

Experimental Research on the Photobleaching Mechanism of PDT Based QDs-CdSe^{*}

Jian Wang¹, Dongxiang Hu¹, Jieguan Deng², Kangqiang Huang¹, Jianwen Xiong^{1#}

¹Laboratory of Quantum Information Technology, School of Physics and Telecommunication Engineering, South China Normal University, Guangzhou

²Institute of Physics, Lanzhou University, Lanzhou

Email: wangjiannv.com@163.com, #jwxiong@scnu.edu.cn

Received: Sep. 30th, 2011; revised: Nov. 12th, 2011; accepted: Nov. 14th, 2011.

Abstract: With the development of the basic research of photodynamic therapy (PDT), photosensitizer photobleaching has become a highly focused area of research within PDT in recent years. In this paper, the photobleaching mechanism of quantum dots in the FBS solution and HL60 cell solutions with oxygen substrate were investigated by the method of theoretical derivation. The results demonstrated that the photobleaching in the single solution was corresponded with the first order kinetics while the photobleaching in the complex solution was corresponded with the second order kinetics. The curve and rate of CdSe photobleaching were obtained by determining the vis absorption spectrum of the CdSe and using of the Beer. Additionally, the photobleaching properties of quantum dot (CdSe) whose theoretical derivation can be confirmed by our experiment were gained.

Keywords: Photodynamic Therapy (PDT); Quantum Dots (QDs); CdSe; Photobleaching; HL60 cells

基于核壳式量子点 CdSe-PDT 光漂白规律的实验研究^{*}

王 健¹, 胡冬香¹, 邓解关², 黄康强¹, 熊建文^{1#}

¹广东省高等学校量子信息技术重点实验室, 华南师范大学物理与电信工程学院, 广州

²兰州大学物理系, 兰州

Email: wangjiannv.com@163.com, #jwxiong@scnu.edu.cn

收稿日期: 2011 年 9 月 30 日; 修回日期: 2011 年 11 月 12 日; 录用日期: 2011 年 11 月 14 日

摘 要: 近年来随着光动力学基础研究不断深入, 光敏剂光漂白及其机制研究日渐成为 PDT 研究的热点问题。本实验利用化学反应动力学原理对量子点 CdSe 在胎牛血清(FBS)和 HL60 细胞悬液的复杂溶液体系中的光漂白速率进行理论推导, 得出其光漂白在单一溶液里符合一级动力学过程, 在复杂溶液中满足二级反应动力学过程的结果。并通过测定量子点 CdSe 的紫外可见吸收光谱, 利用比尔-朗伯吸收定律得到量子点 CdSe 的光漂白曲线和光漂白速率, 通过拟合比较得出光漂白反应动力学规律, 对实验结果进行了理论验证。

关键词: 光动力学; 量子点; CdSe; 光漂白; HL60 细胞

1. 引言

近年来, 随着对光动力学(photodynamic therapy,

PDT)研究的不断深入, 光漂白(Photobleaching)机理及其对光敏剂剂量、光辐照剂量的影响的研究显得愈来愈重要。研究发现光漂白可以用来监测光动力反应过程, PDT 对靶组织的杀伤效应与光敏剂的光漂白不可分割地联系在一起^[1-4]。

光漂白是光动力反应中一个伴随过程, 指光敏剂

^{*}资助信息: 国家自然科学基金项目(61072029); 广东省自然科学基金项目(10151063101000025); 广州市科技计划项目(2010Y1-C111)。

[#]通讯作者。

分子与光敏化反应中生成的 $^1\text{O}_2$ 等产物相互作用, 发生自敏光氧化反应^[5], 目前对于大多数光敏剂的光漂白过程尚不十分清楚^[2], 漂白产物也不明确, 这些都妨碍了人们对光漂白的深入研究和认识^[6]。而量子点因其尺寸效应, 使其吸收光谱能够被调节而可以匹配不同深浅肿瘤的需要^[7-10], 且可直接作为光敏剂或用于能量转移提高传统光敏剂的光动力疗效^[11]。用巯基乙酸做包裹的量子点能透过细胞膜, 同时又不能进入细胞核, 降低了材料本身的毒性, 且具有粒子不易团聚、光化学稳定性显著增加、光淬灭降到最低限度、包裹层无毒且生物相容性好、易提供特异性结合的部位等优点^[12]。

本实验采用巯基乙酸做外包覆的量子点 CdSe 作为光漂白研究对象^[13,14], 其吸收和荧光光谱如图 1 所示。根据其所在的溶液体系将漂白过程进行简化, 利用化学反应动力学原理对量子点 CdSe 在胎牛血清 (FBS) 和 HL60 细胞悬液的复杂溶液体系中的光漂白速率进行了理论推导, 并实验测定量子点 CdSe 的光漂白动力学数据对理论推导结果进行验证。根据量子点 CdSe 的光漂白反应动力学级数, 分析其光漂白动力学过程。

2. 光敏剂光漂白数学模型的理论推导

量子点 CdSe 在 HL60 细胞悬液中的光漂白以单态氧介导为主。假定氧充足, 其光动力反应过程中的主要反应有^[15,16]:

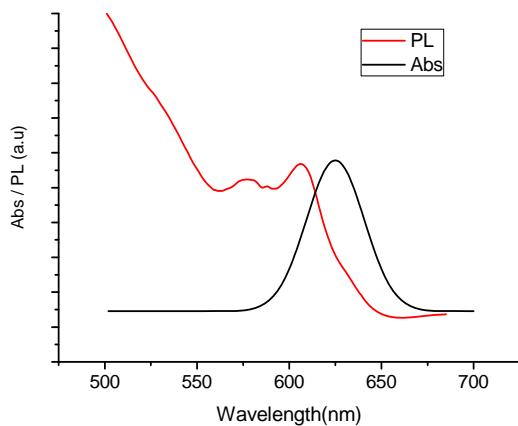
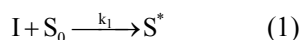
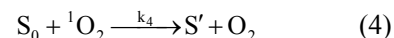
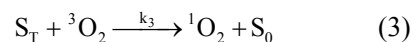


Figure 1. Absorption and PL spectra of thiol-capped CdSe QDs
图 1. 巯基乙酸包裹的 CdSe 量子点的吸收、荧光光谱



假定体系中单态氧的产生和消耗达到平衡, 没有剩余, 则:

$$\begin{aligned} \frac{d[{}^1\text{O}_2]}{dt} &= k_3[S_T][{}^3\text{O}_2] - k_4[{}^1\text{O}_2][S_0] \\ &\quad - k_5[{}^1\text{O}_2][\text{Bio}] = 0 \end{aligned} \quad (1-1)$$

同样假定三线态光敏剂没有剩余, 则:

$$\frac{d[S_T]}{dt} = k_1k_2[S_0][I] - k_3[S_T][{}^3\text{O}_2] = 0 \quad (1-2)$$

三线态光敏剂的含量为:

$$[S_T] = \frac{k_1k_2[S_0][I]}{k_3[{}^3\text{O}_2]} \quad (1-3)$$

单态氧的含量为:

$$[{}^1\text{O}_2] = \frac{k_1k_2[S_0][I]}{k_4[S_0] + k_5[\text{Bio}]} \quad (1-4)$$

综上所述, 可以得出光敏剂的光漂白速率方程为:

$$-\frac{d[S_0]}{dt} = \frac{k_1k_2k_4[S_0]^2[I]}{k_4[S_0] + k_5[\text{Bio}]} \quad (1-5)$$

根据量子点所在的溶液体系的底物情况, 将其光漂白过程简化分解为两种情况:

- 在不含底物的单一溶液体系中, 如水溶液、硼酸缓冲液等, 光敏剂的漂白速率方程为:

$$-\frac{d[S_0]}{dt} = k[S_0] \quad (1-6)$$

- 在含氧化底物的复杂体系中的漂白, 如细胞悬液、胎牛血清溶液等。本实验选用 FBS 溶液和 HL60 细胞溶液, 光敏剂的漂白速率方程为:

$$-\frac{d[S_0]}{dt} = k[S_0]^2 \quad (1-7)$$

由式(1-6)可知, 在不含底物的单一溶液体系中光敏剂的漂白速率符合 1 级反应动力学过程。由式(1-7)可见, 在含有可氧化底物且底物充分的溶液中光敏剂的漂白速率符合 2 级反应动力学过程。

但由于生物体中成分更为复杂, 在氧气充足条件

下, 生物体中单态氧介导的光漂白动力学方程为:

$$-\frac{dC_m}{dt} = kC_m^n \quad (1-8)$$

其中, n 表示反应动力学级数, C_m 为光敏剂在某时刻的浓度, k 是反应速率常数。

由比尔 - 朗伯吸收定律:

$$A = \varepsilon CL \quad (1-9)$$

其中 A 第一激子吸收峰处对应的吸收度, C 是纳米颗粒的浓度, 单位为 Mol/L ; L 是光程长, 单位为 cm , ε 为消光系数。

本实验所用的量子点 CdSe 的第一激子吸收峰位于 605 nm 处, 量子点 CdSe 的粒径大约为 4.8 nm 。而本实验测量吸收光谱用的比色皿的光程长为 1 cm , 所以上式可以简化为:

$$A \approx 3.74 \times 10^5 C \quad (1-10)$$

其第一激子吸收峰对应的吸光度值便可以算出量子点 CdSe 在该溶液中的浓度。

3. 量子点 CdSe 光漂白规律的实验研究

3.1. 实验材料

巯基乙酸做外包覆的量子点^[17] (CdSe/HS-CH₂-COOH, 核半径为 4.8 nm , 包覆后约为 13 nm), 人前髓细胞(早幼细胞)株 HL60, 紫外可见分光光度计 (SHIMADZU UV-2550, 日本), 倒置显微镜(XDS-1 型, 中国), 二氧化碳培养箱(一恒 BPM-80W, 中国), PDT 光反应室(实验室设计)等。

3.2. 实验方法

配制 FBS 加量子点 CdSe 和 HL60 细胞加量子点 CdSe 成五种混合溶液。其中: FBS 组 FBS 终浓度为 10% , 量子点 CdSe 的浓度分别为: $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 。HL60 细胞悬液组每组中 HL60 细胞的最终含量为 1×10^5 个/ml, 量子点 CdSe 的浓度分别为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 。孵育 12 h 后光照, 光照波长为 410 nm , 光密度为 5 mW/cm^2 , 光照前和光照后每隔 10 min 用紫外可见吸收光度计测量各组中混合溶液的吸收光谱^[18]。用紫外可见吸收光度计测不同浓度的 CdSe 量子点在 FBS 溶液及 HL60 细胞溶液中的吸收光谱随光照时间的变化, 得到 CdSe

第一激子吸收峰的吸光度值及浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 时 CdSe 的吸收光谱随时间变化图像。

4. 实验结果及分析

相同浓度的 CdSe 量子点在 FBS 溶液及 HL60 细胞溶液中第一激子吸收峰的吸光度值、浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 时 CdSe 的吸收光谱随时间变化情况如图 2、3 所示。

不同浓度 CdSe 量子点在 FBS 溶液和 HL60 细胞溶液中的浓度变化情况如图 4、图 5 所示。

结合图 4、图 5 可得, 不同浓度 CdSe 量子点在 FBS 溶液和 HL60 细胞溶液中随着光照的进行其第一激子吸收峰的吸光度值均逐渐减少; 在光照 60 min 后,

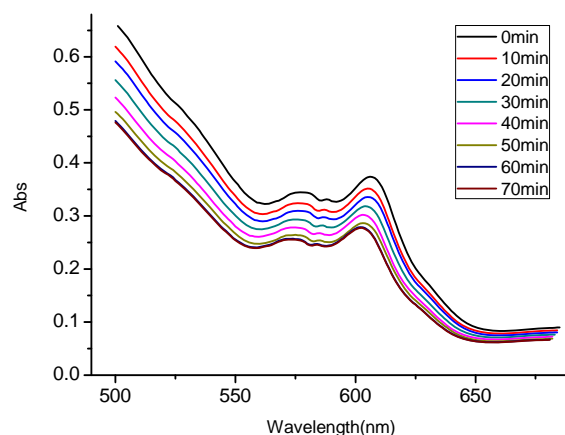


Figure 2. The absorption spectrum of $1.0 \mu\text{mol/L}$ CdSe QDs of different illumination time in FBS solutions $1.0 \mu\text{mol/L}$
图 2. FBS 溶液中浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的 CdSe 量子点在不同光照时间下的吸收光谱

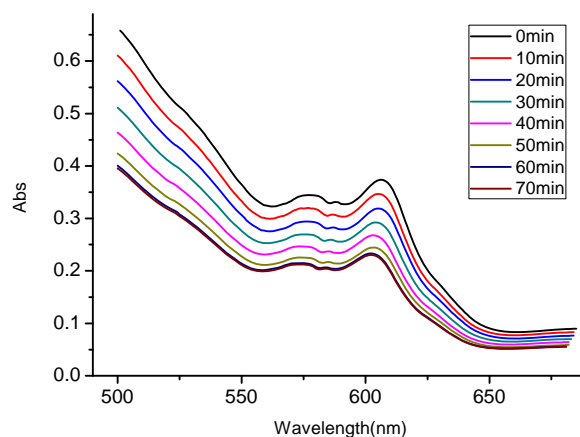


Figure 3. The absorption spectrum of $1.0 \mu\text{mol/L}$ CdSe QDs of different illumination time in HL60 cells
图 3. HL60 细胞溶液中浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的 CdSe 量子点在不同光照时间下的吸收光谱

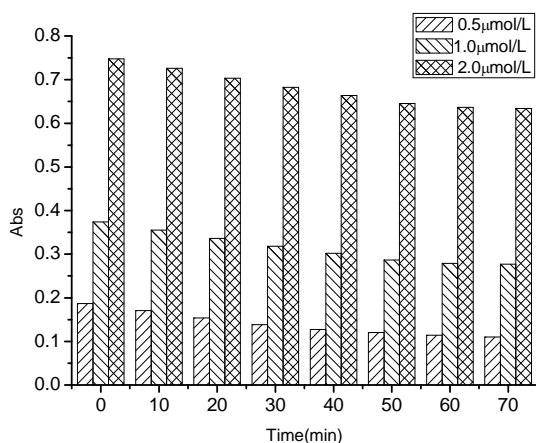


Figure 4. The absorbance of CdSe QDs changed with illumination time in FBS solutions

图 4. FBS 溶液中 CdSe 量子点的吸收峰吸光度值随着光照时间的变化

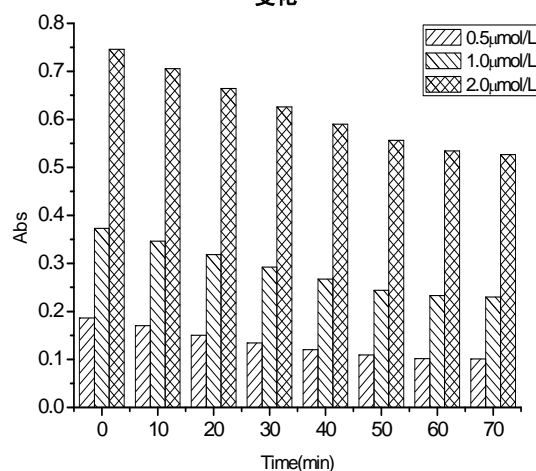


Figure 5. The absorbance of CdSe QDs changed with illumination time in HL60 cell

图 5. HL60 细胞溶液中 CdSe 量子点的吸收峰吸光度值随光照时间的变化

其吸光度值逐渐趋向平稳。不同浓度的 CdSe 量子点吸光度值减少的快慢不同，即浓度越大减少得越多，但由于其初始浓度不同，可将其初始浓度归一化。

CdSe 量子点在 FBS 溶液和 HL60 细胞溶液中光漂白的二次拟合曲线如图 6、图 7 所示。

由图 6、图 7 可知，CdSe 量子点在 FBS 溶液和 HL60 细胞溶液中均存在光漂白现象，且 CdSe 的浓度越大其光漂白速率越小。但相同浓度 CdSe 量子点在 HL60 细胞溶液中光漂白量大于在 FBS 溶液中，其原因可能是由于巯基乙酸包覆的 CdSe 在进入细胞过程中或在细胞内的复杂环境下，使得做外包覆的巯基乙酸更容易脱落，使得单态氧对量子点 CdSe 的氧化更容易。

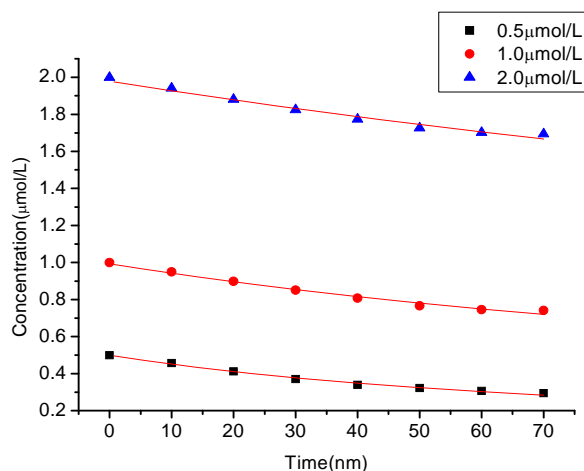


Figure 6. The secondary polynomial fitted photobleaching curve of CdSe QDs in FBS solutions

图 6. FBS 溶液中不同浓度 CdSe 光漂白曲线的二次拟合

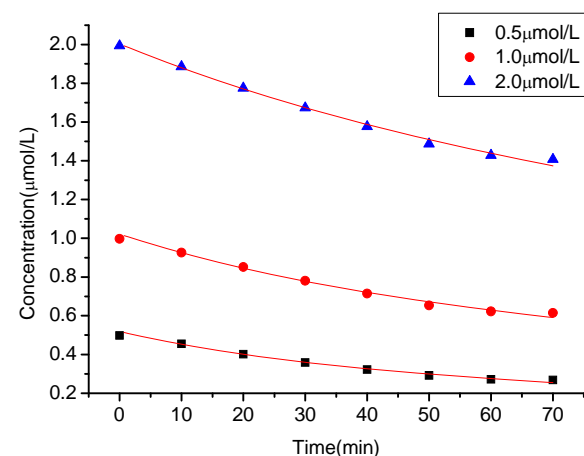


Figure 7. The secondary polynomial fitted photobleaching curve of CdSe QDs in HL60 cells

图 7. HL60 细胞溶液中 CdSe 光漂白曲线的二次拟合

由表 1 得知，量子点 CdSe 在 FBS 溶液中光漂白曲线二级拟合的效果比一级效果好。因此，实验结果与理论推导结果相符，量子点 CdSe 在 FBS 溶液中的光漂白过程符合二级反应动力学过程。在胎牛血清溶液中，单态氧一部分与量子点反应引起漂白，一部分与 FBS 中氨基酸残基等反应，使得量子点 CdSe 在 FBS 溶液中光漂白过程是一系列复杂的氧化反应。

同样，量子点 CdSe 在 HL60 细胞溶液中光漂白曲线二级拟合的效果也比一级好。因此，量子点 CdSe 在 FBS 溶液中的光漂白过程属于二级反应动力学过程。在 HL60 细胞溶液中，单态氧一部分与量子点反应引起漂白，一部分与 HL60 细胞中的大分子物质及细胞内各种结构和成分等反应，使得量子点 CdSe 在

Table 1. The comparison of standard deviation with two different fitted equation in FBS solutions and in HL60 cells
表 1. 量子点 CdSe 在 FBS 溶液及在 HL60 细胞液中光漂白曲线一级二级拟合标准差比较

FBS 溶液	0.5 μmol/L	1.0 μmol/L	2.0 μmol/L	HL60 溶液	0.5μmol/L	1.0 μmol/L	2.0 μmol/L
一级	0.1773	0.0709	0.0729	一级	0.1031	0.0606	0.0599
二级	0.0113	3.693×10^{-4}	1.045×10^{-4}	二级	0.0013	5.179×10^{-4}	1.446×10^{-4}

FBS 溶液中光漂白过程亦是一系列复杂的氧化反应。因此，实验结果与理论相符，量子点 CdSe 在 HL60 细胞溶液中的光漂白过程亦符合二级反应动力学过程。

5. 讨论

基于核壳式量子点 CdSe 光动力疗法中光漂白实验研究表明，不同浓度 CdSe 量子点在 FBS 和 HL60 细胞溶液中随着光照的进行，其第一激子吸收峰的吸光度值均逐渐减少，在光照 60 min 后，其吸光度值逐渐趋向平稳，且量子点浓度越小光漂白速率越大。但是相同浓度 CdSe 量子点在 HL60 细胞溶液中被漂白的量大于 FBS 溶液。在 FBS 溶液和 HL60 细胞溶液中均含有氧化底物，根据单态氧介导的光漂白反应机理，单态氧一部分与量子点反应引起漂白，一部分氧化底物等反应，使得量子点 CdSe 在 FBS 溶液和 HL60 溶液中的光漂白过程是一系列复杂的氧化反应。由实验数据可知：不同浓度 CdSe 量子点分别在 FBS 和 HL60 细胞溶液中的光漂白曲线二级拟合的效果均比一级好，光漂白过程均属于二级反应动力学过程。而由理论推导知，光敏剂在单一溶液里面的光漂白属于一级动力学过程，在含复杂底物的溶液中产生的光漂白属于二级动力学过程，实验数据得到了理论验证。

6. 致谢

本文受到国家自然科学基金项目(61072029)；广东省自然科学基金项目(10151063101000025)；广州市科技计划项目(2010Y1-C111)联合资助，作者在此一并表示感谢。

参考文献 (References)

[1] S. Hackbarth, J. Schlothauer, A. Preu, *et al.* New insights to pri-

mary photodynamic effects—singlet oxygen kinetics in living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, 3(98): 173-179.

[2] D. Sutoa, Y. Iuchia, Y. Ikedab, *et al.* Inactivation of cysteine and serine proteases by singlet oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 2 (461): 151-158.

[3] S. Jensen, C. Rolinb and R. Ipsena. Stabilisation of acidified skimmed milk with HM pectin. *Food Hydrocolloids*, 2010, 4(24): 291-299.

[4] C. L. Yan, X. W. Fu, *et al.* Mitochondrial behaviors in the vitrified mouse oocyte and its parthenogenetic embryo: Effect of taxol pretreatment and relationship to competence. *Fertility and Sterility*, 2010, 3(93): 959-966.

[5] 顾瑛, 刘凡光. 光动力疗法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 10-11.

[6] N. Breusing, S. Grimm, D. Mvondo, *et al.* Light-induced cytotoxicity after aminolevulinic acid is mediated by heme and not by iron. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2010, 1(99): 36-43.

[7] B. C. Wilson, M. S. Patterson and L. Lilge. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: A new paradigm. *Lasers in Medical Science*, 1997, 3(12): 182-199.

[8] R. Generalov, S. Kavaliauskienel, S. Westrom, *et al.* Entrapment in phospholipid vesicles quenches photoactivity of quantum dots. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6(2011): 1875-1888.

[9] 尤小刚, 贺蓉, 高峰等. 核/壳型 CdTe@SiO₂ 荧光纳米复合粒子的制备与表征[J]. *化学学报*, 2007, 6(65): 561-565.

[10] L. Jasmina, J. C. Sung, M. Francoise, *et al.* Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chemistry and Biology*, 2005, 11(12): 1227-1234.

[11] W. C. W. Chan, S. Nie. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. 1998, 5385(281): 2016-2018.

[12] A. C. Samia, X. B. Chen and C. Burda. Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 51(125): 15736-15737.

[13] W. Yu, L. H. Qu, Z. G. Wen, *et al.* Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials*. 2003, 14(15): 2854-2860.

[14] Y. Han, G. Y. Xie, N. Liu, *et al.* Effects of CdTe quantum dots on the antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in testes of mice. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2010, 6(5): 894-898.

[15] 王颖, 刘凡光, 顾瑛等. 血卟啉单甲醚在不同溶液体系中的光漂白途径研究[J]. *中国激光医学杂志*, 2005, 4(14): 268.

[16] 黄乃艳, 顾瑛, 刘凡光等. 卟啉类光敏剂漂白的动力学规律[J]. *中国激光医学杂志*, 2005, 1(14): 31-34.

[17] W. H. Chan, N. H. Shiao and P. Z. Lu. CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals. *Toxicology Letters*, 2006, 3(167): 191-200.

[18] 张宝琴, 肖谧, 张镇西等. ALA-PDT 破坏 K562 和 HL60 白血病细胞实验条件选择的研究[J]. *激光杂志*, 2005, 26(2): 85-87.