

文章编号: 1000-7032(2025)10-1884-12

基于三线态-三线态湮灭的上转换纳米粒子制备及性能研究

郭兰英^{1†}, 陈妍^{2†}, 彭洪尚^{2*}

(1. 皖南医学院 医学影像学院, 安徽 芜湖 241002;

2. 中央民族大学 理学院, 北京 100081)

摘要: 为了解决传统三线态-三线态湮灭(TTA)上转换体系的水分散性差、氧敏感性强及光稳定性不足等瓶颈问题,开发了基于中空介孔二氧化硅纳米粒子(HMSNs)的固态上转换探针(TTA-UCNPs)。通过反相微乳液法和选择性刻蚀技术制备了HMSNs载体,利用其空腔限域效应共负载铂八乙基卟啉(PtOEP)敏化剂与9,10-二联苯蒽(DPA)湮灭剂,并通过酰胺反应进行聚乙二醇-叶酸(PEG-FA)双功能化修饰以提升生物相容性与靶向性。实验结果表明,HMSNs的纳米限域效应显著抑制氧气猝灭(氧敏感性降至6.4%,较有机相体系降低约10.3倍);THF/H₂O混合溶剂洗涤优化分子排布后,441 nm处峰值上转换荧光强度提升约3.5倍;体系在低激发功率下(阈值~5 mW·cm⁻²)呈现非线性发光特性,且光稳定性优异;细胞实验证实其实低毒性(250 μg·mL⁻¹时,HepG2细胞存活率>84%)及高效胞内靶向成像能力。本研究为构建高效稳定的低功率激发生物成像探针提供了新策略。

关键词: 上转换纳米粒子; 荧光探针; 生物成像; 三线态-三线态湮灭; 中空介孔二氧化硅纳米粒子

中图分类号: O482.31 文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20250143

CSTR: 32170.14. CJL.20250143

Preparation and Performance Research of Upconversion Nanoparticles Based on Triplet-Triplet Annihilation

GUO Lanying^{1†}, CHEN Yan^{2†}, PENG Hongshang^{2*}

(1. School of Medical Imageology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China;

2. College of Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

* Corresponding Author, E-mail: hspeng@bjtu.edu.cn

Abstract: This study aims to solve the bottleneck problems of the traditional triplet triplet annihilation (TTA) up-conversion system, such as poor water dispersion, strong oxygen sensitivity and insufficient photostability, and develop solid-state upconversion probes (TTA-UCNPs) based on hollow mesoporous silica nanoparticles (HMSNs). HMSNs carriers were prepared by reverse microemulsion method and selective etching technology. Platinum octaethyl porphyrin (PtOEP) sensitizer and 9,10-diphenylanthracene (DPA) annihilator were co-loaded on the HMSNs carriers using the cavity confinement effect, and polyethylene glycol folate (PEG-FA) bifunctional modification was carried out by amide reaction to improve the biocompatibility and targeting. The experimental results show that the nano confinement effect of HMSNs significantly inhibits oxygen quenching (oxygen sensitivity decreases to 6.4%, which is about 10.3 times lower than that of organic phase system). After washing the optimized molecular arrangement with THF/H₂O mixed solvent, the peak upconversion fluorescence intensity at 441 nm increased by about 3.5 times. At low excitation power (threshold ~5 MW·cm⁻²), the system exhibits nonlinear luminescence characteristics and

收稿日期: 2025-05-07; 修订日期: 2025-05-19

基金项目: 安徽省高等学校科学研究项目(2023AH051760); 皖南医学院博士科研基金(WYRCQD2022002); 企业合作项目(XQHR202416, H202422)

Supported by Natural Science Research Project for Anhui Universities of the Key Scientific Research Foundation of the Education Department of Anhui Province (2023AH051760); Foundation of Doctoral Scientific Research of Wannan Medical College (WYRCQD2022002); Enterprise Cooperation Projects (XQHR202416, H202422)

†: 共同贡献作者

excellent optical stability. Cell experiments confirmed its low toxicity (HepG2 cell survival rate >84% at 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and high-efficiency intracellular targeting imaging ability. This study provides a new strategy for the construction of efficient and stable low-power excitation biological imaging probe.

Key words: upconversion nanoparticles; fluorescent probe; bioimaging; triplet-triplet annihilation; hollow mesoporous silica nanoparticles

1 引 言

上转换发光是一种能够将低能量光子转换为高能量光子发射的反斯托克斯过程^[1],自 1966 年 Auzel 在稀土掺杂玻璃中发现以来^[2],在生物医学成像领域展现出独特价值^[3-5]。传统稀土掺杂上转换纳米体系虽可实现近红外至可见光转换,但其光子吸收截面小、量子产率低且依赖高功率相干光源等缺陷限制了其临床应用^[6-8]。基于三线态-三线态湮灭 (Triplet-triplet annihilation, TTA) 机制的新型上转换体系,凭借低激发功率需求、无需相干光及波长可调谐等优势,成为突破现有技术瓶颈的重要方向^[9-11]。

TTA 上转换过程依赖于敏化剂吸收光子形成三线态(T_1),通过三线态-三线态能量转移 (Triplet-triplet energy transfer, TTET) 激发湮灭剂,两个湮灭剂 T_1 态激子发生湮灭产生高能单线态激子(S_1)并发射短波长荧光^[11]。该过程的高效进行需要满足敏化剂 T_1 能级高于湮灭剂、分子间距离足够近(< 1 nm)以及有效抑制氧气猝灭等关键条件^[9]。铂八乙基卟啉 (Platinum octaethyl porphyrin, PtOEP) 与 9,10-二苯基蒽 (Diphenylanthracene, DTA) 的组合是 TTA 体系中的经典配对,具有较高的能量传递效率^[12-13]。然而,传统 TTA 体系通常需溶解于有机溶剂中,面临水相分散性差、分子在水环境中易聚集导致效率衰减以及氧敏感性强等关键瓶颈^[3, 14],极大地限制了其在生物医学领域的实际应用。

为应对这些挑战,近年来研究者致力于开发基于纳米载体的固态或准固态 TTA 体系,利用纳米限域效应优化分子排布、阻隔氧气并提升水分散性,多种纳米平台已被探索用于构建 TTA 上转换纳米粒子 (TTA-upconversion nanoparticles, TTA-UCNPs)^[15-18]。例如,利用脂质体/纳米液滴将敏化剂/湮灭剂封装在脂质双分子层或油核中,提供生物相容性环境并部分隔离氧气^[19-20]。然而,其长期稳定性和对氧气的完全阻隔能力仍有待提高。Monguzzi 等利用聚合物基质 (如 PLGA、PS) 物理包

埋染料分子,通过优化 PtOEP/DPA 比例至 1:50,显著提升了湮灭效率 (~23 倍) 并降低了环境敏感性,证实了分子空间排布与封装技术对性能优化的关键作用^[21]。但聚合物载体的载药量控制、分子聚集调控及光稳定性仍需优化^[22]。金属有机框架 (Metal-organic framework, MOFs) 的高度有序孔道结构为精确控制敏化剂与湮灭剂的分子间距和排布提供了独特平台,展现出优异的限域效应和潜在的高效能量传递^[23-25]。近期研究进一步探索了 MOFs 在提高固态 TTA 效率和稳定性方面的潜力^[26]。此外,介孔二氧化硅 (Mesoporous silica nanoparticles, MSNs) 凭借其高比表面积和可调孔隙结构,成为解决 TTA 上转换体系光漂白与氧猝灭问题的理想固态载体^[27-29]。将敏化剂与受体封装于 MSNs 孔道内,可有效限制分子扩散、抑制聚集猝灭、隔离氧气并提高水分散性^[30]。特别是,中空介孔二氧化硅纳米粒子 (Hollow mesoporous silica nanoparticles, HMSNs) 融合了 MSNs 和微胶囊的优点,具有更大的内部空腔容积、更高的比表面积和载药能力、优异的生物相容性以及灵活的表面功能化特性,作为药物载体在生物医药领域备受关注^[31]。HMSNs 的空腔结构为敏化剂和湮灭剂提供了更充裕的限域空间,有望通过优化分子装载与排布,构建更高效的固态 TTA 能量传递路径^[32]。

针对上述 TTA 体系面临的水分散性差、氧敏感性强及光稳定性不足等核心瓶颈,本研究创新性地将纳米限域效应与分子排布调控策略相结合,构建了基于聚乙二醇-叶酸 (PEG-FA) 靶向修饰的 HMSNs 固态 TTA 上转换纳米探针 (图 1)。通过反相微乳液法和选择性刻蚀技术制备具有精确介孔结构的 HMSNs 载体,利用其空腔限域特性和高比表面积,通过真空吸附法共负载 PtOEP 敏化剂与 DPA 湮灭剂。进一步通过酰胺反应对 HMSNs 进行 PEG-FA 双功能化修饰,既实现肿瘤靶向识别又提高其生物安全性。实验结果表明,该纳米限域体系不仅能有效隔离氧气猝灭、抑制分子聚集引起的效率衰减,还可通过溶剂极性调控实现敏

化-湮灭分子的有序排布,显著提升三线态能量传递效率。这种将无机纳米载体优势与有机分子光物理特性相融合的设计策略,成功地解决了传统 TTA 体系水溶性差、光稳定性弱的关键难题,为构建高效稳定的靶向生物成像探针提供了新思路。

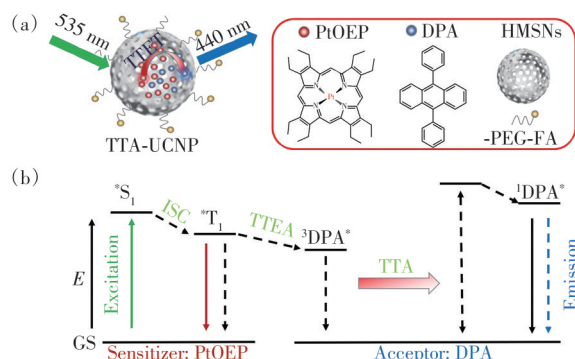


图 1 (a)基于中空介孔二氧化硅球(HMSNs)的 TTA-UCNPs 结构及上转换发光示意图;(b)TTA-UCNP 中 PtOEP 和 DPA 之间三重态-三重态湮灭过程的能级图
Fig.1 (a) Schematic illustration of TTA-UCNPs structure and upconversion luminescence based on hollow mesoporous silica spheres (HMSNs). (b) Energy level diagram describing the sensitized triplet-triplet annihilation process between PtOEP and DPA in the TTA-UCNP

2 实 验

2.1 材料与试剂

9, 10-二联苯蒽(DPA)、四氢呋喃(THF)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自北京伊诺凯科技有限公司;三乙胺(TEA)、正硅酸四乙酯(TEOS)和叶酸(FA)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;无水乙醇、二甲基亚砜(DMSO)、氢氟酸(HF, 40% (质量分数))、氨水(20%~28% (质量分数))购自北京化学工业集团有限责任公司;正己醇、环己烷、铂(II)八乙基卟啉(PtOEP)、曲拉通 X-100 和聚乙二醇($\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$, $\text{MV}=5\,000$)分别购自 Across、Aladdin、Frontier Scientific、上海西陇化工有限公司和北京百灵威科技有限公司。以上所有试剂购买后配成溶液直接使用。实验过程中均用 $18\,\text{M}\Omega$ 的去离子水。

2.2 样品制备

双层二氧化硅($d\text{SiO}_2$)纳米颗粒的制备:利用基于 Triton X-100 的反相微乳液的方法制备 SiO_2 核^[33-34]。取 150 mL 平底烧瓶,向其中加入 5.3 mL 曲拉通、5.4 mL 正己醇和 22.5 mL 环己烷并充分

搅拌 10 min 至混合均匀,加入 1 mL 去离子水后继续搅拌 5 min。然后加入 750 μL 氨水,继续搅拌 30 min,加入 600 μL TEOS 和 APTES 的混合溶液(体积比为 5:1),室温($\sim 25\,^\circ\text{C}$)反应 24 h 后,加入过量的无水乙醇破乳,形成悬浊液,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速离心 10 min 去除上清液后,用乙醇洗涤 3 次,获得 SiO_2 核。然后,利用 Stober 法制备 $d\text{SiO}_2$ 纳米颗粒。将制得的 SiO_2 核分散在 60 mL 乙醇溶液中,超声分散均匀后转移至 150 mL 平底烧瓶,分别加入 10 mL 水和 10 mL 氨水,快速搅拌 30 min 至混合均匀。然后逐滴(每滴 2~3 s)加入 10 mL 含 300 μL TEOS 的酒精溶液,继续反应 3 h 后,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速离心 10 min 去除上清液后,用乙醇和去离子水交替洗涤 5 次,获得 $d\text{SiO}_2$ 纳米颗粒。

中空介孔二氧化硅纳米颗粒(HMSNs)的制备:利用选择性刻蚀法制备 HMSNs^[33-34]。将上述制得的 $d\text{SiO}_2$ 纳米颗粒分散在 80 mL 去离子水中,加入 2.4 mL HF 水溶液并搅拌 6 min。反应结束后,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速离心 10 min 去除上清液后,用去离子水交替洗涤 3 次,获得 HMSNs,冻干后 $4\,^\circ\text{C}$ 储存备用。

HMSNs-PEG-FA 的制备:首先,利用碳二亚胺介导的偶联反应制备 FA-PEG-COOH。将 110 mg FA、239 mg EDC、75 mg NHS 和 20 μL TEA 溶于 50 mL DMSO 中搅拌 1 h,活化 FA 上的羧基。剧烈搅拌下,将所得黄色溶液滴加到含有 250 mg $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ 的 40 mL DMSO 中。反应 16 h 后,将黄色混合物在 PBS 缓冲液(pH 8.5)中透析 24 h,再在去离子水中透析 24 h,得到 FA-PEG-COOH 溶液。然后,制备 HMSNs-PEG-FA。将 5 mL 制备好的 FA-PEG-COOH 溶液、10 mg EDC 和 25 mg NHS 加入到含有 HMSNs ($200\,\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 50 mL PBS 缓冲液(pH 8.5)中,连续搅拌 24 h,再在水中透析 24 h,即可得到聚乙二醇-叶酸分子双修饰的 HMSNs-PEG-FA。

TTA-UCNPs 的制备:将上述 HMSNs-PEG-FA 离心后分散于 THF 溶液中,随后与含有 500 μg 铂(II)八乙基卟啉(PtOEP)和 2 mg 9, 10-二联苯蒽(DPA)的 THF 溶液。超声 10 min,使 PtOEP 和 DPA 进入 HMSNs 的空腔。然后抽真空去除低沸点的 THF,得到携带 PtOEP 和 DPA 的颗粒粉末,并用 THF/ H_2O (体积比为 1:2)混合液离心洗涤后,重新超声分散于水中,即得基于三线态湮灭的上转换纳米粒子(TTA-UCNPs)。

为了保证样品制备的可重复性及测试结果的准确性,以上所有实验都至少重复了三次。

2.3 样品表征

利用日本电子 JEM-1200EX 透射电子显微镜 (TEM) 表征纳米材料形貌,通过马尔文 Nano ZS90 的激光粒度仪 (DLS) 测试纳米材料的动态光散射粒径及 zeta 电位,采用日本分光株式会社 V-750 分光光度计测试紫外-可见吸收光谱,利用日立 F-4500 荧光分光光度计表征纳米材料的荧光光谱。统计分析方法均采用统计学中的定量研究。

氧气敏感性测试:取 2 mL 含有 PtOEP 和 DPA 的 THF 溶液或含有 TTA-UCNPs 的水悬浊液置于比色皿中,用 Parafilm 封口膜密封,然后利用穿刺针插入封口的比色皿中分别将饱和氧 (99.6%) 和饱和氮 (99.6%) 气体引入,通气鼓泡约 10 min,重新封口并测试荧光光谱,每个样品测三次,若荧光强度波动较大,则需要重新通气并测试,保证气氛达到平衡。所有光谱测量均在室温下进行。

细胞培养及毒性评估:文中所采用的细胞株为本实验室冻存的人肝癌 (HepG2) 细胞系。将细胞培养于 6 cm 培养皿中,加入 4 mL 含 10% FBS 的 H-DMEM 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 环境中培养。在细胞培养过程中,每 2 天更换一次新鲜培养基。用 MTT 法测定 TTA-UCNPs 的细胞毒性。即将 HepG2 细胞接种于 96 孔 (每孔 5×10³ 细胞) 板

中,37 °C 培养 24 h,分别加入不同浓度 (0, 50, 100, 150, 200, 250 μg·mL⁻¹) 的 TTA-UCNPs 水悬浊液。37 °C 培养 24 h 后,每孔加入 20 μL 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑 (MTT, 5 mg·mL⁻¹ in PBS, pH 7.4) 溶液。培养 4 h 后,倒出混合溶液,加入每孔 100 μL 的二甲基亚砷 (DMSO) 溶解甲瓚 (MTT 代谢产物)。使用酶标仪记录 490 nm 处的吸光度值 (OD₄₉₀),以上实验各重复三次,利用所得 OD 值计算细胞存活率,计算公式为细胞存活率 (%) = OD_{490 样品} / OD_{490 空白} × 100%。

细胞共聚焦显微成像:将对数生长期的 HepG2 细胞接种在 35 mm 共聚焦培养皿中培养 24 h 后,加入适量的 TTA-UCNPs,继续培养 12 h 至 TTA-UCNPs 被细胞摄取。用 PBS 冲洗三次,洗去死细胞和未被吞噬的纳米颗粒,加入少量 DMEM,防止细胞脱水,将共聚焦皿置于共聚焦显微镜上观察细胞内荧光成像。

3 结果与讨论

3.1 TTA-UCNPs 的制备及表征

采用高分辨透射电子显微镜 (HRTEM, JEM-1200EX) 对 TTA-UCNPs 的形貌、尺寸和微观结构进行表征,并利用 Image J1.51J8 软件针对每个批次样品随机选取并测量多个视野区域中至少 100 个粒子 (图 2(d)~(f)),并计算其平均粒径。由图

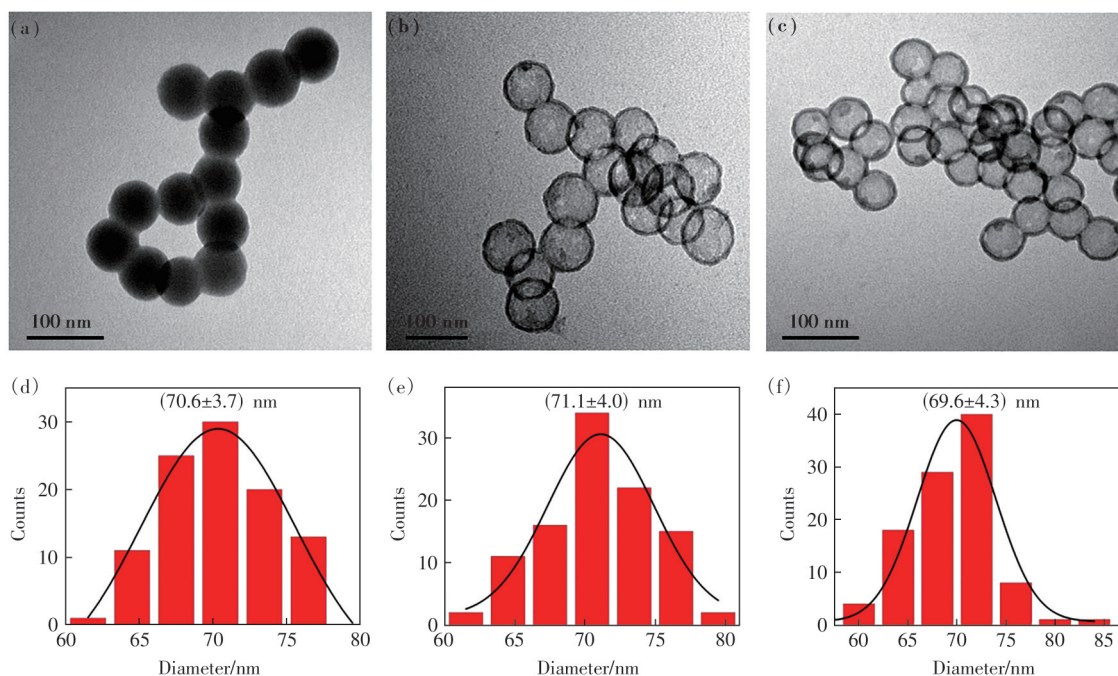


图 2 $d\text{SiO}_2$ ((a)、(d)), HMSNs ((b)、(e)) 和 TTA-UCNPs ((c)、(f)) 的 TEM 及其粒径分布图

Fig.2 TEM images and particle size distribution of $d\text{SiO}_2$ ((a), (d)), HMSNs ((b), (e)), and TTA-UCNPs ((c), (f))

2(a)、(d)可知反向微乳液与 Stöber 法结合制备的核壳结构的双层二氧化硅($d\text{SiO}_2$)形貌规则,呈球形且分散良好,平均粒径约为 70.6 nm。氢氟酸(HF)选择性刻蚀得到中空介孔二氧化硅球(Hollow mesoporous silica nanoparticles, HMSNs)如图 2(b)、(e)所示,粒子平均直径约为 71.1 nm,忽略统计误差,刻蚀前后粒径无明显变化;而且刻蚀后的 SiO_2 球表面光滑、无明显刻蚀痕迹、内部透明度显著增大,说明形成了空腔结构,统计可知空腔平均直径约为 63.5 nm,平均壳层厚度为 7.6 nm。这是由于有机硅氧烷中有机化学链的引入改变了二氧化硅骨架结构。即硅酸四乙酯(TEOS)与 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)在溶液中发生水解时,共同缩聚形成较疏松的有机无机杂化的硅氧烷骨架,更容易受到 HF 的腐蚀,而 TEOS 单独水解缩聚形成的纯 SiO_2 壳层较致密,不易被 HF 腐蚀而被完整保留。同时,我们注

意到,通过真空吸附的方法负载铂(Ⅱ)八乙基卟啉(PtOEP)和 9,10-二联苯蒽(DPA)后得到的基于三线态湮灭的上转换纳米粒子(TTA-UCNPs)的统计粒径平均尺寸大小约为 69.6 nm,与吸附之前的形貌也没有发生明显变化,如图 2(c)、(f)所示。

由动态光散射(DLS)图谱(图 3(a))可知,粒子分散性良好(PDI 值均小于 0.2), $d\text{SiO}_2$ 和 HMSNs 的水动态粒径分别为 108 nm 和 125 nm,略大于干燥状态下 TEM 统计数据,且刻蚀后水动态粒径略微变大,这可能归功于分散在水中的纳米粒子表面的羟基或氨基长链。另外,HMSNs 表面修饰 FA-PEG-COOH 分子后,水动态粒径进一步增大至 223 nm,说明 FA-PEG-COOH 分子的成功修饰。最后,测得负载 PtOEP 和 DPA 之后的上转换纳米粒子(TTA-UCNPs)的流体力学直径为 258 nm,这可能是由于 PtOEP 和 DPA 分子本身的疏水性导致。

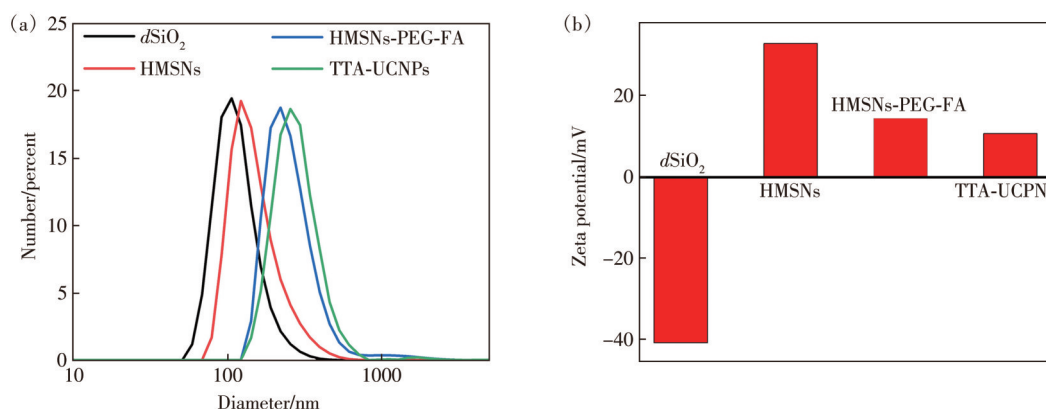


图 3 $d\text{SiO}_2$ 、HMSNs、HMSNs-PEG-FA 和 TTA-UCNPs 的水动态粒径(a)及电位表征(b)

Fig.3 DLS analysis (a) and zeta potential characterization (b) of $d\text{SiO}_2$, HMSNs, HMSNs-PEG-FA and TTA-UCNPs

由图 3(b)可知, $d\text{SiO}_2$ 的电位为 -40.8 mV,说明其表面有丰富的硅羟基。氢氟酸(HF)刻蚀过后,电位为 32.9 mV,说明 SiO_2 核并没有被完全刻蚀溶解,而是变成了疏松的网状结构并保留部分氨基链,而原本致密的 SiO_2 壳层被刻蚀为疏松的介孔结构,使核内部的氨基链与水分子接触甚至延伸到介孔壳层外,使电位由负变为正。这与图 2 中的 TEM 结果一致,也为后续 FA-PEG-COOH 的修饰提供了丰富的反应位点,同时为荧光探针的负载提供了可能。通过酰胺反应,修饰聚乙二醇-叶酸(FA-PEG-COOH)分子后的 HMSNs(HMSNs-PEG-FA)表面电势降为 14.5 mV,证明了 FA-PEG-COOH 的成功修饰。负载铂(Ⅱ)八乙基卟啉(PtOEP)和 9,10-二联苯蒽(DPA)后

的 HMSNs(TTA-UCNPs)后表面电位进一步减小为 10.7 mV,这可能是由于 PtOEP 和 DPA 的疏水性在一定程度上影响了氨基与水分子的相互作用。

随后,为了验证铂(Ⅱ)八乙基卟啉(PtOEP)和 9,10-二联苯蒽(DPA)的有效负载,我们测定了 PtOEP、DPA 在四氢呋喃(THF)和 HMSNs 中的紫外可见吸收光谱,如图 4 所示。由图中可知,PtOEP(质量分数 5%)和 DPA(质量分数 20%)共同负载后的 HMSNs(TTA-UCNPs)吸收光谱与 DPA 的吸收光谱基本一致,且在 535 nm 处有明显的吸收峰,这与 PtOEP 的吸收峰位置一致,说明 PtOEP 和 DPA 已成功负载。但是,我们注意到 TTA-UCNPs 的吸收光谱在 200~425 nm 范围内显著宽化,这可能是由于

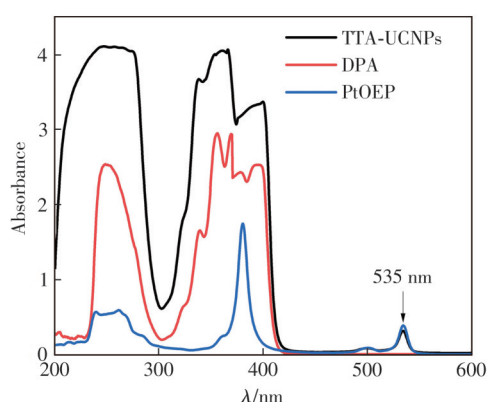


图4 PtOEP和DPA在THF及TTA-UCNPs在水中的吸收光谱

Fig.4 Absorption spectra of PtOEP and DPA in THF and TTA-UCNPs in water

DPA分子在HMSNs中聚集导致。

3.2 TTA-UCNPs的性能优化及表征

上转换效率是影响上转换纳米颗粒(TTA-UCNPs)发光性能的关键指标。为了获取最佳的上转换效率,我们优化了PtOEP和DPA的负载比例和负载量,并测试其荧光发射光谱。为了获取最优的负载比例,我们首先测试了不同比例的PtOEP和DPA在有机试剂四氢呋喃(THF)中的荧光光谱;然后直接读取荧光光谱的相对荧光强度以间接表征TTA-UCNPs的上转换效率,确定最优的PtOEP和DPA的负载比例和负载量。如图5(a)所示,固定PtOEP的质量,依次增加DPA的比重至1:10。结果表明,在535 nm光源照射下,PtOEP和DPA的混合溶液有两个发射峰,分别在

430 nm和645 nm左右。根据已报道文献及三线态-三线态能量转移(TTET)机理可知,645 nm处荧光来源于535 nm光源激发的PtOEP,430 nm处荧光来源于TTET激发的DPA,即基于三线态-三线态湮灭的上转换发光^[12]。我们注意到,645 nm附近的荧光较弱,而430 nm处上转换荧光较强,且随着DPA比例增加,430 nm处荧光先增强再减弱,PtOEP和DPA的质量比为1:4时,430 nm处荧光最强。说明激发态PtOEP可以通过TTET将能量转移给邻近的DPA分子,且PtOEP和DPA的质量比为1:4时,能量转移效率最高。因此,确定质量比1:4为PtOEP和DPA的最优负载比例,后续实验均采用该比例负载。随后,固定HMSNs的质量,依次增加PtOEP和DPA的比重至30%,探究了HMSNs对PtOEP和DPA的负载比例对发光性能的影响。图5(b)显示,当PtOEP和DPA的混合溶液与HMSNs的质量比为25%时,荧光强度最强。因此,HMSNs对PtOEP和DPA的负载量分别为5%和20%时上转换发光效率最高。需要注意的是,上转换荧光强度较弱时,如图5(a)中黑线(1:1)和红线(1:10),图5(b)中黑线(10%)、红线(15%)和蓝线(20%),发射峰处于434 nm附近;上转换荧光强度较强时,如图5(a)中蓝线(1:2)、紫线(1:4)和绿线(1:8),图5(b)中紫线(30%)和绿线(25%),其发射峰逐渐蓝移至430 nm附近。这说明THF和HMSNs中的PtOEP和DPA分子浓度不同,空间排布不同,进而影响其上转换发光性能,这与已报道的研究结果一致^[35-36]。

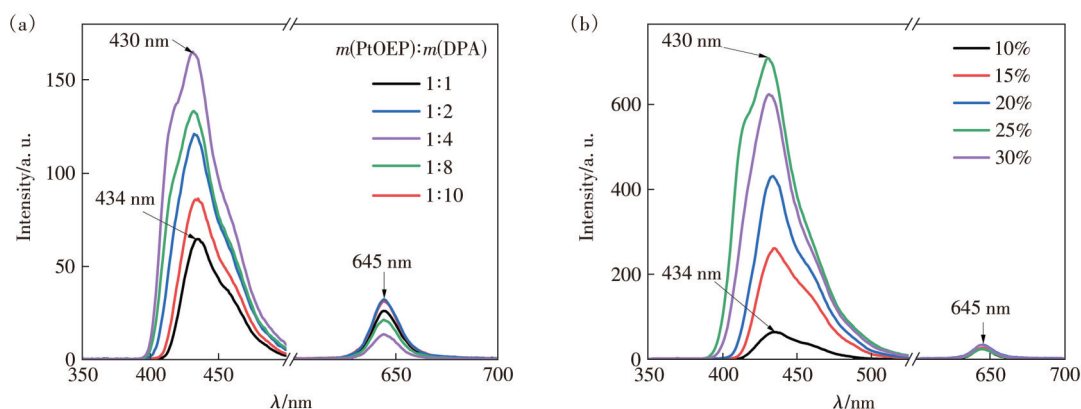


图5 535 nm激发下,PtOEP/DPA在THF(a)和HMSNs(b)中的发射光谱

Fig.5 Emission spectra of PtOEP/DPA in THF (a) and HMSNs (b) under excitation at 535 nm

由已报道文献可知,分子重排在三线态-三线态湮灭上转换(Triplet-triplet annihilation upconversion, TTA-UC)发光体系中具有关键作用^[35-36]。例如,

优化能量传递路径,改变敏化剂/发射剂的聚集态结构,减少非辐射能量损失,提升三线态能量转移(Triplet energy transfer, TET)效率;抑制激子猝灭,

减少分子间碰撞引起的系间窜越(Intersystem crossing, ISC)反向过程,降低三线态激子非辐射衰变;在固态基质(如聚合物、纳米颗粒)中形成稳定的微区结构,阻隔氧气扩散,提升空气稳定性。所以,敏化剂PtOEP和受体DPA的空间排布不仅会影响上转换发光位置,还会极大地影响TTA-UCNPs的上转换效率。然而,PtOEP和DPA都是平面型分子结构,HMSNs内部为介孔结构,通过真空吸附将PtOEP和DPA负载到HMSNs内部,可能会导致两种分子在空腔内的排布处于混乱状态,降低三线态-三线态能量转移(TTET)效率。因此,本文利用四氢呋喃(THF)和水的混合溶剂(THF/H₂O,体积比为1:2)对负载PtOEP和DPA的HMSNs进行洗涤,以期改变PtOEP和DPA的空间排布,进一步提升该TTA-UCNPs的上转换效率。

如图6(a)插图所示,洗涤前TTA-UCNPs水悬浊液为暗粉色,洗涤后变为鲜艳的粉红色。对比图4和图6(a)可知,洗涤后吸收光谱显著窄化,与图4中PtOEP和DPA的单分子吸收光谱吻合,说明THF/H₂O混合溶剂洗涤改变了DPA分子在HMSNs的内部排列,降低了其聚集度。进一步分析发射光谱(图6(b))发现,所有测试条件保持一致的情况下,THF/H₂O混合溶剂洗涤后的TTA-UCNPs上转换发光峰从原来的430 nm附近红移至441 nm附近,且荧光强度显著增强,约为原来的4.5倍。因此,我们推测,在混合溶剂洗涤的影响下,HMSNs空腔内的PtOEP和DPA两种分子得以重排,两分子的空间排布由混乱状态趋于有序状态,三线态能量传递效率增加,上转换荧光强度也随之增强。

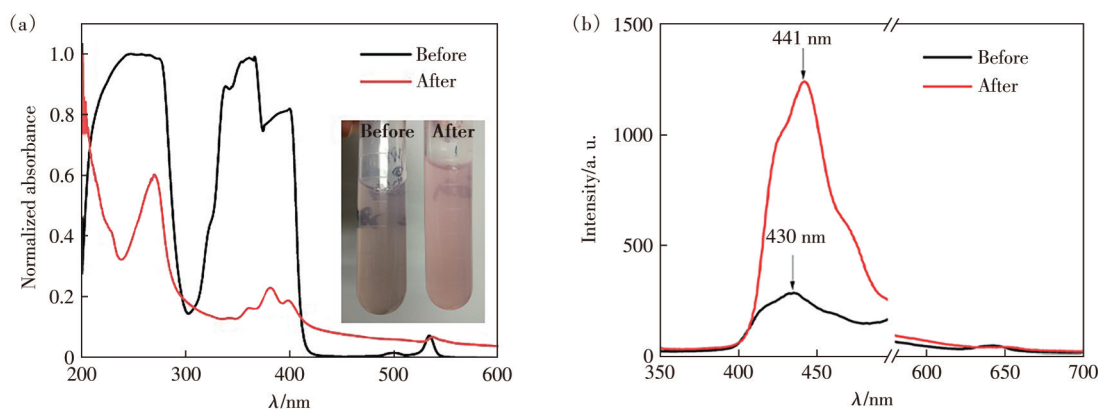


图6 TTA-UCNPs在THF/H₂O混合溶剂洗涤前后的吸收光谱(a)和发射光谱(b)。图(a)中插图为日光下,洗涤前后的TTA-UCNPs在水中的照片

Fig.6 Absorption spectra (a) and emission spectra (b) of TTA-UCNPs before and after washing with THF/H₂O mixed solvent under excitation at 535 nm. The inset in figure (a) shows the pictures of TTA-UCNPs before (left) and after (right) washing in an aqueous suspension under room light

图7为不同激光辐照功率密度下TTA-UCNPs的荧光光谱及441 nm峰值处荧光强度随激光辐照功率密度的变化。由图7(a)可知,不同激光辐照功率密度激发TTA-UCNPs测得的发射光谱表明TTA-UCNPs的上转换荧光强度随着激光辐照功率密度的增大不断增强。图7(b)表明,在0~60 mW·cm⁻²范围内,441 nm处的上转换荧光强度与入射激光辐照功率密度的平方成正比。图7(b)红线显示了发射数据的最佳二次拟合(χ^2),证实了该上转换体系的非线性光学性质。这与目前已报道的固态TTA-UC系统的阈值功率密度(~5 mW·cm⁻²)相当^[37-38],确保低功率激光激活体内成像,减少生物体组织损伤^[39]。

3.3 TTA-UCNPs的稳定性分析

众所周知,PtOEP是一种常用的氧气传感探针,因此为保证三线态湮灭(TTA)上转换体系的能量转移效率,欲获取较高发光效率的TTA-UCNPs,必须降低PtOEP对氧气的敏感性。因此,我们测试了不同气氛下,PtOEP和DPA分别在THF和HMSNs的发射光谱,研究了该TTA-UCNPs的氧气敏感性。氧气敏感性可以用TTA-UCNPs上转换发光对氧的总体猝灭响应 $Q=(I_{N_2}-I_{O_2})/I_{N_2}$ 来表示^[40],其中 I_{N_2} 和 I_{O_2} 分别表示在100%氮气和100%氧气氛围下溶液中TTA-UCNPs的上转换发光强度。由图8可知,THF和HMSNs中 Q 值分别约为72.8%和6.4%,说明HMSNs的包覆可有效

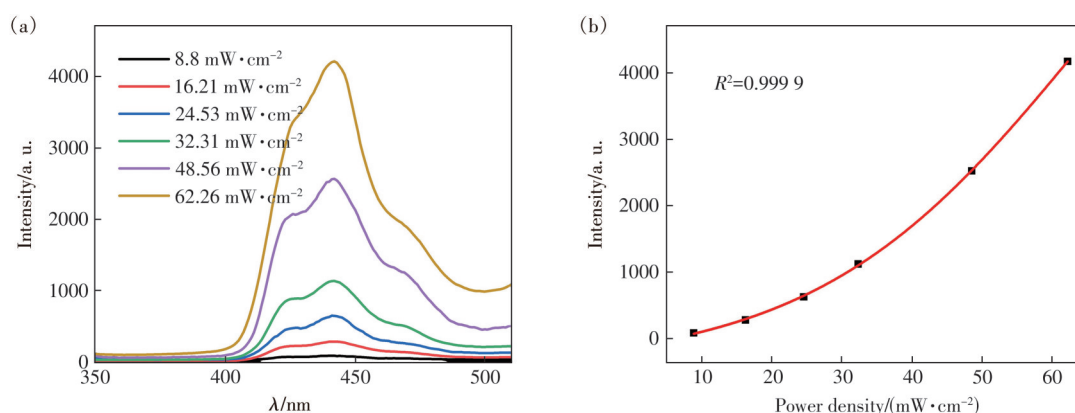


图 7 (a)不同激发功率密度下 TTA-UCNPs 的荧光光谱, $\lambda_{\text{ex}}=535 \text{ nm}$; (b)(a)图中 430 nm 处荧光强度随激光辐照功率密度的变化, 红实线为发射数据的最佳二次拟合曲线(χ^2)

Fig.7 (a) Change of fluorescence intensity of TTA-UCNPs under different excited power ($\lambda_{\text{ex}}=535 \text{ nm}$). (b) Fluorescence intensity at 430 nm versus excitation power. The red line is the quadratic fitting curve of fluorescence data(χ^2)

降低氧气对 PtOEP/DPA 体系上转换发光性能的影响。这可能是由于, 图 8(a) 中 PtOEP/DPA 在 THF 中较易受到氧气影响, 在 N_2 气氛下荧光强度最高, 空气条件下次之, O_2 条件下最低。说明在有机试剂中, PtOEP 易受氧气影响发生猝灭, PtOEP 和 DPA 之间的 TTET 效率降低, 导致 430 nm 处的上转换发光也明显减弱, 降低为原来的 27.2%。图 8(b) 中, 将负载了 PtOEP 和 DPA 的 HMSNs (TTA-UCNPs) 水悬浊液置于 N_2 、空气和 O_2 三种不同气氛下, 测得 TTA-UCNPs 在三种不同气氛中的

荧光强度仅略有不同, 其中 440 nm 处上转换荧光强度较强, 而 645 nm 处 PtOEP 的发光非常微弱。说明 PtOEP 和 DPA 之间发生了高效的能量传递, 使得 PtOEP 自身的荧光减弱而上转换荧光增强。由此可见, 该 TTA-UCNPs 具有很好的氧气稳定性, 具有良好的实际应用前景。需要指出的是, 理论上有机溶剂中 TTA 体系在含氧环境下易被完全猝灭, 而本文的 Q 值仅为 72.8, 这可能是由于 THF 本身易挥发, 氧溶解度不高且通气时间较短引起的, 类似的现象已有相关文献报道^[36]。

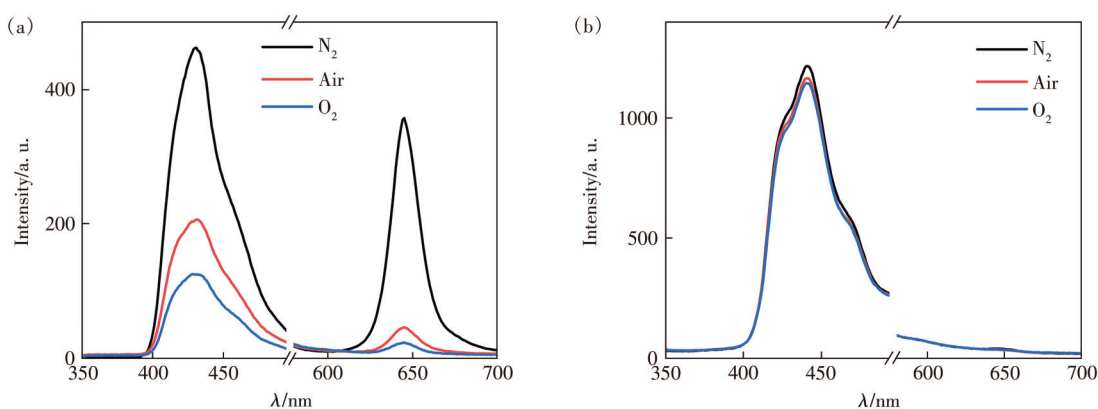


图 8 在 N_2 、 O_2 和空气三种不同气氛下, PtOEP/DPA 分别在 THF(a) 和 HMSNs(b) 中的发射光谱, $\lambda_{\text{ex}}=535 \text{ nm}$

Fig.8 Emission spectra of PtOEP/DPA in THF (a) and HMSNs (b) under three different atmospheres of N_2 , O_2 and air, $\lambda_{\text{ex}}=535 \text{ nm}$

纳米粒子的浓度和光稳定性是影响其发光性能的另一重要指标, 图 9 是不同浓度 TTA-UCNPs 在光源激发下所得的荧光光谱。由图 9(a) 可知, 粒子浓度在 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下时, 荧光强度随浓度的升高而增强; 在 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 荧光强度达到最高;

浓度再次增加时则相对保持不变, 推测是由于粒子达到一个浓度过饱和状态部分沉降, 使得发光仍保持在 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时的强度。由图 9(b) 可知, 随着光照时间的延长, 未观察到纳米粒子上转换荧光强度的显著变化, 表明该体系具有良好的光稳定性能。

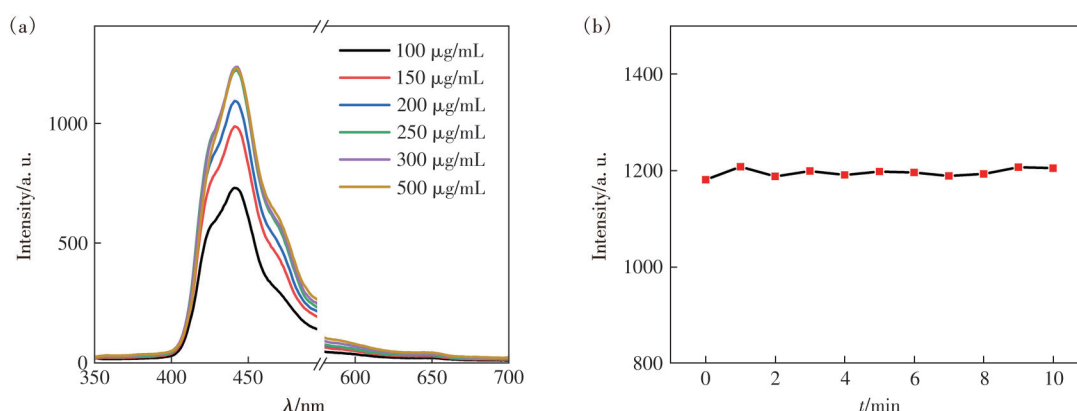


图9 (a)不同浓度TTA-UCNPs的荧光光谱;(b)浓度为 $250\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的TTA-UCNPs在430 nm处的荧光强度随光照时间变化(激光功率密度为 $35\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)。 $\lambda_{\text{ex}}=535\text{ nm}$

Fig.9 (a)Emission spectra of TTA-UCNPs at different concentrations. (b)Fluorescence intensity of TTA-UCNPs at a concentration of $250\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ at 430 nm over irradiation time (laser power density of $35\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). $\lambda_{\text{ex}}=535\text{ nm}$

3.4 TTA-UCNPs的生物成像分析

为了研究TTA-UCNPs的生物成像性能,我们首先探究了TTA-UCNPs的暗毒性。将不同浓度的TTA-UCNPs与人源肝癌(HepG2)细胞共培养24 h后,利用MTT比色法检测不同浓度的TTA-UCNPs对HepG2细胞活性的影响,结果如图10(a)所示。与对照组(未吞噬TTA-UCNPs的HepG2细胞)相比,TTA-UCNPs浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,细胞活性几乎不受影响;TTA-UCNPs浓度逐渐增至 $250\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,细胞存活率呈下降趋势,但均在

84.2%(250)以上。说明 $50\sim 200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内TTA-UCNPs有一定的细胞毒性,但是对细胞的增殖作用影响较小,没有明显的抑制作用。然后,利用共聚焦荧光成像系统评估HepG2细胞对TTA-UCNPs的吞噬情况,并在532 nm激发下观察到细胞中强烈的蓝色荧光(图10(b))。亮场图像和发光图像叠加证实TTA-UCNPs主要位于细胞质内,没有明显的核摄取。证明TTA-UCNPs可以被HepG2细胞吞噬,具有很好的生物兼容性,可以用于生物成像,是非常有前途的上转换荧光生物标志物。

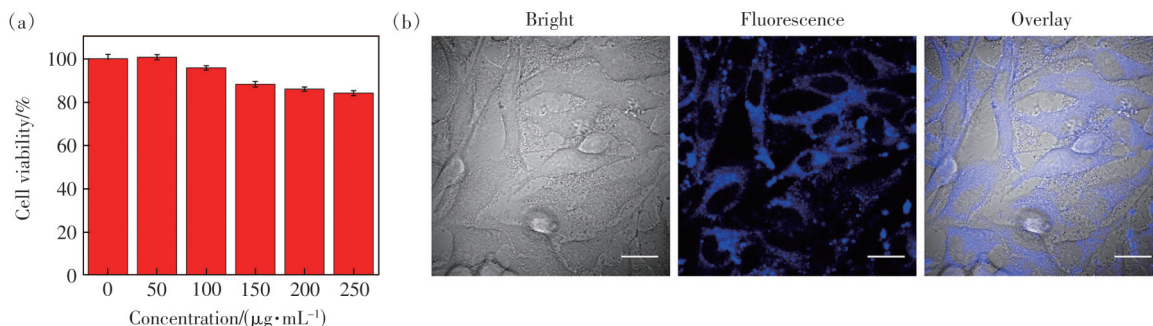


图10 (a)不同浓度的TTA-UCNPs对HepG2细胞活性的影响;(b)与TTA-UCNPs共培养后的HepG2细胞明场(左)、荧光(中)和叠加(右)图像,蓝色荧光激发波长为532 nm,采集范围为420~480 nm,标尺:20 μm

Fig.10 (a)Viability of HepG2 cells incubated with different concentrations of TTA-UCNPs. (b)Bright field (left), fluorescence (middle), and overlay (right) images of HepG2 cells cultured with TTA-UCNPs. The blue fluorescence was collected at 420–480 nm under a 532 nm excitation, scale bar: 20 μm

4 结 论

本研究成功构建了基于HMSNs限域空间的固态TTA上转换纳米探针(TTA-UCNPs)。HMSNs载体通过空腔结构有效隔离氧气猝灭(Q 值仅6.4%)并抑制分子聚集,结合PEG-FA修饰显著提升生物相容性与肿瘤靶向能力。创新性地利用

THF/ H_2O 混合溶剂洗涤调控PtOEP/DPA分子空间排布,使三线态能量传递效率大幅提高,上转换荧光强度增强4.5倍。该体系兼具低功率激发依赖性($I \propto P^2$, 阈值 $\sim 5\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)、优异光稳定性及低细胞毒性,共聚焦成像验证了其高效胞质递送与蓝色荧光发射能力。这一融合无机载体优势与有机

分子特性的设计策略,为开发高效、低毒性的靶向生物成像探针提供了新思路,有望推动上转换技术在肿瘤精准诊断与治疗领域的应用拓展。遗憾的是,该研究尚缺少绝对上转换量子产率,且 THF/H₂O 混合溶剂洗涤后的分子重排机制尚需进

一步完善。

本文专家审稿意见及作者回复内容的下载地址:
<http://cjl.lightpublishing.cn/thesisDetails#10.37188/CJL.20250143>

参 考 文 献:

- [1] 谭文乐, 俞越, 胡德华, 等. 有机发光二极管蓝光材料研究进展 [J]. 发光学报, 2023, 44(1): 1-11.
TAN W L, YU Y, HU D H, *et al.* Recent progress of blue-light emitting materials for organic light-emitting diodes [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2023, 44(1): 1-11. (in Chinese)
- [2] AUZEL F. Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids [J]. *Chem. Rev.*, 2004, 104(1): 139-174.
- [3] LIN W Y, LI J Y, FENG H J, *et al.* Recent advances in triplet-triplet annihilation upconversion for bioimaging and biosensing [J]. *J. Anal. Test.*, 2023, 7(4): 327-344.
- [4] SUN C N, GRADZIELSKI M. Advances in fluorescence sensing enabled by lanthanide-doped upconversion nanophosphors [J]. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2022, 300: 102579.
- [5] 李雅珍, 王喜龙, 田跃, 等. 多光子成像用上转换纳米粒子的单颗粒研究与应用进展 [J]. 发光学报, 2023, 44(11): 2041-2056.
LI Y Z, WANG X L, TIAN Y, *et al.* Current research and application development of single upconverting nanoparticles as multiphoton probes [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2023, 44(11): 2041-2056. (in Chinese)
- [6] 宋宏伟. 稀土掺杂氧化物纳米发光材料研究 [J]. 发光学报, 2008, 29(6): 921-936.
SONG H W. Recent developments on rare earth doped oxide nanocrystals [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2008, 29(6): 921-936. (in Chinese)
- [7] YANG M, GONG H J, YANG D, *et al.* Research progress on rare earth up-conversion and near-infrared II luminescence in biological applications [J]. *Chin. Chem. Lett.*, 2024, 35(2): 108468.
- [8] 贾恒, 冯晓锐, 李大光, 等. 正交激发发射上转换纳米材料的设计、制备与应用 [J]. 中国光学(中英文), 2023, 16(1): 76-93.
JIA H, FENG X R, LI D G, *et al.* Design, preparation and application of orthogonal excitation-emission upconversion nanomaterials [J]. *Chin. Opt.*, 2023, 16(1): 76-93. (in Chinese)
- [9] WEI L L, YANG C, WU W H. Optimizing TTA-UC performance by chemically tuning sensitizers and orderly organizing sensitizers and annihilators [J]. *Chem. Commun.*, 2025, 61(40): 7221-7235.
- [10] BHARMORIA P, BILDIRIR H, MOTH-POULSEN K. Triplet-triplet annihilation based near infrared to visible molecular photon upconversion [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2020, 49(18): 6529-6554.
- [11] NAIMOVIČIUS L, PUN A B. Design and optimization of triplet-triplet annihilation upconversion annihilators [J]. *Trends Chem.*, 2025, 7(4): 171-174.
- [12] LIU Q, YANG T S, FENG W, *et al.* Blue-emissive upconversion nanoparticles for low-power-excited bioimaging *in vivo* [J]. *Am J. Chem. Soc.*, 2012, 134(11): 5390-5397.
- [13] YANAI N, SUZUKI K, OGAWA T, *et al.* Absolute method to certify quantum yields of photon upconversion *via* triplet-triplet annihilation [J]. *J. Phys. Chem. A*, 2019, 123(46): 10197-10203.
- [14] RAIŠYS S, JURŠĖNAS S, SIMON Y C, *et al.* Enhancement of triplet-sensitized upconversion in rigid polymers *via* singlet exciton sink approach [J]. *Chem. Sci.*, 2018, 9(33): 6796-6802.
- [15] WEI L L, YANG C, WU W H. Recent advances of triplet-triplet annihilation upconversion in solvent-free solid materials [J]. *Mater. Chem. Front.*, 2023, 7(16): 3194-3208.
- [16] CHEN J, WANG P Y, LIU J B, *et al.* Achieving efficient TTA-UC both in organogels and solvent-free dry gels by co-assembling annihilator with gelators [J]. *Chin. J. Chem.*, 2025, 43(16): 2021-2028.
- [17] SCHLOEMER T, NARAYANAN P, ZHOU Q, *et al.* Nanoengineering triplet-triplet annihilation upconversion: from

- materials to real-world applications [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(4): 3259-3288.
- [18] KLIMEZAK M, CHAUD J, BRION A, *et al.* Triplet-triplet annihilation upconversion-based photolysis: applications in photopharmacology [J]. *Adv. Healthcare Mater.*, 2024, 13(19): 2400354.
- [19] PRABHAKARAN A, JHA K K, SIA R C E, *et al.* Triplet-triplet annihilation upconverting liposomes: mechanistic insights into the role of membranes in two-dimensional TTA-UC [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2024, 16(22): 29324-29337.
- [20] BRION A, CHAUD J, KLIMEZAK M, *et al.* Photoactivatable liposomes for blue to deep red light-activated surface drug release: application to controlled delivery of the antitumoral drug melphalan [J]. *Bioconjugate Chem.*, 2023, 34(7): 1304-1315.
- [21] MONGUZZI A, FRIGOLI M, LARPENT C, *et al.* Low-power-photon up-conversion in dual-dye-loaded polymer nanoparticles [J]. *Adv. Funct. Mater.*, 2012, 22(1): 139-143.
- [22] CHOI H E, PARK J M, JEONG W Y, *et al.* Water-dispersible and biocompatible polymer-based organic upconversion nanoparticles for transdermal delivery [J]. *Biomater. Res.*, 2024, 28: 0106.
- [23] GONG L S, CHEN L X, LIN Q J, *et al.* Nanoscale metal-organic frameworks as a photoluminescent platform for bioimaging and biosensing applications [J]. *Small*, 2024, 20(45): 2402641.
- [24] PARK J, XU M, LI F Y, *et al.* 3D long-range triplet migration in a water-stable metal-organic framework for upconversion-based ultralow-power *in vivo* imaging [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, 140(16): 5493-5499.
- [25] ROY I, GOSWAMI S, YOUNG R M, *et al.* Photon upconversion in a glowing metal-organic framework [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, 143(13): 5053-5059.
- [26] ZHANG Q Y, LUO G W, HU R, *et al.* Crystalline hydrogen-bonded organic framework for air-tolerant triplet-triplet annihilation upconversion [J]. *Chem. Commun.*, 2024, 60(33): 4475-4478.
- [27] MANZANO M, VALLET-REGÍ M. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery [J]. *Adv. Funct. Mater.*, 2020, 30(2): 1902634.
- [28] YANG Z S, NING Y Y, YIN H Y, *et al.* Lutetium (III) porphyrinoids as effective triplet photosensitizers for photon upconversion based on triplet-triplet annihilation (TTA) [J]. *Inorg. Chem. Front.*, 2018, 5(9): 2291-2299.
- [29] MASSARO G, GENTILI P L, AMBROGI V, *et al.* Triplet-triplet annihilation based upconversion in silica matrices [J]. *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2017, 246: 120-129.
- [30] ASKES S H C, LEEUWENBURGH V C, POMP W, *et al.* Water-dispersible silica-coated upconverting liposomes: can a thin silica layer protect TTA-UC against oxygen quenching? [J]. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2017, 3(3): 322-334.
- [31] GUO H Q, ZHAO X, DUAN Y P, *et al.* Hollow mesoporous silica nanoparticles for drug formulation and delivery: opportunities for cancer therapy [J]. *Colloids Surf. B*, 2025, 249: 114534.
- [32] LEE H, LEE M S, UJI M, *et al.* Nanoencapsulated phase-change materials: versatile and air-tolerant platforms for triplet-triplet annihilation upconversion [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2022, 14(3): 4132-4143.
- [33] GUO L Y, PING J T, QIN J L, *et al.* A comprehensive study of drug loading in hollow mesoporous silica nanoparticles: impacting factors and loading efficiency [J]. *Nanomaterials*, 2021, 11(5): 1293.
- [34] GUO L Y, XIA Q S, QIN J L, *et al.* Skin-safe nanophotosensitizers with highly-controlled synthesized polydopamine shell for synergetic chemo-photodynamic therapy [J]. *J. Colloid Interface Sci.*, 2022, 616: 81-92.
- [35] GOUDARZI H, KOUTSOKERAS L, BALAWI A H, *et al.* Microstructure-driven annihilation effects and dispersive excited state dynamics in solid-state films of a model sensitizer for photon energy up-conversion applications [J]. *Chem. Sci.*, 2023, 14(8): 2009-2023.
- [36] YANG H Z, GUO S W, JIN B X, *et al.* Versatile, stable, and air-tolerant triplet-triplet annihilation upconversion block copolymer micelles [J]. *Polym. Chem.*, 2022, 13(34): 4887-4894.
- [37] RAIŠYS S, JURŠĖNAS S, KAZLAUSKAS K. Boost in solid-state photon upconversion efficiency through combined approach of melt-processing and purification [J]. *Sol. RRL*, 2022, 6(6): 2100873.
- [38] STANCIU S T, RAIŠYS S, KAZLAUSKAS K, *et al.* A rationally designed singlet sink for glassy polymeric photon upconverting films [J]. *J. Mater. Chem. C*, 2024, 12(22): 8087-8097.
- [39] VEPRIS O, EICH C, FENG Y S, *et al.* Optically coupled PtOEP and DPA molecules encapsulated into PLGA-nanoparticles

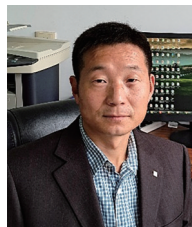
for cancer bioimaging [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(5): 1070.

- [40] GUO L Y, PENG H S, SHEN R Y, *et al.* Iridium-based dual-functional nanoparticles for far-red imaging and photodynamic therapy [J]. *Nano Biomed. Eng.*, 2017, 9(1): 1-8.



郭兰英(1988-),女,河南商丘人,博士,讲师,2021年于北京交通大学获得博士学位,主要从事发光纳米材料和肿瘤诊疗一体化的研究。

E-mail: lyguo@wnmc.edu.cn



彭洪尚(1975-),男,山东临沂人,博士,教授,2007年于北京交通大学获得博士学位,主要从事发光量子点和荧光纳米传感器的研究。

E-mail: hshpeng@bjtu.edu.cn



陈妍(1996-),女,湖南益阳人,硕士,工程师,2020年于中央民族大学获得硕士学位,主要从事发光纳米材料与肿瘤诊疗一体化的研究。

E-mail: 17610357331@163.com