

黄芪多糖-超顺磁性氧化铁纳米复合物的制备及其诱导巨噬细胞极化的活性研究

黄琳清^{1,2}, 史新萌^{1,2}, 王静蓉^{3,4}, 瞿鼎^{1,2}, 刘玉萍^{1,2*}, 陈彦^{1,2*}

(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028; 2. 江苏省中医药研究院, 中药组分与微生态研究中心, 江苏 南京 210028; 3. 中药质量研究国家重点实验室(澳门科技大学), 澳门 999078; 4. 广州中医药大学第二附属医院, 省部共建中医湿证国家重点实验室, 广东 广州 510120)

摘要: 尺寸与表面修饰物是影响超顺磁性氧化铁纳米 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs) 诱导巨噬细胞极化作用的两个关键因素。粒径越小的 SPIONs 诱导巨噬细胞 M1 极化效果越好, 其次, 采用合理的 SPIONs 表面修饰方法还可达到增强极化效果的目的。本研究使用溶剂热法制备 SPIONs 并采用 Box-Behnken 中心组合实验设计和响应面法优化制备方法, 获得小粒径 SPIONs。以黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 为 SPIONs 亲水性表面修饰物, 通过 EDC/NHS 酯化法成功构建黄芪多糖-超顺磁性氧化铁纳米复合物 (APS-SPIONs)。采用动态光散射仪及红外光谱仪对 APS-SPIONs 的结构进行确证; 采用分光光度法对铁、多糖含量进行表征; 流式细胞术考察 APS-SPIONs 对诱导 RAW264.7 细胞极化的影响; 构建 RAW264.7 巨噬细胞与 HepG2 人肝癌细胞 Transwell 共培养体系, 初步考察给药后巨噬细胞体外杀伤肿瘤细胞的效果, CCK-8 (cell counting kit-8) 法考察 APS-SPIONs 对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 的增殖活性影响。最终成功制得粒径在 (82.93 ± 1.47) nm, zeta 电位为 (-24.00 ± 0.47) mV 的 APS-SPIONs。经检测, 多糖含量为 8.69%, 铁含量为 7.04%。APS-SPIONs 在体外可有效诱导 RAW264.7 向 M1 型极化, 在共培养体系中提高巨噬细胞对肝癌细胞的杀伤能力, 且对巨噬细胞的增殖无抑制作用。本研究为极化巨噬细胞并重塑肿瘤免疫微环境达到杀伤肿瘤作用的药物研发提供策略和方法。

关键词: 磁性氧化铁纳米粒; 黄芪多糖; 巨噬细胞极化; 肿瘤相关巨噬细胞; 纳米药物

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)03-0779-10

Preparation and polarization activity research of astragalus polysaccharide-superparamagnetic iron oxide nanocomposite

HUANG Lin-qing^{1,2}, SHI Xin-meng^{1,2}, WANG Jing-rong^{3,4}, QU Ding^{1,2},
LIU Yu-ping^{1,2*}, CHEN Yan^{1,2*}

(1. *Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;* 2. *Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology Research Center, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;* 3. *State Key Laboratory for Quality Research of Chinese Medicines, Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China;* 4. *State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China*)

Abstract: Size and surface modification are the two key factors affecting the effect of macrophages

收稿日期: 2022-09-15; 修回日期: 2022-10-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173985, 81873017); 江苏省卫生健康委医学科研项目 (K2019007); 中药质量研究国家重点实验室(澳门科技大学) 开放课题 (2R2104).

*通讯作者 Tel: 86-25-85608672, E-mail: ychen202@hotmail.com; liu-yuping@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1059

polarization induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). The smaller the particle size, the better the polarization effect of SPIONs. Besides, the reasonable SPIONs surface modification method can also be used to enhance the polarization effect. In this study, SPIONs was prepared by solvothermal method and optimized by Box-Benhnken center combination design and response surface method. Furthermore, astragalus polysaccharide-superparamagnetic iron oxide nanocomplex (APS-SPIONs) was successfully constructed by EDC/NHS esterification method. The structure of APS-SPIONs was confirmed by dynamic light scatter and infrared spectrometer, and the contents of iron and polysaccharide were characterized by spectrophotometry. The effect of APS-SPIONs on inducing mouse macrophages RAW264.7 polarization was investigated by flow cytometry. The RAW264.7 macrophages-HepG2 human hepatoma cancer cells Transwell co-culture system was established to investigate APS-SPIONs improve anti-tumor function of macrophages *in vitro*, and the proliferation activity of APS-SPIONs on RAW264.7 detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method. The results showed that the average particle size and zeta potential of APS-SPIONs were (82.93 ± 1.47) nm and (-24.00 ± 0.47) mV. Polysaccharide and Fe content were 8.69% and 7.04%, respectively. APS-SPIONs effectively induced the polarization of RAW264.7 into M1 type *in vitro*, improving the anti-tumor ability of macrophages in a co-culture system, without effecting the proliferation of macrophages. Our study provides a drug development strategy and preliminary research results to educate macrophages and reshape the tumor immune microenvironment to achieve tumor-killing effects.

Key words: magnetic iron oxide nanoparticle; astragalus polysaccharide; macrophage polarization; tumor associated macrophage; nanomedicine

超顺磁氧化铁纳米粒 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs) 是一种粒径在 100 nm 以下, 主要结构为 α -Fe₂O₃、 γ -Fe₂O₃ 或 Fe₃O₄ 的无机纳米材料, 因其具有良好的超顺磁性和载药性能而被广泛应用于生物学诊断和治疗领域^[1]。近年研究表明^[2,3], SPIONs 不仅可作为磁共振造影剂, 还可作为化学免疫治疗剂。SPIONs 在体内外均能有效地诱导肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 由促肿瘤的 M2 型向抗肿瘤的 M1 型极化, 显示出增强的抗肿瘤增殖和转移作用。研究发现^[4], SPIONs 的粒径越小 (10~50 nm) 越均匀, 越容易通过内吞作用被 TAMs 摄取, 发挥免疫调控作用。而 SPIONs 的尺寸与制备方法密切相关。共沉淀法是目前制备 SPIONs 最经典的方法, 也是工业大生产中最常见的方法^[5]。但实际操作中发现, 该法制得的 SPIONs 存在粒径分布较宽、均匀度差的问题, 从而制约其作为免疫调节药物的临床应用^[6]。而溶剂热法也是合成 SPIONs 的经典方法之一, 在高温高压下进行, 相较低温环境有利于铁纳米晶体的生长及易于控制产物的粒度^[7]。

除尺寸因素外, SPIONs 的表面修饰物也是影响其发挥免疫作用的重要因素。由于裸 SPIONs 铁核在生理环境下易于聚集, 因此亲水性聚合物的包覆是 SPIONs 应用于生物体内必不可少有效策略。现阶段 SPIONs 的主要表面修饰物为多糖类大分子聚合物, 如葡聚糖^[8]。黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 是一种亲水性中药多糖, 具有丰富的羟基与羧

基。此外, 近年来研究发现其具有调控巨噬细胞向 M1 极化的作用^[9]。一方面 APS 可结合 TAMs 上的 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 及 Notch 通路, 进而激活核因子 κ B p65/丝裂原活化蛋白激酶 (nuclear factor kappa-B p65/mitogen-activated protein kinase, NF- κ B p65/MAPK) 信号通路, 促进 TAMs 标志物如白介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-6、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达上调, 有利于 TAMs 驱动分化为 M1 谱系^[10]; 另一方面 APS 还可通过 TLR4 受体上调 CD40 和 CD80 的表达, 有利于增强免疫应答^[11]。因此, APS 作为 SPIONs 的表面修饰物有利于进一步提升其诱导极化的能力。

综上, 为获得粒径较小且免疫活性较强的氧化铁纳米粒, 本研究采用溶剂热法制备 SPIONs, 以响应面法优化制备方法, 并以 APS 修饰 SPIONs, 构建黄芪多糖-超顺磁性氧化铁纳米复合物 (APS-SPIONs)。对 APS-SPIONs 理化性质进行表征, 并对其体外诱导 RAW264.7 细胞极化活性及在共培养体系中调控巨噬细胞抗肿瘤作用进行研究, 为肿瘤免疫药物的研发提供前期研究基础。

材料与方 法

试剂与耗材 APS (纯度 70%, 批号 C29J9Y53671)、十二水合硫酸铁铵 (批号 20170214)、MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide,

批号 H25N11B130393] (上海源叶公司); 无水乙酸钠 (南京化学试剂厂, 批号 201120486F); 六水合三氯化铁 (默克公司, 批号 C12150140); 丙烯酸钠盐 (批号 RH329968)、*N*-羟基琥珀酰亚胺 (*N*-hydroxysuccinimide, NHS, 批号 RH311354)、EDC [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, 批号 RH292074]、四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB, 批号 RH350577) (上海罗恩试剂公司); 乙二醇 (美国 Sigma 公司, 批号 102414871); CCK8 细胞增殖检测试剂盒 (日本东仁化学公司, 批号 TS545); DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司, 批号 8122331); 胎牛血清 (FBS, 浙江硕华公司, 批号 MU1502); 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 批号 22167100)、青-链霉素混合液 (安徽 Biosharp 公司, 批号 21326990); 细胞因子 IL-4 (美国 PeproTech 公司, 批号 012149); 抗小鼠 Fc 受体阻断剂 (TruStain FcX™ PLUS, 批号 B321333)、抗小鼠 CD206-PE/Cy7 (phycoerythrin/cyanine 7) 抗体 (批号 B353129)、抗小鼠 CD86-APC (allophycocyanin) 抗体 (批号 B317522)、抗小鼠 F4/80-PE 抗体 (批号 B340064) (美国 Biolegend 公司); 二甲基亚砜 (methyl sulfoxide, DMSO, 德国 BioFroxx 公司, 批号 EZ7890A253); 活性氧荧光探针 (DCFH-DA) 试剂盒 (碧云天公司, 批号 101221220303); 0.4 μm Transwell 小室 (美国 Costar 公司, 批号 03822016)。

仪器 动态光散射仪 (DLS, 英国 Malvern 公司); 紫外分光光度计 (上海凤凰光学仪器有限公司); 场发射扫描电镜 (field emission scanning electron microscopy, SEM, 捷克 Tescan 公司); 3.0T 核磁共振扫描仪 (美国通用电气公司); 振动样品磁强计 (美国 LakeShore 公司); 冷冻高速离心机、红外光谱仪、酶标仪 (美国 Thermo 公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); 十万分之一分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 万分之一分析天平 (上海良平仪器有限公司)。

细胞 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 和人肝癌细胞 HepG2 (中国科学院上海细胞库)。

SPIONs 的制备 本实验选用溶剂热法制备 SPIONs, 预实验制备方法如下: 称取无水乙酸钠 0.75 g、丙烯酸钠 0.75 g 及六水合三氯化铁 0.27 g 于 50 mL 圆底烧瓶内, 以一定量乙二醇为溶剂溶解, 磁力搅拌器以 300 r·min⁻¹ 搅拌 12 h 后放入高温烘箱反应。以无水乙醇清洗 3 次反应所得沉淀物, 于 50 °C 真空干燥箱干燥 12 h, 即得。

SPIONs 制备方法的单因素考察 文献^[12]报道经典的溶剂热合成法温度范围在 180~200 °C, 时间范围在 8~20 h。本实验以获得小粒径 SPIONs 为目的进行

制备方法的单因素考察实验, 分别考察不同的反应温度 160、190、220 °C, 反应时间 7、10、13 h, 溶剂体积 12、14、16 mL 对粒径的影响。每组实验重复 3 次, 取平均值考察各因素对 SPIONs 粒径的影响。

Box-Behnken 响应面设计实验优化 SPIONs 制备方法 综合单因素实验结果, 根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 以反应时间 (X_1)、反应温度 (X_2) 和反应溶剂量 (X_3) 为自变量。此外, SPIONs 因具有超顺磁性可在磁共振 (MRI) 下成像, 且粒径越小成像能力越佳, 因此使用 MRI 成像仪对 SPIONs 进行磁共振的横向弛豫时间 (T_2) 表征, 并将其作为评价 SPIONs 的指标之一。因此, 以 SPIONs 的粒径 (Y_1)、多分散系数 (polydispersity index, PDI, Y_2) 及 T_2 (Y_3) 为评价指标, 并使用 Hassan 法^[13]对 3 个指标进行归一化处理, 按公式 (1、2) 进行计算, 得到总评归一值 (overall desirability, OD)。

$$d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min}) \quad (1)$$

其中, Y_i 为指标中第 i 个值, Y_{\min} 为指标中最小值, Y_{\max} 为指标中最大值, d_i 为一个单指标中第 i 个值。

$$OD = (d_1 + d_2 + d_3) / 3 \quad (2)$$

其中, d_1 为 SPIONs 的粒径值, d_2 为 SPIONs 的多分散系数值, d_3 为 SPIONs 的横向弛豫时间 (T_2) 值。

应用 Design Expert 8.0.6.1 软件处理数据并进行结果分析, 拟合出此溶剂热法制备 SPIONs 的最优合成条件。

EDC/NHS 法制备 APS-SPIONs 精密称取 SPIONs 40 mg 及 EDC 40 mg, 置于 100 mL 圆底烧瓶, 加入 30 mL 醋酸钠缓冲液 (pH 5) 溶解, 避光搅拌 30 min 后, 加入 20 mg NHS 及 20 mg APS 避光搅拌过夜。使用 10 kDa 透析袋透析 36 h 后, 以 13 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 反复 3 次, 冷冻干燥即得。

SPIONs 及 APS-SPIONs 的理化性质表征

粒径与 zeta 电位 取 SPIONs、APS-SPIONs 水溶液超声后使用马尔文粒径仪进行粒径及 zeta 电位测量。取微量 SPIONs、APS-SPIONs 乙醇溶液滴于铜片上, 干燥后镀金膜在 SEM 下观察其外貌形态及尺寸。

红外光谱 以 KBr 压片法对 SPIONs、APS-SPIONs 进行红外光谱分析, 光谱波长记录范围为 4 000~400 cm⁻¹, 分辨率为 2 cm⁻¹。

超顺磁性测试 取适量 SPIONs、APS-SPIONs 粉末在室温条件下使用振动样品磁化强度计, 磁场变化为 ± 2T, 逐渐加大磁场强度, 观察样品磁化强度值变化, 直至样品的磁化强度值不再增加为止, 输出磁化曲线相关数据, 绘制磁化曲线^[14]。

APS-SPIONs 的铁含量测定

铁含量标准曲线的绘制 精密称取十二水合硫酸

铁铵 20.00 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加入 2 mL 盐酸溶液 ($6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 加超纯水稀释定容至刻度, 得质量浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的铁标准储备溶液。精密移取铁标准储备溶液 0、0.8、1.2、1.6、2.4、2.8 mL 于 50 mL 量瓶中, 加入 10% 盐酸羟胺溶液 1 mL, 超声 5 min, 然后依次加入 2 mL 0.15% 邻二氮菲溶液及 5 mL 醋酸-醋酸钠缓冲溶液 (pH 5), 静置 0.5 h, 加超纯水定容至刻度。在 510 nm 下测定吸光度 (A) 值, 以铁浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标, A 值为纵坐标, 绘制标准曲线为 $y = 0.198 2x - 0.001 6$, $R^2 = 0.999 5$ 。

样品中铁浓度的测定 吸取 1 mL APS-SPIONs 溶液 ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 于 10 mL 量瓶, 加入 3 mL 盐酸超声 20 min, 以超纯水定容。然后从中吸取 1 mL 加入 50 mL 量瓶, 自“铁含量标准曲线的绘制”项下“加入 10% 盐酸羟胺溶液 1 mL”起, 同法操作。

APS-SPIONs 的总多糖含量测定

葡萄糖标准曲线的绘制 精密称取干燥恒重的葡萄糖 10.00 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 配成 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准品溶液。分别取上述标准葡萄糖溶液 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL, 加蒸馏水补足至 2.0 mL 并摇匀。然后依次加入硫酸蒽酮溶液 6 mL, 置沸水浴中反应 15 min, 取出后置冰水中迅速冷却 15 min, 626 nm 下测定 A 值, 以葡萄糖浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标, A 值为纵坐标, 绘制标准曲线为 $y = 31.80x - 0.003 853$, $R^2 = 0.999 8$ 。

样品中总多糖含量的测定 取 3 mg APS-SPIONs 冻干粉置于干燥的具塞试管中加 2 mL 纯水溶解, 自“葡萄糖标准曲线的绘制”项下方法中加入硫酸蒽酮溶液 6 mL 起, 同法测定。

APS-SPIONs 类过氧化物酶活性测定 以 TMB 为过氧化物酶底物, 在过量 H_2O_2 存在和酸性 pH 环境下, 通过监测 650 nm 处氧化 TMB (oxTMB) 的 A 值来反映该催化反应的变化^[15]。移取 2 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 3.6) 及 100 μL 样品溶液于具塞试管中混匀, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅平衡温度到 37 $^\circ\text{C}$, 加入 100 μL TMB 的 DMSO 溶液 ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。孵育 60 s, 加入 200 μL 30% H_2O_2 充分混匀。在反应 5 min 后取适量液体测量在 650 nm 下 A 值的变化。

APS-SPIONs 对诱导 RAW264.7 细胞向 M1 型极化的影响 调整对数生长期的 RAW264.7 细胞密度为每毫升 1×10^5 个, 每孔接种 1 mL 于 6 孔板, 置于培养箱中培养 12 h, 每孔加入 $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 IL-4 诱导 24 h。将细胞分为 SPIONs 组 ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、APS 组 ($125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、APS-SPIONs 组 ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 同时以 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 为阳性对照组, 孵育 24 h。以 PBS 润洗 2 次, 加入

1 mL 含 0.2% FBS 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 轻柔吹打制成细胞悬液, $500 \times g$ 离心 5 min。弃上清, 加入 1 mL 含 0.2% FBS 的 PBS 重悬, 加入 1 μL Fc 受体阻断剂 4 $^\circ\text{C}$ 孵育 10 min。孵育结束, 向细胞悬液中加入 1 μL CD86-PE 抗体、0.6 μL CD206-APC 抗体、1 μL F4/80-PE/Cy7 抗体, 4 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min。孵育结束, 用含 2% FBS 的 PBS 洗细胞 2 次, 加入 300 μL 含 2% FBS 的 PBS 重悬, 用流式细胞仪进行检测和分析。

APS-SPIONs 调控 RAW264.7 胞内活性氧 (ROS) 水平 调整对数生长期的 RAW264.7 细胞密度为每毫升 1×10^5 个, 每孔接种 1 mL 于 6 孔板, 置于培养箱中培养 12 h, 每孔加入 $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ IL-4 诱导 24 h。将细胞分为 SPIONs 组 ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、APS 组 ($125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、APS-SPIONs 组 ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 同时以 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 为阳性对照组, 孵育 24 h。吸出上清液, 以 PBS 润洗 1 次, 每孔加入 1 mL DCFH-DA 的 DMEM 溶液, 于培养箱孵育 30 min。再以 PBS 清洗 2 次, 加入 1 mL 含 0.2% FBS 的 PBS 轻柔吹打制成细胞悬液, $500 \times g$ 离心 5 min。弃上清, 加入 200 μL 含 0.2% FBS 的 PBS 重悬, 用流式细胞仪进行检测和分析。

APS-SPIONs 诱导 RAW264.7 细胞杀伤肿瘤细胞的影响 将 RAW264.7 以 3×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板 0.4 μm Transwell 上室, 以 IL-4 诱导 24 h, 再将 HepG2 以 1×10^5 个/孔的密度接种于下室, 培养 12 h 使其贴壁。以 DMEM 培养基配制 SPIONs、APS、APS-SPIONs 含药培养基, 将细胞分为 SPIONs 组 ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、APS 组 ($125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、APS-SPIONs 组 ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 同时以 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 为阳性对照组, 孵育 24 h。培养 24 h 后弃上清, 以 1 mL PBS 清洗 2 次, 每孔加 500 μL DMEM 培养基与 10 μL MTT 试剂避光孵育 4 h, 加入 DMSO 于 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 10 min 并用酶标仪测定在 490 nm 的 A 值, 通过公式 (3) 计算 RAW264.7 的细胞活性。

细胞活性 (%) =

$$\frac{(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}})}{(A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})} \times 100\% \quad (3)$$

APS-SPIONs 的细胞毒性评价 调整对数生长期的 RAW264.7 细胞密度为每毫升 1×10^5 个, 每孔接种 50 μL 于 96 孔板, 加入不同浓度的 APS、SPIONs、APS-SPIONs, 使终浓度分别为 12.5、25、50、125、250、500、750、1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 同时以不含药的 DMEM 基础培养基作为对照, 以不含细胞加同体积培养基为空白对照组。置 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 每孔各加入 CCK8 溶液 10 μL , 在培养箱中孵育 2 h, 用酶标仪测定 RAW264.7 在 450 nm 的 A 值, 细胞活性计算方式同公式 (3)。

统计学方法 对于响应面模型的显著性统计和回归方程式, 采用 Design Expert 8.0.6.1 软件进行分析; 对于免疫相关数据, 采用 Prism GraphPad 软件进行作图及分析, 通过单因素方差 one-way ANOVA 分析比较多组间的值以确定统计学上显著性差异, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

结果

1 SPIONs 制备方法的优化

1.1 SPIONs 制备方法的单因素考察 在二乙二醇及高温高压的环境下, Fe^{3+} 部分还原成 Fe^{2+} , Fe^{3+} 与 Fe^{2+} 水解形成 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 与 $\text{Fe}(\text{OH})_2$ 并形成 Fe_3O_4 铁核。随反应时间增加, SPIONs 粒径有下降趋势 (图 1A), 符合晶体生长机制, 这可能是 Fe_3O_4 铁核的熟化形成了小粒径的纳米粒。丙酸钠作为表面活性剂, 可为铁核表面带上负电荷, 将晶粒连接在一起, 温度上升后, SPIONs 粒径有明显下降, 这可能是由于晶粒的进一步熟化, 以及在体系中的布朗运动加剧摆脱了丙酸钠的限制。在 190 与 220 °C 下纳米粒粒径继续减小但没有显著差异, 因此选择不再向下进行实验 (图 1B)。随着反应溶剂体积的增加, SPIONs 粒径呈下降趋势, 且在二乙二醇体积为 14 mL 时, 粒径达到最小为 16 nm (图 1C)。这可能是由于溶剂体积增加, 铁纳米生成的晶核更易在体系内均匀分散, 但体积增加后铁纳米粒径有增加趋势, 因此选择此范围进行优化。

1.2 Box-Behnken 实验模型及结果分析 使用响应面模型评价实验结果, 利用软件分析各变量对 SPIONs 粒径的影响效果, 并进行多项式回归拟合, 建立反应时间、反应温度和反应溶剂体积为评价指标, 以 OD 值评分为响应值对实验结果进行回归方程拟合得到二次多项回归方程为: $Y = -29.89 - 0.12X_1 + 0.21X_2 + 1.64X_3 - 5.25 \times 10^{-4}X_1X_2 + 0.01X_1X_3 - 1.50 \times 10^{-3}X_2X_3 + 9.91 \times 10^{-4}X_1^2 - 4.79 \times 10^{-4}X_2^2 - 0.05X_3^2$ 。回归方程的方差分析表明模型的 F 值为 8.24 ($P < 0.001$), 失拟项为 0.650 6 ($P > 0.05$), 差异不显著, 表明该二次多项回归方程选用适当, 该模

型总决定系数 $R^2 = 0.9137$, 说明实验结果与理论预测值相关性较高, 以上各参数表明实验结果具有显著性差异, 模型成立, 可用于 SPIONs 处方优化条件的预测和分析。考察因素水平、实验设计及结果见表 1。

Table 1 Experimental design and results of Box-Behnken response surface. X_1 : Reaction time; X_2 : Reaction temperature; X_3 : Solvent volume; Y_1 : Particle size; Y_2 : Polydispersity index (PDI); Y_3 : Transverse relaxation time (T2)

| Number | X_1/h | $X_2/^\circ\text{C}$ | X_3/mL | Y_1/nm | Y_2 | Y_3/ms |
|--------|----------------|----------------------|-----------------|-----------------|-------|-----------------|
| 1 | 13 | 190 | 16 | 24.86 | 0.367 | 744.097 |
| 2 | 7 | 160 | 14 | 20.89 | 0.370 | 1 188.200 |
| 3 | 7 | 190 | 12 | 30.83 | 0.322 | 724.617 |
| 4 | 10 | 190 | 14 | 29.24 | 0.292 | 511.933 |
| 5 | 10 | 220 | 12 | 45.11 | 0.331 | 429.393 |
| 6 | 10 | 160 | 16 | 23.84 | 0.327 | 1 185.360 |
| 7 | 10 | 220 | 16 | 33.93 | 0.451 | 548.640 |
| 8 | 13 | 160 | 14 | 31.92 | 0.415 | 1 149.100 |
| 9 | 10 | 190 | 14 | 34.00 | 0.265 | 806.760 |
| 10 | 7 | 190 | 16 | 19.72 | 0.321 | 1 035.900 |
| 11 | 10 | 190 | 14 | 20.08 | 0.258 | 840.330 |
| 12 | 10 | 190 | 14 | 34.76 | 0.307 | 733.397 |
| 13 | 10 | 190 | 14 | 19.12 | 0.287 | 526.000 |
| 14 | 13 | 190 | 12 | 42.05 | 0.368 | 569.877 |
| 15 | 10 | 160 | 12 | 21.18 | 0.421 | 1 259.440 |
| 16 | 7 | 220 | 14 | 24.09 | 0.393 | 895.323 |
| 17 | 13 | 220 | 14 | 34.67 | 0.445 | 764.150 |

SPIONs 制备条件的等高线及响应面分析见图 2, 图 2A、B 表示反应时间和溶剂量对 SPIONs 的影响。当反应温度固定为 190 °C 时, 反应时间等高线密度高于溶剂量, 即反应时间对 SPIONs 影响较大; 图 2C、D 表示反应时间和反应温度对 SPIONs 的影响, 当溶剂量固定为 14 mL 时, 反应温度的等高线密度高于反应时间, 即反应温度对 SPIONs 影响较大; 图 2E、F 表示反应温度和溶剂量对 SPIONs 的影响, 当反应时间固定为 10 h 时, 反应温度等高线密度高于溶剂量, 即反应温度对 SPIONs 影响较大。各因素对 SPIONs 的影响排序为反应温度 > 反应时间 > 溶剂量。图 2A、C、E 的等高线图坡面较陡, 表明反应时间和溶剂量、反应时间和反应温度、反应温度与溶剂体积间交互作用较强, 对

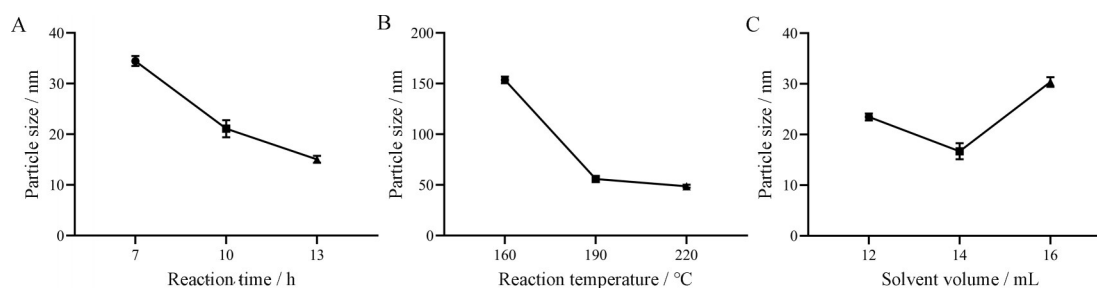


Figure 1 Effects of reaction time (A), reaction temperature (B), solvent volume (C) on the superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) particle size

SPIONs制备方法的影响较大。

1.3 Box-Behnken 法组合优化条件的验证实验 运用 Design Expert 8.0.6.1 软件预测 SPIONs 制备方法的理论最佳条件为反应温度 190 °C、反应时间 7 h 和溶液体积 14 mL。此条件下重复 3 次实验, 所得 SPIONs 粒径在 24.06 nm, 此条件下由回归方程所得的 SPIONs 的理论粒径预测值为 24.73 nm。相对误差为 2.71%, 证明该模型拟合度高, 所得到的 SPIONs 工艺优化条件参数可靠。

2 SPIONs 及 APS-SPIONs 的理化性质表征

在 SEM 下可见 SPIONs 与 APS-SPIONs 呈类球形, 分布均一, 粒径分别在 10 及 30 nm 左右。激光粒度仪测得 SPIONs 平均粒径为 (24.06 ± 5.39) nm, zeta 电位为 (-52.30 ± 1.82) mV, PDI 为 0.263 ± 0.001 , 粒径适中且分布较窄; APS 修饰后, APS-SPIONs 比裸 SPIONs 在水中均一性增加, PDI 为 0.045 ± 0.018 , 粒径为 (82.93 ± 1.47) nm, zeta 电位有所下降, 为 (-24.00 ± 0.47) mV (图 3A、B)。邻二氮菲法测得 SPIONs 铁含量为 15.03%, APS-SPIONs 铁含量为 7.04%, 硫酸蒽酮法测得 APS-SPIONs 总多糖含量为 8.69%。

红外光谱下可见 SPIONs 及 APS-SPIONs 在 597 cm^{-1} 处均有 Fe-O 键的特征吸收峰^[16], 其中 SPIONs 在 $1\ 617\text{ cm}^{-1}$ 处有羧酸根离子的吸收峰, 在 $3\ 551\text{ cm}^{-1}$ 处有羟基的吸收峰, 表明所制备的 SPIONs 为 Fe_3O_4 且表面有羧基及羟基。在图 3C 中, 可见 APS-SPIONs 在 $1\ 715\text{ cm}^{-1}$ 处有一尖峰, 为 C=O 键的峰, $1\ 024\text{ cm}^{-1}$ 处为 C-O-C 的不对称伸缩振动^[17], 因此综合判断 APS 与

SPIONs 除了配位键结合外还可能通过酯键结合。

磁滞回线结果如图 3D 所示, 随着外加磁场强度的提高, 样品的磁化强度值相应增大, 当外加磁场达到 20 kG 时, 样品的磁化强度不再变化, 说明已达到磁饱和, SPIONs 的饱和磁化强度为 $17.08\text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$, APS-SPIONs 的饱和磁化强度为 $6.74\text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ 。撤除外加磁场后, 样品的剩余磁感应强度 (Br) 与磁感应矫顽力 (Hc) 接近零, 即无剩磁。此外, 在整个外加磁场的变化过程中 ($-20\sim 20\text{ kG}$), 没有明显的磁滞回环, 磁滞曲线呈现经典的 S 形。以上结果说明, 合成的 SPIONs 与 APS-SPIONs 具有超顺磁特性, APS-SPIONs 饱和磁化强度弱于 SPIONs, 可能加入 APS 后铁离子在制剂中的浓度下降所导致的。

3 APS-SPIONs 的类过氧化物酶活性测定

如图 4A 所示, SPIONs 在酸性环境下释放的 Fe^{2+} 与 H_2O_2 反应产生羟基自由基, 并氧化 TMB 为 oxTMB, 溶液变成蓝色。如图 4B、C 所示, SPIONs 及 APS-SPIONs 加入体系后迅速发生反应, 在 650 nm 处出现 oxTMB 的最大吸收峰, 与此同时, 空白对照组与 APS 组无明显反应, 颜色也远浅于 SPIONs 及 APS-SPIONs 组。结果表明, SPIONs 与 APS-SPIONs 有一定催化 H_2O_2 生成羟基自由基的能力, 且 APS 的加入不会让 SPIONs 类过氧化物酶活性大幅下降。上述结果可为 APS-SPIONs 在细胞内通过 Fenton 反应与内源性 H_2O_2 反应生成 ROS, 诱导巨噬细胞极化提供依据。

4 APS-SPIONs 诱导 RAW264.7 细胞向 M1 型极化

M0 型巨噬细胞可被 IL-4 诱导成为 M2 型, 被 LPS

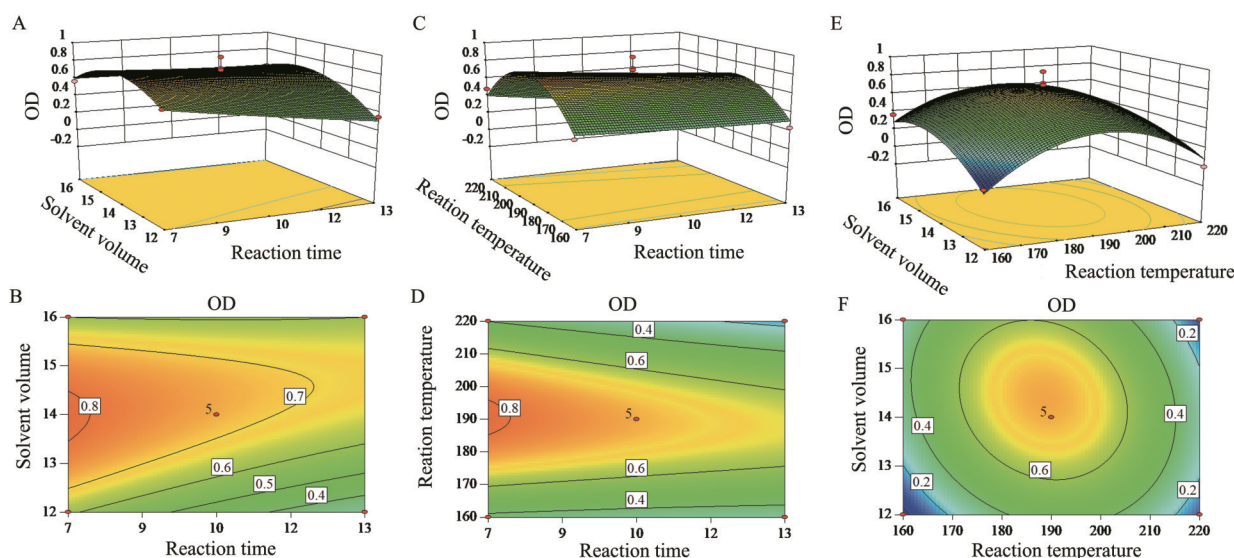


Figure 2 Response surface (A) and contour plots (B) showing the effect of reaction time and solvent volume on the synthesis of SPIONs; response surface (C) and contour plots (D) showing the effect of reaction time and reaction temperature on the synthesis of SPIONs; response surface (E) and contour plots (F) showing the effect of reaction temperature and solvent volume on the synthesis of SPIONs. OD: Overall desirability

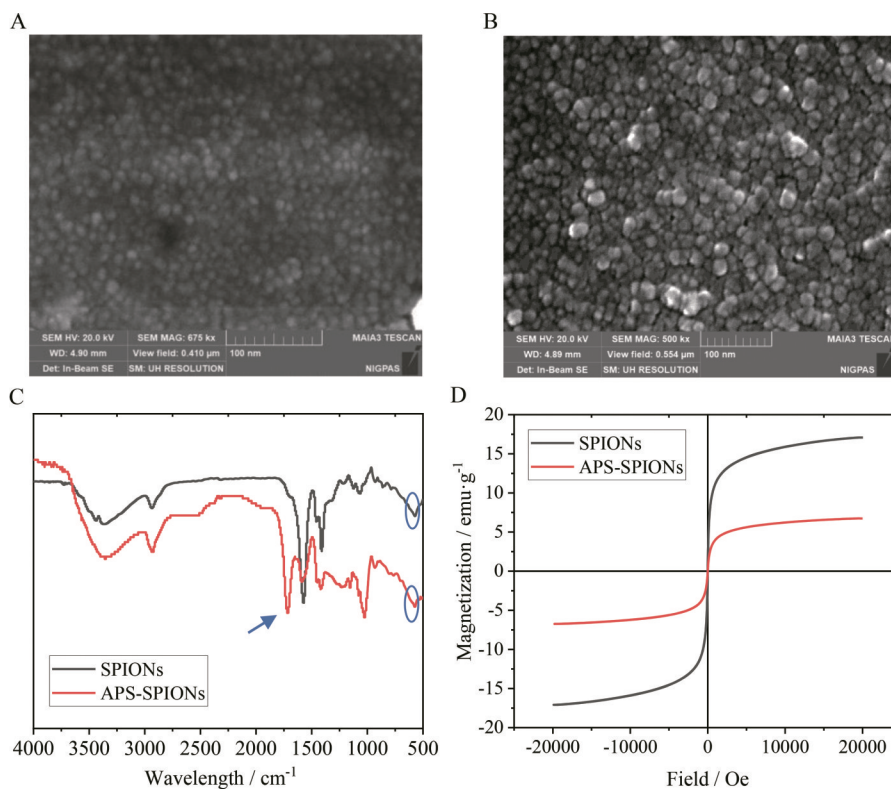


Figure 3 Characterization of SPIONs and astragalus polysaccharide (APS)-SPIONs. A, B: Field emission scanning electron microscopy (SEM) images of the SPIONs (A) and APS-SPIONs (B); C: Hysteresis regression curve of SPIONs and APS-SPIONs; D: Infrared spectrum of SPIONs

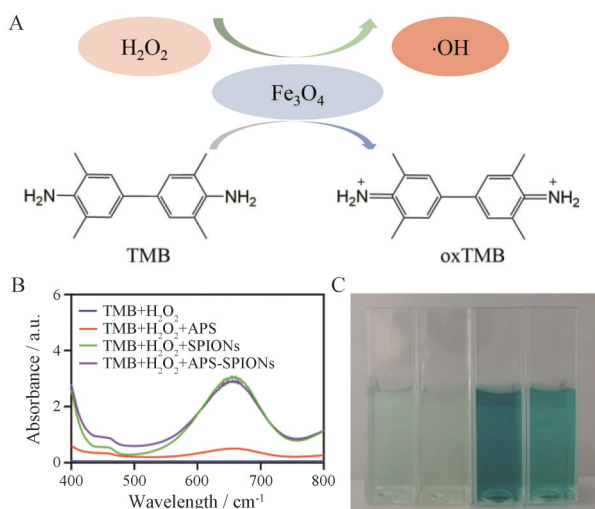


Figure 4 Determination of peroxidase activity of APS-SPIONs. A: The catalytic mechanism of the peroxidase activity of the Fe_3O_4 nanozyme; B: Typical absorption curves of oxTMB at 652 nm in the reaction; C: Different group color changing images in the reaction (from left to right: Blank, APS, SPIONs, APS-SPIONs). TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine; oxTMB: Oxidized TMB

诱导成 M1 型。诱导成为 M2 型的巨噬细胞也可被 LPS 或药物极化为 M1 型。从形态学上来看, M0 型巨噬细胞与 M2 型巨噬细胞较为相似, 为圆形, 而 M1 型

巨噬细胞主要呈短梭形, 给药后细胞部分见图 5A。M1 型巨噬细胞主要表达 $\text{F4/80}^+\text{CD86}^+$, 结果表明 (图 5B、C), APS、SPIONs、APS-SPIONs 给药后, M1 型细胞标志物水平上升, 与对照组 M1 型细胞标志物相比, SPIONs 组是其 1.52 倍, APS 组是其 5.44 倍, APS-SPIONs 组是其 6.49 倍, 表明 APS-SPIONs 可在体外成功诱导巨噬细胞极化为 M1 表型。

5 APS-SPIONs 上调 RAW264.7 细胞胞内 ROS 水平

ROS 水平是影响巨噬细胞极化的重要因素。结果如图 6 所示, APS、SPIONs、APS-SPIONs 均能提升 RAW264.7 胞内 ROS 水平, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。其中 APS-SPIONs 组 ROS 在所有实验组中含量最高。

6 APS-SPIONs 诱导 RAW264.7 细胞杀伤肿瘤细胞

如图 7A 所示, 以 1:3 比例, 将 HepG2 细胞接种在下层, 巨噬细胞接种在 $0.4 \mu\text{m}$ 的腔室微孔膜上。通过 MTT 法评估下室肿瘤细胞的活力。结果显示, APS-SPIONs 组发挥协同杀伤作用, 细胞活力为 35.84%。APS 组及 SPIONs 组的细胞存活率分别为 82.34% 及 69.59%, 远高于 APS-SPIONs 组 (图 7B)。因此, APS-SPIONs 可有效地促进巨噬细胞抑制 HepG2

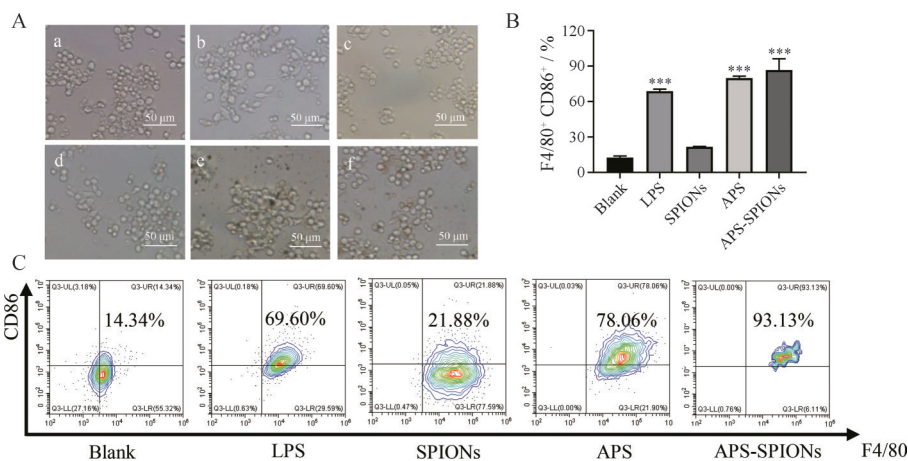


Figure 5 The polarization effect of macrophages *in vitro*. A: Morphology of uninduced RAW264.7 cell (a), morphology of RAW264.7 cell induced to M1 type by lipopolysaccharide (LPS, b), M2 type by interleukin (IL)-4 (c), and treated with APS (d), SPIONs (e) and APS-SPIONs (f). Scale bar: 50 μm; B: Percentage of F4/80⁺ CD86⁺ cells; C: Flow cytometry analysis of the frequency of RAW264.7 cell treated with DMEM medium (blank), LPS, SPIONs, APS or APS-SPIONs. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. ****P* < 0.001 vs blank group

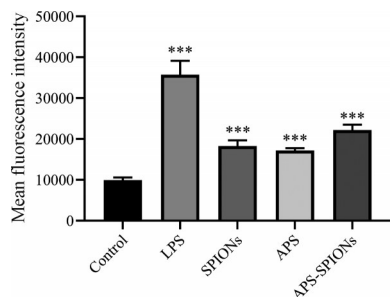


Figure 6 APS-SPIONs regulates intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in RAW264.7 cells. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. ****P* < 0.001 vs control group

细胞生长, 表明体内抗肿瘤的可行性。

7 SPIONs 及 APS-SPIONs 对 RAW264.7 的细胞毒性实验

数据显示, 随着 SPIONs 浓度增长, 细胞活性有所下降, 但仍属于安全范围。而 APS-SPIONs 在实验浓度范围内对巨噬细胞无细胞毒性作用, 且在一定程度上能促进巨噬细胞的活力增长, 表明其具有良好的细胞相容性 (图 8)。

讨论

溶剂热法得益于高温高压的环境, 制备所得 SPIONs 形貌更易控制、均一性较好。在溶剂热法合成 SPIONs 的单因素实验考察中发现, 反应温度与反应时间的提高有利于铁纳米的熟化结晶, 反应溶剂体积的增加有利于形成小粒径的铁纳米。进一步使用响应面法对其制备方法进行优化, 有效改善了前期合成 SPIONs 时粒径分布不均的缺点, 可得到小粒径且分布均一的 SPIONs。

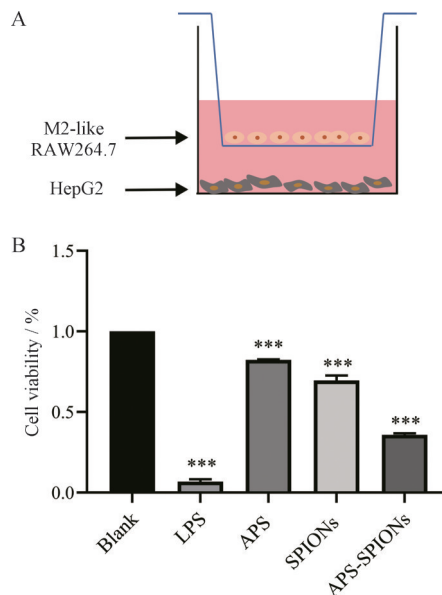


Figure 7 RAW264.7 and HepG2 co-culture system. A: Schematic of the co-culture system, HepG2 cells were seeded on the lower layer and macrophages were seeded on the 0.4 μm sized microporous membrane of chamber at the ratio of 1:3; B: Cell viability assessment of the lower HepG2 cells in the co-culture system. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. ****P* < 0.001 vs blank group

选用表面具有丰富羟基与羧基的 APS 对 SPIONs 进行修饰, 提升了 SPIONs 的水分散性。使用 DLS 测量 SPIONs 及 APS-SPIONs 的粒径为其水合粒径, 会受到纳米粒水化层的影响, SPIONs 的水化层较薄, 加入亲水性好的 APS 后 APS-SPIONs 的亲水性增加, 在水中的水化层亦增加。进一步使用 SEM 观察发现, 干燥的 SPIONs 与其 DLS 结果相差无几, 而干燥的 APS-SPIONs 粒径, 由于失去水的影响, 真实粒径为

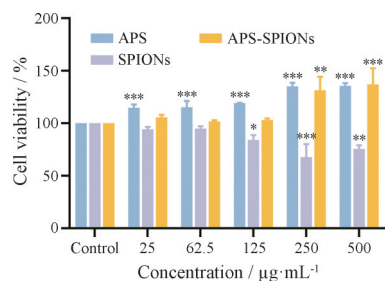


Figure 8 Cell viability assessment of RAW264.7 cells treated with APS, SPIONs, APS-SPIONs. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

30 nm 左右。APS 的加入对 SPIONs 超顺磁性及类过氧化物酶活性没有引起大幅度的下降。

SPIONs 的细胞毒性与其细胞摄取动力学及胞内铁水平密切相关。SPIONs 被巨噬细胞摄取后转运至溶酶体并进一步降解为 Fe^{2+} 与 Fe^{3+} 离子, 并释放至胞质进行 Fenton 反应或被储存在铁蛋白内。本研究中, SPIONs 使巨噬细胞的活性有所下降, 可能与其胞内释放铁离子水平超出巨噬细胞铁稳态有关^[18]。如结果所示, APS-SPIONs 提升了巨噬细胞增殖活性, 可能是 APS-SPIONs 调整了制剂中铁含量, 而铁是与线粒体呼吸作用等细胞生命活动密切相关的元素, 控制在合理范围内有利于细胞生命活动便能促进其增殖。本身具有诱导巨噬细胞极化作用的 APS 与 SPIONs 构成 APS-SPIONs 后, 可协同发挥诱导巨噬细胞 M1 极化作用, 是 SPIONs 组的 4.26 倍, 其给药后胞内 ROS 水平也较其余组更高。进一步使用 Transwell 共培养室用于模拟肿瘤微环境, 对 APS-SPIONs 在体外进行巨噬细胞极化后肿瘤细胞的杀伤作用的实验初步验证, 为其进一步改善体内肿瘤免疫微环境达到杀伤肿瘤作用提供前期研究依据。

综上所述, 本研究中优化后的 SPIONs 制备方法简单可行, 可制得粒径小且均一的 SPIONs。APS-SPIONs 粒径小且分散性好, 并具有良好的极化效果及诱导巨噬细胞抗肿瘤的能力。本研究为肿瘤免疫药物的研发提供了前期研究基础。

作者贡献: 黄琳清负责全部实验内容与结果处理, 并负责文章撰写与修改; 史新萌、瞿鼎提供优化 SPIONs 制备方法思路; 王静蓉、刘玉萍负责文章修改; 陈彦负责实验方案设计、实验指导与结果审核、文章修改与审核。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

[1] Dadfar SM, Roemhild K, Drude NI, et al. Iron oxide nanoparticles: diagnostic, therapeutic and theranostic applications [J]. Adv

Drug Deliv Rev, 2019, 138: 302-325.

[2] Liao ZX, Ou DL, Hsieh MJ, et al. Synergistic effect of repolarization of M2 to M1 macrophages induced by iron oxide nanoparticles combined with lactate oxidase [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 13346.

[3] Wallyn J, Anton N, Vandamme VF. Synthesis, principles, and properties of magnetite nanoparticles for *in vivo* imaging applications—a review [J]. Pharmaceutics, 2019, 11: 601.

[4] Zhang W, Cao S, Liang S, et al. Differently charged superparamagnetic iron oxide nanoparticles preferentially induced M1-like phenotype of macrophages [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 537.

[5] Liu DM, Dong C, Zhong J, et al. Facile preparation of chitosan modified magnetic kaolin by one-pot coprecipitation method for efficient removal of methyl orange [J]. Carbohydr Polym, 2020, 245: 16572.

[6] Chen B, Guo Z, Guo C, et al. Moderate cooling coprecipitation for extremely small iron oxide as a pH dependent T1-MRI contrast agent [J]. Nanoscale, 2020, 12: 5521-5532.

[7] Liang S, Shi S, Zhang H, et al. One-pot solvothermal synthesis of magnetic biochar from waste biomass: formation mechanism and efficient adsorption of Cr(VI) in an aqueous solution [J]. Sci Total Environ, 2019, 695: 133886.

[8] Gao S, Torrente-Rodríguez RM, Pedrero M, et al. Dextran-coated nanoparticles as immunosensing platforms: consideration of polyaldehyde density, nanoparticle size and functionality [J]. Talanta, 2022, 247: 123549.

[9] Han T, Chen Y, Qu D. Research progress of natural polysaccharides and their nano-sized drug delivery systems in regulating tumor microenvironment [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 3212-3223.

[10] Wei W, Li ZP, Bian ZX, et al. Astragalus polysaccharide RAP induces macrophage phenotype polarization to M1 *via* the Notch signaling pathway [J]. Molecules, 2019, 24: 2016.

[11] Feng S, Ding H, Liu L, et al. Astragalus polysaccharide enhances the immune function of RAW264.7 macrophages *via* the NF- κ B p65/MAPK signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2021, 21: 20.

[12] Rafienia M, Bigham A, Hassanzadeh-Tabrizi SA. Solvothermal synthesis of magnetic spinel ferrites [J]. J Med Signals Sens, 2018, 8: 108-118.

[13] Li SL, Duan Q, Zhao ZD, et al. Bottom-up preparation process optimization and prescription screening for β -asarone lipid cubic liquid crystal nanoparticles [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 7464-7472.

[14] Krasitskaya VV, Kudryavtsev AN, Yaroslavtsev RN, et al. Starch-coated magnetic iron oxide nanoparticles for affinity purification of recombinant proteins [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 5410.

[15] Wang M, Chang M, Li C, et al. Tumor-microenvironment-activated reactive oxygen species amplifier for enzymatic cascade cancer starvation/chemodynamic/immunotherapy [J].

- Adv Mater, 2022, 34: e2106010.
- [16] Fahmy HM, Aly EM, Mohamed FF, et al. Neurotoxicity of green-synthesized magnetic iron oxide nanoparticles in different brain areas of Wistar rats [J]. Neurotoxicology, 2020, 77: 80-93.
- [17] Wang K, Li L, Xu X, et al. Fe₃O₄@Astragalus polysaccharide core-shell nanoparticles for iron deficiency anemia therapy and magnetic resonance imaging *in vivo* [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11: 10452-10461.
- [18] Yang LN, Du XK, Liu L, et al. Research progress and therapeutic perspective of iron transport balance based on "iron-inflammation" homeostatic coupling theory [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 1593-1603.