

Tb 掺杂的纳米羟基磷灰石生物荧光探针的合成与表征

李 玲^{1,2} 刘玉侃³ 陶锦晖¹ 张 铭³ 潘海华¹ 唐睿康^{*,1}

(¹ 浙江大学化学系, 浙江大学生物物质与信息调控研究中心, 杭州 310027)

(² 江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214122)

(³ 浙江大学生命科学院, 杭州 310058)

摘要: 本文在室温下用 Tb(III) 对纳米羟基磷灰石(HAP)进行表面修饰制成了新型无机生物荧光探针。在十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)参与调控下, 控制适当的反应条件, 可生成 20 nm 左右的 HAP 颗粒。经表面修饰后所得的 Tb-HAP 颗粒的尺寸范围仍在 20±5 nm 之间, 但具有发光特性, 其最大发射峰值在 544 nm, 且能在可见光波段(488 nm)下进行激发。生物 TEM 结果表明, 这种 20 nm 左右大小的 Tb-HAP 可以很容易地进入兔骨髓间充质干细胞。因此, 这一具有荧光特性的 Tb-HAP 有望成为具有良好生物兼容性的并可在细胞内稳定存在的生物无机纳米探针。

关键词: 羟基磷灰石; 铽; 荧光; 生物探针; 纳米颗粒

中图分类号: O614.23⁺1; O614.341

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2008)09-1369-05

Synthesis and Characterization of Terbium-doped Nano Hydroxyapatite Biological Florescent Probe

LI Ling^{1,2} LIU Yu-Kan³ TAO Jin-Hui¹ ZHANG Min³ PAN Hai-Hua¹ TANG Rui-Kang^{*,1}

(¹Department of Chemistry, Center for Biomaterials and Biopathways, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

(²School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122)

(³College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract: An inorganic biological florescent probe, Tb(III)-doped HAP nanoparticles was obtained by partially replacing calcium ions with terbium ions on the surface of 20 nm HAP at room temperature. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was used in the precipitation of hydroxyapatite to regulate the particle size and the synthesized HAP had a relatively uniform size of 20 nm. Calcium ions on the surface of HAP particle could be partially replaced by Tb(III) to result in the Tb-HAP nanoparticles. The sizes of the Tb-HAP particles are 20±5 nm. After the surface treatment, the nanoparticles become luminescent and their maximum emission intensity is observed at 544 nm, which could be also excited at a visible light region of 488 nm. The result of the biological transmission electron microscopy confirms that these Tb-HAP nanoparticles could be internalized by the rabbit mesenchymal stem cells readily. Therefore, it suggested that the Tb-HAP nanoparticles could be used as a suitable nano inorganic florescent probe with excellent biocompatibility and stability in cells.

Key words: hydroxyapatite; terbium; florescence; biological probe; nanoparticle

收稿日期: 2008-03-24。收修改稿日期: 2008-06-06。

国家自然科学基金资助项目(No.20571064, 20701032)。

*通讯联系人。E-mail: rtang@zju.edu.cn; Tel: 0571-87953736

第一作者: 李 玲, 女, 37 岁, 讲师; 研究方向: 生物矿化; 纳米荧光材料。

0 引言

目前广泛应用的生物探针材料主要有两类:第一类,同时也是应用最广泛的一类是具有荧光特性的有机分子^[1-3],如罗丹明(Rhodamine)、荧光素(fluorescein)、吖啶橙(Acridine orange)等,以它们作为荧光标记物,可以很方便地对细胞进行实时观测。有机荧光探针虽然灵敏性较高,但同时也有着显著的缺点具有光漂白性(photobleaching)^[4]。第二类常见的生物探针是半导体量子点材料^[5],如 CdSe-CdS、CdSe-ZnS、InAs、InP 等。与有机荧光探针材料相比,它们克服了光漂白性这一缺点且荧光强度相对稳定。但由于这些纳米材料的生物安全性问题使之在应用中受到限制。理想的生物荧光探针材料应具备良好的光稳定性、颗粒尺寸在纳米尺度、而且对生物体无毒害作用。

研究表明,纳米无机发光材料有可能替代半导体量子点成为新一类的生物探针^[6]。在众多的无机材料中,羟基磷灰石(Hydroxyapatite,简称 HAP,分子式为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)是人体和动物体内骨骼和牙齿的主要无机组成成分,具有良好的生物兼容性和生物活性^[7]。最近的生物矿化研究指出,在生物体内环境中纳米 HAP 粒子可以稳定存在^[8]。Bauer 等已报道了 HAP 的纳米粒子可进入肝脏癌细胞^[9]。我们课题组的研究结果表明,HAP 的尺寸对于颗粒能否进入细胞内部有着重要影响,而最容易进入细胞的是 20 nm 的 HAP 颗粒^[10]。生物探针的一个最重要也是最基本的要求是,材料的荧光能够在可见光的激发下被明显观测到,而 HAP 本身在可见光激发下并无明显的荧光发射产生。当构成物质主体缺乏某种功能特性时,最常用的方法就是用具有这种功能特性的其他离子来替代原来的主体离子^[11]。镧系元素的离子半径接近于 Ca^{2+} ,生物活性也与之类似^[12],而且它们具有较好的荧光特性。已有很多研究工作表明, Ca^{2+} 可以比较容易地被 Ln^{3+} 所取代^[13]。由此可推知,如能将 HAP 与 Ln^{3+} 进行掺杂,那么就有可能使所获得的新物质能够被可见光所激发。在 Ln^{3+} 之中,发光最强的是 Eu^{3+} 和 Tb^{3+} ^[14],如能将这 2 种离子与 HAP 进行掺杂应该效果最好。Doat 等^[15]以及 Lebugle 等^[16]已经对掺杂镧系元素离子的磷灰石型化合物进行了研究,但他们在对颗粒尺寸大小的控制以及颗粒与细胞的作用两方面并没有同时得到令人满意的结果。Wang 等通过在表面沉积 Y_2O_3 ;

Eu^{3+} 粒子而对 HAP 进行了表面修饰^[17],但在高温烧结后,原有的 HAP 纳米颗粒变成了大尺寸的团块。尺寸方面的缺陷限制了该材料在生物探针方面的应用。本文通过对 HAP 进行表面修饰制备了能被可见光激发的 Tb-HAP 纳米颗粒,其尺寸范围可以较好地控制在 20 ± 5 nm 的范围内。还要特别指出的是 Tb^{3+} 自身的口服半致死量(大鼠) LD_{50} 大于 $5\,000\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[18],而在表面修饰过程中所加入的 Tb 的含量又很低,因此最终所得的 Tb-HAP 纳米粒子可基本视为无毒,不会对生物体产生毒副作用。

1 实验部分

1.1 试剂

所用的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、 $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、乙醇等试剂均为国产分析纯试剂,在细胞实验中高糖 DMEM 培养液(H-DMEM)购自美国 Hyclone 公司,Ficoll 淋巴细胞分离液和胰蛋白酶购自上海生化试剂厂,所有试剂在使用前均未经进一步纯化。所用水均为三次蒸馏水。

1.2 Tb-HAP 纳米粒子的合成

室温下,将 1.80 mmol Na_2HPO_4 和 0.27 mmol CTAB 溶解于 294.0 mL 三蒸水中,不断搅拌,同时逐滴加入 6.0 mL $0.500\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液。此时反应体系中 CaCl_2 、 Na_2HPO_4 和 CTAB 的浓度分别为 10.0、6.0 以及 $0.90\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。体系中所加入的 CTAB 可以作为反应模板,从而调控最终所生成的纳米颗粒的大小^[10,19]。持续搅拌,同时用氨水调节反应体系的 pH 值,使其稳定在 pH 值为 9.5 左右,此时,HAP 纳米粒子自发地从溶液中沉淀析出。反应 1 h 后,HAP 颗粒已基本形成,此时开始向溶液中加入 Tb^{3+} 。在加入之前,先用 $1.0\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 将溶液的 pH 值调至 7.0 附近从而防止 Tb^{3+} 的水解。然后向溶液再缓慢滴加 12.2 mL $5.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$ 溶液并使最终反应体系中的 $n_{\text{Tb}}:n_{\text{Ca+Tb}}$ 物质的量比为 2:100,滴加完毕后继续反应 23 h。反应结束后,所得到的 Tb-HAP 颗粒经高速离心($12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)及微孔滤膜(Nucleopore N003)过滤后,用三蒸水和乙醇多次交替洗涤,所得产品在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下真空干燥。

1.3 仪器

X 射线衍射(XRD)测定:使用日本 Rigaku D/max-2550pc 型 X 射线仪 (Cu 靶, $K\alpha$ 辐射, $\lambda = 0.154\,056\text{ nm}$)。红外光谱测定:使用美国 Nicolet NEXUS 470 型傅立叶红外光谱仪,扫描范围为 $400 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 。

颗粒形貌测定: 使用日本 JEOL JEM200CX 型透射电镜, 工作电压为 200 kV。荧光图谱测定: 使用日本岛津 RF-5301pc 型荧光分光光度计。细胞内颗粒测定: 使用荷兰飞利浦 TECNAL-10 型生物透射电镜, 工作电压为 100 kV。

1.4 细胞实验部分

兔骨髓间充质干细胞的分离培养可参照文献方法^[20], Tb-HAP 纳米颗粒经高温消毒后, 被置于盛有细胞悬浮液的 24 孔板中。共培养 7 d 后, 以磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶和 0.05% EDTA 消化分离 5 min, 在 2.5% 戊二醛/2% 多聚甲醛中预固定, 1% 四氧化锇中后固定, 乙醇梯度脱水, 树脂包埋。包埋后样品经过修块后, 被做成超薄切片, 片厚 70 nm, 将超薄切片捞取至覆有 Formvar 膜的铜网上。超薄切片铜网经过醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色后, 即可进行生物透射电镜观测。

2 结果与讨论

2.1 Tb-HAP 颗粒的表征

图 1 为 Tb-HAP 颗粒的透射电镜图。如上文所述, 在合成过程中体系中所采用的 CTAB 浓度为 $9 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 这一浓度也正是 CTAB 在室温下的临界胶束浓度。文献报道认为, CTAB 形成临界胶束时, 可以通过结构和电荷的互补从而实现其对晶体大小的模板控制作用^[21]。我们的课题组以前的报道也指出, 当 CTAB 浓度为 $9 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 可以生成大小均一的 20 nm HAP 颗粒^[10]。由图 1 可见, 实验所获得生成的 Tb-HAP 为大小分布均匀的颗粒, 其尺寸约为 $20 \pm 5 \text{ nm}$ 。和过去所获得的纯 HAP 的 20 nm 颗粒相比较, 用 Tb^{3+} 对 HAP 的表面修饰并没有显著改变 HAP 颗粒的形貌。

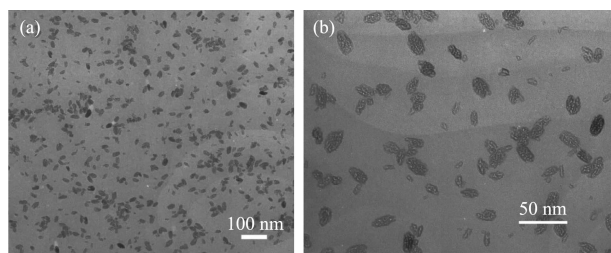


图 1 (a) Tb-HAP 纳米颗粒的透射电镜图; (b) Tb-HAP 纳米颗粒的高倍放大图

Fig.1 (a) TEM image of the Tb-HAP nano particles (b) Magnified image of the Tb-HAP nano particles

图 2 为修饰后的 Tb-HAP 纳米颗粒与纯的 HAP 纳米颗粒的 X 射线衍射对照图。由图 2a 可以

看出, 在 $n_{\text{Tb}}/(n_{\text{Tb}}+n_{\text{Ca}})=2\%$ 时, 该图谱与纳米 HAP 的 XRD 基本一致, 而且它们的峰的位置及相对强度都能很好地对应于 HAP 的标准图谱(PDF09-0432)。但经表面修饰以后, 我们发现羟基磷灰石的结晶度下降了, 部分峰线(2θ 为 $40^\circ \sim 55^\circ$ 之间)变得较为模糊。这一结论也可由红外图谱(图 2b)给予辅助证明。图中处于 $560, 600$ 以及 $1000 \sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ 位置的峰均为磷灰石晶体中磷酸根的特征峰, 这说明羟基磷灰石的结构已经形成。波数为 1419 和 871 cm^{-1} 的小峰表示颗粒中还存在有少量的碳酸根离子。在生物体中形成羟基磷灰石往往具有碳酸根掺杂^[22]。而在本实验中并没有对空气中的 CO_2 进行控制, 所以也同样得到了部分碳酸化的 HAP 颗粒。此外, 3426 cm^{-1} 处的宽峰是由体系中还残留的少量水分中的羟基所产生的。我们注意到, 在图 2b 中 CTAB 的红外峰并未出现, 这说明经过洗涤后 CTAB 基本上从 Tb-HAP 纳米颗粒上除去。

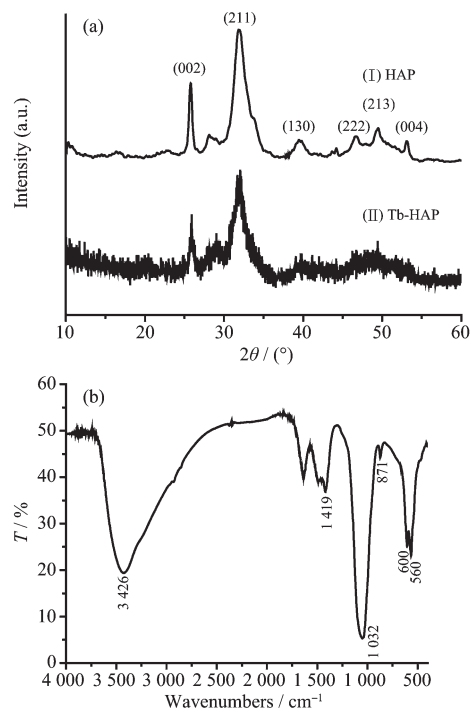


图 2 (a) Tb-HAP 以及 20 nm 纯 HAP 的 XRD 结果; (b) Tb-HAP 纳米颗粒的傅立叶红外光谱图

Fig.2 (a) XRD results of the pure nano HAP and Tb-HAP; (b) IR spectrum of the Tb-HAP nanoparticles

有很多文献已经报道过, 钙离子可以被与其半径相似的其他金属离子所取代, 特别是被镧系元素离子所取代^[14]。在我们的实验中, 虽然 HAP 表面的部分钙离子被 Tb^{3+} 所取代, 但是由于 Tb 在整个体系中所占的比例非常小, 而且取代反应又只在 HAP

表面进行,所以这一掺杂过程很难被检测。但产品中 Tb 的存在可以由 Tb-HAP 的荧光性质来加以证实。在 272 nm 及 488 nm 光激发下,纯 HAP 均不能检测出荧光发射,但经表面修饰后,Tb-HAP 有了明显的荧光性质(见图 3~5)。图 3 是在 272 nm 激发下 Tb-HAP 的荧光发射光谱。图中位于 490,544,585 和 622 nm 处的发射峰分别对应于 Tb 的 $^5D_4-^7F_6$

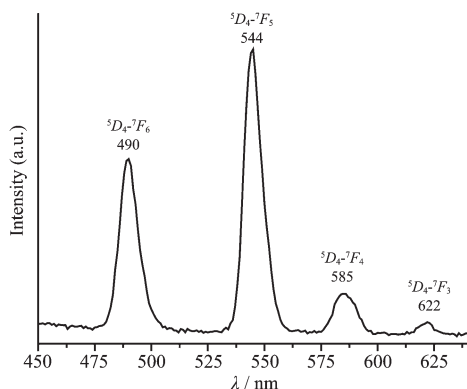


图 3 激发波长为 272 nm 时 Tb-HAP 纳米粒子的荧光发射光谱

Fig.3 Emission spectrum of Tb-HAP particles under excitation of 272 nm

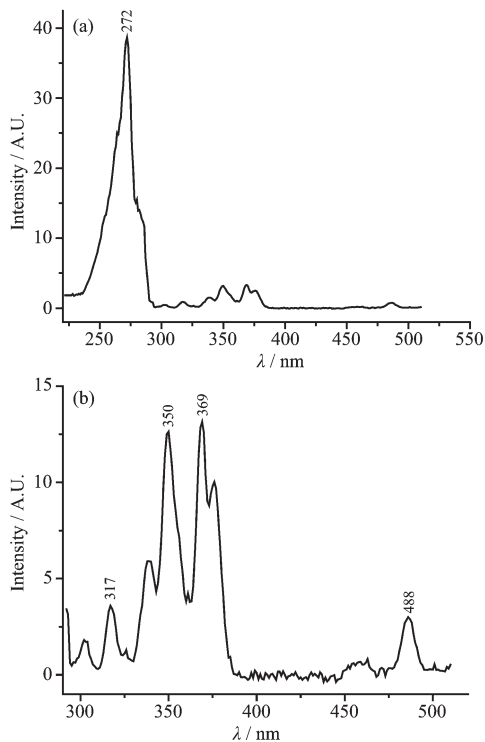


图 4 (a) 发射波长在 544 nm 时 Tb-HAP 纳米粒子的荧光激发光谱;(b) 300~500 nm 激发光谱的细节

Fig.4 (a) Excitation spectrum of Tb-HAP with emission wavelength of 544 nm; (b) Details of the spectrum in the wavelengths of 300~500 nm

7F_6 , $^5D_4-^7F_5$, $^5D_4-^7F_4$ 和 $^5D_4-^7F_3$ 跃迁,这就证明了产物中 Tb 的存在。图 3 中最强发射峰位置位于 544 nm,对应于 Tb 的 $^5D_4-^7F_5$ 跃迁。图 4 是发射波长为 544 nm 时的荧光激发光谱。虽然最强激发峰在 272 nm,但在 488 nm 处也有一处较弱的激发峰。图 5 是激发波长为 488 nm 时的荧光发射光谱图,发射峰的强度虽然弱于 272 nm 激发下所得到的峰强,但是 544 和 585 nm 处的发射峰仍可被清晰辨认。需要特别说明的是,272 nm 位于紫外波段,在此波长下对生物体进行荧光激发会对细胞造成一定程度的伤害,因此在细胞生物实验中均不采用;而 488 nm 则是位于可见光中的蓝光波段,所以用此波长对纳米颗粒进行激发则不会伤害到生物体。这样,488 nm 激发波长的存在就使得 Tb-HAP 可以在生物体内被实时观测从而使 Tb-HAP 具备了作为生物探针的基本特性。

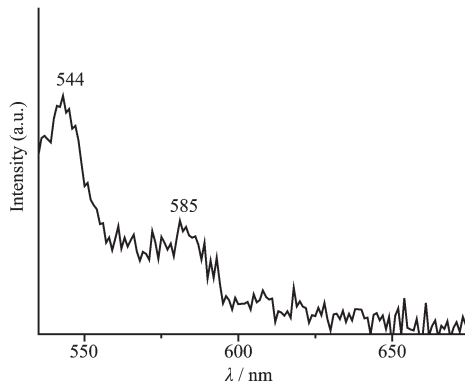


图 5 激发波长为 488 nm 时,Tb-HAP 的荧光发射光谱

Fig.5 Emission spectrum of Tb-HAP under the excitation of 488 nm

2.2 Tb-HAP 颗粒对兔骨髓干细胞的生物兼容

取已与 Tb-HAP 共培养 7 d 后的兔骨髓干细胞,经一系列处理后(处理步骤见 1.4)进行观测。从图 6 可以看出,部分 Tb-HAP 纳米颗粒已经进入了细胞内部(图 6a 中箭头所指是已进入细胞内的 Tb-HAP)。需要特别指出的是,Tb-HAP 纳米颗粒并不是以单一分散的形式存在于细胞中,而是在细胞中形成了团聚体。纳米颗粒在细胞内自发的团聚现象在很多研究中均被观测到。图 6b 是这些聚集体的放大图片,我们可以看到,虽然经历了与细胞共培养以及被细胞摄入等生物过程,Tb-HAP 纳米粒子的形貌和尺寸特征并没有发生改变,完全和图 1 中的颗粒相类似。这说明,经过表面修饰之后,Tb-HAP 仍保留了 HAP 原有的良好的生物兼容性和稳定性。

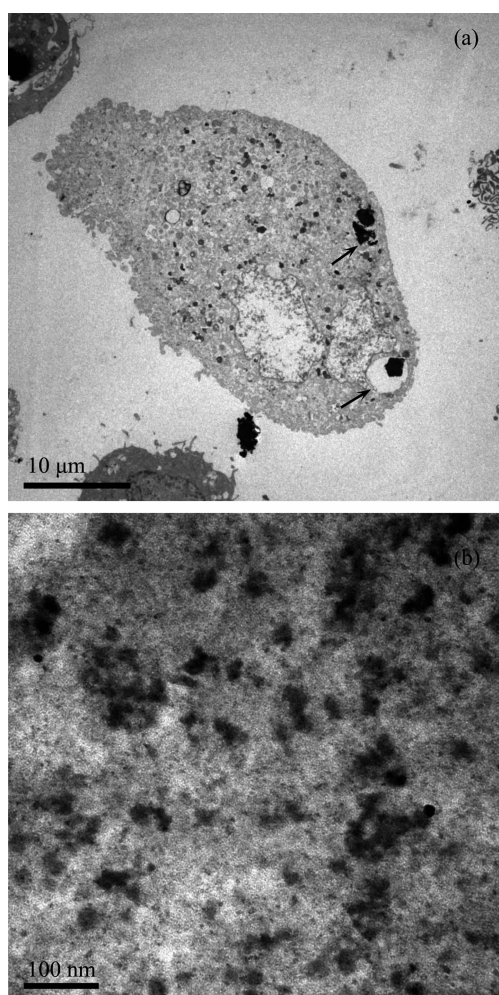


图6 Tb-HAP 颗粒与兔骨髓干细胞共培养 7d 后的生物透射电镜电镜图

Fig.6 Biological TEM images of the rabbit mesenchymal stem cells, which were cultured together with the Tb-HAP particles for 7 days

3 结 论

在室温下用 Tb^{3+} 对羟基磷灰石(HAP)纳米颗粒进行表面修饰,可制得 20 nm 左右的 Tb-HAP 纳米颗粒。和 HAP 不同,Tb-HAP 纳米颗粒具有了明显的荧光特性,并且可以在可见光波段(488 nm)下被激发,发出 544 nm 的荧光,因此它可以作为生物荧光探针被实时观测。和兔骨髓间充质干细胞共培养的生物实验表明,这些 Tb-HAP 纳米颗粒可以很容易地通过细胞膜进入细胞,而进入细胞后的 Tb-HAP 仍保留了原来 HAP 良好的生物兼容性和稳定性。由此可见,我们所合成的 Tb-HAP 纳米颗粒有望成为具有良好生物兼容性和稳定性的无机荧光探

针,这为今后研究无机生物矿物与细胞之间的相互作用提供了良好的工具。

参考文献:

- [1] Yang Y K, Ko S K, Shin I, et al. *Nat. Protocols*, **2007**,**2**:1740~1745
- [2] Tanaka K, Miura T, Umezawa N, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**,**123**(11):2530~2536
- [3] Tatton N A, Kish S J. *Neurosci.*, **1997**,**77**(4):1037~1048
- [4] Zondervan R, Kulzer F, Kol'chenko M A, et al. *J. Phys. Chem. A*, **2004**,**108**(10):1657~1665
- [5] Gao X, Cui Y, Levenson R M, Chung L W K, et al. *Nat. Biotechnol.*, **2004**,**22**(8):969~976
- [6] Patra C R, Bhattacharya R, Patra S, et al. *J. Nanobiotechnol.*, **2006**,**4**:11~
- [7] Sautier J M, Nefussi J R, Forest N. *Cells Mater.*, **1991**,**1**(33):209~217
- [8] Tang R, Wang L, Orme C A, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**,**43**(20):2697~2701
- [9] Bauer I W, Li S P, Han Y C, et al. *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, **2007**,DOI: 10.1007/s10856-007-3124-4
- [10] Cai Y, Liu Y, Yan W, et al. *J. Mater. Chem.*, **2007**,**17**(36):3780~3787
- [11] Jallot E, Nedelec J M, Grimault A S, et al. *Colloids Surf. B*, **2005**,**42**(3~4):205~210
- [12] Shannon R D. *Acta Crystallogr.*, **1976**,**A32**:751~767
- [13] Biekofsky R R, Muskett F W, Schmidt J M, et al. *FEBS Lett.*, **1999**,**460**(3):519~526
- [14] Horrocks Jr W D, Sudnick D R. *Acc. Chem. Res.*, **1981**,**14**:384~392
- [15] Doat A, Fanjul M, Pellé F, et al. *Biomaterials*, **2003**,**24**(19):3365~3371
- [16] Lebugle A, Pellé F, Charvillat C, et al. *Chem. Commun.*, **2006**:606~608
- [17] Wang W, Shi D, Lian J, et al. *Appl. Phys. Lett.*, **2006**,**89**(18):183106~
- [18] Haley T J. *J. Pharm. Sci.*, **1965**,**54**(5):663~670
- [19] Yan L, Li Y, Deng Z X, et al. *Mater. Lett.*, **2002**,**56**(4):496~501
- [20] Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. *Spine*, **2005**,**30**:2379~2387
- [21] Yan L, Li Y D, Deng Z X, et al. *Int. J. Inorg. Mater.*, **2001**,**3**:633~637
- [22] Chickerur N S, Tung M S, Brown W E. *Calcif. Tissue Int.*, **1980**,**32**(1):55~62