

学校编码:10384
学号:31420091150092

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

富勒烯衍生物对 A549 细胞氧化应激损伤的保护作用及机制

Protection of A549 cells from hydrogen peroxide-induced
cytotoxicity by functionalized C₇₀ and C₆₀ fullerenes

张宏刚

指导教师姓名: 叶社房 副教授

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 6 月

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它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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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

纳米科技的高速发展使得纳米材料被越来越多的应用在各个领域。富勒烯因其独特的分子结构，优异的理化性质而受到人们广泛的关注。作为富勒烯重要成员的 C_{60} 和 C_{70} ，由于特殊的性质及易于制备、易于修饰等优点有望在生物医学领域得到广泛应用。目前对于 C_{60} 及其衍生物的生物效应已有较多研究，但有关 C_{70} 富勒烯还缺乏深入系统的研究。本文结合细胞生物学研究新进展，以人肺腺癌细胞株 A549 作为模型细胞，着重探讨了 C_{70} 富勒烯衍生物对 A549 细胞氧化应激损伤的保护作用及机制，并与目前研究较多的 C_{60} 衍生物作比较。主要研究内容和取得的结果如下：

1. 设计合成了三种富勒烯衍生物： C_{70} 丙二酸衍生物，羟基化修饰的 C_{70} 和羟基化修饰的 C_{60} 。通过FI-TR、XPS、MS、SEM、TEM、AFM和Zeta potential等分析方法对制备得到的三种富勒烯衍生物进行了结构表征。表征结果表明，三种富勒烯衍生物的分子式为： $C_{70}(C(COOH)_2)_4$ ， $C_{70}(OH)_{34}$ 和 $C_{60}(OH)_{24}$ ，粒径大约为：70 nm、35 nm、110 nm，且粒径分布均匀，具有良好的分散性和稳定性。
2. 在 H_2O_2 诱导 A549 细胞氧化应激损伤模型基础上，以 CCK-8 比色分析法，Hoechst 33342 荧光染色法分析了细胞活性变化情况；以活性氧捕获剂 DCFH-DA 为标记探针，利用流式细胞仪检测 A549 细胞内 ROS 产生情况；以 Fluo-3 AM 探针检测细胞内 Ca^{2+} 的变化情况，以及通过 AnnexinV/PI 为标记探针检测细胞凋亡情况，来观察富勒烯衍生物对 H_2O_2 诱导 A549 细胞氧化应激损伤的保护作用。结果显示，三种富勒烯衍生物具有良好的细胞相容性，且可以抑制 H_2O_2 处理导致的细胞活性降低、细胞核固缩变小、ROS 升高、 Ca^{2+} 浓度升高以及细胞凋亡。
3. 探讨了富勒烯衍生物对 A549 细胞氧化应激抑制作用的机制。对 A549 细胞内脂质过氧化产物 (MDA) 和三种抗氧化酶 (SOD、GSH-Px 和 CAT) 进行检测，运用化学显色法对 A549 细胞的 caspase-3 活性变化进行分析，运用流式细胞术分析了三种富勒烯衍生物对 A549 细胞线粒体膜电位的影响，同时在体外研究了三种富勒烯衍生物对 DPPH 自由基的清除作用。结果显示：三

种富勒烯衍生物可以抑制 H_2O_2 处理所导致的脂质过氧化产物含量升高和抗氧化酶活性降低，可以抑制 H_2O_2 处理所导致线粒体去极化以及 caspase-3 活性升高，三种富勒烯衍生物都表现出对自由基的清除作用，效率大小为： $\text{C}_{70}(\text{OH})_{34} > \text{C}_{60}(\text{OH})_{24} > \text{C}_{70}(\text{C}(\text{COOH})_2)_4$ 。

关键词：富勒烯； C_{60} ； C_{70} ；抗氧化；富勒醇；氧化应激

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

As nanotechnology and materials science has made rapid development, nanomaterials have been widely applied in many fields. Due to their unique chemical and physical features of C_{60} , the biological activities of fullerenes have been recognized in recent years. As important members of the fullerene, fullerenes C_{60} and C_{70} may spark an abundance of application in biomedicine field because of their startling features such as straightforward synthesis and easily modification. Some of the previous reports indicated that water-soluble C_{60} derivatives had excellent ability to protect cells against ROS-associated damage. However, there is little evidence concerning ROS-scavenging capacity of water-soluble C_{70} derivatives. In the present study, we tested the ability of water-soluble C_{70} derivatives $C_{70}(C(COOH)_2)_4$ and $C_{70}(OH)_{34}$ in protecting cells from oxidative damage induced by H_2O_2 . Furthermore, we compared the two C_{70} derivatives with $C_{60}(OH)_{24}$ to analyze the possible protective role of water-soluble C_{70} derivatives using A549 cells. The main contents and results are as follows:

1. The chemically modified polyhydroxylated fullerene derivatives and malonic acid fullerene derivatives were synthesized. The compounds were characterized by FI-TR、XPS、MS、SEM、TEM、AFM and zeta potential. The chemical form of the three fullerene derivatives used for the experiment *in vitro* were finally determined to be $C_{70}(C(COOH)_2)_4$, $C_{70}(OH)_{34}$ and $C_{60}(OH)_{24}$. The average diameters of nanoparticles determined by DLS were 70, 32, and 117 nm, respectively. Prepared fullerene derivatives are most stable under physiological pH.
2. H_2O_2 is particularly attractive as a model oxidant because its cellular actions and its fate have been well studied. Cell viability was determined by using the CCK-8 assay and hoechst stain. Intracellular ROS was analyzed fluorometrically by measuring the oxidation of the nonfluorescent probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) to the fluorescent metabolites dichlorofluorescein (DCF). The concentration of intracellular free calcium $[Ca^{2+}]_i$ was measured by means of

the cell-permeable fluorescent calcium indicator Fluo-3/AM using a flow cytometry. Apoptotic cell death was detected by Annexin V-FITC/PI staining. Our study demonstrated that $C_{70}(C(COOH)_2)_4$, $C_{70}(OH)_{34}$ and $C_{60}(OH)_{24}$ protect cells against oxidative stress-induced cell damage, suppressing the elevation of intracellular ROS and Ca^{2+} , along with the apoptotic cell death.

3. Furthermore, exposure of A549 cells to H_2O_2 caused a reduction in antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), and an increment in malondialdehyde (MDA) level. Moreover, H_2O_2 caused significant elevation in intracellular caspase-3 activity, and the loss of MMP as determined by flow cytometric assay. However, pretreatment of the cells with fullerene derivatives prior to H_2O_2 exposure blocked these H_2O_2 -induced cellular events noticeably. DPPH assay showed the following sequence of antioxidant efficiency: $C_{70}(OH)_{34} > C_{60}(OH)_{24} > C_{70}(C(COOH)_2)_4$.

Key Words: fullerene C_{70}/C_{60} ; antioxidant; fullerenol; oxidative stress

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
目录.....	III
Contents.....	VI
第一章 绪论	1
1.1 引言.....	1
1.2 富勒烯 (fullerene) 的结构和理化性质.....	2
1.3 水溶性富勒烯衍生物的合成.....	4
1.3.1 非共价方法改善富勒烯的水溶性.....	4
1.3.2 共价修饰富勒烯衍生物的合成.....	4
1.4 富勒烯衍生物生物活性研究进展.....	6
1.4.1 富勒烯的毒性.....	6
1.4.2 富勒烯衍生物的抗氧化保护作用.....	8
1.4.3 富勒烯衍生物抗癌活性.....	11
1.4.4 富勒烯衍生物的抗菌活性.....	12
1.4.5 富勒烯衍生物的其他作用.....	13
1.4.6 C ₇₀ 衍生物生物活性研究进展.....	13
1.5 本研究的提出和研究内容.....	14
第二章 富勒烯衍生物的制备及表征	16
2.1 引言.....	16
2.2 材料与仪器.....	17
2.2.1 实验试剂.....	17
2.2.2 实验仪器.....	18
2.3 实验方法.....	19

2.3.1 富勒烯衍生物的制备.....	19
2.3.2 理化表征.....	20
2.4 结果与讨论.....	22
2.4.1 富勒烯衍生物的制备.....	22
2.4.2 傅立叶变换红外光谱.....	22
2.4.3 X-射线光电子能谱.....	23
2.4.4 质谱.....	25
2.4.5 扫描电子显微镜 (SEM)、透射电子显微镜 (TEM)	29
2.4.8 粒径与表面电位 (DLS and Zeta potential)	30
2.5 本章小结.....	32
第三章 富勒烯衍生物对 A549 细胞氧化应激损伤的保护作用研究 34	
3.1 引言	34
3.2 实验材料.....	35
3.2.1 主要材料与仪器.....	35
3.2.2 主要试剂配制.....	37
3.2.3 常规玻璃器皿的处理.....	37
3.3 实验方法.....	38
3.3.1 细胞培养.....	38
3.3.2 CCK-8 法检测 A549 细胞细胞活性	38
3.3.3 Hoechst 33342 荧光染色.....	39
3.3.4 流式细胞仪检测细胞 ROS 的变化	39
3.3.5 Fluo-3 AM 荧光探针检测细胞钙离子变化.....	40
3.3.5 AnnexinV/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡率	41
3.3.6 统计分析.....	42
3.4 结果与讨论.....	42
3.4.1 CCK-8 细胞毒性检测结果	42
3.4.2 Hoechst 33342 荧光染色检测.....	45
3.4.3 三种富勒烯衍生物对 H ₂ O ₂ 诱导的 A549 细胞内 ROS 水平的影响	46
3.4.4 三种富勒烯衍生物对 H ₂ O ₂ 诱导的 A549 细胞内钙离子浓度的影响	48

3.4.5 三种富勒烯衍生物对 H ₂ O ₂ 诱导的 A549 细胞凋亡率的影响	50
3.5 本章小结	52
第四章 富勒烯衍生物的抗氧化机制研究	53
4.1 引言	53
4.2 实验材料与仪器	54
4.3 实验方法	55
4.3.1 细胞培养	55
4.3.2 脂质氧化产物 (MDA) 检测	56
4.3.3 过氧化氢酶检测	57
4.3.4 谷胱甘肽过氧化物酶检测	58
4.3.5 总 SOD 活性检测	59
4.3.6 Caspase-3 活性分析	60
4.3.7 流式细胞术分析线粒体膜电位改变	61
4.3.8 DPPH 自由基的清除能力测定	62
4.3.9 统计分析	62
4.4 结果与讨论	62
4.4.1 三种富勒烯衍生物对氧化诱导脂质氧化产物 (MDA) 的影响	62
4.4.2 三种富勒烯衍生物对细胞 CAT、SOD 和 GSH-Px 活性的影响	64
4.4.3 三种富勒烯衍生物对氧化诱导的 A549 细胞 Caspase-3 活性的影响	65
4.4.4 三种富勒烯衍生物对氧化诱导的 A549 细胞线粒体膜电位的影响	66
4.4.5 三种富勒烯衍生物 DPPH 自由基的清除能力测定	68
4.5 本章小结	69
第五章 全文总结	71
参 考 文 献	73
硕士期间发表及论文	86
致 谢	87

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Review	1
1.1 Introduction	1
1.2 Physical properties of C₆₀ and C₇₀	2
1.3 The synthesis of water soluble fullerenes derivatives	4
1.4.1 Non-Covalent Methods	4
1.4.2 Covalent Approaches	4
1.4 Advances in biomedical application of fullerenes derivatives	6
1.4.1 Toxicity	6
1.4.2 Antioxidant/cytoprotective activity	8
1.4.3 Anticancer activity	11
1.4.4 Antimicrobial activity Immunomodulation and	12
1.4.5 Other applications	13
1.4.5 Advances in biomedical application of C ₇₀ fullerenes derivatives	13
1.5 The proposal and contents of this study	14
Chapter 2 Preparation and characterization of fullerene derivatives	16
2.1 Introduction	16
2.2 Materials and instruments	17
2.2.1 Materials.....	17
2.2.2 Instruments	18
2.3 Methods	19
2.3.1 Preparation of fullerene derivatives	19
2.3.2 Characterization	20
2.4 Results and Discussion	22

2.4.1 Preparation of fullerene derivatives	22
2.4.2 FT-IR	22
2.4.3 XPS	23
2.4.4 MS.....	25
2.4.5 SEM、TEM.....	29
2.4.8 DLS and Zeta potential	30
2.5 Summary	32
Chapter 3 Protection of A549 cells from ROS-associated damage by functionalized C₇₀ and C₆₀ fullerene derivatives	34
3.1 Introduction	34
3.2 Materials	35
3.2.1 Reagents and instruments.....	35
3.2.2 Preparation of main reagents.....	37
3.2.3 Conventional glassware processing	37
3.3 Methods.....	38
3.3.1 Cell culture.....	38
3.3.2 CCK-8 assay.....	38
3.3.3 Hoechst 33342 stain.....	39
3.3.4 Measurement of ROS.....	39
3.3.5 Intracellular Ca ²⁺ concentration assay.....	40
3.3.5 Determination of apoptosis	41
3.3.6 Statistical analysis	42
3.4 Results and Discussion.....	42
3.4.1 CCK-8 assay.....	42
3.4.2 Hoechst 33342 stain	45
3.4.3 Fullerene derivatives block the accumulation of ROS	46
3.4.4 Fullerene derivatives block the accumulation of intracellular Ca ²⁺	48
3.4.5 Fullerene derivatives attenuate H ₂ O ₂ -induced apoptosis	50
3.5 Summary	52

Chapter 4 Antioxidant mechanism of fullerene derivatives	53
4.1 Introduction	53
4.2 Materials and instruments.....	54
4.3 Methods.....	55
4.3.1 Cell culture	55
4.3.2 Measurement of MDA content, and	56
4.3.3 Measurement of CAT activities	57
4.3.4 Measurement of GSH-Px activities.....	58
4.3.5 Measurement of SOD activities	59
4.3.6 Measurement of caspase-3 activity	60
4.3.7 Measurement of mitochondrial membrane potential.....	61
4.3.8 Antioxidant activity assay	62
4.3.9 Statistical analysis	62
4.4 Results and Discussion.....	62
4.4.1 Fullerene derivatives attenuate H ₂ O ₂ -induced elevation of MDA content	62
4.4.2 Fullerene derivatives rescued loss of antioxidant enzyme activities	64
4.4.3 Fullerene derivatives reduce the caspase-3 activity	65
4.4.4 Fullerene derivatives restored the H ₂ O ₂ -induced mitochondrial dysfunction	66
4.4.5 DPPH assay.....	68
4.5 Summary	69
Chapter 5 Conclusion	71
Reference	73
Research achievements	86
Acknowledgements	87

第一章 绪论

1.1 引言

纳米 (nanometer, nm) 是长度单位, $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$, 即十亿分之一米。1-100 nm 范围内的几何尺度称为纳米尺度 (nanoscale)。纳米技术 (nanotechnology) 是指至少有一维在纳米尺度内, 通过操纵和加工原子、分子得到的具有纳米尺度独特性质和功能的新结构、装置或系统的技术。而运用纳米技术制造出来的在三维空间尺度上至少有一维上处于纳米量级的物质称为纳米材料 (nanomaterial), 如直径为 1-100 nm 的纳米线, 厚度为 1-100 nm 的纳米薄膜。通常将三维都在 1-100 nm 的纳米材料称为纳米颗粒 (nanoparticle), 也称为超微颗粒 (ultrafine particle, UFP), 包括商品化的纳米颗粒和空气中的超细颗粒物 (UFPs) 以及在生物医学方面应用的纳米粒子^[1]。

纳米材料是纳米科技的基础和先导, 随着纳米技术的不断发展和应用, 纳米材料已经成为世界各国科学技术发展的热点^[2]。美国 IBM 公司首席科学家 Armstrong 指出: 正如微电子技术产生了信息革命, 纳米技术及材料的研究将成为下一代信息的核心。我国也高度重视纳米科技及材料的发展, 在国家纳米科技工作会议上提出了纳米科技的发展计划, 并在各个科技项目如“973”和“863”申报上给予纳米方面课题极大的资金资助, 同时鼓励社会投入, 目前累计社会投入超过 30 亿元人民币。

与宏观块状材料不同, 纳米颗粒是一种处于宏观和微观水平之间的介观结构粒子。当同一种物质的材料随着尺寸进入纳米量级时, 由于其表面原子与材料总原子数之比随着粒径尺寸的减少而急剧增大, 其物理、化学性质与宏观材料相比将发生明显的改变, 显示出纳米颗粒独有的物理化学性质, 主要表现出表面效应、小尺寸效应、量子尺度效应和宏观量子隧道效应等特殊效应^[1, 3]。

1985 年, Kroto 等^[4]用高功率激光轰击石墨, 使石墨中的碳原子汽化, 用氦气流把气态碳原子送入真空室。迅速冷却后形成碳原子簇, 再用质谱仪检测。意外的发现了含不同碳原子数的原子簇, 其中相当于 60 个碳原子, 质量数落在 720 处的信号最强, 其次是相当于 70 个碳原子, 质量数为 840 处的信号。C₆₀ 的质谱

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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库