

## C225 偶联磁性白蛋白纳米球的制备、表征及联合磁流体热疗体外靶向抗肺癌的研究

王玲<sup>1</sup>, 高启<sup>1</sup>, 李嘉<sup>1</sup>, 丁粉干<sup>2</sup>, 袁晨燕<sup>3</sup>, 张东生<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>东南大学附属中大医院超声诊断科, <sup>2</sup>病理科, <sup>3</sup>检验科, 江苏 南京 210009; <sup>4</sup>东南大学医学院病理学与病理生理学系, 江苏 南京 210009

**[摘要]** 目的: 制备抗表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)单抗西妥昔(C225)偶联的磁性白蛋白纳米球, 对其表征并联合磁流体热疗观察其体外抑制肺癌细胞的效果。方法: 化学共沉淀法制备 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米粒, 去溶剂化-交联法制备磁性白蛋白纳米球(magnetic albumin nanospheres, MANs), 然后用双功能交联剂 N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯[N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, SPDP]将 C225 偶联其上制备 C225-MANs。纳米球的形态、平均粒径、zeta 电位、抗体结合率、含铁量、细胞靶向性及磁热动力学均被表征。最后采用 CCK-8 及流式细胞(flow cytometry, FCM)分析检测 C225-MANs 介导的体外双靶向磁流体热疗肺腺癌细胞 GLC-82 的效果。结果: 透射电镜显示制备的 C225-MANs 为球形, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒被封装其内, Fe 含量约 2.0 mg/mL; 平均水合粒径约为 140 nm, 带负电; 在输出电流 20 A、输出频率 200 kHz 的交变磁场作用下, 不同 Fe 含量的 C225-MANs 能在 60 min 内升温到 39.3 °C~52.0 °C, 且加热 30 min 后温度能保持恒定。FCM 荧光检测显示抗体结合率为 79.74%。免疫荧光实验和细胞 MRI 成像证实 C225-MANs 能够靶向 GLC-82 细胞。CCK-8 与 FCM 分析显示双靶向联合治疗组的细胞增殖率明显低于其他治疗组, 而凋亡率明显高于其他治疗组( $P < 0.05$ )。结论: C225-MANs 对肺腺癌细胞 GLC-82 具有良好的靶向效应, 且双靶向磁流体热疗联合分子靶向治疗在体外能有效抑制肺癌细胞。

**[关键词]** 磁性纳米粒; 白蛋白纳米球; 西妥昔单抗(C225); 靶向; 热疗

**[中图分类号]** R734.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)11-1487-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20181101

## Preparation and characterization of C225 conjugated magnetic albumin nanoparticles and targeted anti-lung cancer *in vitro* when combined magnetic fluid hyperthermia

Wang Ling<sup>1</sup>, Gao Qi<sup>1</sup>, Li Jia<sup>1</sup>, Ding Fenggan<sup>2</sup>, Yuan Chenyan<sup>3</sup>, Zhang Dongsheng<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Ultrasonography, <sup>2</sup>Department of Pathology, <sup>3</sup>Department of Clinical Laboratory, Zhong Da Hospital, Southeast University, Nanjing 210009; <sup>4</sup>Department of Pathology and Pathophysiology, Medical School, Southeast University, Nanjing 210009, China

**[Abstract]** **Objective:** To prepare and characterize magnetic albumin nanospheres conjugated with cetuximab (C225), which is anti-epithelial growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody, as well as their *in vitro* anti-lung cancer effect when combined with magnetic fluid hyperthermia. **Methods:** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles (NPs) were prepared by chemical co-precipitation, and magnetic albumin nanospheres (MANs) were prepared by desolvation-crosslinking method, then C225 was further conjugated to synthesize C225-MANs using N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP). Their morphology, mean particle size, zeta potential, the antibody conjugation efficiency, iron content, specific cell-binding ability, and magnetothermal dynamic profiles were characterized. Lastly, the therapeutic effect of C225-MANs induced double targeted magnetic fluid hyperthermia on lung adenocarcinoma *in vitro* was evaluated using CCK-8 and flow cytometry (FCM) assay. **Results:** TEM micrographs showed that the prepared C225-MANs were approximately spherical. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs were well incorporated into the core of the nanospheres and the iron content was about 2.0 mg/mL. The mean hydrodynamic diameter was about 140 nm with negative charge. When placing in alternating magnetic field with the output frequency of 200 kHz and the output current of 20 A, the corresponding C225-MANs with different Fe concentrations could rise to a steady

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(81700678, 81501525); 江苏省南京市卫计委一般性课题(YKK16280)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zdszds1222@163.com

temperature ranging from 39.3 °C to 52.0 °C, and the temperature could keep stable without any change after 30 min heating. The fluorescence percentage detected by FCM analysis revealed that the antibody conjugation efficiency was 79.74%. The ability of nanospheres targeting GLC-82 cells *in vitro* was confirmed by immunofluorescence experiments and magnetic resonance imaging. The proliferation rate of double C225 and magnetic-targeted combined group was significantly lower than any other therapy group ( $P < 0.05$ ), while the apoptotic rate of the double C225 and magnetic-targeted combined treatment group were significantly higher than any other therapy group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** C225-MANs had good targeting effect on GLC-82 cells at cellular level. Moreover, dual-targeted magnetic fluid hyperthermia combined with molecular targeted therapy can effectively combat lung cancer *in vitro*.

[Key words] magnetic nanoparticles; albumin nanospheres; cetuximab (C225); targeting; hyperthermia

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(11): 1487-1493, 1505]

热疗是一种古老但却很具前景的肿瘤治疗方法<sup>[1]</sup>。磁性纳米粒(magnetic nanoparticles, MNPs)磁感应升温治疗肿瘤又称作磁流体热疗(magnetic fluid hyperthermia, MFH)技术<sup>[2]</sup>。此疗法具有靶向定位作用,即只有含磁性微粒的肿瘤组织处温度才会升高,不含磁性微粒的正常组织则不会受到热损伤。进行热疗前通过外加磁场定位能够将 MNPs 有效聚集在肿瘤部位,同时肿瘤细胞对纳米颗粒的摄取能力是正常细胞的 8~400 倍,这样被肿瘤细胞内吞的 MNPs 在交变磁场中可以对肿瘤进行“细胞内热疗”,实现靶向热疗而避免加热不均<sup>[3]</sup>。此外结合利用目前已经取得广泛临床效果的小分子靶向治疗药物西妥昔单抗(cetuximab, C225)——表面生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)的单克隆抗体,则能进一步提高治疗的特异性和有效性<sup>[4-5]</sup>。本研究以白蛋白纳米球为纽带,内部包裹四氧化三铁(ferroferic oxide, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)磁性纳米粒,外接 C225 单抗,能够集磁性靶向、抗体靶向、分子靶向治疗、磁流体热疗及磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)等优点为一体,旨在为肿瘤的诊疗一体化开拓新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

三氯化铁分析纯(FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O)、氯化亚铁分析纯(FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O)、氨水(NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O)、25%戊二醛、无水乙醇(上海化学试剂有限公司);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、C225、二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)、N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯[N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate, SPDP]、DAPI 染液(Sigma-Aldrich 公司,美国);Alexa Fluor 488 标记的兔抗小鼠 IgG(上海优宁维生物科技股份有限公司);CCK-8 试剂盒(Kumamoto 公司,日本);JEM-200CX 高分辨率透射电子显微镜

(JEOL 公司,日本);马尔文激光粒度仪(Malvern 公司,英国);荧光倒置显微镜(Nikon 公司,日本);SPG-06A 高频磁感应加热器(深圳双平高频加热器厂);免疫酶联检测仪(MK3-353, Multiskan 公司,美国);FACS Vantage SE 流式细胞仪(Becton-Dickson 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米粒和磁性白蛋白纳米球(magnetic albumin nanospheres, MANs)的制备

参照文献[6-7], Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米粒的制备采用化学共沉淀法。参照文献[8], MANs 的制备采用去溶剂化-交联法。

#### 1.2.2 C225 偶联的磁性白蛋白纳米球(C225-MANs)的制备及表征

参照文献[3, 8-9],用异型双功能交联剂 SPDP 偶联 C225 于磁性白蛋白纳米球表面,制备靶向性磁性纳米球,具体分为以下 3 个步骤:①取适量鼠抗人 EGFR 单克隆抗体 C225,溶于 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 中,按照摩尔比 1:15 的比例加入 20 mmol/L SPDP 的乙醇溶液,室温反应 60 min 后将反应混合物装入预处理好的透析袋中,以 pH 4.5 0.01 mmol/L 的醋酸盐缓冲液透析,除去过量的 SPDP。在带吡啶二硫基的单克隆抗体(McAb-PDP)溶液中加入过量的 DTT 醋酸溶液(pH4.5),室温轻搅 30 min 后以 PBS 透析过夜,除去多余的 DTT,最后得到带巯基的抗体(McAb-PDP-SH)溶液;②取 MANs 悬液适量,利用超声将其均匀分散在 pH4.5、0.01 mmol/L 醋酸盐溶液中,总体积为 1.5 mL,搅拌下滴加 20 mmol/L 的 SPDP 乙醇液 50 μL,反应物 12 000 r/min 离心 1 min 后用 Hank's 液洗涤数次,除去多余 SPDP,得到活化的磁性白蛋白纳米球(MANs-PDP);③将 MANs-PDP 与 McAb-PDP-SH 混合,反应体积为 2 mL,4 °C 轻摇反应 15 h。反应物 12 000 r/min 离心 1 min 后用 Hank's 液洗涤 3 次,最终得到单克隆抗体偶联的磁性白蛋白纳米

球悬液(C225-MANs)。取出少量自制的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米粒及C225-MANs,加无水乙醇超声分散15 min,滴有膜铜网,制得电镜样品,在透射电镜下观察;运用马尔文激光粒径仪检测平均水合粒径及zeta电位;硫氰酸盐分光光度法测定C225-MANs 包载的Fe含量。

### 1.2.3 C225-MANs热动力学试验

将C225-MANs用0.9%NaCl溶液配制成含不同Fe量的纳米磁流体,各取5 mL加入25 mm平底试管中,分别置于频率200 kHz、输出电流20 A的高频磁感应加热设备平板线圈上加热1 h,起始室温25 °C,试管底距高频磁感应加热线圈中心0.5 cm,每隔5 min用TM902C数字测温仪测温1次,以时间为横坐标、温度为纵坐标绘制C225-MANs的磁热升温曲线。

### 1.2.4 C225-MANs的抗体结合率测定

利用免疫荧光染色鉴定C225的偶联,具体操作如下:取一定量C225-MANs悬液,加入等量Alexa Fluor 488标记的兔抗小鼠IgG后于4 °C反应60 min,PBS洗涤沉淀3次,即得Alexa Fluor 488标记的荧光免疫白蛋白纳米球,将其置于荧光显微镜下观察纳米球的荧光染色结果并用流式分析仪检测抗体荧光结合率。

### 1.2.5 C225-MANs体外靶向结合人肺癌GLC-82细胞的研究

免疫荧光染色:人肺腺癌细胞(GLC-82,中科院上海细胞研究所)爬片,待细胞生长至50%~80%时先用冷丙酮室温固定10 min并用PBS漂洗3次(5 min/次),然后用0.5% Triton 室温下穿孔15 min并用PBS漂洗2次(5 min/次),紧接着用1%BSA封闭1 h后加入含Fe量相同的C225-MANs和MANs与GLC-82细胞4 °C反应过夜,PBS漂洗3次(5 min/次),后与兔抗小鼠IgG-Alexa Fluor 488于37 °C避光反应1 h,PBS漂洗3次(5 min/次)后5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI室温染核3 min,最后用PBS漂洗3次(5 min/次)后用荧光倒置显微镜观察细胞荧光染色情况。

体外MRI扫描:取对数生长期的GLC-82细胞接种于6孔板中,每孔约含细胞 $1 \times 10^6$ 个,24 h细胞贴壁后,将具有相同Fe浓度的C225-MANs和非C225靶向的MANs分别与GLC-82共孵育2 h后,弃去培养液,PBS漂洗,然后用0.25%胰蛋白酶消化并收集两组细胞后,离心重悬于0.5 mL 1%琼脂糖的Eppendorf管中,另取1个Eppendorf管,内装琼脂糖作为对照。MRI成像采用7.0 Tesla Micro-MR仪(Bruker,PharmaScan 7.0),内径3.0 cm的体线圈,T2加权

自旋回波成像序列,具体参数如下:视野(FOV)5 cm $\times$ 5 cm;层厚1 mm;矩阵256 $\times$ 256;TR 2 000 ms,TE 36 ms。测量T2弛豫时间。

### 1.2.6 C225-MANs联合磁流体热疗体外抗肺癌实验

细胞培养:GLC-82细胞接种于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,在37 °C饱和湿度、5%  $\text{CO}_2$ 的培养箱中培养,每2~3 d传代1次,待细胞生长至对数生长期开始实验。

CCK-8(Cell Counting Kit-8)法测定细胞的增殖抑制率:将对数生长期的GLC-82细胞用0.25%的胰酶消化,然后用含10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化并吹打细胞成单细胞悬液,随后根据细胞计数板计数结果调整细胞浓度为 $4 \times 10^4$ 个/mL,接种于96孔板(100  $\mu\text{L}/$ 孔),每组8个复孔,置于37 °C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养。待细胞生长密度约为50%~60%后随机分成5组:①阴性对照组(加10%胎牛血清的DMEM培养液);②非靶向热疗组(MANs+MFH);③磁靶向热疗组(MANs+外置磁铁+MFH);④单抗靶向热疗组(C225-MANs+MFH);⑤双靶向热疗组(C225-MANs+外置磁铁+MFH)。按分组情况分别加入DMEM培养液、MANs和C225-MANs,并在磁靶向组与双靶向组的96孔板下放96孔强磁铁(Magneto FCTOR plate,chemicell公司,德国)。2 h后撤掉磁铁并将96孔板置于SPG-06A高频磁感应加热设备平板线圈上进行MFH 1 h,输出频率200 kHz,输出电流20 A。所有组细胞在治疗后继续培养48 h后,每孔加入10  $\mu\text{L}$  CCK8溶液,同前条件继续培养3 h,置于酶标仪上读取450 nm处吸光度值。利用公式计算细胞增殖率(%)=实验组吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。

流式细胞仪(flow cytometry,FCM)测定细胞凋亡率:按上述分组处理GLC-82细胞后,先用不含EDTA的胰酶消化收集各组细胞(消化时间不宜过长,以免引起细胞凋亡引起假阳性),然后用PBS洗涤细胞2次(2 000 r/min离心5 min),收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 细胞,在50  $\mu\text{L}$ 的Binding Buffer中加入5  $\mu\text{L}$  7-AAD染液,混匀;室温、避光反应5~15 min;反应后再加入450  $\mu\text{L}$ 的Binding Buffer混匀;加入1  $\mu\text{L}$  Annexin V-PE混匀;室温、避光反应5~15 min;1 h内用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。用BD FACSDiva软件分析,计算细胞凋亡率。

### 1.3 统计学方法

所有资料均采用SPSS18.0软件分析。研究数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计算各组平均值及标

准差,经方差齐性检验后,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK法,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

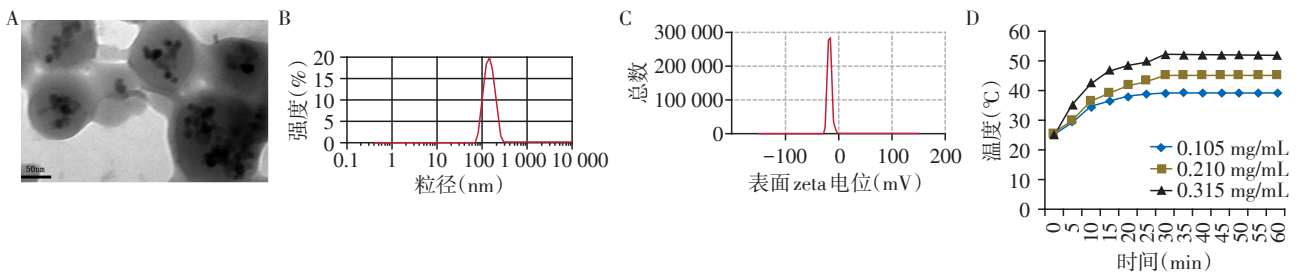
### 2.1 磁性白蛋白纳米球表征

透射电镜显示自制的磁性白蛋白纳米球近似球形,大小均匀,近似圆形的 $Fe_3O_4$ 磁性纳米粒被很好地包入其内(图1A);硫氰酸盐分光光度法测含Fe量 $2.0\text{ mg/mL}$ ;C225-MANs的平均水合粒径约为 $140\text{ nm}$ (图1B),zeta电位约为 $-17.7\text{ mV}$ (图1C);不同含铁量

的C225-MANs在输出电流 $20\text{ A}$ 、输出频率 $200\text{ kHz}$ 的交变磁场(alternating magnetic field, AMF)作用下能在 $60\text{ min}$ 内升温到 $39.3\text{ }^\circ\text{C}\sim 52.0\text{ }^\circ\text{C}$ 不等,且在加热过程中,温度在最初 $30\text{ min}$ 内迅速上升, $30\text{ min}$ 后保持稳定不变;其中含Fe量 $0.210\text{ mg/mL}$ 的C225-MANs升温效果最佳,加热 $30\text{ min}$ 后温度恒定在 $45\text{ }^\circ\text{C}$ (图1D),可选择用于后续磁流体治疗试验。

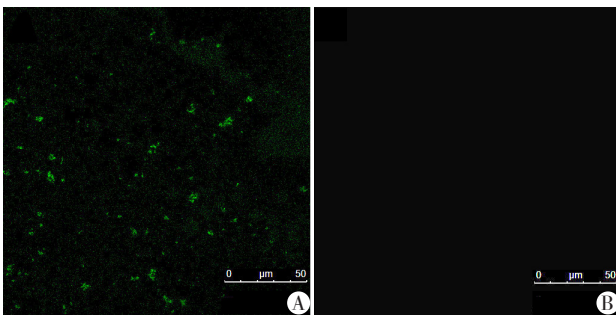
### 2.2 C225-MANs的抗体结合鉴定及抗体结合率

靶向MANs于荧光显微镜下可见绿色荧光(图2A),而非靶向MANs不能结合兔抗小鼠IgG-Alexa Fluor 488,荧光显微镜下未见荧光(图2B)。



A:透射电镜显示C225-MANs呈球形, $Fe_3O_4$ 纳米粒被包入其内;B:平均水合粒径约为 $140\text{ nm}$ ;C:zeta电位为 $-17.7\text{ mV}$ ;D:不同含Fe量的C225-MANs溶液在AMF下的升温曲线。

图1 C225-MANs的表征  
Figure 1 Characterization of C225-MANs



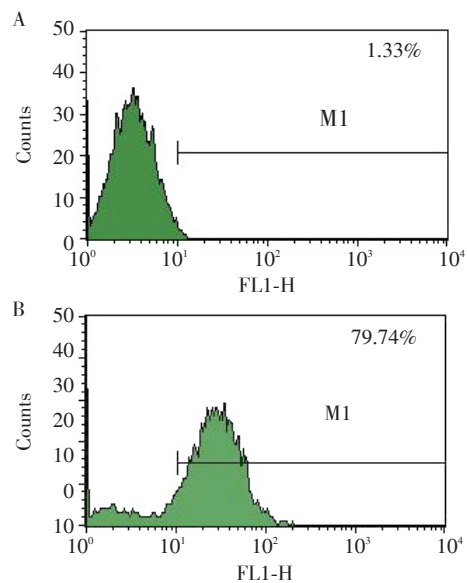
A:靶向MANs镜下可见绿色荧光;B:非靶向MANs镜下未见绿色荧光。

图2 靶向MANs表面抗体结合的鉴定  
Figure 2 Determination of antibodies conjugated on the surface of the targeted MANs

流式细胞仪荧光检测显示C225-MANs的荧光率为 $79.74\%$ (图3),证明了西妥昔单抗被成功偶联到MANs上。

### 2.3 免疫荧光染色

免疫荧光结果显示:C225-MANs处理组细胞能被兔抗小鼠IgG-Alexa Fluor 488染色,在荧光显微镜下发出明亮荧光(图4),显示C225-MANs能与入肺癌细胞特异性结合。而非C225靶向MANs处理



A:未结合荧光二抗的C225-MANs的荧光率;B:C225-MANs结合荧光二抗后的荧光率。

图3 靶向MANs抗体结合率的测定  
Figure 3 Determination of the antibody conjugation efficiency of the targeted MANs

组细胞未结合兔抗小鼠IgG-Alexa Fluor 488,在细胞周围及胞浆探测不到任何荧光(图4),显示MANs不

能与人肺癌细胞特异性结合。

#### 2.4 体外MRI扫描

体外MRI成像显示:C225-MANs与GLC-82细胞共孵育后在T2WI上信号强度明显降低,MANs与GLC-82细胞共孵育后在T2WI上信号强度无明显降

低。C225-MANs组T2弛豫时间与其他两组相比更低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图5)。

#### 2.5 C225-MANs联合MFH体外靶向抗肺癌

##### 2.5.1 CCK-8实验

除阴性对照组对GLC-82细胞无明显影响外,不

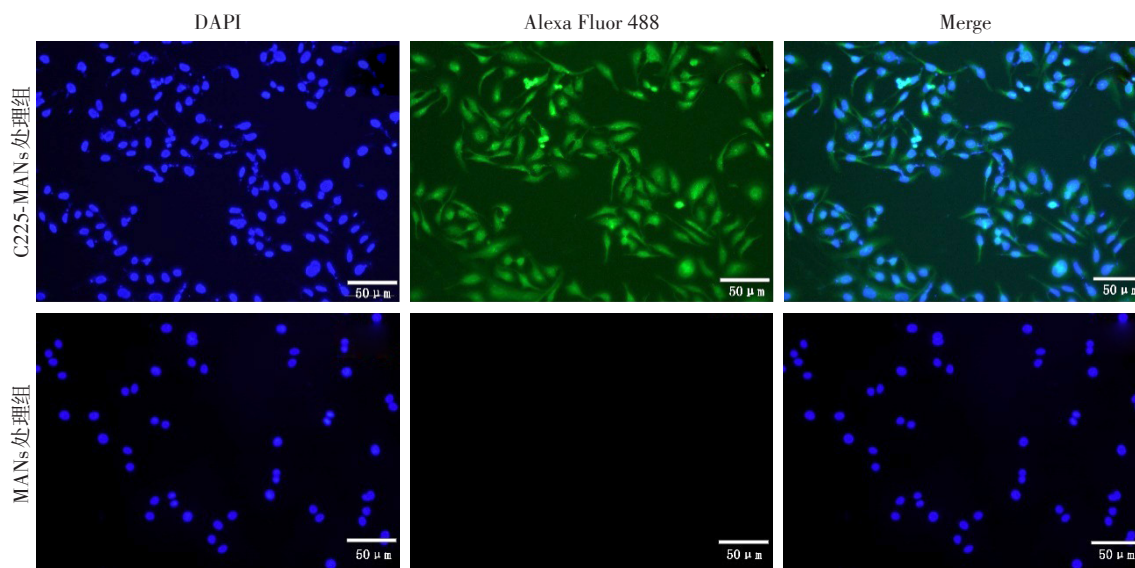
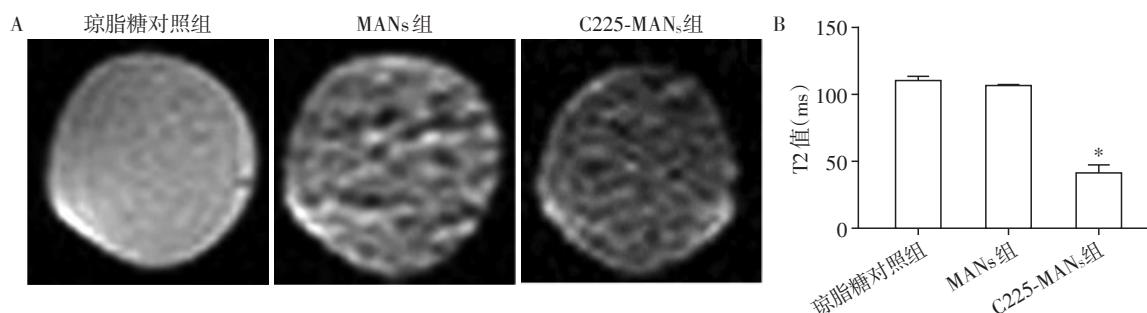


图4 细胞免疫荧光结果

Figure 4 Results of cell immunofluorescence assay



A:各组MRI扫描结果;B:各组T2弛豫时间。与琼脂糖对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

图5 体外MRI扫描结果

Figure 5 *In vitro* results of MRI

同治疗对GLC-82细胞均有不同程度的增殖抑制作用,其中单抗+磁靶向双靶向热疗对肺癌细胞的增殖抑制作用最明显,细胞增殖率仅为15.36%,低于单抗靶向热疗组(30.82%)、磁靶向热疗组(48.77%)、非靶向热疗组(65.66%,图6)。

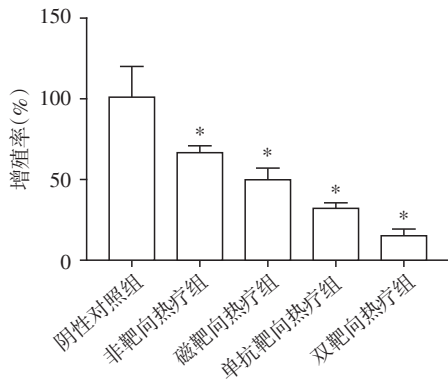
##### 2.5.2 流式细胞仪测定细胞凋亡率

双靶向热疗组细胞凋亡率达40.24%,高于单抗靶向热疗组(30.43%)、磁靶向热疗组(20.80%)和非靶向热疗组(11.41%),较阴性对照组(2.38%)明显高( $P < 0.05$ );单抗靶向热疗组的细胞凋亡率高于磁

靶向热疗组(图7)。

### 3 讨论

纳米技术的兴起为生物医药的发展开辟了新前景,近几十年来以磁控纳米载药体系为基础的靶向治疗已成为肿瘤治疗领域新的研究方向,最具代表性的磁性载体是氧化铁( $Fe_3O_4$ 或 $\gamma-Fe_2O_3$ )纳米颗粒。其中, $Fe_3O_4$ 磁性纳米粒因其具有生物相容性好、非免疫源性、超顺磁毒等优点<sup>[10]</sup>,应用开发最早、研究最多,已被广泛用于生物医学的多个领域,

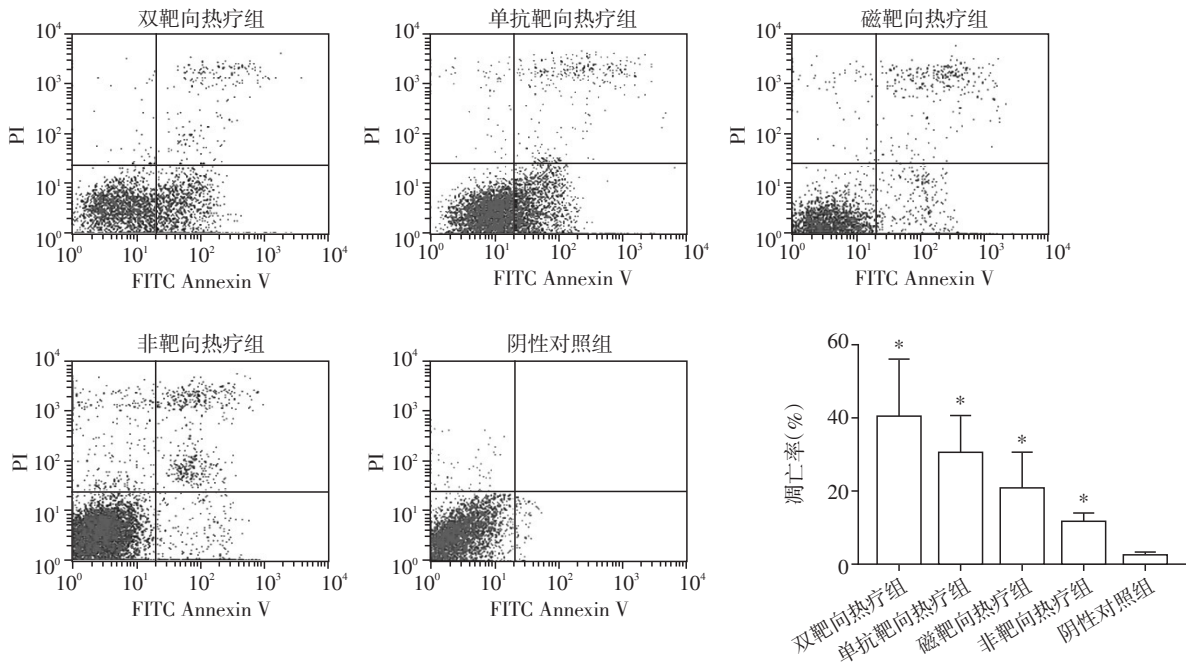


与阴性对照组相比, \*P < 0.05。

图6 CCK-8实验结果

Figure 6 Results of CCK-8 assay

如MRI造影剂、基因或药物载体、肿瘤磁热疗法、细胞标记与分离等<sup>[11-13]</sup>。本实验室利用改良的化学共沉淀法已成功制备出了纳米级Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>并将其用作磁流体热疗的磁感应物质,在体内外肝癌治疗研究中取得了良好效果<sup>[14-15]</sup>。但是纳米级Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>的缺点是比表面积较高,具有强烈聚集倾向,且不具有对肿瘤组织的主动靶向聚集功能。白蛋白因具有安全无毒、无免疫原性、可生物降解、生物相容性好等优点,由其构成的白蛋白纳米球可延缓药物释放,防止药物在转运过程中过早失活,已被广泛用作药物载体<sup>[16-17]</sup>。因此本研究采用白蛋白纳米球包载Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米粒制备MANs可以提供一生物相容、亲



与阴性对照组相比, \*P < 0.05。

图7 流式细胞仪测定GLC-82细胞凋亡率结果

Figure 7 Results of GLC-82 cell apoptosis rates detected by flow cytometry

水且无毒的表面,防止在使用过程中纳米粒的团聚。白蛋白纳米球的制备方法很多,主要有乳化固化法、去溶剂化法、pH凝聚法、聚合物分散法。本实验则采用去溶剂化-固化交联法制备磁性纳米球,原理是通过脱水剂的去溶剂化作用除去白蛋白的水化膜,使白蛋白变性析出,再用戊二醛交联,最终成功制备了包载着磁性纳米颗粒的MANs。

MANs具有磁性被动靶向特性,即在外加磁场作用下,可及时并定点定向聚集到病变组织,从而增强治疗作用,提高疗效,降低不良反应。但是这种磁靶向的缺点也是显而易见的,由于被动靶向只

能使纳米球聚集在靶部位的组织间隙内,要想增大肿瘤细胞对纳米球的内吞作用,就需要纳米球具有对靶细胞的主动靶向作用。分子靶向治疗则为纳米球的主动靶向提供可行性。肿瘤的分子靶向治疗是在肿瘤分子生物学和细胞生物学的基础上,针对可能导致细胞癌变的环节,如细胞信号转导通路、原癌基因和抑癌基因、细胞因子及受体、抗肿瘤血管形成等从分子水平逆转这种恶性生物学行为,从而抑制肿瘤细胞生长,甚至使其完全消退的一种全新生物治疗模式。在肺癌的分子靶向治疗中,抗体疗法正成为一个研究热点,已成为肺癌综合治疗

的一部分<sup>[18]</sup>。抗体疗法主要采用单克隆抗体,其中最受瞩目的是针对EGFR的抑制剂。EGFR属于I型受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK),是原癌基因ErbB1(HER1)的表达产物。有研究表明,非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)上皮可高表达EGFR<sup>[19]</sup>,因此EGFR可作为肺癌治疗的靶点。C225是第一个获准上市的特异性针对EGFR的IgG1单克隆抗体,能够竞争性抑制配体与EGFR结合,阻止EGFR活化。因此本研究中C225作为靶向分子被偶联至白蛋白球表面,既能起到靶向肺癌细胞的作用,又能竞争性抑制配体与EGFR结合起到治疗作用。透射电镜下观察偶联C225单抗后的MANs中包裹着电子密度高的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米粒,显示出Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>已被成功封装其内;从倒置荧光显微镜观察到的荧光及流式细胞仪检测的荧光表达率可以看出C225已被成功偶联其上。此外,细胞免疫荧光实验进一步证明了单抗在白蛋白球表面起到了一定靶向作用,使得C225靶向的MANs更容易被肺癌细胞GLC-82吞噬。由此,成功制备的C225-MANs可作为一种优良载体用于纳米级Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>的高效靶向传输,既能克服其现有体内循环时间短、肿瘤靶向效应欠佳等缺点,也有利于将单抗靶向和磁性靶向联合起来,双靶向磁流体热疗治疗肺癌。

此外,因成功包被了Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米粒,本研究制备的C225-MANs还可作为MRI影像探针,使结合并内吞了C225-MANs的靶区MRI信号明显降低而产生负性对比剂效应,从而可对靶细胞进行鉴别、示踪。体外细胞MRI成像显示C225-MANs能够很好地靶向GLC-82,从而为接下来的靶向治疗奠定了基础。同时在体外磁热升温试验中可以看到,在磁场作用下,C225-MANs的升温能力与含铁量呈正相关,即含铁量越大升温能力越强、温度上升越高,但却又具有共同的升温规律,那就是在作用前30 min内升温迅速,之后升温平缓,30 min后温度则相对恒定不变,这与Yang等<sup>[20]</sup>报道具有一定相似性,这也为后续的MFH试验奠定了有力基础。体外抗肺癌实验结果显示,除阴性对照组对GLC-82细胞无抑制作用外,各MFH处理组均可不同程度地抑制GLC-82细胞的生长和诱导其凋亡。其中双靶向热疗组在单抗靶向和磁靶向的双重靶向作用下,产生了最为有效的杀伤肿瘤细胞和抑制其生长的作用。与此同时,单一靶向组中,抗体靶向组的治疗效果优于磁靶向热疗组,其主要原因在于C225除产生主动靶向引导作用外,也可作为分子靶向药物,增加治

疗作用。

综上所述可以看出,本研究将MANs和单克隆抗体导向制剂联合起来制备C225-MANs,一方面能够将磁性靶向和单抗靶向结合起来,增强对高表达EGFR肺癌细胞的靶向性;另一方面能够将MFH和分子靶向治疗有效整合。此外,基于Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>的MRI成像特性,C225-MANs也能够 在肿瘤的影像诊断中发挥积极作用。因此,C225-MANs在肿瘤的一体化诊疗中拥有巨大的应用潜能,能够为进一步动物试验及未来的临床应用提供理论和试验依据。

#### [参考文献]

- [1] Takahashi I, Emi Y, Hasuda S, et al. Clinical application of hyperthermia combined with anticancer drugs for the treatment of solid tumors [J]. *Surgery*, 2002, 131(15): 78-84
- [2] Laurent S, Dutz S, Hafeli UO, et al. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2011, 166(1): 8-23
- [3] Wang L, An Y, Yuan C, et al. GEM-loaded magnetic albumin nanospheres modified with cetuximab for simultaneous targeting, magnetic resonance imaging, and double-targeted thermochemotherapy of pancreatic cancer cells [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 2507-2519
- [4] Zhang H, Hou XX, Lin M, et al. The study on the preparation and characterization of gene-loaded immunomagnetic albumin nanospheres and their anti-cell proliferative effect combined with magnetic fluid hyperthermia on GLC-82 cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 6445-6460
- [5] Hou XX, Zhang H, Li HB, et al. Magnetic albumin immunonanospheres as an efficient gene delivery system for a potential use in lung cancer: preparation, *in vitro* targeting and biological effect analysis [J]. *J Drug Target*, 2016, 24(3): 247-256
- [6] Liu H, Zhang DS, Du YQ. The immunotherapeutic effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as adjuvants on mice H-22 live cancer [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010, 10(1): 514-519
- [7] Li YT, Liu J, Zhong YE, et al. Biocompatibility of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au composite magnetic nanoparticles *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 2805-2819
- [8] 葛素梅, 张峰, 邢宝玲, 等. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>磁性Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>白蛋白微球的制备与表征 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(11): 1486-1490
- [9] Tang QS, An YL, Liu DF, et al. Folate/NIR 797-Conjugated albumin magnetic nanospheres: synthesis, characterization, and *in vitro* and *in vivo* targeting evaluation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106483

(下转第1505页)

- pressed in the human atherosclerotic arterial wall: Role in C5b-9-induced cell proliferation and migration [J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(2):221-230
- [7] Du Y, Teng X, Wang N, et al. NF- $\kappa$ B and enhancer-binding CREB protein scaffolded by CREB-binding protein (CBP)/p300 proteins regulate CD59 protein expression to protect cells from complement attack [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(5):2711-2724
- [8] Gao L, Qiu W, Wang Y, et al. Sublytic complement C5b-9 complexes induce thrombospondin-1 production in rat glomerular mesangial cells via PI3-k/Akt: association with activation of latent transforming growth factor- $\beta$ 1 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 144(2):326-334
- [9] O'connor L, Gilmour J, Bonifer C. The role of the ubiquitously expressed transcription factor Sp1 in tissue-specific transcriptional regulation and in disease [J]. *Yale J Biol Med*, 2016, 89(4):513-525
- [10] Liu Y, Du Y, Hu X, et al. Up-regulation of ceRNA TINCR by SP1 contributes to tumorigenesis in breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):367
- [11] Li Y, Wu Y, Sun Z, et al. MicroRNA-376a inhibits cell proliferation and invasion in glioblastoma multiforme by directly targeting specificity protein 1 [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1):1583-1590
- [12] Xu JH, Qiu W, Wang YW, et al. Gene expression profile and overexpression of apoptosis-related genes (NGFI-B and Gadd 45 gamma) in early phase of Thy-1 nephritis model [J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 326(1):159-168
- [13] Wang Y, He Q, Qin H, et al. The complement C5b-9 complexes induced injury of glomerular mesangial cells in rats with Thy-1 nephritis by increasing nitric oxide synthesis [J]. *Life Sci*, 2006, 79(2):182-192
- [14] Rintala JM, Savikko J, Rintala SE, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition with erlotinib ameliorates anti-Thy 1.1-induced experimental glomerulonephritis [J]. *J Nephrol*, 2016, 29(3):359-365
- [15] Sato T, Van Dixhoorn MG, Prins FA, et al. The terminal sequence of complement plays an essential role in antibody-mediated renal cell apoptosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(6):1242-1252
- [16] Hillman Y, Mazkereth N, Farberov L, et al. Regulation of complement-dependent cytotoxicity by microRNAs miR-200b, miR-200c, and miR-217 [J]. *J Immunol*, 2016, 196(12):5156-5165
- [17] Wu FJ, Lin TY, Sung LY, et al. BMP8A sustains spermatogenesis by activating both SMAD1/5/8 and SMAD2/3 in spermatogonia [J]. *Sci Signal*, 2017, 10(477):1910
- [收稿日期] 2018-05-14

(上接第 1493 页)

- [10] Shundo C, Zhang H, Nakanishi T, et al. Cytotoxicity evaluation of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles in mouse embryonic stem cells [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, 97:221-225
- [11] Zhao L, Huo M, Liu J, et al. *In vitro* investigation on the magnetic thermochemo therapy mediated by magnetic nanoparticles combined with methotrexate for breast cancer treatment [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2013, 13:741-745
- [12] An Y, Tang Q, Rui Y, et al. *In vitro* MR imaging of folate-receptor expression with the folate-specific nanospheres in a C6 glioblastoma model [J]. *Comput Assist Surg (Abingdon)*, 2017, 22(sup1):312-318
- [13] Li HB, Ke F, An YL, et al. Gemcitabine-loaded magnetic albumin nanospheres for cancer chemohyperthermia [J]. *J Nanopart Res*, 2013, 15(3):1513
- [14] Yuan C, An Y, Zhang J, et al. Magnetic nanoparticles for targeted therapeutic gene delivery and magnetic-inducing heating on hepatoma [J]. *Nanotechnology*, 2014, 25(34):345101
- [15] 杜益群, 张东生, 倪海燕, 等. 肿瘤热疗用  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子的生物相容性研究 [J]. *南京大学学报(自然科学版)*, 2006, 36(3):324-330
- [16] Li J, Di Y, Jin C, et al. Gemcitabine-loaded albumin nanospheres (GEM-ANPs) inhibit PANC-1 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2013, 8(1):176
- [17] Yang R, Chen DZ, Li MF, et al. 20(s)-ginsenoside Rg3-loaded magnetic human serum albumin nanospheres applied to HeLa cervical cancer cells *in vitro* [J]. *Biomed Mater Eng*, 2014, 24(6):1991-1998
- [18] Zhang H, Liang C, Hou XX, et al. Study of the combined treatment of lung cancer using gene-loaded immunomagnetic albumin nanospheres *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11:1039-1050
- [19] Crombet Ramos T, Camilo Rodriguez P, Neningen Vinageras E, et al. CIMAvax EGF (EGF-P64K) vaccine for the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(10):1303-1311
- [20] Yang R, An YL, Miao FQ, et al. Preparation of folic acid-conjugated, doxorubicin-loaded, magnetic bovine serum albumin nanospheres and their antitumor effects *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9:1-13
- [收稿日期] 2018-07-24