

## 电感耦合等离子体 - 质谱法

作者:

Stefan Wilhelm

斯蒂芬森生物医学工程学院  
俄克拉荷马大学  
俄克拉荷马州诺曼Ryan C. Bensen, Naga Rama Kothapalli,  
Anthony W. G. Burgett化学和生物化学  
俄克拉荷马大学  
俄克拉荷马州诺曼

Ruth Merrifield, Chady Stephan

珀金埃尔默公司  
加拿大伍德布里奇

## 使用单细胞 -ICP-MS 法 定量癌症细胞对金纳米 粒子的摄取率

### 介绍

癌症指的是异常细胞不受控制地生长和扩散的一种疾病。根据美国癌症协会的数据，癌症在美国最常见的死亡原因中排名第二。<sup>1</sup> 目前治疗癌症的方法包括手术、放射疗法、免疫疗法、

化学疗法等。尽管这些传统治疗方法可能会提高患者的总体存活率和生活质量，但其还存在一些局限性。例如，在传统癌症化疗中，小分子癌症疗法以非特异性的方式将小分子药物分散至整个人体内。结果是，这些药物不仅杀死了癌细胞，还破坏了机体的健康细胞，给癌症患者带来严重的副作用，<sup>2</sup> 因此迫切需要能够针对病变细胞的新疗法。

纳米粒子 (NP) 在过去的 20 年里引起了极大的关注，原因在于，其为药物递送提供了具有吸引力的优势，从而解决了传统化疗的局限性。<sup>3</sup> 可将纳米粒子设计为同时携带药物和成像探针的模式，以便同时检测和治疗癌症。还可将其设计为专门针对机体病变组织和细胞的模式。很多基于纳米粒子的癌症疗法已获准在临床上使用和 / 或目前正在开发中。<sup>4,5</sup> 与传统小分子药物相比，合理设计的纳米粒子具备以下优势的可行性：(i) 延长体内循环时间；(ii) 减少非特异性细胞摄取、意外偏离目标和副作用；以及 (iii) 通过特定癌细胞靶向部分来提高细胞相互作用。

癌症治疗的疗效与药物量有关，该药物量与每个单独癌细胞相互作用。用于测定药物暴露量的传统药物研究技术，例如，传统的电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS），一直局限于细胞整体测量方法。然而，这些测试方法需要将给定细胞群均质化，以便进行定量分析。需要假设该细胞群中的所有细胞均相似，并假设这些细胞与相同数量的药物相互作用。相反，研究表明，细胞群属于异质，甚至来自同一细胞群和细胞系的细胞也存在差异。<sup>6</sup> 例如，基因表达数据以均匀化细胞群为基础，将存在由于使用平均值数据结果，无法考量在单个细胞内发生的少量却关键的变化，而得出错误结论的可能性。单个细胞可能在大小、蛋白质水平、表达核糖核酸（RNA）转录上存在显著差异。这些差异是在讨论癌症研究、干细胞生物学、免疫学、发展生物学、神经学等以前无法解决的问题时，是非常关键的。

为解决分批处理细胞的试验方法造成的这些局限性，研究人员研发单细胞（SC）ICP-MS 方法。该技术允许快速、可靠地分析大量单个细胞，而非分析作为整体或仅含少量细胞的细胞群。<sup>7</sup> 研究表明，通过采用 SC-ICP-MS 方法，能够测定细胞内金属成分、定量分析金属及金属掺杂药物、纳米粒子的细胞摄取率。<sup>8-11</sup>

在本文中，我们证明了，在单个细胞基础上通过 PerkinElmer 的 NexION<sup>®</sup>2000 单细胞 ICP-MS 解决方案来量化癌细胞的金纳米粒子摄取量。该技术能够准确定量出含金纳米粒子（AuNP）的细胞数，还能够分析每个癌细胞中的 AuNP 数，给出细胞群的摄取分布。

## 实验

### 样品和样品制备

按照 Perrault 和 Chan 的方法，通过晶种介导合成策略制备柠檬酸盐稳定剂的 50 nmAuNP。<sup>12</sup> 为了提高组织培养介质中的胶体稳定性，在室温下，采用 5 kDa methoxy-terminated thiol poly（乙二醇）（USA, Laysan Bio, mPEG<sub>5kDA</sub>-SH），在去离子（DI）水中按比例每个 AuNP 含 40,000 mPEG-SH 的分子浓度，将 AuNP 聚乙二醇化。Malvern ZetaSizer Nano ZS、配备柯达 2Kx2K 数码相机（该数码相机用于获取 AuNP）的电子显微图的日立 H-7600 透射电子显微镜（TEM）进行 AuNP 动态光散射（DLS）实验。

从 ATCC ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)) 购买人类 T24 膀胱癌细胞。在组织培养处理过的培养皿上采用 McCoy 5A 培养基（补充 10% FBS），将细胞培养为单层细胞。对于 AuNP 摄取实验，在组织培养处理过的 6 孔板上，以每孔一百万

个细胞的密度接种 T24 癌细胞，并在 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) 的温度下培养 24 小时，以确保细胞粘附在培养皿表面。然后，在浓度为 0.4nM AuNP 的 McCoy 5A 培养基（补充 10% FBS）中，让细胞和 50 nm（纳米金颗粒直径）聚乙二醇化的 AuNP 接触 4 小时。接着，用 1×PBS 洗涤细胞五次，以酶促方式将其从组织培养皿表面分离，然后用 4% 多聚甲醛将细胞固定在 1×PBS 中，形成最终浓度为 100,000 个细胞 /mL 的单细胞悬浮液。

## 方法

通过表 1 所示条件，在 NexION 2000 ICP-MS 上运行 Syngistix 软件下的单细胞应用模块，完成所有样品分析。图 1 显示了用于 SC-ICP-MS 分析的组件，包括 NexION 2000 Asperon™ 雾化室以及专用的单细胞进样微型 DX 自动取样器。Asperon 雾化室旨在最大程度将细胞传送到 NexION，而单细胞微型 DX 自动取样器则在分析前搅动细胞悬浊液，以确保细胞不会从溶液中沉淀出来。

表 1. NexION 2000 ICP-MS 仪器条件

参数 / 组件	值
雾化器	MEINHARD® 高效雾化器（HEN）
雾化室	Asperon
补偿气体（L/min）	0.7
雾化器气体（L/min）	0.54
等离子体功率（W）	1600
样品流速（μL/min）	10
自动取样器	单细胞微型 DX
搅动	单细胞微型 DX 自动取样器
样品环（μL）	50

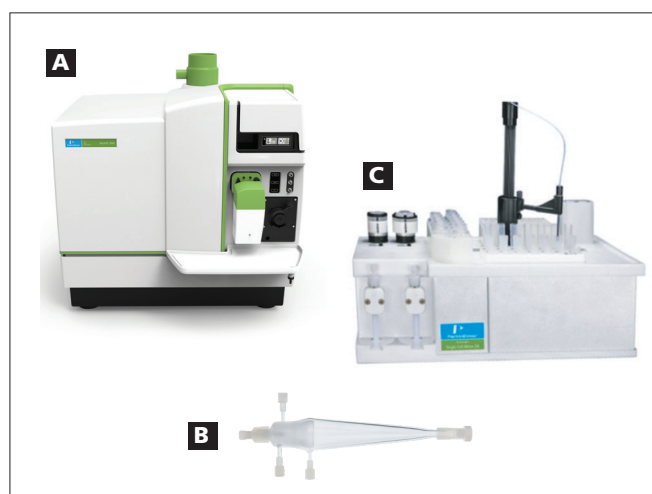


图 1. 单细胞 ICP-MS 的硬件组件：NexION 2000 ICP-MS (A)，Asperon 雾化室 (B)，单细胞微型 DX 自动取样器 (C)。

## 结果和讨论

### 纳米颗粒表征

根据已发表的方法，制备柠檬酸盐分散稳定的 AuNP 胶体。<sup>12</sup>AuNP 胶体的透射电子显微图（图 2）表明，其呈单分散状态，平均直径为 50 nm，呈球形。通过 NexION 2000 ICPMS，单颗粒 ICP-MS（SP-ICP-MS）方法，进一步确定了这些纳米粒子的直径。该分析结果示于图 3 中。

通过 mPEG<sub>5kDA</sub>-SH 对柠檬酸盐稳定性 AuNP 进行表面改性，以提高组织培养基中的胶体稳定性，这些 AuNP 可用于纳米粒子细胞摄取实验。聚乙二醇化 AuNP 的动态光散射（DLS）实验表明，表面改性后流体动力学直径为  $79.9 \pm 2.3$  nm，多分散指数（Pdl）为 0.056（图 4）。然而，TEM 和 SP-ICP-MS 结果类似，由于这些结果实际上均为测定 AuNP 的金属颗粒直径，因此 DLS 结果显示较大尺寸。DLS 结果以分散 AuNP 的布朗运动为基础，因此，结果包括围绕 AuNP 的聚合物配体长度。这意味着 DL 结果表明，考虑到流体动力学直径，NP 尺寸更大。在去离子水中，这些聚乙二醇化 AuNP 的动电位接近中性（数据未显示）。

纳米颗粒特征实验确定 AuNP 呈单分散状态、胶体稳定且高质量，这是接下来通过 SC-ICP-MS 定量癌细胞摄取 AuNP 的先决条件。

### T24 癌细胞摄取量

将人类 T24 膀胱癌细胞用作癌细胞模型，以量化暴露于聚乙二醇化 AuNP 时的细胞纳米颗粒摄取量。采用 0.4 nM 聚乙二醇化的 AuNP，培养 T24 癌细胞 4 小时。用 1xPBS 大量洗涤以去除多余的 AuNP 后，用 4% 多聚甲醛将 T24 癌细胞固定，形成单细胞悬浮液。对于定量每个细胞的 AuNP 数，SC-ICP-MS 分析结果显示，每个细胞的 AuNP 分布范围为每个细胞摄取 1 到 5 个 AuNP（图 5）。

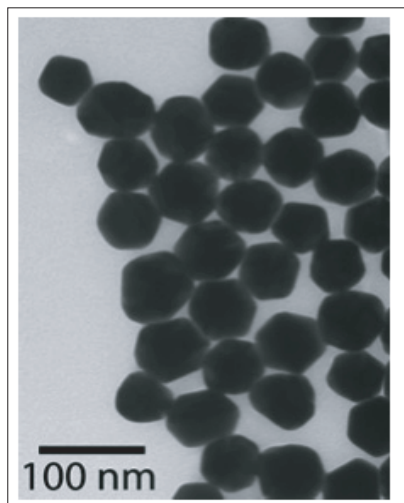


图 2. 50 nm AuNP 的透射电子显微图。图像显示，AuNP 呈球形，平均直径约为 50 nm。

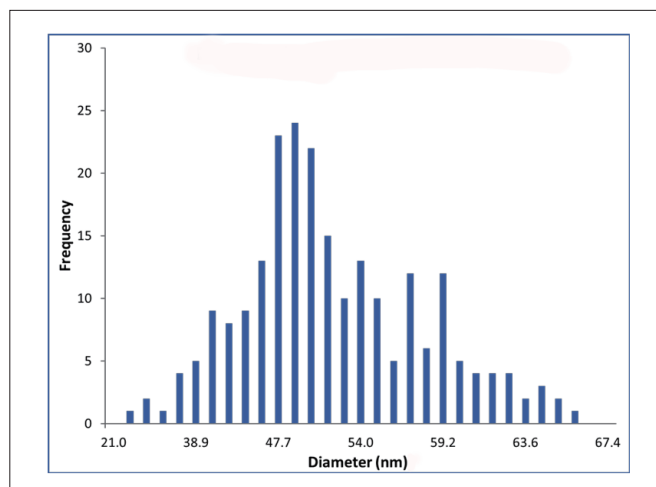


图 3. 根据单颗粒 ICP-MS（SP-ICP-MS），分析金纳米颗粒的粒度分布。

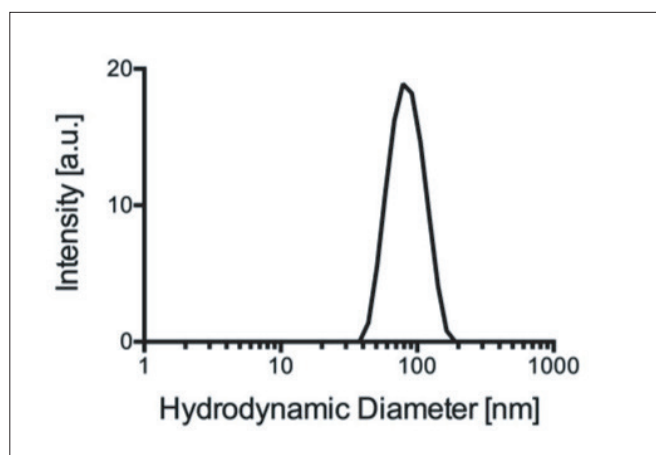


图 4. 在去离子水中，聚乙二醇化 AuNP 的动态光散射（DLS）特征。聚乙二醇化 AuNP 的流体动力学直径为  $79.9 \pm 2.3$  nm（Pdl 为 0.056）。

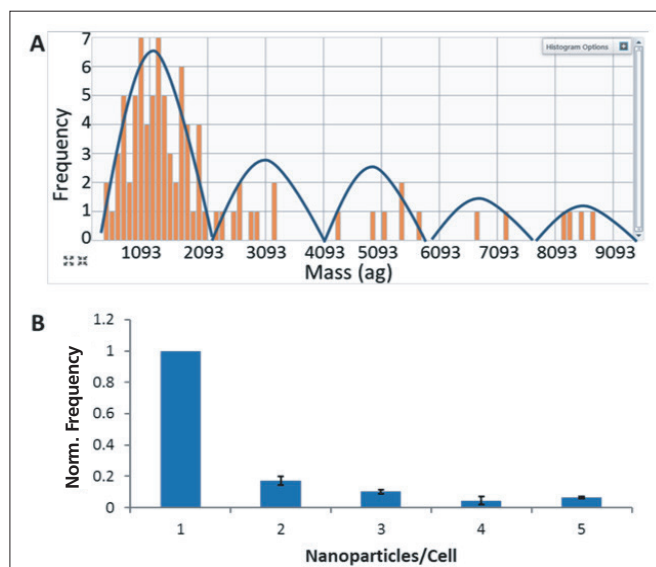


图 5. 通过 PerkinElmer NexION 系统，采用 50 nm（纳米金颗粒）聚乙二醇化 AuNP，培养人类膀胱癌细胞 4 小时，随后进行 SC-ICP-MS 分析。(A) 单个 T24 细胞的金质量分布直方图—蓝色曲线强调了每个细胞含一个或多个 AuNP 的细胞群。(B) 细胞含一个或多个 AuNP（通常含一个 AuNP 的细胞数；n=3）的标准化频率分布直方图—条形柱表示标准差平均值。

SC-ICP-MS 分析为在单个细胞基础上定量癌细胞的 AuNP 摄取量提供了分析方法。这种类型的数据独一无二，并且是传统整体 ICP-MS 方法无法获得的。结果表明，就每个细胞内的纳米粒子数而言，在使用传统消解方法时，AuNP 的摄取量并不均匀。通过传统 ICP-MS 方法制备均质细胞悬浮液，随后量化金含量，结果表明，每个癌细胞平均含  $1.5 \pm 0.1$  AuNP。然而，这一结果未提供单个细胞如何与 AuNP 相互作用的信息。

根据图 5 所示数据，合乎逻辑的下一步是，通过 SC-ICP-MS，研究观察到的纳米颗粒于细胞分布的原因和潜在的生物学机制。换句话说，为什么某些细胞比其他细胞会摄取更多 AuNP？这一点很重要，因为 AuNP 是很有前景的纳米材料，并且越来越多用于癌症治疗的诊断和治疗应用。<sup>4,13</sup> 由于缺乏有效的分析工具，文献中关于 AuNP 如何与单个癌细胞相互作用的量化信息有限。通过量化单细胞（一次一个完整细胞）的细胞内元素浓度，SC-ICP-MS（一种允许将完整的单个细胞导入高灵敏度 ICP-MS 的技术）提供了获得这一重要信息的分析方法。

## 结论

在本研究中，我们通过单细胞 ICP-MS 分析方法，在单个细胞水平上定量癌细胞的 AuNP 摄取量。结果表明，每个细胞吸收的 AuNP 分布并不均匀，特定细胞群内的某些细胞比其他细胞明显摄取更多 AuNP。SC-ICP-MS 是一个强大的分析工具，可在单个细胞水平上量化元素浓度和纳米粒子的分布。这项技术在单细胞基础上，具有提供的纳米粒子 - 细胞相互作用差异新见解的潜力。

## 参考文献

1. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>
2. Love, R.R., Leventhal, H., Easterling, D.V., and Nerenz, D.R. (1989). "Side effects and emotional distress during cancer chemotherapy." *Cancer*, 63(3), 604-612.
3. Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R. "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy." *Nature Nanotechnology* 2, no. 12 (2007): 751.
4. Shi, J., Kantoff, P.W., Wooster, R., and Farokhzad, O.C. (2017). "Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities" , *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 20.
5. Wilhelm, Stefan, Tavares, A.J, Chan, W. "Reply to "Evaluation of nanomedicines: stick to the basics" ." *Nature Reviews Materials* 1, no. 10 (2016): 16074.
6. Magee, J.A., Piskounova, E., Morrison S.J. "Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty." *Cancer Cell* 21, no. 3 (2012): 283-296.
7. "Single Cell ICP-MS Analysis: Quantification of Metal Content at the Cellular Level" , PerkinElmer, 2017.
8. "Monitoring the Uptake of Nanoparticles and Ionic/ Dissolved Gold by Fresh Water Algae using Single Cell ICP-MS" , PerkinElmer, 2017.
9. "New Research Evaluating Cisplatin Uptake in Ovarian Cancer Cells by Single Cell ICP-MS" , PerkinElmer, 2017.
10. "Iron Content Measurement in Individual Bacterial Cells Using SC-ICP-MS" , PerkinElmer, 2018.
11. Merrifield, R., Amable, L., Stephan, C. "Single Cell ICP-MS Analysis: Quantifying the Metal Concentration of Unicellular Organisms at the Cellular Level" , *Spectroscopy*, 33 (6), 33-39.
12. Perrault, S.D., and Chan, W.C. (2009). "Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50–200 nm" , *Journal of the American Chemical Society*, 131(47), 17042-17043.
13. Wilhelm, S., Tavares, A.J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H.F., and Chan, W.C. (2016). "Analysis of nanoparticle delivery to tumours" , *Nature Reviews Materials*, 1(5), 16014.