

叶酸受体靶向 CdS 量子点应用于 HepG2 细胞成像研究

张培根¹ 余德才² 程传伟¹ 贺志鹏¹ 张晓红¹ 力虎林¹ 张海黔^{*,1}

(¹南京航空航天大学材料科学与技术学院, 医学物理系, 南京 210016)

(²南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科, 南京 210008)

关键词: 量子点; 表面修饰; 细胞靶向; 叶酸受体; 生物成像

中图分类号: O614.24²; O613.52; Q334

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2007)09-1662-05

Folate-receptor Targeted CdS Quantum Dots for Identifying Tumor Cell HepG2

ZHANG Pei-Gen¹ YU De-Cai² CHENG Chuan-Wei¹

HE Zhi-Peng¹ ZHANG Xiao-Hong¹ LI Hu-Lin¹ ZHANG Hai-Qian^{*,1}

(¹Medicine Physics Centre, College of Material Science & Engineering, Nanjing University
of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016)

(²Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Nanjing University, Nanjing 210008)

Abstract: High quality CdS quantum dots (CdS QDs) with a narrow size distribution have been synthesized through a reverse micelle route. Chemical modification and folate-functionalization of the QDs resulted in the bio-targeted fluorescent quantum dots (QDFs). Transmission electron microscopy (TEM) and photoluminescence emission spectroscopy were employed to characterize the morphologies and the optical properties of the QDs. Observation on the incorporation of QDFs with tumor cells (HepG2) under laser confocal fluorescent microscopy indicated that the QDFs could successfully identify the target tumor cells with high expression levels of folate receptor.

Key words: quantum dots (QDs); surface modification; cell-targeted; folate-receptor; bio-imaging

0 引言

量子点(quantum dots, QDs)又称半导体纳米晶体(semiconductor nanocrystal),是一种由 II-VI 族或 III-V 族元素组成的尺寸在 2~20 nm 之间,稳定的微小晶粒。近年来,半导体量子点在生物学领域的应用受到了广泛的关注^[1,2],尤其是自 Alivisatos 和 Nie 的研究小组于 1998 年成功地对量子点表面进行改性和修饰后^[3,4],量子点在细胞成像方面的研究取得了长足的进展^[5,6]。在生物学研究中,半导体量子点

被广泛用作荧光染料。与传统荧光染料相比,量子点具有优异的光学性能和化学性能;更高的荧光效率和更强的抗光漂白能力;通过调节量子点的化学成分和粒径,可以得到从可见光到红外光整个光谱的荧光发射波谱;量子点的激发波和荧光发射波之间有更大的 Stokes 位移^[7],可以有效地避免激发光和发射光的交叠;多种量子点可以被同一波长的激发光同时激发^[7]。目前,合成半导体量子点的方法很多,如高温溶剂法、水热法、反胶束法^[8]、相转移法^[9]等。

收稿日期:2007-05-14。收修稿日期:2007-06-22。

国家自然科学基金资助项目(No.60471005)。

*通讯联系人。E-mail: zhanghq@nuaa.edu.cn; Tel: 025-52112910-84582

第一作者: 张培根,男,24岁,硕士研究生;研究方向:半导体纳米材料的制备及应用。

在油相体系中制备的量子点必须要经过表面改性而具有生物相容性才能应用于生物学研究。对量子点进行表面改性的主要手段有:通过含有不同官能团的功能性分子进行化学修饰;利用疏水相互作用;利用静电相互作用;对量子点进行聚合物包覆^[10]等。进一步用生物分子对量子点表面修饰之后可以使半导体量子点具有分子靶向功能,可用于肿瘤的早期诊断。另外,在肿瘤研究中发现,大部分肿瘤细胞中的叶酸代谢旺盛^[11],肿瘤细胞表面的叶酸受体明显高于正常组织细胞表面的叶酸受体^[12]。基于这一特点,叶酸受体作为分子靶向受到了广泛关注。目前在靶向化疗、靶向放疗、免疫疗法等方面已经取得了很大进展^[13-20]。

本文通过反相微胶束法快速制备了粒径均匀、分散良好的 CdS 半导体荧光量子点。然后对量子点进行表面改性,使其能够分散在水性环境中,再用叶酸对其表面进行生物功能化修饰,使其能够特异性地识别表面表达有高水平叶酸受体的肿瘤细胞。用激光共聚焦荧光显微镜观察结果表明,叶酸修饰后的 CdS 量子点能够特异性地与肿瘤细胞膜上的叶酸受体(FR)结合,并被肿瘤细胞吞噬。

1 实验部分

1.1 试剂

硫化钠(Na_2S)、硫酸(H_2SO_4)、氯化镉(CdCl_2)、巯基乙酸(mercaptoacetic acid, MAA)、叶酸、N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、二甲基亚砜(DMSO)、正庚烷、丁二酸二异辛酯磺酸钠(AOT, Sigma)、丙酮、乙醇等均为分析纯试剂,无需进一步提纯。

1.2 CdS 量子点的制备

本实验采用反相微胶束法^[9]制备 CdS 半导体量子点,具体步骤如下:称取 2.673 g AOT 溶解在 60 mL 正庚烷中,形成 A 溶液;用移液管取浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 水溶液 1.08 mL 加入 A 溶液中,超声分散,直到形成均一透明的微乳液,然后在 N_2 气氛保护及磁力搅拌下向微乳液中缓慢通入 H_2S 气体,直至溶液由无色变为亮黄色。用丙酮破乳洗涤、离心分离,收集沉淀,60 °C 真空干燥箱干燥 3 h 即得产物 CdS 量子点。

1.3 用巯基乙酸对 CdS 量子点进行表面改性

将 5 mg 的 CdS 量子点粉末分散在 5 mL 巯基乙酸中,放入烧瓶中搅拌、加热、回流,在 40 °C 下反

应 12 h 后,取出产物用丙酮做清洗液反复离心分离,超声清洗以清除未和量子点化学结合的巯基乙酸。清洗后将产物分成两等份(其中 1 份做进一步的叶酸修饰),分别分散在 5 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS)中。经过表面改性后, QDs 可以稳定地分散在 PBS 中,没有浑浊沉淀现象。

1.4 用叶酸对表面改性后的 CdS 量子点进行修饰

通过巯基乙酸改性之后, QDs 的水溶性明显改善。然后,通过一个通用的化学反应过程^[21]将叶酸和 QDs 表面的巯基乙酸进行化学连接。首先向上述 1.3 中的 5 mL PBS 体系中分别加入 0.1 mL NHS 和 EDC 的 DMSO 溶液, NHS 和 EDC 溶液的浓度均为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在室温下,磁力搅拌 30 min,然后将 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的叶酸 DMSO 溶液加入体系中,室温下继续搅拌 12 h。最后用去离子水透析 12 h,把没有和量子点结合的小分子除去,这样就得到了经过叶酸修饰的量子点(QDFs),把透析后的量子点再分散在 5 mL PBS 缓冲液中。

1.5 体外细胞试验

将人肝癌细胞 HepG2 和量子点共同培养。HepG2 细胞株接种于六孔培养板中,采用 RPMI1640(含 10% 新生牛血清(Hyclone))培养体系,放入 5% CO_2 培养箱中在 37 °C 下培养。在细胞对数生长期加入 0.1 mL QDs 或 QDFs 共同培养。取 1、3、8 和 15 h 作为观察时间点,按时用 PBS 冲洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定 15 min,然后再用 PBS 冲洗 3 遍,90% 甘油封片,在共聚焦显微镜下观察量子点与细胞的结合情况。为了进一步证明 QDFs 对 HepG2 细胞的特异性,我们做了叶酸竞争试验。

1.6 样品表征

CdS 量子点的形貌和大小通过 FEI TechnaiG² 透射电子显微镜进行表征,样品分散在乙醇中;利用 CARY Eclipse 荧光分光光度计测试量子点的光学性能,氙灯(Xe)光源,扫描速度选为“low”档,约为 $1.6 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$;细胞荧光图像通过 Olympus FV1000 激光共聚焦显微镜采集,激发波长为 488 nm。

2 结果与讨论

2.1 透射电子显微镜表征

图 1 是 CdS 量子点的 TEM 照片。由图中可以清晰地看到,实验制得的球形 CdS 量子点没有出现团聚现象,且粒径分布很均匀,其粒径在 6 nm 左右。

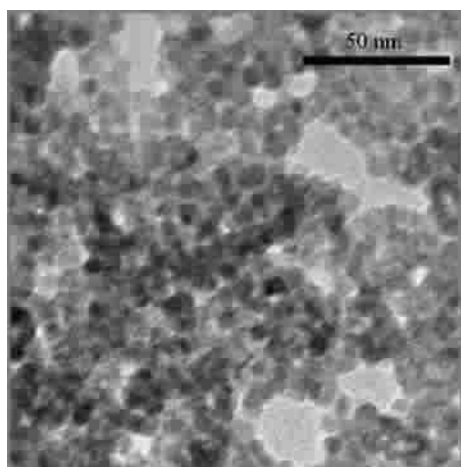


图 1 CdS 量子点的 TEM 照片

Fig.1 TEM image of CdS QDs

2.2 光学性能表征

2.2.1 荧光发射光谱(PL)

图 2 为在波长为 480 nm 的激发光激发下 CdS QDs 的荧光发射光谱。将 1 mg 经 MAA 改性后的 QDs 分散在 5 mL 蒸馏水中,用 CARY Eclipse 荧光分光光度计获得其荧光发射光谱。图中,在 519 nm 处有 1 个荧光发射峰,CdS QDs 的荧光峰位置与激发波长和量子点直径的大小有关^[22-25],这种特性使得将其用于生物荧光标记将更加有效,可以通过调节量子点的直径得到不同波长的荧光,以满足生物科学研究工作中跟踪标记的不同要求。

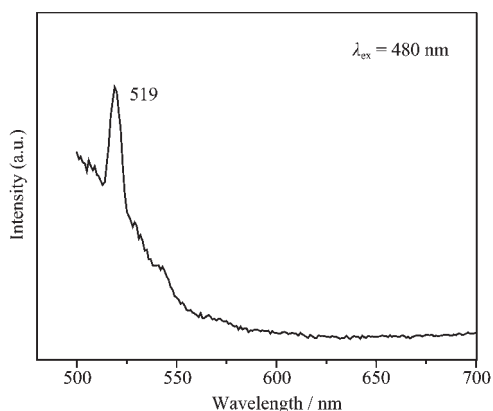


图 2 CdS 量子点的荧光发射光谱

Fig.2 PL emission spectrum of CdS QDs

2.2.2 红外吸收光谱(IR)

图 3 是分散在乙醇中的 CdS 量子点的红外吸收光谱。经过巯基乙酸表面修饰以后和未经修饰相比有明显的 C=O 的吸收峰出现($\nu_{\text{C=O}}=1\,652.61\text{ cm}^{-1}$)。经过多次超声清洗,未和 CdS 量子点化学联结的巯基乙酸已经被冲洗掉,所以,红外吸收光谱中的

C=O 吸收峰表明巯基乙酸和 CdS 量子点形成了稳定的化学连接。

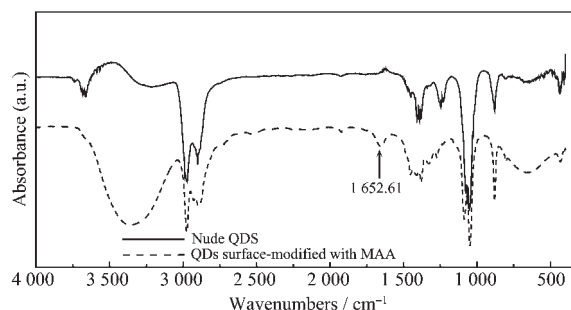


图 3 经过巯基乙酸修饰前后分散在乙醇中 CdS QDs 的红外吸收光谱

Fig.3 Infrared spectra of CdS QDs dispersed in ethanol

2.3 体外细胞实验

2.3.1 经过巯基乙酸表面改性的 QDs 和 HepG2 细胞共同培养

图 4(a),(b),(c)分别是未经过叶酸表面修饰的量子点和 HepG2 细胞共同培养不同的时间后的激光共聚焦荧光显微镜照片,图片为荧光通道图像和透射光通道图像的叠加。从图中可以明显看出,其荧光强度很弱,也没有明显的时间依赖性。图中的微弱的荧光表明有量子点被细胞吸收,这可能是存在不同于受体介导的特异性吸附的其他吸附途径^[26]。延长时间到 15 h(图片未在此文中显示)荧光强度没有明显改变。图 4(d)是未加入量子点的阴性对照组细胞的荧光通道和透射光通道图像的叠加,说明该荧光通道并没有细胞的自发荧光。

2.3.2 经过叶酸表面修饰后的 QDs 和 HepG2 细胞共同培养

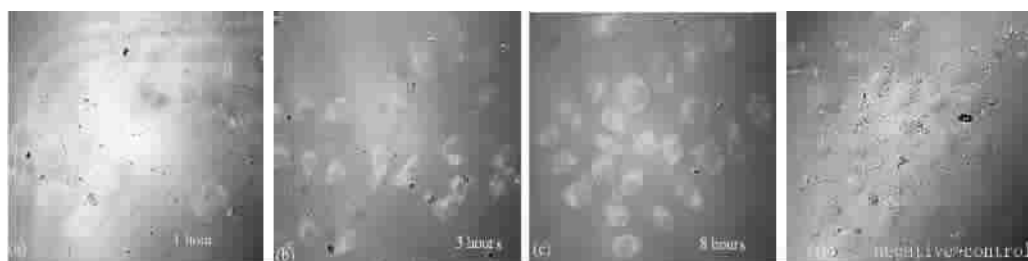
QDs 和 HepG2 共同培养 1、3、8、15 h 以后,固定、制样,用激光共聚焦显微镜观察。图 5(a),(b),(c)为荧光通道和透射光通道图像的叠加,图 5(d)是未加入量子点的阴性对照组细胞的荧光通道和透射光通道图像的叠加,说明该荧光通道并没有细胞的自发荧光。和图 4 中相应时间点的照片对比,其荧光强度明显增强,这说明经过叶酸对量子点表面修饰之后,通过细胞表面的叶酸受体和修饰在 QDs 表面的叶酸的特异性结合大大增加 HepG2 细胞和 QDs 的结合。随着培养时间的延长,细胞胞质的荧光强度增强,这表明 QDs 逐步穿过细胞膜,进入细胞内部。延长时间到 15 h(图片未在此文中显示)荧光强度依然没有明显改变,说明此时肿瘤细胞表面的叶酸受体逐渐被 QDs 饱和。



Incubation time is showed in the pictures

图4 巯基乙酸表面改性的量子点对 HepG2 细胞染色的激光共聚焦荧光显微镜照片

Fig.4 Confocal images of HepG2 cells treated with QDs surface-modified with MAA



Incubation time is showed in the pictures

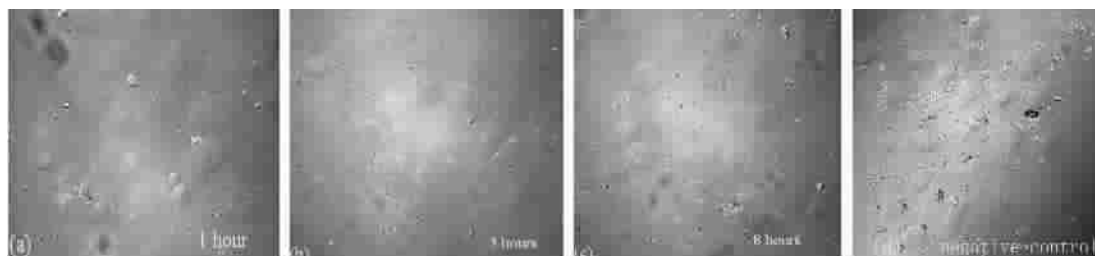
图5 QDFs 对 HepG2 细胞染色的激光共聚焦荧光显微镜照片

Fig.5 Confocal images of HepG2 cells treated with QDFs

2.3.3 QDFs 和叶酸的竞争吸附试验

为了进一步证明 HepG2 细胞对叶酸修饰的量子点的特异性吸附是通过细胞表面的叶酸受体进行的,我们做了叶酸竞争试验。首先向培养孔里加入 0.05 mL 0.05 mol·L⁻¹ 的叶酸的 PBS 缓冲溶液,然后放回 5% CO₂ 培养箱中,1 h 后,再加入经过叶酸表面修饰的量子点。最后取不同培养时间段进行制样观察。图 6 是实验结果的激光共聚焦荧光显微镜照片,图片为荧光通道和透射光通道图像的叠加,图 6(d)为没有加入量子点的阴性对照组细胞的

荧光通道和透射光通道图像的叠加,说明该荧光通道并没有细胞的自发荧光。从图中可以明显看出,其荧光强度稍高于图 4 中的荧光强度,而远远低于图 5 中相应时间点的荧光强度,这说明一部分量子点仍然通过叶酸受体介导而被细胞特异性地吸附,但是,细胞表面的大部分叶酸受体被叶酸饱和,从而使得细胞对量子点的特异性吸附能力明显减弱。这组试验进一步证实了图 5 中的吸附是通过肿瘤细胞膜上的叶酸受体和 QDFs 表面的叶酸特异性结合进行的,间接证明了 QDFs 对叶酸受体的靶向性。



HepG2 cells were saturated for 1 h with folate prior to being treated with QDFs

Incubation time is showed in the pictures

图6 QDFs 对经过叶酸饱和后的 HepG2 细胞染色的激光共聚焦荧光显微镜照片

Fig.6 Laser confocal images of HepG2 cells in a competition experiments

3 结 论

通过一种简单的反相胶束法,我们制备了荧光 CdS 量子点,经 MAA 对 QDs 表面改性后,QDs 可以

有效地分散在水性环境中。用叶酸对 QDs 进行表面修饰得到的 QDFs 对 HepG2 细胞具有特异性识别功能。在细胞实验里,通过对比试验和竞争试验,证明了这种功能化的量子点 QDFs 用于细胞生物学研

究的有效性。

参考文献:

- [1] Hanaki K, Momo A, Oku T. *BBRC*, **2003**,**302**:496~501
- [2] Seydel C. *Science*, **2003**,**300**:80~81
- [3] Bruchez M, Moronne M, Gin P, et al. *Science*, **1998**,**281**: 2013~2016
- [4] Chan W C W, Nie S M. *Science*, **1998**,**281**:2016~2018
- [5] Larson D R, Warren R Z, Watt W, et al. *Science*, **2003**,**300**: 1434~1436
- [6] Moon W K, Lin Y H, Tung C H, et al. *Bioconjugate Chem.*, **2003**,**14**:539~545
- [7] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, et al. *Science*, **2005**, **307**:538~544
- [8] Tang H, Xu G Y, Weng L Q, et al. *Acta Materialia.*, **2004**, **52**:1489~1494
- [9] Wang X, Zhuang J, Li Y D, et al. *Nature*, **2005**,**437**:121~ 124
- [10] Yang H, Holloway P H. *Applied Physics Letters*, **2003**,**82**: 1965~1967
- [11] Langenohl R P, Pietrzik F K. *European Journal of Nutrition*, **2001**,**40**:98~105
- [12] Sudimack J, Sudimack B A, Lee R J. *Advanced Drug Deliv- erty Reviews*, **2000**,**41**:147~162
- [13] Roy E J, Gawlick U, Orr B A, et al. *Advanced Drug Deliv- erty Reviews*, **2004**,**56**:1219~1231
- [14] Lu Y J, Sega E, Christopher P L, et al. *Advanced Drug Deliv- erty Reviews*, **2004**,**56**:1161~1176
- [15] Leamon C P, Low P S. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1991**,**88**:5572 ~5576
- [16] Wang S, Lee R J, Mathias C J. *Bioconjug. Chem.*, **1996**,**7**:56 ~62
- [17] Mathias C J, Wang S, Lee R J. *J. Nucl. Med.*, **1996**,**37**:1003 ~1008
- [18] Ladino C A, Chari R V, Bourret L A, et al. *Int. J. Cancer*, **1997**,**73**:859~864
- [19] Kranz D M, Patrick T A, Brigle K E, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1995**,**92**:9057~9061
- [20] Zhang Y, Kohler N, Zhang M. *Biomaterials*, **2002**,**23**:1553~ 1561
- [21] Bharali D J, Lucey D W, Jayakumar H, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**,**127**:11364~11371
- [22] Clemens B, Chen X B, Narayanan R, et al. *Chem. Rev.*, **2005**,**105**:1025~1102
- [23] Kloepper J A, Mielke R E, et al. *Environ. Microbiol.*, **2003**, **69**(7):4205~4208
- [24] Han M, Gao X, Su J Z. *Nat. Biotechnol.*, **2001**,**19**(7):631~635
- [25] Herron N, Calabrese J C, Farneth W E. *Science*, **1993**,**259**: 1426~1429
- [26] Gabizon A, Shmeeda H, Aviva T H, et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2004**,**56**:1177~1192