

# 基于功能化碳纳米管新型肿瘤靶向探针的研究

欧忠敏 吴宝艳 邢 达\*

(华南师范大学激光生命科学研究教育部重点实验室, 广东 广州 510631)

**摘要** 肿瘤靶向治疗的研究是当今生物医学界的研究热点。寻找具有肿瘤靶向性的高效体内运输载体是实现肿瘤靶向治疗的关键。采用整合素  $\alpha_v\beta_3$  单克隆抗体作为肿瘤靶向分子,以单壁碳纳米管(SWNT)作为运输载体,通过碳纳米管表面的适当功能化,将整合素  $\alpha_v\beta_3$  单抗标记在碳纳米管上,构建整合素  $\alpha_v\beta_3$  单抗标记的碳纳米管新型肿瘤靶向探针;研究探针在人脐静脉内皮细胞 HUVEC 和整合素  $\alpha_v\beta_3$  高表达的人脑神经胶质瘤细胞 U87MG 的肿瘤靶向性。实验结果表明,这种整合素  $\alpha_v\beta_3$  单抗标记的碳纳米管探针对于 U87MG 细胞靶向选择性高,将能成为一种有潜力的药物输送及肿瘤分子影像的新型肿瘤靶向载体。

**关键词** 功能材料; 碳纳米管; 肿瘤靶向治疗; 整合素  $\alpha_v\beta_3$  单克隆抗体

中图分类号 TB34 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS200929s1.0181

## A Novel Cancer-Targeting Probe Based on Integrin $\alpha_v\beta_3$ Monoclonal Antibody Labeled Carbon Nanotubes

Ou Zhongmin Wu Baoyan Xing Da

(MOE Key Laboratory of Laser Life Science & Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China)

**Abstract** The pursuit of efficient and highly target-selective transporters is an active topic in cancer targeting therapy. A novel cancer-targeting probe based on integrin  $\alpha_v\beta_3$  monoclonal antibody labeled carbon nanotubes was developed to investigate cancer cell targeting in vitro. The results revealed that the system had a high efficiency in cancer cell targeting in integrin  $\alpha_v\beta_3$  positive U87MG cells but low targeting in HUVEC cells, indicating that the high efficiency was due to the specific targeting property of integrin  $\alpha_v\beta_3$  monoclonal antibody. Thus, the integrin  $\alpha_v\beta_3$  monoclonal antibody labeled single-walled carbon nanotube (SWNT) probe is a potential carrier-candidate for cancer-imaging and drug-delivering in cancer therapy.

**Key words** functional materials; carbon nanotubes; cancer-targeting therapy; integrin  $\alpha_v\beta_3$  monoclonal antibody

## 1 引 言

恶性肿瘤是威胁人类健康的常见疾病。传统的恶性肿瘤治疗方法对杀灭肿瘤细胞无特异性,治疗效率低且有强大的毒副作用。肿瘤靶向治疗的研究成为当今生物医学界的研究热点<sup>[1]</sup>。肿瘤靶向治疗是指利用对肿瘤细胞有选择性亲和作用的物质作为载体,将治疗药物定向作用于肿瘤部位而不损伤正常部位的治疗方法<sup>[1]</sup>。因此寻找具有肿瘤靶向性的高效体内运输载体已经迫在眉睫,是解决肿瘤靶向

治疗的关键。

自从碳纳米管应用于生物领域以来,由于其独特的结构,电光学,热力学的性能,为生命科学领域带来了新的机遇<sup>[2]</sup>。大量的研究兴趣主要集中在通过碳纳米管的表面功能化将生物分子固定到碳管表面,并将其应用到表征,纯化和分离中<sup>[3~6]</sup>。最近有研究表明表面功能化的碳纳米管能够携带蛋白质,小肽段以及核酸等生物分子进入细胞,而碳纳米管本身的细胞毒性可以忽略<sup>[7~11]</sup>。所有这些研究表

**基金项目:** 国家自然科学基金(30627003, 30870676, 30800261)、广东省自然科学基金(7117865)、教育部留学回国科研启动基金(教外司留[2009]8号)和人事部留学人员科技活动项目择优资助项目(2008年)资助课题。

**作者简介:** 欧忠敏(1976—),女,博士,讲师,主要从事功能性纳米材料的制备和表征等方面的研究。

E-mail: ozm@senu.edu.cn

\* 通信联系人。E-mail: xingda@senu.edu.cn

明碳纳米管是一种非常有潜力的药物输送和癌症治疗的载体。实现肿瘤靶向治疗的另一个重要因素是选取合适的肿瘤靶向分子。整合素是一类细胞表面受体家族,由 $\alpha$ 和 $\beta$ 两个亚基组成的异二聚体跨膜糖蛋白<sup>[12]</sup>,其中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 亚型最为引人注目,它在肿瘤的形成,生长,转移和肿瘤介导的血管增生方面都起重要作用。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在很多恶性肿瘤(如神经胶质瘤,黑色素瘤和卵巢癌等)细胞及肿瘤新生血管系统上都有高表达,而在正常组织上表达匮乏<sup>[13~15]</sup>;而且通过整合素 $\alpha_v\beta_3$ 介导内吞途径可以将整合素 $\alpha_v\beta_3$ 复合物无破坏性地携带入细胞内<sup>[16~19]</sup>,有效克服了大分子药物在生理状态下不能穿透细胞膜进入细胞内的生理屏障。因此,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是一种有临床意义的抗肿瘤治疗的分子靶点。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单克隆抗体通过抗体-抗原识别,可以特异性的选择整合素 $\alpha_v\beta_3$ ,不仅靶向性强,而且药物半衰期长,相对稳定性强<sup>[20]</sup>,是一种非常有潜力的肿瘤靶向分子。

鉴于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗的特异靶向性,以及碳纳米管作为生物载体的巨大潜力,首次以整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗为靶向分子,以碳纳米管为载体,通过构建整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗标记的碳纳米管新型肿瘤靶向探针,研究了探针在肿瘤细胞和正常细胞中的靶向性,为肿瘤靶向治疗提供新策略。

## 2 实验方法

### 2.1 药品与试剂

单壁碳纳米管(SWNT,中国科学院成都有机化学研究所);磷脂化聚乙二醇(PL-PEG-COOH,美国Avanti Polar Lipid公司);整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗(mAb,自美国Santa Cruz生物技术公司);蛋白A(北京博奥森生物技术有限公司);异硫氰酸荧光素(FITC),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),碳二亚胺(EDC)等其它试剂均为分析纯,购自Sigma-Aldrich公司。

### 2.2 样品制备与检测

将SWNT(1 mg)加入PL-PEG溶液(1 mg/ml)中,超声分散6 h;将碳管悬浊液(10000 g)离心15 min;取上清液,并用100 kDa过滤器(Millipore)多次过滤除去过量的PL-PEG,得到最终澄清的SWNT-PEG溶液;并用EDC/NHS活化SWNT-PEG上的羧基(摩尔比1:1:1),与蛋白A上的氨基连接,利用平衡透析法除去游离的蛋白A。同时将适量FITC与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单克隆抗体在避光条件下

孵育,经分离、纯化得到有荧光标记的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗(mAb-FITC)<sup>[21]</sup>。将mAb-FITC溶液(8 nM)滴加到SWNT-PEG-Protein A溶液中,避光反应4 h,并用透析膜(500KDa)透析3~4天,去除游离的mAb-FITC,得到最终的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗标记的碳纳米管靶向探针(SWNT-PEG-mAb),其质量浓度约为0.3~0.4 mg/ml。

细胞培养:神经胶质瘤细胞U87MG和人脐静脉内皮细胞HUVEC分别用含有10%的胎牛血清和1%的青霉素-链霉素的EMEM和DMEM培养基培养。培养条件:37℃,含有5%(体积分数)的CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱。

利用拉曼(Raman)光谱仪(Acton spectro@2300i, Ar离子激光,波长为514.5 nm),UV-vis分光光度计(Lambda-35),荧光分光光度计(LS-55),激光共聚焦显微镜(LSCM510)对SWNT-PEG-mAb探针进行检测分析,同时利用Counting Kit-8(Dojindouboratories, Kumamoto, Japan)检测细胞毒性,经酶标仪(DG5032, Huadong, Nanjing, China)读取,研究探针对细胞杀伤效应。

## 3 结果与讨论

### 3.1 SWNT-PEG-mAb 探针的构建

图1是SWNT-PEG-mAb探针的构建流程图,利用PL-PEG非共价修饰SWNT,形成稳定的

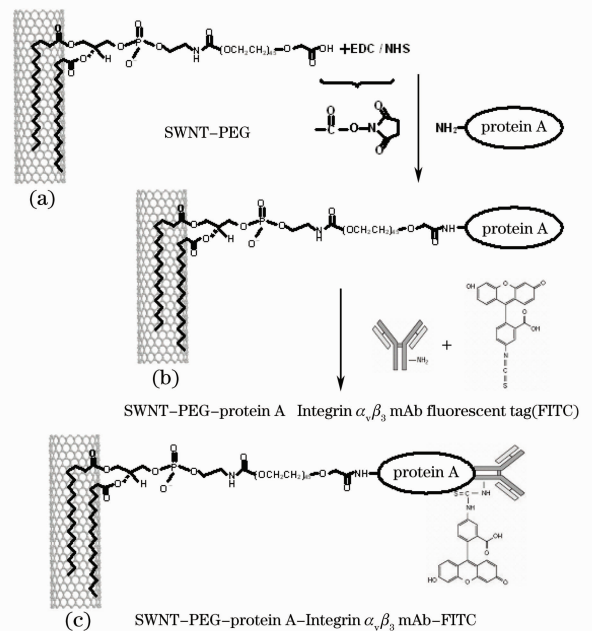


图1 SWNT-PEG-mAb 探针的构建流程图

Fig. 1 An illustration of the procedures of SWNT-PEG-mAb

SWNT-PEG-COOH 溶液, 然后用 EDC/NHS 活化碳纳米管表面的羧基, 通过酰胺键合反应将蛋白 A 引入碳纳米管表面, 将 FITC 标记的 mAb 与表面偶联蛋白 A 的碳纳米管混合, 利用蛋白 A 与整合素  $\alpha_v\beta_3$  单抗 Fc 段结合的特性, 将抗体定向固定在碳纳米管表面, 充分发挥抗体的活性, 提高肿瘤靶向探针的有效性。

### 3.2 SWNT-PEG-mAb 探针的表征

G 峰 ( $1580\text{ cm}^{-1}$ , 石墨峰) 是碳纳米管在拉曼光谱上一个特征峰<sup>[22]</sup>。从 SWNT-PEG-mAb 探针的拉曼光谱(图 2) 可以看到在  $1580\text{ cm}^{-1}$  处有明显的 G 峰, 表明在最终得到的 SWNT-PEG-mAb 探针中包含 SWNT, 而且碳纳米管的结构没有被破坏。此外, 还可以看到(图 2 插图) 黑色澄清的 SWNT-PEG-mAb 溶液, 也进一步说明了 SWNT 存在于探针中。而且 SWNT-PEG-mAb 探针的水溶液高度分散, 在常温下至少可以稳定保存两个星期, 而不出现任何团聚或沉淀。碳纳米管不溶于水, 容易团聚, 而制备的 SWNT-PEG-mAb 探针, 由于磷脂化聚乙二醇的磷脂烷链(PL) 通过 van der Waals 和疏水相互作用吸附在疏水 SWNT 表面, PL-PEG 的亲水端增强 SWNT 的亲水性, 通过 PL-PEG 对 SWNT 的非共价修饰, 不仅没有破坏碳管本身的结构, 而且增强了 SWNT 的亲水性, 还在碳纳米管表面引入活性基团, 为进一步连接生物分子提供了平台。而且有研究<sup>[5, 23, 24]</sup> 表明 PEG 修饰的 SWNT, 可以提高碳纳米管表面的生物相容性和稳定性, 延长碳纳米管在体内的循环时间, 降低碳纳米管对蛋白质的非特异性吸附。因此, PEG 的修饰是将碳纳米管应用

于生物医学领域的关键步骤之一。

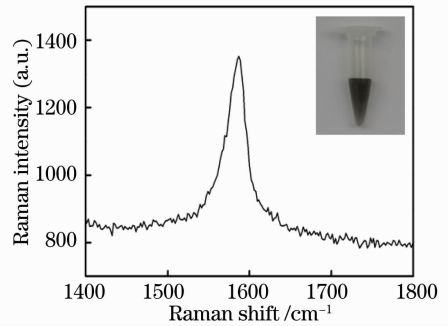


图 2 SWNT-PEG-mAb 探针的拉曼光谱图及样品的照片(插图)

Fig. 2 Raman spectra of SWNT-PEG-mAb and a photography of stable SWNT-PEG-mAb solution (inset)

为了确定 SWNT-PEG-mAb 探针是否标记上 mAb-FITC, UV-vis 分光光度计被用来测量样品。如图 3(a) 所示, SWNT-PEG-mAb 样品在 490 nm 处观察到一个 FITC 的特征吸收峰(粗线), 而且对比游离的 mAb-FITC(细线), 该吸收峰是建立在裸 SWNT 吸收峰的基础上(虚线)。由于游离的 FITC 和 mAb-FITC 在探针制备的过程中已经被分离出最终样品, 因此, SWNT-PEG-mAb 探针的吸收光谱表明 mAb-FITC 标记在 SWNT-PEG-mAb 上。图 3(b) 是样品的荧光光谱图, 两个样品在 520nm 处都可以观察到一个 FITC 荧光发射峰, 进一步证明 SWNT-PEG-mAb 上成功修饰了 mAb-FITC, 而且该结果也为进一步研究 SWNT-PEG-mAb 探针对肿瘤细胞特异靶向性提供一种快速而灵敏的利用激光共聚焦显微镜进行观察的方法。

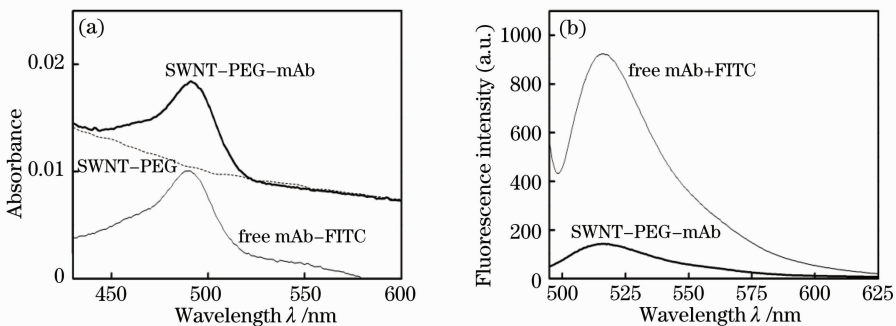


图 3 (a)SWNT-PEG-mAb 探针的吸收光谱图; (b) 荧光光谱图(激发波长为 490 nm)

Fig. 3 (a) Absorbance spectra of SWNT-PEG-mAb sample; (b) fluorescence emission spectra of SWNT-PEG-mAb-FITC with an excitation of 490 nm

### 3.3 细胞毒性检测

细胞毒性实验是检测 SWNT-PEG-mAb 探针能否用于生物活体系统的关键因素。为了确认制备

的 SWNT-PEG-mAb 探针是否具有细胞毒性, 将不同浓度的探针 ( $1.5\sim 12\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 分别与 U87MG 细胞共孵育 12 h, 交换新鲜的 PBS 缓冲液, 在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  下

再继续共孵育 72 h。如图 4 所示,对比空白对照组 (0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),不同浓度下 (1.5~12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的 SWNT-PEG-mAb 探针不能引起细胞的明显死亡,没有观察到明显的细胞毒性。

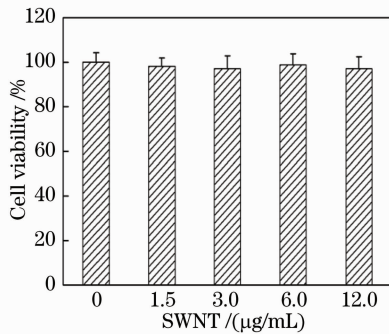


图 4 不同浓度的 SWNT-PEG-mAb 探针对于 U87MG 细胞的毒性影响

Fig. 4 Cytotoxicity of SWNT-PEG-mAb at different concentration on U87MG cells

### 3.4 SWNT-PEG-mAb 探针的肿瘤靶向性

为了验证 SWNT-PEG-mAb 探针的肿瘤靶向

性,将探针 (3~6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 分别与整合素  $\alpha_v\beta_3$  高表达的 U87MG 细胞,以及正常细胞 HUVEC 共孵育 2 h,然后用共焦显微镜观察,从图 5 可见,在 U87MG 细胞中可以观察到很强的荧光,而在正常细胞 HUVEC 中几乎观察不到荧光。其原因可能由于 U87MG 细胞上有大量表达的整合素  $\alpha_v\beta_3$ ,而正常细胞 HUVEC 上整合素  $\alpha_v\beta_3$  的表达匮乏,SWNT-PEG-mAb 探针通过独特的抗体抗原识别功能,能够准确的识别 U87MG 细胞,对 U87MG 细胞呈现高效靶向选择性。研究表明,游离的 FITC 不能进入细胞<sup>[7]</sup>;而且游离的 FITC 和 mAb-FITC 在样品的制备过程中已经被去除,因此 U87MG 细胞上的荧光的确来自标记在 SWNT 上的 mAb-FITC,SWNT-PEG-mAb 探针能选择性地进入那些细胞表面过量表达整合素  $\alpha_v\beta_3$  的肿瘤细胞,而对正常细胞没有影响。此结果表明探针在靶向杀伤肿瘤细胞以及肿瘤靶向分子影像等肿瘤的靶向治疗中有广阔的应用前景。

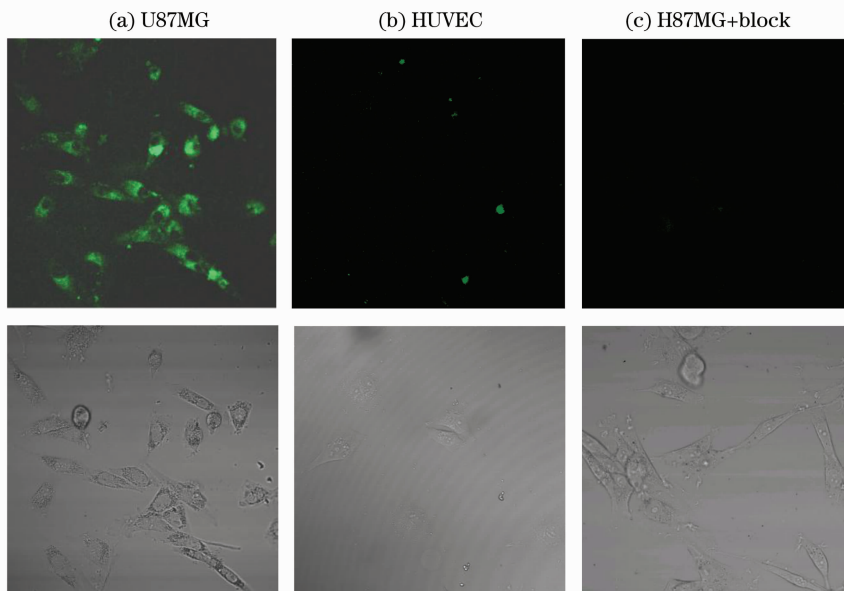


图 5 经 SWNT-PEG-mAb 探针孵育的 U87MG 细胞 (a); HUVEC 细胞 (b) 以及 U87MG 细胞与整合素  $\alpha_v\beta_3$  单抗 (c) 的共焦显微镜图像

Fig. 5 Confocal microscopic images of U87MG (a) and HUVEC cells (b) incubated with SWNT-PEG-mAb and the control group showing blocking of integrin  $\alpha_v\beta_3$  on U87MG cells with integrin  $\alpha_v\beta_3$  monoclonal antibody (c)

为了验证 SWNT-PEG-mAb 探针主要是通过整合素  $\alpha_v\beta_3$  介导的途径进入细胞,将 U87MG 细胞、SWNT-PEG-mAb 以及整合素  $\alpha_v\beta_3$  单抗 (5 nM) 一起共孵育 2 小时,如图 5 (c) 所示,几乎观察不到荧光,表明 SWNT-PEG-mAb 探针通过整合素  $\alpha_v\beta_3$  介导后进入细胞<sup>[16~19]</sup>。因此激光共聚焦显微镜的结果,结合以上拉曼光谱,UV-vis 吸收光谱,荧光

光谱表明具有高效肿瘤靶向性的 SWNT-PEG-mAb 探针制备成功,同时表明 SWNT-PEG-mAb 探针将成为有潜力的抗肿瘤药物的靶向运输以及肿瘤的靶向分子影像等肿瘤的高效靶向生物载体。

## 4 结 论

以整合素  $\alpha_v\beta_3$  单抗作为肿瘤靶向分子,以碳纳

米管作为载体,通过碳纳米管表面的适当功能化,将整合素  $\alpha_v\beta_3$  单抗标记在碳纳米管上,成功制备了 SWNT-PEG-mAb 探针。这一探针不仅稳定、分散、低细胞毒性,而且通过整合素  $\alpha_v\beta_3$  抗原-抗体的特异性识别,对整合素  $\alpha_v\beta_3$  高表达的肿瘤细胞 U87MG 有高选择性,而对正常细胞 HUVEC 无选择性。并且通过整合素  $\alpha_v\beta_3$  介导,将探针携带进细胞内,实现对肿瘤细胞高靶向性,而对正常细胞杀伤小的设想,为靶向肿瘤杀伤提供新方法。这一基于整合素  $\alpha_v\beta_3$  单抗标记的碳纳米管靶向探针有望给药物输送和肿瘤靶向治疗提供新的依据和策略,是一类有潜力的肿瘤靶向载体探针。

### 参 考 文 献

- 1 Li Yan, Ma Jie. Molecular Targeted Cancer Therapy [M]. Beijing: People Medical Publishing House Press, 2007. 1~13  
李岩,马洁. 肿瘤分子靶向治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社,2007. 1~13
- 2 W. R. Yang, P. Thordarson, J. J. Gooding *et al.*. Carbon nanotubes for biological and biomedical applications [J]. *Nanotechnology*, 2007, **18**: 412001
- 3 J. Wang. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review[J]. *Electroanalysis*, 2005, **17**(1): 7~14
- 4 S. Gowtham, R. H. Scheicher, R. Pandey *et al.*. First-principles study of physisorption of nucleic acid bases on small-diameter carbon nanotubes [J]. *Nanotechnology*, 2008, **19**: 125701
- 5 R. Wang, P. Cherukuri, J. G. Duque *et al.*. PEG-eggs: single-walled carbon nanotubes in biocompatible shell-crosslinked micelles[J]. *Carbon*, 2007, **45**: 2388~2393
- 6 D. X. Cui. Advances and prospects on biomolecules functionalized carbon nanotubes[J]. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2007, **7**: 1298~1314
- 7 D. Pantarotto, J. P. Briand, M. Prato *et al.*. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes [J]. *Chem. Commun.*, 2004, **7**(1): 16~17
- 8 D. Pantarotto, R. Singh, D. McCarthy *et al.*. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery[J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**(39): 5242~5246
- 9 N. W. S. Kam, Z. Liu, H. Dai. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**: 12492~12493
- 10 N. W. S. Kam, H. Dai. Carbon nanotubes as intracellular Protein transporters: generality and biological functionality[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**(16): 6021~6026
- 11 Q. Lu, J. M. Moore, G. Huang *et al.*. RNA Polymer translocation with single-walled carbon nanotubes [J]. *Nano. Lett.*, 2004, **4**(12): 2473~2477
- 12 R. O. Hynes. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion[J]. *Cell*, 1992, **69**: 11~25
- 13 B. P. Eliceiri, D. A. Cheresh. The role of alpha(v) integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development[J]. *J. Clin. Invest.*, 1999, **103**(9): 1227~1230
- 14 E. H. Lim, T. N. Danthi, M. Bednarski *et al.*. A review: Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -targeted molecular imaging and therapy in angiogenesis[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2005, **1**: 110~114
- 15 J. D. Hood, D. A. Cheresh. Role of integrins in cell invasion and migration[J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, **2**: 91~100
- 16 J. J. H. Chu, J. W. M. Lee, M. L. Ng. Bio-imaging the entry process of an emerging pathogenic virus: The West Nile virus [J]. *Microsc Microanal.*, 2005, **11**(suppl. 2): 958~959
- 17 T. M. Odriljin, C. G. Haidaris, N. B. Lerner *et al.*. Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -mediated endocytosis of immobilized fibrinogen by A549 lung alveolar epithelial cells[J]. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2001, **24**: 12~21
- 18 M. Roberts, S. Barry, A. Woods *et al.*. PDGF-regulated rab4-dependent recycling of  $\alpha_v\beta_3$  integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading[J]. *Current Biology.*, 2001, **11**: 1392~1402
- 19 T. Panetti, P. J. McKeown-Longo. Receptor-mediated endocytosis of vitronectin is regulated by its conformational state [J]. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**: 11988~11993
- 20 Zou Caiyan, Wen Feiqiu. Integrins and targeted therapy of cancer therapy[J]. *Medical Recapitulate*, 2008, **14**(1): 60~62  
邹彩艳,文飞球. 整合素与肿瘤的靶向治疗[J]. 医学综述, 2008, **14**(1): 60~62
- 21 G. B. Wisdom. Conjugation of antibodies to fluorescein or rhodamine[J]. *Methods Mol. Biol.*, 2005, **295**: 131~134
- 22 A. Jorio, R. Saito, J. H. Hafner *et al.*. Structural (*n, m*) determination of isolated single-wall carbon nanotubes by resonant Raman scattering[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2001, **86**(6): 1118~1121
- 23 Wu Hong, Jiang Zhongyi. Review of nanotube bio-technology[J]. *J. Chemical Industry and Engineering*, 2005, **56**(6): 962~971  
吴洪,姜忠义. 纳米管生物技术[J]. 化工学报, 2005, **56**(6): 962~971
- 24 S. Moonsub, N. W. S. Kam, R. J. Chen *et al.*. Functionalization of carbon nanotubes for biocompatibility and biomolecular recognition[J]. *Nano Lett.*, 2002, **2**(4): 285~288