

[综合评述]

量子点标记的生物实时动态示踪成像研究进展

王 洋, 邓玉林, 庆 宏, 谢海燕
(北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081)

摘要 量子点的荧光特性及其在生物标记和成像应用中的实现, 为生命体系的高灵敏原位、实时及动态成像研究提供了新的发展契机, 已成为当前生物检测和成像的最前沿研究领域之一. 本文综述了量子点光物理性质、量子点标记生物荧光探针制备及其在实时动态示踪成像应用中的研究进展.

关键词 量子点; 探针; 实时; 动态; 成像

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)04-0661-08

纳米技术的发展为生命体系中化学、生物信息的快速、原位、实时、动态和高灵敏获取提供了新的途径, 通过纳米材料标记、示踪来解释一些生命现象已成为目前世界范围内的热点交叉研究领域. 荧光标记示踪一直是生命科学研究中普遍使用的有效方法之一, 并且随着荧光试剂和荧光显微成像技术的发展而不断发展. 量子点(QDs)作为一类新型的荧光标记材料, 具有高强度、高信噪比和十分稳定的荧光性质, 使其在长时间生命活动监测及活体示踪方面具有独特的应用优势. 基于QDs的生物动态示踪成像研究, 因具有重要意义而引起了特殊的兴趣和关注. 本文主要概述了QDs的相关光物理性质、量子点标记生物荧光探针的制备及其在实时动态示踪成像中应用的研究进展.

1 量子点的光物理性质

QDs是由数百到数万个原子组成的原子簇, 生物标记中最常用的CdSe QDs的原子数为 *ca.* 200 到 *ca.* 10000 个, 尺寸在 2 ~ 8 nm 之间^[1], 小于其激子玻尔半径, 是典型的半导体纳米晶粒, 表现出特有的荧光纳米效应. 其光吸收谱宽而连续, 荧光发射谱窄而对称(20 ~ 30 nm)、无长波段拖尾现象, 荧光强度高(单个粒子的荧光肉眼可见)、量子产率高(一般可达60%~80%), 不同粒径和组成的QDs的发射谱可以覆盖紫外到红外的光谱范围(400 nm ~ 2 μm), 因此可以用一种激发光源同时激发不同的QDs, 得到多颜色、宽范围的发射光, 方便地实现了一元激发、多元发射的同时多色标记检测.

此外, 与传统的有机荧光试剂相比较, QDs的荧光还具有明显的优越性: (1) 稳定性好: 光激发会导致有机荧光试剂发生不可逆的光氧化反应, 而使其荧光迅速降低直至消失, 即光漂白, 这严重地限制了荧光试剂在需要进行长时间观察的研究中的应用. QDs由于其无机组成的本质, 其荧光非常稳定, 具有强的抗光漂白能力(其耐光漂白时间比传统的有机荧光试剂长几个数量级). 结合非常强的荧光特性和很大的吸收系数($10^5 \sim 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 使其可以通过能量很低的、细胞没有强烈吸收的光源, 在很长的时间范围内进行低背景干扰成像. (2) 荧光寿命长: QDs典型的荧光寿命为 10 ~ 40 ns^[2], 而一般的有机荧光试剂则只有几纳秒, 如果结合脉冲激光激发以及时间门控检测(Time-gated detection), 可以进一步有效地减少生物荧光成像时的背景噪音. (3) QDs具有非常高的双光子吸收截面, 如CdSe/ZnS QDs的测量值高达47000 GM(Goeppert Mayer)^[3], 已经接近计算的理论值, 比典型的有机荧光试剂大2~3个数量级. 双光子成像技术通过红外超短脉冲激光器产生激光双光子激发样品, 激发同样的荧光分子, 双光子的波长大约是单光子激发所需波长的1倍, 长波长的光子不易被细胞吸

收稿日期: 2007-12-03.

基金项目: 国家“八六三”计划(批准号: 2006AA03Z320)、国家“九七三”计划(批准号: 2006CB933100)、国家自然科学基金(批准号: 20505001)、北京理工大学优秀青年教师资助计划(批准号: 2007YS0603)和病毒学国家重点实验室开放研究基金资助.

联系人简介: 谢海燕, 女, 博士, 副教授, 主要从事纳米生物医学分析研究. E-mail: hyanxie@bit.edu.cn

收,对活细胞的光毒性减少,也降低了光漂白.另外,长波长的光比短波长的光受散射影响也较小,容易穿透更厚的样品.因此,QDs很适合较厚的组织样品以及在体的双光子激发成像.上述特点使QDs在活细胞、组织、活体等生物体系的长时间实时、动态可视化荧光示踪成像中具有无法比拟的优势.因此,美国艾默里大学的聂书明教授^[4]指出:所有的荧光试剂都可以用于死细胞中蛋白的定位标记,但只有QDs可以对活细胞进行长达数小时的示踪.

2 量子点标记生物荧光探针的制备

量子点标记生物荧光探针(以下简称为:量子点探针)利用QDs的荧光性质进行信号转换,通过生物体系中的特异性相互作用,如抗原-抗体、配体-受体、DNA杂交及Biotin-avidin等实现特异性、靶向的识别、标记和示踪.在QDs合成的基础上,目前通用的量子点探针的制备主要需经过QDs修饰和特异性生物分子的偶联两大步骤.

2.1 量子点的修饰

QDs的制备方法大致可以分为常温水相合成法^[5,6]和高温有机溶剂裂解法^[7].比较而言,后者的产物具有较明显的荧光性质,是目前普遍选用的.这样的产物表面结合着一层重要的有机溶剂分子,可以通过封闭纳米晶体表面的晶格缺陷而使悬空键饱和,从而有效地提高其量子产率和荧光强度,它们也通过隔绝溶剂中活性氧和自由基类物质对晶粒的影响而使QDs的稳定性明显增强.但是,这些有机溶剂分子暴露在外面的长烃链致使QDs的亲水性和生物相容性很差,因此,表面修饰成为量子点探针制备中的一个关键步骤.QDs在整个生物医学领域应用的研究就是在QDs表面化学修饰方法不断改进的推动下发展起来的.早期的修饰方法大都基于配体置换,即利用QDs表面的Zn、Cd等元素与巯基、吡啶环等之间强的配位作用,通过巯基丙酸^[8]、巯基乙胺^[9]、半胱氨酸^[10]及组氨酸^[11]等竞争取代QDs表面的有机分子,将其转变为亲水性产物.这些方法比较简单,但由于破坏了QDs表面疏水层的配位和保护作用,使产物的量子产率和稳定性明显降低,荧光强度减弱,并导致有毒物质 Cd^{2+} 等的释放.而且,由于巯基易被氧化及其与Zn或Cd之间的配位结合并不强,使产物稳定性较差而易于团聚.表面硅烷化是另一种配体置换修饰方法^[12],该方法可以使QDs表面得到比较好的保护,且末端的功能基团使产物具有很好的亲水性,产物的稳定性和荧光性质也比较理想.但是,由于多步硅烷化交联反应非常繁琐、耗时,使得该方法一直只能在少数几个实验室重复,而且硅层易被水解而限制了它在长时间示踪研究中的应用.

作为应用于生物体系长时间实时动态示踪成像研究的探针,特异性、稳定性、强荧光性以及生物安全性等是影响其应用效果和前景的关键,这对QDs的修饰提出了更高的要求.首先,修饰产物应足够稳定,能够抵抗各种复杂生物体系中的水解和酶降解;其次,QDs表面配位结合的有机分子对增强和稳定其荧光性能具有重要的作用,所以修饰过程中应尽可能使之保持完整;在此基础上,为使探针具有好的特异性,应尽可能地选用生物相容性好、非特异性吸附少的修饰试剂.

近年来,另一类自组装修饰方法正在不断发展中,选用具有双亲、类脂性质的多元高分子共聚物,在不破坏QDs表面疏水层的基础上,通过疏水相互作用在QDs表面自组装形成新的聚合物包覆层,进一步改善了QDs的稳定性和荧光性质,聚合物层暴露在外围的亲水基团使修饰产物具有极好的水溶性^[13-16].2002年,Dubertret等^[14]首次报道了这一修饰方法.他们将QDs直接包覆到*n*-Poly(ethylene glycol) phosphatidylethanolamine(PEG-PE)和Phosphatidylcholine(PC)形成的混合胶束的疏水空腔中,胶束外部的极性基团使其具有良好的水溶性.由于外层致密的PEG聚合物几乎没有免疫原性和抗原性,使产物具有很好的生物相容性、很弱的非特异性吸附及很好的稳定性,即使在浓度为1 mol/L的盐溶液也可以稳定数月.Wu等^[15]采用类似的方法,先将聚丙烯酸用辛胺进行部分修饰使其具备良好的双亲性,然后将QDs包覆入该聚合物形成的空腔而被修饰.在此基础上,Xing课题组^[16]进一步发明了一种改进的方法,他们先将一种由丁基丙烯酸酯、乙基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯形成的三元高分子聚合物与正辛胺反应,生成具有良好双亲性的聚合物,然后用其修饰QDs,再将PEG连接到粒子表面以增强其生物相容性,由此得到的产物具有很好的单分散性及荧光性质,而且稳定性特别好,可

以耐受各种酸、碱($\text{pH} = 1 \sim 14$)和盐($0.01 \sim 1 \text{ mol/L}$)的腐蚀. 已有的研究表明, 采用经过自组装方法修饰的 QDs 制备的生物荧光探针可适用于各种生命体系中的长时间实时动态成像, 成为目前普遍选用的修饰方法. 当前, 两个主要的 QDs 商品化公司 Qdots 和 Invitrogen 的产品即分别采用前两种方法进行修饰, 但是由于修饰后粒子的粒径偏大, 小的约十几纳米, 大的达到 30 nm 以上, 比有机荧光分子甚至荧光蛋白大得多, 影响了其在某些方面的应用. 因此, 探索更好的 QDs 修饰方法仍然是目前研究的热点之一.

2.2 特异性生物分子的偶联

特异性生物分子可以通过静电作用^[17]、疏水作用^[18]及共价偶联作用等结合到经修饰的 QDs 表面. 生命体系的长时间动态示踪成像要求探针在复杂的生理环境下保持相当好的稳定性, 这使共价偶联法成为首选的探针制备方法. 在聚合物自组装修饰的基础上, 生物分子的共价偶联主要是利用某些基团之间的化学反应, 通过偶联剂的促进活化作用或偶联作用将特异性生物大分子与 QDs 连接, 较为典型的例子有: 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC) 和 *N*-Hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS) 的共同作用可以有效地促进伯氨和羧基的缩合反应^[16]; Sulfosuccinimidyl 4-*N*-maleimidomethyl cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 可以在氨基和巯基之间起桥连作用而使分别含有氨基和巯基的化合物有效偶联^[14]. 氨基、羧基或巯基在许多生物大分子中都有大量存在, 也容易通过化学修饰的方法将它们衍生到生物分子中, 因此这是一种普适性很好的偶联方法, 已经被广泛采用. 基于这种共价偶联法制备的探针稳定性比较好, 大分子不易受环境的影响而脱落, 而且已有的报道都表明, 几乎所有的生物分子连接到纳米粒子表面后仍保持生物活性, 尤其是分子识别能力没有受到太大影响, 可以实现特异性标记和示踪.

3 量子点探针在生物实时动态示踪成像研究中的应用

3.1 活细胞的实时动态荧光观察和成像

细胞膜物质的荧光标记与成像是量子点细胞免疫标记技术的基本应用. 与有机染料标记探针相比, 量子点标记荧光探针在这方面的应用表现出独特的光稳定性、高空间分辨率以及单分子水平的灵敏度. 这种活细胞膜上单分子高灵敏度实时检测的实现将为受体扩散动力学、配体-受体相互作用、生物分子的转运、酶活的变化以及分子马达的运动等研究开辟一条重要的新途径. Dahan 等^[19]采用量子点探针通过间接免疫标记的方法研究了神经元膜上单个甘氨酸受体的扩散动力学, QDs 的荧光稳定性使得可以连续 20 min 观察该受体在突触不同部位的扩散, 而 Cy3 标记的探针只能持续约 5 s. 单分子示踪和运动轨迹的图像分析表明, 该受体 3 个不同的扩散系数分别对应于其在神经元上的突触、突触周边和突触外 3 个不同位置. Howarth 等^[20]用量子点标记探针示踪了海马神经元上一种经受体肽修饰的谷氨酸受体 (AP-GluR2) 的单分子运动情况, 发现一部分受体在相对不动的细胞表面区域作快速的来回运动, 而那些低速运动的受体可能被折叠蛋白束缚着或将被吞噬.

实现 AP-GluR2 在细胞膜上单分子运动的示踪对研究突触可塑性将具有重要意义. Vu 等^[21]制备了连接有肽配体 β NGF 的量子点探针 (β NGF-QDs), 连续 3 ~ 5 d 的细胞识别成像和示踪结果表明, 它可以与细胞表面的 TrkA 受体作用, 激活受体而引起细胞信号转导的级联反应, 刺激神经元分化 (Neuronal differentiation). 这种既有长时间可示踪性又可引起细胞特异性信号转导的探针可能应用于细胞研究的很多方面. O'Connell 等^[22]采用单个连接了抗生物素的量子点探针确证了活细胞表面 Kv2.1 钾离子通道是在不断运动变化着的.

活细胞膜上分子运动的检测可以为细胞膜上蛋白、受体及离子通道等物质的分布及其运动变化提供直接的信息, 但可为活细胞内部复杂运动机制的了解提供更多细胞生物学的重要信息, 是人们长期热衷的研究内容. 荧光蛋白标记探针和染料标记的生物分子已经被用来进行相关的研究, 但其进展受到了转基因技术的繁琐性及染料的光不稳定性等问题的局限. QDs 的荧光特性使它具有明显的优势, 采用相对简易的操作, 可以在长达数天内进行细胞的分化和世系观察, 以及细胞间、细胞内及细胞器间的各种相互作用的原位实时动态示踪. 但是, 量子点标记探针相对较大的粒径及其特殊的表面

结构使它们不能像有机荧光试剂那样通过被动扩散的方式快速穿过细胞膜进入胞内,所以需要有能力将其有效内化到细胞内的方法和手段. 已经报道的方法主要有吞噬^[23~27]、肽介导的转运^[28~30]、受体介导的内化^[31]、微注射^[14,32]及电穿孔^[33]等.

通过吞噬作用使量子点探针进入细胞是非特异性的,不依赖于细胞种类和探针结构的变化,只要细胞和 QDs 直接接触即可发生,很容易实现. Parak 等^[24]在覆盖了 QDs 的胶原质(Collagen)上培养癌细胞,细胞在运动的过程中吞没沿路的 QDs 留下空白区,吞入 QDs 并不影响细胞正常的活动,进而可以获悉癌细胞的运动情况和转移趋势. 进一步通过测定空白区和细胞覆盖区的面积比值,发现扩散癌细胞和非扩散细胞的比值有一定差别,因而可用于区分这两类细胞并有可能应用于癌细胞转移趋势的快速、直接及定量测定^[25]. Jaiswal 等^[26]也报道了 Hela 细胞可以吞噬 QDs 而被标记,之后的实时动态观察发现,吞噬 12 d 后细胞仍可正常生长发育,并且 QDs 可随着细胞的分裂而进入子细胞. 细胞非特异性吞噬量子点探针的具体机理还不十分清楚,不过,上述被吞噬的 QDs 不约而同地聚集在溶酶体和内涵体中,基于此, Hanaki 等^[27]发现 QDs/SSA(羊血清白蛋白)的复合物是内涵体的优异标记物,因为 QD/SSA 在内涵体中的光稳定性比结合在内涵体特异性右旋糖苷上的荧光素至少稳定 30 倍以上. 由于各种量子点探针聚集到溶酶体或内涵体不能被继续分拣及再循环到其它细胞器或分散到细胞质中,所以这是一种无选择性标记,不能进行亚细胞和胞内大分子水平的特异性标记和动态示踪.

与之相反,肽介导的转运是一种特异性和靶向性都比较好的量子点标记探针内化方法. 如 Fuente 等^[28]报道连接了细胞核靶向肽的量子点探针可以被转运到 hTERT-BJ1 人纤维原细胞的细胞核中. Hoshino 等^[29]发现,分别连接了细胞核和线粒体特异性短肽的量子点探针可以进入细胞并分别定位于活 Vero 细胞的细胞核和线粒体. Santra 等^[30]发现,连接了细胞核靶向肽的量子点探针甚至可以透过大鼠的血脑屏障,进入到脑软组织的细胞核中,此结果非常有意义. 因此,人们可以通过鼻喷雾等完全无损伤的手段实现活体中亚细胞层次的标记和示踪. 探针的靶向性和特异性对生物荧光标记是至关重要的,而且短肽比一般的蛋白小很多,这可以有效地降低探针的尺寸,进而提高标记的准确性. 因此,设计和制备更多特异性短肽结合的量子点探针是目前人们非常感兴趣的研究内容之一.

Lidke 等^[31]用连接了表皮生长因子(EGF)的量子点探针研究 erbB/HER 受体介导的信号转导,发现 EGF 可识别并结合细胞表面的特异性受体 erbB1,通过单个 QDs 的“Blinking”现象,实现了活细胞表面受体的高灵敏检测,而且,探针上的 EGF 仍可激活 erbB1 受体,进而引发 EGF-QD 及其受体同时被吞噬和内化,EGF-QD 结合到细胞伪足(Filopodium)后以 10 nm/s 的平均速度向胞体逆向转运,并获得了 EGF-QD 结合和内化的动力学参数,发现吞噬是此过程的速率决定步骤. 这种定量测定的实现使量子点标记探针在信号转导机理研究中具有重要意义.

Dubertre^[14]将经类酯类物质修饰后的胶束 QDs 注射入早期胚胎的个体细胞内,进行世系跟踪(Lineage-tracing)的胚胎遗传学研究. 结果表明,只有在注射了 QDs 的细胞后代中才能观测到 QDs 的特征荧光. 这种实时的单细胞迁移和分化的成像,对胚胎发育学、癌细胞扩散及淋巴细胞免疫学等研究领域具有重要意义. Derfus 等^[32]将结合有细胞核或线粒体靶向肽的量子点探针经微注射进入细胞,经连续 24 h 的动态示踪观察发现,它们可以分别识别目标细胞器,并且在胞内环境的抗光漂白能力比由染料标记的线粒体探针强几个数量级. 所以微注射也可以实现选择性和靶向性标记和示踪,但由于该方法费时费力,只能对单细胞进行操作,效率不高,不适合于多细胞研究,很难得到大量细胞的普遍现象和一般规律. 与此类似,Chen 等^[33]通过电穿孔的方法,使结合有核定位信号肽(NLS)的量子点探针(QDs-NLS)进入细胞,后续的动态示踪发现探针可以在 NLS 的引导下逐渐进入细胞核或聚集到核周围,而且连续作用一周没有发现探针对细胞有明显的毒害作用.

此外, Courty 等^[34]采用基于胞饮小囊渗透溶解的方法,使量子点标记探针进入胞内并均匀地分布在细胞质中,然后利用单个 QDs 荧光可辨的特点,实时地研究了单个驱动蛋白马达在活细胞内的运动轨迹、速度、进程以及推动量子点探针运动需要的作用力等参数. Gu 等^[2]分别用不同颜色的 QDs 标记人乳腺上皮细胞的正常细胞和肿瘤细胞,正常细胞中的 QDs 随着细胞的分裂和腺泡的形成而进入整个腺泡,然后在两个星期的共培养过程中,可以观察到肿瘤细胞不断向腺泡移动,伸展出侵袭伪足,接

触腺泡进而程序性死亡的整个过程^[2]。

对活细胞内生命活动过程进行高灵敏、高分辨、实时、原位、动态研究是当前细胞生物学研究的前沿和热点之一,量子点的出现为这一领域带来了新的机遇。目前国内有些课题组正开展相关的工作。武汉大学、中国科学院武汉病毒研究所、西南大学以及北京理工大学等合作在建立量子点安全、简单制备方法和多种修饰方法以及细胞标记与成像技术等的基础上^[35-37],采用量子点进行病毒与细胞相互作用的实时检测新技术及动态过程可视化方面的研究,拟在活细胞内直接可视化研究病毒-宿主相互作用的动态过程,实时获取病毒侵染过程中重要或关键分子事件如吸附、侵入、脱壳、生物大分子(核酸、蛋白等)的运动行为及轨迹等生命过程信息,进而阐述病毒的侵染和致病等过程机制。目前,已在量子点标记病毒、宿主细胞实时动态成像技术等方面取得进展。

3.2 活体标记和实时动态示踪

水溶性 QDs、QDs 标记的细胞和量子点标记探针可通过注射进入体内,再经过血液循环系统及淋巴循环系统等到达组织和器官,进而实现活体的荧光标记成像。QDs 应用于活体的实时动态示踪也有其独特的优势。首先,某些 QDs,如 CdTe, InP, InAs 等的发射谱在近红外光谱区,这对活体荧光成像非常有意义,因为生物组织和成分对可见光有比较强的散射和吸收,致使可见光在生物组织中的穿透能力比较差。700 ~ 1300 nm 的近红外光被称为“组织光窗(Tissue optical window)”,生物组织对此波段的光吸收和散射效应均最小,穿透率最高。但是,在这个范围内很少有有机荧光试剂的发射谱,而且还存在易被光漂白的局限,因此严重影响了活体荧光成像的发展。理论模型计算的结果表明,QDs 有 700 ~ 900 nm 以及 1200 ~ 1600 nm 两个“近红外光窗”,可应用于在体光学成像^[38]。其次,对于 CdSe/ZnS QDs 等一些发射可见光的 QDs,由于采用目前的合成技术,已经可以制备具有非常优良荧光性质的产物,量子产率高,吸光度大,荧光强度特别强,稳定性也相当好,足以抵抗组织对可见发射光的强吸收和散射,再结合利用双光子激发成像可以增加激发光渗透深度的特点,使得它们在在体荧光成像应用中得到理想的结果。由此可见,QDs 是活体荧光成像的一种新促进剂。

QDs 已被用于多种动物的血管系统被动成像(Passive image)。Larson 等^[39]将绿色荧光 QDs 静脉注射入小鼠体内,双光子激发成像发现,体内 QDs 的荧光仍清晰可辨,用于检测毛细血管的血流速度和脉搏。Lim 等^[38]报道静脉注射入大鼠体内的近红外荧光的 QDs 可用于冠状血管系统的观察。这都是利用自然的循环系统使 QDs 从注射部位到达整个脉管系统,循环系统是将外源分子递送入体内的有效途径。但由于血管器官对被递送物质的吸收,同时 QDs 也可以被网状内皮系统如脾、肝及肾等器官内的吞噬细胞非特异性吸收,所以,除非 QDs 具有很好的靶向功能,否则随着时间的推移,静脉内的 QDs 终将被消耗,这无疑会严重影响它们的循环寿命。因此,要进行血管系统的长期研究必须考虑 QDs 在系统内的精确寿命,并探索延长寿命的办法。据 Ballou 等^[40]报道,用长链 PEG 聚合物(5000 Da)修饰 QDs,大大增长了其在老鼠血流系统中的循环寿命,可接近花青类染料标记抗体的血清寿命,而后者已经被成功地应用于肿瘤标记,而且,荧光在体内至少可以稳定 4 个月。Akerman 等^[8]也报道,经 PEG 修饰的 QDs 连接了组织靶向肽以后,可随着血液循环在特异的血管组织聚集,PEG 可以有效降低探针在网状内皮系统的非特异性吸附。类似的研究将有助于更好地实现 QDs 的活体长时间实时动态示踪应用。

淋巴系统是另一个可将 QDs 递送入特定组织的循环系统。据 Kim 等^[41]和 Popescu 等^[42]报道,通过皮内注射的方式将近红外 QDs 注射入小鼠和猪的体内,它们被树状细胞吞没,并迁移到哨位淋巴结,然后通过低剂量 QDs(400 pmol)和低能量近红外激发(5 mW/cm²)实现了猪淋巴结 1 cm 深处的荧光成像,通过荧光可全程实时地跟踪淋巴腺流向哨位淋巴结,即使当它只是大淋巴结的一小部分时,也可对其快速准确定位,从而进行光引导的精确外科手术,且没有观察到明显的毒副作用。这表明 QDs 有应用于医学成像、指导临床手术及提高治疗准确性的可能。最近, Ballou 等^[43]也实时地观察到被注入到活体肿瘤部位的 QDs 迅速迁移到邻近的哨位淋巴结。在体外装入胞内的 QDs 可随着细胞的运动到达特定的器官,荧光信号可用来示踪器官中的原始细胞及其后裔细胞的运动变化情况。Gao 等^[44]将 QDs 装入癌细胞,然后将它们皮下注射入免疫能力较差的老鼠,而后透过皮肤进行实时动

态荧光检测,可以观察到癌细胞在体内分化形成了一个实体肿瘤. Voural 等^[45]用 QDs 标记的肿瘤细胞经静脉注射入老鼠体内,结合发射谱扫描多光子显微镜成像技术研究了肿瘤细胞的外渗情况,发现 QDs 仅保留在被标记的细胞,而不会渗漏到别的宿主细胞,且标记没有明显影响肿瘤细胞在循环系统中的生存、外渗以及在肺组织中形成肿瘤的能力. Hoshino 等^[46]发现,被淋巴细胞吞噬的 QDs 在淋巴细胞内的荧光稳定性可以保持 7 d 以上,且细胞的活性和功能不受影响,将这些细胞静脉注射入老鼠体内后,它们可在外周血中存在 5 d 以上,7 d 以后在肾脏、肝脏和脾组织中可检测到约相当于初始注射量 20% 的 QDs. 这些结果表明, QDs 可以作为体内长时间生物成像的有效工具.

相对于上述大多数组织和器官水平的荧光成像而言,活体分子成像具有更高的靶向性及更好的特异性,采用目前先进的成像技术和手段,通过 QDs 可以实现在体单分子水平的长时间实时原位动态示踪. 在体条件下, QDs 可通过被动靶向和主动靶向双重途径进入肿瘤部位. 被动靶向主要是由于肿瘤部位增强的渗透性和保留效应而使大分子或纳米粒子在此部位优先聚积^[47]. 主动靶向则通过连接有肿瘤标志物的特异性抗体的量子点探针实现. Gao 等^[44]将前列腺癌细胞的一种特异性抗体连接到 QDs 表面制得探针,经过静脉注射入患有前列腺癌的裸鼠体内,发现探针可通过抗原-抗体的作用而被癌细胞主动结合,在体荧光成像可以观察到正常组织和癌组织中由于分子区别而导致的图像反差 (Image contrast). Tada 等^[48]采用背部皮肤固定器 (Dorsal skinfold chamber) 和配备有高灵敏 CCD 的高速共焦显微镜观察了单个乳腺癌特异性量子点探针在老鼠体内的运动情况,发现它们被注入到体内后以 Stop-and-go 形式不断运动一直到核周边,整个过程可分为 6 个阶段,还可通过速率定量测定来确定其中的决速阶段. 这种高灵敏可视化示踪研究可以为肿瘤发生、发展过程中一些关键单分子事件以及癌细胞转移过程提供重要信息,为癌症的发生、扩散及转移机制的探索提供重要线索,并可望为癌症的早期诊断和疗效评价提供关键性技术.

4 QDs 的生物安全性

对于活细胞和活体的荧光成像而言,外源报告分子对正常生命过程的干扰程度是决定其应用价值的重要因素. 就目前常用的 CdSe 及 CdTe 等 QDs 而言,由于其组成元素 Cd 和 Te 等都具有很强的毒性,特别是在紫外灯照射下的 CdSe QDs 对细胞具有明显的毒性,因为紫外线辐射的能量近似于共价化学键的键能而足以使半导体粒子光解、氧化,释放较多的剧毒 Cd^{2+} . 因此, QDs 潜在的毒性及其在体内的消化、降解和代谢过程已受到高度重视和关注,这将是决定 QDs 能否进一步应用于人体光学成像和辅助治疗的关键因素之一. 虽然已有的细胞研究结果几乎都证明,在没有强烈紫外线辐射并且 QDs 表面被稳定保护时, QDs 对活细胞的毒性不明显,且核或核/壳材料被保护得越好,其释放 Cd 等元素的速度越慢,毒性也越小^[33,49,50]. 目前还没有足够的证据能够确定其对活体毒性的大小,但这是一个不容回避的问题. 由于肝脏是 Cd^{2+} 剧烈伤害的主要器官,很低剂量的 Cd^{2+} (100 ~ 400 $\mu\text{mol/L}$) 即可导致肝细胞活性明显降低,而且约有 25% 的 Cd^{2+} 会在肝脏中沉积,其完全代谢需要 20 ~ 25 年. 对于 QDs 的体内降解问题现在也还悬而未决. 目前用于活体研究的 QDs 基本都经过高分子聚合物包覆修饰,难以发生化学或酶降解,那么它们如何被慢慢过滤和排泄出体外,代谢率有多高,影响这个过程的主要因素有哪些? 关于这些问题还没有完整的答案. 仅有的结果是,药代动力学研究发现 QDs 的表面化学严重影响其循环半衰期. QDs 主要由内皮网状系统的吞噬作用从循环系统中清除,一种理论认为,粒子可以从淋巴结、脾等组织中释放,然后被肾脏中的 Kupfer 细胞吸收再被转运到胆汁系统而被排泄掉. QDs 的代谢和排泄与 QDs 的化学性质密切相关^[42].

5 展 望

在化学、生物及医学等多学科科研工作者的共同努力下, QDs 标记的生物实时动态成像研究已经取得了显著的成果,但也还存在许多需要进一步探索的问题. 就目前的现状而言,在以下几方面需要进一步深入研究:

(1) 高稳定性、安全性及可重复的表面修饰方法研究. 如前所述,表面修饰对量子点的荧光性能、

稳定性、在体内的循环时间、毒性及代谢等诸多方面都起着非常重要的作用,虽然目前采用多元共聚物修饰取得了较好的结果,但仍需进一步改进,使修饰后的产物具有更好的生物相容性、更长的体内循环时间和更低的毒性,并且可以协助 QDs 顺利被代谢到体外,以使 QDs 更好地应用于活体的实时动态示踪和临床医学诊断及治疗.

(2) 近红外荧光 QDs 的制备. 虽然发射可见光的 QDs 应用于活体示踪已经得到了一些满意的结果,但由于生物体系对可见光的强烈吸收和散射,使得成像的深度仅局限在几厘米内,更深的成像仍有赖于近红外荧光探针的发展,目前,近红外发射 QDs 的制备方法还远未成熟,产物的荧光性能和稳定性以及制备方法的重复性均不理想,需要更深入地研究.

(3) 活体的长时间动态示踪. 实时成像与可视化示踪是目前生命科学研究中一个热门研究领域,它可以非常直观地展示特定的生命活动过程,提供过程中的具体信息,为疾病发生发展情况的确定提供直接的证据,并为疾病的治疗提供有效的方法. 在较好地解决了近红外 QDs 的制备和表面修饰方法的基础上,基于 QDs 的活体长时间实时动态示踪研究应将取得更多突破性的进展.

(4) QDs 的生物效应研究. 活体检测方法研究的最终目标之一是服务于人类,提高生命质量. 安全是生物应用材料和生物检测方法和手段的一个基本要求,它们不应该对人体产生毒害和不必要的创伤, QDs 的化学组成注定它不具有绝对的生物安全性,但当它们进入体内以后,经过具体的循环和代谢过程到底会产生怎样的影响,基本还是未知的. 如何通过各种方法弄清楚其潜在的毒害及其作用机理,然后研究对其生物效应进行调控的方法,消除负面的生物效应,调节它与生物体作用的机制,最终有效消除或尽量减少其毒害作用,从而应用于人体是非常值得研究的内容.

(5) 基于 QDs 的多功能纳米材料的制备及其应用. 随着纳米材料制备及其表征技术的不断发展,已经开发出各种多功能纳米材料,它们具备多种纳米效应,而粒径、稳定性及生物相容性等性质并无明显变化,所以兼具多种纳米粒子的作用. 随着其实际应用的实现,其重要性也日益显现出来,可以说,多功能纳米材料的制备及其应用已成为纳米材料发展的一个重要方向^[51~54]. 就 QDs 而言,在充分利用其优良的荧光性能进行检测和成像的基础上,集成应用其它更多的纳米材料,如超顺磁性纳米材料,以提高准确性和应用效率是非常有意义的研究课题.

参 考 文 献

- [1] Smith A. M., Nie S. M. . *Analyst*[J], 2004, **129**: 672—677
- [2] Alivisatos A. P., Gu W., Larabell C. . *Annu. Rev. Biomed. Eng.* [J], 2005, **7**: 55—76
- [3] Larson D. R., Zipfel W. R., Williams R. M., *et al.* . *Science*[J], 2003, **300**: 1434—1436
- [4] Cottingham K. . *Anal. Chem.* [J], 2005, **77**: 354A—357A
- [5] Zhu J. J., Zhou M. G., Xu J. Z., *et al.* . *Materials Letters*[J], 2001, **47**(1/2): 25—29
- [6] SHU Lei(舒磊), YU Shu-Hong(俞书宏), QIAN Yi-Tai(钱逸泰). *Inorganic Chemistry Lett. (无机化学学报)*[J], 1999, **15**(1): 1—7
- [7] Peng Z. A., Peng X. G. . *J. Am. Chem. Soc.* [J], 2001, **123**: 183—184
- [8] Akerman M. E., Chan W. C. W., Laakkonen P., *et al.* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*[J], 2002, **99**(20): 12617—12621
- [9] Mamedova N. N., Kotov N. A., Rogach A. L., *et al.* . *Nano Lett.* [J], 2001, **1**(6): 281—286
- [10] Mitchell G. P., Mirkin C. A., Letsinger R. L. . *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1999, **121**(35): 8122—8123
- [11] Medintz I. L., Clapp A. R., Mattoussi H., *et al.* . *Nat. Mater.* [J], 2003, **2**: 630—638
- [12] Williams S. C., Parak D. J., Zanchet D., *et al.* . *J. Phys. Chem. B* [J], 2001, **105**(37): 8861—8871
- [13] Pellegrino T., Manna L., Kudera S., *et al.* . *Nano Lett.* [J], 2004, **4**: 703—707
- [14] Dubertret B., Skourides P., Norris D. J., *et al.* . *Science* [J], 2002, **298**: 1759—1762
- [15] Wu X., Liu H., Liu J., *et al.* . *Nat. Biotechnol.* [J], 2003, **21**: 41—46
- [16] Xing Y., Chaudry Q., Shen C., *et al.* . *Nature Protocols* [J], 2007, **2**: 1152—1165
- [17] Goldman E. R., Anderson G. P., Tran P. T. . *Anal. Chem.* [J], 2002, **74**(4): 841—847
- [18] Liu Y., Zhang M. X., Zhang Z. L., *et al.* . *Frontiers in Bioscience*[J], 2008, **13**: 923—928
- [19] Dahan M., Lévi S., Luccardin I. C., *et al.* . *Science*[J], 2003, **302**: 442—445
- [20] Howarth M., Takao K., Hayashi Y., *et al.* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*[J], 2005, **102**(21): 7583—7588

- [21] Vu T. Q., Maddipati R., Blute T. A., *et al.*. Nano Lett. [J], 2005, **5**(4): 603—607
- [22] O'Connell K. M. S., Rolig A. S., Whitesell J. D., *et al.*. J. Neurosci. [J], 2006, **26**(38): 9609—9618
- [23] Pellegrino T., Parak W. J., Boudreau R., *et al.*. Differentiation [J], 2003, **71**: 542—548
- [24] Parak W. J., Boudreau R., Gros M. L., *et al.*. Adv. Mater. [J], 2002, **14**(12): 882—885
- [25] Gu W., Pellegrino T., Prark W. J., *et al.*. Methods Mol. Biol. [J], 2007, **374**: 125—132
- [26] Jaiswal J. K., Mattoussi H., Mauro J. M., *et al.*. Nat. Biotechnol. [J], 2003, **21**: 47—51
- [27] Hanaki K., Momo A., Oku T., *et al.*. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 2003, **302**: 496—501
- [28] Fuente J. M., Fandel M., Berry C. C., *et al.*. Chem. Biochem. [J], 2005, **6**: 989—991
- [29] Hoshino A., Fujioka K., Oku T., *et al.*. Microbiol. Immunol. [J], 2004, **48**(12): 985—994
- [30] Santra S., Yang H., Stanley J. T., *et al.*. Chem. Commun. [J], 2005, (34): 3144—3146
- [31] Lidke D. S., Nagy P., Heintzmann R., *et al.*. Nat. Biotechnol. [J], 2004, **22**: 198—203
- [32] Derfus A. M., Chan W. C. W., Bhatia S. N.. Adv. Mater. [J], 2004, **16**(12): 961—966
- [33] Chen F., Gerion D.. Nano Lett. [J], 2004, **4**(10): 1827—1832
- [34] Courty S., Luccardini C., Bellaiche Y., *et al.*. Nano Lett. [J], 2006, **6**(7): 1491—1495
- [35] Xie H. Y., Liang J. G., Liu Y., *et al.*. J. Nanosci. Nanotechnol. [J], 2005, **5**(6): 880—886
- [36] Xie M., Liu H. H., Chen P., *et al.*. Chem. Commun. [J], 2005, (44): 5518—5520
- [37] Wu S. M., Zhao X., Zhang Z. L., *et al.*. Chem. Phys. Chem. [J], 2006, **7**(5): 1062—1067
- [38] Lim Y. T., Kim S., Nakayama A., *et al.*. Mol. Imaging [J], 2003, **2**: 50—64
- [39] Larson D. R., Zipfel W. R., Williams R. M., *et al.*. Science [J], 2003, **300**: 1434—1436
- [40] Ballou B., Lagerholm B. C., Ernst L. A., *et al.*. Bioconjugate Chem. [J], 2004, **15**: 79—86
- [41] Kim S., Lim Y. T., Soltesz E. G., *et al.*. Nat. Biotechnol. [J], 2004, **22**(1): 93—97
- [42] Popescu M. A., Toms S. A.. Expet. Rev. Mol. Diagn. [J], 2006, **6**(6): 879—890
- [43] Ballou B., Ernst L. A., Andreko S., *et al.*. Bioconjugate Chem. [J], 2007, **18**: 389—396
- [44] Gao X., Cui Y., Levenson R. M., *et al.*. Nat. Biotechnol. [J], 2004, **22**: 969—976
- [45] Voural E. B., Jaiswal J. K., Mattoussi H., *et al.*. Nature Medicine [J], 2004, **10**(9): 993—998
- [46] Hoshino A., Hanaki K., Suzuki K., *et al.*. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 2004, **314**: 46—53
- [47] Jain R. K.. Annu. Rev. Biomed. Eng. [J], 1999, **1**: 241—263
- [48] Tada H., Hideo H., Wanatabe T. M., *et al.*. Cancer Res. [J], 2007, **67**(3): 1138—1144
- [49] Derfus A. M., Chan W. C. W., Bhatia S. N.. Nano Lett. [J], 2004, **4**(1): 11—18
- [50] Kirchner C., Liedl T., Kudera S., *et al.*. Nano Lett. [J], 2005, **5**(2): 331—338
- [51] Xie H. Y., Zuo C., Liu Y., *et al.*. Small [J], 2005, **1**(5): 506—509
- [52] Xie H. Y., Xie M., Zhang Z. L., *et al.*. Bioconjugate Chem. [J], 2007, **18**: 1749—1755
- [53] Wang G. P., Song E. Q., Xie H. Y., *et al.*. Chem. Commun. [J], 2005, (34): 4276—4278
- [54] Song E. Q., Wang G. P., Xie H. Y., *et al.*. Clin. Chem. [J], 2007, **53**(12): 2177—2185

Advance in Real-time and Dynamic Biotracking and Bioimaging Based on Quantum Dots

WANG Yang, DENG Yu-Lin, QING Hong, XIE Hai-Yan*

(School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract New development opportunities for ultra-sensitive, *in situ*, real-time and dynamic imaging in life sciences are emerging with fluorescent semiconductor quantum dots (QDs), which are of unique fluorescence properties and have been successfully applied in biological labeling and imaging. Nowadays, QDs-based labeling and imaging is one of the most important frontiers in biodetection and bioimaging. In this paper, the related photophysical properties of quantum dots, recent advance in the preparation of QDs-based fluorescent bioprobes and their applications in real-time and dynamic tracking and imaging are reviewed.

Keywords Quantum dots; Probe; Real-time; Dynamics; Imaging

(Ed. : A, G)