

东南大学学位论文独创性声明



本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得东南大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：周研研 日期：2010.5.24

东南大学学位论文使用授权声明

东南大学、中国科学技术信息研究所、国家图书馆有权保留本人所送交学位论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。除在保密期内的保密论文外，允许论文被查阅和借阅，可以公布（包括以电子信息形式刊登）论文的全部内容或中、英文摘要等部分内容。论文的公布（包括以电子信息形式刊登）授权东南大学研究生院办理。

研究生签名：周研研 导师签名：李扬 日期：2010.5.25



目 录

| | |
|--|----|
| 目 录..... | I |
| 摘 要..... | IV |
| Abstract..... | VI |
| 第一章 绪论..... | 1 |
| 1.1 研究背景..... | 1 |
| 1.2 纳米材料在肿瘤早期诊断中的应用..... | 2 |
| 1.2.1 纳米材料在生物大分子水平检测中的应用..... | 3 |
| 1.2.2 纳米材料在细胞水平的检测应用..... | 3 |
| 1.2.3 纳米材料在组织水平的检测应用..... | 4 |
| 1.3 纳米材料在肿瘤治疗中的应用..... | 5 |
| 1.3.1 纳米材料在逆转肿瘤多药耐药的应用..... | 6 |
| 1.3.2 纳米材料在肿瘤靶向药物控释治疗中的应用..... | 7 |
| 1.3.3 纳米材料在肿瘤光动力治疗中的应用..... | 7 |
| 1.4 本论文的工作..... | 8 |
| 参考文献..... | 9 |
| 第二章 水溶性 CdTe 量子点在肿瘤细胞识别及增强细胞胞内药物浓度的应用研究..... | 13 |
| 摘要..... | 13 |
| 2.1 引言..... | 13 |
| 2.2 实验部分..... | 14 |
| 2.2.1 主要仪器..... | 14 |
| 2.2.2 主要试剂的配制..... | 15 |
| 2.2.3 细胞培养..... | 15 |
| 2.2.4 MPA-CdTe QDs 的制备..... | 16 |
| 2.2.5 MPA-CdTe QDs 对白血病细胞的细胞毒性检验..... | 16 |
| 2.2.6 MPA-CdTe QDs 在白血病诊断中的细胞标记成像的研究..... | 16 |
| 2.2.7 MPA-CdTe 量子点在癌症诊治中的研究..... | 17 |
| 2.2.7.1 电化学检测..... | 17 |
| 2.2.7.2 UV-Vis 紫外吸收光谱分析..... | 17 |
| 2.2.7.3 MTT 分析..... | 17 |
| 2.2.8 统计学分析..... | 18 |
| 2.3 结果与讨论..... | 18 |
| 2.3.1 CdTe QDs 粒子的表征及其细胞毒性研究..... | 18 |
| 2.3.1.1 CdTe QDs 粒子的表征..... | 18 |
| 2.3.1.2 MPA-CdTe QDs 对白血病细胞体外毒性的 MTT 研究..... | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.2 MPA-CdTe QDs 标记 K562 细胞的 TIRFM 荧光成像研究..... | 20 |
| 2.3.3 MPA-CdTe 量子点在癌症治疗中的应用..... | 20 |
| 2.3.3.1 电化学分析研究..... | 20 |
| 2.3.3.2 UV-Vis 吸收光谱分析研究..... | 21 |
| 2.3.3.3 MTT 分析..... | 22 |
| 2.4 小结..... | 23 |
| 参考文献..... | 24 |
| 第三章 水溶性 CdTe 量子点在细胞成像与逆转肿瘤多药耐药的应用研究..... | 26 |
| 摘要..... | 26 |
| 3.1 引言..... | 26 |
| 3.2 实验部分..... | 27 |
| 3.2.1 主要仪器和试剂..... | 27 |
| 3.2.2 水溶性 MPA-CdTe QDs 的制备和表征..... | 27 |
| 3.2.3 细胞培养..... | 28 |
| 3.2.4 MPA-CdTe QDs 对白血病细胞生长影响的研究..... | 28 |
| 3.2.5 白血病活细胞体系的实时动态荧光观察和成像..... | 28 |
| 3.2.6 水溶性 MPA-CdTe 量子点在癌症治疗中的应用研究..... | 28 |
| 3.2.6.1 细胞内柔红霉素 DNR 浓度的变化..... | 28 |
| 3.2.6.1.1 在倒置荧光显微镜下细胞荧光强度的研究..... | 28 |
| 3.2.6.2 细胞外柔红霉素 DNR 浓度的变化..... | 29 |
| 3.2.6.2.1 电化学检测..... | 29 |
| 3.2.6.2.2 UV-Vis 紫外吸收光谱分析..... | 29 |
| 3.2.7 对白血病耐药细胞 K562/A02 耐药性与逆转多药耐药的评估..... | 29 |
| 3.2.8 统计学分析..... | 30 |
| 3.3 结果与讨论..... | 30 |
| 3.3.1 CdTe QDs 表征及其细胞毒性研究..... | 30 |
| 3.3.1.1 CdTe QDs 粒子的表征..... | 30 |
| 3.3.1.2 MPA-CdTe QDs 对白血病细胞毒性的 MTT 研究..... | 30 |
| 3.3.2 白血病活细胞体系的实时动态荧光观察和成像分析..... | 31 |
| 3.3.3 MPA-CdTe 量子点在增加药物吸收和逆转多药耐药性的应用研究..... | 32 |
| 3.3.3.1 细胞胞内的柔红霉素 DNR 荧光强度变化——倒置荧光显微镜结果分析..... | 32 |
| 3.3.3.2 细胞外柔红霉素 DNR 的浓度变化分析..... | 33 |
| 3.3.3.2.1 电化学分析研究..... | 33 |
| 3.3.3.2.2 UV-Vis 紫外吸收光谱分析研究..... | 34 |
| 3.3.3.3 MPA-CdTe QDs 对白血病耐药细胞株 K562/A02 逆转耐药能力的分析..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.4 量子点协同作用的机制 | 36 |
| 3.4 结论 | 37 |
| 3.5 取得的创新性成果 | 37 |
| 第四章 功能化 Ag 纳米粒子在白血病细胞药物控释中的研究 | 42 |
| 摘要 | 42 |
| 4.1 前言 | 42 |
| 4.2 实验部分 | 43 |
| 4.2.1 主要仪器与试剂 | 43 |
| 4.2.2 细胞培养 | 43 |
| 4.2.3 Ag NPs 的制备和表征 | 43 |
| 4.2.4 Ag NPs 的体外细胞毒性实验 | 43 |
| 4.2.5 细胞胞内 DNR 的浓度变化 | 43 |
| 4.2.5.1 细胞内 DNR 的荧光强度观察 | 43 |
| 4.2.5.2 DNR-Ag NPs 复合物对 K562 细胞增值抑制的影响 | 44 |
| 4.2.6 细胞胞外 DNR 的浓度变化 | 44 |
| 4.2.6.1 电化学分析 | 44 |
| 4.2.6.2 紫外吸收光谱分析 | 44 |
| 4.2.7 统计学分析 | 44 |
| 4.3 结果与讨论 | 45 |
| 4.3.1 Ag NPs 的 TEM 表征 | 45 |
| 4.3.2 Ag NPs 对 K562 细胞毒性的 MTT 结果 | 45 |
| 4.3.3 Ag NPs 携带药物 DNR 在白血病 K562 细胞胞内浓度分析 | 46 |
| 4.3.3.1 细胞内荧光分析 | 46 |
| 4.3.3.2 Ag NPs 协同 DNR 对 K562 细胞增值抑制力的影响 —— MTT 分析 | 47 |
| 4.3.4 胞外 DNR 浓度分析 | 48 |
| 4.3.4.1 电化学检测分析 | 48 |
| 4.3.4.2 紫外吸收光谱分析结果 | 49 |
| 4.4 结果与讨论 | 50 |
| 参考文献 | 51 |
| 第五章 总结与展望 | 53 |
| 硕士阶段的成果 | 54 |
| 致 谢 | 55 |



摘要

论文题目：功能纳米复合物在肿瘤细胞识别及其药物控释中的应用研究

硕士研究生：周研研

指导老师：王雪梅 教授

学校名称：东南大学

肿瘤的准确检测及有效治疗一直以来是生物学领域中的研究热点。为了提高肿瘤的治疗效果，需要对病变的部位进行准确定位，提高抗癌药物在肿瘤部位的药物控释蓄积浓度，从而使得抗癌药物能够有效地抑制肿瘤细胞的增殖。纳米材料由于其具有不同于传统材料的优良特性，使得其在生物医药领域中得到越来越多的关注和青睐。例如量子点作为生物荧光标记物逐步地应用到 DNA 及蛋白质的检测、细胞的一元及多元标记成像、活细胞生命动态过程的示踪及活体动物体内的肿瘤细胞靶向示踪等许多生物学领域。

水溶性的碲化镉量子点作为一种良好生物相容性的半导体纳米材料，可以作为功能荧光探针应用于生物学领域的检测中。本论文工作中，我们将表面配体为 3-巯基丙酸的量子点能够以静电结合或共价结合的方式和药物分子（柔红霉素）偶联形成以 QD 为载体的纳米药物复合物，并进一步将其应用于白血病等恶性肿瘤的诊治中。本工作研究结果表明，碲化镉能够与药物分子通过表面吸附、静电作用等相互作用形成纳米复合物，从而显著增强药物分子进入目标肿瘤细胞能力和提高靶向诊治的效果。同时，由于该纳米复合物能够克服耐药细胞的多药耐药性，能够有效地进入到肿瘤细胞内，避免了被耐药蛋白给排出去，增加了抗癌药物在肿瘤细胞内的蓄积浓度。因此该功能性纳米材料不仅可以作为功能性荧光探针针对病变细胞进行快速、准确的标记和检测，而且也可以作为一种良好的纳米药物载体通过与药物自组装结合来显著增加药物分子在肿瘤细胞内的聚集，大幅度提高对肿瘤细胞的杀伤效果。

最近，本工作相关研究论文在国际知名 SCI 收录期刊 *Biomaterials* (IF: 6.646)上发表后，相继得到 MRI Spectroscopy 等研究网站的关注和引用，并对于我们的工作进行追踪报道，给予了高度肯定的评价。在我们研究工作中，相关水溶性量子点具有良好的生物相容性，并具备肿瘤细胞实时动态细胞标记成像与逆转肿瘤多药耐药双重功能，而且对于细胞的生物活性没有不良影响，这种多功能纳米材料在生物学中有着广泛的应用，为以后应用于临床肿瘤的检测与治疗提供了新思路、新方法，给予处于痛苦的癌症患者新的希望。

与此同时，由于银纳米粒子等材料具有优良的光电特性和良好的生物相容性，本工作中，我们进一步研究和探讨了表面被四庚基溴化铵修饰的银纳米粒子在恶性肿瘤药物控释中的应用。研究结果表明，该功能化纳米粒子能够通过表面静电吸附等相互作用与抗癌药物形成纳

米复合物，从而有效地促进柔红霉素等抗癌药物在肿瘤细胞内的蓄积，增强对肿瘤细胞的杀伤能力，因而在恶性肿瘤的检测和治疗等领域中，具有潜在的应用前景。

关键字：恶性肿瘤白血病，柔红霉素，CdTe 量子点，功能化 Ag 纳米粒子，生物分子识别，药物控释

Abstract

Title: Application of Functionalized Nanocomposites in Biorecognition and Targeting Drug Delivery on Cancer cells

Author: ZHOU Yan-yan

Thesis Supervisor: WANG Xue-mei

School: Southeast University

The accurate detection and effective treatment for cancer is the hot topics in the field of biomedical research. In order to improve the therapy effect, it is required not only to locate lesion accurately and efficiently, but also to enhance controlled-release of drugs in the tumor cells, which can further inhibit the viability of the tumor cells. With the development of nanoscience and nanotechnology, nanomaterials have got more and more attention in the biomedical field, owing to their excellent properties which are different from traditional materials. For example, fluorescent quantum dots as biological markers have been gradually applied to detect the DNA and proteins, one and multi-marker cell imaging, dynamic process of live cell life, tracing and targeting of tumor cells in vivo in live animals and many others.

It is already known that water-soluble chromium telluride quantum can serve as a functional fluorescent probe in the relevant biomedical field. With the surface ligand of 3-mercaptopropionic acid, quantum dots can be combined with drug molecules by using electrostatic or covalent coupling interactions to form a promising nanomedicine. In view of these, we have explored the combination of anticancer drug daunorubicin with chromium telluride quantum dot which serves as an auxiliary agent. Our results demonstrate that chromium telluride could readily conjugate with drug molecules and significantly enhance drug molecules concentration in cancer cells. At the same time, the relevant nanocomposites could efficiently overcome the multidrug resistance, and effectively enter into the tumor cells, avoid being discharged by the resistance proteins in the drug-resistant leukemia cells. Therefore, the functionalized nanomaterials are not only used as the efficient fluorescent probe, but also used as a good vehicle of controlled drug release and thus increase accumulation of drug molecules in tumor cells.

Recently, after our work-related research paper has published in the internationally renowned SCI journal *Biomaterials* (IF: 6.646), the MRI Spectroscopy and others reference sites pay much attention, track the coverage of our work, and give the highly positive evaluation. In our study, the related water-soluble quantum dots with good biocompatibility, and real-time dynamic cells with tumor cells have dual function of imaging and reversing multidrug resistance, but also does not adversely affect the biological activity of the cells.

Therefore, the multifunctional nanomaterials have a wide application in biology and medicine. For the future, there is a new idea and method to treat the cancer patients.

As the silver nanoparticles and other materials have excellent optical properties and good biocompatibility, in the present work, we further study and explore the silver nanoparticles with the modified surface of four heptyl bromide in the application of cancer drug delivery. Our results show that the functionalized nanoparticles could combine with anticancer drug through surface adsorption and electrostatic interactions to form anti-cancer nanomedicine, thus effectively promote the intracellular accumulation of anticancer drugs such as daunorubicin in tumor and enhance the killing capacity of tumor cells. Therefore, these have potential application prospects in the detection and treatment of malignant tumors and other areas.

Keywords: Malignant leukemia, Daunorubicin, CdTe quantum dots, Functionalized Ag nanoparticles, Biomolecular recognition, Drug delivery

第一章 绪论

1.1 研究背景

美国癌症学会(American Cancer Society)^[1]公布了2009年美国癌症的最新统计数据报告:2009年,美国预计查出1,479,350新发癌症病例,其中男性766,130例,女性713,220例;全美将有562,340人死于癌症,也就是说每天死亡1500人,癌症仍是严重威胁人类生命和健康的恶性疾病。可喜的是,从1900年到2005年,美国男性癌症患者的死亡率下降19.2%,女性患者死亡率下降11.4%,在这期间被癌症夺去生命者减少65万;相比1993年到2001年,男性患者死亡率每年下降1.5%,女性癌症死亡率从1994年到2002年每年下降0.8%。2001年到2005年间,男性癌症的发病率每年下降1.8%;从1998年到2005年,女性癌症的发病率每年下降0.6%。对于癌症患者发病率和死亡率的下降,美国癌症学会癌症检测策略主任、报告作者杰梅尔(Ahmedin Jemal)是这么解释的:我们继续看到男女癌症病人死亡率和死亡率下降,主要原因是预防措施(尤其是减少吸烟比例)的强化、检测技术的进步(包括对直肠癌、乳腺癌和盆腔癌的检测)以及治疗手段的改进。这一统计报告告诉我们,对于癌症这个“恶魔”是可以战胜的,我们所进行的这项研究事业具有非常重大的意义,但是要研究出减少癌症发病率的新策略和有效的治疗方案,我们还有很长的路要走,还有很多的事情要做。

众所周知,癌症已经成为威胁人类健康的第一杀手。治疗癌症,早期诊断是关键。按目前的医疗水平,早期癌症病人约有80%-90%以上可以治愈,治疗后不仅提高了生存率,也提高了病人的生存质量,因此癌症早期诊断具有十分重要的意义,早期诊断也成为癌症诊治中的一个研究热点。目前,世界上各个国家都认识到了癌症对人类生命安全的威胁,纷纷成立了专门的研究机构。期间,科学家们进行了大量的研究工作,尤其在癌症的诊断、治疗及积极预防方面展开了深入地研究,并且取得了一些令人兴奋的成果^[2-9]。目前在癌症早期诊断应用中主要的方法和技术有:免疫组织化学技术(immunohistochemistry)(或称免疫细胞化学技术(immunocytochemistry));分子生物学的方法;血管和气管检查的磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI),X射线断层扫描技术;无损伤易操作的血清标志物检测方法;以及新的蛋白质组学技术、生物芯片技术、纳米技术等^[10-14]。

随着科学技术的不断进步,科学家们在癌症的治疗方面上也取得了一些突破性的进展,疗效也有显著性的提高。目前,常用的治疗方法有手术疗法(surgery)、化学疗法(chemotherapy)(或称化疗)、放射疗法(radiation therapy)(或称放疗)、基因疗法(gene therapy)、光动力疗法(photodynamic therapy)、中医治疗等治疗方法。而具体选择哪种治疗方式,主要是取决于肿瘤的位置、恶性程度、发展程度以及病人身体状态等。手术疗法主要适应于早期良性肿瘤或恶

性无扩散转移的患者，但是缺点是在早期诊断中还不够精准，同时对扩散转移的癌细胞却无能为力，使癌症复发率高^[15]。放射性疗法在杀死癌细胞的同时，也可能破坏正常组织和正常细胞，且临床上容易出现异常反应^[16, 17]。基因治疗 (gene therapy)，主要是用提高病人的抑癌基因的表达、降低癌基因的表达从而达到治疗目的，这一疗法还不成熟，对有些肿瘤没有找到合适有效的基因，不确定因素也会有潜在风险^[18-20]。中医治疗采用中国传统医学从调整整体机能入手，优点是既能杀死癌细胞，又能提高免疫能力，副作用小，但是治疗周期长，对于早期癌症来说不一定适用，容易耽误治疗的最佳时机，并且很多机理尚不明确^[21]。光动力疗法借助光敏剂在一定范围光波的激发下通过产生活性氧来杀死癌细胞，是一种创伤性小、低毒、选择性较好的治疗方法。但是常常因找不到合适的光敏剂和光源而影响这一方法的广泛应用^[22]。化学疗法是应用可以杀死癌细胞的化疗药物来治疗癌症，是迄今为止，肿瘤治疗中的主要手段。但由于多数的化疗药物都专一性不好，有可能会杀死进行细胞分裂的正常组织细胞，因而常常伤害那些需要进行分裂以维持正常功能的健康组织^[23, 24]。可见，无论是化疗、手术切除或放疗都是对身体有极大负担，而且当肿瘤发生恶性转移后，无论以何种方式都是很难彻底治愈。所以对癌症的治疗依旧是人类目前面临的一个重大考验。

纳米材料 (nanomaterials) 是纳米技术的一个重要方面，是指其结构在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围或以它们为基本单元构成的材料，一般尺寸由 1~100nm 间的粒子组成。纳米材料由于其本身具有的独特性质为其在许多领域的广泛应用提供优势，比如，当在陶瓷中加入纳米材料后，可以改善陶瓷材料的脆性，使陶瓷具有像金属一样的柔韧性和可加工性^[25]；纳米二氧化钛起到抗菌作用，被应用到纺织、水处理、防霉等及人们日常生活的很多方面^[26]；一般情况下实现加入纳米材料的电池其容量比普通电池的容量提升了 10%-30%，电池的功率提高了 25%-35%，电池的寿命也有 40%-60%的延长^[27]；此外，由于纳米粒子具有的小尺寸等特点，它可以通过多种方式（如内吞作用）进入细胞^[28]；如果将某些具有特定功能的药物分子或物质与纳米粒子相结合，这些纳米粒子可以携带特定的官能团或药物分子进入细胞并聚集在靶向细胞的一些特定的部位，从而产生特定的生物学效应^[29,30]。在生物医学的研究领域中，纳米材料的独特性质发挥着一般材料所不具有的特殊功能和作用，使其在生物医学领域得到越来越多的应用，例如在癌症早期诊断和治疗、药物控释、减少副作用、提高药效、发展药物定向治疗，组织工程、人工器官、介入性诊疗器械、血液净化、生物大分子分离、酶工程等众多方面都具有广泛的应用价值和诱人的前景。

1.2 纳米材料在肿瘤早期诊断中的应用

在癌症的诊断中，确诊恶性肿瘤的有效手段是使用活组织检测和细胞形态学检查的方法，但是由于其执行标准宽泛且不易量化而早期病变往往导致误诊或漏诊^[31]。如何提高肿瘤的早

期诊断的可靠性和灵敏性，对肿瘤作出及时准确的早期检测和诊断是医学工作者亟待解决的问题。随着纳米技术的日益发展及其在生物学中的应用，尤其是具有独特性质的纳米材料，现在越来越多地应用于肿瘤的早期检测和诊断中，并展现了令人欣慰的发展前景。大量的研究表明，纳米技术和纳米材料的引入可以极大地提高和改善肿瘤诊断的准确性和可靠性，提高了检测的灵敏度和检出限，从而为癌症的早期诊断打下了基础。

1.2.1 纳米材料在生物大分子水平检测中的应用

生物大分子（DNA、蛋白质等）是参与生命过程的重要分子，对于这些大分子的直接检测、识别对于癌症的早期诊断极为重要。纳米材料因其纳米级的空间尺寸和生物大分子尺度相当，可以与之结合在分子水平上实现对 DNA 或者蛋白质的直接检测、识别，从而为癌症的早期诊断提供依据。Cheng Fang 研究小组在二氧化硅纳米结构上合成了纳米金和纳米银基底，形成直径约为 $15\pm 10\text{nm}$ 的纳米空隙结构，利用表面增强拉曼光谱的方法可以检测到低至 $1\times 10^{-12}\text{M}$ 的 DNA^[32]。Nam 研究组（图 1-1）将纳米粒子结合特定的 DNA 片段和目标分析物形成识别探针——纳米粒子-DNA 生物条形码，从而可以有效地将信号放大，能够简易、快速、准确地检测到目标蛋白分子^[33]。由于纳米材料的引入，实现了高灵敏的 DNA 和蛋白质检测，用这些方法检测癌变早期时突变的 DNA 和异常的蛋白表达，可以大大提高检测的灵敏度，减少漏检的发生。此外这些方法还可以实现高通量检测，提高检测效率和稳定性，为肿瘤的早期检测提供了方法和依据。

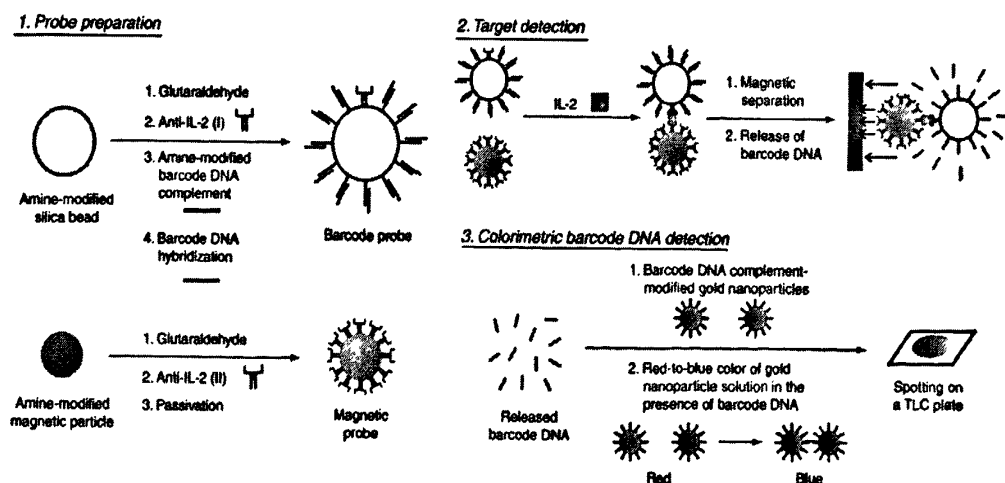


Figure 1.1 Colorimetric bio-barcode amplification assay^[33].

1.2.2 纳米材料在细胞水平的检测应用

在对癌细胞进行检测的过程中，通常会利用癌细胞表面特殊表达的受体，或者与正常细胞比较而言高表达的受体来制备相应的抗体，然后再将特异性的抗体或蛋白标记在纳米材料上，实现特异性结合来达到检测癌细胞的目的。在这个过程中，常会用到量子点（quantum dots,

QDs) (图 1-2), 因为量子点可以在同一激发光源下根据粒径大小不同而被激发出不同颜色的光, 所以便于标记和观察; 而且量子点发出的光具有光稳定性, 与传统的荧光有机染料及荧光蛋白相比不容易淬灭且信号更强, 能够提高检测灵敏度; 再加上它的纳米尺寸的结构特性, 可以容易透入上皮细胞结构松散的癌区到达癌细胞, 因此在癌症检测中受到很大重视, 得到了广泛研究。比如, 因为 SKOV3 卵巢癌细胞表面特异的高表达 HER2, 把 CdSe/ZnS 量子点和抗 HER2 的抗体连接, 然后和 SKOV3 卵巢癌细胞共培养, 所以共培养后看到量子点可以特异的结合到 HER2 高表达的癌细胞膜上, 而且也可以进一步跟踪癌细胞在不同时期细胞膜的形态变化和癌变生理相关的过程, 为癌变机理的研究提供依据 (图 1-2) [34]。类似的方法也用在检测前列腺癌上。前列腺细胞表面特异表达前列腺特异抗原 (PSA), 在 CdTe 量子点上连接抗 PSA 的抗体就可以实现对前列腺癌细胞的特异结合, 同时利用量子点的荧光特性实现癌细胞的检测[35]。

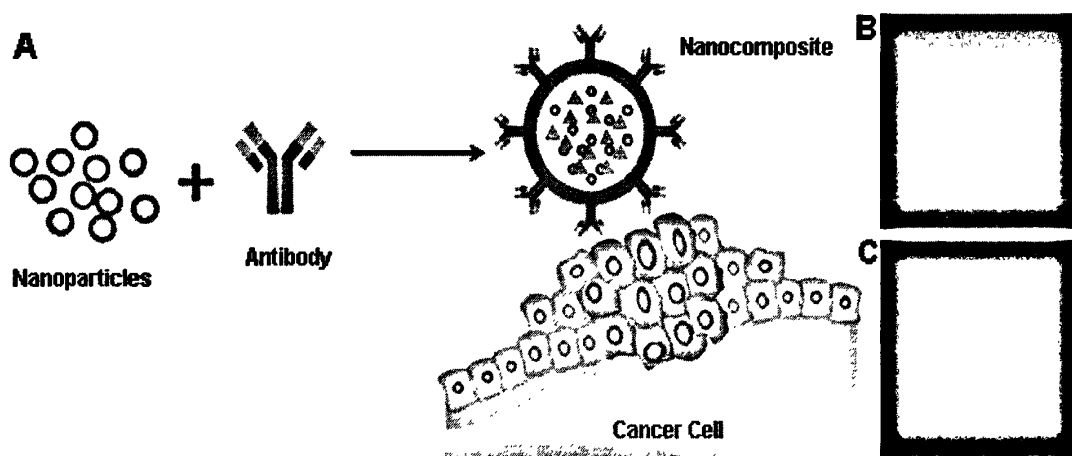


Figure 1-2 (A) The schematic illustration for preparation of fluorescence nanohybrids as multimodal imaging agents for cancer detection. (B) Confocal microscopy images of control cells and treated cell (C) with QD with labeled of HER2 under same manner, which showing specific labeling [34].

1.2.3 纳米材料在组织水平的检测应用

在整个组织机体水平的检测, 常常是采用 MRI (核磁共振成像, magnetic resonance imaging)、CT(X 射线断层扫描, Computed tomography)、PET(正电子计算机断层扫描, positron emission tomography) 或超声 (ultrasound, US) 等检测方法, 但是分辨率并不高。要想提高其分辨率, 关键是找到无毒、灵敏、稳定的造影剂, 目前常用的造影剂里一般含有碘、钡、锰、钆等重金属, 其显著的缺点是特异性和检测灵敏度有限, 不利于早期癌症的检出; 而且有一定的毒副作用, 比如含钆的造影剂有造成肾源性系统纤维化的潜在危害[36]。纳米科技将纳米

材料引入到癌症成像检测中,可以有效地克服传统显影剂的不足,提高检测特异性和灵敏度。纳米材料作为新型造影剂应用于MRI中,其中包括了纳米粒子或量子点、碳纳米管、脂质体、纳米胶团及足球烯等纳米材料^[37]。比如, Hua Ai 研究小组发现经 PEG-PCL 标记的纳米氧化铁自组装胶团,其造影效果有极大地提高,而且可以在小鼠肝区停留长达 36 小时,甚至可以检测到肝部的微小损伤^[38]。Cai 等利用了量子点,对其表面修饰了 RGD 和螯合剂 DOTA,用铜 (^{64}Cu) 标记后进行 PET/NIRF (正电子计算机断层扫描/近红外荧光分析) 双重显像,结果显示,该双重探针主要分布在肿瘤的脉管系统,具有高的灵敏度和信号响应,因此可以提高图像的清晰度、便于检测出机体深处的信号。此外,结果显示在低浓度下就可以利用 PET 显影,其所耗浓度要比一般 NIRF 的用量少,较少的用量从另一个角度讲将会减少造影剂的潜在毒性对机体造成危害(图 1-3)^[39]。

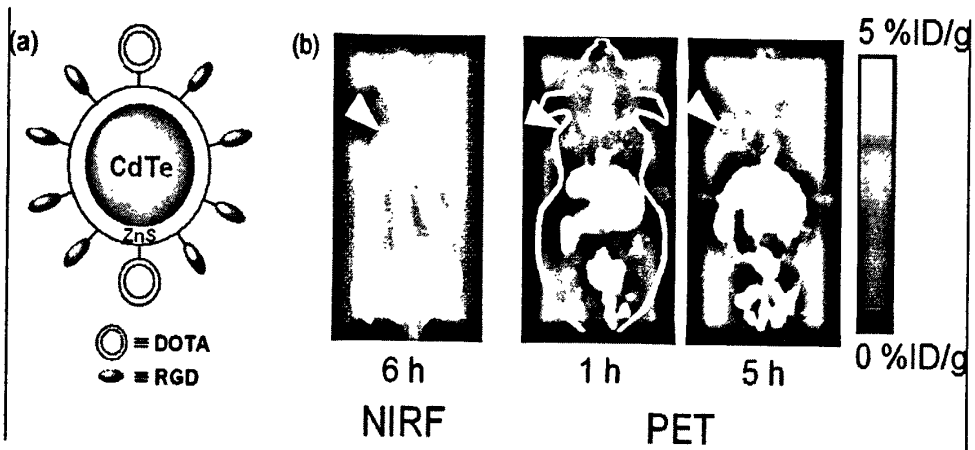


Figure 1-3 Dual-modality PET/NIRF imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ in tumor vasculature. (a) A schematic structure of the dual-modality PET/NIRF probe. (b) NIRF (after injection of QD-RGD) and coronal microPET (after injection of ^{64}Cu -DOTA-QD-RGD) images of a U87MG tumor-bearing mice. Arrowheads indicate tumors ^[39].

1.3 纳米材料在肿瘤治疗中的应用

在肿瘤治疗过程中,化学疗法是目前临床上最早采用的治疗方案之一,但是,化疗常常因为化疗药物自身的毒性,癌细胞内有效药效浓度偏低,药物的靶向性差及多药耐药性等问题而严重阻碍着癌症的治疗。在药物治疗过程中,药物能够进入肿瘤细胞并能有效地在靶细胞内蓄积并达到有效的治疗浓度,对于提高癌细胞的杀伤率和增强治疗效果是至关重要的^[40]。随着纳米技术的迅速发展及其纳米材料在生物医学领域中的应用,纳米材料对于肿瘤治疗的促进作用已经显示出极大的应用前景,并引起人们的极大关注。近年来,越来越多的纳米材料不仅在肿瘤诊断中发挥着巨大的作用,也为肿瘤治疗开辟了一条全新的途径^[41-45]。

1.3.1 纳米材料在逆转肿瘤多药耐药的应用

目前，临床上肿瘤的主要治疗手段依然是化学疗法，尤其是对于白血病患者，一般都采用化疗的方法来治疗癌症。但是在化疗中，由于肿瘤细胞的多药耐药（multidrug resistance, MDR）使得很多化疗药物的疗效很低，却大大阻碍了肿瘤治疗的成功。所以，有效逆转 MDR、提高癌细胞内部药物的有效浓度是化疗成功的关键。现已证实^[46]，大部分肿瘤细胞可以表达多药耐药基因和多药耐药蛋白，这些蛋白多属于 ATP 结合蛋白(ATP-binding cassette, ABC) 家族，其中最主要的三类 ABC 家族，第一类是 P-gp 蛋白（图 1-4 a），有 12 个跨膜区，在胞内侧有 2 个 ATP 结合位点，跨膜区可以结合多种药物底物，胞内区结合的一个 ATP 的水解时，蛋白结构改变，将药物泵出，当另一个 ATP 水解时，可以将蛋白质的结构再恢复回原来的构型，通过这样依赖 ATP 功能的变构实现药物的外排；第二类 ABC 蛋白是 MRP1，其二级结构和 P-gp 很相似，只是前者 N 端多 5 个跨膜区（图 1-4 b），它多结合中性及负性的疏水药物，在外排的过程中伴随着谷胱甘肽的转运；MXR, BCRP, ABC-P 等蛋白属于第三类，其结构如图 1-4 c，具 6 个跨膜区，N 端有 ATP 结合位点，他们能够依赖 ATP 水解提供能量将抗癌药物泵出胞外。

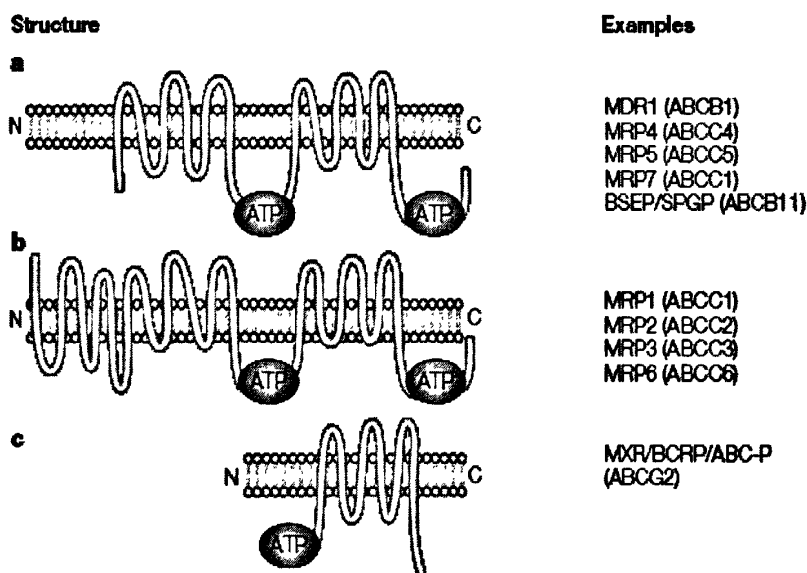


Figure 1-4 Structures of three categories of ABC transporters known to confer drug resistance^[46].

伴随着纳米科学的发展，利用纳米材料来逆转多药耐药性的研究也在如火如荼地进行中，比如，将抗癌药物包裹在纳米脂质体或胶囊中，而避免跨膜蛋白的识别结合，通过细胞的胞吞作用进入肿瘤细胞，而提高了药物在肿瘤细胞内的浓度，也就提高了药物对癌细胞的杀伤能力^[47]。体内实验证实，包裹在 PIHCA 纳米球中的阿霉素处理耐阿霉素胶质瘤小鼠模型时，能够比单纯的阿霉素起到更加明显的治疗效果^[48]。此外，利用磁性四氧化三铁纳米粒子协同

抗癌药物,抑制肿瘤耐药细胞中耐药蛋白的功能,进一步增加药物在靶向肿瘤细胞内的蓄积,也可以达到抑制肿瘤细胞生长的目的^[49,50]。很多令人鼓舞的结果显示了纳米粒子具有逆转MDR的功能,从而为治疗肿瘤开辟了一条光明的途径。

1.3.2 纳米材料在肿瘤靶向药物控释治疗中的应用

在癌症治疗中,传统的抗癌药物进入血液经人体到达大多数组织,由于其选择性和特异性不好,在运输过程会杀死进行正常细胞分裂的组织细胞,而且随着机体组织的深入造成药物浓度的降低,到达肿瘤细胞的特定部位时,不能发挥其疗效,肿瘤无法得到根治性的治疗;纳米粒子可以作为药物的运输载体,将抗癌药物运送到特定的肿瘤组织,而不损伤到正常的组织,增加肿瘤部位的药物蓄积浓度,增强治疗效果、减少毒副作用、提高预后能力。

用于药物传输系统(Drug delivery system, DDS)的纳米药物载体的大小大约在1-200nm左右,主要包括载体部分、靶向部分和所载的药物部分。纳米粒子将抗癌药物运输到特定的肿瘤部位,而不损伤正常的组织和细胞^[51]。最近研究报道^[52],给患有肺癌小鼠灌食磁性纳米粒子,并在施加外界磁场的作用下,使得纳米粒子特异性靶向到达肿瘤的特定部位,选择性杀死肿瘤细胞,而对正常细胞几乎没有影响(图1-5)。

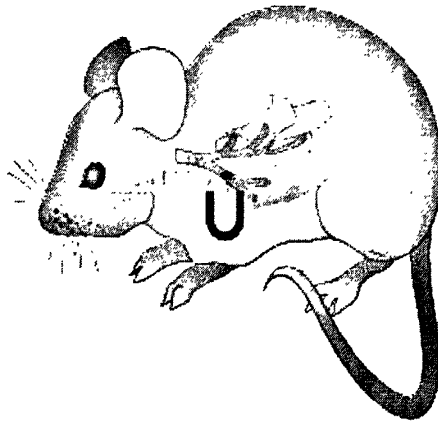


Figure 1-5 Magnetic-field guided drug delivery with magnetic aerosols ^[52].

1.3.3 纳米材料在肿瘤光动力治疗中的应用

光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)是联合应用光敏剂及相应光源通过光动力学反应选择性破坏局部异常组织(包括癌症)的一种治疗方法^[53]。其作用机理是光敏剂分子可以定位于靶细胞或靶组织,当一定波长的光源照射光敏剂后,光敏剂被激发,从基态(单线态)跃迁至电子激发态(三线态),当其返回到基态的时候会释放出能量,这些能量传递给氧,从而产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),比如单线态氧,自由基等。这些ROS与肿瘤组

织和细胞内多种生物大分子发生作用,通过各种信号途径,引起细胞功能性障碍和结构性损伤,介导其对周边细胞、组织、机体等的毒性,最终导致肿瘤组织消亡,在癌症治疗中发挥作用^[54, 55]。随着纳米科技的发展,特别是纳米材料本身具有很多一般材料所不具有的特殊性质,使得其为光动力治疗癌症等方向带来了新的研究和发展的空间。很多纳米材料,如生物可降解的纳米脂质体,聚合物纳米胶囊,纳米胶束等可以作为光敏剂载体,将光敏剂包裹在内部,减轻光敏剂对其他组织的毒性,然后通过生物降解释放出光敏剂,在适当光激发下进行光动力治疗。Allemann 等在 PLGA (poly lactic-co-glycolic acid) 纳米载体上修饰了 PEG,从而使光敏剂在循环系统内的循环时间延长,为治疗提供足够的时间,也能使光敏剂在肿瘤区蓄积浓度增加^[56]。有的纳米材料本身在适当光源激发下,就能产生 ROS,直接起到光敏剂的作用,丰富了光敏剂的范围。比如,量子点常被用来作为显影探针,研究表明它们还可以把能量转给附近的氧气。据此,利用他们稳定的光学特点和荧光特性,已有科学家开展将量子点用作光敏剂的研究^[57]。

此外纳米材料还可以在热疗、超声治疗、基因治疗(比如基于脂质体的载体用来承载核酸运输 siRNA 等)、磁疗等方面发挥重要的作用^[58-61]。

1.4 本论文的工作

本论文探讨和研究了某些具有生物学意义的功能化纳米复合物在肿瘤细胞检测和药物控释中的应用。本论文的工作主要分为以下三个部分:

第一部分是设计并研究了水溶性碲化镉量子点纳米材料及其细胞毒性,采用了全内反射单分子荧光显微镜、电化学、紫外吸收光谱及 MTT 比色法等研究了相关量子点在肿瘤细胞识别与药物控释中的应用,具体内容见第二章。

第二部分是研究了水溶性碲化镉量子点在细胞成像和促进肿瘤细胞对抗癌药物分子的吸收、逆转多药耐药性的应用,并且对于两种量子点对肿瘤细胞药物吸收的影响进行了研究和探讨,具体内容见第三章。

第三部分对功能化银纳米粒子对肿瘤细胞的影响及在药物传输中的作用进行研究,发现银纳米粒子可以充当良好的药物载体,具有很好的载药能力和对肿瘤细胞的杀伤能力,具体内容见第四章。

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009 June 9. (PMID 19474385).
- [2] Etzioni R, Urban N, Ramsey S, et al. The case for early detection. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3:1-10.
- [3] Sasieni P, Castanon A. Call and recall cervical screening programme: Screening interval and age limits. *Curr Diag Pathol*, 2006, 12:114-126.
- [4] Cuzick J, Szarewski A, Terry G, et al. Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet*, 1995, 345:1533-1536.
- [5] Li T, Shi L L, Wang E K, et al. Multifunctional g-quadruplex aptamers and their application to protein detection. *Chem Eur J*, 2009, 15:1036 - 1042.
- [6] Du Y, Chen C G, Li B L, et al. Layer-by-layer electrochemical biosensor with aptamer-appended active polyelectrolyte multilayer for sensitive protein determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25:1902-1907.
- [7] Lu Y D, Xu J J, Liu Y, et al. Manipulated photocurrent generation from pigment-exchanged photosynthetic proteins adsorbed to nanostructured WO₃-TiO₂ electrodes. *Chem Comm*, 2006, 7:785-787.
- [8] Lu Y D, Yuan M J, Liu Y, et al. Remarkably enhanced photoelectric performance of bacteria photosynthetic proteins entrapped on tailored mesoporous WO₃-TiO₂ films. *Langmuir*, 2005, 21:4071-4076.
- [9] Liu Y, Mu L, Liu B H, et al. Controlled switchable surface. *Chem Euro J*, 2005, 11:2623-2631.
- [10] Kubota K, Nakanishi H, Hiki N, et al. Quantitative detection of micrometastases in the lymph nodes of gastric cancer patients with real-time RT-PCR: a comparative study with immunohistochemistry. *Int J Cancer*, 2003, 105:136-143.
- [11] Van Z N. New methods for early diagnosis of lung cancer. *Lung Cancer*, 2002, 38:S9-S11.
- [12] Cerfolio R J, Buddhiwardhan O, Bryant A S, et al. The accuracy of integrated PET/CT compared with dedicated pet alone for the staging of patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 2004, 78:1017 - 1023.
- [13] Barlesi F, Gimenez C, Torre J P, et al. Prognostic value of combination of Cyfra 21-1, CEA and NSE in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Resp Med*, 2004, 98:357-362.
- [14] Iqbal U A, Zhen X, Winfred M, et al. Plasma proteomic profiling: search for lung cancer diagnostic and early detection markers. *Oncol Rep*, 2006, 15:1367-1372.
- [15] Jatin P S, Ziv G. Current concepts in management of oral cancer - Surgery. *Oral Oncol*, 2009, 45: 394-401.
- [16] Annie W C, Norbert J L. Proton radiation therapy for head and neck cancer. *J of Sur Oncol*,

2008, 97:697-700.

- [17] Lu H, Yao M. The current status of intensity-modulated radiation therapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Treat Rev*, 2008, 34:27-36.
- [18] Thomas C E, Ehrhardt A, Kay M A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 2003, 4:346-358.
- [19] Hunt K K, Vorburger S A, Swisher S G. Gene therapy for cancer. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2007.
- [20] Rando T A. Non-viral gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: Progress and challenges. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772:263-271.
- [21] Paterson R R M. Cordyceps-A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? *Phytochemistry*, 2008, 69:1469-1495.
- [22] Castano A P, Mroz P, Hamblin M R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6:535-545.
- [23] Sternberg C N, Donat S M, Bellmunt J, et al. Chemotherapy for bladder cancer: Treatment guidelines for neoadjuvant chemotherapy, bladder preservation, adjuvant chemotherapy, and metastatic cancer. *Urology*, 2007, 69 (Supp 1A):62-79.
- [24] Etzioni D A, El-Khoueiry A B, Beart R W. Rates and predictors of chemotherapy use for stage III colon cancer. *Cancer*, 2008, 113: 3279-3289.
- [25] Fu Y, Zhang L. Simultaneous deposition of Ni nanoparticles and wires on a tubular halloysite template: A novel metallized ceramic microstructure. *J Solid State Chem*, 2005, 178:3595-3600.
- [26] Kamat P V. Meeting the clean energy demand: Nanostructure architectures for solar energy conversion. *J Phys Chem C*, 2007, 111:2834-2860.
- [27] Foyet A, Hauser A, Schafer W. Template electrochemical deposition and characterization of zinc-nickel alloy nanomaterial. *J Electroanal Chem*, 2007, 604:137-143.
- [28] Moore M N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ Intern*, 2006, 32: 967-976.
- [29] Yang P H, Sun X, Chiu J F, et al. Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16: 494-496.
- [30] Gao J, Liang G, Zhang B, et al. FePt@CoS yolk shell nanocrystals as a potent agent to kill HeLa cells. *J Am Chem Soc*, 2007, 129:1428-1433.
- [31] El-Sayed I. H., Huang X., El-Sayed M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano Lett*, 2005, 5: 829-834.
- [32] Fang C, Agarwal A, Buddharaju K D, et al. DNA detection using nanostructured SERS

- substrates with Rhodamine B as Raman label. *Biosen Bioelectron*, 2008, 24:216–221.
- [33] Nam J M, Jang K J, Groves J T. Detection of proteins using a colorimetric bio-barcode assay. *Nature protocols*, 2007, 2:1438–1444.
- [34] Corezzi S, Urbanelli L, Cloetens P, et al. Synchrotron-based X-ray fluorescence imaging of human cells labeled with CdSe quantum dots. *Anal Biochem*, 2009, 388:33–39.
- [35] Dong W, Guo L, Wang M, et al. CdTe QDs-based prostate-specific antigen probe for human prostate cancer cell imaging. *J Lumin*, 2009, 129:926–930.
- [36] Corot C, Idee J M, Hentsch A M, et al., Structure-activity relationship of macrocyclic and linear gadolinium chelates: Investigation of transmetallation effect on the zinc-dependent metalloproteinase angiotensin-converting enzyme, *J Magn Reson Imaging*, 1998, 8:695–702.
- [37] Mody V V, Nounou M I, Bikram M. Novel nanomedicine-based MRI contrast agents for gynecological malignancies. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61:795–807.
- [38] Lu J, Ma S, Sun J, et al. Manganese ferrite nanoparticle micellar nanocomposites as MRI contrast agent for liver imaging. *Biomaterials*, 2009, 30:2919–2928.
- [39] Cai W, Chen K, Li Z B, et al. Dual-function probe for PET and near-infrared fluorescence imaging of tumor vasculature. *J Nucl Med*, 2007, 48:1862–1870.
- [40] Henry C M. New wrinkles in drug delivery. *Chem Eng News*, 2004, 82:37–42.
- [41] Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 47–52.
- [42] Kim S, Lim Y T, Soltesz E G, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol*, 2004, 22:93–97.
- [43] Taton T, Mirkin C, Letsinger R. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 2000, 289:1757–1760.
- [44] Cui Y, Wei Q, Park H, et al. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science*, 2001, 293:1289–1292.
- [45] Chen R J, Bangsaruntip S, Drouvalakis K A, et al. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 4984–4989.
- [46] Gottesman M M, Fojo T, Bates S E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2:48–58.
- [47] Krishna R, Mayer L D. Multidrug resistance (MDR) in cancer—mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Cancer Sci*, 2000, 11:265–283.
- [48] Hu Y P, Jarillon S, Dubernet C, et al. On the mechanism of action of doxorubicin encapsulation in nanospheres for the reversal of multidrug resistance. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1996, 37:556–560.

- [49] Zhang R Y, Wang X M, Wu C H, et al. Synergistic enhancement effect of magnetic nanoparticles on anticancer drug accumulation in cancer cells. *Nanotechnology*, 2006, 17: 3622–3626.
- [50] Wang X M, Zhang R Y, Wu C H, et al. The application of Fe_3O_4 nanoparticles in cancer research: a new strategy to inhibit drug resistance. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 80 (4): 852-860.
- [51] Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54:631–651.
- [52] Amirfazli A. Magnetic nanoparticles hit the target. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2: 467-468.
- [53] Dolmans D E, Fukumura D, Jain R K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 380-387.
- [54] Macdonald I J, Dougherty T J. Basic principles of photodynamic therapy. *J Porphyrins Phthalocyanines*, 2001, 5:105–129.
- [55] Triesscheijn M, Baas P, Schellens J H M, et al. Photodynamic Therapy in Oncology. *Oncologist*, 2006, 11:1034-1044.
- [56] Allemann E, Rousseau J, Brasseur N, et al. Photodynamic therapy of tumours with hexadecafluoro zinc phthalocynine formulated in PEG-coated poly (lactic acid) nanoparticles. *Int J Cancer*, 1996, 66:821—824.
- [57] Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, et al. Quantum dots as photosensitizers? *Nat Biotechnol*, 2004, 22:1360–1361.
- [58] Loo C, Lowery A, Halas N, et al. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Lett*, 2005, 5:709–711.
- [59] Bloch S H, Wan M, Dayton P A, et al. Optical observation of lipid- and polymer-shelled ultrasound microbubble contrast agents. *Appl Phys Lett*, 2004, 84:631–633.
- [60] Yu-Cheng T, Subho M, Leaf H. Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Adv Drug Deliver, Reviews*, 2009, 61:721-731.
- [61] Corchero J, Villaverde A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. *Trends Biotech*, 2009, 8:468-476.

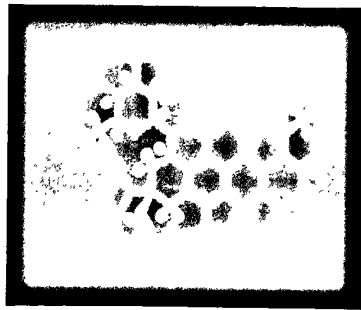
第二章 水溶性 CdTe 量子点在肿瘤细胞识别及增强细胞胞内药物浓度的应用研究

摘要: 本章研究工作中,我们将表面修饰有 3-巯基丙酸的水溶性碲化镉量子点纳米材料应用于白血病细胞的标记成像,并进一步研究其在促进肿瘤细胞吸收抗癌药物柔红霉素中的作用。通过全内反射单分子荧光显微镜的观察,表明该量子点具有良好的荧光稳定性,可实现在活细胞体系中实时、靶向示踪成像。此外,经电化学、UV-Vis 紫外吸收光谱及细胞生长抑制率实验的研究发现,柔红霉素可以与碲化镉纳米粒子结合形成纳米复合物,从而能够有效地促进抗癌药物分子在肿瘤细胞胞内的吸收蓄积,同时可以避免肿瘤耐药细胞膜表面耐药 P-糖蛋白“识别”和“泵出”,增加了药物分子在靶细胞的蓄积浓度,显著地增强了抗癌药物柔红霉素对肿瘤细胞的靶向杀伤作用。

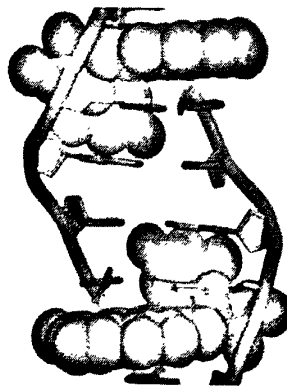
关键字: 碲化镉量子点; 白血病细胞; 柔红霉素; 细胞标记; 药物控释

2.1 引言

抗肿瘤药物分子柔红霉素(DNR)是一种高效光谱性蒽环类药物的衍生物,具有良好的电化学和紫外光谱吸收性质,目前广泛地应用于临床医学的治疗当中。研究证实柔红霉素药物分子是以插入方式与体内的靶分子 DNA 作用,其活性部位是糖环上的氨基基团(-NH₂),通过该活性中间体与癌变细胞 DNA 上的鸟嘌呤(G)结合,使 DNA 的构象发生变化,以此抑制肿瘤细胞 DNA 的复制过程而达到杀死癌细胞的作用^[1]。



DNR的分子结构



DNR与DNA碱基(G)的作用模式

在我国白血病是严重危害人类健康的十类重大疾病之一,多见于青少年,其发病率和死亡率近年来呈上升趋势,因此,癌症的早期诊断及合理有效治疗显得更为重要。目前化学疗法是肿瘤治疗中的主要手段,但癌细胞内有效药物浓度过低,而影响到治疗效果。如何提高

癌症细胞内的有效药物浓度，实现抗癌药物识别靶向并在肿瘤部位蓄积减少用药量、减少对其他器官的伤害等问题是癌症治疗中的难题。近年来，纳米技术的蓬勃发展给癌症的治疗提供了特殊性能的纳米材料并越来越多地在癌症治疗研究中崭露头角，为癌症治疗开辟了新的道路^[2-6]。

在肿瘤治疗过程中，越来越多的纳米粒子与抗癌药物结合形成载药纳米复合物，促进肿瘤细胞对抗癌药物的吸收，从而提高肿瘤细胞内药物浓度。纳米给药系统具有药物的控释、药物的靶向以及显著提高药物的生物利用率等特性，大大克服了传统给药的弱点^[7-13]。文献^[14,15]报道证明抗癌药物与多聚纳米微球或纳米粒子形成复合物可以有效地增加抗癌药物在肿瘤细胞的药物蓄积浓度，从而达到更好的治疗效果。半导体荧光量子点（fluorescent semiconductor quantum dots, QDs）作为一种纳米荧光染料，与传统有机荧光染料相比具有很多优异的荧光性质，比如激发光谱宽、发射光谱窄且其波长可以通过晶体尺寸和组成进行调控、量子产率高、光稳定性好（不易光漂白）、可实现一元激发多元发射的同时标记等^[16-18]，因此量子点标记技术在生物医学领域中发挥着重要的作用，受到日益密切的关注。近年来，半导体量子点作为新型高灵敏的荧光探针在活细胞体系标记^[19,20]、活体和组织成像^[21]、肿瘤模型定位^[22]、癌症的临床诊断^[23]等多个研究领域中，取得了突破性的进展。并且，随着研究人员对生物分子荧光标记方法在生物医学领域中的不断深入研究，目前已经证实了 QDs 荧光标记物质不会干扰目标标记分子的生物活性^[24,25]。

在本工作的研究中，我们制备和表征了水溶性较好的表面修饰基团为 3-巯基丙酸（3-mercaptopropionic acid, MPA）基团碲化镉量子点（MPA-CdTe QDs）。使用全内反射单分子荧光显微镜（TIRFM）方法和四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法，我们研究了该 QDs 对白血病细胞的识别标记能力，考察了其对白血病细胞 K562 的细胞毒性；并利用电化学分析、UV-Vis 紫外吸收光谱及 MTT 分析手段研究了该 3-MPA-CdTe QDs 与抗癌药物柔红霉素(DNR)结合形成纳米复合物 DNR-CdTe QDs 对白血病细胞的影响，研究表明，该纳米复合物有利于载入更多的抗癌药物进入到肿瘤细胞中，可以有效地抑制耐药细胞 K56/A02 的 P-糖蛋白的表达，逆转肿瘤细胞的多药耐药性，大大增加了肿瘤细胞内的 DNR 浓度，从而增强抗癌药物对肿瘤细胞的杀伤作用。

2.2 实验部分

2.2.1 主要仪器

- 1) CHI660b 电化学工作站：上海辰华仪器有限公司；
- 2) 高分辨透射扫描电镜 (HR-TEM)：JEM-2100 日本；

- 3) 荧光分光光度计: LS-55 Perkin-Elmer 公司;
- 4) UV-Vis 紫外分光光度计: Hitachi U-4100 日本;
- 5) 全反射荧光显微镜(TIRFM): Nikon 日本;
- 6) CO₂ 细胞培养箱: GBB16 型, Heraeus, 德国;
- 7) 酶联免疫检测仪: BIO-RAD550, Bio-Rad Laboratories Inc., 美国。

2.2.2 主要试剂的配制

- 1) 柔红霉素(DNR)为固体粉末状试剂: 意大利 Farmitalia 公司, 使用前用生理盐水配成 2mg/mL 的注射剂;
- 2) RPMI 1640 培养液: 美国 GIBCO BRL 公司, 4℃保存备用。

| | |
|--------------------|----------------------|
| PRMI 1640培养液干粉 | 10.4g |
| NaHCO ₃ | 2.1g |
| HEPES | 4.6g |
| 青霉素 | 1×10 ⁴ IU |
| 链霉素 | 0.15g |

溶于800ml双蒸水中, 磁力搅拌使之溶解, 调pH至7.2, 定容至1000mL, 0.22μm微孔滤膜滤器过滤除菌, 分装, -20℃保存。

- 3) 胎牛血清: Sigma 公司, 美国, 分装后-20℃保存备用;
- 4) PBS 液 (0.01M)

| | |
|--|-------|
| NaCl | 8.0g |
| KCl | 0.2g |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 3.49g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 g |

溶于 800ml 双蒸水中, 搅拌溶解均匀后, 定容至 1000mL, 分装, 高压灭菌, 4℃保存, 用前调 pH 7.2~7.4。

- 5) MTT: Amresco 公司, 美国;

称取 50mg MTT, 溶于 10mL PBS 液中 (0.01M, pH 7.2), 终浓度为 5mg/mL, 0.22μm 微孔滤膜滤器过滤除菌, 4℃避光保存。

2.2.3 细胞培养

白血病敏感 K562 细胞和耐药 K562/A02 细胞是悬浮类细胞。在培养的过程中, K562 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 培养基中含有 100 μg/mL 的链霉素和 100 IU/mL 的青霉素。整个培养过程是在 37℃、含有 5%二氧化碳湿润的培养箱中进行的。耐药

细胞 K562/A02 也是使用上述培养基中培养, 并且以 $1 \mu\text{g/mL}$ 的阿霉素来维持其耐药性。

2.2.4 MPA-CdTe QDs 的制备

相关荧光 MPA-CdTe QDs 的制备按照文献^[28]报道的方法并进行了适当的改进。首先, 将 1.175 mM 的 $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶于 62.5 mL 水。然后, 加入 2.85 mM 3-巯基丙酸并搅拌, 通过加入 0.5 mL 1 M NaOH 溶液来调整溶液的 pH 值为 9。接着用高纯的氮气将该溶液进行除氧保护, Al_2Te_3 和 7.5 mL 0.5 M 硫酸反应生成 H_2Te 气体, 该气体与氮气一起缓慢地通入到溶液中, 大约 20 min , 生成 CdTe 的前驱物, 然后将该混合物快速搅拌 10 分钟, 通过回流 60 h 至 72 h 以控制 CdTe 量子点的增长。

2.2.5 MPA-CdTe QDs 对白血病细胞的细胞毒性检验

将处于对数生长期的两种白血病敏感 K562 细胞和耐药 K562/A02 细胞依照 1.0×10^4 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 然后用不同浓度的 MPA-CdTe QDs 作用与细胞培养 48 h 。MPA-CdTe QDs 在每个孔中的最终浓度分别为 $5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 \mu\text{M}$ (用新鲜无菌的 RPMI 1640 培养基进行稀释), 培养体积为 $200 \mu\text{L}$, 每个实验点设三个复孔。同时, 用不含 QDs 的细胞作为对照, 含相同体积培养基作为空白对照组, 同时接种于 96 孔板中, 然后分别培养 48 h 。培养时间终止后每孔加入 MTT 溶液 $20 \mu\text{L}$ (5 g/L) 继续培养 4 h , 吸去上清液, 每孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$, 终止反应后, 将 96 孔板移入平板震荡器, 水平震荡 10 min , 使 MTT 还原产物完全溶解, 然后用酶联免疫检测仪于 492 nm 波长处测定每孔吸光度 (OD 值), 并以空白对照孔的 OD 值调零。结果以每组 3 孔的均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示, 实验至少重复 3 次。细胞生存率公式如下:

$$\text{细胞生存率}(\%) = [\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}] / [\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}] \times 100\%。$$

2.2.6 MPA-CdTe QDs 在白血病诊断中的细胞标记成像的研究

全内反射荧光显微术 (Total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM) 是利用全内反射产生的消逝波激发样品, 使样品表面数百纳米厚的薄层内的荧光团受到激发, 再用高灵敏度和高时间分辨率的摄像机 CCD 来捕捉荧光, 并用计算机进行显像, 从而实现对生物样品观测的一种新技术。由于消逝波特点及 CCD 的优势使全内反射荧光显微镜具有高信噪比、高空间和时间分辨率, 因此它在对单分子的动态观测具有很高的应用价值, 是目前国际上公认的最有前途的单分子光学成像技术。

将处于对数生长期的两种白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 作为实验对象。首先分别以 1000 转/min 离心 5 min , 然后轻轻倒去上清, 用 PBS (0.01 M , $\text{pH} 7.2$) 悬起离心, 重复三次。用适量的 PBS 悬起分别加入少量的 MPA-CdTe QDs, 5 min 后, 取 $15 \mu\text{L}$ 细胞悬液滴在 0.17 mm 厚的玻璃盖片, 然后置于激光束 (488 nm , 全内反射荧光显微镜 (TIRFM)) 下照

射。通过调整激光束的入射角在倒置显微镜 (Nikon 显微镜) 物镜下获得目标图像。

2.2.7 MPA-CdTe 量子点在癌症诊治中的研究

2.2.7.1 电化学检测

由于抗癌药物分子柔红霉素 DNR 具有很好的电化学响应, 是良好的电化学探针分子, 同时电化学测定方法具有高精度、高灵敏度、低成本等优良特性, 是一种快速经济灵敏的测定方法, 因此我们采用了该种测量方法。柔红霉素 DNR 在电化学测定中, 其峰值电流跟柔红霉素 DNR 的浓度呈正比关系^[26], 因此, 我们采用 CHI660b 电化学工作站测到的柔红霉素 DNR 的峰电流变化就可以直接地反映出柔红霉素 DNR 的浓度变化。

将 $1.9 \times 10^{-5} \text{ M}$ DNR 与 $9.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ 的 MPA-CdTe QDs 在 PBS 缓冲液 (0.01M, pH 7.2) 中混合均匀, 4°C 过夜, 使柔红霉素 DNR 分子与 CdTe QDs 自组装成 DNR-CdTe QDs 复合物。次日, 将处于对数生长期的两种白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 分别离心 5min, 然后轻轻倒去上清溶液, 细胞沉淀用 PBS 缓冲液轻轻悬起, 同法离心后用 PBS 缓冲溶液再次悬起并计数。含有柔红霉素 DNR ($1.9 \times 10^{-5} \text{ M}$)、DNR-CdTe QDs 复合物的 K562 细胞溶液 (5×10^5 个/mL) 分别在 37°C 、5% CO_2 培养 2 h; 同时, 用含有 $1.9 \times 10^{-5} \text{ M}$ 柔红霉素 DNR 溶液置于 37°C 、5% CO_2 培养 2 h 作为对样品。所有样品在实验过程中均用 PBS 缓冲液进行稀释处理, 然后离心 5 min, 取上清液体进行电化学分析。

2.2.7.2 UV-Vis 紫外吸收光谱分析

UV-Vis 紫外吸收光谱分析是 Hitachi U-4100 光谱分析仪进行的, 实验温度是室温 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$)。抗癌药物柔红霉素 (DNR) 在 500nm 处具有良好的紫外吸收峰, 而且其峰值的大小与柔红霉素 DNR 浓度呈正相关^[27], 因此, 我们采用该实验手段来检测吸收峰值的变化, 进而反映出柔红霉素 DNR 的浓度变化。实验样品处理如下: 将 $1.9 \times 10^{-5} \text{ M}$ 柔红霉素 DNR 与 $9.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ 的 MPA-CdTe QDs 在 PBS (0.01M, pH 7.2) 中混合均匀, 4°C 过夜, 使柔红霉素 DNR 分子与 CdTe QDs 自组装成 DNR-CdTe QDs 复合物。次日, 将处于对数生长期的两种白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 分别离心 5min, 然后轻轻倒去上清溶液, 细胞沉淀用 PBS 缓冲液轻轻悬起, 同法离心后用 PBS 溶液再次悬起并计数。含有 DNR ($1.9 \times 10^{-5} \text{ M}$)、DNR-CdTe QDs 复合物的 K562 细胞溶液 (5×10^5 个/mL) 分别在 37°C 、5% CO_2 培养 2 h; 同时, 用含有 $1.9 \times 10^{-5} \text{ M}$ DNR 溶液置于 37°C 、5% CO_2 培养 2 h 作为对样品。所有样品在实验过程中均用 PBS 缓冲液进行稀释处理, 然后离心 5 min, 取上清液体进行 UV-Vis 紫外吸收光谱分析。

2.2.7.3 MTT 分析

我们采用生物学手段——MTT 法测定了柔红霉素 DNR 在有或没有 MPA-CdTe QDs 条件

下对白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 的生长情况的影响。柔红霉素的最终浓度为 $1.25 \times 10^{-6} \text{M}$, MPA-CdTe QDs 的浓度为 $6.25 \times 10^{-7} \text{M}$, 混合均匀后 4°C 隔夜保存。首先, 分别将处于对数生长期的白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 按 1.0×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后再加入柔红霉素和 MPA-CdTe QDs 的纳米复合物; 同时, $1.25 \times 10^{-6} \text{M}$ 的柔红霉素或 $6.25 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 MPA-CdTe QDs 纳米粒子作为对照组, 同时接种于 96 孔板中, 每个浓度设 3 个复孔, 培养体积为 $200 \mu\text{L}$, 然后在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养条件下继续培养 24 h 后, 培养时间完成后每孔加入 MTT 溶液 $20 \mu\text{l}$ (5g/L) 继续培养 4 h, 吸去上清液, 每孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$, 终止反应, 将 96 孔板移入平板震荡器, 水平震荡 10min, 使 MTT 还原产物完全溶解, 然后用酶联免疫检测仪于 496nm 波长处测定每孔吸光度 (OD 值), 并以空白对照孔的 OD 值调零。结果以每组 3 孔的均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示, 实验至少重复 3 次。细胞生存率公式如下:

$$\text{细胞抑制率 (\%)} = 1 - [\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}] / [\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}] \times 100\%$$

按上述方法进行处理并进行数据处理。

2.2.8 统计学分析

实验数据用至少进行三次平行实验的平均值 \pm SD (标准偏差) 表示。并用 Student's 中的 t 检验进行分析, $p < 0.05$ 认为有统计学差异。

2.3 结果与讨论

2.3.1 CdTe QDs 粒子的表征及其细胞毒性研究

2.3.1.1 CdTe QDs 粒子的表征

制得的纳米晶体用 JEM-2100 高分辨透射电子显微镜表征其结构, 吸收光谱和发射光谱分别由 Hitachi-4100 近红外紫外吸收光谱仪和 Hitachi-7000 荧光分光光度计来测量。研究结果 (图 2-1A) 显示, 该纳米粒子颗粒分散比较均匀, 其平均粒径约为 5nm 。由图 2-1B-b 可以看出, 当激发波长为 400nm 时, CdTe 量子点在 600nm 附近有一窄而强的发射峰, 而图 2-1B-a 可以看出该纳米晶体具有较宽的紫外吸收光谱。

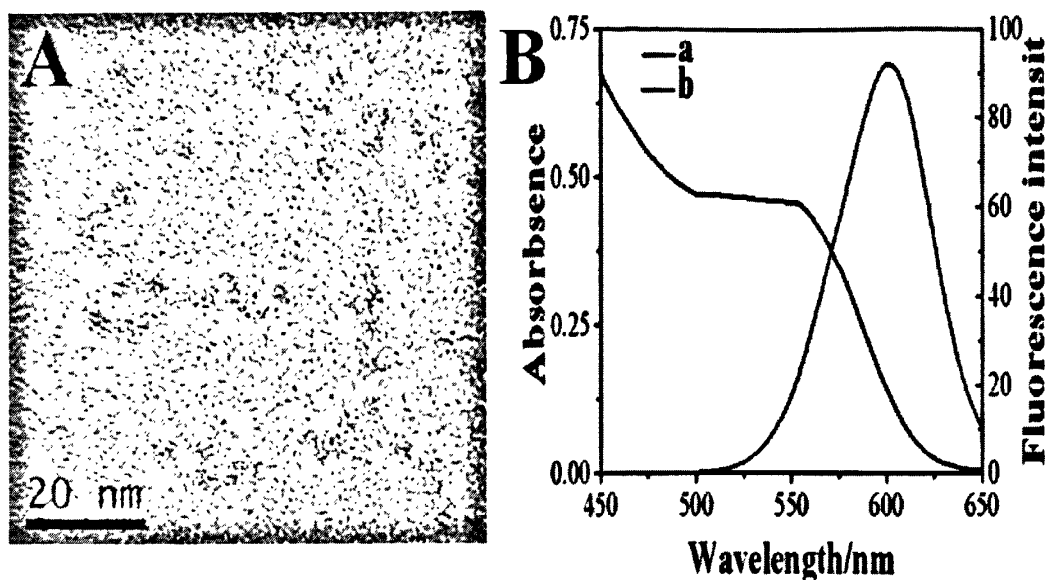


Fig. 2-1 (A) TEM images of MPA-CdTe QDs, (B) Absorption spectroscopy (a) and fluorescence of MPA-CdTe QDs (b).

2.3.1.2 MPA-CdTe QDs 对白血病细胞体外毒性的 MTT 研究

我们采用 MTT 方法研究了不同浓度的 MPA-CdTe QDs 对白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 的细胞毒性。研究表明, MPA-CdTe QDs 对白血病细胞呈剂量的依赖性(图 2-2), 在高浓度作用下, 可以明显地抑制肿瘤细胞的生长增殖, 而在低浓度条件下, 对细胞的生长影响很小。MPA-CdTe QDs 对敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 在 48 h 的半数抑制率 (IC_{50}) 分别是 $1.43 \mu M$ 、 $0.37 \mu M$, 因此, 可以看出 MPA-CdTe QDs 的毒性比较大, 并且在相同浓度条件下对白血病耐药细胞株 K562/A02 有较强的生长抑制作用。

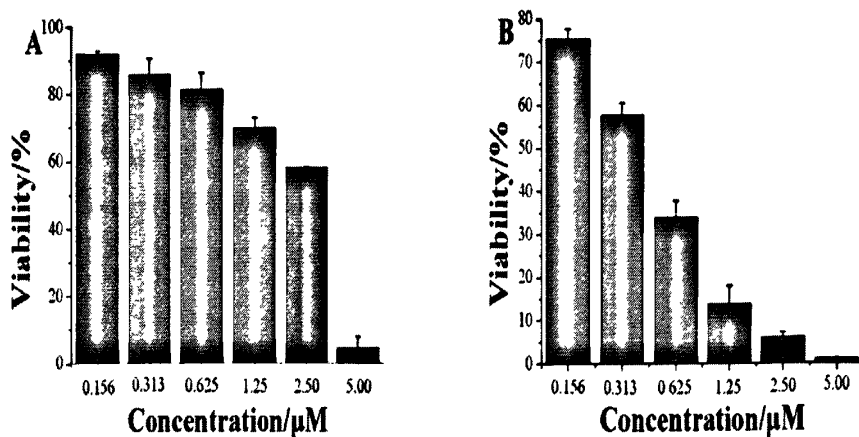


Figure 2-2 Cell viability of leukemia sensitive K562 cells and adriamycin-resistant cell K562/A02 when exposed to different concentrations of MPA-CdTe QDs with red emission for 48 h, respectively. Results are represented as mean \pm SD.

2.3.2 MPA-CdTe QDs 标记 K562 细胞的 TIRFM 荧光成像研究

通过观察 TIRFM (图 2-3), 我们发现 MPA-CdTe QDs 可以很容易地进入白血病 K562 和 K562/A02 细胞内部, 而且随着时间的延长, 我们观察细胞膜处的荧光亮度逐渐减弱, 而细胞内的荧光强度在逐渐增强。实验结果表明, MPA-CdTe QDs 在进入肿瘤细胞内部以后, 仍能保持其有效的荧光强度而不淬灭, 具有较好的光稳定性, 同时 MPA-CdTe QDs 荧光标记细胞不会影响细胞的生物活性, 因此, 该量子点可以作为一种良好的荧光探针应用于活细胞体内的实时动态跟踪。

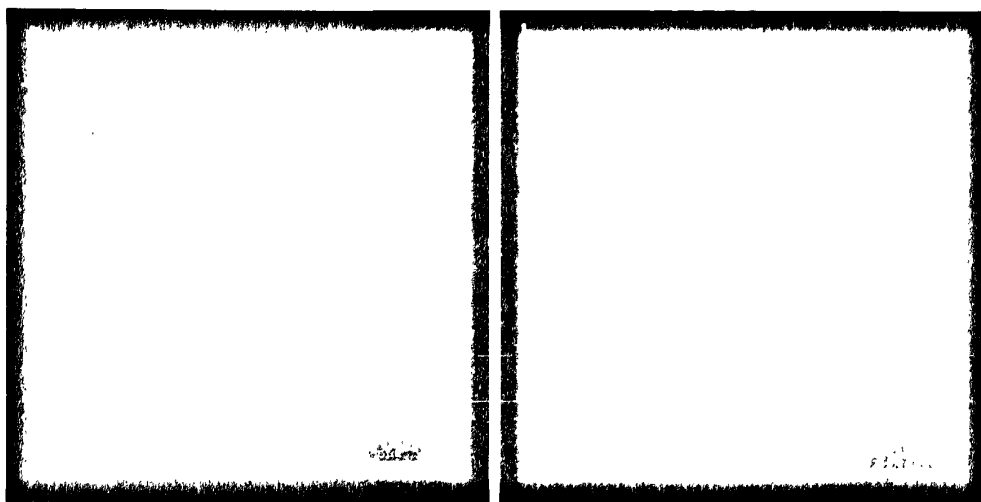


Fig. 2-3 The TIRFM images of K562 (a) and K562/A02 (b) cancer cells after incubated with MPA-CdTe QDs with red emission for 5 minutes.

2.3.3 MPA-CdTe 量子点在癌症治疗中的应用

2.3.3.1 电化学分析研究

我们将 DNR-CdTe QDs 复合物分别与白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 共培养时, 离心后的上清液中含有未被细胞吸收的抗癌药物柔红霉素 DNR, 通过电化学检测这些药物分子, 我们可以推测出白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 吸收药物的情况。相同实验条件下, 单独的柔红霉素 DNR 与靶细胞共培养后, 通过检测细胞外的残存的柔红霉素 DNR 的浓度, 就可以反映出 K562 细胞吸收柔红霉素 DNR 的情况。如图 2-4 所示, 曲线 a 表示 $1.9 \times 10^{-5} \text{M}$ 柔红霉素 DNR 本身的 DPV 峰电流。当白血病敏感细胞 K562 与 DNR 培养 2h 后, 检测出 DNR 的电流峰值下降(图 2-4A, 曲线 b), 说明细胞外液中的 DNR 残留量减少, 而这部分柔红霉素药物分子的减少量主要是通过细胞自身的胞吞作用被 K562 细胞吸收; 当 DNR-CdTe QDs 复合物与 K562 细胞共培养时, 我们发现, 细胞外残余的柔红霉素的电流峰值降低更多(图 2-4A, 曲线 c), 说明细胞外液残留的柔红霉素分子的量更少。对于白血病耐药

细胞 K562/A02 而言, K562/A02 与柔红霉素 DNR 分子培养 2h 后, 检测出柔红霉素 DNR 分子的电流峰值下降(图 2-4B, 曲线 e), 但不如 K562 与柔红霉素 DNR 培养后的电流峰值下降的大, 这是由于 P-糖蛋白的存在使得柔红霉素 DNR 分子“泵出”; 当 DNR-CdTe QDs 复合物与 K562/A02 细胞共培养时, 我们发现, 细胞外残余的柔红霉素 DNR 的电流峰值降低很多(图 2-4B, 曲线 f), 说明细胞外液残留的柔红霉素 DNR 分子的量少了。这一结果说明 DNR-CdTe QDs 复合物可以增加靶细胞吸收药物分子柔红霉素 DNR, 逆转肿瘤的多药耐药性, 增加药物在靶细胞中的蓄积量, 因此, DNR-CdTe QDs 复合物可以促进肿瘤细胞对柔红霉素 DNR 的吸收, 从而增加肿瘤细胞内的药物蓄积浓度。

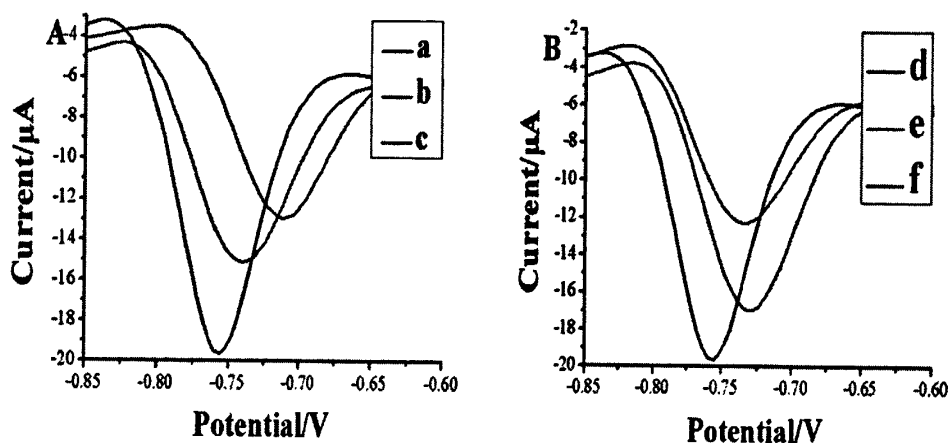


Fig. 2-4 DPV study of DNR residue outside K562 cells (A) and (B) K562/A02 cells in the absence and presence of MPA-CdTe QDs with red emission after incubating for 2 h. (a,d) DNR (1.9×10^{-5} M); (b,e) DNR (1.9×10^{-5} M) and cells; (c,f) DNR (1.9×10^{-5} M) and cells exposed to MPA-CdTe QDs with red emission (9.4×10^{-6} M). Pulse amplitude: 0.05 V; pulse width: 0.05 s; pulse period: 0.2 s.

2.3.3.2 UV-Vis 吸收光谱分析研究

图 2-5 所示的是 DNR-CdTe QDs 复合物分别与白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 共同培养 2h, 和单纯柔红霉素 (DNR) 分别与白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 共同培养 2h 以后, 其培养溶液中残余的柔红霉素相关的 UV-Vis 紫外吸收光谱的差异情况。研究表明, 图 2-5A 所示, 与单纯的柔红霉素溶液相比, 经与 K562 细胞共培养后, 细胞外残余的柔红霉素的吸光度值降低了, 说明柔红霉素与 K562 细胞共培养之后, 溶液中的柔红霉素被细胞吸收进入到细胞内部(图 2-5A-b 所示), 当 DNR-CdTe QDs 复合物作用后, 细胞外柔红霉素的吸光度值进一步明显降低, 说明 DNR-CdTe QDs 复合物可以促进 K562 细胞吸收溶液中的柔红霉素, 导致细胞外柔红霉素含量的减少(图 2-5A-c 所示); 图 2-5B 所示, 与单纯的柔红霉素相比, 经与 K562/A02 细胞共培养后, 细胞外残余的柔红霉素的吸光

度值有所降低,说明柔红霉素与 K562/A02 细胞共培养之后,由于 K562/A02 细胞的多药耐药性,使得被细胞吸收的柔红霉素又被“泵出”到细胞外部(图 2-5B-e 所示),当 DNR-CdTe QDs 复合物作用于 K562/A02 细胞后,细胞外的柔红霉素的吸光度值进一步降低,说明 DNR-CdTe QDs 复合物可以抑制 P-糖蛋白的功能,促进 K562/A02 细胞吸收溶液中的柔红霉素,从而导致细胞外柔红霉素含量的减少(图 2-5B-f)。相关研究结果与电化学分析结果一致,表明 MPA-CdTe QDs 复合物可显著地促进白血病敏感 K562 细胞和耐药 K562/A02 对柔红霉素的吸收,而 MPA-CdTe 量子点的存在可能改变细胞膜的通透性,进而提高肿瘤细胞对外界药物分子的吸收能力,显著地增加药物分子在靶癌细胞内的药物有效浓度和对癌细胞的杀伤能力。

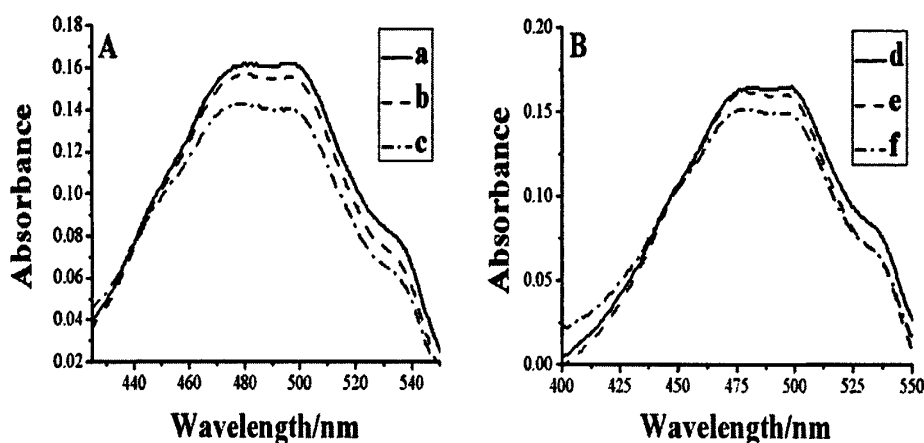


Fig. 2-5 UV-Vis absorption spectra of DNR after the treatment with leukemia K562 (A) and K562/A02 (B) cells in the absence and presence of MPA-CdTe QDs for 2 h. (a,d) DNR (1.9×10^{-5} M); (b,e) DNR (1.9×10^{-5} M) and cells; (c,f) DNR (1.9×10^{-5} M) and cells exposed to MPA-CdTe QDs with red emission (9.4×10^{-6} M).

2.3.3.3 MTT 分析

为了进一步揭示 MPA-CdTe QDs 对相关体系的协同作用,在以上实验研究的基础上,我们采用 MTT 比色法进一步探讨和研究了 MPA-CdTe QDs 纳米粒子对白血病细胞的生长抑制的影响。研究表明,当存在量子点纳米粒子时,药物分子柔红霉素对肿瘤细胞增殖的抑制力明显增强(图 2-6)。在引入纳米药物复合物体系中,对白血病敏感细胞 K562 生长抑制率提高至 36.4%,而单纯的 DNR 对白血病敏感细胞 K562 生长抑制率为 21.2%,图 2-6A 检验结果显示,该 QDs 可以促进 K562 细胞对柔红霉素的吸收,增强柔红霉素对肿瘤细胞的杀伤力。对于白血病耐药细胞,由于该细胞具有多药耐药性,其细胞膜上 P 糖蛋白可以将抗癌药物分子“泵出”,使得细胞内部药物的蓄积浓度降低,达不到理想的效果,而我们采用纳米药物复合体系后,对白血病耐药细胞 K562/A02 增殖抑制变为 32.3%,比单纯柔红霉素的抑制率(13.2%)明显增大(图 2-6B。),由此可见,该复合体系可以有效地改变细胞膜的通透性,增

加肿瘤细胞对抗癌药物的蓄积浓度,使得更多的抗癌药物进入肿瘤细胞内部,从而更好地达到有效治疗的目的。

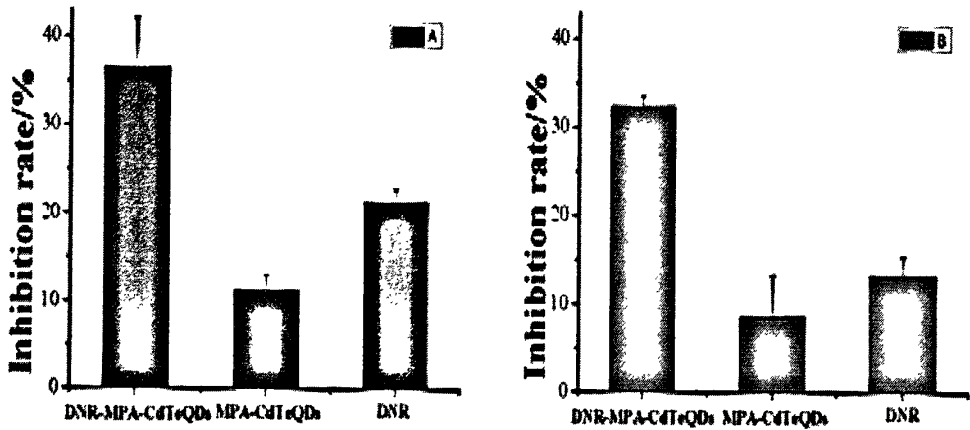


Figure 2-6 MTT assays on the inhibition rate of leukemia K562 and K562/A02 cells after treated with DNR (3.8×10^{-7} M) in the absence and presence of QDs nanoparticles, respectively. Here, and p values < 0.05 . Error bars indicate \pm SD.

2.4 小结

综上所述,水溶性 3-巯基丙酸修饰的碲化镉量子点纳米材料具有稳定的荧光性质且不会影响细胞的生物活性,可以作为一种良好且灵敏的纳米荧光探针标记细胞成像,为实现活体靶向、实时、动态示踪提供了可能。此外,该量子点具有独特的物理和化学性质,可以作为一种纳米药物载体,应用于癌症的治疗和协同用药中,可以联合抗癌药物分子进入肿瘤细胞的内部,逆转肿瘤多药耐药性,增加抗癌药物在肿瘤细胞内的蓄积浓度,增强药物对肿瘤细胞的抑制作用,在恶性肿瘤的诊治中具有潜在的应用前景。

参考文献

- [1] Leng F F, Savkur R, Fokt I. Base specific and regioselective chemical cross-linking of daunorubicin to DNA. *J Am Chem Soc*, 1996, 118:4731
- [2] Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 47–52.
- [3] Kim S, Lim Y T, Soltesz E G, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 93–97.
- [4] Taton T, Mirkin C, Letsinger R. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 2000, 289: 1757–1760.
- [5] Cui Y, Wei Q, Park H, et al. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science*, 2001, 293: 1289–1292.
- [6] Chen R J, Bangsaruntip S, Drouvalakis K A, et al. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 4984–4989.
- [7] Lu H W, Gratzl M. Monitoring drug efflux from sensitive and multidrug-resistant single cancer cells with microvoltammetry. *Anal Chem*, 1999, 71: 2821-2830.
- [8] Burke P J, Koch T H. Design, synthesis, and biological evaluation of doxorubicin-formaldehyde conjugates targeted to breast cancer cells *J Med Chem*, 2004, 47: 1193-1206.
- [9] Akman S A, Doroshov J H, Burke T G, et al. DNA base modifications induced in isolated human chromatin by NADH dehydrogenase-catalyzed reduction of doxorubicin. *Biochemistry*, 1992, 31: 3500-3506.
- [10] Cashman D J, Kellogg G E. A computational model for anthracycline binding to DNA: Tuning Groove-Binding Intercalators for Specific Sequences. *J Med Chem*, 2004, 47: 1360-1374.
- [11] Cogan P S, Koch T H. Studies of Targeting and Intracellular Trafficking of an Anti-Androgen Doxorubicin–Formaldehyde Conjugate in PC-3 Prostate Cancer Cells Bearing Androgen Receptor-GFP Chimera. *J Med Chem*, 2004, 47: 5690-5699.
- [12] Oyewumi M O, Liu S, Moscow J A, et al. Specific association of thiamine-coated gadolinium nanoparticles with human breast cancer cells expressing thiamine transporters. *Bioconjug Chem*, 2003, 14: 404-411.
- [13] Torisawa Y, Kaya T, Takii Y, et al. Scanning electrochemical microscopy-based drug sensitivity test for a cell culture integrated in silicon microstructures. *Anal Chem*, 2003, 75: 2154-2158.
- [14] Lambert G, Fattal E, Pinto-alphandary H, et al. Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. *Pharm Res*, 2000, 17: 707-714.
- [15] Mitra S, Gaur U, Ghosh P C, et al. Tumour targeted delivery of encapsulated

- dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J Controlled Release*, 2001, 74: 317-323.
- [16] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 2005, 307:538-544.
- [17] Medintz I L, Uyeda H T, Goldman E R, et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater*, 2005, 4: 435-446.
- [18] Klostranec J M, Chan W C W. Quantum dots in biological and biomedical research: recent progress and present challenges. *Adv Mater*, 2006, 18:1953-1964.
- [19] Bruchez M J, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 1998, 281: 2013-2015.
- [20] Chan W C, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 1998, 281: 2016- 2018.
- [21] Chan W C W, Maxwell D J , Gao X H, et al . Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13 (1):40-46.
- [22] Gao X H, Cui Y Y, Levenson R M, et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 2004, 22 (8):969-976.
- [23] Smith A M, Dave S, Nie SM, et al. Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 2006, 6 (2):231-244.
- [24] 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. *科学通报*, 2001, 46: 1353-1356.
- [25] 金鹰,邢达.肿瘤细胞的标记及其活体荧光成像. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 19: 942-944.
- [26] Zhang R Y, Wang X M, Wu C H, et al. Synergistic enhancement effect of magnetic nanoparticles on anticancer drug accumulation in cancer cells. *Nanotechnology*, 2006, 17:3622-3626
- [27] Li Q L, Wang X M, Lu X H, et al. The incorporation of daunorubicin in cancer cells through the use of Titanium Dioxide Whiskers. *Biomaterials*, 2009, 30, 4708-4715.
- [28] Gaponik N, Talapin D V, Rogach A L, et al. Thiol-capping of CdTe nanocrystals: an alternative to organometallic synthetic routes. *J Phys Chem B* 2002;106:7177-7185.

第三章 水溶性 CdTe 量子点在细胞成像与逆转肿瘤多药耐药的应用研究

摘要: 在本章的研究工作中, 我们探讨和研究了水溶性 MPA-CdTe 量子点在肿瘤细胞成像与逆转多药耐药性的应用。通过透射电子显微镜、荧光分光光度计和紫外吸收光谱对纳米粒子进行了特性表征; 由 MTT 比色法、全内反射荧光显微镜、电化学和紫外可见吸收光谱等分析手段, 我们研究了该量子点对肿瘤细胞的作用与影响。研究表明, MPA-CdTe 量子点能有效地识别标记肿瘤细胞, 同时可以携带抗癌药物分子进入肿瘤细胞, 有效地逆转肿瘤的多药耐药, 增强肿瘤细胞对药物分子的吸收, 从而更好地发挥抗癌药物的治疗效果。本章研究工作为 QDs 在癌症的识别诊断和治疗等方面的研究做了新的尝试和探索, 为其在临床上的进一步应用提供了一种新的思路和方法。

关键字: MPA-CdTe 量子点; 柔红霉素; 白血病细胞; 细胞成像; 纳米药物载体

3.1 引言

随着纳米技术的快速发展, 越来越多的纳米材料犹如雨后春笋般涌现出来, 由于纳米粒子具有不同于一般材料的独特的物理和化学性质 (譬如小尺寸效应、表面和界面效应及宏观量子隧道效应等), 因而在生物医学领域中得到极大的关注和应用, 尤其在 DNA 的检测^[1], 细胞标记^[2], 纳米药物载体^[3]、癌症的靶向治疗^[4]和成像技术^[5]等方面的应用方兴未艾。很多科学家也是对于纳米材料的毒性进行了研究, 尽管有些纳米颗粒有一定的毒性, 但是人们仍然可以扬长避短, 通过表面修饰一些特定的基团, 使其具有更好的生物相容性, 发挥其独特的效应^[6-14]。表面的化学修饰是生物医学材料界面修饰中广泛使用的方法之一, 通过自组装 (即基于非共价键的相互作用下自发的组织或者聚集成为稳定并且具有一定规则外观的结构)、共价键键合等方法可以制备一些具有较好的生物相容性、稳定性等优良性质的纳米材料, 这些功能化纳米生物材料在研究细胞及生物大分子间相互作用、疾病的临床诊断和治疗等方面具有潜在的应用前景。

近年来, 在肿瘤的诊断和治疗中, 出现了很多新鲜的抗癌药物产品, 但是它们的疗效却不尽人意, 其中重要的一个原因就是肿瘤的治疗过程中, 肿瘤细胞对抗癌药物产生了抗药性和耐药性^[15-17], 从而导致了治疗失败。如何克服肿瘤细胞的多药耐药性并且进行及时、准确的检测和有效地治疗, 一直以来都是一个亟待解决的问题, 因此如何实现对肿瘤细胞的有效检测和有效治疗是生物医学研究领域的重要内容。而肿瘤细胞的耐药机制比较复杂, 目前比较

清楚的耐药机制是细胞膜表面的耐药蛋白（如 P-糖蛋白）可以识别药物分子，而且由于该耐药蛋白在细胞膜上的过度表达造成的^[18,19]。为了有效地治疗肿瘤，人们开展了大量的研究实验，尝试找到可以实现肿瘤细胞治疗中的逆转耐药性的有效方法。

由于具有一些新颖优良的性质，纳米材料可以与一些分子结合，在很大程度上对其自身的物理和化学性质产生影响，同时纳米材料可以通过表面修饰形成特异的纳米复合物，为一些相关的重大疾病诊断和治疗提供了一种有效的手段^[20-23]。众所周知，半导体量子点由于其高的发光效率、良好的光稳定性、连续分布的吸收光谱和呈对称且宽度窄的发射光谱^[24,25]等独特的性质，这些性质使 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^[26-38]。在本章的研究工作中，我们合成和表征了水溶性表面修饰基团为 3-巯基丙酸的碲化镉量子点纳米材料，并且结合抗癌药物分子柔红霉素 DNR 通过静电吸附作用形成了功能化的纳米复合物材料。我们研究并探讨了该量子点纳米材料在活细胞识别和肿瘤治疗中的应用，结果表明，该量子点可以作为很好的荧光探针标记细胞，同时也可以作为一种新型的有效抑制耐药性的药物载体，有效地识别肿瘤细胞并增强抗癌药物在肿瘤细胞胞内蓄积，显著增强对肿瘤细胞的杀伤效果。

3.2 实验部分

3.2.1 主要仪器和试剂

主要仪器有：透射扫描电镜 (JEM-2100, 日本)、全内反射荧光显微镜(Nikon 公司, 美国)、荧光分光光度计(LS-55 Perkin-Elmer 公司)、UV-Vis 紫外分光光度计(Hitachi U4100, 日本)、CO₂ 细胞培养箱(GBB16 型, Heraeus, 德国)、酶联免疫检测仪(BIO-RAD550, Bio-Rad Laboratories Inc., 美国)、电化学工作站(CHI660b, 上海辰华)、。

主要试剂有：柔红霉素(Farmitalia 公司, 意大利)、RPMI 1640 培养基(SIGMA 公司, 美国, 分装后-20℃保存)、胎牛血清(SIGMA 公司, 美国, 分装后-20℃保存)、MTT(Amresco 公司, 美国)、PBS 缓冲液(0.01M, pH 7.2-7.4)、二甲基亚砜(分析纯)等。

3.2.2 水溶性 MPA-CdTe QDs 的制备和表征

水溶性 MPA-CdTe QDs 的制备按照文献^[39]报道的方法并进行了适当的改进，首先，1.175mM 的 Cd(ClO₄)₂·H₂O 溶于 62.5mL 水，然后，加入 2.85 mM 3-巯基丙酸、搅拌，加入 0.5mL 1 M NaOH 溶液调整溶液的 pH 值为 9。接着用高纯的氮气将该溶液除氧保护，Al₂Te₃ 和 7.5mL 0.5 M 硫酸反应生成 H₂Te 气体，该气体与氮气一起缓慢地通入到溶液中，大约 20min，生成 CdTe 的前驱物，同时，将该混合物快速搅拌 10 分钟，回流 10min 至 9 h 以控制 CdTe 量子点的增长。

3.2.3 细胞培养

白血病敏感 K562 细胞和耐药 K562/A02 细胞是悬浮类细胞。在培养的过程中, K562 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 培养基中含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素和 100 IU/mL 的青霉素。整个培养过程是在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含有 5% 二氧化碳湿润的培养箱中进行的。耐药细胞 K562/A02 也是使用上述培养基中培养, 并且以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的阿霉素来维持其耐药性。

3.2.4 MPA-CdTe QDs 对白血病细胞生长影响的研究

将处于对数生长期的白血病敏感细胞株 K562 和耐药细胞株 K562/A02 接种于 96 孔板, 每孔浓度为 1.0×10^4 个细胞, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 24h 后, 加入不同浓度的量子点分别与两种细胞作用, 量子点的最终浓度为 1.48, 2.95, 5.90, 11.8, 23.5, 47.0, 94.0 μM (用新鲜无菌的 RPMI1640 培养基进行稀释), 培养体积为 200 μL , 每个实验点设三个复孔。同时, 用不含 QDs 的细胞作为对照组, 含相同体积培养基作为空白对照组, 同时接种于 96 孔板中, 然后分别培养 72h。培养时间终止后每孔加入 MTT 溶液 20 μL (5g/L) 继续培养 4 h, 吸去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL , 终止反应, 将 96 孔板移入平板震荡器, 水平震荡 10min, 使 MTT 还原产物完全溶解, 然后用酶联免疫检测仪于 492nm 波长处测定每孔吸光度(OD 值), 并以空白对照孔的 OD 值调零。结果以每组 3 孔的均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示, 实验至少重复 3 次。细胞生存率公式如下:

$$\text{细胞生存率}(\%) = [\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}] / [\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}] \times 100\%。$$

3.2.5 白血病活细胞体系的实时动态荧光观察和成像

与有机染料标记探针相比, 量子点作为一种荧光标记探针, 表现出独特的光稳定性、高空间分辨率及单分子水平的灵敏度。相关研究表明^[40]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。因此, 量子点是一种活细胞荧光探针。

将处于对数生长期的两种白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 作为实验对象。首先分别以 1000 转/min 离心 5min, 然后轻轻倒去上清, 用 PBS 缓冲液 (0.01M, pH7.2) 悬起离心, 重复三次。用适量的 PBS 悬起后分别加入少量 MPA-CdTe QDs, 5min 后, 取 15 μL 细胞悬液滴在 0.17mm 厚的玻璃盖片, 然后置于激光束 (488nm, 全内反射荧光显微镜 (TIRFM)) 下照射。通过调整激光束的入射角在倒置显微镜 (Nikon 显微镜) 物镜下获得目标图像。

3.2.6 水溶性 MPA-CdTe 量子点在癌症治疗中的应用研究

3.2.6.1 细胞内柔红霉素 DNR 浓度的变化

3.2.6.1.1 在倒置荧光显微镜下细胞荧光强度的研究

将 DNR (1.27×10^{-4} M) 和量子点 (1.25×10^{-5} M) 在 PBS 缓冲液 (0.01M, pH 7.2) 中混合均匀,

4℃过夜,这样 DNR 与量子点可以自组装成 DNR-CdTe 纳米复合物。次日,取对数生长期的白血病敏感细胞株 K562 和耐药细胞株 K562/A02 分别离心 5min,然后轻轻倒去上清溶液,用 PBS 将细胞轻轻悬起,同法离心后用 PBS 再次悬起并计数。将 DNR-CdTe 纳米复合物分别加入到两种细胞悬浮液中,单独的柔红霉素或碲化镉量子点作为对照实验组。所有样本均在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 小时。培养时间结束时,将细胞吹起、离心、PBS 清洗两次、再次离心,然后将处理过的细胞放置于 IX71 倒置荧光显微镜(激发波长是 488 nm)下观察。

3.2.6.2 细胞外柔红霉素 DNR 浓度的变化

3.2.6.2.1 电化学检测

该检测是在 CHI6600b 电化学工作站上完成的,采用差异脉冲伏安法(DPV)在室温条件下(20±2℃)进行分析,并用三电极体系进行检测:玻碳电极作为工作电极,铂电极作为对电极,甘汞电极作为参比电极。实验样品与药品处理与“3.3.6.1”部分一样,实验中仍采取白血病敏感和耐药细胞两种,细胞浓度为 8×10^5 个,溶液试剂是 PBS 缓冲液(0.01M, pH 7.2),培养 2 小时结束。

3.2.6.2.2 UV-Vis 紫外吸收光谱分析

UV-Vis 紫外吸收光谱分析是在室温(22±2℃)条件下用 Hitachi U-4100 光谱仪进行检测。实验样品处理如下:将 1.27×10^{-4} M 柔红霉素 DNR 与 1.25×10^{-5} M 的 MPA-CdTe QDs 在 PBS (0.01M, pH 7.2)中混合均匀,4℃过夜,使柔红霉素 DNR 与 CdTe QDs 自组装成 DNR-CdTe QDs 复合物。次日,将处于对数生长期的白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 分别离心 5min,然后轻轻倒去上清溶液,细胞沉淀用 PBS 缓冲液轻轻悬起,同法离心后用 PBS 溶液再次悬起并计数。含有柔红霉素 DNR (1.27×10^{-4} M)、DNR-CdTe QDs 复合物的 K562 细胞溶液 (8×10^5 个/mL) 分别在 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 2 h;同时,用含有 1.27×10^{-4} M DNR 溶液置于 37℃、5% CO₂ 培养 2 h 作为对照样品。所有样品在实验过程中均用 PBS 缓冲液进行稀释处理,然后离心 5 min,取上清液体进行 UV-Vis 紫外吸收光谱分析。

3.2.7 对白血病耐药细胞 K562/A02 耐药性与逆转多药耐药的评估

基于以上实验方法,我们进一步对 MPA-CdTe QDs 逆转 K562/A02 细胞多药耐药进行了研究。耐药倍数(Resistant factor, R_f) = $[IC_{50}]_{K562/A02} / [IC_{50}]_{K562}$, 逆转倍数(Reversal index, R_i) = $[R_f'] / [R_f]$,其中 R_f 和 R_f' 分别代表单独 DNR 对 K562/A02 的耐药倍数和 DNR-MPA-CdTe QDs 纳米复合物对 K562/A02 的耐药倍数。每次实验至少重复三次。按照 CB/T16886.5-2003 标准,细胞存活率(P%)可分为 6 级: >100%为 0 级; 75%~100%为 I 级; 50%~74%为 II 级; 30%~49%为 III 级; 15%~29%为 IV 级; 0~14%为 v 级。只有细胞毒性为 I 级或 0 级的生物材料才能用于体内实验。我们选用的 MPA-CdTe QDs 对白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02

细胞存活率分别为 88.8%、91.5%，满足 I 级安全性，证明了我们的实验体系是可行的。

3.2.8 统计学分析

实验数据用至少进行三次平行实验的平均值 \pm SD(标准偏差)表示。并用 Student's 中的 t 检验进行分析， $p < 0.05$ 认为有统计学差异。

3.3 结果与讨论

3.3.1 CdTe QDs 表征及其细胞毒性研究

3.3.1.1 CdTe QDs 粒子的表征

制得的 CdTe QDs 用 JEM-2100 高分辨透射电子显微镜表征其结构，吸收光谱和发射光谱分别由 Hitachi-4100 近红外紫外吸收光谱仪和 Hitachi-7000 荧光分光光度计来测量。研究结果（图 3-1A）显示，该纳米粒子颗粒比较均匀和良好的晶体结构，其平均粒径约为 2.3nm，晶格间距约为 0.23nm。由图 3-2B-a 可以看出，当激发波长为 400nm 时，CdTe 量子点在 525nm 处有一较窄而强的发射峰，而图 3-2B-b 可以看出该纳米晶体具有较宽的紫外吸收光谱。

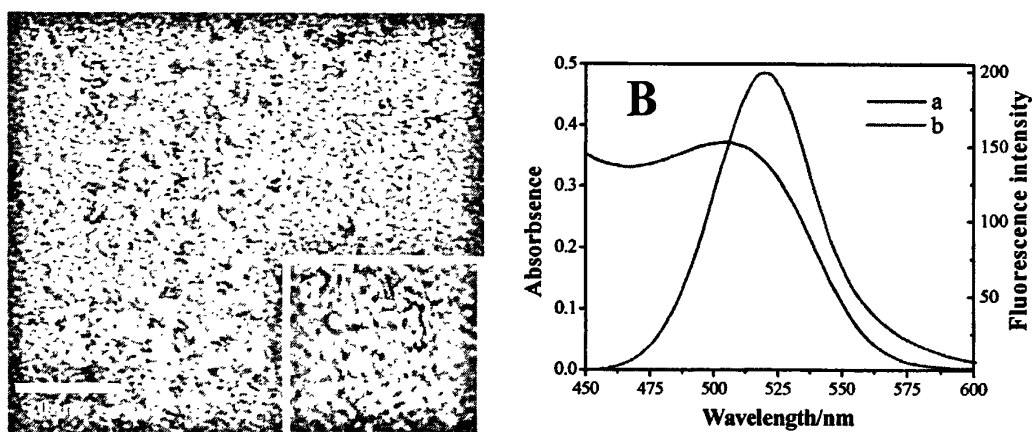


Figure 3-1 (A) TEM images of MPA-CdTe QDs, (B) fluorescence (a) and absorption spectroscopy of MPA-CdTe QDs (b). Image a in A is the HR-TEM image of a single CdTe QD.

3.3.1.2 MPA-CdTe QDs 对白血病细胞毒性的 MTT 研究

首先我们用 MTT 方法研究了不同浓度的量子点对白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/A02 的细胞毒性。研究结果表明，该量子点在 72 h 时对敏感细胞 K562 半数抑制率(IC₅₀)为 17.98 μ M（图 3-2A），而对耐药耐药细胞 K562/A02 的半数抑制率（IC₅₀）是 8.97 μ M（图 3-2B）。同时，在低浓度的条件下，该量子点对白血病细胞增殖抑制作用较小；高浓度时，对白血病细胞的抑制作用比较明显，可以看出白血病细胞对 MPA-CdTe QDs 呈剂量的依赖性。同时，我们发现量子点对于两种细胞的抑制作用是有点差别的，对于耐药细胞更为敏感，原

因可能是量子点表面基团具有一定选择性^[41]。另外, 通过比较我们发现, QD₆₀₀ 量子点的细胞毒性比 QD₅₂₀ 量子点大很多。

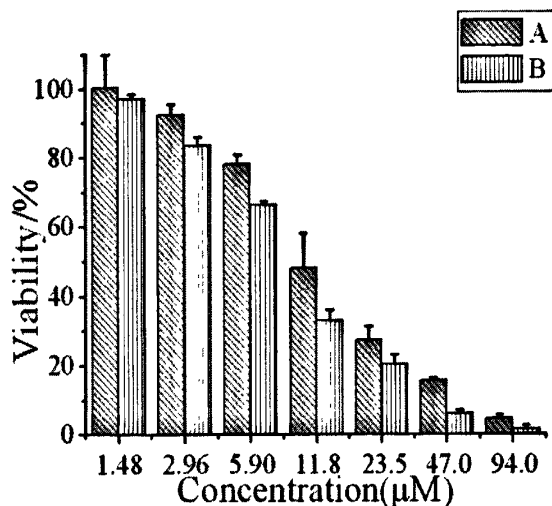


Figure 3-2 Cell viability of leukemia K562 (A) and K562/A02 (B) exposed to CdTe QDs for 72 h.

3.3.2 白血病活细胞体系的实时动态荧光观察和成像分析

实验研究中, 我们发现, MPA-CdTe QDs 可以很轻易地进入白血病敏感细胞株 K562 和耐药细胞株 K562/A02 细胞内部 (TIRFM 图 3-3,) , 而且随着时间的推移, 我们观察细胞膜处的荧光亮度逐渐减弱, 而细胞胞内的荧光强度逐渐增强。MPA-CdTe QDs 在进入肿瘤细胞内部以后, 仍能保持其有效的荧光强度而不淬灭, 具有较好的光稳定性, 同时 MPA-CdTe QDs 荧光标记细胞不会影响细胞的生物活性, 因此, 该量子点可以作为一种良好的荧光探针应用于活细胞体内的实时动态跟踪。在上一章节中, 我们发现, QD₆₀₀ MPA-CdTe 量子点也可以进行活细胞荧光成像, 而且两种量子点可以在一种激发光激发下, 发射不同颜色的荧光, 这样就可以采用不同大小和颜色的量子点来分别标记不同的靶标分子, 从而提高诊断检测的准确性和灵敏性。实时成像与可视化示踪是目前生命科学中的一个热点, 它可以非常直观地展示特定的生命活动过程, 为疾病的发生、发展提供直接证据。



Figure 3-3 The TIRFM images of K562 (a) and K562/A02 (b) cancer cells after incubation with MPA-CdTe QDs for 5 minutes.

3.3.3 MPA-CdTe 量子点在增加药物吸收和逆转多药耐药性的应用研究

3.3.3.1 细胞胞内的柔红霉素 DNR 荧光强度变化——倒置荧光显微镜结果分析

我们从 IX71 倒置荧光显微镜下观察细胞形貌。图 3-4A 显示是在荧光显微镜下的细胞形态，图 3-4B、C 表示是相应的细胞荧光亮度灰度值，该灰度值的提取是采用 Microsoft Visual Basic6.0 程序 BMP2Gray（本实验室吕刚博士提供），首先，将荧光图的 Tiff 格式的图片转换为 24 位位图 BMP 格式的图片，然后选取需要转换的图片区域，利用 BMP2Gray 程序通过调用 API 函数 GetPixel 将各点的颜色值读出，分别得到每一个点的颜色的 R 值、G 值和 B 值，然后按照灰度值 D_{gray} 与 RGB (R, G, B) 值对应的关系如下：

$$D_{gray} = 0.31R + 0.59G + 0.11B$$

从而得到每个点的灰度值，进一步用 Origin 软件进行平均拟合，得到较为平滑的细胞荧光灰度曲线。

将 MPA-CdTe 量子点纳米粒子分别加入白血病 K562 细胞和 K562/A02 细胞的体系中，倒置荧光显微镜图（图 3-4）显示，我们可以观察到该量子点的存在使得柔红霉素 DNR 在细胞内的浓度显著增加，表明 MPA-CdTe 量子点纳米粒子可以充当纳米药物载体作用，促进癌细胞对抗癌药物分子的吸收。由图 3-4A b、e 所示，在该实验条件下单独的 MPA-CdTe 量子点其荧光强度很弱，这样就排除了 QDs 的干扰，细胞的荧光强弱与细胞胞内吸收柔红霉素 DNR 的浓度呈正相关性。相应的图 3-4 B 灰度值可以量化直观地显示 MPA-CdTe 量子点能有效促进 K562 细胞对药物分子的吸收，增加药物分子在细胞内的蓄积；图 3-4 C 灰度值也可以明显地观察到该量子点可以抑制多药耐药蛋白如 P-糖蛋白的作用，将更多的药物分子载入到耐药细胞内部，相关的量化结果与细胞荧光强度结果是一致的。

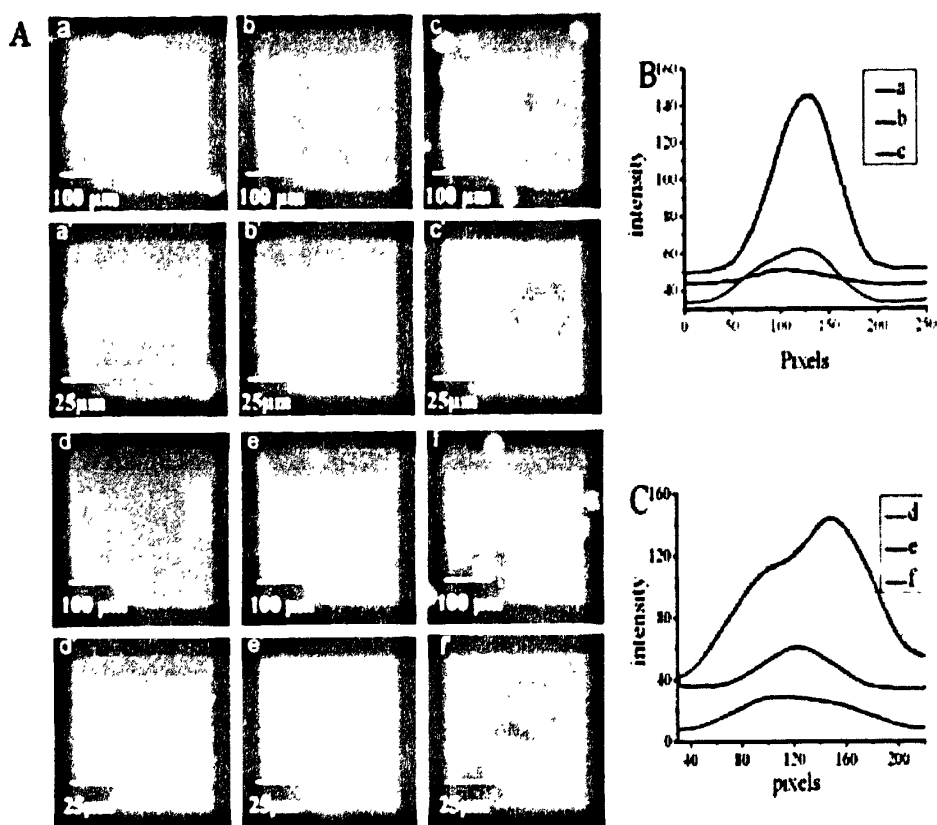


Figure 3-4 (A) Inverted fluorescence microscopy of leukemia K562 cells (a~c) and K562/A02 cells (d~f) after incubation with DNR (1.27×10^{-4} M) (a, d), MPA-CdTe QDs (1.25×10^{-5} M) (b, e), DNR (1.27×10^{-4} M) and MPA-CdTe QDs (1.25×10^{-5} M) (c, f); the image a'~f' show the high magnification of corresponding images. (B and C), regular fluorescence intensity curves corresponding to arrows indicated in image a'~f'.

3.3.3.2 细胞外柔红霉素 DNR 的浓度变化分析

3.3.3.2.1 电化学分析研究

我们通过电化学检测进一步研究和探讨了 DNR-CdTe QDs 复合物分别与白血病敏感细胞株 K562 和耐药细胞株 K562/A02 共培养时对肿瘤细胞的影响。离心后的上清液中含有未被细胞吸收的抗癌药物柔红霉素 DNR 分子，可以推测出白血病细胞吸收药物柔红霉素 DNR 的情况。而相同条件下，单独的柔红霉素 DNR 与靶细胞共培养后，通过检测细胞外残存的柔红霉素 DNR 的浓度，就可以反映出 K562 细胞吸收柔红霉素 DNR 的情况。如图 3-5 所示，曲线 a 表示单纯的柔红霉素 DNR 本身的 DPV 峰电流。当白血病敏感细胞 K562 与柔红霉素 DNR 培养 2 h 后，检测出柔红霉素 DNR 的电流峰值下降了 21.5%(图 3-5A, 曲线 b), 说明细胞外液中的柔红霉素 DNR 残留量减少，而这部分柔红霉素 DNR 药物分子的减少量是通过细胞自身的胞吞作用被 K562 细胞吸收；在量子点纳米粒子存在的情况下，我们发现，细胞外残余的柔红霉素 DNR 的电流峰值降低了 32.1%(图 3-5A, 曲线 c), 说明细胞外液残留的柔红霉素

DNR 更少了。对于白血病耐药细胞 K562/A02 而言, K562/A02 与柔红霉素 DNR 培养 2h 后, 检测出柔红霉素 DNR 的电流峰值仅仅下降了 2.2%(图 3-5B, 曲线 e), 但不如 K562 与柔红霉素 DNR 培养后的电流峰值下降的大, 这是由于耐药细胞膜表面 P-糖蛋白的存在使得柔红霉素 DNR “泵出”; 与量子点共同作用时, 我们发现, 细胞外残余的柔红霉素 DNR 的电流峰值降低了 37.9%(图 3-5B, 曲线 f), 说明细胞外液残留的柔红霉素 DNR 量少了。这一结果说明 QDs 可以影响和改变细胞膜结构, 增加靶细胞对药物分子柔红霉素 DNR 吸收能力, 逆转肿瘤多药耐药, 从而增加药物在细胞中的蓄积浓度, 增强对癌细胞的杀伤能力。

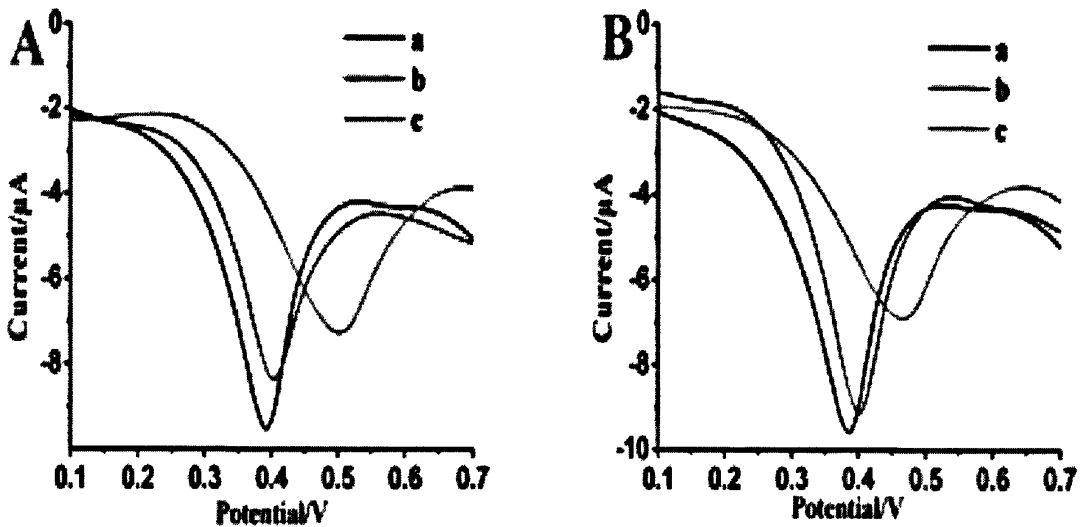


Figure 3-5 DPV study of DNR residue outside K562 cells (A) and (B) K562/A02 cells in the absence and presence of MPA-CdTe QDs after incubating for 2 h. (a) DNR (1.27×10^{-4} M); (b) DNR (1.27×10^{-4} M) and cells; (c) DNR (1.27×10^{-4} M) and cells exposed to MPA-CdTe QDs (1.25×10^{-5} M). Pulse amplitude: 0.05 V; pulse width: 0.05 s; pulse period: 0.2 s.

3.3.3.2.2 UV-Vis 紫外吸收光谱分析研究

UV-Vis 紫外吸收光谱如图 3-6 所示, 研究结果表明, 与单纯的柔红霉素 DNR 溶液相比, 经与 K562 细胞共培养后, 细胞外残余的柔红霉素的吸光度值降低了 18.5%, 说明溶液中的柔红霉素 DNR 被细胞吸收进入到细胞内部 (图 3-6A-b 所示); 当柔红霉素 DNR 与量子点共同作用细胞后, 细胞外柔红霉素 DNR 的吸光度值进一步显著降低, 说明量子点的存在可协同增强 K562 细胞吸收溶液中的柔红霉素, 导致细胞外柔红霉素含量的减少 (图 3-6 A-c 所示)。对于白血病耐药细胞株 K562/A02 的作用, 如图 3-6 B 所示, 单纯的柔红霉素经与 K562/A02 细胞共培养后, 细胞外残余的柔红霉素的吸光度值降低不明显 (仅降低了 4.2%), 说明柔红霉素 DNR 与 K562/A02 细胞共培养之后, 由于 K562/A02 细胞的多药耐药性, 使得被细胞吸收的柔红霉素又被 “泵出” 到细胞外部 (图 3-6B-e 所示); 当量子点联合抗癌药物分子柔红霉

素 DNR 共同作用于 K562/A02 细胞后, 细胞外柔红霉素的吸光度值明显降低 (降低了 27%), 表明量子点的协同作用促进细胞吸收了较多的柔红霉素 DNR, 从而导致胞外柔红霉素的吸光度降低。而癌细胞的多药耐药性是导致癌症治疗失败的主要原因之一, 克服多药耐药性是目目前生物学治疗中迫切需要解决的难题, 我们采用的纳米量子点可以携带抗癌药物分子避开细胞膜上的 P-糖蛋白, 逆转肿瘤多药耐药性, 促进肿瘤细胞对抗癌药物分子的吸收, 进而增加药物分子在癌细胞内的药物有效浓度。

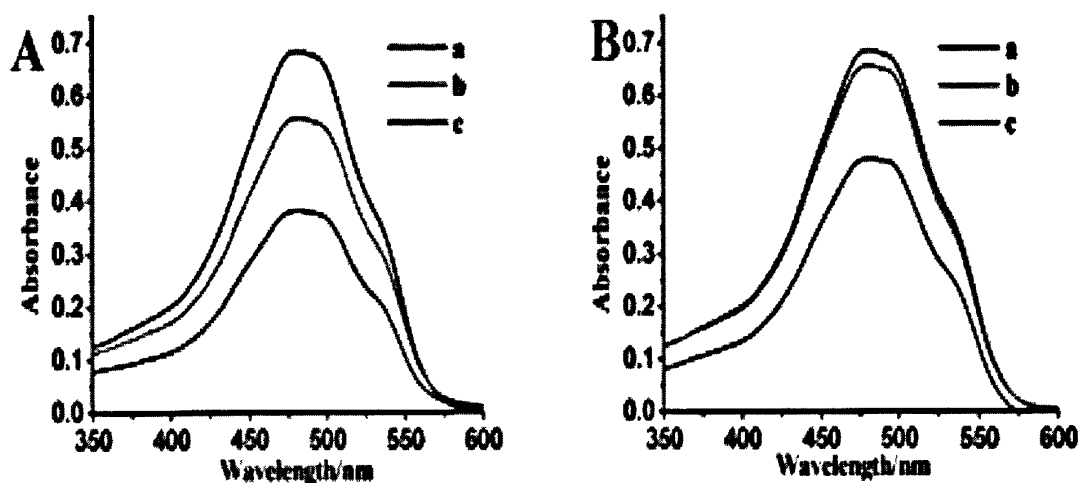


Figure 3-6 UV-Vis absorption spectra of DNR after the treatment with leukemia K562 (A) and K562/A02 (B) cells in the absence and presence of MPA-CdTe QDs for 2 h. (a) DNR (6.35×10^{-5} M); (b) DNR (6.35×10^{-5} M) with cells; (c) DNR (6.35×10^{-5} M) with cells exposed to MPA-CdTe QDs (6.25×10^{-6} M).

3.3.3.3 MPA-CdTe QDs 对白血病耐药细胞株 K562/A02 逆转耐药能力的分析

在以上研究基础上, 我们进一步研究了量子点对 K562/A02 的逆转耐药倍数。表 1 可以看出, 单用柔红霉素 DNR 作用于 K562/A02 和 K562 细胞的 IC₅₀ 分别为 44.91 μ M 和 0.85 μ M, 其耐药倍数约为 53 倍。量子点对 K562/A02 细胞的逆转作用见表 1, 加入 0.625 μ M 的量子点后, 其 IC₅₀ 为 17.18 μ M, 较单用柔红霉素 DNR 组明显降低 ($P < 0.05$), 逆转倍数 (R_f) 为 2.12 倍。研究结果表明, 少量的量子点存在可显著增强抗癌药物分子柔红霉素在白血病 K562/A02 细胞内部的积累, 并在很大程度上导致降低 K562/A02 细胞多药耐药 P-糖蛋白的功能。

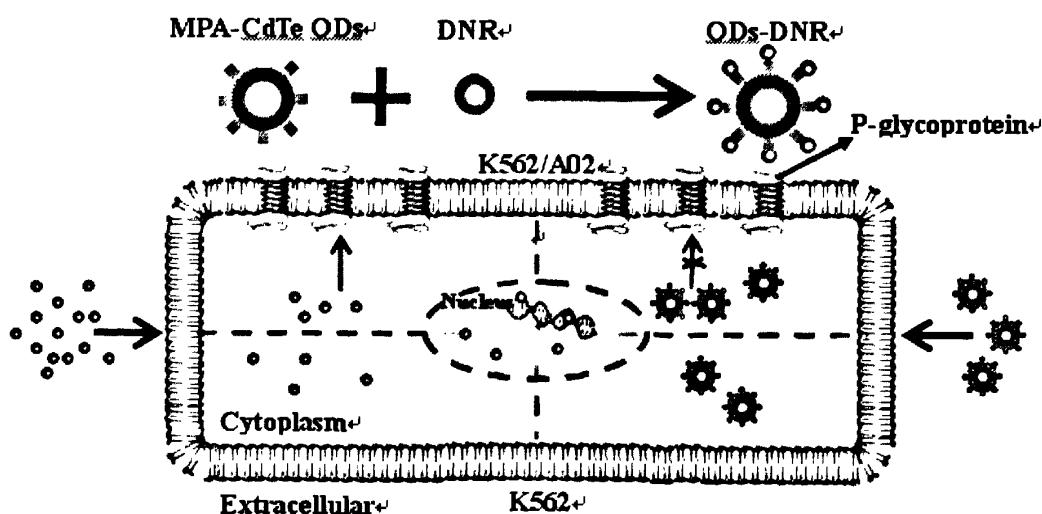
Table 1 The resistant factors and reversal index of leukemia K562 and K562/A02 cell lines to the MPA-CdTe QDs.

| Groups | IC ₅₀ /μM | | Resistant factors | Reversal Index |
|--------------------|----------------------|----------|-------------------|----------------|
| | K562 | K562/A02 | | |
| Control Group | 0.85 | 44.91 | 52.84 | |
| Experimental Group | 0.69 | 17.18 | 24.9 | 2.12 |

P<0.01 Vs Control Group

3.3.4 量子点协同作用的机制

综上所述，我们的 MTT 分析、电化学检测和紫外吸收光谱等研究结果表明，实验中采用的两种 CdTe 量子点可显著提高细胞胞内药物沉积并抑制肿瘤细胞多药耐药性，相关的协同作用机制与作用过程如示意图 Scheme 1 所示。由于 CdTe 量子点表面修饰基团 3-巯基丙酸，因此其表面带有负电荷，通过静电相互作用可吸附带正电荷的柔红霉素 DNR 分子，使得药物分子 DNA 吸附到量子点纳米粒子的表面，从而能够携带大量的柔红霉素 DNR 分子进入到癌细胞的内部，逆转肿瘤多药耐药，增加抗癌药物分子在细胞内的蓄积浓度。而肿瘤细胞通过其自身的内吞作用将胞外的纳米复合物吞噬到细胞内溶酶体中，由于溶酶体内部环境的改变，使得柔红霉素 DNR 分子被卸载下来，柔红霉素 DNR 是一种作用于 DNA 的抗癌药物分子，这样柔红霉素可能是通过与遗传物质 DNA 结合来导致癌细胞的凋亡，也可能是通过诱导一些细胞信号转导通道来杀死肿瘤细胞，更为精确的作用机制还需要作进一步的探讨。



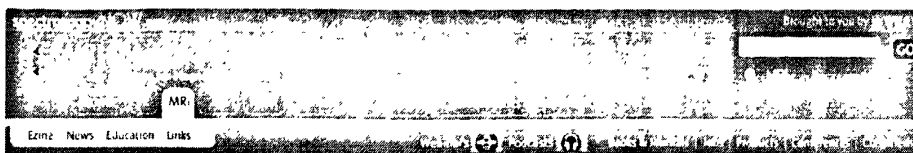
Scheme 1 Illustration of the mechanism of bio-labeling and drug delivery pathway of MPA-CdTe QDs and DNR conjugates into cell membrane.

3.4 结论

本章的研究工作中,我们首先使用单分子全内反射显微镜等方法探讨和研究了 CdTe 量子点有效识别标记癌细胞的实时追踪技术,同时采用电化学分析、紫外吸收光谱及对耐药倍数等手段揭示了该量子点纳米粒子携带抗癌药物分子进入肿瘤细胞逆转多药耐药的机制,研究结果显示,量子点复合物可显著地增强癌细胞对药物分子的吸收,从而可以更好地发挥抗癌药物的治疗效果。因此,本章的实验研究为 QDs 在癌症的早期诊断和治疗等方面进行了有益的尝试和探索,提供了一种潜在的细胞实时示踪成像的新技术新方法。

3.5 取得的创新性成果

最近,我们相关工作的研究论文“Imaging and Inhibition of Multi-drug Resistance in Cancer Cells via Specific Association with Negatively Charged CdTe Quantum Dots”在国际知名 SCI 收录的期刊 *Biomaterials* (IF: 6.646)上发表后,相继得到 MRI Spectroscopy 等研究网站的关注和引用,并对于我们的工作进行追踪报道,给予了高度肯定的评价。我们研究中的水溶性 MPA-CdTe QDs 具有良好的生物相容性,更重要的是,在我们的研究中,相关量子点具备肿瘤细胞实时动态细胞标记成像与逆转肿瘤多药耐药双重功能,而且对于细胞的生物活性没有不良影响,这种多功能纳米材料在生物医学中有着广泛的应用,为以后应用于临床肿瘤的检测与治疗提供了新思路新方法,给予处于痛苦的癌症患者新的希望。该项研究发现在当前相关前沿领域研究中具有重要意义,为以后的研究工作进一步开展奠定了坚实的基础,具有重要的学术价值和应用前景。(下图为 MRI Spectroscopy 对于我们研究成果的网络报道)



Quantum dots boost anticancer drug

[20105217]

Bookmark

Quantum dots (QDs) have received significant attention in biological and biomedical fields. Now, UV-Vis spectroscopy and other techniques have been used to investigate their utility in enhancing the activity of the anticancer agent daunorubicin (DNR) in treating leukaemia cells.

Yanyan Zhou, Qingning Li, Hui Jiang, Gang Lv, Juan Zhao, Chunhui Wu, and Xuemei Wang of the State Key Lab of Bioelectronics (Chien-Shung Wu Laboratory), at Southeast University, in Nanjing, China, and Luxin Shi and Matthias Salke of the Department of Chemistry and Biochemistry, at California State University, Los Angeles, USA, are showing cadmium telluride quantum dots can be used in imaging and inhibition of multi-drug resistant cancer cells.



Xuemei Wang

Photoluminescent semiconductor quantum dots (QDs) have been the focus of research in several fields of biology and biomedical science in recent years. They have some potentially very useful properties above and beyond conventional fluorescent reagents. For instance, they are much brighter (an estimated 20 times) than conventional dyes and also much more stable (some 100 times) and so are neither swamped by other signals nor photobleached. Quantum dots also have the added advantage of having broad absorption and narrow emission spectra. "QD fluorescence is particularly appealing for the visualization of cellular processes, since this method can facilitate multicolour labelling of living cells. Thus, QDs have been widely used in cellular labelling and in *in vivo* long-term fluorescence imaging," the team adds.

Zhou and colleagues have explored water-soluble nanocrystalline CdTe QDs that were capped with negatively charged 3-mercaptopropionic acid (MPA). The capping molecule assists with the uptake of a drug molecule, the anticancer drug daunorubicin, on the QD. These conjugates were developed in previous work. They have now determined efficacy of drug delivery and imaging using a cytotoxicity evaluation on leukaemia sensitive cell K562 and adriamycin-resistant cell K562/A02. They also applied total internal reflection fluorescence microscopy, electrochemistry and UV-Vis absorption spectroscopy to assess the behaviour and characteristics of these particles.

"Our results illustrate that the MPA-CdTe QDs could effectively facilitate the interaction of anticancer agent daunorubicin with leukaemia cells and the efficiency of biolabelling in cancer cells," the team says. "The present study affords a new potential method for simultaneous cellular inhibition and imaging of cancer cells."

The UV-Vis absorption spectroscopy measurements alongside electrochemical experiments carried out at room temperature allowed the team to compare the cellular behaviour under different conditions. Specifically UV-Vis spectroscopy of the daunorubicin residue after treating with leukaemia K562 and K562/A02 cells in the absence and presence of the modified QDs provided additional evidence of the utility of the QDs.

Obvious differences in the absorbance of the daunorubicin residue outside K562 cancer cells depending on whether QDs were used or not reveals just how effective uptake is in the presence of the MPA-CdTe. "It was apparent that the target cells absorbed few daunorubicin molecules in the absence of MPA-CdTe QDs," the team adds.

"We suggest that these nano-crystals interact with the anticancer drug in targeted cancer cells and significantly enhance cytotoxicity on both drug-sensitive and drug-resistant leukaemia cell lines," the researchers conclude. "Our work provides a new strategy for simultaneous cellular imaging and inhibition of multidrug resistance in cancer chemotherapy."

Related links:

- [BioMaterials, 2010, 11, 4956-4961](#)
- [Xuemei Wang](#)

Article by David Bradley

[Click here for more ernie articles](#)
[Click here for more news articles](#)
[Click here for more education articles](#)

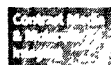


图 3-7 MRI Spectroscopy 对于我们研究成果的追踪报道

参考文献

- [1] Weizmann Y, Patolsky F, Katz E, et al. Amplified DNA sensing and immunosensing by the rotation of functional magnetic particles. *J Am Chem Soc*, 2003, 125:3452-3454.
- [2] Song H T, Choi J S, Huh Y M, et al. Surface modulation of magnetic nanocrystals in the development of highly efficient magnetic resonance probes for intracellular labeling. *J Am Chem Soc*, 2005, 127:9992-9993.
- [3] Gao X H, Cui Y Y, Levenson R M, et al. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 2004, 22:969-976.
- [4] Chen Y, Yang L, Feng C, et al. Nano neodymium oxide induces massive vacuolization and autophagic cell death in non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337:52-60.
- [5] Zhang L M, Zhang K Q, Prändl R, et al. Detecting DNA-binding of proteins *in vivo* by UV-crosslinking and immunoprecipitation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322:705-711.
- [6] Hussain S M, Hess K L, Gearhart J M, et al. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol in vitro*, 2005, 19: 975-983.
- [7] Choi S J, Oh J M, Park T, et al. Cellular toxicity of inorganic hydroxide nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 2007, 7: 4017-4020.
- [8] Jia G, Wang H F, Yan L, et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol*, 2005, 39: 1378-1383.
- [9] Zhang Y, Chen W, Zhang J, et al. *In vitro* and *in vivo* toxicity of CdTe nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol*, 2007, 7: 497-503.
- [10] Brunner T J, Wick P, Manser P, et al. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility *Sci Technol*, 2006, 40: 4374-4381.
- [11] Magrez A, Kasas S, Salicio V, et al. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett*, 2006, 6: 1121-1125.
- [12] Derfus A, Chan W C W, Bhatia S N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett*, 2004, 4: 11-18.
- [13] Brayner R. The toxicological impact of nanoparticles. *Nanotoday*, 2008,3 : 48-55.
- [14] West J L, Halas N J. Application of nanotechnology to biotechnology. *Curr Opin Biotech*, 2002, 11 : 215-217.
- [15] Longley D B, Johnston P G. Molecular mechanism of drug resistance. *J Pathol*, 2005, 205 : 275-292.
- [16] Komarava L, Wadarz D. Drug resistance in cancer : Principles of emergence and prevention, *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102 : 9714-9719.

- [17] Bosch I, Croop J. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochem Biophys Acta Rev cancer*, 1996, 1288:F37-F54.
- [18] Hamada H, Tsuruo T. Functional role for the 170 to 180-Kda glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 7785-7789.
- [19] Hamada H, Tsuruo T. Characterization of the ATPase activity of the Mr 170000 to 180000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells. *Cancer Res*, 1988, 48: 4926-4932.
- [20] Wang X M, Zhang R Y, Wu C H, et al. The application of Fe₃O₄ nanoparticles in cancer research: a new strategy to inhibit drug resistance. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 80:852-860.
- [21] Song M, Zhang R Y, Dai Y Y, et al. The *in vitro* inhibition of multidrug resistance by combined nanoparticulate titanium dioxide and UV irradiation. *Biomaterials* 2006, 27:4230-4238.
- [22] Storm G, Bellior S O, Daemen T, et al. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Advanced Drug Delivery Review*, 1995, 17: 31-48.
- [23] Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnose. *Advanced Drug Delivery Review*, 2002, 54: 631-651.
- [24] Alivisatos A P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, 1996, 271:933-937.
- [25] Ho Y P, Kung M C, Yang S, et al. Multiplexed hybridization detection with multicolor colocalization of quantum dot nanoprobe. *Nano Lett*, 2005, 5:1693-1697.
- [26] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, et al. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science*, 2005, 307:538-544.
- [27] Dubertret B, Skourides P, Norris D J, et al. *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, 2002, 298:1759-1762.
- [28] Jaiswal J K, Mattoussi H, Mauro J M, et al. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotechnol*, 2003, 21:47-51.
- [29] Pinaud F, King D, Moore H P, et al. Bioactivation and cell targeting of semiconductor CdSe/ZnS nanocrystals with phytochelatin-related peptides. *J Am Chem Soc*, 2004,126: 6115-6123.
- [30] Wu X Y, Liu H J, Liu J Q, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 41-46.
- [31] Bruchez M, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 1998, 281: 2013-2016.
- [32] Chan W C W, Nie S M. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 1998, 281: 2016-2018.

- [33] Parak W J, Gerion D, Zanchet D, et al. Conjugation of DNA to silanized colloidal semiconductor nanocrystalline quantum dots. *Chem Mater*, 2002, 14: 2113-2119.
- [34] Dahan M, Lévi S, Luccardini C, et al. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science*, 2003, 302: 442-445.
- [35] Hanaki K, Momo A, Oku T, et al. Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302: 496-501.
- [36] Sandros M G, Gao D, Benson D E. A modular nanoparticle-based system for reagentless small molecule biosensing. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12198-12199.
- [37] Jamieson T, Bakhshi R, Petrova D, et al. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, 2007, 28: 4717-4732
- [38] Kaul Z, Yaguchi T, Harada J I, et al. An antibody-conjugated internalizing quantum dot suitable for long-term live imaging of cells. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85: 133-140.
- [39] Gaponik N, Talapin D V, Rogach A L, et al. Thiol-capping of CdTe nanocrystals: an alternative to organometallic synthetic routes. *J Phys Chem B*, 2002, 106: 7177-7185.
- [40] Cottingham K. Quantum dots leave the light on. *Anal Chem*, 2005, 77: A 354- A 357.
- [41] Hoshino A, Fujioka K, Oku T, et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *NanoLett*, 2004, 4: 2163-2169.

第四章 功能化 Ag 纳米粒子在白血病细胞药物控释中的研究

摘要: 本章工作中我们采用 DNR-Ag NPs 纳米复合药物协同增强白血病细胞胞内药物浓度, 提高对肿瘤细胞有效杀伤能力。通过荧光倒置显微镜、电化学分析、UV-Vis 紫外吸收光谱分析及 MTT 等方法, 探讨了功能化 Ag NPs 作为纳米药物载体协同抗癌药物柔红霉素 DNR 对白血病细胞的作用。研究结果显示, Ag NPs 能够发挥纳米药物载体的作用来携带更多的柔红霉素(DNR)进入白血病 K562 细胞, 增加柔红霉素 DNR 的胞内药物蓄积浓度, 从而增加对癌细胞的杀伤作用。

关键词: 功能化银纳米粒子、柔红霉素、DNR-Ag NPs 纳米复合物、药物控释

4.1 前言

白血病是一种常见的恶性肿瘤, 我国已将其列入重点防治的十大恶性肿瘤之一, 其发病率约为 3-4 人/10 万人口, 发病以儿童和青年居多。对于白血病细胞恶性增殖, 目前治疗癌症的常用方法有: 手术治疗、放射治疗、化学治疗、基因治疗等传统治疗方法, 但毒性大、特异性差, 虽然能使大部分患者病情缓解和生存期延长, 但是 5 年无病痛的生存率仍很低; 骨髓移植可使一部分患者达到治愈得效果, 但是其价格昂贵, 而且骨髓提供者的来源有限, 因此化学疗法仍是目前肿瘤治疗中的主要手段。由于抗癌药物的专一靶向性差, 医生在治疗中采用高剂量的药物, 这极有可能会把正常细胞也杀死, 对患者的身体造成了极大地危害^[1,2]。因此如何提高药物的靶向作用、降低其毒副作用、减少对其他组织器官的伤害等问题是当前癌症治疗中的难题, 也是迫切需要解决的任务。随着纳米科技的发展及其在生物学中的应用, 已经有越来越多的纳米材料应用于癌症的治疗中, 表现出令人兴奋的发展前景^[3-7], 而纳米药物载体在癌症的靶向治疗中已经开始了广泛的研究, 并且展现了令人喜悦的成绩^[8-14], 可有效地增加抗癌药物在肿瘤细胞的药物蓄积浓度, 从而达到更好的治疗效果, 减少毒副作用、提高预后康复能力。

银纳米粒子(Silver nanoparticles, Ag NPs)是一种金属纳米材料, 具有独特的电学、光学、催化等性质^[15-17], 在诸多领域展现出重要的应用价值, 并且 Ag NPs 拥有优良的生物相容性, 这一特性在生物学应用^[18-24]中发挥着重要的作用。本文工作中, 我们将一种功能化 Ag 纳米粒子与抗癌药物柔红霉素(DNR)结合形成纳米复合物, 作用于白血病细胞, 结果表明该纳米复合物有利于载入更多的抗癌药物到癌细胞中, 从而大大增加了癌细胞内的药物浓度, 对癌细胞的杀伤效果显著增强。

4.2 实验部分

4.2.1 主要仪器与试剂

主要仪器有：透射扫描电镜 (JEM-2100, 日本)、荧光显微镜(Nikon TRI)、CO₂ 细胞培养箱(GBB16 型, Heraeus, 德国)、酶联免疫检测仪(BIO-RAD550, Bio-Rad Laboratories Inc., 美国)、电化学工作站(CHI660b, 上海辰华)、UV-Vis 紫外分光光度计(Hitachi U-4100, 日本)。

主要试剂有：柔红霉素(Farmitalia 公司, 意大利)、RPMI 1640 培养基(SIGMA 公司, 美国, 分装后-20℃保存)、胎牛血清(SIGMA 公司, 美国, 分装后-20℃保存)、MTT(Amresco 公司, 美国)、PBS 缓冲液(0.01M, pH 7.2-7.4)、二甲基亚砜(分析纯)等。

4.2.2 细胞培养

白血病敏感 K562 细胞是一种悬浮细胞, 购自中国医学科学院天津血液病研究所。在培养过程中, K562 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 培养基中含有 100 μg/mL 的链霉素和 100 IU/mL 的青霉素。整个培养过程是在 37℃、含有 5%二氧化碳湿润的培养箱中进行的。

4.2.3 Ag NPs 的制备和表征

纳米银粉是采用电化学方法制备, 表面被四庚基溴化铵包覆。Ag NPs 的形貌由透射电子显微镜(TEM)表征, 将 Ag 纳米粒子溶于水, 超声 30 分钟, 滴至铜网上, 待干燥后测量。

4.2.4 Ag NPs 的体外细胞毒性实验

首先, 处于对数生长期的 K562 白血病细胞按 1.0×10^4 个/孔的密度接种在 96 孔板上, 经过夜培养后, 加入终浓度为 3.125、6.25、12.5、25、50、100 μg/mL Ag NPs, 空白对照组也在 96 孔板上以同样的条件, 在 37℃、5% CO₂ 的饱和湿润空气中进行培养 24 h。然后加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT, 继续培养 4h。然后离心 1000 转/分离心 10min, 轻轻弃去上清, 每孔再加入 150 μL 的 DMSO, 振荡混匀, 在酶标仪上用 492nm 检测各孔的吸光度值。细胞的存活率按如下公式进行计算: $([A]_{\text{test}} / [A]_{\text{control}}) \times 100$, 此处, A 代表各孔的吸光度值。每个实验至少独立重复三次, 取平均值进行分析计算。

4.2.5 细胞胞内 DNR 的浓度变化

4.2.5.1 细胞内 DNR 的荧光强度观察

处于对数生长期的白血病 K562 细胞以 1000 转/分离心 10min, 然后轻轻倒去上清溶液, 细胞沉淀用 PBS 缓冲液轻轻悬起, 同法离心后用 PBS 溶液再次悬起并计数。含有 DNR (1.8×10^{-7} M) 的白血病 K562 细胞溶液 (5×10^5 个/mL) 以及含有 DNR-Ag NPs (DNR 1.8×10^{-7} M, Ag NPs 2.0 mg/L) 纳米复合物的 K562 细胞溶液 (5×10^5 个/mL) 均在 37℃、5% CO₂ 培养 2h 后, 将 15 μL 液体滴在 0.17mm 后的玻片上, 然后用 488nm 激光束照射, 在荧光显微镜

(TIRFM)下观察。

4.2.5.2 DNR-Ag NPs 复合物对 K562 细胞增值抑制的影响

用生物学 MTT 法研究了 Ag NPs 对 K562 白血病细胞协同载药能力。首先,处于对数生长期的 K562 白血病细胞按 1.0×10^4 个/孔的密度接种在 96 孔板上,经过夜培养后用浓度为 3.8×10^{-7} M DNR 以及 Ag NPs 2.0 mg/L 进行处理,空白对照组也在 96 孔板上以同样的条件,在 37°C、5% CO₂ 的饱和湿润空气中进行培养 24 h。然后加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT,继续培养 4h。然后离心 1000 转/分离心 10min,轻轻弃去上清,每孔再加入 150 μ L 的 DMSO,振荡混匀,在酶标仪上用 492nm 检测各孔的度值。细胞的抑制率按如下公式进行计算: $(1 - [A]_{\text{test}}/[A]_{\text{control}}) \times 100$, 这里, A 代表各孔的吸光度值。每个实验至少独立重复三次,取平均值进行分析计算。

4.2.6 细胞胞外 DNR 的浓度变化

4.2.6.1 电化学分析

将 3.8×10^{-5} M 柔红霉素 DNR 与 10.mg/L 功能化银纳米粒子在 PBS (0.01M, pH 7.2)中混合均匀,4°C 过夜,使 DNR 与银纳米粒子自组装成纳米药物复合物。次日,将处于对数生长期的白血病敏感细胞 K562 离心 5min,然后轻轻倒去上清溶液,细胞沉淀用 PBS 缓冲液轻轻悬起,同法离心后用 PBS 溶液再次悬起并计数。含有 DNR (3.8×10^{-5} M)、DNR-Ag NPs 纳米复合物的 K562 细胞溶液(5×10^5 个/mL) 分别在 37°C、5% CO₂ 培养 2 h; 同时,用含有 3.8×10^{-5} M DNR 溶液置于 37°C、5% CO₂ 培养 2 h 作为对样品。所有样品在实验过程中均用 PBS 缓冲液进行稀释处理,然后离心 5 min,取上清液体进行电化学分析。

4.2.6.2 紫外吸收光谱分析

将 1.9×10^{-5} M 柔红霉素 DNR 与 5mg/L 功能化银纳米粒子在 PBS (0.01M, pH 7.2)中混合均匀,4°C 过夜,使 DNR 与 Ag NPs 自组装成 DNR-Ag NPs 纳米复合物。次日,将处于对数生长期的白血病敏感细胞 K562 离心 5min,然后轻轻倒去上清溶液,细胞沉淀用 PBS 缓冲液轻轻悬起,同法离心后用 PBS 溶液再次悬起并计数。含有 DNR (1.9×10^{-5} M)、DNR-Ag NPs 纳米复合物的 K562 细胞溶液(5×10^5 个/mL) 在 37°C、5% CO₂ 培养 2 h; 同时,用含有 1.9×10^{-5} M DNR 溶液置于 37°C、5% CO₂ 培养 2 h 作为对样品。所有样品在实验过程中均用 PBS 缓冲液进行稀释处理,然后离心 5 min,取上清液体进行 UV-Vis 紫外吸收光谱分析。

4.2.7 统计学分析

实验数据用至少进行三次平行实验的平均值 \pm SD(标准偏差)表示。并用 Student's 中的 *t* 检验进行分析, $p < 0.05$ 认为有统计学差异。

4.3 结果与讨论

4.3.1 Ag NPs 的 TEM 表征

本文采用的 Ag NPs 用肉眼观察呈黑灰色细粉状, 用 TEM 观察其表面晶体结构。如图 4-1 所示, 该粒子具有很好的晶体结构, 晶格间距为 0.195nm。

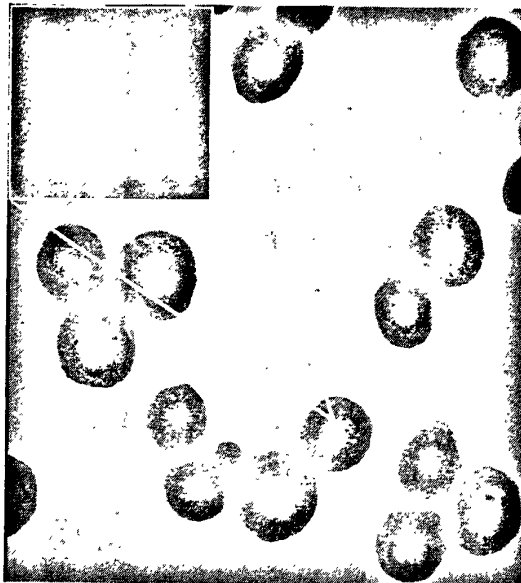


Figure 4-1 TEM image of the Ag nanoparticles

4.3.2 Ag NPs 对 K562 细胞毒性的 MTT 结果

我们用 MTT 法研究了不同浓度的 Ag NPs 对白血病敏感细胞株 K562 的细胞毒性。研究表明, 功能化 Ag NPs 对 K562 细胞的毒性呈剂量依赖性。在高浓度时明显地抑制 K562 细胞的增值能力, 在低浓度时对该细胞影响很小。在细胞培养 24h 后, Ag NPs 对 K562 细胞的半数抑制率 (IC_{50}) 是 20.5mg/L。

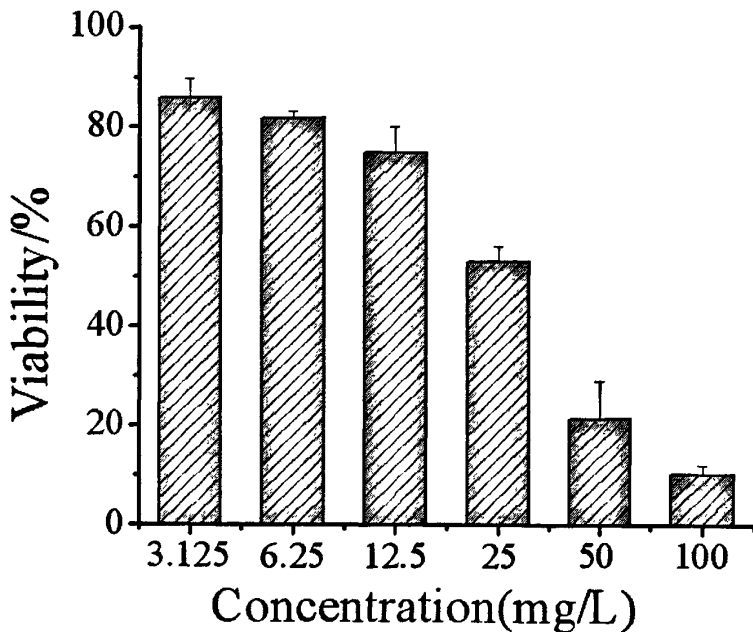


Figure 4-2 Cell viability of different concentrations of Ag NPs on K562 cells, data are mean \pm SD, error bars indicate standard deviation.

4.3.3 Ag NPs 携载药物 DNR 在白血病 K562 细胞胞内浓度分析

4.3.3.1 细胞内荧光分析

我们在荧光显微镜下观察了功能化的 Ag NPs 对 K562 细胞吸收 DNR 的影响。由于柔红霉素 DNR 在 480nm 的激光激发可以产生荧光,因而细胞吸收 DNR 后产生的荧光强度与其吸收量的多少成正比。研究表明, DNR-Ag NPs 复合物与 K562 细胞培养后细胞吸收 DNR 产生的荧光强度 (图 4-3A b) 明显强于单纯的 DNR 与 K562 细胞培养后细胞吸收 DNR 产生的荧光强度 (图 4-3A a); 同时, 通过所选单细胞的荧光强度进行量化, 对于该体系进行了胞内荧光强度的定量比较, 结果显示(图 4-3B), 纳米药物复合物作用后细胞内的荧光强度明显强于单独的柔红霉素作用后的细胞荧光强度, 荧光强度增加了约 90%, 表明在功能化银纳米粒子的作用下, 更多的柔红霉素进入到 K562 细胞中。由于 Ag NPs 本身并不产生荧光, 而在其与含有 DNR 的细胞溶液共培养后, 细胞中 DNR 产生的荧光强度明显增强, 说明功能化 Ag 纳米粒子的存在可以明显改善细胞膜的通透性, 有利于化疗药物进入细胞内部, 促进细胞吸收 DNR, 增强药物在细胞内部的有效浓度, 提高药物对靶细胞的增殖抑制能力。

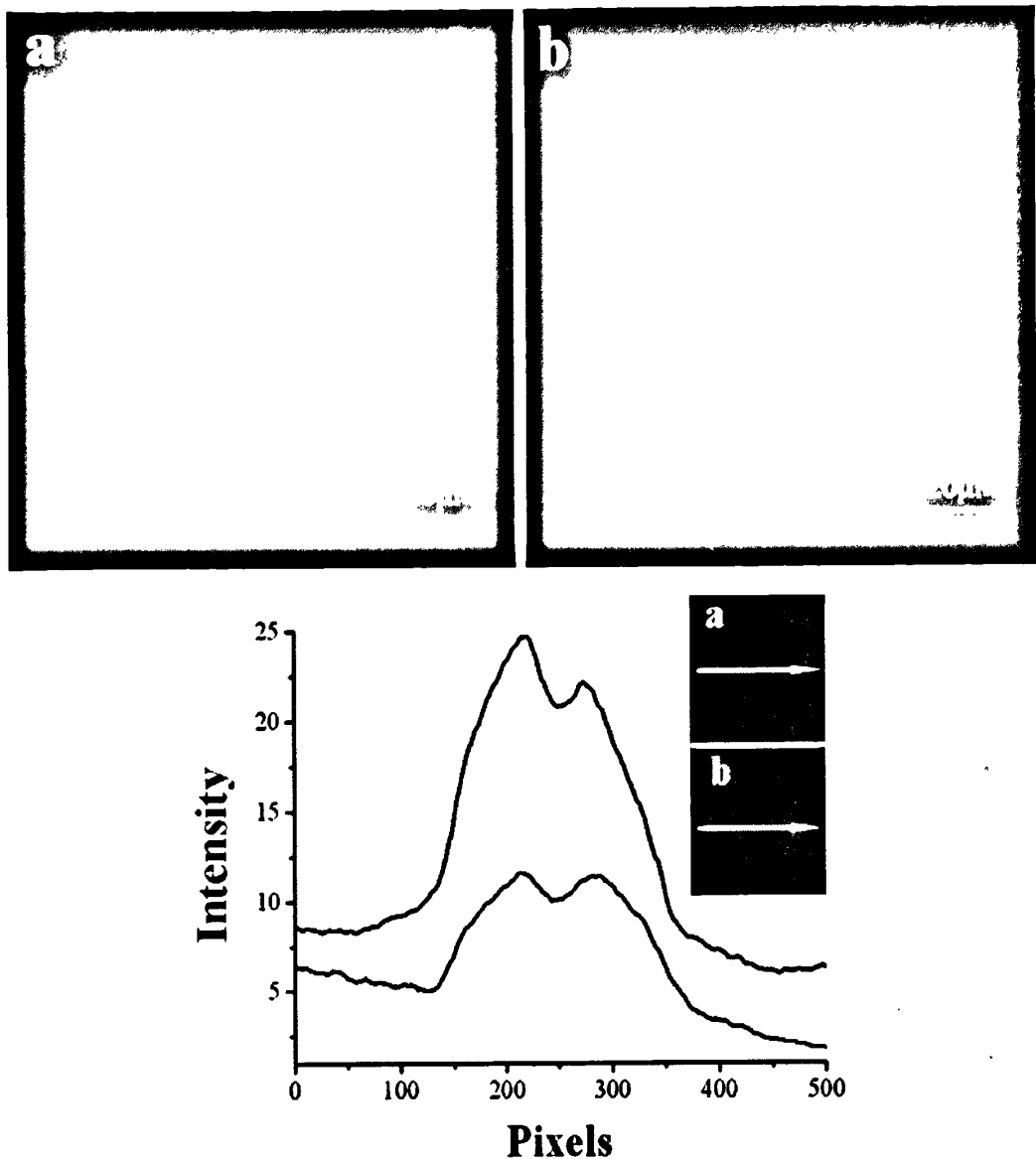


Figure 4-3 The images of K562 cancer cells after incubation with DNR (a) and K562/A02 cancer cells after incubation with DNR-Ag NPs (b) for 2 h.

4.3.3.2 Ag NPs 协同 DNR 对 K562 细胞增值抑制力的影响 —— MTT 分析

在以上研究工作基础上, 我们进一步采用生物 MTT 法检测了 Ag 纳米粒子对 DNR 抑制白血病 K562 细胞增殖能力的影响。考虑到其生物安全性, 我们选用的浓度也是在安全范围内。如图 4-4 所示, MTT 研究结果表明, 当 $2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 的 Ag 纳米粒子与 DNR (浓度是 $3.8 \times 10^{-7} \text{M}$) 共同培养细胞时, 与单纯的相应浓度的功能化 Ag 纳米粒子或 DNR 相比, DNR-Ag NPs 复合物对 K562 细胞增殖的抑制率明显强于单纯药物对 K562 细胞的增殖抑制率。 $2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 的 Ag 纳米粒子对 K562 细胞增殖的抑制率为 9.13%, 而 $3.8 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 DNR 对 K562 细胞的增殖抑制率分是 12%, 但当相同浓度的 Ag 纳米粒子与 DNR 联合使用时, 其对 K562 细胞的增殖抑制率提高到 36%, t 检验的结果表明, DNR-Ag NPs 纳米复合物对 K562 细胞的抑制

率与单独 DNR 对细胞的抑制率具有统计学差异($p < 0.05$)。表明, DNR-Ag NPs 复合纳米药物对 K562 细胞的增殖抑制率具有显著协同作用。

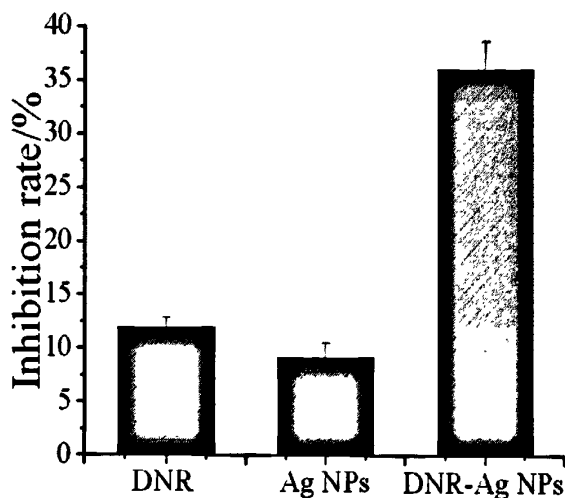


Figure 4-4 MTT assay on the inhibition rate of leukemia K562 cells after treated with DNR (3.8×10^{-7} M) in the absence and presence of 2.0 $\mu\text{g/mL}$ of Ag nanoparticles, respectively. Here, and p values < 0.05 . Error bars indicate \pm SD.

4.3.4 胞外 DNR 浓度分析

4.3.4.1 电化学检测分析

根据荧光显微镜研究结果, 我们可以知道在功能化银纳米粒子的作用下, 可以增加柔红霉素在细胞胞内的蓄积浓度, 而相应进入细胞内部的药物分子与细胞外部的药物浓度是相关的。对于细胞胞外药物浓度变化, 我们采用电化学差分脉冲(DPV)法进行测量, 实验利用 CHI660b 电化学工作站在室温下进行。图 4-5 c 显示了存在银纳米粒子时候的检测曲线, b 显示了没有纳米粒子时的测量曲线, a 曲线是单纯柔红霉素的曲线。从图中可以看出, 存在银纳米粒子的时候, 胞外的柔红霉素的氧化还原峰值明显减小, 并且峰位置明显正移, 而 DPV 的峰值减小跟细胞对柔红霉素的吸收密切相关, 表明该纳米复合体系使得柔红霉素更容易进入 K562 细胞, 具有比较好的协同效应, 因而功能化的银纳米粒子可以作为有效的药物载体, 增强抗癌药物在肿瘤细胞的胞内蓄积浓度。

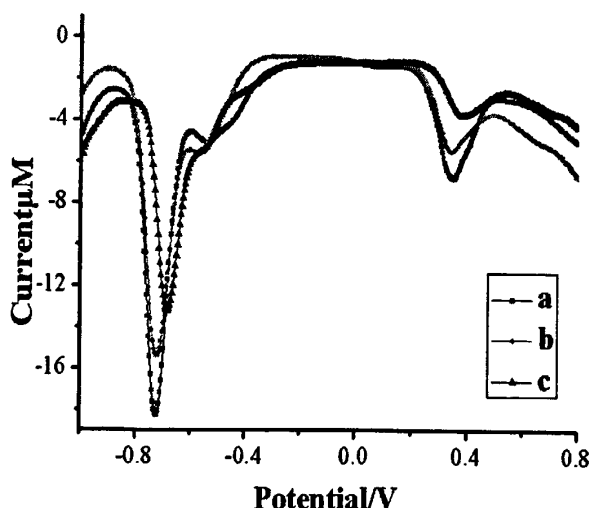


Figure 4-5 DPV study of DNR residue outside K562 cells in the absence and presence of Ag NPs with after incubating for 2 h. (a) DNR (3.8×10^{-5} M); (b) DNR (3.8×10^{-5} M) and cells; (c) DNR (3.8×10^{-5} M) and cells exposed to Ag NPs (10 mg/l). Pulse amplitude: 0.05 V; pulse width: 0.05 s; pulse period: 0.2 s.

4.3.4.2 紫外吸收光谱分析结果

图 4-6 所示研究结果进一步显示, 与单纯的柔红霉素 DNR 溶液相比, 经与 K562 细胞共培养后, 细胞外残余的柔红霉素的吸光度值降低了 20%, 说明柔红霉素 DNR 与白血病敏感 K562 细胞共培养之后, 溶液中的柔红霉素 DNR 被细胞吸收进入到细胞内部(图 4-6-b 所示); 当 DNR 与银纳米粒子共同作用细胞后, 细胞外柔红霉素 DNR 的吸光度值进一步降低了 46%, 表明在功能化银纳米粒子的存在下, 可以增强 K562 细胞吸收溶液中的柔红霉素, 导致细胞外柔红霉素含量的减少(图 4-6-c 所示)。由于每组中柔红霉素的浓度是一样的, 因而吸收峰值越小, 说明培养基的柔红霉素浓度越低, 表明银纳米粒子的协同作用促使白血病细胞吸收了更多的柔红霉素 DNR, 从而导致胞外柔红霉素的吸光度显著降低。

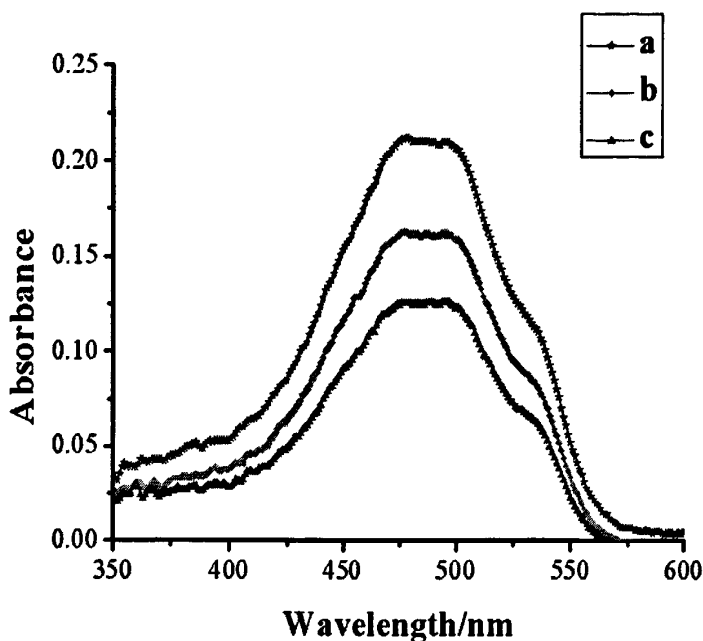


Figure 4-6 UV-Vis absorption spectra of DNR after the treatment with leukemia K562 cells in the absence and presence of Ag NPs for 2 h. (a) DNR (1.9×10^{-5} M); (b) DNR (1.9×10^{-5} M) and cells; (c) DNR (1.9×10^{-5} M) and cells exposed to Ag NPs (5mg/l).

4.4 结果与讨论

综上所述, 本工作研究结果表明, 在功能化 Ag 纳米粒子的作用下, 可以增强 K562 细胞对抗癌药物柔红霉素的吸收, 促使更多的药物分子进入到细胞中, 增强靶细胞内的药物浓度, 和对 K562 细胞的抑制作用, 进一步增加化疗药物对 K562 细胞的杀死性。

这种增强效应的产生可能是通过功能化 Ag 纳米粒子与肿瘤细胞相互作用从而导致细胞膜的结构发生变化、增强细胞膜的通透性, 而且在纳米尺度下的 Ag 纳米粒子本身具有一些特殊的活性, 可以作为药物载体, 有效促进白血病细胞对抗癌药物的吸收, 提高抗癌药物在肿瘤细胞中的有效浓度, 从而增强抗癌药物对肿瘤细胞杀死能力。因而, 功能化 Ag 纳米粒子在肿瘤临床治疗等方面具有潜在而重要的应用前景。

参考文献

- [1] Sternberg C N, Donat S M, Bellmunt J, et al. Chemotherapy for bladder cancer: Treatment guidelines for neoadjuvant chemotherapy, bladder preservation, adjuvant chemotherapy, and metastatic cancer. *Urology*, 2007, 69(Supp1A): 62-79.
- [2] Etzioni D A, El-Khoueiry A B, Beart R W. Rates and predictor of chemotherapy use for stage III colon cancer. *Cancer*, 2008, 113: 3279-3289.
- [3] Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 47-52.
- [4] Kim S, Lim Y T, Soltesz E G, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 93-97.
- [5] Taton T, Mirkin C, Letsinger R. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 2000, 289: 1757-1760.
- [6] Cui Y, Wei Q, Park H, et al. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science*, 2001, 293: 1289-1292.
- [7] Chen R J, Bangsaruntip S, Drouvalakis K A, et al. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 4984-4989.
- [8] Sahoo S K, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today*, 2003, 8: 1112-1120.
- [9] Sunderland C J, Steiert M, Talmadge J E, et al. Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. *Drug Dev Res*, 2006, 67: 70-93.
- [10] Orive G, Gascon A R, Hernandez R M, et al. Techniques: new approaches to the delivery of biopharmaceuticals. *Trends Pharm Sci*, 2004, 25: 382-387.
- [11] Gu F X, Karnik R, Wang A Z, et al. Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today*, 2007, 2: 14-21.
- [12] Fahmy T M, Samstein R M, Harness C C, et al. Surface modification of biodegradable polyesters with fatty acid conjugates for improved drug targeting. *Biomaterials*, 2005, 26: 5727-5736.
- [13] Lambert G, Fattal E, Pinto-alphandary H, et al. Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. *Pharm Res*, 2000, 17: 707-714.
- [14] Mitra S, Gaur U, Ghosh P C, et al. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J Controlled Release*, 2001, 74: 317-323.
- [15] Ferrando R, Jellinek J, Johnston R L. Nanoalloys: from theory to applications of alloy clusters and nanoparticles. *Chem Res*, 2008, 108, 845.

- [16] Ferrer D, Torres-Castro A, Gao X, et al. Three-layer Core/Shell structure in Au-Pd bimetallic nanoparticles. *Nano Lett*, 2007, 7, 1701-1705.
- [17] Molenbroek A M, Norskov J K, Clausen B S. Structure and reactivity of Ni-Au nanoparticle catalysts. *J Phys Chem B*, 2001, 105: 5450-5458.
- [18] 陈炯,韩春茂,林小玮,等. 纳米银敷料在修复II度烧伤创面的应用研究[J]. *中华烧伤杂志*, 2006, 44: 50-52.
- [19] Castellano J J, Shafii S M, Ko F, et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J*, 2007, 4:114-122.
- [20] 李民,牛亚明,林倩君,等. 纳米银敷料对烧伤创面保护作用的观察[J]. *中国医师进修杂志*, 2006, 29:11-13.
- [21] Alt V, Bechert T, Steinrucke P, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*, 2004, 25: 4383-4391.
- [22] Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager J J, et al. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci*, 2005, 88, 412-419.
- [23] Hussain S M, Hess K L, Gearhart J M, et al. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 2005, 19: 975-983.
- [24] Hussain S M, Javorina A K, Schrand A M, et al. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci*, 2006, 92, 456-463.

第五章 总结与展望

恶性肿瘤是危害人类生命健康的重大疾病之一，虽然已经研发出各种方法用来提高对肿瘤细胞检测和治疗水平，并且取得了一定的成果，但是仍然存在很多亟待解决的问题。如何能够及时、准确、定位地实现对肿瘤细胞的高灵敏检测，及其抗癌药物分子能否在肿瘤部分达到有效的蓄积浓度，从而可以抑制甚至杀死肿瘤细胞，这是关键因素。随着纳米技术的快速发展，许多纳米材料在生物医学领域中显示出了极大的优势。在我的硕士毕业论文研究中，首先探讨和研究了两种不同尺寸的碲化镉荧光量子点在活细胞实时成像中的应用，并进一步研究了量子点提高抗癌药物在肿瘤细胞内的蓄积和有效逆转多药耐药的作用。研究表明，该量子点具有稳定的光学性质，可以很好地实现细胞实时示踪成像功能，并有效地促进抗癌药物分子在肿瘤细胞的聚集和向细胞内扩散行为，逆转肿瘤细胞的多药耐药，因而该纳米复合物可有效地提高对肿瘤细胞的识别检测和杀伤能力。而功能化银纳米粒子作为一种具有重要生物学意义的药物载体，能够显著地促进抗癌药物向肿瘤细胞内渗透和扩散，而且与抗癌药物分子形成纳米复合物，实现了在肿瘤细胞内的蓄积，从而抑制肿瘤细胞的增殖能力。

虽然相关工作已经取得了一些创新性的研究成果，但是由于时间、条件等因素的限制，本论文工作还需要进一步深入地开展研究。目前，在药物靶向运输、肿瘤的高灵敏诊断等方面有了很大的进展，但是在临床应用之前，仍有很多问题待于解决，如量子点的细胞毒性与生物功能的构效关系等；在生物标记成像过程中，是不是可以采用不同类别的量子点来准确识别标记生物体的不同结构；银纳米材料表面基团对于光照比较敏感，可以对其在光动力治疗中的应用进行深入研究；同时对于纳米粒子在机体内的代谢途径及其药物控释传输的作用机理等问题。

硕士阶段的成果

期刊论文:

1. **Yanyan Zhou**, Lixin Shi, Qingning Li, Hui Jiang, Gang Lv, Juan Zhao, Chunhui Wu, Matthias Selke, Xuemei Wang. Imaging and Inhibition of Multi-drug Resistance in Cancer Cells via Specific Association with Negatively Charged CdTe Quantum Dots. **Biomaterials**, 2010, 31: 4958-4963. (Highlight in the section of MRI Spectroscopy in Spectroscopy) (SCI,EI IF:6.646)
2. Gang Lv, Fadong Wei, Hui Jiang, **Yanyan Zhou**, Xuemei Wang. DFT study on the intermolecular interactions between Au_n ($n = 2-4$) and thymine. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**. 2009, 915: 98-104. (SCI,EI IF:1.167)
3. Gang Lv, Fadong Wei, Qingning Li, Qin Shen, Hui Jiang, **Yanyan Zhou**, Xuemei Wang. DFT Study on the Interactions Between Au_n ($n = 2...4$) and Adenine. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 2010, 10: 809-818. (SCI,EI IF:1.9)
4. Huangping Wang, Hui Jiang, Haijun Zhang, **Yanyan Zhou**, Chunhui Wu, Juan Zhao, Changyu Wu, Long Ba and Xuemei Wang. One-pot synthesis of hexagonal ZnO nanosheets with a novel structure-directing agent and their application in cell imaging. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. (in press) (SCI,EI IF:1.9)
5. Xiaojing Wu, Hui Jiang, **Yanyan Zhou**, Chunhui Wu, Jingyuan Li, Changyu Wu, Baoan Chen, Xuemei Wang. Selective determination of drug resistant cancer cells on indium tin oxide electrode modified with nano titanium dioxide. **Electrochemistry Communications**. (Accepted) (SCI,EI IF:4.194)

发明专利:

王雪梅, 吴晓静, 姜晖, 吴春惠, 李景源, 周研研, 赵娟, 基于二氧化钛纳米界面的细胞生物传感器的制备方法, 申请号: 201010018313.1

会议论文:

1. **Yanyan Zhou**, Xuemei Wang. Electrochemical study on synergistic effect of drug uptake in cancer cells via new biocompatible nanocomposites. **The 60th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE)**, 2009, Beijing, 45.
2. **Yanyan Zhou**, Xuemei Wang. Synergistic cytotoxic effect of Ag nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells (ICGBBE2009, Nanjing). **The China-Germany Bilateral Symposium on Bioelectronics and Biomaterials (CGBSBB)**, 2009, Nanjing, 105.

致 谢

经过两年多的努力，我的硕士阶段学习和工作就要结束了。在本论文的研究工作中得到了生物电子学国家重点实验和生物科学与医学工程学院的许多老师和同学的关心和支持，在此向他们表示衷心的感谢。

首先，要感谢我的导师王雪梅教授。在我整个论文工作中，王老师给了我细心的指导和悉心的关怀。在学术上，王老师扎实的功底、敏捷的思维、对新理论、新方法及前沿动态敏锐的洞察力，使我受益匪浅；在工作中，王老师治学严谨、勤奋钻研、不辞辛苦和一丝不苟的工作作风，将成为我今后学习的榜样。在我毕业之际，谨向王老师致以我最衷心的感谢和最真挚的祝福！

感谢东南大学中大医院院长陈宝安教授和他的研究组为我们的细胞生物实验上的研究工作提供材料以及在研究过程所提供的宝贵意见。感谢姜晖老师在我科研及论文中提出的建设性意见，以及在论文写作方面给予我的热心帮助。

感谢生物电子学国家重点实验室顾忠泽教授、顾宁教授、何农跃教授、肖忠党教授、付德刚教授、吕晓迎教授、唐祖名教授、巴龙教授、黄宁平副教授、钱卫平教授、张宇教授、黄炎副教授、赵祥伟副教授、徐华老师在我学习期间给予我的关心和指导。感谢生物科学和医学工程学院的何林书记、关佑丽老师、高庆华老师等在我硕士期间给予了很大的帮助。衷心感谢实验室秦慧玲老师。

感谢博士师兄郭大东、吕刚，师姐李庆宁、吴春惠，在我科研初期，给予我莫大的鼓励和帮助。感谢实验室李景源、张根、张海军、王荒平、魏发栋、吴长宇、常虎成、郑久松、赵娟、吴晓静、许佩佩，张园园、张殷朱、张晓璐、张丽及已毕业的师姐何芳、沈琴、胡红利等同学在我的科研工作及日常生活中给予的帮助，感谢你们给我带来的快乐，有了你们的陪伴，我过得很开心。

感谢我的室友以及其他同学在我研究生生活中给予的帮助和照顾。

感谢我的家人，是你们在我无助的时候陪我一起渡过，倾听我的苦楚，分享我的快乐，给予我最温暖的关怀。

还有更多的同学和朋友，在生活中，在学习上给予了我很帮助，在此一并表示衷心的感谢！

周研研

二零一零年五月于南京东南大学

