

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：24520061152675

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

单壁碳纳米管诱导肺泡巨噬细胞
炎症反应及分子机制

Molecular Mechanisms underlying inflammation
response in primary alveolar macrophages exposed to
single-walled carbon nanotubes

吴艺晖

指导教师姓名：张其清 教授/博士生导师

叶社房 博士/副教授

专 业 名 称：生物医学工程

论文提交日期：2009年7月

论文答辩时间：

学位授予日期：

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2009年7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

目 录

中文摘要.....	V
英文摘要.....	III
1 前言.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 纳米材料的基本概念及其特性.....	2
1.3 碳纳米管在生物医学领域的应用进展.....	5
1.4 碳纳米管的生物安全性与毒理学效应研究现状.....	9
1.5 碳纳米管的毒理学效应的可能机制.....	14
1.6 本研究的提出和研究内容.....	18
2 材料与方法.....	21
2.1 常用药品与试剂.....	21
2.2 实验方法.....	27
2.2.1 单壁碳纳米管的纯化.....	27
2.2.2 纯化的单壁碳纳米管理化性质表征.....	27
2.2.3 碳纳米管的灭菌与分散.....	28
2.2.4 原代肺巨噬细胞模型的建立.....	28
2.2.5 MTT 法检测 refined-SWCNTs 对肺泡巨噬细胞的毒性.....	31
2.2.6 相差显微镜观察 refined-SWCNTs 对细胞形态的影响.....	31
2.2.7 TEM 观察 refined-SWCNTs 在细胞内的定位.....	32
2.2.8 ELISA 检测肺泡巨噬细胞分泌 TNF- α 的水平.....	33
2.2.9 DCF 法检测肺泡巨噬细胞内 ROS 的聚积.....	35
2.2.10 蛋白印迹法检测 NF- κ B 蛋白表达.....	37
2.2.11 以 ELISA 为基础的 Trans AM™ NF- κ B p65 试剂盒检测 NF- κ B 与 DNA 结合活性.....	39

2.3 统计方法.....	40
3 结果与讨论.....	41
3.1 单壁碳纳米管的纯化与理化性质表征	41
3.2 原代肺巨噬细胞模型的建立	44
3.3 单壁碳纳米管对原代肺巨噬细胞的毒性效应.....	47
3.4 单壁碳纳米管在原代肺巨噬细胞内的定位	52
3.5 单壁碳纳米管诱导肺泡巨噬细胞分泌 TNF- α	53
3.6 单壁碳纳米管诱导细胞内活性氧 (ROS) 的聚积.....	55
3.7 ROS 在单壁碳纳米管诱导细胞 TNF-a 分泌中的作用.....	59
3.8 单壁碳纳米管活化细胞内 NF- κ B.....	61
3.9 NF- κ B 在单壁碳纳米管诱导细胞 TNF- α 分泌中的作用.....	64
4 全文主要结论.....	67
附 录.....	69
参考文献.....	70
致 谢.....	79
硕士期间发表与交流的论文.....	81

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	VII
Chapter 1 Reviews.....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 The basic concepts and special characteristics of nanoparticles.....	2
1.3 Biomedical application of carbon nanotubes	5
1.4 Progress in biological effects of carbon nanotubes.....	9
1.5 The possible biological effects mechanisms underlying carbon nanotubes...14	
1.6 The proposal and contents of the present study.....	18
Chapter 2 Materials and Methods.....	21
2.1 Chemicals and reagents.....	21
2.2 Research methods.....	27
2.2.1 Purification of single-walled carbon nanotubes.....	27
2.2.2 Characterization of refined- SWCNTs.....	27
2.2.3 Sterilization and disperse of refined- SWCNTs.....	28
2.2.4 Primary rat alveolar macrophages culture.....	28
2.2.5 Cytotoxicity of refined-SWCNTs analysed by MTT.....	31
2.2.6 Modality of refined-SWCNTs detected by phase contrast microscope....	31
2.2.7 Refined-SWCNTs uptake by alveolar macrophages detected by TEM....	32
2.2.8 TNF- α \square release evaluated by ELISA.....	33
2.2.9 Reactive oxygen species(ROS) accumulation evaluated by DCF.....	35
2.2.10 NF- κ B activation evaluated by western blotting.....	37

2.2.11 NF- κ B DNA binding activation evaluated by NF- κ B DNA binding activity TransAM ELISA.....	39
2.3 Statistic method.....	40
Chapter 3 Results and Discussion.....	41
3.1 Purification and characterization of single-walled carbon nanotubes.....	41
3.2 Primary rat alveolar macrophages culture	44
3.3 Cytotoxicity of refined-SWCNTs on alveolar macrophages.....	47
3.4 Refined-SWCNTs uptake by alveolar macrophages.....	52
3.5 TNF- α \square release induced by SWCNTs.....	53
3.6 ROS stimulated with SWCNTs.....	55
3.7 Role of ROS in TNF- α \square release on alveolar macrophages induced by SWCNTs.....	59
3.8 Activation of NF- κ B in alveolar macrophages induced by SWCNTs.....	61
3.9 Role of NF- κ B in TNF- α on alveolar macrophages induced by SWCNTs...64	
Chapter 4 Brief Conclusion of This Article.....	67
APPENDIX: ABBREVIATIONS.....	69
REFERENCES.....	70
ACHNOWLEDGEMENT.....	79
PUBLICATIONS.....	81

摘 要

基于考察 SWCNTs 与原代肺泡巨噬细胞的细胞相容性、原代肺泡巨噬细胞暴露于 SWCNTs 后可能发生的炎症反应、氧化应激和细胞核转录因子- $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 活化状态, 进而阐明 SWCNTs 体外诱导炎症反应涉及的分子机制的目的。本实验采用焙烧、稀盐酸回流法和高速离心的方法, 纯化商品化的 SWCNTs 作为本实验的研究对象; 采用透射电子显微镜 (TEM) 和扫描电子显微镜 (SEM) 的图像分析, 结果显示 refined-SWCNTs 外径及长度较为均一, 中空的单壁管腔清楚可见; 热重分析仪 (TGA) 结果显示当温度达 $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 短时间内样品质量显著变为 7.4% ; 且 X 射线光电子能谱 (XPS) 结果显示, refined-SWCNTs 表面的碳元素为 $98.49\text{ wt}\%$, 而氧元素和氯元素含量分别为 $1.51\text{ wt}\%$ 和 $0.00\text{ wt}\%$; 综合结果表明获得了纯度达 98% 的 SWCNTs。采用支气管灌洗法 (BAL) 从 SD 大鼠肺部提取后纯化、传代和培养原代肺泡巨噬细胞, 建立了本实验的体外细胞模型。采用四甲基噻唑蓝 (MTT) 比色分析法, 发现当 SWCNTs 在 $0\sim 100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 剂量范围内与细胞分别共培养 24 h 、 48 h 和 72 h , 随着剂量的增加和时间的延长, 细胞的存活率均受到影响, 细胞抑制效应呈时间、剂量依赖效应; 其中 SWCNTs 在剂量为 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率下降最为显著。相差显微镜观察发现, $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 SWCNTs 作用细胞 24 h 、 48 h 、 72 h , 细胞与 SWCNTs 表面黏附随着时间的延长而越为牢固, 且脱落的细胞逐渐增多。TEM 观察到 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ SWCNTs 与细胞共培养 6 h 已能进入细胞, 且 SWCNTs 在不同时间的分布以细胞质为主。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测, 发现 $1\sim 10\text{ }\mu\text{g/mL}$ SWCNTs 会诱导细胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$, 且 SWCNTs 为 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时 $\text{TNF-}\alpha$ 分泌量增多最为明显; $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 SWCNTs 分别作用细胞为 8 h 、 12 h 和 18 h , 细胞分泌的 $\text{TNF-}\alpha$ 随暴露时间的增加而增多, 且在 12 h 时 SWCNTs 诱导细胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 量增多最为显著。以活性氧自由基 (ROS) 捕获剂 2', 7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠 (DCFH₂-DA) 为敏感标记探针, 采用共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 和流式细胞仪 (FCM) 检测, 发现 $1\sim 10\text{ }\mu\text{g/mL}$ SWCNTs 作用细胞 6 h , 细胞内的 DCF 荧光强度随着 SWCNTs 剂量的增加而增强, 表明 SWCNTs 诱导了细胞的氧化应激。应用基于 ELISA 技

术的核转录因子 NF- κ B 与 DNA 结合活性分析试剂盒分析核转录因子- κ B (NF- κ B) 与 DNA 的结合活性, 发现 1~10 μ g/mL SWCNTs 剂量依赖性诱导细胞内 NF- κ B 的活化, NF- κ B 与 DNA 结合活性随着 SWCNTs 剂量增加而增强; 用蛋白印迹法 (western blotting) 检测, 发现 1~10 μ g/mL SWCNTs 诱导 NF- κ B 活性亚单位 p65 发生了核转位, 同时 NF- κ B 抑制性亚单位 I κ B α 则发生了胞内降解; 综合结果表明 SWCNTs 诱导了细胞内的 NF- κ B 活化。

结论: 本实验通过纯化获得了纯度达 98% 的 SWCNTs; SWCNTs 能诱导肺泡巨噬细胞产生细胞毒性、细胞氧化应激效应、炎症因子 TNF- α 的释放以及 NF- κ B 的活化; SWCNTs 可能通过氧化应激依赖机制和 NF- κ B 活化机制体外诱导肺泡巨噬细胞炎症反应。

关键词: 活性氧产物; 核转录因子- κ B; 肿瘤坏死因子- α

Abstract

The aim in the present study was to investigate the inflammation reactions, assess oxidative stress and activation of nuclear factor- κ B after exposure of SWCNTs in primary alveolar macrophages, focus on discovering the possible molecular mechanisms involved in the pulmonary cytotoxicity of SWCNTs. The thermal and acidic methods were used to remove metal catalyst from the purchased SWCNTs those which were prepared by a chemical vaporization deposition (CVD) method. And then the physicochemical properties and purity of the refined-SWCNTs was characterize and analysis by the transmission electronic microscopy (TEM), scanning electronic microscopy (SEM), x-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and thermogravimetry analysis (TGA), as TEM and SEM results showed that the refined-SWCNT sizes were homogeneous; the scan of XPS showed that the presence of carbon, oxygen and chlorine elements were 98.49 wt% and 1.51 wt% , 0.00 wt% respectively; the result of TGA remarkably showed that survivor of the sample was remained 7.4 % as thermal ablation as 600 °C; as view of the above rsules, the SWCMTs were refined than 98% which was used as the research objective of this current study. To establish the cell model of primary alveolar macrophages which were used to analyses the cytotoxic reactions of SWCNTs by bronchoalveolar lavage (BAL). The cell viability decreased as concentration- and time-dependant as rat alveolar macrophages exposed to 0~100 μ g/mL refined-SWCNTs for 24 h, 48 h and 72 h which evaluated by MTT reduction assays. The cell adhesive ability decreased markedly with the increase gradually as the SWCNTs-culture time increased which were detected by phase contrast microscope. The absorption of SWCNTs on alveolar macrophages study was detected by TEM. After exposure for 6 h, 10 μ g/mL refined-SWCNTs would cross into the cytoplasm and the results showed that refined-SWCNTs were internalized by alveolar macrophages. TNF- α secretion of alveolar macrophages after exposure of SWCNTs were evaluated by enzyme linked

immunosorbent assay (ELISA). The results showed that 1~10 $\mu\text{g/mL}$ SWCNTs were able to induce inflammatory responses *in vitro*, such as induced TNF- α released in alveolar macrophages for over 8~18 h; TNF- α released increased markedly with the increase in SWCNT concentration and culture time. Then, the reactive oxygen species (ROS) levels in alveolar macrophages labelled by DCFH2-DA and then were evaluated by confocal laser scanning microscope (CLSM) and flow cytometry (FCM). As the dose of SWCNTs in the medium reached 1~10 $\mu\text{g/mL}$ and cultured for over 6 h, the DCF intensity were increasing gradually as dose-dependent manner; it indicated SWCNTs were able to induce ROS generation. The NF- κB DNA binding activity TransAM ELISA kit was used to evaluate the activation of NF- κB DNA binding activity. And the expression of NF- κB p65 and the degradation of NF- κB inhibit protein I $\kappa\text{B}\alpha$ were evaluated by western blotting. As the dose of SWCNTs in the medium reached 1~10 $\mu\text{g/mL}$ and cultured for over 6 h, the activation of NF- κB DNA binding and the transfer of NF- κB p65 into nuclear and the degradation of NF- κB inhibit protein I $\kappa\text{B}\alpha$ were accelerated gradually as dose-dependent manner; it indicated SWCNTs were also able to stimulate NF- κB activation. Furthermore, SWCNTs-induced ROS generation and TNF- α release were not inhibited completely even in the presence of antioxidants such as glutathione reduced form (GSH) or N-Acetyl Cysteine (NAC). SWCNTs-stimulated NF- κB activation and TNF- α release those which were not suppressed completely even in the presence of inhibitors of NF- κB activation such as N-Tosyl-L-phenylalanine-chloromethyl ketone (TPCK) or parthenolide in alveolar macrophages too.

Conclusion: SWCNTs can cause cytotoxicity, induce TNF- α release, oxidative stress and activation of NF- κB on primary alveolar macrophages *in vitro*. Both oxidative stress and activation of NF- κB seem to play important roles in the SWCNTs-induced cytokine TNF- α release, suggesting that SWCNTs may exert pro-inflammatory effects by a mechanism that is, at least in part, mediated by ROS and NF- κB activity.

Key words: ROS; nuclear transfer factor-kappa B; tumor necrosis factor-alpha.

前 言

1.1 引言

21 世纪科学技术的象征是纳米技术(nano technology)。1989 年 IBM 的研究人员构建了一个由 35 个原子描绘成的 IBM 公司图标,从此操纵单个原子的技能掀起了在纳米尺度上研究和开发的浪潮。纳米技术在 20 世纪 80 年代末期诞生并迅速崛起,并被认为是 21 世纪世界上三大支柱科学(生命科学、信息科学、纳米科学)之一。在 20 世纪微米技术兴起时,诺贝尔奖得主 Rohrer 曾说:当微米技术成为工业革命技术的基础,那些最早学会,并最早最好使用微米技术的国家,都在工业的发展中占据了巨大的优势,成为了现在的先进工业国家。同样,21 世纪,由于纳米技术可能导致生产与生活方式的变革,现已成为世界各国投入最多、发展最快的科学研究和技术开发领域之一。由于纳米尺度(0.1~100 nm, 1 纳米等于十亿分之一米)下的物质的特殊性质,纳米技术几乎在各个领域具有了广阔的应用前景。在纳米尺度控制和操纵物质(单原子或原子团簇),对其进行加工,制造各种功能性器械,使用于各个领域,甚至于生物医学领域^[1](图 1-1)。

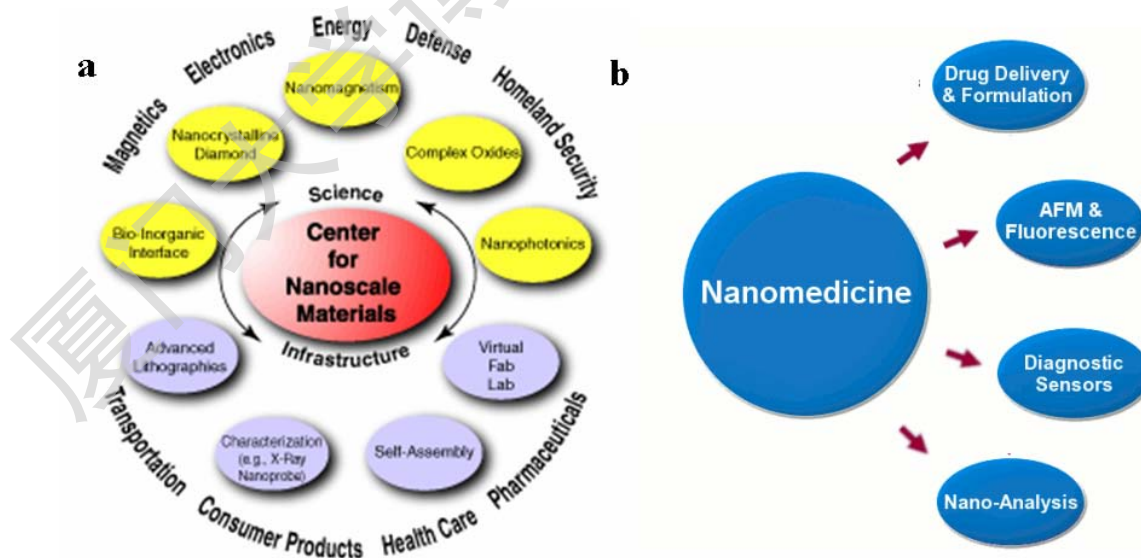


图1-1 纳米技术在各个领域的广泛应用

Figure 1-1 Nanomaterials for technologic (a) and biomedical (b) applications.

1.2 纳米材料的基本概念及其特性

1.2.1 纳米材料的基本概念

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。“纳米(nanometre)”是长度的度量单位,它的长度为一米的十亿分之一(10^{-9}m)。通常所界定的纳米材料的尺寸范围是1~100 nm,一方面,在纳米材料中原子和分子的个体作用更为突出,它介于原子、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,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,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”,表现出大尺寸材料所不具备的特性^[2]。

1.2.2 纳米材料的特性

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^[3],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。

1. 小尺寸效应 (small size effect) ^[4]

“量变产生质变”,当金属或非金属物质被制备成小于一定尺度的粉末时,其物理性质就会发生根本性的变化,具有高强度、高韧性、高比热、高导电率、高扩散率,及对电磁波有强吸收度等特性。这就是纳米材料的小尺寸效应。

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^[5]。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。如二氧化硅粒子在20 nm时开始导电,而铜粒子达到纳米尺寸却不能导电;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,

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