新型氮掺杂型碳量子点的制备及其在生物成像中的应用

张苗苗，房正邹，赵雪纷，牛媛媛，娄嘉明，夏　圣，杜凤移
（江苏大学医学院，江苏镇江　212013）

摘要：碳量子点（carbon dots，CDs）是一种新兴的无机准零维碳纳米材料，因其优异的荧光性能和生物相容性而被应用于生物医学领域。以透明质酸和甘氨酸为前驱物，通过水热法一步制备生物亲和型氮掺杂碳量子点（nitrogen-doped carbon dots，NCDs）。通过透射电子显微镜（transmission electron microscopy，TEM）、傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectroscopy，FTIR）、荧光光谱、射线衍射（X-ray diffraction，XRD）光谱对其进行表征研究发现，NCDs 具有较为均一的粒径分布（约为 3.2 nm）、丰富的亲水表面基团、稳定的荧光性能和较高的荧光量子产率（12%）。生物实验结果表明，NCDs 具有较好的生物相容性和血液相容性，可快速进入细胞内部并成功应用于肿瘤细胞的荧光成像。

关键词：生物医学工程学；氮掺杂碳量子点；水热法；透明质酸；荧光成像
中图分类号：R318　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1674-2850(2016)17-1753-06

Preparetion of novel nitrogen-doped carbon dots for bioimaging

ZHANG Miaomiao, FANG Zhengzou, ZHAO Xuefen, NIU Yuanyuan, LOU Jiaming, XIA Sheng, DU Fengyi
(*School of Medicine*, *Jiangsu Unversity*, *Zhenjiang*, *Jiangsu*　212013, *China*)

Abstract: Carbon dots (CDs) are new inorganic quasi-zero-dimensional carbon nanomaterials, and can be applied in biomedical area due to their good biocompability and unique fluorescence properties. Nitrogen-doped carbon dots (NCDs) are prepared by hydrothermal process using hyaluronic acid and glycine as precursors. NCDs have the property of uniform size distribution (around 3.2 nm), hydrophilic surface groups, stable fluorescence and high fluorescence quantum yield (12%) by transmission electron microscopy (TEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FITR), fluorescence spectra, X-ray diffraction (XRD) spectrum. Also, NCDs have the characteristic of favorable biocompability, hemocompatibility and uptake by cancer cells, which can be applied in fluorescence imaging of tumor cells.

Key words: biomedical engineering; nitrogen-doped carbon dots; hydrothermal process; hyaluronic acid; fluorescence imaging

0　引言

CDs 由少量碳原子构成，为直径小于量子波尔半径的准零维无机纳米颗粒，自 2004 年首次由 SUN 等发现以来，一直是材料领域的研究热点[1~2]。因其具有优异的光电学性质、较低的细胞毒性、良好的生物相容性和廉价的制备成本等特点，在光催化、能量储存、光电设备、光学成像和生物医学等领域均表现出重要的应用价值[3~4]。相比于传统的金属半导体生物相容性较差的缺陷，CDs 有良好的水溶性，并且发出稳定的荧

基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金（20123227120008）；江苏大学高级人才启动基金（11JDG113）；中国博士后科学基金面上项目（2015M571705）
作者简介：张苗苗（1982—），女，讲师，主要研究方向：肿瘤免疫学与纳米医学
通信联系人：杜凤移，副教授，主要研究方向：纳米医学与肿瘤免疫学. E-mail: biodfy@qq.com

光，在生物医学方面具有良好的生物兼容性。这些优越的性能确保了 CDs 在肿瘤成像[5]、基因转染[6]、药物传递[7]和生物传感[8]方面的广泛应用。然而，以往制备的 CDs 往往存在荧光量子产率低、生物亲和性差等问题，这大大限制了其作为荧光探针在细胞成像等领域中的应用。

目前，主要通过含氮化合物表面的钝化来提高 CDs 的荧光量子产率，其作用机理是钝化剂填补 CDs 点表面的缺陷或者是由于其表面产生了能量陷阱导致 CDs 的可见光发射。DONG 等[9]利用半胱氨酸为表面钝化剂，制备了 N 和 S 共掺杂的 CDs，荧光量子产率不仅高达 70%，而且发射光谱不依赖于激发光谱。WEI 等[10]通过一系列不同氨基酸制备了颜色可调的荧光 CDs. 近期，本课题组研究表明氮掺杂的 CDs 具有异质多层的非晶态物相结构[11~12]。

本研究采用自下而上的水热法来制备氮掺杂型荧光 CDs. 为增强 CDs 的生物相容性和荧光性能，筛选天然生物大分子透明质酸和含氮小分子甘氨酸为前驱物。该方法原料易得、过程简单、无需后续处理、适合大规模生产。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

硫酸奎宁、透明质酸 HA、甘氨酸购自阿拉丁公司；胎牛血清、胰蛋白酶和 DMEM 购自 Gibco 公司；四甲基偶氮唑蓝（MTT）购自上海普飞生物技术有限公司；二甲基亚砜（DMSO）购自 Sigma 公司。实验所用的水均为去离子水。

1.2 CDs 的合成过程

将 1 g 透明质酸溶解于 20 mL 水中，与不同质量的甘氨酸混匀搅拌形成均一透明的溶液。将所得溶液转移到 50 mL 的不锈钢高压反应釜中，180℃反应 4 h，自然冷却到室温后，将所得的反应混合物在 5 000 r/min 的转速下离心 15 min 除去沉淀。将所得的上清物质转移到透析膜中，用去离子水透析 3 d 后，真空冷冻干燥得到黑棕色粉末即为 NCDs.

1.3 仪器与表征

红外光谱仪用于分析 CDs 表面所带的基团和化学构成；元素分析仪主要分析 CDs 表面的元素组成；高分辨透射电镜用于表征 CDs 的大小和形貌；紫外－可见光分光光度计用于表征 CDs 的光学性质；酶标仪用于细胞毒性实验中吸光度的检测。

1.4 荧光量子产率的测定

所制备的氮掺杂量子点的产率（Φ）通过比较的方法测量。硫酸奎宁（报道的量子产率：54%）标准液溶解在 0.1 mmol 的硫酸溶液中［折射率（η）=1.33］。将不同浓度的氮掺杂量子点溶解于蒸馏水中制成不同浓度的溶液（η=1.33）。利用紫外－可见分光光度计测定激发波长处的吸光度。所有样品均用激发波长为 360 nm 下的光致发光，并用 FLS920 荧光计记录。样品经过荧光分光光度计的检测后，氮掺杂量子点与对照组在激发波长下发出的紫外荧光强度相同。用以下公式计算量子产率：

$$\Phi_x = \Phi_{st}(Grad_x/Grad_{st})\cdot(\eta^2_x/\eta^2_{st}),$$

其中，st 和 x 分别为标准组和实验组；Φ 为荧光量子产率；Grad 为荧光强度与吸光度的比值；η 为溶剂的指数。为减少重吸收的影响，在 10 mm 的荧光比色皿中吸光度不得超过 0.1 个激发波长。

1.5 细胞的活性测定

采用细胞活性比色检测法（MTT 检测）测定 CDs 的细胞毒性。将 U251（胶质瘤细胞）和 E0771（肝

癌细胞）以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中，每孔细胞数量为 3×10^4 个。将培养板放入 37℃ 5%的 CO_2 培养箱中培养 24 h. 不同浓度的 CDs 溶解于 DMEM 代替培养基培养 24 h，接下来在每孔中加 20 μL 浓度为 2.5 g/L 的 MTT，并在 37℃ 5%的 CO_2 培养箱中培养 4 h. 弃除上清液后，每孔加 150 μL 的 DMSO，96 孔板在摇床上晃动 15 min. 用纯的 DMSO 作为空白对照，在酶标仪上检测波长在 490 nm 每个孔的细胞溶液的吸光度数值。

1.6 细胞的成像与标记

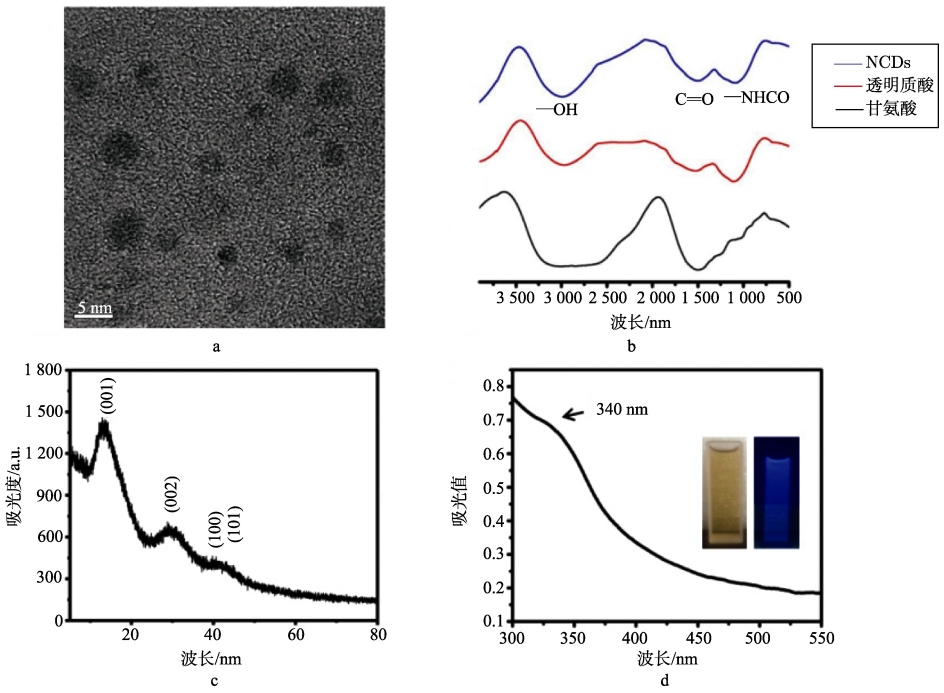
用 U251 和 E0771 检测 CDs 在活细胞中的成像。将这两种细胞接种在直径为 15 mm 的载玻片上，载玻片放在含有 10%胎牛血清的 24 孔板中，然后置于在 37℃ 5%的 CO_2 培养箱中培养 24 h. 随后每孔加 100 μL 浓度为 50 g/L 的 CDs，并在温箱中培养 6 h. 随后弃去培养液，用 PBS 清洗 3 遍，之后用 4%的多聚甲醛在室温下固定 10 min，再用 PBS 清洗 3 遍进行封片。用荧光扫描显微镜观察细胞内 CDs 的荧光发射情况。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件，实验数据用均数±标准差表示，采用一维方差分析进行数据统计分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

通过筛选天然生物活性分子透明质酸与甘氨酸为前驱物，利用一步水热法成功获得高荧光性能与优良生物相容性的 NCDs. 由 NCDs 的 TEM 图可以看出，其大小较为均一，平均粒径为 3.2 nm（如图 1a 所示）.



注：图 1d 中插图，左侧为 NCDs 在白光下的照片，右侧为在紫外灯下的照片

图 1 NCDs 理化与光学特性的表征

Fig. 1 Physicochemical and optical characterization of NCDs

a—NCDs 的透射电镜图；b—FITR 图；c—XRD 光谱图；d—紫外–可见吸收图

a-TEM image of NCDs; b-FTIR spectum of NCDs; c-XRD patterns of NCDs; d-UV-vis absorption spectrum of NCDs

图 1b 为 NCDs、透明质酸和甘氨酸的 FITR 图。可以看出，3 413 cm^{-1} 处的吸收峰为－OH 的伸缩振动峰，1 629 cm^{-1} 处的吸收峰为 C＝O 伸缩振动峰，1 405 cm^{-1} 处为 C—N 的振动吸收峰。由此可得，NCDs 表面富含羟基、羧基及氨基，由于这些基团大部分是亲水基团，从而赋予 NCDs 很好的分散性和水溶性。

对 NCDs 内部物相结构进行 XRD（如图 1c 所示）表征发现 3 个衍射峰：在 13.07° 出现一个非常强而宽的衍射峰{001}，对应氧化石墨烯的层间距；在 28.6° 出现一个较弱的衍射峰接近石墨烯的特征峰{002}. 以上结果说明，经过高温高压碳化聚合而成的 NCDs 呈现非晶态的物相结构，同时兼具石墨烯和氧化石墨烯的内部特征。

图 1d 为 CDs 水溶液的紫外-可见吸收光谱图，在 340 nm 处有一明显的肩峰，其原因可能是前驱物化合物中较大的共轭体系变成较小的共轭体系，中间杂原子跃迁所生成的共轭体系。由图 1 可以看出，NCDs 具有良好的水溶性，将其溶于水中，得到浅棕色的水溶液。在紫外灯（365 nm）的照射下，可以看出 NCDs 发出蓝色的荧光（如图 1d 插图所示）。

图 2 为 NCDs 水溶液的荧光光谱图。由图 2 可以看出，当选用激发波长为 310～380 nm 范围内激发 NCDs 水溶液时，发现发射峰由 420 nm 向 460 nm 红移，且强度先增大再减小。当激发波长在 360 nm 时，在 450 nm 左右出现最大强度的发射峰。NCDs 表现出激发波长依赖的发射光谱特性。可能有两种原因造成这种现象，NCDs 表面不同的发光位点或者其不同粒径造成发射光谱红移。

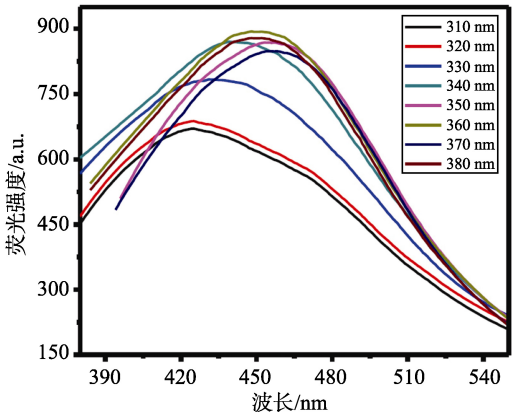


图 2　NCDs 水溶液的荧光光谱图

Fig. 2　Photoluminescene spetrum of NCDs solution

作为生物医用荧光探针，良好的生物相容性显得尤为重要。接下来通过 MTT 与溶血实验表征 NCDs 的生物相容性。由图 3a 可知，在不同浓度的 NCDs 溶液中，U251 与 E0771 的存活率依然很高，说明 NCDs 有较低的细胞毒性。如图 3b 所示，将血细胞溶解在双蒸水（阳性对照组）中，可引起血细胞破坏，从而导致紫外吸收光的结果明显增加。然而，将血细胞溶解在不同浓度的 NCDs 溶液中，紫外吸收光的结果与 PBS（阴性对照组）的结果没有明显差异。由此说明，以天然生物活性分子透明质酸和甘氨酸为前驱物合成 NCDs 可显著改善碳基质纳米颗粒的生物相容性。

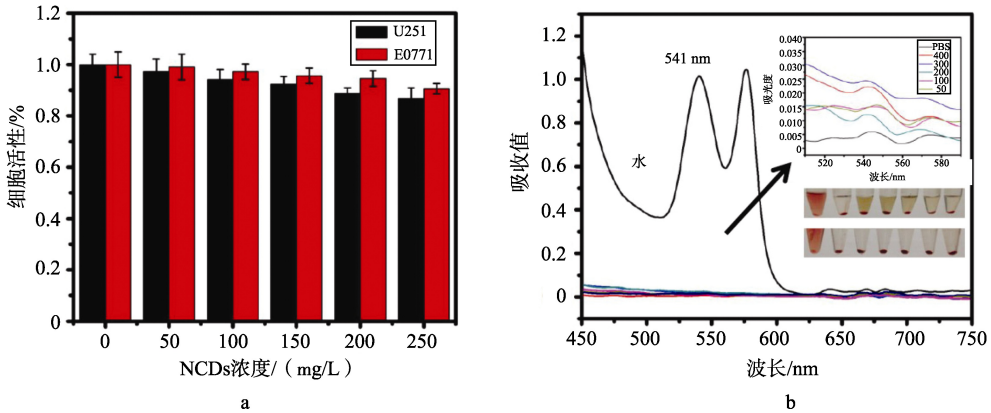


图 3　NCDs 生物相容性的表征

Fig. 3　Biocompatibility characterization of NCDs

a—不同浓度 NCDs 对 U251 和 E0771 细胞活性的影响（MTT）；b—不同浓度 NCDs 对血细胞溶血的影响

a-Effects of NCDs at different concentration on U251 and E0771 cells viability (MTT); b-Effects of NCDs at different concentration on blood cells hemolysis

图 4 为 NCDs 标记肿瘤细胞的荧光显微照片。两种肿瘤细胞用含 NCDs 的培养基孵育 6 h 后，更换培养液，洗去游离未被细胞吞噬的 NCDs. 通过荧光显微镜观察可以发现，两种肿瘤细胞都可以发出多色荧光，说明 NCDs 可以透过细胞膜进入到细胞质当中。在不同的激发光下，NCDs 标记肿瘤细胞发出蓝色、绿色和红色三种不同荧光，说明 NCDs 具备激发光依赖的发射光谱特性。同时，NCDs 这种特性与图 4 激发光红色荧光光谱结果相互印证。值得注意的是，细胞核区域荧光强度很弱，说明 NCDs 很难进入细胞核；但是细胞质的荧光强度很高，特别是细胞核的周边，这可能是因为 NCDs 通过细胞内吞作用透过细胞膜，之后随内吞体快速弥散到细胞质中，而由于细胞核通透性较低，因而 NCDs 不能进入到细胞核。

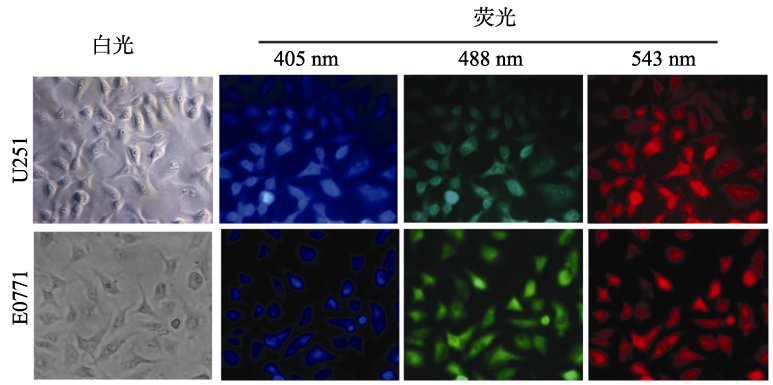


图 4 U251 和 E0771 细胞与 NCDs（100 mg/L）孵育后的荧光照片

Fig. 4 Fluorescence images of U251 and E0771 cells after incubation with NCDs (100 mg/L)

由于 NCDs 这种特殊的光学性质和生物相容性致使其在生物成像领域有很大的应用价值。

3 结论

研究以透明质酸与甘氨酸作为前驱物，用简便的自下而上一步法成功合成粒径均一、水溶性好的 NCDs. 合成的 NCDs 具有非晶态的内部物相结构、激发依赖性发射光谱等特性。天然的生物活性分子赋予了 NCDs 优秀的细胞相容性与血液相容性。当 NCDs 与肿瘤细胞共同培养时，并没有表现出明显的细胞毒性与溶血现象，且很快就被细胞摄入，弥散在细胞质中，尤其在细胞核周围有明显聚集现象。由于这种优异的光学性质和生物相容性，使其作为荧光探针用于肿瘤细胞的荧光成像与标记等方面有很大的潜在应用价值。

[参考文献] (References)

[1] SUN Y P, ZHOU B, LIN Y, et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence[J]. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(24): 7756-7757.

[2] BAKER S N, BAKER G A. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights[J]. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2010, 49(38): 6726-6744.

[3] LIU C, ZHANG P, ZHAI X, et al. Nano-carrier for gene delivery and bioimaging based on carbon dots with PEI-passivation enhanced fluorescence[J]. Biomaterials, 2012, 33(13): 3604-3613.

[4] WU Z L, ZHANG P, GAO M X, et al. One-pot hydrothermal synthesis of highly luminescent nitrogen-doped amphoteric carbon dots for bioimaging from *Bombyx mori* silk-natural proteins[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2013, 1(22): 2868-2873.

[5] CHEN B S, LI F M, LI S X, et al. Large scale synthesis of photoluminescent carbon nanodots and their application for bioimaging[J]. Nanoscale, 2013, 5(5): 1967-1971.

[6] HU L M, SUN Y, LI S L, et al. Multifunctional carbon dots with high quantum yield for imaging and gene delivery[J]. Carbon, 2014, 67: 508-513.

[7] MEWADA A, PANDEY S, THAKUR M, et al. Swarming carbon dots for folic acid mediated delivery of doxorubicin and biological imaging[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2014, 2(6): 698-705.

[8] YANG X M, LUO Y W, ZHU S S, et al. One-pot synthesis of high fluorescent carbon nanoparticles and their applications as probes for detection of tetracyclines[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 56: 6-11.

[9] DONG Y Q, PANG H C, YANG H B, et al. Carbon-based dots co-doped with nitrogen and sulfur for high quantum yield and excitation-independent emission[J]. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2013, 52(30): 7800-7804.

[10] WEI W L, XU C, WU L, et al. Non-enzymatic-browning-reaction: a versatile route for production of nitrogen-doped carbon dots with tunable multicolor luminescent display[J]. Sci. Rep., 2014, 4: 3564.

[11] DU F Y, YUAN J, ZHANG M M, et al. Nitrogen-doped carbon dots with heterogeneous multi-layered structures[J]. RSC Advances, 2014, 4 (71): 37536-37541.

[12] DU F Y, JIN X, CHEN J H, et al. Nitrogen-doped carbon dots as multifunctional fluorescent probes[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2014, 16(11): 1-10.