

稳定剂对水相制备 CdTe 量子点的荧光性能和细胞毒性影响研究

李 峥^{1,2}, 汪勇先¹, 张国欣¹, 韩彦江^{1,2}

(1. 中国科学院 上海应用物理研究所 放射性药物研究中心, 上海 201800; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 用巯基乙酸(TGA)、半胱氨酸(L-Cys)和谷胱甘肽(GSH)这三种巯基稳定剂在水相中制备了 CdTe 量子点(QDs)。红外光谱(FTIR)分析结果表明, 三种稳定剂都成功地利用 Cd^{2+} 与巯基之间的配位与 QDs 相结合并起到保护及稳定的作用。利用荧光光谱对不同 QDs 的荧光性能进行了研究, 结果表明当采用 GSH 作为稳定剂时, QDs 的生长速率较快, 且最大发射波长能够达到约 680nm; L-Cys-CdTe 的生长速率次之, 也能生成具有较大发射波长的 QDs; TGA-CdTe 的生长速率最慢, 且最大发射波长只能达到约 620nm, 但是其荧光强度较高, 适于制备对荧光强度要求较高的 QDs。通过 MTT(噻唑蓝)比色法对细胞存活率进行测定, 同时利用显微镜对细胞形貌进行观察, 结果表明各量子点都具有一定的细胞毒性, 但 TGA-QDs 对细胞的伤害作用更大, 以 $20\mu\text{g/mL}$ 的浓度对细胞培养 24h 后, 细胞存活率只有 52.6%。

关键词: 稳定剂; CdTe; 量子点; 荧光; 细胞毒性

中图分类号: O614

文献标识码: A

Luminescent Properties and Cytotoxicity of CdTe Quantum Dots with Different Stabilizing Agents

LI Zheng^{1,2}, WANG Yong-Xian¹, ZHANG Guo-Xin¹, HAN Yan-Jiang^{1,2}

(1. Radiopharmaceutical Centre, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: CdTe quantum dots (QDs) were prepared in aqueous phase using thioglycolic acid (TGA), L-cysteine (L-Cys), and glutathione (GSH) as stabilizing agents. The luminescent properties of CdTe QDs with different stabilizing agents were studied by using fluorescence spectra. FTIR spectra analysis demonstrates that CdTe QDs are capped with stabilizing agents through the coordination interaction between Cd^{2+} and S. Fluorescence spectra show that CdTe QDs with longer emission wavelength (680nm) can be synthesized more easily when L-Cys or GSH is chosen as stabilizing agents and TGA is proper to prepare highly luminescent QDs because of the effect between Cd^{2+} and sulfhydryl group. The MTT assay and morphology analysis of U87MG cells suggest that the QDs with different stabilizing agents are all toxic to cells. The cytotoxicity of TGA-QDs is higher than that of L-Cys- and GSH- CdTe. The cell viability is only 52.6% when U87MG cells are treated with $20\mu\text{g/mL}$ of TGA-QDs for 24h.

Key words: stabilizing agents; CdTe; quantum dots; luminescence; cytotoxicity

量子点(QDs)是一种无机半导体纳米材料, 其主要由 II B-VI A (CdTe、CdSe 等) 和 III A-V A (InP、InAs 等) 族元素构成。与传统有机荧光染料相比, QDs 具

有不容易发生光淬灭、吸收和发射光谱窄、斯托克斯位移大、荧光寿命长、量子产率高等优点^[1-2]。因此, 其作为传统荧光染料的替代物在分子生物学、细胞生

物、分子显像和医学诊断等领域得到了广泛的研究^[3-5]. 为提高 QDs 的水稳定性和生物相容性, 使之更好地在生物和医学领域得到应用, 直接水相合成逐渐替代有机高温溶剂合成而成为 QDs 的主要制备方法^[6-8]. 在水相合成中, 主要是依靠巯基与 Cd^{2+} 等的配位作用而使用短链巯基化合物作为稳定剂, 其能够有效控制纳米晶体的生长, 使之表面钝化而达到稳定性、溶解性以及表面功能化的目的. 同反应温度、pH 值以及反应物浓度和配比一样, 稳定剂种类对 QDs 的物理和光学性质也具有较大的影响^[6]. 此外由于结构及表面电位等原因, 不同稳定剂制备的 QDs 其毒性也有较大区别^[9], 这也是 QDs 在生物和医学领域应用时必须考察的因素之一. 因此, 水相合成 QDs 时, 稳定剂的选择十分重要, 有必要详细考察不同稳定剂制备的 QDs 性质及其毒性.

本工作选用巯基乙酸 (TGA)、L-半胱氨酸 (L-Cys) 和谷胱甘肽 (GSH) 作为稳定剂在水相中进行 CdTe QDs 的合成, 详细研究了不同稳定剂对 QDs 光学性质的影响, 用 MTT 比色法和显微镜考察了不同 QDs 对 U87MG 肿瘤细胞的毒性, 并对其作用机理进行了初步的探讨.

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

Te 粉 (99.8%) 购自 Aldrich; TGA (90%)、L-Cys (BR)、GSH (BR)、 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (AR)、NaOH (AR)、 NaBH_4 (AR) 均购自国药集团化学试剂有限公司; MTT (BR) 购自碧云天生物技术有限公司.

荧光光谱利用 Hitachi F4500FL 分光光度计 (激发光为 450nm) 进行测量; 红外光谱利用 Thermo Nicolet Avatar 370 傅里叶变换红外光谱仪 (波长范围为 $500 \sim 4000\text{cm}^{-1}$) 进行测量; 利用 Rayto RT-6000 酶标仪 (492nm) 进行 MTT 测试; 利用 ZEISS Axioskop2 荧光显微镜对细胞进行显像. 所有测量均在室温下进行.

1.2 实验过程

1.2.1 CdTe QDs 的制备

首先, 将 6.4mg Te 粉与过量 NaBH_4 反应制备得到 5mL NaHTe 溶液. 称取 22.8mg $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 100mL 去离子水, 再在其中加入不同的稳定剂并用 1mol/L NaOH 调 pH 值至 9.0 ~ 9.5. 然后通入 N_2 保护并将 NaHTe 溶液加入其中, 在 100°C 下反应一定时间制备得到 CdTe QDs. 反应混合物中 $n(\text{Cd})$: $n(\text{稳定剂})$: $n(\text{Te}) = 2:4:1$.

1.2.2 CdTe QDs 的毒性研究

通过 MTT (噻唑蓝) 比色法检测细胞存活率, 同

时利用显微镜对细胞形貌进行观察, 考察不同 CdTe QDs 对 U87MG 肿瘤细胞的毒性. 用 DMEM (含 10% 新生牛血清) 培养 U87MG 细胞 (37°C , 5% CO_2). 在以上制备的 CdTe QDs 中加入少量异丙醇使之沉淀, 然后离心分离并在真空干燥箱中烘干得到 QDs 粉末, 然后将其重新分散在 DMEM (含 10% 新生牛血清) 中并用 $0.22\mu\text{m}$ 一次性过滤器过滤除菌, 得到经处理的 CdTe QDs 的培养基储备溶液. 将制备得到的 CdTe QDs 直接用 DMEM (含 10% 新生牛血清) 进行稀释, 并用 $0.22\mu\text{m}$ 一次性过滤器过滤除菌, 得到未经处理的 CdTe QDs 的培养基储备溶液. 将细胞以 1.2×10^4 个/孔 ($200\mu\text{L}$ /孔) 的浓度植入 96 孔板中, 培养 24h, 细胞贴壁后将 DMEM 吸出, 在每孔中加入 $200\mu\text{L}$ 一定浓度的 CdTe QDs 培养基储备溶液对细胞进行培养. 培养一定时间后在其中加入 MTT 测试试剂, 4h 后将溶液吸出并用 DMSO 使细胞溶解. 用酶标仪测量其光密度 (OD) 值, 通过与对照样进行对比得到细胞存活率来评估 QDs 的细胞毒性, 并且用显微镜对 QDs 的细胞毒性进行了进一步的观察.

2 结果与讨论

2.1 不同稳定剂制备 CdTe QDs 的 FTIR 光谱

TGA、L-Cys 及 GSH 的结构式分别为 SHCH_2COOH , $\text{SHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ 及 $\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{SH})\text{CONHCH}_2\text{COOH}$. TGA 中只含有一个羧基和一个巯基; L-Cys 除羧基和巯基外还含有一个氨基; GSH 除羧基、巯基和氨基外还含有酰胺基团. 不同稳定剂制备的 CdTe QDs 的 FTIR 光谱如图 1 所示. 在 TGA-CdTe 的 FTIR 光谱中可以发现有 $\nu_{\text{O-H}}$ (3433.88cm^{-1}) 和 $\nu_{\text{C=O}}$ (1632.99cm^{-1}) 的特征峰, 此外在 $1420 \sim 1260\text{cm}^{-1}$ 还出现了 $\delta_{\text{O-H}}$ 的峰; 在 L-Cys-CdTe 的光谱同样具有羧基中的 $\nu_{\text{O-H}}$ (3433.97cm^{-1})、 $\nu_{\text{C=O}}$ (1585.22cm^{-1}) 和 $1420 \sim 1260\text{cm}^{-1}$ 区域相对应于 $\delta_{\text{O-H}}$ 的谱峰, 除此之外, 在 3177.23 和 2963.32cm^{-1} 处还出现了 $\nu_{\text{N-H}}$ 的谱峰; 在 GSH-CdTe 的光谱中, $3440 \sim 3300\text{cm}^{-1}$ 的宽峰对应于两个羧基中的 $\nu_{\text{O-H}}$, 此外还存在羧基中的 $\nu_{\text{C=O}}$ (1599.04cm^{-1}) 和 $\delta_{\text{O-H}}$, 而且还出现了酰胺键中的 $\nu_{\text{C=O}}$ (1712.71cm^{-1}), 此外在 $3500 \sim 3000\text{cm}^{-1}$ 区域的数个峰还对应着氨基与酰胺键中的 $\nu_{\text{N-H}}$ 谱峰. 因此可以判断三种稳定剂在制备过程中都成功地连接在 CdTe 周围而起到保护作用. 同时从图中还可以看出, 三种不同稳定剂中共同含有的巯基在 2550cm^{-1} 附近的吸收峰都已经消失, 但保留了在 1070cm^{-1} 附近的

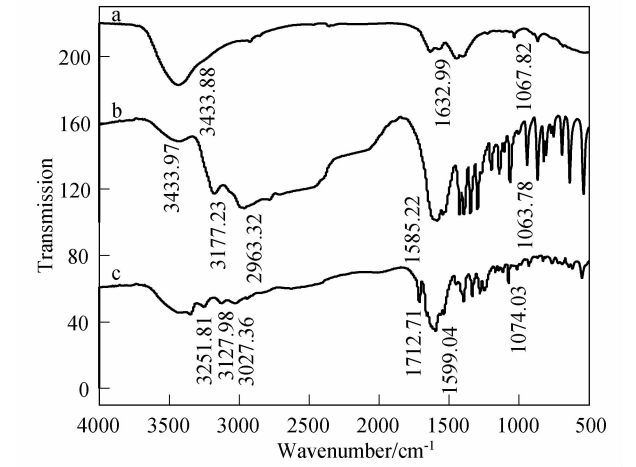


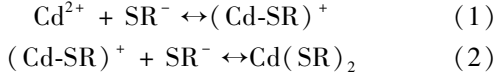
图 1 不同稳定剂制备的 CdTe QDs 的 FTIR 光谱
Fig. 1 FTIR spectra of CdTe QDs with different stabilizing agents
a: TGA-CdTe; b: L-Cys-CdTe; c: GSH-CdTe

C-S 的吸收峰,说明稳定剂主要是靠巯基中的 S 与 CdTe 中的 Cd 进行配位而与 QDs 结合的。

2.2 不同稳定剂制备 CdTe QDs 的荧光性质

图 2 为不同稳定剂制备的 CdTe QDs 在不同反应时间下的荧光光谱,从中可以看出随着反应时间的延长, QDs 的粒径增大,不同稳定剂 QDs 其发射光都向长波方向移动,且发射波长为 560nm 时,其荧光强度都具有较大值,然后随着发射波长的红移而逐步减弱。不同稳定剂制备的 CdTe QDs 荧光强度有所不同,总体看来, TGA-CdTe 的荧光强度最高, L-Cys-CdTe 次之, GSH-CdTe 最弱。图 3(a) 为不同稳定剂制备的 CdTe QDs 荧光发射波长随反应时间的变化关系。从中可以发现,当选用 GSH 作为稳定剂时, CdTe QDs 的生长速率较快,经较短反应时间其发射波长就能达到 680nm;而当使用 TGA 时,其生长速率明显减慢,且其最大发射波长也只有 620nm 左右; L-Cys-CdTe 的生长情况则基于两者之间。此外,从图 3(b) 还可以看出,当选用 TGA 与 L-Cys 作为稳定剂时,半高峰宽随 QDs 发射波长的变化基本一致,而

GSH-CdTe 则有着较大区别,其不同发射波长 QDs 的半高峰宽基本上都窄于前两者,说明以 GSH 作为稳定剂制备出来的 CdTe QDs 粒径分布较为均一。 CdTe QDs 与巯基稳定剂的结合主要靠 Cd^{2+} 与巯基之间的配位来实现的,其可以表示为以下两个方程式^[10]:



其中 $\text{Cd}(\text{SR})_2$ 较之 $(\text{Cd-SR})^{+}$ 更为稳定,能够更有效地控制反应体系中的 Cd^{2+} 数目。 CdTe QDs 的生长速率主要是由反应体系中单体数目即 Cd^{2+} 数决定的^[11]。当选用 GSH 作为稳定剂时,其碳链较长,由于空间位阻易于生成较不稳定的 $(\text{Cd-SR})^{+}$,其分解后能够导致反应体系中 Cd^{2+} 数的增加,从而导致较高的生长速率,而且,充足的游离 Cd^{2+} 也使体系中各含 Te 单体能够有大致平等的几率与之反应,使粒子长大而实现较窄的粒径分布;相反,当使用 TGA 时,生成的 $\text{Cd}(\text{SR})_2$ 较稳定,反应体系中 Cd^{2+} 数目得到有效控制而使生长速率变慢,此时,还能够降低表面缺陷,提高荧光强度。此外,稳定剂不同的表面基团也可能对 QDs 的荧光性能造成影响, TGA 表面只含有一个羧基,各单体之间静电排斥作用较强,不易相互结合生成较大粒子,而 L-Cys 与 GSH 表面含有羧基和氨基,与之结合的单体之间静电排斥作用能够得到一定程度上的抵消,也增加了单体间结合的可能性,有利于大粒子量子点的生成,因此能够达到较长的发射波长。因此, GSH 能够用来快速制备长发射波长的 QDs,而 TGA 则适用于对荧光强度要求较高的 QDs 的制备。

2.3 不同稳定剂制备 CdTe QDs 的细胞毒性

为准确评估不同稳定剂对 QDs 细胞毒性的影响,选用相同发射波长(粒径)的 QDs 进行毒性分析,其结果如图 4(a) 所示。不同 QDs 的细胞存活率都随着培养时间的延长而降低,其中 TGA-QDs 对 U87MG 细胞的伤害更大,且随着培养时间的延长, TGA-QDs

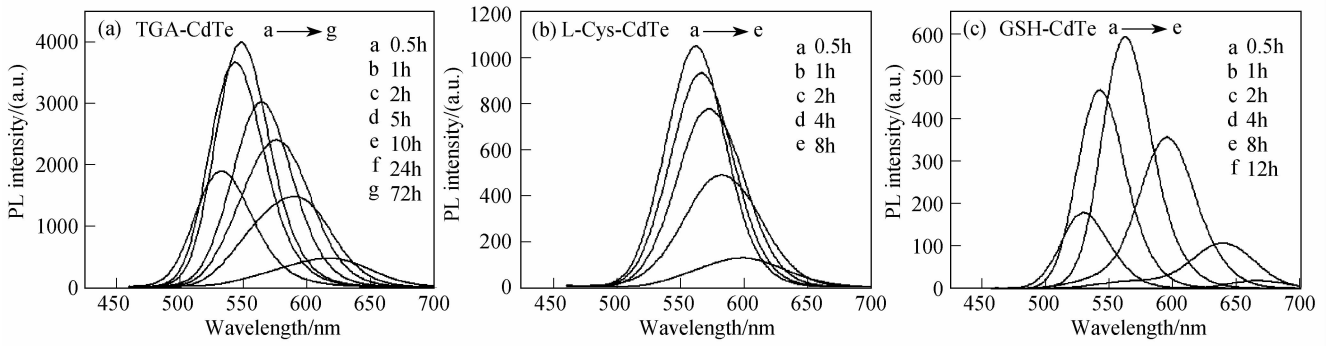


图 2 不同稳定剂制备的 CdTe QDs 在不同反应时间下的荧光光谱
Fig. 2 PL spectra of CdTe QDs with different stabilizing agents reacted for different periods

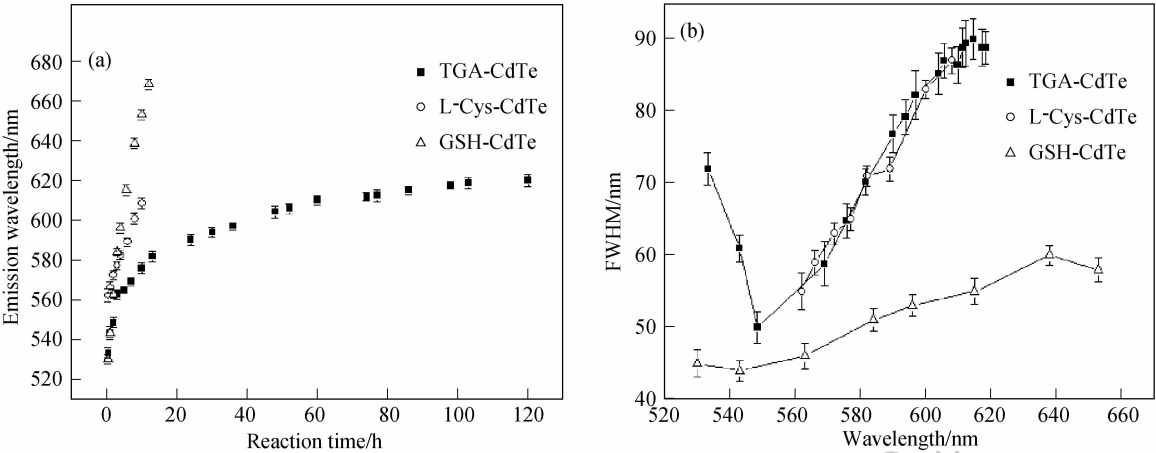


图 3 不同稳定剂制备的 CdTe QDs 荧光峰位半高峰宽随反应时间的变化 (a) 及不同 CdTe QDs 半高峰宽随荧光峰位的变化 (b)

Fig. 3 Emission wavelengths of three CdTe QDs vs reaction time (a) and FWHM of three CdTe QDs vs emission wavelengths (b)

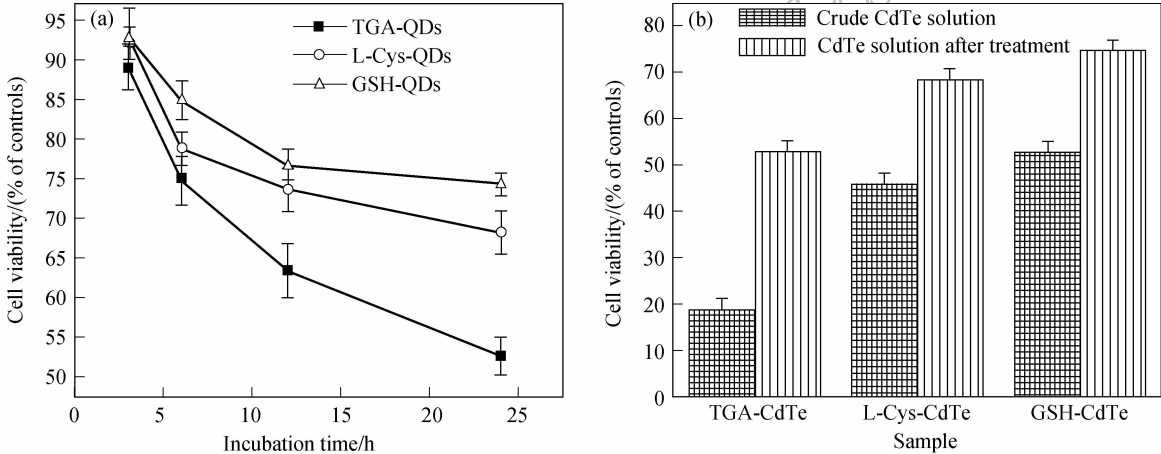


图 4 U87MG 细胞经不同 CdTe QDs 培养后的细胞存活率

Fig. 4 U87MG cell viability for different kinds of CdTe QDs

(a) Cell viability for the QDs with different stabilizing agents. The QDs with their emission wavelengths at 560nm were tested on the cell viability for U87MG cells (MTT assay, $n = 4$). U87MG cell were treated with $20\mu\text{g/mL}$ of different QDs solutions for different time. The cell viability was obtained according to the absorbance of samples and controls; (b) Cell viability for the crude CdTe and CdTe after treatment. The QDs with their emission wavelengths at 560nm were tested on the cell viability for U87MG cells (MTT assay, $n = 4$). U87MG cell were treated with $20\mu\text{g/mL}$ of QDs solutions for 24h

的细胞存活率与其余两种 QDs 之间的差距逐步扩大, 由此说明 TGA-QDs 较之 L-Cys-和 GSH-QDs 有着更大的细胞毒性. 这在图 5 中得到了进一步证明. 当细胞用 TGA-QDs 培养时, 24h 后其大多变圆团聚, 并大量的从培养板壁上脱落, 而用 L-Cys-和 GSH-QDs 进行培养时, 24h 后基本上能保持其正常的梭形状态, 只是出现了少量细胞碎片. 出现细胞毒性差异的原因可能是不同稳定剂制备的 QDs 具有不同的表面基团, 从表面 ζ 电位的角度看, TGA-QDs (QDs-COOH) 所带负电程度较之 L-Cys-和 GSH-QDs (QDs-COOH/ NH_2) 更大^[9], 且在溶液中由于 L-Cys-和 GSH-QDs 中可能存在相互的粒子吸引(由于表面含-COOH 和- NH_2), 从而导致 QDs 在溶液中实际粒径的变化, 造成对细胞毒性的不同影响. 此外, 长碳链稳定剂还可以在

QDs 表面形成更好的保护层, 阻止 QDs 核中 Cd^{2+} 的释放. 除稳定剂结构方面的因素外, 其本身物理性质也有可能导致细胞毒性的差异. 将制备的 CdTe QDs 不经过沉淀、离心和分离处理, 直接将其用 DMEM 稀释来进行细胞培养, 其 MTT 测试结果如图 4 (b) 所示, 当 QDs 未经处理时, 溶液中含有过量的游离 Cd^{2+} , 会对细胞造成较大伤害, 因此, 与经处理 QDs 溶液相比, 细胞存活率都有一定程度的下降. 但是对于不同稳定剂而言, 存活率下降程度有所不同, 其中 TGA-QDs、L-Cys-QDs 和 GSH-QDs 分别由 52.6%、68.2% 和 74.3% 下降到了 18.8%、45.6% 和 52.7%. 可以发现 TGA-QDs 的细胞存活率下降程度最大, 说明除游离 Cd^{2+} 外, 过量的 TGA 也会对细胞造成较大伤害. 其原因就是 TGA 本身能够造成机体免疫、繁殖

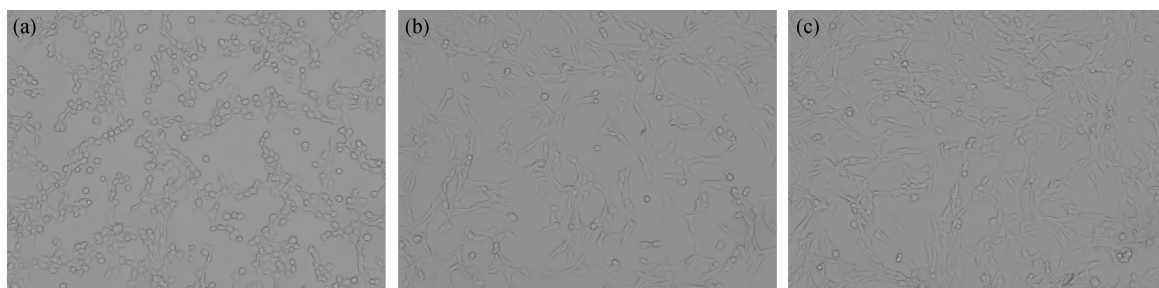


图5 U87MG 细胞经 QDs 溶液培养后的显微镜照片, QDs 的发射波长都为 560nm, 浓度为 20 μ g/mL, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 24h

Fig.5 The image of U87MG cells after treatment with 20 μ g/mL of 560nm QDs with different stabilizing agents for 24h

(a) TGA-QDs; (b) L-Cys-QDs; (c) GSH-QDs

和遗传功能的损伤^[12], 因此, 自然也就会对细胞造成较大的影响. 而 L-Cys 和 GSH 作为天然存在于有机体内的蛋白类物质对细胞也就没有什么毒害作用. 所以, 以 L-Cys 和 GSH 为稳定剂制备的 CdTe QDs 细胞毒性要低于 TGA.

3 结论

用三种不同巯基稳定剂(TGA, L-Cys 和 GSH)在水相中进行了 CdTe QDs 的制备, 并对其荧光性质和细胞毒性进行了分析. 结果表明, 选用 GSH 作为稳定剂时, QDs 生长速率较快, 且随着反应时间的延长, 其发射波长可以达到约 680nm; TGA-QDs 的生长速率最慢, 且最大发射波长只能达到约 620nm, 但其荧光强度较高, 适于进行对荧光强度要求较高的 QDs 的制备. QDs 的细胞毒性试验表明, 不同稳定剂制备的 QDs 都具有一定的细胞毒性, 但相较于 L-Cys 和 GSH 而言, 以 TGA 为稳定剂制备的 QDs 细胞毒性更大, 以 20 μ g/mL 的浓度对细胞培养 24h 后, 细胞存活率只有 52.6%, 在显微镜下观察发现细胞大多变形, 并发生团聚和脱落, 因此, 需进一步采取表面包覆和核壳结构等手段降低其毒性, 以此在生物医学领域得到更好的应用.

参考文献:

[1] Wuister S F, Swart I, Driel F V, *et al.* Highly luminescent water-soluble CdTe quantum dots. *Nano Lett.*, 2003, **3**(4): 503-507.

[2] Kapitonov A M, Stupak A P, Gaponenko S V, *et al.* Luminescence properties of thiol-stabilized CdTe nanocrystals. *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**(46): 10109-10113.

[3] Wang S P, Mamedova N, Kotov N A, *et al.* Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates. *Nano Lett.*, 2002, **2**(8): 817-822.

[4] 陈良冬, 李 雁, 袁宏银, 等. 量子点在肿瘤研究中的应用. *癌症*, 2006, **25**(5): 651-656.

[5] 徐万帮, 汪勇先, 许荣辉, 等(XU Wan-Bang, *et al.*). II-VI 型量子点的制备、修饰及其生物应用. *无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials)*, 2006, **21**(5): 322-328.

[6] Gaponik N, Talapin D V, Rogach A L, *et al.* Thiol-capping of CdTe nanocrystals: An alternative to organometallic synthetic routes. *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**(29): 7177-7185.

[7] 唐爱伟, 滕 枫, 高银浩, 等(TANG Ai-Wei, *et al.*). 水相中 CdSe 与核壳 CdSe/CdS 量子点的制备与发光特性研究. *无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials)*, 2006, **21**(2): 322-328.

[8] 刘明贤, 孙 颖, 甘礼华, 等(LIU Ming-Xian, *et al.*). 静电自组装制备 CdTe 量子点纳米薄膜. *无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials)*, 2008, **23**(3): 557-561.

[9] Hoshino A, Fujioka K, Oku T, *et al.* Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Lett.*, 2004, **4**(11): 2163-2169.

[10] Guo J, Yang W L, Wang C C. Systematic study of the photoluminescence dependence of thiol-capped CdTe nanocrystals on the reaction conditions. *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**(37): 17467-17473.

[11] Peng X G, Wickham J, Alivisatos A P. Kinetics of II-VI and III-V colloidal semiconductor nanocrystal growth: "Focusing" of size distributions. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**(21): 5343-5344.

[12] 侯绍英, 张 岭, 吴 坤, 等. 巯基乙酸对孕酮诱导爪蟾卵母细胞体外成熟过程中 MAPK 和 MPF 激酶活性的影响. *癌变·畸变·突变*, 2008, **20**(2): 107-110.