

# 负载银簇的硅基杂化纳米颗粒制备及其 SERS 性能

文子聪<sup>1</sup>, 牛德超<sup>1</sup>, 李永生<sup>1,2</sup>

(1. 华东理工大学 材料科学与工程学院, 上海 200237; 2. 石河子大学 化学化工学院, 石河子 832003)

**摘要:** 本研究发展了一种简便的“原位还原”策略构建负载银簇的硅基杂化纳米颗粒(Ag@SHNPs)。首先利用两亲性嵌段共聚物 PS<sub>89</sub>-*b*-PAA<sub>16</sub> 自组装行为和 3-巯基丙基三甲氧基硅烷(MPTMS)在亲水链段 PAA 区域的水解缩聚反应形成有机硅胶束杂化纳米结构, 再利用有机硅骨架中丰富的巯基作为还原位点, 原位将银盐转化为银簇, 最终得到负载银簇的硅基杂化纳米颗粒, 并对该杂化纳米颗粒的形貌、结构以及成分组成作了分析。通过测试材料对不同细胞系的毒性验证了其良好的生物相容性。最后以 4-巯基苯甲酸(4-MBA)为探针分子, 对硅基杂化颗粒基底的表面增强拉曼散射(SERS)活性进行检测。在 532 nm 波长的激光激发下, 4-MBA 标记的硅基杂化纳米颗粒展示出明显的拉曼信号增强特性, 增强因子约为 10<sup>5</sup>。因此, 该硅基杂化基底材料在 SERS 生物成像和高灵敏检测方面具有潜在的应用前景。

**关键词:** 银团簇; 限域空间; 原位还原; 表面增强拉曼散射

中图分类号: TQ174 文献标志码: A

## Silver Clusters-loaded Silica-based Hybrid Nanoparticles: Synthesis and SERS Performance

WEN Zicong<sup>1</sup>, NIU Dechao<sup>1</sup>, LI Yongsheng<sup>1,2</sup>

(1. School of Materials of Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

**Abstract:** In this research, a facile “*in-situ* reduction” strategy was developed to construct silver clusters-loaded silica-based hybrid nanoparticles (Ag@SHNPs). Firstly, the formation of organosilica-micellar hybrid nanostructure was achieved by self-assembly of amphiphilic block copolymer PS<sub>89</sub>-*b*-PAA<sub>16</sub> and hydrolysis, and polycondensation of (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTMS) on the hydrophilic PAA segment. Then, the abundant thiol groups in the organosilica framework were used as reduction sites to *in-situ* convert the silver salt into silver clusters, and finally the Ag@SHNPs were obtained. Morphology, structure and composition of the hybrid nanoparticles were analyzed, and their cytotoxicity on different cell lines were explored, showing good biocompatibility. The surface enhanced Raman scattering (SERS) activity of the Ag@SHNPs substrate were detected by using 4-mercaptopbenzoic acid (4-MBA) as the probe molecule. Under an excitation wavelength of 532 nm laser, 4-MBA-labeled Ag@SHNPs exhibited obvious Raman enhanced signal with an enhancement factor of about 10<sup>5</sup>. Therefore, the silica-based hybrid substrate material

收稿日期: 2021-03-23; 收到修改稿日期: 2021-05-18; 网络出版日期: 2021-07-12

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFA0203700); 国家自然科学基金(52072124); 上海市自然科学基金(20ZR1414900) National Key Research and Development Program of China (2016YFA0203700); National Natural Science Foundation of China (52072124); Natural Science Foundation of Shanghai (20ZR1414900)

作者简介: 文子聪(1996-), 男, 硕士研究生. E-mail: mos15915333133@163.com

WEN Zicong(1996-), male, Master candidate. E-mail: mos15915333133@163.com

通信作者: 牛德超, 副教授. E-mail: dcniu@ecust.edu.cn; 李永生, 教授. E-mail: ysli@ecust.edu.cn

NIU Dechao, associate professor. E-mail: dcniu@ecust.edu.cn; LI Yongsheng, professor. E-mail: ysli@ecust.edu.cn

shows potential application prospects in SERS bioimaging and high-sensitivity detection.

**Key words:** silver nanoclusters; confined space; *in-situ* reduction; surface enhanced Raman scattering

表面增强拉曼散射(Surface enhanced Raman scattering, SERS)现象首次由 Fleischman 等<sup>[1]</sup>提出,是一种可以增强化学分子、生物分子的拉曼光谱信号的技术<sup>[2]</sup>,该技术能够提供分子的“指纹”信息,反映探针分子的内部结构。由于其灵敏度优异、选择性高、简单、快速、在分子检测方面具有特异性等特点<sup>[3]</sup>,被广泛应用于检测方面尤其是食品安全<sup>[4]</sup>、环境监测<sup>[5]</sup>、生物医学诊断治疗<sup>[6]</sup>等领域。

贵金属如 Au、Ag 由于其在可见区和近红外区局部表面等离子共振(Localized surface plasmon resonance, LSPR)特性增强,使得金属表面附近的电场增强,同时让拉曼散射截面大幅增强,因此常被用作 SERS 基底材料,且 Ag 比 Au 具有更强的拉曼增强信号能力<sup>[7-8]</sup>。目前已合成的银纳米颗粒有诸多形貌,如纳米棒、纳米球、纳米团簇等<sup>[9]</sup>。涉及制备银纳米颗粒的方法也有很多,如化学还原法,往往是通过加入柠檬酸钠、硼氢化钠等还原剂进行还原<sup>[10-11]</sup>;或者加入一些配体作为保护剂来防止银纳米颗粒不受限地生长而形成团聚<sup>[12]</sup>。上述这些合成方法往往较为复杂,且这类化学试剂也会为材料带来潜在的生物毒性。因此,发展一种简单有效的方法用于制备分散性和生物相容性好的银纳米颗粒/团簇仍然是该领域面临的主要挑战之一。

近年来本课题组利用两亲性嵌段共聚物 PS<sub>89</sub>-*b*-PAA<sub>16</sub> 在临界胶束浓度上自组装形成单分散的胶束,选用 3-巯基丙基三甲氧基硅氧烷(MPTMS)在胶束亲水 PAA 链段上的选择性水解缩聚,得到一系列稳定性高、分散性好的硅基杂化纳米颗粒<sup>[13-15]</sup>。在此基础上,本研究利用这类材料的有机硅骨架中含有的丰富巯基基团,发展了一种简便的“原位还原”策略,通过将 Ag<sup>+</sup>在有机硅骨架中的限域空间内原位还原成银纳米团簇,制备出生物相容性良好的负载银簇的硅基杂化纳米颗粒,被拉曼报告分子 4-巯基苯甲酸(4-MBA)标记后的基底颗粒的拉曼信号明显增强。

## 1 实验方法

### 1.1 负载银簇的硅基杂化纳米颗粒的制备

#### 1.1.1 嵌段共聚物胶束的制备

按照文献<sup>[15]</sup>报道,取 10 mg 聚苯乙烯-*b*-聚丙烯

酸(PS<sub>89</sub>-*b*-PAA<sub>16</sub>)粉末溶解于四氢呋喃(THF)中,室温下搅拌 5 min 至完全溶解后,向上述溶液中快速加入 40 mL 超纯水,搅拌 10 min 至溶液完全混合,将反应溶液转移到截留分子量为 14000 的透析袋中透析,为了去除溶液中的有机溶剂 THF,每隔 2 h 换一次透析介质(去离子水),透析 12 h 后得到嵌段共聚物胶束(Copolymer micelles, CMs)水溶液。

#### 1.1.2 硅基杂化纳米颗粒的制备

在上述 CMs 水溶液中加入 200 μL 3-巯基丙基三甲氧基硅氧烷(MPTMS),然后逐滴加入 1 mL 氨水(NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O),室温下搅拌 24 h 后,将反应溶液转移透析袋中透析,每隔 3 h 换一次透析介质。透析 24 h 后,得到 60 mL 硅基杂化纳米颗粒(Silica-based hybrid nanoparticles, SHNPs)。

#### 1.1.3 负载银簇的硅基杂化纳米颗粒的制备

取 1/5 上述 SHNPs 溶液(约 12 mL),加入 12 mL 浓度为 10 mmol/L 的硝酸银(AgNO<sub>3</sub>)溶液搅拌 24 h,将反应溶液转移到透析袋中透析,每隔 3 h 换一次透析介质,透析 24 h 后得到负载银簇的硅基杂化纳米颗粒(Silver clusters-loaded silica-based hybrid nanoparticles, Ag@SHNPs)。

#### 1.1.4 4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 的制备

拉曼报告分子 4-巯基苯甲酸(4-MBA)标记的 Ag@SHNPs 的合成步骤与 1.1.3 大致相同,不同的是在加入 MPTMS 前先加入 2 mL 浓度为 1 mg/mL 的 4-MBA 乙醇溶液。上述溶液在配置时需避光。

## 1.2 Ellman 试剂对巯基的定量测定

Ellman 试剂配制:取 10 mg 5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸(DTNB)溶于 pH=7.8 的 PBS 中。再配制 1 mmol/L 的 L-半胱氨酸(L-Cys)溶液。然后取 0.2 mL Ellman 试剂和 1.5 mL L-Cys 溶液,与 1.3 mL pH=7.8 的 PBS 混合均匀(3 mL 体系),再在 3 mL 的体系里改变 L-Cys 的量,测试几组混合溶液在 409 nm 处特征吸收峰值,可以根据该组峰值与 L-Cys 的浓度作出标准曲线而计算巯基的含量。

## 1.3 稳定性测试

抗稀释稳定性是通过测定不同稀释倍数(1、2、5、10、20、50、100、200)的 CMs、SHNPs、Ag@SHNPs 溶液的平均水合动力学粒径而获得的。为了模拟在不同体液环境下的时间稳定性,通过测定 Ag@SHNPs 分散在不同介质(含 10%胎牛血清(FBS)的贝科改良

Eagle (DMEM)培养基、10% FBS 的 RPMI1640 培养基, 300  $\mu\text{L}$  Ag@SHNPs 溶液分散在 2.7 mL 介质中) 中 7 d 内的平均水合动力学粒径(置于恒温振荡器中, 37  $^{\circ}\text{C}$ )获得。

#### 1.4 体外细胞毒性测试

Ag@SHNPs 以及 4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 的生物相容性分析: 以人体肝癌细胞 SMMC-7721、小鼠胚胎成纤维细胞 NIH-3T3、小鼠胚胎成纤维细胞 MEF、人类永生化表皮细胞 HaCaT 为研究模型进行了细胞毒性研究。将 SMMC-7721 置于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基, NIH-3T3、MEF、HaCaT 细胞置于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中进行细胞培养, 然后在 96 孔板中每孔接种  $5 \times 10^3$  个细胞 (100  $\mu\text{L}$ ), 外圈每孔加 100  $\mu\text{L}$  PBS, 置于恒温培养箱(37  $^{\circ}\text{C}$ , 含 5%  $\text{CO}_2$ )中培养 24 h 至细胞贴壁。用含有不同浓度的 Ag@SHNPs 以及 4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 的培养基溶液(100  $\mu\text{L}$ )替换原先培养基加入到上述孔板中, 对照组替换成纯培养基溶液, 每个浓度设置 5 个平行样, 置于恒温培养箱继续培养 24 h。除去上清液, 每个孔板内加入 150  $\mu\text{L}$  增强型 CCK8 (Cell Counting Kit-8)溶液(10  $\mu\text{L}$  CCK8 与 140  $\mu\text{L}$  培养基混合)继续在恒温培养箱中孵育 2 h。震荡 10 s 后用酶标仪测定每孔在 490 nm 处的吸光度。细胞存活率按下列公式计算:

细胞存活率=材料处理后的吸光度/对照组的吸光度

#### 1.5 细胞 SERS 评价

将 SMMC-7721 细胞以每孔  $1.5 \times 10^5$  个细胞 (2 mL)接种于 6 孔板中培养 24 h 至完全贴壁, 然后用含有 Ag 浓度为 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 的培养基溶液(1 mL)替换原先培养基加入到上述孔板中, 对照组替换成纯培养基溶液, 继续培养 24 h。除去上清液, 每个孔板用 1 mL PBS 洗涤, 再除去 PBS 并加入 100  $\mu\text{L}$  胰酶消化细胞, 离心 5 min(800 r/min), 用 PBS 洗涤 2 次, 再分散在 PBS 中, 将其置于激光显微拉曼光谱仪的显微镜下检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Ag@SHNPs 制备及形貌结构表征

图 1 为 Ag@SHNP 的制备流程图。首先,  $\text{PS}_{89}\text{-}b\text{-PAA}_{16}$  在有机溶剂 THF 中, 形成前驱体溶液, 然后快速加入一定量的超纯水, 溶液从无色透明变为乳白色, 表明  $\text{PS}_{89}\text{-}b\text{-PAA}_{16}$  自组装形成了嵌段共聚物胶束(CMs)。透析去除有机溶剂后, 硅烷偶联剂 MPTMS 在胶束 PAA 链段上水解缩聚形成硅氧骨架, 得到杂化胶束, 即 SHNPs。根据文献<sup>[15]</sup>报道, 该杂化纳米颗粒具有示意图中的聚合物核-有机硅壳结构, 并且由于有机氧化硅骨架及表面含有丰富的巯基基团, 使得  $\text{Ag}^+$  可在有机硅骨架中的限域空间内原位还原<sup>[16]</sup>, 得到 Ag@SHNPs。

图 2(a)是  $\text{PS}_{89}\text{-}b\text{-PAA}_{16}$  胶束和对应 SHNPs 的水合动力学粒径分布。由于两亲性嵌段共聚物  $\text{PS}\text{-}b\text{-PAA}$  可在选择性溶剂中组装形成单分散的胶束聚集体<sup>[17]</sup>, DLS 结果表明  $\text{PS}_{89}\text{-}b\text{-PAA}_{16}$  自组装得到胶束 CMs 的平均水合动力学粒径为 82.25 nm。进一步采用 200  $\mu\text{L}$  MPTMS 对 CMs 胶束结构进行固定得到 SHNPs, 其平均水合动力学粒径为 82.30 nm。相比于未稳定的  $\text{PS}_{89}\text{-}b\text{-PAA}_{16}$  胶束, SHNPs 的平均动力学直径并未发生明显的变化, 表明 MPTMS 在碱性环境下的水解缩聚反应主要发生在胶束亲水链段 PAA 区域, 并形成含有丰富巯基的有机氧化硅交联层。为了优化银簇在硅基杂化颗粒上的负载量, 本实验探讨了不同 MPTMS 用量(100、150、200  $\mu\text{L}$ )对 SHNPs 粒径、形貌及巯基含量的影响。图 2(b)是  $\text{PS}_{89}\text{-}b\text{-PAA}_{16}$  与不同量 MPTMS 反应制备的 SHNPs 的水合动力学粒径分布。结果表明, 三个样品的动力学尺寸均在 80 nm 左右, 即 MPTMS 的加入量对 SHNPs 的水合动力学粒径未产生明显的影响, 进一步证实了 MPTMS 的水解缩聚反应只发在胶束亲水链段 PAA 区域内部。

图 3 是不同 MPTMS 用量下制备的 SHNPs 的透

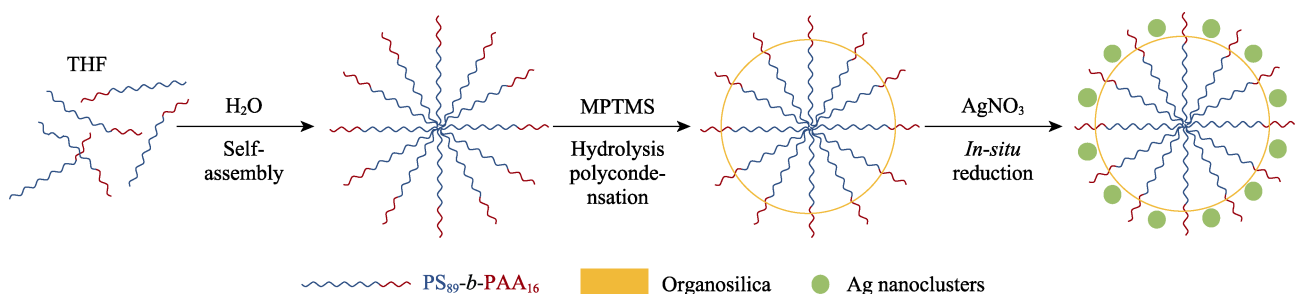


图 1 Ag@SHNPs 制备示意图

Fig. 1 Schematic illustration for the fabrication of Ag@SHNPs



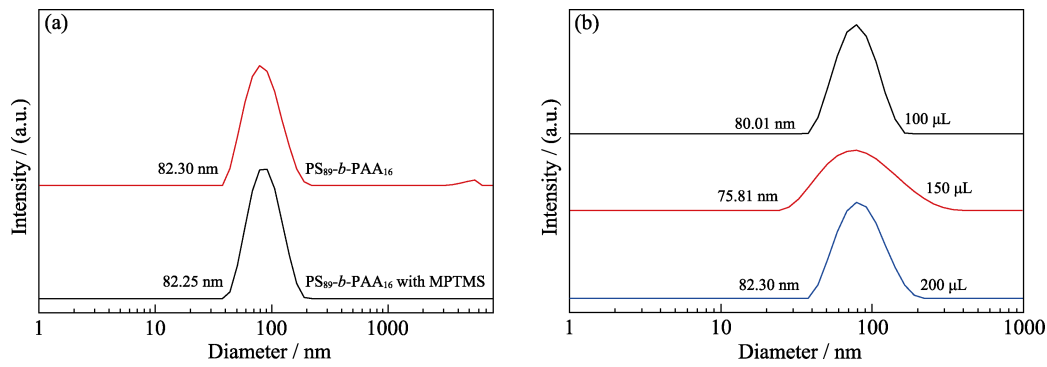


图 2 (a)  $PS_{89}\text{-}b\text{-}PAA_{16}$  胶束和对应 SHNPs 的水合动力学粒径分布, 以及 (b) 不同 MPTMS 用量 (100、150、200  $\mu\text{L}$ ) 下制备的 SHNPs 水合动力学粒径分布

Fig. 2 (a) Hydrodynamic diameter distributions of  $PS_{89}\text{-}b\text{-}PAA_{16}$  micelles and SHNPs, and (b) hydrodynamic diameter distributions of SHNPs prepared with different amounts of MPTMS (100, 150, 200  $\mu\text{L}$ )

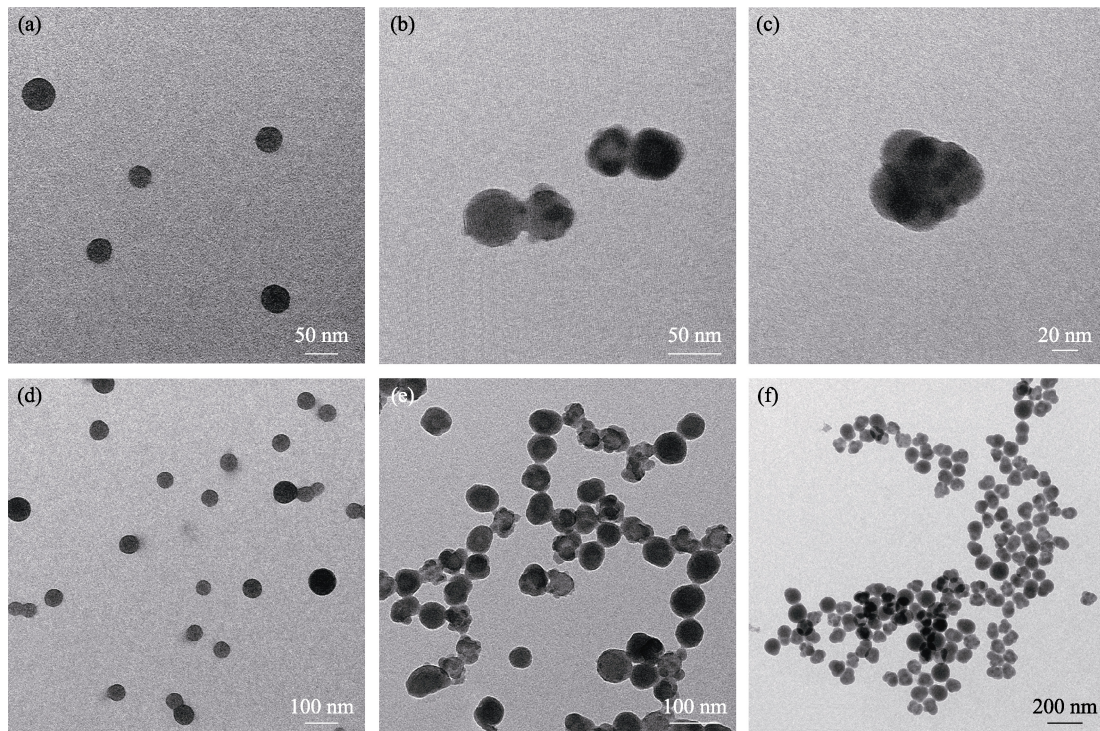


图 3 不同 MPTMS 用量下制备的 SHNPs 的透射电镜照片

Fig. 3 TEM images of SHNPs prepared with different amounts of MPTMS (a, d) 100  $\mu\text{L}$ ; (b, e) 150  $\mu\text{L}$ ; (c, f) 200  $\mu\text{L}$

射电镜照片。随着 MPTMS 用量的增加, SHNPs 的颗粒形貌从规整的球状逐渐变为花状, 表面也逐渐变得粗糙, 进一步证明了 MPTMS 在亲水性 PAA 链段表层区域水解缩聚, 使得有机硅层的厚度逐渐变大, 表层更加粗糙。值得注意的是, 由于 DLS 测的是水合动力学直径, 其数值不仅包括颗粒本身的粒径, 还包括其表面的水合层尺寸。此外, 由于颗粒表面的亲水性 PAA 链段在 TEM 模式下具有较低的对比度, 因此 TEM 测得的粒径数值不包括表面的亲水性 PAA 链段长度。

此外, 如图 4(a)所示, 自由巯基可与 Ellman 试

剂反应生成 TNB, 而 DTNB 和 TNB 分别在 322 和 412 nm 处有吸收峰, 且自由巯基浓度符合朗伯-比尔定律, 因此可以通过测量 DTNB 和巯基反应的产物 TNB 在紫外-可见吸收光谱中 412 nm 处吸收值来定量测定巯基含量<sup>[18]</sup>。Ellman 试剂定量测试巯基含量结果显示各个样品的巯基分别为 0.26、0.41、0.45 mmol/L。这也进一步解释了为什么材料表面越来越粗糙是由表面巯基含量增加而造成的。

图 5 是  $\text{Ag}@\text{SHNPs}$  的透射电镜照片, 可以看出, 直径为 5 nm 左右的黑色颗粒均匀地分布在 SHNPs 纳米球上, 表明银纳米团簇被成功负载在硅基杂化

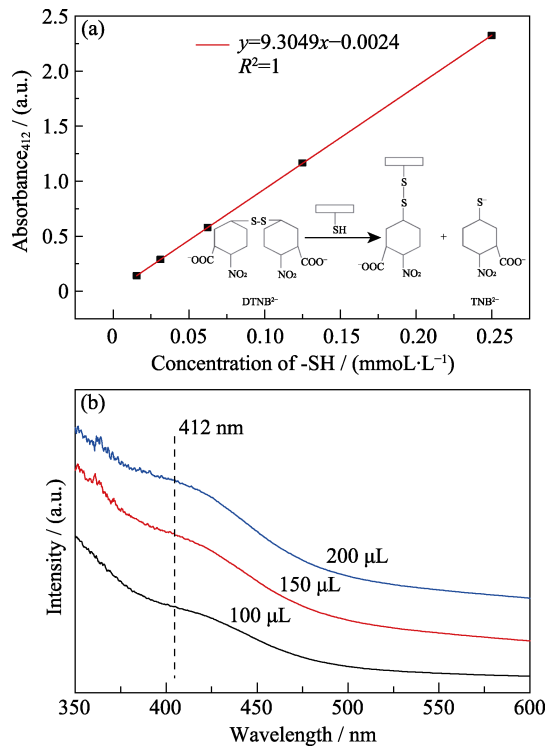


图 4 (a)巯基的标准曲线(插图 Ellman 试剂与巯基反应示意图)与(b)不同 SHNPs 与 Ellman 试剂反应后混合溶液的紫外-可见吸收光谱

Fig. 4 (a) Standard curve of thiol groups with inset showing the reaction between Ellman's agent and thiol groups, and (b) UV-Vis spectra of SHNPs mixed with Ellman's agent

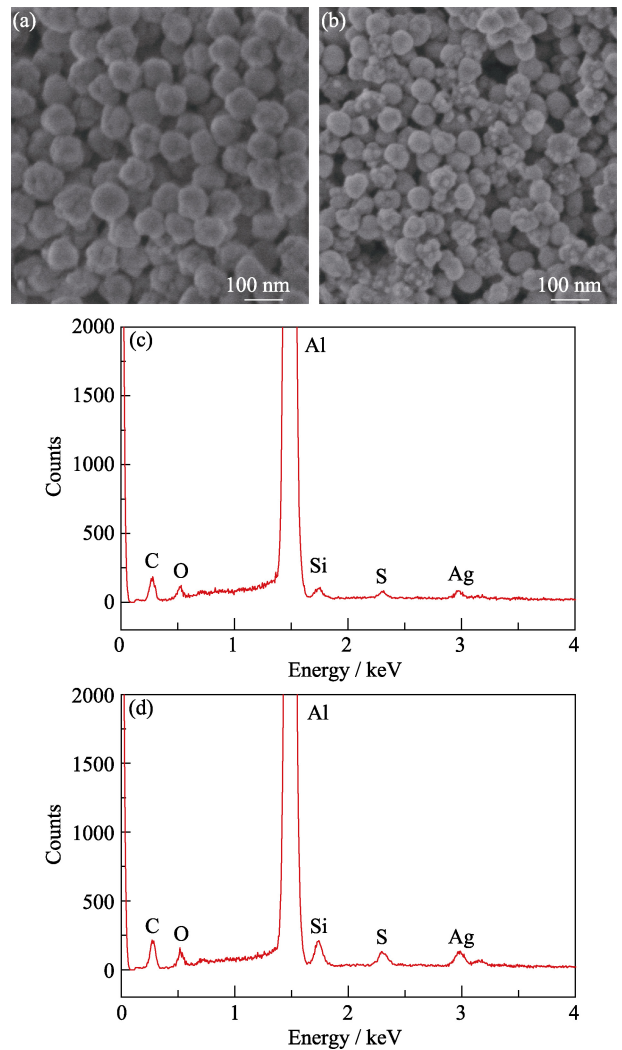


图 6 Ag@SHNPs 和 4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 的扫描电镜照片(a, b)和能谱(c, d)

Fig. 6 SEM images (a, b) and energy-dispersive spectra (c, d) of Ag@SHNPs and Ag@SHNPs with 4-MBA

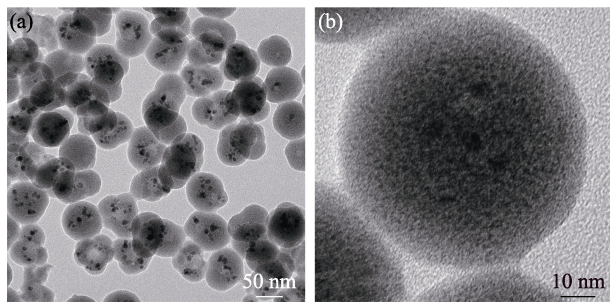


图 5 Ag@SHNPs 的透射电镜照片  
Fig. 5 TEM images of Ag@SHNPs

颗粒中。图 6(a,b)分别为 Ag@SHNPs 和 4-MBA 标记 Ag@SHNPs 的扫描电镜照片。可以看出无论是否引入 4-MBA, 在负载银纳米团簇后的颗粒形貌上均为表面粗糙的球形形貌, 且粒径均保持在 80 nm 左右, 表明引入拉曼信号分子 4-MBA 对材料基本的形貌结构无明显影响。为了进一步证明银元素的存在, 我们对样品进行了 EDS 能谱分析。如图 6(c,d)所示, Ag@SHNPs 和 4-MBA 标记 Ag@SHNPs 均显示出了银元素的存在。值得注意的是, 由于样品是在铝箔上制样, 因此图谱中 Al 元素的含量很高。此外, 通过电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP) 分析

测得 Ag 元素在硅基杂化颗粒上的负载量为 31.76% (质量比), 负载效率为 40.14%。

从图 7(a)中的水合动力学粒径分布图可以看到, 对 SHNPs 进行拉曼报告分子 4-MBA 标记后, 其水合动力学粒径无明显变化, 尺寸在 80 nm 左右。而在表面负载银纳米团簇之后, DLS 测得水合动力学粒径均有一定程度的增大。从图 7(b)中可以看出, SHNPs 的 Zeta 电位在 -33 mV 左右。这主要是由于颗粒表面电负性的羟基和巯基所致。当负载银纳米团簇之后, Zeta 电位由负变正, 这主要是由于表面的巯基被取代, Ag<sup>+</sup>在杂化颗粒表面巯基上原位还原造成的。上述变化也进一步证明了银纳米团簇成功地被修饰到 SHNPs 的表面。

为了更直观地表征整个还原过程, 采用傅里叶转换红外光谱对 CMs、SHNPs、Ag@SHNPs 进行表面化学组成分析。如图 7(c)所示, 2555 cm<sup>-1</sup> 处为巯



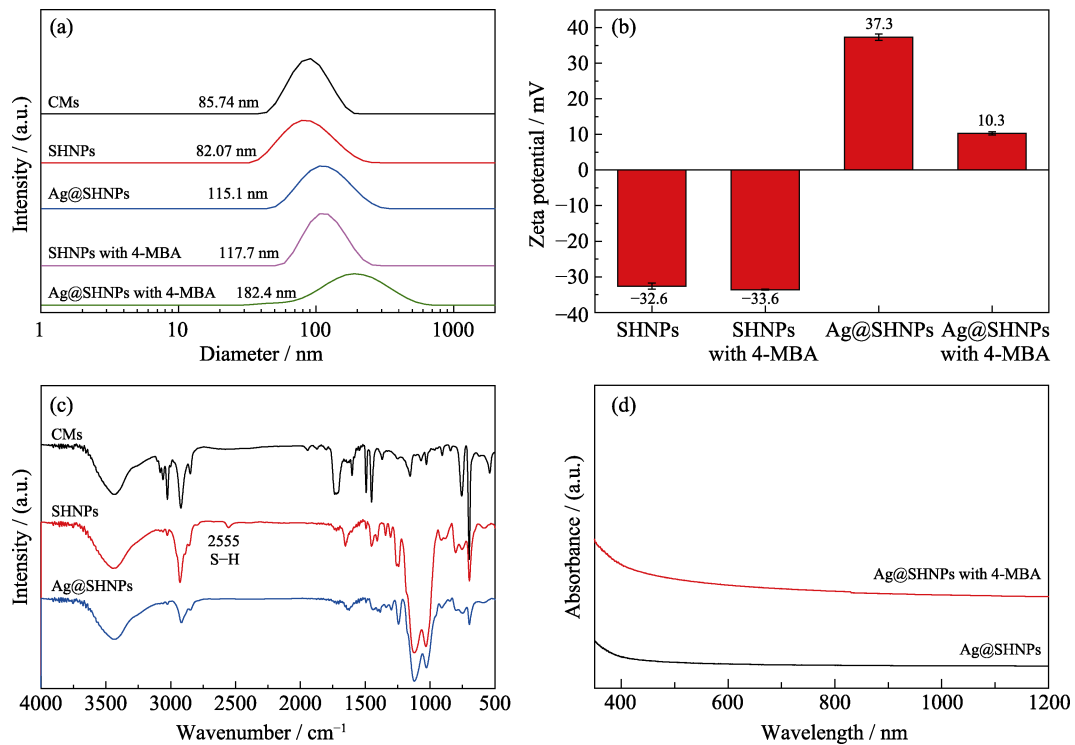


图 7 SHNPs、4-MBA 标记的 SHNPs、Ag@SHNPs、4-MBA 标记的 SHNPs 的(a)水合动力学粒径分布和(b)Zeta 电位图, (c)CMs、SHNPs、Ag@SHNPs 的 FT-IR 图谱, 以及(d)Ag@SHNPs、4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 的紫外-可见吸收光谱

Fig. 7 (a) Hydrodynamic diameter distributions and (b) histogram of Zeta potentials of SHNPs, SHNPs with 4-MBA, Ag@SHNPs, Ag@SHNPs with 4-MBA, (c) FT-IR spectra of CMs, SHNPs, Ag@SHNPs, and (d) UV-Vis spectra of Ag@SHNPs, Ag@SHNPs with 4-MBA

基伸缩振动峰, SHNPs 上巯基的特征峰说明 MPTMS 成功引入并稳定了 CMs 的结构, 而 Ag@SHNPs 巯基特征峰消失也说明巯基被消耗,  $\text{Ag}^+$  成功还原成银单质。同时, 位于  $1036 \text{ cm}^{-1}$  处的强特征吸收峰, 对应于有机硅稳定纳米颗粒的 Si-O-Si 伸缩振动, 说明成功引入了 MPTMS, 并且在 Ag@SHNPs 中该峰没有消失, 也说明负载银纳米团簇后并不会破坏先前形成的有机硅氧化骨架。UV-Vis 光谱是确定颗粒形成和扩散的常用表征技术之一, 据文献报道<sup>[19]</sup>, 银纳米颗粒往往在  $400 \text{ nm}$  波长处存在明显的吸收峰。图 7(d) 是材料的 UV-Vis 光谱, 未观察到纳米银的特征吸收峰, 这主要是由于银纳米团簇超小的原因<sup>[20]</sup>。此外, Ag@SHNPs 的 XRD 图谱(图 8)中没有出现 PDF 卡片中四个银颗粒的衍射峰, 进一步说明没有较大的银纳米颗粒形成, 而材料是以尺寸较小的银纳米团簇的形式存在。

## 2.2 稳定性研究

据文献<sup>[21]</sup>报道, 由于常规胶束通常会在稀释条件下结构发生破坏并分解成游离的表面活性剂。因此在体内复杂环境下, 纳米材料的生物稳定性是一项非常重要的指标。为了证明该硅基杂化纳米颗粒(杂化胶束)被注射到体内后, 其自身复合结构不会

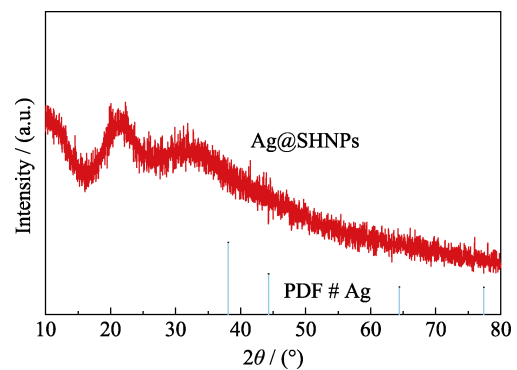


图 8 Ag@SHNPs 的 XRD 图谱  
Fig. 8 XRD pattern of Ag@SHNPs

因稀释发生变化, 本实验研究了不同稀释倍数下的 CMs、SHNPs、Ag@SHNPs 在水中的水合动力学粒径。如图 9(a) 所示, 经过不同倍数的稀释后, SHNPs、Ag@SHNPs 仍能分别保持  $80$ 、 $100 \text{ nm}$  左右的水合动力学粒径。相比之下, 没有经过硅稳定的 CMs 的水合动力学粒径呈现先增大后减小的趋势, 这是由于聚合物浓度降低, 结构发生改变所致。

此外, 为了模拟体内复杂的生理环境, 本实验监测了 Ag@SHNPs 在不同细胞培养基中的动力学尺寸变化。如图 9(b) 所示, 孵育  $7 \text{ d}$  后, Ag@SHNPs 在 RPMI 1640 培养基和 DMEM 培养基中的水合动力

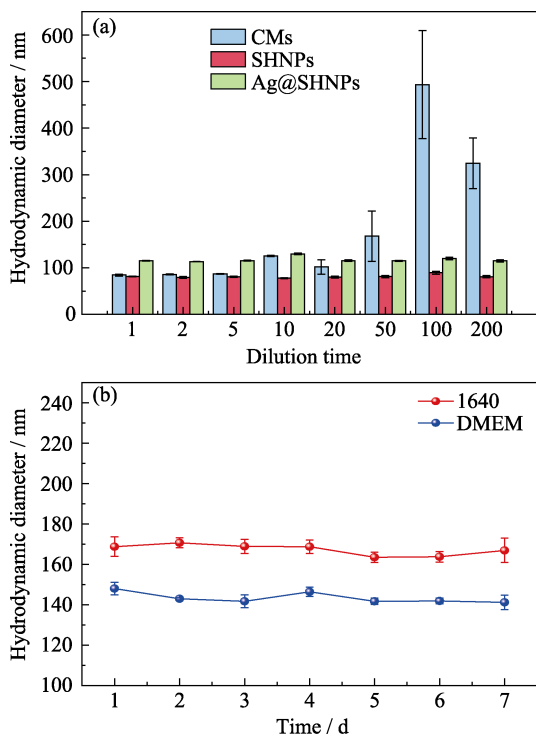


图 9 (a)CMs、SHNPs、Ag@SHNPs 在水中不同稀释倍数下的水合动力学粒径和(b)Ag@SHNPs 7 d 内分散在 RPMI 1640 培养基和 DMEM 培养基中的水合动力学粒径  
Fig. 9 (a) Hydrodynamic diameters of CMs, SHNPs, and Ag@SHNPs in water against dilution, and (b) hydrodynamic diameters of Ag@SHNPs dispersed in RPMI 1640 medium and DMEM medium in 7 d

Colorful figures are available on website

学粒径均无明显变化, 表明其具有良好的生物稳定性。

### 2.3 细胞毒性研究

为了研究 Ag@SHNPs 和 4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 的细胞毒性, 本实验选取了四种细胞系: 人肝癌细胞 SMMC-7721、小鼠胚胎成纤维细胞 NIH-3T3、小鼠胚胎成纤维细胞 MEF、人类永生表皮细胞 HaCaT 作为细胞模型, 并采用增强型 CCK-8 试剂盒对材料的细胞存活率进行检测。据文献<sup>[22]</sup>报道, 传统的银纳米颗粒在银浓度达到 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 对多种细胞系均存在一定的细胞毒性。如图 10 所示, 当银浓度高达 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, Ag@SHNPs 和 4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 分别与上述四种细胞系共培养 24 h 后, 几乎都保持接近 100% 的细胞存活率, 表明 Ag@SHNPs 和 4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 均具有良好的细胞生物相容性。

### 2.4 SERS 性能

对 Ag@SHNPs 溶液进行拉曼报告分子 4-MBA 信号检测结果如图 11。4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 溶液出现了 4-MBA 在 1582、1076  $\text{cm}^{-1}$  的拉曼特征峰<sup>[23]</sup>, 而对照组的 Ag@SHNPs 材料自身溶液以及纯 4-MBA 溶液均未出现上述两个明显的拉曼特征

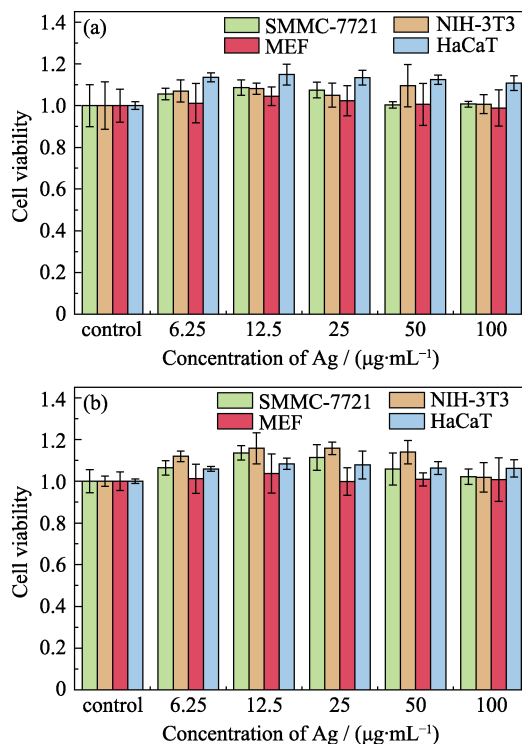


图 10 SMMC-7721 细胞、NIH-3T3 细胞、MEF 细胞、HaCaT 细胞与不同银浓度的(a)Ag@SHNPs、(b)4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 孵育 24 h 后的 CCK-8 细胞存活率

Fig. 10 CCK-8 cell viabilities of SMMC-7721, NIH-3T3, MEF, and HaCaT cells incubated with different Ag concentrations of (a) Ag@SHNPs and (b) Ag@SHNPs with 4-MBA for 24 h

Colorful figures are available on website

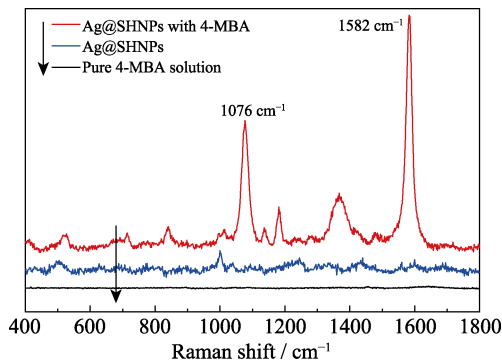


图 11 Ag@SHNPs、4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 以及纯 4-MBA 分子溶液在 532 nm 激发波长下的拉曼光谱图

Fig. 11 Raman spectra of Ag@SHNPs, Ag@SHNPs with 4-MBA and pure 4-MBA solution under 532 nm excitation

峰。同时按照下列公式计算了增强因子  $EF$  (Enhancement factor)<sup>[24]</sup>:

$$EF = \frac{I_{\text{SERS}}/c_{\text{SERS}}}{I_{\text{RS}}/c_{\text{RS}}} \quad (1)$$

式中:  $I_{\text{SERS}}$ 、 $I_{\text{RS}}$  分别为探测分子在、未在增强基底上的特征峰峰强度;  $c_{\text{SERS}}$ 、 $c_{\text{RS}}$  分别为探测分子在、未在增强基底上的浓度。经(1)式估算出 Ag@SHNPs 的增强因子约为  $10^5$ , 这与文献中报道的数值( $10^5$ )

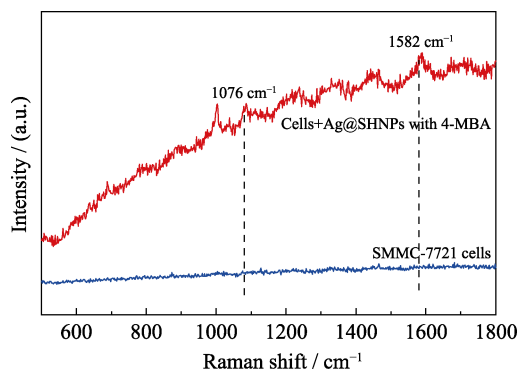


图 12 SMMC-7721 细胞与 4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 共培养 24 h 后的拉曼光谱图

Fig. 12 Raman spectra of SMMC-7721 cells incubated with Ag@SHNPs with 4-MBA for 24 h

相当<sup>[25]</sup>。因此, Ag@SHNPs 具有良好的 SERS 检测能力。

进一步研究 Ag@SHNPs 与 SMMC-7721 细胞共培养后的 SERS 性能发现(图 12), 纯 SMMC-7721 细胞并没有显示出任何拉曼特征峰, 而与 4-MBA 标记的 Ag@SHNPs 共培养后, 能检测到 4-MBA 在 1582、1076  $\text{cm}^{-1}$  的拉曼特征峰。值得注意的是, 整条谱线呈上升趋势, 这可能是仪器误差而造成的基线上扬。以上结果证明了 Ag@SHNPs 被拉曼报告分子 4-MBA 标记后, 在细胞层面尤其是对肿瘤细胞上仍具有 SERS 检测能力。

### 3 结论

本研究发展了一种简便的原位还原策略, 即利用有机硅杂化骨架中丰富的巯基作为还原位点, 成功构建了负载银簇的硅基杂化纳米颗粒(Ag@SHNPs)。所制备得到的 Ag@SHNPs 具有良好的分散性、尺寸均一性和优异的生物稳定性。细胞实验表明, 该纳米颗粒在多种肿瘤细胞模型及正常细胞模型中均未显示出明显的细胞毒性。以 Ag@SHNPs 作为 SERS 基底, 对其进行探针分子 4-MBA 标记后, 其拉曼信号得到较强的提升。因此, 该纳米杂化颗粒有望作为 SERS 基底材料用于各类疾病的高灵敏度生物检测和一体化诊疗。

### 参考文献:

[1] FLEISCHMANN M, HENDRA P J, MCQUILLAN A J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 1974, **26(2)**: 163–166.  
 [2] STILES P L, DIERINGER J A, SHAH N C, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2008, **1**: 601–626.  
 [3] LIN T, SONG Y L, LIAO J, et al. Applications of surface-enhanced Raman spectroscopy in detection fields. *Nanomedicine*,

2020, **15(30)**: 2971–2989.  
 [4] ZHANG D, YOU H, YUAN L, et al. Hydrophobic slippery surface-based surface-enhanced Raman spectroscopy platform for ultrasensitive detection in food safety applications. *Analytical Chemistry*, 2019, **91(7)**: 4687–4695.  
 [5] GUO H, HAMLET L C, HE L, et al. A field-deployable surface-enhanced Raman scattering (SERS) method for sensitive analysis of silver nanoparticles in environmental water. *Science of the Total Environment*, 2019, **653**: 1034–1041.  
 [6] D'ACUNTO M, CIONI P, GABELLIERI E, et al. Exploiting gold nanoparticles for diagnosis and cancer treatments. *Nanotechnology*, 2021, **32(19)**: 192001.  
 [7] HAN C, YAO Y, WANG W, et al. Rapid and sensitive detection of sodium saccharin in soft drinks by silver nanorod array SERS substrates. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, **251**: 272–279.  
 [8] WU C F, HU Q, XIAO C Y, et al. Preparation of Ag@Au core-shell nanoparticles on silicon wafer and their SERS properties. *Journal of Xi'an Technological University*, 2019, **39(3)**: 304–310.  
 [9] RYCENGA M, COBLEY C M, ZENG J, et al. Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chemical Reviews*, 2011, **111(6)**: 3669–3712.  
 [10] HUSANU E, CHIAPPE C, BERNARDINI A, et al. Synthesis of colloidal Ag nanoparticles with citrate based ionic liquids as reducing and capping agents. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2018, **538**: 506–512.  
 [11] SOLOVYEVA E V, UBYIVOVK E V, DENISOVA A S. Effect of diamino stilbene as a molecular linker on Ag nanoparticles: SERS study of aggregation and interparticle hot spots in various environments. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2018, **538**: 542–548.  
 [12] ARAKI J, URATA T. Cellulose nanowhisker/silver nanoparticle hybrids sterically stabilized by surface poly (ethylene glycol) grafting. *Langmuir*, 2020, **36(36)**: 10868–10875.  
 [13] NIU D, LI Y, SHI J. Silica/organosilica cross-linked block copolymer micelles: a versatile theranostic platform. *Chemical Society Reviews*, 2017, **46(3)**: 569–585.  
 [14] JIA X, ZHANG Y, ZOU Y, et al. Dual intratumoral redox/enzyme-responsive NO-releasing nanomedicine for the specific, high-efficacy, and low-toxic cancer therapy. *Advanced Materials*, 2018, **30(30)**: 1704490.  
 [15] NIU D, LI Y, MA Z, et al. Preparation of uniform, water-soluble, and multifunctional nanocomposites with tunable sizes. *Advanced Functional Materials*, 2010, **20(5)**: 773–780.  
 [16] LIU Y, LI Y, KANG Y, et al. Silver nanoparticle generators: silicon dioxide microspheres. *Chemistry-A European Journal*, 2017, **23(26)**: 6244–6248.  
 [17] KHOUGAZ K, ZHONG X F, EISENBERG A. Aggregation and critical micelle concentrations of polystyrene-*b*-poly (sodium acrylate) and polystyrene-*b*-poly (acrylic acid) micelles in organic media. *Macromolecules*, 1996, **29(11)**: 3937–3949.  
 [18] XIA Z, BAIRD L, ZIMMERMAN N, et al. Heavy metal ion removal by thiol functionalized aluminum oxide hydroxide nanowhiskers. *Applied Surface Science*, 2017, **416**: 565–573.  
 [19] DESAI R, MANKAD V, GUPTA S K, et al. Size distribution of silver nanoparticles: UV-visible spectroscopic assessment. *Nanoscience and Nano-technology Letters*, 2012, **4(1)**: 30–34.  
 [20] ZHOU Y, WANG J, YANG G, et al. Cysteine-rich protein-templated silver nanoclusters as a fluorometric probe for mercury (II) detection. *Analytical Methods*, 2019, **11(6)**: 733–738.  
 [21] LU Y, YUE Z, XIE J, et al. Micelles with ultralow critical micelle concentration as carriers for drug delivery. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, **2(5)**: 318–325.  
 [22] MUKHERJEE S G, O'CLAONADH N, CASEY A, et al. Comparative *in vitro* cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicology In Vitro*, 2012, **26(2)**: 238–251.  
 [23] HUANG X B, WU S H, HU H C, et al. AuNanostar@ 4-MBA@ Au core-shell nanostructure coupled with exonuclease III-assisted cycling amplification for ultrasensitive SERS detection of ochratoxin A. *ACS sensors*, 2020, **5(8)**: 2636–2643.  
 [24] LE RU E C, BLACKIE E, MEYER M, et al. Surface enhanced Raman scattering enhancement factors: a comprehensive study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007, **111(37)**: 13794–13803.  
 [25] MARKINA N E, MARKIN A V, ZAKHAREVICH A M, et al. Multifunctional silver nanoparticle-doped silica for solid-phase extraction and surface-enhanced Raman scattering detection. *Journal of Nanoparticle Research*, 2016, **18(12)**: 1–9.