

淺談奈米微粒進出細胞的行為模式及機制

Cellular Trafficking of Nano- or Micro-Scaled Particles

瞿立威、吳立真、楊重熙

Li-Wei Chu, Li-Chen Wu, Chung-Shi Yang

Nano 來自希臘字，為 10 的冪次字首，奈米 (nanometer, 10^{-9} m) 即為一公尺的十億分之一，約是人類頭髮直徑的百分之一，10 倍於氫原子直徑大小 (10^{-10} m)，是一種長度單位，十億分之一公尺。當物質小到奈米尺寸時，將有別於塊材或分子狀態，會產生新特性，包括量子效應及表面效應等。這樣新特性的產生引發許多新的用途，當然新的問題也伴隨著產生。一般而言，小分子藥物進入身體後擴散至全身，雖然治療了病灶卻也帶給其他正常組織副作用。而利用奈米微粒當作藥物載體，可持續適量的釋放藥物，避免短時間內大量藥物攝入，造成強烈副作用。此外，奈米微粒藥物載體也可能躲避免疫系統，並有效地將藥物送入目標細胞，達成降低副作用的目的。但要設計這些新穎藥物傳遞模式，必須先通盤了解奈米微粒進入目標細胞的機制，才能有效治療病灶。隨著新穎奈米材料的應用越普及，人們暴露於這些奈米材料中將不自覺地攝入體內，而這些奈米物質對人體的影響也需加以評估，以減少其帶來的傷害，這些安全評估須建立在奈米微粒進入組織細胞所產生的影響上。本文引用目前發表之相關科學報導，深入淺出地討論當生物基本構成單元的細胞遇到奈米微粒所發生的現象。

"Nano" may refer to the SI prefix representing 10^{-9} . Nanometer stands for one billionth of a meter. The property of materials at nanoscale is markedly different from their counterparts at bulk levels due to the quantum effects. The development of nanotechnology emerges dynamically, and this technique has been applied widely, such as in nanomedicine. Once drug molecules enter the systemic circulation, they are generally distributed to the tissues, including normal and abnormal parts, leading to serious side effects. The application of nanomedicine, taking drug delivery as an example, is able to significantly reduce non-specific drug accumulation and prolong drug release. Additionally, drug encapsulated nanoparticles can be engineered to escape immune surveillance and to achieve higher targeting efficiency. In order to design nano-drugs with optimal performance, the understanding of the processes operated by cells on uptaking and removal of these nanoparticles becomes vital. The properties of nanoparticles, such as size, shape, surface charges, and surface modification with ligands, are discussed herein to give a clear picture on how cell responses to these novel ultra-small particles.

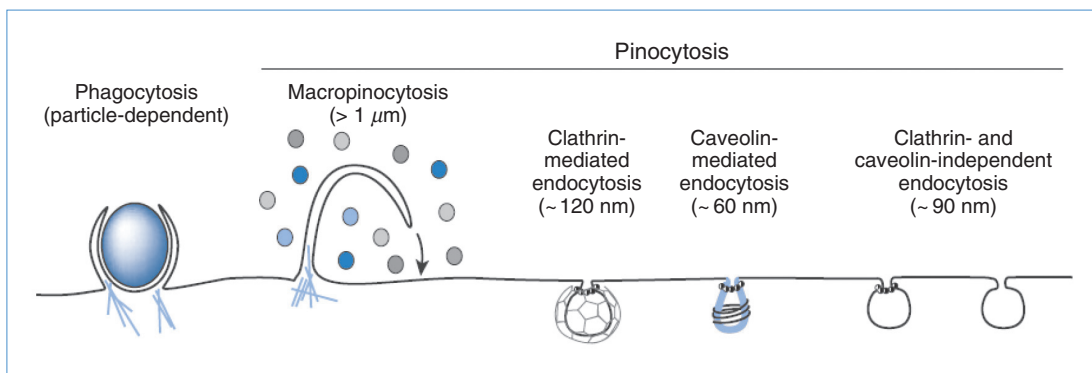


圖 1. 胞吞作用之機制⁽¹⁾。

一、物質進入細胞的方式

細胞膜是主要由磷脂質構成具可流動性之脂質雙層結構，將細胞質與細胞外環境加以區隔，並且控制著細胞內外各種大小分子的進出，以維持細胞正常的生理功能。一些必需性的小分子，如胺基酸、醣類及離子等，可藉由鑲嵌於細胞膜上的蛋白質泵浦或通道進入細胞。而其他巨分子物質因尺寸太大，無法通過這些蛋白質泵浦或通道，必須藉由一系列細胞膜形變、套疊、凹陷及融合的過程，將這些巨分子裹入微囊泡 (vesicle) 吞進細胞中，這個過程通稱為細胞內吞作用 (endocytosis)⁽¹⁾。

細胞內吞作用依照作用機轉及形態的不同，可粗分為細胞吞噬作用 (phagocytosis) 及胞飲作用 (pinocytosis)，其中細胞吞噬作用並非發生在所有

哺乳動物的細胞上，僅於一些專門進行免疫作用相關的細胞才能觀察到，主要是用於吞噬外來病原誘發免疫作用。胞飲作用則在所有細胞都能觀察得到，是細胞用於攝取營養物或生長因子的方法之一。進一步仔細區分胞飲作用，依照參與蛋白質及吞入物的不同至少可分為四種不同的機制，分別為 macropinocytosis、clathrin-mediated endocytosis、caveolin-mediated endocytosis 以及 clathrin- and caveolin-independent endocytosis (圖 1)。這些機制互異而受到調控的細胞內吞作用路徑影響許多複雜的生理過程，諸如賀爾蒙的訊息傳遞、免疫監控、抗原分子的呈現，以及細胞或組織的體內平衡等⁽¹⁾。

有趣的是，上述這些細胞內吞作用的路徑亦是外來病原藉以利用進入寄主細胞的方式。如圖 2 所示，寄主細胞主要有三種路徑 (phagocytosis、

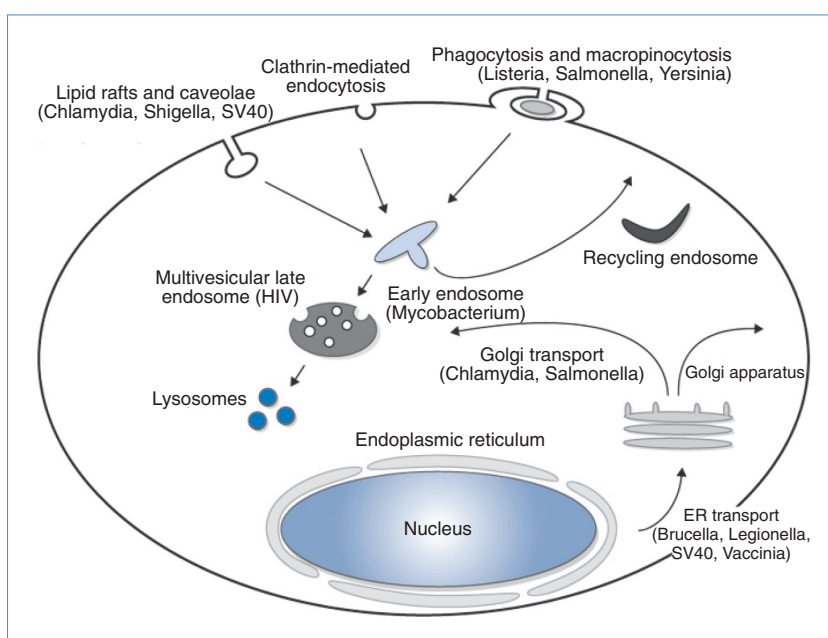


圖 2. 外來病原藉以利用進入寄主細胞的方式⁽²⁾。

clathrin-mediated endocytosis、caveolin-mediated endocytosis) 被外來病原利用進行感染⁽²⁾；寄主細胞吞入病原體後，隨著細胞內吞作用路徑將其分別集中於 early endosome、recycling endosome、multivesicular late endosome、lysosome 等胞器中，由於這些胞器所需的蛋白質及脂質膜等材料是由內質網及高基氏體分泌並運送而來，病原體便進一步透過特有的機制干涉這些細胞分泌路徑⁽²⁾，將病原蛋白質及遺傳物質運送至目標處而致病。

二、影響奈米微粒進入細胞的特性

在自然界中，無論是細胞所需的生物巨分子，或是會感染細胞的病毒顆粒，其尺寸約是數個奈米到數百奈米之間，這與筆者所討論的奈米粒子尺寸範圍是相同的；這不難讓人聯想到奈米粒子會藉由上述的細胞內吞作用路徑進入細胞。先前的報導便提出一種概略的說法，當奈米粒子的尺寸小於 100 nm 能進入細胞當中，當尺寸小於 40 nm 時，則有機會進入細胞核，而尺寸進一步小於 35 nm，甚至能穿越血腦障壁進入大腦⁽³⁾。這樣的說法是粗略地建構於已知的細胞內吞作用路徑上。如圖 1 所示，常見的 clathrin-mediated endocytosis 所形成的微囊泡約 120 nm，與進入細胞的尺寸條件相符 (< 100

nm)，而常見於微血管內皮細胞運送物質的 caveolin-mediated endocytosis 所形成的微囊泡約 60 nm，則與穿越血腦障壁的條件相似 (< 35 nm)。

然而越來越多的實驗顯示這樣的概述並不能完全解釋奈米粒子進入細胞的全貌。有證據指出微米長的奈米碳管亦能進入細胞⁽⁴⁾，而許多僅數奈米大小的血漿蛋白，無法通過血腦障壁。這說明有其他許多的條件因素也影響著奈米粒子進入細胞的能力。因此以下分別針對奈米微粒之尺寸大小、形狀、表面電荷、專一性配體及蛋白質等影響因素逐步加以探討。

1. 尺寸

奈米微粒的尺寸對於進入細胞的效應是目前研究比較清楚的。在 2006 年由 Chithrani 等人發表在 Nano Letters 期刊的報導有了初步系統性的研究；文章內容指出，利用 Hela 細胞分別處理 14、30、50、74 及 100 nm 的金奈米粒子進行研究，發現雖然所有尺寸的金奈米粒子皆能進入 Hela 細胞，然而以 50 nm 的粒子進入最多⁽⁵⁾(圖 3)，這與直觀上認為尺寸越小越容易進入細胞不同。2008 年 Roiter 等人發表關於奈米粒子與脂質膜相互作用的文章或許可提供部分的解釋。如圖 4 所示，藉由存在不同尺寸二氧化矽奈米粒子的表面形成脂質膜覆蓋其上，

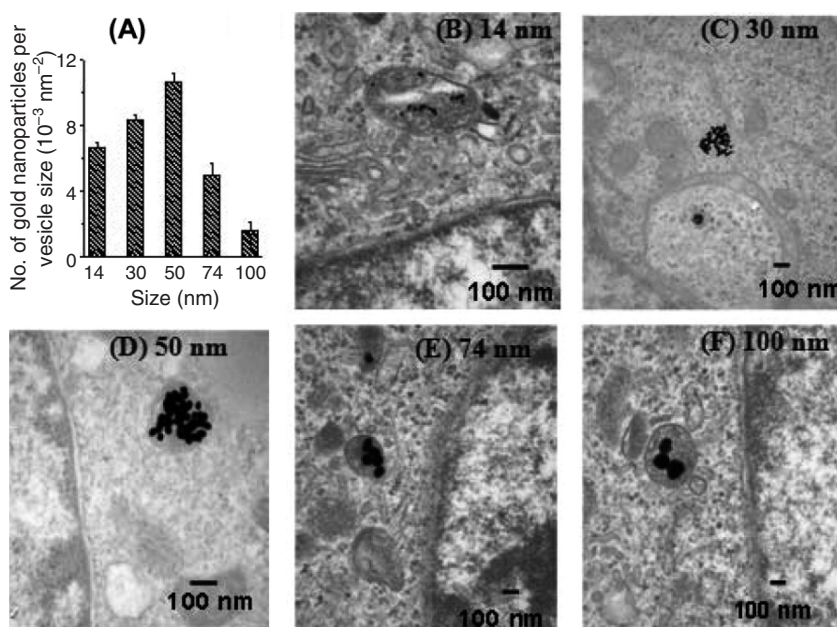


圖 3. 奈米微粒尺寸對於進入細胞的效應⁽⁵⁾。

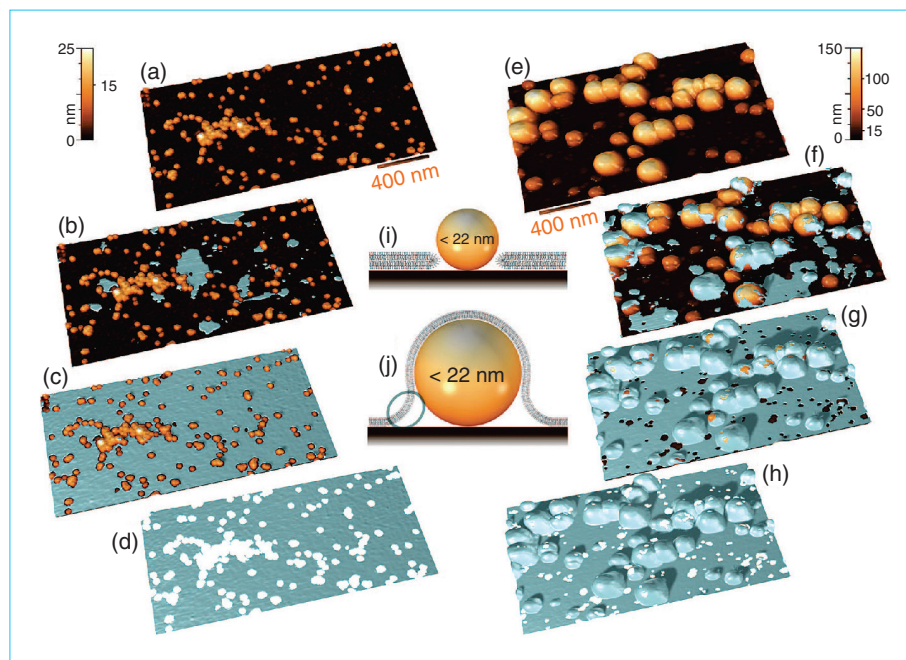


圖 4. 奈米粒子尺寸與細胞膜形成囊泡曲率的相互關係⁽⁶⁾。

發現脂質膜無法覆蓋小於 22 nm 之粒子表面，而產生破洞，大於 22 nm 則能有效地覆蓋形成囊泡。這是因為脂質膜覆蓋小於 22 nm 之粒子時，其表面曲率過大不穩定，而無法形成囊泡。覆蓋大於 22 nm 之粒子時的曲率則在脂質膜承受範圍，故可形成囊泡⁽⁶⁾。所以在進行細胞內吞作用時，細胞以囊泡包裹吞入奈米粒子，亦須同時討論奈米粒子尺寸對細胞膜形成囊泡曲率的影響。相類似的研究結果亦發表於 2008 年的 *Nature Nanotechnology* 期刊，分別利用 2–100 nm 不同尺寸的金奈米粒子在結合 Herceptin 後，透過與 ErbB2 受體作用，以誘發細胞內吞作用時，其中以 40–50 nm 的粒子效果最為顯著⁽⁷⁾ (圖 5)。

2. 形狀

目前奈米粒子形狀對進入細胞效應的研究，基本上是尺寸效應研究的延伸。同樣在 2006 年 Chithrani 等人的報導已經提及形狀的影響，透過 14 × 40 nm (長寬比 1:3) 及 14 × 74 nm (長寬比 1:5) 的金奈米棒處理 HeLa 細胞，結果顯示長寬比越大，進入細胞的奈米棒越少。就 100 nm 以下的奈米粒子而言，長寬比越大，似乎不利於進入細胞⁽⁵⁾。然而若將研究尺寸放大到 100 nm–10 μm 的範圍

時，形狀效應則產生不同的結果。DeSimone 等人在 2008 年於 *PNAS* 期刊報導，藉由非潮溼模板中顆粒複製技術 (particle replication in non-wetting templates)，製作出一系列長寬比極為專一的 PRINT[®] 粒子，以 HeLa 細胞進行實驗發現 150 × 450 nm (長寬比 1:3) 的粒子較其他低長寬比的粒子 (如

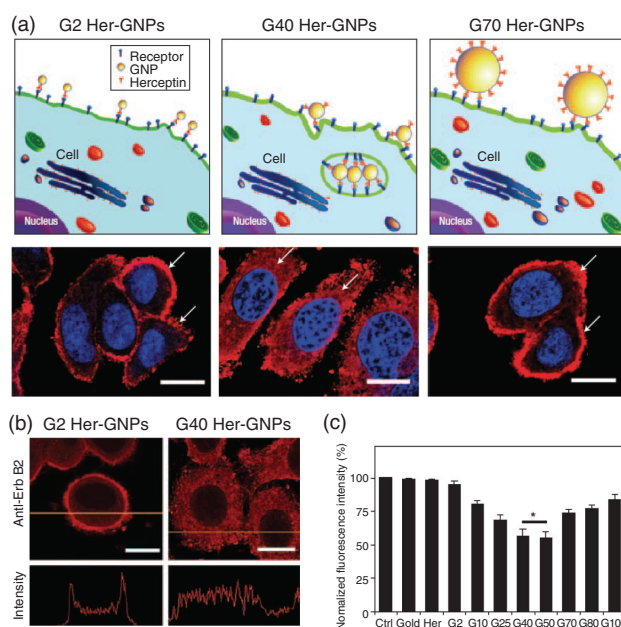


圖 5. 金奈米粒子尺寸與其進入細胞的效應⁽⁷⁾。

200 × 200 nm) 進入細胞快約 4 倍，而且顯然更能深入細胞內部。自然界中所存在尺寸相似的細菌長桿形結構也許能協助解釋，為何高長寬比的 PRINT[®] 粒子進入細胞能比低長寬比粒子更迅速且有效⁽⁸⁾。

3. 表面電荷

一般認為由磷脂質構成的細胞膜表面攜帶著負電荷，所以奈米粒子表面電荷如果為正電，將有助於吸附在細胞膜表面增加進入細胞的效率。在 2009 年 Cho 等人發表於 Nano Letters 期刊的報導指出，利用檸檬酸-金奈米粒子 (帶負電)、PVA-金奈米粒子 (中性) 及 PAA-金奈米粒子 (帶正電)，以 SK-BR-3 細胞進行實驗，發現帶正電的 PAA-金奈米粒子進入細胞的速率約是其他電荷奈米粒子五倍⁽⁹⁾ (圖 6)。然而表面電荷會受週遭溶液環境條件影響而改變，而環境中生物分子的沾附亦會造成影響。此外，Ehrenberg 等人利用 polystyrene 分別修飾羧基 (-COOH)、胺基 (-NH₂) 及脒基 (-CNHNH₂) 形成一系列不同電荷的奈米粒子，並以 HUVEC 細胞進行實驗。結果發現修飾羧基的奈米粒子雖然帶負

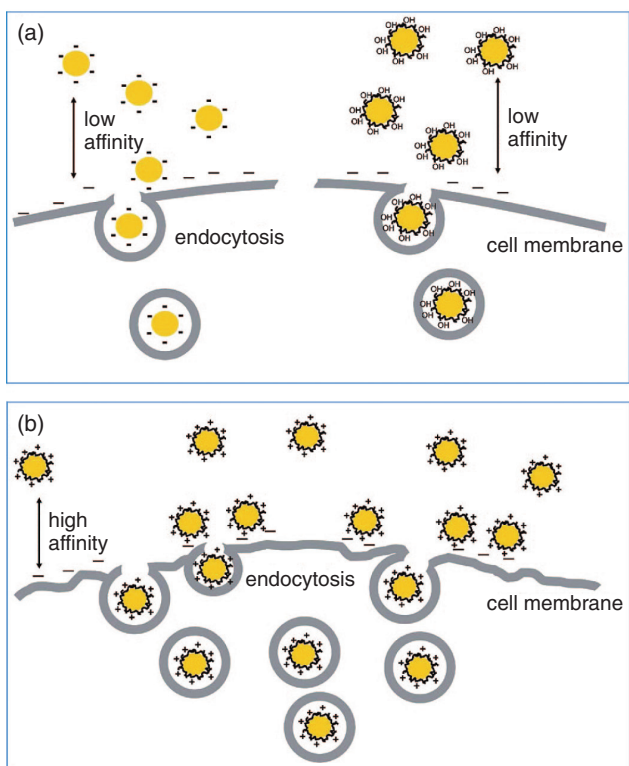


圖 6. 奈米粒子表面電荷與進入細胞效率之影響⁽⁹⁾。

電，但由於吸附大量的血清蛋白，而使細胞攝入的含量最多，其他表面修飾的奈米粒子則依吸附血清蛋白的多寡，而決定其細胞攝入的含量⁽¹⁰⁾ (圖 7)。

4. 專一性配體或蛋白質

利用專一性配體或蛋白質增加進入細胞已是常用的藥物傳遞策略。一方面，透過配體與細胞膜表面的受體結合來刺激誘發細胞進行細胞內吞作用；另一方面，在癌症治療時選用癌細胞上過量表現的受體當作目標，便成為有效的標靶治療。目前臨床研究常用的專一性配體與蛋白質有運鐵蛋白 (transferrin)、表皮生長因子 (EGF) 及葉酸 (folate)⁽¹¹⁾ 等。以運鐵蛋白為例，當運鐵蛋白與運鐵蛋白受體結合，透過 clathrin-mediated endocytosis 進入細胞當中。如圖 8 所示，利用運鐵蛋白受體為標的已發展出許多癌症治療策略，包括運鐵蛋白修飾的微脂體抗癌藥、放射性核種及基因載體，或是運鐵蛋白修飾的病毒粒子、高分子聚合物及奈米粒子等⁽¹²⁾。

此外，利用病毒外鞘蛋白片段所發展出的活性胜肽也能增加奈米粒子進入細胞，例如由 HIV 病毒外鞘蛋白片段篩選出的 TAT 胜肽便能大量誘導奈米粒子進入細胞。在 2007 年 Ruan 等人發表於 JACS 期刊的報導，詳盡地描述了 TAT 胜肽結合量子點大量進入細胞的情形。報導中提到利用轉碟共

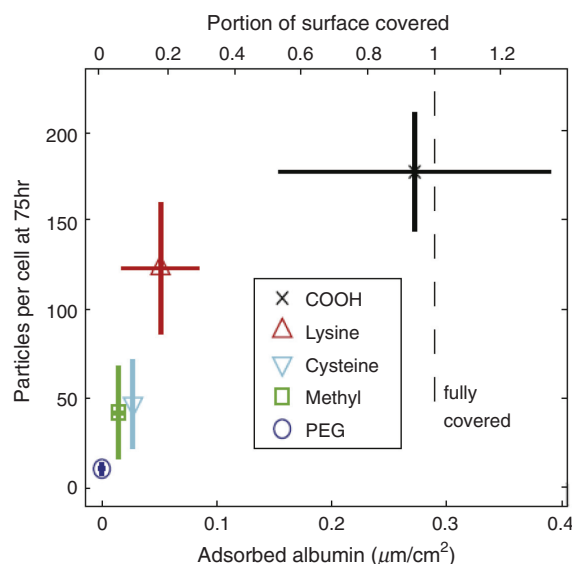


圖 7. 奈米粒子表面電荷吸附蛋白能力與進入細胞速率之效應⁽¹⁰⁾。

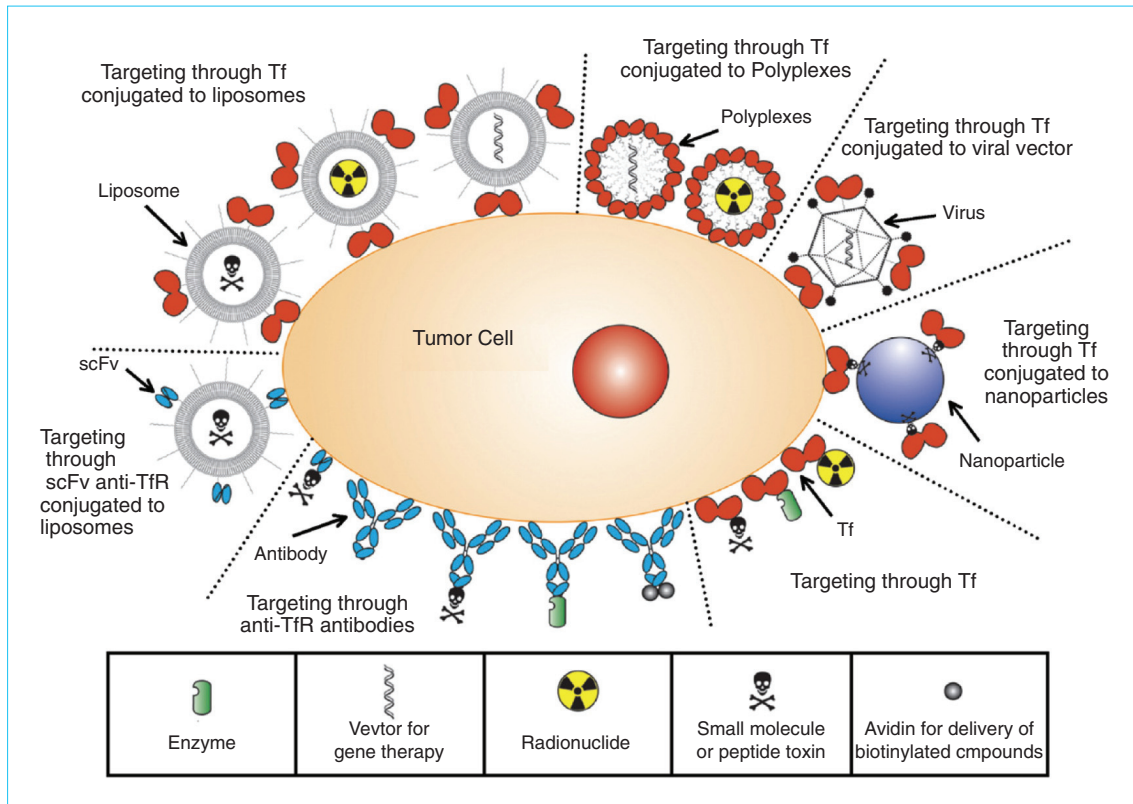


圖 8. 以運鐵蛋白受體為標的之癌症治療策略⁽¹²⁾。

轉焦顯微鏡技術 (spinning disk confocal microscope) 的動態共軛焦影像，觀察到極短時間間距所發生的 TAT-QD 與細胞的交互作用。其中包括剛開始 TAT-QD 大量附著於細胞膜表面，並透過 macropinocytosis 大量進入細胞中，然後附著於細胞微囊泡內側及後續在細胞內運動的狀況⁽¹³⁾ (圖 9)。一般認為 TAT 胜肽由許多鹼性胺基酸組成而帶正電荷，能吸附於帶負電荷的細胞膜表面；亦有報導指出除了電荷吸附外，TAT 胜肽的構形也有助於與細胞膜的交互作用⁽¹⁴⁾。此兩種作用皆輔助與 TAT 胜肽結合的奈米粒子能大量附著於細胞膜表面，進而被細胞吞入。

三、奈米粒子進入細胞中引發的作用及影響

對於藥物傳遞及造影而言，奈米粒子進入細胞只是達成目標的第一步，接下來是希望運送的藥物

能進一步與目標結合。以促進 DNA 損傷的抗癌藥物為例，藥物要能到達細胞核才能造成最佳的治療效果。然而藉由細胞內吞作用方式進入細胞的物質往往都會面臨侷限於 endosome 等胞器中，最後進入 lysosome 被分解為小分子的問題，為因應這種情形的發生，部分科學家即就 endosome escape 效應開始進行研究。目前研究認為如 TAT、poly arginine 等正電荷胜肽能夠促使進入 endosome 的微脂體與 endosome 膜進行交互作用，使得 endosome 膜與微脂體融合釋出微脂體水腔的藥物進入細胞質⁽¹⁵⁾ (圖 10)。

另一種質子海綿效應 (proton sponge effect) 理論認為，當攜帶大量正電荷的高分子聚合奈米粒子 (如 PEI) 由細胞內吞作用進入 endosome 後，隨著 endosome 上的氫離子泵浦將氫離子導入 endosome 中，而聚集過多的正電荷，進一步使氫離子及水分子大量進入 endosome 來中和電性及滲透壓，最後迫使 endosome 被撐破，而釋出內容物⁽¹⁶⁾ (圖 11)。

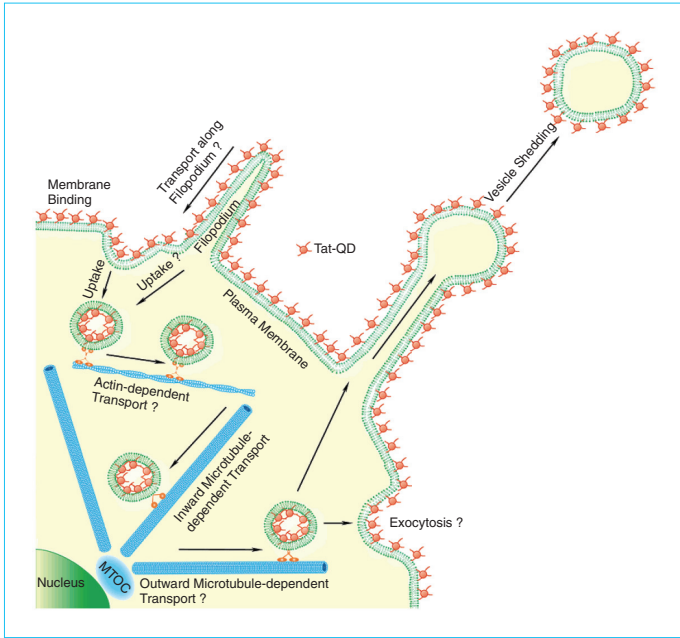


圖 9. TAT-QD 與細胞的交互作用⁽¹⁴⁾。

Endosome escape 有助於奈米粒子進入細胞後更有效地將藥物傳遞至目標處，然而讓原本在 endosome 內的物質釋入細胞質中，同時也造成細胞毒性的增加。尤其一些尺寸小於 100 nm 的無機

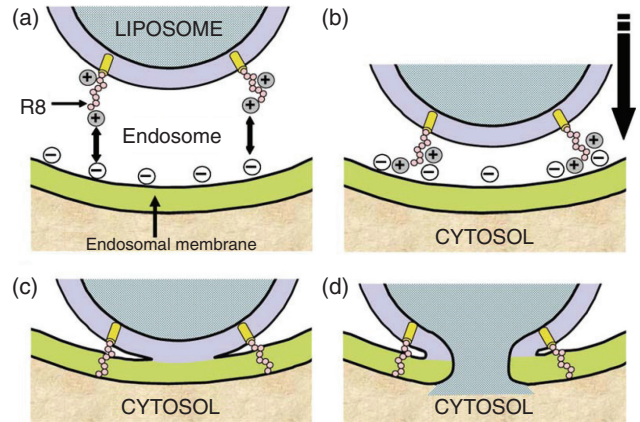


圖 10. 正電荷胜肽促使進入微脂體與 endosome 膜進行交互作用⁽¹⁵⁾。

材料粒子，其誘發自由基或釋出重金屬離子的能力增加許多，進入正常細胞後的影響也更加嚴重⁽¹⁷⁾。發表於 2009 年 Nature Nanotechnology 期刊 Bhabra 等人的報導甚至提到，進入細胞的 CoCr 奈米粒子，造成細胞中粒線體的損傷，並干擾 ATP 的訊息傳遞，透過細胞間的縫隙連接 (gap junction) 將訊息傳遞至其他細胞，進而造成其他細胞 DNA 的損傷⁽¹⁸⁾ (圖 12)。

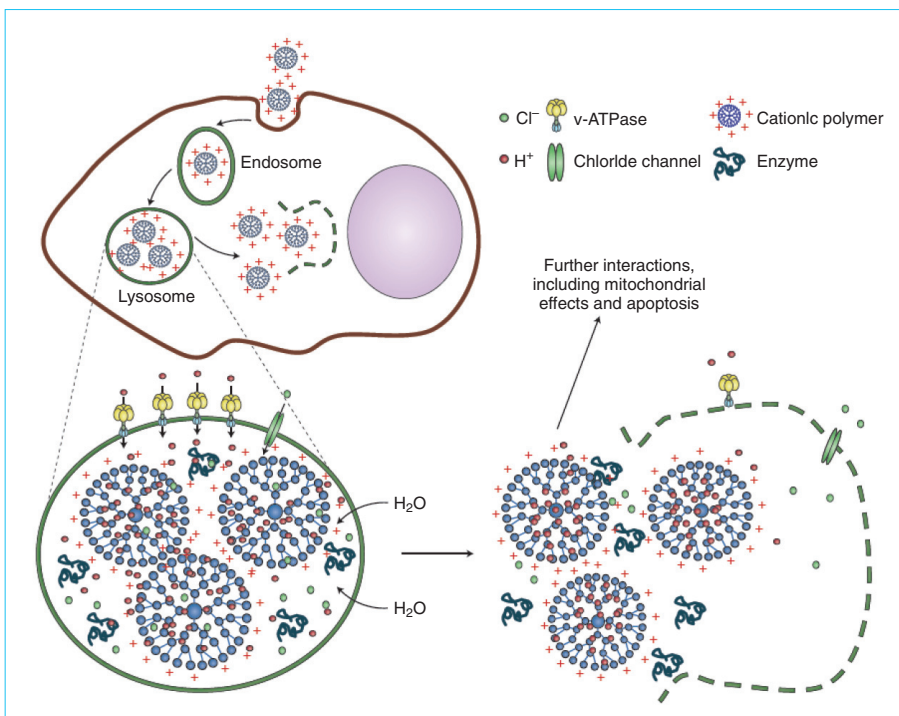


圖 11. 質子海綿效應⁽¹⁶⁾。

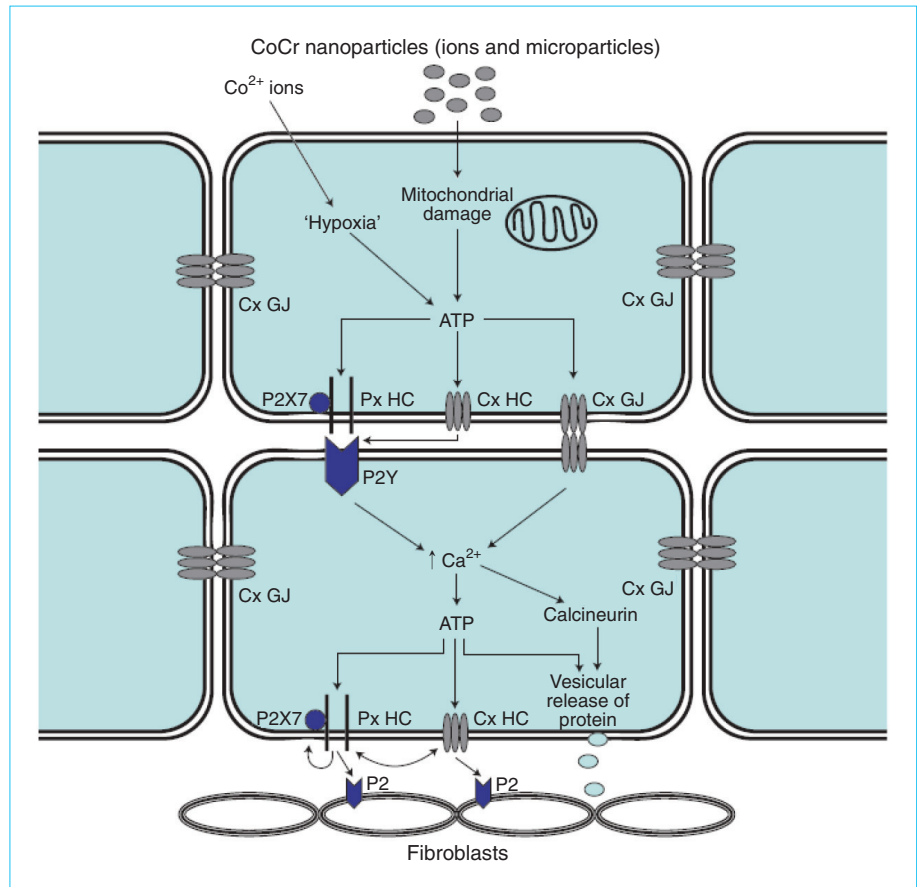


圖 12.
CoCr 奈米粒子藉由細胞間之訊息傳遞造成周邊細胞損傷⁽¹⁸⁾。

四、奈米粒子離開細胞的方式

有鑑於奈米粒子進入細胞達到的藥物傳遞功效及奈米粒子本身對細胞造成的影響，研究奈米粒子如何離開細胞將是下一步重要的課題。若是可以讓奈米粒子進入細胞完成藥物傳遞及造影等任務後能離開細胞，則奈米粒子本身對細胞的影響將降至最低。目前對奈米粒子離開細胞的研究相當少，對其機制的探討更是缺乏。在少數文獻中，2007 年 Chithrani 等人發表於 *Nano Letters* 的報導，提及尺寸及形狀對奈米粒子離開細胞的影響，文中提到將不同大小與形狀的金奈米粒子連接上運鐵蛋白，利用運鐵蛋白 recycling 至細胞表面的特性觀察各種奈米粒子 recycling 至細胞表面的速度。實驗結果顯示，隨著奈米粒子的尺寸增大，recycling 所需時間越長，意指越大的粒子越不易離開細胞⁽¹⁹⁾。2009 年 *ACSnano* 期刊 Jin 等人的報導，利用單一粒子追蹤技術 (single particle tracking) 亦得到類似

的實驗結果⁽²⁰⁾。除了利用運鐵蛋白 recycling 路徑外，理論上奈米粒子應該有許多其他途徑離開細胞，如前述圖 10 所示 TAT-QD 亦有可能附著於細胞膜隨著細胞分泌微囊泡離開細胞⁽¹³⁾。圖 13 所示為目前已知的細胞分泌與胞吐路徑⁽²¹⁾，進入細胞的奈米粒子或許有機會藉由這些路徑離開細胞，不過這還需要更多科學證據加以證明。

五、結論

隨著奈米科技的進步，越來越多的新穎奈米微粒被合成出來，無論是有機、無機或複合材料的微粒將有可能大量運用於未來生活的許多層面。奈米微粒藉由各種細胞生理活動進出細胞，因此設計奈米微粒之組成材料、微粒大小形狀及表面電荷等參數，即可調控粒子進出細胞之效率。在目前生醫領域中，藥物傳遞即為使用奈米微粒較廣泛的應用之一，藉由奈米微粒幫助原本副作用極高的藥物，以

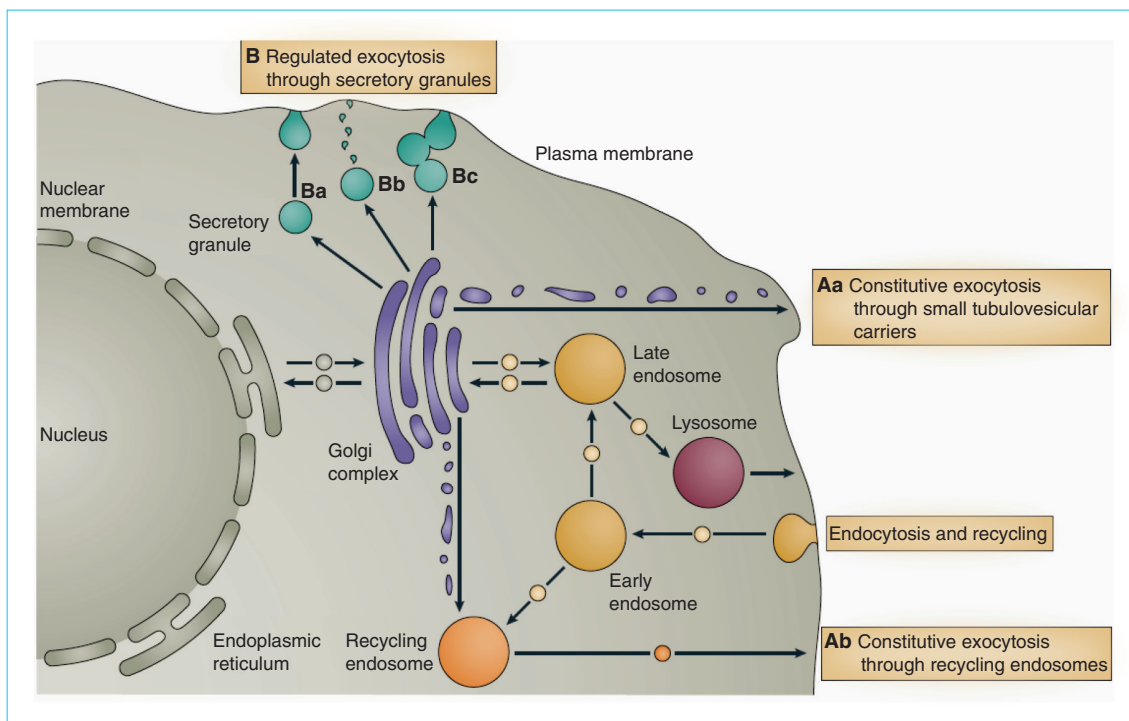


圖 13.
細胞分泌與
胞吐路徑⁽²¹⁾。

更低的劑量集中於病灶，以增加療效，將可大大降低副作用產生。雖然奈米科技在生物醫學領域提供許多可能性，但目前仍多在研究階段，實際能應用於臨床的並不多。以癌症標靶藥物為例，雖然能降低藥物副作用，但病患五年存活率並無顯著提升。此外，其他問題如奈米微粒的靶向能力、偏低的藥物於腫瘤組織累積量等，都顯著影響奈米科技在藥物傳遞方面的應用。因此相關研究，例如尋找更具專一性的腫瘤抗原與腫瘤標誌，以減少奈米微粒累積於非腫瘤組織且(或)能鎖定癌幹細胞，以及如何克服因腫瘤組織高壓而不易送達的問題等，皆是日後研究的主題。另外，對其他層面而言，一些以無機材料製作的新穎奈米微粒，其於生物體的安全性，仍是有所疑慮的。了解奈米微粒如何進出細胞，便能對所造成的生理效應做出評估，進一步做好完善的風險管控。畢竟目前沒人知道當一些原本不會出現在細胞內的物質以奈米尺寸進入細胞後，會產生何種後果。

參考文獻

1. S. D. Conner and S. L. Schmid, *Nature*, **422** (6927), 37 (2003).
2. C. R. Roy and F. G. van der Goot, *Nat Cell Biol*, **5** (1), 16 (2003).
3. K. A. Dawson, A. Salvati, and I. Lynch, *Nat Nanotechnol*, **4** (2), 84 (2009).
4. Q. Mu, D. L. Broughton, and B. Yan, *Nano Lett*, **9** (12), 4370 (2009).
5. B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, and W. C. Chan, *Nano Lett*, **6** (4), 662 (2006).
6. Y. Roiter, M. Ornatska, A. R. Rammohan, J. Balakrishnan, D. R. Heine, and S. Minko, *Nano Lett*, **8** (3), 941 (2008).
7. W. Jiang, B. Y. Kim, J. T. Rutka, and W. C. Chan, *Nat Nanotechnol*, **3** (3), 145 (2008).
8. S. E. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, and J. M. DeSimone, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105** (33), 11613 (2008).
9. E. C. Cho, J. Xie, P. A. Wurm, and Y. Xia, *Nano Lett*, **9** (3), 1080 (2009).
10. M. S. Ehrenberg, A. E. Friedman, J. N. Finkelstein, G. Oberdorster, and J. L. McGrath, *Biomaterials*, **30** (4), 603 (2009).
11. A. Agarwal, S. Saraf, A. Asthana, U. Gupta, V. Gajbhiye, and N. K. Jain, *Int J Pharm*, **350** (1-2), 3 (2008).
12. T. R. Daniels, T. Delgado, G. Helguera, and M. L. Penichet, *Clin Immunol*, **121** (2), 159 (2006).
13. G. Ruan, A. Agrawal, A. I. Marcus, and S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.*, **129** (47), 14759 (2007).
14. C. Peetla, K. S. Rao, and V. Labhasetwar, *Mol Pharm*, **6** (5), 1311 (2009).
15. A. El-Sayed, S. Futaki, and H. Harashima, *AAPPSJ*, **11** (1), 13 (2009).

16. A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, and M. Thompson, *Nat Mater*, **8** (7), 543 (2009).
17. M. Auffan, J. Rose, J. Y. Bottero, G. V. Lowry, J. P. Jolivet, and M. R. Wiesner, *Nat Nanotechnol*, **4** (10), 634 (2009).
18. G. Bhabra, A. Sood, B. Fisher, L. Cartwright, M. Saunders, W. H. Evans, A. Surprenant, G. Lopez-Castejon, S. Mann, S. A. Davis, L. A. Hails, E. Ingham, P. Verkade, J. Lane, K. Heesom, R. Newson, and C. P. Case, *Nat Nanotechnol*, **4** (12), 876 (2009).
19. B. D. Chithrani and W. C. Chan, *Nano Lett*, **7** (6), 1542 (2007).
20. H. Jin, D. A. Heller, R. Sharma, and M. S. Strano, *ACS Nano*, **3** (1), 149 (2009).
21. J. L. Stow, A. P. Manderson, and R. Z. Murray, *Nat Rev Immunol*, **6** (12), 919 (2006).



瞿立威先生為國立清華大學生命科學碩士，現任國家衛生研究院奈米中心研究助理。

Li-Wei Chu received his M.S. in life sciences from National Tsing Hua

University. He is currently a research assistant at the Center for Nanomedicine Research, National Health Research Institutes.



吳立真先生為美國康乃爾大學博士，現任國立暨南國際大學應用化學系及生物醫學科技研究所副教授。

Li-Chen Wu received his Ph.D. from Cornell University, USA. He is currently an associate professor in the Department of Applied Chemistry and Graduate Institute of Biomedicine and Biomedical Technology of National Chi Nan University.



楊重熙先生為美國賓州州立大學化學博士，現任國家衛生研究院奈米中心特聘研究員兼主任。

Chung-Shi Yang received his Ph.D. in chemistry from Pennsylvania State University, USA. He is currently the distinguished investigator and director of the Center for Nanomedicine Research, National Health Research Institutes.