



金属纳米材料的生物化学制备及在 生物医学领域的应用*

唐 乾^{1,2)} 任文生^{1,3)} 曹洪玉^{1,2)} 王立皓^{1,3)} 郑学仿^{1,2,3)**}

(¹⁾ 大连大学, 辽宁省生物有机化学重点实验室, 大连 116622; (²⁾ 大连大学生命科学与技术学院, 大连 116622;

(³⁾ 大连大学环境与化学工程学院, 大连 116622)

摘要 近40年来, 金属纳米材料发展迅猛, 因其不同于宏观晶体的特殊性质, 逐渐在各行业中起到了不可或缺的作用。当下人类面临资源、环境等日益严重的生态问题, 因此金属纳米材料与生物学结合的绿色生态模式是大势所趋。本文重点综述了利用各种植物提取物、微生物以及蛋白质等生物材料作为还原剂, 制备金属以及金属氧化物纳米材料的生物化学绿色合成方法。这些方法操作简单, 制备的材料形貌尺寸不会产生太大变化。除此之外, 生物材料的特定结构与金属纳米材料结合, 通常会表现出协同或者新的理化和生理性能, 以至于这些金属纳米材料在光热治疗及生物成像、抑菌及康复治愈和生物传感器及检测等生物医学领域产生了重大影响。金属纳米材料的生物化学制备会给未来纳米材料和生物学领域带来更多的交叉, 会有更多跨学科工作者对其现存挑战来进行努力工作, 并且在未来的医疗领域定会有金属纳米材料不可或缺的身影。

关键词 金属纳米材料, 生物化学制备, 医学应用

中图分类号 TB31, Q31

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0264

2 000多年前, 人们就已经开始无意识地使用纳米材料。古埃及人曾在不经意间发现了一种纳米尺度的染料, 并用来漂染头发, 其色牢度非常优良; 科学家们还发现现存于大英博物馆的古罗马莱克格斯杯的玻璃中融入了纳米尺寸的金银颗粒, 能够随着光照变化改变颜色; 中国考古学家在文物挖掘中发现古代铜镜千百年后依然完好无损就是因为表面涂有一层纳米尺度的氧化锡保护膜; 流传至今未褪墨的书画也是因为使用的墨汁中存在着纳米尺寸的碳。纳米领域第一次意义上的出现是在20世纪50年代末的美国物理学会年会中, 诺贝尔奖获得者Richard Feynman提出了一种由下至上的合成方法, 并在当时所认知尺寸的基础上, 做出了存在“更大空间”的设想^[1]。1984年, Gleiter教授和他的团队^[2]用原位加压法把金属铁粉制成粒径仅有6 nm的纳米级材料, 这是人类首次带有目的地制备出了纳米级材料, 具有里程碑意义。

金属纳米材料与宏观粒子所表现出的差异正是金属纳米颗粒魅力之所在, 众多工作者为其着迷。

金属纳米材料的光学性质取决于其材料内部电子结构, 纳米材料的量子尺寸效应 (quantum-size effect, QSE) 使金属纳米材料微观结构相对于宏观晶体有很大不同, 其光学性能产生了显著变化^[3-5]。这一变化主要是与金属的表面等离子共振有关, 当入射光波长大于金属纳米材料尺寸时, 导带内的自由电子被激发, 产生相内振动, 从而形成表面等离子共振^[6-8], 更深入地研究纳米材料的光学性质有助于扩大其在现实生活的应用。金属纳米材料直径减小, 表面原子数增多, 相当高的比表面积就会产生一些极为奇特的现象, 比如由电子结构引起的材料催化性能^[9]。尤其自2007年中国科学家阎锡蕴院士发现Fe₃O₄纳米颗粒作为过氧化物酶模拟物至今^[10], 大量基于纳米材料的“纳米酶”

* 国家自然科学基金 (21571025, 21601024, 21601025) 和大连大学科研平台项目 (2021) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 13941164782, E-mail: dlxfzheng@126.com

收稿日期: 2021-09-06, 接受日期: 2021-10-15

研究不断涌现。纳米金^[11-12]、纳米五氧化二钒颗粒^[13]、纳米石墨烯氧化物^[14-15]、纳米氧化铈颗粒^[16-18]以及金属有机框架材料^[19-21]等都被发现具有独特的模拟酶催化活性。除在光学、催化方面表现的特殊性质外,金属纳米材料在热学^[22-23]、磁学^[24-25]以及动力学^[26]也有着不同凡响的物理特性。金属纳米材料的使用在科技不断突破发展的当代起到了中流砥柱的作用。

近40年以来,纳米技术开始迅猛发展,从早期摸索到现在应用于各行各业,从螺丝螺母到汽车飞机,从集成板半导体到新型微型芯片,从能量收集到能量储存,纳米材料的出现几乎使所有工业领域都有了革命性变化,而新的想法和突破也正在为纳米技术不断开辟新的前景^[27]。汪冰等^[28]曾经在《纳米材料生物效应及其毒理学研究进展》一文中写道,“正如微米技术是20世纪科学技术的象征,21世纪科学技术的象征便是纳米技术”,这是对纳米材料、纳米技术未来前景的高度肯定。目前,人类面临着资源消耗和环境污染两大生态问题。为了尽快解决这些问题,节约资源和发展新能源已经成为世界各国可持续发展的大前提。纳米材料推动新能源技术加快发展,而新能源的应用有效降低人类对化石能源的依赖^[29]。与生物学相结合的金属纳米材料在环保和绿色方面更上一层楼,并引起人们广泛关注。在纳米技术不断发展中,与生物领域创新性结合后,使得金属纳米材料在合成上更加简单方便,应用上更加绿色环保,经济上更加节约可行。

在纳米结构和纳米材料的制备上,最需要关注的点就是要克服巨大的表面能,防止因奥斯瓦尔德熟化(Ostwald ripening)或团聚作用导致所制备的金属纳米材料在尺寸上逐渐变大,结构稳定性差。本文侧重选择拥有独特结构并能保持生理活性的生物材料,作为金属纳米材料制备过程中的还原剂、封端剂,甚至作为模板框架来更加绿色环保地避免上述问题的发生。

1 金属纳米材料的制备

1.1 金属纳米材料的一般制备方法

纳米颗粒(nano particles, NPs),是指在三维空间的某一维度尺寸处在1~100 nm之间的微小颗粒。NPs的电子结构在某些晶面上的费米能级刚好处在体能带结构沿该晶向的禁带之中^[30],使得NPs存在小尺寸效应、表面效应、量子尺寸效应、

宏观量子隧道效应等材料特性。除此之外NPs还在光学、电学、物理学、化学、生物学上有多种显著特性。近年来,由于其独特的物理化学性质——高表面积、良好的电导率、低毒性、不错的稳定性和生物相容性,引起了科研工作者的兴趣^[31-32]。

金溶胶是金纳米颗粒(Au NPs)在水溶液中存在的一种很普遍形式,其历史可以追溯到两千多年前。虽然合成胶体金的方法五花八门,但是由Turkevich等^[33-35]早期开发的柠檬酸还原 HAuCl_4 的合成方法到目前仍是制备金纳米颗粒最基础的方法,颇受大众青睐。随后Frens等^[36]在1973年制备出了在10~60 nm之间相对分散的纳米颗粒。近些年来,人们对纳米的尺寸有了更小的追求,通过使用硼氢化物和EDTA还原剂可以制得5 nm左右的纳米颗粒^[37],再小者可以通过硫氰酸钠的混合物制得,其材料尺寸大小为2~3 nm^[38]。但是上述制备过程中皆会使用到例如硼氢化钠、柠檬酸钠、甲酸和硫氰酸钠等有毒试剂作为还原剂,对人体以及环境造成一定危害。

银纳米颗粒(Ag NPs)由于微观尺寸的影响,也具有特殊的物理、化学和生物学特性。这些特性使得Ag NPs在工业、医药、食品上都有广泛的应用,同时Ag NPs特有的优秀抗菌性能是其他纳米材料所不具备的,所以在各种金属纳米材料中脱颖而出,深受广大科研工作者喜爱^[39-41]。Ag NPs制备一般使用硝酸银溶液作为前体,用多元醇方法^[42]来制备。Sun等^[43]选择乙二醇作为还原剂和封端剂,在160°C下还原硝酸银可大批量的制备Ag NPs,但该制备方法也不能符合当前绿色节约的化学理念。

铜是一种较为廉价的金属,经济实用性比较强,同时其纳米颗粒具有较低的制备成本、优异的性能,因此被利用在各行各业,尤其是医疗制药领域。铜是一种微量元素,对许多活细胞无害,且铜能参与许多代谢反应,所以铜纳米颗粒(Cu NPs)在细胞膜、核酸和蛋白质损伤时有显著的抑菌和杀菌活性^[44]。Dhas等^[45]在1998年利用热还原和声化学还原两种还原手段,在氩气存在条件下将水中 $\text{Cu}(\text{N}_2\text{H}_3\text{COO})_2$ 络合物还原,持续2~3 h得到铜纳米团簇。Raja等^[46]在无表面活性剂情况下使用电还原法来制备Cu NPs,获得了Cu NPs的精细尺寸分布,结构也如预期那样,但也存在少量氧化铜产品。这些方法在普遍性上比较适用,但在一定程度上造成资源的浪费和对环境的污染,且在操作上也

有一定限制性。

目前纳米材料制备争议很大, 研磨或者撞击蚀刻法等物理方式制备纳米材料需要非常复杂的操作工序以及精密仪器, 不仅费时、灵敏度低且所需成本高, 不能满足日常实验以及工业生产需求。化学法制备纳米材料需用大量还原剂甚至包含某些有毒化学试剂, 不仅浪费材料, 制备过程中也容易污染环境, 而且这些试剂对动、植物乃至人类的生产生活具有一定潜在危害^[47]。与生物学相结合来制备这些具有特殊性能的纳米材料, 成本低, 减少浪费还能使制备方法更加方便简单。在制备过程中使用含有大量活性位点和还原基团的生物活性材料替代某些有毒化学试剂作为还原剂、封端剂和稳定剂, 已经是广大科研工作者的研究热点。

1.2 金属纳米材料的生物化学制备

究其本质, 纳米材料就是将金属离子还原成零价态的金属单质, 仅仅是在尺度上要求特殊, 需要足够小, 达到纳米领域。传统化学方法在制备过程

均使用一些具有还原性的有机溶剂, 并且最后得到的纳米材料分散性也不是很好。相反, 生物材料来源广泛、成本低廉, 而且大多数拥有羟基、羧基和巯基等活性还原基团。除此之外还拥有自己的结构骨形, 使生成的纳米材料更加分散, 制得的纳米材料具有更加出色的特性。

纳米材料的生物化学制备过程, 主要包括3个过程: a. 孕育过程, 也就是给出一个元素, 让它接下来可以生长下去; b. 生长过程, 让给出的元素能够在给定的条件下向着目标产物发展; c. 停止过程, 让材料长到一定程度停止下来。生物化学方法制备纳米材料, 会用到的充当还原剂的生物材料有植物提取物、蛋白质、多糖以及一些病原微生物(图1)。它们的生物活性以及浓度不同, 会使所制备得到的纳米材料的形貌尺寸完全不同。在制备过程中存在极大的变数, 同样也存在更多的机遇, 来发现更多的新材料新物质。

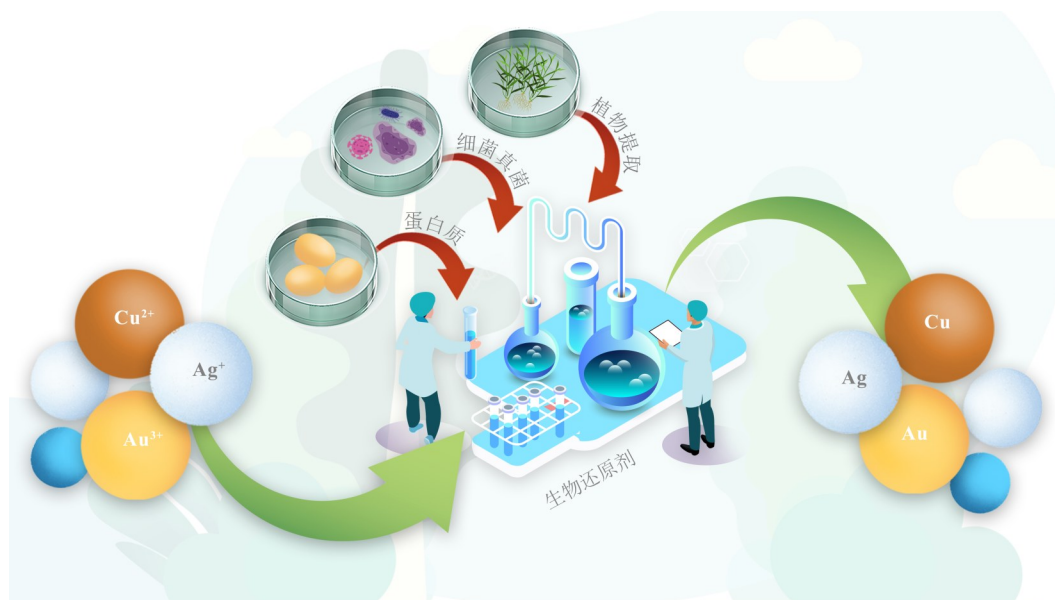


Fig. 1 Schematic diagram of nanoparticle preparation by biological materials such as plant extracts, proteins, bacteria and fungi acting as reducing agents

图1 植物提取物、蛋白质以及细菌真菌等生物材料充当还原剂制备纳米颗粒示意图

1.2.1 植物提取物制备

近期研究发现, 利用植物提取物作为还原剂和稳定剂来制备 Au NPs, 可减少有毒试剂的使用。Basavegowda 等^[48] 使用菠萝蜜果肉进行制备 Au NPs。他们将市场上购买的新鲜菠萝蜜经过切片粉碎离心操作后, 取上清液即菠萝蜜提取物。室温

下, 在无光照环境下将制得的菠萝蜜提取物加入到 2 mmol/L 的 HAuCl_4 中, 放置 2 h, 颜色逐渐从黄色变成深棕色, 即制得 Au NPs。该研究捕捉到一种经济可行的方式来制备纳米材料, 对环境及操作的要求降低了不少。不仅可用汁液多的果肉植物提取物制备纳米材料, Mishra 等^[49] 还将当地市场新鲜

购买的玫瑰茄花束的叶片 700 g 置于 1 200 ml 水中研磨, 然后二次过滤得滤液即玫瑰茄叶提取物。之后恒温下将 20 ml 1 mmol/L HAuCl_4 水溶液和 30 ml 玫瑰茄叶提取物不断搅拌, 最后纯化即得均匀的 Au NPs。Nadagouda 等^[50] 使用蓝莓、黑莓、石榴以及姜黄粉提取物制备 Au NPs 并进行比较, 其中蓝莓、黑莓、石榴提取物均为果肉提取物, 与上述有所相似; 而姜黄粉提取物属于根提取物, 姜黄粉提取物是通过约 6.8 g 姜黄粉倒入煮沸的 100 ml 蒸馏水中提取 12 min 后获得, 过滤取上清液即可。取 9 ml 姜黄提取液加入到 10 mmol/L HAuCl_4 中混合, 在不断搅拌中放置一夜即制备完成。

与 Au NPs 制备过程类似, 也可用植物提取物作为还原剂和封端剂将硝酸银中的 Ag^+ 还原成单质银。Ibrahim 等^[51] 通过香蕉皮提取物 (BPE) 作为还原剂和封端剂的绿色生物合成方法制备出了 Ag NPs。该过程通过将香蕉皮置于蒸馏水中清洗后, 在 100 ml 蒸馏水中粉碎、过滤得滤液, 用等体积的冷丙酮处理滤液, 离心得到 BPE。之后将 6.8 mg

干重的 BPE 加入到 50 ml 1 mmol/L 硝酸银溶液中, 在 30℃ 黑暗中进行反应, 以免硝酸银被光活化。该方法成功使用了农业废弃物香蕉皮来制备 Ag NPs, 且所制备的 Ag NPs 还具有良好的抗菌性能。Długosz 等^[52] 分别使用乙醇和水作溶剂, 将干山楂果切碎分别在乙醇和水中提取 3 h, 过滤得提取液。将 10 ml 提取液与 30 ml 硝酸银混合, 得到浓度为 100 mg/L 的提取物——硝酸银溶液, 之后滴加 0.2~0.25 mol/L NaOH 溶液来活化并调节溶液 pH 值。所制备的 Ag NPs 对黑曲霉、大肠杆菌和酿酒酵母等微生物有一定的抗菌作用。Lateef 等^[53] 将 0.1 g 干燥的山香草 (*Hyptis suaveolens*, *H. suaveolens*) 叶片放入 10 ml 蒸馏水中, 在 60℃ 温度下加热 1 h 后离心分离得到该提取物。然后在 30℃ 温度下, 将 40 ml 1 mmol/L AgNO_3 与 1 ml 提取物反应, 合成 Hs-Ag NPs (图 2)。在该研究中, 所制备的 Hs-Ag NPs 对于清除二苯基苦基苯肼 (DPPH) 和过氧化氢具有非常可观的结果, 可用来清除环境中的自由基。

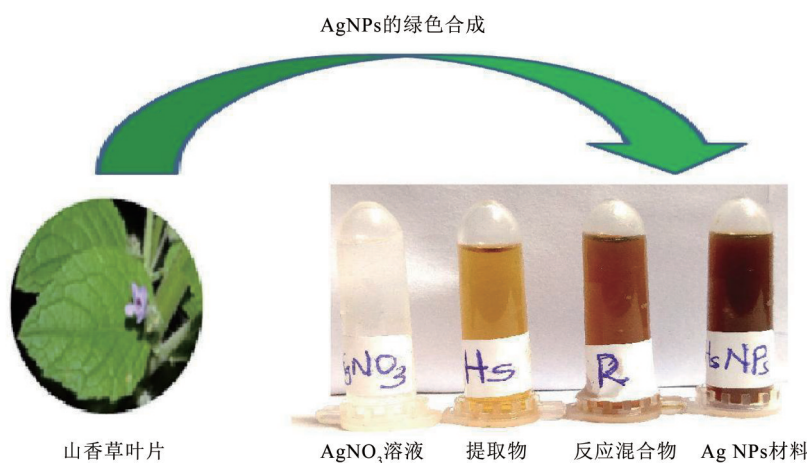


Fig. 2 The biosynthesis of Hs-Ag NPs using the leaf extract of *H. suaveolens*^[53]

图2 使用山香草叶片提取物制备纳米颗粒^[53]

同样, 也可将植物提取物应用到 Cu NPs 的制备中。Padma 等^[54] 将石榴花、叶、果皮和种子的水提取物以 1:10 的比例加入到 1 mmol/L 的硫酸铜溶液中, 在室温下反应过夜。可观察溶液从蓝色变成棕黄色, 静置后沉淀即为 Cu NPs。其研究还发现溶液的酸碱度对纳米颗粒的形状和大小有一定影响。并且该制备方法在作者的条件优化下, 已经进行商业批量合成。Shende 等^[55] 利用枸橼汁来制备

Cu NPs, 省时又便宜。在室温下先将清洗干净成熟的枸橼果实挤压过滤, 得到提取液。再将一定体积的枸橼提取物加入到 100 mmol/L 的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液中, 充分混合加热至沸腾。该方法可以通过肉眼观察就能简单地进行初步判断, 若由蓝色变成淡黄色并且存在一些棕色沉淀即为制备成功。Lee 等^[56] 首次使用植物皱叶木兰 (日本辛夷) 的叶子提取物来生物合成稳定的 Cu NPs。取

25 g 处理过的叶子放入 500 ml 无菌蒸馏水烧瓶中, 煮沸 5 min, 透析后于 4°C 储存。将 30 ml 提取物加入到 170 ml 1 mmol/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 中, 在 95°C 水浴中反应的转化率最大, 同时发现一定温度范围内温度越高, 纳米颗粒的尺寸越小。

Saithambi 等^[57]认为过渡金属在纳米颗粒制备以及应用上具有很大潜力, 所以利用长春花叶提取物作为 Pd^{2+} 到 Pd 零价态的还原剂和稳定剂, 来合成 Pd NPs。最近一些研究表明, 可以使用肉桂树皮^[58]、龙舌兰果^[59]以及咖啡和茶的提取物^[60]而不用另外添加表面活性剂、还原剂和封端剂来大量合成 Pd NPs。Goutam 等^[61]利用生物柴油的原料植物麻疯树的叶提取物来成功合成球形 TiO_2 NPs, 并首次将绿色合成的材料用于二级废水处理。

Nadagouda 等^[62]在使用咖啡和茶的提取物制备纳米粒子的同时, 简单探讨了植物提取物制备纳米材料的机理。他们每 20 min 记录一次紫外光谱, 直到 2 h 后完成实验操作。在紫外光谱图上起初并没有发现特征等离子共振峰, 大约 20 min 左右, 在 460 nm 出现峰值, 并在 60 min 时变得非常明显, 2 h 后峰强度不再变化。谱解析发现在 340 nm 处的强吸收峰为多酚化合物的吸收峰。由此可猜测, 实验中茶类的茶多酚以及咖啡里的咖啡因中含有多酚类化合物, 是还原的关键。多酚类化合物的羟基是金属离子被还原成零价金属的还原剂。上述制备方法中, 其还原机制大同小异, 基本都是使金属离子在不同植物提取物中被还原成单质, 其提取物的结构中含有羟基、羧基、巯基等还原基团。当然能够形成纳米粒子, 而不会堆积聚集形成宏观单质, 是因为所使用的试剂大多数能够充当封端剂、分散剂, 使颗粒不能聚集在一起, 可在纳米尺度上形成一定的分散态, 使其单一粒子能够很好地保持纳米尺寸体积。

1.2.2 微生物制备

微生物易培养、生长快, 因此通过微生物制备纳米材料同样也是目前比较流行的合成方法之一。这些微生物具有独特的生物学特性, 可覆盖在材料表面使颗粒不能聚集、更加分散, 因此, 这些微生物在某种程度上可以充当还原剂、稳定剂^[63]。

Gitanjal 和 ChavanAshok^[64]通过从番茄中分离、培养的真菌尖孢镰刀菌来制备纳米材料, 取用葡萄糖营养肉汤培养的真菌尖孢镰刀菌于 100 ml 双蒸水中培养 3 d, 搅拌过滤得粗细胞滤液, 室温黑暗条件下以 1 : 1 比例加入 1 mmol/L HAuCl_4 溶

液反应可得产物 Au NPs。Husseiny 等^[65]利用营养琼脂和营养肉汤培养的绿脓杆菌细胞上清液将金离子还原, 从而实现细胞外生物合成 Au NPs。

同样可以通过培养细菌、真菌来制备 Ag NPs, Mohammad 等^[66]将细菌分离物 OS4 接种在无菌培养基中, 温度为 35°C 的条件下将细菌放在 pH 为 7.2, 500 ml 锥形瓶中生长 24 h, 然后通过离心培养基取上清液。在室温黑暗处取 2 ml 上清液加入到 98 ml 1 mmol/L 硝酸银溶液中反应, 得到粗产品, 之后经过透析过滤等操作得到以细菌为母体, 体外制得的 Ag NPs。Silva 等^[67]首次报道了利用食线虫真菌稳定的 Ag NPs, 通过培养真菌、离心过滤等操作得到真菌滤液, 将真菌滤液与 100 ml 1 mmol/L 硝酸银溶液在黑暗条件下不断搅拌, 可以观察到溶液颜色明显发生变化, 并可初步断定制备出 Ag NPs。Ballottin 等^[63]将 PDA 培养基中培养 7 d 的内生真菌 *A. tubingensis* 转移至含有 9% 的 NaCl 溶液中, 制备悬浮液, 再接种到 150 ml PDB 培养基中, 在 28°C 下培养 72 h, 随后过滤洗涤除去生物质再过滤得真菌滤液。将 1 ml 0.1 mol/L 硝酸银溶液加入到 99 ml 真菌滤液中, 在 25°C 黑暗中反应 96 h, 得到 Ag NPs。

Varshney 等^[68-69]从电镀废水中提取施氏假单胞菌菌株能有效合成特定尺寸、特性的 Cu NPs。首先从电镀行业排污口附近土壤取样, 经过一系列细菌培养、分离、过滤、离心等操作, 得到施氏假单胞菌上层清液。将 0.1 g 该上清液加入到 100 ml 1 mmol/L 的 CuSO_4 水溶液中, 最终形成立方体和球型的 Cu NPs。Singh 等^[70]先将大肠杆菌培养在 100 ml 含柠檬酸盐的 CM 基本培养基中, 28°C 震荡培养 15 h, 离心收集菌体 (约 30 g 湿重), 将其加入到 100 ml 1 mmol/L CuSO_4 水溶液中, 仍在 28°C 搅拌反应 42 h, 得到 CuO NPs。Abboud 等^[71]第一次报道了使用海藻微生物制备出纳米氧化铜。实验用的藻类为双源藻 (*Bifurcaria bifurcata*), 用去离子水清洗并在 60°C 下烘干, 磨成粉。将 10 g 藻类粉末加入到 50 ml 双蒸水中, 震荡 1 h, 煮沸 15 min 过滤得到藻类提取物。在 110°C 下, 将 2 ml 藻类提取物加入到 20 ml 1 mmol/L CuSO_4 水溶液中持续搅拌, 几个小时后发现蓝色逐渐变成无色再变成砖红色, 即为制备成功。Selvarajan 等^[72]首次使用益生菌植物乳杆菌 VITES07 生物合成 ZnO NPs, 形成的产物形貌、结构和稳定性都相当不错。Yong 等^[73]还使用硫酸盐来还原细菌脱硫弧菌 NCIMB 8307 来进一

步制备Pd NPs。

Saifuddin等^[74]研究表明,混有银离子和枯草芽孢杆菌上清液的溶液,使用微波辐射得到Ag NPs。通过紫外可见光谱发现,该颗粒尺寸和形态非常稳定,在合成后的几个月之后都没有观察到聚集。经过分析发现是由于Ag NPs上的蛋白质覆盖所产生的,而实验中使用的枯草芽孢杆菌上清液具有非常明显的还原酶活性。该研究者做出假设,还原酶与电子传递复合物^[75]和其他蛋白质结合后以一种和真菌相似的方式对银离子进行还原并维持它的稳定性^[76-77]。

1.2.3 蛋白质、多糖制备

蛋白质、多糖中含有大量羟基、羧基、巯基等还原基团,是活性非常好的还原剂,并且某些蛋白质也对纳米颗粒有一定的分散作用,防止其聚集,因此也是人们喜爱的用来制备纳米材料的一类试剂。

Xie等^[78]使用牛血清蛋白(BSA)设计了一种简单的、一锅式的绿色合成路线。该过程类似自然界中生物体的矿化,将BSA作为一个模板或者一个框架来螯合金属离子并对其还原。实验过程是在37℃,将5 ml 10 mmol/L HAuCl₄水溶液添加到5 ml 50 g/L BSA溶液中,剧烈搅拌下2 min后加入0.5 ml 1 mol/L NaOH溶液,反应在37℃剧烈搅拌下进行12 h。最后得到的BSA-Au NCs在溶液中甚至制备成固体状态都非常稳定。Ravindra^[79]设计使用丝氨酸蛋白酶来制备纳米材料,将HAuCl₄与丝氨酸蛋白酶混合,在37℃搅拌,直到获得有色溶液,可制备得到20~200 nm的单分散Au NPs。Garcia-Hernandez等^[80]使用溶菌酶作为模型,通过Layer-by-Layer技术形成了基于Au NPs的蛋白质载体系统。Yan等^[81]利用羧酸凝胶多糖(Cc)作为还原剂和封端剂由HAuCl₄制备Au NPs。Leng等^[82]使用胶原蛋白将HAuCl₄转化为含水Au⁺,然后这些Au⁺被H₂O₂和超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)活化的蛋白质还原得到高度单分散的40~100 nm球状的Au NPs。Piella等^[83]采用一种可以通过动力学控制的种子生长方法,合成高度分散的亚纳米Au NPs,通过调节反应参数,实现“种子”均匀生长,其尺寸能够精准控制在3.5~10 nm之间。

马春蕾等^[84]发明了一种基于银镜反应制备Ag NPs的方法,取硝酸银加入蒸馏水使其完全溶解,逐滴滴加浓氨水配制银氨溶液,取BSA溶液加入银氨溶液,静置于水浴中并反应120 min,之

后透析分离得到银纳米颗粒。Gautam等^[85]通过硫酸改性的BSA来制备银纳米材料,能够在30 min内完成。他们将刚制备好的5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)溶液添加到BSA溶液中,然后取上述1 g/L修饰好的BSA溶液^[86]与不同摩尔比的硝酸银混合,pH保持在7.2左右,温度保持在25℃,在超声辅助条件下反应5 min制备出银纳米材料。Hendler等^[87]通过黏液糖蛋白作为模板制备手性银纳米颗粒。他们将1 g/L硝酸银加入到10 g/L牛颌下黏蛋白(BSM)水溶液中,温度保持在25℃,搅拌24 h。混合物中加入1 ml pH=10,浓度为50 mmol/L的硼酸盐缓冲液中,持续搅拌3 d,即可完成。Wang等^[88]利用网状蛋白和表面具有还原性基团的优势,选择鸡蛋壳膜作为模板和还原剂,通过超简单的方法由高锰酸钾合成MnO₂纳米粒子。

Ma等^[89]根据之前的报道进行了一些修改,以BSA作为生物模板合成铜纳米团簇(Cu NCs)。将1 ml 20 mmol/L Cu(NO₃)₂滴加到5 ml 15 g/L BSA中,搅拌中加入1 ml 0.1 mol/L NaOH溶液,溶液变成紫色,再将混合物放入55℃水中水浴24 h,得到棕色溶液,接下来在去离子水中透析48 h,于4℃储存。Zain等^[90]将40 ml 30 mmol/L硝酸铜溶液与40 ml 2% (w/v)壳聚糖溶液以及4 ml 10% (w/v)抗坏血酸溶液混合,在微波炉中用800 W功率加热4 min。实验表明,伴随着壳聚糖浓度的增加,铜纳米颗粒颜色从浅粉色变为深红色。其中抗坏血酸是作为还原剂还原Cu²⁺,壳聚糖作为模板来控制最后制备的纳米材料尺寸以及防止聚集提高分散性。

2 金属纳米材料在生物医学上的应用

2.1 光热治疗及生物成像

现如今,医学界众多让人束手无策的疾病,并不是没有治疗的药物,而是缺乏药物输送的途径。光热治疗是一种利用金属纳米材料的光学性能,在激光照射时,金属纳米材料会吸收光子,将能量转化成晶格振动能量,能量以热的形式散发出来,从而使金属纳米材料周围的温度升高,来达到一定治疗功效的现代化治疗手段^[91]。由于肿瘤细胞对温度敏感,达到一定温度就可以破坏肿瘤^[92],所以金属纳米材料将光能转化成热能,通过加热目标靶点的部位,就可以杀死肿瘤细胞。作为一种新兴的微创甚至是无创治疗方式,不需要负载药物的光热治疗已被应用到肿瘤治疗领域。在光热治疗的同

时, 金属基本上都会存在一定的表面增强拉曼散射 (SERS), 因为金属的表面等离子共振效应会使得该分子的拉曼散射得到显著增强, 增强成像信号并能降低输入能量, 所以一般光热治疗的同时可以使用生物成像。

金纳米材料由于其优秀的等离子共振效应而备受关注, Song 等^[93]通过抗坏血酸以及表面活性剂将 HAuCl_4 中 Au^{3+} 离子制备成金纳米星 (Au NSs), 之后将各种氨基酸结合在 Au NSs 上来实现靶向 SERS 成像和光激发等离子体光热疗法 (PPTT)。实验表明, 多功能 Au NSs 在近红外两个波段 NIR-I (785 nm) 和 NIR-II (1 064 nm) 的激光激发下, 温度升高从而对 A549 细胞 (肺癌人类肺泡上皮细胞) 有很强的杀伤作用。Sasidharan 等^[94]使用 BSA 稳定后的 Au NSs, 在近红外区域 (795 nm 左右) 有显著的高温活性以及优异的计算机断层扫描 (CT) 成像。实验对正常细胞、癌细胞和红细胞进行了相容性分析, 结果表明没有产生任何活性氧, 并且对癌细胞有着明显的光热细胞毒性。Maltzahn 等^[95]制备的金纳米棒, 具有吸光能力强、光热转换效率高的优势。先将材料通过静脉注射, 再通过 CT 来检测激光照射后肿瘤部位的温度变化, 最后发现肿瘤细胞减少, 治疗效果很显著。Lee 等^[96]通过 BSA 稳定传统制备的 Au 纳米颗粒后, 还原加入的硝酸银溶液, 得到镀银的金纳米材料, 之后在该纳米材料表面标记抗体 anti-PLC γ 1 得到可以用于细胞 SERS 成像的纳米探针。该探针的成像可以清楚地区分癌细胞和正常细胞, 使得癌症早期的发现更加容易。

2.2 抑菌及康复治愈

众所周知, 病毒、细菌等微生物在不断产生抗药性, 传统抗生素类杀菌药物已经渐渐失去往日的能效。金属及其离子有一定的抗菌性, 其纳米颗粒很大程度上放大了这个特性。抗菌纳米材料作为新兴科学技术, 已经在生物医学领域发展相当迅速。

Ag NPs 被认为是新世纪最有潜力的新型抗微生物试剂^[97]。银纳米粒子抗菌性能最强的地方在于非常容易与细菌的细胞膜相互作用, 破坏细胞膜, 从而导致细菌受到损伤, 正常的生理功能受到影响。Dlugosz 等^[52]利用山楂提取物制备了 Ag NPs, 浓度低于 100 mg/L 的 Ag NPs 对病原微生物菌黑曲霉毒素 (*A. niger*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 和酿酒酵母菌 (*S. cerevisiae*) 都有一定的抗菌作用并且对它们的抗菌活性大致相似, 其生长抑制率最高

达到了 79%。Ping 等^[98]通过还原附着在 Fe_3O_4 纳米颗粒表面的硝酸银制备出的 Ag NPs 具有抑菌和顺磁两种功能。除了对大肠杆菌、表皮葡萄球菌和枯草芽孢杆菌表现出良好的抗菌性能外, 还可以使用磁场有效分离富集该 Ag NPs, 不仅能避免对环境的污染, 还可以增加样品的回收率, 进而达到重复使用的目的。Ag NPs 与含硫酶如乙酰丝氨酸硫基酶 (CysK) 的相互作用改变并破坏了病菌的细胞壁形态从而达到抗菌目的^[99]。Naimi-Shamel 等^[100]制备了与四环素结合的 Au NPs, 并在研究中发现金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌等革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌与 Au NPs 的作用更敏感, 抑菌效果更好。与链霉素、庆大霉素、新霉素、氨苄青霉素、卡那霉素和万古霉素结合的 Au NPs 也同样显示出抗菌效果的增强。总之, 与四环素结合的 Au NPs 可能是四环素及其衍生物治疗耐多药感染的一种新的解决方案。Akintelu 等^[101]提出了 Au NPs 的抗菌性能与该颗粒的形状和大小有着密切的联系, 尺寸小于 10 nm 的 Au NPs 通过释放电子增强其反应性, 能与细菌产生良好的相互作用从而起到一定的抗菌性能。Padil 等^[102]制备了一种新型抗菌材料 Cu NPs 修饰的蛭石。蛭石-金属纳米铜杂化材料在 37°C 对金黄色葡萄球菌表现出很强的抗菌活性, 以至于可以拓宽和重新评估蛭石在塑料、纺织品和其他需要抗菌性能的产品中的应用。Tahvilian 等^[103]利用葱属植物的提取物制备 Cu NPs, 经过一系列实验证明, 该纳米材料在 18 g/L 浓度下抑制所有细菌生长, 在 14 g/L 浓度下阻止所有真菌生长。

伤口愈合是指皮肤等组织受到破坏后各种组织的再生、增生, 这个过程中所避免不了的问题就是对伤口的杀菌, 防止感染。研究人员们开始着手设计和开发纳米材料, 特别是金属纳米材料, 作为治疗包括伤口愈合等各种病理的候选物^[104]。在伤口敷料上, 新设计的 Ag NPs 敷料为伤口的治疗和预防感染提供了一个重大突破。银纳米敷料浓度、辅料中的分布及其物理和化学存在形式的不同都会使其对不同伤口有不同作用, 因此 Ag NPs 可被用来制备成各种不同种类的制剂^[105]。Zhang 等^[106]开发了一种添加甘油 (glycerol) 的 BSA 纤维膜, 通过浸泡原位还原 Ag^+ 来合成 G-BSA-Ag 薄膜。该材料拥有银纳米材料的抗菌性能, BSA 的生物相容性和甘油的润滑性, 是应对细菌感染伤口不错的敷料。Chen 等^[107]研究发现, 银纳米材料和光敏剂

酞菁锌会产生双向促进,一方面纳米银会进一步促进酞菁锌产生更多的活性氧自由基,另一方面光敏剂会氧化纳米银来提供更多的 Ag^+ 得到更好的抑菌效果。他们将二者结合并附着在纱布上来作为伤口愈合的敷料,在小鼠实验中发现比一般药剂对于伤口愈合要快得多(图3)。Zangeneh等^[108]使用甜菜(*Falcaria vulgaris*)制备的Cu NPs,并发现其在皮肤伤口愈合方面具有一定的医疗效益。在受损皮肤伤口上涂抹Cu NPs软膏10 d后,伤口面积、总细胞以及血管等方面相比于没有涂抹的伤口来说

有了很大改善。Tian等^[109]使用动物模型研究了Ag NPs在伤口愈合中是怎样提供治疗方式和恢复效率的,发现银纳米材料对伤口恢复有加速作用,同时其对美化外观也有一定的效果。在伤口敷料上,新设计的Ag NPs敷料为伤口的治疗和预防感染提供了一个重大突破。Durán等^[110]使用Ag NPs对棉织物进行掺杂,发现Ag NPs可以用来转化无菌织物,使用扫描电镜能谱仪在未添加Ag NPs的棉纤维中发现了细菌污染物的存在,而经过Ag NPs处理的棉纤维却并未滋生细菌。

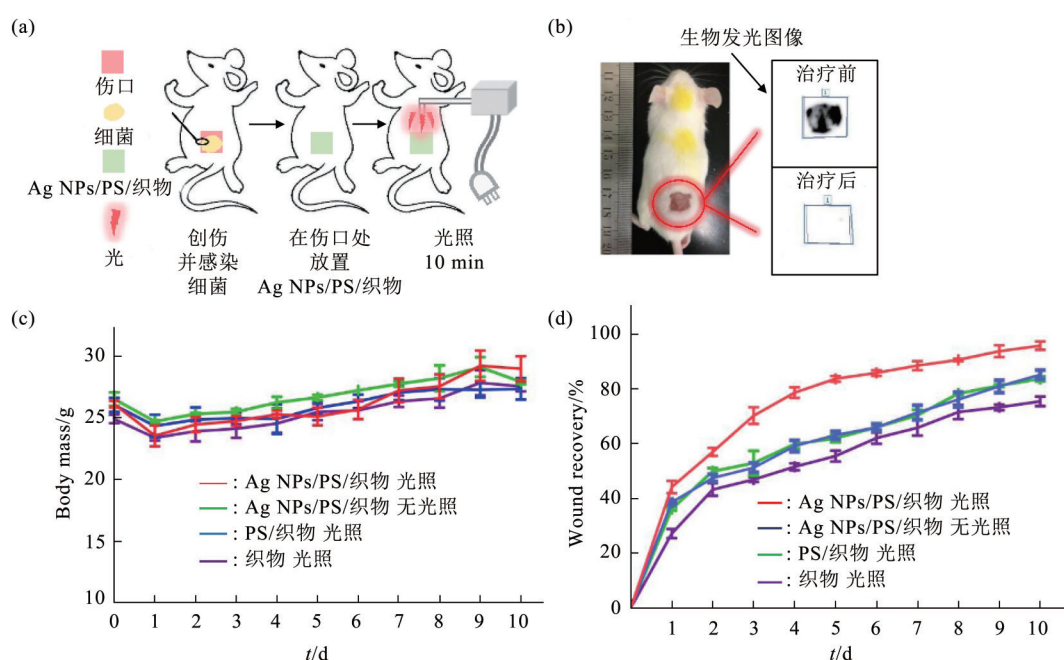


Fig. 3 The effect of the composite product of nano-silver on the therapeutic effect of wounds in mice ^[107]

图3 银纳米颗粒的复合产物 (Ag NPs/PS/Fabric) 对小鼠的伤口自愈效果的影响 ^[107]

(a) 体内细菌感染治疗的实验示意图。(b) 图片是伤口面积的测量值,以及大肠杆菌伤口感染并在用Ag NPs/PS/Fabric处理后小鼠伤口的生物发光图像。(c) 生物发光大肠杆菌感染小鼠的体重增加。(d) Ag NPs/PS/Fabric材料对小鼠中生物发光大肠杆菌感染的切除伤口愈合的影响 ($n=5$)。

2.3 生物传感器及生物检测

金属纳米材料的某些特性,可作为识别某些生物化学信号,再转化并放大成为仪器可识别的光电信号来监测某些物质变化的一种媒介。金属纳米生物传感器相比于传统的机械芯片灵敏度高,在医学检测方面具有很大应用前景。生物传感器由于制备简单、快速、高效、较强的斯托克斯位移(Stokes shifting)和低生物毒性,近十年来被广泛开发,尤其是作为一种无标记检测方式,在多种分析技术中占据优势。

自从 Rotaru 等^[111]首次报道了利用DNA作为模板来制备DNA-Cu NPs后,这种新兴纳米材料的荧光特性就被用来构建生物传感器。Qing等^[112]阐述了以DNA为模板制备Cu NPs的生物传感检测的4种方向:基于反应性淬灭剂的信号传导^[113-114];基于模板长度调节的信号传导^[115-116];基于模板数量调节的信号传导^[117-118]和基于微环境调节的信号传导^[119-120]。Pd纳米材料在汽车尾气处理、燃料电池催化电极、储氢材料及各类有机无机化学催化等领域也拥有广泛应用^[121]。Wang等^[88]研究表明,

利用鸡蛋壳膜所制备的 MnO_2 纳米颗粒可以用于盐酸四环素检测和去污, 在一定缓冲条件下 60 min 后的去除效率为 83.10%。Hirsch 等^[122] 制造了金纳米壳, 该纳米壳由直径为 96 nm 核和 22 nm 壳包围, 并用它们在稀血清中进行距离依赖性免疫测定。同时他们描述了一种使用金纳米壳、分层的电介质-金属纳米粒子, 从而不需要任何样品制备就能检测复杂生物介质中分析物的快速免疫测定方法。Lopes 等^[123] 通过使用多糖提取物菠萝胶 (PG) 的绿色生物合成方法制备了 Au NPs, 所制备的 AuNPs-PG 可作为电极改性剂, 从而可成为一个敏感的电化学传感器用来测定抗组胺药盐酸异丙嗪。Chen 等^[124] 研究了不同 Ag/BSA 比例 BSA-Ag NPc 的荧光特性, 开发了一种检测 H_2O_2 的荧光信号方法。BSA-Ag NPc 在 635 nm 处显示红色荧光发射, 在 H_2O_2 的存在下, 其荧光信号值被加强了数倍, 灵敏性极高并且操作简单、制备容易。由于葡萄糖氧化酶可以氧化葡萄糖产生 H_2O_2 , 因此该系统也能用于检测葡萄糖。由此看来, 该方法可以扩展到各种与 H_2O_2 相关酶催化体系的其他底物检测。Goswami 等^[125] 使用一锅法以蛋白质作为模板制备稳定的 Cu QCs, 在 325 nm 和 410 nm 处有激发和发射的最大值, 具有蓝色荧光。在存在其他干扰离子的情况下, 它也可以选择性地并且非常灵敏地检测百万分之一浓度的剧毒 Pb^{2+} 离子, 是一种非常优秀的生物检测剂。

3 结论与展望

纳米材料与生物学相结合, 是目前响应时代绿色环保号召的重要方向, 也是目前非常有潜力的一个领域。走生物化学合成路线, 可以减少有毒试剂的使用, 减少还原剂、封端剂、稳定剂的资源浪费, 可以不需要苛刻的反应条件, 最后所得到的副产物或者废品相对于环境来说污染更小甚至没有污染, 更加方便进行处理、回收^[126]。金属纳米材料中贵金属的性能表现尤为突出, 也是广大科研工作者非常青睐的一个方向。金纳米颗粒除了金元素本身的价值之外, 还因为它的稳定性, 不易被氧化而被人们看重, 是科研工作者们研究的热门领域。在未来与生物学相结合, 必定能够拥有新的发展前景。银纳米颗粒是迄今为止报道最多的金属纳米颗粒, 因为它的抗菌性能是其他金属纳米颗粒所不能与之媲美的, 在今后发展中, 更简易的绿色合成制备方法会使银纳米颗粒在医学、制药方面的应用更

加广泛、体系更加完善。通过简易的生物合成制备方法获得铜和其他金属及其氧化物纳米材料也会对医学发展、生活质量有进一步的提升。

金属纳米材料被广泛应用于细菌素偶联或修饰, 以增加细菌素活性或减少其在生物医学应用方面的问题。因此, 细菌素与纳米材料的结合已成为一种很有发展前景的分子, 可应用于各种生物医学领域^[127]。有些超微金属纳米材料的尺寸甚至比血液中红细胞还小, 以至于它可以在血液中自由穿梭, 这就为检测和治疗某些疾病提供了非常不错的手段^[128]。如果就此借助其功效, 制作出具有一定生理功效的金属纳米材料, 定会对当今医学上的疑难杂症如癌症、艾滋病以及血栓等疾病的治疗有一定的突破性进展。使用生物材料制备的金属纳米材料能够对现存的医疗手段进行完善和补充, 能够便捷有效地完成医疗目标。所以说, 在医疗科技发展上, 金属纳米材料有着直接或者间接不可小觑的发展前景。

目前来说, 宏观金属晶体已经在工业上如火如荼地使用, 达到了一定的工业水平高度。正如生物学上所讲的“抗药性”, 路遥知马力, 其不完备之处会渐渐显露, 金属纳米材料的生物化学制备会给未来纳米和生物学领域带来更多的交叉, 会有更多跨学科工作者对其现存挑战来进行努力工作, 并且在未来的医疗领域定会有金属纳米材料不可或缺的身影, 所以, 在利用生物材料制备的金属纳米材料未来会在各个领域发光发热, 大放异彩。

参 考 文 献

- [1] Feynman R.P. There is plenty of room at the bottom. *Eng Sci*, 1960, **23**(5): 22-36
- [2] Birringer R, Gleiter H, Klein H P, *et al.* Nanocrystalline materials an approach to a novel solid structure with gas-like disorder?. *Phys Lett A*, 1984, **102**(8): 365-369
- [3] Jałochowski M, Strzak M, Zdyb R. Anomalous optical absorption in ultrathin Pb films. *Phys Rev B*, 2002, **66**(20): 205417
- [4] Manikandan D, Mohan S, Magudapathy P, *et al.* Blue shift of plasmon resonance in Cu and Ag ion-exchanged and annealed soda-lime glass: an optical absorption study. *Physica B Condens Matter*, 2003, **325**: 86-91
- [5] Zhang B. *Physical Fundamentals of Nanomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 2018: 291-335
- [6] Milton K. *The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation*. New York: Academic Press, 1969: 414-426
- [7] Barber P W. Absorption and scattering of light by small particles. *J Colloid Interface Sci*, 1984, **98**(1): 290-291
- [8] Homola J, Yee S S, Gauglitz G. Surface plasmon resonance

- sensors: review. *Sensor Actuat B Chem*, 1999, **54**(1-2): 3-15
- [9] Shan H, Zhe A, Wei M, *et al.* Layered double hydroxide-based catalysts: nanostructure design and catalytic performance. *Chem Commun*, 2013, **49**(53): 5912-5920
- [10] 高利增, 阎锡蕴. 纳米酶的发现与应用. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **40**(10): 892-902
Gao L Z, Yan X Y. *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(10): 892-902
- [11] Li X, Qi Z, Liang K, *et al.* An artificial supramolecular nanozyme based on β -cyclodextrin-modified gold nanoparticles. *Catal Lett*, 2008, **124**(3-4): 413-417
- [12] Weerathunge P, Ramanathan R, Shukla R, *et al.* Aptamer-controlled reversible inhibition of gold nanozyme activity for pesticide sensing. *Anal Chem*, 2014, **86**(24): 11937-11941
- [13] Aydin A, Sayal A, Sayin S, *et al.* An investigation on the relationship between vanadium and antioxidative enzyme system in rats. *Turk J Pharm Sci*, 2005, **2**(1): 17-24
- [14] Sun H, Liu X, Wang X, *et al.* Colorimetric determination of ascorbic acid using a polyallylamine-stabilized IrO_2 /graphene oxide nanozyme as a peroxidase mimic. *Microchim Acta*, 2020, **187**(2): 110-125
- [15] Zhao Q, Gou W, Zhang X, *et al.* Hg^{2+} -activated oxidase-like activity of Ag_2S @graphene oxide nanozyme and its naked-eye monitoring Hg^{2+} application with obvious hyperchromic effect. *Appl Surf Sci*, 2021, **545**(5): 148973
- [16] Janoš P, Ederer J, Došek M, *et al.* Can cerium oxide serve as a phosphodiesterase-mimetic nanozyme?. *Environ Sci Nano*, 2019, **6**(12): 3684-3698
- [17] Singh R, Singh S. Redox-dependent catalase mimetic cerium oxide-based nanozyme protect human hepatic cells from 3-AT induced acatalasemia. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, **175**: 625-635
- [18] Zeng L, Cheng H, Dai Y, *et al.* *In vivo* regenerable cerium oxide nanozyme-loaded pH/ H_2O_2 -responsive nanovesicle for tumor-targeted photothermal and photodynamic therapies. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **13**(1): 233-244
- [19] Hu W C, Pang J, Biswas S, *et al.* Ultrasensitive detection of bacteria using a 2D MOF nanozyme-amplified electrochemical detector. *Anal Chem*, 2021, **93**(24): 8544-8552
- [20] Wang L, Chen Y. Luminescence-sensing Tb-MOF nanozyme for the detection and degradation of estrogen endocrine disruptors. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(7): 8351-8358
- [21] Yu D Q, Ma M M, Liu Z W, *et al.* MOF-encapsulated nanozyme enhanced siRNA combo: control neural stem cell differentiation and ameliorate cognitive impairments in Alzheimer's disease model. *Biomaterials*, 2020, **255**: 120160
- [22] Yeh T S, Sacks M D. Low-temperature sintering of aluminum oxide. *J Am Ceram Soc*, 1988, **71**(10): 841-844
- [23] Ding Y L, Xie J, Cao G S, *et al.* Enhanced elevated-temperature performance of Al-doped single-crystalline LiMn_2O_4 nanotubes as cathodes for lithium ion batteries. *J Phys Chem C*, 2011, **115**(19): 9521-9825
- [24] Xian F, Guan J G, Wang W, *et al.* Preparation, microstructure control and magnetic properties of 1D ferromagnetic metal nanomaterials. *Prog Chem*, 2009, **21**(1): 143-151
- [25] He M, Chen Z N, Xu C, *et al.* Magnetic nanomaterials as sorbents for trace elements analysis in environmental and biological samples. *Talanta*, 2021, **230**: 122306
- [26] Chen L, Fan J L, Gong H R, *et al.* Phase transition and mechanical properties of tungsten nanomaterials from molecular dynamic simulation. *J Nanopart Res*, 2017, **19**(3): 118-128
- [27] Gleiter H, Hahn H, Schimmel T. Advances in nanomaterials. *Beilstein J Nanotechnol*, 2013, **4**: 805-806
- [28] 汪冰, 丰伟悦, 赵宇亮, 等. 纳米材料生物效应及其毒理学研究进展. *中国科学(B辑)*, 2005, **35**(1): 1-10
Wang B, Feng W Y, Zhao Y L, *et al.* *Sci China Ser B*, 2005, **35**(1): 1-10
- [29] 邹才能, 赵群, 张国生, 等. 能源革命: 从化石能源到新能源. *天然气工业*, 2016, **36**(1): 1-10
Zou C N, Zhao Q, Zhang G S, *et al.* *Nat Gas Ind*, 2016, **36**(1): 1-10
- [30] 邓永沛, 赵红秋, 江龙. 纳米金颗粒在仿生工程中的应用. *中国基础科学*, 2000, **9**: 11-17
Deng Y P, Zhao H Q, Jiang L. *China Basic Science*, 2000, **9**: 11-17
- [31] Dykman L, Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem Soc Rev*, 2012, **41**(6): 2256-2282
- [32] Li H, Yang Y W. Gold nanoparticles functionalized with supramolecular macrocycles. *Chinese Chemical Letters*, 2013, **7**: 545-552
- [33] Turkevich J, Garton G, Stevenson P C. The color of colloidal gold. *J Colloid*, 1954, **9**: 26-35
- [34] Turkevich J, Stevenson P C, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc*, 1951, **11**: 55-56
- [35] Turkevich J, Stevenson P C, Hillier J. The formation of colloidal gold. *J Phys Chem*, 1953, **57**(7): 670-673
- [36] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, 1973, **241**: 21-24
- [37] Khlebtsov N G, Bogatyrev V A, Dykman L A, *et al.* Spectral extinction of colloidal gold and its biospecific conjugates. *J Colloid Interface Sci*, 1996, **180**(2): 436-445
- [38] Baschong W, Lucocq J M, Roth J. "Thiocyanate gold": small (2-3 nm) colloidal gold for affinity cytochemical labeling in electron microscopy. *Histochem*, 1985, **83**(5): 409-411
- [39] Gupta R K, Kumar V, Gundampati R K, *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles from the novel strain of *Streptomyces Sp.* BHUMBU-80 with highly efficient electroanalytical detection of hydrogen peroxide and antibacterial activity. *J Environ Chem Eng*, 2017, **5**(6): 5624-5635
- [40] Prabhu S, Poulse E K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Inter Nano Lett*, 2012, **2**(1): 32
- [41] Rai M, Kon K, Ingle A, *et al.* Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, **98**(5): 1951-1961

- [42] Fievet F, Lagier J P, Figlarz M. Preparing monodisperse metal powders in micrometer and submicrometer sizes by the polyol process. *Mrs Bulletin*, 1989, **14**(12): 29-34
- [43] Sun Y G, Xia Y N. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*, 2010, **298**(10): 2176-2179
- [44] Hemmati S, Kamangar S, Ahmeda A, *et al.* Application of copper nanoparticles containing natural compounds in the treatment of bacterial and fungal diseases. *Appl Organomet Chem*, 2020, **34**(4): 5465
- [45] Dhas A, Raj C P, Gedanken A. Synthesis, characterization, and properties of metallic copper nanoparticles. *Chem Mater*, 1998, **10**(5): 1446-1452
- [46] Raja M, Subha J, Ali F B, *et al.* Synthesis of copper nanoparticles by electroreduction process. *Mater Manuf Processes*, 2008, **23**(8): 782-785
- [47] Qiao J, Qi L. Recent progress in plant-gold nanoparticles fabrication methods and bio-applications. *Talanta*, 2020, **223**: 121396
- [48] Basavegowda N, Kumar G D, Tyliczszak B, *et al.* One-step synthesis of highly-biocompatible spherical gold nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* Lam. (jackfruit) fruit extract and its effect on pathogens. *Ann Agric Environ Med*, 2015, **22**(1): 84-89
- [49] Mishra P, Ray S, Sinha S, *et al.* Facile bio-synthesis of gold nanoparticles by using extract of *Hibiscus sabdariffa* and evaluation of its cytotoxicity against U87 glioblastoma cells under hyperglycemic condition. *Biochem Eng J*, 2016, **105**: 264-272
- [50] Nadagouda M N, Iyanna N, Lalley J, *et al.* Synthesis of silver and gold nanoparticles using antioxidants from blackberry, blueberry, pomegranate, and turmeric extracts. *Acs Sustainable Chem Eng*, 2014, **2**(7): 1717-1723
- [51] Ibrahim H M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *J Radiat Rese Appl Sc*. 2015, **8**(3): 265-275
- [52] Długosz O, Chwastowski J, Banach M. Hawthorn berries extract for the green synthesis of copper and silver nanoparticles. *Chem Pap*, 2020, **74**: 239-252
- [53] Lateef A, Oladejo S M, Akinola P O, *et al.* Facile synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Hyptis suaveolens* (L.) poit for environmental and biomedical applications. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng*, 2020, **805**: 012042
- [54] Padma P N, Kumari S C, Banu S T. Effect of diverse factors on green synthesis of copper nanoparticles. *Int J Life Sci*, 2018, **6**(2): 659-664
- [55] Shende S, Ingle A P, Gade A, *et al.* Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. *World J Microbiol Biotechnol*, 2015, **31**(6): 865-873
- [56] Lee H J, Song J Y, Kim B S. Biological synthesis of copper nanoparticles using *Magnolia kobus* leaf extract and their antibacterial activity. *J Chem Technol Biotechnol*, 2013, **88**(71): 1971-1977
- [57] Saithambi A, Kalaiselvi, Selvaraj, *et al.* Synthesis and characterization of palladium nanoparticles using *Catharanthus roseus* leaf extract and its application in the photo-catalytic degradation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2015, **135**: 116-119
- [58] Sathishkumar M, Sneha K, Kwak I S, *et al.* Phyto-crystallization of palladium through reduction process using Cinnamom zeylanicum bark extract. *J Hazard Mater*, 2009, **171**(1-3): 400-404
- [59] Roopan S M, Bharathi A, Kumar R, *et al.* Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of aqueous extract of *Annona squamosa* L peel as biomaterial for the reduction of palladium salts into nanoparticles. *Colloids Surf B*, 2012, **92**(3): 209-212
- [60] Nadagouda M N, Varma R S. Microwave-assisted shape-controlled bulk synthesis of Ag and Fe nanorods in poly(ethylene glycol) solutions. *Cryst Growth Des*, 2007, **8**(1): 291-295
- [61] Goutam S P, Saxena G, Singh V, *et al.* Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using leaf extract of *Jatropha curcas* L. for photocatalytic degradation of tannery wastewater. *Chem Eng J*, 2018, **336**: 859-862
- [62] Nadagouda M N, Varma R S. Green synthesis of silver and palladium nanoparticles at room temperature using coffee and tea extract. *Green Chem*, 2008, **10**(8): 859-862
- [63] Ballottin D, Fulaz S, Souza M L, *et al.* Elucidating protein involvement in the stabilization of the biogenic silver nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*, 2016, **11**(1): 313-314
- [64] Gitanjali S, Chavan Ashok. Synthesis, characterization and stability of gold nanoparticles using the fungus fusarium oxysporum and its impact on seed germination. *Int J Recent Sci Res*, 2015, **6**(3): 3181-3185
- [65] Hussein M I, El-Aziz M A, Badr Y, *et al.* Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2007, **67**(3-4): 1003-1006
- [66] Mohammad O, Saghir K M, Almas Z, *et al.* Antibacterial and cytotoxic efficacy of extracellular silver nanoparticles biofabricated from chromium reducing novel OS4 strain of *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One*, 2013, **8**(3): e59140
- [67] Silva L P, Jairo P O, Juvencio K W, *et al.* Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the cell-free filtrate of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Int J Nanomed*, 2017, **12**: 6373-6381
- [68] Varshney R, Bhadauria S, Gaur M S, *et al.* Characterization of copper nanoparticles synthesized by a novel microbiological method. *JOM*, 2010, **62**(12): 102-104
- [69] Varshney R, Bhadauria S, Gaur M S, *et al.* Copper nanoparticles synthesis from electroplating industry effluent. *Nano Biomed Eng*, 2011, **3**(2): 115-119
- [70] Singh A V, Patil R, Anand A, *et al.* Biological synthesis of copper oxide nano particles using *Escherichia coli*. *Curr Nanosci*, 2010, **6**(4): 365-369
- [71] Abboud Y, Saffaj T, Chagraoui A, *et al.* Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide

- nanoparticles (CONPs) produced using brown alga extract (*Bifurcaria bifurcata*). Appl Nanosci, 2014, **4**(5): 571-576
- [72] Selvarajan E, Mohanasrinivasan V. Biosynthesis and characterization of ZnO nanoparticles using *Lactobacillus plantarum* VITES07. Mater Lett, 2013, **112**(1): 180-182
- [73] Yong P, Rowson N A, Farr J, *et al.* Bioreduction and biocrystallization of palladium by *Desulfovibrio desulfuricans* NCIMB 8307. Biotechnol Bioeng, 2002, **80**(4): 369-379
- [74] Saifuddin N, Wong C W, Nur Y. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. J Chem, 2009, **6**(1): 61-70
- [75] Newman D K, Kolter R. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. Nature, 2000, **405**(6782): 94-97
- [76] Durán N, Marcato P D, Alves O L, *et al.* Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. J Nanobiotechnol, 2005, **3**(1): 8-12
- [77] Durán N, Priscyla D, Marcela D, *et al.* Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, **90**(5): 1609-1624
- [78] Xie J, Zheng Y G, Ying J Y. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. J Am Chem Soc, 2009, **131**(3): 888-889
- [79] Ravindra P. Protein-mediated synthesis of gold nanoparticles. Mater Sci Eng B, 2009, **163**(2): 93-98
- [80] Garcia-Hernandez C, Freese A K, Rodriguez-Mendez M L, *et al.* *In situ* synthesis, stabilization and activity of protein-modified gold nanoparticles for biological applications. Biomater Sci, 2019, **7**(6): 2511-2519
- [81] Yan J K, Liu J L, Sun Y J, *et al.* Green synthesis of biocompatible carboxylic curdlan-capped gold nanoparticles and its interaction with protein. Carbohydr Polym, 2015, **117**: 771-777
- [82] Leng Y, Fu L, Ye L, *et al.* Protein-directed synthesis of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles and their applications in multidimensional sensing. Sci Rep, 2016, **6**: 28900-28911
- [83] Piella J, Bastús N G, Puentes V. Size-controlled synthesis of sub-10-nanometer citrate-stabilized gold nanoparticles and related optical properties. Chem Mater, 2016, **28**(4): 1066-1075
- [84] 马春蕾, 王琦, 唐建可. 一种基于银镜反应制备荧光银纳米颗粒的方法: 中国, CN2017110129072018. 2018-03-20
Ma C L, Wang Q, Tang J K. Method for preparing fluorescent silver nanoparticles based on silver mirror reaction: China, CN2017110129072018. 2018-03-20
- [85] Gautam S, Dubey P, Gupta M N. A facile and green ultrasonic-assisted synthesis of BSA conjugated silver nanoparticles. Colloids Surf B, 2013, **102**: 879-883
- [86] Gravel P. The Protein Protocols Handbook. New York: Humana Press, 2002: 145-175
- [87] Hendler N, Fadeev L, Mentovich E D, *et al.* Bio-inspired synthesis of chiral silver nanoparticles in mucin glycoprotein—the natural choice. Chem Commun, 2011, **47**(26): 7419-7421
- [88] Wang Q, Ma C L, Tang J K, *et al.* Eggshell membrane-templated MnO₂ nanoparticles: facile synthesis and tetracycline hydrochloride decontamination. Nanoscale Res Lett, 2018, **13**(1): 255-262
- [89] Ma C L, Ren W S, Tang J K, *et al.* Copper nanocluster-based fluorescence enhanced determination of d-penicillamine. Luminescence, 2019, **34**(7): 767-773
- [90] Zain N M, Stapley A, Shama G. Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. Carbohydr Polym, 2014, **112**(20): 195-202
- [91] Needham D, Dewhirst M W. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. Adv Drug Deliv Rev, 2001, **53**(3): 285-305
- [92] Link S, Burda C, Mohamed M C, *et al.* Laser photothermal melting and fragmentation of gold nanorods: energy and laser pulse-width dependence. J Phys Chem A, 1999, **103**(9): 1165-1170
- [93] Song C Y, Li F, Guo X Y, *et al.* Gold nanostars for cancer cell-targeted SERS-imaging and NIR light-triggered plasmonic photothermal therapy (PPTT) in the first and second biological windows. J Mater Chem B, 2019, **12**: 2001-2008
- [94] Sasidharan S, Bahadur D, Srivastava R. Albumin stabilized gold nanostars: a biocompatible nanopatform for SERS, CT imaging and photothermal therapy of cancer. Rsc Adv, 2016, **6**(87): 84025-84034
- [95] Maltzahn G V, Park J H, Agrawal A, *et al.* Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas. Cancer Res, 2009, **69**(9): 3892-3900
- [96] Lee S, Kim S, Choo J, *et al.* Biological imaging of HEK293 cells expressing PLCγ1 using surface-enhanced Raman microscopy. Anal Chem, 2007, **79**(3): 916-922
- [97] Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv, 2009, **27**(1): 76-83
- [98] Ping G, Li H, He X, *et al.* Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles. Nanotechnology, 2007, **18**(28): 285604
- [99] Prabhu D, Arulvasu C, Babu G, *et al.* Biologically synthesized green silver nanoparticles from leaf extract of *Vitex negundo* L. induce growth-inhibitory effect on human colon cancer cell line HCT15. Process Biochem, 2013, **48**(2): 317-324
- [100] Naimi-Shamel N, Pourali P, Dolatabadi S. Green synthesis of gold nanoparticles using *Fusarium oxysporum* and antibacterial activity of its tetracycline conjugant. J Mycol Med, 2019, **29**(1): 7-13
- [101] Akintelu S A, Olugbeko S C, Folorunso A S. A review on synthesis, optimization, characterization and antibacterial application of gold nanoparticles synthesized from plants. Int Nano Lett, 2020, **10**: 237-248.
- [102] Padil V T, Černík M. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application. Int J Nanomed, 2013, **8**: 889-898
- [103] Tahvilian R, Zangeneh M M, Falahi H, *et al.* Green synthesis and chemical characterization of copper nanoparticles using *Allium*

- saralicum* leaves and assessment of their cytotoxicity, antioxidant, antimicrobial, and cutaneous wound healing properties. Appl Organomet Chem, 2019, **33**(12): e5234
- [104] Nethi S K, Das S, Patra C R, *et al.* Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications. Biomater Sci, 2019, **7**(7): 2652-2674
- [105] Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?. J Antimicrob Chemoth, 2007, **59**(4): 587-590
- [106] Zhang F, Yang H, Yang Y Q, *et al.* Stretchable and biocompatible bovine serum albumin fibrous films supported silver for accelerated bacteria-infected wound healing. Chem Eng J, 2021, **417**(4): 129145
- [107] Chen J Y, Yang L, Chen J W, *et al.* Composite of silver nanoparticles and photosensitizer leads to mutual enhancement of antimicrobial efficacy and promotes wound healing. Chem Eng J, 2019, **374**(15): 1373-1381
- [108] Zangeneh M M, Ghaneialvar H, Akbaribazm M, *et al.* Novel synthesis of *Falcaria vulgaris* leaf extract conjugated copper nanoparticles with potent cytotoxicity, antioxidant, antifungal, antibacterial, and cutaneous wound healing activities under *in vitro* and *in vivo* condition. J photochem photobiol B, 2019, **197**: 111556
- [109] Tian J, Wong K K Y, Ho C M, *et al.* Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. ChemMedChem, 2007, **2**: 129-136
- [110] Durán N, Marcato P D, Souza G D, *et al.* Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. J Biomed Nanotechnol, 2007, **3**(2): 203-208
- [111] Rotaru A, Dutta S, Jentsch E, *et al.* Selective dsDNA-templated formation of copper nanoparticles in solution. Angew Chem Int Ed Engl, 2010, **49**(33): 5665-5667
- [112] Qing Z H, Bai A L, Xing S H, *et al.* Progress in biosensor based on DNA-templated copper nanoparticles. Biosens Bioelectron, 2019, **137**(15): 96-109
- [113] Ou L J, Li X Y, Liu H W, *et al.* Poly(thymine) -templated fluorescent copper nanoparticles for ultrasensitive label-free detection of Pb²⁺ ion. Anal Sci, 2014, **30**(7): 723-727
- [114] Chen Z Z, Niu Y X, Cheng G Y, *et al.* A fast, highly sensitive and selective assay of iodide ions with single-stranded DNA-templated copper nanoparticles as a fluorescent probe for its application in Kunming mice samples. Analyst, 2017, **142**: 2781-2785
- [115] Luo L, Xu F Z, Shi H, *et al.* Label-free and sensitive assay for deoxyribonuclease I activity based on enzymatically-polymerized superlong poly(thymine)-hosted fluorescent copper nanoparticles. Talanta, 2017, **169**: 57-63
- [116] Chen J Y, Ji X H, Tinnefeld P, *et al.* Multifunctional dumbbell-shaped DNA-templated selective formation of fluorescent silver nanoclusters or copper nanoparticles for sensitive detection of biomolecules. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, **8**(3): 1786-1794
- [117] He Y, Jiao B N. Detection of biotin-streptavidin interactions based on poly(thymine) -templated copper nanoparticles coupled with Exo III-aided DNA recycling amplification. Sensor Actuator B Chem, 2018, **265**: 387-393
- [118] Bao Z C, Ru P L, Wei B Q, *et al.* Direct fluorescence detection of microRNA based on enzymatically engineered primer extension poly-thymine (EPEPT) reaction using copper nanoparticles as nano-dye. Biosens Bioelectron, 2017, **87**: 216-221
- [119] Li X X, Qing Z H, Li Y N, *et al.* Natural peptide probe screened for high-performance fluorescent sensing of copper ion: especially sensitivity, rapidity, and environment-friendliness. ACS Omega, 2019, **4**(1): 793-800
- [120] Qing Z H, Mao Z G, Qing T P, *et al.* Visual and portable strategy for copper(II) detection based on a striplike poly(thymine)-caged and microwell-printed hydrogel. Anal Chem, 2014, **86**(22): 11263-11268
- [121] 李柏枫, 胡珍, 马念, 等. 钯纳米材料的制备及应用. 材料导报, 2014, **28**(17): 24-29
- Li B F, Hu Z, Ma N, *et al.* Mater Rep, 2014, **28**(17): 24-29
- [122] Hirsch L R, Jackson J B, Lee A, *et al.* A whole blood immunoassay using gold nanoshells. Anal Chem, 2003, **75**(10): 2377-2381
- [123] Lopes L C, Lima D, Mendes Hacke A C, *et al.* Gold nanoparticles capped with polysaccharides extracted from pineapple gum: evaluation of their hemocompatibility and electrochemical sensing properties. Talanta, 2021, **223**(1): 121634
- [124] Chen Y, Feng T, Chen L, *et al.* Bovine serum albumin stabilized silver nanoclusters as "signal-on" fluorescent probe for detection of hydrogen peroxide and glucose. Opt Mater, 2021, **114**: 111012
- [125] Goswami N, Giri A, Bootharaju M S, *et al.* Copper quantum clusters in protein matrix: potential sensor of Pb²⁺ ion. Anal Chem, 2011, **83**(24): 9676-9680
- [126] Kharissova O V, Dias H, Kharisov B I, *et al.* The greener synthesis of nanoparticles. Trends Biotechnol, 2013, **31**(4): 240-248
- [127] Naskar A, Kim K S. Potential novel food-related and biomedical applications of nanomaterials combined with bacteriocins. Pharmaceutics, 2021, **13**(1): 86-101
- [128] 曹茂盛. 超微颗粒制备科学与技术. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 1998: 67-102
- Cao M S. Superfine Particle Preparation Science and Technology. Harbin: Harbin Institute of Technology Press, 1998: 67-102

The Preparation of Metal Nanomaterials Through Biochemical Methods and Their Applications in Biomedicine*

TANG Qian^{1,2)}, REN Wen-Sheng^{1,3)}, CAO Hong-Yu^{1,2)}, WANG Li-Hao^{1,3)}, ZHENG Xue-Fang^{1,2,3)**}

¹⁾Liaoning Key Laboratory of Bio-organic Chemistry, Dalian University, Dalian 116622, China;

²⁾College of Life Science and Biotechnology, Dalian University, Dalian 116622, China;

³⁾College of Environmental and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract In the past 40 years, metal nanomaterials have developed rapidly. Because the special properties of metal nanomaterials differ from macroscopic crystals, they have gradually played indispensable roles in all walks of life. At present, human beings are facing increasingly serious ecological problems, such as lack of resources and environmental pollution. Therefore, the green ecological model combining metal nanomaterials with biology is an irresistible general trend. This article mainly focuses on the bio-green synthesis methods of the preparation of the metal and metal oxide nanomaterials with various plant extracts, microorganisms, proteins and other biological materials as reducing agents. These methods are easy to operate and utilize biological reagents with unique physiological structures, which are not only environmentally friendly, but can also limit the growth of nanomaterials, overcome the enormous surface energy, and prevent the enlargement of the metal nanomaterials in size and structure due to Ostwald ripening or agglomeration. In addition, the combination of specific structures of biomaterials with metal nanomaterials usually exhibits synergy or new physicochemical and physiological properties. The surface plasmon resonance of metal nanomaterials will be enhanced under laser irradiation and can emit energy in the form of heat, so it can yield unusually brilliant results in the treatment of tumors. At the same time, with the enhancement of surface plasmon resonance effect, the Raman scattering of the material can be significantly enhanced, so Raman scattering bioimaging can be used to monitor the condition of the upper tumor cells in conjunction with photothermal therapy. Bacteriostatic and antibacterial is a characteristic of most metals, so metal nanomaterials are regarded as a new class of antibacterial biological reagents. The difficulty of wound self-healing lies in bacterial infection, so metal nanomaterials with antibacterial properties have become candidates for treating wounds and other conditions. Many characteristics of metal nanomaterials can be used as media for identifying biological signals and converting them into photoelectric signals to monitor changes with instruments, which has more convenient operation and higher accuracy. Metal nanomaterials prepared from biomaterials can improve and supplement existing medical methods, and accomplish medical goals conveniently and effectively. The biochemical preparation of metal nanomaterials will bring more intersections between the nanometer and biological fields in the future. There will be more interdisciplinary workers to work hard on the existing challenges, and there will be an indispensable figure of metal nanomaterials in medical field in the future.

Key words metal nanomaterials, biochemical preparation, medical applications

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0264

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21571025, 21601024, 21601025) and Scientific Research Platform Project of Dalian University(2021).

** Corresponding author.

Tel: 86-13941164782, E-mail: dlxfzheng@126.com

Received: September 6, 2021 Accepted: October 15, 2021