

激光照射金纳米微粒靶向细胞对 细胞膜通透性的影响

姚翠萍, 张镇西

(西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 利用光吸收性纳米微粒靶向选定细胞后,采用短脉冲激光照射可以得到局部的定位损伤,因此光吸收性纳米微粒作为媒介可诱导可控细胞微效应.激光照射结合有金纳米微粒的细胞可以暂时提高细胞膜的通透性.激光照射后,利用流式细胞仪,测量细胞对异硫氰酸荧光素葡聚糖和碘化丙啶的吸收量来判断细胞膜的暂时通透性和细胞的死亡率.通过实验发现,对于 Karpas-299 细胞,最高的转染率可以达到 65% 以上.实验结果表明,细胞的死亡率和转染率受到金纳米微粒浓度、细胞抗原蛋白和类型的影响.

关键词: 激光;金纳米微粒;细胞膜通透性;靶向性

中图分类号: R318.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2008)12-1560-05

Effects of Selective Cell Targeting with Gold Nanoparticles by Laser Irradiation on Plasma Membrane Permeability

YAO Cuiping, ZHANG Zhenxi

(Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: Light-absorbing nanoparticles targeted cells are heated by short laser pulses to create highly localized cell damage. Therefore absorbing nanoparticles enable to create controlled cellular effects. Gold nanoparticles selectively bond to the cells that are heated by short laser pulses transiently increase the membrane permeability. After irradiation, the permeabilization of the plasma membrane and cell death are probed by fluorescence staining with fluorescein isothiocyanate dextran or propidium iodide, respectively. Following the experiments, the maximal transfection efficiency for Karpas-299 of 65% is achieved, and it is found that the fraction of transiently permeabilized and then resealed cells is affected by the gold concentration and the membrane proteins of different cell lines, to which the nanoparticles were bound.

Keywords: laser; gold nanoparticle; membrane permeability; target

在生物学和医学的很多应用中,需要把大分子送入哺乳细胞的细胞膜内,其中最重要的一个应用就是基因治疗.目前,把基因或者其他大分子送入细胞的方法很多,包括化学、病毒以及物理方法,但是这些方法都有其各自的缺点^[1].由于激光技术和激光应用的不断发展,很多科学家把他们的目光转向了脉冲激光系统,并设法把它们应用到生物技术中.

利用激光进行细胞转染的方法目前有 4 种,微

粒靶向激光转染法是其中的一种.与其他方法相比,微粒辅助激光转染法具有更大的发展潜力^[2].在微粒辅助激光转染法的研究中,Yukihiro 和 Pitsilides 等人分别报道了他们利用激光照射橡胶微粒和金纳米微粒细胞而使外源分子进入生物细胞的研究结果^[3-4].由于金纳米微粒与橡胶微粒相比具有更好的局部损伤性,但对于金纳米微粒在这个方面的研究很不深入,国内目前还没有见到相关报道.

基于上述原因,本文使用了实验室现有的、具有特定相同抗原的 L-428 和 Karpas-299 两种细胞系,针对不同的微粒直径、不同的脉冲能量以及不同的微粒浓度,对微粒辅助激光照射方法影响细胞膜通透性的程度做了深入的实验研究。

1 材料和方法

1.1 仪器设备

本文中所有实验使用的激光是波长为 532 nm、脉宽为 6 ns 的 Q-开关倍频 Nd: YAG 激光(Sure-lite I, Continuum, CA, USA),其光强为高斯分布,输出能量稳定度具有 10% 的方差,激光光束直径为 2 mm 并直接照射样品。在光束中间当每个脉冲能量为 1 mJ 时,激光的能量密度可以达到 0.03 J/cm²,并随激光能量线性增加。实验中,脉冲的频率都为 20 Hz,所使用的样品池专门定做(Hellma),在规格为 25 mm×75 mm 的一片玻璃板上制作了直径为 2 mm 的 18 个样品池,每次做实验时样品量为 4.0 μL。细胞膜的通透性和死亡率分别用流式细胞仪(FACSCAN, Beckman Coulter)测量加入的异硫氰酸荧光葡聚糖(fluorescein isothiocyanate dextran(FITC-D),分子质量10 000 Daltons,分子探针,Sigma 公司,0.1 mol/L)和碘化丙啶(propidium iodide(PI),Sigma 公司,0.02 mol/L)的荧光强度来确定。每个样品中检测5 000个细胞,所采集的数据存储起来并应用 WinMDI 2.8 软件处理。同时,用荧光显微镜(OLYMPUS BH2-RFL-T2)对实验结果进行观测,并用数码相机拍摄照片。

1.2 细胞培养

Karpas-299(人类恶性淋巴瘤细胞)、L-428 细胞(Hodgkin's disease 细胞)均由柏林富兰克林本杰明学院烧伤病理科的 Horst Dürkop 提供。这两种细胞都是悬浮生长在含有 Hepes 和 L-谷氨酸盐并加入了 10% 的胎牛血清、抗生素和抗菌药物(antibiotic/antimycotic solution 100×)的 RPMI-1640(1×)的培养基中(所有这些培养基都是从奥地利 Pasching PAA 实验室购买),并置于培养箱中进行培养,环境为 37℃,CO₂ 与空气的摩尔分数分别为 5%、95%,湿度为 95%~100%。

1.3 实验方法

细胞达到指数增长期时,从培养皿中取出细胞并对细胞进行计数,然后取出一定量的细胞溶液,以 1 400 r/min 的速度在 20℃ 条件下离心 5 min,重新以一定的密度(细胞密度为 4×10⁷ 个/mL 或 2×

10⁷ 个/mL)悬浮于磷酸盐缓冲液(PBS)中。接着加入一定浓度的由 15 nm、30 nm 胶体金和对应于 CD30 的 BerH2 抗体、对应于 CD25 的 ACT1 抗体组成的免疫金颗粒,在培养箱中 37℃ 下培养 20 min。在临照射前,加入 FITC-D 0.1 mol/L。把细胞、纳米微粒和 FITC-D 的混合液移入样品池进行照射。照射结束后,把样品池重新放入培养箱中培养至少 30 min 后,用 PBS 冲洗一遍并悬浮于包含有 PI 的 PBS 中,用流式细胞仪和荧光显微镜测量细胞的荧光以判断细胞膜的通透性和细胞的死亡率。为了得到对于细胞膜通透性提高最优的实验条件,在实验中分别应用了不同的能量以及相同能量不同脉冲数目的激光照射样品,通过比较两种不同的细胞系以证实这种方法的普遍性。

2 实验结果

2.1 两种细胞与 BerH2 金微粒结合后细胞膜的通透性

实验中 Karpas-299 和 L-428 两种细胞分别通过 BerH2 抗体与 30 nm 金微粒结合,细胞浓度为 2×10⁷ 个/mL。采用一个脉冲不同能量激光照射后,通过流式细胞仪测量到的细胞死亡率和转染率如图 1 所示,其中 FITC-D 和 PI 都不会进入未受到任何损伤的细胞,发生细胞膜暂时通透性的细胞只有 FITC-D 可以进入,损伤细胞或者死亡细胞在照射 30 min 后仍然可以看到 PI 进入细胞,或者两者都会进入细胞。图 2 给出的是细胞暂时通透率和死亡率的统计比较结果。随着辐照激光能量的增加,细胞的损伤率(右上区域)和膜的暂时通透率(右下区域)都会提高。由于低吸收率和较强的热效应,与 30 nm 的金微粒相比,采用 15 nm 的金微粒时,需要更高的能量才能导致细胞受损,并提高细胞膜的暂时通透性。

当每个脉冲的能量为 2.5 mJ 时,采用不同数目的激光脉冲照射,细胞结合 30 nm 金微粒时所得到的结果如图 3 所示。从结果可以看出,当脉冲数目大于 5 时,脉冲的数目与结果并没有明显的线性关系,FITC-D 和 PI 荧光强度增加量的变化只有在 1~5 个脉冲之间的变化比较明显。

2.2 Karpas-299 细胞通过 ACT1 抗体与金纳米微粒结合

由于 Karpas-299 细胞更容易出现膜的通透性,并且可以分别通过两种抗体结合金微粒,因此在下文中主要对这个细胞进行讨论。为了找到最佳的实

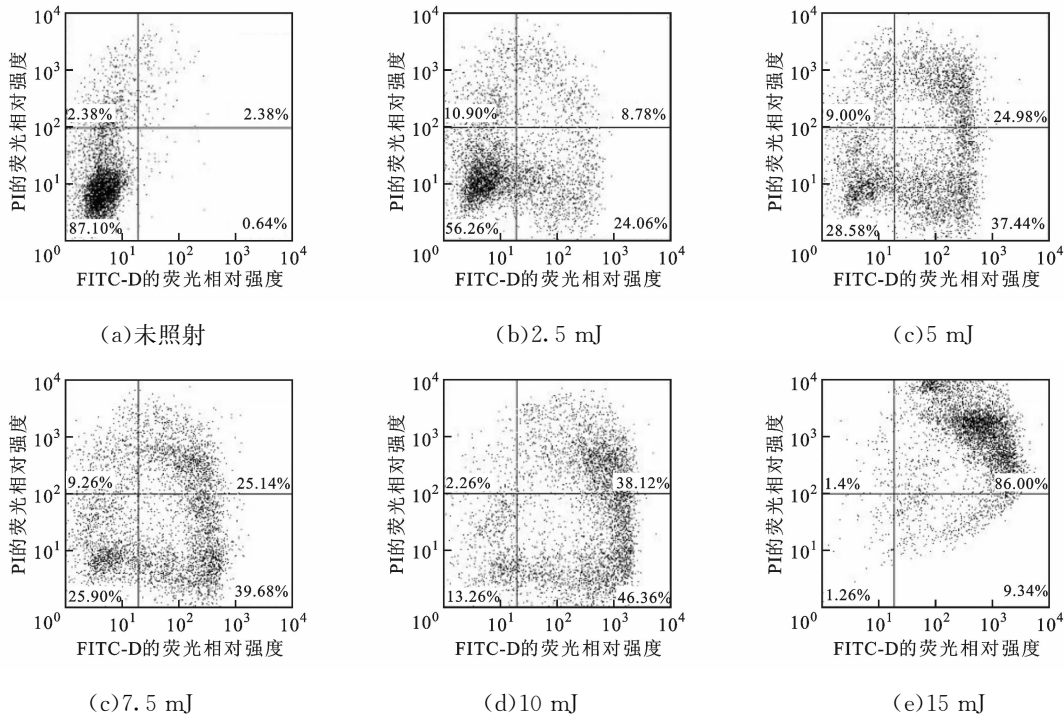


图 1 细胞膜通透性暂时提高和细胞死亡的点图结果

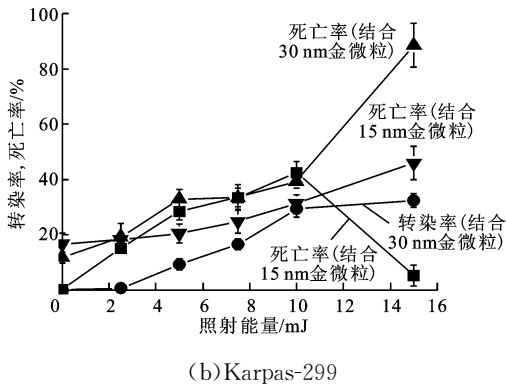
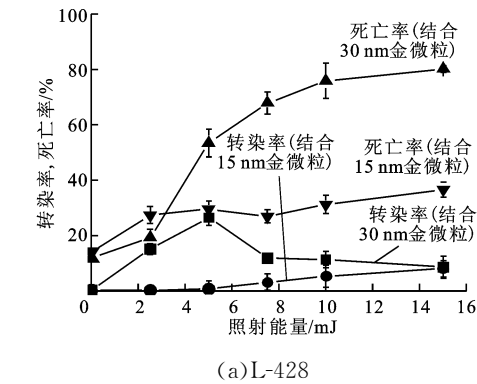


图 2 采用激光照射测量得到的细胞转染率和死亡率

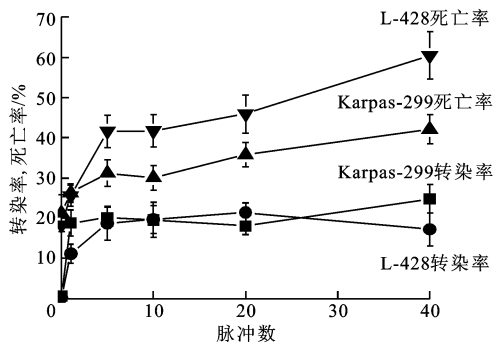


图 3 细胞死亡率、转染率与激光脉冲数的相关性

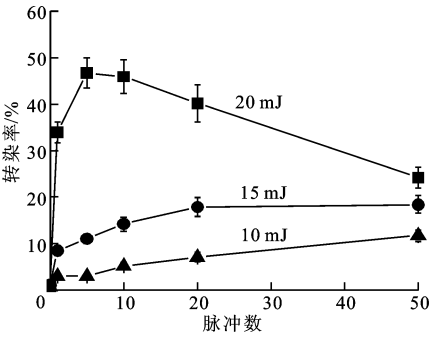
nm 金纳米微粒的实验结果.

实验结果表明,随着激光能量和脉冲数的增加,死亡的细胞和膜暂时通透细胞的比率都会增加.在适合的条件下,膜出现暂时通透性的细胞比率大于死亡细胞的比率^[5].当激光能量和脉冲数都超过一个特定值时,出现膜暂时通透的细胞的比率明显下降,而死亡细胞的比率明显上升.使用 30 nm 的金微粒的实验结果明显好于使用 15 nm 金微粒的结果,这与通过抗体 BerH2 相连接时的实验结果一致.

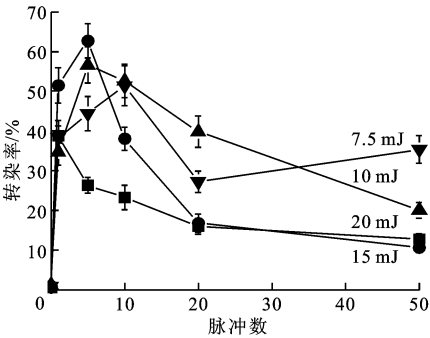
2.3 金纳米浓度对细胞膜通透性影响

实验结果表明,随着金纳米微粒与细胞比率的增加,死亡的细胞相应增加,而细胞膜出现暂时通透性的细胞的比率则呈钟形结构,即在未达到最佳浓

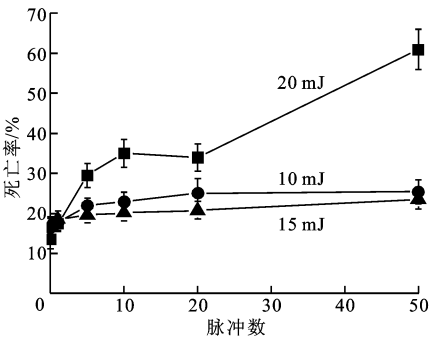
验条件,以得到最小的细胞损伤率和最大的细胞膜通透率,实验中对能量和脉冲的数目都进行了不同的改变,其中采用的细胞密度为 4×10^7 个/mL,纳米金与细胞的比率一定.图 4 给出分别结合 15、30



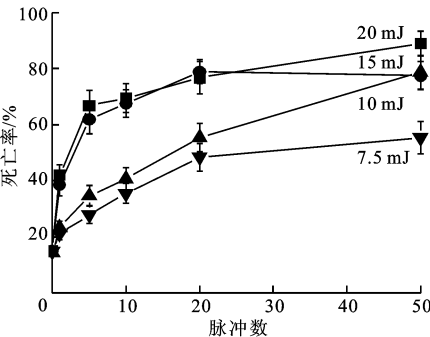
(a)结合 15 nm 金微粒



(b)结合 30 nm 金微粒

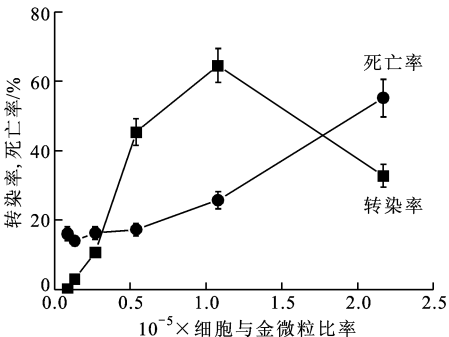


(c)结合 15 nm 金微粒

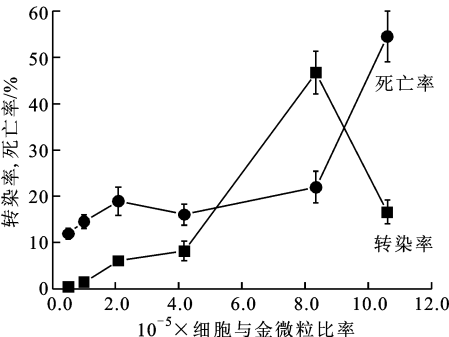


(d)结合 30 nm 金微粒

图 4 细胞转染率和死亡率的统计结果



(a)30 nm 金微粒, 15 mJ



(b)15 nm 金微粒, 20 mJ

图 5 细胞、金纳米微粒数比率与细胞转染率、死亡率的相 关性

3 结果和讨论

本研究通过利用抗原抗体将金纳米颗粒结合到细胞膜上,然后用激光照射,从而达到使细胞膜出现暂时通透性的目的.通过这种方法,正常情况下不能进入细胞的大分子就可以进入细胞.实验中使用了两种细胞系,在不同的能量水平和不同的脉冲数目,以及不同的金纳米微粒浓度条件下,对细胞膜通透性进行了研究^[5].

实验结果表明,采用脉冲激光,除了 L-428 细胞结合 15 nm 金微粒外,两种细胞和两种直径微粒的结合都可以把正常情况下不能进入细胞膜的 FITC-D 分子递入细胞膜,而且转染效率最小为 26%.当超过某一最佳条件,比如脉冲的能量、脉冲的数目以及微粒的浓度时,细胞的死亡率就会大大增加.要达到细胞膜暂时的通透性,直径小的微粒由于其吸收率小,而且在一个激光脉冲内更容易散射,所以需要更高的能量.就两种细胞而言,通过实验发现 Karpas-299 细胞比 L-428 细胞更容易达到膜的暂时通透,而且采用 ACT1 结合会得到更好的结果.实验得到的最佳结果为 FITC-D 的转染率为 68%.通过对不同微粒尺寸的实验结果进行比较,我们可

度前,细胞转染率随着微粒浓度的增加而增大,当达到最佳浓度后,转染率随着微粒浓度的增加而减小.细胞通过 ACT1 抗体与 15 nm 和 30 nm 的金纳米微粒结合,分别采用 20 mJ 和 15 mJ 的 5 个脉冲照射的结果见图 5.

以认为,当实验条件适合时,微粒的尺寸并不是一个重要的影响细胞膜通透性的因素.

通过所有的实验可以得出结论:采用金纳米微粒导致细胞膜通透性提高是与细胞死亡相关的.当偏离最佳条件 50%以上时,细胞膜暂时通透率就会下降,FITC-D 的转染率相应下降,而死亡率大大上升.因此,我们有理由认为,当金纳米微粒激光系统作用于细胞时,只有仔细的调节各种参数,使激光剂量达到亚致死剂量时才会出现细胞膜暂时通透,达到外源物质被送入细胞的目的.

总之,研究描述了一种能够将相对较小的分子转入细胞内的方法.把免疫胶体金连接到细胞膜蛋白上,用纳秒脉冲激光进行照射,细胞膜就可以暂时通透,从而把外源物质导入细胞内.这种方法具有很多优点,其中也包括较高的转染率(68%的转染率和 27%的死亡率).近期的实验也证明了利用这种方法一些大的分子,比如用于标记细胞内部结构的荧光抗体,也可以被导入 L-428 细胞和 Karpas-299 细胞.在以后的实验中将改进比如温度等参数,以能够将遗传物质转入细胞,在此基础上进行一些机理研究.

致谢 本文工作得到了德国吕贝克医学激光中心及 Gereon Huettmann 博士的帮助,特此感谢.

参考文献:

- [1] YANG N S. Gene transfer into mammalian somatic cells [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 1992, 12(4): 335-356.
- [2] YAO C P, ZHANG Z X, RAHMANZADEH R, et al. Laser based gene transfection and gene therapy [J]. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 2008, 7(2): 111-119.
- [3] PITSILLIDES C M, JOE E K, WEI X, et al. Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles [J]. *Biophys J*, 2003, 84(6): 4023-4032.
- [4] UMEBAYASHI Y, MIYAMOTO Y, WAKITA M, et al. Elevation of plasma membrane permeability on laser irradiation of extracellular latex particles [J]. *Biochem J*, 2003, 134(2): 219-224.
- [5] 姚翠萍,姚保利,张镇西.金纳米辅助细胞激光热作用疗法研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(3): 312-316.
YAO Cuiping, YAO Baoli, ZHANG Zhenxi. Laser irradiation cell photothermal therapy assisted by gold nanoparticles[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2007, 34(3): 312-316.

(编辑 杜秀杰)