

文章编号: 1000-7032(2012)11-1215-04

NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ 发光上转换纳米晶的表面修饰及其生物效应

宋 凯^{1,2}, 杜 创¹, 赵军伟¹, 孔祥贵^{1*}

(1. 发光学与应用国家重点实验室 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033;
2. 长春师范学院 生命科学学院, 吉林 长春 130032)

摘要: 不理想的发光上转换纳米晶(UCNPs)表面效应成为其生物标记的主要障碍。本文合成了表面带有氨基功能基团的水溶性 NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ UCNPs, 并通过共价偶联的方式将聚乙二醇(PEG)分子修饰到其表面。光谱测试表明纳米晶的发光性质基本没有变化, 扫描电镜结果说明修饰的 PEG 分子在一定程度上减少了纳米晶的聚集。最后, 细胞毒性实验证明这种修饰后的上转换纳米晶具有良好的生物相容性。

关键词: 发光上转换纳米晶; 聚乙二醇; 表面修饰

中图分类号: O433.4 文献标识码: A DOI: 10.3788/fjxb20123311.1215

Surface Modification of NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ Luminescent Upconversion Nanocrystals and Biological Effects

SONG Kai^{1,2}, DU Chuang¹, ZHAO Jun-wei¹, KONG Xiang-gui^{1*}

(1. State Key Laboratory of Luminescence and Application, Changchun Institute of Optics, Fine Mechanical and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China;
2. School of Life Science, Changchun Normal University, Changchun 130032, China)

* Corresponding Author, E-mail: xgkong14@ciomp.ac.cn

Abstract: Undesirable surface effect of luminescent upconversion nanoparticles (UCNPs) is a major obstacle to the biomarker. In this work, we synthesized the water-soluble NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ UCNPs with amino functional groups and polyethylene glycol (PEG) molecules modified by covalent coupling of the way to the surface of UCNPs. The spectral characterization showed that the luminescent properties of UCNPs unchanged. Scanning electron microscopy results indicate that modification of PEG molecules distinctly reduce the aggregation of UCNPs. The cell toxicity experiments show that this modification on the UCNPs has good biocompatibility.

Key words: luminescent upconversion nanoparticles; polyethylene glycol; surface modification

收稿日期: 2012-08-17; 修订日期: 2012-09-24

基金项目: 国家自然科学基金(11204021, 11004189, 61275202); 吉科教合字[2012]第227号; 长春师范学院自然合字[2010]002号资助项目

作者简介: 宋凯(1979-), 男, 吉林大安人, 主要从事纳米材料表面生物功能化及其生物效应的研究。

E-mail: 22533734@163.com, Tel: (0431)86168106

1 引 言

荧光成像技术具有高的时间和空间分辨率,对于生物学研究和临床应用是一项非常重要的技术,并已经成功地应用于体外和体内成像^[1]。传统的荧光生物成像是基于单光子激发,吸收高能量的光并发射低能量的光。高能量的激发光(如紫外光)有很多弊端和穿透深度浅、容易产生背景光、对生物样品有光损伤等^[2-3]。双光子成像技术虽然一定程度上可解决这个问题,但是它需要高的激发光强度且效率很低。近红外光(800 ~ 1 500 nm)处在“生物窗口”范围,其能量低,能够避免对生物体的损伤,减少生物组织的自荧光,并能够增加组织穿透深度^[4]。因此,利用近红外光作为激发光进行荧光生物成像是非常理想的方法之一。稀土离子掺杂的 UCNP 恰好能够吸收近红外光(980 nm),将低能量的红外光上转换为高能量的蓝光(对 Tm^{3+} 而言)、绿光和红光的发射(对 Er^{3+} 而言)^[5-6]。因此,使用稀土离子掺杂的 UCNP 用做荧光生物成像的探针的研究已经成为当今的热点^[7-8]。

可用于生物标记的 UCNP 要满足以下几个条件:具有水溶性;具有可与生物偶联的官能团;具有一定的生物相容性。在本工作中,我们首先合成了水相的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ UCNP,并将聚乙二醇(PEG)修饰到纳米粒子表面来改善纳米晶的生物相容性,也相应地提高了粒子的分散性^[9-10]。最后,通过生物毒性实验评价了 UCNP 作为生物成像探针的潜在的应用性。

2 实 验

2.1 实验试剂

聚乙酰胺(PEI)聚合物(25000Da)从 Aldrich 公司购买,氟化氨购自上海三爱思试剂公司,聚乙二醇(PEG)购于北京凯正生物公司,胎牛血清购自杭州四季清生物制品公司,胰蛋白酶、青霉素和链霉素购自 Ameresco 公司,MTT 购自上海生工生物工程有限公司,PBS 生物缓冲液、注射用生理盐水购自长春市金鑫生物制药公司。氧化钇、氧化铟、氧化镱购自长春应化所稀土实验室,纯度为 99.999%。硝酸钇、硝酸铟、硝酸镱为自制,浓度为 0.1 mol/mL。硫化钠、DMSO、二乙二醇、柠檬酸三钠和硝酸从北京化工厂购买,均为分

析纯。

2.2 实验仪器

980 nm 半导体激光器;台式高速冷冻离心机(Hettich-I6R);SUV-3101PC 型 UV-Vis 光谱仪(Shimadzu 公司);Siemens D5005 型 X 射线衍射仪;F-4500 荧光光谱仪(日本 Hitachi 公司),以氙灯作为激发光源;S-4800 型扫描电子显微镜,入射电压为 200 kV。

2.3 水溶性 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ UCNP 的水热合成

将 2.5 mL 浓度为 0.2 mol/mL 的稀土硝酸盐水溶液 [$n(\text{Y}):n(\text{Yb}):n(\text{Er}) = 78:20:2$] 和 2.52 mL 浓度为 0.2 mol/mL 的 NaCl 水溶液依次加入到锥形瓶中,然后加入 20 mL 二乙二醇(DEG)。接着加入 5 mL 质量分数为 5% 的 PEI 水溶液。络合 0.5 h 后,加入适量的 NH_4F 水溶液,保持反应体系的 pH 值约为 8。室温反应 1 h 后,将此前驱体溶液转移到容量为 50 mL 的带有聚四氟乙烯衬里的不锈钢反应釜中,填充度约为 60%。将反应釜放入烘箱内,在 180 °C 下反应 5 h。室温冷却后,离心,水洗 3 次,配成质量浓度为 1 g/mL 的 PBS 溶液。

2.4 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ UCNP 表面的 PEG 修饰

分别称量 0.1, 0.2, 0.4 mg 的 SC-PEG,溶解在 1 mL 的去离子水和 DMSO(体积比为 1:1)的混合溶液中,然后分别加入到 1 mL 的纳米粒子溶液中,搅拌 4 h,离心,用去离子水洗两遍,分散在 1 mL 的 PBS 缓冲溶液中。

2.5 MTT 实验

收集对数期生长的细胞,离心洗涤。稀释细胞至 $10^6/\text{mL}$ 接种 96 孔细胞培养板,每孔含细胞约 5×10^4 个,继续培养 10 h。加入含有不同浓度的单纯及表面修饰 PEG 的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ UCNP 的培养基溶液,与细胞共同孵育培养 24 h 后,酶标仪器测定 490 nm 波长的吸光度,MTT 法确定各个孔的细胞存活率。

3 结果与讨论

通过水热合成的方法制备了表面配体为 PEI 聚合物的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ UCNP,PEI 分子的作用一是赋予纳米晶的水溶性,二是为纳米粒子的一步修饰提供可反应的活泼基团。用于生物标

记的理想纳米晶一般都要求分散性好且具有生物兼容性。这里我们通过修饰 PEG 分子到纳米晶的表面来解决这个问题。图 1 给出了 NaYF₄ UC-NPs 修饰不同浓度 PEG 前后的红外光谱。从图中可以看出,随着修饰 PEG 浓度的增加,UCNPs 在 1 100 cm⁻¹附近出现强的 CO—C 的特征吸收峰,而修饰前 UCNPs 表面配体 PEI 的 C—N 特征吸收峰消失。这可以证明 PEG 已经连接到 UCNPs 的表面。

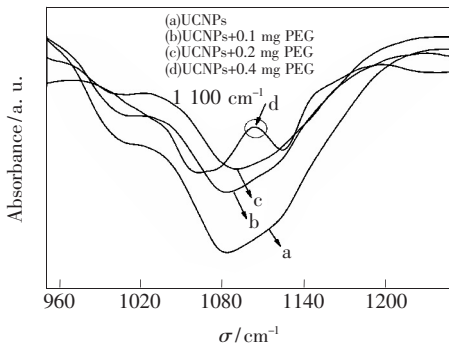


图 1 修饰 PEG 前后的上转换纳米晶红外光谱

Fig. 1 FT-IR of nanocrystals before and after modified with PEG

UCNPs 作为理想的发光材料的另外一个优势是掺杂的稀土离子由于 4f 电子的屏蔽效应,发光性质稳定。这种稳定的荧光信号在生物医学领域可作为生物荧光分析或者生物成像,因此对 UCNPs 要保证其发光光谱不受 PEG 的影响。图 2 是 PEG 修饰前后的 UCNPs 的发光光谱。从图中可以看到 UCNPs 在表面修饰 PEG 前后的发光光谱几乎重合,没有受到任何影响。这种光谱的稳定性在一定程度上保证了它们在荧光生物成像中的应用潜力。

同时,我们对 UCNPs 表面 PEG 修饰前后的

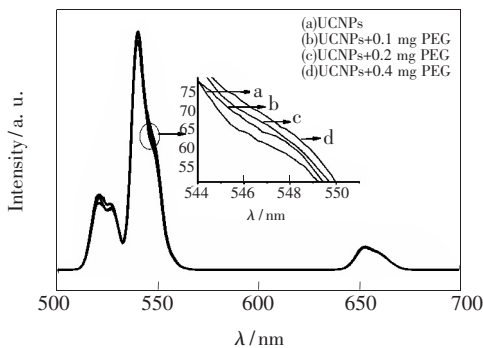


图 2 修饰 PEG 前后的上转换纳米晶的发光光谱

Fig. 2 Luminescence spectra of nanocrystals before and after modified with PEG

样品进行了 SEM 表征。如图 3 所示,没有修饰 PEG 前(图 3(a)),UCNPs 由于表面配体的疏水作用,有明显的聚集现象。随着修饰 PEG 的浓度的增加(图 3(b)、(c)、(d)),UCNPs 的聚集现象逐渐减弱,最后达到单分散的状态,这是因为 PEG 修饰了 UCNPs 以后,改善了它的表面张力,使其在水相得以更好的分散。

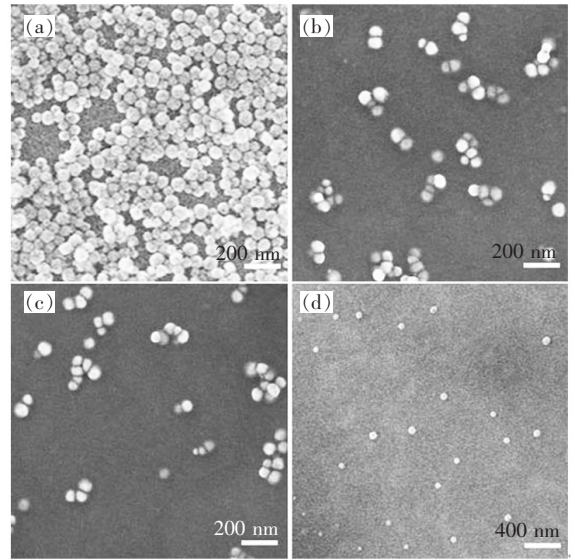


图 3 修饰 PEG 前后的上转换纳米晶的 SEM

Fig. 3 SEM of nanocrystals before and after modified with PEG

PEG 除了是通用的两性分子来改善纳米粒子的水溶性外,同时能够作为 UCNPs“刚性”界面与生物分子之间的缓冲桥梁,赋予 UCNPs 进一步的生物应用的潜力。这里我们也调查了 PEG 修饰的 UCNPs 的生物兼容性。图 4 表示的是 UCNPs 表面修饰 PEG 前后对小鼠肝癌 H22 细胞的毒性,从图中可以看到,没有修饰 PEG 时,10 μg/mL 纳

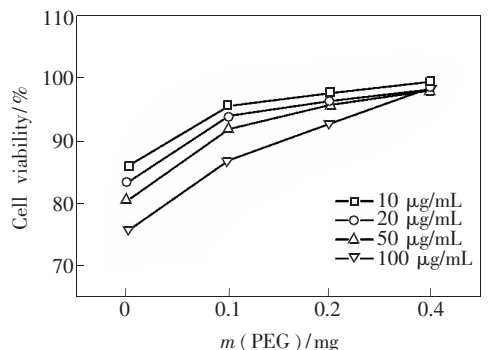


图 4 修饰 PEG 前后的上转换纳米晶的细胞毒性

Fig. 4 The cytotoxic of nanocrystals before and after modified with PEG

米晶与小鼠肝癌 H22 细胞共同培养 24 h 后,细胞存活率为 86%。当浓度增大到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活率降到 76%。而随着 PEG 修饰量的增加,细胞存活率逐渐升高。当 PEG 修饰量达到 0.4 mg 时,细胞存活率达到 98% 以上,受 UCNP 浓度的影响微小,细胞存活率几乎保持不变。

4 结 论

利用 PEI 作为表面配体合成了具有氨基功能基团的水溶性 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ UCNPs,通过进一步修饰 PEG 分子使纳米粒子的分散性得到改善,并且其发光性质未受到影响。进一步的细胞兼容性实验结果证明,这种表面修饰 PEG 的 UCNP 具有很好的生物相容性,可以用于生物荧光成像。

参 考 文 献:

- [1] Rao J H, Dragulescu-Andrasi A, Yao H Q. Fluorescence imaging in vivo recent advances [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(1):17-25.
- [2] Choy G, Choyke P, Libutti S K. Current advances in molecular imaging: noninvasive in vivo bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research [J]. *Mol. Imaging*, 2003, 2(4):303-312.
- [3] de Chermont Q L, Chaneac C, Seguin J, et al. Nanoprobe with near-infrared persistent luminescence for in vivo imaging [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104(22):9266-9271.
- [4] Cai W, Shin D W, Chen K, et al. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects [J]. *Nano Lett.*, 2006, 6(4):669-676.
- [5] Suyver J F, Grimm J, van Veen M K, et al. Upconversion spectroscopy and properties of NaYF_4 doped with Er^{3+} , Tm^{3+} and/or Yb^{3+} [J]. *J. Lumin.*, 2006, 117(1):1-12.
- [6] Krämer K W, Biner D, Frei G, et al. Hexagonal sodium yttrium fluoride based green and blue emitting upconversion phosphors [J]. *Chem. Mater.*, 2004, 16(7):1244-1251.
- [7] Lim S F, Riehn R, Ryu W S, et al. In vivo and scanning electron microscopy imaging of up-converting nanophosphors in caenorhabditis elegans [J]. *Nano Lett.*, 2006, 6(2):169-174.
- [8] Zhao J W, Kong X G. AEP-assisted hydrothermal synthesis and upconversion luminescence of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ nanocrystals [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2011, 32(7):675-679 (in Chinese).
- [9] Masao K, Daisuke M, Yu S, et al. Design of poly(ethylene glycol)/streptavidin coimmobilized upconversion nanophosphors and their application to fluorescence biolabeling [J]. *Langmuir*, 2008, 24(16):8864-8870.
- [10] Wolfgang E, Gary C, Aruna S, et al. PEGylated gold nanoparticles conjugated to monoclonal F19 antibodies as targeted labeling agents for human pancreatic carcinoma tissue [J]. *ACS Nano*, 2008, 2(11):2263-2272.
- [11] Lu Z H, Chen H, He C F, et al. Synthesis of water soluble upconversion $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ nanoparticles using polyvinylpyrrolidone as surfactant and their biological compatibility [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2011, 32(10):993-997 (in Chinese).