

FePt/GO纳米复合材料在放化疗中的应用

缪洪涛¹, 马诗静², 全红¹, 谢丛华²

1. 武汉大学物理科学与技术学院, 湖北 武汉 430072; 2. 武汉大学中南医院放疗科, 湖北 武汉 430071

【摘要】目的:探索 FePt/GO 纳米复合材料的抗肺癌效果。**方法:**通过化学还原的方法制备出粒径约为 3 nm 的 FePt 纳米颗粒, 并通过超声将 FePt 纳米颗粒装载于氧化石墨烯(GO)表面得到 FePt/GO 纳米复合材料, 运用 TEM、AFM、XPS 等技术对其进行表征。将得到 FePt/GO 纳米复合材料分别与非小细胞肺癌细胞(H1975)和人胚肺成纤维细胞(HEL F)共同培养, 用 CCK-8 法对其进行毒性评估; 通过单细胞克隆形成实验与 CCK-8 法评估 FePt/GO 复合纳米材料的放射增敏作用。**结果:**成功制备出 FePt/GO 纳米复合材料, 在一定浓度范围内, FePt/GO 对 H1975 细胞表现出很明显的毒性而对正常 HEL F 细胞无明显毒性, 并且可以有效地增强 X 射线对 H1975 细胞的杀伤作用。**结论:**FePt/GO 纳米复合材料是一种有可能用于临床的抗癌药物。

【关键词】FePt/GO 纳米复合材料; 放射增敏; 细胞毒性; 放化疗

【中图分类号】R312; Q691.5

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2018)05-0612-04

Application of FePt/GO nanocomposites in chemoradiotherapy

MIAO Hongtao¹, MA Shijing², QUAN Hong¹, XIE Conghua²

1. School of Physics and Technology, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Department of Radiation Oncology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Abstract: Objective To explore the potential anticancer effect of FePt/graphene oxide (FePt/GO) nanocomposites in lung cancer. **Methods** FePt nanoparticles with particle size of about 3 nm were prepared by a chemical reduction method, and FePt/GO nanocomposites were facilely produced by assembling FePt nanoparticles to the surface of GO through sonicate. Transmission electron microscope, atom force microscope and X-ray photoelectron spectroscopy were utilized to characterize the surface morphology and chemical composition of FePt/GO nanocomposites. The obtained FePt/GO nanocomposites were cultured with non small cell lung cancer cells (H1975 cells) and Human embryonic lung fibroblasts (HEL F cells), separately, and the cytotoxicity of FePt/GO nanocomposites was evaluated in H1975 cells and HEL F cells by CCK-8 assay. The radiosensitization ability of FePt/GO nanocomposites was determined by colony formation test and CCK-8 assay. **Results** FePt/GO nanocomposites were successfully prepared in this study. Within a certain concentration range, FePt/GO nanocomposites showed significant toxicity to H1975 cells, while keeping no obvious toxicity to HEL F cells. Furthermore, FePt/GO nanocomposites enhanced the suppression of X-ray on H1975 cells growth. **Conclusion** FePt/GO nanocomposite is a potential anticancer agent which could be used in clinical treatment.

Keywords: FePt/GO nanocomposites; radiosensitization; cytotoxicity; chemoradiotherapy

前言

在全世界范围内,肺癌是一种常见并且高致死率

的恶性肿瘤,每年都有数百万的新生病例和死亡病例,并且这个趋势还在增加^[1-2]。传统的治疗方案包括手术,化疗和放疗,但由于本身的局限性,导致患者的生存率还是很低。手术由于肿瘤的位置,分期和患者的身体情况,并不能彻底清除病灶;化疗药物一般都会有较强的副作用,长期服用会产生耐药性;放疗受到肿瘤周围正常组织器官耐受剂量的限制,同时也会产生相应的并发症,如放射线皮炎,放射线肺炎等^[3]。因此,探索新的肿瘤治疗方案迫在眉睫。

纳米材料由于其独特的理化性质越来越多被应

【收稿日期】2018-01-25

【基金项目】国家自然科学基金(81572967);医科达-武汉大学医学物理教学科研基金(250000200)

【作者简介】缪洪涛,硕士在读,研究方向:纳米材料制备、纳米材料在放化疗中的应用, E-mail: 744512027@qq.com

【通信作者】全红,副教授,博士生导师,研究方向:放射治疗、医学影像, E-mail: 00007962@whu.edu.cn

用到肿瘤的诊断和治疗当中,如磁性纳米颗粒由于其磁性可以被用来作为放疗增敏剂、外部磁场导向的药物载体^[4]、CT,MRI的造影剂^[5]、磁热疗^[6]等。Liu等^[7]报道了纳米银颗粒能够增强脑胶质瘤对X射线的敏感性;Yu等^[8]制备了一种对X射线响应的硒纳米材料,可以诱导肿瘤细胞凋亡并增强X射线对肿瘤细胞的杀伤力,显现出更好的治疗效果。因此,探索一种能定向杀死肿瘤细胞避免正常组织受损的纳米材料激起了科学家们很大的兴趣。

本文通过化学还原的方法制备粒径约为3 nm FePt纳米颗粒,并使用超声将其装载于氧化石墨烯(Graphene Oxide, GO)表面来加强水溶性和生物相容性,利用CCK-8法和单细胞克隆来评估FePt/GO纳米复合材料的抗肿瘤效果。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

石墨粉末(>99.85%)、氯铂酸($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、乙酰丙酮铁($\text{Fe}(\text{acac})_3$, 98%)、油酸($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$, 分析纯)、油胺($\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}$, 90%)、硼氢化钠(NaBH_4 , 96%)、浓硫酸(95%~98%)、高锰酸钾、30%双氧水、盐酸。

1.2 样品制备

GO通过改善Hummers法^[9]获得。在0℃冰水浴条件下,将1 g的石墨粉末加入到23 mL的浓硫酸中,搅拌15 min后加入3 g的高锰酸钾并继续搅拌,此时温度控制在20℃以下;搅拌至反应液变为黄绿色,此时升温至35℃并搅拌2 h。随后,加入46 mL的去离子水待反应液冷却至室温,加入5 mL 30%的双氧水,并用5% HCl溶液和去离子水洗涤直到溶液呈中性,此时离心得到的沉淀就是GO。

将0.068 2 g乙酰丙酮铁、0.75 mL油酸、0.75 mL油胺依次加入100 mL无水乙醇中,磁搅拌30 min;待其混合均匀之后,再加入10 mL氯铂酸乙醇溶液(10 mg/mL),继续搅拌30 min;随后,将0.247 g硼氢化钠溶解于100 mL无水乙醇中,并缓慢将其滴加至上述混合溶液中,接着,将反应液水浴加热至40℃反应1 h;最后通过7 500 r/min离心、清洗、真空干燥(40℃, 24 h)得到的黑色物质即为FePt纳米颗粒。

将50 mg FePt和10 mg GO加入50 mL无水乙醇中,室温搅拌1 h,之后超声4 h;通过10 000 r/min的离心和无水乙醇的清洗,得到的产物就是FePt/GO。

1.3 样品表征

采用透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM, JEOL, Japan)和原子力显微镜(Atom Force Microscope, AFM, SPM-9500J3, SHIMADZU,

Japan)来观察FePt/GO的形貌和分布。使用X射线光电子能谱分析(X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS, ESCALAB250Xi, Thermo Fisher, USA)来检测表面化学成分。

1.4 细胞实验

H1975细胞和HELF细胞均购于中科院上海细胞库,并使用RPMI-1640培养液培养于5% CO_2 , 37℃的培养箱中,每毫升培养液包含10%的胎牛血清、100单位青霉素和100 μg的链霉素。

通过CCK-8法检测FePt/GO纳米复合材料的细胞毒性。当时细胞生长至培养皿底面积70%~80%时,使用胰酶将细胞消化脱落并吹散成单细胞,接种到96孔板中(8 000个/孔),待其贴壁后,依次加入浓度为0、2、5、10、15、25 μg/mL的FePt/GO;培养24 h后,每孔加入10 μL的CCK-8试剂,继续孵育并每隔1 h使用酶标仪(Modulus™ II, Turner)测量一次吸光度(Optical Density, OD)直至OD值接近1。相对细胞存活率计算公式为:处理组OD值/对照组OD值。

通过CCK-8法和单细胞克隆法检测FePt/GO纳米复合材料的放射增敏特性。CCK-8法将细胞分为两组,两组均受到浓度为20 μg/mL FePt/GO和4 Gy X射线的处理,只改变两种操作的先后顺序。单细胞克隆法如下:以每孔100、100、200、400、800、1 200个细胞接种在6孔板中,待其贴壁后,加入终浓度为25 μg/mL的FePt/GO纳米复合材料;12 h之后使用中南医院医用加速器(6 MV, Varian, Clinic-Unique, USA)分别照射剂量为0、1、2、4、6、8 Gy的X射线。经过2周的培育后,肉眼可见单细胞克隆点形成,使用4%的多聚甲醛液进行固定,然后使用1%的结晶紫进行染色并计数。使用GraphPad Prism软件进行单靶多击模型拟合生存曲线。以上实验均重复3次,统计结果使用均数±标准差表示。

2 结果

2.1 材料表征

在TEM下观测FePt/GO纳米复合材料,其表面形貌、尺寸和分布如图1所示,形状为类球形,直径约为3 nm(白色箭头),附着在GO(黑色箭头)表面。

图2是FePt/GO的AFM图像。图中白色亮点即为FePt纳米颗粒,黄色的不规则形状为氧化石墨烯。从相应的截面图也可以发现FePt纳米颗粒的直径约为3 nm,GO的厚度约为3 nm,是3个单层GO叠加在一起。

FePt/GO的表面元素由XPS给出,如图3所示,GO主要含C、O两种元素,FePt/GO则含有Fe、Pt、C、O。各元素的含量对比由表1给出。

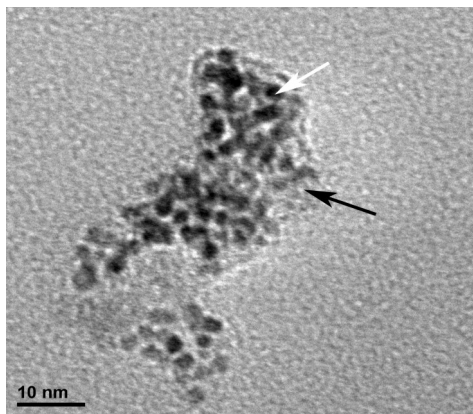


图1 FePt/GO的透射电子显微镜图像

Fig.1 Transmission electron microscope image of FePt/graphene oxide (FePt/GO)

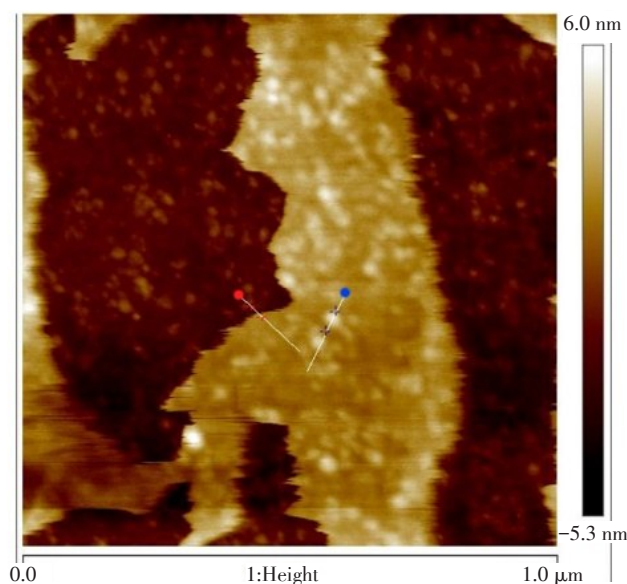


图2 FePt/GO的原子力显微镜图像

Fig.2 Atom force microscope image of FePt/GO

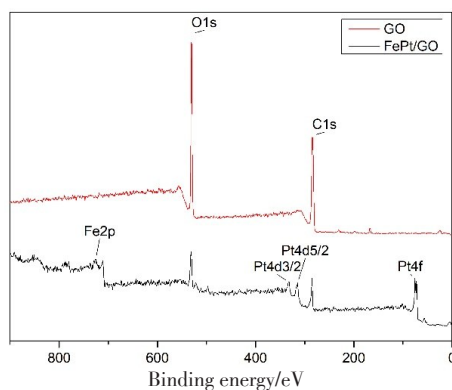


图3 GO与FePt/GO的X射线光电子能谱图

Fig.3 X-ray photoelectron spectroscopy spectra of GO and FePt/GO

2.2 细胞毒性

如图4所示,FePt/GO能够选择性的抑制非小细胞

表1 样品的相对元素丰度(%)

Tab.1 Relative element proportion of samples (%)

Sample	C	O	Fe	Pt
GO	56.10	43.90	0.00	0.00
FePt/GO	40.45	34.33	14.19	11.03

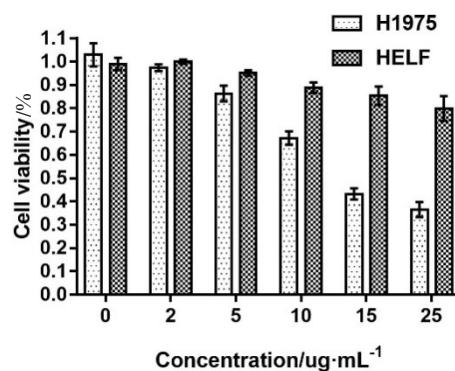


图4 FePt/GO的细胞毒性

Fig.4 Cytotoxicity of FePt/GO

性肺癌H1975细胞的增殖;其抑制效果随着FePt/GO浓度的增加显著增强,在25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的时候,H1975的细胞活性下降至36.8%,半致死剂量(IC_{50})约为15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。虽然HELF细胞的增殖也受到了FePt/GO的影响,但是在25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FePt/GO的作用下也只减少了20%的细胞活性,仍然处在无毒范围内($>75\%$)^[10]。

2.3 放射增敏

FePt/GO纳米复合材料的增敏效果如图5所示。从图5a、b可以看到,2 Gy+FePt/GO(培养基中含有20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FePt/GO,照射2 Gy)处理组所形成的克隆群落明显比只经过2 Gy X射线处理的少,FePt/GO与X射线联合比单纯X射线能更好的抑制肿瘤细胞的生长;从图5c中可以看出,先加FePt/GO后照射组对H1975细胞的抑制效果比先照射后加FePt/GO组的好,并且随着FePt/GO浓度的增加,也愈加明显,说明FePt/GO与X射线之间有一个协同作用,即FePt/GO增强了非小细胞肺癌细胞H7975对X射线的敏感度。

3 讨论和结论

由于单纯的治疗手段难以治愈所有的恶性肿瘤,现在更倾向于将几种手段联合起来使用。比如在肺癌的治疗中,病人不仅会实行常规的化疗,同时还会用放疗来进行辅助治疗^[11]。这种同步放化疗治疗可以减少化疗药物的使用来缓解肿瘤对化疗药物抗药性与化疗药物本身的毒副作用,同时也可以以相对单纯放疗较低的放射剂量来治疗,从而避免或缓解放疗并发

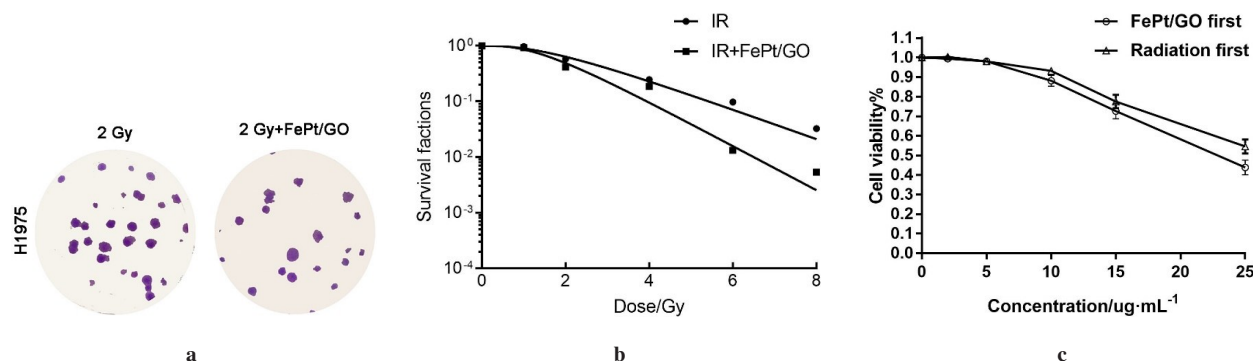


图5 FePt/GO纳米复合材料的增敏效果

Fig.5 Radiosensitization of FePt/GO nanocomposites

a: Colony formation; b: Single target and multi-hit model to fit the survival curve; c: Growth inhibition of H1975 cells treated with FePt/GO nanocomposites before or after X-ray irradiation.

症^[12-14]。在此基础上,研究出一种低毒性、靶向性和能增强对X射线敏感性的多功能药物是很有意义的。Zheng等^[15]报道了FePt纳米颗粒对X射线有吸收作用并会抑制HeLa细胞的增殖。此外,一些无毒的纳米材料如富勒烯(C₆₀)、氧化石墨烯(GO)均被报道能够有效增强化疗药物对癌细胞的杀伤力^[16-17]。

本研究中发现FePt/GO纳米复合材料能够选择性的抑制肿瘤细胞生长,同时能够增强X射线对肿瘤细胞的杀伤力;同时,其对肿瘤细胞的抑制效果(IC₅₀=15 μg/mL)较Zheng等^[15]制备的FePt纳米颗粒(IC₅₀=50 μg/mL)更为优秀。其原因可能如下:首先肿瘤细胞的种类不一致,本文中用的是非小细胞性肺癌细胞H1975,而Zheng等^[15]使用的是宫颈癌细胞HeLa;然后GO载体能够加强FePt纳米颗粒对肿瘤细胞的抑制作用。此外纳米材料由于其尺寸,在实体瘤内会产生高通透和滞留效应,即相对有着完整血管结构的正常组织,纳米材料更容易渗透进入血管结构不完整的肿瘤并长期滞留^[18-20]。由于这一特殊效应使得纳米材料具备天然的靶向性,有利于肿瘤的治疗。

本文在体外实验中初步验证了FePt/GO纳米复合材料应用到非小细胞性肺癌治疗的可能性,还存在局限性,体内复杂的微环境未得到充分的考虑,对于其他正常组织的影响也并不清楚。因此,进一步的体内实验是我们今后的研究方向。

【参考文献】

- [1] TORRE L A, SIEGEL R L, JEMAL A. Lung cancer statistics[M]// AHMAD A, GADGEEL S. Lung cancer and personalized medicine: current knowledge and therapies. Cham: Springer International Publishing, 2016: 1-19.
- [2] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.
- [3] GAO C, KOZLOWSKA A, NECHAEV S, et al. TLR9 signaling in the tumor microenvironment initiates cancer recurrence after radiotherapy[J]. Cancer Res, 2013, 73(24): 7211-7221.
- [4] FUCHIGAMI T, KAWAMURA R, KITAMOTO Y, et al. A magnetically guided anti-cancer drug delivery system using porous FePt capsules[J]. Biomaterials, 2012, 33(5): 1682-1687.

- [5] CHOU S W, SHAU Y H, WU P C, et al. *In vitro* and *in vivo* studies of FePt nanoparticles for dual modal CT/MRI molecular imaging[J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(38): 13270-13278.
- [6] SAHU N K, GUPTA J, BAHADUR D. PEGylated FePt-Fe₃O₄ composite nanoassemblies (CNAs): *in vitro* hyperthermia, drug delivery and generation of reactive oxygen species (ROS)[J]. Dalton Trans, 2015, 44(19): 9103-9113.
- [7] LIU P, HUANG Z, CHEN Z, et al. Silver nanoparticles: a novel radiation sensitizer for glioma?[J]. Nanoscale, 2013, 5(23): 11829-11836.
- [8] YU B, LIU T, DU Y, et al. X-ray-responsive selenium nanoparticles for enhanced cancer chemo-radiotherapy[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016, 139: 180-189.
- [9] WILLIAM S, HUMMERS J, RICHARD E, et al. Preparation of graphitic oxide[J]. J Am Chem Soc, 1958, 80(6): 1339.
- [10] International organization for standardization biological evaluation of medical devices-part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity: ISO 10993-5: 2009[S]. Geneva, 2009.
- [11] BAGCCHI S. Use of chemotherapy in patients with metastatic lung cancer[J]. Lancet Oncol, 2015, 16(6): e263.
- [12] BUTTS C, SOCINSKI M A, MITCHELL P L, et al. Tecemotide (L-BLP25) *versus* placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): a randomised, double-blind, phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(1): 59-68.
- [13] ZATLOUKAL P, PETRUZELKA L, ZEMANOVA M, et al. Concurrent *versus* sequential chemoradiotherapy with cisplatin and vinorelbine in locally advanced non-small cell lung cancer: a randomized study[J]. Lung Cancer, 2004, 46(1): 87-98.
- [14] MEHRA N K, JAIN N K. Cancer targeting propensity of folate conjugated surface engineered multi-walled carbon nanotubes[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 132: 17-26.
- [15] ZHENG Y, TANG Y, BAO Z, et al. FePt nanoparticles as a potential X-ray activated chemotherapy agent for HeLa cells[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 6435-6444.
- [16] CHEN G Y, MENG C L, LIN K C, et al. Graphene oxide as a chemosensitizer: diverted autophagic flux, enhanced nuclear import, elevated necrosis and improved antitumor effects[J]. Biomaterials, 2015, 40: 12-22.
- [17] ZHANG Q, YANG W, MAN N, et al. Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C60 nanocrystal[J]. Autophagy, 2014, 5(8): 1107-1117.
- [18] SHAO J, XIE H, HUANG H, et al. Biodegradable black phosphorus-based nanospheres for *in vivo* photothermal cancer therapy[J]. Nat Commun, 2016, 7: 12967.
- [19] DELLA ROCCA J, WERNER M E, KRAMER S A, et al. Polysilsesquioxane nanoparticles for triggered release of cisplatin and effective cancer chemoradiotherapy[J]. Nanomedicine, 2015, 11(1): 31-38.
- [20] PARK J H, GU L, VON MALTZAHN G, et al. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for *in vivo* applications[J]. Nat Mater, 2009, 8(4): 331-336.

(编辑:薛泽玲)