

## 二氧化硅包覆金纳米团簇的制备及其靶向胃癌细胞和移植瘤双模式成像

周治君,张春雷,马介炳,潘丽媛,张昕,高国,崔大祥(上海交通大学微纳科学技术研究院 生物纳米工程研究室 微纳制造技术国家重点实验室 薄膜与微细技术教育部重点实验室,上海 200240)

### 创新点评:

随着纳米科技的快速发展,纳米材料与医学的联系愈发紧密。纳米材料由于其特殊的表面效应、体积效应及量子尺寸效应,使得纳米材料的光学、力学、磁学等特性发生了巨大的变化,迅速成为了研究热点,在纳米电子学、纳米化学、环境监测、分子影像和医学诊断等方面展示出巨大的应用潜力。针对癌症的早期诊断、治疗和预防,功能化纳米材料的开发得到了广泛地研究并取得了良好的效果,研制胃癌的靶向成像纳米探针对于胃癌的早期诊断和预防具有重大的现实意义。

本期刊登的周治君等人的论文,报道了一种新型的荧光纳米材料二氧化硅包覆金纳米团簇(silica-coated gold nanocluster, AuNC@SiO<sub>2</sub>)的制备及其在胃癌细胞和胃癌肿瘤模型中荧光成像和 CT 成像双模式成像的应用。作者制备得到的 AuNC@SiO<sub>2</sub> 能够发出强烈的红色荧光,并且将其与肿瘤分子标志物叶酸(folate, FA)偶联制备得到功能化的荧光纳米探针。在细胞安全性评价实验中,制备得到的纳米粒子对细胞增殖的影响很小,说明该纳米材料安全性较好,无明显的细胞毒性。在靶向胃癌细胞的光学成像实验中,与 FA 偶联的 AuNC@SiO<sub>2</sub> 能够进入 MGC-803 胃癌细胞,并且在胃癌细胞中发出明显的红色荧光,而在 GES-1 正常细胞中呈现的红色荧光非常微弱,这说明与 FA 偶联的 AuNC@SiO<sub>2</sub> 能够有效地靶向 MGC-803 胃癌细胞。在裸鼠胃癌移植瘤模型中,肿瘤部位注射 AuNC@SiO<sub>2</sub> 后 CT 信号明显增强,说明 AuNC@SiO<sub>2</sub> 纳米粒子能够作为 CT 造影剂应用于胃癌 CT 成像。总之,作者制备的叶酸偶联的 AuNC@SiO<sub>2</sub> 能够用于胃癌细胞和肿瘤模型的荧光和 CT 双模式成像。尽管该成果距离临床应用有很大距离,还需要进一步的深入研究,但是该研究为 AuNC@SiO<sub>2</sub> 纳米粒子作为多功能的示踪剂用于研究胃癌成像和诊断提供了实验依据,将纳米技术和肿瘤多模式成像技术相结合,不失为一次非常有意义的尝试和探索。

中国微生物学会常务理事、干扰素与细胞因子专业委员会主任委员,上海生物工程学会副理事长、医药生物技术委员会主任,卫生部抗体技术重点实验室学术委员会副主任

他健

**[摘要]** **目的:**制备二氧化硅包覆的金纳米团簇(silica-coated gold nanocluster, AuNC@SiO<sub>2</sub>),探讨以其为显像剂靶向胃癌 MGC-803 细胞荧光成像以及胃癌移植瘤模型中 CT 成像的双模式成像的可行性。**方法:**采用层层包硅法制备得到 AuNC@SiO<sub>2</sub>,将其和肿瘤细胞标志物叶酸(folic acid, FA)偶联,MTT 法检测偶联物 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 对 MGC-803 细胞的毒性作用,激光共聚焦显微镜观察其靶向胃癌细胞荧光成像的可能性;以 MG-803 细胞皮下接种 BALB/c 裸鼠建立移植瘤模型,采用 CT 成像系统采集胃癌移植瘤内注射 AuNC@SiO<sub>2</sub> 前后的 CT 信号,探讨 AuNC@SiO<sub>2</sub> 在移植瘤模型中 CT 成像的可行性。**结果:**成功

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目资助(No. 2010CB933901);国家杰出青年基金项目资助项目(No. 881225010)。Project supported by the National Key Basic Research Development Program (973 Program) of China (No. 2010CB933901), and the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (No. 881225010)

**[作者简介]** 周治君(1989-),女,江西省上饶市人,硕士生,主要从事生物纳米技术方面的研究。E-mail:zhouzhijun6189086@163.com

**[通信作者]** 崔大祥(Cui Daxiang, corresponding author),E-mail:dcxui@sjtucn

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130424.1310.002.html>

制备了形貌均一、分散性良好、具有良好荧光光学特性的 AuNC@ SiO<sub>2</sub>, AuNC@ SiO<sub>2</sub> 和 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 在 500 mg/ml 时对胃癌 MGC-803 细胞和正常胃黏膜 GES-1 细胞的毒性均较低。在细胞学实验中, AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 能够有效地靶向胃癌 MGC-803 细胞而非正常 GES-1 细胞,从而清晰地荧光成像;在裸鼠胃癌移植瘤模型中,肿瘤部位注射 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 后 CT 信号明显增强, HU 值由注射前的 129.16 上升到 383.32。 **结论:** AuNC@ SiO<sub>2</sub> 能够用于荧光和 CT 双模式成像, AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 能靶向胃癌细胞荧光成像。

[ 关键词 ] 二氧化硅包覆金纳米团簇( AuNC@ SiO<sub>2</sub> );胃癌;MG-803 细胞;荧光成像;CT 成像

[ 中图分类号 ] R735.2; R730.4

[ 文献标志码 ] A

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2013 )02-0138-07

## Preparation of silica-coated gold nanocluster and its application in dual mode imaging targeting gastric cancer cells and cancer xenograft

Zhou Zhijun, Zhang Chunlei, Ma Jiebing, Pan Liyuan, Zhang Xin, Gao Guo, Cui Daxiang ( National Key Laboratory of Nano/Micro Fabrication Technology, Key Laboratory for Thin Film and Microfabrication of Ministry of Education, Department of Bio-Nano Science and Engineering, Institute of Micro/Nano Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China )

[ Abstract ] **Objective:** To investigate the feasibility of targeted fluorescent imaging to MGC-803 gastric cancer cells and the potential of CT imaging of gastric cancer using nanocomposite probes of silica-coated gold nanocluster ( AuNC@ SiO<sub>2</sub> ).

**Methods:** The AuNC was coated by multilayer silica shells to obtain AuNC@ SiO<sub>2</sub>. AuNC@ SiO<sub>2</sub> was conjugated with cancer cell targeted folic acid ( FA ), and AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA was then used to investigate the feasibility of targeted fluorescent imaging to gastric cancer cells. MG-803 cells were injected subcutaneously into BABL/c nude mice to establish a cancer xenograft model. CT imaging was performed to collect CT signals before and after subcutaneously injection of AuNC@ SiO<sub>2</sub>, thus exploring the feasibility of AuNC@ SiO<sub>2</sub> nanoparticles in CT imaging of tumor mouse models. **Results:** AuNC@ SiO<sub>2</sub> was successfully constructed with a uniform shape, good dispersibility and fluorescence optical properties. AuNC@ SiO<sub>2</sub> and AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA showed a low cytotoxicity on gastric cancer MGC-803 cells and normal gastric mucosal GES-1 cells at a concentration of 500 mg/ml. The AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA showed an effectively targeted ability to gastric cancer MGC-803 cells rather than normal GES-1 cells, thus presenting a clearly fluorescence imaging. CT signals were significantly enhanced in tumors after AuNC@ SiO<sub>2</sub> injection, with HU value increasing from 129.16 before injection to 383.32.

**Conclusion:** AuNC@ SiO<sub>2</sub> can be used for fluorescence imaging and CT dual mode imaging. Moreover, AuNC@ SiO<sub>2</sub> conjugated with FA can realize gastric cancer cells targeted fluorescence imaging.

[ Key words ] silica-coated gold nanocluster ( AuNC@ SiO<sub>2</sub> ); gastric cancer; MG-803 cell; fluorescent imaging; computed tomography imaging

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20( 2 ): 138-144 ]

胃癌是中国癌症发病率和致死率排名第二的恶性肿瘤<sup>[1-4]</sup>,有效的早期诊断和实时追踪胃癌细胞,对胃癌的治疗至关重要。研究者们将癌症早期诊断的目光集中在成像技术上,例如 CT 成像、核磁共振成像以及超声成像等<sup>[5-9]</sup>。然而,单一的成像难以获得病灶部位的足够信息,多种模式成像的融合具有非常重要的意义<sup>[10-12]</sup>。金纳米团簇( gold nanocluster, AuNC )是一种新型的贵金属荧光纳米材料,具有亚纳米结构,其荧光信号强、荧光稳定性好、X-射线吸收系数高,同时生物毒性低、生物相容性好<sup>[13-16]</sup>。这些特性为 AuNC 在荧光成像和 CT 成像中的应用提供了理论支持<sup>[17-22]</sup>。

在本研究中,为了能够保护 AuNC 免受溶液中过量的牛血清蛋白和复杂的外界介质(如溶液 pH、离子强度等)的影响,使其理化性质更加稳定、均一、易于分离纯化以及表面修饰,对 AuNC 表面采用层层包硅法进行包硅处理<sup>[23-24]</sup>,制备了二氧化硅壳包覆 AuNC 核的壳核型荧光纳米粒子 AuNC@ SiO<sub>2</sub>。

叶酸受体( folate receptor, FR )在很多癌细胞表面都高表达,而在正常组织中仅有少量分布。叶酸( folic acid, FA )能特异性地靶向叶酸受体,进而靶向癌细胞<sup>[22]</sup>。本研究选用 FA 作为靶向分子,将 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 和 FA 偶联,制备能靶向癌细胞的 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA,探讨其对胃癌细胞靶向荧光成像

的可能性。同时,制备裸鼠胃癌移植瘤模型,用小动物 CT 成像系统采集注射 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 前后肿瘤部位 CT 信号,观察其在肿瘤中的 CT 成像效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料

氯金酸( chloroauric acid, HAuCl<sub>4</sub> )、牛血清白蛋白( bovine albumin, BSA )、3-氨基丙基三甲氧基硅烷( 3-aminopropyltrimethoxysilane, APTES )、N-羟基琥珀酰亚胺( N-hydroxysuccinimide, NHS )、1-( 3-二甲氨基丙基 )-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[ 1-( 3-dimethylaminopropyl )-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC ]、正硅酸乙酯( tetraethyl orthosilicate, TEOS )、FA 均购于上海阿拉丁试剂有限公司。5 ~ 6 周龄 BALB/c 裸鼠购自上海交通大学动物实验中心上海斯莱克实验动物责任有限公司,动物合格证号: SCXK( 沪 ) 2012-0002。人胃黏膜上皮细胞 GES-1 和人胃癌细胞 MGC-803 购自中科院上海生命科学研究院细胞中心。NICOMP-380ZLS Zeta 电位检测仪购自美国 PSS 公司, NANO/ZEN 1600 System 粒度分析仪购自英国马尔文公司, TCS SP5- II 激光共聚焦荧光显微镜购自德国徕卡公司, Fx Pro/FX 活体成像系统购自加拿大 Carestream Health 公司, Inveon 小动物 PET/SPECT/CT 成像系统购自德国西门子公司。

### 1.2 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 的制备及其表面叶酸功能化

参考文献[ 16 ]合成 AuNC。参考文献[ 22 ]的方法,采用层层包硅法制备 AuNC@ SiO<sub>2</sub>。具体方法:将 200 μl AuNC 溶液稀释在含有氨水的 20 ml 无水乙醇中,搅拌混匀。将 200 μl 正硅酸乙酯加入上述溶液,继续剧烈搅拌;1 h 后再次加入 200 μl 正硅酸乙酯,剧烈搅拌 20 h。通过超速离心分离纯化得到 AuNC@ SiO<sub>2</sub>,溶解在 2 ml 无水乙醇中。

将 FA 与 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 偶联制备具有肿瘤靶向性的 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA。首先,将 2 ml AuNC@ SiO<sub>2</sub> 溶液加入 40 ml 无水乙醇中,加入 APTES,搅拌 4 h,通过离心分离纯化得到表面氨基化的 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>。其次,将 EDC 和 NHS 加入溶解有 FA 的 DMSO 溶液中,避光反应 1 h,活化 FA 表面的羧基。将氨基化的 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> 加入羧基活化的 FA 溶液中,避光搅拌,充分反应 3 h。最后,通过离心分离纯化得到偶联物 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA。

### 1.3 MTT 法检测 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 和 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 对 MGC-803 癌细胞和 GES-1 正常细胞的毒性

以含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI 1640 培养液在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的条件下培养传代

MGC-803 细胞和 GES-1 细胞。将 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 溶解在培养基中,每孔加入 150 μl 不同质量浓度( 31.25、62.5、125、250、500 μg/ml )的纳米粒子,设置 5 个复孔;空白对照组加入 150 μl 培养基。培养 24 h 后,用 MTT 法分析 AuNC@ SiO<sub>2</sub>、AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 对细胞增殖活性的影响。

### 1.4 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 靶向胃癌细胞荧光成像实验

将 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 生物纳米探针与 MGC-803 细胞共培育,控制终质量浓度为 500 μg/ml,培育 3 h。用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,将细胞外的 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 充分洗净,并用 DAPI 染色。5 min 后,用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,2% 多聚甲醛固定细胞,制备细胞爬片,激光共聚焦显微镜观察 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 在胃癌细胞中的成像情况。为了更好地证明 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 以靶向方式进入 MGC-803 癌细胞,设置了两个对照组:第一对照组将 GES-1 细胞与 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 共培育;第二对照组把未偶联 FA 的 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> 与 MGC-803 细胞共培育,在相同的条件下观察纳米粒子是否会进入癌细胞。

### 1.5 裸鼠胃癌移植瘤模型 CT 成像实验

选择 5 周龄 BALB/c 裸鼠,皮下接种 MGC-803 细胞,建立了胃癌移植瘤模型。在肿瘤粒径达到 0.5 cm 后,将 0.01 mol/L PBS 溶解的 AuNC@ SiO<sub>2</sub>( 224 mg/ml )注射入裸鼠的肿瘤组织内。注射结束后,用 Inveon 小动物 PET/SPECT/CT 成像系统采集裸鼠肿瘤部位注射 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 前后的 CT 信号。

## 2 结 果

### 2.1 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 和 AuNC@ SiO<sub>2</sub>-FA 的表征

2.1.1 形貌和粒径 制备的 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 形貌均一、分散性好( 图 1 )。AuNC 的平均粒径为( 2.42 ± 1.22 ) nm, AuNC@ SiO<sub>2</sub> 透射电镜结果和动力学半径检测结果吻合, AuNC@ SiO<sub>2</sub> 的平均粒径为( 58.46 ± 6.78 ) nm。AuNC 在包硅后,形成了外表是二氧化硅壳、内部是蛋白包覆 AuNC 核的壳核型结构的 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 纳米粒子。

2.1.2 紫外吸收和荧光光谱特性 制备得到的 AuNC 和 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 具有良好的荧光光学特性。如图 2 所示,制备的 AuNC 的在 289 nm 处有最大紫外吸收波长;AuNC 的荧光光谱:在 420 和 530 nm 附近有最大激发波长,在 670 nm 处有最大发射波长。制备的 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 在 289 nm 处的紫外吸收特征峰消失;荧光光谱:在 540 nm 处有最大激发波长,在 650 nm 处有最大发射波长。AuNC 包硅制备的 AuNC@ SiO<sub>2</sub> 纳米粒子依旧保持了 AuNC 良好的荧

光特性,并且其激发光谱和发射光谱的斯托克斯位移大于 100 nm,远远大于普通的有机荧光染料。

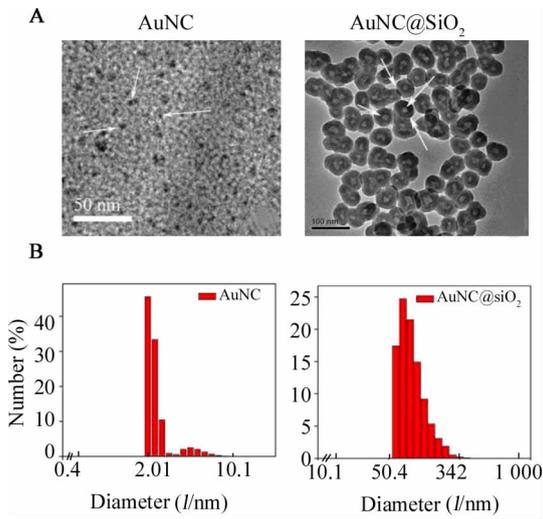


图 1 AuNC 和 AuNC@SiO<sub>2</sub> 的透射电镜 (A) 观察及其动力学粒径分布 (B)

Fig. 1 TEM image (A) and dynamics light scattering (B) of AuNC and AuNC@SiO<sub>2</sub>

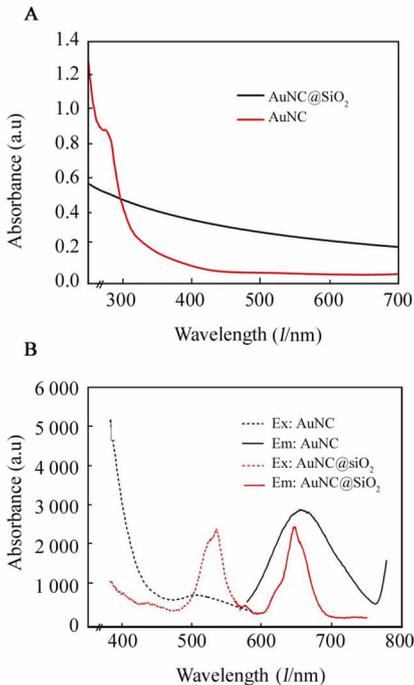


图 2 AuNC 和 AuNC@SiO<sub>2</sub> 的紫外吸收光谱 (A) 和荧光光谱 (B)

Fig. 2 Ultraviolet absorption spectrum (A) and fluorescence spectrum (B) of AuNC and AuNC@SiO<sub>2</sub>

2.1.3 Zeta 电位 检测(图 3)结果显示,AuNC@SiO<sub>2</sub>的初始电位为 -56.7 mV,氨基修饰后,纳米粒

子表面的羟基被氨基替代,Zeta 电位变为 +46.9 mV,得到了氨基修饰的 AuNC@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>。叶酸表面羧基被 EDC 和 NHS 活化后与 AuNC@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> 的表面氨基共价偶联,得到了表面带负电的 COO<sup>-</sup> 修饰的 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA,Zeta 为 -26.3 mV,充分证明纳米粒子表面成功地偶联上了 FA 分子。

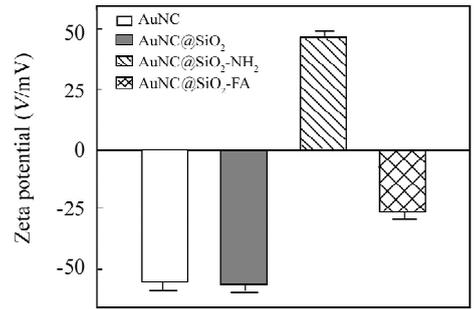


图 3 AuNC、AuNC@SiO<sub>2</sub>、AuNC@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> 和 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 的 Zeta 电位

Fig. 3 Zeta potential of AuNC, AuNC@SiO<sub>2</sub>, AuNC@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> and AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA

2.2 AuNC@SiO<sub>2</sub> 和 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 对 MGC-803 癌细胞和 GES-1 正常细胞的毒性

MTT 法检测结果如图 4 所示,AuNC@SiO<sub>2</sub> 分别与 MGC-803 癌细胞和 GES-1 正常细胞共培育,纳米材料最高质量浓度为 500 μg/ml 时,细胞存活率分别为 (88.74 ± 5.48)% 和 (86.64 ± 2.87)%。AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 分别与 MGC-803 癌细胞和 GES-1 正常细胞共培育,纳米材料最高质量浓度为 500 μg/ml 时,细胞存活率分别为 (88.65 ± 1.52)% 和 (90.74 ± 6.99)%。结果说明,AuNC@SiO<sub>2</sub> 和 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 无论是对 MGC-803 胃癌细胞还是对 GES-1 正常细胞的增殖抑制作用均很小,细胞毒性均较低。

2.3 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 靶向胃癌细胞的荧光成像

AuNC@SiO<sub>2</sub> 与靶向分子 FA 偶联后制备得到的 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 能够特异性地靶向胃癌细胞而非正常细胞。图 5 显示,MGC-803 胃癌细胞膜周围、细胞质中以及少部分细胞核周围存在明亮的红色荧光,说明 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 成功地进入了 MGC-803 细胞。图 6 显示,GES-1 正常细胞膜周围仅存在少量微弱的红色荧光,而细胞质中和细胞核周围几乎没有红色荧光,表明 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 几乎没有进入 GES-1 细胞。图 7 显示,

MGC-803 细胞膜周围、内部及细胞核附近均没有红色荧光, 表明 AuNC@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> 没有进入 MGC-803 细胞。通过对比图 5、6 和 7 的荧光成像结果, 可以判断, 与靶向分子 FA 偶联后的 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 生物纳米探针能够较好地靶向胃癌细胞, 原因是通过靶向分子 FA 与胃癌细胞过表达的 FR 之间的相互结合作用靶向了 MGC-803 细胞, 并且通过激光共聚焦荧光显微镜在 530 nm 条件下激发产生了明显的红色荧光信号。结果表明, AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 可以用于胃癌细胞靶向荧光成像。

HU 值越大, CT 信号越强。实验结果表明, 注射的 AuNC@SiO<sub>2</sub> 在肿瘤组织内可以 CT 成像, 具有明显的 CT 信号。实验证明, AuNC@SiO<sub>2</sub> 可以作为 CT 成像造影剂, 具有广阔的应用前景。

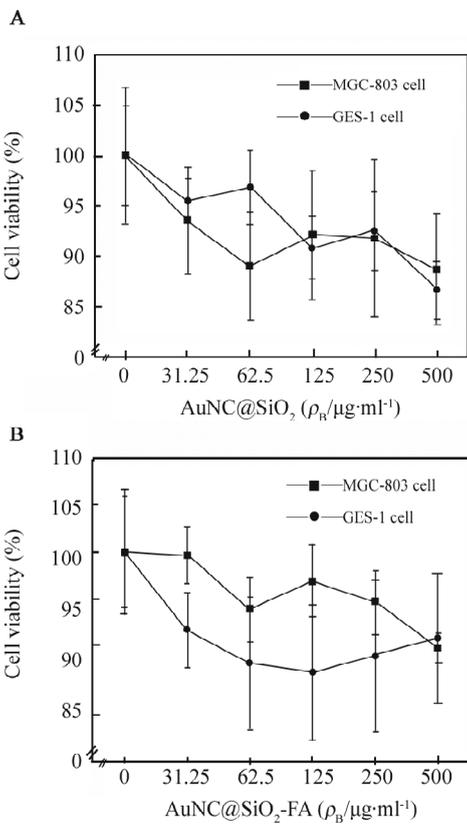


图 4 AuNC@SiO<sub>2</sub>( A )和 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA( B )对 MGC-803 细胞和 GES-1 细胞增殖活性的影响

Fig. 4 Effects of AuNC@SiO<sub>2</sub>( A ) and AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA( B ) on the viability of MUC-803 cells and GES-1 cells

2.4 AuNC@SiO<sub>2</sub> 靶向胃癌细胞移植瘤的 CT 成像

图 8A 是注射 AuNC@SiO<sub>2</sub> 之前的裸鼠的 CT 图像, 肿瘤部位没有明显的 CT 信号。图 8B 为注射 AuNC@SiO<sub>2</sub> 之后采集到的相同截面的 CT 图像, 肿瘤注射部位呈现了很白亮的 CT 信号。裸鼠肿瘤部位注射 AuNC@SiO<sub>2</sub> 前后 CT 信号 HU 值分别为 129.16 和 383.32, 注射后 HU 值增加了 3.83 倍。

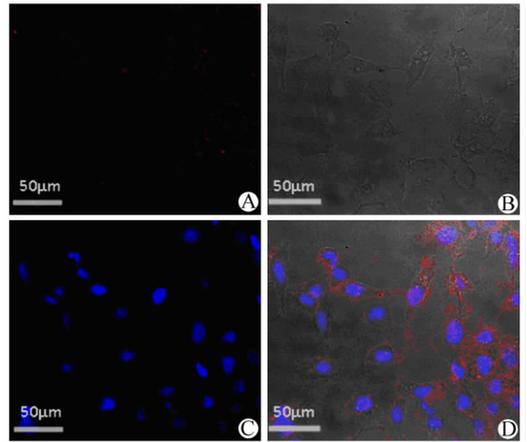


图 5 MGC-803 胃癌细胞与 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 共培养 3 h 后的荧光共聚焦成像

Fig. 5 Confocal fluorescence imaging of MGC-803 gastric cancer cells incubated with AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA for 3 h

A: Red channel, excited at 530 nm; B: Bright-field; C: Blue fluorescence image of nucleus, excited at 350 nm; D: Overlay image

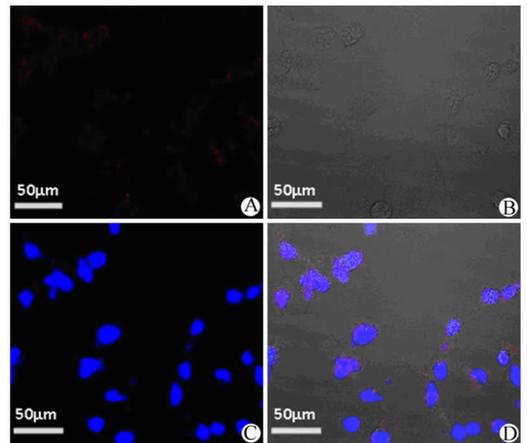


图 6 GES-1 正常胃黏膜细胞与 AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA 共培养 3 h 后的荧光共聚焦成像

Fig. 6 Confocal fluorescence imaging of GES-1 normal gastric mucosal cells incubated with AuNC@SiO<sub>2</sub>-FA for 3 h

A: Red channel, excited at 530 nm; B: Bright-field; C: Blue fluorescence image of nucleus, excited at 350 nm; D: Overlay image

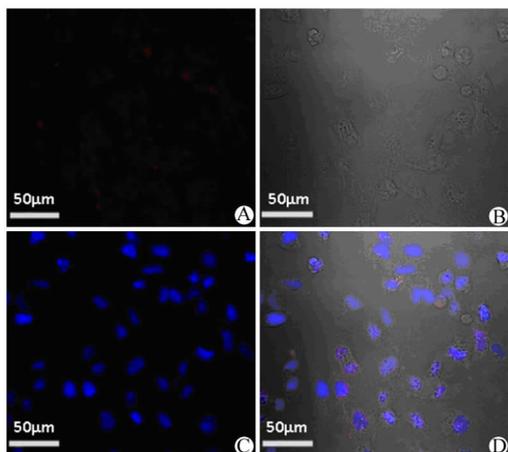


图7 MGC-803 胃癌细胞与  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  共培育 3 h 后的荧光共聚焦成像

Fig. 7 Confocal fluorescence imaging of MGC-803 gastric cancer cells incubated with  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  for 3 h

A: Picture captured through red channel, excited at 530 nm;  
B: Picture of bright-field; C: Picture of the blue fluorescence image of nucleus of dark-field, excited at 350 nm;  
D: Picture of the overlay image

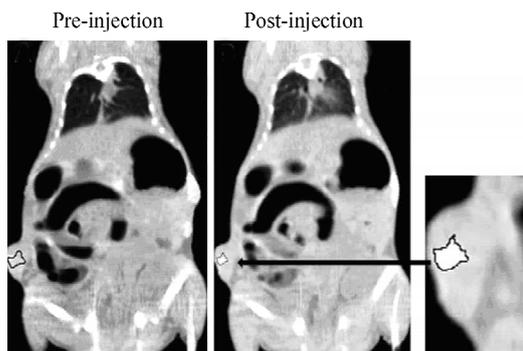


图8  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2$  瘤内注射前后的 CT 成像

Fig. 8 CT images before and after intratumoral injection with  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2$

### 3 讨论

伴随着纳米技术的日益发展,研究者通过筛选胃癌相关的生物标志物,并将其与纳米材料结合,通过分子成像技术追踪和识别活体中的早期胃癌细胞<sup>[24-28]</sup>。量子点、超顺磁性纳米粒子、上转换纳米粒子都已经被作为诊断试剂和造影剂广泛地运用到了活体荧光成像、核磁共振成像、CT 成像等研究中<sup>[9, 26-31]</sup>。如 Choi 等<sup>[31]</sup>利用半胱氨酸包覆的量子点与 Cyclic-RGD 多肽偶联,制备成功能化的纳米荧光探针,成功用于靶向小鼠肿瘤模型进行荧光活体成像的研究。Zhang 等<sup>[13]</sup>也

利用荧光磁性纳米粒子标记的 MSC 和 ES 细胞用于研究活体胃癌细胞靶向成像,希望能够通过多种模式的活体靶向成像技术来发现早期胃癌细胞。尽管目前在纳米技术成像领域已经取得了很大的进展,但是寻找和获得更加安全、有效、生物相容性好的纳米生物探针仍旧是研究人员的重要使命。

牛血清蛋白辅助合成的  $\text{AuNC}$  不仅具有很强的红色荧光特性,并且由于金原子本身具有很强的 X 射线吸收系数,使得  $\text{AuNC}$  在 CT 成像中具有潜在的应用前景。为了探讨金纳米团簇在双模式成像中应用的可能性,本研究制备了  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2$ , 其保持了金纳米团簇的荧光性能,并且壳核型的结构可以保护金纳米团簇不受外界复杂环境的干扰和影响,从而更好地稳定金纳米团簇的物化性质。将 FA 与  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2$  偶联,用于胃癌细胞靶向荧光成像和胃癌移植瘤模型双模式成像的研究。

本实验制备得到的  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2$  光稳定性好,易于表面修饰和 functionalized, 并且保持着  $\text{AuNC}$  的良好荧光特性。在包硅前后,  $\text{AuNC}$  和  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2$  的荧光光谱最大激发波长和最小发射波长发生了微小的变化,这是因为纳米粒子在包硅后荧光染料性质发生了一些改变,该结果和以往文献<sup>[22]</sup>报道中关于其他纳米荧光染料在包硅后荧光光谱变化结果相吻合。 $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2$  表面氨基化修饰和偶联 FA 后 Zeta 电位的变化,确保了  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2$  成功地偶联上 FA 抗体,说明本研究成功制备了所需要的荧光纳米探针。MTT 实验结果显示,制备得到的  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2\text{-FA}$  在高剂量下对胃癌细胞和正常细胞都保持着较低的细胞毒性,说明  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2\text{-FA}$  具有安全和生物相容性好的特性。通过三组细胞荧光成像实验结果的对比和分析,显示生物纳米探针  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2\text{-FA}$  能够特异性靶向胃癌细胞,用于胃癌细胞靶向荧光成像。同时,CT 成像结果显示,  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2$  在裸鼠胃癌移植瘤模型中可以 CT 成像。

本研究首次证实了  $\text{AuNC}@ \text{SiO}_2$  在胃癌细胞及其裸鼠移植瘤模型中荧光成像和 CT 成像的可行性。尽管实验在细胞和动物模型的双模式成像中获得初步成功,但是人体与动物模型之间存在很大的差异性,如何将成功的实验结果应用于复杂的人体并使用于临床还需要不断地深入探讨。

### [参考文献]

- [1] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation *in vitro* [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(4): 399-404.
- [2] Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, et al. New strategies for fluores-

- cent probe design in medical diagnostic imaging [ J ]. Chem Rev, 2010, 110 ( 5 ): 2620-2640.
- [ 3 ] Cui DX, Zhang L, Yan XJ, et al. A microarray-based gastric carcinoma prewarning system [ J ]. World J Gastroenterol, 2005, 11 ( 9 ): 1273-1282.
- [ 4 ] Ruan J, Song H, Ji J, et al. Fluorescent magnetic nanoparticle-labeled mesenchymal stem cells for targeted imaging and hyperthermia therapy of *in vivo* gastric cancer [ J ]. Nanoscale Res Lett, 2012, 7 ( 1 ): 309-320.
- [ 5 ] Hallouard F, Anton N, Choquet P, et al. Iodinated blood pool contrast media for preclinical X-ray imaging applications [ J ]. Biomaterials, 2010, 31 ( 24 ): 6249-6268.
- [ 6 ] Gunasekera UA, Pankhurst QA, Douek M. Imaging applications of nanotechnology in cancer [ J ]. Targ Oncol, 2009, 4 ( 3 ): 169-181.
- [ 7 ] Nasongkla N, Bey E, Ren J, et al. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-Ultrasensitive drug delivery systems [ J ]. Nano Lett, 2006, 6 ( 11 ): 2427-2430.
- [ 8 ] Rong He, Daxiang Cui. Core/shell fluorescent magnetic silica-coated composite nanoparticles for bioconjugation [ J ]. Nanotechnology, 2007, 18 ( 31 ): 1088-1095.
- [ 9 ] Kim D, Jeong YY, Jon S. A drug-loaded aptamer gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer [ J ]. ACS Nano, 2010, 4 ( 7 ): 3689-3696.
- [ 10 ] Cai W, Shin DW, Chen K, et al. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects [ J ]. Nano Lett, 2006, 6 ( 4 ): 669-676.
- [ 11 ] Kirchner C, Liedl T, Kudera S, et al. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles [ J ]. Nano Lett, 2005, 5 ( 2 ): 331-338.
- [ 12 ] Hardman RA. Toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors [ J ]. Environ Health Perspect, 2006, 114 ( 2 ): 165-172.
- [ 13 ] Zhang A, Tu Y, Qin SB, et al. Gold nanoclusters as contrast agents for fluorescent and X-ray dual-modality imaging [ J ]. J Colloid Interface Sci, 2012, 372 ( 1 ): 239-244.
- [ 14 ] Wu X, He XX, Wang K, et al. Ultrasmall near-infrared gold nanoclusters for tumor fluorescence imaging *in vivo* [ J ]. Nanoscale, 2010, 2 ( 10 ): 2244-2249.
- [ 15 ] Guo R, Wang H, Peng C, et al. X-ray attenuation property of dendrimer-entrapped gold nanoparticles [ J ]. J Phys Chem C, 2010, 114 ( 1 ): 50-56.
- [ 16 ] Xie JP, Zheng YG, Jackie YY. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters [ J ]. JACS, 2009, 131 ( 3 ): 888-889.
- [ 17 ] Shang L, Dörlich RM, Brandholt S, et al. Facile preparation of water-soluble fluorescent gold nanoclusters for cellular imaging applications [ J ]. Nanoscale, 2011, 3 ( 5 ): 2009-2014.
- [ 18 ] Rabin O, Perez JM, Grimm J, et al. An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles [ J ]. Nat Mater, 2006, 5 ( 2 ): 118-122.
- [ 19 ] Michaelis J, Hettich C, Mlynek J, et al. Optical microscopy using a single-molecule light source [ J ]. Nature, 2000, 405 ( 6784 ): 325-328.
- [ 20 ] Patr CR, Bhattacharya R, Mukhopadhyay D, et al. Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer [ J ]. Adv Drug Deliver Rev, 2010, 62 ( 3 ): 346-361.
- [ 21 ] Wang H, Zheng L, Peng C, et al. Computed tomography imaging of cancer cells using acetylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles [ J ]. Biomaterials, 2011, 32 ( 11 ): 2979-2988.
- [ 22 ] Hu H, Xiong LQ, Zhou J, et al. Multimodal-luminescence core-shell nanocomposites for targeted imaging of tumor cells [ J ]. Chem Eur J, 2009, 15 ( 14 ): 3577-3584.
- [ 23 ] Xavier LG, Benjamin H, Gregor J, et al. NIR-emitting fluorescent gold nanoclusters doped in silica nanoparticles [ J ]. J Mater Chem, 2011, 21: 2974-2981.
- [ 24 ] Werner S, Arthur F, Ernst B. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range [ J ]. J Colloid Interface Sci, 1967, 26 ( 1 ): 62-69.
- [ 25 ] Ruan J, Ji J, Song H, et al. DiR-labeled embryonic stem cells for targeted imaging of *in vivo* gastric cancer cells [ J ]. Theranostics, 2012, 2 ( 6 ): 618-628.
- [ 26 ] He M, Huang P, Zhang CL, et al. Dual phase-controlled synthesis of uniform lanthanide-doped NaGdF<sub>4</sub> upconversion nanocrystals via an OA/ionic liquid two-phase system for *in vivo* dual-modality imaging [ J ]. Adv Func Materials, 2011, 21 ( 23 ): 4470-4477.
- [ 27 ] Huang P, Bao L, Zhang CL, et al. Folic acid-conjugated silica-modified gold nanorods for X-ray/CT imaging-guided dual-mode radiation and photo-thermal therapy [ J ]. Biomaterials, 2011, 32 ( 36 ): 9796-9809.
- [ 28 ] Ruan J, Ji JJ, Song H, et al. HER2 monoclonal antibody conjugated RNase-A-associated CdTe quantum dots for targeted imaging and therapy of gastric cancer [ J ]. Biomaterials, 2012, 33 ( 29 ): 7093-7102.
- [ 29 ] Huang P, Li ZM, Lin J, et al. Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for *in vivo* simultaneous magnet fluorescent imaging and targeting therapy [ J ]. Biomaterials, 2011, 32 ( 13 ): 3447-3458.
- [ 30 ] Ruan J, Ji J, Song H, et al. Fluorescent magnetic nanoparticle-labeled mesenchymal stem cells for targeted imaging and hyperthermia therapy of *in vivo* gastric cancer [ J ]. Nanoscale Res Lett, 2012, 7 ( 1 ): 309-316.
- [ 31 ] Choi HS, Liu W, Liu F, et al. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles [ J ]. Nat Nanotechnol, 2010, 5 ( 1 ): 42-47.

[ 收稿日期 ] 2012 - 12 - 25

[ 修回日期 ] 2013 - 02 - 20

[ 本文编辑 ] 王莹, 黄静怡