

·快报·

靶向性多肽修饰荧光功能化碳纳米管的制备及 靶向肿瘤细胞的初步研究*

王 雪¹ 周 立² 高 超^{2**} 徐宇虹^{1**}

(¹ 上海交通大学药学院 上海 200240)

(² 浙江大学高分子科学与工程系 高分子合成与功能构造教育部重点实验室 杭州 310027)

摘 要 以羟基化多壁碳纳米管(MWNT-OH)为引发剂,通过原位负离子开环聚合制备了生物相容性多羟基超支化聚缩水甘油接枝的碳纳米管(MWNT-HPG),利用酯化反应将荧光分子罗丹明 6B 标记于聚合物上,然后聚合物上的羟基和丁二酸酐反应将其转化为羧基.用 TGA、FTIR、TEM、SEM 等手段对产物进行了表征.用靶向表皮生长因子受体(EGFR)的小分子多肽 D4 修饰了所得的荧光功能化碳纳米管,并将其做为受体介导靶向肿瘤细胞的纳米载体,通过噻唑蓝(MTT)比色法评价功能化碳纳米管作为载体的安全性.用荧光显微镜观察其与人肺腺癌细胞 SPCAI 细胞的结合状态.结果证明了其有希望成为受体介导靶向肿瘤系统的纳米载体.

关键词 功能化碳纳米管,超支化聚缩水甘油,荧光标记,多肽配体,肿瘤靶向

肿瘤的发生发展与表皮生长因子受体(EGFR)家族有着密切的联系^[1,2].大量实验表明,以 EGFR 为靶点的偶联物或载体系统能够提高药物对肿瘤细胞的靶向输送^[3~7].小分子多肽配体能够在一定程度上避免天然配体或单克隆抗体可能引起的免疫原性或其他异常的生理效应,可以作为理想的配体用于受体靶向输送系统的构建^[8,9].同时,选择有效的纳米载体在肿瘤的靶向治疗中也越来越受到重视.功能化碳纳米管(CNTs)有望用于药物传送及诊断治疗^[10~18].前人做过的一些工作有力地证明了碳纳米管通过化学改性可以成为靶向治疗影像的一体化载体.但是,目前的改性工作仍存在合成工艺比较复杂,溶解分散性差,表面活性基团数目有限等问题.

针对该领域存在的问题和发展趋势,我们从分子设计的角度出发合成了多肽 D4 修饰的功能化碳纳米管.图 1 显示了这一设计思路和反应过程.本文的初步探索证明了碳纳米管有希望成为新型的纳米载体,可能会对肿瘤的治疗产生深远的影响.

1 试剂

多壁碳纳米管(纯度 > 95%,直径 10 ~ 30 nm),清华南风纳米粉体工程中心购买.缩水甘油(真空蒸馏后,2 ~ 4 ℃ 保存)、CH₃OK 溶液(浓度

25%)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)、噻唑蓝(MTT)、Hoechst 染色试剂盒均购自 Aldrich-Sigma 公司.胎牛血清(FBS)和 RPMI1640 培养基从 Gibco 公司购买.靶向性多肽 D4 和非特异性对照用多肽 D4* (纯度为 95%),由本文药理学实验室设计、上海华源生化有限公司合成.除非特别说明,其它试剂和溶剂均购自中国医药集团上海化学试剂公司.

2 测试表征

热失重分析用 PE TGA-7,氮气流速 20 mL/min,升温速度 20 K/min. FTIR 分析采用 PE 1000 傅立叶变换红外光谱仪(KBr 压片).透射电镜(TEM)的检测采用 JEOL JEL2010 场发射电子显微镜,检测电压为 200 kV.扫描电镜(SEM)采用 FEI SIRION 200 场发射电子显微镜.

3 多壁碳纳米管接枝超支化聚缩水甘油(MWNT-HPG)

按照配比将本实验室用 2-叠氮乙醇改性成的 MWNT-OH^[19] 和 CH₃OK 溶液加入到干燥的烧瓶中,再加入少量的四氢呋喃,超声分散.混合物在室温下搅拌 30 min 后加入一定量的二氧六环并升温至 95℃.计量的缩水甘油滴加入体系中反应 2 h.产物反复用甲醇洗后离心.最后沉淀物于

* 庆祝杨士林先生 90 华诞专稿;2009-02-02 收稿,2009-02-25 修稿;国家重点基础研究发展计划(973 计划,项目号 2007CB936000)和国家自然科学基金(基金号 50773038)资助项目;** 通讯联系人, E-mail: chaogao@zju.edu.cn; yhxu@sjtu.edu.cn

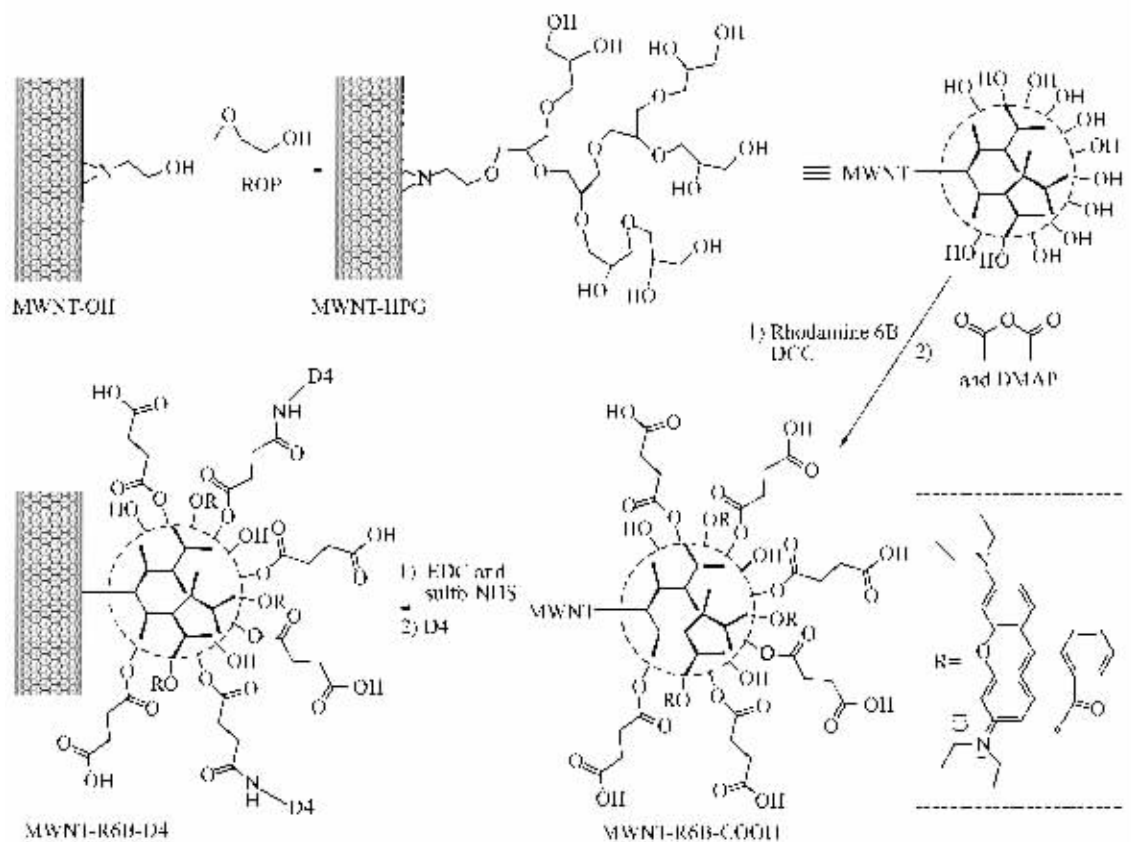


Fig. 1 The reaction protocol for preparation of MWNT-R6B-D4

60℃下真空干燥过夜,得到超支化聚缩水甘油接枝的多壁碳纳米管(MWNT-HPG)。

4 罗丹明 6B 和丁二酸酐改性超支化聚缩水甘油接枝的碳纳米管

通过 DCC(二环己基碳酰亚胺)缩合反应并利用 DMAP(*N,N*-二甲氨基吡啶)作为催化剂在 80℃下反应 24 h,得到了罗丹明 6B 标记的功能化碳纳米管(MWNT-R6B)。然后按照一定配比将 MWNT-R6B,丁二酸酐和已除水的 DMF 加入到干燥的烧瓶中,超声处理 3 min。在 N_2 保护下,加入 DMAP,50℃下反应 24 h。产物离心分离后真空干燥过夜,得到多羧基荧光碳纳米管(MWNT-R6B-COOH)。

5 靶向性多肽修饰 MWNT-R6B-COOH

靶向性多肽 D4 为本文药剂学实验室从计算机辅助设计并通过 BIAcore 技术进行亲和筛选得到的靶向于 EGFR 受体的配体,其氨基酸序列为亮氨酸-丙氨酸-精氨酸-亮氨酸-亮氨酸-苏氨酸(Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Thr),同时借助计算机虚拟技术将 D4 氨基酸序列随机打乱,根据构型和能量分析选中其中一个氨基酸序列为 Arg-Thr-Ala-

Leu-Leu-Leu 的多肽作为 D4 的阴性对照物 $D4^*$ [20]。MWNT-R6B-COOH (10 mg)通过 EDC 缩合反应连接 D4 和 $D4^*$ (2 mg, 0.03 mmol),透析并冻干得到终产物多肽修饰的碳纳米管(分别命名为 MWNT-R6B-D4, MWNT-R6B-D4 *)。

6 功能化碳纳米管的 MTT 细胞毒性试验

根据经典的 MTT 法,将准备好的 3 个浓度 (0.5, 0.1, 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 200 μL 的 MWNT-R6B-COOH 组溶液滴加入 SPCAI 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种 96 孔培养板上,酶标仪检测各孔光吸收值(OD)值,检测波长为 490 nm,记录结果。细胞活力可以用以下公式来计算:

$$\text{相对细胞活力} = \text{OD}_{490}(\text{样品}) / \text{OD}_{490}(\text{对照})$$

其中 $\text{OD}_{490}(\text{样品})$ 为样品孔的光吸收值, $\text{OD}_{490}(\text{对照})$ 为对照孔的光吸收值。

7 荧光显微镜观察功能化碳纳米管与细胞结合

将制备的 D4、 $D4^*$ 修饰的功能化碳纳米管和对照组 MWNT-R6B-COOH 按照浓度为 0.5、0.1、0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 400 μL 分别加入人肺腺癌细胞 SPCAI 细胞培养皿中,在 37℃孵育 4 h。加入 0.5 mL 甲醛固定液固定 20 min,吸掉固定液后在每个培养皿

中加入 Hoechst 染色液,染色 5 min 后用荧光显微镜(激发波长 540 nm)观察功能化碳纳米管与细胞的结合情况.

8 功能化碳纳米管的结构表征

按照图 1 的设计路线,通过原位负离子开环聚合将生物相容性超支化聚缩水甘油接枝到碳纳米管上.对于在碳纳米管上连接有机成分的含量可通过热失重分析(TGA)来评价.如图 2(a)所示,可以看到, MWNT-OH 在 200℃ ~ 500℃ 之间的质量损失量约为 8.2%,而 MWNT-HPG 在 250℃ ~ 500℃ 之间的质量损失量大约为 52%.另外,利用

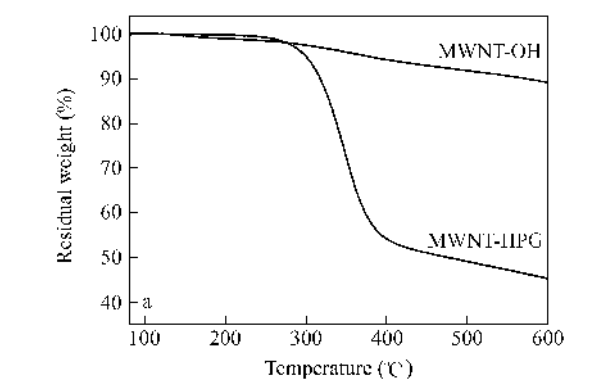


图 2 (a) TGA curves of MWNT-OH and MWNT-HPG; (b) FTIR spectra of MWNT-OH, MWNT-HPG, MWNT-R6B-COOH, and MWNT-R6B-D4

MWNT-HPG 的纳米结构和表面形态用 TEM 和 SEM 进行了观察.从 SEM 图中,可以清晰地观察到 MWNT-OH 样品中碳纳米管的形貌(图 3a),而接枝聚合物后碳管则均匀地分散在连续的聚合物相中(图 3b),表明超支化聚合物接枝的效率 高、效果好.从 TEM 图中,可清晰的看到 MWNT-OH 样中碳纳米管表面光滑、碳管完整、分散较好(图 3c);接枝超支化聚合物后,碳管分散良好,可见明显的聚合物层覆盖在碳纳米管上,在高分辨图上,可看到明显的核-壳结构,表明聚合物均匀地包覆了碳管(图 3d).

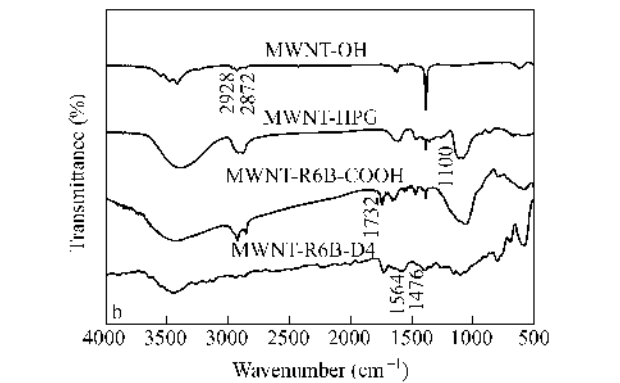
9 荧光修饰功能化碳纳米管的细胞毒性

MTT 毒性实验结果表明,经过荧光修饰后的功能化碳纳米管无论是在何种浓度下,对于 SPCAI 细胞几乎没有细胞毒性,细胞活力都在 98% 以上(数据略),对细胞生长的影响几乎没有影响.说明作为载体对 SPCAI 细胞有着良好的相容性.

10 荧光显微镜初步研究多肽修饰功能化荧光碳纳米管与 SPCAI 细胞的结合

D4 作为一种新颖的靶向 EGFR 受体的小分

子多肽,有着明显靶向高表达 EGFR 细胞或组织、低免疫原性、促细胞分裂作用小,有潜力作为高效的“弹头”用于肿瘤的治疗.通过荧光显微镜,观察了在体外多肽 D4 和 D4 * 修饰的荧光碳纳米管及未修饰多肽的荧光功能化碳纳米管与 SPCAI 细胞的结合能力.如图 4 所示,经过 Hoechst 染色后的细胞核呈蓝色,而经过罗丹明 6B 修饰的碳纳米管成红色荧光(图 4 中,大的球形颗粒呈蓝色荧光;小的灰白色小点呈红色荧光,其中一部分用圆圈进行了标记),可以看出,不同浓度的 MWNT-R6B-D4 与细胞都有明显的结合并且随着浓度的增加,其聚集并特异性结合细胞的数目越多.然而不论在什么浓度下,作为阴性对照的 MWNT-R6B-D4 * 或未修饰的功能化碳纳米管,几乎观察不到罗丹明 6B 结合的红色荧光.结果表明,与 D4 * 和非靶向性功能化碳纳米管相比, D4 修饰功能化荧光碳纳米管与 EGFR 高表达的 SPCAI 细胞结合能力明显,为其作为靶向肿瘤细胞载体提供了有力的证据.同时,我们也发现可能由于其本身分子量分布不均的原因,分子量较大的碳纳米管在进入细胞核内部的能力有所限制.这有待于我们在今后的



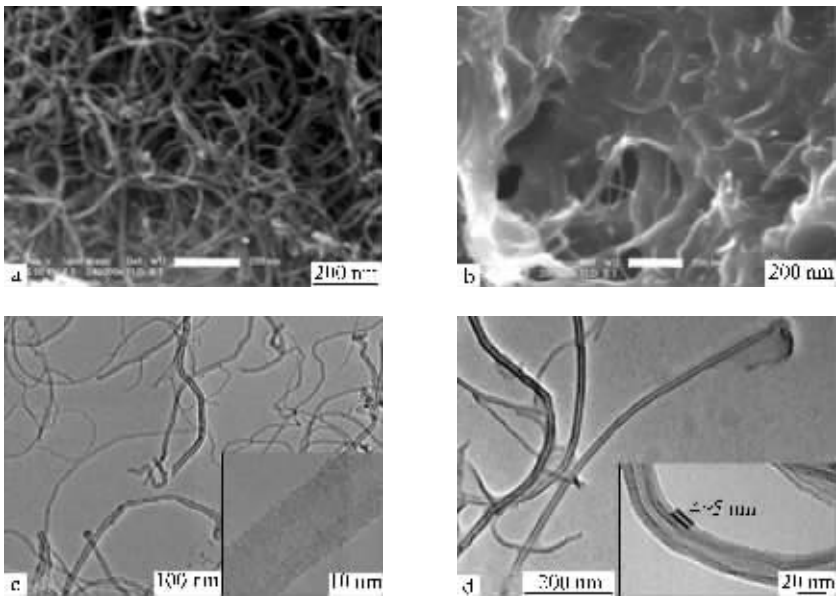


Fig. 3 SEM images of MWNT-OH (a) and MWNT-HPG (b), and TEM images of MWNT-OH (c) and MWNT-HPG (d)

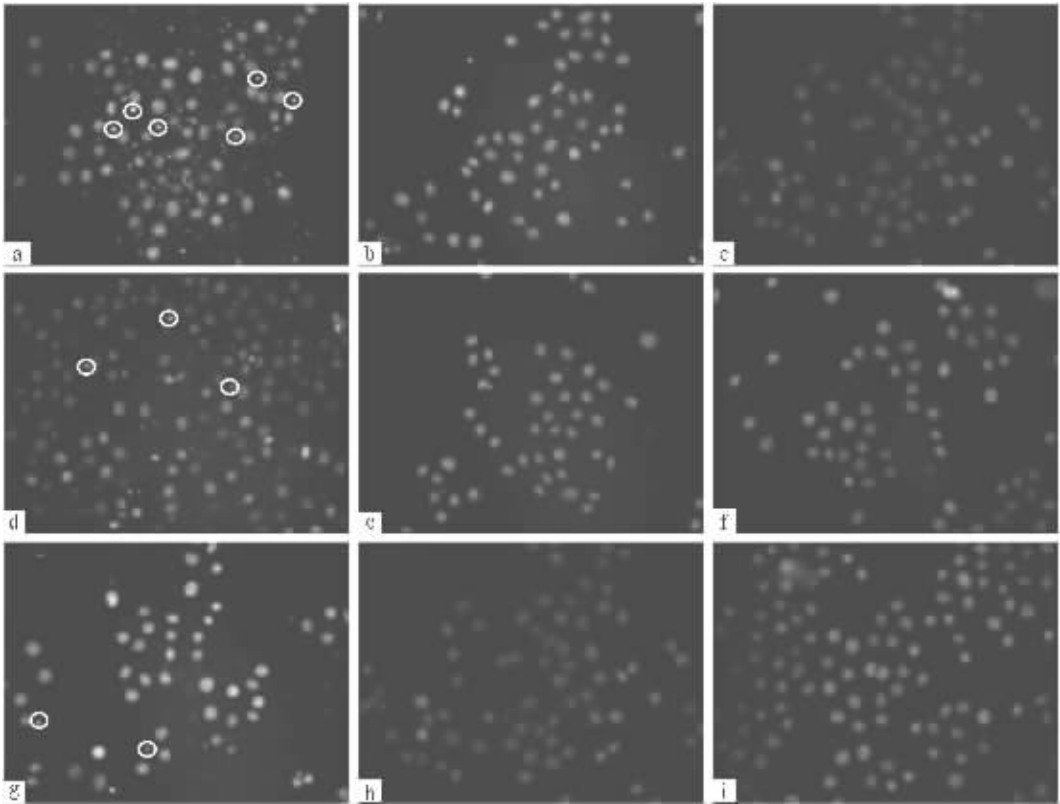


Fig. 4 Fluorescent expression of 0.5 mg/mL of MWNT-R6B-D4 (a), MWNT-R6B-D4* (b), and MWNT-R6B-COOH (c), 0.1 mg/mL of MWNT-R6B-D4 (d), MWNT-R6B-D4* (e), and MWNT-R6B-COOH (f), and 0.02 mg/mL of MWNT-R6B-D4 (g), MWNT-R6B-D4* (h), and MWNT-R6B-COOH (i) in SPCAI cells

The spherical particles represent blue cells, and the smaller white and grey dots (some of them are marked by white circles) represent red fluorescence in corresponding color images, respectively.

研究中进一步控制并降低功能化碳纳米管的粒径分布,经过优化最终分离出可以有效结合并促进内吞的功能化碳纳米管载体.另外,这种新载体系统在体内的安全性和稳定性仍然需要大量的后续试验进行考察和评价.

11 结论

设计并合成了基于碳纳米管的多羟基分子放大器,进一步改性制备了靶向多肽修饰的荧光功能化碳纳米管.靶向多肽 D4 修饰的功能化荧光碳纳米管能够有效的导向 EGFR 受体高表达的细

胞.本研究提出了利用虚拟筛选小分子配体键合功能化荧光功能化碳纳米管的合成方法和实验考察,为进一步深入的研究建立了良好的平台.为设计出高效的靶向肿瘤输送系统提供了良好的思路,同时也能借助这个输送系统,为筛选高特异性能够靶向肿瘤系统的小分子配体提供一个有效的生物筛选模型.在今后的应用中,超支化聚合物修饰的碳纳米管有希望成为多重靶向兼治疗一体化的生物载体.

REFERENCES

1 Normanno N, de Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello M R, Carotenuto A, de Feo G, Caponigro F, Salomon D S. *Gene*, 2006, 366: 2 ~ 16

2 Normanno N, Bianco C, DeLuca A, Maiello M. *Endocr Relat Cancer*, 2003, 10: 1 ~ 21

3 Blessing T, Kursa M, Holzhauser B, Kircheis R, Wagner E. *Bioconjug Chem*, 2001, 12: 529 ~ 539

4 Lutsenko S V, Felaman N B, Severin S E. *J Drug Target*, 2000, 10: 567 ~ 571

5 Jinno H, Ueda M, Ozawa S, Kikuchi K, Ikeda T, Enomoto K, Kitajima M. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1996, 38: 303 ~ 308

6 Kullberg E B, Nestor M, Gedda L. *Pharm Res*, 2003, 23: 1073 ~ 1079

7 Chen P, Mrkobrada M, Vallis K A, Cameron R, Sandhu J, Hendler A, Reilly R M. *Nucl Med Biol*, 2002, 29: 693 ~ 699

8 Gabizon A, Horowitz A T, Goren D, Zemach T. *Bioconjug Chem*, 2003, 9: 6551 ~ 6559

9 Dubey P K, Mishra V, Jain S, Mahor S, Vyas S P. *J Drug Target*, 2004, 12: 257 ~ 264

10 Wu W, Wieckowski S, Pastorin G, Benincasa M, Klumpp C, Briand J, Gennaro R, Prato M, Bianco A. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 6358 ~ 6362

11 Kam N W, Dai H. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 6021 ~ 6026

12 Kam N W, Dai H. *Phys Stat Sol*, 2006, 243: 356 ~ 3566

13 Lu F S, Gu L R, Sun Y P. *Adv Mater*, 2008, 20: 11 ~ 14

14 Rodney P, Feaze L, Dai H J, Stephen J. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 8438 ~ 8439

15 Liu Z, Li X L, Tabakman S, Jiang K, Fan S, Dai H J. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 13540 ~ 13541

16 Kam N S, Liu Z, Dai H J. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12492 ~ 12493

17 Kam N S, Jessop T C, Wender P, Dai H J. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 6850 ~ 6851

18 Chen J Y, Chen S Y, Zhao X R, Kuznetsova L V, Wong S S, Ojima L. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 16778 ~ 16785

19 Gao C, He H, Zhou L, Zheng X, Zhang Y. *Chem Mater*, 2009, 21: 360 ~ 370

20 Denizot F, Lang R. *J Immunol Methods*, 1986, 89: 271 ~ 277

PRIMARY EVALUATION OF PEPTIDE LIGAND FUNCTIONALIZED MULTIWALLED CARBON NANOTUBES AS TUMOR TARGETING CELLS CARRIER

WANG Xue¹, ZHOU Li², GAO Chao², XU Yuhong¹

(¹ School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

(² Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization (Ministry of Education),

Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract Biocompatible multihydroxyl hyperbranched polyglycidol (HPG) was covalently grafted from surfaces of multiwalled carbon nanotubes (MWNTs) by “grafting from” method based on in situ anionic ring-opening polymerization, affording multifunctional MWNT-supported molecular amplifier with HPG content of 52 wt% (MWNT-HPG). Subsequently, fluorescent molecules of rhodamine 6B and succinic anhydride were conjugated to the surfaces of MWNT-HPG by *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) coupling and esterification, respectively, giving rise to fluorescent multicarboxylic nanotubes (MNWT-R6B-COOH). The functionalized MWNTs were characterized by the combination of TGA, FTIR, ¹H-NMR, SEM and TEM measurements. The as-prepared MNWT-R6B-COOH was further modified with the specific peptide of D4 composed with amino acid sequence of leucine-alanine-arginine-leucine-leucine-threonine (Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Thr) which was previously designed against epidermal growth factor receptor (EGFR) by our pharmacy lab. We also used D4* that contains the same kind of amino acids as D4 but with different sequence to modify the MWNT-R6B-COOH as control. Through fluorescent microscope, MWNT-R6B-D4 was found to bind strongly and extensively to the EGFR high-expressing SPCAI cell, comparing with the MNWT-R6B-D4* and MWNT-R6B-COOH. The result suggests that such EGFR ligand-directed functionalized CNTs may be prospective and promising to become an efficient tumor cell targeted carrier for the cancer therapeutics.

Keywords Functionalized multiwalled carbon nanotubes, Hyperbranched polyglycidol, Peptide ligand, Tumor targeting