

面向精准化生物医学的多功能纳米光子学技术

陈越, 王璐玮, 宋军

深圳大学光电子器件与系统教育部/广东省重点实验室, 广东 深圳 518060

摘要 基于纳米材料的生物分子检测、光热治疗、光动力治疗和药物靶向输送等新方法,正逐渐成为生物医学领域中重要的诊疗手段。但由于传统纳米材料本身的局限性或治疗手段的缺陷,当前纳米医疗技术存在药物利用率低、毒副作用大和治疗效果低等问题。将纳米技术和光子学相结合,可以在纳米范围内精确控制光与物质的相互作用,从而使生物医学诊疗技术更加精准和稳定。从四个方面总结回顾了近年国内外面向精准化生物医学的多功能纳米光子学技术的发展状况,这四个方面分别为依靠光学技术改善纳米生物医学的稳定性、依靠光学技术实现对肿瘤纳米治疗过程的精准监控、依靠光学技术深入理解纳米生物医学的作用机制以及依靠新型光学技术获取前沿生物医学精细化研究新手段。

关键词 生物光学; 功能监测和成像; 纳米材料; 光学诊断医学

中图分类号 O436

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0307003

Multifunctional Nanophotonics Technology for Precise Biomedical Applications

Chen Yue, Wang Luwei, Song Jun

Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

Abstract New methods based on nanomaterials, such as biomolecular detection, photothermal therapy, photodynamic therapy and nanoparticle drug delivery, are gradually becoming important measures for diagnosis and treatment. However, due to the shortcoming of conventional nanomaterials or the defects in diagnosis and treatment, current nanomedicine technologies have many challenges, including low drug utilization rate, great toxic side effect and low treatment effect. The combination of nanotechnology and photonic technologies offers precise control over light-matter interaction, which improves the accuracy and stability of the technology for biomedicine diagnosis and treatment on nanometer scale. Domestic and oversea development status of multifunctional nanophotonics technology oriented to precise biomedicine in recent years is summarized from four aspects: to enhance the stability of nanomedicine with optical technologies; to accurately monitor the process of tumor nano-treatment by using optical technologies; to acquire the physical insights of the mechanism of nanomedicine with optical technologies; to develop new methods for refinement of the frontier biomedicine research with novel optical technologies.

Key words biotechnology; functional monitoring and imaging; nanomaterial; optical diagnostics for medicine

OCIS codes 000.1430; 170.2655; 160.4236; 170.4580

1 引 言

纳米生物医学是生物医学技术和纳米技术有机结合后产生的全新的纳米生物技术领域,纳米生物医学的发展对医学产生了很大影响。在过去的几十

年中,许多具有药物诊断和药物传输功能的纳米材料都已应用到生物医学中,一些基于纳米技术的药物也随之出现^[1-2]。将纳米技术的理论与方法运用到现代医学和生物学上,打开了微米尺度以外的世界,而细胞水平上的生理和病理过程都发生在纳米

收稿日期: 2017-08-07; 收到修改稿日期: 2017-09-20

基金项目: 国家 973 计划(2015CB352005)、国家自然科学基金(61605124,61620106016,61525503)

作者简介: 陈越(1988—),女,博士研究生,主要从事肿瘤疾病治疗的光学方法方面的研究。E-mail: chenoyue@163.com

导师简介: 宋军(1978—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事纳米生物光子学方面的研究。

E-mail: songjun@szu.edu.cn(通信联系人)

尺度上,因此利用纳米技术可以解决许多医学和生物学上的重要科学问题和技术难题。

目前,纳米生物医学的主要研究内容包括纳米生物传感、纳米探针成像、纳米疾病治疗等。纳米生物传感是一种利用纳米技术检测特定生物分子含量的技术,它具有可在细胞内实时测量、对细胞无损伤或微损伤等特点。通过纳米生物传感技术可以探测DNA的杂交^[3]、金属阳离子和阴离子的盐浓度及生物素-链球菌霉素的生物分子识别、抗体和抗原间的生物分子识别传感^[4-5]。此外,在基因表达、膜损伤、细胞凋亡、胀亡等由危险物诱导引起的生理反应评估中,纳米生物传感器也可以进行危险物质的毒性分析^[6]。利用纳米生物传感高灵敏度和高特异性的技术优势,可实现对疾病的快速和早期诊断。纳米探针成像将光学探测手段和光学纳米探测分子相结合,对细胞或组织甚至生物体进行成像,进而获得其中的生物学信息^[7]。目前,纳米探针成像包括光学成像、磁共振成像、正电子发射断层成像、单光子衍射成像和光声成像等。利用纳米探针对肿瘤细胞进行标记,实时监测被标记肿瘤细胞在生物体内的生长、转移、对药物的反应等生理和病理活动,揭示了肿瘤发生、发展过程中的细胞和分子机制^[8]。纳米探针成像具有影像信号强度大、靶向效果好、代谢动力学可控等显著优点^[9],在临床和基础研究方面都得到了很好的应用,为临床诊断引入了全新的概念。纳米疾病治疗是以纳米药物作为载体的一种治疗手段,它提高了药物的吸收性和稳定性,改善了药物性质和靶向性,延长了药物的作用时间,进而增加治疗效果,并且毒副作用较小。常用的纳米治疗技术主要包括纳米载药、光热治疗、光动力治疗三类。纳米载药通过对特定的纳米颗粒进行表面修饰,将治疗疾病的分子药物连接或嵌入到纳米颗粒外层,有利于药物储存,并可提高生物体对药物的吸收和药物的稳定性^[10-11]。纳米载药不但建立了新的给药途径,而且能够使药物向高产、自动化、大规模、低成本、携带储存方便、服用方便、小剂量和低副作用方向发展。光热治疗(PTT)利用靶向识别技术将药物聚集在肿瘤组织附近,并在外部光源(一般是近红外光)的照射下将光能转化为热能,诱导蛋白变性并破坏细胞膜,从而达到杀死癌细胞的目的^[12]。然而,破坏癌细胞所需的激光强度远远超过了周围组织的损伤阈值,杀死细胞的同时亦会对其他组织(如皮肤)造成伤害。纳米技术的引入很好地解决了这一问题,使用金纳米棒可以精确控制局部温度,进而

在近红外激光的照射下实现对转移性淋巴结的治疗^[13]。通过对金纳米棒进行修饰(如基于 Bi_2S_3 的金纳米棒),可以实现多光谱光声层析成像/X射线计算机断层扫描引导的光热治疗^[14]。基于纳米材料光热治疗所具有的无损特点,它还可以在治疗疾病的同时用于癌细胞成像^[15-16],从而实现多模态、精准化的癌症治疗。光动力疗法(PDT)是一种用光敏药物和激光活化治疗肿瘤疾病的方法。光敏剂吸收光子的能量后跃迁到激发态,并将能量传递给氧以产生活性氧分子,进而通过氧化作用来攻击细胞结构^[17-18]。但是传统PDT中的光敏剂吸收可见光,且穿透深度浅,只能用于皮肤病等浅层疾病的治疗。利用上转换纳米粒子作为载体,不仅可以精准地将治疗药物运送到病变组织附近,而且长波长激发能够提高PDT的穿透深度,使深层的肿瘤治疗成为可能^[19-22]。

2 面向精准化生物医学的纳米光子学技术

将纳米科学技术应用到生物医学领域,可以发展更加灵敏、快速的诊断技术和更加有效的治疗方法,同时可以在更微观的层面上理解生命活动的过程和机理。然而,为了提高疾病的诊断和治疗效果,通常会对引入的纳米材料进行表面修饰,以提高药物靶向性和载药量,但这样做会对健康的组织造成一定损伤。因此精准监控纳米药物与生物体之间的相互作用,对提高纳米生物医学稳定性,深入了解纳米诊疗工作机制,进而降低纳米材料的毒副作用具有重要意义。

将先进的光学技术与生物纳米医疗相结合,利用非电离辐射的方式提供非侵入活体细胞或组织的成像、传感和光敏治疗,可以为生命科学和医疗领域提供精准的新型工具。与非光学的诊疗方法相比,光学技术具有高空间分辨率和高时间分辨率,其凭借对被标记细胞在活体小动物体内的活动及反应的无损实时动态监测,在肿瘤检测、基因表达、蛋白质分子检测、药物筛选和药物疗效评价等方面发挥着巨大作用。经过十几年的发展,最初的纳米医学概念已经拓展到临床诊断和医疗领域。图1展示了光学技术与纳米生物医学结合后实现的多通道诊断和治疗,包括多模态成像、体内传感和靶向治疗。将多功能纳米颗粒(如量子点、金属纳米颗粒、嵌入染料等)作为成像探针用于体内细胞成像或刺激药物输送^[23-24],不仅可以在纳米粒子上结合靶向制剂、小分

子活性肽和生物相容性的聚合物涂层,还可以将一种或多种治疗药物附加或封装在纳米粒子中,用于实验控制和选择性药物输送,并只针对恶性肿瘤或是选择性的亚细胞定位,而不损伤正常的细胞和组织。

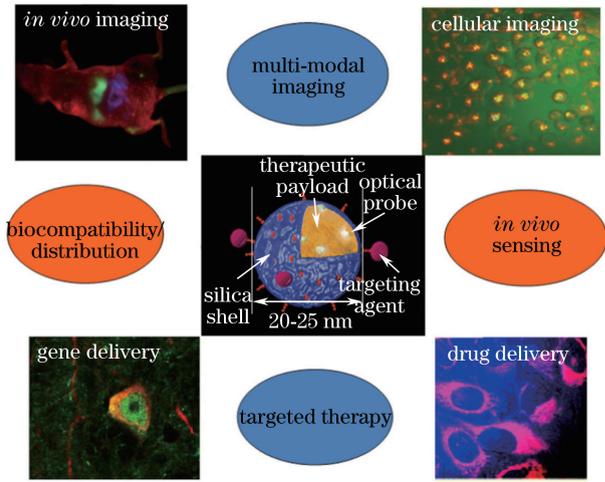


图 1 多功能纳米颗粒联合癌症诊断和治疗策略^[23]

Fig. 1 Multifunctional-nanoparticle strategies for combined cancer diagnostics and therapy^[23]

近年来,纳米技术与光子学两大领域的相互融合成为前沿的交叉学科,为生物医学带来了全新的知识和技术革新,使精准化生物医学成为可能。下面将从光学技术改善纳米生物医学稳定性、精准监控纳米治疗过程、纳米生物医学作用机制和生物医学精细化研究新手段等四方面,概述基于先进光学技术的精准化纳米生物医学应用,并结合具体例子介绍它们各自在生物中的应用。

2.1 依靠光学技术改善纳米生物医学的稳定性

纳米医学研究可以提供细胞内或细胞间结构、调节、信号和运动的信息,利用纳米科技手段可以在纳米尺度上获取生命信息,开展疾病预防、诊断及康复治疗。尽管纳米生物医学有诸多好处,但纳米颗粒在活体或细胞内容易发生颗粒结构的改变、pH变化、自组织团聚、荧光猝灭和粒子振荡,导致信号很不稳定,进而限制了纳米生物医疗的应用。光子学作为信息和能量的载体,具有良好的空间相容性和并行性,将光子学技术引入到传统的纳米生物医疗中,利用生物组织的光学成像、荧光增强和探测、生物光谱和诊断、激光医学中的诊断和光动力诊疗,可以提高原有技术的稳定性。

以表面增强拉曼光谱技术(SERS)为例,虽然通过金属纳米颗粒的局域等离子共振现象大幅提高了拉曼信号的强度,但金属纳米颗粒的布朗运动导致在低浓度条件下信号不稳定。而光镊技术可以有效

地解决这一问题,为单分子浓度的超精细 SERS 检测提供了技术可能。常规光镊辅助 SERS 传感平台如图 2 所示^[25]。2010 年,Rao 等^[26]将银纳米粒子吸附到 DNA 分子上,利用光镊拉曼显微镜检测单个 DNA 分子,然后又利用双光镊和拉曼光谱结合的新方法,研究了金属纳米颗粒与单个 DNA 分子结合后的反应。2016 年,Fazio 等^[27]通过光镊拉曼显微平台研究了浓度极限下探测生物分子(苯丙氨酸、血清白蛋白、溶菌酶)的方法,最低浓度达到微克量级。同年,Wright 等^[28]通过光镊捕获了十面体纳米粒子,成功地利用拉曼散射测量了少量脂类分子。光镊拉曼散射技术将光学囚禁技术与拉曼散射相结合,可应用于细胞、生物分子的研究。该技术用光镊将细胞、纳米粒子禁锢,提高了信号的稳定性,为实际技术操作提供了更多空间和便利。

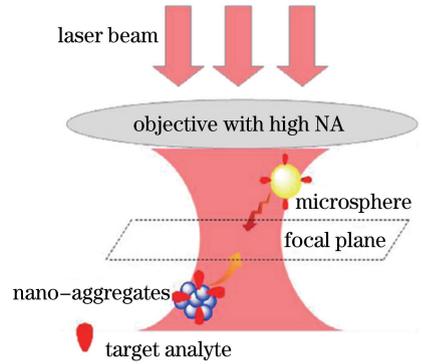


图 2 常规光镊辅助 SERS 传感平台示意图^[25]

Fig. 2 Schematic of conventional optical tweezers-assisted SERS sensing platform^[25]

PDT 是一种微创、具有高度选择性的抗癌治疗的新型疗法,但它依赖于肿瘤中光敏剂的积累,而光敏剂又受周围环境的影响(如 pH),且其在体内运输过程中可能会被代谢掉,致使肿瘤区域无法吸收足够的光敏剂,或使药物的积累存在异类^[29]。所以,引入纳米光学技术可以实现药物的可控释放,极大地提高了 PDT 的稳定性。2017 年,Tong 等^[30]通过合成 DOX-UCNPs@mSiO₂/TiO₂-TC 多功能纳米粒子,构建了 PDT、光子学和化疗相结合的一体化纳米诊断治疗平台。其中 TiO₂ 作为光敏剂具有高活性和优良的化学稳定性,TC 作为交联剂可以将 DOX 药物封装在 SiO₂ 空隙内,以防止药物在体内提前释放。多功能纳米粒子在近红外光辐射下能激发 TiO₂ 产生活性氧,也能诱导 TC 交联剂的光降解和药物释放。通过光照控制药物的释放,保证了药物在体内不受其他因素影响,实现了治疗过程的可控,极大地提高了 PDT 的稳定性。

2.2 依靠光学技术实现对肿瘤纳米治疗过程的精准监控

纳米治疗是借助纳米科技,在分子水平上利用分子操作技术和人体的分子间相互作用开展疾病预防、诊治及康复、改善健康状况等的一门新型科学技术。纳米载药技术可提高药物的吸收度和稳定性,使药物的作用时间延长,疗效增加;PTT具有时间短、疗效明显的特点,可以减轻患者的疼痛;PDT具有微创、高度选择性、疗效确切、无耐药性等优点。但这些技术都需要利用纳米颗粒作为药物载体,而纳米颗粒具有毒性,并且可控性差,在治疗过程中不能实时监测、控制药物的运输与释放,无法确认纳米药物是否到达肿瘤区域,这为肿瘤的精准治疗带来很多困扰。光子学技术具有不直接接触组织、不会对生物药品造成直接损伤、灵敏度高、时间响应快等优势,与多功能纳米颗粒相结合,形成了安全、快捷、高效的肿瘤纳米治疗手段,从而使精准监控治疗过程成为了可能。

PDT是非侵害的治疗癌症和其他疾病的重要方法,目前已在临床上用于肿瘤的诊断和治疗。但是传统的PDT通常由可见光激发,对生物组织的穿透深度受到限制。波长为650~950 nm的近红外

光具有穿透深度深、吸收小的特点,可以产生更清晰的光学图像。利用近红外光激发的上转换纳米粒子可以有效地将近红外光转换为可见光或紫外光,进而激活传统的光敏剂分子产生活性氧,从而进行深组织中肿瘤的光动力治疗。由于波长为980 nm的激光在生物组织中有较强的吸收,因此Zhan等^[31]在2011年尝试改变上转换纳米粒子的激发波长,利用低成本的915 nm近红外激光代替980 nm激光,成功地抑制了水的吸收和组织的热效应。2013年,Wen等^[32]提出了另一个改变NaGdF₄:Yb,Er@NaGdF₄:Nd,Yb核壳结构上转换激发光波长的方法,但是这种结构并不适合荧光共振能量转移的生物应用。2014年,Shen等^[33]报道了用波长为800 nm的激光激发的Nd³⁺、Yb³⁺和激活剂共掺杂的NaYF₄体系,但是对于共掺杂的体系,Nd³⁺和激活剂之间强烈的猝灭效应导致上转换发光很弱。同年,Wang等^[34]利用上转换纳米材料构建了一种新型的NaYF₄:Yb/Ho@NaYF₄:Nd@NaYF₄核壳壳结构,如图3所示。基于这种用808 nm波长激光激发的上转换核壳壳结构,可以同时实现低热效应的光动力治疗和上转换的细胞成像监控,但是这种波长光的穿透深度也不深。

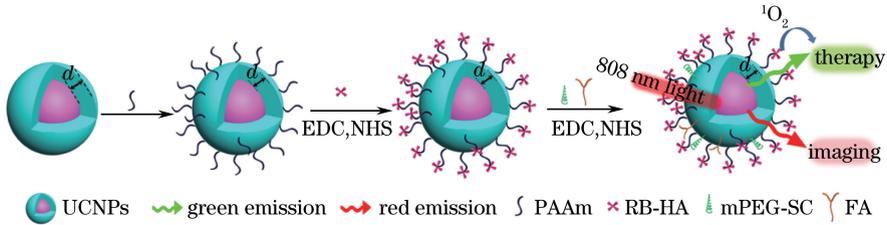


图3 用于PDT和成像的808 nm激光激发的上转换纳米平台的结构和操作原理^[34]

Fig. 3 Construction and operating principle of the nanoplatform stimulated by 800 nm laser for PDT and imaging^[34]

波长为1100~1350 nm的第二近红外窗口和波长为1600~1870 nm的第三近红外窗口,由于散射和吸收的减少,具有比第一近红外光学窗口更长的衰减长度,因此可用于更深层组织的成像^[35]。近红外第二窗口荧光成像可以清晰地观察到组织的深度解剖特征,但是大部分水溶性的有机分子量子产率低,限制了时间分辨率和穿透深度。2017年,Antaris等^[36]利用CH-4T裁剪超分子组装的蛋白质,使荧光量子产率增大了110倍,明亮的分子复合物可以在近红外第二窗口快速成像,速度可达到50 frame/s,利用此复合物与近红外第二窗口协同作用可观察小鼠心脏循环。生物系统的多样性荧光成像是纳米生物医学的一个焦点,目前的荧光通道仅限于可见光和第一个近红

外光谱区域。为了减少背景荧光,实现深层次成像,Zhu等^[37]开发了NIR-II分子显像剂,依靠浮力密度差异,制备了高纯度NIR-II型荧光抗体偶联物,它可用作NIR-II特异分子探针,用于脑组织3D染色在NIR-II窗口多色分子成像。2015年,Diao等^[38]利用大直径半导体单壁碳纳米管在长波长近红外区域(1500~1700 nm,NIR-II)进行活体荧光成像,这种成像剂可以观察深度为3 mm、宽度为3~4 μm的毛细血管,并且可同时映射多个血管的血流速度,这使NIR-II技术成为一种高性能的光学活体成像技术。

将光学技术引入肿瘤纳米医疗,可以从纳米尺度上进行传统医学无法做到的医疗操作和疾病防治,从而在细胞和分子水平上更精确地操控药物分

子,进而有效地监测纳米颗粒的分布与治疗,实现对肿瘤治疗的精准监控^[39]。

2.3 依靠光学技术深入理解纳米生物医学的作用机制

随着纳米医学的发展,越来越多的纳米材料用于生物医学领域。纳米材料可作为化疗药物的有效载体,靶向输送药物到肿瘤局部,以减轻化疗药物的毒副作用。而一些纳米医疗仅从实验中观察肿瘤是否得以控制和肿瘤细胞是否扩散来验证纳米医疗的有效性,并没有掌握纳米医疗的治疗机理,不能从根本上实现对药物治疗过程的掌控。而将光学成像、多光谱荧光成像和多模态成像等技术与纳米生物医学结合,连续追踪体内给药过程,精确了解药物传递和治疗的动力学过程,可为纳米医疗的机制研究做出巨大贡献。

近红外激光照射可引起近红外吸收的纳米载体药物分子的释放,但局部温度迅速升高导致增加的热振动可减弱药物与载体之间的相互作用^[40]。2017年,Dong等^[41]利用生物发光成像和多光谱荧光成像技术,实现了药物传递到肿瘤治疗全过程的可视化。此外,根据实时成像定位和跟踪,进一步说明了药物释放与分布、载体的位置和降解以及肿瘤生长或抑制之间的相互关系。药物传递系统的可视化为纳米生物医学机制的研究提供了一种新途径。同年,Li等^[42]基于小分子化疗药物和光热剂之间的协同装配,在双模态成像指导下开发了一种新型的纳米颗粒。在近红外激光触发肿瘤部位后,纳米颗

粒释放治疗药物,然后被肿瘤细胞通过缓慢吸附内吞作用进行非特异性细胞摄取。酸性溶酶体的共定位会触发这些pH敏感纳米粒子的突然释放,使细胞内产生高效的药物蓄积,从而在血液循环系统中减少对正常细胞有毒害作用的物质。同时,利用纳米粒子细胞的成像能力,监测细胞内吞、胞内释放和化疗药物转运,实现了无创性连续追踪体内给药过程,精确反映了药物传递和治疗的动力学过程,是纳米药物载体机制研究的潜在趋势。

了解纳米粒子与细胞之间的相互作用,可清晰地知道细胞如何与外界沟通,以及病毒或纳米粒子入侵细胞的机制。2017年,Liu等^[43]通过实时监测DNA修饰的纳米金粒子进入细胞的过程及其在细胞内的运输轨迹,首次将纳米粒子的聚集状态和细胞实时运动联系起来,证明了纳米粒子在内吞作用早期以单个粒子状态存在,而在运输过程中则逐渐聚集并与囊泡融合,如图4所示。纳米粒子在细胞膜周围以单粒子状态存在,内吞到细胞内以小聚集的状态分布在细胞质内,并沿着微管快速向细胞核和溶酶体聚集,在细胞核与溶酶体附近以大聚集的状态存在。通过控制温度的方式来观察纳米金的同化机制,当温度降低时,吞噬作用降低,表明同化作用依靠能量。通过荧光和等离子体成像证明了纳米金颗粒运输的快慢依赖于粒子团簇的大小,而不是依赖于细胞器的类型(如核内体和溶酶体)。该研究提出了一种有效的纳米诊断治疗方法,并为纳米生物医学的有效健康管理提供了保障。

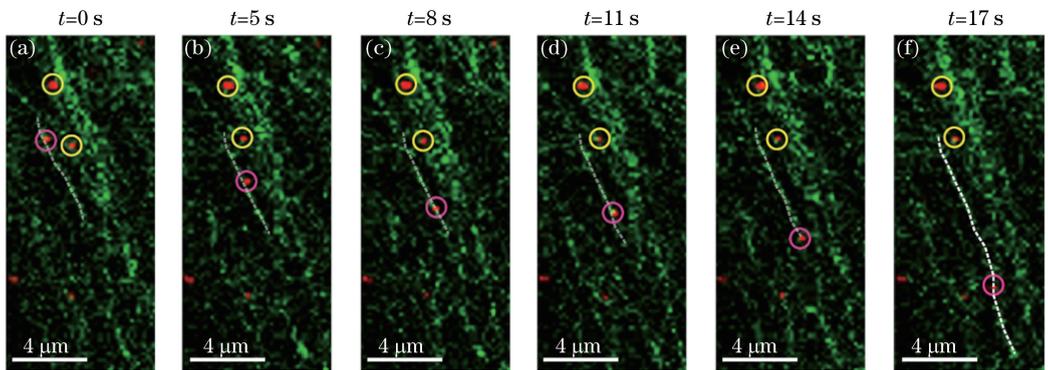


图4 荧光显微镜捕捉到fPlas-gold在微管上的二维运动轨迹^[43](玫瑰紫圆圈代表高速运动颗粒,两个黄色圆圈代表低速运动颗粒)

Fig. 4 Snapshots of 2D trajectory of fPlas-gold on the microtubule captured by fluorescence microscope^[43] (the rose pink circle represents the particle with high-motility, while two yellow circles represent the particles with low-motility)

2.4 依靠新型光学技术获取前沿生物医学精细化研究新手段

尽管近年来生物医学技术获得了稳定高效的发展,但是包括癌症转移、胚胎发育、大脑功能在内的

许多重大问题的机制仍不清晰。要想对这些重大生物医学问题进行更加深入的研究,必须借助一些强有力的新工具。例如:依靠光遗传技术可以对神经元进行非侵入式的精准定位刺激操作,彻底改变了

神经科学领域的研究状况,为神经科学提供了革命性的研究手段;基因编辑技术是可以对基因组精确修饰的一种技术,它能实现基因定点突变、敲入、多位点同时突变和小片段删失等功能,因此在基因组水平上可以进行精确的基因编辑;依靠细胞示踪技术可以判断药物细胞进入生物体内后能否保持生物活性,能否到达目标位置,能否完成预期功效,进而在临床前全面评估新疗法的疗效和副作用。

几乎所有面向前沿生物医学问题研究的关键技术的发展,或多或少都依赖于新型光子学技术的引入。下面仅以细胞示踪技术为例来证明这个观点。细胞示踪技术通过在特定细胞内修饰某种标记物实现细胞示踪,可以在空间及时间两个维度上实时获取与这些细胞相关的信息,对其在体内的存活、分布、分化、迁移、转归等行为进行动态监控,进而在细胞层面揭示许多与生命本源相关的重要机制。作为一种重要的技术工具,细胞示踪技术在现代生物医学的基础研究和临床应用中都获得了广泛应用^[44]。而早期的细胞示踪技术通常仅对某一类细胞修饰同一种标记物,以对它们整体的分化和繁殖进行示踪监控。随着生物医学技术的发展,人们逐渐意识到这种对群体细胞平均效应的示踪研究很可能掩盖了许多与生命进程或疾病起源密切相关的重要的个体信息,因此生物医学研究越来越重视对个体细胞特异性信息的获取,这也对细胞示踪技术的发展提出了新要求。为了实现更加精准化的生物医学研究,研究人员利用纳米颗粒或量子点与蛋白质或病毒等小分子物质相连,实时监测蛋白质或病毒在细胞内与其他物质的相互作用,进而研究其对宿主细胞生命变化过程的影响^[45-46],为生物医学领域提供了更加精准的检测手段。

当前生物医学最热门的癌症转移、胚胎发育、细胞疗法等研究,都迫切地存在如下的技术需求。1) 在癌症机制研究领域,如何阻止转移细胞入侵身体其他部位一直是预防肿瘤扩散亟待解决的核心问题。近期,研究人员发现看似相同的癌细胞中,可能存在着某些特殊的癌细胞个体,这些细胞相当于癌症的种子,能抵抗化疗并在多年后导致癌症复发,这就是著名的癌症干细胞理论^[47]。癌症干细胞是指肿瘤中的一群特殊细胞,它们能通过自我更新和分化,启动并维持癌症的发展。癌症干细胞和常规癌细胞的差别非常小,因此要理清它们的工作机制,必须要在由相当数量癌细胞构成的细胞群落里,对每个细胞进行差异性标记,以便特异性示踪每个细胞

的分化及转移行为,比较并找到具有特殊行为的癌症干细胞,系统地研究它们的行为规律。2) 生物发育研究的终极问题是要解开少数的几个胚胎祖细胞如何能够在不停的分化中生成构成成体器官的大多数细胞的进化奥秘。要开展这些研究,生物发育学家需要对每一代细胞单独标记示踪,并清晰地监控子细胞的生成,同时利用子细胞对标记物的继承来重建细胞谱系关系,这种对不同分化代细胞连续示踪的技术在发育学上被称为细胞谱系示踪技术^[48]。3) 在面向下一代细胞疗法的应用方面,研究者正致力于研发新的药物细胞,不断提高药物细胞的疗效,降低副作用;此外,通过对药物细胞引起的抗原活动进行合理控制,可使药物细胞攻击的靶向更加精确^[49]。在这些新的药物细胞进入临床实验前,必须通过细胞示踪技术对药物细胞的疗效和副作用进行评估,这也需要在同一组织内对不同种类药物的细胞,甚至同一种类药物细胞的不同周期阶段,或不同分化代分别进行标记,以观测它们的疗效差异。此外,下一代细胞疗法的一个重要趋势是复合用药,并重点监控由此带来的疗效加成和副作用改变。这个过程也必须对不同基因改造的药物细胞特异性进行标记并示踪。因此,以上几个重大生物医学问题的研究都迫切需要发展能对大量单细胞个体特异性靶标进行区分,且能实时动态监控的细胞示踪新技术。

要做到这一点,必须找到某种具有多信息维度的技术,以同时对要研究的细胞群落中的每个细胞个体差异性标记特定的信息载体,并能够利用这些信息载体的差异,在动态观测中清晰地地区分识别出每个待研究的细胞个体。基因编辑技术是目前应用最成功的多细胞特异性靶标示踪技术。2016年,Yu等^[50]在不影响细胞功能的前提下,利用基因编辑技术对每个细胞差异性修饰了相应的“条形码”DNA片段,这就好像是给超市内每件货品背面都贴上条形码一样,因此能够在实验后通过细胞基因筛选,从近4000个细胞构成的群落中找到10个目标示踪细胞。同年,McKenna等^[51]还将类似的基因条形码技术成功地用于斑马鱼发育的细胞谱系示踪研究中,结果发现,在4月龄斑马鱼的1138个基因变异体中,只有5个生成了98%以上的血细胞。

尽管基因编辑技术可以成功实现对大量单细胞的特异性标记,但很难利用该技术对在体或活体中细胞的运动、迁移和转化过程进行实时、动态的示踪观测。相比基因编辑技术,光学技术更有利于实时、动态地标记和示踪细胞,且最有利于信息的复用,即

类似基因编辑那样,以条形码的方式对大量单细胞特异性靶标示踪。要实现大量单细胞的特异性靶标示踪,必须有足够量的信息载体,而光波长就是最利于信息复用的物理维度之一。在光通信中,密集波分复用技术已经可以让每个波长在功能上类似于一个 IP 地址,从而可以实现大量波长复用信息的并行传输通信。类似的思想用于细胞示踪一样有效,即发射特定波长的标记物标记细胞,用细胞成像探测到的特定波长信号来区分每个细胞,并对它们进行差异化示踪。

最近,两个不同的研究团队几乎在同一时间提出了相近的解决思路。他们将荧光染料作为增益材料用微米尺度的球形聚合物或油滴包覆形成外壳,利用光在外壳中全反射形成回音壁模式的共振,成功地将

荧光染料的自发辐射变为受激辐射,实现了基于细胞内激光发射的光学标记^[52]。如图 5(a)所示,Humar 等^[53]使用塑料微球包覆染料构成了基于回音壁共振的微米激光器(绿色),进而实现了对癌细胞的动态示踪。在实验中,Humar 等采用蓝光 LED 作为抽运光源,激光工作阈值仅为 2.4 nJ,如图 5(b)所示。当激发光功率达到 38 nJ 时,该光源实现了非常窄带的单波长激光发射,并且通过改变微球的直径可以实现发射波长在增益谱内的调节。该技术的提出将为生物发育、癌症机制研究和细胞疗法技术研究提供一种水溶性更好、操作更简单、实时动态性能更好、可以差异化标记信息量且与基因编辑技术相当的新一代多细胞特异性靶标示踪技术,对于下一代生物学基础及临床应用研究具有重要意义。

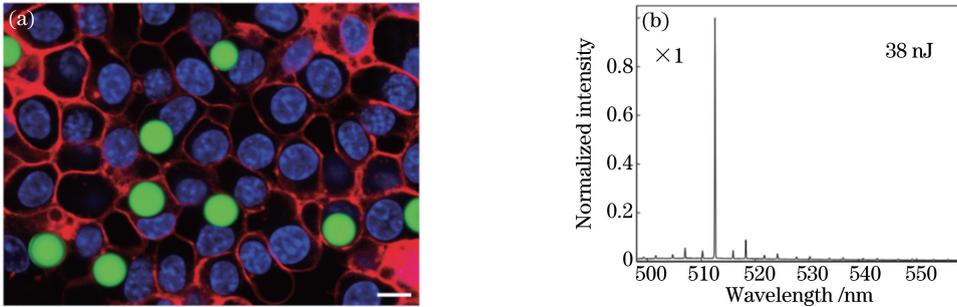


图 5 采用活细胞内塑料微球激光器作为标记物的细胞追踪应用^[53]。

(a) 原代小鼠巨噬细胞的共聚焦成像; (b) 单个荧光珠在 38 nJ 激光抽运功率下的光谱图

Fig. 5 Cell tracking application by using whispering-gallery mode (WGM) micro-resonators lasers in live cells as marker^[53].

(a) Confocal image of raw murine macrophage cells; (b) spectrum of a single fluorescent bead at 38 nJ laser pump intensity

虽然用不同发射波长的激光器标记不同种类的单细胞,可以在满足实时示踪的要求下对大量单细胞特异性靶标进行示踪,但是这些技术要应用于具体的生物学问题,还必须解决以下三个技术难题: 1) 激光器尺寸过大。在 Schubert 和 Humar 的研究中,均采用回音壁共振模式构成激光器的谐振腔,因此若要维持较高的品质因数,微球尺寸不能太小,平均尺寸为 4~20 μm 。这对于细胞标记来说显得过大,单个激光器几乎填满了整个细胞,直接影响细胞的活性,难以长时间用于细胞示踪问题的研究。2) 发射波长难以精确调节。尽管 Schubert 和 Humar 的研究都证实可以通过调节壳层包覆材料尺寸实现发射波长的调节,但可控性差,调节精度不高,很难满足对大量单细胞特异性靶标示踪应用的实际要求。3) 新生代细胞无法继承标记物。由于每个细胞仅标记了单个激光器,新生细胞无法继承相应的标记激光器,使得上述技术无法满足细胞示踪对细胞分化监控的基本需求。

综上所述,尽管采用细胞内微米激光器有望实现对大量单细胞的特异性靶标动态示踪,且实时动态观测性能优于基因编辑技术,然而要想获得更广泛的实际应用还必须解决以上提到的激光器尺寸过大、发射波长难以精确调节、新生代细胞无法继承标记物这三个关键问题。针对以上提到的大量单细胞特异性靶标示踪存在的三个关键问题,本课题组正在使用等离子纳米激光器来取代图 5 中的微米激光器,以实现多细胞特异性示踪的相关研究。基于表面等离子体受激辐射放大的原理,本课题组获得了平均直径在 100 nm 以内的纳米激光器,可用来取代上述研究中基于回音壁共振的微米激光器。在这种情况下,激光器尺寸和通常用于生物光学成像的纳米探针相当,作为细胞示踪标记物不会显著影响细胞的活性;且单细胞内可以标记大量具有相同发射波长的纳米激光器,和通常的纳米探针标记一样,在细胞分化时新生代细胞也会拥有一定的与母细胞同源的纳米激光器,从而使得该技术可成功

用于细胞分化示踪研究,实现了纳米尺度的生物医学诊断和治疗,相关工作将在后续整理后发表。

3 结束语

主要介绍了将光学技术引入纳米生物学后,其为纳米生物医学的稳定性、精准度、治疗机制研究及诊断治疗新方法开发方面带来的优势。通过光学手段可以改善拉曼信号的稳定性,提高探测信号的强度,增强药物的可控度。利用近红外第二窗口穿透深的特点,可以实现体内监控纳米药物分布及靶向治疗。多模态光学成像可以监测纳米颗粒与细胞之间的作用机制及其在体内的运动轨迹。多功能纳米光子学技术(如光遗传技术、基因编辑技术、细胞示踪等)作为新一代生物医学精细化研究新手段,对生物医学基础及临床应用研究具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Zhang L J, Webster T J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration[J]. *Nano Today*, 2009, 4(1): 66-80.
- [2] Tong H, Ouyang S X, Bi Y P, *et al.* Nanophotocatalytic materials: Possibilities and challenges [J]. *Advanced Materials*, 2012, 24(2): 229-251.
- [3] Dun W T, Li M, Li Y, *et al.* Applications of nanobiosensor in biomedical field [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(4): 49-54.
顿文涛, 李勉, 李燕, 等. 纳米生物传感器在生物医药中的应用[J]. *生物技术通报*, 2013(4): 49-54.
- [4] Song H S, Park T H. Integration of biomolecules and nanomaterials: Towards highly selective and sensitive biosensors [J]. *Biotechnology Journal*, 2011, 6(11): 1310-1316.
- [5] Aslan K, Holley P, Davies L, *et al.* Angular-ratiometric plasmon-resonance based light scattering for bioaffinity sensing[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(34): 12115-12121.
- [6] Sasaki T, Matsuki N, Ikegaya Y. Action-potential modulation during axonal conduction [J]. *Science*, 2011, 331(6017): 599-601.
- [7] Contag C H, Jenkins D, Contag P R, *et al.* Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease *in vivo* [J]. *Neoplasia*, 2000, 2(1/2): 41-52.
- [8] Wang X L, Rosol M, Ge S, *et al.* Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using *in vivo* bioluminescence imaging [J]. *Blood*, 2003, 102(10): 3478-3482.
- [9] Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging [J]. *Radiology*, 2001, 219(2): 316-333.
- [10] Slowing I I, Vivero-Escoto J L, Wu C W, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60(11): 1278-1288.
- [11] Soppimath K S, Aminabhavi T M, Kulkarni A R, *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices [J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 70(1/2): 1-20.
- [12] Huang X H, El-Sayed I H, Qian W, *et al.* Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(6): 2115-2120.
- [13] Sugiura T, Matsuki D, Okajima J, *et al.* Photothermal therapy of tumors in lymph nodes using gold nanorods and near-infrared laser light with controlled surface cooling [J]. *Nano Research*, 2015, 8(12): 3842-3852.
- [14] Liu J, Zheng X P, Yan L, *et al.* Bismuth sulfide nanorods as a precision nanomedicine for *in vivo* multimodal imaging-guided photothermal therapy of tumor [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(1): 696-707.
- [15] Mou J, Li P, Liu C B, *et al.* Ultrasmall Cu_{2-x}S nanodots for highly efficient photoacoustic imaging-guided photothermal therapy [J]. *Small*, 2015, 11(19): 2275-2283.
- [16] Song X J, Liang C, Gong H, *et al.* Photosensitizer-conjugated albumin-polypyrrole nanoparticles for imaging-guided *in vivo* photodynamic/photothermal therapy [J]. *Small*, 2015, 11(32): 3932-3941.
- [17] Manyak M J, Russo A, Smith P D, *et al.* Photodynamic therapy [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998, 90(12): 889-905.
- [18] Dolmans D E J G J, Dai F, Jain R K. Timeline: Photodynamic therapy for cancer [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(5): 380-387.
- [19] Lucky S S, Soo K C, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy [J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(4): 1990-2042.
- [20] Zhang X M, Ai F J, Sun T Y, *et al.* Multimodal upconversion nanoplatform with a mitochondria-targeted property for improved photodynamic therapy of cancer cells [J]. *Inorganic Chemistry*, 2016, 55(8): 3872-3880.
- [21] Zhang T, Lin H M, Cui L R, *et al.* NIR-sensitive UCNP @ mSiO₂ nanovehicles for on-demand drug release and photodynamic therapy [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(31): 26479-26489.
- [22] Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours

- [J]. *Journal of Photochemistry & Photobiology B*, 1997, 39(1): 1-18.
- [23] Song J, Qu J L, Swihart M T, *et al.* Near-IR responsive nanostructures for nanobiophotonics: Emerging impacts on nanomedicine [J]. *Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine*, 2016, 12(3): 771-788.
- [24] Park K, Lee S, Kang E, *et al.* New generation of multifunctional nanoparticles for cancer imaging and therapy[J]. *Advanced Functional Materials*, 2009, 19(10): 1553-1566.
- [25] Yuan Y F, Lin Y N, Gu B, *et al.* Optical trapping-assisted SERS platform for chemical and biosensing applications: Design perspectives [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2017, 339: 138-152.
- [26] Rao S, Raj S, Balint S, *et al.* Single DNA molecule detection in an optical trap using surface-enhanced Raman scattering [J]. *Applied Physics Letters*, 2010, 96(21): 213701.
- [27] Fazio B, D'Andrea C, Foti A, *et al.* SERS detection of biomolecules at physiological pH via aggregation of gold nanorods mediated by optical forces and plasmonic heating[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26952.
- [28] Wright A J, Richens J L, Bramble J P, *et al.* Surface-enhanced Raman scattering measurement from a lipid bilayer encapsulating a single decahedral nanoparticle mediated by an optical trap [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(36): 16395-16404.
- [29] Kharroubi L D, Huglo D, Mordon S, *et al.* Nuclear medicine for photodynamic therapy in cancer: Planning, monitoring and nuclear PDT [J]. *Photodiagnosis & Photodynamic Therapy*, 2017, 18: 236-243.
- [30] Tong R H, Lin H M, Chen Y H, *et al.* Near-infrared mediated chemo/photodynamic synergistic therapy with DOX-UCNPs @ mSiO₂/TiO₂-TC nanocomposite[J]. *Materials Science & Engineering C*, 2017, 78: 998-1005.
- [31] Zhan Q Q, Qian J, Liang H J, *et al.* Using 915 nm laser excited Tm³⁺/Er³⁺/Ho³⁺-doped NaYbF₄ upconversion nanoparticles for *in vitro* and deeper *in vivo* bioimaging without overheating irradiation[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(5): 3744-3757.
- [32] Wen H L, Zhu H, Chen X, *et al.* Upconverting near-infrared light through energy management in core-shell-shell nanoparticles [J]. *Angewandte Chemie*, 2013, 52(50): 13419-13423.
- [33] Shen J, Chen G Y, Vu A M, *et al.* Engineering the upconversion nanoparticle excitation wavelength: Cascade sensitization of tri-doped upconversion colloidal nanoparticles at 800 nm [J]. *Advanced Optical Materials*, 2013, 1(9): 644-650.
- [34] Wang D, Xue B, Kong X G, *et al.* 808 nm driven Nd³⁺-sensitized upconversion nanostructures for photodynamic therapy and simultaneous fluorescence imaging[J]. *Nanoscale*, 2014, 7(1): 190-197.
- [35] Sordillo L A, Pu Y, Pratavieira S, *et al.* Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(5): 056004.
- [36] Antaris A L, Chen H, Diao S, *et al.* A high quantum yield molecule-protein complex fluorophore for near-infrared II imaging [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15269.
- [37] Zhu S J, Yang Q L, Antaris A L, *et al.* Molecular imaging of biological systems with a clickable dye in the broad 800- to 1700-nm near-infrared window[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(5): 962-967.
- [38] Diao S, Blackburn J L, Hong G S, *et al.* Fluorescence imaging *in vivo* at wavelengths beyond 1500 nm[J]. *Angewandte Chemie*, 2015, 54(49): 14758-14762.
- [39] Wang Y Z, Huang B, Lü J, *et al.* Current status of nanotechnology applied in biomedicine [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2009, 25(3): 168-174.
王英泽, 黄奔, 吕娟, 等. 纳米技术在生物医学领域的研究现状[J]. *生物物理学报*, 2009, 25(3): 168-174.
- [40] Wang C, Xu H, Liang C, *et al.* Iron oxide @ polypyrrole nanoparticles as a multifunctional drug carrier for remotely controlled cancer therapy with synergistic antitumor effect[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(8): 6782-6795.
- [41] Dong X, Chen H L, Qin J W, *et al.* Thermosensitive porphyrin-incorporated hydrogel with four-arm PEG-PCL copolymer (II): Doxorubicin loaded hydrogel as a dual fluorescent drug delivery system for simultaneous imaging tracking *in vivo* [J]. *Drug Delivery*, 2017, 24(1): 641-650.
- [42] Li Y, Liu G H, Ma J Y, *et al.* Chemotherapeutic drug-photothermal agent co-self-assembling nanoparticles for near-infrared fluorescence and photoacoustic dual-modal imaging-guided chemophotothermal synergistic therapy [J]. *Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society*, 2017, 258: 95-107.
- [43] Liu M M, Li Q, Liang L, *et al.* Real-time visualization of clustering and intracellular transport

- of gold nanoparticles by correlative imaging [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15646.
- [44] Kircher M F, Gambhir S S, Grimm J. Noninvasive cell-tracking methods [J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2011, 8(11): 677-688.
- [45] Gardini L, Capitanio M, Pavone F S. 3D tracking of single nanoparticles and quantum dots in living cells by out-of-focus imaging with diffraction pattern recognition[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16088.
- [46] Liu S L, Wang Z G, Zhang Z L, *et al.* Tracking single viruses infecting their host cells using quantum dots[J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(5): 1211-1224.
- [47] Kaiser J. The cancer stem cell gamble [J]. *Science*, 2015, 347(6219): 226-229.
- [48] Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [49] de Henau O, Rausch M, Winkler D, *et al.* Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3K gamma in myeloid cells [J]. *Nature*, 2016, 539(7629): 443-447.
- [50] Yu C N, Mannan A M, Yvone G M, *et al.* High-throughput identification of genotype-specific cancer vulnerabilities in mixtures of barcoded tumor cell lines [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(4): 419-423.
- [51] McKenna A, Findlay G M, Gagnon J A, *et al.* Whole organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing [J]. *Science*, 2016, 353(6298): 7907.
- [52] Schubert M, Steude A, Liehm P, *et al.* Lasing within live cells containing intracellular optical microresonators for barcode-type cell tagging and tracking [J]. *Nano Letters*, 2015, 15(8): 5647-5652.
- [53] Humar M, Yun S H. Intracellular microlasers [J]. *Nature Photonics*, 2015, 9(9): 572-576.