

文章编号: 1007-4627(2019)04-0492-07

金纳米粒子对黑色素瘤细胞的重离子辐射增敏效应研究

张鹏程^{1,2,3,4}, 刘岩^{1,2,3,4}, 金晓东^{1,2,3,4}, 陈卫强^{1,2,3,4}, 李强^{1,2,3,4,†}

1. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;
2. 中国科学院重离子束辐射生物学重点实验室, 兰州 730000;
3. 甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室, 兰州 730000;
4. 中国科学院大学核科学与技术学院, 北京 100049)

摘要: 采用配体交换法合成了粒径15 nm左右的11-巯基十一烷酸包被的金纳米粒子(mAuNPs), 使用透射电镜和纳米粒度电位仪对合成后的金纳米粒子进行了表征, 然后用MTT法检测了mAuNPs对外培养小鼠黑色素瘤B16-F10细胞的毒性。在传能线密度(LET)为50 keV/ μm 的碳离子束照射下, 利用香豆素-3-羧酸(3CCA)作为荧光探针检测mAuNPs对水溶液中羟自由基的增强效应、二氯荧光素双醋酸盐(DCFH-DA)检测mAuNPs对细胞内活性氧(ROS)的增强效应、克隆形成法检测mAuNPs对B16-F10细胞的辐射增敏效应。实验结果表明: mAuNPs对小鼠黑色素瘤B16-F10细胞基本无毒; mAuNPs对水溶液中的羟自由基产额增强为1.08~2.95倍; 在共培养浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 情况下mAuNPs增加了胞内活性氧水平, mAuNPs在10%细胞存活水平下的辐射增敏比(SER)为1.15。因此, mAuNPs在黑色素瘤细胞中展现出对重离子的辐射增敏效应。

关键词: 金纳米粒子(AuNPs); 小鼠黑色素瘤细胞; 辐射增敏效应; 碳离子辐射

中图分类号: Q691 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.36.04.492

1 引言

放射治疗是肿瘤临床治疗的主要手段之一, 约50%~70%的恶性肿瘤患者需要接受放射治疗(放疗), 约有一半的患者接受了根治性放疗^[1]。肿瘤放疗的目的是利用射线尽可能多地杀死肿瘤细胞, 同时尽量减少对周围正常组织的损伤。得益于重离子束独特的物理学及生物学特性, 重离子放疗在保护正常组织和提高疗效两方面有着独特的优势。在放疗中应用增敏剂, 也可以在提高疗效的同时, 减少对正常组织的辐射。将两者的优势结合, 已经成为当今研究的热点^[2]。

金纳米粒子(AuNPs)因其自身独特的物理、化学和生物特性, 被广泛地应用于辐射增敏的研究当中^[3-5]。AuNPs具有易于修饰的特点, 在相关研究中, 有利用聚乙二醇(PEG)^[6], 硫醇葡萄糖(Glu)^[7], 硫普罗宁(Tiopronin)^[8]等进行修饰的AuNPs。本文所采用的AuNPs的外层包被11-巯基十一烷酸广泛地应用于金

基纳米材料的自组装或包被过程^[9-10]。

金纳米粒子的包被会对金纳米粒子的细胞摄入产生影响^[11]。我们之前的实验中对对比了B16-F10细胞对聚乙二醇包被的金纳米粒子(PEG-AuNPs)、硫普罗宁包被的金纳米粒子(Tiopronin-AuNPs)、11-巯基十一烷酸包被的金纳米粒子(mAuNPs)和柠檬酸钠包被的金纳米粒子(cAuNPs)的摄入^[12]。在同等共培养浓度下, 聚乙二醇包被的金纳米粒子的单细胞摄入量相较于其它包被的金纳米粒子的摄入量差别在一个数量级以上。因此, 虽然之前的研究显示, 聚乙二醇包被的金纳米粒子稳定性较好^[13], 但细胞摄入的金纳米粒子的多少与其辐射增敏效果直接相关^[14]。在综合各种包被的金纳米粒子的摄入情况, 我们最终选择了11-巯基十一烷酸包被的金纳米粒子, 其在较低共培养浓度下可以达到较高的单细胞摄入量。本文研究mAuNPs在高传能线密度(LET)碳离子辐射下对黑色素瘤细胞的辐射增敏效应并探讨其相关机理。

收稿日期: 2019-01-03; 修改日期: 2019-05-07

基金项目: 科技部重点研发计划资助项目(2018YFC0115700, 2018YFC0115702); 甘肃省重大科技专项项目(1602FKDA005); 国家自然科学基金资助项目(11875299, 11805247)

作者简介: 张鹏程(1990-), 男, 江苏启东人, 博士研究生, 从事重离子放射生物学基础研究; E-mail: pczhang@impcas.ac.cn

† 通信作者: 李强, E-mail: liqiang@impcas.ac.

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

超纯水系统(购买自中国香港 Heal Force 公司); $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (购买自中国陕西凯达化工公司); 柠檬酸三钠(sodium citrate)(购买自中国天津科密欧化学试剂公司); 11-巯基十一烷酸(购买自上海萨恩化学技术有限公司); [3(4, 5-二甲基(噻唑-2-亚基)-2, 5-二苯基-2H-四唑溴化物; 噻唑蓝](MTT, 购买自美国 SPECTRUM 公司); 香豆素-3-羧酸(3-CCA, 97%, 购买自中国北京 J&K 化学公司); 活性氧检测试剂盒(购买自中国碧云天公司); 改良型 1640 培养基、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素和 100 U/mL 的青霉素以及胎牛血清(均购买自美国 Hyclone 公司); 培养瓶、35 和 60 mm 的培养皿和 96 孔板(均购买自德国 Eppendorf 公司); Infinite F200/M200 型荧光酶标仪(购买自瑞士 Tecan 公司); Zetasizer 纳米粒度电位仪(购买自英国马尔文公司); 等离子耦合原子发射光谱仪(ICP-OES, 购买自美国安捷伦公司); 小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞系(购买自中国科学院上海细胞库)。

2.2 15 nm 的 mAuNPs 合成

首先根据文献报道的一锅法路线合成 15 nm 的 AuNPs^[15], 然后采用配体交换法合成 mAuNPs。具体的方法如下: 在 2 L 的三口烧瓶中加入 960 mL 超纯水, 用油浴加热至沸腾。然后缓慢匀速地将质量/体积比为 1% 的 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 水溶液(10 mL)滴到三口烧瓶中, 加完后维持沸腾状态。并快速加入质量/体积比为 1% 柠檬酸钠溶液(30 mL), 加毕再煮沸 30 min 后, 停止加热自然冷却至室温。此时三口烧瓶内得到的是金离子在柠檬酸钠还原下自组装而成的 15 nm 的柠檬酸钠包被的金纳米粒子(cAuNPs)。在室温下, 向装有 cAuNPs 三口瓶中加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液(1 mL), 再加入 11-巯基十一烷酸(660 mg), 室温搅拌过夜。由于 Au-S 键具有很强的结合能力, 11-巯基十一烷酸将会取代柠檬酸钠结合在 AuNPs 表面。将金纳米粒子溶液转移到 5 mL 离心管中, 采用转速为 8000 r/min 离心 30 min; 然后用超纯水洗涤, 再离心、洗涤, 如此重复 3 次, 去除游离的 11-巯基十一烷酸后, 将金纳米粒子汇集到同一离心管中后, 再次离心后加入超纯水(1 mL), 制得 mAuNPs 浓缩液。然后采用外标法用 ICP-OES 对 mAuNPs 母液的浓度进行标定测量, 获得 mAuNPs 母液中金浓度。

2.3 mAuNPs 的表征

将 mAuNPs 母液稀释 1000 倍, 然后取 1 μL 的稀释液滴于 400 目电镜铜网上。烘干后用透射电子显微镜(TEM)观察金纳米粒子的粒子尺寸并统计粒径分布。分别配置浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 mAuNPs 和 cAuNPs 各 1 mL, 采用 Zeta 电位专用测量池在 Zetasizer 纳米粒度电位仪上测量 AuNPs 的 Zeta 电位。

2.4 细胞培养

小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞置于 T-25 培养瓶中, 加入 5.0 mL 含有 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素、100 U/mL 的青霉素的改良型 1640 培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度饱和的 5% CO_2 培养箱中培养。培养期间用 0.25% 含 EDTA 的胰酶消化后, 分批进行传代。

2.5 碳离子辐照

利用兰州重离子研究装置(HIRFL)的浅层肿瘤治疗终端提供的 80 MeV/u 碳离子束进行样品辐照, 在照射前对 HIRFL 提供的碳离子束流进行标定, 并采用加入有机玻璃的方法进行碳离子束能量的调节, 使得碳离子照射到样品表面的传能线密度(LET)为 50 keV/ μm , 剂量率为 0.5~2.0 Gy/min, 在室温下进行照射。对照样品进行假照射。

2.6 mAuNPs 水溶液的羟自由基产额测量

将 3CCA (38 mg)用 PBS (10 mL)超声溶解后, 加入 DMSO (14 μL)降低本底读数。然后用 0.22 μm 的过滤器过滤得到 3-CCA/DMSO 溶液, 再用 PBS 稀释十倍供后续使用。取 mAuNPs 储存液与 3-CCA/DMSO 溶液稀释成 1, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的实验样品, 每种实验样品中保证 3-CCA/DMSO 溶液的绝对量相等。等量的 400 μL 样品分别加入到 96 孔板中, 并用封板膜密封防止水溶液蒸发。利用 LET 为 50 keV/ μm 的碳离子照射 2.0 Gy 后, 将样品中的 mAuNPs 离心, 取上清液, 以避免 mAuNPs 对荧光测量的影响。然后将离心后的上清液样品放入黑壁的荧光酶标板中, 在荧光酶标仪中用 395 nm 光激发, 获取 442 nm 的发射荧光读数。荧光读数的高低反映了样品中羟自由基产额的高低。用式(1)计算不同样品的辐射增强比(Enhancement Ratio):

增强比 =

$$\frac{\text{照射后样品的荧光强度} - \text{照射前样品的荧光强度}}{\text{照射后对照组的荧光强度} - \text{照射前对照组的荧光强度}} \quad (1)$$

2.7 mAuNPs 对细胞毒性的检测

使用 MTT 法检测不同浓度 mAuNPs 对 B16-F10 细胞增值活力的影响, 从而判断其细胞毒性。将对数生长期的约 5000 个 B16-F10 细胞接种到 96 孔板中, 培养过夜后, 分别加入浓度为 0, 0.1, 1, 2, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的含 mAuNPs 培养基溶液 200 μL 。共培养 24 h 后, 弃去含 mAuNPs 培养基, 加入含 MTT 的培养基 (5 mg/mL 的 MTT 溶液与培养基按体积比 1:10 比例配制) 100 μL 。培养 4 h 后弃去培养基, 加入 DMSO 溶解, 并高速震荡 10 min。用酶标仪在 570 nm 处读取各孔的吸光度值 (OD)。根据式(2)计算细胞增值活力 (Cellviability):

$$\text{增殖活力} = \left(\frac{\text{实验组 OD 值} - \text{调零组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{调零组 OD 值}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{增强比} = \frac{\text{照射后样品单位面积光密度值} - \text{未照射样品的单位面积光密度值}}{\text{照射后对照组单位面积光密度值} - \text{未照射对照组的单位面积光密度值}} \quad (3)$$

2.9 克隆存活实验

将对数生长期的 B16-F10 细胞接种于直径为 35 mm 的培养皿中, 每皿 1×10^5 个细胞, 过夜。加入浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的含 mAuNPs 培养基 2 mL (控制液面高度为 2 mm)。24 h 后, 弃去培养基, 在 LET 为 50 keV/ μm 的碳离子下分别照射 0, 1, 2, 3, 4, 6 Gy。然后将照射后的细胞按不同剂量, 分别以不同数量接种于直径为 6 mm 的培养皿中, 培养两周, PBS 冲洗, 用含甲醇的结晶紫染色 15 min。计量克隆数, 超过 50 个的克隆认为是一个存活细胞。通过将克隆数除以接种的细胞数, 可以获得每个培养皿中细胞的存活率 (SF), 照射组的细胞存活率除以非照射组 (对照组) 的细胞存活率, 就可得到某一剂量的细胞存活率。根据每个剂量的存活率, 用 Origin 软件进行线性平方 (LQ) 模型的拟合。

2.10 统计分析

上述结果用 SPSS 软件进行配对样本 *t* 检验分析, 观察加入 mAuNPs 后与空白对照 (组) 之间在细胞毒性、

2.8 细胞内活性氧水平的测量

采用二氯荧光素双醋酸盐 (DCFH-DA) 作为荧光探针来测量细胞内的活性氧水平。将对数生长期的 B16-F10 细胞接种到提前铺设了盖玻片的 35 mm 培养皿中, 每皿 1×10^5 个细胞。培养过夜后, 加入金浓度为 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的含 mAuNPs 培养基, 对照组加入不含 mAuNPs 的培养基, 共培养 24 h 后弃去含 mAuNPs 的培养基, 用 PBS 冲洗两次以去除残留 mAuNPs。在照射前 20 min 向每皿加入 1 mL 按 1:1000 比例用无血清培养基稀释的 DCFH-DA 溶液。在 LET 为 50 keV/ μm 的碳离子束下照射 2.0 Gy 后, 取下皿内的盖玻片覆盖在载玻片上, 10 min 后用荧光显微镜在 488 nm 激发/525 nm 发射的条件下拍摄荧光照片。利用 ImageJ 软件勾画细胞, 统计细胞内的荧光光密度值, 根据细胞面积, 计算单位面积光密度值可以反映细胞内的活性氧水平。每组处理至少统计 200 个细胞。用式(3)计算增强比:

辐射增强比、胞内自由基等方面是否有显著影响。

3 结果

3.1 mAuNPs 的合成与表征

图1(a) 所示的是 mAuNPs 的 TEM 图片, 显示 AuNPs 粒径的均匀性和良好的分散度。通过 Image Pro Plus 软件进行至少两百个金纳米粒子的粒径测量, 并统计分布结果, 得到 mAuNPs 的平均粒径分别为 $(15.97 \pm 1.35) \text{ nm}$ [图1(b)]。

图1(c) 和 (d) 是通过纳米粒度电位仪测量得到的 mAuNPs 和 cAuNPs 的 Zeta 电位分布的检测报告。检测报告显示 Zeta 电位分布为单峰分布, 检测结果质量良好。图1(e) 是测量得到的 mAuNPs 和 cAuNPs 的 Zeta 电位数, Zeta 电位显示为 -15.6 和 -18.1 mV, 其绝对值表示纳米粒子胶体溶液的稳定性, 绝对值越大越稳定。绝对值大于 10 mV 的胶体溶液稳定性较好, 结果表明 mAuNPs 在水溶液中有较好的稳定性。mAuNPs 和 cAuNPs 的 Zeta 电位不同, 表明 11-巯基十一烷酸顺利连接在了 AuNPs 上。

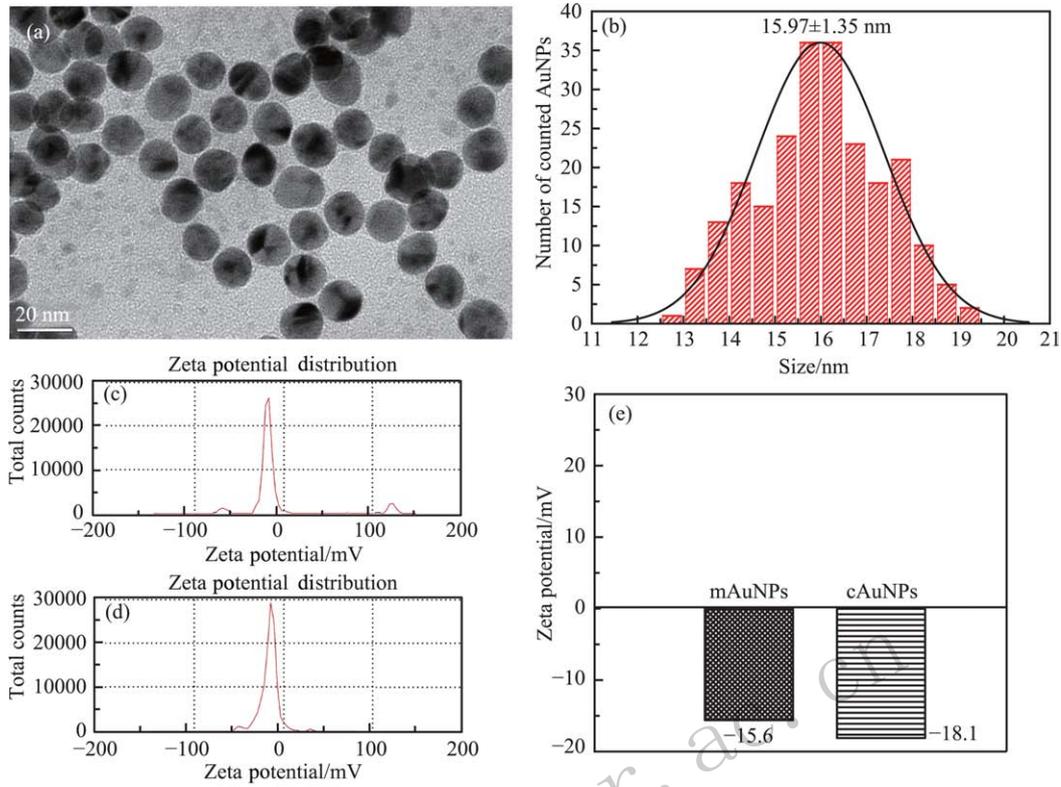


图 1 (在线彩图) mAuNPs 的合成与表征

(a) mAuNPs 的 TEM 照片; (b) mAuNPs 的粒径分布统计; (c) (d) mAuNPs 和 cAuNPs 的 Zeta 电位分布检测结果; (e) mAuNPs 和 cAuNPs 的 Zeta 电位。

3.2 mAuNPs 对 B16-F10 细胞的细胞毒性

图 2 是 MTT 法检测 mAuNPs 对细胞的毒性的统计结果。从图 2 的结果可以看出, 在浓度为 0.1, 1 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, mAuNPs 对细胞的抑制作用在 5% 之内, 随着浓度的上升, 抑制作用有所增强, 但在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下对细胞的抑制在 10% 以内, 且统计分析后无显著差异 ($P=0.064>0.05$)。结果显示, mAuNPs 对细胞的毒性较低。在高浓度下细胞也能保持很好的活性。

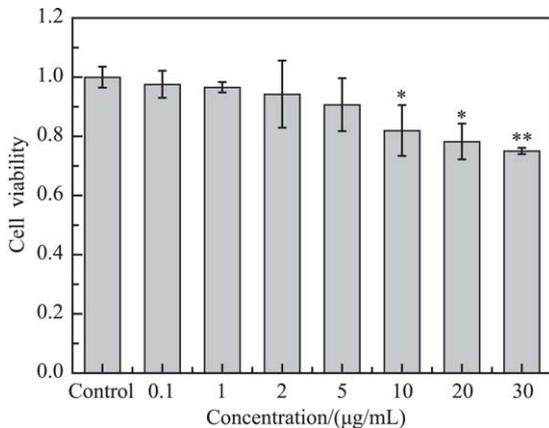


图 2 不同浓度的 mAuNPs 共培养 24 h 的细胞毒性(统计学分析, * $P<0.05$, ** $P<0.001$)

3.3 mAuNPs 的羟自由基辐射增强效应

采用 50 keV/ μm 的碳离子进行辐照实验, 照射剂量为 2.0 Gy; 与不加 mAuNPs 的水溶液相比, 在 5 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下, mAuNPs 有 2.57 和 2.07 倍的增强(图 3)。统计结果显示, 当加入的 mAuNPs 浓度 $\geq 5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 溶液中的羟自由基产额与对照组溶液羟自由基产额相比, 有极显著的差异 ($P<0.001$)。

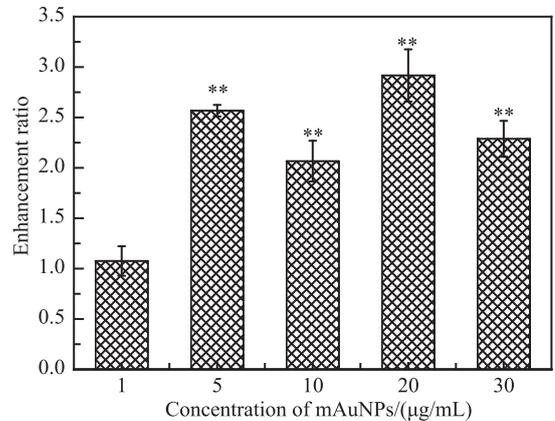


图 3 不同浓度的 mAuNPs 在水中的羟自由基产额的增加(统计学分析, ** $P<0.001$)

3.4 细胞内活性氧水平的测量

通过 ImageJ 软件统计不少于 200 个细胞内单位面积的荧光光密度值，计算得到结果如图 4(a) 所

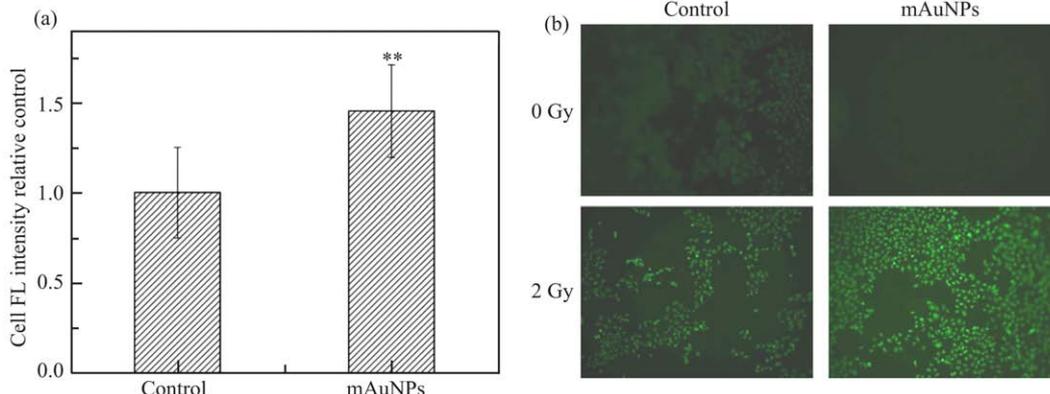


图 4 (在线彩图) mAuNPs 的细胞内活性氧水平荧光强度统计图(a)及胞内活性氧水平检测的荧光照片(b) (统计学分析, ** $P < 0.001$)

3.5 mAuNPs 的细胞克隆存活实验

图 5 为 B16-F10 细胞的克隆存活结果，可以清楚地看到，与 mAuNPs 共培养的细胞在各个剂量点的存活率均比对照组低。利用 LQ 模型对克隆存活数据进行拟合，其公式为 $SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ ，从拟合的曲线中通过计算可得，mAuNPs 在 10% 细胞存活水平下的辐射增敏比 (SER) 为 1.15，在 50% 细胞存活水平下的 SER 为 1.23 (表 1)。

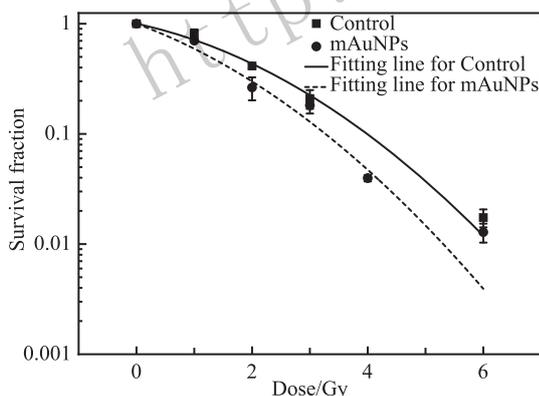


图 5 细胞克隆存活曲线图

表 1 不同存活率下的辐射增敏比

Group	D_{SF10} /Gy	SER	D_{SF50} /Gy	SER
Control	4.17	—	1.87	—
mAuNPs	3.54	1.15	1.44	1.23

4 讨论与结论

由克隆存活结果看出，mAuNPs 对碳离子辐照的

示。在 50 keV/ μm 碳离子照射下，与 mAuNPs 共培养的 B16-F10 细胞内的活性氧水平显著增高，图 4(b) 的检测结果能直观地反映这一点。

B16-F10 细胞有明显的增敏效应。为探讨造成这种效应的机制，我们首先利用 3-CCA 作为荧光探针进行了水溶液中羟自由基增强效应的实验^[16-17]。这是对 mAuNPs 进入细胞内，在辐照后产生自由基过程的一种模拟。实验显示在引入金纳米粒子后进行照射，水溶液中的羟自由基产额明显增加。考虑到细胞内在辐照后存在多种自由基形式，通过不同的机制对细胞造成伤害。3-CCA 作为探针，仅显示出羟自由基的产额变化。而 Hirayama 等^[18]的研究指出，在高 LET 的碳离子束照射下，羟自由基对细胞的杀伤起到了约 30% 的作用。

羟自由基是活性氧的一种，细胞内存在多种形式的活性氧。细胞内活性氧水平的检测能更系统地反应在照射后细胞内活性氧的变化。胞内活性氧的增加对细胞的杀伤作用的权重也更高^[19]，电离辐射可诱导细胞内氧化应激过程^[20]。辐照产生的活性氧与各种生物分子具有很高的反应速率，会与碱基部分快速反应，引起 DNA 损伤，并且诱导膜脂质过氧化，它们是辐射诱导细胞凋亡的重要诱因^[21]。实验结果显示细胞内照射后活性氧水平，在摄入 mAuNPs 的细胞中有显著的增加。

金原子具有很高的电子密度，金纳米辐射增敏的过程中通过康普顿散射或者光电效应会产生很多的次级电子或者辐射光子。这些次级电子或者辐射光子直接或间接作用于细胞 DNA，造成其损伤是金纳米粒子辐射增敏的主要物理学机理^[22]。考虑外层包被也许会造成不同的电子逸散或次级电子发射能力，从而造成不同的辐射增敏效果。

外层包被的不同的药理或者生理作用也有可能造成

金纳米粒子不同的辐射增敏效果。细胞核内的DNA双链断裂(DSB)是造成细胞死亡的主要原因之一^[23-24],不同配体的金纳米粒子也有可能造成不同程度的DNA双链断裂。

本实验研究了金纳米粒子在重离子照射下的辐射增敏效果,表明在较低的共培养浓度会对最终的辐射增敏效果产生较大的影响,其生物学机制还有待进一步研究;此外小鼠黑色素瘤(B16-F10)细胞在小鼠体内有很好的荷瘤能力,还需要进一步建立荷瘤小鼠模型并从活体水平评价金纳米粒子对碳离子辐射增敏效应。本文的研究结果对进一步设计和合成不同包被的金纳米粒子,优化金纳米粒子参数,产生更好的辐射增敏效果具有重要意义。

参考文献:

- [1] LI Yexiong. Tumor Radiotherapy [M]. 5th ed. Beijing: Xiehe Medical University Press, 2018: 3. (in Chinese)
(李晔雄. 肿瘤放射治疗学[M]. 第5版. 北京: 协和医科大学出版社, 2018: 3.)
- [2] LIU Y, LIU X, JIN X *et al.* *Physica Medica*, 2015, **31**(3): 210.
- [3] HAINFELD J F, SLATKIN D N, SMILOWITZ H M. *Physics in Medicine & Biology*, 2004, **49**(18): 309.
- [4] HAINFELD J F, DILMANIAN F A, ZHONG Z, *et al.* *Physics in Medicine & Biology*, 2010, **55**(11): 3045.
- [5] YAN L, PENGCHENG Z, FEIFEI L, *et al.* *Theranostics*, 2018, **8**(7): 1824.
- [6] WANG C H, LIU C J, WANG C L, *et al.* *Journal of Physics D Applied Physics*, 2008, **41**(19): 195301.
- [7] GENG F, SONG K, XING J Z, *et al.* *Nanotechnology*, 2011, **22**(28): 285101.
- [8] CUI L, TSE K, ZAHEDI P, *et al.* *Radiation Research*, 2014, **182**(5): 475.
- [9] SUN J, ZHANG J, JIN Y. *Journal of Materials Chemistry C*, 2012, **1**: 138.
- [10] PARAMANIK B, PATRA A. *Journal of Materials Chemistry C*, 2014, **2**(16): 3005.
- [11] ZHANG P, LIU Y, JIN X, *et al.* *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2018, **14**(5): 1805.
- [12] DYKMAN L A, KHLEBTSOV N G. *Chemical Reviews*, 2013, **114**(2): 1258.
- [13] LIU C J, WANG C H, CHIEN C C, *et al.* *Nanotechnology*, 2008, **19**(29): 295104.
- [14] JAIN S, COULTER J A, HOUNSELL A R, *et al.* *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2011, **79**(2): 531.
- [15] FRENS G. *Nature Physical Science*, 1973, **241**(105): 20.
- [16] CHENG N N, STARKEWOLF Z, DAVIDSON R A, *et al.* *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**(4): 1950.
- [17] SICARDROSELLI C, BRUN E, GILLES M, *et al.* *Small*, 2015, **10**(16): 3338.
- [18] HIRAYAMA R, ITO A, TOMITA M, *et al.* *Radiation Research*, 2009, **171**(2): 212.
- [19] HOSOKAWA Y, TANAKA L, KANEKO M, *et al.* *Archives of Histology & Cytology*, 2002, **65**(4): 301.
- [20] CUI Z G, KONDO T, FERIL L B, *et al.* *Apoptosis*, 2004, **9**(6): 757.
- [21] WOO J H, KIM Y H, CHOI Y J, *et al.* *Carcinogenesis*, 2003, **24**(7): 1199.
- [22] WANG Xufei. *Chinese Journal of Medical Physics*. 2012, **29**(3): 3337. (in Chinese)
(王旭飞. 中国医学物理学杂志, 2012, **29**(3): 3337.)
- [23] CHENG Y, LI F, MLADENOV E, *et al.* *Radiotherapy and Oncology*, 2015, **116**(3): 366.
- [24] APOSTOLOS M, DE CHIARA COLLE, ALA YAROMINA, *et al.* *Radiotherapy and Oncology*, 2015, **116**(3): 480.

Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles on Melanoma Cells Under Heavy Ion Irradiation

ZHANG Pengcheng^{1,2,3,4}, LIU Yan^{1,2,3,4}, JIN Xiaodong^{1,2,3,4}, CHEN Weiqiang^{1,2,3,4}, LI Qiang^{1,2,3,4,†}

(1. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

3. Key Laboratory of Basic Research on Heavy Ion Radiation Application in Medicine,
Gansu Province, Lanzhou 730000, China;

4. Nuclear Science and Technology School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Gold nanoparticles coated with 11-mercaptopundecanoic acid (mAuNPs) in diameter of 15 nm were synthesized using the ligand exchange method. The synthesized gold nanoparticles mAuNPs were characterized by transmission electron microscopy and Zetasizer. Then, the MTT assay was used to evaluate the toxicity of mAuNPs to mouse melanoma B16-F10 cells. All subsequent irradiation experiments were performed under a carbon ion beam with a linear energy transfer (LET) value of 50 keV/ μm . First, coumarin-3-carboxylic acid (3-CCA) was used as a fluorescent probe to detect the radiation enhancement effect of mAuNPs on hydroxyl radicals in aqueous solution. Second, dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was used to evaluate the radiation enhancement effect of mAuNPs on intracellular reactive oxygen species (ROS). More importantly, the radiosensitizing effect of mAuNPs on B16-F10 cells under irradiation with carbon ions was assessed with the clonogenic survival assay. Our experimental results showed that mAuNPs had nearly no toxicity to mouse melanoma B16-F10 cells. The yield of hydroxyl radicals in ultra-pure water in the presence of mAuNPs after exposure to carbon ions increased by a factor of 1.08~2.95. At a co-culture concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mAuNPs increased the level of intracellular ROS and the sensitizer enhancement ratio (SER) of mAuNPs in B16-F10 cells at 10% survival level was 1.15. Thus, our study indicates that mAuNPs have radiation enhancement effect on melanoma cells under heavy ion irradiation.

Key words: gold nanoparticles (AuNPs); mouse melanoma cell; radiosensitizing effect; carbon ion radiation

Received date: 3 Jan. 2019; **Revised date:** 7 May 2019

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFC0115700, 2018YFC0115702); Major Project of Gansu Provincial Science and Technology (1602FKDA005); National Natural Science Foundation of China (11875299, 11805247)

† **Corresponding author:** LI Qiang, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn.