

网络出版时间: 2020-6-29 11:26 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200629.1110.001.html>

◇ 基础医学研究 ◇

空心硫化铜颗粒包载阿霉素形成的纳米颗粒 对胰腺癌 BxPC-3 细胞株的杀伤效应

张 聪¹, 杭立峰², 陈 军¹, 詹 翔¹, 金 雷¹, 余 跃¹

摘要 目的 探究空心硫化铜(CuS)颗粒进行包载阿霉素(DOX),实现化疗药物与光热疗法相结合,从而增强化疗药物对胰腺癌杀伤效果。方法 合成空心 CuS 纳米颗粒、PEG 修饰后的纳米颗粒及包载阿霉素后的 DOX@PEG-CuS,并对其材料进行表征。通过将胰腺癌 BxPC-3 细胞分为四组:不加颗粒的 PBS 对照组,游离 DOX 组,空心 CuS 组,CuS 包载 DOX 组。使用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)去检测胰腺癌细胞对 PEG-CuS 的摄取情况。采用 MTT 法及死活染色分析法检测各实验组对胰腺癌细胞 BxPC-3 的杀伤效果。结果 成功制备出粒径为 356.3 nm 左右的 CuS 纳米颗粒,使用 PEG 进行表面修饰后,PEG-CuS 纳米颗粒粒径为 209.8 nm 左右。通过 PEG 修饰后的 CuS 纳米颗粒在 10% 血清中是稳定存在的。ICP-MS 结果显示在第 2 小时(12.95%)、第 4 小时(20.20%)和第 6 小时时间点(32.98%),胰腺癌细胞对 PEG-CuS 的摄取率随着时间的推移而提高($P < 0.05$, $t = 4.083$; $P < 0.01$, $t = 5.889$); MTT 法显示通过联合光热疗法及化疗后,CuS 包载 DOX 组杀伤效果最好,对胰腺癌细胞杀伤率高达 88.3%,优于单独的 CuS 治疗组的 52.04% 及游离 DOX 组的 45.58% ($F = 711.6$, $P < 0.0001$)。结论 通过 PEG 修饰后的空心 CuS 纳米颗粒在 10% 血清中可以稳定存在,胰腺癌细胞对通过 PEG 修饰后的 CuS 纳米颗粒的摄取率随着时间的推移而提高,通过光热疗法联合化疗对胰腺癌细胞可以达到更强的杀伤效果。

关键词 硫化铜;阿霉素;纳米药物;胰腺癌;光热疗法

中图分类号 R 576

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)07-0987-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.001

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是一种高度恶性的消化道肿瘤,发现时往往已经处于肿瘤晚期,对

于中晚期 PC 临床治疗以化疗为主^[1-2]。阿霉素作为一种经典的化疗药物,但在体内容易被清除^[3-5]。近年来,纳米载药体系可以增强药物体内循环时间引起了广泛关注^[6-7]。

光热疗法(photothermal therapy, PTT)是利用光诱导剂在电磁辐射作用下使得肿瘤局部升温从而杀伤肿瘤细胞的一种新型肿瘤治疗方法,在肿瘤治疗领域已经取得广泛进展^[8-9]。在肿瘤治疗过程中,单独的化疗往往并不理想,已有文献^[10]报道通过结合 PTT 来实现化疗增敏。硫化铜(copper sulphide, CuS)纳米颗粒作为光热治疗剂引起了广泛的关注^[11]。但是由于 CuS 表面积较小难以携带药物^[12-13],该研究旨在通过优化制备方法得到可以携带阿霉素的空心 CuS 纳米颗粒,同时与 PTT 相结合进而实现对 PC 细胞的化疗增敏杀伤效果,为胰腺癌的临床治疗提供进一步的指导。

1 材料与方法

1.1 材料 阿霉素盐酸盐(doxorubicin, DOX)购自北京华丰有限公司; BxPC-3 人源 PC 细胞株购自上海细胞库; 噻唑蓝 [4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; RPMI-1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司; 血清购自美国 Hyclone 公司; 空心 CuS 颗粒由中国科学技术大学生命科学学院杭立峰博士馈赠。

1.2 方法

1.2.1 纳米颗粒的制备 将制备好的空心 CuS 颗粒及 PEG 按质量比 1:1 在水溶液中进行共同孵育 12 h 后,离心即可获得 PEG 修饰的 CuS 颗粒。通过将 PEG-CuS 颗粒与 DOX 共孵育,采用搅拌等方式成功将 DOX 包载于空心 CuS 颗粒中。

1.2.2 纳米颗粒粒径及血清稳定性检测 分别将 100 μ l 制备好的空心 CuS 颗粒溶液加入到不同的比色皿中,用动态光散射仪(dynamic light scatterometer, DLS)来检测纳米颗粒尺寸,温度控制在 25 $^{\circ}$ C,重复 3 次测量。为了了解 CuS 及 PEG 修饰后的

2020-04-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号:31870993); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(编号:WK9110000005)

作者单位: ¹安徽医科大学附属省立医院消化内科,合肥 230001

²中国科学技术大学生命科学学院,合肥 230027

作者简介: 张 聪,男,硕士研究生;

余 跃,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: yuyuemd@163.com

CuS 颗粒是否能在血清中稳定存在,将其加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 溶液中边孵育边缓慢搅拌,然后用 DLS 分别检测不同纳米颗粒在相应时间点的纳米颗粒粒径大小,分析其在血清中稳定性。

1.2.3 细胞培养 人源 PC 细胞系 BxPC-3 使用含有 1% 的双抗及 10% 的胎牛血清的 1640 培养基进行培养,37 °C、5% CO₂ 温箱进行孵育。当细胞密度长到培养皿的 70% ~ 80% 时,使用胰酶(0.25%)进行消化、传代、种板等。

1.2.4 ICP-MS 检测 PEG-CuS 颗粒摄取情况 Bx-PC-3 细胞种植入 24 孔板中,每孔种植 10 万细胞,每组设置 3 个平行对照。温箱中孵育 24 h 后,加入 PEG-CuS 颗粒进行孵育。在温箱孵育 2、4、6 h 后取出培养板,吸去旧的含有颗粒和纳米药物的培养基,向板中各孔使用 500 μl 1 × PBS 缓冲液清洗 3 次,充分洗去孔板中药物残留。接下来向每孔中加入 200 μl 胰酶进行消化,CO₂ 温箱孵育 3 ~ 5 min 后终止消化,消化后将其转移至玻璃瓶中,加入硝酸 300 °C 高温蒸煮,反复蒸煮 3 次后,加入王水(浓盐酸:浓硝酸 = 3 : 1)溶解,MIIL-Q 进行定容,ICP-MS 进行定量检测。

1.2.5 MTT 法检测不同纳米药物杀伤 PC 细胞效果 当 BxPC-3 细胞密度长到培养皿的 70% ~ 80% 左右时,BxPC-3 细胞种植入 96 孔板中,每孔种植 5 000 细胞,CO₂ 温箱孵育过夜,弃去旧培养基,实验共分为 3 组,分别是 CuS 纳米颗粒组、阿霉素组、CuS 包载阿霉素组。CuS 组每孔分别加入浓度为 100、50、25、12.5 μg/ml 的 CuS 颗粒;DOX 组分别加入浓度为 10、5、2.5、1.25 μg/ml 的 DOX;CuS 包载 DOX 采用 100 μg/ml CuS 包载后终浓度为 5 μg/ml 的 DOX 作为治疗初始组,其余各组对半稀释,依次为 50 μg/ml CuS 包载浓度为 2.5 μg/ml DOX,25 μg/ml CuS 包载浓度为 1.25 μg/ml DOX,12.5 μg/ml CuS 包载浓度为 0.625 μg/ml DOX。每组设置 3 个平行对照,不加任何药物的孔设为空白对照组。PBS 组,游离 DOX 组,CuS 及 CuS 包载 DOX 组温箱孵育 4 h 后均给予 1 064 nm 激光器处理,时间为 5 min,功率为 1 W/cm²。照射结束后温箱孵育 24 h。24 h 后,每孔加入 25 μl 5 mg/ml MTT 溶液,孵育 2 ~ 4 h 后,弃去旧培养基,每孔加入 100 微升 DMSO 混匀,摇床震荡 1 h 后,酶标仪 488 nm 波长进行检测。用软件 Excel 2013 和 GraphPad. Prism. V7.0. 处理测好的对应孔的吸光度(optical density, OD)值,计算细胞存活率。细胞存活率(%) = (药物细胞组

OD 值 - 空白对照组 OD 值) / (非光照不加药细胞组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) × 100%。

1.2.6 死活细胞染色法检测不同纳米药物对 PC 细胞杀伤效果 BxPC-3 细胞种植入 24 孔板中,每孔种植 1×10^5 个细胞,实验分为 4 组:PBS 对照组、CuS 组、游离 DOX 组及 CuS 包载 DOX 组。温箱中孵育 24 h 后,分别加入浓度为 100 μg/ml 的 CuS 颗粒,浓度为 5 μg/ml 的 DOX,CuS 浓度为 100 μg/ml 包载后终浓度为 5 μg/ml 的 DOX 组进行孵育。在温箱孵育 4 h 后,PBS 组,游离 DOX 组,CuS 及 CuS 包载 DOX 组温箱孵育 4 h 后均给与 1 064 nm 激光器处理,时间为 5 min,功率为 1 W/cm²。根据死活染色试剂盒的具体步骤进行死活染色,倒置荧光显微镜下进行观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 进行统计分析,每组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本组间变量对比采用 *t* 检验,三组间变量比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 方法。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 空心 CuS 颗粒的粒径及血清中稳定性 首先通过 DLS 验证颗粒的粒径位于 356.3 nm 左右,如图 1A 所示,之后使用 PEG 进行表面修饰后,PEG-CuS 颗粒粒径为 209.8 nm 左右,同时采用透射电镜对 PEG-CuS 进行表征,如图 1B 所示,PEG 修饰后的 CuS 颗粒约 200 nm 左右,这与 DLS 下的结果相一致的。为了验证颗粒在体内的稳定性,使用 10% 血清模拟体内血液循环。通过将 PEG-CuS 颗粒置于 10% 血清中,可以看出颗粒的粒径在一定范围内波动,可以验证材料血清中稳定存在的,如图 1C 所示。

2.2 ICP-MS 定量分析结果显示 BxPC-3 细胞对纳米颗粒在 6 h 时间点摄取最多 在 CO₂ 温箱中分别孵育 2、4、6 h 后,PEG-CuS 颗粒与 PC 细胞孵育后,对细胞摄取量进行定量分析后,在 2、4、6 h 时间点,PC 细胞对 PEG-CuS 的摄取率随着时间的推移而提高,在 4 h 时间点(20.20%)摄取率高于 2 h 时间点(12.95%) (*P* < 0.05, *t* = 4.083),在第 6 小时时间点摄取量(32.98%)高于第 4 小时(20.20%) (*P* < 0.01, *t* = 5.889),差异均具有统计学意义。

2.3 MTT 法显示 CuS 包载阿霉素组在光热情况下杀伤效果最好 细胞水平上,分别将 BxPC-3 细胞与 CuS 及 DOX、CuS 包载 DOX 共孵育后进行光照处

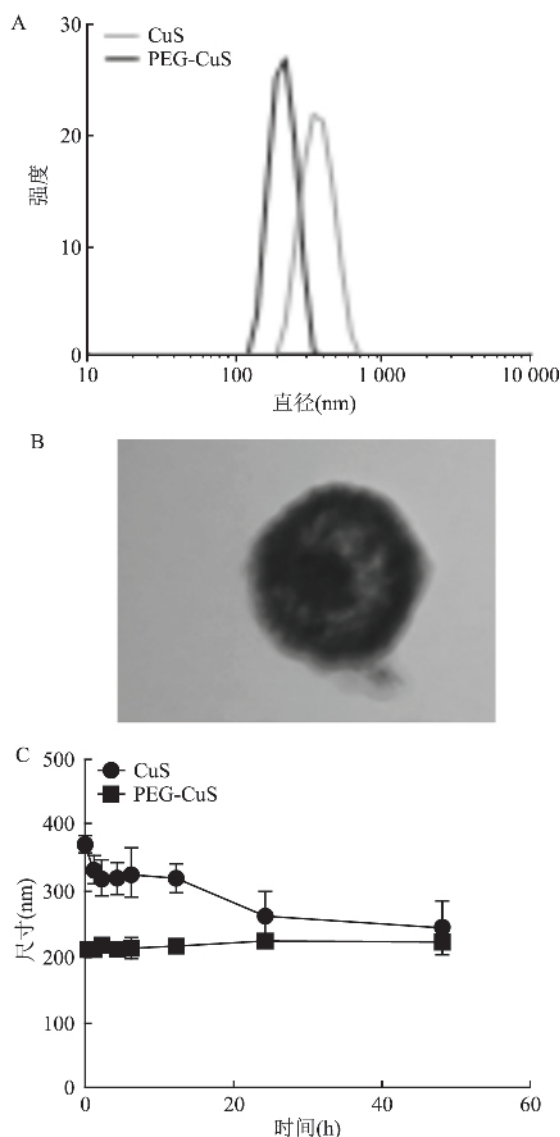


图1 纳米颗粒的相关表征

A: DLS 检测颗粒的粒径; B: PEG-CuS 电镜图片 $\times 400\ 000$; C: 两种颗粒在 10% 血清中的稳定性情况

理($1\ 064\ \text{nm}$, $1\ \text{W}/\text{cm}^2$), 从 MTT 法及死活染色法去验证杀伤效果。从图 2 中可以看出, CuS 包载阿霉素 + 光照 ($100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ CuS 包载浓度为 $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DOX 组) 这组杀伤效果最好, 对 PC 细胞杀伤率高达 88.3%, 优于单独的 CuS + 光照治疗组 ($100\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 的 52.04% ($F = 711.6$, $P < 0.000\ 1$) 及游离 DOX 组 ($5\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 的 45.58% ($F = 711.6$, $P < 0.000\ 1$), 差异具有统计学意义。

2.4 死活细胞染色法检测各治疗组杀伤情况 对各治疗组细胞通过死活染色试剂盒进行染色, 红色细胞代表死细胞, 绿色细胞代表活细胞。如图 3 所示, 之后通过对图片中细胞存活率进行统计分析得出结论: CuS 包载 DOX 组杀伤效果最强, 优于游离

DOX 组 ($P < 0.000\ 1$, $F = 201.8$) 及空心 CuS 组 ($P < 0.000\ 1$, $F = 201.8$)。

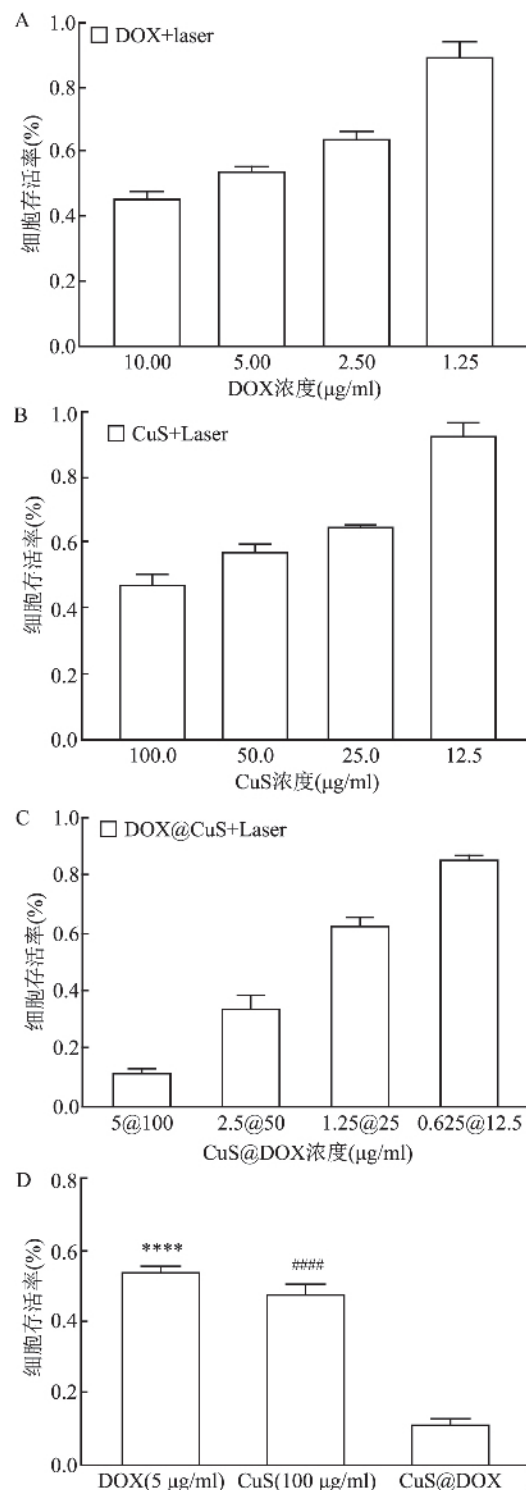


图2 空心 CuS 颗粒及游离 DOX 及 CuS 包载 DOX 对 PC 杀伤情况

A: 游离 DOX 对 PC 细胞的杀伤情况; B: 空心 CuS 颗粒光热治疗后对 PC 杀伤情况; C: 空心 CuS 颗粒包载 DOX 对 PC 细胞杀伤情况; D: $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DOX、 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 CuS 颗粒的光热效果及 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ CuS 颗粒包载 $5\ \mu\text{g}$ DOX 对 PC 细胞杀伤情况; 与 CuS@DOX 比较: **** $P < 0.000\ 1$, #### $P < 0.000\ 1$

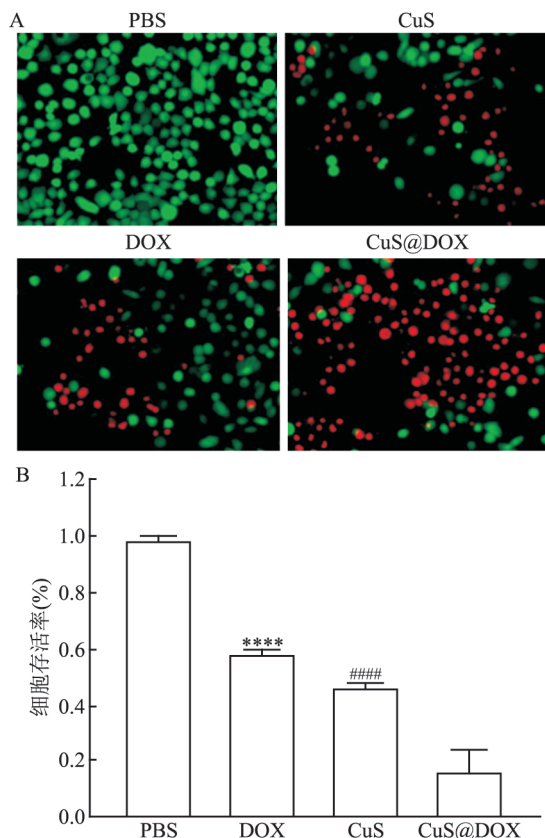


图3 死活染色法检测各治疗组杀伤情况

A: 荧光显微镜拍摄直观图 $\times 20$; B: 死活染色细胞存活率统计图; 与 CuS@DOX 比较: **** $P < 0.0001$, #### $P < 0.0001$

3 讨论

PTT 是近年来出现的一种有效的肿瘤治疗技术。光热剂被递送到目标细胞或组织,然后通过激光照射将吸收的光能转化为热能,导致癌细胞的热消融^[14-15]。CuS 纳米颗粒由于具有稳定的近红外吸收、低成本和高稳定性等优点,是一类很有前途的新型光热剂^[16-17]。

DOX 作为一种经典的杀伤肿瘤的化疗药,虽然取得了较强的杀伤肿瘤效果,但是也带来了强烈的毒副作用,从而限制了其在临床治疗中的应用。近年来,纳米载药体系引起了广泛关注。纳米载药体系主要通过囊封、包埋、吸附等方式包载临床药物,包载后可以改善药物水溶性,提高药物的选择性,增强药物在肿瘤位置富集强度及减少药物对正常组织的副作用等^[18]。因此,本研究设计并制备得到空心 CuS 纳米颗粒用于携带化疗药 DOX。细胞水平结果显示,通过 PEG 修饰后的 CuS 纳米颗粒随着时间的推移 PC 细胞对其摄取率是提高了。接下来进一

步通过 MTT 和死活染色结果均显示通过化疗与光热联合后,杀伤效果增强,对 PC 细胞杀伤率高达 88.3%,证明了两种方案结合的有效性。

综上所述,本研究证明了 CuS 纳米颗粒通过其空心结构成功携带阿霉素,一方面,通过 PEG 修饰后 PC 细胞对 CuS 摄取率随着时间的推移而提高,而且有文献报道通过 PEG 修饰后可以实现纳米药物的血液循环时间延长,并基于肿瘤部位的 EPR 效应进一步实现肿瘤富集作用^[19];另一方面,通过与 PPT 疗法相结合实现了对肿瘤杀伤的化疗增敏作用。而通过 PEG 修饰的 CuS 纳米颗粒在动物水平上是否与细胞水平保持一致,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2017 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] Chen W, Zheng R, Bssde P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-32.
- [3] Pugazhendhi A, Edison T N J I, Velmurugan B K, et al. Toxicity of doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems [J]. *Life Sci*, 2018, 200: 26-30.
- [4] Aktaş İ, Özmen Ö, Tutun H, et al. Artemisinin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats [J]. *Biotech Histochem*, 2020, 95(2): 121-8.
- [5] Chen H, Zheng D, Liu J, et al. pH-sensitive drug delivery system based on modified dextran coated mesoporous silica nanoparticles [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 85: 596-603.
- [6] Kopeckova K, Eckschlager T, Sirc J, et al. Nanodrugs used in cancer therapy [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2019, 163(2): 122-31.
- [7] Ling D, Park W, Park S, et al. Multifunctional tumor pH-sensitive self-assembled nanoparticles for bimodal imaging and treatment of resistant heterogeneous tumors [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(15): 5647-55.
- [8] Hou X, Tao Y, Pang Y, et al. Nanoparticle - based photothermal and photodynamic immunotherapy for tumor treatment [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(12): 3050-60.
- [9] Young J K, Figueroa E R, Drezek R A. Tunable nanostructures as photothermal theranostic agents [J]. *Ann Biomed Eng*, 2012, 40(2): 438-59.
- [10] Sun T M, Du J Z, Yao Y D, et al. Simultaneous delivery of siRNA and paclitaxel via a "two-in-one" micelleplex promotes synergistic tumor suppression [J]. *ACS nano*, 2011, 5(2): 1483-94.
- [11] Cao Q, Guo X, Zhang W, et al. Flower-like Fe₇S₈/Bi₂S₃ superstructures with improved near-infrared absorption for efficient chemo-photothermal therapy [J]. *Dalton Trans*, 2019, 48(10): 3360-8.
- [12] Zhou M, Zhang R, Huang M, et al. A chelator-free multifunctional [64Cu] CuS nanoparticle platform for simultaneous micro-PET/

- CT imaging and photothermal ablation therapy [1]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(43): 15351 – 8.
- [3] Zha Z, Zhang S, Deng Z, et al. Enzyme-responsive copper sulphide nanoparticles for combined photoacoustic imaging, tumor-selective chemotherapy and photothermal therapy [J]. *Chem Commun*, 2013, 49(33): 3455 – 7.
- [4] Liu Y, Bhattarai P, Dai Z, et al. Photothermal therapy and photoacoustic imaging *via* nanotheranostics in fighting cancer [J]. *Chem Soc Rev*, 2019, 48(7): 2053 – 108.
- [5] Ye E, Win K Y, Tan H R, et al. Plasmonic gold nanocrosses with multidirectional excitation and strong photothermal effect [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(22): 8506 – 9.
- [6] Li N, Sun Q, Yu Z, et al. Nuclear-targeted photothermal therapy prevents cancer recurrence with near-infrared triggered copper sulfide nanoparticles [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(6): 5197 – 206.
- [7] Zhou M, Zhang R, Huang M, et al. A chelator-free multifunctional $[^{64}\text{Cu}]$ CuS nanoparticle platform for simultaneous micro-PET/CT imaging and photothermal ablation therapy [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(43): 15351 – 8.
- [8] Ding F, Li H J, Wang J X, et al. Chlorin e6-encapsulated polyphosphoester based nanocarriers with viscous flow core for effective treatment of pancreatic cancer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(33): 18856 – 65.
- [9] Fan F, Yu Y, Zhong F, et al. Design of tumor acidity-responsive sheddable nanoparticles for fluorescence/magnetic resonance imaging-guided photodynamic therapy [J]. *Theranostics*, 2017, 7(5): 1290 – 302.

Doxorubicin-loaded nanoparticles based on hollow copper sulfide for the cytotoxic effects on the pancreatic cancer cell line BxPC-3

Zhang Cong¹, Hang Lifeng², Chen Jun¹, et al

(¹Dept of Gastroenterology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²School of Life Sciences and Medical Center, University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

Abstract Objective To investigate the cytotoxic effects of doxorubicin(Dox)-loaded nanoparticles based on hollow copper sulfide(CuS) on the human pancreatic cancer cell line BxPC-3, to achieve the combination of chemotherapeutic drugs and photothermal therapy, and to enhance the killing effect of chemotherapy on pancreatic cancer. **Methods** Hollow CuS nanoparticles, PEG-modified nanoparticles and DOX@PEG-CuS nanoparticles were synthesized and characterized. BxPC-3 cells were divided into four groups, BxPC-3 cells + PBS, BxPC-3 cells + Free DOX, BxPC-3 cells + PEG-CuS, BxPC-3 cells + DOX@PEG-CuS. Inductively coupled plasma mass spectrometry was used to detect the cellular uptake of BxPC-3 cells. MTT assay and dead and alive staining assay were used to detect the killing effect of each experimental group on pancreatic cancer cell line BxPC-3. **Results** CuS nanoparticles with a size about 356.3 nm were successfully prepared, and after surface modification with PEG, the particle size of the PEG-CuS nanoparticles was about 209.8 nm. CuS nanoparticles modified by PEG are stable in 10% serum. The results of ICP-MS showed that PEG-CuS uptake rate of pancreatic cancer cells increased with the incubation time at 2 h(12.95%), 4 h(20.20%) and 6 h(32.98%) ($P < 0.05, t = 4.083; P < 0.01, t = 5.889$). The results of MTT method showed after combined photothermal therapy and chemotherapy, the doxorubicin-loaded CuS had the best killing effect, and the killing rate of pancreatic cancer cells was up to 88.3%, which was better than 52.04% of the CuS treatment group alone($F = 711.6, P < 0.0001$) and 45.58% of the free Dox group($F = 711.6, P < 0.0001$). **Conclusion** The hollow copper sulfide particles modified by PEG can be stably present in 10% serum. The uptake rate of CuS nanoparticles increases with time after PEG modification. Photothermal therapy combined with chemotherapy can achieve a higher killing effect on pancreatic cancer cell line BxPC-3.

Key words copper sulphide; doxorubicin; nanomedicine; pancreatic cancer; photothermal therapy