

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.18.002

# 对硝基苯硫酚分子内嵌的星形表面增强拉曼散射金 "套娃" 纳米颗粒用于肿瘤拉曼影像的初步研究\*

李明旺 仇媛媛 范晨晨 张永明 崔凯 肖泽宇<sup>△</sup>

(上海交通大学医学院基础医学院药理与化学生物学系 上海 200025)

**摘要 目的:**制备对硝基苯硫酚(4-Nitrobenzenethiol, 4-NBT)分子内嵌的星形表面增强拉曼散射(Surface enhanced Raman Scattering, SERS)金 "套娃" 纳米颗粒,测定其拉曼增强效果和应用于细胞以及活体肿瘤拉曼影像的可行性。**方法:**以种子介导法先后制备金纳米星及星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒,采用透射电镜观察其形貌,激光粒度分析仪测定其粒径及 Zeta 电位,拉曼光谱仪测定其拉曼光谱,考察其对 A549 细胞的拉曼成像效果,建立 A549 皮下瘤模型,考察其对活体皮下瘤的成像效果。**结果:**制备并优化的金纳米星粒径较小,为 60.5 nm,其针尖密度较高,以此为核心制备的星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒形态规整,粒径约为 66.7 nm,Zeta 电位约为 -16.6 mV,拉曼增强效果提升至其前驱体金纳米星的 5.3 倍,能够实现对 A549 细胞及 A549 皮下瘤的拉曼成像。**结论:**所制备的星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒形态规整均一,拉曼增强效果较好,能实现对细胞及活体肿瘤的拉曼影像。

**关键词:**金纳米星;星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒;肿瘤拉曼影像

中图分类号:R-33;R730.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)18-3406-06

## Preliminary Study of 4-NBT Embedded Star-shape SERS Au Nanomaterials for Tumor Raman Imaging\*

LI Ming-wang, QIU Yuan-yuan, FAN Chen-chen, ZHANG Yong-ming, CUI Kai, XIAO Ze-yu<sup>△</sup>

(Department of Pharmacology and Chemical Biology, Institute of Medical Science, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

**ABSTRACT Objective:** To prepare 4-NBT embedded star-shape SERS Au nanomaterials (Gap-enhanced core-shell Au nanostar, GANST) and study feasibility of these nanocomplex for cell and intravital tumor Raman imaging. **Methods:** Au nanostars (ANST) and GANST were prepared by seed-mediated method. The morphology of these nanoparticles were observed by transmission electron microscopy (TEM). The particle size and zeta potential were measured by dynamic light scattering (DLS). The SERS spectra were determined by Raman microscopy. Raman imaging of A549 cells and A549 subcutaneous tumor with GANST were researched. **Results:** The optimized ANST which was 60.5 nm in size had lots of tips on its surface. The size of GANST was 66.7 nm and the zeta potential was -16.6mV. The Raman intensity of GANST was almost 5.3 times higher than that of ANST, and the GANST could be used for A549 cell Raman imaging and intravital A549 subcutaneous tumor Raman imaging. **Conclusion:** The as-prepared GANST were uniform, the SERS property of GANST was satisfied and they could be used for cell and intravital tumor Raman imaging.

**Key words:** Au nanostar; Star-shape SERS Au nanomaterials; Tumor Raman imaging

**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R730.4 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2018)18-3406-06

### 前言

肿瘤影像对于肿瘤的诊断与治疗均具有重要的指导意义。当前已有的医学成像手段主要有光声成像、近红外荧光成像、磁共振成像及电子计算机断层扫描等<sup>[1-3]</sup>。而拉曼影像作为一种基于拉曼分子指纹图谱的非侵入性新型成像模式<sup>[4-7]</sup>,其相比传统的成像手段具有更高的特异性、灵敏度、稳定性以及分辨率<sup>[8,9]</sup>,因而具有潜在的临床应用价值。然而,分子的固有拉曼信号极弱,这在很大程度上限制其实际应用。将拉曼分子吸附在纳米贵金属表面,由于表面等离子共振效应,金属纳米结构表面

局部电磁场极大增强("热点")<sup>[10]</sup>,位于这些"热点"区的拉曼分子信号可被放大几个数量级,这即是所谓的表面增强拉曼散射(Surface enhanced Raman Scattering, SERS),SERS的发现使得拉曼影像的实际应用成为了可能。现有的用于拉曼影像的 SERS 探针基本都是基于金属核心-拉曼分子-SiO<sub>2</sub>/PEG 的核壳结构<sup>[11]</sup>,而单一的金属核心 SERS "热点"较少,拉曼增强效果有限。最近,一种由拉曼分子内嵌于金球核壳之间的纳米"套娃"结构受到了广泛的关注<sup>[12-17]</sup>。由拉曼分子所构筑的纳米级缝隙区域的电磁场得到极大增强,且分子内嵌金球核壳层间,能在复杂环境中保持良好的稳定性。然而,球形"套娃"结

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(31671003; 81471779; 81741014)

作者简介:李明旺(1992-),硕士研究生,主要研究方向:纳米医学,E-mail: limingwang@sjtu.edu.cn,电话:18862300609

<sup>△</sup> 通讯作者:肖泽宇,E-mail: zxiao@sjtu.edu.cn,电话:021-63846590-776415

(收稿日期:2018-04-09 接受日期:2018-05-05)

构内部缝隙区域面积相对较小,且 SERS" 热点" 仍相对较少,能应用到活体内的较少。

基于此,我们设计了一种星形 SERS 金" 套娃" 结构,金纳米星由于其针尖的" 避雷针效应"<sup>[18,19]</sup>因而具有更多的 SERS" 热点"<sup>[20]</sup>,且其粗糙的表面面积相比球更大,可容纳更多的拉曼分子,而核壳" 套娃" 结构赋予其更多的 SERS" 热点" 及更佳稳定性,我们成功制备了这一结构并将其应用于活体肿瘤拉曼影像。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

十六烷基三甲基氯化铵( $C_{19}H_{42}ClN$ ), $\geq 98.0\%$ , 抗坏血酸( $C_6H_8O_6$ ), $\geq 99.7\%$ , 四水合氯金酸( $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$ ), $\geq 47.8\%$ , 硝酸( $HNO_3$ ), $65.0\%-68.0\%$ , 均购自国药集团化学试剂有限公司, 盐酸( $HCl$ ), $36.0\%-38.0\%$ , 购自江苏强盛功能化学股份有限公司, 无水乙醇( $EtOH$ ), 购自上海凌峰化学试剂有限公司, 聚乙烯吡咯烷酮(10000)(PVP-k10), 购自 Sigma-Aldrich, 二甲基甲酰胺( $C_3H_7NO$ ), $99.5\%$ , 购自麦克林, 二甲基亚砜( $C_2H_6OS$ ), $99\%$ , 购自百灵威科技有限公司, 对硝基苯磺酰( $C_6H_5NO_2S$ ), 购自 Fluorochem, 铜网碳支持膜, T300-Cu, 购自北京新兴百瑞技术有限公司, 胎牛血清, 购自 Gibco。

超声波双频清洗机购自宁波新芝生物科技股份有限公司, BT224S 型电子天平购自德国 Sartorius, 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪购自英国 Malvern, 场发射透射电子显微镜-能谱仪购自 FEI, 超纯水系统购自德国 Millipore, 小型冷冻离心机购自美国 Thermo Scientific, 激光显微共焦拉曼光谱仪购自英国 Renishaw。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 金纳米星与星形 SERS 金" 套娃" 纳米颗粒的制备

(1)金纳米星的制备与优化。采用 PVP 体系制备金纳米星(Au nanostar, ANST)<sup>[20]</sup>。第一步制备金种子,称取 50 mg 柠檬酸钠置于 100 mL 单口烧瓶,加入 50 mL  $dH_2O$  磁力搅拌溶解,得到溶液 A。将 1.25 mL  $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$   $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$  以  $dH_2O$  稀释至 100 mL 得到溶液 B。溶液 A、B 分别置于  $60^\circ\text{C}$  油浴中 30 min。之后将溶液 A 迅速加入溶液 B 中,并将混合后的体系升温至  $85^\circ\text{C}$ ,磁力搅拌 600 rpm, 2.5 h。可观察到溶液从淡黄色变为紫黑色并最终变为酒红色。之后将反应液冷却至室温,加入 PVP-k10 120 mg, 磁力搅拌 600 rpm, 12 h。12 h 后,将反应液分装至 50 mL 离心管,离心 14000 rpm, 30 min 后以 4 mL 无水乙醇分散,即得到金种子溶液,置于  $4^\circ\text{C}$  避光保存。第二步生长金纳米星,将 1.6 g PVP-k10 溶于 20 mL N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide, DMF) 并加入 0.5 mL  $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的  $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$ , 得到生长液。磁力搅拌 600 rpm, 3 min 后加入一定量的种子溶液,并在室温下继续搅拌 1 h,直至溶液颜色不再变化即可得到金纳米星。在金纳米星的生长过程中,可通过调节加入的金种子的量来控制纳米星表面的针尖密度和纳米星的尺寸大小。(2)拉曼分子的修饰。取制备好的 DMF 分散的金纳米星 10 mL,超声下(40 KHz)加入  $5\ \mu\text{L}$   $10\text{ mM}$  4-NBT 的二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液,超声 15 min 后,以等量  $dH_2O$  水洗三遍,之后再以 10 mL 0.1 M CTAC 分散得

4-NBT 修饰的金纳米星 ASTN。(3)星形 SERS 金" 套娃" 纳米颗粒的制备。先按照上述方法制备修饰拉曼分子 4-NBT 的金纳米星(ASTN)作为核心。接下来配制生长液<sup>[21]</sup>,在 30 mL 样品瓶中加入 10 mL 0.2 M CTAC 溶液, $60\ \mu\text{L}$   $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的  $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$  溶液和 300  $\mu\text{L}$  0.2 M 的 AA 溶液,混匀后得无色透明生长液。在超声下(40 KHz)加入 10 mL ASTN,超声 20 min。之后以等量  $dH_2O$ ,无水乙醇, $dH_2O$  交替洗涤后再以等量  $dH_2O$  分散可得星形 SERS 金" 套娃" 纳米颗粒(Gap-enhanced core-shell Au nanostar, GANST)。

#### 1.2.2 金纳米星 (ANST) 与星形 SERS 金" 套娃" 纳米颗粒 (GANST) 的表征

(1)透射电镜表征:将上述制备的金纳米星及星形 SERS 金" 套娃" 纳米颗粒水洗后稀释至相应浓度,取  $10\ \mu\text{L}$  溶液滴加于铜网碳支持膜表面形成液滴,待水分自然挥干后置于透射电镜下观察。(2)消光光谱表征:取上述制备的纳米结构的稀释液 2 mL 于石英比色皿中,采用紫外-可见光谱仪进行波长扫描。扫描范围为 400-1000 nm,扫描间隔为 1 nm,以超纯水作为基线参比。(3)动态光散射表征:取上述制备的纳米结构的稀释液采用动态光散射仪测定其粒径、Zeta 电位及多分散系数(Polydispersity index, PDI)。(4)拉曼光谱表征:取上述制备的拉曼分子修饰的金纳米星及星形 SERS 金" 套娃" 纳米颗粒稀释后的溶液  $20\ \mu\text{L}$  滴加在锡箔纸包裹的玻璃片上,置于拉曼光谱仪中以 785 nm 激发波长采集拉曼光谱。

#### 1.2.3 星形 SERS 金" 套娃" 纳米颗粒 (GANST) 用于细胞拉曼成像

(1)样品制备:取对数生长期的 A549 细胞,以 20 w/ 孔的量接种于 20 mm 玻底培养皿中培养过夜,待细胞贴壁生长后弃去废弃培养基,加入以培养基分散的 GANST ( $680\ \mu\text{M}$ ,  $100\ \mu\text{L}$ ), $37^\circ\text{C}$  培养 24 h 后弃去废液,以新鲜培养基 1 mL 洗两遍,以  $1 \times$  PBS 1 mL 洗两遍。加入 4% 多聚甲醛 1 mL 固定细胞 20 min,之后以  $1 \times$  PBS 1 mL 洗一遍,并加入  $1 \times$  PBS  $100\ \mu\text{L}$  于  $4^\circ\text{C}$  保存。(2)拉曼成像:将上述制备的细胞样品置于拉曼光谱仪中采集拉曼光谱。拉曼成像模式为 Streamline HR,激光器选用 830 nm,1200 光栅,激光输出功率为 10.7 mW,曝光时间 1 s,扫描范围中心值为  $1200\text{ cm}^{-1}$ 。其后以其在  $1331\text{ cm}^{-1}$  处的拉曼峰为特征峰,进行细胞成像。

#### 1.2.4 星形 SERS 金" 套娃" 纳米颗粒 (GANST) 用于活体肿瘤拉曼成像

(1)A549 皮下瘤模型的构建。收集对数生长期的 A549 细胞,以基质胶与  $1 \times$  PBS 按体积比 1:1 的混合液分散,调整细胞浓度为  $5 \times 10^7$  个/mL。取  $100\ \mu\text{L}$  细胞悬液以皮下注射的方式注射到裸鼠( $\sim 20\text{ g}$ )背部,待肿瘤生长至  $60\text{ mm}^3$  时使用。肿瘤体积大小按公式  $V = (L \cdot W^2) / 2$  计算,L 为肿瘤最长径(mm),W 为肿瘤最短径(mm),通过游标卡尺测量可得。实验所用裸鼠来自上海灵畅生物科技有限公司,并遵循上海交通大学医学院实验动物科学部的要求饲养。(2)活体肿瘤拉曼影像。取 GANST  $680\ \mu\text{M}$  1 mL 离心并以  $20\ \mu\text{L}$   $1 \times$  PBS 分散。将 GANST 的 PBS 溶液注射到荷瘤小鼠背部的瘤内,24 h 后以异氟烷麻醉小鼠,置于拉曼光谱中采集肿瘤区域的拉曼光谱。拉曼成像模式为 Streamline HR,激光器选用 830 nm,1200 光栅,激光输出功率为 105 mW,曝光时间 2 s,扫描范围中心值为  $1200\text{ cm}^{-1}$ 。其后以 GANST 在  $1331\text{ cm}^{-1}$  处的拉曼峰为特征峰,进行肿瘤近边缘区域的拉曼成像。

1.3 统计学分析方法

将拉曼光谱原始数据输入 GraphPad Prism 7 软件中,以拉曼位移值为横坐标,拉曼信号强度值为纵坐标得到拉曼光谱图。

2 结果

2.1 金纳米星的优化与星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒的表征

在制备金纳米星时,保持生长液的量不变,可通过调节加入金种子的量来控制金纳米星表面的针尖密度。图 1(A-C) TEM 图显示当所加入的金种子的量逐渐减少,所形成的金纳米星表面的针尖数量逐渐增多。而针尖处可产生大量的 SERS "热点",能够极大的增强处于这些位置的拉曼分子的拉曼信号。因而,针尖越多,其 SERS 性质越佳。消光光谱(图 1(D))显示,随着加入的金种子的量的减少,金纳米星的 LSPR 峰位逐渐红

移,表明其粒径逐渐增大,这一结论与 DLS 数据(表 1)相一致。为了获得更好的 SERS 性质,我们进一步调节了金纳米星的针尖密度。图 1(E)是控制金种子的量为 40  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  时所形成的的纳米星的消光光谱,随着金种子的量的减少, LSPR 峰位进一步红移, DLS 数据(表 1)显示其粒径也进一步增大,并且 PDI 值逐渐减小,这或许是因为当金纳米星表面的针尖密度达到饱和时,再次减少金种子的量并不能够使每个金颗粒产生更多的针尖,而多余的生长液在金纳米星表面继续生长,使得原有的针尖相互连接,针尖数量逐渐减少而颗粒粒径逐渐增大,且颗粒变得更加均一圆润,因而 PDI 值变小。如此,纳米星的 SERS 性质则被削弱且较大的粒径会限制其在生物体内的应用。因此,选用 50  $\mu\text{L}$  的金种子所制备的金纳米星或许是理想的选择。

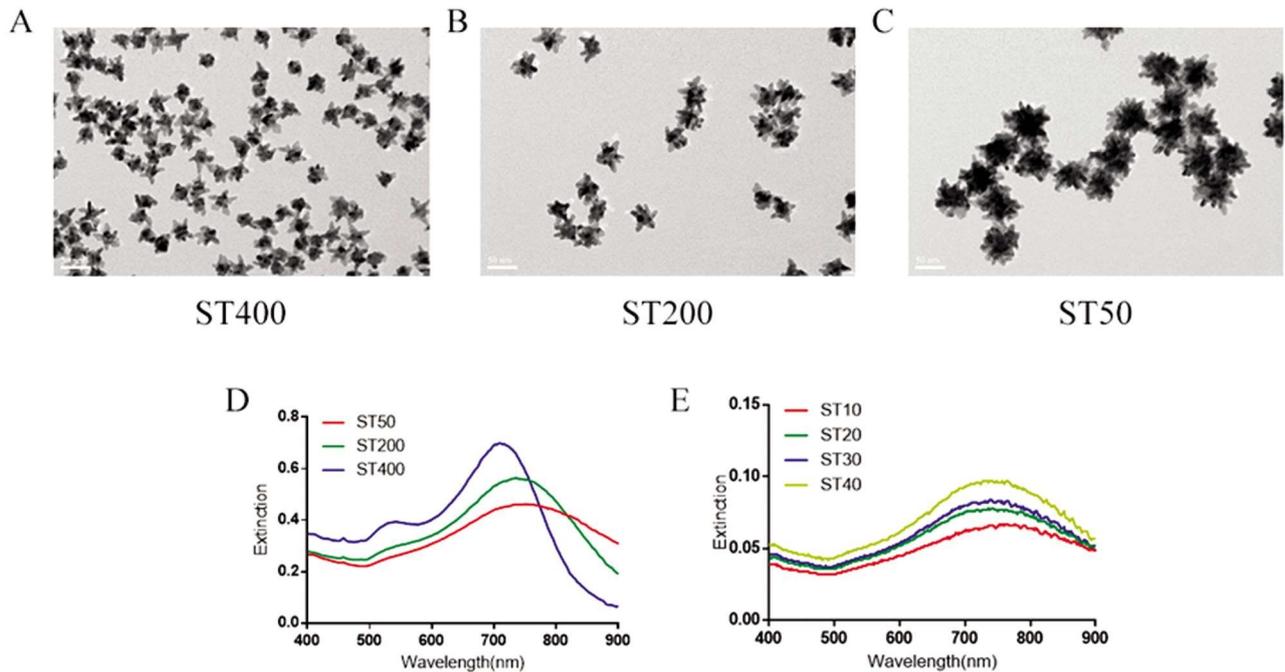


图 1 (A-C)金纳米星透射电镜图(标尺:50 nm),加入金种子的量依次为(A)400  $\mu\text{L}$ , (B) 200  $\mu\text{L}$ , (C)50  $\mu\text{L}$ , (D)与(A-C)相对应的金纳米星的消光光谱, (E)金纳米星的消光光谱,加入金种子的量依次为 40  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ 。

Fig.1 (A-C) TEM of Au nanostar (Scale bar: 50 nm), the amount of Au seeds are (A) 400  $\mu\text{L}$ , (B) 200  $\mu\text{L}$  (C) 50  $\mu\text{L}$ , (D) Extinction spectra of Au nanostar corresponding to (A-C), (E) Extinction spectra of Au nanostar, the amount of Au seeds are 40  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  respectively.

表 1 控制不同量金种子所制备的金纳米星的粒径及电位

Table 1 The Size and Zeta potential of ANST with different amount of Au seeds

Sample	Size/nm	PDI	Zeta potential/mV
ST400	4.6 $\pm$ 0.1	0.568 $\pm$ 0.006	-21.4 $\pm$ 0.6
ST200	6.7 $\pm$ 0.6	0.415 $\pm$ 0.067	-29.7 $\pm$ 1.3
ST50	60.5 $\pm$ 11.3	0.236 $\pm$ 0.019	-18.9 $\pm$ 0.4
ST40	64.2 $\pm$ 1.7	0.192 $\pm$ 0.016	-25.8 $\pm$ 0.5
ST30	76.5 $\pm$ 2.2	0.138 $\pm$ 0.012	-26.6 $\pm$ 0.2
ST20	91.1 $\pm$ 4.3	0.109 $\pm$ 0.020	-24.3 $\pm$ 0.4
ST10	111.1 $\pm$ 3.8	0.094 $\pm$ 0.022	-25.8 $\pm$ 0.5

接下来,我们选用 50  $\mu\text{L}$  的金种子所制备的金纳米星(Au nanostar, ANST)为核心,修饰以 4-NBT 拉曼分子,并在颗粒表

面包覆纳米金壳形成星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒(Gap-enhanced core-shell Au nanostar, GANST)。如图 2 (A) 所示,

GANST 的前驱体 ANST 形态规整, 针尖曲率较大, 颗粒均一, 平均粒径为  $60.5 \pm 11.3$  nm(表 2), PDI 较小, 为  $0.236 \pm 0.019$ 。在包覆了壳层之后(图 2(B)), TEM 下可见其针尖变得较为圆润, 形态仍均一规整, 平均粒径为  $66.7 \pm 17.4$  nm, PDI 变化不大。由于 ANST 表面针尖的不规则性, 包覆壳层之后, 各个针尖处壳层的厚度以及针尖的取向不一致, 因而未见明显的由拉曼小分子 4-NBT 所构筑的缝隙区域。形成 GANST 后, 其消光峰

红移(图 2(C)), 表明折射性质发生变化, 这与 DLS 所测得的粒径变大的结果相一致。图 2(D)是标记了 4-NBT 分子的星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒(GANST)与金纳米星(ANST)的拉曼光谱, 如图所示, 包覆壳层之后, GANST 的拉曼信号显著改善, 位于  $1331 \text{ cm}^{-1}$  处的峰位强度提高为原来的约 5.3 倍, 表明其具有较好的拉曼增强性质。

表 2 金纳米星和星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒的粒径及电位

Table 2 The Size and Zeta potential of ANST and GANST

Sample	Size/nm	PDI	Zeta potential/mV
ANST	$60.5 \pm 11.3$	$0.236 \pm 0.019$	$-18.9 \pm 0.4$
GANST	$66.7 \pm 17.4$	$0.226 \pm 0.005$	$-16.6 \pm 1.5$

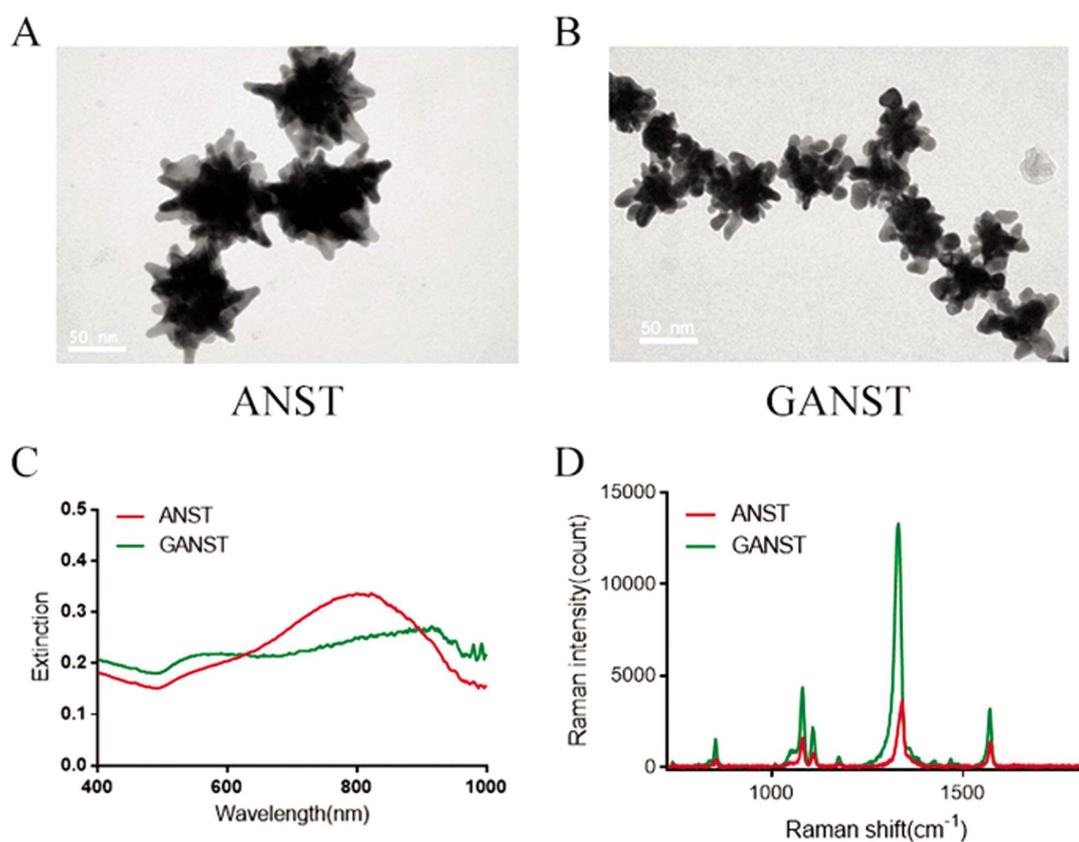


图 2 金纳米星(A)和星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒(B)的透射电镜图(标尺: 50 nm), (C)金纳米星和星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒的消光光谱, (D)修饰 4-NBT 分子的金纳米星与星形 "套娃" 纳米颗粒的拉曼光谱

Fig.2 TEM of ANST (A) and GANST (B) (Scale bar: 50 nm), (C) Extinction spectra of ANST and GANST, (D) Raman spectra of 4-NBT on ANST and embedded in GANST

## 2.2 星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒用于细胞拉曼成像

将 GANST( $680 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{L}$ )与 A549 细胞共孵育 24 h 后, 采用拉曼光谱仪对细胞进行 Streamline HR 模式扫描并以 GANST 在  $1331 \text{ cm}^{-1}$  处的拉曼峰为特征峰, 进行细胞成像。如图 3 所示, 左图为细胞的明场白光图, 可见完整的细胞形态。中间图为细胞的拉曼成像图, 可用拉曼成像图指示细胞内各个区域 GANST 量的多少。右图为两者的叠加, 可见拉曼信号区均存在于细胞内, 表明 GANST 对细胞具有良好的拉曼成像效果。

## 2.3 星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒用于肿瘤拉曼成像

为了进一步研究 GANST 的拉曼成像潜力, 我们将 GAS-

NT 直接注射到荷瘤小鼠背部的瘤内。待 GANST 在瘤内分布 24 h 后, 对肿瘤近边缘区进行 Streamline HR 模式的透皮扫描并以 GANST 在  $1331 \text{ cm}^{-1}$  处的拉曼峰为特征峰进行成像。如图 4 所示, 明场白光图为肿瘤及边缘外表皮, 白色虚线区分出肿瘤区(Tumor, T)和正常皮肤组织(Skin, S), 拉曼成像图中可见强度分布不一的拉曼信号, 叠加图中选取了肿瘤区域(1)、肿瘤近边缘(2)以及正常皮肤(3)三个区域, 分别调出了其拉曼光谱, 可见肿瘤区域  $1331 \text{ cm}^{-1}$  峰位信号较强, 近边缘区较弱, 而正常皮肤区无信号。表明即便透过表皮, GANST 依然具有较好的活体肿瘤成像效果, 且能够与正常组织区分开。

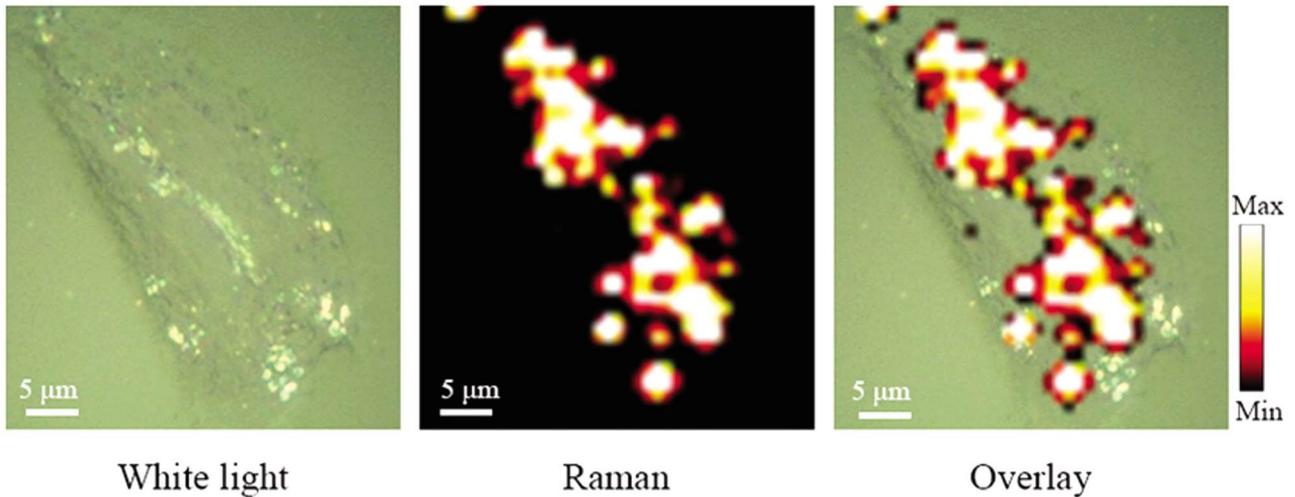


图3 星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒用于 A549 细胞拉曼成像。左图为明场下的细胞图,中间图为拉曼成像图,右图为明场图与拉曼图的叠加  
Fig.3 Raman imaging of A549 cells incubated with GANST. The left one is A549 cell in the bright field, the middle one is Raman imaging of A549 cell and the right one is the overlay mapping

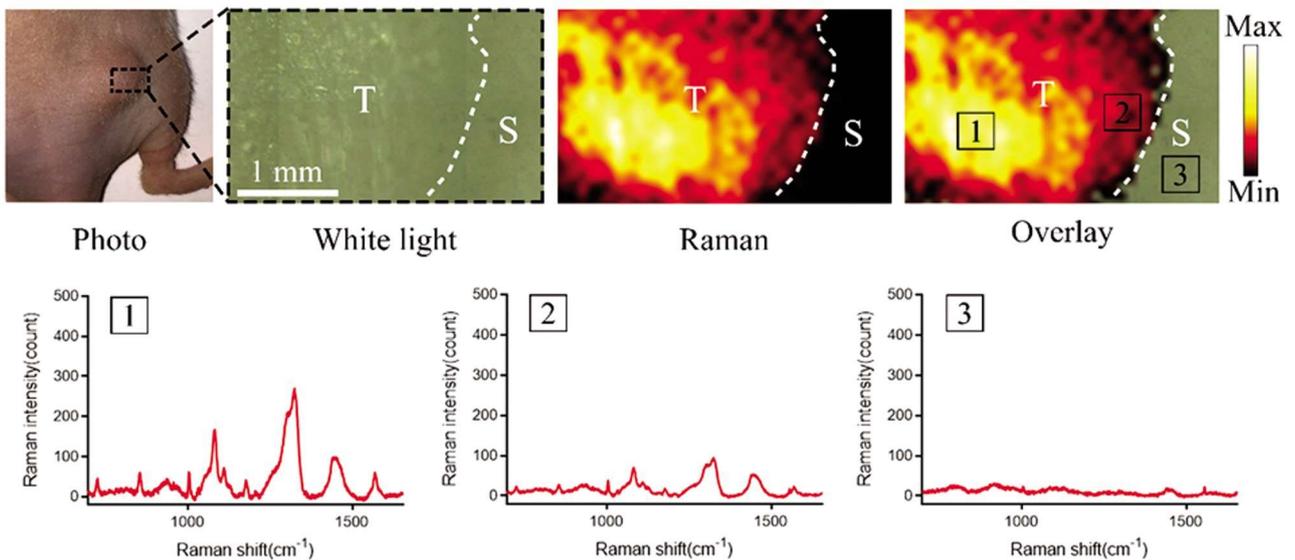


图4 星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒的皮下瘤拉曼成像图  
Fig.4 Raman imaging of subcutaneous tumor with GANST

### 3 讨论

拉曼影像作为一种基于拉曼分子指纹图谱的非侵入性成像模式,其相较于于现有的其他成像模式具有更好的特异性,灵敏度以及分辨率,因而在肿瘤的诊断与精准定位方面具有更大的优势,拥有更大的临床应用潜力。然而,当前已有的 SERS 探针其拉曼信号强度尚欠佳,只有极少数能用于活体影像。设计并制备高信号强度与高稳定性的 SERS 探针一直以来都是推动其在生物医学成像领域应用的关键。近年来,一种拉曼分子内嵌的核壳结构金球 "套娃" 受到广泛关注<sup>[12-17]</sup>,这种套娃结构使拉曼分子内嵌其中,以维持其在复杂环境中稳定性,并且核壳间隙提供了更多的 SERS "热点",拉曼增强效果更佳。然而,球形结构其内部缝隙区面积相对较小,且 SERS "热点" 仍相对较少,活体内应用仍存在较大局限性。因而性质更佳的 SERS 探针仍需进一步研究。

基于此,本研究设计并优化制备了一种星形 SERS 金 "套

娃" 纳米颗粒。我们首先制备并优化了金纳米星结构。由于金纳米星表面针尖的 "避雷针效应",其针尖数量越多,SERS "热点" 越多,且表面粗糙度越高,表面积越大,可连接更多的拉曼分子,得到更强的拉曼信号。因而我们通过控制生长液与金种子的比例来调节金纳米星表面的针尖密度,筛选优化出了粒径较小(约为 60.5 nm)且表面针尖密度较大的金纳米星。之后,以超声法在其表面修饰 4-NBT 拉曼分子,并以此为核心介导壳层生长,得到了核壳结构的星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒。通过透射电镜观察到在包覆金壳层之后,其表面针尖变圆。动态光散射仪数据显示,包覆壳层之后其粒径稍变大,证实星形金 "套娃" 结构的形成。采用拉曼光谱测定其包覆壳层前后的拉曼信号变化,比较 4-NBT 分子在 1331  $\text{cm}^{-1}$  处的拉曼峰强度值,表明在形成 "套娃" 结构之后其拉曼信号提高至原来的 5.3 倍,拉曼信号强度得到了很明显的改善。随后,将星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒与 A549 细胞共孵育,证实其能够被细胞内吞,拉曼成像图显示其在细胞内分布较均匀,可见明显细胞轮廓,

具有较好的细胞成像效果。为了进一步考察其拉曼成像潜力,我们建立了 A549 裸鼠皮下瘤模型,并将星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒注射至活体瘤内,一段时间之后进行透皮扫描,并以其在  $1331\text{ cm}^{-1}$  处的峰位强度进行拉曼成像。拉曼成像图中所选取的三条拉曼谱图显示,位于肿瘤区的拉曼信号强度较好,在肿瘤近边缘区的信号强度较弱,而在正常皮肤组织区域则无拉曼信号。表明此星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒在瘤内注射后,能够在瘤内分散并被肿瘤细胞摄取,能够对肿瘤组织进行拉曼成像,且能够与正常皮肤组织区分开。

综上所述,本研究成功制备了一种星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒,表征其结构并验证其 SERS 性质,并将其成功应用于细胞以及活体肿瘤拉曼影像,具有潜在的影像学应用前景。并且,由于已报道的纳米金材料的光热性质<sup>[21,22]</sup>,以及本研究中消光光谱显示星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒在近红外区具有较强的吸收,其或可同时用于肿瘤的光热治疗,此星形 SERS 金 "套娃" 纳米颗粒作为集拉曼影像与光热治疗剂为一体的新型诊疗一体化试剂的可能性仍值得进一步探索。

#### 参考文献(References)

- [1] Bonanni L, De'Liguori Carino N, Deshpande R, et al. A comparison of diagnostic imaging modalities for colorectal liver metastases[J]. *European Journal of Surgical Oncology*, 2014, 40(5): 545-550
- [2] Lane Lucas A, Qian Ximei, Nie Shuming. SERS Nanoparticles in Medicine: From Label-Free Detection to Spectroscopic Tagging[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(19): 10489-10529
- [3] Andreou Chrysafis, Neuschmelting Volker, Tschaharganeh Darjus Felix, et al. Imaging of Liver Tumors Using Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticles[J]. *Acs Nano*, 2016
- [4] Andreou Chrysafis, Kishore Sirish A, Kircher Moritz F. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A New Modality for Cancer Imaging[J]. *Journal of Nuclear Medicine*, 2015, 56(9): 1295-1299
- [5] Sharma Bhavya, Frontiera Renee R, Henry Anne Isabelle, et al. SERS: Materials, applications, and the future [J]. *Materials Today*, 2012, 15 (1-2): 16-25
- [6] Huang Ruimin, Harmsen Stefan, Samii Jason M, et al. High Precision Imaging of Microscopic Spread of Glioblastoma with a Targeted Ultrasensitive SERRS Molecular Imaging Probe[J]. *Theranostics*, 2016, 6(8): 1075-1084
- [7] Spaliviero Massimiliano, Harmsen Stefan, Huang Ruimin, et al. Detection of Lymph Node Metastases with SERRS Nanoparticles [J]. *Molecular Imaging & Biology*, 2016, 18(5): 677-685
- [8] Harmsen Stefan, Huang Ruimin, Wall Matthew A, et al. Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Nanostars for High Precision Cancer Imaging [J]. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(271): 271ra7
- [9] Harmsen S, Bedics M A, Wall M A, et al. Rational design of a chalcogenopyrylium-based surface-enhanced resonance Raman scattering nanoprobe with attomolar sensitivity [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6570
- [10] Camden J P, Dieringer J A, Wang Y, et al. Probing the structure of single-molecule surface-enhanced Raman scattering hot spots [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(38): 12616-12617
- [11] Kircher M F, De la Zerda A, Jokerst J V, et al. A brain tumor molecular imaging strategy using a new triple-modality MRI-photoacoustic-Raman nanoparticle[J]. *Nature Medicine*, 2013, 18(5): 829
- [12] Gandra Naveen, Singamaneni Srikanth. Bi-layered Raman Intense Gold nanostructures with Hidden Tags (BRIGHTs) for Hiresolution Bioimaging[J]. *Advanced Materials*, 2012[Epub ahead of print]
- [13] Li Lin, Mario Zapata, Min Xiong, et al. Nanooptics of Plasmonic Nanomatryoshkas: Shrinking the Size of a Core-Shell Junction to Subnanometer[J]. *Nano Letters*, 2015, 15(10): 6419-6428
- [14] Lin L, Gu H, Ye J. Plasmonic multi-shell nanomatryoshka particles as highly tunable SERS tags with built-in reporters [J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(100): 17740-17743
- [15] Oh J W, Lim D K, Kim G H, et al. Thiolated DNA-based chemistry and control in the structure and optical properties of plasmonic nanoparticles with ultrasmall interior nanogap [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(40): 14052
- [16] Zhang Y, Qiu Y, Lin L, et al. Ultra-Photostable Mesoporous Silica-Coated Gap Enhanced Raman Tags (GERTs) for High-Speed Bioimaging[J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(4): 3995
- [17] Zhou Jiajing, Xiong Qirong, Ma Jieli, et al. Polydopamine-Enabled Approach toward Tailored Plasmonic Nanogapped Nanoparticles: From Nanogap Engineering to Multifunctionality[J]. *Acs Nano*, 2016, 10(12): 11066
- [18] Niu W, Chua Y A, Zhang W, et al. Highly Symmetric Gold Nanostars: Crystallographic Control and Surface-Enhanced Raman Scattering Property[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137 (33): 10460
- [19] Barbosa S, Agrawal A, Rodríguezlorenzo L, et al. Tuning size and sensing properties in colloidal gold nanostars [J]. *Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids*, 2010, 26(18): 14943-14950
- [20] Li Ming, Kang Jeon Woong, Dasari Ramachandra Rao, et al. Shedding Light on the Extinction Enhancement Duality in Gold Nanostar Enhanced Raman Spectroscopy [J]. *Angewandte Chemie*, 2014, 53 (51): 14115-14119
- [21] Li X, Xing L, Zheng K, et al. Formation of Gold Nanostar-Coated Hollow Mesoporous Silica for Tumor Multimodality Imaging and Photothermal Therapy [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(7): 5817
- [22] Sun Huiping, Su Jinghan, Meng Qingshuo, et al. Cancer Cell Membrane-Coated Gold Nanocages with Hyperthermia-Triggered Drug Release and Homotypic Target Inhibit Growth and Metastasis of Breast Cancer [J]. *Advanced Functional Materials*, 2017, 27 (3): 1604300