DOI:10.16016/j.2097-0927.202312050

二氧化锰纳米颗粒负载槲皮素对乳腺癌细胞的放射增敏作用研究

罗婧文[1],冉永红[1],柳随义[1],李 勇[1],李 娟[1],顾 丹[2],郝玉徽[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):军事预防医学系创伤与化学中毒全国重点实验室[1],第二附属医院普通外科[2]

[摘要] **目的** 探究二氧化锰纳米颗粒负载槲皮素[Mn(QU)]对乳腺癌4T1细胞及移植瘤小鼠的放射增敏作用。**方法** 用油酸模板法合成二氧化锰(MnO_2)纳米颗粒,采用透射电子显微镜、扫描电镜和能量色散X射线光谱仪表征合成的MnO_2纳米颗粒的形貌和化学组分。进一步用物理吸附法负载槲皮素(quercetin, QU),通过傅里叶变换红外光谱仪和紫外分光光度计进行成分表征,并利用溶氧仪检测Mn(QU)在不同pH与不同浓度过氧化氢反应生成氧气的能力;利用CCK-8法检测不同浓度Mn(QU)对小鼠乳腺癌4T1细胞活性的影响;克隆形成、γ-H2AX荧光染色、ROS荧光染色、活/死细胞荧光染色和流式细胞术检测Mn(QU)联合放疗对4T1细胞的放射增敏作用以及对细胞凋亡的促进作用。最后,构建小鼠乳腺癌4T1细胞移植瘤模型评价Mn(QU)联合放疗抑制小鼠乳腺癌生长的作用。**结果** 成功合成了粒径大小约为120 nm MnO_2纳米颗粒并负载QU。所制备的Mn(QU)与过氧化氢反应的氧气生成能力与pH大小呈负相关而与过氧化氢浓度呈正相关;细胞实验结果显示,Mn(QU)在浓度为50 μg/mL时对4T1细胞无明显毒性,但能显著增强X射线诱导的4T1细胞杀伤作用(放疗增敏比为1.61),增加DNA双链的断裂以及ROS的产生,细胞死亡比例增加,诱导4T1细胞凋亡;体内移植瘤实验结果显示不同处理组对小鼠肿瘤体积抑制能力:Mn(QU)联合放疗组>MnO_2联合放疗组>QU联合放疗组>放疗组>对照组。**结论** Mn(QU)联合放疗对乳腺癌4T1细胞表现出显著的增殖抑制和放射增敏作用,并对移植瘤的生长也表现出明显的抑制效果。

[关键词] 二氧化锰,槲皮素,放射增敏,乳腺癌

[中图法分类号] R730.55; R737.9; R979.19 [文献标志码] A

Radiosensitizing effect of quercetin-encapsulated manganese dioxide nanoparticles on breast cancer cells

LUO Jingwen[1], RAN Yonghong[1], LIU Suiyi[1], Li Yong[1], Li Juan[1], GU Dan[2], HAO Yuhui[1] [1]Institute of Combined Injury, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the radiosensitizating effect of quercetin (QU) loaded manganese dioxide nanoparticles [Mn(QU)] on breast cancer cell line 4T1 and tumour-bearing mice. **Methods** Manganese dioxide (MnO_2) nanoparticles were synthesized by oleic acid template method. The morphology and chemical composition of MnO_2 nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM) and X-ray photoelectron spectroscopy. Then QU nanomaterials were encapsulated by using physical adsorption. The composition was characterized by ultraviolet spectrophotometer, and the ability of Mn(QU) nanoparticles reacting with different doses of hydrogen peroxide to produce oxygen at different pH values was detected by dissolved oxygen analyzer. CCK-8 assay was employed to detect the effects of different concentrations of Mn(QU) nanoparticles on the viability of 4T1 cells. Colony formation, γ-H2AX fluorescence staining, ROS fluorescence staining, LIVE/DEAD cell

[通信作者] 郝玉徽,E-mail: yuhui_hao@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

viability assay and flow cytometry were used to evaluate the radiosensitizing and pro-apoptotic effects of Mn(QU) nanoparticles on 4T1 cells. Finally, the effect of Mn(QU) nanoparticles combined with radiotherapy on tumor growth inhibition was evaluated in mouse model of 4T1 cell transplanted tumor. **Results** MnO_2 nanoparticles with particle size of about 120 nm were successfully synthesized and encapsulated with QU. The oxygen generation capacity of the prepared Mn(QU) nanoparticles reacting with hydrogen peroxide was negatively correlated with pH value and positively with hydrogen peroxide concentration. The results of cell experiments showed that Mn(QU) nanoparticles at a concentration of 50 μg/mL had no obvious toxicity to 4T1 cells, but could significantly enhance the X-ray-induced killing effect on 4T1 cells, at a radiotherapy sensitization ratio of 1.61, improve DNA double-strand breaks and ROS production, and induce apoptosis of 4T1 cells. The results of tumor xenograft model experiment indicated that the inhibition of tumor volume was Mn(QU) nanoparticles combined with radiotherapy>MnO_2 nanoparticles combined radiotherapy>QU combined radiotherapy>Radiotherapy>Control. **Conclusion** Mn(QU) nanoparticles combined with radiotherapy can significantly inhibit the proliferation and show radiosensitization of breast cancer 4T1 cells, and also exert a significant inhibitory effect on the growth of the transplanted tumor.

[**Key words**] manganese dioxide; quercetin; radiation sensitization; breast cancer

Corresponding author: HAO Yuhui, E-mail: yuhui_hao@126.com

乳腺癌已经成为当今影响人类健康的重要威胁,每年造成了成千上万的人死亡。针对乳腺癌的治疗,由于传统手术肿瘤切除的高创伤和化疗的毒副作用,使其治疗作用往往不尽人意,同时还有复发的风险,给患者带来了身体上和经济上的双重负担[1-2]。放疗作为一种高能量和高穿透能力的治疗手段,近年来已广泛地应用到深部实体肿瘤的治疗中。当含有高能量的射线照射实体瘤时,射线会直接损伤肿瘤细胞 DNA,进而导致肿瘤细胞的增殖减少,最终杀灭肿瘤[3-4]。此外,高能射线还能通过作用于肿瘤细胞中的过氧化氢和氧气,产生具有细胞毒性的活性氧,使肿瘤细胞发生氧化应激,进而走向死亡[5-6]。然而,由于肿瘤细胞的缺氧微环境,使肿瘤的放疗效果受限。

近年来,含有高原子序数的金属纳米药物用于肿瘤的放射增敏已被广泛研究[7-10]。具有电子未占空轨道的金属原子吸收高能射线的辐射能量,再与水和氧气发生电子交换,生成具有细胞毒性的活性氧,例如单线态氧、过氧化氢、羟基自由基、超氧阴离子,氧化损伤肿瘤细胞的 DNA、脂质化物和蛋白质,诱导细胞发生凋亡和铁死亡[11]。因此,通过提高氧浓度,改善实体肿瘤的缺氧微环境,同时增强肿瘤细胞对射线的敏感性成为肿瘤放疗的重要策略。MnO_2 纳米颗粒具有良好的水溶性和低毒性,近年来已广泛地应用于实体肿瘤的放射治疗中[12]。MnO_2 纳米颗粒能在肿瘤细胞中催化过氧化氢反应生成氧气和细胞毒性的羟基自由基,在改善肿瘤缺氧微环境的同时极大地提高了射线诱导的活性氧生成,产生氧化应激和更强的放疗杀伤效果[13-14]。由于细胞自身存在的保护机制对射线产生辐射抵抗,导致 MnO_2 纳米颗粒的放疗效果不能完全发挥出来。因此,开发兼具氧气生成和抑制辐射抵抗的纳米放疗增敏剂具有显著的迫切性。

QU 作为一种纯天然黄酮醇类化合物,具有抗菌、抗过敏和降血脂等生物学活性[15-16]。此外,近年来研究发现 QU 在癌症治疗中也具有很好的潜力,尤其是可作为放疗增敏剂通过对细胞凋亡的诱导、细胞周期的阻滞及肿瘤乏氧微环境的改善等方式来减轻细胞辐射抵抗从而增强肿瘤的放疗效果[17-18]。但它在实际使用中仍面临许多局限,如水溶性极低、对光敏感,容易降解等。因此,基于 MnO_2 纳米颗粒的优异载药性能和 QU 的放射增敏作用,本研究采用油酸模板法合成 MnO_2 纳米颗粒,再通过物理吸附法负载 QU,增强乳腺癌 4T1 细胞的放射增敏作用。最后,构建小鼠乳腺癌移植瘤模型评价 Mn(QU)联合放疗抑制移植瘤生长的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞及动物 小鼠 4T1 乳腺癌细胞购买于北纳生物技术有限公司,BALB/C 小鼠(SPF 级雌性,6~8 周龄)购买于陆军军医大学实验动物中心。本研究经陆军军医大学伦理委员会批准,并根据《中国实验动物福利和伦理指南》进行。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、链霉素/青霉素、胎牛血清 、胰蛋白酶购买于赛默飞世尔生物化学制品有限公司,CCK-8 试剂购买于重庆葆光生物技术有限公司,γ-H2AX 荧光染色检测试剂盒和活性氧检测试剂盒购买于上海碧云天生物技术有限公司,凋亡试剂

盒购买于普诺赛生物科技有限公司,油酸购买于国药集团化学试剂有限公司,高锰酸钾(AR 级)购买于国药集团化学试剂有限公司,无水乙醇购买于阿达玛斯试剂有限公司,槲皮素购买于麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 *方法*

1.2.1 纳米材料制备 将 10 mL 油酸滴加入 500 mL 高锰酸钾水溶液(2 g/L)中,室温下剧烈搅拌。反应液在室温下保持 12 h 搅拌使其反应完全,生成的棕黑色产物用去离子水洗 3 次去除未反应的高锰酸钾,用乙醇洗 5 次去除残留的油酸或氧化油酸,离心后在 60 ℃下干燥即得 MnO_2 纳米颗粒,于-20 ℃保存备用。称取 20 mg MnO_2 纳米颗粒分散在 5 mL 乙醇中,然后将 5 mL QU 乙醇溶液(2 mg/mL)滴加入混合液中。搅拌 24 h 后,离心用乙醇进行 3 次洗涤,即得 Mn(QU) 纳米材料,于-20 ℃保存。

1.2.2 纳米材料表征和 Mn(QU)产氧能力测定 采用扫描电子显微镜(ZEISS)观测 MnO_2 纳米颗粒形貌,即滴加 MnO_2 纳米颗粒在硅片上,经喷金处理,通过扫描电镜(3 kV 加速电压)观察形貌结构。采用透射电镜(Hitachi)分析 MnO_2 纳米颗粒微观形貌和粒径大小,即滴加 MnO_2 纳米颗粒在铜网上,通过透射电镜(加速电压 100 kV)观察材料形貌以及粒径。采用能量色散 X 射线光谱仪(EDS)进行 MnO_2 纳米颗粒的元素组成分析。采用傅里叶变换红外光谱仪(Perkin Elmer)测定 QU、MnO_2、Mn(QU)的红外吸收光谱图。采用紫外分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司)对 QU、MnO_2、Mn(QU)的组分进行紫外吸收光谱表征。将 50 μg/mL Mn(QU)分散在脱氧水中,在温和搅拌下与不同浓度过氧化氢溶液混合,每 20 秒用溶解氧仪实时检测氧气浓度,测定 Mn(QU)产氧能力。

1.2.3 细胞培养 将 DMEM 培养基加入 10%胎牛血清和 1%链霉素/青霉素用于培养 4T1 细胞并放置于 37 ℃、5% CO_2 含量的恒温培养箱中孵育。通过显微镜监测细胞的生长状态并选取处于对数生长期的细胞用于后续实验。

1.2.4 CCK-8 法测定细胞活性 将 4T1 细胞用胰酶消化,调整细胞的浓度为 5×10^4个/mL,按 100 μL/孔接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后分别依次加入浓度为 0、12.5、25、50、75 和 100 μg/mL 的 Mn(QU)水溶液,每组 6 孔,放回细胞培养箱孵育 48 h 后在每孔加入 10 μL CCK-8 工作液,继续孵育 4 h,用酶标仪获取吸光度 OD 值,计算细胞的存活率。

细胞存活率(%)=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%。

1.2.5 细胞克隆形成实验 将 4T1 细胞接种至细胞 6 孔板,分别用 QU(6.7 μg/mL)、MnO_2(43.3 μg/mL)、Mn(QU)(50 μg/mL)作用 24 h 后弃掉原培养基,每孔加入 PBS 进行清洗,然后再加入 2 mL 新鲜培养基后分别给予 0、2、4 和 6 Gy 的 X 射线生物辐照仪(Rad source 2000)辐照,放回细胞培养箱继续孵育 24 h。将细胞用胰酶消化后调整密度为 10^3 个/孔后放回培养箱继续孵育。用 4%多聚甲醛固定细胞,结晶紫染色,清洗后晾干,拍照。根据单击多靶模型利用 GraphPad Prism 软件进行细胞存活曲线拟合,计算放射增敏比(sensitivity enhancement ratio, SER)。

单击多靶模型公式:Survival fraction (SF) = $1-(1-e^{-kD})^n$;

式中 k 为细胞存活曲线的钝化常数,n 为外推数,k 和 n 的值可由拟合曲线方程直接给出。

SER = D37(对照组)/D37(实验组);D37 = D0 + Dq;D0 = 1/k;Dq = ln n×D0;

式中 D37 表示细胞存活率为 37%时所用的辐射剂量;D0 为平均致死剂量;Dq 为准阈剂量。

1.2.6 γ-H2AX 免疫荧光染色 4T1 细胞按 5×10^4/孔的密度接种于共聚焦培养皿中,放回细胞培养箱孵育贴壁后按下列分组处理:正常对照组(Control)、6 Gy 辐照组(RT)、QU+RT 组、MnO_2+RT 组、Mn(QU)+RT 组。4%多聚甲醛固定后用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。加入免疫染色封闭液进行室温封闭 60 min,封闭后加入按 1∶200 比例稀释的 γ-H2AX 抗体,4 ℃孵育过夜后再用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。加入按 1∶500 比例稀释的 IgG Fab2AlexaFluor(R)555 二抗,在室温下进行避光孵育 2 h 后,用 DAPI 染色液在室温条件下对细胞核进行复染。用 PBS 清洗细胞后放置于共聚焦显微镜(ZEISS 800)下进行检测。

1.2.7 细胞 ROS 检测 将 4T1 细胞接种于 6 孔板,按照 Control、RT、QU+RT 组、MnO_2+RT 组、Mn(QU)+RT 组分组处理后放回细胞培养箱继续孵育 24 h,用 PBS 清洗细胞后在每孔中加入 1 mL 用无血清培养基按 1∶1000 比例稀释的 DCFH-DA,继续孵育 40 min 后清洗 3 次,在荧光显微镜(奥林巴斯)下观察并拍照。

1.2.8 细胞死活荧光染色 将 4T1 细胞接种至 6 孔板,分组处理同上。每孔加入 500 μL 按 1∶1 000 稀释的 Calcein-AM/PI 混合工作液,放回细胞培养箱进行 30 min 避光孵育后在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.9 流式细胞术测定细胞凋亡 将 4T1 细胞接种于 6 孔板中。分组处理后收集细胞并用 PBS 清洗。加入 100 μL 按 1∶10 稀释的 AnnexinV Binding Buffer 重悬细胞。之后再加入 AnnexinV-APC 染色液和 DAPI

染色液各 2.5 μL,避光孵育 15 min。加入 400 μL AnnexinV Binding Buffer 后用流式细胞仪(BD verse)检测细胞凋亡。

1.2.10 移植瘤小鼠体内治疗 于 BALB/C 小鼠右腿前背部皮下接种 1×10^6 个 4T1 细胞(100 μL/只),构建小鼠皮下移植瘤模型,当肿瘤体积长至大约 70 mm^3,将荷瘤小鼠随机分为五组:正常对照组(Control)、6 Gy 辐照组(RT)、QU+RT 组、MnO_2+RT 组、Mn(QU)+RT 组,第 1 天和第 4 天分别给予 PBS、QU(2 mg/kg)、MnO_2(13 mg/kg)和 Mn(QU)(15 mg/kg)药物瘤内注射治疗,放疗组药物干预 4 h 后对肿瘤局部进行 6 Gy 的 X 射线照射。游标卡尺 2 d 测量 1 次小鼠肿瘤的长径(L)和横径(W),并通过 $V=L\times W^2/2$ 公式计算肿瘤体积(V),连续测量 12 天,记录小鼠肿瘤体积变化曲线并计算各组肿瘤生长抑制率。

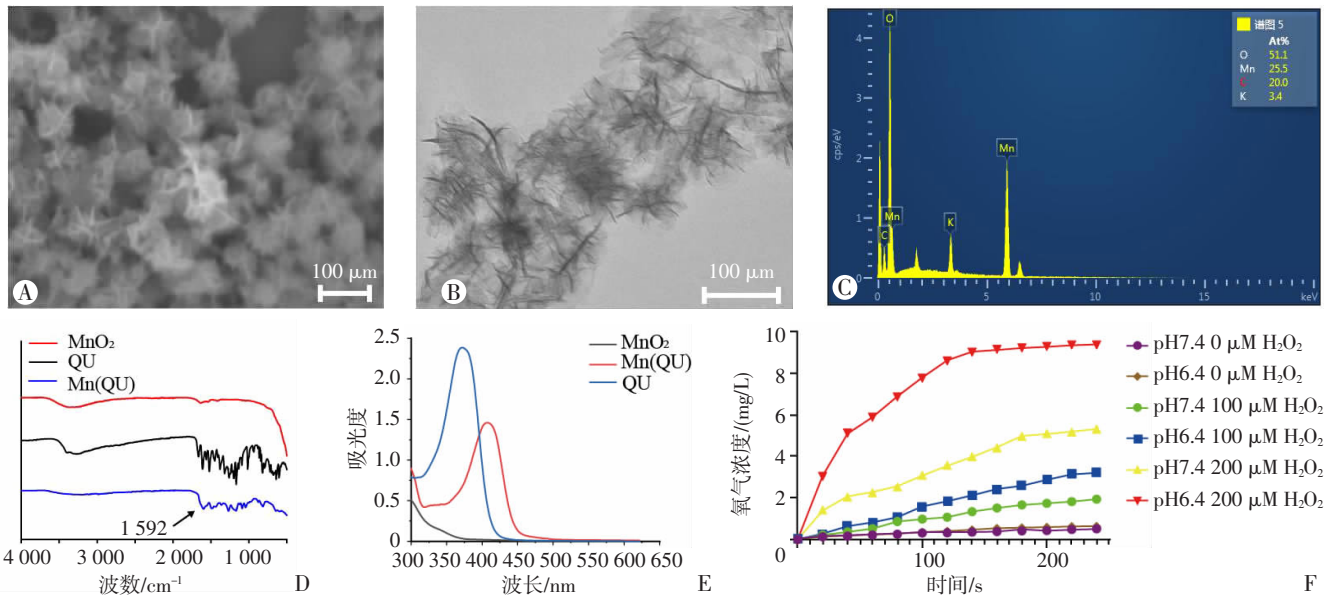
1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0.3 对定量数据进行柱状图绘制和统计分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。当数据服从正态分布且方差齐时组间差异用单因素方差分析(ANOVA)进行对比。$P<0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米材料的理化性质

通过扫描电镜(SEM,图 1A)和透射电镜(TEM,图 1B)可观察到合成的 MnO_2 纳米颗粒的直径约为 120 nm,与文献报道一致[19]。利用能量色散 X 射线光谱仪(EDX)分析 MnO_2 纳米颗粒元素组成。实验结果显示,所合成的纳米颗粒中的主要元素为 Mn 和 O,其原子百分比约为 1∶2,证实了所制备的材料是由二氧化锰组成的 MnO_2 纳米颗粒(图 1C)。将 QU 负载到 MnO_2纳米颗粒上,合成负载槲皮素的二氧化锰纳米颗粒[Mn(QU)]。利用傅里叶变换红外光谱证明了 QU 的存在。从图 1D 中可以看出,1 592 cm^{-1} 处的特征峰属于 QU 的 C=O 伸缩振动。紫外光谱实验结果也显示 Mn(QU)在 410 nm 波长处出现了一个尖锐的吸收峰,这种现象可能是由于 QU(紫外吸收波长为 374 nm)与 MnO_2 结合后的吸收峰发生红移导致(图 1E),这也进一步证实 QU 的成功负载。此外,我们建立了 QU 的浓度与紫外吸光度标准曲线,根据吸光度结果计算出 Mn(QU)载药率高达 13.4 wt.%。为测定 Mn(QU)与过氧化氢反应的产氧能力,我们通过溶氧仪(雷磁,JPB-607A)研究了 Mn(QU)在不同 pH、过氧化氢浓度条件下的氧气生成能力。如图 1F 所示,当过氧化氢的浓度不变时,溶液 pH 越小 Mn(QU)的氧气生成能力越强。当溶液的 pH 不变时,过氧化氢的浓度越高,Mn(QU)的氧气生成能力越强。鉴于肿瘤微环境呈现出弱酸性和高过氧化氢浓度的特性,Mn(QU)有可能通过提升氧气浓度增强肿瘤对放射的敏感性。

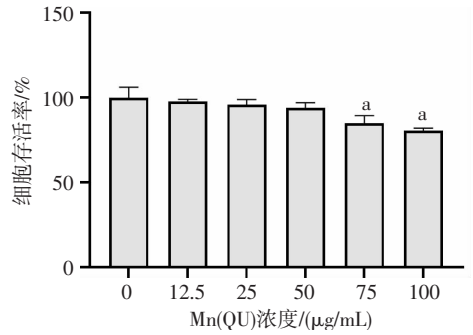


A:MnO_2 的 SEM 图;B:MnO_2 的 TEM 图;C:MnO_2 的 XRD 图;D:QU、MnO_2 和 Mn(QU)的傅里叶变换红外光谱图;E:QU、MnO_2 和 Mn(QU)的紫外吸收光谱图;F:Mn(QU)与过氧化氢反应的产氧能力图

图 1 纳米材料的理化性质表征

2.2 细胞活性评价

采用 CCK-8 法评价了 Mn(QU)对 4T1 细胞的活性影响(图 2)。实验结果表明,当药物浓度增加到 50 μg/mL 时,4T1 细胞活性仍保持大于 90%。药物浓度继续提高,细胞活性略微降低。当药物浓度分别达到 75 μg/mL 和 100 μg/mL 时,细胞活性仍大于 80%,表明合成的 Mn(QU)具有较好的安全性,在 50 μg/mL 剂量内无明显的细胞毒性。



a: $P<0.001$,与 Control 组相比

图 2 不同浓度 Mn(QU)对 4T1 细胞的毒性影响

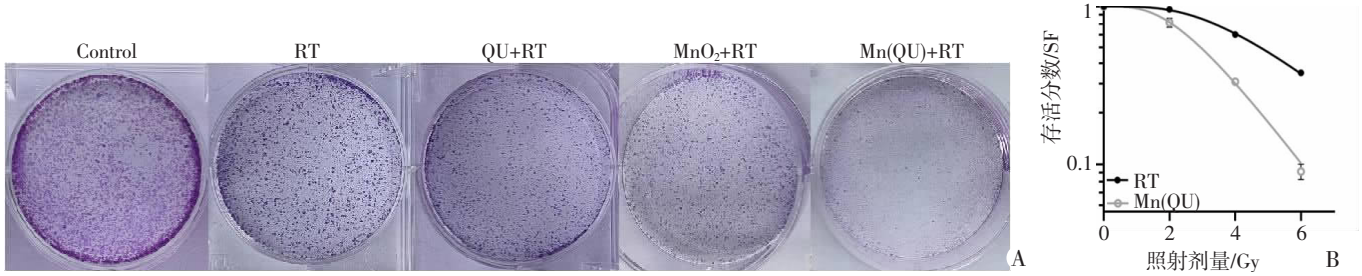
2.3 Mn(QU)的体外放疗增敏抗肿瘤作用

2.3.1 细胞克隆形成实验结果 通过细胞的克隆形成能力评价 Mn(QU)处理后的 4T1 细胞的放射敏感性的改变情况。如图 3A 所示,与 Control 组相比,6 Gy 辐照(RT)处理后的 4T1 细胞克隆形成数目变化不明显,QU 联合 6 Gy 辐照组细胞克隆数略有减少,未表现出显著的放疗增敏活性,MnO_2 联合 6 Gy 辐照组细胞克隆数明显减少,显示出一定的放疗增敏活性,而 Mn(QU)联合 6 Gy 辐照组克隆形成数最少。由此可见,经 Mn(QU)处理后可增加 RT 的肿瘤活性抑制作用。利用单击多靶模型计算细胞的放射敏感性。图 3B 结果显示,相比于单纯辐照组。Mn(QU) 在同等放射剂量下显示出最低的SF值,计算所得Mn(QU)联合放疗组的放射增敏比为 1.61,与其他组相比 Mn(QU) 表现出最强的放射增敏作用。

2.3.2 γ-H2AX 荧光染色结果 γ-H2AX 是发生 DNA 损伤时的重要标志物。辐射造成的 DNA 双链断裂会诱导 H2AX 磷酸化形成 γ-H2AX,通过测定细胞中 γ-H2AX 含量可用于评判 DNA 的损伤程度和修复情况。如图 4 所示,Control 组中仅有极少量的 γ-H2AX 焦点,证明几乎无 DNA 损伤情况发生。单纯辐照 RT 组、QU+RT 组和 MnO_2+ RT 组有少量的 γ-H2AX 焦点形成,而 Mn(QU)+RT 组中形成大量的 γ-H2AX 焦点,表明 Mn(QU)+RT 处理组的 4T1 细胞产生的 DNA 双链断裂数目增加,导致 DNA 损伤加剧,为 Mn(QU) 用于进一步肿瘤放疗增敏治疗提供可能。

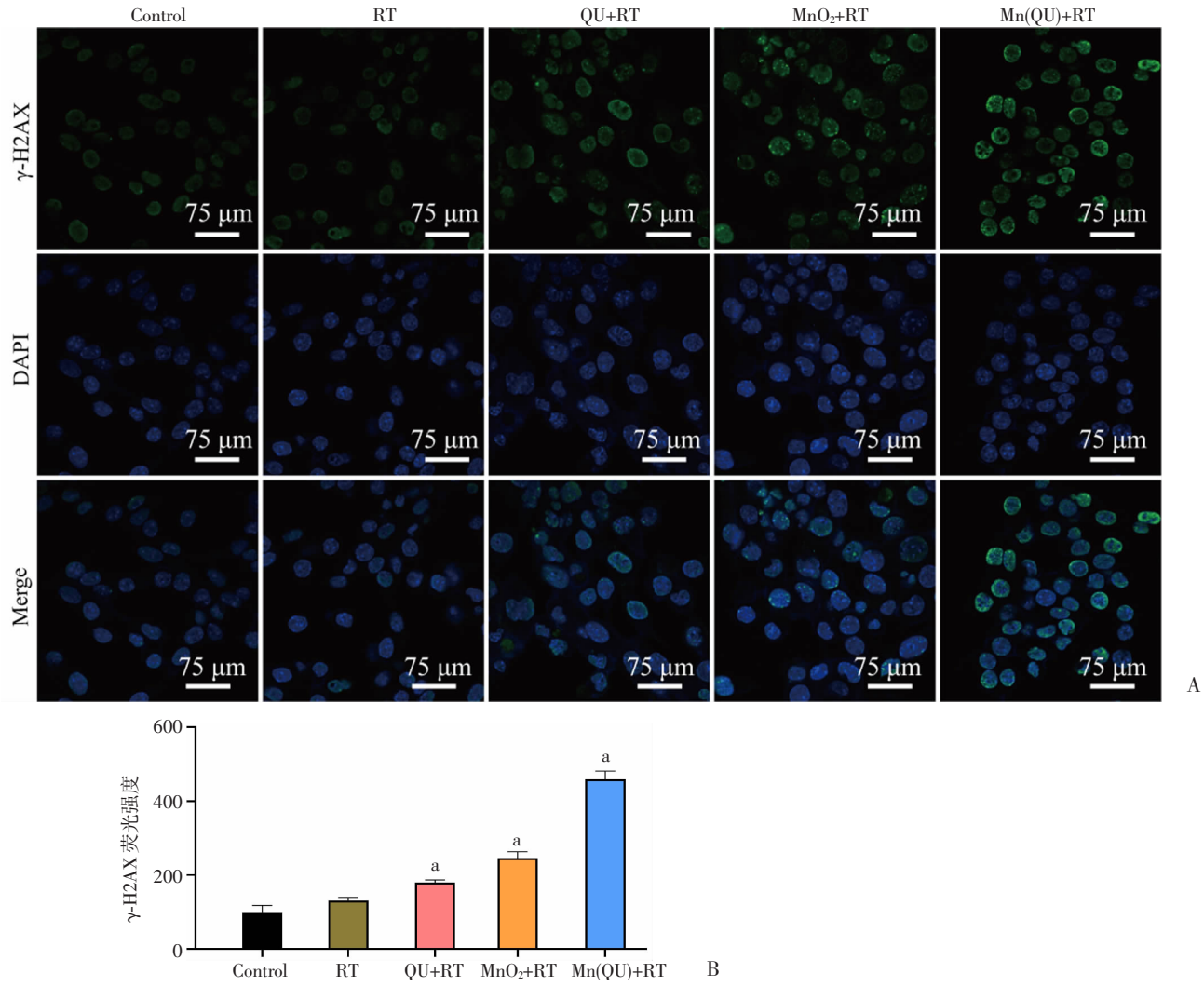
2.3.3 细胞 ROS 荧光染色结果 活性氧 ROS 是高能射线照射细胞后产生的具有细胞毒性的活性物质,同时也是诱导细胞产生氧化损伤的关键刺激因素,通过检测辐照后细胞内 ROS 水平可用来评价药物的放疗活性。利用活性氧指示剂,通过共聚焦显微镜检测 ROS 水平。如图 5 所示,与 Control 组相比,单纯辐照 RT 组和 QU+RT 组没有表现出很明显的 ROS 生成,MnO_2+RT 组表现出一定的辐射诱导 ROS 生成。然而,Mn(QU) 在同等辐照剂量下具有最多的 ROS 生成,进一步表明 Mn(QU) 具有优异的放疗增敏抗肿瘤能力。

2.3.4 细胞活/死荧光染色结果 Calcein-AM/PI 荧光染色通过检测细胞内酯酶活性和细胞膜完整性,从而反映细胞活性与细胞毒性。如图 6 所示,与 Control 组相比,单纯辐照 RT 组和 QU+RT 组没有表现出明显的细胞状态变化,MnO_2+RT 组细胞的死细胞含量略有增多,Mn(QU)+RT 组细胞的死细胞含量明显增多,活细胞数量减少,进一步证实 Mn(QU) 联合放疗对肿瘤细胞活性具有明显的抑制作用。



A:4T1 细胞经分组处理后的克隆形成实验; B:0、2、4、6 Gy X-ray 辐照后 4T1 细胞的生存分数($n=3$)

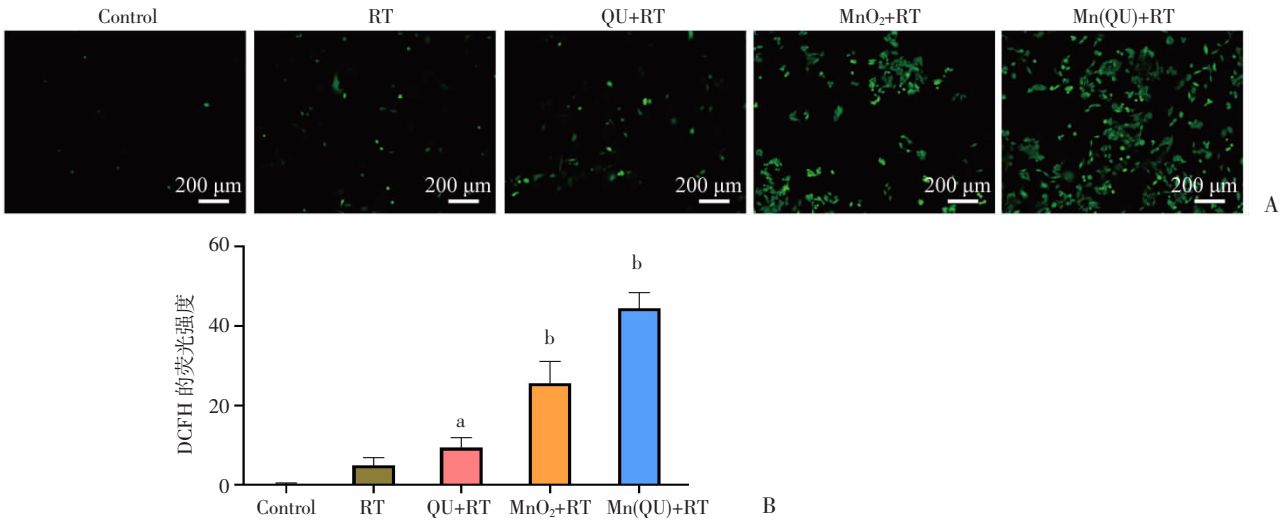
图 3 分组处理后的 4T1 细胞克隆形成影响及 SF 值的计算



与 Control 组相比,a: $P<0.001$

A:免疫荧光检测各组细胞核 γ-H2AX 焦点形成情况;B:各组细胞 γ-H2AX 焦点数目统计图($n=3$)

图 4 分组处理后的 4T1 细胞 γ-H2AX 免疫荧光检测和相对荧光强度统计



A:不同处理组细胞 ROS 生成情况;B:各组细胞 ROS 荧光强度统计图($n=3$)

与 Control 组相比,a: $P<0.05$,b: $P<0.001$

图 5 分组处理后的 4T1 细胞 ROS 荧光检测和荧光强度统计

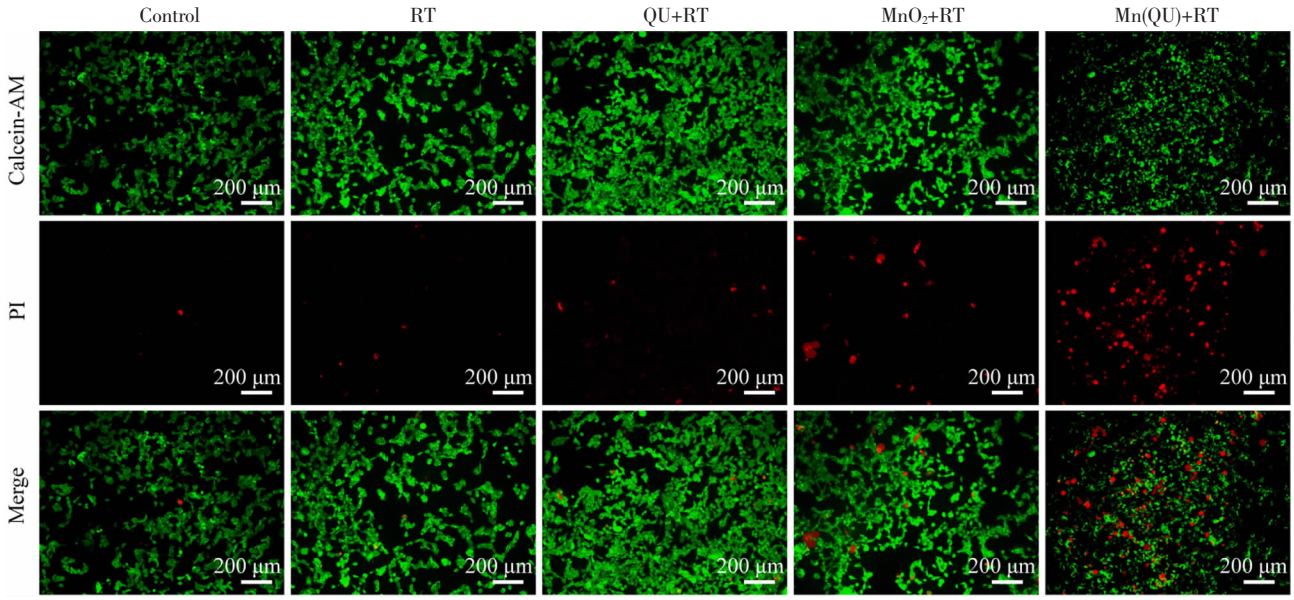


图 6 分组处理后的 4T1 细胞活/死荧光染色图

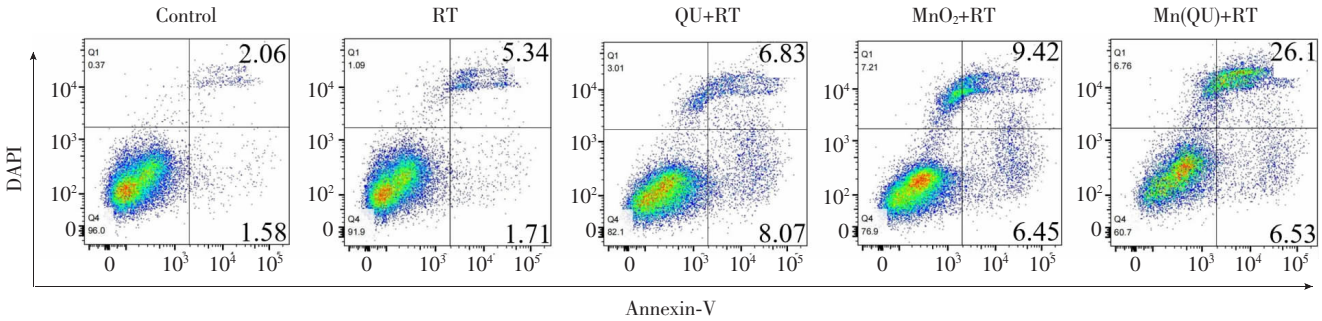


图 7 分组处理后的 4T1 细胞凋亡图

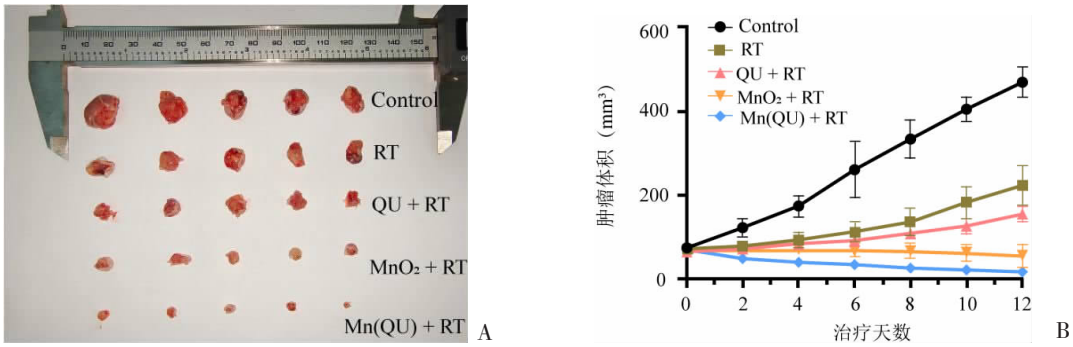
2.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡结果 为评价 Mn(QU)的放疗增敏抗肿瘤活性,通过流式细胞仪检测细胞凋亡。实验结果如图 7 所示,Control、RT、QU+RT、MnO_2+RT 和 Mn(QU)+RT 不同处理后的细胞凋亡率(Q2+Q3)分别为 3.64%、7.05%、14.9%、15.87%,32.63%。与对照组相比,单纯 RT 组的细胞凋亡率仅升高了 3.41 %,表明 4T1 细胞在 6 Gy 辐照下损伤轻微。QU 联合放疗的细胞凋亡率与对照组相比升高了 11.26 %,MnO_2联合放疗组相比对照组的细胞凋亡率增加了 12.23 %,表现出一定的放疗增敏活性。而 Mn(QU)联合放疗组的细胞凋亡率增加了 28.99%,通过加剧 4T1 细胞凋亡比例显著增强了放疗增敏抗肿瘤作用,表明 Mn(QU)通过增强放射治疗诱导的细胞凋亡比例实现放射增敏的抗肿瘤效果。

2.4 体内抗肿瘤效应评价

为进一步评价 Mn(QU)的体内放疗增敏抗肿瘤活性,利用 BALB/C 小鼠建立了 4T1 移植瘤模型来评价 Mn(QU)在小鼠体内的抗肿瘤能力。实验结果显示(图 8),与 Control 组相比,不同处理组对小鼠肿瘤体积生长抑制能力 Mn(QU)+RT 组>MnO_2+RT 组>QU+RT 组,表明 Mn(QU)联合放疗对肿瘤生长抑制效果最明显,进一步确证所制备的 Mn(QU)优异的体内放疗增敏抗肿瘤能力。

3 讨论

放疗作为一种具有高能量和高穿透力的治疗方式,通过给予肿瘤部位射线照射产生直接或间接的杀伤作用,在临床上已经成为精准医学治疗实体瘤的重要医学手段。但因为放疗对周围正常组织的破坏以及肿瘤的高效代谢速度和对大量氧气的需要,使得肿瘤微环境保持着缺氧的状态,使得放疗后断裂的 DNA 周围没有充足的氧气产生稳定的氧化合物,无法有效地抑制 DNA 受损的自动恢复,因此更加进一步限制了放疗的效果。因此怎样通过改变肿瘤的缺氧微环境使放疗抵抗有所缓解是目前的一项研究热点。放疗增敏剂能够在一定程度上解决这些问题对疗效产生的影响。



A:分组处理后第 12 天小鼠的肿瘤实物图;B:分组处理后小鼠移植瘤体积变化曲线

图 8 分组治疗对小鼠移植瘤的体内生长抑制作用

纳米材料作为一门新兴的医工交叉学科,广泛应用于肿瘤放疗增敏[20-21]。和常规化学药物比较,新型纳米材料可以更有效地靶向递送药物,提高灵敏性。纳米材料的尺寸和造型可以变换,从而进一步提高放疗效果。

基于 MnO_2 纳米颗粒其优异的物化和生物学性质,近年来已广泛将其应用于肿瘤的放射增敏领域。同时,MnO_2 纳米颗粒由于良好的生物相容性、形状多样性用于药物递送。如空心 MnO_2 颗粒包载疏水抗癌药物喜树碱(CPT)以实现药物肿瘤微环境响应性递送、改善肿瘤缺氧微环境从而放化疗结合增强肿瘤抑制效果[22];Lin 等用人血清白蛋白(HSA)为模板合成 MnO_2 纳米颗粒并包载自噬抑制剂,逆转异常的肿瘤微环境,抑制自噬激活[23]。然而,由于肿瘤细胞的自我保护机制对射线产生辐射抵抗,导致单纯的 MnO_2 纳米颗粒放疗的效果受到限制,难以发挥出最大疗效。

QU 是一种有抗肿瘤活性的天然黄酮醇类化合物,它能通过调控细胞周期起到放疗增敏的抗肿瘤治疗功效[18]。Choi JA 等发现 QU 可诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡和 G2/M 期阻滞,提高细胞的放射敏感性[24]。基于此,我们通过 MnO_2 纳米颗粒作为递药载体,制备的 Mn(QU)在增加 QU 的生物利用率的同时对乳腺癌 4T1 细胞和小鼠移植瘤具有良好的放射增敏作用。

通过细胞 CCK-8 实验表明合成的 Mn(QU)具有良好的生物相容性。同时克隆形成实验结果发现,与单纯 MnO_2 纳米颗粒相比,Mn(QU)具有更强放疗增敏能力,其放疗增敏比为 1.61。γ-H2AX 免疫荧光和 ROS 荧光染色实验证明 Mn(QU)相比于单纯 MnO_2 纳米颗粒能显著增加辐射诱导的 DNA 双链断裂和刺激更多的细胞毒性 ROS 生成,从而表现更强的 4T1 肿瘤细胞生长抑制作用。细胞活/死荧光染色结果也显示 Mn(QU)能增强 4T1 肿瘤细胞在射线作用下死亡比例。同时,细胞流式分析结果表明,Mn(QU)能增强 4T1 肿瘤细胞在射线作用下发生凋亡的比率,其促凋亡作用显著强于其他对照组,表现出最强的拮抗 4T1 肿瘤细胞生长作用。小鼠移植瘤模型的抑瘤实验结果也表明 Mn(QU)联合放疗组具有最优的实体肿瘤生长抑制作用。综上所述,本研究成功合成了 Mn(QU)纳米药物并对其进行表征,在细胞水平上可实现放疗增敏,体内移植瘤抑制也取得了较好的成效。

设计的 Mn(QU)的放疗增敏抗肿瘤机制可能是 MnO_2 纳米颗粒响应射线照射后肿瘤微环境的高水平过氧化氢,在产氧的同时释放装载的 QU。然后,释放的 QU 可将肿瘤细胞的有丝分裂阻滞在 G2/M 期,同时破坏肿瘤细胞内的氧化还原平衡,抑制肿瘤细胞的自我保护机制,降低了肿瘤细胞对射线产生的抵抗,从而使 MnO_2 纳米颗粒最大限度地发挥放疗增敏作用,提高了辐射所引起的肿瘤细胞 DNA 双链断裂和活性氧生成,促进肿瘤细胞凋亡,充分发挥出优异的体内和体外放疗增敏抗肿瘤效果。希望本文的研究能为设计和开发具有更加优异效果的放疗增敏剂提供了新的见解和思路。

参考文献:

[1] BHAT V, PELLIZZARI S, ALLAN A L, *et al*. Radiotherapy and radiosensitization in breast cancer: Molecular targets and clinical applications[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2022, 169: 103566. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2021.103566.

[2] MONTERAN L, ERSHAID N, DORON H, *et al*. Chemotherapy-induced complement signaling modulates immunosuppression and metastatic relapse in breast cancer[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 5797. DOI: 10.1038/s41467-022-33598-x.

[3] HUANG R X, ZHOU P K. DNA damage response signaling

pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 60. DOI: 10.1038/s41392-020-0150-x.

[4] SANTIVASI W L, XIA F. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(2): 251-259. DOI: 10.1089/ars.2013.5668.

[5] GAO M Q, HUANG X, WU Z F, *et al*. Synthesis of a versatile mitochondria-targeting small molecule for cancer near-infrared fluorescent imaging and radio/photodynamic/photothermal synergistic therapies[J]. Mater Today Bio, 2022, 15: 100316. DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100316.

[6] KIRTONIA A, SETHI G, GARG M. The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(22): 4459-4483. DOI: 10.1007/s00018-020-03536-5.

[7] LI T, GAO M Q, WU Z F, *et al*. Tantalum-zirconium Co-doped metal-organic frameworks sequentially sensitize radio-radiodynamic-immunotherapy for metastatic osteosarcoma[J]. Adv Sci, 2023, 10(10): e2206779. DOI: 10.1002/advs.202206779.

[8] HU B C, XIAO X H, CHEN P, *et al*. Enhancing anti-tumor effect of ultrasensitive bimetallic RuCu nanoparticles as radiosensitizers with dual enzyme-like activities [J]. Biomaterials, 2022, 290: 121811. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2022.121811.

[9] JI C, ZHAO M R, WANG C Y, *et al*. Biocompatible tantalum nanoparticles as radiosensitizers for enhancing therapy efficacy in primary tumor and metastatic sentinel lymph nodes[J]. ACS Nano, 2022, 16(6): 9428-9441. DOI: 10.1021/acsnano.2c02314.

[10] ZHOU X T, YOU M, WANG F H, *et al*. Multifunctional graphdiyne-cerium oxide nanozymes facilitate microRNA delivery and attenuate tumor hypoxia for highly efficient radiotherapy of esophageal cancer[J]. Adv Mater, 2021, 33(24): e2100556. DOI: 10.1002/adma.202100556.

[11] LEI G, MAO C, YAN Y L, *et al*. Ferroptosis, radiotherapy, and combination therapeutic strategies[J]. Protein Cell, 2021, 12(11): 836-857. DOI: 10.1007/s13238-021-00841-y.

[12] YANG G B, JI J S, LIU Z. Multifunctional MnO_2 nanoparticles for tumor microenvironment modulation and cancer therapy [J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2021, 13(6): e1720. DOI: 10.1002/wnan.1720.

[13] CHEN Q, FENG L Z, LIU J J, *et al*. Intelligent albumin-MnO_2 nanoparticles as pH-/ H_2O_2-responsive dissociable nanocarriers to modulate tumor hypoxia for effective combination therapy [J]. Adv Mater, 2018, 30(8): 1707414. DOI: 10.1002/adma.201707414.

[14] PRASAD P, GORDIJO C R, ABBASI A Z, *et al*. Multifunctional albumin-MnO_2 nanoparticles modulate solid tumor microenvironment by attenuating hypoxia, acidosis, vascular endothelial growth factor and enhance radiation response[J]. ACS Nano, 2014, 8(4): 3202-3212. DOI: 10.1021/nn405773r.

[15] MAUGERI A, CALDERARO A, PATANE G T, *et al*. Targets involved in the anti-cancer activity of quercetin in breast, colorectal and liver neoplasms[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2952. DOI: 10.3390/ijms24032952.

[16] ZHAO P F, WANG S, JIANG J Z, *et al*. Targeting lactate metabolism and immune interaction in breast tumor via protease-triggered delivery[J]. J Control Release, 2023, 358: 706-717. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.05.024.

[17] ZANG X L, CHENG M Y, ZHANG X X, *et al*. Quercetin nanoformulations: a promising strategy for tumor therapy [J]. Food Funct, 2021, 12(15): 6664-6681. DOI: 10.1039/d1fo00851j.

[18] MIRAZIMI S M A, DASHTI F, TOBEIHA M, *et al*. Application of quercetin in the treatment of gastrointestinal cancers[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 860209. DOI: 10.3389/fphar.2022.860209.

[19] LIU J Z, ZHANG W Z, KUMAR A, *et al*. Acridine orange encapsulated mesoporous manganese dioxide nanoparticles to enhance radiotherapy[J]. Bioconjug Chem, 2020, 31(1): 82-92. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00751.

[20] PAN Y B, TANG W, FAN W P, *et al*. Development of nanotechnology-mediated precision radiotherapy for anti-metastasis and radioprotection[J]. Chem Soc Rev, 2022, 51(23): 9759-9830. DOI: 10.1039/d1cs01145f.

[21] XIE J N, GONG L J, ZHU S, *et al*. Emerging strategies of nanomaterial-mediated tumor radiosensitization [J]. Adv Mater, 2019, 31(3): e1802244. DOI: 10.1002/adma.201802244.

[22] ZHU D M, LYU M, JIANG W, *et al*. A biomimetic nanozyme/camptothecin hybrid system for synergistically enhanced radiotherapy[J]. J Mater Chem B, 2020, 8(24): 5312-5319. DOI: 10.1039/D0TB00676A.

[23] LIN T S, ZHANG Q, YUAN A H, *et al*. Synergy of tumor microenvironment remodeling and autophagy inhibition to sensitize radiation for bladder cancer treatment [J]. Theranostics, 2020, 10(17): 7683-7696. DOI: 10.7150/thno.45358.

[24] CHOI J A, KIM J Y, LEE J Y, *et al*. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin[J]. Int J Oncol, 2001, 19(4): 837-844. DOI: 10.3892/ijo.19.4.837.

(收稿:2023-12-09;修回:2024-01-12)

(编辑 邓强庭)