

金纳米微粒辅助细胞激光热作用疗法研究*

姚翠萍^{1,2,3**} 张镇西³⁾ 姚保利¹⁾

¹⁾中国科学院西安光学精密机械研究所, 瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 西安 710119;

²⁾中国科学院研究生院, 北京 100049;

³⁾西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室, 生命科学与技术学院生物医学工程研究所, 西安 710049)

摘要 金纳米微粒对可见光的强吸收特性使得光能可以高效地转换为热能. 由于金纳米微粒的尺度在几十纳米范围, 并且很容易与其他生物体结合, 因此可以在局部范围进行激光选择性加热, 这非常适合作为分子或细胞的靶向. 采用这种金纳米微粒辅助激光热作用方法, 对牛肠碱性磷酸酯酶 (alkaline phosphatase aP) 的选择性破坏, 细胞膜的通透性提高以及对细胞的选择性灭活进行了试验并得到了很好的结果. 此外, 还讨论了用这种方法进行基因转染以及选择性光热治疗一些疾病的可能性.

关键词 激光照射, 金纳米微粒, 生物分子, 细胞

学科分类号 R318.15

随着生物技术的发展, 人们对细胞微结构和生物大分子分子结构的认识, 很多情况下需要对细胞、细胞器和生物大分子本身进行操作. 目前借助于激光技术, 对生物分子的微操作已经得到了一定的实现: Anvari 等^[1]用激光光镊对淋巴细胞的功能进行研究. 很多课题组采用微光束注射法对细胞进行基因转染^[2~4], 或者利用飞秒激光直接照射细胞, 使细胞膜出现暂时的通透性而实现基因转染^[5]. 还有一些课题组利用飞秒激光对 DNA 或者亚细胞结构进行切割等操作^[6,7]. 而上述所有对细胞的操作中都要用到比较精确的仪器, 比如显微镜等, 一次只能对一个细胞进行操作. 相对于这种方法, 我们发展了一种不需要精密仪器、对细胞可以进行微操作的方法——纳米微粒辅助激光照射法.

由于金纳米微粒在可见光范围内具有很高的吸收性, 因此, 在几十个纳米范围内产生局部热效应就成为可能. 根据这个特点, 通过脉冲激光照射可以很容易将金纳米微粒的温度加热到它的熔点以上; 另一方面, 由于体积很小, 通过扩散被加热的金微粒很快就会冷却. 有文献报道金纳米周围的温度在纳秒范围内可以达到 1000°C^[8]. 通过试验, 我们已经证明了利用激光照射金纳米微粒可以导致牛肠碱性磷酸酯酶的选择性损伤, 细胞膜的通透性提高以及选择性地细胞灭活. 从而说明采用这种方法

可以对细胞和生物分子造成局部的热学、化学以及机械的损伤或者改变.

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

在整个实验中, 我们分别应用了两种激光源: 530 nm, 脉宽为 6 ns 的 Q- 开关倍频 Nd: YAG 激光 (Surelite I, Continuum, CA, USA) 和 527 nm, 脉宽为 35 ps 锁模 Nd: YLF 激光 (ISL 2001 MPL, Intelligent Laser Systems Inc.). 实验中所使用的样品池是专门定做的, 直径和深度都为 2 mm^[9]. 用于检测细胞膜通透性和死亡率的分子探针分别为异硫氰酸荧光素葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-Dextran, FITC-D, 相对分子质量为 10 000) 和碘化丙锭 (propidium iodide), 然后利用流式细胞仪 (FACSCAN, Beckman Coulter) 测量不同的荧光强度就能判断细胞是否死亡或者细胞膜通透性的暂时提高.

1.2 细胞培养

Karpas299 (人类恶性淋巴瘤细胞)、L428 细胞

*国家自然科学基金资助项目(60578026), 瞬态光学与光子技术国家重点实验室开放基金资助项目.

**通讯联系人. Tel:029-82663286, E-mail: yaocui ping@sohu.com

收稿日期: 2006-08-02, 接受日期: 2006-09-30

(Hodgkin's disease 细胞)以及 KG1 细胞 (髓样白血病细胞), 均从德国 Borstel 生物医学研究中心 (Forschungszentrum Borstel Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Germany) 获得. 这 3 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 (所有这些都是从奥地利 Pasching PAA 实验室购买), 并置于培养箱中进行培养, 37℃, 5% CO₂、95% 空气、95%~100% 湿度. 在细胞呈指数增长期时用于试验. 其中, Karpas299 细胞相对应的抗体为 BerH2 和 ACT1, L428 对应的抗体为 BerH2, 根据细胞选择不同的免疫胶体金 (即抗体与胶体金微粒的结合体) 进行试验.

1.3 试验准备

牛肠碱性磷酸酯酶 (Sigma, p5521) 与胶体金微粒结合体的制作, 与其他蛋白质与胶体金结合体的制作一样, 按照厂家给出的操作规程操作.

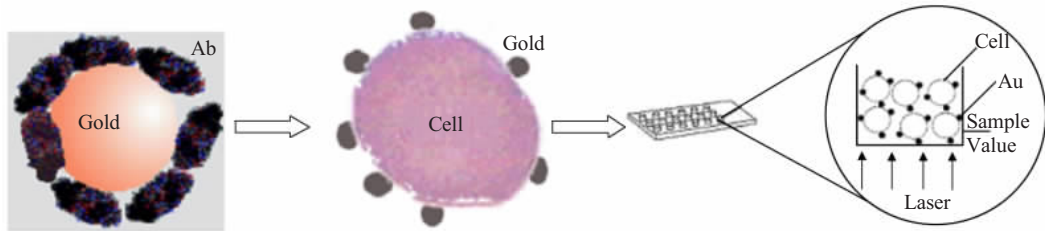


Fig. 1 The schematic figure of the steps of the whole experiment

1.4 实验结果的测定

通过一个自制的荧光强度测量仪测量荧光底物 4- 甲基伞形酮酰磷酸盐 (4-methylumbelliferylphosphate, 4MUP) 的荧光强度, 来测定牛肠碱性磷酸酯酶的活性. 实验前后, 给样品中加入 4- 甲基伞形酮酰磷酸盐, 用安装有 370 nm 带通滤波器的氙弧灯激发样品, 在 445 nm 处测量荧光底物的发射谱. 在牛肠碱性磷酸酯酶的催化作用下, 激光照射后的 4- 甲基伞形酮酰磷酸盐上的磷酸盐基团脱落变为 4- 甲基伞形酮 (4-methylumbelliferone, 4MU), 从而使得在这个波长上测量到的荧光增加. 通过这种方法就可以测量到牛肠碱性磷酸酯酶的活性.

对于细胞试验, 在样品照射结束后, 把样品池再次放入培养箱培养 10~20 min 左右, 然后取出样品池, 把细胞移入加了碘化丙锭的 PBS (同上)

在细胞达到指数增长期时, 从培养皿中取出细胞. 对细胞进行计数, 然后取出一定量的细胞溶液, 以 1 400 r/min 20℃ 离心 5 min, 重新以一定的细胞密度 (根据不同的实验要求达到不同的密度, 在本文的实验中细胞密度为 4×10^7 /ml) 悬浮于 PBS (磷酸盐缓冲液, pH 7.4, 由 Na₂HPO₄·12H₂O, NaH₂PO₄·H₂O, NaCl, KCl 按照一定的比例配制而成) 溶液中. 然后, 把免疫胶体金与悬浮于 PBS (同上) 中的细胞 (对相应的抗体呈阳性) 按照一定的比例混合, 在培养箱中培养 20 min. 取出培养箱中的混合液, 加入异硫氰酸荧光素葡聚糖, 移入样品池中, 立即进行激光照射, 细胞实验的流程如图 1 所示.

在细胞的选择性灭活实验中, 把 Karpas299 细胞与 KG1 细胞混合, 同时加入结合有 FITC-D 的 ACT1 抗体和结合有金微粒 BerH2, 在培养箱中培养一段时间后, 把样品放入样品池对其进行激光照射.

中, 并用流式细胞仪对样品进行测量. 每个样品中测量细胞的总数设定为 5 000 个. 细胞对碘化丙锭呈阳性, 说明细胞死亡, 对异硫氰酸荧光素葡聚糖呈阳性, 则说明细胞暂时性通透性提高.

细胞的选择性灭活实验中, 样品照射后, 直接把细胞移入加了碘化丙锭的 PBS (同上) 中, 并用流式细胞仪对样品进行测量, 样品对碘化丙锭呈阳性, 则说明细胞被灭活. 由于 Karpas299 细胞对 2 种抗体均呈阳性, 而 KG1 细胞均呈阴性, 所以流式细胞仪可以从混合细胞溶液中辨别出结合有金纳米微粒的 Karpas299 细胞, 而 KG1 细胞并不会结合金纳米微粒.

2 结 果

2.1 牛肠碱性磷酸酯酶选择性损伤

实验中采用不同尺寸的金纳米微粒与牛肠碱性

磷酸酯酶结合, 不同的激光光源, 不同的脉冲数目和能量进行照射, 结果表明, 这种方法可以使牛肠碱性磷酸酯酶达到很精确的失活, 并在一定的能量密度照射下, 牛肠碱性磷酸酯酶可以达到完全失活^[9]. 采用单个纳秒脉冲, 只有激光能量密度达到 200 mJ/cm² 时才能观察到牛肠碱性磷酸酯酶的失活, 而且能量密度在 200 mJ/cm² 以上时, 蛋白质的失活大体上与激光能量密度呈线性关系^[9]. 多脉

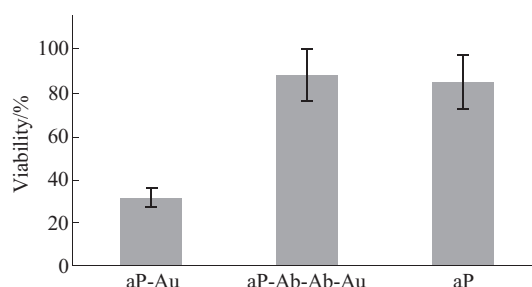


Fig. 2 Viability of the aP-Au conjugate, aP solution and aP-Au that were conjugated by two antibodies after irradiation of the 35 ps pulse laser of 527 nm
10 000 Pulses, 54 mJ/cm².

冲时, 同样随着辐射量的增加牛肠碱性磷酸酯酶的失活也随着增加直到完全失活. 但是当金纳米微粒不直接与牛肠碱性磷酸酯酶接触, 而是通过抗体结合时, 牛肠碱性磷酸酯酶并不会失活. 结果如图 2 所示.

2.2 细胞膜通透性的暂时提高

采用不同的激光对不同的细胞进行照射, 利用前述检测细胞膜通透性与细胞死亡率的方法, 在最优条件下我们得到了对于 10 ku 的小分子最高 60% 以上的转染率, 而细胞死亡率 27%. 这种分子在通常条件下是不可能进入细胞的. 表 1 中给出了采用纳秒激光源对通过不同抗体使金微粒与细胞结合的结合体进行照射的结果. 图 3 则给出了采用纳秒脉冲激光照射 Karpars 299 细胞与 ACT1 免疫胶体金结合体, 得到的流式细胞仪测量的点图结果. 从图 3 可以看出, 当激光能量增加时, 细胞转染率随着能量的增加呈钟型结构, 而细胞的死亡率随着照射能量的增加而不断增加. 采用皮秒激光照射样品时, 试验得到了类似的结果.

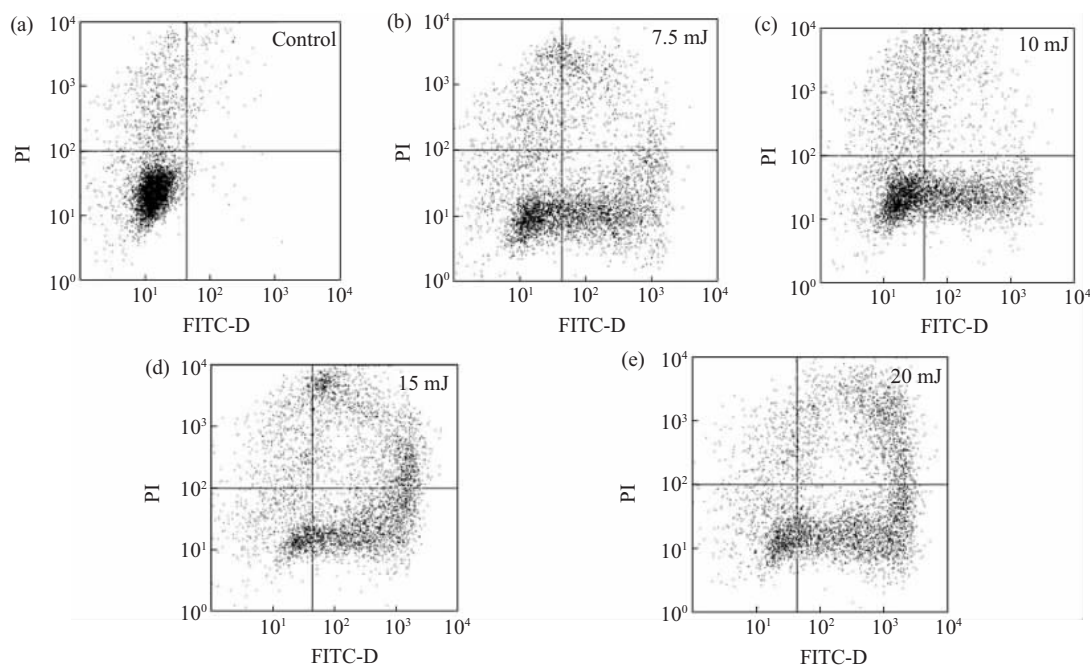


Fig. 3 Flow-cytometric measurements (scatter plots) of transient membrane permeabilization and cell death caused by laser-irradiated nanoparticles

Karpas 299 cells were incubated with 30 nm ACT1 gold conjugates. Not irradiated cells served as control (a); samples were irradiated with different pulse energies: 7.5 mJ (b), 10 mJ (c), 15 mJ (d), 20 mJ (e). And the fraction of transiently permeabilized cells locate in lower right square and damaged or dead cells locate in upper right square.

Table 1 The best efficacies for the transfer of 10 ku FITC-Dextran into Karpas 299 and L428 cells with the corresponding irradiation parameters

Cell line	Particles				
	BerH2 30 nm	BerH2 15 nm	ACT1 30 nm	ACT1 15 nm	
Karpas 299	Transfection efficiency	42.42%	32.40%	67.76%	46.66%
	Irradiation parameters	10 mJ 1 pulse	15 mJ 1 pulse	15 mJ 5 pulses	20mJ 5 pulses
	Particle amounts	$2.54 \times 10^4/\text{cell}$	$5.87 \times 10^5/\text{cell}$	$1.08 \times 10^5/\text{cell}$	$8.34 \times 10^5/\text{cell}$
L428	Transfection efficiency	26.5%	8%		
	Irradiation parameters	5 mJ 1 pulse	15 mJ 1 pulse		
	Particle amounts	$1.43 \times 10^4/\text{cell}$	$2.37 \times 10^5/\text{cell}$		

2.3 对细胞的选择性灭活

当激光照射能量达到一定程度或者能量密度大于某个阈值时, 附着有金纳米微粒的细胞可以有效地被灭活. 实验中, 分别在 Karpas299 细胞与金微粒结合前后对其进行照射, 并观察其结果变化. 图 4a 为对照组, 图 4b 为采用纳秒脉冲激光仅对细胞的照射, 当能量为 20 mJ, 50 个脉冲时的结果, 可

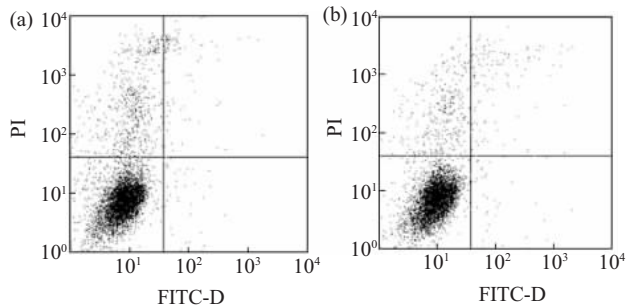


Fig. 4 The cells without gold particles were irradiated

(a) is control and (b) is the result of the irradiation of the 20 mJ, 50 pulses from nanosecond pulse laser.

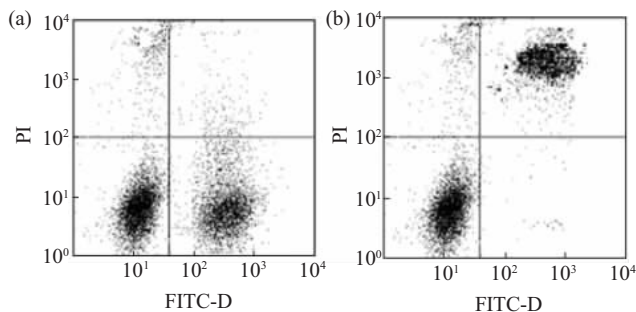


Fig. 5 Selective targeting of CD25 positive cells by laser-irradiated gold nanoparticles

Identification of the CD25 positive cells and measurement of cell viability was performed by flow-cytometry. (a) Dot diagram of a mixture of different cells before irradiation, which shows a certain fraction of CD25 positive cells. (b) Dot diagram after irradiation. CD25 positive cells were killed completely.

以看出, 两幅图基本没有什么变化. 另一组实验中, 根据前述的方法对 Karpas299 与 KG1 细胞混合液采用与上组实验中同样的激光, 同样的参数进行照射, 流式细胞仪的点图结果在图 5 中给出. 其中图 5a 为对照组, 即当混合细胞溶液没有被照射时的结果, 图中右下区域为 Karpas299 细胞. 图 5b 为采用激光照射后的结果. 通过实验可以看出, 激光照射后, 结合金微粒的 Karpas299 细胞死亡率达到 95% 以上, 而没有结合金微粒的 KG1 细胞基本上没有发生变化.

3 讨论

由于纳米材料光学特性的可控性, 因此人们希望能够应用到生物技术, 用于诊断或者成像^[10]. 量子点由于不同的尺寸对应于不同的荧光这种独特的性质而备受人们的重视, 人们对其研究已经涉及到很多领域^[11, 12]. 但是, 在把量子点应用到生物学领域时, 半导体对人类和细胞的潜在危害是存在的两个主要问题. 相对于量子点, 胶体金纳米微粒由于它容易制备, 容易与生物分子结合并没有潜在的细胞毒性, 而成为另一种受人瞩目的纳米材料^[13]. 通过结合抗体而生成的免疫胶体金由于能够标记细胞并对其特异性进行检测, 因此这种技术也得到了一定的发展. El-Sayed 等^[14]利用免疫胶体金对癌症细胞诊断进行了先行性的研究, 得到一定的反响. 同样, Zharov 等^[15]设计了一套系统, 把 40 nm 的金微粒通过抗体与 MDA-MB-231 乳腺癌细胞上的抗原结合, 然后用激光照射细胞微粒结合体, 可以观察到在纳米簇周围产生大量的气泡从而导致肿瘤细胞的死亡. 现在, 这个研究组将这种方法用于灭活细菌^[16]. 而在我们的研究中, 利用抗体选择性地使金微粒粘附在不同的细胞或者生物分子上, 然后采

用激光照射就可以导致细胞非常精确有效的损伤. 这种方法可以发展为一种新型的纳米微粒介导手术. 这种技术可以用于蛋白质损伤, 细胞膜通透性暂时性提高以及选择性灭活病变细胞. 通过上面的分析可知, 这种技术将很有希望用于肿瘤细胞的诊断和治疗上, 将给人们治疗肿瘤带来新的希望.

致谢 在实验中得到德国吕贝克大学生物光子学研究所 Huettmann 博士的指导, 在此真心感谢.

参 考 文 献

- Anvari B, Torres J H, McIntyre B W. Regulation of pseudopodia localization in lymphocytes through application of mechanical forces by optical tweezers. *J Biomedical Optics*, 2004, **9**(5): 865~872
- Kurata S, Ikawa Y. Novel method for substance injection into the cell by laser beam--a study of the injection volume. *Cell Struct Funct*, 1986, **11** (2): 205~207
- Kurata S, Tsukakoshi M, Kasuya T, *et al.* The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells. *Exp Cell Res*, 1986, **162** (2): 372~378
- Palumbo G, Caruso M, Crescenzi E, *et al.* Targeted gene transfer in eucaryotic cells by dye-assisted laser optoporation. *J Photochem Photobiol B: Biology*, 1996, **36** (1): 41~46
- Tirlapur U K, König K. Cell biology: Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature*, 2002, **418** (6895): 290~291
- Koenig K, Riemann I, Fritzsche W. Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses. *Opt Lett*, 2001, **26** (11): 819~821
- Watanabe W, Arakawa N, Matsunaga S, *et al.* Femtosecond laser disruption of subcellular organelles in a living cell. *Opt Express*, 2004, **12**: 4203~4213
- Hüttmann G, Serbin J, Radt B, *et al.* Model system for investigating laser-induced subcellular. *Proc SPIE*, 2001, **4257**: 398~409
- 姚翠萍, 李政, 张镇西. 激光高精度细胞微手术机理的研究. *光学学报*, 2005, **25** (12): 1664~1669
Yao C P, Li Z, Zhang Z X. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25** (12): 1664~1669
- Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nature Biotechnology*, 2004, **22** (1): 47~52
- Bruchez M J, Moronne M, Gin P, *et al.* Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 1998, **281**(5385): 2013~2016
- Chan W C W, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 1998, **281** (5385): 2016~2018
- West J L, Halas N J. Applications of nanotechnology to biotechnology. *Curr Opin Biotech*, 2000, **11**: 215~217
- El-Sayed I H, Huang X, El-Sayed M A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano Letters*, 2005, **5** (5): 829~834
- Zharov V, Galitovskaya E, Johnson C, *et al.* Synergistic enhancement of selective nanophotothermolysis with gold nanoclusters: potential for cancer therapy. *Lasers Surgery Medicine*, 2005, **37** (3): 219~226
- Zharov V P, Mercer K E, Galitovskaya E N, *et al.* Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. *Biophysical J*, 2006, **90** (2): 619~627

Laser Irradiation Cell Photothermal Therapy Assisted by Gold Nanoparticles*

YAO Cui-Ping^{1,2,3**}, ZHANG Zhen-Xi³, YAO Bao-Li¹

⁽¹⁾State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710119, China;

⁽²⁾Graduate School, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

⁽³⁾The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education and Institute of Biomedical Engineering, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract The strong absorption of gold nanoparticles in the visible spectral range allows the localized generation of heat in a volume of only a few tens of nanometer. The efficient conversion of strongly absorbed light by plasmonic gold nanoparticles to heat energy and their easy bioconjugation suggest that the gold nanoparticles can be used as selective photothermal agents in molecular cell targeting. The selective destruction of alkaline phosphatase, the permeabilization of the cell membrane and the selective killing of cells by laser irradiating gold nanoparticles were demonstrated. The potential of using this selective technique in molecularly targeted photothermal therapy and transfection is discussed.

Key words laser irradiation, gold nanoparticles, biomolecules, cell

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (60578602) and The Foundation of State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics.

**Corresponding author. Tel: 86-29-82663286, E-mail: yaocui ping@sohu.com

Received: August 2, 2006 Accepted: September 30, 2006