

开发与应用

荧光 SiO₂ 纳米材料在生物成像中的应用杨 洋¹ 于 录^{2*}

(1.天津城建大学材料科学与工程学院,天津 300384;2.天津城建大学理学院,天津 300384)

摘 要 纳米技术实现了在分子和原子水平上对生命科学进行研究。将有机荧光染料包覆到无机纳米材料中,所制得的核壳型复合纳米材料可应用到生物医学等领域。论述了基于 SiO₂ 的核壳型荧光纳米材料的性能,由于其成本较低,便于制备与表征,且具有优于传统材料的特性而被广泛应用于荧光生物成像。

关键词 二氧化硅,荧光纳米材料,生物成像,应用

Application of silica fluorescent nanomaterial in biological imaging

Yang Yang¹ Yu Lu²

(1.School of Materials Science and Engineering,Tianjin Chengjian University,Tianjin 300384;

2.School of Science,Tianjin Chengjian University,Tianjin 300384)

Abstract Nanotechnology can realize the research of living organism in the molecular and atomic level. With the rapid development of science, the organic fluorescent dyes can be embedded in inorganic nanomaterials to form core-shell nanoparticles. A type of core-shell fluorescent nanomaterial based on silicon dioxide, as well as its widely applications in biological imaging because of its low cost, easier preparation and especially its excellent characteristics than traditional material were discussed.

Key words silica, fluorescent nanomaterial, biological imaging, application

纳米技术是 20 世纪发展最快且最具影响力的技术之一,已经成为跨世纪的科学研究热点。纳米材料是纳米技术的核心,由于其具有许多普通材料望尘莫及的优良特性,因此在各领域的应用日益广泛。新型纳米颗粒——SiO₂ 荧光微纳粒子在生物医学方面,尤其是在生物成像中的应用不断增加,逐渐成为替代传统材料的最佳候选者。

1 荧光微纳粒子及其制备方法

荧光微纳粒子是指可以发出荧光的半导体纳米材料(量子点)或者将荧光团通过包覆、共价键连接以及超分子组装等方式引入有机或无机纳米粒子中,并使纳米粒子表现出有机小分子荧光染料的功能。由于硅纳米颗粒荧光强度大、稳定性好,其在生物成像中的应用很有发展潜力。

目前,荧光 SiO₂ 微纳粒子常见的制备方法以化学方法为主,主要包括传统的 Stober 法^[1-3] 和反相微乳液法^[4-7]。反相微乳液法是最新发展起来的一种合成纳米颗粒的有效方法,由于该法实验操作便捷,生成物稳定、粒径小且均一,所以很受欢迎。而对于传统的 Stober 法,尽管反应条件温和,实验装置不复杂,操作简便省时,但生成的产品粒子尺寸不均一,需要通过过滤或者其他分离方法进一步处理,且后期应用受到限制。Liu 等^[8] 改进了 Stober 法,获得单分散性好、表面光滑的 SiO₂ 球形粒子。对纯 SiO₂ 纳米颗粒形貌尺寸进行表征的手段包括 Zeta 粒径、表面 Zeta 电位、光学及光谱学特征及磁性测量等,而荧光 SiO₂ 微纳粒子也可以采用同样的方法进行化学表征。

基金项目:国家自然科学基金委青年科学基金(21402139)

作者简介:杨洋(1994-),女,硕士,研究方向为生物活性材料。

联系人:于录(1980-),男,副教授,硕士生导师,从事纳米材料生物应用的研究。

2 荧光 SiO₂ 纳米材料的特点及性能研究

荧光微纳粒子的合成有利于在复杂的生物环境下进行最优的单分子研究。由于微纳粒子的核壳结构特点以及 SiO₂ 包覆层的特性,掺杂染料的荧光 SiO₂ 微纳粒子成为独具潜力的多功能应用平台。

荧光 SiO₂ 纳米颗粒具有以下优势:

易于表面修饰。由于硅外壳化学性质活泼,可以实现生物功能化的可行性和普适性。除了采用交联法实现生物修饰外,还可以通过微纳颗粒表面硅烷化等其他方法固定生物大分子,从而满足包覆荧光染料的 SiO₂ 微纳粒子在生物学上的特殊应用。

光学稳定性好。传统的荧光试剂由于存在光漂白且易被氧气等因素干扰而导致荧光信号不稳定。在荧光 SiO₂ 纳米颗粒中,由于荧光染料分子被三维 SiO₂ 网状体系所包裹,提供了化学和机械稳定性的保护围墙,比如阻止直接接触大气氧分子或其他荧光熄灭物质,保持荧光性质不变,不易被光降解或光漂白,表现出较好的光稳定性,荧光寿命也明显延长。

信号放大作用。传统的荧光标记方法存在很多不足,如可单次标记的荧光相对分子质量小,信号较弱。而荧光 SiO₂ 纳米探针的粒子直径在 2~200nm 范围内变化,可包裹成千上万的荧光分子,荧光信号更有很大突破(为普通荧光团的 10000 倍)^[9],是灵敏度好、高通量生物荧光标记的优选材料^[10-11]。

具有很好的生物亲和性且毒性低。对荧光 SiO₂ 纳米颗粒的毒性进行检测,发现其具有生物相容性且毒性^[12-13]极小,故在一定浓度范围内荧光 SiO₂ 纳米探针不会对生物体造成伤害。SiO₂ 基质透明,激发和发射光的透过均不受影响,对有机染料的光谱不会产生影响。SiO₂ 纳米颗粒密度高达 1.96g/cm³,反应后易离心、易分散,制备方法简单。

另外,随着纳米技术的不断发展,研究者越来越能精确掌控微纳粒子直径的大小,并且粒子生物修饰手段也日臻完善,使荧光 SiO₂ 微纳粒子特别稳定,甚至在生理条件下也能表现出多种功能。

3 荧光 SiO₂ 纳米材料在生物成像中的应用

理想的生物标记材料应符合发展需求,表面能结合功能性大分子且荧光信号稳而强,故荧光硅纳米颗粒应运而生。它克服了荧光染料的光稳定性差、荧光强度相对不高和对生物样本的成像深度不

够深等劣势,在作为生物标记用于成像的研究中,备受研究者青睐。

3.1 用于生物细胞成像

细胞成像在许多生物医学应用中是很重要的,荧光 SiO₂ 纳米材料是一种理想的作为生物标记用于成像的材料,特别是经过生物功能化的微纳粒子可以将信号提高很多倍,纳米颗粒在细胞成像中的应用已经日益成熟。

何晓晓等^[14]制备出了较稳定、信号强、多领域应用等极具优势的荧光 SiO₂ 纳米颗粒,并用于系统性红斑狼疮病人外周血中 SmIgG⁺B 淋巴细胞的生物成像。原茵等^[15]用氨基硅烷化试剂与有机荧光染料、正硅酸乙酯(TEOS)在油包水形成的微反应器中同时发生水解,成功合成嵌合有机染料的核壳荧光微纳粒子,产物稳定、荧光信号强,可用于早期凋亡细胞的生物成像。彭妓凤^[16]将半乳糖结合到 SiO₂ 荧光纳米颗粒的硅壳表面,并用于肝癌细胞的生物成像。王婷婷^[17]通过微乳液自组装体系生成包埋罗丹明 G 的荧光 SiO₂ 微纳粒子(FDS-NP),将这种新型的光稳定生物标志物与 HeLa 细胞共同培育 1~4h 后,在活细胞内检测到的荧光信号强且递增,细胞形态没有变化,从而实现对活细胞的荧光显像。

钟旖菱^[18]提出了一种温和而有效的光化学合成方法,该方法能够简便快捷宏量制备荧光硅纳米颗粒,且成本较低,可用于细胞长程免疫荧光成像,初试效果非常好。王丹^[19]利用多孔 SiO₂ 纳米微球包埋光动力治疗药物(PpIX),合成纳米探针——PpIX/SiO₂,PpIX/SiO₂ 同时具有荧光成像和光动力治疗功能。利用该荧光纳米探针可以对生物体外 HeLa 细胞进行示踪,实现细胞的荧光成像。朱诗国等^[20]将荧光染料分子罗丹明 B 异硫氰酸(RITC)包埋到介孔 SiO₂ 中,制备摇铃型结构的 RITC-Au@mSiO₂-60 纳米胶囊,并用于研究肝癌细胞 HepG-2 荧光成像。在培养液中培养 24h 后,发现肝癌细胞形态正常,纳米胶囊没有吸附在细胞表面而是在细胞质中发红色荧光。

王子龙^[21]设计并制备了一种由 9,10-二乙烯基蒽(DSA)荧光团的叶酸修饰的微尺寸(60nm)、分布均匀的介孔 SiO₂ 荧光纳米粒子。通过微纳颗粒与 HeLa 细胞、小鼠前脂肪细胞的成像实验,发现叶酸修饰介孔 SiO₂ 荧光纳米粒子能够识别癌细胞,可用于靶向的癌细胞成像。混旭^[22]利用改良 Stober 法合成了易于标记的荧光 SiO₂ 纳米粒子(FNs),并将

叶酸结合到所制备包覆三联吡啶钌($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)的 SiO_2 纳米粒子上得到荧光纳米探针,荧光纳米探针能够有效识别宫颈癌细胞。王天伊等^[23]合成了包裹异硫氰酸荧光素的硅微纳颗粒(直径为 50nm 左右),并成功利用激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)对荧光硅纳米复合颗粒进入细胞全过程进行实时追踪成像。

王玉双^[24]采用反相微乳液法制备了亚甲基蓝 SiO_2 荧光纳米颗粒,在一定浓度条件下,细胞存活率达 81% 左右。实验表明 Hela 细胞能够吞噬亚甲基蓝 SiO_2 荧光纳米颗粒,由此证明其用于细胞成像的可能性。杨宇^[25]将所制备的纳米 SiO_2 颗粒包裹的荧光探针用于 3 种细胞的标记实验,在加入 0.1mg 的纳米 SiO_2 颗粒包裹的荧光探针后,成功地对 3 种细胞进行了显像。2009 年,Zhang 等^[26]合成了核壳型的复合纳米系统,其实心 SiO_2 内核部分包裹异硫氰酸荧光素(FITC),而 SiO_2 外壳部分结合光敏剂血卟啉,具备了荧光标记功能并可用于细胞成像。2001 年,Santra 等^[6]合成了掺杂三联吡啶钌(RuBpy)的 SiO_2 荧光微纳粒子,又用叶酸修饰其外表面,使其成为能被癌细胞识别的生物标记物。

2005 年,Hooisweng 等^[27]又合成了包裹荧光染料的 SiO_2 微纳粒子,并在表面与抗体结合,实现了通过抗体-抗原相互识别作用用于癌细胞成像。2004 年,Santra 等^[28]将破伤风抗毒素(TAT)偶联到了 FITC 的 SiO_2 微纳粒子表面,并且在人的肺肿瘤细胞、鼠的脑组织细胞中显像。2005 年,Vuu 等^[29]合成了包埋两种染料的 SiO_2 微纳粒子,并实现了 T47 乳腺肿瘤细胞荧光成像。

3.2 用于动物活体成像

宁厚福^[30]利用反相微乳液法制备了易分散、颗粒直径均一(50nm 左右)的荧光 SiO_2 纳米微粒,并将其通过尾静脉注射到幼鼠体内进行活体荧光成像。实验证明所制备的纳米材料能较好地屏蔽生物活体内毛发与组织的影响,获得效果好、时间长(24h)的显像。通过实验发现荧光 SiO_2 纳米微粒可以在生物活体内随血液循环并选择性富集,最终通过幼鼠自身代谢排出体外,不会长期存留在生物体内,安全无毒害。

王丹^[19]将近红外荧光染料(IR-820)包覆于多孔 SiO_2 纳米微球内部(ORMOSIL)并在纳米微球的表面进行生物功能化,制成了有近红外荧光特性的荧光 SiO_2 纳米探针(IR-820/ORMOSIL)。实验证明,这种近红外荧光探针能在人造模拟组织结构

中进行深层组织的荧光成像,从而实现了活体肿瘤细胞的非特异性的标记和宏观活体荧光成像。初立亮^[31]将包埋近红外荧光染料的微纳颗粒应用于小鼠的前哨淋巴结荧光标记、活体功能性成像及活体深层(深度达 500 μm)显微成像。

杨宇^[25]制得纳米 SiO_2 颗粒包裹的荧光探针,采用腹腔注射、尾静脉注射的方式进入到鼠体。实验结果显示该荧光探针并没有过多地聚集在某个脏器,而是整体显像,且最终经过鼠的新陈代谢排出,不会长期存留在生物体内,安全无毒害。凭借纳米 SiO_2 颗粒包裹的荧光探针代谢快、明亮、易分散的优势,能够真正实现生物活体成像。陈庚文^[32]设计合成了一种信号增强型的双光子黏度硅纳米探针,且在活体斑马鱼的荧光染色实验中,可检测到比单分子双光子染料更强的荧光信号。He 等^[33]将两种亲水染料包裹于同一 SiO_2 纳米颗粒内部,合成的近红外荧光纳米颗粒,Stokes 位移大($>200\text{nm}$)。在动物活体成像实验中,荧光信号清晰无干扰。观察发现纳米颗粒不会长期存留在动物体内,安全低毒。

王玉双^[24]利用反相微乳液法制备了以亚甲基蓝为内核材料的亚甲基蓝 SiO_2 荧光纳米颗粒,采用尾静脉注射方式注入裸鼠体内。活体荧光成像结果显示,裸鼠全身都发射出近红外荧光信号,随后亚甲基蓝 SiO_2 荧光纳米颗粒随血液循环,逐渐聚集于肝脏等器官。由此初证其在高灵敏活体体内示踪的可行性。谢春娟^[34]以 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 为内核,外包 SiO_2 纳米粒子,由反相微乳液法合成具有核壳结构的荧光微纳粒子 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{SiO}_2$,其不需要进行表面功能化就可以直接示踪生命分子。使用荧光纳米粒子 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{SiO}_2$ 对小鼠进行荧光成像实验并分析了小鼠体内免疫球蛋白的指标。

4 结语

简述了荧光 SiO_2 纳米微粒常见的合成与表征方法及其固有的许多性质。概述了国内外研究者通过优化染料和采用适宜的制备方法,合成粒径小而均一、分散性好的荧光 SiO_2 纳米颗粒,合成的荧光 SiO_2 纳米颗粒已在生物医药学领域,特别是生物成像方面得到了广泛的应用。

然而目前在理论和技术方面仍存在一定问题,如荧光 SiO_2 纳米颗粒的染料泄漏、信号灵敏度和荧光亮度的提高等。另外,虽然荧光 SiO_2 纳米微粒对生命体的毒性比较低,但并非完全无毒,据报道 SiO_2 纳米硅胶会导致血红细胞发生溶血现象。因

此,今后的研究重点应致力于逐一解决这些不足之处,使荧光 SiO₂ 纳米材料真正成为人们观察生命体的“第三只眼”。

参考文献

- [1] Qhobosheane M, Santra S, Zhang P, et al. Biochemically functionalized silica nanoparticles[J]. *Analyst*, 2001, 126: 1274-1278.
- [2] Stöber W, Fink A, Ernst Bohn. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range[J]. *Journal of Colloid & Interface Science*, 1968, 26(1): 62-69.
- [3] Tapeç R, Zhao J, Tan W H. Development of organic dye-doped silica nanoparticle for bioanalysis and biosensors[J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2002, 2(3-4): 405-409.
- [4] Santra S, Wang K, Tapeç R, et al. Development of novel dye-doped silica nanoparticles for biomarker application[J]. *Biomedical Optics Express*, 2001, 6: 160-166.
- [5] Santra S, Tapeç R, Theodoropoulou N, et al. Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in micro emulsion: the effect of nonionic surfactants[J]. *Langmuir*, 2001, 17: 2900-2906.
- [6] Santra S, Zhang P, Wang K M, et al. Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photo-stable biomarkers[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73: 4988-4993.
- [7] Zhao X, Tapeç-Dytioco R, Tan W H. Ultrasensitive DNA detection using highly fluorescent bioconjugated nanoparticles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(38): 11474-11475.
- [8] Liu L Y, Wang X F, Zhang H X, et al. Preparation of SiO₂ Microspheres Use diphotonic Crystals via Improving Stober Method[J]. *Materials Review*, 2008, 22: 113-115.
- [9] Zhao X J, Bagwe R P, Tan W H. Development of organic-dye-doped silica nanoparticles in a reverse micro emulsion[J]. *Advanced Materials*, 2004, 16(2): 173-176.
- [10] Peng J F, Xing X L, Wang K M, et al. Influence of anions on the formation and properties of chitosan-DNA nanoparticles[J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2005, 5(5): 713-717.
- [11] 段著华, 王柯敏, 谭蔚泓, 等. 有机荧光染料纳米颗粒的制备及其包埋机制的研究[J]. *化学传感器*, 2002, 22(3): 14-19.
- [12] Minet O, Dressier C, Beuthan J. Heat stress induced redistribution of fluorescent quantum dots in breast tumor cells[J]. *Journal of Fluorescence*, 2004, 14: 241-247.
- [13] Beuthan J, Dressier C, Minet O. Laser-induced fluorescence detection of quantum dots redistributed in thermally stressed tumor cells[J]. *Laser Phys*, 2004, 14: 213-219.
- [14] 何晓晓, 王柯敏, 谭蔚泓, 等. 基于生物荧光纳米颗粒的新型荧光标记方法及其在细胞识别中的应用[J]. *科学通报*, 2001, 46(16): 1353-1356.
- [15] 原茵, 何晓晓, 王柯敏, 等. 嵌合异硫氰酸罗丹明 B 核壳荧光纳米颗粒制备新方法的研究[J]. *高等学校化学学报*, 2005, 26(3): 446-448.
- [16] 彭蛟凤. 纳米传感与传输技术研究及其生物医学应用[D]. 长沙: 湖南大学, 2006.
- [17] 王婷婷. 基于介孔二氧化硅的多功能纳米材料的制备及其在药物输送和荧光成像领域的应用[D]. 长春: 东北师范大学, 2011.
- [18] 钟旖菱. 荧光硅纳米颗粒的制备及其在生物荧光成像中的应用基础研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [19] 王丹. 基于荧光纳米粒子的一些生物功能成像研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013(08).
- [20] 朱诗国, 唐珂, 向娟娟, 等. 生物荧光氧化硅纳米颗粒的研制与应用[J]. *物理化学学报*, 2003, 19(4): 311-314.
- [21] 王子龙. 聚集诱导发光分子的合成及其在荧光纳米粒子生物成像中的应用[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [22] 混旭. 荧光纳米粒子探针的制备及其应用研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2008.
- [23] 王天伊, 张鹏, 熊焕明. 荧光二氧化硅纳米颗粒在基因治疗上的应用及激光共聚焦实时监控成像[C]//中国化学会第九届全国无机化学学术会议论文集——生物无机化学, 2015.
- [24] 王玉双. 二氧化硅荧光纳米颗粒用于高灵敏活体成像研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2012.
- [25] 杨宇. 一种安全的纳米包裹近红外荧光蛋白荧光探针的制备及其在动物活体成像中的应用[D]. 上海大学, 2013.
- [26] Zhang Ruirui, Tang Bo. Multifunctional core-shell nanoparticles as highly efficient imaging and photosensitizing agents[J]. *Langmuir*, 2009, 25(17): 10153-10158.
- [27] Hooisweng Ow, Daniel R. Larson, Mamta Srivastava, et al. Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles[J]. *Nano Lett*, 2005, 5(1): 113-117.
- [28] Santra, Mericle, Robert A. TAT conjugated, FITC doped silica nanoparticles for bioimaging applications[J]. *Chemical Communications*, 2004, 41(24): 2810-2811.
- [29] Vu K, McDonald, Michael A, et al. Gadolinium-rhodamine nanoparticles for cell labeling and tracking via magnetic resonance and optical imaging[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2005, 16(4): 995-999.
- [30] 宁厚福. 近红外荧光二氧化硅纳米颗粒的制备及性能研究[D]. 大连理工大学, 2014.
- [31] 初立亮. 几种纳米材料在光学生物成像中的应用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [32] 陈庚文. 荧光 SiO₂ 纳米颗粒性能研究及应用[D]. 大连: 大连理工大学, 2013.
- [33] He X, Wang Y, Wang K, et al. FRET mediated large Stokes shifting near-infrared fluorescent silica nanoparticles (LSS-NFSiNPs) for in vivo small-animal imaging[J]. *Anal Chem*, 2012, 84(21): 9056-9064.
- [34] 谢春娟. 复合荧光二氧化硅纳米颗粒的制备及其在生物分析和光催化降解中的应用[D]. 上海: 上海大学, 2010.

收稿日期: 2017-03-10

修稿日期: 2018-03-18