

◆ 实验研究

Impact of PEG-thiol modification on the colloidal stability and anti-phagocytic capacity of GoldMag nanoparticles

GONG Ming-fu, YANG Hua, ZHANG Song, ZOU Li-guang*, ZHANG Dong, SHU Tong-sheng
(Department of Radiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the impact of PEG-thiol modification on the magnetic property, colloidal stability and anti-phagocytic capacity of GoldMag nanoparticles in vitro. **Methods** GoldMag nanoparticles were modified using PEG-thiol, and the magnetic property of PEG-GoldMag and GoldMag were tested with FSE sequence T2WI, GRE sequence T2*WI and T2 mapping. Zeta potential of the two nanoparticle solutions were tested with Zeta potential instrument, while the absorbance was tested with UV-visible spectrophotometer at different time points. Mouse monocyte-macrophage RAW 264.7 was labeled with GoldMag and PEG-GoldMag and stained with Prussian blue buffer in order to calculate the labeling rate. Intracellular iron content of the RAW 264.7 labeled with two different nanoparticles was measured with ICP-OES to assess the influence of PEG-thiol modification on anti-phagocytic capacity of GoldMag. **Results** The Zeta potential of GoldMag and PEG-GoldMag solution was -18.3 mV and -39.5 mV, respectively. After standing at room temperature for 100 min, the relative absorbance of GoldMag and PEG-GoldMag solution was 50% and 88.5%, respectively. When standing for 200 min, the relative absorbance of the two nanoparticle solutions dropped to 17%—18% and 80%, respectively. Prussian blue staining showed that both the two kinds of nanoparticles could label RAW 264.7 cells, and the label rate of GoldMag and PEG-GoldMag was $(85.3 \pm 2.1)\%$ and $(23.6 \pm 1.3)\%$, respectively. The intracellular iron content of RAW 264.7 cells labeled with GoldMag and PEG-GoldMag was (21.6 ± 2.3) pg/cell and (8.7 ± 1.2) pg/cell, respectively. On T2WI, GRE T2*WI and T2 mapping, the differences of signal intensity and T2 relaxation time between PEG-GoldMag and GoldMag nanoparticle solutions at various concentrations were not statistically significant (all $P > 0.05$). **Conclusion** PEG-thiol modification can significantly improve the suspension stability and anti-phagocytic clearance capacity of GoldMag nanoparticles in vitro without obvious alteration of magnetic properties.

[Key words] GoldMag; PEG-thiol; Suspension stability; Anti-phagocytic capacity; Magnetic resonance imaging

PEG-thiol 修饰对金磁微粒胶体稳定性和抗吞噬能力的影响

龚明福, 杨 华, 张 松, 邹利光*, 张 冬, 舒通胜

(第三军医大学新桥医院放射科, 重庆 400037)

[摘要] **目的** 探讨 PEG-thiol 修饰对 GoldMag 的磁学性能、体外悬浮稳定性和抗吞噬能力的影响。**方法** 用 PEG-thiol 对 GoldMag 进行表面修饰, 采用 MR FSE 序列 T2W、GRE 序列 T2*W 和 T2 mapping 分别检测 PEG-GoldMag 和 GoldMag 的磁学性能; 以 Zeta 电位仪检测两种纳米粒溶液的 Zeta 电位, 紫外-可见分光光度计检测两种纳米粒溶液不同时间点的吸光度, 评估其悬浮稳定性。分别用两种纳米粒对小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 进行体外标记, 以普鲁士蓝染色检测两种纳米粒的细胞标记率, ICP-OES 检测两种不同纳米粒标记的 RAW 264.7 细胞的细胞内铁含量, 评估 PEG

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071197)、国家“十二五”科技支撑计划课题项目子课题(2012BAI23B08-4)。

[作者简介] 龚明福(1986—), 男, 湖南益阳人, 在读硕士。研究方向: 磁共振分子影像。E-mail: hummer198625@sina.com

[通讯作者] 邹利光, 第三军医大学新桥医院放射科, 400037。E-mail: zoulg@tmmu.edu.cn

[收稿日期] 2012-10-06 **[修回日期]** 2013-05-20

修饰对 GoldMag 纳米粒体外抗吞噬能力的影响。**结果** GoldMag 和 PEG-GoldMag 溶液的 Zeta 电位分别为 -18.3 mV 和 -39.5 mV 。室温下静置 100 min 后, GoldMag 和 PEG-GoldMag 溶液的相对吸光度分别为 50% 和 88.5%; 静置 200 min 后两种溶液的相对吸光度分别为 17%~18% 和 80%。两种纳米粒均能标记 RAW 264.7 细胞, GoldMag 和 PEG-GoldMag 对 RAW 264.7 细胞的标记率分别为 $(85.3 \pm 2.1)\%$ 和 $(23.6 \pm 1.3)\%$ 。GoldMag 和 PEG-GoldMag 标记的 RAW 264.7 细胞的铁含量分别为 $(21.6 \pm 2.3)\text{ pg/细胞}$ 和 $(8.7 \pm 1.2)\text{ pg/细胞}$ 。在 T2WI、T2*WI 和 T2 mapping 三种图像上, 各浓度下 PEG-GoldMag 和 GoldMag 纳米粒凝胶的信号强度和 T2 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** PEG-thiol 修饰能显著改善 GoldMag 的悬浮稳定性和抗吞噬清除能力, 且对其磁学性能无明显影响。

[关键词] 金磁微粒; 巯基聚乙二醇; 悬浮稳定性; 抗吞噬能力; 磁共振成像

[中图分类号] R445.2; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2013)07-1053-05

金磁纳米微粒(GoldMag)是由胶体金壳和超顺磁性氧化铁纳米粒(superparamagnetic iron oxide nanoparticle, SPIO)内核构成的具有壳/核结构同时具有胶体金和 SPIO 性质的新型纳米材料, 既能在纳米粒表面耦联特异性抗体, 又具有超顺磁性, 在靶向 MR 分子成像领域有很好的应用前景^[1]。未经表面修饰的 GoldMag 的悬浮稳定性较差, 在磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)中易聚集沉淀, 在生理环境中易被网状内皮系统识别、吞噬并清除, 使其体内应用受到很大限制。聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)是一种无毒、pH 中性、水溶性较好的亲水性多聚物, 且能降低被修饰物的免疫原性和抗原性, 已被食品和药物管理局(food and drug administration, FDA)批准作为体内注射药用聚合物^[2]。本实验采用 O-[2-(3-巯基丙酰基氨基)乙基]-O'-甲基聚乙二醇(PEG-thiol)作为表面活性剂, 对 GoldMag 纳米粒进行表面修饰, 以期在不影响其磁学性能的基础上提高其体外悬浮稳定性和抗细胞吞噬能力。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 GoldMag(陕西北美基因有限公司), 平均粒径 50 nm, 浓度 5 mg/ml。PEG-thiol 和溴化十六烷基三甲基铵(CTAB, Sigma); ATCC 小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7; Hyclone RPMI-1640 培养基、胎牛血清和青霉素-链霉素双抗溶液; 浓硝酸和浓盐酸(国药集团化学试剂有限公司)均为工艺超纯; 马尔文 Zetasizer Nano Series 90 高灵敏纳米粒度分析仪, Beckman Coulter DU800 紫外-可见光分光光度计, ICP-OES 电感耦合等离子体发射光谱仪。

1.2 GoldMag 的 PEG 修饰 将 25 mmol/L CTAB 溶液 1 ml 和等体积 GoldMag 纳米粒混合, 缓慢振荡 20 min, 以 0.5T 永久性磁体分离悬液, 去上清液; 重复 3 次, 去掉多余的 CTAB。用 1 ml 双蒸水将分离出来的 GoldMag 纳米粒重悬, 并加入 1.25 mmol/L 的 PEG-thiol 溶液 1 ml, 于室温下振荡 4 h, 0.5T 永久性

磁体分离 3 次, 去掉多余的 PEG-thiol。最后得到的 PEG 修饰的纳米粒重悬于双蒸水中待用。

1.3 MRI 及图像后处理 采用 GE Signa HDx 3.0T MR 仪。用 1% 琼脂糖凝胶将 PEG-GoldMag 和 GoldMag 纳米粒按照 GoldMag 质量浓度进行梯度稀释, 得到质量浓度分别为 0、10、25、50 $\mu\text{g/ml}$ 的 PEG-GoldMag 和 GoldMag 纳米粒凝胶溶液。按照图 1 所示顺序将装有各浓度纳米粒凝胶的 EP 管固定于 EP 管架上, 置于膝关节表面线圈内行轴位 2D 多层 MR 成像, FOV 16 cm \times 16 cm, 层间距 0~0.5 mm, 层厚 2~3 mm。成像序列和参数: FSE T2W(TR 2000 ms, TE 43.7 ms), GRE T2*W(TR 400 ms, TE 12 ms, 翻转角 20 $^\circ$)和 16 回波 T2 mapping(TR 1025 ms, TE 2.4~60.5 ms)。将图像传输至 AW 4.4 工作站, 选取各

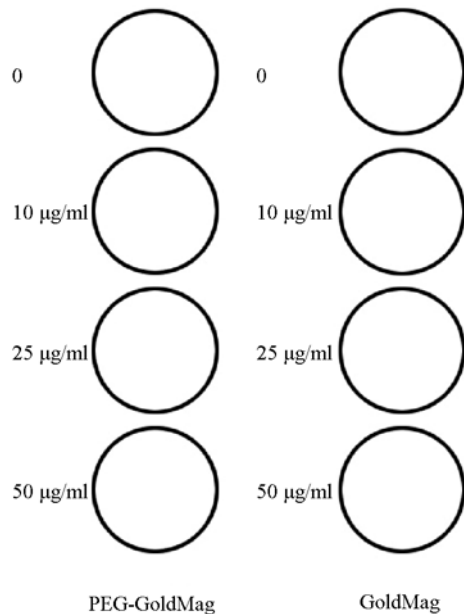


图 1 不同浓度纳米粒凝胶 EP 管排放顺序