

文章编号: 1007-4627(2015)04-0473-06

替拉扎明-金纳米粒子复合物对人肝癌HepG2细胞的 辐射增敏效应研究

刘玺^{1,2,3}, 刘岩^{1,2,3}, 陈卫强^{1,2}, 李强^{1,2}

(1. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;
2. 甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室, 兰州 730000;
3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 将替拉扎明 (TPZ) 与聚乙二醇包被的金纳米粒子 (PEG-GNP) 偶联, 形成新型替拉扎明-金纳米粒子复合物 (TPZ-PEG-GNP)。利用酶标仪获得 TPZ-PEG-GNP 在 200 ~ 800 nm 范围内的紫外-可见光吸收光谱; 采用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 检测 TPZ-PEG-GNP 在人肝癌 HepG2 细胞中的摄取量; MTT 法检测 TPZ-PEG-GNP 对 HepG2 细胞增殖活力的影响; 香豆素-3-羧酸 (3-CCA) 羟自由基探针检测 X 射线和碳离子辐照下 TPZ-PEG-GNP 在水中的羟自由基辐射增强效应; 克隆形成法检测 X 射线及碳离子辐照下 TPZ-PEG-GNP 对 HepG2 细胞的辐射增敏效应。实验结果表明: TPZ 偶联到 PEG-GNP 上形成的 TPZ-PEG-GNP 对 HepG2 细胞基本无毒; 在有氧条件下, TPZ-PEG-GNP 在水中显著增加 X 射线和碳离子辐照下的羟自由基产额, 对 HepG2 细胞具有明显的辐射增敏效应; 在 X 射线及碳离子辐照下 10% 存活水平时, TPZ-PEG-GNP 对 HepG2 细胞的辐射增敏比分别为 1.23 和 1.47。

关键词: 替拉扎明; 金纳米粒子; 人肝癌 HepG2 细胞; 辐射增敏效应

中图分类号: Q691 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/ NuclPhysRev.32.04.473

1 引言

越来越多的研究表明, 肿瘤中的乏氧肿瘤细胞对于射线和传统的抗癌药物具有一定的抗性, 从而使得放疗和化疗的效果大打折扣^[1]; 因而, 肿瘤乏氧增敏药物日益受到人们的关注, 其在临床上的研究和应用正在逐步深入。目前, 临床上常用的肿瘤乏氧增敏剂有 Misonodaxole、Etanidacole、AK-2123、吉西他滨、顺铂、甘氨双唑钠和替拉扎明 (TPZ)^[2]等。

TPZ 是一种人工合成的, 并由乏氧充分激活的前体药物。它在乏氧状态下能优先形成细胞毒素并产生致 DNA 损伤的自由基, 从而达到杀死乏氧肿瘤细胞的目的^[2-5]。TPZ 在乏氧状态下产生的自由基要比有氧状态下高 50 ~ 3004 倍^[6], 这显示出它对乏氧细胞具有更强的增敏效应, 同时对有氧细胞也具有一定的增敏效应。

金纳米粒子 (GNP) 是一种新型的纳米材料, 具有尺寸小、分散性好、稳定性强等优点, 因而具有良好的

生物相容性^[7]。同时, 金纳米粒子用途广泛, 既可以作为成像材料来指示肿瘤存在的部位^[8], 也可以作为药物运载工具增强药物的靶向特异性^[9], 又可作为辐射增敏剂用于肿瘤治疗^[10-11]。

本文将 TPZ 与聚乙二醇包被的金纳米粒子 (PEG-GNP) 进行偶联形成新型的替拉扎明-金纳米粒子复合物 (TPZ-PEG-GNP), 研究 TPZ-PEG-GNP 对 HepG2 细胞系的毒性, 并在有氧状态下, 在水及 HepG2 细胞中探讨 X 射线和碳离子照射下 TPZ-PEG-GNP 的自由基产额增强及细胞辐射增敏效应。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

HAuCl₄·3H₂O (购买自陕西凯达化工公司); 柠檬酸三钠 (购买自天津科密欧化学试剂公司); 甲氧基聚乙二醇硫醇 (mPEG-SH) (购买自中国厦门赛诺邦格生物科技公司); 超纯水系统 (购买自香港 Heal Force 公司); 硫

收稿日期: 2014-12-11; 修改日期: 2015-01-15

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (973 计划) (2010CB834203); 国家自然科学基金委员会-中国科学院大科学装置联合基金资助项目 (U1232207); 国家自然科学基金资助项目 (11205217); 甘肃省杰出青年基金项目 (1111RJDA010)

作者简介: 刘玺 (1990-), 男, 河南南阳人, 硕士研究生, 从事重离子放射生物学基础研究; E-mail: liuxi@impcas.ac.cn

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

辛酰替拉扎明(由天津国际生物医药联合研究院提供); 甲醇(购买自天津利安隆博华医药化学公司); 二甲基亚砜(DMSO, 99.9%)(购买自美国Sigma-Aldrich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%)(购买自北京J&K化学公司); 改良型 1640 培养基、胎牛血清、100 U/mL 的青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素(均购买自美国Hyclone公司); 培养瓶、35 和 60 mm 的培养皿(均购买自美国CORNING公司); 96孔板、Multiskan Spectrum全波长酶标仪(均购买自美国Thermo公司); ICP-MS(购买自美国BD公司); 人肝癌 HepG2 细胞系(由甘肃省肿瘤医院提供)。

2.2 15 nm 的 PEG-GNP 及 TPZ-PEG-GNP 的合成

960 mL 的超纯水; 10 mL, 1% 的 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 加入到三口烧瓶中, 加热至煮沸; 快速加入 30 mL, 1% 的柠檬酸钠溶液, 煮沸 30 min; 自然冷却至室温后, 加入 10 mL, 1 mg/mL 的 mPEG-SH, 搅拌 4 h; 8000 rpm, 离心 30 min; 用超纯水纯化后, 再次离心、冲洗, 重复 3 次, 制成浓缩液^[12-13]。用 ICP-MS 检测 PEG-GNP 的浓度。

向锥形瓶中加入 165 mL 的超纯水和 6 mL, 770 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 15 nm 的 PEG-GNP; 缓慢加入含 14 mg 硫辛酰 TPZ 的甲醇溶液 30 mL, 室温搅拌 6 h; 8000 rpm, 离心 30 min; 先用甲醇纯化, 离心, 再用超纯水纯化离心 3 次, 制成浓缩液。用 ICP-MS 检测 TPZ-PEG-GNP 的浓度。

2.3 紫外-可见光吸收光谱测定

分别取 200 μL 的 TPZ, PEG-GNP 和 TPZ-PEG-GNP 溶液加入 96 孔板中, 利用酶标仪扫描 200 ~ 800 nm 的光谱曲线: 波长步进为 2 nm, 每个样品扫描 3 次; 以波长为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 取 3 次吸光度值的平均值为样品的最终紫外-可见光吸收光谱数据。

2.4 细胞培养

人肝癌 HepG2 细胞在含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 的青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素的改良型 1640 培养基中培养, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度饱和的 5% CO_2 培养箱中培养; 期间用 0.25% 的胰酶传代消化。

2.5 PEG-GNP 与 TPZ-PEG-GNP 在 HepG2 细胞中的摄取量检测

将对数生长期的 HepG2 细胞接种到 T-75 培养瓶中, 每瓶 3×10^6 个细胞, 培养 24 h 后, 分别加入 2, 5, 10, 20 和 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PEG-GNP 和 TPZ-PEG-GNP; 共培养 24 h 后, 弃去含 GNP 的培养基, 酶解并计算细胞密度; 1500 rpm, 离心 10 min; 超声波裂解细胞后, 12000 rpm, 离心 25 min; 弃去上清液, 烘干后用王水溶解、超纯水稀释定容, 用 ICP-MS 测量 GNP 含量。用测得的 GNP 含量除以总的细胞数量, 就可得到平均细胞摄取量。

2.6 PEG-GNP 与 TPZ-PEG-GNP 的水溶液经 X 射线和碳离子辐照后的羟自由基增强效应

称取 38 mg 的 3-CCA, 溶于 10 mL 的 PBS 中, 超声溶解并过滤, 加入 14 μL 的 DMSO, 再用 PBS 稀释 10 倍; 接着分别用超纯水、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PEG-GNP 和 TPZ-PEG-GNP 稀释 10 倍。将上述三种溶液分别分装到直径为 35 mm 的培养皿中, 每个皿 1 mL, 用 50 kVp 的 X 射线 (0.57 Gy/min) 分别照射 0, 1, 2, 3, 4, 5 和 6 Gy; 同时将上述三种溶液分别装到 96 孔板中, 每孔加 365 μL , 用 LET = 30 keV/ μm 的碳离子 (0.1 Gy/min) 分别照射 0, 1, 2 和 3 Gy。

将照射后的溶液转移至 1.5 mL 的离心管中, 离心 12000 rpm \times 25 min, 取出上清液, 加到 96 孔板中。在酶标仪中设置激发光为 395 nm, 发射光为 442 nm, 检测其荧光强度。

用公式 $Y = X_i/X_0$ 来计算辐照后水中的羟自由基产额, 其中 X_i 指某剂量下加 PEG-GNP 或 TPZ-PEG-GNP 辐照后的荧光强度变化, X_0 指某剂量下未加 PEG-GNP 或 TPZ-PEG-GNP 辐照后的荧光强度变化。

用 SPSS 软件对实验结果进行单因素方差分析, 观察两种 GNP 水溶液经辐射后的羟自由基增强效应是否具有差异显著性。

2.7 细胞毒性检测

采用 MTT 法检测细胞增殖活力来判断 PEG-GNP 和 TPZ-PEG-GNP 对细胞的毒性。将对数生长期的 HepG2 细胞接种到 96 孔板中(每孔 10000 个细胞), 培养 24 h 后分别加入 0, 1, 2, 5 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PEG-GNP 和 TPZ-PEG-GNP 溶液(以培养基为溶剂); 分别共培养 24, 48 和 72 h 后, 弃去含药培养基, 加入含 MTT 的培养基; 培养 4 h 后弃去培养基, 加入 DMSO 溶解, 高速震荡 10 min。用酶标仪在 570 nm

处检测各孔的吸光度值(OD)。根据以下公式计算细胞增殖活力:

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

用SPSS软件对实验结果进行双因素方差分析,观察两种GNP在不同浓度和时间下的处理结果之间是否具有差异显著性。

2.8 细胞克隆存活实验

将对数生长期的HepG2细胞接种到直径为35 mm的培养皿中,每个皿种10万个细胞,培养24 h后,分别加入10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PEG-GNP和TPZ-PEG-GNP溶液(以培养基为溶剂),共培养24 h后弃去含GNP的培养基,用50 kVp的X射线(0.57 Gy/min)分别照射0, 1, 2, 3, 4和6 Gy;同时将对数生长期的HepG2细胞接种到底面积为25 cm^2 的培养瓶中,每个瓶中种10万个细胞,培养24 h后,分别加入10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PEG-GNP和TPZ-PEG-GNP共培养24 h,然后弃去GNP,用LET=30 keV/ μm 的碳离子射线(0.1 Gy/min)分别照射0, 1, 2, 3和5 Gy。

然后将照射后的细胞接种到直径为60 mm的培养皿中,培养两周,弃去培养基,PBS冲洗,用结晶紫染色30 min后,计算克隆数量(超过50个细胞的克隆认为是一个存活细胞)。用克隆数除以接种的细胞数,可得到每个培养皿中细胞的存活率(SF),用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。

用SPSS软件对实验结果进行单因素方差分析,观察两种GNP共培养的细胞在SF=10%的辐射增敏效应是否具有差异显著性。

3 结果

3.1 紫外-可见光吸收光谱

如图1所示,单纯的硫辛酰TPZ的吸收波长在270 nm处有个苯环特征峰,而金纳米粒子直径为15 nm的PEG-GNP的吸收波长在522 nm处有显著的特征峰。TPZ与PEG-GNP连接后,产物TPZ-PEG-GNP的吸收波长在264 nm处有个较明显的特征肩峰,可归属于苯环的特征峰,吸收波长在526 nm处的吸收峰可以归属于GNP特征等离子吸收峰。虽然TPZ与PEG-GNP连接后特征峰位置出现微弱偏移,但是紫外吸收光谱证实TPZ确实连接到了PEG-GNP纳米粒子上,形成了新的复合物。

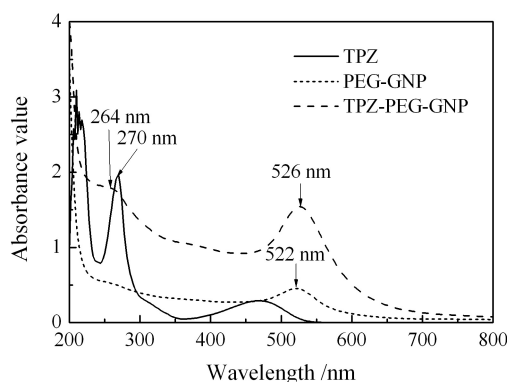


图1 TPZ, PEG-GNP和TPZ-PEG-GNP的紫外-可见光(200~800 nm)吸收光谱

3.2 PEG-GNP与TPZ-PEG-GNP在HepG2细胞中的摄取量

PEG包被的GNP在血清和细胞内有很高的稳定性,如图2所示,从2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的共培养浓度中,PEG-GNP在HepG2细胞中的摄取量稳步提高,当用2~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPZ-PEG-GNP共培养HepG2细胞后,发现其对应浓度下的摄取量都高于PEG-GNP的摄取量,这说明了TPZ的存在增加了GNP的靶向特异性。

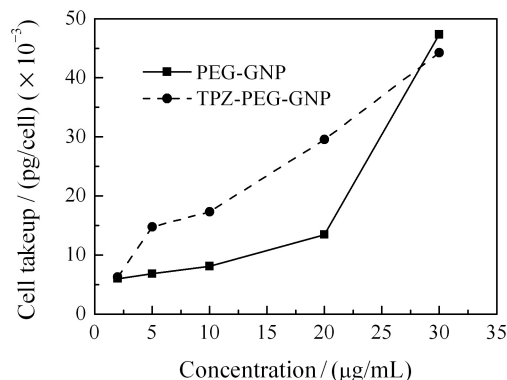


图2 不同浓度的PEG-GNP和TPZ-PEG-GNP与HepG2细胞共培养24 h后,细胞对PEG-GNP和TPZ-PEG-GNP的摄取量

3.3 水中TPZ-PEG-GNP的羟自由基辐射增强效应

与不加GNP的对照组相比,添加了10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PEG-GNP实验组经X射线和碳离子辐照后,其产生的羟自由基产量分别是对照组的0.594~1.646和0.430~1.199倍,结果如图3(a)所示。当添加了10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的TPZ-PEG-GNP后,水溶液经辐照后其产生的羟自由基产量分别是对照组的1.054~3.159和2.294~4.366倍。结果表明,TPZ的引入提高了X射线和碳离子辐照产生的自由基产量。

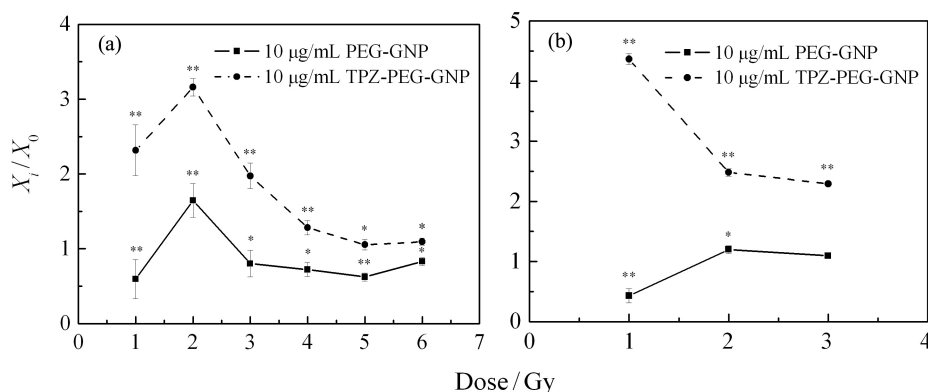


图 3 PEG-GNP和TPZ-PEG-GNP的水溶液经X射线(a)和碳离子(b)辐照后的羟自由基产额增强比(统计学分析, $P=0.05$ 和 0.01)

3.4 TPZ-PEG-GNP对HepG2细胞的毒性

从图4(a)中可以看出, 1和2 µg/mL的PEG-GNP对HepG2细胞无毒性, 5 µg/mL的PEG-GNP抑制作用在15%以内, 10 µg/mL的PEG-GNP的抑制作用在24 h最高, 达到25%; 同时随着共培养时间的增加,

其细胞毒性逐渐减小; 图4(b)显示, 1和2 µg/mL的TPZ-PEG-GNP对HepG2细胞基本无抑制作用, 5和10 µg/mL的TPZ-PEG-GNP对HepG2细胞的毒性都在20%以内, 且时间越长, 其细胞毒性越弱。对比结果显示: TPZ-PEG-GNP对HepG2细胞的毒性相对较低, 即使在较高浓度时, 细胞也能保持较高的活性。

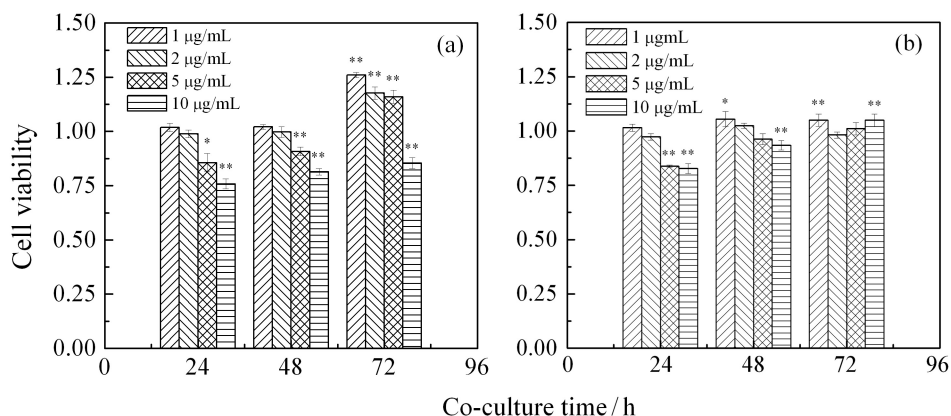


图 4 不同浓度的PEG-GNP(a)和TPZ-PEG-GNP(b)分别与HepG2细胞共培养24, 48和72 h后的细胞活性(统计学分析, $P=0.05$ 和 0.01)

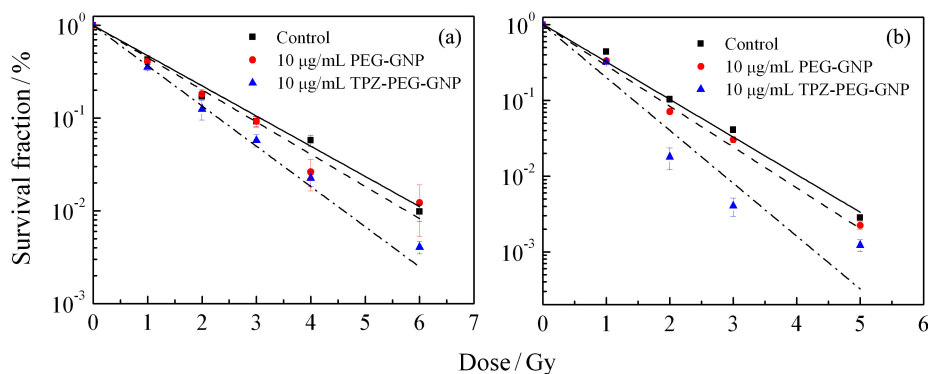


图 5 (在线彩图) X射线(a)和碳离子(b)辐照各组HepG2细胞的存活曲线

3.5 TPZ-PEG-GNP对HepG2细胞的辐射增敏效应

如图5所示, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的TPZ-PEG-GNP在各个剂量点处的细胞存活率均低于对照组和PEG-GNP组, 且随着辐射剂量的增加, 这种差异越来越明显。TPZ-PEG-GNP和PEG-GNP对HepG2细胞的辐射增敏效应如图5中拟合的存活曲线所示, 经计算得到, 在 $SF = 10\%$ 时, X射线辐照下TPZ-PEG-GNP和PEG-GNP对HepG2细胞的放射增敏比分别为1.23和1.05, 而碳离子辐照下TPZ-PEG-GNP和PEG-GNP对HepG2细胞的放射增敏比分别为1.47和1.13。经单因素方差分析发现, 两种不同射线辐照下, TPZ-PEG-GNP组与对照组和PEG-GNP组都具有极显著性差异($P < 0.01$), PEG-GNP组与对照组具有显著性差异($P < 0.05$)。

4 讨论与结论

GNP的辐射增敏特性与其自身的物理和化学性质密切相关, 之前我们曾研究过15 nm的柠檬酸钠包被的GNP对HeLa细胞的辐射增敏效应, 发现其在50 kVp的X射线和LET为70 keV/ μm 的碳离子辐照下对HeLa细胞具有辐射增敏效应。而且我们也发现, 柠檬酸钠包被的GNP容易在培养基和细胞内发生聚集, 不易进入细胞核内; 同时我们曾尝试用TPZ去连接柠檬酸钠包被的GNP, 以增强GNP的靶向性和辐射增敏性, 结果发现两者虽然能连接上, 但是GNP却发生了聚沉。鉴于上述原因, 我们选择PEG包被GNP。当PEG包被GNP后, GNP的亲水半径就会增加, 使得表面电势降低, 增加了GNP的稳定性; 同时由于PEG保护层的存在, 可有效降低Au与DNA的相互作用而造成的细胞损伤, 从而降低GNP的毒性^[14-15]。本文采用TPZ偶联PEG-GNP, 经过全波长酶标仪扫描和吸光度值对比分析, 发现TPZ确实与PEG-GNP进行了偶联, TPZ偶联的数量及与PEG-GNP结合的方式还需要进一步的分析。

TPZ是一种对乏氧肿瘤细胞具有特异选择性的抗癌药物, 我们使用TPZ包被PEG-GNP, 利用电离辐射与GNP相互作用产生次级电子和俄歇电子, 其中一些电子被TPZ捕获后经细胞内相关酶的单电子还原作用而产生自由基, 进而放大电离辐射形成自由基的产额, 提高对肿瘤组织细胞的辐射增敏效应。从克隆存活实验的结果来看, TPZ-PEG-GNP组相比于对照组有明显的辐射增敏效应, 但是PEG-GNP组的增敏效应不太明显, 这与之前其他人报道的实验结论有些出

入^[14-15], 其原因可能与处理的肿瘤细胞品系的特性有关, 也可能与共培养液的浓度^[16]、时间以及射线的品质有关^[17-20]。

由于TPZ对乏氧肿瘤细胞具有特异选择性, 如果用TPZ-PEG-GNP处理乏氧肿瘤细胞, 预计将会增加TPZ-PEG-GNP的细胞摄取量, 其辐射增敏效应可能会提高一定比例, 这将是今后研究的方向; 同时, 如何使PEG-GNP偶联更多的TPZ, 提高细胞对TPZ-PEG-GNP的摄取量, 也是将来不断改进的方向。

本实验在氧存在条件下研究了TPZ偶联15 nm的PEG-GNP形成的TPZ-PEG-GNP复合物在水中受辐照后的羟自由基增强效应, 及对HepG2细胞的毒性和放射增敏效应。结果表明, TPZ-PEG-GNP在有氧条件下能显著提高水中羟自由基的产额, 对HepG2细胞的毒性很小, 同时具有显著的辐射增敏效应。这些研究表明, TPZ和GNP在辐射增敏方面具有很大的研究空间和应用价值。

参考文献:

- [1] MARIA V P, MING J, WILLIAM D B. *Basic&Clinical Pharmacology&Toxicology*, 2011, **108**: 396.
- [2] BROWN J M. *J Cancer*, 1993, **67**: 1163.
- [3] BO H, VIVIAN W Y, EDWIN P H, *et al. Invest New Drugs*, 2011, **29**: 401.
- [4] MUSTAFA B, PAWEL J, GOUTAM C, *et al. J AM CHEM SOC*, 2003, **125**: 11607.
- [5] ZHANG M, STEVENS G. *Melanoma Research*, 1998, **8**: 0960.
- [6] REDDY S B, WILLIAMSON S K. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009, **18**: 77.
- [7] ZHANG S X, GAO Junfang, BUCHHOLZ T A, *et al. Biomed Microdevices*, 2009, **11**: 925.
- [8] DORSEY J F, SUN L, JOH D Y, *et al. Thansl Cancer Res*, 2013, **2**: 280.
- [9] BAO Quanying, GENG Dongdong, XUE Jingwei, *et al. International Journal of Pharmaceutics*, 2013, **446**: 112.
- [10] HAINFELD J F, SLATKIN D N, SMILOWITZ H M. *Phys. Med. Biol*, 2004, **49**: N309.
- [11] HAINFELD J F, DILMANIAN F A, ZHONG Zhong, *et al. Phys. Med. Biol*, 2010, **55**: 3045.
- [12] ZHANG X D, WU D, SHEN X, *et al. Biomaterials*, 2012, **33**: 6408.
- [13] LIU Chijen, WANG Changhai, CHEN Shintai, *et al. Phys Med Biol*, 2010, **55**: 931.
- [14] ZHANG Xiaodong, SONG Shasha, CHEN Jie, *et al. International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine*, 2014, **38**: 1. (in Chinese)
(张晓东, 宋莎莎, 陈婕, 等. *国际放射医学核医学杂志*, 2014, **38**:

- 1.)
- [15] LIU Chijen, WANG Changhai, CHIEN C C, *et al.* Nanotechnology, 2008, **19**: 295104.
- [16] NI Xinye, QIAN Nong, LIN Tao, *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 2013, **33**: 3. (in Chinese)
(倪昕晔, 钱农, 林涛, 等. 中华放射医学与防护杂志, 2013, **33**: 3.)
- [17] WANG Xufei. Chinese Journal of Medical Physics, 2012, **3**: 3337. (in Chinese)
(王旭飞. 中国医学物理学杂志, 2012, **3**: 3337.)
- [18] CHANG Mengya, SHIAU A L, CHEN Yuhuang, *et al.* Cancer Sci, 2008, **99**: 1479.
- [19] LECHTMAN E, CHATTOPADHYAY N, CAI Z, *et al.* Phys Med Biol, 2011, **56**: 4631.
- [20] POLF J C, BRONK L F, DRIESSEN W P, *et al.* Applied Physics Letters, 2011, **98**: 193702.

Radiosensitizing Effect of Tirapazamine-Gold Nanoparticle Compound on Human Hepatoma HepG2 Cells

LIU Xi^{1,2,3}, LIU Yan^{1,2,3}, CHEN Weiqiang^{1,2}, LI Qiang

(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. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Tirapazamine (TPZ) was conjugated with polyethylene-glycol-coated gold nanoparticles (PEG-GNP) to form new tirapazamine-gold nanoparticle compounds (TPZ-PEG-GNP). UV-vis absorption spectrum of TPZ-PEG-GNP at wavelengths from 200 to 800 nm was measured with a microplate reader. The kinetics of TPZ-PEG-GNP uptake by human hepatoma HepG2 cells was determined using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). To evaluate the cellular toxicity of TPZ-PEG-GNP, the effect of TPZ-PEG-GNP on HepG2 cell viability was examined by means of the MTT method. Moreover, the radiation enhancement effect of hydroxide radical production in ultra-pure water with TPZ-PEG-GNP exposed to X-rays and carbon ions was investigated using coumarin-3-carboxylic acid (3-CCA) as the free radical probe. More importantly, the radiosensitizing effect of TPZ-PEG-GNP on HepG2 cells irradiated with X-rays and carbon ions was assessed with the clonogenic survival assay. Our experimental results indicate that TPZ-PEG-GNP had nearly no toxicity to HepG2 cells. The yield of hydroxide radicals in ultra-pure water in the presence of TPZ-PEG-GNP after exposure to X-rays and carbon ions increased obviously and an obvious radiosensitizing effect of TPZ-PEG-GNP on HepG2 cells was observed under aerobic conditions. The radiation enhancement ratio of TPZ-PEG-GNP on HepG2 cells exposed to X-rays and carbon ions was 1.23 and 1.47 at 10% survival level.

Key words: tirapazamine; gold nanoparticles; human hepatoma HepG2 cell; radiosensitizing effect

Received date: 11 Dec. 2014; **Revised date:** 15 Jan. 2015

Foundation item: National Basic Research Program of China (973 Program) (2010CB834203); NSFC-CAS Joint Fund for Research based on Large-scale Scientific Facilities (U1232207); National Natural Science Foundation of China (11205217); Gansu Provincial Funds for Distinguished Young Scientists (1111RJDA010)

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