

研究简报

次血红素六肽对纳米金诱导线虫热激损伤的保护作用

郭常闰¹, 关树文¹, 黄磊¹, 张超¹, 董彪², 宋宏伟², 王丽萍¹

(1. 吉林大学 生命科学学院, 长春 130012; 2. 吉林大学 电子科学与工程学院, 长春 130012)

摘要: 通过考察 Au 纳米球壳对野生型秀丽隐杆线虫的光热转换作用, 建立一种新型的秀丽线虫热激损伤模型. 实验结果表明, 在纳米金浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$, 红外光强为 3 W/cm^2 , 照射 8 min 的热激条件下加入次血红素六肽对线虫有保护作用.

关键词: Au 纳米球壳; 秀丽隐杆线虫; 热激; 次血红素六肽

中图分类号: Q613 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-5489(2012)01-0153-04

DhHP-6 Protection of *Caenorhabditis elegans* from Heat Shock Injury Induced by Au Nanoparticles

GUO Chang-run¹, GUAN Shu-wen¹, HUANG Lei¹, ZHANG Chao¹,
DONG Biao², SONG Hong-wei², WANG Li-ping¹

(1. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China;

2. College of Electronic Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract: Using the light-heat conversion induced by Au nanoparticles, we created a new experimental method of heat-shock for *Caenorhabditis elegans*. DhHP-6 is a mimetic peroxidase designed and synthesised by our laboratory. *C. elegans* was incubated with Au nanoparticles at the concentration of 30 $\mu\text{mol/L}$ and exposed to the infrared lights at a intensity of 3 W/cm^2 for 8 min. The results showed that DhHP-6 had protective effect on the *C. elegans* in this heat-shock conditions.

Key words: Au nanoparticles; *Caenorhabditis elegans*; heat shock; DhHP-6

纳米金是一种具有近红外吸收和散射功能的无机材料, 经近红外光激发后, 可将其吸收的光能高效地转换为热能, 使局域范围内温度升高. 纳米金有纳米金壳和纳米金棒两种, 纳米金壳采用湿化学法合成, 首先合成纳米银粒子, 然后以纳米银粒子为模板, 还原四氯金酸制得^[1-4]. 次血红素六肽 (deuterohaemin- β -Ala-His-Thr-Val-Glu-Lys, DhHP-6) 是一种由吉林大学生物大分子实验室设计并合成的含 His 的过氧化物酶肽类模拟物^[5-6], 研究表明, 次血红素六肽对线虫的氧化应激损伤具有很好的保护作用^[7]. 基于纳米金的光热转换特性, 本文拟建立一种新的热激实验方法, 针对纳米金介导的光热转换作用导致秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的热激损伤, 进一步研究次血红素六肽对该热激环境中线虫的保护作用.

1 材料与仪器

DhHP-6 (由吉林大学生物大分子实验室自主固相肽合成); 金纳米球壳 (由吉林大学宋宏伟教授课题组合成); 琼脂粉 (鼎国生物工程公司); 氯化钠 (分析纯, 北京化工厂); 胆固醇 (分析纯, 上海化学试剂公司); 磷酸二氢钾 (分析纯, 上海试剂二厂).

收稿日期: 2011-05-27.

作者简介: 郭常闰(1987—), 男, 汉族, 硕士研究生, 从事药物筛选的研究, E-mail: guocr0613@mails.jlu.edu.cn. 通讯作者: 王丽萍(1967—), 女, 汉族, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药物筛选的研究, E-mail: wanglp@jlu.edu.cn.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 863 项目基金 (批准号: 2007AA032314).

超净工作台(苏州净化设备有限公司); 红外激光发射器(哈尔滨东联电子技术公司); 96孔板(美国COSTAR公司); 电子分析天平(日本SHIMADZU公司); 0.22 μm 滤器(美国 Millipore 公司).

2 主要溶液的配制

1) LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 蒸馏水配制, 用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调至 $\text{pH} = 7.0$, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min.

2) LB 固体培养基: LB 液体培养基, 临高压灭菌前加入 15 g/L bacto-agar, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min.

3) M9 溶液(1 L): 2.2 mmol/L KH_2PO_4 , 4.2 mmol/L Na_2HPO_4 , 8.55 mmol/L NaCl, 1 mol/L MgSO_4 , 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min.

4) S-Medium: 5.8 g NaCl, 50 mL 1 mol/L $\text{pH} = 6.0$ 的磷酸盐缓冲液, 1 mL 5 mg/mL 胆固醇(溶于体积分数为 95% 的乙醇中), 双蒸水 950 mL, 120 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min. 然后在无菌条件下加入下列灭菌溶液: 3 mL 1 mol/L MgSO_4 , 3 mL 1 mol/L CaCl_2 , 10 mL 100 \times 微量金属盐溶液(trace metal solution), 10 mL 1 mol/L 柠檬酸钾. 4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用.

5) 100 \times 微量金属盐溶液 500 mL 双蒸水中溶有 0.346 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.930 g Na_2EDTA , 0.098 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.144 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.012 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 120 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存.

6) 线虫生长(NGM)固体培养基: NaCl 3 g/L, 琼脂粉 17 g/L, 胰蛋白胨 2.5 g/L, 加入 970 mL 蒸馏水 120 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴轻摇 15 min 后无菌条件下加入 1 mol/L CaCl_2 , 1 mol/L MgSO_4 及 5 mg/mL 溶解于无水乙醇中的胆固醇 1 mL 和 25 mL 1 mol/L $\text{pH} = 6.0$ 磷酸钾缓冲液^[8].

3 方法

3.1 同期化培养秀丽线虫的方法 挑取 20 条处于产卵期的线虫置于一个新的铺有 *E. coli* OP50 的 NGM 平板中, 一般一条产卵期线虫每小时约产卵 8 个. 2~3 h 后, 将平板中线虫挑出, 平板中的卵则处于同一发育时期^[9-10].

3.2 纳米金毒性的测定方法 使用加有胆固醇的 M9 溶液(每 100 mL M9 中加 100 μL 胆固醇溶液), 将纳米金原溶液(2×10^{-4} mol/L) 稀释为不同浓度并设置空白对照, 加入质量分数为 10% 的 5 氟尿嘧啶防止线虫繁殖; 加入质量分数为 1% 的 AMP 抑制细菌生长. 每板挑入同期化好的 L4 期成虫 20~30 只. 每次实验一个浓度, 每个浓度都设一个空白对照组. 采用 2 mL 一次性培养皿于 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养. 24 h 后观测存活率, 若线虫未全部死亡, 则继续培养, 每天统计死亡的线虫数并将死虫挑出. 将实验组与空白组作对比得出无明显毒性的纳米金浓度. 如线虫在 24 h 后全部死亡, 则降低纳米金颗粒的浓度, 重复实验.

3.3 确定红外光强的方法 确定对线虫无明显热激损伤的红外光强范围. 取 96 孔板, B, C, D, E, F, G 每行各孔内加入 50 μL M9 溶液, 3 只同期化好的线虫. B 行设置为空白对照, 不进行红外光照射. C, D, E, F, G 分别用强度为 1.5, 4, 10, 16, 26 W/cm^2 的 980 nm 红外光照射, 每行每孔照射 1 min. 观察照射后线虫的存活状态, 确定红外光强范围.

3.4 测定线虫 24 h 后存活率的方法 取浓度为 1.5×10^{-3} mol/L 的纳米金原溶液, 用 M9 溶液梯度稀释, 由原液开始, 浓度从高到低进行实验, 溶液中加入 Amp 防止染菌(1 $\mu\text{L}/\text{mL}$). 混匀后分别加入 96 孔板的 A2, A3, B2, B3 中, 每孔 50 μL , C2, C3, D2, D3 中加入混有 Amp 的 M9, 每孔 50 μL . 之后每孔内挑入 20 只线虫, 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养 1 h. 取出观察各孔内线虫. 若无死亡, 则进行红外光照射, 观察, 若含有纳米金的各孔内若线虫未全部死亡, 则配置 8 个纯 M9 一次性 2 mL 液体培养板, 将各孔内线虫吸出转入, 每孔一板转入相应板内, 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内过夜培养, 第二天观察各板, 计算存活率.

3.5 测定加入 DhHP-6 后的保护作用方法 在测定线虫存活率实验方法的基础上, 新增加一组加入了用 M9 稀释 DhHP-6 和纳米金混合液的实验, DhHP-6 浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$. 测定 24 h 后存活率, 观察加入 DhHP-6 是否能提高实验组线虫的存活率. 重复实验, 新增只含 DhHP-6 不进行照射的实验组, 纳米金实验组和混合液实验组增加至 2 个, 测定红外光照后 24 h 线虫的存活率.

4 结果与讨论

4.1 纳米金对线虫毒性的测定结果 每组挑取 30 只经同期化培养的线虫, 与不同浓度未过滤的纳米

金作用 24 h 后, 测定线虫的存活率, 结果列于表 1.

表 1 纳米金浓度对线虫 24 h 存活率的影响

Table 1 Effect of different gold nanoparticle concentrations on the survival rate of *C. elegans*

| 纳米金浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ | 100 | 50 | 10 | 3 | 1 | 0.3 | 0 |
|--|-----|----|----|---|----|-----|-----|
| 24 h 后线虫存活率/% | 0 | 0 | 0 | 0 | 80 | 93 | 100 |

继续培养纳米金浓度分别为 1, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 的两组线虫, 48 h 后发现 1 $\mu\text{mol/L}$ 组线虫全部死亡. 测定线虫在浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 的纳米金溶液中的存活曲线, 并用在 M9 溶液中正常培养的线虫作空白对照, 重复实验 3 次, 结果如图 1 所示.

使用 Graphpad Prism 5.0 分析上述 3 组中给药组与空白对照组, 对比无明显差异 ($p > 0.05$). 表明纳米金在此浓度下对线虫的毒性可忽略. 但如果浓度太低, 则后期进行红外光热转换实验时会导致效果极差, 故改为提高纳米金浓度, 测定给药 1 h 后线虫存活率, 结果表明: 加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 纳米金的线虫存活率为 0; 加入 30 $\mu\text{mol/L}$ 纳米金的线虫存活率为 100%. 因此, 当实验中所用纳米金浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$, 给药 1 h 时, 效果较好.

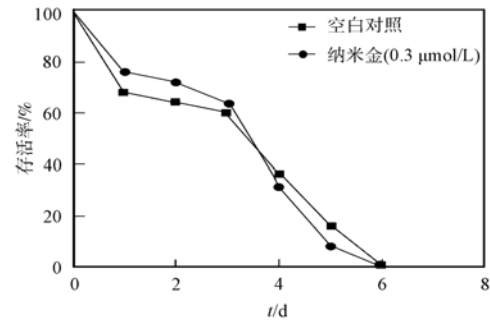


图 1 纳米金热疗对线虫寿命的影响

Fig. 1 Effect of hyperthermia by gold nanoparticles on life span of *C. elegans*

4.2 红外光强照射功率的确定 照射实验发现, 16 W/cm^2 照射 1 min 后孔板底有发黄融化现象, 故 G 行改用 2.5 W/cm^2 进行照射. 照射后观察, F 行内线虫已经全部死亡, E 行大部分线虫活性较差. 观察发现, C, D, G 行线虫与空白对照活性相似. 因此, 可确定实验中的红外光强范围为 0 ~ 4 W/cm^2 , 每孔照射 8 min.

4.3 浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的纳米金照射后对线虫存活率的影响 用浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的纳米金给药 1 h 后红外照射, 培养 24 h 后测定线虫的存活率. E8, E9 孔内加入了 50 μL 浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的纳米金, F8, F9 孔中加入 50 μL M9 做空白对照. 每孔内挑入 20 只同期化的线虫, 1 h 后红外照射, 然后将线虫吸出移入装有 M9 液体培养基的 2 mL 一次性平板内, 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养. 24 h 后测定线虫存活率, 结果如图 2 所示. 图 2 中数据以平均数 \pm 标准偏差的形式表示. 与对照组相比 $p < 0.05$, A 组为纳米金给药照射组, B 组为空白对照组. 由图 2 可见, 给药组与空白对照组有差别, 表明纳米金通过红外光热转换作用导致线虫热激损伤, 该损伤杀死了部分线虫, 该方法用于线虫热激实验可行, 但误差线较大, 说明热激损伤不稳定. 在此实验条件下, 可以测定次血红素六肽对线虫的热激损伤是否有保护作用.

4.4 加入 DhHP-6 后对线虫的保护作用 加入 DhHP-6 后, 配置纳米金溶液和纳米金-DhHP-6 混合液, 96 孔板内 2 孔加纳米金, 2 孔加混合液, 2 孔加 M9, 每孔内挑入 20 只同期化的线虫, 红外光照射, 光强为 3 W/cm^2 , 每孔 8 min, 测定线虫 24 h 后存活率, 重复实验 3 次, 结果如图 3 所示. 图 3 中数据以

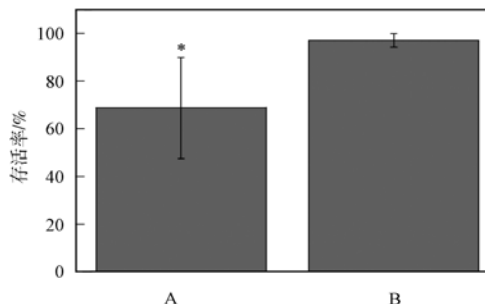


图 2 纳米金给药红外光照射 24 h 后线虫的存活率

Fig. 2 Survival rate of *C. elegans* on the infrared radiation for 24 h in the presence of gold nanoparticles

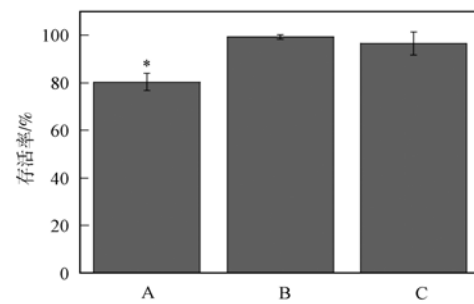


图 3 加入 DhHP-6 后各组线虫存活率的对比结果

Fig. 3 Survival rate of *C. elegans* by adding DhHP-6

平均数 \pm 标准偏差的形式表示. 与对照组相比 $p < 0.05$, A 组为 $30 \mu\text{mol/L}$ 的纳米金给药 1 h 后的照射组, B 组为加入 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 DhHP-6 和 $30 \mu\text{mol/L}$ 的纳米金给药 1 h 后的照射组, C 组为空白对照组. 由图 3 可见, 纳米金照射组因光热转换导致线虫热激损伤, 但热激损伤较小, 添加 DhHP-6 后可明显提高线虫存活率, 几乎达到 100%, 说明加入 DhHP-6 可以帮助线虫抵挡大部分热激损伤. 在此给药条件下, 纳米金及纳米金和次血红素六肽混合组存活率均为 100%, 表明此实验条件下药物对线虫的毒性影响可忽略不计.

综上所述, 本文建立了以纳米金诱导的红外光热转换作用对线虫进行短时变温热刺激的新型热激实验方法, 测定了纳米金对野生型秀丽隐杆线虫的毒性, 并研究了 DhHP-6 对该热激条件下线虫的保护作用. 结果表明, 在纳米金浓度为 $30 \mu\text{mol/L}$, 红外光强为 3 W/cm^2 , 照射 8 min 时, 可导致线虫热激损伤. 在该环境下加入 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 DhHP-6 可明显提高线虫的存活率, 表明 DhHP-6 对此热激损伤有较强的保护作用.

参 考 文 献

- [1] Hirsch L R, Stafford R J, West J L, et al. Nanoshell-Mediated Near-Infrared Thermal Therapy of Tumors under Magnetic Resonance Guidance [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 13549-13554.
- [2] NIU Jian-li. Study on the Apoptosis of the Tumor Cells Induced by Gold Nanoparticle Near-Infrared Hyperthermia [D]: [Master's Degree Thesis]. Changchun: College of Life Science, Jilin University, 2009. (牛建丽. 纳米金红外热疗诱导肿瘤细胞凋亡的研究 [D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学生命科学学院, 2009.)
- [3] SON Sang-jun, BAI Xia, LEE Sang-bok. Inorganic Hollow Nanoparticles and Nanotubes in Nanomedicine [J]. Drug Discovery Today, 2007, 12(15/16): 650-656.
- [4] SUN Yu-gang, XIA You-nan. Mechanistic Study on the Replacement Reaction between Silver Nanostructures and Chloroauric Acid in Aqueous Medium [J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(12): 3892-3901.
- [5] WANG Li-ping, LIU Ya-li, YANG Hui, et al. Synthesis and Anti-cataract Activity of a Novel Peroxidase Mimetics [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2004, 25(11): 2171-2173. (王丽萍, 刘亚丽, 杨卉, 等. 一个新的过氧化物酶短肽模拟物的合成及抗白内障活性研究 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(11): 2171-2173.)
- [6] WANG Di. Study on the Effects and Mechanism of DhHP-6 in Type 2 Diabetes Mellitus [D]: [Master's Degree Thesis]. Changchun: College of Life Science, Jilin University, 2008. (王迪. 亚血红素六肽抗 2 型糖尿病作用及机理研究 [D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学生命科学学院, 2008.)
- [7] GUAN Shu-wen, LI Peng-fei, LUO Jing, et al. A Deuterohemin Peptide Extends Lifespan and Increases Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* [J]. Free Radic Res, 2010, 44(7): 813-820.
- [8] HUANG Lei. The Sod-3 Gene RNA Interference in *Caenorhabditis elegans* [D]: [Master's Degree Thesis]. Changchun: College of Life Science, Jilin University, 2008. (黄磊. 秀丽隐杆线虫 sod-3 基因的 RNA 干扰 [D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学生命科学学院, 2008.)
- [9] LI Peng-fei. The Sir-2.1 Gene RNA Interference in *Caenorhabditis elegans* and the Preliminary Study on the Molecular Mechanisms of DhHP-6 on Extending Life Span in *Caenorhabditis elegans* [D]: [Master's Degree Thesis]. Changchun: College of Life Science, Jilin University, 2009. (李鹏飞. sir-2.1 RNA 干扰线虫模型的建立及 DhHP-6 抗衰老作用机制的初步研究 [D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学生命科学学院, 2009.)
- [10] GUAN Shu-wen. Study on the Molecular Mechanisms of Peroxidase Mimetic DhHP-6 on Extending Life Span in *Caenorhabditis elegans* [D]: [Ph D Thesis]. Changchun: College of Life Science, Jilin University, 2007. (关树文. 过氧化物酶模拟酶 DhHP-6 在秀丽线虫中的抗衰老机制的研究 [D]: [博士学位论文]. 长春: 吉林大学生命科学学院, 2007.)

(责任编辑: 单 凝)