

# 超高含量的 $\alpha$ -酮戊二酸和谷胱甘肽促成 HeLa 细胞耐受纳米银

陈鹤鸣<sup>1#</sup>, 何雨婧<sup>1#</sup>, 陈学情<sup>1</sup>, 邓富昌<sup>2</sup>, 鲁志松<sup>3</sup>, 刘英帅<sup>3</sup>, 杜华茂<sup>1\*</sup>

1 西南大学蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715

2 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所, 北京 100021

3 西南大学材料与能源学院, 重庆 400715

陈鹤鸣, 何雨婧, 陈学情, 邓富昌, 鲁志松, 刘英帅, 杜华茂. 超高含量的  $\alpha$ -酮戊二酸和谷胱甘肽促成 HeLa 细胞耐受纳米银[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4189-4203.

CHEN Heming, HE Yujing, CHEN Xueqing, DENG Fuchang, LU Zhisong, LIU Yingshuai, DU Huamao. Silver nanoparticles-resistance of HeLa cell associated with its unusually high concentration of  $\alpha$ -ketoglutarate and glutathione[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4189-4203.

**摘要:** 纳米银(silver nanoparticles, AgNPs)兼有优良的抗菌和抗癌作用, 但病原体或癌细胞对其的耐受作用将影响其临床应用, 前者耐受纳米银已见报道。本研究以 HeLa 细胞为模型, 探讨癌细胞耐受纳米银的可能性及耐受机制。将 HeLa 细胞代谢物与纳米银混合后测定其抗菌活性和细胞毒性变化, 并用紫外-可见(ultraviolet visible, UV-Vis)分光光度计、粒度仪和透射电镜等检测混合体系中纳米银的理化特征。用非靶向代谢组学分析纳米银结合的代谢物种类, 经腹腔注射 HeLa 细胞建立荷瘤小鼠, 并分析血清对纳米银稳定性的影响。结果表明 HeLa 细胞代谢物可抑制纳米银的抗癌和抗菌作用, 这种抑制作用表现出剂量依赖性, 对纳米银生物学活性产生抑制作用的效应代谢物耐热、不溶于氯仿、含硫元素, 分子量小于 1 kDa。抑制作用的实质是使纳米银发生了聚集, 筛选得到有 115 种代谢物能结合纳米银。进一步探究发现仅当  $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutarate, AKG)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)的浓度共同达到一定阈值才导致纳米银聚集, 而 HeLa 细胞代谢物中两者的浓度分别是正常宫颈上皮细胞的 10 倍和 6 倍, 达到了该阈值。动物实验结果显示荷瘤小鼠血清导致纳米银聚集率显著高于健康鼠血清( $P<0.05$ )。本研究揭示 HeLa 细胞中具有超常含量的  $\alpha$ -酮戊二酸和谷胱甘肽, 两者协同破坏纳米银的胶体稳定性, 从而实现逃逸纳米银的抗癌作用。

**关键词:** 纳米银; 癌细胞; 耐药性; 代谢组学; 胶体稳定性

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: duhmao@swu.edu.cn

Received: 2023-01-13; Accepted: 2023-05-23; Published online: 2023-05-26

# Silver nanoparticles-resistance of HeLa cell associated with its unusually high concentration of $\alpha$ -ketoglutarate and glutathione

CHEN Heming<sup>1#</sup>, HE Yujing<sup>1#</sup>, CHEN Xueqing<sup>1</sup>, DENG Fuchang<sup>2</sup>, LU Zhisong<sup>3</sup>,  
LIU Yingshuai<sup>3</sup>, DU Huamao<sup>1\*</sup>

1 College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 National Institute of Environmental Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China

3 School of Materials and Energy, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Silver nanoparticles (AgNPs) is known as one of the most valuable metal nanoparticles in antibacterial and anticancer application. AgNPs-resistant bacteria has been documented, but it is unclear whether cancer cells can also escape the anti-cancer effect of AgNPs. In this study, we aimed to investigate this phenomenon and its underlying mechanism. The antibacterial activity and cytotoxicity of AgNPs were measured in the presence of HeLa cell metabolites. The status of AgNPs in the system associated with metabolites were characterized by UV-Vis, Zetasizer Nano ZS, and transmission electron microscopy. Non-targeted metabolomics was used to reveal the metabolites components that bind with AgNPs. HeLa cells were injected intraperitoneally to establish the tumor-bearing mice model, and the stability of AgNPs in mice serum was analyzed. The results manifested that HeLa cell metabolites inhibited the anticancer and antibacterial effects of AgNPs in a dose-dependent manner by causing AgNPs aggregation. Effective metabolites that inhibited the biological activity of AgNPs were stable in 100 °C, insoluble in chloroform, containing sulfur elements, and had a molecular weight less than 1 kDa in molecular weight. There were 115 compounds bound with AgNPs. *In vitro* experiments showed that AgNPs aggregation occurred only when the concentration of  $\alpha$ -ketoglutarate (AKG) and glutathione (GSH) together reached a certain threshold. Interestingly, the concentration of AKG and GSH in HeLa cellular metabolites was 10 and 6 times higher than that in normal cervical epithelial cells, respectively, which explained why the threshold was reached. Furthermore, the stability of AgNPs in the serum of tumor-bearing mice decreased by 20% ( $P < 0.05$ ) compared with the healthy mice. In conclusion, our study demonstrates that HeLa cells escaped the anti-cancer effect of AgNPs through the synergistic effect of AKG and GSH, suggesting the need to develop strategies to overcome this limitation.

**Keywords:** silver nanoparticles; cancer cells; drug-resistance; metabolomics; colloidal stability

银、金、钛和铜等金属或其氧化物的纳米粒子具有良好的抗癌、抗菌作用，其作用机制有刺激产生活性氧(active oxygen species, ROS)、激活 caspase-3、增加线粒体外膜的通透性和 DNA

断裂等<sup>[1-2]</sup>。纳米银对多种类型的癌细胞有杀灭作用，包括 HeLa、HCT-116、A549、MCF-7 以及 HepG-2 等， $IC_{50}$  值在 50–250  $\mu\text{g/mL}$  之间<sup>[3]</sup>，抗癌作用的差异除了癌细胞的种类有关外，还

受纳米银尺度与形态、表面修饰及所采用的实验方法等的影响。Swanner 等<sup>[4]</sup>报道纳米银能选择性作用于癌细胞,三阴性乳腺癌细胞经纳米银处理 48–72 h 后死亡,而正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 未受明显影响。纳米银的抗癌作用研究还处于细胞和类器官水平<sup>[1–5]</sup>,少有动物实验和临床前实验,因此,纳米银的体内抗癌作用尚不清楚。

纳米药物因为增强高渗透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)容易在实体瘤中蓄积,在肿瘤微环境中纳米药物的稳定性依然是发挥药效的前提,聚集或团聚将极大影响其功效。肿瘤微环境的低 pH 值、低渗透性和高还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)特征已成为纳米药物载体的设计思路<sup>[6]</sup>,但癌细胞代谢物对纳米银抗癌作用的影响及其在实体瘤中的抗癌作用还未见报道。

本研究将 HeLa 细胞代谢物按不同比例与纳米银混合,结果显示其抗菌作用、抗癌作用均降低,经能谱仪(energy disperse spectroscopy, EDS)分析、差异代谢组学等研究表明 HeLa 细胞代谢物中  $\alpha$ -酮戊二酸、异柠檬酸、谷胱甘肽等小分子严重影响纳米银的稳定性,使其丧失抗菌、抗癌等生物学功能,据此,首次报道癌细胞耐受纳米银的一种新机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料

聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)、芦丁购自生工生物工程股份有限公司,硝酸银( $\text{AgNO}_3$ )购自成都科龙化工试剂厂。大肠杆菌(*Escherichia coli*) K-12 BW25113 购自大肠杆菌遗传储存中心(the Coli Genetic Stock Center), HeLa 宫颈癌细胞由中山大学李颂扬博士惠赠。HCerEpic 细胞购自青旗(上海)生物技术发展有

限公司。GSH 购于上海瑞永生物科技有限公司,  $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutarate, AKG)购于上海毕得医药股份有限公司,异柠檬酸(isocitric acid, ICA)购于上海麦克林生化科技股份有限公司。CellTiter-Lumi<sup>TM</sup> Plus 发光法细胞活力检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。本研究所用无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 BALB/c nude 小鼠,体重 18–22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,在西南大学药学院实验动物中心饲养。

### 1.2 纳米银的合成和表征

按文献 [7] 在常温合成纳米银。用 Nanodrop2000 (Thermo Scientific)进行全波长扫描检测 AgNPs 的特征吸收峰,激光粒度仪分析粒度分布和  $\zeta$  电位(the Malvern zetasizer nano ZS),透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM, HITACHI)表征尺寸和形状。

### 1.3 纳米银的抗癌作用

#### 1.3.1 纳米银对 HeLa 细胞的细胞毒性

将  $2 \times 10^4$  个 HeLa 细胞接种于 96 孔板,生长 24 h 后用 PBS 洗涤 2 次,在无血清达尔伯克必需基本培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养条件下用 40、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs 分别处理 2 h 和 12 h,设无纳米银对照,每个处理设 3 个重复孔。用 Cell Titer-Lumi<sup>TM</sup> 试剂盒测定 ATP 水平以评价细胞存活率,实验重复 3 次。细胞存活率计算公式为:细胞存活率(%)=(样品发光值-本底发光值)/(对照组发光值-本底发光值) $\times 100$ 。

#### 1.3.2 HeLa 代谢物对纳米银的细胞毒性的影响

HeLa 细胞的准备同 1.3.1, PBS 洗涤后加入 100  $\mu\text{L}$  无血清 DMEM 培养基,于 37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下放置 0、2、4、6 h 和 8 h 后再加入 100  $\mu\text{L}$  360  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs,继续孵育 2 h 后,按上述方法检测 ATP 水平并计算细胞存活率。每

组重复 3 孔, 实验重复 3 次。

#### 1.4 HeLa 细胞代谢物对纳米银和双氧水抗菌作用的影响

在不换细胞培养液的情况下发现纳米银的抗癌作用降低, 检测其对抗菌作用的影响。按文献[8]测定纳米银对  $10^5$  CFU/mL *E. coli* 的最低抑制浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。取 1.3.2 中 5 个时间点的细胞培养液与 360  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs 等体积混合后加入  $2 \times 10^5$  CFU/mL *E. coli*, 于 4 h 内连续测定活细菌数。另外, 在长满单层 HeLa 细胞中加无血清 DMEM 培养基孵育 12 h, 取该培养液分别按 5%、10%、15%、20%和 25%加入 360  $\mu\text{g/mL}$  PVP-AgNPs 胶体溶液中, 加入  $2 \times 10^5$  CFU/mL *E. coli* 后测定 4 h 内的活菌数。绘制 2 种处理情况下 *E. coli* 的存活曲线。

考虑到纳米银抗菌的重要机制是产生活性氧, 进一步比较了 HeLa 细胞代谢物对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的影响。将 HeLa 细胞 12 h 的代谢液与 16 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  混合, 测定 *E. coli* 存活曲线。

#### 1.5 HeLa 代谢物对纳米银的稳定性的影响

上述研究发现 HeLa 细胞代谢物抑制纳米银的抗菌和抗癌作用, 但不抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  的抗菌活性, 故猜测其影响纳米银的稳定性。将 HeLa 细胞代谢物与 AgNPs 混合(终浓度 100  $\mu\text{g/mL}$ ), 用 Nanodrop 检测纳米银 12 h 内的紫外-可见(ultraviolet visible, UV-Vis)吸收光谱。为了解使纳米银聚集的代谢物组分的化学性质, 将代谢物于 100  $^\circ\text{C}$ 处理 30 min, 或用氯仿反复处理, 再将处理后的代谢物与纳米银混合, 检测其 UV-Vis 吸收光谱的变化。

将 HeLa 细胞代谢物依次用截留值为 100、50、30、10、3 和 1 kDa 的超滤管分为不同组分, 各组分与 100  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs 等体积混合,

以无血清 DMEM 培养基为对照组, 于 37  $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min 后, 用 Nanodrop 检测 UV-Vis 吸收光谱, 计算纳米银的聚集效率。

聚集效率计算公式为: 聚集效率(%)=[(对照组  $OD_{404}$ -实验组  $OD_{404}$ )/对照组  $OD_{404}$ ] $\times 100$ 。

#### 1.6 纳米银聚集物的表征及元素分析

将 HeLa 细胞代谢物小分子组分与 200  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs 等体积混匀, 于 37  $^\circ\text{C}$ 孵育 3 h 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤沉淀 3 次, 加适量 ddH<sub>2</sub>O 重悬并超声分散 30 min, 用纳米粒度电位仪检测聚集物的粒径和  $\zeta$  电位, 透射电镜检测样品的表面形貌和粒径。EDS 能谱仪(Thermo, 250Xi)检测纳米银聚集物的元素组成。

#### 1.7 代谢物中聚集成分分析

采用非靶向代谢组技术对 HeLa 细胞代谢物聚集纳米银前后的差异成分分析。培养 HeLa 细胞并制备 6 批代谢物经截留值为 1 kDa 的超滤离心管处理, 收集小分子代谢物备用。取 400  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs 与小分子代谢产物(体积比为 1:3)混匀, 37  $^\circ\text{C}$ 孵育 3 h, 12 000 r/min、4  $^\circ\text{C}$ 条件下离心 20 min, 取上清液。将 6 批小分子代谢物及 6 份聚集纳米银后的上清液送苏州帕诺米克生物医药科技有限公司进行非靶向代谢组分析。

#### 1.8 单一组分或双组分对纳米银的聚集作用

分析两组代谢组数据, 综合考虑相对含量变化及分子的元素组成, 用单一化合物或两两组合进行纳米银聚集实验, 检测方法为 UV-Vis 全波长扫描。对能聚集纳米银的组分, 用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定单层 HeLa 细胞换无血清培养基后 2、4、6、8、12 h 分泌到培养液中的量。

#### 1.9 荷瘤小鼠血清影响纳米银稳定性

将 SPF 级 BALB/c nude 小鼠(4 周龄, 雌性)

随机分为2组,对照组每只小鼠腹腔注射 200  $\mu$ L 生理盐水,实验组腹腔注射 200  $\mu$ L 浓度为  $2 \times 10^7$  cells/mL HeLa 细胞悬液,于第 14、21、28、38、48 天采血并分离血清。将血清与 200  $\mu$ g/mL AgNPs 等体积混匀,于 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后,用 Nanodrop 作 UV-Vis 全波长扫描,纳米银聚集效率计算公式同于 1.5。所有动物实验方案经西南大学实验动物伦理审查委员会审核(批准号: IACUC-20230222-01)。

### 1.10 数据统计分析

使用 R 包 mixOmics (V 6.8.5)/ropls (V 1.16.0) 进行正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA), ggpubr 包(V 0.2.5)的 compare%函数进行单因素方差分析,vegan (V 2.5-6)的 adonis 函数进行置换多元方差分析,并用 BH 法(benjamini & hochberg, 1995)校正  $P$  值,认为  $P < 0.05$  差异显著。其他数据统计用 SPSS 22.0 软件进行方差分析和 Duncan 多重比较( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 AgNPs 的合成和表征

芦丁还原银离子后,反应液由淡黄色逐渐变深,最后呈棕色,溶液的 UV-Vis 吸收光谱在 404 nm 处有特征性吸收峰,且峰值随颜色加深而增大(图 1A)。TEM 图像表明合成的 AgNPs 呈球状,粒径在 2–20 nm (图 1B)。加 1 mmol/L PVP 后纳米银的水合粒径从(72.7 $\pm$ 1.2) nm 增大至(124.8 $\pm$ 2.6) nm,  $\zeta$  电位从(-19.2 $\pm$ 0.5) mV 升至(-9.04 $\pm$ 1.16) mV (图 1C)。

### 2.2 HeLa 细胞代谢物抑制纳米银的抗癌、抗菌作用

按常规方法将长满单层 HeLa 细胞洗涤后用系列浓度纳米银处理 2 h 和 12 h,  $IC_{50}$  分别为 120  $\mu$ g/mL 和 40  $\mu$ g/mL (图 2A)。但是,向洗涤

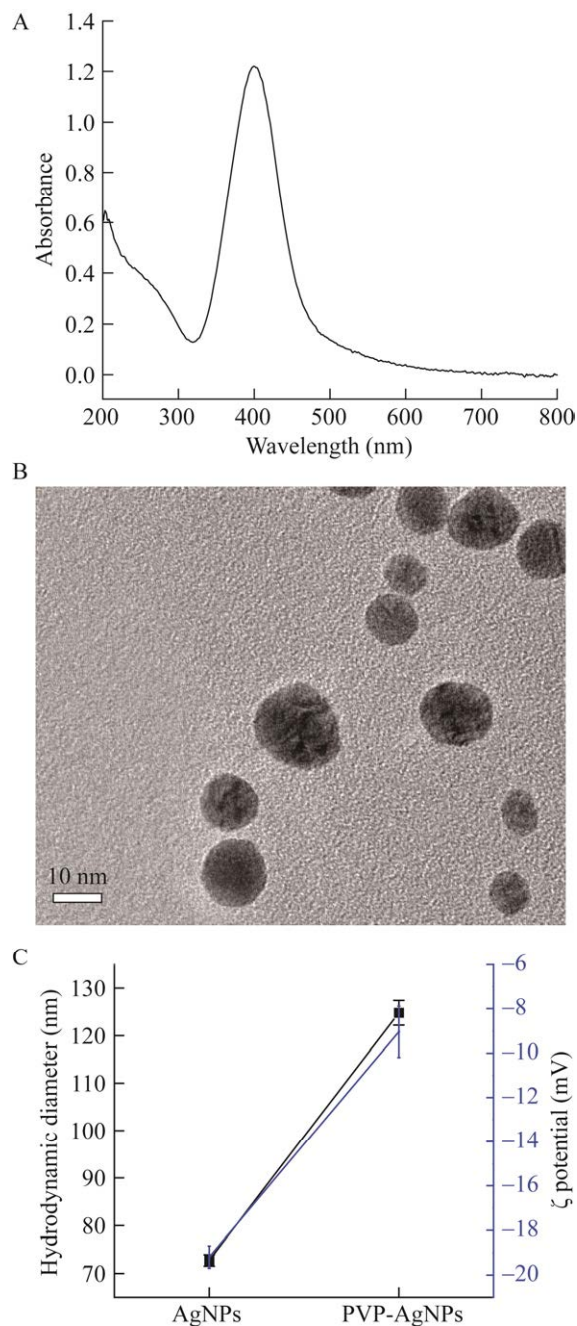
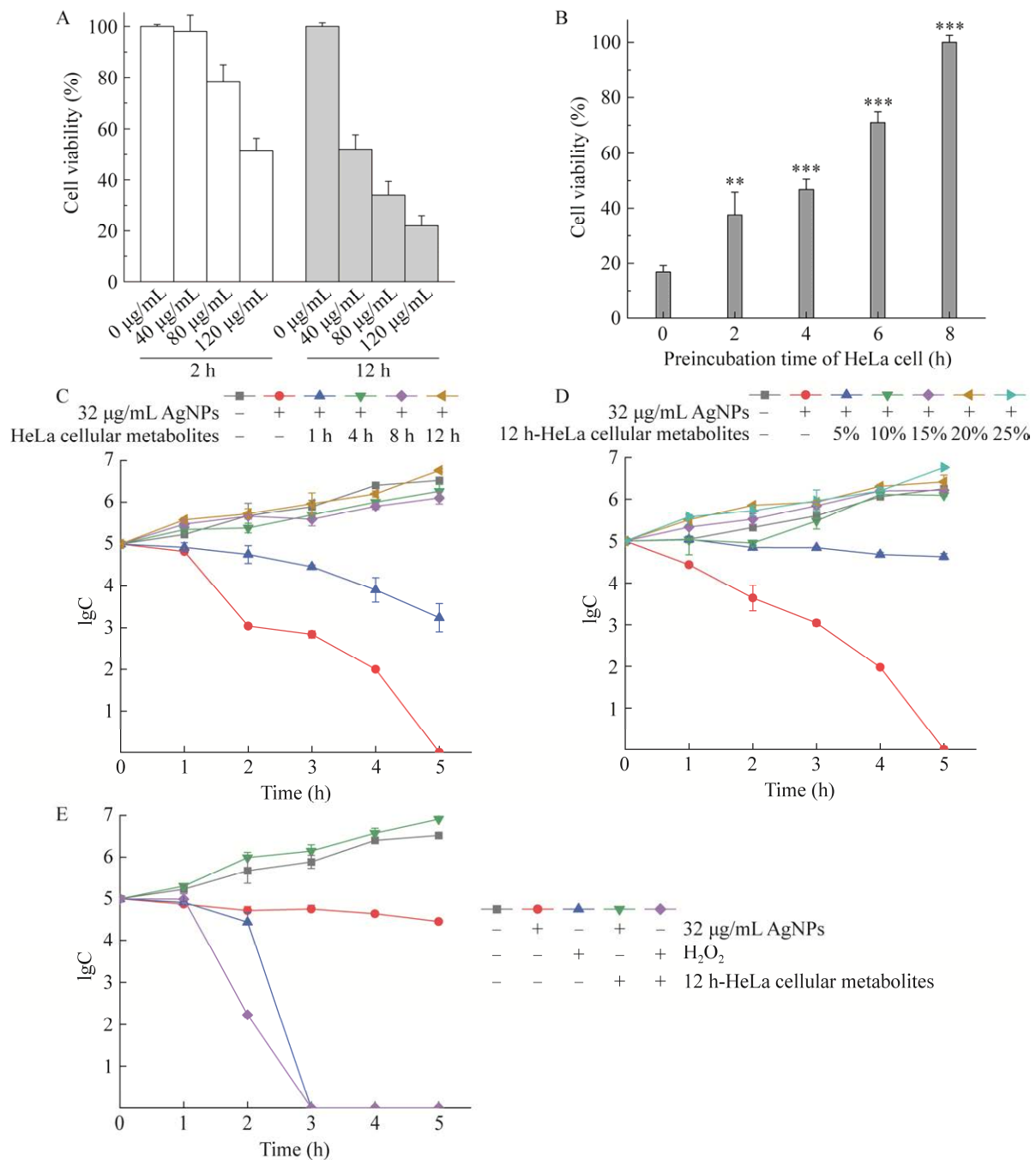


图 1 纳米银的表征 A: 纳米银的 UV-Vis 吸收光谱. B: 纳米银的透射电镜图, 标尺为 10 nm. C: 纳米银稳定前后的水合粒径和  $\zeta$  电位图  
Figure 1 Characterization of silver nanoparticles. A: UV-Vis absorption spectrum of silver nanoparticles. B: TEM image of silver nanoparticles with a scale of 10 nm. C: Hydrodynamic diameter and  $\zeta$  potential of AgNPs with/without PVP.



**图 2 HeLa 细胞代谢物抑制纳米银的抗癌和抗菌作用** A: 纳米银处理 2 h 或 12 h 的细胞毒性. B: HeLa 细胞代谢物导致 180 µg/mL 纳米银抗癌作用降低. C: HeLa 细胞不同时间代谢物导致 2MIC 纳米银抗菌作用降低. D: HeLa 细胞 12 h 代谢导致纳米银抗菌作用降低. E: HeLa 细胞代谢物不抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的抗菌作用  
 Figure 2 The inhibition of anti-cancer and antibacterial effects of silver nanoparticles by HeLa cell metabolites. A: Cytotoxicity of silver nanoparticles treated for 2 h or 12 h. B: Inhibition of the anticancer effect of 180 µg/mL silver nanoparticles by HeLa cell metabolites. C: Inhibition of antibacterial effect of 2MIC silver nanoparticles by time-dependent HeLa cells metabolites. D: The 12 h metabolism of HeLa cells inhibited antibacterial action of silver nanoparticles. E: HeLa cell metabolites did not inhibit the antibacterial action of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

后的细胞加入无血清 DMEM 并孵育 2、4、6 h 和 8 h, 加 AgNPs 至终浓度为 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 处理 2 h 后细胞的存活率分别为 37.6%、46.8%、71.2%和 100%, 对照组仅为 16.8% (图 2B)。这表明 HeLa 细胞不断合成并释放某种代谢物, 该代谢物能抑制纳米银的细胞毒性作用。

将单层 HeLa 细胞 1、4、8 h 和 12 h 的代谢物与浓度为 2MIC 的纳米银等体积混合后, 其抗菌作用也被抑制, 加入 4 h 的代谢物后完全丧失了抗菌作用(图 2C)。按不同比例加入 12 h 的 HeLa 细胞代谢物, 含量超过 10%以后, 纳米银的抗菌作用完全丧失(图 2D)。但是, 这种 12 h 代谢物并不抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  的抗菌作用(图 2E), 这种抑制作用发生在纳米银导致活性氧产生以前, 提示 HeLa 细胞代谢物可能破坏胶体稳定性。

### 2.3 小分子含硫代谢物使 AgNPs 聚集

纳米银在 DMEM 培养基中很稳定, 12 h 内特征性吸收峰不变(图 3A)。将 HeLa 细胞 12 h 代谢物与 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  纳米银等体积混合后, 发现其  $OD_{404}$  逐渐降低, 并在 500–600 nm 段出现新的吸收峰(图 3B), 室温放置 12 h 后所有吸收峰消失, 将沉淀用 dd $\text{H}_2\text{O}$  重悬测得水合粒径为 (419.9 $\pm$ 10.8) nm,  $\zeta$  电位为 -15.2 mV, 多分散性指数 (polymer dispersity index, PDI) 值为 0.499。将纳米银与 HeLa 细胞 2 h 代谢物按系列体积比混合(1:1、1:3、1:7 和 1:15),  $OD_{404}$  值呈线性降低; 将纳米银与 2、4、6、8、10、12 h HeLa 细胞代谢物均按 1:15 (体积分数)混合,  $OD_{404}$  值也呈线性降低(图 3C、3D)。将 12 h HeLa 细胞代谢物与 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  纳米银等体积混合后形成的沉淀干燥后经 TEM 电镜观察, 可见纳米银发生聚集(图 3E)。

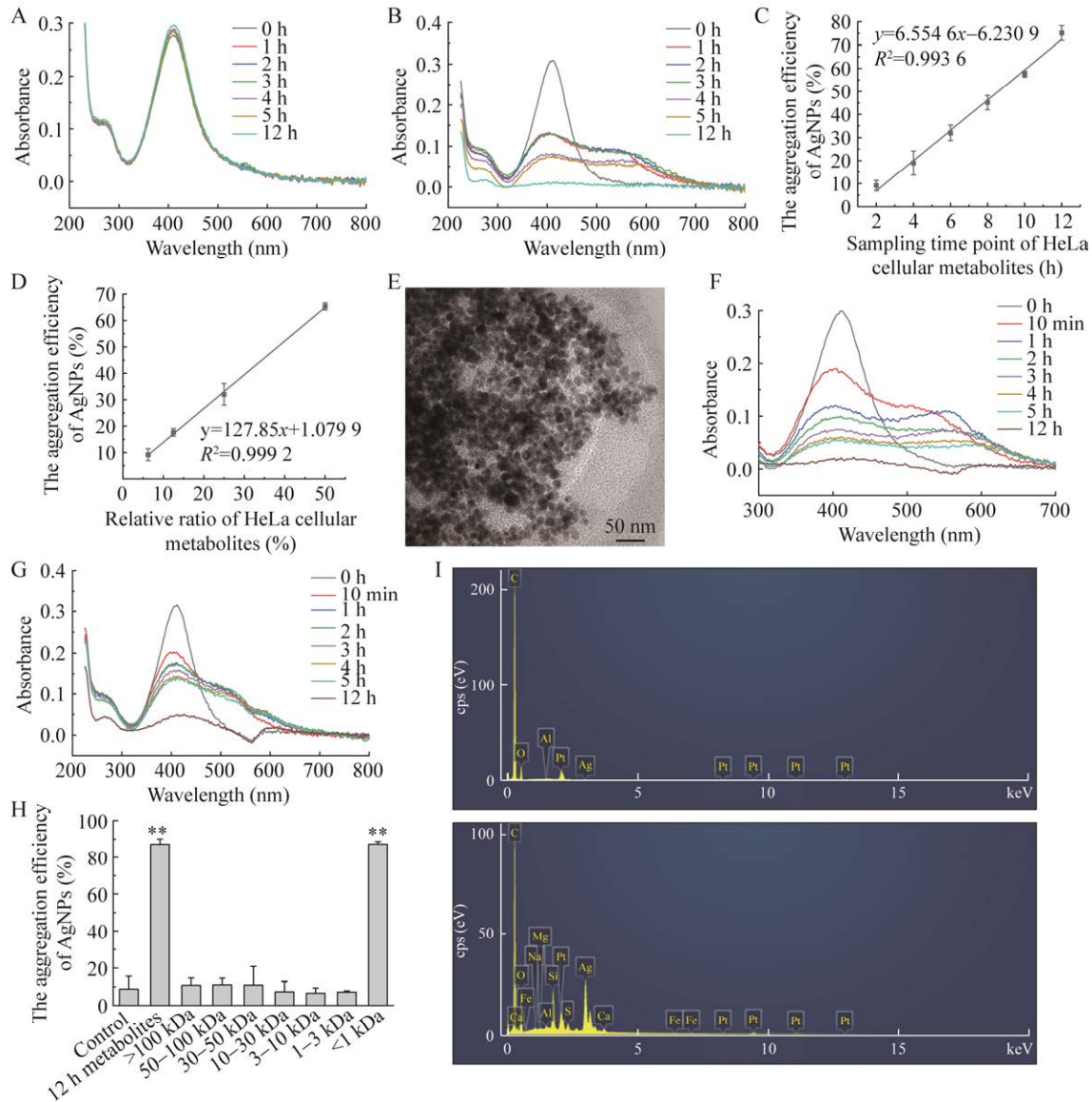
为初步确定代谢物的化学性质, 将 12 h 代谢物作高温处理(100  $^\circ\text{C}$ 、20 min)和氯仿萃取, 但均未改变其聚集纳米银的作用(图 3F、3G),

说明不是蛋白质或脂类物质。用超滤离心管将其分子量大小分为不同组分, 发现低于 1 kDa 的小分子代谢物聚集纳米银(图 3H)。经能谱仪分析样品元素, 比较结果显示纳米银聚集物中含有硫元素(图 3I)。

### 2.4 HeLa 细胞代谢物 $\alpha$ -酮戊二酸和谷胱甘肽联合作用使 AgNPs 聚集

为了进一步鉴定 HeLa 细胞代谢物的种类, 对纳米银处理前后的代谢物进行非靶向代谢组学分析, 结果鉴定出 115 种差异代谢物, 其中有 77 种含量成分经纳米银处理后下降 90%以上(图 4A、4B)。购买其中的 10 种化合物进行实验, 其中苯线磷、东莨菪亭、氰戊菊酯、卡莫司汀、氟哌利多和 N7-甲基鸟苷等不影响纳米银的稳定性, 但 10 mmol/L AKG (该浓度为质谱数据推算结果)在 2 h 内使 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  纳米银完全聚集, 而 ICA 使其一半发生聚集(图 5A、5B)。5 mmol/L AKG 与 5 mmol/L ICA 的作用与 10 mmol/L AKG 相近(图 5E), GSH 含量变化仅 6.76 倍, 但能谱仪结果提示有含硫化合物, 并发现 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  GSH (按质谱结果推算)并不影响纳米银的稳定性(图 5C), 但与 5 mmol/L AKG 混合后能加快纳米银聚集(图 5D), 与 ICA 无协同作用(图 5F)。

用 ELISA 法测定 HeLa 细胞和正常宫颈上皮细胞 HCErEpic 分泌 GSH 和 AKG 的水平, 发现 12 h 内 HeLa 细胞分泌 GSH 的量呈上升趋势, 从 10–30  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 而 AKG 相对恒定, 在 50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  左右; HCErEpic 细胞分泌的这 2 种代谢物均低于 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  (图 6A)。将 0、3、15、30  $\mu\text{mol}/\text{L}$  GSH 与 0、5、25、50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  AKG 两两组合后与纳米银共孵育 60 min, 特征性 SPR 峰  $OD_{404}$  降低, 降低幅度与 GSH、AKG 浓度呈显著正相关, 双因素方差分析(交互)显示纳米银稳定性受 AKG 浓度影响更大, 其中 GSH  $P=4\times 10^{-8}$ , AKG  $P=2\times 10^{-16}$  (图 6B)。



**图 3 HeLa 细胞代谢物导致纳米银聚集**

A: 纳米银在 DMEM 培养基中的 UV-Vis 光谱图. B: HeLa 细胞代谢物导致纳米银 UV-Vis 光谱特征改变. C: HeLa 细胞分泌可聚集纳米银的代谢物呈时间依赖性. D: HeLa 细胞代谢物聚集纳米银的剂量依赖性. E: HeLa 细胞代谢物聚集纳米银的透射电镜图, 标尺为 50 nm. F: 致纳米银聚集细胞代谢物的热稳定性. G: 致纳米银聚集细胞代谢物的脂不相溶性. H: 不同分子量组分对纳米银的聚集作用. \*\*:  $P < 0.01$ . I: EDS 分析纳米银聚合物

Figure 3 Aggregation of silver nanoparticles caused by HeLa cell metabolites. A: Changes of UV-Vis spectra of silver nanoparticles in DMEM medium. B: HeLa cell metabolites lead to changes in the UV-Vis spectral characteristics of silver nanoparticles. C: HeLa cells secrete metabolites that aggregate silver nanoparticles in a time-dependent manner. D: Dose-dependent aggregation of silver nanoparticles by HeLa cell metabolites. E: Transmission electron microscope image of silver nanoparticles aggregated by HeLa cell metabolites with a scale of 50 nm. F: Thermal stability of metabolites inducing silver nanoparticles aggregation. G: Lipid incompatibility of metabolites inducing silver nanoparticles aggregation. H: Aggregation effect of different molecular weight components on silver nanoparticles. \*\*:  $P < 0.01$ . I: EDS analysis of silver nanoparticles aggregations.



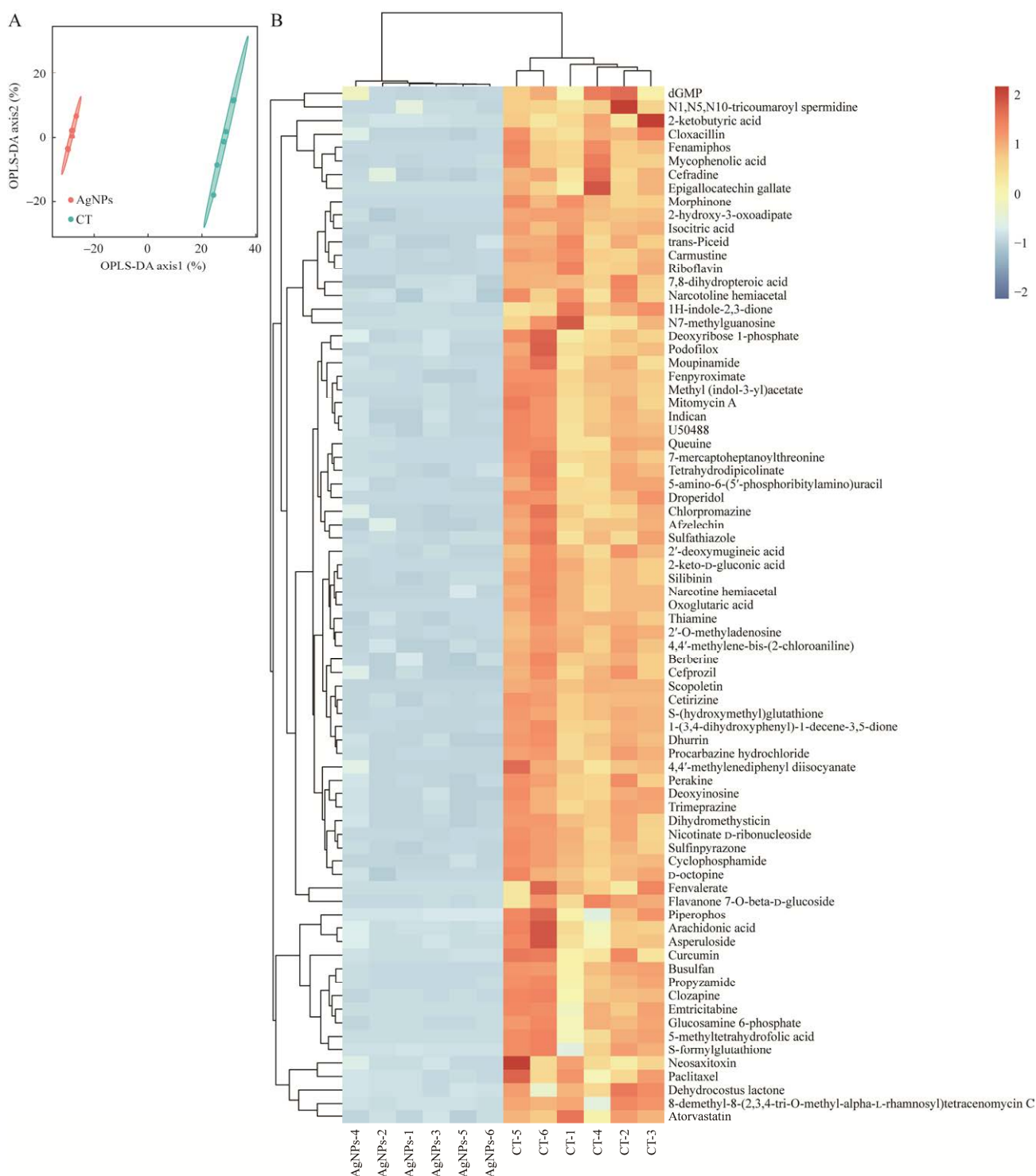
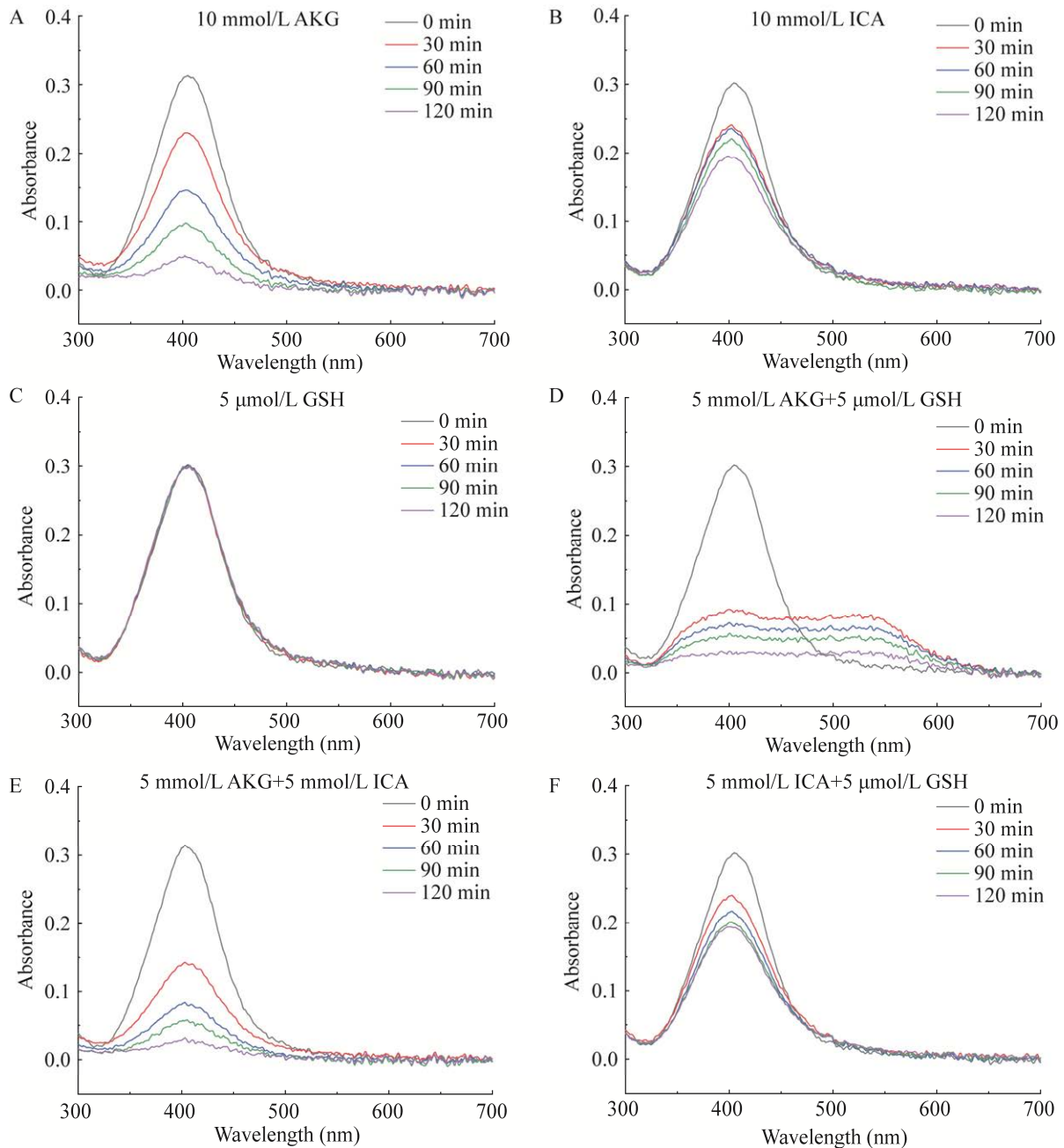


图 4 非靶向代谢组学分析结果 A: OPLS-DA 分析纳米银处理前后代谢物( $n=6$ ). B: 热图展示纳米银处理后含量显著降低的代谢产物

Figure 4 Non-targeted metabolomics analysis. A: OPLS-DA analysis of metabolites before and after silver nanoparticles treatment ( $n=6$ ). B: Heat map showing the components of metabolite with significantly change after treatment of silver nanoparticles.



**图5 HeLa 细胞的 3 种代谢物导致纳米银聚集** A、B、C 中  $\alpha$ -酮戊二酸、异柠檬酸和谷胱甘肽的浓度均按质谱结果计算，D、E、F 按不同比例将各物质混合，分别是 5 mmol/L AKG+5  $\mu$ mol/L GSH、5 mmol/L AKG+5 mmol/L ICA、5 mmol/L ICA+5  $\mu$ mol/L GSH，以模拟 HeLa 细胞代谢物使纳米银聚集的吸收峰值变化。用 Nanodrop-2000 检测不同处理时间后纳米银的 UV-Vis 吸光谱变化

**Figure 5** Three metabolites of HeLa cells cause aggregation of silver nanoparticles. The concentrations of  $\alpha$ -ketoglutarate, isocitrate and glutathione in A, B and C were calculated according to the mass spectrometry results. D: 5 mmol/L AKG+5  $\mu$ mol/L GSH. E: 5 mmol/L AKG+5 mmol/L ICA. F: 5 mmol/L ICA+5  $\mu$ mol/L GSH. To mimic HeLa cell metabolites aggregate silver nanoparticles, the UV-Vis absorption spectrum changes of silver nanoparticles after different treatment times were detected by Nanodrop-2000.

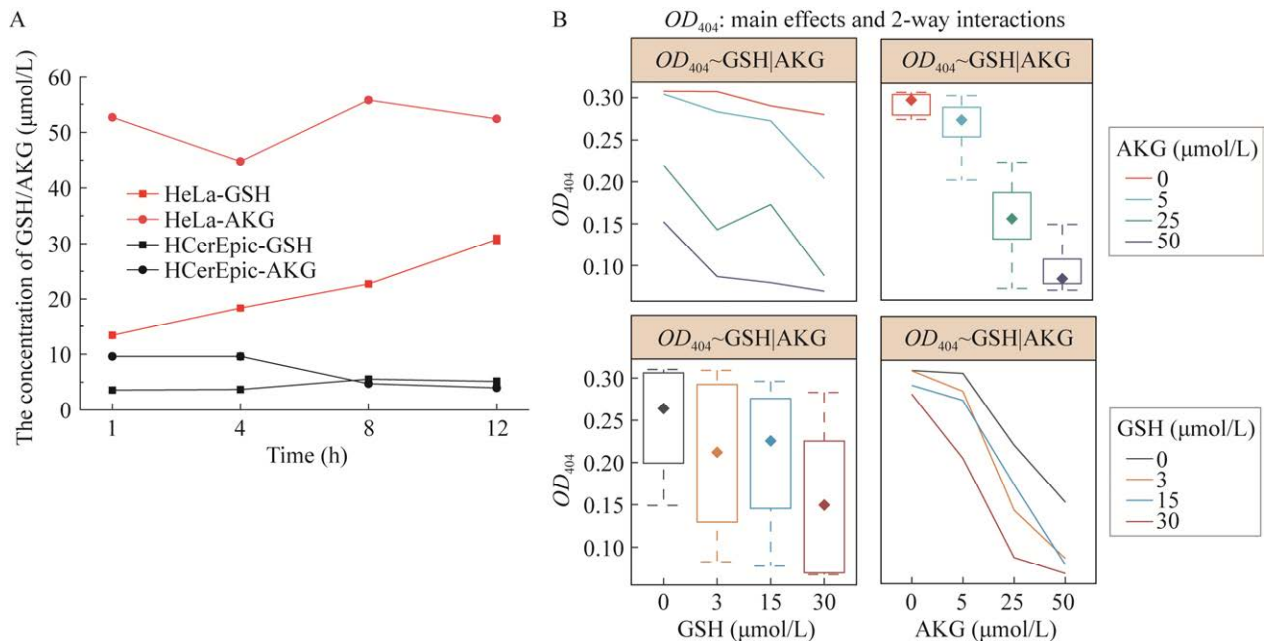


图 6 AKG 和 GSH 协同聚集纳米银 A: 比较 HeLa 细胞与 HCErEpic 细胞分泌 AKG、GSH 的水平。B: AKG、GSH 聚集纳米银的量效关系

Figure 6 AKG and GSH synergistically aggregate silver nanoparticles. A: Comparison of AKG and GSH secreted by HeLa cells and HCErEpic cells. B: Correlation of concentration of AKG and GSH to aggregate silver nanoparticles.

### 2.5 荷瘤小鼠血清对纳米银稳定性的影响

最后, 评估荷瘤小鼠血清中 HeLa 细胞代谢物对纳米银稳定性的影响, 通过腹腔注射建模, 42 d 后实验组小鼠腹腔均有多个白色瘤体, 大小不一[(67.5±21) mg]。第 14、21、28、38、48 天采血分离血清, 与纳米银(终浓度为 100 μg/mL)等体积混合, 纳米银的聚集率随荷瘤时间呈波浪式上升, 第 28、38、48 天血清的聚集率分别为 19.7%、26.9%和 21.3%, 21 d 后小鼠血清对纳米银的聚集就显著高于对照血清( $P<0.05$ ) (图 7)。第 28、48 天血清样品对纳米银的聚集率较前一个采样点有所下降, 这可能与 AKG、GSH 参与小鼠的代谢有关。

## 3 讨论

癌细胞耐药与细菌耐药对人类生命安全造成严重威胁, 也对药物研发构成巨大压力。由

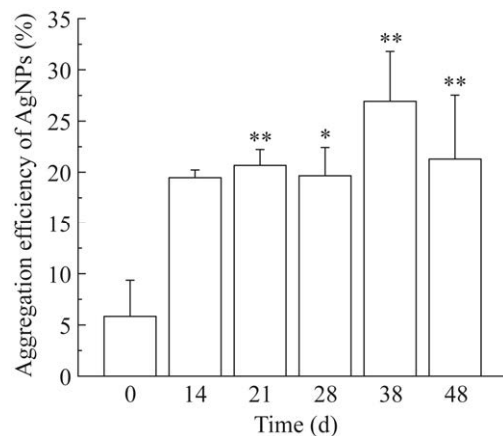


图 7 荷瘤小鼠血清聚集纳米银 荷瘤小鼠血清与纳米银于 37 °C 孵育 30 min 导致纳米银聚集 ( $n=6$ )

Figure 7 Aggregation of silver nanoparticles in the serum of tumor-bearing mice. Silver nanoparticles was aggregated when the serum of tumor-bearing mice was incubated with silver nanoparticles at 37 °C for 30 min, the data expressed as  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ , \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

于纳米银能诱导产生大量 ROS, 因此对多耐药性细菌和多种类型的癌细胞有杀灭作用。含纳米银的抗菌制品已经进入实际应用, 比如含纳米银的植入支架、用于烧伤治疗的敷料、妇科用纳米银水凝胶<sup>[9]</sup>。纳米银的抗癌研究已从细胞水平进入动物实验阶段。但不容忽视的是, 现已发现细菌耐受银的 3 种途径, 其一是细菌中含 *cus ABC* 基因簇, 编码形成外排泵, 能将胞内的银离子、铜离子外排而表现出耐受性<sup>[10-11]</sup>; 其二是反复暴露于纳米银后, 细菌能表达出富含硫、磷的纤毛, 后者导致纳米银在菌体表面聚集而丧失抗菌作用<sup>[12]</sup>; 其三是细菌代谢方式发生改变, 比如  $\Delta narH$  单基因缺失株能在含 100  $\mu\text{g/mL}$  纳米银(8MIC 值)琼脂平板上生长<sup>[13]</sup>。癌细胞耐受化疗药物的报道较多, 耐药机制包括高表达药物外排泵、药物作用靶点的突变、癌细胞内高浓度 GSH, 以及瘤体内存在某些微生物等<sup>[14-18]</sup>, 但目前还未见癌细胞耐受纳米银的报道。本研究发现 HeLa 细胞的培养物导致纳米银的抗癌和抗菌作用降低甚至完全丧失(图 2B、2C), 这种作用呈现量的依赖性, 而 HeLa 细胞代谢物释放入培养基中呈时间依赖性。且发现 HeLa 细胞代谢物不仅能够破坏 PVP 稳定的纳米银的稳定性, 还能够破坏胎牛血清(fetal calf serum, FBS)稳定的纳米银的稳定性, 故推测这种作用与纳米银的稳定剂无关。排除了蛋白质、糖和脂类的可能性, 从差异代谢物的质谱结果中筛选出 AKG、GSH 和 ICA 可改变纳米银的性状, 其中 AKG 和 GSH 联合作用重复出与 HeLa 细胞代谢物作用下相近的 UV-Vis 光谱变化, 并彻底破坏纳米银的胶体稳定性。用 0–50  $\mu\text{mol/L}$  AKG 与 0–30  $\mu\text{mol/L}$  GSH 的系列组合能不同程度地聚集纳米银, 双因素方差分析显示, AKG 对聚集纳米银的效应更显著 ( $P=2\times 10^{-16}$ ) (图 6B)。因此, 找到了 HeLa 细胞

代谢物导致纳米银抗菌、抗癌作用丧失的分子机制。

GSH 是生物中最重要的抗氧化剂之一, 正常细胞内 GSH 浓度为 0.5–10.0 mmol/L, 癌细胞是正常细胞的 4–7 倍<sup>[19]</sup>。癌细胞需要更高浓度的 GSH, 有两方面的实验证据: 其一是肝癌、肺癌、乳腺癌和结肠癌等细胞中 GSH 合成酶的高表达<sup>[20-21]</sup>, 其二是抑制合成 GSH 的限速酶  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸连接酶可促使乳腺癌细胞、卵巢癌细胞凋亡<sup>[22-24]</sup>。目前学界认为癌细胞利用胞内高浓度 GSH 平衡因快速增殖和高突变所致的大量 ROS, 但同时带来的问题是癌细胞内高浓度 GSH 会导致某些抗癌药物失活<sup>[21,25-30]</sup>。AKG 是三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)的重要成员, 也是糖代谢与氨基酸代谢的关键纽带, 近年发现它在癌细胞的代谢中起着特殊的作用。因癌细胞为满足快速增殖的需要, 糖酵解的中间产物 6-磷酸葡萄糖、6-磷酸果糖进入支路代谢生成 NADPH 和其他前体分子; 丙酮酸更多地生成乳酸, 而不是以乙酰辅酶 A 进入线粒体彻底氧化产生 ATP 和 NADH。癌细胞的能量代谢依赖于摄入谷氨酰胺合成 AKG 以满足 TCA 的正常运转。Fe(II)/AKG 作为共同底物参与一类双加氧酶(dioxygenases, OGDD)对 DNA、RNA 和组蛋白的去甲基化等反应, 同时 AKG 脱羧为琥珀酸。这类 OGDD 成为癌症治疗的新靶点, 比如脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase, PHD)在 AKG 存在下将低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )羟基化, 进而被泛素化降解, 如果细胞癌变后琥珀酸、草酰乙酸、2-羟基戊二酸( $\alpha$ -hydroxyglutaric acid, 2-HG)浓度上升, 将竞争性抑制 PHD, 稳定的 HIF-1 $\alpha$  分子将进入细胞核与低氧诱导因子-1 $\beta$  (hypoxia inducible factor-1 $\beta$ , HIF-1 $\beta$ )、乙酰转移酶 p300/CREB 结合蛋白形成聚合物启动低氧转录

组, 进一步促进癌细胞的增殖<sup>[31-32]</sup>。本研究结果显示, 12 h 内 HeLa 细胞释放到培养液中 GSH 的浓度持续上升, 从 13.4  $\mu\text{mol/L}$  升至 30.8  $\mu\text{mol/L}$ , 而 AKG 维持相对稳定的水平, 约 50  $\mu\text{mol/L}$ , 是正常宫颈上皮细胞的 6–10 倍(图 6A)。因此, AKG、GSH 协同聚集纳米银的作用可能使其成为新的癌细胞生物标记物, 开发出简便快捷的诊断方法。

纳米药物进入人体后在复杂生物环境下的稳定性是近年关注的热点。当纳米粒子进入生物流体后会受到一系列力(如范德华力、电磁力等)的作用, 且其中存在的大量复杂生物分子(包括蛋白质、脂质以及核酸等)将迅速竞争性与纳米粒子表面结合<sup>[33-35]</sup>, 形成云冠, 这不仅会影响纳米粒子的生物学功能, 比如靶向性, 也会影响它在生物介质中的稳定性<sup>[36-37]</sup>。Limbach 等<sup>[38]</sup>的研究也表明  $\text{CeO}_2$  NPs 作用于人肺成纤维细胞后会在囊泡内发生聚集沉积。肺癌细胞的特征性代谢物所形成的个性化云冠还可用于诊断<sup>[39]</sup>。本研究中荷瘤小鼠血清测试了纳米银的稳定性, 结果表明腹腔注射 HeLa 细胞 20 d 后聚集率比对照血清高 20% (图 7)。癌细胞的小分子代谢物 AKG、GSH 在一定浓度下使纳米银聚集尚属首次报道, 不同于某些单分子使纳米粒子的  $\zeta$  电位上升, 净电荷减少导致的团聚, 这 2 种分子使特征峰下降的同时发生红移(图 5), 机制有待研究, 推测可能是在纳米银催化下发生了分子交链。癌症患者血液中高浓度 GSH、AKG 是否干扰其他纳米药物的稳定性也有待今后作进一步研究。

## 致谢

王洪波博士、张静萍博士对本文提供宝贵的修改建议和意见, 西北大学的于汉杰博士在糖芯片上提供了技术支持, 在此致以最诚挚的谢意。

## REFERENCES

- [1] ANDLEEB A, ANDLEEB A, ASGHAR S, ZAMAN G, TARIQ M, MEHMOOD A, NADEEM M, HANO C, LORENZO JM, ABBASI BH. A systematic review of biosynthesized metallic nanoparticles as a promising anti-cancer-strategy[J]. *Cancers*, 2021, 13(11): 2818.
- [2] SINGH AK. Comparative therapeutic effects of plant-extract synthesized and traditionally synthesized gold nanoparticles on alcohol-induced inflammatory activity in SH-SY<sub>5</sub>Y cells *in vitro*[J]. *Biomedicines*, 2017, 5(4): 70.
- [3] CHEN Y, WANG Z, XU M, WANG X, LIU R, LIU Q, ZHANG ZH, XIA T, ZHAO JC, JIANG GB, XU Y, LIU SJ. Nanosilver incurs an adaptive shunt of energy metabolism mode to glycolysis in tumor and nontumor cells[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(6): 5813-5825.
- [4] SWANNER J, FAHRENHOLTZ CD, TENVOOREN I, BERNISH BW, SEARS JJ, HOOKER A, FURDUI CM, ALLI E, LI WC, DONATI GL, COOK KL, VIDI PA, SINGH R. Silver nanoparticles selectively treat triple-negative breast cancer cells without affecting non-malignant breast epithelial cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *FASEB BioAdvances*, 2019, 1(10): 639-660.
- [5] GOVINDARAJU K, KRISHNAMOORTHY K, ALSAGABY SA, SINGARAVELU G, PREMANATHAN M. Green synthesis of silver nanoparticles for selective toxicity towards cancer cells[J]. *IET Nanobiotechnology*, 2015, 9(6): 325-330.
- [6] 万冬, 习钰晶, 李孙帆, 潘杰. 基于肿瘤微环境的响应性纳米药物载体的研究进展[J]. *化学工业与工程*, 2021, 38(5): 80-87.  
WAN D, XI YJ, LI SF, PAN J. Progress on nanocarriers in responsive to tumor microenvironment[J]. *Chemical Industry and Engineering*, 2021, 38(5): 80-87 (in Chinese).
- [7] 张红英. 血清稳定纳米银对鼠多耐药大肠杆菌全身感染的保护作用[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2019.  
ZHANG HY. Protective effect of serum-stabilized nano silver against systemic infection of multidrug-resistant *Escherichia coli* in mice[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2019 (in Chinese).
- [8] 陈学情, 蒋家璇, 任志鸿, 李娟, 张红英, 徐建国, 杜华茂. 纳米银的抗菌特性及对多重耐药菌株的抗菌作用[J]. *微生物学报*, 2017, 57(4): 539-549.  
CHEN XQ, JIANG JX, REN ZH, LI J, ZHANG HY, XU JG, DU HM. Antibacterial activity of silver

- nanoparticles against multiple drug resistant strains[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(4): 539-549 (in Chinese).
- [9] LUO HY, LI N, LI DD, XU L. Teaching research on using nano silver ion dressing in clinical nursing of surgically infected wounds[J]. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, 2022, 68(3): 270-281.
- [10] LI XZ, NIKAIIDO H, WILLIAMS KE. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag<sup>+</sup> and are deficient in porins[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(19): 6127-6132.
- [11] NIES DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(2): 313-339.
- [12] PANÁČEK A, KVÍTEK L, SMÉKALOVÁ M, VEČEŘOVÁ R, KOLÁŘ M, RÖDEROVÁ M, DYČKA F, ŠEBELA M, PRUCEK R, TOMANEC O, ZBOŘIL R. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it[J]. *Nature Nanotechnology*, 2018, 13(1): 65-71.
- [13] DU HM, LO TM, SITOMPUL J, CHANG MW. Systems-level analysis of *Escherichia coli* response to silver nanoparticles: the roles of anaerobic respiration in microbial resistance[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 424(4): 657-662.
- [14] GAO Q, LI XX, XU YM, ZHANG JZ, RONG SD, QIN YQ, FANG J. IRE1 $\alpha$ -targeting downregulates ABC transporters and overcomes drug resistance of colon cancer cells[J]. *Cancer Letters*, 2020, 476: 67-74.
- [15] KADIOGLU O, SAEED M, MAHMOUD N, AZAWI S, MRASEK K, LIEHR T, EFFERTH T. Identification of potential novel drug resistance mechanisms by genomic and transcriptomic profiling of colon cancer cells with p53 deletion[J]. *Archives of Toxicology*, 2021, 95(3): 959-974.
- [16] KONG LS, YANG W, CHEN LR, QIAN LT. The DNA methylation-regulated MCTP1 activates the drug-resistance of esophageal cancer cells[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(3): 3342-3352.
- [17] HOUSMAN G, BYLER S, HEERBOTH S, LAPINSKA K, LONGACRE M, SNYDER N, SARKAR S. Drug resistance in cancer: an overview[J]. *Cancers*, 2014, 6: 1769-1792.
- [18] GELLER L, BARZILY-ROKNI M, DANINO T, JONAS O, SHENTAL N, NEJMAN D, GAVERT N, ZWANG Y, COOPER Z, SHEE K, THAISS C, REUBEN A, LIVNY J, AVRAHAM R, FREDERICK DT, LIGORIO M, CHATMAN K, JOHNSTON SE, MOSHER CM, BRANDIS A, et al. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine[J]. *Science*, 2017, 357: 1156-1160.
- [19] SCHÄFER C, FELS C, BRUCKE M, HOLZHAUSEN HJ, BAHN H, WELLMAN M, VISVIKIS A, FISCHER P, RAINOV NG. Gamma-glutamyl transferase expression in higher-grade astrocytic glioma[J]. *Acta Oncologica*, 2001, 40(4): 529-535.
- [20] KALININA EV, GAVRILIUK LA. Glutathione synthesis in cancer cells[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2020, 85(8): 895-907.
- [21] LU SC. Regulation of glutathione synthesis[J]. *Molecular aspects of medicine*, 2009, 30(1/2): 42-59.
- [22] ANDRINGA KELLY K, COLEMAN MITCHELL C, NUKHET AB, HITCHLER MICHAEL J, WALSH SUSAN A, DOMANN FREDERICK E, SPITZ DOUGLAS R. Inhibition of glutamate cysteine ligase activity sensitizes human breast cancer cells to the toxicity of 2-deoxy-D-glucose[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(3): 1605-1610.
- [23] LU SC. Glutathione synthesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013, 1830(5): 3143-3153.
- [24] LANG FF, QU J, YIN HQ, LI LY, ZHI Y, LIU YP, FANG Z, HAO EK. Apoptotic cell death induced by Z-ligustilidein human ovarian cancer cells and role of NRF2[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 121: 631-638.
- [25] FUJIMORI S, ABE Y, NISHI M, HAMAMOTO A, INOUE Y, OHNISHI Y, NISHIME C, MATSUMOTO H, YAMAZAKI H, KIJIMA H, UEYAMA Y, INOUE H, NAKAMURA M. The subunits of glutamate cysteine ligase enhance cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer xenografts *in vivo*[J]. *International Journal of Oncology*, 2004, 25(2): 413-418.
- [26] LI MN, ZHANG ZL, YUAN JS, ZHANG YL, JIN XB. Altered glutamate cysteine ligase expression and activity in renal cell carcinoma[J]. *Biomedical Reports*, 2014, 2(6): 831-834.
- [27] ANDERTON B, CAMARDA R, BALAKRISHNAN S, BALAKRISHNAN A, KOHNZ RA, LIM L, EVASON KJ, MOMCILOVIC O, KRUTTWIG K, HUANG Q, XU G, NOMURA DK, GOGA A. MYC-driven inhibition of the glutamate-cysteine ligase promotes glutathione depletion in liver cancer[J]. *EMBO reports*,

- 2017, 18(4): 569-585.
- [28] VILLABLANCA J, VOLCHENBOUM S, CHO H, KANG MH, COHN S, ANDERSON C, MARACHELIAN A, GROSHEN S, TSAO-WEI D, MATTHAY K, MARIS J, HASENAUER CE, CZARNECKI S, LAI H, GOODARZIAN F, SHIMADA H, REYNOLDS C. A phase I new approaches to neuroblastoma therapy study of buthionine sulfoximine and melphalan with autologous stem cells for recurrent/refractory high-risk neuroblastoma[J]. *Pediatric Blood Cancer*, 2016, 63(8): 1349-1356.
- [29] KIM AD, ZHANG R, HAN X, KANG KA, PIAO MJ, MAENG YH, CHANG WY, HYUN JW. Involvement of glutathione and glutathione metabolizing enzymes in human colorectal cancer cell lines and tissues[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(3): 4314-4319.
- [30] KE HL, LIN J, YE YQ, WU WJ, LIN HH, WEI H, HUANG MS, CHANG DW, DINNEY CP, WU XF. Genetic variations in glutathione pathway genes predict cancer recurrence in patients treated with transurethral resection and *Bacillus calmette-guerin* instillation for non-muscle invasive bladder cancer[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2015, 22(12): 4104-4110.
- [31] HAYASHI Y, YOKOTA A, HARADA H, HUANG G. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in cancer[J]. *Cancer Science*, 2019, 110(5): 1510-1517.
- [32] VATRINET R, LEONE G, de LUISE M, GIROLIMETTI G, VIDONE M, GASPARRE G, PORCELLI AM. The  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in cancer metabolic plasticity[J]. *Cancer & Metabolism*, 2017, 5: 3.
- [33] NEL AE, MÄDLER L, VELEGOL D, XIA T, HOEK EM, SOMASUNDARAN P, KLAESSIG F, CASTRANOVA V, THOMPSON M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface[J]. *Nature Materials*, 2009, 8(7): 543-557.
- [34] MURDOCK RC, BRAYDICH-STOLLE L, SCHRAND AM, SCHLAGER JJ, HUSSAIN SM. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique[J]. *Toxicological Sciences*, 2008, 101(2): 239-253.
- [35] NIERENBERG D, KHALED AR, FLORES O. Formation of a protein corona influences the biological identity of nanomaterials[J]. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 2018, 23(4): 300-308.
- [36] MOORE TL, RODRIGUEZ-LORENZO L, HIRSCH V, BALOG S, URBAN D, JUD C, ROTHENRUTISHAUSER B, LATTUADA M, PETRI-FINK A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(17): 6287-6305.
- [37] SALVATI A, PITEK AS, MONOPOLI M, PRAPAINOP K, BOMBELLI FB, HRISTOV DR, KELLY PM, ÅBERG C, MAHON E, DAWSON K. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface[J]. *Nature Nanotechnology*, 2013, 8(2): 137-143.
- [38] LIMBACH LK, LI YC, GRASS RN, BRUNNER TJ, HINTERMANN MA, MULLER M, GUNTHER D, STARK WJ. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(23): 9370-9376.
- [39] REN J, CAI R, WANG J, DANİYAL M, BAIMANOV D, LIU Y, YIN D, LIU Y, MIAO Q, ZHAO Y, CHEN C. Precision nanomedicine development based on specific opsonization of human cancer patient-personalized protein coronas[J]. *Nano Letters*, 2019, 19(7): 4692-4701.

(本文责编 陈宏宇)