维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)12-1237-05

半导体量子点对原代培养大鼠牙乳头细胞生物相容性的研究

孙德平,杨 凯,陈 睿

(重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究半导体量子点(QDs)对原代培养的大鼠牙乳头细胞(Rat dental papillae cells,RDPCs)的生物相容性。方法:①选择刚出生3天的新生SD大鼠,取出磨牙牙胚,分离牙乳头,用酶消化法培养SD大鼠牙乳头细胞,用波形丝蛋白和细胞角蛋白免疫化学染色鉴定细胞来源,观察细胞的生长规律;②把605QDs、525QDs及两种量子点等浓度的混合物按3种不同浓度与RDPCs共同培养,观察QDs对RDPCs生长和形态的影响;③用MTT法检测不同浓度的605QDs、525QDs及两种量子点等浓度的混合物对RDPCs的毒性作用。结果:①:体外培养的RDPCs生长良好,波形丝蛋白染色阳性而细胞角蛋白染色阴性。②不同浓度的605QDs、525QDs及两种量子点的等浓度混合物对体外培养的RDPCs没有毒性作用,对其生长和形态也没有影响。结论:605QDs、525QDs及两种量子点等浓度的混合物在一定的浓度范围内对RPDCs具有良好的生物相容性,为605QDs、525QDs在活体生理条件下用于活细胞内的多通道信号研究提供了科学依据。

【关键词】半导体量子点(半导体纳米微晶体);大鼠牙乳头细胞;生物相容性;口腔;活细胞

【中国图书分类法分类号】R349.54 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-08

Study on the biocompatibility of semiconductor quantum dots to the rat dental papillae cells (RDPC) cultured in vitro

SUN Deping,et al

(*Department of Oral and Maxillofacial Surgery,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To study the biocompatibility of semiconductor quantum dots to the rat dental papillae cells (RDPCs) cultured in vitro. *Methods*:①RDPCs isolated and cultured with enzyme digestion. Wave form fibroin and cytokeratin were used to identify the cells resource and the growth rules of cells was observed. ②To study the effect of QDs to the RDPCs,The RDPCs were cultured with the 605QDs,525QDs and those mixture in different density.③With the MTT,to study the cytotoxicity of QDs to the RDPCs,The RDPCs were cultured with the 605QDs,525QDs and those mixture in different density. *Results*:① RDPCs cultured in vitro were well growing. Wave form fibroin staining was positive and cytokeratin staining was negative in RDPCs. ②The 605QDs,525QDs and those mixture in different density show no negative effect and cytotoxicity on the growth of the RDPCs. *Conclusion*:The 605QDs、525QDs in a range of density have well biocompatibility to the live cells,which supplied scientific evidence for the research of multichannel signal in living cells in vivo physiological condition

【Key words】Semiconductor quantum dots (semiconductor nanocrystals);Rat dental papillae cells(RDPCs);Biocompatibility;Oral cavity;Live cells

半导体量子点(Semiconductor quantum dots,QDs)又称半导体纳米微晶体,与传统的荧光探针相比,QDs发光度强,光化学稳定性好,不易被光解或漂白,能承受反复多次长时间激发光的激发而荧光强度不发生明显降低,QDs以上的光学特征十分适合于用QDs对活体细胞内的分子标记成像后进行长期的示踪观察[1-5],它将为我们揭示生命现象的分子本质提供直接的证据。

但QDs要用于医学的"实战"可视化研究的首要条件就是要求QDs对活细胞没有毒性,对细胞的生长等生理功能没有影响。鉴于以上,本研究首次将发红光的605QDs半导体量子点和发绿光的525QDs半导体量子点与大鼠活牙乳头细胞(Rat

作者介绍:孙德平(1980-),男,硕士生,
主要研究方向:口腔颌面-头颈肿瘤临床及相关基础研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470893)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

dental papillae cells,RDPCs) 共同培养，观察两种 QDs 对 RDPCs 细胞的毒性作用和生长的影响情况，为在活细胞条件下将 QDs 用于细胞内蛋白质等生物分子的活动和多通道信号的实时可视化研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

刚出生 3 天的 SD 大鼠（重庆医科大学动物实验中心），最大发射波长为 605nm 和 525nm 两种半导体量子点 [CdSe/ZnS](美国 Quantum dot 公司)，倒置相差荧光显微镜（日本 NIKON 公司,TE2004-U)，激光共聚焦显微镜（日本 OLYMPUS 公司,IX 系列),DMEM/F12 培养液(Sigma,美国)，胎牛血清(中国,杭州四季青),广谱兔抗鼠细胞角蛋白(pan cytokemtin,PCK)多克隆抗体、兔抗鼠波形丝蛋白(vimentin)单克抗体、SP 免疫试剂盒、ABC 显色液（均购于北京中杉公司),体式解剖显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 半导体量子点光学性质的检测 用不含牛血清的 DMEM/F12 培养液稀释 605QDs 和 525QDs 两种量子点，将两种量子点和等浓度的两种量子点混合液分别涂于洁净的载玻片上，均用波长为 488nm 的同一光源激发，在激光共聚焦显微镜下观察量子点的发光颜色、发光强度及形态，并用波长为 200～275nm 的紫外线持续照射两种量子点 12h 后观察量子点的荧光颜色和强度变化。

1.2.2 RDPCs 的原代培养 5 只新生 SD 系大鼠断颈处死，置 75%酒精浸泡消毒 5min 后解剖下颌骨，挑取下颌磨牙牙胚，PBS 液冲洗 3 次后于体式显微镜下将牙乳头、成釉器和牙囊分离。然后将牙乳头剪成 $1mm^3$ 组织块，放入等体积的胰酶（0.25%）和胶原酶（4mg/ml）混合液内，于 37℃摇床内 80r/min 条件下消化 1h，加入含 10%胎牛血清的培养基终止消化，吹打均匀后用 70μm 的不锈钢筛网过滤得细胞悬液，于 1000r/min 条件下离心 10min，去上清，加入含 10%胎牛血清的培养基，制成单细胞悬液，接种于一次性培养瓶内，于细胞培养箱内培养。

1.2.3 细胞的传代及免疫细胞化学鉴定 相差倒置显微镜下观察，待细胞长满培养瓶 80%时用消化贴壁法传代，去除残留的上皮细胞。取纯化的第 4 代成纤维样细胞行常规爬片，4%多聚甲醛固定 30min,0.25%Triton X-100 处理 15min，按照 SP 免疫试剂盒说明书进行细胞角蛋白和波形丝蛋白免疫细胞化学染色，最后光镜控制下进行 ABC 显色，细胞内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。

1.2.4 量子点对 RDPCs 生长的影响 取第 4 代对数生长期的细胞，用 0.25%胰酶消化后用培养基配成细胞悬液，以 4×10^4 的密度接种于 24 孔板内，每孔 100μl，共接种 10 板。设置空白对照组(即 RDPCs 中不加入量子点)和试验组，试验组分为 3 组，即 A 组、B 组、C 组。A 组中加入 605QDs，B 组中加入 525QDs，C 组中加入以上两种量子点等浓度的混合物；A 再分为 A_1、A_2、A_3，B 再分为 B_1、B_2、B_3，C 再分为 C_1、C_2、C_3，脚标 1、2、3 代表加入量子点后不同的终浓度（分别为 0.1μmol/L、1μmol/L、2μmol/L)。每组设 24 个平行孔，每天各组取 3 孔细胞，血球计数板计数，每次重复计数 1 次，连续 8d，取平均值，绘制生长曲线。取对数生长期细胞计算倍增时间(double Time DT)，其计算公式：$DT=[Ig2/(IgNt-IgN0)]\times t$，其中 N0 和 Nt 分别表示接种时和培养 t 小时后的细胞数。

1.2.5 量子点对 RDPCs 的毒性作用检测 用 MTT 法检测。以 4×10^4 的密度把单细胞悬液接种于 96 孔板内，每孔 50μl。按照 1.2.4 实验中分组方法设置空白对照组和试验组，每组设 6 个平行孔。然后置于 37℃ 5%CO_2 培养箱中培育，在 48h 加入 MTT 溶液(终浓度 5mg/mL)，继续培养 4h，弃上清，加入 150μL DMSO，在酶标仪 570nm 波长处测定各孔 OD 值。

1.2.6 量子点对活体 RDPCs 形态的影响 605QDs,525QDs 及两种量子点等浓度的混合物与细胞共培养 8d 的过程中，在相差荧光倒置显微镜下，每隔 12h 观察细胞的形态；同时用紫外光激发，观察各试验组 605QDs,525QDs 及两种量子点混合物的发光颜色。

1.2.7 统计方法 数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，使用 SPSS10.0 统计软件，行方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

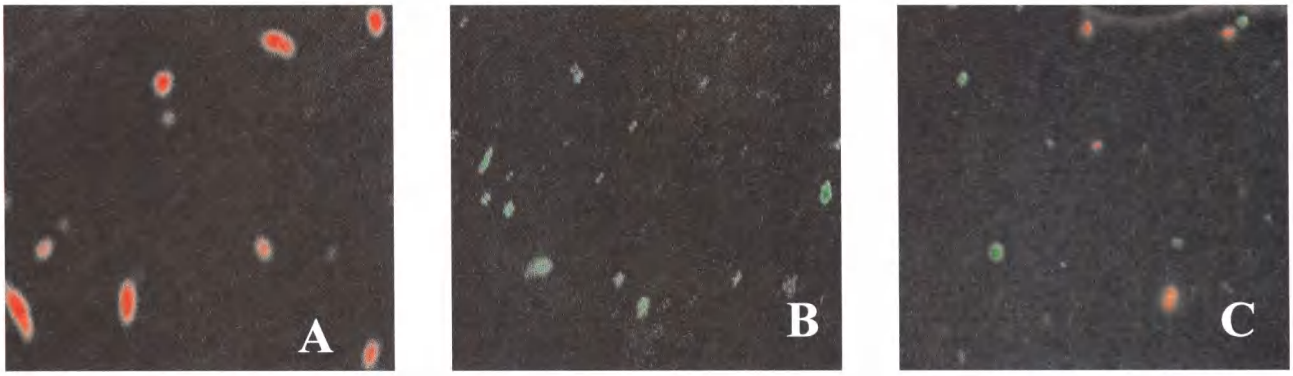
2.1 两种量子点的形态和荧光特征

在 488nm 波长光激发下，605QDs 成红色、525QDs 成绿色，相对荧光比值分别为 250 和 245，他们的形态为圆形或椭圆形，605QDs 和 525QDs 的混合液涂片在同一 488nm 波长光激发下分别发出的红色和绿色光极易区别(图 1)。在波长为 200～275nm 紫外线持续照射 12h 后，605QDs、525QDs 发光颜色无明显减退，相对荧光比值分别为 249 和 240。

2.2 RDPCs 的原代培养及免疫细胞化学鉴定结果

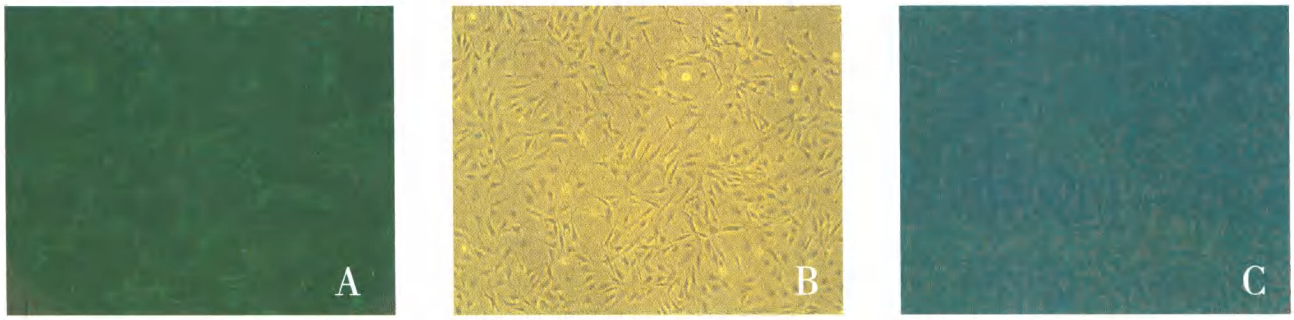
酶消化法培养的细胞能够贴壁生长，在最初的接种 6h 后有上皮细胞和成纤维样细胞贴壁。通过 2-3 代消化贴壁法能去除上皮样细胞得到纯化的成纤维样细胞。倒置相差显微镜下最初的成纤维样细胞成多角形、梭形、星形，细胞有多个突起，细胞浆丰富，细胞核居中，核仁明显；随着细胞的对数生长，细胞形态呈梭形，细胞相互有突起连接，呈栅栏排列。传代后的细胞生长比较快，可以 4-5 天传代。

维普资讯 http://www.cqvip.com



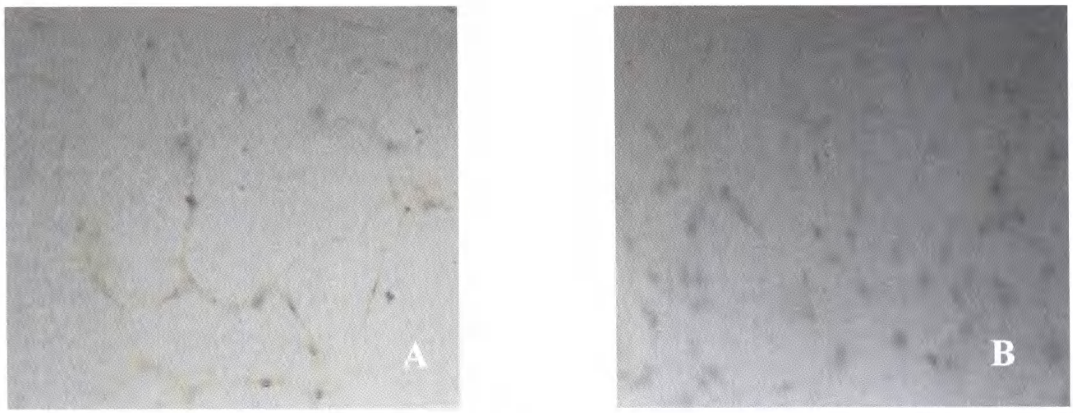
（A：605QDs 成红色. B:525QDs 成绿色. C：605QDs+525QDs 在波长 488nm 激发下同时发不同颜色的光，×8000）

图 1　激光共聚焦下波长 488nm 激发下 605Qds.525Qds 的形态大小和发光颜色



（A:刚贴壁的细胞成多角形状，梭形，有细胞突起，胞浆丰富　B:纯化的第 4 代 RDPCs 成对数生长　C:第 4 代第 8 天的 RDPCs 栅栏状排列，出现复层生生长。均于相差倒置显微下×100）

图 2　原代培养的 RDPCs 的显微结构



A　波形丝蛋白阳性 RDPCs（光镜×100）　B　角蛋白阴性 RDPCs（光镜×100）

图 3

传到第 8 代，生长速度比较慢。细胞在培养 7-8 天出现复层生长，形成结节（图 2）。免疫细胞化学染色显示，细胞波形丝蛋白表达阳性，细胞角蛋白表达阴性（图 3）。提示细胞来源于外胚间叶组织。

2.3　量子点对 RDPCs 生长的影响

对照组和各试验组在接种 2d 后细胞数量均开始增加，3d 后细胞均快速增殖进入对数生长期，第 7d 达到高峰，以后增殖速度减慢进入平台期，各组细胞生长曲线见图 4，均成“S”形，各组细胞的生长未见显著差异（$P>0.05$）。对照组和各试验组细胞的倍增时间见表 1，各组细胞的倍增时间无显著差异（$P>0.05$）。结果表明 605QDs、525QDs 及两种量子

维普资讯 http://www.cqvip.com

点等浓度的混合物的不同浓度未影响 RDPCs 的生长。

表 1 QDs 在不同浓度时对 RDPCs 生长的影响（$\bar{x} \pm s$）

分组			细胞倍增时间
对照组			53 ± 4.4
试验组	A 组	A1 组	53 ± 5.3
		A2 组	53 ± 4.8
		A3 组	52 ± 6.8
	B 组	B1 组	53 ± 2.6
		B2 组	54 ± 4.6
		B3 组	53 ± 6.3
	C 组	C1 组	53 ± 1.3
		C2 组	53 ± 2.7
		C3 组	54 ± 3.9

注：细胞倍增时间，各实验组与空白组比较 $P>0.05$

2.4 量子点对 RDPCs 的毒性作用

对照组和各试验组的 OD 均值见表 2，各组 OD 均值无显著差异（P>0.05）。表明 605QDs、525QDs 及两种量子点等浓度的混合物的不同浓度对 RDPCs 的生长没有影响

2.5 量子点对活体 RDPCs 形态的影响

在倒置相差荧光显微镜下观察：605QDs 发红色荧光、525QDs 发绿色荧光、两种量子点混合物同时发以上两种不同颜色且及易区别的荧光（图 5）。RDPCs 和 605QDs 、525QDs 及两种量子点混合物共同培养 8 天的过程中细胞形态均为成纤维样细胞、胞膜完整、胞浆丰富、细胞核明显，与空白组细胞比较形态没有改变。结果表明 605QDs 、525QDs 及两种量子点混合物不影响 RDPCs 的显微镜下形态。同一光激发下 605QDs 、525QDs 能同时发不同颜色且及易区别的荧光。

表 2 QDs 在不同浓度时对 RDPCs 毒性作用（$\bar{x} \pm s$）

分组			OD 均值
空白组			0.13 ± 0.2
试验组	A 组	A1 组	0.12 ± 0.02
		A2 组	0.12 ± 0.01
		A3 组	0.12 ± 0.02
	B 组	B1 组	0.12 ± 0.01
		B2 组	0.13 ± 0.02
		B3 组	0.12 ± 0.01
	C 组	C1 组	0.12 ± 0.01
		C2 组	0. 12 ± 0.02
		C3 组	0.12 ± 0.02

注：MTT 得到的 OD 值，各实验组与空白组比较 $P>0.05$

3 讨 论

在牙齿发育的帽状期，外胚层间叶细胞聚集形成了牙乳头，牙乳头细胞是牙髓细胞和成牙本质细胞共同的前体细胞。本课题选用刚出生 3 天的 SD 大鼠磨牙牙胚，通过酶消化法能较快地培养出数量多的细胞；用贴壁消化法得到了纯化的成纤维样细胞；细胞角蛋白和波形丝蛋白免疫细胞化学染色证实培养出的细胞是牙乳头间充质细胞[6]。本试验培养的牙乳头细胞在体外传 8 代以内，其对数样生长，显微结构，以及其复层生长的特性都没有明显的变化，8 代内体外培养的牙乳头细胞可以满足研究牙乳头细胞转化的分子机制的细胞模型。虽然有学者对牙乳头细胞分化的信号通道有很多研究[7]，但是在活体条件下研究牙乳头细胞分化的分子机制目前还没有报道。本试验研究的目的就是为半导体量子点作为荧光标记物为研究活体 RDPCs 分化的分子机制提供试验证明。

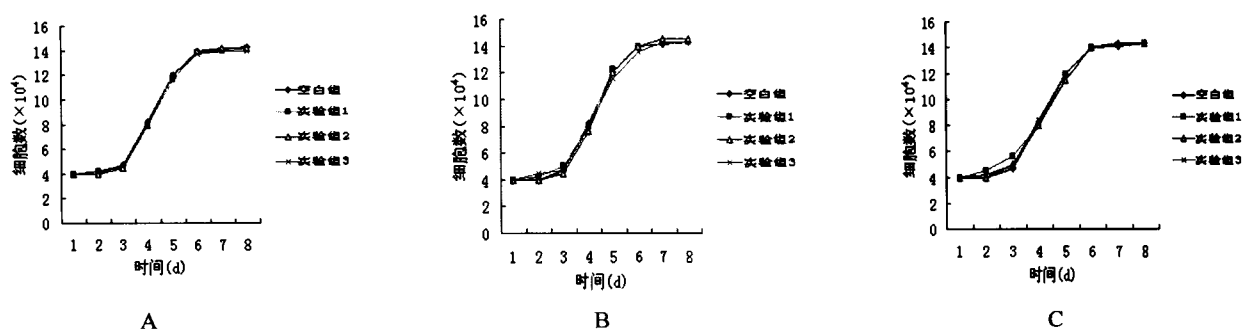
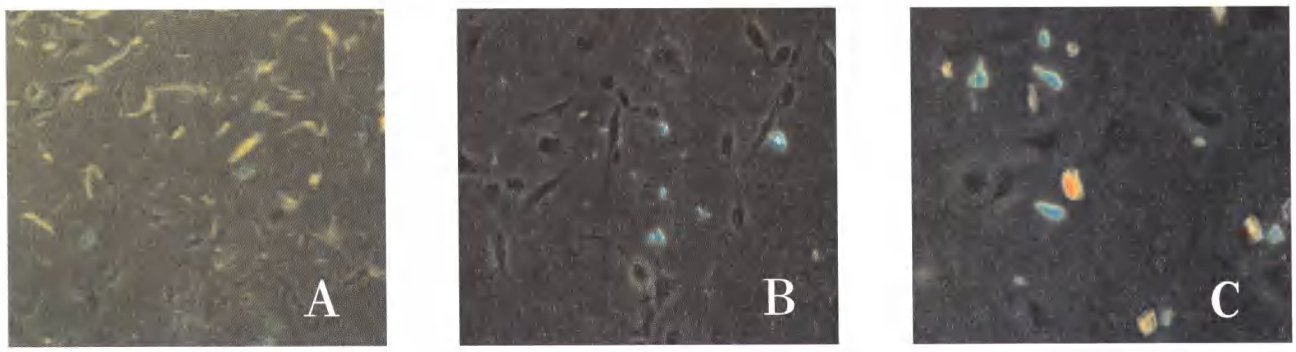


图 4 A：605QDs 各个浓度组和 RDPCs 共同培养的生长曲线 B：525QDs 各浓度组和 RDPCs 共同培养的生长曲线 C：605QDs+525QDs 各浓度组和 RDPCs 共同培养的生长曲线

维普资讯 http://www.cqvip.com



(A:605QDs 和细胞共同培养,B:525QDs 和细胞共同培养,C:605QDs+525QDs 和细胞共同培养)(×100)

图 5 A,B,C 为 605QDs 、525QDs 及两种量子点混合物与细胞共同培养 24h 时,在倒置荧光显微镜下用紫外线激发 QDs 发出的荧光。

半导体量子点做为一种新型的纳米荧光材料,是由半导体材料制成的直径在 2-10nm 的纳米微晶体,通常由ⅡB~ⅥB 或ⅢB~ⅤB 族元素组成。由于受到量子尺寸效应和介电限域效应的影响,从而表现出独特的的光学特性,和传统的荧光标记物(异硫氰酸荧光素,罗丹明等)比较,半导体量子点具有以下优点:①半导体量子点荧光产率高,发光强度大,光稳定性好不易光漂白,这有利于长时间对标记的对象进行持续的动态观测[8,9]。②通过改变量子点的粒径大小可以在同一波长激发下获得从紫外到近红外(或从蓝色到红色)波长范围内任意点的发射光谱,这一独特的光学性质为医学研究中需要同时进行多通道的实时示踪观察提供了良好的基础[5,10]。本课题所用 605QDs、525QDs 为美国量子点公司提供的核 - 壳纳米颗粒, 同样具有以上的优点,同时表面被生物修饰能直接连接单克隆抗体作为特异的分子探针。由于量子点作为一种特殊的纳米材料, 其生物相容性对不同的活细胞可能有变化,混合的量子点可能有细胞毒性,量子点用于活细胞的研究, 需要进一步探讨量子点的生物相容性。因此本课题用不同浓度的 605QDs、525QDs 及两种量子点等浓度的混合物和原代培养的 RDPCs 共同培养 8d, 观察 605QDs、525QDs 及两种量子点混合物对 RDPCs 的生长和生物特性是否有影响。结果表明:不同浓度 605QDs、525QDs 及两种量子点等浓度的混合物和体外培养的 RDPCs 共同培养,不影响细胞的生长和形态结构, 同时 MTT 试验证明 605QDs、525QDs 及两种量子点混合物对 RDPCs 不具有细胞毒性;在激光共聚焦和荧光显微镜下用同一激发光能使 605QDs 和 525QDs 同时发出极易区别的荧光, 且荧光强度强,不易光漂白。本试验证明:量子点具有独特的光学性质和良好的生物相容性,粒径大小不同的 QDs 能同时用于活细胞的多通道的实时动态检测研究。(本课题组感谢重庆医科大学基础医学研究所提供良好的试验条件)

(通讯作者: 杨 凯,13648304197,E-mail:cqfyyk@yahoo.com.cn)

参 考 文 献

[1] Alivisatos AP,Gu W,Larabell C. Quantum dots as cellular probes[J]. Annu Rev Biomed Eng,2005;7:55-76.

[2] Paul Alivisatos. The use of nanocrystals in biological detection [J]. Nat.Biotechnol,2004;22(1):47-52.

[3] 杨 凯. 半导体量子点荧光探针在恶性肿瘤中的应用[J]. 国外医学肿瘤学分册,2005;32(11):836-838.

[4] 杨 凯,陈 睿,孙德平.半导体量子点对口腔鳞癌 BcaCD885 细胞生长、侵袭和转移能力影响的体外研究[J]. 重庆医科大学学报,2007;32(4):337-339.

[5] Chan WCW,Maxwell DJ,Gao XH,et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging[J]. Curr Opin Biotechnol,2003;13(1):40-46.

[6] Nakashima M. Establishment of primary cultures of pulp cells from bovine permanent incisors[J]. Archs Oral Biol,1991;36(9): 655-663.

[7] 何文喜,牛忠英,陈健,等. Smad2 蛋白在人牙乳头细胞内的表达及信号转位过程[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志,2000;10(2):81-83.

[8] 杨 凯. 生物功能化半导体量子点对活细胞内蛋白质分子可视化的研究进展[J]. 国际生物医学工程杂志,2006;29(3):142-144.

[9] Michalet X,Pinaud FF,Bentolila LA,et al. Quantum dots for live cells,in vivo imaging,and diagnostics[J]. Science,2005;307(5709):538-544.

[10] Jaiswal JK,Mattoussi H,Mauro JM, et al. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates[J]. Nat Biotechnol,2003,21(1):47-51.