

# ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CỦA HẠT CACBON NANO ĐỐI VỚI TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ

Ngô Khoa Quang<sup>1\*</sup>, Võ Thị Sang<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Xuân<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

<sup>2</sup> Trường THPT Trà Bồng, Huyện Trà Bồng, Quảng Ngãi

<sup>3</sup> Trường THPT Lê Thánh Tông, Thị xã Ayun Pa, Gia Lai

E-mail: nkquang@hueuni.edu.vn

## TÓM TẮT

Trong bài báo này chúng tôi trình bày nghiên cứu chi tiết về độc tính của hạt cacbon nano (CDs) đối với tế bào. Cụ thể, chúng tôi sử dụng tế bào gốc trung mô để tiến hành đánh giá. Nồng độ hạt cacbon được thay đổi kết hợp với việc khảo sát thời gian nuôi nhằm đánh giá sự tăng sinh của tế bào. Kết quả cho thấy, các hạt CDs không gây ra độc tính đáng kể nào đối với tế bào ở nồng độ lên đến 0,25× sau thời gian nuôi 6 giờ ( $1\times = 0,51 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Kết quả cũng chỉ ra rằng khả năng sống của tế bào ở các nồng độ 0,5×, 0,75× và 1× giảm đáng kể khi tăng thời gian nuôi, chứng tỏ rằng CDs ở các nồng độ này có sự ảnh hưởng đáng kể đối với sự phát triển của tế bào.

**Từ khóa:** Hạt cacbon nano, độc tính với tế bào, thủy nhiệt.

## 1. MỞ ĐẦU

Nằm trong họ các vật liệu cacbon nano, sự xuất hiện của các hạt cacbon nano (còn được gọi là chấm lượng tử cacbon, C-dots hay CDs) phát quang đang thu hút sự chú ý đặc biệt của hầu hết các nhóm nghiên cứu trên thế giới bởi tính chất lý hóa đầy lý thú [1]. C-dots có đầy đủ tất cả các tính chất ưu việt của vật liệu chấm lượng tử bán dẫn truyền thống cũng như khả năng tạo liên kết tốt với các thụ thể, ít bị tẩy màu dưới tác dụng của ánh sáng cường độ mạnh, phổ phát quang phụ thuộc vào bước sóng kích thích và đồng thời không chứa các yếu tố có thể gây độc tính trong thành phần cấu tạo. Vì vậy, trong khoảng hơn một thập kỷ qua, bằng cách khai thác các tính chất quang học độc đáo cũng như khả năng tương thích sinh học cao, C-dots đã và đang được nghiên cứu rộng rãi cho các ứng dụng *in vitro* cũng như *in vivo* để chụp ảnh huỳnh quang trong sinh học [1].

Về mặt kích thước, C-dots là các hạt nano dạng khối cầu rời rạc với kích thước thường nhỏ hơn 10 nm [2]. Cấu trúc vật liệu C-dots gồm lõi là carbon lai hóa  $sp^2/sp^3$  ở dạng vô định hình hoặc tinh thể, bao bọc bên ngoài là các nhóm chức như carboxyl, hydroxyl, carboxylic acid và amino đóng vai trò là nhân tố tạo liên kết với các đối tượng sinh học [3-5]. Với phương pháp chế tạo đơn giản và thân thiện với môi trường, vật liệu C-dots vẫn hội tụ đầy đủ các tính chất và yêu cầu của một vật liệu sử dụng làm đầu dò sinh học, đó là cường độ phát quang mạnh, tính phát quang ổn định, không có yếu tố gây độc tính trong thành phần và khả năng tương thích sinh học cao.

Xét ở khía cạnh ứng dụng trong chụp ảnh sinh học, việc đánh giá độc tính của vật liệu đối với tế bào là rất quan trọng. Có khá nhiều nghiên cứu trước đây đã tập trung nghiên cứu vấn đề này trong cả *in vitro* và *in vivo*. Hu và cộng sự chứng minh rằng, C-dots khi ủ với tế bào ung thư vú người ở nồng độ 2 mg/mL, sau 24 h lượng tế bào sống là 94% [3]. So sánh với công trình của Ray và cộng sự, vật liệu chấm lượng tử bán dẫn chứa Cadimi có độc tính cao hơn nhiều, ở nồng độ nhuộm 10  $\mu\text{g/mL}$ , kết quả nghiên cứu cho thấy chỉ có khoảng 60% tế bào ung thư tụy sống sau 24

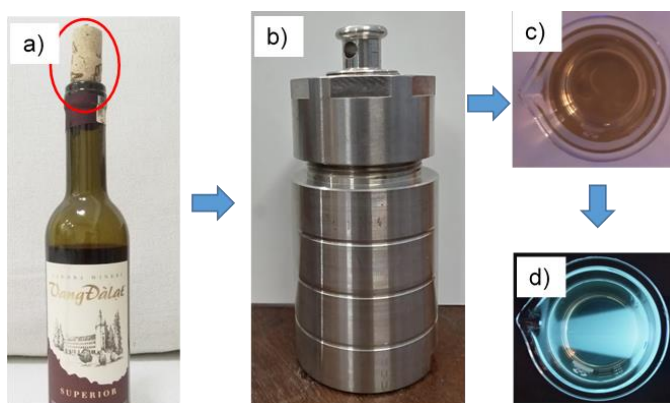
giờ [6]. Không những vậy, công trình của Sun cũng cho thấy khi tiêm C-dots với tổng liều lượng 40 mg, chức năng các cơ quan của chuột CD-1 vẫn không bị ảnh hưởng [7]. Những kết quả trên bước đầu đã chứng tỏ C-dots có tính tương thích sinh học cao, là loại vật liệu tiềm năng để ứng dụng trong các nghiên cứu y sinh.

Trong nghiên cứu được nêu ra ở đây, chúng tôi kết quả tổng hợp C-dots từ nút bấc bằng phương pháp thủy nhiệt. Dựa trên kết quả nghiên cứu tính chất lý hóa khá chi tiết của vật liệu hạt carbon nano được chế tạo từ nút bấc, chúng tôi đã tiến hành giá khả năng tương thích sinh học cũng như khả năng làm đầu dò huỳnh quang của vật liệu bằng cách nuôi cấy các tế bào gốc trung mô (MSCs) trong môi trường có chứa C-dots. Kết quả bước đầu cho thấy đây là một giải pháp kỹ thuật đơn giản, ít tốn kém để chế tạo vật liệu dùng làm đầu dò huỳnh quang ứng dụng trong y sinh.

## 2. THỰC NGHIỆM CHẾ TẠO CDs VÀ NUÔI TẾ BÀO

### 2.1. Chế tạo CDs

Quy trình chế tạo dung dịch chứa hạt cacbon nano từ nút bấc bằng phương pháp thủy nhiệt được tiến hành qua các bước như mô tả trong hình 1. Sau khi được rửa và sấy khô, nút bấc (5,0 g) được cắt nhỏ và cho vào 80 mL nước cất hai lần. Tiếp theo, toàn bộ hỗn hợp được thủy nhiệt ở nhiệt độ 220 °C trong 4 giờ và để nguội đến nhiệt độ phòng. Sản phẩm là dung dịch màu nâu đen được cho qua giấy lọc và ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 15 phút để loại bỏ các hạt có kích thước lớn. Sản phẩm thu được cuối cùng là dung dịch có màu nâu nhạt được bảo quản ở 4 °C và tránh ánh sáng để sử dụng cho các phép đo tiếp theo.



**Hình 1.** Quy trình chế tạo vật liệu C-dots từ nút bấc. (a) Nút bấc từ chai rượu Vang. (b) Nút bấc cắt nhỏ được thủy nhiệt trong bình Teflon. (c) Sản phẩm C-dots dưới ánh sáng mặt trời. (d) Sản phẩm C-dots dưới ánh sáng đèn LED có bước sóng đỉnh ở 415 nm.

### 2.2. Nuôi tế bào và chụp ảnh huỳnh quang

Tế bào gốc trung mô (MSCs) được nuôi trong đĩa 6 giếng với mật độ  $1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>, môi trường nuôi gồm có DMEM/F12, 10% FBS và 1% proxacin. Tủ nuôi được giữ ở điều kiện là 5% CO<sub>2</sub>, 95% không khí và nhiệt độ là 37°C. Quá trình nuôi tế bào được tiến hành liên tục từ 5 đến 6 tuần. Hai lần một tuần, môi trường được thay thế và hình thái học của tế bào được kiểm tra dưới

kính hiển vi quang học đảo ngược. Khi các tế bào đã hợp lưu xấp xỉ 60%, dung dịch chứa carbon nano (CDs) có nồng độ  $0,25 \times (1 \times = 0,51 \text{ mg/mL})$  được thêm vào giếng chứa tế bào. Sau khi ủ thêm 2 giờ, các tế bào được rửa bằng PBS ba lần để loại bỏ các hạt CDs nằm trên bề mặt ngoài của màng tế bào. Hình ảnh huỳnh quang tế bào được quan sát với các bước sóng kích thích lần lượt trong dải 320-380 nm, 450-490 nm và 515-560 nm của kính hiển vi huỳnh quang Leica DM2500 (Leica, Germany).

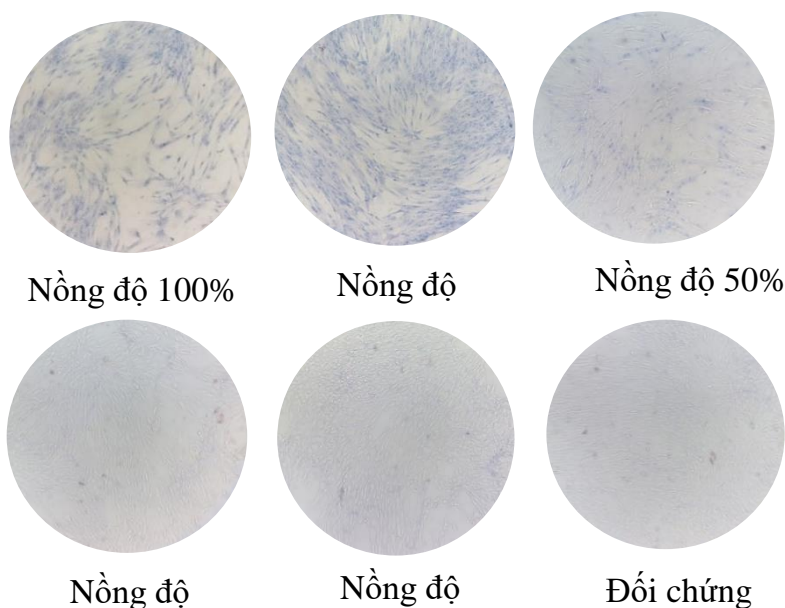
### 2.3. Khảo sát độc tính của CDs với tế bào

Sau khi quá trình nuôi MSCs, dung dịch CDs ở các nồng độ khác nhau được thêm vào môi trường nuôi cấy. Hình ảnh của MSCs được nuôi ở các nồng độ khác nhau của CDs được chụp (bằng kính hiển vi Olympus CKX31) trong ba vi trường khác nhau để đánh giá sai số. Số các tế bào MSCs sau đó được đánh giá bằng cách sử dụng phần mềm ImageJ. Trong đó, tỉ lệ sống của tế bào trong mẫu đối chứng tại 0 giờ được coi là 100% và tỷ lệ tế bào sống của tế bào với các nồng độ CDs khác nhau ( $0,1 \times$ ,  $0,25 \times$ ,  $0,5 \times$ ,  $0,75 \times$ ,  $1 \times = 0,51 \text{ mg / mL}$ ) tại 0 giờ được so sánh với giá trị này. Đối với mỗi giá trị của nồng độ CDs, tỉ lệ sống của tế bào trong thời gian ủ (2 giờ, 4 giờ và 6 giờ) được xác định theo công thức sau,

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Cells}_{(S)}}{\text{Cells}_{(C)}} \times 100.$$

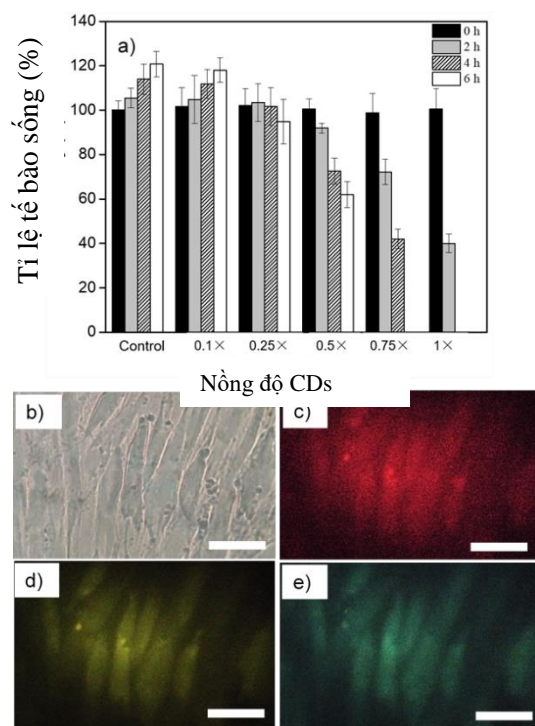
Trong đó,  $\text{Cells}_{(S)}$  và  $\text{Cells}_{(C)}$  tương ứng là tổng số tế bào sống tại mỗi thời điểm nuôi và tổng số tế bào sống tại thời điểm 0 giờ.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN



**Hình 2.** Tế bào gốc trung mô (MSCs) ủ với CDs ở các nồng độ khác nhau sau khi nhuộm với trypan blue (chụp dưới vật kính  $\times 10$ )

Sau khi quá trình nuôi, dung dịch CDs ở các nồng độ khác nhau được thêm vào môi trường nuôi cấy. Hình 2 là ảnh chụp các tế bào MSCs được nuôi ở các nồng độ khác nhau của CDs bằng kính hiển vi Olympus CKX31 trong ba vi trường khác nhau



**Hình 3.** Độc tính tế bào và hình ảnh tế bào khi chụp dưới kính hiển vi huỳnh quang. (a) Tế bào MSCs được nuôi với CDs ở các nồng độ lần lượt là 0, 0,1 ×, 0,25 ×, 0,5 ×, 0,75 × và 1 × trong thời gian 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ và 6 giờ (1 × = 0,51 mg mL<sup>-1</sup>). Tế bào MSCs sau khi nhuộm với CDs được chụp dưới (b) ánh sáng truyền qua, (c) ánh sáng xanh lục (515–560 nm), (d) ánh sáng xanh lam (450–490 nm), và (e) ánh sáng tím (320–380 nm). Thanh định cỡ là 50 μm.

Hình 3a mô tả độc tính với tế bào của CDs sau khi các tế bào MSCs được nuôi với các liều lượng khác nhau. Các hạt CDs ở các nồng độ khác nhau được thêm vào môi trường nuôi khi các tế bào đã hợp lưu xấp xỉ 60%. Do đó, các tế bào tiếp tục tăng sinh nếu các hạt CDs không ảnh hưởng đến quá trình phân chia tế bào. Quan sát hình 3a ta thấy, các giá trị mô tả khả năng sống của tế bào sau khi nuôi 2 giờ, 4 giờ và 6 giờ của mẫu đối chứng (không có CDs) và mẫu có CDs ở nồng độ 0,1× cao hơn 100%. Như mô tả trong hình vẽ, các hạt CDs không gây ra độc tính đáng kể nào đối với tế bào ở nồng độ lên đến 0,25× sau thời gian nuôi 6 giờ. Kết quả cũng chỉ ra rằng khả năng sống của tế bào ở các nồng độ 0,5×, 0,75× và 1× giảm đáng kể khi tăng thời gian nuôi, chứng tỏ rằng CDs ở các nồng độ này có sự ảnh hưởng đáng kể đối với sự phát triển của tế bào. Với ảnh chụp dưới kính hiển vi như mô tả trong hình 3b, các tế bào không có thay đổi đáng kể về hình dạng sau khi được nuôi trong môi trường có CDs. Như thể hiện trong hình 3c, d và e, MSCs phát huỳnh quang các màu tương ứng là xanh lục, vàng và đỏ dưới ánh sáng kích thích màu tím (320–380 nm), xanh lam (450–490 nm) và xanh lục (515–560 nm). Trong khi đó, mẫu đối chứng không có CDs không cho thấy hiện tượng phát huỳnh quang trong cùng điều kiện kích thích (ảnh chụp không được đưa vào). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các công bố trước đây [8, 9]. Sự phát quang phụ thuộc vào kích thích của CDs cho thấy tiềm năng ứng dụng của vật liệu này trong nhuộm huỳnh quang tế bào.

#### 4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tổng hợp thành công vật liệu cacbon nano được chế tạo từ nút bấc bằng phương pháp thủy nhiệt. Kết quả nghiên cứu vi cấu trúc cho thấy, hạt cacbon nano có kích thước trung bình là  $6,2 \pm 2,7$  nm. Chúng tôi cũng đã bước đầu đánh giá tiềm năng ứng dụng của vật liệu này trong nhuộm chẩn đoán tế bào học. Kết quả chụp ảnh dưới kính hiển vi huỳnh quang cho thấy mẫu tế gốc trung mô khi được nuôi nhuộm trong môi trường có chứa C-dots đã phát ánh sáng màu xanh lục, vàng và đỏ dưới ánh sáng kích thích màu tím (320–380 nm), xanh lam (450–490 nm) và xanh lục (515–560 nm). Các nghiên cứu tiếp theo cần được tiến hành nhằm đánh giá chi tiết hơn tính chất của vật liệu cũng như định hướng cho các ứng dụng tiếp theo trong y sinh cũng như hóa phân tích.

#### Tài Liệu Tham Khảo

1. Roy P, Chen P-C, Periasamy AP, Chen Y-N, Chang H-T. Photoluminescent carbon nanodots: synthesis, physicochemical properties and analytical applications. *Materials Today*. 2015;18(8):447-58.
2. Zhang J, Yu S-H. Carbon dots: large-scale synthesis, sensing and bioimaging. *Materials Today*. 2016;19(7):382-93.
3. Hu X, An X, Li L. Easy synthesis of highly fluorescent carbon dots from albumin and their photoluminescent mechanism and biological imaging applications. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2016;58:730-6.
4. Li W, Yue Z, Wang C, Zhang W, Liu G. An absolutely green approach to fabricate carbon nanodots from soya bean grounds. *RSC Advances*. 2013;3(43):20662-5.
5. Miao P, Han K, Tang Y, Wang B, Lin T, Cheng W. Recent advances in carbon nanodots: synthesis, properties and biomedical applications. *Nanoscale*. 2015;7(5):1586-95.
6. Jin S, Hu Y, Gu Z, Liu L, Wu H-C. Application of Quantum Dots in Biological Imaging. *Journal of Nanomaterials*. 2011;2011:834139.
7. Jelinek R. *Carbon Quantum Dots: Synthesis, Properties and Applications*: Springer International Publishing; 2016.
8. Jiang C, Wu H, Song X, Ma X, Wang J, Tan MJT. Presence of photoluminescent carbon dots in Nescafe® original instant coffee: applications to bioimaging. 2014;127:68-74.
9. Li W, Yue Z, Wang C, Zhang W, Liu G. An absolutely green approach to fabricate carbon nanodots from soya bean grounds. 2013;3(43):20662-5.