



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 _____

U D C _____

密 级 _____

博士学位论文

基于金纳米簇的肿瘤活体多模态分子影像研究

胡 皓

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 内科学(消化系病)

研 究 方 向 肿瘤多模态分子影像

指 导 教 师 吴开春 教授(主任医师)

培 养 单 位 西京医院消化内科

二〇一五年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____ 日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____ 导师签名：_____ 日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	4
ABSTRACT	8
前 言	13
文献回顾	16
1. 肿瘤的流行病学、诊断及治疗现状和所面临的挑战	16
2. 分子影像学在肿瘤相关研究中的作用	16
3. 分子影像研究朝向多模态方向发展	18
4. 核素光学双模态分子成像具有明显的成像优势	20
5. 纳米材料与多模态分子成像	25
6. 金纳米簇的研究背景	27
7. 结语	31
正 文	33
第一部分 金纳米簇的合成、表征及放射性标记	33
1. 材料	34
1.1 试剂与耗材	34
1.2 实验仪器	34
2. 方法	35
2.1 HSA@AuNCs 的合成	35
2.2 放射性 ^{64}Cu 标记与纯化	36
2.3 ^{64}Cu -doped AuNCs 的放射化学纯度测定	36

2.4 不同浓度 Cu 制备 Cu-doped AuNCs	36
2.5 琼脂糖凝胶电泳	37
2.6 不同浓度 Cu 制备的 Cu-doped AuNCs 荧光性质的影响	37
2.7 统计分析方法	38
3. 结果	38
3.1 HSA@AuNCs 的合成	38
3.2 AuNCs 吸收光谱及荧光光谱	38
3.3 AuNCs 的形貌及粒径表征、	40
3.4 Cu-doped AuNCs 的吸收光谱及荧光光谱表征	40
3.5 Cu-doped AuNCs 的形貌、粒径表征及 CD 谱变化	40
3.6 ⁶⁴ Cu 标记 AuNCs 的效率、纯度及稳定性	41
3.7 不同浓度 Cu 制备 Cu-doped AuNCs 及其对 AuNCs 荧光特性的影响	43
4. 讨论	46
第二部分 ⁶⁴ Cu-DOPED AuNCs 的体外多模态成像研究与评价	49
1. 材料	50
1.1 试剂与耗材	50
1.2 实验仪器	51
1.3 细胞系	51
2. 方法	51
2.1 细胞复苏、培养穿代、冻存	51
2.2 细胞计数	52
2.3 CCK8 毒性实验	53
2.4 细胞非特异吞噬及免疫荧光	54
2.5 细胞非特异吞噬的流式细胞仪检测	54
2.6 体外 PET 成像	55
2.7 体外 Maestro 成像	55
2.8 体外契伦科夫能量共振转移成像及 IVIS 光谱分段分析扫描	55
2.9 统计分析方法	56
3. 结果	56

3.1 CCK8 细胞毒性研究	56
3.2 U87MG 细胞对纳米粒子的摄取及流式	57
3.3 ^{64}Cu -doped AuNCs 体外 PET 成像评估	58
3.4 ^{64}Cu -doped AuNCs 体外 Maestro 荧光成像评估	59
3.5 体外自发荧光成像及 IVIS 光谱分段扫描	60
4. 讨论	63
第三部分 ^{64}Cu -DOPED AuNCs 的体内多模态成像研究与评价	66
1. 材料	67
1.1 试剂与耗材	67
1.2 实验仪器	67
1.3 细胞系及实验动物	68
2. 方法	68
2.1 荷瘤动物模型建立	68
2.2 ^{64}Cu -doped AuNCs 荷瘤动物的 PET 成像	69
2.3 ^{64}Cu -doped AuNCs 荷瘤动物的自发荧光及契伦科夫成像	69
2.4 ^{64}Cu -doped AuNCs 的器官分布	70
2.5 PET 成像与光学成像的相关性分析	70
2.6 ^{64}Cu -doped AuNCs 组织学评价	71
2.7 统计分析方法	71
3. 结果	71
3.1 ^{64}Cu -doped AuNCs 的近红外自发荧光成像	71
3.2 ^{64}Cu -doped AuNCs 的 PET 成像	74
3.3 PET 成像与光学成像的相关性	77
3.4 ^{64}Cu -doped AuNCs 的器官分布	79
3.5 器官毒性研究	80
4. 讨论	82
小 结	85
参考文献	86

个人简历和研究成果	107
致 谢	111

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
%ID/g	Percentage of injected dose per gram of tissue	每克组织注射剂量百分比
¹⁸ F-FDG	2-deoxy-2-(¹⁸ F)fluoro-D-glucose	氟-18 去氧葡萄糖
AuNCs	Gold nanocluster	金纳米簇
BLI	Bioluminescence imaging	生物发光成像
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer	生物发光能量共振转移
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CCD	Charge coupled device	电荷耦合器件
CCK8	Cell Counting kit-8	细胞计数试剂盒-8
CLRET	Chemiluminescence resonance energy transfer	化学发光能量共振转移
CPM	Counts per minutes	每分钟放射计数
CRET	Cerenkov energy transfer imaging	契伦科夫能量共振转移
CT	Computed tomography	计算机断层扫描
CTAB	Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide	十六烷基三甲基溴化铵
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole)	4',6-二脒基-2-苯基吲哚

DPA	D-penicillamin	D-青霉素胺
EPR	Enhanced permeability and retention effect	高通透性和滞留效应
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FMI	Fluorescence molecular imaging	荧光分子成像
FR	Folate receptor	叶酸受体
FRET	Fluorescence resonance energy transfer	荧光共振能量转移成 像
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GSH	Glutathione	谷胱甘肽
HAuCl ₄	Chloroauric acid	氯金酸
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HSA	Human serum albumin	人血清白蛋白
ICG	Indocyanine green	吲哚菁绿
IGS	Image-guided surgery	手术导航
ITLC	Instant Thin-Layer Chromatography	快速薄层层析
kDa	Kilodalton	千道尔顿
MPO	Myeloperoxidase	过氧化物酶
MRI	Magnetic resonance imaging	核磁共振成像
N ₂ H ₄	Hydrazine hydrate	水合肼
NaOH	Sodium hydroxide	氢氧化钠
NIR	Near-infrared Imaging	近红外成像
NPs	Nanoparticles	纳米颗粒
OI	Optical imaging	光学成像

PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PET	Positron emission tomography	正电子发射断层扫描
PM	Precision medicine	精准医学
QDs	Quantum dots	量子点
RGD	Arg-Gly-Asp	精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸
ROI	Regions of interest	感兴趣区
SD	Standard deviation	标准差
SPECT	Single-photon emission computed tomography	单光子发射计算机断层扫描
SR	Somatostatin receptors	生长抑素受体
T/NT	Tumor to non-tumor ratio	肿瘤/非肿瘤比例
US	Ultrasound imaging	超声成像
UV	Ultraviolet	紫外光
WL	White light	白光
Z-Fix	buffered zinc formalin fixatives	锌福尔马林固定液

基于金纳米簇的肿瘤活体多模态分子影像研究

博士研究生：胡皓

导师：吴开春 教授

共同导师：陈小元 教授

第四军医大学西京医院消化内科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金重大项目（项目号：81090270，81090273）

国家留学基金委

国家 973 计划项目（项目号：2010CB529302）

中文摘要

【研究背景和目的】

自发荧光成像是近些年分子成像研究的新热点。自发荧光成像最重要的特点就是不额外需要激发光，因而与传统荧光成像相比，具有明显的成像优势。首先，自发荧光成像由于无激发光，因此避免了背景荧光、非特异荧光对成像造成的背景干扰。其次，由于生物组织对光的吸收和散射，荧光成像的入射激发光在经过人体时不可避免的会发生强度的减弱。而自发荧光成像由于不需要激发光，因而避免了激发光减弱对成像效果造成的影响。目前，自发荧光成像的研究相对较少，成像原理多是基于能量共振转移原理。量子点则是目前唯一报道的自发荧光能量受体。然而，量子点一般是由 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 等重金属组成，而且很容易发生细胞内的聚集。特别是其内部的重金属粒子的不断自发释出，会对生物体及环境带来的潜在损害。由于毒性的限制，量子点很难进一步在生物医学领域发挥更大作用。因此人们迫切需要研发一种全新、

无毒、高生物相容性的自发荧光系统，进一步推动自发荧光成像及其在分子成像和治疗中的应用。

金纳米簇是一种新型的荧光纳米材料。由于荧光稳定，安全性高，生物相容性好，水溶性佳等特点，日渐成为在体成像和探针研发中的新热点。然而目前尚无有关金纳米簇作为自发荧光成像能量供体的相关研究。本课题将首次利用人血清白蛋白作为模版合成近红外荧光金纳米簇，并首次建立金纳米簇的快速放射性标记方法。在此基础上，通过体内，体外一系列实验，评价金纳米簇与放射性核素间发生契伦科夫能量共振转移的可能性，并探讨金纳米簇作为契伦科夫能量共振转移受体和核素载体，实现自发荧光成像和放射性核素成像的潜在价值，从而为 AuNCs 成为新型多模态成像的候选分子提供理论依据。

【方法】

1. 以用 HSA 为模版合成 AuNCs，TEM 测量其大小，荧光分光光度计测量其荧光光谱，CD 谱测量 HSA 构象改变。以水合肼还原法，将放射性 ^{64}Cu 以无金属螯合物的方式还原于 AuNCs 表面，快速薄层层析 (Instant Thin-Layer Chromatography, ITLC) 测量其标记率和稳定性；
2. 体外评价 ^{64}Cu -doped AuNCs 的 PET 成像及其契伦科夫能量共振转移下的自发近红外荧光成像能力 (CRET-NIR)。进一步采用 IVIS 分析其近红外自发光特点，选取如下滤光片组：无滤片组、 $>590\text{ nm}$ 、 $<510\text{ nm}$ 、 $515 - 575\text{ nm}$ 、 $575 - 650\text{ nm}$ 、 $695 - 770\text{ nm}$ 和 $810 - 875\text{ nm}$ ，对 ^{64}Cu -doped AuNCs CRET-NIR 的成像效果进行分析；
3. 裸鼠皮下接种 U87MG 细胞，尾静脉注射 ^{64}Cu -doped AuNCs，分别使用 PET 成像和 IVIS 小动物成像系统，在注射后不同时间点，行 PET 成像及 CRET-NIR 成像，判断其在体双模态成像能力。以肿瘤部位为感兴趣区，计算不同时间点肿瘤部位的 CRET-NIR 和 PET 信号的变化，并判断二者关系；
4. 生物学分布实验及组织学检查，判断 ^{64}Cu -doped AuNCs 的靶向性，确定其体内代谢特点。

【结果】

1. 成功合成了 HSA 包裹的 AuNCs。TEM 显示所合成的 AuNCs 呈规则球形颗粒，粒径均一，颗粒大小约为 0.93 ± 0.25 nm，分光光度计测量 AuNCs 最大发射光谱约为 680 nm，CD 谱测量结果证实，合成后 HSA 的空间构象得到保持。ITLC 结果显示放射性 ^{64}Cu 几乎全被成功标记于 AuNCs 上，且标记稳定；
2. 体外 PET 成像及荧光成像结果显示， ^{64}Cu -doped AuNCs 展现出良好双模态成像能力。IVIS 系统对成像结果分析表明， ^{64}Cu -doped AuNCs 可发生 CRET-NIR 成像，且强度高于 ^{64}Cu 的契伦科夫辐射。在无滤片组， ^{64}Cu -doped AuNCs 的总信号强度是同放射强度 $^{64}\text{CuCl}_2$ 的 1.6 倍；在 > 590 nm 组， ^{64}Cu -doped AuNCs 强度值为 9.40×10^6 photon/s 远高于 $^{64}\text{CuCl}_2$ 的 3.42×10^6 photon/s（约 2.7 倍）。特别是在 695 - 770 nm 处，由于包含 ^{64}Cu -doped AuNCs 的最大发射波长，荧光强度是 $^{64}\text{CuCl}_2$ 契伦科夫辐射强度的 4.3 倍；
3. 荷瘤动物在体成像表明， ^{64}Cu -doped AuNCs 具备优良的 PET 成像及 CRET-NIR 成像性能。PET 成像及定量结果显示， ^{64}Cu -doped AuNCs 在注射后 1 小时即有明显的肿瘤摄取。ROI 测量显示，随着时间延长，在注射后 18 小时和 24 小时，肿瘤组织可分别达到 14.9 %ID/g 和 15.2 %ID/g 的放射性摄取。IVIS 成像表明 ^{64}Cu -doped AuNCs 可显示出满意的肿瘤 CRET-NIR，注射后 8 小时达最大信号值。与此对应的是，同等放射剂量的 $^{64}\text{CuCl}_2$ 的契伦科夫辐射却基本不能显示肿瘤位置。ROI 测量 $^{64}\text{CuCl}_2$ 契伦科夫辐射强度仅为 ^{64}Cu -doped AuNCs 在体强度的 1/7；由于 CRET 现象，在体 PET 与 CRET-NIR 信号显示出良好的线性相关性，其中 PET 与无滤片组和 > 590 nm 组的相关性分别达到 $r^2 = 0.9340$ 和 $r^2 = 0.9687$ 。然而，由于契伦科夫辐射能量发生了转移， < 510 nm 组中 $^{64}\text{CuCl}_2$ 的契伦科夫辐射与 PET 信号的相关性仅为 $r^2 = 0.7616$ ；
4. 生物分布实验结果显示， ^{64}Cu -doped AuNCs 具有良好的体内动力学特点，肝脏和肾脏是其排泄器官，组织学检查没有发现明显的器官损伤。

【结论】

本课题成功制备了新型自发成像金纳米簇， ^{64}Cu -doped AuNCs，首次将贵金属纳

米簇作为能量受体，成功用于小动物 PET 和 CRET-NIR 双模态成像。该探针具有以下特点：1) 粒径小，水溶性好，稳定性高；2) 具备 PET 及自发 NIR 双模态成像的能力；3) 可将短波长的契伦科夫辐射转化为 AuNCs 的长波长，有利于在体成像；4) 在体无毒，且生物相容性好。⁶⁴Cu-doped AuNCs 有望成为生物医学，特别是分子影像与肿瘤治疗研究的新利器。

【关键词】

金纳米簇；⁶⁴Cu；契伦科夫能量共振转移；自发荧光成像；PET 成像；近红外成像

Multimodality tumor imaging using self-illuminating gold nanoclusters

Candidate for Ph.D.: Hao Hu

Supervisor: Kaichun Wu

Co-supervisor: Xiaoyuan (Shawn) Chen

Department of gastroenterology, Xijing hospital, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, China

Sponsored Programs:

National Natural Science Foundation of China (No.81090270, 81090273)

China Scholarship Council

The national 973 Project (No. 2010CB529302)

Abstract

【Background and aim】

Self-illuminating fluorescence imaging is a newly developed imaging technique, overcoming several shortcomings of traditional fluorescence imaging. It has many distinguished imaging advantages, such as: i) no need of excitation from external illumination sources to fluoresce, resulting in no interference of strong background autofluorescence, and ii) no issue of excitation attenuation caused by photons absorption/scattering in bio-tissue transmission, which serves extremely important for *in vivo* imaging, as most imaging targets are non-superficial. So far, only a few self-illuminating fluorescence probes are designed and constructed based on three different energy transfer mechanisms. Quantum dots (QDs), due to their high quantum yield, tunable emission peaks, long fluorescence lifetimes, and negligible photobleaching, are only one material that been employed as the energy transfer acceptor. However, self-illuminating

QDs are limited for further biomedical applications because most QDs contain heavy metal elements (such as Cd^{2+} , Pb^{2+} , *etc.*) and tend to self-aggregate inside living cells. The cytotoxicity of the released heavy metal ions in biological systems and potential environmental hazard of these ions always hinder their practical applications. Therefore, it is highly desirable to develop novel self-illuminating systems with non-toxicity and good biocompatibility for further biomedical applications, especially in molecular imaging and therapy.

Gold Nanoclusters (AuNCs) are new kind of fluorescent nanomaterials, which have aroused great interest in the development of new types of luminescent probes due to their high fluorescence, good photostability, non-toxicity, excellent biocompatibility and water solubility. However, the self-illuminating property of AuNCs and possibilities of AuNCs served as an energy transfer acceptor have not been reported. This study was designed to use HSA as bio-temple to synthesize AuNCs and developed a novel one-pot isotope labeling method for the first time. The CRET between AuNCs and isotope were discussed, and the multimodality imaging potential of radiolabeled AuNCs were demonstrated by a series of *in vitro* and *in vivo* experiments. The aim of this work was to provide critical evidences and show the potentials of AuNCs as a novel multimodality imaging agent.

【Methods】

1. AuNCs were prepared by a biomimetic synthesis methods using nature HSA as template. Transmission electron microscope (TEM) images were acquired and size was measured. Fluorescence emission spectra were recorded by the fluorescence spectrophotometer, and CD spectra were recorded on a Jasco J-815 spectropolarimeter. ^{64}Cu was reduced and doped onto the AuNCs surface by a chelator-free methods. The labeling efficiency and stability were calculated by instant thin layer chromatography (ITLC);
2. The PET and self-illuminating NIR imaging potentials of ^{64}Cu -doped AuNCs were demonstrated *in vitro*. The IVIS imaging system was applied to evaluate CRET effects

in ^{64}Cu -doped AuNCs by several chosen filter sets: no filters, > 590 nm, < 510 nm, $515 - 575$ nm, $575 - 650$ nm, $695 - 770$ nm, and $810 - 875$ nm;

3. The subcutaneous tumor xenograft model was established by injection of U87MG cells into nude mice. ^{64}Cu -doped AuNCs were administrated by tail vein injection, then PET and self-illuminating NIR (CRET-NIR) imaging were conducted at different time points to evaluate the multimodal imaging ability of ^{64}Cu -doped AuNCs *in vivo*. Regions of interests (ROIs) were drawn over the tumors and the signal intensities from PET and IVIS were measured and compared;
4. Biodistribution study and histological examination were applied to evaluate the pharmacokinetics, targeting efficacy and toxicity of ^{64}Cu -doped AuNCs.

【Results】

1. AuNCs were successfully synthesized using HSA as bio-template. The TEM image showed the size of AuNCs was about 0.93 ± 0.25 nm. The maximum emission peak was at ~ 680 nm. The CD spectropolarimeter showed that the structure conformation of HSA has not changed much even after AuNCs synthesis. The ITLC indicated that almost all the ^{64}Cu was reduced and stably doped onto the AuNCs;
2. *In vitro* PET and self-illuminating images showed satisfied dual-modality imaging capability of ^{64}Cu -doped AuNCs. IVIS imaging analysis demonstrated that the CRET-NIR would happen within ^{64}Cu -doped AuNCs, and the intensity was much higher than the Cerenkov radiation of $^{64}\text{CuCl}_2$ of same radioactivity. Specifically, in the no filter group, the ^{64}Cu -doped AuNCs showed an intensity of 1.6-that of $^{64}\text{CuCl}_2$, and in the filter of >590 nm, the intensity of ^{64}Cu -doped AuNCs was 9.40×10^6 photon/s, which was 2.7 times than that of $^{64}\text{CuCl}_2$ (3.42×10^6 photon/s). More importantly, in $695 - 770$ nm region, which covered parts of the emission spectrum of AuNCs, the intensities of ^{64}Cu -doped AuNCs were 4.3-fold that of $^{64}\text{CuCl}_2$;
3. ^{64}Cu -doped AuNCs exhibited good synergistic dual-modality PET and self-illuminating NIR tumor imaging. PET imaging and ROIs quantification identified evident tumor

uptake of ^{64}Cu -doped AuNCs at 1 h post injection, which increased to 14.9 %ID/g and 15.2 %ID/g at 18 h and 24 h, respectively. IVIS images showed an enhanced tumor uptake of ^{64}Cu -doped AuNCs after injection, reaching maximum at 8 h post injection. Importantly, the CRET-NIR imaging (measured by >590 nm filter) showed satisfactory tumor uptake compared to Cerenkov imaging (measured by filter <510 nm), in which tumor signal was only 1/7 of the total and tumor uptake was barely detected. Because of CRET, the ROI measurement displayed good linear correlation between PET and total signal (no filter, $r^2 = 0.9340$) as well as PET and CRET-NIR signal (>590 nm; $r^2 = 0.9687$). In contrast, a weaker linear correlation was found between PET signals and Cerenkov radiation, due to parts of Cerenkov energy were transferred (<510 nm; $r^2 = 0.7616$);

4. Organ distribution results indicated that the liver and kidneys may be responsible for the route of clearance of ^{64}Cu -doped AuNCs. Histological examination showed no obvious organ damage at 1 day and 7 days after injection of ^{64}Cu -doped AuNCs.

【Conclusions】

In summary, we developed a novel self-illuminating gold nanocluster, ^{64}Cu -doped AuNCs, for dual-modality PET and CRET-NIR fluorescence imaging. To the best of our knowledge, it is the first time that noble metal nanoclusters have been reported as energy transfer acceptors for multimodality imaging. The ^{64}Cu -doped AuNCs we developed have the following features: 1) small size, high solubility and stability in aqueous media; 2) both PET and self-illuminating NIR imaging capabilities; 3) *in vivo* self-illumination, converting short wavelengths of Cerenkov radiation into longer wavelengths, and 4) non-toxicity and good biocompatibility. These self-illuminating nanoclusters provide novel biomedical research tools, especially for molecular imaging and cancer therapy.

【Keywords】

Gold nanocluster; ^{64}Cu ; Cerenkov resonance energy transfer; Self-illuminating imaging;
Positron emission tomography; Near-infrared imaging

前 言

自发荧光成像 (Self-illuminating fluorescence imaging) 是近些年成像研究的新热点。自发荧光成像最重要的特点就是不需要额外的激发光, 因而与传统荧光成像相比, 具有明显的成像优势。首先, 传统荧光成像中背景荧光、非特异荧光常常是影响成像效果的重要因素。自发荧光成像由于无激发光, 因此避免了背景荧光、非特异荧光对感兴趣区 (Regions of interest, ROI) 造成的成像干扰, 提高了成像的敏感性 [1, 2]。其次, 由于生物组织对光的吸收和散射, 荧光成像的入射激发光在经过人体时不可避免的会发生强度的减弱。而自发荧光成像由于不需要激发光, 因而避免了激发光减弱对成像效果造成的影响 [3]。目前自发荧光成像的研究相对较少, 成像原理多是基于三种能量共振转移原理, 即生物发光能量共振转移 (Bioluminescence resonance energy transfer, BRET)、化学发光能量共振转移 (Chemiluminescence resonance energy transfer, CLRET) 及契伦科夫能量共振转移 (Cerenkov energy transfer imaging, CRET)。量子点 (Quantum dots, QDs) 由于较高的荧光产率、波长可调、荧光稳定等有点, 是目前自发荧光成像研究中使用最多的能量受体。比如, So 等人报道了基于 BRET 的自发荧光成像。在实验中他们成功将 Luciferase 催化的生物发光作为能量供体激发了 CdSe/ZnS 量子点, 在无激发光源的条件下使量子点实现在体成像 [2]。Zhang 等人则报道了利用 CLRET 实现深部组织探测的研究。在研究中, 他们利用鲁米诺被氧化时所发出蓝光成功激发了 CdSe/ZnS 量子点, 从而实现了深部组织过氧化物酶 (Myeloperoxidase, MPO) 的探测 [4]。CRET 则由 Robin S. 等人最先提出, 并发现将放射性核素与量子点混合后, 可以激发量子点产生荧光 [5]。我们实验室进一步的研究证实, CRET 的确可以用于激发长波长量子点, 并可用于小动物在体成像 [6, 7]。然而, QDs 一般是由 Cd、Pb、As 等重金属材料组成, 且其表面修饰也常需要有毒物质, 如十六烷基三甲基溴化铵 (Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide, CTAB)。研究发现 QDs 在生物体内使用时, 内部的重金属粒子会不断自发释出, 可对生物体造成直接毒性损害 [8, 9]。QDs 的生物安全性和潜在环境危害限制了 QDs 研究的进一

步临床的转化。即便无毒 QDs 的研究取得了一些进展, QDs 目前还不具备在体临床使用的条件 [8, 10, 11]。因此研发全新安全性高, 生物相容性好的能量受体是进一步推动自发荧光成像临床转化和应用的目标。

近几年, 贵金属纳米簇, 特别金纳米簇 (gold nanocluster, AuNCs), 由于荧光稳定, 安全性高, 生物相容性好, 水溶性佳等特点, 日渐成为在体成像和探针研发中的新热点 [12-19], 需要特别指出的是, 贵金属纳米簇合成常使用具有生物功能的大分子 (如蛋白、短肽、酶等) 作为模版, 因而在生物体内可表现出优良的胶体稳定性、高溶解性、低非特异性摄取等特点 [15, 19, 20]。同时生物大分子众多的生物活性基团 ($-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 等) 为表面功能修饰提供了大量的位点 [21, 22]。以上优点使贵金属纳米簇有望成为新一代自发荧光成像的能量受体。

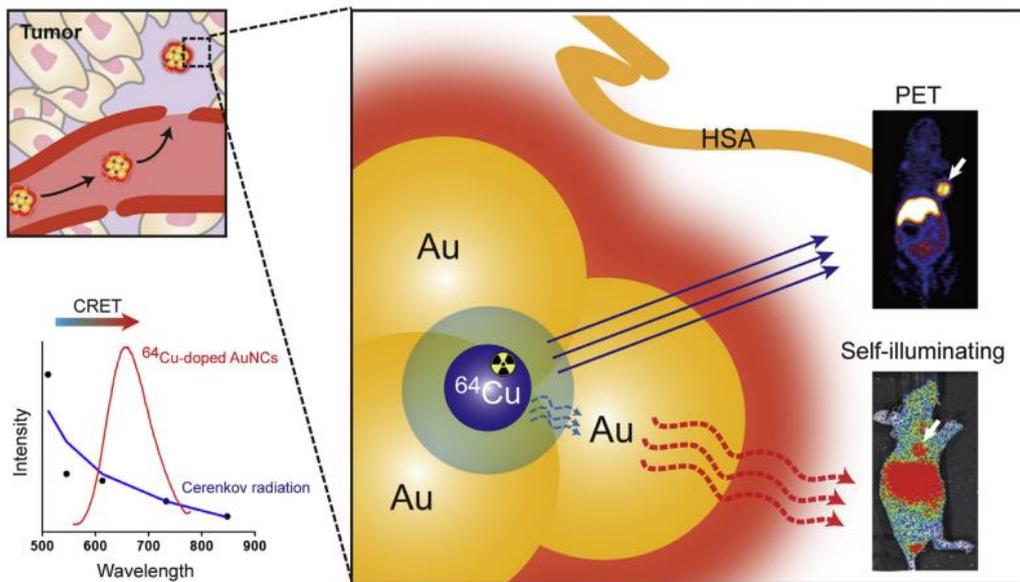


图 1 探针 ^{64}Cu -doped AuNCs 在体双模态 PET 成像及自发近红外成像示意图。放射性核素 ^{64}Cu 一方面作为能量供体用以激发 AuNCs, 另一方面作为 PET 成像的示踪剂。AuNCs 作为自发荧光成像的能量受体。HSA, 人血清白蛋白。

本课题中, 我们系统设计和制备了具有自发荧光成像功能的双模态探针 ^{64}Cu -doped AuNCs, 该探针可进行正电子发射断层成像 (positron emitting imaging, PET) 和近红外 (Near-infrared imaging, NIR.) 自发荧光成像 (如图 1)。放射性 ^{64}Cu 一方面作为能量供体用以激发 AuNCs, 另一方面作为 PET 成像的示踪剂。在此过程中, 我

们建立了无需金属螯合物的 AuNCs 快速放射性标记方法（标记约 1 小时）。所制备的 ^{64}Cu -doped AuNCs 展现了优良的在体荧光稳定性、水溶性和分散性、低毒、高生物相容性等特点。在 U87MG 肿瘤移植瘤模型上， ^{64}Cu -doped AuNCs 成功实现了在体肿瘤双模态成像。高效清晰的 PET 和自发近红外荧光成像展现了 ^{64}Cu -doped AuNCs 作为新型肿瘤多模态成像探针的巨大潜力。

文献回顾

1. 肿瘤的流行病学、诊断及治疗现状和所面临的挑战

肿瘤是威胁人类健康的重大疾病，其总体发病率在全球范围内居高不下。仅 2012 全年，全球新发癌症病人就有一千四百万。据世界卫生组织估计，肿瘤发病率仍将保持上升态势，未来二十年将增长 70% [23]。我国是肿瘤疾病的高发国家，据中国肿瘤登记中心 2013 年年报显示，我国恶性肿瘤发病率为男性 274.69/10 万，女性 197.24/10 万，因肿瘤导致死亡的人约为 210 万人/年。按照我国人口平均寿命 74 岁计算，一生中患恶性肿瘤的机率高达 22 %。因此，肿瘤已成为严重危害国人的健康，消耗大量医疗资源，增加社会和家庭经济负担的重大疾病。

“诊断要早、治疗要精、监测要准”是现代医学对肿瘤诊断和治疗提出的全新挑战。它不仅要求在诊断上能在肿瘤发展初期就发现其存在；在治疗上，更能根据不同肿瘤的特点选择、制定“个体化”的治疗策略，并能对所选治疗手段的有效性进行快速甚至是预先判断，及时指导临床治疗方案。令人遗憾的是现行的肿瘤诊断及治疗监测手段主要依据肿瘤形态学的变化，难以早期判断肿瘤的发生和及时反映肿瘤治疗的疗效。这就需要我们必须创新诊断和治疗模式，探索和研发全新的肿瘤诊疗新策略。

探索不同于以往肿瘤诊断及监测新方法，揭示疾病发生、发展过程中的分子机制和功能变化，是当代医学诊断和治疗研究中极具挑战的前沿方向 [24]。研究表明，肿瘤细胞关键分子的改变早于形态学变化。抓住肿瘤发生发展及治疗过程中重要分子变化就有可能实现肿瘤的早期诊断和精确疗效预测。因此，研发可识别肿瘤关键分子变化的全新肿瘤诊疗手段，将大大提早肿瘤诊断与处置时间，增加疗效效果判定的准确性，提高肿瘤治疗的针对性和有效性。

2. 分子影像学在肿瘤相关研究中的作用

分子影像学 (Molecular Imaging) 是本世纪初刚刚诞生的一门新学科。它的诞生得益于人们近几十年来在细胞生物学、疾病靶点筛选、新成像药物、小动物成像仪器方面所取得的巨大成功。分子影像学可在活体状态 (人和动物) 下通过非侵入的手段，

在细胞及分子水平上观察、定量和表征生理或疾病发生发展的全过程，是一门包含化学、生物学、基础物理学、医学、制药学、生物医学工程等众多学科的交叉科学 [25]。正如 16 世纪末第一台显微镜催生了以形态学观察为主的早期生物学发展一样，分子影像学正催动着新一轮疾病诊断研究和药物研发领域的革命。

现有影像学诊断技术主要是基于疾病形态学改变，通过对比病灶与正常组织间在解剖位置、结构、质地等属性的差异来诊断疾病的。目前形态学诊断方法，肿瘤大小需要至少在厘米级，甚至更大才可能被发现。而在此阶段，肿瘤团块已至少含有 1×10^9 个细胞，因而大多数肿瘤在发现时都已进入晚期。我们知道，早期诊断对肿瘤病人的治疗和预后意义重大。通常 I 期的肿瘤五年生存率大于 90%，如果能在此阶段探测到肿瘤，甚至在更早的癌前病变阶段能够早期干预，肿瘤往往就可以治愈甚至预防 [26]。与前者不同的是，分子影像技术使用的是可与疾病特异性靶点相结合的分子探针作为成像的示踪剂。成像诊断策略上彻底的变革，使分子成像具备对疾病早期“分子事件”探测的能力，从而使肿瘤的早期诊断成为可能 [24, 27]。比如，在肺癌动物模型上，分子影像通过对癌基因 *Kras* 状态的检测，成功实现对仅 1 mm 大小肿瘤的探测 [28]。在前列腺癌患者上，通过靶向淋巴结中巨噬细胞的磁性纳米材料，MRI 可定位以往很难发现的毫米级转移淋巴结 [29]。其次，分子成像借助于特殊靶向成像探针，可早期判定和实时监测肿瘤治疗的反应，并在此基础上评价治疗策略的有效性，为制定和调整“精准化治疗”方案提供依据。精准医学 (Precision medicine, PM) 是 2015 年刚刚提出的新概念，是指医疗的整个过程，即诊断、治疗决策均依据病人个体化的疾病的生物学、病理及基因特点 [30, 31]。2015 年，美国总统奥巴马签署一项高达 2.15 亿美元的预算专门用于精准医学的研究，可以说，精准医学代表着未来医学的发展方向。分子影像通过特异性探针可精准观察肿瘤在治疗中的分子变化，协助医师对治疗效果进行早期判断及预测，及时调整和优化治疗策略和用药，最大限度上扩大治疗效果，从而达到“精准治疗”的目的。比如，作为临床使用最广泛的分子影像探针氟-18 去氧葡萄糖 (2-deoxy-2-(^{18}F)fluoro-D-glucose, ^{18}F -FDG)，可对肿瘤葡萄糖代谢水平进行分析，被广泛用于乳腺癌、结肠癌、食管癌、头颈部肿瘤、肺癌等多种肿瘤的分级分期及评价肿瘤治疗效果的手段。最近的研究和统计结果表明在进展期卵巢癌患者中， ^{18}F -FDG 在化疗药物疗效评价上甚至比血清学标志物 CA-125 还要准确 [32]。再次，分子成像技术可大幅简化和缩短抗肿瘤药物的研究时间，大幅减

少经费投入。一个药物从研发到最终成功上市，其过程往往耗资超过百亿美元，长达10-20年的研究周期。在此过程中，多数药物在研发过程中会被逐渐淘汰 [33]。分子影像通过对药物作用靶点或其下游分子的活体成像，可在活体水平直接证实药物的靶向性及作用机制，从而简化药物研发过程中大量的结构比对、生物信息学靶点分析，以及大量繁琐的动物学、药代动力学、药效学实验，明显加快药物研发的进程。例如，绿色荧光蛋白（Green fluorescent protein, GFP）及荧光素酶（luciferase）标记的各种生物分子被广泛用于抗肿瘤前体药物的筛选。通过 GFP 的荧光成像和 Luciferase 的生物发光成像，人们能更直观的观察药物的作用方式及作用靶点 [34-38]。将候选药物直接进行放射性标记后，利用分子成像技术（主要是放射性成像技术）可以很容易地在活体状态下对候选药物的药代动力学特征进行评价，如循环时间、清除率、半衰期、器官生物分布等 [39-41]。在疗效动态监测上，分子影像同样比传统方式更加客观、直接。分子影像可在同一个体或动物体上进行长时间的动态观察跟踪，而不必进行有害侵入性的检查或处死实验动物，因此大大减少动物实验用量，及简化实验步骤，对照更加客观。此外，在对疾病发生的认识上，分子影像有别于目前“盲人摸象，只见树木不见森林”式的观察方法，强调以活生物体作为整体进行观察，这使得对于疾病的理解更加宏观和系统，更注重诊断和治疗的全局观念。

正是因为分子影像在疾病诊断、疗效检测、药物研发中的重要作用，近些年在分子影像的相关研究越来越受到人们的重视。

3. 分子影像研究朝向多模态方向发展

多种成像技术可用于分子影像，如核磁共振成像（Magnetic resonance imaging, MRI）、超声成像（Ultrasound imaging, US）、计算机断层扫描（Computed tomography, CT）、正电子发射断层成像（Positron emission tomography, PET）、单光子发射计算机断层扫描（Single-photon emission computed tomography, SPECT）、光学荧光成像（Fluorescence molecular imaging, FMI）与光学生物发光成像（Bioluminescence imaging, BLI）所构成的光学成像（Optical imaging, OI）等 [42]。理想状态下，人们希望仅通过一种成像方法便可同时获取组织结构、生理特征等多个层面的成像信息。然而，由于各个成像模态间拥有不同成像优势和成像缺点，目前尚没有一种现行的成

像手段能达到上述目的 [43]。比如，CT 与 MRI 在提供组织结构和解剖位置信息上较其他成像模式更为优越，可提供高达 0.05 - 0.5 mm 的空间分辨率。然而在成像灵敏度上，CT 与 MRI 却只能探测毫摩尔级别浓度的信号。与之相对的放射性核素成像（PET, SPECT）则可提供皮摩尔级别的灵敏度，但其空间分辨率却很低。各成像模态的优、缺点见下表（表 1）。

事实上，早在上世纪 80 - 90 年代，人们已经意识到，可通过整合多个成像技术的途径实现在单次成像条件下获取多个互补的成像信息。美国加州大学的研究者在 1992 年最先报道了早期的 SPECT/CT 原型系统。这项研究开辟了多模态成像方法的研究的先河，为如今在临床上的广泛的 PET/CT, SPECT/CT 成像技术奠定了理论基础 [44]。然而在当时，由于人们对分子成像都还比较陌生，因而并没有将这种特殊的成像方式单独给出一个定义。随着分子影像的发展，多模态分子成像（Multimodality molecular imaging）的概念应时代孕育而生。多模态分子成像将两种或多种分子成像技术相整合，通过整合各模态的成像信息，为疾病诊断提供更为全面，互补的成像信息。多模态分子成像一方面在整合各成像模态优势的同时，回避了它们各自成像上的不足，可使最终成像达到“扬长避短、相得益彰”的成像效果；另一方面，由于成像对象在多个成像模态上得到重复验证，多模态成像的结果更为确证和可靠。此外，从临床实用性上看，多模态分子成像也具有非常切实的临床需要和潜在价值 [45]。这是因为多模态成像，可实现在同一探针、一次成像扫描下，同时得到以往需多次不同成像模态分次采集才能获得的成像信息。因而从临床应用实际出发，多模态分子成像将可大大节省扫描时间，节约医疗成本，减少病人多次检查的不便。多模态分子成像的发展，已经成为当代成像技术未来发展的必然方向 [46]。常见的多模态分子成像组合有核素光学、核素核磁/CT、光学 MRI 等。

表 1 分子影像常见成像模态的优缺点 [47]

Imaging modality	Type of probe	Sensitivity (M)	Spatial resolution	Advantages	Disadvantages
Optical imaging	Fluorescent dyes, quantum dots	Bioluminescence — 10^{-15} – to 10^{-17}	2–5 mm	•High sensitivity •Provide functional	•Low resolution •Limited tissue penetration

		Fluorescence — 10^{-9} to 10^{-12}		information •No radiation exposure
Computed tomography (CT)	Heavy element e.g. iodine	Not well characterized	50–200 μm	•High spatial resolution. •Ability to differentiate between tissues. •Low radiation exposure •Require contrast agent for enhanced tissue contrast. •Radiation •Tissue non-specificity •High cost
Magnetic resonance imaging (MRI)	Para- or superparamagnetic metals (e.g. Gd, Mn)	10^{-3} to 10^{-5}	25–100 μm	•High resolution •No ionizing radiation •Able to image physiological and anatomical details •High cost •Cannot be used in patients with metallic devices e.g. pacemakers
Gamma scintigraphy (PET and SPECT)	Radionuclides (e.g. F-18, In-111, Cu-64)	PET — 10^{-1} to 10^{-12} SPECT — 10^{-10} to 10^{-11}	1–2 mm	•Ability to image biochemical processes •Radiation •Low resolution •Cost
Ultrasound	Gas filled microbubbles	Not well characterized	50–500 μm	•Non-invasive •Ease of procedure •No radiation exposure •Low resolution •Low cost

4. 核素光学双模态分子成像具有明显的成像优势

核素光学成像组合被认为是最有可能推广到临床的多模态成像组合之一 [43, 48]。放射性核素成像 (PET、SPECT) 用于肿瘤诊断原发性及转移性肿瘤的优势非常明确, 其诊断灵敏度比传统 CT 高出 10^8 - 10^9 数量级。超高灵敏度使核素成像具备了可发现超小病变的能力。对于某些疾病来说, PET 甚至可以发现极微小的转移病灶。

但是正如表 1 中所指出的，核素成像也有其缺点：第一，成像时间长，需要大型设备，因而手术过程中有无法实现实时成像定位；第二，空间分辨率低，定位不准确。这就造成在临床上实践中常常遇到对于那些微小且放射性吸收很强病灶，虽然术前核素成像明确显示其大致位置，但由于术中无法实时成像，手术过程中无法定位或需花费很长时间寻找的情况。此类情况常常造成微小病灶切除不全，从而最终导致复发。为解决一问题，医生们曾尝试在术中用手提式 γ 射线或 β 射线探测器去寻找可以病变，如 ^{18}F -FDG, ^{123}I -MIBG, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi 等探针均曾被报道过在术中采取上述方式检测和寻找病变 [23, 49, 50]。可以想象的是，由于受到周围正常器官摄取放射性背景干扰，这种方法的必然是不直观、且准确率很低、耗时耗力，无形中延长手术时间和增加手术医生非必要的放射性暴露。

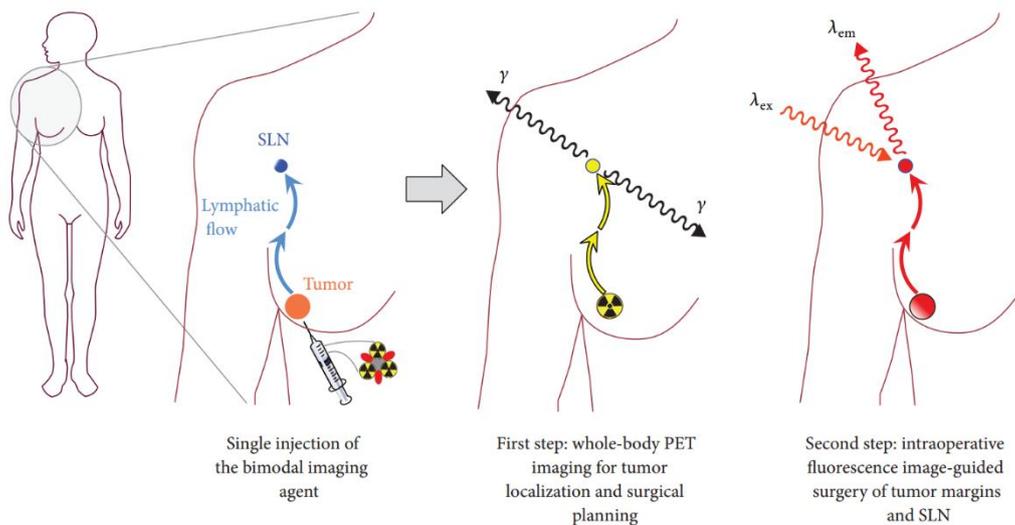


图 2 PET/OI 双模态成像原理示意图。探针注射后，病人首先可进行全身 PET 扫描，通过 PET 成像确定肿瘤原发灶及可能的转移灶，制定手术方案；术中，再利用光学成像提供原发灶和转移灶的精确成像，并在其指导下进行手术切除 [51]。

与核素成像不同的是，光学成像设备简单，灵敏度高，特别是成像速度快，可实现实时成像 [52]。通过光学和核素双模态成像的配合，恰可以完全弥补核素成像的不足。而核素成像同时也能够弥补光学成像深度受限，不能精确定量等问题。与

PET/CT、PET/MRI 成像相比较，核素光学成像组合在肿瘤手术治疗方面具有非常重要的潜在临床价值。PET/CT、PET/MRI 系统不能实现术中实时状态下对肿瘤的精确定位和靶向切除。反之，核素光学成像则可实现上述目的。核素成像可用来术前预先判定肿瘤大致位置，制定手术方案。待到放射性核素完全衰变后，在术中通过光学成像对肿瘤精确部位进行定位，进而实施肿瘤切除的手术导航（Image-guided surgery, IGS 如图 2），精确切除病变。由于减少了手术操作时间，同时也减少了医护人员术中不必要的放射性暴露[51]。此外，相较于其他 MRI 成像组合，核素光学成像的配合还能克服成像探针，特别是较大纳米颗粒和高聚物探针所产生的荧光淬灭，探针胶联聚集等问题 [48]。核素光学双模态成像是目前多模态影像研究中比较热门的成像组合。在成像的仪器及融合成像算法的获得突破后 [53]，研发高效能的核素光学成像探针则成了目前的研究热点 [54-63]。

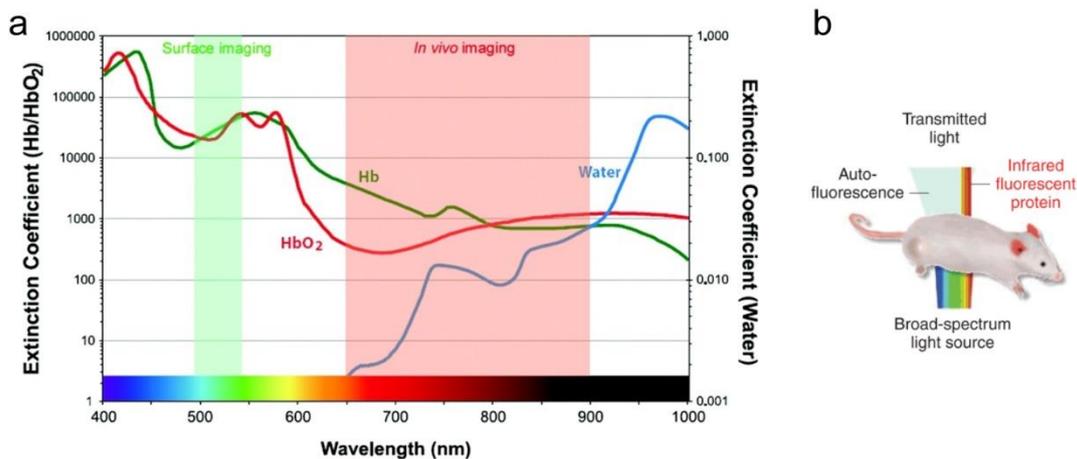


图 3 a、组织中血红蛋白及水对不同波长光的吸收能力。近红外（650 nm - 900 nm）区域组织吸收最少，是在体成像的最佳波长 [64]；b、生物组织的自体荧光与激发光波长相关。近红外光的穿透力最高，且自体荧光最少 [65]。

核素光学双模态成像由核素成像不同大致可分为 PET/OI 和 SPECT/OI。虽然 SPECT/OI 探针在非特异小分子 [66]、抗体 [67, 68]、短肽 [69-74]、纳米材料 [75-78] 近年来也有所报道，但由于 PET 成像在灵敏度方面的优势，PET/OI 的成像组合更受到研究者的关注。而在光学成像中，近红外光学成像 (Near-infrared Imaging, NIR) 则是在体研究中最常选用的波段。这是由于组织特别是水及血红蛋白对波长范围在

650 - 900 nm 的近红外光吸收最少，该波长光穿透能力强，因此也被称为在体光学成像的“透明窗”（如图 3a）；其次，生物组织在近红外波段内不易产生自体荧光信号。因此利用 NIR 成像，可最大程度上减少组织非特异性荧光，具有成像深度深、不易受背景信号干扰，敏感度高的特点 [34, 79-81]（如图 3b）。因而，PET/NIR 成像组合是核素光学双模态成像中最常被选用的组合。下面我们着重介绍 PET/NIR 成像组合的相关研究。

4.1 非靶向荧光小分子的 PET/NIR 成像研究：

卟啉及酞菁类衍生物是一类报道具有红色荧光性质的小分子，由于具有一定的肿瘤靶向性，常用作肿瘤光敏治疗的增敏剂用于光动力治疗。通过标记 PET 核素，这些小分子不仅具有了 PET、光学成像性质，同样还兼具有肿瘤光动力治疗的特性。Pandey 等人报道了 ^{124}I 标记卟啉类似物的研究，PET 及光学成像显示该探针能特异性的在鼠 RIF 肿瘤细胞处聚集，并且展现了良好的光动力治疗效果 [82]。Ranyuk 等人则报道了 ^{64}Cu 与 ^{68}Ga 标记酞菁类衍生物的相关研究 [83, 84]。由于非靶向小分子缺少特异性靶向元件，因此其他正常器官如肝、脾、肺等脏器的脏器含量也较高。因此，目前研究多是将该类分子与抗体、短肽等靶向元件连接后用于在体成像研究 [62, 85, 86]。

4.2 肿瘤靶向小分子及短肽的 PET/NIR 成像研究

由于靶向小分子及短肽能够在体直接的识别肿瘤，因而非特异器官聚积少，肿瘤摄取高，成像对比效果好。叶酸受体（Folate receptor, FR）是一个被广泛承认的肿瘤标志物，已在包括肺癌、卵巢癌、结肠癌等多种肿瘤中发现高表达。因此叶酸受体可作为良好的肿瘤特异性成像靶点 [87, 88]。Liu 等人将放射性 ^{64}C 标记卟啉—叶酸化合物，制备了 ^{64}Cu -porphyrin-folate 双模态探针，该探针能特异性的识别小鼠卵巢癌，并且展示了较好的 PET/OI 成像效果 [89]。Tyr³-octreotate（TATE）是奥曲肽（Octreotide）的衍生物，可用于识别多种神经内分泌肿瘤高表达的生长抑素受体（Somatostatin receptor, SR）。通过在胺基端共价连接核素标记螯合物 DOTA，在羧基端链接 NIR 荧光分子 Cy5.5 后， ^{64}Cu -DOTA-TATE-Cy5.5 可实现在体核素光学双模态成像 [90]。

除靶向小分子外,短肽是肿瘤靶向成像的热点研究之一。这其中研究最为广和热的当属 RGD 短肽(Arg-Gly-Asp)及其衍生物。RGD 短肽可为整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体识别,而后者在多种肿瘤组织上高表达。因此 RGD 短肽常被视为肿瘤特异性成像分子探针的理想选择 [91-96]。Liu 等人报道了 cRGD 双聚体的 PET/OI 双模态标记,利用双功能螯合物 BaAn(Boc)Sar, Liu 成功将 PET 核素 ^{64}Cu 与近红外染料 Cy5.5 连接到 RGD 短肽上。 ^{64}Cu -BaAnSar-RGD₂-Cy5.5 在整合素高表达的 U87MG 肿瘤上高度富集, PET 成像显示,在探针在注射后 1、4、20 小时的富集分别达到 $6.41 \pm 0.28\% \text{ID/g}$ 、 $6.51 \pm 1.45\% \text{ID/g}$ 、 $5.92 \pm 1.57\% \text{ID/g}$ 。同时借助 Cy5.5 光学成像, ^{64}Cu -BaAnSar-RGD₂-Cy5.5 实现了 NIR 指导下荷瘤小鼠的定向肿瘤切除 [97]。Knottin 是另外一个可与 $\alpha_v\beta_3$ 以及 $\alpha_v\beta_5$ 整合素受体高亲和力结合的短肽。通过一个氨基酸连接体 Fmoc-Lys(ivDde)-GlyGly-Tyr, 研究者成功将 Cy5.5 和 ^{64}Cu -DOTA 与 Knottin 连接。同样在整合素受体高表达的 U87MG 肿瘤上成功实现了 PET/NIR 双模态成像 [57]。

然而小分子及短肽的缺点是分子量较小,可标记位点少,化学修饰和标记很容易破坏其识别表位,进而影响其靶向性;同时,所添加的修饰基团,在分子量上与小分子短肽不相上下,可改变原以小分子及肽为主的在体动力学特征,影响它们在体循环特征。

4.3 抗体的 PET/NIR 成像研究

与短肽和小分子相比,抗体具有在体循环时间更长,抗原—抗体亲和力更强,分子量大,标记位点多,对标记条件的耐受性强,标记后抗体本身结构、特性不易受影响等特点,因而成为分子成像常用的靶向元件 [51]。经报道的 PET/NIR 标记抗体有多种,包括 CD20 单克隆抗体 [98], CD105 单克隆及嵌合抗体抗体 [99], 贝伐单抗及西妥昔单抗 [100], 曲妥珠单抗 [56, 67], EpCAM 单克隆抗体等 [101]。标记所采用的核素为 ^{64}Cu , ^{89}Zr 及 ^{111}I , NIR 荧光分子多使用 IRDye800CW, Alexa Fluor 750。

然而过多的标记位点,是抗体标记的优点,同样也为抗体标记带来“挑战”。一方面,如果抗体的抗原识别区因标记遭到破坏,那么抗体活性将受到直接影响,降低抗体对抗原识别的能力;另一方面,由于抗体间位点的竞争,每一个抗体上所标记的核素或染料数目可能不同,使得标记产物并不均一。在 CD20 单克隆抗体的标记中,

研究者将大约 10 分子的放射性核素和 2 分子的荧光染料标记到一个抗体上,发现抗体只在肿瘤部位有中等强度的聚集,而肝脾等非特异器官却有很高的信号。进一步通过系统研究核素标记及荧光标记的比例,研究者发现:肝脏等非特异器官的摄取随着小分子荧光染料标记的增加而增加,同时肿瘤的探针摄取也会随之不断减少。这样所带来的矛盾就是:一方面为了提高 PET 及 NIR 成像的效果,需要的标记越多越好,另一方面,过多的标记则会造成非特异器官过高的摄取 [98]。

综上所述,无论是小分子、肽、还是抗体,生物分子作为双模态成像的载体,要么分子量有限,可用的改造位点有限;要么在功能标记过程中会对其生物学特性,抗原识别及体内动力学产生影响;要么存在标记数量与成像效果之间的矛盾,因而探索和研发新型的成像载体已成为多模态成像研究亟待解决的关键科学问题。

5. 纳米材料与多模态分子成像

纳米科学的研究进步,为多模态成像的发展带来了契机。纳米颗粒(Nanoparticles, NPs)空间大小分布广泛,可在几纳米到几百纳米之间,几乎涵盖了从小分子到生物大分子几乎所有大小范围。特别是 10 - 100 nm 大小的纳米颗粒为分子成像最常选用。虽然“个头”小,纳米材料却拥有比较大的比表面积,可进行多种的功能标记和修饰,因而可承载多种成像模块,是多模态成像的理想平台(如图 4) [102]。而且较生物分子来讲,纳米材料的物理性质和结构非常稳定、功能改造和修饰不易对其产生影响。同时,经不同表面修饰可实现对纳米颗粒体内动力学的控制,如延长纳米颗粒在体循环时间,甚至改变其代谢途径,方便人们对纳米材料体内动力学进行改造。更为重要的是,由于比普通细胞小 100 - 10000 倍,纳米材料不仅可以与细胞表面的分子相互作用,同样可以进入细胞。在此基础上,如将纳米颗粒同成像元件和具有治疗作用的效应元件结合,可实现对疾病诊断、治疗的“一体化”应对。纳米材料的以上特点使纳米材料成为多模态分子成像的理想载体 [47, 103-105]。

在核素光学双模态成像研究领域,近年来以纳米材料为载体的研究报道日渐增多。研究涵盖了纳米胶团 [106]、脂质体 [107]、碳纳米管 [108]、氧化铁 [109-112]、硅 [113]、上转换材料 [114, 115] 及量子点 [54, 55, 116, 117] 等多种纳米材料。由于优

良的荧光特性，量子点成为 PET/OI 较为常用的荧光纳米材料之一。

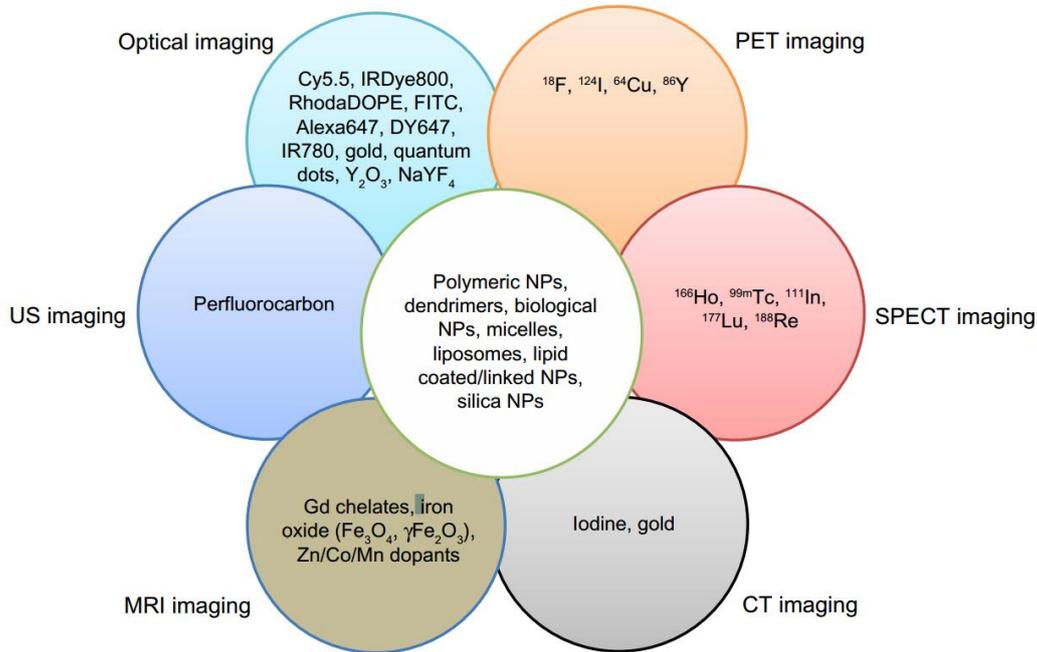


图 4 纳米材料是多模态成像的理想平台[102]

量子点 (Quantum dot, QD) 是一类荧光半导体纳米材料，与常见的小分子荧光物质相比，量子点抗光漂白性强、激发光谱宽、荧光量子产率高、光谱可调。特别是对于 NIR 量子点，只需对其的放射性修饰，就能很容易实现在体 PET/OI 双模态成像的要求 [118]。2007 年陈小元课题组报道了将 ^{64}Cu 通过螯合物 DOTA 标记在发射波长 800nm QD 的研究 [117]。起初是为了研究该 QD 的生物分布及器官代谢情况，然而这个研究却打开了 QD 核素光学双模态成像的大门。此后，利用类似方法，他们又相继发表了基于 QD 的肿瘤血管双模态成像研究。通过血管靶向肽 RGD 及 VEGFR 单克隆抗体的靶向作用，双模态标记的 QD 可在肿瘤部位的高浓度聚集，并在荷瘤小鼠模型上实现了在体 PET/NIR 双模态成像 [54, 55]。为了进一步优化核素的标记，课题组又报道了将放射性 ^{64}Cu 直接作为量子点合成原料的方法 [6, 7]。直接合成的量子点不仅没有影响量子点的光学性质，同时具有更好的 PER/NIR 双模态成像的能力。然而，量子点的中心粒子一般是有 Cd, As 等重金属材料组成，其表面常常需要有毒物质进行修饰，如 CTAB。毒性成为限制量子点临床应用的障碍。虽然无毒、低毒的量子点的研究取得了一些进展，然而量子点目前尚不能作为临床使用的

PET/NIR 双模态成像的载体 [119]。

6. 金纳米簇的研究背景

常见的近红外荧光材料有两类，一类是有机荧光小分子，如 Cy5.5、IRDye800、吖啶菁绿（Indocyanine green, ICG）等，另一类是上面提到的荧光量子点。目前仅荧光小分子 ICG 被 FDA 批准可用于人体 [120]。然而令人遗憾的是，由于 ICG 的两亲性和缺少可用于标记的功能基团，对其化学修饰非常困难 [121, 122]；而量子点，如前述，毒性限制了其临床应用。因此，研发全新无毒、高荧光性能的近红外材料一直是探针研发领域的研究热点。

金纳米簇（Gold nanoclusters, AuNCs）是由几个到十几个金原子所组成的全新荧光纳米材料 [13, 123]。结构上，金纳米簇由内部的金核和外部的保护基团构成。保护基团多由生物分子或聚合物等有机分子构成，表面可进行不同功能基团的修饰。而不同的表面修饰通过与生物系统间的作用，决定了金纳米簇的生物特性，如荧光特性、生物相容性、稳定性等[124]。金纳米簇的半径尺寸通常在 2nm 左右，介于原子和纳米粒子之间，因而又具有与普通纳米粒子完全不同的“类分子样”特性。

6.1 AuNCs 的荧光特性：

由于 AuNCs 尺寸接近电子的费米波长，因此产生了不连续的尺寸相关电子能级，使其具有依赖于粒子粒径大小的荧光特性 [125]。不同方法制备的 AuNCs 所报道的量子产率约 10 – 45 % [126]。Lin 等人将 AuNCs 的光稳定性与量子点及常用小分子荧光基团进行了比较，研究发现，AuNCs 虽然在荧光强度上不如量子点，但是其荧光稳定性质要好于常见的小分子荧光染料 [127]；更值得一提的是，AuNCs 的荧光发射光波长可随粒径和金原子组成的变化表现出可调节性，利用不同的保护基团可合成出从可见光到近红外区范围发射光谱完全不同的 AuNCs（如图 5） [128]。特别是具备 NIR 成像功能的 AuNCs 的出现，使 AuNCs 成为活体成像材料的新成员。

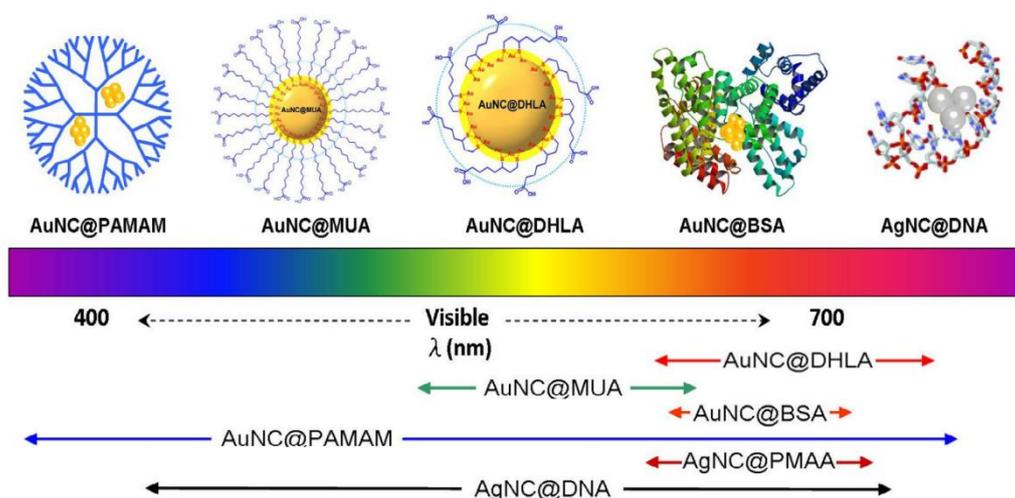


图 5 贵金属纳米簇不同保护基团与荧光发射波长的关系，通过改变贵金属纳米簇的保护基团可使其荧光发射波长实现可调 [128]。

6.2 AuNCs 的生物安全性:

AuNCs 的保护基团主要是一些表面活性剂、树状大分子、硫醇类化合物、核酸、胺类及蛋白质等。这些分子为 AuNCs 提供了良好的生物相容性界面，使 AuNCs 几乎无毒。AuNCs 能够很好的用于生物探针、细胞标记和活体成像 [129, 130]。

6.3 AuNCs 的生物应用:

6.3.1 AuNCs 作为生物传感器:

AuNCs 在与某些物质发生反应后，产生的荧光光子数可在短时间内减少或消失。科学家们利用 AuNCs 的这一现象，开发了基于 AuNCs 的生物传感器，并成功用于对金属离子，小分子化合物，蛋白质及微生物的探测。

谢建平教授组采用一步还原法以 BSA 为模版制备了 BSA@AuNCs，利用 Hg^{2+} 可淬灭 AuNCs 荧光这一原理，用于 Hg^{2+} 的检测。其检出限仅为 0.5 nM，远低于美国环境保护局制定的 10 nM 标准 [131]。Zhang 等人报道了利用谷胱氨肽 (Glutathione, GSH) 为模板合成的金纳米簇 GSH@AuNCs，并用于对 Cr (III) 和 Cr (VI) 的探测，检测最低限分别为 2.5 $\mu g/L$ 和 0.5 $\mu g/L$ [132]。其他金属例子的检测如 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 等也均有报道 [133, 134]。事实上，不单单对金属离子，小分子化合物 (如 H_2O_2 等)、生物硫醇类 (如 Cys 等)、糖、ATP 等，AuNCs 同样可以实现高灵敏度的检测 [135-138]。

例如, 利用胰蛋白酶可水解 AuNCs 表面保护基团 BSA, 进而使 AuNCs 结构遭到破坏、荧光减弱的原理, Hu 等人实现了对胰蛋白酶的高灵敏度检测, 检测限为 2 ng/mL [139]。Xia 等人也报道了类似方法用于高灵敏度检测蛋白酶 (Proteases), 当蛋白酶降解 AuNCs 蛋白保护基团时, 氧分子与 AuNCs 快速接触, 淬灭荧光(如图 6) [140]。此外, Wen 等人还报道了利用 AuNCs 检测蛋白翻译后修饰酶(Protein post-translational modification enzymes) 的研究, 该方法为蛋白翻译修饰的相关研究提供了理想的研究平台 [141]。Huang 等人的研究甚至运用 AuNCs 来检测大肠杆菌, 他们研究发现 AuNCs 荧光强度可与菌体浓度在一定范围内成正相关 [142]。Chen 等人利用溶菌酶 (Lysozyme) 为模版制备了的 lysozyme@AuNCs, 不仅可与细菌相结合用于细菌的探测, 同时溶菌酶所带的杀菌功能依旧保持 [143]。

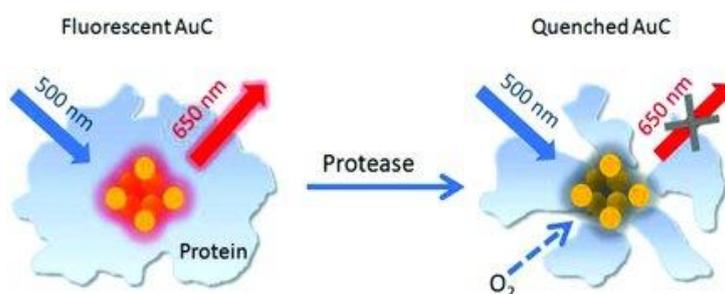


图 6 BSA@AuNCs 检测蛋白酶的原理图。正常情况下, 由于 BSA 的保护, 隔绝了 AuNCs 的内核与外界氧分子 (O_2) 的接触。在蛋白酶的作用下, BSA 降解, BSA@AuNCs 的表面保护基团受到破坏, AuNCs 内核暴露, 荧光被氧分子淬灭

6.3.2 AuNCs 的体外、体内成像研究

AuNCs 优良的荧光性能使其成为荧光成像理想的荧光材料。Shang 等人使用 D-青霉素胺 (D-penicillamin, DPA) 合成了水溶性 DPA@AuNCs, 并与人宫颈癌细胞 Hela 孵育。2 小时后, DPA@AuNCs 被细胞非特异摄取并内吞, 被内吞 DPA@AuNCs 可产生明亮荧光, 证实了 AuNCs 可作为细胞标记用于活细胞的荧光成像(如图 7) [144]。利用肿瘤高亲和力生物分子作为模版或使用肿瘤特异性标志物对合成后的 AuNCs 进行修饰, 可实现 AuNCs 肿瘤细胞特异性靶向成像。比如, 用转铁蛋白 (Transferrin) 及胰岛素 (Insulin) 作为保护基团制备的 AuNCs 可分别靶向转铁蛋白受体高表达的

肺癌 A549 和胰岛素受体高表达的 C2C12 细胞 [145, 146]。又如, Hu 等人使用叶酸 (Folate) 修饰 BSA@AuNCs 成功识别了叶酸受体高表达的乳腺癌细胞 MCF-7 [147]。Wang 等人报道了经 Herceptin 修饰后的 AuNCs 识别乳腺癌 SK-BR3 的相关研究 [148]。

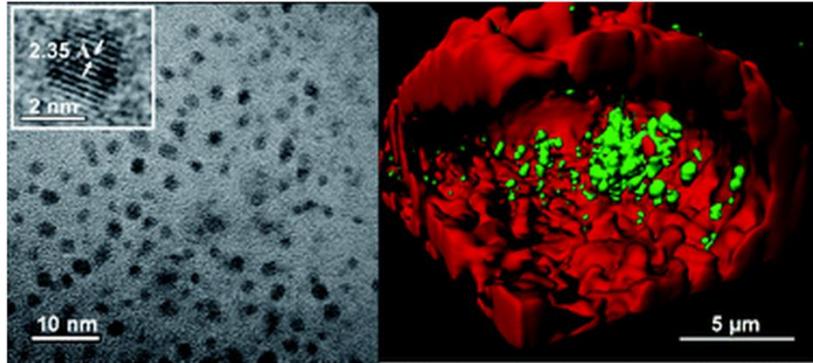


图 7 D-青霉素胺所制备的 AuNCs 用于细胞成像。左图显示了 DPA@AuNCs 的 TEM 图片, 小插图可见其晶格; 右图, 宫颈癌 HeLa 细胞在与 DPA@AuNCs 共孵育 2 小时后, 荧光可见细胞对 DPA@AuNCs 的吞噬。绿色, DPA@AuNCs, 红色, 细胞膜 (经 DiI 染色) [144]。

分散性好、生物相容性佳、具备 NIR 成像功能的 AuNCs 拥有较好的组织穿透力, 是在体成像的理想工具。第一个将 AuNCs 用于活体成像研究发表于 2010 年, Wu 等人制备了具有 710 nm 近红外荧光功能 BSA@AuNCs。直接将 BSA@AuNCs 注射于小鼠皮下及肌肉中, 在激发光激发下, 注射部位的 BSA@AuNCs 清晰可见。进一步在乳腺癌荷瘤小鼠模型上, 尾静脉注射 BSA@AuNCs 后, 在肿瘤在高通透性和滞留效应 (Enhanced permeability and retention effect, EPR) 的作用下, BSA@AuNCs 不断在 MDA-MB-45 肿瘤处聚集 (如图 8); 在另一组宫颈癌 HeLa 细胞动物模型上, 研究者们同样观察到了相同现象 [127]。由于 BSA@AuNCs 非常小, 加之表面的 BSA 保护, 因而在体成像时表现出了较好的生物相容性和成像对比性, 瘤体处的荧光信号明显高于周围正常组织, 器官的非特异摄取也较其他纳米材料少。在对 AuNCs 器官摄取和体内代谢的研究中, 正常小鼠尾静脉注射 GSH@AuNCs 24 小时后, 仅有 3.7% 在肝脏中蓄积, 而超过 50% 的 GSH@AuNCs 经由尿液排除。较低的肝脾富集、较快的肾脏排除, 使 GSH@AuNCs 能在肿瘤处有效高的摄取; 同时非特异组织有

较快的排出速度，也保证了肿瘤成像对比效果更为明显 [149, 150]。

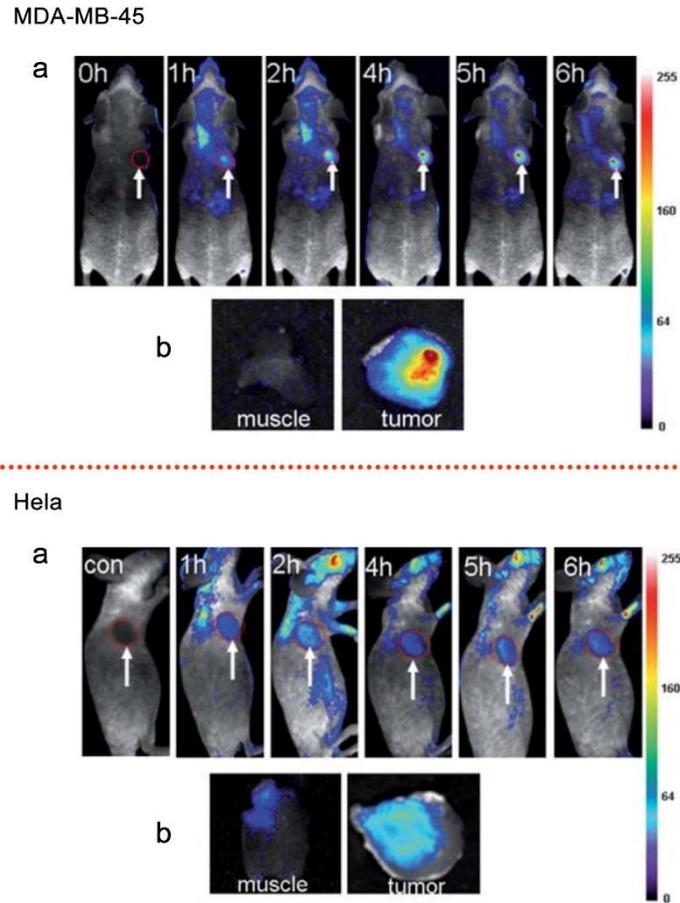


图 8 BSA@AuNCs 在体荧光成像。a，在 EPR 效应作用下，肿瘤对探针的摄取随时间而增加；b，肿瘤组织较肌肉组织，可明显摄取更多的 BSA@AuNCs。上图，乳腺癌 MDA-MB-45 小鼠荷瘤模型；下图，宫颈癌 HeLa 小鼠荷瘤模型 [127]。

7. 结语

综上所述，分子影像为肿瘤早期诊断、疗效的快速评估提供了有效手段。由于分子影像各模态存在各自成像的不足，因此多模态分子影像成为未来影像诊断的发展方向。在成像模态的组合中，PET/NIR 组合将光学成像和 PET 成像的优势进行整合，高灵敏度、高特异性、可定量分析等优点，特别是在肿瘤切除中表现出的潜在临床应用价值，使 PET/NIR 受到了人们越来越多的关注。纳米材料由于其较大的比表面积和稳定的物理化学性质，是 PET/NIR 成像的良好载体。由于传统荧光纳米材料潜在

的生物毒性，严重制约了未来 PET/NIR 的转化应用。因此研究全新 PET/NIR 纳米平台是进一步推动 PET/NIR 研究中亟待解决的科学问题。

AuNCs 作为新一代高效、无毒的纳米荧光探针，其近红外成像能力和高生物安全性，使其逐渐成为在体成像研究的新焦点。然而 AuNCs 能否实现 PET/NIR 双模态成像，通过什么方法实现，以及其在肿瘤多模态成像中的应用价值等一系列问题尚未见报道。研究 AuNCs 的放射性标记方法，并探讨其在肿瘤 PET/NIR 成像中的潜在价值，为进一步拓展 AuNCs 的应用领域，推动多模态成像探针的开发和纳米材料的临床转化具有重要科学意义。

正 文

第一部分 金纳米簇的合成、表征及放射性标记

金纳米簇 (AuNCs) 是一种在生物医学领域和成像领域方面具有着重大发展潜力的荧光纳米材料。前已述及, 由于 AuNCs 具有荧光可调性, 不同方法制备的 AuNCs 可产生自可见光到近红外区 (NIR) 范围不同的荧光。NIR 功能的 AuNCs 已成为在体成像研究的新热点。近年来, 国内外研究学者报道了多种具备 NIR 功能 AuNCs 的合成和改进方法。这些方法包括有模版法、单分子层保护法、配体蚀刻法等。其中模版法应用作为广泛。模版法是以一定分子作为模版合成具有特殊立体结构和功能的 AuNCs。模版分子可以是硫醇化合物、树状大分子、生物相容性好的生物大分子, 如蛋白质、酶、核酸或多肽等。人血清白蛋白 (Human serum albumin, HSA) 是人体广泛存在的生物大分子, 约占血浆蛋白的 50%。本实验首次报道以 HSA 作为模版合成具有近红外功能的 AuNCs 的方法, 以期利用 HSA 优良的生物学特点, 制备生物相容性好、近红外荧光强的 AuNCs。同时, 我们首次报道了 AuNCs 的放射性核素 ^{64}Cu 的标记方法。通过放射性核素标记, 使 AuNCs 具备 PET/NIR 双模态成像的能力。此部分实验是整个课题的基础, 通过对探针的大小、荧光特性、光谱等表征的分析以及生物安全性、核素标记情况等分析与评估, 为下一步多模态成像建立良好的成像探针。

1. 材料

1.1 试剂与耗材

1.1.1 试剂

人血清白蛋白	Sigma 公司
氯金酸	Acros Organics 公司
氢氧化钠	Acros Organics 公司
PBS 缓冲液	Invitrogen 公司
小鼠血清	Sigma 公司
水合肼	Acros Organics 公司
$^{64}\text{CuCl}_2$	美国国立卫生研究院
琼脂糖	Fisher Scientific 公司

1.1.2 耗材

无菌移液管	Fisher Scientific 公司
合成玻璃瓶	Wheaton 公司
ILTC 层析板	Sigma 公司
滤膜枪头	Fisher Scientific 公司
30K 滤膜离心管	Millipore 公司
毛细玻璃管	华西医科大学仪器厂
磁力棒	Fisher Scientific 公司
PD-10 脱盐柱	GE 公司
1.5 mL EP 管	Fisher Scientific 公司

1.2 实验仪器

恒温磁力搅拌器	江苏金坛市医疗器械仪器厂
透射电子显微镜	日本 Hitachi 公司
超纯水装置	Millipore 公司
PH 计	Sartorius 公司

称量电子天平	Sartorius 公司
恒温水浴箱	上海新苗
台式离心机	Thermo Scientific 公司
移液器	Eppendorf 公司
超声波清洗器	昆山合创超声仪器有限公司
F-7000 荧光分光光度计	日本 Hitachi 公司
GENESYS™ 10S 紫外可见光分光光度计	Thermo Scientific 公司
Malvern-Zetasizer 分析仪	英国马尔文公司
4 ℃ 冰箱	Thermo Scientific 公司
小型 γ -计数器	Genesys 公司
凝胶电泳仪	Bio-rad 公司
AR-2000 Radio-TLC 扫描仪	Bioscan 公司
手持式紫外灯	UVP 公司
Maestro 在体成像系统	CRI 公司
J-815 分光偏振仪	JASCO 公司

2. 方法

2.1 HSA@AuNCs 的合成

- 1) 将 HSA 配置成为 50 mg/mL 的溶液，取出 5 mL 加入合成玻璃瓶。将反应放置于磁力搅拌台 37 ℃ 搅拌；
- 2) 将 HAuCl_4 配制成 10 mM 水溶液，向上述反应体系内加入 5 mL HAuCl_4 溶液，并快速搅拌，PH 计测量 PH 约为 2；
- 3) 5 分钟搅拌后，将 1 M NaOH 溶液 500 μM 快速加入。PH 计测量 PH 约为 12；
- 4) 设定反应体系在温度 37 ℃，避光搅拌 12 小时；
- 5) 将反应产物放入 4 ℃ 冰箱避光保存。

2.2 放射性 ^{64}Cu 标记与纯化

- 1) 标记所使用的各项试剂均经超声除气 (degassing) 40 分钟处理;
- 2) 标记前, 使用 30K 滤膜离心管 4000 rpm/min 多次洗涤 AuNCs, 洗涤液选用 PH = 7.4 的去离子水;
- 3) 吸取 1 mL 上述洗涤过的 AuNCs, 向其中加入 5 - 6 mCi $^{64}\text{CuCl}_2$, 室温搅拌 5 分钟, 调节 PH = 5.5;
- 4) 向上述反应体系中快速加入 10 μL 还原剂 N_2H_4 ; 室温搅拌 40 分钟;
- 5) PD-10 脱盐柱纯化前, 使用含 0.1 % 抗坏血酸钠的 PBS 溶液活化;
- 6) 将上述产物通过 PD-10 脱盐柱纯化, 接取纯化 ^{64}Cu 标记的 AuNCs, 记作 ^{64}Cu -doped AuNCs。

2.3 ^{64}Cu -doped AuNCs 的放射化学纯度测定

- 1) 本实验使用快速层析法 (Instant Thin-Layer Chromatography, ITLC) 测量;
- 2) 0.1 M 柠檬酸为溶液展开剂;
- 3) 将 2.2 中标记纯化好的 ^{64}Cu -doped AuNCs 用毛细玻璃管吸取, 在 ITLC 层析板上点样, 并放入展开剂中。注意, 不要让点样点接触展开剂, 以免样本溶解于展开剂中;
- 4) 当样本随展开剂到达距 ITLC 层析板上缘约 10 cm 时, 将 ITLC 层析板取出;
- 5) 用保鲜膜包裹层析板, 放置于 AR-2000 Radio-TLC 扫描仪检测;
- 6) 按照如上相同方法测量同批次 $^{64}\text{CuCl}_2$ 作为对照;
- 7) 计算放射化学纯度。

2.4 不同浓度 Cu 制备 Cu-doped AuNCs

- 1) 标记所使用的各项试剂均经除气 (degassing) 40 分钟处理;
- 2) 标记前, 使用 30K 滤膜离心管 4000 rpm/min 多次洗涤 AuNCs, 洗涤液选用 PH = 7.4 的去离子水;
- 3) 取 1 mL 上述洗涤过的 AuNCs, 向其中加入 1 %, 2 %, 5 % 及 10 % 摩尔比的 CuCl_2 (非放射性), 室温搅拌 5 分钟, 调节 PH = 5.5;
- 4) 向上述反应体系中快速加入 10 μL 还原剂水合肼; 室温搅拌 40 分钟;

- 5) PD-10 脱盐柱纯化前，使用含 0.1 % 抗坏血酸钠的 PBS 溶液活化；
- 6) 将上述产物通过 PD-10 脱盐柱纯化，接取纯化的不同 Cu 浓度的 Cu-doped AuNCs。

2.5 琼脂糖凝胶电泳

- 1) 首先配置电泳缓冲液，Britton-Robinson 电泳缓冲液配方：缓冲溶液用 0.04 M 磷酸、硼酸和醋酸配制，使用 0.2 M NaOH 调节 PH 至 7.4；
- 2) 配置 2 % 的琼脂糖凝胶，将凝胶在微波炉沸腾后，倒入电泳槽模板内；
- 3) 分别取在 PBS 及血清中孵育 24 小时的 Cu-doped AuNCs 18 μL ，与 2 μL 甘油预混。加入胶孔；
- 4) 链接电泳装置，设定电压 7.5 V/cm，电泳时间 30 分钟。

2.6 不同浓度 Cu 制备的 Cu-doped AuNCs 荧光性质的影响

- 1) 不同浓度 Cu 对荧光强度及最大发射波长的影响：取上述不同 Cu 浓度制备的 AuNCs 50 μL 分别稀释至 1 mL 分别放入 1 cm \times 1 cm 的石英测量杯中，使用 F-7000 荧光分光光度计（发射狭缝 10 nm，激发狭缝 5 nm，电压 700 eV）测量其最大发射光谱位置及相对强度；
- 2) 不同溶液对 Cu-doped AuNCs 荧光强度及最大发射波长的影响：将摩尔比 1 % 的 Cu-doped AuNCs 与去离子水、PBS、小鼠血清孵育 24 h 后，取上述溶液中的 AuNCs 50 μL 分别稀释至 1 mL 分别放入 1 cm \times 1 cm 的石英测量杯中，使用 F-7000 荧光分光光度计（发射狭缝 10 nm，激发狭缝 5 nm，电压 700 eV）测量其最大发射光谱位置及相对强度；
- 3) Cu-doped AuNCs 的时间稳定性：将摩尔比 1 % 的 Cu-doped AuNCs 与 PBS 孵育 0、1、2、3 天的样本取出 50 μL 分别稀释至 1 mL 分别放入 1 cm \times 1 cm 的石英测量杯中，使用 F-7000 荧光分光光度计（发射狭缝 10 nm，激发狭缝 5 nm，电压 700 eV）测量其最大发射光谱位置及相对强度；
- 4) Cu-doped AuNCs 的荧光抗漂白性：根据 Wu 等人的方法 [127]，荧光图片使用 Maestro 在体成像系统采集（激发光滤镜波长 465-495 nm，发射光滤镜波长：580-780 nm）。光漂白使用汞灯照射 10 分钟，每分钟 Maestro 采集荧光

图片。使用 Image J 软件测量荧光强度，同时使用罗丹明 6G 作为对照。

2.7 统计分析方法

统计分析使用 Graphpad V5.0 软件，计量数据以 Mean \pm SD 表示。多组之间单因素比较采用 One-way ANOVA，两组间单因素比较实用 t 检验。当 $P < 0.05$ 表示统计学意义。

3. 结果

3.1 HSA@AuNCs 的合成

合成过程中，我们将 HAuCl_4 加入 HSA 溶液后，溶液由黄色逐渐变为无色透明，在加入 NaOH 后，随着反应的继续，反应溶液逐渐加深。反应完成后，反应产物在白光下表现为深棕色，提示 HSA@AuNCs 的形成（注：以下论文正文中除特别说明外，AuNCs 即指 HSA@AuNCs）。在 UV 紫外光（365 nm 波长）照射下，AuNCs 发射出非常强的红色荧光，而与之相比的 HSA 则为淡蓝色荧光光（图 9）。

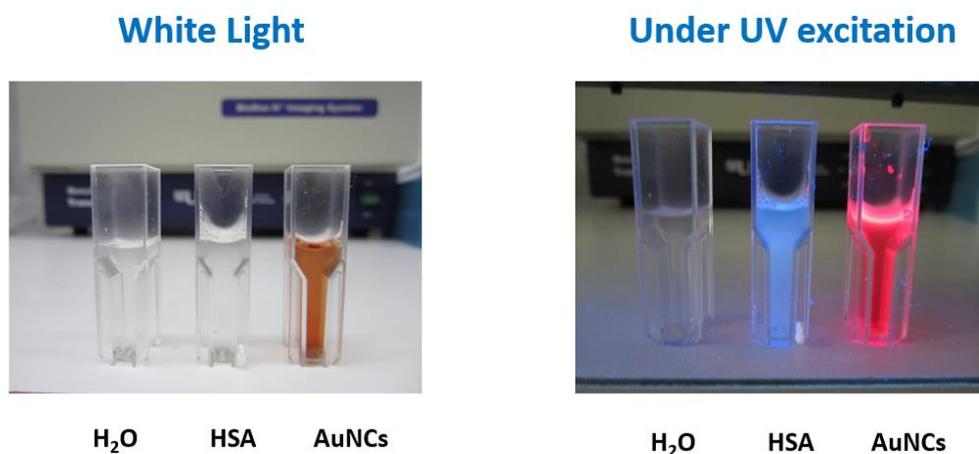


图 9 白光及紫外光下 HSA@AuNCs 的颜色。从左至右：水、HSA、HSA@AuNCs；紫外激发光 365 nm。

3.2 AuNCs 吸收光谱及荧光光谱

分别取样 50 μL HSA 及 AuNCs 分别稀释至 1 mL，分别放入 1 cm \times 1 cm 的石英测量杯中，使用分光光度计测量紫外光谱。如图 10、12 所示，所制备的 AuNCs 在 280

nm 处有明显的吸收峰，而 HSA 在 514 nm 处存在明显吸收，上述结果初步证明了所合成的 AuNCs 与 HSA 本身并不是同一物质。

在 365 nm 波长紫外灯观察下，如上述结果所展示，HSA 为淡蓝色荧光，而 AuNCs 为较强的红色荧光。为测量 AuNCs 的荧光光谱特征，我们取样 50 μL HSA 及 AuNCs 分别稀释至 1 mL 分别放入 1 cm \times 1 cm 的石英测量杯中，使用 F-7000 荧光分光光度计（发射狭缝 10 nm，激发狭缝 5 nm，电压 700 eV），分别用最佳激发光激发，并测量其最大发射光谱，发现 AuNCs 最大发射光谱约为 680 nm，而 HSA 在相同激发条件下，最大发射约为 550 nm。

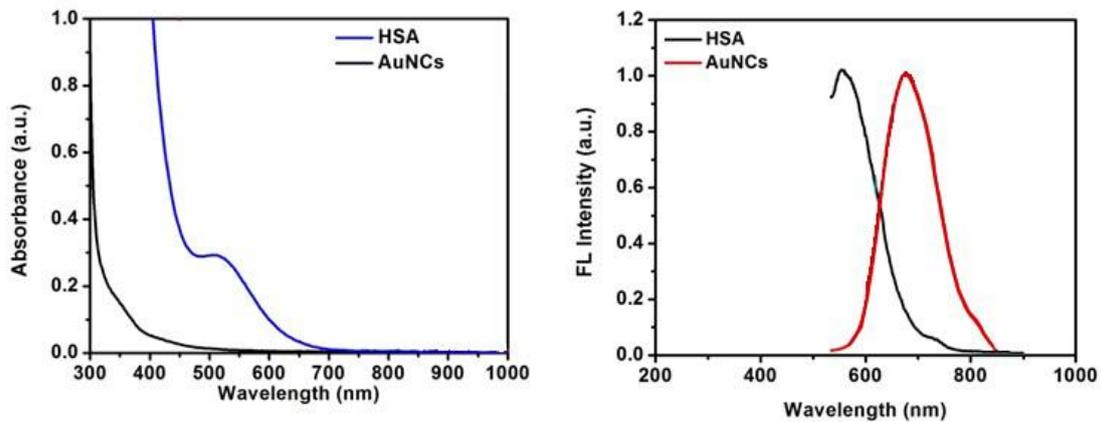


图 10 HSA 与 AuNCs 的紫外吸收光谱及发射光谱

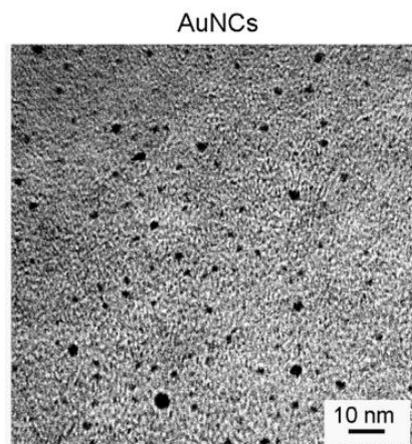


图 11 AuNCs 的 HR-TEM 照片

3.3 AuNCs 的形貌及粒径表征、

2.1 所制备的 AuNCs 点样于铜网制备 TEM 样本后, 使用 HR-TEM 观察。如图 11 所示, 所合成的 AuNCs 呈规则球形颗粒, 粒径均一, 颗粒大小约为 0.93 ± 0.25 nm。

3.4 Cu-doped AuNCs 的吸收光谱及荧光光谱表征

由于放射性物质的特殊管理规定, ^{64}Cu -doped AuNCs 不能直接用仪器测量。我们使用无放射性的 CuCl_2 按照相同方法标记 AuNCs。2.4 方法所制备的 Cu-doped AuNCs (1% Cu) 与亲本 AuNCs 在吸收光谱和发射光谱上存在明显不同。在吸收光谱上, 虽然 Cu-doped AuNCs 与 AuNCs 波形类似, 但是最大吸收峰位置不重合; 在发射光谱上, Cu-doped AuNCs 的最大发射波长发生蓝移, 最大发射波长约 667 nm (如图 12)。

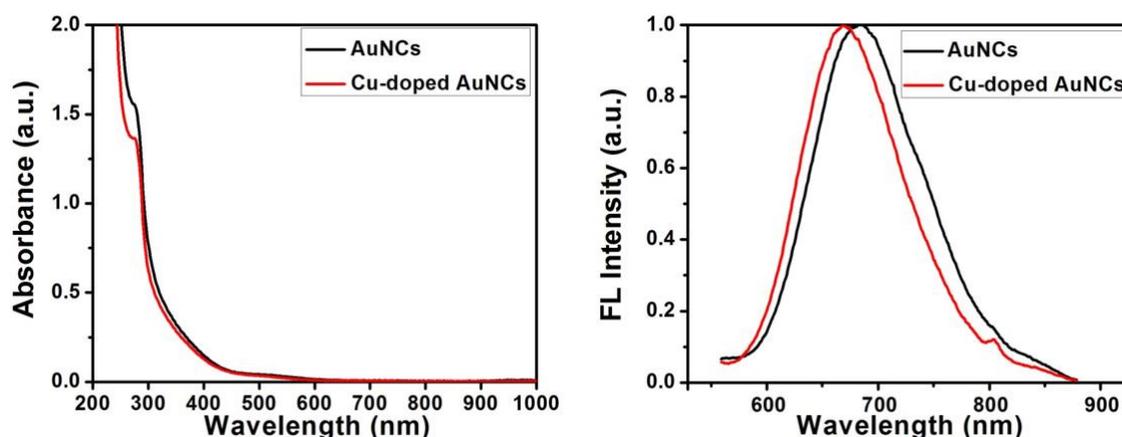


图 12 Cu-doped AuNCs 与 AuNCs 的吸收光谱及最大发射光谱

3.5 Cu-doped AuNCs 的形貌、粒径表征及 CD 谱变化

将 1% Cu-doped AuNCs 点样于铜网制备 TEM 样本后, 使用 HR-TEM 观察。如图 12 所示, Cu-doped AuNCs 同样呈规则球形颗粒, 粒径均一。通过 TEM 测量, Cu-doped AuNCs 的粒径较标记前略有增长, 直径约为 2.56 ± 0.50 nm。DLS 水化半径测量显示 Cu-doped AuNCs 大小为 5.8 ± 1.0 nm (图 13a、b、d)。

为了判断 AuNCs 制备及 Cu 标记对 HSA 空间构象可能的影响。我们测量了 Cu-doped AuNCs 与天然 HSA 的 CD 谱, 并做了相互比较。天然 HSA 在 190 nm 显示了

一个正吸收峰，在 209 nm 和 222 nm 处有两个负吸收峰。在 Cu-doped AuNCs 在 190 nm 处的正吸收峰略有上升，而两个负吸收峰的位置略有蓝移，位置约 205 nm 及 221 nm (图 13b)。

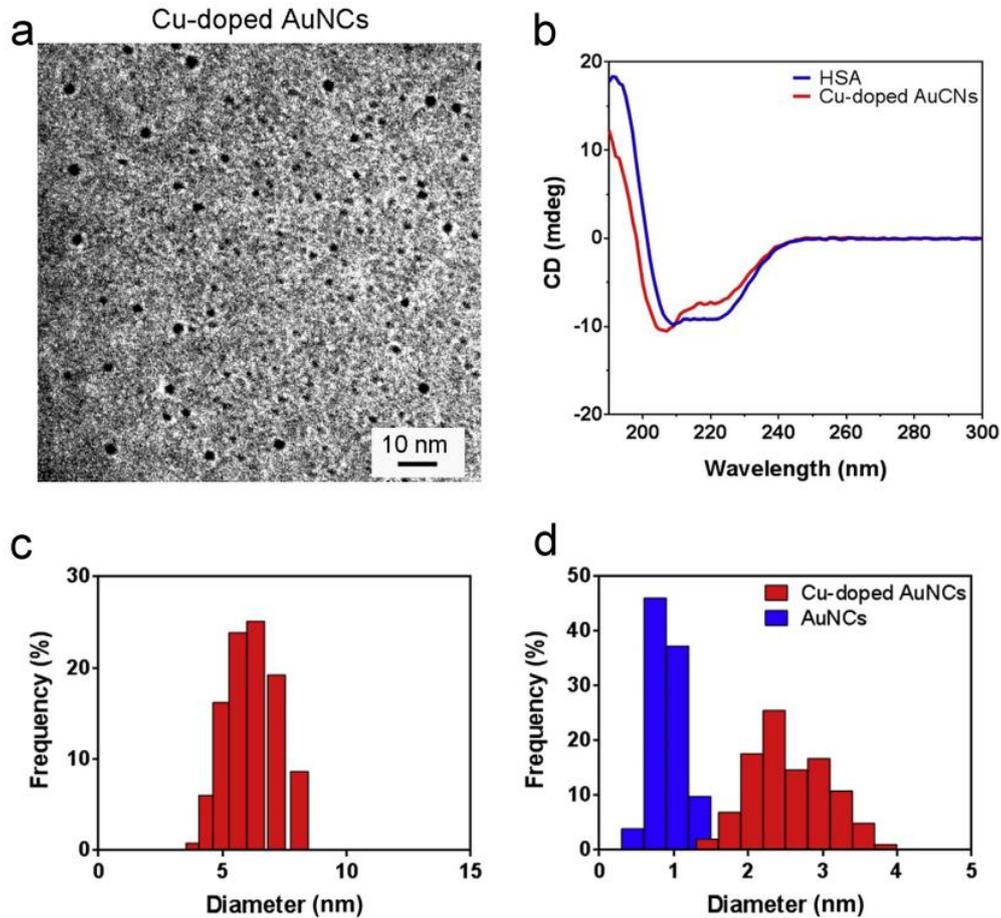


图 13 Cu-doped AuNCs (1% Cu) 表征。a、Cu-doped AuNCs 的 HR-TEM 照片；b、CD 谱测量结果；c、Cu-doped AuNCs 的大小分布；d、DLS 测量水化半径。蓝色，AuNCs；红色， ^{64}Cu -doped AuNCs。

3.6 ^{64}Cu 标记 AuNCs 的效率、纯度及稳定性

通过 2.2 的标记方法，我们成功将 ^{64}Cu 标记于 AuNCs 上。经过 PD-10 柱纯化后，我们将洗脱下的纳米颗粒和 PD-10 脱盐柱分别通过 γ -计数器测量其中放射性核素的含量。结果显示绝大多数的 ^{64}Cu 被标记在了 AuNCs 上，仅很少的放射性残留于 PD-10 脱盐柱中。进一步，我们将样本点样于 ITLC 层析板，通过 ITLC 再次确认样本放化纯度。如图 14a、b 所示，经 PD-10 纯化后， ^{64}Cu 几乎全部标记于 AuNCs 上。

为判断 ^{64}Cu 是被还原于 HSA 上还是 AuNCs 上,我们采用 2.2 相同的标记方法,单独标记了 HSA。结果如图 14c、d 所示, HSA 本身并不能通过 2.2 的方法成功标记上 ^{64}Cu , ITLC 仅显示出游离 ^{64}Cu 峰。进一步添加过量的游离 $^{64}\text{CuCl}_2$, 峰值仍出现在相同位置, 进一步肯定了我们的结论。

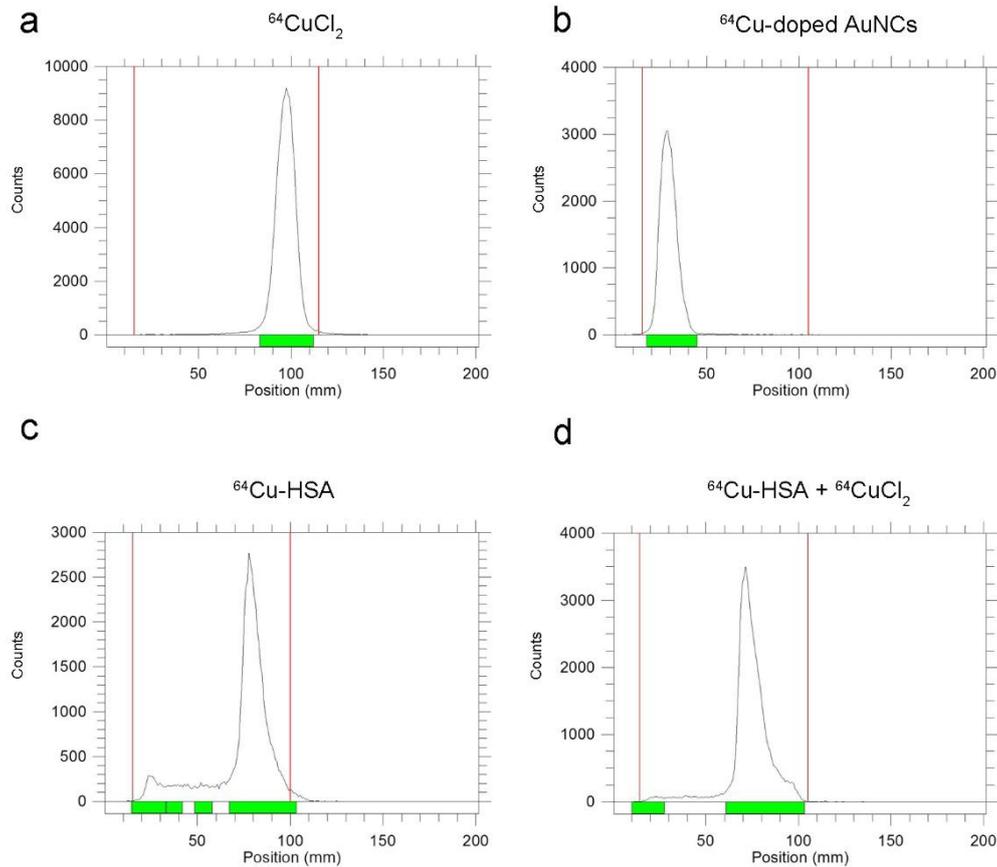


图 14 ITLC 测量 ^{64}Cu 标记 AuNCs 的效率、纯度及稳定性。a、 $^{64}\text{CuCl}_2$; b、 ^{64}Cu -doped AuNCs ; c、 ^{64}Cu 标记 HSA; d、 ^{64}Cu 标记 HSA 后再次加入 $^{64}\text{CuCl}_2$ 。

将 ^{64}Cu -doped AuNCs 置于 PBS 中动态观察 24 小时, ITLC 测量标记率结果显示 ^{64}Cu -doped AuNCs 性质稳定, ^{64}Cu 标记 24 小时内无明显脱落 (图 15)。

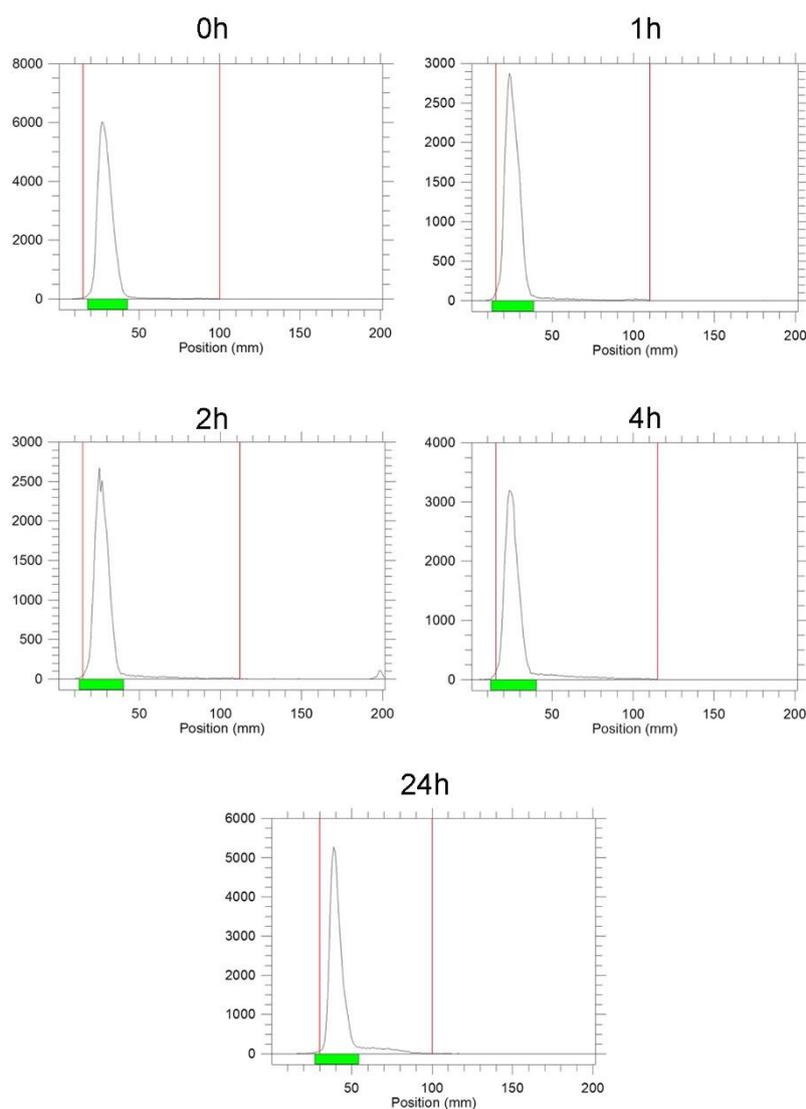


图 15 ITLC 测量 ^{64}Cu -doped AuNCs 标记稳定性

3.7 不同浓度 Cu 制备 Cu-doped AuNCs 及其对 AuNCs 荧光特性的影响

为了研究不同浓度的 Cu 在制备 Cu-doped AuNCs 对 AuNCs 荧光产生的影响，我们使用非放射性 CuCl_2 ，采用相同步骤和方法，分别制备了摩尔比 (Cu : Au) 1%、2%、5%、10% 不同的 Cu-doped AuNCs，如下图 16。在白光状态下，其颜色无肉眼可辨区别。但是在 360 nm 荧光激发下，随着 Cu 浓度的不断增加，Cu-doped AuNCs 的荧光逐渐减弱。

进一步，我们将上述不同浓度的 Cu-doped AuNCs 等量稀释后，放入 F-7000 荧光分光光度计测量其相对荧光强度。我们发现，随着 Cu 浓度的不断增加，荧光强度

随之递减，最大激发峰位置相对蓝移。当摩尔比为 1% 时，荧光强度约保持为原来的 90% 以上，但当摩尔比为 10% 时，荧光强度约降为亲本 AuNCs 的 30% (如图 17a)。

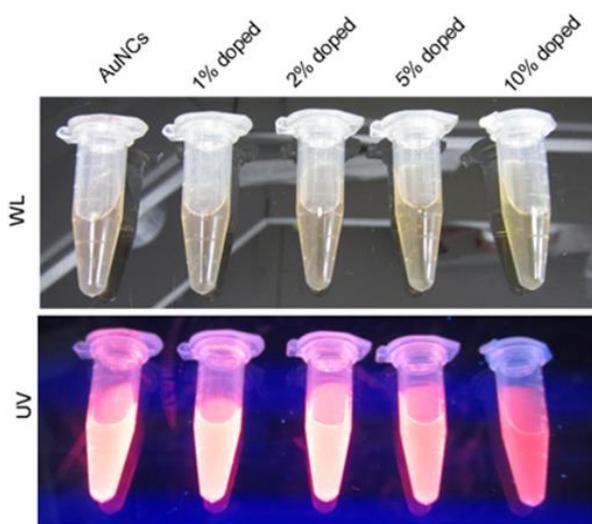


图 16 不同比例 Cu 标记对 AuNCs 的荧光影响。WL，白光；UV，365 nm 紫外。

需要指出的是，核素标记是所用的放射性 ^{64}Cu 非常微量，几乎没有质量。因此对于放射性 ^{64}Cu 对于荧光强度的影响因而可忽略不计。由于放射性核素在使用、运输时及仪器使用限制，为了最大程度上模拟放射性 ^{64}Cu -doped AuNCs，我们选择了摩尔比是 1% 的 Cu-doped AuNCs 进行后续相关研究。我们取 50 μL 1% 的 Cu-doped AuNCs，分别与去离子水、PBS 及小鼠血清共孵育。24 小时后，F-7000 荧光分光光度计分别测量了上述溶液的荧光强度，我们发现 Cu-doped AuNCs 在各溶液中保持稳定，荧光强度未有明显改变 (如图 17b)。吸取在 PBS 及血清中孵育 1% Cu-doped AuNCs，加入琼脂糖凝胶中，30 分钟电泳结果显示，PBS 与血清孵育后 Cu-doped AuNCs 电泳条带位置相同，提示 24 小时孵育后，血清中 Cu-doped AuNCs 仍保持稳定，无明显降解或分解 (如图 18)。

此外，我们同时评估了 Cu-doped AuNCs 随时间的稳定性。将 1% 的 Cu-doped AuNCs 室温放置 0 天、1 天、2 天、3 天后，分别测量其荧光强度与最大激发波长位置，结果显示 Cu-doped AuNCs 性质稳定，不随时间变化 (如图 17c)。荧光抗光漂白性也是评价荧光染料的好坏的重要指标，我们对比了 AuNCs，Cu-doped AuNCs 及常用小分子染料罗丹明 6G 在汞灯连续激发下，10 分钟荧光强度的连续变化。每分钟 Maestro 采集荧光图片，使用 Image J 软件计算荧光强度。结果显示，AuNCs 及 Cu-

doped AuNCs 能保持较好的荧光稳定性，而罗丹明 6G 在 10 分钟汞灯连续激发后，荧光几乎完全消失（如图 16d）。

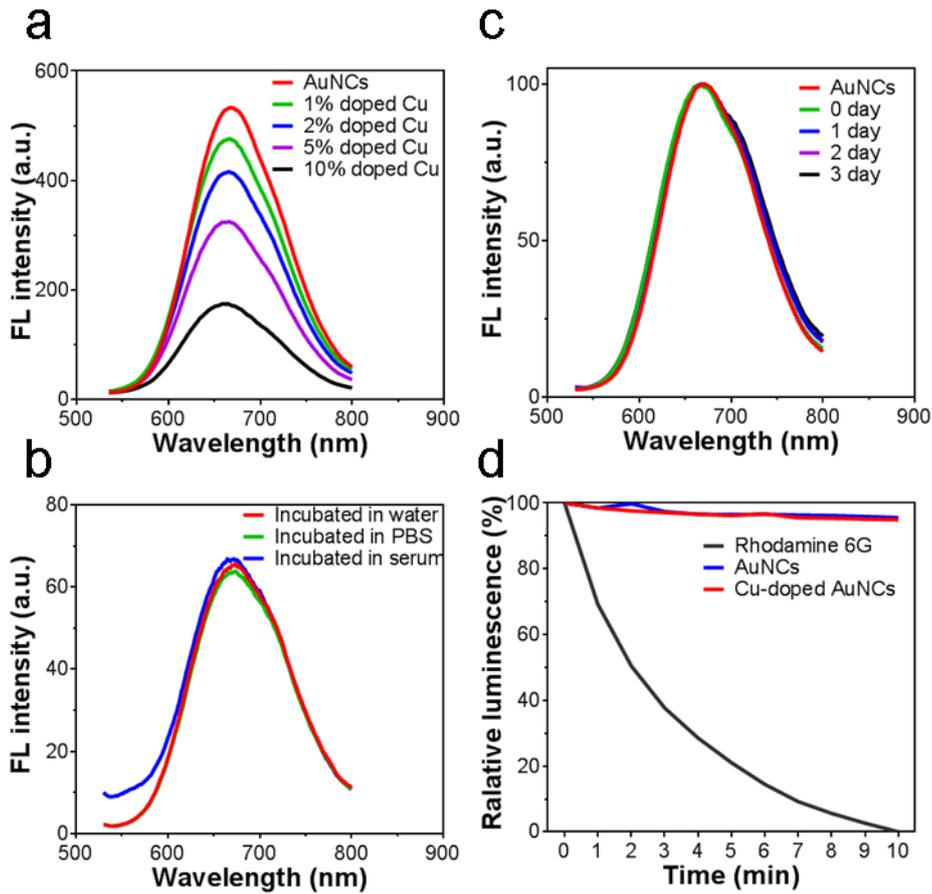


图 17 不同条件下 AuNCs 的荧光变化 a、不同比例 Cu 标记对 AuNCs 的荧光影响；b、1 % Cu-doped AuNCs 在不同溶液中孵育 24 小时后荧光强度变化；c、1 % Cu-doped AuNCs 在 PBS 中静置 1、2、3 天荧光强度变化；d、AuNCs、1 % Cu-doped AuNCs 与罗丹明 6G 抗光漂白对比。

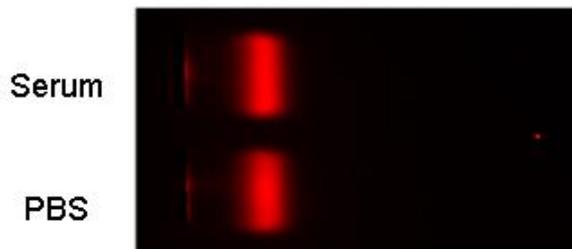


图 18 电泳判断 Cu-doped AuNC 的稳定性。PBS 孵育为对照。

4. 讨论

模板法是制备金纳米簇最常见的方法之一,其中使用有功能的蛋白质,如 BSA、各种酶等作为金纳米簇的合成模板最受研究者关注。这主要是因为蛋白质分子模板在金纳米簇形成中不仅有稳定空间构象,还原及安排金原子排列等一系列作用。更为重要的是,外层蛋白质分子保护可使金纳米簇获得与蛋白质类似的优良生物相容性,为体内成像和实验带来益处 [151]。那么作为模板的蛋白分子,在形成金纳米簇后是否还具有原有蛋白质的功能?如果蛋白质的空间构象和功能得以保存,那么用功能蛋白质为模板合成出的金纳米簇,就将是兼具蛋白质生物功能和金纳米簇荧光特性的“双功能材料”。在牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)为模板合成 AuNCs 过程中,崔大祥等人利用 CD 谱动态观察了在 AuNCs 形成过程中 BSA 的构象变化。研究发现,在 AuNCs 合成初期,由于 BSA 与 AuCl_4^- 离子间的强螯合作用,BSA 的分子构型会发生改变。原有的 190 nm 正吸收峰和 209 nm、222 nm 的负吸收峰会逐渐变平,提示 BSA 的 α 螺旋解旋,蛋白趋向线性的初级结构。然而他们发现 BSA 的改变是可逆的,随着 AuNCs 的形成,BSA 又重新恢复折叠,在 190 nm、209 nm、222 nm 处出现了与天然 BSA 类似的峰,提示 BSA 的结构得到恢复 [17]。Zhang 等人在以辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)为模板制备 AuNCs 时,证明了制备后的 HRP@AuNCs 仍具备 HRP 活性 [135]。Chou 等人使用胰岛素制备 AuNCs,也发现了所制备的 Insulin@AuNCs 仍具有降低血糖的作用 [146]。同样使用转铁蛋白在合成 AuNCs 后,Transferrin@AuNCs 仍表现出携带和吸附铁的能力 [145]。以上研究提示,以蛋白为模板合成 AuNCs,蛋白仍可能保持其本身的生物活性。与前期的相关研究结果相一致,在我们的试验中,HSA@AuNCs 的 CD 谱与天然 HSA 在结构上仅有轻微变化,提示 HSA 大部分恢复了其原始折叠 [17, 152, 153]。HSA 生物活性的保持,对 ^{64}Cu -doped AuNCs 的在体应用具有重要意义。以 HSA 为基础制备的造影剂 AlbunexTM[154, 155]和药物 AbraxaneTM[156, 157]的临床使用表明,HSA 作为保护基团制备,可使纳米颗粒获得与血浆白蛋白类似的生物学特点,如生物相容性好,血液循环时间长,不宜收到网状内皮系统的吞噬等。因此,在本研究中,具备生物活性的 HSA 不仅为 AuNCs 合成提供模板,同样使探针模拟了 HSA 优良的在体生物动

力学特征，在体循环时间增加、非特异吞噬减少，更有利于肿瘤组织摄取。

在纳米材料的放射性标记中，由于 ^{64}Cu 合适长度的半衰期和放射性质 ($t_{1/2} = 12.7$ h, β^+ , 0.653 MeV [17%]) 及简便的标记方式，使 ^{64}Cu 成为纳米材料研究中使用最为广泛的放射性核素 [158, 159]。通常讲 ^{64}Cu 主要是通过大分子螯合物如 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA, $\log k = 22.3$) 标记于纳米材料的表面。然而越来越多的研究表明，螯合物标记并不是 ^{64}Cu 标记的最佳方式。 ^{64}Cu 螯合物在体内不稳定， ^{64}Cu -DOTA 常常会被从纳米材料上置换到体内某些其他蛋白质上，造成非特异器官的高摄取 [160-162]。一些新型的螯合剂，如叉形环拉胺类，虽然较 DOTA 改善了在体稳定性，但是这类螯合物的标记条件往往很苛刻并且标记过程复杂，临床上至今尚无报道使用这类螯合剂的标记方法 [163]。具体到金纳米材料，目前仍多为采用 DOTA 标记的方法。有研究报道表明，采用 DOTA 标记 ^{64}Cu ，在体循环 24 小时后，约有 20 % 的 ^{64}Cu 会由金纳米颗粒颗粒表面上解离。从纳米材料上脱落的 ^{64}Cu ，最终会在非特异器官，如肝脏聚集，因而影响诊断的准确性 [161, 162, 164]。为改善上述情况，越来越多研究将 ^{64}Cu 直接合成在纳米材料中，这样纳米材料与 ^{64}Cu 即为一体。Liu 等人在合成金纳米颗粒时，直接将 ^{64}Cu 合成其中， ^{64}Cu 在体极其稳定，几乎没有脱落产生 [160]。前期，我们实验室报道了将 ^{64}Cu 直接还原于 CdSe/ZnS 量子点表面的方法，同样展现了良好的体内稳定性 [6, 7]。由于目前尚无有关 AuNCs 放射性标记方法的报道，在本研究中，我们创新的采用水合肼还原法，将微量放射性 ^{64}Cu 还原于 AuNCs 表面。为了确证 ^{64}Cu 的确是被标记于 AuNCs 上，而非 HSA。我们使用了相同的实验方法和条件，观察 ^{64}Cu 标记 HSA 的情况。结果显示，ITLC 只检测到与游离 ^{64}Cu 相同位置的峰；且进一步加入过量 ^{64}Cu 时，游离 ^{64}Cu 峰进一步增高，说明 ^{64}Cu 并不能稳定标记于 HSA 上。这个结果也间接证明了， ^{64}Cu 是被标记与 Au 纳米颗粒上而非 HSA 上。该方法将 ^{64}Cu 作为 ^{64}Cu -doped AuNCs 的直接组成部分，利用 Au-Cu 之间可形成金属间化合物，使 ^{64}Cu 牢固贴附于 Au 原子表面。ITLC 及琼脂糖凝胶电泳实验表明，该方法标记率高，稳定性好， ^{64}Cu 几乎全部被标记。这种“整体化”标记有三个好处：第一，标记更为稳定，相较于 DOTA 不会造成 ^{64}Cu 释出，该方法使得 PET 成像诊断及定量更为精确；第二，标记更为简单，且不影响 AuNCs 的荧光特性和 HSA 的空间折叠。实验中，虽然我们观察到了随着 Cu 含量增加，AuNCs 的荧光强度会逐渐减弱，摩尔比 1 % Cu 会使得荧光约降低至

原强度的 90% 左右。但是考虑到用于标记的放射性 ^{64}Cu 含量非常少，质量几乎可以忽略，因此，对于标记用 ^{64}Cu 造成的荧光强度损失，几乎可忽略不计；第三，避免了大分子量螯合分子对探针在体动力学的影响。

本部分实验，我们国际上首次使用 HSA 作为模板，成功合成具备 NIR 成像功能的 AuNCs。该 AuNCs 粒径小，荧光强且稳定。光谱学和 CD 谱研究表明所合成的 AuNCs 荧光特性和 HSA 的生物学效应均得以保持，同时，我们首次报道了 AuNCs ^{64}Cu 的直接标记方法，在无螯合剂的条件下，成功合成了 ^{64}Cu -doped AuNCs，从而使 AuNCs 具备了近红外及 PET 成像双模态成像功能。

第二部分 ^{64}Cu -doped AuNCs 的体外多模态成像研究与评价

多种放射性核素如 ^{18}F 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 等，在放射性衰变的过程中不但可以发射高能 γ 射线、 β 射线，也会发生契伦科夫辐射（Cerenkov Radiation），向外辐射低能光子。这些光子主要以短波长的蓝紫光为主。前一部分，我们观察到了 AuNCs 的主要吸收区域恰好在这一区域，那么 ^{64}Cu -doped AuNCs 就有可能实现无需外界激发光的 CRET 成像。如果我们的推测正确，理论上 ^{64}Cu -doped AuNCs 将具备“四种方式，两种模态”的多模态成像能力。四种成像方式分别是：其一，正电子放射性核素 ^{64}Cu 的 PET 成像；其二， ^{64}Cu 的直接契伦科夫辐射光学成像；其三，AuNCs 本身具有的近红外荧光成像；其四，以 ^{64}Cu 作为能量供体（Energy donor）、AuNCs 作为能量受体（Energy acceptor），通过能量供受体之间的 CRET 成像，实现的无需激发光的近红外成像。这四种成像方式中既包括核素成像，亦包括光学近红外成像模态。那么实际情况下， ^{64}Cu -doped AuNCs 可否实现“四种方式，两种模态”成像的假设，成像条件及成像评价是本部分研究需着重解决和回答问题。

上一部分我们已经成功合成了 ^{64}Cu -doped AuNCs 新型纳米探针，并初步探讨了其表征及荧光特性。本部分的研究重点将在离体水平上，运用 PET 成像、Maestro 光谱分离成像、IVIS 光谱分离方法在离体水平上对 ^{64}Cu -doped AuNCs 的成像效果进行评价。同时，也将在细胞水平上探讨 ^{64}Cu -doped AuNCs 的生物安全性及细胞的非特异吞噬。以期通过本部分的研究，摸索和建立 ^{64}Cu -doped AuNCs 的成像条件，为第三部分 ^{64}Cu -doped AuNCs 的在体成像研究打下了基础。

1. 材料

1.1 试剂与耗材

1.1.1 试剂

胎牛血清	Thermo Scientific 公司
MEM 培养基	Thermo Scientific 公司
细胞培养用青链霉素双抗	Thermo Scientific 公司
PBS	Thermo Scientific 公司
DAPI	Roche 公司
胰蛋白酶	Thermo Scientific 公司
防淬灭封片剂	上海碧云天公司
CCK8 试剂盒	Dojindo 公司
Z-fix 固定液	Anatech 公司
细胞冻存液	Invitrogen 公司

1.1.2 耗材

无菌移液管	Fisher Scientific 公司
细胞培养瓶	Corning 公司
8 孔细胞培养皿	Fisher Scientific 公司
滤膜枪头	Fisher Scientific 公司
15 mL、50 mL 离心管	Corning 公司
0.2 μm 滤器	Millipore 公司
96 孔培养板	Corning 公司
1.5mL EP 管	Fisher Scientific 公司
盖玻片	Fisher Scientific 公司
梯度降温冻存盒	Nalgene 公司
流式上样管	BD Biosciences 公司
细胞冻存管	Nunc 公司
避光锡箔纸	绍兴顺祥锡箔纸公司

细胞计数板

实验室自备

1.2 实验仪器

小动物 PET 成像仪

西门子公司

IVIS 小动物成像仪

Caliper 公司

荧光显微镜

Olympus 公司

倒置显微镜

Olympus 公司

Accuri C6 流式细胞仪

BD Biosciences 公司

多功能酶标仪

Thermo Scientific 公司

细胞培养箱

Thermo Scientific 公司

Geiger 计数器

卢德伦测量公司

移液器

Eppendorf 公司

超声波清洗器

昆山合创超声仪器有限公司

细胞超净台

Thermo Scientific 公司

摇床

上海琪特

台式离心机

Thermo Scientific 公司

4 ℃ 冰箱

Thermo Scientific 公司

恒温水浴锅

上海新苗

-80 ℃ 超低温冰箱

Thermo Scientific 公司

小型 γ 计数器

Genesys 公司

Maestro 在体成像系统

CRI 公司

1.3 细胞系

人脑胶质瘤细胞系 U87MG 购买与 ATCC，保存于我实验室。

2. 方法

2.1 细胞复苏、培养穿代、冻存

1) 本研究采用人脑胶质瘤细胞系 U87MG;

- 2) 将细胞从液氮中取出, 快速放入 37 °C 恒温水浴锅, 并充分摇动, 使其快速融化。同时, 提前预热培养基;
- 3) 将细胞吸出, 与含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的 MEM 培养基 5 mL 预混, 并吸入 15 mL 离心管离心, 离心转速 1000 rpm/min, 时间 3 分钟;
- 4) 离心过后, 弃去上清, 余下细胞沉淀用 5 mL 新鲜培养基重悬;
- 5) 将细胞转入细胞培养瓶, 置于 37 °C 细胞培养箱, 隔日换液;
- 6) 待细胞生长至对数生长期后, 注意不要让细胞生长太满, 进行细胞分瓶和传代;
- 7) 传代时, 首先吸出培养基, 用 PBS 清洗 1 遍, 之后加入 0.25 % 胰蛋白酶, 消化 1 - 3 分钟。消化过程中, 不断摇晃培养瓶, 使胰酶充分与细胞接触;
- 8) 细胞消化完成后, 加入含血清新鲜培养基中和胰酶消化, 反复吹打消化细胞, 将细胞吹落培养瓶, 将吹打下的细胞转入 15 mL 离心管离心。离心转速 1000 rpm/min, 时间 3 分钟;
- 9) 离心后, 加入新鲜培养基, 按照 1:3 的传代比例下传;
- 10) 选取对数生长期的细胞冻存留种, 细胞用 0.25 % 胰蛋白酶消化 3 分钟后。加入培养基中和;
- 11) 将细胞悬液加入 15 mL 离心管离心, 离心转速 1000 rpm/min, 时间 3 分钟;
- 12) 弃去上清, 加入冻存液吹打细胞沉淀。细胞悬液再转入冻存管, 冻存体积最大不要超过 1.8 mL 以免液体遇冷膨胀发生意外;
- 13) 将细胞冻存管放入梯度降温冻存盒, 直接放入 -80 °C 超低温冰箱。第二天转入液氮。

2.2 细胞计数

- 1) 常规消化 U87MG 细胞, 务必使细胞成为单细胞悬液;
- 2) 取 50 μ L 细胞悬液, 加入 50 μ L 台盼蓝染色剂, 活细胞不能染色, 而死细胞可被染成深蓝色
- 3) 取 20 μ L 染色细胞, 轻轻滴在有盖玻片的细胞计数板上, 细胞通过板上的毛细管被吸入细胞计数板;

- 4) 在显微镜下进行细胞计数，首先低倍镜下找到计数格，之后切换到高倍镜进行细胞计数；
- 5) 计数四个大格子内的活细胞，如遇到两个以上细胞按单个细胞计算，如遇压线，按照左侧原则计算。计算公式如下：

$$\text{细胞密度 (个/mL)} = \frac{\text{四大格细胞总数}}{4} \times 10^4$$

2.3 CCK8 毒性实验

- 1) CCK8 即 Cell Counting kit-8，是一种基于高溶解性四唑盐 WST-8，被广泛用于细胞增殖和毒性研究。CCK8 的检测原理是：CCK8 检测试剂 WST-8，可被细胞中脱氢酶，在电子载体作用下还原为高度水溶性的黄色染料甲臞，且生成数量与活细胞的数量呈正比。因此，利用 CCK8 检测这一特性，我们对 ^{64}Cu -doped AuNCs 毒性做了评估。需要说明的是，由于对放射性物质的严格使用规定和管理，研究所使用的是经过多个半衰期，经 Geiger 计数器测量无明显放射的 ^{64}Cu -doped AuNCs。研究步骤如下：
- 2) 于 96 孔培养板接种 U87MG 细胞，接种数量为每孔 4000 细胞，设置平行复孔 4 个，加入 MEM 完全培养基后，37 °C 培养约 24 小时，待细胞完全贴壁；
- 3) 弃去原培养基，向上清中分别加入预先配置好的，含有浓度为 6.25 μM 、12.5 μM 、25 μM 、50 μM 、100 μM 的 ^{64}Cu -doped AuNCs 或 AuNCs 的培养液 (MEM 配置)；不含纳米材料的 MEM 完全培养基作为对照；
- 4) 37 °C 培养约 24 小时，弃去培养基。每孔加入 100 μL PBS，摇床上缓慢清洗一遍，去除残留纳米颗粒；
- 5) 吸去 PBS，向每孔分别加入 MEM 完全培养基 90 μL 和 CCK8 工作液 10 μL ，37 °C 培养约 1 - 1.5 小时；不加 CCK8 的作为对照孔
- 6) 多功能酶标仪，读取 450 nm 的吸光度，并计算细胞活力。计算公式如下：

$$\text{细胞活力(\%)} = \frac{\text{实验孔吸光度} - \text{样品对照孔吸光度}}{\text{细胞CCK8 对照孔吸光度} - \text{CCK8 对照孔吸光度}} \times 100 \%$$

说明：

实验孔：U87MG 细胞 + 完全培养基 + CCK8 + 纳米材料

样品对照孔：完全培养基 + CCK8 + 纳米材料

细胞 CCK8 对照对照：U87MG 细胞 + 完全培养基 + CCK8

CCK8 对照孔：完全培养基 + CCK8

2.4 细胞非特异吞噬及免疫荧光

- 1) 整个操作过程中，注意需避光。
- 2) 向 8 孔玻璃细胞培养小室内接种 U87MG 细胞，细胞接种密度为每孔 4000 个；加入 MEM 完全培养基后，37 °C 培养约 24 小时，待细胞完全贴壁；
- 3) 弃去原培养基，将含有 50 μM 的 AuNCs 及 ^{64}Cu -doped AuNCs（经衰变）加入，每孔 100 μL ；
- 4) 37 °C 培养约 6 小时后，吸去含有纳米材料的培养基，加入 PBS，摇床上缓慢清洗一遍，去除残留纳米颗粒；
- 5) Z-fix 固定液固定细胞 20 分钟，加入 PBS，摇床上缓慢清洗 3 遍，去除 Z-fix 固定液；
- 6) DAPI 复染细胞核，染色约 15 分钟后，加入 PBS，摇床上缓慢清洗 3 遍；
- 7) 将玻璃小室上方塑料孔撬开，只剩载玻片部分。轻甩除去片上水，加入防淬灭封片剂，置于荧光显微镜下 IX81 观察。
- 8) 单纯细胞未加纳米材料组，作为对照。

2.5 细胞非特异吞噬的流式细胞仪检测

- 1) 将 U87MG 细胞接种于 24 孔板，每孔 1×10^4 细胞，设 3 个平行复孔。加入 MEM 完全培养基后，37 °C 培养约 24 小时，待细胞完全贴壁；
- 2) 加入 50 μM AuNCs 及 Cu-doped AuNCs（经衰变），37 °C 培养约 6 小时，吸去含有纳米材料的培养基，加入 PBS，摇床上缓慢清洗一遍，去除残留纳米颗粒；
- 3) 加入 0.25 % 胰蛋白酶，将细胞反复吹打形成单细胞悬液，上流式测试；
- 4) BD Accuri C6 流式细胞仪设定慢速进样速度，选择合适波长 FL-3 通道检测，设定收集 20000 事件为检测时长；正常 U87MG 细胞为对照，Cflow Plus 软件分析结果；

5) 分析过后, 使用专用清洗及去污染洗剂清洗 BD Accuri C6。

2.6 体外 PET 成像

- 1) 吸取新标记的 ^{64}Cu -doped AuNCs 250 μL 与未经标记的母液 AuNCs 250 μL 分别放入 2 支 1.5 mL 的透明 EP 管中, γ 计数器测定放射性含量约 150 μCi ;
- 2) 将 2 支 EP 管平行并排放置于小动物 PET 成像仪中, 启动 PET 进行扫描, 扫描时间 5 分钟;
- 3) 扫描后图像使用 ASIPro VM 软件进行处理, 分别取冠状面及水平面图像进行分析。

2.7 体外 Maestro 成像

- 1) 吸取新标记的 ^{64}Cu -doped AuNCs 250 μL , 与未经标记的母液 AuNCs 250 μL 分别放入 2 支 1.5 mL 的透明 EP 管中, γ 计数器测定放射性含量约 150 μCi ;
- 2) 将 2 支 EP 管平行并排放置于 Maestro 小动物成像仪器进行成像, 成像首先采集白光图像, 曝光时间 10 ms;
- 3) 设定 Maestro 成像系统采集滤光片组设置为 Blue, 激发滤片波长 445 - 490 nm, 发射滤片组波长大于 515 nm, 扫描范围 550 - 720 nm, 每 10 nm 为一扫描获取单位, 曝光时间设置为自动;
- 4) 使用 Maestro 自带软件进行分析处理

2.8 体外契伦科夫能量共振转移成像及 IVIS 光谱分段分析扫描

- 1) 吸取新标记的 ^{64}Cu -doped AuNCs 250 μL , $^{64}\text{CuCl}_2$ 250 μL 分别放入 2 支 1.5 mL 的透明 EP 管中, γ 计数器测定放射性, 并调整两管放射性大小一致, 为 150 μCi ;
- 2) 将 2 支 EP 管平行并排放置于 IVIS 200 小动物成像仪器进行成像, 成像首先采集白光图像, 自动曝光时间;
- 3) 设定 IVIS 成像系统为自发光成像模式, 即不需要激发光条件。同时设置光采集滤光片组为无滤片组、 $> 590 \text{ nm}$ 、 $< 510 \text{ nm}$ 、515 - 575 nm、575 - 650 nm、695 - 770 nm 和 810 - 875 nm。曝光时间设定为 5 分钟, $F/\text{stop} = 1$, Binning

= 4

- 4) 使用 Live imaging V3.0 进行图像分析处理。并测量放射性核素 ^{64}Cu 契伦科夫辐射谱，制作拟合曲线

2.9 统计分析方法

统计分析使用 Graphpad V5.0 软件，计量数据以 Mean \pm SD 表示。多组之间单因素比较采用 One-way ANOVA，两组间单因素比较实用 t 检验。当 $P < 0.05$ 表示统计学意义。

3. 结果

3.1 CCK8 细胞毒性研究

利用蛋白质，采用模板法是制备 AuNCs 最常见的制备方法。蛋白质不仅为 AuNCs 的形成提供骨架，同时使 AuNCs 具有良好的生物安全性和相容性。我们通过第一部分实验成功建立起了 HSA 合成 AuNCs 的方法，并建立了 AuNCs 的一步快速放射性标记方法。为了明确我们所制备的 AuNCs 及 ^{64}Cu -doped AuNCs 的生物安全性，我们使用 CCK8 毒性实验对上述样本的安全性进行了评价。这里为排除放射性核素电离作用对细胞的损伤，我们使用经多个半衰期衰变后，测量无明显放射性的 ^{64}Cu -doped AuNCs，记作 Cu-doped AuNCs。

经过 24 小时与纳米材料的共培养，与正常细胞生长情况相比，AuNCs 及 Cu-doped AuNCs 在所选浓度区间内并不会对细胞的活力、成长和增殖产生影响。倒置显微镜观察细胞形态完好，无坏死细胞漂浮。此外，我们还注意到，在所选浓度范围 6.25-100 μM 内，低浓度的 AuNCs 及 Cu-doped AuNCs 甚至还有一定促生长的作用，细胞活力和生长增殖稍快于对照组，如图 19。CCK8 毒性结果提示，AuNCs 及 ^{64}Cu -doped AuNCs 是具有较高生物安全性的纳米材料。

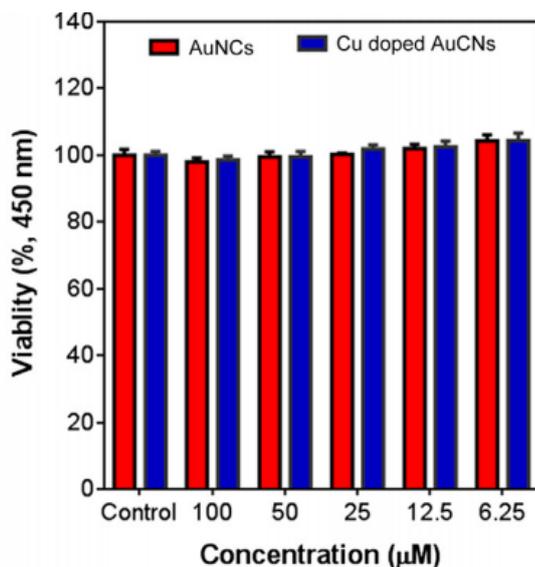


图 19 CCK8 安全性检测

3.2 U87MG 细胞对纳米粒子的摄取及流式

细胞对纳米粒子的摄取与纳米颗粒的大小，表面性质，细胞种类、甚至是实验条件有关 [165]。细胞对纳米颗粒的摄取大致可分为，静电吸附作用、受体介导机制及液相流动机制。当细胞外纳米颗粒浓度较高时，一方面，细胞膜两侧渗透压增加，另一方面细胞膜与纳米颗粒之间的接触碰撞机会增加，因而细胞的摄取增加。为了在细胞水平上，观察 AuNCs 及 ^{64}Cu -doped AuNCs 是否可被 U87MG 细胞摄取，以及 AuNCs 及 ^{64}Cu -doped AuNCs 可否用于细胞成像，我们设计了细胞荧光实验与流式细胞仪检测。这里由于放射性物质管理，我们依旧使用经多个半衰期衰变后，经测量无明显放射性的 Cu-doped AuNCs 代替 ^{64}Cu -doped AuNCs。通过 6 小时纳米材料与细胞的共孵育，细胞荧光实验显示 AuNCs 和 Cu-doped AuNCs 可被 U87MG 细胞明显吞噬，在细胞爬片上，U87MG 细胞所吞噬的 AuNCs 和 Cu-doped AuNCs 在激发下显示出红色荧光。AuNCs 和 Cu-doped AuNCs 在定位上主要聚集在细胞的胞浆中，部分在核周有明显聚集，而细胞核内未见（如图 20a、b）。这符合细胞非特异性吞噬的特点。在流式细胞检测中，我们可以明显观察到孵育前后细胞荧光强度的变化，并且 AuNCs 和 Cu-doped AuNCs 在荧光强度方面差别不大（如图 20c）。这也应证了我们在第一部分的相关结论，即极微量的放射性 ^{64}Cu 标记不会带来明显的荧光特性变化和荧光强度损失。

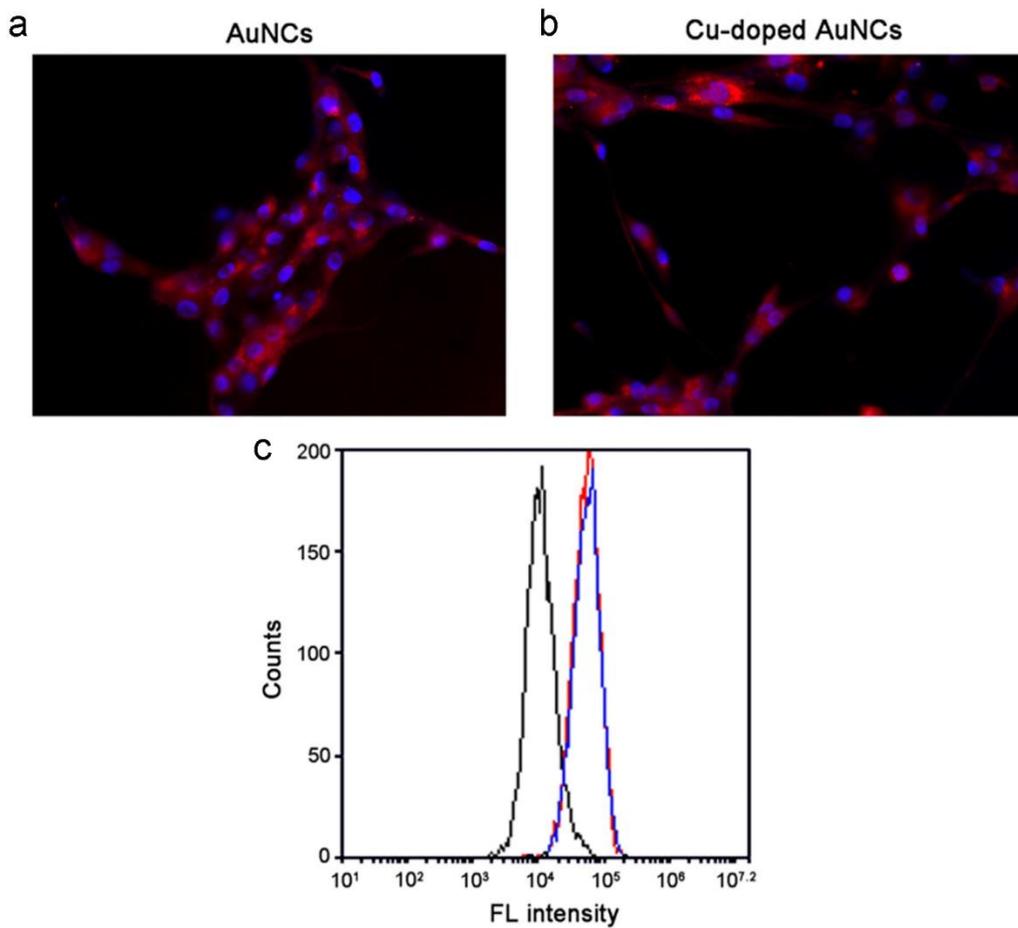


图 20 免疫荧光及流式细胞仪检测 AuNCs 和 Cu-doped AuNCs 的细胞摄取。a、U87MG 细胞与 AuNCs 共孵育 6 小时后，细胞荧光照片；b、U87MG 细胞与 Cu-doped AuNCs 共孵育 6 小时后，细胞荧光照片；c、流式细胞仪定量 U87MG 细胞对 Cu-doped AuNCs 和 AuNCs 6 小时的摄取，黑线，亲本 U87MG 细胞；红线，U87MG 细胞对 AuNCs 的摄取；蓝线，U87MG 细胞对 Cu-doped AuNCs 的摄取。

3.3 ⁶⁴Cu-doped AuNCs 体外 PET 成像评估

正电子核素在衰变过程中释放出的 β^+ 正电子，在组织飞行中与周围负电子相遇，正负电子碰撞发生湮灭，并发射出两个相反方向（互成 180 度角），能量均为 511 keV 的高能 γ 光子。PET 成像就是通过探测相反两个湮灭辐射光子，甄别、分析确定电子对湮灭的位置、时间和能量信息，通过计算机重建，得到 PET 图像。由于同时探测两个反方向的 γ 光子，PET 成像在探测灵敏度、精度及图像质量上比 SPECT 成像

高出很多。为了判断标记后的 ^{64}Cu -doped AuNCs 的放射性成像能力，我们将母液 AuNCs 与标记后的 ^{64}Cu -doped AuNCs 分别装入不同 EP 管，同时进行 PET 扫描（如图 21）。通过对冠状位和水平位的分析，我们发现 ^{64}Cu -doped AuNCs 具有较强的 PET 成像能力。由于 PET 成像具有无限穿透力的及定量的特点，本实验证明 ^{64}Cu -doped AuNCs 具备在体 PET 成像的使用条件。

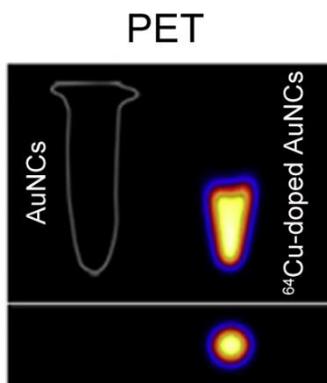


图 21 ^{64}Cu -doped AuNCs 的 PET 效果 左侧、AuNCs；右侧、 ^{64}Cu -doped AuNCs。

3.4 ^{64}Cu -doped AuNCs 体外 Maestro 荧光成像评估

在第一部分实验中，我们成功以 HSA 为模板合成了 AuNCs 及 ^{64}Cu -doped AuNCs。我们通过 F-7000 荧光分光光度计对 AuNCs 及 ^{64}Cu -doped AuNCs 的吸收谱及最大激发波长进行了测量。为了进一步直观观察 AuNCs 及 ^{64}Cu -doped AuNCs 的近红外成像效果，本小节，我们利用 Maestro 小动物成像仪，对 AuNCs 及 ^{64}Cu -doped AuNCs 的近红外成像的效果和最大发射波长进行了分析。Maestro 小动物成像仪器是当今世界最为灵敏的光学成像仪器之一，能够实现对微弱发光甚至单分子荧光的探测。Maestro 最大的特点就是可以实现步进式的光学扫描，从而实现更高精确度的光谱分离分析及光谱分离成像。如图 22a，首先我们在 365 nm 紫外激发下，首先初步验证了 ^{64}Cu -doped AuNCs 的荧光效果。与 AuNCs 类似， ^{64}Cu -doped AuNCs 在紫外下也可发射出红色荧光。为了进一步分析两者的荧光光谱，我们将两支样品管放入 Maestro 成像仪中。设定 Maestro 成像系统采集滤光片组设置为 Blue，激发滤片波长 445 - 490 nm，发射滤片组波长大于 515 nm，扫描范围 550 - 720 nm，每 10 nm 为一扫描获取单位。我们成功获取了在 445 - 490 nm 发光激发下，AuNCs 及 ^{64}Cu -doped AuNCs 的荧光效果图(如图 22b)。在第一部分中，F-7000 荧光分光光度计测量提示，

Cu 标记会使 AuNCs 的最大发射波长位置发生蓝移。与该部分结果一致, Maestro 高灵敏度的测量同样发现了 ^{64}Cu -doped AuNCs 确实较 AuNCs 略有蓝移。进一步通过分离光谱方法, 我们在 Maestro 上根据发射波长的微小差异将 ^{64}Cu -doped AuNCs 与 AuNCs 二者荧光区分, 并用伪彩显示出来 (如图 22c、d)。

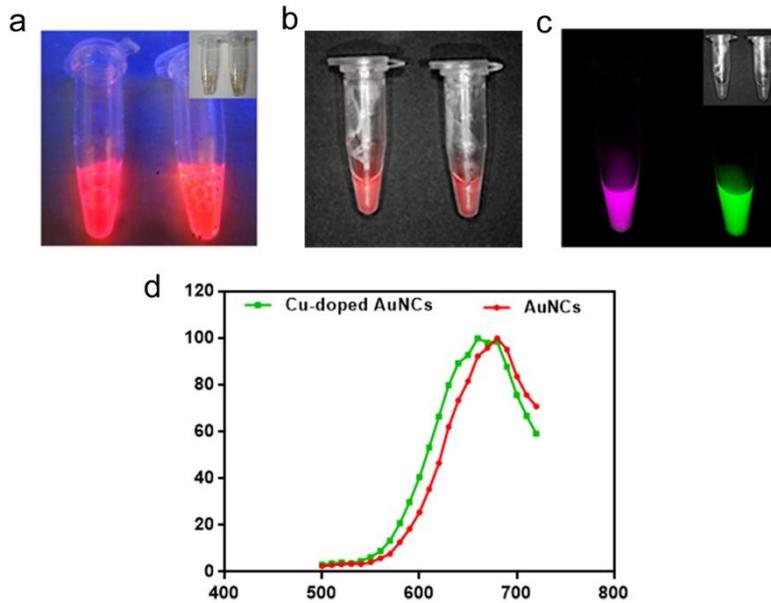


图 22 ^{64}Cu -doped AuNCs 的体外荧光成像。a、紫外灯激发下 (365 nm) AuNCs 与 ^{64}Cu -doped AuNCs 的荧光; b、AuNCs 与 ^{64}Cu -doped AuNCs 经 Maestro 仪器荧光成像 (未进行光谱分离); c、AuNCs 与 ^{64}Cu -doped AuNCs 经 Maestro 仪器荧光成像 (进行光谱分离, 伪彩色)。绿色, ^{64}Cu -doped AuNCs; 红色, AuNCs; D、Maestro 测量 AuNCs 与 ^{64}Cu -doped AuNCs 发射波长。

3.5 体外自发荧光成像及 IVIS 光谱分段扫描

多种放射性核素如 ^{18}F 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 等, 在放射性衰变的过程中不但可以发射高能 γ 射线、 β 射线, 也会会发生契伦科夫辐射, 向外辐射低能光子。这些光子主要以蓝紫光区域等短波长为主, 因而穿透性较差。而第一部分我们发现 AuNCs 的主要吸收部分恰好也在这个部位。那么在探针 ^{64}Cu -doped AuNCs 中, 放射性 ^{64}Cu 可否作为能量的供体, 用于激发发射波长较长的 AuNCs, 从而实现 CRET 成像, 将短波长的契伦科夫辐射转变为穿透力更强近红外光呢? 为了验证该假设, 我们首先对放射性核素 ^{64}Cu 的契伦科夫光谱系进行了测量。IVIS 小动物成像系统对 $150 \mu\text{Ci}$ ^{64}Cu

不同波段的测量后，我们描记了在不同波长条件下 ^{64}Cu 的契伦科夫辐射强度，并标记对应点做曲线拟合，我们发现契伦科夫辐射是一个连续波长的辐射，且波长越短强度越高（如图 23）。这刚好与 AuNCs 的最佳吸收区域重合，因此具备发生 CRET 的条件。

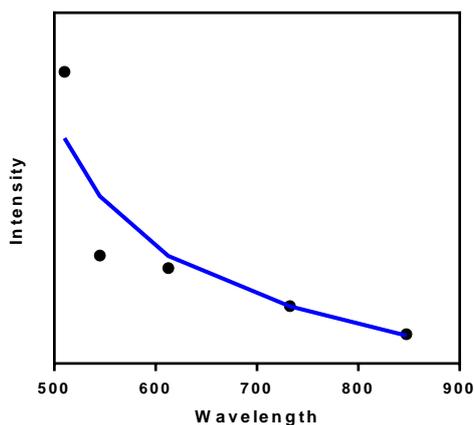


图 23 ^{64}Cu 的契伦科夫辐射在不同波长的强度（IVIS 测量）

之后，在无滤光片的条件下，我们采集了放射性含量相同的两管 $^{64}\text{CuCl}_2$ 和 ^{64}Cu -doped AuNCs 的总体自发荧光信号。 $^{64}\text{CuCl}_2$ 的总信号强度相当于契伦科夫辐射总体的光强度，而 ^{64}Cu -doped AuNCs 的总信号强度则代表 ^{64}Cu 契伦科夫辐射信号与 CRET（AuNCs 受 ^{64}Cu 激发）所产生的自发荧光信号之和。如果没有发生能量共振转移，那么 $^{64}\text{CuCl}_2$ 和 ^{64}Cu -doped AuNCs 的总体信号强度应该相同。然而通过测量我们发现， ^{64}Cu -doped AuNCs 的总信号为 1.61×10^7 photon/s，大于 $^{64}\text{CuCl}_2$ 总信号的 1.03×10^7 photon/s。那么提示增加的荧光强度可能来自 ^{64}Cu -doped AuNCs 的 CRET。进一步，我们测量了小于 510 nm 波长范围内二者自发荧光强度的大小。由于契伦科夫辐射主要以短波长为主，因此这一波段被认为是契伦科夫辐射的主要波段。测量结果显示， $^{64}\text{CuCl}_2$ 在 < 510 nm 波段强度为 4.16×10^6 photon/s，而 ^{64}Cu -doped AuNCs 仅为 2.82×10^6 photon/s，也就是说在 < 510 nm 波长范围内， $^{64}\text{CuCl}_2$ 高于 ^{64}Cu -doped AuNCs。这提示在 ^{64}Cu -doped AuNCs 探针中，部分 ^{64}Cu 的契伦科夫信号作为 CRET 能量供体用于激发了 AuNCs。进一步对 > 590 nm 信号的测量结果更加肯定了我们的设想。在这一波长下契伦科夫辐射已经不是主要能量来源，而是 AuNCs 发射波长存在的区域。

^{64}Cu -doped AuNCs 由于发生了 CRET, ^{64}Cu 激发了 AuNCs 产生近红外荧光, 因而在 $> 590 \text{ nm}$ 的强度值为 $9.40 \times 10^6 \text{ photon/s}$ 远高于 $^{64}\text{CuCl}_2$ 的 $3.42 \times 10^6 \text{ photon/s}$ (约 2.7 倍)。因此, 通过对无滤片、 $< 510 \text{ nm}$ 、 $> 590 \text{ nm}$ 三个波段荧光强度的测量表明 ^{64}Cu -doped AuNCs 确实发生了能量共振转移 (如图 24a、b)。

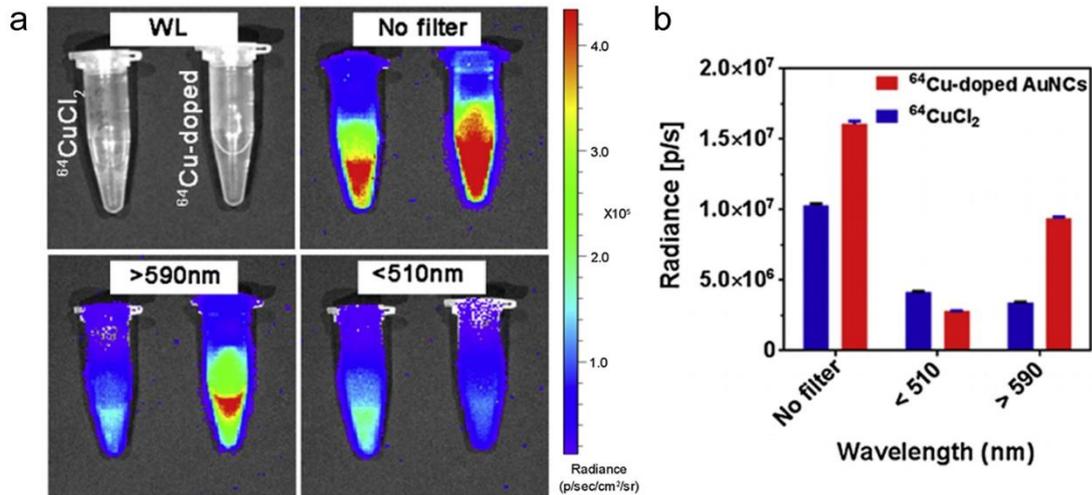


图 24 ^{64}Cu -doped AuNCs 的契伦科夫能量共振转移与自发荧光成像。a、装有 ^{64}Cu -doped AuNCs 和 $^{64}\text{CuCl}_2$ 的 EP 管在白光、无滤片组, $> 590 \text{ nm}$ 、 $< 510 \text{ nm}$ 发射滤光片下的契伦科夫能量共振转移和自发荧光成像; b、IVIS 定量分析 ^{64}Cu -doped AuNCs 和 $^{64}\text{CuCl}_2$ 在无滤片组, $> 590 \text{ nm}$ 、 $< 510 \text{ nm}$ 的强度。

为了进一步确证 $> 590 \text{ nm}$ 信号的确是由 AuNCs 的激发而产生。我们又选择了四个测量波段, 分别是 $515 - 575 \text{ nm}$ 、 $575 - 650 \text{ nm}$ 、 $695 - 770 \text{ nm}$ 、 $810 - 885 \text{ nm}$, 其中 $695 - 770 \text{ nm}$ 涵盖了 AuNCs 的最大发生波长。我们采集了同等放射性大小的 $^{64}\text{CuCl}_2$ 与 ^{64}Cu -doped AuNCs 在如上四个波段中的荧光强度变化。果然, 越是靠近 ^{64}Cu -doped AuNCs 最大发射波长, 采集到的荧光信号越强, 在 $695 - 770 \text{ nm}$ 处达到最大值, 之后下降。而 $^{64}\text{CuCl}_2$ 在这四个波段呈现的却是逐渐下降的过程。在 $695 - 770 \text{ nm}$ 处 ^{64}Cu -doped AuNCs 的荧光强度是 $^{64}\text{CuCl}_2$ 契伦科夫辐射强度的 4.3 倍。因此, 该结果进一步明确 ^{64}Cu -doped AuNCs 发生能量共振转移的证据, 证明了在 ^{64}Cu -doped AuNCs 探针中, ^{64}Cu 的确激发了 AuNCs 发射了近红外光 (如图 25a、b)。

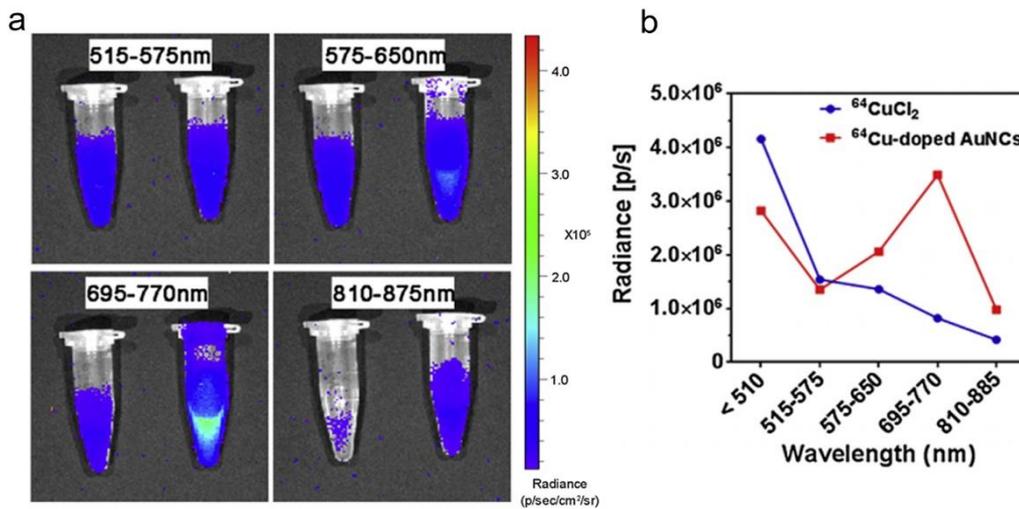


图 25 $^{64}\text{Cu-doped AuNCs}$ 的契伦科夫能量与近红外增强作用。a、装有 $^{64}\text{Cu-doped AuNCs}$ 和 $^{64}\text{CuCl}_2$ 的 EP 管在 515 - 575 nm、575 - 650 nm、695 - 770 nm 和 810 - 885 nm 发射滤光片下的契伦科夫能量共振转移和自发荧光成像；b、IVIS 定量分析 $^{64}\text{Cu-doped AuNCs}$ 和 $^{64}\text{CuCl}_2$ 在 < 510 nm、515 - 575 nm、575 - 650 nm、695 - 770 nm 和 810 - 885 nm 的强度。

4. 讨论

契伦科夫辐射现象是由俄罗斯核物理学家帕威尔·阿列克谢耶维奇·契伦科夫 (Pavel Alekseyevich Cerenkov) 于 1934 年发现的 [166]。契伦科夫辐射产生的条件是当带电粒子在介质中的传播速度超过介质中光的运动速度时，就会向外辐射一种以短波长为主的电磁辐射，该波长主要表现为浅蓝色光。虽然在真空中，不可能有物体的运动速度会高于光速。但是在实际环境中，由于介质对光折射等原因，光子的运动速度不会达到真空中光速水平。因此在粒子加速器及核反应时，物质的运动速度就会超过光速，进而发生契伦科夫辐射现象。多种放射性核素如 ^{18}F 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 等，在放射性衰变的过程中不但可以发射高能 γ 射线、 β 射线，同时由于带电粒子的释放（通常为正、负电子）也会发生契伦科夫辐射，向外辐射光子。契伦科夫辐射是一种不同于荧光现象和韧致辐射发光机制的发光现象，具有连续能谱，可用于光学成像 [167]。

契伦科夫辐射的总强度与带电粒子的量和速度有关系，粒子数量越多、速度越

快,契伦科夫辐射能量就越大。另一方面,与荧光成像具有特定发射频不同,契伦科夫辐射频谱呈连续性,频率越高(波长越短)强度越强 [168]。以上就是为什么我们在核反应堆能肉眼看见的淡蓝色光的原因(大量放射粒子的存在,契伦科夫在短波长蓝光具有较高强度)。而在医学临床和实验中所使用的放射性核素,由于使用剂量有限,因此很难肉眼看到契伦科夫光,但是使用高灵敏度光学 CCD 相机是可以捕捉和观察到的。2009 年 Robertson 等人首次使用 CCD 相机观察到 ^{18}F -FDG 的契伦科夫信号,并成功用于观察小鼠结肠癌的成像观察 [169]。该项研究打开了契伦科夫成像在在在生物医学领域应用的大门。随之,越来越多的医用放射线核素如, ^{177}Lu 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{111}In 等被发现可产生契伦科夫现象,契伦科夫成像因此逐渐收到人们的重视。将契伦科夫成像用于疗效监测,肿瘤成像等报道也越来越多 [170-174]。

契伦科夫成像可以实现单一探针的核素成像与光学成像,且光学成像不需要激发光。但是契伦科夫光学成像的主要问题在于,契伦科夫辐射的主要能量在于紫外多波长区域,而这一区域光由于波长段,组织及散射吸收高,穿透力很不理想。因此如果能将契伦科夫较短波长的光转变为长波长光将有效解决这一问题。

荧光共振能量转移成像 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 的相关研究为我们解决这一问题提供了思路。FRET 发生在两个不同荧光基团中,当一个荧光基团的发射光谱与另一个基团的吸收光谱具有一定重叠,在二者距离合适时,其中一个荧光基团可作为能量供体,用以激发另一受体荧光基团,从而实现荧光波长的转变。FRET 的实现有两个关键要素:第一,合适的距离;第二,两个荧光分子之间的发射和吸收波谱要有重合。根据 FRET 的产生原理,人们发现其实契伦科夫辐射也可以在满足 FRET 的条件下,激发能量受体,将短波长的契伦科夫辐射转变为更长波长能量受体的荧光,实现能量共振转移,即契伦科夫能量共振转移 (CRET)。本实验中,我们对 ^{64}Cu -doped AuNCs 能否发生 CRET 现象进行了验证。

首先,由于放射性核素 ^{64}Cu 是直接被还原和贴附于 AuNCs 表面,且 ^{64}Cu -doped AuNCs 探针的粒径仅为几个纳米,因此 ^{64}Cu 具备激发 AuNCs 的合适距离;另一方面,前期结果显示 AuNCs 的主要吸收区域主要分布在短波长,与 ^{64}Cu 的契伦科夫辐射谱范围恰好重合,即能量受体的吸收区域与能量供体的发射区域重合。由此可见, ^{64}Cu -doped AuNCs 满足了 CRET 的两个要素。我们首先在 $< 510 \text{ nm}$ 的条件下,分别采集了 $^{64}\text{CuCl}_2$ 与 ^{64}Cu -doped AuNCs 的荧光信号。如果没有发生 CRET,那么 $^{64}\text{CuCl}_2$

与 ^{64}Cu -doped AuNCs 在信号强度应该相等，然而，测量结果发现， $^{64}\text{CuCl}_2$ 在 < 510 nm 波段强度为 4.16×10^6 photon/s，而 ^{64}Cu -doped AuNCs 仅为 2.82×10^6 photon/s。而在 > 590 nm 波段下， ^{64}Cu -doped AuNCs 的信号强度却比 $^{64}\text{CuCl}_2$ 高出约 2.7 倍，强度值达到为 9.40×10^6 photon/s。以上结果说明， ^{64}Cu -doped AuNCs 内部的确发生了 CRET 现象， ^{64}Cu 的契伦科夫信号作为能量供体发生了能量共振转移用于激发了 AuNCs，实现了契伦科夫短波长向长波长能量的转移。

然而满足 CRET 条件，并不是进行 CRET 成像的必要理由。必须在发生能量共振转移后，荧光强度要比原 ^{64}Cu 契伦科夫辐射有明显增强才有进行 CRET 成像的必要。为此，我们在无滤光片条件下，对 ^{64}Cu -doped AuNCs 和 $^{64}\text{CuCl}_2$ 总体信号强度进行了测量，发现 ^{64}Cu -doped AuNCs 的总信号为 1.61×10^7 photon/s，大于 $^{64}\text{CuCl}_2$ 总信号的 1.03×10^7 photon/s。进一步对包含 AuNCs 发射波长的近红外波段（695 - 770 nm）测量和分析结果表明， ^{64}Cu -doped AuNCs 在此波段的信号强度是 $^{64}\text{CuCl}_2$ 对应强度的 4.3 倍。证明经过 CRET 后， ^{64}Cu -doped AuNCs 较 $^{64}\text{CuCl}_2$ 信号得到了放大，特别在近红外区域成像能力显著增强。

CRET 成像所带来的直接好处就是，不但将原先穿透力差的契伦科夫光转化为穿透力更强的近红外光，并且在能量共振转移的过程中。近红外区域的成像效果得到显著提升。同时，CRET 也省去了传统荧光成像所需外界激发光源，从而实现了自发成像，避免了组织对于激发光源的散射和吸收等造成激发光减弱以及自体荧光干扰等问题。

本部分实验，我们在国际上首次报道了放射性核素和 AuNCs 间可发生 CRET，并可实现自发荧光成像。通过 PET 成像、Maestro 荧光成像及光谱分离、IVIS 多光谱成像，我们证实了 ^{64}Cu -doped AuNCs 可实现“四种方式、两种模态”的成像，即 PET 核素成像、AuNCs 荧光成像、契伦科夫光学成像及 CRET 成像，具备了近红外光学和 PET 双模态成像的能力。同时，我们在细胞水平上对 ^{64}Cu -doped AuNCs 的生物安全性进行了评价，对 ^{64}Cu -doped AuNCs 的细胞成像能力和非特异性吞噬进行了评估，并摸索了 ^{64}Cu -doped AuNCs 的成像条件，为第三部分“探针的在体成像研究”打下了基础。

第三部分 ^{64}Cu -doped AuNCs 的体内多模态成像研究与评价

多模态成像通过整合多个模态的成像方法，在克服各成像模态间的不足的同时，整合了各个成像模态间的成像优势。较传统单模态成像的方式，多模态成像实现了提供更为全面，互补的疾病信息。然而，多模态成像有赖于性能优良的多模态成像探针。理想状态下，多模态分子探针的设计应该满足在同一探针上实现在多个模态的成像探测，而非多次使用不同探针将多个成像模态扫描结果进行“简单拼合”。纳米材料拥有相对大的表面积，可进行多种的功能修饰且较生物分子物理性质和结构不易受到破坏。经过改造纳米材料表面可承载用于多成像模态的成像模块，因而是多模态分子成像的理想载体。

金纳米材料以其优良的荧光性能使其成为荧光成像理想的荧光材料，常作为生物传感器用于体外重金属粒子的检测。然而在现有发表的研究中，尚无有关金纳米簇多模态成像的研究报道。本研究所制备的 ^{64}Cu -doped AuNCs 使金纳米簇同时具有了 PET 成像和基于 CRET 原理的自发近红外成像 (Self-illuminating NIR imaging) 功能。特别是自发近红外荧光成像，与传统荧光成像相比，避免了自体荧光干扰，以及组织吸收、散射所造成的激发光减弱。同时也进一步拓展了契伦科夫成像的应用。

上一部分实验，我们证明了 ^{64}Cu -doped AuNCs 在体外条件下的 PET 成像及自发近红外成像。那么在体内，特别是在肿瘤模型上 ^{64}Cu -doped AuNCs 可否实现 PET 成像及自发近红外成像是本节需要着重解决和回答的问题。本部分，我们将在荷瘤小鼠模型上，通过一系列动物实验对 ^{64}Cu -doped AuNCs 在体 PET 及自发近红外成像效果、探针生物学分布、器官安全性进行综合性评价，系统评价和建立 ^{64}Cu -doped AuNCs 体内多模态成像的方法。

1. 材料

1.1 试剂与耗材

1.1.1 试剂

牛血清	Thermo Scientific 公司
MEM 培养基	Thermo Scientific 公司
细胞培养用青链霉素双抗	Thermo Scientific 公司
PBS	Thermo Scientific 公司
胰蛋白酶	Thermo Scientific 公司
Z-fix 固定液	Anatech 公司

1.1.2 耗材

无菌移液管	Fisher Scientific 公司
细胞培养瓶	Corning 公司
胰岛素注射器	BD Biosciences 公司
滤膜枪头	Fisher Scientific 公司
15 mL、50 mL 离心管	Corning 公司
0.2 μm 滤器	Millipore 公司
细胞计数板	实验室自备
1.5mL EP 管	Fisher Scientific 公司
异氟烷	Baxter 公司
γ 计数管	Perkin-Elmer 公司

1.2 实验仪器

小动物 PET 成像仪	西门子公司
IVIS 小动物成像仪	Caliper 公司
倒置显微镜	Olympus 公司
细胞培养箱	Thermo Scientific 公司
Geiger 计数器	卢德伦测量公司

移液器	Eppendorf 公司
细胞超净台	Thermo Scientific 公司
台式离心机	Thermo Scientific 公司
4 ℃ 冰箱	Thermo Scientific 公司
恒温水浴锅	上海新苗
-80 ℃ 超低温冰箱	Thermo Scientific 公司
小型 γ 计数器	Genesys 公司
1480 Wizard3 全自动 γ 计数器	Perkin-Elmer 公司
解剖器械	实验室自备
称量天平	Mettler Toledo 公司
显微镜	Olympus 公司

1.3 细胞系及实验动物

人脑胶质瘤细胞系 U87MG 购自于 ATCC，保存于我实验室

无胸腺小鼠 BALB/c 裸小鼠，4-6 周，雌性，购自于 Harlan 实验室。

2. 方法

2.1 荷瘤动物模型建立

- 1) 动物模型建立均严格按照美国国立卫生研究院 (NIH) 动物实验所批准的操作流程执行 (操作批准文号 Protocol: 13-03)，并严格遵守 NIH 有关动物福利的相关要求。小鼠由 NIH 动物中心代养，5 只每笼，常规饲料喂养。环境灯光保持 12 小时亮-暗交替。
- 2) U87MG 使用含有 10 % FBS、100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的 MEM 培养液培养。5 % CO₂ 孵箱 37 ℃ 常规培养，待细胞生长到对数成长期，收集细胞；
- 3) 收集前用新鲜 PBS 溶液清洗细胞，加入 0.25 % 胰蛋白酶，放入 37 ℃ 孵箱消化细胞数分钟；
- 4) 含血清培养基中和胰蛋白酶，将细胞从培养瓶中吹下装入 15 mL 离心管。

- 1000 rpm/min 离心 3 - 5 分钟，弃去上清；
- 5) 加入 8 mL PBS，缓慢吹打细胞沉淀，是细胞尽量分散。再次离心 3 - 5 分钟，1000 rpm/min 弃去上清；
 - 6) 将细胞沉淀 5 mL PBS 重悬，细胞计数板计数。按照 5×10^6 个细胞/100 μ L PBS 比例重悬细胞，之后将细胞悬液转入 1.5 mL EP 管；
 - 7) 胰岛素注射器吸取 100 μ L 细胞悬液(约含有 5×10^6 个细胞) 备用；
 - 8) 使用异氟烷麻醉 BALB/c 裸小鼠，控制气体麻醉流量为 2 - 3 lpm，待小鼠进入完全睡眠后，将注射器内 100 μ L 细胞注射入小鼠右肩部皮下；
 - 9) 注射后，常规饮食，每周记录和观察肿瘤生长状况。

2.2 ^{64}Cu -doped AuNCs 荷瘤动物的 PET 成像

- 1) 当肿瘤生长到 5 - 8 mm^3 可进行成像实验；
- 2) ^{64}Cu -doped AuNCs 经过 PD-10 纯化后，ITLC 测量标记率，标记率在 95 % 以上方可使用；胰岛素针管吸取 ^{64}Cu -doped AuNCs 100 - 150 μ L，放射性剂量约为 200 μCi 。记录放射性测量时间；
- 3) 将动物放置于预麻盒中进行麻醉，异氟烷剂量 2 - 3 lpm；待小鼠完全麻醉后，尾静脉注射所吸取的 ^{64}Cu -doped AuNCs，并在记录注射时间后，将小鼠苏醒；
- 4) 在探针注射后 1 h、3 h、8 h、18 h、24 h 时，行全身 PET 成像；
- 5) 异氟烷再次麻醉小鼠，扫描时将小鼠俯卧位摆放于扫描床上，激光定位器定位肿瘤位置，进床扫描，扫描时间 10 分钟，并设定自动三维重建；
- 6) 扫描后，图像使用 ASIPro VM 软件进行处理，选取肿瘤和腿部肌肉作为 ROI 测量平均值，然后转化为每克组织中注射放射剂量所占的百分比 (Percentage of injected dose per gram of tissue, %ID/g)。计算肿瘤/非肿瘤比例 (Tumor to non-tumor ratio, T/NT)。

2.3 ^{64}Cu -doped AuNCs 荷瘤动物的自发荧光及契伦科夫成像

- 1) 使用与 PET 成像同批，同只小鼠；
- 2) 小鼠 PET 成像介素后，将小鼠转入 IVIS 系统，在探针注射后 2 h、5 h、7 h、9 h、18 h、24 h 时，行自发荧光成像，注意记录每次具体成像时间；

- 3) 以异氟烷对小鼠麻醉后，小鼠侧卧于成像平台上，设定自发光扫描模型（关闭激发光），设定激发光滤片组为无滤光片组（收集总信号，含自发光及契伦科夫信号）、 $< 510\text{ nm}$ 组（仅收集小于 510 nm 波长的信号，主要代表契伦科夫辐射）及 $> 590\text{ nm}$ 组（收集波长大于 $> 590\text{ nm}$ 的信号，主要是自发光信号）；设定扫描时间 10 分钟， $f/\text{stop} = 1$ ， $\text{Binning} = 4$ ；小鼠依次接受以上三个波长滤片组的信号采集；
- 4) 采集图片由 Living Image V3.0 软件进行处理，选取肿瘤和腿部肌肉作为 ROI 测量平均值。

2.4 ^{64}Cu -doped AuNCs 的器官分布

- 1) 在 PET 成像和 IVIS 成像最后成像时间点，数据采集完成后，研究 ^{64}Cu -doped AuNCs 的主要器官分布；
- 2) 麻醉条件下脱颈处死裸小鼠，摘取其主要内脏心、肝、脾、肺、肾，胃、肠、肌、骨、胰腺、肿瘤及血液，并逐一称重、记录时间；
- 3) 将各个组织按照如上顺序，放入全自动 γ 计数器中，测量其每分钟放射计数（Counts per minutes, CPM），经全自动 γ 计数器校正后。使用校正过的 CPM 计算 %ID/g，每组值用 $\text{Mean} \pm \text{SD}$ 表示。

2.5 PET 成像与光学成像的相关性分析

- 1) 在 PET 成像和 IVIS 成像最后成像时间点，数据采集完成后，麻醉条件下脱颈处死裸小鼠，摘取肿瘤和 5 个主要脏器（心、肝、脾、肺、肾）；
- 2) 将每只老鼠的 6 个组织并排放置。分别进行 PET 成像扫描及 IVIS 自发光成像；
- 3) PET 扫描时间为 10 分钟，其他设置与 2.1 相同；
- 4) IVIS 自发光成像时间为 10 分钟，设置同 2.2，需采集无滤光片组（收集总信号，含自发光及契伦科夫信号）、 $< 510\text{ nm}$ 组（仅收集小于 510 nm 波长的信号，主要代表契伦科夫辐射）及 $> 590\text{ nm}$ 组（收集波长大于 $> 590\text{ nm}$ 的信号，主要是自发光信号）；
- 5) PET 成像图像使用 ASIPro VM 软件进行处理，将各个组织作为 ROI 测量其

放射性；

- 6) IVIS 自发光图像使用 Living Image V3.0 软件进行处理，将各个组织确定为 ROI，测量自发荧光强度值。并将 PET 结果与 IVIS 结果进行相关性分析。

2.6 ⁶⁴Cu-doped AuNCs 组织学评价

- 1) 取材与固定：在 ⁶⁴Cu-doped AuNCs 注射后 1 天和 7 天，脱颈处死小鼠，摘取其主要器官心、肝、脾、肺、肾，将其切成小块，放入组织托，投入 10% Z-fix 固定液中进行固定，同期注射等量 PBS 的小鼠为对照；
- 2) 脱水透明：将组织块经过自低浓度至高浓度酒精的脱水，脱去组织中的水分后，将组织块放入二甲苯中透明，二甲苯替换出组织中的酒精；
- 3) 石蜡包埋：将融化的石蜡接入组织托，将组织托放入冰台快速冷却。
- 4) 切片与制片：将包埋好的组织块固定于切片机上，切成 5 - 8 μm 的薄片，延展于水中，然后用玻璃切片将其捞起，平置。放入烘箱烘干；
- 5) 脱蜡与染色：将切片投入二甲苯中脱去石蜡，然后经高浓度至低浓度酒精，蒸馏水水化，苏木精染色。酸水氨水分色，伊红染色液染色；
- 6) 脱水透明与封片：切片经纯酒精脱水，二甲苯透明，之后使用树胶封片；
- 7) 切片经显微镜观察，判断是否有病变。

2.7 统计分析方法

统计分析使用 Graphpad V5.0 软件，计量数据以 Mean ± SD 表示。多组之间单因素比较采用 One-way ANOVA，两组间单因素比较实用 *t* 检验。当 P < 0.05 表示统计学意义。

3. 结果

3.1 ⁶⁴Cu-doped AuNCs 的近红外自发荧光成像

光学成像应用的最大瓶颈和障碍在于光的穿透力，波长越短穿透力愈差。波长范围在 650 - 900 nm 的近红外光由于波长长，生物组织特别是水及血红蛋白对此段波长的光吸收少，光穿透能力强。因而成为光学在体成像研究的最常使用的波段，也是

最有临床潜力的光学成像波段 [175, 176]。在第二部分的研究中, 我们证明了 ^{64}Cu -doped AuNCs 的体外自发荧光强度是 $^{64}\text{CuCl}_2$ 契伦科夫辐射的 2.7 倍 ($> 590 \text{ nm}$), 在近红外 695 - 770 nm 范围, 强度更是达到了契伦科夫的 4.3 倍。优良的近红外成像特性使 ^{64}Cu -doped AuNCs 具备了活体成像的能力。

为了验证 ^{64}Cu -doped AuNCs 活体自发近红外成像, 我们选择了 U87MG 皮下荷瘤小鼠为研究对象。在尾静脉注射 ^{64}Cu -doped AuNCs 后不同时间点 (注射后 2 h、5 h、7 h、9 h、18 h、24 h), 我们利用 IVIS 自发光成像模式 (关闭激发光的条件下) 分别采集了无滤片组、 $> 590 \text{ nm}$ 组及 $< 510 \text{ nm}$ 组三组的信号。无滤片组收集 ^{64}Cu -doped AuNCs 的全部信号, 包含自发荧光信号和放射性核素 ^{64}Cu 所发射的契伦科夫信号; $> 590 \text{ nm}$ 主要收集 ^{64}Cu -doped AuNCs 自发近红外荧光 (CRET) 为主的荧光信号。 $< 510 \text{ nm}$ 组则主要代表 ^{64}Cu 所发射的契伦科夫信号。我们发现, 注射后 2 小时左右, 肿瘤即有明显的摄取, 且随着时间延长, 摄取量不断增加。在注射 9 小时左右达到高峰。之后由于放射性核素的不断衰变, 肿瘤部位的自发光强度随之降低。在约 24 小时时, 达到观察的最低值。无滤片组、 $> 590 \text{ nm}$ 组及 $< 510 \text{ nm}$ 组均表现出一致的趋势, 这表明三组的信号均来自同一个来源, 即 ^{64}Cu -doped AuNCs (如图 26)。各组不同时间点肿瘤自发荧光强度和倍数比较见表 2。

表 2 各滤片组在各成像时间点的肿瘤自发荧光强度

	滤片组 ($\times 10^4 \text{ photon/s}$)			倍数 (Mean:Mean)	
	无滤片	$> 590 \text{ nm}$	$< 510 \text{ nm}$	无滤片: $< 510 \text{ nm}$	$> 590 \text{ nm}$: $< 510 \text{ nm}$
2 h	5.74 ± 2.40	4.69 ± 1.87	0.87 ± 0.21	6.60	5.40
5 h	6.04 ± 3.38	4.84 ± 2.84	0.96 ± 0.34	6.29	5.04
7 h	6.48 ± 3.05	5.09 ± 2.55	1.05 ± 0.44	6.17	4.84
9 h	5.69 ± 2.76	4.52 ± 2.21	0.87 ± 0.38	6.54	5.19
18 h	3.51 ± 1.42	2.77 ± 1.14	0.47 ± 0.16	7.47	5.89
24 h	2.61 ± 1.37	2.11 ± 1.23	0.37 ± 0.19	7.05	5.70

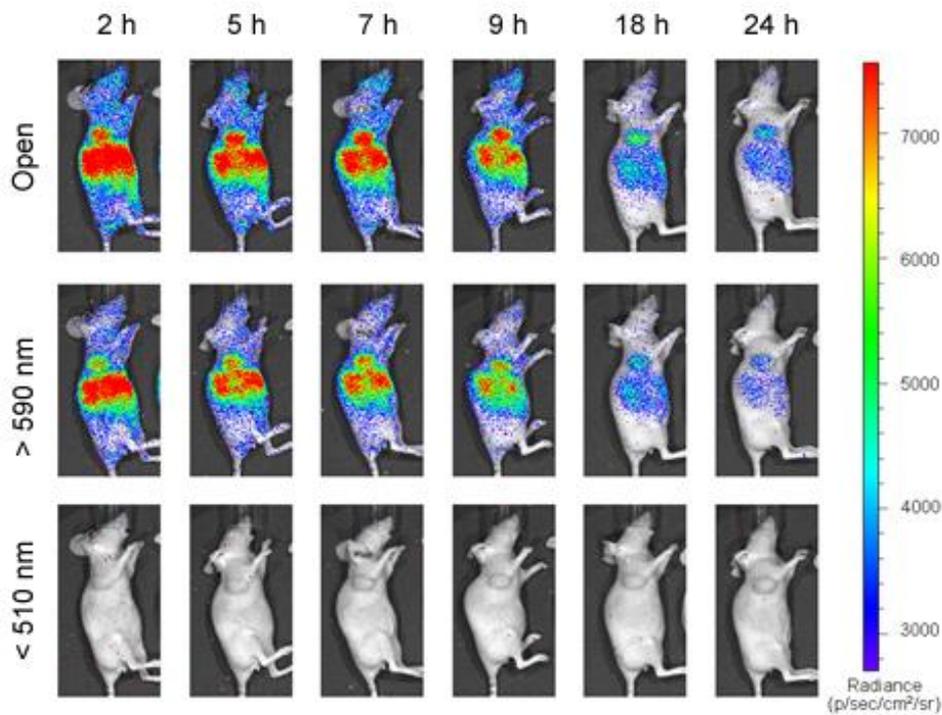


图 26 ^{64}Cu -doped AuNCs 荷瘤动物自发荧光成像。上图、注射 ^{64}Cu -doped AuNCs 后 2、5、7、9、18 和 24 小时后，IVIS 小动物成像系统分别采集在无滤片组、 > 590 nm、 < 510 nm 三个滤片组下荷瘤动物的图像；下图、以肿瘤区域为 ROI，软件分别测量无滤片组， > 590 nm、 < 510 nm 三组信号强度，并描记其与注射时间的关系。

从肿瘤成像效果上看，无滤片组的成像效果最明显，信号强度也最高， > 590 nm 组次之，而主要代表为契伦科夫辐射的 < 510 nm 波段信号，效果最差，信号强度最低。取与无滤片组、 > 590 nm 组相同 BAR 值参照下， < 510 nm 组基本不能观察到肿瘤信号（如图 26）。软件单独调节 < 510 nm 组，肿瘤的信号混杂在背景噪点之中，只能依稀观察到肿瘤的摄取，成像对比度很差（如图 27）。与之形成对比的是，在无滤

片组及 $> 590 \text{ nm}$ 组，即使在探针注射后 24 小时，肿瘤对比度依然清晰。从测量数值上看并不难理解，在各个时间点无滤片组和 $> 590 \text{ nm}$ 组的强度都是 $< 510 \text{ nm}$ 组的数倍。**表 2**呈现的是肿瘤各时间点三组荧光强度的数据。我们可以看出，无滤片组各时间点的成像强度基本保持 $< 510 \text{ nm}$ 组（契伦科夫辐射）的 6-7 倍， $> 590 \text{ nm}$ 所代表的自发荧光信号则保持在 $< 510 \text{ nm}$ 组的 5-6 倍。

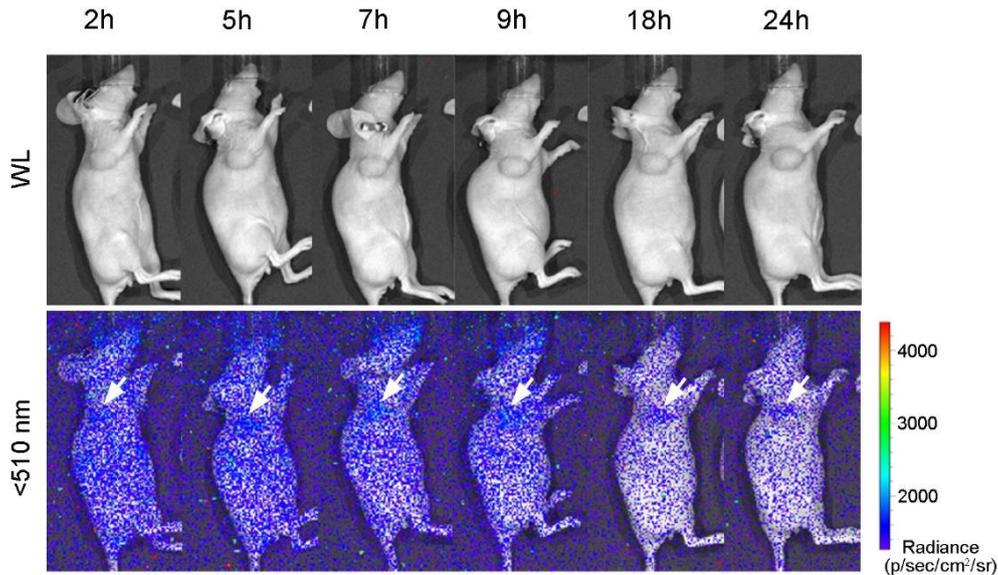


图 27 ^{64}Cu -doped AuNCs 荷瘤动物 $< 510 \text{ nm}$ 自发荧光成像。调整 $< 510 \text{ nm}$ 组成像 BAR 值, 肿瘤的摄取信号混杂在背景噪点之中, 我们只能依稀观察到肿瘤的摄取, 成像对比度很差。WL, 白光。

以上结果说明了 ^{64}Cu -doped AuNCs 成功实现了在体的 CRET 成像, 使本不适用于在体观察、以短波长为主的契伦科夫辐射转变为长波长的 AuNCs 近红外成像, 并成功实现了在体肿瘤的探测。同时, CRET 的作用下, ^{64}Cu -doped AuNCs 实现了不依赖于外界激发光的近红外荧光成像, 成像背景干扰少, 在体近红外成像的最佳时间窗是注射后 2 - 9 小时。

3.2 ^{64}Cu -doped AuNCs 的 PET 成像

PET 成像是当今成像技术中最为敏感的成像技术之一。在 3.1 的研究中, 我们已经证实了 ^{64}Cu 可由 CRET 机制激发 AuNCs, 从而实现 ^{64}Cu -doped AuNCs 在体自发

近红外成像。 ^{64}Cu 除作为能量供体外，其本身是 PET 成像核素。那么 ^{64}Cu -doped AuNCs 的在体 PET 成像效果如何，PET 成像与近红外成像之间又呈现如何关系呢？我们进一步对 ^{64}Cu -doped AuNCs 在体 PET 成像效果进行了评价。尾静脉注射 ^{64}Cu -doped AuNCs 后，我们采集了 U87MG 荷瘤小鼠不同时间点的 PET 图像。通过放射校正，我们从 PET 图像上可以观察到自 ^{64}Cu -doped AuNCs 注射 1 小时后，肿瘤组织的摄取就在不断上升，而正常肌肉组织则在不断下降。随着时间推移，PET 成像上肿瘤显示的愈发明显（如图 28a）。进一步以肿瘤及腿部肌肉作为 ROI，ASIPro VM 软件测量三维 ROI，我们计算出经放射性校正的组织 %ID/g。我们发现肿瘤摄取从 1 小时的 6.9 %ID/g，不断升高，注射后 18 小时增加到 14.9 %ID/g，24 小时后达到最高摄取量 15.2 %ID/g。而正常肌肉的摄取，从注射后 1 小时的 1.3 %ID/g 开始，随时间逐渐降低，最后稳定在 0.5 - 0.6 %ID/g 左右（如图 28b）。反映肿瘤成像对比度最为直观的肿瘤/非肿瘤比值（T/NT）自探针注射后就不断上升。自注射后 1 小时的 5.8，上升至 18 小时的 28.4 并达到峰值，之后逐渐下降（如图 28c），提示最佳成像时间为注射后 18 小时。

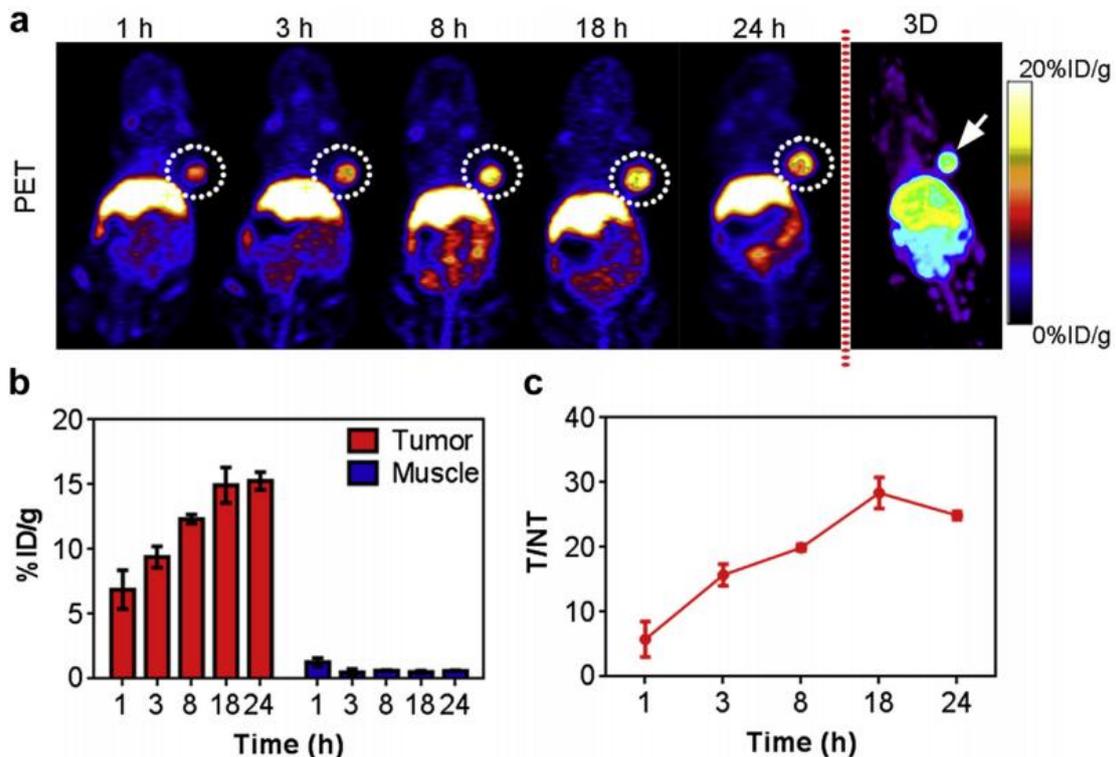


图 28 ^{64}Cu -doped AuNCs 荷瘤动物的 PET 成像及三维重建。a、注射 ^{64}Cu -doped

AuNCs 后，荷瘤动物随时间变化的 PET 成像及注射后 24 小时三维重建；b、选取肿瘤及腿部肌肉作为 ROI，ASIPro VM 软件定量测量后，经放射性校正计算出肿瘤和肌肉组织的 %ID/g；c、肿瘤/非肿瘤比值 (T/NT) 随时间变化曲线。

这里需要指出的是，在 3.1 自发荧光成像时，成像峰值在 7 小时，而在 PET 成像中，我们在图像上观察到 8 小时后，肿瘤摄取仍在升高，并没有像光学成像那样有明显下降的趋势。这是因为自发光学成像是依靠核素契伦科夫辐射激发 AuNCs 来实现的，契伦科夫辐射强度越高，自发荧光成像信号也就越高。而契伦科夫辐射的能量是又与核素放射大小呈正相关的。因此，自发荧光成像信号大小取决于核素放射性的大小。探针注射后，肿瘤信号实际上处在“放射性探针的不断蓄积”与“探针持续放射性衰变”之间的动态平衡中，因此，当肿瘤组织部位的探针衰变快于肿瘤对探针的摄取时，及“入不敷出”时，光学信号便开始下降。然而与光学不同的是，PET 成像以及 ROI 测量结果是经过放射性衰变校正后的结果，该结果校正了探针放射性衰变的影响，因而只表示放射性探针蓄积的程度。如果将肿瘤摄取使用绝对放射性大小来表示，则如下图 29，那么肿瘤绝对放射性大小也会呈现与光学成像一样的结果，即在约 8 小时左右达到高峰，之后随之下降。

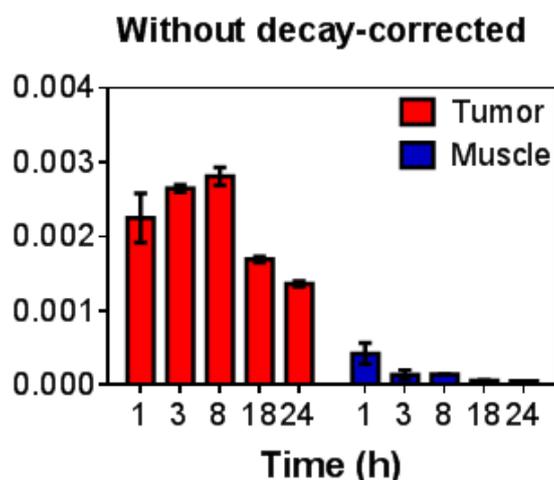


图 29 未经放射性校正肿瘤组织与肌肉组织绝对放射性剂量。

以上结果说明了 ^{64}Cu -doped AuNCs 能被 U87MG 肿瘤高摄取，进而在 PET 成像上展示出了令人满意的 PET 成像能力，注射后 8 - 24 小时是肿瘤 PET 成像的最佳时

间窗，特别是在 8 小时肿瘤摄取达 14.9% %ID/g。同时，研究结果证明 PET 成像与光学成像具有较好的一致性，这也反映了探针 ^{64}Cu -doped AuNCs 在体内稳定。

3.3 PET 成像与光学成像的相关性

通过 3.1 和 3.2 两部分的实验，我们证明了 ^{64}Cu -doped AuNCs 可进行近红外自发荧光成像和 PET 成像，并且提示 PET 成像与光学成像具有较好的一致性。为进一步了解二者间的相关性，我们进行了自发近红外成像与 PET 成像信号间的相关性分析。在 24 小时成像后，脱颈处死小鼠后，我们取其肿瘤组织和 5 个主要器官（心、肝、脾、肺、肾）对其信号进行分析。我们分别采集了上述 6 个离体组织的 PET 成像和 IVIS 自发光成像数据（如下图 30）。

通过 ASIPro VM 及 Living Image V3.0 软件测量，我们分别将 IVIS 自发光测量结果与 PET 成像结果进行了相关性分析。我们共进行了三组相关性分析，分别是“无滤片组与 PET 成像组”，“ $> 590 \text{ nm}$ 组与 PET 成像组”和“ $< 510 \text{ nm}$ 组与 PET 成像组”。通过分析我们发现 $> 590 \text{ nm}$ 组与 PET 成像组在三组中相关性最高，为 $r^2 = 0.9687$ 。无滤片组与 PET 成像组相关性次之，为 $r^2 = 0.9340$ 。这样的结果非常好的印证了我们前期体外研究结果。正是由于自发荧光信号是由 ^{64}Cu 激发，才使得 PET 信号与自发荧光信号成较好的相关性：在 $> 590 \text{ nm}$ 组，由于荧光信号完全来源 ^{64}Cu 的激发，因而与完全来自 ^{64}Cu 的 PET 信号相关性最好；而在无滤片组中，由于 ^{64}Cu CRET 激发 AuNCs 产生的自发荧光信号远高于 ^{64}Cu 本身契伦科夫辐射，因而与 ^{64}Cu 的 PET 信号依旧能保持较好的线性关系。而对于 $< 510 \text{ nm}$ 组来说，如未发生 CRET， ^{64}Cu 的契伦科夫辐射强度应该与 PET 成像信号呈正相关，但是由于部分 ^{64}Cu 的契伦科夫光用于激发了 AuNCs，因而使得 PET 成像信号与 $< 510 \text{ nm}$ 组的相关性仅为 $r^2 = 0.7616$ 。

上面的结果同样也从侧面印证了我们在第二部分的 ^{64}Cu 标记稳定性的研究。如果 ^{64}Cu -doped AuNCs 探针在体内不稳定， ^{64}Cu 从 AuNCs 上发生了解离，那么由于 ^{64}Cu 与 AuNCs 具有完全不同的生物动力学特点，器官的自发荧光信号与 PET 在无滤片组和 $> 590 \text{ nm}$ 组将不会有令人满意的线性关系。同时由于 CRET 现象减弱，在 $< 510 \text{ nm}$ 组的光学信号与 PET 成像的线性关系将更加贴近线性关系（如图 31）。

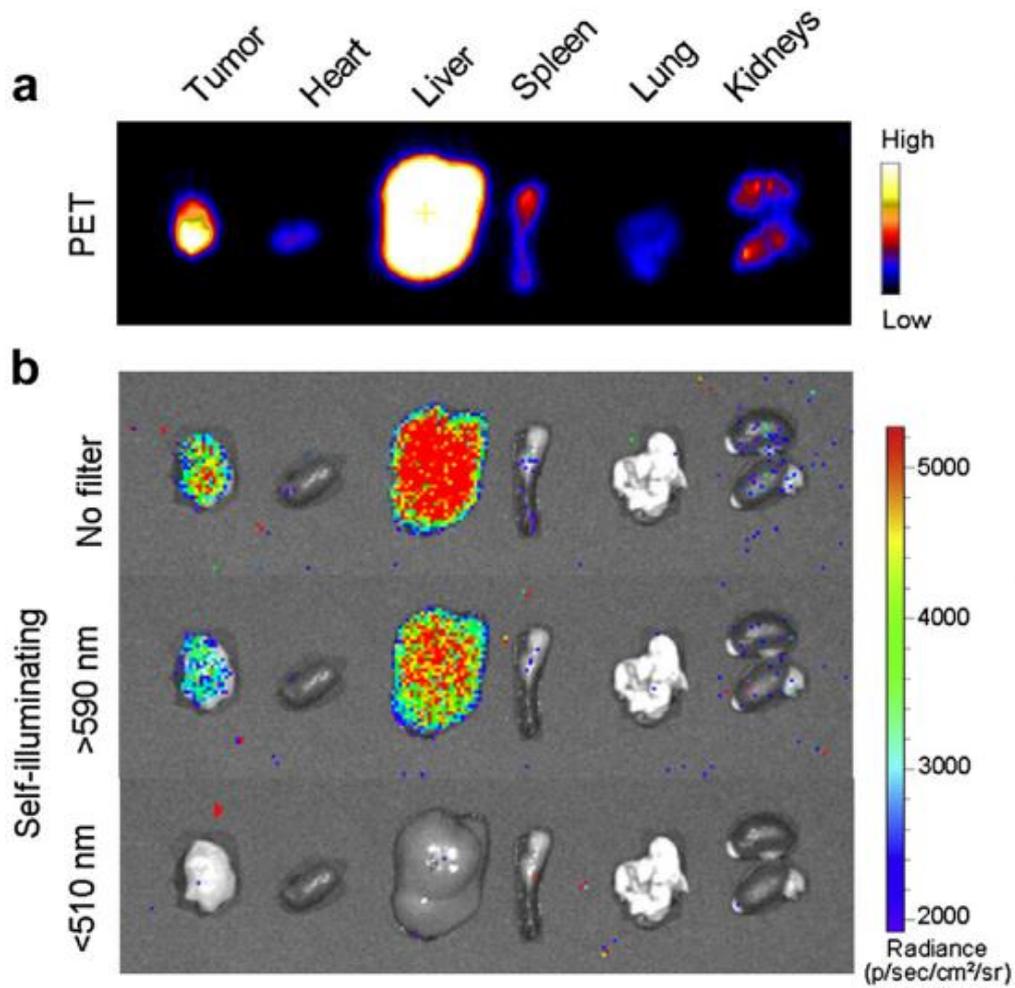


图 30 主要器官离体 PET 成像及自发荧光成像。a、离体器官的 PET 成像；b、离体气管 IVIS 自发荧光成像。自上而下分别是无滤片组、> 590 nm 组与< 510 nm 组；组织从左至右依次为肿瘤、心脏、肝脏、脾脏、肺及双肾。

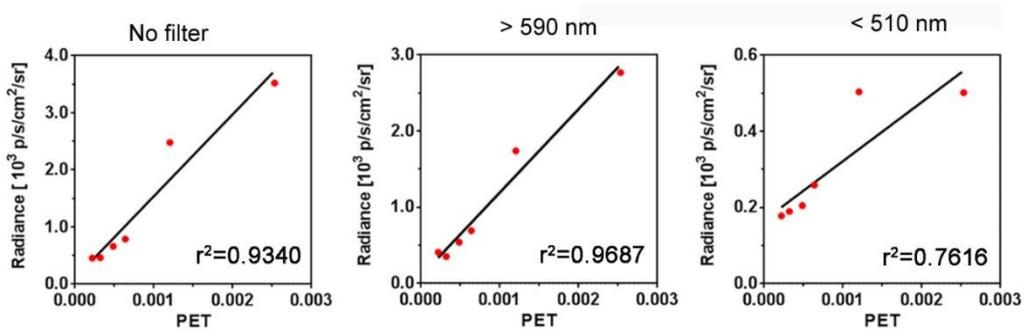


图 31 IVIS 自发荧光信号与 PET 成像结果的相关性分析

以上实验证明了, ^{64}Cu -doped AuNCs 的 PET 成像与自发近红外荧光成像具有良好的线性相关性。同时也表明 ^{64}Cu -doped AuNCs 在体内具有较好的稳定性, ^{64}Cu 标记体内不易发生解离。

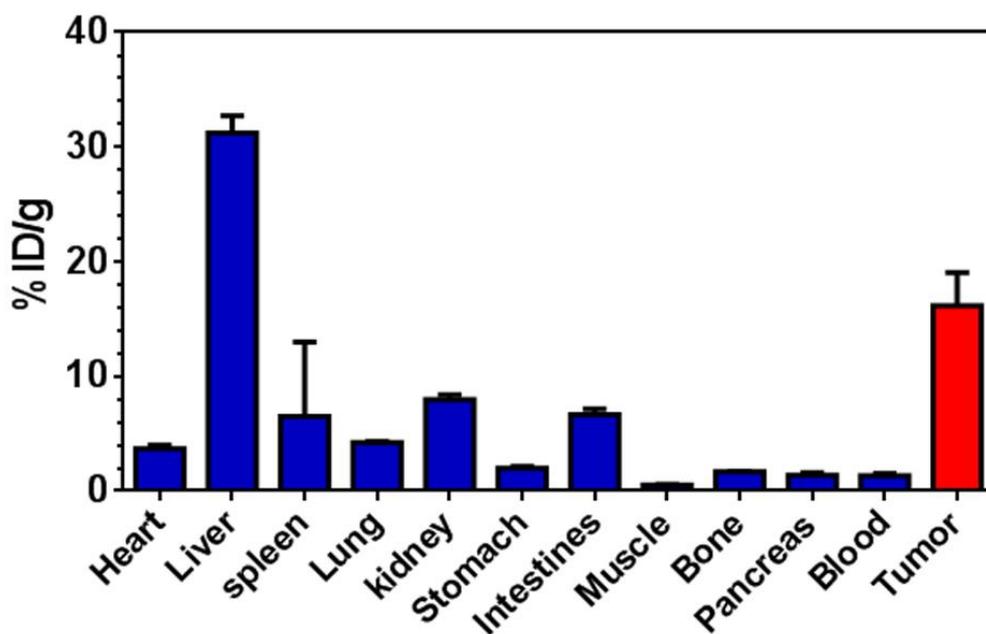


图 32 主要器官 ^{64}Cu -doped AuNCs 的生物分布。

3.4 ^{64}Cu -doped AuNCs 的器官分布

将纳米材料进行放射性标记不仅可使纳米材料具备核素成像能力, 同时简化了对纳米材料在体特征的评价。通过对放射性核素的探测, 使原本需要繁琐步骤的生物学分布、药代动力学等研究变得直观、简单。本研究中, ^{64}Cu 的标记不仅使 AuNCs 实现了 PET 成像和自发近红外成像, 同时通过测量器官中的放射性含量, 我们可以获取 ^{64}Cu -doped AuNCs 的器官分布和体内代谢情况。在 24 小时成像后, 脱颈处死小鼠, 取其心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、肌、骨、胰腺、肿瘤及血液, 并逐一称重、记录。全自动 γ 计数器中测量其每分钟放射计数 (Counts per minutes, CPM), 经全自动 γ 计数器校正后, 计算每克组织中注射放射剂量所占的百分比 (%ID/g)。如图 32, 结果显示肿瘤在 24 小时仍保持较高的放射性 16.1 ± 4.1 %ID/g, 这与 3.2 中 ASIPro VM 软件三维 ROI 测量结果相一致。进一步我们发现肝脏拥有最高放射性, 24 小时

为 $31.2 \pm 2.1 \% \text{ID/g}$, 表明肝脏是其主要的代谢器官之一。这点与我们在小鼠全身 PET 扫描中得到图像一致。肝脏的高信号可能与 AuNCs 的保护基团是 HSA 有关。HSA 是人血清白蛋白, 本身由肝脏合成, 有文献报道使用 HSA 作为靶向试剂成像具有较高的肝脏摄取 [177, 178]。此外, 使用 HSA 同源的 BSA 所制备的 AuNCs, 在荧光成像中也显示出较高的肝脏摄取 [127]。第二位高摄取的器官是肾脏, 为 $8.0 \pm 0.6 \% \text{ID/g}$, 同样与 PET 成像中观察到了肾脏成像相一致, 提示肾脏应该也是 ^{64}Cu -doped AuNCs 的排泄器官。在 Wu 等人报道的 BSA 制备的 AuNCs 研究中, 他们也发现了 AuNCs 通过肾脏排泄的证据, 而 HSA 与 BSA 在结构上相似 [127]。排在第三位的是肠, 这应该是由于肝脏对 ^{64}Cu -doped AuNCs 的排泄所致。而在其他器官如, 心、肺、肌肉、胰腺、骨及血则具有较低的放射性。

3.5 器官毒性研究

在 3.4 器官分布研究中, 我们发现 ^{64}Cu -doped AuNCs 可在肝脏高度富集, 为判断其可能带来的急性器官损伤, 我们分别在 ^{64}Cu -doped AuNCs 注射 1 天及 7 天后, 脱颈处死小鼠, 取其主要器官进行组织学分析。然而, 在各器官的 HE 切片上, 我们并没有发现明显的组织学变化。提示 ^{64}Cu -doped AuNCs 并无明显的急性器官损伤(如图 32)。由于本研究是成像研究, 仅仅需要注射探针一次, 因此 ^{64}Cu -doped AuNCs 的注射剂量少, 体内存在的时间短; 同时 ^{64}Cu -doped AuNCs 尚有 HSA 作为保护基团, 因此并未展现出明显的急性器官损伤与毒性。但值得注意的是, 在 Zhang 等人的研究中[179], 他们采取了隔天注射的方法, 连续注射 BSA@AuNCs(7.55 mg/kg)28 天。在对小鼠肝脏 HE 切片的观察和生化检查后, 他们发现反复多次注射 BSA-AuNCs 可对肝脏和肾脏造成损害。目前虽然没有基于 HSA 制备 AuNCs 长期毒性的报道, 但是对于 ^{64}Cu -doped AuNCs 长期摄入可能造成的肝肾毒性仍需注意。 ^{64}Cu -doped AuNCs 长期摄入对器官的毒性与损伤仍有待于进一步研究。

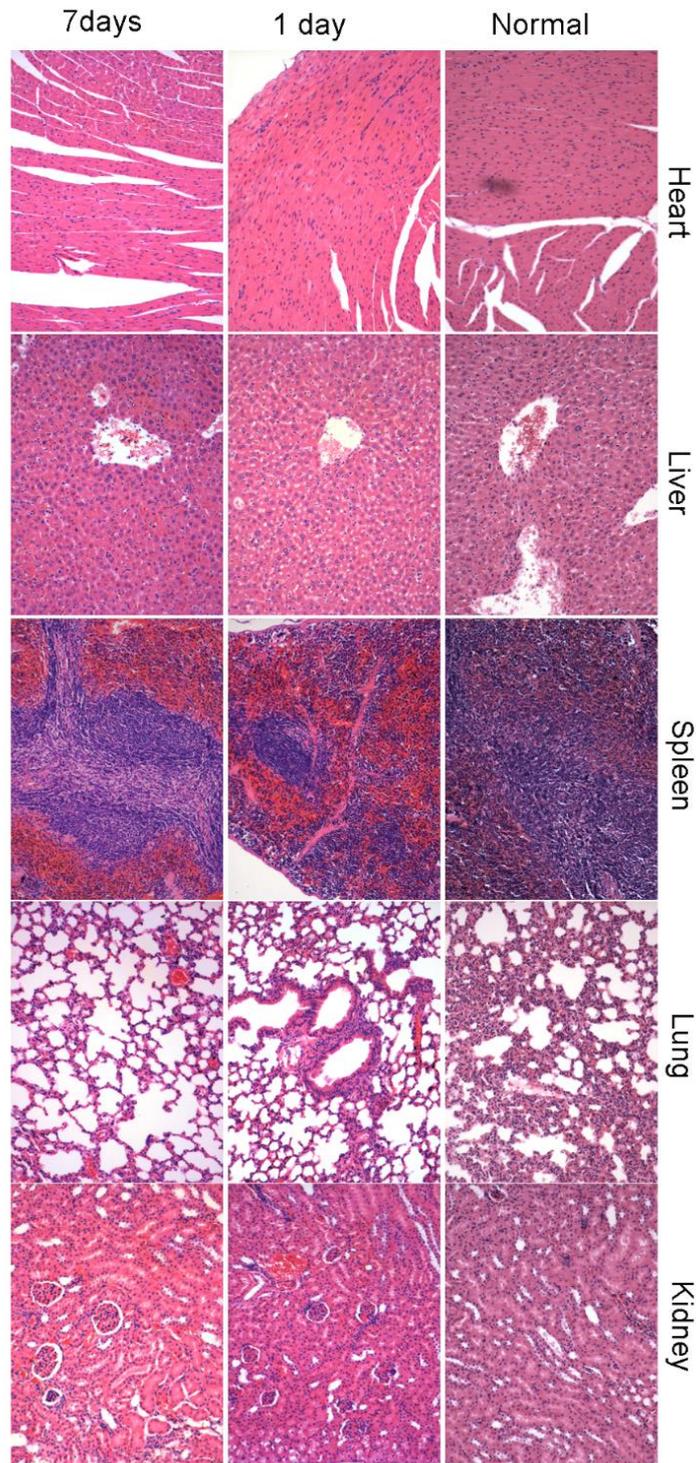


图 32 注射 PBS 与注射 ^{64}Cu -doped AuNCs 1 天和 7 天后，小鼠各主要脏器 HE 切片。

4. 讨论

正常组织的毛细血管结构完整，内皮致密，大分子及脂质不能透过血管壁。而肿瘤血管间隙变宽，结构不完整，血管渗透性大，淋巴回流缺失，造成大分子和脂质的高渗透性和滞留性。这种效应被称为实体瘤的高通透性和滞留效应，即 EPR 效应。EPR 效应首次由 Mastmumura 和 Maedaz 在 1986 发现 [180]，被认为是肿瘤靶向药物及靶向成像探针研发的里程碑事件 [181]。

EPR 效应产生的结构基础是，一方面肿瘤血管结构的不完整，血管内皮间的空隙可大于 100 nm，而正常组织的血管紧密连接大小仅约 2 nm 左右。因此，携带药物或成像功能的纳米材料可顺着血管壁的缺口渗透入肿瘤组织；另一方面肿瘤组织缺少引流大分子的淋巴管，纳米材料在进入肿瘤后不易排除 [182]。在抗肿瘤药物和成像试剂研发上，如果可以充分利用 EPR 效应，其肿瘤靶向能力不仅不会差于，甚至可能好于主动靶向原理（抗体、短肽等介导）设计的药物和成像试剂。脂质体包裹、PEG 修饰的表柔比星 Doxil®就是利用 EPR 效应设计的一类新型抗癌药物。Doxil 具有明显延长的循环时间和增高的肿瘤摄取 [183]。自 1995 年美国食品药品监督管理局（US Food and drug administration, FDA）批准以来，Doxil 在临床治疗多种实体瘤中获得了明显效果，延长了病人的生存期 [184-186]。那么要实现 EPR 效应，所述设计的纳米材料应该满足什么样的条件呢？

影响 EPR 效应的因素有很多，但是分子大小是其中最重要的影响因素之一，这是由于 EPR 效应是一个分子量依赖（molecular weight-dependent）效应 [187]。由于 40 kDa 是肾脏排泄的阈值，当纳米材料或药物的分子量大于 40 kDa 时，将显著增加纳米材料及药物分子的血液循环时间，因此 $t_{1/2}$ 大大增加，体内清除速度减慢，在药代动力学上表现出更高的曲线下面积 AUC（area under the concentration-time curve）。这样纳米材料/分子药物才就有足够的时间慢慢从扩大的血管内皮间进入肿瘤，因此表现出较高的 EPR 效应。同时由于肿瘤血管缺乏引流淋巴管的缘故，40 kDa 的大分子也很难从肿瘤中排除，因而在肿瘤存留的时间也较长，通常需要几天 [180]。⁶⁴Cu-doped AuNCs 是由 HSA 作为保护基团制备而成，不算 Au 的分子量，仅 HSA 分子量的就高达 66.5 kDa 远超过 40 kDa，因而 ⁶⁴Cu-doped AuNCs 表现出了较长的循环时间和不易被肾脏排除的特点。这在 3.3 和 3.4 的实验结果中得到了证实。但并不是只要

具备较大的分子量就一定有较好的 EPR 效应。影响 EPR 好坏的另一个关键因素是生物相容性 [187]。比如, 血浆蛋白都具有较长的, 长达几天的血浆半衰期 (half-time)。如小鼠血浆白蛋白, 其 $t_{1/2}$ 可达 72-96 小时。而经过某些修饰后, 结构被破坏或改变、抑或是造成蛋白变性, 白蛋白的血浆清除率就会非常快。这里还有一个明显的例子就是 α_2 巨球蛋白 (α_2 -Macroglobulin), 单体分子量 170 kDa, 在自然状态下其血浆半衰期约 140 小时。但是当其与 Plasmin 形成聚合体后, 其半衰期就仅有 5 分钟, 会被非常快速的排除体外。在具体实验中, 我们常常将抗体等主动靶向元件接在某些蛋白或纳米材料上, 寄希望利用抗体的靶向性, 增加纳米材料或药物对肿瘤的靶向。孰不知这样的标记反而可能会降低抗体的循环时间, 降低抗体对肿瘤的识别效率。本研究我们所使用的 ^{64}Cu -doped AuNCs, 采用 HSA 作为保护基团, 具有很好的生物相容性。HSA 作为血浆蛋白, 其血浆半衰期近 20 天。特别需要指出的是, 在第一部分 3.5 的试验中, 我们所制备的 Cu-doped AuNCs 与天然 HSA 在 CD 谱上并未发现明显变化。这说明 ^{64}Cu -doped AuNCs 中 HSA 仍最大程度上保持其原有形态。因此, 我们所制备的 ^{64}Cu -doped AuNCs 不仅分子量满足大于 40 kDa 的要求, 同时仍保持了较好的生物相容性, 这也就是我们在本部分动物试验中, 无论在 PET 成像还是自发荧光成像中观察到较高的肿瘤 EPR 摄取的主要原因。

自发荧光成像是近些年成像研究的新热点。自发荧光成像最重要的特点就是不需要额外的激发光, 因而与传统荧光成像相比, 具有明显的成像优势。首先, 自发荧光成像不需要额外的激发光, 这是与传统荧光成像相比最重要的特点。背景荧光、非特异荧光信号常常是影响荧光成像效果的重要因素。自发荧光成像由于不需要激发光, 因而避免了上述背景荧光、非特异荧光对 ROI 荧光信号的干扰, 因而灵敏性更高 [1]。其次, 由于生物组织对光的吸收和散射, 入射激发光在经过人体时不可避免的会发生强度的减弱。而自发荧光成像由于不需要激发光, 因而并不受激发光减弱对成像效果的影响。目前自发荧光成像的研究多基于能量共振转移原理。So 等人报道了基于 BRET 的自发荧光成像。在实验中他们成功将 Luciferase 催化的生物发光作为能量供体激发了 CdSe/ZnS 量子点, 并在能量转化的作用下使得量子点在没有激发光源的条件下实现在体成像 [2]。Zhang 等人则报道了基于 CLRET 原理, 利用鲁米诺被氧化时所发出的蓝光激发 CdSe/ZnS 量子点, 实现深部组织 MPO 的研究 [4]。CRET 是另一个自发荧光成像常用的能量共振转移。CRET 由 Robin S. 等人最先提出, 他们

发现将放射性核素与量子点混合后,可以激发量子点产生荧光 [5]。我们实验室在前期,通过体内研究证实,CRET 的确可以通过激发长波长量子点实现在体成像 [6, 7]。与 BRET 和 CLRET 两种能量共振转移相比,CRET 的发现进一步推动了自发荧光成像由基础向临床的转化。临床中使用的放射性核素,如 ^{131}I 、 ^{18}F 等大多数具备契伦科夫辐射效应,使用目前正在使用的核素作为 CRET 的供体,更容易实现临床转化。因此基于 CRET 的自发荧光成像,将是未来自发荧光成像的主要发展方向。

目前自发荧光成像的能量受体多使用的量子点,然而量子点一般是由 Cd、Pb、As 等重金属材料组成,且其表面修饰也常需要有毒物质,如 CTAB。生物体内应用时重金属粒子元素的不断释放以及有害物质的直接毒性,成为限制量子点临床应用的障碍。本部分研究证明,以 HSA 作为模版合成的金纳米簇,其生物相容性好、低毒,是在体 CRET 自发荧光成像新的候选分子。同时,在体成像数据表明, ^{64}Cu -doped AuNCs 具有较好的 EPR 效应,可被肿瘤组织高摄取。 ^{64}Cu -doped AuNCs 不仅可用于 PET 成像,也可实现高效近红外自发荧光成像,且具有较好的生物安全性,是新型肿瘤多模态成像探针。

小 结

1. 本论文首次使用 HSA 作为模板,成功合成具备 NIR 成像功能的 AuNCs。该 AuNCs 粒径小, 荧光稳定。CD 谱研究表明, 作为 AuNCs 保护基团的 HSA 与天然 HSA 相比构象未发生明显变化, 仍最大程度上保持其原有形态, 使探针模拟了 HSA 优良的在体生物动力学特征;
2. 本论文首次报道了 AuNCs 的快速放射性标记方法。在无螯合剂的条件下, ^{64}Cu 作为探针的直接构成元件, 通过水合肼直接还原于 AuNCs 表面。该方法标记率高, 稳定性好, ITLC 显示 ^{64}Cu 几乎全部被标记;
3. 本论文首次报道了放射性核素和 AuNCs 间可发生 CRET, 并可实现自发荧光成像。所制备的多模态探针 ^{64}Cu -doped AuNCs 较 ^{64}Cu 契伦科夫辐射在近红外区信号有较大提高, 同时还兼具 PET 成像的功能;
4. 在体成像结果表明, ^{64}Cu -doped AuNCs 生物安全性好, 可被肿瘤组织高摄取, 具有较好的在体 PET 成像及自发 NIR 荧光成像效果。 ^{64}Cu -doped AuNCs 是一款新型肿瘤多模态成像探针, 具有广阔的应用前景。

参考文献

1. Frangioni JV: Self-illuminating quantum dots light the way. *Nat Biotechnol* 2006, 24(3):326-328.
2. So MK, Xu C, Loening AM, Gambhir SS, Rao J: Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 2006, 24(3):339-343.
3. Wu Q, Chu M: Self-illuminating quantum dots for highly sensitive in vivo real-time luminescent mapping of sentinel lymph nodes. (vol 7, pg 3443, 2012). *Int J Nanomed* 2012, 7:4531-4531.
4. Zhang N, Francis KP, Prakash A, Ansaldi D: Enhanced detection of myeloperoxidase activity in deep tissues through luminescent excitation of near-infrared nanoparticles. *Nat Med* 2013, 19(4):500-505.
5. Dothager RS, Goiffon RJ, Jackson E, Harpstrite S, Piwnica-Worms D: Cerenkov radiation energy transfer (CRET) imaging: a novel method for optical imaging of PET isotopes in biological systems. *PloS one* 2010, 5(10):e13300.
6. Guo W, Sun X, Jacobson O, Yan X, Min K, Srivatsan A, Niu G, Kiesewetter DO, Chang J, Chen X: Intrinsically radioactive [⁶⁴Cu]CuInS/ZnS quantum dots for PET and optical imaging: improved radiochemical stability and controllable Cerenkov luminescence. *ACS nano* 2015, 9(1):488-495.
7. Sun X, Huang X, Guo J, Zhu W, Ding Y, Niu G, Wang A, Kiesewetter DO, Wang ZL, Sun S *et al*: Self-illuminating ⁶⁴Cu-doped CdSe/ZnS nanocrystals for in vivo tumor imaging. *Journal of the American Chemical Society* 2014, 136(5):1706-1709.
8. Hardman R: A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Persp* 2006, 114(2):165-172.
9. Huang P, Bao L, Yang D, Gao G, Lin J, Li Z, Zhang C, Cui D: Protein-directed

- solution-phase green synthesis of BSA-conjugated M(x)Se(y) (M = Ag, Cd, Pb, Cu) nanomaterials. *Chemistry, an Asian journal* 2011, 6(5):1156-1162.
10. Huang P, Li Z, Lin J, Yang D, Gao G, Xu C, Bao L, Zhang C, Wang K, Song H *et al*: Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for in vivo simultaneous magnetofluorescent imaging and targeting therapy. *Biomaterials* 2011, 32(13):3447-3458.
 11. Huang P, Lin J, Wang X, Wang Z, Zhang C, He M, Wang K, Chen F, Li Z, Shen G *et al*: Light-triggered theranostics based on photosensitizer-conjugated carbon dots for simultaneous enhanced-fluorescence imaging and photodynamic therapy. *Advanced materials* 2012, 24(37):5104-5110.
 12. Zheng J, Nicovich PR, Dickson RM: Highly fluorescent noble-metal quantum dots. *Annu Rev Phys Chem* 2007, 58:409-431.
 13. Xie J, Zheng Y, Ying JY: Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society* 2009, 131(3):888-889.
 14. Li M, Yang DP, Wang X, Lu J, Cui D: Mixed protein-templated luminescent metal clusters (Au and Pt) for H₂O₂ sensing. *Nanoscale Res Lett* 2013, 8(1):182.
 15. Luo Z, Zheng K, Xie J: Engineering ultrasmall water-soluble gold and silver nanoclusters for biomedical applications. *Chem Commun (Camb)* 2014, 50(40):5143-5155.
 16. Zhang XD, Chen J, Luo Z, Wu D, Shen X, Song SS, Sun YM, Liu PX, Zhao J, Huo S *et al*: Enhanced tumor accumulation of sub-2 nm gold nanoclusters for cancer radiation therapy. *Adv Healthc Mater* 2014, 3(1):133-141.
 17. Lin J, Zhou Z, Li Z, Zhang C, Wang X, Wang K, Gao G, Huang P, Cui D: Biomimetic one-pot synthesis of gold nanoclusters/nanoparticles for targeted tumor cellular dual-modality imaging. *Nanoscale Res Lett* 2013, 8(1):170.
 18. Huang P, Lin J, Wang S, Zhou Z, Li Z, Wang Z, Zhang C, Yue X, Niu G, Yang M *et al*: Photosensitizer-conjugated silica-coated gold nanoclusters for fluorescence imaging-guided photodynamic therapy. *Biomaterials* 2013, 34(19):4643-4654.
 19. Zhang C, Zhou Z, Qian Q, Gao G, Li C, Feng L, Wang Q, Cui D: Glutathione-capped

- fluorescent gold nanoclusters for dual-modal fluorescence/X-ray computed tomography imaging. *Journal of Materials Chemistry B* 2013, 1(38):5045-5053.
20. Xavier PL, Chaudhari K, Baksi A, Pradeep T: Protein-protected luminescent noble metal quantum clusters: an emerging trend in atomic cluster nanoscience. *Nano Rev* 2012, 3.
 21. Retnakumari A, Setua S, Menon D, Ravindran P, Muhammed H, Pradeep T, Nair S, Koyakutty M: Molecular-receptor-specific, non-toxic, near-infrared-emitting Au cluster-protein nanoconjugates for targeted cancer imaging. *Nanotechnology* 2010, 21(5).
 22. Wang YL, Chen JJ, Irudayaraj J: Nuclear Targeting Dynamics of Gold Nanoclusters for Enhanced Therapy of HER2(+) Breast Cancer. *ACS nano* 2011, 5(12):9718-9725.
 23. Piert M, Carey J, Clinthorne N: Probe-guided localization of cancer deposits using [18F]fluorodeoxyglucose. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine* 2008, 52(1):37-49.
 24. Weissleder R: Molecular imaging in cancer. *Science* 2006, 312(5777):1168-1171.
 25. Weissleder R, Mahmood U: Molecular Imaging. *Radiology* 2001, 219(2):316-333.
 26. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G, Hartwell L: The case for early detection. *Nature reviews Cancer* 2003, 3(4):243-252.
 27. Massoud TF, Gambhir SS: Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & development* 2003, 17(5):545-580.
 28. Grimm J, Kirsch DG, Windsor SD, Kim CF, Santiago PM, Ntziachristos V, Jacks T, Weissleder R: Use of gene expression profiling to direct in vivo molecular imaging of lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102(40):14404-14409.
 29. Harisinghani MG, Barentsz J, Hahn PF, Deserno WM, Tabatabaei S, van de Kaa CH, de la Rosette J, Weissleder R: Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *The New England journal of medicine* 2003,

- 348(25):2491-2499.
30. Mullard A: \$215 million precision-medicine initiative takes shape. *Nature reviews Drug discovery* 2015, 14(3):155.
 31. Collins FS, Varmus H: A new initiative on precision medicine. *The New England journal of medicine* 2015, 372(9):793-795.
 32. Avril N, Sassen S, Schmalfeldt B, Naehrig J, Rutke S, Weber WA, Werner M, Graeff H, Schwaiger M, Kuhn W: Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy by sequential F-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with advanced-stage ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005, 23(30):7445-7453.
 33. Rudin M, Weissleder R: Molecular imaging in drug discovery and development. *Nature reviews Drug discovery* 2003, 2(2):123-131.
 34. Weissleder R, Ntziachristos V: Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med* 2003, 9(1):123-128.
 35. Gross S, Piwnica-Worms D: Spying on cancer: molecular imaging in vivo with genetically encoded reporters. *Cancer cell* 2005, 7(1):5-15.
 36. Herschman HR: Molecular imaging: looking at problems, seeing solutions. *Science* 2003, 302(5645):605-608.
 37. Contag PR: Whole-animal cellular and molecular imaging to accelerate drug development. *Drug discovery today* 2002, 7(10):555-562.
 38. Wu KD, Cho YS, Katz J, Ponomarev V, Chen-Kiang S, Danishefsky SJ, Moore MA: Investigation of antitumor effects of synthetic epothilone analogs in human myeloma models in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102(30):10640-10645.
 39. Lappin G, Garner RC: Big physics, small doses: the use of AMS and PET in human microdosing of development drugs. *Nature reviews Drug discovery* 2003, 2(3):233-240.
 40. Saleem A, Harte RJ, Matthews JC, Osman S, Brady F, Luthra SK, Brown GD, Bleehen N, Connors T, Jones T *et al*: Pharmacokinetic evaluation of N-[2-

- (dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide in patients by positron emission tomography. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001, 19(5):1421-1429.
41. Propper DJ, de Bono J, Saleem A, Ellard S, Flanagan E, Paul J, Ganesan TS, Talbot DC, Aboagye EO, Price P *et al*: Use of positron emission tomography in pharmacokinetic studies to investigate therapeutic advantage in a phase I study of 120-hour intravenous infusion XR5000. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003, 21(2):203-210.
 42. Weissleder R, Pittet MJ: Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 2008, 452(7187):580-589.
 43. Culver J, Akers W, Achilefu S: Multimodality molecular imaging with combined optical and SPECT/PET modalities. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2008, 49(2):169-172.
 44. Lang TF, Hasegawa BH, Liew SC, Brown JK, Blankespoor SC, Reilly SM, Gingold EL, Cann CE: Description of a prototype emission-transmission computed tomography imaging system. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 1992, 33(10):1881-1887.
 45. Zaidi H, Prasad R: Advances in multimodality molecular imaging. *Journal of medical physics / Association of Medical Physicists of India* 2009, 34(3):122-128.
 46. Tian J, Bai J, Yan XP, Bao S, Li Y, Liang W, Yang X: Multimodality molecular imaging. *IEEE engineering in medicine and biology magazine : the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society* 2008, 27(5):48-57.
 47. Janib SM, Moses AS, MacKay JA: Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews* 2010, 62(11):1052-1063.
 48. Jennings LE, Long NJ: 'Two is better than one'--probes for dual-modality molecular imaging. *Chem Commun (Camb)* 2009(24):3511-3524.
 49. Iagaru A, Peterson D, Quon A, Dutta S, Twist C, Daghighian F, Gambhir SS, Albanese C: 123I MIBG mapping with intraoperative gamma probe for recurrent neuroblastoma. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of*

- the Academy of Molecular Imaging* 2008, 10(1):19-23.
50. Casara D, Rubello D, Pelizzo MR, Shapiro B: Clinical role of $^{99m}\text{TcO}_4/\text{MIBI}$ scan, ultrasound and intra-operative gamma probe in the performance of unilateral and minimally invasive surgery in primary hyperparathyroidism. *European journal of nuclear medicine* 2001, 28(9):1351-1359.
51. Seibold U, Wangler B, Schirmacher R, Wangler C: Bimodal imaging probes for combined PET and OI: recent developments and future directions for hybrid agent development. *BioMed research international* 2014, 2014:153741.
52. Bremer C, Ntziachristos V, Weissleder R: Optical-based molecular imaging: contrast agents and potential medical applications. *European radiology* 2003, 13(2):231-243.
53. Vu NT, Silverman RW, Chatziioannou AF: Preliminary performance of optical PET (OPET) detectors for the detection of visible light photons. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 2006, 569(2):563-566.
54. Cai W, Chen K, Li ZB, Gambhir SS, Chen X: Dual-function probe for PET and near-infrared fluorescence imaging of tumor vasculature. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2007, 48(11):1862-1870.
55. Chen K, Li ZB, Wang H, Cai W, Chen X: Dual-modality optical and positron emission tomography imaging of vascular endothelial growth factor receptor on tumor vasculature using quantum dots. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2008, 35(12):2235-2244.
56. Sampath L, Kwon S, Hall MA, Price RE, Sevick-Muraca EM: Detection of Cancer Metastases with a Dual-labeled Near-Infrared/Positron Emission Tomography Imaging Agent. *Translational oncology* 2010, 3(5):307-217.
57. Kimura RH, Miao Z, Cheng Z, Gambhir SS, Cochran JR: A dual-labeled knottin peptide for PET and near-infrared fluorescence imaging of integrin expression in living subjects. *Bioconjugate chemistry* 2010, 21(3):436-444.
58. Ogawa M, Regino CA, Seidel J, Green MV, Xi W, Williams M, Kosaka N, Choyke PL, Kobayashi H: Dual-modality molecular imaging using antibodies labeled with

- activatable fluorescence and a radionuclide for specific and quantitative targeted cancer detection. *Bioconjugate chemistry* 2009, 20(11):2177-2184.
59. van den Berg NS, Brouwer OR, Schaafsma BE, Matheron HM, Klop WM, Balm AJ, van Tinteren H, Nieweg OE, van Leeuwen FW, Valdes Olmos RA: Multimodal Surgical Guidance during Sentinel Node Biopsy for Melanoma: Combined Gamma Tracing and Fluorescence Imaging of the Sentinel Node through Use of the Hybrid Tracer Indocyanine Green-Tc-Nanocolloid. *Radiology* 2014:140322.
60. Pandey SK, Kaur J, Easwaramoorthy B, Shah A, Coleman R, Mukherjee J: Multimodality imaging probe for positron emission tomography and fluorescence imaging studies. *Molecular imaging* 2014, 13(3):1-7.
61. Ashokan A, Gowd GS, Somasundaram VH, Bhupathi A, Peethambaran R, Unni AK, Palaniswamy S, Nair SV, Koyakutty M: Multifunctional calcium phosphate nano-contrast agent for combined nuclear, magnetic and near-infrared in vivo imaging. *Biomaterials* 2013, 34(29):7143-7157.
62. Ghosh SC, Ghosh P, Wilganowski N, Robinson H, Hall MA, Dickinson G, Pinkston KL, Harvey BR, Sevick-Muraca EM, Azhdarinia A: Multimodal chelation platform for near-infrared fluorescence/nuclear imaging. *Journal of medicinal chemistry* 2013, 56(2):406-416.
63. Robertson R, Germanos MS, Manfredi MG, Smith PG, Silva MD: Multimodal imaging with (18)F-FDG PET and Cerenkov luminescence imaging after MLN4924 treatment in a human lymphoma xenograft model. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2011, 52(11):1764-1769.
64. Joshi BP, Wang TD: Exogenous Molecular Probes for Targeted Imaging in Cancer: Focus on Multi-modal Imaging. *Cancers* 2010, 2(2):1251-1287.
65. Rice BW, Contag CH: The importance of being red. *Nat Biotechnol* 2009, 27(7):624-625.
66. Zhang Z, Liang K, Bloch S, Berezin M, Achilefu S: Monomolecular multimodal fluorescence-radioisotope imaging agents. *Bioconjugate chemistry* 2005, 16(5):1232-1239.

67. Sampath L, Kwon S, Ke S, Wang W, Schiff R, Mawad ME, Sevick-Muraca EM: Dual-labeled trastuzumab-based imaging agent for the detection of human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in breast cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2007, 48(9):1501-1510.
68. Sampath L, Wang W, Sevick-Muraca EM: Near infrared fluorescent optical imaging for nodal staging. *Journal of biomedical optics* 2008, 13(4):041312.
69. Houston JP, Ke S, Wang W, Li C, Sevick-Muraca EM: Quality analysis of in vivo near-infrared fluorescence and conventional gamma images acquired using a dual-labeled tumor-targeting probe. *Journal of biomedical optics* 2005, 10(5):054010.
70. Li C, Wang W, Wu Q, Ke S, Houston J, Sevick-Muraca E, Dong L, Chow D, Charnsangavej C, Gelovani JG: Dual optical and nuclear imaging in human melanoma xenografts using a single targeted imaging probe. *Nuclear medicine and biology* 2006, 33(3):349-358.
71. Wang W, Ke S, Kwon S, Yallampalli S, Cameron AG, Adams KE, Mawad ME, Sevick-Muraca EM: A new optical and nuclear dual-labeled imaging agent targeting interleukin 11 receptor alpha-chain. *Bioconjugate chemistry* 2007, 18(2):397-402.
72. Edwards WB, Akers WJ, Ye Y, Cheney PP, Bloch S, Xu B, Laforest R, Achilefu S: Multimodal imaging of integrin receptor-positive tumors by bioluminescence, fluorescence, gamma scintigraphy, and single-photon emission computed tomography using a cyclic RGD peptide labeled with a near-infrared fluorescent dye and a radionuclide. *Molecular imaging* 2009, 8(2):101-110.
73. Kuil J, Buckle T, Oldenburg J, Yuan H, Borowsky AD, Josephson L, van Leeuwen FW: Hybrid peptide dendrimers for imaging of chemokine receptor 4 (CXCR4) expression. *Molecular pharmaceutics* 2011, 8(6):2444-2453.
74. Kuil J, Buckle T, Yuan H, van den Berg NS, Oishi S, Fujii N, Josephson L, van Leeuwen FW: Synthesis and evaluation of a bimodal CXCR4 antagonistic peptide. *Bioconjugate chemistry* 2011, 22(5):859-864.
75. Boswell CA, Eck PK, Regino CA, Bernardo M, Wong KJ, Milenic DE, Choyke PL,

- Brechbiel MW: Synthesis, characterization, and biological evaluation of integrin alphavbeta3-targeted PAMAM dendrimers. *Molecular pharmaceutics* 2008, 5(4):527-539.
76. Vera DR, Hall DJ, Hoh CK, Gallant P, McIntosh LM, Mattrey RF: Cy5.5-DTPA-galactosyl-dextran: a fluorescent probe for in vivo measurement of receptor biochemistry. *Nuclear medicine and biology* 2005, 32(7):687-693.
77. Mitchell N, Kalber TL, Cooper MS, Sunassee K, Chalker SL, Shaw KP, Ordidge KL, Badar A, Janes SM, Blower PJ *et al*: Incorporation of paramagnetic, fluorescent and PET/SPECT contrast agents into liposomes for multimodal imaging. *Biomaterials* 2013, 34(4):1179-1192.
78. Yang Z, Zheng S, Harrison WJ, Harder J, Wen X, Gelovani JG, Qiao A, Li C: Long-circulating near-infrared fluorescence core-cross-linked polymeric micelles: synthesis, characterization, and dual nuclear/optical imaging. *Biomacromolecules* 2007, 8(11):3422-3428.
79. Frangioni JV: In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Current opinion in chemical biology* 2003, 7(5):626-634.
80. Hilderbrand SA, Weissleder R: Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Current opinion in chemical biology* 2010, 14(1):71-79.
81. Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK: Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clinical radiology* 2010, 65(7):500-516.
82. Pandey SK, Gryshuk AL, Sajjad M, Zheng X, Chen Y, Abouzeid MM, Morgan J, Charamisinau I, Nabi HA, Oseroff A *et al*: Multimodality agents for tumor imaging (PET, fluorescence) and photodynamic therapy. A possible "see and treat" approach. *Journal of medicinal chemistry* 2005, 48(20):6286-6295.
83. Ranyuk E, Lebel R, Berube-Lauziere Y, Klarskov K, Lecomte R, van Lier JE, Guerin B: (68)Ga/DOTA- and (64)Cu/NOTA-phthalocyanine conjugates as fluorescent/PET bimodal imaging probes. *Bioconjugate chemistry* 2013, 24(9):1624-1633.
84. Ranyuk ER, Cauchon N, Ali H, Lecomte R, Guerin B, van Lier JE: PET imaging

- using ^{64}Cu -labeled sulfophthalocyanines: synthesis and biodistribution. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2011, 21(24):7470-7473.
85. Xu H, Baidoo K, Gunn AJ, Boswell CA, Milenic DE, Choyke PL, Brechbiel MW: Design, synthesis, and characterization of a dual modality positron emission tomography and fluorescence imaging agent for monoclonal antibody tumor-targeted imaging. *Journal of medicinal chemistry* 2007, 50(19):4759-4765.
 86. Hendricks JA, Keliher EJ, Wan D, Hilderbrand SA, Weissleder R, Mazitschek R: Synthesis of ^{18}F BODIPY: bifunctional reporter for hybrid optical/positron emission tomography imaging. *Angewandte Chemie* 2012, 51(19):4603-4606.
 87. Low PS, Henne WA, Doorneweerd DD: Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Accounts of chemical research* 2008, 41(1):120-129.
 88. van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, Sarantopoulos A, de Jong JS, Arts HJ, van der Zee AG *et al*: Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results. *Nat Med* 2011, 17(10):1315-1319.
 89. Liu TW, Stewart JM, Macdonald TD, Chen J, Clarke B, Shi J, Wilson BC, Neel BG, Zheng G: Biologically-targeted detection of primary and micro-metastatic ovarian cancer. *Theranostics* 2013, 3(6):420-427.
 90. Edwards WB, Xu B, Akers W, Cheney PP, Liang K, Rogers BE, Anderson CJ, Achilefu S: Agonist-antagonist dilemma in molecular imaging: evaluation of a monomolecular multimodal imaging agent for the somatostatin receptor. *Bioconjugate chemistry* 2008, 19(1):192-200.
 91. Jeschke B, Meyer J, Jonczyk A, Kessler H, Adamietz P, Meenen NM, Kantlehner M, Goepfert C, Nies B: RGD-peptides for tissue engineering of articular cartilage. *Biomaterials* 2002, 23(16):3455-3463.
 92. Hu Z, Arrowsmith RL, Tyson JA, Mirabello V, Ge H, Eggleston IM, Botchway SW, Dan Pantos G, Pascu SI: A fluorescent Arg-Gly-Asp (RGD) peptide-naphthalenediimide (NDI) conjugate for imaging integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ in vitro.

- Chem Commun (Camb)* 2015, 51(32):6901-6904.
93. Knetsch PA, Zhai C, Rangger C, Blatzer M, Haas H, Kaeopookum P, Haubner R, Decristoforo C: [(68)Ga]FSC-(RGD)₃ a trimeric RGD peptide for imaging alphavbeta3 integrin expression based on a novel siderophore derived chelating scaffold-synthesis and evaluation. *Nuclear medicine and biology* 2015, 42(2):115-122.
 94. Ji S, Czerwinski A, Zhou Y, Shao G, Valenzuela F, Sowinski P, Chauhan S, Pennington M, Liu S: (99m)Tc-Galacto-RGD₂: a novel 99mTc-labeled cyclic RGD peptide dimer useful for tumor imaging. *Molecular pharmaceutics* 2013, 10(9):3304-3314.
 95. Zhu L, Guo N, Li Q, Ma Y, Jacobson O, Lee S, Choi HS, Mansfield JR, Niu G, Chen X: Dynamic PET and Optical Imaging and Compartment Modeling using a Dual-labeled Cyclic RGD Peptide Probe. *Theranostics* 2012, 2(8):746-756.
 96. Yoshimoto M, Ogawa K, Washiyama K, Shikano N, Mori H, Amano R, Kawai K: alpha(v)beta(3) Integrin-targeting radionuclide therapy and imaging with monomeric RGD peptide. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2008, 123(3):709-715.
 97. Liu S, Li D, Huang CW, Yap LP, Park R, Shan H, Li Z, Conti PS: Efficient construction of PET/fluorescence probe based on sarcophagine cage: an opportunity to integrate diagnosis with treatment. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 2012, 14(6):718-724.
 98. Paudyal P, Paudyal B, Iida Y, Oriuchi N, Hanaoka H, Tominaga H, Ishikita T, Yoshioka H, Higuchi T, Endo K: Dual functional molecular imaging probe targeting CD20 with PET and optical imaging. *Oncology reports* 2009, 22(1):115-119.
 99. Zhang Y, Hong H, Severin GW, Engle JW, Yang Y, Goel S, Nathanson AJ, Liu G, Nickles RJ, Leigh BR *et al*: ImmunoPET and near-infrared fluorescence imaging of CD105 expression using a monoclonal antibody dual-labeled with (89)Zr and IRDye 800CW. *American journal of translational research* 2012, 4(3):333-346.
 100. Cohen R, Stammes MA, de Roos IH, Stigter-van Walsum M, Visser GW, van

- Dongen GA: Inert coupling of IRDye800CW to monoclonal antibodies for clinical optical imaging of tumor targets. *EJNMMI research* 2011, 1(1):31.
101. Hall MA, Pinkston KL, Wilganowski N, Robinson H, Ghosh P, Azhdarinia A, Vazquez-Arreguin K, Kolonin AM, Harvey BR, Sevick-Muraca EM: Comparison of mAbs targeting epithelial cell adhesion molecule for the detection of prostate cancer lymph node metastases with multimodal contrast agents: quantitative small-animal PET/CT and NIRF. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2012, 53(9):1427-1437.
102. Key J, Leary JF: Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine. *Int J Nanomedicine* 2014, 9:711-726.
103. Rosenblum LT, Kosaka N, Mitsunaga M, Choyke PL, Kobayashi H: In vivo molecular imaging using nanomaterials: general in vivo characteristics of nano-sized reagents and applications for cancer diagnosis. *Molecular membrane biology* 2010, 27(7):274-285.
104. Cai W, Chen X: Nanoplatfoms for targeted molecular imaging in living subjects. *Small* 2007, 3(11):1840-1854.
105. Xie J, Lee S, Chen X: Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced drug delivery reviews* 2010, 62(11):1064-1079.
106. Lin X, Xie J, Niu G, Zhang F, Gao H, Yang M, Quan Q, Aronova MA, Zhang G, Lee S *et al*: Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging. *Nano letters* 2011, 11(2):814-819.
107. Li S, Goins B, Zhang L, Bao A: Novel multifunctional theranostic liposome drug delivery system: construction, characterization, and multimodality MR, near-infrared fluorescent, and nuclear imaging. *Bioconjugate chemistry* 2012, 23(6):1322-1332.
108. Ruggiero A, Villa CH, Bander E, Rey DA, Bergkvist M, Batt CA, Manova-Todorova K, Deen WM, Scheinberg DA, McDevitt MR: Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, 107(27):12369-12374.

109. Stelter L, Pinkernelle JG, Michel R, Schwartlander R, Raschzok N, Morgul MH, Koch M, Denecke T, Ruf J, Baumler H *et al*: Modification of aminosilanzed superparamagnetic nanoparticles: feasibility of multimodal detection using 3T MRI, small animal PET, and fluorescence imaging. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 2010, 12(1):25-34.
110. Nahrendorf M, Zhang H, Hembrador S, Panizzi P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Swirski FK, Weissleder R: Nanoparticle PET-CT imaging of macrophages in inflammatory atherosclerosis. *Circulation* 2008, 117(3):379-387.
111. Hwang do W, Ko HY, Kim SK, Kim D, Lee DS, Kim S: Development of a quadruple imaging modality by using nanoparticles. *Chemistry* 2009, 15(37):9387-9393.
112. Xie J, Chen K, Huang J, Lee S, Wang J, Gao J, Li X, Chen X: PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 2010, 31(11):3016-3022.
113. Bradbury MS, Phillips E, Montero PH, Cheal SM, Stambuk H, Durack JC, Sofocleous CT, Meester RJ, Wiesner U, Patel S: Clinically-translated silica nanoparticles as dual-modality cancer-targeted probes for image-guided surgery and interventions. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 2013, 5(1):74-86.
114. Liu Q, Chen M, Sun Y, Chen G, Yang T, Gao Y, Zhang X, Li F: Multifunctional rare-earth self-assembled nanosystem for tri-modal upconversion luminescence /fluorescence /positron emission tomography imaging. *Biomaterials* 2011, 32(32):8243-8253.
115. Zhou J, Yu M, Sun Y, Zhang X, Zhu X, Wu Z, Wu D, Li F: Fluorine-18-labeled Gd³⁺/Yb³⁺/Er³⁺ co-doped NaYF₄ nanophosphors for multimodality PET/MR/UCL imaging. *Biomaterials* 2011, 32(4):1148-1156.
116. Duconge F, Pons T, Pestourie C, Herin L, Theze B, Gombert K, Mahler B, Hinnen F, Kuhnast B, Dolle F *et al*: Fluorine-18-labeled phospholipid quantum dot micelles for in vivo multimodal imaging from whole body to cellular scales. *Bioconjugate chemistry* 2008, 19(9):1921-1926.
117. Schipper ML, Cheng Z, Lee SW, Bentolila LA, Iyer G, Rao J, Chen X, Wu AM,

- Weiss S, Gambhir SS: microPET-based biodistribution of quantum dots in living mice. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2007, 48(9):1511-1518.
118. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S: Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 2005, 307(5709):538-544.
119. Medintz IL, Mattoussi H, Clapp AR: Potential clinical applications of quantum dots. *Int J Nanomedicine* 2008, 3(2):151-167.
120. Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y: New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chemical reviews* 2010, 110(5):2620-2640.
121. Ogawa M, Kosaka N, Choyke PL, Kobayashi H: In vivo molecular imaging of cancer with a quenching near-infrared fluorescent probe using conjugates of monoclonal antibodies and indocyanine green. *Cancer research* 2009, 69(4):1268-1272.
122. Luo S, Zhang E, Su Y, Cheng T, Shi C: A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials* 2011, 32(29):7127-7138.
123. Chen LY, Wang CW, Yuan Z, Chang HT: Fluorescent gold nanoclusters: recent advances in sensing and imaging. *Analytical chemistry* 2015, 87(1):216-229.
124. Wu Z, Jin R: On the ligand's role in the fluorescence of gold nanoclusters. *Nano letters* 2010, 10(7):2568-2573.
125. Chen S, Ingram RS, Hostetler MJ, Pietron JJ, Murray RW, Schaaff TG, Khoury JT, Alvarez MM, Whetten RL: Gold nanoelectrodes of varied size: transition to molecule-like charging. *Science* 1998, 280(5372):2098-2101.
126. Qu X, Li Y, Li L, Wang Y, Liang J, Liang J: Fluorescent Gold Nanoclusters: Synthesis and Recent Biological Application. *Journal of Nanomaterials*.
127. Wu X, He X, Wang K, Xie C, Zhou B, Qing Z: Ultrasmall near-infrared gold nanoclusters for tumor fluorescence imaging in vivo. *Nanoscale* 2010, 2(10):2244-2249.

128. Lin CAJ, Lee CH, Hsieh JT, Wang HH, Li JK, Shen JL, Chan WH, Yeh HI, Chang WH: Synthesis of Fluorescent Metallic Nanoclusters toward Biomedical Application: Recent Progress and Present Challenges. *J Med Biol Eng* 2009, 29(6):276-283.
129. Shiang Y-C, Huang C-C, Chen W-Y, Chen P-C, Chang H-T: Fluorescent gold and silver nanoclusters for the analysis of biopolymers and cell imaging. *Journal of Materials Chemistry* 2012, 22(26):12972-12982.
130. Liu H, Wu X, Zhang X, Burda C, Zhu J-J: Gold Nanoclusters as Signal Amplification Labels for Optical Immunosensors. *The Journal of Physical Chemistry C* 2012, 116(3):2548-2554.
131. Xie J, Zheng Y, Ying JY: Highly selective and ultrasensitive detection of Hg(2+) based on fluorescence quenching of Au nanoclusters by Hg(2+)-Au(+) interactions. *Chem Commun (Camb)* 2010, 46(6):961-963.
132. Zhang H, Liu Q, Wang T, Yun Z, Li G, Liu J, Jiang G: Facile preparation of glutathione-stabilized gold nanoclusters for selective determination of chromium (III) and chromium (VI) in environmental water samples. *Analytica chimica acta* 2013, 770:140-146.
133. Deng HH, Zhang LN, He SB, Liu AL, Li GW, Lin XH, Xia XH, Chen W: Methionine-directed fabrication of gold nanoclusters with yellow fluorescent emission for Cu sensing. *Biosensors & bioelectronics* 2014, 65C:397-403.
134. Kawasaki H, Hamaguchi K, Osaka I, Arakawa R: pH-Dependent Synthesis of Pepsin-Mediated Gold Nanoclusters with Blue Green and Red Fluorescent Emission. *Advanced Functional Materials* 2011, 21(18):3508-3515.
135. Wen F, Dong Y, Feng L, Wang S, Zhang S, Zhang X: Horseradish peroxidase functionalized fluorescent gold nanoclusters for hydrogen peroxide sensing. *Analytical chemistry* 2011, 83(4):1193-1196.
136. Park KS, Kim MI, Woo MA, Park HG: A label-free method for detecting biological thiols based on blocking of Hg²⁺-quenching of fluorescent gold nanoclusters. *Biosensors & bioelectronics* 2013, 45:65-69.

137. Jin L, Shang L, Guo S, Fang Y, Wen D, Wang L, Yin J, Dong S: Biomolecule-stabilized Au nanoclusters as a fluorescence probe for sensitive detection of glucose. *Biosensors & bioelectronics* 2011, 26(5):1965-1969.
138. Li PH, Lin JY, Chen CT, Ciou WR, Chan PH, Luo L, Hsu HY, Diau EW, Chen YC: Using gold nanoclusters as selective luminescent probes for phosphate-containing metabolites. *Analytical chemistry* 2012, 84(13):5484-5488.
139. Hu L, Han S, Parveen S, Yuan Y, Zhang L, Xu G: Highly sensitive fluorescent detection of trypsin based on BSA-stabilized gold nanoclusters. *Biosensors & bioelectronics* 2012, 32(1):297-299.
140. Wang Y, Wang Y, Zhou F, Kim P, Xia Y: Protein-protected Au clusters as a new class of nanoscale biosensor for label-free fluorescence detection of proteases. *Small* 2012, 8(24):3769-3773.
141. Wen Q, Gu Y, Tang LJ, Yu RQ, Jiang JH: Peptide-templated gold nanocluster beacon as a sensitive, label-free sensor for protein post-translational modification enzymes. *Analytical chemistry* 2013, 85(24):11681-11685.
142. Huang CC, Chen CT, Shiang YC, Lin ZH, Chang HT: Synthesis of fluorescent carbohydrate-protected Au nanodots for detection of Concanavalin A and Escherichia coli. *Analytical chemistry* 2009, 81(3):875-882.
143. Chen WY, Lin JY, Chen WJ, Luo L, Wei-Guang Diau E, Chen YC: Functional gold nanoclusters as antimicrobial agents for antibiotic-resistant bacteria. *Nanomedicine* 2010, 5(5):755-764.
144. Shang L, Dorlich RM, Brandholt S, Schneider R, Trouillet V, Bruns M, Gerthsen D, Nienhaus GU: Facile preparation of water-soluble fluorescent gold nanoclusters for cellular imaging applications. *Nanoscale* 2011, 3(5):2009-2014.
145. Le Guevel X, Daum N, Schneider M: Synthesis and characterization of human transferrin-stabilized gold nanoclusters. *Nanotechnology* 2011, 22(27):275103.
146. Liu CL, Wu HT, Hsiao YH, Lai CW, Shih CW, Peng YK, Tang KC, Chang HW, Chien YC, Hsiao JK *et al*: Insulin-directed synthesis of fluorescent gold nanoclusters: preservation of insulin bioactivity and versatility in cell imaging. *Angewandte*

- Chemie* 2011, 50(31):7056-7060.
147. Hu D, Sheng Z, Fang S, Wang Y, Gao D, Zhang P, Gong P, Ma Y, Cai L: Folate receptor-targeting gold nanoclusters as fluorescence enzyme mimetic nanoprobes for tumor molecular colocalization diagnosis. *Theranostics* 2014, 4(2):142-153.
 148. Wang Y, Chen J, Irudayaraj J: Nuclear targeting dynamics of gold nanoclusters for enhanced therapy of HER2+ breast cancer. *ACS nano* 2011, 5(12):9718-9725.
 149. Zhou C, Long M, Qin Y, Sun X, Zheng J: Luminescent gold nanoparticles with efficient renal clearance. *Angewandte Chemie* 2011, 50(14):3168-3172.
 150. Liu J, Yu M, Zhou C, Yang S, Ning X, Zheng J: Passive tumor targeting of renal-clearable luminescent gold nanoparticles: long tumor retention and fast normal tissue clearance. *Journal of the American Chemical Society* 2013, 135(13):4978-4981.
 151. Chevrier DM, Chatt A, Zhang P: Properties and applications of protein-stabilized fluorescent gold nanoclusters: short review. *NANOP* 2012, 6(1):064504-064501-064504-064516.
 152. Li HW, Ai K, Wu Y: Fluorescence visual gel-separation of dansylated BSA-protected gold-nanoclusters. *Chem Commun (Camb)* 2011, 47(35):9852-9854.
 153. Yue Y, Li H-W, Liu T-Y, Wu Y: Exploring the role of ligand-BSA in the response of BSA-protected gold-nanoclusters to silver (I) Ions by FT-IR and circular dichroism spectra. *Vibrational Spectroscopy* 2014, 74(0):137-141.
 154. Geny B, Mettauer B, Muan B, Bischoff P, Epailly E, Piquard F, Eisenmann B, Haberey P: Safety and efficacy of a new transpulmonary echo contrast agent in echocardiographic studies in patients. *Journal of the American College of Cardiology* 1993, 22(4):1193-1198.
 155. Feinstein SB, Cheirif J, Ten Cate FJ, Silverman PR, Heidenreich PA, Dick C, Desir RM, Armstrong WF, Quinones MA, Shah PM: Safety and efficacy of a new transpulmonary ultrasound contrast agent: initial multicenter clinical results. *Journal of the American College of Cardiology* 1990, 16(2):316-324.
 156. Damascelli B, Cantu G, Mattavelli F, Tamplenizza P, Bidoli P, Leo E, Dosio F,

- Cerrotta AM, Di Tolla G, Frigerio LF *et al*: Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007): Phase I study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity. *Cancer* 2001, 92(10):2592-2602.
157. Ibrahim NK, Desai N, Legha S, Soon-Shiong P, Theriault RL, Rivera E, Esmaeli B, Ring SE, Bedikian A, Hortobagyi GN *et al*: Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2002, 8(5):1038-1044.
158. Guo Y, Aweda T, Black KC, Liu Y: Chemistry and theranostic applications of radiolabeled nanoparticles for cardiovascular, oncological, and pulmonary research. *Current topics in medicinal chemistry* 2013, 13(4):470-478.
159. Liu Y, Welch MJ: Nanoparticles labeled with positron emitting nuclides: advantages, methods, and applications. *Bioconjugate chemistry* 2012, 23(4):671-682.
160. Zhao Y, Sultan D, Detering L, Cho S, Sun G, Pierce R, Wooley KL, Liu Y: Copper-64-alloyed gold nanoparticles for cancer imaging: improved radiolabel stability and diagnostic accuracy. *Angewandte Chemie* 2014, 53(1):156-159.
161. Wang Y, Liu Y, Luehmann H, Xia X, Brown P, Jarreau C, Welch M, Xia Y: Evaluating the pharmacokinetics and in vivo cancer targeting capability of Au nanocages by positron emission tomography imaging. *ACS nano* 2012, 6(7):5880-5888.
162. Boswell CA, Sun X, Niu W, Weisman GR, Wong EH, Rheingold AL, Anderson CJ: Comparative in vivo stability of copper-64-labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes. *Journal of medicinal chemistry* 2004, 47(6):1465-1474.
163. De Silva RA, Jain S, Lears KA, Chong HS, Kang CS, Sun X, Rogers BE: Copper-64 radiolabeling and biological evaluation of bifunctional chelators for radiopharmaceutical development. *Nuclear medicine and biology* 2012, 39(8):1099-

- 1104.
164. Jorgensen JT, Persson M, Madsen J, Kjaer A: High tumor uptake of (64)Cu: implications for molecular imaging of tumor characteristics with copper-based PET tracers. *Nuclear medicine and biology* 2013, 40(3):345-350.
 165. Kettler K, Veltman K, van de Meent D, van Wezel A, Hendriks AJ: Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 2014, 33(3):481-492.
 166. Ruggiero A, Holland JP, Lewis JS, Grimm J: Cerenkov luminescence imaging of medical isotopes. *Journal of Nuclear Medicine* 2010, 51(7):1123-1130.
 167. Thorek D, Robertson R, Bacchus WA, Hahn J, Rothberg J, Beattie BJ, Grimm J: Cerenkov imaging - a new modality for molecular imaging. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2012, 2(2):163-173.
 168. Ross HH: Measurement of .beta.-emitting nuclides using Cerenkov radiation. *Analytical chemistry* 1969, 41(10):1260-1265.
 169. Robertson R, Germanos MS, Li C, Mitchell GS, Cherry SR, Silva MD: Optical imaging of Cerenkov light generation from positron-emitting radiotracers. *Physics in medicine and biology* 2009, 54(16):N355-365.
 170. Balkin ER, Kenoyer A, Orozco JJ, Hernandez A, Shadman M, Fisher DR, Green DJ, Hylarides MD, Press OW, Wilbur DS *et al*: In vivo localization of (9)(0)Y and (1)(7)(7)Lu radioimmunoconjugates using Cerenkov luminescence imaging in a disseminated murine leukemia model. *Cancer research* 2014, 74(20):5846-5854.
 171. Thorek DL, Das S, Grimm J: Molecular imaging using nanoparticle quenchers of Cerenkov luminescence. *Small* 2014, 10(18):3729-3734.
 172. Natarajan A, Habte F, Liu H, Sathirachinda A, Hu X, Cheng Z, Nagamine CM, Gambhir SS: Evaluation of ⁸⁹Zr-rituximab tracer by Cerenkov luminescence imaging and correlation with PET in a humanized transgenic mouse model to image NHL. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 2013, 15(4):468-475.
 173. Spinelli AE, Boschi F: Human Cerenkov imaging using ¹⁸F-FDG. *Journal of*

- nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2014, 55(3):523.
174. Xu Y, Chang E, Liu H, Jiang H, Gambhir SS, Cheng Z: Proof-of-concept study of monitoring cancer drug therapy with cerenkov luminescence imaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2012, 53(2):312-317.
175. Niidome T, Yamagata M, Okamoto Y, Akiyama Y, Takahashi H, Kawano T, Katayama Y, Niidome Y: PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2006, 114(3):343-347.
176. Weissleder R: A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 2001, 19(4):316-317.
177. Choi J, Jeong JM, Yoo BC, Hong MK, Kim YJ, Lee YS, Lee DS, Chung JK: Ga-68-labeled neolactosylated human serum albumin (LSA) for PET imaging of hepatic asialoglycoprotein receptor. *Nuclear medicine and biology* 2015, 42(1):53-58.
178. Schiller E, Bergmann R, Wunderlich G, Andreeff M, Jacob A, Pietzsch H-J, #xfc, rgen: Ga-68- and Cu-64-Labeled NOTA-Albumin Conjugates for PET Sentinel Lymph Node Imaging. *ISRN Molecular Imaging* 2013, 2013:8.
179. Zhang XD, Wu D, Shen X, Liu PX, Fan FY, Fan SJ: In vivo renal clearance, biodistribution, toxicity of gold nanoclusters. *Biomaterials* 2012, 33(18):4628-4638.
180. Matsumura Y, Maeda H: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research* 1986, 46(12 Pt 1):6387-6392.
181. Torchilin V: Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced drug delivery reviews* 2011, 63(3):131-135.
182. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R: Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology* 2007, 2(12):751-760.
183. Modi S, Prakash Jain J, Domb AJ, Kumar N: Exploiting EPR in polymer drug conjugate delivery for tumor targeting. *Current pharmaceutical design* 2006, 12(36):4785-4796.

184. O'Shaughnessy JA: Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Clinical breast cancer* 2003, 4(5):318-328.
185. Perez AT, Domenech GH, Frankel C, Vogel CL: Pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) for metastatic breast cancer: the Cancer Research Network, Inc., experience. *Cancer investigation* 2002, 20 Suppl 2:22-29.
186. Symon Z, Peyser A, Tzemach D, Lyass O, Sucher E, Shezen E, Gabizon A: Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes. *Cancer* 1999, 86(1):72-78.
187. Maeda H, Nakamura H, Fang J: The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced drug delivery reviews* 2013, 65(1):71-79.

个人简历和研究成果

胡皓，男，1985年11月生，陕西省西安市人

个人简历

2004.09 – 2009.06: 第四军医大学临床医学（五年制）专业获医学学士学位

2009.09 – 至今: 第四军医大学西京医院消化内科 硕博连读生

2013.10 – 2015.04: 美国国立卫生研究院 国家公派留学生

研究成果

研究论文:

1. **Hu H**, Cao X, Kang F, Wang M, Lin Y, Liu M, Li S, Yao L, Liang J, Liang J *et al*: Feasibility study of novel endoscopic Cerenkov luminescence imaging system in detecting and quantifying gastrointestinal disease: first human results. *European radiology* 2015, 25(6):1814-22. **IF = 4.338**
2. **Hu H**, Huang P, Weiss OJ, Yan X, Yue X, Zhang MG, Tang Y, Nie L, Ma Y, Niu G *et al*: PET and NIR optical imaging using self-illuminating (64)Cu-doped chelator-free gold nanoclusters. *Biomaterials* 2014, 35(37):9868-9876. **IF = 8.312**
3. **Hu H**, Yin J, Wang M, Liang C, Song H, Wang J, Nie Y, Liang J, Wu K: GX1 targeting delivery of rmhTNFalpha evaluated using multimodality imaging. *International journal of pharmaceutics* 2014, 461(1-2):181-191. **IF = 3.785**
4. **Hu H**, Liu J, Yao L, Yin J, Su N, Liu X, Cao F, Liang J, Nie Y, Wu K: Real-time bioluminescence and tomographic imaging of gastric cancer in a novel orthotopic mouse model. *Oncology reports* 2012, 27(6):1937-1943. **IF = 2.297**
5. Yan X, **Hu H**, Lin J, Jin AJ, Niu G, Zhang S, Huang P, Shen B, Chen X: Optical and photoacoustic dual-modality imaging guided synergistic

- photodynamic/photothermal therapies. *Nanoscale* 2015, 7(6):2520-2526. **IF = 6.739**
6. Zhang J, **Hu H**, Liang S, Yin J, Hui X, Hu S, He M, Wang J, Wang B, Nie Y *et al*: Targeted radiotherapy with tumor vascular homing trimeric GEBP11 peptide evaluated by multimodality imaging for gastric cancer. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2013, 172(1):322-329. **IF = 7.261**
 7. Tang Y, **Hu H**, Zhang MG, Song J, Nie L, Wang S, Niu G, Huang P, Lu G, Chen X: An aptamer-targeting photoresponsive drug delivery system using "off-on" graphene oxide wrapped mesoporous silica nanoparticles. *Nanoscale* 2015, 7(14):6304-6310. **IF = 6.739**
 8. Huang P, Rong P, Jin A, Yan X, Zhang MG, Lin J, **Hu H**, Wang Z, Yue X, Li W *et al*: Dye-loaded ferritin nanocages for multimodal imaging and photothermal therapy. *Advanced materials* 2014, 26(37):6401-6408.
 9. Liu X, Zhang Z, Sun L, Chai N, Tang S, Jin J, **Hu H**, Nie Y, Wang X, Wu K *et al*: MicroRNA-499-5p promotes cellular invasion and tumor metastasis in colorectal cancer by targeting FOXO4 and PDCD4. *Carcinogenesis* 2011, 32(12):1798-1805.
 10. Qiao R, Liu C, Liu M, **Hu H**, Liu C, Hou Y, Wu K, Lin Y, Liang J, Gao M: Ultrasensitive in vivo detection of primary gastric tumor and lymphatic metastasis using upconversion nanoparticles. *ACS nano* 2015, 9(2):2120-2129.
 11. Sha S, Gu Y, Xu B, **Hu H**, Yang Y, Kong X, Wu K: Decreased expression of HOXB9 is related to poor overall survival in patients with gastric carcinoma. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2013, 45(5):422-429.
 12. Cao X, Chen X, Kang F, Lin Y, Liu M, **Hu H**, Nie Y, Wu K, Wang J, Liang J *et al*: Performance evaluation of endoscopic Cerenkov luminescence imaging system: in vitro and pseudotumor studies. *Biomedical optics express* 2014, 5(10):3660-3670.
 13. Wang Y, Zheng X, Zhang Z, Zhou J, Zhao G, Yang J, Xia L, Wang R, Cai X, **Hu H** *et al*: MicroRNA-149 inhibits proliferation and cell cycle progression through the targeting of ZBTB2 in human gastric cancer. *PloS one* 2012, 7(10):e41693.
 14. Xia L, Huang W, Tian D, Zhu H, Qi X, Chen Z, Zhang Y, **Hu H**, Fan D, Nie Y *et al*:

- Overexpression of forkhead box C1 promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2013, 57(2):610-624.
15. Xia L, Huang W, Tian D, Zhu H, Zhang Y, **Hu H**, Fan D, Nie Y, Wu K: Upregulated FoxM1 expression induced by hepatitis B virus X protein promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 2012, 57(3):600-612.
 16. Xia L, Mo P, Huang W, Zhang L, Wang Y, Zhu H, Tian D, Liu J, Chen Z, Zhang Y *et al*: The TNF-alpha/ROS/HIF-1-induced upregulation of FoxMI expression promotes HCC proliferation and resistance to apoptosis. *Carcinogenesis* 2012, 33(11):2250-2259.
 17. Xia L, Tian D, Huang W, Zhu H, Wang J, Zhang Y, **Hu H**, Nie Y, Fan D, Wu K: Upregulation of IL-23 expression in patients with chronic hepatitis B is mediated by the HBx/ERK/NF-kappaB pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2012, 188(2):753-764.
 18. Xin J, Zhan Y, Liu M, **Hu H**, Xia L, Nie Y, Wu K, Liang J, Tian J: ApoG2 induces ER stress-dependent apoptosis in gastric cancer cells in vitro and its real-time evaluation by bioluminescence imaging in vivo. *Cancer letters* 2013, 336(2):260-269.
 19. Yan X, Niu G, Lin J, Jin AJ, **Hu H**, Tang Y, Zhang Y, Wu A, Lu J, Zhang S *et al*: Enhanced fluorescence imaging guided photodynamic therapy of sinoporphyrin sodium loaded graphene oxide. *Biomaterials* 2015, 42:94-102.
 20. Yin J, Hui X, Yao L, Li M, **Hu H**, Zhang J, Xin B, He M, Wang J, Nie Y *et al*: Evaluation of Tc-99 m Labeled Dimeric GX1 Peptides for Imaging of Colorectal Cancer Vasculature. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 2015.
 21. Zhou L, Shang Y, Liu C, Li J, **Hu H**, Liang C, Han Y, Zhang W, Liang J, Wu K: Overexpression of PrPc, combined with MGr1-Ag/37LRP, is predictive of poor prognosis in gastric cancer. *International journal of cancer Journal international du*

cancer 2014, 135(10):2329-2337.

22. Zhu H, Xia L, Zhang Y, Wang H, Xu W, **Hu H**, Wang J, Xin J, Gang Y, Sha S *et al*: Activating transcription factor 4 confers a multidrug resistance phenotype to gastric cancer cells through transactivation of SIRT1 expression. *PloS one* 2012, 7(2):e31431.

国际会议论文:

1. **Hu H**, Liu J, Nie Y, Tian J, Wu K (2011) World Molecular Imaging Congress 2011, San Diego, California from September 7-10th (**AB P350**).
2. **Hu H**, Wang M, Yin J (2013) Gastro 2013 APDW/WCOG Shanghai, Asian Pacific Digestive Week 2013 World Congress of Gastroenterology, 21-24 September 2013, Shanghai Expo Center, Shanghai, China (**AB P1220** and **P1710**).

致 谢

时光如梭，博士阶段的学习马上就要结束了，研究生硕博六年的学习生活让我获益匪浅，感慨良多。昔日的学习和生活场景仍然历历在目，每份成果的取得，不仅是自己努力的结果，更离不开众多帮助和关心过我的师长、同学、朋友和亲人的帮助和默默的付出！在这里我想向他们表达我最由衷的感谢。

首先，我要特别感谢我的导师吴开春教授。在研究生双向选择会上，老师坚定的选择成就了我成为医生的梦想。自研究生学习以来，我的每一个脚印、每一点成长，都倾注着老师的心血与汗水。老师严谨求实的工作作风，深厚广博的学术造诣以及温文尔雅的学者风范，是我今后为人、为学、为医的榜样。老师的谆谆教诲与鞭策我将永远铭记于心，并将一直激励着我在今后的人生道路上不断前行。

衷心感谢美国国立卫生研究院陈小元教授对我在美留学期间给予的帮助和指导。美国留学是我一生中非常宝贵的一份经历。在美研究工作的每个环节，包括选题、实验设计、工作进展、文章撰写和发表都凝聚着您的心血。您对科研前沿的敏锐洞察力以及创造性的思维令人钦佩，您对科学问题的执着追求更值得我学习。您每一句亲切的话语都能激发我昂扬的斗志，让我朝着我的梦想前进。

衷心感谢实验室主任聂勇战教授六年来对我学习和生活的关心、支持和帮助。我是在您的帮助和指导下，从一个懵懂无知的研究生，成长到具有独立科研思维的合格毕业生。您敏锐的学术思维、勇于创新的崇高品质永远值得我学习。我将铭记您对研究生的循循善诱的教导。

衷心感谢樊代明院士、韩英教授、周新民教授、郭学刚教授、张宏博教授、韩国宏教授、王建宏教授、时永全教授、梁洁副教授、王彪落副教授、张德新副教授、么丽萍副教授、梁树辉讲师在实验方法及思路上给予的精心辅导及诚挚帮助。

感谢孙安华副教授以及消化内镜中心全体医务人员对课题的无私支持与帮助，正是你们的帮助才使每一次内镜实验得以顺利进行。

衷心感谢乔泰东主任技师、陈铮副主任技师在实验试剂及耗材提供方面给予的帮助。特别感谢西京医院核医学科汪静主任、杨卫东教授、西京医院心内科曹丰教授、西安电子科技大学梁继民教授在课题给予的指导、建议和协助。感谢西京医院核医学科、病理科、心内科、检验科及学校动物中心各位老师们在实验实施过程所给予的大力支持和帮助。

感谢西京消化病医院实验室其他老师和同学，特别是师姐夏丽敏、胡思隽、严慧、崔丽娜、沙素梅、张琳，师兄张永国、刘俊廷、朱鸿武、徐斌、石晓磊、柏明、祁兴顺，同学殷继鹏、赵晓迪、曹欣、刘向强、张静、王璐，师妹韩亚楠、郭汉青、魏妮、梁聪、尚鑫、许冰，师弟刘常浩、周林，李明、刘剑、李晓伟、余鹏飞对我的帮助。感谢实验室技师窦建华、唐光波、张慧霞、田祖宏、田苗苗等工作、学习、实验及生活中给予的鼎力支持及帮助。感谢本课题组成员在课题讨论中给予的建议。谢谢你们陪我一起在实验室奋战。

感谢我的家人，感谢父母对我的关心和支持。我将用未来努力来报答他们对我的厚爱 and 期待。特别感谢我的妻子，她的理解、支持、关心和鼓励是我顺利完成学业的坚强后盾。

最后，特别向在百忙之中审阅我的论文及参加论文答辩会的老师和同学表示衷心的感谢。