

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.20.006

纳米金壳介导的光热效应对骨肉瘤干细胞体外杀伤作用的研究*

吴杰 郭征[△] 石磊 李明辉 鲁亚杰 高鹏 肖鑫 杨迪

(第四军医大学附属西京医院骨肿瘤科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探究纳米金壳介导的光热效应对骨肉瘤干细胞的杀伤作用。**方法:**采用无血清悬浮培养法富集骨肉瘤干细胞,通过实时荧光定量 PCR 检测所富集细胞 CD133、SOX2、NANOG、OCT4 mRNA 的相对表达量以进行鉴定。将纳米金壳与骨肉瘤干细胞共培养,应用波长 808 nm 的近红外激光器 (1.5 W/cm²) 进行照射以激发光热效应,分别用 CCK8 法检测光热疗法对骨肉瘤干细胞的增殖抑制率,Annexin C-Fitc/PI 双染法检测光热疗法对骨肉瘤干细胞凋亡的影响。**结果:**成功富集了高表达 CD133、SOX2、NANOG、OCT4 mRNA 的骨肉瘤干细胞;纳米金壳介导的光热效应显著抑制了骨肉瘤干细胞的增殖率,当纳米金壳浓度在 0~250 μg/mL 范围内时,增殖抑制率与浓度呈正相关;细胞凋亡结果显示,纳米金壳结合近红外照射组细胞凋亡率显著高于对照组。**结论:**纳米金壳介导的光热效应对骨肉瘤干细胞增殖有明显抑制作用,主要诱导骨肉瘤干细胞发生中晚期凋亡。

关键词:骨肉瘤;肿瘤干细胞;纳米金壳;光热疗法

中图分类号:R-33; R738 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)20-3830-05

In vitro Killing Effect of Gold Nanoshells-mediated Photothermal Therapy on Osteosarcoma Stem Cells*

WU Jie, GUO Zheng[△], SHI Lei, LI Ming-hui, LU Ya-jie, GAO Peng, XIAO Xin, YANG Di

(Department of Orthopaedic Oncology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the in vitro killing effect of gold nanoshells-mediated photothermal therapy. **Methods:** Sphere formation assays were used to isolate osteosarcoma stem cells, real-time fluorescence quantitative PCR were used to identify the stem cell by evaluate the expression of CD133, SOX2, NANOG, OCT4. osteosarcoma stem cells were co-cultured with different concentration of gold nanoshell, 1.5 W/cm² near infrared with a wavelength of 808nm was used to irradiate the cell. CCK8 assay was used to detect the proliferation inhibition rates after treatment with photothermal therapy. Annexin-FITC / PI double staining was used to detect the apoptotic rates. **Results:** Osteosarcoma stem cells with high expression of CD133, SOX2, NANOG, OCT4 were isolated. Photothermal therapy significantly inhibited osteosarcoma stem cell proliferation. Concentration-dependent were observed when the concentration of gold nanoshell between 0~250 μg/mL. The apoptosis rate of photothermal therapy group was significantly high compare to control group. **Conclusions:** Photothermal therapy mediated by gold nanoshell can inhibit proliferation of osteosarcoma stem cell by mechanism of induction the apoptosis.

Key words: Osteosarcoma; Tumor stem cell; Gold nanoshell; Photothermal therapy

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R738 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)20-3830-05

前言

骨肉瘤是好发于儿童及青少年的恶性骨肿瘤,其恶性程度高、预后差,其中骨肉瘤干细胞被认为与骨肉瘤的复发及转移有着密切关系^[1,2]。目前临床上骨肉瘤治疗方法主要采用手术辅以放化、疗,但总体疗效有限,且放、化疗副作用较大,不少患者难以耐受^[3]。因此,探索一种新型治疗方法迫在眉睫。纳米金壳(Gold Nanoshells, GNs)是以二氧化硅为核心,表面附以一层金壳的颗粒,其具有优异的光热转换效率,可将光能高效的转换为热能,基于纳米金壳的光学特性,学者们尝试采用纳米金壳介导的光热疗法(photothermal therapy)杀灭肿瘤细胞,并通过

证实这种光热疗法可显著抑制乳腺癌、肝癌细胞生长^[4-6]。光热疗法对骨肉瘤干细胞是否具有杀伤作用尚无相关报道。本研究旨在探究纳米金介导的光热疗法对骨肉瘤干细胞生长活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨肉瘤 HOS 细胞由第四军医大学骨科研究所保存, RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自四季青公司; 青链霉素、0.25%胰蛋白酶、B27 及 Trizol 购自 Invitrogen 公司; 表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)购自 Pepro-

* 基金项目:西京医院学科助推基础研究项目(XJZT15M06)

作者简介:吴杰(1992-),硕士研究生,主要研究方向:骨肿瘤,骨科新材料, E-mail: wujie@fmmu.edu.cn

[△] 通讯作者:郭征(1965-),博士生导师,教授,主要研究方向:骨肿瘤,骨科新材料, E-mail: guozheng@fmmu.edu.cn, 电话:029-84775284

(收稿日期:2018-03-14 接受日期:2018-04-11)

tech 公司。CCK8 试剂盒购自同仁公司;实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 Takara 公司;PCR 引物购于西安奥科鼎盛生物科技有限公司;超低粘附六孔板购于 Corning 公司;纳米金壳由西安交通大学机械学院提供(图 1)。

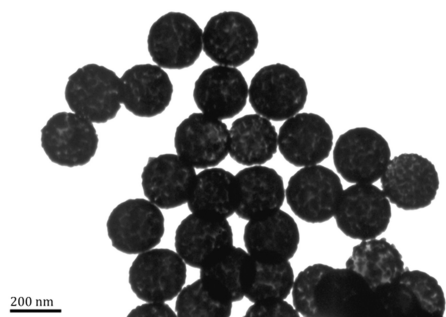


图 1 纳米金壳

Fig. 1 Gold Nanoshell

1.2 方法

1.2.1 悬浮成球法富集肿瘤干细胞 HOS 细胞常规培养采用

富含 10%血清、0.5%青、链霉素的 1640 培养基在恒温 37℃, 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养,隔日换液,传代方式为 1:4。取处于对数生长期的细胞,离心后重悬于无血清培养基中,将细胞接种于超低粘附六孔板中(30000 个/孔),根据 Martins 等^[2,7]报道的方法,在无血清培养基中添加 EGF(10 ng/mL)、bFGF(10 ng/mL)、B27(1:50)以获得具有干性的骨肉瘤细胞球,隔日添加富含生长因子的培养基,连续培养 7 天,收集细胞球,离心重悬后将细胞球吹打成单细胞并置于常规培养皿使用富含血清的培养基进行培养,即获得骨肉瘤干细胞。

1.2.2 q-PCR 检测干性基因表达 采用 Trizol 法分别提取亲代骨肉瘤 HOS 细胞及骨肉瘤干细胞的总 RNA,使用分光光度计检测 RNA 样本 260/280 比值,选取比值介于 1.7-2.0 之间的样本用于下一步实验。使用 Takara qPCR 逆转录试剂盒,根据说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。通过 qRT-PCR 对目的基因 CD133、SOX2、NANOG、OCT4 以及内参基因 β -Actin 进行扩增,引物序列见表 1。通过 2^{-ΔΔCt} 法进行半定量计算,比较两组细胞的干性基因表达情况。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
CD133	CCAGAAGCCGGGTCATAAAT	ATTCACTCAAGGCACCATCC
NANOG	CCCAGCTGTGTGTACTCAAT	GGTTCAGGATGTTGGAGAGTT
OCT4	CCCGCCGTATGAGTTCTGTGG	CCGGGTTTTGCTCCAGCTTCTC
SOX2	CATGCACCGCTACGACG	CGGACTTGACCACCGAAC

1.2.3 细胞增殖检测 取处于对数生长期的骨肉瘤干细胞,胰酶消化、离心后,调整细胞浓度至 5×10^4 /mL,于 96 孔板中接种 100 μ L 细胞悬液,继续培养 24 h 待细胞贴壁,小心吸去孔中培养基,加入经含血清培养基重悬的纳米金壳 100 μ L,纳米金壳浓度梯度为 0 μ g/mL、16 μ g/mL、32 μ g/mL、63 μ g/mL、126 μ g/mL、250 μ g/mL、500 μ g/mL,其中 0 μ g/mL 为对照组,每个浓度梯度设 4 个复孔,继续培养 4 h 后,吸去孔板中含纳米金壳的培养基,重新加入 100 μ L 含血清培养基,并使用功率为 1.5 W/cm² 的近红外射线照射持续照射孔板 6 min,常规培养 24 h 后向每孔加入 10 μ L CCK8 试剂,继续培养 4 h 后终止培养,使用多功能酶标仪检测各孔在波长 450 nm 下的吸光度。实验重复 3 次。根据以下公式计算细胞增殖抑制率:增殖抑制率(%)=1-[A(实验组)-A(空白)]/[A(对照组)-A(空白)] $\times$ 100%,A 为吸光度。

1.2.4 细胞凋亡检测 取处于对数生长期的骨肉瘤干细胞,胰酶消化、离心,调整细胞浓度为 5×10^4 /mL,于 6 孔板接种 2 mL 细胞悬液,设四组:纳米金壳+近红外照射组,单纯纳米金壳组,单纯近红外照射组,对照组(不加纳米金壳及近红外照射)。各组纳米金壳浓度为均为 250 μ g/mL,近红外照射功率均为 1.5 W/cm²、持续照射 6 min,常规培养 24 h 后,使用 Annexin V-FITC/PI 法通过流式细胞检测技术评估细胞凋亡情况。胰酶消化细胞,预冷 PBS 洗涤后用结合缓冲液重悬至 1×10^6 /mL

的浓度,取 100 μ L 细胞悬液滴至流式管,加入 Annexin V-FITC 标记蛋白和相应的核酸染料并混合均匀,室温下避光孵育 15 min 后,然后向流式管中加入含有 5 μ L PI 的 400 μ L 结合缓冲液,上机检测。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS19.0(SPSS 公司,美国)统计软件进行分析,计量资料数采用平均数 $\pm$ 方差($\bar{x} \pm s$)表示,通过单因素方差分析比较差异,组间比较采用 Bonferroni's 法进行检验。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 细胞培养及诱导成球情况

通过倒置显微镜观察可见,无血清培养后 1 天,细胞呈悬浮生长,可见部分细胞凋亡。三天后,逐渐可观察到细胞球形成,形态近似球体,第七天可见细胞球显著增大,球体中央密度高,透光度稍差,周边透光度较好(图 2)。

2.2 qRT-PCR 结果

实时荧光定量 PCR 结果显示(图 3),骨肉瘤干细胞的基因 CD133、SOX2、NANOG、OCT4 均高于亲代骨肉瘤 HOS 细胞,差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

2.3 光热疗法对细胞增殖的影响

倒置显微镜观察可见,经光热疗法后,活细胞数目显著减

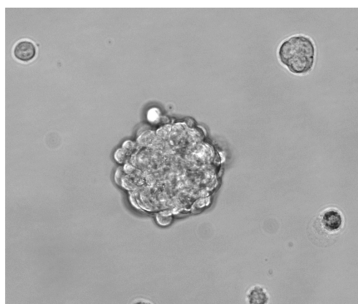


图2 肿瘤细胞球

Fig.2 Spheres of human osteosarcoma

少(图4)。CCK8结果显示(图5),随着纳米金壳浓度的增加,光热疗法对细胞增殖的抑制作用愈加明显,可见光热疗法对骨

肉瘤干细胞的抑制能力与纳米金壳浓度成正相关,当纳米金壳浓度为 $250 \mu\text{g/mL}$ 时,细胞增殖抑制率可达 $62.30 \pm 5.07\%$,当继续增大纳米金壳浓度至 $500 \mu\text{g/mL}$ 时,增殖抑制率为 $60.08 \pm 5.21\%$,未进一步加强对骨肉瘤干细胞的增殖抑制能力。

2.4 光热疗法对细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示(图6),对照组、纳米金壳+照射组、单加纳米金组及单纯照射组正常细胞分别为 $86.57 \pm 2.23\%$ 、 $56.60 \pm 2.46\%$ 、 $73.20 \pm 2.55\%$ 、 $84.17 \pm 4.00\%$,纳米金壳+照射组正常细胞比例低于其余三组,差异具有统计学意义 ($p < 0.05$); 各组细胞中、晚期凋亡率分别为 $7.20 \pm 0.95\%$ 、 $26.10 \pm 1.90\%$ 、 $11.93 \pm 2.05\%$ 、 $7.90 \pm 1.57\%$,纳米金壳+照射组的细胞凋亡率高于其余三组,差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)。

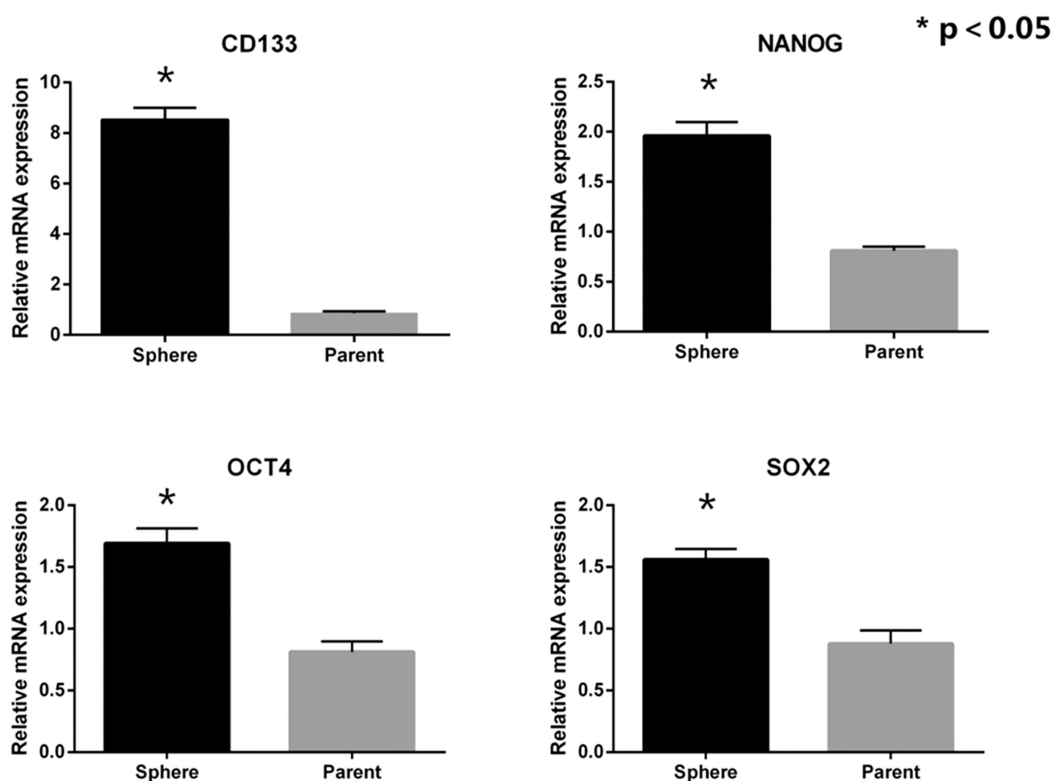


图3 CD133、NANOG、OCT4 及 SOX2 的 mRNA 表达情况

Fig.3 Relative mRNA expression of CD133, NANOG, OCT4 and SOX2

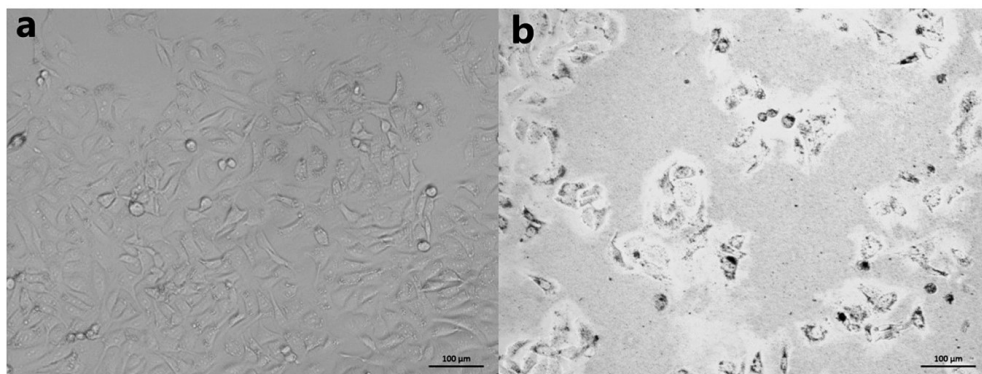


图4 倒置显微镜下观 对照组(a);实验组(b)

Fig.4 Photo by inverted microscope Control group(a); Experimental group(b)

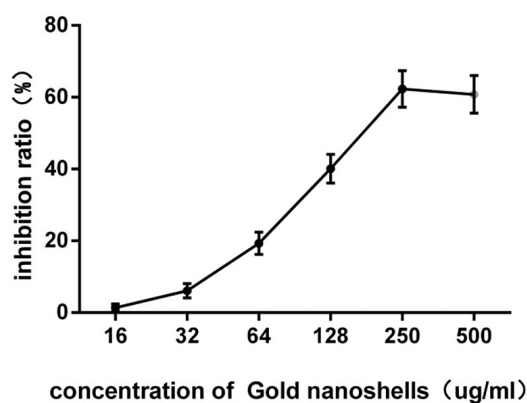


图5 骨肉瘤干细胞增殖抑制率

Fig.5 Inhibition rate of osteosarcoma stem cells

3 讨论

肿瘤干细胞理论认为肿瘤细胞中存在一群具有持续的自我更新能力及高度致瘤性的细胞, 尽管肿瘤干细胞含量极少, 但其与肿瘤的复发、转移及耐药的关系密不可分^[1,8,9]。如果能够在杀伤肿瘤细胞的同时, 进一步杀伤肿瘤干细胞, 那将会降低肿瘤的复发和转移率, 提高患者的生存期及生存质量。传统治疗方法如手术、放、化疗等对于缓慢分裂的骨肉瘤干细胞杀伤作用有限, 亟需探索一种新的治疗手段以达到杀灭肿瘤干细胞的目的。因肿瘤干细胞数量极少, 开展相关研究首要一点是富集骨肉瘤干细胞, 骨肉瘤干细胞的富集方法主要包括侧群细胞筛选法^[10]、无血清悬浮培养法^[2]、基于干细胞表面标志物的免疫学筛选法^[11]。本研究采用悬浮成球培养法成功富集了骨肉瘤干细

胞。基于前期学者们的研究^[11-15], 骨肉瘤干细胞高表达 CD133、SOX2、NANOG、OCT4 mRNA, 本实验 rt-PCR 结果显示我们所富集的骨肉瘤干细胞高表达上述 mRNA。

Halas 等于 1998 年首次合成了纳米金壳, 结构包括球形的二氧化硅核心, 及外覆的一层薄金壳。其具有光学性能可调及高的光-热转换能力, 通过调节二氧化硅核心与金壳厚度的比值, 可将粒子的最大吸收峰在近红外波段(800 nm-2.2 μ m)间进行调整^[16]。生物组织具有的“水窗效应”使得机体对于位于 700~900 nm 波段的近红外光吸收性较弱, 因而近红外光具有较好的生物穿透性、可达到机体较深的部位而不被皮肤或血液吸收^[17-19]。基于纳米金壳的光学特性, 通过纳米金介导光热效应具有杀灭肿瘤细胞的潜能; 此外, 实验证实纳米金具有良好的生物相容性, 对肝、肾功能无明显影响, 且溶血率极低^[4], 使得纳米金介导的光热疗法的成为一种有前景的肿瘤治疗策略。Halas 等^[20]率先开展关于光热疗法的研究, 通过体内、外实验证实了这种光热疗法的有效性。此后不断有学者在此方面进行更深入的探究。因肿瘤细胞增殖迅速、血红素合成旺盛因而肿瘤细胞表面转铁蛋白受体表达量较高^[21], 刘惠玉等^[5]基于这一特点, 在纳米金壳上结合了转铁蛋白, 并通过体内外实验证实了复合转铁蛋白的纳米金壳介导的光热效应对于乳腺癌具有更好地杀伤作用, 使得光热效应具有一定的靶向性, 并且作者还对纳米金壳进行载药, 发现纳米金壳介导的光热疗法与化疗药物具有协同作用。梁重时等^[6]将肝癌靶向肽 A54 以及化疗药物阿霉素 (DOX) 与纳米金壳复合, 形成了新型复合粒子 DOX/A54@GNs, 并通过实验证实, 复合粒子具有更好地靶向性, 并表现出与化疗药物的协同作用。Vankayala R 等^[22]发现,

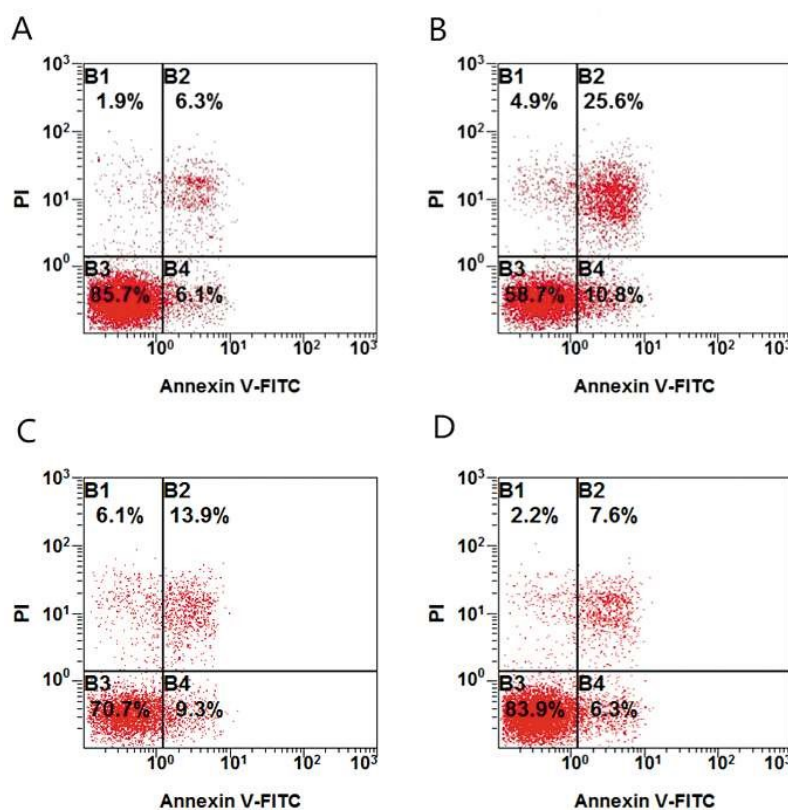


图6 流式细胞仪检测细胞凋亡(A.对照组; B.纳米金壳+近红外射线组; C.单纯纳米金壳组; D.单纯近红外照射组)

Fig.6 Apoptosis rate assayed by flow cytometry (A. control group; B. GNs+NIR; C. GNs; D. NIR)

近红外照射纳米金壳除产生光热效应外,还可产生具有杀灭肿瘤细胞能力的活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 这种现象被称为光动力效应(photodynamic therapeutic, PDT), 并证实光动力效应在较低的近红外照射强度情况下(150 mW/cm²)即能表现出抑制肿瘤细胞增殖的能力。近期, Halas 课题组^[23]使用纳米金壳作为载药介质, 证明了通过近红外射线局部照射, 实现了局部可控性纳米金壳载药释药模型, 这一发现对于实现化疗药物局部释放、降低药物全身毒性有着重要意义。基于学者们对于纳米金壳的研究, 以及骨肉瘤干细胞对于骨肉瘤复发、转移的重要性, 我们试图探究纳米金壳介导的光热效应能否杀灭骨肉瘤干细胞。在体外试验中, 我们发现纳米金壳介导的光热效应可有效抑制骨肉瘤干细胞的增殖, 显著增加了骨肉瘤干细胞的中、晚期凋亡率。这一发现进一步拓宽了对纳米金壳介导的光热疗法的认识。

需要指出的是, 根据美国国家标准协会制定的标准^[24], 对于近红外射线而言, 皮肤最大容许照射强度为 330-350 mW/cm², 本研究及现有大多数文献报道中, 使用的功率大于此值, 使得其临床应用的安全性存在隐患; 其次, 本研究为体外实验, 体内能否达到相同效果仍需要进一步研究; 此外, 本研究未对杀伤机制进行探讨, 尚需进一步实验以明确其作用机制。

总之, 本研究证实纳米金壳介导的光热疗法对于骨肉瘤干细胞的增殖有明显的抑制作用, 是一种有前景的肿瘤治疗策略。但目前仍需要进一步研究, 以提高这种光热疗法的功效并确保治疗的安全性。

参考文献(References)

- [1] Brown H K, Tellez-Gabriel M, Heymann D. Cancer stem cells in osteosarcoma[J]. *Cancer Lett*, 2017, 386: 189-195
- [2] Martins-Neves S R, Corver W E, Paiva-Oliveira D I, et al. Osteosarcoma Stem Cells Have Active Wnt/ β -catenin and Overexpress SOX2 and KLF4 [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2016, 231(4): 876-886
- [3] 郭征. 我国骨肉瘤治疗的现状与问题及发展方向[J]. *中国骨与关节杂志*, 2015, (05): 338-342
- [4] Guo Zheng. Present situation, problems and development in the treatment of osteosarcoma in China [J]. *Chinese Journal of Bone and Joint*, 2015, (05): 338-342
- [5] Fu C, He C, Tan L, et al. High-yield preparation of robust gold nanoshells on silica nanorattles with good biocompatibility[J]. *Science Bulletin*, 2016[Epub ahead of print]
- [6] Liu H, Liu T, Wu X, et al. Targeting Gold Nanoshells on Silica Nanorattles: a Drug Cocktail to Fight Breast Tumors via a Single Irradiation with Near-Infrared Laser Light [J]. *Advanced Materials*, 2012, 24(6): 755-761
- [7] Liang Z, Li X, Xie Y, et al. 'Smart' gold nanoshells for combined cancer chemotherapy and hyperthermia[J]. *Biomed Mater*, 2014, 9(2): 25012
- [8] Martins-Neves S R, Lopes AO, Do Carmo A, et al. Therapeutic implications of an enriched cancer stem-like cell population in a human osteosarcoma cell line[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 139
- [9] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111
- [10] 尹彦斌, 王建杰, 刘祎, 等. 肿瘤干细胞分离研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16 (2): 382-385
- [11] Yin Yan-bin, Wang Jian-jie, Liu Yi, et al. Progress in Isolation of Cancer Stem Cells[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(2): 382-385
- [12] Yang M, Yan M, Zhang R, et al. Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells [J]. *Cancer Science*, 2011, 102(10): 1774-1781
- [13] Brown H K, Tellez-Gabriel M, Heymann D. Cancer stem cells in osteosarcoma[J]. *Cancer Lett*, 2017, 386: 189-195
- [14] Skoda J, Nunukova A, Loja T, et al. Cancer stem cell markers in pediatric sarcomas: Sox2 is associated with tumorigenicity in immunodeficient mice[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(7): 9535-9548
- [15] Wang Y, Teng J S. Increased multi-drug resistance and reduced apoptosis in osteosarcoma side population cells are crucial factors for tumor recurrence[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(1): 81-86
- [16] Palmini G, Zonefrati R, Mavilia C, et al. Establishment of Cancer Stem Cell Cultures from Human Conventional Osteosarcoma [J]. *Journal of Visualized Experiments Jove*, 2016
- [17] Chen X, Hu C, Zhang W, et al. Metformin inhibits the proliferation, metastasis, and cancer stem-like sphere formation in osteosarcoma MG63 cells in vitro[J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(12): 9873-9883
- [18] S J Oldenburg J B J S. Infrared extinction properties of gold nanoshells[J]. *Applied Physics Letters*, 1999, 75(19): 2897-2899
- [19] 梁重时. Au@SiO₂ 纳米复合材料的制备及其在肝癌光热治疗中的应用研究[D]. 华东师范大学, 2011
- [20] Liang Zhong-shi. Synthesis of Au@SiO₂ Nanocomposite Materials and Their Photothermal Therapy Applications in Liver Cancer. East China Normal University, 2011
- [21] Ntziachristos V, Ripoll J, Weissleder R. Would near-infrared fluorescence signals propagate through large human organs for clinical studies? Errata[J]. *Opt Lett*, 2002, 27(18): 1652
- [22] 王懋, 李春炎, 孙云飞, 等. 近红外小动物活体荧光成像系统的研制[J]. *光学学报*, 2013, (06): 247-252
- [23] Wang Mao, Li Chun-yan, Sun Yun-fei, et al. Research of Near Infrared Small Living Fluorescence Imaging System [J]. *Acta Optica Sinica*, 2013, (06): 247-252
- [24] Hirsch L R, Stafford R J, Bankson J A, et al. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(23): 13549-13554
- [25] Daniels T R, Bernabeu E, Rodríguez J A, et al. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2012, 1820(3): 291-317
- [26] Vankayala R, Lin C C, Kalluru P, et al. Gold nanoshells-mediated bimodal photodynamic and photothermal cancer treatment using ultra-low doses of near infra-red light[J]. *Biomaterials*, 2014
- [27] Goodman A M, Neumann O, Nørregaard K, et al. Near-infrared remotely triggered drug-release strategies for cancer treatment [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114 (47): 12419-12424
- [28] Thomas R J, Rockwell B A, Marshall W J, et al. A procedure for laser hazard classification under the Z136.1-2000 American National Standard for Safe Use of Lasers [J]. *Journal of Laser Applications*, 2002, 14(1): 57-66