

## 荧光载体CS-Qdots的构建及生物相容性分析

袁晨燕\*, 王 玲, 安艳丽

(东南大学附属中大医院检验科, 江苏 南京 210009)

**[摘 要]** 目的:构建一种可通过荧光成像进行体内外示踪的纳米基因载体,并对其生物相容性进行初步评价。方法:在量子点Qdots表面修饰壳聚糖后形成荧光纳米颗粒CS-Qdots,检测其电镜形态、光学特征、表面电荷和傅里叶变换红外光谱(FTIR),并将其注入裸鼠移植瘤内观察体内成像信号;以凝胶阻滞电泳检测CS-Qdots携带质粒DNA的能力,并利用激光共聚焦显微镜观察其转染报告基因绿色荧光蛋白在细胞内的表达情况。通过MTT试验检测细胞相对增殖率(RGR)、测定溶血率和小鼠急性毒性试验评价CS-Qdots的生物相容性。结果:电镜观察显示CS-Qdots纳米颗粒粒径为20~30 nm, zeta电位分析其表面电位为 $(28.02 \pm 1.15)$  mV, FTIR图谱显示出壳聚糖的特征谱带, 发射光谱分析CS-Qdots最大发射峰值在630 nm。凝胶阻滞电泳显示纳米颗粒和DNA的比例大于10:1混合以后不再向正极泳动,激光共聚焦观察CS-Qdots能携带质粒pEGFP-C1在HepG2细胞内表达绿色荧光蛋白,小鼠活体成像中CS-Qdots在裸鼠移植瘤内有较强荧光成像信号。MTT试验显示,50、100、200和400  $\mu$ g/mL的CS-Qdots共孵育的细胞RGR分别为1.000、1.000、0.917和0.875,而相应浓度的Qdots孵育细胞RGR为1.000、0.850、0.621和0.326;浓度在100  $\mu$ g/mL以上的Qdots量子点溶血率均大于5%,而CS-Qdots纳米颗粒在400  $\mu$ g/mL以内溶血率均小于5%。小鼠尾静脉注射CS-Qdots 72 h急性毒性试验显示,与生理盐水对照组相比,没有明显的脏器病理损伤,肝肾功能正常,血细胞计数正常。结论:成功构建了荧光纳米颗粒CS-Qdots,它能有效转染基因在细胞内表达,具有较高的生物相容性,并可在体内外进行荧光成像,是可示踪基因的运送纳米载体。

**[关键词]** 量子点;荧光纳米颗粒;可示踪基因运送;生物相容性

**[中图分类号]** Q782

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)10-1227-07

doi:10.7655/NYDXBNS20171001

## Construction and biocompatibility evaluation of fluorescent traceable gene vector CS-Qdots nanoparticles

Yuan Chenyan\*, Wang Ling, An Yanli

(Clinical Laboratory, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare fluorescent nano gene vectors for traceable gene delivery and evaluate the biocompatibility of the nanoparticles. **Methods:** The fluorescent nanoparticles were constructed by quantum dots (Qdots) encapsulated by chitosan, then characterized by transmission electron microscopy (TEM), fluorospectrophotometer, zeta potential and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR). The imaging of tumor-injected xenograft nude mouse was taken to evaluate the *in vivo* fluorescent signal of CS-Qdots nanoparticles. Gel retardation assays were used to test the DNA binding affinity of CS-Qdots. The expression of green fluorescent protein (GFP) gene delivered in cells by CS-Qdots was observed by confocal laser microscope. The biocompatibility of CS-Qdots was evaluated by cells relative grow rate (RGR) of MTT test, hemolysis rate and acute toxicity tests in mice. **Results:** The mean particle size of the CS-Qdots nanoparticles was 20–30 nm in the TEM image and the surface charge of them was  $(28.02 \pm 1.15)$  mV. The characteristic peaks of chitosan were observed on the CS-Qdots FTIR spectra. The light emission peak of CS-Qdots was at 630 nm. Complete retardation was observed for particle-DNA weight ratios over 10:1, for which the DNA was well packed in the gene-CS-Qdots complexes with a positive surface charge. High level expression of GFP genes delivered into HepG2 cells by CS-Qdots was detected by a confocal laser microscopy. The strong fluorescence signal of CS-Qdots *in vivo* was observed in xenograft nude mouse imaging. The MTT results indicated that RGRs of cells co-incubated with CS-Qdots at concentrations of 50, 100, 200 and 400  $\mu$ g/mL were 1.000, 1.000, 0.917, and 0.875, respectively. The RGRs of cells co-incubated with Qdots at the corresponding concentrations were 1.000, 0.850, 0.621 and 0.326. The hemolysis rates of Qdots over the concentration of 100  $\mu$ g/mL were all above 5%. Oppositely, the hemol-

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81501525)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: sesame\_yuan@126.com

ysis rates of CS-Qdots were all below 5% at all the concentrations tested. The results of acute toxicity tests in mice at 72 h post injection indicated that compared to the saline-controlled mice, no symptoms of main organ lesions were observed, no abnormality was seen in the blood cells test, and the functions of liver and kidney were normal in the mice. **Conclusion:** The CS-Qdots fluorescent nanoparticles with high biocompatibility were constructed successfully, which delivered genes into cells efficiently. The nano gene vectors could be traced by fluorescent imaging *in vivo* and *in vitro*.

[Key words] quantum dots; fluorescent nanoparticles; traceable gene delivery; biocompatibility

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(10): 1227-1233]

基因治疗是将外源目的基因通过载体或其他途径导入体内,在靶组织和靶细胞中显示出相应生物学效应,从而治疗疾病的一种方法。在基因治疗的发展过程中,基因载体的研究始终是人们关注的焦点。基因载体能否安全有效地运载基因到指定地点是基因治疗能否在临床上应用的关键所在<sup>[1]</sup>,基因通过载体进行可视化递送能极大提高治疗的可控性。

基因载体主要分为病毒型载体和非病毒型载体 2 种。病毒型载体最大的优点是转染率高,一般可达 90% 以上,但其制备复杂,且存在一些关键的安全性问题,如内在毒性、短期或长期潜在的危险性、对宿主的免疫原性及激活癌基因等,这些缺点使病毒型载体的临床应用受到很大限制<sup>[2]</sup>。纳米载体的出现为基因治疗带来了曙光,纳米载体是非病毒型载体,具有无免疫原性和致癌性、无毒或极低毒性、运载量大、制备简单、易与 DNA 结合、不受 DNA 片段大小的限制、通过靶向修饰可以转运 DNA 到靶细胞等优点,很大程度上弥补了病毒型载体的缺陷<sup>[3]</sup>。

量子点(quantum dots, Qdots)是一种荧光半导体纳米颗粒(fluorescent semiconductor nanoparticles),具有优越的光学成像性能,其荧光亮度高,可为传统有机染料或荧光蛋白的 10~20 倍,成像灵敏度可提高 10~100 倍<sup>[4]</sup>;抗光漂白(photobleaching)能力强,比有机染料和荧光蛋白稳定 100~1 000 倍<sup>[5]</sup>;发射波长可调节<sup>[6]</sup>,通过改变量子点的粒径可以得到不同发射波长的量子点;Stokes 位移大<sup>[7]</sup>,吸收光谱和发射光谱可以相差 200~300 nm,使其发光信号可以清晰地从背景中被辨识,且发射波长光谱窄而对称,激发波长光谱范围宽<sup>[8]</sup>。作为一种新型纳米载体,量子点不仅具有其他纳米基因载体的优势,同时由于其优越的荧光性质,可以示踪基因运载的过程。20 世纪 70 年代末量子点就引起了物理学家、电子工程学家和化学家的注意,但直到 20 世纪 90 年代后期,随着制备技术的不断提高,量子点才在生物、医学研究中,被广泛应用于 siRNA 运载与体内体外成像<sup>[9]</sup>。比

如, Walther 等<sup>[10]</sup>发现量子点表面经过修饰处理后,与多肽形成运载系统,在生物细胞中能稳定存在且没有毒性,该系统能很好地运载 RNA 进入细胞。Li 等<sup>[11]</sup>合成了 CdS 量子点,并用聚乙烯亚胺对其进行表面修饰,修饰后的纳米颗粒粒径为 24 nm, zeta 电位为 +15 mV,表现出非常高的转染效率。

壳聚糖是天然甲壳素的脱乙酰产物,是无生物毒性的碱性多糖,具有优良的生物相容性和可生物降解性,无免疫原性,能与 DNA 形成复合物,保护质粒免受 DNA 酶(DNAase)的降解并提高基因的表达水平。此外,可根据实际需要壳聚糖进行修饰,增加 DNA 传送的组织选择性,提高基因的转染效率<sup>[12]</sup>。这些特性使壳聚糖成为最具潜力、安全而有效的非病毒型基因载体之一。

在本研究中,我们构建了一种壳聚糖包裹的量子点纳米颗粒,对其进行了相关表征和生物相容性的评价,希望能利用壳聚糖良好的生物相容性以降低量子点的毒性,同时赋予量子点表面正电荷,使其成为一种荧光基因载体,为示踪基因载体的研究提供一种选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株

L-929 细胞株(小鼠成纤维细胞)和 HepG2 细胞株(人肝癌细胞)均购自中科院上海细胞研究所。细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中,培养箱条件为 37 ℃,饱和湿度、5% CO<sub>2</sub>。

#### 1.1.2 主要试剂

硼氢化钠(NaHB)、碲粉(Te)、巯基丙酸(2-mercaptopropionic acid, MPA)、氯化镉(CdCl<sub>2</sub>)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、四甲基偶氮唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)均购自中国医药上海化学试剂采购供应站。壳聚糖(chitosan, CS)购自美国 Sigma 公司。所有试剂均为分析纯。

### 1.1.3 主要仪器

透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)H-600(Hitachi 公司,日本);高分辨率透射电镜 (high resolution transmission electron microscopy, HRTEM)JEM-2010 UHR (JEOL 公司,日本);ZETA Plus 粒径分析仪(Brookhaven Instruments 公司,美国);傅里叶转换近红外光谱(Fourier transform infrared spectrometry, FTIR) 分析仪 NEXUS87 (NICOLET 公司,美国);荧光分光光度计 LS50B 型 (Perkin-Elmer 公司,美国);激光共聚焦显微镜 FluoView FV1000(Olympus 公司,日本);CRI 小动物活体成像系统(CRI Maestro 公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 量子点 Qdots 的制备

NaHTe 的制备:以 NaHB 和 Te 摩尔比 2:1 的比例将 NaHB 和 Te 粉加入洁净干燥的玻璃瓶,通 N<sub>2</sub> 10 min 后用胶塞封口,用注射器注入 5 mL 纯水后,于冰浴平稳反应 5 h,上层淡紫色透明液体即为碲化钠(NaHTe)。

CdTe 的制备:在三口烧瓶内加入 100 mL 纯水,加入 0.52 mL MPA 作为稳定剂,磁力搅拌下,加入 CdCl<sub>2</sub> 0.045 6 g,通入 N<sub>2</sub> 30 min,再用浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液将反应体系的 pH 值调至 9.0±0.1,在反应体系中迅速加入新鲜制备的 NaHTe 溶液 100 μL,使体系中的反应前体 NaHTe: Cd<sup>2+</sup>: MPA 的摩尔比为 0.5:1:2.4,升温至 100 ℃,在冷凝回流装置下,在反应的全过程中始终通入 N<sub>2</sub> 并保持磁力搅拌反应,得到红色的水溶性 CdTe 胶体溶液。丙酮沉淀 CdTe,离心分离沉淀后弃去上清,再次用纯水溶解,如此反应数次得到纯净的红色胶体溶液,干燥后得到 CdTe 晶体粉末备用,即量子点颗粒 Qdots。

### 1.2.2 CS-Qdots 纳米颗粒的制备

称取 0.5 g chitosan 溶于 0.1 mol/L 的乙酸溶液 10 mL 中,制备chitosan的储备溶液。纯水稀释 100 倍后,在磁力搅拌下,逐滴加入浓度为 0.1 mg/mL 的 Qdots 胶体溶液,搅拌下逐滴加入浓度为 0.5% (W/V) 的(EDC·HCl)水溶液 0.5 mL,通入 N<sub>2</sub> 磁力搅拌反应过夜,得到 chitosan 包裹的 Qdots (CS-Qdots) 胶体溶液。1×10<sup>6</sup> r/min 超速离心沉淀 CS-Qdots,纯水重新悬浮后洗涤数次。

### 1.2.3 Qdots 和 CS-Qdots 纳米颗粒的表征

#### 1.2.3.1 电镜形态学检测

取出少量制备的 Qdots 纳米晶体和 CS-Qdots 纳米颗粒,加无水乙醇超声分散 15 min,滴有膜铜网,制

得电镜样品,分别用 HRTEM 和 TEM 观察形态。

#### 1.2.3.2 zeta 电位分析

分别取 Qdots 纳米晶体的纯水溶液 (pH7.4)和 CS-Qdots 纳米颗粒的 HEPES 溶液即本实验所用的细胞转染缓冲液 (pH6.8) 2 mL,置于比色皿中,应用 ZETA Plus 粒径分析仪测定 zeta 电位,应用动态光散射软件进行数据处理,记录表面电位。

#### 1.2.3.3 光学性能检测

分别取 2 mL Qdots 纳米晶体和 CS-Qdots 纳米颗粒置于比色皿中,应用荧光分光光度计测量吸收光谱和发射光谱。

#### 1.2.3.4 FTIR 分析

使用 NEXUS870 型光谱仪对 Qdots 纳米晶体和 CS-Qdots 纳米颗粒进行 FTIR 分析。

### 1.2.4 CS-Qdots 结合质粒的凝胶电泳阻滞试验

将 CS-Qdots 纳米颗粒和 pEGFP-C1 载体 DNA 按照质量比为 0:1、2:1、4:1、6:1、8:1、10:1、12:1 和 14:1 的比例在含有 HEPES 缓冲液 (pH6.8) 的试管中混合,终体积 50 μL,每管含有 DNA 的质量均为 10 μg,室温下轻摇孵育 30 min,将混合物在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳 1 h,然后经溴化乙锭染色后在凝胶成像仪下观察电泳情况。未经结合的质粒 DNA 将在电场中向阳极泳动,若质粒 DNA 完全被 CS-Qdots 纳米颗粒包裹结合,则不能向阳极泳动。

### 1.2.5 CS-Qdots 转染质粒进入细胞

用 CS-Qdots 纳米颗粒作为基因载体,将绿色荧光蛋白报告基因载体 pEGFP-C1 转染至肝癌细胞 HepG2。细胞预先种在盖玻片上。将 CS-Qdots 纳米颗粒经 100 ℃真空干燥除菌后与 pEGFP-C1 分别用 500 μL 的 HEPES 缓冲液 (pH6.8) 稀释,然后按照质量比为 12:1 的比例将二者轻轻混合,室温下孵育 30 min。加到 HepG2 细胞上,培养 6 h 后,弃去转染复合物,加入完全 RPMI1640 培养基,继续培养 48 h 后,用封片液将此盖玻片固定在载玻片上,在激光共聚焦显微镜下观察 CS-Qdots 纳米颗粒在细胞内的荧光和绿色荧光蛋白的表达情况。

### 1.2.6 CS-Qdots 在裸鼠移植瘤内荧光成像

用 HepG2 细胞在裸鼠前肢皮下建立移植瘤,CS-Qdots 成像小鼠在瘤体内注入 100 μL CS-Qdots 纳米颗粒 (400 μg/mL),对照小鼠在瘤体内注入 100 μL Qdots 纳米颗粒 (400 μg/mL)。注射 30 min 后在小动物活体近红外荧光成像仪上观察纳米颗粒在瘤体内的弥散和成像情况。



## 1.2.7 CS-Qdots 纳米颗粒的生物相容性分析

### 1.2.7.1 细胞毒性试验

取对数生长期的 L-929 细胞, 细胞浓度  $6 \times 10^4$  个/mL, 以 100  $\mu$ L/孔接种 96 孔培养板, 24 h 后弃去原液, 分别加入 50、100、200、400  $\mu$ g/mL 的 Qdots 纳米晶体和 CS-Qdots 纳米颗粒溶液, 阴性对照为 RPMI1640 培养液, 阳性对照为 0.7% 的聚丙烯酰胺单体溶液, 每组设复孔 8 个, 培养 72 h 后, 每孔加入 20  $\mu$ L MTT, 继续培养 4 h, 弃去各孔内液体, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L, 震荡 10 min 后, 酶标仪测定 492 nm 处的光密度(optical density, OD)值, 实验组 OD 值/阴性对照组 OD 值为细胞相对增殖率(relative growth rate, RGR)。

### 1.2.7.2 溶血试验

抽取新西兰兔血 10 mL, 加入 20 g/L 草酸钾 0.5 mL, 按每 8 mL 加入 10 mL 生理盐水得到稀释的新鲜抗凝兔血; 将 0.2 mL 兔血稀释液加入 10 mL 蒸馏水中, 用分光光度计测量, 波长 540 nm, OD 值为 0.685, 符合试验要求。Qdots 纳米晶体和 CS-Qdots 纳米颗粒用生理盐水配制成 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0  $\mu$ g/mL; 生理盐水作为阴性对照, 蒸馏水作为阳性对照, 每组 5 支试管。将装有待测材料、生理盐水及蒸馏水各 10 mL 的所有试管放入 37  $^{\circ}$ C 水浴中, 30 min 后取出, 各加稀释抗凝兔血 0.2 mL, 摇匀, 37  $^{\circ}$ C 水浴中继续保温 60 min, 将各管溶液置于干燥的离心管中离心(2 500 r/min, 5 min), 自每管取上清液, 在分光光度计上分别测取 545 nm 处的 OD 值, 按下式计算溶血率: 溶血率(%)=(待测样品 OD 均值-阴性对照 OD 均值)/(阳性对照 OD 均值-阴性对照 OD 均值) $\times 100\%$ 。

### 1.2.7.3 CS-Qdots 在小鼠体内的分布及急性毒性

昆明小鼠 20 只, 随机分为对照组和 CS-Qdots 组, 每组 10 只。CS-Qdots 组经尾静脉注入 100  $\mu$ L 的 CS-Qdots(浓度为 400  $\mu$ g/mL), 对照组经尾静脉注入相同体积的 0.9% 生理盐水。72 h 后处死动物, 取主要脏器(心、肺、肝、脾、肾)进行近红外荧光成像, 并取小鼠血液进行全血细胞分析和血清肝功能、肾功能检测。心、肝、脾、肺、肾等重要脏器常规 HE 染色进行病理形态观察。

## 1.3 统计学方法

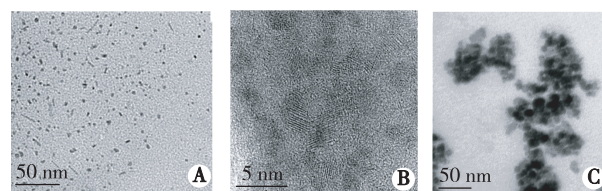
统计工作利用 SPSS17.0 统计软件完成。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 并采用方差分析进行组间比较。 $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Qdots 和 CS-Qdots 表征

#### 2.1.1 透射电镜观察

在普通透射电镜下, Qdots 纳米晶体呈高密度的颗粒状, 粒径微小分散性良好(图 1A), 在高分辨率透射电镜下可以清晰观察到纳米晶体矩阵似的晶格样结构, 每个晶体的粒径在 5 nm 左右(图 1B)。经过 chitosan 的表面修饰后, CS-Qdots 在透射电镜下粒径增加至 25~30 nm, 纳米颗粒呈球形, 分散性良好, 粒径均匀(图 1C)。



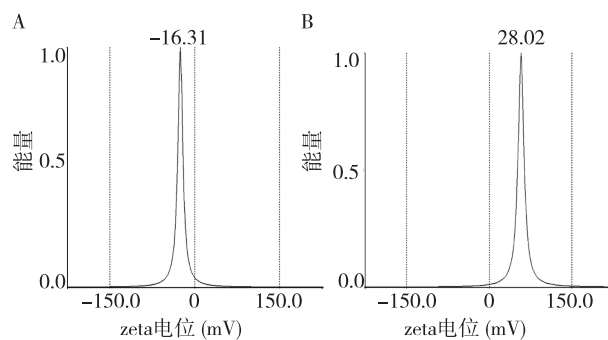
A: 普通透射电镜下的 Qdots 纳米晶体; B: 高分辨率透射电镜下的 Qdots 纳米晶体, 每个晶体的粒径大约在 5 nm 左右; C: 透射电镜下的 CS-Qdots, 纳米颗粒呈球形, 分散性良好, 粒径均匀。

图 1 Qdots 和 CS-Qdots 的透射电镜图

Figure 1 TEM images of Qdots and CS-Qdots nanoparticles

#### 2.1.2 zeta 电位分析

经 zeta 电位分析, 在水溶液中(pH7.0)Qdots 的表面电位为  $(-16.31 \pm 0.91)$  mV, 在 pH6.8 的 HEPES 缓冲液中 CS-Qdots 的表面电位为  $(28.02 \pm 1.15)$  mV (图 2)。



A: Qdots 纳米晶体; B: CS-Qdots 纳米颗粒。

图 2 Qdots 和 CS-Qdots 的 zeta 电位分析

Figure 2 The zeta potential of Qdots and CS-Qdots

#### 2.1.3 FTIR 图谱表征

在 FTIR 上(图 3), Qdots 量子点经壳聚糖修饰后在 2 931.1  $\text{cm}^{-1}$  和 2 873.0  $\text{cm}^{-1}$  出现的峰值代表碳氢键的伸缩吸收峰, 1 647.8  $\text{cm}^{-1}$  出现的峰值代表碳氧键的伸缩吸收峰, 均为壳聚糖的特征谱带, 显示壳聚糖已经成功修饰在量子点表面。

#### 2.1.4 光谱表征

量子点 Qdots 发射光谱相对窄而对称, 最大发射

峰值接近 630 nm。经壳聚糖修饰以后,CS-Qdots 纳米颗粒发射光谱的特征没有发生改变(图 4)。

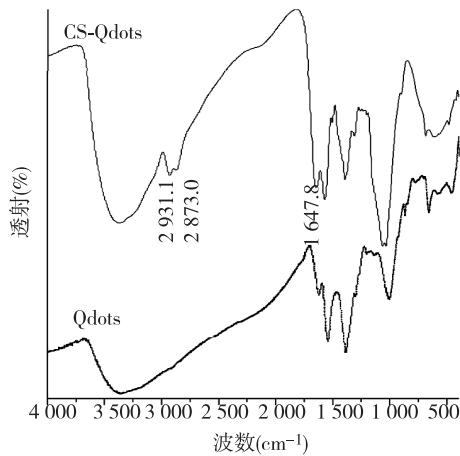


图 3 Qdots 量子点和 CS-Qdots 纳米颗粒的 FTIR 图谱  
Figure 3 FTIR spectra of Qdots and CS-Qdots nanoparticles

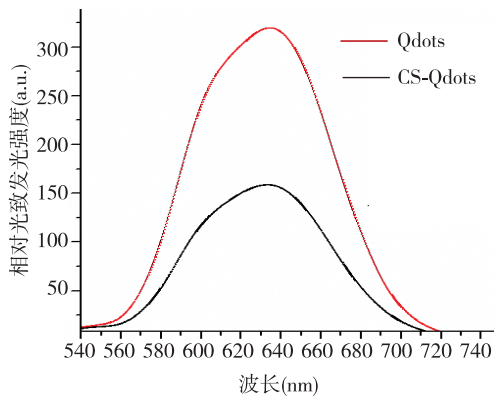


图 4 Qdots 和 CS-Qdots 纳米颗粒的发射光谱  
Figure 4 The emission spectrum of Qdots and CS-Qdots nanoparticles

2.2 与 CS-Qdots 结合后质粒 pEGFP-C1 的凝胶阻滞电泳

如图 5 所示,在纳米颗粒和重组载体的比例大于 10:1 以后,DNA 不再向正极泳动,表示 DNA 上的负电荷已经被中和,CS-Qdots 纳米颗粒和质粒的复合物不再携带负电荷,在这个比例之上 DNA 已经完全与 CS-Qdots 纳米颗粒结合。

2.3 CS-Qdots 转染 pEGFP-C1 至 HepG2 细胞后绿色荧光蛋白的表达

用 CS-Qdots 作为基因载体,将含有报告基因的载体 pEGFP-C1 转染至肝癌细胞 HepG2,48 h 后在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况,如图 6 所示,CS-Qdots 携带基因进入细胞内以后,绿色荧光蛋白在细胞内表达(图 6A),载体也被激发出红色荧光(图 6B),同时两者荧光可以完全重合(图 6C)。

2.4 CS-Qdots 在裸鼠移植瘤内的成像

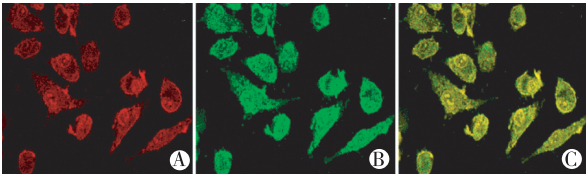
分别在不同裸鼠的 HepG2 细胞移植瘤内注射 100  $\mu$ L Qdots 和 CS-Qdots 纳米颗粒(浓度均为 400  $\mu$ g/mL)30 min 后,用小动物活体近红外荧光成像仪对裸鼠成像,CS-Qdots 纳米颗粒在瘤体内分散良好,成像信号清晰(图 7B),与 Qdots 成像对照小鼠(图 7D)相比,成像范围和清晰程度相类似。

DNA( $\mu$ g)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CS-Qdots( $\mu$ g)	0	10	20	40	60	80	100	120	140



图 5 CS-Qdots 纳米颗粒和报告基因载体 pEGFP-C1 按不同质量比结合后凝胶阻滞电泳图

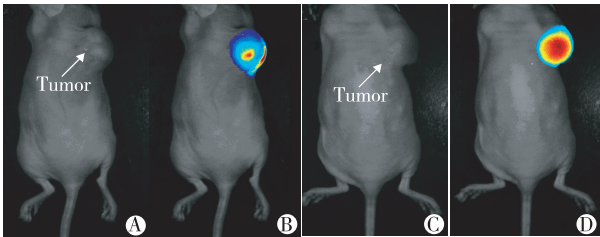
Figure 5 Agarose gel electrophoresis tests for DNA retention in pEGFP-C1 loaded CS-Qdots prepared at various ratios



A:单独激发细胞内表达的 EGFP 基因;B:单独激发进入细胞内的 CS-Qdots 纳米颗粒;C:前二者的融合图片( $\times 400$ )。

图 6 HepG2 细胞经 CS-Qdots 纳米粒转染 pEGFP-C1 后的激光共聚焦显微镜照片

Figure 6 Confocal laser microscopic views of HepG2 cells transfected with pEGFP-C1 genes by CS-Qdots



A:注射 CS-Qdots 的荷瘤裸鼠未激发图片;B:注射 CS-Qdots 的荷瘤裸鼠荧光成像;C:注射 Qdots 的荷瘤裸鼠未激发图片;D:注射 Qdots 的荷瘤裸鼠荧光成像。

图 7 CS-Qdots 和 Qdots 在裸鼠移植瘤内的荧光成像  
Figure 7 The fluorescence images of CS-Qdots and Qdots in xenograft nude mouse

2.5 Qdots 对细胞和 CS-Qdots 增殖的影响

如图 8 所示,Qdots 量子点浓度在 50、100、200 和 400  $\mu$ g/mL 时细胞的 RGR 平均值分别为 1.000、0.850、0.621 和 0.326;而相应浓度 CS-Qdots 作用后

细胞 RGR 平均值分别为 1.000、1.000、0.917 和 0.875。结果显示,经壳聚糖修饰后,Qdots 量子点的细胞毒性有了较明显的下降。

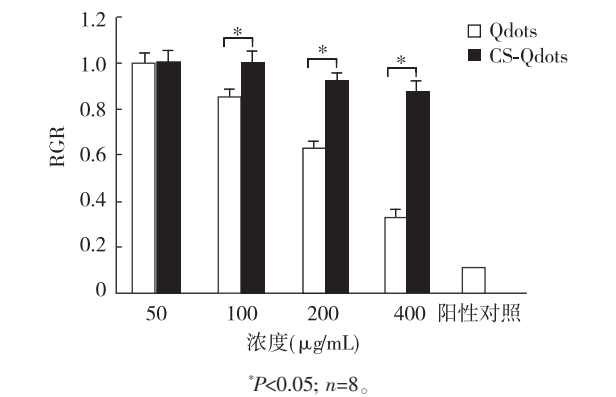


图 8 L-929 细胞与 Qdots 或 CS-Qdots 纳米颗粒孵育后的相对增殖率

Figure 8 RGR of L-929 cells co-incubated with Qdots or CS-Qdots nanoparticles

2.6 溶血试验结果

如图 9 所示,浓度在 100 µg/mL 以上的 Qdots 量子点的溶血率均大于 5%,而 CS-Qdots 纳米颗粒的溶血率在所测浓度范围内均小于 5%。

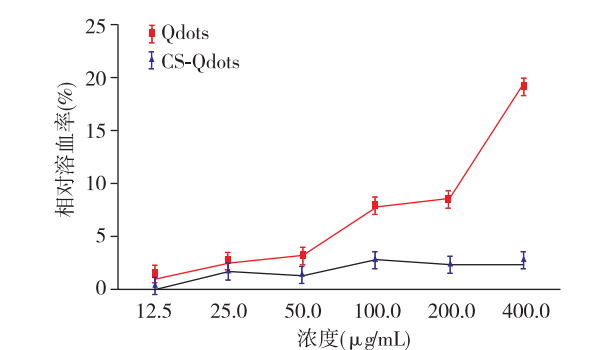


图 9 不同浓度的 Qdots 量子点和 CS-Qdots 纳米颗粒的溶血率曲线

Figure 9 The curve of hemolysis rate of Qdots and CS-Qdots nanoparticles at various concentrations

2.7 CS-Qdots 纳米颗粒在小鼠体内的分布

近红外荧光成像可见主要荧光信号集中在肝脏,其次为肾脏,而心、脾和肺部的荧光信号很微弱(图 10)。该结果提示 CS-Qdots 经静脉注入小鼠体内后主要聚集在肝脏。

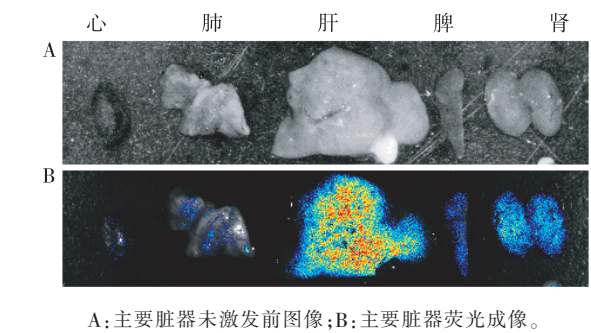


图 10 CS-Qdots 纳米颗粒经尾静脉注入小鼠体内 72 h 后主要脏器(心、肺、肝、脾、肾)荧光成像

Figure 10 The fluorescence imaging of the main organs (the heart, lung, liver, splleen and kidney) of the mouse at 72 h after CS-Qdots injection via tail vein

2.8 小鼠尾静脉注射 CS-Qdots 纳米颗粒后肝肾功

能及血细胞分析

尾静脉注射 CS-Qdots 组和对照组小鼠,从心脏采血,进行全血细胞分析和血清肝肾功能检测。全血细胞分析包括白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(Plt)计数、血红蛋白(Hb)定量。肝功能采用血清丙氨酸氨基转移酶(Alt)水平来评估,肾功能采用血清尿素氮(Bun)水平来评估。注射组各项血细胞计数和血清肝肾功能检测与对照组无显著性差异( $P>0.05$ ,表 1),提示经尾静脉注射 400 µg/mL CS-Qdots 纳米颗粒 300 µL,短时间内(72 h)对小鼠的血细胞组分和肝、肾(CS-Qdots 纳米颗粒主要聚集脏器)功能无明显影响。

2.9 小鼠尾静脉注射 CS-Qdots 纳米颗粒后主要脏

器的病理切片

生理盐水对照组和尾静脉注射 CS-Qdots 纳米颗粒组的小鼠,注射 72 h 后处死,取心、肝、脾、肺、肾做病理切片,经 HE 染色后,在光学显微镜下观察。与生理盐水对照组相比,尾静脉注射组的主要脏器未见明显的炎症、坏死等异常改变(图 11),提示经尾静脉注射 400 µg/mL CS-Qdots 纳米颗粒 100 µL,短时间内(72 h)小鼠的主要脏器无明显的病理损伤。

3 讨 论

基因治疗的关键是获得高效、安全的基因转运载体。无机纳米载体在基因转染方面显示出强大的

表 1 CS-Qdots 纳米颗粒经尾静脉注入裸鼠体内 72 h 后血细胞和血清肝肾功能检测

Table 1 Blood cells test, liver and renal function tests of mice 72 h post CS-Qdots injection

组别	WBC( $\times 10^9$ 个/L)	RBC( $\times 10^{12}$ 个/L)	Hb(g/L)	Plt( $\times 10^9$ 个/L)	Alt(U/L)	Bun( $\mu$ mol/L)
对照组	4.03±0.58	9.65±0.60	166.80±15.58	842.00±99.84	40.20±4.76	5.20±0.71
CS-Qdots 组	5.19±0.67	9.06±0.40	160.40±19.03	829.60±61.01	49.00±8.51	5.61±0.91



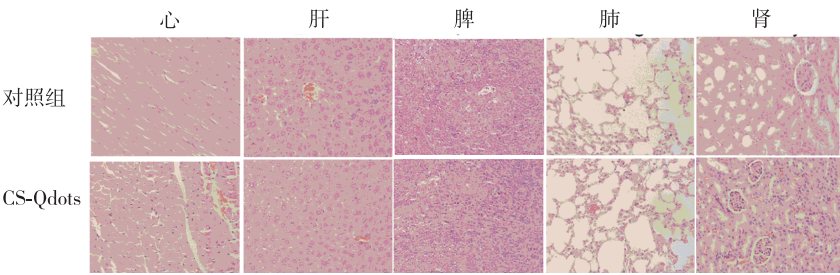


图 11 生理盐水对照组和 CS-Qdots 纳米颗粒尾静脉注射组裸鼠主要脏器细胞的 HE 染色病理切片图(×40)

Figure 11 Major organ histological images of the mice injected with CS-Qdots and normal saline via tail vein (HE, ×40)

优势,无机纳米基因载体一般是指粒径为纳米量级(1~100 nm)的无机微粒,随着载体粒径的减小,其比表面积增大,表面能亦迅速增加,出现许多化学活性点<sup>[13]</sup>。无机纳米载体易稳定分散、制备和贮存方便、装载量大,能穿过组织间隙被细胞吸收,可通过人体最小的毛细血管和血脑屏障将基因运送到身体各个部位<sup>[14]</sup>。量子点具有优越的荧光特性,使用以量子点为基础的纳米基因载体,可以在运载基因的同时,示踪载体在体内外的分布,实现可视化的基因转染。

量子点通常由几百到几千个原子构成,因此其粒径微小,仅有 2~10 nm。如此小的粒径使得量子点易于与其他材料共同构建纳米基因载体,并能使各种材料的特性得到最大的保留。量子点通常可以包裹在其他材料中,或通过其表面的活性基团附着在其他材料表面构成基因载体,为复合纳米材料提供荧光成像基础。我们构建的 CS-Qdots 荧光纳米基因载体在体外细胞转染试验中,可以通过激光共聚焦显微镜检测,并且在裸鼠移植瘤内也能进行活体成像,630 nm 的发射波长可以获得较强的体内成像信号,是一种可进行荧光成像示踪的载体。

无机纳米载体负载基因的方式主要是通过物理、化学等相互作用吸附或连接上基因而成载体-基因复合物<sup>[15]</sup>。负载有 DNA 或基因的无机纳米粒子穿过细胞膜,再到细胞核,将 DNA 或基因转运到生物体细胞中进行表达,目的基因的表达标志转染的成功。在本研究中,CS-Qdots 纳米基因载体可携带绿色荧光蛋白报告基因 pEGFP-C1 进入肝癌细胞 HepG2,绿色荧光蛋白可在细胞内高效表达。

在本试验中制备的量子点表面带有负电荷,这可能源于制备中作为稳定剂使用的巯基丙酸,其在量子点表面残留的巯基和携带的羟基可以携带大量的负电荷,采用静电结合的方法用带正电荷的壳聚糖包裹量子点形成纳米颗粒,不仅可以对量子点起到保护作用,而且可以实现量子点的多糖功能

化。壳聚糖是天然甲壳素的脱乙酰产物,其含有的大量氨基使其表面携带正电荷,化学性质稳定,并能在体内完全降解<sup>[16]</sup>。作为天然存在的多糖类物质,壳聚糖被广泛认为是一种无毒的材料,在日本、芬兰、意大利等国家被直接用于制备口服药品的赋形剂<sup>[17]</sup>,美国 FDA 亦批准壳聚糖作为伤口敷料用于临床治疗<sup>[18]</sup>。由于构成量子点的很多元素对机体有毒副作用(如镉离子),在量子点的降解过程中会产生潜在的毒性,这成为阻碍量子点在活体成像中应用的最大障碍<sup>[19]</sup>。研究显示,通过改变量子点的构成元素,对量子点进行表面修饰,增加量子点的稳定性,将量子点与其他纳米材料复合,可以在不同程度上提高量子点的生物相容性<sup>[20]</sup>。通过对细胞的毒性分析、溶血试验和小鼠急性毒性试验,较没有修饰的量子点,经壳聚糖修饰的 CS-Qdots 荧光纳米颗粒具有相对较好的生物相容性,是一种毒性较低并可以进行体内外示踪的基因载体。小鼠急性毒性试验结果显示,CS-Qdots 纳米颗粒经 72 h 代谢后大量在肝脏聚集,是否会对小鼠产生长期毒性尚未明确,因此以量子点为基础的荧光纳米基因载体仅能为可示踪基因载体的研究提供一种选择的可能性,尚有大量的基础研究需要在后续工作中完成。

[参考文献]

[1] Chen J, Guo Z, Tian H, et al. Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016, 3: 16023

[2] Sum CH, Wettig S, Slavcev RA. Impact of DNA vector topology on non-viral gene therapeutic safety and efficacy [J]. Curr Gene Ther, 2014, 14 (4): 309-329

[3] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy [J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(8): 541-555

[4] Chan WC, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultra-

- [5] Ellis M, Coakley N, Feld R, et al. Use of the epidermal growth factor receptor inhibitors gefitinib, erlotinib, afatinib, dacomitinib, and icotinib in the treatment of non-small-cell lung cancer: a systematic review[J]. *Curr Oncol*, 2015, 22(3): e183–e215
- [6] Ahmad S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer Platinum complexes[J]. *Chem Biodivers*, 2010, 7(3): 543–566
- [7] Berger SH, Wyatt MD. Uracil in DNA: Consequences for carcinogenesis and chemotherapy[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(6): 697–706
- [8] Regine WF, Winter KA, Abrams RA, et al. Fluorouracil *vs* gemcitabine chemotherapy before and after fluorouracil-based chemoradiation following resection of pancreatic adenocarcinoma: a randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2008, 299(9): 1019–1026
- [9] Jorgensen J. Enhancing radiosensitivity: targeting the DNA repair pathways[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(8): 665–670
- [10] Shimura T. Acquired radioresistance of cancer and the AKT/GSK3 $\beta$ /cyclin D1 overexpression cycle[J]. *J Radiat Res*, 2011, 52(5): 539–544
- [11] Toulany M, Rodemann HP. Membrane receptor signaling and control of DNA repair after exposure to ionizing radiation[J]. *Nuklearmedizin*, 2010, 49 (Suppl 1): S26–S30
- [12] Wouters A, Pauwels B, Lardon F, et al. *In vitro* study on the schedule-dependency of the interaction between pemetrexed, gemcitabine and irradiation in non-small cell lung cancer and head and neck cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:441
- [13] Sato Y, Ebara T, Sunaga N, et al. Interaction of radiation and gefitinib on a human lung cancer cell line with mutant EGFR gene *in vitro* [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32 (11): 4877–4881
- [14] 高子夜, 庄亮, 陈元. 吉非替尼对肺癌细胞株 HCC827 和 H358 放射敏感性及其机制研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2012, 15(6): 324–331

[收稿日期] 2016-08-02

(上接第 1233 页)

- sensitive nonisotopic detection [J]. *Science*, 1998, 281 (5385): 2016–2018
- [5] Byers RJ, Hitchman ER. Quantum dots brighten biological imaging[J]. *Prog Histochem Cytochem*, 2011, 45(4): 201–237
- [6] Wilson WL, Szajowski PF, Brus LE. Quantum confinement in size-selected, surface-oxidized silicon nanocrystals[J]. *Science*, 1993, 262(5137): 1242–1244
- [7] Gao X, Cui Y, Levenson RM, et al. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(8): 969–976
- [8] Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing[J]. *Nat Mater*, 2005, 4(6): 435–446
- [9] Zhu H, Zhang S, Ling Y, et al. pH-responsive hybrid quantum dots for targeting hypoxic tumor siRNA delivery[J]. *J Control Release*, 2015, 220 (Pt A): 529–544
- [10] Walther C, Meyer K, Rennert R, et al. Quantum dot-carrier peptide conjugates suitable for imaging and delivery applications[J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19(12): 2346–2356
- [11] Li H, Shih WH, Shih WY, et al. Transfection of aqueous CdS quantum dots using polyethylenimine[J]. *Nanotechnology*, 2008, 19(47): 475101
- [12] Layek B, Lipp L, Singh J. Cell penetrating peptide conjugated chitosan for enhanced delivery of nucleic acid[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 28912–28930
- [13] Xu H, Li Z, Si J. Nanocarriers in gene therapy: a review [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(12): 3483–2507
- [14] Pathak A, Vyas SP, Gupta KC. Nano-vectors for efficient liver specific gene transfer[J]. *Int J Nanomedicine*, 2008, 3(1): 31–49
- [15] Loh XJ, Lee TC, Dou Q, et al. Utilising inorganic nanocarriers for gene delivery[J]. *Biomater Sci*, 2016, 4(1): 70–86
- [16] Kean T, Biodegradation TM. Biodistribution and toxicity of chitosan[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(1): 9–11
- [17] Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient[J]. *Pharm Res*, 1998, 15(9): 1326–1331
- [18] Wedmore I, Mcmanus JG, Pusateri AE, et al. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations[J]. *J Trauma*, 2006, 60 (3): 655–658
- [19] Chen N, He Y, Su Y, et al. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(5): 1238–1244
- [20] Nurunnabi M, Khatun Z, Huh KM, et al. *In vivo* biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(8): 6858–6867

[收稿日期] 2016-11-16