

吞噬二氧化硅微粒对 HepG2 细胞黏附和迁移的影响*

张裕英 胡 玲 高长有**

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

摘 要 通过 Stöber 溶胶-凝胶法制备了掺杂荧光染料的二氧化硅微粒. 透射电子显微镜表征其直径分别为 80、160 和 500 nm. 在荧光显微镜下观察 HepG2 细胞对不同尺寸微粒的吞噬并采用流式细胞仪研究了微粒进入细胞的途径. 检测了二氧化硅微粒的细胞毒性, 通过划痕修复实验、细胞黏附和 Transwell 细胞迁移实验研究了吞噬二氧化硅微粒对细胞黏附和迁移能力的影响. 实验结果表明, HepG2 细胞主要通过网格蛋白介导的胞吞途径对二氧化硅微粒进行吞噬, 4℃ 培养和叠氮化钠处理都会抑制胞吞的效率. 在浓度为 0 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 直径为 80 nm 的二氧化硅微粒会对细胞造成浓度依赖的细胞毒性, 而直径为 160 nm 和 500 nm 的二氧化硅微粒没有对细胞存活率造成明显的影响. 但是, 吞噬三种尺寸的微粒后, 细胞的黏附和迁移能力都有较明显的下降, 推测原因可能是由于胞吞过程对细胞骨架造成了损伤.

关键词 二氧化硅, 胞吞, 细胞毒性, 细胞迁移

随着材料科学与生物学研究领域的不断交叉渗透, 纳米微粒及其复合材料已被广泛应用于生命科学与医学研究中, 在药物的缓释传递、基因载体、免疫荧光探针、疾病的早期诊断等方面显示出优越的生物学性能^[1~4]. 纳米微粒在生物医学研究领域的应用涉及到微粒与细胞的相互作用, 包括微粒进入细胞的途径、在细胞内的分布和转运过程以及对细胞生理功能的影响等. 近年来, 有关不同组成、尺寸、形状和表面性质的纳米微粒与细胞相互作用的研究得到了迅速发展. 研究表明, 细胞内吞是有机聚合物微粒和无机纳米微粒进入细胞的主要途径^[5~7], 不同材料进入细胞后可能会对细胞的活性造成不同的影响, 例如, 正离子聚合物聚乙烯亚胺 (PEI) 作为基因治疗载体能实现 DNA 在细胞内非常高效的表达, 但 PEI 具有严重的细胞毒性且在体内难以代谢清除, 通过聚乙二醇 (PEG) 修饰则可以有效降低其细胞毒性并保持其基因转染效率^[8]; 可生物降解的丙交酯-乙交酯共聚物 (PLGA) 纳米微粒装载染料分子作为细胞内荧光探针进入血管平滑肌细胞后不会对细胞的存活率造成明显影响^[9]; 未经修饰的无机纳米微粒如纳米金、量子点等在细胞内的累积会在一定程度上引起生物学毒性^[10, 11].

作为一种优良的结构和功能材料, 二氧化硅

微粒在化工、制药、化妆品和食品加工等许多领域有着广泛的应用. 近年来, 随着纳米技术和生物科学的迅速发展, 纳米尺度的二氧化硅微粒吸引了更多研究者的目光, 被赋予了新的生物学和医学检测诊治功能. 例如, 纳米二氧化硅微粒作为抗癌药物定向传递和缓释的载体, 能够有效提高传统药物的疗效、降低毒副作用^[12, 13]; 装载 DNA 用于生物体内的基因传递能高效转染细胞并诱导相应蛋白的大量表达^[14, 15]; 与生物分子偶联并掺杂荧光染料的二氧化硅微粒能够用于肿瘤细胞的特异性识别和成像, 在癌症的早期诊断方面发挥重要作用^[16]; 基于纳米二氧化硅微粒制备的生物传感器还能用于检测动物体内葡萄糖、乳酸、L-谷氨酸和次黄嘌呤等生物分子的水平变化^[17].

为了更加安全有效的应用二氧化硅微粒并充分发挥其优良的生物医学功能, 研究者们在进行生物学实验的同时也对其细胞毒性进行了评价. Lin 等的研究结果表明, 粒径为 16 nm 和 46 nm 的二氧化硅纳米微粒通过引起细胞内活性氧水平的上升而造成浓度依赖的细胞毒性^[18], 而另一个研究小组的实验数据则表明低于 100 $\mu\text{g/mL}$ 的粒径为 50 nm 的二氧化硅微粒不会引起分子水平的细胞损伤^[19]. 因此, 对不同尺寸二氧化硅微粒生物相容性的评价还需要进一步的研究. 微粒通过不

* 庆祝杨士林先生 90 华诞专稿; 2009-03-09 收稿, 2009-04-25 修稿; 国家自然科学基金(基金号 50873087, 50425311)和国家重点基础研究发展规划项目(973 计划, 项目号 2005CB623902)资助; ** 通讯联系人, E-mail: cygao@mail.hz.zj.cn

同的途径进入细胞除影响其实现药物传递功能的效率并对细胞的活性造成影响外,还可能会对细胞的增殖、迁移、分化等生理功能造成影响^[20],因此,在考察微粒细胞毒性的同时,还应该对细胞吞噬微粒的途径以及胞吞微粒后细胞功能的变化进行考察.

细胞黏附和迁移是动物细胞的基本生命活动,在胚胎发育、伤口愈合、组织形成等众多生理过程中起着非常关键的作用,在包括肿瘤转移和炎症反应在内的多种疾病状态中也扮演着重要的角色^[21].因此,本文制备了不同粒径的二氧化硅微粒并用荧光染料进行标记,以人肝癌细胞 HepG2 为模型,比较了细胞对不同尺寸的二氧化硅微粒的吞噬能力,考察了微粒进入细胞的途径,对细胞活性的影响,以及吞噬二氧化硅微粒后细胞黏附能力和迁移能力的变化,为二氧化硅微粒安全应用于细胞生物学研究分析提供基础数据.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

罗丹明异硫氰酸盐(RITC)、盐酸金刚烷胺(amandatine-HCl)、染料木素(genestein)、噻唑蓝(MTT)、叠氮化钠(sodium azide)购自 Sigma 公司(USA).正硅酸乙酯(TEOS)、 γ -氨基丙基-三乙氧基硅烷(KH550)、氨水购自北京化学试剂公司.细胞培养及实验用水均为经 Milli-Q water system (Millipore, USA)过滤的超纯水.

HepG2 细胞为本实验室冻存,复苏后用常规方法接种于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养液(Gibco, USA)中,于 37℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱(Thermo, USA)中培养.

其他仪器设备有台式冷冻离心机(Sigma, USA)、JEM - 1230 透射电子显微镜(TEM, JEOL, Japan)、荧光倒置显微镜(Zeiss, Germany)、FACS Calibur 流式细胞计数仪(BD, USA)、酶联免疫检测仪(BioRad, USA).

1.2 二氧化硅微粒的制备和表征

参照文献[22]的方法,首先制备 RITC 标记的硅烷偶联剂,将 9.4 mg KH550 与 11.8 mg RITC 加入 1 mL 无水乙醇中,室温下避光磁力搅拌反应过夜.然后,将第一步的产物加入到按不同体积比混合的水、氨水和无水乙醇的溶液中,再加入一定量的 TEOS,在 30℃ 恒温水浴箱内搅拌反应 4 h 后得

到特定尺寸的 RITC 标记的二氧化硅微粒,离心洗涤多次,干燥保存.

将二氧化硅微粒均匀分散在乙醇中,滴于覆盖有聚合物薄膜的铜网上,自然干燥,于 TEM 下观察二氧化硅微粒的形貌和尺寸.

1.3 流式细胞仪检测细胞对二氧化硅微粒的胞吞途径

将细胞以 8×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板中,放入培养箱培养 24 h 后,分别加入不同尺寸的二氧化硅纳米微粒使其终浓度为 100 μ g/mL,继续培养 4 h,收集细胞,采用流式细胞仪检测细胞内的平均荧光强度.为了研究二氧化硅微粒进入细胞的途径,对比 37℃ 与 4℃ 细胞对二氧化硅微粒吞噬能力的变化,并分别加入能量代谢抑制剂叠氮化钠、网格蛋白通路抑制剂盐酸金刚烷胺和小穴蛋白通路抑制剂染料木素,检测细胞内平均荧光强度,观察抑制剂对细胞吞噬二氧化硅微粒能力的影响.实验重复 3 次.

1.4 二氧化硅微粒对细胞存活率的影响

取对数生长期细胞,将细胞按每孔 1×10^4 个的密度接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,加入用培养液稀释的二氧化硅纳米微粒使其终浓度分别为 5、25、50、100、200 μ g/mL,每个浓度设 3 个复孔,重复 3 次实验.培养 4 h 后每孔加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h,弃去培养液,每孔加入 200 μ L 二甲亚砜(DMSO)轻微振摇使生成的紫色结晶溶解,用酶联免疫检测仪测定 570 nm 的吸光度.以不加细胞只加培养液的孔为空白对照,以加细胞和不含二氧化硅微粒培养液的孔为阴性对照,按下列公式计算细胞存活率:

存活率 % = (实验组 A_{570nm} - 空白组 A_{570nm}) / (对照组 A_{570nm} - 空白组 A_{570nm}) $\times 100\%$

1.5 划痕修复实验

将细胞接种于 24 孔板,调整细胞密度为 5×10^4 个/孔,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养至基本融合,加入不同尺寸的二氧化硅纳米微粒使其终浓度为 100 μ g/mL,继续培养 4 h.每组设 3 个复孔.用塑料针头在培养皿中央纵向划痕,形成均匀一致的划痕且在显微镜下能同时看到创面两侧.加入磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤 3 次以去除未贴壁细胞,更换新鲜培养液,放入培养箱中继续培养.倒置显微镜下观察 24 h 和 48 h 后划痕修复的情况,考察吞噬二氧化硅微粒对细胞修复划痕能力的影响.

1.6 细胞黏附和迁移实验

将细胞按每孔 3×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后加入不同尺寸的二氧化硅纳米微粒使其终浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$, 继续培养 10 h. PBS 洗涤 3 次后消化细胞并在显微镜下计数, 将细胞重悬于 DMEM 培养液中接种于 24 孔板, 调整密度为 5×10^4 个/孔, 每组样品设 3 个复孔. 37°C 培养箱中培养 24 h 后, 加入 PBS 洗涤 3 次以去除未黏附细胞, 再用胰酶消化细胞并计数. 以未加入二氧化硅微粒共培养的细胞为对照, 计算黏附百分率.

细胞迁移实验方法参照文献[23], Transwell 细胞培养小室(Greiner Bio-One, Germany) PET 膜的孔径为 $8 \mu\text{m}$. 细胞与 $100 \mu\text{g/mL}$ 不同尺寸的二氧化硅纳米微粒共培养 10 h 后, 洗涤、消化并计数, 重悬于不含血清的 DMEM 培养液中. 调整细胞密度, 按 1×10^5 每孔加入小室中, Transwell 下室中加入 $600 \mu\text{L}$ 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液. 培养

10 h 后, 将 Transwell 小室取出, PBS 洗涤, 用棉签轻轻擦拭小室内侧壁以去除未穿膜的细胞, 风干后用 0.1% 的结晶紫溶液染色, 显微镜下观察拍照. 加入体积分数为 33% 的醋酸溶液溶解吸附的结晶紫并用酶联免疫检测仪测定 570 nm 的吸光度, 以未加入二氧化硅微粒共培养的细胞为对照, 比较吞噬微粒后细胞迁移能力的变化. 实验重复 3 次.

2 结果和讨论

2.1 二氧化硅微粒的制备和表征

Stöber 溶胶-凝胶法是一种在醇介质中水解正硅酸乙酯合成胶体二氧化硅微粒的方法, 该方法制备得到的微粒单分散性好, 尺寸可控, 而且微粒表面的硅羟基非常有利于进行功能化的改性修饰. 如图 1 所示, 透射电镜下观察到制备得到的二氧化硅微粒呈规则球形, 直径分别为 80、160 和 500 nm 左右, 尺寸均匀, 分散性好.

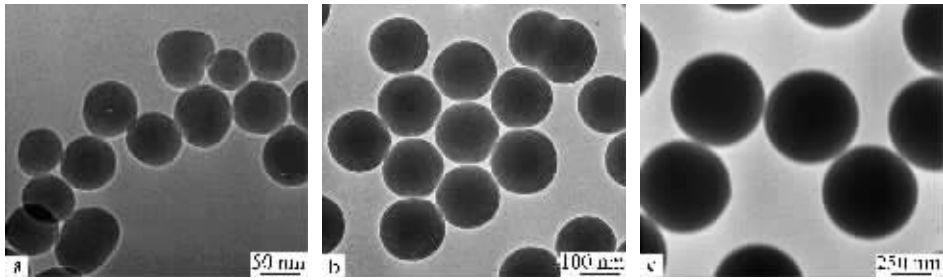


Fig. 1 TEM images of SiO_2 particles with a diameter of (a) 80 nm, (b) 160 nm and (c) 500 nm

2.2 二氧化硅微粒进入细胞的途径

细胞通过不同的途径完成营养物质和代谢产物的转运, 与周围环境发生物质与能量的交换, 完成特定的生理功能. 文献报道, 生物大分子与颗粒性物质主要是通过细胞的内吞作用进入细胞膜, 包括网格蛋白介导的胞吞途径、小穴蛋白介导的胞吞途径、不依赖于网格蛋白和小穴蛋白的胞吞途径等^[24]. 纳米微粒的形状、尺寸、表面电荷和亲疏水性都会对细胞的转运过程造成影响^[6].

将细胞与二氧化硅微粒共培养 4 h, 在荧光显微镜下观察到 3 种尺寸的微粒均能进入细胞, 发出强烈的红色荧光(图 2). 从流式细胞仪检测结果得知, HepG2 细胞对 3 种尺寸的纳米微粒的吞噬能力随粒径增大而有所下降. 如图 2 所示, 吞噬了直径 80 nm 的二氧化硅微粒的细胞大约为总细胞数的 96.5%, 而对于直径 500 nm 的微粒, 被标记的细胞约为总细胞数的 84.4%.

为了研究能量对细胞摄入二氧化硅纳米微粒的影响, 我们比较了 37°C 与 4°C 培养条件下细胞

对二氧化硅微粒吞噬能力的变化. 从图 3 中可以看出, 4°C 条件下细胞对微粒的吞噬作用明显减弱, 被 3 种尺寸微粒标记的细胞比例分别下降到了 37°C 共培养时的 10.3%, 7.9% 和 4.7%. 加入代谢抑制剂叠氮化钠对细胞进行处理也得到了类似的实验结果. 因此, HepG2 细胞对二氧化硅微粒的胞吞是一个能量依赖的转运过程.

盐酸金刚烷胺能通过抑制网格蛋白有被小凹的形成而阻断网格蛋白介导的胞吞途径, 染料木素则会通过抑制酪氨酸激酶的活性而阻断小穴蛋白介导的胞吞途径^[25]. 因此, 我们通过加入这两种抑制剂来进一步研究细胞吞噬二氧化硅纳米微粒能力的变化, 探讨二氧化硅微粒进入细胞的具体途径. 实验结果表明(图 3), 盐酸金刚烷胺能显著抑制 HepG2 细胞对 3 种尺寸微粒的胞吞, 而染料木素的加入对胞吞能力仅有非常轻微的抑制. 由此可知, HepG2 细胞对二氧化硅微粒的吞噬主要是通过网格蛋白介导的胞吞途径来进行, 而小穴蛋白介导的胞吞途径也起到了一定的作用.

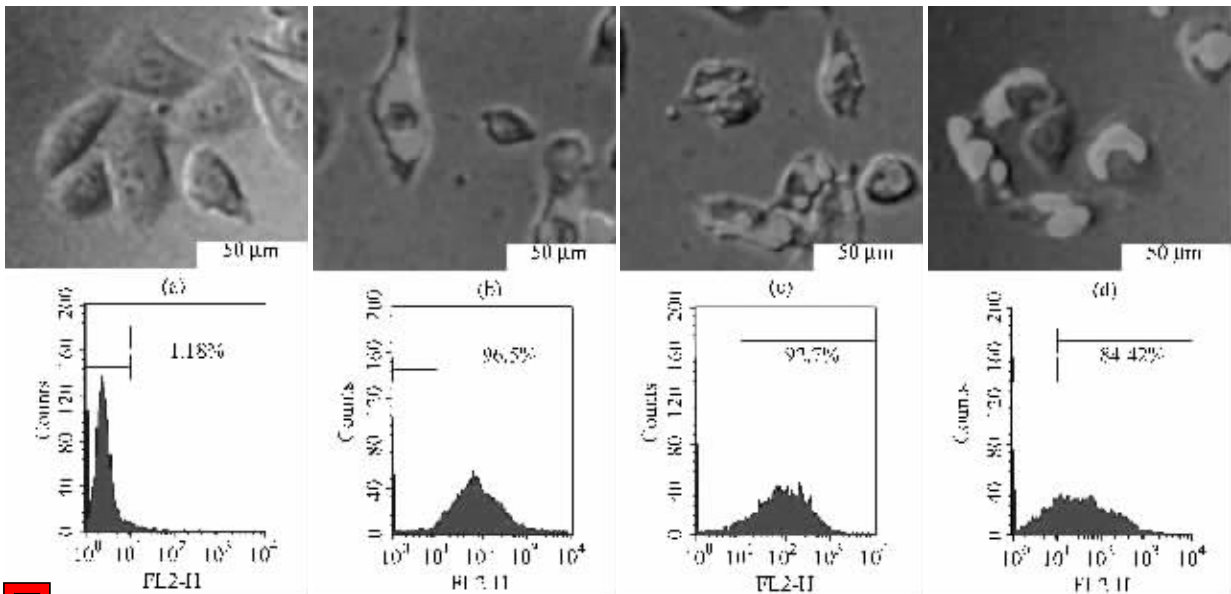


图 2 细胞对 SiO₂ 颗粒的摄取。HepG2 细胞在 37℃ 下与不同尺寸 SiO₂ 颗粒 (80 nm、160 nm 和 500 nm) 孵育 4 h 后, 通过流式细胞术测定其摄取率。图中数字表示摄取 SiO₂ 颗粒的细胞百分比。

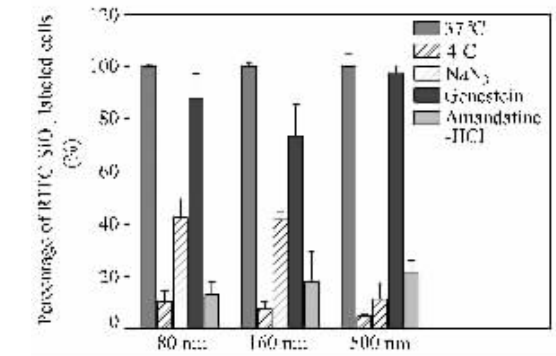


图 3 细胞对 SiO₂ 颗粒的摄取。HepG2 细胞在 37℃ 下与不同尺寸 SiO₂ 颗粒 (80 nm、160 nm 和 500 nm) 孵育 4 h 后, 通过流式细胞术测定其摄取率。图中数字表示摄取 SiO₂ 颗粒的细胞百分比。

The cells were incubated with 100 $\mu\text{g/mL}$ of SiO₂ particles with a diameter of 80, 160 and 500 nm respectively for 4 h; The cells incubated at 37°C in the absence of inhibitor were used as control.

2.3 二氧化硅微粒对细胞存活率的影响

采用 MTT 法研究了不同尺寸的二氧化硅微粒对 HepG2 细胞存活率的影响, 结果如图 4 所示。从图中可以看出, 粒径为 160 nm 和 500 nm 的二氧化硅微粒对细胞的存活率影响并不明显, 浓度达 200 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞存活率仍大于 90%。而粒径为 80 nm 的二氧化硅微粒则引起了浓度依赖的细胞毒性, 微粒浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞存活率分别下降到了 74% 和 67.9%。由此可知, 微粒产生的细胞毒性与其尺寸密切相关, 同样

化学组成的微粒, 纳米尺寸和微米尺寸可能会对细胞造成不同的毒性。

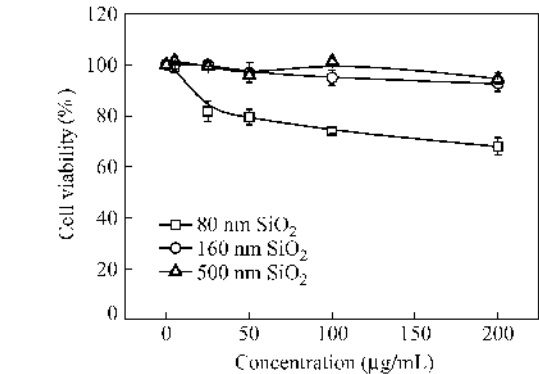


图 4 细胞对 SiO₂ 颗粒的相对存活率。HepG2 细胞在 37℃ 下与不同尺寸 SiO₂ 颗粒 (80 nm、160 nm 和 500 nm) 孵育 4 h 后, 通过 MTT 法测定其相对存活率。图中数字表示相对存活率。

Cells were incubated with the particles of different concentrations (5, 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$) at 37°C for 4 h; The viability of the control sample was set as 100%

2.4 划痕修复实验

细胞吞噬微粒后, 其自身的功能, 如增殖、迁移、分化等可能会受到影响。细胞迁移是多种重要生理活动的基础, 在机体的免疫防卫、创伤修复、血管生成及器官重塑等过程中发挥着关键作用^[26]。划痕修复实验用于研究吞噬二氧化硅微粒对细胞迁移速度的影响, 结果如图 5 所示。从图中可以看出, 未加入二氧化硅微粒共培养的对照细

胞迁移能力较强, 24 h 内划痕区已经被迁移的细胞覆盖约一半, 48 h 后划痕已基本完全修复; 而吞噬了不同尺寸二氧化硅微粒后细胞的运动速度变

慢, 培养 48 h 后也有部分细胞迁移到划痕区, 但完全修复划痕则需要更长的时间.

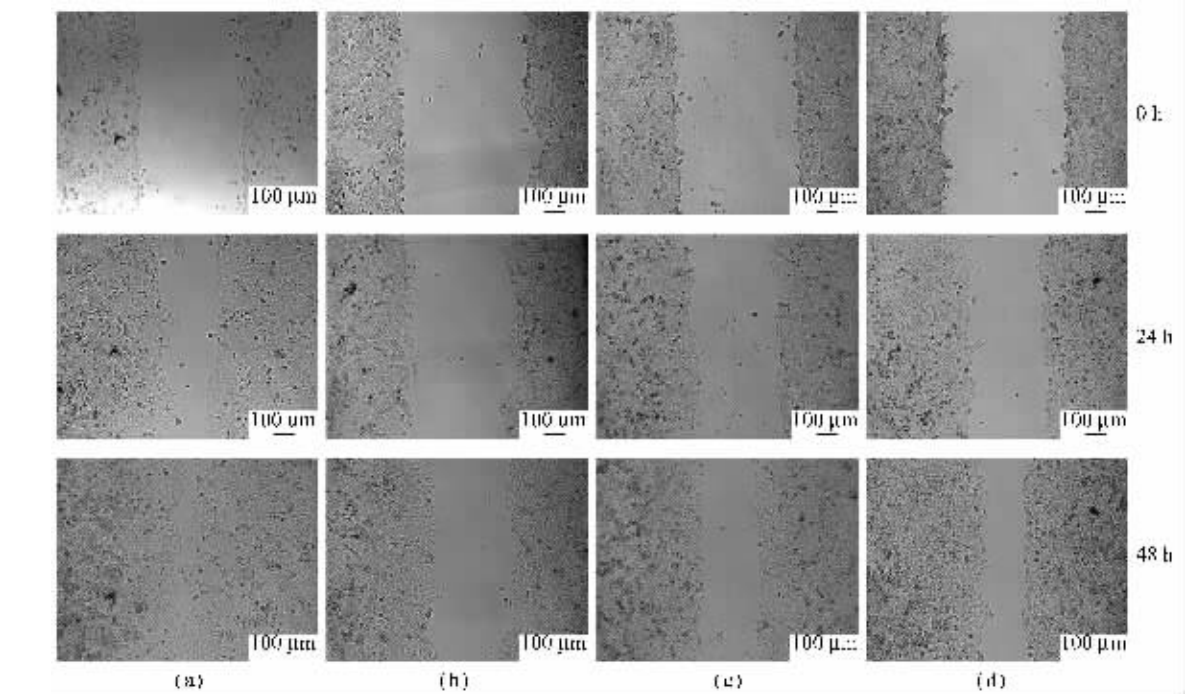


图 5 Bright field photos showing the wound healing process of HepG2 cells which had been incubated without (a) or with 100 $\mu\text{g/mL}$ of SiO_2 particles with a diameter of (b) 80 nm, (c) 160 nm and (d) 500 nm for 4 h, respectively
Each sample was assayed in triplicate

2.5 细胞黏附和迁移

将对照细胞和吞噬了二氧化硅微粒的细胞分散于培养液中, 培养 24 h 后在倒置显微镜下观察拍照, 结果如图 6 所示. 从图中可以看出, 对照细胞形状为较规则的长梭形, 贴壁良好, 而吞噬了二氧化硅微粒的细胞部分变圆, 黏附能力变差, 荧光显微镜下观察到细胞发出强烈的红色荧光, 表明细胞吞噬了大量的二氧化硅微粒. 用胰酶消化细胞并计数(图 6), 与对照细胞相比较, 吞噬了 3 种尺寸二氧化硅微粒的细胞贴壁率均有明显下降, 约为对照细胞的 60% 左右.

Transwell 细胞培养小室被用于比较细胞的迁移速率. 采用结晶紫对穿过膜的细胞进行染色, 显微镜下观察发现, 对照细胞在血清的刺激下迁移速率较快, 10 h 内有大量细胞受到血清的趋化作用影响穿过培养小室膜, 而吞噬了二氧化硅微粒的细胞穿膜效率下降, 穿过膜的细胞数量明显少于对照组(图 7). 用 33% 的醋酸溶液溶解吸附的结晶紫并对吸光度进行比较, 结果如图 7 所示, 与对照组相比较, 吞噬二氧化硅微粒后细胞穿膜的

相对百分比分别下降到了 78.7%、51.5% 和 46.6%.

在细胞对外界物质的吞噬、细胞的黏附和迁移等生理过程中, 细胞骨架扮演着非常重要的角色. 细胞骨架主要由微丝、微管和中间纤维组成, 微丝对于细胞的形态维持及细胞运动起着重要的作用, 微管在胞质中形成网络结构并作为膜泡运输的导轨, 中间纤维围绕着细胞核分布并扩展到细胞质膜, 主要起支撑作用. 细胞对微粒的吞噬以及胞吞小泡在细胞内的运输涉及到微丝、微管、中间纤维等细胞骨架蛋白的重组装配, 过程中可能会引起细胞骨架结构的损坏^[27]. Gupta 等将明胶纳米微粒与人成纤维细胞共培养, 发现较高浓度(500 $\mu\text{g/mL}$)的明胶纳米微粒虽然不会对细胞存活率造成影响, 但是通过对微丝和微管进行免疫荧光染色观察到细胞骨架受到了损坏^[28]. 另外, 本课题组前期研究发现, 吞噬粒径为 100 nm 左右的金纳米微粒会引起 ECV-304 细胞形态和骨架的改变, 而在微粒表面修饰聚己酸内酯后, 则对细胞骨架不会造成明显的损伤^[29].

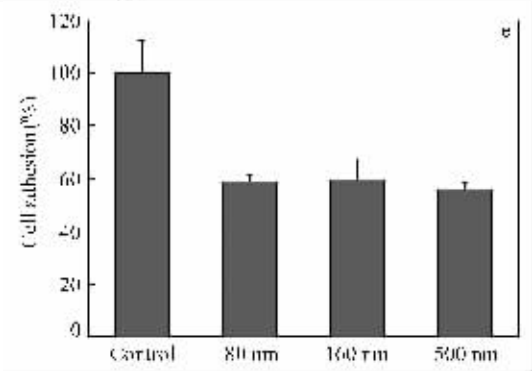
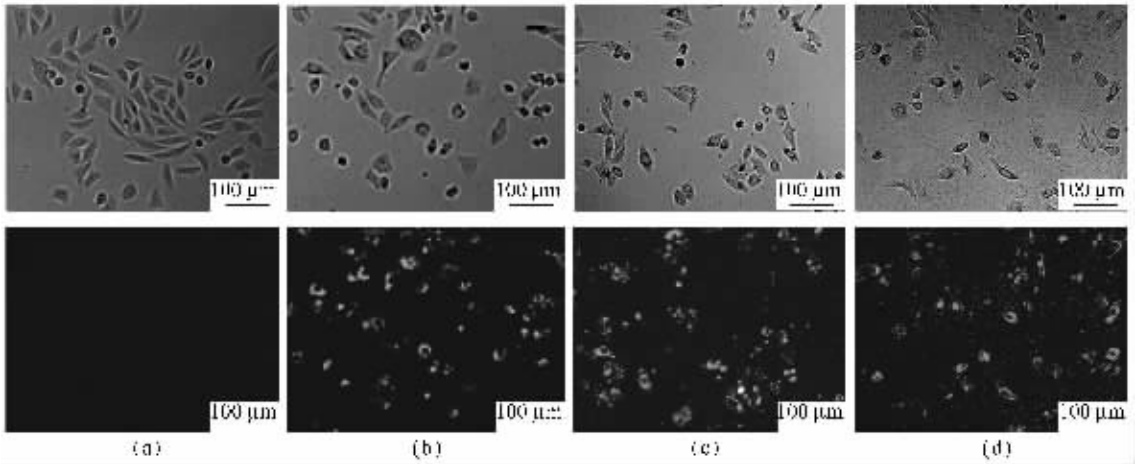


Fig. 6 The upper and the middle rows represent phase contrast and fluorescence images of HepG2 cells observed under an optical microscope, respectively
The cells were incubated without (a) or with 100 μg/mL of SiO₂ particles with a diameter of (b) 80 nm, (c) 160 nm and (d) 500 nm respectively for 10 h, detached, and then equal number of cells were seeded to the culture plate and allowed to adhere for another 24 h; (e) Adhesion of HepG2 cells quantitated from the above observation; The attached cell number of the control sample was set as 100 % .

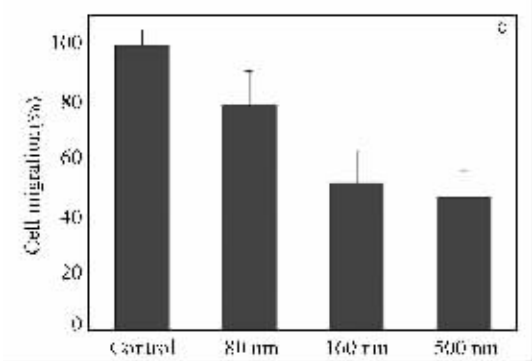
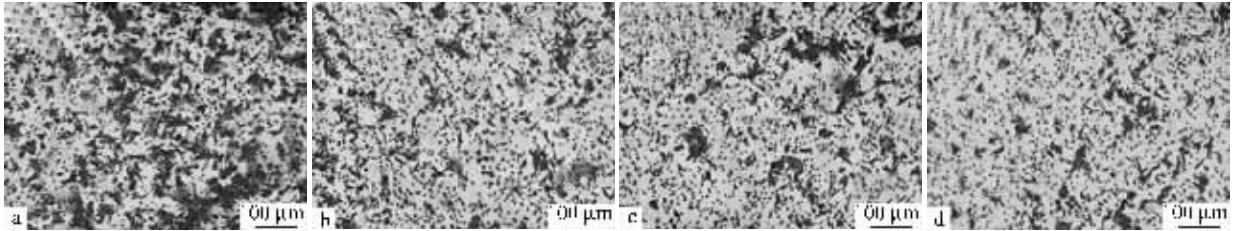


Fig. 7 The up block represents optical images of HepG2 cells that have crossed through the pores of transwell chamber and stained by crystal violet
The cells were incubated without (a) or with 100 μg/mL of SiO₂ particles with a diameter of (b) 80 nm, (c) 160 nm and (d) 500 nm respectively for 10 h, detached, and then 1 × 10⁵ cells were added to each of the upper chamber and incubated for another 10 h; (e) Migration of HepG2 cells quantitated by absorption value; The absorption value of the control sample was set as 100% .

流式细胞仪研究二氧化硅微粒胞吞途径的实验结果表明, HepG2 细胞主要通过网格蛋白介导的细胞内吞对这 3 种尺寸的微粒进行吞噬。微粒吸附到细胞表面后, 细胞膜内陷形成网格蛋白有被小凹, 随后小凹颈部细胞膜融合, 把微粒装入胞吞小泡, 胞吞小泡在细胞内沿着细胞骨架定向运输, 到达溶酶体。因此, HepG2 细胞与直径为 160 nm 和 500 nm 的二氧化硅微粒共培养, 虽然没有引起细胞存活率的明显下降, 但是在细胞吞噬微粒的过程中可能引起了细胞骨架蛋白的变化, 对细胞骨架造成了损伤, 从而抑制了细胞的黏附和迁移能力。因此, 对于微粒生物相容性的评价除细

胞毒性外, 也应考虑到胞吞微粒对细胞黏附、迁移以及分化等功能的影响。

3 结论

制备了荧光染料标记的二氧化硅微粒, 经 TEM 表征直径分别为 80、160 和 500 nm, 研究了 3 种尺寸微粒进入细胞的途径及对细胞活性和功能的影响。实验结果表明, HepG2 细胞主要通过网格蛋白介导的胞吞途径对二氧化硅微粒进行吞噬, 直径为 80 nm 的二氧化硅微粒对细胞引起了浓度依赖的细胞毒性, 3 种尺寸的微粒都会对细胞的黏附和迁移能力造成影响。

REFERENCES

- 1 Brannon-Peppas L, Blanchette J O. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56: 1649 ~ 1659
- 2 Citkowicz A, Petry H, Harkins R N, Ast O, Cashion L, Goldmann C, Bringmann P, Plummer K, Larsen B R. *Anal Biochem*, 2008, 376(2): 163 ~ 172
- 3 Wu X Y, Liu H J, Liu J Q, Haley K N, Treadway J A, Larson J P, Ge N F, Peale F, Bruchez M P. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 41 ~ 46
- 4 Portney N G, Ozkan M. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 384(3): 620 ~ 630
- 5 Gratton S E, Ropp P A, Pohlhaus P D, Luft J C, Madden V J, Napier M E, DeSimone J M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(33): 11613 ~ 11618
- 6 Hu L, Mao Z W, Gao C Y. *J Mater Chem*, 2009, 19: 3108 ~ 3115
- 7 Chithrani B D, Chan W C. *Nano Letters*, 2007, 7(6): 1542 ~ 1550
- 8 Petersen H, Fechner P M, Martin A L, Kunath K, Stolnik S, Roberts C J, Fischer D, Davies M C, Kissel T. *Bioconjugate Chem*, 2002, 13(4): 845 ~ 854
- 9 Panyam J, Sahoo S K, Prabha S, Bargar T, Labhasetwar V. *Int J Pharm*, 2003, 262(1-2): 1 ~ 11
- 10 Pemodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, Ulman A, Rafailovich M. *Small*, 2006, 2(6): 766 ~ 773
- 11 Kim B Y, Jiang W, Oreopoulos J, Yip C M, Rutka J T, Chan W C. *Nano Letters*, 2008, 8(11): 3887 ~ 3892
- 12 Ohulchanskyy T Y, Roy I, Goswami L N, Chen Y, Bergey E J, Pandey R K, Oseroff AR, Prasad P N. *Nano Letters*, 2007, 7(9): 2835 ~ 2842
- 13 Czarnobaj K, Lukasiak J. *J Mater Sci*, 2007, 18(10): 2041 ~ 2044
- 14 Bharali D J, Klejbor I, Stachowiak E K, Dutta P, Roy I, Kaur N, Bergey E J, Prasad P N, Stachowiak M K. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11539 ~ 11544
- 15 Roy I, Ohulchanskyy T Y, Bharali D J, Pudavar H E, Mistretta R A, Kaur N. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(2): 279 ~ 284
- 16 Qian J, Li X, Wei M, Gao X W, Xu Z P, He S L. *Optics Express*, 2008, 16(24): 19568 ~ 19578
- 17 Zhang F F, Wan Q, Li C X, Wang X L, Zhu Z Q, Xian Y Z, Jin L T, Yamamoto K. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 380(4): 637 ~ 642
- 18 Lin W S, Huang Y W, Zhou X D, Ma Y F. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 217: 252 ~ 259
- 19 Jin Y, Kannan S, Wu M, Zhao J X. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20(8): 1126 ~ 1133
- 20 Kostura L, Kraitchman D L, Mackay A M, Pittenger M F, Bulte J W. *NMR in Biomedicine*, 2004, 17(7): 513 ~ 517
- 21 Lauffenburger D A, Horwitz A F. *Cell*, 1996, 84: 359 ~ 369
- 22 Flachsbarth H, Stöber W. *J Colloid Interf Sci*, 1969, 30(4): 568 ~ 73
- 23 He Y B, Chang G D, Zhan S L, Song X M, Wang X F, Luo Y Z. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370(3): 489 ~ 494
- 24 Gao X L, Wang T, Wu B X, Chen J, Chen J Y, Yue Y, Dai N, Chen H Z, Jiang X G. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(1): 35 ~ 40
- 25 Xu Z P, Niebert M, Porazik K, Walker T L, Cooper H M, Middelberg A P J, Gray P P, Bartlett P F, Lu G Q. *J Controlled Release*, 2008, 130(1): 86 ~ 94
- 26 Lauffenburger D A, Horwitz A F. *Cell*, 1996, 84: 359 ~ 369
- 27 Samaj J, Baluska F, Voigt B, Schlicht M, Volkmann D, Menzel D. *Plant Physiol*, 2004, 135(3): 1150 ~ 1161
- 28 Gupta A K, Gupta M, Yarwood S J, Curtis A S G. *J Controlled Release*, 2004, 95: 197 ~ 207
- 29 Mao Z W, Wang B, Ma L, Gao C Y, Shen J Q. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2007, 3: 215 ~ 223

EFFECT OF CELLULAR UPTAKE OF SiO₂ PARTICLES ON ADHESION AND MIGRATION OF HepG2 CELLS

ZHANG Yuying, HU Ling, GAO Changyou

(*Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Ministry of Education,*

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

Abstract The dye-doped SiO₂ particles with diameters of 80, 160 and 500 nm were prepared by using the Stöber sol-gel method. Cellular uptake of the luminescent SiO₂ particles by HepG2 cells and the endocytic pathway were studied by fluorescent microscopy and flow cytometry. Influence of the SiO₂ particles on HepG2 cells was tested in terms of cytotoxicity, cell adhesion and migration by MTT assay, cell adhesion assay, the wound healing and transwell assay. According to the results of flow cytometry, the uptake efficiency of the SiO₂ particles was significantly decreased when the culture was performed at 4°C as well as in the presence of sodium azide or amandatine-HCl, while only very limited reduction was observed with the addition of genestein, revealing that the clathrin-mediated endocytosis was the main uptake pathway. The MTT assay found that the 80 nm SiO₂ particles caused cytotoxicity in a dose-dependent manner, while the 160 nm and 500 nm particles didn't show significant cytotoxicity in a concentration range of 0 ~ 200 µg/mL. However, the results of the wound healing assay, cell adhesion and transwell assay demonstrate that the cell adhesion and migration were greatly inhibited by uptake of the SiO₂ particles regardless of their size, most possibly because the endocytic process leads to disruption of the cytoskeleton. These studies suggest that the effect of endocytosis on functions of cells should also be assessed to evaluate the biocompatibility of nanoparticles.

Keywords Silicon dioxide, Endocytosis, Cytotoxicity, Cell migration