

量子点和量子点-A β -Ab 探针对活体动物的毒性研究

刘人恺¹, 肖波², 曾畅², 吴志国², 冯莉²

1. 深圳市南山区人民医院神经内科, 广东省深圳市 518052

2. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘 要: **目的** 通过组织形态学和动物行为学观察、肝肾功能测定系统考察量子点及制备的量子点-A β -Ab 探针的生物毒性作用, 以此评价量子点及探针的生物相容性。 **方法** 将正常 C57BL 小鼠 30 只随机分为量子点 (QDs) 组、量子点-A β -Ab (QDs-A β -Ab) 组和对照组, 每组 10 只, 分别行量子点、量子点-A β -Ab 探针、PBS 侧脑室注射后, 行 HE 染色、尼氏体染色、动物行为学观察及肝肾功能测定。 **结果** HE 染色和尼氏染色示 QDs 组、QDs-A β -Ab 组海马 CA1 区神经元形态正常, 尼氏体清晰可见, 与对照组无差异。行为学观察 7 d, 3 组小鼠进食进水正常, 二便正常, 无举尾、无皮肤毛发颜色改变, 无步态异常、无兴奋抑制反应, 无死亡。QDs 组和 QDs-A β -Ab 组血清 ALT、AST、BUN 和 CRE 水平与对照组无明显差异 ($P > 0.05$)。 **结论** 量子点及量子点-A β -Ab 探针小鼠整体毒性作用小, 生物相容性好。

关键词: 量子点; 量子点-A β -Ab 探针; 生物相容性; C57BL 小鼠

Study on toxicity of Quantum dots A β -Ab probe to C57BL mice

LIU Ren-Kai, XIAO Bo, ZENG Chang, WU Zhi-Guo, FENG Li. Department of Neurology, Nanshan People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518052, China

Abstract: **Objective** To study the toxicity of Quantum dots (QDs) and Quantum dots-A β -Ab (QDs-A β -Ab) probe to C57BL mice through histomorphological and behavioral comparisons, hepatic and renal function tests in order to evaluate the biocompatibility of QDs and QDs-A β -Ab probe. **Methods** Thirty normal C57BL mice were randomly divided into QDs, QDs-A β -Ab, and control groups. The responses were observed by behavioral comparisons, HE staining and nissl staining after injections of 5 μ L QDs, QDs-A β -Ab probe or normil saline. Hepatic and renal functions were detected using automatic chemistry analyzer. **Results** Cell morphology, ultrastructure and nissl bodies in the hippocampal CA1 of the probe and the QDs groups were normal as the control group. Behavioral observation of seven days showed normal life behaviors and skin changes, walking disorders, excitatory linhibitory response or death did not occur in three groups. There were no significant differences in the contents of serum ALT, AST, BUN and CRE among the three groups. **Conclusions** The QDs and QDs-A β -Ab probes have no toxic effects and show a good biocompatibility in C57BL mice.

Key words: Quantum dots; Quantum dots-A β -Ab probe; biocompatibility; C57BL mice

在生物医学研究领域, 探索和发展高灵敏度的生物标记方法一直是广大神经退行性疾病研究者非常关注的热点, 特别是对于 AD 早期或极早期的诊断和治疗的研究尤为关键^[1]。20 世纪末, 出现了一种新的荧光标记物, 即纳米无机材料的量子点。与传统的有机荧光染料相比, 量子点具有高荧光强度、强抗光漂白能力和窄的发射光谱等独特光学特性。这些独特的荧光特性, 使其在分子生物

学、细胞生物学、基因组学、药物筛选、生物大分子相互作用等研究中具有极大的应用前景^[2]。但是量子点的生物相容性和安全性, 合成的量子点-抗体探针的毒性反应等问题都引起了广大学者的关注。本研究通过组织形态学和动物行为学观察、肝肾功能测定系统考察量子点及制备的量子点-A β -Ab 探针的生物毒性作用, 以此评价量子点及探针的生物相容性。

基金项目: 国家自然科学基金 (30770736)

收稿日期: 2010-10-20; **修回日期:** 2011-01-17

作者简介: 刘人恺 (1981-), 女, 博士, 主要从事神经退行性疾病、脑血管病研究。

通讯作者: 肖波 (1962-), 男, 科主任, 教授, 主任医师, 博士, 主要从事癫痫、神经退行性疾病研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 量子点及量子点-A β -Ab 探针 非官能团的水溶性量子点-605 和量子点-A β -Ab 探针由武汉珈源量子点技术开发有限公司提供,浓度为 1 μ M,荧光最大发射波长为 (605 ± 10) nm,荧光全半峰宽 ≤ 30 nm。

1.1.2 动物 健康 C57BL 小鼠 34 只,由中南大学湘雅医学院实验动物中心 [SCXK(湘)-2006-0002] 提供,鼠龄 3~4 月,体重 30~35 g。

1.1.3 试剂及耗材 多聚甲醛 (Sigma 公司);水合氯醛 (中南大学湘雅医院药剂科);H₂O₂ (国药集团化学试剂有限公司);组织包埋剂 (Sakura 公司);TritonX-100 (Pharmacia 公司);BSA (杭州四季青公司);无水乙醇 (湖南师范大学试剂厂);二甲苯 (湖南师范大学试剂厂);中性树胶 (上海标本模型厂); β -淀粉样肽 (santa cruz 公司);免疫组化载玻片 (上海生工生物工程技术有限公司)。

1.1.4 主要溶液及配制 4% 多聚甲醛固定液的配制:在抽气橱内配置 8% 多聚甲醛贮液,将 8 g 粉状的多聚甲醛溶于 100 ml 去离子水中,加热并搅拌,当温度达 55~60℃ 时,加入 2 mol/L 氢氧化钠溶液直至溶液变清澈透明为止,凉至室温后,用氢氧化钠溶液调 pH 为 7.4,滤纸过滤后 4℃ 保存。平衡盐溶液 PBS、氢氧化钠溶液,封闭缓冲液、抗体稀释液、缓冲甘油封固剂等是实验室常用分析纯或粉剂,或自己配制。

1.1.5 主要仪器 SN-3 型小鼠脑立体定向仪 (日本 Nihon Kohden 公司);5 μ l 微量进样器 (上海医疗器械厂);Multimage II 凝胶成像系统 (美国 Alpha Innotech 公司);DYY-III-8B 稳压稳流型电泳仪 (北京六一仪器厂);全自动生化分析仪 (TOSHIBA 公司);LKB-III 型超薄切片 (瑞典 LKB 公司)。

1.2.1 分组 从正常 C57BL 实验小鼠中筛选出侧脑室注射手术死亡 4 只 (2 只麻醉意外死亡,2 只继发性颅内出血死亡),最后进入实验观察共 30 只,并随机分为 3 组:对照组 (脑室注射 PBS)、量子点组 (脑室注射非官能团水溶性量子点, QDs 组)、量子点-A β -Ab 组 (脑室注射量子点-A β -Ab 探针, QDs-A β -Ab 组),每组 10 只。

1.2.2 量子点-A β -Ab 探针的制备 取高质量水溶性 CdSe/ZnS 核-壳型氨基官能团量子点 (NH₂-QDs) 与 A β 抗体偶联,得到量子点剪辑的抗体偶联

物,即量子点-A β -Ab 探针,4℃ 冰箱保存备用。量子点-A β -Ab 探针由武汉珈源量子点技术开发有限公司制备,浓度为 1 μ M。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳鉴定量子点-A β -Ab 复合物探针性质 将量子点-A β -Ab 复合物探针加入琼脂糖凝胶板的加样孔中后,将制胶板放入电泳槽中,加入电泳液,打开电泳仪,电压为 100V,使样品向正极泳动;电泳完成后切断电源,取出凝胶置于紫外透射仪,302 nm 紫外激发, (595 ± 35) nm 滤光片成像,观察电泳结果,并照相记录。

1.2.4 从形态学角度观察量子点-A β -Ab 探针对活体动物组织形态的影响 参考 George 编制的小鼠立体定位图谱,小鼠用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (60 mg/kg) 后,固定在 SN-3 型 NARISHIGE 小鼠脑立体定向仪上^[3],在前囟后 0.3 mm、矢状缝旁开 1.2 mm 处用牙科钻钻破颅骨,5 μ l 微量进样器自定位点进针,深度 2.2 mm 缓慢注入 5 μ l 液体 (控制注射速度 0.4 μ l/min),注入后留针 5 min,再缓慢退出。缝合伤口,碘酊消毒,四环素软膏局部涂抹处理伤口预防感染,术后白炽灯照射保持体温至苏醒。QDs 组和 QDs-A β -Ab 组分别右侧侧脑室注射 5 μ L QDs、5 μ L QDs-A β -Ab 复合物,对照组予同等剂量 PBS;侧脑室注射后观察 1d 后,断头取脑或灌注固定。将分离的脑组织置于 3.7% 多聚甲醛中 4℃ 后固定 6 h,然后转入 20%、30% 的蔗糖溶液中脱水。48 h 后常规石蜡包埋,连续切片 (厚约 4 μ m) 贴附于多聚赖氨酸处理过的载玻片上,60℃ 烤箱过夜干燥备用。HE 染色,常规石蜡切片脱蜡至水,滴加苏木素液 8 s 后用自来水冲洗,盐酸酒精分化 10 s 后自来水冲洗,入碳酸锂液中反蓝 20 s 自来水冲洗,伊红复染 10 s,自来水冲洗,常规脱水、透明、中性树胶封片。尼氏染色,切片脱蜡,梯度酒精脱水后入蒸馏水;37℃ 温箱中用 1% 焦油坚牢紫水溶液浸染 20~30 min;蒸馏水速洗,用 95% 酒精分色,镜检至神经元尼氏体清晰;无水酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.5 动物行为观察、生化指标检测急性毒性反应 取 QDs 组、QDs-A β -Ab 组和对照组各 5 只,禁食不禁水 3~5 h;观察并记录 24 h 至 7 d 小鼠毒性反应情况及死亡情况,排除 1 只因麻醉意外死亡,7 d 后心脏穿刺取血;4℃,以 4000 转/min 离心 10 min 分离血清;全自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、尿素氮和肌酐水平。

1.3 统计学方法

所有数据使用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。各组数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数的比较用方差分析并对有统计意义的再进行组间比较。

2 结果

2.1 量子点-A β -Ab 探针的性质鉴定

琼脂糖凝胶电泳显示,量子点与 A β 1-42 抗体结合良好,量子点-A β -Ab 探针的量子点浓度较 NH₂-QDs 减低,为 1 μ M,泳动速度比 NH₂-QDs 快,302 nm 荧光可被紫外光激发,最大发射波长为 (605 \pm 10) nm,见图 1。

2.2 量子点-A β -Ab 探针对活体动物组织形态的影响

2.2.1 HE 染色 3 组小鼠脑组织海马 CA1 区 HE 染色可见 QDs 组和 QDs-A β -Ab 组海马 CA1 区细胞排列整齐、均匀,细胞结构完整,与对照组相似,见图 2。

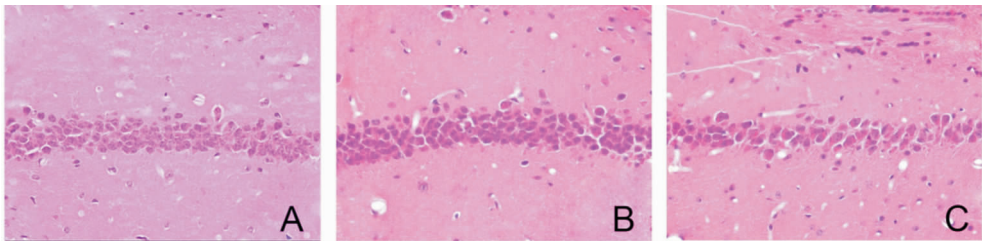
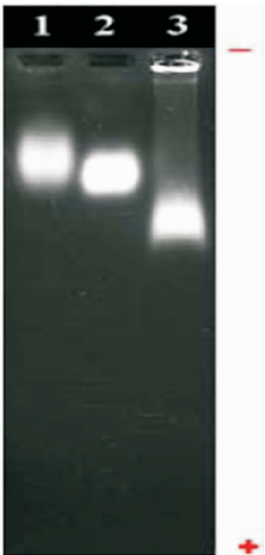


图 2 各组海马 CA1 区 HE 染色, $\times 400$ 。A: 对照组; B: QDs 组; C: QDs-A β -Ab 组。

2.2.2 尼氏染色 在光镜下, QDs 组和 QDs-A β -Ab 组小鼠海马 CA1 区示锥体细胞层神经元排列整

图 1 量子点-A β -Ab 复合物探针琼脂糖凝胶电泳图。从上往下为负极到正极,电压为 100 V, 70 min, 302 nm 紫外光激发, (595 \pm 35) nm 滤光片成像。1: NH₂-QDs; 2: Ac-QDs; 3: QDs-A β 。



齐且紧密,形态正常,胞浆中尼氏体清晰可见,与对照组无差异,见图 3。

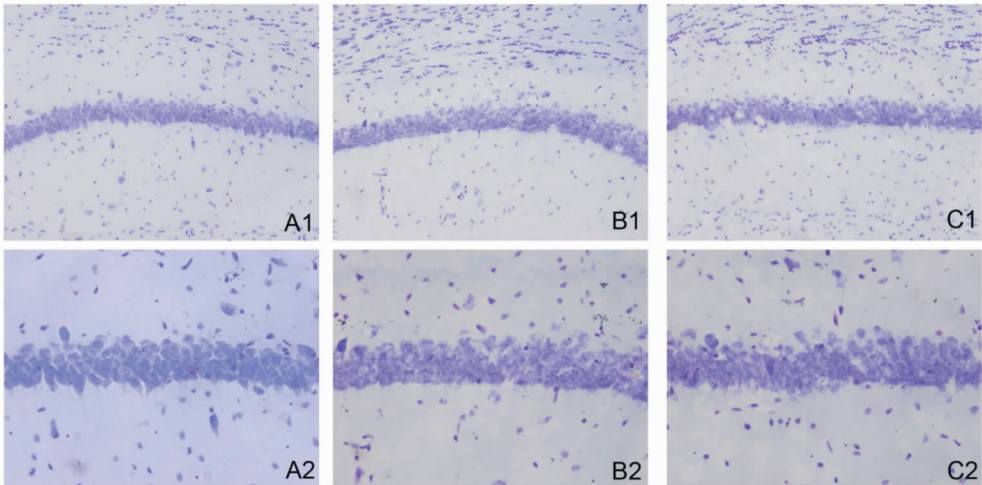


图 3 尼氏染色。A1: 对照组, $\times 200$; B1: QDs 组, $\times 200$; C1: QDs-A β -Ab 组, $\times 200$; A2: 对照组, $\times 400$; B2: QDs 组, $\times 400$; C2: QDs-A β -Ab 组, $\times 400$ 。

2.3 动物行为观察

侧脑室注射 QDs 和 QDs- $\text{A}\beta$ -Ab 探针,连续观察 7 d,3 组小鼠进食进水正常,二便正常,无举尾、无皮肤毛发颜色改变,无步态异常、无兴奋抑制反应;7 d 中 3 组小鼠均无死亡。

2.4 血清生化指标结果

QDs 组和 QDs- $\text{A}\beta$ -Ab 组血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)和肌酐(CRE)水平与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组 ALT、AST、BUN、CRE 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(μL)	AST(μL)	BUN(mmol/L)	CRE($\mu\text{mol/L}$)
QDs 组	58.33 \pm 7.54	409.67 \pm 31.12	15.27 \pm 3.97	33.60 \pm 4.46
QDs- $\text{A}\beta$ -Ab 组	56.67 \pm 11.36	367.33 \pm 21.96	14.50 \pm 3.32	26.36 \pm 6.24
对照组	41.00 \pm 9.46	349.33 \pm 37.33	13.20 \pm 2.75	23.93 \pm 6.78

3 讨论

量子点的毒性作用取决于多种因素,其化学组成、粒径、电荷、浓度、表面涂层(包括表面修饰的材料和官能团)的生物活性以及量子点使用剂量、作用时间、靶细胞类型等均可影响量子点对生物体的毒性^[3]。控制好量子点合成过程中的参数,掌握好量子点的表面修饰技术,尽可能减少重金属内核氧化可能,提高量子点的作用效用,降低使用浓度,增大粒径尺寸才能最大限度地减少量子点的生物毒性作用^[4]。

量子点荧光探针可以实现与目标生物分子的特异性结合,并对该分子进行荧光标记。研究发现量子点荧光探针生物相容性好,可以与生物分子进行有效偶联,细胞毒性小,安全性好,可广泛用于生物活体标记和检测^[5]。量子点作为一类新型的纳米荧光材料,已广泛应用于细胞标记、医学成像、药物筛选以及疾病的诊断和治疗等,特别在生命活动监测及长时间活体示踪等方面具有独特的优势^[6]。本实验选用高质量水溶性 CdSe/ZnS 核-壳型氨基官能团量子点,链接带 SH 的 β -淀粉样肽抗体分子,得到量子点- $\text{A}\beta$ -Ab 探针。鉴定发现探针的荧光效率高、光化学稳定,荧光强度与氨基官能团量子点相近。Chen 等^[7]将量子点与标记分子形成复合物,再与猴病毒 40(SV40)大的 T 抗原核定位信号(NLS)结合,经转染进入活细胞,通过荧光成像系统监测到复合物从细胞质到细胞核的运动过程,后续的动态示踪发现探针可逐渐进入细胞核或聚集到核周围,连续 1 周观察均未见量子点荧光探针对于细胞有明显的毒性作用。Chen 等^[8]将疏乙二醇修饰的水溶性量子点结合鼠抗人甲胎蛋白(AFP),制备功能化的水溶性量子点荧光探针,利用探针进行肝癌体内靶向成像,急性毒性实验发现裸鼠在 1 周内无明显异常或中毒反应。虽然以上研究证实量子点对细胞及裸鼠毒性作用较小,但量子点- $\text{A}\beta$ -Ab 探针是否能应用于 C57BL 小鼠的活

体实验,对小鼠的脑组织是否有损害作用,其生物毒性是我们必须关注的一个重要方面。

海马是大脑学习记忆的关键部位,具有高度有序化的板层结构,且各种学习记忆能力及行为异常与海马结构异常有密切关系,但是海马结构很容易受到外伤、脑炎、毒性重金属离子等损伤,海马也是 AD 最早和最易受损的部位^[9,10],因此,本实验研究以海马为观察点观察 QDs 和 QDs- $\text{A}\beta$ -Ab 探针所致的病理损害。本实验中 HE 染色光镜下见 QDs 组和 QDs- $\text{A}\beta$ -Ab 组小鼠海马 CA1 区细胞排列整齐、均匀,细胞结构完整,与对照组无明显区别。尼氏体的数量和大小,可随生理状态不同而发生变化,如神经元过度疲劳或受到损伤时,尼氏体变小,数量也显著减少甚至消失,当休息或损伤情况好转时,又可复原^[11]。因此,尼氏体可作为反映神经元机能状态的指标。QDs 组和 QDs- $\text{A}\beta$ -Ab 组小鼠海马 CA1 区锥体细胞层神经元排列整齐且紧密,形态正常,胞浆中尼氏体清晰可见。这些结果都表明 QDs 和 QDs- $\text{A}\beta$ -Ab 探针对小鼠的海马组织没有明显的损害。

量子点一般由晶体核心和外壳组成,其核心可为多种金属与非金属形成的化合物,如 III ~ V 族系列的量子点晶体核心有 InP、InAs、GaAs 和 GaN 等,II ~ VI 族系列的量子点可由 ZnS、ZnSe、CdSe 和 CdTe 组成晶体核心。晶体核心是量子点产生特征荧光的基础,但构成核心的金属元素,在细胞内可通过光降解或生物降解释放出金属离子如 Cd²⁺等,这些元素对机体存在潜在毒性。量子点的外壳不但具有结合某些功能基团如巯基、亲和素等的作用,还能对有潜在毒性的核心进行保护,防止其直接接触细胞或生物体,造成毒性损害。Chan 等^[12]发现 CdSe 量子点对人成神经纤维瘤(neuoblastoma, IMR-32)细胞株作用 24 h 后,细胞活性减少 50% ~ 60%,细胞凋亡率明显增加,甚至少数细胞染色体断裂,随后用 ZnS 包被的 CdSe 量子点重复上述

实验没有发现细胞异常。He等^[13]发现在CdTe-MA量子点表面包覆ZnS后,不仅能够提高量子产率,也能显著降低溶血率和细胞毒性。本实验使用的QDs和QD- $\alpha\beta$ -Ab探针量子点是传统的壳核结构,构成量子点的核含镉(Cd)元素,但在重金属核CdSe外包被了一层约0.5 nm厚的硫化锌(ZnS)壳,可以达到防止重金属核氧化反应产生的细胞或生物毒性作用。本实验对注射QDs和QD- $\alpha\beta$ -Ab探针量子点后小鼠进行为期1周的观察,发现实验组行为与对照组无差异且生长发育基本正常。生化指标检测进一步验证了实验剂量的量子点对小鼠的肝肾功能无明显影响。这些实验证明了本实验应用的量子点的重金属核的氧化反应和毒性释放在活体动物中相对较小,量子点及合成的探针生物相容性良好,不影响活体动物的生长发育及正常活动,将其用于实验动物的脑组织体内成像是安全可靠的。

量子点对活体动物的毒性受多方面影响,其中包括量子点本身的物化特性及外部环境条件。前者主要和量子点的尺寸、带电荷量、浓度、表面修饰物的生物活性等因素相关,后者则主要受外界氧化条件、光稳定性、机械稳定性等多方面因素的影响^[14]。本实验中使用的QDs和合成的QD- $\alpha\beta$ -Ab探针活体动物无明显毒性作用,生物相容性好,对脑组织特别是大脑学习记忆的关键部位海马区无明显损害。究其原因可能是:量子点金属核外包被硫化锌外壳,极大减少了重金属核的氧化反应和毒性释放;我们使用的是发射红色荧光的量子点,其尺寸较绿色荧光量子点更大,研究发现其毒性亦更小^[15];进行毒性检测的量子点浓度是根据实验工作浓度来确定的,该浓度较低,低浓度量子点对动物毒性作用较小。

参 考 文 献

- [1] Gao X, Cui Y, Levenson RM, et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(8): 969-976.
- [2] Watson A, Wu X, Bruchez M. Lighting up cells with quantum dots. *Bio Techniques*, 2003, 34(2): 296-300, 302-303.
- [3] Tsay JM, Michalet X. New light on quantum dot cytotoxicity. *Chem Biol*, 2005, 12(11): 1159-1161.
- [4] Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(1): 143-153.
- [5] Hoshino A, Manabe N, Fujioka K, et al. Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine: surface modification regulates biological function, including cytotoxicity. *J Artif Organs*, 2007, 10(3): 149-157.
- [6] Dubertret B. Quantum dots in biology: recent progress. *Med Sci (Paris)*, 2004, 20(8-9): 737-740.
- [7] Chen FQ, Gerion D. Noninvasive imaging of dots in mice. *Nano Lett*, 2004, 4(10): 18-27.
- [8] Chen LD, Liu J, Yu XF, et al. The biocompatibility of quantum dot probes used for the targeted imaging of hepatocellular carcinoma metastasis. *Biomaterials*, 2008, 29(31): 4170-4176.
- [9] Eichenbaum H. Conscious awareness, memory and the hippocampus. *Nat Neurosci*. 1999, 2(9): 775-776.
- [10] Eichenbaum H. How does the hippocampus contribute to memory?. *Trends Cogn Sci*, 2003, 7(10): 427-429.
- [11] Schmidt R, Schmid H, Curb D, et al. Early inflammation and dementia: a 5-year follow-up of the Honolulu Asia Aging Study. *Ann Neurol*, 2002, 5: 168-174.
- [12] Chan WH, Shiao NH, Lu PZ. CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals. *Toxicol Lett*, 2006, 167(3): 191-200.
- [13] He Y, Lu HT, Sai LM, et al. Microwave synthesis of water-dispersed CdTe/CdS/ZnS core-shell-shell quantum dots with excellent photostability and biocompatibility. *Advance Materials*. 2008, 20: 3416-3421.
- [14] Nellesmann C, Dalgard M, Lam HR, et al. The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity in vitro and in vivo. *Toxicol Sci*, 2003, 71(2): 251-262.
- [15] Lovrić J, Bazzi HS, Cuie Y, et al. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *J Mol Med*, 2005, 83(5): 377-385.