

纳米金粒子对裸鼠胃癌组织近红外光谱范围的 组织光学特性影响

孔 猛¹ 曾常春¹ 熊红莲¹ 刘汉平¹ 刘颂豪^{1,2}

(¹ 华南师范大学激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631)

² 华南师范大学信息光电子科技学院, 广东 广州 510631

摘要 为明确纳米金粒子对肿瘤组织近红外光学成像的影响, 研究观察了肿瘤组织于纳米金粒子贮积后对其近红外光谱范围的光学特性的变化特点。实验中, 应用 MCG-803 人胃腺癌细胞系(来源于 CTCC), 采用原位接种法建立 BALB/C 裸小鼠胃癌模型, 给予动物静脉注射纳米金粒子悬液, 以组织切片形式检测肿瘤组织近红外光衰减系数的特征性变化。结果显示, 纳米金粒子在肿瘤组织内贮积后, 肿瘤组织在 800~1500 nm 的近红外光谱谱线特征未改变, 基本轮廓相似, 但其近红外光光谱透射率明显降低 4.4%~7.0%, 经 900, 1000, 1100, 1200, 1300 和 1400 nm 位点的数据统计, 结果具有显著性差异。实验结果说明, 纳米金粒子在胃癌裸鼠肿瘤组织中贮积后, 可以使肿瘤组织近红光的衰减加强, 为肿瘤组织的近红外光学成像检测提供参考。

关键词 医用光学与生物技术; 纳米金; 近红外光谱; 光衰减系数; 胃癌组织

中图分类号 R318.5 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201131.0317004

Effect of Gold Nanoparticles on Tissue Optical Properties of Gastric Tumor Tissue in Near-Infrared Spectral in Nude Mice

Kong Meng¹ Zeng Changchun¹ Xiong Honglian¹ Liu Hanping¹ Liu Songhao^{1,2}

¹ Key Laboratory of Laser Life Science, Ministry of Education, South China Normal University,
Guangzhou, Guangdong 510631, China

² School for Information and Optoelectronic Science and Engineering, South China Normal University,
Guangzhou, Guangdong 510631, China

Abstract In order to detect the effect of gold nanoparticles on gastric tumor tissue in near-infrared optical imaging, the spectral feature in near-infrared is observed after gold nanoparticles piled up in tumor tissues of gastric as a contrast agent. The MCG-803 human gastric cancer cell line (from CTCC) is subcutaneously inoculated in BALB/C nude mice, and then the orthotopic graft model of gastric cancer is made. Animals are divided into two groups: gastric tumor tissue control group and gastric tumor tissue with gold nanoparticles group. The optical attenuation coefficients of tumor tissue are detected by a near-infrared spectroscopy. The results show that the shape of the transmittance spectra of tumor tissues with gold nanoparticles and tumor tissues without gold nanoparticles is similar in near-infrared range from 800 to 1500 nm. But the spectral transmittance is slightly lower than that of the corresponding tumor tissue about 4.4% to 7.0%. And there are significant differences at the statistical sites of 900, 1000, 1100, 1200, 1300 and 1400 nm. The present study has suggested that gold nanoparticles accumulated in nude mice gastric cancer can affect on optical properties tumor of tissue, which can provide a theoretical guidance for the optical imaging detection of tumor tissue.

Key words medical optics and biotechnology; gold nanoparticles; near-infrared spectrum; optical attenuation coefficients; gastric tumor tissue

OCIS codes 170.0170; 160.4236; 170.2680

收稿日期: 2010-07-21; 收到修改稿日期: 2010-10-09

基金项目: 国家自然科学基金(30873238)和广东省科技计划项目(2007B031401010)资助课题。

作者简介: 孔 猛(1984—), 男, 硕士研究生, 主要从事光学在生物医学中的应用方面的研究。

E-mail: kongmeng2865@yahoo.com.cn

导师简介: 曾常春(1974—), 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事光学在生物医学中的应用方面的研究。

E-mail: gzzsys@scnu.edu.cn(通信联系人)

1 引言

纳米金是一种重要的纳米材料,与有机或无机材料相比,贵金属纳米粒子由于具有表面等离子共振(SPR)效应,这种共振效应会导致电磁场中的吸收和散射增强^[1]。纳米金粒子对近红外光具有热效应,可以将吸收的光能转化为热能,进行局部加热,导致蛋白质变性,致使细胞凋亡^[2,3]。纳米金粒子的表面等离子体共振强吸收和散射特性,在生物组织成像、肿瘤诊断和治疗中有着巨大的应用前景^[4,5]。近年来,研究人员设计并合成多种具有近红外吸收特性的纳米金粒子材料,利用纳米金粒子易于控制的表面化学能力,进行物理或化学修饰后制作成生物探针^[6~9]。被修饰后的纳米金粒子可以进一步提高生物组织,特别是肿瘤的成像检测能力^[10~12]。纳米金已成为分子生物学、生物医学,如药物释放、大分子转移^[8]、基因转染^[13~15]和生物医学成像等领域的研究热点。

本文将纳米金粒子注射到采用原位移植法的荷瘤小鼠尾静脉,利用纳米金粒子在肿瘤组织内贮积特点,以组织切片形式探究纳米金粒子贮积在肿瘤组织中对近红外范围的组织光学特性影响,有助于了解纳米金的药用动力学对纳米金尺寸、表面化学和传输模式等的依赖性,为提高肿瘤组织的成像能力提供理论基础。

2 材料与实验方法

2.1 纳米金制备

氯金酸[上海派兰特贵金属有限公司,质量分数 $W(\text{Au})\geq 47.8\%$],柠檬酸钠(广州试剂公司,分析纯),二次蒸馏水。

纳米金粒子制备采用柠檬酸三钠还原法^[16],取质量分数为 0.01% 的氯金酸水溶液 100 mL ,加热至沸腾,搅动下准确加入 1% 的柠檬酸三钠水溶液

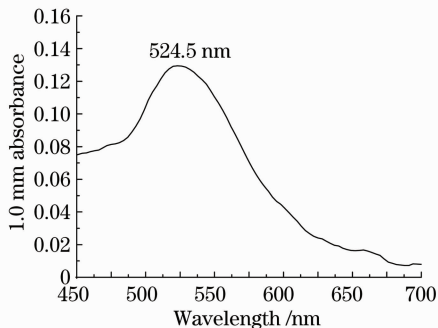


图1 纳米金粒子的可见吸收光谱

Fig. 1 Visible absorption spectrum of gold nanoparticles

2 mL ,金黄色的氯金酸水溶液快速变为红色,继续煮沸 15 min ,冷却后将制备的金纳米颗粒通过透析袋纯化,除去剩余试剂及副产物,最终制备成 2 mL 的金溶胶悬液。实验制备的金溶胶经ND-1000超微量分光光度计检测,可见光区最高吸收峰 524.5 nm (图1),粒径约 25 nm 。

2.2 近红外光谱仪

珀金-埃尔默公司(美国)Lambda-950型UV/VIS/NIR光谱仪,波长范围: $175\sim 3300\text{ nm}$;波长精度: $\pm 0.8\text{ nm}$ UV/VIS, $\pm 0.32\text{ nm}$ NIR;波长重复性: $< 0.02\text{ nm}$ UV/VIS, $< 0.08\text{ nm}$ NIR;光谱带宽: $0.05\sim 5.00\text{ nm}$;积分时间: $0.04\sim 10\text{ s}$ 。

2.3 动物模型的建立与实验分组

裸鼠胃癌动物模型的建立采用原位种植瘤模型:将MCG-803肿瘤细胞系(人胃癌肿瘤细胞系,来源于CTCC)应用DMEM培养基在体积分数 5% 的二氧化碳培养箱中培养,制备成 $1.0\times 10^7\text{ cell/mL}$ 的细胞悬液,将 0.1 mL 的MCG-803细胞悬液注射到BALA/C裸鼠的右背侧。20天后,待皮下肿瘤组织长至直径为 $0.8\sim 1.0\text{ cm}$ 大小时,处死动物,取出肿瘤块,剪切成 $1\sim 1.5\text{ mm}^3$ 的小块。选择体重为 $15\sim 18\text{ g}$ 的BALA/C裸鼠20只(雌雄不限,来自中山大学动物实验中心),用质量分数 0.5% 戊巴比妥钠 35 mg/kg 腹腔注射麻醉,腹部消毒,沿腹正中切口,游离暴露胃体,在胃大弯胃体与幽门连接部将胃壁浆膜层剪开一个长 2 mm 的小口,将已准备的瘤块包埋于胃壁,缝合。将动物置于无菌无特定病原体(SPF)实验室,自由饮水和进食。约20天后,待种植的瘤块直径长至约 $4\sim 6\text{ mm}$ 时,准备下一步实验。

将20只已建立的胃癌动物模型随机分为2组,每组动物10只,其中一组动物给予纳米金胶体溶液(剂量 1 mg/kg 体重)尾静脉注射,另外一组动物给予 0.9% NaCl溶液尾静脉注射作为对照。

24 h后,处死动物,腹部正中切口,暴露胃体,切取胃部肿瘤组织,以备进行光学特性检测。

2.4 组织光学特性检测

将肿瘤组织样品取材后,采用莱卡1900型冰冻切片机将组织切成 $30\text{ }\mu\text{m}$ 的薄片,样品薄片置于 0.67 mm 厚的标准载玻片上,用统一标准 0.16 mm 厚的盖玻片覆盖,中性树脂封片, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存待测。

光谱检测时,扫描波长范围设定为 $800\sim 1500\text{ nm}$ 的近红外波段,扫描步进为 5 nm ,以空白载玻片作为测量基底,样品切片置于密闭测量室内,在相同条件下分别测量肿瘤加纳米金粒子组与肿瘤对

照组的肿瘤组织样品的透射光谱,消去空白基底后可得到组织切片的透射光谱。肿瘤组织样品近红外光谱透射率计算公式为

$$T(\lambda) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{T'_i(\lambda)}{T_0(\lambda)} \times 100\%,$$

式中 $T(\lambda)$ 为样品透射率, $T'(\lambda)$ 为检测光谱即样品和玻片总透射率, $T_0(\lambda)$ 为空白玻片透射率。

2.5 检验方法

数据以均数(\bar{x})±标准差(s)表示,采用 SPSS v13.0 软件 One-Way ANOAY 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为可接受的统计学差异。

3 结 果

3.1 近红外透射光谱线总体轮廓结果比较

实验中对肿瘤加纳米金组与肿瘤对照组的肿瘤组织切片进行近红外光谱 800~1500 nm 波段范围内透射光谱检测,图 2 为肿瘤对照组和肿瘤加纳米金组在近红外光范围内的透射光谱,图 3 为肿瘤对照组和肿瘤加纳米金组近红外光透射率在相同波长处的差值曲线。结果显示,肿瘤加纳米金组的肿瘤组织光谱透射率明显比肿瘤对照组低于 4.4%~7.0%,表明纳米金粒子在肿瘤组织内聚集后可改变其组织的特性使近红外光透射率降低;同时也可以看到肿瘤加纳米金组与肿瘤对照组的近红外透射光谱谱线轮廓基本趋势相似。

3.2 近红外透射光谱结果统计比较

为了能够对肿瘤加纳米金组与肿瘤对照组的光谱透射率进行组间结果的统计比较,实验中分别对 900,1000,1100,1200,1300 和 1400 nm 波长处的光

表 1 肿瘤对照组与肿瘤加纳米金组在不同波长处的光衰减系数比较

Table 1 Comparison of optical attenuation coefficients ($\bar{x} \pm s$) of tumor tissue control group and

tumor tissue with gold nanoparticles group

| Case (n) | 900 nm/% | 1000 nm/% | 1100 nm/% | 1200 nm/% | 1300 nm/% | 1400 nm/% | |
|--|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Tumor tissue control group | 10 | 62.1±3.87 | 63.5±4.80 | 63.7±4.46 | 64.7±4.10 | 66.1±4.40 | 66.9±4.17 |
| Tumor tissue with gold nanoparticles group | 10 | 57.5±5.88* | 57.9±5.75* | 58.1±6.54* | 58.4±7.05* | 59.2±6.94* | 60.5±5.79* |

Compared with control group * $P < 0.01$

3.3 肿瘤组织近红外的透射特性结果比较

为了进一步分析纳米金粒子对肿瘤组织近红外的吸收和散射特性影响,先将肿瘤加纳米金组与肿瘤对照组的透射光谱(图 2)平滑获得图 4(a)所示,再微分得到一阶导数谱图,结果如图 4(b)所示。结果显示,对照组在 800~1500 nm 波段内均是正值,最小处为 1389 nm,数值为 +0.003,这说明肿瘤组

谱透射率进行计算,肿瘤加纳米金组与肿瘤对照组的肿瘤组织光谱透射率的具体数值如表 1 所示。统计比较中各波长的数据运用 One-Way ANOAY 进行单因素方差分析,可以看到在 900,1000,1100,1200,1300 和 1400 nm 波长处,肿瘤组织加纳米金组的光透射率均明显低于肿瘤组织对照组, $P < 0.01$ 。

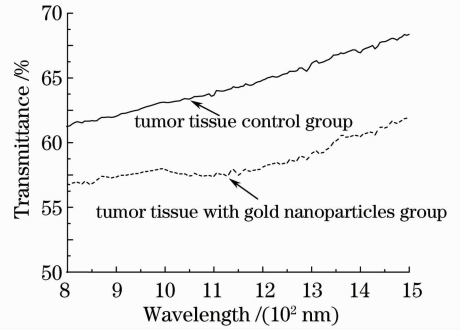


图 2 胃癌组织 800~1500 nm 近红外透射光谱比较
Fig. 2 Transmission spectra of gastric tumor tissues in the range from 800 to 1500 nm

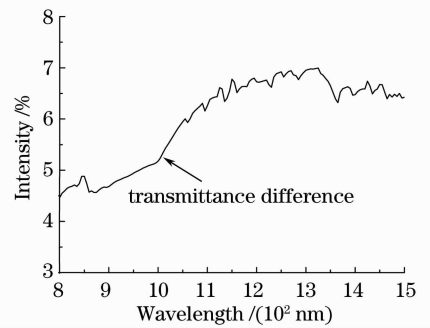


图 3 近红外光透射率相同波长处差值曲线
Fig. 3 Curve of transmittance difference at the same wavelength

织在检测光谱范围内光谱透射率总是随波长的增加而变大;肿瘤加纳米金组透射率在 990~1095 nm 波长范围内出现负值,说明谱线在这个范围内出现下降,对应于图 4(a)中肿瘤加纳米金组透射光谱波谷的下降部分,波谷为 1090 nm,但此波段内最大的下降斜率出现在 1011 nm 处,且数值仅 -0.0087,显示出较缓慢的下降趋势;两组比较,其中 955~1125 nm 的差异特别明显。

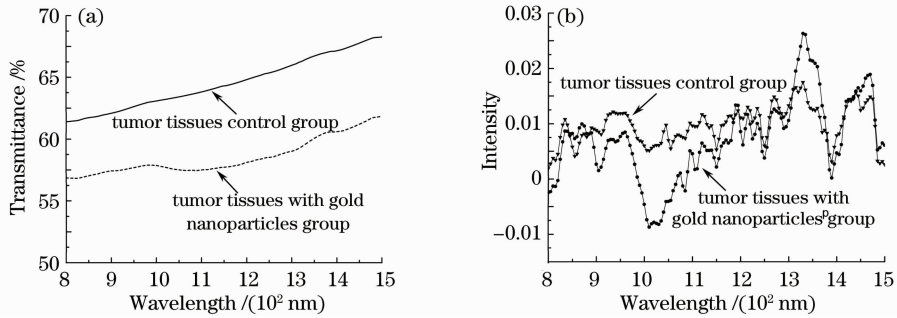


图4 胃癌肿瘤组织近红外光的透射特性。(a)近红外透射平滑光谱,(b)透射光谱的一阶微分图谱

Fig. 4 Transmittance property of tumor tissues in near infrared. (a) near-infrared transmittance spectrogram based on Savitzky-Golay smoothing, (b) the first-order derivative curve

4 讨 论

肿瘤组织与正常组织相比,存在着低分化性、细胞增殖快、大量血管增生和细胞有形成份增加等特点,因其组织本身的特异性改变,使其在可见光-近红外光的散射与吸收特性具有明显的差异性,有研究表明正常和腺癌的结肠组织的组份和结构之间有大的差异^[17]。同时,对胃癌、膀胱癌、结肠癌和肝癌患者术后离体组织的光学散射与吸收特性进行检测分析,结果均显示癌组织与相应的正常组织相比,其光学吸收明显增加,穿透深度变小,衰减系数加大,具有显著性差异。

纳米金是一种具有近红外吸收和散射功能的贵金属纳米材料,与有机或无机材料相比,纳米金粒子具有与尺寸和形状相关的可调光学特性。Mie等^[1]通过求解与球微粒相互作用的麦克斯韦方程,解释了这一现象;当纳米粒子直径远小于激发波长时,某一频率的电场将引起金属自由电子穿越纳米粒子时的相干振荡,这种振荡会导致电磁场中的吸收和散射增强,被称为表面等离子共振(SPR)。纳米金粒子的大小与细胞中的蛋白质、大分子同处于纳米量级,从尺寸上考虑,纳米金粒子适合制作成生物探针。一方面,纳米金粒子的尺寸比细胞以及细胞器小,肿瘤组织对纳米金粒子具有较高的通透性,另一方面,肿瘤组织由于增殖过快,细胞有形成份增加,对纳米金粒子清除能力不足,相对于正常组织,纳米金粒子更容易在肿瘤组织内可以聚集保留一段时间。纳米金粒子的表面化学能力易于控制,进一步推动了其与生物分子的结合,修饰后的纳米金粒子能够特异性的标记肿瘤细胞,在肿瘤细胞内贮积,并提供特定分子的信息。Naomi Halas等^[3]将以二氧化硅为核合成的纳米金壳与靶向分子连接后特异性

聚集在小鼠乳腺癌肿瘤组织内,改变肿瘤组织的光学特性,在提高肿瘤的检测能力的同时运用热疗杀灭肿瘤细胞。

实验中,我们建立裸鼠的胃肿瘤模型,利用近红外光谱对胃癌肿瘤组织、含有纳米金粒子的胃肿瘤组织进行透射扫描,结果显示加入纳米金粒子后肿瘤组织的光衰减系数增加,光透射率减小。说明纳米金粒子聚集肿瘤细胞内降低了近红外光在组织内的穿透能力,与肿瘤对照组相比,加纳米金粒子肿瘤组的胃肿瘤组织的光透射系数衰减明显增加。肿瘤对照组和加纳米金肿瘤组的谱图的基本谱线趋势相同,但在995~1380 nm范围内,加纳米金肿瘤组的透射系数与其它波段相比出现一定程度的下降,换言之,在这个范围内纳米金吸收、散射了更多的近红外光,由图1可见纳米金粒子的可见吸收峰位于524.5 nm,但其半峰全宽较宽,表明制备的纳米金粒子粒径大小并不均匀,且形状不完全为球形,致使纳米金在近红外波段的吸收峰不唯一,在光谱谱线中呈现较平缓的波谷,符合纳米金在此波长段的强吸收和散射特性^[18]。由于实验采用组织切片形式进行检测,样品厚度仅30 μm ,光斑直径为5 mm,每个组织切片中的纳米金含量很低,纳米金粒子吸收近红外光后是否产生热效应,引起肿瘤组织受热变性,导致谱线特征改变,在实验中还无法具体检测。结果说明,纳米金在肿瘤组织和含有纳米金粒子的肿瘤组织中引起的组织光学特性差异性明显,可以进一步增强肿瘤组织的光吸收能力,使光穿透深度变小,衰减系数加大,有利于光学成像中肿瘤组织与正常组织的区分。

5 结 论

实验采用还原法制备了尺寸约25 nm纳米金

粒子,利用纳米金粒子特异性聚集在肿瘤组织内的特性,对纳米金粒子贮积在胃癌肿瘤组织后的近红外透射光谱进行分析。发现纳米金在肿瘤组织内聚集后改变了其组织光学特性,使近红外光透射率降低。本研究中以肿瘤组织切片的方式进行光谱检测,有助于了解纳米金粒子对近红外光在肿瘤组织中整体传输特性的改变,为提高肿瘤组织的近红外光谱成像能力提供理论参考,对肿瘤的早期诊断和检测方法具有一定的临床指导意义。

参 考 文 献

- 1 U. Kreibig, M. Vollmer. Optical Properties of Metal Cluster [M]. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag; 1995. 23~25
- 2 Huiyu Liu, Dong Chen, Fangqiong Tang *et al.*. Photothermal therapy of Lewis lung carcinoma in mice using gold nanoshells on carboxylated polystyrene spheres [J]. *Nanotechnology*, 2008, **19**(45): 455101
- 3 Christopher Loo, Alex Lin, Lean Hirsh *et al.*. Nano shell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer [J]. *Technology in cancer Research & Treatment*, 2004, **3**(1): 33~40
- 4 D. Patrick O'Neal, Leon R. Hirsch, Naomi J. Halas *et al.*. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles [J]. *Cancer Lett.*, 2004, **209**(2): 171~176
- 5 Takuro Niidome, Yasuyuki Akiyama, Kohei Shimoda *et al.*. In vivo monitoring of intravenously injected gold nanorods using near-infrared light[J]. *Small*, 2008, **4**(7): 1001~1007
- 6 Takuro Niidome, Masato Yamagata, Yuri Okamoto *et al.*. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications [J]. *J. Controlled Release*, 2006, **114**: 343~347
- 7 Alaaldin M. Alkilany, Pratik K. Nagaria, Colek R. Hexel *et al.*. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects [J]. *Small*, 2009, **5**(6): 701~708
- 8 Partha Ghosh, Gang Han, Mrinmoy De *et al.*. Gold nanoparticles in delivery applications [J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2008, **60**(11): 1307~1315
- 9 Yang Peihui, Wei Wei, Cai Huaihong *et al.*. Immobilization of anti-transferrin on nano-gold and its immune recognition of transferrin [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, **29**(5): 1398~1401
杨培慧, 韦 炜, 蔡怀鸿等. 抗-转铁蛋白-纳米金探针的制备及对转铁蛋白免疫识别的光谱分析 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, **29**(5): 1398~1401
- 10 Yao Cuiping, Zhang Zhenxi. Influence of laser parameters on permeability of gold nanoparticles targeting cells [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(6): 1609~1615
姚翠平, 张镇西. 激光参数对纳米金靶向细胞通透性的影响[J]. *光学学报*, 2009, **29**(6): 1609~1615
- 11 Xiaochao Qu, Jing Wang, Cuiping Yao *et al.*. Two-photon imaging of lymphoma cells targeted by gold nanoparticles [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2008, **6**(12): 879~881
- 12 Xiaochao Qu, Norbert Koop, Jing Wang *et al.*. Imaging of cancer cells using gold nanoparticles and fluorescent dyes by multiphoton microscopy [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2008, **13**(3): 031217
- 13 Tanya S. Hauck, Arezou A. Ghazani, Warren C. W. Chan. Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells [J]. *Small*, 2008, **4**(1): 153~159
- 14 Takahito Kawano, Masato Yamagata, Hironobu Takahashi *et al.*. Stabilizing of plasmid DNA in vivo by PEG-modified cationic gold nanoparticles and the gene expression assisted with electrical pulses [J]. *J. Controlled Release*, 2006, **111**(3): 382~389
- 15 Cuiping Yao, Zhenxi Zhang, Ramtin Rahmanzadeh *et al.*. Laser-based gene transfection and gene therapy [J]. *IEEE Trans. Nanobiosci.*, 2008, **7**(2): 111~119
- 16 Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions[J]. *Nature Phys.*, 1973, **241**: 20~22
- 17 Wei Hua Jiang, Xing Da, He Bohua *et al.*. Characteristic of absorption coefficient spectrum and scattering coefficient spectrum for human gastric adenocarcinoma [J]. *Chinese J. Lasers*, 2005, **32**(12): 1706~1710
魏华江, 刑 达, 荷博华等. 人胃腺癌组织的吸收系数光谱和散射系数光谱特性[J]. *中国激光*, 2005, **32**(12): 1706~1710
- 18 Stephan Link, Mostafa A. El-Sayed. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals [J]. *Int. Rev. Phys. Chem.*, 2000, **19**(3): 409~453