

功能化石墨烯量子点体内外肿瘤抑制效果评价

王琛(厦门医学院药理学系, 福建 厦门 361023)

摘要: 目的 对前期制备的环肽(cRGD)修饰的、负载多柔比星(doxorubicin, DOX)的石墨烯量子点递药系统(cR-G@D)体内外抑制肿瘤效应进行考察。方法 以 U87 细胞为模型, 采用 CCK-8 法对 cR-G@D 等样品的体外细胞毒性进行分析; 以 $\alpha\beta_3$ 不表达的 MCF-7 细胞和 $\alpha\beta_3$ 过表达的 U87 细胞为模型, 利用共聚焦显微技术进一步分析 cR-G@D 等样品在细胞内的摄取及成像情况; 以 Balb/c 裸鼠(U87)为实验对象, 分别考察 cR-G@D 等样品光热效应及体内肿瘤抑制情况。结果 细胞毒性结果显示 cR-G@D 在激光照射条件下有显著的肿瘤细胞抑制作用; 细胞摄取试验结果显示在 U87 细胞中靶向修饰的石墨烯量子点摄取情况要远优于非靶向修饰的石墨烯量子点, 而在 MCF-7 细胞中各测试样品摄取无明显区别; 体内试验表明 cR-G@D 在激光照射下温度随时间推移而增加, cR-G@D 与激光照射配合条件下肿瘤生长缓慢。结论 cR-G@D 递药系统在激光照射下具有一定的光热效应, 在体内外具有一定的肿瘤抑制效果。

关键词: 功能化; 石墨烯量子点; 肿瘤细胞抑制; 效果评价

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)23-2961-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.23.008

引用本文: 王琛. 功能化石墨烯量子点体内外肿瘤抑制效果评价[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(23): 2961-2965.

Evaluation of the Anti-tumor Effect of Functionalized Graphene Quantum Dots *in Vivo* and *in Vitro*

WANG Chen(School of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the antitumor effect of cRGD modified graphene quantum dot with loading doxorubicin drug delivery system(cR-G@D). **METHODS** The cytotoxicity of cR-G@D *in vitro* was analyzed using U87 cells as model by CCK-8 method. Using MCF-7 cells(without $\alpha\beta_3$ expression) and U87 cells(with $\alpha\beta_3$ overexpression) as models, the intracellular uptake and imaging of cR-G@D and other samples were further analyzed by confocal microscopy. Balb/c nude mice(U87) were used to investigate the photothermal effect and tumor inhibition of cR-G@D and other samples *in vivo*. **RESULTS** The results of cytotoxicity showed that cR-G@D had a significant inhibitory effect on tumor cells under the condition of laser irradiation. The results of cell uptake assay showed that the uptake of targeted modified graphene quantum dots was much better than that of non-targeted modified graphene quantum dots. There was no significant difference among the tested samples in MCF-7 cells. *In vivo* experiments showed that the temperature of cR-G@D increased with the passage of time under laser irradiation. The tumor grew slowly under the condition of cR-G@D combined with laser irradiation. **CONCLUSION** The drug delivery system of cR-G@D have a certain photothermal and tumor inhibitory effect under laser irradiation *in vivo* and *in vitro*.

KEYWORDS: functionalized; graphene quantum dots; tumor cell inhibition effect; evaluation

纳米药物递送系统(drug delivery system, DDS)在提高药物载药量、靶向性和有效性方面以及肿瘤治疗方面显示出前所未有的新机遇^[1-3]。创新的纳米技术平台, 如聚合物纳米颗粒、脂质体、树枝状大分子、纳米壳层、碳纳米管、超磁性纳米颗粒和基于核酸的纳米颗粒, 已被应用于将生物活性物质定向输送到生命系统中, 与游离药物相比, 显示出更好的安全性和更强的抗肿瘤效果^[4]。在各类纳米材料中, 富勒烯、碳纳米管和石墨烯作为生物传感器、成像探针和 DDS 被广泛应用于生物医学领域^[5]。近年来, 石墨烯及其衍生物由于其

单原子层结构和化学性质引起了生物医学研究人员的极大兴趣。功能化石墨烯和氧化石墨烯(graphene oxide, GO)已被证明可以改善药物的溶解性, 延长其半衰期, 并减少其不良反应^[6]。

石墨烯量子点(graphene quantum dot, GQD)是单层二维石墨烯的碎片, 被认为是下一代碳基纳米材料, 在生物医学领域具有巨大的潜力^[7]。最近对这类纳米材料的研究表明, 与石墨烯相比, GQD 毒性更小, 疏水性更强, 并具有稳定的强荧光^[8-9]。GQD 表面存在更活跃的基团, 允许它们进行多模式结合, 使它们成为同时治疗和跟踪肿瘤

基金项目: 福建省卫生计生中青年骨干人才培养项目(2018-ZQN-94)

作者简介: 王琛, 男, 博士, 副教授 Tel: (0592)2110643 E-mail: wc@xmmc.edu.cn

细胞的理想载体^[10]。此外, 由于其独特的结构特性, GQD 已经显示出可以提高抗肿瘤药物的化疗效果。近年来的研究表明, GQD 能有效促进多柔比星(doxorubicin, DOX)、顺铂等药物的核内蓄积, 并能显著提高这些药物的活性和细胞毒性^[11]。这些突出的生物学特性突显了 GQD 相对于改性石墨烯或 GO 和许多其他基于纳米颗粒的传递系统的优越性^[12]。

课题组前期已经成功制备了环肽(cRGD)修饰的、负载盐酸 DOX 的 GQD 递药系统, 并对其理化性质、合成表征等进行了初步研究^[13], 本研究主要是在前期研究的基础上进一步对该递药系统体内外肿瘤抑制作用以及光热效应进行探讨研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

TiX580 红外热像仪(美国 Fluke); Sp8 激光共聚焦显微镜(德国 Leica); M1000 Pro FP&Injector 多功能酶标仪(瑞士 Infinte)。

1.2 试剂

GQD(江苏先丰纳米材料科技有限公司, 批号: 20191203); Cyclo[RGDfK(MPA)](上海强耀生物科技有限公司, 批号: 20190611; 含量>95%); 盐酸 DOX(大连美仑生物科技有限公司, 批号: 201811; 含量>98%); 聚乙二醇 *N*-琥珀酰亚胺 3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(PEG₁₂-SPDP, 赛默飞世尔中国有限公司, 批号: 20197122); U87 胶质瘤细胞(批号: 201965189)和 MCF-7 细胞(批号: 201966523)均购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.3 动物

BALB/c 裸鼠, ♂, 25 只, 体质量 18~25 g, 由厦门大学实验动物中心提供, 动物使用许可号为 SYXK(闽)2018-0009, 本批裸鼠批号为 20191130016, 实验动物伦理审查号为 XMULAC20190080。

2 方法

2.1 样品的制备

前期课题组已经制备了 cRGD 修饰载药 GQD, 并进行了表征与理化性质分析, cRGD 修饰载药 GQD 的具体制备方法参考课题组的前期制备方法^[13]。用 cRGD 对 GQD 进行表面修饰(cR-G), 再以修饰后的 GQD 负载盐酸 DOX, 即得到 cRGD 修饰、负载盐酸 DOX 的 GQD(cR-G@D), 以类似的方法制得未修饰 cRGD 但负载盐酸 DOX 的 GQD(G@D)用于后续对照试验。

2.2 细胞毒性试验

以 U87 肿瘤细胞为模型, 利用 CCK-8 法考察 DOX 组、cR-G 组、cR-G@D 组和 cR-G@D+激光照射组(cR-G@D+NIR 组)对于 U87 肿瘤细胞生长的抑制效果。U87 细胞系在含 10%胎牛血清、100 U·L⁻¹青霉素和 100 μg·mL⁻¹链霉素的 RPM 培养基中培养, 将 U87 细胞以 5×10³·mL⁻¹细胞密度接种于 96 孔板中, 每组样品以 6 个不同浓度分别加入 96 孔板中。孵育结束后, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8 孵育 4 h 后, 用多功能酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值, 计算细胞增殖抑制率与不含药物的培养液对照孔的细胞百分率。为了考察光热与药物联合抑制肿瘤细胞生长的效果, 在上述相同的条件下, cR-G@D+NIR 组激光(808 nm, 2 W·cm⁻²)照射 4 min, 随后用 CCK-8 法测试细胞活性。

2.3 细胞摄取

以 α_vβ₃ 不表达的 MCF-7 细胞和 α_vβ₃ 过表达的 U87 细胞为模型, 考察样品在细胞内的摄取情况。MCF-7 细胞和 U87 细胞以 5×10³·mL⁻¹细胞密度分别在 35 mm 共聚焦培养皿中培养, 再分别加入相当于盐酸 DOX 100 μg·mL⁻¹的 cR-G@D 和 G@D, 然后与 100 μL 的 Hoechst 33342(1 μg·mL⁻¹)混合孵育 20 min。最后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 并加入新鲜培养液。采用激光共聚焦显微镜, 在波长 485 nm 条件下进行拍摄。

2.4 体内光热效应

以 BALB/c 荷瘤裸鼠(含 U87 细胞)为研究对象, 探讨 cR-G@D 的光热效应。当肿瘤长到 60~100 mm³时, 将裸鼠随机分为 2 组(*n*=3)。将相当于盐酸 DOX 100 μg·mL⁻¹的 cR-G@D 和 DOX 分别注入 2 组裸鼠尾静脉 1 h 后, 2 组小鼠均接受激光照射(808 nm, 2 W·cm⁻²)。用红外热像仪记录肿瘤部位温度随时间的变化。

2.5 体内肿瘤抑制效果及体内安全性

用 U87 荷瘤 BALB/c 裸鼠评价 cR-G@D 纳米粒光热和化学药物联合抑制抗肿瘤的作用。分别设计了生理盐水组、DOX 组、G@D 组、cR-G@D 组和 cR-G@D+光照组。每 2 d 给药 1 次, 给药剂量按盐酸 DOX 10 mg·kg⁻¹或纳米粒中相当于盐酸 DOX 10 mg·kg⁻¹, 并每次给予裸鼠在 808 nm (2 W·cm⁻²)激光照射 4 min。给药期间, 定期测定肿瘤体积, 连续给药 10 d 后, 引颈处死小鼠, 计算肿瘤体积。

为了进一步验证 GQD 载体在体内安全性,进行半数致死量和溶血性试验。分别设计了 DOX 组、G@D 组和 cR-G@D 组,每组 4 只小鼠,测定各组在小鼠的半数致死量,进而评价体内安全性。同时采用溶血性试验评价 GQD 体内安全性(生物相容性)。取 2 mL 小鼠全血离心($1\ 200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min),去除上清液,再稀释为 5%红细胞悬液。与载体样品 1:1 混合,37 °C 共育 2 h,离心后取上清在 540 nm 处测定吸光度值。阴性对照为生理盐水-红细胞混悬液(1:1),阳性对照为超纯水-红细胞混悬液(1:1)。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行方差检验, $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞毒性

cR-G 组(cRGD 修饰的 GQD)无论浓度高低,U87 细胞的存活率几乎接近 100%。为了验证 cR-G@D 对于 U87 细胞是否具有光热效应以及比较 cR-G@D 在光照前后的细胞毒性是否增加,设计了 cR-G@D+NIR 组,相比而言 cR-G@D+NIR 组在近红外光照射下,在较低浓度时,U87 细胞都显示出良好的细胞活力,但在较高浓度时,显现了显著的毒性。cR-G@D 组比 DOX 组 U87 细胞存活率高一些。除 cR-G 组外,其他几组都表现出毒性浓度依赖性。细胞存活率结果显示,与 cR-G@D 组和 DOX 组相比,cR-G@D+NIR 的细胞存活率明显降低($P < 0.01$),说明在激光照射下的 cR-G@D 具有明显的细胞毒性特征,结果见图 1。

3.2 细胞摄取

采用激光共聚焦技术研究 GQD 的选择性摄取情况,同时为了说明 cRGD 修饰后的 GQD 具有靶向性,选取了以 $\alpha_v\beta_3$ 不表达的 MCF-7 细胞和 $\alpha_v\beta_3$ 过表达的 U87 细胞为细胞模型。图 2 显示了测试样品在 MCF-7 和 U87 细胞的荧光行为。观察到 G@D 和 cR-G@D 孵育的 MCF-7 细胞的荧光强度较低。对于 U87 细胞内各样品摄取行为却并不相同,经过靶向修饰的载药 GQD(cR-G@D)比非靶向组的荧光强度大。

3.3 体内光热效应

实验设计的 cR-G@D 递药系统,由 cRGD、GQD 和 DOX 3 个要素构成的。其中,cRGD 应该增加靶向性,GQD 应该具有光热效应。在给予相同剂量 cR-G@D 和 DOX 的前提下,经过激光照

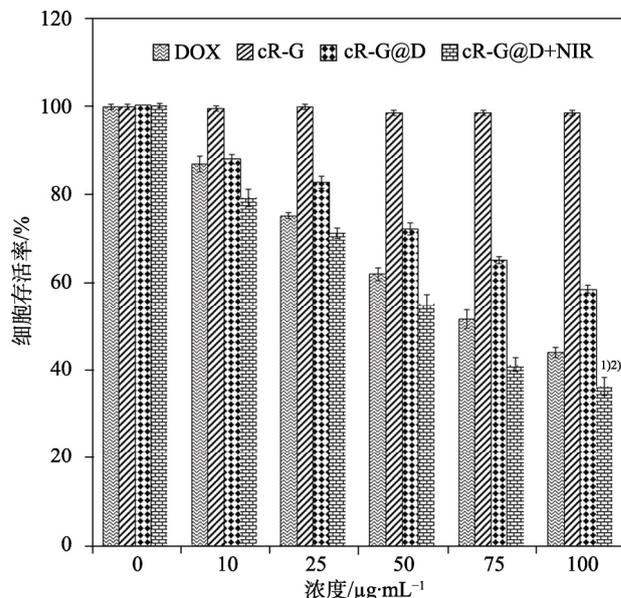


图 1 cR-G@D、DOX、cR-G 和 cR-G@D+NIR 对 U87 的细胞毒作用($n=6$)

与 cR-G@D 组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 DOX 组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Cytotoxicity of cR-G@D, DOX, cR-G and cR-G@D+NIR against U87($n=6$).

Compared with cR-G@D group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with DOX group, ²⁾ $P < 0.01$.

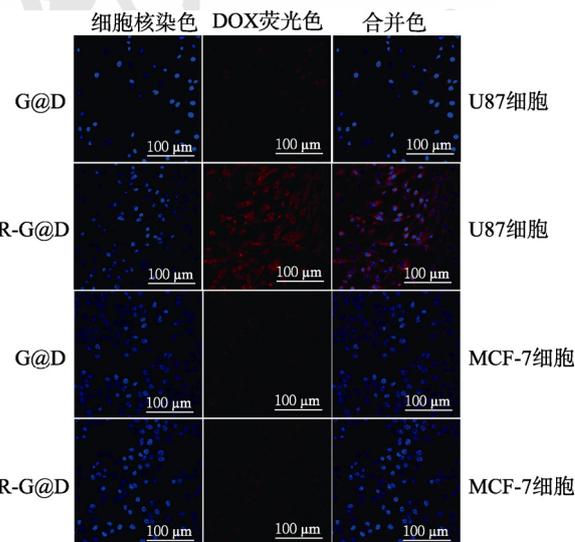


图 2 G@D 和 cR-G@D 在不同细胞内摄取情况

Fig. 2 Cellular uptake of G@D and cR-G@D in different cells

射后,肿瘤部位温度随时间的变化,结果见图 3。注射 DOX 组的肿瘤部位温度没有随时间推移而显著增加,维持在 37~40 °C,结果见图 3A。cR-G@D 组的肿瘤部位温度在 4 min 内温度升高到 47.7 °C。结果见图 4。

3.4 体内肿瘤抑制与体内安全性评价

该部分试验验证所设计的石墨烯系列纳米粒靶向性以及光热联合治疗效应。在给药后的第

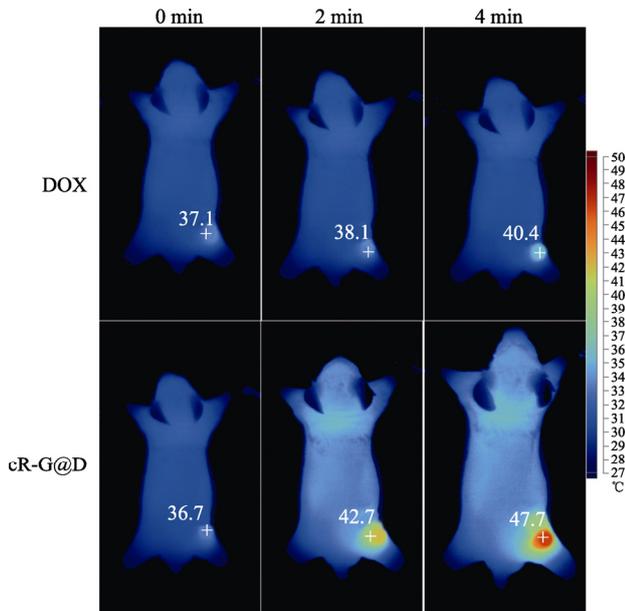


图3 DOX和cR-G@D在荷瘤小鼠体内红外热像图
Fig. 3 IR thermal images of DOX and cR-G@D in tumor-bearing mice

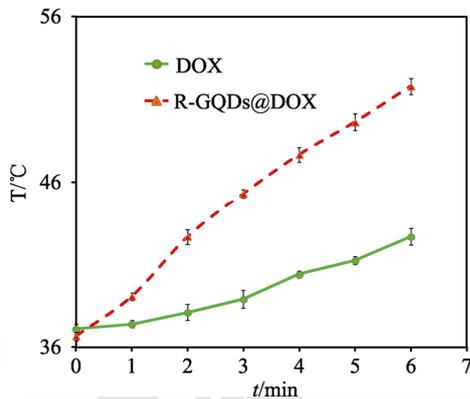


图4 cR-G@D和DOX在肿瘤部位温度变化曲线($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Fig. 4 Temperature curve of cR-G@D and DOX at the tumor site ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

10天, 测量肿瘤大小并将肿瘤取出, cR-G@D+NIR组平均肿瘤大小为 265 mm^3 , cR-G@D组的 1283 mm^3 和 DOX组的 1308 mm^3 , 结果见图5。以第10天肿瘤大小数据为依据, 以生理盐水组为对照组, 计算cR-G@D+NIR组、cR-G@D组、G@D组和DOX组肿瘤(体积)抑制率分别为91.5%, 54.0%, 38.4%和57.8%。肿瘤抑制结果显示, 与cR-G@D组和DOX组相比, cR-G@D+NIR的肿瘤生长速度明显降低($P < 0.01$), 说明制备的cR-G@D递药系统在NIR照射下具有肿瘤抑制效果。

在实验周期内, 各组裸鼠体质量变化见表1。

除了DOX组和G@D组外, 各组荷瘤鼠体质量均增加。DOX组和G@D组体质量下降, 主要

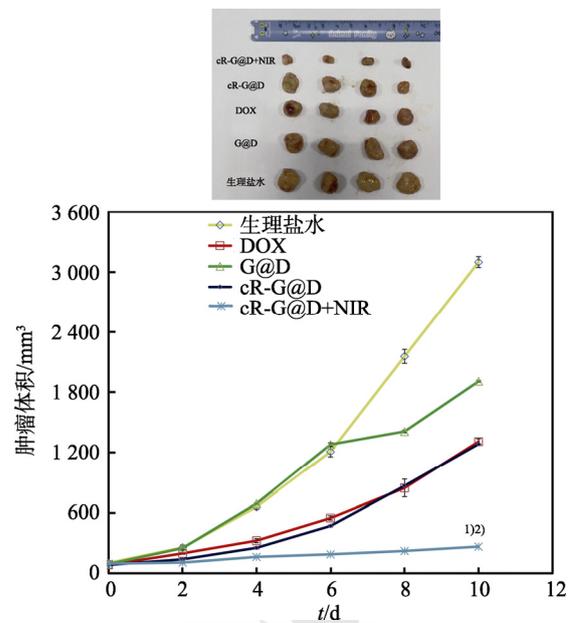


图5 不同治疗方法下的U87荷瘤小鼠肿瘤生长曲线($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

与cR-G@D组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与DOX组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 5 Curve of tumor growth for U87 tumor bearing mice in different treatments ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Compared with cR-G@D group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with DOX group, ²⁾ $P < 0.01$.

表1 给药前后荷瘤裸鼠体质量变化($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Tab. 1 Changes of body weight of tumor-bearing nude mice before and after administration ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	体质量/g	
	注射给药前	处死后
生理盐水组	20.33±0.26	26.00±0.66
DOX组	19.90±0.22	17.33±0.42
G@D组	19.90±0.25	17.45±0.10
cR-G@D组	19.95±0.19	25.28±0.42
cR-G@D+NIR组	19.95±0.19	25.28±0.42

因为这2组均未体现靶向性, 不良反应较大, 影响小鼠正常生理机能, 导致小鼠体质量下降; 而cR-G@D组靶向性强, 裸鼠体质量增长; cR-G@D+NIR组体质量增加略有下降, 可能与激光照射影响有关。

DOX组、G@D组和cR-G@D组的半数致死量分别为15.5, 7.6, $7.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, G@D组和cR-G@D组体内用药在同等剂量下, 毒性比DOX要低。

载药GQD生物相容性(溶血性)结果见图6, 阳性对照(超纯水)呈血红色, 与之颜色差异明显的是阴性对照(生理盐水)为淡黄色, 样品cR-G@D和G@D也呈现淡黄色。定量分析结果见表2, 样品cR-G@D和G@D的溶血率分别为3.18%和2.38%, 该结果与图5的定性分析结果一致, 说明

载药 GQD 生物相容性较好,可以满足后续注射途径给药要求。

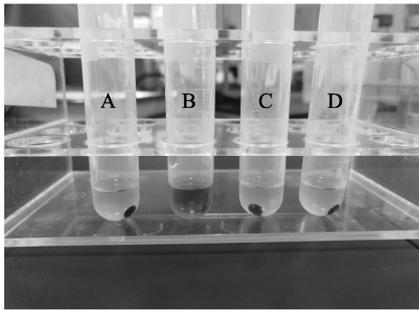


图6 不同样品肉眼可见溶血性
A-阴性对照; B-阳性对照; C-G@D; D-cR-G@D。

Fig. 6 Visual hemolysis in different samples
A-negative control; B-positive control; C-G@D; D-cR-G@D.

表2 不同样品溶血性比较

Tab. 2 Hemocompatibility of different samples

样品	溶血率/%
阴性对照	-
阳性对照	-
G@D	3.18
cR-G@D	2.38

注: 溶血率=(样品吸光度-阴性对照吸光度)/(阳性对照吸光度-阴性对照吸光度)×100%。

Note: Hemolysis rate=(absorbance of sample-absorbance of negative control)/(absorbance of positive control-absorbance of negative control)×100%.

4 讨论

游离 DOX 比 GQD 负载 DOX 具有更大的毒性。其原因可能是游离 DOX 在扩散后短时间内直接进入细胞内,而负载 DOX 的 GQD 则通过内吞作用进入细胞内,而从 GQD 表面释放则需要较长的时间。

利用共聚焦和细胞摄取研究的结果,清楚地表明 U87 癌细胞摄取了更多的 cR-G@D。而 MCF-7 细胞中则摄取的 cR-G@D 很少,其中由于 cRGD 的存在,更多的 cR-G@D 通过 $\alpha_v\beta_3$ 受体介导的基于内吞的靶向递送进入 U87 细胞质。对于 $\alpha_v\beta_3$ 受体不表达的 MCF-7 由于缺少受体介导对于样品的摄取很少。有文献报道 RGD 多肽介导的纳米载体或以石墨烯为载体的递药系统进入细胞机制均为网格蛋白(笼状蛋白)介导的胞饮方式^[14-15],结合本实验设计的 cR-G@D,包含了 RGD 多肽和石墨烯等元素,cR-G@D 进入细胞的机制有很大可能为网格蛋白(笼状蛋白)介导的胞饮方式。

由于 cRGD 修饰后的 GQD 具有光热效应,在一定波长激光照射下可以产生热效应。即使没有给药,用激光照射肿瘤部位温度也会更高,但在

给予了 cR-G@D 且接收激光照射的条件下,肿瘤部位的温度升高更快、幅度更大、更有可能满足临床的治疗需要。

REFERENCES

- [1] JI Q, CHEN J H. The recent advances and application of nanoemulsions[J]. Pharm Today(今日药), 2017, 27(12): 859-864.
- [2] YANG J M, XU D H, LI F Z. Advance in the design and development of nanocarrier-mediated co-delivery for overcoming multidrug-resistant cancer[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2020, 37(6): 750-754.
- [3] ZHAO G K, SU W K, SHUAI Q. Research progress of novel multi-functional biodegradable PEG-PLA/PLGA/PCL polymeric nano-anticancer drug carriers[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2020, 37(18): 2291-2298.
- [4] MAJIDZADEH H, ARAJ-KHODAEI M, GHAFARI M, et al. Nano-based delivery systems for berberine: A modern anti-cancer herbal medicine[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020(194): 111188.
- [5] IMANI R, MOHABATPOUR F, MOSTAFAVI F. Graphene-based Nano-Carrier modifications for gene delivery applications[J]. Carbon, 2018(140): 569-591.
- [6] HASANZADEH M, SHADJOU N. What are the reasons for low use of graphene quantum dots in immunosensing of cancer biomarkers?[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017(71): 1313-1326.
- [7] IANNAZZO D, PISTONE A, SALAMÒ M, et al. Graphene quantum dots for cancer targeted drug delivery[J]. Int J Pharm, 2017, 518(1/2): 185-192.
- [8] NIGAM P, WAGHMODE S, LOUIS M, et al. Graphene quantum dots conjugated albumin nanoparticles for targeted drug delivery and imaging of pancreatic cancer[J]. J Mater Chem B, 2014, 2(21): 3190-3195.
- [9] DONG J, WANG K Q, SUN L P, et al. Application of graphene quantum dots for simultaneous fluorescence imaging and tumor-targeted drug delivery[J]. Sensor Actuat B: Chem, 2018(256): 616-623.
- [10] WANG X, SUN X, LAO J, et al. Multifunctional graphene quantum dots for simultaneous targeted cellular imaging and drug delivery[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014(122): 638-644.
- [11] JAVANBAKHT S, NAMAZI H. Doxorubicin loaded carboxymethyl cellulose/graphene quantum dot nanocomposite hydrogel films as a potential anticancer drug delivery system[J]. Mater Sci Eng: C, 2018(87): 50-59.
- [12] SUI X, LUO C, WANG C, et al. Graphene quantum dots enhance anticancer activity of cisplatin via increasing its cellular and nuclear uptake[J]. Nanomedicine, 2016, 12(7): 1997-2006.
- [13] WANG C, CHEN Y, XU Z Z, et al. Fabrication and characterization of novel cRGD modified graphene quantum dots for chemo-photothermal combination therapy[J]. Sensor Actuat B: Chem, 2020(309): 127732.
- [14] HUANG J, ZONG C, REN B, et al. The 28th annual conference of Chinese chemical society[C]. Chengdu: Chinese Chemical Society, 2012: 172.
- [15] ZHU S J. Studies on tumor targeting of RGD modified doxorubicin loaded PEG-PAMAM conjugates[D]. Shanghai: Fudan University, 2010.

收稿日期: 2021-02-07
(本文责编: 陈怡心)