

文章编号: 1000-7032(2015)04-0485-06

## 荧光碳点在脊椎类模式动物斑马鱼中的 活体成像与毒理学研究

邓 帅<sup>1</sup>, 李雨珊<sup>1</sup>, 段延芳<sup>2</sup>, 李 丽<sup>1\*</sup>, 安利民<sup>2\*</sup>,  
郑 敏<sup>3</sup>, 李炳生<sup>4</sup>, 吴 琼<sup>1</sup>, 孙再成<sup>3</sup>

(1. 哈尔滨工业大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150080;

2. 黑龙江大学 物理科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150080;

3. 发光学及应用国家重点实验室 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033;

4. 哈尔滨工业大学 基础与交叉科学研究院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘要:** 将荧光碳点引入透明斑马鱼胚胎中,研究了荧光碳点在斑马鱼中的活体成像和对斑马鱼的毒副作用。通过对水中添加荧光碳纳米颗粒,从形态上观察其对于斑马鱼个体发育的生物学效应,实时观察其在斑马鱼体内富集代谢的情况,为荧光碳点及其复合物在生物活体成像方面的研究应用奠定基础。结果表明,荧光碳点对斑马鱼生长发育无明显的毒副作用,不会导致胚胎发育异常(通过观察尾巴弯曲情况、色素深浅、血管发育速度、鱼鳃发育速度来确定对胚胎发育的影响),并且对斑马鱼无明显致死现象。荧光碳点进入斑马鱼体内的时间非常迅速,并且可以在48 h之内经代谢排出体外。

**关键词:** 斑马鱼; 荧光碳点; 胚胎发育; 生物毒性

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fgxb20153604.0485

## Flourescent Imaging and Toxicology Study of Carbon Dots in Transparent Zebrafishes

DENG Shuai<sup>1</sup>, LI Yu-shan<sup>1</sup>, DUAN Yan-fang<sup>2</sup>, LI Li<sup>1\*</sup>,  
AN Li-min<sup>2\*</sup>, ZHENG Min<sup>3</sup>, LI Bing-sheng<sup>4</sup>, WU Qiong<sup>1</sup>, SUN Zai-cheng<sup>3</sup>

(1. School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150080, China;

2. College of Physics Science and Technology, Heilongjiang University, Harbin 150080, China;

3. State Key Laboratory of Luminescence and Applications, Changchun Institute of Optics,  
Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China;

4. Academy of Fundamental and Interdisciplinary Sciences, Harbin Institute of Technology, Harbin 150080, China)

\* Corresponding Authors, E-mail: lilili@hit.edu.cn; alm59@126.com

**Abstract:** In this paper, we introduce the carbon dots (CDs) into transparent embryos of zebrafishes and study the flourescent imaging and toxicology of CDs. With immerging oosperms and infants of zebrafishes into the aqueous solution of CDs for 1.5 h, the CDs go through the cell membrane and emerge inside of them. Then, from the morphological, we study the biological effects on the individual development and *in vivo* observe the supersession of zebrafishes. We demonstrate that CDs have no apparent toxicity on the growing development and do not induce the development abnormity of embryo. Furthermore, the CDs do not lead to the death of zebrafishes. We also find that CDs can enter

收稿日期: 2015-01-05; 修订日期: 2015-02-07

基金项目: 国家自然科学基金(21403061, 11474076); 黑龙江省博士后科研启动基金(LBH-Q13082); 中国博士后科学基金(2013M541420); 黑龙江大学学科青年学术骨干百人支持计划; 新教师基金(20132302120069)资助项目

into the zebrafisher rapidly and be expelled from the body within 48 h.

**Key words:** zebrafishes; carbon dots; embryonic development; biotoxicity

## 1 引 言

荧光纳米粒子在生物成像、药效监测和肿瘤治疗等方面有着潜在的应用前景<sup>[1-3]</sup>。为了实现这些功能,需要把纳米粒子直接注入到生物体内,这样就必须首先了解这些纳米粒子对生物体的影响和在生物体内完整的代谢过程<sup>[4-5]</sup>。但是,对于许多半导体量子点,由于尺寸、表面效应或者含有重金属等原因,实验上已经证明其对人类健康存在着负面影响<sup>[6-8]</sup>。荧光碳量子点(碳点)是碳家族继碳纳米管、石墨烯、富勒烯之后的新成员,一出现便引起了广泛的关注<sup>[9-10]</sup>。碳点具有分子量小、荧光稳定性高、激发光谱宽而连续、发射光谱连续可调等优点。此外,因为主要成分是碳,因而被认为具有生物相容性好且毒性低等特点,是生物标记和荧光成像等医学应用的理想材料。经过近十年的努力,人们已经在碳点的制备和应用研究上取得了显著的进步。

要使碳点能够发光且发光波长连续可调,首先必须对其表面进行特殊的修饰。光电子能谱实验证明经过修饰的碳点表面存在着 C—N、C—O、C=O 和 N—H 化学键,表明这种发光碳点的表面非常复杂<sup>[11]</sup>。纳米颗粒的性质与其表面特性有关,而经过修饰的碳点有没有生物毒性还不清楚。目前大部分实验是在老鼠表皮组织中进行成像和药物诊断等方面的尝试,而对于碳点自身对生物体的影响还没有系统的研究。针对这个问题,我们引入了斑马鱼生物模型,研究了碳点对它的生物学影响。斑马鱼具有产卵数目多、鱼卵容易收集筛选、胚胎透明易于观察、灵敏度高和易重复等特点,是研究生态毒理性实验的一种重要的模式动物<sup>[12]</sup>。利用斑马鱼透明和碳点发光的特点,我们用光直接激发进入到鱼体内的碳点,观察到了碳点在受精卵、活体内不同部位的荧光。本文系统研究了碳点从进入斑马鱼受精卵和斑马鱼活体体内、在体内的运动以及最后排出受精卵和体外的整个生物循环过程。实验结果证明荧光碳点对斑马鱼受精卵和活体生长发育无明显的毒副

作用,不会可导致胚胎发育异常,也不会对斑马鱼的不同生理过程产生毒害作用,对斑马鱼无明显致死现象。荧光 CDs 进入斑马鱼体内的时间非常迅速,并且可以经代谢排出体外。这也直接证明了 CDs 可以安全应用于医学领域的生物成像和药物监测等方面。

## 2 实 验

### 2.1 荧光碳点的制备和提纯

荧光碳点的制备方法见参考文献[11]。在进行毒理实验之前,先对碳点进行提纯处理:取碳点粗产物 2 mL,加入丙酮后离心,分离得到产物;将所得产物重新溶于少量水中,加入丙酮,再次离心,纯化;将其溶于水后转入截留分子量为 1 500 u 的透析袋中,每隔 4 h 换一次水,进行透析。24 h 后,使用 PBS 调节 pH 值为 7,然后配成不同浓度的碳点溶液,分别对斑马鱼受精卵和幼鱼进行处理,观察碳点在受精卵和幼鱼中的代谢情况和毒理实验。

### 2.2 碳点的代谢特性实验

配成碳点浓度为 0, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液各 4 mL,加入 6 孔培养皿中,选取受精后 3 h 的斑马鱼鱼卵开始染毒实验,每孔 20 只,每隔 24 h 更换液体,并进行观察计数。选用浓度为 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液,每组溶液中培养 20 只孵化 5 d 的幼鱼,染毒处理 1.5 h 后用 E3 培养液洗 3 次,然后在荧光显微镜 460 nm 波长照射光下观察幼鱼发光及代谢情况,随后在 24 h 和 48 h 时再次在荧光显微镜下观察幼鱼发光情况。

### 2.3 斑马鱼毒理实验(孵化率,心率,自主运动,畸形统计)

取浓度为 0, 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液,加入 6 孔培养皿中,选取受精后 3 h 的斑马鱼鱼卵开始染毒实验,每孔 18 只。在产卵 24 h 后,每隔 3 h 统计鱼的孵化率,直到鱼全部孵化为止。在鱼产卵 24 h 时统计鱼卵的自主运动(即鱼卵中的幼鱼在 1 min 内的摆尾次数)情况,每组取 9 只鱼卵。在鱼产卵 48 h 时统计幼鱼的心率,每组取

5 只幼鱼。最后,统计鱼的畸形率。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 荧光碳点在斑马鱼受精卵内和幼鱼体内的代谢特性

含有重金属的纳米粒子进入到生物体后一般会沉积到体内,很难排出体外,这也成了限制纳米粒子在医学方面应用的主要障碍。因为碳点的一个重要应用是生物成像,所以有必要了解它进入生物体内的代谢特性。利用斑马鱼透明和碳点发光的特点,我们在光照的条件下,观察了碳点在受精卵和幼鱼中的动态代谢情况。

碳点进入卵或鱼体内后,在 365 nm 光激发下,将发出蓝色光( ~ 465 nm)。我们用不同浓度的碳点溶液对斑马鱼受精卵处理 1.5 h,然后取出洗净,置于纯水中。图 1 为不同静置时间下的荧光碳点的代谢情况。从对比实验可以看出,溶液中存在的碳点可以通过细胞膜进入到细胞中(0 h

是指细胞卵被洗净后,立刻进行观察)。随着碳点浓度的增加,细胞的发光亮度也增大,说明进入细胞的碳点数量增多。在鱼卵表面,存在一些发光的大颗粒(见图 1 底部左图和右图)。通过白光观察细胞,发现亮点处是一些碳点的富集。而之所以富集,是由于细胞膜受损或坏死所致,并且即使通过多次洗涤,也很难除去。然后,把鱼卵静置于纯水中 24 h,再进行荧光观测,发现溶液浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  实验组碳点已完全代谢出鱼体外,浓度为 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  实验组碳点还略有残留。等到静置 48 h 后,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  实验组的受精卵中也观察不到碳点,说明碳点可进入斑马鱼卵内富集且能正常代谢出来。在实验过程中,发现碳点容易富集在细胞膜损伤处或坏死点,且难以洗掉,这一点可以从白光与荧光的对比实验中看出。还有一点值得注意,从图中可以发现碳点可以通过细胞膜进入到细胞质中,但是很难进入到细胞核中。

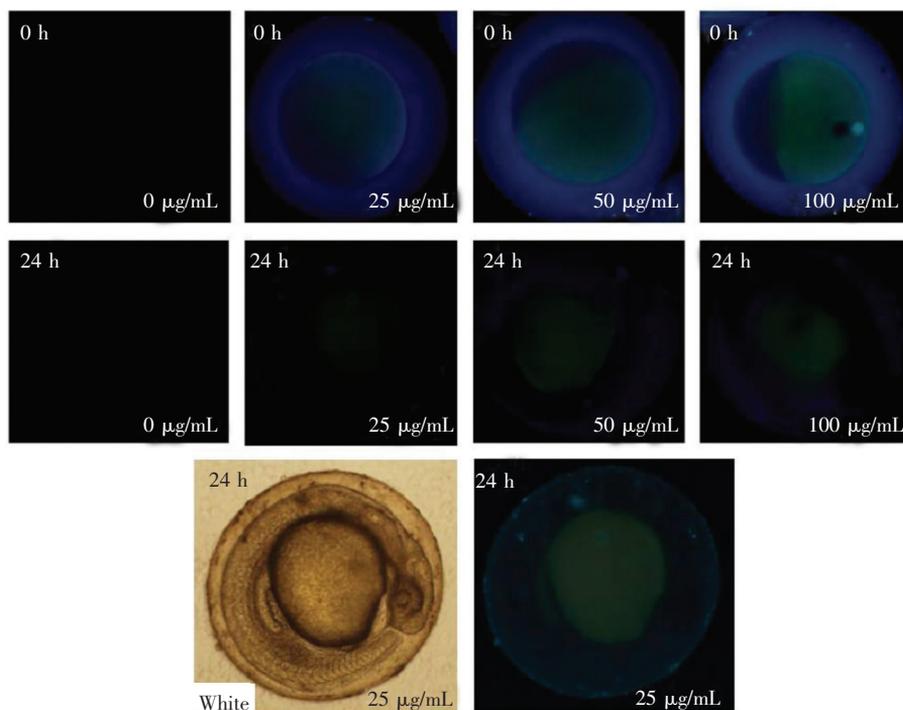


图 1 荧光碳点在斑马鱼受精卵中的发光与代谢情况。24 h 后,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  碳点处理的鱼体内的碳点已经被排除体外。细胞膜损坏部位容易引起碳点的富集。

Fig. 1 Emission and superession characteristics of carbon dots in oosperm of the zebrafishes. Within 24 h, the carbon dots have been expelled from the embryo. The carbon dots are like to converge in the damaged parts of the cell membrane.

用不同浓度的碳点溶液处理 1.5 h 后,取出在纯水中静置不同时间后的斑马鱼幼鱼的荧光成像如图 2 所示。从图中可以看出,随着用于处理

的碳点浓度的增加,发光亮度增大,说明进入到体内的碳点增多。从图中还可以看到,在水中加入碳点来处理斑马鱼,碳点主要富集在口、鳃部和内

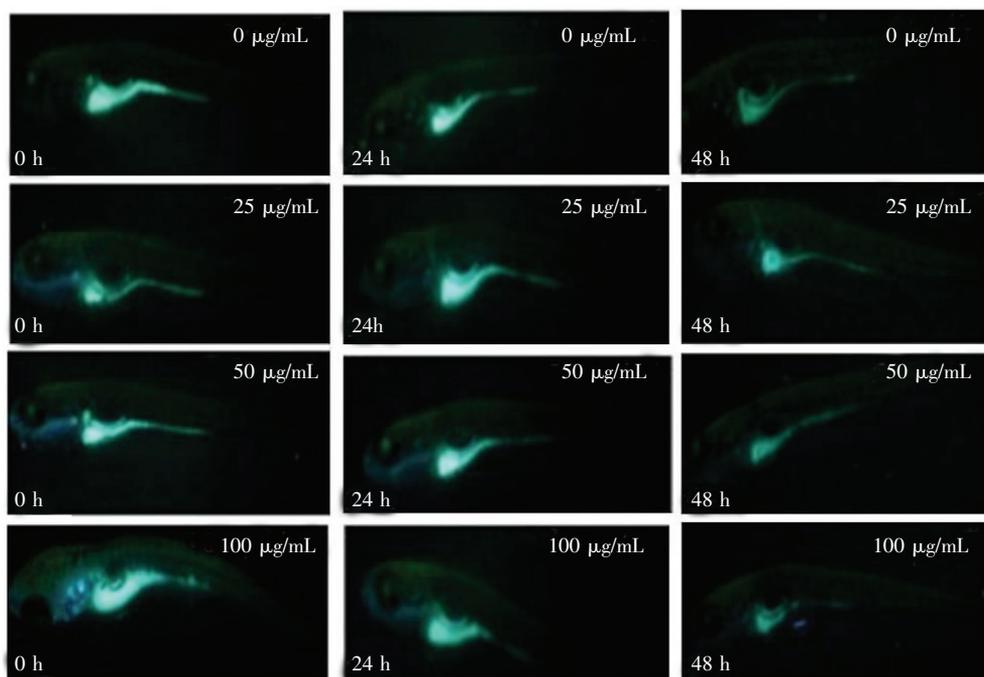


图 2 用不同浓度的碳点溶液处理斑马鱼后,碳点在鱼体内的代谢情况。利用碳点的发光特性,可以看出 48 h 后,碳点可以经过代谢排出体外。

Fig. 2 Emission properties of carbon dots in the zebrafishes. Within 48 h, the carbon dots have been expelled from the zebrafishes.

脏等处,并无进入血液循环。随着静置时间的延长(48 h),斑马鱼幼鱼能将在水中吸入的碳点完全排出体外。而我们在实验中发现,一些纳米粒子如二氧化硅小颗粒等,容易沉积在生物体内,无法排出体外,并且会引起一些严重的疾病。

### 3.2 荧光碳点在斑马鱼受精卵内和幼鱼体内的毒理实验

从图 1 中可知,碳点会进入到受精卵中,因而有可能对生命活动有影响。我们首先研究了不同碳点浓度的水溶液中,斑马鱼受精卵的存活率和孵化率。提纯后的碳点配制成浓度为 0, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液,每组溶液中培养 20 只受精卵,持续 168 h 观察它们的存活率。实验统计结果总结在图 3 中,发现实验组与对照组并无明显区别。为了进一步了解碳点浓度对受精卵的影响,在此基础上,我们又进行了更大浓度的实验,碳点浓度分别为 0, 500, 1 000, 2 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,实验组和对照组仍无差别,仅有少数个体死亡,但这是少数受精卵无法正常生长发育的正常现象。图 4 是斑马鱼受精卵在不同浓度的碳点溶液中的孵化率。受精卵经过 35 h 开始孵化成幼鱼。从图中可以看出,即使在浓度很高的碳点溶液中,受精卵

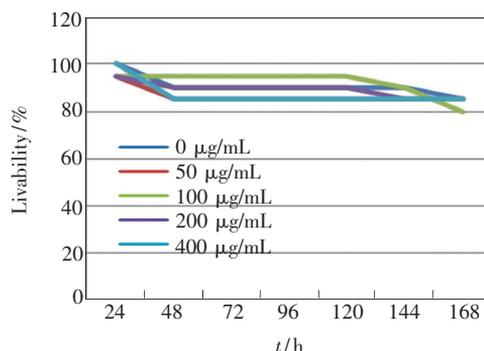


图 3 斑马鱼卵在碳点溶液中存活率统计

Fig. 3 Livability of the zebrafishes ovum in aqueous solution of carbon dots

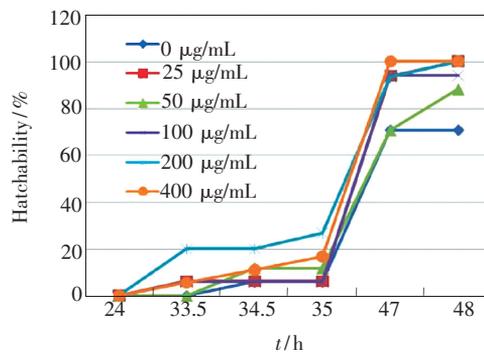


图 4 斑马鱼受精卵在各浓度荧光碳点溶液中的孵化率

Fig. 4 Dependence of the hatchability of the zebrafishes ovum on the concentration of carbon dots

的孵化率也未受到影响。基于以上实验结果可以得出结论:碳点具有良好的生物相容性,对斑马鱼的受精卵没有明显的致死、致畸等不良作用,也不影响其孵化率。

在接下来的实验中,我们研究了碳点浓度对斑马鱼的自主运动和心率的影响。图 5 是斑马鱼在不同浓度的碳点溶液中的自主运动情况。实验表明,荧光碳点对斑马鱼自主运动的频率影响不大。在 0~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度范围内,自主运动基本不受碳点浓度的影响。图 6 是不同浓度的碳点溶液对斑马鱼心率的影响。从图中可以看出,荧光碳点对斑马鱼心率影响不大,在正常范围内波动。

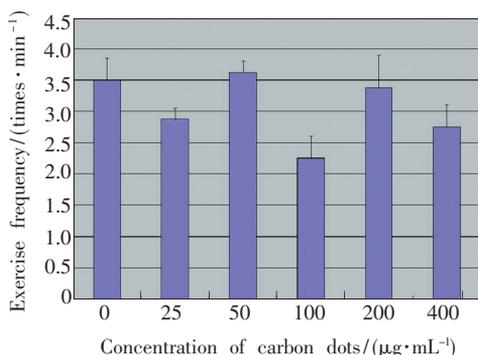


图 5 斑马鱼在各浓度荧光碳点溶液中的自主运动情况  
Fig. 5 Dependence of the exercise frequency of the zebrafishes on the concentration of carbon dots

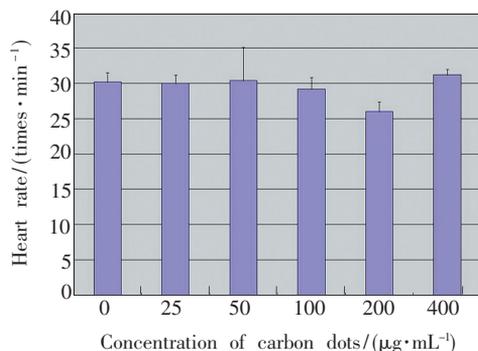


图 6 斑马鱼在各浓度荧光碳点溶液中的心率情况  
Fig. 6 Dependence of the heart rate of the zebrafishes on the concentration of carbon dots

图 7 是斑马鱼在不同浓度的碳点溶液中发生的畸形率。从图中可以看出,不同浓度的碳点溶液对斑马鱼实验组的畸形率影响不大,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的碳点溶液产生的畸形率最高,但也没有超过 12%,说明荧光碳点的致畸率较低。从图 1、3、4 可知,碳点能够进入到受精卵内,但并不影响受精卵的存活率和孵化率,对斑马鱼胚胎发育

这个阶段影响较小。而从图 2、5、6、7 可知,碳点可以进入到斑马鱼体内,但并不能通过渗透进入到斑马鱼的血液循环系统,因而需要进一步研究碳点进入血液循环系统后,对斑马鱼生理活动的影响。目前,把碳点注射到斑马鱼的血管中的实验正在进行当中。从图 7 可知,碳点也能引起少量的畸形。通过显微镜观察了不同碳点溶液中畸形的特征,如图 8 所示。在浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的碳点溶液中,斑马鱼出现了心室水肿和脊椎弯曲两种畸形现象;而在 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的碳点溶液中,斑马鱼出现的畸形均为脊椎弯曲。在现阶段,我们对碳点导致畸形的原因还不清楚。

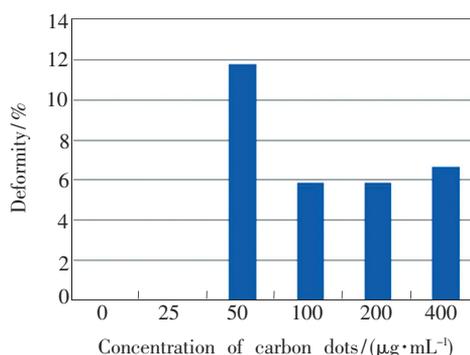


图 7 斑马鱼在各浓度荧光碳点溶液中的畸形率  
Fig. 7 Dependence of the deformity of the zebrafishes on the concentration of the carbon dot

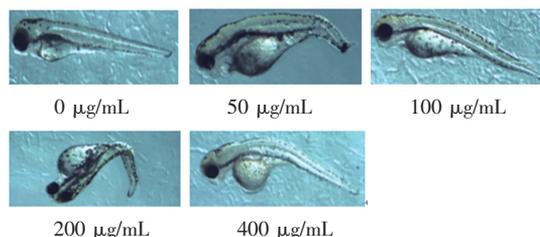


图 8 畸形斑马鱼与正常鱼的对照。碳点会引起心室水肿和脊柱弯曲等畸形。

Fig. 8 Some kinds of deformity can be induced to the zebrafishes by the carbon dots

## 4 结 论

系统研究了不同浓度的碳点溶液对斑马鱼受精卵和幼鱼的影响。荧光碳点在受精卵和斑马鱼中仍然能够发光,并且比较稳定。碳点对生物系统没有毒性,对生物各项生理指标影响较小,在体内代谢快,不会长期积累。由于荧光碳点具有低毒性及制造成本低的优点,所以其代替目前所使用的用于生物研究的标记物有很大的可行性。

## 参 考 文 献:

- [ 1 ] Wang L S, Chuang M C, Ho J A. Nanotheranostics—A review of recent publications [J]. *Int. J. Nanomed.*, 2012, 7: 4679-4695.
- [ 2 ] Cheng Z L, Zaki A A, Hui J Z, *et al.* Multifunctional nanoparticles: Cost *versus* benefit of adding targeting and imaging capabilities [J]. *Science*, 2012, 338(6109):903-910.
- [ 3 ] Chen G Y, Qiu H L, Prasad P N, *et al.* Upconversion nanoparticles: Design, nanochemistry, and applications in theranostics [J]. *Chem. Rev.*, 2014, 114(10):5161-5214.
- [ 4 ] Fischer H C, Chan C W. Nanotoxicity: The growing need for *in vivo* study [J]. *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2007, 18(6):565-571.
- [ 5 ] Hutchison J E. Greener nanoscience: A proactive approach to advancing applications and reducing implications of nanotechnology [J]. *ACS Nano*, 2008, 2(3):395-402.
- [ 6 ] Zhao X S, Wang S T, Wu Y, *et al.* Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish [J]. *Aquat. Toxicol.*, 2013, 136(10):49-59.
- [ 7 ] Nel A, Xia T, Madler L, *et al.* Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. *Science*, 2006, 311(5761):622-627.
- [ 8 ] Moore M N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? [J]. *Environ. Int.*, 2006, 32(8):967-976.
- [ 9 ] Baker S N, Baker G A. Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights [J]. *Angew. Chem, Int. Ed.*, 2010, 49(38):6726-6744.
- [ 10 ] Tang J, Kong B, Wu H, *et al.* Carbon nanodots featuring efficient FRET for real-time monitoring of drug delivery and two-photon imaging [J]. *Adv. Mater.*, 2013, 25(45):6569-6574.
- [ 11 ] Zheng M, Liu S, Li J, *et al.* Integrating oxaliplatin with highly luminescent carbon dots: An unprecedented theranostic agent for personalized medicine [J]. *Adv. Mater.*, 2014, 26(21):3554-3560.
- [ 12 ] Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, *et al.* The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds [J]. *Mol. Cell. Biol.*, 2009, 29(2):493-502.



邓帅(1993 -),男,四川江油人,哈尔滨工业大学本科在读,主要从事生物技术方面的研究。  
E-mail: 627884373@qq.com



李丽(1977 -),女,内蒙古通辽人,博士,副教授,2010年于日本筑波大学获得医学博士学位,主要从事分子生物学方面的研究。  
E-mail: lilili@hit.edu.cn



安利民(1979 -),男,黑龙江富裕县人,副教授,2010年于哈尔滨工业大学获得博士学位,主要从事荧光量子点方面的研究。  
E-mail: alm59@126.com