



## 微波合成靶向核仁的 荧光碳纳米颗粒研究\*

王倩<sup>1)</sup> 冯真真<sup>2)</sup> 毛健<sup>1)</sup> 刘立华<sup>1)</sup> 陈晓良<sup>1)</sup> 魏晓贇<sup>1)</sup> 黄方<sup>1)\*\*</sup><sup>1)</sup> 中国石油大学(华东)重质油国家重点实验室和生物工程与技术中心, 青岛 266580;<sup>2)</sup> 山东省出入境检验检疫局化工矿物测试所, 青岛 266500)

**摘要** 核仁是细胞内重要的亚核结构, 其在恶性病的演变过程中扮演重要角色, 是病理学家诊断癌症的重要指标. 尽管核仁如此关键, 但到目前为止, 核仁的荧光探针寥寥无几. 本文以水杨酸和1,8-二氨基萘为反应物, 通过微波消解法合成了一种新型荧光碳纳米颗粒(FCNs), 采用透射电子显微镜、动态光散射仪、傅里叶红外光谱仪、紫外分光光度计、荧光光谱仪等对其物理、化学、光学性质进行了表征、分析. 借助激光扫描共聚焦等技术对FCNs的细胞摄取机制及分布进行了探究. 实验结果表明, 所合成碳纳米颗粒尺寸均匀, 最佳激发波长在348 nm, 对应的最大发射峰为432 nm, 荧光量子产率为17.8%, 荧光寿命为1.13 ns, 其表面含有丰富的氨基和羟基, 光稳定性强且毒性极低, 可实现对细胞核仁染色, 并且随着共孵育时间的延长, 进入细胞的量越多, 靶向核仁更明显. 此外, 经过对FCNs细胞摄取路径的考察, 发现FCNs是通过小窝介导的路径被内吞. 该研究为碳基纳米材料在亚细胞器靶向成像的应用方面提供了有力的工具和新思路.

**关键词** 碳基纳米材料, 荧光性能, 核仁靶向

**中图分类号** Q6

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0402

荧光标记是生物医学领域中举足轻重的技术, 例如在生物成像、生物传感、药物递送和光动力疗法等研究过程中, 均需要对研究目标进行荧光标记. 为了实现高效、准确的荧光标记, 发展可靠、耐用的荧光探针极其关键. 荧光探针的性质直接决定了生物成像的成功与否. 当前用于荧光标记的探针主要包括荧光蛋白、有机荧光染料、半导体量子点等<sup>[1]</sup>. 其中荧光蛋白虽然特异性好, 但是需要构建带有荧光蛋白的质粒, 操作过程复杂、繁琐, 且荧光蛋白本身光稳定性差. 有机荧光染料通常合成成本低、尺寸小、种类多, 但光稳定性差、不耐漂白. 半导体量子点(QDs)亮度高, 光稳定性好, 但是其中的重金属(如镉、铅和汞)细胞毒性大. 即使它们的表面被包裹, 在成像分析过程中仍存在于细胞, 会对细胞造成损害, 这一缺点大大限制了QDs在细胞方面的应用<sup>[2-3]</sup>. 为了克服上述问题, 科学家开发出了具有更好的光学和生物学特性的碳点(CDs), 作为新型荧光材料用于活细胞的生物成像. 与常规的有机荧光染料及无机半导体量子点

相比, CDs在耐光漂白、化学惰性、表面功能化等方面表现出优异的特性<sup>[3]</sup>. 此外, CDs荧光碳纳米材料因其主要组成元素是碳、氢、氧、氮, 表现出很低的细胞毒性<sup>[4-6]</sup>. 由于上述诸多优点, CDs被广泛应用于不同学科, 包括光催化反应、化学和生物传感、药物基因传递系统、体外和体内生物成像<sup>[7-13]</sup>. Li等<sup>[14]</sup>通过一步电化学方法, 以抗坏血酸水溶液直接合成了可用于细胞成像的多功能碳点. 康玉等<sup>[15]</sup>以蔗糖、L-半胱氨酸为原料制备出了可应用于细胞内Pb<sup>2+</sup>传感的绿色荧光碳点. 据报道, 碳点可以扩散到整个细胞中, 但并没有在细胞器靶向积累<sup>[5]</sup>. 尽管CDs的研究已经取得了长足进步, 但亚细胞器的靶向标记仍然是一个挑战, 碳点

\* 国家自然科学基金(05E09040310, 21874154, 42061134020), 中央高校基础科研业务费专项基金(18CX02126A)和青岛海关研究项目(QK202035)资助.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0532-86981135, E-mail: fhuang@upc.edu.cn

收稿日期: 2020-11-09, 接受日期: 2021-02-17

标记亚细胞结构的能力尚待探索.

核仁是细胞内重要的亚核结构. 它的形状、大小和数量在恶性肿瘤的演变过程中会发生变化, 是外科病理学家诊断癌症的依据. 为了实现核仁成像, 一些核仁染色荧光团在科研工作者的努力下逐渐被报道出来. 比如, 含有铈、钕等的金属配合物<sup>[16-18]</sup>, 小分子有机探针<sup>[12, 19-20]</sup>, 配体修饰的量子点等<sup>[21]</sup>. 然而, 这些核仁染色探针一般需要多步合成, 易被光漂白, 且细胞毒性较强. 因此, 我们迫切希望发展出可用于核仁染色的新型碳纳米荧光团. 我们课题组研究报道了一种可选择性点亮活细胞核仁的nGQD石墨烯碳点<sup>[4]</sup>. 这种碳点是在以炭黑合成cGQD的基础上, 再做修饰而得到的, 过程相对复杂, 且用于核仁染色碳点的研究报道仍处于初步发展阶段. 所以, 这里我们采用微波消解系统成功地一步合成出一种荧光碳纳米颗粒(FCNs), 表征了其物理、化学、光学性质, 并实现了其对细胞核仁的靶向染色.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

1,8-二氨基萘(98%)和水杨酸(99.5%)购自上海麦克林试剂公司. 硫酸奎宁(BR)、无水乙醇和其他试剂购买于阿拉丁试剂有限公司. 细胞培养使用的高糖培养基DMEM和胎牛血清购买于美国生命技术公司. 细胞成像所用的八孔池、96孔板购买于Thermo Fisher(美国). 实验所用超纯水均

经过Millipore超纯水系统处理, 可直接使用. 本文使用的人宫颈癌HeLa细胞购自中国细胞库, 并在本实验室专业细胞培养环境下传代培养.

微波消解器, 美国CEM公司; ZEN3600动态光纳米粒度仪, 英国Malvern Instruments公司; Millipore超滤管, 上海百研生物科技有限公司; JEM-2100透射电子显微镜, Nicolet 6700傅里叶红外光谱, 美国Thermo Fisher公司; Shimadzu UV-2450紫外可见分光光度计, 岛津公司; Horiba FluoroMax-4荧光光谱仪, 美国赛默飞公司; FS5荧光光谱仪, 爱丁堡仪器公司; Nano ZS Zetasizer激光纳米粒度仪, 马尔文仪器有限公司; HERA细胞恒温培养箱, 美国Thermo Fisher公司; Nikon A1共聚焦荧光显微镜, 尼康公司.

### 1.2 合成过程

利用自下而上法, 以水杨酸和1,8-二氨基萘为反应物, 分别称取0.14 g和0.47 g, 将其溶于10 ml无水乙醇中, 然后转移至微波消解装置的反应器中, 发生氨基和羧基的脱水缩合反应而合成. 设定为功率800 W, 反应温度200°C, 反应器温度会迅速升高, 并保持反应1 h. 反应结束后, 关闭仪器, 待温度自然冷却, 低于80°C时, 将样品从反应容器中取出. 图1为微波消解合成碳纳米颗粒的示意图. 最后, 采用0.22 μm的微孔过滤膜过滤所得到的溶液. 将得到的碳纳米颗粒溶液透析24 h(透析袋截留分子质量为500 u), 收集透析袋的内液并干燥, 待用.

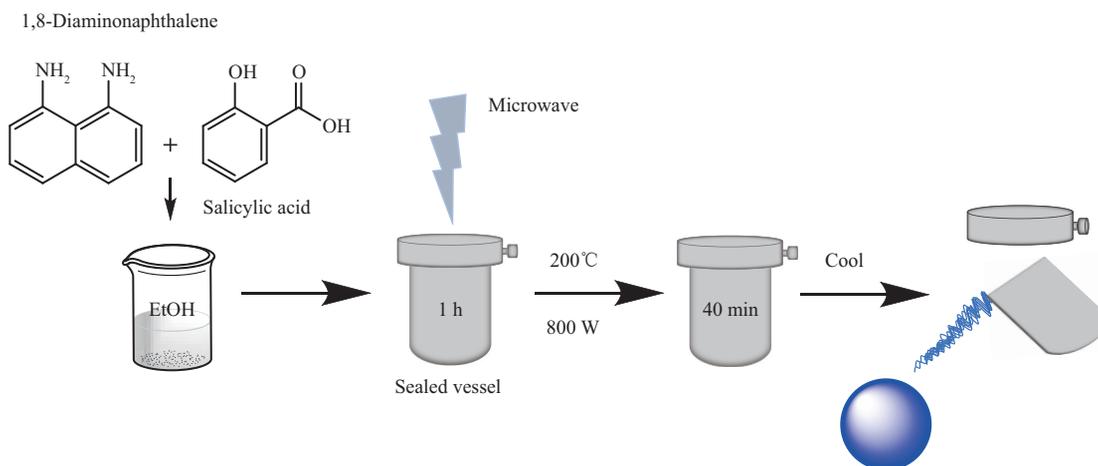


Fig. 1 Schematic diagram for synthesizing FCNs via microwave-assisted heating

### 1.3 性能表征

采用透射电子显微镜 (TEM)、动态光散射仪 (DLS) 对碳纳米颗粒的形貌、尺寸、粒度进行表征. 使用 UV-2450 分光光度计, 在 200~800 nm 波长范围内测得其紫外可见 (UV-Vis) 吸收光谱. 以 4 nm 为间隔, 在激发波长 300~600 nm、发射波长 400~700 nm, 测定碳纳米颗粒的三维荧光光谱. 利用 FS5 荧光光谱仪, 发射狭缝宽度为 0.02 nm, 时间相关单光子计数 (TCSPC) 技术采集其荧光寿命信息.

### 1.4 量子产率和测定

荧光量子产率和荧光寿命是荧光材料的重要特征指标. 荧光量子产率是荧光材料在吸收光后所发射出荧光光子数与所吸收激发光光子数之间的比值. 本文荧光量子产率的测定、计算方法选择参比法. 即, 先采用紫外可见分光光度计测量样品在某激发波长处的吸光度, 再测得该样品在固定激发波长下的荧光发射光谱图. 经计算得到荧光积分面积, 并按照以下公式 (1) 进行计算.

$$Q = Q_R \times \frac{I}{I_R} \times \frac{A}{A_R} \times \frac{n}{n_R^2} \quad (1)$$

其中,  $Q$  是荧光量子产率 (%);  $I$  为待测物的荧光积分面积;  $A$  是目标待测样品的吸光度;  $n$  是目标待测样品溶剂的折射率;  $Q_R$  是参照物硫酸奎宁 (0.1 mol/L  $H_2SO_4$ , 22°C) 的量子产率, 已知其量子产率是 58%;  $I_R$  是硫酸奎宁的荧光积分面积;  $A_R$  是参照物硫酸奎宁的吸光度;  $n_R$  是参照物溶剂的折射率.

### 1.5 荧光寿命测定

荧光寿命指激发光切断后, 荧光强度衰减至原荧光强度  $1/e$  所经历的时间. 它体现的是荧光分子在 S1 激发态的平均寿命. 这里我们利用 FS5 荧光光谱仪, 发射狭缝宽度为 0.02 nm, 时间相关单光子计数 (TCSPC) 技术进行数据采集, 进而获得、分析荧光寿命信息.

### 1.6 耐光漂白能力测定

将同一个 FCNs 溶液放置在紫外灯下, 分别照射 10、20、30、40 min, 然后测定、对比其在 348 nm 激发波长下, 432 nm 发射处的荧光强度.

### 1.7 细胞毒性测试

采用 MTT (3-(4,5)-dimethylthiazolium (-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazolium bromide) 实验评估、测试该碳纳米颗粒的细胞毒性. 首先, 将正常培养的 HeLa 细胞, 以  $2 \times 10^4$ /孔的密度, 接种在含 10% 胎牛血清

的 DMEM 培养基的 96 孔板中. 然后将铺好细胞的 96 孔板放置在 5%  $CO_2$  培养箱中, 于 37°C 孵育 24 h. 在加药前, 使用无菌 PBS 缓冲液清洗细胞, 然后加入 100  $\mu$ l 含有不同浓度 FCNs 的 DMEM 培养基, 孵育 24 h. 以不加 FCNs 的细胞孔作为空白对照. 之后, 向每个孔中加入 20  $\mu$ l MTT 溶液 (5 g/L), 并将孔板在 37°C 下进一步孵育 4 h. 孵育后, 加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砷溶解沉淀的甲瓩. 最后, 使用酶标仪测量 570 nm 处的吸光度, 以处理孔和空白孔的  $A_{570}$  的比值计算细胞存活率.

### 1.8 细胞成像

对于活细胞成像, 首先将  $5 \times 10^3$  个细胞接种到每个八孔池中, 培养 24 h. 然后, 吸弃培养基. 利用无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液清洗细胞 3 次, 再加入 100 mg/L FCNs 溶液, 根据实验需求, 共同培养 1、3、5 h. 同样地吸弃培养基, 并用无菌 PBS 溶液清洗细胞 3 次, 最后加入 PBS 溶液, 利用共聚焦显微镜对细胞进行明场成像和荧光成像. 荧光成像的激发光波长为 405 nm, 发射滤光片为长度 420 nm.

### 1.9 细胞切片透射电镜

在直径 10 cm 的培养皿中培养细胞至长满且生长状态良好. 用无血清 DMEM 培养液清洗细胞 1 次, 然后向其中加入 FCNs 溶液, 共孵育 5 h. 吸弃培养液, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 然后将细胞用细胞刮刮下, 在离心管中低速离心数分钟, 吸弃上清液, 保留沉淀物 (沉淀物体积不小于大米粒大小), 沿管壁小心加入 2.5% 戊二醛固定液, 于 4°C 冰箱内固定过夜. 用 0.1 mol/L PBS 溶液清洗细胞 3 次, 每次 15 min, 然后 1% 锇酸固定液固定 1.5 h. 固定后, 同样用 0.1 mol/L PBS 溶液清洗细胞 3 次, 每次 15 min. 接下来, 经 50%、70%、90%、100% 丙酮逐级脱水 (每级 15 min). 用 Epon812 树脂包埋. 先用 2:1 的纯丙酮与包埋液室温条件下包埋 0.5 h, 再用 1:2 的纯丙酮与包埋液 37°C 条件下, 包埋 1.5 h, 最后使用纯包埋液 37°C 包埋 3 h. 之后, 进行固化, 分别在 37、45、60°C 条件下固化 1.5 h. 最后, 使用 Reichert-Jung ULTRACUT E 型超薄切片 (奥地利), 70 nm 切片, 铜网捞片, 再用透射电子显微镜 (JEM1200, 日本) 观察拍照.

## 2 结 果

### 2.1 TEM、DLS 分析

纳米材料的形貌和尺寸是材料重要的参数, 它在很大程度上决定了生物系统如何与材料相互作用

用, 比如直接影响材料被细胞摄取的方式、运输过程等. 为此, 我们利用TEM和DLS表征了所合成FCNs的形貌和尺寸、粒度及带电性. TEM图直观地表明(图2a), 该碳纳米颗粒呈现球形形貌, 分散非常均匀, 无团聚现象, 其尺寸在38 nm. 图2b, c分别是采用DLS得到的颗粒尺寸分布图及Zeta电位统计图. 经过分析, 可知其分散在水中的尺寸大约45 nm. 由于在合成的过程中, 水杨酸和1,8-二氨基萘摩尔比为1:3, 含有氨基的1,8-二氨基萘过量, 所以FCNs纳米颗粒表面带电, 而且为正电

荷, Zeta电位为50 mV. 利用傅里叶变换红外(FTIR)对FCNs表面的官能团进行分析、探索(图2d).  $3425\text{ cm}^{-1}$ 和 $3343\text{ cm}^{-1}$ 处的峰值分别归因于O—H和N—H的伸缩振动. 该结果表明在碳点中存在含氧和氨基的官能团.  $1665\text{ cm}^{-1}$ 和 $1498\text{ cm}^{-1}$ 处是C=O伸缩振动特征峰, 表明碳点中存在前体的主要官能团.  $1577\text{ cm}^{-1}$ 处的特征吸收峰对应的是C=C的伸缩振动.  $1411\text{ cm}^{-1}$ 处的峰源自C—N的伸缩振动, C—O的伸缩振动出现在 $1221\text{ cm}^{-1}$ 处, 而—CH的特征峰是 $1157\text{ cm}^{-1}$ 和 $753\text{ cm}^{-1}$ 处.

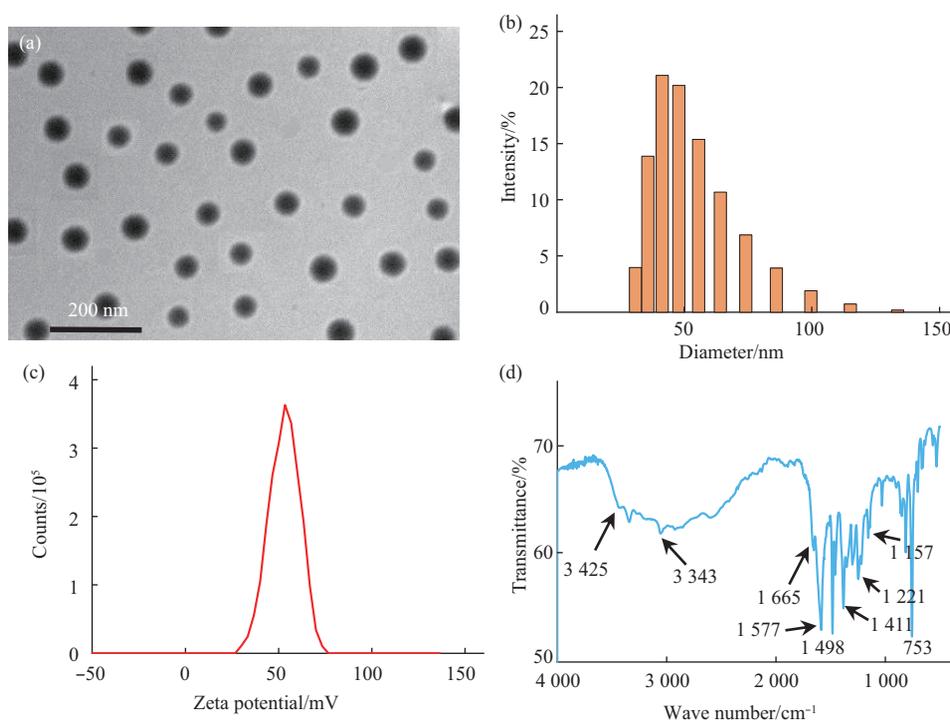


Fig. 2 Characterization of FCNs

(a) TEM image of FCNs; (b) Particle size distribution determined by DLS; (c) Zeta potential of FCN with DLS; (d) FT-IR spectra of FCN.

## 2.2 光学性能分析

图3a描绘了FCNs的紫外可见吸收光谱. 由图可知, 其在230 nm、280 nm、348 nm处分别有三个吸收峰. 其中230 nm处很强的吸收峰, 归因于芳香碳上 $sp^2$ 杂化的 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁; 280 nm处源于FCN表面的C=O键发生 $n-\pi^*$ 跃迁; 348 nm处是由于羰基键的 $n-\pi^*$ 跃迁所造成. 我们测量了FCNs在各种激发波长下(y轴), 对应的发射波长(x轴)的发射强度, 然后根据强度的强弱, 得到FCN的三维荧光光谱(图3b). 由图可知, 其激发波长在310~380 nm, 且只有一个主激发中心和一个发射中心. 为了详细研究其荧光特性, 我们以12 nm间隔, 从300 nm开始激发FCNs(图3c). 当其激发

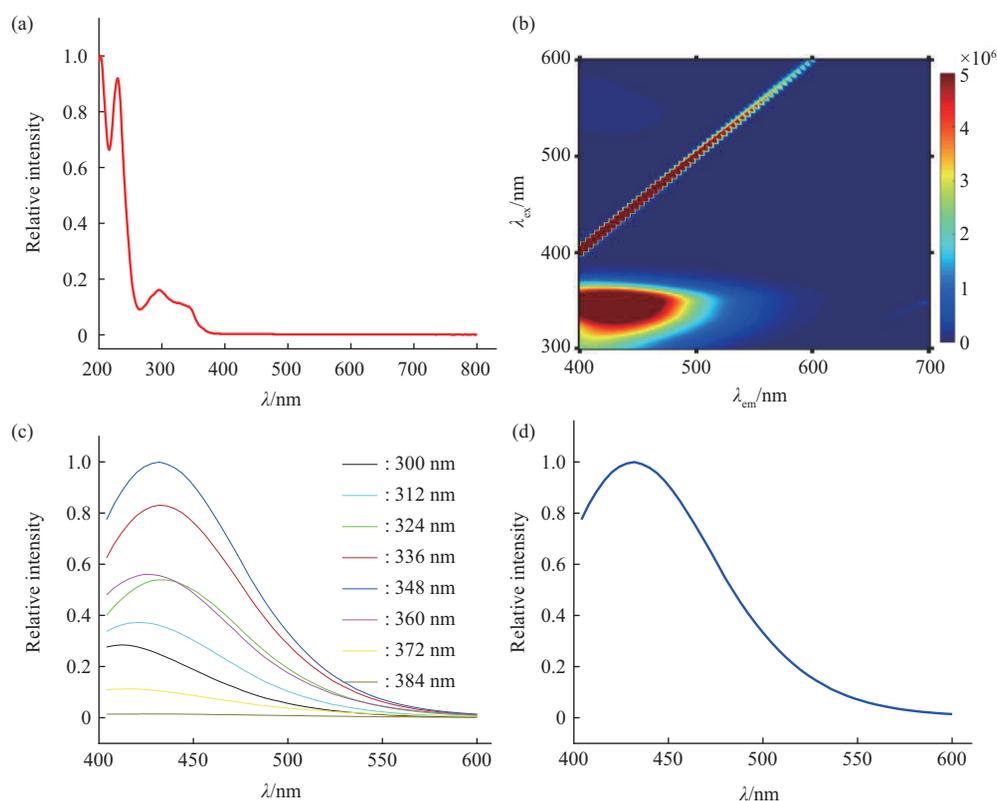
波长在348 nm时, 其最大发射峰在432 nm处(图3d). 以0.1 mol/L  $H_2SO_4$  硫酸奎宁的量子产率为参考<sup>[22]</sup>, 经测定和计算得其量子产率为17.8%.

## 2.3 荧光寿命和光稳定性

光致发光衰减光谱如图4a所示. 该荧光寿命曲线是根据以下拟合公式(2)多指数函数拟合所得:

$$R(t) = A_1 e^{-\left(\frac{t}{\tau_1}\right)} + A_2 e^{-\left(\frac{t}{\tau_2}\right)} + A_3 e^{-\left(\frac{t}{\tau_3}\right)} + A_4 e^{-\left(\frac{t}{\tau_4}\right)} \quad (2)$$

其中 $R$ 为荧光强度;  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$ 、 $A_4$ 为常数;  $\tau_1$ 、 $\tau_2$ 、 $\tau_3$ 、 $\tau_4$ 为各指数成分荧光寿命;  $t$ 为时间. 经拟合得 $\tau_1$ 为0.04 ns (13.7%),  $\tau_2$ 为0.54 ns



**Fig. 3** Fluorescence characterization of FCNs

(a) UV-Vis absorption; (b) 3D fluorescence spectra; (c) Fluorescence spectrum under different excitations; (d) Fluorescence spectrum under excitation of 348 nm.

(25.9%),  $\tau_3$  为 1.21 ns (51.4%),  $\tau_4$  为 3.95 ns (9.1%), 计算得其平均寿命 1.13 ns.

图 4b 显示了在紫外灯照射不同时长下 FCNs 的荧光强度变化. 随着照射时间的延长, 碳纳米颗粒的信号强度逐渐下降, 在 10 min 内下降了 5%, 在 20 min 时下降了 4%. 0.5 h 后, 信号强度共下降了 12%, 而相较于前 0.5 h, 信号强度在 40 min 时仅下降了 1%. 由此可见, FCNs 的光漂白速率是逐渐减弱的, 且即使照射 40 min, FCNs 的信号强度仍然高达 87%.

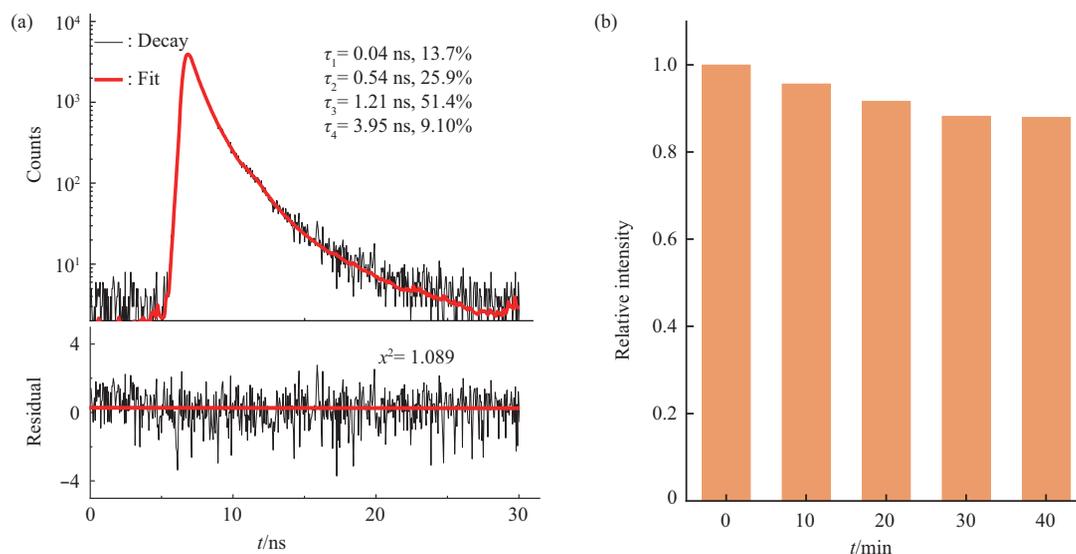
#### 2.4 细胞毒性

为了证实 FCNs 对细胞的毒性, 进而判定其在细胞成像方面的应用潜力, 我们利用 MTT 实验对其毒性进行评估. 当加药浓度为 25 mg/L, 培育 12 h 后, 共聚焦显微镜拍摄的明场细胞生长状态良好 (图 5a). 当加入不同浓度 FCNs, 培育 24 h 后, 细胞的存活率如图 5b 所示. 由图可知, 即使在浓度高达 200 mg/L 条件下, 细胞的存活率仍然高达 87%.

#### 2.5 细胞成像

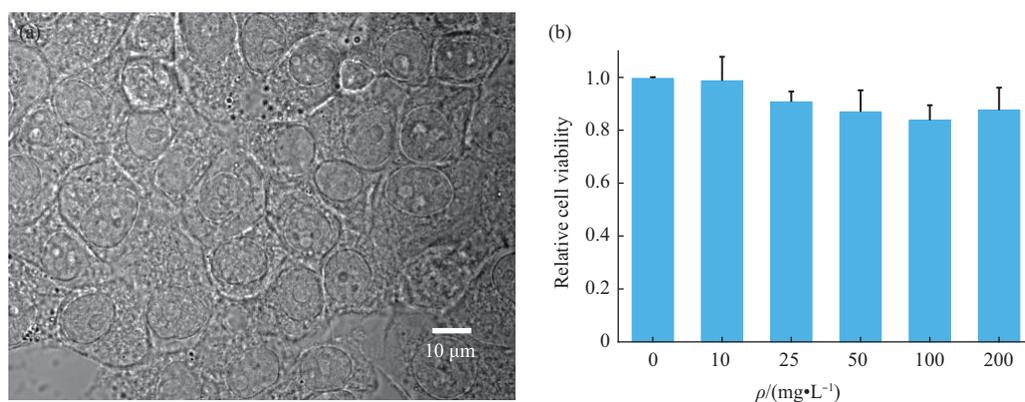
为了确认 FCNs 在生物成像中的应用潜力, 我们进行了 FCNs 染色 HeLa 细胞的荧光成像. 将 FCNs 加入到细胞培养基中, 并在 37 °C 下孵育 5 h 后, 通过共聚焦显微镜观察 FCNs 染色的细胞. 我们发现细胞生长状态良好 (图 6a). 在对应的荧光通道看到 FCNs 集中在了细胞质区域和细胞核仁位置. 经过将细胞明场区域 (图 6a) 和荧光区域 (图 6b) 融合后 (图 6c), 可以看出 FCNs 对细胞膜具备非常有效的穿透能力, 并可以实现对核仁的有效染色. 与此同时, 我们制备细胞切片, 利用 TEM 对其靶向核仁的现象进一步确证 (图 6d). 相较于细胞核与细胞质区域 FCNs 在细胞核仁的地方确有明显聚集现象, 这也更进一步佐证了 FCNs 具备靶向细胞核仁的功能.

此外, 我们对 FCNs 在细胞的停留时间进行了初步探索. 将生长状态良好的细胞与 FCNs 共孵育不同的时间 (图 6e-h), 在不加 FCNs 的情况下, 只观察到了细胞的自荧光 (图 6e), 随着共孵育时间



**Fig. 4 Characterization of fluorescent lifetime and photostability**

(a) Time-resolved photoluminescence decay of FCNs. The red line is a bi-exponential fit of the experimental data and the residuals of fitting. (b) Photostability investigation of FCNs exposure for 40 min.



**Fig. 5 Cytotoxicity assessment of FCNs**

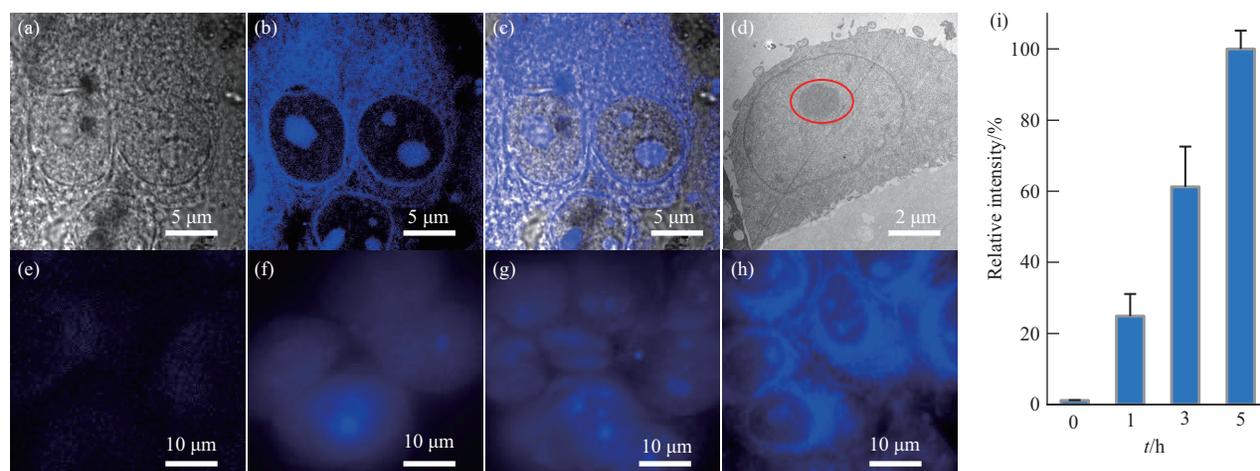
(a) Bright field cell image (incubation with 25 mg/L for 12 h). (b) Cytotoxicity assessment of FCNs on HeLa cell *in vitro* by MTT assays.

的延长, 发现FCNs进入细胞的量增加, 并在核仁部位更加明显地聚集. 通过对不同条件下核仁区域的荧光强度统计分析 (图6i), 孵育5 h的核仁的信号强度是细胞自荧光的35倍, 是孵育1 h的4倍.

## 2.6 细胞摄取途径研究

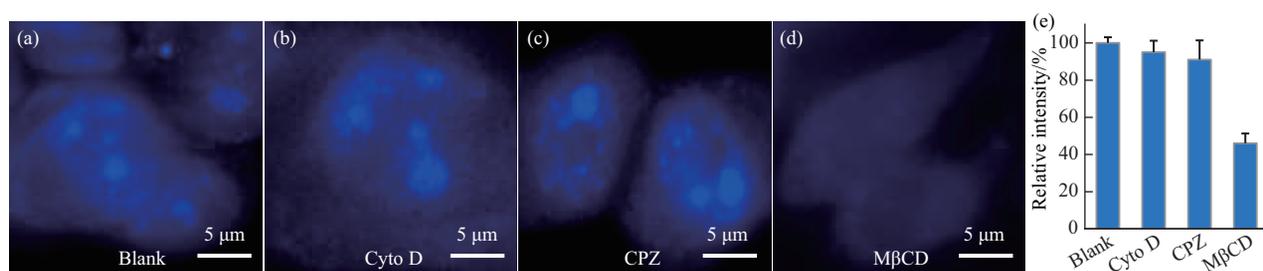
为了考察在细胞正常生长的情况下FCNs进入细胞的途径, 我们利用不同内吞途径抑制剂, 如细胞松弛素D (cytochalasin, Cyto D)、甲基-β-环糊精 (methyl-β-cyclodextran, MβCD) 及氯丙嗪 (chlorpromazine, CPZ) 等药物对细胞进行预处理, 浓度依次分别为5 μmol/L、2 mmol/L、2.5 μmol/L. 首先, 在八孔池中铺上细胞, 待其生长

24 h后, 将抑制剂加入, 先与细胞预处理1 h, 再加入FCNs共孵育5 h. 然后, 利用PBS清洗细胞3遍, 多聚甲醛固定细胞并清洗后, 利用激光共聚焦荧光显微成像系统对其进行成像、分析 (图7). 经过CytoD (图7b) 与CPZ (图7c) 的细胞, 其荧光强度与对照组 (图7a) 没有明显的差异, 而经MβCD (图7d) 处理的细胞组的荧光强度大约是对照组的一半 (图7e), 存在显著的差异. 综上所述表明, FCNs进入细胞的内吞途径与巨胞饮及网格蛋白介导无关, 而主要是以小窝蛋白介导的内吞作用进入细胞.



**Fig. 6 The confocal fluorescent and TEM images of cells incubated with FCNs**

Bright field image (a), fluorescence image (b), merge of image (c), TEM image (d), images of cells incubated with FCNs for 0 h (e), 1 h (f), 3 h (g), 5 h (h), and the intensity statistics of nucleolus incubated with different time (i) were shown.



**Fig. 7 The confocal fluorescent images of HeLa cells treated with different inhibitors**

(a) Without treatment; (b) Cytochalasin D; (c) Chlorpromazine; (d) Methyl- $\beta$ -cyclodextran; (e) Intensity statistics of nucleolus treated with different inhibitors.

### 3 讨 论

生物过程的研究往往需要对细胞器进行染色。尽管已经有多种商品化的亚细胞靶向染料，但是可用于细胞核仁染色成像的染料依然很少<sup>[23]</sup>。核仁是细胞内重要的亚核结构，它的形状、大小和数量在恶性病的演变过程中会发生变化，是病理学家诊断癌症的依据<sup>[24]</sup>。为了实现核仁成像，一些核仁染色荧光团在科研工作者的努力下逐渐被报道出来。比如，含有镉、钕等的金属配合物<sup>[16-18]</sup>、小分子有机探针<sup>[12, 19-20]</sup>、配体修饰的量子点等<sup>[21]</sup>。然而，这些核仁染色探针一般需要多步合成，易被光漂白，且细胞毒性较强。为此，本论文以1,8-二氨基萘和水杨酸为反应原料，发展出一种新型的核仁碳纳米颗粒荧光探针，以弥补以上探针的缺点。碳

点的合成方法众多，比如激光烧蚀法、电化学氧化法、溶剂热法和微波合成法等。其中微波合成法是公认的操作简单、合成快速、成本低廉的方法<sup>[9]</sup>。因此，我们选用了微波消解合成的方法合成了FCNs，并采用了TEM、DLS、傅里叶红外光谱对FCNs的尺寸、形貌及表面的基团进行了表征。实验结果表明其呈现球形形貌，尺寸在38 nm左右，带正电，且表面含氨基、羟基，水溶性较好。该FCNs的尺寸相较于已报道的碳点，尺寸偏大，但其分散性高，并未发生聚集现象，是很有潜力的单分子荧光成像探针。经过对其荧光性质的考察，我们发现其最大吸收在348 nm，最大发射在432 nm，且只有一个发射中心。通过采用参比法对其荧光量子产率测定，得其量子产率为17.8%。光稳定性是探针重要的指标。当我们把FCNs用紫外灯照射不

同时后, 对比其信号强度变化, 可知FCNs具有良好的耐漂白性. 与Reineck等<sup>[25]</sup>报道的荧光染料、金纳米簇相比较 (AF647在1 min内几乎被完全漂白; 金纳米簇的信号强度在7 min内降低至10%), FCNs是极耐漂白的. 据文献报道, 碳点的抗漂白是取决于碳点颗粒的分散性和其分子表面结构的稳定性<sup>[26]</sup>. 由此更进一步说明我们合成的FCNs具有良好的分散性及表面结构的稳定性, 更表现出其格外优异的耐光漂白特性.

探针的毒性大小是探针能否用于细胞成像的前提条件. MTT实验是常用的评估细胞毒性的测试方法, 经过对比, 我们发现即使FCNs浓度高达200 mg/L, 作用时间长达24 h, 细胞的存活率只降低了13%. 与既往报道的碳点相比 (细胞的存活率低于60%), 在同样的加药浓度、共同孵育24 h后, FCNs的细胞毒性减小了约30%<sup>[27-28]</sup>. 与类似实验条件下CdSe/CdS (人表皮角质形成细胞的存活率75%)<sup>[29]</sup>和CdSe/ZnS量子点 (猪肾近端细胞的存活率约50%)<sup>[30]</sup>相比<sup>[30]</sup>, FCNs对细胞的毒性更低. 此外, 体外评估所使用的碳纳米颗粒浓度很大程度上高于实际应用 (如活细胞的光学成像) 所需的浓度和孵育时间. 因此, 该碳纳米颗粒对细胞几乎无毒, 满足了用于活细胞成像的必要前提条件. 细胞成像实验结果表明, FCNs对细胞膜具备非常有效的穿透能力. 与当前报道的大多数碳点相似<sup>[31-32]</sup>, 此FCNs同样可以用于细胞染色, 但是不同的是其具备特异性点亮细胞核仁的特点. 由于反应过程中, 氨基是过量的, 由图1c的电位图我们表征了FCNs的带电性, 并得知其带正电, 而细胞核仁带负电, 故该FCN染核仁的可归因于静电吸附, 这一结果与Wang等<sup>[33]</sup>报道的带正电荷的壳聚糖纳米颗粒 (GCC) 对核仁染色结果相符合. 但是, 相较而言, 该碳纳米颗粒的量子产率、光稳定性及细胞毒性均优于GCC, 且细胞毒性低. 此外, 该碳纳米颗粒的特点及应用也与本课题组发展的靶向核仁的nGQD相类似, 同样是通过静电吸附作用聚集并点亮核仁. 随着共孵育时间的延长, FCNs进入细胞的量越大, 在核仁的部位聚集越明显. 该FCNs靶向核仁成像结果与目前市场上的商品细胞核仁染料SYTO RNA-Select dye的结果一致<sup>[4]</sup>. 但此材料易于合成, 尺寸较大, 更具备将其应用于靶向核仁载药研究的潜力.

纳米材料进入细胞的方式是实现其生物学方面应用的基础, 这将为相关药物的研发、作用靶点

的研究提供有效的依据, 也将为其在生物行为研究领域中的潜在应用提供方向. 据文献报道, 纳米颗粒进入细胞主要有以下3种方式<sup>[34]</sup>. a. 巨胞饮作用, 即通过细胞膜突出的伪足和褶皱将纳米材料包裹起来, 形成吞噬体, 然后与溶酶体融合进入细胞; b. 小窝蛋白介导的胞吞路径, 细胞膜内陷后形成陷窝小泡, 小窝蛋白存在于其表面; c. 网格蛋白介导的胞吞作用. 因此, 选择了3种路径的抑制剂, 包括Cyto D、M $\beta$ CD及CPZ来考察FCNs进入细胞的路径. 其中Cyto D通过抑制F-肌动蛋白的聚合, 来抑制巨胞饮作用; M $\beta$ CD可以用来消除细胞膜中的胆固醇, 用来抑制小窝蛋白介导的内吞作用; CPZ因为可以将细胞膜上的网格蛋白及其连接蛋白转移到内涵体上, 抑制网格蛋白包裹的内吞囊泡的形成, 进而抑制网格蛋白介导的胞吞作用<sup>[35]</sup>. 实验结果表明, FCNs进入细胞的内吞途径与巨胞饮及网格蛋白介导无关, 而主要是以小窝蛋白介导的内吞作用进入细胞. 这结果与诸多文献报道的碳点进入细胞的路径的结果相一致<sup>[34]</sup>.

综上, 本文以微波消解法一步合成了一种尺寸均匀、分散性好、光稳定性高、毒性极低的新型荧光碳纳米颗粒探针FCNs, 并实现了该探针对细胞核仁靶向. 通过对细胞摄取FCNs路径的考察, 发现FCNs是通过小窝介导的路径被内吞. 本研究发展出了一种新型碳纳米材料荧光探针, 为碳纳米材料在靶向成像和生化分析检测中的应用提供了新思路.

## 参考文献

- [1] Terai T, Nagano T. Fluorescent probes for bioimaging applications. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, **12**(5):515-521
- [2] Wang X, Sun X, He H, *et al.* A two-component active targeting theranostic agent based on graphene quantum dots. *J Mater Chem B*, 2015, **3**(17):3583-3590
- [3] Zuo P, Lu X, Sun Z, *et al.* A review on syntheses, properties, characterization and bioanalytical applications of fluorescent carbon dots. *Microchim Acta*, 2016, **183**(2):519-542
- [4] Wang X, Wang Y, He H, *et al.* Steering graphene quantum dots in living cells: lighting up the nucleolus. *J Mater Chem B*, 2016, **4**(4):779-784
- [5] 姜丽, 梁峻毅, 王玉彤, 等. 氮掺杂碳量子点的制备及其在细胞成像与邻硝基苯酚检测中的应用. *分析测试学报*, 2020, **39**(9):1065-1072
- [6] Jiang L, Liang J Y, Wang Y T, *et al.* *Journal of Instrumental Analysis*, 2020, **39**(9):1065-1072
- [6] 李志平, 张俊莉, 双少敏, 等. 叶酸修饰碳点的制备及其靶向细胞成像应用. *山西大学学报(自然科学版)*, 2021, **44**(3):562-570

- Li Z P, Zhang J L, Shuang S M, *et al.* Journal of Shanxi University (Natural Science Edition), 2021, **44**(3):562-570
- [7] 洪碧云, 唐丽荣, 陈伟香, 等. 碱木质素/聚乙烯亚胺碳点的制备及其对pH敏感性. 化工进展, 2019, **38**(4):1970-1977
- Hong B Y, Tang L R, Chen W X, *et al.* Chemical Industry and Engineering Progress, 2019, **38**(4):1970-1977
- [8] 田振, 许戈文, 黄毅萍, 等. 微波合成含氮掺杂碳量子点改性水性聚氨酯的制备与性能. 化工进展, 2020, **39**(10):4127-4133
- Tian Z, Xu G W, Huang Y P, *et al.* Chemical Industry and Engineering Progress, 2020, **39**(10):4127-4133
- [9] He H, Wang X, Feng Z, *et al.* Rapid microwave-assisted synthesis of ultra-bright fluorescent carbon dots for live cell staining, cell-specific targeting and *in vivo* imaging. J Mater Chem B, 2015, **3**(24):4786-4789
- [10] Ehtesabi H, Hallaji Z, Nobar S N, *et al.* Carbon dots with pH-responsive fluorescence: a review on synthesis and cell biological applications. Microchim Acta, 2020, **187**(2):150
- [11] Yuan F, Wang Y K, Sharma G, *et al.* Bright high-colour-purity deep-blue carbon dot light-emitting diodes *via* efficient edge amination. Nat Photonics, 2020, **14**(3):171-176
- [12] Ma Y, Gao W, Zhu L, *et al.* A ratiometric fluorescent probe for reversible monitoring of endogenous SO<sub>2</sub>/formaldehyde in cytoplasm and nucleoli regions and its applications in living mice. Analyst, 2020, **145**(5):1865-1870
- [13] Mura S, Ludmerczki R, Stagi L, *et al.* Integrating sol-gel and carbon dots chemistry for the fabrication of fluorescent hybrid organic-inorganic films. Sci Rep, 2020, **10**(1):4770
- [14] Li H, Zhang M, Song Y, *et al.* Multifunctional carbon dot for lifetime thermal sensing, nucleolus imaging and antialgal activity. J Mater Chem B, 2018, **6**(36):5708-5717
- [15] 康玉, 任国栋, 侯笑雨, 等. 发绿色荧光碳点的制备并用于Pb<sup>2+</sup>的灵敏检测和细胞成像. 化学研究与应用, 2020, **32**(1):32-39
- Kang Y, Ren G D, Hou X Y, *et al.* Chemical Research and Application, 2020, **32**(1):32-39
- [16] New E J, Congreve A, Parker D. Definition of the uptake mechanism and sub-cellular localisation profile of emissive lanthanide complexes as cellular optical probes. Chem Sci, 2010, **1**(1):111-118
- [17] Puckett C A, Barton J K. Fluorescein redirects a ruthenium-octaarginine conjugate to the nucleus. J Am Chem Soc, 2009, **131**(25):8738-8739
- [18] Zhang K Y, Liu H, Tang M, *et al.* Dual-emissive cyclometalated iridium (III) polypyridine complexes as ratiometric biological probes and organelle-selective bioimaging reagents. Inorg Chem, 2015, **54**(13):6582-6593
- [19] Song G, Sun Y, Liu Y, *et al.* Low molecular weight fluorescent probes with good photostability for imaging RNA-rich nucleolus and RNA in cytoplasm in living cells. Biomaterials, 2014, **35**(7):2103-2112
- [20] Zhao L, He X, Li D, *et al.* A novel fluorescent probe for the localization of nucleoli developed *via* a chain reaction of endogenous cysteine in cells. J Mater Chem B, 2020, **8**(34):7652-7658
- [21] Shen R, Shen X, Zhang Z, *et al.* Multifunctional conjugates to prepare nucleolar-targeting CdS quantum dots. J Am Chem Soc, 2010, **132**(25):8627-8634
- [22] Povrozin Y, Terpetschnig E. Measurement of Fluorescence Quantum Yields on ISS Instrumentation Using Vinci. Illinois: ISS Inc, 2011
- [23] Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I. To be or not to be in the nucleolus. Nat Cell Biol, 2000, **2**(6):E107-E112
- [24] Yu J, Parker D, Pal R, *et al.* A europium complex that selectively stains nucleoli of cells. J Am Chem Soc, 2006, **128**(7):2294-2299
- [25] Reineck P, Francis A, Orth A, *et al.* Brightness and photostability of emerging red and near-IR fluorescent nanomaterials for bioimaging. Adv Opt Mater, 2016, **4**(10):1549-1557
- [26] Wang W, Damm C, Walter J, *et al.* Photobleaching and stabilization of carbon nanodots produced by solvothermal synthesis. Phys Chem Chem Phys, 2016, **18**(1):466-475
- [27] Yang S, Wang X, Wang H, *et al.* Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents. J Phys Chem C, 2009, **113**(42):18110-18114
- [28] Zhang L, Xing Y, He N, *et al.* Preparation of graphene quantum dots for bioimaging application. J Nanosci Nanotechnol, 2012, **12**(3):2924-2928
- [29] Zhang L, Monteiro-Riviere N. Assessment of quantum dot penetration into intact, tape-stripped, abraded and flexed rat skin. Skin Pharmacol Physiol, 2008, **21**(3):166-180
- [30] Stern S T, Zolnik B S, Mcleland C B, *et al.* Induction of autophagy in porcine kidney cells by quantum dots: a common cellular response to nanomaterials?. Toxicol Sci, 2008, **106**(1):140-152
- [31] 杨磊, 杨志, 连锋. 碳量子点作为生物相容性发光材料在再生医学方面的应用. 材料导报, 2019, **33**(S2):1-9
- Yang L, Yang Z, Lian F. Materials Reports, 2019, **33**(S2):1-9
- [32] 李亚丽, 郭靖, 宋娟, 等. 荧光碳点探针的合成, 性质及其在生物成像中的应用. 影像科学与光化学, 2019, **37**(1):46-56
- Li Y L, Guo J, Song J, *et al.* Imaging Science and Photochemistry, 2019, **37**(1):46-56
- [33] Wang K, Yuan X, Guo Z, *et al.* Red emissive cross-linked chitosan and their nanoparticles for imaging the nucleoli of living cells. Carbohydr Polym, 2014, **102**:699-707
- [34] Cheng Y, Li C, Mu R, *et al.* Dynamically long-term imaging of cellular RNA by fluorescent carbon dots with surface isoquinoline moieties and amines. Anal Chem, 2018, **90**(19):11358-11365
- [35] Zhou N, Zhu S, Maharjan S, *et al.* Elucidating the endocytosis, intracellular trafficking, and exocytosis of carbon dots in neural cells. RSC Adv, 2014, **4**:62086-62095

## Microwave-synthesized Fluorescent Carbon Nanoparticles for Nucleolus Imaging\*

WANG Qian<sup>1)</sup>, FENG Zhen-Zhen<sup>2)</sup>, MAO Jian<sup>1)</sup>, LIU Li-Hua<sup>1)</sup>, CHEN Xiao-Liang<sup>1)</sup>,  
WEI Xiao-Yun<sup>1)</sup>, HUANG Fang<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>State Key Laboratory of Heavy Oil Processing and Center for Bioengineering and Biotechnology,  
China University of Petroleum (East China), Qingdao 266580, China;

<sup>2)</sup>Testing Institute for Chemicals & Minerals, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266500, China)

**Abstract** The nucleolus is an important subnuclear structure in the cell, which plays an important role in the evolution of malignancies and the diagnosis of cancer. Although the nucleolus is critical, so far, there are really few fluorescent probes for the nucleolus. In this paper, salicylic acid and 1,8-diaminonaphthalene were used as carbon and nitrogen sources, and a novel fluorescent carbon nanoparticles (FCNs) were synthesized by microwave digestion system. Its physical, chemical and optical properties of FCNs were characterized and analyzed by using transmission electron microscope (TEM), dynamic light scattering instrument (DLS), Fourier infrared spectrometer, ultraviolet spectrophotometer, fluorescence spectrometer, etc. The experimental results demonstrated that the synthesized carbon nanoparticles were uniform in size and rich with amino groups on surface. Its best excitation wavelength was 348 nm, the corresponding maximum emission peak was 432 nm. Its fluorescence quantum yield was 17.8% and fluorescence lifetime was 1.13 ns. Moreover, the photostability and cytotoxicity of FCNs were investigated with illumination and MTT assays. Our results suggest that FCNs exhibit to be a really photostable and low toxic probe. To confirm the potential application of this fluorescence FCNs in bioimaging, the FCNs were designed to stain human cervical cancer HeLa cells. After incubation, we found that FCNs enable the function of selectively staining the nucleolus of living cells due to its positive chargeability. Its cellular uptake mechanism and intracellular distribution in HeLa cells were explored further by using confocal laser scanning microscopy and TEM. It was interesting to observe that more FCNs entered the cell, and lighted the nucleolus more obviously with the extension of the co-incubation time. In addition, after investigating the cells' uptake path of FCNs, we found that FCNs were endocytosed *via* caveolae-mediated pathway rather than clathrin mediated pathways or macropinocytosis. Our study provided a potential probe for nucleolus and this finding is of great significance for the development of functional nanomaterials targeting subcellular organelles.

**Key words** carbon nanomaterials, fluorescence properties, nucleolar targeting

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0402

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (05E09040310, 21874154, 42061134020), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (18CX02126A) and Research Project of Qingdao Customs (QK202035).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-532-86981135, E-mail: fhuang@upc.edu.cn

Received: November 9, 2020 Accepted: February 17, 2021