

超小金纳米团簇作为 CT 对比剂的研究

宋莎莎¹ 王骏滢¹ 陈婕¹ 沈秀¹ 王浩¹ 高凯²
张晓东¹ 孙元明¹

¹ (北京协和医学院中国医学科学院放射医学研究所 天津 300192)

² (北京协和医学院中国医学科学院实验动物学研究所 北京 100021)

摘要 采用 X-射线断层扫描(Computed tomography, CT)技术测量肿瘤部位、肝、脾、肾、膀胱的 CT 值和不同时间点的二维、三维影像来评价谷胱甘肽(Glutathione, GSH)保护的超小金纳米团簇作为对比剂的可能性,并验证它的高效肿瘤摄取和清除作用。CT 结果表明,肿瘤部位的加强对比作用随时间的增加而增加,加强的影像直至 6 h 仍未减弱,因此,证明了肿瘤细胞的高效摄取,这有利于将其应用于肿瘤靶影像中。膀胱起始的高 CT 值表明, GSH 保护的金纳米团簇能渗透肾组织,通过膀胱排泄。肾的加强对比表明其有可能应用于探测肾的病变和损伤。

关键词 谷胱甘肽, 金纳米团簇, X-射线 CT 影像, 对比剂

中图分类号 R811

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.050202

过去的几十年,人们利用金纳米颗粒增强的二次电子效应和光电吸收特性,将其应用到癌症诊断,组织特异性影像和血池影像中^[1]。同时,人们将金纳米颗粒应用到 CT 影像中,并且其显示了较长的血液循环时间,更简单的功能化表面和更好的影像效应^[2-3]。然而,研究发现,纳米颗粒的副作用随大小的不同而不同。大的纳米颗粒不能被代谢,它们更多的积累在肝和脾,因此可能会导致毒性,这些缺点阻止了较大的纳米颗粒在 X 射线 CT 影像中的进一步应用。

研究表明,小于 3 nm 的金纳米颗粒与大的金纳米颗粒有不同的化学活性,而且,颗粒的大小在细胞摄取中有重要作用^[4]。本文实验准备了谷胱甘肽保护的 3 nm 大小的超小金纳米团簇,同时,研究了其作为对比剂的可能性。我们发现,金纳米团簇有高的荧光效应,体内影像能通过荧光获得^[5]。而且, GSH 保护的金纳米团簇能被肿瘤细胞高效的摄取,并能延长影像时间。由于金纳米团簇超小的尺寸和强的渗透代谢(Enhanced permeability and retention, EPR)作用,因此,它们也能被清除。所以, GSH 保护的超小金纳米团簇具有低毒、易代谢和高

效摄取作用,因此有作为体内 X-射线 CT 对比剂的可能性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

GSH、 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、柠檬酸钠,美国 Sigma 公司;宫颈癌细胞(U14),中国医学科学院放射医学研究所储存;Inveon Micro-CT/PET 扫描仪,德国西门子公司;Hitachi HF-2000 场发射透射电子显微镜、F4500 荧光分光光度计, HITACHI 日立公司;DU800 紫外分光光度计,美国贝克曼库尔特有限公司。

1.2 实验动物

9 周龄的雄性昆明鼠,购自军事医学科学院,动物许可证: SCXK-(军)2012-0004,在本所 SPF 级实验动物房饲养。通过尾静脉向育有宫颈癌的小鼠注入 0.2 mL ($59.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 GSH 保护的金纳米团簇。然后,在注射后 1 h 和 6 h,用 Micro-CT/PET 扫描仪浏览小鼠。实验重复 3 次。

基金资助: 北京协和医学院协和和新星基金(人 1256)、北京协和医学院青年基金(院 1343)和中国医学科学院放射医学研究所基金项目(ST1440)资助

第一作者: 宋莎莎,女,1988 年 3 月出生,2012 年毕业于河北农业大学,现为北京协和医学院中国医学科学院放射医学研究所硕士研究生,主要研究方向为纳米医学

通讯作者: 张晓东,助理研究员, E-mail: xiaodongzhang@irm-cams.ac.cn; 孙元明,研究员, E-mail: yuanmings1962@163.com

收稿日期: 收稿 2014-06-17; 修回 2014-08-26

1.3 GSH 保护的金纳米团簇的合成

室温下,混合现配的柠檬酸钠溶液、还原性 GSH ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液和 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液,将混合液加热到 70°C ,温和搅拌 24 h,直到混合液变为浅黄色。这样发橘黄色荧光的 GSH 保护的金纳米团簇合成。它的大小和形态学特征通过 200 kV 下的场发射透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM)分析。300 nm 到 70 nm 的光吸收谱通过 DU800 紫外分光仪获得。光激发光通过 F4500 荧光分光光度计获得,得到激发波长和发射波长分别为 483 nm 和 365 nm。

1.4 X-射线 CT 影像实验

注射金纳米团簇的小鼠在 Micro-CT/PET 扫描仪上浏览,最大视野为 $9 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$,超高分辨影像可达到 $15 \mu\text{m}$ 。所有小鼠在 1 h 和 6 h 时从头到尾的方向浏览。记录肿瘤区域,肝、脾、肾、膀胱的 CT

值和肿瘤、肾的影像来评价肿瘤摄取和清除作用。

2 结果和讨论

2.1 GSH 保护的金纳米团簇的特性

图 1 显示了 GSH 保护的金纳米团簇的大小分布、紫外(UV-vis)和光激发光图谱。图 1a 呈现了由 TEM 测得的 GSH 保护的金纳米团簇的大小和整体形态特征,测得单分散的 GSH 保护的金纳米团簇的平均尺寸是 2.46 nm。但是,TEM 不能反映 GSH 保护的金纳米团簇的真实尺寸,我们用动态光散射(Dynamic light scattering, DLS)测量其在水溶液中的大小分布。图 1b 显示了 GSH 保护的金纳米团簇的最大尺寸分布在 2.70 nm。同时,我们通过紫外光谱和荧光光谱来反应其光学特性。图 1c 显示了 GSH 保护的金纳米团簇的吸收带在 370 nm。图 1d 呈现出其发射中心在 600 nm,这表明直接的光学转换和 GSH 保护的金纳米团簇的出现^[6]。

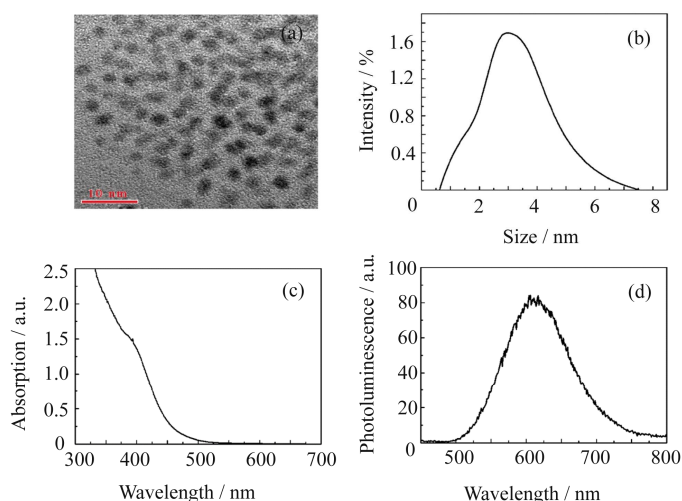


图 1 GSH 保护的金纳米团簇的大小分布和光学特性
(a)和(b)为 TEM 影像和 DLS 大小分布, (c)和(d)为紫外光谱和荧光光谱

Fig. 1 The size distribution and optical properties of GSH-protected Au NCs. TEM image and size distribution were revealed in (a) and (b); UV-vis spectrum and photoluminescences spectrum were presented in (c) and (d), respectively

2.2 生物分布

本文记录了不同时间点主要器官的 CT 值(Hounsfield units, HU)。图 2 显示,随时间增加,肿瘤区域有逐渐增加的 HU 值,证实了肿瘤细胞的不断摄取。肿瘤区域的最大 HU 值为 900 HU,与以前的研究一致^[7]。肝和肾的 HU 值呈现基本稳定的趋势,但肾的平均值是肝的两倍,这使肾有更加清晰

的影像。脾的 CT 值呈现出高斯分布,主要是由于脾的 RES 吸收,然后随时间的增加,脾中的团簇又被进一步代谢、排泄。我们的工作表明,从开始膀胱就有较高的 CT 值,这说明金纳米团簇通过了肾的过滤而被膀胱排泄。有研究表明,当纳米颗粒的最终水和动力学直径小于 5.5 nm 时才能通过肾清除^[8]。总之,高摄取和清除作用能通过 CT 值反应,

数量分析显示, GSH 保护的金纳米团簇在逃离了 RES 的吸收后能被肾代谢。因此, 以上数据表明, GSH 保护的金纳米团簇有更长的影像时间和更强的对比作用, 这有助于其在 X-射线 CT 对比剂中的应用和疾病的诊断。

Peng 等^[9]的研究表明, 通过腹腔和尾静脉向小鼠注射树枝状金纳米颗粒(平均尺寸 3 nm)后能引起同样的加强对比。甚至在 6 h 后, 肿瘤区域仍有明显高的 CT 值, 这与我们的研究结果一致。Kim 等^[2]研究发现, PEG 包裹的金纳米颗粒在肝癌细胞的对比加强是周围正常细胞的 2 倍, 这个对比加强一直持续到 24 h。Aydogan 等^[7]的研究发现, 体外共育肿瘤细胞和金纳米颗粒时能发现高的加强对比, 这与体内实验一致。我们的研究表明, GSH 保护的超小金纳米团簇在主要器官不仅有高的加强对比, 而且随着时间增加, 能够被代谢和清除, 这点优于以上的研究结果。

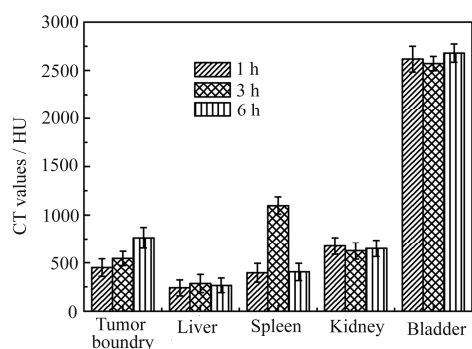


图 2 小鼠肿瘤区域、肝、脾、肾和膀胱的 X-射线 CT 影像值

Fig. 2 The X-ray CT imaging values of different organs of mice including tumor boundary, liver, spleen, kidney, and bladder

2.3 X-射线 CT 影像实验

本文通过二维和三维影像来追踪对比剂的分布, 评价清除作用和肿瘤分布。图 3 为肿瘤部位的三维影像, 从图 3 可以观察到明显的肿瘤边界, 表明 GSH 保护的金纳米团簇能富集和积累在肿瘤细胞; 对比加强一直持续 6 h (图 3b), 说明其有更长和更稳定的影像时间。图 4 为时间依赖的二维 CT 影像。直到 6 h, 肿瘤边界仍然清晰, 与三维结果一致。同时, 图 5 显示了肾清晰的加强信号, 6 h 时, 对比加强也没有减弱, 这有助于探索肾的病变。肿瘤和肾的加强对比主要源于肿瘤和肾部位的巨噬细

胞的吸收。同时, 纳米团簇的 EPR 作用也提高了肿瘤细胞的摄取^[9]。因此, GSH 保护的金纳米团簇可能成为体内 CT 影像合适的对比剂, 并能呈现时间依赖的清除作用。

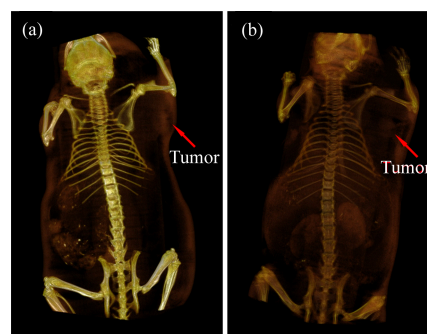


图 3 小鼠肿瘤区域三维 X-射线 CT 影像 (a)和(b)显示的是 1 h 和 6 h 的影像

Fig. 3 In vivo three-dimensional X-ray CT images of tumor regions of U14 tumor-bearing mice. (a) and (b) are CT images at 1 h and 6 h after injection

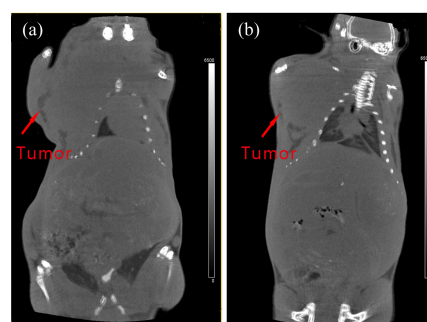


图 4 时间依赖的小鼠二维 X-射线 CT 影像 (a)和(b)分别在 1 h 和 6 h 获得

Fig. 4 Time-dependent two-dimensional X-ray CT images from the mice. (a) and (b) were images obtained at 1 h and 6 h, respectively



图 5 小鼠二维肾 X-射线 CT 影像 (a)和(b)分别是 1 h 和 6 h 的影像

Fig. 5 The two-dimensional X-ray CT images of kidney in mice. (a) and (b) were images obtained at 1 h and 6 h, respectively

我们的工作显示, GSH 保护的超小金纳米团簇有更敏感的影像信号, 更小的副作用, 这些归因于其大的 X-射线吸收和更简单的清除。研究表明, 碘依赖的对比剂在 24 h 后能被全部清除, 这些导致其短的血液循环时间, 快速的血管渗透和急性肾毒性, 同时也限制了其在靶影像中的应用^[2]。Bi 依赖的纳米颗粒对比剂 24 h 后在主要器官的对比明显减弱, 并且主要积累在肝和肾, 导致可能的毒性^[10]。而金纳米颗粒依据的对比剂 2 h 后在肝和肿瘤细胞仍然有逐渐加强的对比^[2-3,7]。对比其他结果, 我们的金纳米团簇比其他纳米材料依据的对比剂和小分子碘有更多优势, 尤其在高肿瘤摄取和清除方面^[11]。有研究表明, 金纳米颗粒应用到 X 射线对比剂中的浓度是 $100 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[2,12]。而我们的工作表明, GSH 保护的金纳米团簇在 $0.591 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 时也能达到相同的效果。因此, 由于 GSH 保护的金纳米团簇的高摄取和清除, 使其有可能发展为 X-射线 CT 影像对比剂。

3 结论

本文研究了 GSH 保护的超小金纳米团簇作为对比剂的可能性。它们显示了很好的兼容性、高效摄取、时间依赖的加强对比和清除作用。生物分布结果显示, 肿瘤部位和肾有高效的积累, 表明肿瘤细胞的高效摄取, 所以其有可能应用到肿瘤靶影像中。时间依赖的二维和三维影像表明, 直到 6 h, 肿瘤区域仍然显示了清晰的边界, 这一过程来源于纳米颗粒被动的 EPR 作用和主动的受体介导的内吞作用。同时, 超小的尺寸避免了很多副作用, 如肾毒性、肝积累。本研究表明, GSH 保护的金纳米团簇能应用于 CT 影像中, 因为它们有高的肿瘤摄取, 更大的靶肿瘤能力和更简单的清除。同时也为下一代影像探针的发展提供了更多的可能。

参考文献

- 1 Cai Q Y, Kim S H, Choi K S, *et al.* Colloidal gold nanoparticles as a blood-pool contrast agent for X-ray computed tomography in mice [J]. *Investigative Radiology*, 2007, **42**(12): 797-806.
- 2 Kim D, Park S, Lee J H, *et al.* Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for

in vivo X-ray computed tomography imaging [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**(24): 7661-7665.

- 3 Rabin O, Perez J M, Grimm J, *et al.* An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles [J]. *Nature Materials*, 2006, **5**(2): 118-122.
 - 4 Alkilany A M, Murphy C J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, **12**(7): 2313-2333.
 - 5 Zhang X D, Wu D, Shen X, *et al.* *In vivo* renal clearance, biodistribution, toxicity of gold nanoclusters [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(18): 4628-4638.
 - 6 Sousa A A, Morgan J T, Brown P H, *et al.* Synthesis, characterization, and direct intracellular imaging of ultrasmall and uniform glutathione-coated gold nanoparticles [J]. *Small*, 2012, **8**(14): 2277-2286.
 - 7 Aydogan B, Li J, Rajh T, *et al.* AuNP-DG: Deoxyglucose-labeled gold nanoparticles as X-ray computed tomography contrast agents for cancer imaging [J]. *Molecular Imaging and Biology*, 2010, **12**(5): 463-467.
 - 8 Choi H S, Liu W, Misra P, *et al.* Renal clearance of quantum dots [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, **25**: 1165-1170.
 - 9 Peng C, Zheng L, Chen Q, *et al.* PEGylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles for *in vivo* blood pool and tumor imaging by computed tomography [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(4): 1107-1119.
 - 10 Zhang X D, Chen J, Min Y, *et al.* Metabolizable Bi_2Se_3 nanoplates: biodistribution, toxicity, and uses for cancer radiation therapy and imaging [J]. *Advanced Functional Materials*, 2014, **24**(12): 1718-1729.
 - 11 Liu Z, Li Z, Liu J, *et al.* Long-circulating Er^{3+} -doped Yb_2O_3 up-conversion nanoparticle as an *in vivo* X-ray CT imaging contrast agent [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(28): 6748-6757.
- Kojima C, Umeda Y, Ogawa M, *et al.* X-ray computed tomography contrast agents prepared by seeded growth of gold nanoparticles in PEGylated dendrimer [J]. *Nanotechnology*, 2010, **21**(24): 245104.

Study on ultra-small gold nanoclusters as X-rays computed tomography contrast agent

SONG Shasha¹ WANG Junying¹ CHEN Jie¹ SHEN Xiu¹ WANG Hao¹ GAO Kai²
ZHANG Xiaodong¹ SUN Yuanming¹

¹(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,
Tianjin 300192, China)

²(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,
Beijing 100021, China)

ABSTRACT To assess the feasibility of ultra-small GSH-protected Au nanoclusters (NCs) employed as X-ray computed tomography (CT) contrast agent and study the effects of efficient uptake and clearance, CT values and time-dependent two- and three-dimensional images were recorded. The CT values of tumor region showed that the enhanced comparison gradually increased with the time. And the high enhanced comparison can also be reflected by distinct images until 6 h later. Therefore, high uptake of cancerous cell was proved by the CT values and two/three-images, which contributes to the application of Au NCs in tumor target imaging. High CT values of bladder were detected from the beginning, showing that Au NCs can permeate kidney tissue and be cleared by bladder. And the enhancement comparison of kidney revealed the possible application of exploration damage and lesion as probe.

KEYWORDS Glutathione, Au nanoclusters, X-ray CT imaging, Contrast agent

CLC R811