

SERS 纳米探针对电刺激过程中细胞内产生活性氧的检测

陈嘉敏^{1,2}, 曲孝章^{1,2,4}, 齐国华³, 徐蔚青^{1,2}, 金永东³, 徐抒平^{1,2}

(1. 吉林大学化学学院, 超分子结构与材料国家重点实验室, 2. 理论化学研究所, 长春 130012;
3. 中国科学院长春应用化学研究所, 电分析化学国家重点实验室, 长春 130022;
4. 吉林大学第一医院, 长春 130031)

摘要 电刺激是用于细胞内紊乱电活动引起疾病的一类重要治疗方式. 在电刺激过程中是否会诱导细胞内活性氧(ROS)水平的改变, 以及常规抗氧化抑制药物与电刺激治疗同时运用带来的影响, 目前尚未有相关研究. 本文设计了一种具有较好生物相容性的金/银核壳纳米棒表面增强拉曼(SERS)活性探针, 用于电刺激过程中细胞内产生 ROS 的检测. 将该探针与细胞共孵育, 使其内化入细胞, 对细胞进行不同时间的电刺激, 利用拉曼光谱对 SERS 探针的信号进行检测. 实验结果表明, 随着电刺激时间的延长, SERS 信号减弱, 说明细胞内产生 ROS 的量明显增加. 该传感机制是利用 ROS 能刻蚀金/银核壳纳米棒的银壳, 从而使其变薄引起 SERS 信号减弱. 抗坏血酸(AA)和谷胱甘肽(GSH)两种抗氧化抑制剂类药物与电刺激同时运用时, 可观察到它们会对电刺激过程产生的 ROS 有清除作用. 该研究发展了一类用于细胞内 ROS 检测的光谱方法, 也为异常的氧化应激和肿瘤治疗过程中的组合用药提供了建议.

关键词 活性氧; 表面增强拉曼光谱; 电刺激; 原位检测

中图分类号 O657.37 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20220033

SERS Nanoprobe for the Detection of Reactive Oxygen Species in Cells Produced by Electrostimulus

CHEN Jiamin^{1,2}, QU Xiaozhang^{1,2,4}, QI Guohua³, XU Weiqing^{1,2},
JIN Yongdong³, XU Shuping^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials, College of Chemistry,
2. Institute of Theoretical Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China;
3. State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;
4. First Hospital of Jilin University, Changchun 130031, China)

Abstract Electrostimulus (ES) is an important therapeutic method for diseases caused by abnormal intracellular electrical activity. Also, ES can induce apoptosis of cells, which is a potential tumor treatment method. At present, there are no relevant studies on the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels produced in the process of ES, and what effects will be brought by the simultaneous implementation of conventional antioxidant inhibitor drugs and ES therapy. In this study, a kind of gold/silver core-shell nanorod-based surface-enhanced Raman (SERS)-active

收稿日期: 2022-01-13. 网络首发日期: 2022-02-18.

联系人简介: 徐抒平, 女, 博士, 教授, 主要从事表面增强拉曼光谱方面的研究. E-mail: xusp@jlu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 21873039, 22173035)、2021 年度应用光学国家重点实验室开放基金(批准号: SKLAO2021001A)和吉林大学学科交叉融合创新项目(批准号: JLUXKJC2020106)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21873039, 22173035), the Open Project of State Key Laboratory of Applied Optics, China (No. SKLAO2021001A14) and the Interdisciplinary Integration Innovation Project of Jilin University, China (No. JLUXKJC2020106).

probe with good biocompatibility was designed for the detection of intracellular ROS generated during ES. The sensing mechanism realized the quantitative analysis of ROS based on the principle that ROS could etch the silver shell, leading to a decrease of the SERS signal of the SERS probe. The probe was co-incubated with cells and was internalized into cells. The cells were then electrically stimulated for different periods of time. Finally, the signal of the SERS probe was detected *in vivo*. The experimental results show that the SERS signal weakens with the extension of ES time, indicating that the amount of ROS produced in cells increases significantly. In addition, two antioxidant inhibitors, ascorbic acid (AA) and glutathione (GSH), were studied when combined with ES. It was observed that they could eliminate reactive oxygen species (ROS) produced by electrical stimulation. This study developed a new method for intracellular ROS detection and suggests a combination of drugs for abnormal oxidative stress and tumor therapy. Also, ES can induce apoptosis of cells, which is a potential tumor treatment method.

Keywords Reactive oxygen species; Surface-enhanced Raman spectroscopy; Electrostimulus; *in situ* Detection

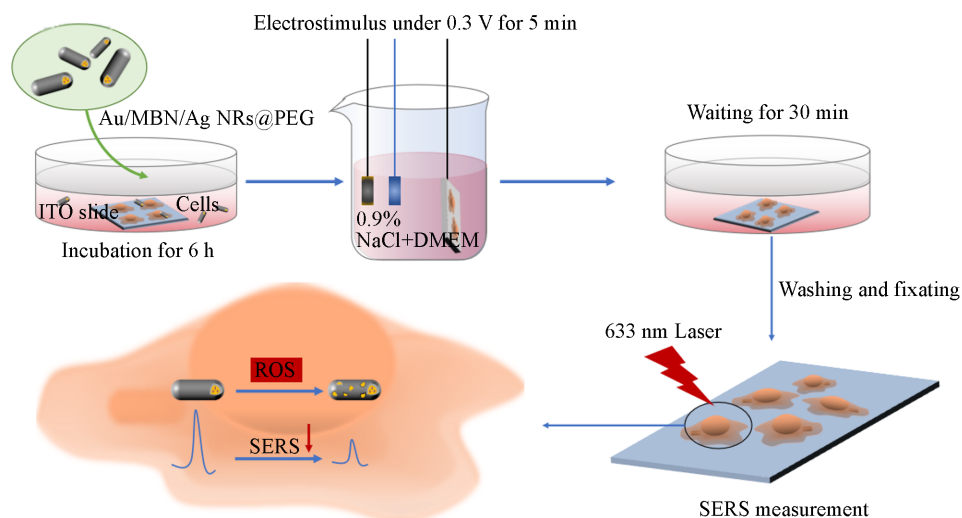
活性氧(ROS)是细胞内氧化还原反应过程中重要的中间物质,与能量转换和新陈代谢密切相关,在细胞多项生理过程中发挥着重要作用. ROS的产生和清除系统积极维持细胞内氧化还原状态,介导氧化还原信号以及调节细胞功能. 活性氧主要包括过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)、单线态氧($^1\text{O}_2$)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和烷基过氧自由基($\text{ROO}\cdot$)等^[1]. 低水平的ROS可作为细胞信号通路、有丝分裂、细胞增殖/迁移/分化以及机体抵抗病原体入侵的重要次级信使;而高水平的ROS容易导致脂质过氧化、蛋白质变性、脱氧核糖核酸损伤和其它生物分子的氧化损伤,从而对细胞和组织产生有害影响^[2]. 活性氧诱导的氧化应激是指体内氧化和抗氧化之间的不平衡状态,是衰老和疾病的重要指标^[3]. 众所周知,炎症组织中过量的活性氧会进一步恶化局部组织损伤并导致炎症性疾病,如伤口脓毒症、炎症性肠病、急性肝病、肾损伤和肝纤维化^[4]. ROS已经成为氧化应激的生物标志物,多种疾病(如阿尔茨海默病、帕金森病、动脉粥样硬化、癌症和抑郁症等)均与氧化应激失调相关^[5]. 具有抗氧化功能的分子(如维生素、类胡萝卜素和类黄酮)或天然酶(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶)和谷胱甘肽过氧化物酶等被证实可以用于清除ROS^[6]. 深入了解细胞内的氧化应激过程、实时监控ROS动态表达,对了解细胞的生理过程和疾病演化至关重要.

生物电场和电流广泛存在于细胞中,在调节各种生物过程中起着重要作用. 细胞内紊乱的电活动会引起各种疾病(如癫痫、帕金森病、心脏病等). 为了调整紊乱的电活动,电刺激(Electrostimulus, ES)成为一种有效的治疗方法^[7]. 与药物治疗相比,ES是一种快速可控的方法,可以避免化学药物的缺点,即外源性物质进入细胞后,需要较长的作用时间以及产生无法控制的副作用. Qi等发现ES可导致细胞色素c的释放^[8]、Caspase-3的激活^[7]和磷酸化丝氨酸的外化^[9],可加速细胞凋亡. 因此,ES也有可能成为肿瘤治疗的有效手段. ES在导致细胞凋亡过程中,细胞内ROS的产生是否存在动态改变,目前尚未有文献进行探讨. 此外,在ES治疗中,如果同时有一些抗氧化药物的辅助治疗,是否会对肿瘤治疗产生干扰,这也需要ROS响应型探针进行原位评价.

由于ROS寿命短、生理浓度低,所以检测和量化ROS具有较高的挑战性. 目前检测方法有分光光度法^[10]、荧光^[11-13]、化学发光^[14]、电子顺磁共振^[15,16]、电子自旋共振波^[17-19]和电化学法^[20,21]等. 表面增强拉曼光谱(SERS)技术由于具有独特的指纹信息、灵敏度高、操作简单、对生物样品近乎无损的特点,在细胞分析中得到了广泛应用^[9]. 由于ROS几乎没有拉曼信号,因此大多采用间接SERS技术检测ROS. 目前SERS检测ROS的方法主要有两种:(1)基于拉曼报告分子(如对氨基苯硫酚、4-巯基苯硼酸)与ROS发生化学反应而产生拉曼信号改变进行传感^[22,23]; (2)基于SERS物理增强机制的调控方法,即利用ROS刻蚀银壳并使银壳变薄导致SERS信号减弱的策略^[5].

本文设计了具有较好生物相容性的金/银核壳纳米棒SERS活性探针,利用该探针对ROS响应的特性检测电刺激过程中细胞内产生的ROS. 其传感机制是利用ROS刻蚀银壳后使银壳变薄,导致SERS信号减弱形成ROS的turn-off检测方式(Scheme 1);研究了抗坏血酸(AA)和谷胱甘肽(GSH)两种药物对清除电刺激过程产生ROS的可能性. 本研究发展了一类新型的ROS检测纳米探针,揭示了电刺激可

导致细胞内 ROS 上调的现象, 为异常的氧化应激用药提供了建议.



Scheme 1 Process of electrostimulus after the probe and cell incubation and SERS sensing of ROS

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

三水合氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 分析纯)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, 纯度 99%)、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC, 纯度 99%)、4-巯基苯腈(MBN, 纯度 96%)和二甲基亚砜(DMSO, 分析纯)均购自阿拉丁试剂公司; 硼氢化钠(NaBH_4 , 纯度 98%)购自天津市福晨化学试剂厂; 抗坏血酸(AA, 纯度 98%)、过氧化氢(H_2O_2 , 质量分数 30%)和硝酸银(AgNO_3 , 分析纯)均购自北京化工厂; 0.25% 胰蛋白酶溶液(EDTA)、牛血清蛋白(FBS)、细胞培养基(DMEM, Invitrogen)、磷酸盐缓冲溶液(PBS, 0.1 mol/L, pH=7.4)和 Hank 平衡盐溶液(HBSS)缓冲溶液(0.1 mol/L)均购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司; 噻唑蓝(MTT, 纯度 98%)购自 Sigma 公司; 细胞组织固定液(质量分数 4% 多聚甲醛)购自索莱宝试剂; 活性氧(ROS)检测试剂盒(DHCFH-DA)购自上海贝博生物科技有限公司; L-还原型谷胱甘肽(GSH, 纯度 98%)购自 Sigma-Aldrich 公司; 甲氧基聚乙二醇-硫醇(mPEG-SH, 分子量 5000)购自天津红太阳金博达生物技术有限公司; 氧化铟锡(ITO)导电玻璃购自珠海凯为光电有限公司.

JEM-2100F 型透射电子显微镜(TEM, 日本电子株式会社); LAMBDA365 型紫外-可见光光度计(UV-Vis, 美国 PerkinElmer 公司); Zetasizer Nano ZS 型动态光散射粒度仪(DLS, 英国 Malvern 公司); LabRAM Aramis 型共聚焦拉曼系统(Raman, 美国 Horiba Jobin Yvon 公司); FV1000 型共聚焦荧光显微镜(日本 Olympus 公司); GF-M3000 型酶标仪(山东高密彩虹分析仪器有限公司); CHI660E 型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司).

1.2 SERS 纳米探针的合成

首先, 根据文献[24]方法合成了金纳米棒(Au NRs). 将 5.0 mL Au NRs 加入 16.4 μL 1.0 mmol/L MBN 溶液, 搅拌 12 h. 离心(6000 r/min, 8 min)去除未反应的 MBN, 制得 MBN@Au NRs 粒子.

在搅拌下, 向 12 mL 80 mmol/L CTAC 溶液中加入 1.2 mL 1.8 nmol/L MBN@Au NRs, 0.9 mL 10 mmol/L AgNO_3 水溶液和 0.9 mL 0.1 mol/L AA 溶液. 将该混合液恒温加热至 60 $^{\circ}\text{C}$ 保持反应 3 h. 将该反应液离心(5000 r/min, 5 min)洗涤. 向沉淀中加水至 4.0 mL, 重悬浮可得 Au/MBN/Ag NRs.

为了提高 Au/MBN/Ag NRs 的生物相容性, 在 Au/MBN/Ag NRs 表面修饰了 mPEG-SH 分子. 向 3 mL Au/MBN/Ag NRs 中加入 3 μL 吐温后, 搅拌 20 min. 400 r/min 离心 5 min 去除多余的吐温; 然后加入 3 μL 1 mmol/L mPEG-SH 溶液, 搅拌 12 h 后离心(4000 r/min, 5 min)清洗; 将获得的探针重悬浮于 1.0 mL 水中, 得到 1.0 mg/mL SERS 纳米探针(Au/MBN/Ag NRs@PEG).

1.3 细胞毒性实验

采用 MTT 实验来评估 SERS 探针对细胞的毒性。首先, 将乳腺癌细胞(MCF-7)和肝癌细胞(HepG2)分别接种在 96 孔微量滴定板上。向每个孔中加入 200 μL 细胞, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 12 h。使用冷 PBS 缓冲溶液洗涤细胞 3 次。将不同浓度的 SERS 纳米探针(0, 0.1, 0.2, 0.4 mg/mL, 各 100 μL)分别加入到孔中。将细胞放入细胞培养箱中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h。用冷 PBS 缓冲溶液洗涤细胞 3 次后, 向每个孔中加入 5 μL 5.0 mg/mL MTT 溶液, 之后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 4 h。除去上述含有 MTT 的培养基后, 向孔内加入 150 μL DMSO。通过酶标仪微孔板读取器读取 578 nm 下的吸光度值。以不加纳米探针的细胞组作为空白对照组。利用公式[细胞存活率(%)=(实验值 OD 均值/对照组 OD 均值) \times 100%, 其中, OD 为吸光度]求出存活率, 并将其做出柱状图。

1.4 ROS 对 SERS 纳米探针的刻蚀效应

在水溶液加入 H_2O_2 来验证 SERS 纳米探针用于 ROS 传感的可行性。首先配制不同浓度(0, 200, 400, 600 和 1000 $\mu\text{mol/L}$)的 H_2O_2 溶液。将 20 μL H_2O_2 溶液与 20 μL SERS 纳米探针在室温下混合反应 30 min。将样品滴在玻璃片上, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干。用激光共聚焦拉曼系统采集样品处的 SERS 光谱。采集 15 个点的 SERS 光谱做平均谱处理。

1.5 电刺激后细胞中 ROS 的荧光成像检测

如 Scheme 1 所示, 首先将 MCF-7 细胞接种于 ITO 导电玻璃上, 然后保持 0.3 V 的电压, 电刺激不同的时间(0, 1, 3, 5, 7 和 9 min)。待刺激结束后 30 min, 加入 2 μL DCFH-DA 荧光探针孵育 30 min, 用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次, 加入细胞组织固定液固定 20 min, 再用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次。用激光共聚焦荧光显微镜进行荧光成像(激发波长为 488 nm)。DCFH-DA 荧光探针本身没有荧光。当进入细胞后被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能穿透细胞膜, 使探针被标记到细胞内。在 ROS 存在下, DCFH 被氧化生成发绿色荧光的 DCF。绿色荧光强度与细胞内的 ROS 水平成正比。

1.6 电刺激后细胞及细胞内 ROS 的 SERS 检测

将 ITO 玻璃(直径 1 cm 的正方形)平放于六孔板内, 将细胞接种于 ITO 玻璃上。待细胞增殖至 ITO 玻璃的 80%, 向 2 mL 培养基中加入 SERS 活性探针(1.0 mg/L, 800 μL)。放入细胞培养箱中孵育 6 h 后, 用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次。

通过 Scheme 1 所示的装置, 对 ITO 玻璃上的细胞进行不同的时间(0, 1, 3, 5, 7 和 9 min)的电刺激, 电压设定为 0.3 V。等待 30 min 之后, 用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次。加入细胞组织固定液反应 20 min, 再用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次。最后, 用激光共聚焦拉曼系统对电刺激后浸泡在 PBS 缓冲溶液(pH=7.4)中的细胞进行 SERS 检测。每组样品选取 10 个以上细胞, 每个细胞上采集 5~8 个点的 SERS 光谱, 做平均谱处理。

1.7 药物消除电刺激作用的检测

首先将细胞接种于 ITO 玻璃上, 加入不同浓度的 SERS 探针孵育 6 h 后, 用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次。然后加入不同浓度的 AA 与谷胱甘肽(GSH)(0.1, 0.5, 1.0 mmol/L)孵育 20 min, 之后用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次。采用 0.3 V 的电压进行电刺激 5 min。等待 30 min 之后, 采用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次, 加入细胞组织固定液反应 20 min, 再用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次。最后, 用激光共聚焦拉曼系统对电刺激后的细胞进行 SERS 检测。

2 结果与讨论

2.1 SERS 纳米探针的表征

采用了银包金纳米棒的核壳型纳米粒子作为 SERS 探针。在银壳和金核之间引入了拉曼报告分子 MBN。首先, 对合成的探针进行了紫外-可见光谱表征。如图 1(A)所示, 制备的金纳米棒的等离激元共振峰位于 645 nm 处。修饰 MBN 后, Au-NR 的等离激元共振峰从 645 nm 蓝移至 635 nm。在此基础上包裹银壳层后, 在 400 nm 左右出现了银的吸收带。修饰 mPEG 后, Au/MBN/Ag NRs 蓝移了 2 nm。

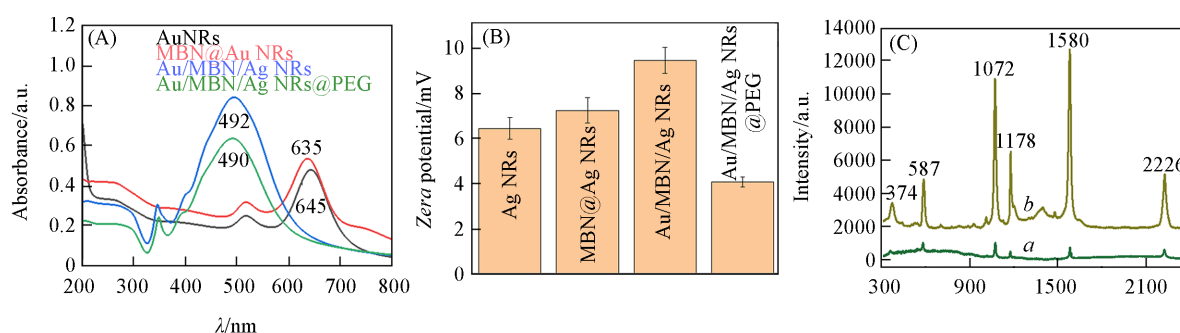


Fig. 1 UV-Vis spectra(A) and Zeta potentials(B) of Au NRs, MBN@Au NRs, Au/MBN/Ag NRs, and Au/MBN/Ag NRs@PEG, and the SERS spectra of MBN@Au NRs(a) and Au/MBN/Ag NRs(b)(C)

采用动态光散射粒度仪对 Au NRs, MBN@Au NRs, Au/MBN/Ag NRs 和 Au/MBN/Ag NRs@PEG 进行了表征. 由图 1(B) 中 Zeta 电位测量结果可见, 修饰 MBN 前后的 Au NRs、合成的 Au/MBN/Ag NRs 以及修饰 mPEG 后的 Au/MBN/Ag NRs 都带正电. MBN@Au NRs (7.2 mV) 的 Zeta 电位相较于 AuNRs (6.4 mV) 增大了 0.8 mV, 表明 MBN@Au NRs 表面的化学环境发生微小变化, MBN 成功地修饰在 Au NRs 上. Au/MBN/Ag NRs 的 Zeta 电位 (9.4 mV) 相较于 MBN@Au NRs (7.2 mV) 增大了 2.2 mV. Au/MBN/Ag NRs@PEG 的 Zeta 电位 (4.1 mV) 相较于 Au/MBN/Ag NRs 的 Zeta 电位 (9.4 mV) 减小了 5.3 mV, 表明 m-PEG 成功修饰在 Au/MBN/Ag NRs 的表面.

对 MBN@Au NRs 和 Au/MBN/Ag NRs 进行了 SERS 表征. 图 1(C) 显示, Au/MBN/Ag NRs 的 SERS 信号强度比 MBN@Au NRs 明显增强. 根据文献 [25] 对拉曼光谱峰进行归属可知, 587 cm⁻¹ 处的峰为 Au—CN 摇摆振动, 1072 cm⁻¹ 处的峰为苯环 C—C 面外弯曲振动, 1178 cm⁻¹ 处的峰为 C—N 伸缩振动, 1580 cm⁻¹ 处的峰为 C=C 伸缩振动, 2226 cm⁻¹ 处的峰为 C≡N 伸缩振动.

采用 TEM 对获得的金纳米棒以及 Au/MBN/Ag NRs 进行表征. 由图 2(A) 可见, 所合成的 Au NRs 的平均尺寸约为 55 nm×23 nm. 图 2(B) 为 Au/MBN/Ag NRs 的 TEM 照片. 可见, 在 AuNRs 的外侧实现了一层平均厚度为 6 nm 的银壳包裹. 所获得 Au/MBN/Ag NRs 的尺寸为 60 nm×38 nm.

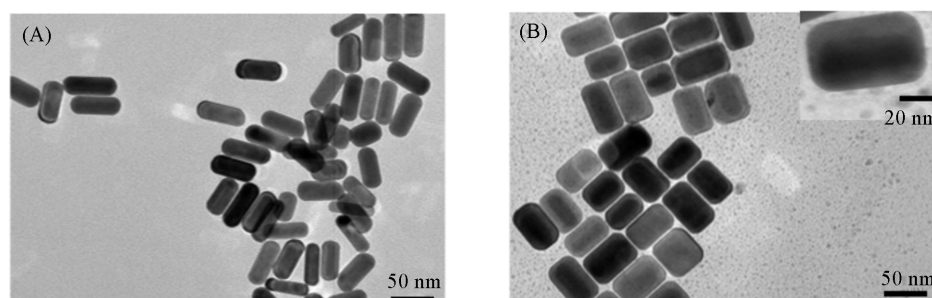


Fig. 2 TEM images of MBN@Au NRs(A) and Au/MBN/Ag NRs(B)

2.2 纳米探针的毒性

研究选取了 MCF-7 和 HepG2 进行细胞相关实验. 首先, 采用 MTT 实验评价了制得的 SERS 纳米探针针对细胞的毒性. 以不加 SERS 纳米探针组为控制组. 图 3(A) 比较了修饰了 mPEG-SH 前后 MCF-7 细胞存活率的差异. 通过对比可发现, Au/MBN/Ag NRs@PEG 与细胞共孵育后的存活率明显提高, 说明 PEG 能提高生物相容性. 在 Au/MBN/Ag NRs@PEG 的浓度为 0.4 mg/mL 时, 细胞存活率达到 80%. 当再增加探针的浓度时, 细胞存活率低于 80%. 因此, 选取 0.4 mg/mL 的 Au/MBN/Ag NRs@PEG 探针浓度进行后续实验. 图 3(B) 为 HepG2 与不同浓度 (0, 0.1, 0.2, 0.4 mg/mL) 的 Au/MBN/Ag NRs@PEG 孵育 24 h 后的细胞存活率柱状图, 可见, 随着 Au/MBN/Ag NRs@PEG 浓度的增加, 细胞的存活率降低, 并且当 Au/MBN/Ag NRs@PEG 浓度为 0.4 mg/mL 时, 细胞的存活率在 80% 以上, 说明探针具有低毒性.

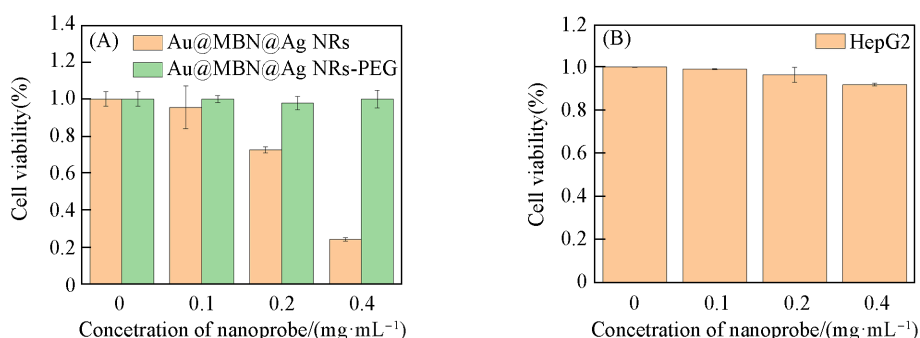


Fig. 3 Cell viabilities of MCF-7 cells after incubated with different concentrations of Au/MBN/Ag NRs, and Au/MBN/Ag NRs@PEG for 24 h(A) and cell viabilities of HepG2 cells after incubated with Au/MBN/Ag NRs@PEG for 24 h(B)

2.3 ROS对纳米探针的刻蚀作用

已有研究表明, ROS对银壳有刻蚀的作用, 导致银壳变薄, SERS信号减弱^[5,26]. 利用H₂O₂代表ROS, 进行ROS传感可行性的评价. 向含有0.4 mg/mL探针的细胞培养基中加入不同浓度的H₂O₂, 进而评价其对银壳层的刻蚀效果. 如图4(A)所示, 随H₂O₂浓度的增加紫外吸收发生蓝移. 由于银壳变薄, 导致其等离激元带位移, 且金纳米棒与银壳之间的耦合也减弱, 进一步降低拉曼报告分子的SERS信号^[26]. 因此, 可以通过SERS光谱强度的下降来传感H₂O₂. 由图4(B)可知, 随着H₂O₂浓度的增加, SERS信号逐渐减弱. 图4(C)为SERS光谱在1072 cm⁻¹处的强度图, 同样体现出SERS信号随H₂O₂浓度的增加而减弱的规律. 该结果显示, 利用Au/MBN/Ag NRs@PEG对H₂O₂的最低检测浓度为200 μmol/L. TEM照片显示, 经1.0 mmol/L H₂O₂刻蚀后银壳变薄, 由原来的6.0 nm降为3.5 nm左右[图4(C)插图].

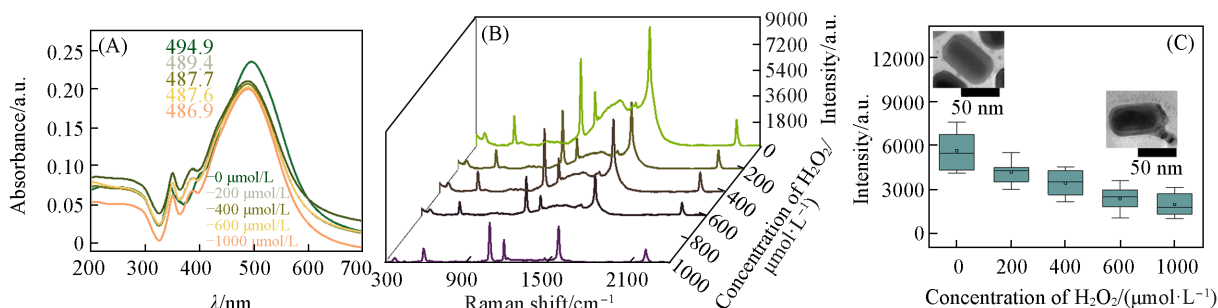


Fig. 4 UV-Vis spectra(A) and SERS spectra(B) of Au/MBN/Ag NRs@PEG after incubated with different concentrations of H₂O₂ (0, 200, 400, 600, and 1000 μmol/L) for 30 min, histogram of SERS intensities at 1072 cm⁻¹ and TEM images(inset) before and after the nanoprobe etched with 1 mmol/L of H₂O₂(C)

2.4 电刺激后细胞中ROS的荧光成像和SERS检测

为了验证细胞经过电刺激后会产生ROS, 使用ROS检测试剂盒(DCFH-DA)检测细胞内的ROS, 并通过共聚焦荧光成像来观察ROS产生量. 图5(A)~(F)为MCF-7细胞经过不同的电刺激时间(0, 1, 3, 5, 7, 9 min)后, 加入DCFH-DA染料的共聚焦荧光成像图片. 可见, 随着电刺激的时间延长, 氧化产物DCF的荧光强度增强. 图5(G)为荧光强度的统计图. 可见, 随着电刺激时间增加, ROS产生得越来越多.

将SERS活性探针分别与MCF-7和HepG2细胞共孵育6 h后, 对细胞进行了不同时间的电刺激. 刺激后产生的ROS对SERS活性探针进行刻蚀反应. 响应30 min后, 用激光共聚焦拉曼系统检测了该过程中探针的SERS信号变化, 从而探测ROS含量的波动变化. 图6(A)和(C)分别为MCF-7和HepG2细胞上获得的电刺激后SERS探针信号. 随着电刺激时间的延长, SERS信号强度减弱. 图6(B)和(D)分别为SERS光谱在1072 cm⁻¹处的柱状图. 同样显示出细胞随着电刺激时间的延长, SERS信号强度减弱, 证明了ROS的产生量变大, 与DCFH-DA染料的共聚焦荧光成像结果(图5)的规律一致. 由此可以

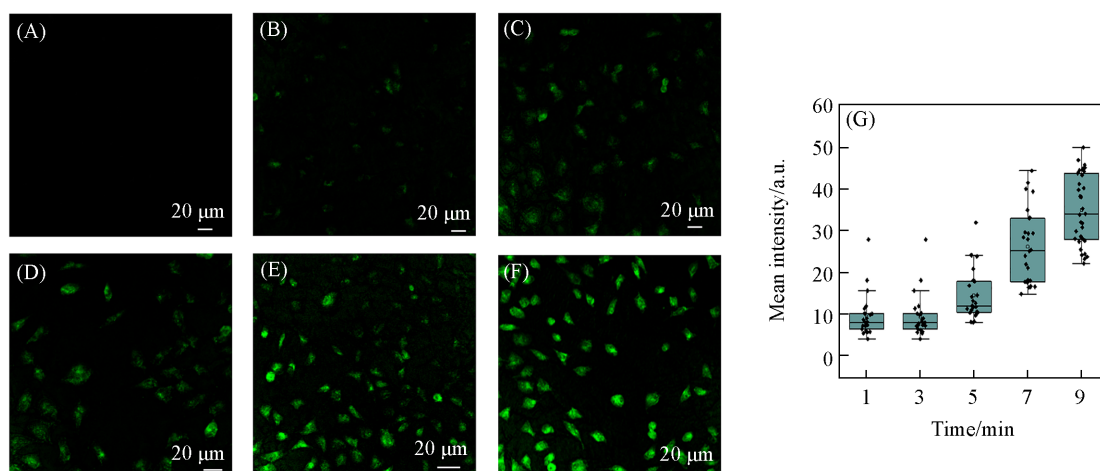


Fig. 5 Confocal fluorescence images of MCF-7 cells after different ES time of 0(A), 1 min(B), 3 min(C), 5 min(D), 7 min(E) and 9 min(F) and stained by DCFH-DA kit, and corresponding statistics of the mean fluorescence intensity(G)

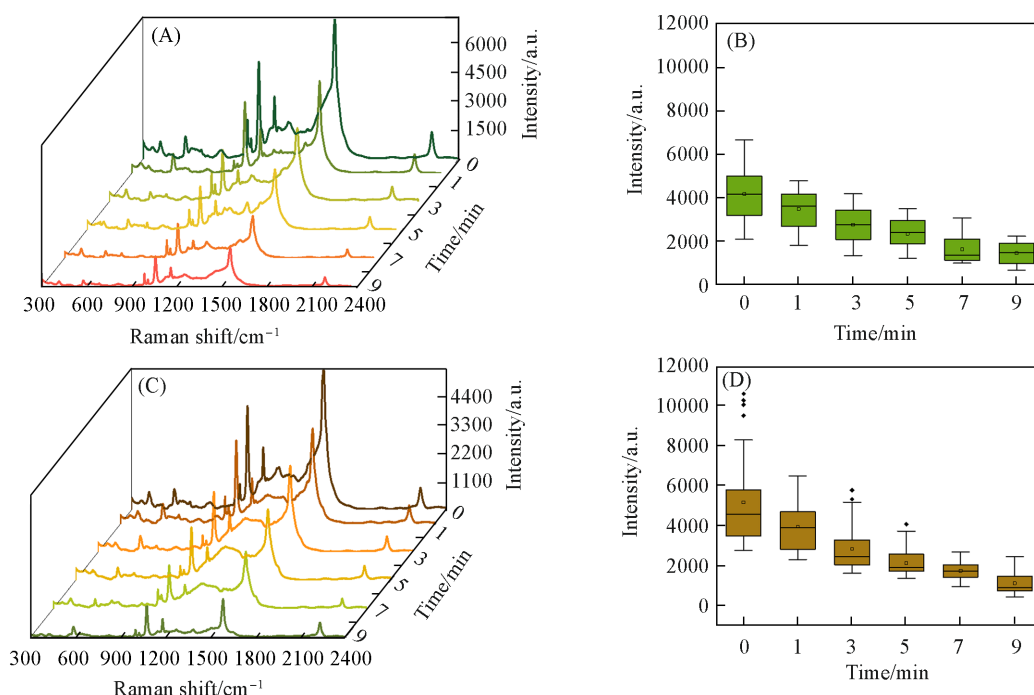


Fig. 6 SERS spectra of MCF-7 cells(A) and HepG2 cells(C) after different time of ES(0, 1, 3, 5, 7, 9 min), and the histograms of SERS intensity of MCF-7 cells(B) and HepG2 cells(D) at 1072 cm⁻¹

说明,电刺激会导致细胞内部ROS上调,达到杀伤肿瘤的目的.利用平均荧光强度比的计算,可得电刺激9 min后ROS的产生量相较未受电刺激的细胞内部,可提高35%.

2.5 外加药物抵抗电刺激的副作用

研究表明,抗坏血酸和谷胱甘肽等物质能有效清除ROS^[6].为了探讨这些药物与ES肿瘤治疗过程中是否可以同时使用,加入不同浓度的AA与GSH与细胞共孵育,再对HepG2细胞进行5 min电刺激,对刺激后的细胞内ROS水平进行SERS检测,如图7(A)和(C)所示.将未加药物与加1 mmol/L药物在1072 cm⁻¹处的平均SERS强度[图7(B)和(D)]进行对比,可见,HepG2细胞随着药物浓度的增加,SERS信号强度增强,证明了抗坏血酸和谷胱甘肽等物质能一定程度抵消掉生成的ROS.两种药物相比可知,GSH的抗氧化作用更为显著.将加1 mmol/L GSH与未加药物组相比可知,该浓度GSH可抵消63%的电刺激过程中细胞产生的ROS.结果证明,抗氧化药物的使用会削弱肿瘤ES治疗的效果.但对异常

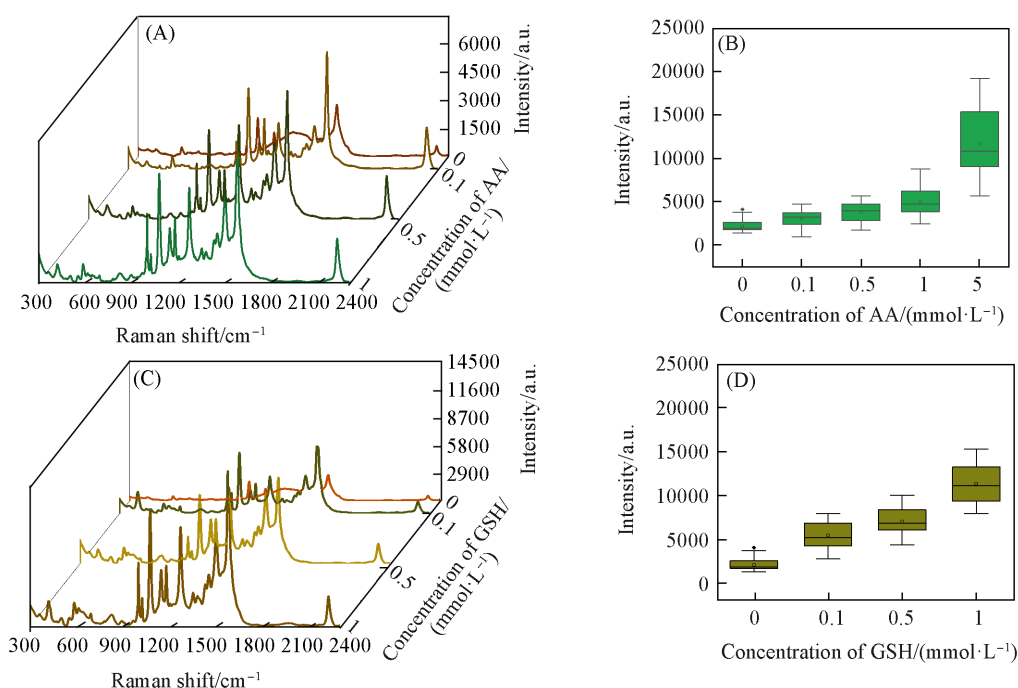


Fig. 7 SERS spectra of nanoprobes obtained from HepG2 cells after incubated with AA(A) and GSH(C), and ES for 5 min, the histograms of SERS intensity of AA(B) and GSH(D) at 1072 cm⁻¹

的氧化应激过程中产生的ROS的消除将有一定帮助。

3 结 论

设计了通过金/银核壳纳米棒SERS探针,实现了细胞内ROS的检测。该探针在0.4 mg/mL浓度下具有低毒性。将该探针与细胞共培养,可以使其较好地内化进入细胞,可进行胞内检测。将该探针用于电刺激治疗过程中细胞内产生ROS的评价,结果证实,电刺激能增加细胞内ROS的产生,且随着电刺激时间的延长,细胞内ROS的产量明显增加。抗坏血酸(AA)和谷胱甘肽(GSH)两种药物可削弱电刺激肿瘤治疗过程产生的ROS,与未加药物的ROS产量相比,可抵消63%的ROS,对肿瘤的治疗有一定的干预作用。该研究将ES治疗与ROS产生建立了直接关联,也从一定程度上证实,ES对癌症的治疗机制有可能与其ROS产生相关。抗氧化药物的运用将一定程度上抵消了细胞内的ROS产生量,可用于异常的氧化应激过程中产生ROS的消除,但对ES治疗肿瘤的杀伤力有一定的削弱,为ES治疗中辅助用药提供了建议。同时可证明,电刺激可引发细胞走向凋亡,有可能成为肿瘤治疗的一种方式。

参 考 文 献

- [1] Cui K., Fan C. C., Chen G. X., Qiu Y. Y., Li M. W., Lin M., Wan J. B., Cai C. S., Xiao Z. Y., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*, 12137—12144
- [2] Noubade R., Wong K., Ota N., Rutz S., Eidenschenk C., Valdez P. A., Ding J., Peng I., Sebrell A., Caplazi P., deVoss J., Soriano R. H., Sai T., Lu R., Modrusan Z., Hackney J., Ouyang W., *Nature*, **2014**, *509*, 235
- [3] Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A., *Oxid. Med. Cell. Longevity*, **2017**, *2017*, 8416763
- [4] Wang Y. Q., Li L. L., Zhao W. B., Dou Y., An H. J., Tao H., Xu X. Q., Jia Y., Lu S., Zhang J. X., Hu H. Y., *ACS Nano*, **2018**, *12*, 8943—8960
- [5] Yue J., Shen Y. T., Wang J. Q., Xu W. Q., Xu S. P., *J. Light Scattering*, **2019**, *31*, 317—325(岳静, 申燕婷, 王佳琪, 徐蔚青, 徐抒平. 光散射学报, **2019**, *31*, 317—325)
- [6] Wang H., Wan K., Shi X., *Adv. Mater.*, **2019**, *31*, 1805368
- [7] Qi G. H., Sun D., Tian Y., Xu C., Zhang Y., Wang D. D., Ma K. S., Xu S. P., Jin Y. D., *Anal. Chem.*, **2020**, *92*, 7861—7868
- [8] Qi G. H., Li H. J., Zhang Y., Li C. P., Xu S. P., Wang M. M., Jin Y. D., *Anal. Chem.*, **2019**, *91*, 1408—1415
- [9] Qi G. H., Wang J. F., Ma K. S., Zhang Y., Zhang J., Xu W. Q., Jin Y. D., *Anal. Chem.*, **2021**, *93*, 2183—2190
- [10] Wang L. Y., Zhu B. H., Deng Y. T., Li T. T., Tian Q. Y., Yuan Z. G., Ma L., Cheng C., Guo Q. Y., Qiu L., *Adv. Funct. Mater.*, **2021**,

- 31, 2101804
- [11] Zhang Y., Li J. H., Bai J., Li L. S., Xia L. G., Chen S., Zhou B. X., *Water Res.*, **2017**, *125*, 259—269
 - [12] Chen X., Wang T. G., Le W. J., Huang X., Gao M. H., Chen Q., Xu S. H., Yin D. T., Fu Q. G., Shao C. G., Chen B. D., Shi D. L., *Theranostics*, **2020**, *10*, 3430—3450
 - [13] Li Z. Y., Xiao L., *Anal. Methods*, **2017**, *9*, 1920—1927
 - [14] Ye S., Hananya N., Green O., Chen H. S., Zhao A. Q., Shen J. G., Shabat D., Yang D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, 14326—14330
 - [15] Tan H. N., Zhao Y. X., Xu X. T., Sun Y., Li Y. H., Du J. X., *Microchimica. Acta*, **2020**, *187*, 42
 - [16] Misak A., Brezova V., Chovanec M., Luspai K., Nasim M. J., Grman M., Tomasova L., Jacob C., Ondrias K., *Antioxidants*, **2021**, *10*, 1286
 - [17] Cui K., Fan C. C., Chen G. X., Qiu Y. Y., Li M. W., Lin M., Wan J. B., Cai C. S., Xiao Z. Y., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*, 12137—12144
 - [18] Rota C., Chignell C. F., Mason R. P., *Free Radical Bio. Med.*, **1999**, *27*, 873—881
 - [19] Moore T. A., Samson K., Ahmad I. M., Case A. J., Zimmerman M. C., *Nursing Res.*, **2020**, *69*, 244—248
 - [20] Yagi M., Takemoto S., Sasase R., *Chem. Lett.*, **2004**, *33*, 152—153
 - [21] Yun Y. J., Lu Z. S., Jiao X. D., Xue P., Sun W., Qiao Y., Liu Y., *Bioelectrochemistry*, **2022**, *144*, 108049
 - [22] Zou Z., Shi Z. Z., Wu J. G., Wu C., Zeng Q. X., Zhang Y. Y., Zhou G. D., Wu X. S., Li J., Chen H., Yang H. B., Li C. M., *Anal. Chem.*, **2021**, *93*, 10789—10797
 - [23] Si Y. M., Li L. L., Qin X. J., Bai Y. C., Li J. S., Yin Y. D., *Analytica Chimica Acta*, **2019**, *1057*, 1—10
 - [24] Nikoobakht B., El-Sayed M. A., *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 1957—1962
 - [25] Wang Y., Yan B., Chen L., *Chem. Rev.*, **2013**, *113*, 1391—1428
 - [26] Shen Y. T., Liang L. J., Zhang J., Li, Z. Y., Yue J., Wang J. Q., Xu W. Q., Shi W., Xu S. P., *Sensors & Actuators: B: Chem.*, **2019**, *285*, 84—89

(Ed.: Y, K, S)