doi: 10.7503/cjcu20180362

聚多巴胺包覆的金纳米棒用于 大鼠下颌下腺造影成像

宋子琦,公柏娟,王 璐,冯 婧,王 博,闫弘静,李志民,孙宏晨 (吉林大学口腔医院,长春 130021)

摘要 用生物相容性好且毒性低的聚多巴胺对金纳米棒进行表面包覆,利用其造影增强的功能,将聚多巴 胺包覆的金纳米棒应用于大鼠下颌下腺导管,实现了下颌下腺造影成像.

关键词 金纳米棒; 计算机体层扫描; 下颌下腺; 造影成像

中图分类号 0631 文献标志码 A

X 射线普通检查(平片检查)和计算机体层扫描(CT)是根据动物体内各组织器官的密度不同,对 X 射线吸收程度各异而形成不同的影像进行诊断,主要用于判断病变的部位、大小、范围及性质 等^[1-5].当某些组织和器官密度与邻近的组织或病变的密度相同或相近时,无法显示其差异,不能达到 诊断要求,造影剂能够改进组织器官与邻近组织的对比度,从而达到诊断目的.据调查,CT 造影剂在 CT 扫描中的应用达 55%^[6].造影剂主要有硫酸钡、无机碘化物(碘化钠水溶液)、有机碘化物(碘海醇、 泛影葡胺)及碘化油等^[7-9].

人类有三大唾液腺,包括腮腺、舌下腺和下颌下腺.其中,最大的是腮腺,位于外耳道的前下方, 开口于平对上颌第二磨牙相对处的颊黏膜.下颌下腺位于下颌骨下缘及二腹肌前、后腹所围成的下颌 下三角内,其导管自腺内侧面发出,导管长而弯曲,开口于舌下阜^[10,11].国外学者已经证明了唾液腺 造影 X 线检查方法的可行性^[12~14],我国学者也有唾液腺造影用于腮腺疾患的诊断、唾液腺肿瘤等检 查的报道^[15,16].唾液腺造影检查技术适用于唾液腺慢性炎症(慢性阻塞性腮腺炎、慢性下颌下腺炎、慢 性复发性腮腺炎)、舍格伦综合症、唾液腺良性肥大、涎瘘、唾液腺导管阴性结石及异物阻塞等^[17-19]. 复方泛影葡胺注射液和碘化油是目前临床上常用的唾液腺造影剂,但其均有碘过敏副作用,易引起过 敏反应,可出现恶心、呕吐、荨麻疹及眩晕等反应,严重者可致命^[20,21].

近年来纳米科学广泛发展,纳米材料被引入到生物医学应用中^[22].金纳米粒子具有化学惰性和高 生物相容性,表面易修饰,生物医用前景广阔^[23,24].由于金具有较大的原子序数和较高的 X 射线吸收 系数,其 X 射线吸收系数是同样条件下碘的 2.7 倍和钨的 1.2 倍,因此是一种非常理想的 CT 造影 剂^[25-28].金纳米粒子体积小,易清除,可以通过代谢排出体外^[29].金纳米粒子,尤其是金纳米棒的 X 射线造影效果好,是具有良好的应用潜力的唾液腺造影剂.由于聚多巴胺的低毒性、高稳定性和高 生物相容性等优点,经聚多巴胺修饰的金纳米棒可以安全应用于动物体内而不会产生生物毒性^[30,31]. 本文采用聚多巴胺包覆金纳米棒用于唾液腺造影剂研究

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,纯度≥99.0%)和十二烷基硫酸钠(SDS,纯度≥99.0%)购自上海

收稿日期: 2018-05-16. 网络出版日期: 2018-12-12.

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(批准号: 20170414047GH)和吉林大学高层次科技创新团队建设项目(批准号: 2017TD-11) 资助.

联系人简介:李志民,男,博士,副教授,主要从事口腔颌面医学影像诊断研究. E-mail: zhimin@jlu.edu.cn

阿拉丁生化科技股份有限公司;四水合氯金酸(HAuCl₄·4H₂O,纯度≥99.9%)、硼氢化钠(NaBH₄,纯 度≥99.0%)和硝酸银(AgNO₃,纯度≥99.9%)购自国药集团化学试剂有限公司;抗坏血酸(AA,纯 度≥99.9%)和盐酸多巴胺(DA,纯度≥99.9%)购自 SIGMA 试剂公司;实验用水均为去离子水.

日本岛津公司 UV-Vis 3600 型紫外-可见-近红外(UV-Vis-NIR)分光光度计;日本日立公司 Hitachi H-800 透射电子显微镜(TEM),200 kV;日本日立公司电感耦合摄像机;美国 THERMO 公司 ESCALAB 250 型 X 射线光电子能谱(XPS)仪;荷兰帕纳科公司 EMPYREAN 型 X 射线衍射(XRD)仪;德国布鲁 克公司 VERTEX 80V 型傅里叶变换红外光谱(FTIR)仪;北京时代北利公司 GT10-1 型高速台式离心机;江苏昆山公司 KQ3200DB 型数控超声波清洗器.

1.2 实验过程

1.2.1 金种子液的制备 于 38 ℃,将 0.355 g 十六烷基三甲基溴化铵溶于 9.75 mL 水中,配成 0.1 mol/L 的 CTAB 溶液.将 1 g 氯金酸溶于 243 mL 水中,得到 10 mmol/L HAuCl₄ 溶液.将 3.8 mg 硼氢化 钠溶于 10 mL 水中,得到 10 mmol/L NaBH₄ 溶液,冷藏. 在搅拌条件下,将 250 μL 10 mmol/L HAuCl₄ 溶液和 600 μL 10 mmol/L NaBH₄ 溶液依次加入 9.75 mL CTAB 溶液中,于 25 ℃避光反应 2.5 h,即可 制得金种子液.

1.2.2 金纳米棒的制备 于 38 ℃,将 2.916 g 十六烷基三甲基溴化铵固体溶于 80 mL 水中,配成 0.1 mol/L 的 CTAB 溶液.将 3.4 mg 硝酸银固体溶于 2 mL 水中,得到 10 mmol/L AgNO₃ 溶液.将 18.5 mg 抗坏血酸固体溶于 1 mL 水中,得到 100 mmol/L AA 溶液.在搅拌条件下,将 1.28 mL 10 mmol/L 的 AgNO₃ 溶液,8 mL 10 mmol/L 的 HAuCl₄ 溶液和 880 μ L 100 mmol/L 的 AA 溶液依次加入 80 mL CTAB 溶液中,于液面下加入 500 μ L 金种子液,于 28 ℃水浴条件下避光反应 20 h,即可制得金纳米棒.在 10000 r/min 的转速下将制得的金纳米棒离心 15 min,弃去上清液,收集沉淀,用去离子水洗涤,稀释 至 20 mL,备用.

1.2.3 聚多巴胺壳层包覆 将 5.768 mg 十二烷基硫酸钠固体溶于 2 mL 水中,得到 10 mmol/L SDS 溶液.将 3.793 mg 盐酸多巴胺固体溶于 2 mL 水中,得到 10 mmol/L DA 溶液.在搅拌条件下,将1 mL 10 mmol/L的 SDS 溶液和 2 mL 10 mmol的 DA 溶液依次加入 20 mL 金纳米棒溶液中,于室温下搅拌反应 10 h,在 10000 r/min 的转速下离心 15 min,弃去上清液,洗涤,收集沉淀,得到聚多巴胺包覆的金纳米棒(AuNRs@PDA).

1.3 体外 X 射线成像检测

配制浓度梯度的聚多巴胺包覆的金纳米棒溶液,浓度梯度分别为0,0.25,0.5,1,2和3 mg/mL, 在体外测试其 CT 造影效果.为了更加直观地体现 X 射线成像效果,在阅片系统中读出每个样品对应 的 CT 信号值,通过数值比较信号的强度和灵敏度.电压 130 kV,电流 45 mA,辐射剂量为9.13 mGy.

1.4 体外细胞毒性实验

将浓度分别为 0, 0. 25, 0. 5, 1, 2 和 3 mg/mL 的 AuNRs@ PDA 溶液与 HaCAT 细胞共培养 24 h 后, 通过 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)染色法计算材料的细胞毒性.

1.5 体内实验和组织病理学分析

将饲养7d的大鼠经腹腔注射10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)后,全麻,仰卧放在自制的手术台上,进行大鼠左侧下颌下腺导管插管,可见大鼠唾液从管内流出,将浓度分别为0,0.25,0.5,1,2和3 mg/mL的 AuNRs@PDA 溶液通过导管注入大鼠下颌下腺后,进行体内造影实验(电压 60 kV,电流7 mA,剂量0.54 mGy).然后对心肝脾肺肾等主要器官及下颌下腺进行脱水,浸蜡,包埋,切片,脱蜡之后染色,观察细胞形态,确定有无水肿或炎细胞侵染现象,评估纳米材料是否对动物体产生伤害,进而确定毒性和安全性.

2 结果与讨论

2.1 形貌分析

图 1(A)给出金纳米棒的 TEM 照片. 可见金纳米棒平均长度为 35.4 nm, 平均直径为 8.4 nm, 尺寸

均一,形貌稳定.采用带负电的 SDS 吸附在金纳米棒表面的 CTAB 上,在静电作用的驱动下,带正电的 DA 单体很容易吸附在金纳米棒表面,并在碱性环境和空气氧化下聚合得到了厚度均一的聚多巴胺壳 层.图1(B)给出聚多巴胺包覆的金纳米棒的 TEM 照片.可以清晰观察到聚多巴胺壳层的存在.图1(C)给出金纳米棒的紫外-可见-近红外吸收光谱.741.5和521.5 nm 处的吸收峰分别对应金纳米棒 纵向和横向的2个局域表面等离子体共振吸收峰.图1(D)给出 AuNRs@PDA 的紫外-可见-近红外吸收 光谱.其在近红外区的吸收峰明显红移,纵向吸收峰为791 nm,证明聚多巴胺壳层的包覆,与图1(B) 结果吻合.



Fig.1 TEM images(A, B) and UV-Vis-NIR absorption spectra(C, D) of gold nanorods(A, C) and polydopamine coated gold nanorods(B, D)

图 2 给出 CTAB, SDS, DA, AuNRs 和 AuNR@ PDA 的 FTIR 谱图. 由图 2 谱线 a 可见, 2960 cm⁻¹处

的特征峰对应甲基中 C—H 的不对称伸缩振 动峰;1465 cm⁻¹处的特征峰对应甲基中 C—H 的变形振动峰;2926 cm⁻¹处的特征峰 对应亚甲基中 C—H 的不对称伸缩振动峰; 2850 cm⁻¹处的特征峰对应亚甲基中 C—H 的 对称伸缩振动峰;1465 cm⁻¹处的特征峰对应 亚甲基中 C—H 的变形振动峰;960 和 910 cm⁻¹处的特征峰对应 C—N 的伸缩振动 峰.对比图 1 谱线 *a* 和 *d* 可见,金纳米棒的 特征峰与 CTAB 的特征峰基本吻合,表明金 纳米棒表面有一层稳定剂 CTAB.对比图 1 谱线 *d* 和 *e* 可见, AuNRs@ PDA 的特征峰不



Fig.2 FTIR spectra of CTAB(a), SDS(b), DA(c), AuNRs(d) and AuNRs@PDA(e)

仅与 CTAB 和金纳米棒高度吻合,而且 1250 cm⁻¹处的特征峰对应—O—SO₃Na 的反对称伸缩振动, 1200 cm⁻¹处的特征峰对应硫氧双键,与 SDS 的特征峰完全一致,SDS 饱和烷基链的各特征峰也均在 AuNRs@ PDA 的红外光谱中出现,表明 SDS 的存在. 在反应过程中,带负电的 SDS 首先通过静电作用 吸附在金纳米棒表面带正电的 CTAB 上,然后带正电的 DA 单体又进一步通过静电作用吸附在 SDS 上,最后多巴胺单体氧化聚合形成聚多巴胺壳层. 红外光谱图中 AuNRs@ PDA 的特征峰和 DA 单体的 特征峰峰位差异很大,证明了 DA 单体并不是简单吸附在了 SDS 上,而是发生聚合反应生成了另一种 物质聚多巴胺.

2.2 结构分析

图 3(A) 给出金纳米棒的广角 XRD 谱图. 可以看到 5 个高强度峰, 20 分别为 38.16°, 44.34°, 64.56°, 77.68°和 81.85°, 分别对应金纳米棒的(111), (200), (220), (311)和(422) 晶面的衍射峰, 表明金的面心立方堆积结构^[32].图 3(B) 为金纳米棒的 XPS 谱图. 可以看出, 结合能在 84.15 和 87.7 eV 处有高强度峰, 分别对应金的 4*f*₂₂和 4*f*₅₂电子能级, 对应 Au-Au 间的结合能.



Fig.3 XRD(A) and XPS(B) spectra of gold nanorods

2.3 体外 X 射线造影性能分析

图 4(A)给出不同浓度的 AuNRs@ PDA 溶液的体外 CT 成像效果图. AuNRs@ PDA 溶液的浓度梯度 分别为 0, 0.25, 0.5, 1, 2 和 3 mg/mL, 随着浓度的增加, AuNRs@ PDA 溶液的 CT 信号逐渐增强, 图 像逐渐变为亮白色. 这是因为金的 X 射线吸收系数高, AuNRs@ PDA 中金的质量分数为 64%, 在 CT 下,随着金浓度的增加,成像效果逐渐增强. 图 4(B)给出阅片系统显示的不同浓度的 AuNRs@ PDA 溶液的 CT 值, 直观地展现了 AuNRs@ PDA 的 CT 造影能力. 图 4(B)表明,去离子水的 CT 值很低,只有 28.2,而浓度为 0.25 mg/mL 的 AuNRs@ PDA 溶液, CT 值即达到了 105.3. 随着 AuNRs@ PDA 溶液浓 度的增加, CT 值逐渐升高,浓度为 0.5, 1, 2 和 3 mg/mL 时, CT 值依次为 132.5, 370.5, 539.3 和 617.1, CT 值随浓度的增加而增大,变化十分明显,表明成像灵敏度高. 说明 AuNRs@ PDA 能够作为 CT 成像造影剂,随着 AuNRs@ PDA 浓度的增加, CT 成像造影剂,随着 AuNRs@ PDA 浓度的增加, CT 成像造影剂,





 $\label{eq:concentration of AuNRs@PDA/(mg \cdot mL^{-1}); (A_1) 0; (A_2) 0.25; (A_3) 0.5; (A_4) 1; (A_5) 2; (A_6) 3.$

2.4 体外毒性分析

HaCAT 细胞与不同浓度的金纳米棒和 AuNRs@ PDA 溶液共混培养 24 h 后,进行 MTT 染色,通过 检测其在 490 nm 处的光密度值判断活细胞的比例.实验结果表明,对照组(未经包覆的金纳米棒溶液) 对细胞增殖有影响,细胞毒性较高;而包覆了聚多巴胺壳层的金纳米棒细胞毒性显著降低,即使在



3 mg/mL 的高浓度下,细胞存活率依旧在 80%左右.实验结果表明,聚多巴胺壳层可以极大程度降低 材料的毒性,提高生物相容性.可见,AuNRs@ PDA 的细胞毒性较低,可以应用于体内实验[图 5(A)].

Fig.5 Cytotoxicities of gold nanorods and polydopamine coated gold nanorods(A) and CTAB, SDS and DA(B) with concentrations

为了证明毒性的来源,本文进一步测试了 CTAB, SDS 和 DA 单体的细胞毒性.实验结果表明, CTAB 的细胞毒性很高,金纳米棒的毒性主要来源于金纳米棒表面的稳定剂 CTAB. SDS 也具有较高的 毒性,但 AuNRs@ PDA 细胞毒性很低,说明 SDS 被聚合物包覆在壳层内部,并没有暴露在外表面. DA 单体的毒性也要远高于 AuNRs@ PDA,说明 DA 单体并不是仅仅吸附在金纳米棒表面,这也从侧面证 实了聚合反应的发生[图 5(B)].

2.5 体内诊断效果分析

图 6 给出大鼠口腔 X 射线图. 可以看出, 聚多巴胺包覆的金纳米棒良好的造影能力和对比效果, 影像中下颌下腺对比度明显, 边界清晰, 表明制备的 AuNRs@ PDA 具有良好的体内实验效果, 可用于 唾液腺成像.



Fig.6 In vivo submandibular gland imaging with AuNRs@PDA of different concentrations Concentration of AuNRs@PDA/(mg · mL⁻¹): (A) 0; (B) 0.25; (C) 0.5; (D) 1; (E) 2; (F) 3. In these figures, the arrow points to the position of the submandibular gland.

2.6 组织病理学分析

经苏木精-伊红(H&E)染色后,在显微图像采集系统阅片观察下,下颌下腺及心肝脾肺肾等主要器官的细胞形态保持稳定,无水肿或炎细胞侵染等现象发生,没有组织病理学改变(图7).研究结果





 $\label{eq:Fig.7} \begin{array}{l} \mbox{Histological evaluation of AuNRs@PDA toxicity $in vivo$ in rat submandibular gland(A, A'), $$ heart(B, B'), liver(C, C'), spleen(D, D'), lung(E, E')$ and kidney(F, F')$ by H&E staining method \\ \end{array}$

(A-F) Control; (A'-F') experiment.

3 结 论

通过种子生长法制备了尺寸均一的金纳米棒,通过氧化聚合在金纳米棒表面包覆聚多巴胺壳层. 聚多巴胺壳层的引入极大地提高了材料的胶体稳定性.实验数据表明,聚多巴胺包覆的金纳米棒分散 均匀、结构稳定.体外实验证明聚多巴胺包覆的金纳米棒细胞毒性很低,有应用于体内的潜能.其造影 能力随着浓度的增加而增强,并且浓度的变化会引起 CT 值的变化,成像灵敏度高,成像效果稳定.体 内实验中,当通过下颌下腺导管所注射的聚多巴胺壳层包覆的金纳米棒浓度达到 3 mg/mL 时,就可以 实现下颌下腺造影,这一纳米复合材料具有优秀的下颌下腺造影能力.实验结束后,动物体内各器官 的细胞形态正常,无水肿或炎细胞侵染的发生,进一步说明聚多巴胺包覆的金纳米棒生物安全性高, 具有广阔的应用前景.

参考文献

- [1] Specht L., Berthelsen A. K., Seminars in Nuclear Medicine, 2018, 48(1), 67-75
- [2] Bankier A. A., Macmahon H., Goo J. M., Rubin G. D., Schaefer-Prokop C. M., Naidich D. P., Radiology, 2017, 285(2), 584-600
- [3] Wile G. E., Leyendecker J. R., Krehbiel K. A., Dyer R. B., Zagoria R. J., Radiographics A Review Publication of the Radiological Society of North America Inc., 2016, 27(2), 325-340
- [4] Koo H. J., Lim S., Choe J., Choi S. H., Sung H., Do K. H., Radiographics A Review Publication of the Radiological Society of North America Inc, 2018, 38(3), 719–739
- [5] Brenner D. J., Mccollough C. H., Orton C. G., Medical Physics, 2006, 33(5), 1189-1191
- [6] Lee N., Choi S. H., Hyeon T., Adv. Mater., 2013, 25(19), 2641-2660
- [7] Yang Q., He Q. Z., Yu F., Zhang Y. L., Si Q. Y., Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, **2018**, (2), 135—139(杨琴, 何其舟, 余飞, 张艳丽, 斯光晏. 解放军医学杂志, **2018**, (2), 135—139)
- [8] Dizendorf E., Hany T. F., Buck A., von Schulthess G. K., Burger C., Journal of Nuclear Medicine, 2003, 44(5), 732-738
- [9] Jung Y., Hwang H. S., Na K., Biomaterials, 2018, 160, 15-23
- [10] Kennedy R. A., Br. J. Oral. Maxillofac. Surg., 2018, 56(2), 90-95
- [11] Eisbruch A., Haken R. K. T., Kim H. M., Marsh L. H., Ship J. A., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1999, 45(3), 577-587
- [12] Schulz M. D., Weisberger R. D., Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Patho., 1948, 1(3), 233-248
- [13] Thomas A. R., Br. J. Radiol., 1956, 29(340), 209-312
- [14] Rubin P., Holt J. F., Am. J. Roentgenol. Radium. Ther. Nucl. Med., 1957, 77(4), 575-598
- [15] Zou Z. J., Chinese Journal of Stomatology, 1954, (1), 18-22(邹兆菊. 中华口腔科杂志, 1954, (1), 18-22)
- [16] Zou Z. J., Chinese Medical Journal, 1978, (1), 353-357(邹兆菊. 中华医学杂志, 1978, (1), 353-357)
- [17] Aframian D. J., Keshet N., Nadler C., Oral. Dis., 2018, 24(1/2), 191-193
- [18] Li W., Wei L., Wang F., Peng S., Cheng Y., Li B., J. Oral. Rehabil., 2018, 45(12), 983-989
- [19] Zou Z. J., Zhang Z. Y., Hua H., Chinese Journal of Stomatology, 1996, (2), 81-84(邹兆菊, 张祖燕, 华红. 中华口腔医学杂志, 1996, (2), 81-84)

- [20] Wu Y. W., Leow K. S., Zhu Y., Tan C. H., Ann. Acad. Med. Singapore, 2016, 45(4), 157-164
- [21] Bhat K. N., Arroyave C. M., Crown R., Ann. Allergy, 1976, 37(3), 169-173
- [22] Cheng L., Wang C., Feng L., Yang K., Liu Z., Chemical Reviews, 2014, 114(21), 10869-10939
- [23] He W., Ai K., Lu L., Science China Chemistry, 2015, 58(5), 753-760
- [24] Yang X., Yang M., Pang B., Vara M., Xia Y., Chemical Reviews, 2015, 115(19), 10410-10488
- [25] Li J., Jiang F., Yang B., Song X. R., Liu Y., Yang H. H., Cao D. R., Shi W. R., Chen G. N., Scientific Reports, 2013, 3(6), 1998-2013
- [26] Lusic H., Grinstaff M. W., Chemical Reviews, 2013, 113(3), 1641-1666
- [27] Li B., Ye K., Zhang Y., Qin J., Zou R., Xu K., Huang X., Xiao Z., Zhang W., Lu X., Hu J., Advanced Materials, 2015, 27(8), 1339—1345
- [28] Dong K., Liu Z., Liu J., Huang S., Li Z., Yuan Q., Ren J., Qu X., Nanoscale, 2014, 6(4), 2211-2217
- [29] Liu Y., Ai K., Lu L., Acc. Chem. Res., 2012, 45(10), 1817-1827
- [30] Liu S., Wang L., Lin M., Wang D., Song Z., Li S., Ge R., Zhang X., Liu Y., Li Z., Sun H., Yang B., Zhang H., ACS Appl. Mater. Interfaces, 2017, 9(51), 44293-44306
- [31] Choi C. K. K., Choi C. H. J., Bian L., J. Am. Chem. Soc., 2015, 137(23), 7337-7346
- [32] He W., Wu X., Liu J., Zhang K., Chu W., Feng L., Hu X., Zhou W., Xie S., J. Phys. Chem. C, 2009, 113(24), 10505-10510

Polydopamine-coated Gold Nanorods for Rat Submandibular Gland Radiography[†]

SONG Ziqi, GONG Baijuan, WANG Lu, FENG Jing, WANG Bo, YAN Hongjing, LI Zhimin^{*}, SUN Hongchen

(School and Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract We demonstrate the application of polydopamine-coated gold nanorods in the CT imaging of rat submandibular gland. Biocompatible polydopamine was coated on the surface of gold nanorods to lower the toxicity. CT value rises with the increase of the concentration of polydopamine-coated gold nanorods *in vitro*, which indicates the high sensitivity to X-ray. The polydopamine-coated gold nanorods are further applied to rat submandibular gland *in vivo* and radiographs are obtained. H&E staining of heart, liver, spleen, lungand kidney show no obvious inflammation for the rats.

Keywords Gold nanorods; Computerized tomography; Submandibular gland; Radiography imaging (Ed.; W, Z)

[†] Supported by the Jilin Province Science and Technology Development Project, China(No.20170414047GH) and the Jilin University Science and Technology Innovative Research Team Project, China(No.2017TD-11).