

聚乙二醇和核酸适配体 AS1411 修饰的金纳米粒子对人宫颈癌 HeLa 细胞放射敏感性的影响

马洪鸽 林温文 史盼影 张保国

【摘要】 目的 研究聚乙二醇(PEG)和核酸适配体 AS1411 修饰的金纳米粒子(AuNPs)对人宫颈癌 HeLa 细胞辐射敏感性的影响。方法 用 PEG 和 PEG-AS1411 分别修饰经柠檬酸钠还原法制备的 AuNPs,制备纳米粒子 AuNPs@PEG 和 AuNPs@PEG-AS1411。分别用 CCK-8 法和克隆形成法检测纳米粒子的细胞毒性。用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)检测 HeLa 细胞对纳米粒子的吸收量。用克隆形成法检测纳米粒子联合 X 射线照射对 HeLa 细胞存活率的影响。结果 CCK-8 实验结果显示,AuNPs@PEG 和 AuNPs@PEG-AS1411 对 HeLa 细胞的毒性很小($P > 0.05$),而克隆形成实验结果则显示,10 d 后 HeLa 细胞的存活率明显降低($t = 4.38 \sim 11.60, P < 0.05$)。用 AS1411 修饰 AuNPs,可以增加细胞对 AuNPs 的吸收。AuNPs@PEG 和 AuNPs@PEG-AS1411 对 HeLa 细胞均具有辐射增敏作用($F = 7.90, 48.23, P < 0.05$),Au 浓度为 10 mg/L 时,其增敏比分别为 1.12 和 1.20。结论 AuNPs@PEG 和 AuNPs@PEG-AS1411 对 HeLa 细胞的急性细胞毒性较小,但具有长期毒性。用 AS1411 修饰 PEG 化的 AuNPs,可以增强 AuNPs 的放射增敏作用。

【关键词】 AS1411; 纳米金粒子; 辐射敏感性

Effects of AuNPs @ PEG-AS1411 nanoparticles on radiosensitization of HeLa cancer cells Ma Hongge, Lin Wenwen, Shi Panying, Zhang Baoguo. School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Collaborative Innovation Center of Radiological Medicine of Jiangsu Higher Education Institutions, Suzhou 215123, China

Corresponding author: Zhang Baoguo, Email: bgzhang@suda.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To study the effects of AuNPs @ PEG-AS1411 nanoparticles on radiosensitization of human uterine cervix cancer HeLa cells. **Methods** AuNPs were synthesized by citrate reduction method and then functionalized with PEG and PEG-AS1411, respectively. CCK-8 assay and colon forming assay were used to detect the acute and chronic toxicity effects of AuNPs on HeLa cells, respectively. At the same time, clonogenic survival assay was applied to measure the cell survival rate of HeLa cells after exposure to AuNPs@PEG and AuNPs@PEG-AS1411 combined with X-ray radiation. The intracellular uptake of AuNPs@PEG and AuNPs@PEG-AS1411 in HeLa cells were detected by ICP-MS. **Results** The CCK-8 assay showed that AuNPs@PEG and AuNPs@PEG-AS1411 were not toxic on HeLa cells($P > 0.05$). But the clonogenic survival assay showed that AuNPs@PEG and AuNPs@PEG-AS1411 had toxicity on HeLa cells significantly after 10 d($t = 4.38 - 11.60, P < 0.05$). AuNPs functionalized with AS1411 could increase the cellular uptake of AuNPs. AuNPs@PEG and AuNPs@PEG-AS1411 both had significant radiosensitive effect on HeLa cells ($F = 7.90, 48.23, P < 0.05$). The values of SER_{D_0} for AuNPs@PEG and AuNPs@PEG-AS1411 were 1.12 and 1.20, respectively, when the concentration of Au was 10 mg/L. **Conclusions** AuNPs@PEG and AuNPs@PEG-AS1411 could cause chronic toxicity on HeLa cells instead of acute effect. PEGylated AuNPs functionalized with AS1411 could enhance the radiosensitivity of HeLa cells *in vitro*.

【Key words】 AS1411; Au nanoparticles; Radiosensitization

表 1 3 种不同浓度的纳米粒子不同培养时间 HeLa 细胞的存活率(%, $\bar{x} \pm s$)

粒子	Au 浓度(mg/L)	样本数	24 h	48 h	72 h
AuNPs@ PEG	0	6	100	100	100
	5	6	103.4 ± 3.7	107.1 ± 4.6	98.9 ± 2.1
	10	6	104.6 ± 3.3	108.1 ± 4.3	97.7 ± 2.1
AuNPs@ PEG-AS1411	0	6	100	100	100
	5	6	106.1 ± 5.5	105.2 ± 4.7	101.2 ± 2.2
	10	6	107.1 ± 3.4	101.0 ± 2.7	98.5 ± 4.2
AuNPs@ PEG-cApt	0	6	100	100	100
	5	6	106.5 ± 3.5	107.0 ± 3.7	101.1 ± 2.2
	10	6	103.7 ± 2.4	106.0 ± 2.7	97.5 ± 3.2

取出培养板,弃培养基,每孔加入 90 μ l 新的 DMEM 培养基和 10 μ l CCK-8 溶液,放入 37°C、5% CO₂ 饱和湿度条件下继续孵育 2 h。630 nm 波长为参比波长,在多功能酶标仪上检测各孔 450 nm 波长吸光度(A)值。细胞存活率(%) = (实验组平均 A 值 - 空白对照组平均 A 值) / (对照组平均 A 值 - 空白对照组平均 A 值) × 100%。

8. 克隆形成法测量 X 射线照射后 HeLa 细胞的存活率:取对数生长期细胞,制成单细胞悬液,根据照射剂量接种不同的细胞数。吸收剂量为 0、2、4、6 和 8 Gy 时分别以 500、500、2 000、6 000 和 10 000/孔密度种入直径为 60 mm 培养皿中,每组每个剂量点设 3 个平行样。细胞分 AuNPs@ PEG 组、AuNPs@ PEG-AS1411 组和 AuNPs@ PEG-cApt 组。细胞接种后培养 24 h,弃培养基,各组加含金浓度分别为 0、5 和 10 mg/L 的相应修饰的 AuNPs 培养基,继续培养 24 h,用 160 kVp X 射线照射各组细胞,吸收剂量分别为 0、2、4、6 和 8 Gy。照射后继续培养 6 h 后,换新鲜纯培养基继续培养 10 d。甲醇固定 0.5 h,姬姆萨染色 0.5 h,计数 50 个细胞以上的细胞集落。计算细胞存活分数(SF),SF = 受照细胞克隆形成率/未照射细胞克隆形成率。细胞克隆形成率(%) = 克隆形成数/接种细胞数 × 100%。根据单击多靶模型 $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$,拟合细胞存活曲线,阈剂量 $D_q = D_0 \ln N$ 。根据 D_0 和 D_q 值,分别计算出 SER_{D_0} 和 SER_{D_q} 。

9. 统计学处理:结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 软件进行分析。组间比较采用方差分析,多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 3 种纳米粒子的细胞毒性:表 1 为 CCK-8 法得到的 AuNPs@ PEG、AuNPs@ PEG-AS1411 和

AuNPs@ PEG-cApt 对 HeLa 细胞存活率影响的实验结果。3 种 AuNPs 对 HeLa 细胞的存活率没有明显的影响($P > 0.05$),表明 AuNPs@ PEG、AuNPs@ PEG-AS1411 和 AuNPs@ PEG-cApt 对 HeLa 细胞的急性毒性很小。

表 2 为用克隆形成法得到的 AuNPs@ PEG、AuNPs@ PEG-AS1411 和 AuNPs@ PEG-cApt 处理细胞 24 h,对 HeLa 细胞存活率影响的实验结果。结果显示,HeLa 细胞的存活率明显降低。表明这 3 种纳米粒子对 HeLa 具有长期毒性。

表 2 不同浓度 3 种纳米粒子作用后 10 d HeLa 细胞存活率(%, $\bar{x} \pm s$)

粒子	样本数	0 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
AuNPs@ PEG	3	100	90.4 ± 4.9 ^a	82.7 ± 4.5 ^a
AuNPs@ PEG-AS1411	3	100	86.9 ± 4.0 ^b	78.2 ± 4.2 ^b
AuNPs@ PEG-cApt	3	100	89.2 ± 3.8 ^c	80.6 ± 4.0 ^c

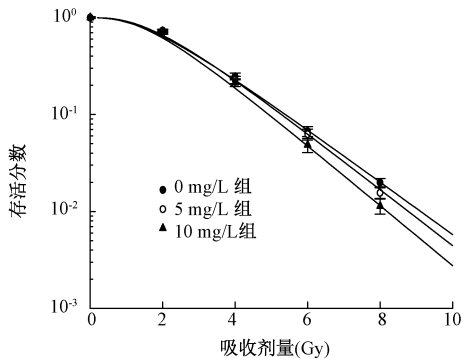
注:与 0 mg/L 比较,^a $t = 4.38, 8.60$; ^b $t = 7.33, 11.60$; ^c $t = 6.35, 10.80, P < 0.05$

由表 1 和表 2 的实验结果可以看出,浓度达到 10 mg/L 时, AuNPs@ PEG、AuNPs@ PEG-AS1411、AuNPs@ PEG-cApt 对 HeLa 细胞急性毒性很小,但存在长期毒性。

2. 细胞内 3 种 AuNPs 的含量:用含 Au 浓度为 10 mg/L 的 AuNPs@ PEG、AuNPs@ PEG-AS1411、AuNPs@ PEG-cApt DMEM 培养基培养 HeLa 细胞 24 h 后,进入到每个细胞中的 AuNPs 数分别为 $(3.09 \pm 0.42) \times 10^3$ 、 $(11.67 \pm 0.33) \times 10^3$ 、 $(3.68 \pm 0.37) \times 10^3$ 。结果显示,每个细胞中 AuNPs@ PEG-AS1411 含量是 AuNPs@ PEG 的 3.8 倍($t = 27.8, P < 0.01$),而每个细胞中 AuNPs@ PEG 和 AuNPs@ PEG-cApt 含量差异无统计学意义,表明 AS1411 可以促进细胞对纳米金粒子的吸收。

3. 3 种 AuNPs 对细胞辐射敏感性的影响:以表 2 中 0 Gy 细胞存活率为基准,定义其相对存活率为

100%, 对各组的细胞存活率进行校正, 从而得到细胞存活率曲线。图 1 为不同浓度 AuNPs@ PEG 预处理联合 X 射线照射后 HeLa 细胞存活率曲线。与单纯照射组(0 mg/L 组)比较, 不同浓度组的存活率差异有统计学意义 ($F = 5.65, 7.90, P < 0.05$), 表明 AuNPs@ PEG 可以增加 HeLa 细胞的辐射敏感性。



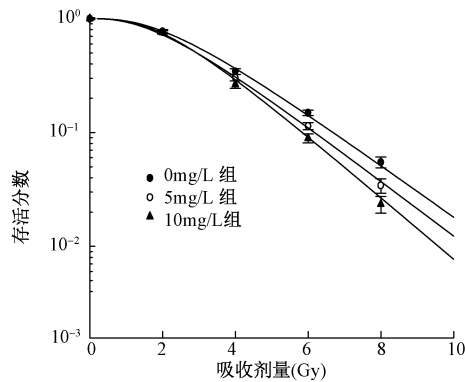
注: 与 0 mg/L 比较, 5 mg/L 时各剂量点, $F = 5.65, P < 0.05$; 10 mg/L 时各剂量点, $F = 7.90, P < 0.05$

图 1 AuNPs@ PEG 纳米粒子对 HeLa 细胞辐射敏感性的影响

图 2 为不同浓度 AuNPs@ PEG-AS1411 预处理联合 X 射线照射后 HeLa 细胞存活率曲线。与单纯照射组(0 mg/L 组)比较, 不同浓度组的存活率曲线差异有统计学意义 ($F = 14.97, 48.23, P < 0.05$), 表明 AuNPs@ PEG-AS1411 可以增加 HeLa 细胞的辐射敏感性。

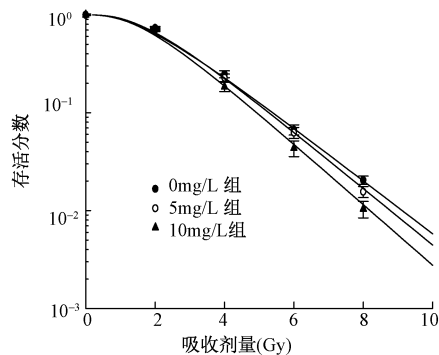
图 3 为不同浓度 AuNPs@ PEG-cApt 预处理联合 X 射线照射后对 HeLa 细胞存活率曲线, 从图 3 可以看出: 与单纯照射组(0 mg/L 组)比较, 不同浓度组的存活率曲线差异有统计学意义 ($F = 5.24, 7.51, P < 0.05$), 表明 AuNPs@ PEG-cApt 可以增加 HeLa 细胞的辐射敏感性。

使用单击多靶模型拟合细胞存活曲线, 得出的 D_0, D_q 值见表 3。结果表明, SER_{D_0}, SER_{D_q} 随着 AuNPs@ PEG-AS1411 浓度的增加而增加, 3 种纳米粒子都可以增加 HeLa 细胞的辐射敏感性, 增敏比



注: 与 0 mg/L 比较, 5 mg/L 时各剂量点, $F = 14.97, P < 0.05$; 10 mg/L 时各剂量点, $F = 48.23, P < 0.05$

图 2 AuNPs@ PEG-AS1411 纳米粒子对 HeLa 细胞辐射敏感性的影响



注: 与 0 mg/L 比较, 5 mg/L 时各剂量点, $F = 5.24, P < 0.05$; 10 mg/L 时各剂量点, $F = 7.51, P < 0.05$

图 3 AuNPs@ PEG-cApt 纳米粒子对 HeLa 辐射敏感性的影响

与 Au 的浓度相关, 但在 0 ~ 10 mg/L 范围内, 增敏效果还不明显。AuNPs@ PEG-AS1411 的增敏比最大, AuNPs@ PEG 和 AuNPs@ PEG-cApt 的增敏比无明显差异, 表明 AS1411 修饰 AuNPs 可以增强 AuNPs 的辐射增敏作用。

讨 论

已有研究表明, AuNPs 有辐射增敏作用, 但要求

表 3 3 种纳米粒子的辐射增敏比

粒子	Au 浓度 (mg/L)	样本数	D_0 (Gy)	D_q (Gy)	SER_{D_0}	SER_{D_q}
AuNPs@ PEG	0	3	1.90	2.38	—	—
	5	3	1.80	2.10	1.06	1.13
	10	3	1.70	2.05	1.12	1.16
AuNPs@ PEG-AS1411	0	3	1.90	2.38	—	—
	5	3	1.78	2.09	1.07	1.14
	10	3	1.59	2.00	1.20	1.20
AuNPs@ PEG-cApt	0	3	1.90	2.38	—	—
	5	3	1.79	2.10	1.06	1.14
	10	3	1.68	2.05	1.12	1.16

注: “—” 为无数据。SER. 增敏比

Au 浓度要达到 500 mg/L, 才有明显的增敏作用^[2,4-8]。如此大量的 AuNPs 进入人体, 存在极大的安全隐患。Cho 等^[9]研究证实, 4.26 mg/kg PEG 修饰的 13 nm AuNPs 在小鼠肝脏中引起明显炎症和凋亡。本研究中, 浓度达到 10 mg/L 时细胞存活率降到约 80%, 表明 AuNPs 存在长期毒性。因此, 为减少对正常组织的损伤, 用 AuNPs 作增敏剂, 需要将 AuNPs 靶向到肿瘤细胞。Hainfeld 等^[5]研究表明, AuNPs 增敏比与细胞内 AuNPs 的浓度相关。细胞对 AuNPs 的吸收与纳米粒子的大小、表面修饰密切相关, 增加细胞内金纳米浓度, 必须对 AuNPs 的表面进行修饰, 使其更容易进入细胞内^[3,10-11]。Chattopadhyay 等^[12]发现, 利用 Her-2 修饰 AuNPs, 使其靶向到肿瘤细胞和肿瘤组织, 发现可以增强辐射效应。而裸 AuNPs 是胶体, 稳定性差, 并且纳米粒子进入体内, 很容易被肝脏或脾脏中的巨噬细胞吞噬。为了提高 AuNPs 的稳定性和生物相容性, 防止被肝脏或脾脏中的巨噬细胞所清除, 最常用的方法用 PEG 修饰纳米粒子表面^[13]。由于 PEG 的作用, AuNPs@PEG 难以进入细胞内, 但会吸附在细胞膜上, AuNPs 进入细胞的量很少^[3]。需要在 PEG 的末端连接上能够促进纳米粒子进入肿瘤细胞及细胞核的分子, 如细胞穿膜肽、能够结合核仁素 (nucleolin) 的适配体 AS1411 等, 使 AuNPs 靶向肿瘤细胞, 容易穿过细胞膜, 大量沉积在细胞内^[14-15]。

核仁素是正常细胞核中丰度最高的磷酸化核蛋白, 约占核仁蛋白的 10%^[16]。核仁素具有多种生物功能, 包括调控核糖体的生物合成和成熟, 调控细胞分化增殖、胞质分裂、染色质复制、核仁发生、抗细胞凋亡等。正常的细胞膜上无核仁素, 而对于快速生长细胞、肿瘤细胞, 则在细胞质中过表达, 并被转运到细胞表面^[16-17]。肿瘤细胞表面的核仁素可作为肿瘤细胞的标志物, 也可作为靶向肿瘤细胞的靶点。肿瘤细胞表面的核仁素可以将其配体从细胞表面传送到细胞核中^[15]。利用肿瘤细胞表面核仁素的特性, 将 AuNPs 靶向输运到肿瘤细胞中。核酸适配体 AS1411 是核仁素的特异性适配体, 具有体积小、化学性质稳定不易被降解、易于合成、易修饰、无免疫原性等优点^[18]。因此, 本研究中, 选用 AS1411 修饰 AuNPs@PEG, 利用肿瘤细胞表面核仁素过表达, 而正常细胞表面无核仁素的特点, 使 AuNPs 靶向肿瘤细胞, 再利用核仁素的输运特性, 将 AuNPs 输运到肿瘤细胞内。通过制备 PEG

和 PEG-AS1411 修饰的 AuNPs@PEG 和 AuNPs@PEG-AS1411, 研究 AuNPs@PEG、AuNPs@PEG-AS1411 在 HeLa 内的沉积, 以及 AuNPs@PEG、AuNPs@PEG-AS1411 对 HeLa 细胞辐射敏感性的影响, 结果表明, AS1411 修饰 AuNPs 可以增加 HeLa 细胞内 AuNPs 数量。对于 X 射线, AS1411 可以增强 AuNPs@PEG 的辐射增敏作用, 增敏效果与纳米粒子浓度成正相关, 其机制可能与 AS1411 修饰的 AuNPs 更容易进入到肿瘤细胞有关。Au 浓度达到 10 mg/L 时, 增敏比达到 1.20, 增敏效果不显著。增敏比低的原因是使用的 AuNPs 浓度比较低, 细胞内 AuNPs 太少。影响肿瘤细胞内 AuNPs 浓度的因素很复杂, 如纳米粒子的粒径、表面修饰等。还需要进行进一步的研究, 提高 AuNPs 的辐射增敏效果。

参 考 文 献

- [1] Connor EE, Mwamuka J, Gole A, et al. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity[J]. *Small*, 2005, 1(3):325-327.
- [2] Jain S, Coulter JA, Hounsell AR, et al. Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 79(2):531-539.
- [3] Oh E, Delehanty JB, Sapsford KE, et al. Cellular uptake and fate of PEGylated gold nanoparticles is dependent on both cell-penetration peptides and particle size[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(8):6434-6448.
- [4] Zheng Y, Hunting DJ, Ayotte P, et al. Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons[J]. *Radiat Res*, 2008, 169(1):19-27.
- [5] Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice[J]. *Phys Med Biol*, 2004, 49(18):N309-N315.
- [6] Misawa M, Takahashi J. Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticle under X-ray and UV irradiations[J]. *Nanomedicine*, 2011, 7(5):604-614.
- [7] Rahman WN, Bishara N, Ackerly T, et al. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy[J]. *Nanomedicine*, 2009, 5(2):136-142.
- [8] Tao K, Zeng J, Wang X, et al. Enhancement of radiation cytotoxicity in breast cancer cells by localized attachment of gold nanoparticles[J]. *Small*, 2008, 4(9):1537-1543.
- [9] Cho WS, Cho M, Jeong J, et al. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles[J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2009, 236(1):16-24.
- [10] Gu YJ, Cheng J, Lin CC, et al. Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles[J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2009, 237(2):196-204.
- [11] Cho EC, Au L, Zhang Q, et al. The effects of size, shape, and

- surface functional group of gold nanostructures on their adsorption and internalization by cells[J]. *Small*, 2010, 6(4):517-522.
- [12] Chattopadhyay N, Cai Z, Kwon YL, et al. Molecularly targeted gold nanoparticles enhance the radiation response of breast cancer cells and tumor xenografts to X-radiation[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 137(1):81-91.
- [13] Conde J, Ambrosone A, Sanz V, et al. Design of multifunctional gold nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* gene silencing[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(9):8316-8324.
- [14] Hosta-Rigau L, Olmedo I, Arbiol J, et al. Multifunctionalized gold nanoparticles with peptides targeted to gastrin-releasing peptide receptor of a tumor cell line[J]. *Bioconjugate Chem*, 2010, 21(6):1070-1078.
- [15] Dam DHM, Lee JH, Sisco PN, et al. Direct observation of nanoparticle-cancer cell nucleus interactions[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(4):3318-3326.
- [16] Medina FJ, González-Camacho F, Manzano AI, et al. Nucleolin, a major conserved multifunctional nucleolar phosphoprotein of proliferating cells[J]. *J Appl Biomed*, 2010, 8(3):141-150.
- [17] Berger CM, Gaume X, Bouvet P. The roles of nucleolin subcellular localization in cancer[J]. *Biochimie*, 2015, 113(1):78-85.
- [18] Bates PJ, Laber DA, Miller DM, et al. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide ASI411 as a novel treatment for cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2009, 86(3):151-164.

(收稿日期:2015-04-19)

· 消息 ·

2015 年《中华放射医学与防护杂志》评价指标再获佳绩

2015 年 10 月 21 日, 中国科技论文统计结果发布。中国科技信息研究所《中国科技期刊引证报告(核心版)》显示, 在 2014 年 2 383 种中国科技核心期刊(即中国科技论文统计源期刊)中, 《中华放射医学与防护杂志》的综合评价总分排名第 104 位, 较去年上升 24 位。在军事医学与特种医学类期刊中, 核心总被引频次、核心影响因子和综合评价总分均位列第一。与去年相比, 影响因子由 0.375(第 3 名)升至 0.476(第 1 名), 增长了 27%; 总被引频次和综合评价总分保持首位, 总被引频次由 782 次增至 856 次, 综合评价总分由 72 分提高至 78.2 分, 呈现出全面提升的势头。此外, 基金论文比 50%。作者地区分布数、机构分布数也有上升, 说明本刊影响力不断扩大, 吸引了越来越多领域和地区的作者。

纵观近 5 年, 继《中华放射医学与防护杂志》2011 年成立第八届编委会, 2014 年成立第九届编委会以来, 编委们集思广益, 杂志推行了一系列有效措施, 取得了良好的效果。定期召开定稿会, 各领域专家集体终审稿件, 严格把关, 退稿率从 40% 提高到 60% 以上, 保证了杂志的学术质量; 2010 年底建成的杂志网站 www.cjrmpp.net, 至今访问量 250 多万次, 实时发布论文全文, 在 PDF 版的基础上, 增加了 HTML 格式, 并向 3 000 余名专家、作者推送 Email - Alert 服务; 2013 年开通了微信平台, 方便、快捷地报道杂志最新动态。杂志的影响力不断扩大, 2013—2014 年和 2015—2017 年, 《中华放射医学与防护杂志》连续获得“中国精品科技期刊工程项目”资助。2014 年入选“第 3 届中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

目前, 国内共有中英文期刊 6 210 种, 其中自然科学类 4 087 种, 2014 年进入中国科技核心期刊的为 2 383 种, 分布在 113 个学科门类中。作为一个受众面小的交叉学科, 本刊能跻身接近前 100, 显示了近年来持续增长的影响力。在此, 感谢各位编委和审稿专家的奉献, 广大读者和作者的支持!

百尺竿头, 更进一步。随着医疗照射防护事业的发展, 期望杂志焕发出更大的生机和活力。

(本刊编辑部)