

# Ag<sub>2</sub>S 纳米晶的制备及其近红外光热治疗应用

邓立儿<sup>1</sup>, 李妍<sup>2</sup>, 巩蕾<sup>1</sup>, 王佳<sup>1</sup>

(1. 西安工业大学 光电工程学院, 西安 710032; 2. 北京科技大学 材料科学与工程学院, 北京 100083)

**摘要:** 光热治疗是近年来受到广泛关注的一种低副作用的癌症治疗方法, 治疗中使用的纳米光热剂的制备和性能是决定光热治疗效应的关键因素。本研究采用热解和表面配体置换相结合的方法制备得到二氢硫辛酸(DHLA)修饰的 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶材料, 这种材料具有良好的水溶性、光热稳定性和生物相容性。研究结果显示浓度大于 40 μg/mL 的 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶在波长为 980 nm、功率密度为 5 W/cm<sup>2</sup> 的红外激光照射下对宫颈癌细胞具有明显的杀伤效果, 且光热稳定性良好。Ag<sub>2</sub>S 纳米晶的光热效应与其良好的荧光成像功能相结合, 可实现光热治疗的可视化和精准化。

**关键词:** Ag<sub>2</sub>S 纳米晶; 光热效应; 980 nm 激光; 可视化

中图分类号: O614 文献标识码: A

## Preparation of Ag<sub>2</sub>S Nanocrystals for NIR Photothermal Therapy Application

DENG Li-Er<sup>1</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, GONG Lei<sup>1</sup>, WANG Jia<sup>1</sup>

(1. School of Optoelectronic Engineering, Xi'an Technological University, Xi'an 710032, China; 2. School of Materials Science and Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Photothermal therapy (PTT) is a promising cancer treatment with both high effectiveness and low side effects. It is very important that the advancement of the NIR photothermal cancer therapy is dependent on the development of photothermal agents. Herein, this study developed hydrophilic DHLA-Ag<sub>2</sub>S nanocrystals as a new photothermal agent, which were synthesized by combining a thermal decomposition and ligand exchange route. The as-prepared Ag<sub>2</sub>S nanocrystals appear good water solubility, photo thermal stability and biocompatibility. Under irradiation of 980 nm laser with a power density of 5 W/cm<sup>2</sup>, HeLa cancer cells *in vitro* can be efficiently killed by photothermal effects of the Ag<sub>2</sub>S nanocrystals (40 μg/mL). The photothermal effect of Ag<sub>2</sub>S nanocrystals and its good fluorescence imaging function can realize the visualization and precision of photothermal therapy.

**Key words:** Ag<sub>2</sub>S nanocrystals; photothermal effect; 980 nm laser; visualization

癌症是威胁人类生命和健康的首要疾病, 近年来随着纳米技术的进步, 与纳米材料相结合的肿瘤物理治疗方法——光热治疗(Photothermal Therapy, PTT)逐渐进入了科学家的视野<sup>[1-3]</sup>。PTT 就是利用纳米粒子吸收光能转换成热能, 引起肿瘤组织的温度升高, 从而杀死癌细胞<sup>[4-5]</sup>。由于生物体组织的“水

窗效应”, 近红外光可以较好地穿透皮肤组织<sup>[6-7]</sup>, 因此利用近红外激光作为一种非侵入性光源进行光热治疗是理想的选择。2003 年, Hirsch 等<sup>[8]</sup>使用 Au@SiO<sub>2</sub> 核壳结构纳米粒子作为光热材料注入到乳腺癌细胞, 在近红外激光照射下, 肿瘤组织被迅速加热, 温度升高 30~35℃, 组织切片观察到明显

收稿日期: 2017-10-19; 收到修改稿日期: 2018-02-27

基金项目: 国家自然科学基金(51472197); 陕西省自然科学基金(2016JM6011); 陕西省光电功能材料与器件重点实验室开放研究基金(2015SSj-59-2)

National Natural Science Foundation of China (51472197); Natural Science Foundation of Shaanxi Provincial (2016JM6011); Open Research Grant of Key Laboratory of Optoelectronic Functional Materials and Devices of Shaanxi Province (2015SSj-59-2)

作者简介: 邓立儿(1983-), 女, 副教授. E-mail: denglier118@126.com

的肿瘤细胞死亡,这是人们首次提出光热治疗的概念。

目前,可用于光热治疗的纳米光热材料分为无机材料和有机材料两大类,有机材料的生物相容性相对较好,但是其光热转换效率较低,因而目前研究的热点仍集中在无机材料,尤其是各种金纳米粒子材料,金纳米球、金纳米棒、金纳米核壳结构等已被作为光热治疗中的光敏材料<sup>[9-13]</sup>。由于等离子体共振效应,金系列纳米结构的光热效率较高,生物毒性较低,但其制备成本也较高。碳纳米管具有独特的结构特性,可以吸收近红外光迅速转换成热能,从而使癌细胞坏死<sup>[14-16]</sup>。碳纳米管(CNTs)的比表面积较大,对于小分子和离子的吸附能力强,还可以键合多种化学基团以实现细胞的靶向功能。但未经功能化的 CNTs 表面高度疏水,不溶于水和大多数有机溶剂,有一定的生物毒性,还需寻找合适的功能化方式以及选择最佳的表面修饰。除此之外,锆纳米晶<sup>[17-18]</sup>、多孔硅<sup>[19]</sup>、石墨烯<sup>[20]</sup>、三氧化钨<sup>[21]</sup>、硫化铜<sup>[22]</sup>以及碳包覆的铁钴<sup>[23]</sup>等纳米粒子也都显示出一定的光热效应,但都还不够成熟。因此,有必要开发兼具生物相容性好、成像功能强和载药能力大、光热转换效率高、光热稳定性好、制备方法简单的新型纳米光热材料。

硫化银纳米材料具有独特的光学和电学性能,经过研究和探索,Ag<sub>2</sub>S 量子点已成功用于生物活体成像检测,取得了较好的进展<sup>[24-25]</sup>。而且 Ag 离子本身具有杀菌功能,通过热解法制备的 SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S 复合纳米结构可以有效杀灭黑曲霉菌<sup>[26]</sup>。另外,Ag<sub>2</sub>S 在近红外区有个较强的吸收峰<sup>[27]</sup>,因此,Ag<sub>2</sub>S 纳米材料有可能具有较强的光热效应,用于光热杀死肿瘤细胞。本研究采用热解和配体置换相结合的方法制备 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶,得到了单分散、水溶性好的纳米光热材料,为肿瘤光热治疗研究探索新材料和新方法,推动 PTT 在临床上的应用。

## 1 实验方法

### 1.1 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶的制备和表面修饰

实验试剂和仪器:二乙基二硫代氨基甲酸银(C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>AgNS<sub>2</sub>,DDTC 银盐)和 1-十二硫醇(C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>S,DT)购自 Sigma Aldrich 中国有限公司;乙醇(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)、环乙烷(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>)、二氢硫辛酸(C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>,DHLA)购自西安化学试剂厂;台式高速离心机(TG20-WS)和恒温磁力搅拌器(RCT)分别购自湖南沪康和德国 IKA 公司。实验用水为去离子水,所用试剂均为分析纯。

采用热解和表面配体置换的方法制备 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶材料,具体操作如下:将 0.2 mmol DDTC 银盐和 15 g DT 先后加入置于磁力搅拌器上的三口烧瓶中,抽真空 3 min 后通入氮气,循环 3 次,使整个反应体系在 N<sub>2</sub> 气保护下进行。将体系以 10℃/min 的速率升温至 150℃,持续搅拌反应 4 h 后冷却至室温。将产物装入透析袋中,去离子水透析 24 h,去除未反应的分子和粒子。透析后加入 50 mL 乙醇,置于离心机中以 8000 r/min 的转速离心 10 min,得到表面修饰 DT 的疏水 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶材料(DT-Ag<sub>2</sub>S)。用于生物体光热效应的材料需水溶性良好,因此进行表面配体置换。取 0.1 mmol 的 DT-Ag<sub>2</sub>S、25 mL 环己烷、30 mL 乙醇和 0.35 g DHLA 室温搅拌 24 h,12000 r/min 离心 30 min,去离子水清洗两遍后超声分散到去离子水中,得到 DHLA 修饰的 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶材料(DHLA-Ag<sub>2</sub>S)。

### 1.2 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶的表征

通过紫外-可见-近红外分光光度计(UV-3600-Plus,日本岛津)检测纳米材料的光学性质;用 X 射线衍射仪(XRD-7000,日本岛津)和高倍透射电镜(TEM, H9500,日本日立)观察分析纳米材料的形貌和尺寸;使用 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(3110,美国赛默飞)培养细胞;通过荧光倒置显微镜(TE2000u,日本尼康)和酶标仪(ELX808,美国宝特)测试细胞活性。

### 1.3 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶光热效应测试

选用波长为 980 nm 的红外激光器作为热源,对置于比色皿中不同浓度的 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶水溶液进行照射,数字测温仪实时记录纳米晶水溶液中的温度变化。作为对比,记录激光照射同样时间内去离子水的温度变化。在此过程中,随着温度的升高,散热越来越明显,影响测量精度,因此将比色皿包覆保温的同时,选用合适的激光功率密度,使照射时间尽量缩短。

### 1.4 细胞培养

宫颈癌(HeLa)细胞购自 ATCC,将其置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内,用含 10%胎牛血清(FBS)的亚甲基双丙烯酰胺(DMEM)培养液培养,培养液每 2 天更换一次。实验前用含有 0.25%的胰蛋白酶和 0.02%的乙二胺四乙酸(EDTA)溶液消化,收集于 15 mL 无菌离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃取上清液,用培养液重悬备用。

### 1.5 细胞生物毒性测试

采用 MTT 法测试 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶的生物相容性。首先在 96 孔板中每孔加入 100 μL 的细胞悬浮液,培养过夜,待细胞贴壁后吸出培养液。加入 150 μL

包含不同浓度  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶的培养液(无胎牛血清)继续置于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  的培养箱中培养 24 h。然后移去培养液, 加入  $20 \mu\text{L}$  的四甲基偶氮唑蓝(MTT)孵育 4 h 后, 去除上清液, 加入  $100 \mu\text{L}$  的二甲基亚砷(DMSO)震荡溶解 10 min。使用酶联免疫检测仪检测  $490 \text{ nm}$  处的吸光度, 与对照组相比计算得到细胞存活率。细胞存活率为  $90\%$  以上的纳米晶水溶液浓度即被视为对细胞安全的浓度。

### 1.6 光热治疗实验

96 孔板中每孔加入  $100 \mu\text{L}$  细胞悬浮液, 将含有不同浓度  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶的培养基与 HeLa 细胞一起孵育 12 h 后, 用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 遍。使用功率密度为  $5 \text{ W/cm}^2$  的  $980 \text{ nm}$  激光先后照射不加  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶的培养液培养的细胞和加入不同浓度的  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶培养液培养的细胞, 照射一定时间后, 每个孔补充  $150 \mu\text{L}$  细胞培养基。培养 12 h 后, 取出  $100 \mu\text{L}$  的上清液至另一 96 孔板中, 加入  $20 \mu\text{L}$  的 MTT 继续孵育 4 h 后, 去除上清液, 加入  $100 \mu\text{L}$  的 DMSO 震荡溶解 10 min 后使用酶联免疫检测仪检测  $490 \text{ nm}$  处的吸光度。

取出上清液后, 96 孔板中分别加入  $100 \mu\text{L}$  碘化丙啶(PI)和钙黄绿素(Calcein-AM)染料的 PBS 混合溶液, 避光染色 0.5 h 后, 在荧光显微镜下观察并拍照。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\text{Ag}_2\text{S}$ 纳米晶的形貌及红外吸收特性

图 1(a)为制备得到的不同浓度的  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶水溶液及粉末光学照片, 溶液及粉末均呈褐色, 溶液清澈透明, 说明纳米晶水溶性良好。将样品放置 6 个月后, 溶液依然清澈, 没有下沉, 说明稳定性良好。

图 1(b)为未修饰 DHLA 的  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶的 XRD 图谱, X 射线波长  $\lambda=0.15406 \text{ nm}$ 。图谱与  $\text{Ag}_2\text{S}$  单斜晶标准粉末衍射图案(JCPDS, 14-0072)基本吻合, 没有其它杂峰出现, 证明没有其它相和其他物质, 属于单斜晶型, 这是因为在  $178^\circ\text{C}$  以下形成的  $\text{Ag}_2\text{S}$  均为单斜晶型。与标准卡相比较, 测试得到的 XRD 图谱的衍射峰半高宽要更宽一些, 这是源于晶粒的小尺寸效应。图 1(b)中插图为  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶的 TEM 照片, 纳米晶为球形, 边缘规整, 统计得到其粒径约为  $40 \text{ nm}$ 。

图 2(a)为在  $300 \text{ kV}$  的加速电压下由透射电镜(日立 H-9500)拍摄出的单个  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶的 HRTEM 照片, 放大倍率为 80 万倍, 可以看出晶格周期性良

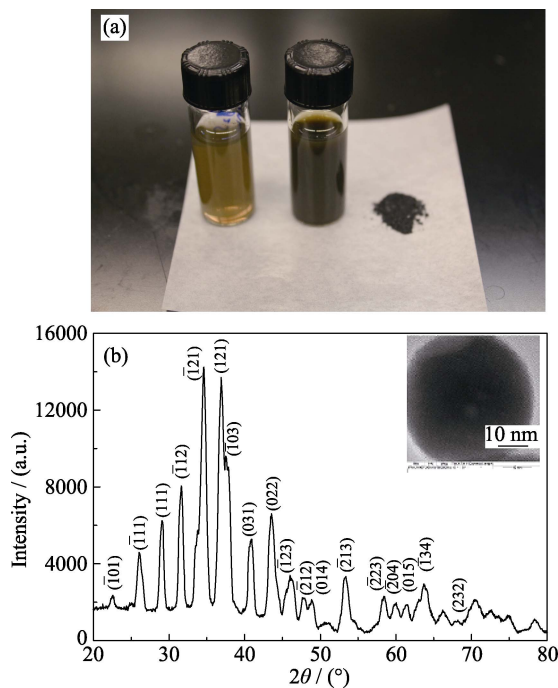


图 1  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶粉末及不同浓度水溶液照片(a)和  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶的 XRD 图谱(b)及其 TEM 照片(插图)

Fig. 1 Photograph of DHLA- $\text{Ag}_2\text{S}$  nanocrystals aqueous dispersion (a) and XRD pattern (b) with inset showing TEM image of  $\text{Ag}_2\text{S}$  nanocrystals

好, 箭头所示晶面间距为  $0.237 \text{ nm}$ , 与  $\text{Ag}_2\text{S}$  单斜晶 JCPDS 标准数据中  $(\bar{1}03)$  晶面的晶面间距( $0.238 \text{ nm}$ )非常接近, 说明图 2(a)为  $(\bar{1}03)$  晶面的切面图。紫外-可见-红外分光光度计测试得到的红外吸收谱图(图 2(b))显示, 在可见及近红外区域  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶都有吸收。单斜晶  $\text{Ag}_2\text{S}$  块体材料的禁带所对应的能量是  $1.1 \text{ eV}$ , 相当于  $1127 \text{ nm}$ , 本实验制备得到的  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶的吸收峰值位于  $1060 \text{ nm}$  处, 相对于  $1127 \text{ nm}$  产生了  $67 \text{ nm}$  的蓝移, 这源于纳米晶的量子限域效应。

### 2.2 $\text{Ag}_2\text{S}$ 纳米晶的光热特性

#### 2.2.1 $\text{Ag}_2\text{S}$ 纳米晶的光热转换效率

图 3(a)为不同浓度( $0$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $40$  和  $80 \mu\text{g/mL}$ )的  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶水溶液在红外激光照射下的升温曲线图(照射激光功率密度为  $5 \text{ W/cm}^2$ , 激光波长为  $980 \text{ nm}$ )。在激光持续照射  $5 \text{ min}$  后, 浓度为  $80 \mu\text{g/mL}$  的  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶水溶液的温度升高了  $20.5^\circ\text{C}$ , 而作为对照组的纯水, 相同时间内温升只有  $6.2^\circ\text{C}$ 。说明相对于水分子,  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米粒子对于入射光具有更强的吸收作用, 将光能转化成热能, 从而导致了溶液温度提升幅度更高。随着浓度的增加( $5$ – $40 \mu\text{g/mL}$ ), 激光辐照  $5 \text{ min}$ ,  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶水溶液的温升分别为  $13.2$ 、 $15.5$ 、 $17.1$  和  $19.8^\circ\text{C}$ , 说明材料的光热转换能力与其浓度成正比。相同光照时间下( $5 \text{ min}$ )的温升

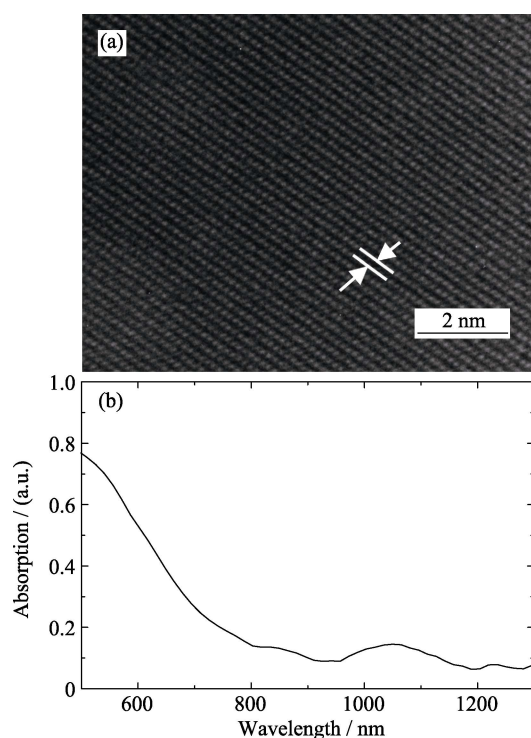


图2  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶 HRTEM 照片(a)及其水溶液的吸收光谱(b)  
Fig. 2 HRTEM images of the synthesized  $\text{Ag}_2\text{S}$  nanocrystals (a) and UV-Vis-NIR spectrum (b) of  $\text{Ag}_2\text{S}$  nanocrystals suspended in water

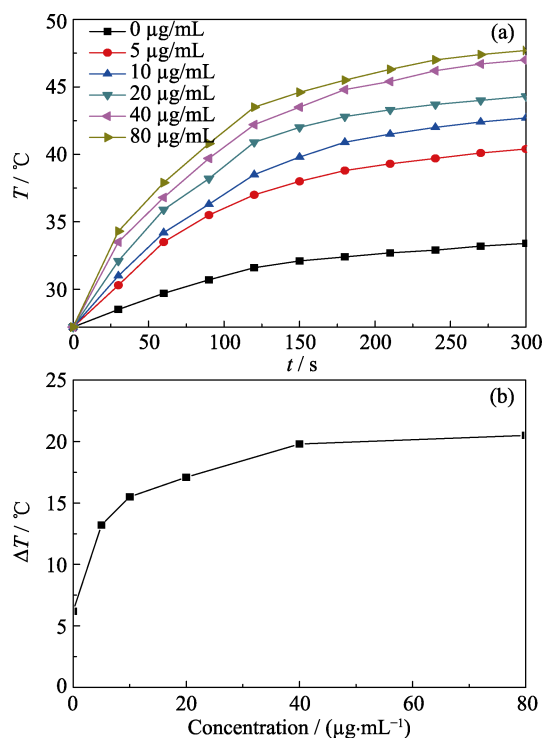


图3 不同浓度  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶水溶液在激光照射下的升温曲线(a)和相同光照时间下(5 min)的温升值随溶液的浓度变化曲线(b)

Fig. 3 Temperature elevation of the aqueous dispersion of  $\text{Ag}_2\text{S}$  nanocrystals with different concentrations as a function of irradiation time (a) and plot of temperature change ( $\Delta T$ ) over a period of 5 min versus the concentration of the  $\text{Ag}_2\text{S}$  nanocrystals aqueous dispersion (b)

值随溶液的浓度变化曲线如图 3(b)所示, 从 0~10  $\mu\text{g/mL}$ , 曲线快速上升, 温升随浓度变化明显, 之后曲线逐渐趋于平缓, 温升随浓度变化减慢。这是因为溶液温度较高时, 散热增强, 从而导致溶液温升减缓。

持续照射浓度为 80  $\mu\text{g/mL}$  的  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶水溶液 7 min 后, 溶液与周围环境达到热平衡, 温度不再升高, 溶液的温升值为 21.3 $^{\circ}\text{C}$ 。此时, 撤去激光, 测试溶液的降温曲线, 得到系统的传热常数, 计算  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶的光热转换效率。图 4(a)显示了纳米晶加热和冷却过程的温度变化曲线。依据 Roper 等<sup>[28]</sup>的报道, 光热转换效率  $\eta$  可以由下面的公式计算:

$$\eta = \frac{hS(T_{\max} - T_{\text{surr}}) - Q_{\text{dis}}}{I(1 - 10^{-A_{980}})} \quad (1)$$

其中,  $h$  是传热系数,  $S$  是系统的表面积,  $hS$  为系统的传热常数,  $T_{\max}$  是系统的平衡温度(激光照射时达到的最高温度),  $T_{\text{surr}}$  是环境温度,  $A_{980}$  为纳米晶在 980 nm 激光照射下的吸光度,  $I$  是系统吸收的总热量,  $Q_{\text{dis}}$  是样品瓶和溶剂吸收的热量。从图 4(a)中可以看出, 环境温度  $T_{\text{surr}}$  为 27.2 $^{\circ}\text{C}$ , 系统的平衡温度  $T_{\max}$  为 48.5 $^{\circ}\text{C}$ , 溶液的吸光度  $A_{980}$  为 0.16。照射激光的功率密度为 5  $\text{W/cm}^2$ , 激光光斑的半径为 0.25 mm,

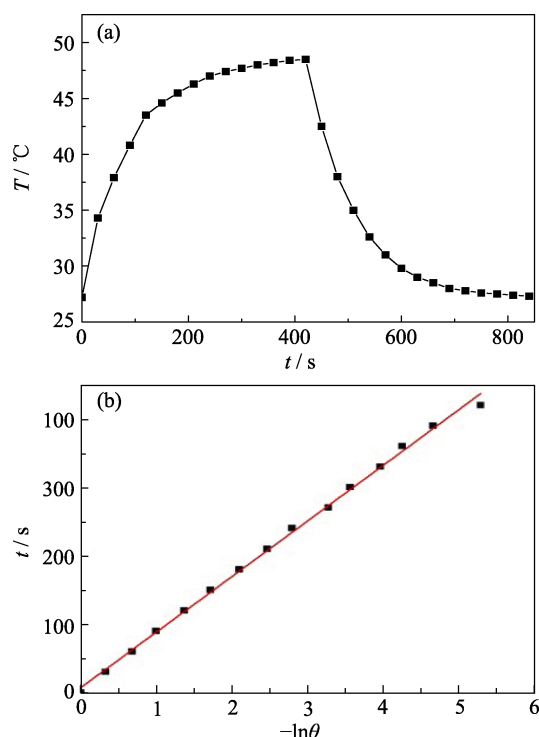


图4 80  $\mu\text{g/mL}$  的  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶水溶液在激光(980 nm, 5  $\text{W/cm}^2$ )照射下加热(激光开)和冷却(激光关)过程的温度变化曲线(a)及其  $t$  与  $\ln\theta$  的线性拟合曲线(b)

Fig. 4 Temperature evolution of  $\text{Ag}_2\text{S}$  nanocrystals aqueous dispersion (80  $\mu\text{g/mL}$ ) during heating (laser on) and cooling (laser off) (a) and linear fitting curve between  $t$  and  $\ln\theta$  (b)

照射时间为 7 min, 计算得到系统吸收的总热量  $I$  为 4121 mW。  $Q_{\text{dis}}$  通过使用相同功率的激光照射纯水作测试, 测得结果为 126 mW。  $hS$  的计算需要用到如下公式:

$$hS = \frac{\sum_i m_i C_{p,i}}{\tau_s} \quad (2)$$

其中,  $m$  为溶液的质量,  $C$  为其比热容。在本实验中,  $m=0.3$  g,  $C=4.2$  J/g·°C。  $\tau_s$  为系统热平衡的时间常数, 其计算方法参考文献[29]:

$$T = -\tau_s \ln \theta, \quad \text{其中} \quad \theta = \frac{T - T_{\text{surr}}}{T_{\text{max}} - T_{\text{surr}}}$$

绘制  $T$  与  $\ln \theta$  的关系曲线, 如图 4(b) 所示,  $\tau_s$  即为直线的斜率,  $\tau_s=88.4$  s。由公式(2)可计算得到  $hS=14.3$  mW/°C, 将各个参量代入公式(1), 得到 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶的光热转换效率  $\eta$  为 13.9%。这个转换效率与金纳米壳(13%)的转换效率相仿, 低于金纳米棒(21%)和 Cu<sub>9</sub>S<sub>5</sub>(25.7%)的转换效率<sup>[30]</sup>, 但其制备简单, 成本低廉, 而且 Ag<sub>2</sub>S 自身具有较强的红外发射功能, 已有课题组将其作为造影剂注入生物体内, 证实其具有良好的荧光成像功能<sup>[31-32]</sup>。因此, 采用 Ag<sub>2</sub>S 作为光热治疗中的光热转换材料, 可通过其荧光成像实现治疗过程中的实时检测, 有助于确定肿瘤的位置、大小及纳米光热粒子在肿瘤组织的富集, 有助于监测肿瘤部位及周边正常组织温度的变化。

### 2.2.2 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶的光热稳定性

使用激光( $\lambda=980$  nm, 功率密度为 5 W/cm<sup>2</sup>)照射浓度为 80  $\mu\text{g/mL}$  的 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶水溶液, 经过 420 s 升温至最高温度达到平衡后, 关闭激光, 待其温度降至室温后再次打开激光照射, 重复上述操作 2 次。图 5 是升温 and 降温过程中记录的温度值随时间的变化曲线, 可以看出, 当体系温度降至室温后

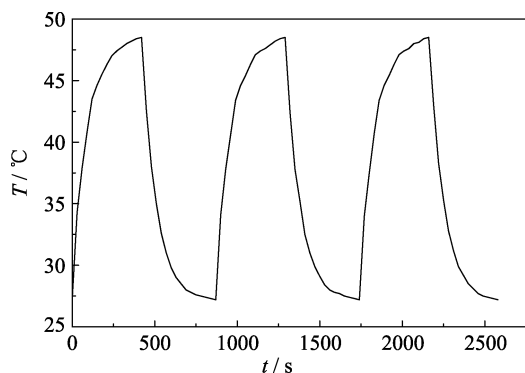


图 5 三个周期激光开关过程的 DHLA-Ag<sub>2</sub>S 纳米晶水溶液温度值随时间的变化曲线

Fig. 5 Temperature varied with time of DHLA-Ag<sub>2</sub>S nanocrystals aqueous solution in three cycles of laser switching

用激光重复照射时, 水溶液温度依然可以上升至首次照射时的最高温度, 证明 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶具有很好的光热稳定性, 可重复利用。

### 2.3 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶的生物相容性

对于生物应用来说, 材料的生物相容性是非常重要的一个影响因素。因此, 需要对制备得到的 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶进行细胞毒性测试。使用 MTT 法对不同浓度(5、10、20、40、80 和 160  $\mu\text{g/mL}$ )的 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶水溶液的细胞毒性进行测试, 结果显示, 随着纳米晶溶液浓度的增加, 细胞的存活率呈一定幅度的下降, 但是均保持在 90% 以上(图 6)。当溶液浓度高达 160  $\mu\text{g/mL}$  时, HeLa 细胞的存活率依然达到 91%, 证明 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶的细胞毒性较低, 适合于生物应用。

### 2.4 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶的热疗效应

通过体外实验进一步研究 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶光热杀死癌细胞的效果, 不同浓度(0、10、40 和 80  $\mu\text{g/mL}$ )的 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶与 HeLa 细胞共培养后在 980 nm 激光照射下的细胞成活率与纳米晶浓度及激光照射时间的关系如图 7 所示(照射激光功率密度为 5 W/cm<sup>2</sup>)。随着激光照射时间(10、15 和 20 min)的增加, HeLa 细胞的存活率逐渐下降, 但照射 20 min 时的对照组细胞存活率依然达到 86%, 表明不加纳米晶时, 单纯的光照对细胞的杀伤能力有限。加入纳米晶后, 光照下 HeLa 细胞的存活率随着纳米晶浓度的提高和光照时间的延长逐渐降低, 当光照时间为 20 min 时, 与浓度为 40  $\mu\text{g/mL}$  的 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶共培养的细胞存活率仅为 20%, 杀伤效果明显。与浓度为 80  $\mu\text{g/mL}$  的 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶共培养的细胞存活率仅为 8%, 癌细胞几乎全部被杀死。该结果表明, Ag<sub>2</sub>S 纳米晶在激光照射下, 能有效地杀灭肿瘤细胞, 具有较强的体外光热治疗能力。HeLa 细胞近红外光热治

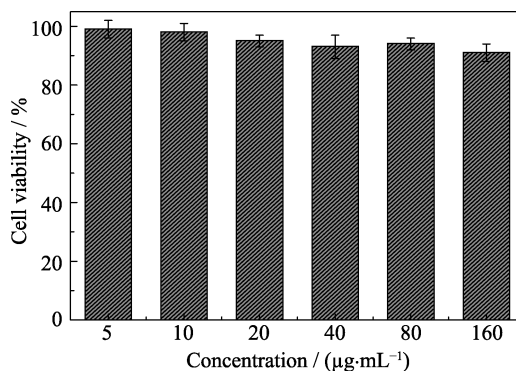


图 6 与不同浓度的 Ag<sub>2</sub>S 纳米晶水溶液共培养 24 h 后 HeLa 细胞的存活率

Fig. 6 Cell viability of HeLa cells incubated with different concentrations of Ag<sub>2</sub>S nanocrystal aqueous solutions for 24 h



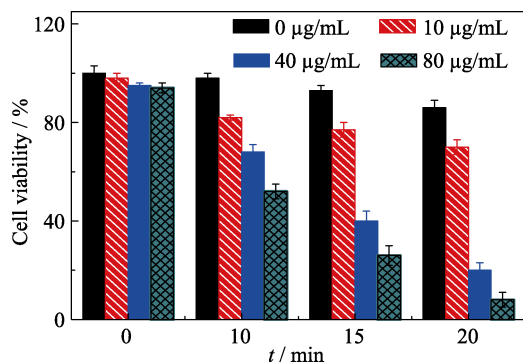


图 7 不同光照时间和不同浓度的  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米材料光热治疗后 HeLa 细胞的存活率

Fig. 7 Cell viability of HeLa cells incubated with different concentrations of  $\text{Ag}_2\text{S}$  nanomaterials and then being irradiated by a NIR laser for different time

疗后用 Calcein-AM (绿色荧光, 显示活细胞)和 PI (红色荧光, 显示死细胞)染料共染色(图 8)。在同样红外光照 20 min 的情况下, 与不同浓度  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米材料共培养的细胞存活率差异明显。培养过程中未加入  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米材料(0  $\mu\text{g/mL}$ )的细胞在光照后发出较强的绿色荧光、较弱的红色荧光, 说明大部分细胞依然存活。随着培养期间  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶浓度(10、40 和 80  $\mu\text{g/mL}$ )的增加, 光照后绿色荧光依次减弱, 红

色荧光逐渐增强。当  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶浓度为 40  $\mu\text{g/mL}$  时, 仅有微弱的绿色荧光,  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶浓度为 80  $\mu\text{g/mL}$  时几乎看不到绿色荧光, HeLa 细胞几乎全部死亡, 荧光测试结果与 MTT 检测结果相符。

### 3 结论

本研究通过热解法制备了疏水性 DT 修饰的  $\text{Ag}_2\text{S}$ , 再经表面配体置换后得到水溶性的 DTLA 修饰的  $\text{Ag}_2\text{S}$  球形纳米晶。纳米晶为单斜晶型, 单分散性良好, 在近红外区具有较好的吸收性能。研究发现浓度大于 40  $\mu\text{g/mL}$  的  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶在波长为 980 nm 激光(功率密度为 5  $\text{W/cm}^2$ )照射下对肿瘤细胞具有明显的杀伤效果, 光热治疗潜力显著。 $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶的制备简单, 成本低廉, 具有良好的水溶液稳定性、光热稳定性和生物相容性。持续照射浓度为 80  $\mu\text{g/mL}$  的  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶水溶液 7 min 至热平衡状态时, 溶液的温升值高达 21.3 $^{\circ}\text{C}$ 。此时撤去激光, 测试纳米晶加热和冷却过程的温度变化曲线, 计算得到  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶的光热转换效率为 13.9%。研究结果显示  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶用于抗肿瘤治疗有着潜在的应用前景。

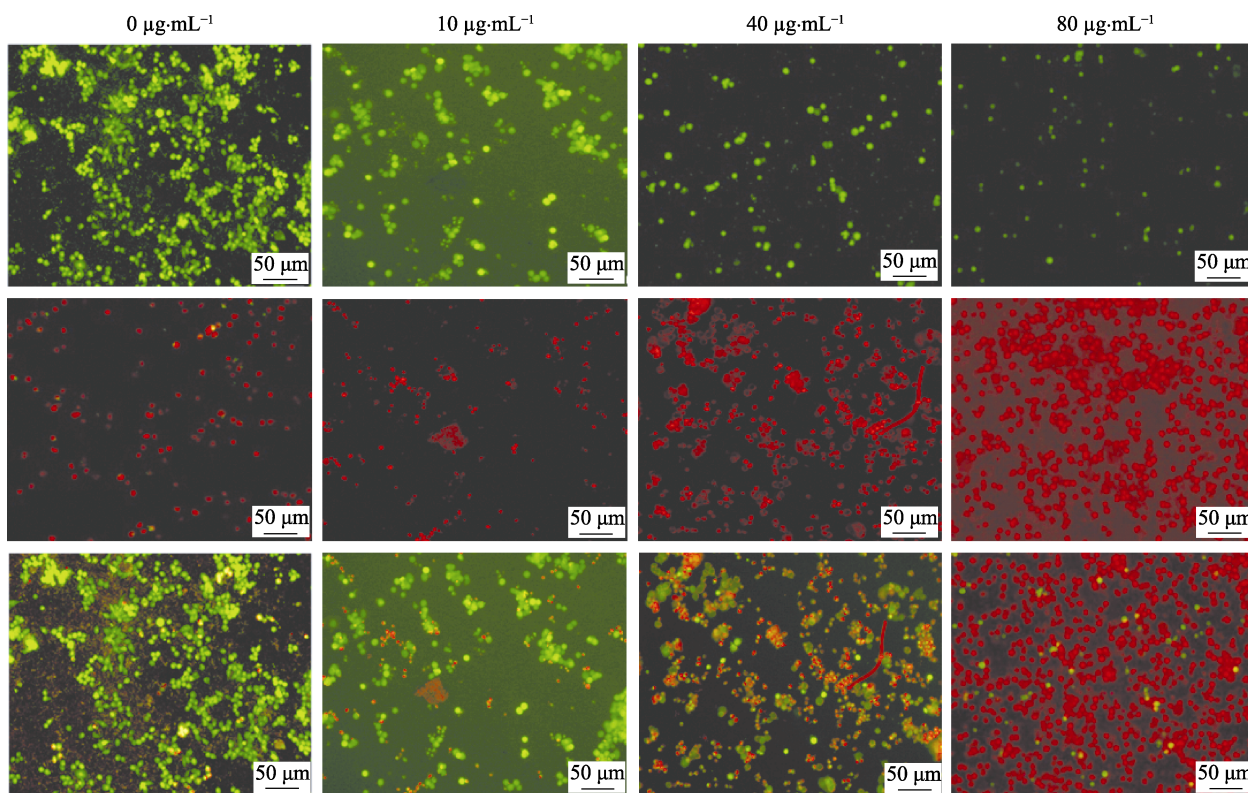


图 8 光照 20 min 后不同浓度  $\text{Ag}_2\text{S}$  纳米晶材料杀灭肿瘤细胞效果的荧光照片

Fig. 8 Fluorescence images of HeLa cells after photothermal treatment with different concentrations of  $\text{Ag}_2\text{S}$  nanomaterials under NIR irradiation for 20 min  
Green fluorescence: live cells; Red fluorescence: dead cells. All bars are 50  $\mu\text{m}$

## 参考文献:

- [1] LU W, XIONG C, ZHANG G D, *et al.* Targeted photothermal ablation of melanomas with melanocyte-stimulating hormone analog conjugated hollow gold nanospheres. *Clin. Cancer Res.*, 2009, **15**(3): 876–886.
- [2] TAKOR A S, GAMBHIR S S. Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy. *CA. Cancer J. Clin.*, 2013, **63**(6): 395–399.
- [3] VOGEL A, VENUGOPALAN V. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem. Rev.*, 2003, **103**(2): 577–581.
- [4] YANG J, CHOI J, BANG D, *et al.* Convertible organic nanoparticles for near-infrared photothermal ablation of cancer cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**(2): 441–444.
- [5] ZHAI YUN GANG, DONG WEN JIE, GAO YONG PING, *et al.* Preparation of superparamagnetic gold nanocomposites with different diameters and their imaging and therapy applications. *Journal of Inorganic Materials*, 2015, **30**(9): 950–956.
- [6] YANG J, CHOI J, BANG D, *et al.* Convertible organic nanoparticles for near-infrared photothermal ablation of cancer cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**(2): 441–444.
- [7] THAKARE V S, DAS M, JAIN A K, *et al.* Carbon nanotubes in cancer theragnosis. *Nanomedicine*, 2010, **5**(8): 1277–1301.
- [8] HIESCH L R, STAFFORD R J, BANKSON J A. *et al.* Nanoshell-media-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**(23): 13549–13554.
- [9] HUANG X, JAIN P K, EL-SAYED I H. *et al.* Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Alex. J. Med.*, 2011, **47**(15): 1–9.
- [10] HAO Y W, ZHANG B X, ZHENG C X, *et al.* The tumor-targeting core-shell structured DTX-loaded PLGA@Au nanoparticles for chemo-photothermal therapy and X-ray imaging. *Journal of Controlled Release*, 2015, **220**: 545–555.
- [11] LI J L, GU M. Gold-nanoparticle-enhanced cancer photothermal therapy. *IEEE J. Sel. Top Quant Electron.*, 2010, **16**(4): 989–996.
- [12] LI Z, HUANG P, ZHANG X, *et al.* RGD-conjugated dendrimer-modified gold nanorods for *in vivo* tumor targeting and photothermal therapy. *Mol. Pharmaceutics.*, 2010, **7**(1): 94–104.
- [13] LI Z B, HUANG H, TANGS Y, *et al.* Small gold nanorods laden macrophages for enhanced tumor coverage in photothermal therapy. *Biomaterials*, 2016, **74**(30): 144–154.
- [14] CHAKRAVARTY P, MARCHES R, ZIMMERMAN N S, *et al.* Thermal ablation of tumor cells with anti body-functionalized single-walled carbon nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, **105**(25): 8697–8702.
- [15] ZHANG Z, LIU S, XIONG H. Electrospun PLA/MWCNTs composite nanofibers for combined chemo- and photothermal therapy. *Acta Biomaterialia*, 2015, **26**(20): 115–123.
- [16] POLAND C A, DUFFIN R, KINLOCH I, *et al.* Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat. Nanotechnol.*, 2008, **3**(7): 423–428.
- [17] LANBERT T N, ANDREWS N L, GERUNG H, *et al.* (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *Biomaterials*, 2008, **29**(5): 1912–1919.
- [18] DABBOUSI B O, RODRIGUEZVIEJO J, FV MIKULEC F V, *et al.* (CdSe) ZnS core-shell quantum dots: synthesis and optical and structural characterization of a size series of highly luminescent materials. *J. Bacteriol.*, 1997, **182**(13): 3649–3654.
- [19] LEE C, KIM H, HONG C, *et al.* Porous silicon as an agent for cancer thermotherapy based on near-infrared light irradiation. *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**(40): 4790–4795.
- [20] YANG K, ZHANG S A, ZHANG G X, *et al.* Graphene in mice: ultra high *in vivo* tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Lett.*, 2010, **10**(9): 3318–3323.
- [21] SHARKER S M, KIM S M, LEE J E, *et al.* Functionalized biocompatible WO<sub>3</sub> nanoparticles for triggered and targeted *in vitro* and *in vivo* photothermal therapy. *J. Control. Release*, 2015, **217**: 211–220.
- [22] YANG C, MA L, ZOU X J, *et al.* Surface plasmon-enhanced Ag/CuS nanocomposites for cancer treatment. *Cancer Nano*, 2013, **4**(4/5): 81–89.
- [23] SHERLOCK S P, TABAKAN S M, XIE L, *et al.* Photothermally enhanced drug delivery by ultra-small multifunctional FeCo/graphitic-shell nanocrystals. *ACS Nano*, 2011, **5**(2): 1505–1512.
- [24] KRYUKOV A I, STROYUK A L, ZIN'CHUK N N, *et al.* Optical and catalytic properties of Ag<sub>2</sub>S nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2004, **221**(1/2): 209–221.
- [25] WANG Q T, WANG X B, LOU W J, *et al.* Synthesis of bismuth sulfide nanostructures and their electrochemical hydrogen storage behavior. *New Journal of Chemistry*, 2010, **34**(9): 1930–1935.
- [26] HONGG S, ROBINSON J T, ZHANG Y J, *et al.* *In vivo* fluorescence imaging with Ag<sub>2</sub>S quantum dots in the second near-infrared region. 2012, **51**(39): 9818–9821.
- [27] LI C Y, ZHANG Y J, WANG M, *et al.* *In vivo* real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag<sub>2</sub>S quantum dots in the NIR-II window. *Biomaterials*, 2014, **35**(1): 393–400.
- [28] ROPER D K, AHN W, HOEPFNER M. Microscale heat transfer transduced by surface plasmon resonant gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**(9): 3636–3641.
- [29] YUWEN L H, ZHOU J J, ZHANG Y Q, *et al.* Aqueous phase preparation of ultrasmall MoSe<sub>2</sub> nanodots for efficient photothermal therapy of cancer cells. *Nanoscale*, 2016, **8**: 2720–2726.
- [30] TIAN Q W, JIANG F R, ZOU R J, *et al.* Hydrophilic Cu<sub>9</sub>S<sub>5</sub> nanocrystals: a photothermal agent with a 25.7% heat conversion efficiency for photothermal ablation of cancer cells *in vivo*. *ACS Nano*, 2011, **5**(12): 9761–9771.
- [31] HONG G S, ROBINSON T J, ZHANG Y J, *et al.* *In-vivo* fluorescence imaging with Ag<sub>2</sub>S quantum dots in the second near-infrared region. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**(39): 9818–9821.
- [32] DU Y P, XU B, FU T, *et al.* Near-infrared photoluminescent Ag<sub>2</sub>S quantum dots from a single source precursor. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, **132**(5): 1470–1471.