

小鼠对量子点的透皮吸收和代谢*

唐 蕾¹⁾ 张春玲^{2)**} 宋光明¹⁾ 徐忠伟¹⁾ 金 迅¹⁾

(¹⁾中国人民武装警察部队医学院, 天津 300162; ²⁾南开大学物理科学学院, 天津 300071)

摘要 皮肤是身体的最大器官, 能够直接与含纳米材料的防晒霜、化妆品等接触, 但是人们对纳米材料的皮肤渗透性却了解不多. 本文研究了水溶性硫硒化镉(CdSeS)量子点纳米颗粒的皮肤渗透性和在体内的代谢情况. 将雄性 ICR 鼠背部脱毛, 在脱毛部位涂抹直径约为 5 nm、发光波长为 620 nm 的量子点 0.32 nmol, 然后检测皮肤和心、肝、脾、肺、肾中量子点沉积量随时间的变化情况. 荧光显微像显示, 量子点能够堆积在皮肤的表皮层中和真皮层的毛囊和腺体中, 电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)结果表明, 透皮吸收的量子点能够沉积在器官中, 并且肝和肾中沉积的量子点代谢缓慢, 涂抹量子点 5 天之后, 肾脏中残存的镉离子浓度仍超过 14 ng/g. 这些结果表明, 量子点能够被小鼠透皮吸收, 而且对肝和肾产生严重影响.

关键词 量子点, 纳米颗粒, 透皮吸收, 代谢路径, ICP-MS

学科分类号 Q6, R36

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00323

半导体量子点是直径介于 2~100 nm 的半导体纳米材料, 通常由 III~V 族或者 II~VI 族元素制备而成. 量子点具有激发光波段范围宽、发射光谱宽度窄、荧光强度高、稳定性好而且寿命较长等优点, 与传统的有机染料相比具有明显的优越性. 因此, 目前量子点在生物学和医学领域中最具前景的应用是作为荧光标记物^[1-2]. 但是量子点中常含有 Cd²⁺、Se²⁻和 Te²⁻等离子, 对机体的肾脏和肺脏都有毒性. 通过在量子点外包覆外壳, 可以降低重金属离子在体内的释放, 还可以结合某些功能基团, 如巯基、亲和素等, 使量子点能够与生物分子结合并有较好的生物相容性. 但是, 即使量子点的组成元素中不含重金属离子, 量子点自身的小尺寸对生物体的危害性仍有待验证^[3], 量子点的潜在毒性研究引起了人们越来越多的重视. 然而, 目前多数量子点毒理学研究集中在量子点的细胞毒性方面^[4-5], 对活体动物的毒性研究相对缺乏.

皮肤是身体最大的器官, 对于外部污染是一道有效的天然屏障, 但是皮肤同时是纳米多孔半透膜, 纳米颗粒有可能穿透这种纳米多孔膜. 因为皮肤可能直接接触含有纳米材料的药膏、化妆品等, 例如防晒霜之类的产品中一般含有二氧化钛或者氧

化锌的纳米颗粒, 化妆品口红中含有氧化铁纳米颗粒, 因此纳米材料对皮肤的渗透性是判定纳米材料毒性的的重要依据^[6]. 量子点属于半导体类纳米颗粒, 具有优异的光学特性, 当涂抹于皮肤上后, 可以通过检测荧光进行量子点皮肤渗透性研究. 扩散池试验表明, 直径 4.6 nm 的球形量子点 QD655 和 8.4 nm×5.78 nm 的钉状量子点 QD621 都能够穿透完整的猪皮, 而包覆羧酸的直径为 12 nm×6 nm 的椭球形量子点 QD655 无法穿透皮肤^[6-7]. 在本文中, 我们直接在 ICR 小鼠背部皮肤上涂抹量子点材料, 分析量子点材料对活体小鼠皮肤的渗透性以及在小鼠体内的代谢路径, 研究量子点材料的生物毒性.

1 试验过程

1.1 量子点材料

本项研究中所使用的量子点材料购于天津游瑞量子点有限公司. 量子点的核为硫硒化镉(CdSeS).

* 中国人民武装警察部队医学院重点项目(WYZ201003).

** 通讯联系人.

Tel: 022-23494815, E-mail: zhangchl@nankai.edu.cn

收稿日期: 2011-07-12, 接受日期: 2011-09-27

在碱性介质下, 硅试剂在量子点外形成硅氧网络结构. 通过进一步将硅氧网络结构最外层水解成硅羟基, 油溶性量子点将转变成水溶性量子点, 同时降低量子点的毒性. Tecnai G2 F20 场发射投射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)测得量子点的平均粒径为 5 nm, 如图 1 所示. 荧光光谱仪测得量子点的发光峰值为 620 nm.

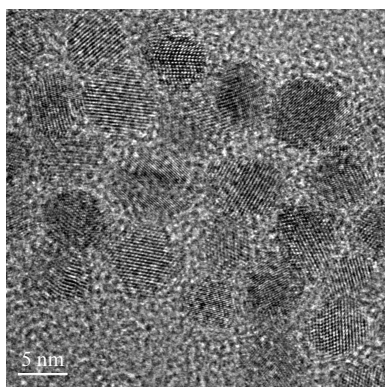


Fig. 1 TEM picture of QDs used in this study

The average size is 5 nm in diameter.

试验所用水溶性量子点的浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$, pH 值为 8.0. 使用前量子点溶液放置在 4℃ 的冰箱中避光保存, 使用时先用超声波超声震荡 2 min, 以保证量子点的分散性. 为了检测量子点荧光强度的稳定性, 将 40 μl 的量子点溶液滴在载玻片上, 放于动物饲养室的饲养架上, 每天对相同位置进行一次荧光显微镜拍照, 并且拍照时使用相同的曝光时间. 荧光图片显示, 相邻 2 天的荧光强度无明显区别. 直接比较滴加量子点溶液 6 h 和 7 天之后的荧光图像, 如图 2a 和 b, 发现 7 天之后荧光强度和 6 h 之后的荧光强度相比略有减少. 因此可以得出结论, 在动物饲养室的温度和光照情况下, 载玻片上量子点的荧光强度比较稳定.

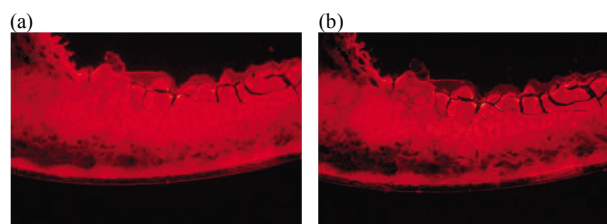


Fig. 2 Fluorescence images of a glass slide 6 h (a) and 7 days (b) after coating with QD solutions

The fluorescence images were taken with the same exposure time.

1.2 活体动物准备

实验中所用动物为雄性 ICR 鼠, 体重约 25 g, 购于军事医学科学院实验动物中心. 试验前用戊巴比妥将动物麻醉, 小心地用弯尖手术剪刀剪掉小鼠背毛, 然后用温水浸湿的医用纱布擦拭剃毛部位, 在剃毛部位涂抹高级脱毛膏, 3 min 后再用温水浸湿的医用纱布仔细擦掉脱毛膏, 让皮毛自然风干即可完成脱毛工作, 脱毛皮肤面积约为 1.5 cm^2 . 在光学显微镜下观察脱毛的皮肤部分是否有损伤, 挑选没有损伤的小鼠饲养在装有消毒锯末的饲养笼中, 放于通风的动物饲养室.

1.3 涂抹量子点

取 6 只脱毛小鼠不涂抹量子点做为对照组, 剩余小鼠脱毛 24 h 之后再次用戊巴比妥麻醉, 在每只小鼠脱毛部位均匀涂抹 80 μl 的量子点溶液(折合含量子点 0.32 nmol), 让其自然风干. 为防止小鼠苏醒后互相挤蹭涂抹量子点的部位, 将它们每只各放在一个饲养笼内单独饲养.

1.4 血浆和器官采样

取涂抹量子点后 1、6、12、24、48 和 120 h 做为观察时间点. 在每个观察时间点分别取 6 只涂抹量子点的小鼠, 在荧光灯下拍摄照片, 然后将其脱颈处死. 从每只小鼠眼睛静脉血管各取血约 1.0 ml, 混合后放入肝素化防凝血试管中, 然后取涂抹量子点部位的皮肤和心、肝、脾、肺、肾. 最后 6 只对照组小鼠也进行脱颈处死, 进行血液和器官采样.

1.5 组织定位

为了评估量子点在皮肤和器官中的沉积情况, 对皮肤和器官进行病理检查. 用手术剪刀剪下涂抹量子点部位皮肤后, 立即用镊子展平放入预先滴在冰块上的包埋剂中, 冷冻得到皮肤样品块. 将心、肝、脾、肺、肾每种器官切成两半, 其中一半放入滴在冰块上的包埋剂中, 冷冻得到器官样品块. 将皮肤和器官样品块用冷冻切片机进行连续切片, 切片厚度为 10 μm . 为防止切片时量子点沾污, 每切一片样品后都用干净丝绸擦拭刀片. 在制备皮肤切片时, 每次都让切片刀从真皮层向表皮层方向进刀, 防止量子点被切片刀从皮肤表面拽到真皮层. 序数为奇数的切片进行 HE 染色, 用光学显微镜观测样品结构. 序数为偶数的切片粘到载玻片上后用丙酮固定, 通过荧光显微镜观察切片上量子点的荧光.

1.6 DAPI 染色

涂抹在皮肤表面的量子点,一部分可能被透皮吸收,另一部分风干之后会留在皮肤表面.为了确定皮肤表面的荧光是源于渗透进入皮肤的量子点还是风干后停留在皮肤表面的量子点,我们对涂抹量子点溶液 1 h 和 6 h 之后的皮肤切片进行了 DAPI 染色.因为通过 DAPI 染色可以确定皮肤细胞的位置,所以皮肤细胞以上的荧光肯定是源于风干后停留在皮肤表面的量子点,细胞之间的荧光一定源于渗透进入皮肤的量子点.

1.7 Cd 含量分析

通过电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测定各种器官中 Cd 离子含量随时间的变化情况,可以判断量子点在体内的代谢路径.为测定血液中镉含量,将放入肝素化防凝血试管中的血浆以 2 000 r/min 离心 10 min,取上清液得到血清样品.将对照组和 1、6、12、24、120 h 时采集的 6 只小鼠的另一半心、肝、脾、肺、肾各分成 3 组,每组 2 只小鼠的相同器官分别合在一起,称重后放在玻璃研磨器中,加入 1 ml 蒸馏水研磨,得到器官样品的匀浆液.血清和器官匀浆液用 4:1 的硝酸和高氯酸混合酸溶液消解,制成 ICP-MS 的样品,然后放入 ICP-MS 的进样室进行 Cd 离子含量测定.

2 结果和讨论

2.1 活体皮肤表面荧光观测

涂抹量子点溶液的小鼠皮肤部位自然风干之后,在日光下和未涂抹量子点的皮肤部位颜色基本相同,但是在荧光灯下,涂抹量子点的皮肤部位显现明亮的红色荧光.图 3a 和 b 为 2 只小鼠涂抹量子点 24 h 和 48 h 之后,在波长为 352 nm 荧光灯下的图像,它们的脱毛部位都可见明亮的红色荧光.

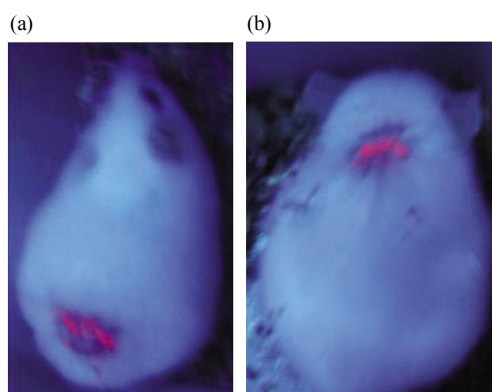


Fig. 3 Fluorescence images of two mice 24 h (a) and 48 h (b) after coating with QD solutions

整体来说,涂抹量子点后较长时间内红色荧光都会比较明显,但是荧光强度逐渐减弱.因为量子点优于普通有机染料之一就是荧光不易淬灭,我们前面的试验也证明所使用的量子点在动物饲养室的温度和光照条件下荧光强度非常稳定,相邻 2 天量子点荧光强度基本相同.因此,荧光强度减弱可能是由于量子点对皮肤具有一定穿透性,一部分量子点渗透到体内,导致表面残余量子点减少,致使荧光强度减弱.另一方面,在饲养过程中,小鼠皮肤与鼠笼、锯末接触,部分量子点被磨擦掉也会导致荧光强度减弱.

2.2 小鼠皮肤结构

小鼠皮肤截面切片经 HE 染色后置于光学显微镜下观测.图 4 所示为涂抹量子点溶液 1 h 和 6 h 之后的小鼠皮肤截面切片.可见,经 HE 染色之后,小鼠皮肤结构可清晰分辨.在图 4a 的皮肤切片中含大量的汗腺,包括汗腺分泌部(①)和汗腺导管(②).图 4b 中,上面深色部位为表皮层(E),其中细胞比较密集,下面浅色部位为真皮层(D),最下面脂肪颗粒(F)清晰可见.真皮层中有毛囊(H),毛囊两侧为皮脂腺(S).由于小鼠皮肤较薄,因此无法清晰判断角质层的厚度.

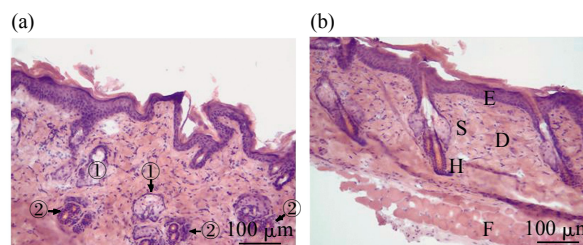


Fig. 4 Optical microscopy images of skin slices of two mice after HE dyeing

1 h (a) and 6 h (b) after coating with QD solutions. Note the secretion sites ① and catheters ② of sweat glands in figure (a) and the epidermis (E), dermis (D), fat particles (F), hair follicles (H) and sebaceous glands (S) in figure (b).

2.3 组织中量子点荧光观测

为了观测量子点溶液涂抹到皮肤上之后,量子点在皮肤表面的渗透情况和在器官中的沉积情况,对皮肤和器官的冷冻切片进行荧光观测.而且,为了判定皮肤切片中接近皮肤表面的荧光到底来自渗透进皮肤的量子点还是在皮肤表面风干的量子点,对 1 h 和 6 h 的皮肤切片还进行了 DAPI 染色,图 5

所示为对应的检测结果。

图 5a1~a4 为 1 h 切片的检测结果, 图 5b1~b4 为 6 h 切片的检测结果, 两行中 1 为明场像, 2 为 DAPI 像, 3 为量子点荧光像, 4 为 DAPI 像和量子点荧光像的叠加像。由于观察荧光的切片没有用封片剂封片, 导致样品结构有损坏。但是通过参考 HE 染色的皮肤结构图, 并且对比明场像和 DAPI 像, 可知图 5a2 和图 5b2 上部密集的蓝色光点对应皮肤的表皮层, 下部密集的蓝色光点对应真皮层中的毛囊和腺体, 因此, 对比 2 和 3 可以判断量子点主要聚集在皮肤表层附近, 并且在毛囊和皮脂腺、汗腺附近有少量的聚集。

为了更清楚地判断皮肤表面附近量子点的具体位置, 对图 5a4 和 b4 近皮肤表面放大如图 5c 和 d。图 5c 中上部密集的蓝色光点为皮肤表皮层的细胞,

量子点的红色荧光主要位于密集的蓝色光点之上, 因此可以判定, 涂抹量子点溶液 1 h 之后, 量子点主要位于表皮层的上部, 渗透进入表皮层的量子点比较少。图 5d 中红色荧光已经和蓝色光点大范围交叠, 因此可以判定, 涂抹量子点溶液 6 h 之后, 大量的量子点已经进入表皮层。通过对比两幅图, 可知随着时间延长, 量子点能够渗透进入完整的皮肤。

图 5a4 和 b4 的中下部显示, 量子点聚集在毛囊附近, 这可能是由于毛囊和皮脂腺、汗腺在皮肤表面有开口, 纳米尺寸的量子点材料容易通过它们在皮肤表面的开口进入并堆积在毛囊和皮脂腺、汗腺中。这与 Alvarez-Roman 等^[8]观察到的纳米颗粒聚集在毛囊开口的现象相似。

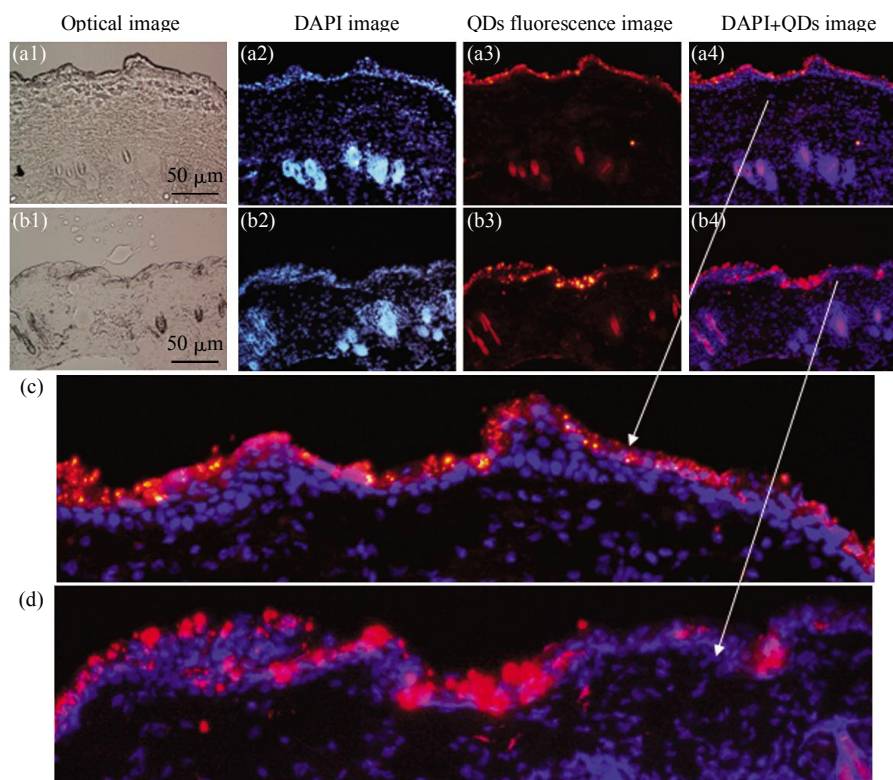


Fig. 5 Microscopy images of skin slices 1h and 6 h after coating with QD solutions

(a1)~(a4) 1 h after coating QD solutions. (b1)~(b4) 6 h after coating QD solutions. In the two rows, 1 is the optical microscopy image, 2 is the DAPI image, 3 is the QDs fluorescence image, 4 is the overlay of DAPI image and fluorescence of QDs. (c) and (d) are the higher magnification of parts near skin surface in (a4) and (b4).

在皮肤和器官切片中未观察到单个的量子点, 这可能是由于量子点的尺寸为纳米量级, 普通的荧

光显微镜无法达到纳米量级的分辨率。但是从理论上来说, 在皮肤和器官中必定存在量子点, 这是因

为猪皮的角质细胞的间距是 19 nm^[7], 虽然小鼠的细胞间距会略小, 但是我们所选用的量子点粒径约为 5 nm, 因此, 量子点完全有可能扩散, 通过细胞间隙穿透皮肤, 进而通过血液循环进入体内脏器.

2.4 Cd 离子含量

在固定时间点取小鼠血液和心、肝、脾、肺、肾制备样品液, 利用 ICP-MS 进行镉含量检测, 检测结果如图 6 所示. 从检测数据可以看出, 涂抹量子点后心和肺中镉离子含量变化不大, 但是在肝、脾和肾中镉离子含量明显增加, 经过 120 h 之后, 肝、肾中堆积量最大. 这是由于涂抹在皮肤表面的量子点对皮肤具有一定的渗透性, 进入皮肤真皮层的量子点通过血液循环进入体内脏器, 但是各种脏器对量子点的吸收和代谢不同, 堆积在肝和肾中的量子点未能通过代谢有效排出体外, 而脾内堆积的量子点能够较快代谢减少.

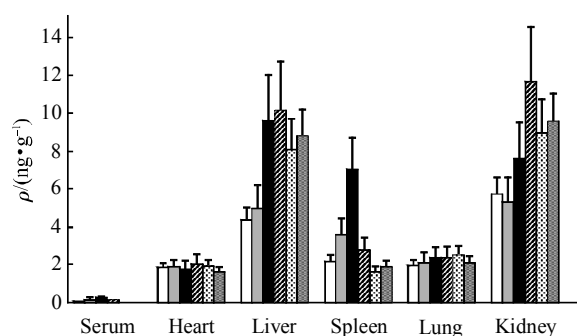


Fig. 6 The average concentrations of Cd atoms in serum and the main organs at different time intervals

□: Control; ▨: 1 h; ▩: 6 h; ▤: 12 h; ▥: 24 h; ▦: 120 h.

本实验中, 肝、脾和肾中镉的含量随时间缓慢增加, 然后缓慢减小, 这与 Chen 等^[9]报道的器官中镉离子含量快速增加然后迅速减少的趋势不同. 分析认为, 这是由于 Chen 等采用的是尾部静脉注射量子点溶液的方式, 血液中镉离子含量随着注射迅速增加. 然而在我们的研究中, 量子点溶液涂抹在小鼠皮肤上, 存在一个缓慢渗透的过程, 而且, 量子点溶液自然风干之后, 小鼠皮肤上分泌的汗液和皮脂也会促进量子点的进一步渗透. 因此, 涂抹

量子点的方法相对来说是一个缓释的过程.

3 结 论

皮肤是人体的最大器官, 对外界污染物具有天然屏障作用. 但是量子点等纳米颗粒具有纳米量级的小尺寸, 可以突破这层屏障. 本研究中小鼠脱毛的背部皮肤上涂抹水溶性 CdSeS 量子点溶液, 发现量子点可以渗透到小鼠皮下, 进而通过血液循环堆积在心、肝、脾、肺和肾等器官中, 而且在肝和肾中堆积严重, 经过 120 h 仍不能有效代谢.

致谢 感谢南开大学的赵焱老师在 ICP-MS 检测上的帮助.

参 考 文 献

- [1] 李步洪, 张镇西, 谢树森, 等. 量子点在生物学中的研究进展. 激光生物学报, 2006, **15**(2): 214-220
Li B H, Zhang Z X, Xie S S, *et al.* Acta Laser Biol Sin, 2006, **15**(2): 214-220
- [2] 李常艳, 李 倩, 刘海涛, 等. 量子点荧光标记技术的研究热点及面临的挑战. 生物化学与生物物理进展, 2010, **37**(1): 103-110
Li C Y, Li Q, Liu H T, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2010, **37**(1): 103-110
- [3] 林道辉, 冀 静, 田小利, 等. 纳米材料的环境行为与生物毒性. 科学通报, 2009, **54**(23): 3590-3604
Lin D H, Ji J, Tian X L, *et al.* Chin Sci Bull, 2009, **54**(23): 3590-3604
- [4] Chan W H, Shiao N H. Cytotoxic effect of CdSe quantum dots on mouse embryonic development. Acta Pharmacol Sin, 2008, **28**(2): 259-266
- [5] 章 晨, 董正伟, 沈筱筠, 等. 量子点 540 诱导人皮肤成纤维细胞 DNA 双链断裂. 毒理学杂志, 2008, **22**(3): 177-181
Zhang C, Dong Z W, Shen X Y, *et al.* J Toxicol, 2008, **22**: 177-181
- [6] Zhang L W, Yu W W, Colvin V L, *et al.* Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes. Toxic Appl Pharm, 2008, **228**(2): 200-211
- [7] Ryman-Rasmussen J P, Riviere J E, Nancy A. Monteiro-riviere, penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. Toxic Sci, 2006, **91**(1): 159-165
- [8] Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia, *et al.* Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. J Control Release, 2004, **99**(1): 53-62
- [9] Chen Z, Chen H, Meng H, *et al.* Bio-distribution and metabolic paths of silica coated CdSeS quantum dots. Toxic Appl Pharm, 2008, **230**(3): 364-371

Transdermal Delivery Through *in vivo* Mouse Skin and Metabolic Path of Quantum Dots*

TANG Lei¹⁾, ZHANG Chun-Ling^{2)**}, SONG Guang-Ming¹⁾, XU Zhong-Wei¹⁾, JIN Xun¹⁾

¹⁾ Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China;

²⁾ College of Physics Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Skin is the largest organ of the body and is a potential route of exposure to sunscreens and cosmetics containing nanoparticles, but the permeability of the skin to these nanoparticles is unknown. In this paper, we studied the transdermal delivery capacity through mouse skin of water-soluble CdSeS quantum dots (QDs) and the deposition of these QDs in the body. QD solution was coated on the dorsal hairless skin of male ICR mice. Fluorescence microscope was used to observe the deposition of QDs in mouse skin and heart, liver, spleen, lung and kidney. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) was used to measure the ¹¹¹Cd concentration to indicate the concentration of QDs in plasma and organs. The fluorescence images show that QDs can penetrate into the dermal layer and deposit in the organs through blood circulation. ICP-MS result indicates that QDs deposit seriously in liver and kidney, and they are difficult to clear. ¹¹¹Cd concentration is still more than 14 ng/g in kidney after 5 days. These results suggest that QDs has *in vivo* transdermal delivery capacity through mouse skin and is harmful to the liver and kidney.

Key words quantum dots, nanoparticles, transdermal delivery, metabolism, ICP-MS

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00323

*This work was supported by a grant from Medical College of Chinese People's Armed Police Force in 2010(WYZ201003).

**Corresponding author.

Tel: 86-22-23494815, E-mail: zhangchl@nankai.edu.cn

Received: July 12, 2011 Accepted: September 27, 2011