

• 综述 •

金纳米棒光热治疗肿瘤的生物安全性评估*

王浩 综述, 张世文[△] 审校

650118 昆明, 昆明医科大学第三附属医院·云南省肿瘤医院 头颈外一科

[摘要] 金纳米棒具有高效的光热转换特性和良好的生物相容性, 是当前医学应用研究的热点之一, 目前已在细胞成像、药物或者基因运载以及肿瘤光热治疗等方面开展系列研究。虽然金为惰性金属材料, 但金纳米微粒仍然存在某些金属毒理特性, 且金纳米棒在制备过程中常常还会用到的一些毒性化学物质, 因此金纳米棒的生物安全性成为临床应用研究要解决的首要问题之一。本文拟从金纳米棒理化特性、化学修饰、生物毒性及体内代谢和安全等方面进行综述, 旨在为金纳米棒进行医学研究提供生物安全相关理论依据。

[关键词] 金纳米棒; 光热治疗; 生物安全性; 评估

[中图分类号] R312; R730.55 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2019.10.013

引文格式: Wang H, Zhang SW. Assessment of biosafety of gold nanorods in photothermal tumor therapy [J]. J Cancer Control Treat, 2019, 32(10): 935-939. [王浩, 张世文. 金纳米棒光热治疗肿瘤的生物安全性评估[J]. 肿瘤预防与治疗, 2019, 32(10): 935-939.]

Assessment of Biosafety of Gold Nanorods in Photothermal Tumor Therapy

Wang Hao, Zhang Shiwen

First Department of Head and Neck Surgery, Yunnan Cancer Hospital & The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University & Yunnan Cancer Center, Kunming 650118, Yunnan, China

Corresponding author: Zhang Shiwen, E-mail: zhangshiwen_3@163.com

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (NO. 81560496), and by grants from Health and Family Planning Commission of Yunnan Province (NO. D-201620) and Science & Technology Department of Yunnan Province (NO. C20048).

[Abstract] Gold nanorods have become a hot spot in medical application due to their high efficiency in photothermal conversion and good biocompatibility. Currently, a series of studies have been carried out on cell imaging, drug or gene delivery, and photothermal tumor therapy. Although gold is an inert metal material, gold nanoparticles still have some toxicological properties of metal. Moreover, some toxic chemicals are often used in the preparation of gold nanorods. Therefore, the biological safety of gold nanorods has become one of the primary problems to be solved in clinical application research. This paper intends to review the physical and chemical properties, chemical modification, biological toxicity, metabolism and safety of gold nanorods, and provide theoretical basis for biosafety in medical research of gold nanorods.

[Key words] Gold nanorods; Photothermal treatment; Biosafety; Assessment

近年来,随着纳米医学科技不断发展,新型纳米材料应用于临床研究受到广泛关注^[1]。金纳米棒因具有高效的光热转换特性和良好的生物相容性等独特的理化特性,已在免疫检测、细胞成像、基因运

载以及肿瘤治疗等领域深入研究,具有广阔的生物医学应用前景^[2-3]。作为一种新型的高效光热转换贵金属纳米材料,金纳米棒具有宏观金属粒子所不具备的物理性质。金纳米微粒本身的毒理性质以及制备过程中所用到的毒性化学物质,使金纳米棒的生物安全性成为临床应用研究要解决的首要问题之一。国内外研究显示,将一些正常物质制成纳米级后,可能会产生潜在的生物毒性^[2-3]。因此,在医学应用相关研究中,系统性评估金纳米棒的生物安全性显得至关重要。

[收稿日期] 2019-07-29 [修回日期] 2019-09-23

[基金项目] * 国家自然科学基金项目(编号:81560496); 2016年度云南省高层次卫生计生技术人才项目(编号:D-201620); 2018年云南省中青年学术和技术带头后备人才项目(编号:C20048)

[通讯作者] [△]张世文, E-mail: zhangshiwen_3@163.com

1 金纳米棒的理化特性和修饰

现代纳米技术可制备不同尺寸大小及不同形貌的金纳米棒。不同大小、形貌的金纳米材料的理化特性是不一样的。金纳米棒 (gold nanorods, AuNRs or GNRs) 在透射电镜下的结构示一种纳米级别的棒状金纳米颗粒 (图 1A)^[4], 其物理和化学性质非常稳定, 具有表面等离子震荡特性, 即当金纳米棒长横比为 3.9 时, 其纵向最大光吸收峰位为 800nm (图 1B), 波长为 800nm 的近红外激光照射金纳米棒可以引起该微粒表层导带电子发生相干最大震荡。金纳米棒有两个表面等离子共振带, 横向带在可见光区 $\lambda = 520\text{nm}$ 处, 而纵向带在很宽的近红外光波长范围内^[5-6], 只要纵横比发生微小的变化, 金纳米棒的纵向带的吸收波长就会发生剧烈变化。纵向模式的共振如果发生在近红外光谱 700 ~ 900nm 的波长范围内, 能够在生物组织中具有最大穿透深度, 以及最高细胞摄取效率^[7]。与其他纳米材料相比, 金纳米棒的细胞毒性相对低^[8], 可以通过 Au-硫醇键与药物等聚合, 从而轻松实现功能化。利用其易于修饰的特性, 可以将药物和生物分子结合到金纳米棒上输送到身体的特定部位^[9]。多项研究证明, 金纳米棒在众多纳米材料 (金纳米壳、金纳米球、金纳米笼等) 中光热转换效率最高^[10]。目前金纳米棒最主要的合成法为种子生长法, 以十六烷基三甲基溴化铵 (cetyl-trimethyl ammonium bromide, CTAB) 分子作为表面活性剂。CTAB 在金纳米棒的表面形成双层有机膜, 其阳性季铵基团之间相互排斥使得金纳米棒在水性介质中相对稳定、分散, 然而, CTAB 包裹的金纳米棒在磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 和血清中却不稳定^[11], 且有很明显的生物毒性^[12], 这种现象大大地限制了金纳米棒在生物医学领域中的应用。另外, CTAB 还会阻碍生物相容性好的化合物对金纳米棒表面的修饰作用^[13]。解决问题的思路是替代 CTAB 或对其进行包被。替代 CTAB 的方法有: 将 CTAB 从金纳米棒悬浮液中置换到含有磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 的氯仿溶液中^[14]。与 CTAB-AuNRs 相比, PC 修饰的金纳米棒细胞毒性较低, 或是使用逐层聚电解质沉积作为增强金纳米棒表面稳定性的手段, 而非 CTAB^[15]。Huang 等^[16]发现后者在 PBS 和血清中表现出优异的稳定性, 保持了光学性质。烷硫醇对金具有高亲和力, 也可用于替代 CTAB 分子^[17]。Wang 等^[18]通过双相转移配体交换, 用 11-巯基十一

烷酸置换金纳米棒表面的 CTAB 分子。作者认为, 相对于 CTAB-AuNRs, 11-巯基十一烷酸-金纳米棒用于心肌钙蛋白 I 测定的阳性参考值下限降低了 5 倍, 从而大大提高了灵敏度。另外, 金纳米棒还可与磷脂-葡聚糖缀合, 缀合后的金纳米棒在多个 pH 值的溶液和血清中均表现出很好的稳定性。另一种替代方案是在 CTAB 的基础上, 再包被其他表面物质, 例如用聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 硫醇化 CTAB, PEG 涂覆的金纳米棒已广泛用于生物学应用。有研究表明 PEG 可以延长纳米材料在生物体内的循环时间^[19]。PEG 通过将硫醇接头锚定在金纳米棒表面, 可以让金纳米棒更易功能化, 可以结合肽、蛋白质、抗体、寡糖、核酸等多种生物分子^[20]。与这些物质结合后的金纳米粒子能满足不同类型肿瘤诊断和治疗的需要, 从而形成围绕金纳米棒的多平台肿瘤诊治体系^[21-22]。目前金纳米棒的功能化修饰是研究其在生物体内主动靶向的方法之一, 方法是使用肽或抗体等小分子化合物来修饰金纳米棒, 使其能特异性地结合到高表达亲和性配体的肿瘤组织或细胞。有学者发现, 与抗表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 抗体结合的金纳米棒可靶向结合到高表达 EGFR 的膀胱癌细胞, 借此可对膀胱癌进行靶向光热消融^[23]。Zhang 等^[24]发现抗 EGFR 抗体缀合的金纳米棒 (抗 EGFR-GNS) 对目前临床上预后很差的三阴性乳腺癌有较为理想的抑制作用, 抗 EGFR-GNS 介导的光热治疗显著诱导溶酶体自噬, 最终导致高表达 EGFR 的乳腺癌细胞死亡。因此, 通过对金纳米棒表面进行修饰与功能化, 大大降低其毒性, 进而为其广泛应用于生物医学领域提供重要基础。

2 金纳米棒的细胞毒性

金纳米粒子粒径在 10 ~ 100nm 的范围内, 能够自由穿越细胞, 在膜蛋白指导下通过内吞效应进入细胞中, 在细胞外分泌下排出。金纳米粒子在细胞中的迁移速率与其粒径存在联系, 粒径越小, 毒性越大, 迁移效率越快, 并且金纳米粒子能够穿过细胞膜进入特定的细胞器中, 干扰细胞器功能发挥, 因此金纳米粒子具有潜在细胞毒性。Patra 等^[25]研究表明, 5nm 的金纳米微粒可以促进肺癌 A549 细胞凋亡, 抑制肺癌 A549 细胞增殖。而直径 10nm 和 20nm 的金纳米微粒并没有出现明显的细胞毒性。Coradeghini 等^[26]研究表明, 当浓度 $\geq 50\mu\text{mol/L}$ 时, 5nm 的金纳米粒子会显现出对 Balb/3T3 的细胞毒

性,而 15nm 的金纳米粒子却没有显现。球形 1.4nm 的金纳米粒子通过氧化应激机制导致肿瘤细胞中的线粒体损伤甚至出现坏死^[27]。Pan 等^[28]研究发现直径 1.4nm 的金纳米微粒对结缔组织中的成纤维细胞、上皮细胞、巨噬细胞和黑色素瘤细胞的细胞毒性最为明显,可导致细胞快速死亡,而直径 15nm 的金纳米微粒即使在高浓度下也是无毒的。Connor 等^[29]研究也发现,直径 18nm 的金纳米粒子进入细胞内并不会对细胞产生毒性。由此可见,金纳米微粒的细胞毒性与其粒径有关,直径越小,细胞毒性越大。因此,金纳米粒子的尺寸不同,与细胞相互作用的行为也会产生差异。从一定程度上而言,细胞毒性与其浓度呈正相关。有研究学者利用金纳米棒对肺腺癌细胞进行转染分析^[30],通过在 96 孔板中进行肺腺癌细胞的培养,加入不同浓度的金纳米棒溶液后,利用 MTT 方法检测培养 24、48、72 小时之后的细胞毒性,结果表明金纳米棒浓度越高,细胞安全性越低。当金纳米棒的浓度在 100ppm 时,在 24 小时内对细胞有良好的生物安全性。随浓度

升高,细胞存活率降低,随时间增长其细胞的存活率也会显著降低。当其浓度较高时会使细胞出现凋亡。有研究学者通过配体交换的方法,在金纳米微粒表面引入了羟基、羧基以及甲基,分别制备三种不同表面修饰功能团的金纳米微粒,其平均粒径为 15nm,电位均为负值,通过 MTT 方法比较修饰后和未经修饰金纳米微粒作用 HeLa 细胞和 MCC-803 细胞之后的细胞存活率^[31]。结果显示,当金纳米微粒浓度达到 197ng/mL 时,表现为低细胞毒性。从细胞周期结果来看,没有经过修饰的金纳米微粒对细胞 G2/M 周期活动具有一定的影响。在生殖毒性方面,根据 Wiwantitkit^[32]等的研究,化学衍生的金纳米粒子使雄性生殖细胞的运动活力降低。Taylor 等^[33]同样报道了暴露于激光作用下的修饰后的金纳米微粒使雄性生殖细胞的运动活力降低。综上所述,可以认为金纳米棒的尺寸及浓度均会影响细胞增殖,尺寸越小,浓度越高,细胞毒性越大。同时,金纳米棒表面修饰物的不同对细胞毒性也会产生影响。

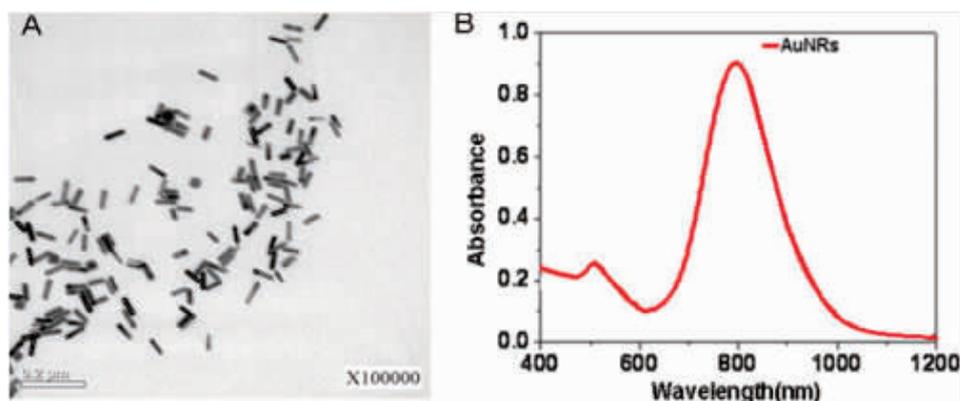


图 1 金纳米棒结构透射电镜图及吸收光谱图

Figure 1. Transmission Electron Microscope and Absorption Spectra of Gold Nanorods

A. Transmission electron microscope of gold nanorods; B. The near-infrared laser with a wavelength of 800 nm illuminates the gold nanorods, which can cause the coherent maximum oscillation of surface-conduction electrons of particles.

3 金纳米棒体内代谢与安全性

研究发现,不同大小、形貌的金纳米材料在生物体内的分布、代谢过程和毒性也不尽相同^[34]。金纳米棒在体内吸收、分布以及积累的生物效应与其长径比、表面电荷分布情况、表面积有一定联系。当金纳米棒接触细胞或者蛋白时,纳米微粒表面会与蛋白质发生生物反应,形成生物-纳米界面,进而导致金纳米棒的理化性质发生较大变化。在临床上将金纳米棒经外周静脉注射到血液中时,血液中复杂蛋白复合物会在纳米微粒表面形成蛋白层,进而被血液具有高结合率以及高浓度的蛋白包裹形成蛋白

冠。蛋白冠会改变原有的金纳米棒大小及其表面构成,影响纳米金微粒的吸收和运输。为更准确分析金纳米棒在体内的分布代谢情况,研究学者选取四种不同表面修饰的长径比为 3.8 的金纳米棒,并以小鼠作为研究对象,通过一次性尾静脉注射的方式使小鼠染毒,选择几个不同时间点,观察小鼠体内肾脏、肝脏以及脾脏组织形态变化以及有关生化指标变化。结果发现,有 70% 的金纳米棒位于小鼠的肝脏中。少量金纳米棒分布于脾脏、肺脏、肾脏和脑。金纳米棒分布以及代谢器官主要在肝脏和脾脏。过量的金纳米棒会影响机体肝脏功能,CTAB-AuNRs 对于小鼠肝脏产生的损害最为严重,其毒性主要在

CTAB 这一结构中,而有蛋白冠包裹的纳米微粒则具有良好的生物相容性。当 CTAB-AuNRs 进入肝脏后主要聚集在肝巨噬细胞的溶酶体中,引起机体氧化应激和炎症反应,进而使小鼠机体初期形成脂质过氧化,之后恢复正常。从病理学和氧化损伤指标可以看出,除 CTAB-AuNRs 组的其他组中,研究都们都发现组织毒性效应,可能是金等惰性金属材料诱导的细胞自噬^[35],进一步导致小鼠体内炎症^[36]和细胞凋亡^[37]。Sonavane 等^[38]研究发现,15~50nm 直径的金纳米可以穿透小鼠血-脑屏障进入脑组织并蓄积。Lasagna-Reeves 等^[39]研究同样发现金纳米在低浓度的情况下依然能透过小鼠的血脑屏障,增加了神经元毒性损伤的风险。还有研究报道,金纳米微粒对生殖有一定毒性。用氨基化聚乙二醇修饰的金纳米注射到小鼠体内能够引起睾酮的分泌,但不会影响小鼠的生育能力,而甲氧基聚乙二醇修饰的金纳米既不影响小鼠睾酮的分泌能力,也不会影响小鼠的生育能力^[40]。上述结果表明,金纳米棒在体内分布及代谢器官主要在肝脏及脾脏中,会对肝脏造成损伤,引起轻微的毒性。虽然金纳米棒分布在脑组织中含量较低,但依旧会透过血脑屏障,造成神经元的损伤。而在生殖方面,目前并没有发现明显的生殖毒性。

4 总结与展望

金纳米棒在生物医学研究中广泛应用。可以尝试将不同类型的技术(譬如细胞成像、药物运载和光热治疗)整合到一套纳米平台上,达到诊断与治疗的整合并用。虽然我们看到金纳米棒展现出广泛的应用前景,但如果将其应用到临床医学研究中仍然会有很多问题值得去探索。如何安全有效地利用金纳米棒进行疾病诊断和治疗,是我们科研工作者一直追求的目标。随着纳米科技的进步,对金纳米材料复合物或纳米载体进行无毒化处理,将有利于我们开发出更多基于金纳米微粒的诊断和治疗方法,造福人类。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Mi Y, Shao Z, Vang J, et al. Application of nanotechnology to cancer radiotherapy[J]. *Cancer Nanotechnology*, 2016, 7(1): 11.
- [2] Wang L, Li D, Hao Y, et al. Gold nanorod-based poly(lactic-co-glycolic acid) with manganese dioxide core-shell structured multifunctional nanoplateform for cancer theranostic applications[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 3059-3075.
- [3] Al Zaki A, Hui JZ, Higbee E, et al. Biodistribution, Clearance, and toxicology of polymeric micelles loaded with 0.9 or 5 nm gold nanoparticles[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2015, 11(10): 1836-1846.
- [4] Zhang S, Li Y, He X, et al. Photothermolysis mediated by gold nanorods modified with EGFR monoclonal antibody induces Hep-2 cells apoptosis in vitro and in vivo[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 1931-1946.
- [5] Thota S, Chen S, Zhou Y, et al. Structural defect induced peak splitting in gold-copper bimetallic nanorods during growth by single particle spectroscopy[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(35): 14652-14658.
- [6] Rayavarapu RG, Petersen W, Ungureanu C, et al. Synthesis and bioconjugation of gold nanoparticles as potential molecular probes for light-based imaging techniques [J]. *Int J Biomed Imaging*, 2017, 2007: 29817.
- [7] Huang L, Hu J, Huang S, et al. Nanomaterial applications for neurological diseases and central nervous system injury[J]. *Prog Neurobiol*, 2017, 157: 29-48.
- [8] Zou Y, Celli A, Zhu H, et al. Confocal laser scanning microscopy to estimate nanoparticles' human skin penetration in vitro[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 8035-8041.
- [9] Jin S, Ma X, Ma H, et al. Surface chemistry-mediated penetration and gold nanorod thermotherapy in multicellular tumor spheroids[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(1): 143-146.
- [10] Bokseveld M, Blanchard NP, Jaffal A, et al. Shape-selective purification of gold nanorods with low aspect ratio using a simple centrifugation method[J]. *Gold Bulletin*, 2017, 50(1): 69-76.
- [11] Guarnieri D, Sabella S, Muscetti O, et al. Transport across the cell-membrane dictates nanoparticle fate and toxicity: a new paradigm in nanotoxicology[J]. *Nanoscale*, 2014, 6(17): 10264-10273.
- [12] Takahashi H, Niidome Y, Niidome T, et al. Modification of gold nanorods using phosphatidylcholine to reduce cytotoxicity [J]. *Langmuir*, 2006, 22(1): 2-5.
- [13] Wang X, Mei Z, Wang Y, et al. Gold nanorod biochip functionalization by antibody thiolation[J]. *Talanta*, 2015, 136: 1-8.
- [14] Ahmed W, Bhatti AS, Van Ruitenbeek JM. Efficient seed-media-

- ted method for the large-scale synthesis of Au nanorods[J]. *J Nanopart Res*, 2017, 19(3):115.
- [15] Tian L, Chen E, Gandra N, et al. Gold nanorods as plasmonic nanotransducers; Distance-dependent refractive index sensitivity[J]. *Langmuir*, 2012, 28(50):17435-17442.
- [16] Huang HC, Barua S, Kay DB, et al. Simultaneous enhancement of photothermal stability and gene delivery efficacy of gold nanorods using polyelectrolytes[J]. *ACS Nano*, 2009, 3(10):2941-2952.
- [17] Bokseveld M, Blanchard NP, Jaffal A, et al. Shape-selective purification of gold nanorods with low aspect ratio using a simple centrifugation method[J]. *Gold Bull*, 2017, 50(1):69-76.
- [18] Wang W, Fan X, Xu S, et al. Low fouling label-free DNA sensor based on polyethylene glycols decorated with gold nanoparticles for the detection of breast cancer biomarkers[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 71:51-56.
- [19] Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, et al. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy[J]. *Nanomedicine(Lond)*, 2011, 6(4):715-728.
- [20] Mayle KM, Dern KR, Wong VK, et al. Polypeptide-based gold nanoshells for photothermal therapy[J]. *SLAS Technol*, 2017, 22(1):18-25.
- [21] Gao B, Xu J, He KW, et al. Cellular uptake and intra-organ biodistribution of functionalized silica-coated gold nanorods[J]. *Mol Imaging Biol*, 2016, 18(5):667-676.
- [22] Li C, Zhang Y, Li Z, et al. Light-responsive biodegradable nanorattles for cancer theranostics[J]. *Adv Mater*, 2017, 30(8).
- [23] Cho SK, Emoto K, Su LJ, et al. Functionalized gold nanorods for thermal ablation treatment of bladder cancer[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(7):1267-1276.
- [24] Zhang M, Kim HS, Jin T, et al. Near-infrared photothermal therapy using EGFR-targeted gold nanoparticles increases autophagic cell death in breast cancer[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 170(2):58-64.
- [25] Patra HK, Banerjee S, Chaudhuri U, et al. Cell selective response to gold nanoparticles[J]. *Nanomedicine*, 2007, 3(2):111-119.
- [26] Coradeghini R, Gioria S, García CP, et al. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 217(3):205-216.
- [27] Jia YP, Ma BY, Wei XW, et al. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles[J]. *Chinese Chem Lett*, 2017(4):31-42.
- [28] Pan Y, Leifert A, Ruau D, et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage[J]. *Small*, 2009, 5(18):2067-2076.
- [29] Connor EE, Mwamuka J, Gole A, et al. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity[J]. *Small*, 2005, 1(3):325-327.
- [30] Yatao R, Qin C, Hong Q, et al. Experimental comparison of photothermal conversion efficiency of gold nanotriangle and nanorod in laser induced thermal therapy[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2017, 7(12):416.
- [31] Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 12(1):39-50.
- [32] Wiwanitkit V, Sereemasapun A, Rojanathanes R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(1):e7-e8.
- [33] Taylor U, Petersen S, Barchanski A, et al. Influence of gold nanoparticles on vitality parameters of bovine spermatozoa[J]. *Reprod Domest Anim*, 2010, 45:60.
- [34] Lakhani PM, Rompicharla SV, Ghosh B, et al. An overview of synthetic strategies and current applications of gold nanorods in cancer treatment[J]. *Nanotechnology*. 2015, 26(43):432001.
- [35] Liptrott N J, Giardiello M, McDonald TO, et al. Assessment of interactions of efavirenz solid drug nanoparticles with human immunological and haematological systems[J]. *J Nanobiotechnology*, 2018, 16(1):22.
- [36] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation[J]. *Nature*, 2011, 469(7330):323-335.
- [37] Armstead AL, Minarchick VC, Porter DW, et al. Acute Inflammatory Responses of Nanoparticles in an Intra-Tracheal Instillation Rat Model[J]. *Plos One*, 2015, 10(3):e0118778.
- [38] Sonavane G, Tomoda K, Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration; Effect of particle size[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2008, 66(2):274-280.
- [39] Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(4):649-655.
- [40] Li WQ, Wang F, Liu ZM, et al. Gold Nanoparticles Elevate Plasma Testosterone Levels in Male Mice without Affecting Fertility[J]. *Small*, 2013, 9(9-10):1708-1714.