



# 石墨烯量子点与体外巨噬细胞 生物相容性的研究\*

刘琦 许海燕 苏雨轩 周开红 李常艳\*\*

(内蒙古大学化学化工学院, 呼和浩特 010021)

**摘要** 目的 探讨石墨烯量子点(GQDs)的对体外RAW264.7巨噬细胞存活率、细胞凋亡及炎症因子表达的影响和细胞成像能力,为GQDs在生物医学领域的安全应用提供理论基础。方法 采用改性Hummer's法制备了氧化石墨烯。利用 $H_2O_2$ 和 $W_{18}O_{49}$ 在水热条件下产生的羟基自由基,采用自上而下的方法将氧化石墨烯切割成GQDs。利用X射线粉末衍射、X光电子能谱、透射电镜、原子力显微镜、扫描电镜和傅里叶红外变换等技术对GQDs微观结构进行详细分析。通过CCK-8、流式细胞、激光共聚焦方法和实时荧光定量PCR(RT-qPCR),评价GQDs对巨噬细胞的生物兼容性和对炎症因子表达的影响。通过CCK-8、流式细胞术和RT-qPCR,评价GQDs对巨噬细胞的生物兼容性和炎症因子的影响。激光共聚焦显示GQDs在巨噬细胞中成像情况。结果 水热条件下,以 $W_{18}O_{49}$ 为催化剂可将氧化石墨烯切割为3~5 nm蓝光GQDs,产率为43%,荧光寿命( $\tau$ )=1.67 ns。三重态碳烯自由基的Zigzag型位点和缺陷态导致GQDs表现出激发波长的依赖性,其最佳激发和发射波长分别为330 nm和400 nm。GQDs表面丰富的含氧官能团和其亲水性使其具有良好的水溶性。CCK-8和死活染色表明,GQDs具有较高的生物兼容性。RT-qPCR分析结果显示,GQDs对体外RAW264.7细胞有生长抑制作用,可刺激RAW264.7细胞提高TNF- $\alpha$ 的表达,使细胞膜破裂并产生IL-1 $\beta$ 炎症因子诱导细胞凋亡。激光共聚焦结果显示,蓝光GQDs具有一定的体外细胞成像能力。结论 石墨烯量子点的水溶性、低毒、荧光特性和炎症因子的诱导效应,为其在免疫标记和细胞成像领域的应用提供了广阔的前景。

**关键词**  $W_{18}O_{49}$ , 石墨烯量子点, RAW264.7巨噬细胞, 生物兼容性, 炎症因子

**中图分类号** Q23

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0491

与传统的有机染料和荧光蛋白等荧光标记物相比,量子点具有发光颜色可调、激发范围宽、发射光谱窄、光稳定性好和抗光漂白性等诸多优势,为生命体系的靶向示踪,高灵敏、实时、原位、特异性标记和靶向药物等研究提供了新的发展契机<sup>[1-5]</sup>。II-VI族量子点(CdSe、CdTe、PbS)和纳米酶(NiO、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)存在表面不易修饰和功能化,且毒性高的缺陷,使其在生命科学与医学领域的应用有一定的局限性。

石墨烯量子点(graphene quantum dots, GQDs)不同于其他碳材料家族(碳纳米管和石墨烯)成员。GQDs是零维石墨烯基材料。它的量子限域效应使其具有非零带隙的半导体特征。另外,量子点的尺寸效应使GQDs呈现出光学可调性,光波范围包含紫外到可见光甚至近红外。据报道,氧化、还原或调整表面官能团的浓度可以改变GQDs

的发射强度和光致发光颜色。再者,量子点的边界效应和两亲性,使GQDs拥有大的比表面积、丰富的官能团、空位缺陷和高度的分散性。这些特性使GQDs成为零维碳基材料中的超级明星。作为最丰富和最重要的一种生物元素,它独特的光学特性、高分散性、生物兼容性引起科学家们的广泛关注<sup>[6-8]</sup>。

Zhang等<sup>[9]</sup>首次将荧光石墨烯量子点成功地用于干细胞成像。Dong研究组<sup>[10]</sup>将酸性氧化得到了绿色荧光GQDs,GQDs激发波长为488 nm时,不但可用于人乳腺癌MFC-7细胞膜和细胞质的标记,还可进入到细胞核进行标记。Inazumi等<sup>[11]</sup>发

\*国家自然科学基金(22067015)和内蒙古自治区研究生精品课程建设项目(JP20231008)资助。

\*\*通讯联系人。

Tel: 0471-4995123, E-mail: celicy@imu.edu.cn

收稿日期: 2023-12-12, 接受日期: 2024-04-16

现, 胰岛素结合的 GQDs 可以对胰岛素受体在脂肪细胞中的分布、内化和循环过程进行实时动态监测。基于碳材料的上转换荧光性质, Li 等<sup>[12]</sup>发现, 用超快脉冲激光产生的双光子激发掺杂型氧化石墨烯纳米颗粒可以产生强的荧光, 将其成功用于细胞和深层组织成像。Wang 等<sup>[13]</sup>采用一步溶剂热法合成了聚合物包裹的氮掺杂碳点, 成功地实现了体内脑胶质瘤靶向成像。Ge 等<sup>[14]</sup>通过改变聚噻吩的衍生物前驱体的类型, 合成了集荧光成像、光声成像和光热治疗为一体的红色荧光石墨烯量子点, 对肿瘤具有很大的杀伤能力。目前对于 GQDs 用于肿瘤免疫治疗的荧光标记、免疫细胞成像及 GQDs 的免疫细胞炎症效应和信号通道的研究相对较少。巨噬细胞是生物体内重要的天然免疫细胞, 参与天然免疫、炎症及多种病理生理过程, 可通过膜表面的模式识别受体等识别病原微生物, 也可对外来异物进行直接吞噬与清除, 是维护机体内环境稳定的重要因素。巨噬细胞在体内外均可对量子点进行有效吞噬。研究表明, 石墨烯及其衍生物可影响巨噬细胞和 T 细胞等免疫细胞的分化发育<sup>[15-17]</sup>。

本文借助  $W_{18}O_{49}$  催化剂, 在水热条件下通过体系内产生的羟基自由基将氧化石墨烯切割为量子点, 并利用 X 射线粉末衍射 (X-ray diffraction, XRD)、傅里叶变换红外 (fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)、原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM)、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)、X 射线光电电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 等技术手段对 GQDs 进行微观结构表征的基础上, 对其荧光性能进行了分析, 以小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7) 为模型细胞, 采用 CCK-8、死活染色、流式细胞仪、激光共聚焦和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 等研究手段, 探究 GQDs 与体外 RAW264.7 细胞相互作用产生炎症效应后, 细胞存活率、细胞成像、炎症因子变化和细胞凋亡的诱因。

## 1 材料与方法

### 1.1 化学材料和试剂

高纯石墨 ( $\geq 99.85\%$ , 国药集团化学试剂有限公司); 浓  $H_2SO_4$  ( $95\% \sim 98\%$ , 平湖化工试剂厂); 浓  $H_3PO_4$  ( $95\% \sim 98\%$ , 国药集团化学试剂有限公司);  $KMnO_4$  (国药集团化学试剂有限公司);

$H_2O_2$  ( $30\%$ , 国药集团化学试剂有限公司);  $HCl$  ( $36\% \sim 38\%$ , 平湖化工试剂厂); 六氯化钨 ( $WCl_6$ , 阿拉丁试剂公司); 正丙醇 (平湖化工试剂厂); 无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.2 生物材料和试剂盒

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7, 碧云天生物技术公司); DMEM 培养基 (上海 Viva Cell 公司); 胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司); 青霉素 (penicillin, 华北制药集团); 链霉素 (streptomycin, 华北制药集团); 氯化钠 ( $NaCl$ , 国药集团化学试剂有限公司); 氯化钾 ( $KCl$ , 国药化学试剂有限公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 阿拉丁试剂公司); CCK-8 试剂盒 (亚科因生物技术有限公司); Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒 (碧云天生物技术公司); RNAiso Plus (宝生物工程公司), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (翌圣生物科技有限公司)。

### 1.3 实验仪器

荧光倒置显微镜 (DMi1, 德国徕卡公司); 酶标仪 (BIO-RAD Model 680, 美国伯乐公司); X 射线粉末衍射仪 (AXS-D8 型, 德国 Bruker 公司); 红外光谱仪 (Tensor27 型, 德国 Bruker 公司); 冷场发射透射电子显微镜 (Talos F200C G2, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司); 扫描电子显微镜 (S-4800 型, 日本日立公司); X 射线光电电子能谱 (ESCALABXI+, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司); 原子力扫描探针显微镜 (CSPM5500, 北京本原公司); 拉曼光谱 (LABRAM HR EVOLUTION, 美国 Thermo Fisher 公司); 激光共聚焦显微镜 (FV1000, Carl Zeiss AG); 瞬态稳态荧光光谱仪 (FLS-1000, 英国爱丁堡公司); 荧光定量 PCR 仪 (Lightcycler 480 II, Roche); 流式细胞仪 (ACEA BIOSCIENCES INC, NOVOCYTE); Zeta 电位仪 (90PLUS, 布鲁克海文公司)。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 氧化石墨烯和催化剂 $W_{18}O_{49}$ 的制备

采用改性 Hummer's 法制备氧化石墨烯<sup>[18-19]</sup>。69 ml 浓  $H_2SO_4$  加到 3.0 g 石墨粉和 1.5 g  $NaNO_3$  混合物, 冷却至  $0^\circ C$ 。9.0 g  $KMnO_4$  分批缓慢加入到上述混合液中, 然后加热至  $35^\circ C$  反应 30 min。接着缓慢加入 138 ml  $H_2O$ , 维持  $98^\circ C$  反应 15 min, 水浴冷却反应 10 min, 加入 420 ml  $H_2O$  和 3 ml  $30\% H_2O_2$  冷却后终止反应, 筛选、过滤、多次洗涤后真空干燥, 即可获得浅棕色的氧化石墨烯 (文档 S1)。

采用温和条件一步合成石墨烯量子点, 需要合适的催化剂。催化剂的制备过程如下: 0.1 g  $\text{WCl}_6$  固体加入到 50 ml 的正丙醇中搅拌均匀, 然后转移到 50 ml 水热反应釜中, 200℃下反应 9 h。反应后的样品自然冷却, 用无水乙醇离心、洗涤 3 次。70℃真空干燥 12 h 后收集固体, 之后对其进行结构表征, 得到  $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$  构型的催化剂 (表征结果见图 S1)。

#### 1.4.2 石墨烯量子点的制备

0.15 g 自制的氧化石墨烯, 加入 5 ml 去离子水, 超声 20 min。然后将其加入到 5 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 mol/L) 中搅拌均匀。0.05 g  $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$  加入到上述混合溶液中充分混合。最终将混合溶液转移到 15 ml 的水热反应釜, 200℃反应 72 h, 自然冷却到室温, 离心、分离、洗涤, 无需进一步纯化即可得到浅黄色 GQDs 水溶液。

#### 1.4.3 细胞的培养和准备

RAW264.7 细胞所用培养基为 DMEM 培养基。培养基过滤后添加 10% 胎牛血清, 2 mol/L L-谷氨酰胺, 100 IU/ml 双抗 (青霉素和链霉素)。用于实验的细胞均在对数生长期 ( $\geq 98\%$  的细胞生活率)。于 37℃、含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中静置培养, 达 85% 的覆盖度传代。

#### 1.4.4 RAW264.7 细胞死活染色

将 RAW264.7 细胞接种在 24 孔板中, 细胞密度为  $2 \times 10^5$ /孔, 培养 24 h 后, 更换上述 5 组不同浓度的 (100、200、300、400 和 500 mg/L) GQDs 进行培养 24 h, 然后弃去培养基, 用 PBS 清洗一遍, 加入适量的 Calcein/PI 检测工作液, 在 37℃黑暗条件下孵育 5 min 后, 在荧光显微镜下进行拍照, 对细胞的活性进行评价。

#### 1.4.5 细胞毒性测试

细胞成活率采用 CCK-8 试剂盒进行测试。将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中, 细胞密度约为 8 000/孔, 贴壁生长 1 d 后, 于 96 孔中分别加入 GQDs, 去除旧的培养基, 加入 120  $\mu\text{l}$  包含 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 试剂的新鲜培养基, 37℃下培育 2 h。然后测试 96 孔板各孔在 450 nm 的吸光度 ( $A$ ) 值。

RAW264.7 细胞毒性测试浓度梯度为 100、200、300、400、500 mg/L; 时间梯度为 24、48、72 h。每批次实验对照组以未加入样品的细胞为空白对照, 每个浓度单次实验中设置 6 个重复, 各组实验独立重复 3 次。用酶标仪在 450 nm 波长处测定各

孔  $A$  值。

细胞成活率 (cell viability) 的计算为:

$$\text{Cell viability} = \frac{A_1 - A_3}{A_2 - A_3} \times 100\%$$

其中,  $A_1$  为加入 GQDs 细胞组吸光度值,  $A_2$  为无样品细胞组的吸光度值,  $A_3$  为 CCK-8 试剂的吸光度值。细胞毒性测试中的每个数据点有 6 个对照。

#### 1.4.6 RAW264.7 细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ mRNA 表达

将细胞种在 6 孔板上, 使细胞密度为  $2 \times 10^5$ /孔, 加入相对应的培养基, 孵育 24 h, 弃去培养基, PBS 清洗 3 遍。按照 Magen RNA 提取试剂盒的步骤提取总 RNA 后, 将总 RNA 按照逆转录试剂盒步骤进行逆转录, 然后在 LightCycler®PCR 仪上进行 RT-qPCR 反应, 通过 RT-qPCR 对 *IL-1 $\beta$*  和 *TNF- $\alpha$*  基因的表达进行检测 (具体过程见表 S1~S3)。各组实验独立重复 3 次, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对结果进行计算。

#### 1.4.7 流式细胞测试

将处于对数生长期的细胞消化后, 按细胞密度为  $2 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板上, 孵育 24 h。然后分别加入不同浓度的氧化石墨烯量子点溶液。培养 6 h 后, 弃去培养基, PBS 清洗 3 遍。加入 100  $\mu\text{l}$  1 $\times$  Annexin V 结合缓冲液, 随后加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{l}$  PI, 室温条件下避光反应 15 min, 最后加入 400  $\mu\text{l}$  1 $\times$  Annexin V 结合缓冲液, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

#### 1.4.8 激光共聚焦显微镜成像

利用激光共聚焦显微镜观察 GQDs 在 RAW264.7 细胞内的分布和细胞成像的状态。RAW264.7 细胞接种于共聚焦专用培养皿, 细胞密度约为  $2 \times 10^5$ /孔, 加适量 DMEM 培养基和 500  $\mu\text{l}$  GQDs, 培养箱放置 4 h, 去除 DMEM 培养基, 1 $\times$  PBS 冲洗 2 次后弃掉上清液, 加入适量的 HBSS 缓冲液上机观察, 激发波长为 408 nm。

#### 1.4.9 材料表征

X 射线粉末衍射, 电压 40 V, 电流 40 A, 铜靶  $\text{Cu K}\alpha$  ( $\lambda=1.54056 \text{ \AA}$ ), 扫描速度为  $2^\circ/\text{min}$ , 扫描角度为  $5^\circ \sim 80^\circ$ 。

傅里叶红外变换取适量的冻干样品, 采用 KBr 压片法进行测试, 测量范围  $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 。

场发射扫描电子显微镜测试过程中, 需将适量待测样品均匀分布在导电胶上, 喷金 150 s 后上机测试。扫描加速电压 10~13 kV, 加速电流 10  $\mu\text{A}$ , 显示分辨率 70~110 K。



X射线光电能谱的激发源为AlK $\alpha$  X射线, 功率为: 300 W, 真空度为 $3\times 10^{-7}$  Pa。

原子力显微镜的扫描范围为1.54  $\mu\text{m}$ , 横向0.2 nm, 纵向0.1 nm。

荧光光谱的光谱分辨率: 0.05 nm, 数值孔径: F/4.2, 波长精度:  $\pm 0.2$  nm。

Zeta 电位: 电导率范围: 0~25 S/m; 电场强度: 0~60 kV/m; 温度控制:  $-5\sim 105^{\circ}\text{C}$ ,  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ; pH值: 6.8; 样品体积: 1~1.5 ml; 分散介质: 1 $\times$  PBS和DMEM培养基。

#### 1.4.10 数据分析

实验数据来自3次独立的实验, 采用平均值 $\pm$ 标准差表示, 数据分析采用Graph Pad Prism Soft软件进行分析, 细胞毒性的统计意义分析采用one-way ANOVA方法,  $P<0.05$ 认为有显著性差异, 用\*表示,  $P<0.01$ 在图中用\*\*表示,  $P<0.001$ 在图中用\*\*\*表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 氧化石墨烯结构分析

图1所示, 采用改性Hummer's法制备了氧化

石墨烯。利用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ 在水热条件下产生的羟基自由基, 采用自上而下的方法将氧化石墨烯切割成GQDs。XRD谱图(图2a)显示, 石墨粉 $2\theta=28.44^{\circ}$  (002)的特征衍射峰, 采用改进的Hummer's法<sup>[20]</sup>处理后消失, 在 $2\theta=9.96^{\circ}$  (001)出现氧化石墨烯的特征衍射峰<sup>[21-22]</sup>。FT-IR光谱图(图2b)进一步显示石墨被氧化、插层后所形成的官能团:  $3460\text{ cm}^{-1}$ 为一OH伸缩振动所产生的吸收峰;  $3000\sim 3600\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内宽的吸收峰为吸附水分子中的一OH峰;  $1715\text{ cm}^{-1}$ 为羰基 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动峰;  $1385\text{ cm}^{-1}$ 为 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动峰;  $1150\text{ cm}^{-1}$ 为 $\text{C}-\text{OH}$ 伸缩振动峰<sup>[23-25]</sup>。XPS能谱图(图2c)显示, C1s在284.8 eV处出现 $\text{sp}^2$ 杂化碳的特征峰, 在287.8 eV处出现羰基( $\text{C}=\text{O}$ )的特征峰<sup>[26]</sup>, 拉曼谱图(图2d)中 $1350\text{ cm}^{-1}$ 、 $1590\text{ cm}^{-1}$ 处出现分别出现D峰和G峰, 且D/G的强度比为0.83, 表明石墨经氧化、插层后晶格发生畸变, 形成了氧化石墨烯。SEM和AFM图像显示, 氧化石墨烯为片层结构(图2e, f), 且厚度为0.8 nm左右(图S2), 说明石墨经氧化、分离和清洗后形成石墨烯单层薄片(图1), 与文献报道的层间距相吻合<sup>[27-28]</sup>。

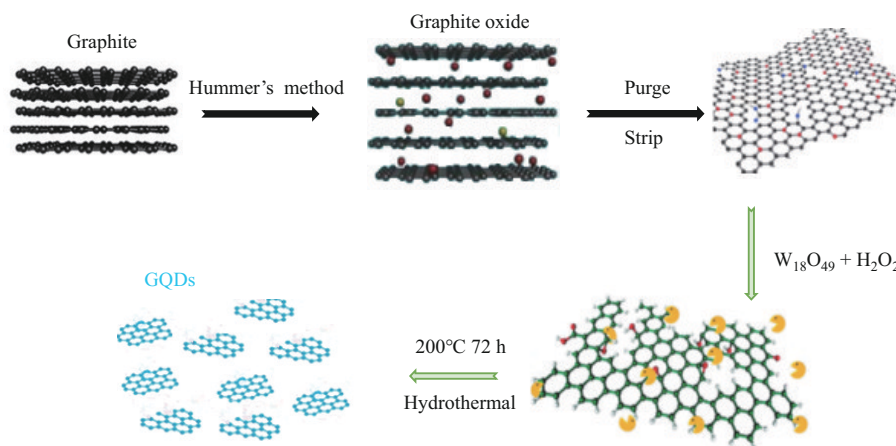
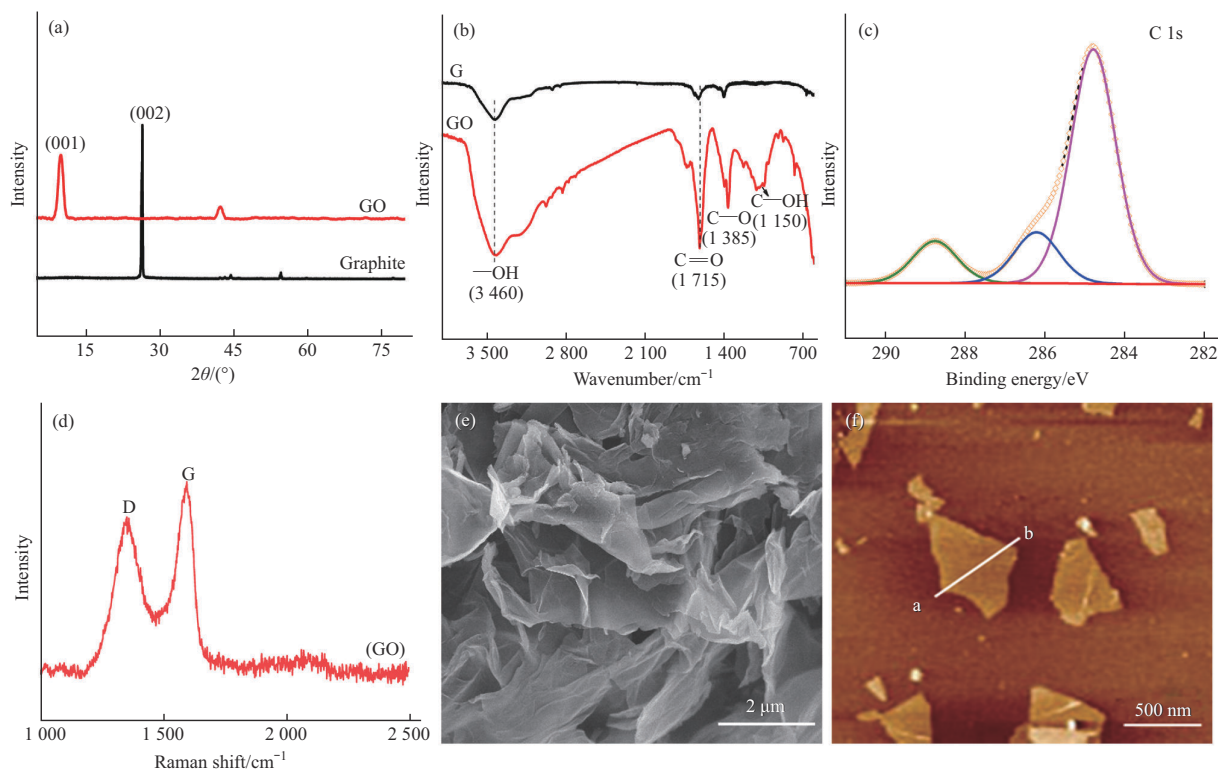


Fig. 1 Design scheme of graphene quantum dot synthesis

### 2.2 石墨烯量子点的结构和荧光性能分析

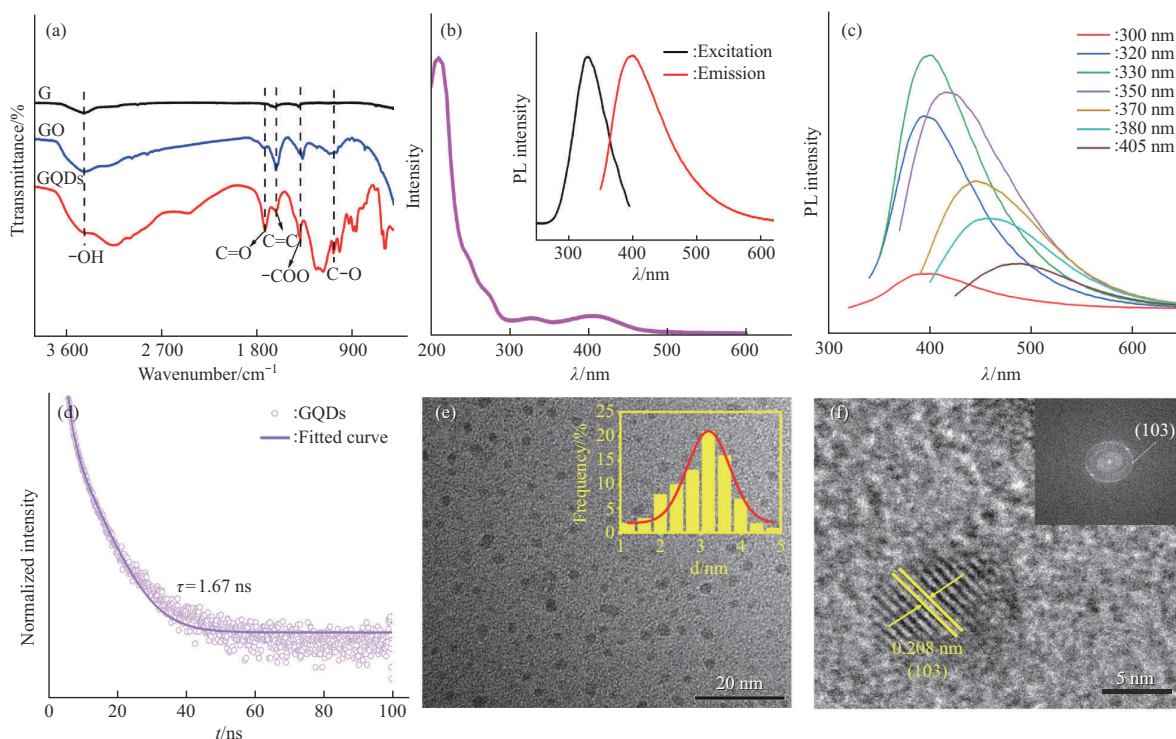
$\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ 催化剂(图S1)在 $200^{\circ}\text{C}$ 的水热条件下, 将氧化石墨烯氧化切割为蓝光GQDs<sup>[28-29]</sup>(图3)。FT-IR光谱数据(图3a)显示:  $1646\text{ cm}^{-1}$ 处的碳碳双键( $\text{C}=\text{C}$ )吸收峰明显减弱,  $3400\text{ cm}^{-1}$ 处羟基( $-\text{OH}$ )、 $1725\text{ cm}^{-1}$ 处羰基( $\text{C}=\text{O}$ )、 $1426\text{ cm}^{-1}$ 处羧基( $-\text{COO}$ )和 $1058\text{ cm}^{-1}$ 处 $\text{C}-\text{O}$ 键的吸收峰明显增强<sup>[30]</sup>, 表明氧化石墨烯经 $-\text{OH}$

羟基自由基切割后, 生成具有丰富官能团结构的量子点, 表面缺陷较多, 使其具有较低的Zeta电位(图S3), 并且在不同溶液环境下具有良好的分散性(图S4, S5)。如图3b所示, GQDs在紫外区230~320 nm表现出很强的吸收, 吸收末端可延伸至可见区域。其中230 nm处基于芳香 $\text{C}=\text{C}$ 键的 $\pi-\pi^*$ 跃迁, 320 nm处属于 $\text{C}=\text{O}$ 键或其他连接基团的 $n-\pi^*$ 跃迁。紫外图中的小图和荧光谱图显示,



**Fig. 2 Structure and morphology of graphene oxide**

(a) XRD spectra; (b) FT-IR spectra; (c) XPS spectra; (d) Raman spectra; (e) SEM image; (f) AFM image.



**Fig. 3 Surface structure, fluorescence properties, transmission electron microscopy and high-resolution**

Transmission electron microscopy images of graphene quantum dots (GQDs). (a) FT-IR spectra. (b) UV-visible spectra of GQDs (small figures show the excitation and emission spectra of GQDs). (c) Emission spectra of GQDs at different excitation wavelengths. (d) Fluorescence lifetime spectra of GQDs transmission electron microscopy images. (e) Transmission electron microscopy of GQDs and the particle size distributions. (f) High-resolution transmission electron microscopy and diffracted light spots of GQDs.

GQDs的发光范围为300~600 nm (图3c), 最佳激发和发射波长分别为330 nm和400 nm。GQDs表现出激发波长的依赖性, 这表明GQDs表面存在大量的官能团, 且GQDs表面氧化程度越高, 产生的表面缺陷越多 (与FT-IR表面分析结果相吻合), 导致荧光发射波长红移, 而且荧光强度逐渐减弱, 这是由三重态碳烯自由基的Zigzag型位点和缺陷态所致<sup>[31-32]</sup>, 其荧光寿命 $\tau=1.67$  ns (图3d)。透射电镜图像 (图3e, f) 显示, GQDs的粒径大小为3~5 nm, 高分辨透射电镜中清晰可见 (103) 晶格面

( $d=0.208$  nm)<sup>[33]</sup>。

### 2.3 石墨烯量子点巨噬细胞兼容性

图4显示, 对照组、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L和500 mg/L GQDs RAW264.7细胞 Calcein和PI死活染色结果显示: GQDs样品具有较高的细胞兼容性。如图5a所示, 不同浓度 (100、200、300、400、500 mg/L) 的GQDs样品与RAW264.7细胞作用24、48、72 h后, 对RAW264.7细胞的存活率均有不同程度的影响。其中, 浓度为500 mg/L的GQDs样品的细胞存活率最

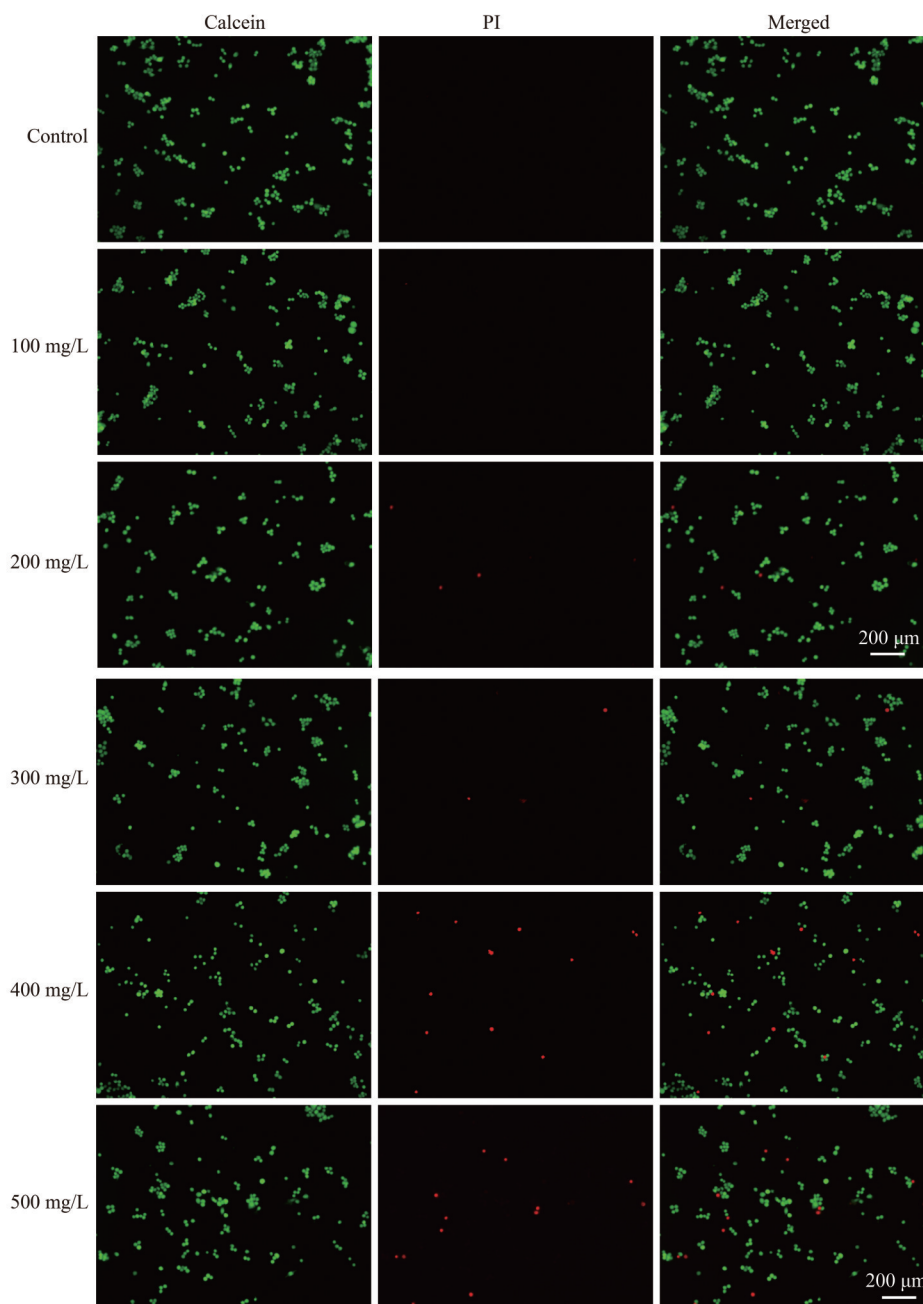


Fig. 4 *In vitro* RAW264.7 cell live/dead staining images at different concentrations of GQDs



低为60%左右, 100、200、300、400 mg/L浓度的GQDs与RAW264.7细胞作用72 h后, 细胞生存率分别为90%、86%、74.6%、67.6%。与对照组相比, 差异有显著性意义 ( $P<0.0001$ ), CCK-8实验结果显示RAW264.7细胞的存活率与GQDs的浓度和时间存在明显的依赖关系<sup>[34-35]</sup>, 这一结果与文献报道的纳米NiO、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>和TiO<sub>2</sub>对巨噬细胞的毒性规律一致<sup>[36-38]</sup>, 500 mg/L的GQDs处理的样品依然具有60%的细胞生存率, 表明GQDs具有较高的生物相容性, 归因于GQDs表面具有富含氧官能团 (—COOH、—OH和C=O), 使其表面为负电荷, 具有低亲和力与细胞膜作用时, 易被吞噬进入到细胞内部, 为此进行了流式细胞仪和透射电镜的检测<sup>[39-40]</sup>。

2.4 炎症因子对RAW264.7细胞凋亡的影响

双变量流式细胞仪的散点图 (图5b) 结果显示, 200 mg/L石墨烯量子点对RAW264.7细胞凋亡的变化。与对照组相比 (表S4), Q1区的机械损伤细胞占比从0.34%上升到1.27% (FITC-/PI+), Q3区的活细胞占比从92.08%下降到80.17% (FITC-/PI-)。随着RAW264.7细胞对石墨烯量子点的相互

作用, Q2区的晚期坏死细胞比例从0.65%上升到2.14% (FITC+/PI+), Q4区的早期凋亡细胞比例从0.65%上升到2.14% (FITC+/PI-)。早期凋亡细胞, 由于细胞肿胀, 其前向散射光增大; 凋亡中晚期的细胞和坏死细胞由于其细胞膜损伤, PI能够穿透细胞膜而嵌入DNA中, 染色体降解, 核破裂形成, 细胞内颗粒增多, 故凋亡细胞侧向散射光增加<sup>[41-42]</sup>。

如图5c, d所示, 与对照组相比, RT-qPCR的分析结果具有显著差异。在脂多糖 (LPS) +干扰素 $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) 的刺激作用下, RAW264.7细胞增加TNF- $\alpha$ 水平的表达, 并与其他细胞因子共同作用参与体外RAW264.7细胞的免疫反应, 介导RAW264.7细胞产生IL-1 $\beta$ 炎症因子, 从而诱导RAW264.7细胞凋亡。综合CCK-8、死活染色、流式细胞和RT-qPCR的实验结果, 可以推断, 当GQDs浓度 $\geq 200$  mg/L时, 对体外RAW264.7细胞有生长抑制作用, 主要是由于GQDs被内吞进入RAW264.7细胞, 刺激RAW264.7细胞提高TNF- $\alpha$ 的表达, 使细胞膜破裂并产生IL-1 $\beta$ 炎症因子, 改变了RAW264.7细胞周期诱导细胞凋亡, 导致RAW264.7细胞死亡<sup>[43-44]</sup>。

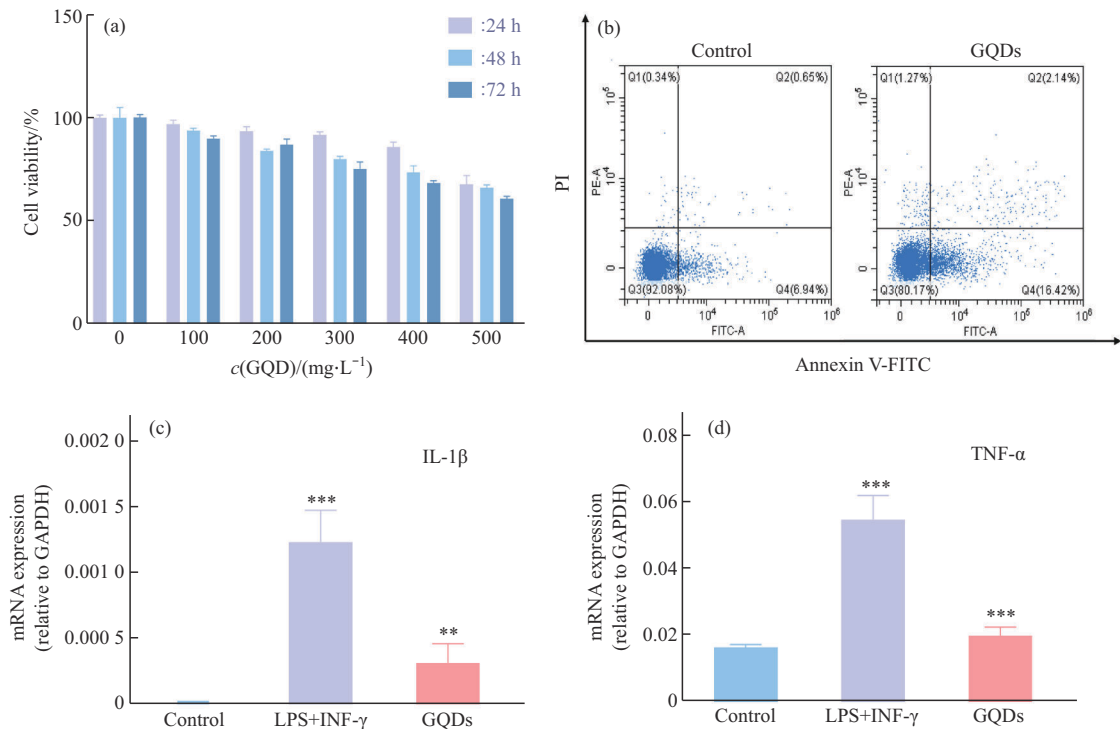


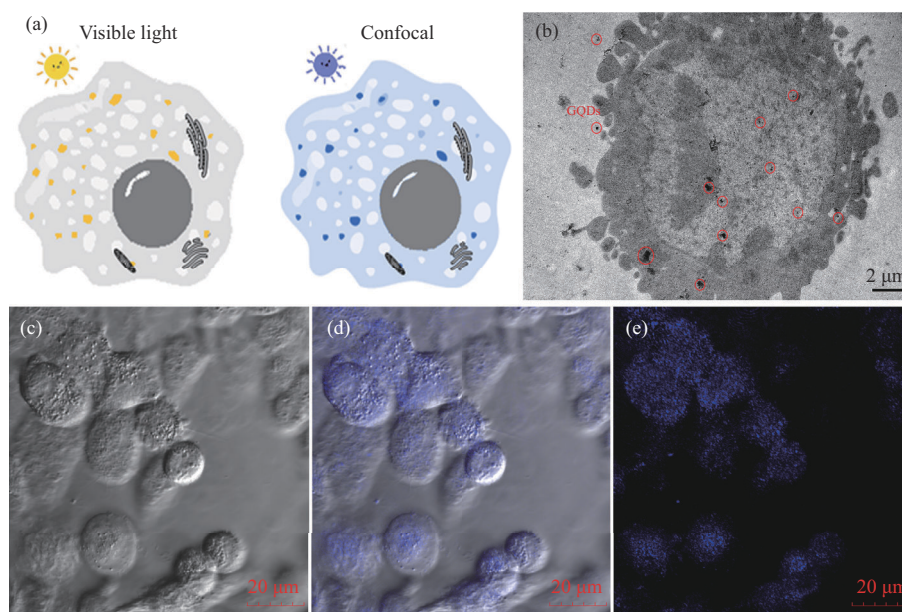
Fig. 5 Effects of GQDs on RAW264.7 cell viability, apoptosis and inflammatory factors

(a) Cell viability of GQDs at different concentrations and different time states. (b) Effect of 200 mg/L GQDs on apoptosis of RAW264.7 cells. (c) Effect of 200 mg/L GQDs on the inflammatory factor IL-1 $\beta$  of RAW264.7 cells. (d) Effect of 200 mg/L GQDs on RAW264.7 TNF- $\alpha$ . \*\* $P<0.01$  vs control with significant difference. \*\*\* $P<0.001$  vs control with significant difference.

## 2.5 GQDs在RAW264.7细胞中的成像

为了评价GQDs的体外RAW264.7细胞的成像能力,采用透射电镜和激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)观察RAW264.7细胞对GQDs的摄取情况,结果如图6a~e所示。刺激4 h后,表面带负电荷的GQDs通过内吞进入到RAW264.7细胞内部,可引起细胞的免疫反应,这一过程与流式细胞测试结果和RT-qPCR的实验结果相呼应。408 nm光源激发后,GQDs在体外RAW264.7细胞中呈蓝光,使其具有体外细胞成像能力。通常,石墨烯量子点的荧光归因于 $\pi$ - $\pi^*$ 的能带跃迁和表面缺陷发射的结

合或竞争。450 nm的发射波长透过实体组织的效率会降低,且因GQDs发光效率低,荧光寿命短,在细胞成像方面具有一定局限性。由于石墨烯量子点表面含有丰富的官能团,大量的理论计算和实验表明,杂原子的掺杂(如氮、硼、硫、磷等)可以有效地调节石墨烯量子点的能带和电子密度,带来新颖的荧光性质和电子性质。未来掺杂型石墨烯量子点优异的光学性能和生物兼容性,结合激光共聚焦成像技术可成为巨噬细胞内多种分子检测最有效的示踪手段,也将开启肿瘤免疫治疗的新途径。



**Fig. 6** Transmission electron microscopy and laser scanning confocal images of RAW264.7 cells treated with 200 mg/L GQDs

(a) Schematic diagram of the interaction of GQDs with *in vitro* RAW264.7 cells under visible light and confocal state. (b) Transmission electron microscopy of the interaction of GQDs with *in vitro* RAW264.7 cells. (c-e) Bright-field, dark-field, and post-complexed confocal images of RAW264.7 cells treated with GQDs *in vitro*.

## 3 结 论

水热条件下,利用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ 相互作用产生的羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )将氧化石墨烯自上而下切割成3~5 nm蓝光GQDs,量子产率为43%。GQDs表面丰富的含氧官能团提升了它的生物兼容性。RT-qPCR的分析结果显示:GQDs影响巨噬细胞内TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 炎症因子的表达,对RAW264.7细胞凋亡产生影响。激光共聚焦结果显示,蓝光石墨烯量子点具有一定的体外细胞成像能力,为今后掺

杂型石墨烯量子点的荧光性能调变和巨噬细胞生物成像提供理论与实验依据,这项工作将有助于推动GQDs在活细胞成像、肿瘤免疫标记和治疗方面发挥积极的作用。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn>, <http://www.cnki.net>):

PIBB\_20230491\_Document\_S1.pdf

PIBB\_20230491\_Figure\_S1.pdf

PIBB\_20230491\_Figure\_S2.pdf

PIBB\_20230491\_Figure\_S3.pdf



PIBB\_20230491\_Figure\_S4.pdf

PIBB\_20230491\_Figure\_S5.pdf

PIBB\_20230491\_Table\_S1.pdf

PIBB\_20230491\_Table\_S2.pdf

PIBB\_20230491\_Table\_S3.pdf

PIBB\_20230491\_Table\_S4.pdf

## 参 考 文 献

- [1] Zhang Y, Lv Y, Li L S, *et al.* Aminophosphate precursors for the synthesis of near-unity emitting InP quantum dots and their application in liver cancer diagnosis. *Exploration* (Beijing), 2022, **2**(4): 20220082
- [2] Dubertret B, Skourides P, Norris D J, *et al.* *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, 2002, **298**(5599): 1759-1762
- [3] Dahan M, Lévi S, Luccardini C, *et al.* Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science*, 2003, **302**(5644): 442-445
- [4] Ganji Arjenaki R, Samiepour G, Sadat Ebrahimi S E, *et al.* Development of novel radiolabeled antibody-conjugated graphene quantum dots for targeted *in vivo* breast cancer imaging and biodistribution studies. *Arab J Chem*, 2024, **17**(2): 105518
- [5] Ziaee N, Farhadian N, Abnous K, *et al.* Dual targeting of Mg/N doped-carbon quantum dots with folic and hyaluronic acid for targeted drug delivery and cell imaging. *Biomed Pharmacother*, 2023, **164**: 114971
- [6] Yan Y, Gong J, Chen J, *et al.* Recent advances on graphene quantum dots: from chemistry and physics to applications. *Adv Mater*, 2019, **31**(21): e1808283
- [7] Tang J, Liu Y. Gram-scale synthesis of graphene quantum dots via energetic material deflagration for bioimaging application. *J Phys Chem Solids*, 2024, **184**: 111718
- [8] Jin X J, Tan L, Zhao Z Q, *et al.* Facile synthesis of graphene quantum dots with red emission and high quantum yield. *New J Chem*, 2023, **47**(5): 2221-2229
- [9] Zhang M, Bai L, Shang W, *et al.* Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphenequantum dots as a robust biological label for stem cells. *J Mater Chem*, 2012, **22**(15): 7461-7467
- [10] Dong Y, Chen C, Zheng X, *et al.* One-step and high yield simultaneous preparation of single- and multi-layer graphenequantum dots from CX-72 carbon black. *J Mater Chem*, 2012, **22**(18): 8764-8766
- [11] Inazumi T, Yamada K, Shirata N, *et al.* Prostaglandin E<sub>2</sub>-EP4 axis promotes lipolysis and fibrosis in adipose tissue leading to ectopic fat deposition and insulin resistance. *Cell Rep*, 2020, **33**(2): 108265
- [12] Li J L, Bao H C, Hou X L, *et al.* Graphene oxide nanoparticles as a nonbleaching optical probe for two-photon luminescence imaging and cell therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, **51**(8): 1830-1834
- [13] Wang Y, Meng Y, Wang S, *et al.* Direct solvent-derived polymer-coated nitrogen-doped carbon nanodots with high water solubility for targeted fluorescence imaging of glioma. *Small*, 2015, **11**(29): 3575-3581
- [14] Ge J, Jia Q, Liu W, *et al.* Red-emissive carbon dots for fluorescent, photoacoustic, and thermal theranostics in living mice. *Adv Mater*, 2015, **27**(28): 4169-4177
- [15] Yang L, Qin A, Chen S, *et al.* Manganese(ii) enhanced fluorescent nitrogen-doped graphene quantum dots: a facile and efficient synthesis and their applications for bioimaging and detection of Hg<sup>2+</sup> ions. *RSC Adv*, 2018, **8**(11): 5902-5911
- [16] Korejwo D, Chortarea S, Louka C, *et al.* Gene expression profiling of human macrophages after graphene oxide and graphene nanoplatelets treatment reveals particle-specific regulation of pathways. *NanoImpact*, 2023, **29**: 100452
- [17] Vakili B, Karami-Darehnanaraji M, Mirzaei E, *et al.* Graphene oxide as novel vaccine adjuvant. *Int Immunopharmacol*, 2023, **125**(PtA): 111062
- [18] William S, Hummers J R, Richarde O. Contribution from the baroid division, national lead company. *J Am Chem Soc*, 1958, **20**(3): 1339-1340
- [19] Marciano D C, Kosynkin D V, Berlin J M, *et al.* Improved synthesis of graphene oxide. *ACS Nano*, 2010, **4**(8): 4806-4814
- [20] Cutroneo M, Torrisi L, Badziak J, *et al.* Graphite oxide based targets applied in laser matter interaction. *EPJ Web Conf*, 2018, **167**: 02004
- [21] Chen J, Li Y, Huang L, *et al.* High-yield preparation of graphene oxide from small graphite flakes via an improved Hummers method with a simple purification process. *Carbon*, 2015, **81**: 826-834
- [22] Sperandio G, Junior I M, Bernardo E, *et al.* Graphene oxide from graphite of spent batteries as support of nanocatalysts for fuel hydrogen production. *Processes*, 2023, **11**(11): 3250
- [23] Eigler S, Dotzer C, Hirsch A, *et al.* Formation and decomposition of CO<sub>2</sub> intercalated graphene oxide. *Chem Mater*, 2012, **24**(7): 1276-1282
- [24] Torrisi L, Cutroneo M, Havranek V, *et al.* Self-supporting graphene oxide films preparation and characterization methods. *Vacuum*, 2019, **160**: 1-11
- [25] Talik P, Moskal P, Kucharska M, *et al.* Raman spectroscopy investigations of hydrated hydroxypropyl cellulose mixtures with low-soluble salicylic acid: molecular interactions and the water-binding structure. *J Mol Struct*, 2023, **1294**: 136452
- [26] Xu Y, Sheng K, Li C, *et al.* Highly conductive chemically converted graphene prepared from mildly oxidized graphene oxide. *J Mater Chem*, 2011, **21**(20): 7376-7380
- [27] Huang K, Delport G, Orcin-Chaix L, *et al.* Single layer nano graphene platelets derived from graphite nanofibres. *Nanoscale*, 2016, **8**(16): 8810-8818
- [28] Trpkov D, Vinić M, Dojčilović R, *et al.* Fast, eco-friendly synthesis of blue luminescent nitrogen-doped graphene quantum dots in glycerol. *Opt Quantum Electron*, 2022, **54**(6): 387
- [29] Zhu C, Yang S, Wang G, *et al.* A new mild, clean and highly

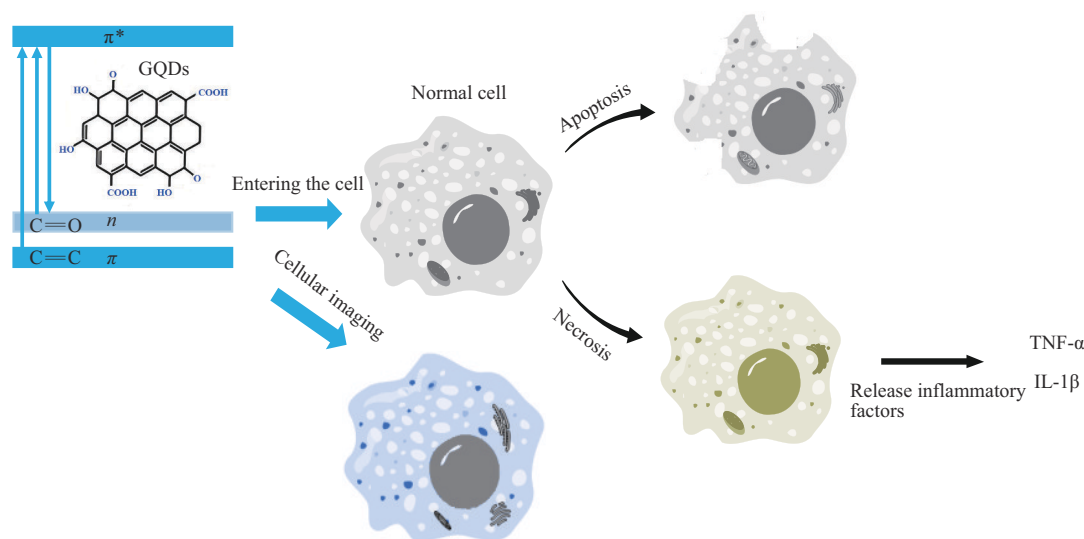
- efficient method for the preparation of graphene quantum dots without by-products. *J Mater Chem B*, 2015, **3**(34): 6871-6876
- [30] Naik J P, Sutradhar P, Saha M. Molecular scale rapid synthesis of graphene quantum dots (GQDs). *J Nanostruct Chem*, 2017, **7**(1): 85-89
- [31] Nakada K, Fujita M, Dresselhaus G, *et al*. Edge state in graphene ribbons: nanometer size effect and edge shape dependence. *Phys Rev B*, 1996, **54**(24): 17954-17961
- [32] Zhang R, Qi S, Jia J, *et al*. Size and refinement edge-shape effects of graphene quantum dots on UV-visible absorption. *J Alloys Compd*, 2015, **623**: 186-191
- [33] Nick Vamivakas A, Zhao Y, Lu C Y, *et al*. Spin-resolved quantum-dot resonance fluorescence. *Nat Phys*, 2009, **5**: 198-202
- [34] Zhang J, Ma Y Q, Li N, *et al*. Preparation of graphene quantum dots and their application in cell imaging. *J Nanomater*, 2016, **2016**: 9245865
- [35] Shabbir H, Wojtaszek K, Rutkowski B, *et al*. Milk-derived carbon quantum dots: study of biological and chemical properties provides evidence of toxicity. *Molecules*, 2022, **27**(24): 8728
- [36] Luo M, Chen P, Wang J, *et al*. The cytotoxicity of oxidized multi-walled carbon nanotubes on macrophages. *Sci China Chem*, 2016, **59**(7): 918-926
- [37] Paramo L, Jiménez-Chávez A, Medina-Ramírez I E, *et al*. Biocompatibility evaluation of TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, and TiO<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanomaterials: insights into potential toxic effects in erythrocytes and HepG2 cells. *Nanomaterials (Basel)*, 2023, **13**(21): 2824
- [38] Lin L, Zheng Y, Wang C, *et al*. Concentration-dependent cellular uptake of graphene oxide quantum dots promotes the odontoblastic differentiation of dental pulp cells *via* the AMPK/mTOR pathway. *ACS Omega*, 2023, **8**(6): 5393-5405
- [39] Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*, 2010, **6**(1): 12-21
- [40] Asati A, Santra S, Kaftanis C, *et al*. Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano*, 2010, **4**(9): 5321-5331
- [41] 李常艳. 纳米功能材料的可控制备、表面修饰及其荧光标记和细胞毒性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2014
- Li C Y. Study on Controllable Preparation, Surface Modification, Fluorescence Labeling and Cytotoxicity of Nano-functional Materials[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2014
- [42] 周瑞. 牛血清白蛋白—槲皮素纳米颗粒的稳定性和细胞摄入及吸收的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015
- Zhou R. Study on Stability, Cell Intake and Absorption of Bovine Serum Albumin-quercetin Nanoparticles[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015
- [43] Zhao M, Li P, Qiao D, *et al*. N6-methyladenosine modification of TSC1 mRNA contributes to macrophage polarization regulated by Coptisine in DSS-induced ulcerative colitis. *Phytomedicine*, 2024, **122**: 155153
- [44] Yang J, Bai Y, Shen S, *et al*. An oral nano-antioxidant for targeted treatment of inflammatory bowel disease by regulating macrophage polarization and inhibiting ferroptosis of intestinal cells. *Chem Eng J*, 2023, **465**: 142940

## Study on Biocompatibility of Graphene Quantum Dots With Macrophages *in vitro*\*

LIU Qi, XU Hai-Yan, SU Yu-Xuan, ZHOU Kai-Hong, LI Chang-Yan\*\*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China)

### Graphical abstract



**Abstract Objective** GQDs has become a superstar among zero-dimensional carbon-based materials. As one of the most abundant and important biological elements, its unique optical properties, high dispersion and biocompatibility have attracted extensive attention from scientists. This paper aims to investigate the effect of GQDs on cell viability, apoptosis and inflammatory factor expression in RAW264.7 macrophages and evaluate cell imaging capability of GQDs *in vitro*, which could provide theoretical basis for the safe application of GQDs in biomedical field. **Methods** Graphene oxide was prepared by modified Hummer's method.  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$  interacted with each other under hydrothermal conditions to produce hydroxyl radicals, which can cut graphene oxide into GQDs using a top-down approach. The microstructure of GQDs was analyzed in detail by X-ray powder diffraction, X-ray photoelectron spectroscopy, transmission electron microscopy, atomic force microscopy, scanning electron microscopy and Fourier infrared transform. The biocompatibility of GQDs on macrophage was evaluated by CCK-8 and dead/live staining. Flow cytometry results showed the apoptosis of RAW264.7 macrophages induced by GQDs. mRNA expression of inflammatory factors was evaluated by

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (22067015) and Inner Mongolia Autonomous Region Postgraduate Quality Courses Construction Project (JP20231008).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-471-4995123, E-mail: celicy@imu.edu.cn

Received: December 12, 2023 Accepted: April 16, 2024



RT-qPCR. Cell imaging was exhibited by laser scanning confocal. **Results** Hydroxyl radicals are produced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$  under hydrothermal conditions, which contribute to cut graphene oxide into 3–5 nm GQDs in one step. The quantum yield of this method is 43%. Fluorescence lifetime of these blue GQDs is 1.67 ns. The Zigzag-type site and defect state of the triplet carbene radical lead to the excitation wavelength dependence of GQDs, and the optimal excitation and emission wavelengths are 330 nm and 400 nm, respectively. The boundary effect and amphiphilicity of quantum dots make GQDs possess abundant functional groups, vacancy defects and high dispersion, which results in GQDs exhibits good water solubility. RAW264.7 macrophages are incubated with different concentration in DEME medium for 24 h, 48 h and 72 h to evaluate cell. The survival rate of RAW264.7 cells is significantly dependent on the concentration and time of GQDs. CCK-8 and dead/alive staining show that GQDs have high biocompatibility. The effect of 200 mg/L GQDs on apoptosis of RAW264.7 cells is revealed by the scatter plot of bivariate flow cytometry. Under the stimulation of LPS+INF- $\gamma$ , the expression of TNF- $\alpha$  was increased in RAW264.7 cells, which co-acted with other cytokines to participate in the immune response of RAW264.7 cells *in vitro*, and mediated the production of IL-1 $\beta$  inflammatory factor in RAW264.7 cells, thereby inducing apoptosis of RAW264.7 cells. The results of RT-qPCR showed that GQDs can inhibit the growth of RAW264.7 cells *in vitro*, and stimulate them to increase TNF- $\alpha$  expression in RAW264.7 cells, which make cell membrane rupture and produce IL-1 $\beta$  inflammatory factors to induce cell apoptosis. The high biocompatibility of GQDs is attributed to the rich oxygen-containing functional groups ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ , and  $\text{C}=\text{O}$ ) on the surface of GQDs, which makes its surface negatively charged and easy to be swallowed into the cell interior when interacting with the cell membrane with low affinity. Transmission electron microscopy (TEM) observed that the GQDs were swallowed into the cells. Furthermore, laser confocal results displayed that blue GQDs has certain ability of cell imaging *in vitro*. **Conclusion** The water solubility, low toxicity, fluorescence properties and the induction effect of inflammatory factors of GQDs provide broad prospects for their application in the field of immunotherapy and cell imaging in the future.

**Key words**  $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ , graphene quantum dots, RAW264.7 macrophages, biocompatibility, inflammatory factors

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0491