

表面修饰的金纳米棒的生物相容性和细胞摄取研究

方文彦¹, 闵元增², 徐迈¹, 朱传高¹

(1. 淮南师范学院化学与化工系, 安徽淮南 232001; 2. 中国科学技术大学化学与材料科学学院, 安徽合肥 230026)

摘要:制备了棒状纳米金颗粒并对其表面进行了修饰,研究了其生物相容性以及运载荧光物质进入细胞的功能. 所制备的材料通过聚乙二醇稳定、采用双修饰的方法获得了具有活性-NH₂基团存在、稳定性好且生物相容性高的表面修饰的金纳米棒. 采用透射电子显微镜和紫外可见吸收光谱对表面修饰的金纳米棒进行了表征,运用 MTT 比色分析法通过细胞毒性研究了表面修饰的金纳米棒的生物相容性,用流式细胞仪和激光共聚焦显微镜考察了其运载荧光物质进入细胞的功能. 结果表明,表面修饰的金纳米棒具有良好的生物相容性,具有作为荧光物质或药物载体的应用前景,可应用于疾病的诊断治疗.

关键词:金纳米棒;表面修饰;聚乙二醇;荧光探针

中图分类号: TB383; Q523 **文献标识码:** A doi:10.3969/j.issn.0253-2778.2011.05.008

Biocompatibility and cellular uptake of surface-modified gold nanorods

FANG Wenyan¹, MIN Yuanzeng², XU Mai¹, ZHU Chuangao¹

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Huainan Normal University, Huainan 232001, China;

2. School of Chemistry and Materials, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: Surface modified gold nanorods which are hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) stabilized were obtained and their biocompatibility and function of delivering fluorescent molecules into cells were also studied. The CTAB stabilized gold nanorods were surface modified with polyethylene glycol (PEG) through in situ dithiocarbamate formation and ligand exchange. The surface modified gold nanorods (PEG-GNRs) with terminal amine on its surface was prepared. The shape and optical properties of surface modified GNRs were characterized by transmission electron microscope (TEM) and UV-Vis. Then, the biocompatibility of PEG-GNRs was measured with MTT assay. A confocal laser scanning microscope (CLSM) and a fluorescence activated cell sorter (FACS) were employed to study PEG-GNRs' function of delivering fluorescence molecules into cells. Results show that PEG-GNRs have good compatibility and can be used as a vector for delivering fluorescent molecules or drug into cells for cell imaging in the future.

Key words: gold nanorods; surface modification; polyethylene glycol (PEG); fluorescent probe

0 引言

金纳米颗粒具有潜在的生物医学方面的应用,

例如它能够用于细胞成像、药物或者基因运输以及癌症治疗等^[1-6],因此它受到各国学者的广泛关注. 由于金颗粒稳定性高、易于表面修饰,而且金纳米在

收稿日期:2010-11-11;修回日期:2011-04-22

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金重点研究项目(KJ2009A008),淮南市科技计划项目(2010A03205)资助.

作者简介:方文彦(通讯作者),女,1963年生,硕士/副教授.研究方向:应用化学. E-mail:wfyang6312@126.com

合成过程中形貌容易控制,更加增强了金纳米材料的应用前景^[7].例如棒状的金纳米颗粒具有独特的光学性能,它在近红外区(800 nm左右)有一个特征吸收峰^[8],近红外光被组织吸收很少而能够深层次地穿透组织,这使得金纳米棒在成像和光热疗方面具有很强的应用前景^[9-10].

鉴于金纳米颗粒的医学应用前景,其潜在的毒性也受到人们的广泛关注.有研究表明,在纳米金合成过程中使用了稳定剂(例如十六烷基三甲基溴化铵)可使纳米金产生较强的细胞毒性,从而阻碍了它在生物学上的应用^[11].

本文采用聚乙二醇(PEG)对金纳米棒进行修饰,并使复合材料的表面具有反应活性的氨基基团,所制备的材料可以有效地负载荧光染料,并具有良好的生物相容性,克服了传统纳米金合成过程中因稳定剂的使用而产生的细胞毒性.通过流式细胞仪和激光共聚焦显微镜观察,发现金纳米棒可运载荧光标记物进入细胞.

1 实验

1.1 金纳米棒的制备与表征

参照文献^[12]的方法制备由十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)稳定的棒状纳米金(GNRs).将该金纳米棒溶液离心、除去上清液,沉淀用超纯水洗涤2次以除去过量的CTAB和其他盐,调节GNRs水溶液光密度至1.0~1.2 OD.取3 mL光密度为1.0 OD的GNRs水溶液,通过原位二硫代氨基甲酸酯方式,用氨基-聚乙二醇₃₄₀₀-氨基修饰金纳米棒^[9].将所得溶液离心,除去上清液,将沉淀悬浮在4 mL 250 $\mu\text{mol/L}$ 5-kDa 甲氧基-聚乙二醇₅₀₀₀-硫辛酸水溶液中,用1 mol/L NaOH调节溶液pH值至7.5,室温下搅拌过夜,即得到由氨基-聚乙二醇₃₄₀₀-氨基和甲氧基-聚乙二醇₅₀₀₀-硫辛酸双重修饰的纳米金棒(PEG-GNRs).

PEG-GNRs的形貌通过透射电子显微镜(TEM)进行表征,吸收光谱通过紫外-可见分光光度法进行检测.

1.2 PEG-GNRs的生物相容性

分别将人乳腺癌细胞(MCF-7)、人肺癌细胞(A549)和正常细胞(人胚胎肾细胞HEK293)在添加有10%小牛血清的RPMI-1640培养液中培养至合适的时间.实验时,将细胞种在96孔板中,每孔加100 μL 3 000个细胞,培养24 h后,用各种Au浓度

的PEG-GNRs处理细胞,再在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养72 h,然后除去培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗细胞2~3次后,加100 μL 含20% 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)的细胞培养液,在37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 条件下培养2 h.每孔加100 μL 细胞溶解缓冲液(细胞溶解缓冲液由20 g十二烷基磺酸钠溶于50 mL H_2O ,再加50 mL N,N-二甲基甲酰胺制成,pH=4.7),细胞继续培养过夜.用Bio-Rad 680酶标仪在570 nm波长测吸光度,各种浓度下细胞的存活率以百分率表示,每个实验重复做3次取平均值分析.

1.3 荧光染料罗丹明的标记

将罗丹明异硫氰酸酯(RBITC)溶于甲醇加入PEG-GNRs溶液中,调节混合溶液的pH值至9.0,罗丹明异硫氰酸酯与PEG-GNRs表面的氨基进行反应.室温下反应过夜后,离心洗涤3次,然后将纳米颗粒重悬于水中,即得罗丹明标记的金纳米棒.

1.4 激光共聚焦显微镜荧光成像

在24孔板中每孔种 5×10^4 个MCF-7细胞在玻璃盖玻片上,维持温度37 $^{\circ}\text{C}$,5%的 CO_2 ,95%湿度下培养24 h,再将罗丹明标记的PEG-GNRs与其一起培养2 h,然后移出培养液.用RPMI 1640培养液将这些细胞冲洗3次,用超纯化水冲洗2次,在室温下用细胞固定液固定10 min后,再用超纯化水冲洗.按供应商提供的标准试验方案用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)将细胞核染色,用PBS将染色后的细胞洗涤3次.将盖玻片用抗荧光淬灭的封片液在载玻片上封片,用莱卡TCS-SP5激光共聚焦显微镜成像(CLSM,激光微系统,德国,双光子系统).DAPI和RBITC激发波长分别为364 nm和543 nm.

1.5 用流式细胞仪测定细胞吞噬作用

在24孔板中每孔种 5×10^4 个MCF-7细胞,加0.5 mL RPMI 1640培养液,在5% CO_2 气体,90%湿度中孵育24 h.用含罗丹明标记的PEG-GNRs的RPMI 1640培养液取代原培养液,在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育细胞2 h,然后用RPMI 1640培养液冲洗细胞3次,再用PBS洗2次,用胰蛋白酶处理得到细胞.得到的细胞悬浮在PBS中,以1 000 r/min的转速离心5 min,除去上清液,用PBS清洗细胞团以减少培养液背景荧光.经过两个周期的洗涤、离心分离,将细胞悬浮在200 μL 细胞固定液中.用流式细胞仪计数RBITC阳性细胞(BD生物科学,美国),用WinMDI

2.9 软件对结果进行分析.

2 结果与讨论

2.1 PEG-GNRs 的表征

金纳米棒的形貌通过透射电镜进行表征,图 1 结果表明,金颗粒的分布较为均匀,平均粒径为 $42 \text{ nm} \times 11 \text{ nm}$,纵横比为 3.8,为典型的纳米短棒.紫外-可见吸收检测显示,PEG-GNRs 在 510 nm 和 767 nm 波长处有两个吸收峰(见图 2),符合典型的短 GNRs 吸收峰特征,分别对应于纵、横两面的可见共振吸收^[8].

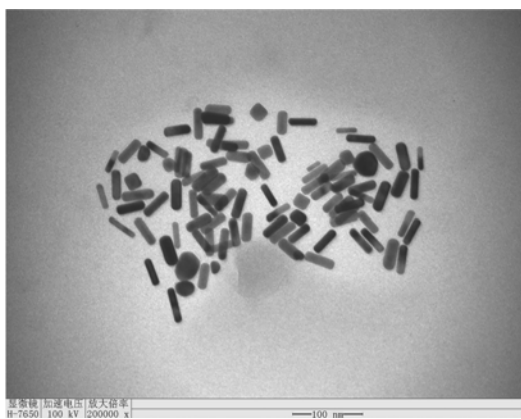


图 1 PEG-GNRs 的透射电镜表征

Fig. 1 TEM image of PEG-GNRs

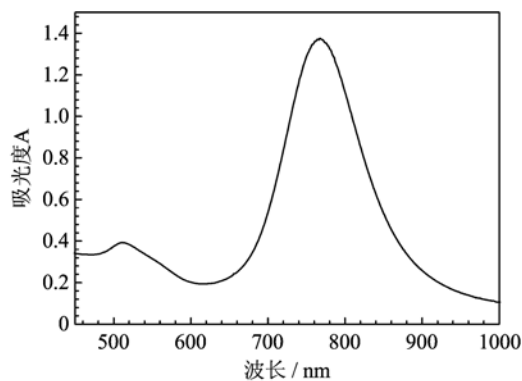


图 2 PEG-GNRs 的紫外吸收

Fig. 2 UV-vis spectrum of PEG-GNRs

为确保所制备的纳米颗粒的生物兼容性,我们实验了不同金浓度的 PEG-GNRs 对几种不同细胞的毒性(金浓度用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法检测,细胞包括肿瘤细胞 MCF-7, A549 和正常细胞 HEK293). 结果表明,在实验所采用的金浓度范围内($\leq 40 \mu\text{mol/L}$),所使用的 PEG-GNRs 具有很好的生物兼容性(见表 1).

2.2 PEG-GNRs 的细胞摄取

PEG-GNRs 的细胞摄取通过荧光检测. 经罗丹明修饰的 PEG-GNRs 发射 580 nm 的红色荧光,因而可以用于荧光检测. 图 3(a)为通过细胞核染料苯基吲哚(DAPI)染色细胞后,利用 354 nm 紫外光波长的光线激发、在激光共聚焦显微镜下观察到的细胞照片,蓝色部分显示为细胞核. 图 3(b)为利用 463 nm 波长的光线激发,红色荧光显示通过荧光染料罗丹明修饰的 PEG-GNRs 在细胞内的分布. 图 3(c)为明场下的细胞照片,显示了细胞的轮廓. 图 3(d)为图 3(a)、图 3(b)和图 3(c)的叠加,结果表

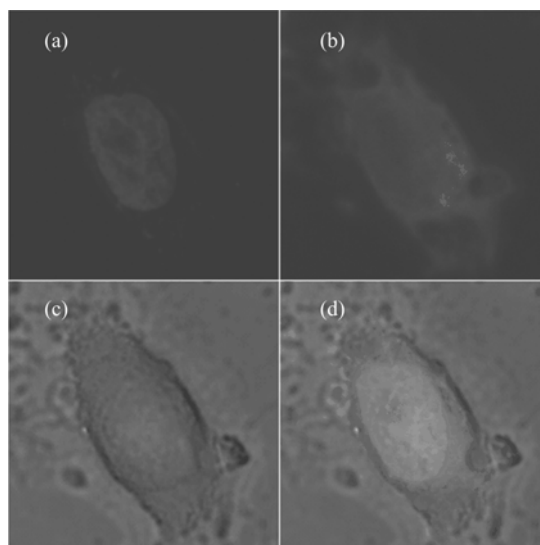


图 3 PEG-GNRs 细胞摄取的激光共聚焦显微镜照片

Fig. 3 Cellular uptake photographs of PEG-GNRs

from Confocal laser scanning microscopy

表 1 不同浓度的 PEG-GNRs 处理后的细胞活性

Tab. 1 The activity of cells which were processed by different concentrations of PEG-GNRs

各细胞系存活率	所加材料的浓度					
	$1 \mu\text{mol/L}$	$5 \mu\text{mol/L}$	$10 \mu\text{mol/L}$	$15 \mu\text{mol/L}$	$30 \mu\text{mol/L}$	$40 \mu\text{mol/L}$
HEK293	$(105 \pm 7.2)\%$	$(90.7 \pm 6.3)\%$	$(90.4 \pm 7.3)\%$	$(93.5 \pm 9.3)\%$	$(97.5 \pm 6.4)\%$	$(96.7 \pm 9.3)\%$
MCF-7	$(112.5 \pm 8.3)\%$	$(114.4 \pm 7.2)\%$	$(117.4 \pm 4.3)\%$	$(113.6 \pm 6.2)\%$	$(117.4 \pm 8.7)\%$	$(116.4 \pm 8.1)\%$
A549	$(91.3 \pm 6.1)\%$	$(88.5 \pm 8.2)\%$	$(85.2 \pm 9.7)\%$	$(88.8 \pm 7.7)\%$	$(95.8 \pm 8.6)\%$	$(87.4 \pm 4.7)\%$

明, PEG-GNRs 颗粒可携带生物标记物进入细胞内, 在细胞质内可以较好地分布, 而在细胞核内分布较少。

通过流式细胞仪进一步定量地检测了金纳米颗粒的细胞摄取。图 4 显示, 与对照细胞相比, 用罗丹明标记的 PEG-GNRs 加入细胞培养液与细胞一起孵育后, 细胞荧光强度约增强了 3 倍, 这一结果表明荧光染料罗丹明标记的 PEG-GNRs 可以被细胞有效地摄入。图 4 中灰色表示细胞空白样品, 荧光强度为 3.09 ± 0.1 ; 红色表示经罗丹明标记的 PEG-GNRs 处理 2 h 的细胞, 荧光强度为 9.91 ± 0.4 。

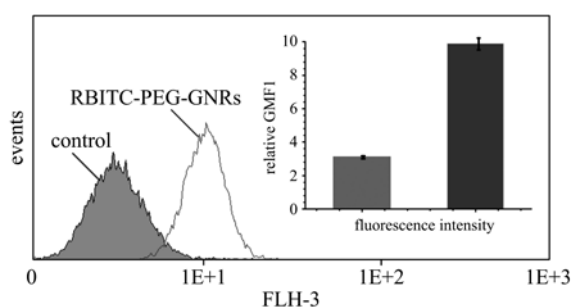


图 4 流式细胞仪检测细胞荧光强度

Fig. 4 Fluorescence intensity of cells measured by FACS

3 结论

本文采用聚乙二醇对金纳米棒进行修饰, 制备了 PEG 稳定的棒状纳米金颗粒。所制备的材料稳定性好, 可用于负载荧光探针用于细胞成像。透射电镜图像及紫外-可见光谱图显示 PEG-GNRs 具有典型的短 GNRs 特征; 细胞毒性实验证明 PEG-GNRs 具有很好的生物相容性; 激光共聚焦显微镜照片及流式细胞仪检测结果显示 PEG-GNRs 能携带荧光染料进入细胞内, 由此可推知 PEG-GNRs 可以同样的反应机理携带生物标记物进入细胞内。因此 PEG-GNRs 可作为荧光试剂或其他生物标记物的载体, 广泛应用于疾病诊断或治疗, 具有广阔的应用前景。

致谢 衷心感谢中国科学技术大学刘扬中教授对本课题的指导。

参考文献 (References)

[1] Lee S E, Sasaki D Y, Perroud T D, et al. Biologically

functional cationic phospholipid-gold nanoplasmonic carriers of RNA [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(39): 14 066-14 074.

- [2] Jain P K, Huang X H, El-Sayed I H, et al. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine [J]. *Accounts Chem Res*, 2008, 41(12): 1 578-1 586.
- [3] Murphy C J, Gole A M, Stone J W, et al. Gold nanoparticles in biology: Beyond toxicity to cellular imaging [J]. *Accounts Chem Res*, 2008, 41(12): 1 721-1 730.
- [4] Wijaya A, Schaffer S B, Pallares I G, et al. Selective release of multiple DNA oligonucleotides from gold nanorods [J]. *ACS Nano*, 2009, 3(1): 80-86.
- [5] Tong L, Zhao Y, Huff T B. Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity [J]. *Adv Mater*, 2007, 19(20): 3 136-3 141.
- [6] Giljohann D A, Seferos D S, Daniel W L, et al. Gold nanoparticles for biology and medicine [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2010, 49(19): 3 280-3 294.
- [7] Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity [J]. *Chem Soc Rev*, 2009, 38(6): 1 759-1 782.
- [8] Huang X H, Neretina S, El-Sayed M A. Gold Nanorods: From synthesis and properties to biological and biomedical applications [J]. *Adv Mater*, 2009, 21(48): 4 880-4 910.
- [9] Huang X H, El-Sayed I H, Qian W, et al. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(6): 2 115-2 120.
- [10] Rabin O, Perez J M, 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.
- [11] Alkilany A M, Nagaria P K, Hexel C R, et al. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects [J]. *Small*, 2009, 5(6): 701-708.
- [12] Sau T K, Murphy C J. Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution [J]. *Langmuir*, 2004, 20(15): 6 414-6 420.