

网络出版时间: 2018-9-25 14:31 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180921.1451.001.html>

◇基础医学研究◇

RGDC 肽修饰的金纳米粒子协同光热疗法 杀伤胰腺癌细胞的研究

任乐、陈军、杨席席、韦瑞玲、许朝、余跃

摘要 目的 探究精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-半胱氨酸(RGDC)四肽修饰的金纳米粒子(AuNPs)协同光热疗法(PTT)杀伤人原位胰腺癌BxPC-3细胞的效果。方法 将RGDC肽修饰到AuNPs表面以合成RGDC/AuNPs,采用高分辨率电镜及紫外分光光度计对RGDC/AuNPs进行表征,采用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)法检测RGDC/AuNPs和未修饰的AuNPs被胰腺癌BxPC-3细胞摄取的情况,应用MTT法和活死细胞染色法观察经波长532 nm的光照射前后RGDC/AuNPs和AuNPs对BxPC-3细胞杀伤效果。结果 RGDC/AuNPs呈致密的球形形貌,粒径在45 nm左右。与AuNPs组相比,RGDC/AuNPs粒子能够更好的被BxPC-3细胞摄取($P < 0.01$)。MTT法和活死细胞染色法结果表明RGDC/AuNPs组在近红外光照射下杀伤BxPC-3细胞效果显著优于单纯的AuNPs组($P < 0.01$)。结论 RGDC肽修饰增加了胰腺癌BxPC-3细胞对AuNPs粒子的摄取以及增强了PTT对BxPC-3细胞的杀伤作用。

关键词 金纳米粒子; 氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-半胱氨酸; 胰腺癌; 光热疗法

中图分类号 R 753.9; R 454.2; Q 516

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)11-1657-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.001

胰腺癌被认为是最致命的恶性肿瘤,5年生存率不足5%^[1]。由于其早期症状隐匿且不典型,大多数患者在初次被确诊的时候已经到了中晚期,失去了手术治疗机会。临幊上大多采用药物化疗(如吉西他滨)、放射治疗以及生物治疗等方法。但由于副作用多、靶向性差等弱点限制了这些方法的应用。光热疗法(photothermal therapy, PTT)在肿瘤治疗领域具有重要的应用价值。金纳米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)由于其独特的性质被认为可以

作为PTT的理想材料^[2]。研究^[3]显示精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)在动物肿瘤实验中表现出良好的肿瘤靶向性。也有研究^[4]报道富含半胱氨酸(cysteine)的酸性蛋白可增加胰腺癌对吉西他滨治疗敏感性。该研究旨在观察精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-半胱氨酸(Arg-Gly-Asp-Cys, RGDC)修饰的AuNPs协同PTT杀伤人原位胰腺癌细胞BxPC-3的效果,为AuNPs体内外抗胰腺癌提供新的方法参考。

1 材料与方法

1.1 材料 氯金酸、柠檬酸钠购自上海国药集团化学试剂有限公司; RGDC 购自美国 MedChemExpress 公司; 人胰腺癌细胞系 BxPC-3 细胞购自中科院上海细胞库; RPMI-1640 购自美国 Invitrogen 公司; 噻唑蓝(MTT) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 钙黄绿素乙酰甲酯(calcein, AM) 和溴乙非啶豪莫二聚体(ethidium homodimer-1) 购自美国赛默飞世尔公司。

1.2 方法

1.2.1 RGDC 肽修饰的 AuNPs(RGDC/AuNPs) 制备 取 50 ml 1 mmol/L 的氯金酸在剧烈搅拌(1 000 r/min)条件下煮沸。随后迅速加入 5 ml ,38.8 mmol/L 的柠檬酸钠,待颜色由浅黄变成紫红色,继续煮沸 10 min,AuNPs 制备完毕,冷却待用。取 400 μl 的上述 AuNPs 和 400 μl RGDC(1 mmol/L) 分散在 5 ml 的超纯水中,置于 28 °C 的水浴锅中过夜,随后用超纯水 6 000 r/min 离心 5 min 去除多余的 RGDC(重复 3 次),RGDC/AuNPs 粒子制备完毕。

1.2.2 细胞培养 使用 RPMI-1640 培养液(含有 10% PBS 和 1% 的双抗),将 BxPC-3 细胞置于 5% CO₂ 细胞培养箱中 37 °C 培养,贴壁达到 80% ~ 90% 时利用 0.25% 的胰酶消化传代。

1.2.3 电感耦合等离子体质谱仪(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 检测 RGDC 肽修饰前后的金纳米粒子被细胞摄取的情况 待 BxPC-3 细胞孵育至对数期,用胰酶消化吹打重悬,

2018-07-11 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085SQH224)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院消化内科, 合肥 230001

作者简介: 任乐,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

种 24 孔板 ,每孔 5×10^6 个放置温箱培养 24 h ,用 RPMI-1640 培养液分别配置 AuNPs 粒子和 RGDC/AuNPs 粒子 ,浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$,将不做任何处理的细胞孔作为空白对照 ,将上述溶液分别加入孔板中 ,每组设置 3 个复孔 ,在 37 ℃ 温箱中孵育 24 h 。之后吸出上清液 ,弃去含 AuNPs 的培养基 ,PBS 冲洗 3 遍 ,胰酶消化并计算细胞密度 ;1 500 r/min 离心 10 min ;超声裂解细胞 ,高速离心 20 min ;吸出上清液 ,烘干 ,用王水溶解、超纯水定容 ,用 ICP-MS 测量 AuNPs 含量。用测得的 AuNPs 含量除以总的细胞数量得到平均细胞摄取量。

1.2.4 MTT 法检测光照后各组对细胞的杀伤作用

收集对数期 BxPC-3 细胞 ,置 37 ℃、5% CO_2 温箱孵育 24 h ,每孔加入 10 μl 不同纳米粒子组溶液 ,浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$,同时设置不含纳米粒子的对照孔 ,每组设定 3 复孔 ,继续培养 24 h 。洗掉孔板中培养液 加入新的培养液。分别用波长 532 nm 的光 0.5 W/cm^2 的功率照射各组细胞 5 min ,在一次照射停止后 ,直至分散液的温度恢复到室温之后再重复照射 ,累计 3 次。光照结束后继续培养 4 h ,加入配好的 MTT(1 mg/ml) ,继续温箱培养 4 h ,加入 20% 十二烷基硫酸钠裂解液 (sodium dodecyl sulfate SDS) ,高速震荡 10 min ,再用酶标仪 (570 nm 波长) 检测各孔吸光度 (optical density ,OD) 值。以如下公式计算细胞存活率 (%) = (实验组 OD 值 - 调零组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 调零组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.2.5 活死细胞染色法检测光照后各组对细胞的杀伤作用 进一步通过活死细胞染色直观地观察这种低功率光强下的 MTT 杀伤胰腺癌细胞的效果 ,种板方法同 MTT 检测 ,培养 24 h 后洗净原有培养液 ,加入新的完全培养液 ,实验分为 3 组 ,即不加 AuNPs 的空白对照组、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AuNPs 组和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RGDC/AuNPs 组 ,分别用波长 532 nm 的近红外光 0.5 W/cm^2 的功率照射三组细胞 5 min ,继续放入温箱培养 8 h ,随后加入用 PBS 配置好的活死细胞染色液钙黄绿素乙酰甲酯 (calcein ,AM) 2 $\mu\text{m}/\text{ml}$ 和溴乙非啶豪莫二聚体 (ethidium homodimer-4) 4 $\mu\text{m}/\text{ml}$,每孔 100 μl ,室温下孵育 30 min ,荧光显微镜拍照保存 ,最后用 Image J 统计各张图片中的死细胞及活细胞数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析 ,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,两组间变量比较采用 *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 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米粒子的成功制备 电镜视野下可观察到数个致密的球形形貌 ,平均粒径在 45 nm 左右。见图 1。RGDC/AuNPs 粒子及单纯 AuNPs 粒子的紫外吸收峰值 ,RGDC/AuNPs 粒子和 AuNPs 粒子吸收曲线存在明显不同 ,提示了 RGDC/AuNPs 粒子制备成功。见图 2。

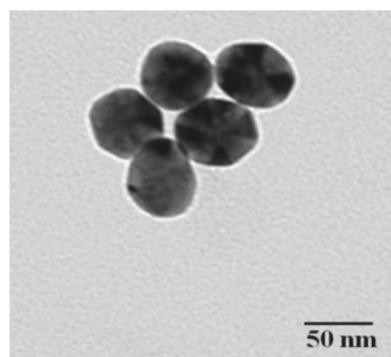


图 1 透射电镜检测 AuNPs 粒子的颗粒大小及形貌

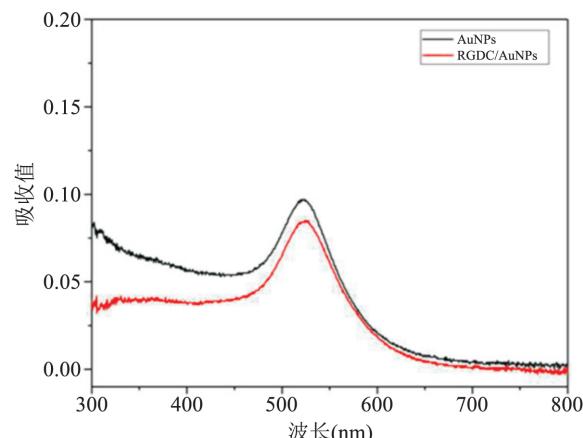


图 2 RGDC 四肽修饰前后 AuNPs 粒子紫外吸收变化

2.2 细胞对 RGDC 修饰前后的金纳米粒子的摄取情况 两组金纳米粒子 (AuNPs 组和 RGDC/AuNPs 组) 分别在 2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度下与 BxPC-3 细胞孵育 24 h ,随后利用 ICP-MS 检测细胞对不同浓度条件下两组纳米粒子的摄取含量。随着浓度梯度的增加 ,BxPC-3 细胞对两组纳米粒子的摄取含量呈增长趋势。在不同浓度梯度下 ,RGDC/AuNPs 组的摄取量均多于 AuNPs 组 ,差异有统计学意义 ($P < 0.01$) 。见表 1。

2.3 光照前后各组对细胞的杀伤作用 在未进行光照的情况下 ,各组中 BxPC-3 细胞的细胞存活率都

在 80% 以上,且组间存活率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3A。进一步采用波长为 532 nm,功率密度为 0.5 mW/cm² 的激光照射两组细胞 5 min,照射停止后,待分散液的温度恢复到室温之后再重复照射,累计 3 次,继续培养 6 h 后检测了各组的细胞数量。在 3 个不同浓度梯度下,RGDC/AuNPs 组对胰腺癌细胞 BxPC-3 杀伤效果明显强于 AuNPs 组($P < 0.01$),表明 RGDC/AuNPs 粒子可能通过光热协同效应来抑制胰腺癌细胞 BxPC-3,见图 3B、表 2。

表 1 不同浓度的两组纳米粒子和胰腺癌细胞共同培养后对两组纳米粒子摄取的量的比较($n = 3 \bar{x} \pm s$)

浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	AuNPs 组	RGDC /AuNPs 组	t 值	P 值
2.5	4.281 ± 0.021	$4.896 \pm 0.024^{**}$	19.28	< 0.01
5	5.132 ± 0.056	$6.158 \pm 0.062^{**}$	12.28	< 0.01
10	7.214 ± 0.071	$10.821 \pm 0.083^{**}$	33.02	< 0.01
20	10.016 ± 0.089	$14.523 \pm 0.095^{**}$	34.62	< 0.01

2.4 热疗法对各组细胞抑制的情况 通过活死细胞染色进一步直观地观察光热疗法抑制细胞增长的效果。在活死细胞染色中,活细胞被标记为绿色,死细胞被标记为红色。选取激光波长为 532 nm,功率密度为 0.5 W/cm²,经过照射后发现未加入 AuNPs 的空白对照组基本无红色标记的死细胞出现,见图 4A; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AuNPs 组有少量死细胞,见图 4B;而 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RGDC/AuNPs 组则从出现大面积的死细胞,见图 4C。计数结果显示 RGDC/AuNPs 组对细胞的抑制率明显高于 AuNPs 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

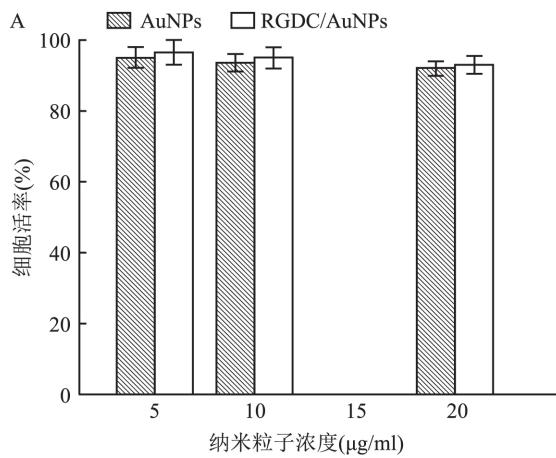


图 3 MTT 法检测各组粒子光照或非光照对胰腺癌细胞 BxPC-3 细胞的杀伤作用

A: 未光照的两组粒子对胰腺癌细胞 BxPC-3 细胞孵育 6 h 的毒性; B: 光照 6 h 后两组粒子对胰腺癌细胞 BxPC-3 细胞的杀伤作用; 与 AuNPs 组比较: ** $P < 0.01$

表 2 光照下各组纳米粒子对胰腺癌细胞生长抑制率的影响(% $n = 3 \bar{x} \pm s$)

浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	AuNPs 组	RGDC /AuNPs 组	t 值	P 值
5	14.23 ± 1.87	$36.16 \pm 3.10^{**}$	6.057	< 0.01
10	19.39 ± 1.91	$47.21 \pm 3.70^{**}$	6.681	< 0.01
20	25.41 ± 2.72	$55.19 \pm 4.80^{**}$	5.398	< 0.01

表 3 活死细胞染色法检测各组对胰腺癌细胞生长抑制率的影响(% $n = 3 \bar{x} \pm s$)

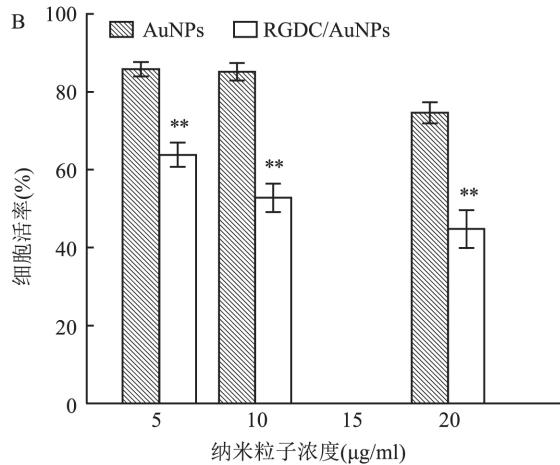
组别	抑制率
空白对照	0.00 ± 0.00
AuNPs	15.73 ± 2.16
RGDC/AuNPs	$50.31 \pm 5.68^{**}$
F 值	53.81

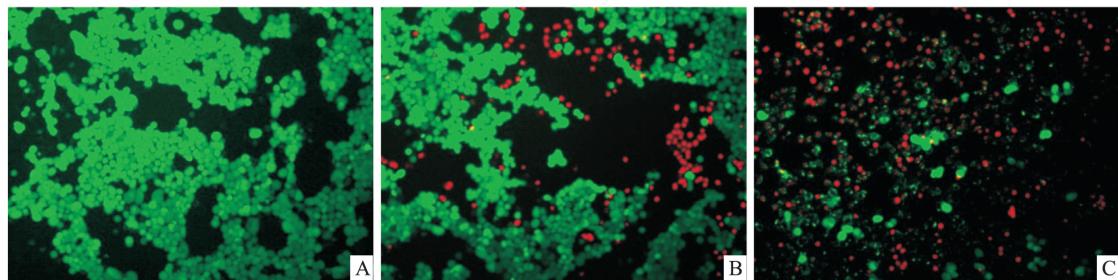
与 AuNPs 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

AuNPs 具有独特的表面等离子体共振的特性及光热转换效率显著,在 PTT 抗肿瘤上被越来越多地研究^[5]。由于 AuNPs 通过胞吞作用进入细胞较难,细胞摄取率较低,限制了其临床应用。如何通过对纳米粒子的表面修饰增加对特定肿瘤细胞的靶向性,从而更有效地杀灭肿瘤细胞仍然是一个巨大挑战。

整合素被认为在肿瘤发展中发挥着关键的作用,而 RGD 序列被认为是绝大多数整合素的特异性配体,可控制及介导细胞在生物材料上的粘附行为^[6]。Han et al^[7] 研究发现对 RGD 肽一级序列后引入新的氨基酸可改变其对不同组织的亲和性。前期研究^[8] 显示胰腺癌细胞及其周围的基质分泌大



图 4 活死细胞染色法检测各组之间光照后对细胞的杀伤效果 $\times 200$

A: 空白对照组; B: AuNPs 组; C: RGDC/AuNPs 组

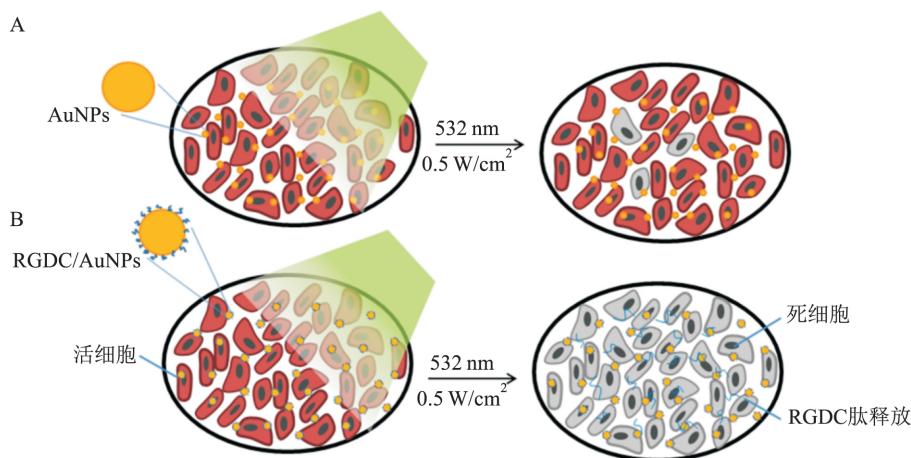


图 5 AuNPs 和 RGDC/AuNPs 在光热条件下杀伤胰腺癌细胞的效果图

A: AuNPs 在光热条件下杀伤胰腺癌细胞的效果图; B: RGDC/AuNPs 在光热条件下杀伤胰腺癌细胞的效果图

量的已知的具有与紫杉醇疗效相关性的蛋白质,富含半胱氨酸。并且,该富含半胱氨酸的蛋白是一种分泌性细胞基质糖蛋白,是一个潜在的细胞周期抑制因子,在接近 70% 的胰腺癌患者中存在表达^[9]。因此,本实验从如何对纳米粒子表面功能化,开发出针对性的增强胰腺癌细胞对纳米粒子的摄取等方面出发,制备了 RGDC/AuNPs 纳米粒子。由于通过金硫键和 AuNPs 之间的共价连接形成较强的耦合,纳米粒子的表面等离子体共振峰向近红外区域移动,从而使这种纳米平台可被有效的用于 PIT 中^[10]。

进一步观察 RGDC/AuNPs 较普通 AuNPs 的优势,ICP-MS 定量检测直接证实了 RGDC 肽修饰的 AuNPs 被胰腺癌细胞摄取率显著提高,接近单纯金纳米粒子的 2 倍,其中的原因可能归结于 RGDC 肽对胰腺癌有主动的靶向性。另外,经过 PIT 照射后,RGDC/AuNPs 颗粒能够显著增加光热效率,原因可能是经光照射后,硫金键断裂,更多的 AuNPs 和 RGDC 游离在细胞内,提高对细胞的损伤作用^[11]。由于金硫键通常较为稳定,既可以减少纳米粒子的非靶向释放,同时这种化学键可与巯醇反应

和(或)发生热裂^[12]。Piao et al^[13]通过将金纳米笼与细胞膜抗菌肽组成的协作纳米系统作为光热抗癌剂,在近红外光照射下,该纳米系统所产生的有效光热杀伤了癌细胞,这可能是由于通过由金纳米笼的光热启动细胞内的巯醇反应使得金硫键断裂进而释放抗菌肽,进一步起到膜损伤的作用。同时有研究^[14]发现 RGDC 修饰的二氧化钛(titanium dioxide, TiO₂)在紫外辐射下对海拉细胞(HeLa)具有更高的杀伤效果。本研究结果显示 RGDC/AuNPs 组对细胞的抑制率明显高于 AuNPs,这可能归因于 RGDC 四肽本身对胰腺癌细胞表面整合素的靶向性以及 RGDC 四肽富含半胱氨酸,其对 AuNPs 杀伤胰腺癌细胞也具有一定的协同作用。具体的模拟图见图 5。

综上所述,通过引入带有巯基的半胱氨酸形成 RGDC 的四肽,使得半胱氨酸引入的巯基直接通过金硫键修饰到 RGDC/AuNPs 表面,由于这种 RGDC 四肽修饰后的纳米粒子具有对胰腺癌细胞的靶向性,增加了胰腺癌细胞对这种纳米粒子的摄取率,同时实现了 RGDC/AuNPs 在热响应性情况下可发

生巯基断裂从而释放 RGDC 四肽, 增加了胰腺癌细胞内富含半胱氨酸的 RGDC 四肽的游离浓度, 增强胰腺癌细胞对吉西他滨化疗敏感性, 进一步达到在光热治疗时对胰腺癌细胞的协同杀伤作用, 为 AuNPs 体外抗胰腺癌提供新的方法参考。但 RGDC/AuNPs 在体内应用效果有待进一步研究。

参考文献

- [1] Siegel R L , Miller K D , Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin , 2018 , 68(1) : 7 – 30.
- [2] Li W , Zhang H , Guo X , et al. Gold nanospheres-stabilized indocyanine green as a synchronous photodynamic-photothermal therapy platform that inhibits tumor growth and metastasis [J]. Acs Appl Mater Interfaces , 2017 , 9(4) : 3354 – 67.
- [3] Danhier F , Le Breton A , Preat V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis [J]. Mol Pharm , 2012 , 9(11) : 2961 – 73.
- [4] 张建新, 蒋海华, 毛正发, 等. 富含半胱氨酸的酸性蛋白增加胰腺癌对吉西他滨化疗敏感性的机制 [J]. 中华肿瘤杂志, 2014 , 36(5) : 335 – 40.
- [5] Sun Y , Wang Q , Chen J , et al. Temperature-sensitive gold nanoparticle-coated pluronic-PLL nanoparticles for drug delivery and chemo-photothermal therapy [J]. Theranostics , 2017 , 7(18) : 4424 – 44.
- [6] Chen H , Niu G , Wu H , et al. Clinical application of radiolabeled rgd peptides for PET imaging of integrin alphavbeta3 [J]. Theranostics , 2016 , 6(1) : 78 – 92.
- [7] Han H , Jin Q , Wang Y , et al. The rational design of a gemcitabine prodrug with AIE-based intracellular light-up characteristics for selective suppression of pancreatic cancer cells [J]. Chem Commun , 2015 , 51(98) : 17435 – 8.
- [8] Tummers W S , Kimura R H , Abou-Elkacem L , et al. Development and preclinical validation of a cysteine knottin peptide targeting integrin αvβ6 for near-infrared fluorescent-guided surgery in pancreatic cancer [J]. Clin Cancer Res , 2018 , 24(7) : 1667 – 76.
- [9] Giordano G , Pancione M , Olivieri N , et al. Nano albumin-bound paclitaxel in pancreatic cancer: current evidences and future directions [J]. World J Gastroenterol , 2017 , 23(32) : 5875 – 86.
- [10] Muhamma N , Jin C S , Huynh E , et al. Phototheranostic porphyrin nanoparticles enable visualization and targeted treatment of head and neck cancer in clinically relevant models [J]. Theranostics , 2015 , 5(12) : 1428 – 43.
- [11] Hong R , Han G , Fernandez J M , et al. Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers [J]. J Am Chem Soc , 2006 , 128(4) : 1078 – 9.
- [12] Li H , Wang P , Deng Y , et al. Combination of active targeting, enzyme-triggered release and fluorescent dye into gold nanoclusters for endomicroscopy-guided photothermal/photodynamic therapy to pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Biomaterials , 2017 , 139: 30 – 8.
- [13] Piao J G , Liu D , Hu K , et al. Cooperative nanoparticle system for photothermal tumor treatment without skin damage [J]. ACS Appl Mater Interfaces , 2016 , 8(4) : 2847 – 56.
- [14] Yin Y , Zhu W W , Guo L P , et al. RGDC functionalized titanium dioxide nanoparticles induce less damage to plasmid DNA but higher cytotoxicity to HeLa cells [J]. J Phys Chem B , 2012 , 117(1) : 125 – 31.

RGDC peptide modified gold nanoparticles and photothermal therapy exert synergistic efficacy in pancreatic cancer cells

Ren Le , Chen Jun , Yang Xixi , et al

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

Abstract Objective To investigate the cytotoxic effects of photothermal therapy (PTT) based on RGDC peptide modified gold nanoparticles on the human pancreatic cancer cell line BxPC-3. **Methods** RGDC peptide was modified on the surface of AuNPs to synthesize RGDC/AuNPs. RGDC/AuNPs was characterized by high resolution electron microscopy and ultraviolet spectrophotometry. The cellular uptake of RGDC/AuNPs and unmodified AuNPs by BxPC-3 cells was detected by ICP-MS. The cytotoxic effects of RGDC/AuNPs and AuNPs with 532 nm wavelength light were observed by MTT assay and live dead cell staining. **Results** The RGDC/AuNPs showed a dense spherical morphology with a particle size of about 45 nm. Compared with AuNPs group, RGDC/AuNPs particles were better taken up by BxPC-3 cells ($P < 0.05$). The results of MTT assay and live/dead cell staining showed that the photothermal effects on BxPC-3 cells of RGDC/AuNPs group were significantly better than that of AuNPs alone group under laser irradiation ($P < 0.05$). **Conclusion** RGDC peptide modification increases the cellular uptake of AuNPs in pancreatic cancer BxPC-3 cells, and enhances photothermal effects on BxPC-3 cells.

Key words gold nanoparticles; RGDC; pancreatic cancer; photothermal therapy