

学校编码: 10384
学号: 31420091150089

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

几种纳米材料作为基因载体和药物载体的
研究

The study of several kinds of nano materials as gene and
drug carriers

王天晓

指导教师姓名: 任 磊 教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2012 年 月

论文答辩时间: 2012 年 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

本论文旨在研究明胶-硅氧烷、金纳米棒复合水凝胶和介孔二氧化硅三种纳米材料作为基因载体和药物载体的生物学效应。

本论文工作主要分为以下三个方面：

1. 将单一多肽（Tat、HA2、R8）和两种多肽（Tat 和 HA2 或者 Tat 和 R8）修饰到明胶-硅氧烷纳米粒子（GS NPs）表面，系统研究不同多肽修饰的 GS NPs 对转染基因的包裹和保护、细胞活性、细胞内化、细胞内逃逸溶酶体效率和负载基因的基因转染效率等方面的区别，从而探讨不同多肽修饰的负载基因的 GS NPs 在细胞内转运的路径。
2. 通过双光照射释药（808 nm 激光刺激释放包载在水凝胶中的药物，680 nm LED 灯光发挥酞菁的光动力作用）的方法考察了包载酞菁（AlSc₄Pc₄）的金纳米棒复合水凝胶（Au_{rod}@ pNIPAAm-PEGMA/AlSc₄Pc₄）在体外的光动力治疗效果，并对其产生的机制作了初步研究。
3. 在细胞水平和动物水平上考察了四种包载酞菁（ZnPc）的修饰 PEG、PEI 的介孔二氧化硅（MSN/ZnPc、PEI-MSNs/ZnPc、PEG-MSNs/ZnPc 和 PEG-PEI-MSNs/ZnPc）的光动力效应，并对其产生光动力治疗的机制作了初步研究。

关键词：明胶-硅氧烷；金纳米棒；纳米水凝胶；介孔二氧化硅；光动力治疗

Abstract

This thesis was aimed to investigate the biological effect of gelatin-siloxane nanoparticles, Au_{rod}@pNIPAAm-PEGMA nanogels, mesoporous silica nanoparticles (MSNs) as gene and drug carriers. The following three aspects were discussed in this thesis:

1. Construct single peptide (Tat, HA2, R8) or two peptides (Tat/HA2 or Tat/R8) modified gelatin-siloxane nanoparticles, and compare the ability of gene transfection mediated by those as-synthesized gelatin-siloxane nanoparticles.
2. Investigate the PDT effects of Aluminium tetrasulphonated phthalocyanine mediated by Au_{rod}@ pNIPAAm-PEGMA on Hela cells.
3. Study the PDT effects of Zinc phthalocyanine mediated by MSNs, PEI-MSNs, PEG-MSNs and PEG-PEI-MSNs both *in vitro* and *in vivo*.

Key words: Gelatin-siloxane nanoparticle; Au nanorod; Nanohydrogel; Mesoporous silica nanoparticle; Photodynamic therapy

目 录

| | |
|-----------------------------------|----|
| 摘 要 | I |
| Abstract | II |
| 第一章 绪论 | 1 |
| 1.1 基因治疗及载体 | 1 |
| 1.2 PDT 治疗及载体 | 2 |
| 1.3 纳米材料与细胞的相互作用 | 5 |
| 1.4 本课题的提出和研究内容 | 11 |
| 参考文献 | 12 |
| 第二章 多肽修饰的明胶-硅氧烷纳米粒子作为基因载体的研究 | 21 |
| 2.1 引言 | 21 |
| 2.2 实验试剂和仪器 | 21 |
| 2.3 实验方法 | 23 |
| 2.4 结果与讨论 | 31 |
| 2.5 讨论 | 39 |
| 2.6 本章小结 | 40 |
| 参考文献 | 40 |
| 第三章 金纳米棒复合水凝胶作为光动力药物载体的生物学研究 | 43 |
| 3.1 引言 | 43 |
| 3.2 实验试剂和仪器 | 43 |
| 3.3 实验方法 | 46 |
| 3.4 结论 | 52 |
| 3.5 讨论 | 66 |
| 3.6 本章小结 | 68 |
| 参考文献 | 68 |
| 第四章 PEG、PEI 修饰的介孔二氧化硅作为光动力药物载体的生物 | |

| | |
|-------------------|-----|
| 学研究 | 71 |
| 4.1 引言 | 71 |
| 4.2 实验试剂和仪器 | 71 |
| 4.3 实验方法 | 72 |
| 4.4 结果与讨论 | 80 |
| 4.5 本章小结 | 92 |
| 参考文献 | 93 |
| 全文总结及展望 | 96 |
| 硕士期间发表论文情况 | 98 |
| 致谢 | 100 |

Contents

| | |
|---|-----------|
| Abstract in Chinese | I |
| Abstract in English | II |
| Chapter 1 Reviews | 1 |
| 1.1 Gene Therapy and Gene Vector | 1 |
| 1.2 Photodynamic Therapy and Drug Carrier | 2 |
| 1.3 Interaction Between Nanomaterials and Cells | 5 |
| 1.4 Proposal and content of this study | 11 |
| References | 12 |
| Chapter 2 Different Peptides Modified Gelatin-siloxane Nanoparticles as Gene Vectors | 21 |
| 2.1 Introduction | 21 |
| 2.2 Materials and Instruments | 21 |
| 2.3 Experimental | 23 |
| 2.4 Results | 31 |
| 2.5 Discussion | 39 |
| 2.6 Conclusions | 40 |
| References | 40 |
| Chapter 3 Au_{rod}@pNIPAAm-PEGMA as Photodynamic Drug Carriers | 43 |
| 3.1 Introduction | 43 |
| 3.2 Materials and Instruments | 43 |
| 3.3 Experimental | 46 |
| 3.4 Results | 52 |
| 3.5 Conclusions | 68 |

| | |
|---|-----------|
| References | 68 |
| Chapter 4 PEG and PEI Modified Mesoporous Silica Nanoparticles as Photodynamic Drug Carriers | 71 |
| 4.1 Introduction | 71 |
| 4.2 Materials and Instruments | 71 |
| 4.3 Experimental | 72 |
| 4.4 Results and Discussion | 80 |
| 4.5 Conclusions | 92 |
| References | 93 |
| Summary and future works | 96 |
| Publications | 98 |
| Acknowledgement | 100 |

第一章 绪论

1.1 基因治疗及载体

1.1.1 基因治疗概述

基因治疗是指将具有治疗作用的基因导入到靶细胞以纠正或补偿基因缺陷和异常，达到治疗疾病目的的一种方法[1]。基因治疗有广义和狭义之分，广义的基因治疗包括了狭义的基因治疗和利用基因药物进行治疗[2]。狭义的基因治疗（gene therapy）是利用分子生物学的方法，在基因水平上进行临床治疗。通过基因转移技术将外源正常基因直接导入患者病变部位的靶细胞，通过控制目的基因的表达、抑制、校正、替代或补偿缺陷或异常基因，从而恢复受体细胞、组织或器官的正常生理功能，进而达到治疗疾病的一种新型治疗方法[3]。

基因递送是基因治疗中的关键技术，基因递送载体包括病毒载体和非病毒载体。基因载体将治疗基因导入靶细胞需要克服以下细胞屏障：细胞膜、溶酶体、细胞核膜或线粒体膜等[4, 5]。

1.1.2 基因载体

基因载体主要分为病毒载体和非病毒载体。

病毒载体利用病毒对宿主细胞的高度感染性，能够将外源基因有效地导入细胞中，具有较高的转染效率。病毒载体的构建主要是移除病毒原有的致病性基因，代之以我们需要的治疗性基因，同时必须保留病毒结合到宿主细胞以及将基因导入细胞核所必需的基因。现在常用的病毒载体主要包括逆转录病毒（retrovirus）、腺病毒（adenovirus）、慢病毒（lentivirus）等[6, 7]。尽管病毒载体在治疗癌症以及遗传性疾病方面已经取得了长足的进展，但是其安全及有效性仍然没有得到完全的保证。病毒载体的一些固有缺陷，如病毒的免疫原性[8]、致癌性[9]、对生殖细胞的非特异性转染[10]等等还没有得到完全的改善。另一方面，近年来兴起的非病毒基因载体可以解决病毒载体带来的上述的一些安全性问题，此外，非病毒载体具有使用方便、易于大规模合成、生物相容性好的优点[11]。因此非病毒载体用于基因治疗方面有很好的前景。

现在研究的非病毒载体主要可以分为两大类：

1. 阳离子聚合物。壳聚糖、聚醚酰亚胺（PEI）、明胶等都属此类。Erbacher 等人将壳聚糖用于体外培养细胞的转染，取得了很好的效果[12]；而 PEI 作为转染试剂，其使用已经得到了商业化推广。由于 PEI 相对较高的细胞毒性，很多研究集中在 PEI 的改性及修饰方面以提高 PEI 的生物相容性[13]。

2. 有机-无机杂合纳米粒子，包括有机修饰的金纳米粒子、磁性纳米粒子、硅纳米粒子。硅纳米粒子具有很好的生物相容性，很适合作为基因载体。Roy 等人将有机修饰并荧光标记的硅纳米粒子作为基因载体转染体外培养的细胞取得了很好的效果[14]；而 Bharali 等人则成功将有机修饰的硅纳米粒子用于体内的基因转染[15]。

1.2 PDT 治疗及载体

1.2.1 光动力治疗概述

光动力治疗（Photodynamic Therapy，简称 PDT）是 20 世纪 70 年代后期发展起来的一种用于肿瘤临床治疗的新方法[16]。该疗法又称光辐射疗法或光化学疗法。与传统疗法如外科手术、化疗、放射治疗等相比，光动力治疗以其有效、安全、创伤小、副反应少、可协同性、可重复性和相对成本低等优点脱颖而出，并且在肿瘤的治疗中显示出很强的生命力，为中晚期、特别是无法采用传统方法治疗的癌症患者提供了一个机会，增加了一种治疗手段[17, 18]。目前，PDT 已经成为肿瘤防治研究中一个十分活跃的领域。近年来，美国的 FDA、日本、荷兰和加拿大等国的卫生部门已相继确认了这一肿瘤新疗法的治疗标准，在国内 PDT 治疗也逐渐成为新的研究热点。

1.2.2 光动力治疗基本原理

光动力治疗的基本原理是：机体接受光敏剂后一定时间，肿瘤组织摄取和存留的光敏剂较多，经特定波长的光照射，在生物组织中氧的参与下发生光化学反应，产生单态氧和或自由基，破坏组织和细胞中的多种生物大分子，最终引起肿瘤细胞死亡，达到治疗目的[19]。

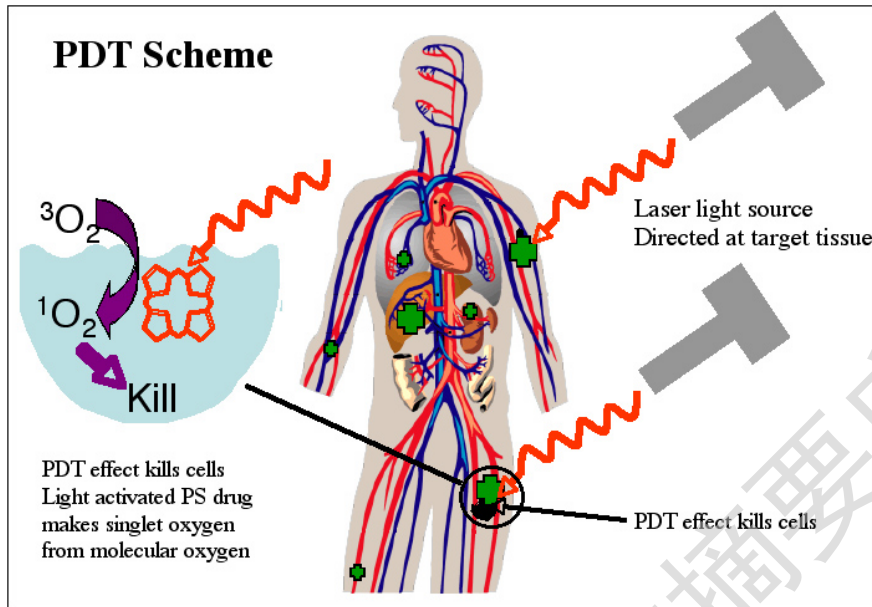


图 1-1 光动力治疗示意图[20]

Figure 1-1 Principle stages of photodynamic therapy [20]

1.2.3 光动力治疗引发生物学效应的机制

1.2.3.1 直接杀死肿瘤细胞

光化反应过程产生一些对生物体有害的活性氧物质，如单线态氧、超氧阴离子、羟自由基及过氧化氢等。这些分子能损伤蛋白质的巯基和氨基等基团而使蛋白质发生变性、交联以致结构发生改变、酶活性丧失等；同时还能攻击多聚不饱和脂肪酸引起脂质过氧化，导致生物膜结构和功能改变和破坏；另外还可能损伤 DNA 的分子结构。进而使肿瘤细胞收到严重影响直接死亡[21, 22]。

1.2.3.2 诱导细胞凋亡

PDT 能引起细胞以凋亡或坏死的两种不同形式的死亡发生[23]。PDT 对肿瘤的治疗作用主要是通过诱导肿瘤细胞凋亡而产生的[24]。目前，尽管对于 PDT 诱导细胞凋亡的确切机制还不很清楚，但随着分子生物学突飞猛进的发展，在分子水平上研究光动力治疗的作用机制有许多新进展。目前认为主要有以下三种机制：

1. 定位于线粒体的光敏剂诱导凋亡的机制

线粒体是细胞生命活动控制中心，它不仅是细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心，而且是细胞凋亡调控中心[25]。线粒体产生 ROS 后，使得膜电位降低、线粒

体发生去极化。在凋亡信号的刺激下，线粒体发生膨胀，其外膜膜电位降低，外膜破裂后释放出膜间隙的诸多凋亡效应因子，在细胞凋亡中起着主开关的作用，线粒体通透性转变孔的长时间开放，使得细胞色素 C、凋亡诱导因子、 Ca^{2+} 以及膜间隙中的其它凋亡因子被释放至细胞质中，它们或激活凋亡蛋白家族的主要成员 caspases，或独立破坏核内染色质，或作用于其它 Ca^{2+} 依赖性蛋白，从而是整个细胞结构破坏，功能紊乱，最终变成泡状凋亡小体而凋亡[26-29]。

2. 定位于溶酶体的光敏剂诱导凋亡的作用机制

定位于溶酶体的光敏剂通过两种途径致细胞凋亡[30]：第一种是经光照后光敏剂再分布于其它非线粒体靶点，诱导细胞凋亡[31]。另一种是光动力作用引发溶酶体原发损伤，酸性鞘磷脂酶活化，神经酰胺释放，细胞由此发生凋亡[32]。

3. 定位于质膜的光敏剂诱导凋亡的作用机制

定位于细胞膜的光敏剂通常开启死亡受体通路或者开启内部通路。大多数的光敏剂瞄准线粒体，线粒体功能的破坏可以诱导体内体外迅速的细胞凋亡[33]。定位于质膜的光敏剂也可以引起细胞坏死[34]，很可能是因为质膜的完整性遭到破坏，细胞内的 ATP 迅速耗竭。

1.2.4 光敏剂

在光动力治疗过程中，光敏剂、光源和有氧环境是其必须具备的三要素[35]，其中光敏剂是最关键的组成部分，光敏剂的结构与性能直接影响着肿瘤治疗的效果。第一代光敏剂是几种卟啉类化合物的混合物，卟啉类光敏剂是在卟吩环上拥有取代基的一类大环化合物的总称[36]。该类光敏剂活性较小，对光吸收差，清除率低，治疗效果不好，容易引起光敏反应，因此，很快被第二代光敏剂取代。

目前研究的第二代光敏剂按照结构可分为二氢卟吩类[37]、酞菁类[38, 39]和原卟啉[40]的衍生物。其中，酞菁类化合物是目前研究最为广泛的一类光敏剂，现已应用于临床的肿瘤治疗[38, 39]。该类光敏剂一般由 4 个苯环或萘环连接到卟啉的 β 吡咯位，并且用 N 原子替代甲位 C。酞菁类化合物脂溶性很强，因而通常与金属离子相连，以降低由于脂溶性过大而产生的溶解问题，其第 6 配位常常结合铝、锌、硅等，可以保证单态氧的顺利产生。但是，酞菁类光敏剂一般亲

水性不强，在水中易团聚，从而影响了其生物利用率和对光的吸收。

1.2.5 光动力药物载体

目前研究采用药物传递系统递送光敏剂进入细胞内，以克服单纯光敏剂在光动力治疗过程中存在的一些问题。理想的药物递送系统应该具备生物可降解，免疫原性小，与光敏剂结合后不改变后者活性，并能提供环境使光敏剂以单体释放，同时能使光敏剂聚集在病变组织，达到治疗浓度，并且在非靶细胞分布很少或没有分布等特点。目前已报道的光动力学纳米药物递送系统主要有胶束[41]、脂质体[42]、亲水聚合物-光敏剂共聚物[43]、聚合物粒子[44]、无机纳米粒子[45]等，并取得不同程度的成功。但也都有其各自的缺点。例如，胶束中的聚氧乙烯蓖麻油能引起急性超敏反应[46]，脂质体、亲水聚合物-光敏剂共聚物由于血浆半衰期较短，难以提高药物在肿瘤组织中浓度等[47]。

1.3 纳米材料与细胞的相互作用

纳米材料与细胞相互作用是一个复杂的生物学过程，一方面纳米材料被细胞摄取、代谢和降解，另一方面细胞的结构和功能也受到纳米材料的影响。近年来纳米材料与细胞相互作用的研究进展主要有：

1. 纳米材料影响细胞膜、细胞骨架和细胞核等亚细胞结构[48-50]。细胞膜脂双层与纳米材料接触后，物理性质发生改变，其稳定性与完整性受到破坏；纳米材料选择性激活或阻塞某些膜表面通道蛋白，接上配体后特异性结合细胞膜表面的受体或载体蛋白，进而启动不同的细胞应答；纳米材料破坏细胞骨架的有序结构，进而影响细胞骨架参与的某些生命活动；纳米材料与细胞核内大分子直接或间接作用，造成一系列 DNA 损伤，定义为“基因毒性” [51]。

2. 纳米材料影响细胞的某些重要生理功能。纳米材料通过凋亡或者自噬引起细胞程序性死亡[52]；某些纳米材料可促进或者自身诱导干细胞定向分化[53]；装载抗肿瘤药物的纳米材料连接某些配体后，能够特异地抑制肿瘤细胞的增殖、粘附和迁移[54]；碳纳米管能够特异地增强神经细胞的电生理活性，促进信号转导[55]。纳米材料的形状、大小、组成和表面性质等理化因素，在以上细胞生物学效应中起着非常重要的作用。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库