doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.01.002

巨噬细胞膜仿生纳米铁颗粒制备 及多形性胶质母细胞瘤 MRI 成像的初步实验研究*

余宏微 陈静文 贺美娟 范旭辉 王毅晖 王 悍[△] (上海交通大学医学院附属第一人民医院放射科 上海 200080)

摘要目的:探讨巨噬细胞膜仿生的纳米铁颗粒(Fe₃O₄ NCs@MM)对多形性胶质母细胞瘤 MRI 成像的研究。方法:制备巨噬细胞 膜仿生的纳米铁颗粒 Fe₃O₄ NCs@MM,利用动态光散射(Dynamic Light Scattering,DLS)和透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope,TEM) 对其水合动力学粒径、表面电势和形态进行表征。采用 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)评价巨噬细胞膜的完整包覆;紫外可见光谱测定巨噬细胞膜仿生的纳米铁颗 粒抗蛋白吸附能力。通过 MRI 成像系统,分析了含不同浓度的 Fe 元素(0.1-1.6 mM)的 Fe₅O₄ NCs@MM 在 GSH 存在或不存在时 的 T₁ 弛豫效应。采用细胞增殖 - 毒性实验(Cell Counting Kit-8,CCK-8),测定巨噬细胞膜仿生纳米铁颗粒处理肿瘤细胞 24 h 后的 细胞活性。尾静脉注射巨噬细胞膜仿生纳米铁颗粒至原位胶质母细胞瘤模型中,观察成像效果。结果:巨噬细胞膜仿生的纳米铁 颗粒 Fe₃O₄ NCs@MM 的水合动力学粒径和表面电势分别为 286.5± 7.6 nm 和 -20.7± 3.5 mV,且在水溶液中分布均匀,具有较好 的单分散性。包覆巨噬细胞膜的纳米铁颗粒具备抗蛋白吸附的能力。MRI 成像显示,制备的巨噬细胞膜仿生的纳米铁颗粒 Fe₃O₄ NCs@MM 为 GSH 响应型 MRI 对比剂,具有较好的 T₁- 加权磁共振成像效果,在尾静脉注射巨噬细胞膜的纳米铁颗粒 0.5 h 后, 肿瘤部位的信号可见增强。结论:巨噬细胞膜仿生的纳米铁颗粒 Fe₃O₄ NCs@MM 可实现多形性胶质母细胞瘤的 MRI 成像。 关键词:仿生纳米颗粒;MRI 成像;多形性胶质母细胞瘤

中图分类号:R-33;R445;R739.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)01-6-06

Experimental Study of Nanoparticles with Biomimetic Macrophage Membrane for MRI Imaging of Glioblastoma*

YU Hong-wei, CHEN Jing-wen, HE Mei-juan, FAN Xu-hui, WANG Yi-hui, WANG Han^A

(Department of Radiology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of medicine, Shanghai, 200080, China) **ABSTRACT Objective:** To investigate the MRI imaging of glioblastoma multiforme with nanoparticles biomimetic to macrophage cell membrane (Fe₃O₄ NCs@MM). **Methods:** The nanoparticles with macrophage cell membrane (Fe₃O₄ NCs@MM) were prepared and characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) and Transmission Electron Microscope (TEM). Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to evaluate the complete coating of extracted macrophage cell membranes. The anti-protein adsorption ability of nanoparticles with macrophage cell membrane was determined by UV-VIS spectroscopy. The T₁ relaxation effects of Fe₃O₄NCs@MM with Fe at different concentrations (0.1-1.6 mM) in the presence or absence of GSH were analyzed by MRI. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to determine the cell activity of tumor cells treated with macrophage cell membrane bionic nanoparticles for 24 h. Glioblastoma-bearing mice were injected with macrophage cell membrane biomimetic nanoparticles and scanned by MRI. **Results:** The hydration kinetic particle size and surface potential of macrophage cell membrane biomimetic nanoparticle (Fe₃O₄ NCs@MM) were 286.5± 7.6 nm and -20.7± 3.5 mV respectively, with good monodispersion. Nanoparticles coated with macrophage cell membrane can successfully resist protein adsorption. MRI imaging showed that the prepared macrophage membrane bionic nanoparticles (Fe₃O₄ NCs@MM) were considered as GSH-responsive MRI contrast agents for T₁-weighted MRI imaging. The enhanced signal at the tumor site can be observed at 0.5 h post-injection of Fe₃O₄ NCs @MM. **Conclusion:** MRI imaging of glioblastoma multiforme can be achieved by biomimetic nanoparticles of macrophage cell membrane (Fe₃O₄ NCs@MM).

Key words: Biomimetic nanoparticles; MRI imaging; Glioblastoma multiforme

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R445; R739.4 Document code: A Article ID:1673-6273(2024)01-6-06

^{*}基金项目:国家自然科学基金项目(82271969);上海市教委重大项目(202101070002E00085);上海市科学技术委员会项目(19411951403) 作者简介:余宏微(1996-),男,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤分子影像学,E-mail: iyuhongwei@163.com

[△] 通讯作者:王悍,E-mail: han.wang@shsmu.edu.cn

⁽收稿日期:2023-07-04 接受日期:2023-07-30)

前言

多形性胶质母细胞瘤 (Glioblastoma multiforme,GBM)是 最常见的 WHO IV 级胶质瘤,占所有神经胶质瘤的一半以上, 是致死率最高的恶性肿瘤之一^[1,2]。目前治疗 GBM 的方法包括 手术切除、化疗、放疗以及新兴的免疫治疗、基因治疗、光疗和 热疗等^[3],但大多数 GBM 患者的中位生存期大约只有 15 个 月,长期生存时间超过 5 年的患者不到 5%^[47]。因此,改善 GBM 早期诊断与治疗具有重要意义。

由于血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)¹⁸及血脑肿瘤屏障 (blood-brain tumor barrier, BBTB)^[9,10]的存在,限制了对比剂或 治疗药物在神经系统肿瘤中的应用,因此探索能顺利穿过 BBTB 的新型载药体系,可提高 GBM 早期诊断效率^[11]。近年 来,随着纳米医学技术的发展,尤其是分子影像学的出现,纳米 载体递送体系成为促进药物跨 BBTB 转运的研究热点^[12]。经仿 生细胞膜修饰的智能纳米递送体系在增强脑靶向性、提高载药 量等方面受到越来越多的关注,一方面其可以减少炎症反应, 另一方面可以避免网状内皮系统(Reticuloendothelial System, RES)的清除,延长血液循环时间[13,14],从而促进了递送的物质 在脑实质的蓄积[15]。值得注意的是,巨噬细胞表面过表达的整 合素 α4、β1 可以与肿瘤细胞表面血管细胞粘附分子 -1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)相结合, 实现对肿瘤的靶 向[16-18]。且巨噬细胞表面的巨噬细胞-1抗原(Mac-1)也使它们 能够穿透血脑屏障,有效靶向胶质瘤^[19]。MRI 成像由于有较好 的软组织分辨率和多方位、多参数成像的优势,是 GBM 常用 的诊断方法,超小Fe₃O₄呈现出良好的生物相容性和低细胞毒 性,具有高成像分辨率等优点,被认为是钆基对比剂的理想替 代品,可作为潜在的 T1 磁共振成像对比剂,在临床上具有重要 的应用价值^[20]。在超小 Fe₃O₄ 的基础上合成的 Fe₃O₄ 纳米团簇 (Fe₃O₄NCs)具有更好的稳定性和生物相容性,并更容易被细 胞吞噬。在高 GSH 的还原性条件下, Fe₃O₄ NCs 纳米团簇会解 离成单个且分散均匀的超小 Fe₃O₄ NPs,可以用于 T₁ MR 成像 ^[21]。因此,我们设想用巨噬细胞膜包裹 Fe₃O₄ NCs(Fe₃O₄ NCs@MM),研究其对原位多形性胶质母细胞瘤的 MRI 成像 效果。

1 材料和方法

1.1 材料

三氯化铁(Iron chloride, FeCl₃, 阿达玛斯(上海)试剂有限 公司); 无水乙酸钠(Sodium acetate anhydrous, NaOAc, 国药集 团化学试剂有限公司); 一缩二乙二醇(Diethylene glycol, DEG, 国药集团化学试剂有限公司); 柠檬酸钠二水合物(Sodium citrate dihydrate, 阿拉丁试剂(上海)有限公司); 1-(3-二甲氨基丙 基)-3 乙基碳二亚胺盐酸盐 (1-(3-Dimethylaminopropyl) -3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC, 吉尔生化有限公司); N-羟基琥珀酰亚胺(NHydroxysuccinie NHS, 吉尔生化有限公司); N-羟基琥珀酰亚胺(NHydroxysuccinie NHS, 吉尔生化有限公司); N, 胶二盐酸盐(Cystamine dihydrochloride, 梯希爱(上海) 化成工业发展有限公司); 替莫唑胺(Temozolomide, TMZ, 西格 玛奥德里奇(上海) 贸易有限公司); DMEM 细胞培养液(Hyclone 公司), 青霉素 - 链霉素(杭州吉诺生物科技有限公司); 双辛可宁酸(BCA)蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限 公司);苄基磺酰氟(Phenylmethylsulfonyl fluoride,PMSF,上海 碧云天生物技术有限公司碧云天公司);JEOL 2010F 透射电子 显微镜(日本电子株式会社);纳米粒度分析仪(英国 Malvern Zetasizer 公司);电感耦合等离子体发射光谱仪(美国 Leeman 公司);核磁共振成像仪 0.5 T NMI20(上海纽曼电子科技有限 公司)。

1.2 材料的合成

1.2.1 合成表面柠檬酸稳定的超小四氧化三铁纳米颗粒 Fe₃O₄ NPs 准备所需药品试剂,使用精密电子天平称量所需要量的 原料:无水三氯化铁 648.8 mg,柠檬酸钠(Na₃Cit)471 mg,无水 醋酸钠 1312 mg,一缩二乙二醇(又名甘二醇,DEG)40 mL。无 水三氯化铁加入一缩二乙二醇中,超声震荡半小时以上直至 完全溶解。将柠檬酸钠(Na₃Cit)加入到上述溶液中,80 ℃水浴 锅内搅拌 2 h,柠檬酸钠完全溶解后,将无水醋酸钠加入其中, 持续搅拌至粉末完全溶解后,将溶液转移至 50 mL 高压反应釜 中,设置烘箱温度为 200 ℃,反应 4 h。反应结束后冷却至室温, 将产物全部转移至 50 mL 离心管中,以转速 13000 rpm 4 ℃ 的 条件离心 30 min,弃去上清液,沉淀使用适量无水乙醇回溶,重 复操作 3 次,最终将沉淀物放在真空干燥箱中 60 ℃烘干,得到 表面柠檬酸稳定的超小四氧化三铁纳米颗粒(Fe₃O₄ NPs)。

1.2.2 合成四氧化三铁纳米团簇Fe₃O₄ NCs 称取前述合成的 超小四氧化三铁纳米颗粒 Fe₃O₄ NPs 50 mg,将其溶解于 5 mL 超纯水中,超声震荡助溶,溶解后持续搅拌,往溶液中逐滴缓慢 滴加 EDC(206.5 mg,1 mL 超纯水),30 min 后,逐滴缓慢滴加 NHS(124 mg,1 mL 超纯水),用于活化 Fe₃O₄ NPs 上的羧基,反 应 3 h。随后,往溶液中滴加 Cys(98.5 mg,1 mL 超纯水),搅拌 3 天。使用截留分子量为 10000 的纤维膜透析袋于 PBS 中透析 1 天,然后在超纯水中透析 2 天,最终得到二硫键交联的四氧化 三铁纳米团簇 Fe₃O₄ NCs 溶液。

1.2.3 **巨噬细胞膜包裹**Fe₃O₄ NCs,**制备**Fe₃O₄ NCs@MM 培养 小鼠巨噬细胞(RAW264.7),待其长至对数生长期,计数10⁷ 个,使用胰酶消化,在1000 rpm 转速下离心 5 分钟,得到细胞 沉淀。用无菌的 PBS 溶液清洗 3 次。向沉淀中加入 3 mL 含 10% 的 PMSF 的低渗细胞裂解液,在冰浴中孵育 15 分钟。使用冻融 法反复冻融三次(快速放于 -20 ℃使其冷冻,快速融化使其达 到 37 ℃)。以 850×g 的离心力离心 15 分钟,温度设置为 4 ℃, 离心结束后除去沉淀,设置离心力为 16000×g,将上清液离心 30 分钟,留下沉淀。将沉淀重悬于 1 mL 的 PBS 溶液中,即可得 到巨噬细胞膜的悬液。将 1 mL 的 Fe₃O₄ NCs 与 1 mL 的巨噬细 胞膜悬液搅拌,使用 Avanti 微型挤出机将溶液挤出 11 次,然后 10000 rpm,30 min 离心去除多余的细胞膜囊泡,制备得到 Fe₃O₄ NCs@MM。

1.3 材料的表征

1.3.1 水合动力学粒径、Zeta 电势和 PDI 测试 配制质量浓度 为 1 mg/mL 的 Fe₃O₄ NPs、Fe₃O₄ NCs、Fe₃O₄ NCs@MM,使用动态光散射(DLS)分别测试其在室温下的水合动力学粒径和表面电势变化,每个样品重复检测 3 次。

1.3.2 巨噬细胞膜完整性的评估 利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 电泳(SDS-PAGE)测试评价提取的巨噬细胞膜的完整包覆。使

用碧云天牌 BCA 蛋白定量试剂盒测定巨噬细胞膜悬液 (Macrophage, CMs)、Fe₃O₄ NCs@MM 中的蛋白含量,并用 PBS 调节蛋白浓度到相同的 1.0 mg/mL。取 5 μL 的蛋白 Marker 上 样到第一条泳道。取 20 μL 的巨噬细胞膜悬液、Fe₃O₄ NCs 和 Fe₃O₄ NCs@MM 依次加至泳道。设置跑胶电源的电流为 100 mA, 时间为 30 min。结束以后将胶取出,使用考马斯亮蓝超快染液 浸泡 30 min。加入超纯水,使其在摇床上脱色 2 h。使用数码扫 码仪采集预制胶上的蛋白条带。

1.3.3 抗非特异性蛋白吸附评估 为了验证巨噬细胞膜包覆 对纳米颗粒的抗非特异性蛋白吸附能力的影响,使用紫外可见 光谱测定了 $Fe_3O_4 NCs(未包覆) 和 Fe_3O_4 NCs@MM(巨噬细胞$ 膜包覆后)对非特异性蛋白吸附能力的变化。称量 11 mg 的牛 $血清白蛋白(BSA),使其溶解于 PBS 中,并与 <math>Fe_3O_4 NCs(未包$ $覆)和 Fe_3O_4 NCs@MM(巨噬细胞膜包覆后)混合,制成不同 Fe$ 浓度(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mM)的 BSA 溶液,最终 BSA 浓度为1 mg/mL。同时,也制备了浓度为 1 mg/mL 的 BSA 溶液用于对照。将上述溶液置于恒温水浴锅中,在 37 ℃下孵育 2 小时。孵育后,离心 30 分钟,以 14000 rpm 收集上清液,并使用紫外可见分光光度计测量孵育前后 BSA 溶液(1 mg/mL)在 278 nm 处 $的吸光值。通过比较吸光值的差异(<math>\triangle$ Absorbance),评估 Fe_3O_4 NCs 和 $Fe_3O_4 NCs@MM$ 的抗蛋白吸附能力。

 1.3.4 透射电子显微镜(TEM)测试 用超纯水将合成的 Fe₃O₄ NPs 和 Fe₃O₄ NCs@MM 配成浓度约为 1 mg/mL,分别取 5 μL 滴在铜网上,使用电烤灯照射 10 min,至干燥以后用于 TEM 测试。

1.4 T1 弛豫率性能测试

首先通过 ICP-OES 测定中 Fe 元素的含量,然后分别配制 两管不同浓度 Fe 元素([Fe] = 0.1、0.2、0.4、0.8 和 1.6 mM)的溶 液各 1 mL。将其共分为两组,一组加入 GSH(10 mM),另一组 不加 GSH。使用 3.0 T 磁共振成像仪测量不同 Fe 浓度下样品 的 T1 弛豫时间,横坐标为 Fe 浓度,纵坐标为弛豫时间的倒数 (1/T1),进行线性拟合,得到回归方程,绘制图像,斜率即为材 料的 T1 弛豫率(r1)。扫描参数如下:自旋回波 T1 加权相,重复 时间 TR = 500 ms,回波时间 TE = 15 ms,层厚(slice sickness) =1 mm,层间距(slice space)= 0.8 mm,扫描野 FOV=100 mm× 80 mm。

1.5 CCK-8 法检测细胞毒性

复苏脑胶质瘤 C6 细胞,待其传代 3 次以后,细胞状态稳定 且生长良好,此时进行铺板,按照每孔 10000 个细胞接种在 96 孔板中,其中,B2-G2 为空白板,不接种细胞。B3-G3 为对照组, 加入的是 DMEM 完全培养基。在 96 孔板的最外圈加上 PBS 防止液体蒸发。将细胞置于 5% CO₂、37 ℃的细胞培箱中孵育 12 小时,使细胞完全贴壁。取冻干的 Fe₃O₄ NCs 和 Fe₃O₄ NCs@MM,分别使用 DMEM 完全培养基溶解配制成浓度 100 µg/mL、200 µg/mL、500 µg/mL、800 µg/mL、1000 µg/mL、1200 µg/mL、1500 µg/mL、2000 µg/mL。弃去旧的培养基,加入上述 配好的不同材料。培养 24 小时后,弃去旧的培养基,加入已制 CCK-8 检测工作液,5% CO₂、37 ℃的细胞培箱孵育 2 h,使用酶 标仪检测 450 nm 波长处的吸光度(OD)值。计算细胞活力。

1.6 原位瘤模型的构建及体内 MR 成像

首先构建胶质瘤原位瘤模型。消化计数 C6 细胞,将细胞浓

度调整为 2× 10⁷/mL,置于冰上。按照剂量 50 mg/kg 的舒泰 50 对 ICR 小鼠进行腹腔麻醉。麻醉后,对小鼠进行脱毛处理并使 用立体定位仪固定小鼠,用 75 %酒精消毒小鼠头皮。沿着额顶 正中线切开头皮约 1 cm,找到前囟。在前囟后 2 mm、正中线右 侧 2 mm 的位置,使用微型钻孔器进行钻孔。使用微量注射器 吸取 5 μL 细胞并固定在立体定位仪上,向下进针 3 mm。以 1 μL/min 的速度缓慢将肿瘤细胞注入颅内,注射完毕后留针 10 分钟。缓慢退出微量注射器,并使用棉签压迫止血。缝合头 皮并使用碘伏棉球进行消毒。观察小鼠的反应,给小鼠保温并 等待动物清醒后将其放回饲养笼中。每三天进行 MRI 扫描以 观察是否形成了肿瘤。当原位胶质母细胞瘤成瘤后,经过尾静 脉注射 10 mg/mL Fe₃O₄ NCs 和 Fe₃O₄ NCs@MM,分别在注射 前、注射后 0.5 h、1 h 和 2 h 观察成像效果。MRI 扫描参数如 下:重复时间(TR)为 500 ms,回波时间(TE)为 15 ms,扫描野 (FOV)为 60 mm× 60 mm,层厚为 2 mm。

1.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.4.0 对数据进行统计分析,多组组 间差异使用 one-way analysis of variance (ANOVA)检验,当 *P*<0.05 时具有统计学差异。

2 结果

2.1 Fe₃O₄ NPs、Fe₃O₄ NCs 和 Fe₃O₄ NCs@MM 的表征

2.1.1 水合动力学粒径、Zeta 电势和 PDI 测试结果 使用 Zetasizer 纳米粒度分析仪测试 Fe₃O₄ NPs、Fe₃O₄ NCs 和 Fe₃O₄ NCs@MM 在水中的水合动力学粒径、Zeta 电势和分散性指数 (PDI)。如表1所示,Fe₃O₄NPs的电势为-45.2±1.5mV,粒径 为 80.9± 3.2 nm, Fe₃O₄ NCs 的电势为 -30.1± 2.6 mV, 粒径为 382.3± 6.9 nm, 电势上升, 粒径增加, 证明了四氧化三铁纳米团 簇(Fe₃O₄NCs)的成功合成。当使用巨噬细胞膜仿生包裹 Fe₃O₄ NCs后,其电势升高至-20.7±3.5mV,相对于带正电荷的材料 而言,Fe₃O₄ NCs@MM 整体仍带负电荷,在生物体内的分散性 更好,更容易被肝脾系统清除,因此具有良好的生物安全性。包 膜后水合粒径降至286.5±7.6 nm,细胞膜本身是由脂质双层 组成的,而纳米材料在与膜相互作用时,会被膜表面的脂质分 子包裹并形成纳米复合体,使其表面暴露出较少的材料,从而 导致其粒径变小。PDI 值越小表示纳米材料粒径分布越均匀, Fe₃O₄ NPs、Fe₃O₄ NCs 和 Fe₃O₄ NCs@MM 的 PDI 均小于 0.5,表 明合成的纳米材料尺寸分布均匀。

2.1.2 **透射电子显微镜 (TEM) 测试结果** 通过 TEM 观察 Fe₃O₄ NPs 和 Fe₃O₄ NCs@MM 的形貌和尺寸。如图 1(A)所示, Fe₃O₄ NPs 形貌规整且尺寸分布均一。图 1(B)显示巨噬细胞膜 成功包覆 Fe₃O₄ NCs。图 1(C)是使用 Image J 软件统计分析出 Fe₃O₄ NCs@MM 的粒径分布频率直方图,得出 Fe₃O₄ NCs@MM 的粒径为 99.5± 4.6 nm。

2.1.3 巨噬细胞膜完整性和功能性评价 采用 SDS-聚丙烯酰 胺凝胶电泳(SDS-PAGE)评估了 Fe₃O₄ NCs@MM 上的细胞膜 包覆情况。测试前先用 BCA 蛋白定量试剂盒定量分析 Macrophage CMs 和 Fe₃O₄ NCs@MM 中的蛋白含量,调整浓 度,使得上样时蛋白含量保持一致。

表	1 Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NCs $\#Fe_3O_4$ NCs (e	@MM的水合动力学粒径、Zeta 电势和	a PDI
Table 1 Hydr	ation kinetic particle size, zeta potential	and PDI of Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NCs and	Fe ₃ O ₄ NCs@MM
Samples	Zeta potential (mV)	Hydrodynamic size (nm)	Polydispersity ind
Fe ₃ O ₄ NPs	-45.2± 1.5	80.9± 3.2	0.25± 0.03

 Samples
 Zeta potential (mV)
 Hydrodynamic size (nm)
 Polydispersity index (PDI)

 Fe_3O_4 NPs
 -45.2± 1.5
 80.9 ± 3.2 0.25 ± 0.03
 Fe_3O_4 NCs
 -30.1± 2.6
 382.3 ± 6.9 0.31 ± 0.04
 Fe_3O_4 NCs@MM
 -20.7± 3.5
 286.5 ± 7.6 0.43 ± 0.04

C

Frequency(%)









如图 2 所示,在未包膜的 Fe₃O₄ NCs 组没有观察到相关的 蛋白条带,而巨噬细胞膜组(Macrophage CMs)和包膜后的 Fe₃O₄ NCs@MM 显现出与一致的蛋白条带,证实了材料上成功 包覆了巨噬细胞膜。



图 2 Fe₃O₄ NCs、巨噬细胞膜(Macrophage CMs)和Fe₃O₄ NCs@MM的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.2 Results of SDS-PAGE analysis of Fe₃O₄ NCs, macrophage membranes (Macrophage CMs) and Fe₃O₄ NCs@MM

2.1.4 抗非特异性蛋白吸附评估 采用采用紫外 - 可见光谱 仪测定了 Fe_3O_4 NCs 和 Fe_3O_4 NCs@MM 对非特异性蛋白吸附 能力的变化,评估材料的抗蛋白吸附能力。结果如图 3 所示, Fe_3O_4 NCs@MM 的吸光度 \triangle Absorbance 变化明显低于 Fe_3O_4 NCs,表明巨噬细胞膜的包覆能够赋予 Fe_3O_4 NCs@MM 良好的抗蛋白吸附能力。



Fig.3 Evaluation of anti-protein adsorption of Fe $_3O_4$ NCs and Fe $_3O_4$ NCs@MM

2.2 弛豫率性能测试结果

采用核磁共振成像仪检测 Fe_3O_4 NCs@MM 的成像性能及 弛豫率,结果如图 4 所示, Fe_3O_4 NCs@MM 在 GSH(10 mM)存 在条件下的 T_1 弛豫率 r1=3.6 mM⁻¹s⁻¹,是不存在 GSH 时弛豫率 0.5 mM⁻¹s⁻¹ 的 7.2 倍。表明 GSH 响应的 Fe_3O_4 NCs@MM 可以 作为 T1 MR 对比剂,有良好的 T1 MR 成像性能。

2.3 CCK-8 法检测细胞毒性结果

用不同浓度 (100 μg/mL、200 μg/mL、500 μg/mL、800 μg/mL、1000 μg/mL、1200 μg/mL、1500 μg/mL、2000 μg/mL)的 Fe₃O₄ NCs、Fe₃O₄ NCs@MM 与 C6 细胞共孵育 24 小时后,采用 CCK-8 试剂盒检测 C6 细胞的活性。结果显示,当 Fe 离子浓度 在 1500 μg/mL 及以下时,与 Fe₃O₄ NCs@MM 共培养的肿瘤细 胞活性可维持在 80 %以上。

2.4 原位瘤模型中材料的 MR 成像

采用 3.0 T MR 设备对原位移植瘤模型小鼠进行成像性能的评价,结果如图 6 所示, Fe₃O₄ NCs 和 Fe₃O₄ NCs@MM 均具有较好的体内 T₁ 成像性能,经尾静脉注射纳米材料 0.5 h 后,肿瘤可见强化, 1 h 后开始减弱。巨噬细胞膜包裹以后 Fe₃O₄

NCs@MM 增强效果比未包覆巨噬细胞膜的 Fe₃O₄ NCs 更加显著,分析结果可能与巨噬细胞膜包裹以后增加了肿瘤部位材料

聚积有关。因此,结果表明 Fe₃O₄ NCs@MM 能够实现原位脑胶 质瘤的 MR 成像。



图 4 在有无 GSH 条件下,不同 Fe 浓度下Fe₃O₄ NCs@MM 的 T1 MR 成像结果(A)及弛豫率(B)

Fig.4 T₁-weighted MR images (A) and corresponding plots 1/T₁ (B) of Fe₃O₄ NCs@MM in the presence and absence of GSH (10 mM) at different Fe concentrations



的细胞活力

Fig.5 C6 cell viability after 24 h incubation with different concentrations of Fe₃O₄ NCs and Fe₃O₄ NCs@MM

3 讨论

通过以上结果表明,本研究成功采用溶剂热法制备了超小 四氧化三铁纳米颗粒Fe₃O₄NPs,通过二硫键使其形成四氧化 三铁纳米团簇Fe₃O₄NCs,并使用巨噬细胞膜仿生包覆,得到了 具有靶向胶质母细胞瘤的新型纳米材料Fe₃O₄NCs@MM。采用 紫外分光光度计、纳米粒度分析仪、透射电子显微镜(TEM)、核 磁共振成像仪等方法对制备的纳米材料Fe₃O₄NPs,Fe₃O₄NCs 和Fe₃O₄NCs@MM进行表征,结果显示纳米材料粒径分布均 匀,且纳米材料带负电荷,具有良好的生物安全性。SDS-聚丙 烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果证明了Fe₃O₄NCs@MM上 的细胞膜的成功包覆,抗非特异性蛋白吸附评估实验结果表明



图 6 Fe₃O₄ NCs、Fe₃O₄ NCs@MM 在原位移植瘤模型中的成像效果评价 Fig.6 In vivo T₁-weighted MR images of Fe₃O₄ NCs, Fe₃O₄ NCs@MM in the orthotopic GBM

巨噬细胞膜的包覆能够赋予 Fe₃O₄ NCs@MM 良好的抗蛋白吸 附能力。为进一步研究巨噬细胞膜仿生的多功能纳米铁颗粒的 MR 成像性能,采用核磁共振成像仪分别测定溶液的弛豫时 间,计算得知 Fe₃O₄ NCs@MM 在 GSH(10 mM)存在条件下的 T₁ 弛豫率 r1=3.6 mM⁻¹s⁻¹,表明 GSH 响应的 Fe₃O₄ NCs@MM 可 以作为 T₁ MR 对比剂,有良好的 T₁ MR 成像性能。此部分实验 结果为后续的细胞及动物实验奠定了基础。

在体外细胞实验中,通过 CCK-8 法测试了纳米材料的细

胞毒性,结果证明当 Fe 浓度在 1500 μg/mL 及以下时,与纳米 材料共孵育的细胞活性仍在 80%以上。体内动物实验中,采用 原位多形性胶质母细胞瘤 ICR 小鼠模型,评估纳米材料的 T₁ MR 成像效果,结果证明,巨噬细胞膜包覆的 Fe₃O₄ NCs@MM 成像效果优于单纯超小四氧化三铁纳米颗粒 Fe₃O₄ NPs。因磁 共振成像空间分辨率高、组织穿透力强^[21],对于胶质母细胞瘤 早期诊断至关重要,因此 Fe₃O₄ NCs@MM 作为潜在的 T₁ 磁共 振成像对比剂,在临床上具有重要的应用价值^[21]。 综上所述,本研究成功合成了四氧化三铁纳米团簇 Fe₃O₄NCs,通过物理包裹的方式在其表面包裹了巨噬细胞膜, 成功制备了Fe₃O₄NCs@MM 纳米平台,使其具有免疫逃避功 能,避免了免疫细胞的吞噬,增强了纳米平台在原位胶质母细 胞瘤中的精准递送。同时,本研究新开发的纳米平台含二硫键 (S-S 键),对肿瘤细胞中较高浓度的 GSH 具有还原响应性^[23], 能够在肿瘤微环境条件下实现原位胶质母细胞瘤的磁共振的 T1WI,提供更丰富的诊断信息,并且为后续的诊疗一体化研究 中的精准药物释放奠定了实验基础。

随着胶质母细胞瘤分子生物学研究的进展,其诊断和治疗 方式也随之发生了改变^[24]。因肿瘤异质性的存在,使得胶质母 细胞瘤术后化疗的敏感性不同,并产生治疗抵抗^[25],而且化疗 药物的研发速度缓慢,临床可供选择的药物单一^[26]。因此,基于 多功能纳米材料的精准靶向治疗,为 GBM 的诊疗提供了新思 路、新方法。在基础研究方面,有文献报道 Fe₃O₄ 可以促进巨噬 细胞向抗肿瘤的 M₁ 型极化^[27]。M₁ 型极化的巨噬细胞可以产生 iNOS、TNF-α 等因子,抑制肿瘤细胞的生长^[28,29],诱导巨噬细胞 向 M₁ 型分化可以作为抗肿瘤免疫治疗的新方法^[30],因此本研 究合成的 Fe₃O₄ NCs@MM 对肿瘤微环境中巨噬细胞的影响及 调控作用值得进一步探讨研究。

参考文献(References)

- Shergalis A, Bankhead A, Luesakul U, et al. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma [J]. Pharmacol Rev, 2018, 70 (3): 412-445.
- [2] Glas M, Happold C, Rieger J, et al. Long-term survival of patients with glioblastoma treated with radiotherapy and lomustine plus temozolomide[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(8): 1257-1261.
- [3] Khan F, Pang L, Dunterman M, et al. Macrophages and microglia in glioblastoma: heterogeneity, plasticity, and therapy [J]. J Clin Invest, 2023, 133(1): e163446.
- [4] Grillone A, Battaglini M, Moscato S, et al. Nutlin-loaded magnetic solid lipid nanoparticles for targeted glioblastoma treatment [J]. Nanomedicine (Lond), 2019, 14(6): 727-752.
- [5] Ding D, Tang X, Cao X, et al. Novel self-assembly endows human serum albumin nanoparticles with an enhanced antitumor efficacy[J]. AAPS PharmSciTech, 2014, 15(1): 213-222.
- [6] Tapeinos C, Tomatis F, Battaglini M, et al. Cell Membrane-Coated Magnetic Nanocubes with a Homotypic Targeting Ability Increase Intracellular Temperature due to ROS Scavenging and Act as a Versatile Theranostic System for Glioblastoma Multiforme [J]. Adv Healthc Mater, 2019, 8(18): e1900612.
- [7] Akmal M, Hasnain N, Rehan A, et al. Glioblastome Multiforme: A Bibliometric Analysis[J]. World Neurosurg, 2020, 136: 270-282.
- [8] Pardridge W M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development[J]. NeuroRx, 2005, 2(1): 3-14.
- [9] Oberoi R K, Parrish K E, Sio T T, et al. Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood-brain barrier to treat glioblastoma[J]. Neuro Oncol, 2016, 18(1): 27-36.
- [10] Arvanitis C D, Ferraro G B, Jain R K. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases [J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(1): 26-41.
- [11] Zhao Y, Yue P, Peng Y, et al. Recent advances in drug delivery systems for targeting brain tumors[J]. Drug Deliv, 2023, 30(1): 1-18.
- [12] Li X, Li W, Wang M, et al. Magnetic nanoparticles for cancer theranostics: Advances and prospects [J]. J Control Release, 2021, 335: 437-448.

- [13] Fang R H, Gao W, Zhang L. Targeting drugs to tumours using cell membrane-coated nanoparticles[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(1): 33-48.
- [14] Lopes J, Lopes D, Pereira-Silva M, et al. Macrophage Cell Membrane-Cloaked Nanoplatforms for Biomedical Applications [J]. Small Methods, 2022, 6(8): e2200289.
- [15] Miao Y, Yang Y, Guo L, et al. Cell Membrane-Camouflaged Nanocarriers with Biomimetic Deformability of Erythrocytes for Ultralong Circulation and Enhanced Cancer Therapy [J]. ACS Nano, 2022, 16(4): 6527-6540.
- [16] Xie J, Shen Z, Anraku Y, et al. Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies [J]. Biomaterials, 2019, 224: 119491.
- [17] Cao H, Dan Z, He X, et al. Liposomes Coated with Isolated Macrophage Membrane Can Target Lung Metastasis of Breast Cancer [J]. ACS Nano, 2016, 10(8): 7738-7748.
- [18] Chen Q, Zhang X H, Massague J. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs[J]. Cancer Cell, 2011, 20(4): 538-549.
- [19] Lai J, Deng G, Sun Z, et al. Scaffolds biomimicking macrophages for a glioblastoma NIR-Ib imaging guided photothermal therapeutic strategy by crossing Blood-Brain Barrier[J]. Biomaterials, 2019, 211: 48-56.
- [20] Basina G, Diamantopoulos G, Devlin E, et al. LAPONITE (R) nanodisk-"decorated" Fe₃O₄ nanoparticles: a biocompatible nanohybrid with ultrafast magnetic hyperthermia and MRI contrast agent ability[J]. J Mater Chem B, 2022, 10(26): 4935-4943.
- [21] Ma D, Chen J, Luo Y, et al. Zwitterion-coated ultrasmall iron oxide nanoparticles for enhanced T (1)-weighted magnetic resonance imaging applications[J]. J Mater Chem B, 2017, 5(35): 7267-773.
- [22] Li F, Liang Z, Liu J, et al. Dynamically Reversible Iron Oxide Nanoparticle Assemblies for Targeted Amplification of T1-Weighted Magnetic Resonance Imaging of Tumors [J]. Nano Lett, 2019, 19(7): 4213-4220.
- [23] Ma Y, Su Z, Zhou L, et al. Biodegradable Metal-Organic-Framework-Gated Organosilica for Tumor-MicroenvironmentUnlocked Glutathione-Depletion-Enhanced Synergistic Therapy[J]. Adv Mater, 2022, 34(12): e2107560.
- [24] Leone A, Colamaria A, Fochi N P, et al. Recurrent Glioblastoma Treatment: State of the Art and Future Perspectives in the Precision Medicine Era[J]. Biomedicines, 2022, 10(8): 1927.
- [25] Jackson C M, Choi J, Lim M. Mechanisms of immunotherapy resistance: lessons from glioblastoma [J]. Nat Immunol, 2019, 20(9): 1100-1109.
- [26] Dapash M, Hou D, Castro B, et al. The Interplay between Glioblastoma and Its Microenvironment[J]. Cells, 2021, 10(9): 2257.
- [27] Wu C, Zhang G, Wang Z, et al. Macrophage-Mediated Delivery of Fe (3)O (4)-Nanoparticles: A Generalized Strategy to Deliver Iron to Tumor Microenvironment[J]. Curr Drug Deliv, 2022, 19(9): 928-939.
- [28] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425-6240.
- [29] Chen Y, Song Y, Du W, et al. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression[J]. J Biomed Sci, 2019, 26(1): 78.
- [30] Xia Y, Rao L, Yao H, et al. Engineering Macrophages for Cancer Immunotherapy and Drug Delivery [J]. Adv Mater, 2020, 32 (40): e2002054.