

功能化硅壳荧光纳米粒的细胞吞噬研究*

赵焕英¹ 王 楠² 于景娴³ 杨 慧^{1**} 邓云龙³ 彭玉龙³

(¹ 首都医科大学神经科学研究所 北京 100069) (² 中国人民武装警察部队总医院 北京 100039)

(³ 首都医科大学化学生物学与药学院 北京 100069)

摘 要 合成了氨基聚酰胺-胺(PAMAM(G1.0))和酯基(PAMAM(G1.5))功能化的两种硅壳荧光纳米粒,通过透射电镜(TEM)、纳米粒度及电动电位测定仪(zeta 电势)、傅立叶红外光谱仪(FIR)和热失重分析仪(TGA)进行表征.通过透射电镜(TEM)、共聚焦显微镜(CLSM)、细胞计数试剂盒(CCK-8)实验、流式细胞计数法评价两种硅壳荧光纳米粒进入 9L 细胞能力的大小、在细胞内的分布情况以及细胞毒性. TEM 分析表明,修饰的硅壳纳米粒大小约为 60 nm 左右, pH = 7.4, 氨基功能化的纳米粒 zeta 电势为 +19.08, 酯基功能化的为 -9.01; FTIR 和 TGA 实验进一步证明两种纳米粒被氨基和酯基的功能化. TEM 和 CLSM 结果表明纳米粒主要存在细胞浆中,且能被溶酶体吞噬. CCK-8 结果显示两种纳米粒的浓度高达 1 mg/mL 时仍无明显的毒性作用,且有促细胞增殖作用. 流式细胞计数结果表明,细胞摄取纳米粒呈浓度和时间依赖性,氨基比酯基修饰的纳米粒更易进入细胞.

关键词 二氧化硅, PAMAM 树状分子, 细胞吞噬, 细胞毒性

荧光纳米粒在细胞标记、追踪、造影和靶向药物转运的基础研究和应用方面引起广泛的重视. 但传统的荧光染料例如荧光素异硫氰酸酯(FITC)、异硫氰酸四乙基罗丹明(RITC)以及吖啶类菁染料(Cy3)等荧光强度较低,光稳定性较差^[1],因而在高灵敏检测的生物造影应用领域受到限制. 最近的研究表明,经二氧化硅包埋的荧光磁性氧化铁纳米粒,不仅具有较强的荧光强度,而且由于硅壳的保护,荧光染料不易外泄,从而增强了荧光染料稳定性^[2,3]. 然而,由于荧光纳米粒表面存在 FITC 和表面活性剂,会降低其生物相容性^[4]. 而且纳米粒的细胞吞噬效率在很大程度上取决于粒子的表面物理化学性能,因此,对硅荧光纳米粒表面进行适当功能化修饰是提高其细胞吞噬效率及增加生物相容性的有效方法.

聚酰胺-胺(PAMAM)树状分子是一类迭代合成的高单分散性的大分子. 其内部空腔可携带小分子药物^[5]、外表面大量活性官能团可连接基因、配体等生物活性分子,因此在药物及基因载体方面取得重要进展^[6]. 但由于 PAMAM 细胞毒性与其代数成正比,目前广泛采用的高代 PAMAM 不

可避免具有一定细胞毒性,影响了其进一步的应用^[7]. 采用低代 PAMAM 修饰硅荧光纳米粒,不仅避免了因 PAMAM 功能化纳米粒而可能引起细胞毒性,而且所形成的无机-有机体系也有效弥补了低代 PAMAM 作为载体转运效率的不足.

本文分别制备了末端为氨基和酯基的 PAMAM 树状分子功能化的硅壳荧光磁性纳米粒 Fe₃O₄ 纳米粒作磁核,磁核外面经 TEOS 水解成 SiO₂ 外壳,其中 FITC 包裹在硅壳中,这种硅壳结构表示为 Fe₃O₄@SiO₂(FITC), Fe₃O₄@SiO₂(FITC)-PAMAM(G1.0)和 Fe₃O₄@SiO₂(FITC)-PAMAM(G1.5). 采用胶质瘤细胞(9L)调查上述纳米粒的细胞吞噬. TEM 用来研究纳米粒在细胞内的分布情况以及进入细胞的机理. 通过流式细胞计数评估不同功能团修饰对纳米粒进入细胞能力的影响. CCK-8 方法用来评价纳米粒的细胞毒性. 关于 PAMAM 功能化的硅壳荧光纳米粒进入 9L 胶质瘤细胞能力评价未见文献报道,该研究可为硅壳荧光纳米粒在胶质瘤细胞的标记或转运提供基础数据.

* 2008-11-03 收稿, 2008-12-17 修稿; 国家重点基础研究发展计划(973 计划, 项目号 2006CB500706)、国家自然科学基金项目(基金号 30670655)和北京市属高等学校人才强教深化计划项目; ** 通讯联系人, E-mail: zhuiyang@ccmu.edu.cn

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

3-氨丙基三乙氧基硅烷(APS)、荧光素异硫氰酸酯(FITC)购自 Sigma 公司(美国). 六水合三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、六水合硫酸亚铁铵($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、氨水、油酸、曲拉通 X-100、原硅酸乙酯(TEOS)、丙烯酸甲酯(MA)、乙二胺(EDA)等均购自北京化学试剂公司,为分析纯. 9L 细胞为本室冻存,细胞计数试剂盒(CCK-8)购自日本同仁化学研究所, LysoTracker blue DND-22 购自 invitrogen (美国), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培养基及胎牛血清等购自 Gibco (美国).

LGJ0.5-II 台式冷冻干燥机(北京四环仪器厂), JEM-1230 透射电子显微镜(TEM, JEOL, 日本), 傅立叶红外分析仪(FITR, NICOLET AVATAR 330, 美国), NETZSCH 热重及差热分析仪(德国), Nano-2S90 纳米粒度及动电位测定仪(ZETASIZER, 英国). HEPA Class 100 CO_2 培养箱(Thermo, 美国), IX71 荧光倒置显微镜(Olympus, 日本), TCS SP5 激光共聚焦显微镜(LEICA, 德国), EPICS XL 流式细胞计数仪(Coulter, 美国), 1420 型酶联免疫检测仪(Perkin Elmer, 美国).

1.2 纳米粒的制备和表征

Fe_3O_4 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC) 分别参照文献[8, 9]的方法制备.

$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G1.0)的制备是在有氮气保护的三口烧瓶中, 将 24 mL MA 加入到 271 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)的甲醇溶液中, 搅拌 48 h, 用永久磁铁从反应液中分离出黑棕色的固体, 所得固体用无水乙醇洗 5 次, 真空干燥, 得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G0.5). 取上述纳米粒, 溶于 200 mL 甲醇中, 再加入含 30 mL EDA 的甲醇溶液搅拌 72 h, 得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G1.0)溶液, 磁分离、醇洗并干燥, 得目标纳米粒 1.

$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G1.5)的制备是在目标纳米粒 1 的甲醇溶液中, 加入 48 mL MA 的甲醇溶液, 反应 48 h 后, 磁分离、醇洗并干燥得到目标纳米粒 2 —— $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC) @PAMAM(G1.5).

目标纳米粒 1 和 2 分别用透射电镜(TEM)、

zeta 电位、FTIR 和 TGA 进行表征. TEM 的表征方法是首先配制 0.05 mg/mL 纳米粒的乙醇溶液, 超声分散均匀后, 滴于覆盖有膜的铜网上, 真空干燥后, 于 TEM 下观察纳米粒的尺寸. zeta 电位的表征方法是将两种纳米粒配置成 0.5 mg/mL 的水溶液, 用盐酸和氢氧化钠溶液调整 $\text{pH} = 7.4$, 测定其 zeta 电位. FTIR 表征采用溴化钾压片方法. TGA 表征方法是分别将 3 种纳米粒, 在 40°C 真空干燥 24 h 后, 在氮气氛围的热失重仪内加热温度 $20 \sim 900^\circ\text{C}$, 升温速率为 10 K/min .

1.3 荧光显微镜观察纳米粒在细胞中的定位

将浓度为 0.1 mg/mL 纳米粒与 9 L 细胞共孵育 4 h, 吸弃培养基, 细胞用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗 3 遍, 用 4% 多聚甲醛固定 1 h, PBS 洗 3 遍, 4,6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)染色 10 min, PBS 洗 3 遍. 置于荧光倒置显微镜下观察. 为了验证纳米粒细胞定位, 细胞接种在共聚焦培养皿上并与纳米粒共孵育 4 h 后, 吸弃培养液, 用 PBS 洗 3 遍, 加入含 50 nm LysoTracker Blue 的无酚红 DMEM 全细胞培养液继续培养 3 h, 在激光共聚焦显微镜(CLSM)下观察激发光为 488 nm 时 FITC, 405 nm 时的 DAPI 和 LysoTracker Blue 染料物质在细胞内的定位.

1.4 流式细胞计数法评估纳米粒被细胞吞噬能力

将细胞接种在 6 孔板上, 每孔 1×10^6 后, 放培养箱继续培养 24 h 后, 分别加入 1 mL 不同浓度的纳米粒 DMEM 溶液(0.01, 0.05, 0.1 mg/mL), 继续培养, 分别于 1, 2, 4 h 收集细胞, 用流式细胞仪计数, 实验重复 3 次.

1.5 TEM 验证纳米粒在细胞中的分布

细胞与 0.1 mg/mL 纳米粒共孵于 4 h 后, 胰酶消化后离心, 磷酸缓冲液 PBS 洗 3 遍, 3% 戊二醛固定 4 h, PBS 洗 2 次, 入 2% 锇酸固定 2 h, 梯度酒精 50%、70%、80%、90%、100% I、100% II 各 10 min 脱水, 丙酮 I、丙酮 II 各 15 min, 树脂 I 过夜, 树脂 II 30 min, 再包埋干燥. 超薄切片后上 TEM 观察.

1.6 CCK-8 实验评价纳米粒对细胞活力的影响

将细胞按每孔 2×10^4 接种于 96 孔板培养过夜, 加入用全细胞培养液稀释的终浓度为 0.1、0.25、0.5、0.75、1.0 mg/mL 纳米颗粒, 每个浓度重复 6 孔, 重复 3 次实验. 以不加细胞只加培养液的孔为空白对照孔, 以加细胞加培养液的孔为阴性

对照,继续培养 24 h. 弃掉培养液, PBS 洗 3 遍, 每孔加入含 10% CCK-8 培养液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 2 h 后, 用酶标仪测定 OD_{490 nm} 值, 按下列公式计算细胞存活率:

$$\text{存活率} \% = (\text{实验组 OD}_{490} - \text{空白组 OD}_{490}) / (\text{对照组 OD}_{490} - \text{空白组 OD}_{490}) \times 100 \%$$

2 结果和讨论

2.1 功能化纳米粒的制备与表征

制备得到的 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC), 其表面上既有羟基, 又有氨基. 当加入 MA 时, 就会与氨基发生迈克尔加成, 生成端酯基的纳米粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G0.5). 当再加入乙二醇时, 发生酰胺化反应生成端氨基的目标纳米粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G1.0). 再加入 MA 就会重复上述的制备方法. 由图 1 可以看出经氨基或酯基 PAMAM 修饰后的硅壳荧光磁性纳米粒子呈规则球形, 直径在 60 nm 左右, 大小均匀, 分散性较好. 而且制备好的纳米粒子可以在永久磁铁作用下从反应溶液中成功分离出来, 说明纳米粒子具备很好磁性作用. 在 pH = 7.4 时, 氨基、酯基修饰硅壳荧光磁性纳米粒子的 zeta 电位分别为 +19.08 和 -9.01, 未经修饰的硅壳荧光磁性纳米粒 zeta 电势为 -17.4, zeta 电位从负到正的变化表明纳米粒表面被修饰了不同的功能团. 红外光谱也证实了 PAMAM 的修饰. 如图 2(A) 所示, 在 2900 cm^{-1} 有 $-\text{CH}_2-$ 的伸缩振动, 在 1600 cm^{-1} 处有 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 的羰基伸缩振动, 而且从曲线 b 和 c 中可看出端氨基 PAMAM(G1.0) 和端酯基 PAMAM(G1.5) 修饰的纳米粒比未修饰的 a 曲线纳米粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC) 有更大的峰面积. 从图 2(B) 热失重曲线可看出, 核的热失重为 79.2%. 而经 PAMAM G1.0 和 G1.5 修饰后的纳米粒分别为 76.1% 和 71.5%, 失重百分数的增加也证实了不同代数 PAMAM 已修饰在硅壳荧光纳米粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC) 的表面.

2.2 9L 细胞对纳米粒的吞噬

荧光显微镜被用来初步评估 9L 细胞对纳米粒的吞噬. 图 3(A) ~ (C)、图 3(I) ~ (III) 分别显示的是纳米粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G1.0)、 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G1.5) 的荧光照片. 其中荧光图 3(A) 和 (I) 虚箭头显示的是发绿光的纳米粒子, 图 3(B) 和 (II) 实箭头显示的

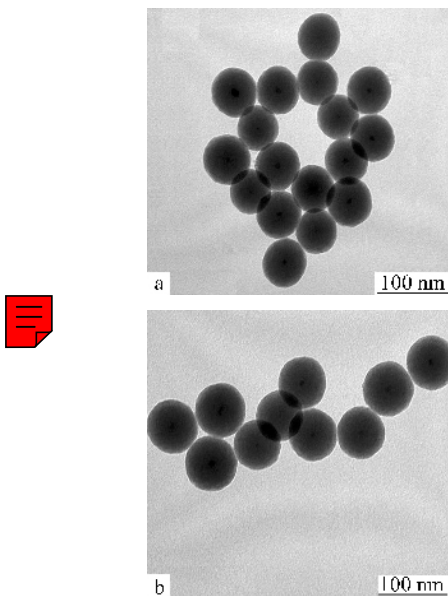


图 1 TEM images of (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G1.0) and (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G1.5)

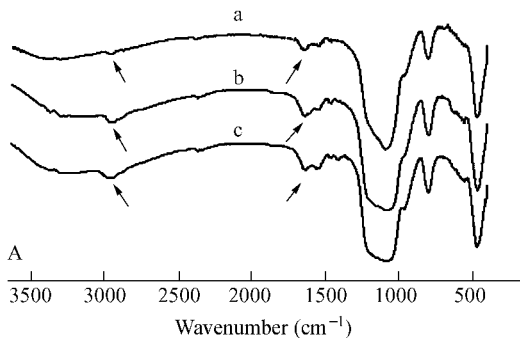


图 2 FTIR spectra (A) and TGA curves (B)
a) $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC); b) $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G1.0);
c) $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ (FITC)-PAMAM(G1.5)

是发蓝光的细胞核 (DAPI 染色), 图 3(C) 和 (III) 分别是图 3(A) 和 (B), (I) 和 (II) 的叠加, 荧光显微镜分析表明绿色的纳米粒呈连续状分布在蓝色的细胞核周围, 并且是在细胞浆里.

CLSM 用来进一步调查纳米粒在细胞中的定位. 图 3(D) 和 (IV)、(E) 和 (V)、(F) 和 (VI) 分别显示的是纳米粒 (虚箭头所示, 绿色)、被 Lysotracker blue 染色的溶酶体 (实箭头所示, 蓝色) 和二者的叠加图. 从叠加图箭头位置可以看出, 绝大多数的绿色纳米粒与被染蓝色的溶酶体重叠, 导致颜色变为青紫色, 说明两种目标纳米粒在进入细胞浆后被溶酶体俘获, 从而进一步证明了纳米粒进入细胞中而不是附着在细胞上, 并且分布在细胞浆

中.这与文献报道的有关纳米颗粒的细胞分布结 果相吻合^[10,11].

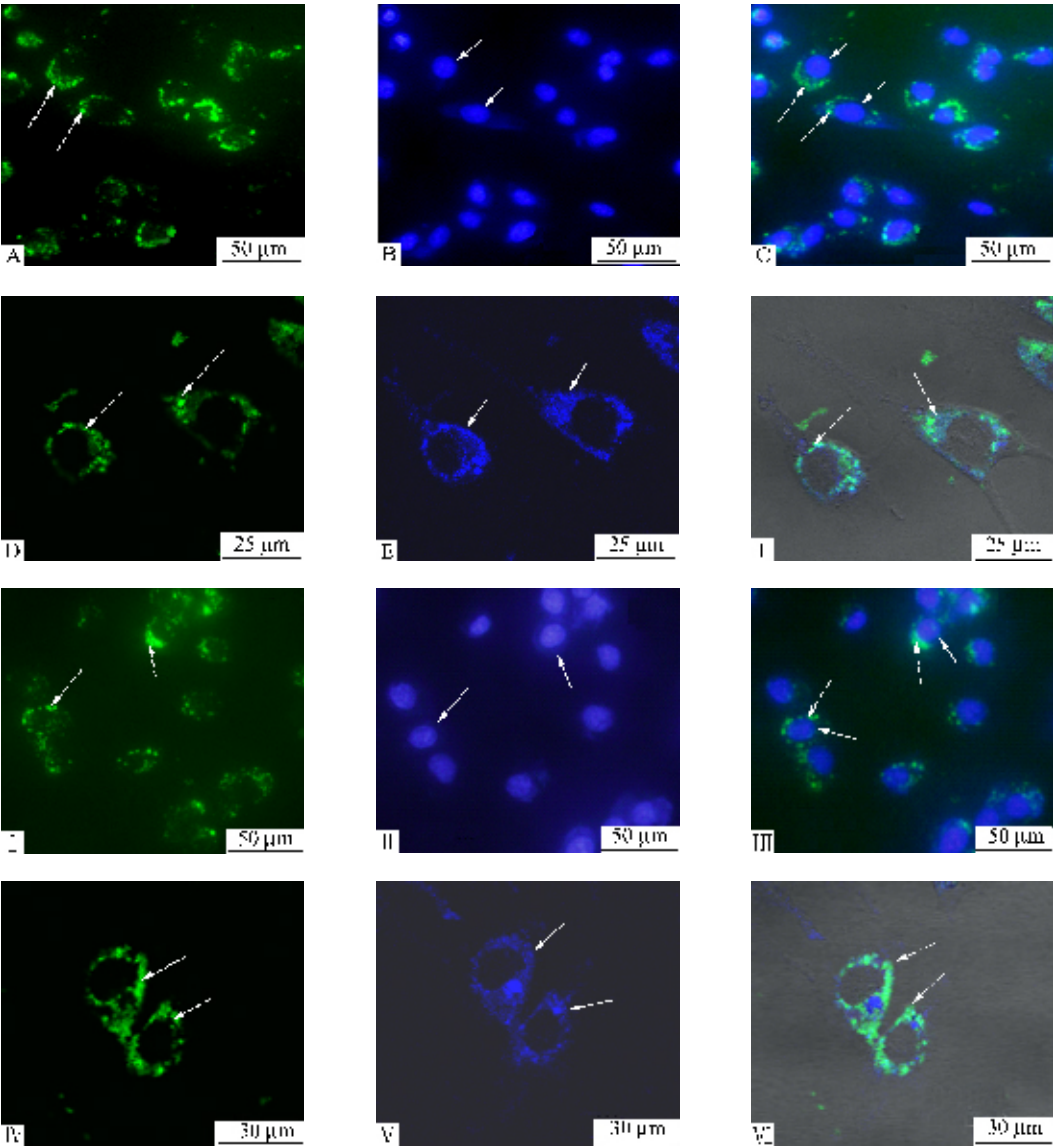


图 3 The fluorescence images of 9L cells treated with $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2(\text{FITC})\text{-PAMAM}(\text{G1.0})$ (A ~ F) and $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2(\text{FITC})\text{-PAMAM}(\text{G1.5})$ (I ~ VI)
(A,D,I,IV) Fluorescence image of FITC(absorption at 490 nm, emission at 520 nm) ; (B, II) Fluorescence image of DAPI(absorption at 359 nm, emission at 461nm) ; (E, V) Fluorescence image of Lysotracker blue(absorption at 373 nm,emission at 422 nm) ; (C) The merged image of (A) and (B) ; (F) The merged image of (D) and (F) ; (III) The merged image of (I) and (II) ; (VI) The merged image of (IV) and (V)

2.3 纳米粒进入细胞能力评价

吞噬含 FITC 纳米粒的细胞被流式细胞仪激发后发绿光,通过对含荧光的细胞进行流式细胞计数来比较不同的官能化对细胞吞噬程度的影响.图 4(a)是目标纳米粒进入细胞情况的统计图,图 4(b)是部分流式细胞结果图.从图 4(a)可以看出,随着纳米粒浓度增加和孵育时间的增长,纳米粒进入细胞的数目增加,即细胞吞噬两种纳米粒呈浓度和时间依赖性.在 0.01 ~ 0.05 mg/mL 纳米粒浓度范围内,细胞摄取纳米粒速度随时间

变化增加明显,而大于 0.05 mg/mL 时,摄取速度增长变慢;在浓度为 0.01 mg/mL 时, PAMAM (G1.0)修饰较 (G1.5) 修饰的纳米粒在各时间点被细胞吞噬量要高,在浓度为 0.05 mg/mL 时, (G1.0)修饰的在 2 h 前被细胞吞噬的量也高于 (G1.5) 修饰的纳米粒.这是因为在低浓度 0.01 mg/mL 时,在生理 pH 条件下, PAMAM (G1.0) 修饰的纳米粒带正电,而细胞膜表面带负电荷,阴阳离子的相互作用使的氨基的纳米粒进入细胞速度和量高于带负电的 PAMAM (G1.5) 修饰纳米粒,即纳

米粒被细胞的吞噬属静电吸附机制,这与文献[12,13]报道的细胞吞噬结果相同. 纳米粒的吞噬除了静电吸附机制外,还存在受体机制和液相流动机制^[14]. 在高浓度时细胞膜两边的渗透压差增大,纳米粒与细胞膜碰撞机会增加,介导了特异或非特异受体吞噬作用增加,从而促进了纳米粒进入细胞,当细胞内纳米粒达饱和时,吞噬速度变

缓,故当纳米粒浓度高于 0.05 mg/mL 时,细胞摄取纳米粒的速度变慢. 图 4(b) 显示的是两种纳米粒在浓度为 0.01 mg/mL,与细胞孵育 1 h 时纳米粒标记细胞的比率. 从图中可看到 PAMAM(G1.5)修饰的纳米粒在 1 h 时,计数了 98.4% 的细胞,仅有 30.1% 细胞被标记;PAMAM(G1.0)修饰的计数了 97% 的细胞,有 41.2% 细胞被标记.

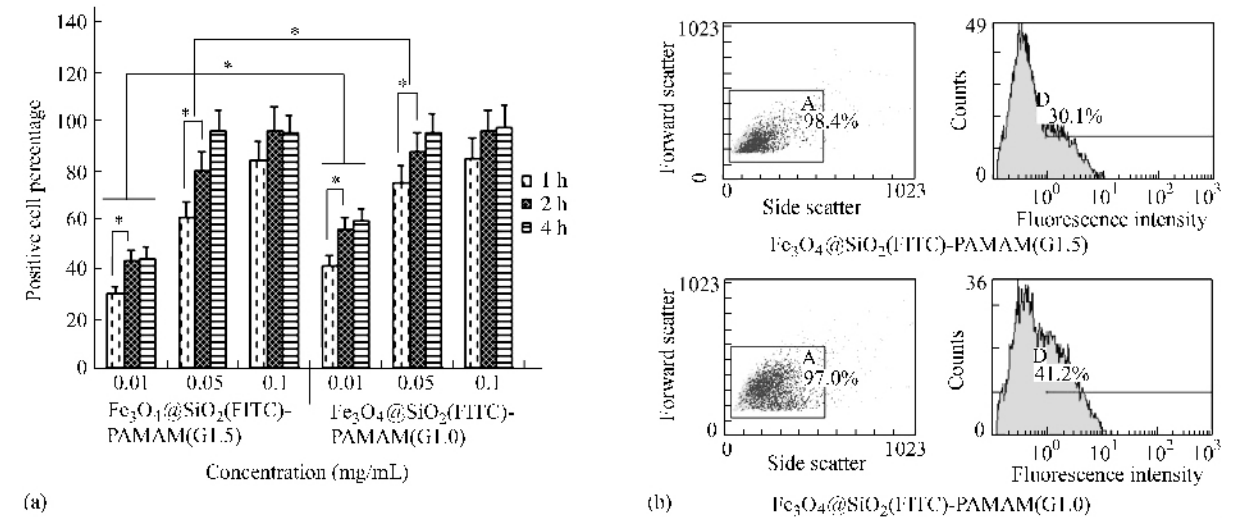


Fig. 4 (A) Flow cytometry analysis of two kinds of nanoparticles on 9L cells after 1, 2 and 4 h incubation time at concentrations of 0.01, 0.05 and 0.1 mg/mL (Positive cells percentage were shown as mean $\pm$ SD (standard deviation), experiments were repeated twice in six wells); (B) Representative flow cytometry chart of two kinds of nanoparticles (0.01 mg/mL) on 9L cells after 1 h incubation

2.4 纳米粒进入细胞机制探讨

TEM 用来研究纳米粒的入胞机制. 图 5 是纳米粒与 9L 细胞孵育 4 h 的细胞电镜图. 在图 5(A) 显示是 PAMAM(G1.5) 修饰的纳米粒在细胞内的分布情况, 在胞浆中可见大量散在的纳米粒、吞噬泡及沉积在溶酶体中的纳米粒. 图 5(B) 显示的是 PAMAM(G1.0) 修饰的纳米粒在细胞内的分布, 箭

头 2 所示细胞膜与纳米粒接触后正在形成凹陷, 在细胞浆中可看到散在的吞噬泡及沉积在溶酶体中的纳米粒, 同样核膜完整, 核内无分布. TEM 分析表明纳米粒主要是以胞吞的机制进入细胞, 即纳米粒首先引发细胞膜凹陷, 然后被细胞包裹形成吞噬小泡进入细胞浆, 进而吞噬小泡会和溶酶体融合, 载体进入溶酶体^[14,11].

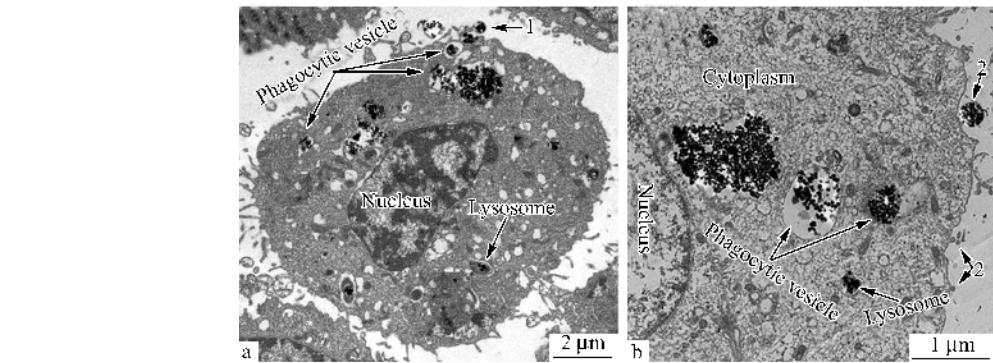


Fig. 5 TEM images of 9L cells treated with two kinds of functionalized nanoparticles

a) The uptake of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{FITC})\text{-PAMAM}(\text{G1.5})$ was initiated upon the invagination of the plasma membrane. Some nanoparticles were already internalized into the cells and form phagocytotic vesicle, while some still in the process of uptake at the plasma membrane (number 1 show). Some nanoparticles were trapped inside the lysosome; b) Cells uptake of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{FITC})\text{-PAMAM}(\text{G1.0})$, nanoparticles were also in cytoplasm and lysosome, number 2 show invagination of the plasm membrane

2.5 细胞毒性评价

图 6 显示的是不同官能化的纳米粒对细胞的毒性评估. 本法采用的是较四甲基偶氮盐比色法(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)更灵敏和方便的 CCK-8 法. 由图 6 知, 从整个趋势看氨基比酯基的纳米粒对细胞的影响大, 这可能由于表面电荷

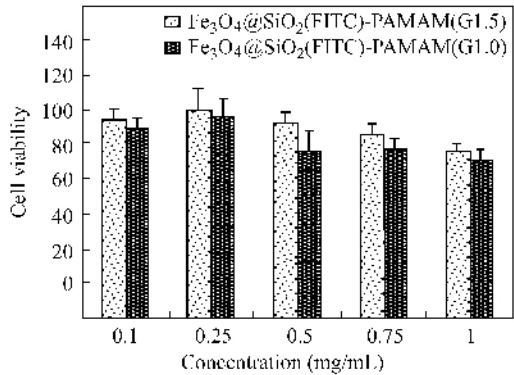


Fig. 6 Cytotoxicity of two kinds of nanoparticles at concentration of 0.1 ~ 1 mg/mL on 9L cell after 24 h incubation
The cells viability was determined by CCK-8 assay and was shown as mean + SD of three determinations

不同引起的, 因为都是同基团不同代数 PAMAM 修饰后纳米颗粒大小几乎没差别, 而只是表面电荷发生很大变化. 但这两种纳米粒在测试浓度范围内 9L 细胞的增殖率都很高, 即使在浓度高达 1.0 mg/mL 时, 两种纳米粒的细胞存活率仍然超过 90%, 且在一定浓度范围内还有促细胞增殖作用, 因此经 PAMAM 修饰后的磁硅纳米粒没有明显的胞毒性.

3 结论

合成了 PAMAM(G1.0) 和 PAMAM(G1.5) 修饰的硅壳荧光纳米粒, 大小经 TEM 表征为 60nm, zeta 电势、TGA、FTIR 表明两种纳米粒被氨基和酯基功能化. 实验证明两种纳米粒对细胞不产生毒性作用, 都分布在细胞浆中, 并能进一步被溶酶体吞噬. 氨基功能化的纳米粒较酯基功能化的纳米粒更宜被细胞吞噬. 这些结果表明纳米粒可以通过表面修饰, 改变其标记细胞的效率及改善对细胞的毒副作用, 为硅壳纳米粒的后续修饰提供参考, 有利于进一步拓展硅纳米颗粒在生物医学领域中的应用.

REFERENCES

1 Quarta A, Di Corato R, Manna L, Ragusa A, Pellegrino T. IEEE Trans Nanobioscience, 2007, 6(4) 298 ~ 308
2 Santra S, Liesenfeld B, Bertolino C, Dutta D, Cao Z H, Tan W H, Moudgil B M, Mericle R A. J Lumines, 2006, 117(1) 75 ~ 82
3 Yuan Yin (原茵), He Xiaoxiao (何晓晓), Wanf Kemin (王柯敏), Tan Weihong (谭蔚弘), Peng Jiaogeng (彭娇凤), Huang Shansheng (黄杉生). Chem J Chinese Universities (高等学校化学学报), 2005, 26(3) 445 ~ 448
4 Thibodeau M S, Giardina C, Knecht D A, Helble J, Hubbard A K. Toxicol Sci, 2004, 80(1) 34 ~ 48
5 Ye Ling (叶玲), Yang Hua (杨华), He Manlin (何满林), Tang Yajuan (唐亚娟), Chen Shuangling (陈双玲), Yuan Yang (原阳), Yun Liuhong (恽榴红). Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 2006, (1) 32 ~ 36
6 Huang R Q, Pei Y Y, Jiang C. J Biomed Sci, 2007, 14(5) 595 ~ 605
7 Jeyprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown N B, D'Emanuele A. Int J Pharm, 2003, 252(1-2) 263 ~ 266
8 Yoon T J, Kim J S, Kim B G, Yu K N, Cho M H, Lee J K. Angew Chem Int Ed Engl, 2005, 44(7) 1068 ~ 1071
9 Kopke R D, Wassel R A, Mondalek F, Grady B, Chen K, Liu J, Gibson D, Dormer K J. Audiol Neurotol, 2006, 11(2) 123 ~ 133
10 Gupta A K, Gupta M. Biomaterials, 2005, 26 1565 ~ 1573
11 Kim J S, Yoon T J, Yu K N, Noh M S, Woo M, Kim B G, Lee K H, Sohn B H, Park S B, Lee J K, Cho M H. J Vet Sci, 2006, 7(4) 321 ~ 326
12 Xing Xinli (邢新丽), He Xiaoxiao (何晓晓), Wang Kemin (王柯敏), Peng Jiaofeng (彭娇凤), Tan Weihong (谭蔚弘). Chem J Chinese Universities (高等学校化学学报), 2006, 27(11) 2076 ~ 2078
13 Kumar R, Roy I, Hulchanskyy Y T, Goswami L N, Bonoiu A C, Bergey E J, Trampusch K M, Maitra A, Prasad P N. Acs Nano, 2008, (2) 449 ~ 456
14 Xing X, He X, Peng J, Wang K, Tan W. J Nanosci Nanotech, 2005, 5(10) 1688 ~ 1693

CELLULAR UPTAKE OF FUNCTIONALIZED SILICA-COATED
FLUORESCENT NANOPARTICLES

ZHAO Huanying¹, WANG Nan², YU Jingxian³, YANG Hui¹, DENG Yunlong³, PENG Yulong³

(¹ *Beijing Institute for Neuroscience, Capital Medical University, Beijing 100069*)

(² *The General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039*)

(³ *School of Chemical Biology and Pharmaceutical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069*)

Abstract Silica-coated fluorescent nanoparticles functionalized with amine-or ester-poly(amido-amide) (PAMAM) were synthesized and characterized by TEM, FTIR, TGA and zeta potential measurements. The efficiency of cellular uptake of nanoparticles, the cytotoxicity of nanoparticles toward 9L cell, and the distribution of nanoparticles in 9L cell were investigated by transmission electron microscopy (TEM), confocal laser scanning microscopy (CLSM), CCK-8 assay and flow cytometry analysis. TEM revealed the average size of nanoparticles was about 60 nm and the zeta potential of nanoparticles modified with amine groups was +19.08, with ester groups was negative-9.01 at physiological pH, respectively. FTIR and TGA results also testified that the two kind of silica-coated fluorescent nanoparticles were respectively functionalized by amine- and ester- PAMAM. CLSM demonstrated that most nanoparticles were distributed in cytoplasm and were entrapped in endosomes. CCK-8 analysis showed that both nanoparticles had no apparent toxicity. Flow cytometry analysis indicated that the cellular uptake of nanoparticles by 9L cells was a concentration- and time- dependent endocytic process, and the uptake of amine functionalized nanoparticles was more efficient than that of ester functionalized nanoparticles.

Keywords Silica, PAMAM, Cellular uptake, Cytotoxicity