

doi:10.3969/j.issn.1007-7545.2020.12.012

多层级 NaHoF₄ 纳米核壳颗粒的制备及其抗癌诊疗

王辰, 刘海洲, 宁淑芳, 唐艳萍, 张力图

(广西医科大学 肿瘤医学院, 南宁 530021)

摘要:为能够在无 Ce 掺杂时增强 NaHoF₄ 的荧光发射能力,设计制备了 Yb³⁺ 浓度梯度多层级纳米核壳颗粒,并对其微观形貌、荧光发射能力、相结构及抗癌诊疗效果进行了测试。结果表明,合成的六边形 NaHoF₄ 颗粒结晶度良好,尺寸约为 20 nm;多层级包覆壳层薄且均匀,该结构的荧光发射强度高于无/单一壳层包覆。980 nm 激光照射下,表面修饰 Ce6 的多层级 NaHoF₄ 纳米核壳颗粒在 HeLa 癌细胞中具有良好的抗癌诊疗作用。

关键词:核壳结构; NaHoF₄; 发射强度; 上转换; 抗癌诊疗

中图分类号: TB34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-7545(2020)12-0064-05

Preparation and Anticancer Theranostics of Multilayer NaHoF₄ Core-Shell Nanoparticles

WANG Chen, LIU Hai-zhou, NING Shu-fang, TANG Yan-ping, ZHANG Li-tu

(Oncology Medical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: In order to enhance fluorescence emission ability of NaHoF₄ without Ce doping, multilayer core-shell nanoparticles with Yb³⁺ concentration gradient were designed and prepared, whose microstructures, fluorescence emission abilities, phase structures and anticancer theranostics effects were measured. The results show that prepared hexagonal NaHoF₄ particles have good crystallinity with particle size of about 20 nm. The multilayer coating shell is thin and uniform, fluorescence emission intensity of this structure is higher than that of no or single coating shell. Under 980 nm laser irradiation, multilayer NaHoF₄ nanoparticles with Ce6 surface modification have good anticancer theranostics effect in HeLa cancer cells.

Key words: core-shell structure; NaHoF₄; emission intensity; upconversion; anticancer theranostics

稀土基上转换纳米颗粒(UCNPs)因其具有良好的光学及生物学特性,在生物荧光成像及光学治疗领域被寄予厚望^[1-2]。为获得更理想的成像和治疗效果,UCNPs 的荧光强度需进一步提高,主要手段包括基质结构调变、壳层包覆、掺杂优化及高功率激发^[3-4]。与常见的 Er、Tm 作为发光中心不同,Ho 的上转换发光强度一般比较低,且调变十分困难,这

主要是受其跃迁能级的限制。通常仅能通过向基质中掺杂一定量的 Ce³⁺,与 Ho³⁺ 发生交叉弛豫,调整其荧光强度及红绿荧光比值^[5]。该方式虽简单,但是 Ce³⁺ 的掺杂会影响 Ho³⁺ 良好的电子弛豫和较高的磁矩性能,不利于 Ho 基荧光材料作为造影剂在计算机断层扫描(CT)及核磁共振成像(MRI)等生物医学领域开展应用^[6]。此外,由于生物体往往不

收稿日期: 2020-09-03

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(2017GXNSFAA198155);南宁市青秀区科学研究与技术开发计划项目(2016051, 2017036)

作者简介: 王辰(1988-),男,辽宁清原人,博士,讲师;**通信作者:** 张力图(1966-),男,广西南宁人,主任技师

能采用高密度激光辐照,高功率激发同样不适用于 Ho^{3+} 荧光强度的提高^[7]。因此相对于基质结构调变,采用多层级核壳包覆设计 UCNP_s 可以较为简单地提高 Ho^{3+} 的荧光强度,且不引入 Ce^{3+} 及高功率激光,有效解决生物体内外诊疗时荧光强度低的问题^[8]。

本研究以 NaHoF_4 为内核,且包覆含不同浓度 Yb^{3+} 的 NaGdF_4 多级壳层促进其荧光增强,从而得到多层级纳米 $\text{NaHoF}_4 @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb}^{3+} @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb}^{3+}$ 颗粒。利用X-ray衍射(XRD)、透射电镜(TEM)、上转换荧光(UCL)等检测方法,对纳米颗粒的显微结构及光学性能进行了表征;将其与HeLa癌细胞共培养,测试了经Ce6表面修饰后该多层级纳米颗粒的抗癌诊疗效果。

1 试验

1.1 试验原料及合成

所有药品均为分析纯化学试剂。将稀土氧化物(RE_2O_3)粉末 Ho_2O_3 、 Gd_2O_3 、 Yb_2O_3 溶于浓盐酸中,经过120℃蒸发排酸后分别制得 HoCl_3 、 GdCl_3 、 YbCl_3 溶液^[9]。取10 mmol RECl_3 、30 mmol 油酸钠、15 mL 去离子水、20 mL 乙醇和35 mL 正己烷置于同一烧杯内70℃水浴搅拌4 h,分液清洗后得 $\text{RE}(\text{OA})_3$ 备用。将1 mmol HoCl_3 、15 mL 油酸及15 mL 1-十八烯加入100 mL 三口瓶中,90℃除水30 min后升至156℃再加热30 min。断电降至室温后加入10 mL 甲醇、2.5 mmol 氢氧化钠和4 mmol 氟化铵,在280℃流动氮气保护下加热45 min。用环己烷和酒精清洗 NaHoF_4 样品,通过 $\text{RE}(\text{OA})_3$ 的高温热解反应在粉体颗粒外层包覆 $\text{NaGdF}_4 : \text{Yb}^{3+}$,最终获得多层级纳米 $\text{NaHoF}_4 @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb}^{3+} @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb}^{3+}$ 颗粒。

1.2 试验样品表征及测试

分别用XRD、TEM、UCL对样品的晶体结构、微观形貌及荧光性质进行表征。随后,将5 mL 样品溶液与0.1 g 聚醚酰亚胺进行搅拌,清洗后溶于二甲基亚砜。加入0.5 mL 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐/N-羟基丁二酰亚胺溶液及2 mg 二氢卟吩e6(Ce6)继续搅拌2 h,经PBS溶液清洗后,配制不同浓度样品溶液加入96孔板与HeLa细胞共培养^[10]。再经有/无980 nm 激光照射10 min 对照处理,培养24 h后进行标准MTT测试其体外细胞毒性。此外,利用上转换荧光成像显微镜观察样品在癌细胞内荧光成像效果。

2 结果与讨论

2.1 多层级 NaHoF_4 纳米核壳颗粒的显微组织形貌

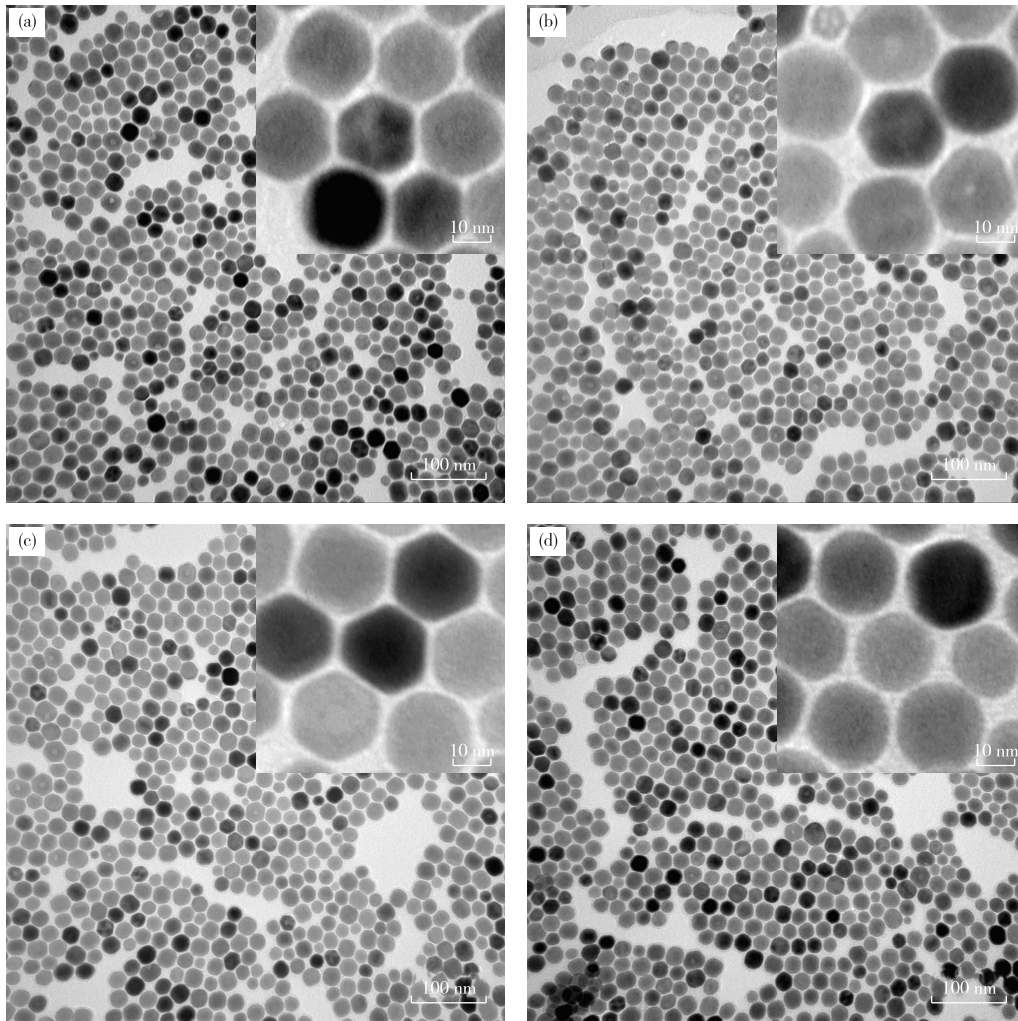
图1a为纳米 NaHoF_4 颗粒样品的TEM照片。图中颗粒形状近似六边形,以蜂窝状排列,尺寸约为20 nm,其粒度存在大小不一的现象。图1b和图1c分别为 NaHoF_4 颗粒被 $\text{NaGdF}_4 : \text{Yb}^{3+}$ 一次、二次包覆后样品的TEM图像。由于在包覆过程中纳米颗粒被多次离心、涤洗,其尺寸均一性得到了明显改善。图1d为多层级 NaHoF_4 纳米核壳颗粒经Ce6表面修饰后的样品显微照片。从上述照片中可以看出,包覆及表面修饰并未对纳米 NaHoF_4 样品颗粒尺寸、形貌与分布情况造成明显影响,说明多层级包覆壳层薄且均匀,这十分有利于保持 NaHoF_4 内核的医用造影能力^[11-12]。

2.2 多层级 NaHoF_4 纳米核壳颗粒的荧光性能

图2a为多层级 NaHoF_4 纳米核壳颗粒的上转换荧光发射光谱。相较于无核壳结构的纳米 $\text{NaHoF}_4 : \text{Yb}^{3+}$,经多层包覆后的 NaHoF_4 纳米核壳颗粒,其荧光发射强度有了明显提高,说明核壳结构设计可以有效提升其可见光区的上转换荧光发射能力。此外,双壳层包覆比单一壳层包覆的荧光强度有较大幅度的提高,这是因为双壳层中的 Yb^{3+} 采用浓度梯度设计,可以将激发光的能量尽可能多地向内核传导,使发光中心 Ho^{3+} 得到更多的激发能,进而使荧光发射强度提高。由于Ce6在可见光区尤其是红光区有较强吸收,所以多层级核壳颗粒包覆Ce6以后,荧光强度会有小幅下降,但仍优于无壳层或单一壳层颗粒,不影响其上转换荧光成像效果。图2b为多层级 NaHoF_4 纳米核壳颗粒的荧光寿命拟合曲线。通过分析图2b中数据可知,此纳米颗粒的荧光寿命不低于500 μs ,能够满足上转换荧光成像的需要。

2.3 多层级 NaHoF_4 纳米核壳颗粒的晶体结构

为了分析多层级 NaHoF_4 纳米核壳颗粒的晶体结构,并进一步了解多层级核壳颗粒的结构组成,选取代表性样品 $\text{NaHoF}_4 @ \text{NaGdF}_4 : 40\% \text{Yb}^{3+} @ \text{NaGdF}_4 : 20\% \text{Yb}^{3+} @ \text{Ce6}$ 进行XRD测试。通过谱图分析可知(图3),该纳米颗粒具有清晰的衍射锐峰,说明其结晶度良好。此外,衍射峰位置主要和 NaHoF_4 的PDF卡片相符,壳层中的 NaGdF_4 与 NaYbF_4 对衍射峰位置无明显影响。以上现象进一步说明 NaHoF_4 表面包覆的 $\text{NaGdF}_4 : \text{Yb}^{3+}$ 壳层很薄,与TEM检测结果吻合。



(a) NaHoF₄; (b) NaHoF₄@NaGdF₄:Yb³⁺; (c) NaHoF₄@NaGdF₄:Yb³⁺@NaGdF₄:Yb³⁺; (d) NaHoF₄@NaGdF₄:Yb³⁺@NaGdF₄:Yb³⁺@Ce6

图1 NaHoF₄ 内核及多层包覆后纳米颗粒的显微形貌

Fig. 1 Microstructures of NaHoF₄ cores and nanoparticles with multilayer coated

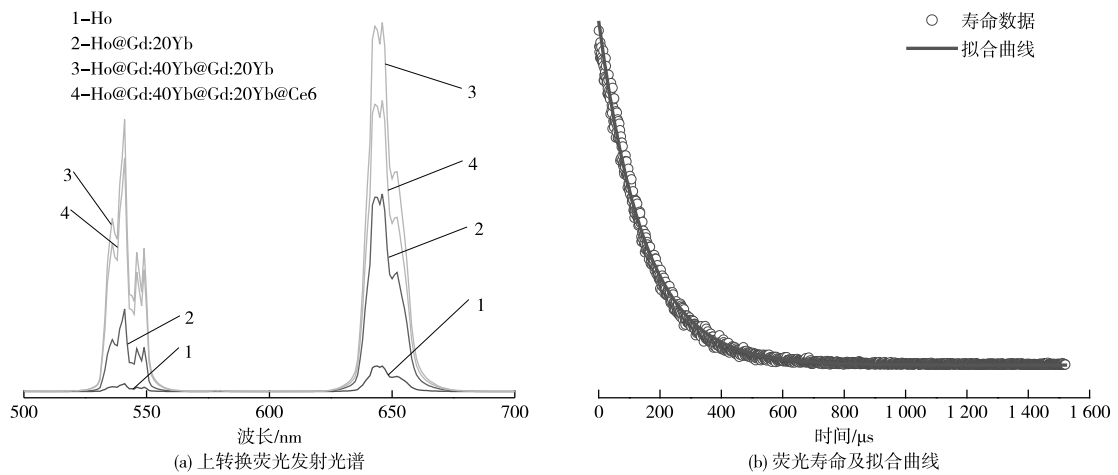
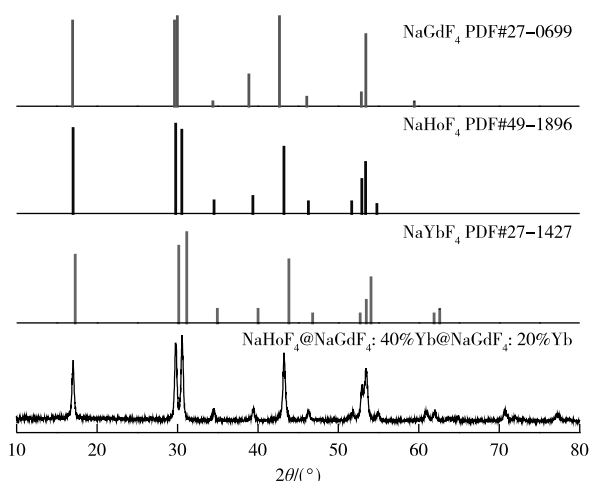
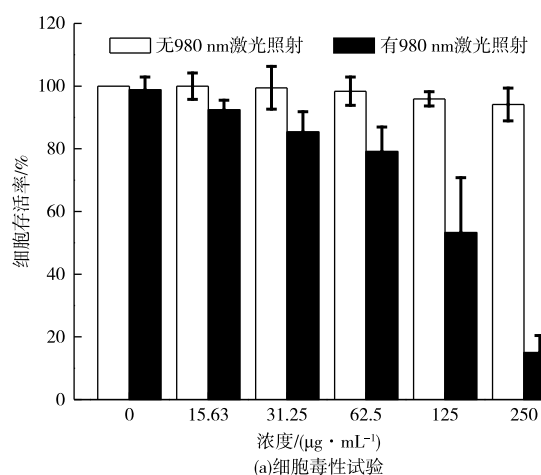


图2 多层次 NaHoF₄ 纳米核壳颗粒的稳态/瞬态荧光测试

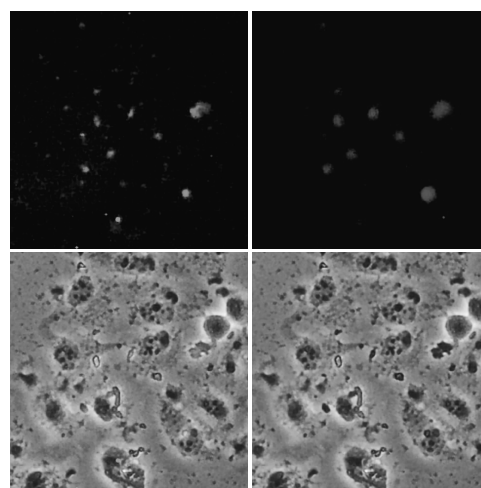
Fig. 2 Steady/transient fluorescence measurement of multilayer NaHoF₄ core-shell nanoparticles

图 3 多层级 NaHoF₄ 纳米核壳颗粒的 XRD 谱Fig. 3 XRD patterns of multilayer NaHoF₄ core-shell nanoparticles

(a) 细胞毒性试验

2.4 多层级 NaHoF₄ 纳米核壳颗粒的抗癌诊疗

利用标准 MTT 试验对多层级 NaHoF₄ 纳米核壳颗粒的抗癌效果进行测试,结果见图 4。分析图 4a 后可知,没有 980 nm 激光照射处理时,随着纳米颗粒浓度的不断增加,细胞存活率并未明显降低,说明该纳米核壳颗粒具有较好的生物相容性。当有 980 nm 激光照射处理时,纳米颗粒发出的上转换荧光能够使 Ce6 产生单线态氧,从而起到杀伤癌细胞的作用。随着纳米颗粒浓度的增加,HeLa 癌细胞的存活率均值从 99% 降至 15%,说明 980 nm 激光辐照后多层级 NaHoF₄ 纳米核壳颗粒具有良好的抗癌效果。取与样品共培养的 HeLa 细胞制片,经上转换荧光显微镜观察后可以发现(如图 4b),多层级 NaHoF₄ 纳米核壳颗粒在癌细胞中具有荧光显像能力,且在红、绿通道均可实现荧光成像效果,有利于荧光成像时进行多色调变,使检测过程更加灵活可靠。



(b) 上转换荧光成像

图 4 Ce6 修饰多层级 NaHoF₄ 纳米核壳颗粒在 HeLa 癌细胞内的诊疗效果Fig. 4 Theranostic effect of Ce6 modified multilayer NaHoF₄ core-shell nanoparticles in HeLa cancer cells

3 结论

1) 利用 RE(OA)₃ 的高温热解反应能够在 NaHoF₄ 外多层包覆 NaGdF₄:Yb³⁺, 合成高结晶度六边形纳米核壳颗粒, 颗粒尺寸约为 20 nm。

2) 多层级包覆比无包覆或单层包覆的 NaHoF₄ 纳米颗粒荧光强度更高, 在癌细胞内可实现上转换荧光成像。

3) 980 nm 激光辐照下, 表面修饰 Ce6 的多层级 NaHoF₄ 纳米核壳颗粒具有良好的体外抗癌效果。其与癌细胞共培养浓度 250 μg/mL 时, 癌细胞存活率均值降至 15%。

参考文献

- [1] SUN Y, FENG W, YANG P Y, et al. The biosafety of lanthanide upconversion nanomaterials [J]. Chemical Society Reviews, 2015, 44(6): 1509-1525.
- [2] 杨飘萍, 盖世丽, 贺飞. 稀土上转换发光材料[M]. 北京: 科学出版社, 2018: 160-230.
YANG P P, GAI S L, HE F. Rare Earth Upconversion Luminescent Materials [M]. Beijing: Science Press, 2018: 160-230.
- [3] ZUO J, LI Q Q, XUE B, et al. Employing shells to eliminate concentration quenching in photonic upconversion nanostructure[J]. Nanoscale, 2017, 9(23): 7941-7946.

- [4] ZHU Y S, XU W, CUI S B, et al. A protected excitation-energy reservoir for efficient upconversion luminescence[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(1): 250-259.
- [5] GAI S L, LI C X, YANG P P, et al. Recent progress in rare earth micro/nanocrystals: Soft chemical synthesis, luminescent properties, and biomedical applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 114(4): 2343-2389.
- [6] GAO W, ZHENG H R, HAN Q Y, et al. Enhanced red upconversion luminescence by codoping Ce^{3+} in β -NaY($Gd_{0.4}$) F_4 : Yb^{3+}/Ho^{3+} nanocrystals [J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2014, 2(27): 5327-5334.
- [7] ZHENG W, HUANG P, TU D T, et al. Lanthanide-doped upconversion nano-bioprobes: electronic structures, optical properties, and biodetection [J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(6): 1379-1415.
- [8] KUANG Y, XU J T, WANG C, et al. Fine-tuning ho-based red-upconversion luminescence by altering $NaHoF_4$ core size and $NaYbF_4$ shell thickness [J]. *Chemistry of Materials*, 2019, 31(19): 7898-7909.
- [9] 王辰, 匡野, 曲波, 等. 共沉淀法制备多孔纳米氟氧钇粉体及其性能研究[J]. *有色金属(冶炼部分)*, 2019(5): 56-59.
- WANG C, KUANG Y, QU B, et al. Preparation and properties of porous nano-Yttrium oxyfluoride powder by coprecipitation method [J]. *Nonferrous Metals (Extractive Metallurgy)*, 2019(5): 56-59.
- [10] YANG D, YANG G X, GAI S L, et al. Multifunctional theranostics for dual-modal photodynamic synergistic therapy via stepwise water splitting[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(8): 6829-6838.
- [11] SUN L Z, PAN J F, ZHANG X B, et al. Single Ho^{3+} -doped upconversion nanoparticles for high-performance T_2 -weighted brain tumor diagnosis and MR/UCL/CT multimodal imaging[J]. *Advanced Functional Materials*, 2014, 24(42): 6613-6620.
- [12] FENG Y M, XIAO Q B, ZHANG Y H, et al. Neodymium-doped $NaHoF_4$ nanoparticles as near-infrared luminescent/ T_2 -weighted MR dual-modal imaging agents in vivo[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(3): 504-510.

~~~~~

(上接第 41 页)

- [15] KANG J, SENANAYAKE G, SOHN J, et al. Recovery of cobalt sulfate from spent lithium ion batteries by reductive leaching and solvent extraction with Cyanex 272[J]. *Hydrometallurgy*, 2010, 100(3/4): 168-171.
- [16] 满伯乾. 萃取法从废旧锂离子电池回收钴[J]. *应用科学*, 2019(9): 130-131.
- MAN B Q. Recover cobalt from spent lithium ion battery by solvent extraction[J]. *Technology and Life*, 2019(9): 130-131.
- [17] 杨振宁, 陈志传, 高大明, 等. 电镀污泥中铜镍回收方法及工艺的研究[J]. *环境污染与防治*, 2008, 30(7): 58-61.
- YANG Z N, CHEN Z C, GAO D M, et al. Recovery of copper and nickel from electroplating sludge [J]. *Environmental Pollution & Control*, 2008, 30(7): 58-61.
- [18] SPEIGHT J G. *Lange's Handbook of Chemistry*[M]. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2005.
- [19] 肖超, 曾理, 李义兵, 等. 磷酸盐沉淀法除铬热力学研究[J]. *有色金属科学与工程*, 2017, 8(5): 103-108.
- XIAO C, ZENG L, LI Y B, et al. Thermodynamic analysis on removing Cr(III) by phosphate precipitation[J]. *Nonferrous Metals Science and Engineering*, 2017, 8(5): 103-108.
- [20] 孙放, 赵中伟. 磷酸钙体系热力学分析[J]. *稀有金属与硬质合金*, 2006, 34(2): 35-39.
- SUN F, ZHAO Z W. Thermodynamic analysis on calcium phosphate system [J]. *Rare Metals and Cemented Carbides*, 2006, 34(2): 35-39.
- [21] 肖超, 曾理, 李义兵, 等. 磷酸盐沉淀法除铁过程热力学分析[J]. *中国有色金属学报*, 2018, 28(3): 637-643.
- XIAO C, ZENG L, LI Y B, et al. Thermodynamic analysis on removing iron by phosphate precipitation[J]. *The Chinese Journal of Nonferrous Metals*, 2018, 28(3): 637-643.