

中图分类号: R446

论文编号:

学科分类号: 320.11

密 级: 公 开

安徽理工大学

硕士学位论文

果糖改性铜基纳米材料的制备 及其生物学效应研究

作者姓名: 王 铮

专业名称: 临床检验诊断学

研究方向: 纳米材料制备与生物学研究

导师姓名: 陈峰 研究员

导师单位: 上海市第十人民医院

答辩主席: 刘月华 教授

论文答辩日期: 2023 年 5 月 27 日

安徽理工大学研究生院

2023 年 4 月 14 日

A Dissertation in Clinical Laboratory Diagnostics

**The preparation of fructose-modified copper-based
nanomaterials and their biological effects**

Candidate:	Zheng Wang
Supervisor:	Feng Chen
Medical School	
Anhui University of Science and Technology	
No. 168, Taifeng Street, Huainan, 232001, Anhui, P. R. China	

摘 要

目的: 骨肉瘤是最常见的骨科恶性肿瘤, 给患者及社会造成了严重的经济负担和健康威胁。术前化疗+手术切除肿瘤+术后化疗的新辅助化疗方案显著提高了患者的疗效和 5 年无事件生存率, 其中化疗是其中关键因素, 但随着肿瘤细胞的耐药性逐渐显现, 逆转耐药成为临床亟待解决的热点问题。致病菌导致的感染严重影响机体机能, 可单独或者伴随其他疾病出现, 抗生素的长期滥用导致细菌耐药性提高, 有效抗菌逐渐变得棘手。生物医用材料的出现和飞速发展, 逐渐为生物医疗诊断和治疗提供了新的思路 and 方案, 其中具有高的比表面积的纳米材料被广泛研究和应用。本研究中, 拟基于水热反应制备铜基纳米材料, 并应用于抗肿瘤和抗菌研究中。探索铜基纳米材料抗肿瘤和抗菌活性的同时深入研究其作用机制, 全面评估铜基纳米材料的生物活性。

方法: (1) 以水和乙醇混合液作为反应体系, 调控不同的水和乙醇比例, 加入 1,6-二磷酸果糖三钠盐 (FDP) 溶液和氯化铜溶液, 磁力搅拌混匀后转移至反应釜内, 置于烘箱内, 调控反应时间和反应温度进行水热反应以制备铜基纳米材料, 优选两种反应体系, 分别制得果糖改性氯化亚铜纳米颗粒和磷酸氢铜纳米片自组装微球。

(2) 以磷酸氢铜纳米片自组装微球制备过程为例, 在水热反应过程中设置不同时间点终止反应以获得一系列产物, 对产物进行扫描电子显微镜表征以探索铜基纳米材料的形成机制。

(3) 通过扫描电子显微镜、透射电子显微镜、选区电子衍射、元素面扫、X 射线粉末衍射 i 分析、X 射线光电子能谱分析、傅里叶变换红外光谱和热重分析对铜基纳米材料的形貌、结构、尺寸、物相及化学性质进行细致表征。

(4) 通过物理吸附将阿霉素负载于果糖改性氯化亚铜纳米颗粒并利用紫外可见光光度计分析其载药率。选择人骨肉瘤细胞 (MG63) 和耐阿霉素人骨肉瘤细胞 (MG63/DXR), 通过 MTT 法和活死细胞染色评估载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒的抗肿瘤活性, 进一步通过 Western blot 和 RNA-Seq 方法探索载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒的抗肿瘤作用机制。

(5) 选择典型的革兰氏阴性菌（大肠杆菌）和革兰氏阳性菌（金黄色葡萄球菌）评估磷酸氢铜纳米片自组装微球的抗菌活性。为进一步探索其抗菌机制，通过电子自旋共振（ESR）和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）显色反应法测定羟基自由基（ $\cdot\text{OH}$ ）以研究磷酸氢铜纳米片自组装微球的抗菌机制。

结果：（1）通过优选反应体系的底物浓度和水热反应条件，分别制得两种均匀、稳定、分散性好的材料分别命名为果糖改性氯化亚铜纳米颗粒和磷酸氢铜纳米片自组装微球。

（2）以磷酸氢铜纳米片自组装微球制备为例，通过对不同时间点产物进行扫描电镜表征揭示了铜基纳米材料的形成机制：（i）水热反应中 FDP 水解产生磷酸根和有机小分子果糖；（ii）磷酸盐离子与铜离子反应，生成无定形磷酸铜-有机分子杂化微球；（iii）微球内原位形成纳米花，同时无定形磷酸铜相结晶为磷酸氢铜相；（iv）磷酸氢铜纳米片继续生长和组装以形成磷酸氢铜纳米片自组装微球。

（3）MTT 和活死细胞实验提示载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒具备优异的骨肉瘤细胞杀伤活性，Western blot 结果提示肿瘤细胞高表达果糖转运膜蛋白 GLUT5，载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒可靶向富集于肿瘤细胞，一定程度上逆转肿瘤耐药，协同发挥抗肿瘤效应。RNA-Seq 结果提示载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒通过激活 MAPK 信号通路，以及增强 ROS 效应介导细胞凋亡，从而达到逆转耐药的效果。

（4）磷酸氢铜纳米片自组装微球表现出了优异的抗大肠杆菌和抗金黄色葡萄球菌活性。进一步机制研究提示磷酸氢铜纳米片自组装微球中的铜具备过氧化氢酶样活性，通过与过氧化氢发生氧化还原反应生成活性氧羟基自由基，消耗还原剂谷胱甘肽的同时破坏细菌细胞膜以发挥抗菌效应。

结论：以水和乙醇为反应体系，通过加入 1,6-二磷酸果糖三钠盐（FDP）溶液和氯化铜溶液启动水热反应成功制备了铜基纳米材料，本研究中的铜基纳米材料具备优异的载药性能、抗肿瘤效应和抗菌活性。为临床骨肉瘤的治疗、化疗药物的耐药性问题和细菌感染问题提供了新的可行思路，为基础研究中纳米材料的设计、载药递送、靶向输送问题提供了新的可行方案，具有较强的研究意义和科学价值。

关键词：铜基材料；纳米材料；果糖；骨肉瘤；抗菌；水热反应；

Abstract

Objective: Osteosarcoma is the most common orthopaedic malignancy and poses a serious economic burden and health threat to patients and society. The neoadjuvant chemotherapy regimen of preoperative chemotherapy + surgical resection of the tumour + postoperative chemotherapy has significantly improved patient outcomes and 5-year event-free survival rates, of which chemotherapy is a key factor, but with the consequent emergence of tumour cell resistance, it has become a hot clinical issue that needs to be addressed. Infections caused by pathogenic bacteria can have a serious impact on the body's function, either alone or in association with other diseases, and the chronic misuse of antibiotics has led to increased bacterial resistance, making effective antimicrobial resistance increasingly challenging. The emergence and rapid development of biomedical materials has gradually provided new ideas and solutions for biomedical diagnosis and treatment, among which nanomaterials with high specific surface area have been widely studied and applied. In this study, copper-based nanomaterials are proposed to be prepared based on a hydrothermal reaction and applied in antitumour and antibacterial studies. The anti-tumour and antibacterial activities of copper-based nanomaterials will be explored while their mechanisms of action will be investigated in depth, and the biological activities of copper-based nanomaterials will be evaluated comprehensively.

Methods: (1) A mixture of water and ethanol was used as the reaction system, and different ratios of water and ethanol were adjusted to add fructose 1,6-diphosphate (FDP) solution and copper chloride solution, which were mixed with magnetic stirring and transferred to the reaction kettle and placed in an oven, and the reaction time and reaction temperature were adjusted for hydrothermal reaction to prepare copper-based nanomaterials. Fructose-modified cuprous chloride nanoparticles (Fru-CuCl NPs) and copper hydrogen phosphate nanosheets self-assembled microspheres (CP-NSMSs) were produced, respectively.

(2) Taking the preparation of copper hydrogen phosphate nanosheet

self-assembled microspheres as an example, the reaction was terminated at different time points during the hydrothermal reaction to obtain a series of products, and the products were characterized by scanning electron microscopy to explore the formation mechanism of copper-based nanomaterials.

(3) The morphology, structure, dimensions, phases and chemical properties of the copper-based nanomaterials were carefully characterized by scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, selected area electron diffraction, elemental mapping, X-ray powder diffraction analysis, X-ray photoelectron spectroscopy, fourier transform infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis.

(4) Doxorubicin (DOX) was loaded onto fructose-modified cuprous chloride nanoparticles by physical adsorption and its drug loading rate was analyzed by UV-visible photometry. Human osteosarcoma cells (MG63) and doxorubicin-resistant human osteosarcoma cells (MG63/DXR) were selected to evaluate the antitumor activity of fructose-modified copper chloride nanoparticles loaded with adriamycin by MTT assay and live-dead cell staining, and further explore the antitumor mechanism of fructose-modified copper chloride nanoparticles loaded with adriamycin by Western blot and RNA-Seq.

(5) Typical Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *E. coli*) and Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) were selected to evaluate the antibacterial activity of the copper hydrogen phosphate nanosheets self-assembled microspheres. To further explore the antibacterial mechanism, hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) were measured by electron spin resonance (ESR) and 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) colourimetric method to investigate the antibacterial mechanism of the copper hydrogen phosphate nanosheets self-assembled microspheres.

Results: (1) By optimizing the substrate concentration and hydrothermal reaction conditions of the reaction system, two homogeneous, stable and well-dispersed materials named as fructose-modified cuprous chloride nanoparticles (Fru-CuCl NPs) and copper hydrogen phosphate

nanosheet self-assembled microspheres (CP-NSMSs) were fabricated, respectively.

(2) Taking the preparation of copper hydrogen phosphate nanosheet self-assembled microspheres as an example, the formation mechanism of copper-based nanomaterials was revealed by scanning electron microscopy characterization of the products at different time points: (i) hydrothermal reaction of FDP to produce phosphate and organic small molecule fructose; (ii) reaction of phosphate ions with copper ions to produce amorphous copper phosphate-organic molecule hybrid microspheres; (iii) *in situ* formation of nanoflowers within the microspheres, while the amorphous copper phosphate phase crystallizes into a copper hydrogen phosphate phase; (iv) continued growth and assembly of copper hydrogen phosphate nanosheets to form copper hydrogen phosphate nanosheet self-assembled microspheres.

(3) MTT assay and live-dead cell assays suggested that the doxorubicin-loaded fructose-modified copper chloride nanoparticles possessed excellent osteosarcoma cell killing activity, and the Western blot results suggested that the tumor cells highly expressed the fructose transporter membrane protein GLUT5, suggesting that the doxorubicin-loaded fructose-modified copper chloride nanoparticles could target and enrich in tumor cells, reverse tumor drug resistance to a certain extent, and synergistically exert their anti-tumor effects. The RNA-Seq results suggested that doxorubicin-loaded fructose-modified copper chloride nanoparticles reversed drug resistance by activating MAPK signaling pathway as well as enhancing ROS effect-mediated apoptosis.

(4) The copper hydrogen phosphate nanosheets self-assembled microspheres exhibited excellent anti-*E. coli* and anti-*S. aureus* activities. Further mechanistic studies suggest that copper in the copper hydrogen phosphate nanosheets self-assembled microspheres possesses peroxidase-like activity, which generates reactive oxygen hydroxyl radicals through redox reactions with hydrogen peroxide, consumes the reducing agent glutathione and damages bacterial cell membranes to exert antibacterial

effects.

Conclusion: Copper-based nanomaterials were successfully prepared by initiating hydrothermal reactions with the addition of fructose 1,6-diphosphate (FDP) solution and copper chloride solution using water and ethanol as the reaction system. The copper-based nanomaterials in this study possess excellent drug-carrying properties, antitumor effects and antibacterial activities. It provides a new feasible idea for the treatment of clinical osteosarcoma, the problem of drug resistance of chemotherapeutic drugs and the problem of bacterial infection, and a new feasible solution for the design, drug-carrying delivery and targeted delivery of nanomaterials in basic research, which has strong research significance and scientific value.

KeyWords: Copper-based materials; Nanomaterials; Fructose; Osteosarcoma; Antibacterial; Hydrothermal reaction;

目 录

引言.....	1
1. 生物医用材料现状.....	1
2. 骨肉瘤概述及其治疗现状.....	1
2.1. 骨肉瘤概述.....	1
2.2. 骨肉瘤的治疗现状.....	2
3. 纳米材料在骨肉瘤治疗中的应用研究.....	6
3.1. 纳米材料概述.....	6
3.2. 纳米材料在骨肉瘤治疗中的研究.....	7
4. 铜基材料在骨肉瘤治疗中的应用研究.....	11
5. 铜基材料在抗菌治疗中的应用研究.....	12
6. 研究课题的提出和研究意义.....	14
1 铜基纳米材料的调控制备及系统表征.....	16
1.1 铜基纳米材料的调控制备.....	16
1.1.1 实验条件与实验材料.....	16
1.1.2 铜基纳米材料的制备方法.....	17
1.2 铜基纳米材料的理化性质系统表征.....	18
1.2.1 实验条件与实验材料.....	18
1.2.2 实验方法.....	19
1.2.3 实验结果与讨论.....	20
1.3 铜基纳米材料的形成机制研究.....	25
1.3.1 实验方法.....	25
1.3.2 实验结果与讨论.....	26
1.4 本章小结.....	29
2 铜基纳米材料抗骨肉瘤作用及其机制研究.....	30
2.1 铜基纳米材料抗骨肉瘤作用的研究.....	30
2.1.1 实验条件与实验材料.....	30
2.1.2 实验方法.....	32
2.1.3 统计学分析与方法.....	36
2.1.4 实验结果与讨论.....	36
2.2 铜基纳米材料抗骨肉瘤作用的机制研究.....	40
2.2.1 实验条件与实验材料.....	40
2.2.2 实验方法.....	42
2.2.3 统计学分析与方法.....	46
2.2.4 实验结果与讨论.....	46

2.3 本章小结.....	51
3 铜基纳米材料的抗菌性能及其机制研究	53
3.1 铜基纳米材料的抗菌活性研究	53
3.1.1 实验条件与实验材料.....	53
3.1.2 实验方法.....	54
3.1.3 统计学分析与方法.....	55
3.1.4 实验结果与讨论.....	55
3.2 铜基纳米材料的抗菌机制研究	58
3.2.1 实验条件与实验材料.....	58
3.2.2 实验方法.....	59
3.2.3 实验结果与讨论.....	60
3.3 本章小结.....	65
结论.....	66
参考文献.....	68

英文缩写词对照表

Abbreviation Index

英文缩写	英文全称	中文全称
OS	Osteosarcoma	骨肉瘤
DOX	Doxorubicin	阿霉素
ROS	Reactive Oxygen	活性氧
FDP	Fructose-1,6-diphosphate	1, 6-二磷酸果糖三钠盐
TMB	Tetramethyl benzidine	四甲基联苯胺
ESR	Electron spin resonance	电子自旋共振光谱
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	细胞培养基
SEM	Scanning electron microscopy	扫描电子显微镜
TEM	Transmission electron microscopy	透射电子显微镜
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy	傅里叶变换红外光谱
SAED	Selected area electron diffraction	选区电子衍射
TGA	Thermogravimetric Analysis	热重分析
XRD	X-Ray Diffraction	X射线衍射分析
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy	X射线光电子能谱分析
Fru-CuCl NPs	Fructose-modified cuprous chloride nanoparticles	果糖改性氯化亚铜纳米颗粒
CP-NSMSs	Copper hydrogen phosphate nanosheets self-assembled microspheres	磷酸氢铜纳米片自组装微球
DOX@Fru-CuCl NPs	DOX-loaded fructose-modified cuprous chloride nanoparticles	载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒
MG63	MG63	人骨肉瘤细胞
MG63/DXR	MG63/DXR	耐阿霉素人骨肉瘤细胞
WB	Western blot	蛋白免疫印迹

GLUT5	GLUT5	果糖跨膜转运蛋白 5
ESR	Electron spin resonance	电子自旋共振
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	大肠杆菌
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus	金黄色葡萄球菌

引 言

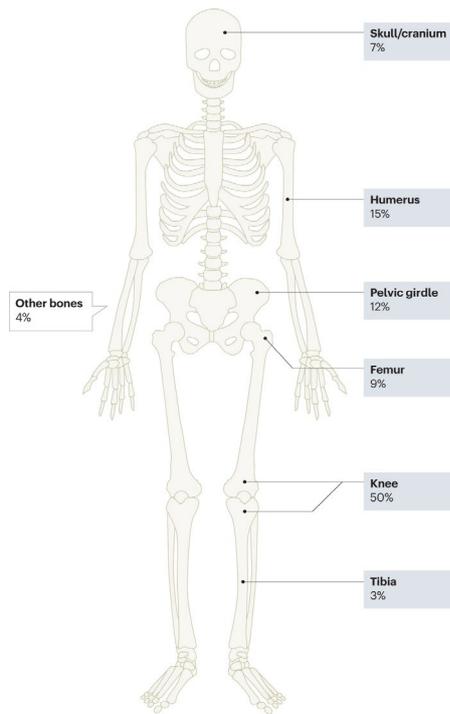
1.生物医用材料现状

据统计，自 20 世纪 90 年代至今，全球生物材料科学与技术飞速发展，其市场份额以每年 13% 的速度迅速增长；《2017-2021 年中国生物医用材料行业投资分析及前景预测报告》显示我国生物医用材料从 650 亿元增长到 2400 亿元，预测将来其市场需求量还将持续增长。近几年国家也陆续颁布一系列政策支持生物医用材料的发展，目前，我国生物医用材料产业仍处于起步阶段，产业模式仍以资源消耗型为主，高端生物医用材料市场仍严重依赖进口产品，因此，研发具有自主知识产权的高性能生物医用材料成为目前需解决的研究重点和难点。

2.骨肉瘤概述及其治疗现状

2.1. 骨肉瘤概述

骨肉瘤（Osteosarcoma, OS）也被称为成骨肉瘤，是最常见的恶性骨肿瘤，发病率约为 4.4/10 万/年，患病率约占人类所有恶性肿瘤的 1%。骨肉瘤的多发人群中主要是儿童及青少年人群或者 65 岁以上者，通常为继发性肿瘤或 Paget 病所致[1]。骨肉瘤起源于间叶组织，恶性程度极高，长骨干骺端因为血供丰富，容易发生。临床上以股骨远端（43%）和胫骨近端（23%）最为多见[2, 3]（图引言.1）。骨肉瘤极易发生转移，数据显示 15%-20% 的患者在就诊时就已经发生了肿瘤远处转移灶，肺部是最常见的远处转移灶（ $\geq 85\%$ ）[4]。



图引言.1 原发性骨肉瘤的解剖分布[5]

Figure.1 Anatomical distribution of primary osteosarcoma[5]

2.2. 骨肉瘤的治疗现状

骨肉瘤早期的主要治疗手段为手术治疗，其策略主要是高位截肢后关节离断，但其 5 年存活率仅有 20%左右[6]。20 世纪 70 年代，Rosen Jaffe 教授提出了手术治疗辅以术后化学治疗的新方案，使得患者的 5 年生存率提高到了 50%；紧接着 Rosen Jaffe 教授继续提出了术前辅助化疗-手术切除肿瘤-术后辅助化疗的新辅助化疗方案，将患者的 5 年生存率得到了进一步提高[7, 8]。即便如此，骨肉瘤的临床疗效目前仍不乐观，特别是合并转移灶的患者预后更差，因此探索新的骨肉瘤治疗方式势在必行。

2.2.1. 骨肉瘤的手术治疗

骨肉瘤曾经最主要的手术方式是截肢离断术，但随着化疗方案的出现使得保肢手术成为主流手术方式，该术式可以保留患者肢体的大部分功能，极大的提高了患者的生活质量和 5 年生存率[6, 9]。但该手

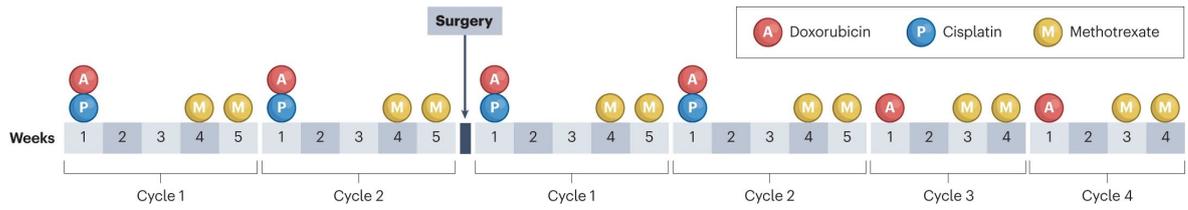
术难度要求较高，骨肉瘤的外科手术治疗，要求必须在安全范围内切除肿瘤组织，与此同时，尽量保留正常组织，以此来降低患者术后复发率，这也有利于术后重建和功能康复。

2.2.2. 骨肉瘤的化学治疗

Evans 教授在 20 世纪 60 年代提出应用丝裂霉素 C 治疗骨肉瘤，随后 Rosen Jaffe 教授提出在骨肉瘤患者术后应用阿霉素（Doxorubicin, DOX）和甲氨蝶呤（Methotrexate）进行化疗，自此开启了骨肉瘤化学治疗的篇章[10]。Rosen 教授在 1979 年提出新辅助化疗，该方法不仅能控制原发病灶和远处转移病灶，同时可以改善肿瘤周围微环境，为保肢手术提供条件。

目前临床应用的化疗药物主要有阿霉素（DOX）、甲氨蝶呤（MTX）、顺铂（DDP）、依托泊苷（VP-16）、表柔比星（EPI）、异环磷酰胺（IFO）和环磷酰胺（CTX）等，其中 MTX、DOX、DDP 和 IFO 最为常用。临床应用中提示使用单一化疗药物容易产生耐药性，多药联合化疗能够一定程度减少耐药的同时提高疗效。目前常用的化疗方案包括 AP 方案：DOX + DDP，和 MAP 方案：高剂量 MTX + DOX + DDP，其中 MAP 是最广泛应用的化疗方案（图引言.2），也是欧美国家推荐的标准方案[11, 12]。研究显示在非转移性骨肉瘤术后应用 MAP 化疗方案，患者的 5 年无事件生存率可达 60-70%，极大提高了患者的生存质量[13]。新辅助化疗的应用虽然提高了部分患者的 5 年生存率，但是对于晚期或者复发的骨肉瘤患者 5 年生存率仍只有 20% 左右[14]。有关文献报道紫杉醇类化疗药物比如多西紫杉醇和吉西他滨联合用药可以一定程度治疗复发、难治性骨肉瘤；同时，也有研究指出异环磷酰胺和依托泊苷或吉西他滨和阿霉素组成的化疗方案对复发难治性骨肉瘤有一定疗效。然而，几项临床试验证实上述化疗方案的疗效并不显著[15-17]。

综上，化疗方案的出现极大的提高了骨肉瘤患者的疗效和 5 年生存率，但是化疗也存在毒副作用和耐药性问题亟待解决。探索更多更安全的化疗药物、合理的联合化疗方案、逆转骨肉瘤的耐药等成为骨肉瘤化疗研究的焦点问题。



图引言.2 骨肉瘤的 MAP 化疗方案示例[5]

Figure.2 Example MAP chemotherapy regimen for osteosarcoma [5]

2.2.3. 骨肉瘤的放射治疗

骨肉瘤的放射治疗是通过电离辐射断裂肿瘤细胞 DNA 链，导致肿瘤细胞死亡。骨肉瘤细胞对放射治疗有一定耐受性，因此放疗并不能完全杀死肿瘤细胞，临床多用于肿瘤边缘的治疗、手术不完全切除后的治疗或无法手术切除的终末治疗[18, 19]。近年来学者致力于针对放射增敏进行探索，有研究提示人参多糖（GPS）可以提高骨肉瘤对放射治疗的敏感性[20]。

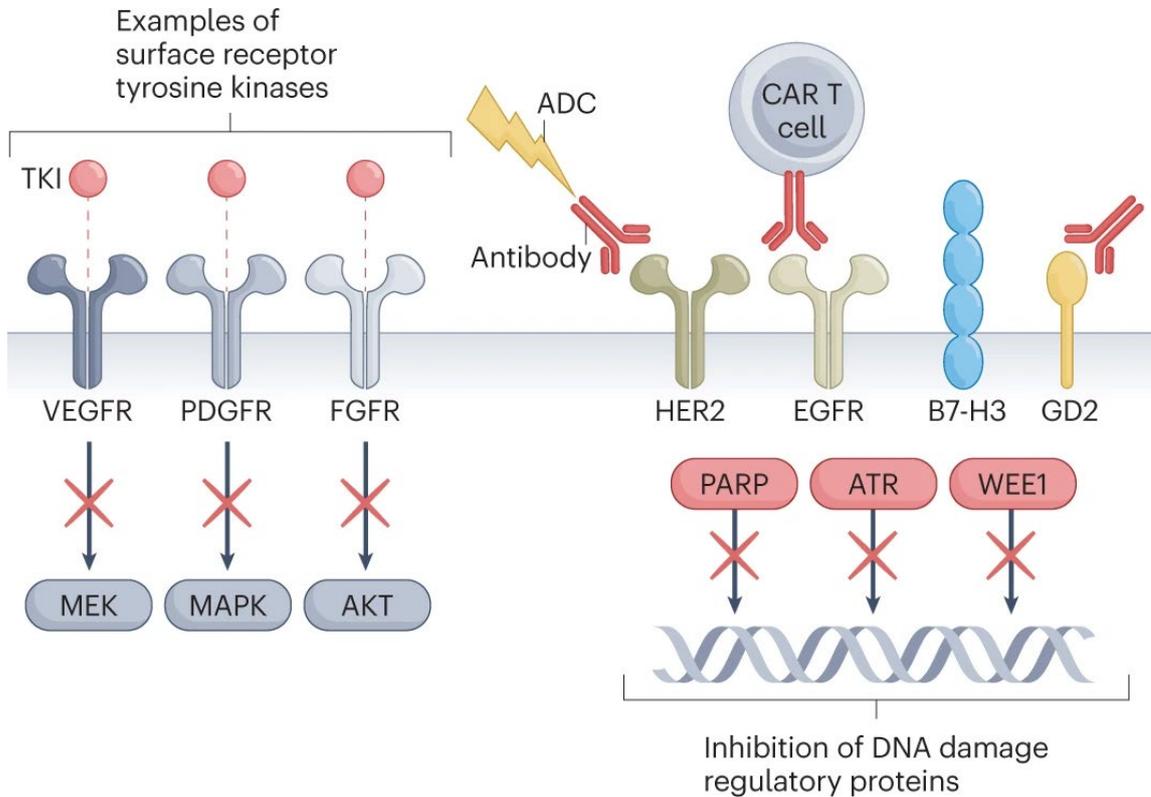
2.2.4. 骨肉瘤的免疫治疗

人体免疫系统发挥着免疫监视、免疫防御和维持免疫稳态的功能。100 年前，William Coley 教授使用灭活的化脓链球菌和黏质沙雷氏菌混合物来治疗骨肉瘤并取得了一定的疗效，自此拉开了骨肉瘤免疫治疗的序幕[21]。肿瘤的免疫治疗主要是由细胞免疫启动的，其中自然杀伤细胞（NK）和自然杀伤 T 细胞（NKT）是消灭肿瘤细胞的关键因素，当然其他天然免疫细胞包括吞噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞也参与到肿瘤抑制中[22]。目前骨肉瘤的免疫治疗使越来越多的患者受益，但是对复发性和转移性骨肉瘤患者的疗效仍有限，同时因为免疫治疗作用于大量细胞，因此带来的细胞毒性也不容易忽视[23]。有学者提出联合免疫治疗和靶向治疗以获得更好的疗效。

2.2.5. 骨肉瘤的分子靶向治疗

分子靶向治疗是指应用具有高选择性和亲和性的小分子药物或者单克隆抗体，特异性的针对骨肉瘤细胞，干扰其生长及增殖以达到杀

灭肿瘤细胞的目的[24]。当下分子靶向治疗的焦点是 HER2（Human epidermal growth factor receptor 2，人类表皮生长因子受体）（图引言.3），其表达越高，骨肉瘤患者的生存率越低，研究显示 HER2 单克隆抗体曲妥单抗可以提高 HER2 阳性骨肉瘤患者的生存率[25]。



图引言.3 骨肉瘤治疗的潜在靶点[5]

Figure.3 Potential targets for osteosarcoma treatment[5]

2.2.6. 骨肉瘤的基因治疗

目前骨肉瘤的基因治疗方法主要包括抑癌基因、自杀基因、反义基因、免疫基因及其联合基因等。其中抑癌基因的研究较多包括 p53、p16 和 p21 等，其中关于 p53 的基因研究最为深入，研究表明骨肉瘤患者的 p53 基因常发生突变[26]。

2.2.7. 骨肉瘤的其他治疗

除开上文所述骨肉瘤治疗手段，目前针对骨肉瘤治疗还包括干细胞疗法、栓塞疗法、射频消融疗法、光疗法、疼痛疗法等。同时，随

着材料科学理论的迅速进步和技术的飞速发展，越来越多的材料被用于研究治疗骨肉瘤，部分研究肯定了生物医用材料在骨肉瘤治疗中的疗效，其中纳米材料因其独特的理化优势而被广泛研究和应用。

3. 纳米材料在骨肉瘤治疗中的应用研究

3.1. 纳米材料概述

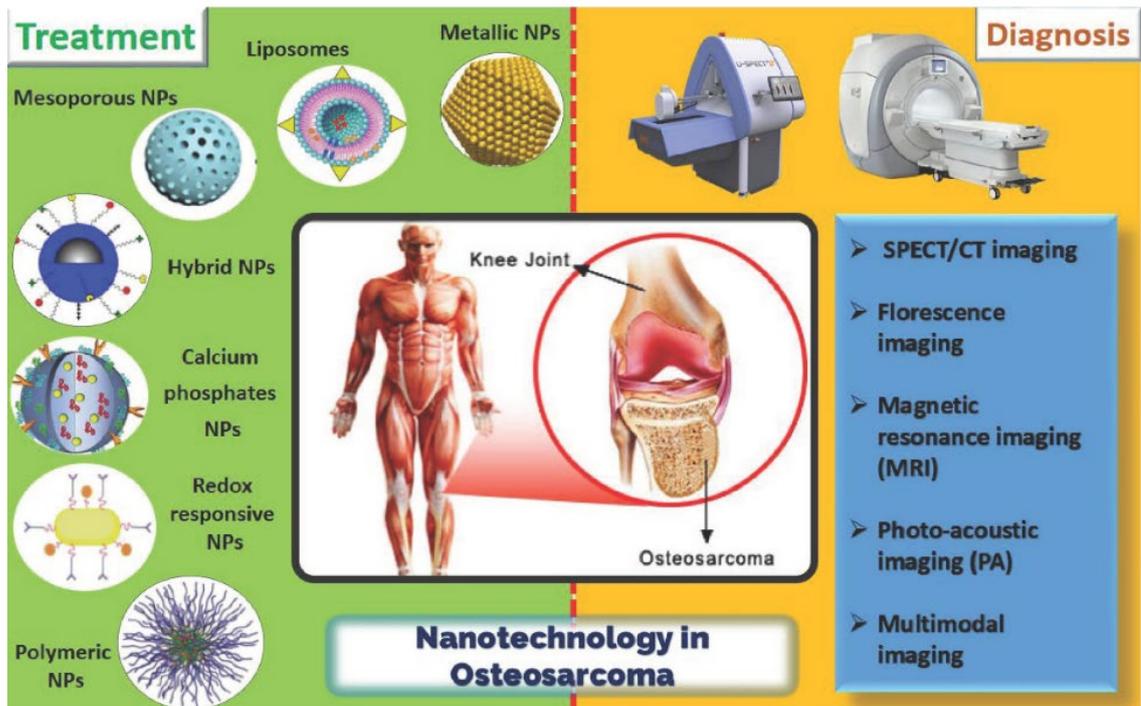
纳米材料是指在三维空间里至少有一个维度的尺寸在纳米量级（1 nm~100 nm）的材料。根据不同维度可将纳米材料分为零维纳米级（量子点、金属纳米颗粒、富勒烯等）、一维纳米级（纳米线、纳米管、纳米棒等）、二维纳米级（纳米膜、纳米片等）、三维纳米级（多晶体、树枝状大分子等）和由纳米粒子构建的纳米结构材料（金属-有机框架、脂质纳米材料等）[27]。随着精准医学的提出和多学科交叉合作模式的发展，纳米材料科学和生物医学科学的结合越来越紧密，纳米材料在生物医学领域的应用也取得了巨大进展。

纳米材料在应用主要包括多种形式。（1）药物载体：纳米材料尺寸小，比表面积大，同时易于表面修饰，是新型药物载体的较优选择。纳米材料作为药物的递送载体具有较多的优势：纳米材料可构建负载药物的缓释体系，从而延长药物的作用时间；纳米材料和负载药物可协同发挥生物作用以增强负载药物药效，同时可减轻药物的毒副作用；纳米材料可保护负载药物使其避免快速被酶解而失效，提高了药物的作用稳定性；某些药物载体具有靶向作用，可以提高病灶的药物浓度实现精准医学。目前研究较多的纳米载体材料有金属纳米颗粒、可降解高分子纳米材料及生物活性纳米材料等[28]。（2）肿瘤治疗：近年来，纳米技术的飞速发展对肿瘤治疗的研究提供了新的思路，其优异的可塑性能使其在肿瘤治疗领域具有广阔的应用前景[29]。骨肉瘤对大分子物质具有滞留作用和选择性高通透性，这一现象也叫做增强渗透与滞留效应现象，利于纳米材料进入并长时间停留在肿瘤组织从而延长其在生物体内的循环和作用时间，属于一种被动靶向效应[30]。大部分纳米材料具有较优异的生物相容性和生物降解性，不会引起机体的免疫应答，同时可降解为无害的代谢产物。因此，纳米材料因其独特优势的理化性质和生物学性质使其广泛应用于肿瘤免疫治

疗、热疗、光疗、放疗和化疗等研究中[31]。按照纳米材料的化学组成成分目前应用于肿瘤治疗的纳米材料主要分为有机纳米材料和无机纳米材料。其中研究较多的有机纳米材料主要包括脂质体、壳聚糖和蛋白质类纳米材料，无机纳米材料中以碳纳米材料、磁性纳米材料、金属纳米材料及非金属纳米材料为主。（3）抗菌材料：指具有抗菌/杀菌功能的纳米材料，抗菌纳米材料抗菌/杀菌的主要机理包括干扰细胞壁的合成、破坏细胞膜、干扰核酸合成和抑制蛋白质合成。纳米材料根据其抗菌方式可分为两大类：第一类是纳米抗菌材料，是指纳米材料自身具有抗菌功能，无需添加其他药物即可发挥抗菌作用；第二类是以纳米载药体系为基础的纳米抗菌药物体系，比如胶束、纳米颗粒等[32]。研究提示以纳米材料作为抗菌药物载体可提高药物稳定性，达到控制和靶向的作用。再者，纳米材料常通过多种机制发挥抗菌作用，因此其产生耐药性的可能性较低[33]。（4）生物传感器：生物传感器是一个集生物信息学、生物工程、生物医学和机械学等多个学科为一体的交叉融合新兴高科技领域。根据纳米材料和纳米技术研发的新型生物传感器可对生物对象包括核酸、蛋白、离子等生物成分和温度、湿度、心率、心电等生物感知进行高灵敏度的检测和传感。比如基于量子点和硅纳米微球构建的新型荧光标记物可以对核酸和蛋白等进行靶向标记和成像，基于纳米材料的电子纹身可以实时精准的感知周围环境的温度湿度及人体的心率、心电等信号。（5）生物影像：临床影像诊疗中，目前常用的造影剂存在作用时间短、靶向性不佳、使用剂量高等缺点，纳米材料造影剂具有独特的光、电、声、磁等理化性质，具有优异的生物相容性和低毒副作用，从而被研究应用于各种检查包括CT、MRI、PET-CT等的增强剂/造影剂。

3.2. 纳米材料在骨肉瘤治疗中的研究

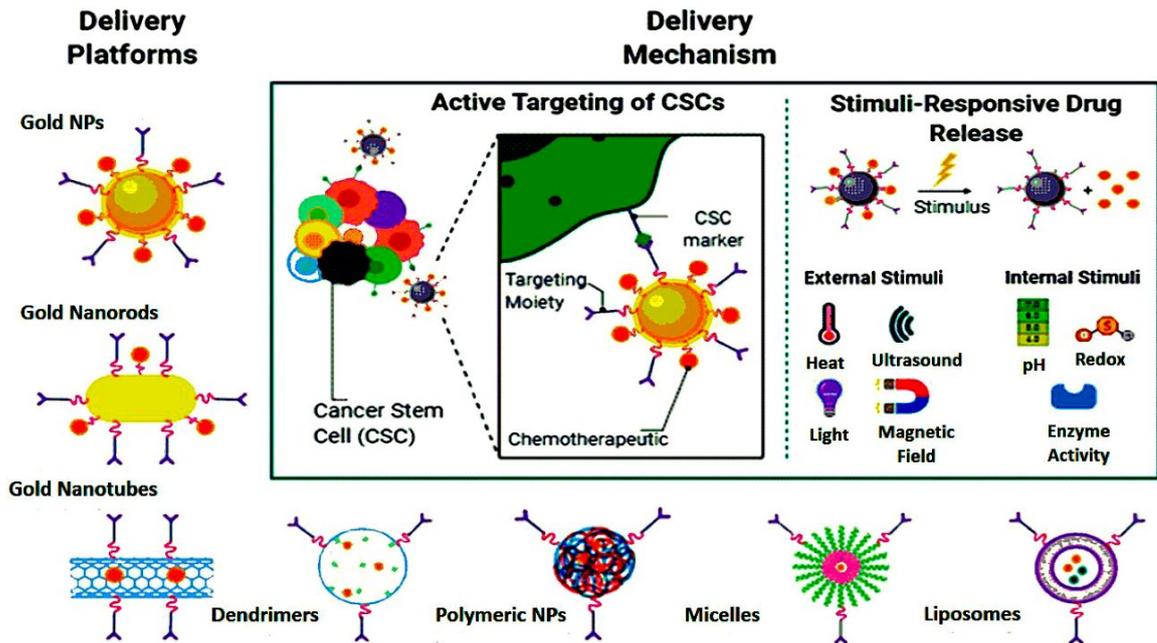
纳米科学理论的发展和纳米制造技术的革新是新型生物医用纳米材料研究的基础，同时为临床常见疾病骨肉瘤提供了一种新的诊疗思路和替代方案（图引言.4）。



图引言.4 纳米科学在骨肉瘤诊疗中的研究及应用[34]

Figure.4 Research and application of nanoscience in the treatment of osteosarcoma [34]

目前关于纳米材料在骨肉瘤治疗中的研究集中在利用纳米材料的特征性理化性质作为优选的药物载体进行递送和靶向输送（图引言.5）。作为药物递送系统纳米材料具有以下优势：（1）纳米材料有助于改变药物的药代动力学并提高递送效率；（2）纳米材料具有较优异的药物封装能力和控制缓释能力；（3）纳米材料本身可以进行理化改性和修饰从而进一步增强抗肿瘤效应[35, 36]。目前应用于骨肉瘤治疗的纳米材料主要分为以下几类：聚合物纳米载体、脂质体、金属纳米颗粒、氧化还原响应性纳米载体、介孔二氧化硅载体和合成纳米颗粒[34]。



图引言.5 纳米粒子介导的对癌症干细胞（CSCs）的靶向药物输送[34]

Figure.5 Nanoparticle-mediated targeted drug delivery to cancer stem cells (CSCs) [34]

3.2.1. 聚合物纳米载体

聚合物纳米材料因具有较优异的生物相容性和生物可降解性被广泛研究应用于骨肉瘤研究中的药物、蛋白和基因高效递送[37]。Li 等研究中，通过修饰纳米载体使其具有聚（酯酰胺）以结合递送阿帕替尼用以治疗复发性骨肉瘤，阿帕替尼是一种高度选择性血管内皮生长因子受体 2 抑制剂，结果提示聚合物纳米材料聚集在肿瘤部位诱导肿瘤细胞凋亡，显著增强了骨肉瘤的治疗效果[38]。有研究提出使用修饰后的壳聚糖基纳米载体包裹甲氨蝶呤使其能够靶向累积在骨肉瘤细胞中以杀死肿瘤细胞，结果提示胞吞作用使聚合物纳米材料在肿瘤细胞中表现出更高的浸润性，此外，和游离的甲氨蝶呤相比，被聚合物纳米材料包裹递送的甲氨蝶呤展现出了对人骨肉瘤细胞 MG63 更高的细胞毒性[39]。

3.2.2. 脂质体

脂质体主要由天然胆固醇和无毒磷脂组成，具有较好的生物相容性，常作为模型生物膜被用于定点递送。脂质体相比其他载体更稳定，同时可以通过其头部、尾部和键的结构变化策略对其进行理化修饰和改性[40]。有研究提出使用透明质酸涂层修饰后的脂质体携带阿霉素用于治疗耐阿霉素骨肉瘤，脂质体可以通过与 CD44 受体结合而被骨肉瘤细胞有效吸收，避免阿霉素被 P-糖蛋白泵清除，以达到高效给药和精准治疗[41]。另外一项研究中，低分子肝素被用于结合脂质体，同时将阿伦磷酸盐和阿霉素协同封装，其中的低分子肝素可以延长脂质体的血液循环时间，阿伦磷酸盐可以预防和治疗骨质疏松和骨质破坏，结果显示其具有非常好的抗原位骨肉瘤和转移瘤的疗效[42]。近年来，有研究提出开发双重脂质体药物递送系统以协同多种药物治疗骨肉瘤，无疑协同载药的双重脂质体是治疗骨肉瘤的一种很有前景的新方法。

3.2.3. 金属纳米颗粒

金属纳米颗粒对生物正常细胞的细胞毒性低，在肿瘤微环境中具有较高的靶向性和定位性，同时可在肿瘤组织富集，使其成为骨肉瘤治疗研究中药物靶向递送的理想选择[43]。二氧化钛纳米颗粒在肿瘤研究中展现出了优异的生物传感性能和靶向活性，金、银和铜的纳米颗粒也被证实能够抑制骨肉瘤细胞增殖[44]。

3.2.4. 氧化还原响应性纳米载体

刺激反应法是骨肉瘤治疗研究中比较新颖的方法。这些刺激可以由肿瘤微环境中的氧化还原电位、肿瘤酸度引起，也可以由在肿瘤微环境中触发释放的酶引起，目前关于开发氧化还原敏感纳米载体用于骨肉瘤的靶向递送研究越来越多[45]。有研究合成了与透明质酸偶联的氧化还原敏感脂质体用于骨肉瘤的药物递送，该体系以肿瘤微环境的氧化还原电位作为刺激，脂质体靶向 CD44 受体以增强骨肉瘤的化疗，阿霉素被用作骨肉瘤中胞质药物递送的模型药物，结果提示该体系具有非常好的应用前景[46]。

3.2.5. 介孔二氧化硅

鉴于介孔二氧化硅基纳米材料的高稳定性、高生物相容性和多孔结构带来的高表面积，其可以负载不同性质和尺寸的分子并构建其控释体系。介孔二氧化硅纳米颗粒已被广泛探索通过调节附着在表面的官能团来控制阿霉素[34]。

3.2.6. 合成纳米颗粒

目前，学者们正在开发各种纳米材料的组合，以创建一种混合纳米结构，以增强稳定性和生物相容性，同时改进靶向递送[34]。

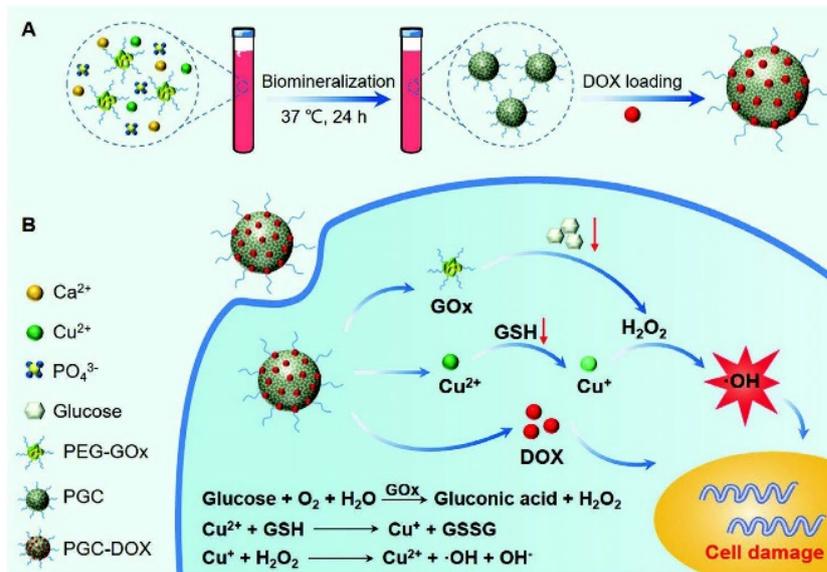
4. 铜基材料在骨肉瘤治疗中的应用研究

过渡金属离子的配位化合物在药物生物化学中占有重要的地位。基于铂的配合物，特别是顺铂由于其具有优异的抗癌特性被广泛应用于骨肉瘤治疗的基础和临床研究中，然而骨肉瘤细胞对顺铂及基于铂的药物的耐药性限制了其进一步应用[47, 48]。为了解决上述问题，许多其他金属基材料包括铜等被研究用于抗癌治疗[49-52]。

在生物体的生长发育过程中，会多次发生有计划且精准控制的程序性细胞死亡时间，包括细胞凋亡、细胞坏死、细胞焦亡等[53]。最近，Tsvetkov 等学者报道了一种调节细胞死亡的新策略，这和之前已知的细胞死亡机制不同，新发现指出铜离子可以通过阻断已知的细胞死亡机制来诱导细胞死亡，其过程涉及到蛋白质脂酰化，被称为铜死亡[54]。同时，Ysvetkov 等人还确定了七个促进铜细胞凋亡的基因：FDX1、LIAS、LIPT1、DLD、DLAT、PDHA1 和 PDHB 以及三个抑制铜细胞凋亡的基因：MTF1、GLS 和 CDKN2A。越来越多的证据表明，铜死亡可以影响肿瘤生长并诱导肿瘤细胞死亡，从而在肿瘤免疫和抗肿瘤治疗中发挥着不可或缺的作用[55, 56]。研究表明铜离子可以发生类芬顿反应产生大量自由基以杀死肿瘤细胞，同时，铜离子可以消耗细胞内的还原剂谷胱甘肽以增强氧自由基的杀伤效果[52]。

Huang 等人提出利用化学动力疗法治疗肿瘤（图引言.6），研究中使用聚乙二醇修饰的葡萄糖氧化酶作为模板，形成可生物降解的铜掺杂磷酸钙纳米颗粒，然后负载阿霉素，其中的葡萄糖氧化酶作为酶催化剂可以有效的催化细胞内的葡萄糖降解生成过氧化，同时释放的

铜离子（II）与细胞内的谷胱甘肽反应以消耗还原剂谷胱甘肽，与此同时，铜离子（II）被还原为具有类芬顿作用的铜离子（I），然后通过铜离子（I）介导的类芬顿反应分解过氧化氢生成氧自由基，从而进一步诱导肿瘤细胞死亡[52]。



图引言.6 利用谷胱甘肽耗竭和增强活性氧生成的纳米催化疗法有效治疗癌症[52]

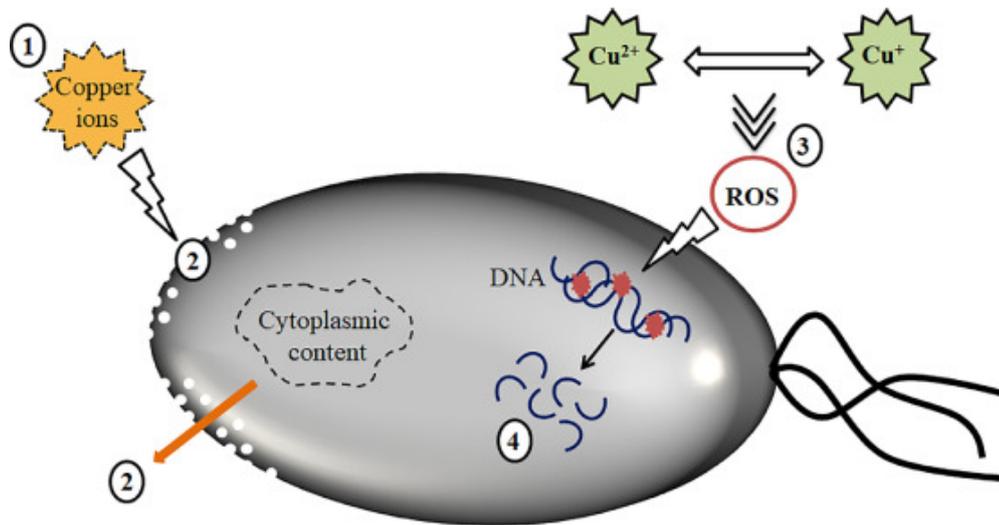
Figure.6 Nanocatalytic therapy using glutathione depletion and enhanced reactive oxygen species production for effective cancer treatment [52]

前文已述铜基材料因可诱导细胞凋亡被研究应用于肿瘤的治疗并列举相关研究详述，当然，铜基材料不仅仅在抗肿瘤研究中具有独特的优势，其在抗菌方面也具有较多的优势，被广泛应用到抗菌的基础和临床研究中。

5. 铜基材料在抗菌治疗中的应用研究

2008年，美国环境保护署 (EPA) 正式认定铜为金属抗菌剂。病原体引起的感染是临床最为常见的疾病和并发症，随着病原体对抗生素产生的耐药性越来越强，铜及铜基材料为抗菌治疗提供了良好的替代方案[57]。

关于铜抗菌的机制，研究显示其关键过程是基于铜的氧化还原特性，铜离子可以通过类芬顿反应产生活性氧（Reactive Oxygen, ROS），生成的活性氧会对病原体的脂质、蛋白质、膜和核酸造成损害[58]。铜及铜基材料杀菌过程可分为 4 个步骤。首先，铜从掺杂铜的复合材料中释放出来；其次，细胞损伤始于膜破裂，导致细胞质含量损失；接下来，生成的自由基通过与蛋白质和脂质相互作用导致进一步的细胞损伤，最终 DNA 片段化，导致细胞死亡[59]（图引言.7）。



图引言.7 铜及铜基材料抗菌步骤示意图[57]

Figure.7 Schematic diagram of the antimicrobial steps for copper and copper-based materials [57]

铜可以添加到不锈钢、钛合金等中制备铜基合金材料，即铜合金。在 Ren 等人研究中铜基材料即显示出了显著的抗菌效果，对金黄色葡萄球菌的抑制率达 20%，大肠杆菌的抑制率高达 40%，24h 后，该铜基材料杀死了 99% 的细菌[60]。铜基纳米材料的制备方法主要包括液相化学还原法、微乳液法、溶剂热法等，为制备更具优异性能的铜基纳米材料，很多研究会加入蛋白、聚合物、酶等调控改性铜基纳米材料的理化结构从而赋予终产物更优异的理化性能，该策略简单易行可控。

6. 研究课题的提出和研究意义

骨肉瘤是临床骨科常见肿瘤，目前针对骨肉瘤的主要治疗手段包括手术、放化疗、免疫治疗和靶向治疗等，尤其是新辅助化疗方案（术前辅助化疗+手术切除骨肉瘤+术后辅助化疗）的出现，极大提高了患者的5年无事件生存率。化疗药物在骨肉瘤诊疗中扮演者十分重要的角色，其长期使用带来的耐药性问题也逐渐获得越来越多的关注，一定程度上限制了其临床疗效。基于此，研发新型的抗肿瘤药物势在必行，具有较高的比表面积特性的纳米生物材料可以负载多种药物，同时其特异性的肿瘤富集效应赋予其一定的靶向性能，另外，纳米材料所特有的理化性质比如铜基纳米材料的氧化还原性质使其本身也具有一定的抗肿瘤能力，再者，部分纳米材料可一定程度上逆转肿瘤耐药来增强抗肿瘤效应。因此，近几年纳米材料成为骨肉瘤基础研究中的热点。

病原体导致的感染是临床常见疾病和并发症，临床常规使用抗生素控制微生物引起的感染。然而，随着近一个世纪以来抗生素的持续和过度使用，细菌对抗生素的累积耐受性或耐药性大大削弱了抗生素的疗效。抗生素耐药性的快速发展已经威胁到农业、公共卫生和经济增长。因此，迫切需要开发高效、低耐药的新型细菌感染治疗剂来替代传统抗生素。在此背景下，金属离子作为一种古老的抗菌剂，由于其具有广谱抗菌能力、低耐药潜力、高杀菌率和长期疗效等优点，再次受到研究者的青睐。在金属抗菌材料（例如金、银、铂）中，铜离子由于其优异的抗菌效果和特定的生物活性功能（例如促进血管生成等）而受到越来越多的关注。铜的优异抗菌效果归因于其多种抗菌机制的结合，其中铜不仅可以破坏细菌膜，还通过不同的生理过程（例如类芬顿反应和谷胱甘肽还原酶的失活）诱导活性氧的释放。因此，开发有效且生物相容的铜基抗菌剂是解决抗生素耐药性问题的迫切需要。

基于此，本文提出了一种新的水解辅助合成铜基纳米材料的方法。具体如下：通过使用有机磷酸盐源的缓慢和可控水解，避免金属离子与磷酸盐离子直接反应时金属磷酸盐晶体的快速成核和无序生长。有机磷酸盐源的水解可由反应条件（例如温度、pH、压力等）控制，从

而成功制备各种纳米结构的金属磷酸盐材料。据我们所知，尚未报道使用有机磷酸盐源制备的具有高抗菌/抗肿瘤效果的铜基纳米结构材料。本课题选择小生物分子 1, 6-二磷酸果糖三钠盐(fructose-1,6-diphosphate, FDP)和氯化铜，水热合成铜基纳米材料并探究其生物学效应。主要的研究内容包括以下三个部分：

第一部分：铜基纳米材料制备及其系统表征。首先，基于对水热反应条件的探究及对反应产物的筛选，前期研究中探究了不同时间，不同温度，不同比例，不同反应体系下产物的合成，通过系列表征筛选出目标产物。有机磷源的水解可以通过反应条件(例如温度、pH、压力等)来控制各种纳米结构金属磷酸盐材料的成功制备，并且 FDP 具有一定的还原性可以对反应中生成的铜离子(I) 起到保护作用。同时，对制备的铜基纳米材料进行系统表征，包括铜基纳米材料的形貌、结构、化学组成等，通过 SEM, TEM, FTIR, XRD 等表征手段确定是否成功合成具有稳定结构的铜基纳米材料，探究铜基纳米材料的形成机制。

第二部分：铜基纳米材料的抗菌性能研究。首先，通过探究四甲基联苯胺(Tetramethyl benzidine, TMB)和电子自旋共振(Electron spin resonance, ESR)光谱测定类芬顿反应产生活性氧(例如 $\cdot\text{OH}$)的发生；其次，使用革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性细菌大肠杆菌作为细菌模型，通过稀释涂布法评估铜基纳米材料的抗菌活性。

第三部分：体外细胞学抗肿瘤研究。通过噻唑蓝比色法(MTT colorimetry method, MTT 法)和细胞活死染色研究铜基纳米材料对骨肉瘤细胞(MG63)和骨肉瘤细胞阿霉素耐药株(MG63/DXR)杀伤作用；通过紫外分光光度计探究铜基纳米材料对盐酸阿霉素(DOX)的载药性能；通过 Western Blot、RNA-seq 细胞分子生物学技术研究铜基纳米材料的抗肿瘤作用机制。

本文创新性在于通过不同水热反应条件调控有机磷源的水解来控制各种结构纳米材料的制备，以及对铜基纳米材料的抗菌性和肿瘤细胞杀伤作用的研究。目前国内外还没有通过 FDP 制备铜基纳米材料的报道，更没有开展其抗菌和抗肿瘤研究。本研究有望为铜基纳米材料的设计和制备提出一种新颖且有效的方案，在抗菌应用方面和抗肿瘤方面具有良好的发展前景。

1 铜基纳米材料的调控制备及系统表征

1.1 铜基纳米材料的调控制备

1.1.1 实验条件与实验材料

1.1.1.1 实验所需主要设备与仪器

表 1.1 铜基纳米材料制备过程中的主要设备与仪器

Table 1.1 Main equipment and instruments in the preparation process of copper based nanomaterials

设备与仪器名称	生产公司
移液枪套装	Eppendorf 公司（德国）
恒温磁力搅拌器（B11-3）	上海司乐仪器有限公司（中国）
水纯化系统（RODI-220A1）	厦门锐思捷水纯化技术有限公司（中国）
冷冻干燥机（SCIENTZ-10N）	宁波新芝生物科技股份有限公司（中国）
台式高速离心机（TG1650-WS）	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司（中国）

1.1.1.2 实验所需主要试剂与耗材

表 1.2 铜基纳米材料制备过程中的主要试剂与耗材

Table 1.2 Main reagents and consumables in the preparation of Cu-based nanomaterials

试剂与耗材名称	供应商
氯化铜（II）， CuCl_2	阿拉丁试剂（上海）有限公司（中国）
1,6-二磷酸果糖三钠盐（FDP）	阿拉丁试剂（上海）有限公司

(中国)

无水乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $\geq 99\%$)

Thermo Fisher (美国)

离心管 (15 mL, 50 mL)

JET BIOFIL® (中国)

1.1.2 铜基纳米材料的制备方法

通过大量前期实验筛选出了各个底物的最佳浓度和剂量。首先，使用超纯水配制 0.5 mmol L^{-1} 的氯化铜 (II) 溶液和 0.2 mmol L^{-1} 的 FDP 溶液。室温条件下使用移液枪转移 13.5 mL 无水乙醇+水 (无水乙醇:水=1:9 或无水乙醇:水=9:1) 至小烧杯中然后放置于磁力搅拌器上；其次，使用移液枪转移 1 mL 配制好的 0.5 mmol L^{-1} 氯化铜 (II) 溶液和 0.5 mL 配制好的 0.2 mmol L^{-1} 的 FDP 溶液加入到上述小烧杯中；磁力搅拌 3 分钟充分混匀上述混合液，接下来将上述混合液转入水热反应釜中进行水热反应。众所周知，水热反应的时间和温度是影响最终产物的比较重要的两大因素，因此，本研究中设置了一系列的反应温度 ($150 \text{ }^\circ\text{C}$, $180 \text{ }^\circ\text{C}$) 和反应时间 (1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h)。水热反应结束后，将水热反应釜中的混合溶液转移至 50 mL 离心管中置于离心机内离心 (3000 转/分, 3 分钟)，弃上清，使用超纯水和无水乙醇分别充分洗涤沉淀 3 次后置于冷冻干燥机内冻干 24 h 后保存于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内 (图 1.1)。同时，本研究中，为了研究有机磷源对产物生长和自组装的影响，在不存在有机磷源的情况下，使用无机铜和磷酸盐离子作为前体制备对照样品。

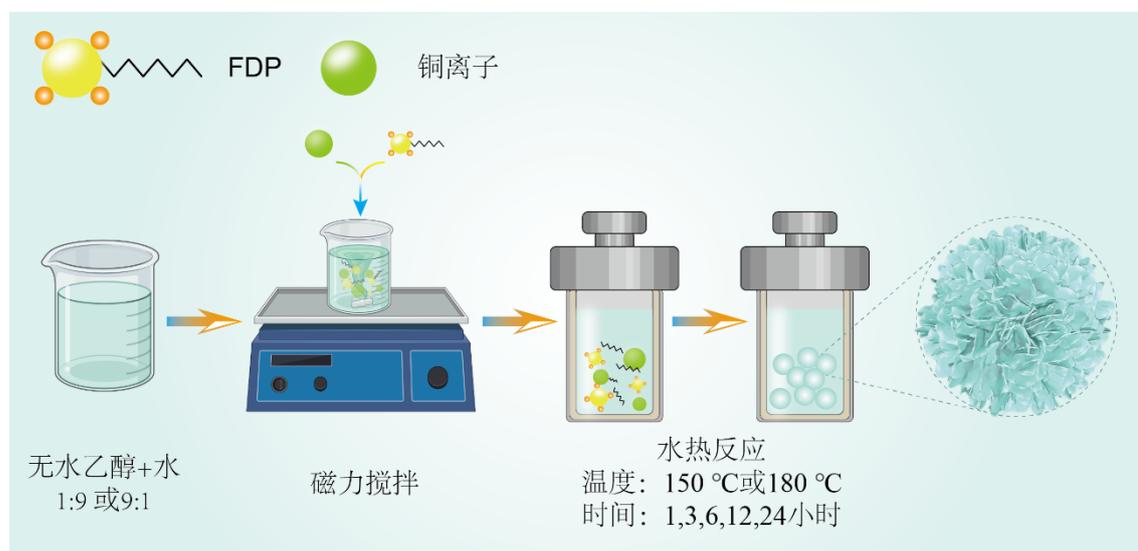


图 1.1 水热法制备铜基纳米材料示意图

Figure 1.1 Schematic diagram of copper-based nanomaterials prepared by hydrothermal method

1.2 铜基纳米材料的理化性质系统表征

1.2.1 实验条件与实验材料

1.2.1.1 实验所需主要设备与仪器

表 1.3 铜基纳米材料的理化性质系统表征中所需的主要设备与仪器

Table 1.3 Main equipment and instruments required in the systematic characterization of physical and chemical properties of Cu-based nanomaterials

设备与仪器名称	生产公司
场发射扫描电子显微镜 (SEM)	Hitachi, S-4800 (日本)
场发射透射电子显微镜 (TEM)	JEM, 2100F (日本)
场发射扫描电子显微镜 (SEM)	Gemini S-300, ZEISS (德国)
X 射线粉末衍射仪	Smartlab 9KW, Rigaku (日本)
X 射线光电子能谱	Thermo Kalpha (美国)
TGA 热重分析仪	STA-8000, PerkinElmer (美国)
红外光谱分析仪 (FTIR)	Nicolet iS 10, Thermo, (美国)
超声波处理机 (1500F-DZ)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)

1.2.1.2 实验所需主要试剂与耗材

表 1.4 铜基纳米材料的理化性质系统表征中所需的主要试剂与耗材
Table 1.4 Main reagents and consumables required in the systematic characterization of physical and chemical properties of Cu-based nanomaterials

试剂与耗材名称	供应商
无水乙醇 (C ₂ H ₅ OH, ≥ 99%)	Thermo Fisher (美国)
溴化钾 (KBr) 晶体	阿拉丁试剂 (上海) 有限公司 (中国)

1.2.2 实验方法

将上述水热反应获得的产物铜基纳米材料及对照样通过场发射扫描电子显微镜 (Field-emission scanning electron microscope, SEM) 和透射电子显微镜 (Field-emission transmission electron microscope, TEM) 分析对其形貌、结构和尺寸进行细致表征; 通过能谱分析 (EDS)、X 射线衍射分析 (X-Ray Diffraction, XRD)、X 射线光电子能谱分析 (XPS)、热重分析 (TGA) 和傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析对其物相及化学性质进行细致表征。具体的表征方法详情如下:

- (1) SEM 分析: 待测铜基纳米材料及对照样品通过离心和洗涤, 室温干燥后分散于适量无水乙醇中, 超声 1 分钟使其充分均匀分散, 利用移液枪转移适量体积上述液体至贴于铜板的碳胶带上, 待无水乙醇充分挥发后喷金, 将待测样品放入扫描电镜仪器内, 抽真空后观察其结构和形貌。
- (2) TEM 分析: 待测铜基纳米材料及对照样品通过离心和洗涤, 室温干燥后分散于适量无水乙醇中, 超声 1 分钟使其充分均匀分散, 利用移液枪转移适量体积上述液体至贴于铜板的碳胶带上, 待无水乙醇充分挥发后将待测样品放入扫描电镜仪器内, 抽真空后观察其结构和形貌。
- (3) 能谱分析 (EDS): 待测样品通过超声充分均匀分散于无水乙醇中, 利用移液枪转移适当体积至贴于铜板的碳胶带上, 待无水乙醇彻底挥发后喷金, 使用扫描电镜进行元素能谱分析。
- (4) X 射线粉末衍射分析 (XRD): 待测样品通过 XRD 分析仪进行表征, 扫描速度为 5° min⁻¹, Cu 靶 K α 射线, 波长为 1.5406 Å,

扫描范围为 5° - 60° 。

- (5) 红外光谱分析 (FTIR) : 取适量待测样品与干燥的溴化钾 (KBr) 晶体在研钵中混合后用研磨棒充分研磨, 然后将研磨后的混合粉末转移至配套的模具中, 压制成圆形薄片, 然后置于红外光谱分析仪中进行检测。
- (6) X 射线光电子能谱分析 (XPS) : 待测样品干燥后充分研磨成粉末, 将样品用导电胶固定在样品台上, 然后置于 X 射线光电子能谱仪中进行检测。
- (7) 热重分析 (TGA) : 待测样品干燥后充分研磨成粉末, 在空气中, 梯度升温至 1100°C , 设定时间点称量并计算其质量损耗。

1.2.3 实验结果与讨论

大量研究优选出了两种反应体系 (A 体系: 水: 无水乙醇=1:9; B 体系: 水: 无水乙醇=9:1)。

A 体系中, 实验结果提示在特定的水热反应条件下 (反应温度: 150°C , 反应时间: 6h) 生成的产物均一性、分散性和形貌最稳定, 同时在该特定条件下生成的铜基纳米材料尺寸最小, 拥有较大的比表面积利于载药和被细胞内吞, 为方便后文叙述, 本文将该特定体系和条件下生成的产物命名为果糖改性氯化铜 (I) 纳米颗粒 (Fru-CuCl NPs)。如图 1.2 所示为 Fru-CuCl NPs 的 SEM、TEM、XRD、Mapping、FTIR 和 XPS 表征结果。SEM 和 TEM 图像 (图 1.2 a, b) 结果显示水热反应生成的 Fru-CuCl NPs 呈纳米颗粒形貌, 具有良好的均一性, 纳米颗粒尺寸小于 200 nm 。图 1.2 c 所示为产物的 XRD 分析结果, 可见产物的 XRD 吸收峰对应着标准卡片 JCPDS 33-0451 (氯化铜 (I)) 与标准卡片 JCPDS 18-0439 (氯化铜 (II)), 表明产物中氯化铜 (I) 的存在, 分析其原因, FDP 水解后生成的果糖具有一定的还原性, 和氯化铜 (II) 发生氧化还原反应生成了氯化铜 (I), 且 CuCl 经过果糖改性不易被氧化, 保持一价状态。通过元素面扫对 Fru-CuCl NPs 进行元素组成分析, 结果如图 1.2 d 所示, 碳 (C)、氧 (O)、磷 (P) 和铜 (Cu) 元素均匀分布于 Fru-CuCl NPs 中。同时, 本研究采用傅里叶变换红外(FTIR)光谱表征了 Fru-CuCl NPs 的化学性质, FTIR 光谱揭示

了 FDP 和相关衍生物的存在。1653 cm^{-1} 处的吸收峰归于 P-O 的弯曲振动，1040 cm^{-1} ，949 cm^{-1} 处观察到的吸收峰可归因于 P-O 的反对称伸缩振动，949 cm^{-1} 处观察到的吸收峰可归因于磷氧四面体 PO_4^{3-} 中 P-O 的对称伸缩振动，832 cm^{-1} 为 P-O-C 的伸缩振动，在 Fru-CuCl NPs 的光谱中也观察到与 DOX 相关的 1235 cm^{-1} 、1211 cm^{-1} 、1115 cm^{-1} 光谱峰，提示成功装载 DOX。同时，通过 X 射线光电子能谱分析，在 401.8 eV 的峰值代表 DOX 的成功装载，且通过对 Cu 的 XPS 的 LMM 谱图的分析，在 570.04 eV 出现的峰值证明了 Cu (I) 的存在。

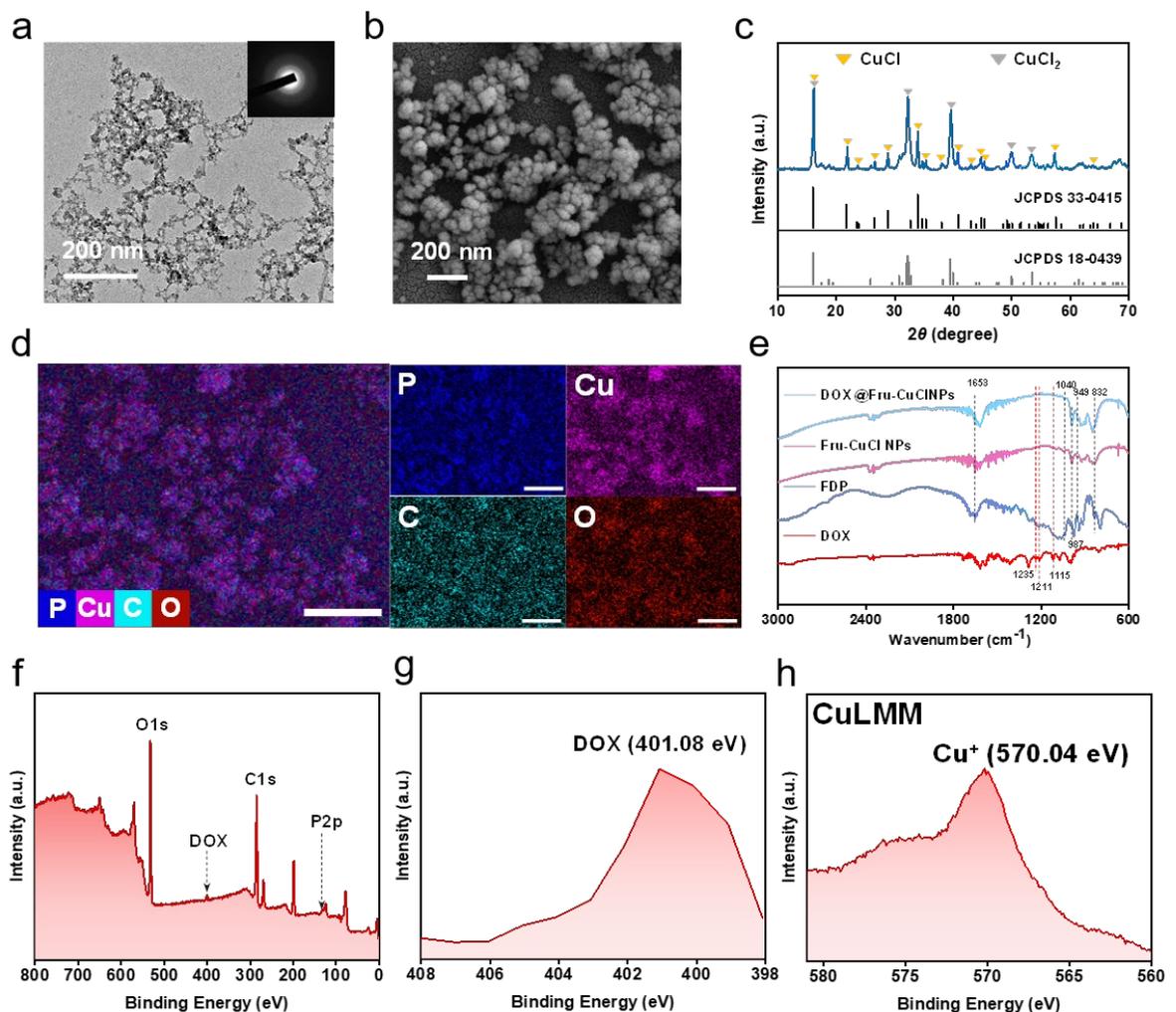


图 1.2 果糖改性氯化铜 (I) 纳米颗粒 (Fru-CuCl NPs) 以及 DOX@Fru-CuCl NPs 的理化性质表征结果。(a) Fru-CuCl NPs 的 TEM 图；(b) Fru-CuCl NPs 的 SEM 图；(c) Fru-CuCl NPs 的 XRD 分析结果；(d) Fru-CuCl NPs 的能谱分析结果；(e) Fru-CuCl NPs 以及

DOX@Fru-CuCl NPs 的 FTIR 图谱；（f-h）DOX@Fru-CuCl NPs 的 XPS 分析结果。

Figure 1.2 Physicochemical properties of fructose-modified copper (I) nanoparticles (Fru-CuCl NPs) and DOX@Fru-CuCl NPs. (a) TEM image of Fru-CuCl NPs; (b) SEM image of Fru-CuCl NPs; (c) XRD results of Fru-CuCl NPs; (d) energy spectrum analysis results of Fru-CuCl NPs; (e) FTIR spectra of Fru-CuCl NPs and DOX@Fru-CuCl NPs; (f-h) DOX@Fru-CuCl The XPS analysis results of NPs.

B 体系中，实验结果提示在特定的水热反应条件下（反应温度：150 °C，反应时间：24 h）生成的产物均一性及形貌最稳定。为方便后文叙述，本文将该特定体系和条件下生成的产物命名为磷酸氢铜纳米片自组装微球（Copper hydrogen phosphate nanosheet assembled microspheres, CP-NSMSs），同时，本研究中设置了对照组，即在相同反应条件下使用无机磷酸盐代替 FDP 提供磷酸根，对照组产物命名为磷酸氢铜纳米片（Copper hydrogen phosphate nanosheets, CP-NSs）。如图 1.3 所示为 CP-NSMSs 的 SEM、XRD、EDS、FTIR 和 TGA 表征结果。SEM 结果显示水热反应生成的 CP-NSMSs 呈微球形貌，直径约 $5.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ，由厚度约为 $34.5 \pm 2.3 \text{ nm}$ 的磷酸氢铜纳米片自组装构建而成（图 1.3 a）。图 1.4 所示为对照样 CP-NSs 的 SEM 结果，提示 CP-NSs 的尺寸约 300 nm，厚度约 30 nm，均一性较 CP-NSMSs 差。通过对比 CP-NSMSs 和 CP-NSs 的 SEM 结果可知，FDP 不仅作为有机磷源提供了磷酸根离子，同时作为表面活性剂调控了产物的形貌和结构。图 1.3 b 所示为产物的 XRD 分析结果，可见产物的 XRD 吸收峰对应着标准卡片 JCPDS 31-0458（磷酸氢铜），表明产物中磷酸氢铜的存在，同时，我们还观察到了一个与标准卡片 JCPDS 06-0344（氯化铜（I））对应的杂质峰，即提示氯化铜（I）的存在。分析其原因，FDP 水解后生成的果糖具有一定的还原性，和氯化铜（II）发生氧化还原反应生成了不溶于水和无水乙醇的氯化铜（I）。通过 EDS 和元素面扫对 CP-NSMSs 进行元素组成及含量分析，结果如图 1.3 c-d 所示，碳（C）、氧（O）、磷（P）和铜（Cu）元素均匀分布于 CP-NSMSs 微球中。其

中的 P 和 Cu 来自于磷酸氢铜，C、O 来自有机分子果糖，提示 CP-NSMSs 微球为有机-无机杂化结构。图 1.3 e 所示为 CP-NSMSs、CP-NSs 和 FDP 的 FTIR 图谱，在 CP-NSMSs 和 CP-NSs 的 FTIR 光谱中观察到了磷酸基团的典型拉伸振动峰（ 991 cm^{-1} 和 1047 cm^{-1} ），提示磷酸氢铜的形成。TGA 分析曲线显示（图 1.3 f）CP-NSMSs 的重量损失大于 CP-NSs，这一结果表明，水解的小有机分子吸附在 CP-NSMSs 的纳米片表面上，起到表面活性剂的作用，调控了纳米片的自组装形成微球。

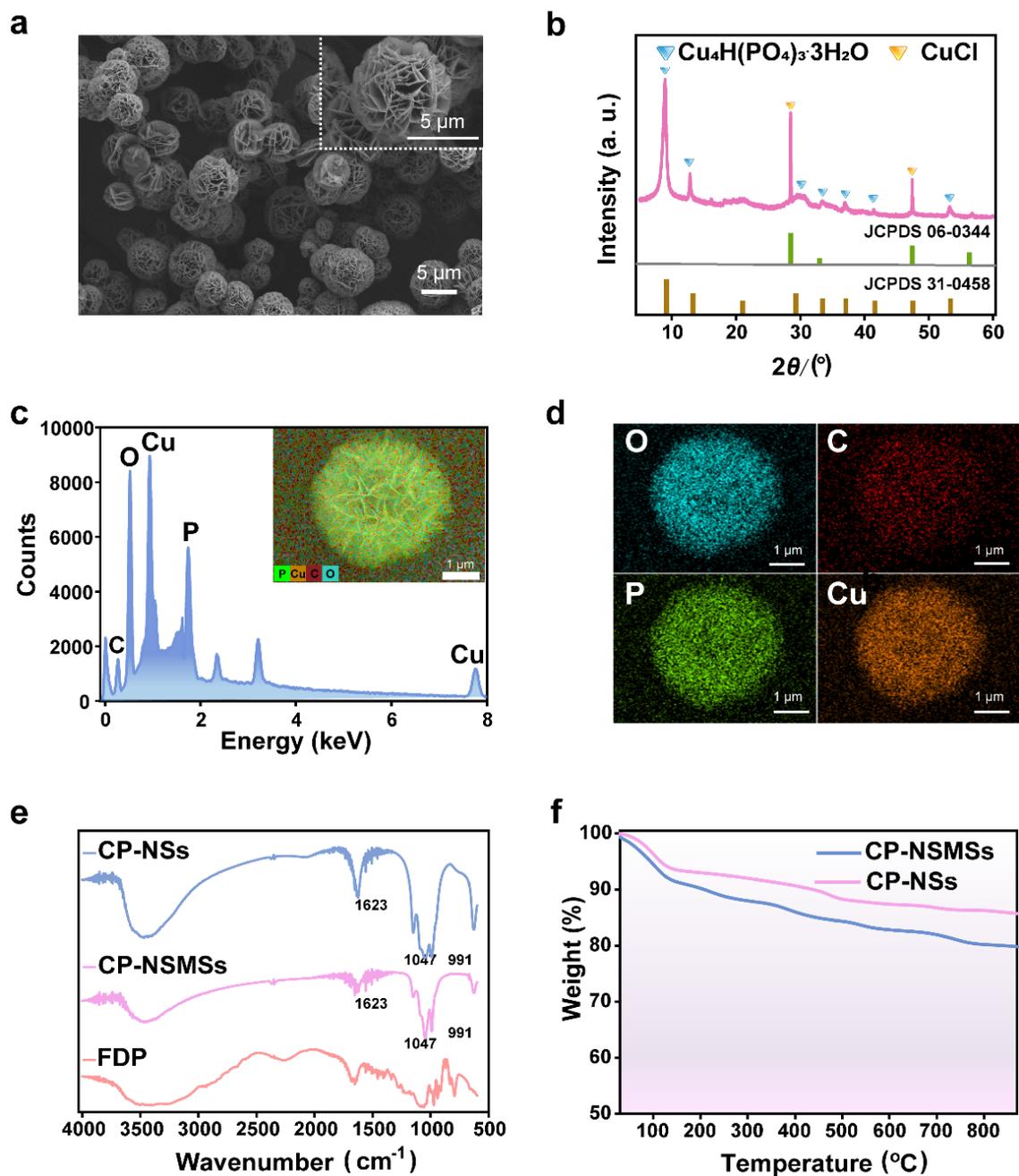


图 1.3 铜基纳米材料（磷酸氢铜纳米片自组装微球，CP-NSMSs）的物理性质表征结果。（a）CP-NSMSs 的 SEM 图；（b）CP-NSMSs 的 XRD 分析结果；（c-d）CP-NSMSs 的能谱分析及元素面扫结果；（e）CP-NSMSs 的 FTIR 图谱；（f）CP-NSMSs 的热重分析结果。

Figure 1.3 Characterization results of physical and chemical properties of copper based nanomaterials (copper hydrogen phosphate nanosheet self-assembled microspheres, CP-NSMSs). (a) SEM plot of CP-NSMSs; (b)

XRD analysis results of CP-NSMSs; (c-d) energy spectrum analysis and elemental surface scan results of CP-NSMSs; (e) FTIR profile of CP-NSMSs; (f) Thermogravimetric analysis results of CP-NSMSs.

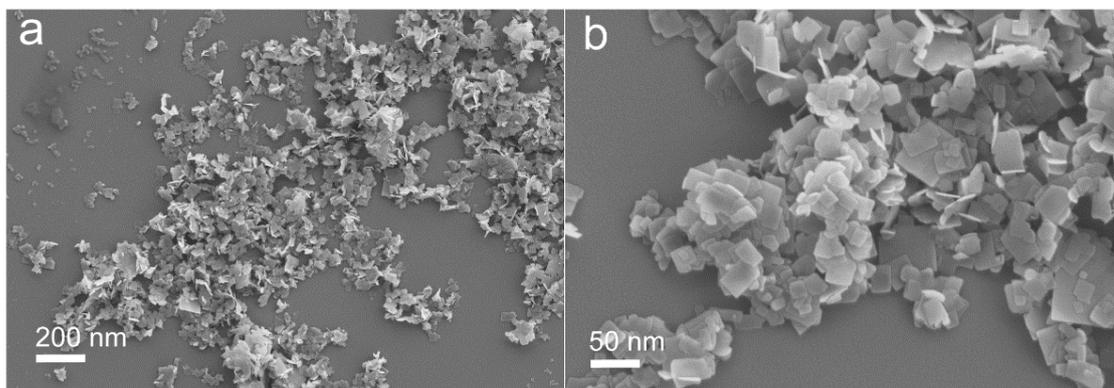


图 1.4 对照组磷酸氢铜纳米片（CP-NSs）的扫描电镜（SEM）表征结果图。

Figure 1.4 Scanning electron microscopy (SEM) characterization of the control copper hydrogen phosphate nanosheets (CP-NSs).

1.3 铜基纳米材料的形成机制研究

1.3.1 实验方法

底物浓度、水热反应温度和时间是影响最终产物形貌的三大关键因素。首先是底物的浓度，上文 1.2.3 部分提到 FDP 不仅作为有机磷源提供磷酸根，同时可以作为表面活性剂调控产物的形貌和结构。为进一步探索 FDP 的调控作用和铜基纳米材料的形成机制，本研究在 B 体系（水：无水乙醇=9:1）中设置了一系列不同的氯化铜（II）/FDP 摩尔比（5:1,1:1,1:5）以对比产物的变化。

其次是水热反应的温度，本研究在 B 体系中设置了 2 个反应温度（150 °C，180 °C）以探究不同水热反应温度对产物的影响。

最后是水热反应的时间，本研究在 B 体系中设置了 5 个反应时间（1 h，3 h，6 h，12 h，24 h）以探究不同水热反应时间对产物的影响。

1.3.2 实验结果与讨论

不同氯化铜 (II) /FDP 摩尔比所生成的产物的扫描电镜如图 1.5 所示。可见，不同氯化铜 (II) /FDP 摩尔比所生成的产物直径分别是 $5.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (5:1)、 $1.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (1:1) 和 $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (1:5)。提示反应体系中 FDP 的含量越高，获得的产物尺寸越小。如图 1.5 c, f 所示，产物的表面较图 1.5 a, d, b, e 更粗糙更糊，这是有机分子典型的 SEM 形态，分析其原因，在高浓度 FDP 下，大量水解的小有机分子被吸附到新形成的磷酸氢铜纳米片的表面上，阻止它们与铜离子的接触并抑制进一步生长，从而形成更小的微球。

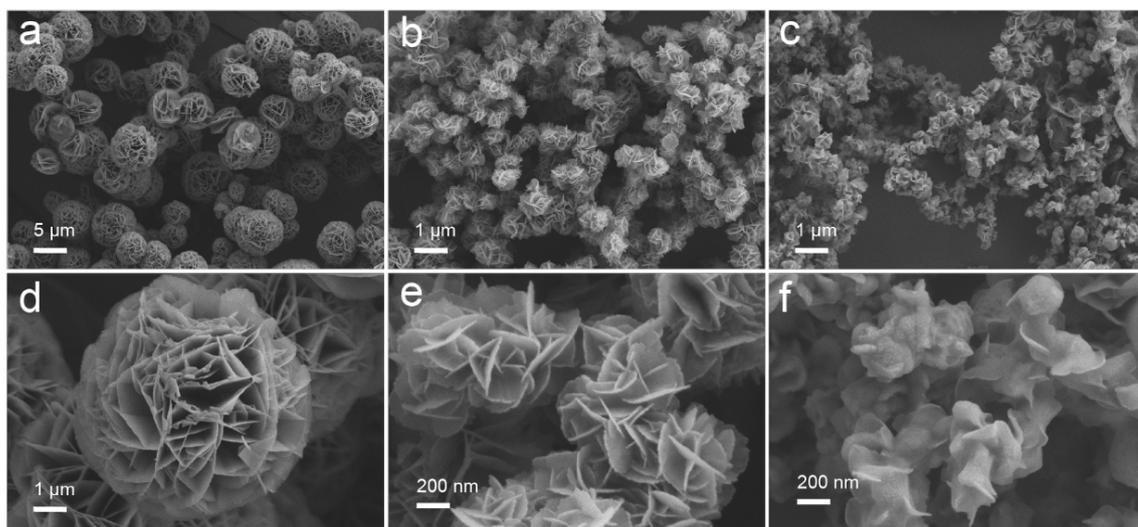


图 1.5 不同氯化铜 (II) /FDP 摩尔比 (a, d) 5:1, (b, e) 1:1 和 (c, f) 1:5 下制备的铜基纳米材料的 SEM 结果图。

Figure 1.5 SEM result plots of copper based nanomaterials prepared at different copper chloride (II) /FDP molar ratios of (a, d) 5:1, (b, e) 1:1, and (c, f) 1:5.

研究发现设置水热反应温度为 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时，没有任何产物生成，这可能是由于 FDP 没有水解，在该温度下不会产生磷酸根离子。相比之下，在 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的反应温度下合成了具有相似形貌的 CP-NSMSs (图 1.6 和图 1.3 a)。结果表明，FDP 的水解温度在 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上，水解后可反应获得 CP-NSMSs。

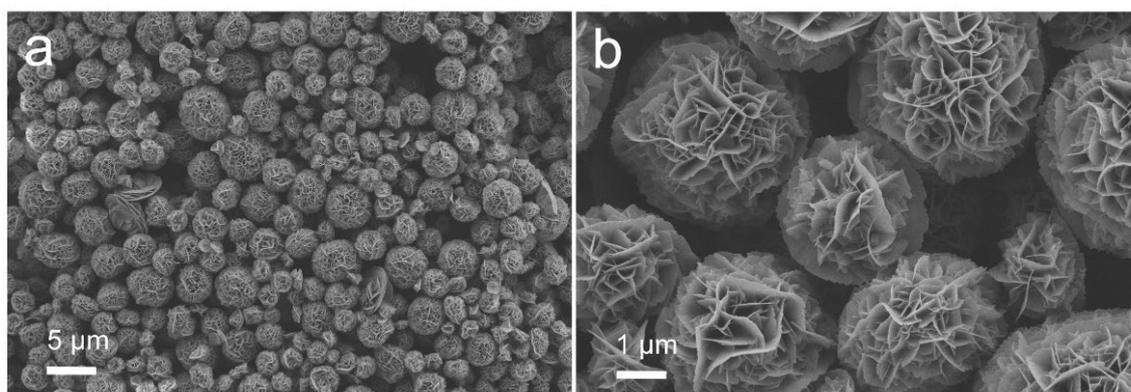


图 1.6 在 180 °C 水热反应温度下，FDP 作为有机磷源合成的铜基纳米材料的 SEM 图像。

Figure 1.6 SEM images of copper based nanomaterials synthesized by FDP as an organophosphorus source at a hydrothermal reaction temperature of 180 °C.

如图 1.7 所示，不同水热反应时间生成的产物形貌是不一样的。微球形貌在水热反应 1 h 的时候观察到，有趣的是，此时的微球是实心球体，而非纳米片自组装形成（图 1.7 a）。随着水热反应延长至 3 h，可清晰观察到由纳米片组装形成的纳米球状结构（图 1.7 b），表明 FDP 在加热 3 h 后缓慢水解，生成磷酸根离子与铜离子反应，从而形成磷酸氢铜纳米片。进一步延长水热反应时间可形成具有均匀尺寸和良好自组装结构的 CP-NSMSs（图 1.7 c, d）。

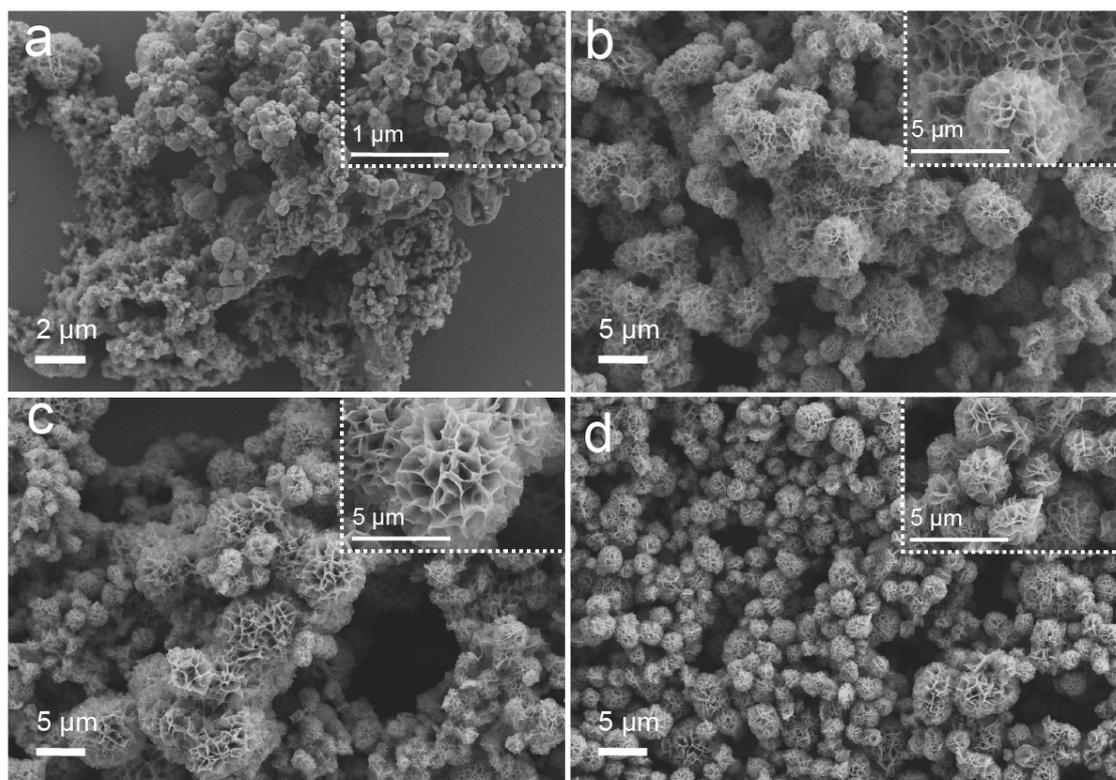


图 1.7 SEM 图像展示 CP-NSMSs 的形成过程：(a) 1 h，(b) 3 h，(c) 6 h 和 (d) 12 h。

Figure 1.7 SEM images demonstrate the formation of CP-NSMSs: (a) 1 h, (b) 3 h, (c) 6 h and (d) 12 h.

综上，本文总结 CP-NSMSs 的形成机制包括四个步骤：(i) 加热时 FDP 水解产生磷酸根离子和有机小分子（如果糖）；(ii) 磷酸盐离子在大量果糖和未水解的 FDP 分子存在下与铜离子反应，形成无定形磷酸铜-有机分子杂化微球；(iii) 纳米片在这些微球内原位形成，在此期间无定形磷酸铜相结晶为磷酸氢铜相；(iv) 磷酸氢铜纳米片通过消耗最初形成的混合微球中的磷酸盐而继续生长和组装以形成 CP-NSMSs。如图 1.7 和图 1.3 a 所示，延长水热反应时间后，获得的纳米片边缘变得更加锋利，提示其中磷酸氢铜晶体随着反应时间的延长其结晶度越来越高。研究指出这种具有锋利边缘的纳米材料可以通过物理损伤破坏细菌膜从而达到杀菌作用。通过大量实验，优选出在 150 °C 水热反应温度下反应 24 h 的具有均匀尺寸和锋利边缘的磷酸氢

铜纳米片自组装微球 (Copper hydrogen phosphate nanosheet assembled microspheres, CP-NSMSs) 用于进一步的抗菌性能评估 (详见第三章)。

1.4 本章小结

本章主要阐述了铜基纳米材料的制备方法、理化性质系统表征和其形成机制。研究中使用 FDP 作为有机磷源提供磷酸根与体系中的铜离子发生水热反应以获得产物, 同时 FDP 及其水解后的有机小分子比如果糖可以作为表面活性剂调控铜基纳米材料的形貌和自组装。众所周知, 底物浓度、反应时间和反应温度是影响水热反应产物的三大关键因素。本研究中, 通过大量前期实验已优选出了两种反应体系 (A 体系: 水: 无水乙醇=1:9; B 体系: 水: 无水乙醇=9:1), 优选依据主要是反应条件难易程度、安全性、产物的均一性和稳定性等。A 体系中, 探索出了最佳反应温度 (150 °C) 和反应时间 (6 h), 此最佳条件下, 调控制备的果糖改性氯化铜 (I) 纳米颗粒 (Fru-CuCl NPs) 具备均匀、稳定、分散性好等优点, 同时其尺寸较小, 其高比表面积赋予 Fru-CuCl NPs 良好的载药性能, 可以负载化疗药物阿霉素 (DOX) 用以抗骨肉瘤治疗研究。B 体系中, 探索出了最佳反应温度 (150 °C) 和反应时间 (24 h), 此最佳条件下, 调控制备的磷酸氢铜纳米片自组装微球 (CP-NSMSs) 具备均匀、稳定、分散性好等优点, 同时其水热反应时间较长为 24 h, 磷酸氢铜纳米片的结晶度高, 边缘十分锋利, 对细菌膜有一定的物理损伤功能, 可作为抗菌治疗研究的替代方案。

为进一步探索铜基纳米材料的形成机制, 本章以 B 体系为对象, 设置一系列时间点 (1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h)。通过对不同时间点产物进行扫描电镜表征揭示了铜基纳米材料的形成机制: (i) 水热反应时 FDP 发生水解产生磷酸根和有机小分子 (如果糖); (ii) 磷酸盐离子与铜离子反应, 形成无定形磷酸铜-有机分子杂化微球; (iii) 微球内原位形成纳米花, 在此期间无定形磷酸铜相结晶为磷酸氢铜相; (iv) 磷酸氢铜纳米片继续生长和组装以形成 CP-NSMSs。

2 铜基纳米材料抗骨肉瘤作用及其机制研究

2.1 铜基纳米材料抗骨肉瘤作用的研究

2.1.1 实验条件与实验材料

2.1.1.1 实验所需主要设备与仪器

表 2.1 铜基纳米材料抗骨肉瘤作用研究中的主要设备与仪器

Table 2.1 Main equipment and instruments in the study of the anti-osteosarcoma effect of copper based nanomaterials

设备与仪器名称	生产公司
移液枪套装	Eppendorf 公司 (德国)
称重天平 (BSA124S-CW)	北京赛多利斯科学仪器有限公司 (中国)
水纯化系统 (RODI-220A1)	厦门锐思捷水纯化技术有限公司 (中国)
电冰箱 (4 °C, -20 °C, -80 °C)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
电冰柜 (-20 °C)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
生物安全柜 (HR40-IIA2)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
医用离心机 (L500)	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司 (中国)
二氧化碳培养箱 (3111)	Thermo Fisher (美国)
液氮罐 (Locator JR)	Thermo Fisher (美国)
多功能酶标仪	Bio Tek Synergyz (美国)
冷冻干燥机 (SCIENTZ-10N)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
超声波处理机 (1500F-DZ)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
恒温振荡摇床 (ZHTY-50V)	上海知楚仪器有限公司 (中国)

倒置荧光显微镜	德国徕卡公司（德国）
紫外-可见光（UV-Vis）分光光度计	Evolution UV201, Thermo Fisher（美国）

2.1.1.2 实验所需主要试剂与耗材

表 2.2 铜基纳米材料抗骨肉瘤作用研究中的主要试剂与耗材

Table 2.2 Main reagents and consumables in the study of Cu-based nanomaterials against osteosarcoma

试剂与耗材名称	供应商
无水乙醇（C ₂ H ₅ OH, ≥99%）	Thermo Fisher（美国）
阿霉素（Doxorubicin, DOX）	阿拉丁试剂（上海）有限公司（中国）
EP 管（1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL）	上海贝晶生物技术有限公司（中国）
细胞冻存液	北京博奥龙免疫技术有限公司（中国）
细胞计数板	Marienfeld 公司（德国）
细胞培养瓶（25 cm ² , 75 cm ² ）	JET BIOFIL®（中国）
离心管（1.5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL）	JET BIOFIL®（中国）
细胞冻存管	JET BIOFIL®（中国）
细胞培养板（6 孔, 24 孔, 96 孔）	JET BIOFIL®（中国）
胎牛血清	Gibco 公司（美国）
青链霉素	Gibco 公司（美国）
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco 公司（美国）
PBS(1×)	HyClone 公司(美国)
高糖 DMEM 细胞培养基	HyClone 公司(美国)
噻唑蓝（MTT）	Beyotime Biotechnology（中国）
Calcein AM（钙黄绿素）染色液	Beyotime Biotechnology（中国）
Propidium Iodide（碘化丙啶）染色液	Beyotime Biotechnology（中国）
二甲基亚砷	阿拉丁试剂（上海）有限公司

(Dimethylsulfoxide, DMSO) (中国)

2.1.2 实验方法

前文已述, 通过大量前期实验, 确定了用于抗肿瘤研究的铜基纳米材料反应体系和反应条件 (A 体系: 水: 无水乙醇=1:9, 反应时间: 150 °C, 反应时间: 6 h), 筛选标准为产物的均一性、稳定性、形貌和尺寸大小等[61]。最终的产物命名为果糖改性氯化亚铜纳米颗粒 (Fructose-modified cuprous chloride nanoparticles, Fru-CuCl NPs)。

骨肉瘤 (Osteosarcoma) 是最常见和最严重的原发性恶性骨肿瘤, 每年每百万人中儿童和青少年的发病率约为 3-4.5 例, 给社会和病患带来了巨大的经济负担和健康威胁[62]。骨肉瘤的治疗手段较多包括手术切除、化疗、放疗、免疫治疗、靶向治疗等, 随着新辅助化疗方案: 术前辅助化疗+手术切除肿瘤+术后辅助化疗的出现, 极大延长和提高了患者的生存时间和生存质量。欧美标准推荐的主要化疗方案为 MAP 方案: 高剂量甲氨蝶呤+阿霉素+顺铂, 但是随着化疗药物的长期使用, 骨肉瘤细胞逐渐对化疗产生耐受, 骨肉瘤对化疗的耐药性不仅限制了化疗的广泛应用同时还极大降低了新辅助化疗方案的疗效。基于此, 本文拟开展实验, 设计制备铜基纳米材料作为载体负载化疗药物阿霉素 (Doxorubicin, DOX) 协同发挥抗肿瘤效应, 同时探索其抗肿瘤机制, 为抗骨肉瘤基础研究提供一种新的思路。人骨肉瘤细胞 (MG63) 常用于抗骨肉瘤基础研究, 本文使用的 MG63 购买自江苏凯基生物技术股份有限公司。耐阿霉素人骨肉瘤细胞 (MG63/DXR) 由上海市第十人民医院科创园骨科基础与转化研究中心提供。

2.1.2.1 载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒 (DOX@Fru-CuCl NPs) 的制备

首先, 参照 1.1.2 所述的方法制备果糖改性氯化亚铜纳米颗粒 (Fru-CuCl NPs), 然后按照 7:10 的质量比混合 DOX 和 Fru-CuCl NPs, 转移至 10 mL 纯水体系, 冰浴超声 5 分钟至材料充分均匀分散于纯水中。接下来, 将其置于恒温摇床内 12 h 后取出, 离心 (8000 转/分, 30 分钟) 弃上清, 使用无水乙醇充分洗涤 2-3 遍后置于冷冻干燥机内冻干 24 h 后即可获得载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒

(DOX@Fru-CuCl NPs)，保存于 4 °C 冰箱便于后续使用。

2.1.2.2 DOX@ Fru-CuCl NPs 中 DOX 载药量的研究

首先，配制不同浓度的 DOX 溶液，使用紫外-可见光分光光度计测出不同浓度 DOX 的吸光度，以此绘制 DOX 的标准曲线。然后参照 2.1.2.1 的步骤制备 DOX@ Fru-CuCl NPs，和 2.1.2.1 不同的是摇床 12 h 取出离心后取上清使用紫外-可见光分光光度计测其吸光度，通过 DOX 的标准曲线计算上清的 DOX 含量，以计算负载于 DOX@ Fru-CuCl NPs 的 DOX 量以获得 DOX 的载药量。

2.1.2.3 细胞的培养、换液、传代、冻存、复苏与计数

(1) 细胞培养：首先需要配制好用于 MG63 和 MG63/DXR 培养的完全培养基。高糖 DMEM 基础培养基，胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)，青链霉素 (Penicillin/streptomycin, PS) 按照 100:10:1 的体积比充分混匀配制细胞完全培养基，配制的完全培养基中青链霉素的浓度分别为 100 U mL^{-1} 和 $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 。

(2) 细胞换液：通过光学显微镜观察细胞培养瓶中细胞状态，常规来讲每 2-3 天换液一次。其操作如下：a. 使用移液枪移除培养瓶内的旧培养基；b. 使用移液枪转移 1-2 mL PBS 溶液至细胞培养瓶内，摇晃培养瓶以清除漂浮及死亡的细胞，移除 PBS 溶液，重复上述操作 2-3 次；c. 加入 5 mL (25 cm^2 细胞培养瓶) 或 15 mL (75 cm^2 细胞培养瓶) 细胞完全培养基，然后置于光学显微镜下观察细胞的数量、形态及黏附情况；d. 75% 乙醇消毒后放置于细胞培养箱内培养。

(3) 细胞传代：通过光学显微镜观察若细胞培养瓶内贴壁细胞的量达到 80%-90% 时需要进行细胞传代。其操作简述如下：a-b. 同细胞换液；c. 加入 1 mL (25 cm^2 细胞培养瓶) 或 2 mL (75 cm^2 细胞培养瓶) 0.25% Trypsin-EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) 溶液，轻晃培养瓶使 Trypsin-EDTA 溶液完全覆盖瓶底，75% 乙醇消毒后置于细胞培养箱内孵育 2-3 分钟；d. 取出细胞培养瓶置于光学显微镜上观察细胞形态是否已经变圆，若大部分细胞已经变圆表示大部分贴壁细胞已经脱落下来，消毒后置于生物安全柜内加入与 Trypsin-EDTA 溶液等量体积的细胞完全培养基终止反应，然后使用移液枪充分吹打瓶底使 MG63

或 MG63/DXR 彻底悬浮；e.将上述细胞悬液转移至离心管内，离心（800 转/分，3 分钟）后充分弃上清，加入 3 mL 新鲜的完全培养基充分重悬后平均转移至 3 个对应规格的细胞培养瓶（可根据不同情况按照不同比例传代，一般采取 1:3 传代），然后补充新鲜完全培养基至 5 mL 或 15 mL，置于显微镜下观察细胞的数量及形态；f.75 %乙醇消毒后置于细胞培养箱内培养。

（4）细胞冻存：细胞冻存和复苏应遵循“慢冻快复苏”原则。操作简述如下：a-d.同细胞传代；e.将含有细胞悬液的离心管离心去上清后，加入 3 mL 新鲜的细胞冻存液充分重悬后平均转移至 3 个细胞冻存管内（一般根据细胞数量决定冻存比例），冻存管做好标记；f.将细胞冻存管置于细胞冻存盒内，然后于-80 °C冰箱内冻存 1 天后转移至液氮罐内长期保存。

（5）细胞复苏：细胞冻存和复苏应遵循“慢冻快复苏”原则。操作简述如下：a.将细胞冻存管从液氮罐中取出，置于 37 °C 水浴锅内快速复温；b.使用移液枪将细胞悬液转移至离心管内，加入等量的新鲜完全培养基，离心（800 转/分，3 分钟）去上清，加入 2 mL 新鲜的完全培养基充分重悬后转移至对应规格的细胞培养瓶中，补足完全培养基，然后置于显微镜下观察细胞的数量及形态；c. 75 %乙醇消毒后置于细胞培养箱内培养。

（6）细胞计数：a-d.同细胞传代；e.将含有细胞悬液的离心管离心去上清后，加入 5 mL 新鲜的完全培养基充分重悬；f.使用无菌水清洗细胞计数板，酒精擦拭后晾干备用；g.使用移液枪转移 10 μ L 上述细胞悬液至细胞计数板盖玻片的一侧，细胞悬液会通过渗透作用渗透至计数区域；h.然后将细胞计数板置于显微镜上，使用细胞计数器记录细胞计数板四个象限中的细胞总数；i.细胞的浓度（个/ mL）=（四个象限中的细胞总数/4） $\times 10^4$ 。

2.1.2.4 MTT 法评估铜基纳米材料（Fru-CuCl NPs）抗 MG63 活性

（1）将增殖良好，形态良好的 MG63 或 MG63/DXR 计数后按照 1×10^4 个/孔的初始浓度接种于 2 块 96 孔细胞培养板内。然后置于细胞培养箱内（37 °C，5 % CO₂），24 h 后可见细胞贴壁生长。

（2）将上述冷冻干燥后的 DOX@Fru-CuCl NPs、Fru-CuCl NPs（对照

组)和 DOX (对照组)称重后分装于无菌 EP 管内并做好标记,灭菌后分散于上述已经配制好的细胞完全培养基内,配制成含不同材料浓度的完全培养基,设置的 DOX@Fru-CuCl NPs、Fru-CuCl NPs 和 DOX 的浓度梯度为 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, 同时设置不掺入任何材料的细胞完全培养基为空白组。

(3) 细胞接种 24 h 后,光学显微镜下观察 96 孔板内细胞的生长及贴壁情况,使用移液枪移除 96 孔细胞板中旧的培养基,然后每个孔按照不同浓度对应加入 100 μL 新鲜含有 DOX@Fru-CuCl NPs、Fru-CuCl NPs 和 DOX 的完全培养基与 MG6 或 MG63/DXR 共培养。

(4) 材料与 MG63 或 MG63/DXR 共培养 24 h 后,取出对应的 96 孔细胞培养板,移除其中的旧培养基及材料,使用 PBS 清洗 3 遍,然后避光条件下每孔按照 1:10 的体积比加入配置好的 MTT 和完全培养基混合液 110 μL 。然后置于细胞培养箱内避光孵育 4 h 后取出,将每孔中液体全部吸出,每个孔内加入 150 μL DMSO 后置于摇床避光低速振荡 10 分钟。然后每孔转移 110 μL 上清至新 96 孔板中,使用多功能酶标仪检测其在 490 nm 波长处的 OD (Optical density) 值。

(5) 材料与 MG63 或 MG63/DXR 共培养 48 h 后,采用同 (4) 的方法检测其 OD 值,绘制出 OD 值的变化曲线。

2.1.2.5 活死细胞染色评估铜基纳米材料 (Fru-CuCl NPs) 对 MG63 的毒性作用

(1) 参照 2.1.2.1 的步骤制备 DOX@ Fru-CuCl NPs, 同时设置对照组 Fru-CuCl NPs 和 DOX。

(2) 将生长良好的 MG63 或 MG63/DXR 计数后按照 1×10^4 个细胞/孔的密度分别均匀接种于 24 孔板中,然后置于细胞培养箱内培养 24 h。

(3) 培养 24 h 后, MG63 或 MG63/DXR 贴壁生长,各自对应加入一定浓度的材料 DOX@ Fru-CuCl NPs、Fru-CuCl NPs 和 DOX,同时设置不加材料的空白组。

(4) 细胞与材料共培养 24 h 后,移除旧细胞培养基,用 PBS 溶液清洗细胞 1-2 遍。

(5) 将购买的 Calcein AM (钙黄绿素 AM) 染色液和 Propidium Iodide

(碘化丙啶)染色液按照说明书配制成混合的染色工作液,所配制的工作液中钙黄绿素 AM 和 PI 的浓度分别为 $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ 和 $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ 。染色工作液应该现配现用,将配制好的染色工作液加入到上述共培养的细胞培养板内,每个孔加入 $100 \mu\text{L}$ 染色工作液,轻轻摇晃细胞培养板使染色工作液充分均匀覆盖所有细胞,然后置于细胞培养箱内避光孵育 30 分钟。

(6) 孵育结束后,移除染色工作液,加入 $100 \mu\text{L}$ 新鲜的细胞完全培养基再次置于细胞培养箱内避光孵育 30 分钟以保证细胞内酯酶充分水解钙黄绿素以生产带有绿色荧光的 Calcein。

(7) 孵育结束后,移除旧培养基,加入少量不含血清的细胞基础培养基,然后置于倒置荧光显微镜下观察细胞染色情况并采集图像。根据活死染色的原理,活细胞在荧光显微镜下发绿光,死细胞在荧光显微镜下发红光。

2.1.3 统计学分析与方法

实验数据中的定量数据均以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 的形式表示,数值数据均使用 IBM SPSS Statistics 软件进行统计和分析,使用 GraphPad Prism 8 及 OriginPro 9 进行图表制作。

2.1.4 实验结果与讨论

为保证 Fru-CuCl NPs 可以顺利装载 DOX,本研究根据不同浓度的紫外吸光度的测定,拟合出 DOX 的标准曲线(图 2.1 a),然后测定载药后上清液的紫外分光光度值(图 2.1 b),通过标准曲线,计算得到载药率约为 13.47%,提示药物(DOX)成功装载。如图 2.2 所示,在 24 h 内, MG63 或 MG63/DXR 与不同浓度 DOX 共培养, MG63 细胞活力明显下降, MG63/DXR 由于具有一定耐药性,其活性下降较 MG63 更平缓,且经过计算 MG63/DXR 的 IC₅₀ 为 $20.97 \mu\text{g mL}^{-1}$,远远大于 MG63 的 IC₅₀,这也证明了 MG63/DXR 对 DOX 的耐药性。如图 2.2 c, d 显示 Fru-CuCl NPs 的细胞毒性与浓度成正比且与 MG63 或 MG63/DXR 细胞共培养 24、48 h 后,细胞活力明显下降,提示 Fru-CuCl NPs 对 MG63 或 MG63/DXR 具有一定的毒性作用。在图 2.3 a 中 DOX@Fru-CuCl NPs 对 MG63/DXR 细胞毒性与浓度成正相关,提示

DOX@Fru-CuCl NPs 对耐药株 MG63/DXR 细胞仍具有杀伤作用，且其杀伤效率仍与浓度成正相关。如图 2.3 b 所示，在同等浓度下，DOX@Fru-CuCl NPs 比单独 DOX 表现出更显著的细胞损伤，提示 DOX@Fru-CuCl NPs 具有一定的逆转耐药潜力，其中的 DOX 和果糖改性氯化亚铜纳米颗粒发挥着协同抗肿瘤细胞作用。为进一步直观探索 DOX@Fru-CuCl NPs 对耐药株 MG63/DXR 的杀伤能力，本研究采用了细胞活死染色，PBS（对照）和 DOX 对耐药细胞的细胞毒性较小，而 DOX@Fru-CuCl NPs 在 MG63/DXR 细胞中诱导了更高水平的凋亡，经 DOX ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$)、Fru-CuCl NPs ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$)、DOX@Fru-CuCl NPs ($28 \mu\text{g mL}^{-1}$)处理 24 h 后的 MG63/DXR 细胞的 Calcein AM（活细胞，绿色）和 PI（死细胞，红色）染色图像(图 2.3 c) 与 MTT 实验的结果一致。

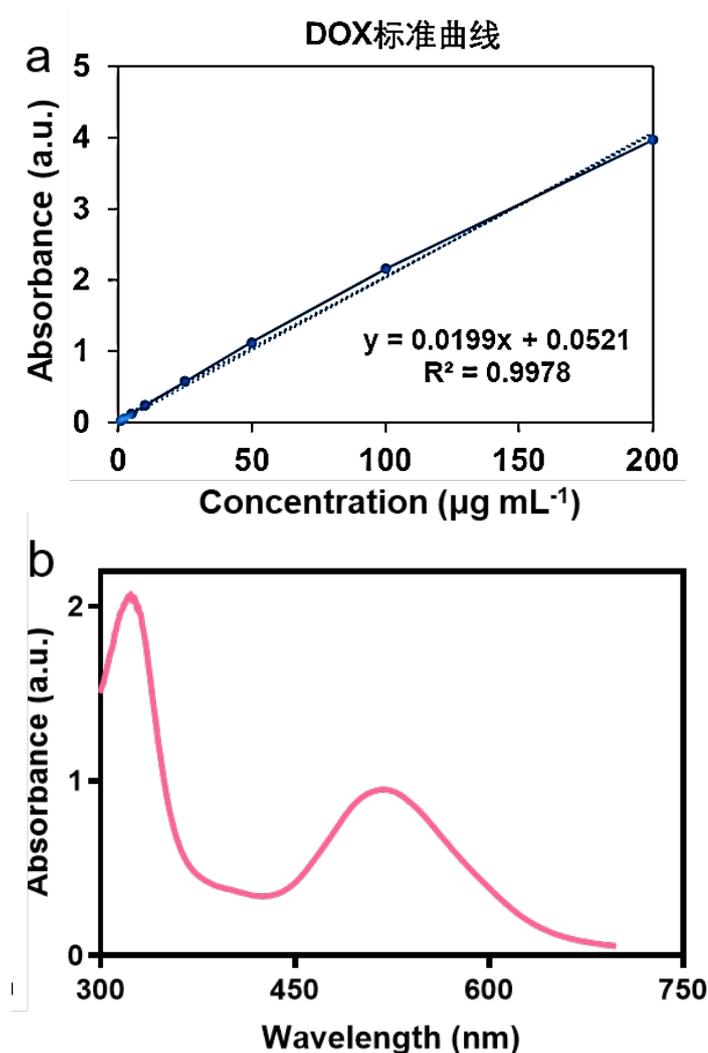


图2.1 (a)DOX 在水体系内对紫外吸收强度的标准曲线； (b)Fru -

CuCl NPs 与 DOX 结合后上清的紫外吸收强度。

Figure 2.1 (a) Standard curve of UV absorption intensity of DOX in water system; (b) UV absorption intensity of the supernatant after Fru-CuCl NPs were bound to DOX.

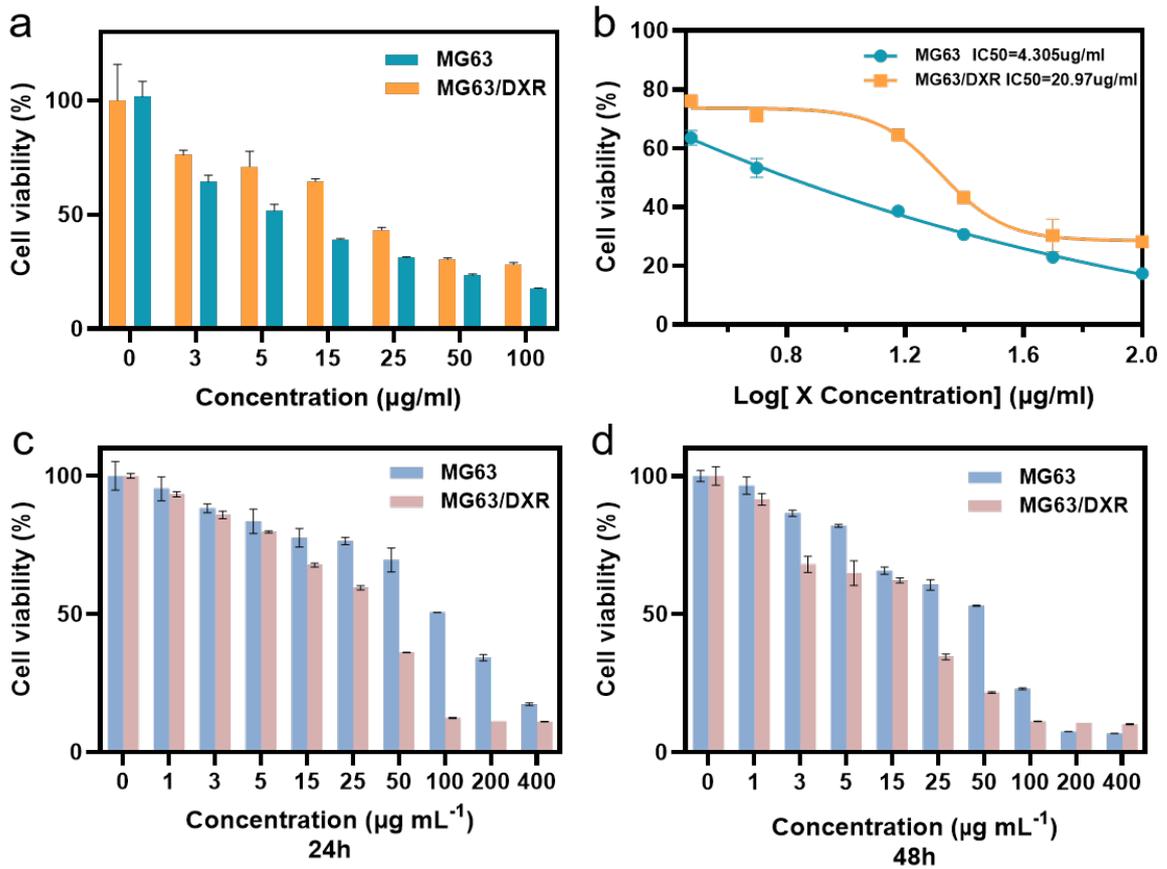


图 2.2 (a-b) MG63 细胞和 MG63/DXR 细胞在不同浓度下与 DOX 共孵育 24 h 后的细胞相对存活率及其 IC_{50} ; (c-b) MG63 细胞和 MG63/DXR 细胞与不同浓度 Fru-CuCl NPs 共孵育 24 h 和 48 h 后的细胞相对存活率。

Figure 2.2 (a-b) Relative cell viability and IC_{50} of MG63 cells and MG63/DXR cells incubated with DOX at different concentrations for 24 h; (c-b) Relative cell viability of MG63 cells and MG63/DXR cells incubated

with different concentrations of Fru-CuCl NPs for 24 and 48 h.

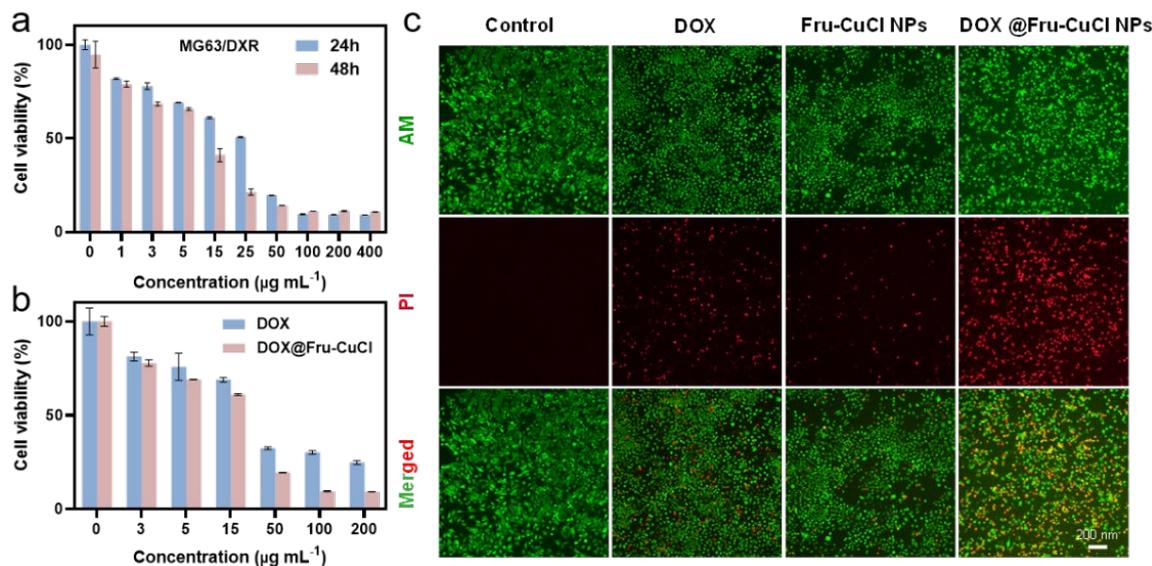


图 2.3 (a) MG63/DXR 细胞与不同浓度 DOX@Fru-CuCl NPs 共培养 24 h 和 48 h 后的相对细胞存活率；(b) MG63/DXR 细胞与不同浓度 DOX@Fru-CuCl NPs 或 DOX 共培养 24 h 后的相对细胞存活率。(c) PBS、DOX ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$)、Fru-CuCl NPs ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$)和 DOX@Fru-CuCl NPs ($28 \mu\text{g mL}^{-1}$)处理 MG63/DXR 细胞 48 h 后，Calcein AM (活细胞) 和 PI (死细胞) 染色图像。

Figure 2.3 (a) Relative cell viability of MG63/DXR cells co-cultured with different concentrations of DOX@Fru-CuCl NPs for 24 h and 48 h; (b) Relative cell survival of MG63/DXR cells after 24 h of co-culture with various concentrations of DOX@Fru-CuCl NPs or DOX. (c) MG63/DXR cells treated with PBS, DOX ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$), Fru-CuCl NPs ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) and DOX@Fru-CuCl NPs ($28 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 48 h; Images of Calcein AM (live cells) and PI (dead cells) staining.

2.2 铜基纳米材料抗骨肉瘤作用的机制研究

2.2.1 实验条件与实验材料

2.2.1.1 实验所需主要设备与仪器

表 2.3 铜基纳米材料抗骨肉瘤作用的机制研究中的主要设备与仪器

Table 2.3 The main equipment and instruments in the study of the mechanism of the anti-osteosarcoma effect of copper based nanomaterials

设备与仪器名称	生产公司
移液枪套装	Eppendorf 公司 (德国)
称重天平 (BSA124S-CW)	北京赛多利斯科学仪器有限公司 (中国)
高速冷冻离心机 (5424R)	Eppendorf 公司 (德国)
电冰箱 (4 °C, -20 °C, -80 °C)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
电冰柜 (-20 °C)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
生物安全柜 (HR40-IIA2)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
医用离心机 (L500)	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司 (中国)
二氧化碳培养箱 (3111)	Thermo Fisher (美国)
冷冻干燥机 (SCIENTZ-10N)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
超声波处理机 (1500F-DZ)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
涡旋振荡器 (Vortex, QL-901)	江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司 (中国)
回旋往复转移摇床 (TS-2)	江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司 (中国)
Nano Drop (2000)	Thermo Fisher (美国)
Western-Blot 电泳仪	Bio-Rad 公司 (美国)

Western-Blot 电转仪	Bio-Rad 公司 (美国)
蛋白分析成像系统	LICoR Odyssey (美国)
金属干浴仪器 (LS-D202)	Fisher Scientific (德国)
电热恒温水浴锅	Fisher Scientific (德国)
高压蒸汽灭菌器 (MLS-3780)	SANYO 公司 (日本)

2.2.1.2 实验所需主要试剂与耗材

表 2.4 铜基纳米材料抗骨肉瘤作用的机制研究中的主要试剂与耗材

Table 2.4 Main reagents and consumables in the study of the mechanism of the anti-osteosarcoma effect of copper based nanomaterials

试剂与耗材名称	供应商
离心管 (1.5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL)	JET BIOFIL® (中国)
阿霉素 (Doxorubicin, DOX)	阿拉丁试剂 (上海) 有限公司 (中国)
EP 管 (1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL)	上海贝晶生物技术有限公司 (中国)
RIPA 裂解液	Gibco 公司 (美国)
PMSF (蛋白酶抑制剂)	Gibco 公司 (美国)
细胞计数板	Marienfeld 公司 (德国)
细胞培养瓶 (25 cm ² , 75 cm ²)	JET BIOFIL® (中国)
细胞培养板 (6 孔, 24 孔, 96 孔)	JET BIOFIL® (中国)
胎牛血清	Gibco 公司 (美国)
青链霉素	Gibco 公司 (美国)
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco 公司 (美国)
PBS(1×)	HyClone 公司(美国)
高糖 DMEM 细胞培养基	HyClone 公司(美国)
BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型)	Beyotime Biotechnology (中国)
Tris·HCl (pH=6.8, pH=8.8)	Sinopharm Chemical Reagents Co., Ltd (中国)

10% SDS	Sinopharm Chemical Reagents Co., Ltd (中国)
10% AP	Sinopharm Chemical Reagents Co., Ltd (中国)
硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose membrane, NC)	Sinopharm Chemical Reagents Co., Ltd (中国)
氯仿	Sinopharm Chemical Reagents Co., Ltd (中国)
6×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	Beyotime Biotechnology (中国)
30% Acrylamide	Beyotime Biotechnology (中国)
TEMED	Beyotime Biotechnology (中国)
电泳缓冲液	Beyotime Biotechnology (中国)
转膜缓冲液	Beyotime Biotechnology (中国)
丽春红染色液	Beyotime Biotechnology (中国)
无菌无酶水 (DEPC·H ₂ O)	Beyotime Biotechnology (中国)
TRIzol 提取试剂	上海生工生物科技公司 (中国)
75%乙醇消毒液	上海利康消毒高科技有限公司 (中国)
Western-Blot 二抗	Santa Cruz 公司 (美国)
Mouse anti-Glut5	Santa Cruz 公司 (美国)
Mouse anti-actin	Santa Cruz 公司 (美国)
DNase I	TaKaRa 公司 (日本)
Illumina HiSeq xten/NovaSeq 6000 测序平台	Illumina 公司 (美国)

2.2.2 实验方法

首先, 参照 2.1.2.1 所述的方法制备载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒 (DOX@Fru-CuCl NPs)。选择生长和形态良好的 MG63 或 MG63/DXR, 计数后按照 1×10^5 /孔均匀铺于 6 孔板内, 每孔加入 2 mL 完全培养基后置于细胞培养箱内培养 24 h, 待 MG63 或 MG63/DXR 贴壁后对应孔内加入浓度为 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的 DOX@Fru-CuCl NPs, 设置加入浓度为 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的 Fru-CuCl NPs 或 $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的 DOX 作为对照组, 同时设置不加入材料的细胞为空白组。材料与细胞共培养 24 h 后取出通过蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 和 RNA 测序 (RNA sequence, RNA-seq) 探索载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒 (DOX@Fru-CuCl NPs) 抗骨肉瘤细胞的作用机制。

2.2.2.1 蛋白免疫印迹 (Western blot, WB)

1. 将上述与材料共培养 24 h 后的细胞先用 PBS 充分洗涤干净, 使用胰酶消化后重悬于 PBS 中, 然后转移至 EP 管内, 使用高速冷冻离心机离心 (12000 转/分, 1 分钟, 4 °C) 后弃上清, 置于 4 °C 冰盒内。
2. 配制细胞裂解液, RIPA 裂解液与 PMSF (蛋白酶抑制剂) 的体积比为 100:1, 现配现用, 上述每个 EP 管内加入 150 μL 细胞裂解液, 在 4 °C 冰盒上用移液枪吹打至溶液澄清后裂解 30 分钟, 然后离心 (12000 转/分, 30 分钟, 4 °C), 转移上清 (即蛋白) 至新的 EP 管内, 保存可置于 -20 °C 冰箱。
3. 蛋白浓度测定及蛋白定量, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) 测定上述蛋白样品的浓度, 为统一 WB 分析的蛋白上样量, 使用上述细胞裂解液调整所有蛋白样品的浓度一致均为 5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ 。
4. 在上述蛋白样品中加入 6 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 蛋白样品与 6 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液的体积比为 5:1, 然后置于 100 °C 预热的金属干浴仪器中煮 30 分钟, 使蛋白彻底变性, 煮后离心 (12000 转/分, 3 分钟), 取上清准备蛋白上样。
5. WB 所需试剂及胶准备

(1) 配胶 (SDS-PAGE): ① 将玻璃板及胶板洗净后吹干备用, 按照表 2.5 所示的组分和比例配制下层的分离胶, 然后加入异丙醇使分离胶液面平整; ② 30-45 分钟后, 分离胶完全凝固, 按照表 2.5 所示的组分和比例配制上层的浓缩胶, 使用滤纸彻底吸净异丙醇, 将配制的上层浓缩胶加入到凝固好的下层分离胶上, 迅速将梳子垂直缓慢向下插入; ③ 30 分钟后, 待上层浓缩胶凝固后, 将梳子缓慢垂直向上拔出, 配制好的胶最好现配现用。

表 2.5 WB 实验中分离胶与浓缩胶的配制组分与比例

Table 2.5 Components and proportions of the preparation of separating and concentrating gum in WB experiments

组分	分离胶 (10%)	浓缩胶 (5%)
超纯水 (mL)	4.0	2.1

30% Acrylamide (mL)	3.3	0.5
Tris·HCl (mL)	2.5 (pH=8.8)	0.38 (pH=6.8)
10% SDS (mL)	0.1	0.03
10% AP (mL)	0.1	0.03
TEMED (mL)	0.004	0.003

(2) 电泳缓冲液配制：碧云天购买的 SDS-PAGE 电泳液 (Tris-Gly, 10×) 使用超纯水稀释至 1×即可使用。

(3) 转膜缓冲液配制：将从碧云天购买的 Western 转膜液 (粉剂) 分散于 200 mL 无水乙醇和 800 mL 超纯水中即可获得转膜缓冲液。

(4) 封闭液配制：碧云天购买的封闭液可直接使用。

(5) PBST 缓冲液配制：100 mL 10×PBS 溶液，500 μL 吐温 (Tween)，900 mL 超纯水；将上述三种液体混合均匀置于磁力搅拌器上充分搅拌混匀即为 PBST 缓冲液。

(6) 抗体稀释液配制：碧云天购买的抗体稀释液可直接使用。

6. WB 分析

(1) 将上述配制好的电泳胶正确放置于跑胶槽中，加入电泳缓冲液，将准备好的蛋白样品依次取 25 μL 加入到电泳胶泳道内，在最左侧泳道内加入 5 μL marker，打开电泳仪，设置 80 V 的恒定电压，待 marker 分开条带后 (30-45 分钟) 将恒定电压改为 120 V，当蓝色条带跑到分离胶的下缘时停止电泳。取出胶，将浓缩胶部分裁去，将分离胶置于预冷的转膜缓冲液中。

(2) 转膜槽内加入预冷的转膜缓冲液，将转膜用黑白夹子置于盛有预冷转膜缓冲液的平底盘内，黑色面置于最下面，然后由下至上依次放置：一张浸湿的海绵，三张浸湿的滤纸，分离胶，一张硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose membrane, NC)，三张浸湿的滤纸和一张浸湿的海绵，然后将转膜用黑白夹子夹好，整个过程中应避免气泡的产生。将此转膜用黑白夹子正确放置于转膜槽内。然后将转膜槽置于冰水混合物内，设定转膜恒定电压为 80 V，转膜时间为 120 分钟。

(3) 转膜结束后，将 NC 膜取出置于黑色避光小盒子内 (NC 膜与胶接触的一面为正面，正面朝上)，加入丽春红染色液，将小盒子置于摇床上低转速染色 2 分钟，丽春红可将所有蛋白染上色从而形成有色条带，通过丽春红染色可判断蛋白样品是否成功转移到 NC 膜上。

用保鲜膜保护好 NC 膜，根据丽春红染色裁剪掉多余的部分。

(4) 将修剪后的 NC 膜置于黑色避光小盒子内（正面朝上），加入封闭液，室温下放置于摇床上低速摇匀封闭 2 h，封闭的目的是将所有蛋白都封闭住，但不影响后续一抗和二抗的结合，可以排除无关蛋白的影响。

(5) 封闭之后，使用抗体稀释液稀释 Actin、GLUT5 一抗，稀释比例根据购买的一抗产品说明书来，本研究中使用的稀释比例为 1:1000，稀释后的一抗加入到黑色避光小盒子内覆盖整个 NC 膜即可，置于 4 °C 冰箱内孵育过夜。

(6) 一抗孵育过夜后，用 PBST 缓冲液洗膜，倒入适量的 PBST 缓冲液，在摇床上摇晃 10 分钟，摇床的速度可以适当加快以洗去没有与蛋白结合的一抗，重复 3 遍。

(7) 使用抗体稀释液按照产品说明书稀释二抗，本研究中稀释比例为 1:1000，加入二抗，置于摇床上室温避光孵育 1 h，摇床的速度宜缓慢。

(8) 二抗孵育结束后，用 PBST 缓冲液洗膜，倒入适量的 PBST 缓冲液，在摇床上摇晃 10 分钟，摇床的速度可以适当加快，重复 3 遍。使用蛋白分析成像系统 Odyssey 进行扫膜，利用 Image Studio 图像处理软件分析显影条带的灰度值。

2.2.2.2 RNA 测序 (RNA sequence, RNA-seq)

1. 将上述与材料共培养 24 h 后的细胞取出，移液枪吸去 6 孔板内旧的培养基，沿着孔板侧壁缓慢加入 2 mL 预冷的 PBS，轻轻前后摇晃清洗细胞，弃掉 PBS，重复洗涤 2-3 次。
2. 经过预冷的 PBS 洗涤的细胞一般容易脱落，如遇到贴壁较紧的情况，可以使用刮板或胰酶消化等方式辅助获得细胞。
3. 胰酶消化后的细胞使用 5 mL 左右的完全培养基重悬下来，转移至 15 mL 离心管内，离心（2000 转/分，5 分钟），弃上清，再加入 2 mL PBS 重悬，重复离心步骤。
4. 采用 TRIzol 法提取 MG63 或 MG63/DXR 细胞中的总 RNA，使用 DNase I 去除基因组 DNA。
5. 分别采用 2100 Bioanalyser、ND-2000 方法检测 RNA 样品的质量，

以保证使用合格的样品（ $OD_{260/280}=1.8\sim 2.2$ ， $OD_{260/230}\geq 2.0$ ， $RIN\geq 6.5$ ， $28S:18S\geq 1.0$ ， $>1\ \mu\text{g}$ ）进行转录组测序。

6. RNA 文库的建立采用 TruSeq™ RNA sample preparation Kit（Illumina, San Diego, CA）试剂盒。

7. 首先利用带有 Oligo（dT）的磁珠从 $1\ \mu\text{g}$ 总 RNA 中富集有 poly-A 尾的 mRNA。再加入 fragmentation buffer，将 mRNA 随机断裂成 300 bp 左右的小片段。

8. 接着采用 SuperScript double-stranded cDNA synthesis kit（Invitrogen, CA）试剂盒，加入六碱基随机引物（Illumina），以 mRNA 为模板反转合成一链 cDNA，随后进行二链合成，形成稳定的双链结构。

9. 双链的 cDNA 结构为粘性末端，加入 End Repair Mix 将其补成平末端，随后在 3' 末端加上一个 A 碱基，用于连接 Y 字形的接头。

10. cDNA 经过 PCR 富集（sample preparation Kit（Illumina, San Diego, CA）试剂盒中自带）后，beads（DNA clean beads）筛选 200-300 bp 的条带。

11. 经 TBS380（Picogreen）定量后，文库使用 Illumina HiSeq xten/NovaSeq 6000 测序平台进行高通量测序，测序读长为 PE 150。

12. RNA-Seq 结果整理与分析。

2.2.3 统计学分析与方法

实验数据中的定量数据均以平均值 \pm 标准差（Mean \pm SD）的形式表示，数值数据均使用 IBM SPSS Statistics 软件进行统计和分析，使用 GraphPad Prism 8 及 OriginPro 9 进行图表制作。

2.2.4 实验结果与讨论

研究发现，果糖利用增强和果糖跨膜转运蛋白（GLUT5）高表达是许多癌细胞特有的代谢特征[63-65]。GLUT5 在许多癌细胞中过表达，但在除肠上皮细胞外的健康组织中没有表达，GLUT5 在正常组织和癌组织中的选择性表达提示这种果糖转运体可能是一个潜在的治疗靶点[66]。基于 GLUT5 的作用靶点，研究了几种用于癌症治疗的果糖包被纳米粒子，并取得了较满意的结果[67, 68]。基于 GLUT5 一种对果糖及其衍生物具有高亲和力的膜转运蛋白)在肿瘤和健康组织中的表达变

化, 本研究利用这一特性, 设计以 FDP 和 CuCl_2 为原料, 合成了具有靶向 GLUT5 作用的果糖改性氯化铜 (I) 纳米颗粒 (Fru-CuCl NPs)。如图 2.4 所示, 通过 WB 实验, 证明了 MG63 和 MG63/DXR 相较于 MC3T3 细胞, GLUT5 呈明显的高表达, 提示本研究中的铜基纳米材料 Fru-CuCl NPs 针对 MG63 和 MG63/DXR 具有优异的靶向性。

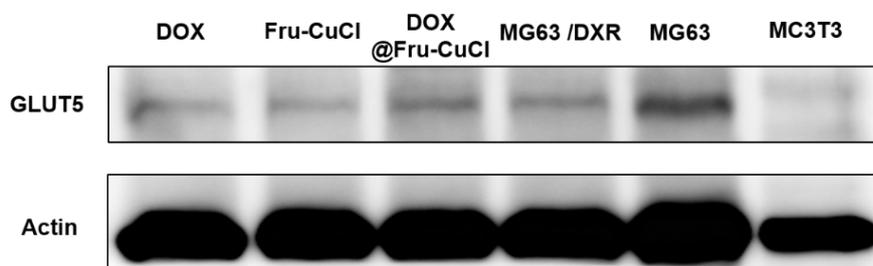


图 2.4 不同材料处理的不同细胞的 GLUT5 蛋白表达水平。

Figure 2.4 GLUT5 protein expression levels in different cells treated with different materials.

本研究对与 DOX@Fru-CuCl NPs 共培养 24 h 的 MG63/DXR 细胞作为实验组和正常培养 24 h 的 MG63/DXR 作为空白对照组进行了 RNA 测序(RNA-seq),结果显示相对于对照组, 转录表达发生了改变, 包括上调($n = 4251$)和下调($n = 2691$)(图 2.5)以及从 Venn 图中可以看出, DOX@Fru-CuCl NPs 组有 16.24%的基因 ($n = 2271$) 出现转录变化(图 2.6), 提示 DOX@Fru-CuCl NPs 对 MG63/DXR 细胞的基因转录有着明显的干预效果。如图 2.7 和 2.8 所示, 两组间差异基因功能 GO 富集集合和差异基因功能注释分析, 发现差异性基因转录主要表现在细胞凋亡和信号转导。从中挑选出相关通路基因进行分析, 如图 2.9 a 和 2.9b 所示, 结果显示有关 MAPK 信号通路基因有显著差异, 为了更直观了解通路里的基因转录变化, 本研究构建的热图也验证了这一变化(图 2.10)。在 MAPK 信号通路中实验组显著上调了 c-Jun 氨基端激酶 (c-Jun aminoterminal kinas, JNK), JNK/SAPK 作为 MAPK 级联信号通路中重要的一条, 促进了肿瘤细胞的凋亡, 与此同时, 也上调 Fas (TNF receptor superfamily member 6), CASP8 (caspase 8), CASP3

(caspase 3) 促进了细胞的凋亡, 这同样在铂类药物耐药通路中起着很好的逆转耐药的效果。

研究发现耐药细胞的 ROS 水平出现下降, 高浓度的 ROS 可以促进肿瘤细胞的凋亡, MAPK 作为 ROS 的下游信号, 不少文献中也表示 MAPK 信号参与了 ROS 对肿瘤细胞凋亡的调节, 因此本文猜测 DOX@Fru-CuCl NPs 可能通过对 JNK 的上调介导了 MAPK 信号通路的激活, 促进了 ROS 的发生, 从而逆转肿瘤细胞的耐药性。

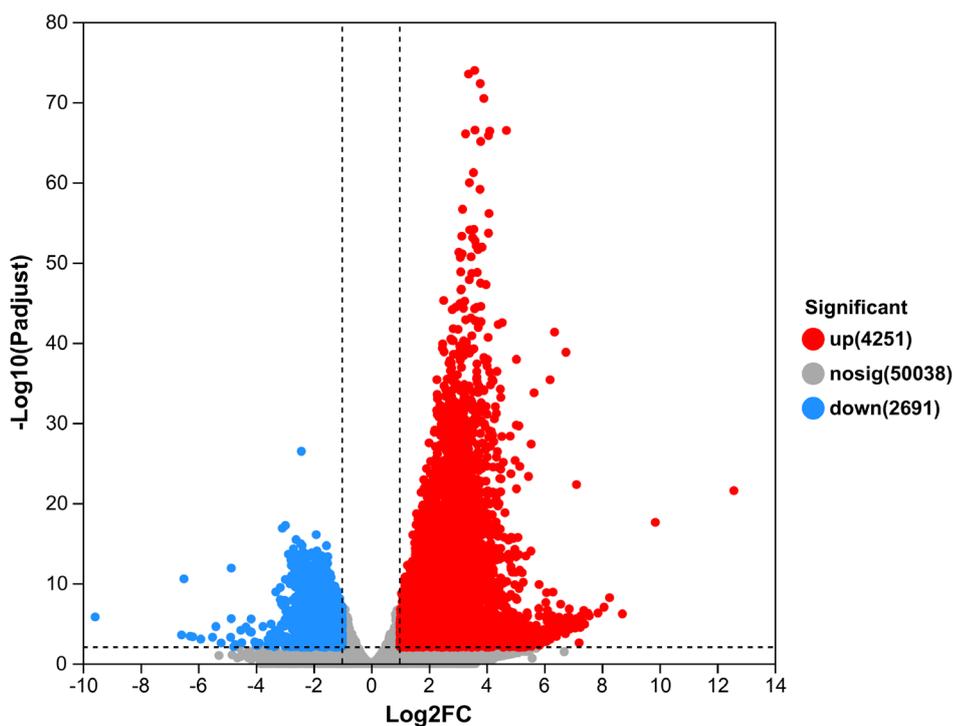


图 2.5 DOX@Fru-CuCl NPs 组与对照组基因分析的火山图。显示了显著上调(红色)和下调(蓝色)的转录物。

Figure 2.5 Volcano plot of gene analysis between DOX@Fru-CuCl NPs group and control group. Significantly up-regulated (red) and down-regulated (blue) transcripts are shown.

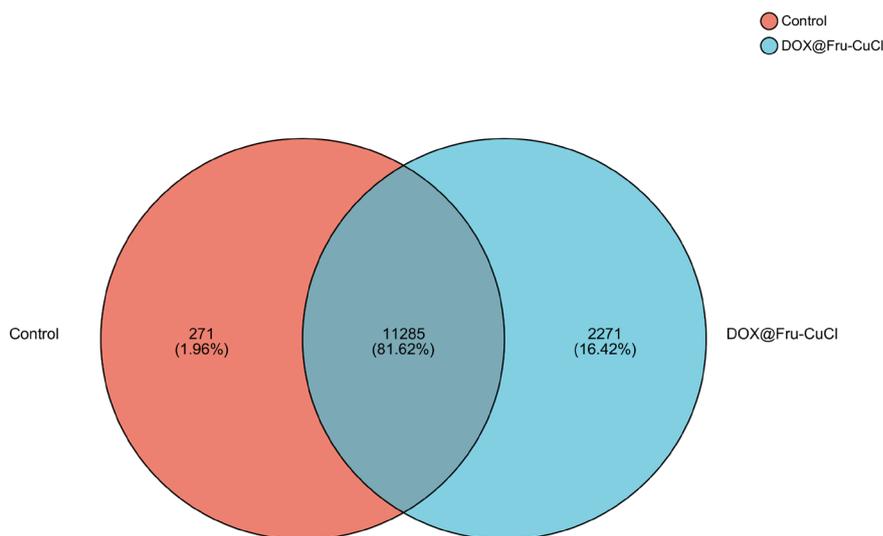


图 2.6 DOX@Fru-CuCl NPs 组与对照组的 Venn 图。

Figure 2.6 Venn plot of DOX@Fru-CuCl NPs group and control group.

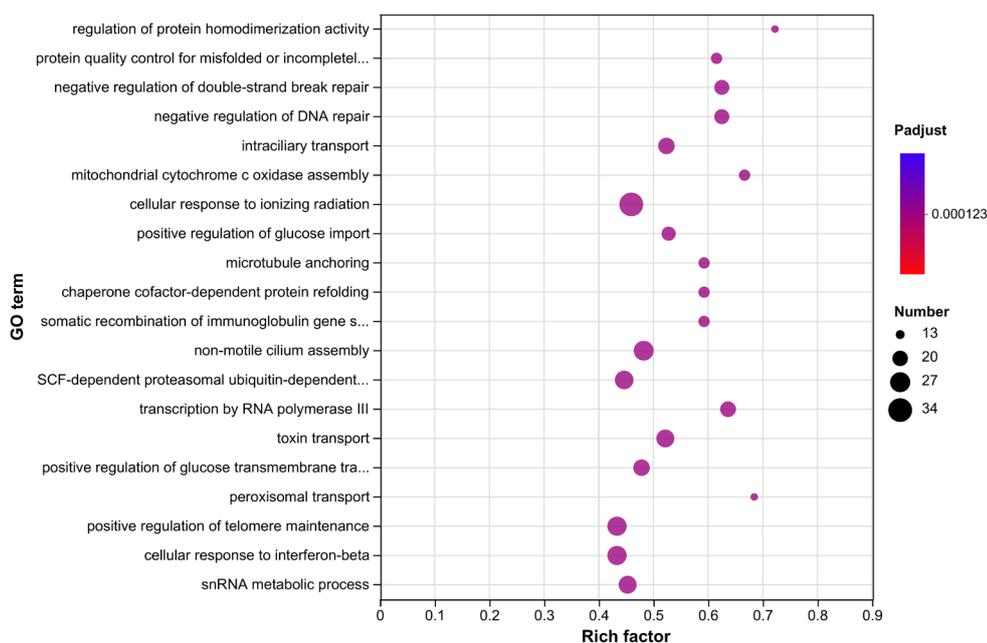


图 2.7 DOX@Fru-CuCl NPs 组与对照组的差异性基因 GO 富集分析图。

Figure 2.7 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

between DOX@Fru-CuCl NPs group and control group.

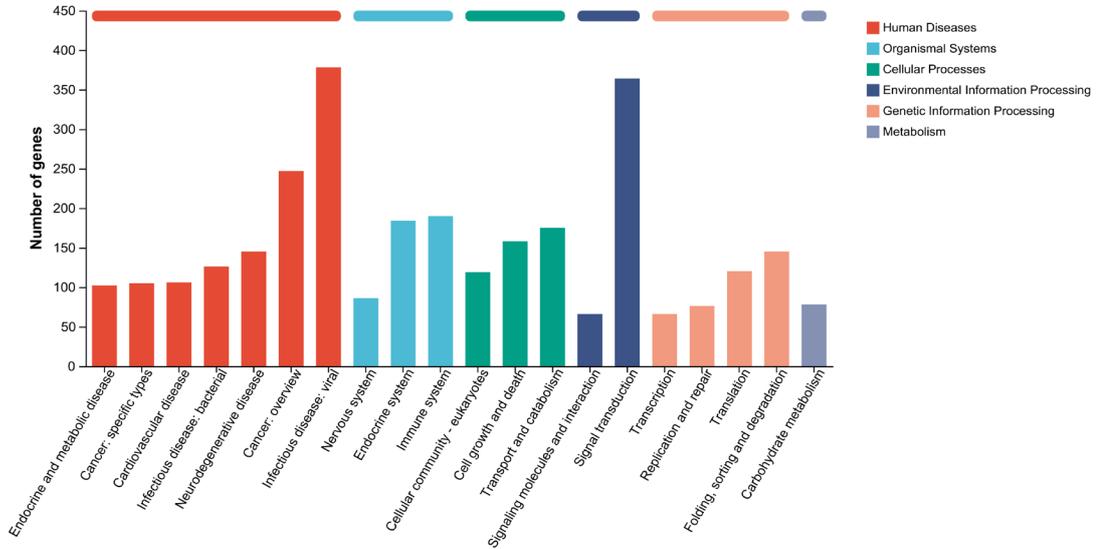


图 2.8 DOX@Fru-CuCl NPs 组与对照组的差异性基因注释分析图。

Figure 2.8 Differential gene annotation analysis map between DOX@Fru-CuCl NPs group and control group.

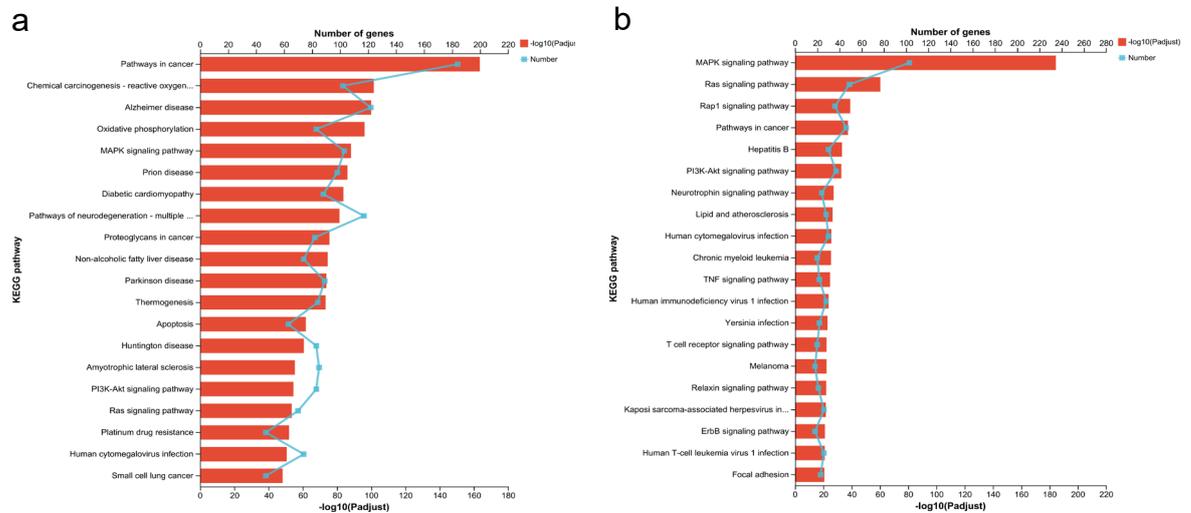


图 2.9 (a-b) 筛选的诱导癌症相关通路中基因的广泛转录变化以及 MAPK 通路的转录表达变化分析。

Figure 2.9 (a-b) Screening induced extensive transcriptional changes of genes in cancer-related pathways as well as analysis of transcriptional expression changes in the MAPK pathway.

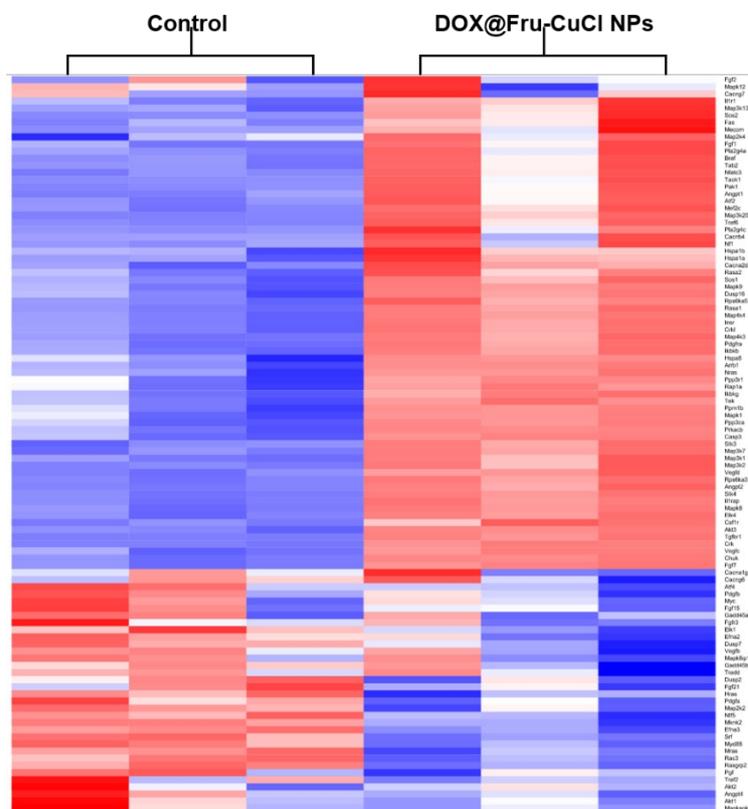


图 2.10 MAPK 通路相关基因变化热图。

Figure 2.10 Heat map of MAPK pathway-related gene changes.

2.3 本章小结

本章内容主要包括两个方面：铜基纳米材料的抗肿瘤活性研究和抗肿瘤作用机制的研究。骨肉瘤是最常见的骨科恶性肿瘤，新辅助化疗着重突出术前术后化疗的重要性。其中 MAP 方案是目前公认的疗效最佳的标准化疗方案，肿瘤对化疗药物的耐药性是目前临床亟待解决的问题。生物材料通常通过两个途径解决上述问题：生物材料本身具有较优异的抗肿瘤活性，协同化疗药物发挥抗肿瘤效应；生物材料

可逆转肿瘤对化疗药物的耐药性，提高其对化疗药物的敏感性，从而提高抗肿瘤活性。

人骨肉瘤细胞（MG63）和耐阿霉素人骨肉瘤细胞

（MG63/DXR）常被用于表征材料的抗肿瘤活性研究，本研究中，铜基纳米材料（果糖改性氯化亚铜纳米颗粒和载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒）均表现出了一定的杀肿瘤细胞活性，特别是载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒（DOX@Fru-CuCl NPs）不仅可以靶向富集到 MG63 细胞中，同时其中的 DOX 和果糖改性氯化亚铜纳米颗粒可以协同发挥抗肿瘤效应，提高抗肿瘤活性，即使是针对耐药株

（MG63/DXR）也表现出高于单纯 DOX 的抗肿瘤活性，是一种良好的抗骨肉瘤材料，为临床骨肉瘤的治疗提供了一种治疗可能。为进一步探索铜基纳米材料抗肿瘤的作用机制，WB 结果证明了 MG63 和 MG63/DXR 相较于 MC3T3 细胞，GLUT5 呈明显的高表达，提示本研究中的铜基纳米材料 Fru-CuCl NPs 针对 MG63 和 MG63/DXR 具有优异的靶向性。RNA 测序(RNA-seq)，发现了其上调了作为 ROS 下游通路的 MAPK 信号通路 c-Jun 氨基端激酶（c-Jun aminoterminal kinas, JNK），促进了细胞凋亡，一定程度上逆转了肿瘤细胞的耐药。

3 铜基纳米材料的抗菌性能及其机制研究

3.1 铜基纳米材料的抗菌活性研究

3.1.1 实验条件与实验材料

3.1.1.1 实验所需主要设备与仪器

表 3.1 铜基纳米材料的抗菌活性研究所需的主要设备与仪器

Table 3.1 Main equipment and instruments required in the study of antimicrobial activity of Cu-based nanomaterials

设备与仪器名称	生产公司
恒温摇床 (ZHPW-250)	天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司 (中国)
高压蒸汽灭菌器 (MLS-3780)	SANYO 公司 (日本)
称重天平 (BSA124S-CW)	北京赛多利斯科学仪器有限公司 (中国)
电冰箱 (4 °C, -20 °C, -80 °C)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
电冰柜 (-20 °C)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
生物安全柜 (HR40-IIA2)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
多功能酶标仪	Bio Tek Synergyz (美国)
恒温恒湿孵育箱	Thermo Fisher (美国)

3.1.1.2 实验所需主要试剂与耗材

表3.2 铜基纳米材料的抗菌活性研究所需的主要试剂与耗材**Table 3.2** Main reagents and consumables required in the antibacterial activity study of Cu-based nanomaterials

试剂与耗材名称	供应商
氯化钠 (≥99.0%)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
胰蛋白胨	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
酵母粉	阿拉丁试剂 (上海) 有限公司 (中国)
摇菌管	常德比克曼生物科技有限公司 (中国)
琼脂粉	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
培养皿	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)

3.1.2. 实验方法

前文已述, 通过大量前期实验, 确定了用于抗菌性能研究的铜基纳米材料反应体系和反应条件 (B 体系: 水: 无水乙醇=9:1, 反应时间: 150 °C, 反应时间: 24 h), 筛选标准为产物的均一性、稳定性、形貌和尺寸大小等[61]。最终的产物命名为磷酸氢铜纳米片自组装微球 (CP-NSMSs)。

临床上感染的常见致病菌包括革兰氏阴性菌 (G-) 和革兰氏阳性菌 (G+) 两大类, 大肠杆菌 (*E. coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 分别是革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的典型代表, 常应用于抗菌研究中[69, 70]。本研究采用上述两种细菌用于铜基纳米材料的抗菌性能研究, 其中, 革兰氏阴性大肠杆菌 (ATCC 8739) 购买自上海富祥生物科技有限公司 (中国上海), 革兰氏阳性金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538) 购买自青岛海博生物技术有限公司 (中国青岛)。

3.1.2.1 细菌培养

首先在无菌环境下配制细菌培养基, 配方为: 10 g 氯化钠 + 10 g 胰蛋白胨 + 5 g 酵母粉 + 1 L 蒸馏水。上述液体充分混匀后转移至锥形瓶内, 纱布封住瓶口, 然后进行高温高压灭菌, 灭菌后将冻存的细菌复苏重悬于细菌培养基内, 再次使用纱布封住瓶口, 然后置于恒温摇床内培养 (37 °C) 24 h。

3.1.2.2 细菌定量

将上述培养 24 h 后的细菌悬液取出, 使用多功能酶标仪进行定量, 设置波长为 600 nm, 当 OD 值 (Optical Density, 吸光度) =1 时, 提示细菌浓度为 2×10^9 个 mL^{-1} 。使用细菌培养基将上述定量后的细菌稀

释为 1×10^7 个 mL^{-1} 用于后续实验。

3.1.2.3 细菌与材料共培养

使用 1 mL 细菌培养基配置不同浓度 ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$) 的磷酸氢铜纳米片自组装微球 (CP-NSMSs), 转移至摇菌管内。对应各自加入 1 mL 上述浓度为 1×10^7 个 mL^{-1} 的细菌悬液, 然后再各加入 8 mL 细菌培养基使其总体积为 10 mL, 也即最终的细菌浓度为 1×10^6 个 mL^{-1} , 最终的 CP-NSMSs 的浓度为 $0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ 。然后将摇菌管置于恒温摇床内培养 (37°C) 24 h 和 48 h 两个时间点。

3.1.2.4 细菌稀释涂布平板计数法

将上述与不同浓度 CP-NSMSs 共培养 24 h 或 48 h 后的细菌混合液 (浓度为 1×10^6 个 mL^{-1}) 进行梯度稀释, 稀释至细菌浓度为 1×10^2 个 mL^{-1} 。

然后先配制固体细菌培养基, 配方为: 10 g 氯化钠 + 10 g 胰蛋白胍 + 5 g 酵母粉 + 15 g 琼脂粉 + 1 L 蒸馏水, 上述配方混匀后纱布封口, 高温高压灭菌后取 10 mL 培养基平铺至 10 cm 培养皿, 室温凝固。使用移液枪转移 100 μL 上述稀释后的细菌悬液至固体细菌培养基上, 每个时间点每个材料浓度的细菌悬液设置三个平行样, 然后使用一次性细菌涂布棒将细菌悬液均匀涂抹于固体细菌培养基上。接下来, 将培养皿置于恒温恒湿孵育箱内 (37°C) 培养 12 h。培养 12 h 后, 将培养皿取出进行光学拍照、计数统计和整理分析。

3.1.3 统计学分析与方法

实验数据中的定量数据均以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 的形式表示, 数值数据均使用 IBM SPSS Statistics 软件进行统计和分析, 使用 GraphPad Prism 8 及 OriginPro 9 进行图表制作。

3.1.4 实验结果与讨论

自古以来, 铜就因为其抗菌性能而被熟知, 其抗菌活性可以追溯

到公元前 3000 年 Hippocrate 的著作中[71]。近十几年，由于抗生素的广泛应用导致病原体的耐药泛滥，铜作为抗菌材料或涂层再次成为研究的焦点和热点，2008 年，美国环境保护局认定铜及其合金是有效的抗菌物质，可以在 2 h 内杀死 99.9% 的细菌[72]。其他部分金属也有一定的抗菌属性比如银，但都存在不同的缺点从而限制了其广泛应用，比如银在室内环境下对于密切接触的病原体杀菌效果不如铜，铜可在室内环境对密切接触的病原体展现出快速而高效的杀菌效果，这增强了铜的适用范围。铜具有较优异的生物相容性，目前大多数研究集中在使用铜本身、铜涂层、铜载药、铜复合材料进行抗菌[61, 71]（图 3.1）。铜及铜基材料还被广泛应用于伤口敷料中以避免感染并促进伤口愈合[73]。

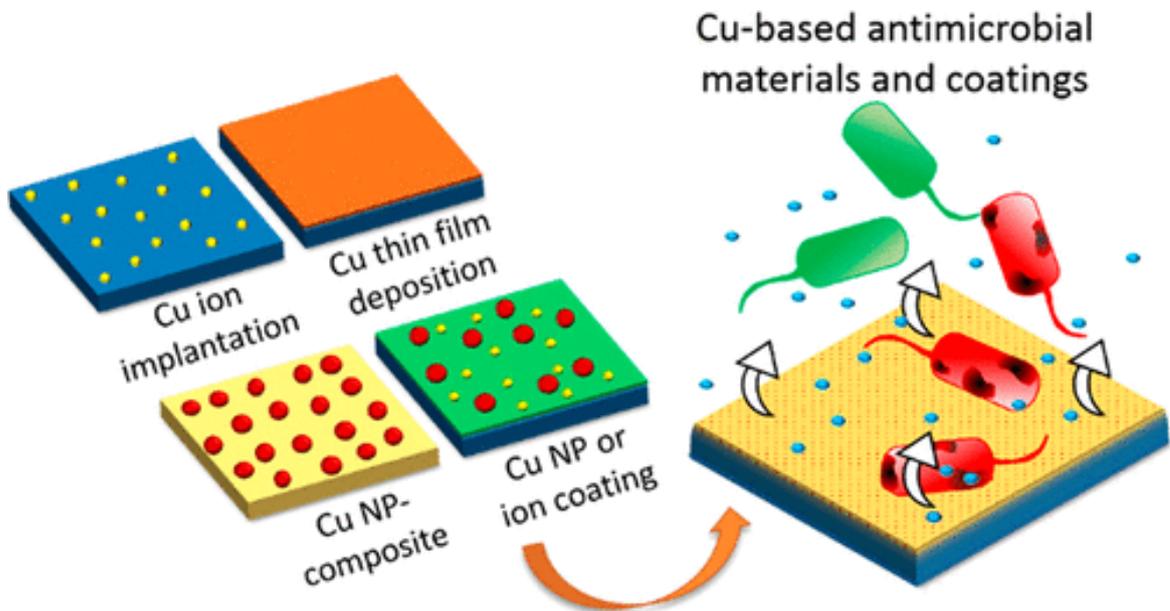


图 3.1 铜及铜基材料被应用于抗菌研究[61]

Figure 3.1 Copper and copper-based materials used in antibacterial research [61]

本研究中应用磷酸氢铜纳米片自组装微球（CP-NSMSs）探索其对革兰氏阴性大肠杆菌和革兰氏阳性金黄色葡萄球菌的抗菌性能。如图 3.2 所示，针对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌率随 CP-NSMSs 浓度的增加而提高，当 CP-NSMSs 的浓度为 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时，CP-NSMSs

与细菌共培养 48 h 后，测得大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌率分别为 96.78% 和 82.4%。当 CP-NSMSs 的浓度增加到 $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时，对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌率均达到 98% 以上，提示 CP-NSMSs 具有优异的抗菌活性。结果显示与金黄色葡萄球菌一起孵育 48 h 的 CP-NSMSs 的抗菌活性低于在 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 浓度下孵育 24 h 的 CP-NSMSs，这可能是由于金黄色葡萄球菌在共孵育 48 h 后对铜抗菌的适应性，随着孵育时间的进一步增加或铜离子浓度的增加，适应性逐渐丧失而被杀死[74]。

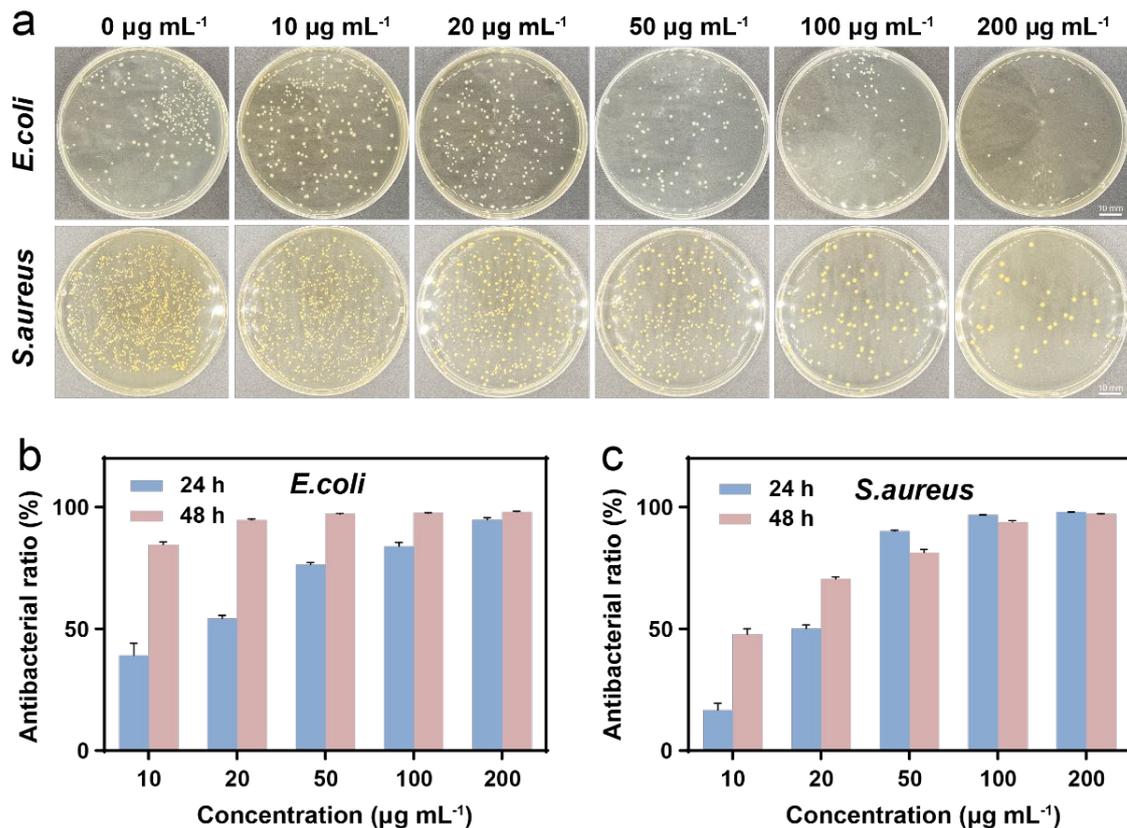


图 3.2 铜基纳米材料磷酸氢铜纳米片自组装微球 (CP-NSMSs) 的抗菌实验结果。(a) 大肠杆菌/金黄色葡萄球菌与不同浓度 CP-NSMSs 共孵育 48 h 后的涂板菌落光学图；(b) 大肠杆菌与不同浓度 CP-NSMSs 共孵育 24/48 h 后的涂板菌落计数统计图；(c) 金黄色葡萄球菌与不同浓度 CP-NSMSs 共孵育 24/48 h 后的涂板菌落计数统计图。

Figure 3.2 Antibacterial test results of copper based nanomaterial copper phosphate hydrogen copper nanosheet self-assembled microspheres (CP-NSMSs)

hydrogen phosphate nanosheet self-assembled microspheres (CP-NSMSs). (a) optical pattern of plate-coated colonies of *E. coli*/*S. aureus* after incubation with different concentrations of CP-NSMSs for 48 h; (b) Statistical plot of colony counts of *Escherichia coli* on coated plates after incubation with different concentrations of CP-NSMSs for 24/48 h; (c) Statistical plot of colony counts on coated plates after incubation of *Staphylococcus aureus* with various concentrations of CP-NSMSs for 24/48 h.

3.2 铜基纳米材料的抗菌机制研究

3.2.1 实验条件与实验材料

3.2.1.1 实验所需主要设备与仪器

表 3.3 铜基纳米材料的抗菌机制研究所需的主要设备与仪器

Table 3.3 The main equipment and instruments required in the study of the antibacterial mechanism of copper based nanomaterials

设备与仪器名称	生产公司
水纯化系统 (RODI-220A1)	厦门锐思捷水纯化技术有限公司 (中国)
电子自旋共振波谱仪	EMXplus-6/1 光谱仪 (德国布鲁克)
恒温振荡摇床 (ZHTY-50V)	上海知楚仪器有限公司 (中国)
紫外-可见光 (UV-Vis) 分光光度计	Evolution UV201, Thermo Fisher (美国)

3.2.1.2 实验所需主要试剂与耗材

表 3.4 铜基纳米材料的抗菌机制研究所需的主要试剂与耗材

Table 3.4 The main reagents and consumables required in the study of the antibacterial mechanism of copper based nanomaterials

试剂与耗材名称	供应商
5,5-二甲基-1-吡咯啉 N-氧化物 (DMPO)	阿拉丁试剂 (上海) 有限公司 (中国)
3% 过氧化氢溶液	广东恒健制药有限公司 (中国)
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	上海麦克林生化科技股份有限公司 (中国)
乙酸钠缓冲液 (NaAC)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
EP 管	上海贝晶生物技术有限公司 (中国)

3.2.2 实验方法

大量研究证实,铜及铜基材料具有抗菌性能主要归功于其类氧化还原性能,即铜可以和细胞/细菌内的过氧化氢发生类芬顿反应 (Fenton like reaction) 从而生成羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$),羟基自由基作为活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 可以诱导细胞死亡。为探索本研究中磷酸氢铜纳米片自组装微球 (CP-NSMSs) 的抗菌机制,该部分内容设计实验检测羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的存在证实 CP-NSMSs 通过类芬顿反应生成 $\cdot\text{OH}$ 从而诱导细菌死亡。

3.2.2.1 通过电子自旋共振 (Electron spin resonance, ESR) 检测羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)

首先通过 B 体系水热反应制备获得 CP-NSMSs。然后,使用超纯水配制 1 mol L^{-1} 的 5,5-二甲基-1-吡咯啉 N-氧化物 (DMPO) 溶液作为羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 捕集剂。将 $30 \mu\text{L}$ DMPO 溶液加入到 $30 \mu\text{L}$ 含有不同浓度 CN-NSMSs ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) 的 3% 过氧化氢溶液中,最终体系总体积为 $60 \mu\text{L}$ 。然后将上述混合物转移至石英毛细管中,使用电子自旋共振波谱仪记录溶液中的羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 信号。

3.2.2.2 通过 TMB (Tetramethylbenzidine) 法检测羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)

TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 四甲基联苯胺) 作为羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的显色剂可以定量或者定性的检测羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)。首先通过 B 体系水热反应制备获得 CP-NSMSs。使用超纯水配制 0.1 mmol mL⁻¹ 的乙酸钠 (NaAC) 缓冲液, 然后使用 0.1 mmol mL⁻¹ 的乙酸钠缓冲液作为溶剂配制 0.25 mg mL⁻¹ 的 TMB 溶液和 1 mmol mL⁻¹ 的过氧化氢溶液。向 EP 管内加入 500 μL 0.25 mg mL⁻¹ 的 TMB、500 μL 1 mmol mL⁻¹ 的过氧化氢溶液和 500 μL 0.1 mmol mL⁻¹ 的乙酸钠缓冲液, 再加入 500 μL 含材料 CP-NSMSs 的乙酸钠溶液, 调整最终体系 (2 mL) 中 CP-NSMSs 的浓度分别为 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 。同时, 为了进一步探索该机制, 本研究中参照上述方案另外设置了一个反应体系, 即保持 CP-NSMSs 的浓度恒定为 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 调整过氧化氢的浓度分别为 1.00 mmol mL⁻¹、0.50 mmol mL⁻¹、0.25 mmol mL⁻¹、0.125 mmol mL⁻¹ 和 0.0625 mmol mL⁻¹。接下来, 将上述各个 EP 管置于恒温振荡摇床 (37 $^{\circ}\text{C}$) 内避光反应 30 分钟。最后观察并拍照 EP 管内溶液颜色变化定性检测羟基自由基, 并使用紫外-可见分光光度计通过检测上述溶液在 652 nm 波长处的吸光度定量检测羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的生成。

另外, 再设置一个反应体系, 参照上述方案, 向 EP 管内加入 500 μL 0.25 mg mL⁻¹ 的 TMB、500 μL 1 mmol mL⁻¹ 的过氧化氢溶液和 500 μL 0.1 mmol mL⁻¹ 的乙酸钠缓冲液, 再加入 500 μL 含材料 CP-NSMSs 的乙酸钠溶液, 调整最终体系 (2 mL) 中 CP-NSMSs 的浓度为 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 然后向体系内加入不同浓度 (0 mmol mL⁻¹、0.5 mmol mL⁻¹、1.0 mmol mL⁻¹、2.5 mmol mL⁻¹) 的谷胱甘肽 (Glutathione, GSH)。接下来, 将上述各个 EP 管置于恒温振荡摇床 (37 $^{\circ}\text{C}$) 内避光反应 30 分钟。最后观察并使用紫外-可见分光光度计通过检测上述溶液在 652 nm 波长处的吸光度定量检测羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的生成。

3.2.3 实验结果与讨论

铜发挥抗菌活性的确切机制尚未完全揭示。研究指出, 铜及铜基材料的抗菌效果主要取决于以下几个因素: 铜的物理状态 (离子或者

纳米颗粒等)、铜的化学状态(氧化状态或还原状态)、与微生物接触的铜的浓度、微生物与铜的接触程度、环境温度与湿度等[75]。目前流行的主要学说包括两种(如图 3.3 所示):(1)膜去极化。具有完整活性膜的细菌膜内外电位差约为 100~200 mV(取决于细菌种类),细菌膜内部处于较低的负电位。研究提示铜离子可以结合到细菌细胞膜的负电位区域从而减少这种引起膜去极化的电势差,当电势差降低至零时,细菌细胞膜会发生损坏甚至破裂[76, 77]。也有研究报道,铜离子可以与革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的脂多糖或肽聚糖或羧基结合从而破坏细菌细胞膜的稳定性[69]。(2)类芬顿反应生成活性氧(ROS)。铜离子引起 ROS 升高主要归功于其发生类芬顿反应和产生羟基自由基的能力。ROS 的升高会导致氧化损伤,包括但不限于核酸损伤和膜脂质过氧化[78]。

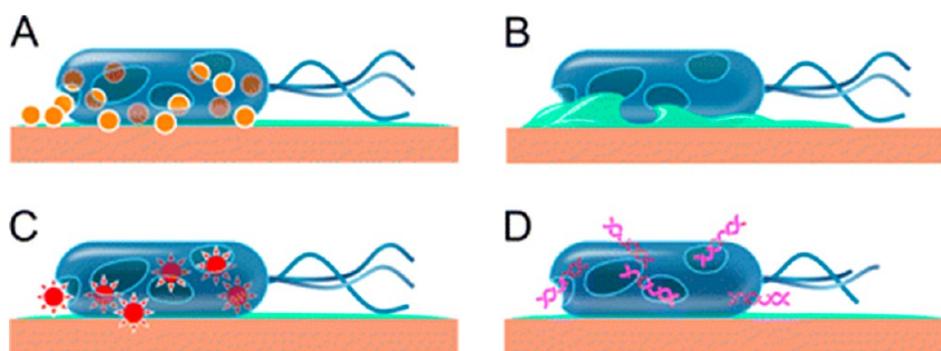


图 3.3 铜及铜基材料抗菌的机制示意图。(A) 铜离子溶解; (B) 细菌细胞膜破裂导致膜电位和细胞质含量损失; (C) ROS 产生; (D) DNA 降解。

Figure 3.3 Schematic of antibacterial mechanism of copper and copper-based materials. (A) Dissolution of copper ions; (B) Bacterial cell membrane disruption leading to loss of membrane potential and cytoplasmic content; (C) ROS production; (D) DNA degradation.

由此可见,活性氧羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的形成是铜及铜基材料抗菌过程中十分重要的一个环节。为探索本研究中铜基纳米材料的抗菌机制,本文设计实验检测反应过程中羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的生成

以阐明其抗菌机制。如图 3.4 所示， $\cdot\text{OH}$ 的生成通过使用 DMPO 作为自旋捕集剂的电子自旋共振（ESR）光谱测量提示在所有 CP-NSMSs 浓度的 ESR 光谱中均观察到 $\cdot\text{OH}$ 的典型峰强度为 1:2:2:1，表明 CP-NSMSs 具有过氧化物酶样催化活性，在 H_2O_2 存在下发生类芬顿反应产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基。

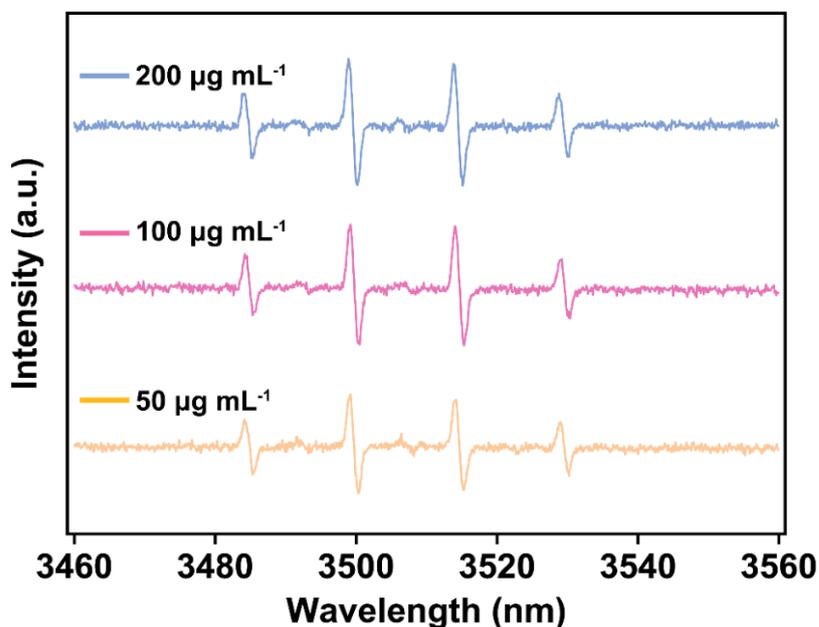


图 3.4 使用 DMPO 作为羟基自由基（ $\cdot\text{OH}$ ）捕集剂，不同浓度的 CP-NSMSs- H_2O_2 反应体系的电子自旋共振谱（ESR）。

Figure 3.4 Electron spin resonance spectrum (ESR) of the CP-NSMSS- H_2O_2 reaction system at different concentrations using DMPO as a hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) trap.

铜基材料可以充当过氧化物酶样纳米酶，通过类芬顿反应生成 ROS（例如 $\cdot\text{OH}$ ）。使用四甲基联苯胺（TMB）作为底物表征过氧化物酶样催化活性。TMB 可被高活性的 $\cdot\text{OH}$ 氧化，导致 TMB 水溶液快速变成蓝色。如图 3.5 所示，CP-NSMSs 显示出对 TMB 的材料浓度和底物浓度依赖性催化活性。其结果与 ESR 结果一致。

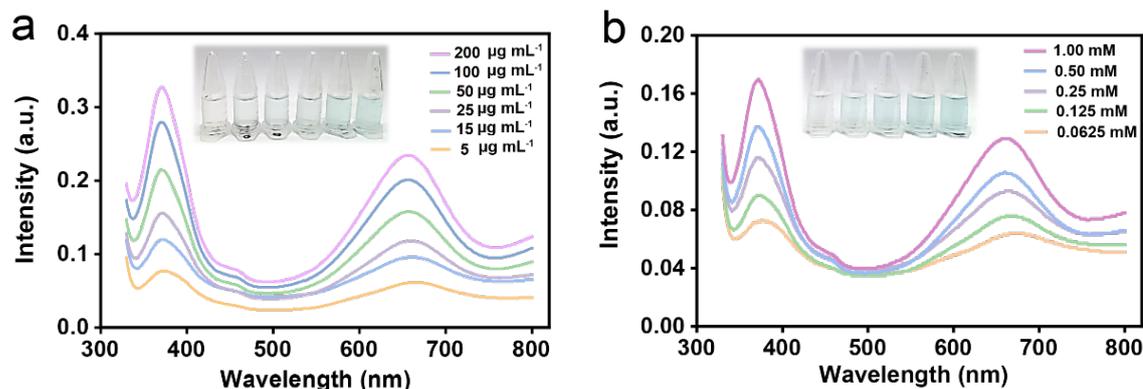


图 3.5 (a) 在 $0.25 \text{ mmol mL}^{-1}$ H_2O_2 溶液中, 添加不同浓度 CP-NSMSs 处理 TMB 溶液后的光学照片和紫外-可见光光谱分析结果。(b) 在不同浓度 H_2O_2 溶液中, 添加相同浓度 CP-NSMSs ($50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) 处理 TMB 溶液后的光学照片和紫外-可见光光谱分析结果。

Figure 3.5 (a) Optical photos and UV-vis spectroscopic analysis results of TMB solution treated with different concentrations of CP-NSMSs in $0.25 \text{ mmol mL}^{-1}$ H_2O_2 solution. (b) Optical photos and UV-vis spectroscopic analysis results of TMB solution treated with the same concentration of CP-NSMSs ($50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) in different concentrations of H_2O_2 solution.

作为细胞/细菌中的一种重要抗氧化剂, 谷胱甘肽 (GSH) 可以通过氧化还原反应去除细胞/细菌中产生的 $\cdot\text{OH}$ 避免被氧化。因此, CP-NSMSs 产生的羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 会耗尽细菌中的 GSH。为了验证 CP-NSMSs 对 GSH 的消耗作用, 在含有 CP-NSMSs 和 GSH 体系中进行 TMB 测定。如图 3.6 所示, 结果表明, 添加 CP-NSMSs 有助于 GSH 的消耗, CP-NSMSs 由于其过氧化物酶样催化活性而产生的羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 可与 GSH 发生氧化还原反应, 由于 GSH 的消耗, 大量 ROS 被用于氧化 GSH, 从而导致 TMB 大部分保留而呈现出较弱的颜色变化, 同时随着 GSH 的浓度增加, TMB 被氧化就更少, 显色也就更淡, 进一步验证了 CP-NSMSs 通过类芬顿反应产生 ROS 诱发细胞/细菌死亡的设想。综上, 本研究中的 CP-NSMSs 具有优异的 ROS 生成能力, 有助于 GSH 耗竭和细菌细胞膜破坏, 这有利于增强其抗菌活性。

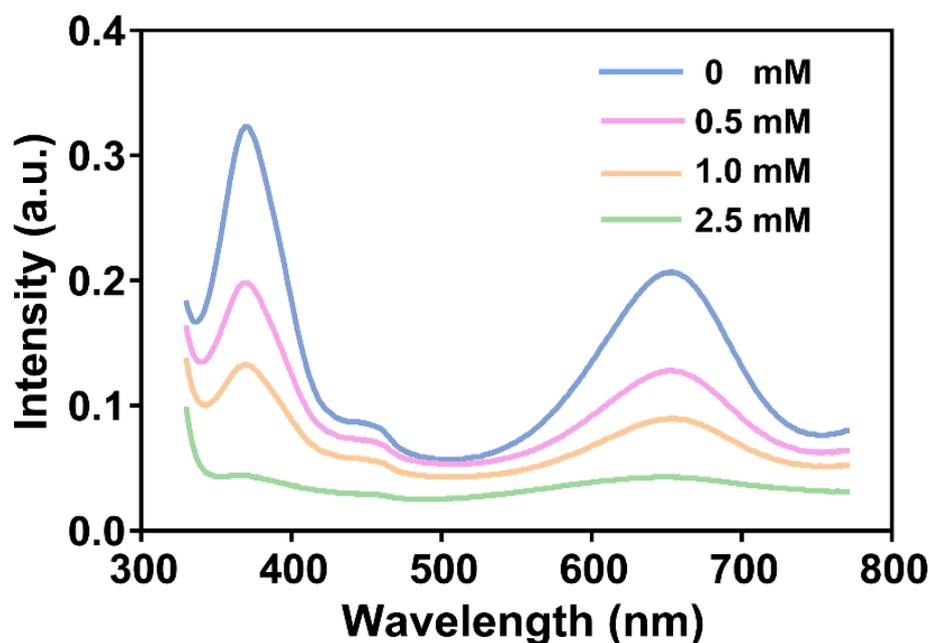


图 3.6 在 $1 \text{ mmol mL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ 和 $50 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ CP-NSMSs}$ 溶液中，保持加入的 TMB 量一致，添加不同浓度 GSH (0 mmol mL^{-1} 、 0.5 mmol mL^{-1} 、 1.0 mmol mL^{-1} 、 2.5 mmol mL^{-1}) 反应后的紫外-可见光光谱分析结果。

Figure 3.6 In a solution of $1 \text{ mmol mL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ and $50 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ CP-NSMSs}$, the amount of TMB added was kept consistent. The results of UV-vis spectroscopy after adding different concentrations of GSH (0 mmol mL^{-1} , 0.5 mmol mL^{-1} , 1.0 mmol mL^{-1} , 2.5 mmol mL^{-1}).

综上，本研究中的铜基纳米材料主要是利用铜的过氧化氢酶样活性与细胞/细菌内的过氧化氢发生类芬顿反应从而产生活性氧羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)，羟基自由基具有强氧化性消耗谷胱甘肽，同时破坏细胞膜及细胞/细菌内核酸物质，从而诱发细胞/细菌死亡，具有较优异的抗菌活性。同时，上文提到铜的抗菌活性和铜的物理状态有关，磷酸氢铜纳米片自组装微球 (CP-NSMSs) 的 SEM 结果提示该微球非实心微球，而是由众多纳米片组装二次，纳米片具有十分锐利的边缘，也可作为锐器物理破坏细菌细胞膜，从而诱发细菌死亡。

3.3 本章小结

本章主要包括两部分内容：第一部分利用常见致病菌大肠杆菌和金黄色葡萄球菌评估铜基纳米材料的抗菌活性，结果显示 CN-NSMSs 具有优异的抗革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌活性；第二部分通过电子自旋共振（ESR）和 TMB 测定法检测活性氧羟基自由基（ $\cdot\text{OH}$ ）探索本研究中铜基纳米材料的抗菌机制，提示铜基纳米材料具有氧化还原酶样活性，与细胞/细菌内过氧化氢发生类芬顿反应，产生 ROS 破坏细胞膜，消耗 GSH 从而杀灭细菌，其他研究也有指出该机制[71]，同时铜基纳米材料的独特锐利边缘也是其物理破坏细菌细胞膜的武器。

结 论

本研究通过调控水热反应条件和各底物浓度配比制备获得了多种铜基纳米材料，通过大量的 SEM 和 TEM 表征优选出了两种反应体系（A 体系：水：无水乙醇=1:9，反应温度：150 °C，反应时间：6 h；B 体系：水：无水乙醇=9:1，反应温度：150 °C，反应时间：24 h）。A 体系获得的铜基纳米材料命名为果糖改性氯化亚铜纳米颗粒（Fru-CuCl NPs），B 体系获得的铜基纳米材料命名为磷酸氢铜纳米片自组装微球（CP-NSMSs）。以 B 体系为例，通过对不同时间点产物进行扫描电镜表征揭示了铜基纳米材料的形成机制：（i）水热反应时 FDP 发生水解产生磷酸根和有机小分子（如果糖）；（ii）磷酸盐离子与铜离子反应，形成无定形磷酸铜-有机分子杂化微球；（iii）微球内原位形成纳米花，在此期间无定形磷酸铜相结晶为磷酸氢铜相；（iv）磷酸氢铜纳米片继续生长和组装以形成 CP-NSMSs。

系统理化表征结果提示 Fru-CuCl NPs 具备均匀、稳定、分散性好等优点，同时其尺寸较小，其高比表面积赋予 Fru-CuCl NPs 良好的载药性能，通过紫外-可见分光光度计分析得知 Fru-CuCl NPs 对阿霉素（DOX）的载药率为 13.47%。载 DOX 后的铜基纳米材料命名为载阿霉素果糖改性氯化亚铜纳米颗粒（DOX@Fru-CuCl NPs）。MTT 和活性细胞染色实验提示 DOX@Fru-CuCl NPs 具有较优异的骨肉瘤细胞（MG63）杀死作用，即使针对耐阿霉素人骨肉瘤细胞（MG63/DXR）也表现出优异的抗肿瘤效应，提示 DOX@Fru-CuCl NPs 中 DOX 和铜基纳米材料可协同发挥抗肿瘤活性，同时铜基纳米材料可一定程度逆转肿瘤细胞对 DOX 的耐药性，为临床解决化疗耐药性问题提供了可靠的新思路。WB 实验结果提示肿瘤细胞或与材料共培养的肿瘤细胞呈现出 GLUT5 高表达，DOX@Fru-CuCl NPs 水解产物中含 FDP，提示 DOX@Fru-CuCl NPs 具备一定的靶向活性，可以富集在肿瘤细胞中发挥抗肿瘤活性。RNA-Seq 结果提示其可以上调 MAPK 信号通路中的 JNK，提高细胞内 ROS 水平，从而促进细胞凋亡，逆转细胞耐药。

系统理化表征结果提示 CP-NSMSs 具备均匀、稳定、分散性好等优点，同时，其亚结构磷酸氢铜纳米片具备锋利的边缘，可对细菌细胞膜产生物理切割损伤。电子自旋共振（ESR）和 TMB 实验提示 CP-

NSMSs 中的铜具有类过氧化物酶活性，可以与细菌/细胞内过氧化氢发生氧化还原反应，生成活性氧（ROS）羟基自由基（ $\cdot\text{OH}$ ），作为细胞内重要的还原剂，谷胱甘肽（GSH）会被 CP-NSMSs 和羟基自由基消耗，同时破坏细菌细胞膜导致细菌死亡。以上较为公认的铜及铜基材料抗菌机制在本研究中也得到了进一步验证。通过细菌稀释涂布平板计数法进一步探索了铜基纳米材料 CP-NSMSs 的抗菌活性，结果提示 CP-NSMSs 可显著杀死革兰氏阴性菌（大肠杆菌）和革兰氏阳性菌（金黄色葡萄球菌）。

综上，本研究中的铜基纳米材料具有优异的抗肿瘤及抗菌活性，为临床骨肉瘤的治疗、化疗药物的耐药性问题和细菌感染问题提供了新的可行思路，为基础研究中纳米材料的设计、载药递送、靶向输送问题提供了新的可行方案，具有较强的研究意义和科学价值。

当然，本研究也存在以下问题待进一步解决：（1）本研究中设计体外实验研究了铜基纳米材料的抗肿瘤和抗菌活性，缺乏体内实验数据进一步验证。拟在后续工作中，设计动物实验，选取裸鼠进一步探索铜基纳米材料体内抗肿瘤效应及其对心肝脾肺肾的影响和副作用；选取 SD 大鼠构建皮肤感染模型进一步探索铜基纳米材料体内抗菌抗感染能力，同时设置局部感染和全身感染对比其抗菌性能。（2）本研究没有表征铜基纳米材料的进胞方式，同时没有通过系统的细胞分子实验验证不同通路的抗肿瘤抗菌作用机制。拟在后续工作中，通过生物电镜、免疫组织化学和免疫荧光等手段进一步探索材料的进胞方式和机制。同时，筛选更多抗肿瘤抗菌通路，通过 WB 和 RT-qPCR 进一步验证其作用机制。

参考文献

- [1] V.L. Tippet, L. Tattersall, N.B. Ab Latif, K.M. Shah, M.A. Lawson, A. Gartland, The strategy and clinical relevance of in vitro models of MAP resistance in osteosarcoma: a systematic review, *Oncogene* 42(4) (2023) 259-277.
- [2] M. Li, Z.I. Lin, J. Yang, H. Huang, G.L. Liu, Q. Liu, X. Zhang, Y. Zhang, Z. Xu, H. Lin, Y. Chai, X. Chen, B.T. Ko, J. Liu, C.K. Chen, C. Yang, Biodegradable Carbon Dioxide-Derived Non-Viral Gene Vectors for Osteosarcoma Gene Therapy, *Adv Healthc Mater* 12(3) (2023) e2201306.
- [3] L. Mirabello, R.J. Troisi, S.A. Savage, Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, *Cancer* 115(7) (2009) 1531-1543.
- [4] M.S. Isakoff, S.S. Bielack, P. Meltzer, R. Gorlick, Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success, *J Clin Oncol* 33(27) (2015) 3029-3035.
- [5] H.C. Beird, S.S. Bielack, A.M. Flanagan, J. Gill, D. Heymann, K.A. Janeway, J.A. Livingston, R.D. Roberts, S.J. Strauss, R. Gorlick, Osteosarcoma, *Nat Rev Dis Primers* 8(1) (2022) 77.
- [6] N.M. Bernthal, N. Federman, F.R. Eilber, S.D. Nelson, J.J. Eckardt, F.C. Eilber, W.D. Tap, Long-term results (>25 years) of a randomized, prospective clinical trial evaluating chemotherapy in patients with high-grade, operable osteosarcoma, *Cancer* 118(23) (2012) 5888-5893.
- [7] M.W. Bishop, K.A. Janeway, R. Gorlick, Future directions in the treatment of osteosarcoma, *Curr Opin Pediatr* 28(1) (2016) 26-33.
- [8] I. Lilienthal, N. Herold, Targeting Molecular Mechanisms Underlying Treatment Efficacy and Resistance in Osteosarcoma: A Review of Current and Future Strategies, *Int J Mol Sci* 21(18) (2020) 6885.
- [9] K.I. Reddy, H. Wafa, C.L. Gaston, R.J. Grimer, A.T. Abudu, L.M. Jeys, S.R. Carter, R.M. Tillman, Does amputation offer any survival benefit over limb salvage in osteosarcoma patients with poor chemonecrosis and close margins?, *Bone Joint J* 97-B(1) (2015) 115-120.

- [10] 王存硕, 王帅, 薛海滨, 罗小波, 骨肉瘤治疗研究进展[J], 标记免疫分析与临床 29(10) (2022) 1789-1793.
- [11] P.A. Meyers, Systemic therapy for osteosarcoma and Ewing sarcoma, *Am Soc Clin Oncol Educ Book* (2015) e644-647.
- [12] J.K. Anninga, H. Gelderblom, M. Fiocco, J.R. Kroep, A.H. Taminiu, P.C. Hogendoorn, R.M. Egeler, Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand?, *Eur J Cancer* 47(16) (2011) 2431-2445.
- [13] P.A. Meyers, C.L. Schwartz, M. Krailo, E.S. Kleinerman, D. Betcher, M.L. Bernstein, E. Conrad, W. Ferguson, M. Gebhardt, A.M. Goorin, M.B. Harris, J. Healey, A. Huvos, M. Link, J. Montebello, H. Nadel, M. Nieder, J. Sato, G. Siegal, M. Weiner, R. Wells, L. Wold, R. Womer, H. Grier, Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate, *J Clin Oncol* 23(9) (2005) 2004-2011.
- [14] P.A. Meyers, J.H. Healey, A.J. Chou, L.H. Wexler, P.R. Merola, C.D. Morris, M.P. Laquaglia, M.G. Kellick, S.J. Abramson, R. Gorlick, Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma, *Cancer* 117(8) (2011) 1736-1744.
- [15] E. Palmerini, R.L. Jones, E. Marchesi, A. Paioli, M. Cesari, A. Longhi, C. Meazza, L. Coccoli, F. Fagioli, S. Asaftei, G. Grignani, A. Tamburini, S.M. Pollack, P. Picci, S. Ferrari, Gemcitabine and docetaxel in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma and spindle cell sarcoma of bone, *BMC Cancer* 16 (2016) 280.
- [16] J.P. Lagmay, M.D. Krailo, H. Dang, A. Kim, D.S. Hawkins, O. Beaty, 3rd, B.C. Widemann, T. Zwerdling, L. Bomgaars, A.M. Langevin, H.E. Grier, B. Weigel, S.M. Blaney, R. Gorlick, K.A. Janeway, Outcome of Patients With Recurrent Osteosarcoma Enrolled in Seven Phase II Trials Through Children's Cancer Group, Pediatric Oncology Group, and Children's Oncology Group: Learning From the Past to Move Forward, *J Clin Oncol* 34(25) (2016) 3031-3038.
- [17] C.A. Arndt, N.V. Koshkina, C.Y. Inwards, D.S. Hawkins, M.D. Krailo, D. Villaluna, P.M. Anderson, A.M. Goorin, M.L. Blakely, M. Bernstein, S.A.

- Bell, K. Ray, D.C. Grendahl, N. Marina, E.S. Kleinerman, Inhaled granulocyte-macrophage colony stimulating factor for first pulmonary recurrence of osteosarcoma: effects on disease-free survival and immunomodulation. a report from the Children's Oncology Group, *Clin Cancer Res* 16(15) (2010) 4024-4030.
- [18] I.F. Ciernik, A. Niemierko, D.C. Harmon, W. Kobayashi, Y.L. Chen, T.I. Yock, D.H. Ebb, E. Choy, K.A. Raskin, N. Liebsch, F.J. Hornicek, T.F. Delaney, Proton-based radiotherapy for unresectable or incompletely resected osteosarcoma, *Cancer* 117(19) (2011) 4522-4530.
- [19] M. Khan, K.S. Rankin, R. Todd, E. Lethbridge, C. Gerrand, Surgical excision and not chemotherapy is the most powerful modality in treating synovial sarcoma: the UK's North East experience, *Arch Orthop Trauma Surg* 139(4) (2019) 443-449.
- [20] X.Y. Zhang, K. Sun, Q. Zhu, T. Song, Y. Liu, Ginseng polysaccharide serves as a potential radiosensitizer through inducing apoptosis and autophagy in the treatment of osteosarcoma, *Kaohsiung J Med Sci* 33(11) (2017) 535-542.
- [21] A. Smrke, P.M. Anderson, A. Gulia, S. Gennatas, P.H. Huang, R.L. Jones, Future Directions in the Treatment of Osteosarcoma, *Cells-Basel* 10(1) (2021) 172.
- [22] O. Demaria, S. Cornen, M. Daeron, Y. Morel, R. Medzhitov, E. Vivier, Harnessing innate immunity in cancer therapy, *Nature* 574(7776) (2019) 45-56.
- [23] Z. Hu, S. Wen, Z. Huo, Q. Wang, J. Zhao, Z. Wang, Y. Chen, L. Zhang, F. Zhou, Z. Guo, H. Liu, S. Zhou, Current Status and Prospects of Targeted Therapy for Osteosarcoma, *Cells-Basel* 11(21) (2022) 3507.
- [24] K. Igarashi, K. Kawaguchi, T. Kiyuna, K. Miyake, T. Murakami, N. Yamamoto, K. Hayashi, H. Kimura, S. Miwa, H. Tsuchiya, R.M. Hoffman, Effective Metabolic Targeting of Human Osteosarcoma Cells In Vitro and in Orthotopic Nude-mouse Models with Recombinant Methioninase, *Anticancer Res* 37(9) (2017) 4807-4812.
- [25] N.J. Mason, J.S. Gnanandarajah, J.B. Engiles, F. Gray, D. Laughlin, A.

- Garnier-Hausser, A. Wallecha, M. Huebner, Y. Paterson, Immunotherapy with a HER2-Targeting Listeria Induces HER2-Specific Immunity and Demonstrates Potential Therapeutic Effects in a Phase I Trial in Canine Osteosarcoma, *Clin Cancer Res* 22(17) (2016) 4380-4390.
- [26] J.Y. Ru, Y. Cong, W.B. Kang, L. Yu, T. Guo, J.N. Zhao, Polymorphisms in TP53 are associated with risk and survival of osteosarcoma in a Chinese population, *Int J Clin Exp Pathol* 8(3) (2015) 3198-3203.
- [27] M.J. Mitchell, M.M. Billingsley, R.M. Haley, M.E. Wechsler, N.A. Peppas, R. Langer, Engineering precision nanoparticles for drug delivery, *Nat Rev Drug Discov* 20(2) (2021) 101-124.
- [28] Y. Liu, Q. Li, Q. Bai, W. Jiang, Advances of smart nano-drug delivery systems in osteosarcoma treatment, *J Mater Chem B* 9(27) (2021) 5439-5450.
- [29] 尹翼鹏晨, 张琴, 傅小龙, 纳米材料在肿瘤诊疗中的应用研究进展[J] *中国癌症杂志* 29(05) (2019) 328-337.
- [30] 陈芳, 陶金, 车晓航, 熊素彬, 叶小磊, 肿瘤微环境的渗透性增强与肿瘤治疗[J] *国际药学研究杂志* 43(02) (2016) 264-267.
- [31] J. Zhang, H. Tang, Z. Liu, B. Chen, Effects of major parameters of nanoparticles on their physical and chemical properties and recent application of nanodrug delivery system in targeted chemotherapy, *Int J Nanomedicine* 12 (2017) 8483-8493.
- [32] M. Chen, J. He, S. Xie, T. Wang, P. Ran, Z. Zhang, X. Li, Intracellular bacteria destruction via traceable enzymes-responsive release and deferoxamine-mediated ingestion of antibiotics, *J Control Release* 322 (2020) 326-336.
- [33] W. Gao, S. Thamphiwatana, P. Angsantikul, L. Zhang, Nanoparticle approaches against bacterial infections, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 6(6) (2014) 532-547.
- [34] M. Barani, M. Mukhtar, A. Rahdar, S. Sargazi, S. Pandey, M. Kang, Recent Advances in Nanotechnology-Based Diagnosis and Treatments of Human Osteosarcoma, *Biosensors (Basel)* 11(2) (2021) 55.
- [35] Z. Cheng, A. Al Zaki, J.Z. Hui, V.R. Muzykantov, A. Tsourkas,

Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities, *Science* 338(6109) (2012) 903-910.

[36] R. Liang, M. Wei, D.G. Evans, X. Duan, Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics, *Chem Commun (Camb)* 50(91) (2014) 14071-14081.

[37] B. Begines, T. Ortiz, M. Perez-Aranda, G. Martinez, M. Merinero, F. Arguelles-Arias, A. Alcudia, Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects, *Nanomaterials (Basel)* 10(7) (2020) 1403.

[38] X. Li, L. Wang, L. Wang, J. Yu, G. Lu, W. Zhao, C. Miao, C. Zou, J. Wu, Overcoming therapeutic failure in osteosarcoma via Apatinib-encapsulated hydrophobic poly(ester amide) nanoparticles, *Biomater Sci* 8(21) (2020) 5888-5899.

[39] S. Li, Y. Xiong, X. Zhang, Poloxamer surface modified trimethyl chitosan nanoparticles for the effective delivery of methotrexate in osteosarcoma, *Biomed Pharmacother* 90 (2017) 872-879.

[40] E. Yuba, T. Osaki, M. Ono, S. Park, A. Harada, M. Yamashita, K. Azuma, T. Tsuka, N. Ito, T. Imagawa, Y. Okamoto, Bleomycin-Loaded pH-Sensitive Polymer(-)Lipid-Incorporated Liposomes for Cancer Chemotherapy, *Polymers (Basel)* 10(1) (2018) 74.

[41] E. Gazzano, I. Buondonno, A. Marengo, B. Rolando, K. Chegaev, J. Kopecka, S. Saponara, M. Sorge, C.M. Hattinger, A. Gasco, R. Fruttero, M. Brancaccio, M. Serra, B. Stella, E. Fattal, S. Arpicco, C. Riganti, Hyaluronated liposomes containing H₂S-releasing doxorubicin are effective against P-glycoprotein-positive/doxorubicin-resistant osteosarcoma cells and xenografts, *Cancer Lett* 456 (2019) 29-39.

[42] H. Wu, Y. Luo, D. Xu, X. Ke, T. Ci, Low molecular weight heparin modified bone targeting liposomes for orthotopic osteosarcoma and breast cancer bone metastatic tumors, *Int J Biol Macromol* 164 (2020) 2583-2597.

[43] E.R. Evans, P. Bugga, V. Asthana, R. Drezek, Metallic Nanoparticles for Cancer Immunotherapy, *Mater Today (Kidlington)* 21(6) (2018) 673-685.

[44] D. Chowdhury, A. Paul, A. Chattopadhyay, Photocatalytic polypyrrole-

TiO₂-nanoparticles composite thin film generated at the air-water interface, *Langmuir* 21(9) (2005) 4123-4128.

[45] M. Kanamala, W.R. Wilson, M. Yang, B.D. Palmer, Z. Wu, Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review, *Biomaterials* 85 (2016) 152-167.

[46] Y. Chi, X. Yin, K. Sun, S. Feng, J. Liu, D. Chen, C. Guo, Z. Wu, Redox-sensitive and hyaluronic acid functionalized liposomes for cytoplasmic drug delivery to osteosarcoma in animal models, *J Control Release* 261 (2017) 113-125.

[47] V. Brabec, DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71 (2002) 1-68.

[48] V. Brabec, J. Kasparikova, Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs, *Drug Resist Updat* 8(3) (2005) 131-146.

[49] A.M. Pizarro, P.J. Sadler, Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes, *Biochimie* 91(10) (2009) 1198-1211.

[50] M.R. Kaluderovic, G.N. Kaluderovic, S. Gomez-Ruiz, R. Paschke, A. Hemprich, J. Kuhling, T.W. Remmerbach, Organogallium(III) complexes as apoptosis promoting anticancer agents for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines, *J Inorg Biochem* 105(2) (2011) 164-170.

[51] C.X. Zhang, S.J. Lippard, New metal complexes as potential therapeutics, *Curr Opin Chem Biol* 7(4) (2003) 481-489.

[52] L.H. Fu, Y. Wan, C. Qi, J. He, C. Li, C. Yang, H. Xu, J. Lin, P. Huang, Nanocatalytic Theranostics with Glutathione Depletion and Enhanced Reactive Oxygen Species Generation for Efficient Cancer Therapy, *Adv Mater* 33(7) (2021) e2006892.

[53] Y. Wang, L. Zhang, F. Zhou, Cuproptosis: a new form of programmed cell death, *Cell Mol Immunol* 19(8) (2022) 867-868.

[54] P. Tsvetkov, S. Coy, B. Petrova, M. Dreishpoon, A. Verma, M. Abdusamad, J. Rossen, L. Joesch-Cohen, R. Humeidi, R.D. Spangler, J.K. Eaton, E. Frenkel, M. Kocak, S.M. Corsello, S. Lutsenko, N. Kanarek, S.

- Santagata, T.R. Golub, Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins, *Science* 375(6586) (2022) 1254-1261.
- [55] G. Zhang, J. Sun, X. Zhang, A novel Cuproptosis-related LncRNA signature to predict prognosis in hepatocellular carcinoma, *Sci Rep* 12(1) (2022) 11325.
- [56] Z. Bian, R. Fan, L. Xie, A Novel Cuproptosis-Related Prognostic Gene Signature and Validation of Differential Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma, *Genes (Basel)* 13(5) (2022) 851.
- [57] A. Jacobs, G. Renaudin, C. Forestier, J.M. Nedelec, S. Descamps, Biological properties of copper-doped biomaterials for orthopedic applications: A review of antibacterial, angiogenic and osteogenic aspects, *Acta Biomater* 117 (2020) 21-39.
- [58] G. Borkow, J. Gabbay, Copper as a biocidal tool, *Curr Med Chem* 12(18) (2005) 2163-2175.
- [59] G. Grass, C. Rensing, M. Solioz, Metallic copper as an antimicrobial surface, *Appl Environ Microbiol* 77(5) (2011) 1541-1547.
- [60] L. Ren, K. Yang, L. Guo, H.W. Chai, Preliminary study of anti-infective function of a copper-bearing stainless steel, *Mat Sci Eng C-Mater* 32(5) (2012) 1204-1209.
- [61] D. Mitra, E.T. Kang, K.G. Neoh, Antimicrobial Copper-Based Materials and Coatings: Potential Multifaceted Biomedical Applications, *ACS Appl Mater Interfaces* 12(19) (2020) 21159-21182.
- [62] L. Mirabello, R.J. Troisi, S.A. Savage, International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons, *Int J Cancer* 125(1) (2009) 229-234.
- [63] W.L. Chen, Y.Y. Wang, A. Zhao, L. Xia, G. Xie, M. Su, L. Zhao, J. Liu, C. Qu, R. Wei, C. Rajani, Y. Ni, Z. Cheng, Z. Chen, S.J. Chen, W. Jia, Enhanced Fructose Utilization Mediated by SLC2A5 Is a Unique Metabolic Feature of Acute Myeloid Leukemia with Therapeutic Potential, *Cancer Cell* 30(5) (2016) 779-791.
- [64] W.L. Chen, X. Jin, M. Wang, D. Liu, Q. Luo, H. Tian, L. Cai, L. Meng, R. Bi, L. Wang, X. Xie, G. Yu, L. Li, C. Dong, Q. Cai, W. Jia, W. Wei, L.

- Jia, GLUT5-mediated fructose utilization drives lung cancer growth by stimulating fatty acid synthesis and AMPK/mTORC1 signaling, *JCI Insight* 5(3) (2020) e131596.
- [65] Y. Pu, H. Zhang, Y. Peng, Q. Fu, Q. Yue, Y. Zhao, L. Guo, Y. Wu, Dual-targeting liposomes with active recognition of GLUT(5) and alpha(v)beta(3) for triple-negative breast cancer, *Eur J Med Chem* 183 (2019) 111720.
- [66] S.A. Hannou, D.E. Haslam, N.M. McKeown, M.A. Herman, Fructose metabolism and metabolic disease, *J Clin Invest* 128(2) (2018) 545-555.
- [67] X.K. Hu, S.S. Rao, Y.J. Tan, H. Yin, M.J. Luo, Z.X. Wang, J.H. Zhou, C.G. Hong, Z.W. Luo, W. Du, B. Wu, Z.Q. Yan, Z.H. He, Z.Z. Liu, J. Cao, Y. Wang, W.Y. Situ, H.M. Liu, J. Huang, Y.Y. Wang, K. Xia, Y.X. Qian, Y. Zhang, T. Yue, Y.W. Liu, H.Q. Zhang, S.Y. Tang, C.Y. Chen, H. Xie, Fructose-coated Angstrom silver inhibits osteosarcoma growth and metastasis via promoting ROS-dependent apoptosis through the alteration of glucose metabolism by inhibiting PDK, *Theranostics* 10(17) (2020) 7710-7729.
- [68] J. Zhao, K. Babiuch, H. Lu, A. Dag, M. Gottschaldt, M.H. Stenzel, Fructose-coated nanoparticles: a promising drug nanocarrier for triple-negative breast cancer therapy, *Chem Commun (Camb)* 50(100) (2014) 15928-15931.
- [69] L. Ma, X. Song, Y. Yu, Y. Chen, Two-Dimensional Silicene/Silicon Nanosheets: An Emerging Silicon-Composed Nanostructure in Biomedicine, *Adv Mater* 33(31) (2021) e2008226.
- [70] Y. Chong, Q. Liu, C.C. Ge, Advances in oxidase-mimicking nanozymes: Classification, activity regulation and biomedical applications, *Nano Today* 37 (2021) 101076.
- [71] N. Bisht, N. Dwivedi, P. Kumar, M. Venkatesh, A.K. Yadav, D. Mishra, P. Solanki, N.K. Verma, R. Lakshminarayanan, S. Ramakrishna, D.P. Mondal, A.K. Srivastava, C. Dhand, Recent advances in copper and copper-derived materials for antimicrobial resistance and infection control, *Curr Opin Biomed Eng* 24 (2022) 100408.

- [72] M. Vincent, R.E. Duval, P. Hartemann, M. Engels-Deutsch, Contact killing and antimicrobial properties of copper, *J Appl Microbiol* 124(5) (2018) 1032-1046.
- [73] J. Salvo, C. Sandoval, Role of copper nanoparticles in wound healing for chronic wounds: literature review, *Burns Trauma* 10 (2022) tkab047.
- [74] E. Tarrant, P.R. G, M.R. McIlvin, J. Stevenson, A. Barwinska-Sendra, L.J. Stewart, M.A. Saito, K.J. Waldron, Copper stress in *Staphylococcus aureus* leads to adaptive changes in central carbon metabolism, *Metallomics* 11(1) (2019) 183-200.
- [75] M. Vincent, P. Hartemann, M. Engels-Deutsch, Antimicrobial applications of copper, *Int J Hyg Environ Health* 219(7 Pt A) (2016) 585-591.
- [76] C. Espirito Santo, E.W. Lam, C.G. Elowsky, D. Quaranta, D.W. Domaille, C.J. Chang, G. Grass, Bacterial killing by dry metallic copper surfaces, *Appl Environ Microbiol* 77(3) (2011) 794-802.
- [77] S.L. Warnes, V. Caves, C.W. Keevil, Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria, *Environ Microbiol* 14(7) (2012) 1730-1743.
- [78] J.A. Lemire, J.J. Harrison, R.J. Turner, Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications, *Nat Rev Microbiol* 11(6) (2013) 371-384.