

As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ 复合纳米粒的制备及其杀伤宫颈癌 HeLa 细胞的实验研究

袁春燕¹, 安艳丽², 张东生^{3*}

(¹东南大学附属中大医院妇产科, 江苏 南京 210009; ²江苏省分子影像与功能影像重点实验室, ³东南大学医学院病理与病理生理学系, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:通过制备 As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ 复合纳米粒研究体外热化疗对宫颈癌 HeLa 细胞株的作用。方法:采用改良的化学沉淀-浸渍法制备 As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ 复合纳米粒,通过扫描电镜、能谱仪、原子荧光光谱仪来表征;检测 As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ 复合纳米粒的释药水平及在交变磁场中的升温能力;通过 MTT 比色法和流式细胞仪检测化疗组、热疗组及热化疗组对宫颈癌的治疗效果。结果:制备的复合纳米粒粒径为 20~40 nm;复合纳米粒体外升温能达到肿瘤的有效治疗温度(41~46℃);释药缓慢,48 h 释药为 13.28%。在 MTT 实验中,As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ 复合纳米粒组细胞抑制率明显高于单纯纳米雄黄溶液组和 Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ 联合交变磁场加热组 ($P < 0.05$);在凋亡率检测中,As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ 复合纳米粒联合磁流体热疗组细胞凋亡率明显高于单纯纳米雄黄溶液组和 Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ 联合交变磁场加热组 ($P < 0.05$)。结论:采用改良的化学沉淀-浸渍法可以成功制备 As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ 复合纳米粒,体外实验证明该复合纳米粒联合交变磁场热疗对宫颈癌细胞具有很强的生长抑制和诱导凋亡作用。

[关键词] As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄; 纳米; 热化疗; 宫颈癌

[中图分类号] R737.33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)12-1678-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20131207

Preparation of nano-As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ and its effect on treatment of human cervical cancer cells

Yuan Chunyan¹, An Yanli², Zhang Dongsheng^{3*}

(¹Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009;

²Jiangsu Key Laboratory of Molecular and Functional Imaging, ³Department of Radiology, Department of Pathology and Pathophysiology, Medical School, Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anticancer effect of nano-As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ particles on human cervical cancer cells through chemotherapy in combination with thermotherapy in alternating magnetic fields. **Methods:** The nano-As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ particles were prepared by improved technique of chemical co-precipitation and impregnation, and characterized by SEM, EDS and atom fluorescence spectrometer. The heat effect and the release ratio of nano-As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ particles were studied under alternating magnetic fields in vitro. The treatment effect of human cervical cancer cells was detected by MTT assay and FCM. **Results:** The nano-As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ particles had an average diameter of 20~40 nm with stable release ratio of 13.28% for 48 h, and had very distinct heat effect in alternating magnetic fields and could rise to a steady temperature for tumor hyperthermia (41~46℃). The inhibition ratio of the cells exposed to nano-As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ particles was significantly higher than that exposed to nano-As₄S₄ and Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ groups ($P < 0.05$). The apoptosis rate of cells exposed to nano-As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ particles was much higher than that exposed alone to that exposed to nano-As₄S₄ and Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** The nano-As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ particles can be successfully conducted by improved technique of chemical co-precipitation and impregnation, and the nano-As₄S₄/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ particles combined with magnetic hyperthermia can effectively induce cell apoptosis.

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81171452, 81271635, 81301270)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 13358111969@189.cn

[Key words] $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$; nanoparticles; thermochemo therapy; cervical cancer

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(12): 1678-1682]

雄黄是一种含砷的化合物,很早以前雄黄就以复方形式用于治疗宫颈糜烂、宫颈癌及尖锐湿疣^[1]。现代研究表明,雄黄无论在临床应用上,还是在基础研究方面都已经取得一定进展。但是,随着治疗病例的增加,应用范围的扩大,雄黄的不良反应及用药剂量较大是目前需要解决的问题。本实验室利用改良的化学共沉淀法制备了纳米雄黄^[2-3],与传统雄黄相比,其毒性低,将其用于大鼠胶质瘤 C6 细胞,显示出强烈的诱导凋亡作用。1996 年,德国学者 Jordan 等^[4]发现纳米级磁微粒比微米级微粒能产生更多的热量,提出了磁流体热疗 (magnetic fluid hyperthermia, MFH) 新技术。本实验采用改良的化学沉淀-浸渍法制备了 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒,将具有广谱抗癌性的纳米雄黄 (As_4S_4) 和磁流体 (锰锌铁氧体) 热疗结合起来,对宫颈癌 Hela 细胞株进行热化疗的体外实验研究。

1 材料和方法

1.1 材料

雄黄 (南京药材公司), 二甲基亚砷 (DMSO, Sigma 公司, 美国)。高糖 DMEM、胰酶、胎牛血清 (Gibco 公司, 美国), 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (AMRESCO 公司, 美国), 硫酸锰、硫酸锌和硫酸亚铁等均均为分析纯。能谱仪 (Noran, Vantage 公司, 美国); H600 透射电镜 (Hitachi 公司, 日本); 扫描电镜 (JEOLJSM-6360LV, 日本); 酶标仪 (BD 公司, 美国); 振动样品磁强计 (VSM, Lake Shore 公司, 美国); 流式细胞仪 (FACS Vantage SE, Becton-Dickson 公司, 美国); 原子荧光光谱仪 (北京瑞利分析仪器公司); Hela 细胞株 (中国科学院上海细胞研究所)。

1.2 方法

1.2.1 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒的制备

纳米雄黄制备方法参照文献^[2-3]。将雄黄原粉粉碎后,用 2 mol/L 浓盐酸 40℃ 浸泡 3 h 并不断搅拌,蒸馏水冲洗至中性,过滤。用浓盐酸浸泡 24 h,蒸馏水冲洗至中性,过滤,弃滤液,得到去除杂质元素的雄黄粉末。将上述预处理后的雄黄粉末加入饱和的 Na_2S 溶液适量,磁力搅拌,反应在氮气保护下进行,使充分反应。去离子水反复冲洗,过滤,弃渣,缓慢滴加 0.2 mol/L 的盐酸,并不断搅拌,将最后生成的

纳米雄黄 4℃ 避光保存。

$Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 制备方法参照文献^[5-8]。按 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 摩尔比 1:1:4 准确称量适量 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 种硫酸盐,研成粉末后将适量 NaOH 溶液加入其中,磁力搅拌器高速搅拌 3 h 后放入 80℃ 烤箱干燥,马弗炉 400℃ 焙烧 1 h,冷却后用热蒸馏水浸洗去除可溶性硫酸钠无机盐,烘干成锰锌铁氧体粉末。

采用改良的化学沉淀-浸渍法制备复合纳米粒。称量适量锰锌铁氧体粉末,加入纳米雄黄水溶液少许,磁力搅拌器搅拌 2 h (保持温度在 45℃) 后,离心烤干。

1.2.2 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒的表征

取出少量制备的 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒,加入无水乙醇超声分散 20 min 后滴铜网,在扫描电镜下观察形态。扫描电镜下对制备的复合纳米粒成分进行能谱分析,确定其元素组成成分。用镜头纸包裹一定质量的样品粉末,夹在样品夹上,开启实验仪电源,磁场正相增大,再反相减小,直到电脑屏幕上出现一闭合曲线。用原子荧光光谱仪测定其含砷量。

1.2.3 升温试验

将复合纳米粒用生理盐水配成 6、8、10、12 g/L 的磁流体,置于频率为 200 kHz、输出电流 300 A 的交变磁场下进行升温试验,每 5 min 记录 1 次温度。

1.2.4 释药试验

用生理盐水配成 8 g/L 的混悬液,取 10 ml 装于透析袋中,外面透析介质亦为生理盐水,磁力搅拌器常温搅拌 50 h,每隔 1 h 取液测量释放液中 As 含量,绘制累积释药曲线。

1.2.5 细胞株和细胞培养

宫颈癌细胞株 Hela 常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37℃、5% CO_2 的细胞培养箱中。

1.2.6 MTT 比色法检测细胞增殖抑制率

取对数生长期 Hela 细胞,消化吹打成单细胞悬液,计数,用培养液调成细胞浓度为 6×10^4 个/ml,将细胞接种到 2 个 96 孔培养板中,100 μ l/孔,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。一块培养板分别加入 DMEM 培养液 (阴性对照组)、13 μ g/ml 纳米

雄黄溶液培养(单纯化疗组),另一块培养板分别加入 8 g/L 的 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 培养液(单纯热疗组)及 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒培养液(热化疗组),置于 200 kHz、4 kW,输出电流 300 A 的交变磁场加热 1 h 继续培养,48 h 后加入 MTT 20 μ l,4 h 后弃去液体,每孔加入 150 μ l DMSO,置于酶标仪上振荡混匀 10 min 测 570 nm 吸光度值。根据公式计算:细胞增殖抑制率=1-实验组吸光度值/对照组吸光度值。同等条件本实验重复 3 次。

1.2.7 流式细胞术测凋亡率

按上述分组将治疗 24 h 后细胞制成单细胞悬液,PBS 洗涤细胞 2 次,70% 乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定细胞 24 h 以上。检测前用 PBS 洗涤细胞 2 次,细胞重悬于 0.5 ml PI 染色液中,室温避光染色 30 min,用 300 目丝网过滤后即可上机分析。同等条件本实验重复 3 次。

2 结果

2.1 表征

采用化学沉淀-浸渍法制备的 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米材料为棕褐色粉末,用扫描电镜观察, $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒近似球形,密度较高,粒径在 20~40 nm(图 1),扫描电镜下任选一视野进行能谱分析,均能检测到锰、铁、锌、硫、砷等材料成分(图 2)。 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米材料的比饱和磁化强度为 52.74 emu/g, $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 比饱和磁化强度为 54.48 emu/g,表明两种材料均具有较强的磁响应性(图 3)。

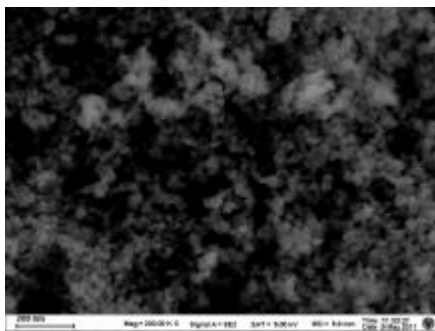


图 1 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒 SEM 图

Figure 1 SEM image of the $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles

2.2 升温情况

不同浓度的 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒在体外交变磁场作用下具有升温能力,在前 30 min 升温迅速,30~45 min 升温平缓,之后温度基本保持恒定不变,且 8 g/L 浓度的复合纳米粒升温能达到肿瘤治疗的有效温度(41~46 $^{\circ}$ C)(图 4)。

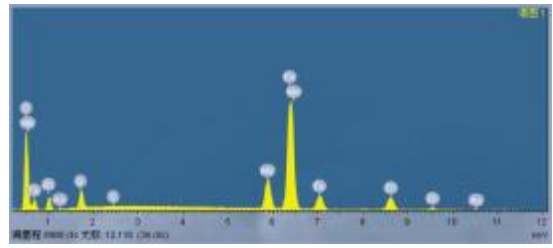


图 2 能谱分析复合纳米粒成分

Figure 2 EDS of the $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles

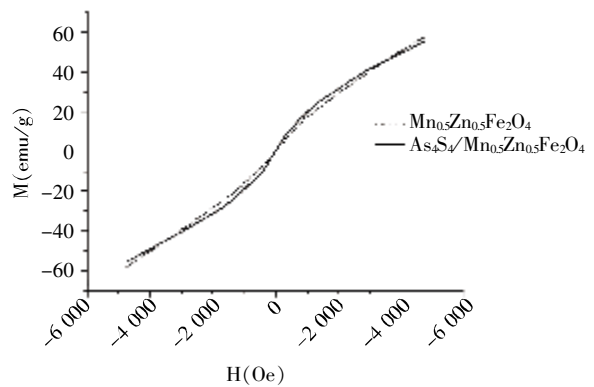


图 3 复合纳米粒的磁滞回线

Figure 3 Hysteresis loop of the $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles

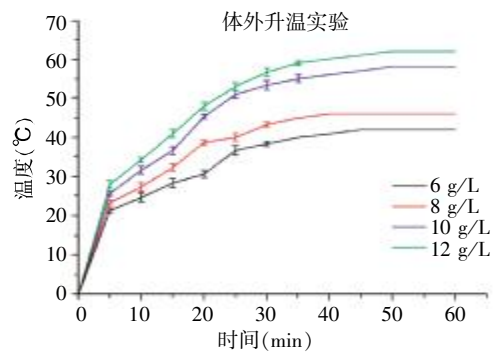


图 4 复合纳米粒的体外升温试验

Figure 4 Heating test curve of the $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles

2.3 体外释药速率的动态测定结果

以生理盐水为介质考察了 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米材料的体外动态释放,计算其累积释放率,48 h 释药为 13.28%,曲线平缓(图 5)。

2.4 MTT 比色法检测结果

结果显示 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒联合交变磁场加热组能显著抑制细胞增殖,它的抑制率远远高于单纯纳米雄黄溶液组和 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 联合交变磁场加热组 ($P < 0.05$,图 6)。

2.5 流式细胞术检测结果

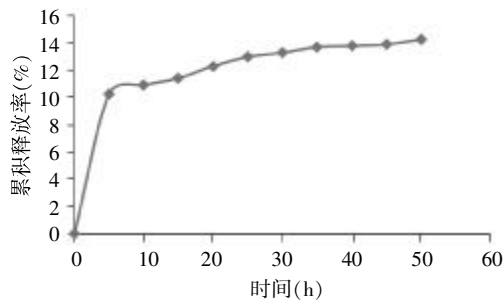


图 5 复合纳米粒的体外动态累积释放率

Figure 5 The accumulative release rates of $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles

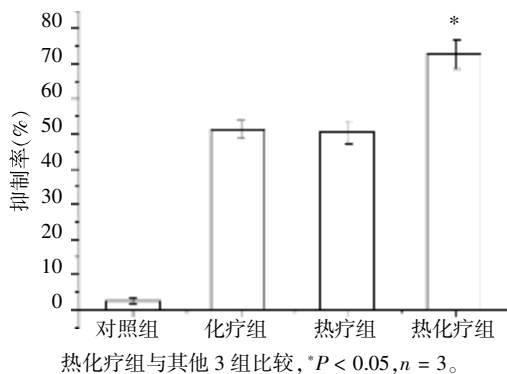
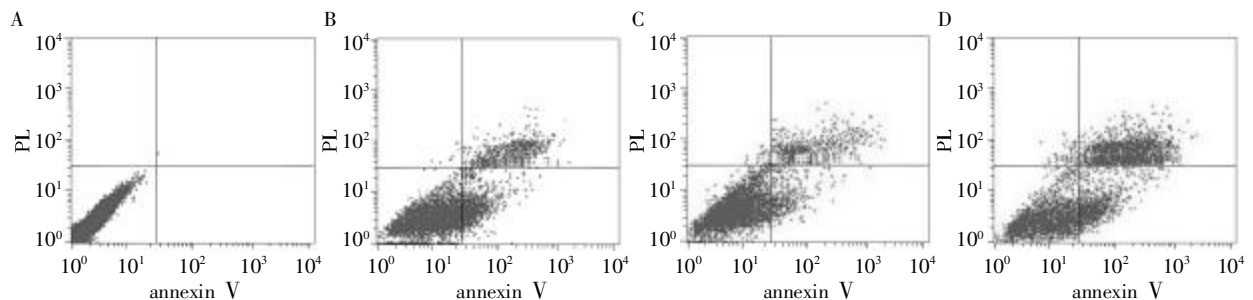


图 6 复合纳米粒联合交变磁场治疗宫颈癌 HeLa 的细胞抑制率

Figure 6 Growth inhibitory rates of $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles with MFH on HeLa cells



A: 对照组; B: 单纯化疗组; C: 单纯热疗组; D: 热化疗组。

图 7 各实验组细胞流式细胞分析结果

Figure 7 The results of flow cytometry

$Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒, 并将其作用于宫颈癌细胞, 将 As_4S_4 的细胞毒作用与磁热疗相结合, 寻求一个更有效的杀伤恶性肿瘤细胞的方法。

在研究中, 首先采用化学共沉淀法制备 $As_4S_4/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒。该方法快速、简单且成本低, 雄黄纯度较高; 制备的复合纳米粒的粒径为 20~40 nm; 在体外升温实验中能达到肿瘤的有效治疗温度 (41~46°C); 且复合纳米粒释药缓慢, 48 h 释药为 13.28%。为其进一步研究打下了基础。

在后续的治疗实验中, 设置了阴性对照组、单纯

流式细胞术检测显示: 不同治疗组作用于宫颈癌 HeLa 细胞 48 h 后, 均可在细胞周期 G1 期前出现明显的亚二倍体凋亡峰, 而对照组未见明显凋亡峰。单纯化疗组、单纯热疗组以及热化疗组的凋亡率分别为 $(28.97 \pm 1.73)\%$ 、 $(18.72 \pm 1.12)\%$ 、 $(49.89 \pm 1.51)\%$ (图 7)。热化疗组与单纯治疗组相比, 差别具有统计学意义 ($P < 0.05, n = 3$)。

3 讨论

近年来的研究表明, 传统中药雄黄具有抗肿瘤作用并已经成功应用于急、慢性粒细胞白血病的治疗^[9-11]。雄黄作为一种含砷矿物中药, 在我国已有二千余年的医用历史, 但由于剂型单一、生物利用度低、临床用量大以及毒性高等缺点, 严重制约了其进一步发展及进军国际市场。因此, 寻找一种简单、高效、低成本的方法用于雄黄的炮制, 降低雄黄毒性、提高其生物利用度, 成为亟待解决的问题。热疗是一种古老但很有前景的肿瘤治疗方法^[12]。将热疗与放疗或化疗结合使用, 不仅可以减少放、化疗药物剂量, 而且可以实现全周期、全空间对癌细胞的杀伤, 大大提高疗效。近年来, 许多研究者将砷与热疗通过不同的形式联合起来治疗恶性肿瘤, 取得了显著的成果。本研究拟通过化学沉淀-浸渍法制备 As_4S_4 /

化疗组、单纯热疗组及热化疗联合治疗组 4 个组别。MTT 检测结果显示热化疗联合治疗组对于人宫颈癌细胞具有较强的细胞杀伤作用, 细胞生存率明显低于单纯化疗组和单纯热疗组。流式细胞分析也有类似发现, 热化疗联合治疗组诱导的细胞凋亡率为 $(49.89 \pm 1.51)\%$, 而相应同等浓度的单纯热疗组、单纯化疗组诱导的细胞凋亡率分别为 $(28.97 \pm 1.73)\%$ 、 $(18.72 \pm 1.12)\%$ 。倪海燕等^[13]通过乳化冷冻凝聚法制备了 As_2O_3 磁性纳米微球, 并通过治疗宫颈癌证明 As_2O_3 联合热疗对肿瘤细胞的生长抑制

和诱导凋亡作用;王丽等^[14]通过化学沉淀-浸渍法制备 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒,并通过治疗乳腺癌证明该复合纳米粒联合交变磁场热疗对乳腺癌细胞具有很强的生长抑制和凋亡诱导作用;这些结果均与本研究结果相似。

总之,本实验成功制备了直径为 20~40 nm、升温能达到肿瘤治疗有效温度同时可控制药物缓慢释放的 $\text{As}_4\text{S}_4/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒。体外细胞杀伤实验证实,该纳米粒联合交变磁场热疗对肿瘤细胞具有很强的生长抑制和凋亡诱导作用,为治疗宫颈癌提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] 徐红,陈宜鸿,陈爱香,等. 复方雄黄乳膏的制备和临床疗效观察[J]. 中国医院药学杂志,2002,22(3):183
- [2] An YL, Nie F, Wang ZY, et al. Preparation and characterization of realgar nanoparticles and their inhibitory effect on rat glioma cells[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 3187-3194
- [3] 王子好,王丽,张东生. 纳米雄黄脂质体的制备、特性检测和体外抗肿瘤细胞作用的研究[J]. 东南大学学报:医学版,2009,28(3):175-179
- [4] Jordan A, Wust P, Scholz R, et al. Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro[J]. *Int J Hyperthermia*, 1996, 12(6):705-722
- [5] Lin M, Zhang D, Huang J, et al. The anti-hepatoma effect of nanosized Mn-Zn ferrite magnetic fluid hyperthermia associated with radiation in vitro and in vivo[J]. *Nanotechnology*, 2013, 24(25):255101
- [6] Lin M, Huang J, Zhang J, et al. The therapeutic effect of PEI- $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ nanoparticles/pEgr1-HSV-TK/GCV associated with radiation and magnet-induced heating on hepatoma[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(3):991-1000
- [7] Wang L, Zhang J, An Y, et al. A study on the thermochemotherapy effect of nanosized $\text{As}_2\text{O}_3/\text{MZF}$ thermosensitive magnetoliposomes on experimental hepatoma in vitro and in vivo [J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(31): 315102
- [8] Tang QS, Zhang DS, Cong XM, et al. Using thermal energy produced by irradiation of Mn-Zn ferrite magnetic nanoparticles (MZF-NPs) for heat-inducible gene expression[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(17):2673-2679
- [9] Bal P, Fabián M, Pastorek M, et al. Mechanochemical preparation and anticancer effect of realgar As_4S_4 nanoparticle[J]. *Mater Lett*, 2009, 63(17):1542-1544
- [10] Wang XB, Gao HY, Hou BL, et al. Nanoparticle realgar powders induce apoptosis in U937 cells through caspase MAPK and mitochondrial pathways[J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(5):653-658
- [11] Qi J, He P, Chen W, et al. Comparative proteome study of apoptosis induced by As_4S_4 in retinoid acid resistant human acute promyelocytic leukemia NB4-R1 cells [J]. *Leuk Res*, 2010, 34(11):1506-1516
- [12] Takahashi I, Emi Y, Hasuda S, et al. Clinical application of hyperthermia combined with anticancer drugs for the treatment of solid tumors [J]. *Surgery*, 2002, 131(15): 78-84
- [13] 王丽,王子好,张东生. $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒的制备及其对乳腺癌细胞增殖、凋亡的实验研究[J]. 东南大学学报:医学版,2009,28(5):361-365
- [14] 倪海燕,张东生,杜益群. As_2O_3 磁性纳米微球的制备及其联合磁流体热疗对宫颈癌治疗的体外实验研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2006,26(4):271-274

[收稿日期] 2013-06-07