网络出版时间: 2021-7-28 14:31 网络出版地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1037.063.html

# 铁酸锌磁性纳米颗粒诱导活性氧及促死亡 自噬杀伤肾癌细胞的实验研究

杨荷宇<sup>12</sup> 张 力<sup>1234</sup> 闻慧琴<sup>5</sup> 温诚浩<sup>12</sup> 汪 辉<sup>12</sup> 梁朝朝<sup>123</sup>

摘要 目的 探讨铁酸锌磁性纳米颗粒(ZF NPs) 对肾癌细胞(Caki-1)的杀伤效应及其与活性氧(ROS)和自噬的相关性。方法 采用水相法合成 ZF NPs 使用透射电子显微镜(TEM)等方法对 ZF NPs 进行表征测试;噻唑兰(MTT)法检测 ZF NPs 对 Caki-1 细胞的生长抑制作用; DCFH-DA 染色检测不同处理组细胞内 ROS 水平; TEM 观察 ZF NPs 能否诱导 Caki-1 细胞产生自噬泡; Western blot 检测不同处理组细胞内 ROS 水平; TEM 观察 ZF NPs 能否诱导 Caki-1 细胞产生自噬泡; Western blot 检测不同处理组细胞的变化; DCFH-DA 染色、MTT 及 Western blot 探究 ZF NPs 杀伤 Caki-1 细胞过程中诱导 ROS 与自噬的调控机制。结果 尺寸、形貌均一的 ZF NPs 具备可用于 MRI 的顺磁性。ZF NPs 对 Caki-1 细胞具有剂量及时间依赖性杀伤效应 在此过程中,ZF NPs 以剂量及时间依赖的方式诱导 Caki-1 细胞产生 ROS ,而 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)可减少

2020-10-13 接收

- 基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81801831、82072055); 安徽高校 自然科学研究计划(编号: KJ2019A0278); 安徽高校优秀 青年人才支持计划(编号: gxyqZD2019018)
- 作者单位:安徽医科大学第一附属医院<sup>1</sup> 泌尿外科、<sup>4</sup> 科研处科研实 验中心、<sup>5</sup> 输血科 ,合肥 230022
  - <sup>2</sup> 安徽医科大学泌尿外科研究所,合肥 230022
  - 3 泌尿生殖系统疾病安徽省重点实验室 合肥 230022

作者简介:杨荷宇,男,硕士研究生;

张 力,男 副教授,硕士生导师,责任作者,Email: lzhang @ ahmu. edu. cn ROS 的积累,并减弱 ZF NPs 的杀伤效应。ZF NPs 亦可诱导 Caki-1 细胞产生自噬,渥曼青霉素可抑制 ZF NPs 引起的微 管相关蛋白 1 轻链 3-二型(LC3-II)蛋白积累,并减弱 ZF NPs 的杀伤效果。ZF NPs 与海藻糖联用则会诱导更强的肿 瘤杀伤效应 机制为海藻糖可增加 ZF NPs 杀伤 Caki-1 细胞 过程中 ROS 的积累及促死亡自噬的强度。在此过程中, NAC 抑制 ROS 可减弱 ZF NPs 诱导的自噬强度,渥曼青霉素 抑制自噬亦可减少 ROS 的积累。结论 ZF NPs 具备成为 MRI 造影剂的潜力,并可诱导 ROS 及促死亡自噬交互调控 杀伤 Caki-1 细胞。

关键词 肾癌;铁酸锌磁性纳米颗粒;活性氧;自噬 中图分类号 R 737.11

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2021)08 - 1190 - 07 doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2021.08.004

肾细胞癌是源自肾实质泌尿小管上皮系统的恶性肿瘤。据统计<sup>[1]</sup> 2020 年美国预计新发肾癌病例数 73 750 例,预计死亡病例数 14 830 例。早期肾癌患者可行手术治疗,而部分患者在初次就诊时已发生远处转移<sup>[2]</sup>,并且转移性肾癌患者对化疗或免疫治疗不敏感<sup>[3]</sup>。因此,对早期肾癌进行灵敏特异的诊断以及摆脱转移性肾癌的治疗困境,具有重要的临床意义。

nanotubes by hydrothermal reaction to construct a new implant coating. The coating's surface morphology, element distribution, crystal phase, hydrophilicity and the release concentration of  $Sr^{2+}$  in the coating were detected by scanning emission electron microscopy, X-ray diffraction, atomic force microscopy, surface contact angle measurement instrument and inductively coupled plasma spectrometer. The cytocompatibility and osteogenic activity of MC3T3-E1 on the coating were evaluated by cytological test *in vitro*, and the osteogenic effect of strontium doped TiO<sub>2</sub> nanotube implants *in vivo* was analyzed by Micro-CT. **Results** Sr was successfully incorporated into TiO<sub>2</sub> nanotube, mainly in the form of strontium titanate. The surface roughness of the coating had no significant change compared with that of TiO<sub>2</sub> nanotube, and the hydrophilicity of the coating increased significantly; the strontium doped TiO<sub>2</sub> nanotube coating promoted the cell adhesion and proliferation, and increased the alkaline phosphatase activity. The strontium doped TiO<sub>2</sub> nanotube coating implant significantly increased the bone volume fraction around the implant. **Conclusion** Sr doped TiO<sub>2</sub> nanotube coating implant show good biocompatibility and osteogenic ac-tivity, which can promote bone formation.

Key words strontium; TiO<sub>2</sub> nanotube; implant; osteogenic properties

纳米材料是指至少在三维空间中的一维处于纳 米尺度(1~100 nm)范畴内的材料,其中,铁酸锌纳米 颗粒(zinc ferrite nanoparticles,ZF NPs)因其优良的 特性而备受关注<sup>[4]</sup>。较于传统 MRI 造影剂,ZF NPs 不仅能更加清晰地显示狭窄的血管<sup>[5]</sup>还在抗肿瘤等 方面具有广阔的应用前景<sup>[6]</sup>。在肾癌诊断中,MRI 可 区分良性实体肿块与肾细胞癌亚型,明确肿瘤的组织 学分级,并可避免不必要的手术<sup>[7]</sup>。该文主要研究 ZF NPs 的抗肿瘤效应,并进一步探讨活性氧(reactive oxygen species ROS)及自噬在 ZF NPs 杀伤肾透明细 胞癌 Caki-I 中的关联与调控机制,旨在为临床诊疗肾 癌提供新的思路。

1 材料与方法

 1.1 主要试剂与仪器 六水合三氯化铁(FeCl<sub>3</sub>・ 6H<sub>2</sub>O)(美国 Sigma Aldrich 公司);氯化锌(ZnCl<sub>2</sub>)、 聚乙二醇、氨水(北京国药集团);MTT、二甲基亚砜 及海藻糖(德国 Bio Froxx 公司);ROS 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术研究所);抗LC3B 抗体(美 国 Proteintech 公司);渥曼青霉素(美国 MCE 公 司);荧光显微镜(日本 Olympus 公司);流式细胞仪 (美国 Beckman 公司)。

**1.2** 材料合成 称取 1.514 g 的 FeCl<sub>3</sub> • 6H<sub>2</sub>O 与 0.382 g 的 ZnCl<sub>2</sub> 溶于 25 ml 去离子水中,磁子搅拌 至溶液澄清,加入5 g 聚乙二醇,继续搅拌形成溶液 A。配置 0.7% 的氨水溶液,在磁子搅拌下,迅速向 溶液 A 中加入 25 ml 的氨水溶液,混合溶液在超声 破碎机下超声 30 min 后,100 ℃下加热 30 min。冷 却至室温,溶液继续在超声破碎机下超声 30 min 后,去离子水稀释溶液 0.22 μm 滤膜除菌。

1.3 细胞株及细胞培养 人肾癌 Caki-1 细胞株购 自中国科学院细胞库(北京);在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培 养箱中培养 ,DMEM 培养液中添加 10% 胎牛血清及 青、链霉素各 100 U/ml。胰蛋白酶定期消化细胞进 行传代培养 ,取对数生长期细胞用于实验。

**1.4** 细胞活力检测 Caki-I 细胞以 4 × 10<sup>4</sup> 个/ml 接种于 96 孔板, 贴壁后每孔分别加入不同浓度或种 类的药物定容至 100 μl,并设置细胞活力对照组。 培养 24 h 后,每孔加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml) 培养 4 h, 吸弃上清液,每孔加入 150 μl 二甲基亚 砜,使用酶标仪以 490 nm 波长测定各孔吸光度。

**1.5** 细胞内 **ROS** 测定 Caki-I 细胞以 1.2 × 10<sup>5</sup> 个/ml 接种于 12 孔板,贴壁后每孔分别加入不同浓度或种类的药物定容至 1 ml,并设置 ROS 对照组。

培养6h后,去除细胞培养液,每孔加入1ml无血清 培养基稀释的 DCFH-DA 荧光探针(10 μmol/L) 孵 育 20 min,PBS 洗涤3次,荧光显微镜观察染色情况 并随机选取视野拍照,每个视野细胞总数大于1000 个。观察结束后,胰蛋白酶消化收集细胞,并置于流 式管中用于流式细胞仪检测。

**1.6 TEM** 观察自噬的产生 Caki-I 细胞以 2.5 × 10<sup>5</sup> 个/ml 接种于 6 孔板,贴壁后加入药物定容至 2 ml,并设置自噬对照组。培养 24 h 后,细胞刮收集 细胞。加入电镜固定液重悬后 4 ℃ 固定 12 h,室温 下 2% 四氧化锇固定 1 h。细胞用梯度乙醇分级脱 水并包埋在环氧树脂中,将样品切成超薄切片并染 色后 TEM 观察。

1.7 Western blot 检测标志蛋白 RIPA 裂解液提 取各组细胞蛋白 加入上样缓冲液后沸煮 15 min 使 蛋白彻底变性。在电泳缓冲液中进行聚丙烯酰胺凝 胶电泳后 将蛋白质转移至硝酸纤维素膜(NC 膜) 上 ,含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h ,加入 1 : 500 的 LC3 一抗或 1 : 500 的 GAPDH 一抗 A ℃ 过夜 , TBST 洗 5 次 ,加相应二抗孵育 1 h ,TBST 洗膜 5 次 后显色发光。

**1.8** 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件对实验数 据进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单 因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间比较,采 用 SNK-q 检验进行均数之间的两两比较,P < 0.05为差异有统计学意义。

#### 2 结果

2.1 ZF NPs 的理化表征 TEM 结果显示 ZF NPs 的尺寸形貌为长约 20 nm 的纳米短棒;由于材料表 面有聚乙二醇修饰,该纳米短棒可很好地分散在水 溶液中;动态光散射分析显示,ZF NPs 的粒径分布 信息与 TEM 观察到的纳米棒的尺寸吻合,稍大的粒 径对应若干个纳米棒的堆叠;X 射线衍射图谱显示 ZF NPs 各衍射峰的峰位与 ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 标准卡片 JCPDS (22-1012)的(311)、(400)、(422)、(511)衍射峰位 置一致 样品符合尖晶石型结构的 ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>;室温条 件下磁学性能测试显示 ZF NPs 具有良好的顺磁性。 见图 1。

**2.2 ZF NPs对Caki-1**细胞的生长抑制作用 不同 浓度(1、5、10、11、12、13、14、15 μg/ml) ZF NPs 处理 Caki-1 细胞 24 h, MTT 结果显示,细胞活力随 ZF NPs 浓度的增加而下降(*F* = 414.0, *P* < 0.01); 14 μg/ml的ZF NPs分别处理细胞6、12、24 h, 细胞活



图 1 ZF NPs 理化表征

A: ZF NPs 的透射电镜图 ×80 000; B: ZF NPs 的动态光散射粒径数据 插图为 ZF NPs 水溶液; C: ZF NPs 的 X 射线衍射图谱及各衍射峰位 置; D: 室温下 ZF NPs 的磁滞曲线

力随着时间的延长而下降(F = 289.1, P < 0.01)。 见图 2。

2.3 ZF NPs 诱导 ROS 杀伤 Caki-1 细胞 不同浓 度( $1.5.10.14 \mu$ g/ml) ZF NPs 处理 Caki-1 细胞 6 h 后 ,DCFH-DA 染色显示,随着 ZF NPs 浓度的提高, ROS 的积累在不断增加; 14  $\mu$ g/ml 的 ZF NPs 分别 处理 Caki-1 细胞 1.2.4.6 h 后显示,ROS 的积累随 着时间的延长也在增加,见图 3。

N-乙酰-L-半胱氨酸(N-Acetyl-L-cysteine,NAC) 是一种含巯基的抗氧化剂,可保护细胞免受氧自由 基的损害。将5 mmol/L 的 NAC 与 14 μg/ml 的 ZF NPs 联合处理细胞6 h ,ROS 的积累减少;相同浓度 下 NAC 与 ZF NPs 联合处理细胞 24 h 后 ,MTT 结果 显示 ZF NPs 单独处理后 Caki-1 细胞的细胞活力为 (59.81 ± 3.95)%,而 ZF NPs + NAC 组的细胞活力 为(80.93 ± 3.24)%,高于 ZF NPs 单独处理组,差 异有统计学意义(F = 82.07 P < 0.01)。见图 4。 2.4 ZF NPs 诱导促死亡自噬杀伤 Caki-1 细胞 自噬是一个吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并将其包 裹进入囊泡,与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其 包裹内容物的过程。因此,通过 TEM 观察到自噬泡 是检测自噬产生的金标准。使用 14  $\mu$ g/ml ZF NPs 处理 Caki-1 细胞 24 h 后, TEM 显示 Caki-1 细胞中

自噬泡数量增多(图 5A 红箭头所示)。当自噬发生时,存在于胞质中的微管相关蛋白轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3 ,LC3) 一型





A: 不同浓度 ZF NPs 对 Caki-1 细胞活力的影响; B: ZF NPs 不同处理时间对 Caki-1 细胞活力的影响; 与0 μg/ml 比较: \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001; 与0 h 比较: <sup>###</sup>P < 0.001



图 3 DCFH-DA 染色观察 ZF NPs 诱导 Caki-1 细胞产生 ROS ×100 A: 不同浓度 ZF NPs 诱导 Caki-1 细胞产生 ROS 的变化; B: ZF NPs 不同处理时间诱导 Caki-1 细胞产生 ROS 的变化



A: DCFH-DA 染色观察 ZF NPs 与 NAC 共处理后 ROS 的变化 × 100; B: ZF NPs 与 NAC 共处理后细胞活力的变化; a: 对照组; b: ZF NPs(Z) 组; c: NAC(N) 组; d: Z + N 组; 与对照组比较: \*\*\* *P* < 0.001; 与 ZF NPs 组比较: <sup>###</sup>*P* < 0.001

(LC3-I] 会被特异性地剪切成绑定在自噬体膜上的 LC3-II 故 LC3-II 蛋白积累水平的高低代表了自噬 水平的高低。使用 14  $\mu$ g/ml 的 ZF NPs 处理 Caki-I 细胞 6 h 后 ,Western blot 结果显示 LC3-II 蛋白的积 累增多 ,将 1  $\mu$ mol/L 的自噬抑制剂渥曼青霉素 (wortmannin ,Wort) 与 14  $\mu$ g/ml 的 ZF NPs 联合处理 细胞 6 h 后 ,LC3-II 蛋白的积累则减少(*F* = 21.90 , *P* < 0.01)。 使用 14 µg/ml 的 ZF NPs 分别与 Wort(1µmol/L)、自噬增强剂海藻糖(Trehalose)(50 mmol/L) 共 处理 24 h 后 ,MTT 结果显示 相较于 ZF NPs 单独处 理组 ZF NPs + Wort 组的细胞活力回升(F = 18.98, P < 0.01); 而 ZF NPs + Trehalose 组的细胞活力则下 降(F = 476.6, P < 0.01),见图 5。

2.5 ZF NPs 诱导 ROS 及促死亡自噬交互调控杀 伤 Caki-I 细胞 14  $\mu$ g/ml 的 ZF NPs 与 50 mmol/L 的 Trehalose 联合处理 Caki-I 细胞时,分别加入 Wort (1  $\mu$ mol/L)、NAC(5 mmol/L)  $\beta$  h 后荧光显微镜和 流式细胞仪检测各组 ROS 含量,结果显示,ZF NPs + Trehalose 组内 ROS 的积累较 ZF NPs 组增加,ZF NPs + Trehalose + NAC 组和 ZF NPs + Trehalose + Wort 组内 ROS 的积累则减少。而 24 h 后 MTT 结果 显示 ZF NPs + Trehalose + NAC 组和 ZF NPs + Trehalose + Wort 组细胞活力分别为(70.79 ± 0.81)% 和(72.63 ± 2.29)%,相较于 ZF NPs + Trehalose 处 理组(24.49 ± 5.53)% 細胞活力均回升,且差异有 统计学意义(F = 196.5 P < 0.01)。

同时,Western blot 结果显示,相较于 ZF NPs 组 ZF NPs + NAC 组的 LC3-II 蛋白的积累减少(*F* = 149.2 *P* < 0.01),而 ZF NPs + Trehalose 组的 LC3-II 蛋白进一步增多,并且与 ZF NPs + Trehalose 组相 比,Wort 和 NAC 均可减少细胞内 LC3-II 蛋白的积 累(*F* = 67.56 *P* < 0.01)。见图 6。

### 3 讨论

肾透明细胞癌是最常见的肾脏恶性肿瘤,早期 肾癌患者可接受手术治疗,而转移性肾癌患者的治 疗手段则较少。尽管5年相对生存率现有所改善,



图 5 ZF NPs 诱导 Caki-1 细胞产生自噬效应以及 ZF NPs 与自噬抑制或增强剂对 Caki-1 细胞活力的影响 A: ZF NPs 处理后的 Caki-1 细胞的 TEM 图像, 箭头指示自噬泡 ×5 000; B: ZF NPs 与 Wort 共处理后 LC3-II 蛋白表达情况; C: ZF NPs 与 Wort 共处理后细胞活力的变化; D: ZF NPs 与 Trehalose 共处理后细胞活力的变化; a: 对照组; b: ZF NPs(Z) 组; e: Wort(W) 组; f: Z + W 组; g: Trehalose(T) 组; h: Z + T 组; 与对照组比较: \*\*\* P < 0.001; 与 ZF NPs 组比较: <sup>##</sup>P < 0.01 ,<sup>###</sup>P < 0.001

但总体而言预后仍然很差<sup>[8]</sup>。近年来,将纳米材料 应用于癌症的诊疗越来越受到研究者的青睐。例 如:氧化铁纳米颗粒可作为MRI造影剂,用于多种 癌症的诊断<sup>[9]</sup>。氧化锌纳米颗粒可作为一种多靶 点的纳米载体,对肿瘤的治疗具有深远的影响<sup>[10]</sup>。 ZF NPs 结合了上述两种纳米材料优异的理化特性, 但 ZF NPs 在肿瘤中的研究并不多见。因此,本研究 合成了尺寸均一的水分散 ZF NPs,一方面 ZF NPs 具备顺磁性,并可通过"渗透与滞留增强效应"在肿 瘤组织中累积<sup>[11]</sup>,有望作为 MRI 造影对比剂辅助 肾癌诊断;另一方面,ZF NPs 可作为药物直接或增 敏杀伤肾癌细胞,有望解决肾癌患者对化疗药物不 敏感的难题。

本研究重点评估了 ZF NPs 对 Caki-1 细胞的生 长抑制作用,显示 ZF NPs 对 Caki-1 细胞的生长抑制 作用具有剂量和时间依赖性。ROS 是线粒体呼吸 的副产物,现被认为是纳米颗粒引起细胞死亡的诱 因之一<sup>[12]</sup>。结果表明,ZF NPs 诱导 Caki-1 细胞产 生的 ROS 是引起 Caki-1 细胞死亡的重要原因,并且 ROS 清除剂可有效抑制该过程。

自噬是溶酶体介导的降解过程,用于清除受损

的细胞器、异常聚集的蛋白质和侵入的病原体 ,几乎 在每个哺乳动物细胞中都以低水平状态运转,在维 持细胞的稳态和促进细胞的存活中起着至关重要的 作用。细胞在受到物理、化学或生物等刺激后,可应 激性地提升细胞内的自噬水平 ,而这种被诱导的自 噬可分为促进细胞存活或加速细胞死亡两种情况。 大量研究表明 纳米材料作为一类独特的自噬诱导 剂 ,可将细胞自噬水平由本底低水平提升到较高水 平。虽然部分纳米材料能够引起抑制细胞死亡的自 噬 即促生存自噬 ,但在多数情况下 ,由纳米材料诱 导的自噬会促进细胞死亡,即促死亡自噬<sup>[13]</sup>。因 此 不同的纳米材料在不同的细胞中诱导的自噬对 细胞命运的影响不可一概而论。本研究利用 TEM 以及 Western blot 探究 ZF NPs 能否诱导 Caki-I 细胞 产生自噬以及自噬的类型。结果表明 ZF NPs 可诱 导 Caki-I 细胞产生自噬效应,并且自噬强度的抑制 或增强,可直接调控ZFNPs的肿瘤细胞杀伤效应。 而细胞的自噬水平与细胞活力存在负相关性 因此 , ZF NPs 可诱导 Caki-1 细胞产生促死亡型细胞自噬。

综上所述 ZF NPs 可诱导 ROS 及促死亡自噬杀伤 Caki-1 细胞。ROS 在自噬激活中起着至关重要





A: DCFH-DA 染色观察不同药物作用下 Caki-I 细胞 ROS 的变化 ×100; B: 流式细胞仪检测不同药物作用下 Caki-I 细胞 ROS 的变化; C: 不 同药物作用下 Caki-I 细胞活力的变化; D: ZF NPs 与 NAC 共处理后 LC3-II 蛋白表达情况; E: 不同药物作用下 Caki-I 细胞 LC3-II 蛋白表达情 况; a: 对照组; b: ZF NPs(Z) 组; c: NAC(N) 组; d: Z + N 组; e: Wort(W) 组; g: Trehalose(T) 组; h: Z + T 组; i: Z + T + N 组; j: Z + T + W 组; 与对照组 比较: \*\*\* *P* < 0.001; 与 ZF NPs 组比较: <sup>##</sup>*P* < 0.01, <sup>###</sup>*P* < 0.001; 与 Z + T 组比较: <sup>Δ△</sup>*P* < 0.001

的作用 但具体调控机制仍不清楚<sup>[14]</sup>。因此 ,为进 一步探究两者在 ZF NPs 杀伤 Caki-1 细胞过程中的 调控关系 ,课题组首先检测在自噬水平升高的情况 下 ,Caki-1 细胞内 ROS 的情况 随后继续探究 Caki-1 细胞内 ROS 清除与自噬水平改变的关联。结果表 明 ZF NPs 可通过诱导促死亡自噬进而促进 ROS 的 积累以杀伤 Caki-1 细胞 ,而 ROS 的积累又可进一步 提升促死亡自噬强度进而杀伤 Caki-1 细胞。由此 可见 ZF NPs 在杀伤 Caki-I 细胞的过程中诱导 ROS 及促死亡自噬的产生,并且两者在这一过程中可交 互调控、相互促进,进而有效地杀伤肿瘤细胞。

### 参考文献

- [1] Siegel R L , Miller K D , Jemal A. Cancer statistics , 2020 [J].
  CA Cancer J Clin , 2020 , 70(1): 7 30.
- [2] Wiechno P , Kucharz J , Sadowska M , et al. Contemporary treat-

ment of metastatic renal cell carcinoma[J]. Med Oncol ,2018 ,35 (12): 156.

- [3] Posadas E M, Limvorasak S, Figlin R A. Targeted therapies for renal cell carcinoma [J]. Nat Rev Nephrol ,2017 ,13(8): 496 – 511.
- [4] Li J, Meng Q, Zhang Y, et al. Size-dependent kinetics during non-equilibrium lithiation of nano-sized zinc ferrite [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 93.
- [5] Chaudhary R, Roy K, Kanwar R K, et al. Engineered atherosclerosis-specific zinc ferrite nanocomplex-based MRI contrast agents [J]. J Nanobiotechnology, 2016, 14: 6.
- [6] Wei W , Hu H , Chen L , et al. Size-controllable synthesis of zinc ferrite/reduced graphene oxide aerogels: efficient electrochemical sensing of p-nitrophenol [J]. Nanotechnology , 2020 , 31 (43): 435706.
- [7] Lopes Vendrami C , Parada Villavicencio C , DeJulio T J , et al. Differentiation of solid renal tumors with multiparametric MR imaging[J]. Radiographics ,2017 ,37(7): 2026 – 42.
- [8] Barata P C, Rini B I. Treatment of renal cell carcinoma: current status and future directions [J]. CA Cancer J Clin , 2017, 67

(6): 507 - 24.

- [9] Xie L , Jin W , Chen H , et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cancer diagnosis and therapy [J]. J Biomed Nanotechnol , 2019 , 15(2): 215 - 416.
- [10] Aldalbahi A, Alterary S, Ali Abdullrahman Almoghim R, et al. Greener synthesis of zinc oxide nanoparticles: characterization and multifaceted applications [J]. Molecules , 2020 , 25(18) : 4198.
- [11] 魏恺言,付旭东,王新军,等.仿生型纳米红细胞靶向药物递送系统的制备及体内外抗肿瘤效果评价[J].安徽医科大学学报,2019,54(7):1016-22.
- [12] Bezza F A , Tichapondwa S M , Chirwa E M N. Fabrication of monodispersed copper oxide nanoparticles with potential application as antimicrobial agents [J]. Sci Rep , 2020 , 10(1): 16680.
- [13] Zhang Y , Zhang L , Gao J , et al. Pro-death or pro-survival: contrasting paradigms on nanomaterial-induced autophagy and exploitations for cancer therapy [J]. Acc Chem Res , 2019 , 52(11): 3164 – 76.
- [14] Scherz-Shouval R , Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology [J]. Trends Biochem Sci , 2011 , 36 (1): 30-8.

## Zinc ferrite magnetic nanomaterials induce reactive oxygen species and pro-death autophagy to kill renal cancer cells

Yang Heyu<sup>1 2</sup>, Zhang Li<sup>1 2 3 4</sup>, Wen Huiqin<sup>5</sup>, et al

(  $^1Dept$  of Urology ,  $^4Center$  for Scientific Research ,

<sup>5</sup>Dept of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Institute of Urology, Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>3</sup>Anhui Medical University and Anhui Province Key Laboratory of Genitourinary Diseases, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the killing effect of zinc magnetic ferrite nanomaterials (ZF NPs) on kidney cancer Caki-I cells and its correlation with ROS and autophagy. *Methods* ZF NPs were synthesized by aqueous method and characterized by TEM and other methods. The inhibitory effect of ZF NPs on Caki-I cells was detected by Thiazole Blue(MTT) assay. Intracellular ROS levels were detected by DCFH-DA staining. TEM was used to observe the autophagosomes in Caki-I cells after ZF NPs treatment. The changes of autophagy effect were detected by Western blot. DCFH-DA staining, MTT and Western blot were used to investigate the regulation mechanism of ROS and autophagy induced by ZF NPs during the killing of CaKi-I cells. *Results* ZF NPs with uniform size and shape were synthesized by aqueous method, which exerted paramagnetic properties for MRI. ZF NPs had a dose and time dependent killing effect on Caki-I cells. In this process, ZF NPs could induce Caki-I cells to produce dose and time dependent ROS, while NAC could reduce the production of ROS and weaken the killing effect of ZF NPs. ZF NPs could also elicit autophagy in Caki-1 cells. After co-treatment with Wortmannin , the accumulation of LC3-II decreased and the subsequent cell viability was higher than that of ZF NPs treated alone , while co-treatment with Trehalose could increase ROS production and autophagic intensity in executing tumoricidal effect of ZF NPs. Among the sensitization process , NAC could reduce the accumulation of LC3-II and Wortmannin could decrease ROS generation. Conclusion ZF NPs have the potential to become a MRI contrast agent , and can induce ROS and prodeath autophagy to kill Caki-I cells.

Key words renal cancer; zinc ferrite magnetic nanoparticles; ROS; autophagy