

硫化铅量子点的结肠癌近红外 IIb 区荧光成像研究

孙静文¹, 魏国光¹, 钱余义¹, 郑彬彬¹, 高 帅¹, 伊庆同^{2*}, 陆 伟^{1*}

- (1. 复旦大学药学院, 智能化递药教育部重点实验室, 聚合物分子工程国家重点实验室, 上海 201203;
2. 复旦大学附属浦东医院盆底中心, 上海 201399)

摘要: 近红外 IIb 区 (near-infrared-IIb, NIR-IIb, 1 500~1 700 nm) 荧光因长发射波长, 在穿透生物组织时可显著降低光散射及组织自发荧光的干扰, 实现更深层影像及更高的空间分辨率。采用硫化铅 (PbS) 制备了一种 NIR-IIb 荧光量子点 (quantum dots, QDs)。通过控制 PbS 核的大小调整 PbS QDs 的发射波长, 并采用阳离子交换法生成硫化镉 (CdS) 壳层, 合成核壳结构的 PbS/CdS 量子点 (core/shelled lead sulfide/cadmium sulfide quantum dots, CSQDs)。通过对 CSQDs 表面进行聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰, 提高 CSQDs 在水溶液中的稳定性。经 PEG 修饰的 CSQDs (PEG-CSQDs) 荧光发射峰为~1 550 nm, 量子效率为 7.2%。动物实验经复旦大学药学院实验动物伦理委员会 (IACUC) 批准。静脉注射 PEG-CSQDs 2 h 后, 可实现对小鼠荷 CT26-Luc 原位结肠癌模型肿瘤区域清晰的 NIR-IIb 荧光成像。原位肿瘤与周边正常组织的荧光信号强度比为 42.3, 转移肿瘤与周边正常组织的荧光信号强度比为 22.3。可检测原位瘤的尺寸为 3.4 mm×2.5 mm, 转移瘤的尺寸为 1.2 mm×0.9 mm, 并能够准确地指导手术切除肿瘤。本研究所制备的 PEG-CSQDs 为结肠癌的早期诊断和指导手术切除提供了新方法。

关键词: 量子点; 近红外 IIb 区 (NIR-IIb); 荧光探针; 结肠肿瘤; 荧光指导手术

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)07-1699-08

Lead sulfide quantum dots for the near-infrared IIb window fluorescence imaging of colon cancer

SUN Jing-wen¹, WEI Guo-guang¹, QIAN Yu-yi¹, ZHENG Bin-bin¹, GAO Shuai¹,
YI Qing-tong^{2*}, LU Wei^{1*}

- (1. Key Laboratory of Smart Drug Delivery, Ministry of Education, State Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China;
2. Pelvic Center of Pudong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201399, China)

Abstract: The near-infrared-IIb (NIR-IIb, 1 500–1 700 nm) window fluorescence with long emission wavelength has reduced light scattering and tissue auto-fluorescent background, achieving deep tissue imaging with high spatial resolution. Herein, we prepared an NIR-IIb fluorescent quantum dots (QDs) composed of lead sulfide (PbS). The fluorescence spectrum of PbS QDs were adjusted by controlling the size of the PbS core. Cadmium sulfide (CdS) shell was synthesized by the cation exchange method to form the core/shelled lead sulfide/cadmium sulfide quantum dots (CSQDs). The surface of CSQDs was modified with polyethylene glycol (PEG) to increase their stability in aqueous solution. The resulting PEG-modified CSQDs (PEG-CSQDs) had the emission peak at ~1 550 nm with quantum yield of 7.2%. The animal procedures were approved by the Institutional Animal Care

收稿日期: 2020-05-31; 修回日期: 2020-06-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (91859110); “上海市优秀学术带头人”计划 (19XD1420200); 上海市浦东新区卫生系统重点学科建设资助项目 (PWZxk2017-21); 上海市浦东新区科技发展基金民生科研专项资金资助项目 (PKJ2019-Y29).

*通讯作者 Tel: 86-21-51980185, Fax: 86-21-51980184, E-mail: wlu@fudan.edu.cn;

Tel: 86-21-68030812, Fax: 86-21-68036053, E-mail: yiq926@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0872

and Use Committee (IACUC) of Fudan University School of Pharmacy. At 2 h postinjection, PEG-CSQDs clearly delineated the tumor region of mice bearing orthotopic CT26-Luc colon cancer model in the NIR-IIb fluorescence imaging. The fluorescent intensity ratio of primary tumor and adjacent normal tissue was 42.3, and that of metastatic tumor and adjacent normal tissue was 22.3, which allowed to detect the primary tumor of 3.4 mm×2.5 mm in dimension and the metastatic tumor of 1.2 mm×0.9 mm in dimension, and accurately guided the excision of tumors. The PEG-CSQDs prepared in this study provided a new approach for the early diagnosis and guidance of surgical resection of colon cancer.

Key words: quantum dot; near-infrared-IIb window; fluorescent probe; colonic neoplasm; imaging guided surgery

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一。结肠镜检查是临床上结肠癌筛查的标准诊断工具^[1]。然而,由于结肠镜检查主要靠肉眼根据形态学细节进行诊断,缺乏准确性,特别是在慢性炎症相关的结肠癌病例中诊断更加困难^[2]。此外,在指导手术操作过程中,仅在消化内镜下通过肉眼观察判断病灶部位,准确性较差,需对病灶进行标记,如临床常采用吲哚菁绿、亚甲蓝和靛胭脂等染料标记病灶用于指导外科手术^[3]。但是这些荧光染料易发生光漂白,且大多染料的荧光发射波长位于可见光区(400~750 nm)或近红外一区(near-infrared-I, NIR-I, 750~900 nm),由于组织光散射导致组织穿透深度不足,限制了荧光成像在手术指导中的应用^[4]。

近红外二区(NIR-II, 1 000~1 700 nm)荧光具有更长的发射波长。其中,NIR-IIb(1 500~1 700 nm)荧光可显著降低在穿透生物组织时的光散射及组织自发荧光的干扰^[5],达到更深的探测深度以及更高的空间分辨率^[3,5]。因此,发展具有更深成像深度、更高空间分辨率和信噪比的NIR-IIb荧光生物成像技术具有重要意义^[6]。

量子点(quantum dots, QDs)是一种具有独特光学性质的纳米材料,与一般有机染料相比,具有量子效率高、耐光漂白性能好和发射带窄等优良的生物成像特性^[3,7]。QDs的发射波长可以通过控制其大小或组成,在较宽的波长范围内调节^[8]。因此,制备发射波长在NIR-IIb的QDs,研究其对早期结肠癌诊断及指导手术具有潜在的临床应用价值^[5]。

硫化铅(PbS)QDs发射光谱跨越整个NIR-IIb,展现出优异的体内NIR-IIb成像性能^[8,9]。然而PbS QDs在各种分散介质中,易发生表面氧化反应。为防止PbS核氧化,文献^[1,10]报道的方法是使用稳定性材料,如硫化镉(CdS)和硫化锌(ZnS)等,通过阳离子交换法,在PbS表面生成一层保护壳,形成核壳结构的QDs。此外,应用于生物成像的QDs通常是通过金属有机化学合成制备,所得QDs在水中不分散^[11],需要

通过对QDs表面进行包覆和修饰,以提高量子点在水溶液中的稳定性和生物相容性^[12,13]。

本研究设计了一种基于核壳结构的PbS/CdS量子点(core/shelled lead sulfide/cadmium sulfide quantum dots, CSQDs),发射峰为~1 550 nm的NIR-IIb荧光探针。通过合成的两亲性聚合物,油胺支链的聚丙烯酸(oleamine-branched polyacrylic acid, OPA),利用疏水作用与CSQDs连接,使得CSQDs在水溶液中分散,并进一步与末端氨基修饰的聚乙二醇(methoxy-PEG-amine, M_r ~5 k)及八臂聚乙二醇氨基(8 arm-PEG-amine, M_r ~40 k)连接^[14,15],制备了经PEG修饰的CSQDs(PEG-CSQDs)。由于其核/壳结构和PEG层,CSQDs在生理介质中表现出良好的水稳定性。PEG-CSQDs可通过肿瘤的增强渗透与滞留效应(enhanced permeability and retention, EPR effect),迅速在肿瘤组织富集,肿瘤部位表现出相对明显增强的荧光,可用于结肠癌诊断和指导手术切除。

材料与方法

药品与试剂 氯化铅(lead chloride, $PbCl_2$)、氧化镉(cadmium oxide, CdO)、升华硫(sublimed sulfur)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐[3-(3-dimethylaminopropyl)-1-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC·HCl]、吗啉乙磺酸一水合物(MES monohydrate)、聚丙烯酸(polyacrylic acid, M_r ~1.8 k)、*N,N*-二环己基碳二亚胺(*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、油酸、1-十八烯、*N,N*-二甲基甲酰胺(*N,N*-dimethylformamide, DMF)[阿拉丁试剂(上海)有限公司];油胺[萨恩化学技术(上海)有限公司];无水碳酸钠、无水硫酸钠(上海展云化工有限公司);methoxy-PEG-amine HCl salt(M_r ~5 k,北京键凯科技股份有限公司);8 arm-PEG-amine(M_r ~40 k,西宝生物科技(上海)股份有限公司);RPMI 1640培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青链霉素、胰酶(美国Hyclone公司);三氯甲烷、正己烷、无水乙醇、1,2-二氯乙烷(国药集团化

学试剂有限公司); 超纯水为 Millipore 公司 Milli-Q Integral 10 系统制备。

细胞和动物 CT26-Luc cells (小鼠结肠癌细胞-荧光素酶标记), 购自 Imanis Life Sciences 公司。健康 BALB/c 小鼠, 雄性, SPF 级, 购自上海灵畅生物科技有限公司, 许可证号: SCXK (沪) 2018-0003。动物实验经复旦大学药学院实验动物伦理委员会 (IACUC) 批准。

仪器 Tecnai G2-20 TWIN 透射电子显微镜 (美国 FEI 公司); 液氮制冷二维 InGaAs 阵列检测器 (Cougar, 比利时 Xenics 公司); 科研级短波红外相机 (SC640, 中国深圳天盈光电系统有限公司); 808 nm 激光器 (MDL-H-800, 长春新产业光电技术有限公司); 1 000 和 1 500 nm 长通滤光片 (美国 Thorlabs 公司); 稳态/瞬态荧光光谱仪 (QM 40) (美国 PTI 公司); 马尔文 Zetasizer Nano-ZS 动态光散射仪 (英国马尔文仪器有限公司); 德国徕卡倒置荧光显微镜 [Leica DMi8-M, 徕卡显微系统 (上海) 贸易有限公司]。

数据分析 采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制 QDs 的荧光光谱及粒径图, 采用 Image J_v1.8.0 软件进行肿瘤和正常组织的信噪比及 PEG-CSQDs 的生物分布定量分析。

PbS QDs 的合成 升华硫 (0.08 g, 5 mmol) 置于二颈烧瓶中, 加入油胺溶解, 常温下真空泵脱气 30 min, N₂ 保护下, 溶液在 120 °C 搅拌反应 30 min, 即制得硫前体。PbCl₂ (0.834 g, 3 mmol) 置于二颈烧瓶中, 加入油胺, 常温下真空泵脱气, N₂ 保护下, 升温至 120 °C, 真空泵脱气 30 min 后升温至 140 °C, 即制得 PbCl₂ 前体^[6]。待 PbCl₂ 前体稳定在 140 °C 后, 快速加入硫前体。反应 30 min 后, 使用等体积正己烷 (-20 °C) 淬灭, 所得溶液静置, 去除下层白色沉淀。上层溶液使用等体积无水乙醇沉淀, 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集底部 PbS QDs。PbS QDs 在正己烷中均匀分散, 加入双倍体积油酸, 涡旋 3~5 min, 除去剩余的硫, 再次通过离心收集 PbS QDs^[16,17]。

CSQDs 的合成 CdO (1.2 g, 9.2 mmol) 置于二颈烧瓶中, 加入油酸 (8 mL)、1-十八烯 (20 mL), 常温下真空泵脱气, N₂ 保护下, 加热至 200 °C, 至 CdO 完全溶解, 溶液澄清呈淡黄色, 降温至 100 °C, 真空泵脱气 30 min。将制备的 PbS QDs 均匀分散在 1-十八烯中, 转移至二颈瓶中, 常温下真空泵脱气约 30 min 后转移至 CdO 溶液中, 100 °C 加热搅拌反应 30 min^[6]。反应结束后, 使用等体积 -20 °C 正己烷淬灭, 所得溶液静置 10 min, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 除去底部白色沉淀。所得上层溶液中加入等量无水乙醇沉淀, 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集底部沉淀, 重复两次收集沉淀即得 CSQDs。

CSQDs 的修饰 OPA 的制备方法参考文献^[18,19]。将制得的 OPA (25 mg) 溶于 CHCl₃ (2 mL) 中, 加入 CSQDs (5 mg), 室温下搅拌 1 h。反应结束后, 除去 CHCl₃, 将产物分散在 50 mmol·L⁻¹ 碳酸钠溶液中, 超滤管 (100 kDa) 离心浓缩, 加入超纯水洗 2~3 次。将得到的经 OPA 表面修饰的 CSQDs (OPA-CSQDs) 分散在 MES 缓冲液 (pH 8.5, 0.01 mol·L⁻¹), 另将 methoxy-PEG-amine (15 mg)、8 arm-PEG-amine (5 mg) 和 EDC·HCl (10 mg) 分别溶于适量的 MES 缓冲液中, 并按顺序依次加入 QDs 溶液, 室温下反应过夜。反应结束后, 将反应液转移至超滤管中浓缩, 用 PBS (0.01 mol·L⁻¹) 洗涤 2~3 次得到最终产物 PEG-CSQDs。

PbS QDs、CSQDs、OPA-CSQDs 及 PEG-CSQDs 发射光谱测定 使用稳态/瞬态荧光光谱仪, 在 808 nm 激发下、1 200~1 700 nm 波长内, 分别对合成的 PbS QDs、CSQDs、OPA-CSQDs 及 PEG-CSQDs 的发射光谱进行测定。

CSQDs、OPA-CSQDs 及 PEG-CSQDs 量子效率 (quantum yield, QY) 测定 以 IR26 (QY = 0.5%)^[6] 为参照, 在 808 nm 激发下, 测量 CSQDs、OPA-CSQDs 及 PEG-CSQDs 的量子效率。其中, IR26、CSQDs 分别以 1,2-二氯乙烷、三氯甲烷为溶剂, OPA-CSQDs 和 PEG-CSQDs 以水为溶剂, 按照公式 (1)^[20,21] 计算 CSQDs、OPA-CSQDs 及 PEG-CSQDs 的量子效率。

$$QY_{\text{sample}} = QY_{\text{ref}} \frac{k_{\text{sample}}}{k_{\text{ref}}} \left(\frac{n_{\text{sample}}}{n_{\text{ref}}} \right)^2 \quad (1)$$

其中, QY_{sample} 和 QY_{ref} 分别代表被测样品和参照的量子效率; k_{sample} 和 k_{ref} 分别代表被测样品和参照的荧光积分强度随紫外吸收变化的斜率; n_{sample} 和 n_{ref} 分别代表被测样品和参照所用溶剂的折射率。

CSQDs 及 PEG-CSQDs 的透射电子显微镜 (TEM) 观察及粒径测定 采用 Tecnai G2-20 TWIN 透射电子显微镜观察合成的 CSQDs 形态, 并用马尔文 Zetasizer Nano-ZS 动态光散射仪测定 CSQDs 及修饰后的 PEG-CSQDs 的粒径。

结肠癌小鼠模型的建立 CT26-Luc 细胞系在含有 10% FBS、100 u·mL⁻¹ 青霉素、100 μg·mL⁻¹ 链霉素的 RPMI-1640 培养基, 37 °C、5% 二氧化碳培养箱中培养。BALB/c 小鼠采用 1% 戊巴比妥钠麻醉, 将 CT26-Luc 细胞 (1×10⁷ mL⁻¹, 50 μL) 接种于小鼠盲肠肠壁^[21]。

结肠癌小鼠模型的体内 NIR-IIb 荧光成像 根据文献^[21]可知, 肿瘤细胞接种 4 天后, 在盲肠部位已形成小肿瘤。由于本研究目的是考察 PEG-CSQDs 探针注射后对早期结肠肿瘤的成像效果, 因此该结肠癌模型满足

本实验要求。小鼠尾静脉注射 PEG-CSQDs ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $200 \mu\text{L}$), 麻醉状态下打开腹腔, 暴露出结肠部位, 808 nm 激光器照射 (激光功率密度 $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$), 发射光通过 1000 和 1500 nm 长通滤波片, 使用液氮制冷 InGaAs 相机记录小鼠肿瘤部位的荧光变化。并分别在 0.5 、 2 、 4 和 8 h 拍照, 记录肿瘤和周围肠组织荧光强弱变化。

NIR-IIb 荧光成像指导肿瘤切除 荷瘤小鼠尾静脉注射 PEG-CSQDs ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $200 \mu\text{L}$), 2 h 后麻醉状态下打开腹腔, 暴露出结肠部位, 进行 NIR-IIb 荧光成像, 采用短波红外相机采集信号, 定位肿瘤并指导手术切除。对切除的肿瘤进行 NIR-IIb 影像, 采用 OCT 包埋, 连续冰冻切片 (8 和 $30 \mu\text{m}$)。分别对 $8 \mu\text{m}$ 厚切片进行 H&E 染色, 对 $30 \mu\text{m}$ 厚切片进行 NIR-IIb 荧光成像。

PEG-CSQDs 的生物分布 荷瘤小鼠尾静脉注射 PEG-CSQDs ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $200 \mu\text{L}$), 分别于 2 和 8 h 后, 处死小鼠, 取出心、肝、脾、肺、肾、脑、肠、骨、肌肉、皮肤、肿瘤和血液, 采用短波红外相机, 拍摄 NIR-IIb 荧光照片。采用 PEG-CSQDs ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{L}$) 作为标准参照。通过 Image J 进行 ROI 分析, 按照公式 (2) 计算各器官组织的摄取。

$$\text{Concentration of drugs } (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 4 \mu\text{g} / m_{\text{test}} \quad (2)$$

其中, A_{test} 、 A_{blank} 和 A_{control} 分别代表采集的组织或血液、空白和标准参照的总光子数; 标准参照中 PEG-CSQDs 质量为 $4 \mu\text{g}$; m_{test} 为所测组织质量 (g)。

结果

1 PbS QDs 发射光谱

PbS QDs 的合成反应温度与反应时间不同, 则 QDs 的发射波长和量子效率不同。由图 1 所示, 因为 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 温度过低, 难以合成具有高荧光强度的 QDs。当温度达到 $140 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 随着反应时间的延长, QDs 发射峰向长波长方向移动。由于 PbS QDs 核表面与 CdO 进行阳离子交换反应, PbS QDs 内核尺寸减小, 发射光谱将发生蓝移。因此, 欲制备发射峰在 $1500\sim 1600 \text{ nm}$ 的 CSQDs, 应选用发射峰在 1600 nm 以上的 PbS QDs 作内核。由此确定 PbS QDs 的反应条件为 $140 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 30 min 。

2 CSQDs 的发射光谱

为确定所合成的 CSQDs 发射峰波长, 选用了不同阳离子交换反应时间。由图 2 可见, 所合成的 CSQDs 的发射峰随反应时间延长蓝移。由此判断, $\text{Pb}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ 阳离子交换的反应温度为 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 、反应时间为 30 min 时, 合成的 CSQDs 发射峰在 $\sim 1500 \text{ nm}$ 。

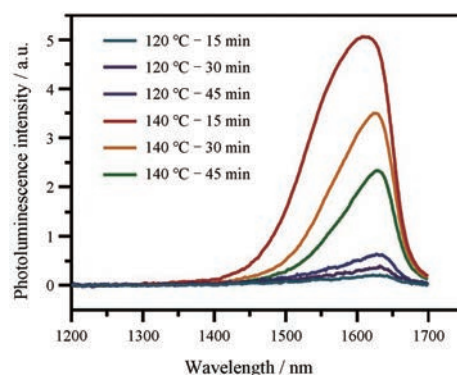


Figure 1 Effects of reaction temperature and reaction time on fluorescence emission spectra of lead sulfide quantum dots (PbS QDs)

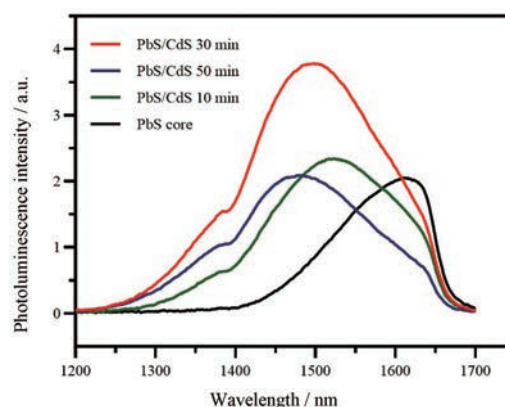


Figure 2 Effect of $\text{Pb}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ ligand-exchange reaction time on the fluorescence emission spectra of PbS QDs or CSQDs. CSQDs: Core/shelled lead sulfide/cadmium sulfide quantum dots; PbS: Lead sulfide; CdS: Cadmium sulfide

3 OPA-CSQDs 和 PEG-CSQDs 的发射光谱

OPA 连接后 CSQDs 的表面性质发生改变, 使得 CSQDs 由脂溶性变为水溶性。如图 3 所示, OPA-CSQDs 和 PEG-CSQDs 的发射峰为 $\sim 1550 \text{ nm}$ 。与未修饰的 CSQDs 比较, OPA 修饰导致 CSQDs 的发射峰向长波长方向移动。这一现象与其他结构的量子点相似, 在相

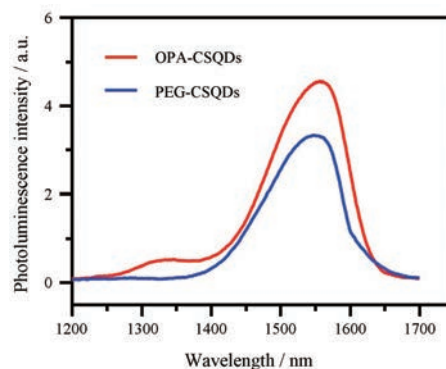


Figure 3 Fluorescence emission spectra of oleyamine-branched polyacrylic acid-modified CSQDs (OPA-CSQDs) and polyethylene glycol-modified CSQDs (PEG-CSQDs), respectively

转移过程中发射峰发生小幅度变化^[11,22]。

4 CSQDs、OPA-CSQDs及PEG-CSQDs的量子效率

如图4所示,以IR26为参照,测得CSQDs、OPA-CSQDs及PEG-CSQDs的量子效率分别为21.6%、8.3%和7.2%。结果提示,当使用OPA表面修饰CSQDs,使其由脂溶性转为水溶性时,CSQDs的表面结构发生改变可导致量子效率显著降低。这一现象也存在于对其他量子点的修饰^[23,24]。

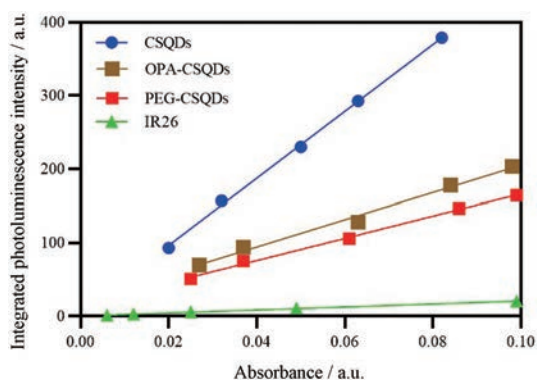


Figure 4 Integrated emission intensities of IR26 in 1, 2-dichloroethane, CSQDs in chloroform, OPA-CSQDs or PEG-CSQDs in water as a function of absorbance at 808 nm, respectively

5 CSQDs的TEM图像及粒径分布

如图5所示,所合成的CSQDs的粒径为 5.4 ± 0.4 nm, PEG修饰后的CSQDs粒径为 27.9 ± 1.4 nm。

6 PEG-CSQDs在小鼠结肠癌模型体内显像结果

如图6所示,小鼠尾静脉注射PEG-CSQDs 5 min后,PEG-CSQDs由血管渗入肿瘤部位。随着时间的延

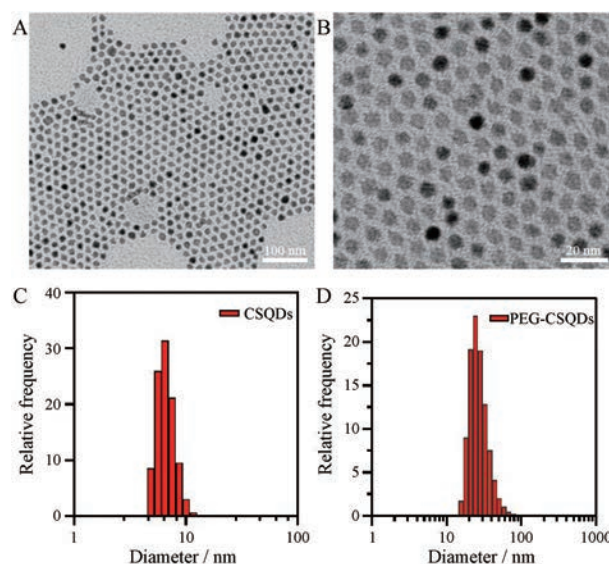


Figure 5 Transmission electron micrographs of CSQDs (A, B). Size-distribution histogram of CSQDs (C) and PEG-CSQDs (D), respectively

长, PEG-CSQDs进一步从血管渗透蓄积于肿瘤部位。测得原位瘤的尺寸为 3.4 mm \times 2.5 mm, 转移瘤的尺寸为 1.2 mm \times 0.9 mm。注射后2 h, PEG-CSQDs在肿瘤部位的积累达到最高,扣除背景信号后的原位肿瘤与周边正常组织的荧光信号强度比为42.3, 转移肿瘤与周边正常组织的荧光信号强度比为22.3。在注射后24 h, 肿瘤部位的平均荧光强度与正常组织接近。

7 NIR-IIb 荧光影像指导手术切除肿瘤

如图7所示,尾静脉注射2 h后PEG-CSQDs可对

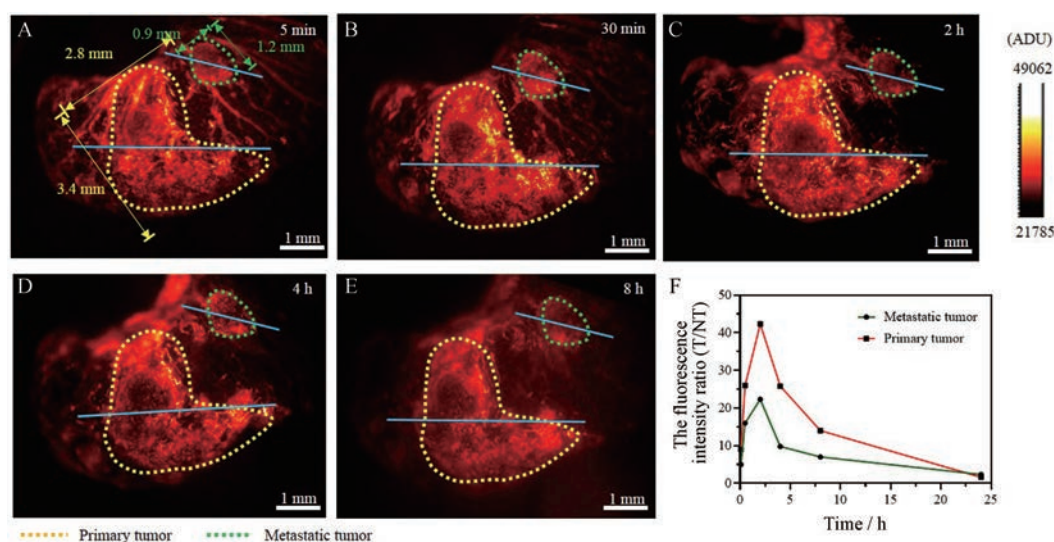


Figure 6 *In vivo* fluorescence imaging of PEG-CSQDs in colon cancer. A-E: The NIR-IIb fluorescence images were collected at 5 min, 0.5, 2, 4 and 8 h after intravenous injection, respectively; F: The fluorescence intensity ratio of tumor (T) to normal tissue (NT) over time after the intravenous injection. The fluorescence signals on the blue lines or of the background in the images were quantified. The fluorescence intensity ratio was thus calculated: (signal of tumor - signal of background) / (signal of normal tissue - signal of background)

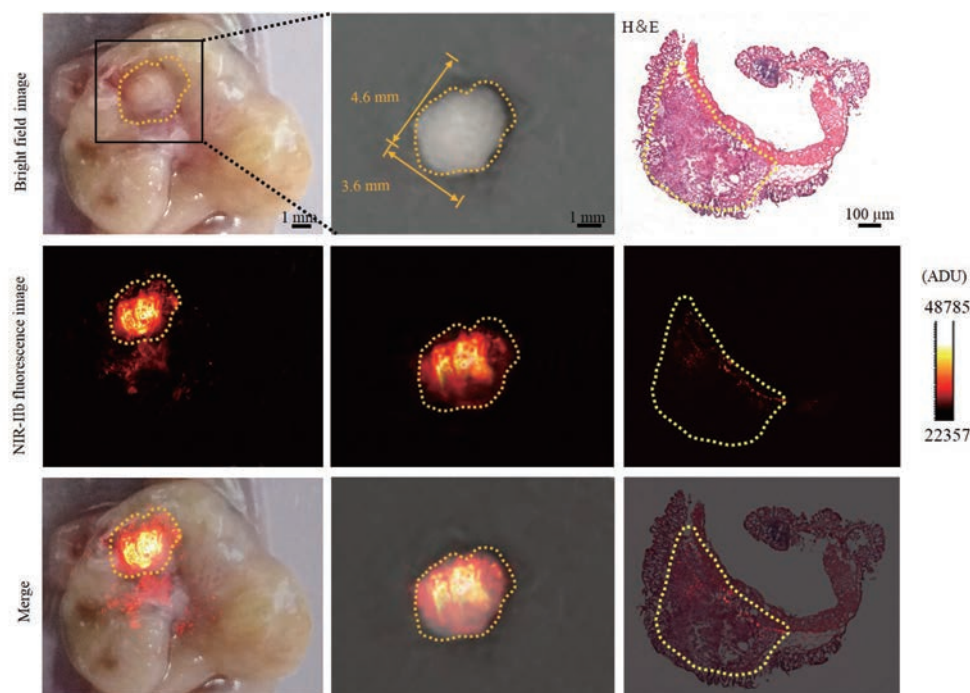


Figure 7 Intraoperative NIR-IIb fluorescence imaging of orthotopic CT26-Luc colon tumor of mice (left column), the resected tumor under the guidance of NIR-IIb fluorescence imaging (middle column), and the histologic analysis of the resected tumor (right column). Circle area represents tumor region

肿瘤的大小和位置实现完整清晰的NIR-IIb荧光成像。在影像指导下切除肿瘤, NIR-IIb荧光成像显示切除肿瘤的尺寸为4.6 mm×3.6 mm。切除组织冰冻切片的NIR-IIb荧光显像及H&E染色结果证实PEG-CSQDs定位于肿瘤组织。

8 PEG-CSQDs在结肠癌模型小鼠的体内分布

由图8可见, 静脉注射的PEG-CSQDs在小鼠的肝脏和脾脏分布最高。注射2 h后, PEG-CSQDs在肿瘤组织中的分布是正常肠道中的(8.2 ± 0.6)倍; 肿瘤部位PEG-CSQDs蓄积在8 h时明显下降, 此比例下降为(1.9 ± 0.2)倍。这一结果证实了PEG-CSQDs在注射2 h后达到最佳的信噪比和影像效果。

讨论

本研究采用PbS为主要材料, 通过控制反应温度和时间, 调节PbS QDs的尺寸, 合成了发射峰为~1 550 nm的NIR-IIb PbS QDs。通过阳离子交换反应, 将PbS外层钝化, 减少PbS核与环境的相互作用, 可获得更好的稳定性^[19]。PbS QDs的发射波长与反应温度和时间相关。在一定范围内, 随反应温度提高和反应时间延长, PbS QDs核尺寸增加, 发射光谱红移。按此规律可获得不同发射波长的PbS QDs。由于CdS壳层的形成依赖于阳离子交换, 在整个反应过程中, CSQDs的整体尺寸保持不变, 随着CdS壳层厚度的增加, PbS的核尺寸减

小, 使得CSQDs的发射峰蓝移。

在CSQDs合成中, 以油胺作为保护剂, 制得油溶性的CSQDs。需使用生物相容性材料对其修饰, 以使其注射后在体内环境中稳定, 而不会引发聚集^[22]。本研究使用一种两亲性聚合物即OPA作为CSQDs的表面涂层。OPA与CSQDs在有机相中混合, OPA聚合物疏水尾端插入QDs表面的油酸烷基链, 通过多个烷基链之间的范德华力/疏水作用形成有序的致密结构。在此过程中, OPA聚合物骨架上丰富的羧基使得CSQDs可以在水相中分散, 并提供了下一步与PEG连接的官能团。但OPA修饰降低了CSQDs量子效率, 这是由于OPA覆盖在CSQDs表面, 改变CSQDs的表面状态, 从而导致发光效率发生变化^[23,24]。OPA修饰后, 使得CSQDs发射峰红移, 但仍满足NIR-IIb成像的需求。

作者前期的研究结果显示, 与吲哚菁绿介导的NIR-I荧光成像效果相比, NIR-II (1 000~1 300 nm) 荧光探针BPBBT的荧光成像具有低的结肠癌成像背景干扰, 克服了假阳性结果^[21]。本研究的NIR-IIb PEG-CSQDs与BPBBT相比, PEG-CSQDs具有更长的荧光发射波长、更深的组织荧光穿透能力、更高信噪比及更强的抗光漂白能力, 可作为一种优良的荧光探针。同时, PEG-CSQDs的量子效率是BPBBT的3倍左右, 具有更高的量子效率。

本研究采用小鼠原位结肠癌模型评价所制备的

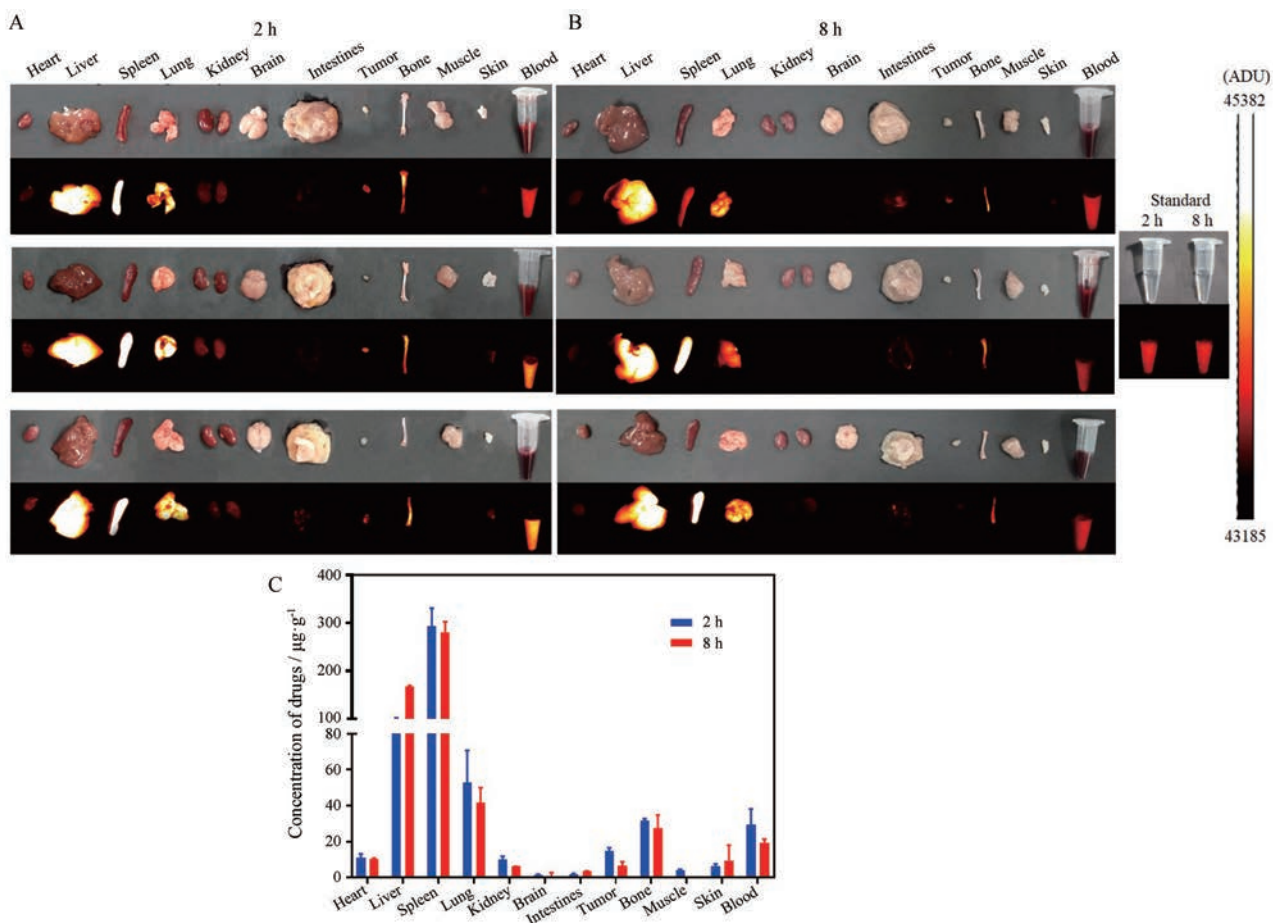


Figure 8 Biodistribution of PEG-CSQDs in mice bearing CT26-luc orthotopic tumor at 2 h (A) and 8 h (B) after *iv* injection of PEG-CSQDs ($2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $200\ \mu\text{L}$), respectively. The volume of each blood sample was $100\ \mu\text{L}$. Standard, $4\ \mu\text{g}$ of PEG-CSQDs. Tissue distribution of the fluorescence probes was calculated based on the fluorescence intensity of tissues in the images (C). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

PEG-CSQDs 对早期肿瘤的 NIR-IIb 荧光成像效果。结果证明, PEG-CSQDs 注射后可在肿瘤部位富集, 使得荧光明显增强, 最小可对 $1.2\text{ mm}\times 0.9\text{ mm}$ 的转移瘤实现清晰的显像。因此, PEG-CSQDs 对于结肠肿瘤, 特别是对于微小肿瘤, 具有良好的显像和定位效果, 展现出其作为一种高亮度 NIR-IIb 荧光探针应用于结肠癌的早期诊断及手术指导的潜能。此外, 由于 PEG-CSQDs 的肿瘤成像机制是其通过 EPR 效应富集于肿瘤部位, 因此可以推断 PEG-CSQDs 对于除结肠癌以外其他具有 EPR 效应的肿瘤也会展现出良好的早期诊断和手术导航的潜力。

作者贡献: 陆伟设计了该研究。伊庆同参与实验设计, 指导肿瘤手术切除实验。孙静文和钱余义共同完成量子点的制备, 高帅完成量子点的荧光光谱测定, 郑彬彬完成量子点的透射电镜观察, 魏国光和孙静文共同完成量子点的影像, 魏国光完成肿瘤切除手术实验。孙静文和陆伟归纳整理数据并撰写论文。

利益冲突: 本文作者声明无利益冲突。

References

- [1] Jeong S, Song J, Lee W, et al. Cancer-microenvironment-sensitive activatable quantum dot probe in the second near-infrared window [J]. *Nano Lett*, 2017, 17: 1378-1386.
- [2] Park Y, Ryu YM, Jung Y, et al. Spraying quantum dot conjugates in the colon of live animals enabled rapid and multiplex cancer diagnosis using endoscopy [J]. *ACS Nano*, 2014, 9: 8896-8910.
- [3] Brunetti J, Riolo G, Gentile M, et al. Near-infrared quantum dots labelled with a tumor selective tetrabranch peptide for *in vivo* imaging [J]. *J Nanobiotechnol*, 2018, 16: 21-31.
- [4] Cai Y, Wei Z, Song C, et al. Optical nano-agents in the second near-infrared window for biomedical applications [J]. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 22-37.
- [5] Matea CT, Mocan T, Tabaran F, et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 5421-5431.
- [6] Zhang MX, Yue JY, Cui R, et al. Bright quantum dots emitting at approximately $1\ 600\text{ nm}$ in the NIR-IIb window for deep tissue fluorescence imaging [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115:

- 6590-6595.
- [7] Ahmed SR, Dong JH, Yui M, et al. Quantum dots incorporated magnetic nanoparticles for imaging colon carcinoma cells [J]. *J Nanobiotechnol*, 2013, 11: 28-37.
- [8] Tsukasaki Y, Morimatsu M, Nishimura G, et al. Synthesis and optical properties of emission-tunable PbS/CdS core-shell quantum dots for *in vivo* fluorescence imaging in the second near-infrared window [J]. *RSC Adv*, 2014, 4: 41164-41171.
- [9] Wang JH, Fan J, Li JC, et al. In-capillary probing of quantum dots and fluorescent protein self-assembly and displacement using forster resonance energy transfer [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40: 933-939.
- [10] Huang ZY, Xu ZH, Mahboub M, et al. PbS/CdS core-shell quantum dots suppress charge transfer and enhance triplet transfer [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56: 16583-16587.
- [11] Yong KT, Roy I, Ding H, et al. Biocompatible near-infrared quantum dots as ultrasensitive probes for long-term *in vivo* imaging applications [J]. *Small*, 2009, 5: 1997-2004.
- [12] Guan XW, Guo ZP, Wang TH, et al. A pH-responsive detachable peg shielding strategy for gene delivery system in cancer therapy [J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18: 1342-1349.
- [13] Ju L, Zhang GL, Zhang C, et al. Quantum dot-related genotoxicity perturbation can be attenuated by PEG encapsulation [J]. *Mutat Res*, 2013, 753: 54-64.
- [14] Pan QB, Zhang J, Li X, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of phospholipid-coated silver-graphene quantum dot multifunctional nanoparticles [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 366-372.
- [15] Ye XY, Mei L. The black phosphorus quantum dots-based photothermal effect on dendritic cells activation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1297-1302.
- [16] Jeong S, Jung YB, Bok S, et al. Multiplexed *in vivo* imaging using size-controlled quantum dots in the second near-infrared window [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018. DOI: 10.1002/adhm.201800695.
- [17] Kong YF, Chen J, Fang HW, et al. Highly fluorescent ribonuclease-A-encapsulated lead sulfide quantum dots for ultrasensitive fluorescence *in vivo* imaging in the second near-infrared window [J]. *Chem Mater*, 2016, 28: 3041-3050.
- [18] Zhang MX, Huang BH, Sun XY, et al. Clickable gold nanoparticles as the building block of nanobioprobes [J]. *Langmuir*, 2010, 26: 10171-10176.
- [19] Zhou M, Nakatani E, Gronenberg LS, et al. Peptide-labeled quantum dots for imaging GPCRs in whole cells and as single molecules [J]. *Bioconjug Chem*, 2007, 18: 323-332.
- [20] Zhao HG, Chaker M, Ma DL. Effect of CdS shell thickness on the optical properties of water-soluble, amphiphilic polymer-encapsulated PbS/CdS core/shell quantum dots [J]. *J Mater Chem*, 2011, 21: 17483-17491.
- [21] Gao S, Wei GG, Zhang SH, et al. Albumin tailoring fluorescence and photothermal conversion effect of near-infrared-II fluorophore with aggregation-induced emission characteristics [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 2206-2221.
- [22] Taniguchi S, Sandiford L, Cooper M, et al. Hydrophobin-encapsulated quantum dots [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 4887-4893.
- [23] Hu R, Law WC, Lin GM, et al. PEGylated phospholipid micelle-encapsulated near-infrared PbS quantum dots for *in vitro* and *in vivo* bioimaging [J]. *Theranostics*, 2012, 2: 723-733.
- [24] Drozd D, Zhang HY, Goryacheva I, et al. Silanization of quantum dots: challenges and perspectives [J]. *Talanta*, 2019. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120164.