文章编号:1000-7032(2018)03-0280-07

金纳米星/双锥的可控制备、光热转换及体外光热治疗

吴 頔,樊 淼,张露云,邢晶晶,吕树芳,曾乐勇* (河北大学化学与环境科学学院,河北保定 071002)

摘要:采用种子生长法,分别制备了金纳米星和金纳米双锥,利用透射电子显微镜、紫外-可见(UV-Vis)分光 光度计等对样品进行了表征,并评价了金纳米星和金纳米双锥的光热转换性能、生物相容性以及体外光热治 疗性能。结果表明,金纳米星和金纳米双锥的 UV-Vis 吸收峰位于 808 nm 和 815 nm 左右。在 808 nm 激光辐 照下,光热转换效率分别为 48.43% 和 53.68%。细胞实验表明,金纳米星和金纳米双锥具有良好的生物相容 性。808 nm 激光辐照 5 min 后, MCF-7 细胞存活率分别降至 22.54% 和 13.73%;且在同等条件下,金纳米双 锥具有更加优异的光热治疗性能,是一种安全、高性能的肿瘤光热治疗用纳米探针材料。

关 键 词:金纳米星;金纳米双锥;光热治疗 中图分类号:0482.31 **文献标识码:**A **DOI**:10.3788/fgxb20183903.0280

Controllable Synthesis, Photothermal Conversion and *in vitro* Photothermal Therapy of Gold Nanostars/Nanobipyramids

WU Di, FAN Miao, ZHANG Lu-yun, XING Jing-jing, LYU Shu-fang, ZENG Le-yong* (College of Chemistry & Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China) * Corresponding Author, E-mail: zenglyhbu@163.com

Abstract: Using seed-growth method, gold nanostars and gold nanobipyramids were synthesized, respectively, and they were characterized by transmission electron microscope and ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometer. Moreover, the photothermal conversion, biocompatibility and *in vitro* photothermal therapy (PTT) of gold nanostars and gold nanobipyramids were evaluated. The results show that the UV-Vis absorption peaks of gold nanostars and gold nanobipyramids are located at about 808 nm and 815 nm, and the photothermal conversion efficiency is calculated to be 48.43% and 53.68%. The cell experiments indicate that the gold nanostars and gold nanobipyramids have good biocompatibility, and the viabilities of MCF-7 cells incubate with gold nanostars and gold nanobipyramids are decreased to be about 22.54% and 13.73%, after they are irradiated by 808 nm laser for 5 min, respectively. Furthermore, compared with the gold nanostars, the gold nanobipyramids have more excellent PTT performance, which could be good candidate as safe and high-efficient nanoprobe material for PTT in tumors.

Key words: gold nanostars; gold nanobipyramids; photothermal therapy

收稿日期: 2017-09-14;修订日期: 2017-12-13

基金项目:国家自然科学基金(51772074,U1732127);河北省科技厅重点基础研究项目(17961302D);河北省教育厅青年拔尖人才 项目(BJ2017002);河北大学大学生创新创业训练计划(2017145)资助项目

Supported by National Natural Science Foundation of China (51772074,U1732127); Key Basic Research Foundation of Science & Technology Department of Hebei Province (17961302D); Youth Top-notch Talents of Education Department of Hebei Province (BJ2017002); Undergraduate' Innovation and Entrepreneurship Training Program of Hebei University (2017145)

1引言

恶性肿瘤疾病严重威胁人类的健康和生命, 具有侵袭性强、易复发转移、预后差等缺点,给患 者造成巨大的经济和心理负担。分子影像和分子 探针技术的进步和发展,对实现恶性肿瘤的精准 诊疗意义重大。与传统的手术、放疗、化疗方法相 比,光热治疗(PTT)是一种无创、局部、安全的光 学治疗方法,它利用纳米探针材料的光热转换性 能,可以将光能转变为热能消融癌细胞,具有治疗 程序简便、治疗时间短、恢复速度快等优点,在恶 性肿瘤的治疗中具有重要的应用前景^[13]。

目前,用于肿瘤 PTT 的纳米探针材料主要包 括贵金属纳米材料、碳基/铜基等无机纳米材料以 及有机材料等[4-10]。由于材料的光转换效率局 限,通常需要提高光辐照通量以及光辐照时间才 能发挥其优异的 PTT 性能。然而,过高能量的激 发光会引起组织非特异性"热损伤",热效应大。 因此,寻找生物相容性好、光热转换效率高的纳米 探针材料是实现其安全治疗的前提。金纳米材料 具有特殊的表面等离子体共振(SPR)性质,具有 毒性低、水溶性好及表面易官能化等优点[11-12]。 特别是金纳米星和金纳米双锥,其在近红外区的 吸收光谱可连续调控,光热转换效率较高,是一类 具有潜在应用前景的 PTT 用纳米探针材料^[13-14]。 金纳米星和金纳米双锥的形貌具有明显差异,根 据材料的形貌-结构-性能之间的构效关系,其在 同等条件下的光热转换以及光热治疗性能应该与 形貌具有对应关系。然而,到目前为止仍没有关 于金纳米星和金纳米双锥光热性能的定量对比研 究。因此,系统研究金纳米星和金纳米双锥的可 控制备,并评价其光热性能和生物相容性,对实现 它们在肿瘤安全、高效 PTT 中的应用具有重要的 意义。

本文采用种子生长法,合成出了金纳米星和 金纳米双锥材料,利用透射电子显微镜(TEM)、 紫外-可见(UV-Vis)分光光度计对金纳米星和金 纳米双锥的形貌和 SPR 吸收性质进行了表征;评 价了它们在 808 nm 激光辐照下的光热性能,并计 算了光热转换效率;最后,以人乳腺癌细胞 MCF-7 为对象,研究了金纳米星和金纳米双锥的生物相 容性和体外 PTT 性能。

2 实 验

2.1 试剂与仪器

主要试剂:氯金酸(HAuCl₄,98%)和十六烷 基三甲基溴化胺(CTAB,99%)购自萨恩化学技 术(上海)有限公司,柠檬酸钠(Alfa Aessar, 99%)、硝酸银(AgNO₃,Alfa Aessar,99%)和抗坏 血酸(Alfa Aessar,99%)购自北京伊诺凯科技有 限公司,盐酸(HCl,AR)购自天津市科密欧化学 试剂有限公司,羧基巯基聚乙二醇(SH-PEG-COOH, M_w = 1 000)和3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑溴化物(MTT,>98%)购自上 海索宝生物科技有限公司。

主要仪器:TEM(FEI Tecnai F20)、UV-Vis 分 光光度计(PerkinElmer Lambda 35)、红外热成像 仪(武汉奥斯特光电,MAG-V30)、酶标仪(thermal Fisher,FC)、磁力搅拌器(德国 IKA, RCT Basic)、 高速离心机(上海安亭,TGL-15B)。

2.2 金纳米星和金纳米双锥的制备

2.2.1 金纳米星的制备

向装有 49 mL 水的烧瓶中加入 1 mL 的 HAuCl₄(50 mmol/L)溶液,加热煮沸;然后向其中 加入 7.5 mL 的柠檬酸钠(质量分数为 1%)溶液, 继续加热煮沸 15 min 后,冷却至室温,即得到金 种子溶液。向装有 15 mL 水的烧杯中,依次加入 100 μ L 的 HAuCl₄(59 mmol/L)溶液、20 μ L 的 HCl(1 mol/L)溶液和 20 μ L 的金种子溶液;室温 搅拌 2 min 后,迅速向其中加入 40 μ L 的 AgNO₃ (10 mmol/L)溶液和 100 μ L 的抗坏血酸(100 mmol/L)溶液;30 s 后,向其中加入 0.5 mL 的 SH-PEG-COOH(0.2 mmol/L)溶液,继续搅拌 30 min, 离心收集,得到金纳米星样品。

2.2.2 金纳米双锥的制备

向装有 2 mL 的 HAuCl₄(10 mmol/L)溶液的 烧瓶中依次加入 40 mL 的 CTAB(100 mmol/L)溶 液和 400 µL 的 AgNO₃(10 mmol/L)溶液制成生 长溶液;然后将 800 µL 的盐酸(1 mol/L)溶液和 100 µL 的抗坏血酸(100 mmol/L)溶液加入到生 长溶液中并持续搅拌; 2 min 后,取 2.2.1 中制备 的金种子溶液 280 µL 加入到上述溶液中,将其在 28 ℃水浴环境中静置、保温 5 h;待溶液颜色变为 暗紫色时,离心并用去离子水清洗,然后向其中加 入 2 mL 的 SH-PEG-COOH(0.2 mmol/L)溶液;继 续搅拌30 min,离心收集,得到金纳米双锥样品。

2.3 光热性能及光热转换效率

首先,研究纳米粒子浓度对光热性能的影响, 分别将金纳米星和金纳米双锥分散于去离子水 中,配制成不同浓度的纳米粒子溶液(0,20,40, 60,80 µg/mL);然后利用 808 nm 激光(功率密度 2.0 W/cm²) 对纳米粒子溶液进行辐照, 辐照时间 为5 min,利用红外热成像仪监测溶液温度的变 化,并绘制出温度随时间的变化曲线。其次,研究 激光功率密度对光热性能的影响,取浓度为80 µg/mL的金纳米星和金纳米双锥溶液,利用不同 功率密度的 808 nm 激光(0,0.5,1.0,1.5,2.0 W/cm²)进行辐照,辐照时间为5 min,利用红外热 成像仪监测溶液温度的变化,并绘制出温度随时 间的变化曲线。最后,研究金纳米星和金纳米双 锥的光热转换效率,利用红外热成像仪监测纳米 粒子溶液经 808 nm 激光(2.0 W/cm²) 辐照 5 min 后的升温和降温情况。

2.4 细胞毒性及体外光热治疗

取对数生长期的人乳腺癌细胞 MCF-7 分别 与不同浓度的金纳米星和金纳米双锥溶液(0, 20,40,60 和 80 μg/mL)共孵育 24 h,考察不同浓 度纳米粒子对细胞存活率的影响。将不同浓度的 金纳米星和金纳米双锥溶液(0,20,40,60,80 μg/ mL)分别与 MCF-7 细胞共孵育4h,然后利用 808 nm 激光(功率密度2.0 W/cm²)进行辐照5 min, 继续孵育20h后,测定细胞存活率。将浓度为80 μg/mL 的金纳米星和金纳米双锥溶液分别与 MCF-7 细胞共孵育4h,然后利用不同功率的 808 nm 激光(功率密度0.5,1.0,1.5,2.0 W/cm²)进 行辐照5 min,继续孵育20h后,测定细胞存 活率。

3 结果与讨论

3.1 金纳米星和金纳米双锥的制备及表征

对合成的金纳米星和金纳米双锥的形貌进行了表征。如图1(a)和(b)为金纳米星的低倍和高倍TEM图,可以看出金纳米星分散性好、尺寸均一,具有明显的针状结构,单个金纳米星的尺寸约为100~150 nm。图1(c)和(d)为金纳米双锥的TEM图,可以看出金纳米双锥纯度高、分散性好、尺寸分布均匀,单个金纳米双锥的长径比约为10:3(纵向长度约为100 nm,横向宽度约为30 nm)。



- 图 1 金纳米星和金纳米双锥的 TEM 图。(a),(b)金纳米星的低倍和高倍 TEM 图;(c),(d)金纳米双锥的低倍和高倍 TEM 图。
- Fig. 1 TEM images of gold nanostars and gold nanobipyramids. (a), (b) Low-and high-magnification TEM images of gold nanostars. (c), (d) Low-and high-magnification TEM images of gold nanobipyramids.

金纳米材料具有优异的 SPR 性质,其在近红 外波段的吸收是评价其近红外光热转换以及光热 治疗性能优劣的关键。图 2(a)和(b)分别为金 纳米星和金纳米双锥的 UV-Vis 吸收光谱图,从图 2(a)中可以看出,金纳米星的中心吸收峰位于 808 nm 左右,其吸收峰较宽化,覆盖 600~1 000 nm 范围。在图 2(b)中,金纳米双锥具有两个明 显的吸收峰,其中强度较低、位于 518 nm 左右的 吸收峰对应于金纳米双锥的横向特征峰,强度较高、位于 815 nm 左右的吸收峰对应于金纳米双锥的纵向特征峰;纵向与横向特征峰强度比值越大, 金纳米双锥的纯度越高。在图 2(b)中,计算得到 两个特征峰的强度比值约为 2.97,表明所合成的 金纳米双锥具有较高的纯度。由于合成的金纳米 星和金纳米双锥在 808 nm 附近均有特征吸收峰, 因此可以用作近红外响应的光热转换材料。



图 2 金纳米星和金纳米双锥的 UV-Vis 吸收光谱图。(a)金纳米星;(b)金纳米双锥。



3.2 材料的光热性能及光热转换效率计算

固定金纳米星和金纳米双锥溶液的体积为 2 mL,通过改变纳米粒子浓度和 808 nm 激光辐照功率,研究了金纳米星和金纳米双锥溶液的升温情况。 图 3(a)和(c)分别是不同浓度的金纳米星和金纳米 双锥溶液在 808 nm 激光(功率密度为 2.0 W/cm²) 辐照下的温度变化情况。从图中可知,随着纳米粒 子浓度的提高,溶液的升温越来越快;而在相同条件 下,纯水的温度仅升高了 4.19 ℃,表明 808 nm 激光 的热效应小,对正常组织不具有热损伤性。图 3(b) 和(d)分别是浓度为 80 µg/mL 的金纳米星和金纳 米双锥溶液在不同功率 808 nm 激光辐照下的温度 变化情况。可以看出,随着辐照功率的增加,纳米粒 子溶液的升温越来越快。当金纳米星和金纳米双锥 的浓度为 80 μg/mL 时,在 2.0 W/cm² 的 808 nm 激 光辐照下,金纳米星和金纳米双锥溶液的温度分别 升高了 35.50 ℃和42.88 ℃,表明金纳米双锥具有更 优异的光热性能。

光热转换效率是评价一种材料光热性能的重要 指标。在实验中,采用功率密度为2.0 W/cm²的808 nm 激光,分别对2 mL 的金纳米星和金纳米双锥溶 液照射5 min,同时监测溶液的升温和降温情况,如 图4(a)和4(c)所示。根据文献[15]报道的方法,材 料的光热转换效率计算公式如下:



图 3 不同浓度和不同功率条件下,金纳米星和金纳米双锥的温度变化曲线。(a),(b)金纳米星;(c),(d)金纳米双锥。 Fig. 3 Temperature variation curves of gold nanostars and gold nanobipyramids under different concentration of nanomaterials and different power density of 808 nm laser. (a), (b) Gold nanostars. (c), (d) Gold nanobipyramids.

$$\sum_{i} m_i C_{\mathrm{p},i} \frac{\mathrm{d}T}{\mathrm{d}t} = Q_{\mathrm{NPs}} + Q_{\mathrm{s}} - Q_{\mathrm{loss}}, \qquad (1)$$

$$\eta = \frac{hA(\Delta T_{\max} - \Delta T_{H_{2}0})}{I(1 - 10^{-A_{\lambda}})},$$
 (2)

$$\theta = \frac{\Delta T}{\Delta T_{\max}},\tag{3}$$

$$t = \frac{\sum_{i} m_i C_{\mathrm{p},i}}{hA} \ln\theta, \qquad (4)$$

其中 m_i 和 $C_{p,i}$ 分别为溶液中不同物质的质量和比 热, ΔT_{max} 为金纳米星和金纳米双锥溶液在 5 min 内温度变化最大值, $\Delta T_{H_{20}}$ 为纯水在 5 min 内温度 变化最大值(可由图 3(a)得到),I为 808 nm 激 光功率密度, A_λ 为金纳米星和金纳米双锥的特征 吸收峰强度值。为了计算出材料的光热换换效率 η ,必须得出 hA值,为此,根据图4(a)和(c)可绘 制出金纳米星和金纳米双锥溶液在降温阶段时间 (t)与 – $\ln\theta$ 的关系曲线,如图4(b)和4(d),直线 拟合后斜率分别为341.29和363.49。根据公式 (4)可知,hA值与图4(b)和(d)中的斜率负相 关。在公式(4)中,纳米粒子的质量可忽略不计, 仅考虑溶剂(2 mL水,质量和比热均已知)的质 量,则可求得金纳米星和金纳米双锥的hA分别为 0.0246和0.0231,将其代入公式(2),得到金纳 米星和金纳米双锥的光热转换效率分别为48.43% 和53.68%,表明金纳米双锥具有更高的光热转 换效率。



图 4 金纳米星和金纳米双锥的升温/降温曲线以及在降温阶段时间(t)与 – $\ln\theta$ 之间的线性关系曲线。(a),(b)金纳米 星;(c),(d)金纳米双锥。

Fig. 4 Heating/cooling curves and the linear relationship of time data (t) versus $-\ln\theta$ obtained from the cooling period. (a), (b) Gold nanostars. (c), (d) Gold nanobipyramids.

3.3 材料的细胞毒性及细胞光热治疗性能评价

材料的生物相容性评价是实现其体内应用的 前提。在我们的实验中,将不同浓度的金纳米星 和金纳米双锥分别与人乳腺癌细胞 MCF-7 共孵 育 24 h,然后采用 MTT 方法对细胞存活率进行表 征。如图 5(a)所示,当金纳米星和金纳米双锥的 浓度从 0 µg/mL 提高到 80 µg/mL 时,细胞存活 率均在 90% 以上,表明金纳米星和金纳米双锥均 具有良好的生物相容性。

采用 808 nm 激光,研究了不同条件下金纳米 星和金纳米双锥对 MCF-7 细胞的光热治疗性能。 图 5(b) 是当 2.0 W/cm² 的 808 nm 激光辐照 5 min 后,不同浓度的金纳米星和金纳米双锥分别 与 MCF-7 细胞共孵育后的细胞存活率。可以发 现,随着纳米粒子浓度的提高,细胞存活率逐渐降 低;而且,在相同条件下,金纳米双锥的光热治疗

纳米双锥的光热治疗性能优于金纳米星。当808 nm激光功率密度为2.0 W/cm²、纳米粒子浓度为80 µg/mL时,金纳米星和金纳米双锥孵育的MCF-7 细 胞存活率分别为22.54%和13.73%,表明金纳米双 锥具有更加优异的光热治疗性能。



图 5 金纳米星和金纳米双锥的细胞毒性以及体外光热治疗性能。(a)细胞毒性;(b)不同浓度条件下的光热治疗性能; (c)不同激光功率密度条件下的光热治疗性能。

Fig. 5 Cytotoxicity and *in vitro* PTT performance of gold nanostars and gold nanobipyramids. (a) Cytotoxicity. (b) PTT performance with different concentration of nanomaterials. (c) PTT performance with different power density of 808 nm laser.

4 结 论

本文采用种子生长法合成出了分散性好、尺 寸均一、纯度高的金纳米星和金纳米双锥材料,金 纳米星尺寸约为100~150 nm,吸收峰位于808 nm 左右;金纳米双锥的长径比约为10:3,纵向长 度约为100 nm,纵向吸收峰位于815 nm 左右。 当 2.0 W/cm² 的 808 nm 激光辐照 5 min 时,80 μg/mL 的金纳米星和金纳米双锥溶液的升温可达 35.50 ℃和 42.88 ℃,光热转换效率分别为 48.43% 和 53.68%,与 MCF-7 细胞共孵育后细胞存活率分 别降至 22.54% 和 13.73%。而且,在同等条件 下,金纳米双锥的光热性能优于金纳米星,是一种 优异的肿瘤 PTT 用纳米探针材料。

参考文献:

- [1] CHENG L, WANG C, FENG L Z, et al. Functional nanomaterials for phototherapies of cancer [J]. Chem. Rev., 2014, 114:10869-10939.
- [2] SHANMUGAM V, SELVAKUMAR S, YEH C S. Near-infrared light-responsive nanomaterials in cancer therapeutics [J]. Chem. Soc. Rev., 2014, 43:6254-6287.
- [3] ZOU L L, WANG H, HE B, et al. Current approaches of photothermal therapy in treatmenting cancer matastasis with nanotherapeeutics [J]. Theranostics, 2016, 6:762-772.
- [4] WANG C, BLACK K C L, LUEHMANN H, et al. Comparison study of gold nanohexapods, nanorods, and nanocages for photothermal cancer treatment [J]. ACS Nano, 2013, 7:2068-2077.
- [5] ZHOU M, LI J J, LIANG S, et al. CuS nanodots with ultrahigh efficient renal clearance for positron emission tomography imaging and image-guided photothermal therapy [J]. ACS Nano, 2015, 9:7085-7096.
- [6] LI C, KWON W, BEACK S, et al. Biodegradable nitrogen-doped carbon nanodots for non-invasive photoacoustic imaging and photothermal therapy [J]. Theranostics, 2016, 6:2196-2208.
- [7] 李奕杉, 钟年丙, 廖强, 等. 基于六硼化镧与壳聚糖的光热转换生物材料 [J]. 发光学报, 2017, 38(8): 1021-1027.

LI Y S, ZHONG B N, LIAO Q, et al. . Photo-thermal biomaterials based on lanthanum hexaboride (LaB_6) and chitosan [J]. Chin. J. Lumin. , 2017, 38(8):1021-1027. (in Chinese)

- [8] 李欣远, 纪穆为, 王虹智, 等. 近红外光热转换纳米晶研究进展 [J]. 中国光学, 2017, 10(5):541-554.
- LI X Y, JI M W, WANG H Z, *et al.*. Research progress of near-infrared photothermal conversion nanocrystals [J]. *Chin. Opt.*, 2017, 10(5):541-554. (in Chinese)
- [9] ZHOU J, LU Z G, ZHU X J, et al. NIR photothermal therapy using polyaniline nanoparticles [J]. Biomaterials, 2013, 34:9584-9592.
- [10] ZOU Q L, ABBAS M, ZHAO L Y, et al. . Biological photothermal nanodots based on self-assembly of peptide-porphyrin conjugates for antitumor therapy [J]. J. Am. Chem. Soc. , 2017, 139:1921-1927.
- [11] YANG X, YANG M X, PANG B, et al. Gold nanomaterials at work in biomedicine [J]. Chem. Rev., 2015, 115: 10410-10488.
- [12] DREADEN E C, ALKILANY A M, HUANG X H, et al. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine [J]. Chem. Soc. Rev., 2012, 41:2740-2779.
- [13] WANG S J, HUANG P, NIE L M, et al. Single continuous wave laser induced photodynamic/plasmonic photothermal therapy using photosensitizer-functionalized gold nanostars [J]. Adv. Mater., 2013, 25:3055-3061.
- [14] FENG J, CHEN L M, XIA Y Z, et al. Bioconjugation of gold nanobipyramids for simultaneous SERS detection and targeted photothermal therapy in breast cancer [J]. ACS Biomater. Sci. Eng., 2017, 3:608-618.
- [15] LIU Y, AI K, LIU J, et al. Dopamine-melanin colloidal nanospheres: an efficient near-infrared photothermal therapeutic agent for in vivo cancer therapy [J]. Adv. Mater., 2013, 25:1353-1359.



吴頔(1984 -),女,辽宁抚顺人,硕 士,实验师,2010年于东北林业大 学获得硕士学位,主要从事纳米材 料制备及生物医学应用的研究。 E-mail: wudi2137@163.com



曾乐勇(1981 -),男,河北新河人,博 士,研究员,2010年于中科院长春光 机所获得博士学位,主要从事无机纳 米探针制备及肿瘤可视化诊疗的 研究。

E-mail: zenglyhbu@163.com