

金纳米棒的表面修饰及其应用于 肿瘤诊疗的研究进展*

李晓帆^{1, 2)} 陈春英^{2)**} 赵蕴慧¹⁾ 袁晓燕¹⁾

¹⁾ 天津大学材料科学与工程学院, 天津市材料复合与功能化重点实验室, 天津 300072;

²⁾ 国家纳米科学中心中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室, 北京 100190

摘要 金纳米棒具有独特的光学性质、表面易修饰性、较低的生物毒性和良好的生物相容性, 因而在成像、光热治疗和药物载带等方面具有极高的潜在应用价值. 本文综述了典型的金纳米棒表面修饰方法及其在生物成像、光热治疗和药物治疗中的应用, 重点阐述了通过金纳米棒同时实现肿瘤诊断和治疗相结合的研究进展.

关键词 金纳米棒, 生物成像, 光热治疗, 药物治疗, 肿瘤诊疗

学科分类号 R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00401

金纳米结构(纳米球、纳米棒、纳米壳、纳米星、纳米笼等)具有特殊的光学性质, 当入射光的频率与金纳米粒子表面自由电子的振动频率发生共振耦合时, 就会在表面产生等离子共振, 产生很强的光吸收和光散射, 这种现象被称为表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)效应^[1]. SPR效应使得金纳米粒子可以应用于线性光学成像, 如暗场显微镜成像^[2]、光学相干层析成像^[3]以及非线性光学成像, 如双光子荧光成像^[4]. 此外, 由于金纳米粒子具有SPR效应, 可将吸收的光能迅速转化为热能, 即光热转换效应(光热效应)^[5], 产生的热量会导致肿瘤细胞的细胞膜出泡、细胞膜的通透性显著增强、热量引起胞内蛋白质变性、线粒体功能丧失, 最终导致细胞的坏死^[6]. 同时, 金纳米粒子表面可以实现多种表面修饰与功能化, 进而用于载带药物. 表面修饰主要可以分为化学方法和物理方法两类: 化学方法主要是在金颗粒表面偶联一些小分子或聚合物分子^[7-8]; 物理方法则主要是通过自组装、静电吸附等物理作用包覆一些有机或无机材料^[9-10]. 经过修饰后的金纳米粒子可用于载带药物^[11]、基因^[12]、连接靶向配体^[13]和荧光染料^[14]等, 扩展了其应用范围.

其中, 金纳米棒(gold nanorods, Au NRs)具有形状的各向异性, 有横向和纵向两个SPR吸收峰. 横向SPR吸收峰位于520 nm左右处, 是金纳米粒子的特征吸收峰; 纵向SPR吸收峰(long surface plasmon resonance, LSPR)可通过调节Au NRs的长径比, 在可见区和近红外区(650~900 nm)之间进行精确调控^[15-16]. 而生物组织和水分子对近红外光的吸收弱^[17], 因此近红外光是适合光介入成像和治疗的窗口. 利用超短脉冲近红外激光照射Au NRs, 可实现皮下深层组织的成像和光热治疗, 发出的热量又可以使Au NRs载带的药物得到释放, 此外, 这种热疗和药物释放可以通过近红外光的照射实现远程控制^[16]. 这种可控并且非侵入的治疗方式, 已经引起了越来越多的关注.

由于金纳米粒子同时具有生物成像, 光热治疗和药物载带的能力, 将这三者结合在一起就能够在同一平台上实现肿瘤的诊断和治疗, 即诊疗综合平

* 国家自然科学基金资助项目(31070854).

** 通讯联系人.

Tel: 010-82545560, E-mail: chenchy@nanoctr.cn

收稿日期: 2013-09-07, 接受日期: 2013-12-05

台(theranostics). 而 Au NRs 的 LSPR 在近红外区, 使得光热治疗和药物释放的过程通过易于穿透人体组织的近红外光实现可控. 因此, Au NRs 是将成像、光热治疗和药物载带整合到同一平台上的一种优良材料^[18-20]. 本文简要介绍了典型的金纳米棒表面修饰法及其在生物成像、光热治疗和药物治疗中

的应用, 重点阐述了通过金纳米棒同时实现肿瘤诊断和治疗相结合的研究进展, 并对 Au NRs 平台设计的关键以及未来在临床应用上可能遇到的问题进行了总结与展望. 图 1 是金纳米棒作为诊疗结合平台的示意图.

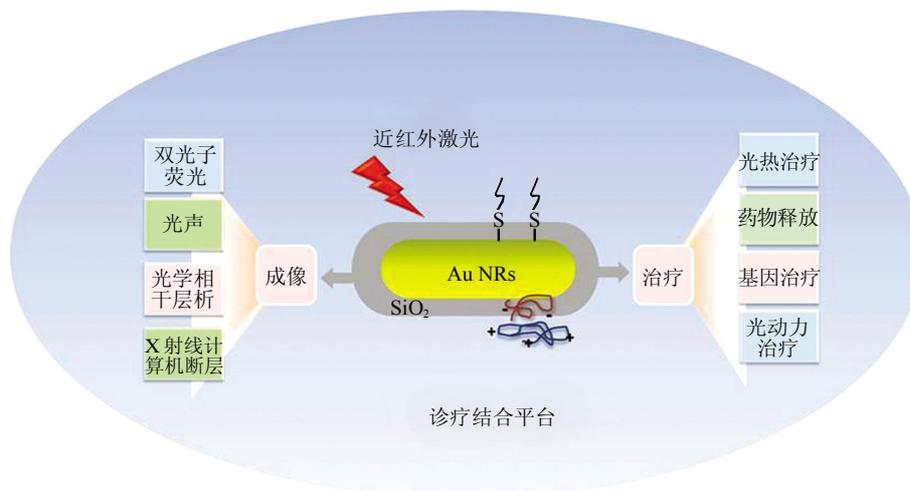


Fig. 1 Illustration of Au NRs as a theranostic platform

图 1 Au NRs 作为诊疗结合平台的示意图

1 金纳米棒的表面修饰及功能化

晶种生长法, 因其合成过程的简便和对 Au NRs 长径比灵活精确的调控, 而成为合成 Au NRs 最为广泛的一种方法^[21]. 用这种方法制备的 Au NRs, 表面包覆了一层具有结构导向作用的表面活性剂——十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB), 它可以为 Au NRs 表面提供正电荷, 从而通过静电排斥作用来防止 Au NRs 在水环境中的聚沉. CTAB 包覆的 Au NRs 在高离子强度(如 PBS 和细胞培养基)中会迅速聚沉, 而且 CTAB 会破坏生物膜的完整性, 从而产生细胞毒性. 因此作为药物载体, Au NRs 表面残余的 CTAB 需要被去除或覆盖^[9]. 此外, 出于对生物应用的考虑, 如连接靶向性分子、连接造影剂和载药等, 也需要对 Au NRs 表面进行修饰. 常见的 Au NRs 表面修饰法主要有以下几种: 通过金-硫键偶联巯基化合物法, 高分子电解质层层吸附法, 以及介孔二氧化硅包覆法.

1.1 通过金-硫键偶联巯基化合物

由于巯基(-SH)与金之间存在较强的相互作用, Au NRs 表面的 CTAB 可以通过带巯基的化合物进行置换. 这种置换相对直接, 只需要用过量的巯基化合物与 Au NRs 混合, 经过若干小时后即可完成修饰, 例如: 最常用的带巯基的聚乙二醇 (-SH-PEG)^[13]. 作为制备具有生物相容性纳米材料的常用策略, PEG 层可防止颗粒聚集、非特异性蛋白吸附, 并且可使纳米材料在动物体内具有更长的循环时间, 从而在肿瘤部位有更多的富集. 我们研究小组已经发现, 用 PEG 完全取代 CTAB 后的 Au NRs 具有可以忽略的细胞毒性, 而 CTAB 修饰的 Au NRs, 其细胞毒性完全由 CTAB 产生^[9]. -SH-PEG 的另一端可以与一些靶向性分子相连, 如 RGD 肽^[13]、叶酸(FA)^[7]等, 与特定的细胞或分子发生作用, 从而减少非特异性细胞吞噬对正常细胞的副作用. 其他带巯基的化合物也可用来对 Au NRs 进行表面功能化, 如: 用带巯基的 DNA 修饰 Au NRs 可以用作基因治疗^[22]、用带巯基的肽修饰 Au

NRs 可用来做细胞核靶向^[23]。此种方法的优点在于: 仅需采用适当的有机合成的方法, 将所需要连接在 Au NRs 上的分子(不具有很大的位阻效应)与巯基进行偶联, 即可修饰 Au NRs 表面; 但缺点在于: 若将此载体应用于动物实验中, 动物体内带巯基的物质, 如几乎存在于每一个细胞中的谷胱甘肽, 可能会与 Au NRs 表面带巯基的修饰物发生竞争性取代, 造成预先设计载体功能失效。

1.2 高分子电解质层层吸附

另一种常见的修饰法, 是在 Au NRs 表面依次沉积、层层吸附阳离子和阴离子的聚电解质^[24]。利用这种方法, 带负电的聚苯乙烯磺酸钠(PSS)常作为一种温和的洗涤剂 and 吸附剂, 通过超滤和配体交换来去除 CTAB。然后, 将阳离子聚电解质, 如聚二甲基二烯丙基氯化铵(PDDAC), 吸附在 PSS 修饰的 Au NRs 表面。这样可以较为容易地控制 Au NRs 表面附着抗体、蛋白质和靶向性分子, 并且 Au NRs 的表面电荷对于其细胞吞噬和生物分布也起着重要作用。我们研究小组已经发现: 用 PDDAC 修饰的 Au NRs, 与 CTAB 修饰的 Au NRs 相比, 显示出了更小的细胞毒性和更高的细胞摄取能力^[9]。此种方法的优点在于: 合成过程十分快捷、简便, 并且可灵活地转换 Au NRs 的 Zeta 电位, 以利于后续的生物应用, 如细胞摄取实验。其缺点在于: 合成出的纳米粒子均一性和规整性不好, 可能出现聚电解质将若干个 Au NRs 包覆在一起的情况^[25]。

1.3 介孔二氧化硅包覆

在 Au NRs 表面修饰介孔二氧化硅(SiO₂)层是一种更具前景的修饰方法。2008 年, Gorelikov 和 Matsuura^[10]报道了在 CTAB 包覆的 Au NRs 表面通过一步合成, 修饰一层薄的介孔 SiO₂的工作。在包硅反应中, Au NRs 表面的 CTAB 充当了硅源——硅酸乙酯(TEOS)的三维聚合模板, 因而辅助形成了介孔 SiO₂ 的孔结构。介孔 SiO₂ 纳米颗粒具有高的比表面积、大的孔体积、良好的生物相容性、化学稳定性和热稳定性以及易于表面修饰的特点, 因此可作为理想的药物载体^[26]。介孔 SiO₂ 修饰层不仅解决了 CTAB 毒性和 Au NRs 分散性的问题, 而且为 Au NRs 作为一种药物载体提供了可能。迄今为止, 已有报道用介孔 SiO₂ 修饰的 Au NRs 用于成像^[27]、光热治疗^[28]和药物载体^[29]的研究。我们研究小组也报道了将 AuNR@SiO₂ 纳米颗粒作

为近红外光调控的多功能肿瘤诊疗平台的工作^[30]。此种方法的优点在于: 同时利用了 Au NRs 独特的光学性质、介孔 SiO₂ 优良的载药性质及生物相容性; 其缺点在于: 传统的介孔 SiO₂ 纳米材料在合成中通常会涉及到高温煅烧步骤, 形成的介孔 SiO₂ 骨架十分稳定^[31], 对多种化学环境均耐受, 但 Au NRs 不耐高温, 通过此法形成的 Au NRs@SiO₂ 纳米粒子不能经过高温煅烧过程, 所以 Au NRs@SiO₂ 在某些化学环境中容易脱落, 限制了其进一步的修饰。

2 金纳米棒在生物成像中的应用

目前, Au NRs 在生物成像领域的应用主要有以下四种: 双光子荧光成像、光声成像、光学相干层析成像以及 X 射线计算机断层成像。

2.1 双光子荧光成像

双光子荧光成像(two-photon fluorescence, TPF), 也称为双光子冷光成像, 因其具有亚微米级空间分辨率、低背景荧光、较低的光损伤以及穿透深层组织的能力而受到广泛关注。在高密度激发光的照射下, 可以在 Au NRs 表面观察到双光子或多光子激发的荧光信号, 量子效率比块状材料强 6~7 个数量级^[32]。在飞秒级近红外激光的激发下, Au NRs 可以发出很强的双光子荧光信号, 甚至连单个纳米颗粒也可以被检测到^[32]。Durr 等^[33]探索了 Au NRs 的双光子荧光成像能力, 他们将靶向癌细胞的抗体接在 Au NRs 上, 在胶原基质的 3D 组织模型中进行成像。结果发现, Au NRs 的双光子荧光信号比周围组织的自发荧光高出三个数量级, 深度可达 75 μm。Tong 等^[6]将 FA 连接在 Au NRs 上, 与 FA 受体过量表达的 KB 细胞和 NIH-3T3 细胞分别进行孵育, 利用 Au NRs 发出的双光子荧光对细胞吞噬纳米颗粒过程进行示踪发现, 对于处在吞噬不同阶段 Au NRs 所在的位置, 通过双光子荧光信号都可以很清晰地观察到。

2.2 光声成像

光声成像(photoacoustic tomography, PAT)是一种新的成像手段, 它通过某种特殊材料来吸收激发光, 并转化为声波信号来进行检测, 信号可达到的深度甚至超过双光子荧光信号。这种材料首先将吸收的光转化为热, 使得周围的空气发生热膨胀, 从而产生用于成像的声波信号。声波信号可通过扫描转化装置转化为图像。Au NRs 的 SPR 效应, 使其

具有很强的光吸收能力和光热转换能力,因而成为用于光声成像的一种理想材料. 近来, Yang 等^[34]利用自制的光声显微镜得到了 Au NRs 在细胞内的成像图片,成功地检测到不同时间内, 胸腺癌细胞系对 Au NRs 的摄取以及 Au NRs 的分布情况. Jokerst 等^[35]报道了 Au NR@SiO₂ 在活鼠体内间充质干细胞中的光声成像. 研究发现, 由于硅层的存在, 既增强了 Au NRs 的光声信号, 也增加了 Au NRs 的细胞摄取量. 这种经过 Au NR@SiO₂ 调节后的光声成像技术, 具有较低的背景信号以及较高的空间和时间分辨率.

2.3 光学相干层析成像

另一种较新的成像手段是光学相干层析成像(optical coherence tomography, OCT), 它通过测量生物组织的背散射光强度和相位获取内部的显微结构信息进行三维层析成像, 具有微米级分辨率. 由于 Au NRs 表面加强的光吸收和散射作用, 当其在生物目标组织中聚集时, 可以显著地加强信号的对比度. 近来, Jung 等^[36]利用 Au NRs 作为造影剂, 对小鼠前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)进行原位成像. 这种成像手段被称为光热-光学相干层析成像(PT-OCT), 而 Au NRs 是光热造影剂中的一类. 基于 Au NRs 的光热造影性质, 与传统的 OCT 相比, PT-OCT 可以得到分辨率更高图像.

2.4 X 射线计算机断层成像

X 射线计算机断层成像(X-ray computed tomography, X-CT)是一种利用数位几何处理后重建的三维放射线医学影像, 是一种广泛应用于临床的成像手段. 因为原子质量与 X 射线吸收系数呈正相关, 含碘的小分子在体内 X-CT 中常用作造影剂来提高可辨识度. 但由于肾脏的排泄作用, 这种造影剂只能维持相对较短的成像时间, 并且具有肾脏毒性. 近来, Au NRs 作为新的 X-CT 成像造影剂, 已经受到了越来越多的关注. 金元素具有比碘更高的原子质量和 X 射线吸收系数, 并且经过 PEG 修饰的 Au NRs 与碘基造影剂相比, 具有更长的循环时间. Au NRs 还可以接连靶向性配体, 通过 X-CT, 在分子水平上实现特定位置的可视化. Chen 等^[29]报道了载有吲哚菁绿(ICG)的 Au NR@SiO₂ 具有 X-CT 以及荧光的双重成像功能. Au NR@SiO₂ 可以有效地提高 X-CT 对比度, 而且利用这种双重成像的模式, 可以达到多种手段成像的效果. 在另一篇文章中, 此研究组通过 X-CT, 利用 Au NR@SiO₂-FA 进行了全血循环下的靶向性研究^[37].

3 金纳米棒在肿瘤治疗方面的潜在应用

3.1 光热治疗

Au NRs 在肿瘤光热治疗(热疗)方面的应用主要是基于其高效的光热转换效应. 在高功率激光的照射下, Au NRs 产生的热量可以使局部环境温度升高几百度^[38]. 这种局部的热效应, 可以用来清除病灶组织, 如肿瘤细胞, 并且提供了一种可以代替外科手术的非侵入性治疗方式. Wu 等^[39]发现, 在飞秒激光的照射下, 当光的能量密度仅为 1.5 J/mm² 时, 吞噬了 Au NRs 的人类肝癌(QGY)细胞有 90% 发生了死亡, 并通过对比实验证明了细胞死亡是 Au NRs 的光热效应所致. Tong 等^[40]发现在光诱导下, Au NRs 可以破坏细胞膜, 导致细胞凋亡. Au NRs 在被细胞吞噬前, 吸附在细胞表面的阶段, 会导致细胞膜上出现孔洞, 因而使胞外的 Ca²⁺ 涌入, 然后肌动蛋白的网状结构发生降解产生大量气泡. Dickerson 等^[40]在荷瘤小鼠模型中, 将 PEG 修饰的 Au NRs 注入动物体内并有效富集在肿瘤部位, 并用近红外激光进行照射. 用 2 W·cm⁻² 功率密度的激光照射 10 min 后, 经过 13 天培养, 小鼠身上 25% 的肿瘤已经完全被再吸收.

3.2 药物载体

光控释药, 因其在释药剂量^[41]和释药时间^[42]上具有灵活的可控性而得到了广泛的关注. Au NRs 作为药物载体, 可使药物分子通过物理吸附和化学键两种方式连接在 Au NRs 表面, 而 Au NRs 进行光热转换后所产生的热量, 传播到周围局部环境, 又可以使得药物发生释放^[42-44]. Zhong 等^[43]用带有二硫键的聚己内酯-b-聚乙二醇(PCL-b-PEG)嵌段共聚物对 Au NRs 进行修饰, 并在 PCL 层包载了阿霉素(DOX). 体外释药结果发现, 在生理条件下, DOX 的释放量十分有限, 但在低功率(0.2 W/cm²)近红外激光的照射下, 药物释放量显著提高, 这可能是由于 Au NRs 的光热效应所发出的热量致使高分子 PCL 链段发生相变, 从而促使药物释放. 值得一提的是, 由于释药过程可通过近红外激光进行远程控制, 使得人类乳腺癌(MCF-7)细胞的耐药株也发生了死亡(DOX 浓度 10 mg/L, 细胞活力 38%).

4 Au NRs 在肿瘤诊断和治疗结合方面的应用

利用纳米材料实现肿瘤的诊断和治疗相结合

(诊疗结合), 近年来已经受到了越来越多的关注. 而纳米材料独特的物理化学性质, 赋予其能够在单一平台上整合成像诊断和药物治疗的巨大潜质. Au NRs 自身便可实现多种成像和光热治疗的功能, 而且由于其表面修饰的牢固性和多样性, 可以将更多的功能, 例如多重成像、主动靶向、药物控释、光动力治疗等结合起来. 为了更加明晰地表示 Au NRs 在诊疗结合中的应用, 表 1 中总结了几种典型的 Au NRs 的表面修饰、靶向配体、成像方法以及治疗手段.

4.1 成像与光热治疗相结合

在 2006 年, Huang 等^[42]利用 Au NRs 首次实现了同时进行的成像和光热治疗. 他们用抗表皮生长因子受体(anti-epidermal growth factor receptor, anti-EGFR)修饰 Au NRs, 并用其处理恶性口腔上皮细胞. 由于恶性细胞表面过度表达 EGFR, anti-EGFR-Au NRs 可以选择性地聚集在恶性细胞表面. 因此在暗场显微镜下, 利用 Au NR 强的光散射, 可清晰地将恶性细胞与正常细胞区分开来. 并且, 由于这种聚集作用, 在光热治疗中, 杀死恶性细胞的激光能量是杀死正常细胞的一半. Huff 等^[43]利用 TPF 成像比较了细胞对 CTAB-AuNRs 和 FA-AuNRs 的摄入能力. 他们发现, 在相同孵育时间内, 前者以非特异性摄入的通路进入细胞内部, 而后者则聚集在细胞表面. 在另一组实验中, 作者发现, 在激光的照射下, Au NRs 可以诱导肿瘤细胞死亡, 在此过程中细胞膜表面会产生大量气泡. 虽然 Au NRs 本身可用于多种成像技术, 但荧光染料成像更具有普适性与便捷性, 通过对 Au NRs 表面进行修饰, 也可以负载荧光染料, 实现荧光成像, 或如 2.4 节中所述, 实现多重成像功能. Yi 等^[44]将肽作为连接剂, 设计并合成了一种用近红外荧光染料 Cy5.5 修饰的 Au NRs, 这种肽可以被金属蛋白酶基质(matix metalloproteinase, MMP)降解. MMP 是一种锌族蛋白质, 并且已经确定 MMP 与肿瘤的代谢过程相关. 近红外染料的荧光在 Au NRs 表面呈淬灭状态, 当肿瘤细胞分泌的 MMP 将肽分解后, 近红外染料被释放出来, 荧光也得到了恢复. 利用这个过程, 作者确定了 MMP 在肿瘤细胞中的表达和肿瘤的增殖, 并实施了热疗, 体外和体内实验都说明肿瘤细胞可得到有效抑制. Kuo 等^[46]利用 Au NRs 偶联了一种光敏试剂——吖啶菁绿(indocyanine green, ICG), 同时实现了光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)、光

热治疗以及成像三种功能. PDT 是利用光敏试剂在特定波长光的照射下产生活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)来杀死肿瘤细胞的过程. ICG 与 Au NRs 通过 CTAB 和聚苯乙烯-马来酸的交替共聚物(PSMA)的层层静电吸附作用偶联在一起. 细胞实验结果表明, PDT 和热疗结合后的效果比两者单独作用的效果都要好. 此外, ICG 作为一种近红外荧光染料, 也实现了 Au NRs 的多重成像. Chen 等^[47]将 Au NRs 均匀填充在介孔 SiO₂ 纳米珠内(Au RNBs), 与 Au NRs 相比, 这种新型的纳米结构极大地提高和光声成像信号的强度, 并且体外与体内的光热治疗都取得了很好的效果.

4.2 成像与药物治疗相结合

Bonoiu 等^[48]报道了 Au NRs 负载 siRNA 在鼠海马体进行体内基因沉默的研究. 作者用层层吸附的方法将对抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 siRNA 修饰在 Au NRs 的表面. 用 Au NR-siRNA 纳米复合物原位注射入 Sprague-Dawley 鼠海马体的 CA1 区域, 体内纳米粒子细胞定位是通过免疫荧光标记来实现的. 结果发现, 纳米粒子主要聚集在 CA1 区域, 只有少量的向相邻区域扩散. 定量实时聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)结果显示, 当纳米粒子注入后, CA1 区域表达 GAPDH 基因得到了有效的抑制. 正电子成像技术(positron emission tomography, PET)是一种临床医学上较为常用的成像技术, 需要具有正电子的造影剂, 利用 Au NRs 可负载这种造影剂, 实现更为接近实际的应用. Xiao 等^[13]设计并合成出了一种用 PEG-AuNRs, 它通过 pH 敏感的胺键与 DOX 偶联. 靶向性配体 cRGD 与 PET 试剂 ⁶⁴Cu 的螯合物与 PEG 末端相连. 细胞摄取实验和毒性实验结果说明, 带有靶向分子 cRGD 的 Au NRs 具有更高的细胞摄取量和细胞毒性, 这是因为肿瘤细胞表面 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白的过度表达. 但体内的 PET 成像和生物分布研究并未发现 cRGD-AuNRs 具有明显的靶向效果.

4.3 光热治疗与药物治疗相结合

Hauck 等^[49]率先报道了将 Au NRs 的光热治疗和化疗结合起来的工作. 他们将 PDDAC 修饰的 Au NRs 包载顺铂处理肿瘤细胞. Au NRs 的热疗作用可使顺铂的用量降低约 33%, 这对降低顺铂给肾脏带来的副作用是十分重要的. 近来, Xiao 等^[50]利用 DNA 形成的互补链来包载 DOX, 提供了一种载带药物的新方法. 作者用带巯基的 DNA 与 Au NRs 偶联, 再与其互补链配对. DNA 双螺旋由 CG

碱基对构成, 为负载 DOX 提供了位点. 在近红外的照射下, DNA 双链解旋, 启动了 DOX 的释放, 与此同时 Au NRs 也发挥了热疗的作用. Shen 等^[51]用介孔 SiO₂ 包覆 Au NRs(Au NR@SiO₂)首次对致瘤区域实现化疗和热疗的协同作用. 体外实验结果证明细胞毒性的产生既是由于热效应致使的细胞膜发泡, 也是由于 DOX 的释放. 体内实验结果证明, 与单独的热疗和化疗相比, 结合治疗具有更好的效果.

4.4 成像、光热治疗、药物治疗三者结合

Guo 等^[52]通过非共价作用将壳聚糖(CS)包覆在 Au NRs 外, 将异硫氰酸荧光素(FITC)作为荧光染料与壳聚糖共价相连, 并利用壳聚糖的基质空间来包载顺铂. 利用暗场显微镜和荧光显微镜对 CS-Au NRs 的位置进行了成像, 得到了 CS-Au NRs 位置的互补信息. 与其他纳米颗粒表面很薄的一层表面活性剂或高分子相比, CS 可以提供相对较大基质空间, 来作为药物的“储蓄池”. 细胞毒性结果显示, 经过 48 h 处理后, 负载了顺铂的 CS-Au NRs 与游离的顺铂相比, 具有几乎相同的效果. 值得一提的是, 不载顺铂的 CS-Au NRs 仅仅通过热疗,

在激光功率密度为 3 W/cm² 时, 便几乎可将肿瘤细胞全部杀死.

我们研究小组近来探索了 AuNR@SiO₂-DOX 纳米粒子在成像、化疗和热疗结合方面的潜在应用^[30]. 我们利用 TPF 成像来观察 AuNR@SiO₂-DOX 在细胞内的位置. 为了研究热疗的效果, 采用 24 mW/cm² 和 48 mW/cm² 两种功率密度的近红外激光来照射 Au NR@SiO₂-DOX 处理后的人类肺癌细胞(A549), 通过染色分析溶酶体膜通透能力的变化来观察热疗的效果. 在 48 mW/cm² 下, 仅仅照射 3 min 后, 即发现溶酶体膜遭到了破坏, 之后细胞膜发生了出泡; 而在 24 mW/cm² 下, 溶酶体的通透能力并未发生变化, 细胞膜也保持完整. 为了研究化疗的效果, 采用 20 mW/cm² 功率密度的激光来照射 AuNR@SiO₂-DOX 处理后的细胞, 照射 3 min 后细胞没有明显死亡, 但继续培养 24 h 后细胞出现明显死亡. 因为在 24 mW/cm² 的功率密度下, 溶酶体通透能力没有明显变化, 所以推测细胞死亡原因是 DOX 发生了释放. 此外, 在 DOX 模拟释放实验中发现, 与 37°C 水浴释放相比, 激光照射后 DOX 的释放量明显升高.

Table 1 Several typical applications of Au NR@SiO₂ in combination of diagnosis and therapy

表 1 几种典型的 Au NRs 在诊疗结合中的应用

表面修饰	靶向配体	成像手段	治疗方法	参考文献
无	anti-EGFR	光散射	热疗	[2]
PEG	FA	TPF	热疗	[45]
Cy 5.5- 肽	MMP	Cy 5.5 荧光	热疗	[14]
PSMA	无	ICG 荧光	热疗+光动力治疗	[46]
介孔 SiO ₂	无	PAT	热疗	[47]
PSS, PDDAC	无	免疫荧光标记	siRNA 的基因治疗	[48]
PEG	cRGD	PET	DOX 化疗	[13]
PDDAC	无	无	顺铂化疗+热疗	[49]
DNA	无	无	DOX 化疗+热疗	[50]
介孔 SiO ₂	无	无	DOX 化疗+热疗	[51]
CS	无	光散射+FITC 荧光	顺铂化疗+热疗	[52]
介孔 SiO ₂	无	TPF	DOX 化疗+热疗	[30]

5 Au NRs 的生物安全性

纳米材料在生物体中的分布、转运、代谢及毒性是评价安全性的几个重要方面. 纳米材料具有一定的尺寸, 一般通过内吞或吞噬途径进入细胞内

部. 而 Au NRs 表面修饰、长径比与细胞摄入过程密切相关, 此外, 细胞类型也是一个重要的影响因素. Qiu 等^[9]用 PDDAC、聚对苯乙烯磺酸(PSS)与 PEG 分别修饰的 Au NRs, 发现 PDDAC 修饰的 Au NRs 摄入量是其他表面修饰的 10 倍以上, 没有显

著的毒性, 并且他们发现 Au NRs 的长径比越大, 越难以被细胞摄取. 此外, 体外实验发现, Au NRs 可被多种细胞吞噬, 如巨噬细胞、上皮细胞、肿瘤细胞、树突细胞、神经细胞等. Wang 等^[53]研究了 CTAB 修饰的 Au NRs 对三种不同细胞(人支气管上皮细胞、人肺癌上皮细胞和骨髓间充质干细胞)摄入途径, 发现虽然摄入途径相似, 但 Au NRs 在不同类型细胞内的转运途径不同, Au NRs 可选择性蓄积在肺癌细胞的线粒体中, 并引起线粒体膜电位降低, 加剧氧化应激水平, 最终杀死肺癌细胞. 在另一项工作中, 他们用多种分析技术研究了 CTAB-Au NRs 在 Sprague-Dawley 大鼠体内的生物分布以及 Au NRs 在体内结构的信息^[54].

在体内实验中, 科学家们发现, Au NRs 表面容易吸附多种血浆蛋白组分, 在表面形成一层“蛋白冠”结构, 改变了 Au NRs 的表面性质以及粒径, 影响到其在组织内的分布. 由于 Au NRs 粒径较大, 难以经泌尿系统与排泄系统清除, 因而难以通过尿液排出^[55]. 此外, 通过血液途径进入动物体内的纳米载体很容易蓄积在网状内皮系统. 通过在 Au NRs 表面修饰 PEG, 一定程度上可减少被网状内皮细胞识别和非特异蓄积, 血浆蛋白的非特异吸附, 延长血液中的循环时间, 提高在靶器官和靶细胞的蓄积量^[56]. 但是, 研究发现, 在生物器官中积累的 Au NRs 并未引起明显的毒副作用, 其可能的原因是: Au NRs 中金元素为零价, 具有化学惰性, 不易解离为具有毒性的金离子^[57].

6 结论与展望

本文概述了典型的 Au NRs 表面修饰方法及其在生物成像、光热治疗、药物治疗中的应用, 重点综述了其在肿瘤与诊疗结合方面的最新进展. 由于 Au NRs 独特的理化性质, 使其在诊断和治疗联合应用, 即肿瘤的诊疗平台中成为了关注的焦点. 未来临床上的期望在于: 希望能通过实时成像, 观察到 Au NRs 药物载体在动物体内靶标部位蓄积后, 对目标位置施加近红外光介导照射, 使得 Au NRs 发挥热疗和化疗的作用. 而 Au NRs 的表面修饰与功能化是设计这种诊疗结合平台的关键. Au NRs 表面修饰的目标主要在于实现更加有效的药物载带和释放、与靶向配体相连、降低 Au NRs 表面毒性并提高生物相容性. 但是, Au NRs 作为诊疗综合平台仍然存在一些问题. 已有的研究表明, Au NRs 的毒性可以忽略, 但是这种毒性的评价仅仅是

建立在体外细胞培养以及模式动物的基础之上, 并且是在一个相对较短的时期之内. 还需要对 Au NRs 的长期慢性毒性进行系统评价^[58]. 另一方面, 金纳米载体在临床应用上的实际效果究竟如何尚未分晓. 大多数研究的针对性都非常明确, 如在 Au NRs 表面修饰特定的配体用以靶向特定的细胞系, 而在更加复杂的体系中是否还会有相同的效果? 因此, 如果将 Au NRs 作为诊疗综合平台真正应用到临床中, 还需要投入更多的研究和努力.

参 考 文 献

- [1] Mulvaney P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir*, 1996, **12**(3): 788-800
- [2] 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 Am Chem Soc*, 2006, **128**(6): 2115-2120
- [3] Oldenburg A L, Hansen M N, Ralston T S, *et al.* Imaging gold nanorods in excised human breast carcinoma by spectroscopic optical coherence tomography. *J Mater Chem*, 2009, **19**(22): 6407-6411
- [4] Wang H, Huff T B, Zweifel D A, *et al.* *In vitro* and *in vivo* two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(43): 15752-15756
- [5] Alkilany A M, Thompson L B, Boulos S P, *et al.* Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, **64**(2): 190-199
- [6] Tong L, Zhao Y, Huff T B, *et al.* Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity. *Adv Mater*, 2007, **19**(20): 3136-3141
- [7] Newell B B, Wang Y L, Irudayaraj J. Multifunctional gold nanorod theragnostics probed by multi-photon imaging. *Eur J Med Chem*, 2012, **48**(1): 330-337
- [8] Alkilany A M, Shatanawi A, Kurtz T, *et al.* Toxicity and cellular uptake of gold nanorods in vascular endothelium and smooth muscles of isolated rat blood vessel: importance of surface modification. *Small*, 2012, **8**(8): 1270-1278
- [9] Qiu Y, Liu Y, Wang L M, *et al.* Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*, 2010, **31**(30): 7606-7619
- [10] Gorelikov I, Matsuura N. Single-step coating of mesoporous silica on cetyltrimethyl ammonium bromide-capped nanoparticles. *Nano Lett*, 2008, **8**(1): 369-373
- [11] Tang H Y, Shen S, Guo J, *et al.* Gold nanorods@mSiO₂ with a smart polymer shell responsive to heat/near-infrared light for chemo-photothermal therapy. *J Mater Chem*, 2012, **22**(31): 16095-16103
- [12] Xu L G, Liu Y, Chen Z Y, *et al.* Surface-engineered gold nanorods: promising DNA vaccine adjuvant for HIV-1 treatment. *Nano Lett*, 2012, **12**(4): 2003-2012

- [13] Xiao Y, Hong H, Matson V Z, *et al.* Gold nanorods conjugated with doxorubicin and eRGD for combined anticancer drug delivery and PET imaging. *Theranostics*, 2012, **2**(8): 757–768
- [14] Yi D K, Sun I C, Ryu J H, *et al.* Matrix metalloproteinase sensitive gold nanorod for simultaneous bioimaging and photothermal therapy of cancer. *Bioconjug Chem*, 2010, **21**(12): 2173–2177
- [15] Nikoobakht B, El-Sayed M A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods using seed-mediated growth method. *Chem Mater*, 2003, **15**(10): 1957–1962
- [16] Vigderman L, Zubarev E R. High-yield synthesis of gold nanorods with longitudinal SPR peak greater than 1200 nm using hydroquinone as a reducing agent. *Chem Mater*, 2013, **25**(8): 1450–1457
- [17] Niidome T, Shiotani A, Akiyama Y, *et al.* Theragnostic approaches using gold nanorods and near infrared light. *Yakugaku Zasshi*, 2010, **130**(12): 1671–1677
- [18] Zhang Z J, Wang J, Chen C Y. Near-infrared light-mediated nanoplatfoms for cancer thermo-chemotherapy and optical imaging. *Adv Mater*, 2013, **25**(28): 3869–3880
- [19] Zhang Z J, Wang J, Chen C Y. Gold nanorods based platforms for light-mediated theranostics. *Theranostics*, 2013, **3**(3): 223–238
- [20] Nie X, Chen C Y. Au nanostructures: an emerging prospect in cancer theranostics. *Sci China Life Sci*, 2012, **55**(10): 872–883
- [21] Jana N R, Gearheart L, Murphy C J. Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Adv Mater*, 2001, **13**(17): 1389–1393
- [22] Yamashita S, Fukushima H, Akiyama Y, *et al.* Controlled-release system of single-stranded DNA triggered by the photothermal effect of gold nanorods and its *in vivo* application. *Bioorg Med Chem*, 2011, **19**(7): 2130–2135
- [23] Oyelere A K, Chen P C, Huang X, *et al.* Peptide-conjugated gold nanorods for nuclear targeting. *Bioconjug Chem*, 2007, **18**(5): 1490–1497
- [24] Park H, Lee S, Chen L, *et al.* SERS imaging of HER2-overexpressed MCF7 cells using antibody-conjugated gold nanorods. *Phys Chem Chem Phys*, 2009, **11**(34): 7444–7449
- [25] 袁 丽, 王蓓蓓, 唐倩倩, 等. 介孔二氧化硅纳米粒子应用于可控药物传输系统的若干新进展. *有机化学*, 2010, **30**(5): 640–647
Yan L, Wang P T, Dang J J, *et al.* *Chin J Organic Chem*, 2010, **30**(5): 640–647
- [26] Slowing I I, Vivero-Escoto J L, Wu C W, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, **60**(11): 1278–1288
- [27] Luo T, Huang P, Gao G, *et al.* Mesoporous silica-coated gold nanorods with embedded indocyanine green for dual mode X-ray CT and NIR fluorescence imaging. *Opt Express*, 2011, **19**(18): 17030–17039
- [28] Chen Y S, Frey W, Kim S, *et al.* Enhanced thermal stability of silica-coated gold nanorods for photoacoustic imaging and image-guided therapy. *Opt Express*, 2010, **18**(9): 8867–8878
- [29] Wang T T, Chai F, Wang C G, *et al.* Fluorescent hollow/rattle-type mesoporous Au@SiO₂ nanocapsules for drug delivery and fluorescence imaging of cancer cells. *J Colloid Interface Sci*, 2011, **358**(1): 109–115
- [30] Zhang Z, Wang L, Wang J, *et al.* Mesoporous silica-coated gold nanorods as a light-mediated multifunctional theranostic platform for cancer treatment. *Adv Mater*, 2012, **24**(10): 1418–1423
- [31] Kuo T R, Hovhannisyan V A, Chao Y C, *et al.* Multiple release kinetics of targeted drug from gold nanorod embedded polyelectrolyte conjugates induced by near-infrared laser irradiation. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(40): 14163–14171
- [32] Maiorano G, Sabella S, Sorce B, *et al.* Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano*, 2010, **4**(12): 7481–7491
- [33] Durr N J, Larson T, Smith D K, *et al.* Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods. *Nano Lett*, 2007, **7**(4): 941–945
- [34] Yang S, Ye F, Xing D. Intracellular label-free gold nanorods imaging with photoacoustic microscopy. *Opt Express*, 2012, **20**(9): 10370–10375
- [35] Jokerst J V, Thangaraj M, Kempen P J, *et al.* Photoacoustic imaging of mesenchymal stem cells in living mice via silica-coated gold nanorods. *ACS Nano*, 2012, **6**(7): 5920–5930
- [36] Jung Y, Reif R, Zeng Y, *et al.* Three-dimensional high-resolution imaging of gold nanorods uptake in sentinel lymph nodes. *Nano Lett*, 2011, **11**: 2938–2943
- [37] Huang P, Bao L, Zhang C, *et al.* Folic acid-conjugated silica-modified gold nanorods for X-ray/CT imaging-guided dual-mode radiation and photo-thermal therapy. *Biomaterials*, 2011, **32**(36): 9796–9809
- [38] Tong L, Wei Q, Wei A, *et al.* Gold nanorods as contrast agents for biological imaging: optical properties, surface conjugation and photothermal effects. *Photochem Photobiol*, 2009, **85**(1): 21–32
- [39] Wu X, Chen J Y, Brech A, *et al.* The use of femto-second lasers to trigger powerful explosions of gold nanorods to destroy cancer cells. *Biomaterials*, 2013, **34**(26): 6157–6162
- [40] Dickerson E B, Dreaden E C, Huang X, *et al.* Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice. *Cancer Lett*, 2008, **269**(1): 57–66
- [41] Rai P, Mallidi S, Zheng X, *et al.* Development and applications of photo-triggered theranostic agents. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, **62**(11): 1094–1124
- [42] Mayer G, Heckel A. Biologically active molecules with a "light switch". *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006, **45**(30): 4900–4921
- [43] Zhong Y N, Wang C, Cheng L, *et al.* Gold nanorod-cored biodegradable micelles as a robust and remotely controllable doxorubicin release system for potent inhibition of drug-sensitive and -resistant cancer cells. *Biomacromolecules*, 2013, **14**(7): 2411–2419
- [44] Wijaya A, Schaffer S B, Pallares I G, *et al.* Selective release of multiple DNA oligonucleotides from gold nanorods. *ACS Nano*,

- 2009, **3**(1): 80–86
- [45] Huff T B, Tong L, Zhao Y, *et al.* Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. *Nanomedicine*, 2007, **2**(1): 125–132
- [46] Kuo W S, Chang C N, Chang Y T, *et al.* Gold nanorods in photodynamic therapy, as hyperthermia agents, and in near-infrared optical imaging. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, **49**(15): 2711–2715
- [47] Chen P J, Hu S H, Fan C T, *et al.* A novel multifunctional nano-platform with enhanced anti-cancer and photoacoustic imaging modalities using gold-nanorod-filled silica nanobeads. *Chem Commun*, 2013, **49**(9): 892–894
- [48] Bonoiu A C, Bergey E J, Ding H, *et al.* Gold nanorod-siRNA induces efficient *in vivo* gene silencing in the rat hippocampus. *Nanomedicine*, 2011, **6**(4): 617–630
- [49] Hauck T S, Jennings T L, Yatsenko T, *et al.* Enhancing the toxicity of cancer chemotherapeutics with gold nanorod hyperthermia. *Adv Mater*, 2008, **20**(20): 3832–3888
- [50] Xiao Z, Ji S, Shi J, *et al.* DNA self-assembly of targeted near-infrared-responsive gold nanoparticles for cancer thermo-chemotherapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, **51**(47): 11853–11857
- [51] Shen S, Tang H Y, Zhang X T, *et al.* Targeting mesoporous silica-encapsulated gold nanorods for chemo-photothermal therapy with near-infrared radiation. *Biomaterials*, 2013, **34**(12): 3150–3158
- [52] Guo R, Zhang L Y, Qian H Q, *et al.* Multifunctional nanocarriers for cell imaging, drug delivery, and near-IR photothermal therapy. *Langmuir*, 2010, **26**(8): 5428–5434
- [53] Wang L M, Liu Y, Li W, *et al.* Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: implications for cancer therapy. *Nano Lett*, 2011, **11**(2): 772–780
- [54] Wang L M, Li Y F, Zhou L J, *et al.* Characterization of gold nanorods *in vivo* by integrated analytical techniques: their uptake, retention, and chemical forms. *Anal Bioanal Chem*, 2010, **396**(3): 1105–1114
- [55] Sadauskas E, Wallin H, Stoltenberg M, *et al.* Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol*, 2007, **4**: 10
- [56] Walkey C D, Olsen J B, Guo H B, *et al.* Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(4): 2139–2147
- [57] Wang L M, Li Y F, Zhou L J, *et al.* Characterization of gold nanorods *in vivo* by integrated analytical techniques: their uptake, retention, and chemical forms. *Anal Bioanal Chem*, 2010, **396**(2): 1105–1114
- [58] Li Y, Chen C. Fate and toxicity of metallic and metal-containing nanoparticles for biomedical applications. *Small*, 2011, **7**(21): 2965–2980

Surface Modification of Gold Nanorods and Their Applications in Combination of Cancer Diagnosis and Therapy*

LI Xiao-Fan^{1,2)}, CHEN Chun-Ying^{2)**}, ZHAO Yun-Hui¹⁾, YUAN Xiao-Yan¹⁾

¹⁾ School of Materials Science and Technology, and Tianjin Key Laboratory of Composite and Functional Materials, Tianjin University, Tianjin 30072, China;

²⁾ National Center for Nanoscience and Nanotechnology, Beijing 100190, China)

Abstract Gold nanorods have surface plasmon resonance (SPR) effect and own longitudinal plasmon resonance absorption (LSPR) peaks which can be tuned between visible and near infrared (NIR) zones. Moreover, because of SPR effect, gold nanorods also have photothermal effects which can transfer the energy absorbed from light into heat. And NIR light can penetrate into biological tissue with minimal lateral invasion. Therefore, gold nanorods are promising in the biomedical applications such as imaging, photothermal therapy and drug delivery and all of these applications can be controlled remotely by NIR light. And gold nanorods can integrate these functions into one platform, which can realize the combination of diagnosis and therapy, namely theranostics. This review introduces the basic properties of gold nanorods, summarizes three methods of surface modification, review the applications in two-photon fluorescence imaging, photoacoustic tomography imaging, optical coherence tomography imaging, X-Ray computed tomography imaging, photothermal therapy and drug delivery, and highlights latest progresses in application of theranostics.

Key words gold nanorods, imaging, photothermal therapy, chemotherapy, theranostics

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00401

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(31070854).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-82545560, E-mail: chenchy@nanoctr.cn

Received: September 7, 2013 Accepted: December 5, 2013