCAM-PE)或浓度为 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的荧光标记的络合物(G6-3aEpCAM-PE和G6-5aEpCAM-PE)于 37°C 水浴避光共育1 h,洗涤除去未结合的络合物后,用荧光显微镜于 λ_{ex} 470/40 nm, λ_{em} 525/50 nm模式下定性观察捕获情况。

1.4 络合物对目标癌细胞的增殖抑制作用

取处于生长对数期的HT29细胞,胰蛋白酶消化后,用培养基吹打配制成细胞悬液,经细胞计数后,取密度为 $8 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液接种到96孔板中,每孔 $100 \mu\text{L}$,后置于 37°C , 5%的 CO_2 培养箱中培养24 h。接着在无菌操作台上,先用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤G6-aEpCAM络合物母液,后去除旧的培养基,每孔分别加入 $100 \mu\text{L}$ 用培养基稀释的不同浓度的G6-aEpCAM络合物(1.25, 2.5, 5, 10, $20 \mu\text{g}/\text{mL}$)共培养。另设置空白对照组、溶剂对照,每组6个复孔。作用48 h后,移除含络合物的培养基,于每孔中加入 $100 \mu\text{L}$ 含MTT($500 \mu\text{g}/\text{mL}$)的无血清无酚红培养基。继续孵育4 h后,取出96孔板停止培养。轻轻移除各孔的上清液,每孔加入DMSO $150 \mu\text{L}$,摇床振荡10 min,待蓝紫色结晶全部溶解后于酶标仪上 570 nm 波长处测定各孔的光吸收值($A_{570 \text{ nm}}$)。存活率可由公式获得:存活率(%)=(实验组 $A_{570 \text{ nm}}$ -溶剂对照组 $A_{570 \text{ nm}}$)/(空白对照组 $A_{570 \text{ nm}}$ -溶剂对照组 $A_{570 \text{ nm}}$) $\times 100\%$ 。

1.5 络合物对目标癌细胞的周期分布影响

选取对数生长期的人结肠癌细胞HT29经胰蛋白酶消化后,调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$,以 $1.5 \text{ mL}/\text{孔}$ 接种于6孔板中,置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养24 h;用 $0.22 \mu\text{mol}/\text{L}$ 滤膜过滤G6-aEpCAM络合物母液,配制一系列浓度梯度(0, 10, $20 \mu\text{g}/\text{mL}$),CC G6用作阴性对照,无络合物处理组作为空白对照组。吸弃旧培养基,用PBS洗涤细胞后,于每孔加入2 mL对应的络合物,培养箱内继续孵育48 h。共培养后,用PBS洗涤细胞3次,除去络合物,消化收集细胞移入离心管中, 200 g 离心6 min,弃去上清后,用预冷的PBS洗涤细胞2次。小心吸取上清液,在离心管中留约 $200 \mu\text{L}$ 的PBS,避免吸走细胞,之后每管加入1 mL预冷的70%乙醇混匀固定, -20°C 过夜, 200 g 离心6 min,弃去乙醇,用预冷的PBS清洗一次,吸取上清,残留约 $50 \mu\text{L}$ 左右的PBS,弹击以分散细胞。将配制好的碘化丙啶染色液(染色缓冲液 $500 \mu\text{L}$,碘化丙啶染色液($20 \times$) $25 \mu\text{L}$, RNase A ($50 \times$) $10 \mu\text{L}$)每管 $500 \mu\text{L}$ 加入到对应的空白对照管和样品管中,室温避光染色30 min。用流式细胞仪在激发通道 488 nm 处检测细胞周期分布情况。

1.6 络合物对目标癌细胞的形态学影响

取对数生长期的HT29细胞,胰酶消化调整细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$,以 $1.5 \text{ mL}/\text{孔}$ 接种于6孔培养板上,置 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养。待细胞贴壁后,每孔加入不同浓度(0, 10,

$20 \mu\text{g}/\text{mL}$)的G6-aEpCAM络合物及CC G6,作用48 h后,胰酶消化,离心收集细胞,用PBS洗涤3次,每管加入 $100 \sim 500 \mu\text{L}$ 的PBS悬浮细胞,使得细胞悬液的终浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6/\text{mL}$ 。预先按比例配制吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)染色液。取 $1 \mu\text{L}$ 的染液加入到每个样品管中,轻轻混匀,室温避光染色15 min。染色完毕后,取少量滴加到载玻片上,轻轻盖上盖玻片,于荧光显微镜GFP模块下(λ_{ex} 510 nm)观察细胞的凋亡与坏死情况。

1.7 络合物对目标癌细胞的凋亡分析

取对数生长期的HT29细胞,胰酶消化调整细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$,以 $1.5 \text{ mL}/\text{孔}$ 接种于6孔培养板上,置 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养。待细胞贴壁后,去除旧培养基,阴性孔加入新鲜的培养基,样品孔则加入不同浓度的G6-aEpCAM络合物及CC G6(0, 10, $20 \mu\text{g}/\text{mL}$),作用48 h后,胰酶消化,离心收集细胞,用PBS洗涤3次,剩余 $50 \mu\text{L}$ 的PBS重悬细胞。按样品数量同比例配制双染液,即 $500 \mu\text{L}$ Binding Buffer+ $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC+ $5 \mu\text{L}$ PI。取 $500 \mu\text{L}$ 上述染色混合液逐个加入到阴性对照管和样品管中,室温避光反应15 min。设置两个单阳补偿管即死细胞+ $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC或死细胞+ $5 \mu\text{L}$ PI,调节电压,用流式细胞仪在激发通道 488 nm 处检测细胞凋亡状况。

2 结果和讨论

2.1 G6-aEpCAM络合物的鉴定及表征

由FTIR图谱(图1)可以看出,原树枝状聚合物G6 PAMAM在 $3500 \sim 3100 \text{ cm}^{-1}$ 处有N—H伸缩振动吸收,在 $1350 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 处有C—N伸缩振动吸收,且结构中存在 $1680 \sim 1630 \text{ cm}^{-1}$ C=O伸缩振动, $1655 \sim 1590 \text{ cm}^{-1}$ N—H弯曲振动, $1420 \sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ C—N伸缩的酰胺键特征吸收峰。

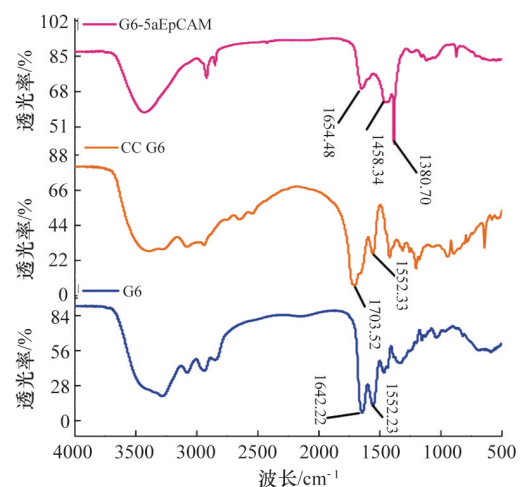


图1 G6 PAMAM dendrimers衍生物及对应络合物的红外图谱
Fig. 1 FTIR spectra of G6 PAMAM dendrimer derivatives and their corresponding conjugates

当其用丁二酸酐进行表面修饰后发现,随着羧化程度的加深,1655~1590 cm^{-1} 处的N—H弯曲振动逐步增强。当CC G6偶联上aEpCAM后,CC G6和G6-aEpCAM络合物仍保留在1680~1630 cm^{-1} 处的C=O伸缩振动,但只有络合物在1400 cm^{-1} 附近有酰胺类化合物C—N键伸缩振动的吸收带,可见抗体已成功偶联在纳米材料的表面。

UV吸收图谱显示(图2),抗体aEpCAM在220和280 nm处均有特征吸收峰,其相关系数分别为0.9944和0.991,且CC G6本身在220 nm处没有紫外吸收值,故选择220 nm作为判断抗体是否络合到纳米材料上的指标。选取一定浓度的G6-aEpCAM络合物,测其UV图谱,发现络合物在220 nm出现特征吸收峰,可见aEpCAM已成功连接到CC G6表面。最后,根据aEpCAM的标准曲线,可计算出每个G6-aEpCAM络合物中大概络合了2个aEpCAM分子。

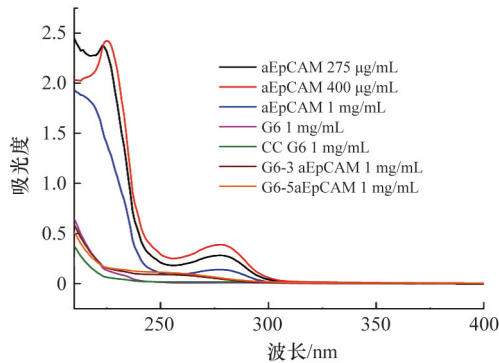


图2 G6 PAMAM dendrimers 衍生物及对应络合物的紫外吸收图谱

Fig. 2 UV spectra of G6 PAMAM dendrimer derivatives and their corresponding conjugates

为了进一步确定荧光标记的抗体aEpCAM-PE是否连接到CC G6表面,采用激光共聚焦显微镜对荧光标记的络合物G6-aEpCAM-PE的水溶液拍照分析(图3),当aEpCAM-PE连接到CC G6表面上时,材料表面会显示橙黄色荧光,且络合物呈现聚集特性。

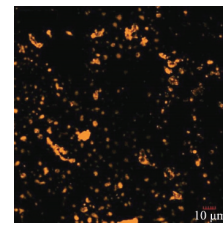


图3 G6-5aEpCAM-PE 络合物水溶液在 λ_{ex} 543 nm, λ_{em} 560~660 nm模式下的荧光图谱

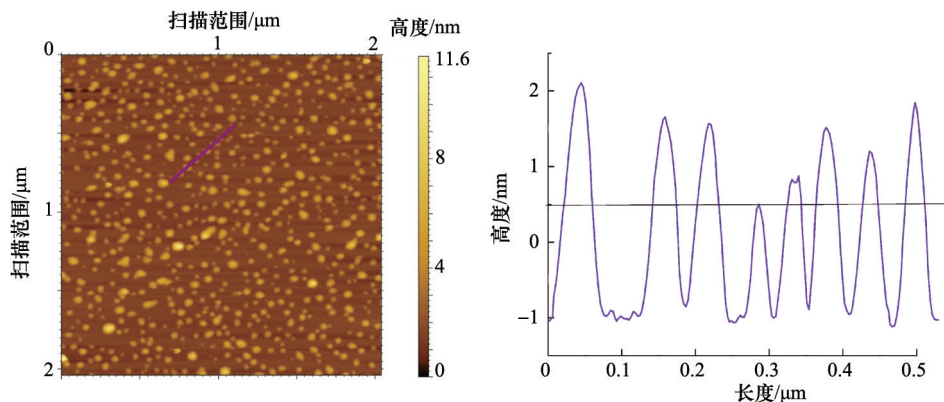
Fig. 3 Representative fluorescence image of G6-5aEpCAM-PE conjugate at λ_{ex} of 543 nm and λ_{em} of 560-660 nm.

纳米材料G6 PAMAM dendrimers 在羧基化修饰和抗体aEpCAM包被前后,其粒径和表面电势发生很大的变化。随着羧化程度加深,电负性增强,粒径变大。当CC G6连接aEpCAM后,尽管电势没有太大改变,但因抗体和材料本身的聚集特性,以及络合物分子量的急剧增大,G6-5aEpCAM络合物的粒径呈现急剧增长的趋势,且在溶液中停留时间越长,聚集现象越明显,故络合物的实际尺寸远比其水溶性直径要小(表1)。

表1 Dendrimers 表面功能化修饰前后的水溶性粒径和电势
Table 1 Distribution of hydrophilic diameters and zeta-potentials of G6 dendrimers before and after surface modification

| 样品 | 平均直径/nm | 平均电势/mV |
|------------|---------|---------|
| G6 | 8.50 | 14.00 |
| CC G6 | 11.70 | -18.81 |
| G6-5aEpCAM | 457.97 | -17.90 |

为了确定络合物的表面形貌及颗粒大小,用原子力显微镜对其进一步表征。AFM成像显示(图4),纳米材料包被抗体后,其高度维持在1~2 nm之间,且颗粒形状类似圆形,故初步推测其为圆饼状的结构特征,且络合物的水平直径约(35±5) nm。



(a) 扫描范围内粒子形貌

(b) 代表性粒子(如紫色划线所示)的粒径和高度分布

图4 G6-3aEpCAM 络合物的原子力显微镜图谱

Fig. 4 A typical AFM scan of G6-3aEpCAM conjugate

2.2 络合物对贴壁HT29细胞的识别和结合

当贴壁的HT29细胞与不同浓度的G6-aEpCAM-PE络合物(0, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)共培养1 h后,由荧光分析(图5)可知,未用抗体或络合物处理过的细胞,仅细胞核显示蓝色,且CC G6 dendrimers对HT29细胞无特异性的识别和结合作用,而用抗体(aEpCAM-PE)或络合物(G6-3aEpCAM-PE和G6-5aEpCAM-PE)处理过的HT29细胞,除细胞核显示蓝色外,细胞表面还展示独特的荧光叠加颜色(橙黄色)。另外,由细胞表面的荧光强度进一步分析知,络合物显示出比抗体更强的结合特异性。

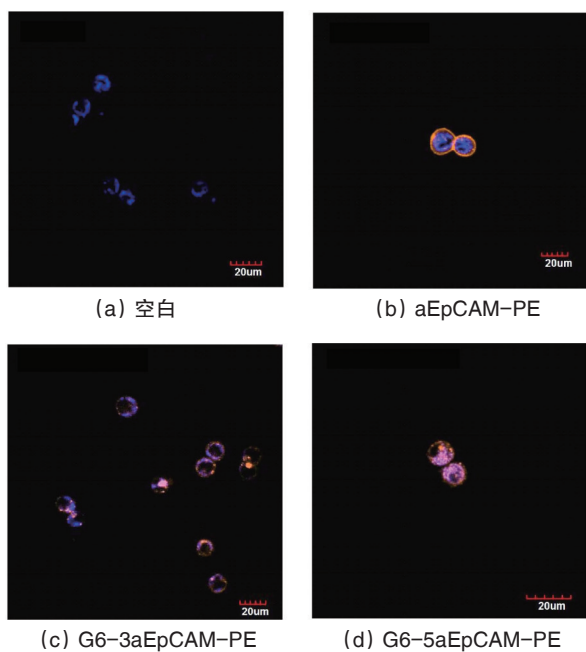


图5 G6-aEpCAM络合物对贴壁细胞的识别和结合图像
Fig. 5 Fluorescence images of the adherent cells recognized and bound by G6-aEpCAM conjugates

2.3 络合物对悬浮HT29细胞的识别和捕获

荧光标记的络合物G6-aEpCAM-PE是否也能对悬浮细胞HT29特异性地识别和捕获呢,本文用荧光显微镜进一步分析。将事先用Hoechst 33258标记的悬浮细胞与荧光标记的络合物或抗体在仿生37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中共孵育1 h后,那些被捕获的细胞表面都展示出抗体标记的特征性荧光。被aEpCAM-PE和G6-5aEpCAM-PE捕获的细胞表面显示叠加的粉红色荧光,且取同等体积的细胞悬液观察时,拍照视野内出现的荧光标记的细胞数目较多(图6)。可见,用靶向抗体aEpCAM-PE修饰的G6 PAMAM dendrimers除可以识别和结合贴壁的靶细胞外,还可对游离的靶细胞进行特异性捕获。

2.4 络合物对HT29细胞的抗增殖能力

G6-aEpCAM络合物对捕获的HT29细胞是否能进一步活性调控,本文运用常规的MTT测试法考察其对HT29细胞增殖能力的影响。由图7可知,G6-aEpCAM络合物可浓度依赖性地降低HT29细胞的活性。与CC G6相比,在同等质量浓度下,即CC G6的物质的量浓度是络合物物质的量浓度5

倍的条件下,CC G6对细胞活性也没有产生很大的影响,最高抑制率不到40%。而G6-5aEpCAM络合物在浓度15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的用量下,抑制率可高达65%。可见,G6-aEpCAM络合物可显著降低目标癌细胞的活性,抑制癌细胞的增殖。

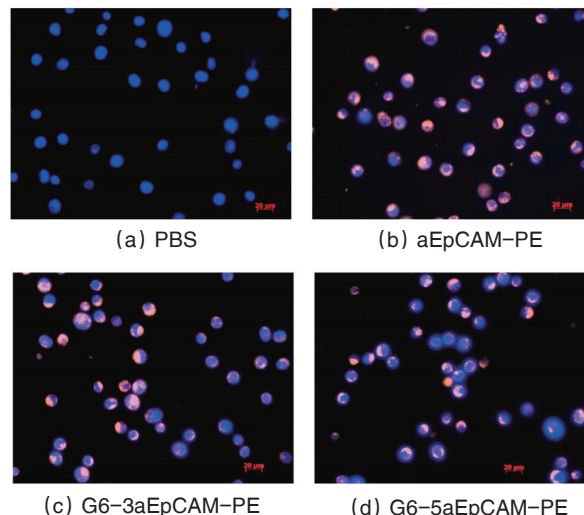
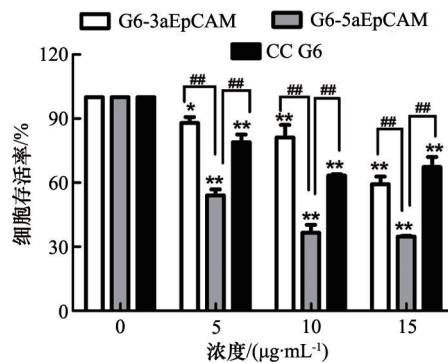


图6 G6-aEpCAM络合物对悬浮细胞的识别和捕获图像
Fig. 6 Fluorescence images of the suspensory cells recognized and captured by G6-aEpCAM conjugates



*和**表示样品组和对照组的差异;#和##表示同一样品不同浓度间的差异;*和#表示存在显著性差异($P < 0.05$);**和##表示存在极显著差异($P < 0.01$)。下同。

图7 G6-aEpCAM络合物随浓度增加对HT29细胞株的增殖抑制作用

Fig. 7 Anti-proliferation effects of G6-aEpCAM conjugates on HT29 cells at various concentrations

2.5 络合物对HT29细胞周期的阻滞作用

正常分裂的细胞周期是指从上一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成,一般包含G₁期、S期、G₂期、M期4个阶段。当药物作用后,会直接影响细胞周期素依赖性激酶(CDK)的表达,导致细胞周期调控发生紊乱,使细胞分裂阻断在某一特定阶段,从而影响细胞的生长。而G6-aEpCAM络合物如何影响所捕获的HT29细胞的生长,研究采用流式细胞仪来定量分析细胞的周期分布状况。HT29细胞经过48 h的G6-aEpCAM络合物(0, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理后用PI染色,后测定其在G₀/G₁、S和G₂/M期的细胞分布百分比。

图8显示,空白对照组中G₀/G₁期细胞数占细胞总数的69.86%,S期占23.98%,G₂/M期占6.16%。而用络合物处理后的HT29细胞,随络合物浓度从10 μg/mL增加到20 μg/mL,S期细胞百分比呈现浓度依赖性递增但增长率最大为14%。

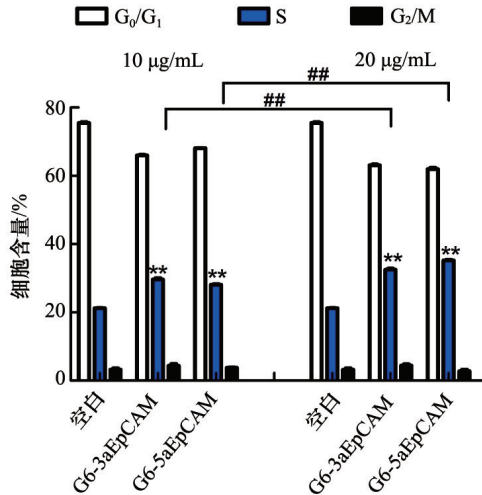


图8 G6-aEpCAM络合物对HT29细胞周期各个时期的分布
Fig. 8 Distribution of cell population in every phase (G₀/G₁, S, G₂/M) induced by G6-aEpCAM conjugates

同时,G₀/G₁期细胞百分比显著下降,而G₂/M期,细胞虽呈现下降趋势,但未有显著变化。故整体分析可知,包被抗体后的纳米材料可轻微影响细胞周期各个时期的分布,阻断细胞生长在S期,避免细胞分裂过早地进入G₂/M期,从而抑制所捕获靶细胞的活性。

2.6 络合物对HT29细胞的形态学改变

为了定性观察络合物对捕获的HT29细胞的凋亡和坏死情况的影响,研究采用AO/EB双染法初步判断HT29细胞的凋亡状态。AO能透过胞膜完整的细胞,嵌入细胞核DNA,使之发出明亮的绿色荧光。EB能透过胞膜受损的细胞,嵌入核DNA,发出橘红色荧光。在荧光显微镜下观察可知(图9),未经络合物处理的细胞呈现清晰的细胞结构,保持细胞核、细胞器和质膜的完整性,细胞表面呈现均匀的绿色荧光。用CC G6处理过的细胞作为阴性对照,可发现即使在最高浓度20 μg/mL下,CC G6对细胞的活性和形态结构并没有产生太大的影响。而对比用G6-aEpCAM络合物处理过的细胞,则出现染色质着绿色呈固缩状或圆珠状,细胞核边缘模糊的现象,但并未有明显的膜起泡,核碎裂及凋亡小体的出现。可见,aEpCAM抗体包被的纳米材料络合物可抑制所捕获的HT29细胞的活性,最大程度上诱导细胞进入凋亡早期,但不产生强烈的细胞毒性效应。

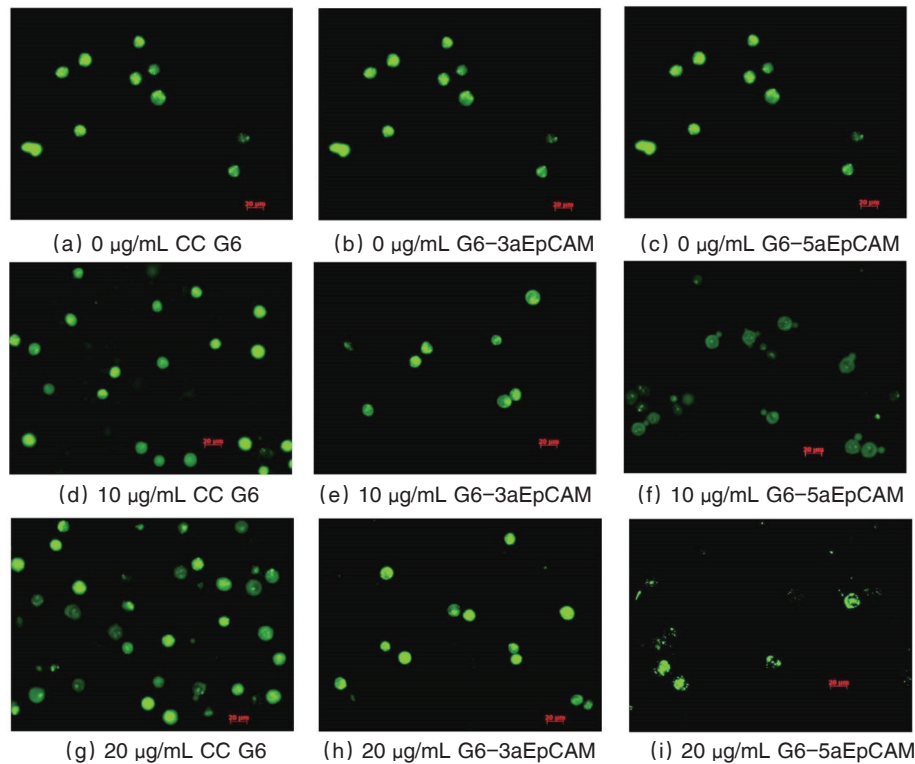


图9 AO/EB染色荧光显微镜下所观察到的络合物作用后的细胞形态学变化

Fig. 9 Morphological change of HT29 cells after treated with conjugates and stained with AO/EB

2.7 络合物对HT29细胞的凋亡影响

为了进一步定量分析络合物对捕获的HT29细胞的凋亡和坏死情况的影响,采用Annexin V-FITC/PI对细胞进行双染标记。流式细胞仪分析通常将细胞分为4个群体:碎片或

死亡的细胞(FITC-PI⁺标记);活细胞(FITC-PI⁻标记);早期凋亡细胞(FITC⁺PI⁺标记);晚期凋亡或坏死的细胞(FITC⁺PI⁺细胞)。图10显示,与正常细胞相比,G6-aEpCAM络合物作用后的细胞,其活细胞数目下降,早期凋亡或坏死细胞数目增

加,增加率在10%左右,且呈现剂量依赖型。而阴性对照CC G6则几乎不导致细胞凋亡,可见细胞早期凋亡现象则主要归因于纳米材料表面所偶联的抗体存在,这也显示了EpCAM受体在结肠癌细胞HT29表面高表达的重要性。可见,aEpCAM包被的纳米材料络合物能轻微下调捕获HT29细胞的活性而不造成细胞严重损伤或死亡,该研究结果与上述细胞活性抑制、细胞形态学改变、细胞周期停滞的程度相一致。

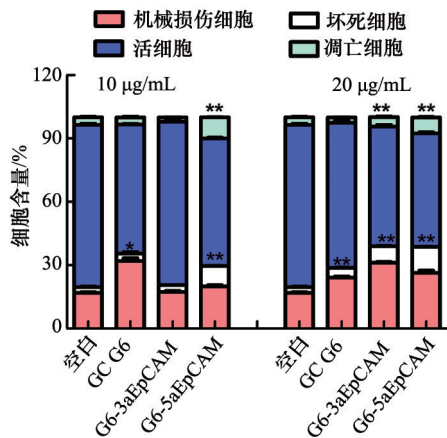


图10 Annexin V-FITC/PI双染检测络合物作用后的细胞凋亡
Fig. 10 Analysis of apoptosis in HT29 cells that exposed to conjugates with Annexin V-FITC/PI staining

3 结论

选取生物安全性高、尺寸小、负载量高、末端基团丰富的G6 PAMAM dendrimers作为基质,研究多价络合物针对结肠癌细胞表面高表达而正常细胞不表达的生物标记物的靶向性抗体。该方法制备的纳米材料络合物具有圆饼状的结构特征,粒径和电势稳定。FTIR和荧光光谱等手段均证明抗体或荧光标记抗体在G6 PAMAM dendrimers表面的成功偶联。应用该络合物可以实现体外高选择性和特异性地识别和捕获目标结肠癌细胞株HT29并下调其活性的目的。这些前期研究为构建新型纳米材料——靶向配体络合物来捕获病人血液中微量CTCs并下调其活性提供了研究思路和策略,同时也为实现肿瘤转移的预警和预防提供了可能。

参考文献 (References)

[1] Eccles S A, Welch D R. Metastasis: Recent discoveries and novel treatment strategies[J]. *Lancet*, 2007, 369(9574): 1742-1757.
 [2] Fidler I J. The pathogenesis of cancer metastasis: The 'seed and soil' hypothesis revisited[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(6): 453-458.
 [3] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61(2): 69-90.
 [4] Klein C A. Cancer. The metastasis cascade[J]. *Science*, 2008, 321(5897): 1785-1787.
 [5] Cristofanilli M, Budd G T, Ellis M J, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. *New England Journal of Medicine*, 2004, 351(8): 781-791.
 [6] Zieglschmid V, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor

cells in peripheral blood[J]. *Critical Reviews Clinical Laboratory Sciences*, 2005, 42(2): 155-196.
 [7] Budd G T, Cristofanilli M, Ellis M J, et al. Circulating tumor cells versus imaging: Predicting overall survival in metastatic breast cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12(21): 6403-6409.
 [8] Pantel K, Brakenhoff R H, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(5): 329-340.
 [9] Arya S K, Lim B, Rahman A R. Enrichment, detection and clinical significance of circulating tumor cells[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(11): 1995-2027.
 [10] Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis [J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1559-1564.
 [11] Cristofanilli M, Hayes D F, Budd G T, et al. Circulating tumor cells: A novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23(7): 1420-1430.
 [12] Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, et al. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2007, 25(33): 5194-5202.
 [13] Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the CellSearch system[J]. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13(3): 920-928.
 [14] Mohamed H, Murray M, Turner J N, et al. Isolation of tumor cells using size and deformation[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(47): 8289-8295.
 [15] Dharmasiri U, Njoroge S K, Witek M A, et al. High-throughput selection, enumeration, electrokinetic manipulation, and molecular profiling of low-abundance circulating tumor cells using a microfluidic system[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(6): 2301-2309.
 [16] Adams A A, Okagbare P I, Feng J, et al. Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(27): 8633-8641.
 [17] Nagrath S, Sequist L V, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology[J]. *Nature*, 2007, 450(7173): 1235-1239.
 [18] Xia X R, Monteiro-Riviere N A, Riviere J E. An index for characterization of nanomaterials in biological systems[J]. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5(9): 671-675.
 [19] Kojima C, Kono K, Maruyama K, et al. Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly (ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs[J]. *Bioconjugate chemistry*, 2000, 11(6): 910-917.
 [20] Luo D, Haverstick K, Belcheva N, et al. Poly (ethylene glycol)-conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible, high-efficiency DNA delivery [J]. *Macromolecules*, 2002, 35(9): 3456-3462.
 [21] Shukla R, Thomas T P, Peters J L, et al. HER2 specific tumor targeting with dendrimer conjugated anti-HER2 mAb[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2006, 17(5): 1109-1115.
 [22] Thomas T P, Patri A K, Myc A, et al. In vitro targeting of synthesized antibody-conjugated dendrimer nanoparticles[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(6): 2269-2274.
 [23] Hong S, Leroueil P R, Majoros I J, et al. The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform[J]. *Chemistry & Biology*, 2007, 14(1): 107-115.
 [24] Myung J H, Gajjar K A, Saric J, et al. Dendrimer-mediated multivalent binding for the enhanced capture of tumor cells[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011, 50(49): 11769-11772.

(责任编辑 吴晓丽)