

# 含铜硅酸钙纳米棒复合水凝胶用于肿瘤治疗和皮肤伤口愈合性能研究

吴爱军<sup>1,2</sup>, 朱敏<sup>1</sup>, 朱钰方<sup>2</sup>

(1. 上海理工大学 材料与化学学院, 上海 200093; 2. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 高性能陶瓷与超微结构国家重点实验室, 上海 200050)

**摘要:** 为了清除皮肤肿瘤手术切除后的残余肿瘤细胞并促进皮肤伤口愈合, 开发一种具有肿瘤治疗和促进皮肤伤口愈合功能的水凝胶具有重要意义。本研究以水合硅酸钙纳米线为基体材料, 以 NaCl 和 KCl 为熔盐介质, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 为铜源, 采用熔盐法制备了含铜硅酸钙(Cu-CS)纳米棒, 并将其复合到海藻酸钠水凝胶得到 Cu-CS 纳米棒复合水凝胶(Cu-CS/SA)。实验结果表明, 随着铜盐添加量增大和熔盐处理温度升高, Cu-CS 纳米棒的 Cu 含量逐渐上升, 但其催化过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)生成羟基自由基(·OH)的性能呈现先升高后下降的趋势; 在 3%铜盐添加量和熔盐处理温度 700 °C 条件下所制备的 3Cu-CS 纳米棒具有最佳的催化性能, Cu 元素均匀地分布在纳米棒表面, 其价态为+2 价, 且 Cu 元素的含量极低, 仅为 0.61%。细胞实验发现 Cu-CS 纳米棒含量不超过 20%的复合水凝胶具有良好的生物相容性, 并且 Cu-CS/SA 水凝胶在模拟肿瘤微环境条件下能催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成高细胞毒性的·OH, 进而实现化学动力学治疗肿瘤的效果, 同时还能促进血管内皮细胞和成纤维细胞的增殖和迁移。因此, Cu-CS 纳米棒复合水凝胶有望用于皮肤肿瘤术后治疗。

**关键词:** 熔盐法; 含铜硅酸钙纳米棒; 水凝胶; 化学动力学治疗; 皮肤伤口愈合

中图分类号: TQ174 文献标志码: A

## Copper-incorporated Calcium Silicate Nanorods Composite Hydrogels for Tumor Therapy and Skin Wound Healing

WU Aijun<sup>1,2</sup>, ZHU Min<sup>1</sup>, ZHU Yufang<sup>2</sup>

(1. School of Materials and Chemistry, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. State Key Laboratory of High Performance Ceramics and Superfine Microstructures, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

**Abstract:** Developing a hydrogel with tumor therapy and skin wound healing is of great significance for eliminating residual tumor cells and promoting skin wound healing after surgical resection of skin cancers. Here, copper-incorporated calcium silicate (Cu-CS) nanorods were prepared by a molten salt method with calcium hydrate silicate as matrix, NaCl and KCl as molten salt, and CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O as Cu source, and then incorporated into sodium alginate (SA) hydrogel to achieve Cu-CS/SA composite hydrogel. The results showed that Cu content of Cu-CS nanorods increased with the increase of the Cu source addition and the treatment temperature, but their catalytic activity for

收稿日期: 2022-03-21; 收到修改稿日期: 2022-04-19; 网络出版日期: 2022-05-09

基金项目: 国家自然科学基金 (51872185, 52072246)

National Natural Science Foundation of China (51872185, 52072246)

作者简介: 吴爱军(1997-), 男, 硕士研究生. E-mail: wuaijun1233@163.com

WU Aijun (1997-), male, Master candidate. E-mail: wuaijun1233@163.com

通信作者: 朱敏, 副教授. E-mail: mzhu@usst.edu.cn; 朱钰方, 教授. E-mail: zjf2412@163.com

ZHU Min, associate professor. E-mail: mzhu@usst.edu.cn; ZHU Yufang, professor. E-mail: zjf2412@163.com

producing hydroxy radical ( $\cdot\text{OH}$ ) from  $\text{H}_2\text{O}_2$  exhibited the trend of increasing and then decreasing. Nanorods, prepared with 3% copper source (3Cu-CS) at  $700\text{ }^\circ\text{C}$ , displayed the best catalytic performance. Cu with +2 valence state could be uniformly distributed on the surface of Cu-CS nanorods, with Cu content as low as 0.61%. Importantly, Cu-CS/SA hydrogel with Cu-CS nanorods less than 20% were biocompatible and could catalyze  $\text{H}_2\text{O}_2$  to produce cytotoxic  $\cdot\text{OH}$  in a simulated tumor microenvironment, exhibiting outstanding chemodynamic effect. Furthermore, Cu-CS/SA hydrogel could promote proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells and human dermal fibroblast. Therefore, Cu-CS/SA hydrogel is a promising material for applying in tumor therapy and skin wound healing.

**Key words:** molten salt method; copper-incorporated calcium silicate nanorods; hydrogel; chemodynamic therapy; skin wound healing

黑色素瘤是一种常见的恶性皮肤肿瘤, 转移性强、致死率高<sup>[1-2]</sup>, 目前临床治疗的主要方法是手术切除和化疗<sup>[3]</sup>。然而, 手术切除会造成大面积皮肤缺损且很难彻底消除残余肿瘤细胞, 而化疗通常有很强的毒副作用<sup>[4-5]</sup>。近年来一些新兴的肿瘤治疗方法不断涌现, 如化学动力学治疗<sup>[6-7]</sup>、光动力学治疗<sup>[8]</sup>、免疫治疗<sup>[9]</sup>等。其中化学动力学治疗是治疗剂基于(类)芬顿反应将  $\text{H}_2\text{O}_2$  催化生成高毒性的 $\cdot\text{OH}$ 来杀死肿瘤细胞, 具有靶向特异性、毒副作用小等优势。因此, 开发兼具低毒副作用且能有效清除术后残余肿瘤细胞和促进皮肤伤口愈合的功能生物材料具有重要意义。

硅酸盐生物陶瓷材料由硅、氧及其他生物活性元素组成, 在皮肤修复领域展现出广阔前景<sup>[10]</sup>。硅酸盐生物陶瓷材料由于生物降解而缓慢释放的硅离子及其他活性离子可促进皮肤等软组织修复<sup>[11-13]</sup>。例如, 硅酸钙(Calcium Silicate, CS)是最常见的二元硅酸盐生物陶瓷, 其降解释放的钙、硅离子对血管内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs)和成纤维细胞(Human Dermal Fibroblasts, HDFs)的增殖、迁移以及蛋白质和生长因子的表达有促进作用<sup>[14-15]</sup>。Tian 等<sup>[16]</sup>用 CS 粉体的浸提液培养 HUVECs, 发现当 CS 的浓度为  $25\text{ mg/mL}$  时, 其浸提液能明显促进 HUVECs 增殖; 当 CS 的浓度为  $0.195\sim 0.78\text{ mg/mL}$  时, 其浸提液能明显促进 HUVECs 的血管内皮生长因子表达。

虽然 CS 陶瓷在皮肤修复领域具有应用前景, 但它却缺乏肿瘤治疗功能。值得注意的是, Cu 离子不仅可以模拟低氧压环境刺激血管新生<sup>[17]</sup>, 还能在酸性环境下催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生 $\cdot\text{OH}$ 用于杀死肿瘤细胞<sup>[18]</sup>。Chen 等<sup>[19]</sup>将含  $\text{CuO}_2$  纳米颗粒的微针刺入裸鼠背部的皮肤肿瘤, 由于肿瘤酸性微环境诱导微针中释放

的 Cu 离子与  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应生成 $\cdot\text{OH}$ 而明显抑制肿瘤生长。因此, 如果能将 Cu 元素引入 CS 陶瓷, 则有可能得到一种低毒副作用且能有效清除术后残余肿瘤细胞和促进皮肤伤口愈合的功能生物材料用于恶性皮肤肿瘤治疗。

目前, 含铜硅酸钙(Cu-CS)生物陶瓷粉体的制备主要采用化学沉淀法、溶胶-凝胶法等<sup>[20-21]</sup>。Kong 等<sup>[20]</sup>采用化学沉淀法制备了 Cu-CS 粉体, 并证实其释放的 Cu 离子和 Si 离子对血管生成具有协同作用。但其绝大部分 Cu 元素分布在 CS 粉体内部, 使得催化位点稀少、化学动力学性能降低, 而提高 Cu 元素含量则会导致细胞毒性增大。因此, 如何制备 Cu 含量低且高催化活性高的 Cu-CS 生物陶瓷粉体依然是极富挑战的课题。

熔盐法是一种以盐类为反应介质, 在熔融盐中反应生成目标产物的方法。液态的熔盐环境有利于金属前驱体与基体材料表面反应, 将微量的金属元素均匀地负载在基体材料表面<sup>[22-23]</sup>。Xiao 等<sup>[24]</sup>通过熔盐法在  $\text{TiO}_2$  纳米颗粒表面负载原子级分布的 Ni, 制备出高效的单原子催化剂, 发现熔融离子的强极化能力有利于 Ti-O 键断裂, 并促进 Ni-O 键形成, 从而将原子级分布的 Ni 负载在  $\text{TiO}_2$  表面。因此, 采用熔盐法有可能制备出 Cu 含量低且催化活性高的 Cu-CS 生物陶瓷。

从实际应用考虑, 如果将 Cu-CS 粉体直接敷于皮肤肿瘤术后创面, 松散的粉体难以提供足够的机械支撑和多孔结构来诱导新生组织的长入, 而且也不利于后期敷料清除。将含 Cu-CS 粉体与水凝胶复合形成创面敷料则可以避免上述问题, 同时水凝胶还具有保持伤口湿润和吸收渗出液功能, 有利于皮肤修复<sup>[25]</sup>。其中, 海藻酸钠水凝胶(SA)因具有生物相容性良好、制备工艺简单等优势而常被用

于制备皮肤创面敷料<sup>[26-27]</sup>。Ma 等<sup>[28]</sup>制备的复合  $\beta$ -FeSi<sub>2</sub> 粉体的 SA, 具有光热-化学动力学联合治疗肿瘤效果, 并且释放的生物活性 Fe 离子和 Si 离子还有利于 HUVECs 的迁移和分化而促进皮肤伤口的血管生成。

本研究以具有高比表面积的水合硅酸钙纳米线 ( $\text{Ca}_6\text{Si}_6\text{O}_{17}(\text{OH})_2$ , CSH) 为基体材料、NaCl 和 KCl 为熔盐介质、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  为铜金属前驱体, 采用熔盐法制备 Cu-CS 纳米棒, 再将其复合 SA 得到 Cu-CS 纳米棒复合水凝胶 (Cu-CS/SA)。详细研究了铜盐添加量和熔盐处理温度对 Cu-CS 纳米棒催化性能的影响, 探究了 Cu-CS/SA 水凝胶的生物相容性以及化学动力学性能, 进一步评估了 Cu-CS/SA 水凝胶分别与 HUVECs 和 HDFs 培养时对细胞增殖和迁移的影响。

## 1 实验方法

### 1.1 实验药品

四水合硝酸钙 ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 98.5\%$ )、九水合硅酸钠 ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , AR)、氯化钙 ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\geq 96.0\%$ )、氯化钠 ( $\text{NaCl}$ ,  $\geq 99.5\%$ )、氯化钾 ( $\text{KCl}$ ,  $\geq 99.8\%$ )、五水合硫酸铜 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99.0\%$ ) 均购于中国医药集团上海化学试剂有限公司, 海藻酸钠 (SA) 购于阿法埃莎化学 (中国) 有限公司, 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 购于上海碧云天生物科技有限公司。所有试剂在使用前未经过进一步提纯处理。

### 1.2 水合硅酸钙纳米线的合成

研究采用水热法合成水合硅酸钙纳米线 ( $\text{Ca}_6\text{Si}_6\text{O}_{17}(\text{OH})_2$ , CSH)<sup>[29]</sup>。首先, 将 11.368 g 的  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  和 9.446 g 的  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  分别溶于 100 mL 去离子水, 常温下磁力搅拌 1 h; 接着, 将上述两种溶液混合均匀后转移至水热釜, 200 °C 下反应 24 h; 待水热釜自然冷却后, 将白色沉淀物用去离子水和乙醇分别洗涤三次, 在 60 °C 烘箱中烘干, 得到 CSH 纳米线。

### 1.3 Cu-CS 纳米棒的制备

熔盐法制备 Cu-CS 纳米棒的具体实验步骤如下: 首先, 将 0.585 g NaCl、0.746 g KCl、1 g CSH 分别与 0、5、10、30、50 mg 的  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  混合, 在玛瑙研钵中研磨 40 min, 使粉体混合均匀; 接着, 将研磨均匀的粉体转移至坩埚, 再置于管式炉中, 在氩气气氛中以 5 °C/min 的升温速度加热至 700 °C, 保温 1 h, 冷却至室温后将坩埚取出; 然后, 用去离子水洗涤混合物五次, 除去可溶性盐; 最后, 将洗涤后的粉体在 60 °C 的烘箱中干燥 24 h, 得到不同铜含量

的硅酸钙纳米棒, 并分别命名为 CS、0.5Cu-CS、1Cu-CS、3Cu-CS 和 5Cu-CS。

### 1.4 Cu-CS 纳米棒复合水凝胶的制备

制备 Cu-CS 纳米棒复合水凝胶的具体实验步骤如下: 首先, 将 1.5 g 的海藻酸钠 (SA) 加入 100 mL 去离子水中, 磁力搅拌 24 h, 得到质量分数 1.5% 的 SA 溶液; 然后, 分别将 0、0.75、1.5、3、6 mg 的 3Cu-CS 和 3 mg 的 CS 纳米棒加入到 1 g 含质量分数 1.5% SA 溶液中, 搅拌均匀; 最后, 用质量分数 3% 的  $\text{CaCl}_2$  溶液交联 24 h, 得到成型水凝胶, 并根据纳米棒与 SA 的质量比, 将不同水凝胶分别命名为 SA、5%-Cu-CS/SA、10%-Cu-CS/SA、20%-Cu-CS/SA、40%-Cu-CS/SA 和 20%-CS/SA。

### 1.5 结构与理化性能表征

用 18 kW 靶向 X 射线衍射仪 (X-ray Diffraction, XRD, D8Advance, Bruker, 德国) 分析粉体的物相组成; 使用场发射扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM, S-4800, Hitachi, 日本) 观察粉体和水凝胶的微观形貌; 利用透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscope, TEM, JEM-2100F, 日本) 观察粉体的形貌和元素分布。采用电感耦合等离子体原子发射光谱 (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, ICP-AES, Varian 715-ES, 美国) 法测定纳米棒中 Cu 含量和水凝胶释放的 Ca、Si、Cu 离子; 采用 X 射线光电子能谱仪 (X-ray Photoelectron Spectrometer, XPS, ESCALab250, Thermo Fisher Scientific, 美国) 测定纳米棒中 Cu 元素的价态。采用多功能酶标仪 (SpectraFluor Plus, Tecan, Crailsheim, 德国) 测试紫外-可见光吸收光谱, 用于分析纳米棒和水凝胶的化学动力学性能。

### 1.6 水凝胶离子释放测试

研究采用 ICP-AES 方法测定水凝胶释放的 Ca、Si、Cu 离子。将 SA、20%-CS/SA、20%-Cu-CS/SA 水凝胶浸泡在 37 °C 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 中, 控制水凝胶质量与 Tris-HCl 缓冲液体积的比例为 0.1 g/mL。浸泡 1、3、5 d 离心后分别吸取上层溶液, 并过孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜收集滤液, 最后检测滤液中 Ca、Si、Cu 离子浓度。

### 1.7 纳米棒的化学动力学性能检测

以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 作为  $\cdot\text{OH}$  探针, 根据 TMB 的显色反应分析 Cu-CS 纳米棒的化学动力学性能。为测试不同制备条件对 Cu-CS 纳米棒的化学动力学性能的影响, 将不同铜盐添加量和不同熔盐处理温度下制备的纳米棒分散于含有  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 mmol/L) 的 pH 6.0 的乙酸钠缓冲溶液中 (其终浓

度为 1 mg/mL), 然后立即加入 30  $\mu$ L 的 TMB 乙醇溶液(10 mg/mL), 反应 30 min 后, 利用多功能酶标仪检测溶液的紫外-可见光吸收光谱。

为揭示不同 pH 对 Cu-CS 纳米棒的化学动力学性能的影响, 本实验将 3Cu-CS 和 CS 纳米棒分散于 pH 6.0 或 pH 7.4 的含  $H_2O_2$  (100 mmol/L) 的乙酸钠缓冲溶液中, 保持 3Cu-CS 和 CS 纳米棒在反应体系中的终浓度为 1 mg/mL, 然后立即加入 30  $\mu$ L 的 TMB 乙醇溶液(10 mg/mL), 反应 20 min 后, 检测溶液的紫外-可见光吸收光谱。

### 1.8 水凝胶的化学动力学性能检测

按上述 1.7 节的方法分析 Cu-CS 纳米棒复合水凝胶的化学动力学性能。将不同 Cu-CS 添加量的水凝胶置于含有  $H_2O_2$  (100 mmol/L) 的 pH 6.0 的乙酸钠缓冲溶液中, 其最终浓度为 0.1 g/mL, 然后立即加入 30  $\mu$ L 的 TMB 乙醇溶液(10 mg/mL), 反应 60 min 后, 检测溶液的紫外-可见光吸收光谱。

为探究 Cu-CS/SA 水凝胶随时间变化的化学动力学性能, 将 20%-Cu-CS/SA 水凝胶置于含有  $H_2O_2$  (100 mmol/L) 的 pH 6.0 的乙酸钠缓冲溶液中, 其最终浓度为 0.1 g/mL, 然后立即加入 30  $\mu$ L 的 TMB 乙醇溶液(10 mg/mL), 每隔 5 min 利用多功能酶标仪检测一次溶液的紫外-可见光吸收光谱。

为探究 Cu-CS/SA 水凝胶在没有  $H_2O_2$  情况下随时间变化的化学动力学性能, 将 20%-Cu-CS/SA 水凝胶置于不含  $H_2O_2$  的 pH 6.0 的乙酸钠缓冲溶液中, 其最终浓度为 0.1 g/mL, 然后立即加入 30  $\mu$ L 的 TMB 乙醇溶液(10 mg/mL), 每隔 5 min 利用多功能酶标仪检测一次溶液的紫外-可见光吸收光谱。

为探究 TMB 随时间变化的化学动力学性能, 将 30  $\mu$ L 的 TMB 乙醇溶液(10 mg/mL) 加入到含有  $H_2O_2$  (100 mmol/L) 的 pH 6.0 的乙酸钠缓冲溶液中, 每隔 5 min 利用多功能酶标仪检测一次溶液的紫外-可见光吸收光谱。

为探究  $H_2O_2$  浓度对 Cu-CS/SA 水凝胶的化学动力学性能的影响, 将 20%-Cu-CS/SA 水凝胶置于含不同浓度  $H_2O_2$  (50、75、100 mmol/L) 的乙酸钠缓冲溶液(pH 6.0) 中, 保持 20%-Cu-CS/SA 水凝胶在反应体系中的浓度为 0.1 g/mL, 然后立即加入 30  $\mu$ L 的 TMB 乙醇溶液(10 mg/mL), 每隔 5 min 检测一次溶液在 652 nm 处的吸光值。

为探究溶液的 pH 对 Cu-CS/SA 水凝胶的化学动力学性能的影响, 将 20%-Cu-CS/SA 水凝胶置于 pH 6.0 或 pH 7.4 的含  $H_2O_2$  (100 mmol/L) 的乙酸钠缓冲溶液中, 保持 20%-Cu-CS/SA 水凝胶在反应体

系中的浓度为 0.1 g/mL, 然后立即加入 30  $\mu$ L 的 TMB 乙醇溶液(10 mg/mL), 每隔 5 min 检测一次溶液在 652 nm 处的吸光值。

### 1.9 细胞毒性检测

采用 CCK-8 方法测试计算细胞的存活率, 具体步骤如下: 首先, 将 HUVECs 以  $3 \times 10^4$  cells/well 或 HDFs 以  $2 \times 10^4$  cells/well 的密度接种到 24 孔板内培养 24 h, 使其贴壁生长; 接着, 移去孔板里的培养液, 并将装有 SA、20%-CS/SA、5%-Cu-CS/SA、10%-Cu-CS/SA、20%-Cu-CS/SA 和 40%-Cu-CS/SA 水凝胶的 Transwell 细胞培养板小室转移到多孔板的每个孔中, 重新注入培养液, 得到的水凝胶含量为 0.1 g/mL, 空白组 (Blank 组) 中换上等量的培养液, 共同培养 24 h; 然后, 移去上述的 Transwell 小室和培养液, 在每孔中加入 300  $\mu$ L 的 10% CCK-8 溶液, 继续培养 2 h; 最后, 每孔吸取 100  $\mu$ L 的溶液至 96 孔板中, 利用酶标仪检测 450 nm 波长处各孔的吸光值(OD), 根据不同组别与空白对照的 OD 值的比值计算细胞存活率, 从而判断水凝胶的细胞毒性。

### 1.10 细胞增殖实验

利用 CCK-8 方法测试细胞增殖, 具体步骤如下: 首先, 将 HUVECs (每孔  $5 \times 10^3$ ) 或 HDFs ( $5 \times 10^3$  cells/well) 接种到 24 孔板内培养 24 h, 使其贴壁生长; 接着, 移去孔板里的培养液, 并将装有 SA、20%-CS/SA、20%-Cu-CS/SA 水凝胶的 Transwell 小室转移到每孔中, 重新注入培养液, 最终的水凝胶含量为 0.1 g/mL, Blank 组中换上等量的培养液, 隔天换液; 然后, 在到达预设的时间点(1、3 和 5 d), 按 1.9 节的方法检测 450 nm 波长处各孔的 OD 值。

### 1.11 黑色素瘤细胞内活性氧及其体外抗肿瘤检测

采用荧光倒置显微镜观察黑色素瘤细胞 (B16F10) 内活性氧(ROS) 情况, 利用 CCK-8 方法检测 B16F10 细胞的活性。实验组别为: (a) Blank (pH 7.4 或 pH 6.0); (b) SA (pH 7.4 或 pH 6.0); (c) 20%-CS/SA (pH 7.4 或 pH 6.0); (d) 20%-Cu-CS/SA (pH 7.4 或 pH 6.0); (e) Blank+ $H_2O_2$  (100  $\mu$ mol/L, pH 7.4 或 pH 6.0); (f) SA+ $H_2O_2$  (100  $\mu$ mol/L, pH 7.4 或 pH 6.0); (g) 20%-CS/SA+ $H_2O_2$  (100  $\mu$ mol/L, pH 7.4 或 pH 6.0); (h) 20%-Cu-CS/SA+ $H_2O_2$  (100  $\mu$ mol/L, pH 7.4 或 pH 6.0), 具体实验步骤如下述。

为探究不同处理条件对 B16F10 细胞内 ROS 的影响, 利用荧光倒置显微镜观察其胞内荧光变化。首先, 将 B16F10 细胞( $2 \times 10^4$  cells/well) 接种到 24 孔板内培养 24 h, 使其贴壁生长; 接着, 移去培养液,

将装有 SA、20%-CS/SA、20%-Cu-CS/SA 水凝胶的 Transwell 小室轻轻放入孔板中, Blank 组为空白对照, 在这四组中分别加入 pH 6.0 的不含或者含有 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的细胞培养液, 水凝胶的最终浓度为 0.1 g/mL, 共同培养 24 h; 然后, 移去上述 Transwell 小室和培养液, 各组加入 DCFH-DA 检测试剂, 继续培养 20 min, 移去检测液并用磷酸缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) 清洗 3 次后用荧光倒置显微镜观察 B16F10 细胞内 ROS 变化, 其中绿色荧光代表产生的 ROS。

为探究 Cu-CS/SA 水凝胶的化学动力学治疗效果, 采用 CCK-8 法测试不同条件处理的 B16F10 细胞的活性。首先, 将 B16F10 细胞( $2 \times 10^4$  cells/well)接种到 24 孔板内培养 24 h, 使其贴壁生长; 接着移去培养液, 将装有 SA、20%-CS/SA、20%-Cu-CS/SA 水凝胶的 Transwell 小室轻轻放入孔板中, Blank 组为对照组, 然后按照实验分组加入不同 pH 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的细胞培养液, 使水凝胶的最终浓度为 0.1 g/mL, 共同培养 24 h; 然后移去上述的 Transwell 小室和培养基, 在每孔中加入 300  $\mu\text{L}$  10% CCK-8 溶液, 继续培养 2 h; 最后, 每孔吸取 100  $\mu\text{L}$  溶液至 96 孔板中, 利用酶标仪测试 450 nm 波长处每孔的 OD 值。

### 1.12 细胞迁移实验

为测定 Cu-CS 纳米棒复合水凝胶对正常细胞迁移的影响, 本研究做了 HUVECs 和 HDFs 的划痕实验。首先, 将 HUVECs ( $1 \times 10^5$  cells/well) 或 HDFs ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) 接种到 24 孔板内培养, 培养一段时间使细胞长成融合单层状态; 接着, 使用 200  $\mu\text{L}$  的微量移液器枪头垂直向下划出一条均匀的划痕, 用无血清的培养基洗去多余的细胞碎片, 使划痕边缘平整; 然后, 将装有 SA、20%-CS/SA、20%-Cu-CS/SA 水凝胶的 Transwell 小室轻轻放入孔板中, Blank 组

为空白对照, 加入无血清的培养液培养 24 h, 水凝胶的最终浓度为 0.1 g/mL; 最后, 各组细胞样品中加入 300  $\mu\text{L}$  的 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 30 min, 用 PBS 溶液洗涤 3 次, 再加入 200  $\mu\text{L}$  的结晶紫溶液 (0.1%) 染色 2 min, PBS 溶液洗去多余的染料, 并用 ImageJ 软件标记创口边缘, 测定未愈合的创面面积, 计算细胞迁移率。细胞迁移率=(初始创面面积-特定时间点的创面面积)/初始创面面积 $\times 100\%$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Cu-CS 纳米棒的制备与表征

据文献报道<sup>[24]</sup>, 熔盐法制备负载型催化剂时, 前驱体添加量和熔盐处理温度是影响催化剂催化性能的两个重要因素。因此, 本研究在不同铜盐添加量和不同熔盐处理温度下制备了 Cu-CS 粉体, 并进行表征与分析。图 1(a) 是不同铜盐添加量的 CSH 纳米线在 700  $^{\circ}\text{C}$  熔盐处理制备的 Cu-CS 粉体的 XRD 图谱。由图谱可知, 铜盐添加量为 0、0.5%、1%、3%、5% 的 CSH 纳米线都转变成了硅酸钙( $\text{CaSiO}_3$ ) 物相。图 1(b) 是 3% 铜盐添加量的 CSH 纳米线经不同温度熔盐处理制备的 Cu-CS 粉体的 XRD 图谱, 可以看出经过 650、700 和 750  $^{\circ}\text{C}$  熔盐处理的 CSH 纳米线也都转变成了  $\text{CaSiO}_3$  物相。Shen 等<sup>[30]</sup>研究表明, CSH 在高温下会脱去结合水形成  $\text{CaSiO}_3$ 。因此, CSH 纳米线经过熔盐处理可得到更加稳定的  $\text{CaSiO}_3$  物相。另一方面, 在不同铜盐添加量和不同熔盐温度条件下制备的 Cu-CS 粉体都没有在 XRD 图谱上出现铜相关的物相, 可能是由于熔盐处理时熔融离子的强极化力将 Cu 元素负载在基体表面<sup>[24]</sup>, 未形成铜单质或者铜的化合物, 并且 Cu 元素负载量极低, 难以形成特征峰。

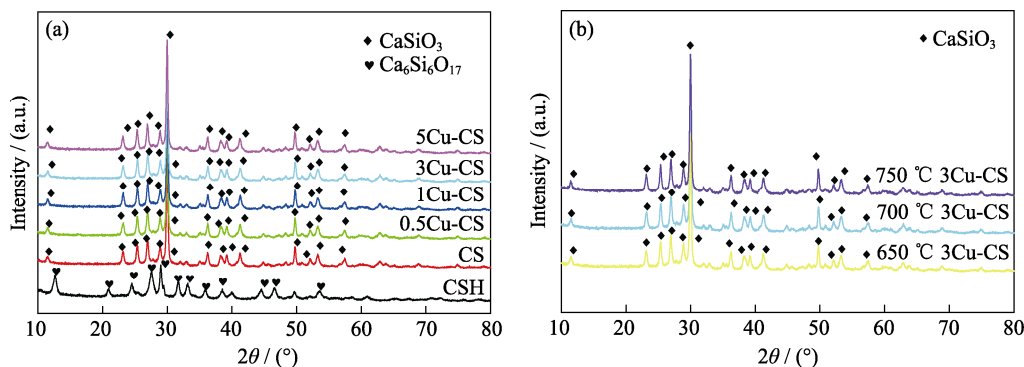


图 1 (a)不同铜盐添加量和(b)不同温度熔盐处理制备的 Cu-CS 粉体的 XRD 图谱

Fig. 1 XRD patterns of Cu-CS powders prepared by molten salt method with (a) different amounts of copper salt and (b) different temperatures

图 2(a~c)分别为 CSH、CS 和 3Cu-CS 粉体的 SEM 照片,可以看出,CSH 为纳米线,具有细长的线状结构,与文献报道的形貌一致<sup>[29]</sup>;熔盐处理后得到的 CS 和 3Cu-CS 样品为短棒状结构的纳米棒。纳米线向纳米棒形貌改变可能是由于熔盐法制备过程中的熔盐体系具有刻蚀性<sup>[31]</sup>,可刻蚀 CSH 纳米线,使其断裂形成纳米棒。

图 3 是 3Cu-CS 纳米棒的 TEM 照片及 EDS 能谱与元素分布。从图 3(a)可以看出,熔盐法制备的 3Cu-CS 纳米棒形貌较均一,直径为(71±12) nm,长度为(787±38) nm,表面光滑,未出现铜单质或者铜氧化物纳米颗粒。EDS 图谱(图 3 (b))在 8.048 keV 处出现 Cu 元素特征峰,表明 3Cu-CS 纳米棒中含有 Cu 元素,而 EDS 图谱在 7.478 和 8.265 keV 处出现 Ni 元素特征峰则为来源于支撑 3Cu-CS 纳米棒的镍

网。进一步地,3Cu-CS 纳米棒的 Ca、Si、O、Cu 元素分布均匀(图 3 (c)),表明熔盐法能将 Cu 元素均匀地负载在硅酸钙纳米棒表面。

本研究利用 XPS 图谱进一步分析了 3Cu-CS 纳米棒表面 Cu 元素的价态。从 3Cu-CS 纳米棒的 Cu2p 图谱可知(图 4(a)),Cu 2p<sub>1/2</sub> 和 Cu2p<sub>3/2</sub> 主峰结合能为 953.3 和 933.3 eV,且 Cu2p<sub>1/2</sub> 和 Cu2p<sub>3/2</sub> 卫星峰结合能为 962.6 和 942.6 eV,表明 3Cu-CS 纳米棒中的 Cu 元素的价态为+2 价<sup>[19,32]</sup>。Lin 等<sup>[33]</sup>研究表明,Cu<sup>2+</sup>能在酸性条件下与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应生成·OH。因此,Cu-CS 纳米棒表面的 Cu 元素可以作为活性位点在肿瘤酸性微环境中与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应生成·OH,发挥化学动力学效应。进一步地,本研究采用 ICP-AES 方法测定了不同工艺条件下制备的 Cu-CS 纳米棒的 Cu 负载量。一方面,在 700 °C 的熔盐处理温度下,

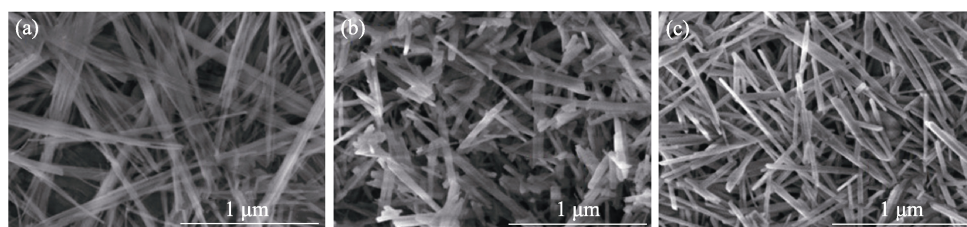


图 2 (a) CSH、(b) CS 和(c) 3Cu-CS 粉体的 SEM 照片  
Fig. 2 SEM images of (a) CSH, (b) CS and (c) 3Cu-CS powders

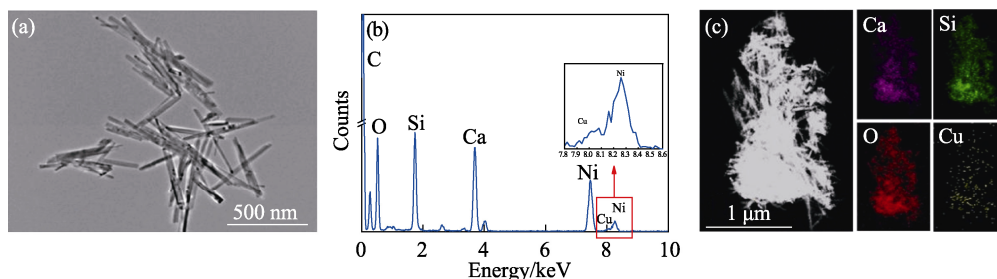


图 3 3Cu-CS 纳米棒的(a) TEM 照片、(b) EDS 谱图和(c)元素分布图  
Fig. 3 (a) TEM image, (b) EDS spectrum and (c) elemental mapping of 3Cu-CS nanorods  
The color figure can be obtained from online edition

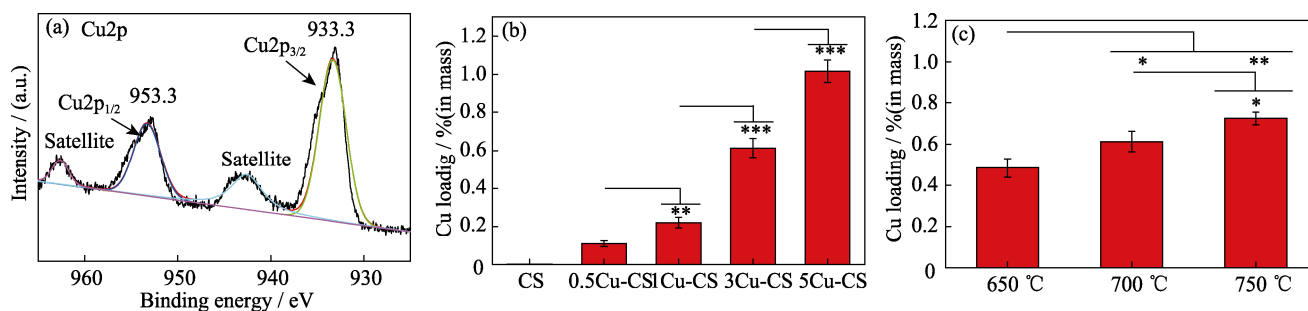


图 4 3Cu-CS 纳米棒的(a)Cu2p XPS 图谱, ICP-AES 方法测定的(b)不同铜盐添加量和(c)不同熔盐处理温度制备的 Cu-CS 纳米棒的 Cu 负载量

Fig. 4 (a) Cu2p XPS spectrum of 3Cu-CS nanorods, Cu amounts of Cu-CS nanorods prepared with (b) different copper salt additions and (c) different temperatures by ICP-AES method, respectively. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$   
The color figures can be obtained from online edition

当铜盐添加量分别为 0、0.5%、1%、3%、5% 时制备的 CS、0.5Cu-CS、1Cu-CS、3Cu-CS、5Cu-CS 纳米棒的 Cu 含量分别是 0、0.11%、0.22%、0.61%、1.02% (图 4(b))。另一方面, 在铜盐添加量为 3% 的情况下, 当熔盐处理温度分别为 650、700 和 750 °C 时制备的 Cu-CS 纳米棒的 Cu 含量分别是 0.48%、0.61%、0.72% (图 4(c))。这表明铜盐添加量和熔盐处理温度都会影响 Cu-CS 纳米棒表面 Cu 元素的负载量<sup>[24]</sup>, 并且随着铜盐添加量和熔盐处理温度升高, Cu 元素在纳米棒表面的负载量也随之显著增加, 这将会对 Cu-CS 纳米棒的催化性能产生影响。

## 2.2 Cu-CS 纳米棒的化学动力学性能

本研究采用 TMB 分子作为  $\cdot\text{OH}$  探针测试 Cu-CS 纳米棒的化学动力学性能, 其原理为 Cu-CS 纳米棒与  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应的产物  $\cdot\text{OH}$  能使无色的 TMB 氧化成蓝色的氧化态 TMB(ox-TMB), 因此可以利用紫外-可见光吸收光谱来测定  $\cdot\text{OH}$  的产生<sup>[34]</sup>。由图 5(a) 可以看出, 在酸性条件下, 含有 100 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 TMB 测试液中同时加入 0.5Cu-CS、1Cu-CS、3Cu-CS、5Cu-CS 纳米棒均在 652 nm 处出现明显的特征吸收峰, 而加入 CS 纳米棒的 TMB 测试液、纯 TMB 测试液和只加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 TMB 测试液都没有任何特征吸收峰, 这表明只有 Cu-CS 纳米棒才可以在酸性条件下催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生  $\cdot\text{OH}$ 。从图 5(a) 还可以看出, 随 Cu 含量增加, Cu-CS 的化学动力学性能呈现先增强后减弱的趋势, 即当铜盐添加量为 3% 时, 化学动力学性能最高。由图 5(b) 可以看出, 在酸性条件下, 加入不同熔盐处理温度制备的 3Cu-CS 纳米棒测试液均在 652 nm 处有明显的特征峰, 即都具有化学动力学性能, 并且随着熔盐处理温度升高,

化学动力学性能也呈现先增强后减弱的趋势。综合以上结果可知 700 °C 熔盐处理 3% 铜盐添加量的 CS 纳米线制备的 3Cu-CS 纳米棒具有最佳的化学动力学性能。Kathleen 等<sup>[35]</sup>研究证明, 催化剂表面暴露的有效催化位点的比例将直接影响其催化活性。本研究中, 随着铜盐添加量增大和熔盐处理温度升高, Cu-CS 纳米棒的 Cu 元素负载量逐渐上升 (图 4(b, c)), 其表面的 Cu 催化位点也逐渐增加, 催化性能提高; 但过量的 Cu 元素负载则容易导致 Cu 元素团聚, 减少表面有效的催化位点, 造成催化性能下降。

图 5(c) 是在 pH 6.0 或者 pH 7.4, 有或没有  $\text{H}_2\text{O}_2$  条件下, 加入 3Cu-CS 纳米棒的 TMB 测试液在 400~800 nm 范围内的紫外-可见光吸收光谱。从图中可以看出, 在没有  $\text{H}_2\text{O}_2$  的情况下, 不同 pH 环境下加入 3Cu-CS 纳米棒都没有使 TMB 测试液在 652 nm 处出现特征峰; 在含有  $\text{H}_2\text{O}_2$  的情况下, pH 7.4 的 TMB 测试液中加入 3Cu-CS 纳米棒, 其在 652 nm 处的吸光值略有增加, 出现很弱的特征吸收峰, 而 pH 6.0 的 TMB 测试液中加入 3Cu-CS 纳米棒, 其在 652 nm 处的吸光值显著增加, 出现了明显的特征吸收峰。以上结果表明, 3Cu-CS 纳米棒只有在酸性条件下才能催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生大量  $\cdot\text{OH}$ , 这使得靶向肿瘤组织的化学动力学治疗成为可能。

## 2.3 水凝胶的微观形貌和结构

本研究将具有良好化学动力学性能的 3Cu-CS 纳米棒与海藻酸钠复合制备 Cu-CS/SA 复合水凝胶。图 6(a~c) 分别是冷冻干燥后的 SA、20%-CS/SA 和 20%-Cu-CS/SA 水凝胶的表面 SEM 照片, 三种水凝胶的表面均较光滑。从水凝胶的断面 SEM 照片可以看出, 三种水凝胶都具有微米级的孔结构, 其中 CS

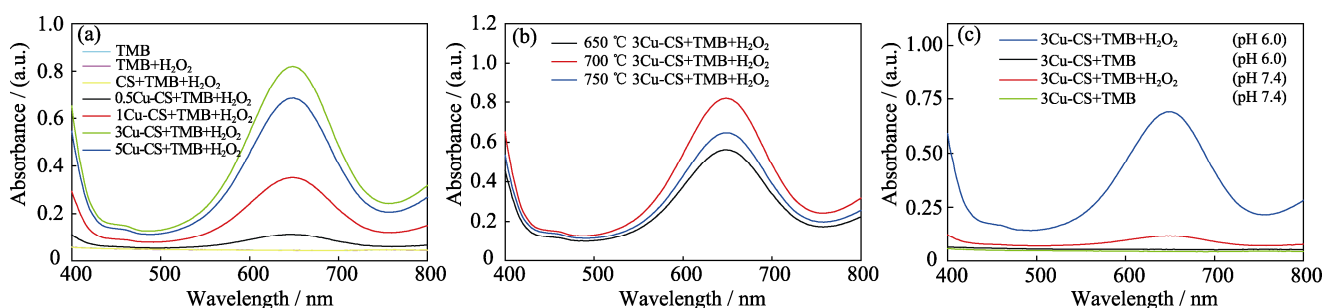


图 5 Cu-CS 纳米棒的化学动力学性能

Fig. 5 Chemodynamic effects of Cu-CS nanorods

(a, b) UV-Vis absorption spectra of TMB solutions with pH 6.0 and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 mmol/L) after adding Cu-CS nanorod (1 mg/mL) prepared by a molten salt method with (a) different copper salt additions and (b) different treatment temperatures for 30 min;

(c) UV-Vis absorption spectra of TMB solutions after adding 3Cu-CS nanorods (1 mg/mL) into TMB solutions under pH 6.0 or pH 7.4 conditions and with or without  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 20 min

The color figures can be obtained from online edition

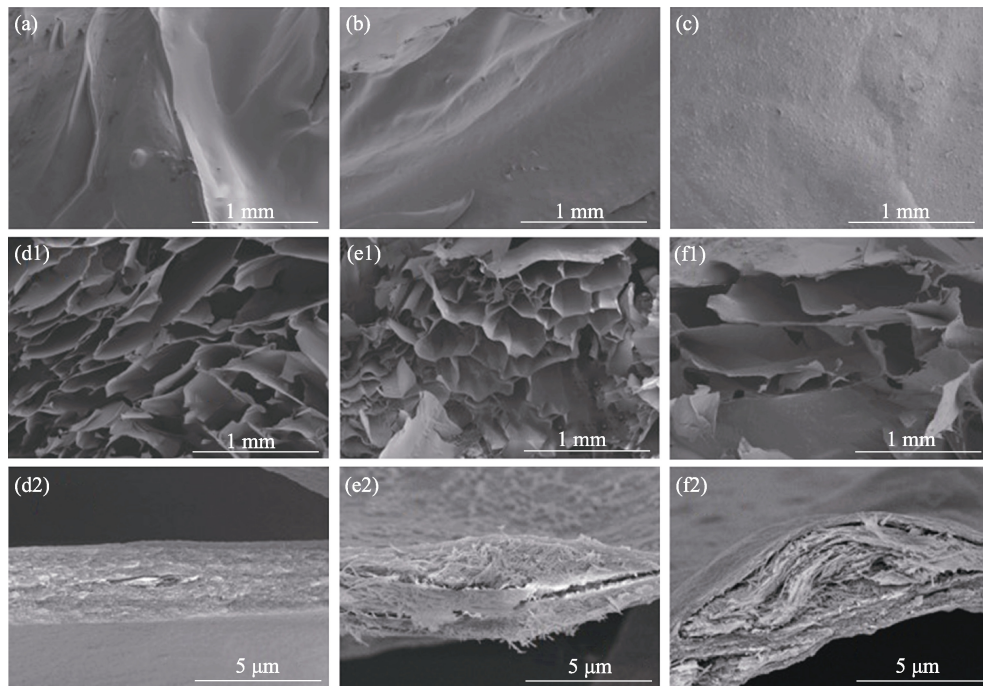


图 6 (a, d1, d2) SA、(b, e1, e2) 20%-CS/SA 和(c, f1, f2) 20%-Cu-CS/SA 水凝胶的表面以及断面 SEM 照片  
Fig. 6 SEM images of the surfaces and cross sections for (a, d1, d2) SA, (b, e1, e2) 20%-CS/SA and (c, f1, f2) 20%-Cu-CS/SA hydrogels

和 Cu-CS 纳米棒的复合没有对其孔结构产生影响(图 6(d1~f1)), 而且绝大部分的 CS 和 Cu-CS 纳米棒分布在水凝胶的孔壁内部(图 6(d2~f2))。

本研究进一步采用 ICP-AES 方法检测了 SA、20%-CS/SA 和 20%-Cu-CS/SA 水凝胶在 Tris-HCl 缓冲液中的离子释放情况。如图 7 所示, 20%-CS/SA 和 20%-Cu-CS/SA 水凝胶浸泡 5 d 后的 Ca 离子累计释放量分别为 20.1 和 19.6 mg/mL, 浸泡 5 d 后的 Si 离子累计释放量分别为 7.9 和 8.0 mg/mL, 两种水凝胶的 Ca、Si 离子释放量没有显著性差异。20%-Cu-CS/SA 水凝胶浸泡 1, 3, 5 d 后的 Cu 离子累计释放量分别为 0.22、0.30 和 0.30 mg/mL, 表明 20%-Cu-CS/SA 水凝胶对于 Cu 离子的释放具有初始快速释放的特点, 浸泡 3 d 后基本没有 Cu 离子释放, 并且 Cu 离子的

累计释放趋缓, 这可能是由于 Cu-CS 纳米棒的 Cu 元素含量低且分布在纳米棒表面造成的。由于 SA 水凝胶中并没有 CS 纳米棒或者 Cu-CS 纳米棒, 因此都未测得释放的 Ca、Si、Cu 离子。已有研究表明, 释放微量的 Ca 离子和 Si 离子有利于提高细胞活性<sup>[14-16]</sup>, 且释放微量的 Cu 离子不仅没有细胞毒性而且能促进血管的生成<sup>[16]</sup>, 同时释放 Cu 离子还有利于在肿瘤酸性微环境下与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应产生·OH 用于杀死肿瘤细胞<sup>[19]</sup>, 由此推断 20%-Cu-CS/SA 水凝胶具有良好的生物学效应。

## 2.4 水凝胶的化学动力学性能

Cu-CS/SA 水凝胶的化学动力学性能仍然以 TMB 分子为探针进行测试分析。由图 8(a)可以看出, 在 pH 6.0 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mmol/L) 条件下的 TMB 测试

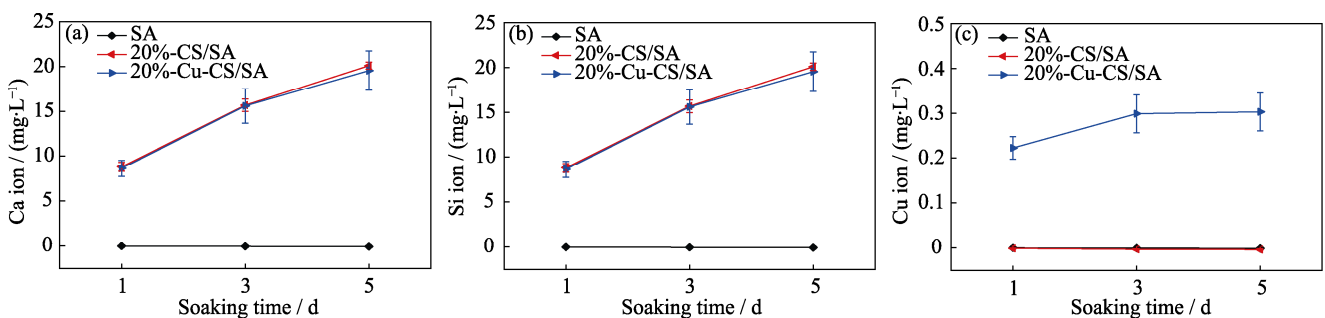


图 7 SA、20%-CS/SA 和 20%-Cu-CS/SA 水凝胶在 Tris-HCl 缓冲液中的(a) Ca、(b) Si、(c) Cu 离子释放  
Fig. 7 Release behaviors of (a) Ca, (b) Si and (c) Cu ions from SA, 20%-CS/SA and 20%-Cu-CS/SA hydrogels in Tris-HCl buffer

The color figures can be obtained from online edition



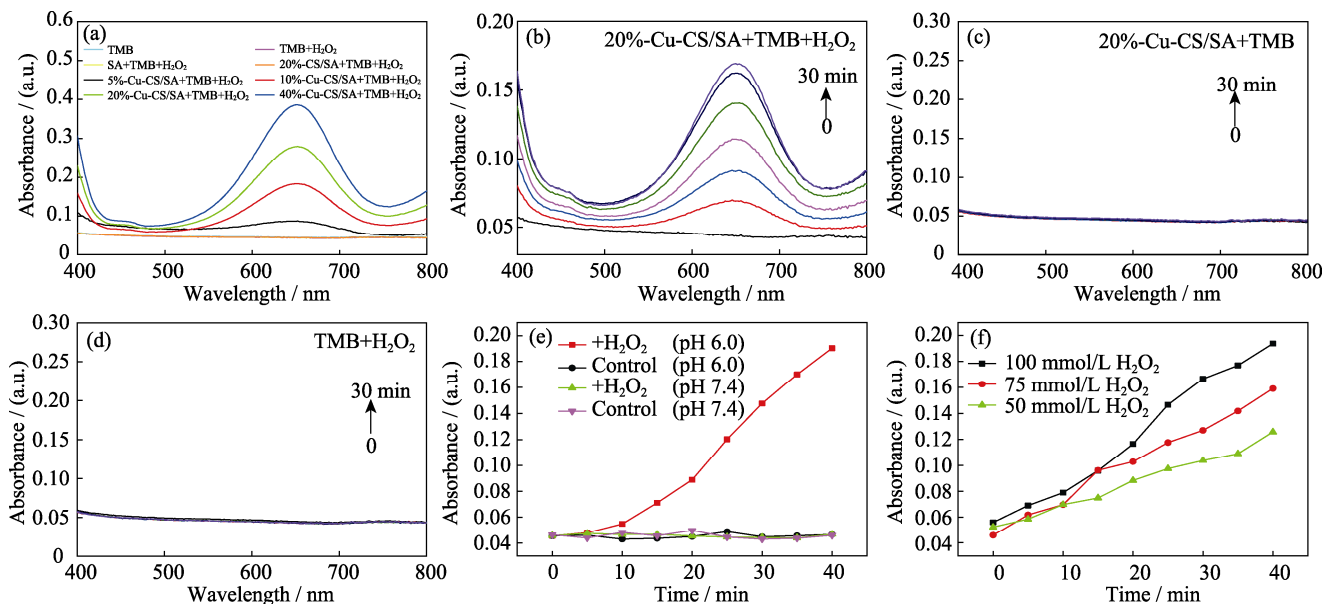


图 8 Cu-CS/SA 水凝胶的化学动力学性能

Fig. 8 Chemodynamic effects of Cu-CS/SA hydrogels

(a) UV-Vis absorption spectra of TMB solutions with pH 6.0 and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 mmol/L) after adding Cu-CS/SA hydrogel (0.1 g/mL) with different contents of Cu-CS nanorods for 60 min; (b) UV-Vis absorption spectra changes of TMB solutions with time after adding 20%-Cu-CS/SA hydrogel (0.1 g/mL) under a condition of pH 6.0 and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 mmol/L); (c) UV-Vis absorption spectra changes of TMB solutions with time after adding 20%-Cu-CS/SA hydrogel (0.1 g/mL) under a condition of pH 6.0; (d) UV-Vis absorption spectra changes of TMB solutions with time under a condition of pH 6.0 and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 mmol/L); (e) Absorbance changes at 652 nm versus time for TMB solutions with 20%-Cu-CS/SA hydrogel under pH 6.0 or pH 7.4 conditions and with or without  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (f) Absorbance changes at 652 nm versus time for TMB solutions with different concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  at pH 6.0 after adding 20%-Cu-CS/SA hydrogel (0.1 g/mL).

The color figures can be obtained from online edition

液中分别加入 5%-Cu-CS/SA、10%-Cu-CS/SA、20%-Cu-CS/SA、40%-Cu-CS/SA 水凝胶(0.1 g/mL), 反应 60 min 后 TMB 测试液在 652 nm 处均出现了对应于 ox-TMB 的特征吸收峰, 并且强度逐渐增加, 而纯 TMB 测试液、TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$  测试液、TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$ +SA 测试液和 TMB+  $\text{H}_2\text{O}_2$ +20%-CS/SA 测试液均没有出现吸收峰, 表明只有 Cu-CS/SA 水凝胶才能在酸性条件下催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生 $\cdot\text{OH}$ , 并且复合水凝胶的化学动力学性能随 Cu-CS 纳米棒含量的增加而增强。

图 8(b-d)分别是 pH 6.0 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 mmol/L)条件下加入 20%-Cu-CS/SA 水凝胶(0.1 g/mL)、pH 6.0 条件下只加入 20%-Cu-CS/SA 水凝胶(0.1 g/mL)、pH 6.0 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 mmol/L)条件下不加入 20%-Cu-CS/SA 水凝胶的 TMB 测试液在 400~800 nm 范围内吸光值随时间变化的曲线。从图中可以看出, 只有在 pH 6.0 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 mmol/L)条件下加入 20%-Cu-CS/SA 水凝胶的 TMB 测试液时, 其在 652 nm 处对应的特征吸光值随时间延长而逐渐增加, 即生成的 $\cdot\text{OH}$  量逐渐增加, 而不加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  或者 20%-Cu-CS/SA 水凝胶的 TMB 测试液都基本没有出现特征吸收峰, 表明 20%-Cu-CS/SA 水凝胶是持续催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生 $\cdot\text{OH}$  的

关键。

图 8(e)是在 pH 6.0 或者 pH 7.4, 有或没有  $\text{H}_2\text{O}_2$  条件下, 加入 20%-Cu-CS/SA 水凝胶的 TMB 测试液在 652 nm 处的吸光值随时间变化的曲线。从图中可以看出, 在没有  $\text{H}_2\text{O}_2$  的条件下, 无论是在 pH 6.0 还是 pH 7.4 条件下, 20%-Cu-CS/SA 水凝胶都不会引起 TMB 测试液在 652 nm 处吸光值的变化; 在含有  $\text{H}_2\text{O}_2$  的情况下, pH 7.4 的 TMB 测试液中加入 20%-Cu-CS/SA 水凝胶, 其在 652 nm 处的吸光值基本没有变化, 但是 pH 6.0 的 TMB 测试液中加入 20%-Cu-CS/SA 水凝胶, 其在 652 nm 处的吸光值随着时间显著增大。由此表明, 20%-Cu-CS/SA 水凝胶只有在酸性条件下才能催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生 $\cdot\text{OH}$ 。

图 8(f)是不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  在 pH 6.0 的 TMB 测试液中加入 20%-Cu-CS/SA 水凝胶(0.1 g/mL)后, 其在 652 nm 处的吸光值随时间变化曲线。从图中可以看出, 在相同的反应时间条件下, 随着 TMB 测试液中  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度增加, 其吸光值也随之增加, 表明 20%-Cu-CS/SA 水凝胶在酸性条件下催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生 $\cdot\text{OH}$  的能力与  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度成正相关<sup>[34]</sup>。因此, 高浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  的肿瘤微环境有利于 20%-Cu-CS/SA 水凝胶催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生更多 $\cdot\text{OH}$ , 从而实现化学动力学治疗的目的。

## 2.5 水凝胶的细胞毒性

HUVECs 和 HDFs 分别与 SA 水凝胶、20%-CS/SA 水凝胶和不同 Cu-CS 纳米棒含量的 Cu-CS/SA 水凝胶培养 24 h 后的细胞存活率结果显示(图 9), 随着水凝胶中 Cu-CS 纳米棒含量从 5%增加到 20%, HUVECs 和 HDFs 的细胞存活率均保持 80%以上, 与 SA 水凝胶和 20%-CS/SA 水凝胶没有显著性差异, 但水凝胶中 Cu-CS 纳米棒的含量达到 40%时, HUVECs 和 HDFs 的细胞存活率分别仅为 60.9%和 63.1%, 表明其细胞活性较差。一般认为细胞存活率大于 80%的材料具有良好的生物相容性。因此, Cu-CS 纳米棒含量 20%时, Cu-CS/SA 水凝胶具有良好的生物相容性。Kong 等<sup>[20]</sup>研究表明, 铜

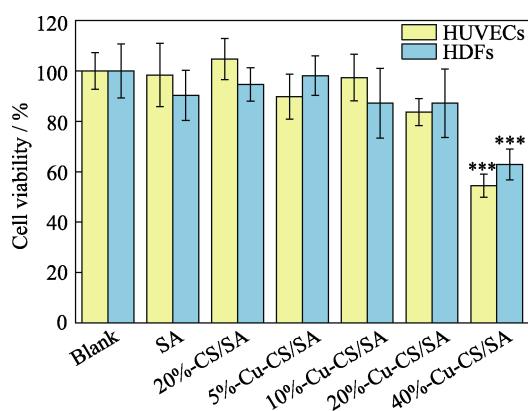


图 9 内皮细胞和成纤维细胞与不同 Cu-CS 纳米棒含量的 Cu-CS/SA 复合水凝胶培养 24 h 后的细胞存活率

Fig. 9 Cell viabilities of HUVECs and HDFs after 24 h incubation with hydrogels incorporated with different contents of Cu-CS nanorods

The color figure can be obtained from online edition

\*\*\*:  $p < 0.001$

离子浓度高于  $3.2 \mu\text{g/mL}$  时, HUVECs 的细胞存活率会低于 60%。因此, 40%-Cu-CS/SA 水凝胶组的 HUVECs 和 HDFs 细胞存活率低可能是由水凝胶释放的铜离子浓度过高所致。因此, 本研究选用既有较高催化活性又有良好细胞相容性的 20%-Cu-CS/SA 水凝胶进行后续细胞实验研究。

## 2.6 B16F10 细胞内 ROS 分析与治疗效果评价

本研究模拟肿瘤弱酸性(pH 6.0)和高浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{mol/L}$ )的微环境下<sup>[19]</sup>, 以不同条件处理 B16F10 细胞, 检测细胞内 ROS 产量, 以此分析 Cu-CS/SA 水凝胶的化学动力学性能。据文献报道<sup>[33]</sup>, 本身无荧光的 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)具有良好的细胞膜渗透性, 进入细胞后能被快速水解生成 2',7'-二氯二氢荧光素(DCFH), 而 ROS 能快速氧化 DCFH 生成绿色荧光产物 2',7'-二氯荧光素(DCF), 因此可以根据荧光强度来表征细胞内 ROS 产生情况。

如图 10 所示, 当细胞环境调至 pH 6.0 时, Blank 组、SA 组、20%-CS/SA 组和 20%-Cu-CS/SA 组都没有产生绿色荧光; 当细胞环境调至 pH 6.0 且升高  $\text{H}_2\text{O}_2$  的浓度时, Blank 组、SA 组和 20%-CS/SA 组只会产生非常微弱的绿色荧光, 这可能是由培养液中的  $\text{H}_2\text{O}_2$  进入细胞导致, 但是 20%-Cu-CS/SA 组则出现了强烈的绿色荧光, 表明在弱酸性(pH 6.0)和高浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{mol/L}$ )的环境下, 20%-Cu-CS/SA 水凝胶能发挥化学动力学效应, 产生大量的 ROS, 有利于肿瘤的治疗<sup>[36]</sup>。

进一步地, 本研究采用 CCK-8 方法测试不同条件处理的 B16F10 细胞活性, 以此评估 20%-Cu-CS/SA 水凝胶对肿瘤细胞的治疗效果。

如图 11 所示, 当细胞环境调至 pH 7.4 时, 无论

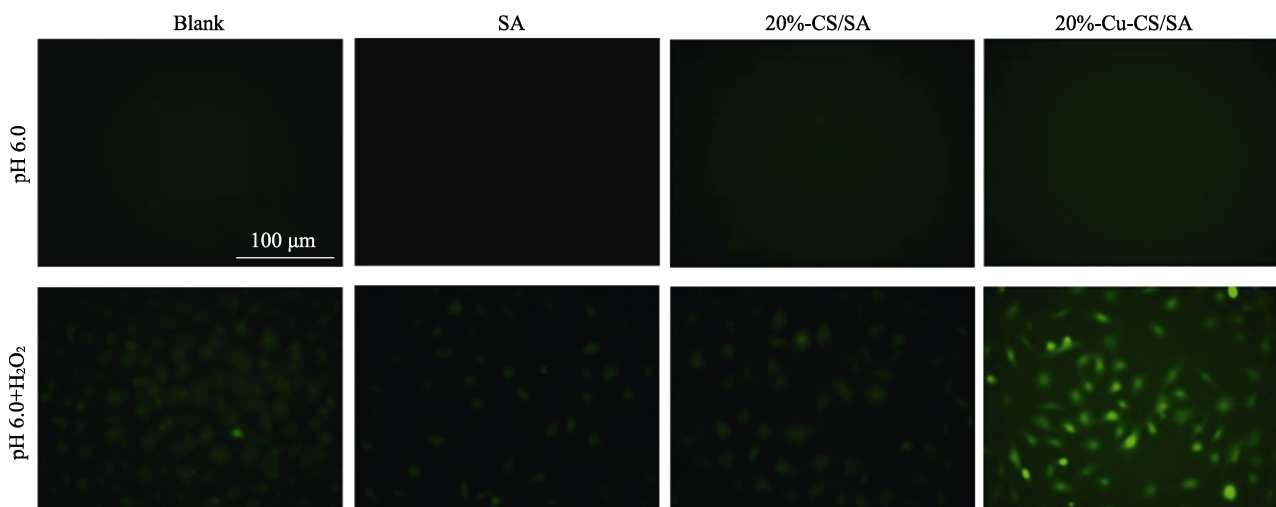


图 10 不同条件处理后 B16F10 细胞内 ROS 荧光显微照片

Fig. 10 Fluorescence images of B16F10 cells after different treatments for observing intracellular ROS

The color figures can be obtained from online edition

是否升高  $H_2O_2$  的浓度, Blank 组、SA 组、20%-CS/SA 组和 20%-Cu-CS/SA 组的细胞活性都可达 85% 以上; 当细胞环境调至 pH 6.0 时, 无论是否升高  $H_2O_2$  的浓度, Blank 组、SA 组和 20%-CS/SA 组的细胞活性均可达 90% 以上, 不加  $H_2O_2$  的 20%-Cu-CS/SA 组的细胞活性也可高达 93%, 但是加  $H_2O_2$  的 20%-Cu-CS/SA 组的细胞活性却下降至 43%, 表明在弱酸性(pH 6.0)和高浓度  $H_2O_2$  (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 环境下, 20%-Cu-CS/SA 水凝胶对肿瘤细胞的增值有显著抑制作用。20%-Cu-CS/SA 水凝胶体外抗肿瘤的机制可能与其在酸性条件下能与  $H_2O_2$  反应催化生成  $\cdot\text{OH}$  有关。高毒性  $\cdot\text{OH}$  可引起细胞结构的不可逆损伤, 如线粒体和蛋白质的破坏, 进而引起肿瘤细胞凋亡<sup>[37-38]</sup>。

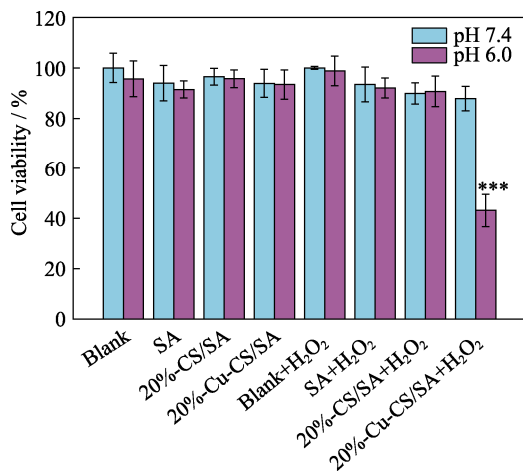


图 11 不同条件处理下的 B16F10 细胞的存活率  
Fig. 11 Cell viability of B16F10 cells after different treatments  
\*\*\*:  $p < 0.001$

### 2.7 血管内皮细胞和成纤维细胞的增殖和迁移

HUVECs 和 HDFs 在皮肤伤口愈合中起到重要的作用<sup>[28]</sup>。本研究以 HUVECs 和 HDFs 为细胞模型, 探究了 20%-Cu-CS/SA 水凝胶对 HUVECs 和 HDFs 的细胞增殖和迁移的影响。

图 12(a~b)分别为 HUVECs 和 HDFs 培养 1、3、5 d 的增殖状况。从图中可以看出, SA、20%-CS/SA 和 20%-Cu-CS/SA 水凝胶组均具有良好的生物相容性。随着培养时间延长, 细胞出现增殖。当培养至第 5 天时, 相比较于 Blank 组和 SA 组, 20%-CS/SA 组和 20%-Cu-CS/SA 组都能显著促进 HUVECs 和 HDFs 增殖, 而 20%-CS/SA 组和 20%-Cu-CS/SA 组并没有显著性差异。已有研究表明, 微量的 Ca 离子和 Si 离子对细胞有刺激作用, 能明显提高细胞活性<sup>[14-16]</sup>。因此, 本研究可能是 20%-CS/SA 组和 20%-Cu-CS/SA 组释放的生物活性 Ca 离子和 Si 离子促进了 HUVECs 和 HDFs 的增殖, 而 20%-Cu-CS/SA 组释放的 Cu 离子对 HUVECs 和 HDFs 的增殖影响不大。

进一步, 本研究通过划痕法研究了 20%-Cu-CS/SA 水凝胶对 HUVECs 和 HDFs 的迁移影响。由图 13 可以看出, 相较于 Blank 组和 SA 组, 20%-CS/SA 组和 20%-Cu-CS/SA 组中有更多的 HUVECs 和 HDFs 迁移到划痕区。对 HUVECs 和 HDFs 的迁移作定量统计结果表明: 对于 HUVECs 而言, Blank 组和 SA 组的细胞迁移率分别为 50% 和 52%, 而 20%-CS/SA 组和 20%-Cu-CS/SA 组的细胞迁移率为 66% 和 64%; 对于 HDFs 而言, Blank 组和 SA 组的细胞迁移率为 47% 和 46%, 而 20%-CS/SA 组和 20%-Cu-CS/SA 组的细胞迁移率为 56% 和 59%。因此, 相较于 Blank 组和 SA 组, 20%-CS/SA 组和 20%-Cu-CS/SA 组都能促进 HUVECs 和 HDFs 迁移, 这有利于皮肤伤口的愈合。已有研究表明, 微量的 Ca 离子和 Si 离子对 HUVECs 和 HDFs 的迁移起促进作用<sup>[39-40]</sup>。20%-CS/SA 组和 20%-Cu-CS/SA 组对 HUVECs 和 HDFs 的细胞迁移效果相当, 可能是由于 20%-CS/SA 组和 20%-Cu-CS/SA 组释放的生物活性 Ca 离子和 Si 离子起到了促进 HUVECs 和 HDFs 迁移的作用。

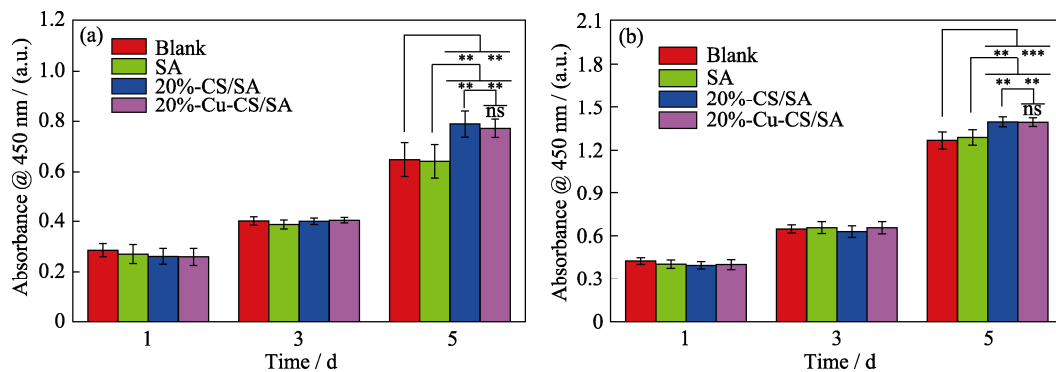


图 12 与不同水凝胶共培养的(a)血管内皮细胞和(b)成纤维细胞的增殖状况  
Fig. 12 Cell proliferations of (a) HUVECs and (b) HDFs cultured with different hydrogels  
ns:  $p > 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ; The color figures can be obtained from online edition

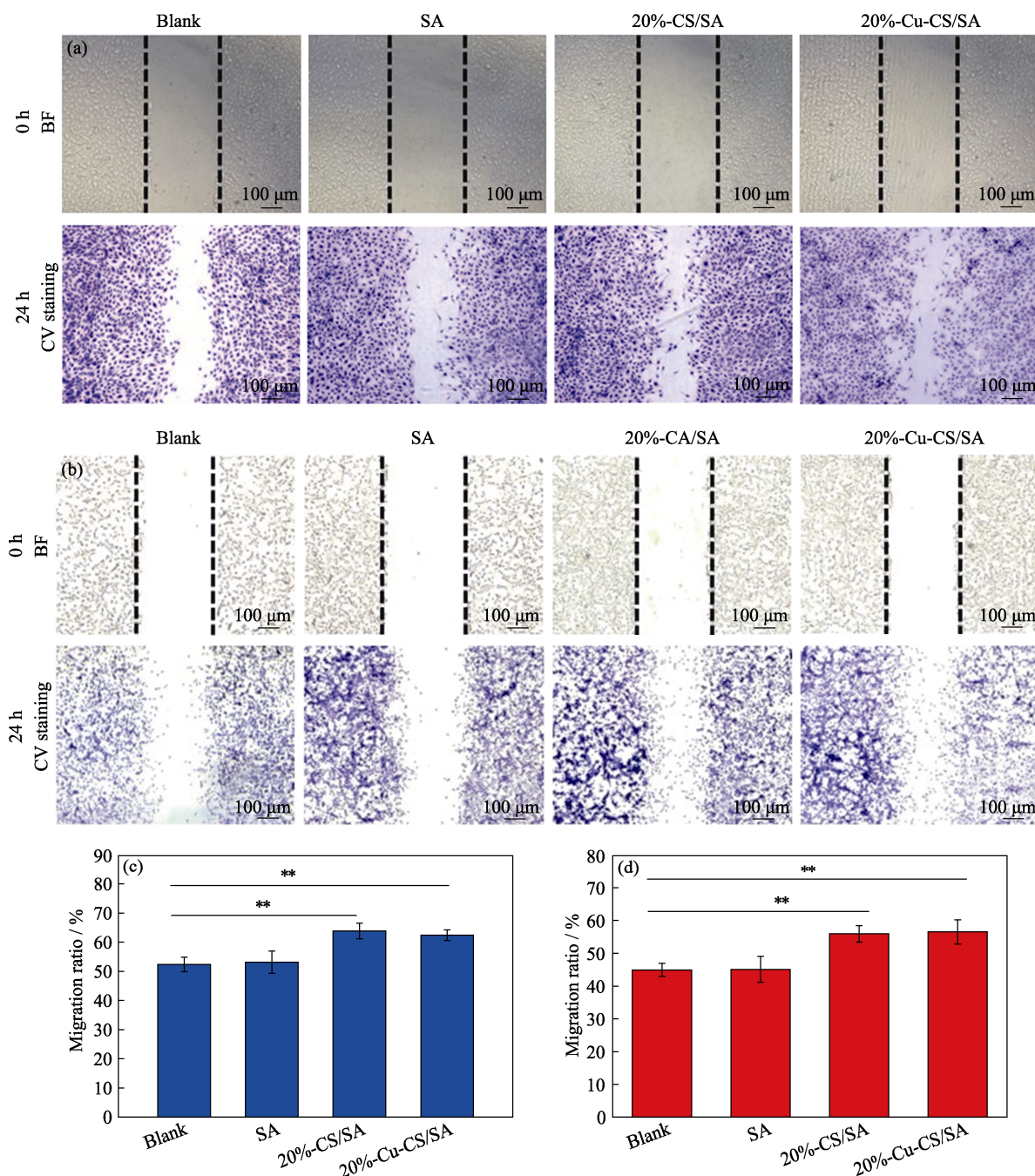


图 13 与 SA、20%-CS/SA 或 20%-Cu-CS/SA 水凝胶共培养 24 h 后(a, c)内皮细胞和(b, d)成纤维细胞的迁移显微照片以及(c, d)相应定量统计的细胞迁移率(\*\* $p < 0.01$ )

Fig. 13 (a, b) Cell migration images and (c, d) corresponding migration rates of (a, c) HUVECs and (b, d) HDFs after cultured with SA, 20%-CS/SA and 20%-Cu-CS/SA hydrogels for 24 h, respectively (\*\*:  $p < 0.01$ )

The color figures can be obtained from online edition

### 3 结论

本研究采用熔盐法制备了 Cu-CS 纳米棒, 并将其与海藻酸钠复合得到 Cu-CS/SA 复合水凝胶。Cu-CS 纳米棒表面的 Cu 元素负载量随铜盐添加量和熔盐处理温度升高而增加, 但 Cu-CS 纳米棒催化  $H_2O_2$  生成  $\cdot OH$  的催化性能则随 Cu 含量增加呈现先

升高后下降的趋势, 其中 3%铜盐添加量和熔盐处理温度  $700\text{ }^\circ\text{C}$  条件下制备的 3Cu-CS 纳米棒的催化活性最高, 而且其 Cu 元素含量仅为 0.61%。Cu-CS 纳米棒含量不高于 20%的 Cu-CS/SA 复合水凝胶具有良好的生物相容性。在模拟肿瘤弱酸性和高  $H_2O_2$  含量的微环境中, Cu-CS/SA 复合水凝胶能催化  $H_2O_2$  生成高细胞毒性的  $\cdot OH$  而具有化学动力学治疗功能, 导致黑色素瘤细胞的活性降至 43%。另一方面,

Cu-CS/SA 复合水凝胶能促进内皮细胞和成纤维细胞增殖和迁移, 有利于皮肤伤口愈合。因此, Cu-CS/SA 复合水凝胶对于肿瘤治疗和皮肤伤口愈合具有较大的应用前景。

## 参考文献:

- [1] CULLEN J K, SIMMONS J L, PARSONS PG, *et al.* Topical treatments for skin cancer. *Advance Drug Delivery Reviews*, 2020, **153**: 54–64.
- [2] JEMA A, BRAY F, CENTER M M, *et al.* Global cancer statistics. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, **61(2)**: 69–90.
- [3] CHEN Q, KE H, DAI Z, *et al.* Nanoscale theranostics for physical stimulus-responsive cancer therapies. *Biomaterials*, 2015, **73**: 214–230.
- [4] MA B, DANG W, YANG Z, *et al.* MoS<sub>2</sub> nanoclusters-based biomaterials for disease-impaired wound therapy. *Applied Material Today*, 2020, **20**: 100735–15.
- [5] MA H, ZHOU Q, CHANG J, *et al.* Grape seed-inspired smart hydrogel scaffolds for melanoma therapy and wound healing. *ACS Nano*, 2019, **13(4)**: 4302–4311.
- [6] LIU C, XING J, AKAKURU O U, *et al.* Nanozymes-engineered metal-organic frameworks for catalytic cascades-enhanced synergistic cancer therapy. *Nano Letters*, 2019, **19(8)**: 5674–5682.
- [7] TANG Z, LIU Y, HE M, *et al.* Chemodynamic therapy: tumor microenvironment-mediated Fenton and Fenton-like reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, **58(4)**: 946–956.
- [8] DAI X, DU T, HAN K. Engineering nanoparticles for optimized photodynamic therapy. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, **5(12)**: 6342–6354.
- [9] CHANG M, WANG M, WANG M, *et al.* A multifunctional cascade bioreactor based on hollow structured Cu<sub>2</sub>MoS<sub>4</sub> for synergistic cancer chemodynamic therapy/starvation therapy/phototherapy/immunotherapy with remarkably enhanced efficacy. *Advanced Materials*, 2019, **31(51)**: 1905271–10.
- [10] LI H, CHANG J. Bioactive silicate materials stimulate angiogenesis in fibroblast and endothelial cell co-culture system through paracrine effect. *Acta Biomaterialia*, 2013, **9(6)**: 6981–6991.
- [11] LI H, ZHAI W, CHANG J. Effects of wollastonite on proliferation and differentiation of human bone marrow-derived stromal cells in PHBV/wollastonite composite scaffolds. *Journal of Biomaterials Applications*, 2009, **24(3)**: 231–246.
- [12] DING S, SHIE M, HOSHIIBA T, *et al.* Osteogenic differentiation and immune response of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on injectable calcium-silicate-based bone grafts. *Tissue Engineering Part A*, 2010, **16(7)**: 2343–2354.
- [13] ZHAI W, LU H, CHEN L, *et al.* Silicate bioceramics induce angiogenesis during bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 2012, **8(1)**: 341–349.
- [14] LI H, HE J, YU H, *et al.* Bioglass promotes wound healing by affecting gap junction connexin 43 mediated endothelial cell behavior. *Biomaterials*, 2016, **84**: 64–75.
- [15] YU H, PENG J, XU Y, *et al.* Bioglass activated skin tissue engineering constructs for wound healing. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8(1)**: 703–715.
- [16] TIAN T, WU C, CHANG J. Preparation and *in vitro* osteogenic, angiogenic and antibacterial properties of cuprorivaite (CaCuSi<sub>4</sub>O<sub>10</sub>, Cup) bioceramics. *RSC Advances*, 2016, **6(51)**: 45840–45849.
- [17] WU C, ZHOU Y, XU M, *et al.* Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. *Biomaterials*, 2013, **34(2)**: 422–433.
- [18] LIN L, HUANG T, SONG J, *et al.* Synthesis of copper peroxide nanodots for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> self-supplying chemodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, **141(25)**: 9937–9945.
- [19] CHEN J, CAO Y, LIN S, *et al.* A responsive microneedle system for efficient anti-melanoma by combining self-enhanced chemodynamic therapy with photothermal therapy. *Chemical Engineering Journal*, 2022, **432(4)**: 133466.
- [20] KONG N, LIN K, LI H, *et al.* Synergy effects of copper and silicon ions on stimulation of vascularization by copper-doped calcium silicate. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, **2(8)**: 1100–1110.
- [21] GIANNOULATU V, THEODOROUS G S, ZORBA T, *et al.* Magnesium calcium silicate bioactive glass doped with copper ions: synthesis and *in-vitro* bioactivity characterization. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2018, **500**: 98–109.
- [22] JAIRTON D, ROBERTO F, SOUZA D, *et al.* Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis. *Chemical Reviews*, 2002, **102(10)**: 3667–3692.
- [23] LIU D, FU Q, CHU Y. Molten salt synthesis, formation mechanism, and oxidation behavior of nanocrystalline HfB<sub>2</sub> powders. *Journal of Advanced Ceramics*, 2020, **9(1)**: 35–44.
- [24] XIAO M, ZHANG L, LUO B, *et al.* Molten-salt-mediated synthesis of an atomic nickel Co-catalyst on TiO<sub>2</sub> for improved photocatalytic H<sub>2</sub> evolution. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, **59(18)**: 7230–7234.
- [25] JONES V, GREY J, HARDING K G. Wound dressings. *British Medical Journal*, 2006, **332(7544)**: 777–780.
- [26] FERNANDO I P S, LEE W, HAN E J, *et al.* Alginate-based nano materials: fabrication techniques, properties, and applications. *Chemical Engineering Journal*, 2020, **391**: 123823–13.
- [27] HERNANDEZ G A C, TELLEZ J L, RODRIGUEZ L L M, *et al.* Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: a review. *Carbohydrate Polymers*, 2020, **229**: 115514.
- [28] MA W, MA H, QIU P, *et al.* Sprayable β-FeSi<sub>2</sub> composite hydrogel for portable skin tumor treatment and wound healing. *Biomaterials*, 2022, **431(4)**: 133466.
- [29] LIN K, CHANG J, CHEN G, *et al.* A simple method to synthesize single-crystalline β-wollastonite nanowires. *Journal of Crystal Growth*, 2006, **300(2)**: 267–271.
- [30] SHAE S, HENDERSON C M B, KOMANSCHEK B U. Dehydration/recrystallization mechanisms, energetics, and kinetics of hydrated calcium silicate minerals: an *in situ* TGA/DSC and synchrotron radiation SAXS/WAXS study. *Chemical Geology*, 2000, **167(1)**: 141–159.
- [31] LI Y, SHAO H, LIN Z, *et al.* A general Lewis acidic etching route for preparing MXenes with enhanced electrochemical performance in non-aqueous electrolyte. *Nature Materials*, 2020, **19(8)**: 894–900.

- [32] YE F, DAI H, PENG K, *et al.* Effect of Mn doping on the microstructure and magnetic properties of CuFeO<sub>2</sub> ceramics. *Journal of Advanced Ceramics*, 2020, **9(4)**: 444–453
- [33] LIN L, SONG J, SONG L, *et al.* Simultaneous Fenton-like ion delivery and glutathione depletion by MnO<sub>2</sub>-based nanoagent to enhance chemodynamic therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, **57(18)**: 4902–4906.
- [34] GUO M, HE J, MA S, *et al.* Determination of Hg<sup>2+</sup> based on the selective enhancement of peroxidase mimetic activity of hollow porous gold nanoparticles. *Nano Brief Reports and Reviews*, 2017, **12(4)**: 1750050–11.
- [35] KATHLEEN M, JOCHEN L. Synthesis-structure-activity relationships in Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> catalyzed CO oxidation. *Frontiers in Chemistry*, 2018, **6**: 185–197.
- [36] TARPEY M, FRIDOVICH I. Methods of detection of vascular reactive species nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circulation Research*, 2001, **89(3)**: 224.
- [37] CHEN W, LOU G, LEI Q, *et al.* Overcoming the heat endurance of tumor cells by interfering with the anaerobic glycolysis metabolism for improved photothermal therapy. *ACS Nano*, 2017, **11(2)**: 1419–1431.
- [38] SHENG D, LIU T, DENG L, *et al.* Perfluorooctyl bromide & indocyanine green co-loaded nanoliposomes for enhanced multimodal imaging-guided phototherapy. *Biomaterials*, 2018, **165**: 1–13.
- [39] SHENG L, ZHANG Z, ZHOU Y, *et al.* A novel "hot spring"-mimetic hydrogel with excellent angiogenic properties for chronic wound healing. *Biomaterials*, 2021, **264**: 120414.
- [40] MA L, ZHOU Y, LIU Y, *et al.* Multifunctional bioactive Nd-Ca-Si glasses for fluorescence thermometry, photothermal therapy, and burn tissue repair. *Science Advances*, 2020, **6(32)**: eabb1311–12.