## 

molecule inhibitors and their clinical development[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2008, 8 (4): 370-374

- 6 Blagosklonny MV. HSP 90 associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs[J]. Leukemia, 2002, 16 (4): 455 - 462
- 7 Wu L X, Xu J H, Zhang K Z, et al. Disruption of the Bcr Abl/ HSP90 protein complex: a possible mechanism to inhibit Bcr - Abl positive human leukemic blasts by novobiocin[J]. Leukemia, 2008, 22 (7): 1402 - 1409
- 8 Sawai A, Chandarlapaty S, Greulich H, et al. Inhibition of HSP90 down - regulates mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and sensitizes EGFR mutant tumors to paclitaxel[J]. Cancer Res, 2008, 68 (2): 589 - 596
- 9 Pedersen NM, Madshus IH, Haslekås C, et al. Geldanamycin induced down – regulation of ErbB2 from the plasma membrane is clathrin dependent but proteasomal activity independent [J]. Molecular Cancer Research, 2008, 6 (3); 491 – 500
- 10 Heath EI, Hillman DW, Vaishampayan U, et al. A phase II trial of 17 - allylamino - 17 - demethoxygeldanamycin in patients with hormone - refractory metastatic prostate cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2008, 14 (23): 7940 - 7946

- 11 Cao X, Bloomston M, Zhang T, et al. Synergistic antipancreatic tumor effect by simultaneously targeting hypoxic cancer cells with HSP90 inhibitor and glycolysis inhibitor [J]. Clinical Cancer Research, 2008, 14 (6): 1831 - 1839
- 12 Ha K, Fiskus W, Rao R, et al. HSP90 Inhibitor mediated disruption of chaperone association of ATR with HSP90 sensitizes cancer cells to DNA damage[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2011, 10 (7): 1194 1206
- Smith E, Dejsuphong D, Balestrini A, et al. An ATM and ATR dependent checkpoint inactivates spindle assembly by targeting CEP63
  [J]. Nat Cell Biol, 2009, 11 (3): 278 285
- Moran DM, Gawlak G, Jayaprakash MS, et al. Geldanamycin promotes premature mitotic entry and micronucleation in irradiated p53/p21 deficient colon carcinoma cells[J]. Oncogene, 2008, 27 (42): 5567 5577
- Kennedy DR, Beerman TA. The radiomimetic enediyne C 1027 induces unusual DNA damage responses to double - strand breaks[J]. Biochemistry, 2006, 45 (11): 3747 - 3754

(收稿日期:2014-01-17) (修回日期:2014-04-16)

# 多壁碳纳米管抑制 RAW264.7 巨噬细胞的吞噬功能

李慧祝红闫莉谷婧丽郝维曹济民

摘要目的观察多壁碳纳米管(MWCNT)对巨噬细胞吞噬功能的影响。方法 采用常规细胞培养技术培养 RAW264.7 巨噬细胞;用流式细胞术定量检测 RAW264.7 巨噬细胞吞噬异硫氰酸荧光素标记的大肠杆菌(FITC - tagged E. coli k - 12)的情况。结果 MWCNT剂量依赖性地抑制 RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌,随着 MWCNT浓度的增加,RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌的量(用平均荧光强度表示)降低。此外,MWCNT抑制 RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌亦呈时间依赖性:用 MWCNT(75μg/ml) 孵育 RAW264.7 细胞12h后,RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌的量与对照组相比降低了约70.4%(P<0.01),同时参与吞噬活动的 RAW264.7 细胞的百分比也从对照组的98.6%降低到了92.4%(P<0.05)。即使用低剂量的 MWCNT(25μg/ml)孵育 RAW264.7 细胞药噬大肠杆菌的量与对照组相比仍降低了约77.1%(P<0.01),同时参与吞噬活动的 RAW264.7 细胞的百分比也从对照组的98.6%降低到了92.4%(P<0.01)。即使用低剂量的 MWCNT(25μg/ml)孵育 RAW264.7 细胞的百分比也从对照组的98.6%降低到了92.4%(P<0.01)。即使用低剂量的 MWCNT(25μg/ml)所有 RAW264.7 细胞的百分比也从71.2%降低到了43.4%(P<0.01)。用脂多糖(LPS,10μg/ml)激活 RAW264.7 细胞后, 其吞噬能力明显增强,而 MWCNT仍可剂量依赖性地抑制 LPS 激活的 RAW264.7 细胞的吞噬能力,与 LPS 组相比, MWCNT (75μg/ml)和 LPS 共孵育组吞噬大肠杆菌的量降低了70.9%(P<0.01)。结论 MWCNT 可明显抑制 RAW264.7 巨噬细胞的吞噬 % 功能。

关键词 多壁碳纳米管 巨噬细胞 吞噬 大肠杆菌 流式细胞术 [中图分类号] R393 [文献标识码] A

Multi – walled Carbon Nanotube Suppresses the Phagocytotic Function of RAW264.7 Macrophages. Li Hui, Zhu Hong, Yan Li, et al. Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

基金项目:科技部"973"基金资助项目(2011CB933500) 作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理学系 通讯作者:曹济民,电子信箱: caojimin@126.com

**Abstract Objective** To observe the effect of multi – walled carbon nanotube (MWCNT) on the phagocytotic function of RAW264.7 macrophages. **Methods** Flow cytometry was used to quantitatively identify the effect of MWCNT on the phagocytotic activities of RAW264.7 macrophages on FITC – tagged E. coli k – 12. **Results** MWCNT inhibited the phagocytotic activity of RAW264.7 cells in a time – and concentration – dependent manner. Along with the increases of incubation time and MWCNT concentration, the mean fluorescence intensity (MFI) of phagocytosed E. coli inside the RAW264.7 cells decreased, indicating a decrease in the numbers of engulfed E. coli). In addition, the percentage of RAW264.7 cells participated in the phagocytosis was also reduced by MWCNT. After cells were treated with MWCNT (75µg/ml) for 12h, the MFI were decreased by 70.4% (P < 0.01 vs control group), and the devouring percentage of RAW264.7 cells was decreased from 98.6% to 92.4% (P < 0.05). Incubation of RAW264.7 cells with MWCNT at a lower concentration (25µg/ml) but a longer time (24 h) also reduced the MFI by 77.1% (P < 0.01 vs control group) and the devouring percentage (from 71.2% to 43.4%, P < 0.01). When the RAW264.7 cells was activated by LPS (10µg/ml), MWCNT could still concentration – dependently inhibit the phagocytotic function of RAW264.7 cells, MWCNT at 75µg/ml reduced the MFI by 70.9% (P < 0.01 vs LPS alone). **Conclusion** MWCNT suppresses the phagocytotic function of RAW264.7 macrophages.

Key words Multi - walled carbon nanotube; RAW264.7 macrophages; Phagocytosis; FITC - tagged E. coli; Flow cytometry

碳纳米管由石墨烯片卷曲而成,根据石墨烯片的 层数,可以将碳纳米管分为多壁碳纳米管(multiwalled carbon nanotube, MWCNT) 和单壁碳纳米管 (single - walled carbon nanotube, SWCNT)。碳纳米管 重量轻、比表面积大,是研制药物递送载体的良好材 料,因其展示的较高的稳定性和良好的生物相容性, 在生物医学领域显示出了无限的应用前景<sup>[1,2]</sup>。有 研究报道,碳纳米管对骨细胞的增殖分化及骨组织的 生成具有明显的促进作用,能促进神经再生和减少神 经组织瘢痕的产生<sup>[3,4]</sup>。随着对碳纳米管研究的深 入,其生物安全性方面的报道也逐渐受到重视<sup>[5~8]</sup>。 虽然碳纳米管对生物有一定的毒性作用,但其在生物 医学应用领域仍被寄予厚望。目前生物学界对碳纳 米管的免疫细胞效应仍知之甚少。本工作以来源于 小鼠的 RAW264.7 巨噬细胞系作为吞噬细胞模型, 采用荧光素标记的大肠杆菌 E. coli k - 12 (FITC - E. coli k-12)作为吞噬体系,重点研究了 MWCNT 对巨 噬细胞吞噬功能的影响。考虑到碳纳米管的可能毒 性与剂量和作用时间的关系,笔者观察了不同浓度和 不同作用时间的多壁碳纳米管的功效。

#### 材料与方法

1.细胞和试剂:RAW264.7 巨噬细胞系、Hepes、DMEM(高糖)培养基、双抗(含青霉素和链霉素)及 PBS 缓冲液购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心;胎牛血清购自 Gibco公司(USA);6 孔板、12 孔板等细胞培养耗材购自 Corning 公司(USA);荧光标记的大肠杆菌吞噬试剂盒(v6694 Vybrant<sup>®</sup> Phagocytosis Assay Kit)购自 Molecular Probes 公司(USA)。

2. 流式细胞术:常规培养 RAW264.7 细胞;选取对数生长期的 RAW264.7 细胞,用 0.25%的胰酶消化成单个细胞,加入 DMEM 培养基终止消化,1000r/min 离心 5min,弃掉上清液,重新加入 DMEM 完全培养基充分重悬细胞。调整细胞浓

度为5×10<sup>5</sup>/ml,接种到12孔细胞培养板中,每孔接种1ml, 37℃培养。观察不同浓度 MWCNT 对 RAW264.7 吞噬能力的 影响:实验设置5个浓度,MWCNT的浓度分别为0(对照组)、 10、25、50 和 75µg/ml。另设流式细胞术的阴性对照组(即 RAW264.7 细胞吞噬无 FITC 标记的 DH - 5α 大肠杆菌)。 MWCNT与 RAW264.7 细胞共同孵育 12h。观察固定浓度 (25µg/ml) MWCNT、不同作用时间对 RAW264.7 细胞吞噬能 力的影响:实验设置5个时间点,分别为0(对照组)、4、7、9和 24h。另设流式细胞术的阴性对照组。观察 MWCNT 对活化 的 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响:实验设置 5 个组,分别为 对照组(不加 MWCNT,也不加 LPS), LPS 组(LPS 10µg/ml), LPS + MWCNT 25µg/m 组, LPS + MWCNT 50µg/ml 组, LPS + MWCNT 75µg/ml组,每组中的相应处理因素(LPS, MWCNT) 均与 RAW264.7 细胞共孵育 16h。另设流式细胞术的阴性对 照组。观察 RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌:参照荧光素 FITC 标记大肠杆菌吞噬试剂盒的给定方法,解冻 0.5ml HBSS 缓冲 液,并与 FITC 标记的大肠杆菌(E. coli k-12) 干粉充分混匀, 移入含4.5ml去离子水的棕色瓶中,超声混匀直至大肠杆菌 微粒充分分散,于12孔板中每孔加入20µl微粒,阴性对照组 加入不带荧光标记的 DH-5α 大肠杆菌。然后 37℃ 避光孵育 2h,吸弃上清,每孔加入 200μl 台盼蓝(pH 4.4),反应 1min 以 淬灭多余的 E. coli k-12 微粒。用 PBS 洗 3 次,收集细胞,加 入 500μl PBS 充分重悬成单细胞悬液,用 200 目筛网过滤后, 再用 Accuri<sup>®</sup> C6 流式细胞仪(美国 BD 公司生产)检测荧光强 度。每个样本获取10000个细胞进行分析,已被吞噬的 E. colik - 12 的荧光强度检测,采用激发波长 485nm,吸收波长 530nm。计算吞噬指数,即 RAW264.7 细胞吞噬 FITC - tagged E. coli k - 12 的平均数量,用平均荧光强度(MFI)表示: MFI = (FI<sub>sample</sub> - FI<sub>negative</sub>)/FI<sub>negative</sub>。公式中,FI<sub>sample</sub>表示样本的 荧光强度,即 RAW264.7 吞噬 FITC - E. coli k - 12 后的荧光 强度;FInegative表示阴性对照组的荧光强度,即细胞吞噬 DH-5α后的荧光强度。此外,笔者也关注了参与吞噬活动的 RAW264.7细胞的百分比情况,用以反映整个 RAW264.7细

胞群体中参与吞噬活动的细胞比例。

3. 统计学方法:用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析,数据 用均数 ±标准差(x̄±s)表示。两组比较用分组检验,多组比 较用方差分析进行统计学处理。以 P < 0.05 为差异有统计学 意义。

结 果

1. MWCNT 剂量依赖性地抑制 RAW264.7 细胞 的吞噬功能:流式细胞术结果如图 1 所示,对照组的 RAW264.7 细胞对 FITC 标记的大肠杆菌有一定的吞 噬能力。随着 MWCNT 浓度的递增(10、25、50 和 75μg/ml), RAW264.7 细胞吞噬 FITC - tagged E. coli k - 12 的量(用平均荧光强度 MFI 表示)逐渐降低,与 对照组相比分别降低了约 17.0%(*P* < 0.05)、 46.6%、62.5%和70.4%(*P* < 0.01)。参与吞噬活动 的细胞百分比也从对照组的 98.6%降低到 MWCNT 75μg/ml 组的 92.4%(*P* < 0.05)。



**图 1** 流式细胞术显示 MWCNT 浓度依赖性地抑制 RAW264.7 细胞对大肠杆菌的吞噬能力 A~E.不同浓度的 MWCNT 对 RAW264.7 细胞吞噬荧光标记大肠杆菌(FITC – E. coli k – 12)的影响; 阴性对照组为 RAW264.7 细胞吞噬无 FITC 标记的 DH – 5α 大肠杆菌的情况; 对照组为无任何处理的 RAW264.7 细胞吞噬荧光标记大肠 杆菌的情况; F. 以对照组的 MFI 为 100%, 根据 A~E 所得到的统计图, 表示不同浓度 MWCNT 组吞噬 FITC – E. coli k – 12 的荧光强度百分比, 与对照组相比, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

2. MWCNT 时间依赖性地抑制 RAW264.7 细胞 吞噬大肠杆菌的能力:随着 MWCNT 孵育时间的延长 (4、7、9、24h), RAW264.7 细胞吞噬荧光标记大肠杆 菌(FITC – E. coli k – 12)的量(用平均荧光强度 MFI 表示)逐渐降低,与对照组相比分别降低了约 28.4%、47.8%、63.2%和77.1%(P均<0.01)。参 与吞噬活动的细胞百分比也逐渐降低,分别为对照组 71.2%、MWCNT 4h 组 69.7%、MWCNT 7h 组 65.1%、MWCNT 9h 组 52.0%、MWCNT 24h 组 43.4%(P<0.05),详见图 2。

3. MWCNT 对活化的 RAW264.7 细胞的吞噬功 能的抑制作用:被 LPS(10μg/ml)激活的 RAW264.7 细胞与静息 RAW264.7 细胞相比,吞噬 FITC – tagged E. coli k – 12 的平均荧光强度(MFI)升高了约 2.62 倍(P < 0.01)。MWCNT 能够抑制活化的 RAW264.7 细胞的吞噬能力,且随着 MWCNT 浓度的升高(25、50、75 $\mu$ g/ml),活化的 RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌 的量逐渐减少;参与吞噬的细胞百分比也逐渐降低,分别为:对照组 64.2%,LPS 组 91.1%(与对照组相 比,P < 0.01),LPS + MWCNT 25 $\mu$ g/ml 组 85.4%,LPS + MWCNT 50 $\mu$ g/ml 组 75.2%,LPS + MWCNT 75 $\mu$ g/ml 组 70.7%(3 组分别与 LPS 单独作用相比,P 均 < 0.01),详见图 3。



·iê

吉・

**图 2** 流式细胞术显示 MWCNT 时间依赖性地抑制 RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌的能力 A~E.固定浓度(25μg/ml) MWCNT 孵育不同时间,对 RAW264.7 细胞吞噬 FITC – E. coli k – 12 的影响; F. MWCNT 不 同孵育时间, RAW264.7 吞噬 FITC – E. coli k – 12 大肠杆菌 MFI 占对照的百分比统计图; 与对照组相比, \* P < 0.01





A. 对照组;B. 用 LPS(10μg/ml)激活的 RAW264.7 细胞吞噬 FITC - E. coli k - 12 的情况;C ~ E. 不同浓度的 MWC-NT 和 LPS 共同作用 RAW264.7 细胞 16h 后,RAW264.7 细胞吞噬 FITC - E. coli k - 12 的情况;图 C ~ E 中未显示 对照组;F. 活化的 RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌 MFI 占对照的百分比统计图,以对照组的 MFI 为 100%;与对照组 相比,\*P < 0.01;与 LPS 组(LPS + MWCNT 0μg/ml)相比,\*P < 0.05,\*\*P < 0.01

· 23 ·

### 讨 论

随着碳纳米管在工程学、生物学和医学方面应用 的迅速普及,人类和动物接触和摄入碳纳米管的概率 也在增加,这势必增加了碳纳米管生物危害性的风 险<sup>[9]</sup>。生物体对外源性入侵物质(如碳纳米管)的第 一道防线是免疫系统,巨噬细胞吞噬异物是免除异物 伤害的关键因素之一<sup>[10]</sup>。巨噬细胞与外源性异物的 相互作用有两个方面,一方面是巨噬细胞吞噬和清除 异物,另一方面是外源性异物(如碳纳米管)对巨噬细 胞产生可能的伤害作用或其他效应,而对这种伤害作 用或其他效应目前所知甚少。有研究发现,MWCNT 聚 集在小鼠肺部能够引起显著的促纤维化反应和炎症, 而且能触发 RAW264.7 细胞产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[11]</sup>。每天 6h 将 大鼠暴露在 MWCNT 气雾剂中,两周后支气管肺泡灌洗 液中的中性粒细胞、肺泡巨噬细胞、白蛋白的量明显增 多<sup>[12]</sup>。也有报道称,小鼠吸入 MWCNT 后,肺泡巨噬细 胞内发现 MWCNT 颗粒,而且一定浓度的 MWCNT 能够 减弱 NK 细胞的功能,导致免疫抑制,如 T 细胞依赖的抗 体应答和 T 细胞的增殖能力降低<sup>[13]</sup>。由此可见,巨噬细 胞在碳纳米管引起的机体免疫应答起到重要作用。但 未见 MWCNT 对巨噬细胞吞噬功能影响的报道。

本工作重点研究了多壁碳纳米管对小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞的吞噬功能的影响。笔者观察 了不同的 MWCNT 浓度和不同的 MWCNT 孵育时间 对静息 RAW264.7 细胞吞噬功能的影响。研究发 现,MWCNT 能够进入 RAW264.7 细胞,这与之前的 研究结果相一致<sup>[13]</sup>。同时笔者发现 MWCNT 能够显 著减弱 RAW264.7 细胞吞噬 FITC - E. coli k - 12 的 能力,且呈现明显的浓度和时间依赖性。研究中笔者 还比较了静息和 LPS 激活两种状态下,RAW264.7 细胞 吞噬功能的变化。结果显示,RAW264.7 细胞在没 有受到吞噬刺激因子 LPS 激活的状态下,也具有一 定的吞噬能力。用 LPS 激活的 RAW264.7 细胞,其吞 噬能力明显增强,这与预期和报道的结果一致<sup>[14]</sup>。 MWCNT 能够削弱 LPS 对吞噬的刺激作用,即 MWCNT 同样能够抑制激活的 RAW264.7 细胞的吞噬能力。

Pisanic 等<sup>[15]</sup>在 PC12 神经细胞上发现 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 纳 米材料对细胞骨架的破坏作用。Huang 等<sup>[16]</sup>发现, 长棒行单分散介孔碳纳米管使微丝断裂成无序状而 在细胞膜附近皱缩破坏,从而破坏 A375 黑素瘤的细 胞骨架。笔者认为 MWCNT 进入巨噬细胞后可能由 于其三维结构的原因,对细胞骨架产生了一定的影 响,进而阻碍了巨噬细胞吞噬其他物质。但 MWCNT 究竟如何影响吞噬,以及是否与细胞骨架有关,尚需 进一步探索。

本项研究的主要技术手段是流式细胞术,其优势 在于可以精确定量分析。研究结果提示,MWCNT 对巨 噬细胞吞噬功能有抑制作用。这一效应在今后的纳米 生物学、纳米毒理学和纳米医学研究方面应引起重视。

志谢:感谢中国医学科学院基础医学研究所许海 燕教授和孟洁副教授提供碳纳米管。

### 参考文献

- 1 Portney NG, Ozkan M. Nano oncology: drug delivery, imaging, and sensing[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 384(3):620-630
- 2 Venkatesan N, Yoshimitsu J, Ito Y, et al. Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics [J]. Biomaterials, 2005, 26(34): 7154-7163
- 3 Zanello LP, Zhao B, Hu H, et al. Bone cell proliferation on carbon nanotubes[J]. Nano Lett, 2006, 6(3):562 - 567
- 4 Mattson MP, Haddon RC, Rao AM. Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as subs trates for neuronal growth [J]. J Mol Neurosci,2000, 14(3): 175 - 182
- 5 Tang S, Tang Y, Zhong L, et al. Short and long term toxicities of multi – walled carbon nanotubes in vivo and in vitro [J]. J Appl Toxicol,2012, 32:900 – 912
- 6 Wako K, Kotani Y, Hirose A, et al. Effects of preparation methods for multi – wall carbon nanotube (MWCNT) suspensions on MWCNT induced rat pulmonary toxicity[J]. J Toxicological Sci,2010,35:437 - 446
- 7 Inoue K, Takano H, Koike E, et al. Effects of pulmonary exposure to carbon nanotubes on lung and systemic inflammation with coagulatory disturbance induced by lipopolysaccharide in mice [J]. Exp Biol Med,2008, 233:1583 - 1590
- 8 Zhao Y, Xing G, Chai Z. Nanotoxicology: Are carbon nanotubes safe? [J]. Nat Nanotechnol, 2008, 3:191 - 192
- 9 Smith CJ, Shaw BJ, Handy RD. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects [J]. Aquat Toxicol, 2007, 82:94 - 109
- 10 Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry:linking microbial infections to chronic inflammation and cancer [J]. Cell, 2006, 124(4):823-835
- 11 Van Berlo D, Wilhelmi V, Boots AW, et al. Apoptotic, inflammatory, and fibrogenic effects of two different types of multi – walled carbon nanotubes in mouse lung[J]. Arch Toxicol, 2014,88(9):1725 – 1737
- 12 Umeda Y, Kasai T, Saito M, et al. Two week toxicity of multi walled carbon nanotubes by whole – body inhalation exposure in rats [J]. J Toxicol Pathol, 2013, 26(2): 131 – 140
- 13 Mitchell LA, Gao J, Wal RV, et al. Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes [J]. Toxicol Sci, 2007,100(1):203-214
- 14 Fang H, Pengal RA, Cao X, et al. Lipopolysaccharide induced macrophage inflammatory response is regulated by SHIP[J]. J Immunol,2004, 173(1):360 – 366
- 15 Pisanic II TR, Blackwell JD, Shubayev VI, et al. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons [J]. Biomaterials, 2007, 28: 2572 - 2581
- Huang XL, Teng X, Chen D, et al. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function [J]. Biomaterials, 2010, 31: 438-448 (收稿日期:2014-05-08) (修回日期:2014-05-16)

· 24 ·