

# 叶酸修饰的 CdSe-TiO<sub>2</sub> 对 HL60 细胞的光动力灭活作用

孙广宇, 符秋伟, 郭文博, 鲁丽, 艾保全, 熊建文

华南师范大学物理与电信工程学院广东省量子调控与材料重点实验室, 广东 广州 510006

**摘要** 研究了叶酸修饰硒化镉掺杂二氧化钛(FA-CdSe-TiO<sub>2</sub>)的纳米颗粒体外光动力(PDT)灭活 HL60 细胞的作用效果,探讨了叶酸修饰增强 CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒 PDT 效果的作用机理。利用水解沉积法制备 CdSe-TiO<sub>2</sub>,采用表面修饰方法制备 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒。通过透射电镜(TEM)、傅里叶红外光谱(FTIR)、紫外可见吸收光谱等方法,对纳米颗粒进行结构和光学性质的表征;采用 CCK-8 法检测细胞活性;利用荧光探针标记技术分析细胞内活性氧水平,通过扫描电镜观察细胞的超微结构。结果表明:FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒对细胞暗室毒性相较于 CdSe-TiO<sub>2</sub> 没有大幅变化;而在光照条件下,FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 对细胞的生长抑制率相比于 CdSe-TiO<sub>2</sub> 有较大提升,其中叶酸比例为 1.0 时,在 18 J/cm<sup>2</sup> 光剂量辐照下,PDT 效率达 84%;叶酸表面修饰提高了 HL60 细胞对纳米颗粒的摄取效率,使细胞内活性氧水平提升,进而增强了对 HL60 细胞的 PDT 灭活效率。

**关键词** 生物光学; 叶酸修饰硒化镉掺杂二氧化钛; 光动力疗法; 叶酸; 光敏剂; HL60 细胞

中图分类号 R454.2

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0407004

## Photodynamic Inactivation of HL60 Cells *in vitro* with Folic Acid-Modified CdSe-TiO<sub>2</sub>

Sun Guangyu, Fu Qiuwei, Guo Wenbo, Lu Li, Ai Baoquan, Xiong Jianwen

Guangdong Provincial Key Laboratory of Quantum Engineering and Quantum Materials, School of Physics and Telecommunication Engineering, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510006, China

**Abstract** The *in vitro* photodynamic therapy(PDT) inactivation efficiency of HL60 cells based on cadmium selenide-doped titanium dioxide nanoparticles modified by folic acid (FA-CdSe-TiO<sub>2</sub>) is investigated and the mechanism of folic acid modification to enhance the PDT effect of CdSe-TiO<sub>2</sub> nanoparticles is discussed. The CdSe-TiO<sub>2</sub> nanoparticles are prepared by hydrolysis deposition method, and FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> nanoparticles are prepared by surface modification method. The structure and optical properties of the nanoparticles are characterized by transmission electron microscopy (TEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), ultraviolet visible absorption spectrum and so on. The cell viability is measured by CCK-8 method. The intracellular reactive oxygen species (ROS) levels are analyzed by fluorescence probe labeling technique, and the ultrastructure of the cells is observed by scanning electron microscopy. The results show that FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> nanoparticles have no significant change in cytotoxicity compared with CdSe-TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the darkroom condition. However, under the light condition, FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> has a great increase in cell growth inhibition rate. When the ratio of folic acid is 1.0, the PDT efficiency is 84% at 18 J/cm<sup>2</sup> light irradiation. Folic acid surface modification increases the uptake efficiency of HL60 cells to the nanoparticles, and the level of ROS in the cells is increased, thereby the PDT inactivation efficiency of HL60 cells is enhanced.

**Key words** biotechnology; cadmium selenide-doped titanium dioxide modified by folic acid; photodynamic therapy; folic acid; photosensitizer; HL60 cells

收稿日期: 2017-07-31; 收到修改稿日期: 2017-09-20

基金项目: 国家自然科学基金(61072029)、广州市科技计划项目(2014J4100049)

作者简介: 孙广宇(1992—),男,硕士研究生,主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: 2015020886@m.scnu.edu.cn

导师简介: 熊建文(1962—),男,博士,教授,主要从事激光生物学和生物医学光子学方面的研究。

E-mail: jwxiong@scnu.edu.cn (通信联系人)

## 1 引 言

白血病是发病率较高且严重危害人类健康的血液系统恶性肿瘤。光动力疗法(PDT)是一种利用特定波长的光照射光敏药物,产生单线态氧或氧自由基,从而造成靶组织或靶细胞损伤的新型治疗方法<sup>[1-2]</sup>。PDT具有选择性杀伤肿瘤细胞、抗瘤谱广、可与其他治疗方法联合使用等诸多优点<sup>[3-5]</sup>。在光动力治疗中,光敏剂作为能量载体和反应桥梁对治疗效果起着决定性的作用<sup>[6-7]</sup>,所以对光敏剂性能的改善及新型光敏剂的构建成为当前研究的热点。二氧化钛( $\text{TiO}_2$ )作为一种光催化材料,具有光催化活性较高、生物相容性较好和化学性质稳定等一系列优点<sup>[8]</sup>,这些优点使其应用于 PDT 中成为可能。但由于  $\text{TiO}_2$  具有较宽的带隙宽度,从而导致其对可见光的响应度较低,使其在 PDT 应用中受到一定的限制<sup>[9]</sup>。

量子点(QDs)因其独特的性质而被广泛应用于生物成像和探针标记<sup>[10-11]</sup>。量子尺寸效应优异决定了量子点激发光波长范围宽、发射光谱宽度窄的优点。研究发现, $\text{TiO}_2$ 通过量子点改性可将其吸收谱拓展至可见光区,达到可见光响应的目的,提高了光催化效率<sup>[12-13]</sup>。实验研究表明, $\text{CdSe}$ 与 $\text{TiO}_2$ 复合可以有效提高 $\text{TiO}_2$ 对可见光的利用效率,光催化性能明显改善<sup>[14]</sup>。本课题组前期研究也发现, $\text{CdSe-TiO}_2$ 纳米颗粒对人早幼粒细胞白血病的细胞系(HL60细胞)有较好的灭活效果<sup>[15]</sup>。

在 PDT 治疗中,光敏剂的靶向性能越来越引起研究者的重视。叶酸受体(FR)对叶酸(叶酸)及其类似物具有灵敏度高、特异性强的优点<sup>[16-17]</sup>。它主要包括 FR- $\alpha$ 及 FR- $\beta$ 两种亚型,研究发现<sup>[18-19]</sup>叶酸受体在不同亚型的白血病细胞中,有 68%的 FR- $\beta$ 受体发生过度表达的现象,而在正常人血细胞中的表达极少。本课题组相关的研究表明,通过叶酸修饰增强了 HL60 细胞对硫掺杂  $\text{TiO}_2$ (S- $\text{TiO}_2$ )纳米颗粒的吸收<sup>[20]</sup>。

本文采用水解沉积法制备可见光响应的  $\text{CdSe-TiO}_2$  纳米颗粒,用叶酸对其表面进行修饰制得 FA- $\text{CdSe-TiO}_2$ ,探究了叶酸修饰前后及不同比例的叶酸修饰下对 HL60 细胞的光动力灭活效果,从而证明了 FA- $\text{CdSe-TiO}_2$  具有作为光敏剂的重要特性。

## 2 材料与方 法

### 2.1 细胞株

HL60 细胞由中山大学实验动物中心细胞库提供。

### 2.2 试剂和仪器

叶酸(上海 Sigma Aldrich)、硒粉(Se, >99.99%)、无水亚硫酸钠(分析纯)、钛酸丁酯( $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{Ti}$ ,分析纯)、无水乙醇( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ,分析纯)、氯化镉水合物( $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , >99.5%)、巯基乙酸( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{S}$ ,分析纯)、碳酸氢钠(中国 Daomao)、氢氧化钠(天津致远)、盐酸(天津致远)、pH 试纸、完全 RPMI-1640 培养基(美国 Gibco)、活性氧检测试剂盒(北京普利来)、CCK-8 试剂(日本同仁化学研究所)、台盼蓝。

本研究所用仪器如下:UV-3100 型紫外-可见分光光度计,WFY-28 型荧光分光光度计(天津拓普公司),傅里叶变换红外光谱(FTIR)仪(型号:Nicolet 6700),JEM-2100HR 透射电子显微镜(TEM,日本 Jeol 公司),Countess TM 型自动细胞计数仪(美国 Invitrogen),PDT 反应室(自行设计),410 nm LED 光源(自行设计),Bio-Rad imark 酶标仪(美国伯乐),SW-sCJ 型洁净工作台(苏州安泰),超微振荡器(姜堰新康),HH·CP-TW(80 L)二氧化碳培养箱(上海一恒科技),细胞计数板及 96 孔板等其他常规器皿。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 FA- $\text{CdSe-TiO}_2$ 纳米复合颗粒的制备

$\text{CdSe}$  是以巯基乙酸为稳定剂,利用水相法合成的水溶性量子点。

##### 1) $\text{CdSe-TiO}_2$ 纳米颗粒的制备

采用水解沉积法。称取 0.13196 g  $\text{CdSe}$  粉末,加入 30 mL 无水乙醇,超声震荡 1 h 得分散体系 A。再量取 1.761 mL 钛酸丁酯,边搅拌边逐滴加入到 A 中,搅拌 15 min 得分散体系 B。将体积比 1:5 的水和无水乙醇混合液 10 mL,边搅拌边逐滴加入 B 中,继续搅拌 1 h。离心分离沉淀物,分别用蒸馏水和无水乙醇清洗两遍,室温下风干。用马弗炉 500 °C 焙烧 4 h,碾磨 30 min,过滤、杀菌制得样品。

##### 2) 叶酸表面修饰

将 840 mg 碳酸氢钠溶于 100 mL 的去离子水中,量取 40 mL 碳酸氢钠溶液并使用氢氧化钠和盐酸将其 pH 值调为 5.5。将适量叶酸加入所制得的

碳酸溶液中,置于磁力搅拌器上搅拌。取适量 CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒样品加入 5 mL 去离子水中进行超声分散。将所配制的 CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒悬液在超声的环境下逐滴加入到叶酸溶液中,将混合溶液避光处理,在室温下持续搅拌 24 h。最后将制得的 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒使用饱和碳酸氢钠溶液和去离子水各清洗 2 遍。

### 2.3.2 细胞培养与计数

将 HL60 细胞置于完全 RPMI-1640 培养基中,把整个培养基放入 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、95% (均为体积分数)空气的二氧化碳培养箱中培养。取处于对数生长期的细胞进行实验。将打散的细胞液与台盼蓝按 1:1 的比例混合,将混合液移至细胞计数板上,使用自动细胞计数仪计数。

### 2.3.3 细胞实验

根据探究目的,事先在 96 孔培养板上规划好实验,实验分为光照板和遮光板,每块板分别设置实验组和调零组,同一参数设置三个重复孔以减小误差。取对数生长期细胞浓度为  $4 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  的 HL60 细胞接种到 96 孔板中,实验组中每个孔接种 100  $\mu\text{L}$  的 HL60 细胞,紧接着在实验组中分别加入终值质量浓度为 10, 20, 30, 50  $\mu\text{g/mL}$  的 CdSe-TiO<sub>2</sub> 和不同叶酸比例的 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 溶液各 100  $\mu\text{L}$ ; 在调零组中,只加入 200  $\mu\text{L}$  的血清含量为 10% 的 RPMI-1640 培养液,将板放在超微振荡器上振荡,使药物和细胞混合均匀,用酒精擦拭 96 孔板,将其置于培养箱中培养。其中,光照板细胞在培养 12 h 后,置于 PDT 辐照室接受不同光照剂量的光照(光功率为  $5 \text{ W/cm}^2$ ); 遮光板则避光处理,连续培养 12 h。所有孔板每孔加入 20  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 试剂,置于超微振荡器振荡,混合均匀后置于培养箱中继续培养 4 h,最后使用美国 Bio-Rad 伯乐 imark 酶标仪,以 450 nm 为测量波长,630 nm 为参考波长,检测上述实验组和调零组细胞活性的吸光度。

### 2.3.4 细胞内活性氧检测

采用荧光探针标记技术测试细胞内活性氧水平<sup>[21]</sup>。取细胞浓度为  $4 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  的 HL60 细胞,加入终值质量浓度为 20  $\mu\text{g/mL}$  的纳米颗粒,在暗室条件下共同孵育 12 h。配制物质的量浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  的 DCFHDA 培养液,加入上述细胞液中孵育 20 min。孵育完成后,取出细胞,用磷酸盐缓冲(PBS)溶液将细胞清洗 2 次,将其置于光动力反应室中光照 1 h。光照后,使用荧光分光光度计,在 488 nm 激发波长下进行细胞内活性氧探针的荧光检测。

### 2.3.5 细胞活性检测

CCK-8(Cell Counting Kit-8)法具有操作简单方便、灵敏度高、重复性好的优点<sup>[22-23]</sup>。故本实验采用 CCK-8 法,以 450 nm 为测量波长,630 nm 为参考波长进行细胞活性检测,以提高实验的准确度。

### 2.3.6 光照系统

使用本课题组自主发明的基于 LED 阵列的光动力反应装置(专利号:201210244215.9)。它由均匀的面光源 LED 阵列、光电检测装置、单片机以及升降台(载物台)等结构组成。本装置可通过调节载物台与光源的距离,实现光功率密度可调的特性。

### 2.3.7 数据分析

实验数据采用 Origin、SPSS 11.5 软件进行处理,实验数据均采用“均值±标准差”的方式进行表示。

## 3 实验结果分析与讨论

### 3.1 叶酸修饰的 CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米复合颗粒的表征

#### 3.1.1 TEM 成像分析

如图 1(a)、(c)所示为 CdSe-TiO<sub>2</sub> 样品的 TEM 图像,可以观察到实验制备的 CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒呈球状或类方形,具有一定的分散性,尺寸在 30 nm 左右;图 1(b)、(d)为 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 样品的 TEM 图,对比图(a)、(c)可以发现,叶酸修饰后纳米颗粒的分散性没有显著改变,在纳米颗粒表面可以观察到一层有机包覆膜[图 1(d)箭头所指],证明了叶酸与 CdSe-TiO<sub>2</sub> 成功结合,图(d)中显示的叶酸修饰后纳米颗粒粒径约为 40 nm。研究表明粒径在 100 nm 以下的颗粒均能满足进入细胞的条件,因此本实验所制备的纳米颗粒符合光敏剂的尺寸要求。

#### 3.1.2 能谱仪(EDS)结果分析

如图 2 所示为 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的 EDS 分析结果,图中所出现的 Se、Cd、Ti 和 O 的元素峰表明,本实验已成功制备出 CdSe-TiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒。EDS 测试结果显示样品含有大量的 C 元素,这可能是由于叶酸表面修饰的原因。结果还显示有铜元素峰,这可能是由于在进行 EDS 分析时使用了铜网装载样品<sup>[24]</sup>。

#### 3.1.4 FTIR 分析

如图 3 所示,在叶酸的 FTIR 结果(曲线 b)中 3320, 3540  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰,是由叶酸分子中羟基(-OH)和氨基(-NH-)的振动所引起的; CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的 FTIR(曲线 c)中,位于 807  $\text{cm}^{-1}$  吸收峰对应于 O-Ti-O 键的振动,位于 1645, 3313  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰则是由锐钛矿表面的羟基

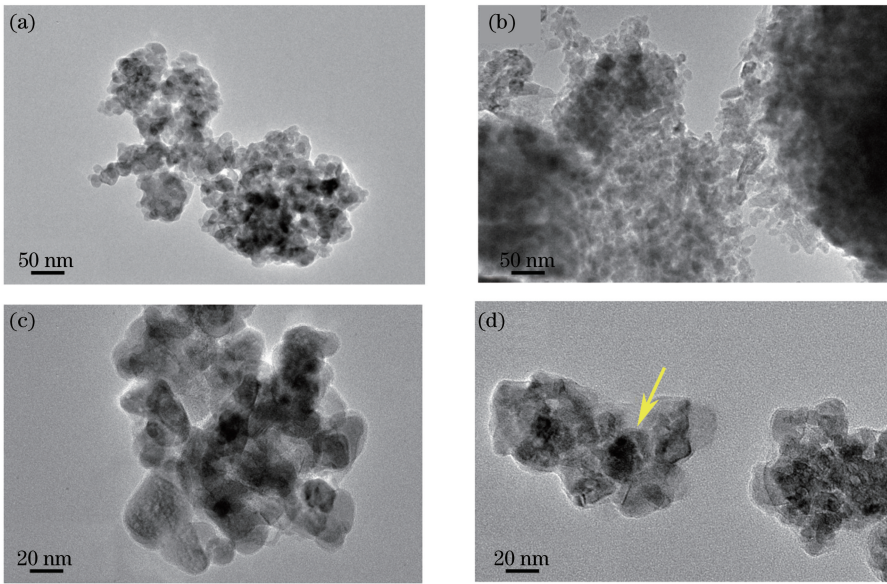


图 1 (a)、(b) CdSe-TiO<sub>2</sub> 样品的 TEM 图像和(c)、(d) FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 样品的 TEM 图像

Fig. 1 (a), (b) TEM images of CdSe-TiO<sub>2</sub> sample and (c), (d) TEM images of FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> sample

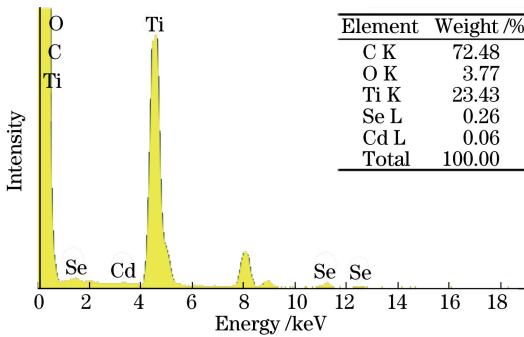


图 2 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 样品的 EDS 能谱

Fig. 2 EDS energy spectrum of FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> sample

(—OH)振动引起。在 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 的 FTIR(曲线 a)中可以发现,叶酸修饰 CdSe-TiO<sub>2</sub> 后,位于 1645, 3313 cm<sup>-1</sup>附近的吸收峰消失或减弱,而在 1481 cm<sup>-1</sup>处出现类似于羧酸盐(—COOM)的吸收峰,在 1689 cm<sup>-1</sup>处出现叶酸的嘧啶环伸缩振动的特征峰,以及在 3319, 3334 cm<sup>-1</sup>附近出现对应叶酸分子中氨基(NH—)振动的吸收峰。综合以上结果分析可知,叶酸分子与 CdSe-TiO<sub>2</sub> 表面的羟基以酯化反应的方式相结合形成 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub>。

### 3.1.5 紫外-可见光吸收光谱分析

如图 4(a)所示,可以观察到 TiO<sub>2</sub> 的吸收谱主要位于 387.5 nm 以下,这也是由其具有较宽的带隙宽度(3.2 eV)所致。相比与 TiO<sub>2</sub> 的吸收光谱, CdSe-TiO<sub>2</sub> 和 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的吸收光谱均不同程度的红移至可见光区,且在 410 nm 处 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 相较于 CdSe-TiO<sub>2</sub> 的吸收强度略有

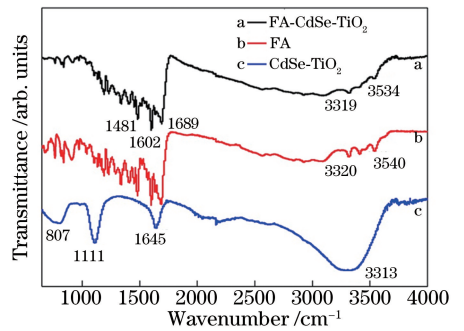


图 3 (a) FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 样品的 FTIR;(b)叶酸的 FTIR; (c) CdSe-TiO<sub>2</sub> 样品的傅里叶红外光谱

Fig. 3 (a) FTIR of FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> sample;

(b) FTIR of FA; (c) FTIR of CdSe-TiO<sub>2</sub> sample

增加,这说明, CdSe 和 TiO<sub>2</sub> 的复合有效地增强了 TiO<sub>2</sub> 对可见光的吸收,经适量叶酸分子的修饰,仍可以保持纳米颗粒对可见光的有效吸收。

图 4(b)为本实验采用的光动力辐照室 LED 光源的发射光谱,其发射峰位于 410.23 nm 处,与 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub>、CdSe-TiO<sub>2</sub> 的吸收谱有较好的重叠,能够满足对该纳米颗粒可见光激发的实验要求。

### 3.2 不同浓度下 CdSe-TiO<sub>2</sub> 和不同叶酸比例的 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米粒子对 HL60 细胞的暗室毒性

CdSe-TiO<sub>2</sub> 和不同叶酸比例修饰的 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒在暗室条件下对 HL60 细胞的活性的影响如图 5 所示。从图中可以发现,暗室条件下,当样品质量浓度小于 20 μg/mL 时, CdSe-TiO<sub>2</sub> 和叶酸修饰比例分别为 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 的 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 样品的样品与细胞共育 12 h 后,细胞相对存活

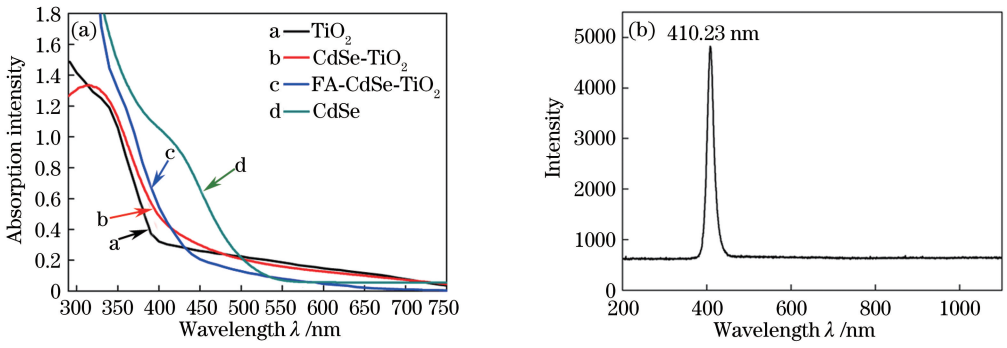


图 4 (a) 纳米颗粒的紫外-可见吸收光谱; (b) 光动力试验箱 LED 阵列发射光谱

Fig. 4 (a) Ultraviolet-visible absorption spectrum of nanoparticles; (b) emission spectrum of LED array in PDT test box

率大约保持在 80% 以上, 当药物浓度逐渐增大时, 细胞相对存活率逐渐降低。另外, 在叶酸比例小于 100% 时, 随着叶酸比例的增加, 细胞的相对存活率随之降低, 这表明叶酸分子对 HL60 细胞的靶向作用, 提高了 HL60 细胞对 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的摄取效率。当叶酸修饰比例增加到 2.0 时, 相对于较低比例修饰的样品, 暗室条件下细胞相对存活率反而增加, 这可能是由于叶酸大比例的增加, 降低了纳米颗粒中 CdSe 的比例, 使得药物本身的毒性降低, 表明叶酸的修饰不会引起新的细胞毒性, 可能还能在一定程度上减缓纳米颗粒的毒性。

幅降低。从图中看出, 与 CdSe-TiO<sub>2</sub> 相比, FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 对 HL60 细胞的 PDT 灭活效率明显提高。随着光照强度的增加, 不同样品的 PDT 灭活效率均有所提高。其中当叶酸修饰比例为 1.0、光照强度为 18 J/cm<sup>2</sup> 时, PDT 灭活效率最高, 达 84%。同时发现, 在叶酸比例总体小于 1.0 时, FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 的灭活效率随着叶酸比例的增加而增加, 而当叶酸修饰比例增加到 2.0 时, PDT 灭活效率出现显著降低, 这可能是由于过量的叶酸表面修饰阻碍了光源对 CdSe-TiO<sub>2</sub> 的激发。

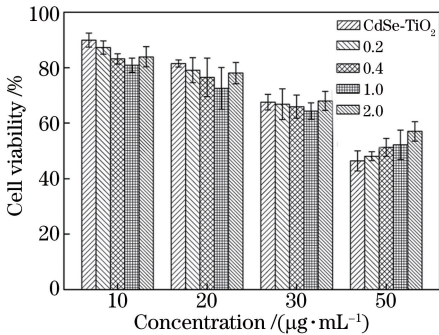


图 5 不同浓度下 CdSe-TiO<sub>2</sub> 和 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> (不同叶酸比例) 纳米粒子作用下的 HL60 细胞在暗室条件下的细胞存活率

Fig. 5 Viability of HL60 cells treated with CdSe-TiO<sub>2</sub> and FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> (with different FA ratios) nanoparticles with different concentrations under darkroom conditions

### 3.3 不同光照剂量下 CdSe-TiO<sub>2</sub> 和不同叶酸比例的 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米粒子 PDT 效率

图 6 为 CdSe-TiO<sub>2</sub> 和不同叶酸比例的 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒在不同光照强度下对 HL60 细胞的 PDT 灭活效率。根据纳米颗粒对 HL60 细胞暗室毒性的结果, 选取纳米颗粒质量浓度为 20 µg/mL, 分别按照 6, 12, 18 J/cm<sup>2</sup> 的光剂量进行辐照。可以发现, 光辐照后细胞的相对存活率大

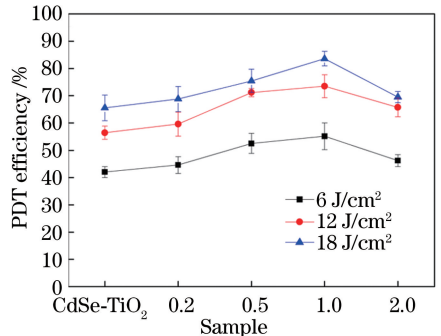


图 6 不同光照剂量下 CdSe-TiO<sub>2</sub> 和不同叶酸比例的 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 对 HL60 细胞的 PDT 效率  
Fig. 6 PDT efficiency of CdSe-TiO<sub>2</sub> and FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> modified with different FA ratios on HL60 cells at different light intensities

### 3.4 活性氧水平分析

在 PDT 中, 光敏剂在光照激发后, 将能量传递给细胞内的氧分子, 产生大量氧化性极强的活性氧, 导致细胞膜或细胞器被破坏, 从而杀伤细胞<sup>[25-26]</sup>。本实验采用荧光探针标记技术, 通过测得的荧光光谱分析了 PDT 过程中, CdSe-TiO<sub>2</sub> 和叶酸比例为 100% 的 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 作用于 HL60 细胞后, 细胞内产生的活性氧水平。结果如图 7 所示, FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 对应的细胞组细胞内活性氧的水平高于 CdSe-TiO<sub>2</sub> 对应的细胞组。该活性氧水平测试结果

与前述 PDT 效率实验结果一致,说明通过叶酸修饰可以有效提高 HL60 细胞对纳米颗粒的摄取率,从而增强对 HL60 细胞的光动力灭活效率。

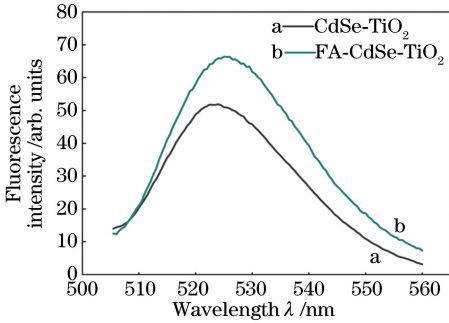


图 7 PDT 作用后 HL60 细胞中活性氧探针荧光光谱( $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ )

Fig. 7 Fluorescence spectra of reactive oxygen species probe in HL60 cells after PDT ( $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ )

### 3.5 PDT 作用前后 HL60 细胞超微结构观察

通过扫描电镜法观察 PDT 作用前后 HL60 细胞的超微结构,得到如图 8 所示结果。图 8(a) 为正常

HL60 细胞图,可以看到,HL60 细胞直径约为  $8 \mu\text{m}$ ,细胞结构完整、轮廓清晰、且有绒毛结构。图 8(b) 为 CdSe-TiO<sub>2</sub> 介导 PDT 作用后 HL60 细胞的超微结构图,可以看出,CdSe-TiO<sub>2</sub> 和 HL60 细胞共育并光照后,细胞结构被破坏,细胞膜表面产生一定程度的破裂和小孔,细胞不完整,有裂解趋势;分析认为,CdSe-TiO<sub>2</sub> 主要聚集在细胞膜表面,经光照激发,产生活性氧自由基(ROS),致使细胞膜表面破坏,最终导致细胞裂解坏死。图 8(c)、(d) 分别为 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 与 HL60 细胞共育并光照后的多个细胞图和单个细胞图,从图 8(d) 可以看出,细胞结构被破坏严重,细胞膜出现严重破裂和缺陷,细胞器组织也出现一定程度破坏;分析认为通过内吞作用进入细胞的 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒和聚集在细胞膜表面的纳米颗粒,在光照激发后产生大量 ROS,ROS 与细胞器及细胞膜发生氧化反应,导致细胞器和细胞膜被破坏,从而使 HL60 细胞坏死。

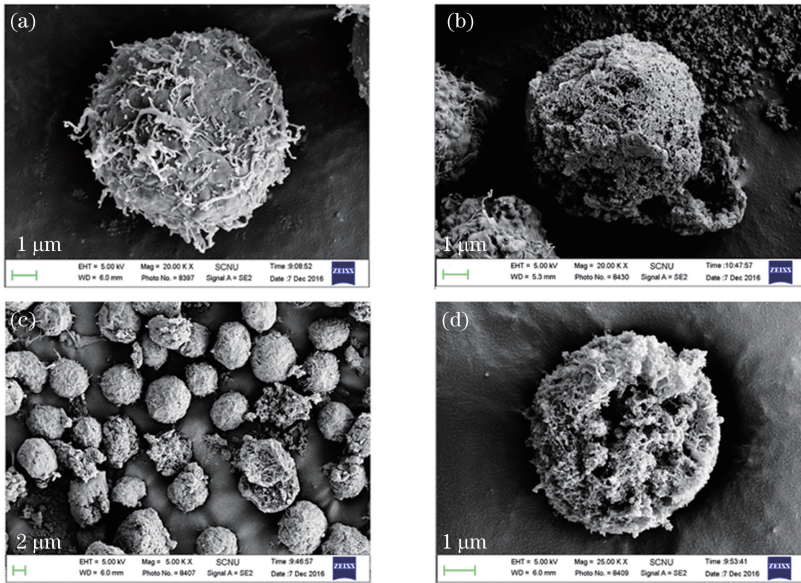


图 8 (a) 正常 HL60 细胞和(b)、(c)、(d) PDT 处理后 HL60 细胞的超微结构

Fig. 8 Ultrastructural morphology of (a) untreated HL60 cell and (b), (c), (d) HL60 cells after PDT

## 4 结 论

通过水解沉积法和表面修饰的方法,分别制备得到 CdSe-TiO<sub>2</sub> 和 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒,采用 TEM、EDS、FTIR 和紫外可见吸收光谱对纳米颗粒结构和光学性质进行了研究,结果表明,通过 CdSe 与 TiO<sub>2</sub> 的复合及叶酸的表面修饰成功将 TiO<sub>2</sub> 的吸收光拓展到可见光区;叶酸分子与 CdSe-TiO<sub>2</sub> 表面的羟基以酯化反应的方式相结合,纳米颗粒粒径

在  $30 \sim 50 \text{ nm}$  左右,满足光动力细胞实验的要求。细胞暗室毒性实验发现,在药物质量浓度低于  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,其暗室毒性较小,细胞存活率在  $80\%$  左右;不同光照强度下,经过适量比例的叶酸表面修饰,有效提高了 CdSe-TiO<sub>2</sub> 对 HL60 细胞的 PDT 灭活效率,其中当叶酸修饰比例为 1.0 时,灭活效率最高,达  $84\%$ 。活性氧分析发现,FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 对应的细胞组活性氧水平相较于 CdSe-TiO<sub>2</sub> 更高,与 PDT 灭活效率的结果一致。对 PDT 作用前后

HL60 细胞的超微结构观察进一步表明,叶酸的表面修饰,提高了细胞对纳米颗粒的摄取效率,从而提高了对 HL60 细胞的光催化灭活效率。

综合以上分析,本实验研究制备的 FA-CdSe-TiO<sub>2</sub>,有良好的生物相容性和光催化灭活效果,具有作为光动力治疗白血病细胞光敏剂的重要特征。FA-CdSe-TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒对血液正常细胞的影响研究,将是下一步的工作。

### 参 考 文 献

- [1] Dougherty T J, Gomer C J, Henderson B W, *et al.* Photodynamic therapy [J]. Journal of the National Cancer Institute, 1998, 90(12): 889-905.
- [2] Allison R R, Mota H C, Bagnato V S, *et al.* Biotechnology and photodynamic therapy-state of the art review[J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2008, 5(1): 19-28.
- [3] Lyons M, Phang I, Eljamel S. The effects of PDT in primary malignant brain tumours could be improved by intraoperative radiotherapy [J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2012, 9(1): 40-45.
- [4] Paszko E, Ehrhardt C, Senge M O, *et al.* Nanodrug applications in photodynamic therapy [J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2011, 8(1): 14-29.
- [5] Gary-Bobo M, Hocine O, Brevet D, *et al.* Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2012, 423(2): 509-515.
- [6] Senge M O. *m*THPC-A drug on its way from second to third generation photosensitizer? [J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2012, 9(2): 170-179.
- [7] Shibu E S, Hamada M, Murase N, *et al.* Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 2013, 15(1): 53-72.
- [8] Huang K Q, Chen L, Xiong J W, *et al.* Preparation and characterization of visible-light-activated Fe-N Co-doped TiO<sub>2</sub> and its photocatalytic inactivation effect on leukemia tumors [J]. International Journal of Photoenergy, 2012, 2012(14): 1910-1912.
- [9] Akpan U G, Hameed B H. Parameters affecting the photocatalytic degradation of dyes using TiO<sub>2</sub>-based photocatalysts: a review [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 170(2): 520-529.
- [10] Medintz I L, Mattoussi H. Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009, 11(1): 17-45.
- [11] Yaghini E, Seifalian A M, MacRobert A J. Quantum dots and their potential biomedical applications in photosensitization for photodynamic therapy [J]. Nanomedicine, 2009, 4(3): 353-363.
- [12] Garcia A M F, Fernandes M S F, Coutinho P J G. CdSe/TiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles produced in AOT reverse micelles: applications in pollutant photodegradation using visible light [J]. Nanoscale Research Letters, 2011, 6(1): 1-4.
- [13] Feng H, Thanhthuy T T, Chen L, *et al.* Visible light-induced efficiently oxidative decomposition of p-Nitrophenol by CdTe/TiO<sub>2</sub> nanotube arrays [J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 215-216: 591-599.
- [14] Zhang J Z, Gao S M, Song J, *et al.* Research development on CdSe/TiO<sub>2</sub> nanocomposites [J]. Micronanoelectronic Technology, 2011, 48(1): 26-36. 张居正, 高善民, 宋佳, 等. CdSe/TiO<sub>2</sub> 纳米复合材料的研究进展 [J]. 微纳电子技术, 2011, 48(1): 26-36.
- [15] Xue T, Guo W B, Liang X Y, *et al.* An experimental study on the visible light inactivated HL60 cells in vitro based on CdSe doped anatase TiO<sub>2</sub> [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2017, 26(3): 224-231. 薛婷, 郭文博, 梁雪影, 等. 基于 CdSe 掺杂锐钛矿 TiO<sub>2</sub> 的可见光体外灭活 HL60 细胞实验研究 [J]. 激光生物学报, 2017, 26(3): 224-231.
- [16] Parker N, Turk M J, Westrick E, *et al.* Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay [J]. Analytical Biochemistry, 2005, 338(2): 284-293.
- [17] Hilgenbrink A R, Low P S. Folate receptor-mediated drug targeting from therapeutics to diagnostics [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005, 94(10): 2135-2146.
- [18] Ross J F, Wang H, Behm F G, *et al.* Folate receptor type  $\beta$  is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia [J]. Cancer, 1999, 85(2): 348-357.
- [19] Pan X Q, Zheng X, Shi G, *et al.* Strategy for the treatment of acute myelogenous leukemia based on folate receptor  $\beta$ -targeted liposomal doxorubicin combined with receptor induction using all-trans retinoic acid [J]. Blood, 2002, 100(2): 594-602.
- [20] Fu Q W, Xue X Y, Xue T, *et al.* An experimental study on the photocatalytic inactivation of HL60 cells in vitro based on sulfur-doped titanium dioxide

- modified folic acid [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2017, 26(1): 30-36.
- 符秋伟, 梁雪影, 薛婷, 等. 基于叶酸修饰的 S-TiO<sub>2</sub> 的 PDT 体外灭活 HL60 细胞实验研究[J]. *激光生物学报*, 2017, 26(1): 30-36.
- [21] Li L L, Zheng Z L, Huang K Q, *et al.* ROS detection in HL60 based on ALA-PDT [J]. *Optoelectronics*, 2011, 1(2): 11-15.
- 李莉莉, 郑泽麟, 黄康强, 等. 基于 ALA-PDT 的 HL60 细胞中的活性氧检测 [J]. *光电子*, 2011, 1(2): 11-15.
- [22] Xiong J W, Xiao H, Zhang Z X. An experimental research on different detections between MTT and CCK-8[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, 16(5): 559-562.
- 熊建文, 肖化, 张镇西. MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较 [J]. *激光生物学报*, 2007, 16(5): 559-562.
- [23] Monshi A, Foroughi M R, Monshi M R. Modified Scherrer equation to estimate more accurately nanocrystallite size using XRD[J]. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 2012, 2(2): 154-160.
- [24] Harada Y, Ogawa K, Irie Y, *et al.* Ultrasound activation of TiO<sub>2</sub> in melanoma tumors[J]. *Journal of Controlled Release*, 2011, 149(2): 190-195.
- [25] Irena M, Jarmila K. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways[J]. *Plos One*, 2012, 7(3): e32972.
- [26] Chen Y K, Senadi G C, Lee C H, *et al.* Apoptosis induced by 2-aryl benzothiazoles-mediated photodynamic therapy in melanomas via mitochondrial dysfunction[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2014, 27(7): 1187-1198.