

靶向量子点的合成及其在活体成像研究中的应用

翟 鹏^{1,2} 许改霞^{1,2} 朱小妹¹ 王晓梅² 牛憨笨¹

(¹深圳大学光电工程学院, 教育部/广东省光电子器件与系统重点实验室, 广东 深圳 518060)
²深圳大学医学院, 深圳市生物医学工程重点实验室, 广东 深圳 518060)

摘要 利用水相法制备 CdTe 量子点, 在不同细胞培养基及不同 pH 值环境中对其进行了稳定性表征, 研究了量子点对 HeLa 细胞增殖抑制率的影响, 而后利用耦联转铁蛋白的量子点对 HeLa 细胞进行了靶向性标记, 最后将量子点与葡聚糖耦联, 通过透明背脊皮翼视窗观察其在血管内的动态过程。结果表明: 合成的量子点发射谱峰值为 660 nm, 在 DMEM 和 M1640 细胞培养基中具有良好稳定性, 当缓冲液 pH 值由 5 升高到 13 时, 量子点荧光强度先升高后下降; 量子点浓度为 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, HeLa 细胞存活率高于 80%; 耦联转铁蛋白的量子点对 HeLa 细胞靶向作用明显; 可观察到耦联葡聚糖的量子点在小鼠血管中的动态运动。该研究表明合成的量子点可成功用于活体成像。

关键词 生物技术; 靶向量子点; 水相合成; 靶向标记; 透明背脊皮翼视窗

中图分类号 Q5 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201340.0104003

Synthesis of Targeting Quantum Dot and Its Applications in *In Vivo* Imaging Research

Zhai Peng^{1,2} Xu Gaixia^{1,2} Zhu Xiaomei¹ Wang Xiaomei² Niu Hanben¹

¹Key Laboratory of The Ministry of Education / Guangdong Optoelectronic Devices and System, College of Optoelectric Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China
²Key Laboratory of Biomedical Engineering of Shenzhen, College of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

Abstract We synthesize CdTe quantum dots in aqueous solution and characterize the stability of quantum dots in different culture media and different pH environments. The impact of quantum dots on HeLa cellular proliferation inhibition rate is studied. The quantum dots conjugated with transferrin are used for HeLa cell labelling. Finally, the quantum dots are conjugated with dextran and applied in the transparent dorsal skin fold window chamber to observe the dynamics of the bioconjugations in blood vessels. The experimental results show that the quantum dots peaking at 660 nm are stable in cell culture media of DMEM and M1640. When the pH of the buffer solutions increases from 5 to 13, the fluorescence intensity of CdTe increases firstly and then reduces. The cell viability is higher than 80% even when the concentration of quantum dots is 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The quantum dots conjugated with transferrin obviously target to the HeLa cells. What's more, the clear dynamic fluorescence images of quantum dots conjugated with dextran are observed under microscope. The study shows that such quantum dots can be used for living imaging research successfully.

Key words biotechnology; targeting quantum dot; aqueous synthesis; targeting labelling; transparent dorsal skin fold window chamber

OCIS codes 170.2520; 170.3880; 170.4580

收稿日期: 2012-07-23; **收到修改稿日期**: 2012-09-04

基金项目: 国家 973 计划(2012CB825802)、国家自然科学基金(30900335)、广东省自然科学基金(2008078)和深圳市基础研究项目(JC201005280500A)资助课题。

作者简介: 翟 鹏(1987—), 男, 硕士研究生, 主要从事从事量子点及其生物医学应用等方面的研究。

E-mail: huobifang@163.com

导师简介: 许改霞(1977—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事生物光子学方面的研究。E-mail: xugaixia@szu.edu.cn

1 引 言

量子点(QD),又称为纳米晶,是一种纳米级别的半导体结晶颗粒,一般由Ⅱ-Ⅵ族(CdTe, CdSe, ZnS, ZnSe等)、Ⅲ-Ⅴ族(GaAs, GaN, InP, InAs等)或Ⅳ-Ⅵ族(PbSe)元素组成。由于其三维尺度均为1~100 nm,介于原子和宏观物体之间,因此表现出独特的光学性质^[1,2];量子点荧光强度高,具有比传统有机染料大10~50倍的摩尔消光系数;根据需要,易于合成不同发射谱的量子点;量子点的斯托克斯频移可以达到300~400 nm,便于成像信号探测;吸收谱宽,发射谱窄,有利于开展生物样品多色标记;抗光漂白,荧光寿命长,便于长时间活体成像。

自1998年Chan等^[3]和Bruchez等^[4]同时在*Science*上报导了量子点在细胞及组织标记成像中的研究结果后,量子点的应用便开始由物理化学向生物医学领域进军。但由于此前合成的量子点都在有机相环境中合成,水溶性差,毒性高,合成过程复杂,因此限制了其在生物医学领域中的应用。而同在1998年,Gao等^[5]以TGA作为稳定剂,制备出水溶性的具有高量子产率和良好稳定性的CdTe量子点,使量子点在生物医学领域内的应用开辟了新的篇章。近来,关于量子点在生物医学领域应用的深入研究越来越多^[6]。

基于透明背脊皮翼视窗的光学成像系统具有微创、实时、动态和原位观察等^[7]众多优点,能够同时实现肿瘤分子、细胞、组织层面的成像^[8],为进行肿瘤诊断、抗肿瘤药物和肿瘤部位微血管的研究,人们将量子点与透明背脊皮翼视窗结合,推动了肿瘤的研究进展。2007年,Tada等^[9]将量子点与HER2耦联,用共聚焦显微镜观察记录了耦联量子点从血管溢出到靶向到肿瘤细胞表面及积聚在细胞间隙的过程,验证了量子点用于肿瘤诊断和载药研究的可能。

为继续深入研究量子点结合透明背脊皮翼视窗在肿瘤研究中的应用,本文首先合成了水溶性的CdTe量子点,验证了其在不同培养基及pH值环境中的稳定性,而后将其与转铁蛋白(Tf)耦联,进行了细胞靶向实验,最后将葡聚糖与量子点耦联,并将耦联体通过尾静脉注射的方式使其进入血管,利用显微镜实时观察了其在视窗血管内的动态变化。

2 实验材料与方 法

2.1 实验材料

Te粉(纯度99+%)、L-半胱氨酸(98%)、

CdCl₂·6H₂O(99%)、NaBH₄(99%)、哌嗪二甲基磺酸(PIPE)、转铁蛋白 human(97%)、葡聚糖-70000(Dextran)、4-2甲氨基吡啶(DMAP)、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)和二甲基亚砜(DMSO)均购自广州百灵威科技有限公司;胎牛血清、M1640培养基和噻唑蓝(MTT)购自深圳库源生物科技有限公司;健康4周龄雄性Balb/C小鼠和雌性Balb/C裸鼠购自广东省医学实验动物中心,许可证号SCXK(粤)2008-00;人子宫颈癌细胞系HeLa细胞由深圳大学医学院培养。

2.2 实验仪器

实验仪器主要包括:荧光分光光度计(Hitachi, F-4600)、紫外可见分光光度计(BECKMAN COULTER, DU720)、全自动倒置荧光显微镜(Olympus, IX81)、体视显微镜(Olympus, SZX16)、pH计(METTLER, DELTA320)、酶标仪(BIORAD, iMARK)。

2.3 实验方法

2.3.1 量子点合成

以半胱氨酸为稳定剂,在水溶液中合成^[10]。称取硼氢化钠150 mg, Te粉192 mg,加入三颈瓶,氩气环境中加入超纯水40 mL,常温磁力搅拌2 h,合成Te前驱体;称取L-半胱氨酸871 mg,六水高氯酸镉1258 mg,混合加入三颈瓶,氩气环境加入超纯水50 mL,并用1 mol/L的NaOH调节pH值,充分混合后加入合成好的新鲜的Te前驱体,调节pH值,96℃冷凝回流,磁力搅拌8 h后终止反应。取样测试吸收谱和发射谱,干燥后配置浓度为1 mg/mL的CdTe量子点测量在不同培养基和不同pH环境下的荧光发射谱。利用共价键耦联方式将量子点与转铁蛋白耦联^[11],进行HeLa细胞靶向实验。

2.3.2 量子点对HeLa细胞存活率检测

在96孔板中均匀接种5000个HeLa细胞,放入5%,37℃培养箱培养至85%时分别加入8个不同浓度梯度的量子点液50 μL,每个浓度设置6个复孔,孵育24 h。弃去培养基,小心用磷酸盐缓冲液(PBS)冲2遍后,每孔加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL,即0.5% MTT),继续培养4 h。终止培养,每孔加入150 μL二甲基亚砜,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪光学厚度(OD)490 nm处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔(M1640培养液、MTT和DMSO)和对照孔(细胞、M1640培养液、相同剂量溶解量子点的

不含血清的 M1640 培养基、MTT 和 DMSO)。

2.3.3 构建小鼠透明背脊皮翼视窗^[12]

用碘汀消毒处理小鼠背部手术部位,提起背部皮肤,确保提起部位的组织是平坦的,用手术缝合针线将视窗初步固定,而后锥子打孔,用止血钳将螺丝紧紧固定视窗。用手术剪剪开小鼠背部另一侧皮肤,注意不要伤及血管,固定好另一片视窗,内嵌定位环,放入盖玻片,固定紧固环,拧紧螺母。

2.3.4 量子点耦联葡聚糖^[13]

首先将葡聚糖活化,方法如下:用 DMSO 分别配制 30 mmol/L 的葡聚糖、DSC 溶液 1 mL,混合均匀后,加入用 DMSO 缓冲液配制的 30 mmol/L 的 DMAP 溶液 1 mL,磁力搅拌 6 h,用丙酮将活化的葡聚糖萃取出来,烘干备用。配制 10 mmol/L (pH 为 7.5) PBS 缓冲液,用此缓冲液配制 10 mg/mL 的量子点 500 μ L,而后加入活化的葡聚糖粉末,使其在混合溶液中的浓度为 6 mmol/L,4 $^{\circ}$ C 下振荡 12 h。

3 结果与讨论

3.1 量子点的光谱表征

3.1.1 CdTe 量子点的发射谱和吸收谱

取反应 8 h 后的量子点溶液 2 mL,测量其荧光发射谱和吸收谱,其荧光发射谱峰值为 660 nm,半峰全宽为 54 nm,如图 1 所示。选择合成发射谱峰值在 660 nm 的 CdTe 量子点,因为在生物组织中,650~900 nm 被称为“近红外窗口”,此时染料的荧光可以避免生物自发荧光,具有很好的组织穿透性^[14]。合成的 CdTe 发射谱半峰全宽仅为 54 nm,说明合成的量子点具有良好的粒径均一性。

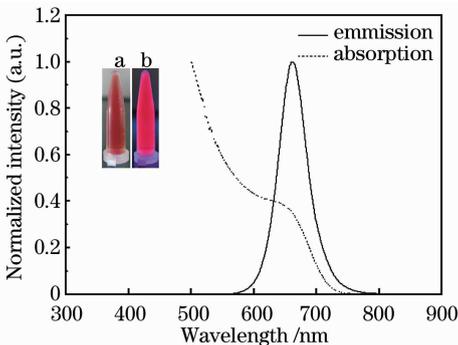


图 1 CdTe 量子点的吸收谱和发射谱。(a)量子点白光下图像;(b)量子点荧光下成像(312 nm 激发)

Fig. 1 Absorption and emission spectra of CdTe QDs.

(a) Image of QDs in white light; (b) image of QDs in fluorescence (excited at 312 nm)

3.1.2 量子点在不同 pH 环境中的稳定性

利用 PBS 缓冲液配制 10 ng/mL 的量子点溶液,并分别将其 pH 调至 5,6,7,8,9,10,11,12,13,测量其荧光发射谱,并将峰值归一化处理,做出折线图。如图 2 所示,当缓冲液 pH 从 5 升到 10 时,荧光峰值随之递增,pH=10 时,量子点的荧光发射谱峰值达到最高,当 pH>10 时,荧光谱峰值开始降低。出现这种现象的原因是由于在酸性环境下,氢离子与量子点表面阳离子竞争配体,导致一部分表面配对的配体解散,形成表面缺陷,从而导致它们的荧光猝灭,酸性越强,氢离子浓度越高,猝灭越严重^[15]。而在强碱性环境下,硫醇基极易被氧化,同样导致配对配体解散,而使量子点的发光强度降低。需要注意的是当缓冲液 pH=6 时,量子点荧光强度迅速下降,而当缓冲液 pH=5 时,量子点荧光强度仅为 pH=10 时荧光强度的 1%,这表明该量子点在酸性环境下将无法发射荧光,推断这种量子点不适合用于胃部(胃液 pH=1)标记或成像实验。

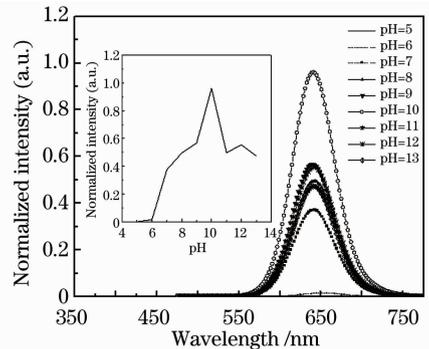


图 2 量子点在不同 pH 环境下荧光发射谱
Fig. 2 Fluorescence emission spectrum of QDs in different pH environments

3.1.3 量子点在不同培养基中的稳定性

分别用 DMEM 培养基、M1640 培养基和 PBS 配制浓度为 10 ng/mL 的 CdTe 量子点溶液,用荧光分光光度计测量不同时刻溶液的发射谱,以开始的荧光发射谱峰值为标准做归一化处理。如图 3 所示,量子点荧光强度在 PBS 溶液中缓慢下降,8 h 后变为初始强度的 30%。而在 DMEM 和 M1640 培养基中,量子点的荧光强度表现为先上升后下降,在 6 h 时又出现一个峰值,然后开始下降。其中在 DMEM 中量子点的稳定性最好,8 h 后的荧光强度与初始值相差不多。原因可能是在 DMEM 和 M1640 中具有能够保护表面稳定性的物质,而在 PBS 溶液中却没有。

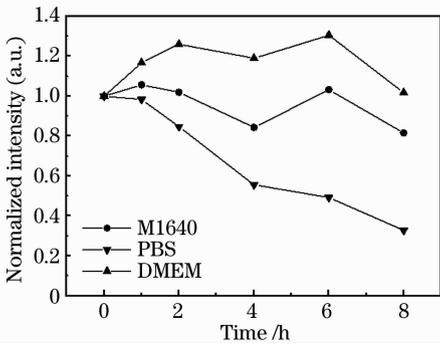


图 3 量子点在不同培养基中的荧光发射谱强度
Fig. 3 Fluorescence emission spectrum intensity of QDs in different culture media

3.2 量子点对 HeLa 细胞存活率的影响

随着量子点浓度的升高, HeLa 细胞的存活率降低, 如图 4 所示, 当量子点的浓度为 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞存活率大于 80%, 当量子点浓度升高至 192 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞存活率仍大于 50%, 而应用于小鼠活体成像的量子点浓度仅为 ng/mL 的数量级, 这表明该量子点在活体成像应用时的剂量是安全的。

3.3 靶向量子点对 HeLa 细胞的标记

转铁蛋白受体是一类广泛存在于脊椎动物体液及其细胞中的 II 类跨膜糖蛋白^[16], 它参与调节铁的

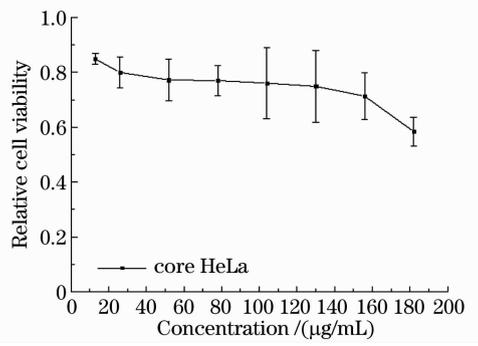


图 4 量子点对 HeLa 细胞存活率的影响

Fig. 4 Impact of QDs on the survival rate of HeLa cells
代谢, 可以通过内吞作用将转铁蛋白转运入细胞中。在肿瘤细胞中, 为了满足肿瘤细胞迅速分裂对铁的大量需求, 介导更多荷载铁的内吞, 转铁蛋白受体过表达^[17]。因此转铁蛋白常被作为一种肿瘤靶分, 耦联荧光标记物后用于癌细胞示踪。本研究将 CdTe 量子点与转铁蛋白耦联制成靶向量子点 CdTe-Tf, 将浓度为 1 ng/mL 的 CdTe 与 CdTe-Tf 溶液 10 μL , 分别加入 2 mL 的细胞培养皿中, 与 HeLa 细胞共孵育 2 h 后, 用 PBS 溶液清洗 3 次, 在荧光显微镜下观察。由图 5 可知, 耦联转铁蛋白的量子点对 HeLa 细胞具有明显的靶向作用, 并且大部分量子点结合在 HeLa 细胞的膜表面, 而转铁蛋白受体

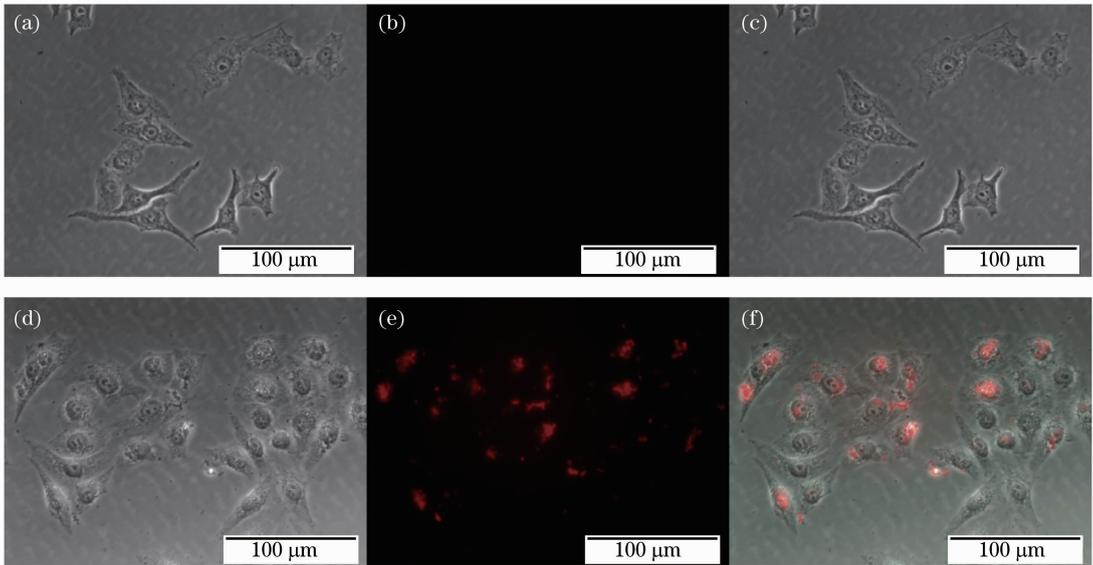


图 5 CdTe-Tf 对 HeLa 细胞的靶向性。(a) CdTe 作用 HeLa 细胞明场成像; (b) CdTe 作用 HeLa 细胞荧光成像; (c) CdTe 作用 HeLa 细胞明场成像与荧光成像叠加图; (d) CdTe-Tf 作用 HeLa 细胞明场成像; (e) CdTe-Tf 作用 HeLa 细胞荧光成像; (f) CdTe-Tf 作用 HeLa 细胞明场成像与荧光成像叠加图

Fig. 5 CdTe-Tf targeting HeLa cells. (a) Bright field imaging of HeLa cell treated with CdTe; (b) fluorescent field imaging of HeLa cell treated with CdTe; (c) overlay image of bright field iamging and fluorescence field iamging of HeLa treated with CdTe; (d) bright field imaging of HeLa treated with CdTe-Tf; (e) fluorescence field imaging of HeLa treated with CdTe-Tf; (f) overlay image of bright field imaging and fluorescence field imaging of HeLa treated with CdTe-Tf

位于细胞膜表面,验证了 CdTe-Tf 对 HeLa 细胞的靶向性,结合位点为转铁蛋白受体。

3.4 透明背脊皮翼视窗构建及量子点荧光团在血管内成像

利用体视显微镜,在成功构建的透明背脊皮翼视窗中,可以清晰地看到血管及局部组织成像,如图 6(a)、(b)所示。但由于体视显微镜在放大倍数及微量荧光团检测上具有局限性,因此在观察量子

点荧光团在血管中的转运时,改用倒置荧光显微镜进行观察。将 0.1 mL 浓度为 1 mg/mL 的量子点葡聚糖耦联体通过尾静脉注射进入免疫缺陷性小鼠体内,5 min 后在在荧光显微镜下观察(蓝光激发,红光发射),在透明背脊皮翼视窗中可以观察到量子点耦联葡聚糖的荧光团,而且能持续观测其动态过程,大约经过 20 s 的时间,量子点荧光团随血液循环从观察视野下方转移到上方,移动距离约为 300 μm 。

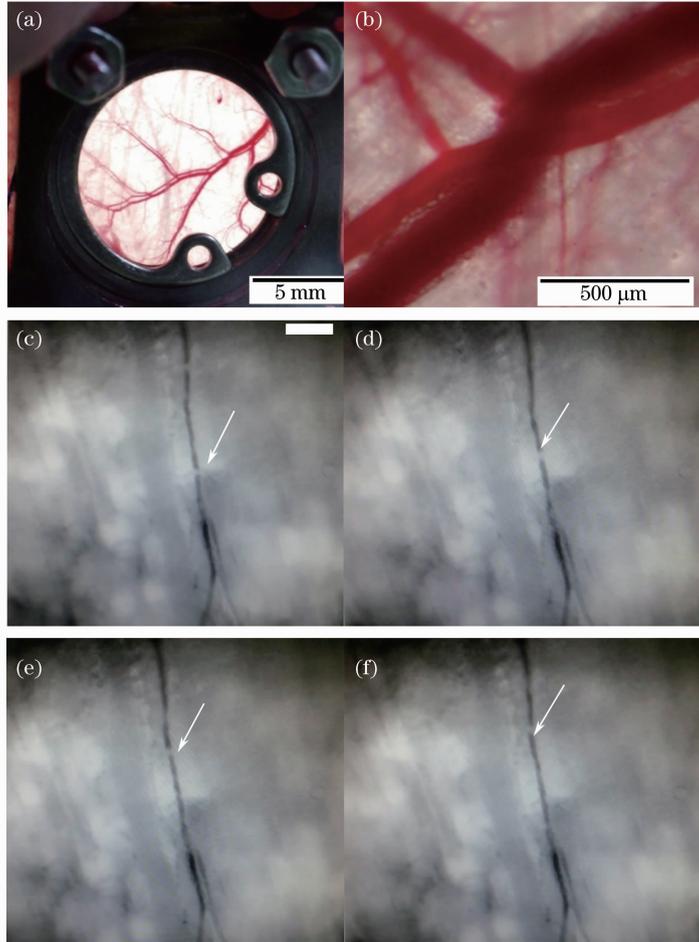


图 6 透明背脊皮翼视窗模型及量子点在视窗血管中的运动。(a)体视显微镜下透明背脊皮翼视窗图;(b)体视显微镜下局部血管图;(c)~(f)倒置荧光显微镜下量子点在血管中的运动(箭头指示为量子点荧光团,标尺为 200 μm)

Fig. 6 Model of transparent dorsal skin fold window chamber and the motion of QDs in the vessel. (a) Image of transparent dorsal skin fold window chamber by stereo microscope; (b) image of local vasculature by stereo microscope; (c)~(f) motion of QDs in vessel by inverted fluorescent microscope (the arrows directing the QD fluorophores, scale 200 μm)

4 结 论

成功地合成了一种在生物环境中稳定的量子点;研究了量子点对 HeLa 细胞存活率的影响,发现当量子点的浓度为 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,HeLa 细胞存活率仍大于 80%,而应用于小鼠活体成像的量子点浓度仅为 ng/mL 的数量级,因此可以忽略量子点的毒性问题。用合成的 CdTe 量子点耦联转铁蛋白后,对

HeLa 细胞具有明显的靶向实验,可用于肿瘤细胞的示踪。利用合成的量子点耦联葡聚糖,通过构建小鼠透明背脊皮翼视窗,在显微镜下可清晰看到血管中量子点的转运情况,这对于研究肿瘤微环境血管状况以及抗肿瘤药物筛选具有重要意义。

参 考 文 献

1 Shuming Nie, Yun Xing, Gloria J. Kim *et al.*. Nanotechnology

- applications in cancer[J]. *Ann. Rev. Bioned. Eng.*, 2007, **9**: 257~288
- 2 Ute Resch-Genger, Markus Grabolle, Sara Cavaliere-Jaricot *et al.*. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels[J]. *Nature Methods*, 2008, **5**(9): 763~775
- 3 W. C. Chan, S. Nie. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection [J]. *Science*, 1998, **281**(5385): 2016~2018
- 4 M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin *et al.*. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels[J]. *Science*, 1998, **281**(5385): 2013~2016
- 5 M. Y. Gao, A. L. Rogach, A. Kornowski *et al.*. Strongly photoluminescent CdTe nanocrystals by proper surface modification [J]. *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102** (43): 8360~8363
- 6 Wang Xiaomei, Yong Ken-Tye, Xu Gaixia *et al.*. Invasion of CdSe/CdS/ZnS quantum dots for oocytes *in vitro* maturation[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(11): 2730~2734
 王晓梅, 杨开泰, 许改霞 等. CdSe/CdS/Zns 量子点对体外培养成熟卵母细胞的侵入性研究[J]. *中国激光*, 2010, **37** (11): 2730~2734
- 7 Gudrun E. Koehl, Andreas Gaumann, Edward K. Geissler. Intravital microscopy of tumor angiogenesis and regression in the dorsal skin fold chamber; mechanistic insights and preclinical testing of therapeutic strategies [J]. *Clin. Exp. Metastasis*, 2009, **26**(4): 329~344
- 8 Li Chuanyuan, Shan Siqing, Cao Yiting *et al.*. Role of incipient angiogenesis in cancer metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev.*, 2000, **19**(1-2): 7~11
- 9 Hiroshi Tada, Hideo Higuchi, Tomonobu M. Wanatabe *et al.*. *In vivo* real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice[J]. *Cancer Res.*, 2007, **67**(3): 1138~1144
- 10 Wing-Cheung Law, Ken-Tye Yong, Indrajit Roy *et al.*. Aqueous-phase synthesis of highly luminescent CdTe/ZnTe core/shell quantum dots optimized for targeted bioimaging[J]. *Small*, 2009, **5**(11): 1302~1310
- 11 Greg T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques* (2nd edition)[M]. Rockford; Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, 2008. 495~497
- 12 Gregory M. Palmer, Andrew N. Fontanella, Siqing Shan *et al.*. *In vivo* optical molecular imaging and analysis in mice using dorsal window chamber models applied to hypoxia, vasculature and fluorescent reporters [J]. *Nature Protoc.*, 2011, **6** (9): 1355~1366
- 13 Christopher Earhart, Nikhil R. Jana, Nandan Erathodiyi *et al.*. Synthesis of carbohydrate-conjugated nanoparticles and quantum dots[J]. *Langmuir*, 2008, **24**(12): 6215~6219
- 14 R. Weissleder. A clearer vision for *in vivo* imaging[J]. *Nature Biotechnol.*, 2001, **19**(4): 316~317
- 15 J. Aldana, N. Mallette, X. Peng. Size dependent dissociation pH of thiol-coated cadmium chalcogenides nanocrystals[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**(8): 2496~2504
- 16 Hongzhe Sun, Hongyan Li, P. J. Sadler. Transferrin as a metal ion mediator[J]. *Chem. Rev.*, 1999, **99**(9): 2817~2842
- 17 Peter T. Gomme, Karl B. McCann, Joseph Bertolini. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions [J]. *Drug Discov. Today*, 2005, **10**(4): 267~273

栏目编辑:李文喆