

包载铑纳米颗粒的复合水凝胶对胰腺癌 BxPC-3 细胞的杀伤效应

王宁薇¹,张 聪¹,刘 刚²,余 跃¹

摘要 目的 探究包载铑纳米颗粒的复合水凝胶 NPN + Rh-PEG NPs (NRP)对胰腺癌 BxPC-3 细胞的杀伤效应。方法 首先利用原子转移自由基聚合(ATRP)合成嵌段共聚物,再通过水相法合成 PEG 修饰的铑纳米颗粒,并通过超声混匀制备预混液后升温合成负载纳米颗粒的复合水凝胶 NRP。对其进行表征和催化性能验证。利用透射电镜及扫描电镜对铑纳米颗粒和复合水凝胶 NRP 进行形貌表征。用热成像仪检测复合水凝胶 NRP 的光热性能,然后用噻唑蓝比色法(MTT)和活-死细胞染色法观察其对 BxPC-3 细胞的生长抑制作用。最后,使用 MTT 和血液相容性测试验证其生物安全性。结果 成功制备出粒径约为 10 nm 的铑纳米(Rh-PEG)。在冷冻扫描电镜下复合水凝胶显示多孔结构,铑元素均匀分布在复合水凝胶内部。在激光功率 1 W/cm² 的 808 nm 近红外光(NIR)照射下,80 μg/ml 的 NRP 生成活性氧(ROS)的能力是纯水凝胶(NPN)的 19.6 倍($P < 0.05$);光照条件下,催化过氧化氢分解率高达 96.8%。在激光功率 1 W/cm² 的 808 nm NIR 照射下,5 min 内 80 μg/ml 的 NRP 能够升温至 58.9 °C。MTT 结果显示,40 μg/ml 的 NRP 在 1 W/cm² 的 808 nm NIR 照射后,BxPC-3 细胞存活率最低,仅为 14.8%。活-死细胞染色结果证明,与不使用 808 nm NIR 照射比较,光照下 40 μg/ml 的 NRP 的细胞杀伤作用更强。结论 均匀包载铑纳米颗粒的复合水凝胶 NRP 有效地增强对胰腺癌 BxPC-3 细胞的杀伤效应。

关键词 铑纳米颗粒;水凝胶;活性氧;胰腺癌

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1040-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.020

胰腺癌主要是指胰腺外分泌腺的恶性肿瘤,由于缺乏有效的早期筛查方法,治疗方案单一,预后差而被誉为“癌症之王”^[1]。由于胰腺癌具有几乎无法穿透的间质,低血管和低灌注的肿瘤血管等独特病理生物学特征,使得除手术切除外的大多数治疗

方案基本无效^[2]。近年来,铑(Rh)纳米粒子作为光敏剂增强肿瘤的光热疗法和光动力疗法受到越来越多的关注^[3-4]。然而,铑纳米粒子应用于临床仍然需要克服疏水性及金属纳米在体循环内代谢产生的副作用等局限性。水凝胶作为一种安全性高、生物相容性好的纳米药物载体能够有效递送药物,最大程度减少药物的副作用^[5]。该研究旨在构建能够负载铑纳米粒子的复合水凝胶,并研究其对于胰腺癌细胞的杀伤作用,为进一步开发新的抗胰腺癌药物提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂 噻唑蓝(methyl thiazolyl retrazolium, MTT)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;人原位胰腺腺癌细胞(BxPC-3)、人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)细胞株购自上海细胞库;三水合氯化铑(III)(RhCl₃·3H₂O, 99%)、甲氧基聚乙二醇硫醇(PEG-SH, Mw = 2 000)、三乙胺、四氢呋喃、异丙醇、硼氢化钠(NaBH₄, 98%)、二甲亚砜(DMSO, ≥99.0%)、二溴聚乙二醇、N-异丙基丙烯酰胺、N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺、氯化亚铜和 H₂O₂ (30%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Rh-PEG 的制备 通过水相还原方法合成铑纳米颗粒。首先将 30 mg RhCl₃·3H₂O 和 20 mg PEG-SH 完全溶解在 50 ml 去离子水中,然后逐滴添加 NaBH₄水溶液(2 mg/ml, 5 ml),不断搅拌。还原反应在室温下 10 min 完成。反应后,将混合物转移至透析袋(Mw:3 500 D)中并在去离子水中透析 2 d。冻干后得到 Rh-PEG NPs 粉末。

1.2.2 复合水凝胶 NRP 的制备 取 0.2 g 二溴聚乙二醇溶解在 6 ml 异丙醇/水(体积比为 95/5)混合溶剂中,放入至聚合瓶,然后加入 2.5 g N-异丙基丙烯酰胺、0.2 g N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺、28.6 mg 氯化亚铜,充分溶解,通入氮气保护,在 3 次冻融循环后,通过微量注射器注射 94 μl 的三[2-(甲基氨基)乙基]胺开始聚合。室温下反应 72 h,所得产物

2024-01-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31870993)

作者单位:¹中国科学技术大学附属第一医院消化内科,合肥 230001

²宿松县中医院脾胃病科,安庆 246000

作者简介:王宁薇,女,硕士研究生;

余 跃,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: yuyuemd@ustc.edu.cn

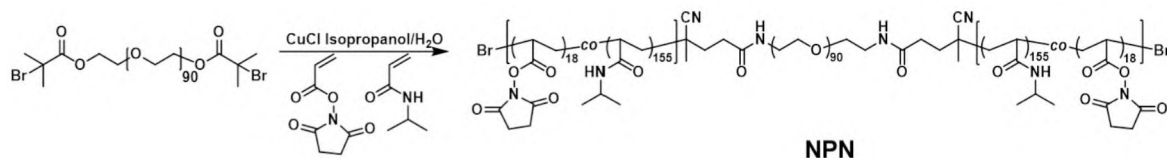


图1 水凝胶材料 NPN 的合成路线

经铝柱分离(洗脱液为四氢呋喃)、透析(再生纤维素透析袋 $M_w:4\ 000\ D$)、冻干(冻干温度 $-60\ ^\circ\text{C}$)后,获得聚 N-异丙基丙烯酸酰胺- N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺-聚乙二醇- N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺-N-异丙基丙烯酸酰胺共聚物(简称为 NPN)。NPN 合成路线示意图见图 1。称取适量 NPN 固体粉末溶解在 $4\ ^\circ\text{C}$ 的生理盐水中,之后,在充分溶解的 NPN 溶液中加入 PEG 修饰的 Rh 纳米制备成水凝胶预混液,将样品放入 $37\ ^\circ\text{C}$ 热水中升温至凝胶态,制备复合水凝胶命名为 NPN + Rh-PEG NPs (NRP)。

1.2.3 复合水凝胶 NRP 的表征 首先对 Rh-PEG NPs 进行表征。制取新的 Rh-PEG 分散液去离子水稀释至适当浓度,逐滴滴在碳膜铜网上,静置 60 min,待铜网干燥后对样品使用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)检测其形貌特征。另取适量分散液转移到石英比色皿中,使用动态光散射仪(dynamic light scattering, DLS)进行粒径测试, $25\ ^\circ\text{C}$ 恒温条件下进行。之后对复合水凝胶 NRP 进行表征。将 2 ml 上述复合水凝胶 NRP 放入液氮中,3 min 冷冻完全后取出。将冷冻样品放入真空冷冻干燥机中, $-60\ ^\circ\text{C}$ 冷冻干燥 48 h。将冷冻干燥后的样品使用电子扫描显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察样品截面形貌,并使用扫描电镜能谱(energy dispersive spectromete, EDS)对样品的元素分布进行表征。

1.2.4 复合水凝胶 NRP 的催化性能检测 通过使用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)作为指示剂,来探讨不同浓度的复合水凝胶 NRP 和 NPN 在 808 nm NIR 照射条件下产生 ROS 的效率。制备浓度为 5、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的复合水凝胶,NIR 照射 5 min, TMB 溶液室温孵育过夜,用紫外可见分光光度计(ultraviolet-visible spectrophotometer, UV-vis)测量溶液的紫外吸收情况。使用硫酸钛和 H_2O_2 生成过氧化物-钛复合物黄色沉淀,溶解于稀硫酸后,可在波长 412 nm 处测定。在一定范围内,其颜色深浅与反应剩余的 H_2O_2 浓度呈线性关系。分析有无 808 nm NIR 照射条件

下复合水凝胶 NRP 催化 H_2O_2 分解的效率。

1.2.5 复合水凝胶 NRP 的光热性能检测 为了阐明 NRP 的光热效应,按照上述流程制备纳米粒子浓度为 0、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的复合水凝胶 NRP。将制备好的 1 ml 复合水凝胶装入 1.5 ml 的离心管中,然后在功率密度为 $1\ \text{W}/\text{cm}^2$ 的 808 nm NIR 激光下照射 5 min,用热成像仪(Fluke Ti400)记录温度变化,并截取时间点分析。为了进一步评估激光功率对光热性能的影响,使用功率为 0.5、1.0、1.5、2.0 W/cm^2 的 NIR 照射粒子浓度 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的复合水凝胶 NRP 并记录实时温度变化。相同步骤制备纳米粒子浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品,将离心管放置在 808 nm NIR 中照射 5 min,当温度趋于稳定时停止激光,等待样品在室温下自然冷却,重复 5 个循环。激光照射运行参数设置为 $1\ \text{W}/\text{cm}^2$ 。使用热成像仪(Fluke-Ti400)对整个实验过程中样品温度的变化进行摄像记录,对数据进行分析处理。

1.2.6 细胞培养 人源胰腺癌 BxPC-3 细胞置于 RPMI-1640 培养基中培养,RPMI-1640 培养基中添加 10% 胎牛血清、50 U/ml 青霉素和 50 U/ml 链霉素。细胞在 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的无菌恒温培养箱中繁衍及扩增。HUVECs 在 DMEM 完全培养基中培养,细胞在 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的无菌恒温培养箱中繁衍及扩增。当培养皿中的细胞密度达到 70% ~ 80% 时,进行细胞的传代。

1.2.7 复合水凝胶 NRP 的杀伤作用检测 NRP 对 BxPC-3 细胞的杀伤作用检测分为以下 3 部分。① 将 BxPC-3 细胞接种于 96 孔板中(1×10^4 个/孔),实验分为 5 组:NRP 浓度分别为 0、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$,进行 $1\ \text{W}/\text{cm}^2$ 的 808 nm NIR 照射 5 min 或不进行光照,其余孔内加入等量完全培养基作为空白对照。在孵育 48 h 后,每孔加入 20 μl 的 MTT 溶液(5 mg/ml)。继续孵育 4 h 后,用细针头小心去除旧培养基,加入 150 μl 二甲亚砜,溶解后在酶标仪上测定 490 nm 处的吸光度(absorbance, A),并计算细胞存活率。细胞存活率的计算公式为:细胞存活率 = (药物细胞组 A 值 - 空白对照组 A 值)/(不加

药细胞组 A 值 - 空白对照组 A 值) $\times 100\%$ 。② 将 BxPC-3 细胞接种于另一 96 孔板 (1×10^4 个/孔), 实验分为 5 组: Rh-PEG 浓度分别为 0、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$, 进行 1 W/cm^2 的 808 nm NIR 照射 5 min。MTT 检测步骤及细胞存活率计算同上。③ 在 6 孔板中进行活 - 死细胞染色实验, 将 BxPC-3 细胞接种于 6 孔板中 (1×10^6 个/孔), 实验分为 4 组: PBS(无光照)、复合水凝胶 NRP(无光照)、Rh-PEG 溶液(光照)、NRP(光照)。孵育 48 h 后弃去旧培养基, 加入含有碘化丙啶 ($10 \mu\text{mol/L}$) 和荧光素二乙酸酯 ($5 \mu\text{mol/L}$) 的 RPMI-1640 孵育 10 min, 用倒置荧光显微镜观察各组细胞荧光并拍照记录。

1.2.8 复合水凝胶 NRP 的安全性检测 复合水凝胶 NRP 的安全性检测分为以下 2 部分。① 在 96 孔板中, 接种处于对数生长期的 HUVECs (1×10^4 个/孔), 实验分为 5 组: 40 $\mu\text{g/ml}$ 复合水凝胶 NRP(光照)、40 $\mu\text{g/ml}$ 复合水凝胶 NRP(无光照)、80 $\mu\text{g/ml}$ 复合水凝胶 NRP(光照)、80 $\mu\text{g/ml}$ 复合水凝胶 NRP(无光照)、等量完全培养基(无光照), 进行 1 W/cm^2 的 808 nm NIR 照射 5 min 或不进行光照。培养 48 h, 分别在选定的时间点进行细胞存活率的计算, MTT 法检测及存活率计算方式同上。② 使用小鼠全血进行血液相容性测试。5 只 6~8 周龄 20 g 的 BALB/c 雄性小鼠, 购自北京维通利华生物科技有限公司, 饲喂标准小鼠食物。所有程序经中国科学

技术大学附属第一医院实验动物伦理委员会批准 [批准号: 2024-N(A)-008], 麻醉后眼眶取血。将待测试的样品分为 6 组, 即 10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$ 复合水凝胶 NRP、阴性对照组和阳性对照组。每组依次向 5 ml 离心管内加入 500 μl 复合水凝胶、生理盐水和去离子水; 然后依次再加入 50 μl 的小鼠全血和 4 ml 的生理盐水, 每组重复 3 次。去离子水为阳性对照, 生理盐水为阴性对照。孵育 1 h 后, 2 000 r/min 离心 5 min, 取所有样品 0.5 ml 上清液, 用紫外可见分光光度计测量紫外吸收情况, 并分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 进行统计分析, 两组间均数比较采用 *t* 检验, 3 组及以上均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复合水凝胶 NRP 的表征 TEM 结果显示, Rh-PEG 表现为颗粒结构, 粒径在 10 nm 左右, 见图 2A、B。电子扫描显微镜结果显示, 冻干后的复合水凝胶内部呈现出典型的疏松孔道样结构, 见图 2C。能量色光谱仪 (EDS) 元素分析结果显示, 铈元素均匀分布在复合水凝胶内部, 见图 2D。

2.2 复合水凝胶 NRP 的催化性能 UV-vis 结果表明, 在 808 nm NIR 照射下, 当 Rh-PEG 纳米粒子浓度为 5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$ 时复合水凝胶 NRP 催

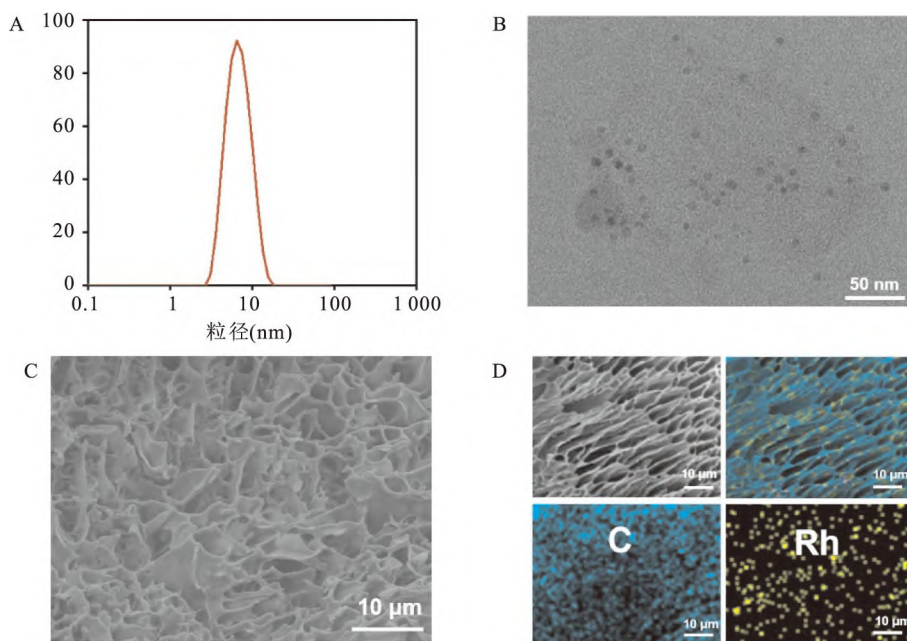


图 2 复合水凝胶 NRP 的表征

A: Rh-PEG 的水合粒径分布; B: Rh-PEG 的透射电镜图像 $\times 50\,000$; C: 复合水凝胶的冷冻电镜扫描图像 $\times 5\,000$; D: 复合水凝胶的元素分布图 $\times 5\,000$

化产生 ROS 能力增强,生成 ROS 的能力分别是相同条件下 NPN 的 4.1、7.4、9.4、10.5 和 19.6 倍($P < 0.05$),见图 3A。相同浓度条件下,808 nm NIR 照射能够有效增强复合水凝胶 NRP 催化 H_2O_2 分解的能力,见图 3B。

2.3 复合水凝胶 NRP 的光热性能 升温结果表明,在相同浓度下,复合水凝胶的光热升温能力随着激光功率的增大而增强。当激光器功率为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 W/cm^2 时,40 $\mu g/ml$ 复合水凝胶 808 nm NIR 持续照射 5 min 后,温度分别从 20 $^{\circ}C$ 环境温度升高至 23.0、36.5、47.7、49.3、61.2 $^{\circ}C$,见图 4A。光热性能研究实验表明,其光热效果具有明显的浓度依赖性。在激光功率 1 W/cm^2 条件下,复合水凝胶的光热升温能力随着浓度的增大而增强。浓度为 0、10、20、40、80 $\mu g/ml$ 时 808 nm NIR 持续照射 5 min 后,温度分别从 20 $^{\circ}C$ 环境温度升高至 23.0、34.6、42.5、47.3、58.9 $^{\circ}C$,见图 4B。同时,浓度为 40 $\mu g/ml$ 激光功率 1 W/cm^2 条件下,复合水凝胶的光热升温在 5 个循环内保持稳定,见图 4D。光热转换效率约为 38.2%,见图 4C。

2.4 复合水凝胶 NRP 对 BxPC-3 细胞的杀伤情况

当纳米粒子浓度为 0、10、20、40、80 $\mu g/ml$ 时,加入复合水凝胶 NRP 经过 808 nm NIR 照射 5 min 或不照射后孵育 48 h,MTT 法检测光照或无光照条件下不同浓度的复合水凝胶对 BxPC-3 细胞的杀伤能力,除了纳米粒子浓度为 0 $\mu g/ml$ 时,其他浓度下光照后 BxPC-3 细胞的存活率显著低于同纳米粒子浓度下不光照的 BxPC-3 细胞的存活率,见图 5。活-死细胞染色结果见图 6,NRP + 光照组显示最明亮的红色荧光,而 NRP 无光照组仅显示出少量红色荧

光,证明复合水凝胶 NRP 在 808 nm NIR 照射 5 min 后对细胞的杀伤效果较强。

2.5 复合水凝胶 NRP 的安全性 复合水凝胶 NRP 浓度为 80 $\mu g/ml$ 时,与 HUVECs 共孵育 48 h 后,未经 808 nm NIR 照射细胞存活率高达 97.7%,在 808 nm 激光照射后,存活率仅为 9.3% ($P < 0.05$)。见图 7A。溶血实验表明,各分组浓度的复合水凝胶 NRP 与生理盐水组的结果差异均无统计学意义,未引起小鼠红细胞溶血。见图 7B。

3 讨论

近年来,光疗(即光动力疗法或光热疗法)已成为癌症有效的替代或补充治疗方案^[6]。铈已被证明是一种安全有效的抗肿瘤药物,例如铈纳米、二聚 Rh(II)化合物和 Rh(I)或 Rh(III)衍生物^[7]。铈纳米粒子具有良好的光热性能和光催化性能,且具备金属纳米固有的化疗毒性,其抗肿瘤效应已在部分肿瘤治疗中得到了应用^[8]。水凝胶作为局部联合治疗的平台,有望解决传统的静脉给药和免疫治疗对胰腺癌治疗效果较差的困境^[9]。因此,将安全性高的水凝胶和铈纳米药物相结合制备的复合水凝胶能够有效联合光动力和光热治疗,充分发挥纳米粒子的抗肿瘤作用。

本研究制备了负载有铈纳米的 NRP。研究结果表明铈纳米分散性良好且尺寸均一,NRP 内部结构疏松多孔。Liu et al^[10] 研究证明胰腺癌细胞中存在较正常细胞过量的 H_2O_2 ,并且这种失调会直接或间接地促进肿瘤细胞的增殖及恶性转化,降低细胞微环境中的 H_2O_2 能够增强细胞的杀伤作用。众所周知 ROS 是光动力疗法中杀伤肿瘤所必需的,

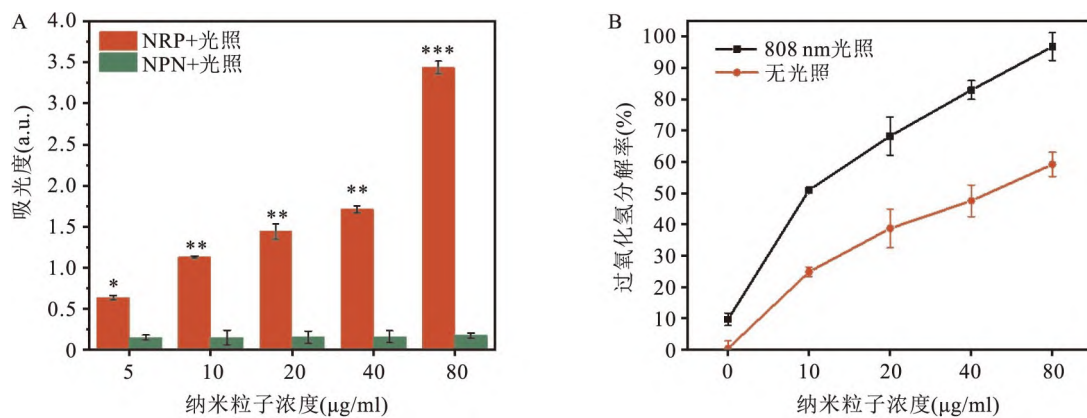


图3 复合水凝胶的催化性能

A: 复合水凝胶的催化产生 ROS 能力; B: 有光照和无光照条件下复合水凝胶 NRP 的 H_2O_2 分解能力; 与同纳米粒子浓度 NPN + 光照组比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

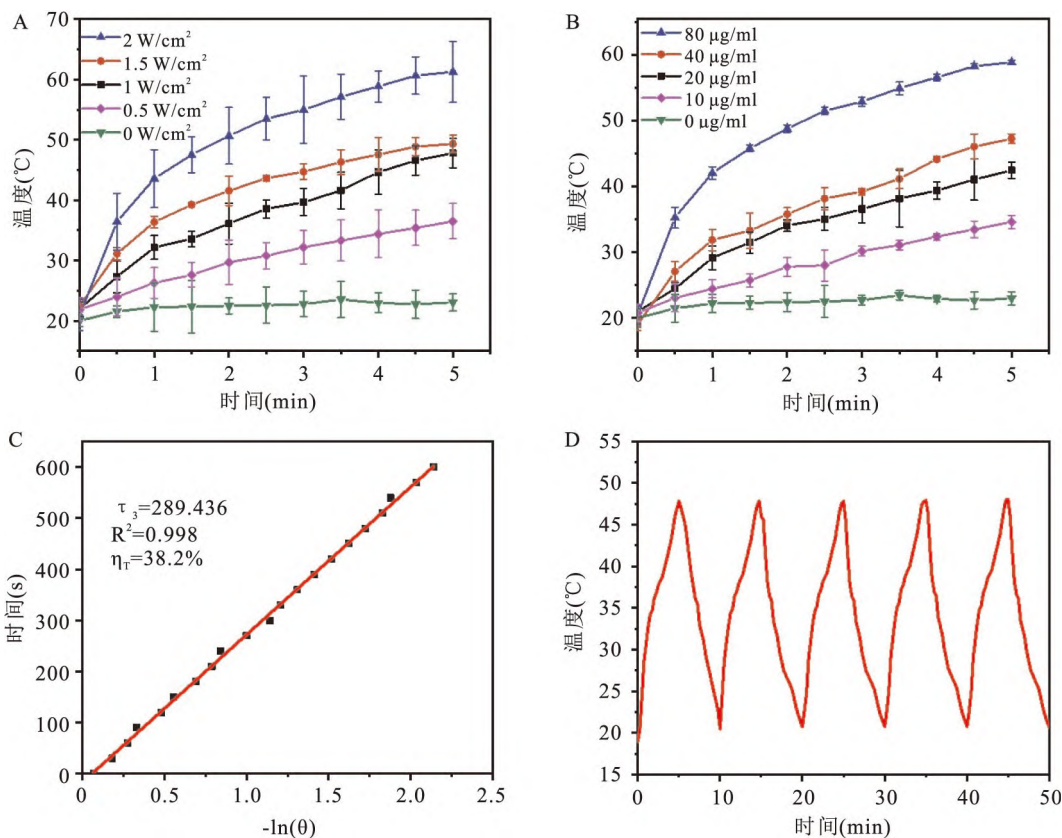


图4 复合水凝胶的光热性能

A: 40 µg/ml 复合水凝胶 NRP 在不同功率 808 nm NIR 照射下光热性能; B: 不同浓度的复合水凝胶在 808 nm NIR 照射下光热性能(激光功率 1 W/cm²); C: 从冷却周期计算的传热时间常数; D: 40 µg/ml 复合水凝胶 NRP 在功率强度为 1 W/cm² 的 808 nm NIR 激光照射下, 5 次循环的加热曲线

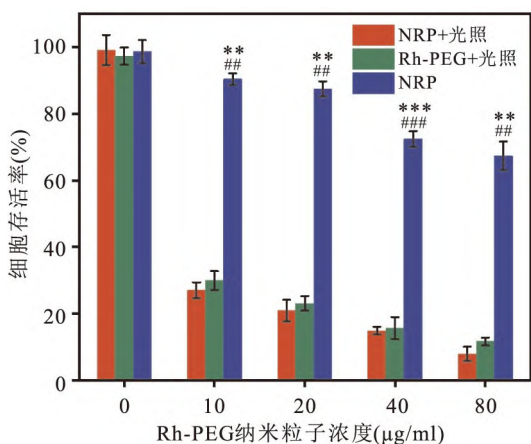


图5 复合水凝胶的细胞杀伤能力

与光照条件下同浓度的 Rh-PEG 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与光照条件下同浓度的 NRP 比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

ROS 水平升高会激活肿瘤细胞内诱导凋亡的信号通路。故此进行 NRP 的光催化性能研究, 结果表明, 其光催化产生 ROS 的效果具有明显的浓度依赖性, 808 nm NIR 照射能够有效增强其催化 H₂O₂ 分

解的能力, 这可能是由于光照增强了 NRP 的催化作用也可能与其光热性能有关, 使得 H₂O₂ 加速分解^[11]。

此外, 本研究结果也表明, NRP 的光热效果具有明显的浓度依赖性和功率依赖性。光热循环实验证明所合成的复合水凝胶光热性能稳定。在 808 nm NIR 照射下, BxPC-3 细胞的存活率随着 NRP 内纳米粒子浓度的增加而下降, 可能是由于金属纳米的肿瘤化疗作用, 无光照条件下也能够发挥一定的杀伤作用, 但是杀伤作用弱于 808 nm NIR 照射后。活-死细胞染色结果证明, NRP 在 NIR 光照下杀伤能力强, 而相同条件无光照情况下细胞杀伤效果较弱。生物相容性评估表明 NRP 在无光照条件下无明显毒性, 且不会导致溶血, 具有良好的生物安全性。

传统的金属纳米药物发挥作用的途径是通过静脉注射后的高渗透长滞留效应被动靶向聚集在肿瘤组织内, 虽然能够一定程度上提高药物在肿瘤组织中的有效浓度, 但是近年来的研究^[12] 结果表明, 由

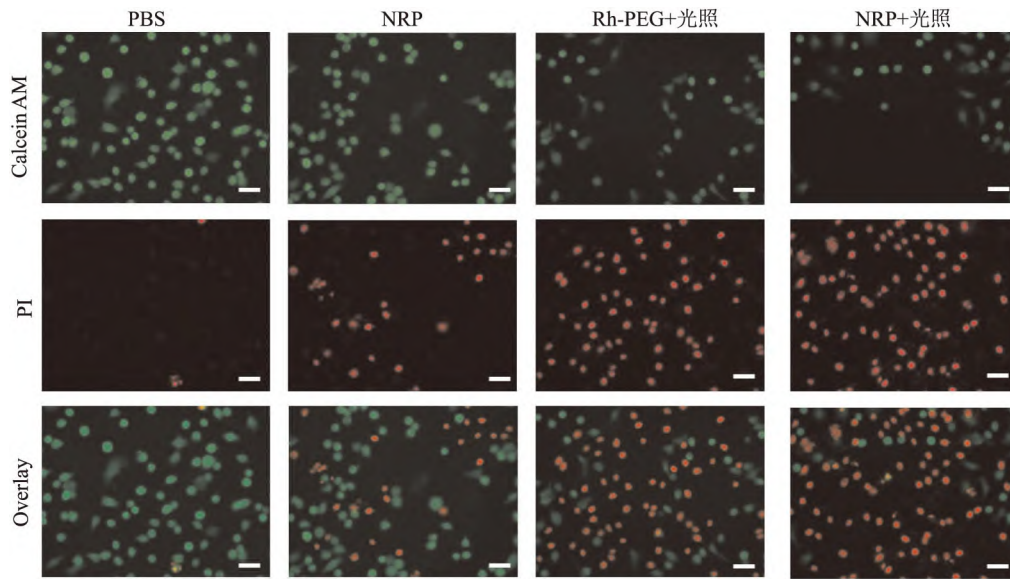


图6 活-死细胞染色法检测复合水凝胶对 BxPC-3 细胞的杀伤作用 ×500

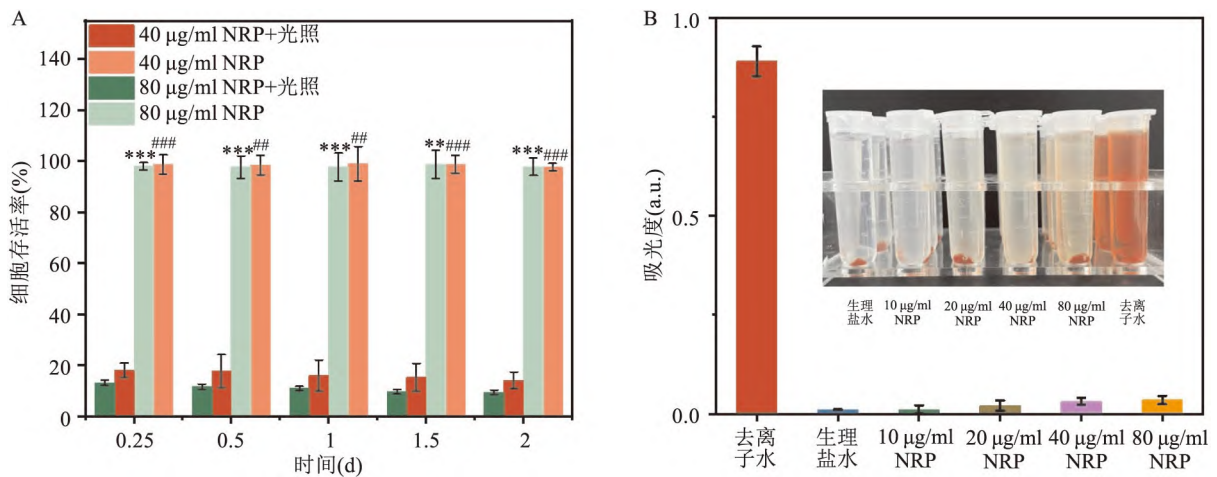


图7 复合水凝胶的安全性

A: MTT 法检测不同浓度水凝胶共培养下 HUVECs 的存活率; B: 复合水凝胶的溶血分析; 与光照条件下 80 μg/ml NRP 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与光照条件下 40 μg/ml NRP 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

于单核吞噬系统和肾脏系统的隔离或清除,最终到达肿瘤部位的纳米药物不超过注射剂量的 1%。而且,胰腺癌特殊的肿瘤微环境进一步限制了纳米药物到达肿瘤部位,致密的肿瘤基质、匮乏的肿瘤内血供以及较高的肿瘤内组织液压强均极大地阻碍了纳米药物向肿瘤组织内部的递送^[13]。此外,大于 6 nm 的纳米颗粒不能被很快清除,并可能积聚在不同的器官中,导致潜在的毒性^[14]。复合水凝胶局部治疗有望解决纳米药物全身给药的缺点。复合水凝胶既可以实现同样的纳米粒子杀伤癌细胞的作用,又可以避免药物的全身循环,减少所需药物的剂量和脱靶效应,降低全身副作用。

参考文献

[1] 马丹丹, 张 翌, 林振宇, 等. PRC1 在胰腺癌中的细胞生物学功能及临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(2): 189-95.

[2] Duan H, Li L, He S. Advances and prospects in the treatment of pancreatic cancer[J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18:3973-88.

[3] Younis M, Wu Y, Fang Q, et al. Synergistic therapeutic antitumor effect of PD-1 blockade cellular vesicles in combination with Igaratimod and Rhodium nanoparticles [J]. J Colloid Interface Sci, 2023, 649:929-42.

[4] Kang S, Shin W, Choi M, et al. Morphology-controlled synthesis of rhodium nanoparticles for cancer phototherapy[J]. ACS Nano, 2018, 12(7):6997-7008.

- [5] Wang D, Li H, Wang D, et al. Supramolecular coassembled peptide hydrogels for efficient anticancer therapy by RNS-based PDT and immune microenvironment regulation [J]. *Macromol Biosci*, 2022, 22(12):e2200359.
- [6] Yan T, Alimu G, Zhu L, et al. PpIX/IR-820 dual-modal therapeutic agents for enhanced PDT/PTT synergistic therapy in cervical cancer [J]. *ACS Omega*, 2022, 7(49): 44643–56.
- [7] Liu F, Chen W, Ma L, et al. Assembly of fluorinated benzodiazepines *via* Rh(III)-catalysed [5 + 2] annulation of N-benzimidazole indolines with 2,2-difluorovinyl tosylate [J]. *New J Chem*, 2023, 47(27): 12589–94.
- [8] Machuca A, Garcia-Calvo E, Anunciação D S, et al. Rhodium nanoparticles as a novel photosensitizing agent in photodynamic therapy against cancer [J]. *Chemistry*, 2020, 26(34):7685–91.
- [9] Li X, Xu X, Xu M, et al. Hydrogel systems for targeted cancer therapy [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11:1140436.
- [10] Liu Q, Ge W, Martínez-Jarquín S, et al. Mass spectrometry reveals high levels of hydrogen peroxide in pancreatic cancer cells [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2023, 62(19): e202213703.
- [11] Wu F, Zhang Q, Sun B, et al. MoO₃-x nanosheets-based platform for single NIR laser induced efficient PDT/PTT of cancer [J]. *J Control Release*, 2021, 338:46–55.
- [12] Wu D, Shi X, Zhao F, et al. An injectable and tumor-specific responsive hydrogel with tissue-adhesive and nanomedicine-releasing abilities for precise locoregional chemotherapy [J]. *Acta Biomater*, 2019, 96:123–36.
- [13] Stopa K B, Kusiak A A, Szopa M D, et al. Pancreatic cancer and its microenvironment—recent advances and current controversies [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9):3218.
- [14] Domingues C, Santos A, Alvarez-Lorenzo C, et al. Where is nano today and where is it headed? A review of nanomedicine and the dilemma of nanotoxicology [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(7):9994–10041.

Killing effect of composite hydrogel containing Rhodium nanoparticles on pancreatic cancer BxPC-3 cells

Wang Ningwei¹, Zhang Cong¹, Liu Gang², Yu Yue¹

(¹*Division of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001*; ²*Dept of Spleen and Stomach, Susong County Traditional Chinese Medicine Hospital, Anqing 246000*)

Abstract *Objective* To investigate the killing effect of Rhodium nanoparticles loaded composite hydrogel NPN + Rh-PEG NPs (NRP) on pancreatic cancer BxPC-3 cells. *Methods* Block copolymers were synthesized using atom transfer radical polymerization (ATRP), followed by the synthesis of PEG-modified Rhodium nanoparticles through an aqueous method. A premixed solution was prepared by ultrasonication and then heated to synthesize the composite hydrogel NRP loaded with nanoparticles. It was then characterized and its catalytic properties were verified. The morphology of Rhodium nanoparticles and the composite hydrogel NRP was characterized by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. The thermal imaging instrument was used to detect the photothermal properties of the composite hydrogel NRP, and then the growth inhibitory effect on BxPC-3 cells was observed using the MTT and live-dead staining methods. Finally, its biological safety was verified using MTT and blood compatibility testing. *Results* Rh-PEG with a particle size of about 10 nm was successfully prepared. The composite hydrogel showed porous structure under cryo scanning electron microscope, and Rhodium was evenly distributed in the composite hydrogel. Under the irradiation of 808 nm near-infrared light (NIR) with a laser power of 1 W/cm², the ability of 80 μg/ml NRP to generate reactive oxygen species (ROS) was 19.6 times that of pure hydrogel (NPN) ($P < 0.05$). Under light conditions, the catalytic decomposition rate of hydrogen peroxide was as high as 96.8%. Under the irradiation of 808 nm NIR with a laser power of 1 W/cm², the temperature of 80 μg/ml NRP could rise to 58.9 °C within 5 minutes. MTT results showed that the survival rate of BxPC-3 cells was the lowest, only 14.8%, after 40 μg/ml NRP was irradiated with 1 W/cm² of 808 nm NIR. The results of live dead cell staining proved that the cell killing effect of 40 μg/ml NRP under light irradiation was stronger than that without 808 nm NIR irradiation. *Conclusion* The composite hydrogel NRP uniformly loaded with Rhodium nanoparticles can effectively enhance the killing effect on pancreatic cancer BxPC-3 cells.

Key words Rhodium nanometer; hydrogel; reactive oxygen species; pancreatic cancer