第 34 卷第 11 期
2018 年 11 月

无 机 化 学 学 报
CHINESE JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRY

Vol.34 No.11
1943-1949

二氧化硅–共聚物杂化荧光纳米材料用于动物活体成像

张泽芳[1] 袁 薇[2] 徐 明[2] 易 韬*,[3] 张善端[1] 李富友*,[2]

([1]复旦大学先进照明技术教育部工程研究中心,上海 200433)

([2]复旦大学化学系,上海 200433)

([3]复旦大学附属华山医院中西医结合科,上海 200040)

摘要:以氧化硅(SiO_2)前驱体与三嵌段共聚物 F108 合成较小粒径的 SiO_2-共聚物杂化纳米体系(SNP),并与高效近红外发射的疏水染料 M507 自组装,构建了近红外发光纳米探针 M507@SNP。同时,研究了 M507@SNP 的光物理性能和细胞毒性。动物成像实验证明该纳米成像探针可实现活体层次高信噪比的小动物全身成像和前哨淋巴结的指示。

关键词:杂化复合材料;荧光成像;空心二氧化硅粒子;近红外荧光染料

中图分类号:O613.72 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-4861(2018)11-1943-07

DOI:10.11862/CJIC.2018.250

Silica-Copolymer Hybrid Nanocomposite for Animal Bioimaging

ZHANG Ze-Fang[1] YUAN Wei[2] XU Ming[2] YI Tao*,[3] ZHANG Shan-Duan[1] Li Fu-You*,[2]

([1]*Engineering Research Center of Advanced Lighting Technology, Ministry of Education, Fudan University, Shanghai* 200433, *China*)

([2]*Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai* 200433, *China*)

([3]*Department of Integrative Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai* 200040, *China*)

Abstract: Near-infrared nanometer probe (M507@SNP) is obtained by monomer self-assembly between silica precursor and triblock copolymer F108 and then doping hydrophobic near-infrared dye M507. The photophysical properties and cytotoxicity of M507@SNP are investigated. Furthermore, M507@SNP is used as a fluorescent nanoprobe for monitoring whole-body and sentinel lymph node of rodents with high signal-to-noise.

Keywords: hybrid composite; fluorescent bioimaging; hollow silica nanoparticle; near-infrared dye

0 引 言

目前,光学成像具有无创性、实时、高分辨率的特点,在疾病的早期诊断和具有重要意义,其中近红外(near-infrared,NIR)成像其发射波长位于 700~1 000 nm,在该范围内生物组织自发荧光较少,吸收低,近年来成为生物成像研究的热点。NIR 染料应用于生物成像可最大限度的降低背景干扰,增加组织穿透深度[1-2]。如小分子染料吲哚菁绿(indocyanine green,ICG)作为造影剂已被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,FDA)批准应用于临床手术导航和淋巴结的指示。但大部分 NIR 染料发光效率底、水溶性差、在生物体内造影时间短[3]。因此将纳米材料对 NIR 染料进行包裹,有利于克服上述局限性,拓展其在生物医药领域的应用[4-5]。

近年来,纳米材料功能化后被用作诊断和治疗的工具,在疾病的诊疗领域被广泛关注[6-8]。比如基于纳米结构的造影剂被大量开发,用于对病理结构进行高信噪比的成像[9-10]。其中二氧化硅(SiO_2)纳米颗粒

收稿日期:2018-05-14。收修改稿日期:2018-09-05。

国家重点基础研究发展计划(No.2017YFA0205100)项目资助。

*通信联系人。E-mail:fyli@fudan.edu.cn, yt13817969911@163.com

作为一种生物相容性好的非金属无机材料，尤其是介孔 SiO_2 纳米材料具有较大的孔容和比表面积，在酶固定、药物递送、生物成像等方面显示出广阔的应用前景[11-13]。目前，荧光 SiO_2 纳米材料的常用合成方法是先制备介孔 SiO_2 粒子，再将荧光染料吸附到 SiO_2 的介孔孔道中[14-15]。该方法存在荧光染料容易从孔道中脱附的弊端，而且所制备的荧光 SiO_2 纳米材料因表面无特殊功能化，容易被网状内皮系统(reticulo-endothelial system，RES)识别，并在肝脏、脾脏、肺等器官中长期蓄积，造成机体的长期毒性[16]。

本文利用三嵌段共聚物(Pluronic F108)和氧化硅前驱体合成单体，后通过自组装，获得内部中空的氧化硅聚合物杂化纳米体系[17-18]。由于嵌段共聚物为两亲性的 PEO_{132}-PPO_{50}-PEO_{132}，聚环氧乙烷(poly(ethylene oxide)，PEO)链可伸展于纳米颗粒表面，形成配体，与后修饰的 PEG 配体相比，合成方法更简单，不受修饰位点限制，密度更高，能有效阻止 RES 系统的识别和截获，有助于氧化硅纳米材料获得更长的循环时间。聚环氧丙烷(poly(propylene oxide)，PPO)与氧化硅前驱体共价连接，组装时形成疏水空腔，疏水染料或药物与 PPO 通过疏水–疏水相互作用，形成较为稳定的结构，不易从空腔中逃逸，功能化的杂化氧化硅纳米体系得以构建[19]。在此我们使用易挥发的溶剂环己烷作为扩孔剂，温和条件下可被完全除去，以获得更大的中空结构，负载更多疏水染料或药物。我们进一步合成了一种发光效率高的 NIR 疏水染料 M507，通过疏水–疏水作用简单、快捷地将 M507 负载在氧化硅–共聚物杂化纳米颗粒内部空腔中，构建了小尺寸的近红外纳米探针(图 1)，并在活体层次开展尾静脉注射后的动物整体成像实验和足垫注射后的前哨淋巴结成像实验。

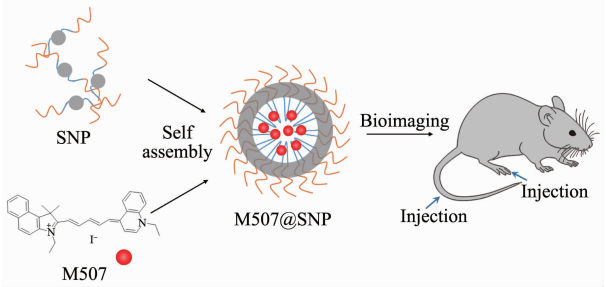


图 1 荧光复合纳米材料 M507@SNP 的构建过程和活体成像示意图

Fig.1 Schematic illustration of the synthetic strategy of the fluorescent nanocomposite M507@SNP and its application in animal imaging

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

N-聚丙二醇与环氧乙烷嵌段共聚物(Pluronic F108)、四乙氧基硅烷(tetraethoxysilane，TEOS)、二乙氧基二甲基硅烷(dimethyldimethoxysilane，DEDMS)，盐酸(HCl)，胺丙基三乙氧基硅烷(aminopropyl triethoxysilane，APES)，均购买自 Sigma-Aldrich 化学试剂公司。丙二醛双苯亚胺单盐酸盐(malo-naldehyde bis(phenylimine) monohydrochlride)购买自百灵威科技有限公司。以上药品均为分析纯，使用过程中不需要进一步提纯。实验用水均为去离子水。碘化 1-乙基-2，3，3-三甲基苯并吲哚盐和 1-乙基-4-甲基喹啉碘化物照文献[20]的方法合成。

人宫颈癌细胞 HeLa 细胞购买自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。4 周大的雌性 Balb/c 裸鼠购买自上海斯莱克实验动物有限公司。动物实验流程均符合动物管理与使用委员会的规则标准。

利用透射电子显微镜 JEOLJEM-2010F(TEM，200 kV)表征纳米材料的尺寸和形貌，将纳米材料分散在水中，取一滴于铜网上，自然晾干后进行表征。

紫外吸收光谱于 PTI 公司的 QM40 稳态/瞬态荧光光谱仪上测试。荧光发射光谱于 Edinburgh 公司的 LFS920 荧光光谱仪上测试。粒径分布于 Malvern 公司的纳米粒度-Zeta 电位分析仪上进行测试。绝对量子效率于 Hamamatsu instrument 公司的 C13532-12 Quantaurus-QY plus 测量系统进行测试。

1.2 近红外染料 M507 的合成和表征

染料 M507 按照图 2 所示的路线合成。在 50 mL 三口烧瓶中，分别加入 1.3 g 1-乙基-2，3，3-三甲基苯并吲哚碘化物 1.0 g 丙二醛双苯亚胺单盐酸盐(物质的量之比为 1∶1.1)，然后加入 20 mL 醋酸酐(Ac_2O)，1 mL 醋酸(AcOH)，0.5 g 醋酸钾(AcOK)，在氮气氛围下，于 90 ℃持续搅拌反应 2 h，然后再加入 0.9 g 1-乙基-4-甲基喹啉碘化物继续反应 2 h。将反应液冷却至室温后加入到 200 mL 水中，搅拌并缓慢加入碳酸氢钠至无气泡产生。使用二氯甲烷萃取后加入无水硫酸钠干燥，旋干除去溶剂后，得到的粉末以二氯甲烷和甲醇为洗脱液 (二氯甲烷与甲醇体积之比为 10∶1)，在硅胶柱上分离提纯，得到目标染料 M507。染料的结构通过质谱与核磁进行确认，并计算产率为 52%。

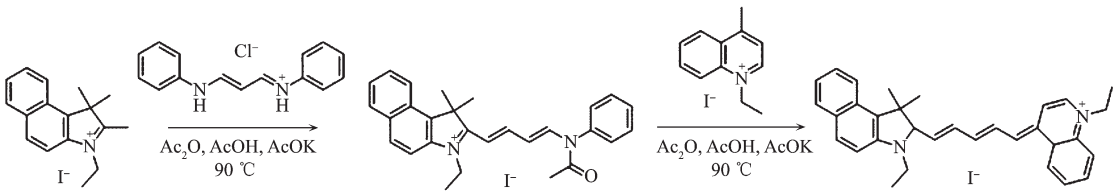


图 2　染料 M507 的合成路线示意图

Fig.2　Synthetic route of NIR dye M507

1.3　SNP 杂化纳米材料的合成

嵌段共聚物 F108 与二氯甲烷(质量之比为 2:1)分散于 30 mL 的 2.0 mol·L^{-1} 盐酸溶液中,充分搅拌 30 min 后,得到透明溶液;再加入 1.0 mL 四乙氧基硅烷(TEOS),15 min 后再加入二乙氧基二甲基硅烷(DEDMS),同时加入一定量的环己烷作为扩孔剂,持续搅拌 3 h。充分透析去除杂质,然后在 50 ℃下旋蒸去除二氯甲烷,将所得的二氧化硅–聚合物杂化纳米复合材料(SNP)分散在水中保存。

1.4　复合纳米探针 M507@SNP 的制备

将 1.5 mg 的 M507 染料溶于 50 μL 二氯甲烷中,将此溶液注入 SNP 水溶液(浓度为 10 mg·mL^{-1})中,超声使其分散均匀;然后在 50 ℃下,旋蒸去除二氯甲烷;产物在水中分散,透析洗去游离的 M507 染料,得到纳米复合材料 M507@SNP。

1.5　细胞毒性评估

根据文献[21],在体积百分数为 5% CO_2 和 95% 空气氛中,37 ℃下孵育 12 h。待 HeLa 细胞贴壁后,用 DMEM (Dulbecco′s Modified Eagle Medium)培养液稀释不同浓度的 M507@SNP,培养箱中孵育 24 h。分别在每个孔里加入 20 μL 浓度为 5 mg· mL^{-1} 的 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,MTT)溶液,将 96 孔板继续孵育 4 h,在每个孔里加入二甲亚砜(DMSO) 100 μL,在培养箱中放置 20 min 后,用酶标仪测试 96 孔板中每个孔在 490 nm 处的吸收光强度(即 OD490 值)的吸收光强度。用以下公式计算细胞存活率:

$$\text{Cell viability}=\frac{OD_{Sample}-OD_{Blank}}{OD_{Control}-OD_{Blank}}\times 100\%$$

其中 Cell viability 为细胞存活率,OD_{Sample}、OD_{Blank} 和 $OD_{Control}$ 分别为样品的 OD490 平均值、空白的 OD490 平均值和对照的 OD490 平均值。

1.6　裸尾静脉注射 M507@SNP 的活体成像实验

向健康 4 周龄雌性 Balb/c 裸鼠尾静脉注射 0.2 mL 的 M507@SNP(1.0 mg·mL^{-1})溶液。注射 24 h 后对小鼠进行麻醉,在小动物活体成像系统中进行成像[22],激发波长为 730 nm,功率密度为 40 mW·cm^{-2},收集波长为(800±12) nm。通过断颈处死小鼠后,剖开其腹部,暴露主要器官,再次进行荧光成像。

1.7　M507@SNP 用于前哨淋巴结成像实验

向健康 4 周龄雌性 Balb/c 裸鼠的右侧足垫注射 0.02 mL 的 M507@SNP(1.0 mg·mL^{-1})溶液。注射 24 h 后对小鼠进行麻醉,在小动物活体成像系统中成像,激发波长为 730 nm,功率密度为 40 mW·cm^{-2},收集波长为(800±12) nm。通过断颈处死小鼠后,剖开其腿部皮肤,暴露前哨淋巴结,再次进行荧光成像。

2　结果与讨论

2.1　二氧化硅纳米复合材料 SNP 的表征

合成的二氧化硅–聚合物杂化纳米复合材料 SNP 通过透射电镜对其形貌和粒径进行表征。图 3a 为由三嵌段共聚物 F108 和氧化硅前驱体自组装形成的纳米结构,环己烷的加入可作为扩孔剂得到空心结构。SNP 为粒径均一的单分散空心纳米球状颗粒,其直径约为 31 nm。动态光散射(DLS)测试表明该粒子约为 41 nm,如图 3b 所示。所制备的纳米材料 SNP 具有空心结构,内部空腔直径约为 10 nm,为后续负载有机染料 M507 提供了可能性。

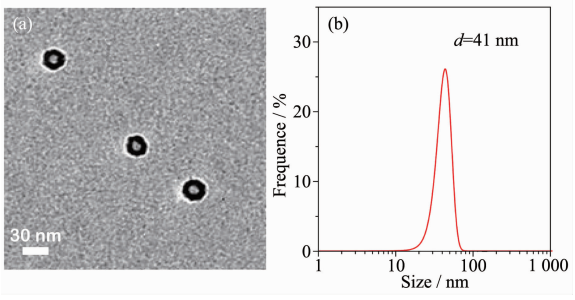


图 3　纳米材料 SNP 的 TEM 照片 (a)和 DLS 粒径分布图 (b)

Fig.3　TEM image (a) and size distribution (b) of the SNP nanoparticle

2.2　近红外染料 M507 的结构和发光性质

基于先前的工作[23],我们以 Cy5.5 为基础,将苯

并吲哚替换为喹啉来设计近红外染料分子,合成了喹啉-苯并吲哚结构的 M507。我们使用质谱和核磁对 M507 的结构进行了确认, 如图 4 所示,M507 对应的最强峰位置在 445.190 8,图 5 的 ^{1}H NMR 谱图都能很好地对应解释,证明了产物的纯度。^{1}H NMR (400 MHz,$CDCl_3$):δ 9.45(d,J=6.6 Hz,1H),8.40(d,J=8.3 Hz,1H),8.13(d,J=8.4 Hz,2H),7.95~7.84(m,5H),7.72(t,J=7.4 Hz,1H),7.58(t,J=7.0 Hz,1H),7.57(dd,J=14.2,7.1 Hz,1H),7.44~7.33(m,1H),7.19(d,J=8.7 Hz,1H),7.00 (d,J=13.9 Hz,1H),6.50 (t,J=12.3 Hz,1H),5.77(d,J=12.9 Hz,1H),4.93~4.81(m,2H),3.99(s,2H),1.71(t,J=7.1 Hz,3H),1.60(s,6H),1.42(s,3H)。

我们考察了 M507 染料的吸收性质和荧光性质。图 6 给出了 M507 在二氯甲烷中的紫外可见吸收与荧光发射光谱。其最大吸收峰位于 738 nm,其发射峰位于 820 nm。相比于对称的染料 Cy5,用喹

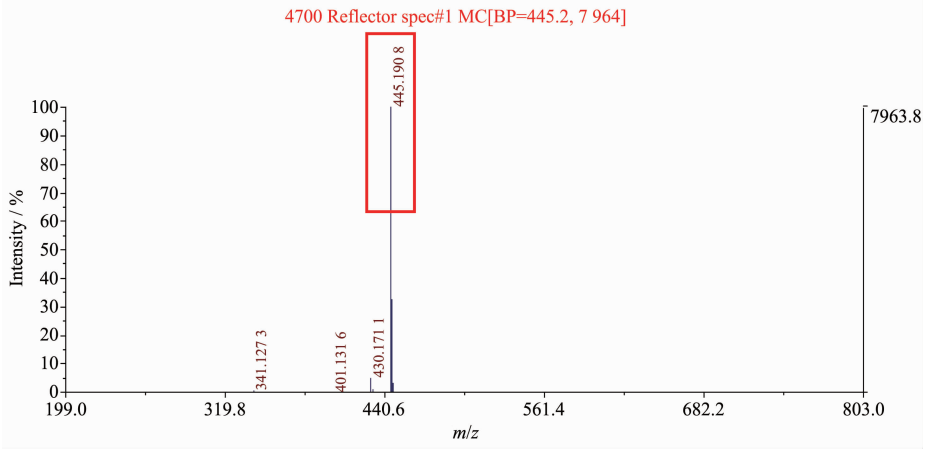


图 4 M507 的 MALDI-TOF 谱图

Fig.4 MALDI-TOF spectrum of M507

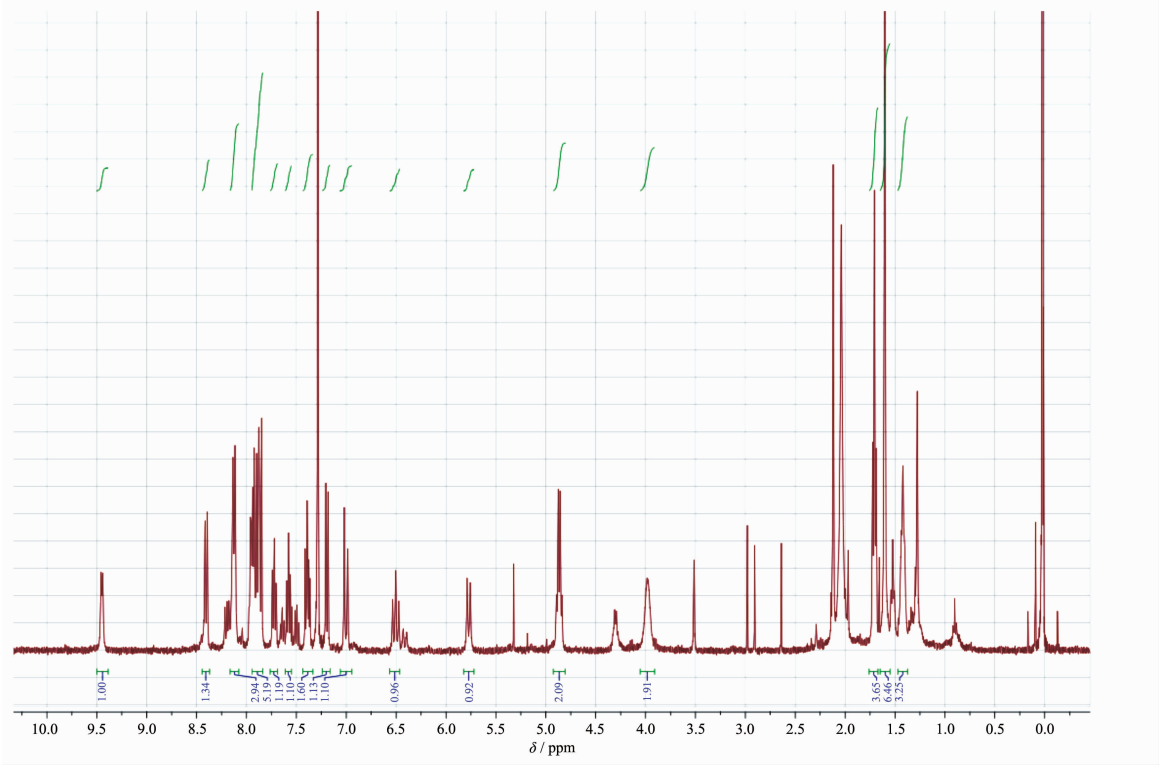


图 5 M507 的 ^{1}H NMR 谱图

Fig.5 ^{1}H NMR spectrum of M507

啉盐替代一个苯并吲哚盐后，其最大吸收比 Cy5 (λ_{abs}=678 nm) 红移了 60 nm，相应地，发射峰红移 120 nm。M507 的光谱发生明显的红移,比 FDA 批准容许临床使用的染料 ICG 的发射波长更长,为后续纳米探针的构建和生物成像实验的开展提供了新的思路。而且,通过绝对量子效率测量系统测出 M507 在 DMSO 中的绝对量子效率高达 10.1%。经过比尔–朗伯定律计算得到 M507 吸收的摩尔消光系数为 8×10^4 L·mol^{-1}·cm^{-1}。

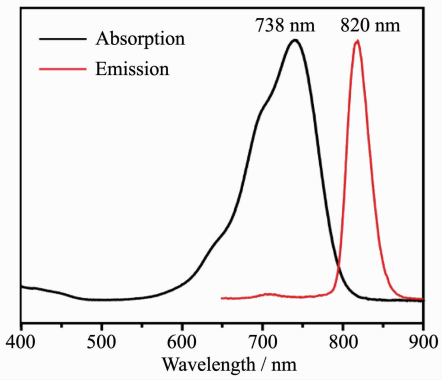
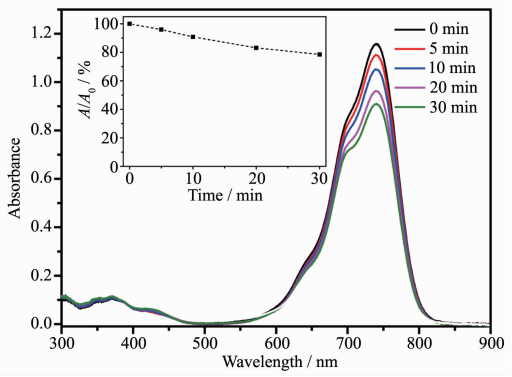


图 6　染料 M507 在二氯甲烷中的紫外–可见吸收与荧光发射光谱

Fig.6　Absorption spectrum and emission spectrum of the dye M507 in dichloromethane

2.3　近红外纳米材料 M507@SNP 的发光稳定性研究

成像探针的发光稳定性对其能否在活体层次进行长时间的成像起着决定性作用。我们通过紫外吸收光谱对构建的近红外纳米材料 M507@SNP 的光稳定进行监测。图 7 给出了 M507@SNP 在比较苛刻的条件 (较高的光功率密度:730 nm 激光,300 mW·cm^{-2};无氮气保护)下的连续光照(30 min)时的光稳定性数据。在 30 min 的连续光照下,染料的吸光度仅下降约 20%，表明即使在苛刻的实验条件下,M507@SNP 仍显示了良好的光稳定性。由于每次生物成像时激光照射时间较短(<0.5 min),因此,激光照射造成的光漂白影响(<0.4%)几乎可忽略不计。



A is the absorbance with illumination t min and A_0 is the absorbance without illumination

图 7　M507@SNP 的紫外–可见吸收光谱随 730 nm 激光光照时间的变化图

Fig.7　Change in absorption spectra of the M507@SNP solution under illumination of 730 nm laser with different times

2.4　M507@SNP 的细胞安全性评估

作为荧光成像探针,必须评估 M507@SNP 自身的细胞安全性。我们利用 MTT 毒性分析法,测试了不同浓度的 M507@SNP 对 HeLa 细胞的生理毒性。如图 8 所示，当 M507@SNP 浓度高达 1.0 mg·mL^{-1} 时,细胞存活率仍能保持在 80%以上,表明纳米探针 M507@SNP 具有良好的生物相容性,可用于进一步活体实验。

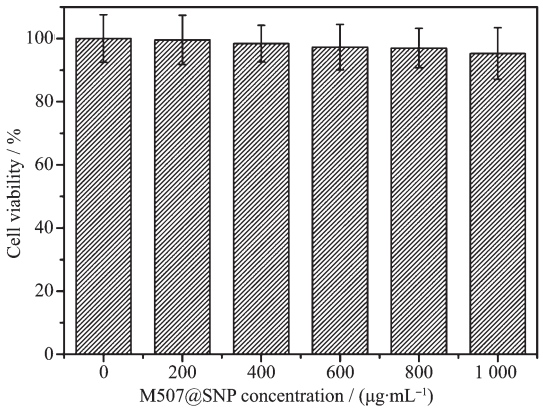
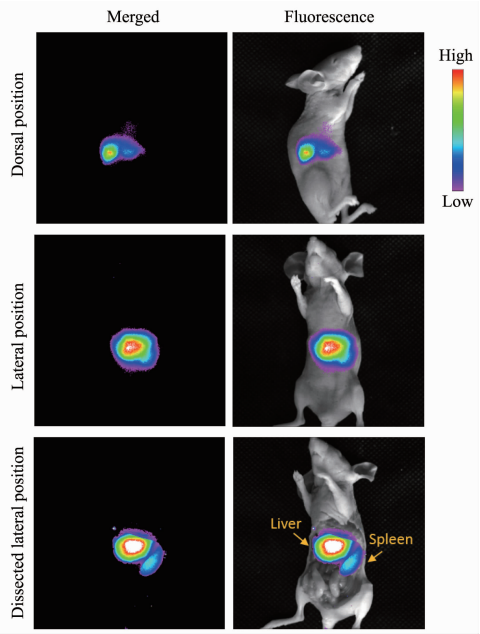


图 8　通过 MTT 测试确定 M507@SNP(200~1 000 μg·mL^{-1}) 的细胞增殖影响, 孵育温度为 37 ℃, 孵育时间为 24 h

Fig.8　Cell viability (%) estimated by MTT proliferation tests versus different incubation concentrations of M507@SNP (200~1 000 μg· mL^{-1}) at 37 ℃ for 24 h

2.5　M507@SNP 用于生物成像实验

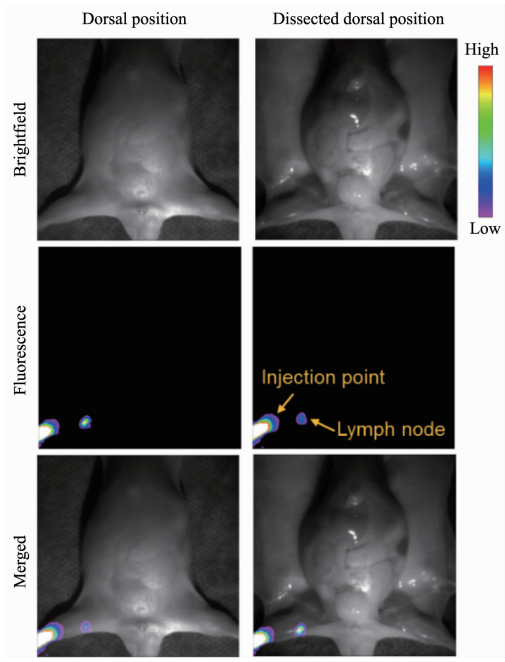
在活体层次上，我们开展了纳米探针 M507@SNP 的小鼠尾静脉注射成像实验，并利用 M507 的近红外荧光信号((800±12) nm)对动物体内的纳米探针进行成像跟踪。图 9 给出了纳米探针 M507@SNP 注射 24 h 后进行的成像实验结果,从图 9 可知,组织的自发荧光对荧光成像没有任何影响;即使在未解剖的条件下,肝脏和脾脏区域均显现出强烈的荧光信号。解剖后肝脏和脾脏处的荧光信号更明显,且轮廓清晰,这是由于 2 个器官含有大量



Excitation wavelength is 730 nm and signal collection wavelength is (800±12) nm

图 9 经尾静脉注射 M507@SNP 后 24 h 的动物整体荧光成像

Fig.9 Whole-body bioimaging of the mouse injected intravenously with M507@SNP solution



Excitation wavelength is 730 nm and signal collection wavelength is (800±12) nm

图 10 小鼠右侧足垫注射 M507@SNP 后 24 h 时的前哨淋巴结成像

Fig.10 *In vivo* lymphatic node fluorescence imaging of the paw of the nude mouse of injected with M507 @SNP solution under illumination at 730 nm

巨噬细胞,为网状内皮系统的主要器官,因此纳米探针会在肝脏和脾脏处富集。

为了进一步验证 M507@SNP 在活体层次对前哨淋巴结造影的效果,我们在小鼠右侧足垫注射了纳米探针 M507@SNP,并在注射后 24 h 进行活体成像。如图 10 所示,引流的前哨淋巴结显示强烈的荧光信号,淋巴结轮廓清晰完整,信噪比高。上述的活体成像结果表明,负载了近红外染料的氧化硅–聚合物杂化纳米材料 M507@SNP 能够在活体层次实现高信噪比的器官和淋巴结成像。

3 结 论

本文通过引入 4-喹啉盐作为受体,合成了发光效率较高、波长更长、稳定性较好的近红外有机染料 M507,通过将三嵌段共聚物 F108 和氧化硅的前驱体连接形成单体,采用自组装的方法,形成中空结构的氧化硅纳米球,加入疏水染料 M507,成功构建了近红外荧光纳米探针。由于嵌段共聚物两亲性的性质,亲水段向外保证纳米探针在水相中的分散性,疏水段向内形成空心结构,并与负载的疏水染料经过疏水–疏水相互作用,形成较为稳定的结构,避免 M507 的逃逸,并实现了活体层次的器官呈现和前哨淋巴结成像。所制备的纳米探针中染料 M507 最大发射峰位于近红外波段 820 nm,比传统染料 Cy5 的发射波长红移了 120 nm,在 DMSO 中的绝对量子效率高达 10.1%,为构建长波长的近红外荧光染料提供了新的思路。而且,该荧光纳米探针在苛刻条件下表现出较强的光稳定性,可用于小动物的整体荧光成像和前哨淋巴结成像,有望在疾病诊断领域有良好的应用前景。

参考文献:

[1] Boens N, Leen V, Dehaen W. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**,**41**(3): 1130-1172

[2] Antaris A L, Chen H, Cheng K, et al. *Nat. Mater.*, **2016**,**15** (2):235-242

[3] Zhu H, Fan J L, Du J J, et al. *Acc. Chem. Res.*, **2016**,**49** (10):2115-2126

[4] Pansare V J, Hejazi S, Faenza W J, et al. *Chem. Mater.*, **2012**,**24**(5):812-827

[5] Wolfbeis O S. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**,**44**(14):4743-4768

[6] Xie J, Lee S K, Chen X Y. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2010**, **62**(11):1064-1079

[7] Chen G Y, Roy I, Yang C H, et al. *Chem. Rev.*, **2016**,**116**(5):2826-2885

[8] Davis M E, Chen Z, Shin D M. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2008**,**7**(9):771-782

[9] Biju V. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**,**43**(3):744-764

[10]Yuan W, Yang D P, Su Q Q, et al. *Adv. Funct. Mater.*, **2016**,**26**(47):8631-8642

[11]Vallet-Regi M, Balas F, Arcos D. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**,**46**(40):7548-7558

[12]Song N, Yang Y W. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**,**44**(11):3474-3504

[13]TIAN Shu-Fang(田淑芳), ZOU Xue-Yan(邹雪艳), LU Hai-Tao(卢海涛), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2015**,**31**(7):1329-1334

[14]Mekaru H, Lu J, Tamanoi F. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2015**,**95**:40-49

[15]Yue Q, Li J L, Luo W, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**,**137**(41):13282-13289

[16]Yu M X, Zheng J. *ACS Nano*, **2015**,**9**(7):6655-6674

[17]Zhao L Z, Yuan W, Huijun P T, et al. *Small*, **2017**,**13**(29):1700963

[18]Chua Y T, Lin C X, Kleitz F, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**,**3**(19):10480-10491

[19]Kamaly N, Yameen B, Wu J, et al. *Chem. Rev.*, **2016**,**116**(4):2602-2663

[20]Wang Z S, Li F Y, Huang C H, et al. *J. Phys. Chem. B*, **2000**,**104**(41):9676-9682

[21]Guadagnini R, Kenzaoui B H, Walker L, et al. *Nanotoxicology*, **2015**,**9**:13-24

[22]Liu Q, Feng W, Yang T S, et al. *Nat. Protoc.*, **2013**,**8**(10):2033-2044

[23]Yang H R, Han C M, Zhu X J, et al. *Adv. Funct. Mater.*, **2016**,**26**(12):1945-1953