

doi: 10.3788/gzxb20154406.0630005

红细胞内吞银包金纳米颗粒的实时表面增强喇曼研究

张枝芝^{1,2}, 林漫漫^{2,3}, 张泽森¹, 徐斌^{1,2}, 姚辉璐², 刘军贤¹

(1 广西师范大学 物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004)

(2 广西科学院生物物理实验室, 南宁 530007)

(3 武汉大学 化学与分子科学学院, 武汉 430072)

摘要: 研究了结晶紫包裹的银包金纳米粒子进入红细胞的实时过程。利用激光光镊喇曼技术每隔 20 s 通过光镊囚禁红细胞并收集该细胞及邻近溶液的喇曼光谱, 抽取光谱中具代表性的特征峰来观察其强度随时间的变化。结果表明: 从囚禁的红细胞中收集到的光谱包括了归属红细胞与结晶紫的特征峰。红细胞的光谱特征峰 1 001、1 128、1 213 cm⁻¹ 和结晶紫的光谱特征峰 915、1 177、1 389、1 586、1 619 cm⁻¹ 的强度随着时间增加, 表明在红细胞与纳米粒子共培养的过程中, 纳米粒子在红细胞中累积, 并引起红细胞信号增强。分析红细胞与其邻近溶液的光谱差, 发现归属结晶紫的光谱特征峰 913、1 179、1 586 cm⁻¹ 随时间呈类余弦的变化, 表明红细胞内的结晶紫包裹的银包金纳米粒子含量先升高后降低再升高。通过计算得到纳米粒子开始进入红细胞的时间范围及进入的速度、被溶酶体降解的速度。研究表明表面增强喇曼技术为研究外物进入细胞提供了新的实验方法和思路。

关键词: 光谱学; 表面增强; 喇曼光谱; 内吞作用; 红细胞; 结晶紫; 银包金纳米颗粒

中图分类号: O657.37

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2015)06-0630005-8

Real-time Study on Erythrocyte Endocytosing Ag@AuNPs by Surface-enhanced Raman Scattering

ZHANG Zhi-zhi^{1,2}, LIN Man-man³, ZHANG Ze-sen¹, XU Bin^{1,2}, YAO Hui-lu², LIU Jun-xian¹

(1 College of Physics and Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China)

(2 Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China)

(3 College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Tracking the process which erythrocyte endocytoses gold core-silver shell nanoparticles wrapped in crystal violet with laser optical tweezers raman technique was studied. The erythrocytes were imprisoned by optical tweezers every 20 s, the raman spectra of erythrocytes and the adjacent solutions were collected. Results show that the collected spectra of erythrocytes include the characteristic peaks of erythrocyte and crystal violet. The intensity of peaks belonging to erythrocyte of 1 001, 1 128, 1 213 cm⁻¹ and which belonging to crystal violet of 915, 1 177, 1 370, 1 586, 1 619 cm⁻¹ increase over time, which show that in the process of co-culture with erythrocytes and nanoparticles, nanoparticles could increase the signal of erythrocyte and be accumulated in erythrocytes. By analyzing the difference of spectra value between erythrocytes and its adjacent solutions, it finds that spectral characteristic peaks belonging to crystal violet of 913, 1 179, 1 586 cm⁻¹ changing like cosine with time, which suggested that the nanoparticles in erythrocyte induced after first increased, and then increased again. The time range where nanoparticles began to enter erythrocyte, the entering speed and the rate of lysosome degrading nanoparticles wrapped in crystal were caculated. This study shows that surface-enhanced

基金项目: 广西自然科学基金 (Nos. 2012GXNSFFA060008, 2014GXNSFAA118362) 资助

第一作者: 张枝芝(1988—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为表面增强在活体细胞的应用及喇曼数据分析。Email: zhangzhizhi35@163.com

通讯作者: 姚辉璐(1972—), 男, 研究员, 硕士, 主要研究方向为仪器开发及光谱分析。Email: huiluy@gmail.com

收稿日期: 2014-12-11; 录用日期: 2015-03-23

<http://www.photon.ac.cn>

raman spectroscopy can provide a new idea and an experimental method for the study of foreign objects into to cells.

Key words: Spectroscopy; Surface-enhanced; Raman spectroscopy; Endocytosis; Erythrocyte; Crystal violet; Gold core-silver shell nanoparticles

OCIS Codes: 300.0300; 300.6360; 170.5660; 170.1530; 160.4236

0 引言

红细胞是血液中数量最多的一种血细胞,是通过血液运输氧和二氧化碳的最主要的媒介,更是药物注射后进入体循环乃至整个生物体的媒介。因此研究纳米粒子与红细胞的相互作用和内吞进入红细胞的生物学过程对新型纳米材料作为载体的药物治疗有着重要的意义。目前大多数文献用免疫荧光技术与其共焦显微镜技术或者电子显微镜技术研究细胞内吞纳米粒子与培育时间的关系^[1-4]、计算细胞内纳米粒子数^[2,4]。Connor 等^[5]研究了白血病细胞和一系列金纳米粒子的内吞作用与毒性问题。Meng 等^[1]通过透射电子显微镜采用荧光标记法研究 DAOY 细胞对荧光标记的纳米粒子内吞的时间依赖性。Cartiera 等^[2]建立三个不同的细胞模型研究细胞内吞纳米粒子,发现不同细胞系对纳米粒子的吸收速度和程度不一样。Davda 等^[3]研究了细胞对纳米粒子的吸收与时间和纳米粒子的浓度有关。

表面增强喇曼散射效应(Surface-Enhanced Raman Scattering,SERS)是发生在金属纳米结构表面的光散射现象,它可以使吸附物质的喇曼信号强度得到极大增强,可作为一种高灵敏度的检测手段。纳米金颗粒(Gold Nanoparticles,AuNPs)具有较好的分散性和生物相容性,SERS 不受水干扰,特别适用于生物体系的检测。纳米银颗粒(Silver Nanoparticles,AgNPs)的 SERS 增强因子比 AuNPs 高 $10^2 \sim 10^3$ 倍,但易沉聚,性质不稳定,毒性强。银包金纳米粒子(Gold core-silver shell Nanoparticles,Ag@AuNPs)则结合了两者的优势,增强效果好,毒性小^[7],性质稳定。

在现有的实验条件下用 780 nm 激光激发结晶紫(Crystal Violet,CV)得到的增强效果最好,因此本文选择 CV 作为追踪喇曼信号的染料分子。将已有的激光光镊喇曼系统^[8-10]与 SERS 结合,追踪红细胞与 CV 包裹的 Ag@AuNPs 共培养的实时过程,分析其喇曼光谱特征峰值趋势,以及红细胞与其邻近溶液的喇曼光谱差。

1 实验部分

1.1 实验装置和材料准备

实验所用的单细胞激光光镊喇曼光谱系统如图 1^[8-9]。其中, TC 为温度控制器(Temperature controller); DL 为二极管激光器(Diode laser); OP 为

光隔离器(Optical isolator); IF 为干扰滤波片(Interference filter); PH 为小孔(Pinhole); HNF₁, HNF₂ 为陷波滤波片(Holographic notch filter); CCD 为光电耦合探测器(Charge-coupled detector); DM 为二向色镜(Dichroic mirror); BS 为分光镜(Beam splitter); Obj 为物镜(Objective lens); EP 为目镜(Eyepiece); VC 为摄像机(Video camera)。该系统由光镊、共焦显微喇曼系统构成。波长为 780 nm 的激光导入倒置生物显微镜(TE2000-U, Nikon, 日本)中。激光束经过油浸物镜,聚焦形成一个光能量势阱(光镊)以囚禁细胞。这束激光同时也用于激发被囚禁细胞的喇曼光谱。之后细胞散射的光聚焦到光谱仪(SpectraPro2300i, Acton, USA)中,由电荷耦合器件 CCD (PIXIS400BR, Princeton Instruments) 探测到喇曼信号,并在计算机上以喇曼光谱图的形式表示出来,其中 CCD 冷却到 -70 °C。

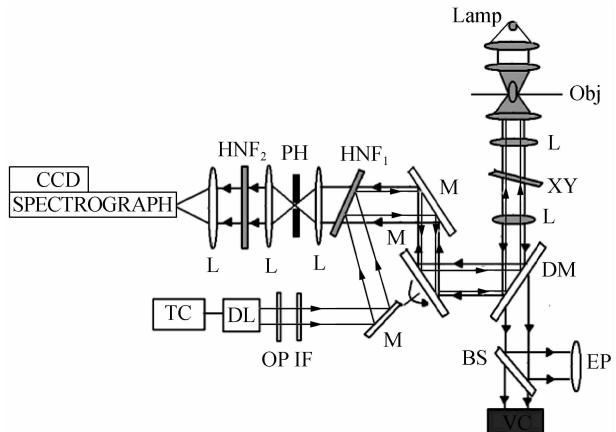


图 1 激光光镊喇曼光谱系统

Fig. 1 Laser optical tweezers Raman spectroscopy system

实验采用 18~26 g 雌性 Sprague dawley 小鼠剪尾取血,加聚丁二酸丁二醇酯(Poly Butylenes Succinated, PBS)稀释,现取现用。

结晶紫、氯金酸、柠檬酸钠、抗坏血酸、硝酸银均购买于 Sigma 公司(分析纯),王水用盐酸:硝酸 = 3:1 制备, PBS。实验用水均为超纯水(OKP-S010 型, 上海徕科实业发展有限公司)。

1.2 纳米粒子的合成

根据柠檬酸钠还原法^[7]制备 AuNPs,以 AuNPs 为种子进一步制备 Ag@AuNPs。

AuNPs 合成方法为:量取 50 mL 的超纯水放入烧瓶中,然后加入 500 μL 的 1% 的氯金酸溶液,加热搅拌;等烧瓶里的溶液沸腾后加入 900 μL 的 1.12% 柠

柠檬酸钠,搅拌 20 min 后停止加热,冷却到室温,4℃冰箱保存。

Ag@AuNPs 合成方法为:取 10 mL 的 AuNPs,放入干净烧杯中,搅拌依次加入 400 μ L 的 0.14% 柠檬酸钠,100 μ L 的 1.76% 抗坏血酸,最后缓慢逐滴加入 200 μ L 的 1.69% 硝酸银,继续搅拌 15 min,4℃ 冰箱保存。

1.3 光谱收集和数据处理

1×10^{-6} mol/L 的 CV 与 5.5×10^{11} particle/mL 的 Ag@AuNPs 过夜培养 12 h 后,再与红细胞混合后立刻连续观察,此时 Ag@AuNPs 浓度为 2.75×10^{11} particle/mL。通过计算得出纳米颗粒浓度^[11]。利用光镊囚禁红细胞,收集喇曼光谱,背景喇曼光谱信号来于细胞附近。光谱获取积分时间为 5 s,功率为 5 mW,光斑大小为 2 μ L。在 2 h 内连续采集红细胞光谱与其邻近溶液光谱。光谱数据的处理过程包括平滑、基线校正和求平均。所有数据的处理在 Origin9.0 软件中进行,峰强度抽取和减背景由自编程序处理。

2 结果与讨论

2.1 纳米粒子紫外可见吸收光谱(UV-Vis)和电镜(TEM)图

图 2 为纳米粒子的 UV-Vis 图,其中 AuNPs 的特征吸收峰为 521 nm,Ag@AuNPs 的特征吸收峰为 497 nm、383 nm。图 3 分别是 AuNPs 和 Ag@AuNPs 的 TEM 图,从 TEM 图中得出 AuNPs 的粒径约为

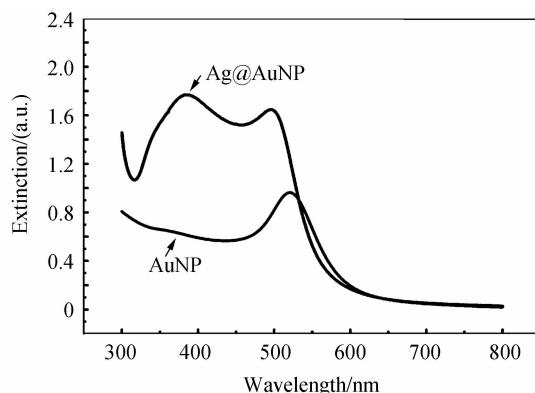


图 2 AuNPs 与 Ag@AuNPs 的紫外吸收光谱

Fig. 2 UV-Vis spectra of AuNPs and Ag@AuNPs

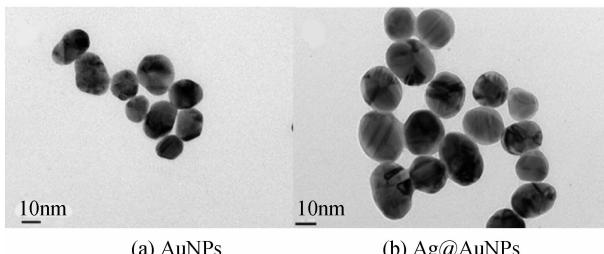


图 3 AuNPs 与 Ag@AuNPs 的 TEM 图
Fig. 3 TEM of AuNPs and Ag@AuNPs

20 nm,Ag@AuNPs 的粒径约为 30 nm。

2.2 光谱分析

2.2.1 红细胞的喇曼光谱和 CV 的 SERS 光谱

图 4 为红细胞的喇曼光谱图,图 5(a)为浓度是 1×10^{-6} mol/L 的 CV 的喇曼光谱图,图 5(b)和(c)是浓度为 1×10^{-6} mol/L 的 CV 分别与 AuNPs、Ag@AuNPs 过夜培养 12 h 后,CV 的 SERS 光谱图。可以观察到,红细胞光谱主要特征峰为 753、1 001、1 128、1 213、1 546 cm^{-1} ;CV 光谱主要特征峰为 762、915、1 177、1 389、1 538、1 586、1 619 cm^{-1} 。其中红细胞的光谱特征峰 753、1 546 cm^{-1} 和 CV 的光谱特征峰 762、1 538 cm^{-1} 因峰值相差不大,由频移造成的影响难以区分,所以文中对此特征峰不作研究。比较图 5(a)~

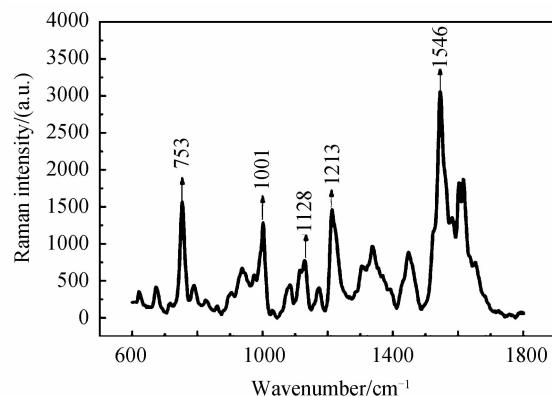


图 4 红细胞的喇曼光谱

Fig. 4 Raman spectra of erythrocyte

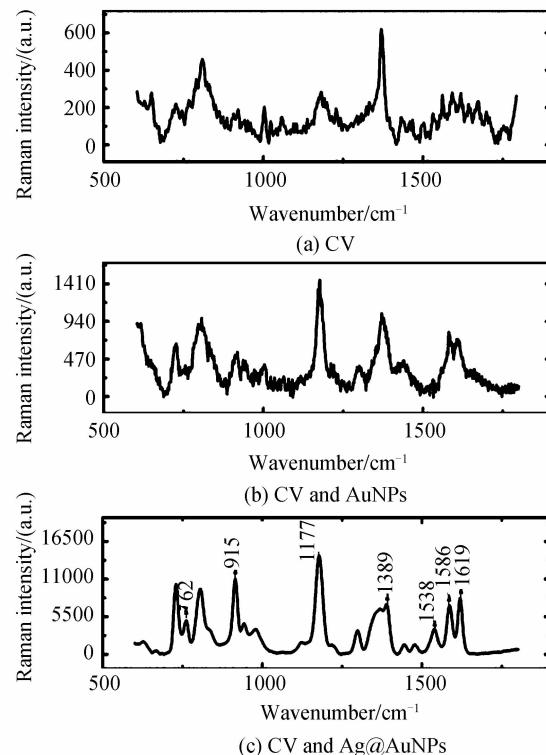


图 5 CV 的喇曼光谱

Fig. 5 Raman spectra of crystal violet

(c), 可知浓度为 1×10^{-6} mol/L 的纯 CV 基本没有喇曼信号; 图 5(b)则说明 AuNPs 能让 CV 喇曼信号增强, 但效果不大; 对比图 5(a)和(c)可知 Ag@AuNPs 能使 CV 的喇曼信号增强约 1×10^4 倍。

2.2.2 红细胞与 CV 包裹的 Ag@AuNPs 混合后的光谱分析

图 6 为红细胞与 CV 包裹的 Ag@AuNPs 混合后, 收集到的红细胞喇曼光谱特征峰强度随时间变化的时间统计图。归属红细胞的 $1\,001$ 、 $1\,128$ 、 $1\,213\text{ cm}^{-1}$ 特征

峰和归属 CV 的 915 、 $1\,177$ 、 $1\,389$ 、 $1\,586$ 、 $1\,619\text{ cm}^{-1}$ 特征峰强度整体上都随时间上升, 在前 20 min 以一定的趋势上升; 在 20 min~40 min 之间基本不变, 达到一个平台; 在 40 min~60 min 之间又以一定趋势上升。这与文献[2]研究 DAOY 细胞对粒子内吞的结果相似, 第一个阶段前 2 h 内吞的粒子量快速增大, 接下来的 2 h 缓慢到达第一个平台; 第二个阶段内吞速度又一次急剧增大且快于前一阶段内吞速度, 最后到第二个平台。

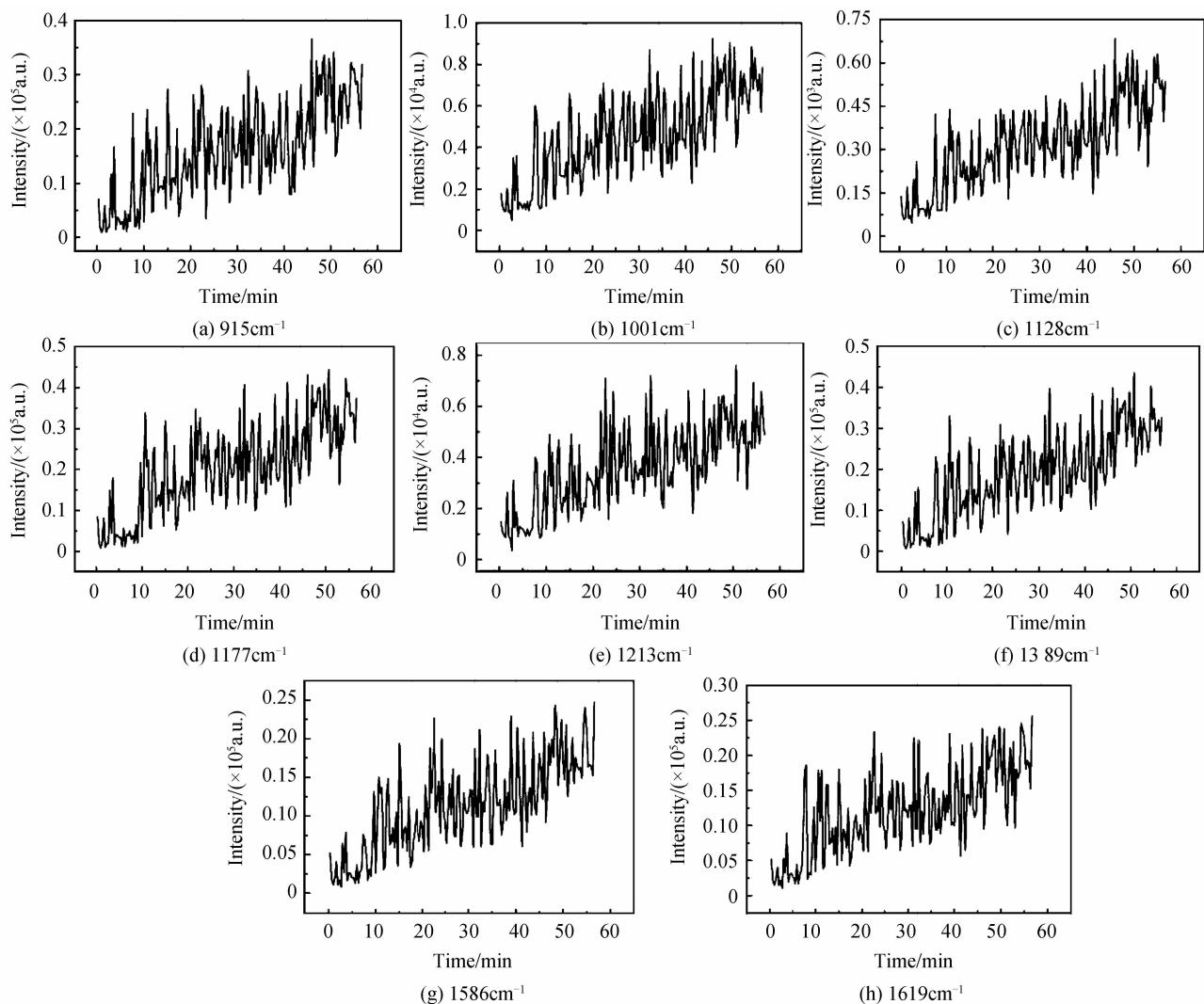


图 6 红细胞与 CV 包裹的 Ag@AuNPs 混合后, 红细胞喇曼光谱的特征峰强度在 1h 内随时间变化趋势

Fig. 6 After mix erythrocyte and Ag@AuNPs wrapped in crystal violet, strength trend diagram of the characteristic peak of the erythrocyte Raman spectra changes over time within 1 h

红细胞光谱特征峰的归属如表 1^[13-14], 其中 $1\,001\text{ cm}^{-1}$ 归属苯丙氨酸的对称呼吸振动, $1\,213\text{ cm}^{-1}$ 归属色氨酸和苯丙氨酸的 $n(\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5)$ 模, 这些都是与血红蛋白有关的特征峰。与血红蛋白有关的特征峰 $1\,001$ 、 $1\,213\text{ cm}^{-1}$ 的强度随时间整体上升, 推测 CV 包裹的 Ag@AuNPs 进入了红细胞并在细胞内累积。 $1\,128\text{ cm}^{-1}$ 归属蛋白类 C-N 拉伸模和糖类 C-O 拉伸模, 是与血糖有关的特征峰^[12]。与血糖有关的特征峰

$1\,128\text{ cm}^{-1}$ 的强度随时间整体上升, 推测是 Ag@AuNPs 吸附红细胞表面并累积。红细胞吸附或内吞 Ag@AuNPs 后, 细胞表面或内部的生物分子吸附在 Ag@AuNPs 上, 当发生喇曼散射时, 生物分子的振动谱线得到增强。CV 光谱的各特征峰的归属如表 2^[15], CV 的光谱特征峰 915 、 $1\,177$ 、 $1\,389$ 、 $1\,586$ 、 $1\,619\text{ cm}^{-1}$ 强度随时间整体上升, 推测红细胞使 CV 包裹的 Ag@AuNPs 富集, 且 CV 依然靠静电作用标志在

Ag@AuNPs 上,才使得CV信号增强或得到累加.

表 1 红细胞喇曼光谱特征峰的归属表

Table 1 Characteristic peak assignments for the erythrocyte Raman spectra

Wavenumber/ cm ⁻¹	Assignments
753	Symmetric breathing of tryptophan
937	Proline, hydroxyproline,(C-C) skeletal of collagen backbone
1 001	Symmetric ring breathing mode of phenylalanine
1 128	C-N stretching (proteins)C-O stretching (carbohydrates)
1 213	L-Tryptophan, phenylalanine
1 336	Nucleic acid bases
1 447	CH ₂ bending mode of proteins & lipids
1 546	Tryptophan
1 603	C=C in-plane bending mode of phenylalanine & tyrosine
1 616	C=C stretching mode of tyrosine & tryptophan

表 2 结晶紫喇曼光谱特征峰的归属表

Table 2 Characteristic peak assignments for the Crystal Violet Raman spectra

Wavenumber/ cm ⁻¹	Assignment
729,762,804	Out of plane vibration of ring C-H bend
915	Ring skeletal vibration of radical orientation
1 174,1 177	In plane vibration of ring C-H bend
1 298	Phenyl ring C-C stretching
1 369,1 389	N-phenyl stretching
1 442,1 477	Phenyl ring C-C stretching + ring deformation
1 538	Phenyl ring C-C stretching + N ⁺ = phenyl stretching
1 586	Phenyl ring C-C stretching and bend
1 619	Phenyl ring C-C stretching + N- phenyl stretching

图 7 为红细胞邻近溶液的喇曼光谱特征峰强度随时间变化的趋势,归属 CV 光谱的特征峰随时间呈一定的上升趋势,并且实验中观察到样品溶液中有漂浮物,且越来越多,越来越大. 这是由于纳米颗粒和血液中Cl⁻离子一起会发生沉聚,形成多聚体,而适当的

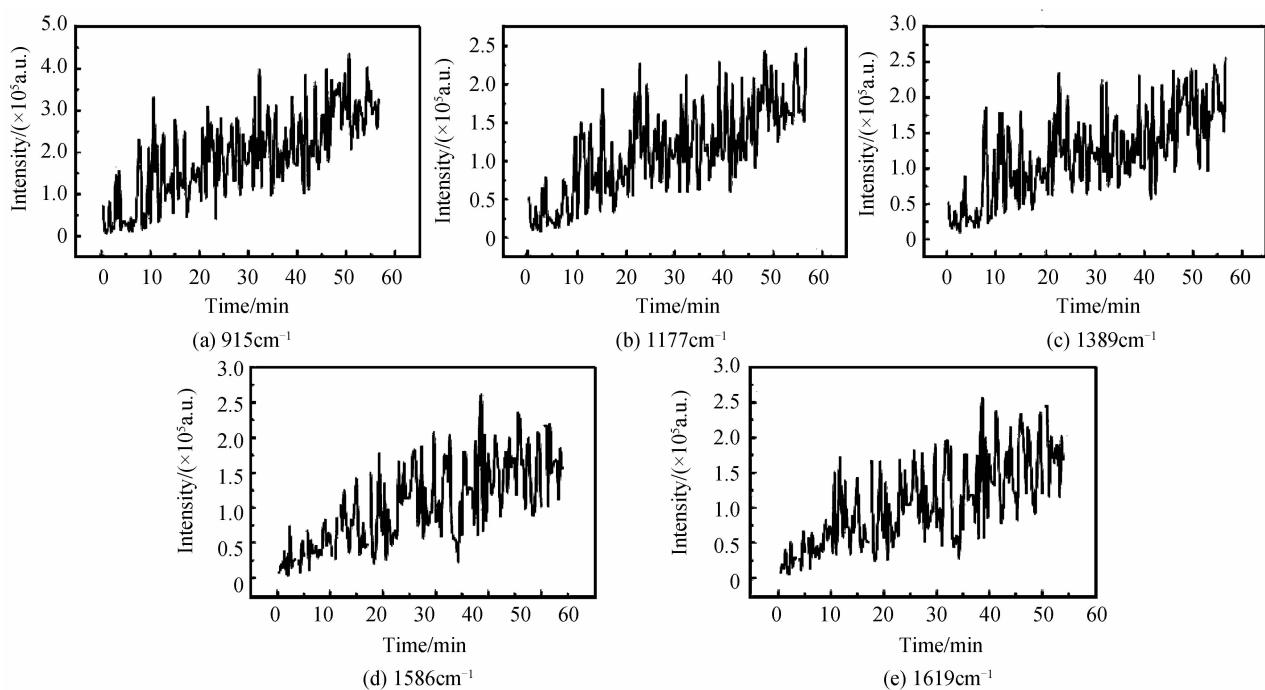


图 7 红细胞邻近溶液的喇曼光谱特征峰强度在 1h 内随时间变化趋势

Fig. 7 Strength trend diagram of the characteristic peak of the solution Raman spectra changes over time within 1 h 多聚体的增强效果要比单聚体的强^[15-16].

2.2.3 红细胞和其邻近溶液两者的光谱差分析

研究中的 Ag@AuNPs 带负电性,靠静电作用和阳离子型染料 CV 链接,带电粒子在红细胞膜上粘附的主要驱动力也是静电. 图 8 是红细胞和其邻近溶液光谱差的峰强度随时间变化趋势. 从图中看出,其中归属于 CV 的 913、1 179、1 586 cm⁻¹ 峰强度在 0~6 min 基本不变,在 6~22 min 随时间上升,在 22~36 min 随

时间下降,在 36~50 min 又随时间上升. 文献[17]指出几乎所有的细胞类型都显示出内吞及在溶酶体中降解大分子的能力. Cartiera^[4] 指出 OK 细胞 30 min 后开始在细胞内发现纳米粒子,4 h 后细胞内纳米粒子含量到达极限,之后慢慢减少. 结合分析,可知 0~6 min 间 Ag@AuNPs 没有进入红细胞内; 6~22 min 间 Ag@AuNPs 大量进入红细胞; 22~36 min 内细胞内的 Ag@AuNPs 大量被溶酶体降解; 而 36~50 min 内则再次

有大量 Ag@AuNPs 进入红细胞.

不同浓度的 Ag@AuNPs 与同为 1×10^{-6} mol/L 的 CV 过夜培养后, 测得其 CV 的喇曼光谱, 不同特征峰的强度与对应 Ag@AuNPs 浓度如图 9. 由图知 CV 特征峰强度随 Ag@AuNPs 浓度升高而升高, 当 Ag@AuNPs 浓度升至 $1.6 \times 2.75 \times 10^{11}$ particle/mL 后, 特征峰强度到达最高且基本呈稳定状态. 根据相应的 CV 特征峰强度可依图找出相应的 Ag@AuNPs 浓度, 已知体积即可计算出 Ag@AuNPs 颗粒数.

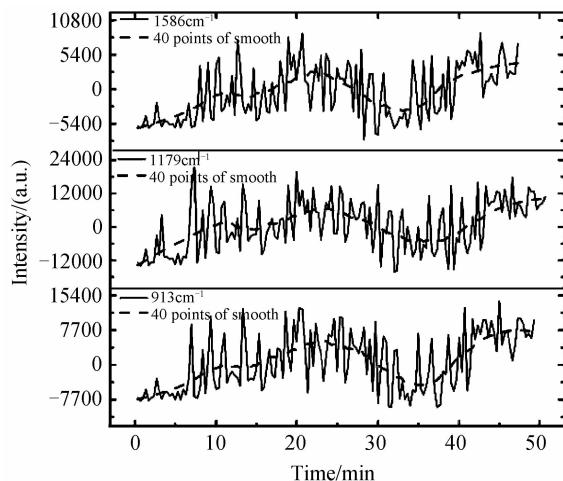


图 8 红细胞和其邻近溶液的喇曼光谱差的峰强度在 1 h 内随时间变化趋势图

Fig. 8 Erythrocyte and its neighboring solution Raman spectra D-value of peak strength changes over time within 1 h trend chart

表 3 各个特征峰的变化
Table 3 Changes of the characteristic peaks

Wavenumber/ cm^{-1}	Beginning of intensity	Last of intensity	Periods of time/min	D-value of intensity	Concentration of NPs/ ($\times 2.75 \times 10^{11}$ particles/mL)	Velocity/ (particles/min)
913	-7587.60	-7587.60	0~6	0	0	0
	-7587.60	5314.13	6~22	12901.73	1.60	2
	5314.13	-4505.78	22~36	-9819.91	1.51	-2
	-4505.78	7660.29	36~50	12166.07	1.60	3
1179	-13674.2	-13674.2	0~6	0	0	0
	-13674.2	6759.17	6~23	20433.37	1.60	2
	6759.17	-5302.01	23~37	-12061.2	1.47	-2
	-5302.01	10170.05	37~52	15472.06	1.60	2
1586	-6051.97	-6051.97	0~6	0	0	0
	-6051.97	2729.53	6~22	8781.5	1.60	2
	2729.53	-3372.41	22~33	-6101.94	1.41	-3
	-3372.41	4050.22	33~52	7422.63	1.50	2

Note: Velocity, $v = \frac{N}{t} = \frac{cV_e}{t}$, where N is the number of particles, t is the time, c is the Concentration of nanoparticles, $V_e = 9.514 \times 10^{-11} \text{ cm}^3$ is the volume of erythrocyte which the average radius is $3.35 \mu\text{m}$ and the thickness is $2.70 \mu\text{m}$, positive is the enter speed, the dissolution rate is negative.

度为 3 particle/min. 依此从表 3 可知 1179 、 1586 cm^{-1} 峰在各个时间段内的速度. 我们发现 Ag@AuNPs 进入红细胞和被溶酶体降解的速度都约为 $2 \sim 3$ particle/

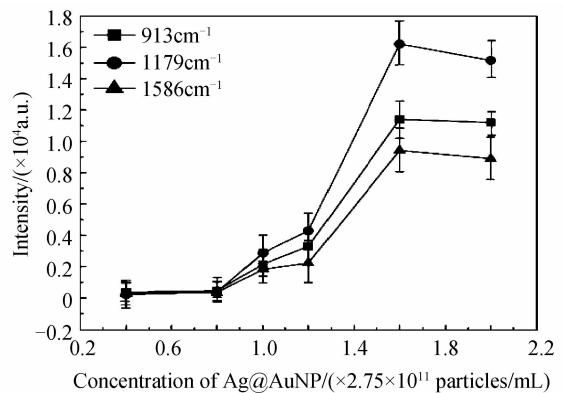


图 9 不同浓度的 Ag@AuNPs 与 CV 培养后喇曼光谱特征峰对应的喇曼强度

Fig. 9 The raman spectral characteristic peaks corresponding to the intensity after training with different concentrations of Ag@AuNPs and CV

表 3 为红细胞内 CV 不同特征峰在不同时间段内强度变化情况、峰强度值对应浓度情况以及 Ag@AuNPs 进入红细胞或溶酶体降解 Ag@AuNPs 的速度. 由图 8 和表 3 知在 $0 \sim 6$ min 间 CV 的 913 、 1179 、 1586 cm^{-1} 峰强度基本保持最低, 即 CV 包裹的 Ag@AuNPs 还没进入红细胞. 在约 11 min 时 CV 修饰的 Ag@AuNPs 的细胞内外浓度基本一样. 根据 913 cm^{-1} 峰可知在 $6 \sim 22$ min 间 Ag@AuNPs 进入红细胞的平均速度为 2 particle/min ; 在 $22 \sim 36$ min 间溶酶体溶解 Ag@AuNPs 的平均速度为 2 particle/min ; 在 $36 \sim 50$ min 间再次有 Ag@AuNPs 进入红细胞的平均速

度为 2 particle/min . 纳米粒子在两次进入红细胞的时间段内(例如, 913 cm^{-1} 峰的 $6 \sim 22$ min, $36 \sim 50$ min)累积粒子数的最大限度约为 33 particle.

在一般情况下用光学显微镜(TE2000-U, Nikon, 日本)观查红细胞内是没有颗粒状物体的。图 10 为红细胞在与 Ag@AuNPs 混合后不同时间的图片,结合图 8 分析前 3 min 红细胞内没有颗粒状物体,但细胞膜有小颗粒附着,满足图 8 的 0~6 min 时表述的光谱变化情况;15 min 时红细胞内有 2~3 颗颗粒,细胞膜也有颗粒附着,与图 8 的 6~22 min 时光谱变化的情况相吻合;29 min 时红细胞内颗粒相较 15 min 时少了,细胞膜外有颗粒,符合图 8 的 22~36 min 时光谱变化情况;最后 48 min 时红细胞颗粒相对较多,与 36~50 min 时光谱变化的情况相一致。

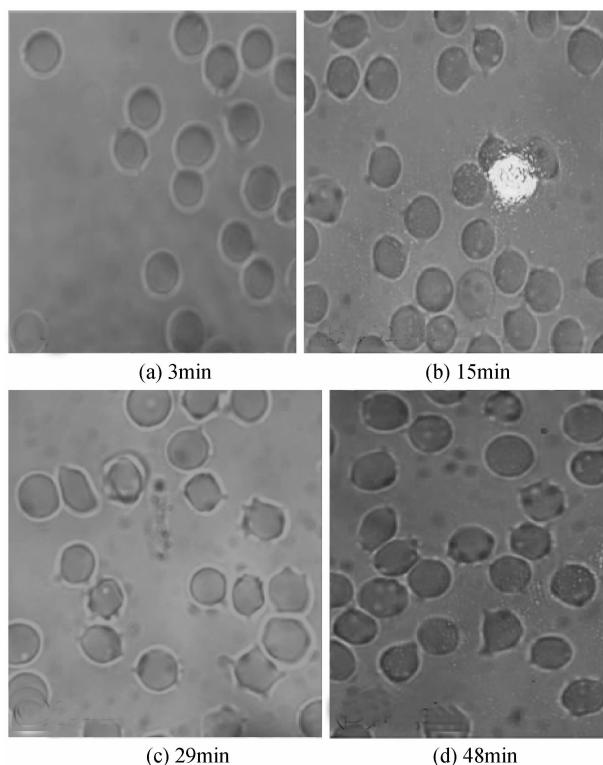


图 10 红细胞和 CV+Ag@AuNPs 混合后图片
Fig. 10 Photo of after mix erythrocyte and
CV+Ag@AuNPs

3 结论

本文应用 SERS 及光镊技术对 CV 修饰的 Ag@AuNPs 进入红细胞的喇曼光谱进行研究,连续观察红细胞光谱特征峰以及红细胞与背景溶液光谱差的特征峰值趋势,发现 CV 修饰的 Ag@AuNPs 和红细胞混合后,6 min 后能检测到 Ag@AuNPs;CV 修饰的 Ag@AuNPs 进入红细胞的过程是动态过程,红细胞内 CV 修饰的 Ag@AuNPs 积累量先升高后降低再升高;CV 包裹的 Ag@AuNPs 进入红细胞的速度与其被降解的速度基本相同,平均速度约为 2~3 particle/min;CV 包裹的 Ag@AuNPs 在红细胞内累积的最大限度的颗粒数约为 33 颗;红细胞内吞 CV 修饰的 Ag@AuNPs 过程约为 20~30 min,较一般细胞内吞纳米颗粒快。通

过 SERS 光谱对 Ag@AuNPs 进入红细胞代谢过程的研究,可以更具体地获得 Ag@AuNPs 进入红细胞的实时过程,为研究纳米粒子携带药物进入红细胞并最终进入血液循环系统提供新的方法和依据。

参考文献

- [1] MENG W, KALLINTERI P, WALKER D A, et al. Evaluation of poly (glycerol-adipate) nanoparticle uptake in an in vitro 3-D brain tumor co-culture model[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2007, **232**(8): 1100-1108.
- [2] CARTIERA M S, JOHNSON K M, RAJENDRAN V, et al. The uptake and intracellular fate of PLGA nano particles in epithelial cells[J]. *Biomaterials*, 2009, **30**(14): 2790-2798.
- [3] DAVDA J, LABHASETWAR V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, **233**(1-2): 51-59.
- [4] CHANG J, JALLOULI Y, KROUBI M, et al. Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, **379**(2): 285-292.
- [5] CONNOR E E, MWAMUKA J, GOLE A, et al. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity[J]. *Small*, 2005, **1**(3): 325-327.
- [6] SONG Wen-zhi, YIN Wan-zhong, YANG Huan, et al. Investigation of gold nano-particles cytotoxicity by MTT method in vitro [J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2011, **15**(8): 1242-1245.
宋文植, 尹万忠, 杨欢, 等. MTT 法检测纳米金粒子体外细胞毒性的研究[J]. 中国实验诊断学, 2011, **15**(8): 1242-1245.
- [7] SHEN A G, CHEN L F, XIE W, et al. Triplex Au-Ag-C core-shell nanoparticles as a novel raman label[J]. *Advanced Functional Materials*, 2010, **20**(6): 969-975.
- [8] PENG L, CHEN D, SETLOW P, et al. Elastic and inelastic light scattering from single bacterial spores in an optical trap allows the monitoring of spore germination dynamics [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, **81**(9): 4035-4042.
- [9] WANG Yan-jun, QIN Zong-ding, YAO Hui-lu, et al. Laser-tweezer raman spectroscopy study of single rat fetal liver stem cell[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2014, **43**(6): 630004.
王雁军, 覃宗定, 姚辉路, 等. 单个大鼠胎儿干细胞的激光光镊喇曼光谱[J]. 光子学报, 2014, **43**(6): 630004.
- [10] YAO H L, TAO Z H, AI M, et al . Raman spectroscopic analysis of apoptosis of single human gastric cancer cells[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2009, **50**(2): 193-197.
- [11] QIAN X, PENG X H, ANSARI D O, et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags[J] *Nature*, 2008, **26**(1): 83-90.
- [12] LIN Man-man, NIU Li-yuan, QIN Zhao-jun, et al. Semi-quantitative analysis of blood glucose using raman spectroscopy[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2012, **41**(1): 112-115.
林漫漫, 牛丽媛, 覃赵军, 等. 喇曼光谱对血糖的半定量分析[J]. 光子学报, 2012, **41**(1): 112-115.
- [13] MOVASAGHI Z, REHMAN S, DR REHMAN I U, et al. Raman spectroscopy of biological tissues [J]. *Applied Spectroscopy*, 2007, **42**(5): 493-541.
- [14] PREMASIRI W R, LEE J C, ZIEGLER L D. Surface-enhanced raman scattering of whole human blood, blood plasma, and red blood cells: cellular processes and bioanalytical sensing[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2012, **116**(31): 9376? 9386.
- [15] ZHANG Hao-ran, MAN Shi-qing. Surface-enhanced raman

- scattering activities of crystal violet based on Au/SiO₂[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2011, **39**(6): 821-826.
- 张浩然, 满石清. 基于 Au/SiO₂ 纳米粒子的结晶紫表面增强喇曼特性研究[J]. 分析化学, 2011, **39**(6): 821-826.
- [16] YU Yue-hui, YU Ting, ZHOU Ji. Effects of silver nanoparticles on spectroscopy properties of rhodamine B and electrolyte effect[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(2): 209-216.
- 王悦辉, 王婷, 周济. 纳米银粒子对表面吸附罗丹明 B 的光谱学性质的影响及电解质效应研究[J]. 光子学报, 2011, **40**(2): 209-216.
- [17] HU Ling, ZHANG Yu-ying, GAO Chang-you. Influence of structures and properties of polymer nanoparticles on their cellular uptake and cell functions[J]. *Progress in Chemistry*, 2009, **21**(6): 1254-1267.
- 胡玲, 张裕英, 高长有. 聚合物纳米粒子的结构和性能对胞吞和细胞功能的影响[J]. 化学进展, 2009, **21**(6): 1254-1267.