

多功能硅纳米粒子的制备及其在肿瘤细胞中的应用研究

亢一茜, 薄宇霞, 王美嘉, 蔺瑞霞, 马若晴, 窦亚坤*

华北理工大学药学院, 河北 唐山

收稿日期: 2026年4月27日; 录用日期: 2026年5月19日; 发布日期: 2026年5月28日

摘要

采用常温水相合成法制备兼具长波长荧光发射性质及单线态氧生成能力的多功能硅纳米粒子(Ce6-SiNPs), 并针对肿瘤细胞进行荧光成像与光动力治疗。利用一系列表征手段, 对荧光Ce6-SiNPs进行结构、光学性质等分析; 通过CCK8法和细胞成像实验考察荧光Ce6-SiNPs的生物安全性与肿瘤细胞成像效果; 并开展光动力治疗相关实验, 分别检测其在体外及细胞内的单线态氧生成能力, 同时探究单线态氧对肿瘤细胞的杀伤情况。基于CCK8法的细胞毒性评估显示, 荧光Ce6-SiNPs具有低毒性特征, 满足生物应用的基本要求; 肿瘤细胞成像实验证明荧光Ce6-SiNPs在肿瘤细胞中能够达到良好的荧光成像效果, 可用于生物成像领域; 体外及细胞内单线态氧生成能力的检测实验表明制备的荧光Ce6-SiNPs能够有效产生单线态氧, 具备进行光动力治疗的核心作用基础; 而细胞杀伤活性实验进一步验证了荧光Ce6-SiNPs具备肿瘤细胞杀伤能力, 为肿瘤细胞精准治疗提供了兼具成像与治疗功能的新型纳米材料。

关键词

硅纳米粒子, 荧光成像, 光动力治疗, 单线态氧, CCK8法

Preparation of Multifunctional Silicon Nanoparticles and Their Application in Tumor Cells

Yiqian Kang, Yuxia Bo, Meijia Wang, Ruixia Lin, Ruoqing Ma, Yakun Dou*

School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan Hebei

Received: April 27, 2026; accepted: May 19, 2026; published: May 28, 2026

*通讯作者。

文章引用: 亢一茜, 薄宇霞, 王美嘉, 蔺瑞霞, 马若晴, 窦亚坤. 多功能硅纳米粒子的制备及其在肿瘤细胞中的应用研究[J]. 分析化学进展, 2026, 16(2): 147-158. DOI: 10.12677/aac.2026.162017

Abstract

Multifunctional silicon nanoparticles (Ce6-SiNPs) with long-wavelength fluorescence emission and singlet oxygen generation ability were prepared by aqueous synthesis at room temperature, and fluorescence imaging and photodynamic therapy were performed for tumor cells. The structure and optical properties of Ce6-SiNPs were analyzed by a series of characterization methods. The biological safety of fluorescent Ce6-SiNPs and the imaging effect of tumor cells were investigated by CCK8 method and cell imaging experiment. Experiments related to photodynamic therapy were carried out to detect its singlet oxygen production ability *in vitro* and in cells, and to explore the killing effect of singlet oxygen on tumor cells. Cytotoxicity evaluation based on CCK8 method shows that fluorescent Ce6-SiNPs has low toxicity and meets the basic requirements of biological application. The experiment of tumor cell imaging proves that fluorescent Ce6-SiNPs can achieve good fluorescence imaging effect in tumor cells and can be used in the field of biological imaging. The detection experiments of singlet oxygen generation ability *in vitro* and in cells show that the prepared fluorescent Ce6-SiNPs can effectively generate singlet oxygen, which has the core function foundation for photodynamic therapy. The cytotoxicity experiment further verified that fluorescent Ce6-SiNPs has the ability to kill tumor cells, and provided a new nano-material with both imaging and therapeutic functions for precise treatment of tumor cells.

Keywords

Silicon Nanoparticles, Fluorescence Imaging, Tumor Cell Therapy, Singlet Oxygen, CCK8 Method

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近年来,硅纳米粒子(Silicon nanoparticles, SiNPs)作为一类具有低生物毒性与高生物相容性的荧光成像探针,已成为纳米生物医学领域的研究热点[1][2]。SiNPs作为一种新型的荧光探针,与传统含重金属的荧光量子点相比,具有生物安全性更高、生物相容性优异、光学性能可控且稳定以及制备成本更低等诸多优势,现已被广泛应用于传感、生物检测及荧光成像等领域[3]-[6]。众所周知,在荧光成像应用中,探针的发射波长、荧光量子产率与组织穿透能力呈正相关关系,即发射波长越长、量子产率越高,探针的组织穿透能力越强,成像效果也越理想[7]-[9]。然而,目前通过水热合成法制备的荧光 SiNPs,其荧光发射波段多集中于蓝绿光区域。例如, Ye 等[10]采用微波辅助合成策略,在 180°C 条件下制备出荧光量子产率达 28.8% 的蓝光发射 SiNPs,并将其成功应用于细胞成像研究; Na 课题组[11]借助反应釜调控反应温度,在 150°C 下反应 5 h,获得了黄绿色荧光发射的 SiNPs,实现了活细胞内 pH 值的可视化监测; Ma 研究团队[1]则在氮气氛围保护下,于 200°C 条件下反应 15 min,合成了发光强度较高的蓝绿色荧光 SiNPs,有效缩短了反应周期并提升了材料的发光性能。尽管相关研究已取得一定进展,但现有荧光 SiNPs 的制备常需依赖高温高压的苛刻反应条件,更关键的是荧光发射波长偏短,在成像应用中存在明显局限。因此,如何在更加温和的反应条件下制备长波长荧光发射的 SiNPs,仍是该领域亟待攻克的关键挑战。

目前,对于硅纳米粒子(SiNPs)的研究仍主要聚焦于其荧光特性,并以此为基础应用于传感与生物成像等方面。如闫雅倩[12]采用反向微乳液法制备出修饰了透明质酸的荧光纳米粒子,利用其荧光成像性质

用于检测人宫颈癌细胞 HeLa 细胞；李典[13]开发了一种新型的基于 FRET 的双光子荧光纳米探针平台，用于细胞内源性 ATP 的高选择性和高灵敏度的荧光比率生物成像；Zhou 等[14]以秀丽隐杆线虫为模型，证实了环状 RGD-肽共轭的 SiNPs 可以特异性标记活秀丽隐杆线虫中的肌肉附着结构，且经 120 min 激光漂白后仍保留超 80% 荧光信号，有力证明了该 SiNPs 在生物成像领域的应用价值。综上可知，制备得到的荧光 SiNPs 的应用主要集中在生物成像领域，具有较大的局限性，因此制备具有多功能的 SiNPs 是一项具有挑战性的工作。

本课题采用常温水相合成法制备了发射红色荧光的硅纳米粒子(SiNPs)，该方法不仅能在温和条件下简便实施，无需高温高压，更关键的是成功克服了传统 SiNPs 发射波长短的固有缺陷。制得的荧光 Ce6-SiNPs 除了具有发射波长长的优点，能够更好地应用于细胞成像领域，还具有产生单线态氧($^1\text{O}_2$)进行肿瘤细胞光动力治疗的能力。通过 CCK8 法实验结果表明，该红色荧光 Ce6-SiNPs 具有低毒性和优异的生物相容性，同时利用体外 HepG2 细胞成像实验以及光动力治疗相关实验证明该红色荧光 Ce6-SiNPs 可以产生良好的荧光成像和光动力治疗效果。综上，本课题所述红色荧光 Ce6-SiNPs 在肿瘤细胞成像和光动力治疗领域具有优异的应用前景。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

电子天平(BS-224S, 赛多利斯科学仪器有限公司); 数控超声波清洗器(JP-040S, 深圳市洁盟清洗设备有限公司); 荧光分光光度计(F-4500, 日本日立公司); 紫外分光光度计(Lambda 35, PerkinElmer 仪器有限公司); 傅立叶红外光谱仪(Spectrum Two, PerkinElmer 仪器有限公司); FV1000 荧光共聚焦显微镜(IX71, 奥林巴斯株式会社)。

N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 *N*-(2-氨基乙基)-3-氨基三甲氧基硅烷(DAMO)购自上海阿拉丁生化科技有限公司。Ce6、2-(*N*-吗啉代)乙磺酸缓冲液(MES)、盐酸(HCl)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、柠檬酸三钠溶液、乙酸乙酯、二氯甲烷、溴化钾(KBr)、无水乙醇购自天津市津东天正精密化学试剂厂。1,3-二苯基异苯并咪唑(DPBF)、氢氧化钠(NaOH)和氯化钠(NaCl)购自天津永大化学试剂有限公司。无水磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)和无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)购自上海麦克林生化科技有限公司。4%多聚甲醛(PFA)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)购自北京索莱宝科技有限公司、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)购自上海麦克林生化科技股份有限公司。实验室制备去离子水并用于所有实验。所有试剂均为分析级，无需纯化可直接使用。

2.2. 荧光 Ce6-SiNPs 的制备与条件优化

采用常温水相合成法制备荧光 Ce6-SiNPs。首先，将 1 mg Ce6 加入到 10 mL pH = 5 的 2-(*N*-吗啉代)乙磺酸缓冲液(MES)中溶解，并放入超声波中混匀。向溶有 Ce6 的 MES 溶液中各加入 4 mg *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)，并在水浴锅中以 25℃，350 r/min 反应 40 min 后，加入 500 μL *N*-(2-氨基乙基)-3-氨基三甲氧基硅烷(DAMO)恒温 25℃，350 r/min 反应 15 h，完成硅源 Ce6-DAMO 的制备。接着向硅源 Ce6-DAMO 中加入经超声混匀后的柠檬酸三钠溶液，恒温 25℃，350 r/min 进行反应。为了使制备得到的硅纳米粒子具有更加优异的光学性质，对反应时间和还原剂的用量进行了优化。将制备得到的荧光 Ce6-SiNPs 溶液转入分子量截留值为 3500 的透析袋中进行透析纯化，透析时间为 12 h，并每隔 4 h 更换一次透析用水。纯化后的荧光 Ce6-SiNPs 溶液保存于 4℃冰箱中备用。同时取部分样品进行冷冻干燥处理以获得固体产物，用于后续结构与性能表征。

2.3. 荧光 Ce6-SiNPs 的细胞毒性测定

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 将其用完全培养基进行稀释, 并以每孔 100 μL 、含 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 未接种细胞的空白孔则加入等量无菌 PBS 缓冲液。将 96 孔板置于培养箱中孵育 24 h, 待细胞完全贴壁后, 吸弃孔内原有培养基, 随即加入 100 μL 经空白培养基稀释的荧光 Ce6-SiNPs 溶液, 浓度梯度设置为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每个浓度组均设 6 个复孔, 并同步设置空白组与对照组。继续将 96 孔板放入培养箱孵育 24 h 后, 移除孔内培养基, 使用无菌 PBS 缓冲液轻柔洗涤细胞, 之后每孔加入 90 μL 空白培养基与 10 μL CCK8 试剂, 在培养箱中继续孵育 3 h。最后利用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的(OD)值。按照公式计算细胞存活率(CVR):

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{OD}_n - \text{OD}_0}{\text{OD}_a - \text{OD}_0} \times 100$$

式中:

OD_n ——实验组的吸光度值;

OD_a ——对照组的吸光度值;

OD_0 ——空白组的吸光度值。

2.4. 荧光 Ce6-SiNPs 的肿瘤细胞成像实验

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 将其用完全培养基进行稀释, 随后接种到 24 孔板中(24 孔板加入了提前消毒好的玻片), 未接种细胞的空白孔则加入等量无菌 PBS 缓冲液, 放入培养箱中培养 24 h 后, 再加入 300 μL 不同浓度(8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)用空白培养基稀释的荧光 Ce6-SiNPs 溶液, 并设置空白组, 继续放入培养箱培养 24 h; 固定荧光 Ce6-SiNPs 溶液的浓度为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 培养时间分别为 3 h、6 h、12 h、18 h 和 24 h, 同样设置空白组, 并放入培养箱继续培养 24 h。培养结束后对已经爬片好的细胞进行 DAPI 染色, 在荧光共聚焦显微镜下观察荧光成像情况。

2.5. 肿瘤细胞光动力治疗相关实验

2.5.1. 体外单线态氧检测

称取 3 mg DPBF 溶于 30 mL DMSO 中, 分取 6 份 5 mL 该溶液, 每份均与 3 mL 荧光 Ce6-SiNPs 溶液混合均匀, 共配成 6 份混合液。随后在黑暗条件下, 将 6 份混合液依次经 660 nm 激光照射 0 min、3 min、6 min、9 min、12 min、15 min, 最后用紫外分光光度计测定溶液中产生的单线态氧。

2.5.2. 细胞内单线态氧检测

将 HepG2 细胞以每孔 1×10^5 的密度接种于 12 孔板中, 置于培养箱内孵育 24 h, 随后更换为含荧光 Ce6-SiNPs 的培养基继续培养 24 h, 之后再次更换为新鲜培养基, 接着, 使用 660 nm 近红外激光分别照射细胞 2 min、4 min、6 min、8 min 和 10 min, 最后通过 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)试剂检测细胞内产生的单线态氧。

2.5.3. CCK8 法检测光动力诱导的细胞存活率

取对数生长期的 HepG2 细胞, 并以每孔 100 μL 、含 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 空白孔加等量无菌 PBS, 置于培养箱孵育 24 h 至细胞完全贴壁。弃原培养基, 每孔加 100 μL 空白培养基稀释的荧光 Ce6-SiNPs 溶液(药物浓度梯度: 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、256 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每组设 6 个复孔, 同时设空白组与对照组。孵育 12 h 后用 660 nm 的近

红外激光每孔照射 1 min，继续培养 12 h。随后用 PBS 缓冲液轻柔洗涤细胞，每孔加 90 μL 空白培养基与 10 μL CCK8 试剂，孵育 3 h。采用酶标仪于 450 nm 波长下测定各孔 OD 值，并按公式计算细胞存活率。

3. 实验结果

3.1. 荧光 Ce6-SiNPs 的制备与条件优化

3.1.1. 荧光 Ce6-SiNPs 的制备

图 1 是通过水相合成法制备荧光 Ce6-SiNPs 的示意图。

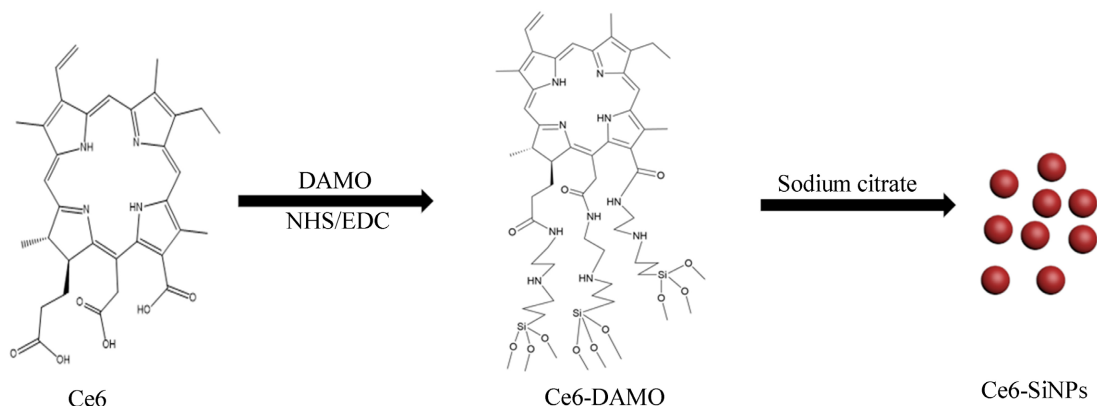


Figure 1. Schematic diagram of preparing fluorescent Ce6-SiNPs by aqueous synthesis method

图 1. 水相合成法制备荧光 Ce6-SiNPs 的示意图

3.1.2. 荧光 Ce6-SiNPs 制备条件优化

本课题利用单一变量法，通过优化反应时间(分别为 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h)和柠檬酸三钠剂量(分别为 10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg)来对荧光 Ce6-SiNPs 的制备条件进行优化，期望得到荧光性能更加优异的硅纳米粒子。由图 2(a)可以看出，固定柠檬酸三钠剂量为 40 mg，反应时间从 1 h 增大到 5 h 的过程中，反应时间为 3 h 时，荧光 Ce6-SiNPs 的荧光强度最强；由图 2(b)可以看出，固定反应时间为 3 h，柠檬酸三钠剂量从 10 mg 增大到 60 mg 的过程中，柠檬酸三钠剂量为 40 mg 时，荧光 Ce6-SiNPs 的荧光强度最强。因此荧光 Ce6-SiNPs 的最佳制备条件为反应时间 3 h、柠檬酸三钠剂量为 40 mg。

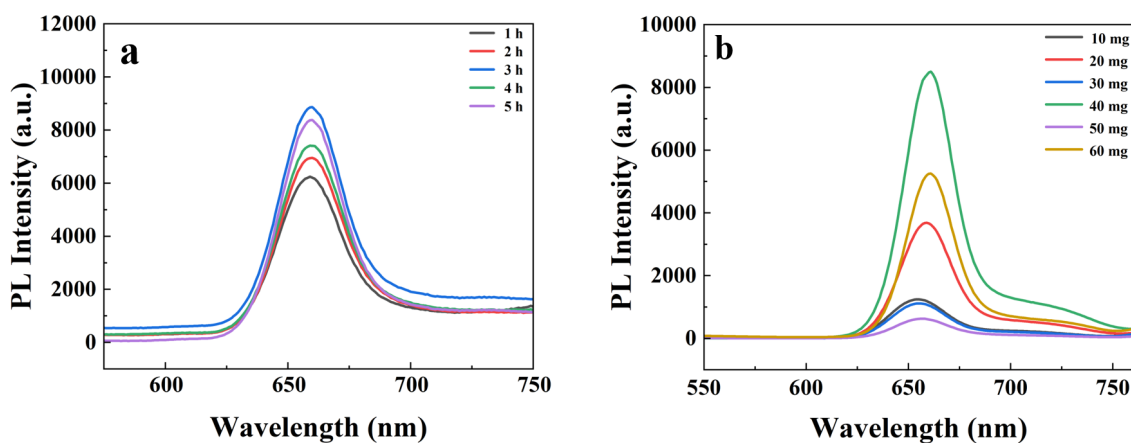


Figure 2. Optimization of preparation conditions for fluorescent Ce6-SiNPs

图 2. 荧光 Ce6-SiNPs 的制备条件优化

3.2. 荧光 Ce6-SiNPs 的表征

3.2.1. 结构分析

对样品进行红外光谱分析, 图 3 是荧光 Ce6-SiNPs 的红外光谱图。图中 1107 cm^{-1} 对应 Si-O-Si 的伸缩振动; 2932 cm^{-1} 和 1388 cm^{-1} 分别与不饱和 C-H 伸缩振动和弯曲振动相关; 1388 cm^{-1} 弱吸收带是 C-N 的伸缩振动[15][16]; 3396 cm^{-1} 处对应酰胺键中 N-H 的伸缩振动; 1582 cm^{-1} 处的吸收峰对应酰胺 I 带(C=O 的伸缩振动); 1205 cm^{-1} 与 1272 cm^{-1} 处的吸收峰为酰胺 III 带(C-N 伸缩振动与 N-H 弯曲振动的耦合振动)。以上结果表明, 合成的荧光 Ce6-SiNPs 富含酰胺键, 证明了荧光 Ce6-SiNPs 的成功制备。

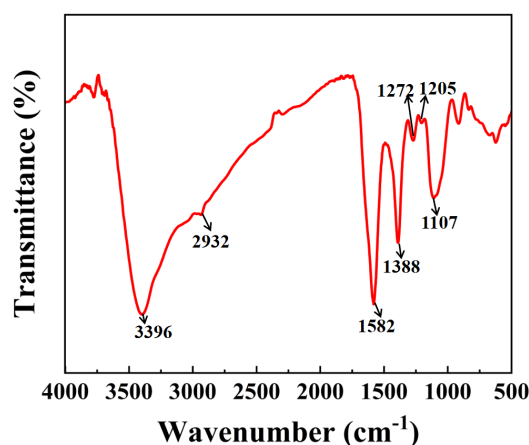


Figure 3. Infrared spectrum analysis of fluorescent Ce6-SiNPs
图 3. 荧光 Ce6-SiNPs 的红外光谱分析

3.2.2. 水溶性与分散性测定

利用有机溶剂乙酸乙酯、二氯甲烷和水, 对制备的荧光 Ce6-SiNPs 进行水溶性与分散性测定。由图 4(a)可看出荧光 Ce6-SiNPs 完全溶解于水相, 水相分散液呈透明的均一澄清状态, 未出现粒子沉降、团聚等现象, 且水相与有机相实现了完全分离。由图 4(b)可看出, 在紫外灯照射下, 仅水相层展现出明亮的红色荧光, 而有机相层则无荧光, 说明荧光 Ce6-SiNPs 完全溶解于水相中。综上表明制备的荧光 Ce6-SiNPs 具有良好的水溶性及水分散稳定性。

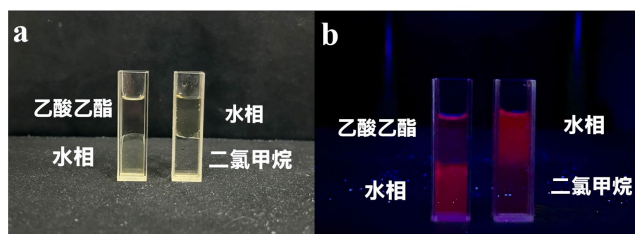


Figure 4. Determination of water solubility and dispersibility of fluorescent Ce6-SiNPs, (a) Dispersion of aqueous Ce6-SiNPs solution in organic solvents under sunlight; (b) Dispersion of aqueous Ce6-SiNPs solution in organic solvents under UV light
图 4. 荧光 Ce6-SiNPs 的水溶性与分散性测定, (a) 日光下荧光 Ce6-SiNPs 水溶液在有机溶剂中的分散情况; (b) 紫外灯下荧光 Ce6-SiNPs 水溶液在有机溶剂中的分散情况

3.2.3. 稳定性评估

首先利用 NaCl 影响测试法, 对合成的荧光 Ce6-SiNPs 进行盐稳定性评估, 如图 5(a)所示, 荧光 Ce6-

SiNPs 在 NaCl 浓度为 10 mM~50 mM 范围内具有较强且相对稳定的荧光强度,表明合成的荧光 Ce6-SiNPs 在高离子条件下具有较强的稳定性;接着对其进行 pH 稳定性评估,如图 5(b)所示,荧光 Ce6-SiNPs 在 pH 为 2~12 范围内均能保持相对稳定的荧光强度,表明合成的荧光 Ce6-SiNPs 具备优异的 pH 稳定性。

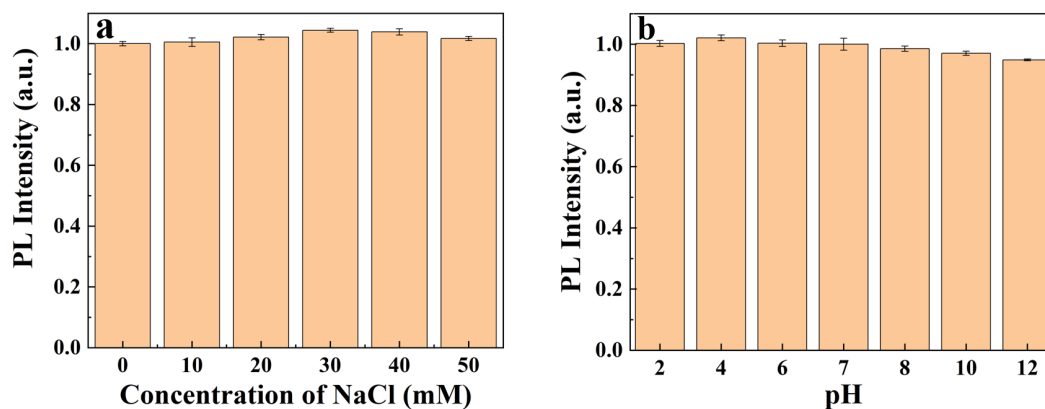


Figure 5. Stability evaluation of fluorescent Ce6-SiNP, (a) salt stability evaluation; (b) pH stability evaluation
图 5. 荧光 Ce6-SiNPs 的稳定性评估, (a) 盐稳定性评估; (b) pH 稳定性评估

3.2.4. 光学性质表征

(1) 紫外光谱分析

利用紫外-可见分光光度计测吸收光谱,对制备的荧光 Ce6-SiNPs 进行光学性质分析。如图 6 所示,在 Ce6-DAMO 和荧光 Ce6-SiNPs 的紫外-可见吸收光谱图中,400 nm 以及 660 nm 处呈现出 Ce6 的特征吸收峰,表明 Ce6 与 DAMO 形成的新硅源,以及制备的荧光 Ce6-SiNPs 并未破坏 Ce6 的结构,证明 Ce6 与 DAMO 的成功偶联以及荧光 Ce6-SiNPs 的成功制备。

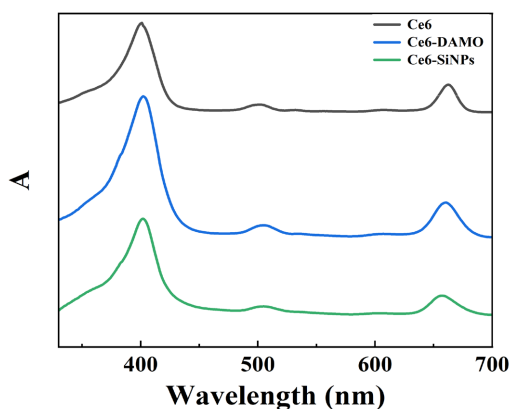


Figure 6. Ultraviolet spectrum of fluorescent Ce6-SiNPs
图 6. 荧光 Ce6-SiNPs 的紫外光谱图

(2) 荧光光谱分析

图 7 为荧光 Ce6-SiNPs 的荧光光谱图,从谱图可见,合成的荧光 Ce6-SiNPs 的最佳激发波长为 505 nm,最佳发射波长为 660 nm。由图 7 中的插图可以看到,制备的荧光 Ce6-SiNPs 溶液放在紫外灯下照射,能够发射明亮的红色荧光,与其发射波长是一致的,表明制备的荧光 Ce6-SiNPs 能够发射波长较长的红色荧光。

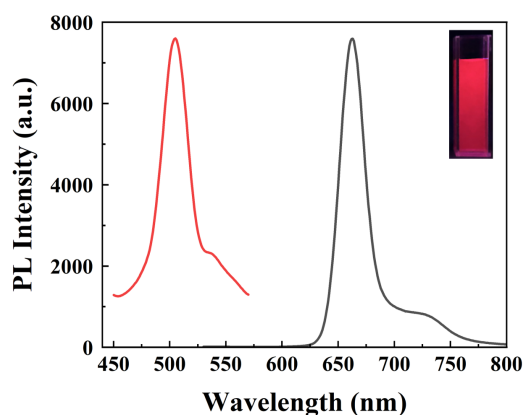


Figure 7. Fluorescence spectrum of fluorescent Ce6-SiNPs

图 7. 荧光 Ce6-SiNPs 的荧光光谱图

3.3. 细胞毒性实验

如图 8 所示, HepG2 细胞在浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、32 $\mu\text{g/mL}$ 、64 $\mu\text{g/mL}$ 、128 $\mu\text{g/mL}$ 、256 $\mu\text{g/mL}$ 的用空白培养基稀释的荧光 Ce6-SiNPs 溶液中孵育 24 h 后, 在浓度高达 256 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率仍保持较高水平, 说明在 0 $\mu\text{g/mL}$ ~256 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内荧光 Ce6-SiNPs 的细胞毒性较小, 生物安全性良好, 与同类型介孔硅负载 Ce6 体系的结果趋势一致[17], 证明制备的 Ce6-SiNPs 具有良好的生物相容性。

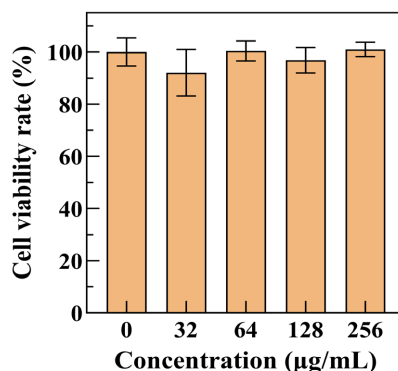


Figure 8. Cytotoxicity result graph of fluorescent Ce6-SiNPs

图 8. 荧光 Ce6-SiNPs 的细胞毒性结果图

3.4. 荧光成像实验

将荧光 Ce6-SiNPs 与 HepG2 肿瘤细胞共孵育, 以探究 Ce6-SiNPs 在肿瘤细胞中的荧光成像效果。制备的 Ce6-SiNPs 具有良好的亲水性和水分散性, 减少了材料在生理环境中的聚集, 从而可以提高在肿瘤细胞中的摄取效率。Ce6-SiNPs 与肿瘤细胞共孵育后, 主要通过细胞内吞作用摄取进入细胞, Ce6-SiNPs 与细胞膜接触并相互作用, 诱导细胞膜内陷形成囊泡, 将纳米颗粒包裹形成内吞小泡进入细胞。

将不同浓度(8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 、32 $\mu\text{g/mL}$ 和 64 $\mu\text{g/mL}$)的荧光 Ce6-SiNPs 与 HepG2 肿瘤细胞孵育 24 h 后, 如图 9 所示, 经 532 nm 激发光照射后, 细胞中呈现出红色荧光信号, 且荧光强度随 Ce6-SiNPs 浓度的升高呈剂量依赖性增强。将荧光 Ce6-SiNPs 荧光成像图与 DAPI 染色的细胞核成像图进行叠加分析, 结果显示, 荧光 Ce6-SiNPs 可成功进入 HepG2 细胞内, 且主要分布于细胞核周围的细胞质区域。

接着我们采用特定浓度(64 $\mu\text{g/mL}$)的荧光 Ce6-SiNPs 对 HepG2 细胞进行不同时间的孵育实验。由图

10 可知, 在 3 h、6 h、12 h、18 h、24 h 的梯度孵育时间下, 细胞的荧光亮度随孵育时间的延长而逐步增强, 这一现象表明进入细胞质的荧光 Ce6-SiNPs 数量呈递增趋势, 印证了荧光 Ce6-SiNPs 可通过内吞作用逐渐进入细胞内部, 且无论是图 9 不同浓度处理组, 还是图 10 不同培养时间组, 都可发现肿瘤细胞形态无明显变化, 同 CCK8 检测结果一致, 也说明荧光 Ce6-SiNPs 的细胞毒性较小。综上说明荧光 Ce6-SiNPs 在 HepG2 细胞中能够展现出优异的荧光成像性能, 证实本研究制备的荧光 Ce6-SiNPs 适用于体外荧光成像研究。

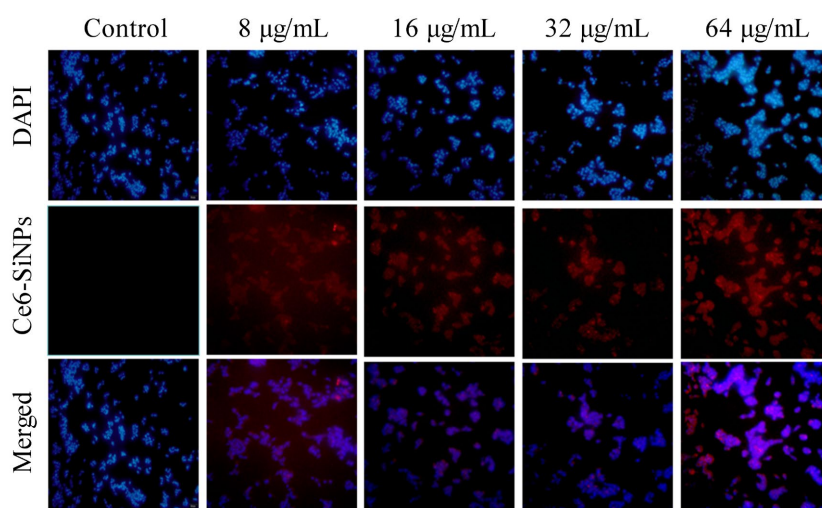


Figure 9. Fluorescence imaging of HepG2 cells incubated with Ce6-SiNPs with different concentrations for 24 h (blue is DAPI-stained nucleus fluorescence, red is Ce6-SiNPs fluorescence, and Merge is the superposition of them; Scale: 100 μm)

图 9. HepG2 细胞与不同浓度荧光 Ce6-SiNPs 共孵育 24 h 后的荧光成像图(蓝色为 DAPI 染色的细胞核荧光, 红色为 Ce6-SiNPs 的荧光, Merge 为两者叠加图; 标尺: 100 μm)

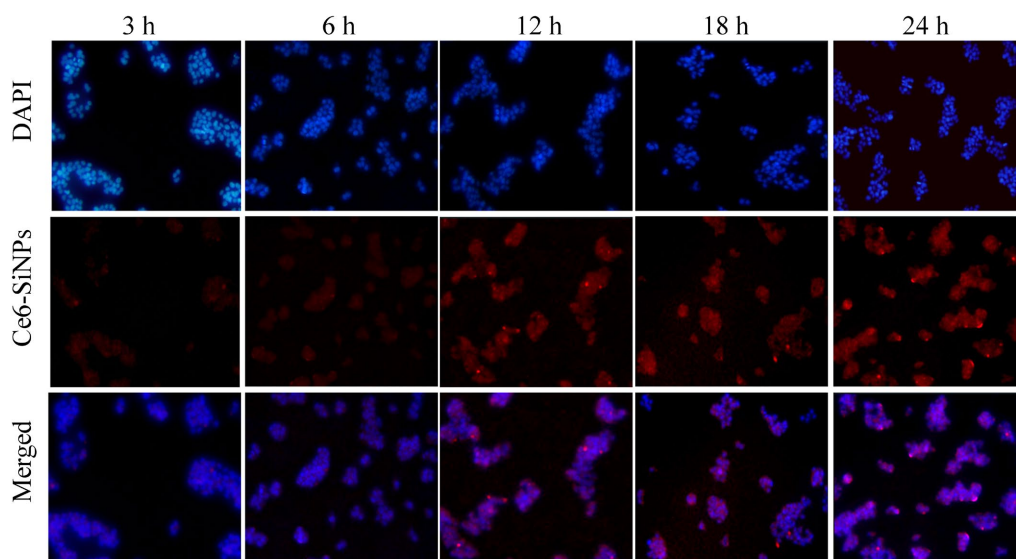


Figure 10. Fluorescence imaging images of 64 $\mu\text{g/mL}$ fluorescent Ce6-SiNPs solution co-incubated with HepG2 cells at different time points (blue is DAPI-stained nucleus fluorescence, red is Ce6-SiNPs fluorescence, and Merge is their superposition; Scale: 100 μm)

图 10. 64 $\mu\text{g/mL}$ 荧光 Ce6-SiNPs 溶液与 HepG2 细胞共孵育不同时间点后的荧光成像图(蓝色为 DAPI 染色的细胞核荧光, 红色为 Ce6-SiNPs 的荧光, Merge 为两者叠加图; 标尺: 100 μm)

3.5. 光动力治疗相关实验

3.5.1. 体外单线态氧检测

利用活性氧指示剂法对制备的荧光 Ce6-SiNPs 进行体外单线态氧的检测。1,3-二苯基异苯并咪唑 (DPBF) 在紫外 420 nm 处有较强吸收峰, 该物质可与单线态氧($^1\text{O}_2$)发生不可逆的氧化反应而被消耗, 当其与 $^1\text{O}_2$ 结合时, 在 420 nm 处的吸光度降低, 因此可利用 DPBF 测定体外产生的单线态氧。由图 11 可看出, 在 660 nm 激光照射下, 随着光照时间的延长, DPBF 在 420 nm 波长处的吸光度持续下降, 这一现象表明 DPBF 被体系内产生的单线态氧氧化分解, 证实了在激光照射下, 荧光 Ce6-SiNPs 具备单线态氧生成能力, 为后续开展肿瘤细胞光动力治疗实验奠定了关键的实验基础。

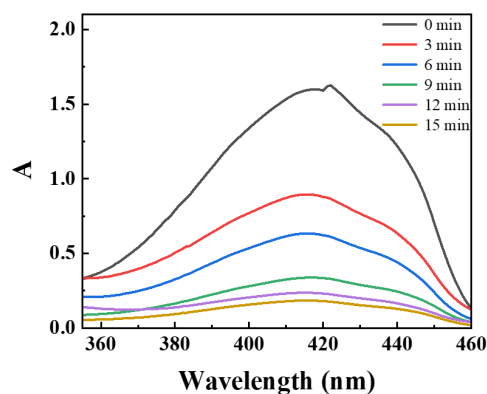


Figure 11. Absorption spectra of the fluorescent Ce6-SiNPs solution containing DPBF after being irradiated with near-infrared light at 660 nm for different durations

图 11. 含有 DPBF 的荧光 Ce6-SiNPs 溶液在 660 nm 近红外光照射不同时间后的吸收光谱

3.5.2. 细胞内单线态氧检测

本课题采用检测试剂 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)来量化细胞内单线态氧水平。本质上, DCFH-DA 是非荧光的, 但是细胞内的单线态氧可以将 DCFH 氧化为 DCF, 使其发出荧光。由图 12 可看出, 未经 660 nm 近红外激光照射的细胞表现出最小的荧光, 没有显著变化, 而暴露于 660 nm 近红外激光照射的细胞, 随着照射时间的增加, 在 DCFH-DA 通道中检测到细胞内荧光逐渐增强, 表明荧光 Ce6-SiNPs 在细胞层面仍可稳定产生单线态氧, 为下一步肿瘤细胞光动力杀伤实验的推进提供了重要依据。

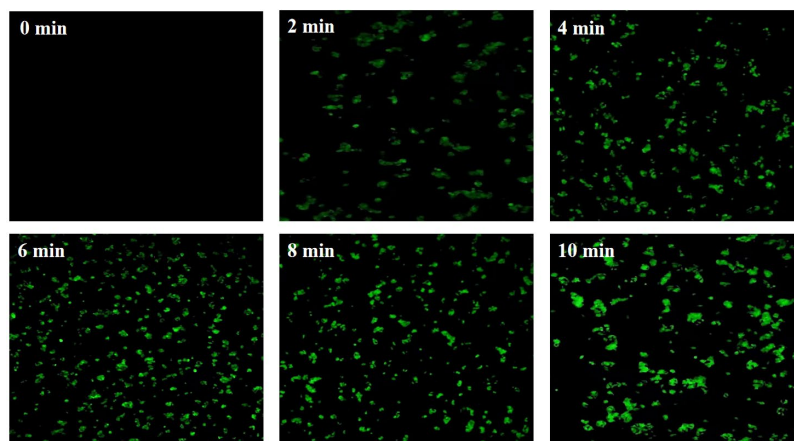


Figure 12. Experimental result diagram of intracellular singlet oxygen release

图 12. 细胞内单线态氧释放实验结果图

3.5.3. CCK8 法检测光动力诱导的细胞存活率

如图 13 所示, 随着荧光 Ce6-SiNPs 浓度的增加, HepG2 细胞的活力逐渐降低, 当浓度到达 256 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率仅为 15%。上述现象揭示了荧光 Ce6-SiNPs 具有浓度依赖的光毒性, 说明在 660 nm 激光照射下, 该材料能够促使细胞内产生高细胞毒性的单线态氧, 从而导致细胞死亡, 有力验证了在肿瘤细胞中, 该荧光 Ce6-SiNPs 具有较强的光动力治疗能力。这一效果与介孔硅负载 Ce6 体系的光动力治疗水平相当, 而显著优于游离的 Ce6 [17] [18]。

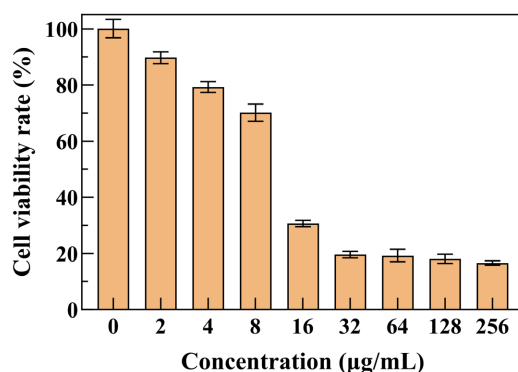


Figure 13. Survival rate of HepG2 cells under illumination treatment with different concentrations of fluorescent Ce6-SiNPs
图 13. 不同浓度荧光 Ce6-SiNPs 光照处理下 HepG2 细胞的存活率

4. 结论

本研究采用常温水相合成法, 并通过单一变量法优化其制备条件, 成功制备出了兼具荧光发射和光动力治疗的多功能硅纳米粒子 Ce6-SiNPs, 并对其进行结构、水溶性、稳定性以及光学性质的表征, 结果显示, 荧光 Ce6-SiNPs 不仅具有良好的水溶性, 环境稳定性及优异的荧光发射能力, 为其后续在肿瘤成像领域的应用提供了可靠的支撑, 同时进一步采用检测试剂 DPBF 和 DCFH-DA, 分别检测体外及细胞内单线态氧的生成情况, 结果表明荧光 Ce6-SiNPs 在光照条件下具备单线态氧生成能力, 为肿瘤细胞内的光动力治疗奠定了关键的实验基础。CCK8 法与体外 HepG2 细胞成像实验结果证明, 该荧光 Ce6-SiNPs 具有较低的细胞毒性, 不仅能够在肿瘤细胞内呈现出良好的荧光成像效果, 还可以在激光照射下在肿瘤细胞中产生单线态氧, 有效杀伤肿瘤细胞。综上, 本研究制备的多功能荧光 Ce6-SiNPs 不仅为长波长荧光发射硅纳米粒子的制备提供了详实的理论依据与切实可行的技术方案, 还扩展了硅纳米粒子的应用领域, 使其不仅在体外肿瘤细胞的荧光成像领域展现了良好的应用前景, 同时也为肿瘤细胞的治疗提供了新的研究思路。目前多功能荧光 Ce6-SiNPs 虽然在体外肿瘤细胞的应用中取得了一定的研究成果, 但还不能用于活体肿瘤的研究。相信随着研究的深入开展, 多功能硅纳米粒子一定会在体内研究领域展现出客观的应用前景。

基金项目

河北省自然科学基金青年基金项目(nos B2024209021), 河北省教育厅科技项目 - 河北省省属高校基本科研业务费研究项目(JQN2021036)。

参考文献

- [1] Ma, Y.J., Li, S., Qin, Y.T., *et al.* (2023) Multimode Sensing Platform Based on Turn-On Fluorescent Silicon Nanoparticles for Monitoring of Intracellular pH and GSH. *Analytical Chemistry*, **95**, 6664-6671.

- <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c00171>
- [2] Pan, C., Wen, Q., Ma, L., Qin, X. and Feng, S. (2022) Green-Emitting Silicon Nanoparticles as a Fluorescent Probe for Highly-Sensitive Crocin Detection and pH Sensing. *New Journal of Chemistry*, **46**, 12729-12738. <https://doi.org/10.1039/d2nj00690a>
- [3] Han, Y., Wang, Y., Liu, X., Chen, J. and Qiu, H. (2021) Green- and Red-Emitting Fluorescent Silicon Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Acid Phosphatase Sensing. *ACS Applied Bio Materials*, **5**, 295-304. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01086>
- [4] Pan, C., Qin, X., Lu, M. and Ma, Q. (2023) Green Synthesis of Yellow-Green Emissive Silicon Nanoparticles and Their Application for the Sensitive Fluorescence Detection of Bilirubin. *Analytical Methods*, **15**, 3034-3042. <https://doi.org/10.1039/d3ay00421j>
- [5] Bai, Y., Su, Q., Xiao, J., Feng, F. and Yang, X. (2020) Exploration of Synthesizing Fluorescent Silicon Nanoparticles and Label-Free Detection of Sulfadiazine Sodium. *Talanta*, **220**, Article 121410. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121410>
- [6] 窦亚坤, 李文友, 何锡文. 常压微波辅助法制备高荧光量子产率水溶性硅纳米粒子及其在细胞荧光成像中的应用[J]. 分析实验室, 2022, 41(12): 1514-1520.
- [7] Wang, R.G., Zhao, M.Y., Deng, D., *et al.* (2018) An Intelligent and Biocompatible Photosensitizer Conjugated Silicon Quantum Dots-MnO₂ Nanosystem for Fluorescence Imaging-Guided Efficient Photodynamic Therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, **6**, 4592-4601. <https://doi.org/10.1039/c8tb00931g>
- [8] Duan, Q.J., Zhao, Z.Y., Zhang, Y.J., *et al.* (2023) Activatable Fluorescent Probes for Real-Time Imaging-Guided Tumor Therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **196**, Article 114793. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114793>
- [9] Ci, Q., Wang, Y., Wu, B., Coy, E., Li, J.j., Jiang, D., *et al.* (2023) Fe-Doped Carbon Dots as NIR-II Fluorescence Probe for *in Vivo* Gastric Imaging and Ph Detection. *Advanced Science*, **10**, Article 2206271. <https://doi.org/10.1002/advs.202206271>
- [10] Ye, H.L., He, X.W., Li, W.Y., *et al.* (2022) Two-Photon-Excited Tumor Cell Fluorescence Targeted Imaging Based on Transferrin-Functionalized Silicon Nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **267**, Article 120450. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120450>
- [11] Na, M., Han, Y., Chen, Y., Ma, S., Liu, J. and Chen, X. (2021) Synthesis of Silicon Nanoparticles Emitting Yellow-Green Fluorescence for Visualization of pH Change and Determination of Intracellular pH of Living Cells. *Analytical Chemistry*, **93**, 5185-5193. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c05107>
- [12] 闫雅倩. 功能化纳米硅生物传感器在肿瘤诊断和药物检测中的应用研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海师范大学, 2016.
- [13] 李典. 双光子硅纳米颗粒的制备、传感性能及癌症治疗应用的研究[D]: [硕士学位论文]. 宁波: 宁波大学, 2021.
- [14] Zhou, Y.F., Zhang, Y., Zhong, Y., *et al.* (2018) The *in Vivo* Targeted Molecular Imaging of Fluorescent Silicon Nanoparticles in *Caenorhabditis Elegans*. *Nano Research*, **11**, 2336-2346. <https://doi.org/10.1007/s12274-017-1677-1>
- [15] Nsanzamahoro, S., Wang, W., Zhang, Y., Shi, Y. and Yang, J. (2021) Synthesis of Orange-Emissive Silicon Nanoparticles as “Off-On” Fluorescence Probe for Sensitive and Selective Detection of L-Methionine and Copper. *Talanta*, **231**, Article 122369. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122369>
- [16] Dou, Y.K., Shang, Y., He, X.W., *et al.* (2019) Preparation of a Ruthenium-Complex-Functionalized Two-Photon-Excited Red Fluorescence Silicon Nanoparticle Composite for Targeted Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy *in Vitro*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **11**, 13954-13963. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b00288>
- [17] Abdel Gaber, S.A., Stepp, H., Abdel Kader, M.H. and Lindén, M. (2023) Mesoporous Silica Nanoparticles Boost Aggressive Cancer Response to Hydrophilic Chlorin E6-Mediated Photodynamic Therapy. *Cancer Nanotechnology*, **14**, Article No. 67. <https://doi.org/10.1186/s12645-023-00216-4>
- [18] Luo, W., Liu, R.S., Zhu, J.G., *et al.* (2021) Subcellular Location and Photodynamic Therapeutic Effect of Chlorin e6 in the Human Tongue Squamous Cell Cancer Tca8113 Cell Line. *Oncology Letters*, **21**, 1-8.