

色氨酸碳点的合成及在细胞生物学成像中的应用

唐秋玲¹ 赵晓欢² 杨明锡² 潘佳慧¹ 李格格¹ 孟阳¹ 王柳然¹ 于维先^{3*}

(1. 吉林大学口腔医学院牙周病科 吉林 长春 130021;

2. 吉林大学超分子结构与材料国家重点实验室 吉林 长春 130012;

3. 吉林省牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的:利用碳点标记不同细胞,通过共聚焦显微镜下碳点的多色荧光特性,达到观察不同细胞的成像特点。方法:采用水热法合成色氨酸碳点,用 TEM、FT-IR、荧光光谱仪对碳点进行表征。采用 MTT 法检测碳点对小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7、小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 和小鼠成纤维细胞系 L929 成像效果,以确定碳点最佳成像浓度。选择最佳浓度的碳点分别与上述 3 种细胞共培养 24 h 后,在共聚焦显微镜下观察细胞的成像特点。结果:TEM 下观察制备的碳点为球形颗粒,粒径约为 3.35 nm;FT-IR 显示碳点的分子结构仅由碳、氧、氢和氮元素组成。荧光光谱显示碳点在不同激发波长下可以呈现不同的颜色,具有激发依赖性。MTT 结果显示当碳点浓度在 400 mg/L 时,RAW264.7 细胞活性达 67%,MC3T3-E1 细胞活性达 79%,L929 细胞活性达 89%,表明碳点进入细胞内部并不会明显影响细胞活性。成像结果显示,在 488 nm 和 543 nm 激发波长下,3 种细胞均可以呈现绿色和红色的荧光图像,RAW264.7 和 L929 荧光区主要集中在细胞膜和细胞质,而 MC3T3-E1 整个细胞都具有荧光,表明碳点可能部分进入细胞核中。结论:制备的碳点对细胞成像效果好,且能够使细胞具有多色荧光,对直接观察和分析细胞的形态和生理活动具有重要的意义。

[关键词] 荧光碳点 细胞 生物学成像**[中图分类号]** R780 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2017)11-1213-05**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.11.020

Preparation and Cell Biology Imaging with Tryptophan Carbon Dots. Tang Qiu-Ling¹, ZHAO Xiao-huan², YANG Ming-xi², PAN Jia-hui¹, LI Ge-ge¹, MENG Yang¹, WANG Liu-ran¹, YU Wei-xian^{3*}. 1. Department of Periodontology, School of Stomatology, Jinin University. Changchun 130021, China; 2. State Key Lab of Supramolecular Structure and Material, Jinin University. Changchun 130012, China; 3. Key Lab for Tooth Development and Jaw Regeneration of Jinin Province. Changchun 130021, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the imaging characteristics of different cells that labeled by carbon dots (CDs) with multicolor fluorescence properties. **Methods:** Tryptophan CDs were synthesized by hydrothermal method and characterized by TEM, FT-IR, and fluorescence spectrometer. MTT method was used to detect CDs at different concentrations co-cultured with RAW264.7, MC3T3-E1, and L929 for 24h, which were observed under confocal microscope. The optimum imaging concentration of CDs was determined. **Results:** TEM showed that CDs were spherical particles with excellent dispersion and particle size of about 3.72nm. FTIR showed that molecular structure of CDs was consisted of carbon, oxygen, hydrogen, and nitrogen elements. Fluorescence spectra showed that at different excitation wavelengths, CDs could present different colors with excitation dependencies. MTT results showed that the cell activity of RAW264.7, MC3T3-E1, and L929 were up to 67%, 79% and 89% when the concentration of CDs was 400mg/L. The results of cell imaging showed that green and red fluorescence images were

observed at 488 nm and 543 nm excitation wavelengths. The fluorescence of CDs was mainly detected in cell membrane and cytoplasm of RAW264.7 and L929. The entire MC3T3-E1 cell showed fluorescence, which indicated that the CDs might partially enter into its nucleus. **Conclusion:** Tryptophan CDs can be applied to cell imaging to facilitate observation and analysis of cell morphology and physiological activi-

基金项目 国家自然科学基金面上项目(编号:81570983)
吉林省卫生技术创新项目(编号:2016J073)
吉林省科技厅自然科学基金项目
(编号:20150101076JC)

作者简介 唐秋玲(1990~),女,湖北人,医师,硕士,主要从事口腔牙周病学临床和基础研究工作。

* 通讯作者 于维先,电话:0431-88796000

ties.

[Key words] Carbon dots Cell Biological imaging

生物学成像是以生物发光作为信号,对生物体进行组织、细胞和分子水平的定性和定量研究。荧光成像因其简单易操作、灵敏度高等优点成为人们观测细胞结构、理解生命过程的一种必不可少的工具,在生命科学几乎各个领域都被广泛应用^[1]。合适的荧光造影剂是得到理想荧光图像的重要因素。从有机小分子到荧光蛋白,再到量子点、纳米粒子等,各种各样的荧光造影剂被发现并被深入研究。有机小分子染料一般尺寸较小,其优势在于对生物体系的干扰极其细微,然而却容易被光漂白,使用寿命过短,容易光解和褪色,光解产物往往对生物体产生杀伤作用,更主要的是难以进行多色同时标记,因此很难实现实时、无损监测和研究。纳米粒子具有更强的光稳定性,并且可以克服以上传统造影剂的缺点。最近的研究发现,碳点(carbon dots, CDs),又称碳纳米点,它是一类新型碳纳米材料,具有优良的光学性能、粒径小,穿透力强、毒性小,使其在生物学成像^[2]、生物学感应^[3]、肿瘤治疗^[4]等领域中具有广泛的应用前景。碳点在不同的激发状态下具有多色荧光性,由于碳点表面含有羟基基团,其对细胞壁具有很高的亲和力,能吸附到细胞膜上,使细胞在不同的激发状态下具有不同的荧光特性^[5]。本实验通过制备色氨酸碳点,标记细胞,观察其成像特点,为应用该碳点观察和分析细胞的形态和生理活动奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器 色氨酸、邻苯二胺(阿拉丁,纯度 99%);浓盐酸(北京化学试剂)为分析纯。MTT 粉剂(Amresco 公司,美国);40%甲醛(北京化学试剂);二甲基亚砜 DMSO(北京化工厂);小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7(中科院细胞库)、小鼠成纤维细胞系 L929(中科院细胞库);小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1(Gibco,美国);H-DMEM 培养基、胎牛血清和青/链双抗(Gibco,美国);CO₂ 恒温细胞培养箱(SANYO,日本);台式高速离心机(Eppendorf,德国);马弗炉(JKKZ4-10,济南精密科学仪器仪表有限公司);透射电子显微镜(TEM, JEM-2100F,日本);傅立叶红外光谱仪(FT-IR, AVATAR360,美国);荧光光谱仪(RF-5301 PC,日本);酶标检测仪(Bio-TEK,美国);激光扫描共聚焦显微镜(Olympus,日本)。

1.2 碳点的制备 分别称取 0.051 g 色氨酸和 0.108 g 邻苯二胺溶解于 10 mL 去离子水中,再加入 200 μ L 浓盐酸,用玻璃棒均匀搅拌,将液体转移入 10 mL 的反应釜中,拧紧釜盖,于马弗炉中在 200 $^{\circ}$ C 条件下反应 12 h,待反应釜自然冷却至室温,将反应釜中液体用 0.22 μ m 滤器过滤后,用 PBS 缓冲液透析 48 h,每 6 h 换 1 次透析液,获得样本进行后续实验。

1.3 碳点的表征

1.3.1 TEM 检测 取 1 mL 碳点溶液,加 9 mL 去离子水稀释,充分溶解后,取 10 μ L 滴加在直径为 3 mm 的 V3 超薄碳网上,自然晾干后,用 TEM 观察碳点的尺寸、形貌,用 Nano Measurer 软件计算粒子的粒径大小分布。

1.3.2 荧光光谱仪检测 取 0.5 mL 碳点溶液加入石英比色皿中,加去离子水稀释至有效测定浓度,设置扫描范围为 220~750 nm 的荧光发射光谱,狭缝宽度为 5 nm,扫描速度为 1200 nm/min 等参数,扫描得到样品的荧光光谱。

1.3.3 FT-IR 检测 取适量 KBr 粉末于玛瑙研钵中,然后加一滴碳点溶液,烘干后快速研磨成极细的粉末,用模具加压形成均匀透明薄片,从 400~4000 cm^{-1} 波段进行红外光谱测试,傅立叶变换得到样品红外光谱图。

1.4 碳点生物安全性评价 采用 MTT 法检测碳点的细胞毒性。分别取对数生长期的 RAW264.7、MC3T3-E1 和 L929 细胞计数后取 3×10^6 个细胞,按照每孔 5×10^3 个细胞转至无菌 96 孔板,在 5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件下共培养 24 h,设置加细胞培养液为空白对照组(BL),相应孔加入不同浓度的 CDs,每组设置 6 个复孔,每孔加入培养液 100 μ L,5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件下共培养 24 h,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μ L。5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,随后终止培养,小心吸出孔内培养液,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡溶解 10 min,选择 490 nm 波长,在酶标检测仪上测定各孔 A 值,并计算细胞相对增值率 RGR(%)=(实验组 A 均值/空白对照组 A 均值) \times 100%。

1.5 碳点标记细胞的成像观察 分别取对数生长期的上述 3 种细胞计数后取 1×10^5 个细胞于共聚焦皿中,5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件下共培养 24 h,吸出原培养液后加入培养液所含碳点浓度为 400 mg/L。培养 24 h 后,小心吸出孔内培养液,PBS 冲洗 3 次后,加入 1 mL 10%甲醛固定 15 min,固定完毕后,

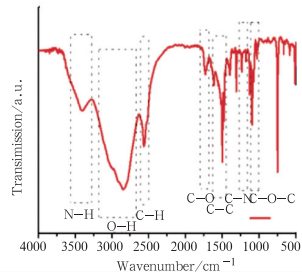
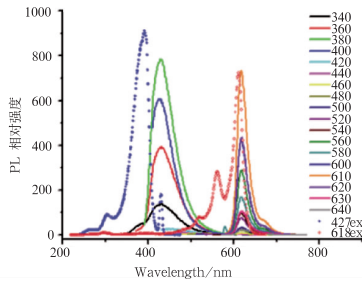
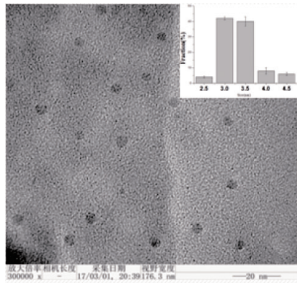


图 1 碳点的 TEM 照片 (×300000)

图 2 碳点的光谱结果

图 3 碳点的傅立叶红外光谱

Fig. 1 TEM images of CDs (×300000).

Fig. 2 Fluorescence spectra of CDs.

Fig. 3 FTIR spectra of CDs.

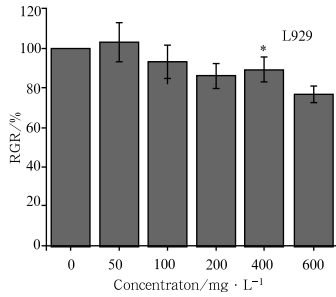
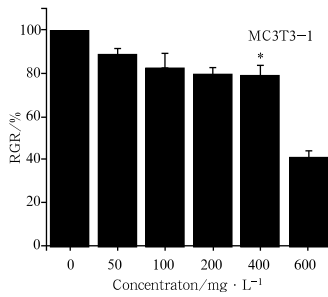
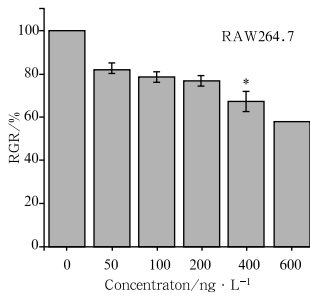


图 4 各组细胞的 MTT 结果

Fig. 4 The MTT results of different cells.

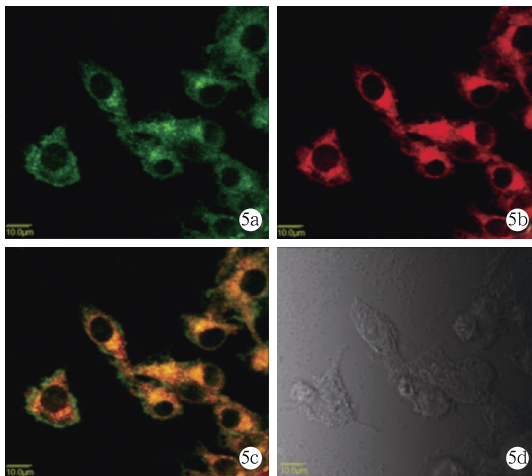
小心吸出孔内固定液,用 PBS 冲洗 3 次后,加入 1 mL PBS 溶液于共聚焦皿中,共聚焦显微镜中观察不同激发波长下细胞成像结果。

2.2 荧光光谱结果 碳点的荧光光谱图,其中 340 ~ 640 nm 代表对应的激发波长,427ex、618ex 代表对应的最佳激发波长。碳点在不同的激发波长下,可以呈现不同的颜色,表现出激发依赖性,见图 2。

2.3 FT-IR 结果 碳点的红外光谱图,3418 cm⁻¹ 归属于 N-H 伸缩振动,3000 cm⁻¹ 左右的宽峰为缩合 OH 的伸缩振动吸收,2570 cm⁻¹ 为 C-H 伸缩振动吸收峰,1730 cm⁻¹ 和 1500 cm⁻¹ 附近特征峰分别归属于 C=O 双键和 C=C 双键的伸缩振动,1240 cm⁻¹ 处为 C-N 键的伸缩振动,1098 cm⁻¹ 为 C-O-C 的对称伸缩振动峰,1000 cm⁻¹ 以下为芳环的指纹区。红外表征说明碳点表面保留了碳源中的氨基、羧基等基团,这些官能团能赋予碳点良好的水溶性和分散性,见图 3。

2.4 色氨酸碳点生物安全性评价结果 MTT 结果显示随着碳点浓度的增加,24 h 时碳点溶液组的光吸收值和 RGR 均相应减少,400 mg/L 碳点溶液组在培养 24 h 时,3 种细胞的 RGR 均相应减少,且与空白对照组相比,有统计学差异 ($P < 0.05$),见图 4。当碳点浓度为 400 mg/L 时 RAW264.7 细胞活性达 67%,MC3T3-E1 细胞活性达 79%,L929 细胞活性达 89%,表明碳点进入细胞内部并不会明显降低细胞活性。

2.5 细胞成像结果 RAW264.7、MC3T3-E1、L929 细胞与碳点培养后共聚焦显微镜成像结果,RAW264.7 细胞呈圆形或椭圆形,细胞较小比较密



5a:488nm 激发波长;5b:543nm 激发波长;5c:5a 和 5b 的融合图;5d:明场图(×1200)

图 5 RAW264.7 细胞与碳点成像图

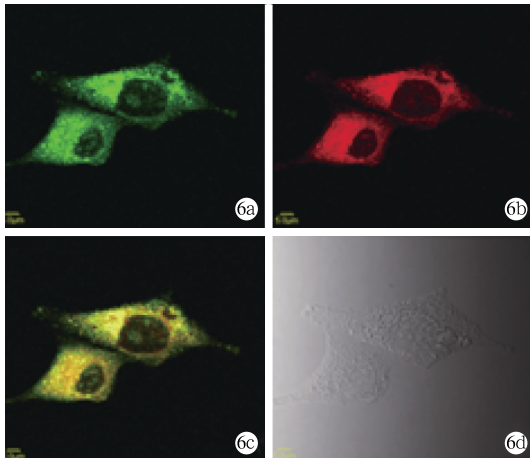
Fig. 5 The images of RAW264.7 cells with CDs.

1.6 统计学分析 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 碳点的形态、粒径及分布 TEM 观察碳点为球形颗粒,粒径大小均匀,分散度较好,见图 1。通过 Nano Measurer 软件计算 500 个碳点直径,该碳点的粒径约为 3.35 nm。

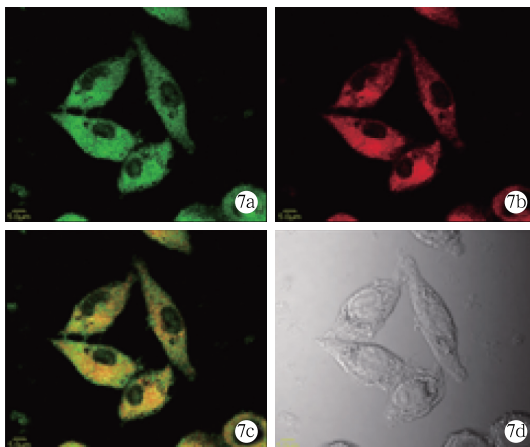
集,很少见突起。MC3T3-E1 细胞呈梭形或者锥形,细胞和细胞核较大。L929 细胞呈长梭形,具有突起。3 种细胞在不同的激发波长下,可以呈现不同颜色的荧光,RAW264.7 和 L929 荧光区域主要集中在细胞膜和细胞质,MC3T3-E1 整个细胞都具有荧光,成像后的细胞轮廓清楚,且荧光强度稳定,说明碳点对细胞具有很好的成像效果,见图 5、图 6、图 7。



6a: 488 nm 激发波长; 6b: 543 nm 激发波长; 6c: 5a 和 5b 的融合图; 6d: 明场图($\times 1200$)

图 6 MC3T3-E1 细胞与碳点成像图

Fig. 6 The images of MC3T3-E1 cells with CDs.



7a: 488 nm 激发波长; 7b: 543 nm 激发波长; 7c: 7a 和 7b 的融合图; 7d: 明场图($\times 1200$)

图 7 L929 细胞与碳点成像图

Fig. 7 The images of L929 cells with CDs.

3 讨论

在生物医学领域里,对细胞、生物分子进行染色或修饰标记是进行细胞和分子鉴别和测量的一项重要技术,其中以荧光生物标记最为常用。近年来生物学成像的方法主要有荧光染料染色或半导体量子点成像。常用于细胞标记的荧光染料种类有嵌入式

荧光染料、荧光素、罗丹明等,这些荧光染料只有吸收合适能量的光子后,才能从基态跃迁到激发态,而所用的光必须是精确的波长,经过多次激发和光发射,荧光染料会分解,且其激发波长较窄。量子点较荧光染料的优点在于:能够承受多次激发和光发射、具有宽的激发谱和窄的发射谱等,但是半导体量子点中含有金属离子,其对生物体和环境会造成很大的毒性,而碳点作为一种新型纳米材料则可克服上述各项缺点。其粒径较小,分子量只有传统荧光试剂的十分之一,更容易通过内吞作用到达细胞内^[6],可以更好的应用于细胞荧光标记与生物学成像等领域。因此,碳点在生物医学领域的研究中将蕴含着巨大的应用前景。

近年来碳点的生物学成像应用研究越来越广泛,Nandi 等^[7]利用碳点标记不同细菌的荧光光谱与荧光强度阈值不同,来鉴别不同种类的细菌,为鉴别细菌提供了一种新的方法;Ritenbery 等^[8]利用碳点标记铜绿假单胞菌的生物膜,以研究时间、温度、群体感应抑制剂对生物膜形成过程的影响,从而使生物膜的形成过程可视化;Yang 等^[9]通过修饰碳点,使碳点选择性抑制革兰阳性菌,利用碳点对细菌的成像可以使其抑菌效果可视化。以上研究均基于碳点的生物学成像,为鉴别细菌、研究抗菌机制和生物膜的形成机制提供了新的思路。

水热法制备碳点操作方法简单,其最大的优点是所用的碳源种类繁多,自然界中含碳的材料能够提供丰富的碳源,因此,水热法为合成碳点的首选途径。2012 年 Dong^[10] 和 Mohapatra^[11] 研究团队分别利用豆浆和橙汁使用水热法制得性能优异荧光碳点。色氨酸作为机体内的必须氨基酸,参与人体蛋白质合成和代谢调节,是生物合成中非常重要的结构单元。由于其具有多个官能基团,如羧基、氨基和吡啶基团,其经过修饰之后可以形成多种不同的结构单元。所以,色氨酸是一种良好的碳源材料。基于以上分析,本实验以色氨酸作为碳源,采用水热法合成碳点,在装釜过程中色氨酸、邻苯二胺和去离子水一定要混合均匀,尽量减少合成的碳点浓度误差。在体外细胞成像时,考虑到碳点溶液低浓度时其生物安全性好荧光强度弱,而高浓度时生物安全性差荧光强度高,综合以上两方面考虑选择浓度为 400 mg/L 的碳点溶液进行细胞成像。结果显示碳点在 488 nm、543 nm 激发波长下 3 种细胞均成绿色、红色荧光图像,且细胞结构清晰,这为碳点的生物学成像提供了实验室数据。

综上所述,合成碳点溶液的方法简单可行、成本低廉,且合成后的碳点不仅能够不同的激发状态下具有多色荧光性,具有非常高的光稳定性,而且生物安全性好,同时在细胞中生物学成像效果好。牙周炎是一种发生在牙齿支持组织的慢性免疫炎症性疾病,可引起牙周结缔组织破坏和牙槽骨吸收^[12]。破骨细胞、成骨细胞和成纤维细胞在牙周炎这一免疫炎症过程中具有重要的作用,本实验研究发现,氨基酸碳点对破骨细胞、成骨细胞和成纤维细胞均具有很好的成像效果,将通过碳点的细胞成像,在研究牙周炎的发生发展机制和治疗转归评价具有重要的意义。

参考文献

- [1] Kraut R, Bag N, Wohland T. Fluorescence correlation methods for imaging cellular behavior of sphingolipid-interacting probes [J]. *Methods Cell Biol*, 2012, 108(3): 395-427
- [2] Atchudan R, Edison TN, Lee YR. Nitrogen-doped carbon dots originating from unripe peach for fluorescent bioimaging and electrocatalytic oxygen reduction reaction [J]. *J Colloid interface Sci*, 2016, 15(482): 8-18
- [3] Liu S, Zhao N, Cheng Z, et al. Amino-functionalized green fluorescent carbon dots as surface energy transfer biosensors for hyaluronidase [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(15): 6836-6842
- [4] Bhunia SK, Maity AR, Nandi S, et al. Imaging cancer cells expressing the folate receptor with carbon dots produced from folic acid [J]. *Chembiochem*, 2016, 17(7): 614-619
- [5] Nandi S, Mailshev R, Mirsky Y, et al. Membrane analysis with amphiphilic carbon dots [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50(71): 10299-10302
- [6] Kang YF, Fang YW, Li YH, et al. Nucleus-staining with biomolecule-mimicking nitrogen-doped carbon dots prepared by a fast neutralization heat strategy [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2015, 51(95): 16956-16959
- [7] Nandi S, Ritenbery M, Jelinek R. Bacterial detection with amphiphilic carbon dots [J]. *Analyst*, 2015, 140(12): 4232-4237
- [8] Ritenbery M, Nandi S, Jelinek R, et al. Imaging *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular polymer scaffolds with amphiphilic carbon dots [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(5): 1265-1270
- [9] Yang J, Zhang X, Ma YH, et al. Carbon dot-based platform for simultaneous bacterial distinguishment and antibacterial applications [J]. *ASC Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(47): 32170-32181
- [10] Zhu C, Zhai J, Dong S. Bifunctional fluorescent carbon nanodots: green synthesis via soy milk and application as metal-free electrocatalysts for oxygen reduction [J]. *Chen Commun (Camb)*, 2012, 48(75): 9367-9369
- [11] Sahu S, Behera B, Maiti TK, et al. Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents [J]. *Chen Commun (Camb)*, 2012, 48(70): 8835-8837
- [12] 高爱超,于海燕,李娜,等. 牙龈卟啉单胞菌多糖(Pg-LPS)对破骨细胞 EphA2 基因表达的调控[J]. *口腔医学研究*, 2015, 31(03): 268-275

[收稿日期:2017-05-10]

(本文编辑 汪喻忠)

书讯

北京大学医学出版社隆重推出《口腔颌面外科门诊手术操作规范与技巧》,主编:赵吉宏,副主编:唐海阔、蔡育。

本书由武汉大学口腔医院口腔颌面外科赵吉宏教授主编,从基础、规范、实用的角度出发,紧密围绕临床实际,系统介绍了口腔颌面外科门诊常见手术的操作规范,详尽到患者体位、麻醉方式、消毒范围以及手术步骤的各个细节。本书的精华在于手术步骤及手术技巧的介绍,系作者多年来的临床工作经历、经验和体会凝练而成。全书配图 700 余幅,包括临床操作实景照片、模型照片及手绘图,图片精美直观、层次清晰、立体感强,具有较好的视觉效果。文字部分力求简明扼要,重点突出。

本书适合于口腔通科医生、本科生、研究生、进修医生等人员学习和参考,对他们掌握科学规范的口腔颌面外科技术大有裨益。订购方式:1)出版社邮购,电话:010-82802495;010-62046414。网络订购:登录亚马逊、淘宝、天猫一输入书名一即可网购。