

实验技术与方法

# 用于蛋白输送的有机硅载体综合实验设计

程 度, 余东升, 陈玉静, 欧阳红群

(中山大学 材料科学与工程学院, 广东 广州 510275)

**摘 要:** 有机硅是杂化生物材料的典型代表和发展方向之一, 基于有机硅的综合实验既涵盖了无机、有机以及高分子等材料学科内部的交叉, 也包含了材料与生命科学的交叉。实验合成了活性氧响应性的有机硅烷, 通过反相纳米乳液和溶胶-凝胶方法制备有机硅纳米粒子, 可负载和输送绿色荧光蛋白。通过核磁共振、动态光散射、荧光成像以及流式细胞术等方法评价了其理化特性和蛋白传输等性能。载蛋白有机硅纳米粒子具有粒径小、细胞吸收效率高、活性氧响应性释放、可降解和低毒性的优点。通过多学科知识的综合应用, 强化对学生交叉研究能力的训练。

**关键词:** 杂化生物材料; 蛋白传输载体; 有机硅纳米粒子; 环境敏感传输载体; 综合实验

中图分类号: TQ469 文献标识码: A 文章编号: 1002-4956(2023)10-0008-07

## Comprehensive experimental design of integrated biomaterials for organosilica-based protein delivery carrier

CHENG Du, YU Dongsheng, CHEN Yujing, OUYANG Hongqun

(School of Materials Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The organosilica materials are a typical representative and development direction of hybrid biomaterials. The content of this integrated experiment includes not only the internal cross-studies between inorganic, organic, and polymeric materials but also the interdisciplinary studies between materials and life sciences. The reactive oxygen species (ROS)-sensitive organosilane is synthesized and used to prepare organosilica nanoparticles through sol-gel reaction in reverse nano-emulsion, which can be used to encapsulate and deliver green fluorescent protein. Their physicochemical properties and protein delivery ability are evaluated through nuclear magnetic resonance, dynamic light scattering, fluorescence imaging, and flow cytometer analyses. The protein-loaded organosilica nanoparticles has several advantages, including small diameter, high cellular uptake efficiency, ROS-sensitive protein release, biodegradability, and low cytotoxicity. These features of the integrated experiment are conducive to understanding and mastering the knowledge and technologies of hybrid biomaterials preparation and evaluation for students.

**Key words:** hybrid biomaterials; protein delivery carrier; organosilica nanoparticle; environment-responsive delivery carrier; integrated experiment

人类健康和社会发展不仅受困于癌症等已有疾病, 近年来也受到新型冠状病毒肺炎等新发疾病的侵害, 解决这些“痛点”的关键技术如 mRNA 疫苗/药物、基因编辑疗法和生物 3D 打印等, 都需要生物材料的支撑<sup>[1]</sup>。多学科融合是生物材料的创新发展动力

和典型特征, 其交叉属性不仅体现在材料与生命科学的交叉, 而且也具有无机、有机和高分子等材料学科内部高度交叉的特点<sup>[2]</sup>。因此, 高校在开设生物材料理论和实验课时, 不仅需要体现前沿性, 也需要兼顾突出交叉性<sup>[3-5]</sup>。目前, 生物材料综合实验大多是基于

收稿日期: 2023-03-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(22275215); 广东省自然科学基金面上项目(2022A1515011304)

作者简介: 程 度(1972—), 男, 河南鹤壁, 博士, 教授, 研究方向为生物医用高分子材料, chengdu@mail.sysu.edu.cn。

引文格式: 程 度, 余东升, 陈玉静, 等. 用于蛋白输送的有机硅载体综合实验设计[J]. 实验技术与管理, 2023, 40(10): 8-14.

Cite this article: CHENG D, YU D S, CHEN Y J, et al. Comprehensive experimental design of integrated biomaterials for organosilica-based protein delivery carrier[J]. Experimental Technology and Management, 2023, 40(10): 8-14. (in Chinese)

单一类型材料设计的, 同时集成多种材料且体现生物材料发展方向的综合实验设计较为少见, 不利于对高年级本科生和研究生的前沿交叉综合研究能力的培养。本实验从较为成熟的科研实例中提炼出简便易行的技术方案, 结合前沿的药物智能释放策略, 用于模型蛋白的输送与传输性能评价, 从而将无机、有机、高分子材料以及生物医学知识结合在一起, 能够较好地培养学生的综合研究能力。

无机硅生物材料已有广泛的研究和应用, 具有易于制备和性能稳定的优点, 但是无机硅的不可降解性也限制了其在医学中的应用范围<sup>[6]</sup>。在无机硅粒子表面修饰聚乙二醇和荧光分子等有机材料, 提高无机硅纳米粒子的生物相容性和功能性, 是杂化硅材料制备的早期策略<sup>[7]</sup>。随后, 通过可逆加成-断裂链转移聚合、原子转移自由基聚合和点击化学等方式在无机硅粒子表面接枝阳离子聚合物, 实现对核酸药物(包括 DNA、小干扰 RNA 以及 mRNA)的输送<sup>[8]</sup>。通过使用硅烷有机衍生物制备了可水解的桥连倍半硅氧烷纳米粒子<sup>[9]</sup>。近年来, 一些科研团队发展了多种有机硅杂化材料, 保留了无机硅材料的优点, 并避免了无机硅难以降解的缺陷, 应用于小分子化学药物、核酸以及蛋白等多种药物的体内传输, 取得了较好的治疗效果, 丰富了生物材料的类型<sup>[9-10]</sup>; 同时发展了刺激响应性纳米载体传输多种药物<sup>[11-13]</sup>, 并将谷胱甘肽等还原剂、活性氧(reactive oxygen species, ROS)以及 pH 敏感的有机结构引入有机硅烷中, 通过反相纳米乳液联合溶胶-凝胶法制备可响应微环境刺激的有机硅纳米粒子, 进一步优化了有机硅药物载体的可降解性和药物控释性能<sup>[14-15]</sup>。此外, 在可操作性方面, 桥连有机硅烷的合成较为复杂, 而含有 TK 等刺激响应基团有机硅烷的合成则较为简便。在有机硅烷中引入对 pH、还原剂或 ROS 等敏感的结构, 不仅可使之具有可降解性, 而且赋予其响应性控制药物释放的性能, 为进一步提高药物治疗效果提供了强有力的工具<sup>[15-17]</sup>。

硅材料在传输小分子化学药物上的应用已有多年的研究, 而应用于蛋白药物的传输则是目前硅基生物材料研究的热点之一。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是一种广泛使用的模式蛋白, 具有可观测性和易于制备的优点, 在蛋白药物传输载体性能的评价中得到广泛应用。本实验利用所制备的刺激响应性有机硅载体传输 GFP 蛋白, 将具有 ROS 响应性的缩硫酮结构(thioetal, TK)引入有机硅烷中, 在纳米乳液中通过溶胶-凝胶法制备载蛋白的有机硅纳米粒子, 通过有机硅烷和纳米粒子的表征、纳米粒子的响应性解体以及细胞吸收性能评价等内容, 使学生了解和掌握杂化生物材料制备与评价的知识和实操。

## 1 实验方法

### 1.1 实验试剂

3-氨基丙基三乙氧基硅烷(aminopropyl triethoxysilane, APTES)、四乙氧基硅烷、3-巯基丙酸、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDCI)和 N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxy succinimide, NHS)购自百灵威科技有限公司, 曲拉通 X-100、正己醇、环己烷、二氯甲烷(dichloromethane, DCM)购自阿拉丁有限公司, 溴化钾、无水硫酸镁、氯化钠、碳酸氢钠、丙酮、无水乙醇和氨水购自广州化学试剂厂。人类乳腺癌细胞 4T1 购自上海细胞库。用于细胞培养的 DMEM 培养基、青霉素-链霉素双抗、0.25%胰蛋白酶-EDTA、胎牛血清和磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)均购自美国 Gibco 公司。GFP 购自广州皓宝科技有限公司。

### 1.2 实验仪器

采用 Bruker Avance II 600 型核磁共振波谱仪(Bruker Biospin, Germany)进行氢谱<sup>1</sup>H-NMR 表征, 具体操作如下: 称取 10 mg 干燥的样品, 将其溶解于 600  $\mu$ L 的氘代溶液中。过滤样品, 将滤液加入核磁管中。每个样品的采样次数均为 32。

采用 NicoletNexus 670 红外光谱仪进行傅里叶红外光谱(FTIR)表征, 具体操作如下: 扫描干净的溴化钾晶片作为空白背景; 取样品的二氯甲烷溶液滴加至溴化钾晶片表面。待溴化钾晶片表面液体完全挥发后, 在 400~5000  $\text{cm}^{-1}$  的范围扫描红外光谱, 分析样品的官能团结构。

在 25  $^{\circ}\text{C}$  下使用 90Plus/BI-MAS 动态光散射系统(Malvern NANO ZS, NY)检测纳米粒子粒径, 具体操作如下: 将样品加入去离子水后, 超声分散 5 min, 分别加入微量粒径池或电位池中, 进行分析测量。仪器散射角 173 $^{\circ}$ 。每个样品均测定 5 次, 取平均值作为最终值。

采用 HITACHI H-7650 (Hitachi High Technologies, Japan)透射电子显微镜观察形貌。冻干机采用 Alpha 1-2 LDplus (Christ, Germany), 具体操作如下: 将样品滴加在普通碳支持膜铜网上, 室温下静置, 挥发干燥液体, 使用透射电镜观察其形貌并拍照。

采用徕卡 DMI8 倒置荧光显微镜(Leica Microsystems Inc, United States)观察细胞摄取纳米粒子情况, 具体操作如下: 经纳米粒子处理过的细胞, 用 PBS 洗 3 次, 加入新鲜 PBS, 置于倒置荧光显微镜下观察。经 Hoechst 33342 染料染色细胞核和 GFP 蛋白分别用 330~380 nm 波长和 450~490 nm 波长的滤光

片观察。

采用流式细胞仪 (CytoFLEX, Beckman Coulter, United States) 对细胞摄取效率进行定量分析, 具体操作如下: 纳米粒子处理过的细胞, PBS 洗 3 次后, 用胰酶消化, 再将其转入离心管中后, 800 r/min 离心 8 min, 弃上清, 用 PBS 溶液洗涤, 800 r/min 离心 8 min, 弃去上清。重复 PBS 洗涤 1 次后, 细胞悬浮于 0.5 mL 的 PBS 中, 上机检测。采用 FL1 (525 nm 检测发出的绿色荧光, 用于 GFP 的检测) 来检测。未转染的细胞

作为空白组用于背景的校正。所得数据用 WinMDI software (Version 2.9, Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) 进行分析。细胞 CO<sub>2</sub> 培养箱为 HF90 (上海力康, 中国)。

### 1.3 ROS 敏感有机硅烷的合成

3,3'-(丙烷-2,2-二基双(硫烷二基))二丙酸 (缩硫酮单体, TK 单体)、NHS 修饰的 TK 单体 (TK-NHS) 和 ROS 敏感有机硅烷 (Si-TK-Si) 的合成路线如图 1 所示。

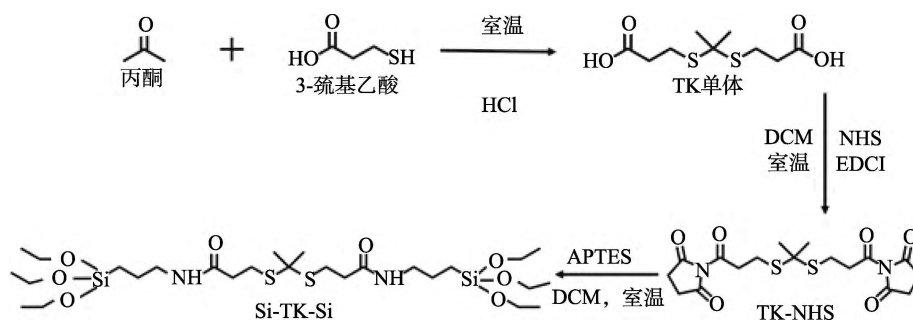


图 1 ROS 敏感有机硅烷的合成路线图

#### 1.3.1 ROS 敏感的 TK 单体的合成

参照本实验室报道的文献合成<sup>[15]</sup>, 具体操作如下: 量取 2.13 mL 的无水丙酮 (28.30 mmol, 2eq) 和 1.23 mL 的无水 3-巯基丙酸 (14.15 mmol, 1eq) 置于 250 mL 的茄形瓶中, 在 HCl 气氛中, 室温搅拌 2~6 h, 然后加入 200 mL 冰预冷的饱和氯化钠溶液, 沉淀出产物, 抽滤得白色沉淀。用冰预冷的正己烷 (100 mL) 和冰预冷的去离子水 (100 mL) 依次洗涤产物, 真空冷冻干燥后得到白色目标产物。

#### 1.3.2 TK-NHS 的合成

利用 EDCI 和 NHS 对羧基进行活化, 具体操作如下: 将 1.50 g TK (5.95 mmol, 1eq)、1.65 g NHS (14.35 mmol, 2.2 eq) 和 3.44 g EDCI (17.93 mmol, 3 eq) 分别加入 250 mL 茄形瓶中, 再加入 100 mL 无水 DCM 将反应物充分溶解, 在室温条件下充分搅拌反应 4~6 h 后, 将反应混合液转移至 500 mL 的分液漏斗中, 分别用 0.1 mol/L HCl、饱和 NaCl 溶液、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液洗涤, 收集有机相。加入适量无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 收集有机相, 旋蒸后得到白色固体状目标产物。

#### 1.3.3 ROS 敏感有机硅烷 (Si-TK-Si) 的合成

利用 APTES 和 TK-NHS 酰胺化反应合成 ROS 敏感有机硅烷, 具体操作如下: 称取 1.50 g TK-NHS (3.36 mmol, 1 eq) 于反应瓶中, 然后加入 100 mL 无水二氯甲烷将其充分溶解, 在氮气气氛中, 将 1.58 mL APTES (6.72 mmol, 2 eq) 逐滴加入反应瓶中, 室温反应 6~12 h, 减压去掉二氯甲烷, 得到黄色液体状目

标产物。

### 1.4 负载 GFP 的 ROS 敏感有机硅纳米粒子 (Si@GFP) 的制备

参考我们报道的文献制备<sup>[15]</sup>, 具体操作如下: 向 250 mL 的烧瓶中加入 14 mL 环己烷, 然后再分别将 4 mL 的曲拉通 X-100 和 3.6 mL 的正己醇分别加入环己烷溶液中, 室温条件下搅拌 0.5 h。加入 700 μL GFP 蛋白水溶液 (1 g/L), 剧烈搅拌 2 h。向混合溶液中加入 100 μL Si-TK-Si, 搅拌 0.5 h 后, 加入 100 μL 质量分数为 30% 的氨水溶液。反应 2.5 h 后, 向反应体系中加入 40 mL 无水乙醇终止反应。离心得到沉淀, 并依次用无水乙醇 (20 mL) 和去离子水各分别洗涤 3 次, 最终得到 Si@GFP。无机硅纳米粒子 in-Si@GFP 的制备采用类似方法, 用四乙氧基硅烷代替 Si-TK-Si。

### 1.5 纳米粒子 Si@GFP 理化性能的评价

纳米粒子粒径表征: 使用动态光散射方法测定纳米粒子的粒径, 每组纳米粒子粒径平行测定 5 次, 取平均值分析。

纳米粒子形貌表征: 将 10 μL 样品 (0.5 g/L) 滴在铜网上, 然后置于干燥器中晾干 24 h, 干燥后置于透射电镜下观测粒子的形貌。

### 1.6 GFP 蛋白体外释放行为分析

利用透析法研究纳米粒子在模拟肿瘤组织氧化环境下 GFP 蛋白释放行为。具体操作如下: 首先, 分别将 10 mg Si@GFP 和 in-Si@GFP 纳米粒子分散于 2 mL 的 PBS 内, 分成二等份。将装有 1 mL Si@GFP 纳米粒子混合液的透析袋 (截留分子量为 50 kDa) 分别浸

入含 0 和 100  $\mu\text{mol/L}$  浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 PBS 缓冲溶液中, in-Si@GFP 组做同样的处理, 放置在恒温摇床内模拟体内环境。在给定的时间点各组透析膜外取 4 mL 缓冲液样品进行 GFP 定量分析, 并补加等体积相应浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  的缓冲液。利用蛋白质定量试剂盒测量不同时间点 GFP 的累积释放量, 并运用 Origin 软件绘制释放曲线。

### 1.7 纳米粒子的细胞吸收性能评价

细胞以  $2 \times 10^2$  个/孔的密度接种于培养皿(直径 60 mm)中, 在  $37^\circ\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  加湿培养箱中培养 24 h。加入 10  $\mu\text{L}$  纳米粒子溶液(0.1 g/L)孵育 4 h 后, 加入 Hoechst 33342 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 染料对细胞核染色。染色 10 min 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗涤 3 次去除未吸收的纳米粒子和染色剂, 然后再向培养皿中加入 1 mL 的 PBS。置于倒置荧光显微镜下观察, 细胞核被标记为蓝色荧光, GFP 蛋白则发出绿色荧光。通过流式细胞仪对纳米粒子 Si@GFP 的细胞摄取进行定量分析, 将细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔的密度接种于培养皿(直径 100 mm)中, 用不同组的纳米粒子与细胞共孵育 4 h。将细胞从培养皿上消化下来, 分散于 400  $\mu\text{L}$  的 1 $\times$ PBS 中, 上流式细胞仪分析。

### 1.8 纳米粒子的细胞毒性实验

通过四唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法评估纳米粒子对小鼠乳腺癌细胞(4T1)和人正常肝细胞(LO2)毒性, 具体操作如下: 将细胞以

每孔  $5 \times 10^3$  个细胞密度接种到 96 孔板中。培养过夜后, 分别与不同浓度的 Si@GFP 共同培养 24 h。然后将 MTT 溶液(10  $\mu\text{L}$ , 5 g/L)添加到各个孔中, 继续孵育 4 h, 随后, 弃去培养基, 各孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜(DMSO), 震荡 5 min, 溶解晶体。采用酶标仪测定各孔在 570 nm 处的吸光值。根据公式计算不同条件下细胞存活率: 细胞存活率=(实验组吸光度值/对照组吸光度值) $\times 100\%$ 。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 ROS 敏感有机硅烷的核磁表征

通过  $^1\text{H-NMR}$  和 FTIR 对 TK 单体、TK-NHS 及 Si-TK-Si 的特征峰进行表征, 结果如图 2 所示。

ROS 敏感 TK 单体的  $^1\text{H-NMR}$  如图 2(a)所示, 其特征峰化学位移归属为:  $\delta 2.71(\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)$ 、 $\delta 2.92(\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)$  和  $\delta 1.64(\text{CH}_3)$ 。TK-NHS 的  $^1\text{H-NMR}$  特征峰化学位移归属为(图 2(b)):  $\delta 5.31(\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO})$ 、 $\delta 2.8(\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)$ 、 $\delta 2.92(\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)$  和  $1.64(\text{CH}_3)$ 。Si-TK-Si 的  $^1\text{H-NMR}$  特征峰化学位移归属为(图 2(c)):  $\delta 3.84(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)$ 、 $\delta 2.90(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})$ 、 $\delta 2.45(\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)$ 、 $\delta 1.66(\text{C}-\text{CH}_3, \text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)$ 、 $\delta 1.21(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3)$  和  $\delta 0.61(\text{Si}-\text{CH}_2)$ 。Si-TK-Si 的  $^1\text{H-NMR}$  谱中  $\delta 0.61$ 、1.21、2.54、2.62、3.84 处特征峰的出现证明了目标产物的成功合成。

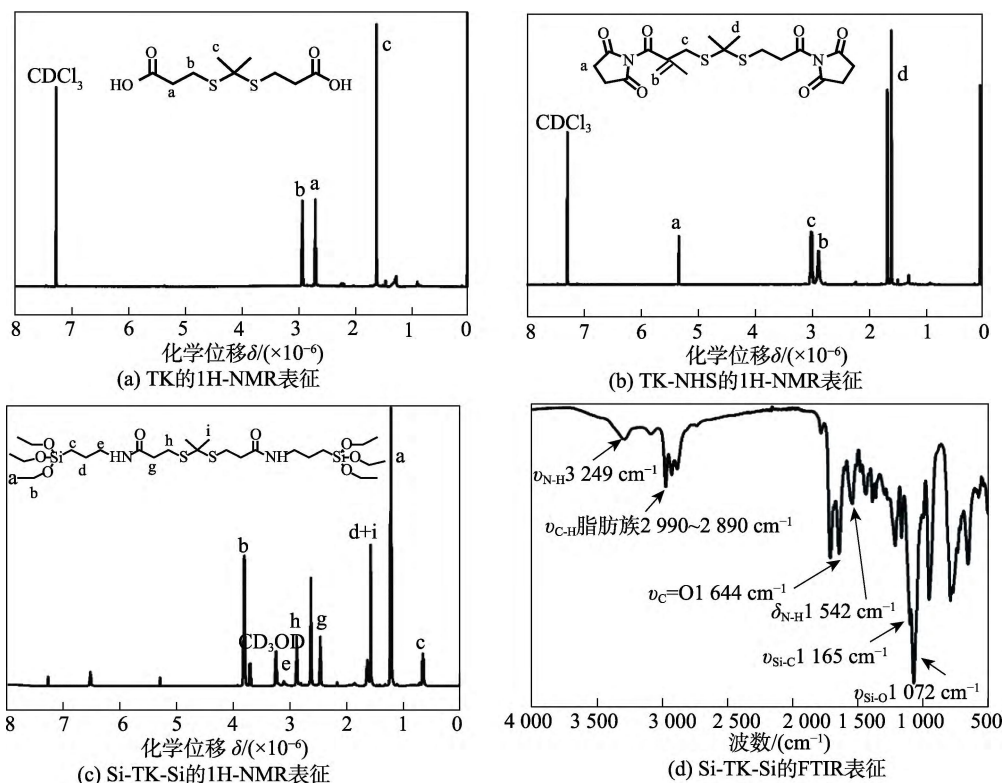


图 2 TK、TK-NHS 及 Si-TK-Si 的  $^1\text{H-NMR}$  表征和 Si-TK-Si 的 FTIR 表征

FTIR 特征峰 ( $3\ 249\ \text{cm}^{-1}$  处的  $\nu_{\text{N-H}}$ ,  $2\ 999\text{--}2\ 890\ \text{cm}^{-1}$  处脂肪族的  $\nu_{\text{C-H}}$ ,  $1\ 644\ \text{cm}^{-1}$  处  $\nu_{\text{C=O}}$ ,  $1\ 542\ \text{cm}^{-1}$  处  $\delta_{\text{N-H}}$ ,  $1\ 165\ \text{cm}^{-1}$  处的  $\nu_{\text{Si-C}}$  以及  $1\ 072\ \text{cm}^{-1}$  处的  $\nu_{\text{Si-O}}$ ) 也证实了 Si-TK-Si 的成功合成 (图 2(d))。u 为 vibration 的缩写, 表示红外光谱中的伸缩振动。

## 2.2 纳米粒子 Si@GFP 的粒径、形貌和体外蛋白释放行为

通过动态光散射法测得 Si@GFP 纳米粒子的粒径约为  $95\ \text{nm}$  (图 3(a))。电镜下 Si@GFP 纳米粒子呈现大小较为均一的球状形貌 (图 3(b)), 粒径约为  $95\ \text{nm}$ , 与动态光散射的测定结果一致。将无机硅纳米粒子 in-Si@GFP 和有机硅纳米粒子 Si@GFP 分别用  $1\ \text{mmol/L}\ \text{H}_2\text{O}_2$  处理  $6\ \text{h}$  后, 置于透射电子显微镜下观察。无机硅纳米粒子的结构仍保持完整, 没有显著变

化 (图 3(c)); 而有机硅纳米粒子则出现解体, 形貌发生显著变化, 表明有机硅纳米粒子 Si@GFP 具有很好的 ROS 响应性和可降解性。进一步通过模拟肿瘤内的微环境 (含  $100\ \mu\text{mol/L}\ \text{H}_2\text{O}_2$  的 PBS 溶液) 评价 ROS 响应性有机硅的蛋白体外释放行为。将 Si@GFP 和 in-Si@GFP 分别置于  $100\ \mu\text{mol/L}\ \text{H}_2\text{O}_2$  的环境下, 在不同时间点分析 GFP 的释放量 (图 3(d))。无论  $\text{H}_2\text{O}_2$  是否存在, 非 ROS 敏感的无机硅载体 in-Si@GFP 都没有 GFP 蛋白的释放行为。在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在的条件下, 有机硅载体 Si@GFP, 在与  $\text{H}_2\text{O}_2$  共孵育  $20\ \text{h}$  后, 超过 40% 的 GFP 蛋白从 Si@GFP 中释放出来 (图 3(e))。这些结果表明有机硅载体包载 GFP 蛋白后形成较为均一且粒径较小的球形纳米粒子, 并能够响应肿瘤细胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  的微环境, 将 GFP 蛋白从载体中释放出来。

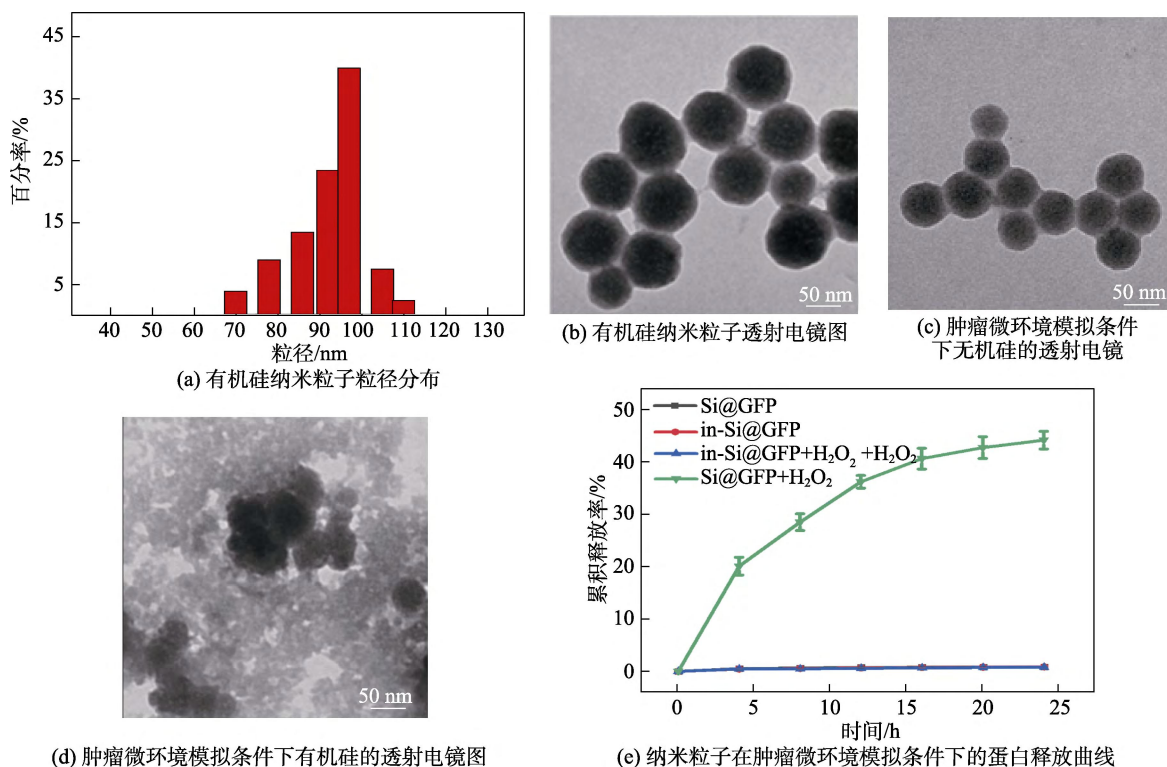


图 3 有机硅纳米粒子的粒径、形貌以及体外蛋白释放行为分析

## 2.3 定性和定量分析纳米粒子的细胞吸收能力

在不同时间点, 用倒置荧光显微镜定性分析载体负载 GFP 后进入细胞的能力, Hoechst 3324 标记的细胞核呈现蓝色荧光, GFP 蛋白呈现绿色荧光。Si@GFP 纳米粒子分别与细胞共孵育  $4、8、12$  和  $24\ \text{h}$  后, 观察纳米粒子进入细胞的情况 (图 4(a))。  $4\ \text{h}$  后细胞内可观察到明显的 GFP 蛋白的绿色荧光,  $8\ \text{h}$  后荧光强度达到最大, 随后荧光强度逐渐降低,  $24\ \text{h}$  绿色荧光几乎消失。这些结果表明 Si@GFP 纳米粒子可进入细胞内并可响应肿瘤细胞内富含  $\text{H}_2\text{O}_2$  的微环境而释放 GFP 蛋白; 共孵育  $12\ \text{h}$  后, GFP 蛋白在细胞内蛋白酶

的作用下发生降解。为了定量评价 Si@GFP 传输 GFP 蛋白的能力, 用流式细胞术分析经 Si@GFP 处理细胞中具有绿色荧光细胞所占的百分比, 从而定量评价 Si@GFP 将 GFP 传输到细胞内的能力。如图 4(b) 和 4(c) 所示, Si@GFP 与细胞共培养  $4\ \text{h}$  后, GFP 荧光阳性细胞所占百分比为  $51.9\%$ , 说明纳米载体可将 GFP 蛋白有效导入到细胞内。

## 2.4 Si@GFP 纳米粒子的安全性初步评价

将 Si@GFP 分别与正常肝细胞 LO2 和肿瘤细胞 4T1 进行共孵育, 运用 MTT 方法评价其对正常细胞和肿瘤细胞的细胞毒性。如图 5(a) 所示, Si@GFP 对 LO2

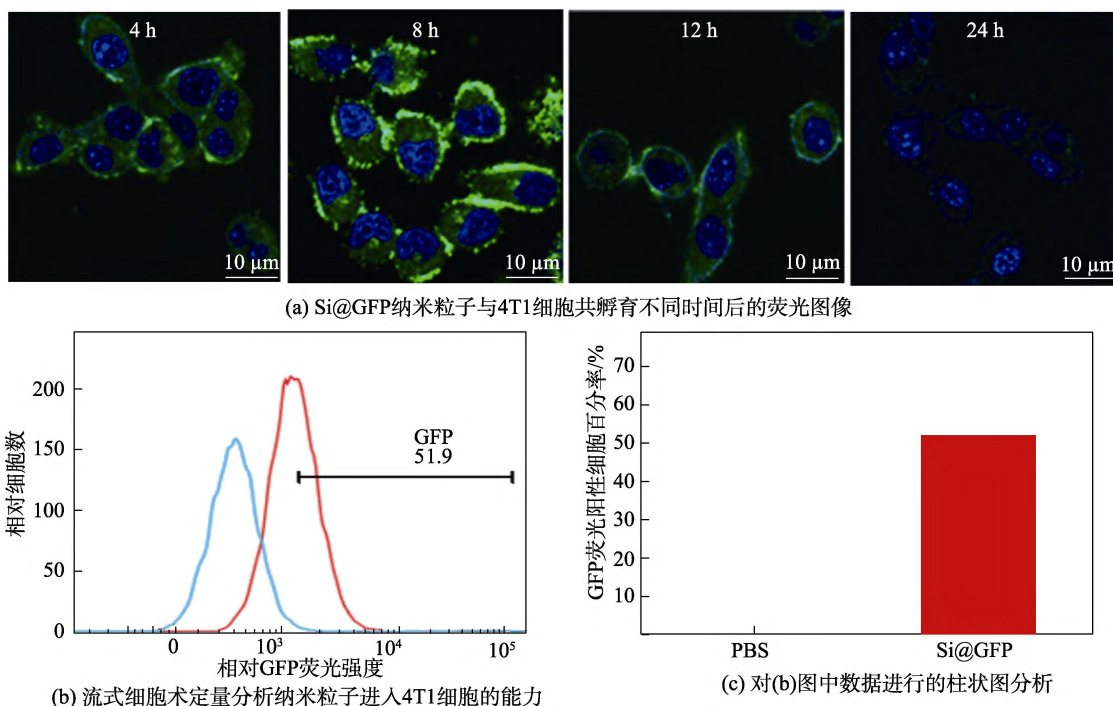


图 4 定性和定量分析纳米粒子的细胞吸收性能

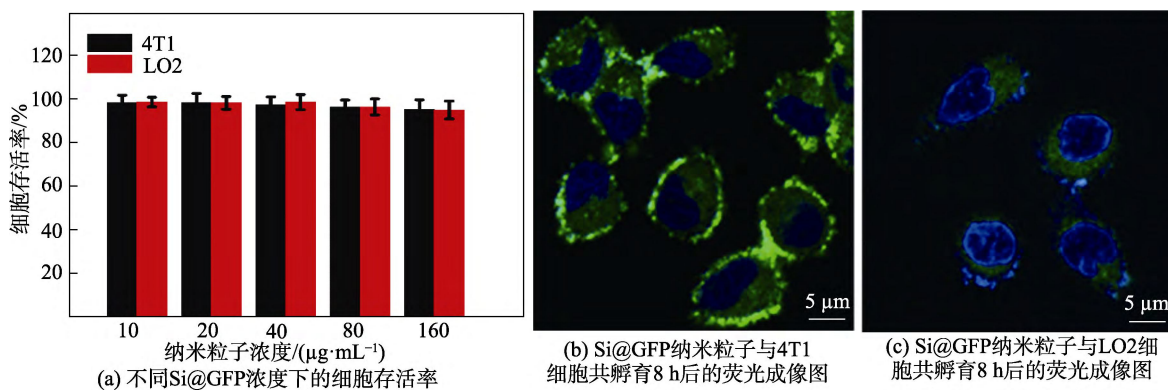


图 5 不同细胞对纳米粒子吸收性能的评价

和 4T1 细胞均没有显著的细胞毒性, 即使在 160  $\mu\text{g/mL}$  Si@GFP 的高浓度下, LO2 和 4T1 细胞仍然维持在约 100%, 这表明 Si@GFP 纳米粒子对正常肝细胞 LO2 和肿瘤细胞 4T1 均没有明显的细胞毒性, 这可能与有机硅载体的可降解性和硅元素的生物惰性有关。我们进一步评价了肿瘤细胞 4T1 和正常肝细胞 LO2 吸收 Si@GFP 的差异 (图 5(b) 和 5(c)), 细胞核经 Hoechst 3324 标记后呈现蓝色荧光, GFP 蛋白呈现出绿色荧光。共孵育 8 h 后, 肿瘤细胞 4T1 内 GFP 蛋白的绿色荧光明显强于正常肝细胞 LO2, 表明肿瘤细胞更易于吸收 Si@GFP 纳米粒子。

### 3 讨论

多学科融合是生物材料发展的重要策略, 杂化生物材料是最能体现生物材料多学科交叉融合特性的一类材料。杂化生物材料结合了多种材料的优点, 通过

取长补短来提高材料的综合性能, 也极大地丰富了生物材料的种类。无机硅材料是生物惰性材料, 而且具有原料易得和产品易制备的特点, 使其在生物材料中有较为广泛的研究和应用<sup>[6]</sup>。然而, 不可降解性是无机硅材料自身难以避免的短板, 限制了其在医疗健康领域的应用范围。近年来, 研究者通过杂化材料策略发展的有机硅材料, 克服了无机硅材料难以降解的问题, 改善了单一材料的理化特性, 使得硅材料再次引发关注, 是杂化材料策略促进生物材料发展的典型实例。

本综合实验通过将 ROS 敏感的 TK 有机结构引入硅烷中, 使学生亲身体验杂化材料的研发思路和技术; 在合成和表征 ROS 敏感的有机硅烷的实验中, 需要使用缩酮反应、羧基活化以及酰胺化等多种反应和表征手段, 训练了学生的多步合成和多种表征分析手段联用的能力, 使学生可以较好地应对后续工作和学习中可能遇到的复杂合成和表征工作; 也囊括了材料学与

生命科学的多学科知识,能够满足对高年级本科生和研究生综合交叉研究能力培养的需求,是一个较为适宜的高阶生物材料综合实验。

#### 4 结语

本综合实验设计了 ROS 敏感有机硅烷的合成与表征、反相纳米乳液联合溶胶-凝胶反应制备有机硅纳米粒子、纳米粒子的形貌表征、环境响应性能和蛋白传输能力评价等内容,综合应用了无机、有机以及高分子化学与物理等多种材料学科的知识技能,并结合了生物医学功能评价的知识技能。实验操作涉及核磁共振波谱仪、红外光谱仪、动态光散射仪、倒置荧光显微镜、流式细胞仪等设备,可培养学生对多学科仪器设备的实操能力。通过跨学科理论知识的综合应用和多学科实验技能的实操训练,可以满足培养多学科交叉研究能力和高素质创新性人才的需求。

#### 参考文献 (References)

- [1] 杨芳, 童杨, 顾宁. 纳米生物材料的研究进展与发展趋势[J]. 中国基础科学, 2022, 24(1): 46–56.  
YANG F, TONG Y, GU N. Research progress and development trend of nanobiomaterials[J]. China Basic Science, 2022, 24(1): 46–56. (in Chinese)
- [2] 罗璐, 李建树, 杨佼佼. 多学科交叉下的生物材料导论硕士研究生课程教学方法探讨[J]. 教育教学论坛, 2020(49): 333–334.  
LUO J, LI J S, YANG J J. Discussion on teaching methods of the graduate's course in introduction of biomaterials in the multidisciplinary cross-cutting context[J]. Education Teaching Forum, 2020(49): 333–334. (in Chinese)
- [3] 程度, 陈极峰, 余东升. 小分子药物传输载体综合实验设计[J]. 实验技术与管理, 2021, 38(12): 43–47.  
CHENG D, CHEN J F, YU D S. Integrated experiment design of small molecule drug delivery carrier[J]. Experimental Technology and Management, 2021, 38(12): 43–47. (in Chinese)
- [4] 程度, 李晓霞, 乔立红. 基因传输载体综合实验设计[J]. 实验室研究与探索, 2020, 39(8): 22–26, 55.  
CHENG D, LI X X, QIAO L H. Design of integrated experiment for polymeric gene delivery carrier[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2020, 39(8): 22–26, 55. (in Chinese)
- [5] 王建方, 邢欣, 吴文健, 等. 生物材料学课程的设置与改革思考[J]. 高等教育研究学报, 2011, 34(1): 95–97.  
WANG J F, XING X, WU W J, et al. Consideration of biomaterials science course and its reform[J]. Journal of Higher Education Research, 2011, 34(1): 95–97. (in Chinese)
- [6] CROISSANT J G, FATIEIEV Y, ALMALIK A, et al. Mesoporous silica and organosilica nanoparticles: Physical chemistry, biosafety, delivery strategies, and biomedical applications[J]. Advanced Healthcare Materials, 2018, 7(4): 1700831.
- [7] HE Q, ZHANG J, SHI J, et al. The effect of pegylation of mesoporous silica nanoparticles on nonspecific binding of serum proteins and cellular responses[J]. Biomaterials, 2010, 31(6): 1085–1092.
- [8] WANG Z, CHANG Z, LU M, et al. Shape-controlled magnetic mesoporous silica nanoparticles for magnetically-mediated suicide gene therapy of hepatocellular carcinoma[J]. Biomaterials, 2018, 154: 147–157.
- [9] XING Y, PENG J, XU K, et al. Polymerizable molecular silsesquioxane cage armored hybrid microcapsules with in situ shell functionalization[J]. Chemistry-A European Journal, 2016, 22(6): 2114–2126.
- [10] NAKAMURA M, ISHIMURA K. Synthesis and characterization of organosilica nanoparticles prepared from 3-mercaptopropyltrimethoxysilane as the single silica source[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2007, 111(51): 18892–18898.
- [11] DENG S H, LI X X, LIU S S, et al. Codelivery of CRISPR-Cas9 and Chlorin e6 for spatially controlled tumor-specific gene editing with synergistic drug effects[J]. Science Advances, 2020, 6(29): eabb4005.
- [12] CHENG J J, TEPLY B A, SHERIFI I, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery[J]. Biomaterials, 2007, 28(5): 869–876.
- [13] CHEN W C, YUAN Y Y, CHENG D, et al. Co-delivery of doxorubicin and siRNA with reduction and pH dually sensitive nanocarrier for synergistic cancer therapy[J]. Small, 2014, 10(13): 2678–2687.
- [14] PRASETYANTO E A, BERTUCCI A, SEPTIADI D, et al. Breakable hybrid organosilica nanocapsules for protein delivery [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2016, 128(10): 3384–3388.
- [15] YU Y F, CHEN J, LIU S, et al. ROS-responsive organosilica nanocarrier for the targeted delivery of metformin against cancer with the synergistic effect of hypoglycemia[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2021, 9(30): 6044–6055.
- [16] LU N, FAN W, YI X, et al. Biodegradable hollow mesoporous organosilica nanotheranostics for mild hyperthermia-induced bubble-enhanced oxygen-sensitized radiotherapy[J]. ACS Nano, 2018, 12(2): 1580–1591.
- [17] WU M, MENG Q, CHEN Y, et al. Large pore-sized hollow mesoporous organosilica for redox-responsive gene delivery and synergistic cancer chemotherapy[J]. Advanced Materials, 2016, 28(10): 1963–1969.

(编辑: 张利芳)