

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.04.013

· 基础研究 ·

金纳米星负载二氢卟吩 e6 对肺癌 A549 细胞的光动力效应

李晨露¹, 夏芳芳², 章阿敏², 崔大祥^{1,2} (1. 温州医科大学 检验医学院与生命科学学院, 浙江 温州 325000; 2. 上海交通大学 纳米生物医学工程研究所, 上海 200240)

[摘要] **目的:** 制备负载光敏剂二氢卟吩 e6 (chlorin e6, Ce6) 的金纳米星 (gold nanostars, GNS), 研究其对肺癌 A549 细胞的光动力作用效果。 **方法:** GNS 经巯基聚乙二醇 (SH-PEG-NH₂) 修饰后与光敏剂 Ce6 振荡过夜, 制备出具有光动力治疗效应的探针 GNS-PEG@Ce6, 检测其表征、形态和包封率, 通过激光共聚焦显微镜比较 A549 细胞对探针 GNS-PEG@Ce6 与 Ce6 的吞噬作用。应用 MTT 法检测探针 GNS-PEG@Ce6 对 A549 细胞增殖的抑制效果, 通过流式细胞仪检测探针 GNS-PEG@Ce6 与 Ce6 对 A549 细胞凋亡的影响。 **结果:** 探针 GNS-PEG@Ce6 的粒径为 100 nm 左右, 具有良好的分散性和稳定性, Ce6 的包封率为 50% 左右。探针 GNS-PEG@Ce6 以胞吞方式进入细胞, 主要分布于细胞质内, 且较 Ce6 能更有效地进入细胞。探针 GNS-PEG@Ce6 对 A549 细胞的增殖抑制作用强于 Ce6 ($P < 0.05$), 流式细胞仪检测证明了探针对细胞有极为明显的致凋亡效果。 **结论:** 以 GNS 作为载体能有效地增加肺癌 A549 细胞对 Ce6 的摄取, 从而进一步增强 Ce6 对肺癌 A549 细胞的杀伤效果。

[关键词] 金纳米星; 二氢卟吩 e6; 肺癌; A549 细胞; 光动力治疗

[中图分类号] R734.2; R730.57 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)04-0394-07

Photodynamic effects of gold nanostars loading chlorin e6 on lung cancer A549 cells

LI Chenlu¹, XIA Fangfang², ZHANG Amin², CUI Daxiang^{1,2} (1. School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China; 2. Institute of Nano Biomedicine and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare GNS (gold nanostars) loading photosensitizer chlorin e6 (Ce6) and to investigate its photodynamic effects on lung cancer A549 cells. **Methods:** GNS was firstly modified by SH-PEG-NH₂ and then mixed with Ce6 and shaken overnight to prepare GNS-PEG@Ce6, which had photodynamic therapy effects. The characterization, morphology and encapsulation rate were detected. The difference between the phagocytosis of Ce6 and GNS-PEG@Ce6 by A549 cells were observed with a Leical TCS SP8 confocal laser scanning microscope. MTT assay was used to examine the inhibitory effect of GNS-PEG@Ce6 on the proliferation of A549 cells while FCM was used to detect the effect of probe GNS-PEG@Ce6 on the apoptosis of A549 cells. **Results:** The particle size of the GNS-PEG@Ce6 was about 100 nm. The prepared GNS-PEG@Ce6 nanoparticles exhibited good dispersion and stability and the encapsulation rate of Ce6 was about 50%. GNS-PEG@Ce6 entered the cells by endocytosis and mainly distributed in the cytoplasm; compared with Ce6, GNS-PEG@Ce6 could enter the cells more effectively. The proliferation-suppression effect of GNS-PEG@Ce6 on A549 cells was significantly stronger than that of Ce6 ($P < 0.05$). The results of flow cytometry showed that the probe exhibited strong apoptotic effect on A549 cells. **Conclusion:** GNS, as the drug carrier, could effectively increase the Ce6 uptake efficacy in A549 cells, thus further enhancing the killing effects of Ce6 on lung cancer A549 cells.

[Key words] gold nanostars; Chlorin e6; lung cancer; A549 cells; photodynamic therapy

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(4): 394-400. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.04.013]

[基金项目] 国家重点研发计划资助项目 (No. 2017YFA0205301, No. 2015CB931802); 上海市经信委资助项目 (No. XC-ZXSJ-02-2016-05)。Project supported by the Funding Project of National Key Research and Development Program (No. 2017YFA0205301, No. 2015CB931802), and the Funding Project of Shanghai Economic and Information Committee (No. XC-ZXSJ-02-2016-05)

[作者简介] 李晨露 (1992-), 女, 硕士生, 主要研究方向为肺癌早期诊断与治疗相关的纳米技术和细胞免疫治疗, E-mail: 18267850608@163.com

[通信作者] 崔大祥 (CUI Daxiang, corresponding author) 博士, 上海交通大学特聘教授, 博士生导师, 主要从事生命科学及纳米材料科学交叉领域的研究, E-mail: dxcui@sjtu.edu.cn

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)是一种非侵入性治疗肿瘤的新技术,其机制是在激发光的作用下,光敏剂产生单线态氧(singlet oxygen)及其他活性氧类物质(reactive oxygen species, ROS),从而导致肿瘤细胞坏死和凋亡^[1-2]。光敏剂种类多样,其中Ce6被广泛应用,因其产生单线态氧的效率很高,故适合开发用于肿瘤的光动力治疗^[3]。迄今为止,大部分光敏剂都表现为疏水性,在溶液中很容易聚集,故在实际应用中面临困难。由此以纳米颗粒、聚合物类、糖类、脂类等为基础的纳米探针逐渐发展,成为Ce6实际应用的新型模式^[4-6]。

金纳米材料所具备的惰性使其性质相对稳定且安全,同时具有合成方法简单、易修饰、生物相容性好等优点^[7-9]。GNS作为一种研究比较成熟的贵金属纳米材料,不仅是一种理想的光热转换材料,而且可以作为药物载体,因此在多种疾病诊疗一体化的研究中得到广泛应用^[10-12]。

本研究将GNS作为载体,在其表面修饰SH-PEG-NH₂(巯基聚乙二醇),从而提高它的稳定性和分散性。然后与光敏剂Ce6物理吸附后形成探针GNS-PEG@Ce6。本文比较探针GNS-PEG@Ce6与Ce6对A549细胞的光动力效应,探索此探针与普通光敏剂Ce6的PDT作用的区别,及其在治疗肺癌中潜在的应用价值。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与仪器

氯金酸(HAuCl₄·4H₂O)购自国药集团化学试剂有限公司,巯基聚乙二醇(SH-PEG-NH₂, MW ≈ 2000)购自金畔生物公司,Ce6购自百灵威公司;DMEM高糖培养基购自Hyclone公司,新生牛血清(NBS)购自Gibco公司,Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自翊圣生物公司;MTT及Hoechst 33342染色液购自Sigma公司。紫外分光光度计购自美国Agilent公司,扫描电子显微镜、生物型透射电镜、场发射透射电镜(SEM、TEM、HRTEM)购自美国FEI公司,酶标仪购自美国Thermo Fisher公司,FV500-IX70型激光共聚焦显微镜购自德国Leica公司,FACScalibur型流式细胞仪购自美国BD公司。

1.2 细胞培养

肺癌A549细胞购买于中国科学院上海细胞库,于含10%新生牛血清的DMEM培养液中常规培养,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中,细胞贴壁生长良好,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 GNS-PEG@Ce6的制备及其形态学观察

GNS的制备途径主要有两种:一步合成法^[13]和种

子生长法^[14]。本研究中采用种子合成法来制备GNS,其基本原理如下:在生长液中加入金纳米种子(10 nm左右),在酸性环境下与表面活性剂、银离子及弱还原剂存在的反应体系里,金离子被逐渐还原,从而形成GNS^[15-16]。另外,SH-PEG-NH₂具有高度的稳定性和良好的生物相容性,因此用其来包覆GNS,从而解决GNS分散性差等问题^[17-18]。合成的具体步骤^[12,19]如下:(1)合成金纳米种子(seeds)。在50 ml无菌锥形瓶中加入20 ml氯金酸溶液(1 mmol/L),加热匀速搅拌至溶液沸腾,迅速加入3 ml柠檬酸三钠(0.01 g/ml),搅拌至溶液不变色,随后置于4℃备用。(2)合成GNS。在50 ml无菌锥形瓶中依次加入20 ml氯金酸溶液(0.25 mmol/L)、0.2 mL盐酸(1 mmol/L)、2 ml金纳米种子、0.2 ml硝酸银溶液(3 mmol/L)、0.1 ml抗坏血酸溶液(0.1 mmol/L),室温下快速搅拌1 min,即可得到GNS。(3)GNS修饰。将适量的SH-PEG-NH₂加入到上述合成的GNS溶液中,室温下快速搅拌12 h,即可得到GNS-PEG。(4)GNS-PEG负载Ce6。将适量的Ce6加入到GNS-PEG溶液中,37℃的恒温震荡箱中避光共孵育12 h,离心洗涤得到探针GNS-PEG@Ce6。

取适量刚合成的探针GNS-PEG@Ce6悬液,通过粒径仪检测探针的平均粒径及分布情况。

同时滴1滴探针悬液于硅片及铜网上,将硅片及铜网上的悬液室温下晾干,扫描电镜与透射电镜观察探针形态并拍照。

探针GNS-PEG@Ce6浓度以负载上的Ce6计算:通过紫外分光光度计测定并得到Ce6标准曲线,从而计算包封率。

1.4 激光共聚焦显微镜观察A549细胞对GNS-PEG@Ce6的吞噬作用

取对数生长期的A549细胞,以3×10⁵个/孔的密度接种于共聚焦培养皿中,分别标记为0.5、6、12 h。待细胞贴壁后按上述标记加入5 μg/ml的Ce6或探针GNS-PEG@Ce6处理相应时间。吸弃上清,用PBS洗涤2次,以4%多聚甲醛固定,室温放置20 min后,每孔加入PBS洗涤2次。随后加入Hoechst 33342染色液在室温染色20 min,每孔加1 ml PBS,激光共聚焦显微镜下观察。

1.5 MTT法检测GNS-PEG@Ce6经激光PDT对A549细胞的体外杀伤作用

实验分为实验组及空白对照组:空白对照组为不加光敏剂的单纯对照组;根据光敏剂的不同,实验组分为GNS-PEG@Ce6和Ce6组。取对数生长期A549细胞以5 000个/孔的密度接种于96孔细胞培养板中,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养24

h, 细胞贴壁后使用。吸弃培养液, 分别加入浓度为 1、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 的 Ce6 或 GNS-PEG@Ce6, 药物作用 24 h 后吸弃孔内液体, 用 PBS 洗涤后, 每孔重新加入 100 μl 培养液。每孔用波长为 633 nm 的氦氖激光器 He-Ne NIR 照射 60 s。照光后的细胞培养 12 h, 每孔加入 0.5 mg/ml 的 MTT 溶液 100 μl , 继续避光孵育 4 h 后终止培养。弃上清, 每孔加入 200 μl 二甲亚砜溶液 (DMSO), 摇床轻摇 10 min 使甲臞晶体充分溶解。用酶标仪测定 490 nm 波长处的各孔光密度 (D) 值, 每组重复 3 次, 分别求出各组细胞增殖活力。细胞增殖活力 (%) = $[D(\text{加药组}) - D(\text{空白组})] / [D(0 \text{加药组}) - D(\text{空白组})]$, 从而对比两种药物对于 A549 细胞的细胞毒性。

1.6 流式细胞仪检测 GNS-PEG@Ce6 对 A549 细胞经体外 PDT 导致 A549 细胞凋亡的影响

取对数生长期的 A549 细胞, 以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板, 分别标记为 A549+光照 (laser) 组、A549+Ce6+laser 组、A549+GNS-PEG@Ce6+laser 组。待细胞贴壁后按上述分组加入浓度 5 $\mu\text{g/ml}$ 的 Ce6 或 GNS-PEG@Ce6 处理 24 h。吸弃上清, 用 PBS 洗涤 2 次后每孔加入 2 ml 培养液。每孔用波长为 633 nm 的 He-Ne NIR 照射 6 min 后继续避光孵育 12 h。另一 6 孔板, 标记为 A549 组、A549+Ce6 组、A549+GNS-PEG@Ce6 组, 待细胞贴壁后按分组加入浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 的 Ce6 或 GNS-PEG@Ce6 处理 24 h 后终止培养。各组细胞终止培养后用胰酶消化 (其中上清和洗涤液也收集, 不丢弃) 后离心, PBS 洗涤 2 次, 每组收集 $(1 \sim 5) \times 10^5$ 个细胞。每管细胞用 100 μl 的结合缓冲液重悬后, 加入 5 μl 的 Annexin V-FITC 和 10 μl 的 PI 染色液, 混匀, 避光室温染色 15 min。随后加入 400 μl 的 1 \times 结合缓冲液, 混匀, 上流式细胞仪检测。

1.7 统计学处理

采用 SPSS15.0 软件进行数据统计, 组间数据资料对比采用 ANOVA 分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 探针 GNS-PEG@Ce6 的表征

2.1.1 探针 GNS-PEG@Ce6 的粒径 使用粒径仪检测合成的 GNS-PEG@Ce6 粒径大小。GNS-PEG@Ce6 的粒径分布情况如图 1 所示, GNS-PEG@Ce6 粒径在 100 nm 左右, 且粒径较均一。

2.1.2 探针 GNS-PEG@Ce6 的形态 使用扫描电镜和透射电镜观察探针 GNS-PEG@Ce6 的形态, GNS-PEG@Ce6 的扫描电镜图如图 2A 所示, 透射电镜图如图 2B 所示。探针 GNS-PEG@Ce6 形貌均一, 粒径在

70 nm 左右, 这与粒径分布情况大致相符。本研究中合成的探针 GNS-PEG@Ce6 棱角分明, 分散性好。

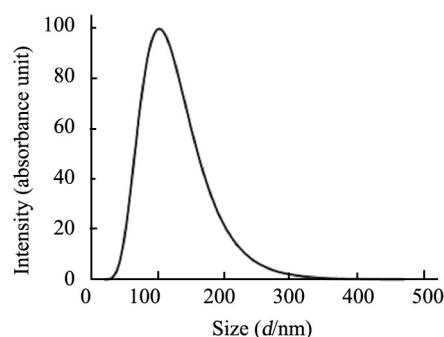


图1 GNS-PEG@Ce6 粒径分布
Fig.1 Size distribution of GNS-PEG@Ce6

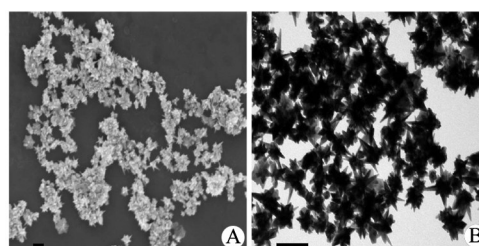


图2 GNS-PEG@Ce6 的扫描电镜(A)和透射电镜(B)图(标尺=100 nm)

Fig.2 SEM (A) and TEM (B) images of GNS-PEG@Ce6 (The scale bar is 100 nm)

2.1.3 探针 GNS-PEG@Ce6 包封率 Ce6 的标准曲线如图 3 所示, $Y = 0.0797 \cdot X - 0.2312$ ($R^2 = 0.99953$), 该曲线中各点较均匀的分散在曲线的两侧, 且分散系数为 0.999, 说明该标准曲线拟合程度高, 误差小, 可以进一步应用。本研究计算得出 GNS-PEG@Ce6 中 Ce6 的包封率为 50% 左右。

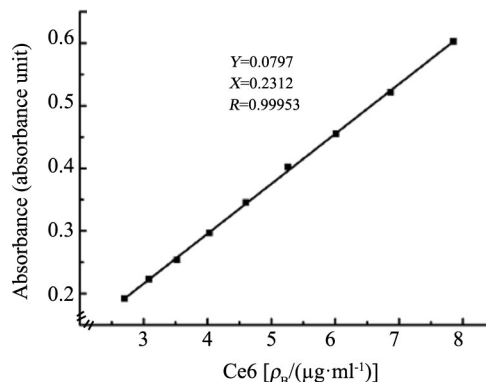


图3 Ce6 的标准曲线

Fig.3 The standard curve of Ce6

2.1.4 紫外分光光度计表征 分别将 GNS、PEG、

Ce6、GNS-PEG、GNS-PEG@Ce6这5种溶液分散于超纯水中用紫外分光光度计测定的情况如图4所示。GNS在波长700 nm处有一个明显的紫外吸收峰,与文献报道相符,说明本研究中合成的深蓝色溶液即为GNS。SH-PEG-NH₂没有明显的紫外特征峰,与图中GNS-PEG、GNS相似的紫外特征峰一致。Ce6在波长400 nm和660 nm有特征峰,探针GNS-PEG@Ce6在相应波长处也出现了与Ce6相同的特征峰,从而说明了Ce6已成功负载到该纳米探针GNS-PEG@Ce6中。

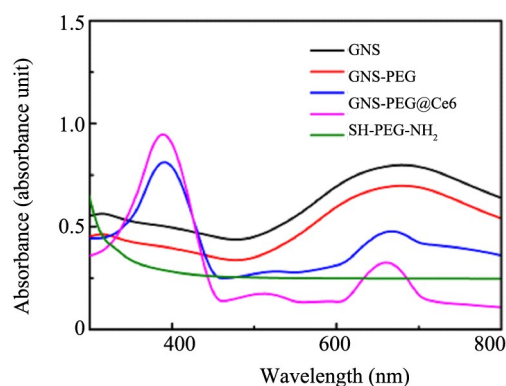


图4 GNS、PEG、Ce6、GNS-PEG、GNS-PEG@Ce6的紫外可见吸收光谱

Fig.4 UV-Vis spectrophotometry of GNS, GNS-PEG, GNS-PEG@Ce6, Ce6 and SH-PEG-NH₂

2.2 A549细胞对GNS-PEG@Ce6有较强吞噬作用

使用激光共聚焦显微镜来观察A549细胞吞噬探针GNS-PEG@Ce6与Ce6的情况,在相应激发光的照射下,Hoechst 33342染色液将A549细胞的细胞核染成蓝色,Ce6与GNS-PEG@Ce6发红色荧光,从而通过观察两种荧光在细胞内的分布来比较两组物质进入细胞的情况。如图5所示,蓝色荧光明显,说明Hoechst 33342染色液成功将A549细胞的细胞核染色。实验中观察到,共孵育时间对细胞吞噬Ce6量的影响表现为当A549细胞与Ce6或GNS-PEG@Ce6共孵育0.5 h时,细胞内几乎看不到任何红色荧光,说明在该时间内两组物质几乎都未进入细胞;当孵育至6 h时,Ce6组细胞内出现些许红色荧光,而GNS-PEG@Ce6组细胞内出现较明显的红色荧光,说明此时两组物质逐渐进入细胞,而相较于Ce6,GNS-PEG@Ce6进入细胞的量更多。当孵育时间延长至12 h,两组的红色荧光强度均增强,且GNS-PEG@Ce6组的红色荧光仍然强于Ce6组,说明随着时间的延长,两组物质逐渐被细胞吞噬,并且经GNS修饰的Ce6能更有效地进入细胞。Ce6能进入细胞是进行细胞成像的先决条件,实验证明GNS-

PEG@Ce6较疏水性的Ce6能更容易地进入细胞,从而能更好地发挥光动力治疗效果。

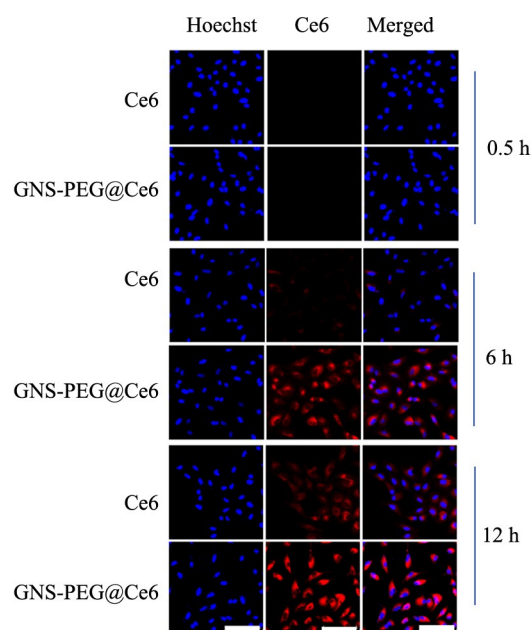


图5 A549细胞与Ce6或GNS-PEG@Ce6共孵育0.5、6和12 h的激光共聚焦图(标尺=100 nm)

Fig.5 Confocal images of A549 cells co-incubation with free Ce6 or GNS-PEG@Ce6 for 0.5, 6 and 12 h(The scale bar is 100 nm)

2.3 GNS-PEG@Ce6对A549细胞有明显的PDT效果

2.3.1 增殖抑制效果

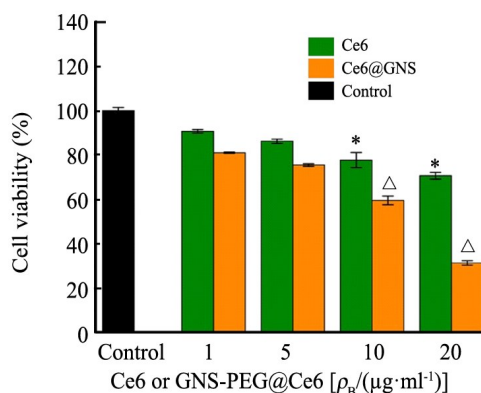
通过MTT法比较在He-Ne NIR照射下,探针GNS-PEG@Ce6或Ce6与A549细胞共孵育时的细胞存活率。如图6所示,在两者质量浓度均为1 μg/ml时,Ce6组的细胞存活率为(91±0.008)%,而GNS-PEG@Ce6组的细胞存活率仅有(81±0.003)%。随着浓度的升高,两者的杀伤活性也逐渐增大。当浓度为20 μg/ml时,两组的细胞存活率差异显著[(71±0.015)% vs (31±0.010)%, $P<0.05$]。这表明在激光照射下,探针GNS-PEG@Ce6较Ce6对A549细胞有更好的光动力治疗效果。

2.3.2 致凋亡与坏死效果

使用流式细胞仪比较GNS-PEG@Ce6与Ce6在体外的光动力治疗效果(图7),实验分为6组,分别为A: A549组;B: A549+laser组;C: A549+Ce6组;D: A549+GNS-PEG@Ce6组;E: A549+Ce6+laser组;F: A549+GNS-PEG@Ce6+laser组。前四组的细胞凋亡和坏死的比例均很小(细胞死亡率<5%),说明A549细胞在无激光照射时,或与Ce6共孵育时,或与GNS-PEG@Ce6共孵育时,对细胞影响均较小,基本无细胞毒性,可以进一步地应用到生物体内。Ce6+laser组的细胞坏死和晚期凋亡率为72.4%,而GNS-PEG@Ce6+laser组的细胞坏死和晚期凋亡率为88.9%。

3 讨论

近年来,纳米材料中的贵金属纳米材料(特别是金纳米颗粒),因其独特的光学性质和优异的生物相容性而得到广泛关注,其制备和应用已成为肿瘤诊断和治疗领域中的研究热点^[20-22]。金纳米颗粒能与各种生物分子、药物和配体连接形成具有特殊功能的探针,以实现靶向递送和治疗。其中PEG修饰是金纳米颗粒最常用的化学修饰方法之一^[23]。金纳米颗粒表面与PEG一端的巯基很容易通过金-硫键发生反应,从而在金纳米颗粒表面形成PEG层,使其在水溶液中保持良好的分散性^[24]。



* $P < 0.05$ vs Control; [△] $P < 0.05$ vs Ce6

图6 MTT法比较Ce6或GNS-PEG@Ce6与A549细胞共孵育时细胞存活率

Fig.6 Cell viability of A549 cells co-incubated with free Ce6 or GNS-PEG@Ce6 analyzed by MTT assay

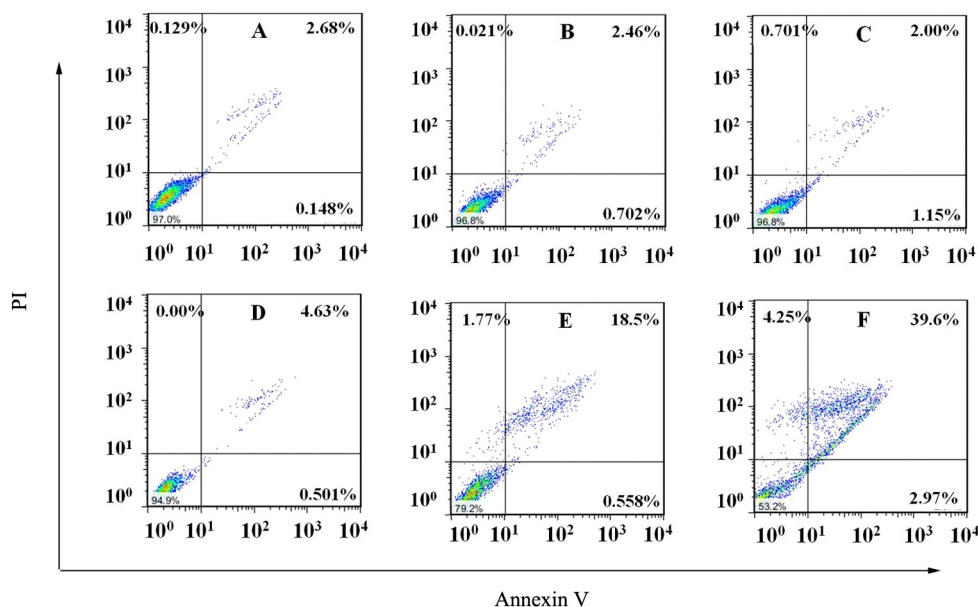


图7 Ce6和GNS-PEG@Ce6对A549细胞的PDT作用的流式细胞术分析

Fig.7 PDT effect of free Ce6 and GNS-PEG@Ce6 on A549 cells detected by FCM

本研究先用SH-PEG-NH₂来修饰GNS,再物理吸附上光敏剂Ce6,形成具有光动力治疗作用的探针GNS-PEG@Ce6。根据粒径仪和扫描电镜、透射电镜观察结果表明探针GNS-PEG@Ce6棱角分明,形貌均一,分散性好,粒径在70 nm左右。本研究中探针GNS-PEG@Ce6浓度以负载上的Ce6计算,可以得到Ce6的包封率为50%左右。本研究中用物理吸附方法来负载光敏剂Ce6,方法简单有效,且包封率较共价偶联高得多^[25]。根据GNS、PEG、Ce6、GNS-PEG、GNS-PEG@Ce6这5种溶液的紫外分光光度图显示,探针GNS-PEG@Ce6在波长700 nm处有一个与GNS相似的紫外特征峰,在波长400和660 nm处有与光敏剂Ce6相似的特征峰,从而说明了Ce6已成功负载

到该纳米探针GNS-PEG@Ce6中^[26]。

根据激光共聚焦结果显示,当A549细胞与Ce6或GNS-PEG@Ce6共孵育0.5 h时,两组物质几乎都未进入细胞;当孵育时间到6 h时,GNS-PEG@Ce6组较Ce6组细胞内出现较明显的红色荧光,说明随着孵育时间的延长,两组物质逐渐进入细胞,且GNS-PEG@Ce6比Ce6进入细胞的量更多。随着时间的延长,两者进入细胞的量逐渐增多,且荧光对比差异越来越明显。说明随着孵育时间的增加,Ce6与GNS-PEG@Ce6逐渐被细胞吞噬,且经GNS修饰的Ce6能更有效地进入细胞。Ce6能进入细胞是进行细胞成像的先决条件,该研究证明GNS-PEG@Ce6较疏水性的Ce6能更容易地进入细胞,这可能是GNS-

PEG@Ce6的光动力作用效果强于Ce6的原因之一^[27-29]。本研究发现,在NIR照射下,Ce6与GNS-PEG@Ce6的细胞毒性均随其浓度(1~20 μg/mL)的增大而增加,并且与探针GNS-PEG@Ce6共孵育的A549细胞的存活率明显低于与Ce6共孵育的细胞,且两者的杀伤活性差异越来越大。说明在激光照射下,探针GNS-PEG@Ce6的PDT作用明显强于Ce6。最后使用流式细胞仪比较两者在体外的光动力治疗效果,结果显示A549细胞在无激光照射下,与Ce6或GNS-PEG@Ce6共孵育时,细胞的损伤均较小,基本无细胞毒性,可以进一步地应用到生物体内。而在激光照射下,Ce6+laser组与GNS-PEG@Ce6+laser组的细胞坏死和晚期凋亡率分别为72.4%、88.9%,这说明激光照射后,Ce6发挥了光动力治疗效果,且GNS-PEG@Ce6的杀伤效果强于Ce6。MTT结果与流式结果相符,共同印证了探针GNS-PEG@Ce6相较于光敏剂Ce6有更强大的光动力治疗效果^[30]。

综上所述,本文成功制备了以GNS为纳米载体、负载光敏剂Ce6的新型NIR刺激响应的探针GNS-PEG@Ce6,其对肺癌A549细胞的光动力治疗效果明显强于Ce6。

[参 考 文 献]

- [1] QUIRK B J, BRANDAL G, DONLON S, et al. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors--where do we stand?[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2015, 12(3): 530-544. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2015.04.009.
- [2] DĄBROWSKI J M, ARNAUT L G. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment[J]. Photochem Photobiol Sci, 2015, 14(10): 1765-1780. DOI: 10.1039/c5pp00132c.
- [3] MORET F, SCHEGLMANN D, REDDI E. Folate-targeted PEGylated liposomes improve the selectivity of PDT with meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) [J]. Photochem Photobiol Sci, 2013, 12(5): 823-834. DOI: 10.1039/c3pp25384h.
- [4] MIAO W, SHIM G, LEE S, et al. Safety and tumor tissue accumulation of pegylated graphene oxide nanosheets for co-delivery of anti-cancer drug and photosensitizer[J]. Biomaterials, 2013, 34(13): 3402-3410. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.010.
- [5] YUE C, ZHANG C, ALFRANCA G, et al. Near-infrared light triggered ROS-activated theranostic platform based on Ce6-CPT-UC-NPs for simultaneous fluorescence imaging and chemo-photodynamic combined therapy[J]. Theranostics, 2016, 6(4): 456-469. DOI: 10.7150/thno.14101.
- [6] KIM K, LEE C S, NA K. Light-controlled reactive oxygen species (ROS)-producible polymeric micelles with simultaneous drug-release triggering and endo / lysosomal escape[J]. Chem Commun (Camb), 2016, 52(13): 2839-2842. DOI: 10.1039/c5cc09239f.
- [7] YUAN H, FALES A M, VO-DINH T. TAT peptide-functionalized gold nanostars: enhanced intracellular delivery and efficient NIR photothermal therapy using ultralow irradiance[J]. J Am Chem Soc, 2012, 134(28): 11358-11361. DOI: 10.1021/ja304180y.
- [8] YANG Y, ZHANG J, XIA F, et al. Human CIK cells loaded with Au nanorods as a theranostic platform for targeted photoacoustic imaging and enhanced immunotherapy and photothermal therapy[J/OL]. Nanoscale Res Lett, 2016, 11(1): 285[2017-12-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4894853/>. DOI: 10.1186/s11671-016-1468-8.
- [9] ZHANG J J, XIA F F, YANG F, et al. Human CIK cells loaded with gold nanoprisms as theranostic platform for targeted photoacoustic imaging and enhanced immuno-photothermal combined therapy[J]. Nano Biomed Eng, 2016, 8(3): 112-127. DOI: 10.5101/nbe.v8i3.p112-127.
- [10] DACARRO G, PALLAVICINI P, BERTANI S M, et al. Synthesis of reduced-size gold nanostars and internalization in SH-SY5Y cells[J/OL]. J Colloid Interface Sci, 2017, 505: 1055-1064[2017-12-19]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9797\(17\)30767-1](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9797(17)30767-1). DOI: 10.1016/j.jcis.2017.06.102.
- [11] CHATTERJEE S, RINGANE A B, ARYA A, et al. A high-yield, one-step synthesis of surfactant-free gold nanostars and numerical study for single-molecule SERS application[J/OL]. J Nanoparticle Res, 2016, 18(8): 242[2017-12-19]. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-016-3557-0?view=classic>.
- [12] LIU Y, ZHI X, YANG M, et al. Tumor-triggered drug release from calcium carbonate-encapsulated gold nanostars for near-infrared photodynamic / photothermal combination antitumor therapy[J]. Theranostics, 2017, 7(6): 1650-1662. DOI: 10.7150/thno.17602.
- [13] HE R, WANG Y C, WANG X, et al. Facile synthesis of pentacle gold-copper alloy nanocrystals and their plasmonic and catalytic properties [J/OL]. Nat Commun, 2014, 5: 4327[2017-12-19]. <https://www.nature.com/articles/ncomms5327>. DOI: 10.1038/ncomms 5327.
- [14] LAI Y M, LI F, SUN S Q. Controlled surface enhanced resonance raman scattering (SERRS) in biological environment[J]. Integrated Ferroelectrics, 2013, 146(1): 88-98. DOI: 10.1080/10584587.2013.789736.
- [15] BURROWS N D, HARVEY S, IDESIS F A, et al. Understanding the seed-mediated growth of gold nanorods through a fractional factorial design of experiments[J]. Langmuir, 2017, 33(8): 1891-1907. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b03606.
- [16] PARK K, HSIAO M S, YI Y J, et al. Highly concentrated seed-mediated synthesis of monodispersed gold nanorods[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(31): 26363-26371. DOI: 10.1021 / acsami.7b08003.
- [17] HARRISON E, NICOL J R, MACIAS-MONTERO M, et al. A comparison of gold nanoparticle surface co-functionalization approaches using Polyethylene Glycol (PEG) and the effect on stability, non-specific protein adsorption and internalization[J / OL]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 62: 710-718[2017-12-19]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928-4931\(16\)30096-0](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928-4931(16)30096-0). DOI: 10.1016/j.msec.2016.02.003.
- [18] SINGH L, PARBOOSING R, KRUGER H G, et al. Intracellular localization of gold nanoparticles with targeted delivery in MT-4 lymphocytes[J/OL]. Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol, 2016, 7(4): 045013 [2017-12-19]. https://www.researchgate.net/publication/309163526_Intracellular_localization_of_gold_nanoparticles_with_targeted_delivery_in_MT-4_lymphocytes. DOI: 10.1088/2043-6262/7/4/045013.
- [19] JAYASEELAN C, RAMKUMAR R, RAHUMAN A A, et al. Green

- synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of *Abelmoschus esculentus* and its antifungal activity[J/OL]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 45: 423-429[2017-12-19]. http://xueshu.baidu.com/s?wd=paperuri%3A%282997078802e17200404b3ea6b88fd5fb%29&filter=sc_long_sign&tn=SE_xueshusource_2kduw22v&sc_vurl=http%3A%2F%2Furopepmc.org%2Fabstract%2FAGR%2FIND500606611&ie=utf-8&sc_us=17221946897300815476. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.12.019.
- [20] SCOTT A W, GARIMELLA V, CALABRESE C M, et al. Universal biotin-PEG-linked gold nanoparticle probes for the simultaneous detection of nucleic acids and proteins[J]. *Bioconjug Chem*, 2017, 28(1): 203-211. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00529.
- [21] BALAMURUGAN M, KAUSHIK S, SARAVANAN S. Green synthesis of gold nanoparticles by using *Peltophorum pterocarpum* flower extracts[J]. *Nano Biomedicine & Engineering*, 2016, 8(4): 213-218. DOI: 10.5101/nbe.v8i4.p213-218.
- [22] KAPUR A, ALDEEK F, JI X, et al. Self-assembled gold nanoparticle-fluorescent protein conjugates as platforms for sensing thiolate compounds via modulation of energy transfer quenching[J]. *Bioconjug Chem*, 2017, 28(2): 678-687. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00006.
- [23] LEOPOLD L F, TODOR I S, DIACONEASA Z, et al. Assessment of PEG&BSA-PEG gold nanoparticles cellular interaction[J/OL]. *Colloids & Surfaces A-Physicochemical & Engineering Aspects*, 2017, 532: 70-76[2017-12-19]. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.06.061>. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2017.06.061.
- [24] TAMARKIN L, I KINGSTON D G. Exposing the tumor microenvironment: how gold nanoparticles enhance and refine drug delivery[J]. *Ther Deliv*, 2017, 8(6): 363-366. DOI: 10.4155/tde-2016-0095.
- [25] HE D G, HAI L, HE X, et al. Glutathione-activatable and O₂/Mn²⁺-Evolving nanocomposite for highly efficient and selective photodynamic and gene-silencing dual therapy[J/OL]. *Adv Func Materials*, 2017, 27(46): 1704089[2017-12-19]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adfm.201704089/pdf>. DOI: 10.1002/adfm.201704089.
- [26] FAN H, ZHAO Z, YAN G, et al. A smart DNAzyme-MnO₂ nanosystem for efficient gene silencing[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 127(16): 4883-4887. DOI: 10.1002/anie.201411417.
- [27] LUO W, LIU R S, ZHU J G, et al. Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca8113 cell line[J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(2): 551-556. DOI: 10.3892/ol.2014.2720.
- [28] ROSIN F C P, CORRÊA L, ROSIN F C P, et al. Resistance of oral squamous cell carcinoma cells to 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy[J/OL]. *Photodia Photodyn Ther*, 2017, 17: A70 [2017-12-19]. https://www.researchgate.net/publication/315461231_Resistance_of_oral_squamous_cell_carcinoma_cells_to_5-aminolevulinic_acid-mediated_photodynamic_therapy. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.01.159.
- [29] LI Y, YU Y, KANG L, et al. Effects of chlorin e6-mediated photodynamic therapy on human colon cancer SW480 cells[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(12): 4867-4876.
- [30] XUE Q, WANG X, WANG P, et al. Role of p38MAPK in apoptosis and autophagy responses to photodynamic therapy with Chlorin e6[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2015, 12(1): 84-91. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.12.001.

[收稿日期] 2017-12-20

[修回日期] 2018-03-05

[本文编辑] 黄静怡