creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

이 학 석 사 학 위 논 문

바이오 이미징 및 감광제를 위한 형광 골드 나노클러스터-실리카 복합 나노구조체의 합성

The facile synthesis of fluorescent Au nanoclusters-silica hybrid nanocomposite (FLASH) as bio-imaging and photosensitizer

2017년 8월

서울대학교 대학원

화학부 유기화학 전공

김 태 식

Abstract

이 논문은 형광을 내는 금 나노클러스터 중심과 실리카 막으로 구성되어 있는 공유적으로 결합한 복합 나노구조체에 대한 연구이다. 금 나노클러스터의 리간드인 Glutathione (GSH)과 APTES가 결합 한 후 TEOS와 함께 공 응축 반응을 통해 실리카 막을 만들게 된다. 이 새로운 방법은 금 나노클러스터가 실리카 막 구조 안에서 분산되도록 만들어 준다. 이 새로운 복합 나노구조체 (FLASH)는 금 나노클러스터보다 약 4 배 증가된 양자 수율 (QY)과 형광 세기를 보여준다. 이 복합 나노결정체는 물에 좋은 분산도와 낮은 세포 독성을 갖고 있을 뿐만 아니라, 자외선 영역의 빛을 조사받으면 광역동 치료를 위한 활성 산소를 만들어 낸다. FLASH는 바이오 이미징 및 광역동 치료를 위한 감광제로서 유망한 복합 나노구조체이다.

주요어 : 금 나노클러스터, 실리카 복합 나노구조체, 바이오 이미징, 감광제, 광역동 치료.

학 번 : 2014-22395

Table of contents

1. Introduction 1
1. 1. 활성 산소 (ROS) 및 광역동 치료 (PDT) 1
1. 2. 1. Gold nanocluster (AuNC) 3
1. 2. 2. AuNC를 활용한 선행 연구들 5
1. 2. 3. AuNC 기반의 복합 나노플랫폼 6
2. Experimental section 9
3. Results and Discussion 15
4. Conclusion 29
5. Reference 30
Abstract (in English) 38

1. Introduction

1. 1. 활성 산소 (ROS) 및 광역동 치료 (PDT)

일중항 산소 (O_2^1) 또는 자유 라디칼과 같은 활성 산소 (reactive oxygen species, ROS)는 광범위한 생리학적 과정에서 중요한 신호 분자이다. 높은 농도의 ROS는 단백질, 핵산 및 지질에 산화 스트레스를 유도하여 살아있는 세포에 심각한 손상을 준다. 이 손상은 암과 신경계 질환을 비롯한 수많은 인체 질환을 유발한다.[1] 세포는 산화 스트레스로부터 세포와 기관을 보호하기 위해 섬세하고도 복잡한 항산화 보호 시스템을 개발했다. 정상 호기성 세포에서 활성 산소는 Glutathione (GSH)과 같은 생화학적 항산화 물질과 균형을 이룬다. 따라서 ROS의 메커니즘을 이해하는 것은 생물학적 및 의학적 요법에 필수적이라고 할 수 있다.[2]

광역동 치료 (photodynamic therapy, PDT)는 부작용을 줄이고, 세포의 독성을 줄이며 약물의 내성을 최소화로 시키면서 암을 치료하기 위한 점진적이고 비수술적인 치료법이다. 광역동 매개의 세포 사멸은 광에 의해 활성화 된 감광제 (photosensitizer, PS)에 의해 생성된 활성 산소를 통해 세포 사멸 또는 괴사가 일어난다. (그림 1)[3-4] 감광제는 광역동 치료에 광범위하게 사용되어 왔지만 몇 가지 단점이 있다. 포르피린, 빌리루빈, 엽록소와 같은 대부분의 감광제 유도체는 소수성 구조를 가지고 있기 때문에, 감광제들은 수용액에서 응집되어 광역동 효율을 감소시키는 경향이 있다.[5-6] 또한, 활성 산소의 확산 거리가 상대적으로 짧고 (0.1μm), 특정 세

포 구조에 대한 감광제의 구조가 유사할 경우에 광 손상이 발생한다.[7] 효과적인 광역동 치료를 위해 많은 종류의 나노 물질을 통해 감광제의 캡슐화 또는 암 세포에 대해 표적화를 통해 암 세포로 감광제를 효율적으로 전달하는데 사용되었다.[8-9] 그러나 캡슐 안에 있는 감광제는 운반체로부터 조기 방출을 유도하여 PDT의 효율을 감소시킬 수 있는 단점이 있다.[10] 따라서 새로운 감광제를 발굴하는 일은 매우 중요한 일이라고 할 수 있다.

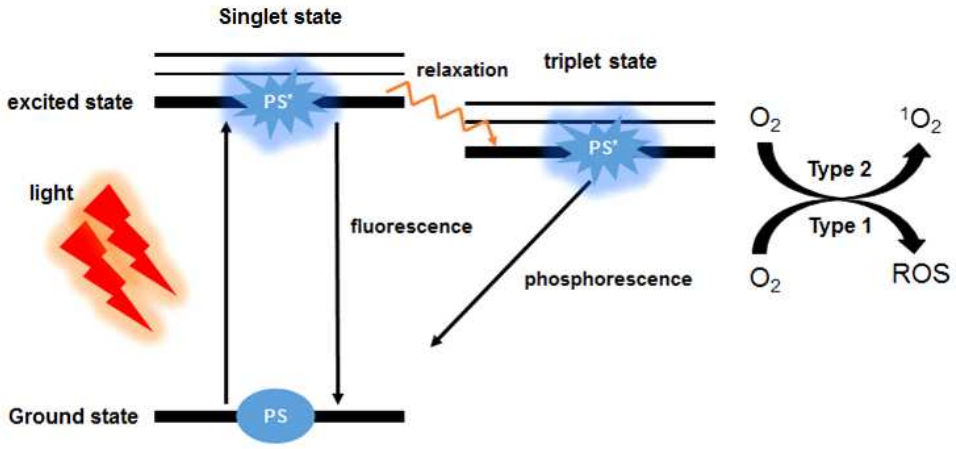


그림 1. Jablonski 도표를 통한 감광제에 의한 광역동 치료 개략도.

1. 2. 1. Gold nanocluster (AuNC)

Gold nanocluster (AuNC)는 일반적으로 2 ~ 5 nm 이하의 크기를 가지고 있으며, 수십 ~ 수백 개의 원자로 이루어져 있다.[11] AuNC는 다양한 알킬 사슬, glutathione (GSH), bovine serum albumin (BSA) 과 같은 싸이올(-SH) 작용기가 있는 상태에서 Au의 전구체를 통해 합성된다.[12,13] AuNC는 gold nanoparticle (AuNP)와 다른 물리적 및 광학적 성질을 나타낸다.[14] AuNC는 크기가 너무 작기 때문에 surface plasmon resonance (SPR) 흡수 밴드가 없다. 그러나 AuNC는 양자 감금 효과 (quantum confinement effect)에 기반을 둔 광 발광 (photoluminescence, PL)을 갖는다.[2] (그림 2)

AuNC의 PL과 같은 광학적 성질은 입자의 크기, 리간드, 구조 및 전하 효과에 의존한다.[15] 리간드의 효과에서 AuNC의 최대 형광은 610 nm 부근에서 나타나는데 이 형광은 S 원자에서 Au 중심 원자로의 전하 이동 (ligand to metal charge transfer, LMCT)이나 또는 리간드-금속-금속 전하 이동 (ligand to metal-metal charge transfer, LMMCT)에 의해 일어난다.[16] 또한, AuNC의 광학물리적 특성은 반도체의 전자 구조와 유사하기 때문에 광촉매의 가능성을 가지고 있다.

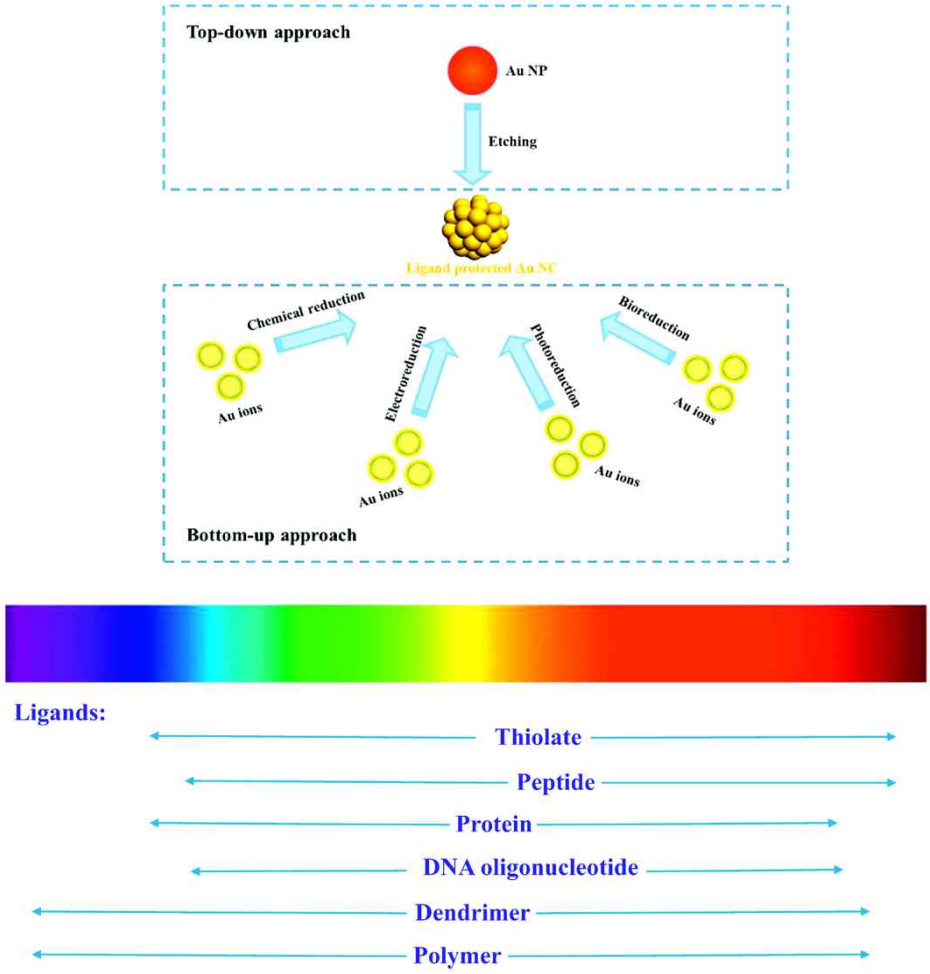


그림 2. 형광 AuNC의 합성 전략과 리간드에 의한 AuNC의 형광 개략도.[17]

1. 2. 2. AuNC를 활용한 선행 연구들

이전의 연구들에서 AuNC는 AuNC가 결합 된 TiO_2 필름에 의한 일산화탄소 (CO) 환원 또는 수소 (H_2) 생성과 같은 촉매 시스템에 이용하였다.[18-19] 다른 연구들은 AuNC가 활성 산소 (ROS)를 생성할 수 있음을 보여 주었다.[20-21]

특히, 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 Glutathione (GSH)과 같은 생체 분자를 이용하여 안정화 된 AuNC는 수용액 내에서 안정하며 세포 독성이 낮은 것으로 알려져 있다.[22-23] 이러한 종류의 AuNC는 형광 기반의 검출,[24] 바이오 이미징,[25-27] 광역동 치료 (PDT),[28] 광열 치료 (PTT)[29], 약물 또는 유전자 전달 시스템,[30-32] 광촉매[33-34]와 같은 다양한 생물학적 연구에 많이 사용되어 왔다.

하지만 AuNC는 이러한 장점에도 불구하고 여전히 몇 가지 한계점이 있다. Organic dye보다 약 3 ~ 6 % 정도의 상대적으로 낮은 quantum yield (QY)를 가지고 있기 때문에 세포에서 관찰하기에 어려움이 있다.[35] 그리고 생물학적 환경에서 AuNC의 리간드 변화 또는 예상하지 못한 생체 내의 반응의 결과로 형광이 소멸 될 확률도 있다.

1. 2. 3. AuNC 기반의 복합 나노플랫폼

최근에 AuNC의 낮은 형광 강도를 극복하기 위해 많은 연구자들이 AuNC의 리간드를 바꾸거나 passivation을 시도했다.[36] 또는, 생물학적인 환경에서 AuNC의 바람직하지 않은 반응을 피하기 위해 생체 적합한 물질로 알려져 있는 실리카를 사용하여 AuNC 중심 실리카 막 구조 (AuNC@SiO_2)로 만들어서 사용하였다.[37] (그림 4)

최근 몇 십년간 AuNC 중심 - 실리카 막 구조 (AuNC@SiO_2)는 Stöber 방법으로 합성되었다.[38] 이 중심 - 막 구조는 AuNC의 바람직하지 않은 반응을 막아주고, 실리카 막의 표면은 쉽게 개질 될 수 있다. 그러나 중심 - 막 구조의 성질은 실리카 막의 두께에 따라 변화 될 수 있으며 AuNC가 막의 내부에서 응집되어 형광의 소강을 초래할 수 있다.[39-40]

따라서 우리는 바이오 이미징과 감광제를 위해 공 응축 반응으로 AuNC가 실리카에 연결된 실리카 복합 나노 구조체 (FLASH)를 합성했다. (그림 3) 중심-막 구조와 달리, 이 나노 복합 구조체에서 AuNC의 리간드인 GSH는 APTES와 공유 결합을 통해 실리카 매트릭스 구조에 연결되어 있다.[41] 이러한 복합 나노구조체는 형광의 세기를 수십 배 정도 향상시킬 수 있다.[42] 합성 된 복합 나노구조체는 세포 내 형광 기반의 바이오 이미징으로 사용가능하고 막 표면을 쉽게 기능화 할 수 있다. 또한, 생물학적 환경 하에서 화학적 안정성과 형광 안정성을 가지고 있다. AuNC와 달리 FLASH는 자외선 조사 하에서 충분한 활성 산소를 생성 할 수 있어 광역동치료 (PDT)에 도 사용될 수 있다. 즉, FLASH는 생물학적 환경에

서 보다 높은 cell viability, 수용성 및 안정성과 증가된 형광 세기와 광촉매 역할을 보여줌으로써 유망한 감광제 및 바이오 이미징이 되는 복합 나노구조체임을 알 수 있다.

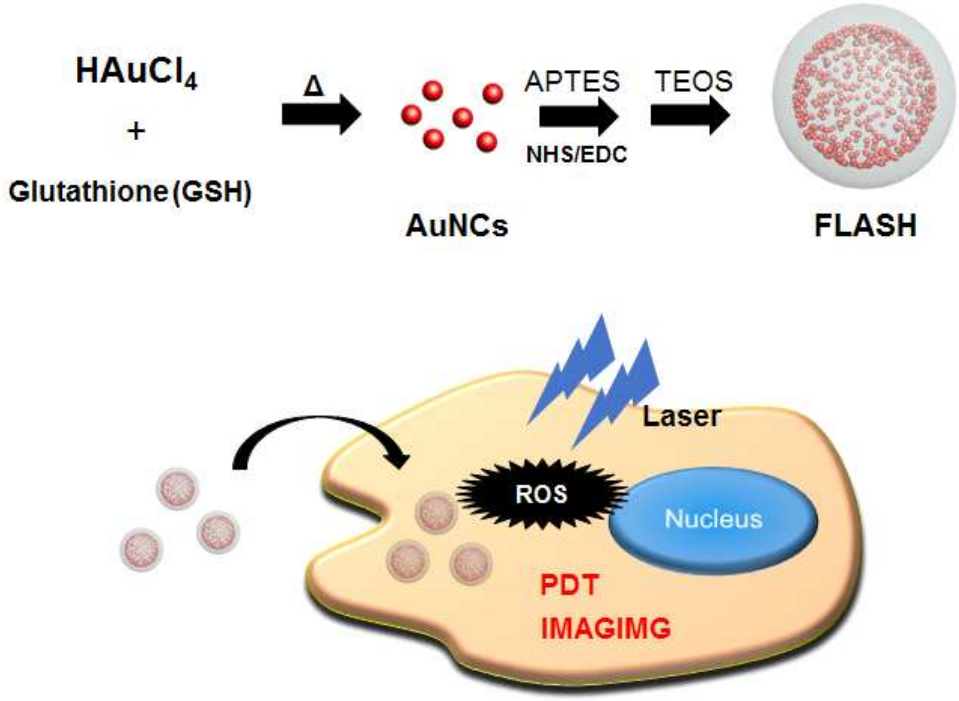


그림 3. FLASH 합성 절차 및 FLASH 중재 바이오 이미징 및 광역동 치료의 전략에 대한 개략도.

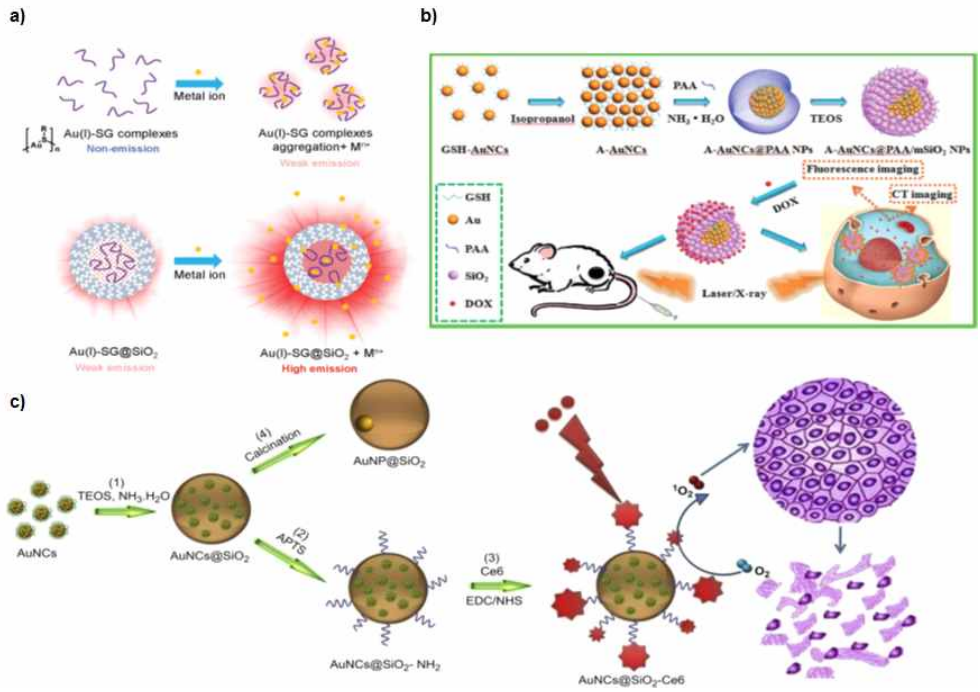


그림 4. AuNC@SiO_2 복합 나노플랫폼의 응용. a) Jianping Xie와 동료들이 개발한, Au(I)-SG 착물 및 Au(I)-SG_2@SiO_2 NPs의 금속 이온에 유도 된 뭉침에 의한 발광(AIE)의 개략도.[37] b) Chungang Wang과 동료들이 개발한, pH에 의존한 약물 전달을 위한 AAuNC@PAA/mSiO_2 NP에 대한 합성 전략 및 생체 내 및 세포 내에서 간암의 이중 CT 및 형광 이미징 및 화학 요법의 개략도.[43] c) Xiaoyuan Chen와 동료들이 개발한, 광역동 치료를 위한 Ce6가 결합한 실리카가 코팅 된 금 나노클러스터 (AuNCs @SiO_2-Ce6)의 합성 과정 개략도.[6]

2. Experimental section

2. 1. Materials

Hydrogen tetrachloroaurate (III) hydrate 은 Kojima Chemicals (Sayama, Saitama, Japan)에서 구입하였다. L-Glutathione reduced (GSH), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), Tetraethyl Orthosilicate (TEOS), N-Hydroxysuccinimide (NHS)는 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)는 TCI Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Ammonium hydroxide (25%), ethyl alcohol (95%), hydrochloric acid (35%)은 DAEJUNG chemical & metals (Siheung, GyeongGi, Republic of Korea)에서 구매하였다. 10X phosphate-buffered saline (PBS), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 그리고 fetal bovine serum (FBS)는 WelGENE (Seoul, Republic of Korea) 구매하였다. LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay Kit는 Molecular Probes Invitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A.)에서 구매하였다. 15 mL 부피의 10K Amicon filter는 Millipore(Billerica, MA, USA)에서 구매하였다.

2. 2. AuNC의 합성

Jinbin Liu 등에 의해 보고 된 방법을 이용하여 AuNC를 합성하였다.[47] 간단히 말하면, 3.6 mM L-Glutathione 용액 50 mL를 95 ℃

의 오일 배스에서 가열하였다. 그런 다음, 2 시간 동안 격렬히 교반하면서 0.248 M $HAuCl_4$ 용액 605 μL를 첨가 하였다. 합성 된 AuNC는 반응 후 aggregate를 제거하기 위해 17,000g에서 원심 분리하여 정제 하였다. 추가로 정제하기 위해 상층액을 20 mM 염산 수용액을 사용하여 용액의 pH를 3 ~ 4로 맞춘 후, 용액에 에탄올을 넣어 침전시켰다. 생성물을 원심 분리기 5810R (Eppendorf, Germany)에 의해 6500 rpm에서 10 분 동안 3 회 에탄올을 사용하여 정제 하였다. 침전물을 진공 오븐에서 건조시키고 50 mL의 1X PBS 완충액에 재 분산시켰다.

2. 3. AuNC와 APTES와 결합

11 mg의 EDC와 8 mg의 NHS 모두 20 mL의 AuNC 용액을 15 분 동안 교반하면서 첨가하여 카르복실기 ($-COO^-$)를 활성화시켰다. 사전 활성화 후, 용액에 APTES 25 μL를 첨가하고 교반하면서 4 시간 동안 반응시켰다. 생성물을 15 mL의 Amicon 필터를 사용하여 6500 rpm에서 10 분 동안 3 회 증류수로 정제 하였다. 마지막으로, APTES 변형 된 AuNC를 5 mL의 증류수에 재 분산시켰다.

2. 4. FLASH의 합성

200 μL의 APTES와 결합한 AuNC와 5 μL의 TEOS를 1 mL의 에탄올에서 혼합 하였다. 그 후, 1 mL의 에탄올과 300 μL의 증류수 및 30 μL의 25 % NH_4OH 용액에 첨가한다. 공 응축 반응으로 실

온에서 3 시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 상층액이 자외선 아래에서 미 반응된 AuNC의 형광을 방출하지 않을 때까지 생성물을 8000 rpm에서 10 분 동안 증류수로 3 회 정제 하였다.

2. 5. 광촉매 활성 (Photocatalytic activity)

각각의 1 mL 안에 나노 물질이 없는 20 μM methylene blue (MB), 100 μg / mL의 실리카 나노 입자 (SN)가 포함 된 20 μM MB, 이론적으로 FLASH와 동일한 농도인 187.7 nM AuNC가 포함된 20 μM MB, 100 μg / mL의 FLASH가 있는 20 μM MB 4 가지 종류의 샘플을 준비한 후, 90 분 동안 48W UV-transilluminator (ATTO, Republic of Korea)를 사용하여 샘플에 조사하였다. 1 시간 동안 매 10 분마다 측정 후 마지막 90 분을 측정하였으며, MB의 광분해는 UV-Vis 분광법으로 측정되었다.

2. 6. 입자의 특성 결정 (Characterization)

나노 입자의 이미지를 얻는 데 Energy-filtering transmission electron microscope LIBRA 120 (Carl Zeiss, Germany), high-resolution TEM (JEM-2100F, USA)가 사용되었다 . Energy dispersive spectroscopy elemental mapping은 HADDF-STEM 통해 얻었다. UV-Vis absorption spectra을 얻는데 UV-Vis spectrophotometer S-3100 (Scinco, Republic of Korea)를 사용하였다. 형광은 spectrofluorometer FP-8300 (Jasco Inc., U.S.A.)을

사용하여 측정하였다. 365 nm 레이저 조사는 365-nm LED (Shanghai Yulitech Co., Ltd., China, 0.2 W/cm^2)을 사용하였다. 양자 수율 (quantum yield, QY)은 Quantum Efficiency Measurement System QE-1200 통해 얻었다. Photoluminescence (PL)은 ACTON spectrometer (Acton, Massachusetts, U.S.A.)를 사용하여 얻었다. Fourier transform Infrared (FT-IR) spectra는 VERTEX 70 (Bruker, USA) 와 HYPERION microscope를 통해 얻었다.

2. 7. Cell culture

인간 자궁 경부암 세포주인 HeLa cell은 4.5 g/L D-glucose를 함유한 DMEM에서 culture하였으며 10%의 fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL의 penicillin 그리고 100 g/mL의 streptomycin을 추가하였다. 세포들은 37℃, 5% CO_2 조건에서 습도가 유지되는 incubator에서 유지하였다.

2. 8. 세포 독성 실험 (CCK-8 assay)

AuNC의 정량적인 cell viability을 조사하기 위해 HeLa 세포 (1 × 10^4 개의 세포 / 웰)를 96-웰 플레이트에 seeding 후 24 시간 동안 배양하고, 이론적으로 FLASH와 동일한 양의 다양한 농도의 AuNC를 배양하였다. 24 시간 배양 한 후 세포를 1x PBS로 조심스럽게 세척하고 CCK-8 분석 용액을 무 혈청 배지로 1 시간 동안 첨가 한 후 마이크로 플레이트 판독기 (Molecular Devices,

Inc., USA)를 사용하여 450 및 670 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3 중으로 수행되었다.

FLASH의 광역동 효과와 관련된 정량적인 cell viability을 조사하기 위해, HeLa 세포 (1 × 10^4 개의 세포 / 웰)를 96- 웰 플레이트에 seeding 후 24 시간 동안 배양하고, 다양한 농도의 FLASH를 배양하였다. 배양 12 시간 후 365 nm LED (Shanghai Yulitech Co., Ltd., China, 0.2 W / cm^2)를 10 분간 조사한 후 혈청을 함유한 배지로 교체 하였다. 12 시간 배양 한 후 세포를 1x PBS로 조심스럽게 세척하고 CCK-8 분석 용액을 무 혈청 배지로 1 시간 동안 첨가 한 후 마이크로 플레이트 판독기 (Molecular Devices, Inc., USA)를 사용하여 450 및 670 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3 중으로 수행되었다.

2. 9. 세포 내 광역동 치료효과

세포 내에서 광역동 치료의 치료 효과를 알아보기 위해 미리 24 시간 배양 한 HeLa 세포 (1.2 × 10^5 개의 세포 / 웰)12- 웰 플레이트에서 혈청이 없는 배지를 사용하여 각각 FLASH (200 μg / mL)와 이론적으로 동일한 농도의 AuNC를 12 시간 동안 처리하였다. 혈청이 함유된 배지로의 배지 교환 후, 세포를 365 nm LED (0.2 W / cm^2)로 10 분 동안 조사 하였다. 추가로 12 시간 배양 한 후, 각 웰을 제조자의 프로토콜에 기초한 live / dead 분석 시약으로 처리 하였다. 세포의 밝은 필드와 형광 이미지는 4X 목적으로 역 형광 현미경, IX70 (Olympus, Japan)를 사용하여 얻었다. 얻은 이미지는 내부에 제공된 소프트웨어를 사용하여 의사 착색

(pseudo-coloring), 형광 강도 및 배경 제거 과정을 진행하였다.

2. 10. 세포 내 형광 이미지

HeLa 세포 (5.0 × 10^4 개의 세포 / 웰)를 8-웰 유리 챔버에 seeding하고 24 시간 동안 배양 후 각 웰에 FLASH (200 μg/mL)가 포함된 무 혈청 배지 조성으로 4 시간 동안 처리하였다. 배양 후, 세포를 1x PBS로 조심스럽게 헹구고 배지를 혈청이 함유된 신선한 배지로 교체하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 Hoechst 33342 염색 키트로 핵을 염색 한 후, 밝은 영역 및 형광 이미지를 60x 대물렌즈를 갖는 델타 비젼 엘리트 현미경 시스템을 사용하여 이미지를 얻었다. 얻은 이미지는 내부에 제공된 소프트웨어를 사용하여 의사 착색 (pseudo-coloring), 형광 강도 및 배경 제거 과정을 진행하였다.

3. Results and Discussion

3. 1. AuNC의 물리적 특성

AuNC의 평균 크기는 high-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM)으로 측정 한 결과 약 3 ~ 5 nm였다. (그림 1b) AuNC가 크기가 너무 작기 때문에 SPR peak가 없고, 200 nm에서 강한 흡광을 나타내다가, 500 nm 파장 이상에서 광학 특성을 나타내지 않고 기하급수적으로 감소했다. 반면에, photoluminescence (PL)는 LMCT와 같은 리간드 효과에 의존하여 461 nm에서 최대 excitation을 보이고 605 nm에서 최대 emission이 나왔다 (그림 1a). 유사하게, AuNC의 3D 형광 스펙트럼은 λ_{ex} / λ_{ex} = 445 / 613 nm로 나타났다. 365 nm 자외선을 조사하면 주황색 형광이 방출된다. (그림 1c). AuNC의 양자 수율은 λ_{ex} : 394nm 에서 3 %이었다.

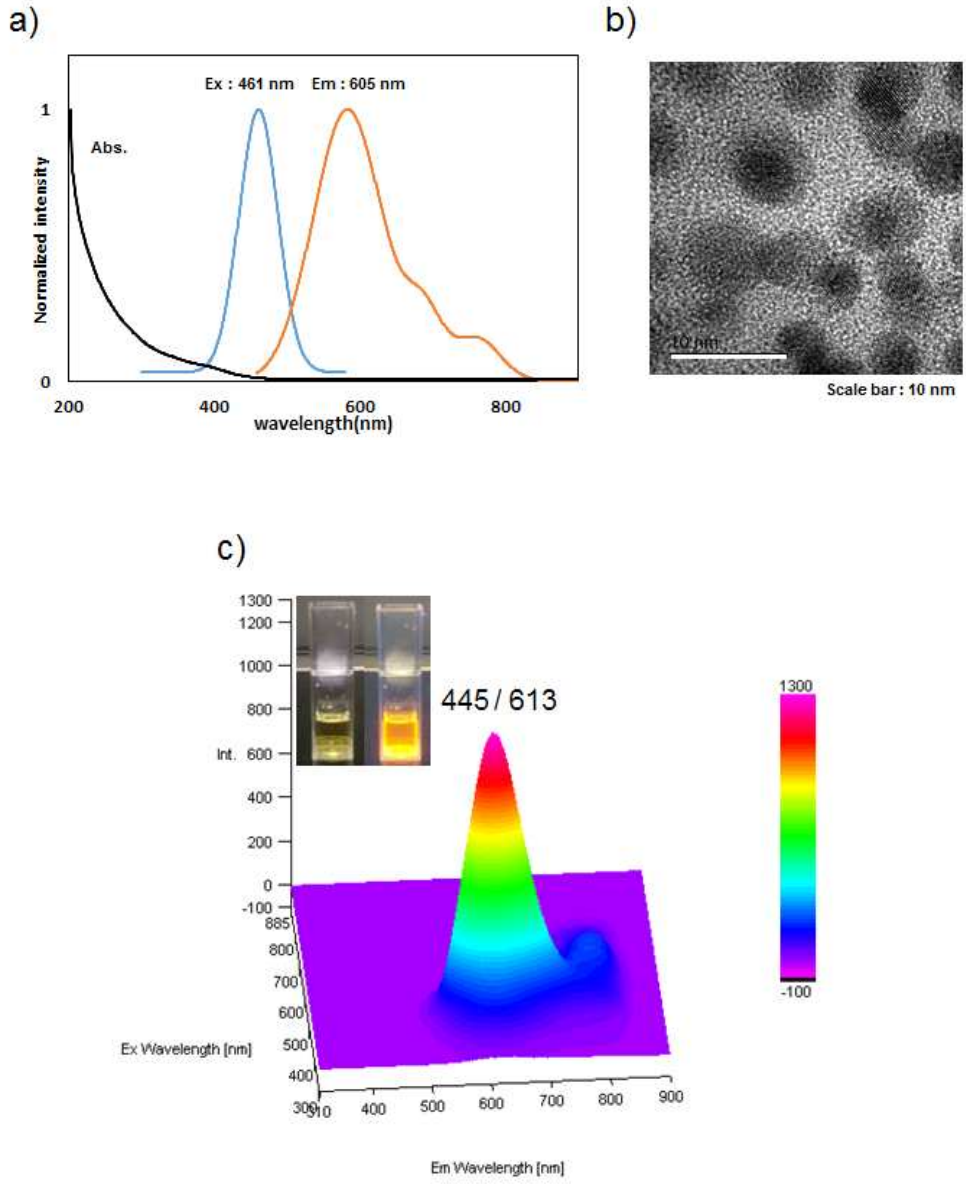


그림 1. AuNC의 특성 a) UV-Vis 및 photoluminescence (PL) 스펙트럼. b) HR-TEM 이미지 c) 3D-형광 스펙트럼 (주변 및 자외선 하에서 얻어진 사진 삽입).

Glutathione (GSH) 으로 안정화 된 AuNC는 높은 수용성을 가지며, 카르복실 작용기(-COO^-)를 가졌다. 공 응축 반응으로 AuNC에 실리카 막을 생성하기 위해 AuNC의 리간드인 GSH와 APTES가 EDC/NHS 반응을 통해 결합하게 된다. PL 스펙트럼에서 최대 excitation 과 emission에 큰 차이를 보이지 않았지만 3D 형광 스펙트럼에서 APTES와 결합한 AuNC는 최대 excitation 파장이 458 nm에서 405 nm로 blue shift를 제외하고는 광학 특성이 변하지 않았다. (그림 2)

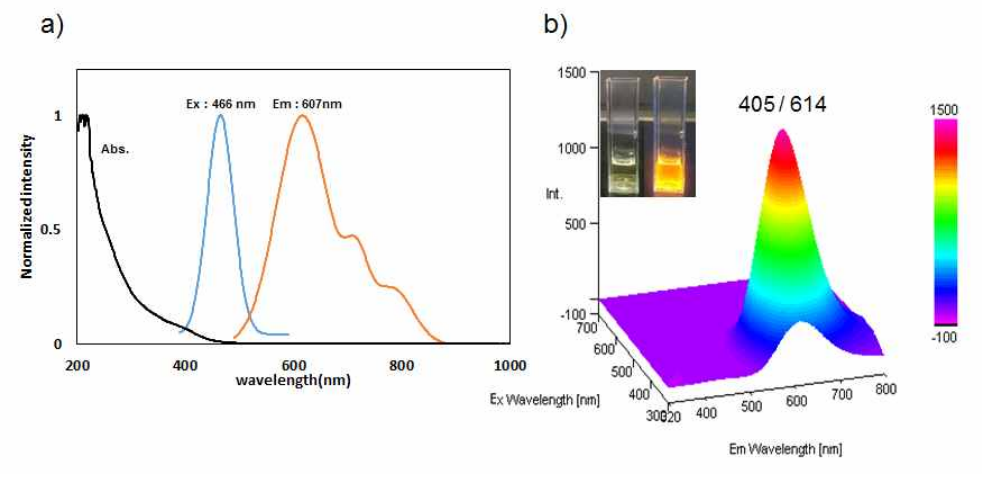


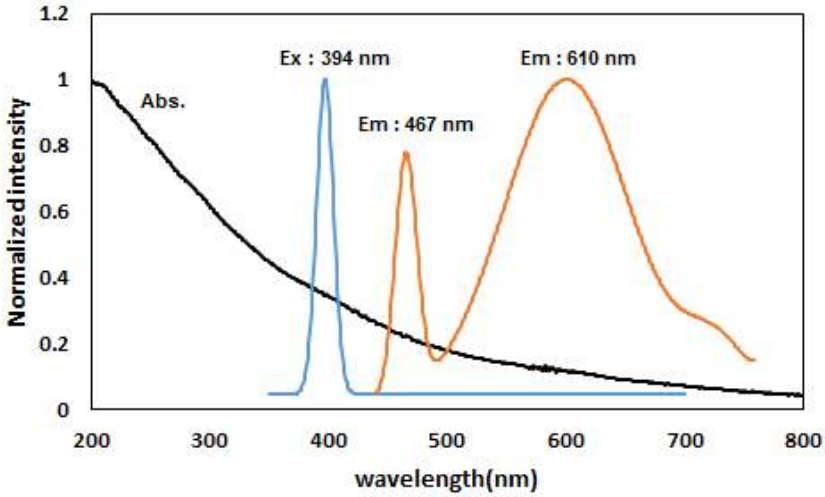
그림 2. APTES와 결합된 AuNC의 특성 a) UV-Vis 및 photoluminescence (PL) 스펙트럼. b) 3D-형광 스펙트럼 (주변 및 자외선 하에서 얻어진 사진 삽입).

3. 2. FLASH의 물리적 특성

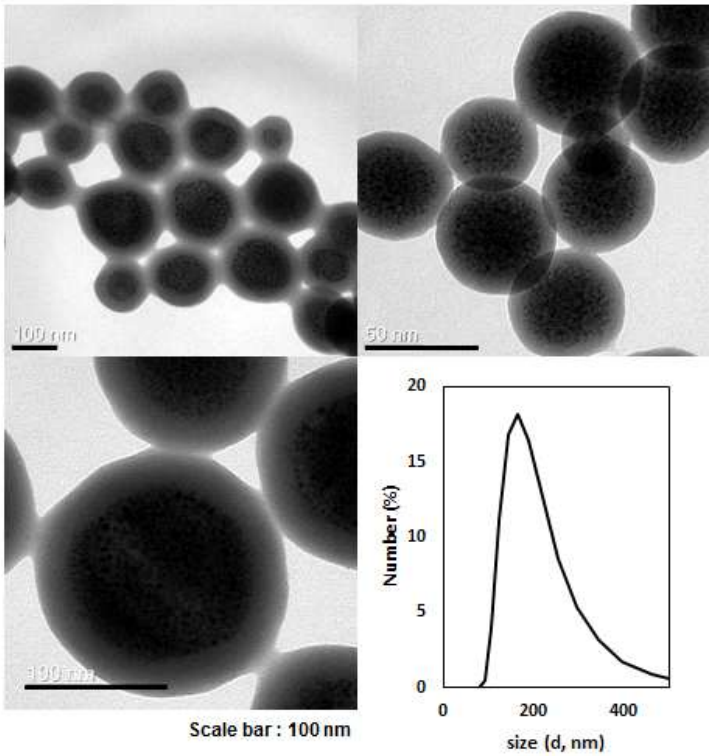
FLASH는 TEOS와 APTES와 결합한 AuNC를 사용하여 공 응축 반응으로 합성되었다. FLASH의 평균 크기는 TEM 사진 (n = 30)에서 중심 및 막에 대해 103.9 및 28.6 nm 이었고 DLS 측정에서 유체 역학 크기는 164 nm이었다. (그림 3b) FLASH의 TEM 사진에서 AuNC가 실리카 매트릭스에 분포되어 있음을 보여 준다. 또한, FLASH의 energy dispersive spectrometer (EDS) elemental mapping을 통해서 AuNC의 중심-막 구조를 확인 할 수 있다. (그림 4).

FLASH는 금 나노클러스트와 마찬가지로 SPR peak를 갖지 않았다. 그러나 FLASH의 경우 800 nm 파장까지 흡수가 점진적으로 감소하여 광학 특성이 향상되었다. FLASH의 AuNC는 실리카 매트릭스 안에 위치했기 때문에 실리카의 반사 지수 (reflex index)가 다르기 때문에 APTES와 결합한 AuNC보다 최대 excitation 파장이 405 nm에서 370 nm로 blue shift 했다. FLASH는 394 nm excitation 하에서 467 nm에서 상대적으로 약한 방출 peak가 나오고 610 nm에서 강한 방출 피크를 나타내었으며, 4 배 높은 QY인 12.8 %를 보였다. (그림 3a, c)마찬가지로, FLASH는 λ_{ex} : 394 nm에서 동일한 농도 (100 nM)의 AuNC보다 4.3 배 강한 PL 강도를 나타냈다. 이것은 PL 강도와 양자 수율 (QY)의 부합되는 결과임을 알 수 있다. (그림 5).

a)


Ex : 394 nm
Em : 610 nm
Abs.
Em : 467 nm
Normalized intensity
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
200
300
400
500
600
700
800
wavelength(nm)

b)


100 nm
50 nm
100 nm
Scale bar : 100 nm
Number (%)
20
15
10
5
0
0
200
400
size (d, nm)

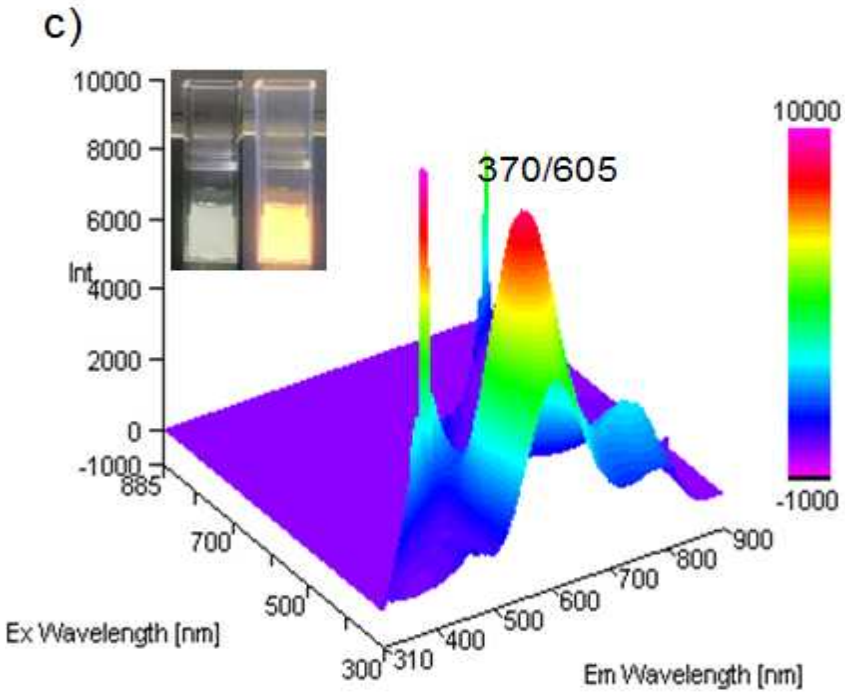


그림 3. FLASH의 특성 결정 a) UV-Vis 및 photoluminescence (PL) 스펙트럼. b) TEM 이미지 및 DLS 결과 c) 3D-형광 스펙트럼 (주변 및 자외선 하에서 얻어진 사진 삽입).

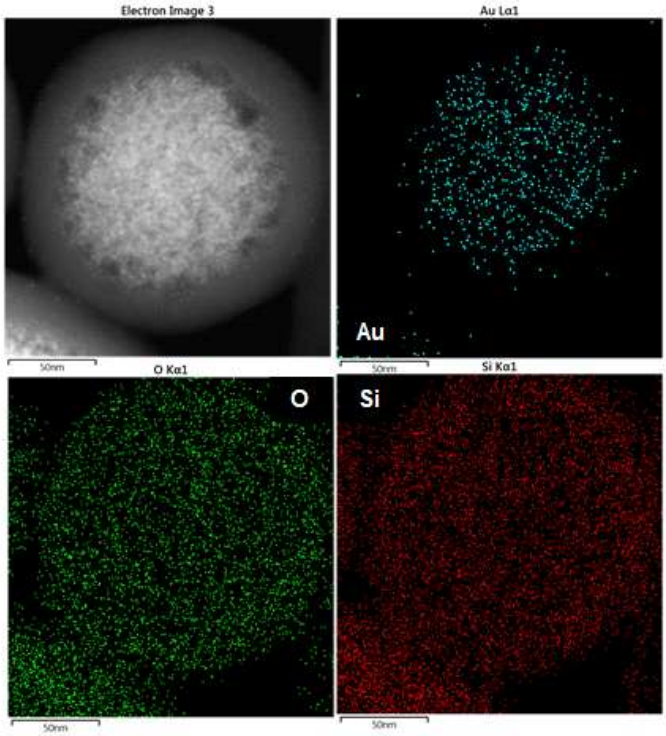


그림 4. FLASH의 STEM 이미지와 EDS elemental mapping (Au Lα, O Kα, Si Kα).

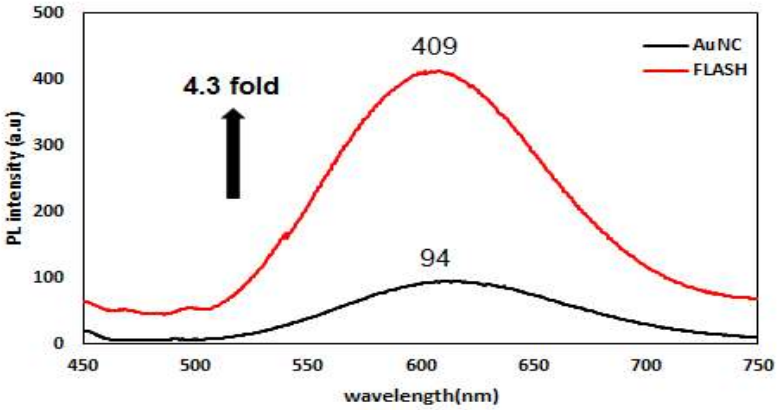


그림 5. 394 nm에서의 excitation에서 같은 농도(100 nM)의 FLASH와 AuNC의 PL intensity 비교.

3. 3. FT-IR 분석

우리는 Fourier transform 적외선 분광기 (FT-IR)로 AuNC의 변형을 관찰했다. 스펙트럼 (그림 2)에서 알 수 있듯이 AuNC는 1600 ~ 1700 cm^{-1}에 GSH (C = O 대칭 스트레칭)의 아미드 Ⅰ과 1533 cm^{-1}에 GSH (C-N 신축)의 아미드 Ⅱ를 가지고 있다. 또한 1403 cm^{-1}에서 카르복실기 (COO^-) 대칭 스트레칭 밴드를 보였다. 그러나 카복실 그룹 (COO^-) 비대칭 스트레칭 밴드는 아미드 Ⅰ 스트레칭 밴드와 겹치기 때문에 구별 될 수 없었다. (그림 6a) APTES와 결합한 후, APTES의 Silane 스트레칭 밴드에 해당하는 919 cm^{-1}와 1090 cm^{-1}에서 새로운 강한 피크가 나타났다.[41,44] 이 결과는 APTES가 GSH와 공유 결합 된 것을 말해준다.(그림 6b)

FLASH에 대해 실리카 막 형성의 검증은 APTES가 결합한 AuNC가 없는 실리카 나노 입자 (SN)와 비교하여 FT-IR로 측정하였다. 아미드 Ⅰ & Ⅱ 밴드는 APTES가 결합된 AuNC의 존재로 인해 FLASH에서만 관찰되었으며, SN에 비해 약 1,250 cm^{-1}의 강한 shoulder 밴드는 Si-O-Si 스트레칭과 Si-O-M 스트레칭 피크의 중첩임을 추측 할 수 있다.[45-46](그림 6c,d)

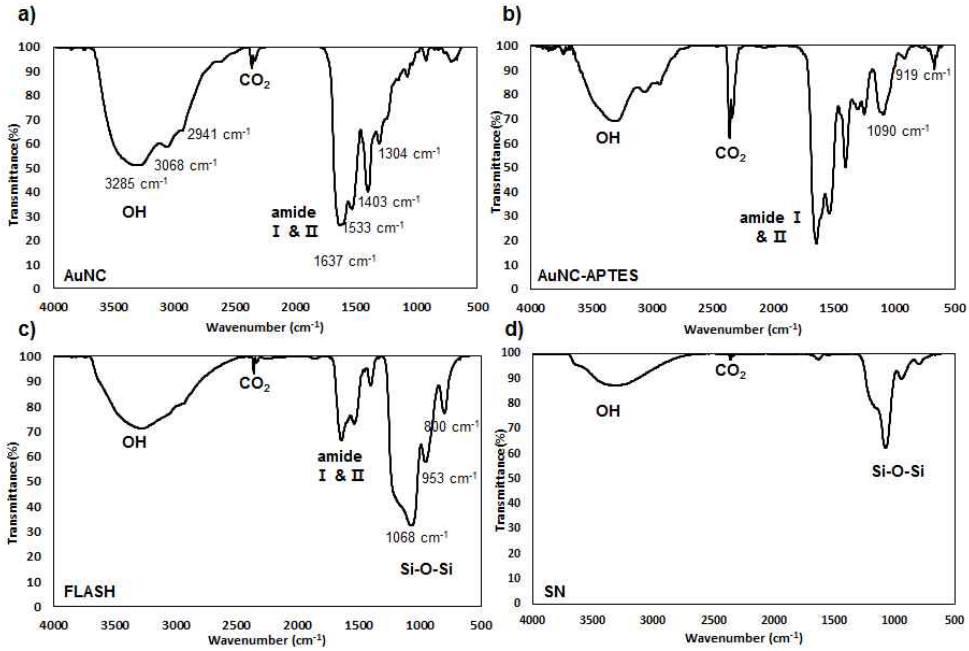


그림 6. FT-IR 스펙트럼 a) AuNC b) APTES와 결합한 AuNC c) FLASH d) 실리카 나노입자 (SN)

3. 4. 광촉매 활성 (Photocatalytic activity) 측정

FLASH의 광촉매 활성을 조사하기 위해, UV 영역의 레이저 조사 아래에서 FLASH에 의해 생성된 활성 산소로 인한 메틸렌 블루(MB)의 광분해를 통해 특징지었다. 90 분 동안 100 μg/mL FALSH의 광촉매 반응으로 MB의 86 %가 분해되었다. AuNC의 경우, 이론적으로 FALSH와 동일한 농도(187.6 nM)에서 MB의 41 %가 로 분해되었다. 대조적으로, 나노 물질이 없는 MB와 실리카 나노 입자가 있는 경우는 UV 영역의 레이저 조사 90 분 동안 MB의 4 %와 8 % 만 분해되었다 (그림 7). 이 결과는 FLASH가 광역동 치료 (PDT)에 사용될 수 있음을 보여준다.

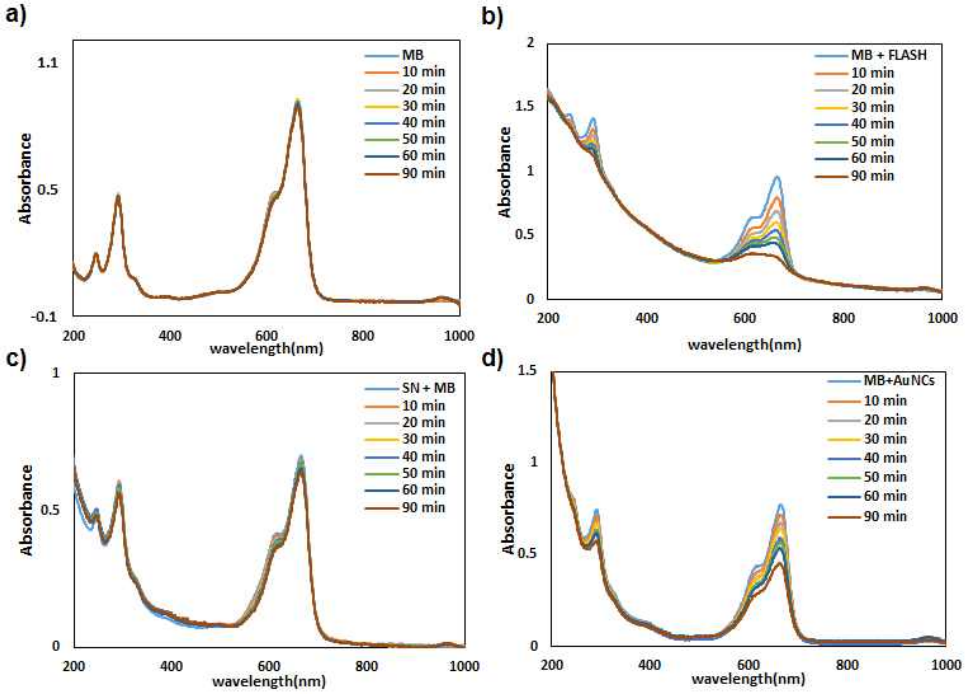


그림 7. 자외선 조사 하에서 Methylene Blue (MB)의 분해에 따른 UV-Vis 스펙트럼 변화 a) 나노 물질이 없이 MB만 있는 경우 b) FLASH와 MB 경우 c) SN과 MB 경우 d) AuNC와 MB 경우

3. 5. 세포 내 광역동 치료효과

우리는 세포 카운팅 키트-8 (CCK- 8) 분석을 사용하여 인간 자궁경부암 세포 라인 (HeLa)에 대한 FLASH와 AuNC의 세포 생존 능력을 조사했다. (그림 8a) FLASH는 500 μg/mL 처리 농도까지 UV 영역의 레이저 조사 없이 세포 생존율의 91 % 이상이 관찰되었다. 마찬가지로, 이론적으로 동일한 농도의 AuNC도 88 % 이상의 세포 생존율이 나왔다.

FLASH의 높은 생체 적합성과 비교하여 자외선 조사-매개 광역동 치료는 용량에 따른 의존성을 보이며 세포 viability의 감소를 명백하게 나타냈다. 10 분간 0.25 / cm^2의 365 nm 자외선 조사에 따라 CCK-8 분석을 실시한 결과 과민성 세포의 생존율은 53.67 % (125 μg/mL), 27.08 % (250 μg/mL) 및 6.32 % (500 μg/mL)로 나왔다.

광 역동 치료법은 Calcein AM/EthiD-1로 live / dead 염색과 형광 현미경 관찰에 의해 확인하였다. HeLa 세포의 사멸은 UV 영역의 레이저가 처리 된 지정된 영역에서만 선택적으로 나타났다. 반면에, FLASH와 달리 AuNC는 live/dead 염색 이미지로부터 충분한 광역동 치료 효율을 나타내지 않았다 (그림 8b).

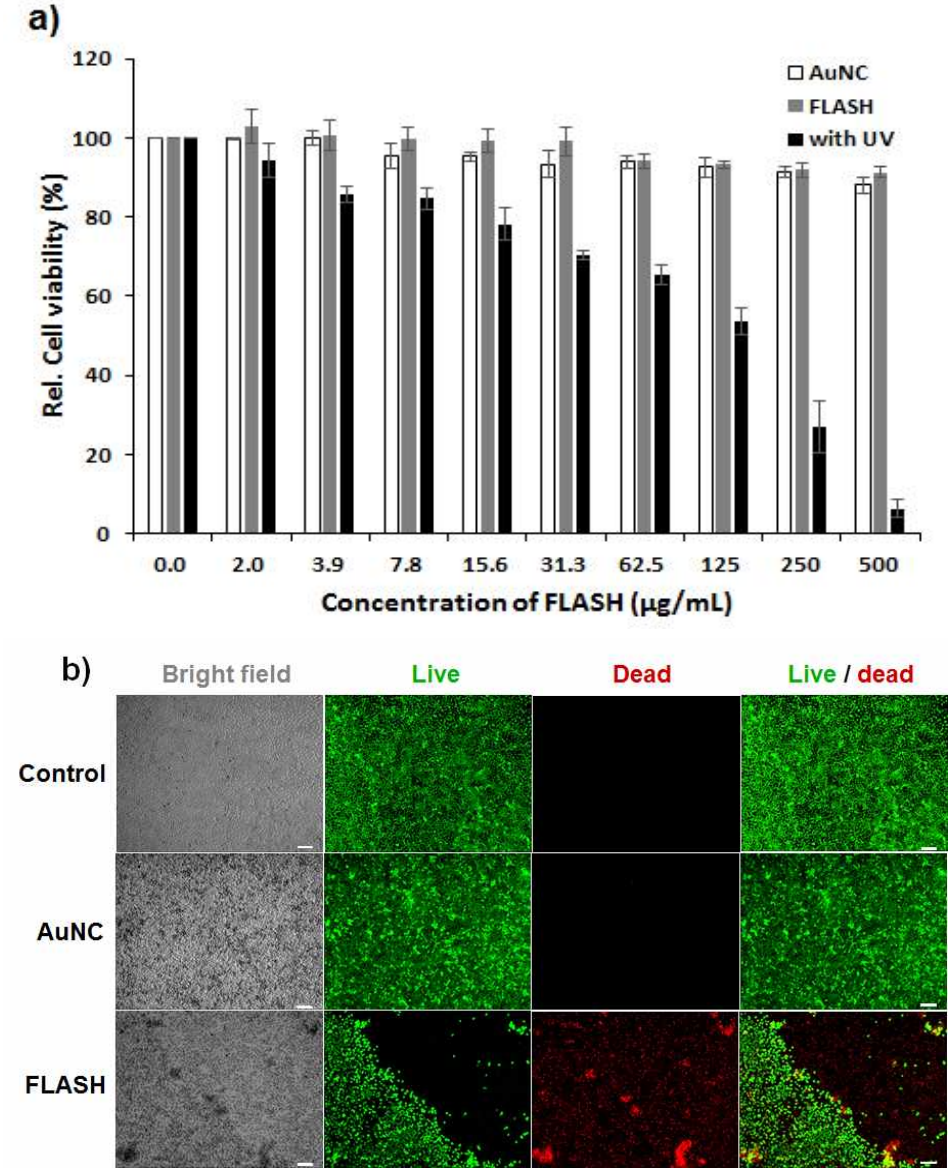


그림 8. 광역동 치료 가능성을 검증하기 위한 HeLa 세포에 대한 FLASH 세포 독성 분석. (a) AuNC, FLASH의 세포 독성 분석 및 UV 영역의 레이저 조사에 의해 유발 된 FLASH 매개 광 역동 세포 제거 분석 (b) 시각적으로 지정된 부위에서 선택적 광역동 치료를 뒷받침하는 live / dead 염색. 스케일 바는 100 mm.

3. 6. 세포 내 FLASH의 형광 이미지

우리는 HeLa 세포에 대해 FLASH를 사용하여 형광 살아있는 세포에서 바이오 이미징을 수행했다. FLASH를 처리하고 4 시간 동안 배양 한 후 Hoechst 33342에 의해 세포핵의 염색을 관찰하여 세포 내 FLASH 분포를 명확하게 관찰 하였다. Hoechst 33342 (ex/em = 365/461 nm)와 FLASH (ex/em = 492/575 nm) 신호에 따르면 세포 내로의 성공적인 도입과 FLASH 형광을 통한 세포 내 분포의 바이오 이미징이 확인되었다. (그림 9).

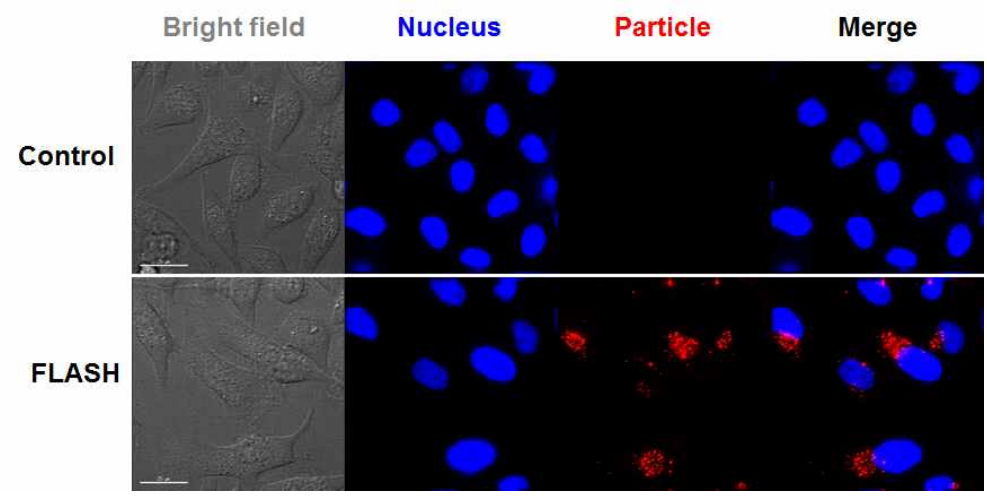


그림 9. FLASH를 처리 한 HeLa 세포의 형광 이미지. 세포 핵은 Hoechst 33342 (청색)에 의해 염색되었고, 도입 된 FLASH는 핵 주위에서 적색 신호로 관찰되었다. 스케일 바는 25 mm.

4. Conclusion

GSH를 환원제 및 표면 안정제로 사용하여 간편한 방법으로 형광을 내는 AuNC를 합성하였다. APTES의 결합 이후의 공 응축 반응으로 실리카 막 형성으로 형광을 내는 AuNC 중심과 실리카 막의 중심 - 막 구조인 복합 나노구조체 (FLASH)를 생성시켰다. FLASH는 UV 영역의 빛의 조사 하에서 향상된 양자 수율 (QY) 및 광촉매 활성을 나타냈다. FLASH는 우수한 생체 적합성, 수용액에서 분산성, 향상된 광 발광 및 광촉매 활성을 보여주므로 FLASH가 다양한 약물 전달 및 생체 의학 응용을 위한 유망한 복합 나노구조체가 될 것으로 기대한다.

5. Reference

1. Buttke, T. M.; Sandstrom, P. A., Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today* 1994, *15* (1), 7-10.
2. Hu, L.; Deng, L.; Alsaiari, S.; Zhang, D.; Khashab, N. M., "Light-on" sensing of antioxidants using gold nanoclusters. *Anal Chem* 2014, *86* (10), 4989-94.
3. Luo, Y.; Kessel, D., Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. *Photochemistry and photobiology* 1997, *66* (4), 479-483.
4. Dellinger, M., Apoptosis or necrosis following Photofrin® photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochemistry and photobiology* 1996, *64* (1), 182-187.
5. Lee, J. S.; Kim, S.; Na, H. K.; Min, D. H., MicroRNA-Responsive Drug Release System for Selective Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy In Vivo. *Adv Healthc Mater* 2016, *5* (18), 2386-95.
6. Huang, P.; Lin, J.; Wang, S.; Zhou, Z.; Li, Z.; Wang, Z.; Zhang, C.; Yue, X.; Niu, G.; Yang, M.; Cui, D.; Chen, X., Photosensitizer-conjugated silica-coated gold nanoclusters for fluorescence imaging-guided photodynamic therapy. *Biomaterials* 2013, *34* (19), 4643-54.
7. Mayhew, S.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Brown, S. B., Investigation of Cross-resistance to a Range of

Photosensitizers, Hyperthermia and UV Light in Two Radiation-induced Fibrosarcoma Cell Strains Resistant to Photodynamic Therapy In Vitro¶. *Photochemistry and Photobiology* 2001, *73* (1), 39.

8. Kim, S.; Ahn, S. M.; Lee, J.-S.; Kim, T. S.; Min, D.-H., Functional manganese dioxide nanosheet for targeted photodynamic therapy and bioimaging in vitro and in vivo. *2D Materials* 2017, *4* (2), 025069.
9. Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 2006, *6* (7), 535-45.
10. Brevet, D.; Gary-Bobo, M.; Raehm, L.; Richeter, S.; Hocine, O.; Amro, K.; Loock, B.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Morere, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J. O., Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Chem Commun (Camb)* 2009, (12), 1475-7.
11. Sakamoto, M.; Tachikawa, T.; Fujitsuka, M.; Majima, T., Photoreactivity of As-fabricated Au clusters at the single-cluster level. *J Am Chem Soc* 2009, *131* (1), 6-7.
12. Xie, J.; Zheng, Y.; Ying, J. Y., Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *J Am Chem Soc* 2009, *131* (3), 888-9.
13. 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. *J Am Chem Soc* **2013,** *135* (13), 4978-81.

14. Ramakrishna, G.; Varnavski, O.; Kim, J.; Lee, D.; Goodson, T., Quantum-sized gold clusters as efficient two-photon absorbers. *J Am Chem Soc* **2008,** *130* (15), 5032-3.
15. Chen, L. Y.; Wang, C. W.; Yuan, Z.; Chang, H. T., Fluorescent gold nanoclusters: recent advances in sensing and imaging. *Anal Chem* **2015,** *87* (1), 216-29.
16. Stamplecoskie, K. G.; Kamat, P. V., Size-dependent excited state behavior of glutathione-capped gold clusters and their light-harvesting capacity. *J Am Chem Soc* **2014,** *136* (31), 11093-9.
17. Zheng, Y.; Lai, L.; Liu, W.; Jiang, H.; Wang, X., Recent advances in biomedical applications of fluorescent gold nanoclusters. *Adv Colloid Interface Sci* **2017,** *242*, 1-16.
18. Chen, Y. S.; Kamat, P. V., Glutathione-capped gold nanoclusters as photosensitizers. Visible light-induced hydrogen generation in neutral water. *J Am Chem Soc* **2014,** *136* (16), 6075-82.
19. Herzing, A. A.; Kiely, C. J.; Carley, A. F.; Landon, P.; Hutchings, G. J., Identification of active gold nanoclusters on iron oxide supports for CO oxidation. *Science* **2008,** *321* (5894), 1331-5.
20. Kawasaki, H.; Kumar, S.; Li, G.; Zeng, C.; Kauffman, D. R.; Yoshimoto, J.; Iwasaki, Y.; Jin, R., Generation of Singlet Oxygen by Photoexcited Au25(SR)18Clusters. *Chemistry of Materials* **2014,** *26* (9), 2777-2788.

21. Misawa, M.; Takahashi, J., Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV Irradiations. *Nanomedicine* **2011,** *7* (5), 604-14.
22. Chattoraj, S.; Bhattacharyya, K., Fluorescent Gold Nanocluster Inside a Live Breast Cell: Etching and Higher Uptake in Cancer Cell. *The Journal of Physical Chemistry C* **2014,** *118* (38), 22339-22346.
23. 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.
24. Wu, Y. T.; Shanmugam, C.; Tseng, W. B.; Hiseh, M. M.; Tseng, W. L., A gold nanocluster-based fluorescent probe for simultaneous pH and temperature sensing and its application to cellular imaging and logic gates. *Nanoscale* **2016,** *8* (21), 11210-6.
25. Bi, F.; Yin, H.; Zheng, S.; Zhu, Q.; Yang, H.; Kang, M.; Gan, F.; Chen, X., One-step synthesis of peptide conjugated gold nanoclusters for the high expression of FGFR2 tumor targeting and imaging. *RSC Adv.* **2016,** *6* (6), 4627-4633.
26. Shang, L.; Dorlich, R. M.; Brandholt, S.; Schneider, R.; Trouillet, V.; Bruns, M.; Gerthsen, D.; Nienhaus, G. U., Facile preparation of water-soluble fluorescent gold nanoclusters for cellular imaging applications. *Nanoscale* **2011,** *3* (5), 2009-14.
27. 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), 2244-9.

28. Han, L.; Xia, J. M.; Hai, X.; Shu, Y.; Chen, X. W.; Wang, J. H., Protein-Stabilized Gadolinium Oxide-Gold Nanoclusters Hybrid for Multimodal Imaging and Drug Delivery. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017,** *9* (8), 6941-6949.
29. Khlebtsov, B.; Zharov, V.; Melnikov, A.; Tuchin, V.; Khlebtsov, N., Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters. *Nanotechnology* **2006,** *17* (20), 5167-5179.
30. Chattoraj, S.; Amin, A.; Jana, B.; Mohapatra, S.; Ghosh, S.; Bhattacharyya, K., Selective Killing of Breast Cancer Cells by Doxorubicin-Loaded Fluorescent Gold Nanoclusters: Confocal Microscopy and FRET. *Chemphyschem* **2016,** *17* (2), 253-9.
31. Tao, Y.; Li, Z.; Ju, E.; Ren, J.; Qu, X., Polycations-functionalized water-soluble gold nanoclusters: a potential platform for simultaneous enhanced gene delivery and cell imaging. *Nanoscale* **2013,** *5* (13), 6154-60.
32. Dutta, D.; Chattopadhyay, A.; Ghosh, S. S., Cationic BSA Templated Au - Ag Bimetallic Nanoclusters As a Theranostic Gene Delivery Vector for HeLa Cancer Cells. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2016,** *2* (11), 2090-2098.

33. Zhou, S.; Duan, Y.; Wang, F.; Wang, C., Fluorescent Au nanoclusters stabilized by silane: facile synthesis, color-tunability and photocatalytic properties. *Nanoscale* **2017,** *9* (15), 4981-4988.
34. Yu, C.; Li, G.; Kumar, S.; Kawasaki, H.; Jin, R., Stable $Au_{25}(SR)_{18}/TiO_2$Composite Nanostructure with Enhanced Visible Light Photocatalytic Activity. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2013,** *4* (17), 2847-2852.
35. Polavarapu, L.; Manna, M.; Xu, Q. H., Biocompatible glutathione capped gold clusters as one- and two-photon excitation fluorescence contrast agents for live cells imaging. *Nanoscale* **2011,** *3* (2), 429-34.
36. Wu, B.-Y.; Wang, C.-W.; Chen, P.-C.; Chang, H.-T., Glutathione assisted preparation of gold nanoclusters using minimum amount of protein. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017,** *238*, 1258-1265.
37. Zhao, T.; Goswami, N.; Li, J.; Yao, Q.; Zhang, Y.; Wang, J.; Zhao, D.; Xie, J., Probing the Microporous Structure of Silica Shell Via Aggregation-Induced Emission in Au(I)-Thiolate@SiO_2 Nanoparticle. *Small* **2016,** *12* (47), 6537-6541.
38. Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of colloid and interface science* **1968,** *26* (1), 62-69.
39. Ji, B.; Giovanelli, E.; Habert, B.; Spinicelli, P.; Nasilowski, M.; Xu, X.; Lequeux, N.; Hugonin, J. P.; Marquier, F.;

Greffet, J. J.; Dubertret, B., Non-blinking quantum dot with a plasmonic nanoshell resonator. *Nat Nanotechnol* **2015,** *10* (2), 170-5.

40. Serrano, I. C.; Vazquez-Vazquez, C.; Adams, A. M.; Stoica, G.; Correa-Duarte, M. A.; Palomares, E.; Alvarez-Puebla, R. A., The effect of the silica thickness on the enhanced emission in single particle quantum dots coated with gold nanoparticles. *RSC Advances* **2013,** *3* (27), 10691.
41. Liu, C.; Bao, L.; Tang, B.; Zhao, J. Y.; Zhang, Z. L.; Xiong, L. H.; Hu, J.; Wu, L. L.; Pang, D. W., Fluorescence-Converging Carbon Nanodots-Hybridized Silica Nanosphere. *Small* **2016,** *12* (34), 4702-6.
42. Grzelak, J.; Krajewska, A.; Krajnik, B.; Jamiola, D.; Choma, J.; Jankiewicz, B.; Piątkowski, D.; Nyga, P.; Mackowski, S., Hybrid silica-gold core-shell nanoparticles for fluorescence enhancement. *Nanospectroscopy* **2016,** *2* (1).
43. Wu, X.; Li, L.; Zhang, L.; Wang, T.; Wang, C.; Su, Z., Multifunctional spherical gold nanocluster aggregate@polyacrylic acid@mesoporous silica nanoparticles for combined cancer dual-modal imaging and chemo-therapy. *J. Mater. Chem. B* **2015,** *3* (12), 2421-2425.
44. Zhang, Z.; Zhang, P.; Guo, K.; Liang, G.; Chen, H.; Liu, B.; Kong, J., Facile synthesis of fluorescent Au@SiO2 nanocomposites for application in cellular imaging. *Talanta* **2011,** *85* (5), 2695-9.
45. Le Guével, X.; Hötzer, B.; Jung, G.; Schneider, M.,

NIR-emitting fluorescent gold nanoclusters doped in silica nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **2011,** *21* (9), 2974.

46. El-Toni, A. M.; Yin, S.; Sato, T., Control of silica shell thickness and microporosity of titania-silica core-shell type nanoparticles to depress the photocatalytic activity of titania. *J Colloid Interface Sci* **2006,** *300* (1), 123-30.

47. Liu, J.; Duchesne, P. N.; Yu, M.; Jiang, X.; Ning, X.; Vinluan, R. D., 3rd; Zhang, P.; Zheng, J., Luminescent Gold Nanoparticles with Size-Independent Emission. *Angew Chem Int Ed Engl* **2016,** *55* (31), 8894-8.

Abstract

Tae Shik Kim
Department of chemistry
The Graduated school
Seoul National University

This paper reports a covalently linked hybrid nanocomposites composed of fluorescent gold nanoclusters (AuNCs) core and Silica shell (FLASH). Glutathione (GSH), the ligand of AuNCs, was conjugated with APTES and then co-condensed with TEOS to make a shell. This newly developed method made it possible for AuNCs to be distributed in the silica matrix structure. The novel hybrid nanocomposites (FLASH) exhibited enhanced quantum yield and about 4 times higher fluorescence intensity than AuNCs. They showed good water solubility and low cell cytotoxicity. Also, FLASH generated enough amounts of reactive oxygen species (ROS) under UV-irradiation for photodynamic therapy (PDT). FLASH are the promising nanocomposite as bio-imaging and photosensitizer for PDT.

Keywords : gold nanoclusters, silica hybrid nanocomposite, Bio-imaging, photodynamic therapy, photosensitizer.

Student Number : 2014-22395