

内标化 SERS 探针检测磷脂双层膜中 药物释放研究初探

邹欣欣^{1,2}, 王运庆²

(1. 烟台大学新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心, 分子药理学和药物评价教育部重点实验室, 烟台大学, 山东 烟台 264005; 2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 本研究设计合成了一种核-壳结构内标化表面增强拉曼散射(SERS)探针,并用于磷脂双层膜中药物释放研究.该SERS探针中,拉曼报告分子包裹在金纳米球和金纳米壳层中间,金纳米壳层将报告分子与外部环境隔开,确保了信号稳定性.同时,金纳米壳外层裸露,可以用于待测分子的SERS传感.进一步在内标化SERS探针表面包裹以磷脂双分子层,以二乙基硫脲三碳菁化碘(DTTC)作为模型药物,构建探针标记脂质体纳米结构,并进行细胞标记.通过检测探针内标和DTTC拉曼信号的比率变化,可以反映细胞内纳米药物的释放行为.所建立的比率方法有效消除了拉曼测试仪器本身误差的影响,为药物的体内检测提供了一种新的检测方法.

关键词: 表面增强拉曼散射(SERS);内标化SERS探针;脂质体;药物释放

中图分类号: R917 **文献标志码:** A

近年来,表面增强拉曼散射(SERS)纳米光学探针在生物医学领域得到了广泛关注.SERS探针主要由金、银等贵金属纳米粒子和表面结合的有机报告分子2部分组成^[1-3],其中贵金属纳米粒子作为拉曼信号增强基底,报告分子则赋予SERS探针特征散射谱峰,二者的光学性质共同决定SERS探针的信号强度^[4].与荧光、核磁共振成像相比,SERS成像技术具有多方面的优越性^[5-7]:(1)灵敏度高.单个SERS探针的散射光强度是单个量子点荧光强度的100倍以上,在痕量、定量检测中优势突出;(2)空间分辨率高.检测光学信号通常聚焦到200 μm微区范围,实现细胞和微区组织水平的信号示踪;(3)拉曼测试避免了复杂的样品处理,分析速度快,

可以满足动态测定需求^[8-9].

最近SERS成像技术被尝试应用于纳米药物检测.例如,有研究实时检测了谷胱甘肽引发的金纳米粒子(AuNP)装载6-巯基嘌呤和6-巯基鸟嘌呤抗癌药物在活细胞中的动态释放过程^[10].首先将药物结合在AuNP表面,生成具有药物分子特征SERS信号的纳米复合物.随着药物分子从AuNP表面解离,复合物的SERS信号逐渐下降,据此实现细胞和小鼠肿瘤组织内纳米药物的定位和释药速率测定.也有工作通过化学偶联的方法制备银纳米粒子-氧化石墨烯(GO)复合体系,然后在其表面负载阿霉素(DOX),得到具有DOX特征SERS信号的纳米药物^[11].通过细胞内SERS信号变化研究了细胞内

收稿日期: 2017-03-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573393);山东省科学技术发展计划资助项目(2014GF01074);烟台大学研究生科技创新基金资助项目(YDYB1316).

作者简介: 邹欣欣(1990-),女,山东滨州人,硕士研究生.

通信作者: 王运庆(yqwang@yic.ac.cn),副研究员,博士,从事纳米药物研究.

GO 载药材料表面药物释放过程。

这些工作展示了 SERS 技术用于原位动态监测的可行性,但在定量测定准确性方面还存在如下问题:(1) 探针结构的不完善使得探针自身信号不稳定,在一定时间内外层吸附的报告分子会发生解离;(2) 在定量方法上,由于拉曼光谱仪在分析样品时需要显微镜的辅助,显微镜聚焦位置的偏差将造成采集拉曼信号强度的变化,引起定量误差。因此,为了进一步推动 SERS 技术在药物研究中的发展,必须在新探针设计和分析方法上实现突破。

本研究内容设计新型金壳包裹的内标化 SERS 探针,显示良好的信号稳定性和灵敏度。进一步以磷脂双分子层作为脂质体模型,以 DTTC 作为模型药物进行检测,通过拉曼信号的比率变化来反映细胞内纳米药物的释放行为。建立的比率策略有效消除了拉曼测试误差的影响,为药物的体内检测提供了一种新的检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

氯金酸、硝酸银、抗坏血酸,国药集团化学试剂有限公司;孔雀石绿异硫氰酸酯(MGITC),上海赛默飞世尔科技;二乙基硫醛三碳菁碘(DTTC)、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;蛋黄卵磷脂 Lipoid E80,德国 Lipoid GmbH 公司。实验所用的水均是经过二次纯化所得的超纯水($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)。

扫描电子显微镜(S-4800),日本 Hitachi 公司;DXR 激光共聚焦显微拉曼光谱仪,Thermo Fisher 公司;注射泵(LSP04-1A),保定兰格恒流泵有限公司。

1.2 实验内容

1.2.1 金纳米球的合成 根据文献报道^[12],金纳米球的合成采用种子合成法进行。

种子的合成:5 mL 0.2 mol/L 十六烷基三甲基氯化铵(CTAC),加入 4.5 mL 去离子水,515 μL 4.86 mmol/L HAuCl_4 溶液,450 μL 0.1 mol/L 的冰镇 NaBH_4 溶液,30 $^\circ\text{C}$ 快速搅拌 2 min,静置 1 h。

金纳米球的合成:4.5 mL 去离子水,加入 5 mL 0.2 mol/L CTAC,515 μL 4.86 mmol/L HAuCl_4 ,75 μL 0.04 mol/L 抗坏血酸,搅拌均匀,加入 25 μL 种子,28 $^\circ\text{C}$ 搅拌均匀,静置 2 d。加入不同量的 1.0 mol/L 的抗坏血酸溶液和等量的 4.86 mmol/L

HAuCl_4 溶液合成金纳米球,28 $^\circ\text{C}$ 搅拌 15 min。

1.2.2 内标化 SERS 探针 Au@MGITC@Au 的合成

取 1.0 mL 上述合成的金纳米球溶液,9 000 r/min 离心 15 min,分散在 1.0 mL 的去离子水中,加入一定浓度的孔雀石绿异硫氰酸酯(MGITC)溶液,摇匀,静置过夜,9 000 r/min 离心 15 min,分散在 1.0 mL 去离子水中,加入 1.0 mL 0.2 mol/L 的 CTAC 溶液,1.0 mol/L 的抗坏血酸溶液和等量的 4.86 mmol/L HAuCl_4 溶液,28 $^\circ\text{C}$ 搅拌 15 min。

1.2.3 内标化 SERS 探针稳定性的考察

取 3 份 1.0 mL 内标化 SERS 探针溶液,分别加入 1.0 mL 0.5 mol/L HCl 溶液,30% NaCl 溶液,3% H_2O_2 溶液,摇匀,室温下放置一段时间,观察溶液的状态,离心,用等量的去离子水分散,进行样品溶液拉曼信号值的测定,比较处理前后信号值的变化。

1.2.4 DTTC 脂质体的制备 称取一定量的精制蛋黄卵磷脂 Lipoid E 80 于圆底烧瓶中,加入无水乙醇(5 mg/mL),使其完全溶解,再加入一定量的 DTTC 的乙醇溶液(终浓度为 2×10^{-6} mol/L),37 $^\circ\text{C}$ 旋蒸除去乙醇,使圆底烧瓶壁上形成薄膜,真空干燥 2 h,加入与乙醇等量的蒸馏水水化薄膜,振摇使瓶壁上的薄膜完全溶解,得到浑浊的白色溶液。进一步水浴超声 30 min,得到近似透明的溶液,过 250 nm 的微孔滤膜,备用。

1.2.5 内标化 SERS 探针标记脂质体及细胞成像

取 1.0 mL 内标化 SERS 探针,3 000 r/min 离心 10 min,用 1.0 mL DTTC 脂质体分散,室温放置 12 h,脂质体的磷脂双层将探针表面的 CTAC 置换,形成脂质体包裹的探针结构。

培养肺癌细胞 SMMC 7721 至对数期,胰酶消化成单细胞悬液,稀释后接种于 24 孔板中,置于细胞培养箱中培养。贴壁后,加入脂质体包裹内标化 SERS 探针溶液,共培养 2、4 和 6 h 后,置于玻璃片上密封并观察细胞形态,记录细胞内的拉曼信号。

2 结果与讨论

内标化 SERS 探针用于药物释放过程动态监测的研究思路如图 1 所示。标记的纳米药物将同时体现内标探针信号和金壳外层吸附的药物信号。进入细胞后,内标信号由于金壳的保护不受干扰,而药物自身的拉曼信号则随着药物分子游离和释放而逐渐下降。通过实时监测细胞内内标分子和待测药物的 SERS 信号响应值,即可推算出药物分子的浓度,达到对细胞内药物的实时监测目的。

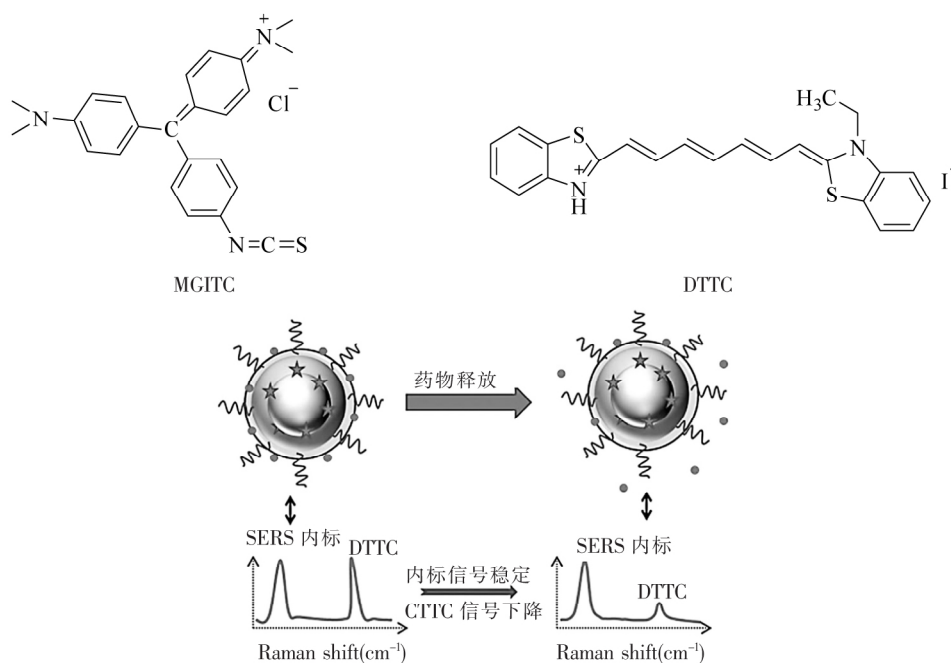


图 1 内标化 SERS 探针用于监测药物释放的原理图

Fig. 1 Schematic of drug release monitoring using internalized SERS probe

2.1 内标化 SERS 探针合成的考察

2.1.1 金球的合成 制备内标化 SERS 探针所需要的金球核心采用抗坏血酸还原氯金酸的方法制备. 如图 2(a) 所示, 金球粒径 30 nm 左右, 粒径均匀, 分散性较好. 金球合成以后, 用去离子水洗掉表面高密度涂布的 CTAC 配体, 以消除对后续巯基报告分子与金球的吸附和金壳生长的不利影响.

2.1.2 Au@MGITC@Au 内标化 SERS 探针的合成

本实验选用 MGITC 作为内标拉曼分子, 其通过 Au-S 化学键与金球稳定结合, 形成种子溶液. 进一步向种子溶液中加入一定体积的 Au^{3+} 生长液, 形成壳核型 Au@MGITC@Au 内标探针. 如图 2 所示, 随着 Au^{3+} 生长液加入量的增加, 合成探针的粒径逐渐增大, 当加入 200 μL 金生长液时, SERS 信号强度达

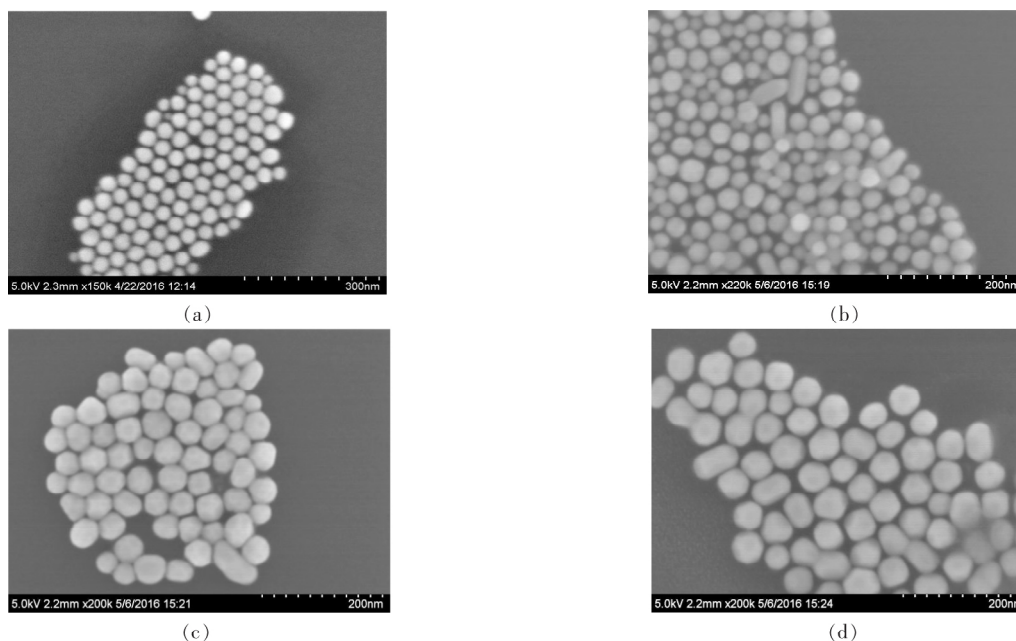


图 2 扫描电镜

Fig. 2 SEM image

到最大值,当继续加入时基本保持稳定(图 3、4),因此选择加入 200 μL 金生长液作为合成内标探针的条件. 信号增强的原因是外层金壳包裹以后,与金球内核形成“热点”效应,使嵌入在“热点”中的 MGITC 感受到显著增强的电磁场效应. 探针的高灵敏度为下一步的细胞内检测奠定了基础.

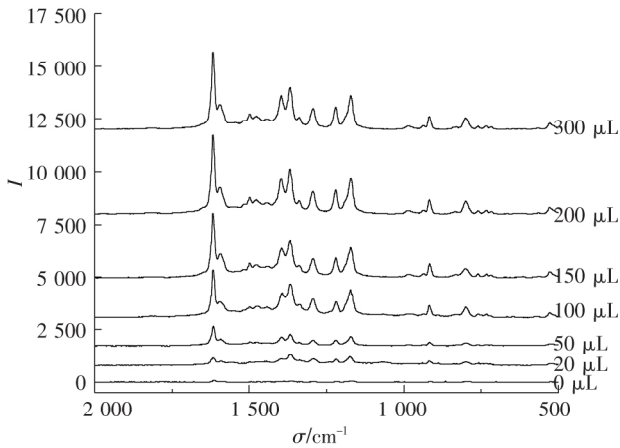


图 3 加入不同体积 Au^{3+} 生长液的 Au@MGITC@Au 内标化 SERS 探针的拉曼光谱

Fig.3 Raman spectra of Au@MGITC@Au internalized SERS probes with different volume Au^{3+} growth solution

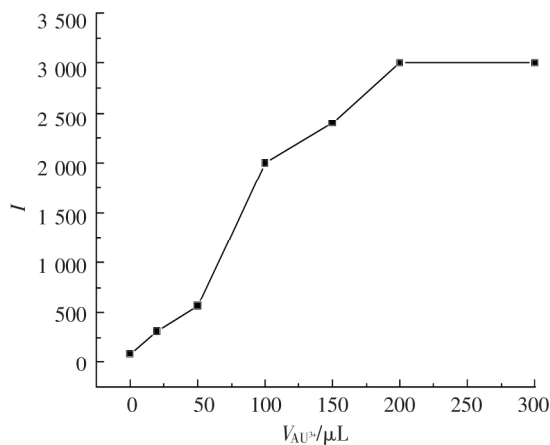


图 4 在 1613.52 cm^{-1} 处加入 Au^{3+} 生长液的体积与内标化 SERS 探针的拉曼信号值关系

Fig.4 The relationship between the volume of Au^{3+} growth solution and the Raman intensity of the internalized SERS probe at 1613.52 cm^{-1}

2.2 内标化 SERS 探针稳定性的考察

为了考察内标化 SERS 探针应用于生物研究中的信号稳定性,分别测试了其在酸、盐、过氧化物等严苛条件下的信号变化. 同时制备了银层包裹的 Au

@MGITC@Ag SERS 探针作对比. 实验结果显示,金壳包裹的内标化 SERS 探针在各测试条件下均具有良好的稳定性,而由于银层氧化、溶解等因素, Au@MGITC@Ag SERS 探针的信号显著下降(图 5).

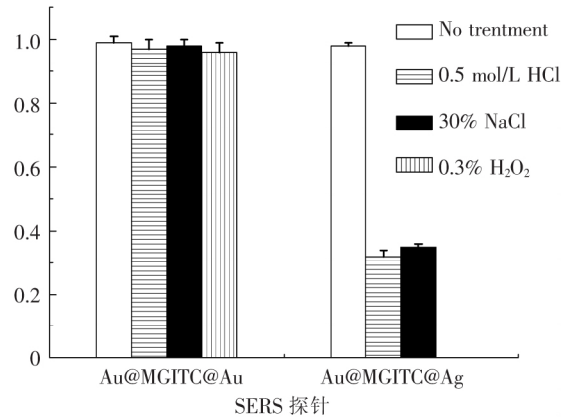


图 5 与 HCl , NaCl , H_2O_2 混合前后 Au@MGITC@Au 和 Au@MGITC@Ag 自身拉曼信号的比值

Fig.5 The signal variation of Au@MGITC@Au and Au@MGITC@Ag before and after the treatment of HCl , NaCl , H_2O_2 solutions

2.3 内标化 SERS 探针的生物应用及细胞成像

在内标化 SERS 探针中, MGITC 包裹在金纳米球和金纳米壳层中间,显示了良好的信号稳定性. 而金纳米壳外层裸露,可以进一步用于待测分子的 SERS 传感. 为了验证 SERS 传感的设想,本实验以 DTTC 溶液作为模型药物进行拉曼信号的测定. 如图 6 和图 7 分别为 MGITC 和 DTTC 的 SERS 图谱,二者分别具有 1613.53 cm^{-1} 处和 1122.05 cm^{-1} 处的特征峰. 在混合光谱中这 2 个特征峰能够良好分离,因此可以用这 2 个峰位的强度指征各自含量. 图 8 显示不同浓度 DTTC 溶液加入到内标化 SERS 探针后的混合光谱图. 随着 DTTC 溶液浓度的增大,其拉曼响应值逐渐增大,而内标报告分子 MGITC 的信号值基本保持不变. 图 9 显示分别以 1613.53 cm^{-1} 处和 1122.05 cm^{-1} 处的特征峰强度对应 DTTC 溶液所做折线图,可看出,内标化 SERS 探针可以检测到 10^{-6} mol/L 的 DTTC 溶液,灵敏度高,且 DTTC 在 10^{-6} 到 $5 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ 范围内呈良好的线性关系,DTTC 与内标分子的拉曼信号的比率与 DTTC 浓度的线性方程为 $y = 0.0096x + 0.1032$ ($r = 0.9987$),表明可以通过信号比率的方法反映探针表面待测分子的含量变化.

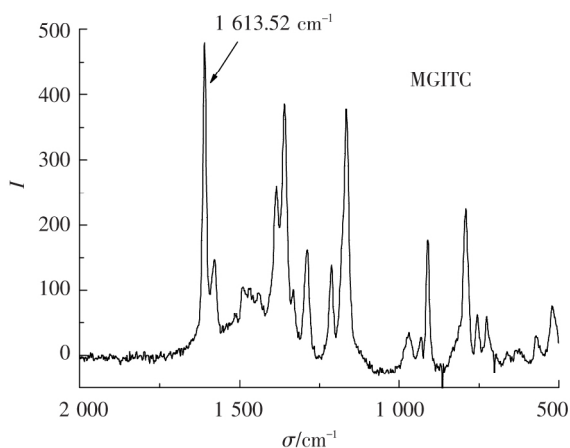


图 6 MGITC 的拉曼光谱
Fig. 6 The Raman spectra of MGITC

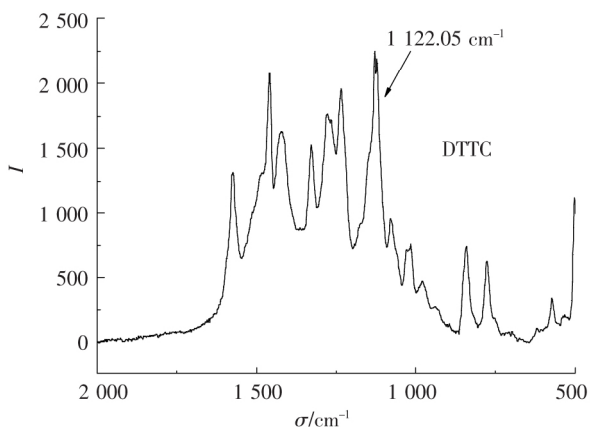


图 7 DTTC 的拉曼光谱
Fig. 7 The Raman spectra of DTTC

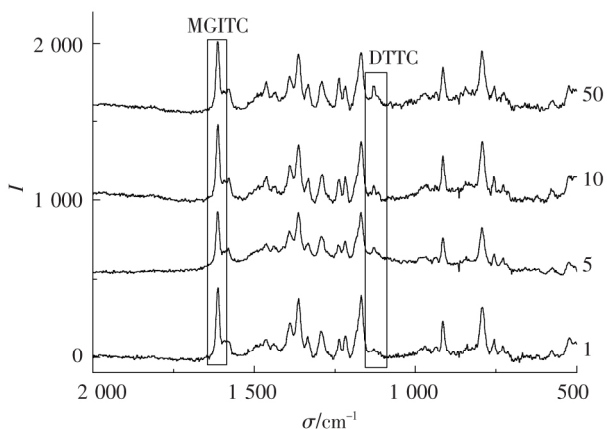


图 8 内标化 SERS 探针中分别加入不同浓度的 DTTC(1, 5, 10, 50 $\mu\text{mol/L}$) 溶液的拉曼光谱
Fig. 8 The Raman spectra of different concentration DTTC (1, 5, 10, 50 $\mu\text{mol/L}$) solution were added to the internalized SERS probes

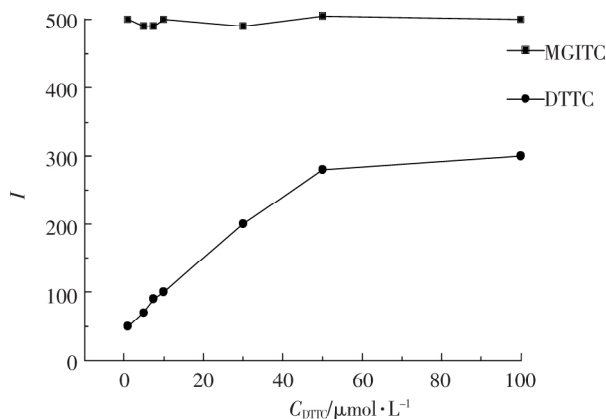


图 9 内标化 SERS 探针中加入 DTTC 溶液的体积与拉曼信号的关系
Fig. 9 The relationship between the volume of the DTTC solution and the Raman signal intensity

进一步以磷脂双分子层作为脂质体模型,以 DTTC 作为模型药物进行检测,通过拉曼信号的比率变化来研究细胞内纳米药物的释放行为.将内标化 SERS 探针标记脂质体与肺癌细胞(SMMC 7721)共培养,记录标记脂质体溶液被细胞摄取后不同时间的拉曼信号变化情况.如图 10 所示,标记后的脂质体可以很快被细胞摄取,位于细胞内呈现颗粒状金黄色的 SERS 探针图像.在探针出现的微区可以采集到明显的 SERS 信号,且随着探针在细胞中时间的延长,内标分子的信号值几乎保持不变,而 DTTC 的信号峰逐渐降为零.该实验结果表明,验证了在细胞内磷脂层中 DTTC 缓慢释放,使其自身的拉曼信号下降(图 11).

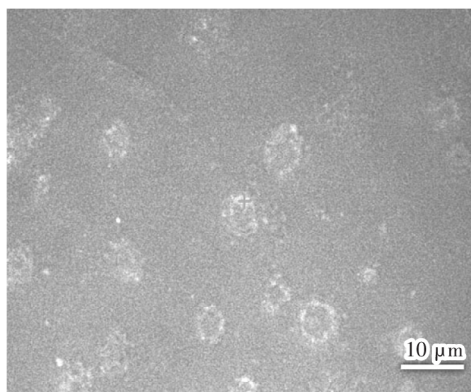


图 10 肺癌细胞 SMMC 7721 与标记脂质体溶液共培养 4 h 的显微镜照片
Fig. 10 The photo of SMMC 7721 cells incubated with liposome coated SERS tags for 4 h

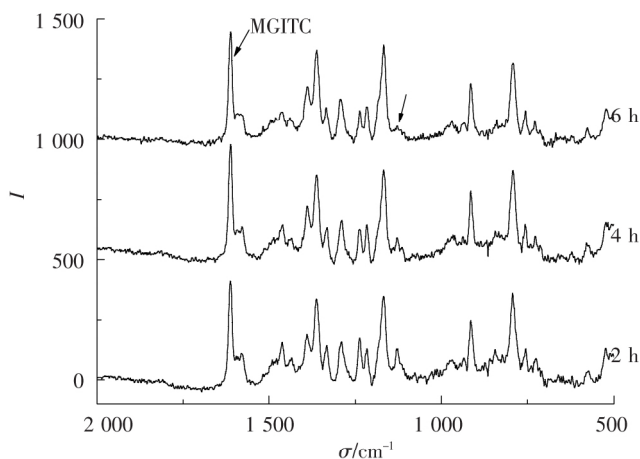


图 11 肺癌细胞 SMMC 7721 与标记脂质体溶液共培养不同时间的拉曼光谱

Fig. 11 The Raman spectra obtained from SMMC 7721 cells at different incubation time

3 小 结

本实验设计并合成了一种新型内标化 SERS 探针,可以避免外部环境对探针稳定性的影响,研究了该探针在酸性、盐和过氧化物条件下的稳定性,结果证明,该内标化 SERS 探针稳定性良好,可以用于进一步的实际生物样品的检测.进一步以磷脂双分子层作为脂质体模型,以 DTTC 作为模型药物进行检测,显示出较好的内标特性.本工作证实了内标化 SERS 探针用于细胞内药物的释放研究的可行性,为纳米药物分析提供了新的探针工具和检测方法.

参考文献:

- [1] ZHOU Y, LEE C, ZHANG J, et al. Engineering versatile SERS-active nanoparticles by embedding reporters between Au-core/Ag-shell through layer-by-layer deposited polyelectrolytes [J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2013, 1(12): 3695–3699.
- [2] CHEN D, COPELAND C, MAJUMDAR D, et al. In silico modeling of functionalized graphene oxide-metal cluster con-

jugates as Raman probe: Raman activity of pyridine [J]. *Structural Chemistry*, 2017, 28(2): 379–389.

[3] 伍林, 欧阳兆辉, 曹淑超. 拉曼光谱技术的应用及研究进展 [J]. *光散射学报*, 2005, 17(2): 180–186.

[4] WANG Y, YAN B, CHEN L. SERS tags: novel optical nanoprobe for bioanalysis [J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(3): 1391–1428.

[5] 许智宏, 黄伟, 林多, 等. 鼻咽癌组织拉曼光谱研究进展 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2016, 36(8): 2518–2521.

[6] HASSANAINA WA, IZAKEA EL, SCHMIDT MS, et al. Gold nanomaterials for the selective capturing and SERS diagnosis of toxins in aqueous and biological fluids [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 91(15): 664–672.

[7] CONDE J, BAO C, CUI D, et al. Antibody-drug gold nanoantennas with Raman spectroscopic fingerprints for in vivo tumor theranostics [J]. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2014, 183(10): 87–93.

[8] KARABEBER H, HUANG R, IACONO X P, et al. Guiding brain tumor resection using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles and a hand-held Raman scanner [J]. *American Chemical Society Nano*, 2015, 8(10): 9755–9766.

[9] JIANG X, JIANG Z, XU T, et al. Surface-enhanced Raman scattering-based sensing in vitro: facile and label-free detection of apoptotic cells at the single-cell level [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(5): 2809–2816.

[10] BANHOLZER MJ, MILLSTONE JE, QIN L, et al. Rationally designed nanostructures for surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(5): 885–897.

[11] HUANG J, ZONG C, SHEN H, et al. Tracking the intracellular drug release from graphene oxide using surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Nanoscale*, 2013, 5(21): 10591–10598.

[12] LAI X F, ZOU Y X, WANG S S, et al. Modulating the morphology of gold graphitic nanocapsules for plasmon resonance-enhanced multimodal imaging [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(10): 5385–5391.

Preliminary Investigation on Drug Release from Phospholipid Bilayer Film by Internal Standard-SERS Tags

ZOU Xin-xin^{1,2}, WANG Yun-qing²

(1. School of Pharmacy, Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, Yantai University, Yantai 264005, China; 2 Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chi-

nese Academy of Sciences , Yantai 264003 , China)

Abstract: An internalized SERS probe is designed and synthesized for the study of release behavior of drug encapsulated in lipid bilayers. In this SERS probe , Raman reporter molecule is entrapped inside the metal shell so that the Raman signal is not affected by the external environment and keeps stable. Moreover , the probe has a high sensitivity due to the additional signal enhancement effect of the outer shell. Then SERS probe labeled liposome is prepared by coating lipid bilayer on the surface of the internalized SERS probe and using DTTC as a model drug. By monitoring the ratio variation of the Raman intensity of DTTC and the SERS probe , the release behavior of DTTC inside the lipid bilayer in cells should be reflected. The proposed ratiometric method can eliminate effectively the effect of error from the Raman measurement and provide a new way for the in vivo drug release investigation.

Key words: Surface-Enhanced Raman Scattering(SERS) ; internalization SERS probe; liposome; drug release

(责任编辑 周雪莹)

(上接第 18 页)

Synthesis , Antifungal Activity of Novel Inulin Derivatives with Halogeno Benzene

CHEN Yuan¹ , GAO Li¹ , GUO Zhan-yong²

(1. Institute of Ocean , Yantai University , Yantai 264003 , China; 2. Yantai Institute of Coastal Zone Research , Chinese Academy of Sciences , Yantai 264003 , China)

Abstract: Using chemical modification , we graft antifungal groups (halogeno benzene and pyridine) onto inulin. The structure of target products is identified by infrared spectrometry and ¹H-NMR. Their antifungal activities against three kinds of phytopathogens are estimated in vitro , respectively. The inhibitory property of all the obtained inulin derivatives exhibits a remarkable improvement over raw material. Of all the synthesized inulin derivatives , compound 4ClPhPyAIL reveals the strongest antifungal ability with inhibitory indices of 61% , 49% , and 46% against *Colletotrichum lagenarium* (Pass) Ell. et halst , *Fusarium oxysporum* (schl.) F. sp. *niveum* (F. *oxysporum*) and *Phomopsis asparagi* (Sacc.) Bubak at 1.0 mg/mL respectively. These data demonstrate that chemical modification is a powerful way to improve biological activity of inulin. Furthermore , these experiments have provided a new idea for exploit of high-value inulin products.

Key words: inulin derivatives; halogeno benzene; synthesis; structure identification; antifungal activity

(责任编辑 周雪莹)