

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 200445007

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

几种基于金的纳米粒子
细胞生物效应研究

The Cell Bioeffect Study of Several Au-based Nanoparticles

黄小丽

指导教师姓名:	张其清 教授 任磊 副教授
专 业 名 称:	生物医学工程
论文提交日期:	2007 年 6 月
论文答辩日期:	2007 年 月
学位授予日期:	2007 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2007 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

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

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非盈利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打：“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪论	1
1.1 引言.....	1
1.2 纳米材料的基本概念.....	2
1.3 纳米材料的奇异特性.....	2
1.4 Au 纳米材料研究和应用进展.....	5
1.5 纳米材料生物效应研究的必要性和紧迫性.....	12
1.6 纳米材料体外生物效应及其毒理学研究现状与分析	14
1.7 纳米材料生物效应可能的作用机制	17
1.8 纳米材料的生物效应未来研究重点和展望.....	20
1.9 本研究的提出和拟研究内容	20
参考文献.....	22
第二章 原代小鼠胚胎成纤维细胞培养	28
2.1 引言.....	28
2.2 材料和方法	29
2.3 结果与讨论	35
2.4 本章小结.....	40
参考文献.....	41
第三章 Au-Au₂S 纳米粒子作为药物释放载体的细胞生物效应研究	42
3.1 引言.....	42
3.2 材料和方法	43
3.3 结果与讨论	57
3.4 本章小结.....	81
参考文献	82

第四章 不同 Au 纳米粒子的细胞生物效应研究.....	85
4.1 前言.....	85
4.2 材料和方法.....	86
4.3 结果与讨论.....	94
4.4 本章小结.....	119
参考文献.....	120
作者攻读硕士学位期间发表与交流的论文.....	121
致谢.....	122

厦门大学博硕士

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Reviews	1
1.1 Instruction	1
1.2 The Basic Concepts of Nanomaterials	2
1.3 Singular Characteristics of Nanomaterials	2
1.4 The Research and Application Progress of Au Nanomaterials	5
1.5 The Necessary and Emergency of Studing Bioeffects of Nanomaterials... 	12
1.6 Bioeffects and <i>in vitro</i> Toxicology Research of Nanomaterials	14
1.7 The Possible Mechanism of Bio-effects of Nanomaterials.....	17
1.8 Nanomaterials bio-effects Research Priorities and prospects	20
1.9 The Proposal and Contents of This Study	20
References	22
Chapter 2 Culture of Primary Mouse Embryo Fibroblasts	28
2.1 Introduction	28
2.2 Materials and Methods.....	29
2.3 Results and discussion	35
2.4 Summary.....	40
References	41
Chapter 3 The Cell Bioeffect Study of Au-Au₂S Nanoparticles as Drug Delivery Vector	42
3.1 Introduction	42
3.2 Materials and Methods.....	43
3.3 Results and discussion	57

3.4 Summary	81
References	82
Chapter 4 The Cell Bioeffect Study of Several Au-based Nanoparticles	85
4.1 Introduction	85
4.2 Materials and Methods	86
4.3 Results and Discussion	94
4.4 Summary	119
References	120
Selected Publications and Conference Presentations	121
Acknowledgements	122

廈門大學博碩

摘 要

在研究与开发纳米材料的同时,纳米材料的生物效应即生物安全性问题也逐渐成为科研工作者研究的新焦点。作为众多纳米材料重要成员之一的 Au 纳米粒子,由于制备简单、易于生物修饰等优点在生物医学领域得到了广泛应用,但是有关 Au 纳米粒子的生物效应研究还缺乏深入系统的研究。本论文瞄准基于 Au 的纳米粒子的细胞生物效应,开展了一系列的研究。取得的主要成果有:

(1) 在本实验室建立起小鼠胚胎成纤维细胞培养和传代的稳定方法,然后应用培养的成纤维细胞检测了近红外敏感的 Au-Au₂S 纳米粒子的细胞毒性反应,探讨了小鼠胚胎成纤维细胞培养用于体外毒理学检测的可行性,探索出一种经济、稳定、快速的外来化合物细胞毒性评价方法。

(2) 本课题组合成了近红外敏感的药物释放载体 Au-Au₂S 纳米粒子,并对其和载顺铂的 cisplatin-Au-Au₂S 的细胞毒性、细胞内的分布定位、以及潜在致癌性进行了考察。通过细胞毒性实验,细胞凋亡实验,乳酸脱氢酶实验,二阶段细胞转化实验,透射电镜切片等多种方法考察了 Au-Au₂S 纳米粒子作为药物载体的生物相容性。同时,为研究纳米材料在不同细胞系生物效应的差异,本研究选取了 Hela, CHL, NIH/3T3, PMEF 等多种细胞系对其进行了系统的考察。结果表明,一定浓度范围内 Au-Au₂S 纳米粒子对三种细胞系的生长、繁殖均未产生明显的毒副作用;纳米粒子进入细胞内后,细胞依然保持良好的形态和生长状况。为 Au-Au₂S 纳米粒子作为药物释放载体进一步应用于临床提供了一定的实验数据和理论依据。

(3) 同种纳米材料其形态尺寸(粒径)大小以及剂量的多少等参数不同时,其性质会发生较大改变,从该角度出发,本课题研究了 4 种不同形状、3 种不同粒径的 Au 纳米粒子的生物效应。采用 MTT 分析方法,流式细胞术,LDH 实验,结合 Hoechst 33258 染色方法,系统考察了不同 Au 纳米粒子对 CHL 细胞的毒性。结果表明,纳米粒子对细胞毒性影响均存在浓度依赖关系,不同形状的 Au 纳米粒子的细胞毒性不同,其毒性大小由大到小顺序为:棒状>菜花状>立方体状>球状。三种不同粒径(12 nm, 30 nm, 50 nm)的纳米粒子的细胞毒性无显著差异。

利用 ICP/MS, TEM, 考察三种不同细胞 (Hela, NIH/3T3, CHL) 对纳米粒子的吸收, 并同步观察纳米粒子在细胞内的分布情况, 结果显示不同的细胞对各种纳米粒子的吸收率为 30% 左右, 各细胞系对纳米粒子的吸收无明显差异。TEM 结果显示不同形状的金纳米粒子均能通过细胞膜进入细胞, 包裹于溶酶体内, 并随机分布在细胞质内。

关键词: 原代培养; 纳米粒子; 细胞生物效应

厦门大学博硕

Abstract

With the fast development of nanotechnology, the bioeffects of the nanomaterials have gradually become a new focus in the research fields flowing the research and exploitation of nanomaterials. Recently, gold nanoparticles as one of the important nanomaterials display several features of straightforward synthesis and easily modification, which make them be widely applied in biomedicine. However, the bioeffects of gold nanoparticles have not been systematic studied. This thesis is aimed at the cell bioeffects of Au-based nanoparticles. A series of studies on cell bioeffects of Au-based nanoparticles have been operated. The main results are as follows:

(1) Establishing the methods of mouse embryo fibroblasts culture and subculture stability. Then the cultured fibroblasts were used to detect the cytotoxic reactions of near-infrared sensitive Au-Au₂S Nanoparticles. Discussion the possibility of toxicology testing on mouse embryonic fibroblasts cultured *in vitro*. To explore an economic, stable and rapid cytotoxicity evaluation methodologies of foreign compounds.

(2) Based on Au, we synthesized the near-infrared-sensitive drug delivery vector Au-Au₂S nanoparticles, to further investigate biological safety of NIR sensitive cisplatin-loaded Au-Au₂S nanoparticles, four different cell lines were used to investigate the acute cytotoxicity, cell apoptosis, and the long term potential carcinogenicity *in vitro*. our *in vitro* short and long-term data provided preliminary evidence suggesting the cisplatin-loaded Au-Au₂S nanoparticles are non-toxic below the maximum recommended dosage.

(3) The toxicity of three different shape and different size gold nanoparticles to CHL cells was investigated by MTT analysis, flow cytometry technology and Hoechst 33258-based analysis. Results indicated that the cytotoxicity on CHL cells were concentration-dependent, and the following order was observed: rod>cauliflower>cube>sphere. No significant difference was observed among three

different size. ICP / MS and TEM were used to study the absorption of nanoparticles on three different cells (Hela, NIH/3T3, CHL) and, in parallel observation of nanoparticles distribution in cells, The results showed that 30% nanoparticles were uptaken by various cell lines. TEM results show that the different shape of nanoparticles can enter through the cell membrane and randomly distributed in the cytoplasm.

Key words: Primary cell culture; Nanoparticles; Cell bioeffect

廈門大學博碩

第一章 绪论

1.1 引言

1959 年 12 月 29 日, 美国著名的物理学家、两度诺贝尔物理学奖获得者 Richard Phillips Feynman^[1]在美国物理学召开的年会上, 作了一个题为 “There's Plenty of Room at the Bottom” 的著名演讲。在演讲中, 他满怀激情的说: “当我们深入并游荡在原子的周围, 我们是在按不同的定律活动, 我们会遇到许许多多新奇的事情, 能以全新的方式生产, 完成异乎寻常的工作。如果有一天可以按人的意志安排一个个原子, 将会产生什么样的奇迹?” 他给人们描述了一幅激动人心的画面: 通过人为的操纵单个原子, 来构造人们需要的特定功能的材料。正如 Feynman 的预言, 纳米科学技术在几十年后兴起并迅速发展。并被认为是 21 世纪科技发展四大支柱领域之一, 由于其可能导致生产与生活方式的变革, 现已成为当前世界各国投入最多, 发展最快的科学研究和技术开发领域之一^[2,3,4,5,6]。如图 1-1, 是各国政府近八年内纳米技术领域的投资额度曲线^[7]。

本论文的重点是有关 Au 纳米材料的生物效应方面的研究工作, 我们先去了解纳米科技的基本概念和 Au 纳米材料的研究应用历史, 这将对进一步理解研究基于 Au 的纳米材料的重要意义有更深刻的认识。

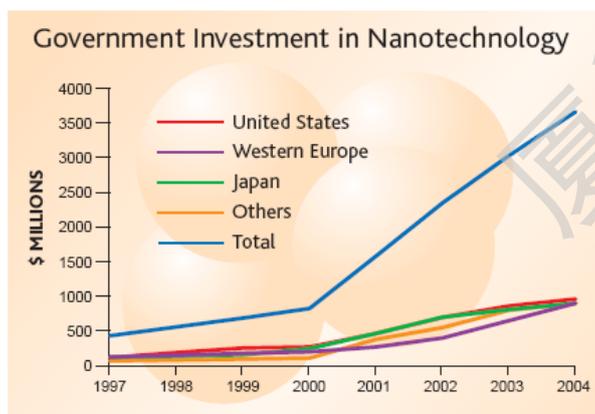


图 1-1 各国政府在纳米技术领域的投资额度曲线

Fig.1-1 Government Investment in Nanotechnology

1.2 纳米材料的基本概念

纳米材料和技术是纳米科技领域富有活力，研究内涵十分丰富的科学分支。“纳米(nm)”是长度的度量单位，它的长度为一米的十亿分之一(10^{-9} m)。它正好介于原子、分子为代表的微观世界和以人类活动为代表的宏观世界的中间地带，也是物理学、化学、材料科学、生命科学以及信息科学发展的新领域。通常所界定的纳米尺寸范围是1~100 nm，纳米材料是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围或由它们作为基本单元构成的材料。一方面，在纳米材料中原子和分子的个体作用更为突出，使得人们可以在原子层面上进行材料制备和器件设计。通俗地说，纳米材料可以被当作一种“超分子”，充分地展现出量子效应；而另一方面它又是一种非常小的“宏观物质”，表现出体材料所不具备的特性。

1.3 纳米材料的奇异特性

纳米技术和纳米材料特别是金属纳米材料自诞生 10 余年以来所取得的巨大成就和对科学及社会各个领域的影 响和渗透一直引人注目，主要原因之一即因为它具有奇异的特性。因纳米体系既非典型的微观系统亦非典型的宏观系统，是一种典型的介观系统^[8]，具有表面效应、小尺寸效应和宏观量子隧道效应。当将宏观物体细分成纳米级粒子后，其光学、热学、电学、磁学、力学及化学方面的性质将和大块固体时显著不同。纳米材料的奇异特性正引起世界各国科学家浓厚的研究热情^[9]。

(1) 表面效应^[10]

球形粒子的表面积与直径的平方成正比，其体积与直径的立方成正比，故其比表面积(表面积:体积)与直径成反比。随着粒子直径变小，比表面积将会显著增大，说明表面原子所占的百分数将会显著地增加。超微粒子表面原子百分数与粒子直径的关系见表 1-1^[11]。

表 1-1 纳米粒子表面原子数与粒子直径的关系

Tab.1-1 the relations between Nanoparticle surface atoms and particle diameter

纳米微粒尺寸 (nm)	包含原子数	表面原子所占比例
10	30000	20
4	4000	40
2	250	80
1	30	90

由表 1-1 可见, 对直径大于 100 nm 的粒子表面效应可忽略不计, 当尺寸小于 100 nm 时, 比表面积剧增, 甚至 1 g 超微粒子表面积的总和可高达 100 m², 这时的表面效应将不容忽略。

巨大的比表面积, 键态严重失配, 出现许多活性中心, 表面台阶及粗糙度增加, 表面出现非化学平衡、非整数配位的化学价, 导致纳米体系的化学性质与化学平衡体系出现很大差别^[12,13,14]。因此超微粒子的表面具有很高的活性, 在空气中金属粒子会迅速氧化而燃烧。利用表面活性, 金属超微粒子可望成为新一代的高效催化剂和贮气材料以及低熔点材料。

(2) 小尺寸效应^[15]

纳米材料以原子或分子为起点, 可设计出更强、更轻、可自修复的结构材料^[16]。当纳米微粒尺寸与光波波长、德布罗意波长、超导态相干长度等特征尺寸相当或者更小时, 其周期性边界被破坏, 则其声、光、电、磁、热力学等性能呈现出新奇的现象, 显现出与传统材料的极大差异。如铜粒子达到纳米尺寸就不能导电, 而二氧化硅粒子在 20 nm 时却开始导电, 高分子材料加纳米材料制成的刀具比金刚石制品还要坚硬, 纳米陶瓷具有良好的韧性等。金属纳米材料的电阻随尺寸下降而增大, 电阻温度系数下降甚至变成负值; 10 nm-25 nm 的铁磁金属微粒矫顽力比相同的宏观材料大 1000 倍, 而当粒子尺寸小于 10 nm 时矫顽力变为 0, 表现为超顺磁性。

对纳米粒子而言, 尺寸变小, 同时其比表面积显著增加, 从而产生一系列新奇的性质。特殊的光学、热学性质、磁学、力学性质。同时纳米粒子的小尺寸效应还表现在超导电性、介电性能、声学特性以及化学性能等方面。

(3) 久保效应

日本科学家久保提出定义^[17]:当粒子尺寸减小到很低值时,费米能级附近的电子能级由准连续变成离散能级的现象。久保提出过能级间距和金属粒子的关系公式:

$$S=E_F/3N$$

式中 S 为能级间距, E 为费米能级, N 为总电子数。因为宏观物体包含无限原了, N 趋于无穷, 则 S 趋于零, 即大粒子或宏观物体能级间距几乎为零, 而纳米微粒包含原子有限, N 不算太大, 则能级间距大于热能、电场能或者磁场能时, 使其磁、光、热、电、超导电性能与宏观材料显著不同, 即量子尺寸效应。金属超微粒中电子数较少, 因而不遵守费米统计, 小于 10 nm 的纳米微粒强烈地趋于电中性, 即久保效应。

(4) 宏观量子隧道效应^[18]

微观粒子具有贯穿势垒的能力称为隧道效应。近年来, 人们发现一些宏观量, 例如微粒的磁化强度、量子相干器件中的磁通量和电荷等也具有隧道效应。人们把这种现象称之为宏观的量子隧道效应 MQT(Macroscopic Quantum Tunneling)^[19]。

(5) 原子的扩散行为

原子扩散行为影响材料的诸多性能如蠕变、超塑性、电性能和烧结性等。纳米晶 Co 的自扩散系数比 Cu 的体扩散系数大 14-16 个量级, 比 Cu 的晶界自扩散系数大 3 个量级。Fe 在非晶 FeSiBNbCu 晶化形成的复相纳米合金 Au(由 Fe, Si 纳米金属间化合物和晶间的非晶相构成)中的扩散要比在非晶合金 Au 中快 10-14 倍, 这是由于存在过剩的热平衡空位。Fe 在 Fe-Si 纳米晶中的扩散由空位调节控制。10 年前, Gleite 教授预测^[20,21], 若某材料的晶粒尺寸减至纳米级, 则在低温下会扩散蠕变且应有很好的塑性变形能力, 甚至可以在室温下扩散蠕变。但近年实验发现, 多数纳米金属样品极脆, 扩散蠕变速率亦低。

(6) 催化和贮氢性能

在催化剂材料中, 反应活性位置可以是表面上的团簇原子, 或是表面上吸附的另一种物质。由于纳米晶材料可以提供大量催化活性位置, 因此很适宜作催化材料。现在已经有多种纳米金属粒子弥散在惰性物质上的催化剂如 Rh/Al₃O₂, Pt/C 广泛应用于石油化工及汽车排气处理等方面。FeTi 和 Mg₂Ni 是贮

氢材料的重要候选合金。如用 Mg 和 Ni 粉末经球磨可直接形成化学当量的 Mg_2Ni ，晶粒平均尺寸为 20 nm-30 nm，吸氢性能比普通多晶材料好得多。纳米晶 FeTi 的吸氢活化性能明显优于普通多晶材料。

1.4 Au 纳米材料研究和应用进展

基于 Au 的纳米材料是众多纳米材料中的重要成员之一，具有易控制粒径大小（从 0.8 到 200 nm），表面易被大量的小分子、多肽、DNA、蛋白等修饰性以及易重复合成等优点^[22]，而且 Au 纳米粒子是一种球状分层的纳米复合物粒子，由薄的金壳和绝缘体核组成，在纳米壳球体的核-壳结构中，其等离激元共振频率随核和壳相对大小的变化而系统地变化。利用自组装和还原化学，可以自由地设计和制造纳米壳球体，使其等离激元共振吸收峰的位置位于光谱的近红外区。Au 纳米材料这一独特的光学性质，体现其人工设计的可控性，在药物缓释、免疫分析、癌症治疗和成像以及生物传感等很多领域有着广泛的应用前景。

1.4.1 Au 纳米材料在生物医学中的研究与应用

纳米金是应用于生物医学分析、获取体内外信息较理想的材料。近年来在生物分析和生物标记研究领域也得到了较大发展。如应用于原位杂交的检测、免疫电镜的检测、凋亡标记的检测以及一些生物传感器的检测等研究领域都得到了广泛的应用。

1. 免疫标记

纳米金拥有高密度的免疫标记能力，可以和任何有适合基团的分子键合。Au 纳米粒子作为特殊标记物进行生化分析的研究始于 20 世纪 60 年代。1962 年，有学者用金纳米粒子标记细胞进行电子显微镜研究；1971 年，有人又将金纳米微粒引入电镜免疫技术中，从而开创了 Au 纳米颗粒用于免疫标记技术的先河。1981 年，IGS 与银显染增强技术结合形成免疫金银染色 (IGSS)^[23]。2005 年，Hussain 等^[24]将纳米金标记的缩氨酸配体与细胞一起孵育，使其进入细胞内。其优点在于：①可以适用于不同的反应（蛋白质、肽类、脂、寡核苷酸等），且反应的条件十分温和；②纳米 Au 的共轭化合物穿透性很强，以达到 40 倍的穿透能力。凝胶过滤分离，纯化标记聚合物，化学计量法即可计算其标记量；③Au

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.

廈門大學博碩