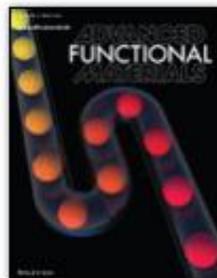


读书报告

汇报人：程利娇

2018.05.26





Volume 23, Issue 17

Pages: 2101-2217

May 6, 2013

Materials
Views

www.MaterialsViews.com

ADVANCED
FUNCTIONAL
MATERIALS

www.afm-journal.de

Naturally Occurring Nanoparticles from *Arthrobotrys oligospora* as a Potential Immunostimulatory and Antitumor Agent

Yongzhong Wang, Leming Sun, Sijia Yi, Yujian Huang, Scott C. Lenaghan,
and Mingjun Zhang*

IF: 12.124

FULL PAPER



目录
CONTENTS



01

Introduction

02

Materials and
methods

03

Results and
discussion

04

Conclusions



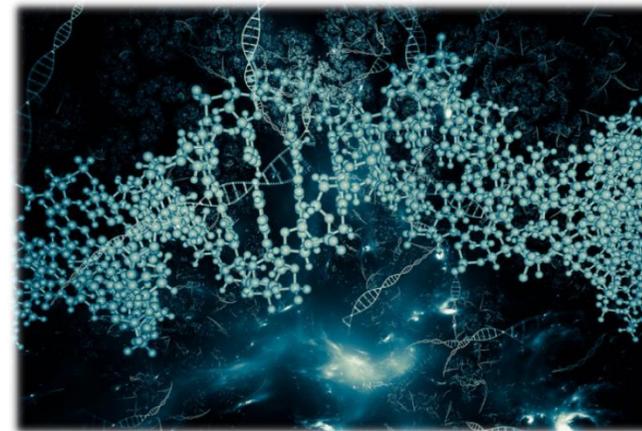
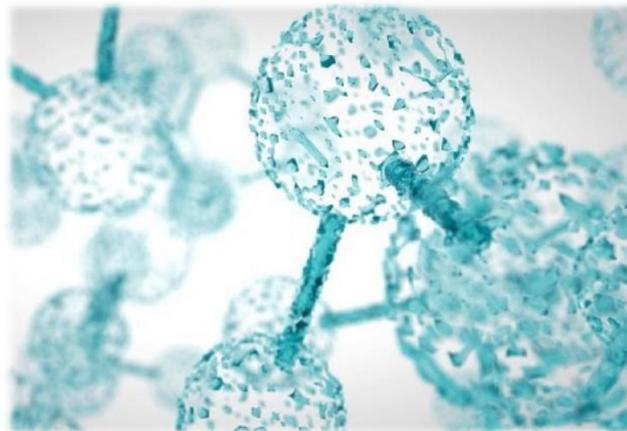
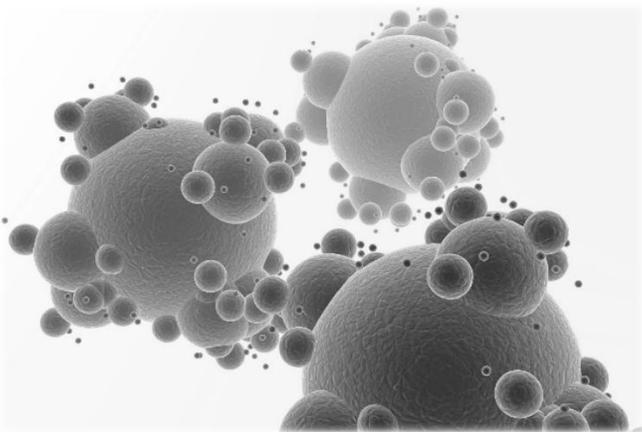
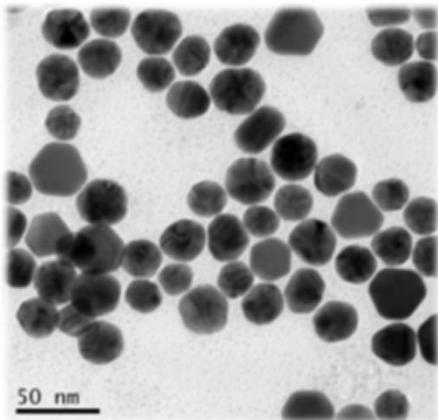


PART 01

Introduction



Introduction



纳米粒子又称超细微粒子，属于胶体粒子大小的范畴。纳米粒子具有重要的科学研究价值，处于微观体系和宏观体系之间，搭起了大块物质和原子、分子之间的桥梁。因纳米效应使其物理性能显著的提高，在光电、化学及生命科学等具有广阔的应用开发前景。

Introduction

不同来源，天然存在的**无机纳米粒子**，在土壤、地下水和地表水、火山灰、浪花、烟雾等中被发现，目前已被广泛研究。

具有生命的生物体产生（分泌）的**有机纳米粒子（NONPs）**由于其独特的物理化学性质以及更强的生物相容性，最近才引起科学界的关注。



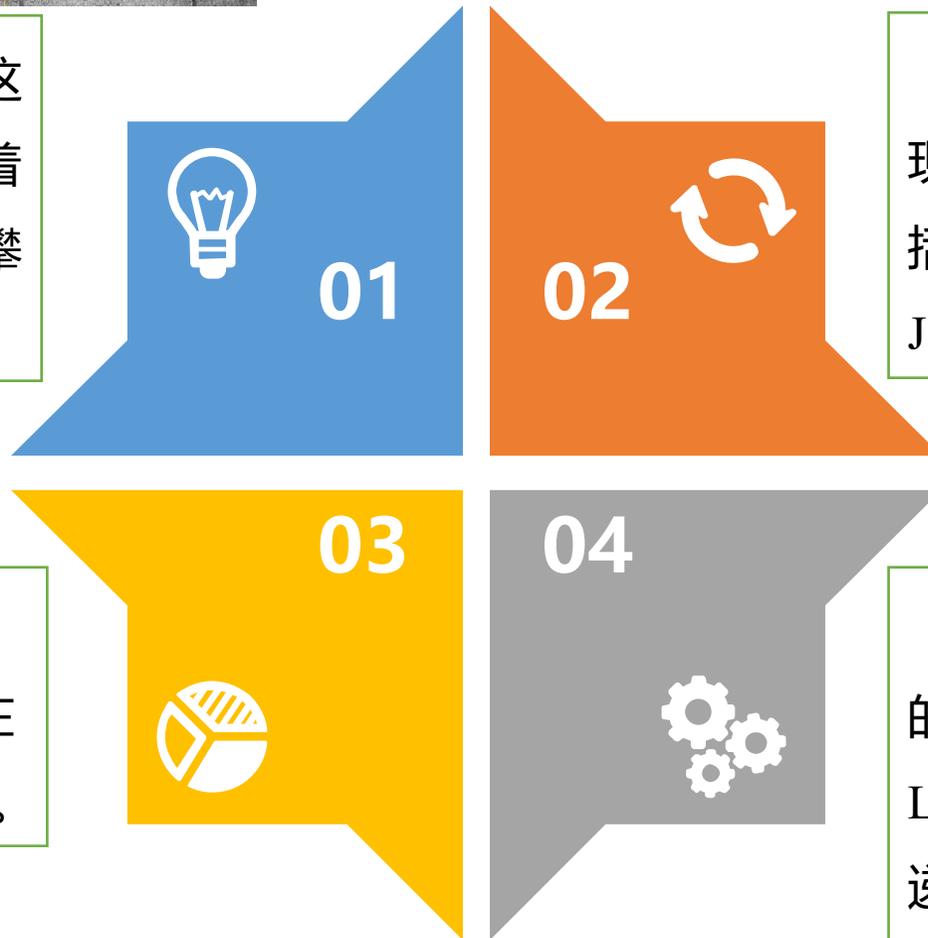
Introduction



常春藤分泌有机纳米粒子，这些纳米粒子有助于产生强大的粘着力，使常春藤能够在垂直的表面攀爬 (M. Zhang et, 2008)。



在各种海洋物种的分泌物中发现了类似有机纳米结构的物质，包括多毛类、贻贝、藤壶和海星 (L. J. Xiao et, 2011) 。



哺乳动物血液中的低密度脂蛋白(LDL)一直被认为是天然存在的纳米粒子 (I. R. Corbin et, 2006)。

LDL作为哺乳动物体内胆固醇的主要转运载体，并且生物激发的LDL已被作为潜在的载体用于靶向递送诊断剂和治疗剂 (H. Jin et, 2012)。

Introduction



微生物



多细胞生物体、
高等动物等

天然有机纳米粒子(NONPs)

多种形式、不同功能





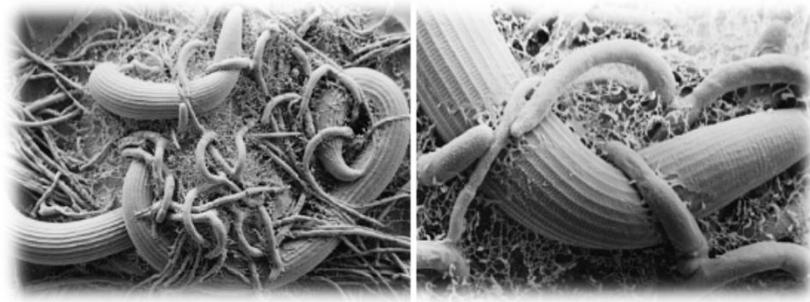
Introduction

对 NONPs 的研究不仅有助于我们了解纳米粒子在生物系统中的作用，而且也为纳米材料在生物医学和生物技术中的应用提供新的思路。

了解纳米材料是如何在自然系统中形成的，为“下一代”工程或仿生纳米结构材料的合成提供理论基础。

近年来，开发应用天然纳米材料对更有效的癌症治疗和检测至关重要。（Brannon-Peppas *et al.*, 2004）

基于天然纳米粒子的工程载体系统表明具有显著的抗肿瘤特性，并在化学疗法，免疫疗法，放射疗法，热疗法和光动力学疗法中具有很大的应用潜力。（Praetorius *et al.*, 2007）



本研究

Arthrobotrys oligospora (少孢节丛孢菌)：半知菌纲、壳霉目、壳霉科：真菌界代表性肉食者，具有腐生和捕食能力，以营养菌丝特化形成的捕食器捕食线虫为生。

在线虫或蛋白质物质存在的情况下，*Arthrobotrys oligospora*可以由腐生阶段转变为掠夺捕食阶段，其特征是形成了可以捕获线虫以供随后消化的三维捕获网络的纳米级生物聚合物。



Introduction



技术要点:

微生物生长在很大程度上受**培养基组份**及**环境因素**的影响。因此，在不受培养基干扰的情况下，从微生物培养中发现并分离得到NONPs的适当培养体系对该研究至关重要。

研究目的:

发现收集天然存在 *Arthrotrrys oligospora* 中的新型纳米粒子，进一步探究这些天然纳米颗粒用作免疫刺激剂，抗癌药物和用于癌症治疗的药物载体的应用潜力。



PART **02**

Materials and methods





Materials and methods

培养方法的建立

1

2

SEM, AFM, DLS 监测

NONPs 纯化

3

4

NONPs 的可能来源

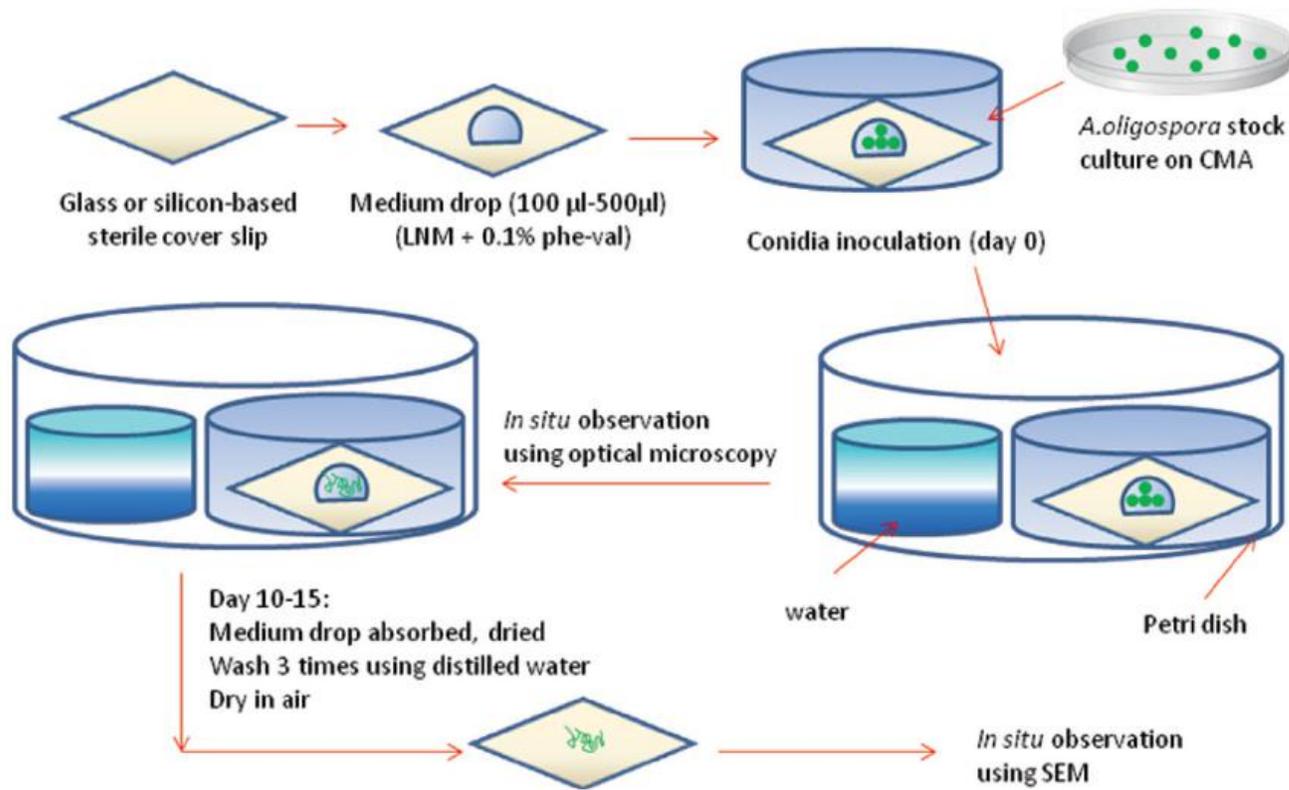
免疫刺激作用

5

6

细胞毒性作用检测

1、真菌静置培养方法



依据：哺乳动物细胞的悬滴培养法和真菌玻片培养法

1、一滴液体培养基（LNM+0.1% phe-val）加到无菌盖玻片上放入小培养皿（3cm）中。

2、将50-100个来自CMA培养皿上的培养物的小孢子菌分生孢子接种到该液滴中。

3、另取一小培养皿装满水，并将两者放入大培养皿（10cm）中维持湿度。

4、1mg / m L phe-val的低营养培养基（LNM）用来维持真菌生长。

5、25°C下培养15天，直到分泌的纳米颗粒被收获。

培养基组份

低营养培养基 (LNM) : 液体

仅包含无机盐、维生素等, 防止固体培养介质中存在的琼脂颗粒的污染。

Table S1. The ingredients and their concentration of the modified low nutrient medium (LNM) used in this work.

Ingredients	Concentration
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.2 mg/ml
KCl	1 mg/1 ml
FeCl ₃ •6H ₂ O	0.03 mg/ml
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.88 μg/ml
MnSO ₄ •H ₂ O	0.3 μg/ml
thiamin-HCl	2 μg/ml
biotin	0.05 μg/ml

2、NONPs的制备及检测

采用倒置光学显微镜、扫描电子显微镜(SEM)和原子力显微镜(AFM), 实时监测观察细菌的生长以及分泌产生的NONPs, 直至不再生长。

在蒸馏水中超声处理, 将菌体与NONPs分离, 从而获得纯化的NONPs, 使用 300 KDa醋酸纤维素透析膜对样品透析3天, 进一步纯化纳米粒子。



✈ 2、NONPs的制备及检测

DLS技术：测量粒子粒径，具有准确、快速、可重复性好等优点，已经成为纳米科技中比较常规的一种表征方法。目前动态光散射仪器不仅具备测量粒径的功能，还具有测量Zeta电位、大分子的分子量等的功能。

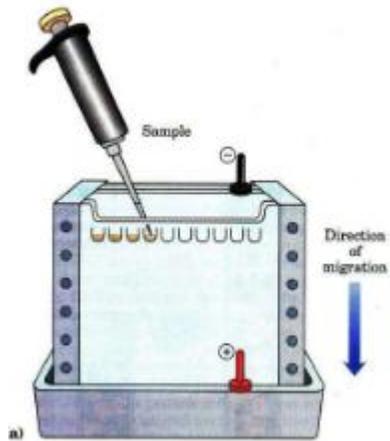
Zeta电位：数值与胶态分散的稳定性相关，是对颗粒之间相互排斥或吸引力的强度的度量。分子或分散粒子越小，Zeta电位的绝对值（正或负）越高，体系越稳定，即溶解或分散可以抵抗聚集。



Zeta电位[mV]	胶体稳定性
0 到 ± 5 ,	快速凝结或凝聚
± 10 到 ± 30	开始变得不稳定
± 30 到 ± 40	稳定性一般
± 40 到 ± 60	较好的稳定性
超过 ± 61	稳定性极好

✈ 2、NONPs的制备及检测

NONPs的化学成分检测： 定量测定冻干NONPs中的粘多糖(GAGs)和蛋白质浓度，分析NONPs的化学成分。通过SDS-PAGE电泳分析，对其中的蛋白质进行检测。



3、免疫刺激作用



采用剂量滴定法（0、0.5、2、5、10、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），使用RAW 264.7巨噬细胞测定NONPs作用后的免疫刺激电位，检测巨噬细胞相关细胞因子TNF- α 、IL-6和IL-12的浓度，研究其在体外潜在的免疫刺激作用。

4、毒性作用检测

- MTT 法检测NONPs对RAW 264.7巨噬细胞是否存在毒性作用。
- 使用 B16BL6 和 A 549细胞探究NONPs的细胞毒性作用。
- 通过NONPs与抗肿瘤药物阿霉素(DOX)结合形成NONP-DOX,
检测NONPs是否能作为潜在的抗癌药物载体。



PART **03**

Results and discussion



1、倒置光学显微镜观察

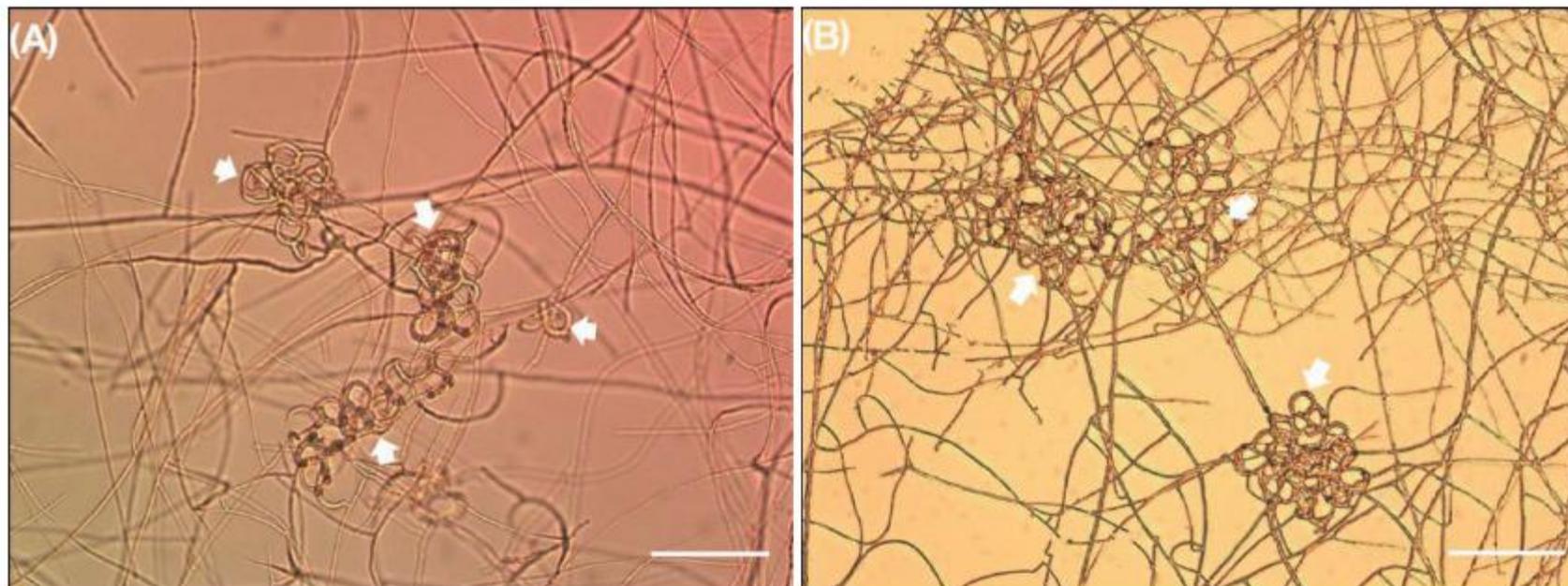
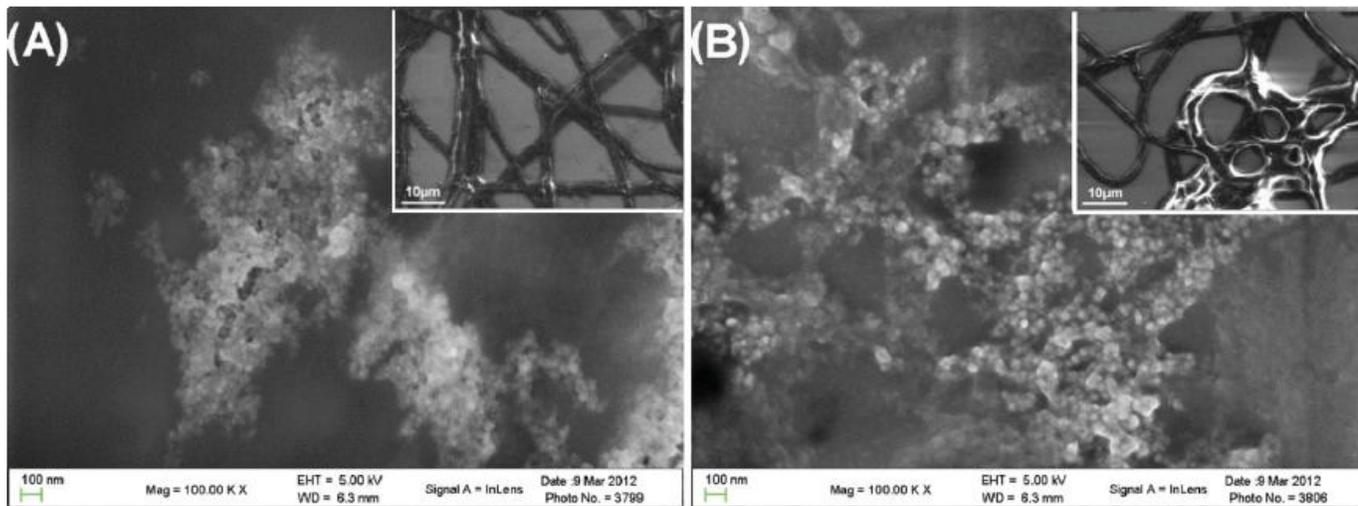
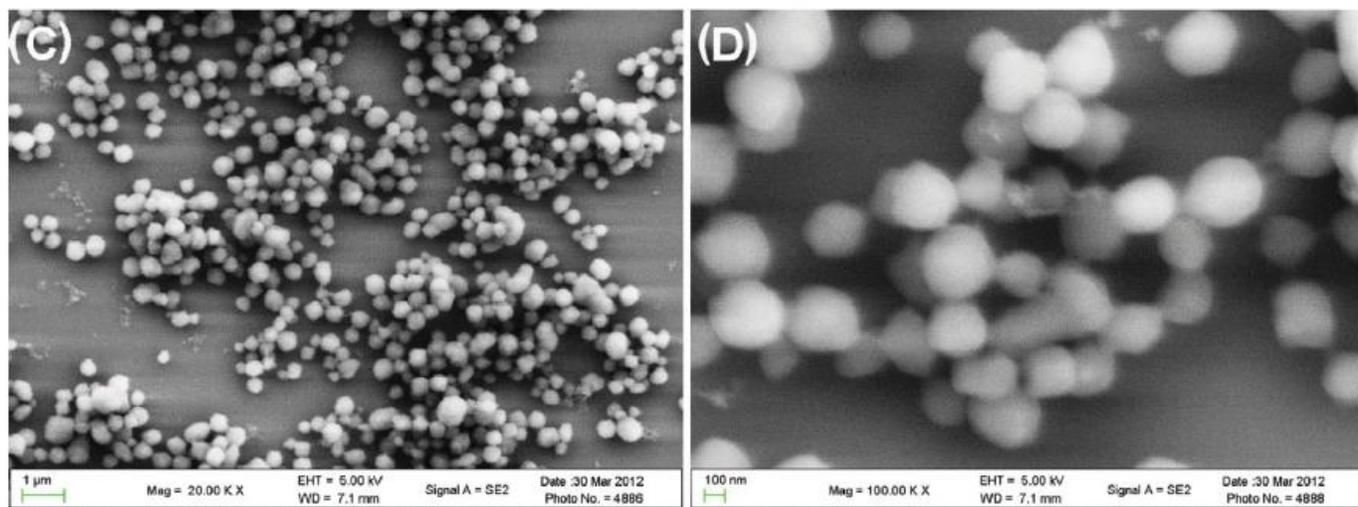


Figure 2. Abundant growth of *A. oligospora* mycelia and 3D traps in the novel sitting drop culture system was monitored in situ using inverted optical microscopy. A) *A. oligospora* growth in a medium drop on the cover slip on day 5 after inoculation; B) The air-dried *A. oligospora* mycelia with 3D traps on the cover slip on day 5 after inoculation. The liquid LNM supplemented with 1 mg/mL phe-val was used. Arrow indicates the 3D traps. Scale bars represent 200 μm .

1、扫描电镜观察 (SEM)

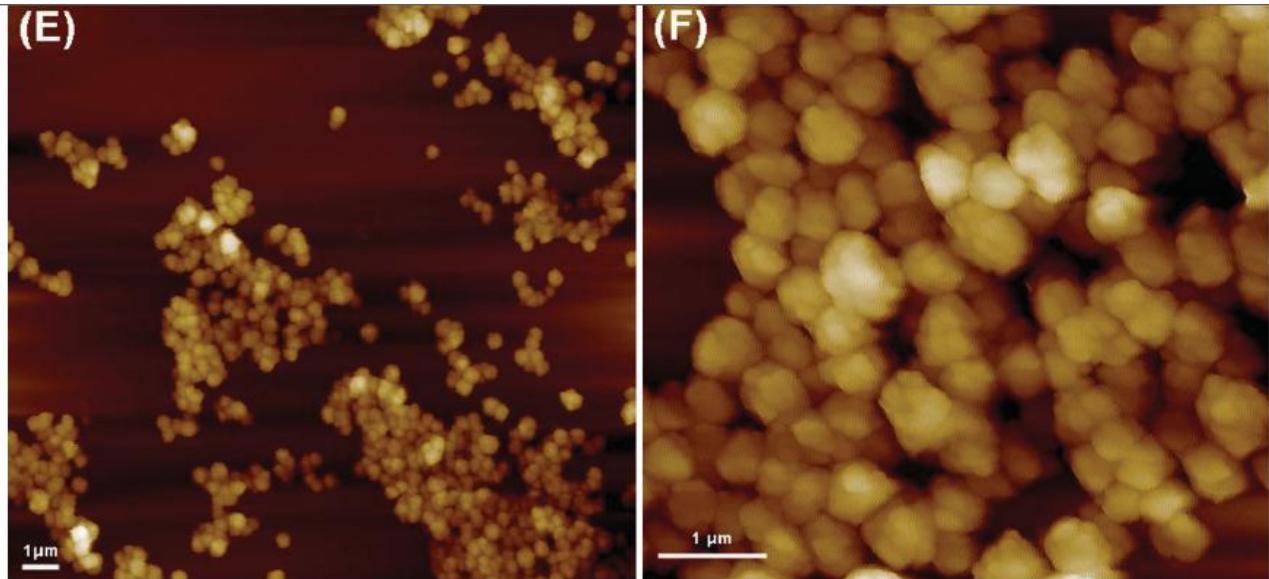


NONP-S: 接种15天后, 通过在蒸馏水中超声处理菌丝体制备的纳米颗粒NONP-S使用扫描电镜观察: 在菌丝和三维网状结构表面观察到大量纳米粒子。



NONP-W: 通过使用蒸馏水洗涤菌丝体制备的纳米颗粒为球形, 直径200-300nm。

✈️ 1、原子力显微镜(AFM)观察



原子力显微镜观察NONP-W：显示出类似的现象，直径在300-500 nm之间(图E, F)。

超声法制备的纳米粒子NONP-S与洗涤后的纳米颗粒NONP-W无明显区别。

✈ 2、DLS和Zeta电位分析

用DLS和Zeta电位分析方法测定了溶液中NONP-W与NONP-S的颗粒直径以及Zeta电位。



激光粒度分析仪-动态光散射



Zate 电位仪

2、DLS分析

NONP-W和NONP-S的平均粒径为360~370 nm

Table 1. Characteristics of the naturally occurring nanoparticles (NONPs) from *A. oligospora* and NONP-DOX conjugates.

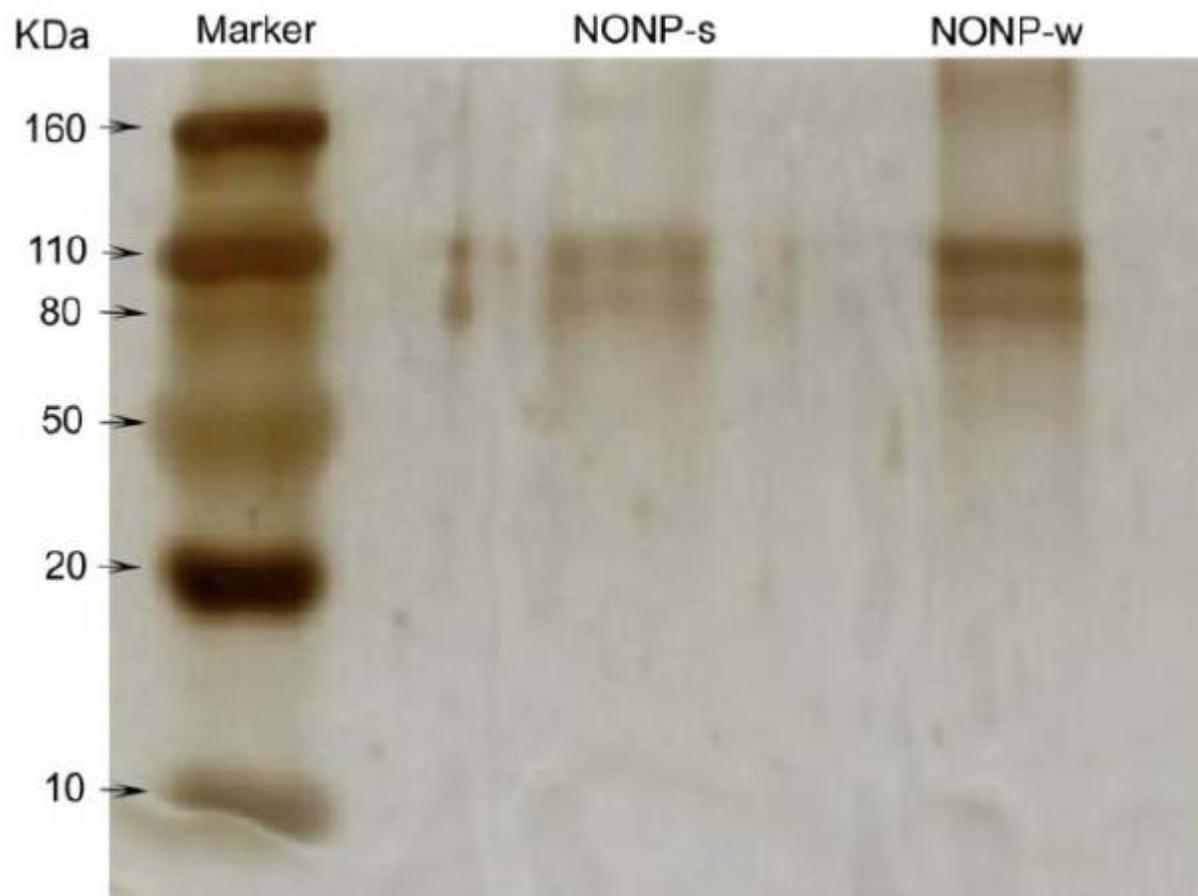
	Particle Size [nm]	Zeta Potential [mV]	GAG [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	Protein [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
NONP-W ^{a)}	371.2 \pm 74.59	-33.2 \pm 5.55	28.03 \pm 1.32	544.73 \pm 16.70
NONP-S ^{b)}	369.0 \pm 67.49	-33.9 \pm 5.77	28.22 \pm 5.39	554.42 \pm 22.93
NONP-DOX ^{c)}	380.9 \pm 60.13	-20.8 \pm 5.37	-	-



定量测定冻干NONPs中葡萄糖胺多糖 / 粘多糖(GAG)和蛋白质浓度，分析NONPs的化学成分。1mg冻干纳米颗粒中含有 $\approx 28\mu\text{g}$ GAG和 $\approx 550\mu\text{g}$ 蛋白质。

NONP-DOX: NONP-W和抗肿瘤药物DOX (阿霉素) 之间的偶联物，通过酰胺键连接。

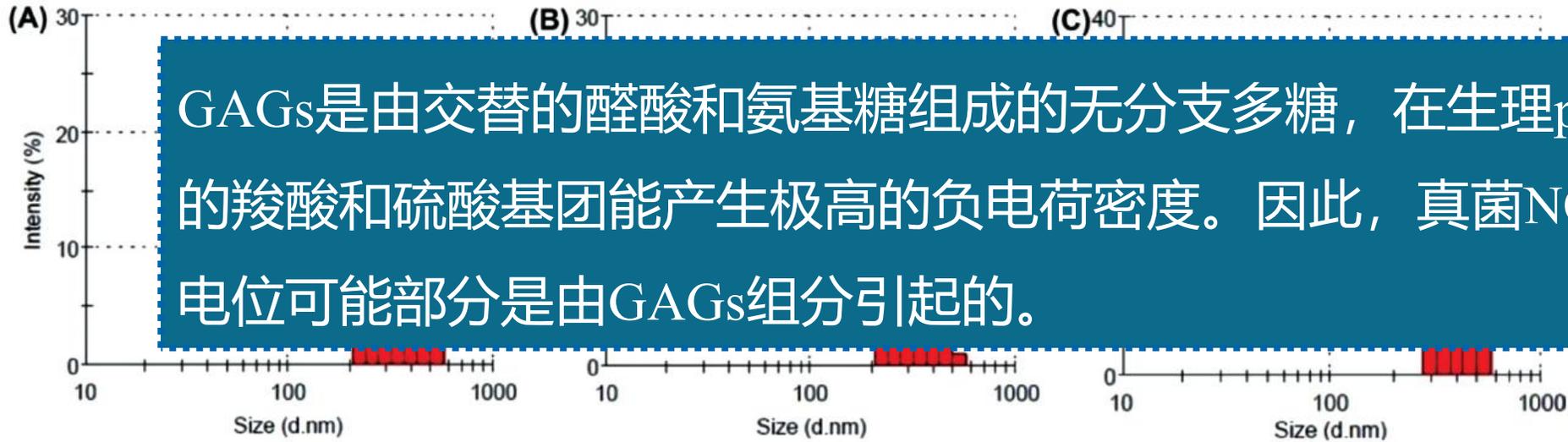
✈ SDS-PAGE分析



两种纳米粒子样品中均含有两种主要的蛋白质，分子量分别为110和80 kDa。

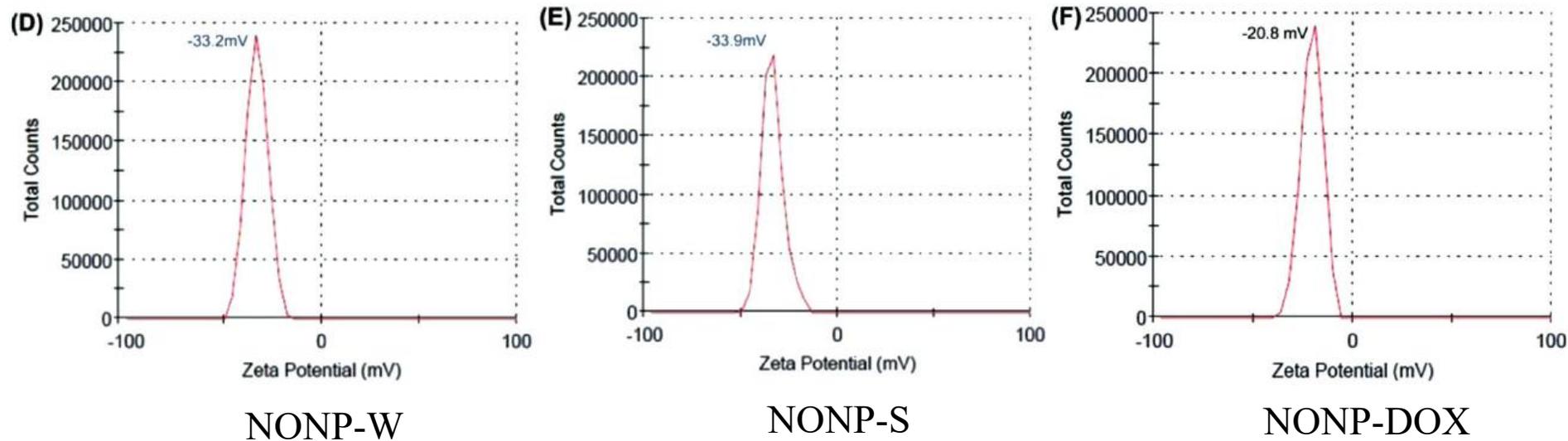
由于大多数糖胺聚糖是以共价方式连接到核心蛋白形成蛋白多糖，推测两个蛋白组分可能是共价地附着在真菌NONPs的缝隙上。

2、Zeta电位分析



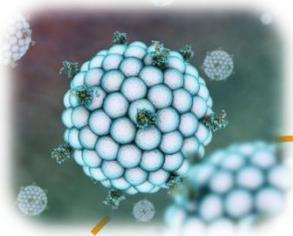
GAGs是由交替的醛酸和氨基糖组成的无分支多糖，在生理pH下去质子化的羧酸和硫酸基团能产生极高的负电荷密度。因此，真菌NONPs的负Zeta电位可能部分是由GAGs组分引起的。

Zeta电位在pH 6.0下为-33 mV。



Zeta电位[mV]	胶体稳定性
0 到 ± 5	快速凝结或凝聚
± 10 到 ± 30	开始变得不稳定
± 30 到 ± 40	稳定性一般
± 40 到 ± 60	较好的稳定性
超过 ± 61	稳定性极好

✈ 3、NONP s 的可能来源



目前尚不清楚这种真菌是如何分泌纳米粒子的，以及它们在真菌的生长和发育过程中发挥了何种生物学作用。

本研究中测试了分泌纳米粒子的可能来源。在静置悬滴培养系统中采用了不同的培养基，并比较了纳米粒子的产量。

3、NONPs 的可能来源

Table 2. The effect of 3D traps, mycelia and medium ingredients on the nanoparticle secretion from the fungus.

	3D traps ^{a)}	Mycelia ^{a)}	Nanoparticles [GAG, μg] ^{b)}
LNM + dipetide	+++	+++	+++ (8.39 \pm 0.15)
LNM + PO ⁴⁻	-	+++	+++ (8.44 \pm 0.27)
LNM	+	+++	+++ (8.21 \pm 0.11)
LNM + dipetide (Initial media) / water (subsequent replenishment)	+	++	++ (6.17 \pm 0.34)
Water	-	+	+ (2.14 \pm 0.05)

当LNM添加1mg/mL的Phe-Val时，真菌的进入捕食期，从而产生大量的三维网络捕获结构。

在非Phe-Val的LNM中，真菌生长缓慢，产生少量的三维捕获物。当LNM添加12 mM磷酸盐缓冲液时，真菌只有腐生阶段发育，菌丝体生长不受影响，无三维捕获物形成。

Arthrotrys oligospora 分泌的NONPs与三维网络捕获结构的生成无关，而与菌丝体的生长有关。

✈ 4、NONPs对RAW 264.7小鼠巨噬细胞的免疫刺激作用

高等植物、蘑菇、地衣和藻类中的一些多糖在体内和体外都具有免疫刺激作用。

(Paulsen *et al.*, 2009)

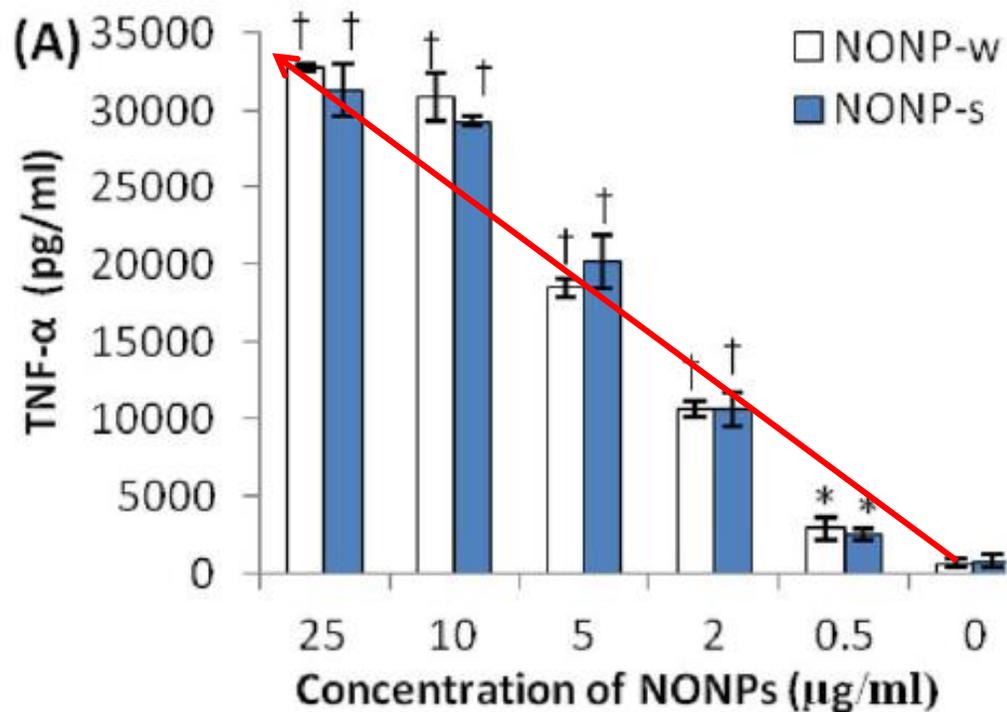
GAGs, 如肝素, 硫酸乙酰肝素等报道为潜在的癌症治疗剂, 可在体外抑制肿瘤细胞粘附, 迁移, 生长和侵袭。(Yip *et al.*, 2006)

GAG共价连接的蛋白聚糖, 在原位乳腺癌模型中, 减少70%原发性肿瘤的生长并消除其转移能力。

(Reed *et al.*, 2005)

NONPs在体外的潜在免疫刺激作用和细胞毒性作用。

4.1、NONPs对TNF- α 浓度的影响

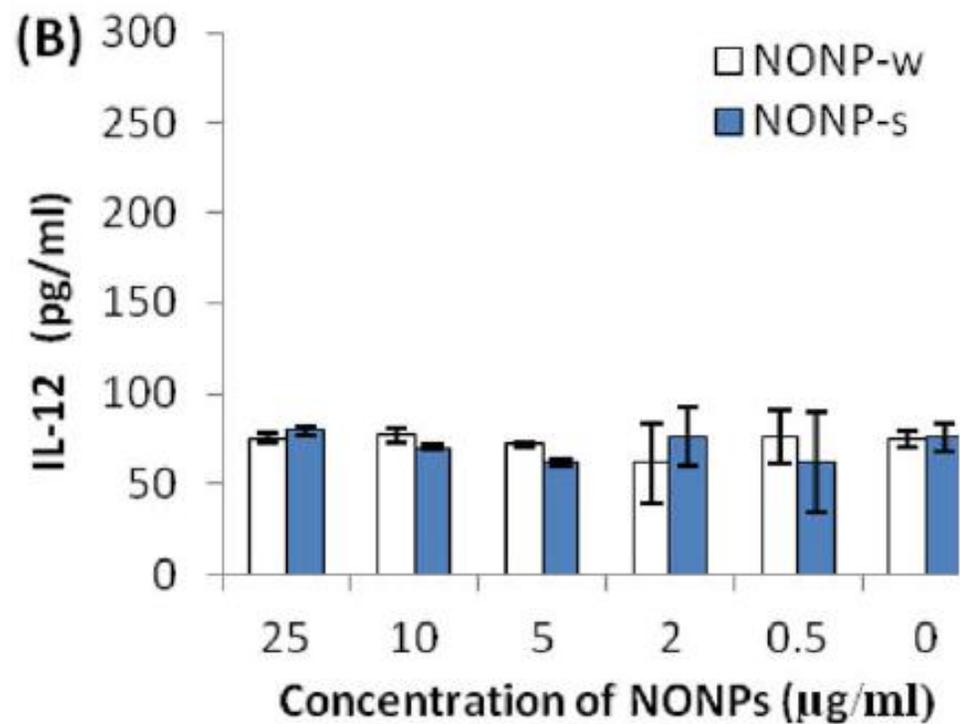


NONP-W和NONP-S作用后:

RAW264.7 细胞分泌的肿瘤坏死因子TNF- α 量 (约为对照组的3~39倍)显著高于对照组, 呈现剂量依赖性。NONP-W和NONP-S对肿瘤坏死因子TNF- α 的诱导无显著性差异。

纳米粒子作用24h后RAW 264.7细胞培养液中肿瘤坏死因子TNF- α 的浓度。

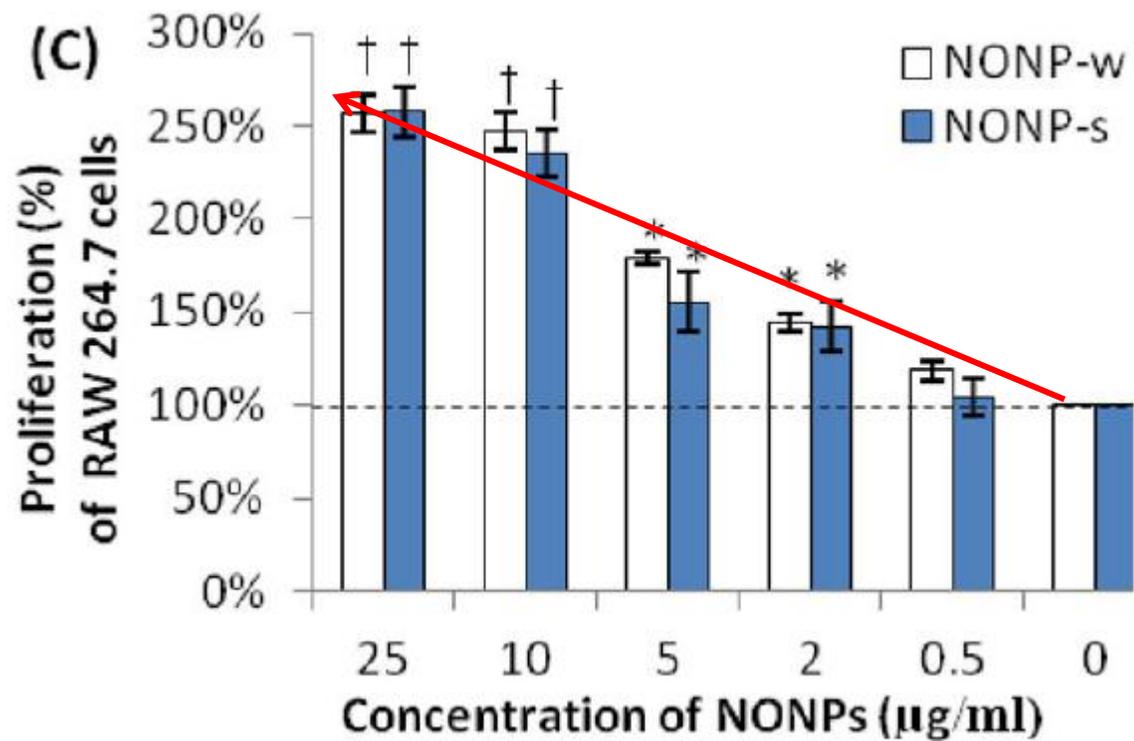
✈ 4.2、NONPs对 IL-12 浓度的影响



NONP-W和NONP-S作用后：
对IL-12没有明显的诱导作用。

NONPs 作用24h后，RAW 264.7细胞
培养中IL-12的浓度。

4.3、NONPs对RAW 264.7细胞增殖的影响



NONP-W和NONP-S作用后：
RAW 264.7巨噬细胞量随NONPs浓度的升高而增加。

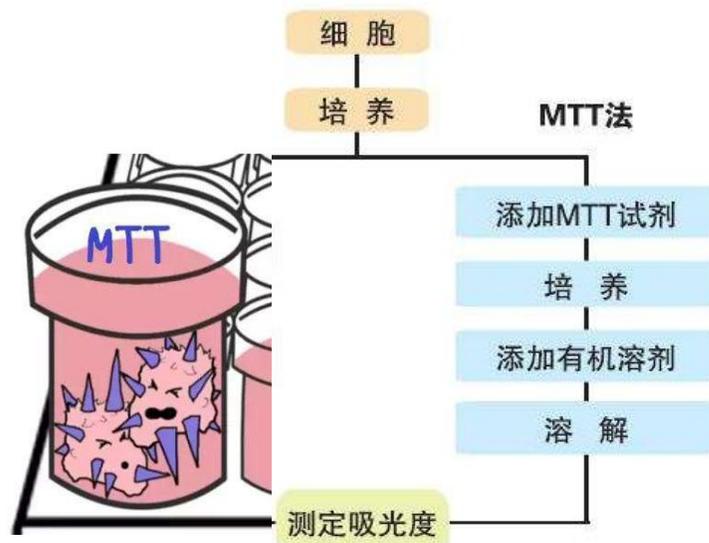
NONPs作用24h后，对RAW 264.7巨噬细胞增殖的促进作用。

✈ 4.4、巨噬细胞毒性的检测

MTT法： 又称MTT比色法，是一种检测细胞存活和生长的方法。

原理：活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。

应用：用于一些生物活性因子的检测、抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验以及肿瘤放射敏感性测定等。特点是灵敏度高、经济。



4、NONPs的免疫刺激作用 (小结)

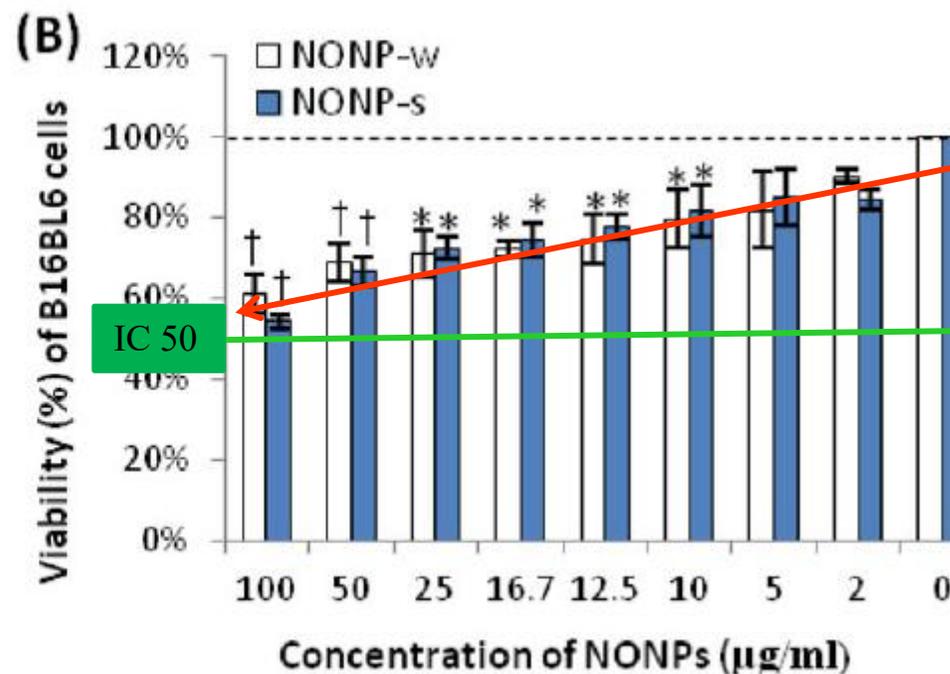
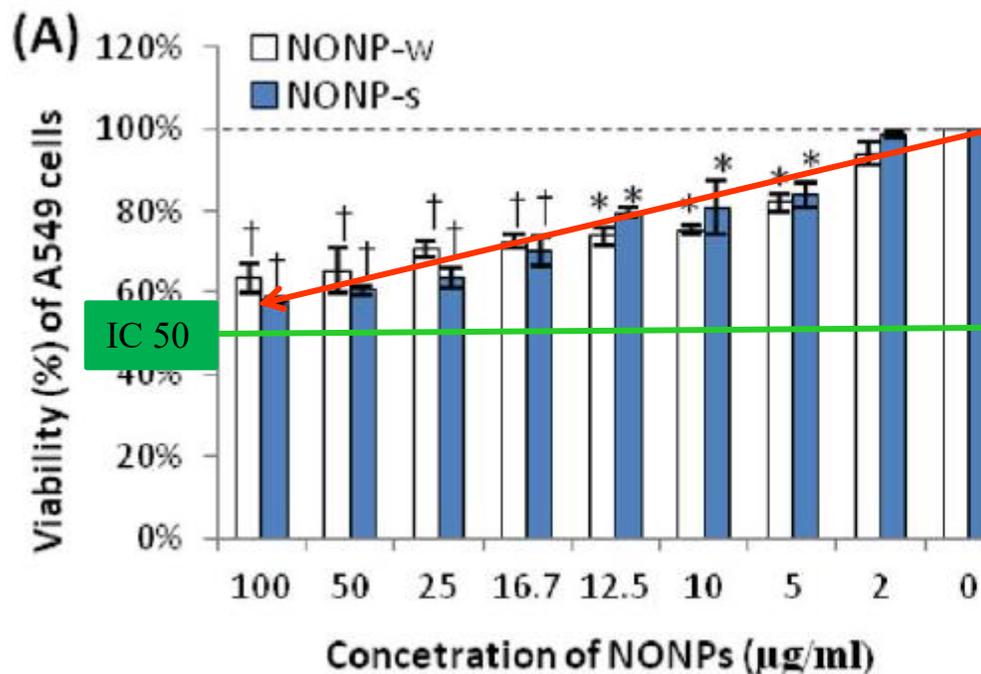


用MTT法检测NONPs对RAW 264.7巨噬细胞的细胞毒性，结果表明对RAW 264.7巨噬细胞无细胞毒性作用。

虽然，目前尚不清楚RAW 264.7巨噬细胞的增殖是否与肿瘤坏死因子TNF- α 的分泌有关，但巨噬细胞的增殖有助体内免疫功能的调节，从而表明*Arthrotrrys oligospora*产生的NONPs具有潜在的免疫刺激作用。

5.1、NONPs对肿瘤细胞的毒性作用

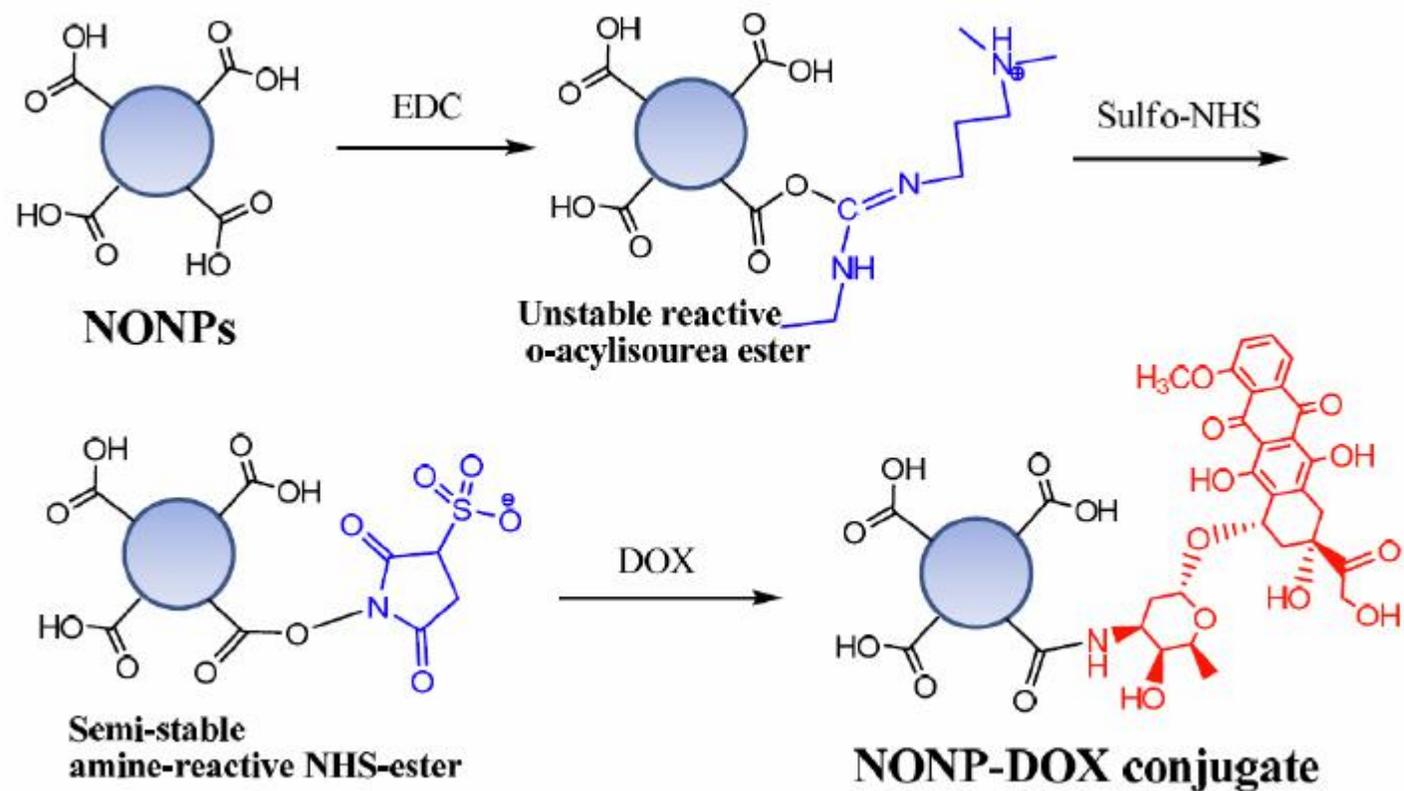
使用人肺癌A 549 细胞和小鼠黑色素瘤 B16BL6 细胞 (2-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。



NONPs对两种肿瘤细胞的 IC 50 估计均大于100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

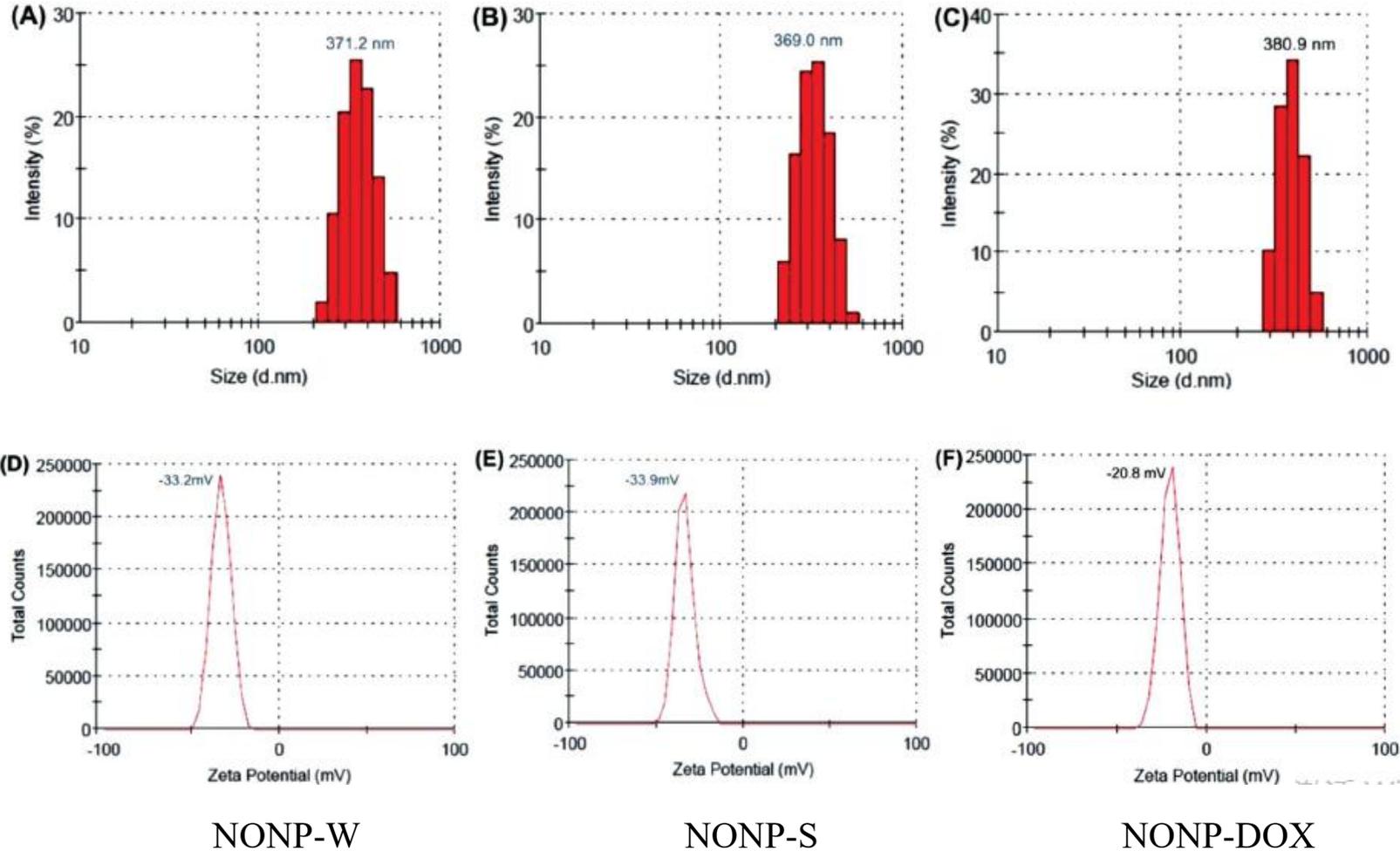
表明：NONPs与某些抗肿瘤药物相比，其细胞毒性作用较小。

5.2、NONP-DOX对肿瘤细胞的毒性作用



通过NONPs与抗肿瘤药物阿霉素(DOX)结合形成NONP-DOX, 检测NONPs是否能作为潜在的抗癌药物载体。

5.2、NONP-DOX对肿瘤细胞的毒性作用

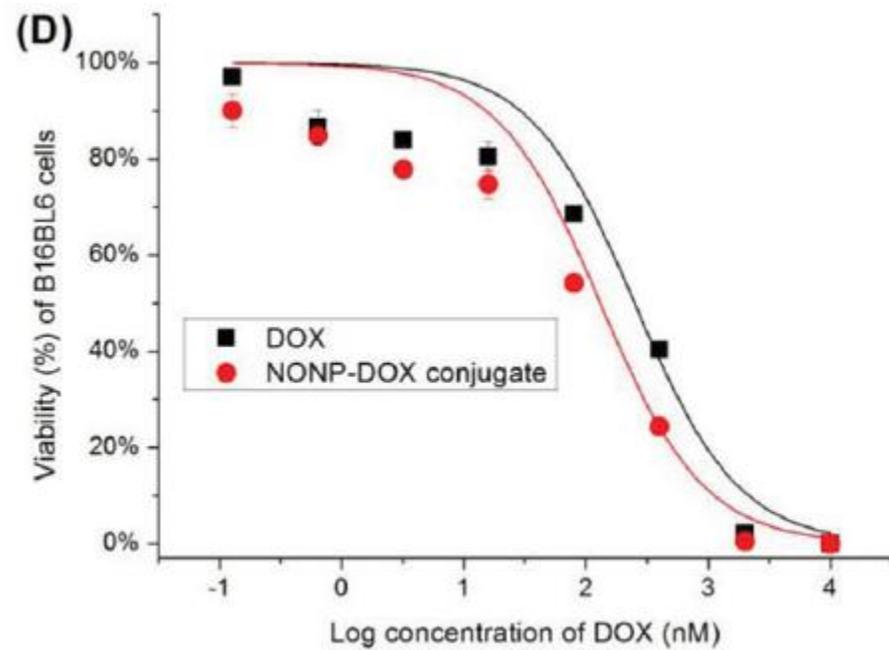
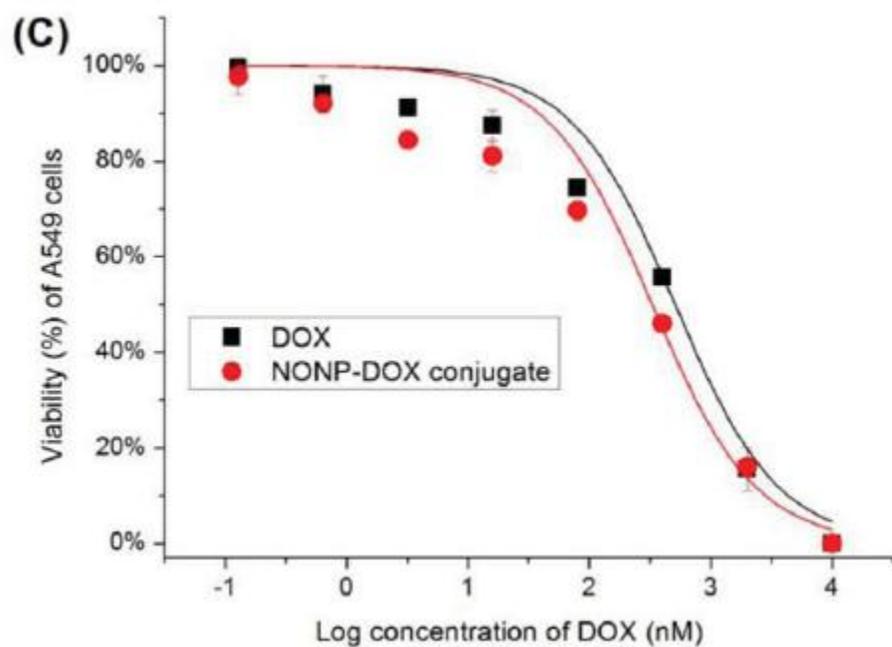


NONP-DOX:

平均尺寸：约为380 nm，与两种NONPs相比，NONP-DOX结合物的粒径无显著性差异。

Zeta电位：由-33 mV 增加到-20 mV。

5.2、NONP-DOX对肿瘤细胞的毒性作用



与游离DOX相比，NONP-DOX结合物对两种细胞均表现出较强的剂量依赖性抑制作用。

✈️ 5.2、NONP-DOX对肿瘤细胞的毒性作用

Table 3. IC₅₀ values [nM] of NONP-DOX conjugates and free DOX on melanoma and lung cancer cells (48 h).

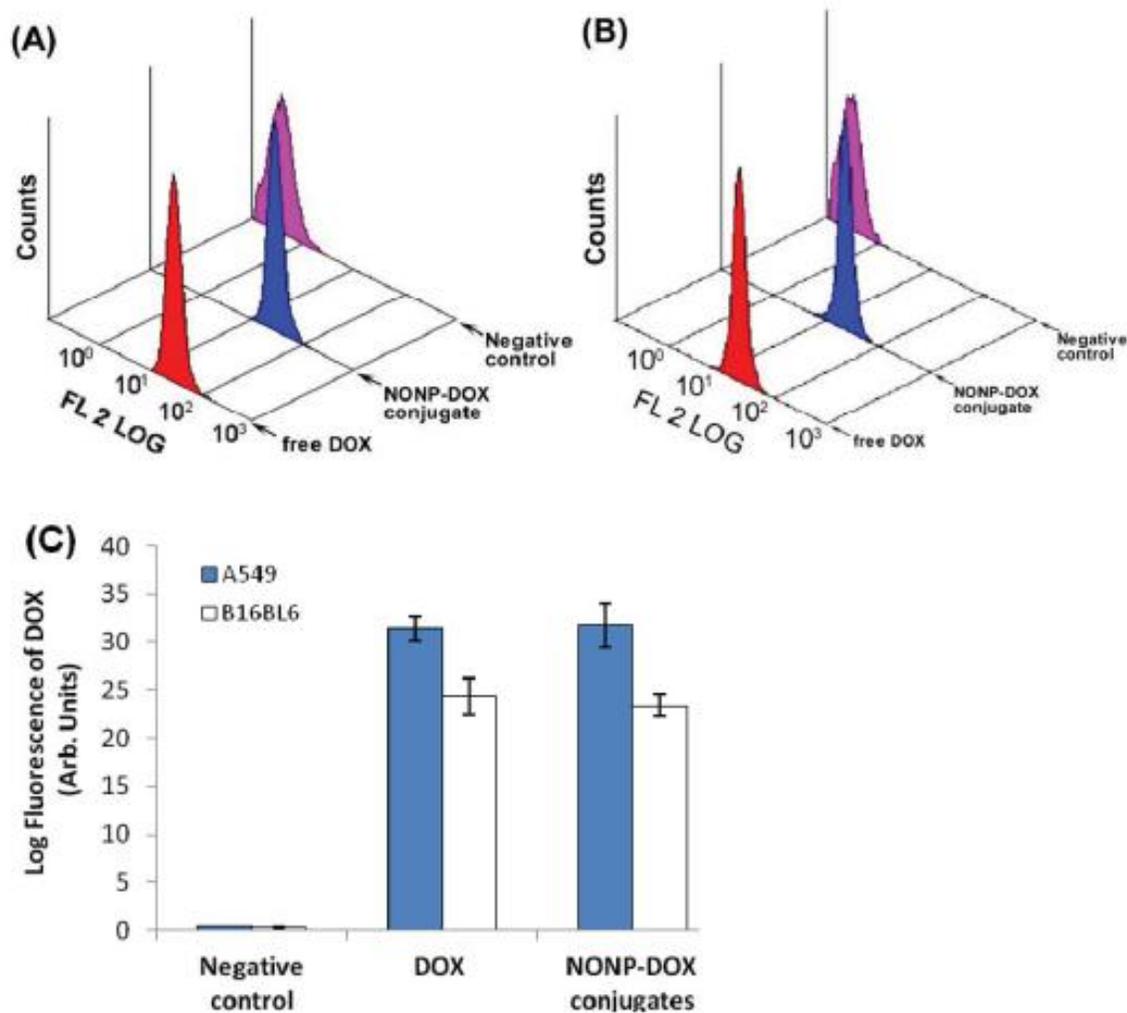
	Lung cancer A549 cells	Melanoma B16BL6 cells
Free DOX	551.71 ± 36.72	254.22 ± 11.35
NONP-DOX conjugates	342.34 ± 57.17*	139.93 ± 28.30*
NONP ctrl	>100 µg/mL	>100 µg/mL

IC₅₀ was determined from cell survival plots using “DoseResp” function of OriginPro 8.0; *P < 0.05, as compared with free DOX.

NONP-DOX结合物对两种细胞增殖的抑制率高于游离的DOX。

NONP-DOX 结合物和游离DOX的IC₅₀值表明，DOX与NONPs结合，具有协同的细胞毒性效应。

6、NONP-DOX在肿瘤细胞中的摄取和分布



使用流式细胞仪和共聚焦显微镜法进一步检测NONP-DOX结合物在细胞内的摄取和分布。

在 10μ 的DOX浓度下，游离DOX和NONP-DOX结合物的DOX荧光没有显著性差异。

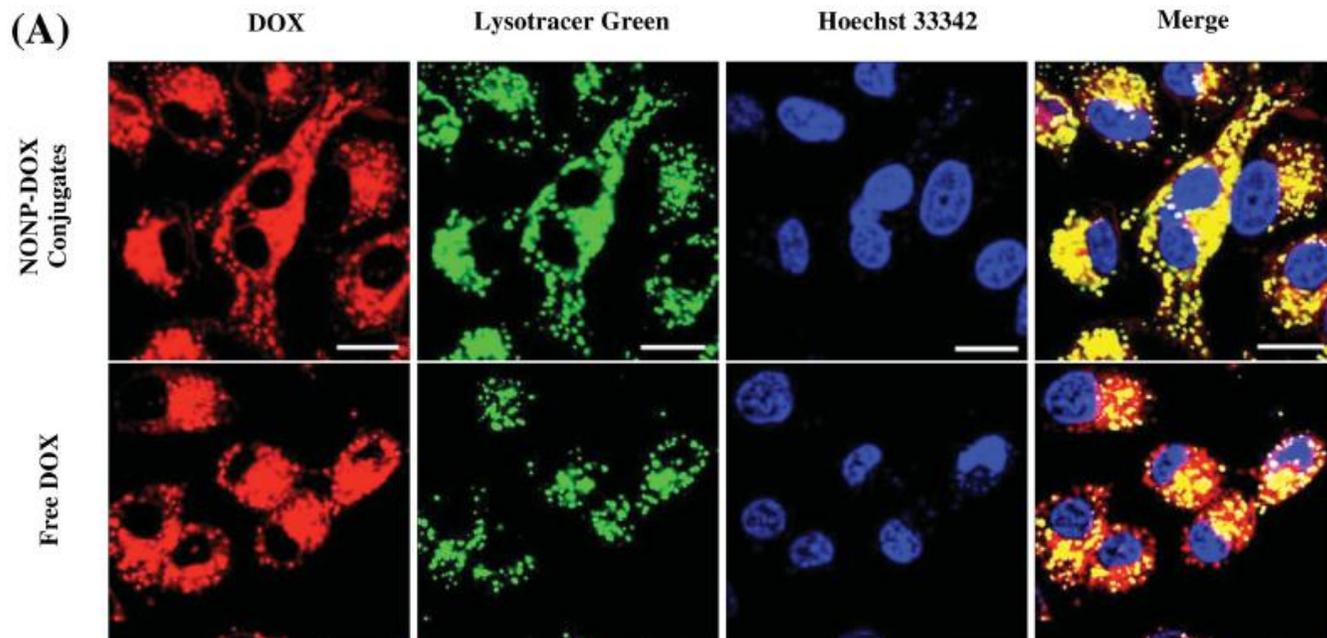
(A)人肺癌A549细胞和(B) 小鼠黑素瘤B16BL6细胞摄取NONP-DOX的流式细胞分析

6、NONP-DOX在肿瘤细胞中的摄取和分布



为了进一步观察NONP-DOX结合物的亚细胞分布，使用核选择染料(Hoechst 33342，蓝色)和酸性内溶酶体选择染料(Lyso Tracker Green DND-26)分别标记细胞核和内小体/溶酶体(内溶酶体)，共聚焦显微镜进行观察。

A549细胞



1、NONP-DOX和游离DOX在细胞内的分布不同。

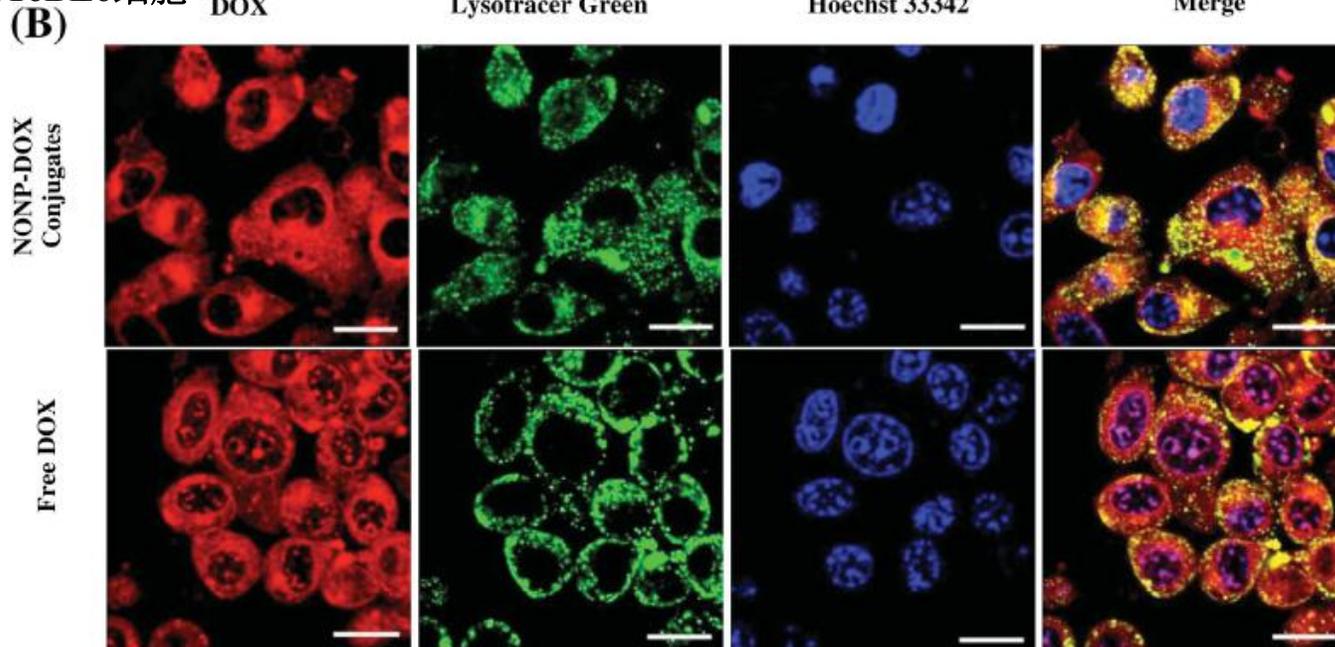
NONP-DOX：大部分DOX主要位于内溶酶体室中。

游离DOX：大部分位于内溶酶体外。

纳米颗粒主要通过胞吞作用内化，通常主要存在于内体或溶酶体内（Iversen *et al.*, 2011），NONP-DOX结合物也可能存在胞吞作用，使之进入溶酶体内。

用NONP-DOX结合物处理的两种细胞中都没有明显的核分布，原因可能是由于孵育的4小时期间，NONP-DOX被隔离在内溶酶体区室中造成的。

B16BL6细胞





PART 04

Conclusions





Conclusions

1、真菌静置培养方法的建立。

2、通过SEM, AFM对纳米粒子进行观察。

3、在免疫制剂以及抗肿瘤药物方面的潜在应用。



Conclusions



01

本研究建立了一种新的培养方法-**真菌静置培养法**，在不受培养基中固体介质污染或干扰的情况下，对*Arthrobotrys oligospora*的生长进行了实时监测，观察了纳米粒子的产生情况，收集所产生的纳米粒子并进行纯化，用于后续研究。





通过扫描电镜和原子力显微镜首次发现真菌分泌的大量球形纳米颗粒。据推测，*Arthrobotrys oligospora* 分泌的 NONPs 与三维网络捕获物的形成无关，而是从生长的菌丝体中分泌出来的。

进一步的分析表明，真菌 NONPs 的平均尺寸为360~370 nm，zeta 电位为-33 mV，pH 6.0。NONPs 含有约28 μ g/mg的糖胺聚糖和约550 μ g/mg 的蛋白质。



Conclusions



NONPs在作为免疫刺激剂和抗肿瘤药物方面具有的潜在应用能力。可明显诱导RAW264.7小鼠巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子TNF- α 。对小鼠黑色素瘤B16BL6与人肺癌A 549细胞有轻微的细胞毒性作用。与DOX结合均有协同杀伤作用。

因此，它们可能在肿瘤免疫化疗中发挥多功能的作用，预期体内会出现化疗，药物递送和免疫调节的协同抗肿瘤效力。

03





Conclusions

本研究为微生物在可控条件下制备新型有机纳米粒子 (NONPS) 提供了一种新的方法, 为今后利用合成生物学控制有机纳米粒子的合成开辟了新的途径。



请各位老师批评指正



