

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.22.004

文章编号: 1005-8982 (2018) 22-0019-08

双色上转换纳米荧光探针在套细胞淋巴瘤细胞靶向成像中的应用*

杨光¹, 郑如意², 董程骥¹, 陈梦茜¹, 金在顺¹

(1. 牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157011; 2. 江苏省徐州市矿山医院, 江苏 徐州 221006)

摘要: 目的 构建上转换纳米靶向探针, 并探究其在特异性标记套细胞淋巴瘤细胞株中的应用价值, 为体内套细胞淋巴瘤的靶向诊断提供理论依据和指导。**方法** 采用 H_2O_2 对 $NaYF_4:Er^{3+}$ 和 $NaYF_4:Yb^{3+}, Tm^{3+}$ 上转换纳米粒子表面进行氧化处理, 使该粒子由最初的疏水性转变为亲水性; 在 NHS、EDC 的作用下, 亲水性的 $NaYF_4:Er^{3+}$ 上转换纳米粒子与 CD20 单克隆抗体共价结合, $NaYF_4:Yb^{3+}, Tm^{3+}$ 上转换纳米粒子与 CD5 单克隆抗体共价结合; CD20 抗体- $NaYF_4:Er^{3+}$ 纳米粒子偶合物和 CD5 抗体- $NaYF_4:Yb^{3+}, Tm^{3+}$ 纳米粒子偶合物的混合悬液与套细胞淋巴瘤细胞株室温下孵育 2 h; CD20 抗体- $NaYF_4:Er^{3+}$ 纳米粒子偶合物和 $NaYF_4:Yb^{3+}, Tm^{3+}$ 纳米粒子的混合悬液与套细胞淋巴瘤细胞株室温下孵育 2 h; $NaYF_4:Er^{3+}$ 纳米粒子和 CD5 抗体- $NaYF_4:Yb^{3+}, Tm^{3+}$ 纳米粒子偶合物的混合悬液与套细胞淋巴瘤细胞株室温下孵育 2 h; 未偶联有任何抗体的 $NaYF_4:Er^{3+}$ 和 $NaYF_4:Yb^{3+}, Tm^{3+}$ 上转换纳米粒子的混合液与套细胞淋巴瘤细胞株室温下孵育 2 h; 使用配备有 980 nm 近红外激光的尼康 Eclipse Ti-S 倒置荧光显微镜对各组细胞进行上转换成像, 观察细胞表面上转换荧光的强度。**结果** 实验组细胞表面释放出蓝、绿双色的上转换纳米荧光, 但通过观察 3 组对照实验, 细胞表面却仅分别释放出单一的绿色荧光、蓝色荧光以及未见任何荧光。**结论** 上转换纳米粒子与 CD20 或 CD5 抗体成功共价偶联, 可以对套细胞淋巴瘤细胞株进行特异性标记、成像。

关键词: 上转换荧光; 纳米探针; 生物成像; 套细胞淋巴瘤; 免疫标记

中图分类号: R733.4

文献标识码: A

Application of dual color upconversion nanofluorescence probes in cell targeted imaging of mantle cell lymphoma*

Guang Yang¹, Ru-yi Zheng², Cheng-ji Dong¹, Meng-xi Chen¹, Zai-shun Jin¹

(1. Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China; 2. The Mine Hospital of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu 221006, China)

Abstract: Objective To construct the upconversion targeted nanoprobes, and explore their application value in the specific labeling of mantle cell lymphoma cell lines, so as to provide theoretical basis and guidance for the targeted diagnosis of mantle cell lymphoma *in vivo*. **Methods** H_2O_2 was used to oxidize the surfaces of the $NaYF_4:Er^{3+}$, $NaYF_4:Yb^{3+}$ and Tm^{3+} upconversion nanoparticles and change their character from hydrophobicity to hydrophilicity. With the help of NHS and EDC, hydrophilic $NaYF_4:Er^{3+}$ upconversion nanoparticles were covalently combined with CD20 monoclonal antibody while $NaYF_4:Yb^{3+}$ and Tm^{3+} upconversion nanoparticles were covalently combined with CD5 monoclonal antibody respectively. The mixture containing CD20 antibody- $NaYF_4:Er^{3+}$

收稿日期: 2018-03-28

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81172204); 黑龙江省肿瘤创新团队项目 (No: 2013TD009); 牡丹江医学院研究生创新科研项目 (No: 2016YJSCX-03MY)

[通信作者] 金在顺, E-mail: zaishun5@126.com

upconversion nanoparticle conjugates and CD5 antibody- $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}$ and Tm^{3+} upconversion nanoparticle conjugates was incubated with mantle cell lymphoma cell lines at room temperature for 2 h. The mixture containing CD20 antibody- $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ upconversion nanoparticle conjugates and $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}$ and Tm^{3+} upconversion nanoparticles was incubated with mantle cell lymphoma cell lines at room temperature for 2 h. The mixture including $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ upconversion nanoparticles and CD5 antibody- $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}$ and Tm^{3+} upconversion nanoparticle conjugates was incubated with mantle cell lymphoma cell lines at room temperature for 2 h. The mixture including dual color upconversion nanoparticles without any antibody was incubated with mantle cell lymphoma cell lines at room temperature for 2 h. The cells in all the groups were imaged using a Nikon Eclipse Ti-S inverted fluorescence microscope equipped with 980 nm near infrared laser, and the intensity of fluorescence conversion on the surface of the cells was observed. **Results** On the surface of the cells in the experimental group, blue and green dual color upconversion fluorescence could be observed; however, through observation of the 3 control groups, only single green fluorescence, blue fluorescence and no fluorescence were released from the cells surface, respectively. **Conclusions** Upconversion nanoparticles are covalently coupled with CD20 or CD5 antibody, which can be used for specific labeling and imaging of mantle cell lymphoma cell lines.

Keywords: upconversion fluorescence; nanoprobe; biological imaging; mantle cell lymphoma; immune labeling

套细胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma, MCL) 是非霍奇金淋巴瘤 (non-hodgkin lymphoma, NHL) 中的一种亚型, 约占全部 NHL 的 6%^[1]。免疫表型为成熟的 B 细胞表型, 即细胞表面表达有大量的 CD20 和 CD5 抗原^[2-3]。由于其恶性程度高、侵袭速度快^[4], 因此 MCL 的早期诊断及早期治疗成为延长生存期的关键。

上转换纳米颗粒 (upconversion nanoparticles, UCNPs) 作为一种新型的荧光标志物, 具有上转换功能强大、检测敏感性高^[5-7]、化学稳定性好以及细胞毒性很低等^[8]一系列优点, 在 980 nm 近红外光 (near infrared, NIR) 激发下将释放出明亮的上转换荧光 (upconversion fluorescence, UCL)。基于抗原、抗体之间的特异性免疫反应原理, 本研究将采用 UCNPs 与相应抗体偶联的方法, 使该粒子具有靶向性, 进而对 MCL 细胞株进行靶向成像。现将对 UCNPs 在 MCL 细胞靶向成像中的应用进行探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ 和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}$, Tm^{3+} 纳米颗粒由牡丹江医学院电镜室提供, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 购自北京亚太恒信生物科技有限公司, 2-吗啉乙磺酸 (2-morpholinoethanesulfonic acid, MES, 99%)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸酸 [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC·HCl, 98%]、N-羟基琥珀酰

亚胺 (N-Hydroxysuccinimide, NHS, 98%) 购自上海阿拉丁试剂公司, RPMI 1640 培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, 双氧水 (H_2O_2 , 30%) 购自辽宁泉瑞试剂有限公司, CD20 (Clone: 2H7) 和 CD5 (Clone: UCHT2) 单克隆抗体购自美国 BD 生物科技公司, Jeko-1 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.2 仪器 Night OWL 小动物活体成像系统购自德国 Berthold 公司, Eclipse Ti-S 倒置荧光显微镜购自日本尼康公司, 傅里叶转换红外光谱仪 (fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, WG1233B3-980 nm 半导体激光系统购自北京艾纳捷光电科技有限公司, 超声波细胞破碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司, 温控磁力搅拌器购自常州普天仪器制造有限公司, CO_2 培养箱、离心机和微量移液枪均购自美国 Thermo 公司, StatSpin Cytofuge 12 细胞甩片机购自北京自然基因科技有限公司。

1.2 纳米颗粒疏水性向亲水性的转化

双氧水作为一种强氧化剂, 对纳米颗粒表面油酸盐配体碳碳双键进行直接氧化。通过该方法可将有疏水特性的纳米颗粒转变为亲水性。将 0.1 g 预先制备好的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}$, Tm^{3+} 纳米颗粒和 8 ml 的 H_2O_2 混匀, 在室温下磁力搅拌 1 h。氧化结束后, 通过离心弃除上清液。氧化后的沉淀加入去离子水在超声波细胞破碎仪下充分粉碎洗涤, 之后离心, 最后将沉淀在 70℃ 恒温箱中干燥 24 h。使用同样的方法 $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ 纳

米粒子也由最初的亲水性转变为疏水性。

1.3 氧化后的纳米颗粒与 CD20/CD5 抗体偶联

取氧化后的 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米颗粒 0.05 g, 向其中加入 MES 并将混合液在超声波细胞破碎仪的作用下充分粉碎 5 min。超声降解粉碎机功率为 600 W。在转速 4 000 r/min 的条件下离心, 弃除上清液。然后向沉淀中加 14 ml MES、0.005 g EDC、0.015 g NHS 在室温下磁力搅拌 2 h。磁力搅拌结束后, 将混合液离心、去除上清液。再向沉淀中加入 PBS 在超声波细胞粉碎机作用下充分粉碎洗涤 2 次, 离心、去上清液并向沉淀中加 5 ml PBS 和 50 μl CD5 单克隆抗体 (1 : 100 稀释), 将其放在摇床上振荡 2 h。最后将加入抗体的混合液放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。即连接有 CD5 抗体的 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米粒子成功制备。使用同样的方法, 偶联有 CD20 单克隆抗体的 $\text{NaYF}_4 : \text{Er}^{3+}$ 纳米探针也成功制备。

1.4 UCNPs 上转换性能检测及傅里叶波谱分析

取适量偶联有相应抗体的 UCNPs 悬液, 使用配备有 980 nm 近红外激光的 Night OWL 小动物活体成像系统对其进行成像。激发功率分别为 0、0.7 和 1.0 W, 以此来验证 UCNPs 的发光性能。取仅仅氧化后的, 与 NHS、EDC 反应后的以及与相应抗体偶联后的 UCNPs, 使用 FT-IR 对其进行波谱分析, 以此间接验证该粒子最终是否已被成功的生物功能化以及是否已与相应的抗体成功偶联。

1.5 UCNPs 细胞毒性检测

吸取 200 μl Jeko-1 细胞悬液 (细胞数 : 6.3×10^5 个) 接种到 24 孔培养板内, 共接种 15 个孔。其中实验组 12 个孔, 对照组 3 个孔。然后向 15 个培养孔内分别加 800 μl 含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。实验组中的 12 个培养孔每 4 个孔为一组, 共分为 3 组。每组分别滴加 20、40、80、160 μl UCNPs 悬液。将 24 孔培养板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度为 5% 的条件下分别培养 24、48 和 72 h。在不同的时间点使用台盼蓝对细胞进行染色并利用血球计数板进行活细胞计数。通过以下公式计算细胞活性进而评估 UCNPs 的细胞毒性 : 细胞活性 (%) = (实验组活细胞数 / 对照组活细胞数) \times 100%。

1.6 细胞培养和成像

细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养, 培养箱温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度为 5%。取对数

生长的细胞用于该实验。为了使细胞均匀分布于载玻片上, 吸取 Jeko-1 细胞悬液 100 μl (细胞数 : 1.5×10^5 个) 加入细胞甩片机加样孔内, 1 000 r/min 离心 5 min, 使细胞均匀分布于载玻片。丙酮固定细胞后, 向 Jeko-1 细胞所在区域滴加 CD20 抗体 $\text{NaYF}_4 : \text{Er}^{3+}$ 纳米探针悬液和 CD5 抗体 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米探针悬液的混合液 300 μl , 室温下湿盒内孵育 2 h。在对照实验中, 向 Jeko-1 细胞所在区域滴加 $\text{NaYF}_4 : \text{Er}^{3+}$ 纳米探针悬液和 CD5 抗体 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米探针悬液的混合液 300 μl ; 向 Jeko-1 细胞所在区域滴加 CD20 抗体 $\text{NaYF}_4 : \text{Er}^{3+}$ 纳米探针悬液和 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米探针悬液的混合液 300 μl ; 向 Jeko-1 细胞所在区域滴加 $\text{NaYF}_4 : \text{Er}^{3+}$ 纳米探针悬液和 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米探针悬液的混合液 300 μl , 在同样的条件下进行孵育。孵育结束后用 PBS 充分洗涤 3 次, 彻底去除多余的、没有和细胞结合的纳米探针, 使用配备有 980 nm 近红外激光的尼康 Eclipse Ti-S 倒置荧光显微镜进行细胞成像。

2 结果

2.1 UCNPs 细胞毒性及上转换性能

为了探究 UCNPs 的细胞毒性, 使用台盼蓝对 Jeko-1 细胞染色的方法来确定不同量的 UCNPs 与细胞培养不同时间后其对细胞生长所产生的影响。设定 UCNPs 探针悬液体积梯度, 即 20、40、80 和 160 μl , 在同样的生理条件下分别与 Jeko-1 细胞培养 24、48 和 72 h, 然后进行台盼蓝染色、活细胞计数, 并计算细胞活性。由图 1A 可见, 随着 UCNPs 探针悬液体积的增加以及 UCNPs 探针与细胞孵育时间的延长, 各组细胞的细胞活性几乎均处于 90% 以上, 并未发生明显的降低。同时, 将台盼蓝溶液与细胞悬液按 1 : 1 的比例混匀, 然后将混合液加入血球计数板内, 通过倒置显微镜直观的观察活细胞的比例。由于已经死亡的细胞可以被台盼蓝染为深蓝色, 见图 1B 可见, 可以看出血球计数板内死细胞数是非常的少, 而透亮的活细胞则占较高比例。此外, 为进一步明确 UCNPs 的上转换性能的高效性, 吸取少量偶联有相应抗体的 UCNPs 悬液, 通过使用小动物活体成像系统对粒子探针的上转换发光性能进行检测。由图 2 可见, 在未给予近红外光激发的情况下, UCNPs 并未产生 UCL。然而当近红外光的激发功率达到 0.7 W 时, UCNPs 探针悬液却释放出明亮的 UCL。并且通过肉眼观察发现, 随着近

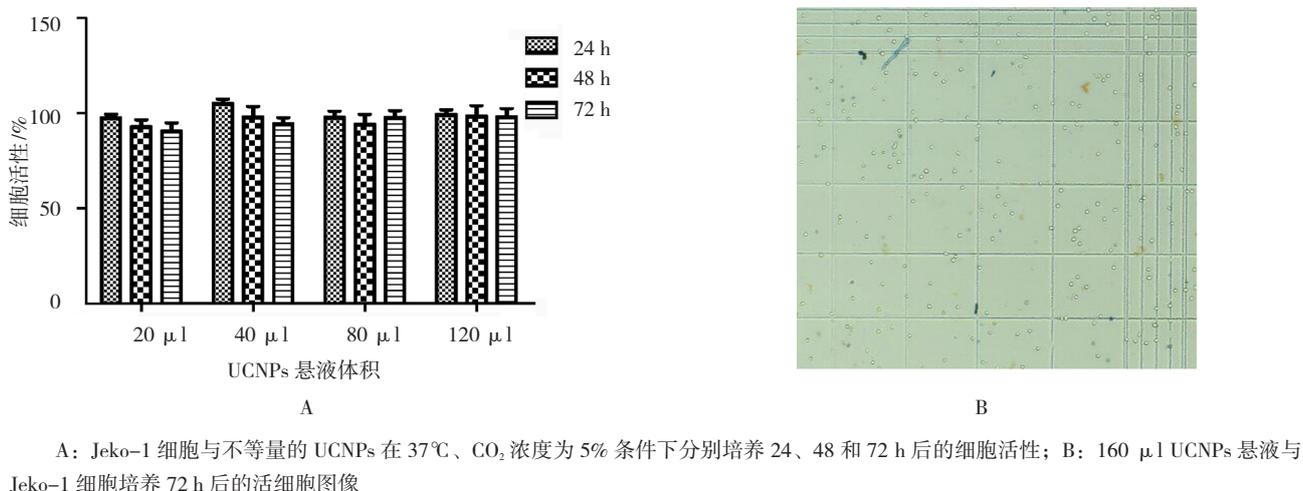
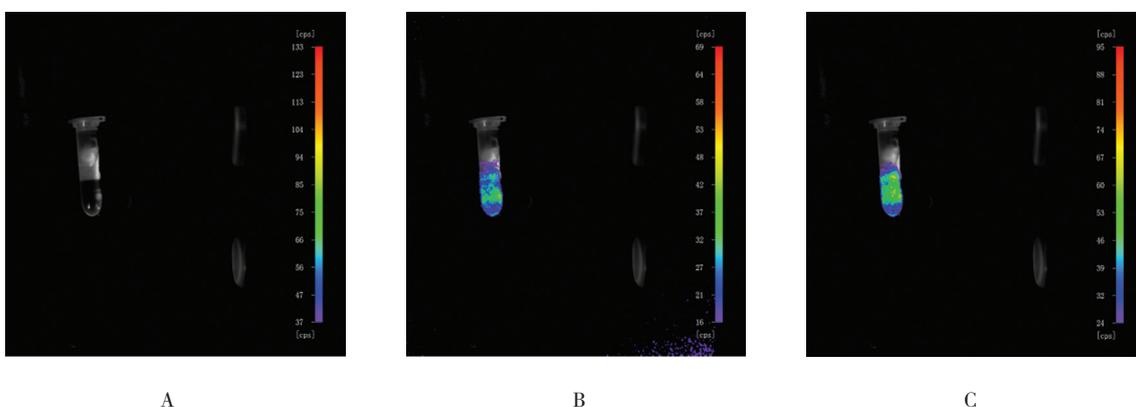


图 1 UCNPs 细胞毒性检测结果



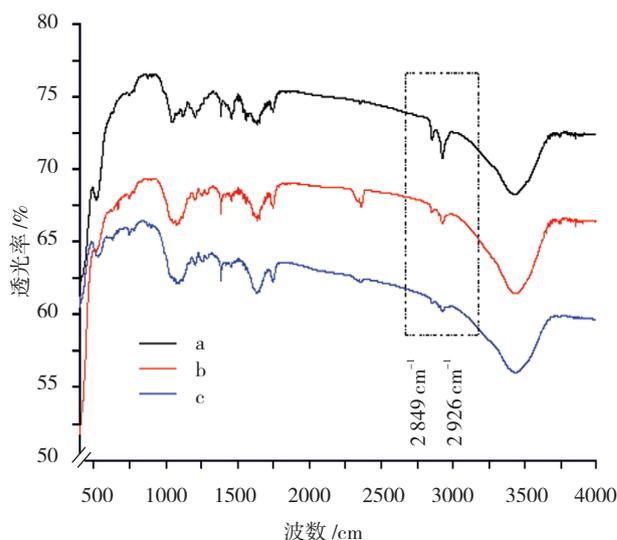
A: 未给予近红外激光激发; B: 近红外激光激发功率为 0.7 W; C: 近红外激光激发功率为 1.0 W

图 2 UCNPs 悬液的上转换成像

红外光激发功率的增加 (P=1 W), 该探针所产生的 UCL 的强度也随之增强。

2.2 UCNPs 的表面氧化及生物功能化

由于最初的 UCNPs 表面被油酸所包覆, 因而其表现为疏水特性。为了使其具有水溶性, 使用 H₂O₂ 对粒子表面油酸配体上的碳碳双键 (R-HC=CH-R') 进行氧化, 以此形成带有更多羧基 (-COOH) 的壬二酸。为了确定 UCNPs 是否已与单克隆抗体成功偶联, 采用一种间接的检测方法对其进行验证, 即使用傅里叶转换红外光谱仪 (FT-IR) 对粒子进行波谱分析检测。见图 3, a、b、c 分别代表仅仅氧化后 UCNPs、与 NHS、EDC 反应的 UCNPs 和与单克隆抗体反应后的 UCNPs 的波谱。可以看出波数在 2 849 cm⁻¹ 和 2 926 cm⁻¹ 处, a、b、c 所代表的 3 种经过不同处理的粒子的吸收峰强度逐渐下降。



a: UCNPs 被 H₂O₂ 氧化后的 FT-IR 波谱; b: UCNPs 与 NHS、EDC 反应后的 FT-IR 波谱; c: UCNPs 与抗体反应后的 FT-IR 波谱

图 3 UCNPs 的 FT-IR 波谱分析结果

2.3 细胞免疫标志和成像

在这项研究中, 由于细胞表面的抗原与 UCNP 上偶联的单克隆抗体之间发生特异性的免疫反应, Jeko-1 细胞得以被特异性的识别标志。抗体的羧基基团和纳米粒子表面的氨基基团在 NHS 和 EDC 的辅助下将发生冷凝反应^[9], 进而 UCNP 与单克隆抗体发生共价交联, 见图 4。因此根据以上原理, 氧化后的 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米颗粒与 CD5 抗体发生交联进而牢固连接形成 CD5 抗体-UCNP 轭合物, 同样 CD20 抗体通过该方法与 $\text{NaYF}_4 : \text{Er}^{3+}$ 纳米粒子共价结合形成 CD20 抗体-UCNP 轭合物。基于 Jeko-1 细胞表面表达大量 CD20 和 CD5 抗原, 以及细胞表面的抗原与纳米颗粒上的抗体之间发生的特异性免疫反应, Jeko-1

细胞能够被 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ UCNP 和 $\text{NaYF}_4 : \text{Er}^{3+}$ UCNP 特异性标志。

为了通过细胞实验来证实功能化后的 UCNP 可以对 Jeko-1 细胞进行免疫标志, 将 Jeko-1 细胞与 UCNP-CD20 抗体轭合物和 UCNP-CD5 抗体轭合物的混合液室温孵育 2 h, 再使用 PBS 对细胞充分清洗以除去未与细胞结合的残存粒子。然后使用配备有 980 nm 近红外激光的共聚焦显微镜对细胞进行上转换成像, 激发功率为 1.5 W, 曝光时间为 2 s。由图 5 可见, 将明场像和暗场像进行重叠, 细胞的形状和位置并未发生任何改变。在 $\times 20$ 物镜下发现该细胞表面释放明亮的蓝、绿双色 UCL, 且释放双色荧光的 UCNP 在细胞表面分布的部分区域并未发生重叠, 同时在细胞

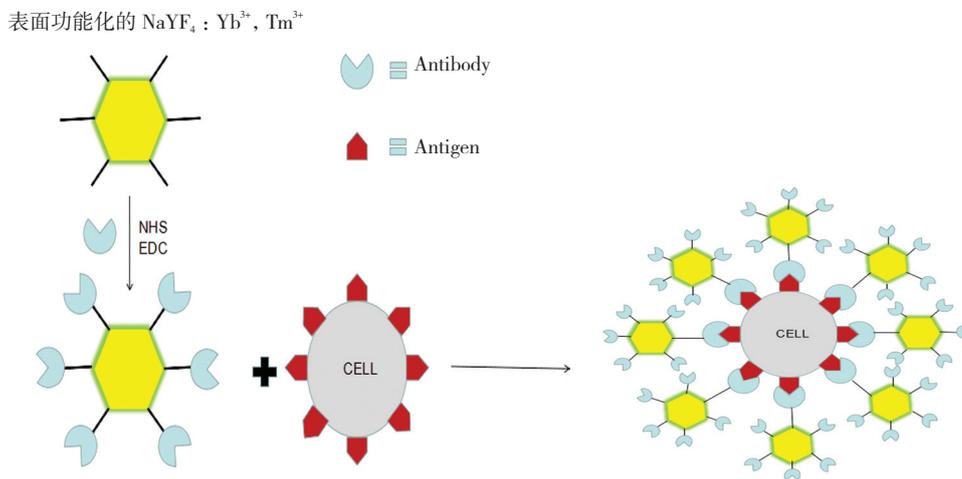
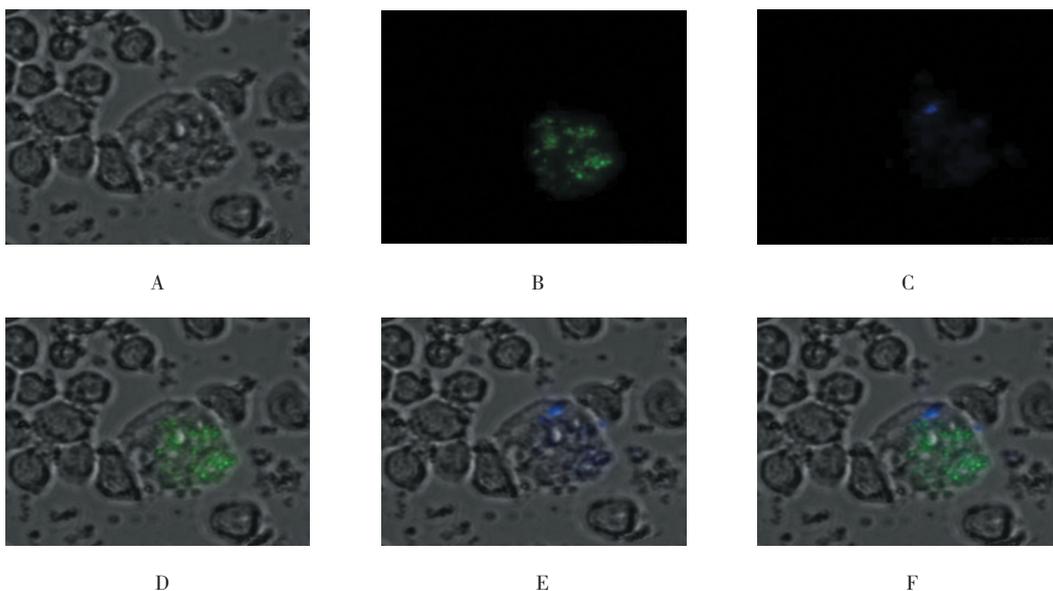


图 4 细胞的免疫标志



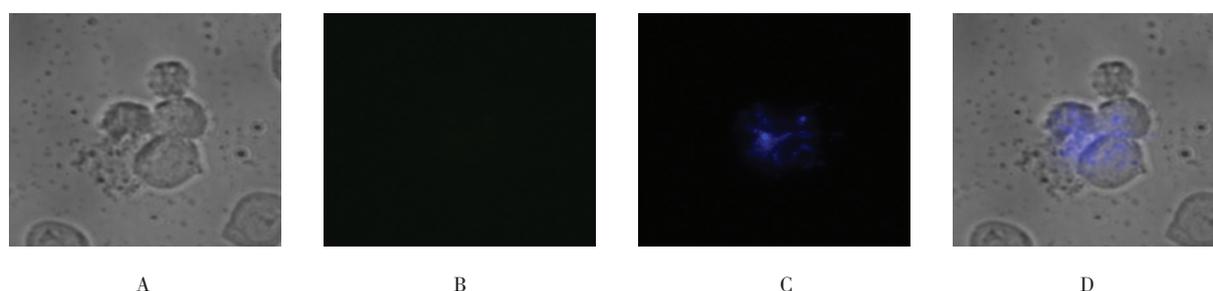
A: 明场像; B: 绿光通道暗场像; C: 蓝光通道暗场像; D: A 与 B 的重叠像; E: A 与 C 的重叠像; F: D 与 E 的重叠像

图 5 Jeko-1 细胞与 $\text{NaYF}_4 : \text{Er}^{3+}$ -CD20 抗体和 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ -CD5 抗体共同孵育后上转换荧光图像 (20 μm)

外区域也未见残存的发光粒子, 这意味着 UCNP 的确认仅仅分布于细胞上。

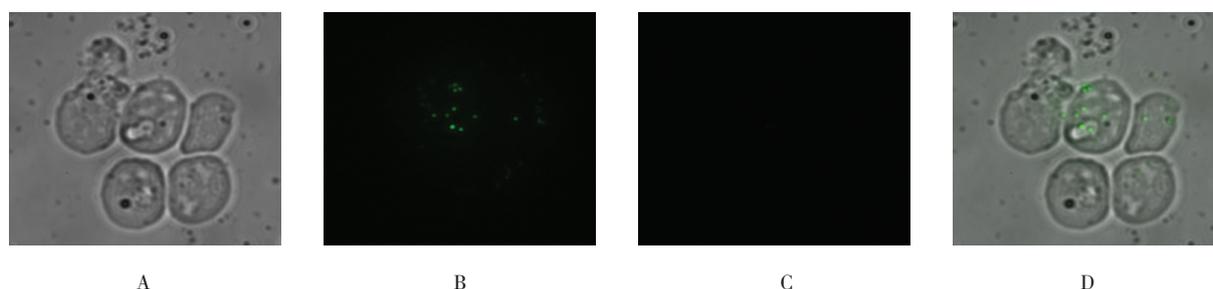
进一步验证是否细胞与 UCNP 之间的连接是基于抗原/抗体介导的特异性免疫反应。在同样的孵育条件下, 将 Jeko-1 细胞与 $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ 纳米探针悬液和 CD5 抗体 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米探针悬液的混合液共同孵育。在 UCNP 未与 CD20 抗体偶联的情况下与 Jeko-1 细胞共同孵育后, 细胞表面仅可见 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 释放明亮的蓝色 UCL, 而未见 $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ 所释放的绿色荧光 (见图 6)。此外, 将 Jeko-1 细胞与 CD20 抗体

$\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ 纳米探针悬液和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米探针悬液的混合液共同孵育, 一定时间后进行 UCL 成像。UCNP 在未与 CD5 抗体偶联的情况下与 Jeko-1 细胞共同孵育后, 细胞表面仅可见 $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ 释放的明亮的绿色 UCL, 而未见 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 释放的蓝色 UCL (见图 7)。最后将 Jeko-1 细胞与未偶联任何抗体的 $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ 纳米探针悬液和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米探针悬液的混合液共同孵育, 然后进行上转换成像。由于 UCNP 悬液中未添加任何抗体, Jeko-1 细胞表面并未释放出蓝、绿双色 UCL (见图 8)。



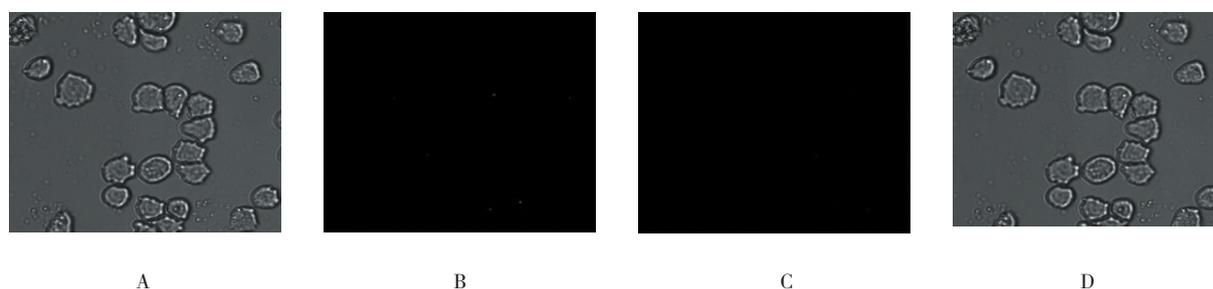
A: 明场像; B: 绿光通道暗场像; C: 蓝光通道暗场像; D: A、B 和 C 的重叠像

图 6 Jeko-1 细胞与 $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ 和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ -CD5 抗体共同孵育后上转换成像



A: 明场像; B: 绿光通道暗场像; C: 蓝光通道暗场像; D: A、B 和 C 的重叠像

图 7 Jeko-1 细胞与 $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ -CD20 抗体和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 共同孵育后上转换成像



A: 明场像; B: 绿光通道暗场像; C: 蓝光通道暗场像; D: A、B 和 C 的重叠像

图 8 Jeko-1 细胞与 $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$ 和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 共同孵育后上转换成像 (20 μm)

3 讨论

UCNPs 在一定量的范围内无毒性, 对细胞的生长并未产生抑制作用, 同时也不会导致细胞死亡。该粒子具有强大的上转换性能, 即使激光的功率非常

低依然能够高效的将低能量的近红外光转变为高能量的可见光, 在将来极有可能成为一种非常理想的生物探针应用于生物医学成像。通过 FT-IR 波谱分析, 在波数 $2\ 849\ \text{cm}^{-1}$ 和 $2\ 926\ \text{cm}^{-1}$ 处 a、b、c 波谱

显示 UCNP 的吸收峰强度逐渐降低, 间接证明氧化后 UCNP 与 NHS、EDC 成功连接以及与单克隆抗体成功偶联。双氧水对 UCNP 表面的氧化处理以及 NHS、EDC 与 UCNP 的成功结合为 UCNP 与单克隆抗体的成功偶联奠定基础, 最终 UCNP 与单克隆抗体共价结合, 具有靶向性的 UCNP 得以被成功制备。在 UCNP 偶联有 CD20 和 CD5 单克隆抗体的情况下, UCNP 与 Jeko-1 细胞孵育一定时间后进行上转换成像, 细胞表面释放出明亮的双色 UCL, 这说明细胞表面已标记有大量的上转换纳米粒子, CD5 抗体-UCNP 复合物和 CD20 抗体-UCNP 复合物能够和 Jeko-1 细胞表面相结合。而 UCNP 未与某种抗体偶联直接与 Jeko-1 细胞孵育, 细胞表面则并未释放出相应的 UCL, 这意味着细胞与 UCNP 的成功结合与 UCNP 是否与相应的抗体成功偶联有着必然的联系, 细胞之所以被 UCNP 所标记是由于细胞表面的抗原和 UCNP 上已偶联的抗体之间发生的特异性免疫反应所致, 偶联有相应抗体的 UCNP 能够对 MCL 细胞株进行靶向标记。

目前, 用于淋巴瘤细胞株靶向成像的方式主要有细胞免疫荧光技术、量子点靶向标志技术、纳米粒子靶向标志技术、放射免疫示踪法等。细胞免疫荧光技术是最为常用且较为成熟的一种细胞靶向标志技术, 同样是根据抗原/抗体之间的特异性免疫反应, 细胞被特定的荧光素所标志。然而, 由于荧光素具有较高的光漂白性^[10], 易发生荧光淬灭, 因此该技术对实验条件要求较为苛刻, 自加荧光二抗起所有的步骤必须在避光、黑暗的环境中进行, 实验结束后需尽快在荧光显微镜下观察, 以防荧光淬灭影响观察效果。量子点虽然已经成功的克服以上缺点, 但是其固有毒性和化学不稳定性却引起人们的广泛关注^[11]。放射免疫示踪法也已被研究应用于细胞的靶向标志, 其具有检测敏感性高、特异性强、简便易行等优点^[12], 然而该方法所使用的标志物为同位素示踪物, 该示踪物具有一定的放射性, 长时间接触会对实验人员的身体健康造成一定的辐射损伤^[13]。

而 UCNP 则具有独特的光学性能, 其检测敏感性高且不具有光漂白性^[14], 同时细胞对 980 nm 近红外光的吸收非常低, 将导致来自细胞的自体荧光强度较低, 进而增加了图像信噪比, 极大地改善了图像的质量^[15]。基于以上优点, 在医学基础研究和临床应用方面, UCNP 有潜力替代传统的荧光探针应用于生物分子标志、细胞靶向成像和动物活体成像^[16-17]。最近,

有研究人员^[9, 18-19]已报道, 上转换纳米探针在体内和体外生物成像中的应用进展。在以上的生物成像研究中, 经常选择宫颈癌细胞、卵巢癌细胞、结直肠癌细胞、人口腔表皮样癌细胞等贴壁细胞作为靶细胞进行实验且均取得理想的实验结果。证实在生物成像应用中, 基于上转换纳米材料的荧光探针可以被应用于肿瘤细胞的靶向生物标志。然而关于 MCL 细胞株甚至其他悬浮细胞的相关报道却并不多见。UCNP 在 MCL 细胞靶向成像中的应用, 为其将来应用于小鼠体内以及临床病人体内 MCL 病灶的靶向检测奠定基础。同时, CD20 单克隆抗体又被称之为美罗华, 是一种高效的临床化疗药物用于治疗 B 细胞来源的淋巴瘤^[20]。因此, UCNP 与 CD20 抗体的结合不仅仅有助于 MCL 的靶向检测, 同时对肿瘤病灶也起到精准治疗的效果, 减少对正常细胞、组织造成不必要的损伤。受此启发, UCNP 还具有巨大的潜力应用于其他恶性肿瘤的早期检测、靶向定位和精准治疗, 对未来医学事业的发展具有重要的指导意义。

综上所述, 本研究发明一种新颖的上转换纳米粒子的氧化方法, 仅仅使用双氧水对粒子表面进行氧化。与勒米厄-冯鲁德洛夫试剂相比, 该氧化方法步骤更加简便、耗时更少。且该方法并未对纳米粒子的形态大小、结构、组成、上转换发光性能产生不利的影响。通过体外实验, 在 MCL 细胞表面看到强烈、明亮的上转换荧光信号。同时在 980 nm 近红外光的激发下, 并未看到肿瘤细胞产生的自体荧光。表面修饰功能化后的 UCNP 在 NHS、EDC 的作用下与抗 CD20/CD5 抗体结合形成 UCNP-CD20/CD5 抗体耦合物。UCNP-CD20/CD5 抗体耦合物作为一种高效的荧光标志物应用于 Jeko-1 细胞的免疫标志和成像。通过对照实验, 本研究发现, UCNP-CD20/CD5 抗体耦合物具有靶向性, 能够对 MCL 细胞进行特异性标志, 为以后活体内 MCL 病灶的靶向检测奠定基础, 同时也为以后对其他恶性肿瘤的早期诊断、靶向定位、精准治疗提供理论基础和实验依据。

参 考 文 献:

- [1] SKARBNIK A P, GOY A H. Lenalidomide for mantle cell lymphoma[J]. Expert Review of Hematology, 2015, 8(3): 257-264.
- [2] HRGOVIC I, HARTMANN S, STEFFEN B, et al. Cutaneous involvement as a rare first sign of systemic mantle cell lymphoma: a case report and review of the literature[J]. Molecular & Clinical Oncology, 2016, 4(5): 728-732.

- [3] SMITH M R. Should there be a standard therapy for mantle cell lymphoma[J]. *Future Oncology*, 2017, 7(2): 227-237.
- [4] INBAL H H, DANIEL R, SHIRI W, et al. Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes[J]. *Cancer Letters*, 2015, 364(1): 59-69.
- [5] WANG F, BANERJEE D, LIU Y S, et al. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy[J]. *Analyst*, 2010, 135(8): 1839-1854.
- [6] MAO Y B, HUANG J Y, OSTROUMOV R, et al. Synthesis and luminescence properties of erbium-doped Y₂O₃ nanotubes[J]. *Journal of Physical Chemistry C*, 2008, 112(7): 2278-2285.
- [7] CHANDRA S, DEEPAK F L, GRUBER J B, et al. Synthesis, morphology, and optical characterization of nanocrystalline Er³⁺: Y₂O₃[J]. *Aps Meeting*, 2010, 114(2): 874-880.
- [8] WANG X, LI Y. Monodisperse nanocrystals: general synthesis, assembly and their applications[J]. *Chemical Communications*, 2007, 28(28): 2901-2910.
- [9] WANG M, MI C C, WANG W X, et al. Immunolabeling and NIR-excited fluorescent imaging of hela cells by using NaYF₄: Yb, Er upconversion nanoparticles[J]. *Acs Nano*, 2009, 3(6): 1580-1586.
- [10] WE MOERNER. New directions in single-molecule imaging and analysis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(31): 12596-12602.
- [11] BYRNE S J, WILLIAMS Y, DAVIES A, et al. "Jelly Dots": Synthesis and cytotoxicity studies of CdTe quantum dot-gelatin nanocomposites[J]. *Small*, 2007, 3(7): 1152-1156.
- [12] 吴晓伟, 张现忠. 孕激素受体靶向的放射性药物研究进展 [J]. *同位素*, 2017, 30(1): 63-70.
- [13] 陆克义, 李险峰. 甲状腺疾病患者 ¹³¹I 治疗后对他人的辐射危害评价 [J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2004, 28(5): 226-229.
- [14] WEST J L, HALAS N J. Engineered nanomaterials for biophotonics applications: improving sensing, imaging, and therapeutics[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2003, 5(1): 285-292.
- [15] JALIL R A, ZHANG Y. Biocompatibility of silica coated NaYF₄ upconversion fluorescent nanocrystals[J]. *Biomaterials*, 2008, (29): 4122-4128.
- [16] SHALAV A, RICHARDS B S, TRUPKE T, et al. Application of NaYF₄: Er³⁺ up-converting phosphors for enhanced near-infrared silicon solar cell response[J]. *Applied Physics Letters*, 2005, 86(1): 013505-013508.
- [17] BUNZLI J C. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging[J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110(5): 2729-2755.
- [18] CHATTERJEE D K, RUFAlHAH A J, ZHANG Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(7): 937-943.
- [19] CAO T, YANG Y, GAO Y, et al. High-quality water-soluble and surface-functionalized upconversion nanocrystals as luminescent probes for bioimaging[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(11): 2959-2968.
- [20] ZAJA F, FERRERO S, STELITANO C, et al. Second-line rituximab, lenalidomide, and bendamustine in mantle cell lymphoma: a phase II clinical trial of the Fondazione Italiana Linfomi[J]. *Haematologica*, 2017, 102(5): e203-e206.

(张蕾 编辑)