

# 细菌纳米磁小体有望作为靶向药物载体\*

孙建波<sup>1</sup> 姜伟<sup>1</sup> 李颖<sup>1\*\*</sup> 张阳德<sup>2</sup> 李季伦<sup>1</sup>

(中国农业大学生物学院农业部农业微生物资源与应用重点开放实验室 北京 100094)<sup>1</sup>

(中南大学湘雅医院卫生部纳米生物技术重点实验室 长沙 410008)<sup>2</sup>

**摘要:** 趋磁细菌细胞内合成的纳米磁小体具有颗粒均匀, 晶型稳定的特点, 每个磁小体有脂膜包被。提纯的磁小体毒性低, 生物相容性好, 可作为多种药物和大分子化合物的载体而应用于定向治疗肿瘤。本文介绍了细菌磁小体的结构特点, 提出了采用细菌磁小体连接抗癌药物的策略, 讨论了建立磁小体载药体系靶向治疗癌症的可能性。

**关键词:** 趋磁细菌, 磁小体, 纳米载体

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0165-04

## The Magnetosomes of Magnetotactic Bacteria May be Used as Drug-carriers for Targeted Therapy\*

SUN Jian-Bo<sup>1</sup> JIANG Wei<sup>1</sup> LI Ying<sup>1\*\*</sup> ZHANG Yang-De<sup>2</sup> LI Ji-Lun<sup>1</sup>

(College of Biological Sciences, China Agricultural University; Key Laboratory of Agro-Microbial Resource and Application, Ministry of Agriculture, Beijing 100094)<sup>1</sup>

(Xiangya Hospital of Central South University, National Key Laboratory of Nano-biological Technology, Ministry of Health, Changsha 410008)<sup>2</sup>

**Abstract:** Magnetotactic bacteria can form uniform nanometer sized magnetic particles (magnetosomes) within the bacterial cells and each particle is enveloped in a membrane. The purified magnetosomes are compatible and less toxic to SD rat. It may be used as a carrier to link with certain antibiotics and larger molecular compounds for treatment of tumors. Here we described the properties of the magnetosomes and the strategies for linking drugs. We also discussed the possibility to establish the system of targeted therapy for cancers using drug-loaded magnetosomes.

**Key words:** Magnetotactic bacteria, Magnetosome, Nano-carrier

磁小体 (magnetosome) 是趋磁细菌 (magnetotactic bacteria) 细胞内合成的纳米磁性颗粒, 单个的磁颗粒有脂膜包被, 因具备纳米药物载体的性质而为研究者所关注<sup>[1, 2]</sup>。由于趋磁细菌人工培养水平低, 不易获得大量磁小体, 导致对其应用研究受到限制。本室在前期的研究中, 于 42L 自动发酵罐上提高了培养水平, 摸索了磁小体的大量回收和纯化的步骤, 建立了纯净磁小体的灭菌、保存和简便的质量检测方法, 完成了初步的磁小体对 SD 大鼠的急性毒性试验。研究结果表明, 磁小体有望作为一种新型的药物载体应用于肿瘤的靶向治疗。

## 1 细菌磁小体的性质与特点

不同趋磁细菌所合成的磁小体的成分、形态

结构及大小各不相同, 因此细菌磁小体具有种属特异性<sup>[3-5]</sup>, 从形态上看, 有子弹状或液滴状、薄片状及球状等; 晶体结构为平截六面体和八面体的棱柱形; 成分有  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{FeS}$ 、 $\text{Fe}_3\text{S}_4$  或  $\text{FeS}_2$  等; 晶体直径通常在 35 nm ~ 120 nm 之间。同一种菌体只含成分单一、大小一致、形状相同和数目稳定的磁小体。

目前研究主要集中在 3 个趋磁细菌菌株, 发现它们的磁小体均为  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  晶体, 每个晶体外膜组分与细胞质膜类似<sup>[6-8]</sup>。对 *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 菌株磁小体膜组分分析表明, 中性脂类及游离脂脂肪酸、糖脂及硫脂、磷酸脂在总脂中所占重量百分比分别为 8%、30%、62%, 其中磷脂脂的主要成分是磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙

\* 国家高技术研究发展计划项目 (“863”项目) (No. 2004AA218032)

\*\* 通讯作者 Tel: 010-62733751, E-mail: yingli528@vip.sina.com

收稿日期: 2006-04-10, 修回日期: 2006-05-30

醇胺<sup>[6]</sup>。*M. magneticum* AMB-1 菌株磁小体膜的磷脂双分子层含有98%的脂类和2%其他组分的复合物。每毫克磁小体含有31.79微克的脂肪酸,其中棕榈油酸与油酸占90%。磷脂占总脂类的58%,磷脂酰乙醇胺则占磷脂的50%<sup>[7]</sup>。*M. gryphiswaldense* MSR-1 菌株磁小体膜含有的磷脂和脂肪酸与亚细胞器外膜组分类似,主要为磷脂酰乙醇胺和磷脂酰甘油<sup>[8]</sup>。

磁小体膜中高含量的磷脂酰乙醇胺使磁小体表面为电负性。由于pH对磷脂酰乙醇胺基本氨基团的极化,使磷脂酰乙醇胺在高pH值时呈电负性,在低pH值时呈中性。推测磁小体在低离子强度而高pH的水溶液中,由于表面的电负性大,则分散性会更好<sup>[9]</sup>。研究表明,在磁小体膜中有多种其它生物膜中不存在的特异性蛋白<sup>[10-12]</sup>。在磁小体膜上表达特定蛋白的技术已经建立<sup>[13]</sup>,也为膜的修饰提供了便利。目前磁小体已在固定化酶载体<sup>[14]</sup>,制备磁性细胞<sup>[15]</sup>,基因转移<sup>[16]</sup>,DNA、RNA的分离和标记<sup>[17,18]</sup>,免疫检测<sup>[19,20]</sup>等几方面进行了研究,但作为靶向药物载体用于疾病治疗的研究尚未见报道。

## 2 细菌磁小体作为靶向纳米药物载体的优越性

纳米药物载体是指用于装载(吸附、连接或包埋)药物的纳米颗粒,其直径少于100nm。纳米药物载体主要有纳米脂质体、高分子纳米药物载体、纳米磁性颗粒和纳米智能药物载体4大种类。目前处于研究热点的是磁性纳米药物载体,它在生物体内的靶向性是指利用外加磁场,使磁性纳米粒在病变部位富集,减轻药物对正常组织的接触,降低毒副作用,提高药物的疗效。

细菌磁小体优于人造纳米药物载体,表现在以下几个方面:(1)具有很窄的粒度分布范围和稳定的晶形。磁螺菌磁小体近球形,粒径30nm~50nm<sup>[5]</sup>;(2)颗粒主成分为 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,无其他杂质,具有顺磁性;(3)晶体颗粒有脂膜包被,不易聚集;(4)磁小体膜上带有大量的伯氨基,可用于与药物分子的共价连接,连接药物后可通过外加磁场而易分离纯化,(5)载药磁小体在体内通过降解磁小体外膜即可实现药物的释放。

日本学者在细菌磁小体应用基础研究中做出了很多尝试,其中磁小体与抗体的连接体系在免

疫检测中具有灵敏度高、稳定性好的特点<sup>[19,20]</sup>。近期又在磁小体膜上获得一种新的锚定蛋白,将这种蛋白与报告基因偶联可以得到稳定的表达<sup>[21]</sup>。

## 3 细菌磁小体可连接的药物种类

根据前人的研究工作和磁小体的特点,结合药物的化学修饰与改造经验,可以初步确定磁小体偶联药物的种类和策略。磁小体可以连接的药物主要有抗体类药物、核酸类药物、放射性核素和化疗药物4大类。

**3.1 磁小体与抗体药物的偶联** 自1997年第一个抗肿瘤抗体药物 rituximab 获准上市销售以来,抗肿瘤抗体药物已占据了抗肿瘤药物市场10%的份额<sup>[22]</sup>。但用抗体药物治疗实体瘤时,因抗体到达肿瘤内部的量少而显著影响疗效。阻断肿瘤血管的形成或破坏肿瘤血管,可有效地抑制肿瘤的生长及转移。磁小体与抗体偶联的技术已经建立<sup>[14,19,20]</sup>,将载抗体的磁小体通过外加磁场固定于实体瘤部位,可有效地抑制肿瘤血管的形成和破坏肿瘤血管。Kanneta 等将阿霉素与抗子宫内膜腺癌单抗进行了偶联,偶联物对靶细胞的毒性是游离阿霉素的27倍<sup>[23]</sup>。采用异型三功能试剂将磁小体与抗体和化疗药物进行连接,可以制备出高效的抗肿瘤药物。

**3.2 磁小体与核酸类药物的偶联** 磁小体曾被用于吸附DNA和基因的转移<sup>[16-18]</sup>,因此,可将磁小体与特定的DNA片段进行偶联,用于靶向基因治疗。

**3.3 磁小体与放射性核素的偶联** 常用的放射性核素有<sup>99m</sup>Tc、<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>111</sup>In等。选择合适的螯合物可将放射性核素偶联到磁小体上,如果再与其他抗癌药物联用效果更佳,2002年上市的 Zevalin 是放射性核素与鼠源抗体的偶联物,专用于治疗B细胞型非霍奇金淋巴瘤<sup>[22]</sup>。

**3.4 磁小体与化疗药物的偶联** 磁小体膜的重要组成部分为磷脂酰乙醇胺,带有大量的伯氨基,利用氨基与其他分子连接的研究已有不少实例,有多种连接剂可供选择,连接技术也比较成熟<sup>[22,24]</sup>。

## 4 细菌磁小体载药的策略

**4.1 直接偶联策略** 将磁小体与药物混合后再直接加入偶联剂,主要用于氨基与氨基之间的连接。常见的抗肿瘤抗生素几乎均含有氨基,如阿霉素、

表阿霉素、柔红霉素、依达比星、吡柔比星等为阿霉素结构类似物,只含一个氨基;而丝裂霉素、平阳霉素、培洛霉素等则含有多个氨基<sup>[25]</sup>。

戊二醛为同型双功能试剂,与伯氨基反应的条件温和,可在4~40℃范围内,pH 6.0~8.0的缓冲液中进行,且反应不可逆。因此戊二醛被广泛用于蛋白之间氨基的连接,但在连接单抗治疗剂时,戊二醛的非特异性连接易产生同聚物和抗体聚合物<sup>[22]</sup>。如果戊二醛用于磁小体载药则不存在这类问题,因为制备好的载药磁小体具有磁性,易于分离纯化。类似的偶联剂还有乙二醛、丙二醛等脂肪二醛以及二琥珀酰亚胺脂肪酸酯如辛二酸二琥珀酰亚胺酯(*N,N'*-Disuccinimidyl suberate, DSS)、*N,N'*-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(*N,N'*-Disuccinimidyl carbonate, DSC)。

**4.2 间接偶联策略** 间接偶联策略是先分别对磁小体和药物或偶联物进行修饰,最终实现药物与磁小体的偶联,可采用以下方式。

**4.2.1 与含巯基或二硫键药物的偶联:**对于含有巯基或二硫键的药物,可以先用3-(2-吡啶二硫基)丙酸 *N*-羧基琥珀酰亚胺酯(*N*-Succinimidyl 3-[2-pyridyldithio] propionate, SPDP)对磁小体进行修饰,然后用二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)将磁小体上连接的SPDP还原,再与药物直接混合,通过二硫键的交换将其偶联到磁小体上,磁小体载抗体可采用这种策略<sup>[19,20]</sup>。

**4.2.2 与含氨基药物的偶联:**Trauts试剂2-亚胺四氢噻吩(2-Iminoethiolane, 2-IT)可以与化合物的伯氨基反应,在化合物上引入巯基<sup>[26]</sup>,使携带伯氨基的磁小体轻易地转换为带巯基的磁小体,带伯氨基的药物也可以转换为带巯基的药物,这方面可供选择的偶联剂较多。因此,对于含有氨基的药物,也可采用间接偶联的策略进行,先将药物进行修饰,使其带有二硫键,然后采用4.2.1所述方法与磁小体连接。这为磁小体与具有不同物理化学性质的药物之间的偶联提供了更多的选择。

**4.2.3 与含羧基药物的偶联:**在1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide, EDC)作用下,含氨基化合物可与含羧基化合物反应,因此磁小体也可以与含羧基药物分子偶联。

**4.2.4 与其他药物的偶联:**对于不含有氨基、巯基或二硫键、羧基的药物,可以先将药物分子进

行修饰,使其带有这些基团中的一种,然后采用前述策略进行。

**4.2.5 特殊的偶联方式:**重要的间接偶联方式是以大分子载体作为桥,将数个小分子药物连接到大分子载体上,然后将大分子载体偶联到磁小体上<sup>[22]</sup>。常用的中间药物载体有聚谷氨酸(poly-Glu),聚赖氨酸(poly-Lys),聚天冬氨酸(poly-Asp),聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG),聚糖(Dextran, DT)等。

poly-Glu (PLGA)是多羧基化合物,仅有一个氨基,在此氨基上引入吡啶二硫键后形成PLGA-3-(2-吡啶二硫基)-丙酰基(PLGA-3-[2-pyridyldithio] propionyl, PLGA-PDP),然后在EDC的作用下与含氨基的小分子药物如阿霉素(Adriamycin, ADM)反应形成PDP-PLGA-(ADM)<sub>n</sub>。磁小体用SPDP修饰后再经DTT还原去掉吡啶二硫键成巯基,便可与PDP-PLGA-(ADM)<sub>n</sub>反应,将PLGA-(ADM)<sub>n</sub>偶联到磁小体上,反应过程如图1。

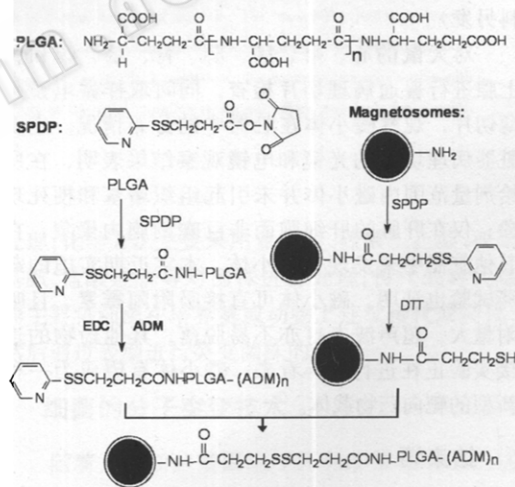


图1 以PLGA为桥,阿霉素与磁小体连接示意图

poly-Lys是多氨基大分子,在*N,N'*-二环己基碳二亚胺(*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide, DCC)和*N*-羧基琥珀酰亚胺(*N*-Hydroxysuccinimide, NHS)作用下,与含羧基的小分子药物反应,形成偶联物,偶联物再与巯基琥珀酰亚胺-4-苯基马来酰亚胺丁酸(sulfosuccinimidyl-4-[*p*-maleimidophenyl] butyrate, sulfo-SMPB)反应,形成sulfo-SMPB-poly-lysine-药物;磁小体与2-IT反应成为巯基化的磁小体。巯基化的磁小体与sulfo-SMPB-poly-lysine-药物反应即可形成以poly-Lys为桥的偶联物。

DT<sub>40</sub>和DT<sub>10</sub>都是聚糖化合物(Dextran),可考虑用高碘酸钠将其氧化成多醛基的化合物,然后依次加入含氨基的小分子药物和磁小体,这一方法类似于戊二醛连接的策略。另一个方法是在溴化氰作用下,Dextran与ε-氨基己酸反应引入数个氨基己酸,在EDC作用下分别与含氨基药物(如丝裂霉素)和乙二胺反应,然后与2-IT反应引入巯基,再将巯基与磁小体连接。

## 5 磁小体生物安全性检测及载药预实验结果

为了解磁小体作为药物载体的安全性,本室进行了纯净磁小体的动物实验。采用从趋磁螺菌细胞内提取的高纯度磁小体,通过舌下静脉注射SD大鼠进行毒理实验。初步结果证明,磁小体对大鼠的半数致死量为62.7mg/kg。从存活大鼠腹腔静脉取血进行血液生化检测,其血常规(24项)、心激酶与肝功能(16项)均未见明显异常(资料另发)。

对大鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑、肠和肾上腺进行普通病理切片检查,同时取样做电镜超薄切片,观察磁小体在脏器中的分布情况。主要脏器病理切片的光镜和电镜观察结果表明,在所给剂量范围内磁小体并未引起组织堵塞和梗死现象;仅在肝脏的肝细胞而非巨噬细胞内聚集,在其他脏器中未发现磁小体。本室近期实施的载药试验也证明,磁小体可直接吸附阿霉素,且吸附量大,超声波击打亦不易脱落,其他药物的连接实验正在进行中。看来,磁小体有望成为一种新型的靶向药物载体。

## 6 结束语

2004年9月,英国科学家发表了预见,认为细菌磁小体是一种良好的靶向药物载体,但他同时指出,目前的首要问题是必须从细胞内获得足够的高质量磁小体<sup>[27]</sup>。可见,细菌磁小体越来越受到人们的关注。本实验室已经摸索出适宜的人工培养趋磁细菌的条件及分离纯化磁小体的有关步骤,获取更多磁小体用于载药实验已有了物质基础。初步的动物实验,也给予我们很有价值的启示,期待着多学科科学家的通力合作,使细菌磁小体这一自然资源尽快得以应用。

## 参考文献

- [1] Blakemore R P, Maratea D, Wolfe R S. *J Bacteriol*, 1979, **140**: 720 ~ 729.
- [2] Schüler D, Frankel R B. *Appl Microbiol Biotech*, 1999, **52**: 464 ~ 473.
- [3] Bazylinski, D A. *ASM News*, 1995, **61**: 337 ~ 343.
- [4] Bazylinski D A, Garratt-Reed A, Frankel R B. *Microsc Res Tech*, 1994, **27**: 389 ~ 401.
- [5] Schüler D J. *Mol Microbiol Biotech*, 1999, **1**: 79 ~ 86.
- [6] Gorby Y A, Beveridge T J, Blakemore R P. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 834 ~ 841.
- [7] Matsunaga T, Sato R, Kamiya S, *et al.* *J Magn Magn Mater*, 1999, **194**: 126 ~ 131.
- [8] Grunberg K, Muller E-C, Otto A, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70** (2): 1040 ~ 1050.
- [9] Matsunaga T, Sato R, Kamiya S, *et al.* *J Magn Magn Mater*, 1999, **194**: 126 ~ 131.
- [10] Grunberg K, Wawer C, Telso B M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 4573 ~ 4582.
- [11] Okamura Y, Takeyama H, Matsunaga T. *Appl Biochem Biotech*, 2000, **84** ~ 86: 441 ~ 446.
- [12] Arakaki A, Webb J, Matsunaga T. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 8745 ~ 8750.
- [13] Matsunaga T, Arakaki A, Takahoko M. *Biotech Bioeng*, 2002, **77** (6): 614 ~ 618.
- [14] Matsunaga T, Kamiya S. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **26**: 328 ~ 332.
- [15] Matsunaga T, Hashimoto K, Nakamura N, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1989, **3**: 401 ~ 405.
- [16] Takeyama H, Yamazawa A, Nakamura C, *et al.* *Biotech Techniques*, 1995, **9** (5): 355 ~ 360.
- [17] Yoz B, Matsumoto M, Matsunaga T. *J Biotech*, 2002, **94**: 217 ~ 224.
- [18] Ota H, Takeyama H, Nakayama H, *et al.* *Biosens Bioelectro*, 2003, **18**: 683 ~ 687.
- [19] Nakamura N, Matsunaga T. *Anal Chem Acta*, 1993, **281**: 585 ~ 589.
- [20] Matsunaga T, Ueki F, Obata K, *et al.* *Anal Chem Acta*, 2003, **475**: 75 ~ 83.
- [21] Yoshino T, Matsunaga T. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**: 465 ~ 471.
- [22] 甄永苏, 邵荣光. 抗体工程药物. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [23] Kameta Y, Tsukazaki K, Kubushiro K, *et al.* *Oncol Rep*, 2000, **7** (5): 1099 ~ 1106.
- [24] 罗贵民. 酶工程. 北京: 化学工业出版社教材出版中心, 2003.
- [25] 汤光, 李大魁. 现代临床药理学. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [26] Jue T, Lambert J M, Piece L R, *et al.* *Biochem*, 1978, **17** (25): 5399 ~ 5405.
- [27] <http://www.nature.com/news/2004/040906/full/040906-11.html>