

# 新型功能化上转换纳米材料对脉络膜黑色素瘤细胞特异性成像的研究

赵兵新, 符爱存, 李秀红, 魏丽, 王卫群

**引用:**赵兵新, 符爱存, 李秀红, 等. 新型功能化上转换纳米材料对脉络膜黑色素瘤细胞特异性成像的研究. 国际眼科杂志, 2025, 25(1): 24-30.

**基金项目:**河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(No. LHGJ20190289)

**作者单位:**(450000)中国河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院眼科

**作者简介:**赵兵新, 毕业于温州医科大学, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 眼用纳米生物技术与生物医学工程、青少年近视防控。

**通讯作者:**王卫群, 毕业于郑州大学, 医学博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 屈光手术、青光眼. [xiwangw390@163.com](mailto:xiwangw390@163.com)

收稿日期: 2024-04-01 修回日期: 2024-11-29

## 摘要

**目的:**观察通过改进方法制备出的新型功能化上转换纳米材料 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 对脉络膜黑色素瘤细胞(OCM-1)的特异性成像现象。

**方法:**制备出 NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er(UCNP<sub>s</sub>), 再等离子体处理将之表面羧基化; 分别接载氨基聚乙二醇和转铁蛋白(Tf)制备出 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf。对其进行相应表征, 检测其生物相容性, 通过荧光分光光度仪和倒置荧光显微镜检测对 OCM-1 的特异性荧光现象。

**结果:**相应表征证明成功合成了 UCNP<sub>s</sub> 和 UCNP<sub>s</sub>-PEG, 以及进一步接载 Tf 后形成的 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf。复合物 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 具有卓越的生物相容性, 并且能发出显著的绿色荧光。同样条件下, 荧光强度检测结果和倒置荧光显微镜的观察结果均证明其在细胞 OCM-1 成像方面的显著特异性。

**结论:**合成的新型功能化 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 纳米复合物生物相容性好, 且可以对细胞 OCM-1 特异性成像。

**关键词:**上转换纳米颗粒; 等离子体; 脉络膜黑色素瘤; 转铁蛋白; 特异性成像

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2025.1.05

## Study on specific imaging of choroidal melanoma cells by novel functionalized upconversion nanomaterials

Zhao Bingxin, Fu Aicun, Li Xiuhong, Wei Li, Wang Weiqun

**Foundation item:**Henan Province Medical Science and Technology Research Plan Province Department Joint Construction Project (No. LHGJ20190289)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China  
**Correspondence to:** Wang Weiqun. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China. [xiwangw390@163.com](mailto:xiwangw390@163.com)

Received: 2024-04-01 Accepted: 2024-11-29

## Abstract

• **AIM:** To prepare a novel functionalized upconversion nanomaterial UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf through an improved method and observe its specific imaging phenomenon to choroidal melanoma cells (OCM-1).

• **METHODS:** NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er (Up-conversion nanoparticles, UCNP<sub>s</sub>) was Prepared and plasma was treated to carboxylate the surface; then amino polyethylene glycol and transferrin (Tf) were respectively loaded to prepare UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf. Characterized them accordingly, its biocompatibility was tested accordingly, and the specific fluorescence phenomenon of OCM-1 was detected by fluorescence spectrophotometer and inverted fluorescence microscopy.

• **RESULTS:** Characterization confirmed successful synthesis of UCNP<sub>s</sub>, UCNP<sub>s</sub>-PEG, and further loading of Tf to form UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf. UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf showed excellent biocompatibility and emitted significant green fluorescence. Under the same conditions, fluorescence intensity measurement and observations from the inverted fluorescence microscope both demonstrated its significant specificity in imaging to OCM-1 cells.

• **CONCLUSION:** The synthesized novel functionalized UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf nanocomposite showed good biocompatibility and achieve specific imaging to OCM-1 cells.

• **KEYWORDS:** up-conversion nanoparticles; plasma; choroidal melanoma; transferrin; specific imaging

**Citation:** Zhao BX, Fu AC, Li XH, et al. Study on specific imaging of choroidal melanoma cells by novel functionalized upconversion nanomaterials. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2025, 25(1): 24-30.

## 0 引言

脉络膜黑色素瘤是最常见的葡萄膜恶性肿瘤,也是成人最常见的眼内恶性肿瘤,其患病率在我国眼部恶性肿瘤的第二位,仅次于视网膜母细胞瘤。其特点是恶性程度高,易转移,并且即使是在明确的转移前做眼球摘除,5 a 死亡率仍然高达 17%-53%,对患者的视力及生命造成严重威胁<sup>[1]</sup>。目前该疾病主要是通过常规影像学检查初步

诊断,病理诊断确诊,往往难以发现早期病变。因此开发出特异性更强的检测手段,改进早期脉络膜黑色素瘤诊断和治疗的方法很有必要。上转换发光纳米材料可以在低能光的刺激下发出高能荧光<sup>[2]</sup>。这类纳米材料的荧光强度显著,灵敏度高,特别是在生物成像的应用上展现出了令人瞩目的优势<sup>[3]</sup>。但其生物相容性差,必须经过一定的生物材料修饰后,对生物机体才会有较好的安全性,且修饰方法较为复杂,限制了其在生物成像方面的应用<sup>[4]</sup>。等离子体表面处理技术是一种独特的表面修饰方法<sup>[5-6]</sup>。聚乙二醇具有非常优异的水溶性和良好的生物相容性,在生物工程研究中,常用来修饰材料改善其生物活性,使生物相容性较差的微观尺寸无机物材料改性后可以直接用于细胞或者生物机体的研究和实际应用<sup>[7]</sup>。由配体受体强有力的亲和作用介导的内吞现象是动物细胞经典的跨膜转运机制之一。转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)在恶性肿瘤细胞表面具有高表达的特性,使装载转铁蛋白(transferrin, Tf)的药物或分子有靶向恶性肿瘤细胞发挥作用的可能性<sup>[8-9]</sup>。我们之前也基于脉络膜黑色素细胞(OCM-1)表面TfR高表达的特性,开发了通过Tf和TfR介导用于靶向输送到脉络膜黑色素瘤的新型药物<sup>[10]</sup>。因此,本研究拟先通过等离子体处理,将NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er(Up-conversion nanoparticles,UCNPs)表面上易修饰小分子有机基团羧基后,使接载有机物的反应更加容易,再接载有机物氨基聚乙二醇mNH<sub>2</sub>-PEG,用来提升上转换纳米材料生物相容性。随后接载转铁蛋白Tf,合成复合物纳米粒UCNPs-PEG-Tf,用于对OCM-1细胞进行特异性成像的研究,拟实现对OCM-1细胞的示踪以改进脉络膜黑色素瘤诊断和治疗方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要材料** LnCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O(Ln=Y, Yb, Er, 79:20:1)(Sigma, 美国); NH<sub>4</sub>F(Sigma, 美国); 乙酸(Sigma, 美国); 氨基聚乙二醇(Sigma, 美国); 转铁蛋白(Sigma, 美国); NHS(Sigma, 美国); EDC·HCl(Sigma, 美国); 视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)(温州医科大学); OCM-1细胞(温州医科大学)。

**1.1.2 主要仪器** 高速离心机(Centrifuge 5810R, 德国Eppendorf公司); 傅里叶变换红外光谱仪(NICOLET 6700, Thermal Scientific); F-4600 荧光分光光度计(F-46005J2-0004, 日本Hitachi公司); 电子天平(AL204-IC, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司); 荧光倒置显微镜(IX81, 奥林巴斯); 透射电子显微镜(TEM, Tecnai F 2000, 美国); 多功能酶标仪(Molecular Devices公司)

### 1.2 方法

**1.2.1 β-NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er 的制备** 在三颈烧瓶中放入5 mL含有1 mmol LnCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O(Ln=Y, Yb, Er, 79:20:1)的甲醇溶液,再加入6 mL的油酸,15 mL的十八烯,在150℃温度,通氩气流的条件下,磁力搅拌30 min,形成黄色的溶液。降低温度至50℃,加含有0.16 g NH<sub>4</sub>F和0.10 g NaOH的甲醇溶液,在50℃温度、通氩气流的条件下,磁力搅拌30 min,升高温度至110℃,除去残余的甲醇和水。混合物溶液加热至308℃,保持1.5 h。然后用乙醇洗涤多次,通过高速离心机离心分离,即可得到β-NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er(UCNPs)。

### 1.2.2 乙酸等离子体处理 UCNPs 形成 UCNPs-COOH

关闭与等离子体处理仪连接的装有乙酸的烧瓶,并将乙酸加热至70℃,形成乙酸气体。称取一定量干燥的UCNPs,最大面积均匀在称量纸上摊开,放到等离子体处理仪腔体中,并关好阀门。打开总电源,打开真空泵,等到显示屏显示系统的真空压强为5 Pa,打开进气口,让乙酸气体进入腔体,使腔体内气压达到10 Pa以上,接着以20 W的功率进行等离子体处理90 s,使UCNPs表面接上羧基-COOH,形成UCNPs-COOH。

**1.2.3 UCNPs-COOH 接载 mNH<sub>2</sub>-PEG 形成 UCNPs-PEG** 通过氨基聚乙二醇(mNH<sub>2</sub>-PEG)上的氨基和UCNPs-COOH上羧基形成的酰胺-CO-NH-结合在一起形成UCNPs-PEG。具体步骤如下:mNH<sub>2</sub>-PEG充分溶解到水中配成1 mg/mL。将一定质量的NHS加入到上述溶液中,常温下磁力搅拌15 min,然后将一定质量的EDC加入其中持续搅拌15 min。最后将1 mg/mL UCNPs-PEG加入其中,常温持续搅拌4 h。终产物溶液通过离心机1 000 r/min离心10 min,将未反应的UCNPs-COOH除去,保留上清液;再将上清液通过离心机6 000 r/min离心30 min,将上清液弃掉,把EDC和NHS以及未反应的mNH<sub>2</sub>-PEG除去,沉淀即为UCNPs-PEG。

**1.2.4 UCNPs-PEG 接载 Tf 形成 UCNPs-PEG-Tf** Tf含有羧基,通过UCNPs-PEG上的氨基和Tf上羧基形成的酰胺-CO-NH-结合在一起形成UCNPs-PEG-Tf<sup>[10]</sup>。具体步骤大致与1.2.3相同。

**1.2.5 合成材料的相关表征** 对合成的材料进行透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)、接触角(contact angle, CA)、傅里叶红外变换光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)和荧光光度计等表征。

**1.2.6 对 UCNPs-PEG-Tf 纳米复合物进行生物相容性检测** 通过CCK-8法检测细胞生存率和活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)释放率法检测该复合物对于细胞的生物相容性。

**1.2.6.1 用 CCK-8 法检测 UCNPs-PEG-Tf 对 ARPE-19 的毒性** CCK-8试剂盒中的试剂被活细胞中的物质还原为黄色的可溶性的甲臍,活细胞的数量和生成的甲臍吸光值成正比,可以用该原理检测活细胞的生存率<sup>[11]</sup>。将处于对数生长期的ARPE-19细胞按照5×10<sup>3</sup>个/孔将之加入到96孔板中,在37℃、5% CO<sub>2</sub>的湿润培养箱中培养24 h后,将每孔的细胞培养液吸除,除对照组外,实验组分别加入含有不同浓度(0、5、10、50、100 μg/mL)UCNPs-PEG-Tf材料的10%胎牛血清的新鲜细胞培养液,继续培养。分别于24、48、72 h后,弃掉培养基,每孔用PBS清洗2遍。然后避光条件下加入含有10% CCK-8试剂的细胞培养液孵育2 h,在450 nm吸光度的酶标仪中进行检测得到OD值,然后计算细胞存活率。计算式为:细胞存活率=(实验孔吸光值-空白孔吸光值)/(对照孔吸光值-空白孔吸光值)×100%。

**1.2.6.2 检测细胞内 ROS 释放率** 细胞内的ROS增加可引起氧化应激反应从而导致细胞受到损害<sup>[12]</sup>,根据检测结果计算ROS的释放率,分析细胞内ROS水平的变化,进而可以反映细胞受损伤的情况。将无菌盖玻片置于6孔板内,接种ARPE-19细胞,细胞数为10<sup>5</sup>个/孔,于相应条

件(37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、湿度为90%)下培养箱中孵育;24 h后,用含有不同浓度(0、5、10、50、100 μg/mL) UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf材料的新鲜细胞培养液替换旧培养液,继续培养;各组孔板到达相应培养时间(24、48、72 h)后,吸除原液并加入配置好的DCFH-DA(无血清的培养液配成10 μmol/mL DCFH-DA),锡纸包裹,避光于特定条件下孵育20 min后,吸出原液,用PBS洗涤细胞数次将游离的DCFH-DA去除;用加抗荧光淬灭封片液的载玻片盖上贴有细胞的盖玻片;用多功能酶标仪在激发波长488 nm,发射波长525 nm条件下检测。最后计算ROS的释放率。计算式为:ROS释放率=(实验组荧光值-空白组荧光值)/(对照组荧光值-空白组荧光值)×100%。

### 1.2.7 靶向脉络膜黑色素瘤荧光成像观察

**1.2.7.1 荧光分光光度计检测细胞荧光强度** 取相同数量的OCM-1细胞和ARPE-19细胞置于培养瓶中,用相同浓度的UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf细胞培养液培养4 h;将培养液吸出,并用提前预热好的Hank's平衡盐溶液漂洗后,再加入胰酶使贴壁细胞脱离培养瓶壁,将培养瓶中的细胞悬液离心,之后吸走上清液。分别将收集到的OCM-1细胞和ARPE-19细胞配成相同细胞浓度的液体,使用荧光分光光度计对相同细胞浓度的液体进行荧光检测;对比二者的荧光强度。使用同样的方法,对比UCNP<sub>s</sub>-PEG/UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf对于OCM-1细胞的荧光强度。

**1.2.7.2 倒置荧光显微镜下观察细胞荧光成像** 将无菌清洁干燥的玻璃片(0.8 cm×0.8 cm)放入24孔细胞培养板中,取0.5 mL细胞密度为4×10<sup>4</sup> cell/mL的细胞(ARPE-19和OCM-1)分别混悬液接种于玻璃片上,然后将其放置于特定条件(37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、湿度为90%)下孵育;24 h后,将培养液吸出,预热好的PBS漂洗2遍,加入含有UCNP<sub>s</sub>-PEG/UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf(0.1 mg/mL)的细胞培养液,继续在相同条件孵育2 h;冰甲醇-20 ℃固定7 min,再用PBS漂洗5 min;Hoechst 33258覆盖细胞,-20 ℃下孵育4 min,然后用PBS漂洗;980 nm激光激发,而后在荧光倒

置显微镜下观察。

统计学分析:采用统计学软件SPSS23.0进行分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验表示。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 合成材料的相关表征** TEM结果显示我们合成的UCNP<sub>s</sub>为大小均一、直径约为13.0 nm的球形纳米粒。比色皿中新合成的上转换纳米材料UCNP<sub>s</sub>分散液在980 nm激光的激发下,可以发出强烈的绿色荧光。荧光分光光度计测出该材料在560 nm处有较突出的特征峰。表征结果证明我们合成了可以发出强烈绿色荧光的、具有荧光特征峰的纳米级球形颗粒,见图1。UCNP<sub>s</sub>经过乙酸等离子体处理后形成羧基化的UCNP<sub>s</sub>-COOH,接载氨基聚乙二醇之后形成的UCNP<sub>s</sub>-PEG,再接上Tf后形成UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf,分别给它们做了傅里叶红外变换检测结果见图2。UCNP<sub>s</sub>-PEG是通过UCNP<sub>s</sub>-COOH和mNH<sub>2</sub>-PEG发生酰胺反应形成酰胺键生成的,UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf是UCNP<sub>s</sub>-PEG和Tf发生酰胺反应生成的。前后对比发现,酰胺键的相对应的峰1643 cm<sup>-1</sup>(N-H振动峰)、2880 cm<sup>-1</sup>(C-H伸缩峰)以及1060 cm<sup>-1</sup>(C-H伸缩峰)变的更宽更大。该表征结果表明我们成功合成了UCNP<sub>s</sub>-PEG和UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf。UCNP<sub>s</sub>和UCNP<sub>s</sub>-PEG接触角的测量结果见图3,材料接触角越大,其亲水性越差;接触角越小,其亲水性越好。图3A显示UCNP<sub>s</sub>的接触角测量结果约为80°,图3B显示经过水溶性良好的PEG修饰后,UCNP<sub>s</sub>-PEG的接触角测量结果约为20°。该结果表明UCNP<sub>s</sub>经过水溶性良好的PEG修饰形成UCNP<sub>s</sub>-PEG后,亲水性大大增加。新型复合物UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf分散液用荧光分光光度计检测,在560 nm处有仍然有很明显的波峰出现。嵌入照片显示980 nm红外光激发可发出显著的绿色荧光,见图4。该结果表明,经过PEG以及Tf修饰后形成的新型复合物UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf仍具备发出显著绿色荧光的性能。

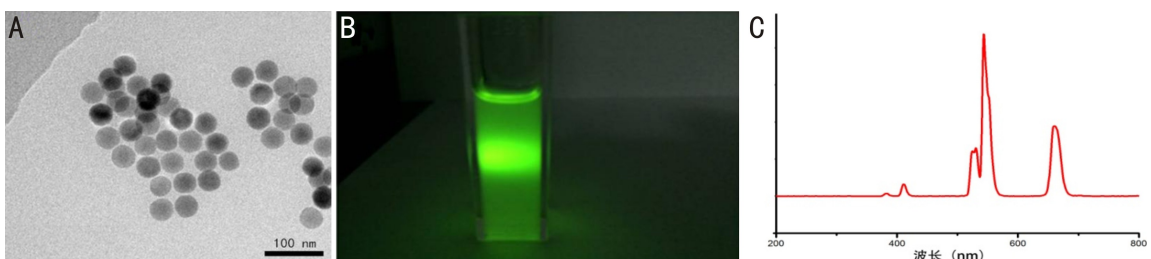


图1 UCNP<sub>s</sub>的表征 A:UCNP<sub>s</sub>的TEM结果图;B:UCNP<sub>s</sub>在980 nm红外光激发下发出绿光的图;C:荧光分光光度计检测的结果。

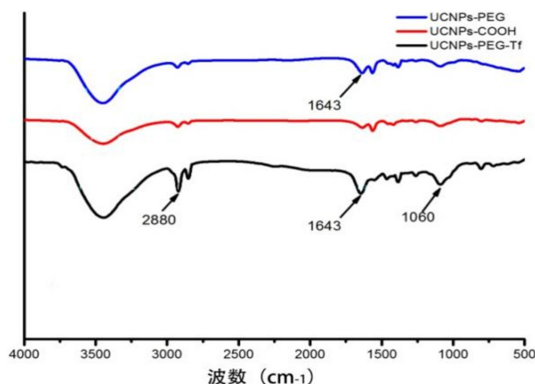


图2 UCNP<sub>s</sub>-COOH及UCNP<sub>s</sub>-PEG和UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf的FTIR图谱。



## 2.2 上转换纳米材料 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 的生物相容性检测

用含有不同浓度复合上转换纳米材料 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 的细胞培养液孵育 ARPE-19 细胞, 得出 CCK-8 检测数据, 上转换纳米材料 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 浓度与培养时间和 ARPE-19 生存率的关系见表 1, 结果表明用含有上转换复合纳米材料的细胞培养液培养 ARPE-19 细胞, 随着浓度和时间的增加, 细胞的生存受到一定的抑制作用, 但是抑制作用不明显, 在浓度从 5 μg/mL 到高达 100 μg/mL 并且培养了长达 72 h 之后, 细胞生存率仍然达到用纯培养液培养的细胞的 84.89% 以上。同时时间点, 不同浓度组与

0 μg/mL 组相对对细胞的生存率影响差别基本一致, 差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。

本实验中, 用含有不同浓度复合上转换纳米材料 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 的细胞培养液孵育 ARPE-19 细胞, 随着所加入材料浓度从 0 μg/mL 增加到 100 μg/mL, 且孵育时间一直增加到长达 72 h, 细胞内 ROS 的量基本稳定在 95%–113.42%。同时时间点, 不同浓度与 0 μg/mL 浓度相比, 对细胞产生的 ROS 相对量差别基本一致, 差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), 见表 2。该组实验证明复合上转换纳米材料 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 有良好的生物相容性。

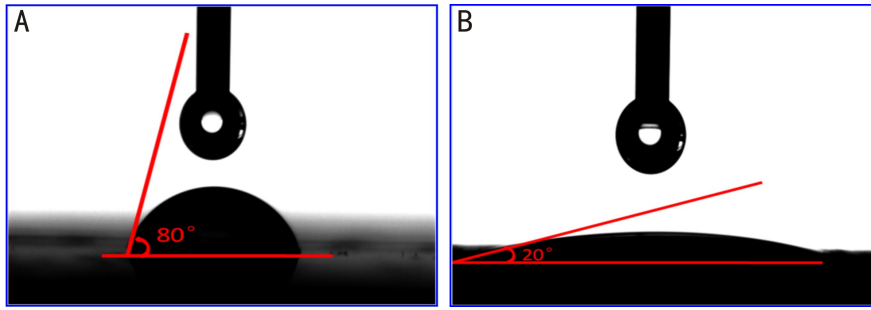


图 3 UCNP<sub>s</sub> 和 UCNP<sub>s</sub>-PEG 接触角的测量结果 A: UCNP<sub>s</sub>; B: UCNP<sub>s</sub>-PEG。

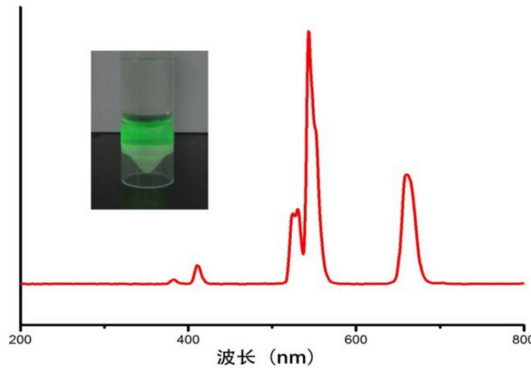


图 4 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 在 980 nm 激光下发出绿色荧光。

表 1 不同时间含有不同浓度 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 的细胞培养液孵育 ARPE-19 细胞生存率结果 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

时间	0 μg/mL 组	5 μg/mL 组	10 μg/mL 组	50 μg/mL 组	100 μg/mL 组
24 h	0.9933±0.0345	1.0357±0.0667	1.0640±0.0680	0.9597±0.0615	0.9497±0.0335
$P_{24}$		$P_{5-0} = 0.3482$	$P_{10-0} = 0.1829$	$P_{50-0} = 0.4553$	$P_{100-0} = 0.1909$
48 h	0.9607±0.0354	0.9792±0.0420	0.9137±0.0449	0.9031±0.0554	0.8489±0.0664
$P_{48}$		$P_{5-0} = 0.5900$	$P_{10-0} = 0.2276$	$P_{50-0} = 0.2037$	$P_{100-0} = 0.0618$
72 h	0.9629±0.0490	0.9653±0.0285	0.9888±0.0229	0.9629±0.0490	0.9374±0.0152
$P_{72}$		$P_{5-0} = 0.9473$	$P_{10-0} = 0.4548$	$P_{50-0} = 0.4296$	$P_{100-0} = 0.1316$

注:  $P_{24}$ 、 $P_{48}$ 、 $P_{72}$  分别表示该行为特定时间点 (24、48、72 h) 做统计比较的  $P$  值;  $P_{5-0}$ 、 $P_{10-0}$ 、 $P_{50-0}$ 、 $P_{100-0}$  分别表示特定时间点的 5、10、50、100 μg/mL 浓度组的细胞生存率与 0 μg/mL 浓度组的细胞生存率比较的统计  $P$  值。

表 2 不同时间含有不同浓度 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 的细胞培养液孵育 ARPE-19 细胞内 ROS 释放率结果 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

时间	0 μg/mL 组	5 μg/mL 组	10 μg/mL 组	50 μg/mL 组	100 μg/mL 组
24 h	0.9950±0.0151	1.0250±0.0349	1.0321±0.0346	1.0445±0.0551	1.0850±0.0549
$P_{24}$		$P_{5-0} = 0.2426$	$P_{10-0} = 0.1640$	$P_{50-0} = 0.2078$	$P_{100-0} = 0.0520$
48 h	0.9950±0.0172	1.0450±0.0451	0.9549±0.0349	1.0805±0.0550	1.0550±0.0451
$P_{48}$		$P_{5-0} = 0.1472$	$P_{10-0} = 0.1488$	$P_{50-0} = 0.0620$	$P_{100-0} = 0.0977$
72 h	1.0030±0.0345	0.9833±0.0245	0.9949±0.0349	1.1149±0.0649	1.1342±0.0850
$P_{72}$		$P_{5-0} = 0.4670$	$P_{10-0} = 0.7906$	$P_{50-0} = 0.0583$	$P_{100-0} = 0.0688$

注:  $P_{24}$ 、 $P_{48}$ 、 $P_{72}$  分别表示该行为特定时间点 (24、48、72 h) 做统计比较的  $P$  值;  $P_{5-0}$ 、 $P_{10-0}$ 、 $P_{50-0}$ 、 $P_{100-0}$  分别表示特定时间点的 5、10、50、100 μg/mL 浓度组的 ROS 释放率与 0 μg/mL 浓度组的 ROS 释放率比较的统计  $P$  值。

### 2.3 UCNPs-PEG-Tf 对 OCM-1 细胞特异性成像观察

**2.3.1 荧光分光光度计检测 UCNPs-PEG-Tf 对 OCM-1 细胞特异性发光现象** 相同细胞浓度、同样检测条件下,含 UCNPs-PEG-Tf 的细胞培养液培养后的 OCM-1 细胞发出的荧光强度是 UCNPs-PEG 培养后的 3.09 倍;含有 UCNPs-PEG-Tf 的细胞培养液分别培养细胞 OCM-1 和 ARPE-19,在相同细胞浓度、同样检测条件下,发出的荧光强度前者是后者的 4.39 倍,见图 5。表明 UCNPs-PEG-Tf 可以通过 Tf/TfR 使 OCM-1 细胞特异性发出强烈的荧光。

**2.3.2 倒置荧光显微镜下观察 UCNPs-PEG-Tf 对 OCM-1 细胞的特异性成像** 在分别含有 UCNPs-PEG-Tf 和 UCNPs-PEG 荧光纳米材料的培养液中,对细胞 OCM-1/ARPE-19 进行 2 h 的孵化。之后洗涤和固定,在倒置荧光显微镜下进行检查,观察结果见图 6。第一列是明场下用显微镜观察细胞的结果图,第二列是 Hoechst 细胞核的荧光图,第三列细胞亲和荧光纳米材料 UCNPs-

PEG-Tf/UCNPs-PEG 后发出绿光荧光的结果图,第四列是前者合并之后的图。三组实验分别是:第一行是肿瘤细胞 OCM-1 在用含 UCNPs-PEG-Tf 的培养液孵育后的图,第二行是正常细胞 ARPE-19 用含 UCNPs-PEG-Tf 的培养液孵育后的图,第三行是肿瘤细胞 OCM-1 用含 UCNPs-PEG 的培养液孵育后的荧光图。可以看出,肿瘤细胞 OCM-1 用含 UCNPs-PEG-Tf 的培养液孵育后可以发出强烈的绿色荧光,正常细胞 ARPE-19 在用含 UCNPs-PEG-Tf 的培养液孵育后几乎不发出绿色荧光,推测肿瘤细胞 OCM-1 比正常细胞 ARPE-19 容易与 UCNPs-PEG-Tf 结合,才能发出较为强烈的绿色荧光,应该是肿瘤细胞表面有 TfR 受体高表达的原因所致;加入没有 Tf 修饰的 UCNPs-PEG 培养液孵育的肿瘤细胞 OCM-1 也能发出绿色荧光,但是强度与含 UCNPs-PEG-Tf 的培养液培养后发出的绿色荧光强度相比低很多,UCNPs-PEG-Tf 和 UCNPs-PEG 二者相差 Tf,通过这个步骤推测是 Tf 和 TfR 受体在该过程中起了作用,使 UCNPs-PEG-Tf 可以针对肿瘤细胞 OCM-1 特异性绿色成像。

### 3 讨论

脉络膜黑色素瘤是成年人最常见的眼部恶性肿瘤,严重威胁患者的视力和生命健康<sup>[1,13]</sup>。临床上通常使用眼底检查、荧光素眼底血管造影以及常规影像学检查如磁共振等手段诊断脉络膜黑色素瘤,但这些检查对脉络膜黑色素瘤的早期病变难以查明,从而延误治疗时机。开发出在细胞层面特异性更强的成像检测方法,可以对脉络膜黑色素瘤的诊断和治疗方法进行改进<sup>[14]</sup>。

近年来,纳米生物材料在眼科的研究如火如荼,分别在靶向药物输送、对遗传物质表达影响和生物成像等方面表现出前所未有的良好应用前景。王鑫晨等<sup>[15]</sup>对纳米给药系统在眼底疾病治疗中的研究进展做出了综述性的分析讨论。我们前期的工作也对开发 Tf 和 TfR 介导靶向输送到脉络膜黑色素瘤的新型药物做出了探索<sup>[10]</sup>。

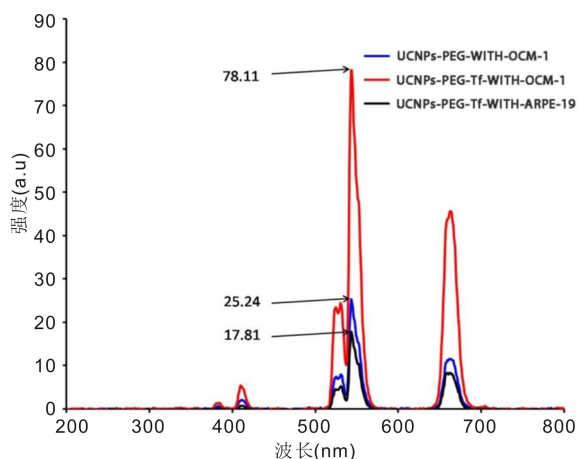


图 5 含有不同材料 UCNPs-PEG-Tf/UCNPs-PEG 的细胞培养液培养不同细胞 OCM-1/ARPE-19 后,相同细胞浓度的荧光分光光度计检测结果。

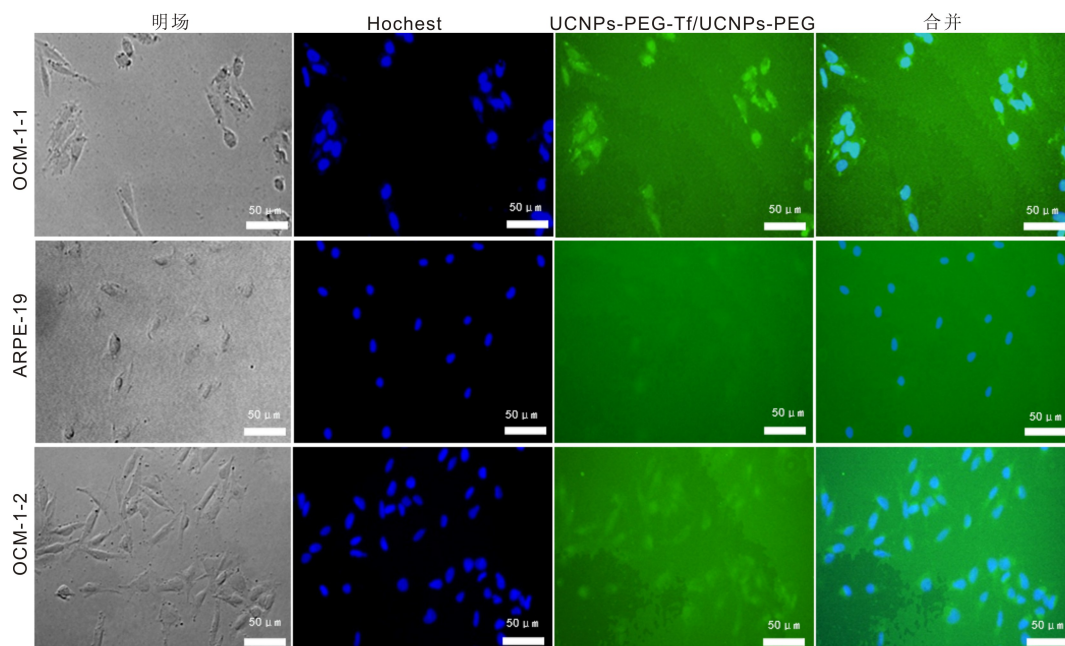


图 6 倒置荧光显微镜下观察细胞荧光成像,OCM-1-1 行和 ARPE-19 行加的材料是 UCNPs-PEG-Tf,OCM-1-2 行加的材料是 UCNPs-PEG。



Dastaviz 等<sup>[16]</sup>研究了含伞丙烯素纳米粒对视网膜色素上皮细胞 VEGF-A 和 CTGF 基因表达的影响。储彬彬等<sup>[17]</sup>对硅基纳米探针用于眼部疾病的成像检测与治疗进行了综述。近年来上转换纳米材料在生物成像研究方面得到了广泛的应用<sup>[3]</sup>。因此,本实验合成了新型功能化的 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 上转换纳米复合物,对其理化特征、生物相容性和对 OCM-1 细胞的特异性成像进行了研究。

上转换纳米材料能将低级能量刺激转化为高级能量的荧光辐射,由于其几乎不存在自发荧光,对生物组织也几乎没有破坏性,因此,UCNP<sub>s</sub> 被广泛应用于生物成像领域<sup>[18-19]</sup>。Lim 等<sup>[20]</sup>首次将 50-150 nm 的 Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup> 稀土上转换发光纳米材料用于培养线虫,然后用波长为 980 nm 的激光作为激发光源进行激发,可以清晰地看到纳米材料在线虫体内的分布。后续一些具有较强上转换荧光强度和良好生物相容性的小尺寸上转换发光纳米颗粒陆续被世界各地科学家合成出来用于小动物的活体成像研究<sup>[21-23]</sup>。上转换纳米材料非常适合用于生物成像,但是其生物相容性较差<sup>[4]</sup>,为了提升 UCNP<sub>s</sub> 的生物相容性,科学家尝试了多种小分子有机物的修饰,比如用聚乙烯胺(PEI)<sup>[24]</sup>、β-环糊精<sup>[25]</sup>以及 1,2 二硬脂酸-3 磷脂酰乙醇胺-甲氧基聚乙二醇(DSPE-PEG)<sup>[26]</sup>等修饰 UCNP<sub>s</sub> 后,均表现出优异的生物相容性,可以安全用于细胞和组织的成像研究。但是这些修饰方法较为复杂。等离子处理是表面处理的一项重要技术,近年来广泛用于纳米材料的表面修饰<sup>[5-6,27-28]</sup>,其原理为在一定的电场环境中,气体分子间会发生剧烈的碰撞,形成活性极高的等离子体,其能量足以断裂绝大部分的化学键,会引发暴露在表面的相应化学反应,并将气体基团引入表面以改进材料的特性。聚乙二醇具有优异的理化性质,经常用于材料的改性<sup>[7]</sup>。我们用氨基聚乙二醇修饰了石墨烯,结果也表明聚乙二醇化石墨烯具有卓越的水分散性和生物相容性<sup>[10]</sup>。鉴于此,本实验首先成功合成了 UCNP<sub>s</sub>,通过等离子表面处理仪处理,使 UCNP<sub>s</sub> 表面羧基化修饰,形成了 UCNP<sub>s</sub>-COOH。为了进一步提升纳米复合物的生物相容性,我们通过温和简便的酰胺化反应接载了 mNH<sub>2</sub>-PEG,制备了 UCNP<sub>s</sub>-PEG。接着再通过酰胺键反应将 Tf 接载在 UCNP<sub>s</sub>-PEG 上形成 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf<sup>[10]</sup>。TEM 表明直径约为 13.3 nm 的球形纳米粒 UCNP<sub>s</sub>(图 1A),在 980 nm 激光照射下,可以发射出强烈的绿光(图 1B)。在荧光分光光度计测量下,可以看 560 nm 处有高大的特征峰(图 1C)。图 2 中傅里叶红外变换检测结果显示,前后对比可以发现,酰胺键的特征峰逐渐变的更宽更大<sup>[10]</sup>。图 3 接触角测量结果显示 UCNP<sub>s</sub>-PEG 的接触角仅为 20°,表明其亲水性大大增加<sup>[29]</sup>。图 4 表明修饰后的复合物 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 仍然具有发出强烈荧光的特性。TEM、FTIR、CA 以及荧光光度计等表征结果证明我们成功合成了 UCNP<sub>s</sub>、UCNP<sub>s</sub>-PEG 和 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf。

成功制备出的 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 对正常细胞的活性和生存是否有不利的影响,是必须要关注的。因此我们使用正常细胞 ARPE-19,对经过 mNH<sub>2</sub>-PEG 修饰后形成的 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 进行了细胞存活率和 ROS 释放率的检测,以评估该材料的生物相容性。结果如下:本实验中,ARPE-19 细胞生存率的检测结果见表 1,表明 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 对细胞的生存几乎没有影响<sup>[11]</sup>;表 2 结果表明细胞内 ROS 的量基本稳定,说明复合上转换纳米材料对

ARPE-19 细胞 ROS 的释放基本没有影响<sup>[12]</sup>。均证明通过等离子羧基化处理并接载增加材料生物相容性常用的有机物聚乙二醇后,对细胞的活性和生存几乎没有影响,表明 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 具有卓越的生物相容性。

研究表明,TfR 在肿瘤细胞表面表达的密度是正常细胞密度的 2-7 倍,且正常细胞与肿瘤细胞对 Tf 的亲力和力相差可达 10-100 倍<sup>[8-9,30-31]</sup>,前期我们的研究也证明了 TfR 在脉络膜黑色素瘤上的高表达,并由此构建了 Tf-TfR 介导的新型聚乙二醇化石墨烯抗肿瘤纳米药物 Tf-PG-DOX,实现了针对 OCM-1 的高靶向药物输送,通过跨膜内吞作用将抗肿瘤药物(阿霉素)输送到肿瘤细胞内部,实现肿瘤细胞的高靶向杀伤,并有效抑制肿瘤细胞的转移<sup>[10]</sup>。本实验中,应用这一特性,将 Tf 接载于 UCNP<sub>s</sub>-PEG 制备出 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf,研究 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 对 OCM-1 的特异性成像现象。检测结果见图 5、6 所示:(1)对于同一种类肿瘤细胞 OCM-1 而言,相同细胞数量、同样检测条件下,含 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 的细胞培养液孵育后发出的荧光强度是 UCNP<sub>s</sub>-PEG 的 3.09 倍;含有转铁蛋白的 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 和不含转铁蛋白的 UCNP<sub>s</sub>-PEG 分别都孵育肿瘤细胞 OCM-1 2 h 后,在倒置荧光显微镜下观察前者仍然可以强烈荧光,而后者只能发出微弱的荧光。虽然孵育细胞相同,但 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 含 Tf,与 OCM-1 细胞上的 TfR 亲和力较强<sup>[8-9,30-31]</sup>,因此可以结合吞噬更多的荧光纳米颗粒,而 UCNP<sub>s</sub>-PEG 不含 Tf,不能通过受体配体的强亲和力作用结合较多荧光物质,所以前者发出的荧光强度较为强烈。(2)对于不同细胞类型而言,含有 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 的细胞培养液分别孵育细胞 OCM-1 和 ARPE-19 后,在相同细胞数量、同样检测条件下,前者发出的荧光强度是后者的 4.39 倍;用含有 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 的细胞培养液分别孵育 OCM-1 细胞和 ARPE-19 细胞 2 h 后,在倒置荧光显微镜下观察 OCM-1 细胞可以发出较强的荧光,而 ARPE-19 细胞几乎不发出荧光。这也是由于 Tf 和 TfR 之间强烈的亲和力作用,而肿瘤细胞 OCM-1 表面比正常细胞 ARPE-19 含有较多的 TfR,UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 可以靶向识别 OCM-1 细胞,更多地聚集于细胞周围或者进入到细胞内部所致<sup>[32-33]</sup>。荧光强度值和荧光置荧光显微镜观察检测结果一致,二者相互佐证,直观地表明 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 可以通过 Tf/TfR 实现 OCM-1 细胞特异性成像。

武明星等制备的 FA-PFH-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ADM 纳米颗粒,借助叶酸和叶酸受体之间的特性实现对视网膜母细胞的靶向特异性结合,还能实现体外超声/光声/磁共振三模态成像<sup>[34]</sup>。本实验有异曲同工之处,即通过简便易行的方法成功制备新型纳米复合材料 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf,通过 Tf 和 TfR 之间的超亲和力关系实现与 OCM-1 细胞的特异性结合,首次通过上转换纳米材料使 OCM-1 细胞特异性发出强烈绿色荧光而进行成像。

本实验通过等离子体处理,将羧基修饰于上转换纳米颗粒表面,便于后续接载 mNH<sub>2</sub>-PEG 提升其生物相容性和接载 Tf,通过 Tf 和 TfR 之间的受体配体关系,实现对肿瘤细胞 OCM-1 的特异性显著成像,有很好的创新性。新制备的纳米复合物 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf 对 OCM-1 细胞的特异性显著成像效果,有很好的潜在应用价值,未来可以用于早期脉络膜黑色素瘤的诊断,还有望帮助术者在术中寻找区分残留 OCM-1 细胞,亦或将之静脉注射,复合材料

随循环系统分散至全身后,通过低功率红外激光照射,根据检测的绿色荧光强度推测是否有全身其他组织转移等。本实验的不足之处在于尚未进行相关的动物实验研究,没有在活体机体中展现出新合成的纳米复合物 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf对脉络膜黑色素瘤的特异性显著成像效果,本实验后续研究也将在该方向做出进一步深入的探索。

综上所述,本研究通过等离子体表面处理法将羧基接在制备的 UCNP<sub>s</sub> 表面,而后通过温和简便的酰胺化反应接载氨基聚乙二醇形成 UCNP<sub>s</sub>-PEG,接着与对肿瘤细胞 OCM-1 有靶向亲和作用的 Tf 再次通过酰胺化反应形成具有良好的生物相容性的、可以发出绿色荧光的纳米复合物 UCNP<sub>s</sub>-PEG-Tf,该复合物可以针对肿瘤细胞 OCM-1 特异性成像,有望在脉络膜黑色素瘤诊断和治疗中展现其价值。

**利益冲突声明:** 本文不存在利益冲突。

**作者贡献声明:** 赵兵新论文选题与修改,实验操作,初稿撰写;符爱存、李秀红协助选题;魏丽文献检索,数据分析;王卫群选题指导,数据分析,论文修改。所有作者阅读并同意最终的文本。

#### 参考文献

[1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 2014,64(1):9-29.

[2] Malhotra K, Hrovat D, Kumar B, et al. Lanthanide-doped upconversion nanoparticles: exploring A treasure trove of NIR-mediated emerging applications. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(2):2499-2528.

[3] Borse S, Rafique R, Murthy ZVP, et al. Applications of upconversion nanoparticles in analytical and biomedical sciences: a review. *Analyst*, 2022,147(14):3155-3179.

[4] Li Y, Chen C, Liu FF, et al. Engineered lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biosensing and bioimaging application. *Mikrochim Acta*, 2022,189(3):109.

[5] Park W, Lu DW, Ahn S. Plasmon enhancement of luminescence upconversion. *Chem Soc Rev*, 2015,44(10):2940-2962.

[6] Peng H, Li SX, Xing J, et al. Surface plasmon resonance of Au/Ag metals for the photoluminescence enhancement of lanthanide ion Ln<sup>3+</sup> doped upconversion nanoparticles in bioimaging. *J Mater Chem B*, 2023, 11:5238-5250.

[7] Gautam M, Jozic A, Su GLN, et al. Lipid nanoparticles with PEG-variant surface modifications mediate genome editing in the mouse retina. *Nat Commun*, 2023,14:6468.

[8] Zhang PC, Hu LJ, Yin Q, et al. Transferrin-modified c[RGDfK]-paclitaxel loaded hybrid micelle for sequential blood-brain barrier penetration and glioma targeting therapy. *Mol Pharmaceutics*, 2012,9(6):1590-1598.

[9] Kawamoto M, Kohno M, Horibe T, et al. Immunogenicity and toxicity of transferrin receptor-targeted hybrid peptide as a potent anticancer agent. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013,71(3):799-807.

[10] Zhao BX, Dong KL, Lin MM, et al. A transferrin triggered pathway for highly targeted delivery of graphene-based nanodrugs to treat choroidal melanoma. *Adv Healthc Mater*, 2018,7(16):e1800377.

[11] James N, Kini S, Pai S, et al. Comparative evaluation of corneal storage medias used as tooth avulsion medias in maintaining the viability of periodontal ligament cells using the cell counting kit-8 assay. *Clin Cosmet Investig Dent*, 2022,14:87-94.

[12] Sies H, Belousov VV, Chandel NS, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022,23(7):499-515.

[13] 季赛燕, 鲍泳扬, 任伟民, 等. 老年患者葡萄膜黑色素瘤的临

床病理分析. *中国临床研究*, 2023,36(3):421-424,429.

[14] 魏文斌. 进一步提高我国脉络膜黑色素瘤的诊断治疗水平. *中华眼底病杂志*, 2006,22(3):147-149.

[15] 王鑫晨, 张妍春, 黄婵妍. 纳米给药系统在眼底疾病治疗中的研究进展. *国际眼科杂志*, 2024,24(3):403-410.

[16] Dastaviz F, Vahidi A, Khosravi T, et al. Impact of umbelliprenin-containing niosome nanoparticles on VEGF-A and CTGF genes expression in retinal pigment epithelium cells. *Int J Ophthalmol*, 2024,17(1):7-15.

[17] 储彬彬, 何耀. 硅基纳米探针用于眼部疾病的成像检测与治疗. *高等学校化学学报*, 2022,43(12):124-137.

[18] Liang GF, Wang HJ, Shi H, et al. Recent progress in the development of upconversion nanomaterials in bioimaging and disease treatment. *J Nanobiotechnol*, 2020,18(1):154.

[19] Song C, Zhang S, Zhou Q, et al. Upconversion nanoparticles for bioimaging. *Nanotechnol Rev*, 2017,6(2):233-242.

[20] Lim SF, Riehn R, Ryu WS, et al. *In vivo* and scanning electron microscopy imaging of upconverting nanophosphors in *Caenorhabditis elegans*. *Nano Lett*, 2006,6(2):169-174.

[21] Liu Q, Sun Y, Yang T, et al. Sub-10 nm hexagonal lanthanide-doped NaLuF<sub>4</sub> upconversion nanocrystals for sensitive bioimaging *in vivo*. *J Am Chem Soc*, 2011,133(43):17122-17125.

[22] Ma Y, Bao J, Zhang Y, et al. Mammalian near-infrared image vision through injectable and self-powered retinal nanoantennae. *Cell*, 2019,177(2):243-255.e15.

[23] Hao CL, Wu XL, Sun MZ, et al. Chiral core-shell upconversion Nanoparticle@MOF nanoassemblies for quantification and bioimaging of reactive oxygen species *in vivo*. *J Am Chem Soc*, 2019,141(49):19373-19378.

[24] Chatterjee DK, Rufaihah AJ, Zhang Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. *Biomaterials*, 2008,29(7):937-943.

[25] Kong YJ, Yuan F, Yang F, et al. Cell-membrane-anchored upconversion nanoprobe for near-infrared light triggered cell-cell interactions. *Anal Chem*, 2022,94(35):12024-12032.

[26] Liang T, Wang QR, Li Z, et al. Removing the obstacle of dye-sensitized upconversion luminescence in aqueous phase to achieve high-contrast deep imaging *in vivo*. *Adv Funct Materials*, 2020, 30(16):1910765.

[27] Lv RC, Yang F, Jiang X, et al. Plasmonic modulated upconversion fluorescence by adjustable distributed gold nanoparticles. *J Lumin*, 2020, 220:116974.

[28] 李焯赫, 林良良, 汪盛, 等. 微等离子体合成纳米材料的研究进展. *高校化学工程学报*, 2021,35(4):589-600.

[29] Zou RT, Shan SY, Huang LB, et al. High-performance intraocular biosensors from chitosan-functionalized nitrogen-containing graphene for the detection of glucose. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020,6(1):673-679.

[30] Zhang H, Jin C, Zhang L, et al. CD71-specific aptamer conjugated with monomethyl auristatin E for the treatment of uveal melanoma. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022,14(1):32-40.

[31] Zhou D, Wu QH, Qiu HJ, et al. Simvastatin inhibits endometrial cancer malignant behaviors by suppressing RAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway-mediated reactive oxygen species (ROS) and ferroptosis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022:6177477.

[32] Thomsen MS, Johnsen KB, Kucharz K, et al. Blood-brain barrier transport of transferrin receptor-targeted nanoparticles. *Pharmaceutics*, 2022,14(10):2237.

[33] Koneru T, McCord E, Pawar S, et al. Transferrin: biology and use in receptor-targeted nanotherapy of gliomas. *ACS Omega*, 2021,6(13):8727-8733.

[34] 李醒, 郑文笛, 邹宏密, 等. 叶酸-磁双靶向多功能纳米分子探针用于视网膜母细胞瘤体外多模态成像的研究. *国际眼科杂志*, 2022,22(12):1948-1954.