

大长径比金纳米棒的合成及其单细胞毒性研究

周海英 周瑞 熊斌 何彦*

(湖南大学化学传感与计量学国家重点实验室, 化学化工学院, 生物学院, 长沙 410082)

摘 要 利用三步晶种生长法合成长径比约为 14 的大长径比金纳米棒(GNR), 利用巯基十一酸(MUDA) 对金纳米棒表面进行了生物适应性修饰, 并在宏观水平上研究了修饰前后的金纳米棒在对细胞活性的影响。利用单细胞方法分别考察了修饰后的纳米金棒对细胞贴壁过程、增殖速率、细胞内 ROS 以及骨架排布的影响。虽然 MTT 细胞活性结果显示内吞后的金纳米棒对细胞无毒, 但单细胞毒性分析方法发现, 不同浓度纳米金棒对早期贴壁过程有较小的影响, 且内吞的纳米金棒在一定程度上促进了细胞的增殖, 而高浓度下纳米金棒引起了细胞内 ROS 含量的升高, 并破坏了细胞内骨架纤维排布。本研究建立了用单细胞行为分析纳米颗粒对细胞毒性的方法, 证明了以往仅仅利用 MTT 等宏观手段分析纳米材料生物适应性是不足的。纳米材料在生物医学领域的进一步应用还应考虑单细胞及分子水平上的毒性效应。

关键词 大长径比金纳米棒; 表面修饰; 细胞毒性

1 引 言

金纳米棒是一种棒状的金纳米颗粒, 特殊的形状使其具有更为奇特的性质, 金纳米棒的纵向等离子共振峰会随着长径比的增大向近红外区移动。由于可见光不容易穿透生物组织, 而大长径比的金纳米棒在近红外光区对光的吸收和散射能力都很强, 因此对于皮下组织的癌症治疗和诊断具有更好的选择性^[1, 2]。

金纳米棒在生物体的广泛应用, 使得研究不同物理和化学性质的金纳米棒对细胞的影响变得十分重要^[3]。尤其是金纳米棒的表面化学对其生物行为的影响^[4]。对不同种类纳米颗粒的研究表明, 纳米颗粒的表面化学强烈影响它的细胞毒性和细胞内吞^[5-10]。金纳米棒合成过程需要用十六烷基溴化铵(CTAB) 作为金纳米棒生长的保护剂和软模板, 但 CTAB 显示出了严重的细胞毒性^[10-12]。为了降低金纳米棒的毒性效应, 许多对其表面修饰的方法应运而生, 例如利用聚合物^[10]和磷脂^[13]包裹表面带 CTAB 的金纳米棒, 或是用其它分子如 HS-PEG 来置换金纳米棒表面的 CTAB 分子^[6]。

通常, 评估金纳米棒毒性的主要方法是对细胞的活性进行表征, 采用的方法都是宏观测量的平均结果, 如 MTT 细胞活性测量法等。这些方法一般取的都是长时间培养后大量纳米棒对很多细胞的平均毒性。而近年的研究发现, 这种平均测量结果已经无法很好地反映纳米材料的生物适应性。金纳米棒暴露于细胞后不仅只对细胞的增殖和内吞产生影响^[14], 长时间的暴露还可能会引发细胞内氧化压力的变化, 可能会导致细胞凋亡或其它复杂的细胞反应^[15, 16]。这就需要在单细胞水平上实时原位研究金纳米棒与细胞的相互作用。目前, 单细胞水平上表征细胞活性的方法主要以染色为主。在纳米材料被细胞内吞进入细胞之后所引起的细胞各个功能的影响都有相对应单细胞分析方法。当体外粘附培养的细胞传代之后, 具有一定的贴壁周期, 通过考察内吞有纳米材料的细胞传代后细胞贴壁面积以及细胞伸展形态随贴壁时间的变化可以考察纳米材料对贴壁的影响。接着, 通过统计细胞数量随细胞增殖时间的变化, 可以考察细胞增殖速率。再者, 内吞纳米材料之后, 对细胞内分子的调节和影响也有方法可以进行单细胞分析, 如细胞内氧化压力(ROS) 水平, 可以通过对应的 ROS 染料(DCFH-DA) 进行表征, 荧光越强, 表示 ROS 水平越高。纳米材料进入细胞后对细胞骨架的调节也可通过对骨架识别的染料(Phalloidin-FITC) 进行分析。

本研究先合成长径比约为 14 的大长径比金纳米棒, 利用巯基十一酸(MUDA) 对金纳米棒表面进行修饰。在宏观水平上, 采用 MTT 细胞活性表征法研究了 GNR-MUDA 对细胞的毒性; 在单细胞水平上,

2012-07-26 收稿; 2012-09-19 接受
本文系国家自然科学基金项目(No. 20975036) 资助
* E-mail: yanhe2012@gmail.com

分析了 GNR-MUDA 对细胞贴壁周期、增殖速率、细胞内 ROS 以及细胞骨架排布的影响。这些单细胞分析方法可以被推广用于研究其它纳米粒子的生物适应性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

85-Z 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司);DK-S22 恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);DGX-9143BC-1 电热鼓风干燥箱(上海福玛实验设备有限公司);Centrifuge 5415D 型离心机(Eppendorf 公司);超净工作台;CO₂ 培养箱(Thermo 公司);CKX 41 相差显微镜(日本 Olympus 公司);CRX6 型干热灭菌箱(上海精宏实验设备有限公司);Malvern Zetasizer Nano 仪;JEOL-1230 型透射电子显微镜;酶标仪;低温离心机;Nikon Eclipse 80i 正置显微镜;Nikon 60 ×(NA 0.7-1.25) 镜头;Olympus DP72 彩色 CCD 摄像机;超声波清洗仪(宁波新芝生物科技有限公司)。

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, 99%), HAuCl₄ · 3H₂O(99.99%), NaBH₄(98%), 抗坏血酸(AA, 99.7%), 浓 HCl(38%), 浓 HNO₃(分析纯) 均购自上海国药集团化学试剂有限公司;胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、细胞基础培养基(Dulbecco's modification of eagle's medium, DMEM)、磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH=7.4)、抗生素(Penicillin-streptomycin)、胰蛋白酶 Trypsin-EDTA(0.05%、0.25%), 均购自美国 GIBCO 公司;二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、70% 酒精, 均购自北京鼎国生物科技有限公司。巯基十一酸(MUDA)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、鬼笔环肽(Phalloidin-FITC)、2',7'-二氯二氢荧光素二醋酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA), 均购自美国 Sigma 公司。实验用水均由 Millipore 公司的超纯水装置(TANKPE030) 制备的二次蒸馏水。

细胞实验中所需的耗材:22 mm×22 mm 盖玻片、无菌培养皿($d=100$ mm, 35 mm), 购自 Corning 公司;无菌移液管(10 mL)、各种规格无菌离心管, 购自 BD Falcon 公司;载玻片(世泰实验器材有限公司);细胞冻存管、96 孔板、0.22 μm 滤膜、10 mL 注射器(北京鼎国生物科技有限公司)。

2.2 大长径比金纳米棒的合成

合成过程中所用玻璃器皿都是用新配制的王水(浓 HCl-浓 HNO₃, 3:1, V/V) 进行清洗后, 用自来水冲洗 3 遍, 再用二次蒸馏水清洗 2 遍。

2.2.1 金种的制备 在温和搅拌下, 在 9.2 mL 0.1 mol/L CTAB 溶液中加入 0.25 mL 0.01 mol/L HAuCl₄ 溶液, 溶液立即由浅黄色转为橙黄色。迅速加入 500 μL 0.01 mol/L 冰 NaBH₄ 溶液呈棕色, 继续搅拌 2 min, 静置 2 h 待用。

2.2.2 金种的生长 取 3 个试剂瓶, 分别标为 A、B 和 C, A 和 B 中分别配制 9 mL 生长液, C 中配制 90 mL 生长液。生长液中各组分的浓度分别为 2.5×10^{-4} mol/L HAuCl₄、 5.0×10^{-4} mol/L 抗坏血酸(AA), 0.1 mol/L CTAB 溶液。

将 1 mL 金种加入到 9 mL A 生长液中, 振摇 10 s 后, 取 1 mL A 液加入到 9 mL B 生长液中, 振摇 15 s, 再将 B 生长液全部倒入 90 mL C 生长液中, 振摇 15 s, 静置在 30 °C 水浴中过夜。将 C 中上清液全部倒掉, 只剩底部的金棒, 在其中加入 10 mL 水, 超声分散。得到 3 g/L GNR-CTAB 溶液。

2.3 金纳米棒的表面修饰

取 0.0102 g 巯基十一酸(MUDA) 固体于一支 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 水, 超声分散至溶液呈白色悬浊液。加入 400 μL 25% 氨水, 振摇后得到透明溶液, 补加水到 2 mL, 得到 23 mmol/L MUDA 溶液。向装有 1 mL 3 g/L 金纳米棒溶液(GNR-CTAB) 的 2 mL 离心管中加入 100 μL 23 mmol/L MUDA 溶液, 于 30 °C 600 r/min 振荡。每隔 4 h 补加一次 MUDA 溶液, 共加 7~8 次。以 2000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液, 向其中加入 1 mL 水, 超声分散。用水再洗两遍, 离心, 弃去上清液, 将离心管中的溶液定容至 1 mL, 使得修饰后的金纳米棒(GNR-MUDA) 的浓度基本保持在 3 g/L。用水配制不同浓度的 GNR-MUDA 溶液, 待用。

2.4 Zeta 电位表征

分别移取 700 μL GNR-CTAB 溶液和 GNR-MUDA 溶液于专门测量表面电荷的比色皿中,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测量它们的表面电荷。将 GNR-MUDA 分散于细胞培养基中 2 h 后,测量金纳米棒表面电荷的变化。

2.5 不同浓度 GNR-MUDA 与 HeLa 细胞作用实验

将处于对数生长期的 HeLa 细胞分别传于带玻片的直径为 35 mm 的培养皿中,摇匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。分别加入含有不同浓度的 GNR-MUDA 的培养基。将细胞重新置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中继续培养 24 h,于暗场显微镜下观察。

2.6 细胞内吞 GNR-MUDA 的 TEM 观察实验

细胞传代 24 h 后,更换含有 400 mg/L GNR-MUDA 的培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中作用 24 h。胰酶消化、收集细胞并制备 TEM 样品。

2.7 细胞毒性实验

HeLa 细胞培养至对数生长期,弃去旧培养基,用 PBS 冲洗 2 遍,用 0.05% 胰蛋白酶消化细胞;加入 3 mL 细胞培养基,吹打分散后计数。将细胞的密度调整到 1.5×10^4 个/mL,将细胞悬液接种于无菌 96 孔板中,放置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。各孔中分别加入不同浓度的 GNR-CTAB 溶液和 GNR-MUDA 溶液,作用不同的时间。加入 MTT,用酶标仪在 490 nm 波长处测定其吸光度(OD)值。每组实验平行进行 3 次。

2.8 单细胞方法考察 GNR-MUDA 对细胞的贴壁和增殖影响

颗粒在细胞内对细胞活性的影响:取状态良好的 HeLa 细胞,加入不同浓度的颗粒共培养 24 h,以达到最大的内吞;将细胞传代,于不同的时间段观察细胞的伸展、贴壁面积、增殖数量。颗粒在细胞外对细胞活性影响:取状态良好的 HeLa 细胞,传代时给细胞中加入不同浓度的颗粒,然后经过不同时间的培养,观察细胞的伸展、贴壁面积、增殖数量。

数据经 Nano measure 和 Image J 软件处理,分别得到细胞的贴壁指数与细胞的贴壁面积随贴壁时间的变化趋势。

2.9 单细胞方法考察 GNR-MUDA 对细胞氧化压力影响

先将不同浓度的颗粒与细胞共培养 24 h,另取两盘分别作为阴性对照(Negative)和阳性对照(Positive)。取 900 μL 温热的 PBS 加入到用锡箔纸包着的 1.5 mL 离心管中,再加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 下解冻的 100 μL 100 mmol/L DCFH-DA 染料,振荡 15 s,得到 10 mmol/L 温热 DCFH-DA。在每盘细胞中加入 1 mL 10 mmol/L DCFDA 染料,用锡箔纸包着,于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中作用 30 min 后用温热的 PBS 清洗 3 次。荧光显微镜下观察。其中阴性对照为空白样品,阳性对照为用 100 mmol/L H_2O_2 处理 30 min 的样品。

2.10 单细胞方法考察 GNR-MUDA 对细胞骨架影响

将不同浓度的颗粒与细胞共培养 24 h 后用 4% 甲醛固定细胞后, PBS 清洗细胞 2 次;加入 500 μL 0.1% Triton X-100,于培养箱中作用 5 min 后用 PBS 清洗细胞 1 次再在每盘细胞中加入 400 μL 5 mg/L 兔笔环肽 Phalloidin-FITC 染料,于培养箱中作用 1 h 后,用 PBS 清洗 1 次;再加入 1 mL PBS。荧光显微镜下观察。

3 结果与讨论

3.1 金纳米棒表面修饰前后的电位表征

本实验利用 Zeta 电位测量仪分别测量了 GNR-CTAB、GNR-MUDA、培养基中的 GNR-MUDA 的表面电荷,结果如表 1 所示,修饰前金纳米棒表面吸附了大量的 CTAB 分子,因而显正电性。用 MUDA 修饰后的金纳米棒,因其表面的 CTAB 被 MUDA 分子置换下来,使得金纳米棒表面带有负电荷。表面带负电的 GNR-MUDA 溶液与细胞培养基混合后,表

表 1 金纳米棒修饰前后的 Zeta 电位变化以及将金纳米棒分散于细胞培养基中的表面电荷

Table 1 Surface charge of high aspect ratio Au nanorods (GNRs) after surface modification or dispersed in water and cell medium

样品 Sample	GNR-CTAB 水(in water)	GNR-MUDA 水(in water)	GNR-MUDA 培养中 (in cell culture medium)
电位 Zeta-potential (mV)	+57.5	-21.6	-6.84

MUDA: 11-Mercaptoundecanoic acid.

面会吸附血清蛋白,表面的负电性降低。此结果说明 MUDA 分子已经很好的修饰在金纳米棒的表面。

3.2 不同浓度 GNR-MUDA 与 HeLa 细胞内吞的暗场成像

HeLa 细胞与不同浓度 GNR-MUDA 共培养 24 h 后的内吞结果如暗场图片(图 1)所示,与空白细胞(Blank)相比,金纳米棒能够大量被细胞内吞,低浓度的金纳米棒内吞后比较分散,而高浓度的金纳米棒在细胞核的周围发生大量的聚集,显示出较强的散射光,并细胞内的金纳米棒数量随着金纳米棒浓度的增大而增多。

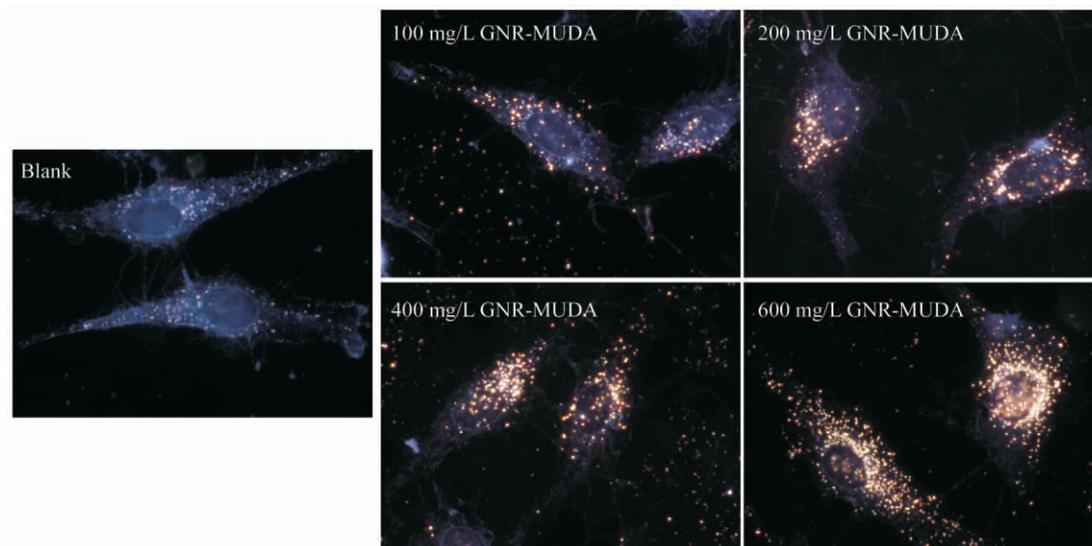


图 1 暗场图片为 HeLa 细胞与不同浓度 GNR-MUDA 共培养 24 小时的内吞结果

Fig. 1 Dark field images of cellular uptake of different concentrations of GNR-MUDA after incubated with HeLa cells for 24 h

3.3 TEM 研究细胞对 GNR-MUDA 的内吞

利用 TEM 观察了 HeLa 细胞与 400 mg/L GNR-MUDA 作用 24 h 后的内吞结果,如图 2 所示。金纳米棒大量进入细胞,并在细胞内以团聚体的形式存在。

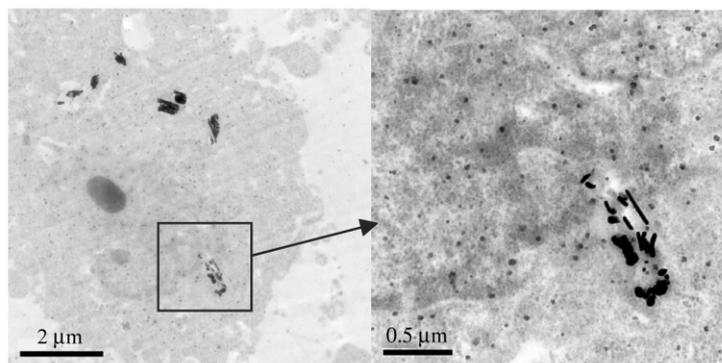


图 2 TEM 图片显示 HeLa 细胞与 400 μg/mL GNR-MUDA 培养 24 小时之后的内吞结果(左)右边是放大的区域

Fig. 2 TEM images showed the intracellular GNR-MUDA after incubated 400 mg/L GNR-MUDA with HeLa cells for 24 h (left), the black arrow indicated the enlarged area (left)

3.4 宏观方法表征 GNR-MUDA 对细胞的毒性

用 MTT 法研究了 GNR-CTAB 与 GNR-MUDA 对细胞的毒性效应,结果如图 3 所示。GNR-CTAB 与细胞作用 2 h 就会对细胞产生毒性(图 3A)。200 mg/L GNR-CTAB 与细胞培养 2 h,可以使得活性降至 30% 左右。作用时间延长到 24 h 时,与不同浓度 GNR-CTAB 相互作用的细胞全部失去活性。而 GNR-MUDA 与细胞相互作用的浓度达到 600 mg/L,作用 24 h,对细胞都没有产生明显毒性(图 3B,活性达 80%)。说明 GNR-MUDA 基本无毒。

3.5 单细胞分析方法表征 GNR-MUDA 对细胞的毒性-细胞贴壁的影响

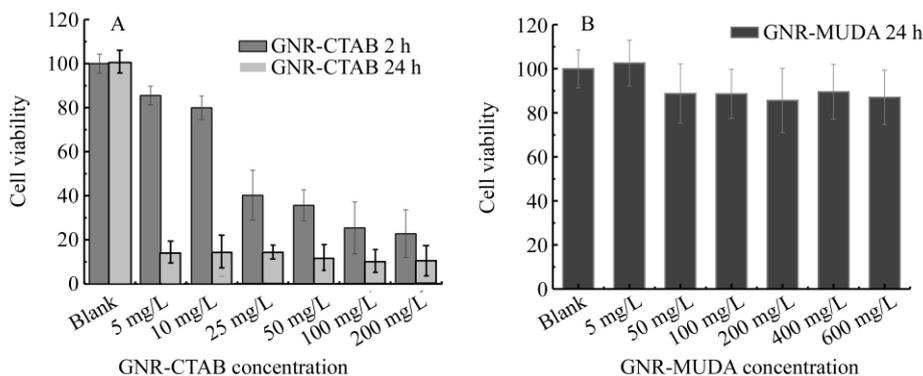


图 3 (A) 不同浓度 GNR-CTAB 分别与 HeLa 细胞作用 2 h 和 24 h 的 MTT 结果 ,(B) 不同浓度 GNR-MUDA 与 HeLa 细胞作用 24 h 的 MTT 结果

Fig. 3 (A) 3-(4,5-dimethylthiazol(2-yl))-5-di-phenyltetrazolium bromide results of different concentrations of GNR-CTAB incubated with HeLa cells for 2 h and 24 h ,(B) MTT results of different concentrations of GNR-MUDA incubated with HeLa cells for 24 h

本研究用细胞形态指数说明细胞的贴壁及伸展程度。细胞形态指数(图 4)是指梭形细胞较长两端的距离(a)与较短两端的距离(b)之比。

分别对颗粒在细胞内和外这两种情况下细胞形态指数和贴壁面积进行统计。颗粒在细胞内的情况如图 5 所示,细胞的形态指数和细胞贴壁面积都随着贴壁时间的延长而增大;但在贴壁开始的前 2 h,空白细胞的形态指数都为 1,说明细胞没有开始伸展,而吞有不同浓度 GNR-MUDA 的细胞却开始伸展,细胞的贴壁面积比空白细胞大。随后,空白细胞的贴壁速率开始变大,24 h 时,与不同浓度 GNR-MUDA 作用过的细胞与空白细胞都正常贴壁。

颗粒在细胞外,在不同浓度 GNR-MUDA 的作用下,在 8 h 之前,细胞的贴壁速率都比空白细胞低;8 h 时,在不同浓度 GNR-MUDA 影响下的细胞形态指数(图 6A)和贴壁面积(图 6B)都开始与空白细胞保持一致,中间时间点(如 2 和 4 h)细胞的贴壁略有差异,但细胞最终都

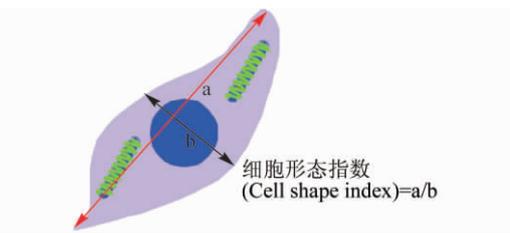


图 4 细胞形态指数描述示意图,梭形细胞较长两端的距离与较短两端的距离之比

Fig. 4 Cell shape index was measured by the ratio of long and short axis distance for fusiform cells

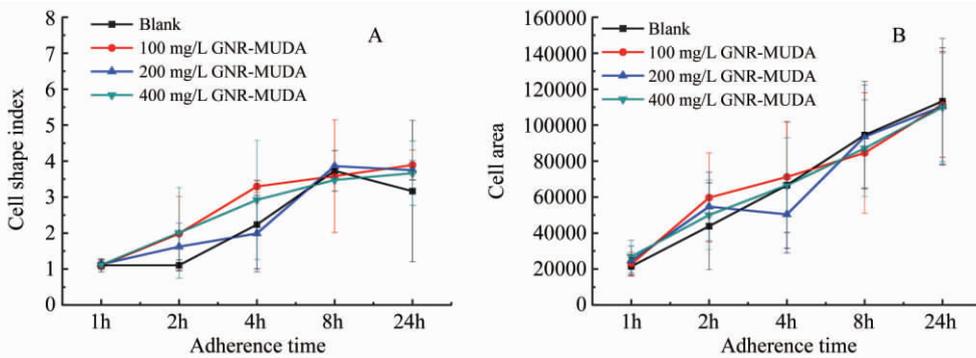


图 5 (A) 内吞有不同浓度 GNR-MUDA 的 HeLa 细胞的贴壁时间与细胞形态指数的关系图,(B) 内吞有不同浓度 GNR-MUDA 的 HeLa 细胞的贴壁时间与细胞贴壁面积的关系图

Fig. 5 Graphs showed the relationship between the HeLa cell adherence time and the cell shape index (A), the adherence time and the cell areas; (B), respectively with the internalized GNR-MUDA

正常贴壁。说明了 GNR-MUDA 对细胞的贴壁影响不大。

3.6 单细胞分析方法表征 GNR-MUDA 对细胞的毒性-细胞增殖的影响

当颗粒在细胞内的情况下统计细胞的增殖情况如图 7A 所示。浓度为 200 和 400 mg/L GNR-MUDA 细胞的增殖速率要慢于空白细胞的增殖速率。而浓度为 100 mg/L GNR-MUDA 细胞的增殖速率要

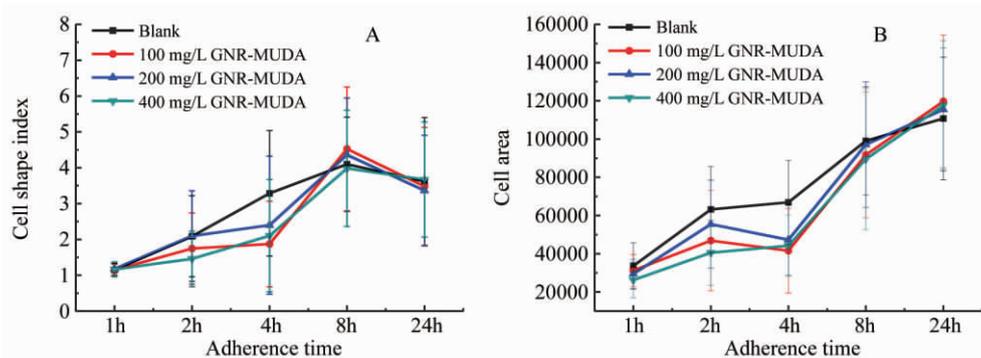


图 6 不同浓度 GNR-MUDA 在 HeLa 细胞贴壁中对细胞贴壁形态指数随时间的变化图 (A) 和不同浓度 GNR-MUDA 在 HeLa 细胞贴壁中对细胞贴壁面积随时间的变化图 (B)

Fig. 6 Graphs showed the relationship between HeLa cell adherence time and cell shape index (A), adherence time and cell areas (B), respectively with the extracellular GNR-MUDA

大于高浓度 GNR-MUDA 对细胞增殖的影响,而且也大于空白细胞的增殖速率。

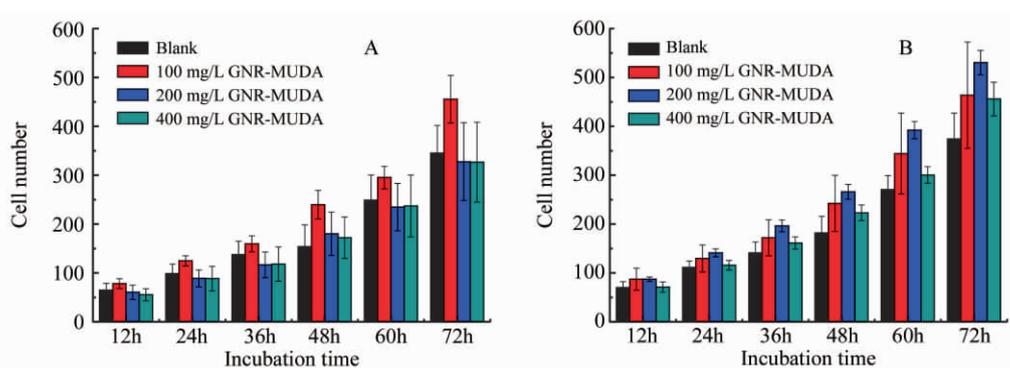


图 7 内吞了 GNR-MUDA 的 HeLa 细胞的增殖速率随培养时间的变化图 (A), 不同浓度 GNR-MUDA 在 HeLa 细胞增殖过程中对细胞增殖速度随培养时间的影响关系图 (B)

Fig. 7 (A) Effect of internalized GNR-MUDA on the proliferation of HeLa cells and (B) Effect of the extracellular GNR-MUDA on the proliferation of HeLa cells

颗粒在细胞外的情况下统计细胞的增殖情况如图 7B 所示。不同浓度的 GNR-MUDA 在细胞生长过程中对细胞的增殖速率都有加快作用。随着与细胞作用的 GNR-MUDA 浓度的增大,细胞的增殖速率也随之增大,直到 GNR-MUDA 浓度达到 200 mg/L,GNR-MUDA 对细胞增殖速率的加快作用也达到最大。当 GNR-MUDA 的浓度达到 400 mg/L 时,GNR-MUDA 对细胞增殖速率的加快作用有所下降,但还是比空白细胞的增殖速率快。

3.7 单细胞分析方法表征 GNR-MUDA 对细胞的毒性-细胞氧化压力的影响

将细胞与 GNR-MUDA 共培养 24 h 之后,进行 DCFH-DA 染色实验,结果如图 8 所示。GNR-MUDA 浓度为 100 和 200 mg/L 时,细胞内 ROS 比阴性对照稍高。GNR-MUDA 浓度达到 600 mg/L 时,细胞内的 ROS 含量显著增高。为了更好地表明不同浓度的 GNR-MUDA 对细胞内 ROS 量的影响,对荧光结果进行强度统计,结果如图 9 所示。阴性对照和阳性对照的强度统计分别为 10 和 40。低浓度的 GNR-MUDA 的 ROS 强度约为 15,当浓度增大时,影响更大,ROS 强度可达到 35。MTT 结果显示,100 ~ 600 mg/L 的 GNR-MUDA 对细胞的活性没有产生明显的毒性影响。但 ROS 结果却表明,单细胞水平上,细胞内吞纳米金棒之后,影响了细胞内的氧化还原平衡,增加了 ROS 含量。

3.8 单细胞分析方法表征 GNR-MUDA 对细胞的毒性-细胞骨架的影响

将细胞与不同浓度 GNR-MUDA 共培养 24 h 之后,对 HeLa 细胞骨架用鬼笔环肽 Phalloidin-FITC 进行染色表征,结果如图 10 所示。空白细胞的骨架排布纤维分布均匀且成较粗的线状。而加入不同浓度的纳米金棒作用后,细胞骨架不同程度的受损,随着 GNR-MUDA 浓度的增大,细胞骨架中较粗的蛋白纤维减少,有断裂现象发生(400 mg/L),且变得无序(600 mg/L)。

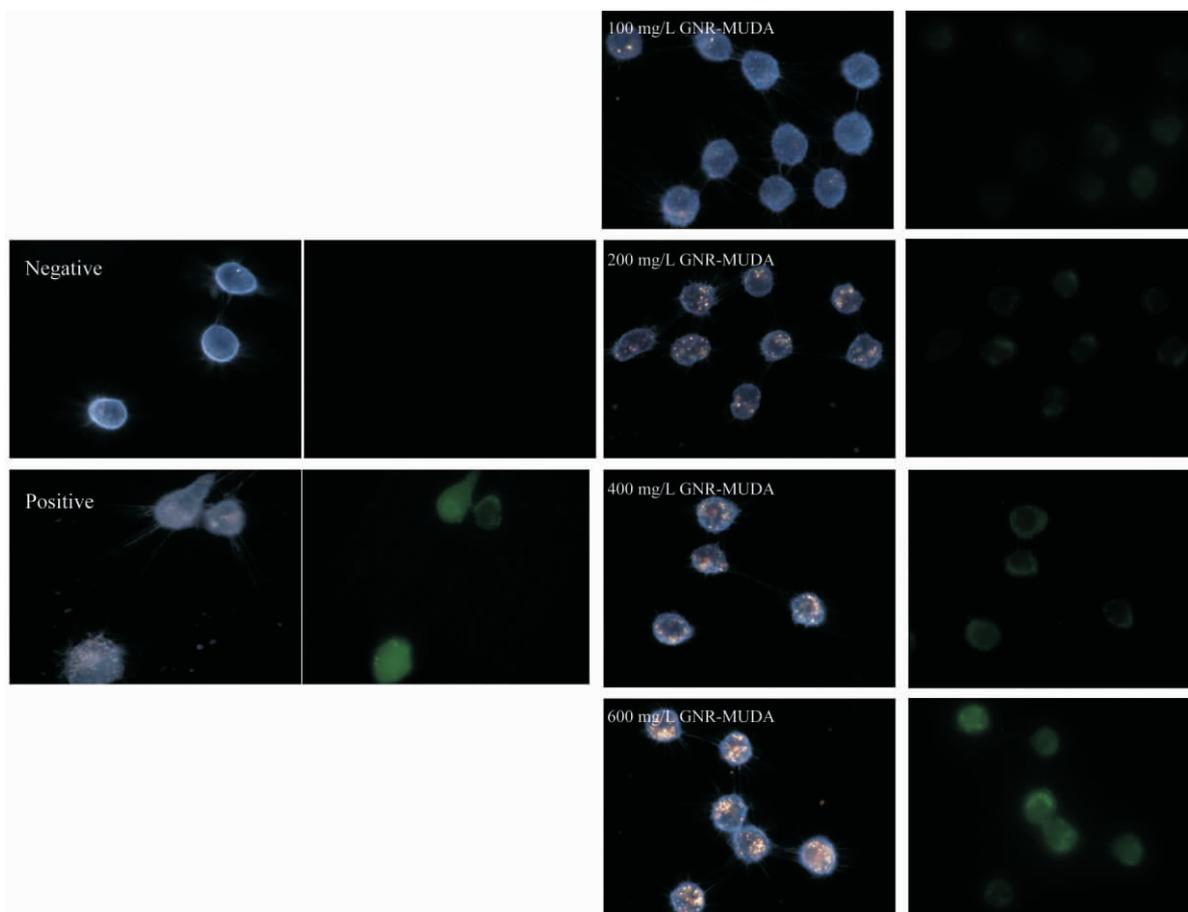


图 8 不同浓度 GNR-MUDA 对细胞内 ROS 产量的影响(每组图片中左边为暗场图片 右边为荧光图片)

Fig. 8 Dark field images (left) and fluorescence images (right) showed the effects of GNR-MUDA on the intracellular-reaction oxygen species (ROS) production as a function of different concentration

4 结 论

利用三步合成法合成了长径比约为 14 的纳米金棒, 利用宏观毒性表征法 MTT 活性测量结果显示: 经 MUDA 分子取代 CTAB 修饰金棒之后, 大大提高了金纳米棒的生物相容性。而通过在单细胞水平上活性研究结果发现, GNR-MUDA 对细胞贴壁、增殖、细胞内 ROS 以及细胞骨架排布有不同程度的影响。对细胞传代后早期的贴壁行为稍有影响, 而不同浓度的 GNR-MUDA 被细胞内吞后, 促进了细胞的增殖。但是, 细胞内 ROS 的结果显示内吞了 GNR-MUDA 的细胞内氧化压力上升, 且细胞骨架纤维被干扰, 断裂。这些结果都说明了宏观 MTT 表征纳米材料的毒性是远远不够的。本实验在前人研究细胞活性的基础上, 建立了一种在单细胞水平上分析纳米材料生物学效应的方法。结果表明要将纳米材料进一步应用于生物医学领域, 就需要更细致的分析单细胞及分子水平上纳米材料的生物学效应。

References

- 1 Jin R, Cao Y C, Hao E, Métraux G B, Schatz G C, Mirkin C A. *Nature*, **2003** (6957): 425-490
- 2 Xue C, Mirkin C A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46(12): 2036-2038
- 3 Lewinski N, Colvin V, Drezek R. *Small*, **2008**, 4(1): 26-49

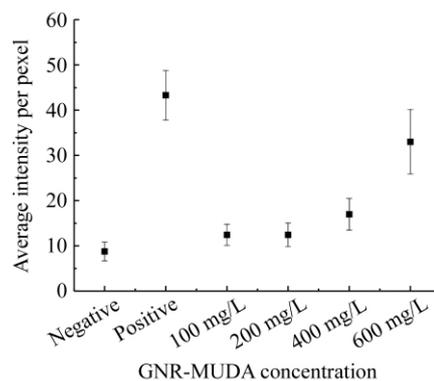


图 9 不同浓度 GNR-MUDA 与细胞作用后细胞内 ROS 产量的荧光强度统计图

Fig. 9 Fluorescence intensity indicated the ROS production induced by different GNR-MUDA treated cells

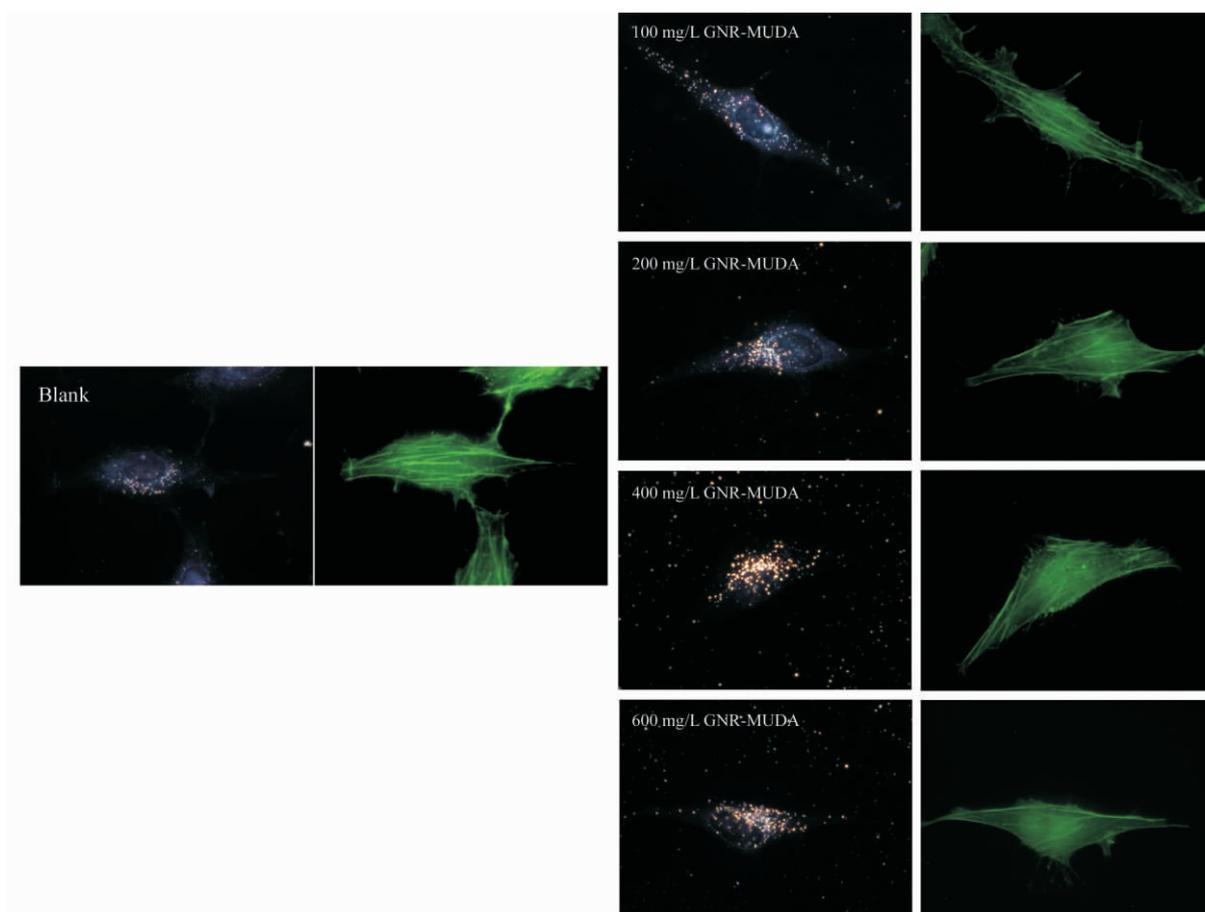


图 10 不同浓度 GNR-MUDA 对细胞骨架的影响(每组图片中左边为暗场图片, 右边为荧光图片)

Fig. 10 Dark field images (left) and fluorescence images (right) showed the effects of GNR-MUDA with different concentrations on cell cytoskeleton formation

- 4 Murphy C J , Gole A M , Stone J W , Sisco P N , Alkilany A M , Goldsmith E C , Baxter S. *Accounts of Chemical Research* , **2008** , 41(12) : 1721–1730
- 5 Hauck T S , Ghazani A A , Chan W C W. *Small* , **2008** , 4(1) : 153–159
- 6 Niidome T , Yamagata M , Okamoto Y , Akiyama Y , Takahashi H , Kawano T , Katayama Y , Niidome Y. *Journal of Controlled Release* , **2006** , 114(3) : 343–347
- 7 Hussain S M , Braydich-Stolle L K , Schrand A M , Murdock R C , Yu K O , Mattie D M , Schlager J J , Terrones M. *Advanced materials* , **2009** , 21(16) : 1549–1559
- 8 Huff T B , Hansen M N , Zhao Y , Cheng J X , Wei A. *Langmuir* , **2007** , 23(4) : 1596–1599
- 9 Chithrani B D , Ghazani A A , Chan W C W. *Nano Letters* , **2006** , 6(4) : 662–668
- 10 Alkilany A M , Nagaria P K , Hexel C R , Shaw T J , Murphy C J , Wyatt M D. *Small* , **2009** , 5(6) : 701–708
- 11 Parab H J , Chen H M , Lai T C , Huang J H , Chen P H , Liu R S , Hsiao M , Chen C H , Tsai D P , Hwu Y K. *The Journal of Physical Chemistry C* , **2009** , 113(18) : 7574–7578
- 12 Leonov A P , Zheng J , Clogston J D , Stren S T , Patri A K , Wei A. *ACS Nano* , **2008** , 2(12) : 2481–2488
- 13 Lee S E , Sasaki D Y , Perroud T D , Yoo , D , Patel K D , Lee L P. *Journal of the American Chemical Society* , **2009** , 131(39) : 14066–14074
- 14 Barnes C A , Elsaesser A , Arkusz J , Smok A , Palus J , Leniak A , Salvati A , Harahan J P , Jong W H D , Howard V. *Nano Letters* , **2008** , 8(9) : 3069–3074
- 15 Bartneck M , Keul H A , Singh S , Czaja K , Bornemann J , Bockstaller M , Moeller M , Groll J. *ACS nano* , **2010** , 4(6) : 3073–3086
- 16 Pan Y , Leifert A , Ruau D , Neuss S , Bornemann J , Simon U , Jahnhen-Dechent W. *Small* , **2009** , 5(18) : 2067–2076

Preparation and Cytotoxicity of High-aspect-ratio Gold

Nanorods at Single Cell Level

ZHOU Hai-Ying, ZHOU Rui, XIONG Bin, HE Yan*

(*State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China*)

Abstract We have synthesized high-aspect-ratio gold nanorods (GNR) by using a three-step seed-mediated growth method. The aspect ratio of the GNRs is approximately 14. The modification of the GNRs was achieved by replacing the CTAB molecules on the surface of gold nanorods with the 11-mercaptopundecanoic (MUDA) molecules. The cytotoxicity of the as-prepared GNRs and their effects on endocytosis, adhesion, proliferation, intracellular reactive oxygen species (ROS) level and cytoskeleton of the cells were studied. Interestingly, by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, the GNRs did not show a significant toxicity to HeLa cells. However, single cell viability assays showed that GNR uptake could influence the cell adhesion at the early stage, though the effect was not much, and the cell proliferation was promoted to some degree. Moreover, large amounts of GNR uptake will lead to increased intracellular ROS level and impaired the cell skeleton.

Keywords High-aspect-ratio gold nanorods; Surface modification; Cytotoxicity

(Received 26 July 2012; accepted 19 September 2012)