

## 金纳米棒核/二氧化硅壳纳米复合结构的 可控制备及细胞成像

王英帅<sup>1</sup>, 周颖<sup>1</sup>, 王珺楠<sup>2\*</sup>, 邵丹<sup>3</sup>, 孙允陆<sup>1</sup>, 李晶<sup>3</sup>, 董文飞<sup>1</sup>

(1. 吉林大学 集成光电子国家重点联合实验室, 吉林 长春 130012;

2. 吉林大学 白求恩第二医院 心血管内科, 吉林 长春 130041;

3. 吉林大学 白求恩医学院 药理系, 吉林 长春 130021)

**摘要:**采用模板合成以及溶胶凝胶方法制备了金纳米棒核/二氧化硅壳(GNR@SiO<sub>2</sub>)纳米复合粒子,探讨了这种新型纳米复合结构的可控制备、光谱性质、细胞毒性和细胞成像。通过紫外可见分光光度计、透射电镜、共聚焦显微镜对样品进行表征,结果表明:通过对反应时间的调控,获得的纳米复合粒子的二氧化硅壳层厚度可以控制在20~30 nm。由于二氧化硅壳层的存在,大大提高了金纳米棒的稳定性,同时降低了金纳米棒的细胞毒性;此外,由于二氧化硅壳层具有良好的化学修饰作用,因此可以将荧光探针分子标记在二氧化硅壳层表面,修饰后的纳米复合粒子可以通过细胞内吞作用进入细胞,从而实现细胞内的光学成像。因此,该纳米粒子复合材料在生物传感、细胞成像以及光热治疗等方面有着良好的应用前景。

**关键词:**金纳米棒;二氧化硅;核壳结构;细胞毒性;细胞成像

中图分类号:O482.3; TB383 文献标识码:A doi:10.3788/CO.20130605.0743

## Controlled synthesis and cell imaging of gold nanorod-silica core-shell nanoparticles

WANG Ying-shuai<sup>1</sup>, ZHOU Ying<sup>1</sup>, WANG Jun-nan<sup>2,\*</sup>, SHAO Dan<sup>3</sup>,

SUN Yun-lu<sup>1</sup>, LI Jing<sup>3</sup>, DONG Wen-fei<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory on Integrated Optoelectronics, Jilin University, Changchun 130012, China;

2. Department of Cardiology, The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China;

3. Department of Pharmacology, Norman Bethune College of Medicine,  
Jilin University, Changchun 130021, China)

\* Corresponding author: junanwang1973@gmail.com

**Abstract:** The template method and sol-gel technique were used for the preparation of gold nanorod-silica core-shell (GNR@SiO<sub>2</sub>) nanocomposites. The controllable synthesis, spectroscopic properties, cytotoxicity

收稿日期:2013-07-12;修订日期:2013-09-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 91123029, No. 61077066, No. 81201804);吉林省自然科学基金资助项目(No. 20101534);吉林省科技发展计划资助项目(No. 201205006)

and cell imaging of these nanocomposites were discussed by using UV-Vis spectrophotometry, transmission electron microscopy, confocal microscopy and other characterized measurements. The results show that, by control of the reaction time, the thickness of silica shell can be facilely tuned in the regime of 20 – 30 nm; the colloidal stability of gold nanorods has been greatly improved, and their cell cytotoxicities are significantly decreased due to the presence of the silica shell. In addition, fluorescent probes can be easily attached on the silica shell by post chemical reactions. As formed fluorescent core-shell nanocomposites can be easily captured by cells through endocytosis pathway, which is useful for the optical imaging. Therefore, these nanoparticle composites have a great potential in fields of biosensors, cell imaging and photothermal therapy.

**Key words:** gold nanorod; silica; core-shell structure; cytotoxicity; cell imaging

## 1 引言

金纳米棒(GNRs)以其独特的物理化学性质及潜在的生物光子学应用,如光热治疗<sup>[1-3]</sup>,生物传感<sup>[4-5]</sup>,分子成像<sup>[6-8]</sup>等,获得了人们的广泛关注。和球形的金纳米粒子一样,GNRs本身也具有特异的表面等离子体共振特性。其与球形金纳米粒子的不同之处在于通过调节GNRs的长宽比,其表面等离子体共振波长可以从可见光(550 nm)到近红外(1 550 nm)区域连续可调。众所周知,近红外光被生物组织吸收很少,而且能够深层次地穿透组织。因此,GNRs在光成像和光热疗等方面有良好的应用前景。

然而,GNRs在生物医学光子学领域应用时,本身存在两点不足<sup>[9]</sup>:第一,细胞毒性强。种子生长法合成的GNRs使用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),会在产物表面产生包覆的CTAB层而导致较高的细胞毒性。第二,单纯的GNRs因其比表面积较小而难以提供较高的药物或者基因负载量,因此不适合用于诊治一体化研究。此外,GNRs在细胞内容易聚集,从而引起等离子共振波长严重偏移而降低了光热治疗的效果。

为了解决以上问题,本文利用模板和溶胶凝胶合成的方法制备金纳米棒核/二氧化硅壳(GNR@SiO<sub>2</sub>)纳米复合粒子,通过反应时间来调控二氧化硅壳层厚度。通过二氧化硅对GNRs的表面修饰,有效地降低了GNRs的毒性,同时提高了GNRs的胶体稳定性,降低了由于团聚所产生的等离子共振波长蓝移的问题。文中也探讨了这

种核壳材料在细胞成像上的应用。

## 2 材料与方 法

### 2.1 实验试剂和仪器

实验所用的试剂为十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、正硅酸乙酯(TEOS)、硼氢化钠(NaBH<sub>4</sub>)、3-氨基丙基-三甲氧基硅烷(APS)、异硫氰酸荧光素(FITC)、HepG2人肝癌细胞、HepG2细胞、MTT(噻唑蓝)、DMSO(二甲基亚砷)、Hoechst 33342、PBS缓冲溶液、硝酸银(AgNO<sub>3</sub>)、抗坏血酸(AA)、甲醇、氨水、氢氧化钠、氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O)。所有化学品均直接使用,不需进一步提纯。实验中所用超纯水由three-stage Milli-Q Plus 185系统净化,电阻率为18.2 MΩ·cm。

紫外-可见分光光度计为日本岛津(Shimadzu)公司UV-265FW型。激光共聚焦显微镜为奥林巴斯公司FV-1000型。透射电镜为日立公司H-600型。Zeta电势以及粒度仪采用Malvern公司的Nano-Zs型仪器。酶联免疫检测仪为Bio-Rad公司生产的Model550型。流式细胞仪由美国BD公司生产。

### 2.2 GNR@SiO<sub>2</sub>纳米复合粒子制备

GNRs根据种子生长法合成<sup>[10]</sup>。首先将0.25 mL氯金酸(0.100 mol/L)、1 mL超纯水以及0.60 mL硼氢化钠(0.010 mol/L)溶液依次加入到7.5 mL CTAB溶液中配置种子溶液,经过2 h后加入一定量种子溶液到生长溶液中,生长溶液由100 mL CTAB溶液、5 mL氯金酸溶液、1 mL硝

酸银以及 0.55 mL 抗坏血酸溶液组成,混合溶液在恒温水浴锅中保持 30 °C,搅拌过夜后,离心水洗两次。

GNR@SiO<sub>2</sub>合成方法按照文献[11]中的方法做进一步的修改,将提纯后的 GNRs 加入到 10 mL 超纯水中,超声均匀分散后加入 100 μL 一定浓度的氢氧化钠溶液,在较低搅拌转速的条件下每隔 30 min 加入一次 20% 溶于甲醇的 TEOS,加入 2~3 次,在水浴锅中 20 °C 反应 24~48 h。将获得的产物在乙醇中清洗 3 次,分散到水中使用。

### 2.3 GNR@SiO<sub>2</sub>纳米复合粒子的荧光分子修饰

首先,将硅烷耦合剂 APS 和染料 FITC 共价偶联<sup>[12-13]</sup>。具体的方法是将 0.5 mg 的 FITC 和 0.5 mg APS 混合溶解在 10 mL 无水乙醇中,在黑暗中室温下搅拌 12 h,获得偶联的 APS-FITC。然后,在 GNR@SiO<sub>2</sub>纳米粒子溶液中加入一定量的 APS-FITC,使其发生水解反应,搅拌 5 h 后,经过多次清洗,获得荧光分子标记的 GNR@SiO<sub>2</sub>纳米复合粒子 GNR@SiO<sub>2</sub>-FITC,最后将其分散在水中待用。

### 2.4 细胞毒性测试

细胞毒性试验采用 MTT 方法检测。将 HepG2 人肝癌细胞以每孔 6 000 个细胞的密度接种到 96 孔培养板中,培养 24 h 后,分别给予按照不同光密度(OD)值标定浓度的 GNRs 和 GNR@SiO<sub>2</sub>,孵育 24 h 后,每孔加 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL,37 °C 继续培养 4 h 后,终止培养,吸弃上清液,每孔加 150 μL DMSO,避光振荡 10 min,使甲

贍(MTT 液被酶还原后产生的蓝色结晶物质)充分溶解。用酶标仪检测 570 nm 处的吸光度值(A)。按以下公式计算:细胞存活率 = 实验组平均 A 值/空白对照组平均 A 值 × 100%,以上操作均平行操作 3 次。

### 2.5 细胞成像测试

在 24 孔板中放入适宜大小的盖玻片,将 HepG2 细胞以每孔 50 000 个细胞的密度接种到 24 孔板中。培养 24 h 后,将制备好的 GNR@SiO<sub>2</sub>-FITC 溶液加入孔中,在培养箱中 37 °C 条件下孵育 6 h。孵育结束后,吸去上述培液,用预冷 PBS 缓冲溶液洗涤细胞 3 遍,采用 4% 多聚甲醛液于 4 °C 固定 30 min 后,使用预冷的 PBS 缓冲溶液洗涤细胞 3 遍。而后加入 Hoechst 33342 (5 μg/mL)于 37 °C 孵育 5 min 进行细胞核染色。孵育结束后,快速除去培液,用预冷过的缓冲溶液 PBS 洗涤细胞 3 遍,将盖玻片放在滴有抗荧光淬灭剂的载玻片上,用激光共聚焦显微镜于 405/488 nm 激发下拍照<sup>[14]</sup>。

## 3 结果与讨论

### 3.1 纳米粒子的结构表征

图 1 分别为 GNRs 和 GNR@SiO<sub>2</sub> 纳米粒子的 TEM 图,根据该图可以分析纳米粒子的尺寸和形貌。其中图 1(a)中 GNRs 的形貌均一,长度在 43 nm 左右,直径约为 16 nm。图 1(b)和 1(c)是不同厚度壳层的 GNR@SiO<sub>2</sub> 纳米粒子的 TEM 图。

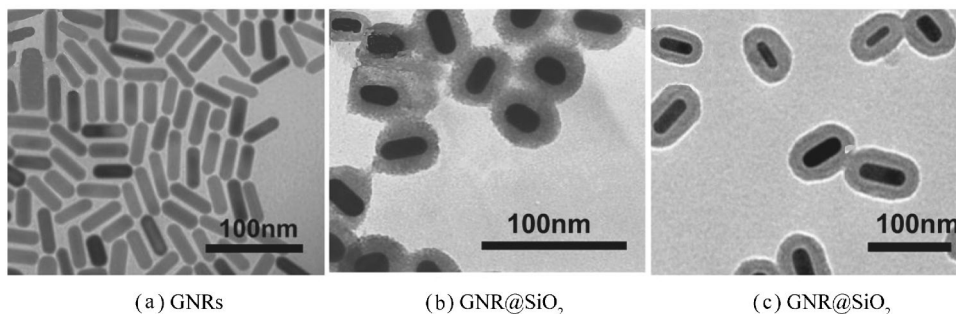


图 1 GNRs and GNR@SiO<sub>2</sub> 的透射电镜(TEM)照片

Fig. 1 TEM images of GNRs and GNR@SiO<sub>2</sub>

厚度的调控主要是采用控制反应时间的方法。比如在加入相同质量的 TEOS 的前提下,通过调控不同的反应时间来控制二氧化硅壳层的厚度在 20 ~ 30 nm,其中图 1(b)为反应 10 h 后纯化所得的核壳结构 (GNR@ SiO<sub>2</sub>),厚度为 22 nm 左右。图 1(c)为反应 24 h 后纯化得到的产物,厚度为 30 nm 左右。这种制备核壳结构的方法简单,且获得的结构完整。更重要的是,该方法具有很好的厚度可控性,可以在 GNRs 上缓慢的增加二氧化硅壳层的厚度,这样就不会造成由于水解过程太快所导致的 GNR@ SiO<sub>2</sub> 粒子聚集。

### 3.2 GNR@ SiO<sub>2</sub> 的表面电势以及光谱性质

通过上述方法制备的 GNR@ SiO<sub>2</sub> 粒子可以长期稳定分散在水溶液中。其表面的带电性质可以通过测试其 Zeta 电势进行判断。如图 2 所示,其表面电势为 20.4 mV,说明表面带有正电荷。利用萃取的方法将 CTAB 去除后,再测量其 Zeta 电势,发现表面电势为 -19.6 mV。结合图 1(b)中壳层表面的缺损推断正电荷来源于金棒表面 CTAB 未被二氧化硅壳层完全包裹,负电荷由二氧化硅在水中电离形成的硅酸所致。该结果进一步证实了 CTAB 在 GNR@ SiO<sub>2</sub> 颗粒上存在的事实。

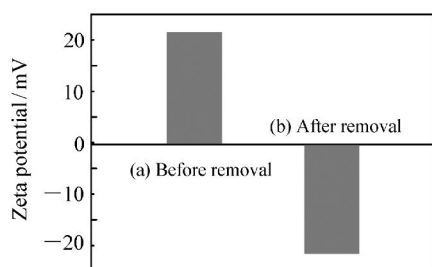


图 2 GNR@ SiO<sub>2</sub> 去除 CTAB 前后的 Zeta 电势

Fig. 2 Zeta potentials of GNR@ SiO<sub>2</sub> before and after removing the CTAB

GNR@ SiO<sub>2</sub> 颗粒的特征等离子体吸收峰可以利用 UV-Vis 分光光度计进行测定,如图 3 所示。结果表明,在生长 20 nm 的二氧化硅壳层后,GNR@ SiO<sub>2</sub> 的等离子共振峰从 725 nm 移到 735 nm。这种红移现象是包覆二氧化硅后引起 GNRs 表面介质折射率的变化所导致的。

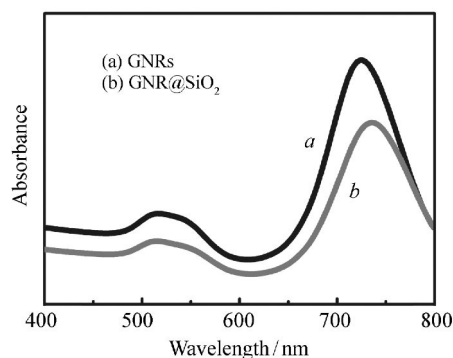


图 3 GNRs 和 GNR@ SiO<sub>2</sub> 的紫外可见吸收光谱

Fig. 3 UV-Vis absorption spectra of GNRs and GNR@ SiO<sub>2</sub>

### 3.3 细胞毒性的测定

GNRs 和 GNR@ SiO<sub>2</sub> 粒子的细胞毒性通过 MTT 法进行检测,这里肝癌 HepG2 细胞作为研究对象。用 MTT 法检测了不同的 OD 值 1、0.5、0.25、0.125、0.0625 和 0.031 25 等条件下的 GNRs 和 GNR@ SiO<sub>2</sub> 纳米粒子作用于肝癌 HepG2 细胞 24 h 的活性的影响,同时与不加纳米粒子条件下 (CON) 肝癌 HepG2 细胞 24 h 的活性的影响作比较。如图 4 所示,结果表明:GNRs 和 GNR@ SiO<sub>2</sub> 对 HepG2 细胞的毒性作用呈剂量依赖性,细胞毒性随着一定范围的浓度增加有所提升,同一条件下 GNRs 的细胞毒性显著地强于 GNR@ SiO<sub>2</sub>,OD 值在 0.062 5 时 GNR@ SiO<sub>2</sub> 比 GNRs 有明显低的细胞毒性,而随着浓度的增加,细胞毒性

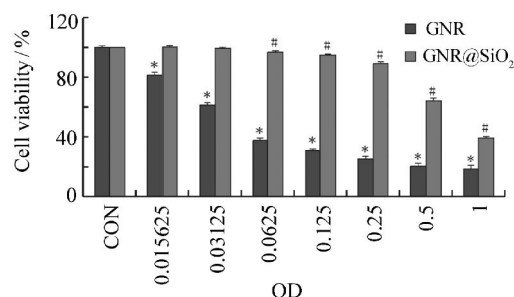


图 4 GNRs 和 GNR@ SiO<sub>2</sub> 对肝癌细胞活性的影响

Fig. 4 Cell activity diagram of GNRs and GNR@ SiO<sub>2</sub> in hepatocellular carcinoma cells

的差距变的更加明显。数据表明:在 GNRs 的表面包覆二氧化硅可以有效降低细胞毒性,原因可能在于二氧化硅将金棒表面的 CTAB 包裹,降低了 CTAB 本身带来的毒性。

### 3.4 细胞成像

为了实现低细胞毒性的 GNR@SiO<sub>2</sub> 的纳米粒子在细胞光学成像上的应用,利用化学偶联的方法在 GNR@SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒表面上修饰荧光分子。FITC 是一种绿色的荧光分子探针,容易和氨基反应,但是和二氧化硅没有作用。因此,首先将 FITC 和 APS 进行偶联,形成新的小分子化合物 FITC-APS,然后再将其加入 GNR@SiO<sub>2</sub> 的纳米粒子溶液中,通过水解反应在 GNR@SiO<sub>2</sub> 表面进行耦合,得到 FITC 标记的 GNR@SiO<sub>2</sub> 的纳米粒子,记为 GNR@SiO<sub>2</sub>-FITC 粒子。

用激光共聚焦显微镜对 GNR@SiO<sub>2</sub>-FITC 纳米复合粒子进行示踪,观察其跨膜转运和细胞内

吞定位成像。GNR@SiO<sub>2</sub>-FITC 纳米复合粒子与 HepG2 细胞共孵育 6 h,其中所用细胞与毒性测试中所用细胞为相同类型,清洗固定染色后在共聚焦显微镜下观察<sup>[15]</sup>。如图 5 所示,其中 5(a) 为 Hoechst 染料在 405 nm 波长激光的激发下产生的荧光图像,图中蓝色显示的是肝癌细胞的细胞核,细胞核的成像能够有效地反映细胞的生理活性并显示细胞的位置。图 5(b) 为 GNR@SiO<sub>2</sub>-FITC 纳米复合粒子在 488 nm 激光激发下 FITC 产生的荧光图像,可以在细胞胞质中观察到 FITC 的绿色荧光,能够明显地观察到细胞的轮廓,证实了 GNR@SiO<sub>2</sub>-FITC 纳米复合颗粒能够被细胞有效吞噬。图 5(c) 为复合颗粒进入细胞后的明场图,表明粒子内吞后细胞没有明显的死亡趋势,具有较好的活性。实验结果表明:该金纳米颗粒具有良好的生物相容性,并且能够通过内吞方式进入细胞,从而实现细胞的准确定位和细胞成像。

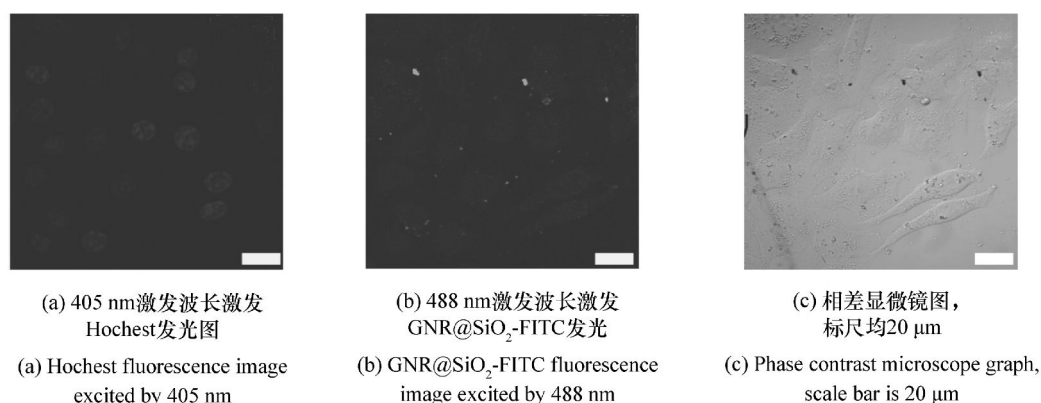


图 5 激光共聚焦显微镜观察 GNR@SiO<sub>2</sub>-FITC 复合纳米粒子与 HepG2 细胞共孵育 6 h 后在肝癌细胞内的光学成像图

Fig. 5 Confocal laser scanning microscopy localization imaging of GNR@SiO<sub>2</sub>-FITC nanoparticles and HepG2 cells incubated for 6 h in hepatoma cells

## 4 结 论

本文利用模板法和溶胶凝胶法制备 GNR@SiO<sub>2</sub> 的纳米复合粒子。通过调整反应时间来调控二氧化硅壳层厚度,并通过二氧化硅的修饰有效地降低 GNRs 的毒性,同时提高 GNRs 的胶体稳

定性,降低由于团聚所产生的共振波长移动问题。修饰二氧化硅后的纳米复合粒子具备了良好的细胞内吞性,偶联 FITC 后可以达到细胞定位和细胞成像的目的。以上结果表明,GNR@SiO<sub>2</sub> 在生物传感、细胞成像以及光热治疗载体方面具有广泛的应用前景。

## 参考文献:

- [1] HUFF T B, TONG L, HANSEN M N, *et al.*. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells nanomedicine[J]. *Nanomedicine*, 2007, 2:125-132.
- [2] WANG L Y, BAI J W, HUANG Y, *et al.*. Multifunctional nanoparticles displaying magnetization and near-IR absorption Angew[J]. *Chem.*, 2008, 47:2439-2442.
- [3] HUANG X H, JAIN P K, L-SAYED M A, *et al.*. Gold nanoparticles and nanorods in medicine: from cancer diagnostics to photothermal therapy[J]. *Nanomedicine*, 2007, 2:681-693.
- [4] YU C X, IRUDAYARAJ J. Multiplex biosensor using gold nanorods[J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79:572-579.
- [5] CHEN C D, CHENG S F, WANG C, *et al.*. Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods [J]. *Biosens. Bioelectron*, 2007, 22:926-932.
- [6] DURR N J, LARSON T, SMITH D K, *et al.*. Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods[J]. *Nano Lett.*, 2007, 7:941-945.
- [7] IMURA K, NAGAHARA T, OKAMOTO H. Dispersion of cylindrical surface plasmon polaritons[J]. *J. Chem. Phys.*, 2005, 122:154701-154705.
- [8] IMURA K, NAGAHARA T, OKAMOTO H. Characteristic near-field spectra of single gold nanorods and imaging of plasmon modes[J]. *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109:13214-13220.
- [9] ZHANG Z J, WU X C, CHEN C Y, *et al.*. Mesoporous silica-coated gold Nanorods as a light-mediated multifunctional theranostic platform for cancer treatment[J]. *Adv. Mat.*, 2012, 24:1418-1423.
- [10] EL-SAYED M A. Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes[J]. *Acc. Chem. Res.*, 2001, 34:257-264.
- [11] GORELIKOV I, MATSUURA N. Single-step coating of mesoporous silica on cetyltrimethyl ammonium bromide-capped nanoparticles[J]. *Nano Lett.*, 2008, 8:369-373.
- [12] ZHANG L, ZHANG F, DONG W F, *et al.*. Magnetic-mesoporous Janus particles[J]. *Chem. Commun.*, 2011, 47:1225.
- [13] ZHANG L, ZHANG F, WANG Y SH, *et al.*. Magnetic colloidosomes fabricated by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> SiO<sub>2</sub> hetero-nanorods[J]. *Soft Matter*, 2011, 7:7375-7381.
- [14] HUANG X H, EL-SAYED M A, 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):2115-212.
- [15] 孙桂敏, 杨培慧, 孙俊环, 等. 金纳米棒标记 HepG2 人肝癌细胞的荧光成像及其 AFM 探测[J]. *发光学报*, 2011, 32(6):636-641.
- SUN G M, YANG P H, SUN J H, *et al.* Fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma cells labeled with gold nanorods and detection by AFM[J]. *Chinese J. Luminescence*, 2011, 32(6):636-641. (in Chinese)

## 作者简介:



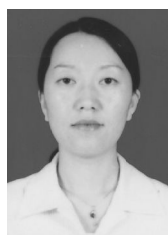
王英帅(1986—),男,山东潍坊人,硕士,2009年于吉林大学获得学士学位,主要从事金纳米粒子在诊治一体化方面的研究。E-mail:yingshuaiwang1987@163.com



孙允陆(1986—),男,山东青岛人,博士,2009年于吉林大学获得学士学位,主要从事基于激光直写、干涉及UV光刻等手段对生物材料进行微纳加工方面的研究。E-mail:lucio422@qq.com



周颖(1988—),女,江苏泰州人,硕士,2011年于燕山大学获得学士学位,主要从事纳米材料合成、药物靶向等方面的研究。E-mail: zouying2326@126.com



李晶(1973—),女,吉林长春人,博士,副教授,硕士生导师,1997年于白求恩医科大学获得学士学位,2002年、2006年于吉林大学分别获得硕士、博士学位,主要从事肿瘤药理学和抗肿瘤新药开发方面的研究。E-mail: lijing@jlu.edu.cn



王珺楠(1973—),女,吉林长春人,博士,副教授,硕士生导师。1997年于白求恩医科大学获得学士学位,2004年于大连医科大学获得硕士学位,2007年于吉林大学获得博士学位,主要从事诊治一体化纳米材料在冠心病治疗方面的研究。E-mail: jdehywn@163.com



董文飞(1975—),男,吉林长春人,博士,副教授,硕士生导师,1996年于浙江大学获得学士学位,1999年于中国科学院长春应用化学研究所获得硕士学位,2004年于德国马克斯-普朗克研究所获得博士学位,主要从事生物纳米材料光子学等方面的研究。E-mail: wenfeidong@126.com



邵丹(1988—),男,四川重庆人,博士,2010年于四川大学获得学士学位,主要从事纳米材料介导的肿瘤诊治一体化和纳米材料安全性的研究。E-mail: lucio422@qq.com