

基于Au纳米粒子修饰MXene递药系统的构建及其抗乳腺癌研究

刘爱萍, 刘耿君, 李雅欣, 王海燕*

青岛大学附属医院, 山东 青岛

收稿日期: 2022年3月26日; 录用日期: 2022年4月21日; 发布日期: 2022年4月28日

摘要

目的: 近年来, MXene作为一种新型二维(2D)纳米材料, 因其优异的性能而被广泛研究用作纳米递药平台。为了探索其新的表面改性方式和抗乳腺癌作用, 我们构建了DOX@Ti₃C₂@Au-PEG纳米复合药物递送系统。方法: 采用金纳米颗粒(Au NPs)对Ti₃C₂进行改性, 引入巯基聚乙二醇醛基(SH-PEG-CHO)提高水溶性, 同时负载化疗药物阿霉素(DOX), 制备DOX@Ti₃C₂@Au-PEG纳米复合药物递送系统, 进行表征验证其成功制备, 并进一步研究其光热性能和抗乳腺癌作用。结果: Ti₃C₂被成功刻蚀成单层薄片, Au NPs在其表面均匀散在分布, 平均尺寸约为20 nm。Ti₃C₂@Au纳米复合材料具有良好的光热升温性能和极低的细胞毒性。细胞试验证明, DOX@Ti₃C₂@Au-PEG纳米复合体系取得了最佳的光热治疗(PTT)协同化疗的抗乳腺癌效果。结论: 成功构建基于Au纳米粒子修饰MXene的药物递送体系DOX@Ti₃C₂@Au-PEG, 其展现出良好的光热升温性能及协同化疗的抗乳腺癌效果, 值得进一步研究。

关键词

光热治疗, MXene, 药物递送, 化疗, 表面改性

Construction of MXene Delivery System Modified by Au Nanoparticles and Its Anti-Breast Cancer Effect

Aiping Liu, Gengjun Liu, Yaxin Li, Haiyan Wang*

The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Mar. 26th, 2022; accepted: Apr. 21st, 2022; published: Apr. 28th, 2022

*通讯作者 Email: why_phd@163.com

文章引用: 刘爱萍, 刘耿君, 李雅欣, 王海燕. 基于 Au 纳米粒子修饰 MXene 递药系统的构建及其抗乳腺癌研究[J]. 临床医学进展, 2022, 12(4): 3600-3607. DOI: 10.12677/acm.2022.124522

Abstract

Objective: In recent years, MXene, as a new two-dimensional (2D) nanomaterial, has been widely studied as a nanodrug delivery platform due to its excellent properties. In order to explore the new surface modification method and anti-breast cancer effect, we constructed DOX@Ti₃C₂@Au-PEG nanocomposite drug delivery system. **Methods:** Ti₃C₂ was modified by gold nanoparticles (Au NPs), the sulfhydryl polyethylene glycol aldehyde group (SH-PEG-CHO) was introduced to improve water solubility, and chemotherapy drug DOX was loaded at the same time to construct the DOX@Ti₃C₂@Au-PEG nanocomposite drug delivery system, and its successful preparation was verified by characterization. Further experiments were conducted to study its photothermal properties and anti-breast cancer effects. **Results:** Ti₃C₂ was successfully etched into a single layer. Au NPs were evenly distributed on the surface with an average size of about 20 nm. Ti₃C₂@Au nanocomposites have good photothermal heating performance and low cytotoxicity. Cell experiments have proved that DOX@Ti₃C₂@Au-PEG nanocomposite system has achieved the best anti-breast cancer effect of photothermal therapy (PTT) combined with chemotherapy. **Conclusion:** The drug delivery system DOX@Ti₃C₂@Au-PEG based on Au nanoparticles modified MXene was successfully constructed, which showed excellent anti-breast cancer treatment effect of photothermal chemotherapy, which deserves further study.

Keywords

Photothermal Therapy, MXene, Drug Delivery, Chemical Therapy, Surface Modification

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近年来, 乳腺癌的发病率逐渐上升[1], 其治疗仍主要采用手术、化疗、放疗等传统手段。然而这些传统的治疗方法虽然能取得良好的治疗效果, 但也存在许多不可避免的缺点, 如选择性差、全身毒性高、易产生耐药性、容易复发和转移等[2]。因此, 探索新的肿瘤治疗方法, 采用协同治疗是未来肿瘤治疗的新方向。光热治疗(PTT)是一种在肿瘤组织中聚集光热转化剂的新型治疗方法, 光热转化剂在外部光源的照射下, 吸收光能, 产生能量转换, 将光能转化成热能, 使其局部温度升高, 从而杀死癌细胞或组织[3]。PTT作为一种无创治疗方法, 因其毒性低、副作用少而受到越来越多学者的关注。

目前, 二维(2D)纳米材料, 包括石墨烯[4]、铋烯[5]、黑磷[6]、二卤代物和氧化物[7]。因其具有超薄的片层结构、丰富的表面功能、较大的比表面积和较低的生物毒性, 在生物医学领域得到广泛研究。除上述材料外, MXene作为一种新型的2D纳米材料, 也引起了科学界的广泛兴趣[8] [9]。对于公式为M_{n+1}X_nT_x (n = 1~3)的材料, 通常由过渡金属(M)和碳/氮(X)组成, 并由它们所对应的MAX相生成。A代表元素周期表中IIIA或者IVA族的元素, T_x代表它们的表面官能团, 如-O、-OH、和-F, 这取决于所选用的刻蚀剂。与传统的2D纳米材料相比, MXene在生物医学应用中具有以下几个优点: 1) 丰富的表面官能团使其具有良好的亲水性, 解决了大多数化疗药物疏水性的缺点[10]; 2) 具有极低的细胞毒性和良好的生物组织相容性[11] [12]; 3) 巨大的活性表面, 可连载化疗药物进行协同化疗, 或与靶向分子连接进行靶向治疗[13]; 4) 具有较高的近红外光吸收性能和光热转化效率[14]。这些特性使得MXene不

仅是一种良好的光热转化剂，同时也是一种理想的抗癌药物传递载体，以配合化疗达到更好的治疗效果。

在本研究中，通过原位生长的方法将 Au NPs 固定在 Ti_3C_2 表面，引入巯基聚乙二醇醛基(SH-PEG-CHO)增加载体水溶性，同时负载化疗药物阿霉素(DOX)，构建 DOX@ Ti_3C_2 @Au-PEG 纳米复合体系，探究其体内外光热转化性能和抗乳腺癌作用，为肿瘤治疗提供新的研究思路。

2. 实验部分

2.1. 实验材料

盐酸，氟化锂，氯金酸，国药集团化学试剂有限公司；巯基聚乙二醇醛基(SH-PEG-CHO, 分子量 5000)，西安齐岳生物有限公司；四羟甲基氯化磷(THPC, 80%)，聚丙烯胺盐酸盐(PAH, 分子量 15,000)，上海阿拉丁生化科技有限公司；阿霉素(DOX)，大连美仑生物科技有限公司；CCK-8 试剂盒，MedChemExpress；RPMI-1640 培养基，胎牛血清(FBS)，美国 GIBCO 公司。

2.2. DOX@ Ti_3C_2 @Au-PEG 纳米复合递药体系的制备

首先，用盐酸/氟化锂刻蚀掉最大相 Ti_3AlC_2 中的 Al 层，合成 Ti_3C_2 纳米薄片。将 1 g 氟化锂加入到 20 mL 9 M 盐酸溶液中搅拌 5 min 使氟化锂完全溶解，然后将 1 g Ti_3AlC_2 逐渐加入上述溶液，35℃环境中反应 24 h。多次离心、洗涤至上清液 pH 达到 6 时，得到 Ti_3C_2 纳米薄片。

然后，制备金种子和金生长溶液，并采用原位生长的方法将 Au NPs 固定在 Ti_3C_2 纳米片表面。将 12 μ L 四羟甲基氯化磷(THPC, 80%)和 0.25 mL 氢氧化钠(2 M)溶液加入到 45 mL 超纯水中搅拌 5 min，将 2 mL 氯金酸溶液(1%)快速加入上述溶液中，室温下避光搅拌过夜，得到金种子溶液。将 25 mg 碳酸钾加入到含有 1.5 mL 氯金酸的 100 mL 超纯水中，室温下避光搅拌过夜，得到金生长溶液。将 2 mL Ti_3C_2 纳米片悬液(1 $mg \cdot mL^{-1}$)加入到 4 mL 2 $mg \cdot mL^{-1}$ 的聚丙烯胺盐酸盐(PAH, 分子量 15,000)溶液中充分反应，离心洗涤去除多余 PAH 分子后，加入 10 mL 金种子溶液，室温搅拌 4 h，离心洗涤去除多余金种子溶液后，加入金生长溶液搅拌 2 h，加入 29% 甲醛溶液搅拌 1 h，即得到含 Ti_3C_2 @Au 的悬液。

最终，制备 DOX@ Ti_3C_2 @Au-PEG 纳米复合递药体系。将 1 mL Ti_3C_2 @Au (1 $mg \cdot mL^{-1}$)悬液分散在 4 mL 巯基聚乙二醇醛基(SH-PEG-CHO, 4 $mg \cdot mL^{-1}$)溶液中搅拌 2 h，加入 20 mL 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$ DOX 溶液，室温下避光搅拌过夜，将沉淀物收集为 DOX@ Ti_3C_2 @Au-PEG，冷冻干燥后，置于-20℃储存以备后续使用。

2.3. 表征

使用扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)观察 Ti_3C_2 纳米片和 Ti_3C_2 @Au 纳米复合材料的形貌，使用红外热成像仪记录实验中的温度变化。

2.4. 体外光热转化性能研究

将 Ti_3C_2 @Au 悬液(0.05 $mg \cdot mL^{-1}$)用 808 nm、0.75 $W \cdot cm^{-2}$ 的激光照射 10 min，观察其温度变化情况，并与水溶液作对照。 Ti_3C_2 @Au 悬液(0.1 $mg \cdot mL^{-1}$)分别经 808 nm、不同功率(0.25、0.5、0.75、1 $W \cdot cm^{-2}$)激光照射 5 min，研究其光热升温性能。

2.5. 细胞实验

2.5.1. 细胞培养

小鼠乳腺癌细胞系 4T1 细胞由青岛大学附属医院中心实验室提供。使用含有 90% RPMI-1640 基础培养基、10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素双抗溶液的完全培养基进行培养，置于 37℃、含 5% CO_2 的细胞培

养箱中孵育。

2.5.2. 体外 DOX@Ti₃C₂@Au-PEG 抗乳腺癌研究

为研究 Ti₃C₂@Au-PEG 纳米复合载体的细胞毒性, 首先将 4T1 细胞以 8×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中, 完全培养基孵育过夜, 使细胞贴壁, 加入不同浓度的 Ti₃C₂@Au-PEG 悬液(0、150、300、450、600 ppm)孵育 24 h, 每个浓度设五个复孔, 孵育结束后, 使用 CCK-8 试剂盒检测细胞相对存活率。为研究不同浓度 Ti₃C₂@Au-PEG 悬液经 NIR 照射的细胞杀伤作用, 将同样孵育过夜的贴壁细胞, 分别与不同浓度 Ti₃C₂@Au-PEG 悬液(0、25、50、75、100 ppm)孵育 4 h, 用 808 nm、0.75 W·cm⁻² 的激光照射 5 min, 使用 CCK-8 试剂盒检测细胞相对存活率。

将 4T1 细胞以 8×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中, 完全培养基孵育过夜, 使细胞贴壁。如表 1 所示, 分五组进行实验, 各组处理结束后, 使用 Calcein/PI 双染试剂盒进行细胞染色, 活细胞被染成绿色, 死细胞被染成红色。每组设五个复孔, 重复三次实验。

Table 1. Cell experiment groups

表 1. 细胞实验分组

序号	组别	处理措施
(1)	对照组	用 100 μ L 生理盐水替换旧培养基, 孵育 2 h
(2)	NIR 组	用 808 nm、1 W·cm ⁻² 的激光照射 10 min
(3)	DOX 组	用 100 μ L 含 10 μ g·mL ⁻¹ DOX 的基础培养基替换旧培养基, 孵育 2 h
(4)	DOX@Ti ₃ C ₂ @Au 组	用 100 μ L 含 20 mg·mL ⁻¹ DOX@Ti ₃ C ₂ @Au 的基础培养基替换旧培养基, 孵育 2 h
(5)	DOX@Ti ₃ C ₂ @Au + NIR 组	培养基替换旧培养基, 孵育 2 h 后, 用 808 nm、1 W·cm ⁻² 的激光照射 10 min

2.6. 统计学分析

使用 SPSS26.0 软件进行统计学分析。定量资料以均数 \pm 标准差(Means \pm SD)表示, 两组间均数数比较采用两独立样本 t 检验(independent samples t-test), $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3. 结果与讨论

3.1. 基于 Au NPs 修饰 Ti₃C₂ 的纳米复合载体的表征

为了证实单层 Ti₃C₂ 和 Ti₃C₂@Au 纳米复合材料的成功制备, 对其进行了 SEM 表征, 如图 1(a)、图 1(b)所示, 合成的 Ti₃C₂ 表面干净, 略有卷曲, Au NPs 均匀地散在分布在 Ti₃C₂ 纳米片表面, 出现几条褶皱, 说明其具有良好的柔韧性, SEM 图像直接证实了 Ti₃C₂ 和 Ti₃C₂@Au 的成功制备。

TEM 图像(图 2(a), 图 2(b))所得结果与 SEM 图像相对应, 可以更加清晰地看到 Ti₃C₂ 纳米片的形貌, 已经被完全刻蚀呈薄层状, 另外, Au NPs 在其表面的均匀分布, 粒径在 5~30 nm 之间, 这样相对较小的纳米粒径, 为后续体内有效循环提供了可能性。

另外, Ti₃C₂@Au 纳米复合材料的能量色散分析表(表 2)显示了其主要元素组成: C (51.62%)、Ti (1.76%)、Au (8.81%), 其中 Al 层已经从 MAX 相中被完全刻蚀掉, 说明 Ti₃C₂ 的成功制备以及 Au NPs 的良好表面固定。

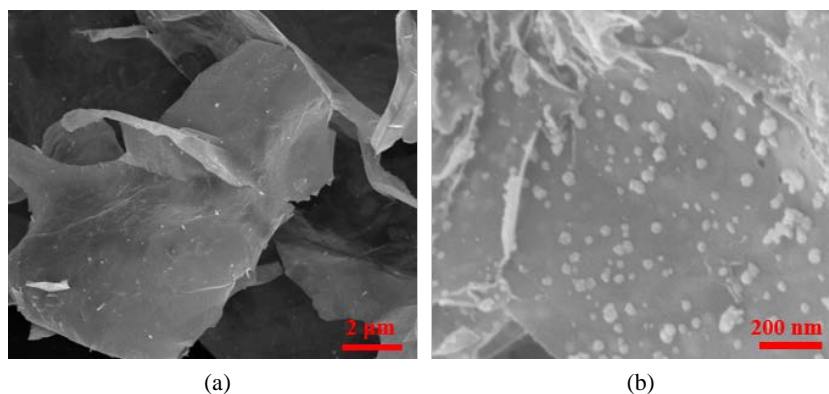


Figure 1. The SEM images of Ti_3C_2 (a) and $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ (b)

图 1. Ti_3C_2 (a) 和 $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ (b) 的扫描电子显微镜(SEM)图像

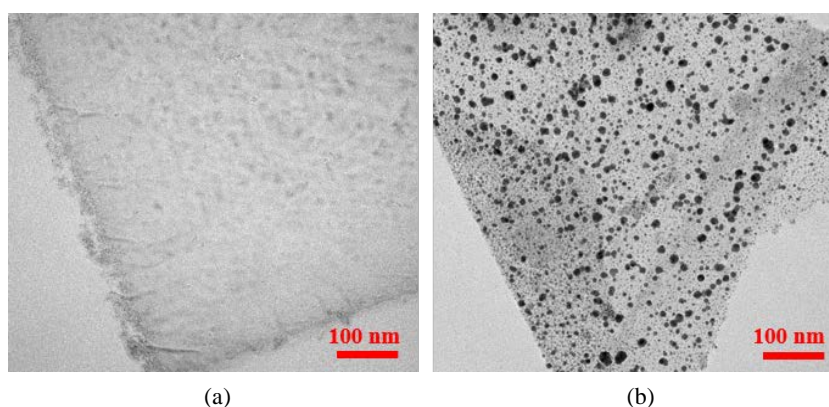


Figure 2. The TEM images of Ti_3C_2 (a) and $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ (b)

图 2. Ti_3C_2 (a) 和 $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ (b) 的透射电子显微镜(TEM)图像

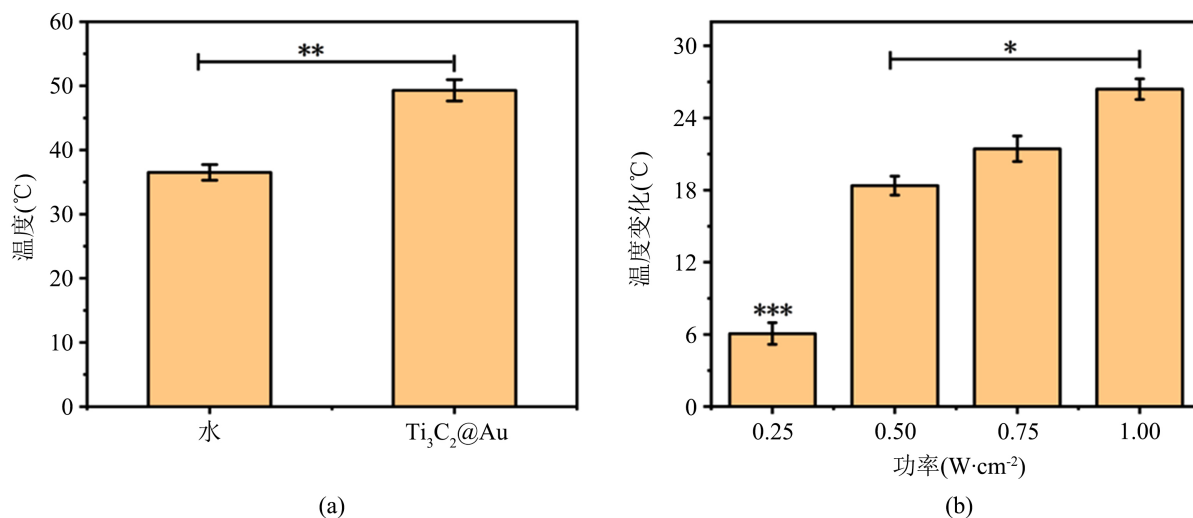
Table 2. Main element composition of $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ nanocomposites

表 2. $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ 纳米复合材料的主要元素组成

元素	原子数	质量(%)	归一化质量(%)	原子百分比(%)
Ti	22	1.76	2.82	0.84
C	6	51.62	83.02	98.14
Au	79	8.81	14.16	1.02

3.2. 体外光热转化性能研究

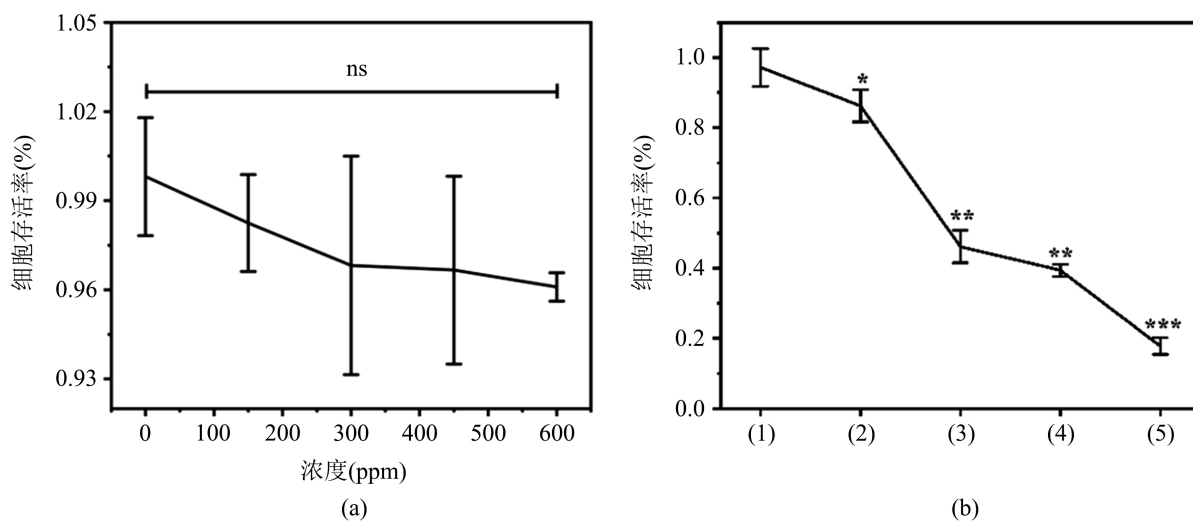
用 808 nm 、 $0.75\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的激光照射 $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ 悬液($0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 10 min ，其温度可以达到 49.4°C ，而相同条件下，水溶液仅能达到 36.5°C (图 3(a))，二者之间存在显著统计学差异($P < 0.01$)。Au NP 作为一种贵金属，本身具有很好的光热升温性能，与纳米材料结合在一起，进一步提高了整个载体的光热转化效率。另外，用 808 nm 、不同功率(0.25 、 0.5 、 0.75 、 $1\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$)的 NIR 照射 $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ 悬液($0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 5 min ，结果如图 3(b)所示，随着功率的增加， $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ 悬液的温度逐渐升高，且各组间存在显著统计学差异。当功率为 $1\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时，最高可以达到 56°C ，较初始温度升高了 26.3°C ，说明其具有优异的体外光热升温性能。



注: *: 各组间相比, $P < 0.05$; **: 两组间相比, $P < 0.01$; ***: 与其余三组相比, $P < 0.001$ 。

Figure 3. (a) Heating effect of H_2O and $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ suspension ($0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) irradiated by NIR (808 nm , $0.75 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 10 min. (b) Heating effect of $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ suspension ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) irradiated by NIR (808 nm) with different powers (0.25 , 0.5 , 0.75 , $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 5 min

图 3. (a) H_2O 和 $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ 悬液($0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)用 808 nm 、 $0.75 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的激光照射 10 min 的升温效应。(b) $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ 悬液($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)经 808 nm 、不同功率(0.25 、 0.5 、 0.75 、 $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$)的 NIR 照射 5 min 的升温效应



注: (1) 对照组; (2) NIR 组; (3) DOX 组; (4) $\text{DOX}@\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ 组; (5) $\text{DOX}@\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au} + \text{NIR}$ 组。ns: 无统计学差异; *: 与对照组相比, $P < 0.05$; **: 与对照组相比, $P < 0.01$; ***: 与对照组相比, $P < 0.001$ 。

Figure 4. (a) The cell survival rate after coincubation with different concentrations $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ suspensions (0 , 150 , 300 , 450 , 600 ppm) for 24 h. (b) The cell survival rate of each group

图 4. (a) 4T1 细胞与不同浓度 $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ -PEG 悬液(0 、 150 、 300 、 450 、 600 ppm)共孵育 24 h 后的细胞存活率。(b) 各处理组的细胞存活率

3.3. 细胞实验

考虑到纳米复合载体在生物医学领域的实际应用, 其细胞毒性成为一个关键性问题。CCK-8 试验显示(图 4(a)), 即使 $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ -PEG 纳米复合载体的浓度达到 600 ppm 时, 细胞仍保持较高的存活率(平均值为 96.1%), 且在各浓度下, 其细胞存活率与对照组相比, 无统计学差异($P > 0.05$), 这表明 $\text{Ti}_3\text{C}_2@\text{Au}$ -PEG

纳米复合载体无明显细胞毒性, 这为进一步体内研究和将来的临床应用转化提供了可能性。此外, 按表 1 所示分组给予 4T1 细胞相应处理后, 进行 CCK-8 试验, 结果如图 4(b) 所示, 各组细胞存活率与对照组相比, 均存在统计学差异, 这说明各疗法均可取得一定疗效, 但 DOX@Ti₃C₂@Au + NIR 组治疗效果最明显, 其细胞存活率仅为 17.8%, 且与对照组之间存在显著统计学差异(P < 0.001), 这说明 PTT 联合化疗的综合抗乳腺癌效果最佳, 有望取代单一疗法成为更好的治疗策略。此外, 光热效应不仅本身可以通过高热导致肿瘤细胞死亡, 而且可能有效增加细胞通透性, 从而加强细胞对药物和载体的摄取, 进一步导致肿瘤细胞死亡。

4. 结论

综上所述, 本研究成功制备了基于 Au NPs 修饰 MXene 的纳米复合递药体系 DOX@Ti₃C₂@Au-PEG, Ti₃C₂@Au-PEG 纳米载体具有良好的光热升温性能, 表现出极低的细胞毒性, 巨大的表面有利于药物负载, 可以用作稳定的肿瘤协同治疗的递药载体。该纳米复合递药体系, 在细胞实验中初步展现出良好的 PTT 协同化疗的综合抗乳腺癌效果, 说明联合疗法优于各单一疗法, 这表明 MXene 在纳米递药生物医学领域具有广阔的应用前景, 值得进行下一步探索。

基金项目

山东省自然科学基金资助项目(ZR2017MH042)。

致 谢

刘爱萍负责设计实验、进行实验、数据整理分析和文章撰写, 刘耿君和李雅欣参与部分细胞实验, 王海燕负责课题总体构思和修改文章。

参考文献

- [1] Higgins, M. and Baselga, J. (2011) Targeted Therapies for Breast Cancer. *Journal of Clinical Investigation*, **121**, 3797-3803. <https://doi.org/10.1172/JCI57152>
- [2] Valastyan, S. And Weinberg, R. (2011) Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, **147**, 275-292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>
- [3] Chen, Q., Xu, L., Liang, C., et al. (2016) Photothermal Therapy with Immune-Adjuvant Nanoparticles Together with Checkpoint Blockade for Effective Cancer Immunotherapy. *Nature Communication*, **7**, Article ID: 13193. <https://doi.org/10.1038/ncomms13193>
- [4] Xing, C., Jing, G., Liang, X., et al. (2017) Graphene Oxide/Black Phosphorus Nanoflake Aerogels with Robust Thermo-Stability and Significantly Enhanced Photothermal Properties in Air. *Nanoscale*, **9**, 8096-8101. <https://doi.org/10.1039/C7NR00663B>
- [5] Xue, T., Liang, W., Li, Y., et al. (2019) Ultrasensitive Detection of miRNA with an Antimonene-Based Surface Plasmon Resonance Sensor. *Nature Communication*, **10**, 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07947-8>
- [6] Ouyang, J., Deng, L., Chen, W., et al. (2018) Two Dimensional Semiconductors for Ultrasound-Mediated Cancer Therapy: The Case of Black Phosphorus Nanosheets. *Chemical Communication*, **54**, 2874-2877. <https://doi.org/10.1039/C8CC00392K>
- [7] Yin, F., Hu, K., Chen, S., et al. (2017) Black Phosphorus Quantum Dot Based Novel siRNA Delivery Systems in Human Pluripotent Teratoma PA-1 Cells. *Journal of Materials Chemistry B*, **5**, 5433-5440. <https://doi.org/10.1039/C7TB01068K>
- [8] Frey, N., Wang, J., Vega, B., et al. (2019) Prediction of Synthesis of 2D Metal Carbides and Nitrides (MXenes) and Their Precursors with Positive and Unlabeled Machine Learning. *ACS Nano*, **13**, 3031-3041. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b08014>
- [9] Szuplewska, A., Kulpinska, D., Dybko, A., et al. (2019) 2D Ti₂C (MXene) as a Novel Highly Efficient and Selective Agent for Photothermal Therapy. *Materials Science Engineering C*, **98**, 874-886. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.021>

-
- [10] Ghidui, M., Naguib, M., Shi, C., *et al.* (2014) Synthesis and Characterization of Two-Dimensional Nb₄C₃ (MXene). *Chem Commun (Camb)*, **50**, 9517-9520. <https://doi.org/10.1039/C4CC03366C>
- [11] Gupta, S., Hevia, D., Patchva, S., *et al.* (2012) Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxidants and Redox Signaling*, **16**, 1295-1322. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4414>
- [12] Kumar, S., Lei, Y., Alshareef, N., *et al.* (2018) Biofunctionalized Two-Dimensional Ti₃C₂ MXenes for Ultrasensitive Detection of Cancer Biomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, **121**, 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.076>
- [13] Tu, T., Wang, Z., Bai, J., *et al.* (2014) Rapid Prototyping of Concave Microwells for the Formation of 3D Multicellular Cancer Aggregates for Drug Screening. *Advanced Healthcare Materials*, **3**, 609-616. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300151>
- [14] Diao, S., Blackburn, J., Hong, G., *et al.* (2015) Fluorescence Imaging *In Vivo* at Wavelengths beyond 1500 nm. *Angewandte Chemie International Edition*, **54**, 14758-14762. <https://doi.org/10.1002/anie.201507473>