

## ·论著·

# 金纳米颗粒修饰及其对肝癌细胞生长和辐射损伤的影响

张晓东 陈婕 吴迪 沈秀 宋莎莎 龙伟 王浩 刘培勋 樊赛军 孙元明

**【摘要】目的** 用巯基-聚乙二醇(SH-PEG)对金纳米颗粒(AuNPs)进行化学修饰(PEG-AuNPs)并分析其对肝癌细胞存活率和辐射对肝癌细胞作用的影响。**方法** 制备的 AuNPs 用 SH-PEG 进行化学修饰,用透射电子显微镜观测 PEG-AuNPs 的大小及肝癌细胞对其的摄取,应用 Cell Titer-Glo 发光法和克隆形成实验分别分析 PEG-AuNPs 对肝癌细胞的生长抑制作用和辐射对肝癌细胞作用的影响。**结果** 制备的 PEG-AuNPs 的尺寸分别为 14.4 nm 和 30.5 nm。30.5 nm PEG-AuNPs 更容易被肝癌细胞摄取,表现出明显地抑制肝癌细胞生长的作用和提高辐射对肝癌细胞的杀伤作用。**结论** AuNPs 经过 SH-PEG 化学修饰,30.5 nm PEG-AuNPs 对肝癌细胞的生长抑制作用和提高辐射杀伤肝癌细胞的作用强于 14.4 nm PEG-AuNPs。

**【关键词】** 聚乙烯二醇类;金纳米颗粒;放射增敏;肝癌细胞

**Effect of Au nanoparticles modified with sulfhydryl-polyethylene glycol on liver cancer cell proliferation and radiation damage** Zhang Xiaodong, Chen Jie, Wu Di, Shen Xiu, Song Shasha, Long Wei, Wang Hao, Liu Peixun, Fan Saijun, Sun Yuanming. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Zhang Xiaodong, Email: xiaodongzhang@irm-cams.ac.cn; Sun Yuanming, Email: yuanmings1962@163.com

**【Abstract】 Objective** Au nanoparticles (AuNPs) was chemically modified with sulfhydryl-polyethylene glycol (SH-PEG) and its effects on liver cancer cell survival and radiation damage were assessed. **Methods** PEG-AuNPs were chemically fabricated with SH-PEG and AuNPs. The size of PEG-AuNPs and uptake by liver cancer cell were observed by field-emission transmission electron microscopy (TEM). The Cell Titer-Glo luminescent cell viability assay and cell colonies were used to examine effect of PEG-AuNPs on liver cancer cells' survival and radiation damage. **Results** 14.4 nm and 30.5 nm PEG-AuNPs were obtained by above fabrication. 30.5 nm PEG-AuNPs were presented more absorption, inhibition the survival and enhance radiation effect to liver cancer cell. **Conclusions** After modification with SH-PEG, larger PEG-AuNPs with 30.5 nm showed stronger inhibition in liver cancer cellular survival and promoted liver cancer cells sensitive to radiation.

**【Key words】** Polyethylene glycols; Au nanoparticles; Radiosensitive; Liver cancer cell

金纳米颗粒(Au nanoparticles, AuNPs)具有良好的生物相容性和光学特性<sup>[1-3]</sup>,在临床肿瘤放射治疗和光热治疗方面具有独特的作用<sup>[4-5]</sup>。到目前为止,已有研究报道,AuNPs在前列腺癌、黑色素

瘤和乳腺癌等肿瘤中具有放射增敏作用<sup>[6-8]</sup>。肿瘤细胞对 AuNPs 的摄取影响肿瘤放疗效果,而 AuNPs 的大小和表面化学性质决定肿瘤细胞的摄取量<sup>[9-10]</sup>。对 AuNPs 表面进行修饰,可以提高其在水溶液中的稳定性,这是提高细胞摄取的有效方法。

本研究使用巯基-聚乙二醇(sulfhydryl-polyethylene glycol, SH-PEG)对 AuNPs 表面进行修饰,分析 PEG-AuNPs 的大小、被肝癌细胞的摄取量以及对肝癌细胞存活率的影响和对肝癌细胞的辐射增敏作用。

**DOI:** 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2014.03.004

**基金项目:** 国家自然科学基金(81000668);天津市自然科学基金(13JCQNJC13500);中国医学科学院放射医学研究所基金(SF1207和SZ1336);北京协和医学院协和新星基金(人1256);北京协和医学院青年基金(院1343)

**作者单位:** 300192 天津,北京协和医学院中国医学科学院放射医学研究所,天津市放射医学与分子核医学重点实验室

**通信作者:** 张晓东 (Email: xiaodongzhang@irm-cams.ac.cn);孙元明 (Email: yuanmings1962@163.com)

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料

SH-PEG 购自美国 Sigma 公司, 氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>, 分析纯)、柠檬酸钠试剂均购于国药集团上海化学试剂有限公司, 胎牛血清购于中国杭州四季青公司, RPMI-1640 培养基购于美国 HyClone 公司, UV-1750 型紫外分光光度计购自岛津仪器(苏州)有限公司, Infinite 200 多功能酶标仪购自瑞士 Tecan 公司, 噻唑蓝、PBS 购自北京索莱宝科技有限公司, 肝癌细胞 HepG2 和 H22 由我所提供。

### 1.2 SH-PEG 包裹的 AuNPs (PEG-AuNPs) 的制备和分析

按照常规方法<sup>[1]</sup>制备 AuNPs。将 10 mg 氯金酸溶于 100 ml 蒸馏水中, 煮沸, 分别加入 1.3 ml 和 5 ml 1% 的柠檬酸钠溶液作为还原剂, 再煮沸 30 min, 即可制得 AuNPs 溶液。将制得的 AuNPs 溶液置于 4 ℃ 冰箱保存备用。AuNPs 与带有负电荷的柠檬酸结合后, 会导致其表面带有负电荷。为了减少 AuNPs 的负电荷, 使用 SH-PEG 进行包裹。将 1 mg SH-PEG 加入到 AuNPs 的溶液中, 搅拌 1 h, 以离心半径为 6.5 cm、16 000 r/min 离心 30 min, 蒸馏水洗 2 次, 即可得到 PEG-AuNPs。制备的 PEG-AuNPs 保存于 4 ℃ 冰箱中, 使用前经 0.22 μm 的滤膜过滤。

使用透射电子显微镜(Hitachi HF-2000, Japan)观测 PEG-AuNPs 的形态、结构和大小。

### 1.3 细胞培养

本研究采用鼠源肝癌细胞系 HepG2 和人源肝癌细胞系 H22。在 37 ℃、饱和湿度和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 将两种细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中进行培养。培养液每 2 天更换一次。

### 1.4 肝癌细胞系摄取 PEG-AuNPs 的样品制备

将生长期的肝癌细胞 HepG2 和 H22 的浓度调整为  $2 \times 10^4$  个/ml, 分别接种 1 ml 于 6 孔培养板的孔中, 将 6 孔培养板置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 h。将含有 PEG-AuNPs 的上述培养基同体积加入 6 孔培养板的孔中, 使 PEG-AuNPs 的终浓度为 25 μg/ml。培养 24 h 后, 取出 6 孔培养板, 用胰酶消化贴壁的肝癌细胞, 使用 PBS 洗 3 次, 将收集的样品细胞放入专用铜质网架上, 使用透射电子显微镜观察细胞形态。

### 1.5 PEG-AuNPs 对肝癌细胞 HepG2 和 H22 存活率影响的实验方法

采用 Cell Titer-Glo 发光法分析存活细胞内 ATP 的新陈代谢, ATP 与存活细胞数量成正比, 以此来评价 PEG-AuNPs 对肝癌细胞 HepG2 和 H22 存活率的影响。按照 Cell Titer-Glo 发光法分析试剂盒(北京普洛麦格生物技术公司)说明书进行操作。细胞以每孔 100 μl 培养液含有  $0.3 \times 10^4$  个的浓度接种于 96 孔板中, 置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜。第 2 天用 PBS 洗 2 遍, 然后加入终浓度分别为 0、12.5、25.0、50.0、100.0、和 200.0 μg/ml 的 PEG-AuNPs 溶液, 每个浓度设置 3 个平行孔, 培养 24 h, 用 20 μl Cell Titer-Glo 的活力发光试剂替换孔中的原有培养基, 避光 10 min, 使用多功能酶标仪测定。

### 1.6 PEG-AuNPs 对肝癌细胞 HepG2 和 H22 放射增敏作用的实验方法

采用细胞克隆形成实验分析 PEG-AuNPs 对肝癌细胞 HepG2 和 H22 的放射增敏作用。在培养基中, 将 14.4 和 30.5 nm PEG-AuNPs 的浓度调整为 25 μg/ml。将处于生长期的 HepG2 和 H22 细胞加入准备好的含有 PEG-AuNPs 的培养基中, 置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h, 用 <sup>137</sup>Cs γ 射线进行 0、1、2 和 4 Gy 剂量照射, 照射完成后更换新鲜的培养基。将正常对照组(用不含有 PEG-AuNPs 的培养基作用于细胞)和实验组(细胞与 25 μg/ml 的 PEG-AuNPs 溶液作用)的 HepG2 和 H22 细胞悬液浓度调整为  $0.3 \times 10^4$  个/ml, 在 6 孔板中每孔加入 2 ml 细胞悬液, 置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 7 d。取出 6 孔板, 弃去上清液, 用 PBS 小心浸洗 2 次, 每孔用固定液(醋酸:甲醇=1:3)固定 15 min, 然后弃去固定液, 加适量的吉姆萨染液染色 3~5 min, 然后用流水缓慢洗去染色液, 放置空气中干燥。然后计数细胞克隆数。

### 1.7 统计学分析

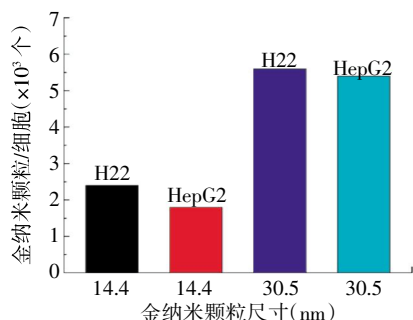
用 PASW18.0 统计软件对数据进行方差分析和 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PEG-AuNPs 的大小和肝癌细胞对其的摄取

制备的两种尺寸的 PEG-AuNPs 分别为 14.4 nm 和 30.5 nm。AuNPs 经过表面修饰后会影响到细胞的内吞途径, HepG2 和 H22 细胞膜形成小的突起来

捕获周围的 PEG-AuNPs。HepG2 和 H22 细胞摄取两种尺寸的 PEG-AuNPs 的量见图 1。如图中所示, 30.5 nm 比 14.4 nm PEG-AuNPs 更容易被 HepG2 和 H22 细胞摄取。这与最近报道的 30 nm 的 PEG-AuNPs 有很高的细胞摄取量的结果一致<sup>[12-14]</sup>。

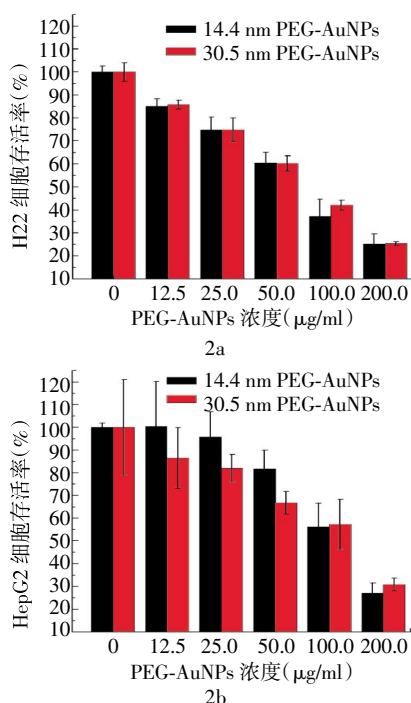


**图 1** HepG2 和 H22 细胞对 14.4 nm 和 30.5 nm PEG-AuNPs 的摄取 图中, PEG-AuNPs: 巯基-聚乙二醇包裹的金纳米颗粒。

**Fig.1** The uptake of HepG2 and H22 for PEG-AuNPs with 14.4 nm and 30.5 nm

## 2.2 PEG-AuNPs 对 H22 和 HepG2 细胞存活率的影响

图 2 为 14.4 nm 和 30.5 nm PEG-AuNPs 对 H22 (图 2a) 和 HepG2 (图 2b) 细胞存活率的影响。当



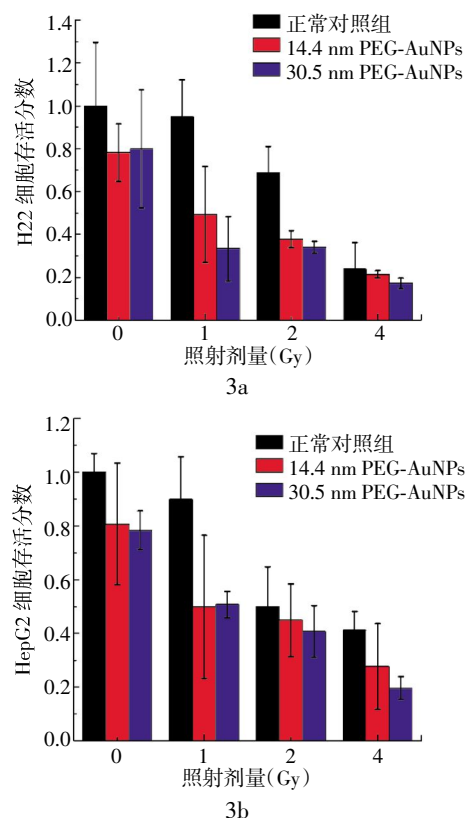
**图 2** 14.4 nm 和 30.5 nm PEG-AuNPs 对 H22 (2a) 和 HepG2 (2b) 细胞 24 h 存活率的影响 图中, PEG-AuNPs: 巯基-聚乙二醇包裹的金纳米颗粒。

**Fig.2** The effect of PEG-AuNPs in 14.4 nm and 30.5 nm on the cell viability rate for 24 hours

PEG-AuNPs 浓度为 12.5~50.0 μg/ml 时, 30.5 nm PEG-AuNPs 抑制 HepG2 细胞存活率的作用大于 14.4 nm PEG-AuNPs; 当浓度为 50.0 μg/ml 时, 两者间的差异有统计学意义( $t=9.08, P<0.05$ )。本研究结果表明, PEG-AuNPs 浓度的增加抑制了 HepG2 和 H22 细胞的存活率, 且表现出细胞毒性作用。当浓度为 12.5~50.0 μg/ml 时, 30.5 nm PEG-AuNPs 对 HepG2 细胞的存活率具有更强的抑制作用, 这之前报道的结果一致<sup>[15]</sup>。

## 2.3 PEG-AuNPs 对肝癌细胞 H22 和 HepG2 的放射增敏作用

采用克隆形成实验分析 PEG-AuNPs 对 H22 和 HepG2 细胞的放射增敏作用结果见图 3。图中所示, 在辐射剂量为 0~4 Gy 时, 随剂量的增加, 正常对照组的 H22 和 HepG2 细胞的存活分数明显降低, 14.4 nm 和 30.5 nm PEG-AuNPs 处理的 H22 和 HepG2 细胞存活分数低于相应的正常对照组, 30.5 nm PEG-



**图 3** 不同照射剂量下 14.4 nm 和 30.5 nm PEG-AuNPs 对 H22 细胞(3a)和 HepG2(3b)细胞的克隆形成率 图中, PEG-AuNPs: 巯基-聚乙二醇包裹的金纳米颗粒。

**Fig.3** The effect of PEG-AuNPs in the 14.4 nm and 30.5 nm on the formation rate of cell clone under different radiation doses

AuNPs 对 HepG2 细胞存活分数的抑制比 14.4 nm PEG-AuNPs 的作用明显。当辐射剂量为 1 Gy 和 2 Gy 时, 14.4 nm 和 30.5 nm PEG-AuNPs 对 H22 细胞的辐射增敏作用与相应的正常对照组相比, 差异有统计学意义(当辐射剂量为 1 Gy 时, 14.4 nm:  $t=4.88$ , 30.5 nm:  $t=10.01$ ,  $P$  均 $<0.05$ ; 当辐射剂量为 2 Gy 时, 14.4 nm:  $t=4.88$ , 30.5 nm:  $t=0.85$ ,  $P$  均 $<0.05$ )(图 3a)。辐射剂量为 1 Gy 和 4 Gy 时, 30.5 nm PEG-AuNPs 对 HepG2 细胞的辐射增敏作用与相应的正常对照组相比, 差异有统计学意义(当辐射剂量为 1 Gy 时,  $t=6.01$ ,  $P<0.05$ ; 当辐射剂量为 4 Gy 时,  $t=0.74$ ,  $P<0.05$ )(图 3b)。

### 3 讨论

AuNPs 对肿瘤细胞的毒性作用和辐射增敏作用与其被肿瘤细胞的摄取密切相关, 肿瘤细胞摄取 AuNPs 的数量是由颗粒尺寸和表面化学性质决定的<sup>[9-10]</sup>。AuNPs 的大小通过加入柠檬酸钠的量来控制。柠檬酸钠量的增加会减小合成的 AuNPs 的尺寸。柠檬酸钠是强碱弱酸盐, 其水溶液的 pH 值约为 8, 加入的柠檬酸钠增多, 溶液的 pH 值越大, OH<sup>-</sup>就越多, 溶液中 OH<sup>-</sup>结合成络合物的氯金酸就越多。所以与 AuNPs 形成初期表面上包裹的柠檬酸钠的 OH<sup>-</sup>的氯金酸就会减少, 使得反应过程中颗粒的聚集减少, 制备的 PEG-AuNPs 的尺寸就越小。反之, 加入的柠檬酸钠越少, 氯金酸被还原的就越不充分, 制得的 PEG-AuNPs 的尺寸就越大<sup>[16-17]</sup>。所以当分别加入 1.3 ml 和 5 ml 的柠檬酸钠时, 制得的 AuNPs 的尺寸分别为 30.5 nm 和 14.4 nm。

PEG-AuNPs 更稳定, 其可以通过内吞被肿瘤细胞摄取<sup>[18-20]</sup>, SH-PEG 包含有巯基端, 通过 Au-S 共价键与 AuNPs 结合。SH-PEG 的末端具有很强的亲水性, 从而提高了 AuNPs 的亲水性。当 PEG-SH 与 AuNPs 结合的浓度比较低时, SH-PEG 链间的距离比较大, 两者之间不能够有效地相互作用, SH-PEG 链将弯曲、绕圈形成类似“蘑菇”的聚集体; 当浓度变高时, SH-PEG 链将变得更紧, 并且在水溶液中完全延伸形成类似“刷子”的结构<sup>[18]</sup>。本研究使用的浓度接近于饱和浓度, 颗粒表面上的络合物有所提高, 形成类似“刷子”的聚集体, 增加了颗粒的分散性和生物相容性。

本研究结果证实, 30.5 nm 比 14.4 nm PEG-

AuNPs 更容易被 HepG2 和 H22 细胞摄取。修饰后的 PEG-AuNPs 的浓度增加明显抑制了 HepG2 和 H22 细胞的存活率, 表现出细胞毒性作用。在浓度为 12.5~50.0  $\mu\text{g/ml}$  时, 30.5 nm PEG-AuNPs 对 HepG2 细胞存活率具有更强的抑制作用。在辐射剂量为 0~4 Gy 时, 随剂量的增加, 正常对照组的 H22 和 HepG2 细胞的存活率明显降低。14.4 nm 和 30.5 nm PEG-AuNPs 处理的 H22 和 HepG2 细胞存活率低于相应的正常对照组, 30.5 nm PEG-AuNPs 对 HepG2 细胞存活率的抑制作用比 14.4 nm PEG-AuNPs 明显。这表明使用 SH-PEG 对 AuNPs 表面进行修饰得到 14.4 nm 和 30.5 nm 两种不同的 PEG-AuNPs, 其中 30.5 nm PEG-AuNPs 更容易被肝癌细胞摄取, 从而抑制肝癌细胞生长的作用。同样, 通过辐射两种肝癌细胞克隆形成实验表明, 两种不同大小的 PEG-AuNPs 能提高辐射抑制肝癌细胞克隆生长作用, 表明其具有辐射增敏作用, 这种辐射增敏作用与 AuNPs 的大小有关。本研究对 PEG-AuNPs 进行实验所得的结果与文献报道的其大小和表面化学性质决定摄取量的结果相一致<sup>[9-10]</sup>。

综上所述, AuNPs 经过 PEG-SH 修饰后, 制得了大小比较均匀的 14.4 nm 和 30.5 nm PEG-AuNPs。30 nm PEG-AuNPs 更容易被肝癌细胞经过胞饮作用所吞噬, 对肝癌细胞的抑制作用更明显, 能增加辐射对肝癌细胞的杀伤作用。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Rosi NL, Giljohann DA, Thaxton CS, et al. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation[J]. *Science*, 2006, 312(5776): 1027-1030.
- [ 2 ] Sokolov K, Follen M, Aaron J, et al. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 1999-2004.
- [ 3 ] Wu D, Zhang XD, Liu PX, et al. Gold Nanostructure: fabrication, surface modification, targeting imaging, and enhanced radiotherapy [J]. *Curr Nanoscience*, 2011, 7(1): 110-118.
- [ 4 ] Chithrani DB, Jelveh S, Jalali F, et al. Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy[J]. *Radiat Res*, 2010, 173(6): 719-728.
- [ 5 ] Hainfeld JF, Dilmanian FA, Zhong Z, et al. Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma [J]. *Phy Medi Biol*, 2010, 55(11): 3045-3059.
- [ 6 ] Jain S, Hirst DG, O'sullivan JM. Gold nanoparticles as novel agents

(下转第 189 页)