

• 综 述 •

基于纳米技术的表面增强拉曼光谱 在细胞研究中的应用

崔颜, 任斌, 田中群

(厦门大学 化学化工学院, 固体表面物理化学国家重点实验室和厦门大学分析科学重点实验室, 福建 厦门 361005)

[摘要] 纳米生物学和医学研究的一个重要目标就是从分子水平上深入了解活细胞的生物学机制, 通过实时探测活细胞的分子结构和功能的改变, 尽早发现病变细胞, 实现对疾病的早期诊断。表面增强拉曼光谱(SERS)具有较高的表面物种的检测灵敏度, 能从分子水平上获得物质的结构及化学组成信息, 具有指纹识别特征。与红外、荧光等其它光谱手段相比, 更具有不受水干扰、不易猝灭、可用红光激发、受生物样品自身荧光干扰小等优点, 尤其适合于生物体系研究。本文将结合本研究组的研究, 从方法学角度介绍近期 SERS 在常规细胞研究乃至癌细胞研究中国内外的研究进展, 以及所面临的困难和挑战。

[关键词] 表面增强拉曼光谱(SERS); 纳米粒子; 细胞; 文献综述

[中图分类号] O657.38 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-6264(2011)01-0254-09

doi 10.3969/j.issn.1671-6264.2011.01.040

随着人们对生命体系研究的深入、对疾病发生机制的探求及战胜疾病愿望的渴望, 采用常规组织切片、蛋白染色等生物医学手段已经不能满足要求。细胞是生命活动的基本单位, 细胞之间的信号传导是实现各种生命功能的基础, 而疾病的发生发展也与细胞表面成分改变、细胞凋亡、细胞的增殖分化等密切相关, 越来越多的工作倾向于从单细胞、单分子水平上探究生命问题。目前, 对单细胞研究的技术主要包括荧光光谱技术、扫描探针显微技术、微流控技术、毛细管电泳技术等^[1], 但大多数技术存在侵入性, 会对细胞产生破坏, 并且无法从分子水平上获得细胞内结构的具体信息。

光学技术具有无侵入、无电离辐射、允许多种模式成像、可获得实时与定量等多种信息的特点, 在生命科学研究中占有越来越重要的地位。目前已经在生物医学领域中得到应用的光谱技术主要有紫外可见吸收光谱、红外光谱、荧光光谱、拉曼光谱[包括表面增强拉曼光谱(SERS)、受激拉曼光谱(SRR)和相干反斯托克斯拉曼光谱(CARS)]等。其中 SERS 作为一种振动光

谱不仅能够提供分子内结构信息, 具有指纹识别特征; 并且 SERS 借助贵金属纳米结构的局域电磁场增强使位于纳米结构附近分子的拉曼信号得到几个数量级的放大, 与常规拉曼相比具有更高的检测灵敏度。特别是随着单分子 SERS 的发现^[2-3], 在特殊结构热点内的 SERS 信号可以与荧光信号相比拟。若所研究分子的电子吸收和激光激发波长相近, 又会产生 $10^3 \sim 10^4$ 的增强, 与 SERS 效应耦合所产生的表面增强共振拉曼光谱(SERRS)可以达到 $10^{10} \sim 10^{14}$ 的增强^[4-5]。然而 SERS 光谱与其它光谱相比具有稳定、不易猝灭、可用红光激发、对生物样品损坏小、不受生物样品自身荧光及水的干扰等特点, 尤其适合于生物医学的研究。SERS(SERRS)在生物物理、生物化学以及生物医学中的应用兴起于上世纪 80 年代中期, 在近几年发展迅猛, 目前已经在小分子检测、DNA、适配子、蛋白质、病毒、细菌、细胞等基础研究以及体外传感、癌症诊断、反恐化学战争检测、环境污染分析、艺术考古鉴定等实际体系得到应用^[6-29]。本文结合近几年国内外 SERS 在细胞研究领域的发展以及我们在该领域多年工作的

[收稿日期] 2010-11-09 [修回日期] 2010-12-02

[基金项目] 973 项目(2007CB935603和 2009CB930703); 国家自然科学基金资助项目(20825313和 20827003); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2010121019)

[作者简介] 崔颜(1980-), 女, 江苏常州人, 理学博士。E-mail: ycu@xmu.edu.cn

[通信作者] 任斌 E-mail: bren@xmu.edu.cn

经验,从方法学的角度对这些工作进行综述,并对目前SERS在细胞研究领域所面临的困难、挑战和机遇进行了分析。

1 SERS (SERRS) 在细胞研究中的基本方法——直接检测和间接检测

总的来说, SERS(SERRS)在细胞研究乃至整个生物医学研究中所采用的研究方法可以归纳为两类:直接检测和间接检测。直接检测主要是将待测的生物样品(如蛋白、DNA、细胞等)直接作用于SERS活性基底,获得该生物样品自身的分子振动信息。该方法充分利用了SERS(SERRS)具有指纹识别的优势。但是,由于生物蛋白分子通常是由拉曼散射截面较小的氨基酸序列构成,且和表面作用力也较弱,直接检测时信号往往极弱。此外,对于细胞这种复杂体系,通常所得到信息非常复杂,虽然通过后续的信号处理可以得到一些特征信息,但如何从获得的SERS谱图中获取和生命过程直接相关的信息,仍是一个巨大的挑战。直接检测的核心问题是如何发展高重现性、洁净、高灵敏和高选择性的SERS基底。

间接检测通常是将具有明确谱峰归属而且拉曼信号很强的分子(这类分子一般具有很大的 π 共轭体系,或在所采用的激发光波长处具有共振增强效应)标记在具有SERS效应的纳米粒子上,然后在SERS标记的纳米粒子上修饰具有特异识别能力的生物分子(如抗体、DNA、适配子等),进而将SERS(SERRS)标记的纳米粒子靶向到细胞特定的位点。此时SERS(SERRS)标记分子像荧光分子一样只是作为一个标记信号,但与荧光光谱相比,其谱峰非常窄,在多组分标记检测中具有突出的优势。间接检测法损失了SERS(SERRS)光谱直接获得待测体系指纹图谱的优势,该方法以后的发展方向将是如何实现高靶向性、高灵敏度、高特异性和多功能性。

近年来SERS(SERRS)光谱技术在生命医学中得到越来越广泛的应用,也逐渐由基础研究走向实际应用,并实现了基于SERS的流式细胞术^[30]、胶体Au免疫检测等。但纵观全局,SERS(SERRS)技术在细胞研究中的应用一方面取决于人们对于生物识别分子(适配子、抗体、DNA)的认识和筛选,另一方面也和纳米科学的发展、高活性SERS基底和高选择性基底(主客体识别)的发展紧密相关。

2 细胞的直接检测

2.1 纳米粒子法

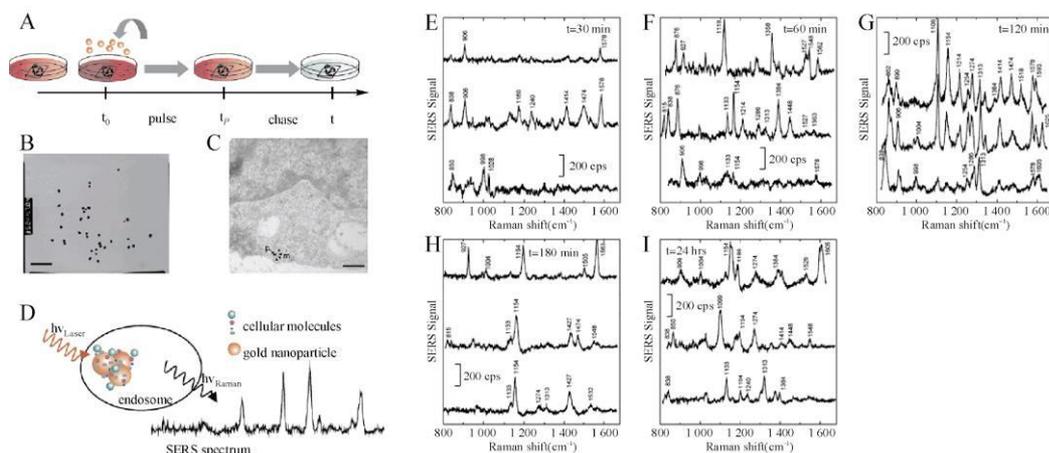
采用纳米粒子作为SERS基底对细胞进行直接研

究是一种最简单的方法,通过将纳米粒子与细胞相互作用,可以研究细胞内分子动力学^[31]、正常细胞和发生凋亡的细胞鉴别^[32]、外部化学物质与细胞的相互作用^[33]。结合共振拉曼光谱还可以对血红细胞中不同游离态的血红素及结合在膜上的血红素进行鉴别^[34]。

Kneipp等^[31]首次将Au纳米粒子用于细胞内分子动力学变化研究。通过对与细胞共培养不同时间段的Au纳米粒子的SERS光谱分析可揭示细胞内的分子动力学变化过程(图1)。结合透射电子显微镜(TEM)图发现纳米粒子最后都到达溶酶体。进一步对两种不同细胞上皮细胞和巨噬细胞的SERS谱图进行分析,发现这两种细胞株的SERS谱图都会随时间发生变化,且呈现明显不同的谱峰特征。上皮细胞体系的SERS谱图主要由多种蛋白、脂及核酸组成,而巨噬细胞除了类似的特征谱峰外还存在明显的单体腺苷或三磷酸盐(AMP/ATP)的SERS信号。

采用SERS可以对正常细胞及凋亡细胞进行鉴别。纳米粒子较难进入正常细胞的细胞核,只能从有限的纳米粒子上获得SERS光谱。当细胞发生凋亡时,内部细胞器的膜结构会被破坏,导致内部生物分子和纳米粒子在细胞内的分布更均匀,可获得代表性的信息,同时在SERS光谱中能检测到DNA的特征峰^[32-35]。

此外,借助纳米粒子SERS基底还能对外部化学物质与细胞的相互作用进行研究。例如,人们发现自由的抗癌药物阿霉素(DOX)可进入癌细胞的细胞核,加入Ag纳米粒子后便能获得DOX-DNA复合物的SERS信息。若将DOX首先吸附在Ag纳米粒子表面再和细胞共培养,复合纳米粒子则无法穿过细胞核膜只能滞留于溶酶体中,得不到任何DNA信息^[33]。这一工作借用已知分子结构的外来物种研究其与细胞内物质的相互作用,从而间接地反映细胞与外来物质的相互作用。另外一个比较典型的例子是将可能刺激细胞产生特殊响应的化学物质加入到细胞中,通过检测细胞SERS谱峰的变化来监测细胞对外来刺激所作出的反映。例如将钙离子载体(inomycin,一种常用触发细胞释放钙离子的试剂)加入到CHO细胞中,在 1643 cm^{-1} 会出现一个新峰(归属于氨基酸I级结构),且峰强随时间变化迅速增长并到达平台。这一结果与用荧光探针检测 Ca^{2+} 释放的实验比较一致,只是在时间尺度上不同。与荧光探针法检测 Ca^{2+} 释放不同,采用SERS光谱直接借用细胞本体分子作为探针,反映了细胞与钙离子载体的相互作用,此外SERS光谱还能提供细胞的本体信号,通过细致的分析可获



A. 在 t_0 时刻将 Au 纳米粒子加入到细胞培养基内, 共培养一段时间 (t_p), 随后继续于不含纳米粒子的培养基内培养一段时间 (t), 在 PBS 清洗后进行拉曼检测; B. 分散于细胞培养基后 Au 纳米粒子的透射电子显微镜图, 比例尺: 500 nm; C. 透射电子显微镜表明单个 IRPT 细胞通过细胞内吞可摄取纳米粒子; D. 细胞 SERS 检测的示意图; E~I IRPT 细胞与 Au 纳米粒子共培养不同时间后所获得的典型 SERS 谱图

图 1 实验流程图^[31]

A. Gold nanoparticles were applied with the cell culture medium at time t_0 as a pulse of duration t_p , followed by incubation in medium without nanoparticles for different times t at which the Raman experiments were carried out in PBS buffer; B. Transmission electron micrograph of gold nanoparticles immersed in cell culture medium, scale bar 500 nm; C. Transmission electron micrograph showing the endocytotic uptake of an individual gold nanoparticle by an IRPT cell, scale bar 500 nm; D. Schematic of the SERS measurements inside the endosomal compartment; E~I Typical surface enhanced Raman scattering (SERS) spectra from cells of the epithelial cell line IRPT after incubation with gold nanoparticles for different time

Fig 1 Schematic of the experiment^[31]

得比荧光光谱更丰富的信息^[36]。利用 SERS 还能够在单细胞水平监测神经递质的释放。例如, 人们已采用 Ag 纳米粒子实现了小鼠 PC12 细胞在 K^+ 环境下所分泌的一些神经递质如儿茶酚胺、去甲肾上腺素、多巴胺的检测^[37], 但目前要同时实现对细胞分泌物的高空间分辨率及高时间分辨率的检测还比较困难。采用高 SERS 活性基底可以实现毫秒级时间分辨率的检测, 但对细胞进行逐点扫描成像, 在获得高空间分辨率的同时也极大地降低了时间分辨率, 有可能丢失某一时点某一位点的细胞释放物信息。若采用数值孔径较小且放大倍数较低的显微镜降低空间分辨率则可直接对整个细胞进行检测, 可能满足时间分辨率的要求, 却又丢失了空间分辨率的信息, 无法确切知道某一时点是在细胞哪个位点释放物质。另外对于细胞分泌物的检测, 若采用聚集的纳米粒子作为 SERS 基底, 基底均一性较差, 很难实现定量检测, 而另一方面纳米粒子将可能被细胞内吞。若采用均一的组装 SERS 基底将可以获得更均一的信息, 且可探测细胞下膜的物质释放^[38]。

纳米粒子进入细胞后大多是进入溶酶体, 无法进入细胞核或其它细胞器。一个解决方法便是对纳米粒

子表面进行核定位肽修饰, 从而大大增加纳米粒子进入细胞核的可能性。尽管采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 作为保护剂法所获得的 Au 纳米棒在连接核定位肽后存在 CTAB 及核定位肽本体信号的干扰, 但仍可以对细胞核/细胞质及正常细胞/癌细胞进行区别^[39-40]。

2.2 细胞内生长纳米粒子法

另一种对细胞进行直接检测的方法则是通过细胞自身的还原作用对外部溶液中所添加的金属离子进行还原。此时所获得的纳米粒子会在细胞质甚至细胞核内出现, 从而避免常规细胞对纳米粒子摄取后纳米粒子只能到达溶酶体的问题。并且避免了化学合成过程中表面活性剂及其它分子在纳米粒子表面的吸附导致对细胞内弱吸附能力物种检测的干扰^[41]。若将从内部生长 Au 纳米粒子上所获得的 SERS 谱图与合成 Au 纳米粒子与细胞共培养所获得的 SERS 谱图进行对照, 可发现最明显的区别在于后者的 SERS 谱图上将出现 500 cm^{-1} 双硫键振动 (溶解酶蛋白具有大量的双硫键), 这很好地说明纳米粒子与细胞共培养后, 最终将位于溶酶体内。而直接在细胞内生长的纳米粒子上未得到任何该峰的信息, 说明纳米粒子更会在细胞质

内出现。

2.3 纳米吸管法

采用纳米粒子进行细胞研究, 如果不进行特殊的表面修饰, 不可避免地存在纳米粒子在细胞内发生聚集, 只能停留在溶酶体内, 无法靶向到达细胞核或其它细胞器等问题; 若进行复杂的表面修饰又无疑会影响到 SERS 的直接检测; 细胞内直接生长纳米粒子则又会对细胞本身的状态有一定的影响。SERS 活性纳米吸管 (nanopipette) 可以很容易地进行细胞质和细胞核内不同细胞器的定位研究, 并且能够检测细胞在外界刺激后的变化。另外纳米吸管吸附 Au 纳米粒子后仍保持畅通, 可以进一步地进行药物注射研究^[42]。

2.4 组装纳米粒子 SERS 基底

采用组装 SERS 基底, 可获得细胞膜蛋白信息, 有望为细胞信号传导、正常细胞与癌细胞的鉴别、物质跨膜运输等的理解提供有益的数据。通过在 ITO 上组装 Au 纳米粒子获得高重现性的 SERS 基底, 利用碘离子的强吸附能力取代基底表面吸附的杂质, 然后通过电化学氧化法将强吸附的碘离子氧化成弱吸附的碘酸根离子获得干净的 SERS 基底, 并应用于单个活细胞膜蛋白的研究 (图 2)^[43]。尽管在电化学氧化过程中也伴随着少量的金溶出并导致 1/3 ~ 1/2 的 SERS 活性的降低, 但是干净的基底却为未知物或弱吸附物种的检测提供了可靠的基础, 从而使得 SERS 可以可靠地应用于未知物或弱吸附物种的痕量分析以及生物体系和界面水的研究。然而活细胞体系非常复杂且细胞膜具有流动性及通透性, 这就给 SERS 光谱的分析带来困难。由于所获得的谱峰信息一直在变化, 这就需要在获得大量数据的前提下进一步采用数学方法 (如 PCA) 处理。但是对于正常细胞和癌变细胞差别往往就是蛋白质结构发生变化或发生蛋白质甲基化, 这种细微的变化能否灵敏地在 SERS 光谱上体现出来就并没有定论。这需要结合其它的光谱或者电化学手段进行进一步研究。

3 细胞的间接检测

3.1 癌细胞检测

利用功能化 SERS 标记纳米粒子对癌细胞进行间接检测的基本原理与 SERS 标记免疫检测以及在组织、活体肿瘤检测中所涉及的原理一致。主要是基于生物分子的相互识别作用及拉曼探针分子标记纳米粒子的高灵敏性及高分辨率等特点。目前研究的重点集中在功能化纳米粒子设计上, 围绕如何提高 SERS 活性 (SERS 活性基底的设计和标记分子的选择)、如何提高功能化纳米粒子的稳定性 (保护性壳层的设计)、

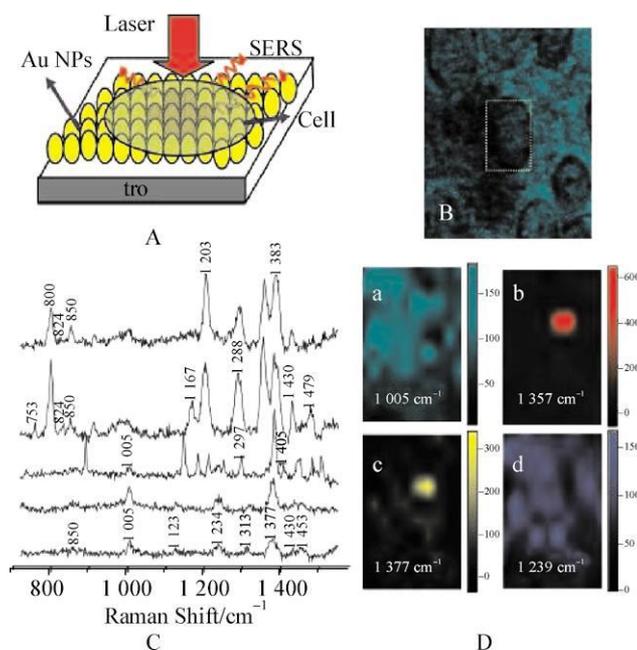


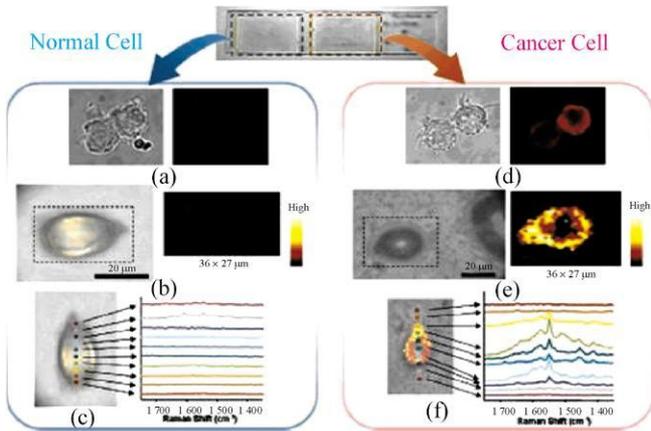
图 2 A 采用 SERS 进行细胞膜检测的实验示意图; B 共聚焦拉曼仪透射模式下所获得的 CHL 细胞图像; C 从单个活细胞不同点所获得的 SERS 谱图; D. 以不同氨基酸的拉曼强度作为成像信息对图 B 中矩形区域进行成像所获得的拉曼成像图: (a) 苯丙氨酸 (1005 cm^{-1}), (b) 色氨酸 (1357 cm^{-1}), (c) 脯氨酸 (1377 cm^{-1}), (d) 甲硫氨酸 (1239 cm^{-1}), 每个点的采样时间为 5 s 照到样品的激光功率为 0.4 mW^[43]

Fig 2 A Schematic diagram showing the experimental configuration for the SERS measurement of the cell membrane; B Video image of a CHL cell obtained in the transmission mode on a confocal microprobe Raman instrument; C. SERS spectra obtained at different spots of a living cell; D. SERS images obtained in the rectangular region of B using the SERS intensities of different amino acids as the imaging signal (a) Phe (1005 cm^{-1}), (b) Cys (1357 cm^{-1}), (c) Pro (1377 cm^{-1}); and (d) Met (1239 cm^{-1}). The acquisition time for each point was 5 s and the laser power at the sample was 0.4 mW^[43]

如何赋予纳米粒子更多的功能 (多模式成像以加强对癌症诊断的准确性)、如何提高多功能化纳米粒子的靶向性 (在靶分子的选择上由通过抗原抗体作用逐渐向适配子发展) 等方面展开。

癌细胞的细胞膜表面通常具有一些与正常细胞不同的蛋白或者糖基 (物种或者浓度), 常用的标志物包括表皮生长因子受体 (EGFR)、磷酸酶 (PLC γ 1)、叶酸受体等。将这些癌细胞标志物的抗体与 SERS 标记的纳米粒子相连, 可实现对癌细胞的靶向检测。然而蛋白的活性与其结构和存在的环境密切相关, 如果条件选择不当, 容易发生变性导致检测中的假阳性或假阴性。而采用核酸适配体这种稳定的 DNA 序列可以有效地克服这一问题, 显著提高检测的可靠性。而为了提高间接检测的灵敏度, 人们发展了 Au@Ag 纳米粒子 (图 3)^[44]、Ag 纳米粒子镶嵌的 SiO_2 纳米粒子^[45]、

Au纳米花^[46]、有机-无机复合纳米粒子(CO Ns)^[47]等不同结构的SERS标记纳米粒子。



(a). 标记量子点对正常细胞的荧光成像图: (左)明场成像图, (右)荧光成像图; (b). 单个正常细胞的SERS成像图: (左)明场成像图, (右)对单个正常细胞以R6G分子 1650 cm^{-1} 峰进行的拉曼成像图, 扫描步长为 $1\text{ }\mu\text{m}$; (c). 单个正常细胞明场成像和拉曼成像的叠加图, 彩色点表示激光斑点沿着y轴方向穿过细胞的中间; (d). 标记量子点对癌细胞的荧光成像图: (左)明场成像图, (右)荧光成像图; (e). 单个癌细胞的SERS成像图: (左)明场成像图, (右)对单个癌细胞以R6G分子 1650 cm^{-1} 峰进行的拉曼成像图, 扫描步长为 $1\text{ }\mu\text{m}$; (f). 单个癌细胞明场成像和拉曼成像的叠加图, 彩色点表示激光斑点沿着y轴方向穿过细胞的中间

图3 正常人胚胎肾细胞(HEK 293)及磷酸酶(PLC γ 1)表达的HEK 293细胞的荧光及SERS成像^[44]

(a). QD-labeled fluorescence images of normal cells (left) brightfield image (right) fluorescence image (b). SERS images of single normal cell (left) brightfield image (right) Raman mapping image of single normal cell based on the 1650 cm^{-1} R6G peak, the cell area was scanned with an interval of $1\text{ }\mu\text{m}$; (c). Overlay image of brightfield and Raman mapping for single normal cell, colorful spots indicate the laser spots across the middle of the cell along the y axis (d). QD-labeled fluorescence images of cancer cells (left) brightfield image (right) fluorescence image (e). SERS images of single cancer cell (left) brightfield image (right) Raman mapping image of single cancer cell based on the 1650 cm^{-1} R6G peak, the cell area was scanned with an interval of $1\text{ }\mu\text{m}$; (f). Overlay image of brightfield and Raman mapping for single cancer cell, colorful spots indicate the laser spots across the middle of the cell along the y axis

Fig 3 Fluorescence and SERS images of normal HEK 293 cells and PLC γ 1-expressing HEK 293 cells^[44]

肿瘤细胞很容易从一病灶脱落, 通过血液循环进行转移, 因此直接从全血进行肿瘤标志物及肿瘤细胞的检测对肿瘤的早期诊断是极其重要的。目前一般的癌细胞诊断只是局限于实验室培养的细胞, 并没有真正应用于全血检测。Oxonica公司发展了一系列SERS探针(包括Au@SiO₂、磁性的SERS tag), 首次将SERS技术应用于无洗涤、无分离、全血活细胞检测^[48]。通

过利用抗体修饰的磁性纳米粒子将癌细胞进行捕获浓缩, 并结合SERS标记免疫纳米粒子进行特异性检测, 检测限(LOD)可以优于 $10\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 并获得99.7%的高准确率。与其它光谱相比, 由于SERS可采用近红外光激发, 因此不会受到背景的干扰可直接应用于全血体系检测。在此基础上, 后人进一步将SERS检测和磁性分离集成到同一个纳米粒子中, 避免了繁琐的多步操作^[49-50]。

此外, 还可将SERS和瑞利散射、荧光等多种光学性质集成于同一个纳米粒子, 并将其用于细胞成像、癌细胞检测等。由于瑞利散射信号强, 即使只有单粒子也可以通过肉眼观察, 因此可利用单个纳米粒子的瑞利散射对纳米粒子与细胞的相互作用进行研究。若借助金属纳米粒子强瑞利散射首先对细胞进行成像, 快速发现兴趣点, 进一步进行细致的SERS研究^[51]将极大地提高检测的目的性及效率。对Ag/氧化铁复合物进行SERS标记, 然后包裹上SiO₂, 再通过硅烷化试剂在表面上接上荧光分子, 获得集磁性、SERS、瑞利散射、荧光性质于一体的纳米粒子, 可望用于生物成像和传感^[52]。此外近年来荧光-SERS(F-SERS)多模式纳米粒子在癌细胞诊断中的研究也受到人们越来越多的关注^[53-57]。通过合理地选择SERS分子和荧光分子可以获得既有SERS信号又有荧光信号的多模式观察体系, 为生物医学的多组分分析和诊断奠定基础。将SERS技术与瑞利散射、双光子发光成像、SEM等技术相结合, 可对细胞膜上受体的聚集度及其在细胞表面的分布进行多模式成像^[58]。

3.2 细胞内pH传感

对于细胞内微环境的pH传感仍然是细胞研究中极具挑战性的课题。通过合理的选择探针分子, 同样也可以利用SERS光谱对细胞进行pH传感, 仍属于需要探针分子的间接检测方法。这种传感器设计的主要原理是通过选择pH敏感分子对纳米粒子进行修饰, 在不同pH值下, 该分子某一官能团会发生质子化和去质子化的转变, 导致SERS光谱能灵敏反映分子结构的变化。通过质子化和去质子化官能团SERS光谱相对强度的变化可间接获取分子周围环境的pH信息。这种pH纳米传感器可通过细胞内吞作用进入细胞, 反映细胞内微环境pH的改变^[59-62]。

4 SERS技术在细胞研究中的难点和展望

SERS作为一种高灵敏、无损伤、具备指纹分析特征且可用于含水体系研究的光谱技术, 在细胞体系乃至生物医学研究中具有其它谱学技术如CT、磁共振成像、荧光等技术无法比拟的优势。同时SERS作为在

细胞研究中的新兴技术,不可避免地还存在一些亟待解决的问题。当 SERS 技术以直接检测方式应用于复杂的细胞体系研究时,主要存在选择性检测、定量检测及谱图分析等问题。(1) 选择性检测:细胞生物体远比一般纯样品体系复杂。体系中的任何分子都可能吸附在 SERS 基底表面,使谱图复杂化,这为 SERS 谱图的解析带来了巨大的困难。SERS 检测中,设计分子和 SERS 基底间选择性的相互作用,细胞体系中一些感兴趣的分子不可避免的由于电性或亲疏水基团的原因导致无法与 SERS 基底表面强烈作用,造成一些重要信息的丢失。而利用该特点,如果能对 SERS 基底表面进行特殊的改性,能够变劣势为优势,在 SERS 基底修饰对某一类分子或某一种分子具有特性吸附的基团,便能使 SERS 技术在复杂体系中得到应用。(2) 定量检测:与常规拉曼光谱相比,SERS 光谱的谱峰强度受电磁场增强分布、分子吸附取向、SERS 选律等影响,与分子浓度并不存在简单的线性关系。目前还没有一种可以兼具大面积均匀、增强因子高和表面洁净的 SERS 基底,这就使得 SERS 难以应用于定量分析。尽管已有一些工作尝试将 SERS 技术用于定量分析,但目前基本上还依赖于定点检测或多点平均这两个方法。然而定点检测操作较为困难,不可能得到实际应用。多点平均的方法会受超强增强位点的影响,难以获得很好的重现性。内标法可能是最可信也是最合适的方法,可以消除基底的差异性所带来的影响,但内标分子与待测物的竞争吸附,将对检测过程中内标的稳定性及可靠性提出挑战。(3) 谱图分析:在理想状态下,SERS 的指纹图谱特征可以使我们很好地鉴别不同种细胞、细胞膜内及膜外的不同成分、细胞的应激释放物、正常或癌变细胞的差异等等。但必须考虑到以下几个实际问题:细胞的差异以及细胞实时变化的释放物是否都可以与基底相互作用并被 SERS 检出;其次,如何对获得的复杂谱图进行解析;最后也是最关键的一点,如何将谱图中获得的信息与具有生命意义的过程对应。目前,借助大量的数据库及数据统计分析可以实现对细胞谱峰的初步解析,对于一些主要峰的指认亦能与从文献中找到相似的结果进行对照。然而由于细胞种类繁多,即使是同一类细胞当其来源不同,所获得的谱峰整体峰形、谱峰的位置及相对强度将可能不同。因此,很难获得很可信的数据使得不同组之间进行平行比较。另外,目前对于谱峰的解释还停留在对某个氨基酸或碱基的振动的简单归属,还很难进一步将其与生命过程联系。

当 SERS 技术应用于细胞生物体的间接检测时,将主要涉及到信号灵敏度、特异性、生物相容性等问题。(1) 信号灵敏度:当 SERS 应用于间接检测时,所

起的作用与荧光类似,只是一个标志物。与荧光相比具有稳定、可采用近红外光激发、以及不受水干扰等优势。最显著的优势是其半峰宽很窄,无需借助复杂的数学处理即可用于多组分分析。然而与荧光光谱相比,信号弱是 SERS 标记必须面对和解决的首要问题。目前荧光成像因荧光信号强可以达到录像的速度,而且荧光分子小不易受生物体免疫系统的排斥。然而 SERS 信号的强度和纳米粒子的稳定性是一对难以调和的矛盾体。尽管目前从一些聚集体上获得的 SERS 信号可达到单分子检测水平,在近红外区甚至优于荧光方法,但应用于生物体系研究时,却需要避免团聚体的形成。因为在进行活体研究时,团聚体通常会被免疫系统排除而不能到达目标。如果能发展体积小且增强较大的二聚体纳米粒子可以实现这一目标,目前已有一些相关的报道^[63],但制备方法的可操作性及产率还需进一步改善。若 SERS 技术要像 CT、MRI 等影像技术一样作为癌症诊断的手段,必须进一步提高其灵敏度。(2) 特异性:许多在均相反应具有较好特异性的生物标志物当吸附到纳米粒子表面时,如果没有进行合适的表面预修饰,很容易失活。生物标志物特异性结合率与蛋白的质量及来源密切相关,若缺乏合适的选择,将无法很好实现特异性检测。另外目前纳米粒子与细胞相互作用及进入细胞后的途径及机制仍然模糊不清,如何借助 SERS 技术对这一过程进行追踪表征,如何使纳米粒子突破溶酶体靶向到各个细胞器,真正将靶向治疗及诊断紧密结合等将是极具挑战性的课题。(3) 纳米粒子的生物相容性:纳米粒子毒理学现在已经是一个独立的学科,甚至专门设有机构对纳米粒子的毒性进行评估。合适的表面修饰是降低纳米粒子毒性的一大方法,基于 SERS 的纳米粒子靶向诊断也不可避免涉及到纳米粒子生物相容性这一问题。

正是由于 SERS 在细胞研究中具有的优势,以及 SERS 在细胞领域中的应用存在诸多问题,该学科的发展存在很多的机遇和挑战。这一学科继续发展,必然需要纳米材料、生物技术、信息处理等多学科的交叉和共同推动。

[参考文献]

- [1] BREHM-STECHER B F, JOHNSON E A. Single cell microbiology: Tools, technologies and applications[J]. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, 68(3): 538-559.
- [2] NE SM, EMERY S R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering[J]. *Science* 1997, 275(5303): 1102-1106.
- [3] KNEIPP K, WANG Y, KNEIPP H, et al. Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)

- [J]. *Phys Rev Lett* 1997, 78(9): 1667-1670
- [4] DIERNGER J A, LETTAN R B, SCHEIDT K A, et al. A frequency domain existence proof of single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *J Am Chem Soc* 2007, 129(51): 16249-16256
- [5] MICHAELS A M, NIRMAL M, BRUS L E. Surface enhanced Raman spectroscopy of individual rhodamine 6G molecules on large Ag nanocrystals[J]. *J Am Chem Soc* 1999, 121(43): 9932-9939
- [6] ZHANG X Y, YOUNG M A, LYANDRES O, et al. Rapid detection of an anthrax biomarker by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *J Am Chem Soc* 2005, 127(12): 4484-4489
- [7] STUART D A, BEGGS K B, van DUYN R P. Surface-enhanced Raman spectroscopy of half-mustard agent[J]. *Analyst* 2006, 131(4): 568-572
- [8] ALVAREZ-PUEBLA R A, DOS SANTOS D S, AROCA R F. SERS detection of environmental pollutants in humic acid-gold nanoparticle composite materials[J]. *Analyst* 2007, 132(12): 1210-1214
- [9] MULVHILL M, TAO A, BENJATHRIF K, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for trace arsenic detection in contaminated water[J]. *Angew Chem Int Edit* 2008, 47(34): 6456-6460
- [10] BROSSEAU C L, GAMBARDILLA A, CASADIO F, et al. Ad-hoc surface-enhanced Raman spectroscopy methodologies for the detection of artist dyestuffs: Thin-layer chromatography-surface enhanced Raman spectroscopy and *in situ* on the fiber analysis[J]. *Anal Chem* 2009, 81(8): 3056-3062
- [11] KNEIPP K, KNEIPP H, ITZKAN I, et al. Surface-enhanced Raman scattering and biophysics[J]. *J Phys Condens Mat* 2002, 14(18): R597-R624
- [12] GOLIGHTLY R S, DOERING W E, NATAN M J. Surface-enhanced Raman spectroscopy and homeland security: A perfect match? [J]. *ACS Nano* 2009, 3(10): 2859-2869
- [13] SCHLUCKER S. SERS microscopy: Nanoparticle probes and biomedical applications[J]. *Chem Phys Chem* 2009, 10(9-10): 1344-1354
- [14] HUDSON S D, CHUMANOV G. Bi analytical applications of SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy) [J]. *Anal Bioanal Chem* 2009, 394(3): 679-686
- [15] WILLETS K A. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) for probing internal cellular structure and dynamics[J]. *Anal Bioanal Chem* 2009, 394(1): 85-94
- [16] HAN X X, ZHAO B, OZAKI Y. Surface-enhanced Raman scattering for protein detection[J]. *Anal Bioanal Chem* 2009, 394(7): 1719-1727
- [17] WACHSMANN-HOGL U S, WEEKS T, HUSER T. Chemical analysis *in vivo* and *in vitro* by Raman spectroscopy: From single cells to humans[J]. *Curr Opin Biotechnol* 2009, 20(1): 63-73
- [18] HARZ A, ROSCH P, POPP J. Vibrational spectroscopy-A powerful tool for the rapid identification of microbial cells at the single-cell level[J]. *Cytometry Part A* 2009, 75A(2): 104-113
- [19] DOERING W E, POTTIM E, NATAN M J, et al. SERS as a foundation for nanoscale, optically detected biological labels[J]. *Adv Mater* 2007, 19(20): 3100-3108
- [20] PORTER M D, LIPERT R J, SIPERKO L M, et al. SERS as a bioassay platform: Fundamentals, design and applications[J]. *Chem Soc Rev* 2008, 37(5): 1001-1011
- [21] CHOURPA I, LEIFH, DUBOIS P, et al. Intracellular applications of analytical SERS spectroscopy and multispectral imaging[J]. *Chem Soc Rev* 2008, 37(5): 993-1000
- [22] KNEIPP K, KNEIPP H, KNEIPP J. Surface-enhanced Raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates: From single-molecule Raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells[J]. *Acc Chem Res* 2006, 39(7): 443-450
- [23] YONZON C R, STUART D A, ZHANG X Y, et al. Towards advanced chemical and biological nanosensors: An overview[J]. *Talanta* 2005, 67(3): 438-448
- [24] VIKESLAND P J, WEGGINTON K R. Nanomaterial enabled biosensors for pathogen monitoring: A review[J]. *Environ Sci Technol* 2010, 44(10): 3656-3669
- [25] EFRIMA S, ZEIRIL. Understanding SERS of bacteria[J]. *J Raman Spectrosc* 2009, 40(3): 277-288
- [26] RYDER A G. Surface enhanced Raman scattering for narcotic detection and applications to chemical biology[J]. *Curr Opin Chem Biol* 2005, 9(5): 489-493
- [27] HUH Y S, CHUNG A J, ERICKSON D. Surface enhanced Raman spectroscopy and its application to molecular and cellular analysis[J]. *Microfluid Nanofluid* 2009, 6(3): 285-297
- [28] KNEIPP J, WITTIG B, BOHR H, et al. Surface-enhanced Raman scattering: A new optical probe in molecular biophysics and biomedicine[J]. *Theor Chem Acc* 2010, 125(3-6): 319-327
- [29] VO-DINH T, WANG H N, SCAFFIDI J. Plasmonic nanoprobe for SERS biosensing and bioimaging[J]. *J Biophotonics* 2010, 3(1-2): 89-102
- [30] GODDARD G, BROWN L O, HABBERSETT R, et al. High-resolution spectral analysis of individual SERS-active nanoparticles in flow[J]. *J Am Chem Soc* 2010, 132(17): 6081-6090
- [31] KNEIPP J, KNEIPP H, MCLAUGHLIN M, et al. *In vivo* molecular probing of cellular compartments with gold nanoparticles and nanoaggregates[J]. *Nano Lett* 2006, 6(10): 2225-2231

- [32] TANG H W, YANG X B B, KRKHAM J, et al. Chemical probing of single cancer cells with gold nanoaggregates by surface enhanced Raman scattering [J]. *Appl Spectrosc*, 2008, 62(10): 1060-1069.
- [33] NABIEV I R, MORJANI H, MANFATI M. Selective analysis of antitumor drug interaction with living cancer cells as probed by surface enhanced Raman spectroscopy [J]. *Eur Biophys J* 1991, 19(6): 311-316.
- [34] BRAZHEN A, ABDALIS, BRAZHEN A R, et al. New insight into erythrocyte through *in vivo* surface enhanced Raman spectroscopy [J]. *Biophys J* 2009, 97(12): 3206-3214.
- [35] TANG H W, SMITH D A. Glyoxal induced apoptosis studied by near infrared surface enhanced Raman scattering [J]. *Chem J Chin Univ Chin* 2008, 29(2): 254-257.
- [36] ZHANG X L, YIN H B, COOPER J M, et al. Characterization of cellular chemical dynamics using combined microfluidic and Raman techniques [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 390(3): 833-840.
- [37] DIJKSTRA R J, SCHEENEN W, DAM N, et al. Monitoring neurotransmitter release using surface enhanced Raman spectroscopy [J]. *J Neurosci Methods*, 2007, 159(1): 43-50.
- [38] TOOMRE D, MANSTEN D J. Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy [J]. *Trends Cell Biol* 2001, 11(7): 298-303.
- [39] OYELERE A K, CHEN P C, HUANG X H, et al. Peptide conjugated gold nanorods for nuclear targeting [J]. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18(5): 1490-1497.
- [40] XIE W, WANG L, ZHANG Y Y, et al. Nuclear targeted nanoprobe for single living cell detection by surface enhanced Raman scattering [J]. *Bioconjugate Chem*, 2009, 20(4): 768-773.
- [41] SHAMSAIE A, JONCZYK M, STURGIS J, et al. Intracellularly grown gold nanoparticles as potential surface enhanced Raman scattering probes [J]. *J Biomed Opt* 2007, 12(2): 3.
- [42] VIOL E A, ORYNBAYEVA Z, BOUCHARDM J et al. *In situ* intracellular spectroscopy with surface enhanced Raman spectroscopy (SERS)-enabled nanopipettes [J]. *ACS Nano* 2009, 3(11): 3529-3536.
- [43] LIM D, CUI Y, GAO M X, et al. Clean substrates prepared by chemical adsorption of thiol followed by electrochemical oxidation for surface enhanced Raman spectroscopic study of cell membrane [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(13): 5118-5125.
- [44] LEE S, KM S, CHOO J, et al. Biological imaging of HEK293 cells expressing PLC gamma 1 using surface enhanced Raman microscopy [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(3): 916-922.
- [45] KM J H, KM J S, CHOI H, et al. Nanoparticle probes with surface enhanced Raman spectroscopic tags for cellular cancer targeting [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(19): 6967-6973.
- [46] XIE J P, ZHANG Q B, LEE J Y, et al. The synthesis of SERS-active gold nanoflower tags for *in vivo* applications [J]. *ACS Nano* 2008, 2(12): 2473-2480.
- [47] KOH A L, SHACHAF C M, ELCHURIS, et al. Electron microscopy localization and characterization of functionalized composite organic-inorganic SERS nanoparticles on leukemia cells [J]. *Ultramicroscopy* 2008, 109(1): 111-121.
- [48] SHAM Y, XU H X, NATAN M J, et al. Surface enhanced Raman scattering tags for rapid and homogeneous detection of circulating tumor cells in the presence of human whole blood [J]. *J Am Chem Soc* 2008, 130(51): 17214-17215.
- [49] NOH M S, JUN B H, KM S, et al. Magnetic surface enhanced Raman spectroscopic (M-SERS) dots for the identification of bronchioalveolar stem cells in normal and lung cancer mice [J]. *Biomaterials* 2009, 30(23-24): 3915-3925.
- [50] JUN B H, NOH M S, KM J, et al. Multifunctional silver embedded magnetic nanoparticles as SERS nanoprobe and their applications [J]. *Small* 2010, 6(1): 119-125.
- [51] HUANG X H, EL-SAYED I H, QIAN W, et al. Cancer cells assemble and align gold nanorods conjugated to antibodies to produce highly enhanced sharp and polarized surface Raman spectra: A potential cancer diagnostic marker [J]. *Nano Lett* 2007, 7(6): 1591-1597.
- [52] GOLE A, AGARWAL N, NAGAR I P, et al. One-pot synthesis of silica-coated magnetic plasmonic tracer nanoparticles [J]. *Chem Commun*, 2008, 46: 6140-6142.
- [53] JUN B H, KM J H, PARK H, et al. Surface enhanced Raman spectroscopic encoded beads for multiplex immunoassay [J]. *J Comb Chem*, 2007, 9(2): 237-244.
- [54] KM K, LEE H B, LEE Y M, et al. Rhodamine B isothiocyanate modified Ag nanoaggregates on dielectric beads: A novel surface enhanced Raman scattering and fluorescent imaging material [J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(7): 1864-1869.
- [55] WOO M A, LEE S M, KM G, et al. Multiplex immunoassay using fluorescent surface enhanced Raman spectroscopic dots for the detection of bronchioalveolar stem cells in murine lung [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(3): 1008-1015.
- [56] YU K N, LEE S M, HAN J Y, et al. Multiplex targeting tracking and imaging of apoptosis by fluorescent surface enhanced Raman spectroscopic dots [J]. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18(4): 1155-1162.
- [57] KM K, LEE Y M, LEE H B, et al. Silver-coated silica beads applicable as core materials of dual-tagging sensors operating via SERS and MEF [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2009, 1(10): 2174-2180.
- [58] KENNEDY D C, TAYLOR L, LYN R K, et al. Nanoscale aggregation of cellular beta(2)-adrenergic receptors measured by plasmonic interactions of functionalized nanoparticles [J].

- ACS Nano 2009 3(8): 2329-2339.
- [59] TALLEY C E, JUSINSKI L, HOLLARS C W, et al Intracellular pH sensors based on surface enhanced Raman scattering [J]. Anal Chem, 2004, 76(23): 7064-7068.
- [60] WANG Z Y, BONO U A, SAMOC M, et al Biological pH sensing based on surface enhanced Raman scattering through a 2-aminothiophenol silver probe [J]. Biosens Bioelectron, 2008, 23(6): 886-891.
- [61] KNEIPP J, KNEIPP H, WITIG B, et al One and two photon excited optical pH probing for cells using surface enhanced Raman and hyperRaman nanosensors [J]. Nano Lett 2007, 7(9): 2819-2823.
- [62] PALLAORO A, BRAUN G B, REICH N O, et al Mapping local pH in live cells using encapsulated fluorescent SERS nanotags [J]. Small 2010, 6(5): 618-622.
- [63] LI W Y, CAMARGO P H C, LU X M, et al Dimers of silver nanospheres: Facile synthesis and their use as hot spots for surface enhanced Raman scattering [J]. Nano Lett 2009, 9(1): 485-490.

(本文编辑: 何彦梅)

• 综 述 •

聚磷酸酯纳米凝胶载药系统的研究进展

熊梦华, 杜金志, 王均

(中国科学技术大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230027)

[摘要] 纳米载药系统是纳米药物实现产业化的重要基础之一。作为纳米载药系统的一种, 纳米凝胶在药物载体领域的研究倍受关注。纳米凝胶是一种能够在水溶液中分散并具有纳米尺寸的水凝胶颗粒, 通常由物理或化学交联的聚合物网络结构所组成。纳米凝胶具有特定的优势, 例如优异的药物负载能力、较高的化学结构稳定性以及对外界环境的刺激作出灵敏的响应性等。与此同时, 作为一种具有良好生物相容性和生物降解性的高分子材料, 聚磷酸酯在化疗药物和基因药物的运输以及组织工程领域都表现出很好的潜力。本文综述本课题组最近几年在聚磷酸酯纳米凝胶药物载体系统的研究工作。

[关键词] 纳米药物载体; 纳米凝胶; 聚磷酸酯; 文献综述

[中图分类号] O633.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-6264(2011)01-0262-07

doi 10.3969/j.issn.1671-6264.2011.01.041

纳米药物的研究是纳米医学研究领域的重要组成部分。纳米药物可使药物具有更高的生物利用度, 而纳米药物载体能增强难溶性药物的溶解性, 增强药物输送的靶向性, 并控制药物的释放, 因而有效提高药效, 并降低药物的毒副作用。纳米药物和纳米药物载体系统的研究也因此成为当前国际医药学界的前沿和热点^[1-2]。纳米药物应用的关键之一是纳米载药系统的设计与研发。目前广泛研究的纳米载药系统包括聚合物纳米载药系统(包括纳米凝胶)、基于脂质材料的纳米载药系统, 以及基于无机材料的纳米载药系统等。纳米凝胶是一种能够在水溶液中分散并具有纳米尺度

的水凝胶颗粒, 通常由物理或化学交联的聚合物网络结构所组成^[3-6]。与其它载药系统相比, 纳米凝胶载药系统除了具有极高的药物携载能力外, 还具有很好的化学稳定性, 同时也具有易修饰的特点。因此, 纳米凝胶载药系统正引起越来越多的研究者的关注。

考虑到医学应用的特殊要求, 纳米载药系统在材料的选择上有着严格的标准, 材料本身应具有良好的生物相容性及生物降解性。以磷酸酯键为主链链接的聚磷酸酯可被水解, 在一些体内存在的酶的催化下聚磷酸酯水解加速, 而且, 通过合理设计的聚磷酸酯大都显示良好的生物相容性。聚磷酸酯在传统药物和核酸

[收稿日期] 2010-10-23 [修回日期] 2010-11-05

[作者简介] 熊梦华(1985-), 男, 浙江义乌人, 在读硕士研究生。E-mail huabea@mail.ustc.edu.cn

[通信作者] 王均 E-mail jwang699@ustc.edu.cn