

5 nm 金纳米颗粒对大鼠皮质神经元的作用及机制初探

吴玉芸,刘正霞,郭志睿,刘莹,鲁翔*

(南京医科大学第二附属医院老年医学科,江苏 南京 210011)

[摘要] **目的:**探讨直径 5 nm 的小尺寸金纳米颗粒(gold nanoparticles,GNPs)对大鼠皮质神经元细胞的作用及相关机制。**方法:**使用硼氢化钠还原法制备 GNPs,用透射电镜(TEM)及紫外-可见光光谱(UV-Vis)进行鉴定。用 5% 牛血清白蛋白(BSA)对 GNPs 进行包裹提纯后制备成不同浓度(600、1 200、2 400 $\mu\text{g/L}$)的 GNPs 培养液。采用免疫荧光染色鉴定原代培养的大鼠皮质神经元纯度。体外培养原代大鼠皮质神经元 72 h 后,以正常培养的神经元为对照组,以不同浓度 GNPs 溶液孵育 48 h 后的神经元作为实验组。采用 TEM 观察 GNPs 在细胞内的分布;采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力;采用 TUNEL 法检测细胞凋亡;采用丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒检测氧化应激水平。**结果:**TEM 及 UV-Vis 显示硼氢化钠还原法制备的 GNPs 呈尺寸均一的球形,在溶液中均匀分散。原代培养的大鼠皮质神经元纯度为(82.0 \pm 2.3)%。GNPs 主要以聚合体形式分布于胞浆、溶酶体、囊泡中。随着 GNPs 浓度的增高,细胞活性逐渐降低,尤其 1 200 和 2 400 $\mu\text{g/L}$ 处理组细胞活力较对照组显著降低($P < 0.05$)。TUNEL 染色结果显示,随着 GNPs 浓度的增高,凋亡细胞数逐渐增加,1 200 和 2 400 $\mu\text{g/L}$ 处理组细胞凋亡明显,具有显著性差异($P < 0.05$)。随着 GNPs 浓度的增高,细胞内 MDA 含量逐渐增加,SOD 含量逐渐减少,1 200 和 2 400 $\mu\text{g/L}$ 处理组与对照组相比 MDA 含量显著升高,SOD 含量显著降低($P < 0.05$)。**结论:**5 nm GNPs 能降低大鼠皮质神经元的细胞活力,促进其凋亡,其机制可能与氧化应激损伤相关。

[关键词] 金纳米颗粒;大鼠皮质神经元;细胞凋亡;氧化应激

[中图分类号] R743

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)07-811-06

doi:10.7655/NYDXBNS20160710

Effects of 5 nm gold nanoparticles on rat cortical neurons and relative mechanism

Wu Yuyun, Liu Zhengxia, Guo Zhirui, Liu Ying, Lu Xiang*

(Department of Geriatrics, the Second Affiliated Hospital, NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the effects of 5 nm gold nanoparticles (GNPs) on newborn rat cortical neurons and the underlying mechanism. **Methods:**GNPs were prepared by the NaBH₄ reduction method. Transmission electron microscope(TEM) and ultraviolet-visible (UV-Vis) spectra were obtained to characterize GNPs. Immunofluorescence staining was performed to indentify primary neurons and calculate the purity. After culture for 72 h, primary cortical neurons were incubated with neuron culture medium with(600, 1 200, 2 400 $\mu\text{g/L}$) or without GNPs for 48 h. TEM was used to investigate the cellular uptake and distribution of GNPs; Cell counting kit-8 (CCK-8) was employed to evaluate cell viability; TUNEL assay was performed to analyze apoptosis; MDA and SOD were measured to assess oxidative stress. **Results:**TEM and UV-Vis showed that GNPs were homogeneous in size and shape and well dispersed in culture medium. The purity of primary neurons was (82.7 \pm 2.3)%. GNPs were mainly distributed in cytoplasm, lysosomes and vesicles. The cell viability was found to decrease with increasing concentrations of GNPs ($P < 0.05$). In addition, GNPs were found to induce apoptosis in neurons. Particularly, higher concentrations (1 200 $\mu\text{g/L}$ and 2 400 $\mu\text{g/L}$) markedly increased neural apoptosis ($P < 0.05$). Furthermore, our results suggested pro-oxidant ability of 5 nm GNPs, which is supported by escalating MDA and reducing SOD along with increasing concentrations of GNPs ($P < 0.05$). **Conclusion:**Five nm GNPs can significantly reduce cell viability and induce apoptosis in newborn rat cortical neurons, which potentially links to oxidative stress.

[Key words] gold nanoparticles (GNPs); rat cortical neuron; cell apoptosis; oxidative stress

[Acta Univ Med Nanjing,2016,36(07):811-816]

[基金项目] 国家自然科学基金(81300999,81470501)

*通信作者(Corresponding author),E-mail;luxiang66@njmu.edu.cn

随着人口老龄化的加快,脑卒中发病率逐年提高,居中国死因排名第二,严重危害人类生命健康。缺血性脑卒中约占卒中患者总数 70%~80%,其发生率高、致残率高、复发率高,严重影响患者的生存和生活质量^[1]。目前缺血性脑卒中的治疗方法有很多,如抗血小板聚集、改善脑循环、降低颅内压、清除氧自由基、改善脑代谢等,但这些方法均未能能在临床实验中达到理想的治疗效果^[2]。许多在体外实验中证实具有神经保护功能的药物,在体内实验中并未表现出有益性^[3],原因可能是药物在传递到靶细胞前被降解,细胞对药物吸收有限,或者难以通过血脑屏障等^[4]。

金纳米颗粒(gold nanoparticles,GNPs)是指直径为 1~100 nm 的微小金颗粒,具有独特的理化性质,如表面效应、量子尺寸效应、小尺寸效应、等离子共振等^[5]。GNPs 具有良好的生物相容性,在生物医学领域已有广泛应用,如肿瘤治疗、生物成像、生物传感、药物载体等^[6]。目前已有许多文献报道 GNPs 药物载体的作用。Seo 等^[7]发现将 5~20 nm GNPs 与抗肿瘤药物结合后能实现药物的定向运输,大大增加其抗肿瘤效果。Kim 等^[8]发现,将甲氨蝶呤与 135 nm GNPs 结合后可以用于光化学疗法并增强其对类风湿性关节炎的治疗效果。而且,有学者指出小尺寸 GNPs 比表面积大,很大程度提高药物传递效率^[9],更有利于发挥其药物载体的作用。然而,随着 GNPs 在医药领域的应用,其产生的细胞毒性也逐渐引起学者的重视^[10]。一部分研究发现,GNPs 产生的细胞毒性与其尺寸密切相关。Pan 等^[11]发现 1.4 nm GNPs 在低浓度就能对结缔组织成纤维细胞、上皮细胞、黑素瘤细胞、巨噬细胞产生细胞毒性,而 15 nm GNPs 在 60~100 倍浓度时仍未表现出细胞毒性。Lee 等^[12]研究结果显示 5 nm GNPs 较 100 nm GNPs 对人神经前体细胞表现出更强的细胞毒性。这些结果说明,小尺寸 GNPs 更有可能产生细胞毒性。

将 GNPs 尤其是小尺寸 GNPs 作为药物载体,可有效改善药物的血脑屏障通过率^[13],为缺血性脑卒中的药物治疗提供了可能。然而,由小尺寸带来的细胞毒性也不容忽视。因此,筛选出尺寸合适的 GNPs 对其在缺血性脑卒中治疗中的应用至关重要。目前关于小尺寸 GNPs 的细胞毒性研究较多^[14],而对神经元的作用仍不清楚,因此,本研究旨在探讨 5 nm GNPs 对大鼠皮质神经元的作用及相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

新生 24 h 内的 SD 大鼠购于南京医科大学实验动物中心,所有的实验步骤均符合南京医科大学实验动物伦理委员会实验动物管理条例。

1.1.2 主要试剂

CCK-8 试剂盒 (Biosharp 公司,美国),TUNEL 试剂盒 (Roche 公司,德国),MDA 检测试剂盒 (南京凯基公司),SOD 检测试剂盒 (上海碧云天公司),DMEM/F12 完全培养基、FBS、青霉素/链霉素、Neurobasal-A 培养液、B27、胰酶 (Gibco 公司,美国),BSA (Roche 公司,德国),DNA 酶 (Sigma 公司,美国),抗 NSE 抗体 (Proteintech 公司,美国),羊抗兔抗体 (杭州联科生物技术股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 GNPs 的制备及修饰

使用硼氢化钠还原法制备 5 nm GNPs。先用去离子水配制 80 mL 含有 0.25 mmol/L 氯金酸和 0.25 mmol/L 柠檬酸钠的混合液,在室温高速搅拌下快速加入新配制的 2 mL 100 mmol/L 的硼氢化钠溶液,搅拌 5 min 后,室温放置 2 h。

将制备好的 5 nm GNPs 原液以 1:4 的比例与 5% BSA (去离子水配) 搅拌包裹 30 min,20 000 r/min 离心 1 h,弃上清,再以含 2% B27 的 Neurobasal-A 培养液重悬 5 nm GNPs 沉淀,获得浓度分别为 0、600、1 200、2 400 $\mu\text{g/L}$ 的 5 nm GNPs 培养液。

1.2.2 大鼠皮质神经元原代培养

取新生 24 h 内的 SD 大鼠,雌雄不限,75% 酒精浸泡消毒 1 min,在冰上预冷的 PBS 中,剪开皮肤与颅骨,用弯镊取出两侧大脑半球,于显微镜下剥离脑膜,分离脑皮质,并剪碎。将准备好的皮层组织转移到无菌的小三角烧瓶中,加入适量 0.25% 含 EDTA 的胰酶和 DNA 酶,于 37℃ 恒温水浴锅中震荡消化 7 min,消化完成后,用等体积含 10% FBS 的 DMEM 培养液终止消化,并轻柔吹打制成细胞悬液。将细胞悬液经 200 目滤网过滤后转移至离心管中,以 1 000 r/min,4℃ 的条件离心 5 min,弃上清,用 10% FBS 的 DMEM 培养液重悬,并计数。将细胞悬液接种在预先 0.1 mg/mL 多聚赖氨酸 (PLL) 包被的培养板中,于 37℃ 恒温培养箱 (5% CO₂,95% O₂) 中培养,4 h 后全换为含 2% B27 的 Neurobasal-A 培养液。

1.2.3 大鼠皮质神经元免疫荧光鉴定

采用神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫荧光技术鉴定神经元。取体外培养 5 d 的大鼠皮质神经元,吸去培养液,用 PBS 洗 2 遍,4%多聚甲醛室温下固定。30 min 后,PBS 清洗 3 遍,用内含 1% Triton X-100 的 5% BSA 透化 1 h,然后用抗 NSE 的兔抗鼠多克隆一抗按照 1:100 的比例 4℃孵育过夜。次日 PBS 清洗 3 次后,用 Dylight 549-TFP 标记的羊抗兔二抗按照 1:100 的比例避光孵育 1 h,PBS 清洗 3 次,用 DAPI 染核 5 min,最后 PBS 清洗 1 遍,用荧光显微镜观察。随机取 3 个视野,计算阳性细胞数占总细胞数的百分比,即为神经元纯度。

1.2.4 透射电子显微镜(TEM)观察 GNP 在细胞内的分布

加入 2 400 $\mu\text{g/L}$ GNP 培养液培养 48 h 后,吸去培养液,PBS 洗 3 次,然后用 0.25% 含 EDTA 的胰酶消化成单个细胞悬液,以 4 000 r/min、4℃离心 10 min,去上清,加入 3.7%甲醛溶液,室温 20 min 固定细胞。再用四氧化锇固定细胞 2 h,乙醇梯度脱水(30%、50%、70%、80%、90% 乙醇各 1 次,100% 乙醇脱 3 次,每次 15 min),然后用环氧丙烷洗涤细胞 2 次,agar-100 树脂(PLANO 公司,德国)包被样品后在 60℃聚合,48 h 后使用超薄切片机(Leica Microsystems 公司,德国)切片,放置于铜网上,在柠檬酸铅的醇溶液中用乙酸铀酰染色。透射电子显微镜 JEM-2100EX(JEOL,日本)观察并拍照。

1.2.5 细胞活性检测

种植在 96 孔板中的大鼠皮质神经元培养 72 h 后分成对照组及不同浓度(600、1 200、2 400 $\mu\text{g/L}$) GNP 处理组。继续孵育 48 h 后,弃培养液,换成不含 GNP 的神经元培养液 100 μL ,往每孔内加入 10 μL 细胞活力检测液,于温箱内继续孵育。4 h 后用全自动酶标仪测定 450 nm 波长下的吸光度。进行 3 次重复实验后统计细胞活性。

1.2.6 细胞凋亡检测

采用 TUNEL 法原位检测细胞凋亡。大鼠皮质神经元于玻璃爬片上培养 72 h 后分成对照组及不同浓度(600、1 200、2 400 $\mu\text{g/L}$) GNP 处理组。继续孵育 48 h 后,弃培养液,用 PBS 清洗 2 次,然后用 4% 多聚甲醛在室温下固定,1 h 后用 PBS 清洗 2 次,用 1% Triton X-100 4℃透化 2 min,透化的同时按照说明书配制好 TUNEL 反应混合液,透化完成后每孔加入 50 μL 反应混合液,37℃避光孵育,1 h 后 PBS 清洗 3 次,再用 DAPI 染色 5 min,PBS 清洗 1 遍后,每组随机取 3 个视野,在荧光显微镜下拍照

并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率=TUNEL 染色阳性细胞数/DAPI 染色阳性细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.7 氧化应激水平检测

种植在 6 孔板中的大鼠皮质神经元培养 72 h 后分成对照组及不同浓度(600、1 200、2 400 $\mu\text{g/L}$) GNP 处理组。继续孵育 48 h 后,弃培养液,用 PBS 洗 2 次,0.25% 含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞。每组计数 1×10^6 个,4 000 r/min、4℃离心 10 min,去除上清,留细胞沉淀备用。

MDA 测定:细胞沉淀中加 1 mL 预冷的 RIPA 细胞裂解液,于冰上裂解 20 min,每 5 min 剧烈震荡 1 次,裂解完成后 12 000 g、4℃离心 5 min,每个样品取上清 200 μL ,根据 MDA 试剂盒说明书进行测定。根据标准曲线,计算得出每组相应的 MDA 含量值。每组进行 3 次重复实验。

SOD 测定:细胞沉淀中加 200 μL PBS,在冰浴条件下进行匀浆,获得的匀浆液以 1 000 g、4℃离心 5 min,取上清根据 SOD 试剂盒说明书进行测定。每组进行 3 次重复实验。

1.3 统计学方法

使用 SPSS17.0 软件进行数据处理。所有数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据比较使用单因素方差分析或 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GNP 的合成与鉴定

TEM 和 UV-vis 是对 GNP 进行表征的常用方法^[15]。TEM 显示 GNP 呈现尺寸均一的球形,直径约为 5 nm,在溶液中均匀分散(图 1A)。UV-vis 显示 GNP 在 504 nm 处呈现单一尖锐的吸收峰(图 1B)。经典的计算球形 GNP 光学吸收峰的 Mie 理论认为^[16],球形的 GNP 的吸收峰是单峰,峰型越尖锐,则说明单分散性越佳,而且尺寸越大的球形金纳米颗粒,其吸收峰对应的波长位置数也越大。本文中 UV-vis 吸收峰位于 504 nm,说明合成的纳米颗粒尺寸非常小,进一步定性地支持了透射电镜的表征结果。

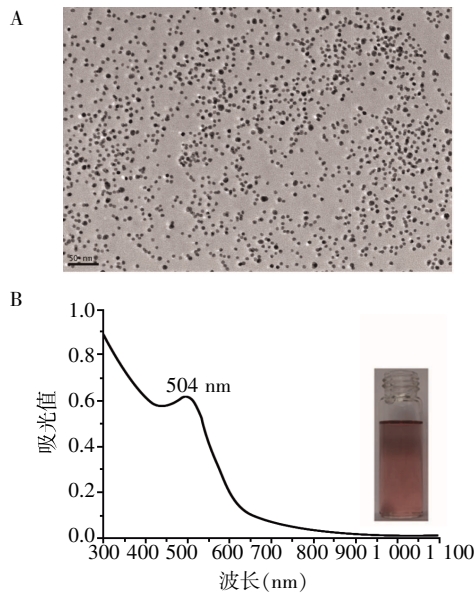
2.2 神经元免疫荧光染色

根据神经元 NSE 免疫荧光染色结果,随机选取 3 个视野,计算所得的神经元纯度为(82.7 \pm 2.3)%。

2.3 GNP 在神经元内的分布

TEM 观察显示:神经元内可见大量 GNP,主要以聚合体形式分布于细胞胞浆、溶酶体以及囊泡中(图 2)。

2.4 GNP 对神经元细胞活力的影响



A:GNPs 的 TEM 照片($\times 35\ 000$);B:GNPs 的 UV-Vis 和数码照片。

图 1 金纳米颗粒的合成与鉴定

Figure 1 Synthesis and characterization of GNPs

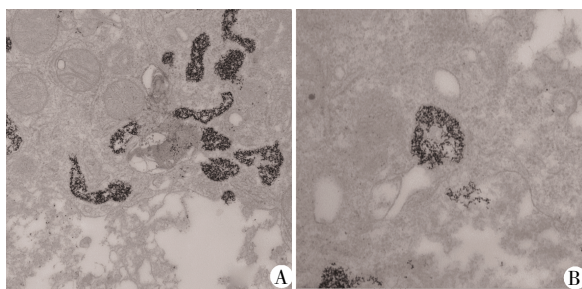
在细胞活力分析实验中,将对照组细胞活性定义为 100%。与对照组相比,600、1 200 和 2 400 $\mu\text{g/L}$ GNPs 处理组神经元细胞活力分别为:(81.06 \pm 18.44)%、(74.42 \pm 7.15)% 和 (69.10 \pm 7.57)%。随着 GNPs 浓度的增加,细胞活性逐渐下降,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。

2.5 GNPs 对细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果显示:与对照组相比,600、1 200 和 2 400 $\mu\text{g/L}$ GNPs 处理组神经元细胞凋亡率分别为:(109.57 \pm 35.21)%、(184.24 \pm 11.59)% 和 (261.82 \pm 25.01)% ,提示 GNPs 对神经元细胞具有显著的促凋亡作用,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$,图 4)。

2.6 GNPs 对氧化应激的影响

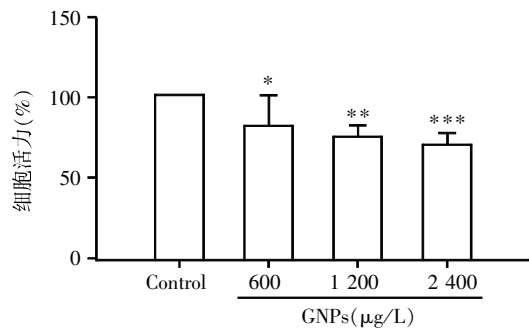
将对照组细胞 MDA、SOD 均定义为 100%。与



A:50 000 倍 TEM 照片;B:80 000 倍 TEM 照片。

图 2 TEM 观察金纳米颗粒在细胞内的分布

Figure 2 Intracellular distribution of GNPs observed by TEM



与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 3 金纳米颗粒对大鼠皮质神经元细胞活性的影响

Figure 3 Effect of GNPs on cell viability in rat cortical neurons

对照组相比,600、1 200 和 2 400 $\mu\text{g/L}$ 的金纳米颗粒处理 48 h 后,随着 GNPs 浓度的增加,细胞内 MDA 含量逐渐增加,其中 1 200、2 400 $\mu\text{g/L}$ 组细胞 MDA 较对照组明显增高 ($P < 0.05$),而 SOD 含量逐渐减少,600、1 200 和 2 400 $\mu\text{g/L}$ GNPs 处理组较对照组均有显著性差异 ($P < 0.05$),提示 GNPs 在神经元细胞内具有促氧化应激的作用,并且随着 GNPs 浓度的增高而增强(图 5)。

3 讨论

本研究结果显示,5 nm GNPs 能明显降低大鼠皮质神经元的细胞活力,增加其凋亡率,且具有浓度-效应关系。细胞氧化应激水平检测结果显示,5 nm GNPs 能显著升高细胞内 MDA 水平,降低 SOD 水平,提示其引起细胞损伤的机制可能与氧化应激相关。

目前关于 GNPs 细胞毒性的报道结论不一。Leite 等^[17]认为 GNPs 本身对细胞并没有毒性。他发现 4.8 nm GNPs 并没有影响骨骼肌细胞 C2C12 活性,但它改变了细胞的生理状态,使其更易接受死亡刺激。然而,更多的学者认为 GNPs 能对细胞产生毒性,但产生细胞毒性的原因尚无定论。部分学者认为 GNPs 的细胞毒性可能与制备方式相关。Freese 等^[18]发现,GNPs 对人上皮细胞和内皮细胞的毒性与颗粒表面的柠檬酸含量有关,含量越多,对细胞的毒性就越大。Sathishkumar 等^[19]发现,用生物制备方法替代传统制备方法后,GNPs 的细胞毒性大大降低。而另一部分学者认为 GNPs 的细胞毒性可能与其尺寸密切相关。Coradeghini 等^[20]报道称,用 GNPs 孵育鼠成纤维细胞后,GNPs 吸收随时间延长而增加,造成的细胞毒性呈量效关系,且 5 nm 的细胞毒性较 15 nm 更明显,这提示小尺寸 GNPs 更易产生细

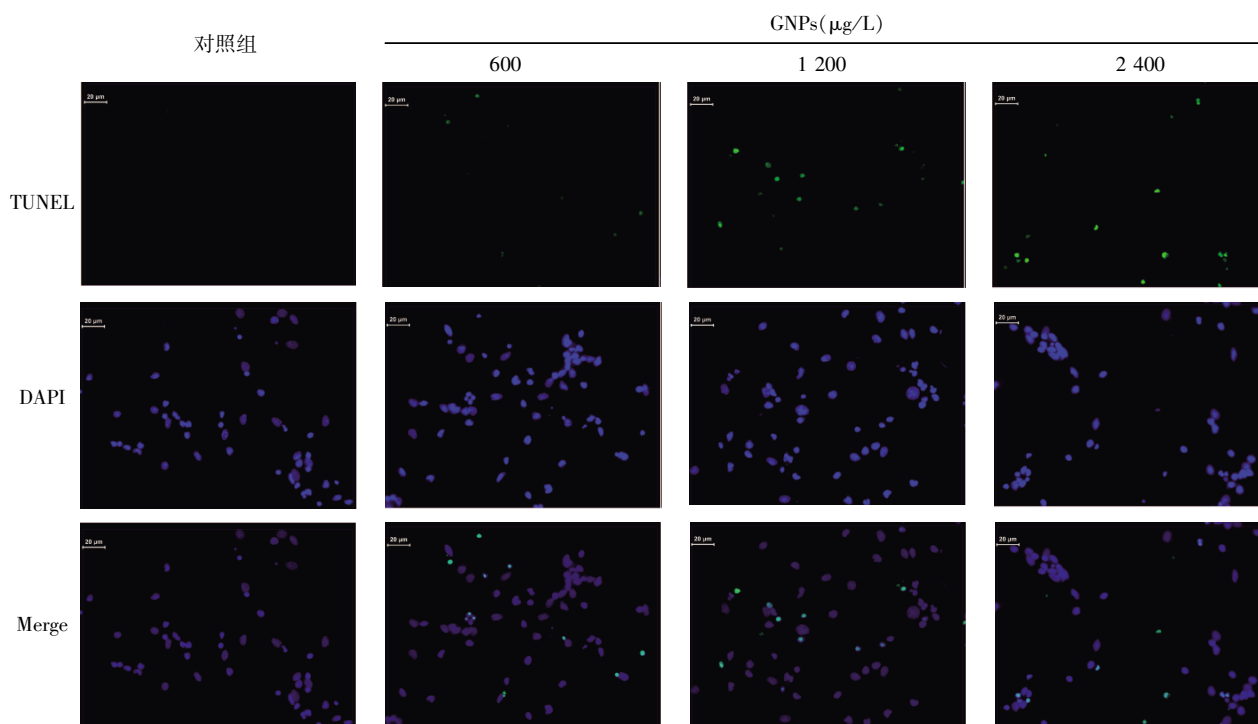
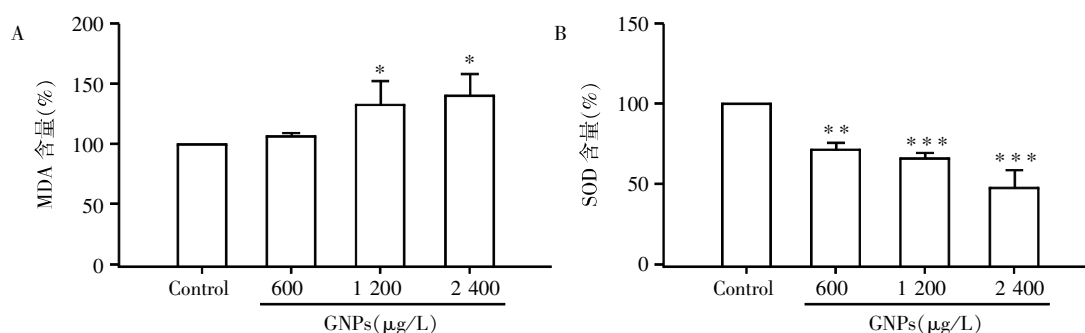


图 4 金纳米颗粒对大鼠皮质神经元凋亡的影响($\times 400$)

Figure 4 Effect of GNPs on apoptosis in rat cortical neurons($\times 400$)



A: 金纳米颗粒对 MDA 含量的影响($n=3$); B: 金纳米颗粒对 SOD 含量的影响($n=3$); 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 金纳米颗粒对大鼠皮质神经元氧化应激的影响

Figure 5 Effect of GNPs on oxidative stress in rat cortical neurons

胞毒性。本研究中,采用鞣酸法制备 GNPs,但经过 5% BSA 修饰提纯,所以笔者推测,本研究中 GNPs 对神经元表现出的细胞毒性是由其尺寸引起。

随着 GNPs 浓度的增加,神经元细胞内脂质过氧化产物 MDA 含量明显增高,抗氧化酶 SOD 含量则明显降低,这提示 GNPs 能够显著提高细胞内氧化应激水平。目前关于小尺寸 GNPs 引起细胞毒性的确切机制尚不明确。多数研究认为活性氧(ROS)是小尺寸 GNPs 产生细胞毒性的主要原因。Ito 等^[21]发现,15 nm GNPs 能催化 MCF-7 和 HepG2 产生 ROS,过量产生的 ROS 会攻击细胞内线粒体和微粒体,导致细胞损伤甚至凋亡。Mythch 等^[22]研究发现 5 nm GNPs 通过促进氧化应激和激活 NF- κ B 通路

导致人星形胶质细胞死亡。Di Guglielmo 等^[23]研究发现,12 nm GNPs 能通过诱导氧化应激间接导致 DNA 损伤,造成细胞毒性。这些结果都与本研究结果一致。然而,也有一部分学者提出了其他的观点。Chuang 等^[24]将 3 种尺寸(10 nm \times 39 nm、10 nm \times 41 nm、10 nm \times 45 nm)的 GNPs 分别作用于 6 种细胞(人胃腺癌细胞、人肺腺癌上皮细胞、人正常肺组织细胞、鼠胚胎纤维母细胞、猪肾细胞、非洲绿猩猩肾细胞)后发现,GNPs 通过诱导细胞凋亡和延长细胞周期发挥其细胞毒性作用,且毒性强弱根据细胞种类不同有所区别。而 Liu 等^[25]认为,14 nm GNPs 作用于 RAW264.7 细胞能促进炎症介质的表达,从而造成免疫毒性。对此,笔者认为,GNPs 产生细胞毒

性的机制十分复杂,确切的机制仍待进一步研究。

本实验发现 5 nm GNPs 对大鼠皮质神经元存在细胞毒性作用,其损伤机制可能与氧化应激有关。较小的尺寸可能是其引起毒性的主要原因。因此,下一步计划选择 GNPs 的合适尺寸,为缺血性脑卒中的治疗筛选出适合的药物载体。

[参考文献]

- [1] Liu Z,Zhang L,He Q,et al. Effect of baicalin-loaded PEGylated cationic solid lipid nanoparticles modified by OX26 antibody on regulating the levels of baicalin and amino acids during cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *Int J Pharm*,2015,489(1/2):131-138
- [2] 袁志俊,李小刚. 干细胞治疗缺血性脑卒中的研究进展 [J]. *中国组织工程研究*,2013,17(45):7954-7960
- [3] Diener HC,Lees KR,Lyden P,et al. NXY-059 for the treatment of acute stroke:pooled analysis of the SAINT I and II Trials[J]. *Stroke*,2008,39(6):1751-1758
- [4] Thompson BJ,Ronaldson PT. Drug delivery to the ischemic brain[J]. *Adv Pharmacol*,2014,71:165-202
- [5] Cheng LC,Jiang X,Wang J,et al. Nano-bio effects:interaction of nanomaterials with cells[J]. *Nanoscale*,2013,5(9):3547-3569
- [6] 周国强,陈春英,李玉锋,等. 纳米材料生物效应研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*,2008,35(9):998-1006
- [7] Seo JM,Kim EB,Hyun MS,et al. Self-assembly of biogenic gold nanoparticles and their use to enhance drug delivery into cells [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*,2015,135(7):27-34
- [8] Kim HJ,Lee SM,Park KH,et al. Drug-loaded gold/iron/gold plasmonic nanoparticles for magnetic targeted chemo- photothermal treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Biomaterials*,2015,61(8):95-102
- [9] Dreaden EC,Austin LA,Mackey MA,et al. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery [J]. *Ther Deliv*,2012,3(4):457-478
- [10] Tang Y,Shen Y,Huang L,et al. *In vitro* cytotoxicity of gold nanorods in A549 cells [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*,2015,39(2):871-878
- [11] Pan Y,Neuss S,Leifert A,et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles [J]. *Small*,2007,3(11):1941-1949
- [12] Lee U,Yoo CJ,Kim YJ,et al. Cytotoxicity of gold nanoparticles in human neural precursor cells and rat cerebral cortex [J]. *J Biosci Bioeng*,2016,12(3):341-344
- [13] Li CH,Shyu MK,Jhan C,et al. Gold nanoparticles increase endothelial paracellular permeability by altering components of endothelial tight junctions,and increase Blood-Brain barrier permeability in mice [J]. *Toxicol Sci*,2015,148(1):192-203
- [14] 吴玉呈,刘正霞,郭志睿,等. 金纳米颗粒对人肺腺癌细胞株 A549 的毒性效应[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2014,34(4):417-421
- [15] Manju S,Malaikozhundan B,Vijayakumar S,et al. Antibacterial,antibiofilm and cytotoxic effects of Nigella sativa essential oil coated Gold nanoparticles [J]. *Microb Pathog*,2016,91(2):129-135
- [16] Liu X,Xu H,Xia H,et al. Rapid seeded growth of monodisperse,quasi-spherical,citrate-stabilized gold nanoparticles via H₂O₂ reduction[J]. *Langmuir*,2012,28(38):13720-13726
- [17] Leite PE,Pereira MR,Santos CA,et al. Gold nanoparticles do not induce myotube cytotoxicity but increase the susceptibility to cell death[J]. *Toxicol In Vitro*,2015,29(5):819-827
- [18] Freese C,Uboldi C,Gibson MI,et al. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres:Comparative studies on human endothelial and epithelial cells[J]. *Part Fibre Toxicol*,2012,9(7):23
- [19] Sathishkumar M, Pavagadhi S, Mahadevan A, et al. Biosynthesis of gold nanoparticles and related cytotoxicity evaluation using A549 cells[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*,2015,114(4):232-240
- [20] Coradeghini R,Gioria S,García CP,et al. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts[J]. *Toxicol Lett*,2013,217(3):205-216
- [21] Ito S,Miyoshi N,Degraff WG,et al. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-induced oxidative stress on two cancer cell lines by gold nanoparticles [J]. *Free Radic Res*,2009,43(12):1214-1224
- [22] Mytych J,Lewinska A,Zebrowski J,et al. Gold nanoparticles promote oxidant-mediated activation of NF-κB and 53BP1 recruitment-based adaptive response in human astrocytes[J]. *Biomed Res Int*,2015,2015:304575
- [23] Di Guglielmo C,De Lapuente J,Porredon C,et al. *In vitro* safety toxicology data for evaluation of gold nanoparticles-chronic cytotoxicity,genotoxicity and uptake[J]. *J Nanosci Nanotechnol*,2012,12(8):6185-6191
- [24] Chuang SM,Lee YH,Liang RY,et al. Extensive evaluations of the cytotoxic effects of gold nanoparticles [J]. *Biochim Biophys Acta*,2013,1830(10):4960-4973
- [25] Liu Z,Li W,Wang F,et al. Enhancement of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and interleukin-6 production by PEGylated gold nanoparticles in RAW264.7 cells[J]. *Nanoscale*,2012,4(22):7135-7142