

基于 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 上转换发光纳米晶的 复合微球组装及其光动力活性

张庆彬* 程 成

(浙江工业大学理学院应用物理系, 杭州 310023)

摘要: 采用微乳液法, 以 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 纳米晶为发光基元, 酞菁锌(ZnPc)光敏分子与十八碳烯-马来酸酐共聚物(PMAO)为功能分子, 一步组装获得了 $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ 复合微球, 此微球同时具备成像与光动力活性功能, NaYF_4 可作为低生物背景的荧光成像剂, 同时其上转换发光可以敏化 ZnPc 用于光动力活性研究, PMAO 分子经过简单的水解反应即可实现表面羧基功能化。TEM, Zeta 电位与 PL 测试证实了微球的结构与性能。利用荧光共聚焦成像技术实现了对 HeLa 细胞的发光成像; 进一步通过单线态氧监测及 980 nm 光照下的 MTT 法细胞活性测试表明微球具有光动力活性功能。

关键词: $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$; 上转换发光; 复合微球; 生物成像; 光动力治疗

中图分类号: O611.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2015)01-0081-06

DOI: 10.11862/CJIC.2015.017

Composite Microspheres Assembly and Photosensitive Activity Research Based on $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ Upconverting Nanoparticles

ZHANG Qing-Bin* CHENG Cheng

(Department of Applied Physics, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310023, China)

Abstract: A multifunctional composite microspheres were prepared based on $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ upconversion nanoparticles (UCNPs), zinc phthalocyanine (ZnPc) and poly(maleic anhydride-alt-1-Octadecene) (PMAO) via a one step self-assembly process in microemulsion droplets. The UCNPs as fluorescence imaging agent can be used for biological imaging, and can also use the up-converting luminescence sensitization photosensitive molecules for the research of photosensitive activity. PMAO molecules provide anhydride functional groups for immobilization of biomolecules. The morphologies and property were characterized by transition electron microscopy (TEM), Zeta potential and photoluminescence (PL) spectroscopy. The fluorescence confocal cell imaging confirms that the $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ are suitable for potential biological labeling. Photodynamic cancer cell killing ability was evaluated using a MTT assay with HeLa cells under different time irradiations. The results indicating that the $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ composite microspheres have highly killing ability to HeLa cells under 980 nm light irradiation.

Key words: $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$; upconversion luminescence; composite microspheres; biological imaging; photodynamic therapy

光动力疗法(Photodynamic therapy, PDT)^[1]是指光敏剂选择性的聚集在肿瘤组织中, 接受光照后在区域内产生单线态氧(singlet oxygen, $^1\text{O}_2$), $^1\text{O}_2$ 能够造

成细胞膜的不可逆损伤, 从而使肿瘤细胞凋亡的一种治疗方法。相对于手术等治疗方法因其具有靶向性、低损伤的优点而在肿瘤治疗领域备受关注^[1-4]。在

收稿日期: 2014-06-30。收修改稿日期: 2014-10-21。

国家自然科学基金(No.21305126)和浙江省教育厅科研补助(No.Y20125738)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: qbzhang@zjut.edu.cn

光动力治疗中光敏剂通常有两个作用,首先是利用其光敏活性在光照下产生活性氧进行 PDT 治疗,同时利用其自身荧光探测病变所在区域^[5-7]。然而,大部分光敏剂的激发光源为短波长的紫外或可见光,短波长光组织穿透能力弱,同时会激发生物体的背景荧光降低检测的信噪比以及光敏化效果;此外,光敏分子自身也存在易于被蓝紫光漂白的不足。针对这些问题,有工作提出将半导体量子点(QDs)与光敏剂相结合,利用 QDs 发光敏化光敏分子,同时 QDs 高的发光稳定性可以提高检测的准确性,但由于 QDs 下转换的发光机制同样面临短波长激发光组织穿透能力弱,敏化效果不佳的缺陷^[8]。

稀土离子掺杂上转换发光纳米晶(Upconversion Nanoparticles, UCNPs)近年来在生物医学领域的应用研究引起了人们的广泛关注^[9-11]。上转换发光机制是一种非线性光学过程,即长波长的光照射物体经过多光子吸收或能量传递等过程,产生短波长的发射光。因此,上转换纳米晶具有稀土发光材料窄发射谱带、宽 Stokes 频移、更高发光稳定性等优点,特别是其近红外光(980 nm)激发的上转换的发光特性,在生物检测中具有深的组织穿透能力,极低的生物背景荧光等优点,使其已经被广泛用于生物领域的成像、检测及治疗研究^[9-12]。目前,已经有一些工作报道基于 UCNPs 的 PDT 研究^[13-20]。其基本原理是 980 nm 光源激发上转换纳米粒子发光,再通过纳米晶与光敏分子间的能量传递过程激发光敏分子从而敏化环境中的分子氧而产生 $^1\text{O}_2$, 目前 PDT 材料构建的策略主要是在纳米粒子的表面包覆层(如 SiO_2)内装填光敏分子^[13-17],或者利用亲水性分子或聚合物对粒子进行表面亲水性修饰,利用表面亲水基团(如: $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$)偶联光敏分子的方法^[20]。这些材料制备方法都需要经过复杂的表面修饰过程,比如在表面附加包覆层内填装的方法,颗粒表面包覆层的厚度难于精确控制,材料的可重复性受到一定的限制;同时,由于受到包覆层厚度和偶联剂链长的限制而增加了上转换纳米晶(给体)与光敏分子(受体)间的距离,降低了能量传递的效果;因此,有必要发展新的光敏粒子组装策略简化材料的制备过程,提高光敏化效率。

本文以油相 UCNPs 为发光基元,加入与纳米晶表面相容的肽菁锌(ZnPc)作为光敏药物,与十八碳烯-马来酸酐交替共聚物(PMAO)共同组装,一步获得了 UCNPs-ZnPc-PMAO 复合微球,该微球同时具

备成像与光敏活性功能,经简单的水解反应即可实现羧基功能化。TEM, PL, Zeta 电位等测试证实了复合体的光学性能与表面性质,采用荧光共聚焦成像技术成功实现了对 HeLa 细胞的光学成像,进一步通过单线态氧测试以及 980 nm 光照下的 MTT 法细胞活性测试表明材料具有优良的光动力活性功能。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

合成纳米晶所用稀土氯化物为自制,稀土氧化物 Y_2O_3 (99.99%), Yb_2O_3 (99.99%), Er_2O_3 (99.99%)均购买于北京稀土创新技术有限公司,浓盐酸(HCl); NH_4F (98%),油酸(OA),十二烷基磺酸钠(SDS), 9, 10-二亚甲基丙二酸酐均购买于中国化学试剂公司。十八碳烯(ODE; 90%, Alfa aesar),聚马来酸酐与十八碳烯的交替共聚物(PMAO; $M_r=30\ 000\sim50\ 000$, Aldrich)。磷酸盐缓冲液(PBS, $0.05\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=7.4)以及 NaAc-HAc 缓冲液($0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=5.0)等自己配制。生物试剂包括 DMEM 细胞培养基,血清等购自苏州科晴生物技术公司。

微球的尺寸和形貌通过 G2 F20 S-Twin FEI 型场发射透射电子显微镜测试,加速电压为 200 kV;上转换发光是在 Hitachi F4600 荧光光谱仪外接 980 nm 激光器光源测得(激发光功率为 1 mW);表面电性采用 Colloidal Dynamics Zeta 电位分析仪测试得到。微球细胞成像为 Leica TCS SP5 共聚焦显微成像系统测试;细胞活性数据采用 Perkin Elmer Victor 多功能酶标仪测得。

1.2 上转换纳米晶 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 的合成

$\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 合成参照报道的方法稍作修改^[21]。首先按比例称取 YCl_3 (0.78 mmol), YbCl_3 (0.2 mmol), ErCl_3 (0.02 mmol)放入 50 mL 的三颈瓶中,加入 9 mL 油酸和 12 mL 的十八碳烯,体系加热升温到 160 $^{\circ}\text{C}$ 溶解稀土盐,冷却至室温,将 NaOH (2.5 mmol)和 NH_4F (4 mmol)的甲醇溶液注入到反应体系中,缓慢搅拌 30 min。之后,在氩气流保护下升温逐渐蒸出甲醇等杂质,升温至 300 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h,结束反应冷却至常温,离心收集产物,分别用乙醇与水的混合液,乙醇与二氯甲烷的混合液清洗 2 次,获得纳米晶分散于二氯甲烷中备用。

1.3 $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ 复合微球组装

$\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ 通过微乳液组装技术获得,将包含 4 mg $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 纳米晶的二氯甲烷溶

液与包含 0.2 mg PMAO 的二氯甲烷溶液混合,取 0.1 mL 肽菁锌 (ZnPc) 的四氢呋喃饱和溶液加入体系,使有机相的总体积为 1 mL。有机相与 10 mL 包含 50 mg SDS 的去离子水溶液混合,高速机械搅拌得到稳定的微乳液,之后,加热到 40 °C,在缓慢搅拌下逐渐蒸发掉体系内的有机溶剂。加入 NaOH 溶液调体系的 pH 值为 13,继续缓慢搅拌溶液保持 10 h,结束反应,产物经离心清洗后分散于去离子水中备用。

1.4 复合微球的细胞成像

人癌细胞系的 HeLa 细胞在培养箱 5% CO_2 , 37 °C 条件下进行培养。选择对数期的细胞,按一定浓度种入超薄培养皿中,待细胞贴壁后将 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的 $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ 复合微球加入培养液中,放入培养箱继续培养 24 h;之后将培养基吸干,用 PBS 缓冲液反复清洗掉游离的纳米粒子,加入少量的培养液进行共聚焦细胞成像检测。

1.5 MTT 法研究微球的细胞毒性与光动力细胞杀伤能力

MTT 测试细胞毒性实验过程为:收集对数期的 HeLa 细胞,细胞计数确定细胞浓度,培养基稀释细胞浓度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,之后,种入 96 孔板(每孔 100 μL),放入培养箱中培养 24 h,待细胞贴满孔板底部,将不同浓度梯度的药物加入培养液中,放入培养箱继续培养 24 h;将 96 孔中的原培养液洗出,用 pH 7.4 PBS 清洗 2 次,加入新的培养基,每孔加入 20 μL 的 MTT,用锡箔纸包裹好,放入培养箱反应 2 h,之后将培养基吸干,每孔加入 150 μL 的 DMSO,用移液枪轻吹溶液使结晶充分溶解,通过多孔板检测仪进行光谱测试。

细胞培养与种板方法与以上相同,接种 5 组细

胞,每组设 5 个复孔,第一组作为参比样品,第 2~5 组加入复合材料进行光动力活性研究。操作过程如下:待细胞贴壁后在治疗组加入 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的复合药物,培养 2~4 h,之后分别对 2~5 治疗组进行不同时间长度的 980 nm 光照射,在本实验中,第 2~5 组照射时间分别为 5, 10, 15, 20 min;将孔板放入细胞培养箱,继续培养 24 h,之后,吸出原培养基,经 PBS 缓冲液清洗后加入含有 MTT 的新培养基,孵育 2 h,再次移除培养基,加 DMSO 溶解晶体,通过多孔板检测仪进行光谱测试。

2 结果与讨论

2.1 复合微球的组装与描述

上转换光敏复合微球制备过程(图 1)中,首先将 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 纳米晶与 PMAO 聚合物按一定质量比均一的分散在二氯甲烷中,肽菁锌(ZnPc)光敏分子先在少量四氢呋喃溶液中溶解,再与纳米晶聚合物体系混合,这样可以利用四氢呋喃的油水双溶性增加 ZnPc 在二氯甲烷中的溶解度,使 ZnPc 与纳米晶、PMAO 共同组成微乳体系的油相。由于 ZnPc 是具有疏水性的分子,而 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 表面油酸配体以及 PMAO 聚合物都具有丰富的疏水碳链,因此,三者极易通过疏水相互作用结合,经过乳化与低温油相溶剂蒸发过程疏水部分逐渐结合就可以得到结构稳定的复合微球, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 纳米晶及微球的电镜展示在图 2 中,电镜结果显示纳米晶的平均粒径为 15 nm,复合微球尺寸分布在 200~300 nm 之间,在微球的电镜图中可以清晰的看到纳米晶之间的间隙,这是粒子与聚合物及肽菁锌共同组装的特征形貌,粒子之间被有机层隔开,表明粒子与有机分子均一的组装在一起,这样就通过简单的一步法微

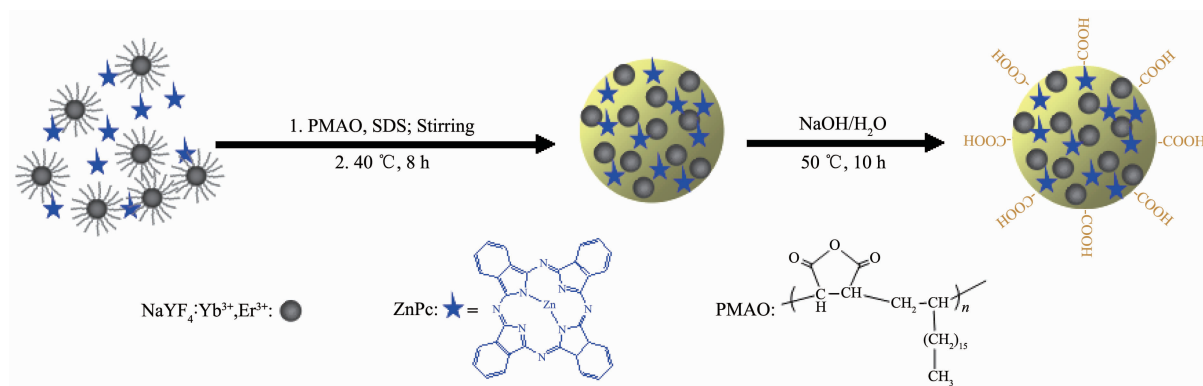


图 1 $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ 复合微球组装过程示意图

Fig.1 Schematic illustration of the self-assembly process of $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ composite microspheres

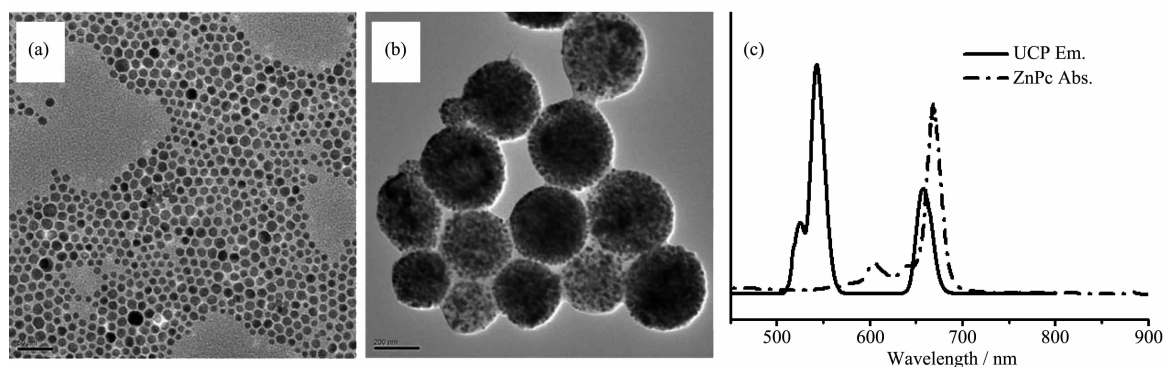


图 2 (a) $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ 纳米晶的 TEM 结果, (b) 复合微球 TEM 结果, (c) 上转换发射光谱与 ZnPc 的吸收光谱
Fig.2 (a) TEM image of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ nanocrystals; (b) TEM image of the $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ composite microspheres;
(c) Fluorescence spectra of the $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ (black line) and absorption spectra of the ZnPc (dot line)

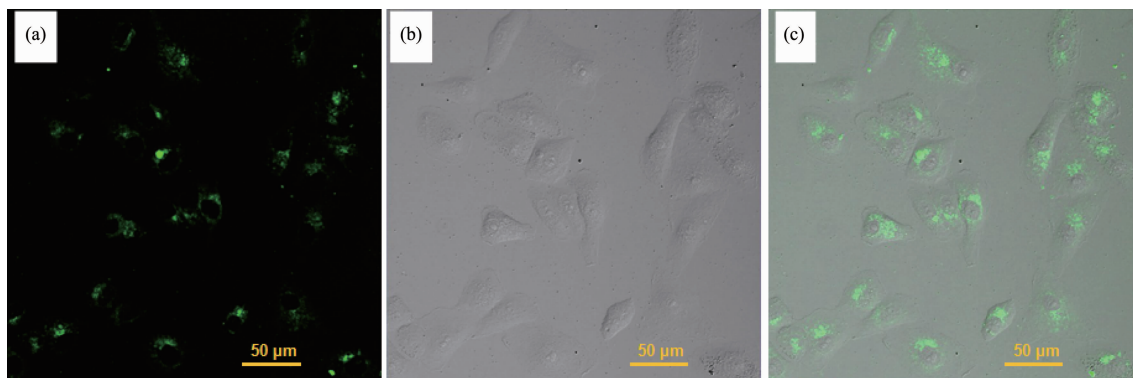
乳液组装过程,成功实现了单一颗粒内多种功能的复合。首先,微球内的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ 纳米晶具有良好的上转换发光功能,自身可以作为低生物背景荧光的光学成像剂;其次,在微球中共同组装的 ZnPc 分子可以被纳米晶的红光发射所敏化产生单线态氧,因而具有光动力活性,这样材料就具备了成像与光动力治疗的复合功能。图 2(c)展示了 980 nm 光源激发的上转换发射光谱与 ZnPc 的吸收光谱的交叠情况,光谱中光敏分子 ZnPc 的吸收与纳米晶的红光发射(650 nm)部分有良好的重叠表明其适合通过上转换发光进行敏化。

在这种复合微球设计中一个突出的优点是不需要额外的水溶性修饰,组装微球的聚合物分子中包含大量的酸酐基团,酸酐经简单的水解处理就可以使微球表面含有丰富的羧基,这些羧基不仅使 $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ 微球具有优良的亲水性,同时,也可以作为反应基团为后续的应用偶联功能分子。作为结果,微球可以均一的分散在水及 PBS 等缓冲

溶液中,在水溶液中呈现 ZnPc 的蓝色,用 980 nm 光源照射溶液可以观测到上转换发光(Supporting information 1),与 NaYF_4 纳米晶相比微球的发射光谱中红光谱带(650 nm)有轻微的降低,表明有部分能量被 ZnPc 吸收(supporting information 2)。为了进一步确定微球的表面性质,对微球进行了表面 ζ 电位测试,测试结果显示微球表面电位为 -38.7 mV (supporting information 3),强的电负性表明粒子的表面为负电性的羧基功能团。

2.2 $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ 复合微球 *Hela* 细胞成像

上转换纳米晶的激发光源为 980 nm 的近红外光,在检测中不会激发生物体的自身荧光,因此,相对于蓝紫或可见光激发的下转换发光材料,成像清晰,具有更高的信噪比。为了表征复合微球的成像功能,我们选用人癌细胞系的 *Hela* 细胞与复合微球共同孵育,通过非特异性吸附过程进行细胞成像测试,结果显示了清晰的细胞形态,上转换发光与细胞很好的符合(图 3),表明制备的微球适合用于生物成像



(a) Dark-field images; (b) Bright-field images; (c) Stack images of the dark-field and bright-field

图 3 $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ 微球用于 *Hela* 细胞共聚焦荧光成像

Fig.3 Confocal fluorescence images of the *Hela* cell

研究。

2.3 $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ 复合微球的光动力活性

为了验证复合微球的光动力活性,我们选择单线态氧检测剂 9,10-二亚甲基丙二酸蒽(ABDA)分子对单线态氧进行了检测,测试过程中将 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 微球与 ABDA 分子分散于 PBS 缓冲液中,以 980 nm 光进行照射,分别在不同时间长度进行 ABDA 的光谱检测,测试结果显示随着照射时间的延长 ABDA 发射光谱明显减弱,这是由于单线态氧($^1\text{O}_2$)能够猝灭 ABDA 发光所导致的,表明 980 nm 光照射下环境中不断有 $^1\text{O}_2$ 产生(图 4),间接的证明复合微球通过上转换发光能够敏化光敏剂产生单线态氧。以此为基础,我们进一步对微球的癌细胞光动力杀伤性能进行研究。在此之前我们选择 5 组细胞分别加入不同浓度的复合微球,采用 MTT 法对复合微球的细胞毒性进行了评价(图 5a),细胞增殖能力数据显示复合微球本身对细胞生长有一定的抑制作用,随着体系内加入微球含量的递增,对细胞增殖能力的影响逐渐增强,表明微球本身有一定的细胞毒性。我们选择毒性相对较低的浓度 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的微球进行光动力癌细胞杀伤效果的研究。将微球与 HeLa 细胞共同孵育 2~4 h 后,第 1 组样品不进行光照射,第 2~5 组用 980 nm 光源分别照射 5,10,15 与 20 min,在每组当中另取未加入复合微球的 HeLa 细胞进行相同时长的 980 nm 光源照射作为对照。之后放入细胞培养箱培养 24 h 后进行 MTT 测试(图 5b),结果显示经过 980 nm 光照射的样品细胞增殖能力明显变差,随着照射时间的延长对细胞生长的抑制效果显著增强,而未加入微球的对照组细胞增

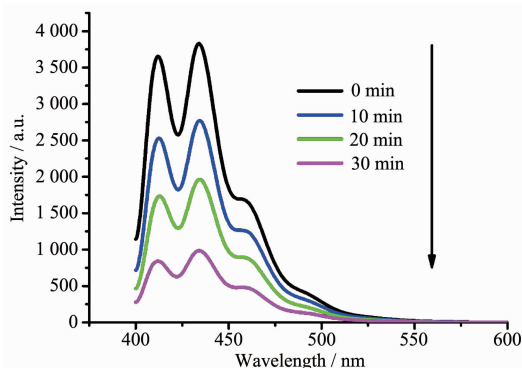


图 4 980 nm 光源不同时长照射微球对 9,10-二亚甲基丙二酸蒽发光的猝灭程度检测单线态氧

Fig.4 9,10-Anthracenedipropionic acid luminescence quenching method for the determination of singlet oxygen under 980 nm laser

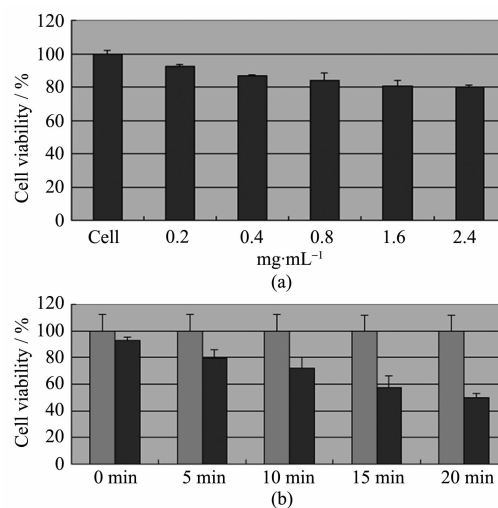


图 5 (a) MTT 法微球的细胞毒性测试; (b) 不同时间长度照射下微球对细胞增殖能力的影响(黑色柱体), 浅灰色柱体为未加入微球的细胞样品

Fig.5 (a) MTT method cancer cell viability test; (b) Cancer cell activity test under different time irradiations under 980 nm laser, containing $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ samples(black columns), without $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ samples (gray column)

殖情况正常,表明材料具有光动力活性功能,可用于潜在的生物医学治疗研究。

3 结 论

本文采用微乳液技术制备了一种集成像与光敏活性功能于一体 $\text{NaYF}_4\text{-ZnPc-PMAO}$ 复合微球,此微球具有制备方法简单,结构稳定,功能复合的特点。在微球内聚集的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 上转换纳米晶可作为低生物背景的荧光成像剂,与纳米晶紧密结合的 ZnPc 分子可作为光动力治疗的光敏药物,复合微球表面富含酸酐基团经简单的水解反应即可实现表面羧基功能化。进一步的荧光共聚焦细胞成像以及 MTT 法细胞活性测试表明复合微球适合于成像与光动力治疗等潜在生物学应用研究。

参考文献:

- [1] Celli J, Spring B, Rizvi I, et al. *Chem. Rev.*, **2010**,**110**:2795-2838
- [2] Bechet D, Couleaud P, Frochot C, et al. *Cell*, **2008**,**26**:612-621
- [3] Chatterjee D, Fong L, Zhang Y. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2008**,**60**:1627-1637
- [4] Cordeiro R, Miotto R, Baptista M. *J. Phys. Chem. B*, **2012**,

- 116**:14618-14627
- [5] Li L, Luo Z, Chen Z, et al. *Bioconjugate Chem.*, **2012**,**23**: 2168-2172
- [6] Yukruk F, Dogan A, Canpinar H, et al. *Org. Lett.*, **2005**,**7**: 2885-2887
- [7] Schmitt F, Freudenreich J, Barry N, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**,**134**:754-757
- [8] Samia A, Chen X, Burda C, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, **125**:15736-15737
- [9] Chen Z, Chen H, Hu H, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**,**130**: 3023-3029
- [10] Cui S, Yin D, Chen Y, et al. *ACS Nano*, **2013**,**7**:676-688
- [11] GAO Yuan(高渊), CAO Tian-Ye(曹天野), LI Fu-You(李富友). *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2012**,**28**(10): 2043-2048
- [12] Dev K, Abdul J, Zhang Y. *Biomaterials*, **2008**,**29**:937-943
- [13] Zhang P, Steelant P, Kumar M, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**,**129**:4526-4527
- [14] Qian H, Guo H, Ho P, et al. *Small*, **2009**,**5**:2285-2290
- [15] Guo H, Qian H, Idris N, et al. *Nanomedicine: NBM*, **2010**,**6**: 486-495
- [16] Shan J, Budijono S, Hu G, et al. *Adv. Funct. Mater.*, **2011**, **21**:2488-2495
- [17] Wang C, Tao H, Cheng L, et al. *Biomaterials*, **2011**,**32**:6145-6154
- [18] Lim M, Lee Y, Zhang Y, et al. *Biomaterials*, **2012**,**33**:1912-1920
- [19] Chatterjee D, Zhang Y. *Nanomedicine: NBM*, **2008**,**3**:73-82
- [20] Liu K, Liu X, Zeng Q, et al. *ACS Nano*, **2012**,**6**:4054-4062
- [21] Qian H, Zhang Y. *Langmuir*, **2008**,**24**:12123-12125