

叶酸受体靶向的 CdTe/CdS 量子点荧光探针的制备和表征

江珊珊¹, 谢民强¹, 符小艺²

(1. 南方医科大学珠江医院耳鼻咽喉头颈外科, 广东广州 510280; 2. 华南理工大学材料学院, 广东广州 510640)

摘要:【目的】研制一种叶酸受体修饰的 CdTe/CdS 量子点荧光探针并初步验证其靶向性。【方法】以巯基丁二酸(MSA)为稳定剂, 采用水相合成法合成 CdTe/CdS 核壳型量子点。利用紫外分光光度计、荧光分光光度计、X 线粉末衍射仪、透射电镜分别对其紫外吸收情况、光致发光性质、晶体结构、形貌进行表征。采用连接了叶酸的氨基聚乙二醇与 CdTe/CdS 量子点偶联, 制备叶酸受体靶向的(FA-PEG-CdTe/CdS)量子点荧光探针。通过凝胶电泳和光谱分析鉴定偶联效果。在荧光倒置显微镜下观察已知细胞表面叶酸受体阳性的鼻咽癌细胞株 HNE-1 和人喉癌细胞株 Hep-2 及叶酸受体阴性的鼻咽癌细胞株 CNE-2 和 FA-PEG-CdTe/CdS 量子点探针的摄取情况。通过观察分析不同细胞被标记的情况去检验荧光探针的靶向性和特异性。【结果】以巯基丁二酸为稳定剂, 当 pH = 10, 物质的量比为 $n(\text{Te}^{2-}):n(\text{Cd}^{2+}):n(\text{MSA}) = 1:10:10.5$ 的条件下, 随加热回流反应时间的延长, CdTe 量子点的粒径不断增长, 吸收光谱和光致发光谱不断红移。在反应 10 min 时获得了量子产率高达 72.5% 的 CdTe 量子点; X 射线粉末衍射图显示出对应立方晶型 CdTe 的三个晶面(111), (220), (311), 透射电子显微镜下呈近似球形, 粒径分布较均匀, 平均粒径约为 3 nm(反应 10 min)。琼脂糖凝胶电泳和荧光光谱分析证实 CdTe/CdS 量子点与 PEG-FA 成功偶联, 荧光显微镜下显示出叶酸受体阳性的 HNE-1、Hep-2 被 FA-PEG-CdTe/CdS 量子点荧光探针特异性标记。【结论】CdTe 量子点可作为新型的荧光标记材料, 核壳型 CdTe/CdS 量子点与叶酸偶联后稳定性较好, FA-PEG-CdTe/CdS 量子点荧光探针具有良好的靶向性, 在高表达叶酸受体的肿瘤诊断和治疗方面具有良好的应用前景。

关键词: 量子点; 分子靶向; 叶酸; CdTe/CdS; 荧光探针; 鼻咽癌; 喉癌

中图分类号: R739.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)03-0331-08

Synthesis and Characterization of Folate Targeting CdTe/CdS Quantum Dots Fluorescent Probe

JIANG Shan-shan¹, XIE Ming-qiang¹, FU Xiao-yi²

(1. Department of Otolaryngology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; 2. School of Material Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: 【Objective】 To develop a CdTe/CdS quantum dots fluorescent probe (FA-PEG-CdTe/CdS) modified with folate receptor and to detect its targeting. 【Methods】 CdTe/CdS QD were synthesized in aqueous phase by using mercaptosuccinic acid (MSA) as stabilizer and linker. The spectral properties were investigated via fluorescence spectrophotometer and UV spectrophotometry. Crystal composition was determined via X-ray diffraction. Morphology of the prepared QD was determined on a transmission electron microscopy (TEM). The folate receptor targeting quantum dots fluorescent probe FA-PEG-CdTe/CdS was made by coupling CdTe/CdS QD with FA-PEG-NH₂. The Coupling effect was evaluated by agarose gel electrophoresis and spectral analysis. The cellular uptake in FR-positive human nasopharyngeal carcinoma cells (HNE-1 cells) and FR-negative human nasopharyngeal carcinoma cells (CNE-2 cell) for FA-PEG-CdTe/CdS was found by means of inverted fluorescence microscopy. We can test the targeting property and specificity by observing the mark situation of different cells which cultured in different medium. 【Result】 In the condition of pH = 10, $n(\text{Te}^{2+}):n(\text{Cd}^{2+}):n(\text{MSA}) = 1:10:10.5$, with reaction time prolonging, the diameters of MSA-stabilized CdTe is increasing and the adsorption spectra and emission spectrum is constantly red shifting but the fluorescence quantum yield of CdTe QD is decreasing.

收稿日期: 2013-01-03

基金项目: 国家自然科学基金(21103052); 教育部高校博士点基金(20114433110001); 广东省自然科学基金(10251051501000001)

作者简介: 江珊珊, 硕士, 研究方向: 量子点医学应用, E-mail: jiangshansh08@126.com; * 通信作者, 谢民强, 教授, 博士生导师, E-mail: min_qiang_x@hotmail.com

The quantum yield of CdTe QD had reached 72.5% in the reaction of ten minutes. The XRD patterns of MSA-stabilized CdTe had proved the corresponding (111), (220), (311) lattice faces of cubic crystal CdTe. The picture of TEM show the CdTe particle size distribution is uniform and the average particle diameter is 3 nm (10 min). The agarose gel electrophoresis and spectral analysis proved that CdTe/CdS-PEG-FA is Stable. From the result of inverted fluorescence microscopy, FR-positive HNE-1, Hep-2 can be specific marked by FA-PEG- CdTe/CdS. 【Conclusion】 CdTe quantum dots can be used as a new fluorescent marking material. FA-PEG- CdTe/CdS have a good stability and targeting property and the value of the folate receptor targeting QD applying in diagnosis and therapy of cancers in which the FA receptor (FR) is over expressed is brilliant.

Key words: quantum dots (QD); molecular target folic acid (FA); CdTe/CdS; fluorescent probe; nasopharyngeal carcinoma; laryngocarcinoma

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(3):331-338]

量子点(quantum dots, QD)是纳米尺度原子和分子的集合体,粒径范围在 2 ~ 20 nm 之间,一般由 II-VI 族或 III-V 族元素组成。因其介于体相材料与分子间的物质状态,故展示出许多特殊的光、电、磁、催化等性质^[1-2]。近年来,量子点的研究备受关注,其应用领域越来越广泛,特别是其在免疫生物学和临床检验学等研究中显示出潜在的良好应用前景^[3-4]。在生物医学的应用中,量子点和传统有机荧光染料相比具有以下特性:激发光谱宽而连续,吸光系数大,荧光强度高,荧光发射峰窄而对称,无长波拖尾等,而且量子点不同的组成或粒径大小具有不同颜色的荧光,这样就可以在同一激发光下获得不同颜色的标记成像。利用上述特点可以合成高品质的量子点荧光探针^[5-9]。II-VI 型量子点有高量子效率和质量光发射^[10],随尺寸改变在可见光区具有宽的发射范围,而 CdTe 量子点发射光谱随尺寸变化可覆盖整个可见光区,从而成为研究热点之一^[11]。在量子点应用方面,量子点的量子产率和稳定性对其应用有最直接的影响。因此,如何合成高量子产率的量子点成为 CdTe 量子点研究的重要课题之一。研究表明^[12-13]:不同的 pH、稳定剂及 Cd、Te、稳定剂之间比例均对量子点的量子产率及稳定性产生较大影响。国内外很多学者有这方面研究,例如:Zhao 等^[12]通过改变 Cd 与 Te 的物质的量之比,将 CdTe 量子点的荧光量子产率提高到 34%;Shavel 等^[14]通过改变 Cd 与 TGA 的物质的量之比及反应的 pH 值,合成了荧光量子产率为 50% 的 CdTe 量子点。癌症是严重威胁人类健康的疾病之一,仅仅 2008 年大约有 1270 万新增病例,760 万患者死于癌症^[15]。目前降低癌症死亡率的最佳途径就是早期诊断。叶酸(folic acid, FA)是一种人体必需的维生素,它

主要通过叶酸受体转运,除了在脉络丛、胎盘、肺、胸腺、肾脏中叶酸受体低水平表达外,在大多数正常组织极少表达^[16]。而在许多肿瘤包括头颈部肿瘤组织中叶酸受体呈高水平表达^[17]。我们课题组前期研究发现鼻咽癌细胞株 HNE-1、喉癌组织及细胞株 Hep-2 也高表达叶酸受体^[18-19]。基于叶酸受体表达的组织分布特点、叶酸与叶酸受体的高度亲和性,为叶酸受体介导的肿瘤荧光探针检测和靶向治疗提供了良好的分子基础。为了寻找一种新的鼻咽癌早期诊断方法,我们首先采用水相合成法,以巯基丁二酸为稳定剂,在 pH=10, $n(\text{Te}^{2+}):n(\text{Cd}^{2+}):n(\text{MSA})=1:10:10.5$ 条件下合成了一种稳定的量子产率高达 72.5% 的 CdTe 量子点,再通过双氨基聚乙二醇(PEG(NH₂)₂)作为偶联中介,制备了偶联叶酸的量子点荧光探针,并对高表达叶酸受体的鼻咽癌细胞进行体外标记成像研究,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

CNE-2, 中山大学动物实验中心细胞库提供; HNE-1 和 Hep-2, 中南大学细胞库提供; 碲粉(Te 纯度为 99.99%, 购于 Sigma 公司), 硼氢化钠(NaBH₄, AR 级)、氯化镉(CdCl₂, AR 级)、巯基丁二酸(MSA, AR 级)、硫化钠(Na₂S, AR 级)、聚乙二醇(PEG₂₀₀₀, AR 级)均购于上海晶纯试剂有限公司, 氢氧化钠(NaOH, AR 级)、氯化氢(HCl, CP 级), 购自国药集团上海化学试剂公司; 叶酸(FA, AR 级), 购自广东光华化学厂有限公司; F-4500 型紫外分光光度计(Hitachi 日本)、F-4500 型荧光分光光度计(Hitachi 日本)、JEM-2010HR 透射电镜

(JEOL 日本)、D8-advance X 线粉末衍射仪(Bruker 德国)、倒置荧光显微镜(Nikon 日本)。

1.2 无壳和核壳型量子点的合成及纯化

1.2.1 Te 前驱液的制备 称取碲粉 0.025 g, 硼氢化钠 0.04 g 装入乳胶塞密闭的小试管中, 注入 3 mL 去离子水, 留一小排气孔, 超声处理 20 min 后静置 1 h。反应过程中溶液由紫色渐渐变为粉红色, 再变为无色透明, 气泡也渐渐减少。

1.2.2 CdTe 量子点的制备 称取 CdCl_2 0.35 g, 巯基二丁酸 0.3 g, 溶于 100 mL 蒸馏水中, 用 1 mol/L NaOH 溶液调节溶液的 pH 值到 10。把溶液加入 100 mL 三颈瓶中, 通氩气 30 min 后, 把新鲜制备的 NaHTe 快速加入到氩气保护下的 CdCl_2 溶液中, 溶液的颜色变成透明淡酒红色, 室温搅拌 20 min 后开始加热, 分别在加热反应 5、15、20、30 min 取样检测荧光强度, 全部反应在氩气保护下完成。

1.2.3 CdTe/CdS 制备 将已纯化干燥的 CdTe 量子点溶于 80 mL 去离子水中, 加入 CdCl_2 0.23 g, 巯基二丁酸 0.1 g 后搅拌至溶液为透明橙色, 1 mol/L NaOH 调整 pH 至 8.5。通氩气搅拌 20 min 后开始以 0.05 mL/min 的速度缓慢滴加 20 mg/mL 的 Na_2S 水溶液 1 mL, 然后加热 30 min (此过程持续通氩气)。

1.2.4 量子点纯化 在制备好的量子点溶液中加入 3 倍体积的异丙醇后, 4 000 r/min ($r = 16$ cm) 离心 10 min, 弃去上清液, 加入 30 mL 去离子水, 再重复上述过程, 得到的沉淀在室温下真空干燥。

1.3 量子点的表征

利用紫外分光光度计检测量子点的紫外吸收度; 荧光分光光度计检测量子点的荧光发射光谱 (条件: $E_x = 365$ nm, $E_m = 500 \sim 700$ nm, Scan Speed: 1200 nm/min, E_x Slit: 5 nm, E_m Slit: 5 nm, PMT voltage: 400 V); 透射电镜观察量子点粒径及分散情况; 利用 X 线粉末衍射仪确定量子点晶体结构。

1.4 PEG₂₀₀₀-FA 的合成

参照胡海梅等^[20]的方法合成端氨基聚乙二醇 [diaminopolyethylene glycol, PEG₂₀₀₀ (NH_2)₂], 将已干燥好的 PEG₂₀₀₀ 20 g 溶于 20 mL 无水二氯甲烷和 50 mL 无水吡啶的混合溶剂中, 然后在冰水浴条件下逐滴加入含 11.4 g 对甲基苯磺酰氯的无水二氯甲烷溶液 80 mL 中。体系在避光条件下室温反应 24 h。然后用等体积的 3 mol/L 的 HCl 溶液萃取。

有机相用 10 g NaHCO_3 洗涤后过滤, 滤液旋转蒸发, 得到对甲基苯磺酸酯修饰的 PEG。将上述产物 16 g 溶于 200 mL 氨水中 (25% ~ 28%), 在高压反应釜中于 80 °C 条件下反应 24 h。待体系冷却至室温, 然后用等体积的 CH_2Cl_2 萃取。收集有机相, 将其与 100 mL 1 mol/L 的 NaOH 混合并搅拌 2 h, 然后再用水将有机相洗涤至中性。旋转蒸发后得到双氨基聚乙二醇。

按 Ohguchi 等^[21]报道的方法制备 FA-PEG₂₀₀₀-NH₂, 0.58 g FA 溶于 30 mL 无水二甲基亚砜中, 搅拌条件下加入二环己基碳二亚胺 0.8 g 及 N-羟琥珀酰亚胺 0.23 g, 搅拌反应 4 h, 使 FA 的羧基活化。然后加入双氨基聚乙二醇 (PEG₂₀₀₀ (NH_2)₂) 2.4 g, 搅拌反应 8 h, 使 FA 活化的羧基与 PEG₂₀₀₀ 端氨基相连接。反应结束后加入双蒸水 120 mL, 过滤除去不溶物后, 产物冷冻干燥。

1.5 合成并检测 QD-PEG-FA

1.5.1 制备 QD-PEG-FA 取纯化后 0.01 g/mL 的 CdTe/CdS 量子点 1 mL, 5 mg/mL 的 EDC 水溶液 30 μL , 5 mg/mL 的 NHS 水溶液 60 μL , 轻度振荡 10 min, 再加入 100 μL 的 PEG₂₀₀₀-FA (5 mg/mL), 稍振荡后 4 °C 静置反应 6 h。用分子质量为 10 ku 的过滤管离心 10 min (4 000 r/min, $r = 16$ cm), 取内套管液体。

1.5.2 琼脂糖凝胶电泳 以丙三醇作为沉淀剂 (样品: 丙三醇 = 3 : 1), 各取 15 μL 样品 (见实验结果), 分别加入琼脂糖凝胶中电泳, 电泳条件: PB 缓冲液, 65 V, 100 mA, 90 min。

1.6 量子产率的计算

室温下的荧光量子产率以罗丹明 6G (荧光量子产率为 95%) 作参比来测定。即通过测量 CdTe 量子点和罗丹明 6G 的稀水溶液在同一激发波长下的积分荧光强度和对该波长光的吸光度, 并按下式计算荧光量子产率^[22]:

$$Y_u = Y_s \times F_u \times A_s / (F_s \times A_u)$$

式中, Y_u 和 Y_s 分别表示待测物和参比物的荧光量子产率, F_u 和 F_s 分别表示待测物和参比物的积分荧光强度, A_u 和 A_s 分别表示待测物和参比物对该激发波长的入射光的吸光度。测定时, 激发波长为 365 nm, 激发和发射狭缝均为 3.0 nm。

1.7 细胞培养

将生长状态良好的鼻咽癌细胞 HNE-1 (FA 受体表达阳性)、CNE-2 (FA 受体表达阴性) 和人喉

癌细胞 Hep-2(FA 受体表达阳性),消化离心后用 RPMI-1640 全培养基制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$,接种于 24 孔板内,每孔体积 500 μL 。贴壁生长 24 h 后吸弃所有孔内的培养基,以 PBS 液洗涤一次后分别加入以 500 μL 的 RPMI-1640 稀释的 QD、QD-PEG、QD-PEG-FA (表 1)共培养 6 h。吸弃全部培养液体,PBS 液充分洗涤去除未被摄取的各种试剂。甲醇溶液-20 $^{\circ}\text{C}$ 固定 20 min,双蒸水充分洗涤后置荧光倒置显微镜下观察。

2 结 果

2.1 合成 CdTe 量子点的特性测定

成功制备出稳定的荧光量子产率高达 72.5% 的 CdTe 量子点。水相合成中随着反应时间的延

表 1 细胞实验设计

Table 1 Cell experiment design						
Group	1	2	3	4	5	6
HNE-1	a	b	c ₁	c ₂	c ₃	d
CNE-2	a	b	c ₁	c ₂	c ₃	d
Hep-2	a	b	c ₁	c ₂	c ₃	d

a: 1 mg/mL QD; b: 1 mg/mL QD-PEG; c: QD-PEG-FA (c₁: 1 mg/mL, c₂: 0.5 mg/mL, c₃: 0.25 mg/mL); d: RPMI-1640

长,所得到的 CdTe 量子点的粒径不断增大,吸收光谱和光致发光谱不断红移。在 365 nm 的紫外光的激发下,发射光由绿色逐渐变为黄色、橙色、红色(图 1);而量子点的激发波长范围很宽,激子吸收峰非常明显,当加热反应回流时间为 5、15、20、30 min 时,量子点的吸收峰依次为 508、540、554、567 nm(图 2A);量子点的发射光谱窄,光致发光

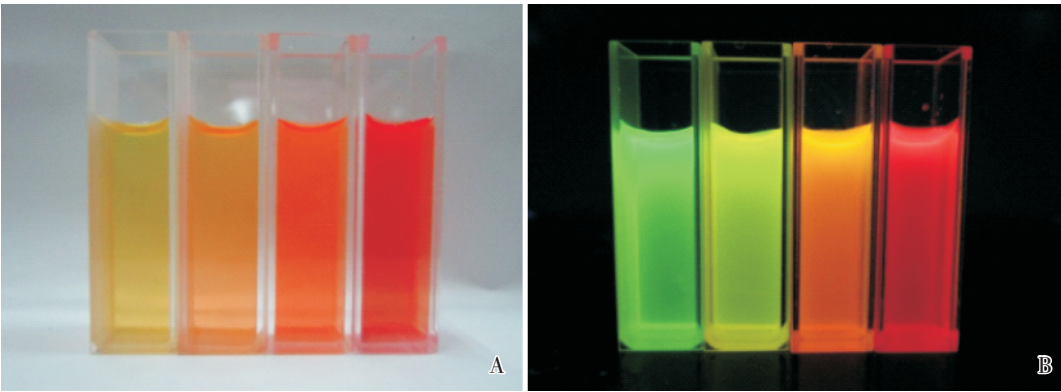


图 1 不同粒径的 CdTe 量子点白光(A)和紫外光(B)下的照片
Fig.1 Fluorescence in various time synthesized CdTe quantum dots

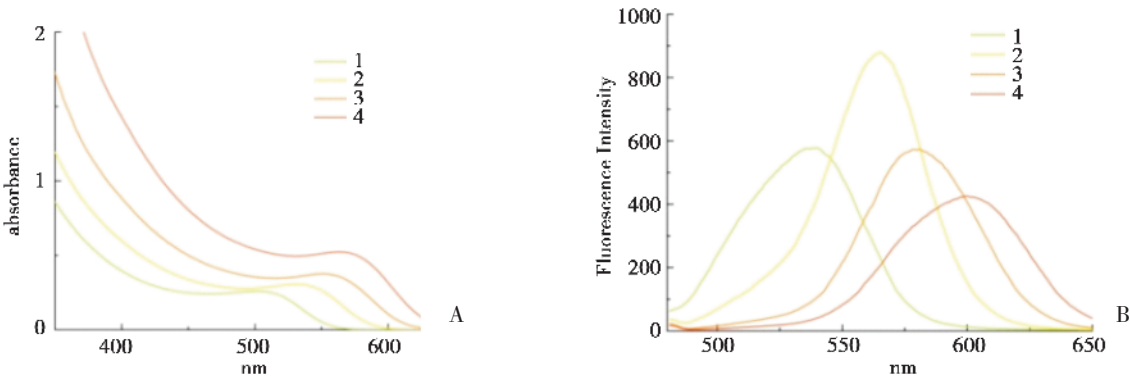


图 2 不同时间点合成的 CdTe 量子点的吸收光谱(A)和光致发光光谱(B)
Fig.2 Absorption(A) and fluorescence emission spectra (B) of CdTe QD synthesized in different time
1: 5 min; 2: 15 min; 3: 20 min; 4: 30 min

峰对称、稳定,最大荧光发射波长分别为 540、565.2、579 和 615.2 nm(图 2B),经计算后对应的荧光量子产率分别为 72.5%、69.94%、62.0%、29.85%。根据文献^[22]计算得四种量子点样品的粒径分别为 2.55、3.12、3.28、3.40 nm。加热回流 10 min 合成的 CdTe 量子点的 X 射线粉末衍射图在 2θ 值为 24.449、40.695、48.799 处出现了三个峰(图 3),与立方晶型 CdTe 的(111),(220),(311)三个晶面形成良好的对应,由于量子点的粒径较小,导致峰变宽。在透射电子显微镜下可以观察到 CdTe 纳米微粒呈近似球形,粒径分布较均匀,平均为 3 nm 左右(图 4)。

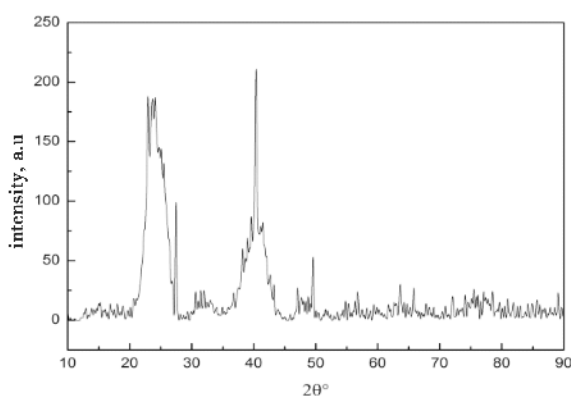


图3 CdTe 量子点粉末的 XRD 图

Fig.3 The XRD diagram of CdTe QD powder

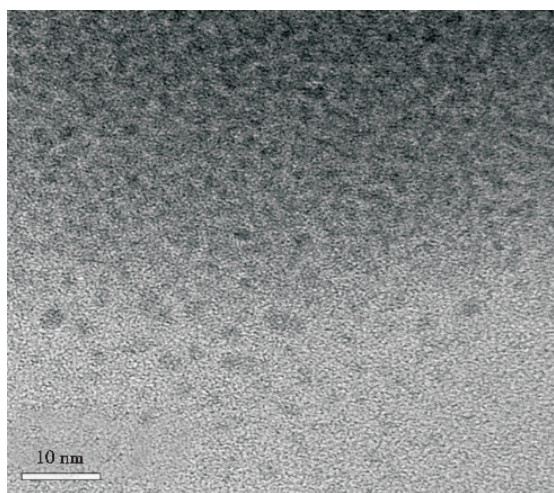


图4 CdTe 量子点的电镜照片

Fig.4 HRTEM image of CdTe QD synthesized in 10 min

CdTe/CdS 量子点是在已纯化干燥的 CdTe 量

子点的基础上合成的,图 5 中显示了在反应 10 min 时合成的 CdTe 基础上继续合成的 CdTe/CdS 量子点(反应 5、10、20、30 min)的光致发光光谱,随着反应时间的延长光致发光光谱不断红移,说明量子点粒径不断增大,也说明了 CdS 壳核结构的形成。我们合成的量子点(CdTe、CdTe/CdS),液体状态下密封保存在 4℃条件下,半年内未出现沉淀、荧光强度减弱等变化,状态非常稳定。

2.2 量子点荧光探针合成稳定性鉴定

制备好的 QD-PEG-FA 超滤离心纯化后,采用光致发光光谱测定(图 6)和琼脂糖凝胶电泳(图 7)证实,QD-PEG-FA 量子点荧光探针偶联效果良好。从图 6 中可看出 CdTe 量子点偶联生物大分子后,光致发光光谱红移,荧光强度下降。图 7 显示叶酸(条带 4)本身无明显的紫外激发光,而 PEG 和 PEG-FA 有自身发光(蓝色,条带 2、3);氨基 PEG 带正电,电泳过程中向负极泳动。从条带 2、3、4 中我们可以看出,连接 FA 后,由于 FA 表面的羧基带负电,PEG 的极性被改变,PEG-FA 向正极泳动,表明 PEG 与 FA 连接满意。由于有部分未连接的 PEG 没能从偶联反应体系中去掉(实验条件所致),故条带 2 有微量向负极泳动而出现蓝光;条带 1、7 分别和 3、8 比较后显示:QD-PEG 偶联是成功的,但有少量未反应完全的 PEG 未能从反应体系中去掉而出现向负极泳动的蓝光;条带 5 呈现桔黄拖尾荧光,分别与条带 6、7、8 和 2 比较表明 QD-PEG-FA 连接稳定,反应产物中 PEG-FA 残留较少。纯化后的叶酸受体靶向的 CdTe/CdS 量子点荧光探针在 4℃水溶液及细胞培养液(RPMI-1640)中储存 3 个月内未见沉淀及荧光减弱。

2.3 量子点荧光探针合成靶向性鉴定

鼻咽癌细胞 HNE-1、CNE-2 和人喉癌细胞 Hep-2 与含有 QD、QD-PEG、QD-PEG-FA 培养液共培养 6 h 后,荧光显微镜下观察可见:①叶酸受体阳性鼻咽癌细胞 HNE-1(图 8 A、B)和喉癌细胞 Hep-2(图 8 C、D)近 100%的细胞膜表面均可见较强的荧光标记,不同种类的细胞荧光强度稍有差别。而叶酸受体表达阴性的鼻咽癌细胞 CNE-2(图 8 E、F)则未见明显荧光标记。②鼻咽癌细胞 HNE-1、喉癌细胞 Hep-2、人鼻咽癌细胞 CNE-2 和 QD、QD-PEG 共培养 6 h 后,细胞表面未见明显的荧光标记。我们的叶酸受体靶向的量子点荧光探针标记细胞后放置 1 周,仍可见荧光。

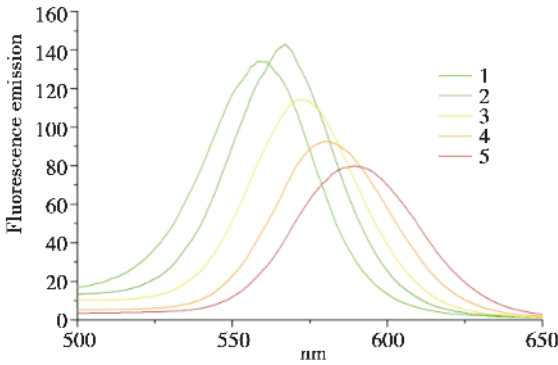


图 5 不同时间点合成的 CdTe/CdS 量子点的光致发光光谱
Fig.5 Fluorescence emission spectra of CdTe/CdS QD synthesized in different time
1: 0 min (CdTe); 2: 5 min; 3: 10 min; 4: 20 min; 5: 30 min

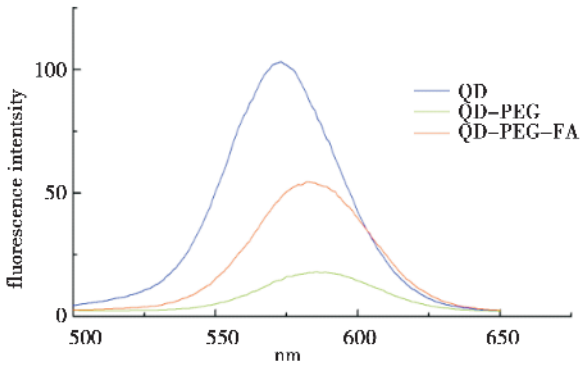


图 6 QD 量子点、QD-PEG、QD-PEG-FA 的光致发光光谱
Fig.6 Fluorescence emission spectra of QD, QD-PEG and QD-PEG-FA
QD was CdTe/CdS.

3 讨 论

癌症是严重威胁人类生命的疾病之一，早期发现与治疗是目前降低癌症死亡率最有效的方法,因此,研究癌症的早期诊断具有重要的临床意义。叶酸受体在绝大多数正常组织中极少表达,而



图 7 琼脂糖凝胶电泳照片
Fig. 7 The photo of agarose gel electrophoresis
1: QD-PEG; 2: PEG-FA; 3: PEG; 4: FA; 5: QD-PEG-FA; 6: QD-PEG+FA; 7: QD-PEG; 8: QD. QD was Cd Te/CdS.

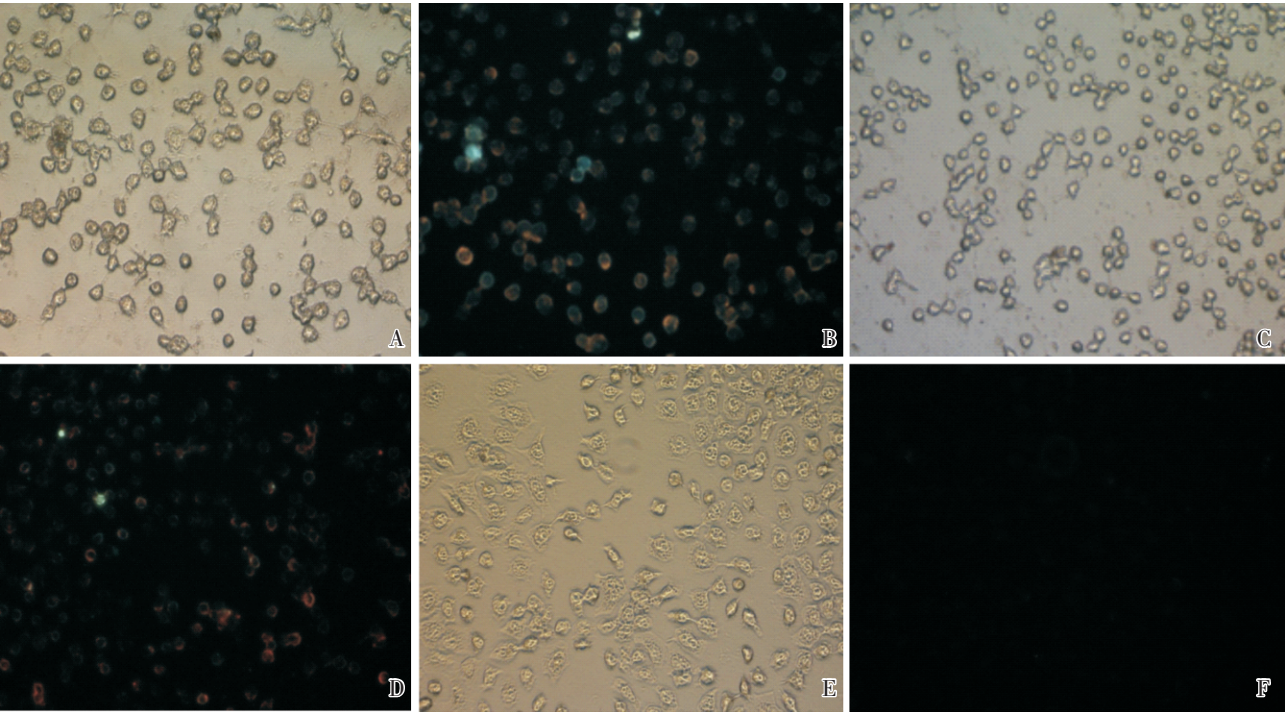


图 8 与 QD-PEG-FA 共培养 6 h 后白光和紫外光激发下的细胞图像
Fig.8 Image of cells in light and ultraviolet after cultivated with QD-PEG-FA
A, B: HNE-1, $\times 400$; C, D: Hep-2, $\times 200$; E, F: CNE-2, $\times 400$; A, C, E; in light; B, D, F; in ultraviolet.

在许多肿瘤包括头颈部肿瘤组织中高表达^[17]。受体和其配体的结合具有较强的特异性、选择性。作为荧光标记物,量子点有其独特的优势,较普通荧光染料的荧光强度高,耐光漂泊,而量子点荧光探针具有良好的荧光性和较强的稳定性,可较长时间保存,He 等^[23]以牛血清白蛋白(BSA)作为中介制备了 FA-BSA-QD,Valérie 等^[24]采用高分子聚合物(polymer spacer)作为偶联剂制备了偶联 FA 的量子点,但量子产率均不高。我们采用水相化学合成法、合成了产率高达 72.5%的量子点,以 PEG 作为修饰材料,成功制备了叶酸和量子点偶联的荧光探针,在 4℃水溶液及细胞培养液(RPMI-1640)中保存了 3 个月,未见沉淀及荧光减弱。标记细胞后放置 1 周,仍可见荧光,提示 CdTe/CdS 量子点与叶酸偶联后的叶酸受体靶向的量子点荧光探针稳定性良好,可长时间保存。但其光致发光光谱较原先的量子点红移,荧光强度也下降,这也反过来证明 QD-PEG-FA 偶联效果较好。我们分析光致发光光谱红移的原因可能是偶联后产物的粒径增大,量子点明显的介电限域效应所致;荧光强度下降的原因,一方面可能是在偶联包覆过程中量子点表面的部分配体脱落及部分团聚;另一方面可能是偶联限制了量子点表面电子的活跃造成的。

从荧光显微镜观察的结果可以看出,共培养 6 h 后,叶酸受体表达阳性的 HNE-1 细胞被 QD-PEG-FA 特异性标记,而酸受体表达阴性的细胞 CNE-2 未见明显标记,提示我们制备的量子点荧光探针 QD-PEG-FA 的叶酸受体靶向性良好,有望应用于叶酸受体表达阳性肿瘤细胞荧光成像和叶酸受体介导的肿瘤靶向治疗研究中。由于不同粒径的量子点在同一激发光下可产生不同颜色的发射光谱(图 1),因此我们可利用这一特性,在后期研究中将多种不同粒径的量子点标记不同的靶向分子,在同一激发光下可观察到同一细胞中不同分子受体的表达情况。

实验中我们发现:最子点偶联生物大分子后荧光强度减弱,在今后的研究中可以在改善最子点合成工艺或增加表面修饰、改善偶联条件等方面来降低其荧光强度下降程度。我们的叶酸受体

靶向的最子点荧光探针,具有极好的生物相容性和靶向性,但对细胞仍有部分毒性作用,需在今后研究中通过表面改性等方式减小其毒性作用,使其更好的应用于生物医学当中。

(致谢:衷心感谢中山大学高分子化学系、中山大学测试中心、华南理工大学材料学院、南方医科大学珠江医院中心实验室的大力协助)

参考文献:

- [1] Wilson WL, Szajowski PF, Brus LE. Quantum confinement in size-selected Surface-oxidized silicon nanocrystals[J]. Science, 1993, 262(5137): 1242-1244.
- [2] Bruchez M Jr, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels [J]. Science, 1998, 281(5385): 2013-2016.
- [3] 徐海娥, 闰翠娥. 水溶性量子点的制备及应用[J]. 化学进展, 2005, 7(5): 800-808.
Xue HE, Yan CE. Preparation and Application of Water-Soluble Quantum Dots[J]. Progr Chem, 2005, 7(5): 800-808.
- [4] 林章碧, 苏星光, 张皓, 等. 用水溶液中合成的量子点作为生物荧光标记物的研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(2): 216-220.
Lin ZB, Su XG, Zhang H, et al. Studies on Quantum Dots Synthesized in Aqueous Solution for Biological Labeling [J]. Chem Res Chin Univ, 2003, 24(2): 216-220.
- [5] Xie YH, Gilmer GH, Roland C, et al. Semiconductor Surface Roughness: Dependence on Sign and Magnitude of Bulk Strain [J]. Phys Rev Lett, 1994, 73(22): 3006-3009.
- [6] Tersof J, Terehert C, Lagally MG. Self organization in growth of quantum dot superlattices [J]. Phys Rev Lett, 1996, 76(10): 1675-1678.
- [7] Pehlke E, Moll N, Kley A, et al. Shape and stability of quantum dots[J]. Appl Phys, 1997, A 65: 525-534.
- [8] APetz R, Vescan L, Hartmann A, et al. Photoluminescence and electroluminescence of SiGe dots fabricated by island growth[J]. Appl Phys Lett, 1995, 66(4): 445-447.
- [9] 彭英才. 半导体量子点的自组织生长及其应用 [J].

- 半导体杂志, 1999, 24(3): 40-50.
- Peng YC. Self organized growth of semiconductor quantum dots and its applications [J]. Semiconductor magazine, 1999, 24(3): 40-50.
- [10] Chen CJ, Wang XZ, Bellani V. Study on Photoluminescence Spectra of $\text{Cd}_{1-x}\text{Mn}_x\text{Te}/\text{CdTe}$ Diluted Semiconductor Superlattices with High Mn Compositions [J]. Spectrosc Spectr Anal, 2006, 26(3): 396-398.
- [11] Qin YB, Yang X, Yu JS. Synthesis and characterization of CdTe nanoparticles stabilized by cysteamine[J]. Chin J Inorgan Chem, 2006, 22(5): 851-855.
- [12] Zhao K, Li J, Wang HZ, et al. Stoichiometric ratio dependent photoluminescence quantum yields of the thiol capping CdTe nanocrystals[J]. J Phys Chem C, 2007, 111(15): 5618-5621.
- [13] Liu YF, Yu JS. Selective synthesis of CdTe and high luminescence CdTe/CdS quantum dots: the effect of ligands[J]. J Colloid Interface Sci, 2009, 333(2): 690-698.
- [14] Shavel A, Gaponik N, Eychmüller A. Factors governing the quality of aqueous CdTe nanocrystals: calculations and experiment[J]. J Phys Chem B, 2006, 110(39): 19280-19284.
- [15] Ahmedin JDVM, Freddie B, Melissa M, et al. Global cancer statistics[J]. CA: A Cancer J Clinicians, 2011, 61(2): 69-90.
- [16] Sudimack J, Lee RJ. Targeted drug delivery via the folate receptor[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 41(2): 147-162.
- [17] Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines: Physiologic and clinical implications[J]. Cancer, 1994, 73(9): 2432-2443.
- [18] 张宏征, 谢民强, 李仲汉, 等. 叶酸受体在鼻咽癌组织及细胞中的表达与意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(6): 833-836.
- Zhang HZ, Xie MQ, Li ZH, et al. Expression of folate receptor in the tissues and cells of nasopharyngeal carcinoma [J]. China J Modern Med, 2009, 19(6): 833-836.
- [19] 陈燕, 陈鸿雁. 叶酸受体在鼻咽癌细胞系及鼻咽癌组织中的表达[J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(7): 627-628.
- Chen Y, Chen HY. Expression of folate receptor in nasopharyngeal carcinoma cell line and in nasopharyngeal carcinoma tissue[J]. J Oncol, 2009, 15(7): 627-628.
- [20] 胡海梅, 潘仕荣. 聚乙二醇单甲醚-聚 L-赖氨酸嵌段共聚物的合成及其表征[J]. 功能高分子学报, 2005, 18(4): 623-629.
- Hu HM, Pan SR. Synthesis and Characterization of the block copolymers of poly(1-lysine) with poly(ethylene glycol) monomethyl ether[J]. J Funct Polymers, 2005, 18(4): 623-629.
- [21] Ohguchi Y, Kawano K, Hattori Y, et al. Selective delivery of folate-PEG-linked, nanoemulsion-loaded aclinomycin A to KB nasopharyngeal cells and xenograft: effect of chain length and amount of folate-PEG linker[J]. Drug, 2008, 16(9): 660-667.
- [22] Crosby GA, Demas JN. Measurement of photoluminescence quantum yields[J]. Jphys Chem, 1971, 75(8): 991-1024.
- [23] Yu WW, Qu LH, Guo WZ, et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals[J]. Chem Mater, 2003, 15(14): 2854-2860.
- [24] Meng H, Chen JY, Mi L. Conjugates of folic acids with BSA-coated quantum dots for cancer cell targeting and imaging by single-photon and two-photon excitation[J]. J Biol Inorg Chem, 2011, 16(1): 117-123.
- [25] Gérard VA, Maguire CM, Bazou D, et al. Folic acid modified gelatine coated quantum dots as potential reagents for in vitro cancer diagnostics [J]. J Nanobiotechnol, 2011, 9(1): 50-57.

(编辑 刘清海)