



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.010
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(1):52-56.

· 基础研究 ·

纳米金增加阿霉素耐药肝癌细胞株敏感性的实验研究

邵明涛¹, 潘运龙^{1,2}, 覃莉³, 丁晖¹, 赵晓旭², 吴晓波¹

(暨南大学附属第一医院 1. 胃肠外科 2. 伽玛刀中心, 广东 广州 510632; 3. 暨南大学医学院 组织胚胎学教研室, 广东 广州 510632)

摘要

目的: 观察纳米金 (GNP) 人耐药肝癌细胞株耐药性的逆转作用。

方法: 采用氯金酸柠檬酸三钠还原法制备并鉴定; 分别用 GNP 与阿霉素 (ADM) 组单独或联合作用于 ADM 耐药的肝癌细胞株 HepG2/ADM, 以未处理的 HepG2/ADM 细胞为对照, 用 MTT 法检、流式细胞术检测细胞的增殖与凋亡情况; 紫外分光光度计检测 HepG2/ADM 细胞经 ADM 单独作用以及 GNP 与 ADM 联合作用后细胞内 ADM 浓度。

结果: 与对照细胞比较, ADM 单独作用及 GNP 与 ADM 联合作用后, HepG2/ADM 的增殖均明显抑制、凋亡率明显升高, 但后者的作用明显强于前者 (均 $P < 0.05$), 而 GNP 单独作用对细胞的增殖与凋亡无明显影响 (均 $P > 0.05$); GNP+ADM 作用后, HepG2/ADM 细胞内的 ADM 含量较 ADM 单独作用后的 ADM 含量明显增加 [$(2.92 \pm 0.13) \mu\text{g/L}$ vs. $(1.68 \pm 0.74) \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$]。

结论: GNP 可增加 HepG2/ADM 细胞对 ADM 的敏感性, 该作用可能与其增加 HepG2/ADM 细胞内的 ADM 浓度有关。

关键词

癌, 肝细胞; 金属纳米粒子; 阿霉素; 多药耐药
中图分类号: R735.7

Gold nanoparticles re-sensitizing adriamycin-resistant hepatocellular carcinoma cells: an experimental study

SHAO Mingtao¹, PAN Yunlong^{1,2}, QIN Li³, DING Hui¹, ZHAO Xiaoxu², WU Xiaobo¹

(1. Department of Gastrointestinal Surgery 2. Gamma Knife Center, the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Department of Histology and Embryology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract

Objective: To investigate the drug resistance reversing effect of gold nanoparticles (GNPs) on drug-resistant human hepatocellular carcinoma cell line.

Methods: GNPs were synthesized by reducing hydrogen tetrachloroaurate using tri-sodium citrate, and identified. Adriamycin (ADM)-resistant hepatocellular carcinoma HepG2/ADM cells were treated with GNP and adriamycin (ADM), alone or in combination, using HepG2/ADM cells without any treatment as a control,

基金项目: 国家基础研究 973 计划资助项目 (2010CB833603); 国家自然科学基金资助项目 (81472849); 暨南大学第一临床医学院科研培育基金资助项目 (511005004); 暨南大学第一临床医学院开放基金资助项目 (511005026)。

收稿日期: 2014-11-01; **修订日期:** 2014-12-23。

作者简介: 邵明涛, 暨南大学附属第一医院硕士研究生, 主要从事抗肿瘤血管生成及肿瘤血管正常化方面的研究。

通信作者: 潘运龙, Email: tpanyl@jnu.edu.cn

and then the cell proliferation and apoptosis were determined by MTT assay and flow cytometry, respectively. The intracellular ADM concentration of HepG2/ADM cells after exposure to ADM alone or GNP plus ADM were determined by ultraviolet-visible spectrophotometer.

Results: Compared with control cells, the cell proliferation was inhibited and apoptosis rate was increased significantly in HepG2/ADM cells treated with ADM along or combination with GNP, and these effects were more remarkable in the latter than in the former (all $P < 0.05$). The intracellular ADM concentration in HepG2/ADM cells exposed to GNP plus ADM was significantly higher than in those exposed to ADM alone [(2.92±0.13) $\mu\text{g/L}$ vs. (1.68±0.74) $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$].

Conclusion: GNP can enhance the sensitivity of HepG2/ADM cells to ADM, and this effect may be related to its increasing the intracellular ADM accumulation in HepG2/ADM cells.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; Metal Nanoparticles; Adriamycin; Multiple Drug Resistance

CLC number: R735.7

化疗是恶性肿瘤治疗的重要手段之一,然而由于肿瘤细胞多药耐药性(multidrug resistance, MDR)^[1]的存在,化疗效果并不理想^[2]。MDR发生的机制复杂,目前认为MDR的主要机制与耐药肿瘤细胞对抗肿瘤药物的主动外排作用密切相关^[3],即细胞将进入胞内的化疗药物排至胞外,从而降低胞内药物浓度,影响化疗药物的发挥作用。因此,如何改变细胞耐药性,增加细胞内化疗药物浓度,增强化疗疗效值得深入研究。纳米金(gold nanoparticles, GNP)是金的微小颗粒,在肿瘤治疗方面具有很大的潜能^[4]。笔者前期研究^[6-7]表明GNP不仅具有抗肿瘤血管生成^[5]及诱导肿瘤血管正常化的作用,还可以作为“载药工具”增加非耐药肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[8]。那么,GNP是否可以增加化疗药物对耐药肿瘤细胞的细胞毒性作用,从而增加化疗效果。本研究就这一问题进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

对阿霉素(ADM)耐药的肝癌细胞株HepG2/ADM由本实验室保存RPMI-1640培养液、L-谷氨酰胺、青霉素和链霉素均购自美国Hyclone公司;ADM购自浙江海正药业股份有限公司;胎牛血清和胰蛋白酶购自美国Gibco公司;MTT和DMSO购自美国Sigma公司;实验用水为超纯水;Annexin V-FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

氯金酸和枸橼酸钠均为国产分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。紫外可见分光光度计购自美国PerkinElmer公司;酶联免疫检测仪购自美国Bio-Rad公司;相关酶标板为Costar酶标板。

1.2 细胞培养

HepG2/ADM细胞株用含0.5 $\mu\text{g/mL}$ ADM、10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的RPMI-1640培养液,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为5%的饱和湿度条件下培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 GNP的制备及鉴定

采用氯金酸柠檬酸三钠还原法^[9]制备GNP,通过紫外可见分光光度计在400~700 nm波长处扫描样品特征性吸收峰,通过透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)对GNP的粒径进行表征。

1.4 MTT法检测细胞的增殖抑制率

实验分成对照组(无血清培养基)、GNP(5.0 nmol/L)组、ADM(1.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$)组、GNP+ADM组。取对数生长期的HepG2/ADM细胞,0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,以 1×10^4 个/mL的细胞密度接种于96孔板中,100 μL /孔。细胞培养24 h后,吸出上清液,按照分组,分别加入无血清培养基、终浓度为5.0 nmol/L的GNP溶液、不同浓度(1.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$) ADM溶液、5.0 nmol/L GNP溶液+不同浓度(1.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$) ADM溶液各10 μL 以及无血清培养液150 μL ,继续培养细胞24 h。实验终止前4 h,各孔加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μL 继续培养4 h,弃去上清,每孔加入150 μL 二甲基亚

砷,在测量波长570 nm、参比波长630 nm处测吸光度(A值)。细胞增殖抑制率(IR)。IR=(1-药物组A值/对照组A值)×100%。

1.5 流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡率

取对数生长期HepG2/ADM细胞,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于6孔板中,2 mL/孔;细胞贴壁生长24 h后,按各分组分别加入无血清培养液、5.0 nmol/LGNP溶液、2.0 μg/mL ADM溶液、5.0 nmol/LGNP溶液+2.0 μg/mL ADM溶液各100 μL以及无血清培养液2 mL。药物作用24 h后,用胰酶消化细胞并收集于试管中,PBS洗涤细胞3次。按Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒说明书提供的方法检测细胞凋亡率。细胞凋亡率的检测:每管样品中分别加入200 μL结合缓冲液重悬细胞后,加入5 μL Annexin V-FITC与5 μL PI,轻轻混匀,避光室温反应15 min,上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6 紫外分光光度计检测细胞内ADM浓度

在室温(25℃)条件下配制浓度为50 mg/L的ADM溶液,用紫外分光光度计于200~800 nm波长范围扫描,结果显示在480 nm处有最大吸收峰,配制8个不同浓度的ADM标准溶液,用紫外分光光度计测其480 nm吸光度,得到浓度-吸光度标准曲

线。实验分组:ADM组、GNP+ADM组。每组设4个复孔。按分组将HepG2/ADM细胞以 1×10^4 个/孔接种于96孔板。培养24 h后,对照组加无血清培养基100 μL,同时,GNP处理组加入5.0 nmol/L GNP溶液100 μL、1 h后用PBS洗净上述液体,各实验组分别加入10 μg/mL的ADM 200 μL,继续培养4 h后收集各组上清液,测其480 nm处的吸光度。根据标准曲线得到各实验组细胞内ADM浓度。

1.7 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。所有实验均重复3次,统计资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用配对t检验,3组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GNP的制备及鉴定

制备获得的GNP溶液呈酒红色,紫外可见分光光度计扫描显示,GNP的最大吸收峰在520 nm处(图1A);TEM观察发现,GNP呈球形,粒径均一,直径约20 nm,离散度好,无团聚(图1B)。

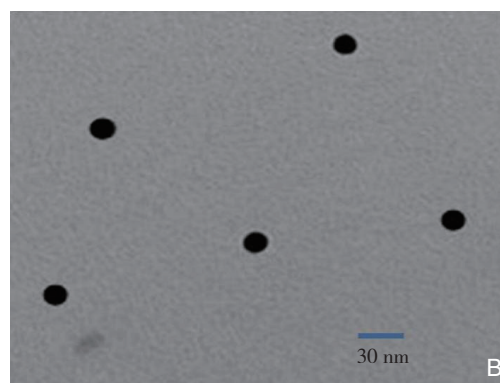
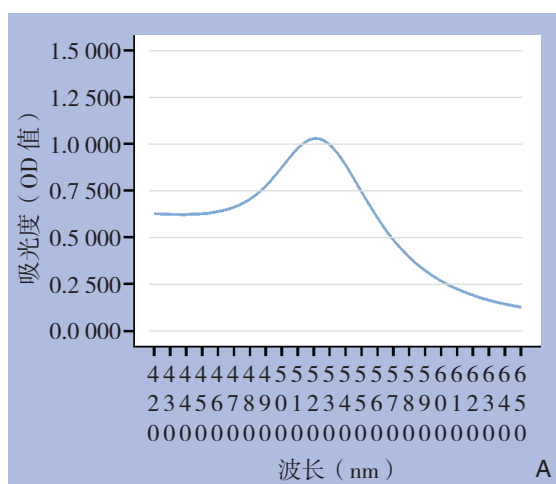


图1 GNP的鉴定 A: GNP的紫外吸收光谱; B: 透射电子显微镜图像
Figure 1 Identification of GNP A: UV-visible absorption spectra; B: TEM micrograph

2.2 GNP对HepG2/ADM细胞增殖抑制率的影响

MTT检测结果显示,GNP(5.0 nmol/L)与ADM(1.0、2.0 μg/mL)联合作用后,HepG2/ADM细胞的增殖抑制率均明显高于相应浓度的单

纯ADM(1.0、2.0 μg/mL)组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),单纯GNP对HepG2/ADM细胞无明显抑制作用($P > 0.05$)(表1)。

表1 各组 HepG2/ADM 细胞的增殖抑制率

Table 1 Proliferation inhibitory rates in each group of HepG2/ADM cells

分组	增殖抑制率 (%)
对照组	0
GNP 组	2.46 ± 0.73
ADM 1.0 μg/mL 组	12.76 ± 0.94
ADM 2.0 μg/mL 组	18.76 ± 1.08
GNP+ADM 1.0 μg/mL 组	26.71 ± 1.33 ¹⁾
GNP+ADM 2.0 μg/mL 组	30.85 ± 1.28 ¹⁾

注: 1) 与相同浓度 ADM 单独作用组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. ADM of the same concentration alone treatment group

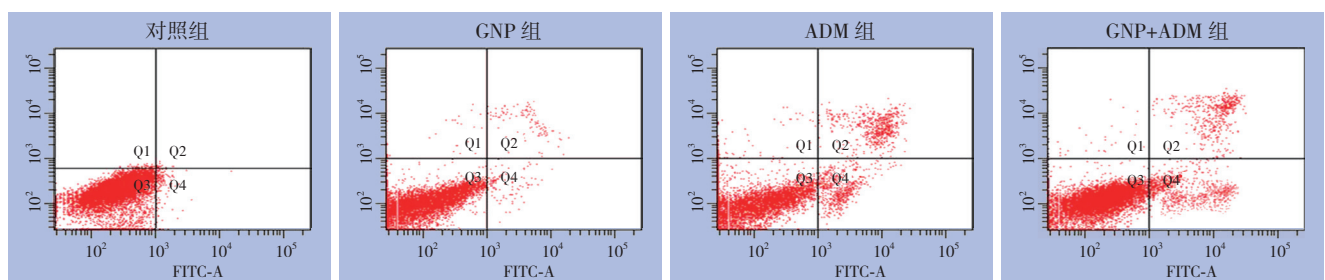


图2 各组 HepG2/ADM 细胞凋亡情况

Figure 2 Apoptosis in each group of HepG2/ADM cells

2.4 GNP 对 HepG2/ADM 细胞内 ADM 含量的影响

紫外分光光度计检测结果 (图3) 显示, GNP+ADM 处理组 HepG2/ADM 细胞内的 ADM 含量较单独 ADM 处理组明显增加 [$(2.92 \pm 0.13) \mu\text{g/L}$ vs. $(1.68 \pm 0.24) \mu\text{g/L}$] ($P < 0.05$)。

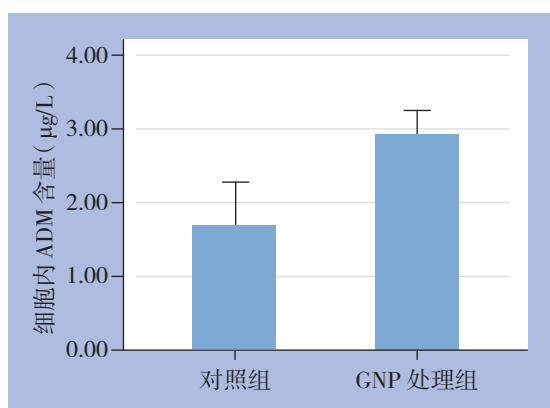


图3 GNP 对 HepG2/ADM 细胞内 ADM 含量的影响

Figure 3 Effect of GNP on intracellular ADM concentration of HepG2/ADM cells

2.3 GNP 对 HepG2/ADM 细胞凋亡率的影响

FCM 检测结果显示, GNP+ADM 组 HepG2/ADM 细胞的细胞凋亡率明显高于单纯 ADM 组 [$(7.43 \pm 2.13) \%$ vs. $(16.71 \pm 2.48) \%$] ($P < 0.05$), 且两者均高于对照组 [$(3.28 \pm 0.74) \%$] ($P < 0.05$); 单纯 GNP 组 HepG2/ADM 细胞凋亡率 [$(5.09 \pm 1.37) \%$] 与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图2)。

3 讨论

化疗是治疗晚期肝癌的重要手段之一, 但是由于肝癌细胞 MDR^[10] 作用的存在, 使得许多肝癌患者化疗效果并不理想。这主要是因为耐药细胞可以通过 ABC (ATP-binding cassette) 转运蛋白或谷胱甘肽系统增加对化疗药物的主动外排作用^[11-15], 降低了肿瘤细胞内化疗药物浓度, 从而影响化疗效果。因此, 研究增加多药耐药肝癌细胞内药物浓度, 从而提高肝癌的化疗效果是急需解决的问题。

本研究从 ADM 对耐药细胞 HepG2/ADM 的增殖抑制作用、诱导 HepG2/ADM 凋亡方面及 GNP 影响 HepG2/ADM 胞内药物浓度方面初步探讨了 GNP 增加 ADM 对 HepG2/ADM 的细胞毒性作用。MTT 结果及 FCM 结果显示: GNP 与 ADM 联合作用后, HepG2/ADM 细胞的增殖抑制率及凋亡率均明显高于单纯 ADM 组 ($P < 0.05$)。这与本课题组前期研究结果一致^[8,16]。

GNP 是金的纳米粒子, 在肿瘤治疗方面具有很大的潜能。既可以通过与 VEGF165、bFGF 结合发挥抗肿瘤血管生成^[5]的作用, 也可以与细胞内谷胱甘肽的巯基 (GSH) 结合形成很强的共价键^[17]。

相关研究表明^[18-19], 谷胱甘肽参与耐药肿瘤细胞的主动外排作用。结合本研究结果, GNP处理组HepG2/ADM细胞内的ADM含量较对照组明显增加, 笔者推测, GNP可以通过与HepG2/ADM细胞中GSH结合, 降低HepG2/ADM细胞的主动外排作用, 从而增加胞内ADM药物浓度, 进而增加ADM对HepG2/ADM细胞的细胞毒性作用。另外, GNP主要经非特异性内吞作用进入细胞^[20], 其触发的HepG2/ADM细胞内吞作用可能成为ADM入胞的第二条途径, 从而增加HepG2/ADM细胞对ADM的摄入。

综上所述, 纳米金可以增加耐药细胞内化疗药物浓度, 增加耐药细胞对化疗药物的敏感性。对于其更详尽的作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 焦明文, 袁凯, 王玉龙, 等. MK-2206逆转人乳腺癌细胞耐药的作用及机制研究[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(11):1494-1500.
- [2] Ferrer G, Acuna-Villaorduna C, Escobedo M, et al. Outcomes of multidrug-resistant tuberculosis among binational cases in El Paso, Texas[J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 83(5):1056-1058.
- [3] Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition[J]. Xenobiotica, 2008, 38(7/8):802-832.
- [4] Jain S, Hirst DG, O'Sullivan JM. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy[J]. Br J Radiol, 2012, 85(1010):101-113.
- [5] 潘运龙, 邱思远, 覃莉, 等. 纳米金抑制裸鼠肝癌血管生成及肝癌生长[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(12):800-804.
- [6] Pan Y, Ding H, Qin L, et al. Gold nanoparticles induce nanostructural reorganization of VEGFR2 to repress angiogenesis[J]. J Biomed Nanotechnol, 2013, 9(10):1746-1756.
- [7] 傅岳武, 潘运龙, 覃莉, 等. 纳米金抑制Ang-2和RGS-5表达导致裸鼠肝癌血管正常化[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(12):2247-2252.
- [8] 潘运龙, 赵晓旭, 覃莉, 等. 纳米金对表阿霉素的增敏作用[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(4):533-535.
- [9] Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, et al. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(9):3530-3534.
- [10] 杨永光, 刘丽娟, 李明意, 等. 抑制survivin表达对肝癌细胞阿霉素化疗敏感性的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(6):742-746.
- [11] Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, et al. Targeting multidrug resistance in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(3):219-234.
- [12] Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents[J]. Cancer Treat Rev, 2007, 33(1):9-23.
- [13] Martelli C, Dei S, Lambert C, et al. Inhibition of P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance (MDR) by N,N-bis(cyclohexanol) amine aryl esters: further restriction of molecular flexibility maintains high potency and efficacy[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 21(1):106-109.
- [14] Burg D, Riepsaame J, Pont C, et al. Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GSTpi function in GSH-conjugation, drug sensitivity and JNK signaling[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 71(3):268-277.
- [15] Polgar O, Robey RW, Bates SE. ABCG2: structure, function and role in drug response[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008, 4(1):1-15.
- [16] 巫青, 潘运龙, 覃莉, 等. 纳米金增强顺铂对肝癌HepG2细胞的细胞毒作用[J]. 肿瘤, 2012, 32(9):675-680.
- [17] Ghosh P, Han G, De M, et al. Gold nanoparticles in delivery applications[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(11):1307-1315.
- [18] 韩晓群, 李著华, 张敬各, 等. 降低细胞内GSH浓度对乳腺癌细胞阿霉素敏感性的影响[J]. 四川大学学报:医学版, 2007, 38(5):770-774.
- [19] 刘明华, 任美萍, 李蓉, 等. 川芎嗪对人卵巢癌顺铂耐药细胞株COC1/DDP的逆转作用研究[J]. 重庆医学, 2011, 40(20):1982-1984.
- [20] Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes[J]. Nano Letters, 2007, 7(6):1542-1550.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 邵明涛, 潘运龙, 覃莉, 等. 纳米金增加阿霉素耐药肝癌细胞株敏感性的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(1):52-56. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.010
Cite this article as: SHAO MT, PAN YL, QIN L, et al. Gold nanoparticles re-sensitizing adriamycin-resistant hepatocellular carcinoma cells: an experimental study[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(1):52-56. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.010