

学校编码:10384
学号:31420081150629

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

多壁碳纳米管对成骨细胞增殖
及分化的影响

Effects of Multi-walled Carbon Nanotubes on the
Proliferation and Differentiation of Osteoblast

王义芳

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: 2011 年 月

论文答辩时间: 2011 年 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席:_____

评 阅 人:_____

2011 年 月

多壁碳纳米管对成骨细胞增殖及分化的影响

王义芳

指导教师

叶社房

副教授

厦门大学

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

摘 要

碳纳米管 (carbon nanotubes, CNTs) 具有独特的物理、化学和生物特性, 使其在骨组织修复材料的应用中得到广泛关注的热点材料之一。有关 CNTs 的细胞毒理学研究还不够深入, 已公开报道的研究结果也存在着极大的争议。一些研究结果显示 CNTs 可引起一系列与细胞代谢有关的细胞凋亡、细胞周期间歇、氧化应激反应、细胞信号转导和炎症反应发生。体外骨组织细胞生物相容性的研究是 CNTs 在骨组织工程的发展和骨组织工程材料的应用研究中亟待解决的关键科学问题之一。本文结合 CNTs 毒理学研究新进展, 以成骨细胞 MC3T3-E1 细胞株作为模型细胞, 考察两种不同长度的多壁碳纳米管 (multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs) 对 MC3T3-E1 细胞增殖与分化的影响并探讨其机制。具体如下:

采用混合酸化的方法纯化 MWCNTs, 得到分散性良好的 MWCNTs 悬液; 用多步超声过滤的方法分离出两种不同长度 MWCNTs, 并用 Image J 图像处理软件统计分析 MWCNTs 长度分布。用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)、X 射线光电能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)、热重分析仪 (thermo gravimetric analyzer, TGA) 对两种不同长度的 MWCNTs 进行理化表征分析。

MC3T3-E1 成骨细胞暴露于两种不同长度的 MWCNTs, 用 WST-1 比色分析法测定 MWCNTs 对 MC3T3-E1 细胞的毒性效应; 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 单染结合流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 检测细胞凋亡率; 吖啶橙/溴化乙锭 (acridine orange/ethidium bromide, AO/EB) 双染进行细胞凋亡形态学观察。

利用异硫氰酸酯 (fluorescein isothiocyanate, FITC)-BSA 标记 MWCNTs, 结合激光共聚焦扫描显微镜 (confocal laser scanning microscopy, CLSM) 观察了两种不同长度的 MWCNTs 在细胞内的分布与定位情况; 利用 FCM 侧向角散射光特性, 定量分析 MC3T3-E1 细胞对 MWCNTs 的摄取率; 利用荧光显微镜与扫描电镜 (scanning electron microscopy, SEM) 观察不同长度的 MWCNTs 对 MC3T3-E1 成骨细胞粘附的影响。

利用对硝基磷酸苯酚二钠 (pNPP) 法与茜素红染色 (alizarin red staining, ARS) 法检测 MWCNTs 对 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)

活性与矿化结节形成的成骨分化功能的影响。利用罗丹明荧光素-鬼笔环肽 (rhodamine phalloidin) 与 FITC 标记的抗 α -tubulin 二抗, 结合 CLSM 观察 MWCNTs 对细胞骨架 F-actin 与 α -tubulin 的影响。

结论: 结果表明, S-MWCNTs 与 L-MWCNTs 对 MC3T3-E1 细胞活性抑制均表现为浓度依赖性, 细胞凋亡是诱导细胞活性降低的可能机制; 两种长度的 MWCNTs 均在细胞表面有不同程度的聚集, 细胞内部的 MWCNTs 主要集中在胞浆中, 且无明显的长度依赖性, 细胞与 MWCNTs 的相互作用导致细胞的粘附能力下降; ALP 与 ARS 实验结果表明, MWCNTs 对 MC3T3-E1 细胞成骨分化功能抑制表现为浓度依赖性, 细胞骨架重组的抑制可能是导致 MC3T3-E1 细胞成骨分化功能抑制的原因之一。

关键词: 多壁碳纳米管; MC3T3-E1 细胞; 增殖分化; 细胞骨架

Abstract

Carbon nanotubes (CNTs) have attracted great attention due to their unique physical and chemical properties. Because of the lack of systematic studies on the biological and toxicological properties of CNTs, there is a discrepancy on toxicity reports. CNTs generated cell level changes including changes involved in metabolism, apoptosis, cell cycle arrest, stress response, cellular transport and inflammatory response. *In vitro* assays using cultured cells are of great significance for studying many aspects of cell biology for CNTs in bone tissue engineering. In this study, a series of experiments were carried out to investigate the cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) using MC3T3-E1 cell line. The main contents and results are as follows:

Pristine MWCNTs were oxidized by the oxidizing acid (H_2SO_4 , HNO_3 or H_2O_2). The oxidized MWCNTs in the supernatant were then size-separated using a multi-step microfiltration process. Two different lengths of MWCNTs were characterized using a transmission electron microscope (TEM), thermo gravimetric analyzer (TGA), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

The cytotoxicity of MWCNTs on MC3T3-E1 cells was investigated by a WST-1 assay. Flow cytometry (FCM) and acridine orange/ethidium bromide double staining (AO/EB) were applied to analyze apoptosis after treated with MWCNTs.

The location of MWCNTs in MC3T3-E1 cells was observed by CLSM, flow cytometric light scatter was used to evaluate the cellular uptake potential of MWCNTs. Quantitative cell adhesion assays (DAPI staining) were performed on MC3T3-E1 cells after incubation with MWCNTs. MC3T3-E1 cells morphology was observed by using SEM.

The effect of MWCNTs on MC3T3-E1 cells differentiation was investigated by p-nitrophenyl phosphate disodium (pNPP) and alizarin red staining (ARS) assays; Immunofluorescence was used to evaluate the effect of MWCNTs on cytoskeleton reorganization.

Conclusion: Acidic oxidation methods and multi-step microfiltration process

could produce multi-walled carbon nanotubes with 161 nm and 681 nm in length, respectively. Treatment of MC3T3-E1 cells with MWCNTs significantly inhibited cell proliferation. MC3T3-E1 cells exposed to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs were found undergoing apoptosis. The interaction between MWCNTs and MC3T3-E1 cells affected the initial cell attachment, morphology and cell functions. These results suggested that the safety profile of MWCNTs should be more thoroughly investigated in order to provide better understanding for their design and applications as biocompatible nanomaterials.

Key Words: Multi-walled carbon nanotubes; MC3T3-E1 cells; Proliferation and Differentiation; Cytoskeleton

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 碳纳米管在生物医学工程领域的应用进展	2
1.2.1 碳纳米管在生物复合材料中的应用	2
1.2.2 碳纳米管在载体系统中的应用	2
1.2.3 碳纳米管应用于示踪与标记	4
1.2.4 碳纳米管在生物传感器中的应用	5
1.3 碳纳米管的生物相容性评价	6
1.4 碳纳米管在骨组织工程的研究进展	8
1.4.1 碳纳米管的骨组织相容性	8
1.4.2 碳纳米管的骨组织毒性效应	10
1.5 本研究的提出和研究内容	10
参考文献	12
第二章 多壁碳纳米管的纯化及表征	19
2.1 引言	19
2.2 材料与方法	20
2.2.1 实验试剂	20
2.2.2 实验方法	21
2.2.2.1 MWCNTs 纯化及表征	21
2.2.2.2 MWCNTs 对培养基成分的影响	22
2.3 结果与讨论	23
2.3.1 MWCNTs 理化表征	23
2.3.2 MWCNTs 对培养基成分的影响	26
2.4 本章小结	29

参考文献	30
第三章 多壁碳纳米管的 MC3T3-E1 成骨细胞毒性研究	33
3.1 引言	33
3.2 实验材料与方法	34
3.2.1 实验材料.....	34
3.2.2 实验方法.....	37
3.2.2.1 成骨细胞活性分析(WST-1)	37
3.2.2.2 PI 单染法与 AO/EB 双染法检测细胞凋亡.....	37
3.2.2.3 成骨细胞摄取 MWCNTs 研究.....	38
3.2.2.4 成骨细胞粘附实验.....	39
3.2.2.5 MWCNTs 对 MC3T3-E1 细胞功能的影响.....	40
3.2.2.6 免疫荧光法观察细胞骨架 F-actin 与 α -tubulin.....	40
3.3 结果与讨论	41
3.3.1 WST-1 毒性检测结果.....	41
3.3.2 细胞凋亡检测.....	42
3.3.3 成骨细胞摄取 MWCNTs 研究.....	45
3.3.4 成骨细胞粘附观察.....	48
3.3.5 MWCNTs 对成骨细胞增殖和分化的影响.....	49
3.3.6 细胞骨架形态学观察.....	53
3.4 本章小结	57
参考文献	58
第四章 全文总结	62
硕士期间发表及论文	63
致 谢.....	64

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Reviews	1
1.1 Introduction	1
1.2 Biomedical application of carbon nanotubes	2
1.2.1 The application of carbon nanotubes in nanocomposites.....	2
1.2.2 The application of carbon nanotubes in delivery system	2
1.2.3 The application of carbon nanotubes for labelling and tracking	4
1.2.4 Carbon nanotubes for biosensor applications.....	5
1.3 The biocompatibility of carbon nanotubes	6
1.4 The application of carbon nanotubes in bone tissue engineering	8
1.4.1 Carbon nanotubes with bone tissue compatibility	8
1.4.2 Bone tissue toxicity of carbon nanotubes.....	10
1.5 The proposal and contents of this study	10
REFERENCES	12
Chapter 2 Purification and characterization of multi-walled carbon nanotubes	19
2.1 Introduction	19
2.2 Materials and methods	20
2.2.1 Materials.....	20
2.2.2 Methods.....	21
2.2.2.1 Characterization of MWCNTs	21
2.2.2.2 Probing the interaction of MWCNTs with α -MEM	22
2.3 Results and discussion	23
2.3.1 Characterization of the MWCNTs	23
2.3.2 The interaction of MWCNTs with α -MEM	26

2.4 Summary	29
REFERENCES	30
Chapter 3 The cytotoxicity of MWCNTs on MC3T3-E1 cells	33
3.1 Introduction	33
3.2 Materials and methods	34
3.2.1 Materials.....	34
3.2.2 Methods.....	37
3.2.2.1 WST-1 assay	37
3.2.2.2 PI single staining and AO/EB double staining	37
3.2.2.3 Cellular uptake of MWCNTs	38
3.2.2.4 Adhesion behavior of MC3T3-E1 cells.....	39
3.2.2.5 Effects of MWCNTs on the osteogenic differentiation of cells	40
3.2.2.6 Immunohistochemistry.....	40
3.3 Results and discussion	41
3.3.1 WST-1 assay	41
3.3.2 PI single staining and AO/EB double staining.....	42
3.3.3 Cellular uptake of MWCNTs	45
3.3.4 Adhesion behavior of MC3T3-E1 cells	48
3.3.5 Effects of MWCNTs on the osteogenic differentiation of cells	49
3.3.6 Effects of MWCNTs on the F-Actin and microtubule Cytoskeleton	53
3.4 Summary	57
REFERENCES	58
Chapter 4 General Conclusions	62
Publications and Conference Presentations	63
Acknowledgement	64

第一章 绪论

1.1 引言

1991年,日本电镜专家 Iijima 等通过高分辨透射电子显微镜 (high resolution transmission electron microscope, HRTEM) 在电弧放电法生产富勒烯的阴极沉积物中发现了由碳原子构成的直径为 4-30 nm、长度约为 1 μm 的中空管,这就是今天被人们广泛关注的碳纳米管 (carbon nanotubes, CNTs), 也称巴基管(bucky tube)^[1]。CNTs 是继石墨、金刚石和 C_{60} 之后的又一种碳的同素异形体, 结构类似于由碳原子形成的六边形网络片层所组成的中空管体^[2], 根据石墨片层的多少可分为单壁碳纳米管 (single-walled carbon nanotubes, SWCNTs) 与多壁碳纳米管 (multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs) 两种类型。SWCNTs 由一层石墨原子层构成, 其直径大多为 0.4-2 nm; 而 MWCNTs 可看成由多个直径不同的单层石墨原子层的空心圆柱套构而成, 直径 2-100 nm。CNTs 所具有的纳米级尺寸和独特的结构使其具有良好的性能: 较大的比表面积、特殊的电学性质、超高的力学性能、具有极高的强度和极大的韧性 (其抗拉强度是钢的 100 倍, 重量却不及钢的 1/6)。基于 CNTs 以上优异的物理化学性质, 自 CNTs 发现伊始, 研究人员就致力于开发其在生物学和生物医学领域的应用^[3-5]。

CNTs 在生物医学工程领域显示出诱人的潜在应用价值和前景, 吸引了众多科研工作者的关注, 研究领域主要集中在生物传感器、药物载体、组织工程和生物显像等几个方面。例如: 在 CNTs 表面可以通过物理吸附或者化学偶联方式负载细胞穿透性较差生物大分子 (蛋白、核酸等), 将其载送进入细胞, 从而在载体及生物传感器领域备受关注^[6-8]; 利用 CNTs 的空腔管体容纳生物特异性分子及药物载送生物活性分子及药物进入细胞或组织^[9]; CNTs 在近红外区域有荧光信号, 而在这个区域细胞的本底荧光较小, 不会对 CNTs 的荧光信号造成干扰, 因此可以用 CNTs 的近红外荧光特性实现对细胞表面低表达蛋白的灵敏检测, 从而进行疾病诊断并在细胞水平上对治疗效果进行评价^[10, 11]。此外, CNTs 优良的机械及导电性能也使其成为硬组织工程材料研究和应用的主要方向之一^[12-15]。虽然 CNTs 是由被认为无毒或低毒的石墨组成, 但现有研究资料关于 CNTs 毒性或

生物兼容性的研究结果相互矛盾。因此，在 CNTs 应用到人体这个复杂的微环境中时，都必须考虑到它对人类健康的影响，需要对 CNTs 的毒性和生物兼容性进行全深入地调查研究。认识和解决这一问题，是促进和保障纳米科技健康和可持续发展的必要条件。自 2003 年以来，由于国家政府机构（特别是一些发达国家）的高度重视，迅速组织和开展了有关 CNTs 生物毒理作用的研究。为此，多国都开始进行纳米生物安全性的专题研究，以保证这种新型材料的使用安全。

1.2 碳纳米管在生物医学工程领域的应用进展

1.2.1 碳纳米管在生物复合材料中的应用

生物医用材料领域中，细胞与材料间的相互作用是研究的主要课题之一。材料表面的微观结构对细胞的生物调控作用甚为重要。一方面，纳米材料因其独特的体积效应和表面效应，有利于细胞粘附、增殖和细胞分化。例如，有研究表明 CNTs 涂覆的 3D 胶原支架材料利于成骨细胞 Saos-2 的粘附与伸展；同样在聚氨酯 (polyurethane, PUR) 泡沫上沉积 CNTs 后表现出利用羟基磷灰石形成显着的生物兼容性，其原因是 CNTs 提供利于羟基磷灰石形成的晶核及表面的化学基团。另一方面，目前应用较广的医用材料多由一些有机高分子制成，受高分子的固有性质所限，材料的机械性能不够理想。CNTs 具有较大的长径比、较低的密度、很高的轴向强度和刚度可作为理想的复合材料增强相。此外，CNTs 良好的导电性能，可用于模拟细胞所处的微环境，Edwards^[16] 等研究发现 PLGA/MWCNTs (poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA) 复合材料利于成纤维细胞的增殖，其原因在于此支架材料整合了 CNTs 的机械与电学性能。众多研究表明，高分子材料中加入 CNTs 可以显著改善原有聚合物的传导性、强度、弹性和韧性。CNTs 及其有机复合材料作为一种新型的具有生物和光电双重性能的复合材料，既具有包括 CNTs 的各种光电机机械性能，又具备有机材料的韧性等特性，将在组织工程领域得到广泛研究。

1.2.2 碳纳米管在载体系统中的应用

CNTs 具有特殊的管状结构，而且体积小，作为高效传质单元能够较为容易地

穿过细胞膜；另一方面，CNTs比表面积大，易于吸附有机分子，可在养料运输、药品供给系统与细胞之间形成圆筒形的渠道。CNTs优异的理化性能使其成为运载氨基酸、蛋白质和核酸等分子最佳选择之一^[17-20]。目前，将药物等分子装载到CNTs上有三种方法：

第一种方法是利用范德华力将药物、大分子物质自然的装载到CNTs的管腔内或吸附到CNTs表面^[21]。模拟了大分子进入CNTs内的动力学模型结果表明，在水溶性环境下DNA分子可以自然进入到CNTs管腔内。范德华力和CNTs的疏水性在DNA装载到CNTs的过程中起着重要作用。研究认为，CNTs-DNA复合物有望在DNA修饰的分子电子学、分子传感器、基因传输系统方面取得应用。

第二种方法是将药物或大分子物质以物理静电吸附或化学共价结合方式连接到功能化的CNTs上。DNA、蛋白质、药物等大分子物质穿透细胞膜的能力很差，但是CNTs具有良好的细胞膜通透性，有的CNTs甚至可以进入细胞核。利用CNTs对细胞膜的通透性，Pantarotto^[22]等用氨功能化的CNTs与质粒DNA通过静电作用连接在一起后与HeLa细胞共培养发现，该复合物可以穿透过细胞膜进入胞内，并能将交联在一起的质粒DNA有效的导入细胞核，与空白组相比复合物组基因表达量提高了10倍；Singh^[23]等将质粒DNA结合与CNTs表面，利用CNTs作为基因运输载体同样增强质粒DNA的细胞通透性。同样CNTs表面负载药物还可用于靶向、成像、治疗等^[24]，Murakami^[25]等将阿霉素共价结合与氧化后的CNTs表面增强药物的抗癌效果。

第三种方法是利用纳米萃取的方法在液相中将药物装入CNTs管腔内。此方法一方面，可实现药物缓、控释；另一方面，提高药物进入细胞的能力。例如，Murakami^[26]等用该方法将地塞米松装载到氧化型的SWCNTs管腔内（每克CNTs可装载200 mg地塞米松），释放实验结果表明，在磷酸盐缓冲液（37 °C, pH 7.4）中可以持续的释放出地塞米松。体外实验结果表明，释放出的地塞米松激活了鼠骨髓基质细胞STZ的糖皮质激素响应组件转录因子，并诱导鼠成骨细胞MC3T3-E1碱性磷酸酶的表达。细胞膜的选择透过性阻碍药物进入细胞的有效浓度，Ajima^[27]等将顺铂填充入SWCNTs管腔内，结果发现SWCNTs负载顺铂，提高顺铂进入细胞的效率，细胞内高浓度的顺铂是增强其抗癌效果的关键。

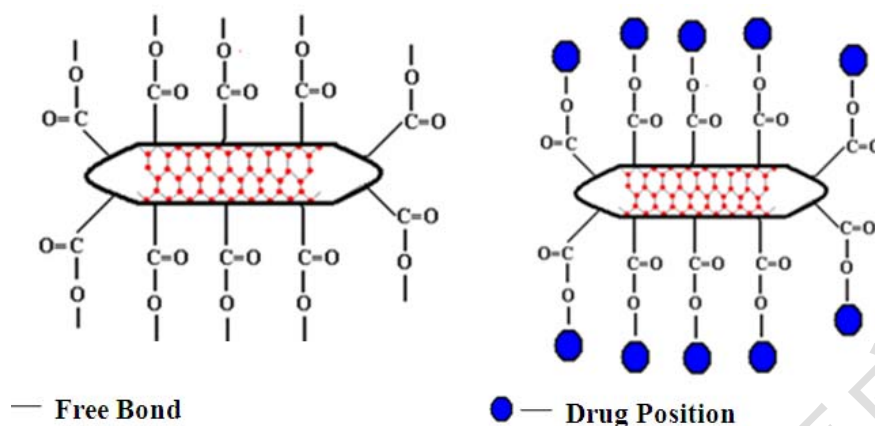


图 1-1 碳纳米管表面羧基化与载药示意图^[28]

Figure 1-1 The carbon nanotubes are functionalized with carboxylic acid (Left) and drug uploaded with functionalized carbon nanotube (Right)

1.2.3 碳纳米管应用于示踪与标记

由于 CNTs 具有生物相容性、近红外荧光和稳定性等特性，可作为光学成像、磁共振和放射性示踪中的造影剂等^[29-31]。CNTs 可在体内无侵袭性地追踪植入的细胞和监控组织生成的过程。标记植入的细胞不仅能够帮助评估工程化组织的生存能力，同时也有助于研究移植细胞的体内分布和迁徙途径。

造血干细胞在再生医学中具有重要意义，但是迄今为止仍未有有效的示踪方式检测造血干细胞的分化。CNTs 本身的特殊理化性质为其在再生医学中的应用奠定了基础。CNTs 由于具有特殊的一维空间结构并以其空间限制效应为造影剂分子提供一个有效的平台以提高其成像能力，并且磁性 CNTs 对造血干细胞无毒副效应，可以用于细胞示踪。

红外光谱在 900-1300 nm 是生物医学应用上一个重要的光学窗口，有较低的光学吸收和较小的自发荧光背景。利用 SWCNTs 近红外特性，Kam^[32]等通过叶酸修饰 SWCNTs 使其能够选择性地进入有叶酸受体的肿瘤细胞的示踪，同时近红外的连续辐射使得 SWCNTs 产生过度的局部升温，最终形成红外触发的选择性癌细胞致死而不影响无受体的正常细胞。

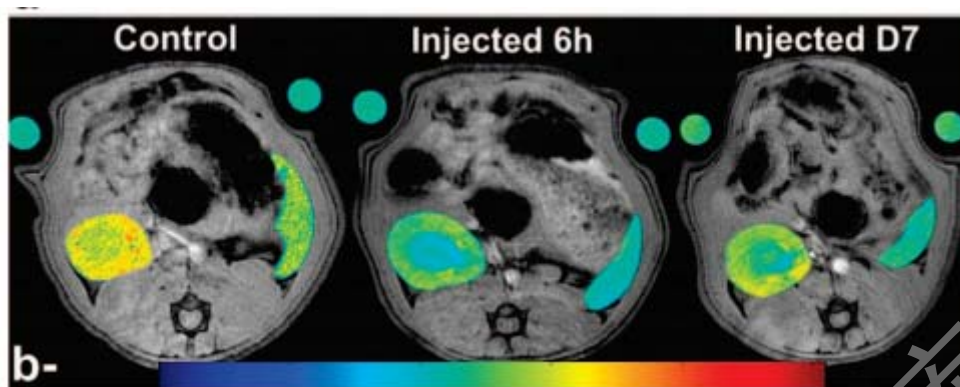


图 1-2 碳纳米管在核磁成像系统中的应用^[31]: 碳纳米管注射鼠体内 6 小时, 7 天后碳纳米管在脾脏和肾脏内不同程度的聚集

Figure 1-2 Proton MR Image of an injected rat: 6 h after, and 7 days after injection showing signal variation in the spleen and kidneys

1.2.4 碳纳米管在生物传感器中的应用

生物传感器是一门由生物、化学、物理、电子技术等多种学科相互交叉渗透发展起来的新学科,是目前非常活跃的一个研究领域。生物传感器由于选择性高、分析速度快、操作简单、价格低廉、可进行在线甚至活体分析等特点,引起了科研工作者的极大关注。近年来,随着生命科学的迅速发展,利用生物传感器快速检测与鉴定生命物质,研究生命体系中的生化反应,进而跟踪监测生命体的代谢过程具有十分重要的意义,使得生物传感器研究越来越受到重视。CNTs 修饰电极的表面效应,即直径小、表面能高、原子配位不足,使其表面原子具有很高的活性,与周围的物质间的电子传递更容易。CNTs 在修饰电极领域的引入,开辟了碳纳米管在电催化和电分析化学中的应用新领域^[33, 34]。Lee^[35]等将细胞色素 C (cytochrome c) 固定于聚苯胺与 MWCNTs 基质表面, MWCNTs 电极增强实时监测的可能。Lynam^[36]等将鼠免疫球蛋白 G (anti- IgG) 与通过共价结合与非共价结合的方式结合与 CNTs 上,通过循环伏安法检测发现 CNTs 基传感器可以用于免疫检测。调控 CNTs 电极表面的修饰,使 CNTs 的优异性能完美地表达出来,以促进和开拓其在各领域的实际应用,成为近年来化学家们极为关注的研究方向。

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