

金纳米颗粒介导的细胞光穿孔表征方法

顾清, 王佳壮, 杜晓凡, 王晶, 张镇西, 姚翠萍*

西安交通大学生命科学与技术学院生物医学分析技术及仪器研究所, 陕西 西安 710049

摘要 提出了一种新的表征方法——膜电位测量。膜电位恢复时间与膜穿孔尺寸相对应, 因此建立起细胞膜穿孔尺寸的大小与激光能量阈值之间的关系, 可为准确地向细胞内递送不同分子量的外源物质提供理论支持。将金纳米颗粒与胃癌细胞共同培养, 在保证细胞不受金纳米颗粒毒性影响的前提下, 选择不同能量纳秒脉冲激光照射共孵育后的胃癌细胞, 并采用碘化丙啶(PD)和钙黄绿素乙酰甲酯(Calcein-AM)对穿孔后的细胞进行染色验证。结果发现: 当加入直径为 100 nm 的金纳米颗粒, 其数量与细胞数比为 400: 1, 激光能量密度在 20 mJ/cm² 时, 可以在保证细胞活性的前提下成功实现 532 nm 脉冲激光的细胞膜穿孔; 在穿孔条件下, 采用光标测技术测量细胞膜电位, 发现细胞膜电位先增加后复原, 最大增量为 50 mV, 恢复时间为 250 s。膜电位结果再次验证, 光穿孔造成的细胞膜损伤是可以恢复的, 而且可以用膜电位变化来表征。

关键词 生物光学; 激光; 金纳米颗粒; 细胞膜电位; 光穿孔; 光标测

中图分类号 TN249

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207021

Cell Optoporation Characterization Method for Gold-Nanoparticle Mediation

Gu Qing, Wang Jiazhuang, Du Xiaofan, Wang Jing, Zhang Zhenxi, Yao Cuiping*

Institute of Biomedical Analytical Technology and Instrumentation, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China

Abstract A new characterization method, namely membrane voltage measurement method, is proposed. Because the recovery time of membrane potential is dependent on the size of optoporation, establishing the relationship between the size of cytomembrane optoporation and the laser energy threshold can provide theoretical support for importing different exogenous substances into cells. In this study, gastric cancer cells are cultured with gold nanoparticles. On the premise that cells are not affected by the toxicity of gold nanoparticles, gastric cancer cells incubated with gold nanoparticles are irradiated using a nanosecond-pulsed laser with different energies. Propidium iodide and calcein-AM are used for staining verification of perforated cells. The results indicate that optoporation of cell membrane can be successfully achieved with 400 nanoparticles (diameter of 100 nm) per cell and 20 mJ/cm² energy density by 532 nm pulsed laser, without obvious dead cells. During the optoporation, the membrane potential is measured using optical mapping technique. It is found that the membrane potential firstly increases and then restores with 50 mV maximum increment and 250 s recovery time. These results confirm that the cell membrane damage can be recovered by optoporation and characterized by membrane potential change.

Key words biotechnology; laser; gold nanoparticle; cell membrane potential; optoporation; optical mapping

OCIS codes 170.1420; 170.1530; 100.2960

1 引 言

细胞是生命体的基本活动单元, 细胞膜作为分割细胞内外的物理屏障, 不仅保证了细胞的完整性, 还参与了信息和能量传递等多种细胞活动。但在很

多情况下, 例如基因治疗、药物递送、人工授精等跨膜递送技术中, 由于细胞膜的保护机制, 目标物质难以进入细胞内^[1-2]。因此, 实现细胞膜穿孔是进行外源物质向细胞内导入的技术关键。

目前, 实现细胞穿孔并将外源物质导入细胞的

收稿日期: 2019-10-08; 修回日期: 2019-11-07; 录用日期: 2019-11-15

基金项目: 国家自然科学基金(61575156, 61775178, 61705177)、中央高校基础研究经费(zdyf20170101)

* E-mail: zsyep@mail.xjtu.edu.cn

方法可分为机械、生物、化学和物理方法,常用的方法有机械微注射、电穿孔等,但这些方法都有各自的不足。机械微注射^[3]存在费时、易污染样品、对操作人员技术要求高等缺点;生物学方法大部分采用重组病毒基因载体,其毒性和免疫原性,以及大规模制备的困难,限制了其在医学上的应用,并且该方法受细胞类型限制^[4];物理方法中电穿孔方法虽然穿孔率高,但是穿孔后的死亡率也高^[5]。与其他方法相比,激光辅助的光穿孔方法由于具有非接触、高效和专一性等优点,受到了广大学者的青睐^[6]。细胞膜光穿孔的改变一般是瞬时、微小的,故在基因转染、药物递送等方面具有重大的科学应用价值,例如可在不影响细胞活性的情况下,将脱氧核糖核酸(DNA)质粒、信使核糖核酸(RNA)、重组基因或其他物质(如蛋白质、治疗药物等)导入到活细胞中^[7]。

对于金纳米颗粒介导的纳秒激光诱导细胞光穿孔,由于金纳米颗粒具有表面等离子体共振效应^[8],激光照射金纳米颗粒时,金纳米颗粒的电子通过共振吸收入射激光光子,此时局域能量沉积引起的热效应会导致纳米颗粒周围物质发生相变,形成微纳尺度空化气泡,空化气泡破裂形成微小射流,射流产生的机械力会使细胞膜表面形成微孔^[9-10],从而让外源性物质进入细胞内。本课题组曾经利用准静态理论对金纳米颗粒的光场增强效应进行模拟^[11]。目前对细胞膜光穿孔的表征方法主要为荧光物质导入法,通过荧光显微镜成像以及流式细胞仪来分辨穿孔的效率。此外,细胞膜穿孔与金纳米颗粒的性质以及金纳米颗粒的热效应密切相关,因此很多科学家通过各种方法来测量金纳米颗粒的热效应^[12],通过热效应获得空化气泡的尺寸信息,进而获得细胞膜穿孔的信息。目前虽然可采用时间分辨瞬态吸收光谱仪和时间分辨 X 射线光谱仪^[13]进行金纳米颗粒热效应的测量,但是仪器昂贵,操作复杂。采用脂质体和冰的相变也可获得金纳米颗粒热效应温度,通过建立模型获得细胞膜穿孔信息^[13],这种方法获得的结果与所建立模型有关,而且分辨率有限。由于每种细胞都有自己特定的细胞膜电位,当细胞膜穿孔时,细胞膜内外的离子就会发生交换,细胞膜电位会随之发生变化,而当细胞恢复到原始状态时,细胞膜电位又恢复到正常水平,所以本研究拟采用激光照射后细胞膜电位变化以及细胞膜电位恢复时间来表征细胞膜的穿孔信息,理论上还可通过细胞膜电位恢复时间获得穿孔尺寸信息^[14]。

传统测量细胞膜电位的方法有电极和膜片钳技

术,但是基于电极和膜片钳技术对细胞光穿孔信息进行实时监测时,不仅操作复杂,而且每次只能处理单个细胞,费时费力,此外电极法测量准确度也不够高,不能满足本实验的需求。光标测技术是借助于电压敏感染料和数字成像技术将细胞膜电位的变化转换成光学信号进行记录的一种新的功能成像方法。该方法通过电压敏感染料对细胞进行染色,在外部刺激下使细胞的膜电位发生改变,利用光学标测系统来检测细胞的膜电位变化,可以通过膜电位变化的过程推测出穿孔之后膜电位的恢复时间,并间接得出细胞穿孔的大小,达到精准测量细胞穿孔的目的,为细胞光穿孔技术在基因治疗及细胞基础研究领域的应用提供有效的支撑手段。与电极和膜片钳技术方法相比,光标测技术可以以非接触、高效快速的方式来测量细胞群体甚至同一细胞的不同位点电信号的变化过程,不会对细胞造成机械损伤^[15],并且具有较高的时间分辨率和空间分辨率,更适用于细胞光穿孔过程细胞膜电位信息的实时追踪。

本研究采用纳秒脉冲激光器对金纳米颗粒介导的细胞光穿孔技术进行探索,以细胞膜穿孔引起的膜电位变化作为测量对象,得出光穿孔过程中细胞膜电位的变化过程。

2 细胞光穿孔及细胞膜电位光学标测系统

实验中使用的细胞光穿孔及细胞膜电位光学标测系统原理如图 1 所示,也称为双激光荧光显微系统,包括明场照明模块、激光照射模块、三维微调模块、成像模块和电压敏感染料激发模块。该系统可分为 4 条共轴光路:1)激发金纳米颗粒的 532 nm 脉冲激光光路;2)激发电压敏感染料的 532 nm 连续激光光路;3)相机成像光路;4)明场光路。

将细胞培养皿固定在三维调节平台上,通过上下前后左右微调,进行调焦和成像区域选择。其中,激光照射模块中用于细胞光穿孔的激光器为调 Q 倍频 Nd:YAG 固体激光器(型号:Q-smart450, Quantel),激光器发射中心波长为 532 nm,半峰全宽为 5 ns,泵浦脉冲的最大重复频率为 10 Hz。该激光器的输出光束经过二向色镜的反射后被分束镜分束:一束进入功率能量计(Ophir PE50-DIF-C),实现对入射泵浦激光能量的实时监测与记录;另一束经 40 倍 532 nm 波长脉冲激光聚焦镜(数值孔径 0.6)聚焦到样品溶液中,使 532 nm 波长的脉冲激光

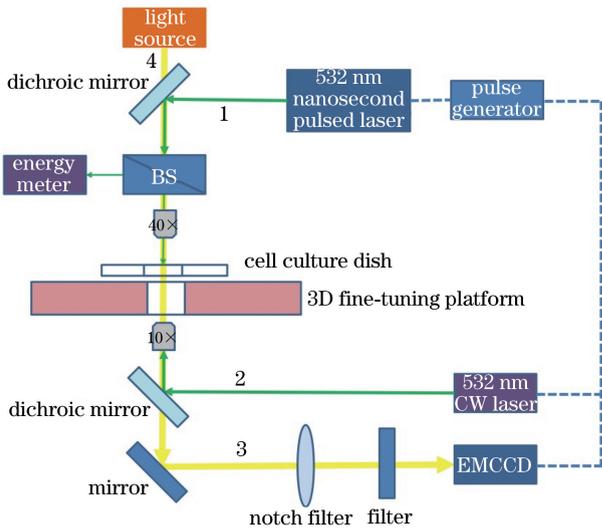


图 1 双激光荧光显微系统示意图

Fig. 1 Schematic of dual laser fluorescence microscopy system

从上至下射入到细胞培养皿中,实现细胞穿孔。明场照明模块中光纤钨卤素灯为明场光源,光经过二向色镜和激光聚焦镜并与 532 nm 波长脉冲激光合束后一起射入到细胞培养皿中。电压敏感染料激发模块用于激发电压敏感染料,使之产生荧光,随着细胞穿孔-恢复过程中膜电位的变化,电压敏感染料会表现出不同强弱的荧光,该部分核心部件为 532 nm 连续激光器,该激光器输出的激光经二向色镜反射后,经 10×物镜聚焦到样品溶液中。电压敏感染料发出的荧光,经过二向色镜、限波片和滤光片后进入到电子倍增 CCD(EMCCD, X897, Andor)显微成像装置中用于成像。时序控制模块核心部件为八通道数字延时脉冲发生器(DG645, Stanford Research Systems Inc.),用于调控各个模块之间的触发时间。

3 实验材料和方法

3.1 细胞培养

本实验的研究对象为胃癌细胞 S7901(购买于军事医学科学院细胞库),细胞培养液由 89% 的 RPMI 培养液(购买于美国 Hyclone 公司)加入 10% 胎牛血清溶液(购买于四季青生物工程材料有限公司)和 1% 双抗(购买于海门碧云天生物技术有限公司)混合而成。将细胞培养液置于温度为 37 °C、CO₂ 浓度为 5%、空气湿度为 95% 的细胞培养箱中培养。

3.2 金纳米颗粒及染料暗毒性实验

所用金纳米颗粒(购买于 BBI 公司)的粒径为 100 nm,吸收峰为 567 nm。由于在 532 nm 处仍然

有强吸收,用 532 nm 纳秒脉冲激光器激发金纳米颗粒产生空化气泡。测量金纳米颗粒暗毒性实验,在 96 孔板上的每个孔中铺 8×10^3 个细胞,将其置于细胞培养箱中孵育 12 h 后再加入不同浓度的金纳米颗粒,理论上使每个细胞上金纳米颗粒的个数 N 分别为 0、25、50、100、200、400、800、1600 个,再孵育 3 h 后采用细胞增殖-毒性检测试剂盒(CCK-8, 购于日本同仁化学研究所)测量不同金纳米颗粒数目对胃癌细胞存活率的影响。

电压敏感染料选取 di-4-ANEPPS(购买于 Invitrogen 公司)^[2],其被广泛用于心脏细胞和神经细胞的电生理学研究^[16-17],其激发波长和发射波长分别约为 532 nm 和 620 nm。同样采用 CCK-8 测量其不同浓度对胃癌细胞存活率的影响,并设计梯度实验,取 5 mg di-4-ANEPPS 并将其溶于 4 mL 二甲基亚砜(DMSO)中制成电压敏感染料原液,然后吸取不同体积的原液加入至磷酸缓冲盐溶液(PBS)(购买于海门碧云天生物技术有限公司)中进行稀释,调整每毫升 PBS 中的电压敏感染料的含量,使得染料质量浓度分别为 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。进行细胞毒性实验时,将上述含有不同质量浓度电压敏感染料的 PBS 与细胞孵育 20 min 后,再用 CKK8 进行细胞活性测量。

3.3 光穿孔实验方法

利用 Calcein-AM/PI 双染法对胃癌细胞是否成功实现光穿孔进行验证,取 5 μL 浓度为 1.5 mmol/L 的 Calcein-AM 溶液(购买于上海翊圣生物科技有限公司)和 15 μL 浓度为 2 mmol/L 的碘化丙啶(PI)溶液(购买于上海翊圣生物科技有限公司),分别加入到 5 mL 的 PBS 中制成染色工作液,封装放入 4 °C 冰箱冷藏备用。

在 96 孔板上的每个孔中铺 8×10^3 个细胞后将其置于细胞培养箱中孵育 12 h,待细胞附着在培养皿底部时,分别以每个细胞上平均含有 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 个金纳米颗粒数量的比例加入到金纳米颗粒溶液中,孵育 3 h 后,大部分金纳米颗粒沉积到细胞膜上^[18];再将与金纳米颗粒孵育后的细胞和 PI 溶液进行混合,将培养皿放置在上述系统中的三维调节平台上,采用不同能量密度的 532 nm 脉冲激光照射,激光能量密度梯度分别设为 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 mJ/cm^2 ,去激发细胞膜上的金纳米颗粒,使其产生空化气泡,导致细胞膜穿孔;此时若细胞膜成功穿孔,PI 会顺利进入细胞,染色 10 min 后洗掉 PI,再孵育 2 h;细胞如果穿孔程

度不剧烈,细胞膜的微小损伤会使细胞仍然保持活性,这时再用 Calcein-AM 对细胞进行染色,15 min 后洗去染料,并加入 PBS,在荧光显微镜下观测。若细胞膜成功穿孔或者细胞死亡,PI 会进入细胞,在 490 nm 的激发波长激发下,细胞产生红色荧光,若细胞保持活性,细胞被 Calcein-AM 染色,在 535 nm 的激发波长下呈绿色荧光,所以当同一个细胞在两种激发波长下分别可以显示出红色和绿色,说明该细胞成功实现了无损光穿孔。

3.4 细胞光穿孔细胞膜电位测量实验方法

对于细胞膜电位测量实验,首先配制体积浓度为 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的 di-4-ANEPPS 电压敏感染料溶液工作液,封装放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏备用。

对照组不加金纳米颗粒,实验组加金纳米颗粒,并使得每个细胞上金纳米颗粒平均个数为 400。实验开始前以同样密度铺好细胞,孵育 12 h 后,对实验组加入直径为 100 nm 的金纳米颗粒培育 3 h,再对两组细胞进行 di-4-ANEPPS 避光染色 20 min,将细胞培养皿放置于三维调节平台上,利用 DG645 控制各个模块的时序进行细胞穿孔和膜电压测量,时序控制图如图 2 所示。为了去掉激光照射下荧光光漂白的影响,在光穿孔前,先打开连续激光和相机并

使其处于外触发模式,调整样品台待细胞轮廓清晰;然后用数字延迟脉冲发生器 DG645 控制相机和连续激光器,以工作模式相同的状态对细胞进行测量,获取 150 帧图像,对图像进行图像处理获取荧光染料变化的基线,用于校正实验结果;然后将相机和连续激光关掉,利用纳秒脉冲激光对金纳米颗粒进行照射,使细胞膜穿孔,同时给数字延迟脉冲发生器 DG645 一个开始信号,使其输出不同延迟时间的两路脉冲信号,将两路脉冲信号分别用于触发相机和连续激光器(激发电压敏感染料),并进行膜电位测量。如图 2 所示,相机工作时刻比穿孔激光器延迟 10 ms,曝光时长为 150 ms,用于激发电压敏感染料的连续激光器工作时刻比相机延迟 10 ms,工作时长为 100 ms,期间相机获取一幅图像。间隔不同时间后再次启动下一个周期,获取另一幅图像,以此类推,一共获取几百帧图像,然后对每帧图像中的荧光信号进行分析,获取膜电位变化信息。每个工作周期的时间长短根据实验经验获取,周期太短,荧光染料有可能会产生严重的光漂白,信噪比太低,周期相对于膜恢复时间过长,就测量不到膜恢复时间。根据前期实验结果,细胞膜恢复时间为几百毫秒到几十秒。

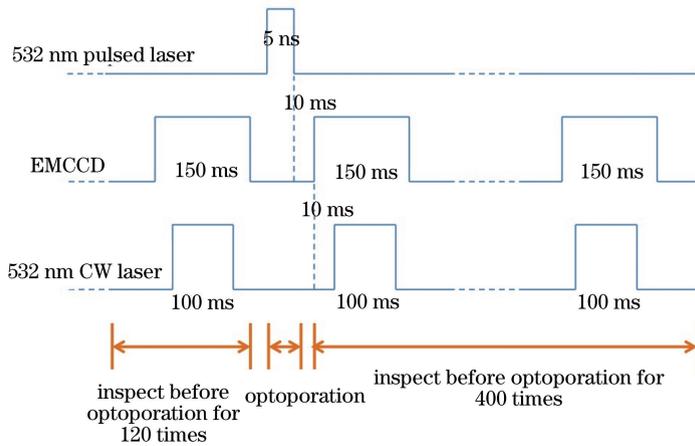


图 2 光穿孔实验同步时序示意图

Fig. 2 Diagram of synchronous timing of optoporation experiment

3.5 细胞光穿孔膜电位变化图像预处理及基线校准

将采集到的图片存储为 tif 格式,以保留荧光图像原始的灰度值,排除人为调节白平衡的影响。通过上述实验,得到了几十到上百个相同位置的细胞荧光图像,由于细胞膜上荧光强度变化很微弱,为了得到细胞膜上膜电位的变化信息,即细胞膜上的荧光强度变化,就必须降低其他非细胞部分的影响,用 Matlab 编程,实现如下功能:1)先圈定一个背景区

域,计算背景区域的平均灰度值;2)选择目标区域,选取整个细胞;3)利用边缘提取算法,选择细胞边缘为有效区域;4)计算边缘提取后有效区域内的荧光灰度值,用该值减去背景的灰度值,以减小背景变化带来的误差;5)基于获得的灰度值画出灰度值随时间变化的图像;6)以穿孔前的膜电位变化曲线为基准,对穿孔后的膜电位变化曲线加以去基线校正;7)得到最终细胞膜荧光强度随时间变化的曲线。

将 150 帧基线图片编号命名后循环读取, 计算目标区域内的平均灰度值, 150 幅图像代表 150 个时间节点, 进而得到目标区域灰度值随时间变化的拟合直线, 算出直线的斜率 K , 再用穿孔后的点的 Y 值都减去 $K \times (X - 150)$, 然后对整幅图像进行基线校准, 得到一条总体趋势水平的直线, 结果如图 3 所示。通过基线校正后, 脉冲激光对电压敏感染料的影响也被消除。

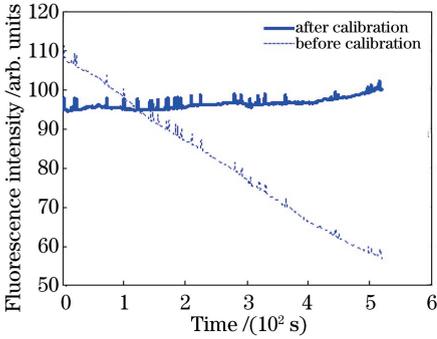


图 3 膜电位变化基线校准结果

Fig. 3 Baseline calibration result of membrane potential change

4 实验结果与分析

4.1 金纳米颗粒及染料毒性结果

金纳米颗粒暗毒性结果如图 4 所示, 金纳米颗粒和细胞共孵育 3 h, 每个细胞上的金纳米颗粒为 0~1600 个时, 对细胞均无特别强烈的毒性, 细胞存活率均在 90% 以上, 但是随着浓度的增加, 毒性有变大的趋势, 因此, 在能达到穿孔条件的前提下, 应尽量降低金纳米颗粒浓度, 来保证更高的细胞活性和存活率。

di-4-ANEPPS 染料暗毒性检测结果如图 5 所示, 其体积浓度在 3.125, 6.25, 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 下细胞存活率均在 100% 左右, 可以认为此体积浓度下几乎没有毒性, 而体积浓度高于 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时细胞存活率有所下降, 因此, 后续实验可以选择体积浓度为 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的电压敏感染料溶液, 这样既能达到染色要求, 又不影响细胞活性。

4.2 细胞穿孔及膜电位变化趋势

为了探索金纳米颗粒介导的细胞光穿孔以及光穿孔后细胞膜电位的变化趋势, 选择直径为 100 nm 的金纳米颗粒作为介导体, 根据实验结果, 当选择激光能量密度为 20 mJ/cm^2 , 且每个细胞中金纳米颗粒平均个数为 400 时, 穿孔效果最好。得到的细胞穿孔的图像如图 6 所示。

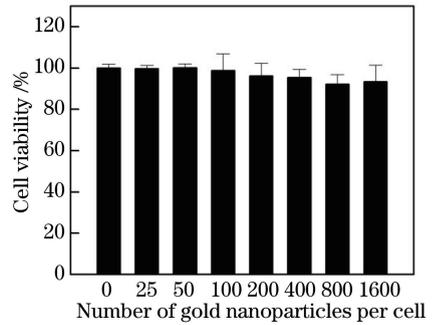


图 4 金纳米颗粒数对胃癌细胞存活率的影响

Fig. 4 Effect of number of gold nanoparticles on viability of gastric cancer cells

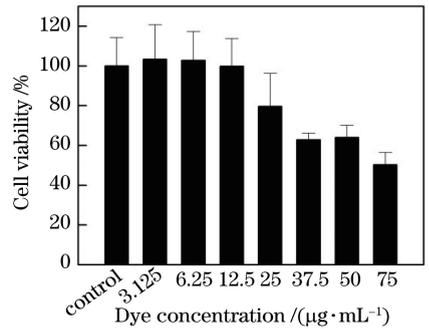


图 5 di-4-ANEPPS 浓度对胃癌细胞存活率的影响

Fig. 5 Effect of di-4-ANEPPS concentration on viability of gastric cancer cells

图 6(a) 是 PI 染色的结果, 部分细胞被染成深色, 证明细胞膜已经出现损伤; 图 6(b) 是 Calcein-AM 染色结果, 几乎所有的细胞都被染成了深色, 证明大多数细胞状态都良好; 图 6(c) 是明场图像; 图 6(d) 是图 6(a) 和 6(b) 的合成图像, 图中浅色部分的细胞实现了穿孔, 并且能保持活性, 达到了实验对细胞膜无损穿孔的预期。

细胞膜在穿孔到恢复过程中, 跨膜电位会表现出微小的波动。采用自主搭建的细胞穿孔及膜电位光学检测系统进行了细胞膜电位变化的探索。分别对加入金纳米颗粒的实验组和不加金纳米颗粒的对照组进行细胞膜电位检测。图 7 为未加入和加入直径为 100 nm 粒径、表面电性为阴性的金纳米颗粒在受到 532 nm 纳秒脉冲激光照射前后的电位变化。其中小方框代表圈中的背景区域, 大方框代表选择的目标区域, 即要处理的细胞, 通过 Matlab 程序处理之后得到细胞膜荧光强度随时间变化的曲线, 经过基线校正之后, 分别获得图 7(b) 和图 7(d)。可以明显看出, 实验组在用 532 nm 纳秒脉冲激光照射后会立即有一个荧光强度的突变, 随后逐渐恢复至原来的水平, 穿孔过程比较迅速, 膜电位上升较快, 在本实验中恢复过程比较缓慢, 需要大约 250 s,

大致 4 min。细胞膜上的电压敏感染料的荧光灰度值在穿孔前的平均值为 227,穿孔后的峰值为 234,荧光强度变化了 3%。通过标定,di-4-ANEPPS 的

特性为每 100 mV 的电压变化会引起 7% 的荧光强度变化,因此图中荧光强度实际变化了 3%,则实际上细胞膜电位的变化在 50 mV 左右。

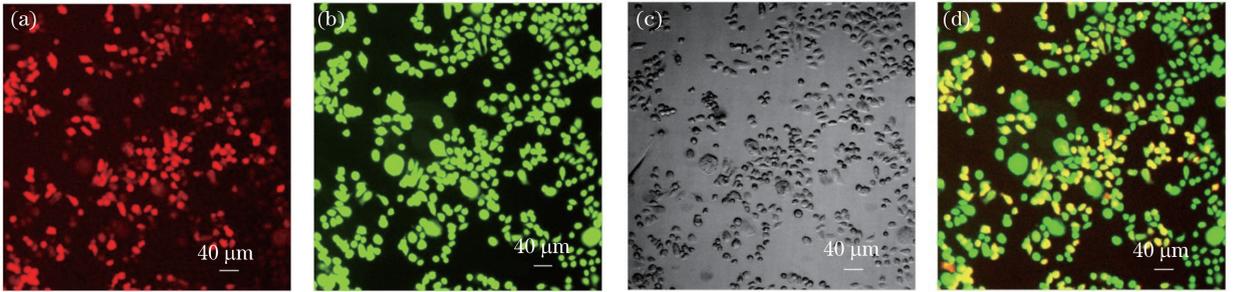


图 6 金纳米颗粒介导的细胞光穿孔结果。(a) PI 染色结果;(b) Calcein-AM 染色结果;(c) 明场细胞图像;(d) PI 和 Calcein-AM 染色图像的结合图

Fig. 6 Results of gold nanoparticle-mediated cell optoporation. (a) PI staining result; (b) Calcein-AM staining result; (c) bright field cell image; (d) combination of PI and Calcein-AM staining images

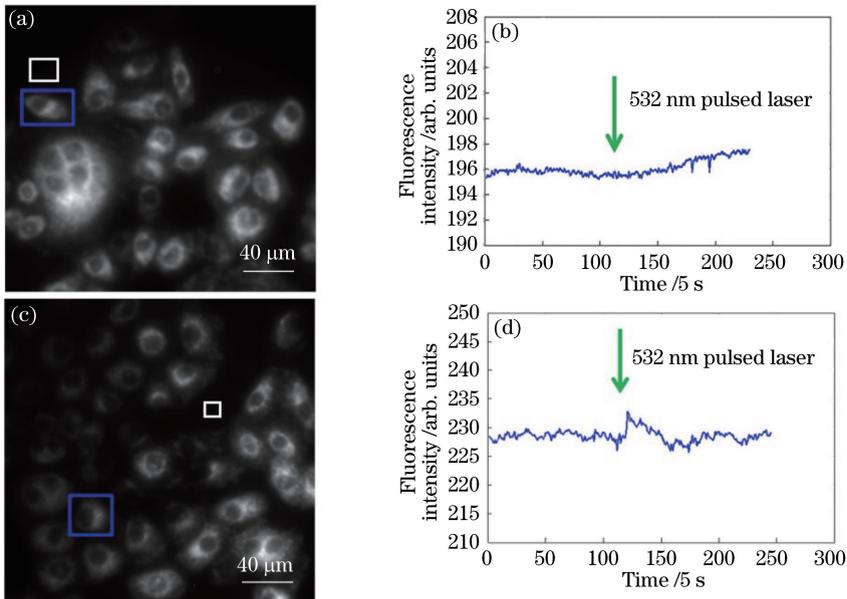


图 7 未加金纳米颗粒(对照组)和加金纳米颗粒(实验组)激光诱导细胞膜电位变化检测。(a)对照组的荧光图像;(b)加入激光脉冲后细胞膜的电位变化图;(c)实验组的荧光图像;(d)加入激光脉冲后细胞膜的电位变化图

Fig. 7 Detection of laser-induced changes in cell membrane potential without gold nanoparticles (control group) and with gold nanoparticles (experimental group). (a) Fluorescence image of control group; (b) image of cell membrane potential change after introducing pulse laser; (c) fluorescence image of experimental group; (d) image of cell membrane potential change after introducing pulse laser

5 结 论

利用 PI 和 Calcein-AM 双染试剂对细胞是否穿孔进行检测,通过金纳米颗粒和染料暗毒性实验,在保证细胞不受金纳米颗粒毒性影响的前提下对细胞光穿孔的条件进行探索和参数剂量优化。利用自主搭建的细胞光穿孔及膜电位光标测系统实现了在 20 mJ/cm² 能量密度下对细胞的无损可恢复穿孔;并且得到了细胞穿孔后膜电位的变化趋势,发现对

于胃癌细胞而言,穿孔的瞬间膜电位会有 50 mV 的变化,穿孔约 4 min 后,膜电位才能完全恢复。膜电位结果表明,细胞膜电位测量方法可以表征细胞膜穿孔,而且光穿孔造成的细胞膜损伤是可以自行恢复的。由于每种细胞的膜电位具有一定的差异性,因此后期考虑用不同的细胞进行实验。

参 考 文 献

[1] Berry C C. Possible exploitation of magnetic

- nanoparticle-cell interaction for biomedical applications [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2005, 15(5): 543-547.
- [2] Miller E W. Small molecule fluorescent voltage indicators for studying membrane potential [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 33: 74-80.
- [3] Bartoli M, Claycomb W C. Transfer of macromolecules into living adult cardiomyocytes by microinjection [M] // Pierce G N, Claycomb W C. *Novel methods in molecular and cellular biochemistry of muscle. Developments in molecular and cellular biochemistry*. Boston, MA: Springer, 1997, 20: 103-109.
- [4] Wang L H, Wu D C, Xu H X, et al. High DNA-binding affinity and gene-transfection efficacy of bioreducible cationic nanomicelles with a fluorinated core [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(2): 755-759.
- [5] Saklayen N, Huber M, Madrid M, et al. Intracellular delivery using nanosecond-laser excitation of large-area plasmonic substrates [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(4): 3671-3680.
- [6] Li M, Lohmuller T, Feldmann J. Optical injection of gold nanoparticles into living cells [J]. *Nano Letters*, 2014, 15(1): 770-775.
- [7] Liang X X, Wang J, Zhang Z X. Nano-scale photoporation by tightly focused lasers: a survey [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University*, 2012, 46(10): 107-115.
梁晓轩, 王晶, 张镇西. 纳米尺度激光紧聚焦光穿孔技术 [J]. *西安交通大学学报*, 2012, 46(10): 107-115.
- [8] Tan W, Yang C, Tang J L, et al. Study of extinction enhancement of Au nano antenna by using finite difference time domain method [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2018, 47(5): 0516006.
谭伟, 杨存, 唐吉龙, 等. 基于时域有限差分法的 Au 纳米天线增强消光特性研究 [J]. *光子学报*, 2018, 47(5): 0516006.
- [9] Dhakal K, Black B, Mohanty S. Introduction of impermeable actin-staining molecules to mammalian cells by optoporation [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6553.
- [10] Fu L, Wang S Q, Xin J, et al. Research of optical breakdown induced by nanosecond laser in water and gold nanosphere solutions [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(2): 0207029.
付磊, 王思琪, 辛静, 等. 纳秒激光在水和金纳米球溶液中的光致击穿研究 [J]. *中国激光*, 2018, 45(2): 0207029.
- [11] Zhang Z, Wang S, Xu H, et al. Role of 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(5): 051043.
- [12] Yao C P, Dong Y H, Wang J, et al. Development of the research in nanosacle heating of laser activated gold nanoparticles [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2014, 23(1): 1-8.
姚翠萍, 董艳花, 王晶, 等. 纳米金激光纳观热效应研究与进展 [J]. *激光生物学报*, 2014, 23(1): 1-8.
- [13] Qin Z, Bischof J C. Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating [J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(3): 1191-1217.
- [14] Krassowska W, Filev P D. Modeling electroporation in a single cell [J]. *Biophysical Journal*, 2007, 92(2): 404-417.
- [15] Momose-Sato Y, Sato K. Development of synaptic networks in the mouse vagal pathway revealed by optical mapping with a voltage-sensitive dye [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2016, 44(2): 1906-1918.
- [16] Takaki T, Inagaki A, Chonabayashi K, et al. Optical recording of action potentials in human induced pluripotent stem cell-derived cardiac single cells and monolayers generated from long QT syndrome type 1 patients [J]. *Stem Cells International*, 2019: 7532657.
- [17] Mullah S H E R, Komuro R, Yan P, et al. Evaluation of voltage-sensitive fluorescence dyes for monitoring neuronal activity in the embryonic central nervous system [J]. *The Journal of Membrane Biology*, 2013, 246(9): 679-688.
- [18] Heinemann D, Schomaker M, Kalies S, et al. Gold nanoparticle mediated laser transfection for efficient siRNA mediated gene knock down [J]. *PloS One*, 2013, 8(3): e58604.