

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00703

四氧化三铁磁性纳米颗粒对人角质形成细胞超微结构的影响

汤莹,范晓燕,羊富光,林方兴,金婵,杨勇骥*

第二军医大学基础部生物物理学教研室,上海 200433

[摘要] **目的** 研究四氧化三铁(磁性 Fe_3O_4) 纳米颗粒对人角质形成细胞(HaCaT)超微结构的影响。**方法** 将不同浓度的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒悬液加入培养的 HaCaT 细胞中,在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的细胞培养箱中共同孵育 4 h,收集细胞进行常规透射电镜制样,在透射电镜下观察纳米 Fe_3O_4 颗粒进入细胞的方式及细胞超微结构的改变。**结果** Fe_3O_4 磁性纳米颗粒平均粒径为 12 nm。在不同浓度下 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒均能以吞噬的方式进入细胞,进入细胞后再从吞噬泡中释出,主要对其附近的线粒体造成影响,线粒体出现肿胀,线粒体嵴溶解。**结论** Fe_3O_4 磁性纳米颗粒主要对 HaCaT 细胞中颗粒附近的线粒体结构有损伤,且存在浓度依赖性。

[关键词] 磁性纳米颗粒;四氧化三铁;HaCaT 细胞;超微结构

[中图分类号] R 318.68 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)07-0703-04

Influence of ferroferric oxide magnetic nanoparticles on ultrastructure of human keratinocyte cells

TANG Ying, FAN Xiao-yan, YANG Fu-guang, LIN Fang-xing, JIN Chan, YANG Yong-ji*

Department of Biophysics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles on human keratinocyte cells (HaCaT cells). **Methods** HaCaT cells were incubated with different concentrations of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for 4 h at 37°C with $5\% \text{CO}_2$. Then transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the way nanoparticles entering HaCaT cells and the ultrastructure of HaCaT cells. **Results** The mean diameter of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles was 12 nm. The nanoparticles of different concentrations could enter the HaCaT cells by phagocytosis. After entering the cells the particles were released from phagocytic vesicles and exerted influence on the nearby mitochondria, leading to mitochondria swelling and cristae dissolving. **Conclusion** Fe_3O_4 magnetic nanoparticles can damage the ultrastructure of mitochondria near the particles in HaCaT cells, and the effect is in a concentration-dependent manner.

[Key words] magnetic nanoparticles; ferrosferric oxide; HaCaT cell; ultrastructure

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(7): 703-706]

纳米颗粒一般是指粒径在 100 nm 以下的超微颗粒。由于其尺寸很小,结构特殊,因此具有许多物理化学特性,如小尺寸效应、大的比表面积、极高的反应活性、量子效应等^[1-2]。磁性纳米颗粒具有超细粒径、生物相容性和超顺磁性,因而在生物医学领域中的应用日益增多^[3-5]。目前磁性纳米颗粒主要应用于靶点定位给药、细胞标记、细胞和组织定位、转染、免疫分析及核磁共振成像等生物学领域^[6-12]。在磁性纳米颗粒中,四氧化三铁纳米颗粒(磁性 Fe_3O_4) 是最普遍的应用形式。随着纳米材料越来越多的应用于生物医学领域,它们如何与生命体发生相互作用

以及对生命过程带来何种影响成为当今纳米学科的研究热点。

本实验以人永生化角质形成细胞(HaCaT)为对象,研究不同浓度 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒对细胞超微结构的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料、试剂与仪器 HaCaT 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒悬液由复旦大学医学院提供, MEM 培养液为 Gibco 公司产品,小牛血清购自杭州四季青生物工程材料

[收稿日期] 2012-04-24 **[接受日期]** 2012-06-26

[基金项目] 国家科技支撑计划(31-1122ZCKF), 质检公益性行业科研专项(201210284-2)。Supported by National Key Technology R&D Program (31-1122ZCKF) and Special Fund for Quality Control of Public Welfare Industry (201210284-2)。

[作者简介] 汤莹,讲师。E-mail: ty1205@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81870923, E-mail: yjyang22@163.com

有限公司,胰蛋白酶购于上海博光生物科技有限公司。实验用主要仪器设备有旋涡混合器(VORTEX-6,海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、数控超声波仪(KQ-300DB,昆山市超声仪器公司)、超薄切片机(UC-6,德国 Leica 公司);透射电子显微镜(H-7650,日本 Hitachi 公司)。

1.2 分散磁性纳米颗粒 Fe_3O_4 将 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒悬液加入无血清 MEM 培养液,配制成浓度为 2 mg/ml 的母液,利用数控超声波仪在功率为 300 W、水温 25~30℃ 时将母液超声解聚 3 次,每次 10 min^[13]。使 Fe_3O_4 纳米颗粒均匀分散于培养液中。

1.3 细胞培养及实验分组 在细胞培养箱 37℃、5% CO_2 的环境下,将接种于直径 10 cm 培养皿中的 HaCaT 细胞培养至对数生长期。然后在这些培养皿中加入分散后的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒母液,配制成终浓度分别为 10、50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 4 组溶液;以不加 Fe_3O_4 纳米颗粒的 HaCaT 细胞为对照组,在培养箱内共同孵育 4 h。

1.4 透射电镜样品制备 将各培养皿中 HaCaT 细胞用 0.1 mol/L PBS 溶液漂洗 3 次后,刮下培养皿中贴壁生长的细胞,并将细胞悬液分别吸入离心管中,低速离心(1 006 $\times g$)收集细胞,加入 4% 多聚甲醛固定液固定,4℃ 过夜。将固定后的 HaCaT 细胞离心弃固定液,0.1 mol/L PBS 溶液漂洗 3 次,每次 15 min,加入血浆后离心,弃上清,再加入戊二醛使细胞凝块。将细胞块切成 1 mm³,经 0.1 mol/L PBS 溶液漂洗过夜,1% 锇酸后固定。梯度乙醇、丙酮脱水,浸透后用环氧树脂 Epon812 包埋。60℃ 聚合 48 h。超薄切片,经醋酸铀-硝酸铅双重染色后,在透射电镜下观察细胞的超微结构。

2 结果

2.1 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒在无血清 MEM 培养液中的分散状态 利用本实验室建立的纳米颗粒解聚方法可以使团聚的纳米材料充分分散。本实验中,在透射电镜下观察可见处理后 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的平均粒径为 12 nm,近球形(图 1)。颗粒分散良好,可满足纳米材料生物学效应的研究。

2.2 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒对 HaCaT 细胞超微结构的影响 对照组中 HaCaT 细胞形态不规则,细胞膜光滑完整,有突起。细胞核形状不规则,但大而清晰,核仁明显;各细胞器结构完整、清晰。粗面内质

网丰富,线粒体数量多,嵴清晰可见;细胞内有少量空泡(图 2A)。

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组中,有少量 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒进入细胞内部。HaCaT 细胞外形无明显变化,细胞膜表面的突起无明显增多,胞质内空泡稍多,线粒体无肿胀,但嵴结构不清晰(图 2B)。

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组中,有较多 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒进入细胞,细胞膜表面的突起增多,胞质内也有较多大小不等的空泡,线粒体肿胀,部分线粒体嵴溶解(图 2C)。

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组中,细胞内有大量 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,成簇分布,胞质内有较大空泡,纳米颗粒附近的线粒体肿胀,嵴溶解(图 2D)。

200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组中,细胞中有大量 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,胞质内有很多空泡,线粒体极度肿胀,大部分线粒体的嵴溶解(图 2E)。

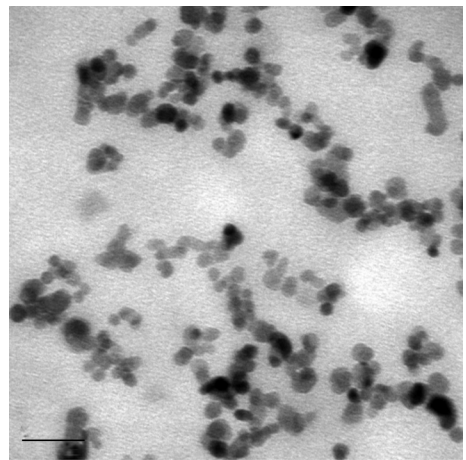


图 1 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒在无血清 MEM 中的分散状态

Fig 1 TEM image of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles dispersed in serum-free MEM

Bar=50 nm

在透射电镜下观察可见, Fe_3O_4 磁性纳米颗粒主要是以吞噬的方式进入 HaCaT 细胞中(图 2E,白箭头)。进入细胞的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒有 3 种存在状态:(1) Fe_3O_4 磁性纳米颗粒被单层生物膜包裹,纳米颗粒的数量不等;(2) Fe_3O_4 磁性纳米颗粒孤立分散分布于细胞中,无生物膜包裹;(3)包裹 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的单层生物膜缺损,部分纳米颗粒在吞噬泡外(图 2C)。各实验组中 HaCaT 细胞的内质网和细胞核超微结构均无明显变化,高浓度组中细胞内溶酶体略有增多。

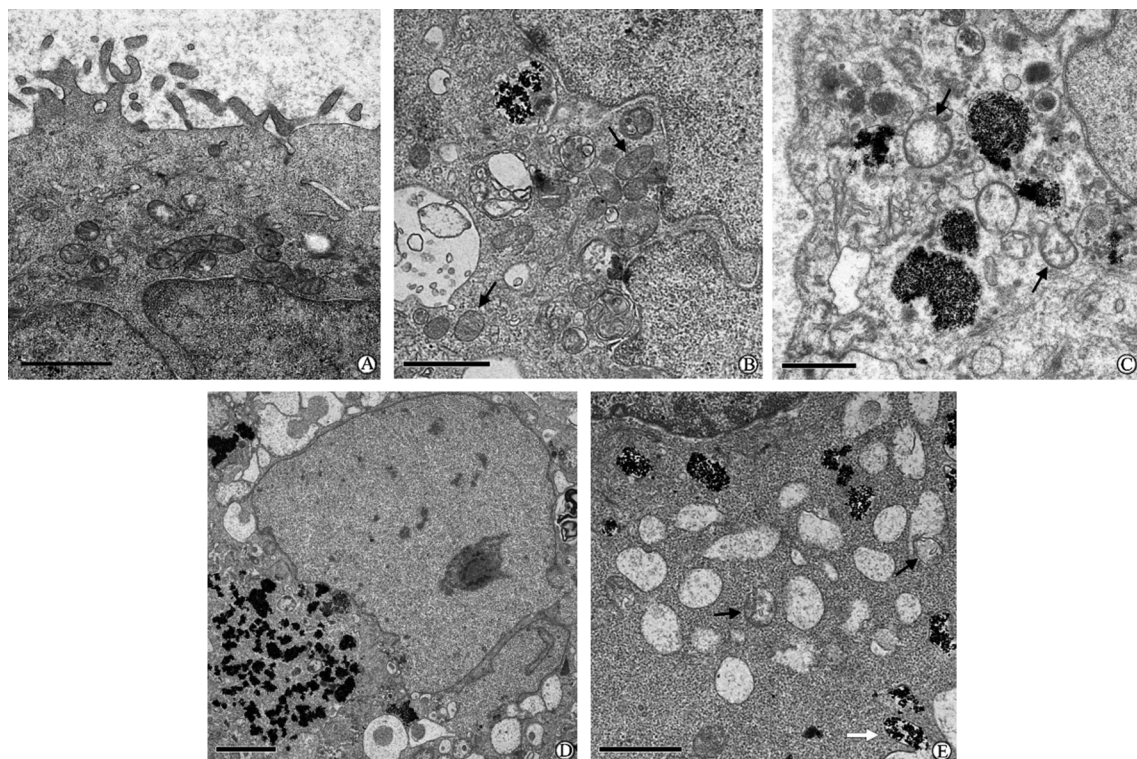


图2 与 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒共孵育 4 h 后 HaCaT 细胞的透射电镜图像

Fig 2 TEM image of HaCaT cells 4 h after incubation with Fe_3O_4 magnetic nanoparticles

A: In control group HaCaT cell surface had some microvillus. The mitochondria of HaCaT cells were normal; B: In 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ group, there were a few Fe_3O_4 magnetic nanoparticles in HaCaT cells. Mitochondria had no swelling (\uparrow), and the crista was dissolved; C: In 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ group, there were some Fe_3O_4 magnetic nanoparticles in HaCaT cells. Mitochondria were swollen, and the crista was dissolved (\uparrow); D: In 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ group, there were a lot of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles in HaCaT cells and there were some vacuoles; E: In 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ group, Fe_3O_4 magnetic nanoparticles entered HaCaT cells by phagocytosis (white arrow). There were many vacuoles in the cytoplasm. Mitochondria were swollen with the dissolved crista (\uparrow). A, B, C, E: Bar = 1 μm ; D: Bar = 2 μm

3 讨论

Fe_3O_4 颗粒的粒径在 100 nm 以下时, 其理化性质会发生变化。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒具有超顺磁性和良好的生物相容性, 在导向药物载体、肿瘤磁过热疗法、磁共振成像、细胞标记等生物学中应用越来越多, 因此, Fe_3O_4 磁性纳米颗粒制备方法是纳米材料研究的热点。很多研究关注于 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的表面修饰^[7, 14-15], 以减小其对细胞、组织和机体的毒性作用。我们认为, 研究清楚 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒本身对细胞的影响比选择 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的表面修饰物更加有针对性。

有研究^[16]发现相对于粒径较大的氧化铁纳米颗粒, 粒径较小的氧化铁纳米颗粒对细胞的毒性更大。本研究中采用 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的平均粒径为 12 nm, 实验中发现, Fe_3O_4 磁性纳米颗粒主要是以吞噬的方式进入 HaCaT 细胞。本实验室早前研

究^[17]显示 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒可以直接穿膜进入红细胞; 也有研究报道 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒可以以吞噬的方式进入间充质干细胞(MSC)、HeLa 细胞和纤维细胞^[18-19]。由此可见, Fe_3O_4 磁性纳米颗粒进入不同类型细胞的方式不同, 表明细胞膜自身的性质对于磁性纳米颗粒进入细胞的方式也有影响。

经电镜观察发现, Fe_3O_4 磁性纳米颗粒与 HaCaT 细胞共孵育 4 h 时, 被吞噬进入 HaCaT 细胞的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒多数仍在吞噬泡中, 但也有一部分纳米颗粒会从破损的吞噬泡膜出来, 进而散在分布于胞浆中。这可能是吞噬泡的空间较小, 纳米颗粒相对较密集, 使得吞噬泡中 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的总表面能增加, 因而对吞噬泡膜的破坏力增强; 也可能是吞噬泡主动释放出纳米颗粒。随着纳米颗粒的浓度增高, 细胞中的空泡也明显增加, 但是内质网、细胞核等细胞器的超微结构无明显变化, 溶酶体略有增多, 所以可以推测这些空泡中有部分

是原来吞噬 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的吞噬泡,进入细胞后,又将这些纳米颗粒释放出来,最后就形成了大小不等的空泡。实验中,还发现吞噬有 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的 HaCaT 细胞中只有线粒体的超微结构发生了较大变化,出现肿胀,线粒体嵴紊乱不清或溶解等损伤性改变,这些结果提示线粒体对 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的物化特性比较敏感。可以推测,这种影响仅限于距离这些纳米颗粒较近的线粒体,距离较远的线粒体的功能基本不受影响,所以细胞中其他细胞器的结构未见损伤性变化,溶酶体也只是略有增多。HaCaT 细胞中线粒体的损伤表现存在浓度依赖性。

本实验结果表明, Fe_3O_4 磁性纳米颗粒进入细胞的方式主要是吞噬作用,进入细胞后再从吞噬泡中释出。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒对细胞超微结构的影响主要是其附近的线粒体,对其他细胞器和远处的线粒体影响很小。在以后的实验中,可以通过检测细胞线粒体功能的变化来进一步验证。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Service R F. American Chemical Society meeting. Nanomaterials show signs of toxicity[J]. *Science*,2003,300:243.

[2] Brumfiel G. A little knowledge[J]. *Nature*,2003,424:246-248.

[3] Lu A H, Salabas E L, Schüth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*,2007,46:1222-1244.

[4] Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles [J]. *Biosci Bioeng*, 2005,100:1-11.

[5] Kumar A, Jena P K, Behera S, Lockey R F, Mohapatra S, Mohapatra S. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery[J]. *Nanomedicine*,2010,6:64-69.

[6] Bruce I J, Sen T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy silanes and their application in magnetic bioseparations[J]. *Langmuir*,2005,21:7029-7035.

[7] Yallapu M M, Othman S F, Curtis E T, Gupta B K, Jaggi M, Chauhan S C. Multi-functional magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2011,32:1890-1905.

[8] Namdeo M, Saxena S, Tankhiwale R, Bajpai M, Mohan Y M, Bajpai S K. Magnetic nanoparticles for drug delivery applications[J]. *J Nanosci Nanotechnol*,2008,8:3247-3271.

[9] Osaka T, Matsunaga T, Nakanishi T, Arakaki A, Niwa D, Iida H. Synthesis of magnetic nanoparticles and their application to bioassays[J]. *Anal Bioanal Chem*,2006,384:593-600.

[10] Sun C, Lee J S, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*,2008,60:1252-1265.

[11] Wilhelm C, Gazeau F. Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles[J]. *Biomaterials*,2008,29:3161-3174.

[12] 刘世霆,晏媛,陈志良,张玉忠,金星.超顺磁性葡聚糖氧化铁纳米颗粒的研制及表征[J]. *南方医科大学学报*,2006,26:331-333.

[13] 汤莹,羊富光,杨勇骥,于洋,雷长海,范晓燕,等.二氧化钛纳米颗粒解聚方法[J]. *解剖学杂志*,2009,32:632-634.

[14] Jayapaul J, Hodenius M, Arns S, Lederle W, Lammers T, Comba P, et al. FMN-coated fluorescent iron oxide nanoparticles for RCP-mediated targeting and labeling of metabolically active cancer and endothelial cells[J]. *Biomaterials*, 2011,32:5863-5871.

[15] Mahmoudi M, Simchi A, Milani A S, Stroeve P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles[J]. *J Colloid Interface Sci*,2009,336:510-518.

[16] 李倩,唐萌,班婷婷,马明,顾宁.不同粒径纳米 Fe_2O_3 的细胞毒性及氧化作用[J]. *中国公共卫生*,2005,21:589-591.

[17] 杨勇骥,汤莹,于洋,雷长海,羊富光.纳米材料侵入细胞的电镜研究[J]. *电子显微学报*,2008,27:400-403.

[18] Lorenz M R, Holzapfel V, Musyanovych A, Nothelfer K, Walther P, Frank H, et al. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells[J]. *Biomaterials*,2006,27:2820-2828.

[19] Gupta A K, Gupta M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles [J]. *Biomaterials*,2005,26:1565-1573.

[本文编辑] 魏学丽,邓晓群