

# 15 nm 聚乙二醇保护的 Au 纳米颗粒对 HepG2 细胞的放射增敏作用

张晓东 宋莎莎 陈婕 吴迪 沈秀 孙元明 刘培勋

**【摘要】目的** 研究 Au 纳米颗粒对 HepG2 细胞的放射增敏作用。**方法** 首先制备典型的 15 nm 聚乙二醇(PEG)包裹的 Au 纳米颗粒, 然后使用紫外可见分光光度计实时定量检测纳米颗粒的血浆稳定性, 同时使用噻唑蓝法研究给药后 24 h 和 48 h 的细胞活性, 最后, 通过克隆形成实验研究不同浓度的 Au 纳米颗粒对 HepG2 细胞的放射增敏作用。**结果** PEG 包裹的 Au 纳米颗粒具有较好的血浆稳定性, 在 24 h 及以后未见表面等离子共振吸收峰有明显的偏移。细胞活性实验表明, 24 h 后, 细胞的活性有所降低, 但是 48 h 后细胞的活性迅速恢复到 90%。进一步研究克隆形成发现, Au 纳米颗粒具有明显的放射增敏作用。**结论** 15 nm PEG 包裹的 Au 纳米颗粒具有较高的血浆稳定性、较低的细胞毒性和较好的放射增敏作用。

**【关键词】** 聚乙烯二醇类; 金纳米颗粒; 放射增敏

**Radiosensitivity enhancement of typical 15 nm polyethylene-glycol-coated Au nanoparticles on HepG2 cell** Zhang Xiaodong, Song Shasha, Chen Jie, Wu Di, Shen Xiu, Sun Yuanming, Liu Peixun. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Zhang Xiaodong, Email: xiaodongzhang@irm-cams.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the radiosensitivity enhancement of Au nanoparticles to HepG2 cell. **Methods** 15 nm polyethylene-glycol-coated(PEG) Au nanoparticles were synthesized, and then blood stability were tested by using the UV-vis optical absorption. Meanwhile, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide methods were used to investigate the cell viability after 24 and 48 hours treatments, and cloning formation were used to investigate the radiosensitivity enhancement. **Results** It was found that PEG-coated Au nanoparticles presented a high blood stability, and surface plasmon response has not shown significant changes after 24 hours. Cell viability was decreased after 24 hours treatment, but it was recovered to 90% after 48 hours. Cloning formation showed Au nanoparticles presented a significant radiosensitivity enhancement. **Conclusion** 15 nm PEG-coated Au nanoparticles presented a good blood stability, low cytotoxicity and high radiosensitivity enhancement.

**【Key words】** Polyethylene glycols; Gold nanoparticles; Radiation sensitizing

肿瘤的治疗是人类一直追求的目标, 其中放射治疗是治疗肿瘤的主要手段。据统计, 每年有 60% 以上的肿瘤患者要接受放射治疗。因此, 提高肿瘤的放射治疗效果, 降低正常组织的辐射剂量, 对于肿瘤的放射治疗具有重要的科学意义和实用价值。

DOI: 10. 3760 / cma. j. issn. 1673-4114. 2014. 01. 002

**基金项目:** 国家自然科学基金(81000668); 天津市自然科学基金(13JCQNJC13500); 中国医学科学院放射医学研究所基金(SF1207; SZ1336); 北京协和医学院协和新星基金(人 1256); 北京协和医学院青年基金(院 1343)

**作者单位:** 300192 天津, 北京协和医学院中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室

**通信作者:** 张晓东 (Email: xiaodongzhang@irm-cams.ac.cn)

高能 $\gamma$ 射线和 X 射线与物质的主要作用方式包括康普顿散射和光电吸收, 而物质的光电吸收与重金属原子的原子序数密切相关。也就是说, 原子序数越高, 其放射增敏效果越明显。Au 的原子序数为 79, 明显高于临床常使用的 I (原子序数为 53) 及其化合物。然而, 离子状态的 Au 具有较强的活性, 其表面容易与体内的各种蛋白相互结合, 最终导致较强的毒性。与 Au 离子相比, Au 纳米颗粒具有明显的优势, 首先, Au 纳米颗粒具有较强的高通透性和滞留效应 [(enhanced permeability and retention, EPR) 效应], 有利于放射治疗; 其

次, 相对于 Au 离子, Au 纳米颗粒的毒性较低; 最后, Au 纳米颗粒的表面容易修饰, 具有更为广泛的医学用途。Au 纳米颗粒由于其独特的光学<sup>[1-3]</sup>和表面化学特性<sup>[4-6]</sup>, 以及在光热治疗<sup>[7-8]</sup>、放射治疗<sup>[9-10]</sup>和 X 射线造影剂<sup>[11-13]</sup>等方面的潜在应用, 引起了人们广泛的兴趣。Hainfeld 等<sup>[14]</sup>使用尺寸为 1.9 nm 的裸 Au 颗粒, 发现小鼠连续照射后其肿瘤体积明显变小, 直至消失, 而没有辐照的小鼠全部死亡。此后, 多个团队也研究发现 Au 纳米颗粒具有明显的放射增敏作用<sup>[11-14]</sup>。

然而, 纳米材料在生理环境中的形成是个极其复杂的过程。大量研究表明, Au 纳米材料的生物学反应与其表面化学<sup>[14-16]</sup>、尺寸<sup>[17-19]</sup>和给药方式<sup>[20]</sup>有关。一方面, 我们研究发现, 表面化学可以影响 Au 纳米颗粒在生理环境中的稳定性, 从而影响其毒性; 裸的 Au 纳米颗粒在血液中与蛋白作用形成 100 nm 的聚集体, 然后被内皮网状系统吸收到达肝脏和脾脏<sup>[21-23]</sup>。聚乙二醇 (polyethylene glycols, PEG) 包裹层通过降低表面电势来提高 Au 纳米颗粒的稳定性<sup>[24]</sup>。另一方面, 我们发现, 小尺寸的 Au 纳米颗粒具有更强的 EPR 效应, 可以在肿瘤组织中更好地富集, 从而达到治疗的效果。

本研究以 15 nm 的 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒为材料, 从物理学性质、血浆稳定性、体外的细胞活性、体外放射增敏作用等几个方面来研究其生物学反应。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料

PEG-SH 购自德国 Serva 公司, 氯金酸 (HAuCl<sub>4</sub>, 分析纯)、柠檬酸钠试剂均购于国药集团上海化学试剂有限公司, UV-1750 型紫外-可见分光光度计购自岛津仪器 (苏州) 有限公司, 噻唑蓝、PBS 购自北京索莱宝科技有限公司, HepG2 细胞 (人肝癌细胞) 由我所提供。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒的制备

将柠檬酸钠 (3 ml, 6 mg/ml) 加到氯金酸溶液 (19.7 ml, 0.1%) 中, 在 90 °C 的条件下搅拌 1 h, 即可制得 Au 纳米颗粒溶液, 置于 4 °C 备用。然后, 取 10 mg 的 PEG-SH 室温下加入到 Au 纳米颗粒的溶液中, 反应 24 h。随后使用截留分子质量为 3000 的超滤管超滤, 得到 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒。

#### 1.2.2 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒的光学特性测定

使用透射电子显微镜 (JEM-2100F, 日本电子株式会社生产) 观测 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒的形貌和尺寸, 工作电压为 200 kV。用紫外分光光度计测 Au 纳米颗粒的紫外吸收光谱, 其光谱测量范围为 400~800 nm。

#### 1.2.3 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒在血浆中的稳定性测定

取 0.2 ml PEG 包裹的 Au 纳米颗粒加入到 0.8 ml 的血浆中, 充分均匀搅拌, 然后使用紫外-可见分光光度计测量上述溶液分别在 0、0.5、1、2、6、12、24 h 各时间点的光学吸收谱。

#### 1.2.4 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒对 HepG2 细胞的毒性实验

在 96 孔培养板的每孔铺 6 000 个处于对数期的 HepG2 细胞, 待细胞贴壁后, 加入浓度为 0~0.25 mmol/L 的 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒, 作用 24 h 和 48 h 后, 加入噻唑蓝继续培养 4 h, 终止培养后吸去培养液, 加入二甲基亚砜溶液, 用酶标仪在 492 nm 波长处测吸光度值, 做出 Au 纳米团簇毒性测试曲线, 从而判断 Au 纳米团簇的细胞毒性范围。

#### 1.2.5 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒对 HepG2 细胞的克隆形成实验

在 6 孔培养板的每孔铺 10 万个对数期的 HepG2 细胞, 待细胞贴壁后, 用含 0.05 和 0.1 mmol/L Au 纳米颗粒的培养基替换孔中原有的培养基, 24 h 后用 <sup>137</sup>Cs 进行照射, 照射剂量分别为 0、1、2、4、6、8 Gy。每个浓度、每个照射剂量设 3 个平行孔。照射后立即用新鲜培养基替换含 Au 纳米颗粒的培养基, 放置培养箱中进行培养。当 6 孔板中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。弃去上清液, 用 PBS 小心浸洗 2 次。加纯甲醇或醋酸甲醇混合液 (醋酸: 甲醇为 1:3) 5 ml, 固定 15 min。然后去掉固定液, 加适量 Giemsa 染色液染 10~30 min, 用流水缓慢洗去染色液, 放置空气中干燥。在显微镜下计数, 大于 50 个细胞为一个克隆, 计数克隆数。最后计算克隆形成率。

## 2 结果

### 2.1 Au 纳米颗粒的光学特性

图 1a 为 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒的透射电子显微镜图片, 从图中可以看出, PEG 包裹的 Au 纳米颗粒的平均尺寸为 15 nm, 而且具有较好的单分

散性。图 1b 是 PEG 包裹和未包裹的 Au 纳米颗粒的紫外吸收光谱图,从图中可以看出,在 525 nm 波长处出现了明显的吸收峰,即表面等离子共振峰。表面等离子共振峰与 Au 纳米颗粒的尺寸有很大关系,15 nm 的 Au 纳米颗粒对应于 525 nm 波长的表面等离子共振吸收。我们注意到,用 PEG 包裹后,Au 纳米颗粒吸收峰有微小的移动,这说明 PEG 包裹层对 Au 纳米颗粒的光学特性有微小的影响。

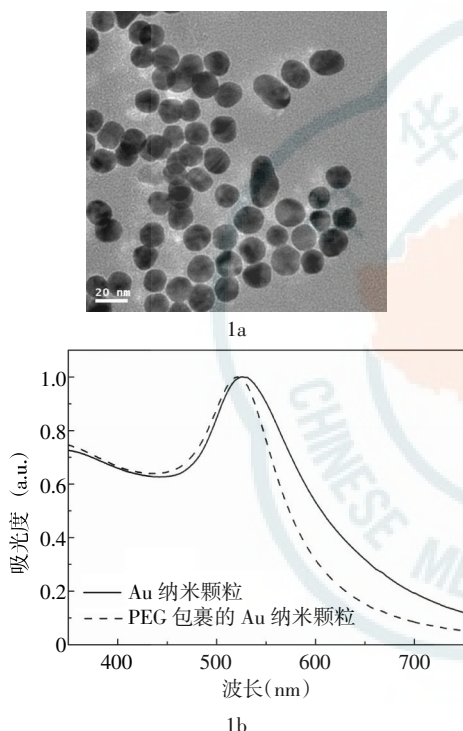


图 1 Au 纳米颗粒的透射电子显微镜图(1a)和紫外吸收光谱图(1b) 图中,PEG:聚乙二醇。

Fig.1 Transmission electron micrograph(1a) and optical absorption(1b) of 15 nm PEG coated Au nanoparticles

### 2.2 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒在血浆中的稳定性

血浆中 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒在 0、0.5、1、2、6、12、24 h 各时间点的稳定性检测结果见图 2。从图 2 可以看出,PEG 包裹的 Au 纳米颗粒加入血浆中后,仍然能清晰地看到 525 nm 波长处的表面等离子共振吸收峰,且随着反应时间的增加表面等离子峰强度逐渐降低,但是 Au 纳米颗粒的表面等离子共振吸收峰没有明显的移动。这说明,PEG 包裹的 Au 纳米颗粒在血浆中与各种蛋白发生了反应,并且形成了大的 Au 纳米颗粒-蛋白质杂化结构,即所谓的蛋白质电晕(corona)结构。表面等离子共振吸收峰没有移动说明 PEG 包裹的 Au 纳

米颗粒没有发生团聚,仍然保持其物理学特性。

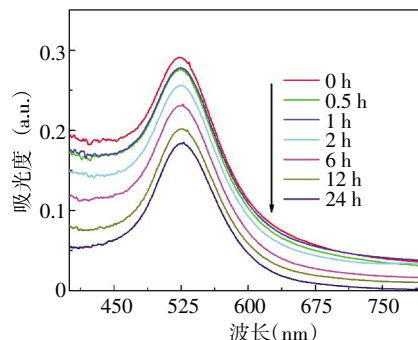


图 2 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒在血浆中的稳定性 图中,PEG:聚乙二醇。

Fig.2 The plasma stability of PEG coated Au nanoparticles overtime

### 2.3 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒对 HepG2 细胞的毒性

为了进一步研究 Au 纳米颗粒的体外毒性反应。本研究使用噻唑蓝比色法检测 24 和 48 h 时不同浓度的 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒对 HepG2 细胞活性的影响,结果见图 3。图 3 显示,在 24 h 时,0~0.03 mmol/L 的 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒对 HepG2 细胞的毒性较小,细胞活性较高,能达到 90%以上;然而当 Au 纳米颗粒的浓度大于 0.06 mmol/L 时,细胞活性逐渐降低,0.25 mmol/L 时降到 60%。在 48 h 时,HepG2 细胞的活性均较高,即使 Au 纳米颗粒的浓度为 0.25 mmol/L,细胞活性也能保持在 90%以上。结果显示,PEG 保护的 Au 纳米颗粒对 HepG2 细胞的毒性相对较低。

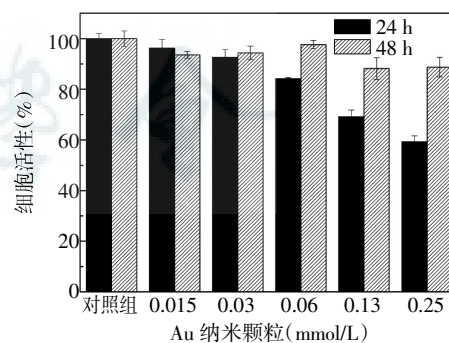


图 3 不同浓度的 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒对 HepG2 细胞活性的影响 图中,PEG:聚乙二醇;对照组:无 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒。

Fig.3 The cell viability of HepG2 cell after 24 h and 48 h of incubation with different concentrations of PEG coated Au nanoparticles

### 2.4 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒对 HepG2 细胞的放射增敏作用

不同剂量 <sup>137</sup>Cs 照射含 PEG 包裹的 Au 纳米颗

粒的 HepG2 细胞存活率结果见图 4。从图 4 可以看出,随着辐射剂量的增加,空白组(无 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒)和含 0.05、0.1 mmol/L PEG 包裹的 Au 纳米颗粒的 HepG2 细胞存活率逐渐降低。在 8 Gy 照射时,空白组的细胞存活率约为 3%,而含 0.05 和 0.1 mmol/L 的 Au 纳米颗粒的 HepG2 细胞存活率分别为 1.3% 和 0.9%,说明 Au 纳米颗粒表现出了明显的放射增敏作用。使用多靶单击拟合模型方程计算发现,PEG 包裹的 Au 纳米颗粒的放射增敏比为 1.31。

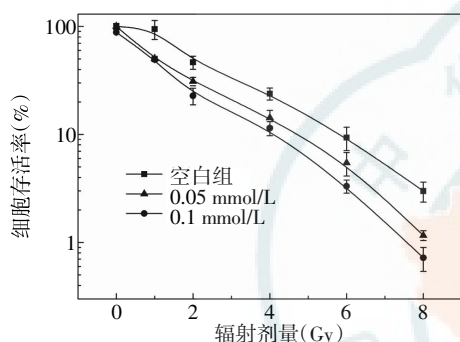


图 4  $^{137}\text{Cs}$  照射对含 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒的 HepG2 细胞存活率的影响 图中,PEG:聚乙二醇。

Fig.4 The cell viability of HepG2 cell incubating with PEG coated Au nanoparticles of different concentrations after irradiating by  $^{137}\text{Cs}$  of different dose

### 3 讨论

Au 纳米颗粒的物理性质与其大小和表面化学密切相关。对于尺寸大于 5 nm 的贵金属纳米颗粒,都会在不同波长范围内出现表面等离子共振吸收。以 Au 为例,其表面等离子共振峰位于 520 nm 波长处左右。我们之前系统地研究了不同大小尺寸的 Au 纳米颗粒的表面等离子共振,发现当 Au 纳米颗粒的尺寸从 5 nm 增加到 80 nm 时,其表面等离子共振吸收峰也将移动到 545 nm 波长左右的范围;另外一个影响其物理性质的因素就是 Au 纳米颗粒的表面化学,当 PEG 包裹了 Au 纳米颗粒以后,Au 纳米颗粒的亲水半径将增加,表面电子增加,因此表面等离子共振将略微增加,这与我们实验观测到的一致<sup>[24]</sup>。

通过进一步研究得知,当纳米材料与生物组织相互作用时,表面化学将扮演更为重要的角色。我们前期的研究发现,当纳米颗粒与血浆相互作用时,Au 纳米颗粒将首先与血液中的各种蛋白和酶迅速反应,生成各种新的 Au 纳米颗粒-蛋白质杂化

物,这种结构称为“蛋白质电晕”;我们前期的研究发现,对于 10~20 nm 的 Au 纳米颗粒,容易在血液中形成 30 nm 的蛋白质电晕,这些结构最终决定纳米颗粒的细胞摄取、细胞活性等生物界面的反应<sup>[7,9,16]</sup>。Au 纳米颗粒对其表面等离子共振极其敏感,从血浆稳定性实验中,没有发现明显的表面等离子共振吸收峰的移动,说明纳米颗粒没有发生严重的团聚;同时,表面等离子共振吸收逐渐降低,说明 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒已经和各种蛋白开始反应。PEG 是一种较为常用的生物包裹物,其可以降低对纳米颗粒的物理特性和血浆稳定性的影响。

Au 纳米颗粒的毒性也与诸多因素有关。其中最为重要的就是表面配体和细胞毒性,不同大小的纳米颗粒将决定其进入细胞膜的多少。大量的研究表明,与裸的 Au 纳米颗粒相比,PEG 包裹的 Au 纳米颗粒的细胞摄取要高很多,而且摄取的最佳时间为 6 h<sup>[24-25]</sup>。对于 15 nm 的 Au 纳米颗粒,其进入细胞的方式必然是内吞,而且需要消耗大量能量,这决定其过程必然要有各种蛋白参与。摄取的 Au 纳米颗粒在细胞内将与 DNA 发生相互作用,从而对细胞造成影响。PEG 保护层是一种较为稳定的结构,可以有效地降低裸 Au 与 DNA 发生相互作用而造成的损伤,从而降低毒性。

对于放射增敏作用,有很多的影响因素。一方面,其与细胞摄取有关。HepG2 细胞对 Au 纳米颗粒的摄取对其放射增敏作用产生很大的影响。已有研究表明,15 nm 的 PEG 包裹的 Au 纳米颗粒对肿瘤细胞的摄取较高,这为放射增敏提供了非常好的证据<sup>[7]</sup>。另一方面,Au 纳米颗粒的光电吸收截面较大,其对于  $\gamma$  射线的吸收较高。以 Au 为例,其在 100 keV 处的  $\gamma$  射线吸收系数为 5.18 cm<sup>2</sup>/g。高的  $\gamma$  射线吸收率导致了更多的次级电子,比如俄歇电子、散射的光电子和激发产生的特征 X 射线,这些射线都可以加速肿瘤细胞的死亡,从而起到增强放射治疗的作用。从材料上讲,选取较好的配体分子是未来的发展趋势。本实验中所选用的 PEG 包裹分子,可以有效改进 Au 纳米颗粒的血液稳定性,但是未来还可以进一步改进表面包裹层,从而达到更高的治疗效果。此外,尽管有一些体内的放射增敏研究,但是更深入的放射增敏的研究仍然很有必要,这将对纳米材料的使用起到极大的推动作用。

本实验研究了 15 nm 的 PEG 包裹的 Au 纳米颗

粒的血浆稳定性、体外毒性和放射增敏作用。结果表明, PEG 包裹的 Au 纳米颗粒在血浆中的稳定性较好, 表面等离子共振吸收峰没有明显移动。进一步研究的体外毒性表明, PEG 包裹的 Au 纳米颗粒的毒性较低, 48 h 后肿瘤细胞的活性仍能达到 90% 以上。放射增敏研究表明, Au 纳米颗粒具有一定的放射增敏作用, 其体外的增敏比可以达到 1.31。这些研究表明, Au 纳米颗粒具有较好的放射增敏作用, 对于其放射增敏作用可以通过改进纳米颗粒而进一步提高。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, et al. Gold nanoparticles for biology and medicine[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49(19): 3280–3294.
- [ 2 ] Eustis S, El-Sayed MA. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes[J]. *Chem Soc Rev*, 2006, 35(3): 209–217.
- [ 3 ] 陈婕, 张晓东, 吴迪, 等. 巯基-聚乙二醇修饰的不同尺寸金纳米颗粒的制备和光学特性[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2013, 37(1): 16–19.
- [ 4 ] Hu M, Chen J, Li ZY, et al. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2006, 35(11): 1084–1094.
- [ 5 ] Wang S, Huang P, Nie L, et al. Single continuous wave laser induced photodynamic/plasmonic photothermal therapy using photosensitizer-functionalized gold nanostars[J]. *Adv Mater*, 2013, 25(22): 3055–3061.
- [ 6 ] Luo Z, Yuan X, Yu Y, et al. From aggregation-induced emission of Au(I)-thiolate complexes to ultrabright Au(0)@Au(I)-thiolate core-shell nanoclusters[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(40): 16662–16670.
- [ 7 ] Zhang XD, Wu D, Shen X, et al. Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(16): 6408–6419.
- [ 8 ] Day ES, Bickford LR, Slater JH, et al. Antibody-conjugated gold-gold sulfide nanoparticles as multifunctional agents for imaging and therapy of breast cancer[J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, 5: 445–454.
- [ 9 ] Zhang XD, Chen J, Luo Z, et al. Enhanced tumor accumulation of sub-2 nm gold nanoclusters for cancer radiation therapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2014, 3(1): 131–141.
- [ 10 ] Rahman WN, Bishara N, Ackerly T, et al. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy[J]. *Nanomedicine*, 2009, 5(2): 136–142.
- [ 11 ] Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TM, et al. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent[J]. *Br J Radiol*, 2006, 79(939): 248–253.
- [ 12 ] Kim D, Park S, Lee JH, et al. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(24): 7661–7665.
- [ 13 ] Tong L, Wei Q, Wei A, et al. Gold nanorods as contrast agents for biological imaging: optical properties, surface conjugation and photothermal effects[J]. *Photochem Photobiol*, 2009, 85(1): 21–32.
- [ 14 ] Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, et al. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains [J]. *Bioconjug Chem*, 2004, 15(4): 897–900.
- [ 15 ] Hauck TS, Ghazani AA, Chan WC. Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells[J]. *Small*, 2008, 4(1): 153–159.
- [ 16 ] Zhang XD, Wu D, Shen X, et al. In vivo renal clearance, biodistribution, toxicity of gold nanoclusters[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(18): 4628–4638.
- [ 17 ] Pan Y, Neuss S, Leifert A, et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles[J]. *Small*, 2007, 3(11): 1941–1949.
- [ 18 ] De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(12): 1912–1919.
- [ 19 ] Zhang XD, Wu D, Shen X, et al. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 2071–2081.
- [ 20 ] Zhang G, Yang Z, Lu W, et al. Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(10): 1928–1936.
- [ 21 ] Lipka J, Semmler-Behnke M, Sperling RA, et al. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(25): 6574–6581.
- [ 22 ] Zhang XD, Wu HY, Wu D, et al. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes[J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, 5: 771–781.
- [ 23 ] Xie J, Zheng Y, Ying JY. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(3): 888–889.
- [ 24 ] Wu X, He X, Wang K, et al. Ultrasmall near-infrared gold nanoclusters for tumor fluorescence imaging in vivo [J]. *Nanoscale*, 2010, 2(10): 2244–2249.
- [ 25 ] Wu Z, Jin R. On the ligand's role in the fluorescence of gold nanoclusters[J]. *Nano Lett*, 2010, 10(7): 2568–2573.

(收稿日期: 2013-07-25)