

荧光碳点的合成及对酿酒酵母的毒性研究

黄淮青 曾 萍 韩宝福 徐淑坤*

(东北大学理学院化学系, 沈阳 110819)

摘要:以葡萄糖为碳源采用溶剂热法合成了荧光碳点。紫外吸收光谱、荧光光谱以及透射电镜照片表明,所合成的荧光碳点发光性能优异,分散性好,且无团聚现象。荧光碳点原溶液出现浓度淬灭现象,稀释 60 倍情况下荧光最强。以酿酒酵母为模型生物,考察了不同生长时期(调整期、对数期早期、对数期中期)的酿酒酵母与不同浓度的荧光碳点共培养后的生长曲线。结果表明,即使荧光碳点浓度在 $27.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下也没有影响酵母菌的生长曲线,可认为基本没有细胞毒性。比较了相同荧光强度下的荧光碳点与 CdTe 量子点对酿酒酵母的细胞毒性,结果表明荧光碳点的毒性显著低于量子点的毒性。

关键词: 荧光碳点; 溶剂热法; 酿酒酵母; 细胞毒性

中图分类号: O613.71

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2012)01-0013-07

Preparation of Fluorescent Carbon Dots and Its Cytotoxicity for *Saccharomyce cerevisiae*

HUANG Huai-Qing ZENG Ping HAN Bao-Fu XU Shu-Kun*

(Department of Chemistry, Northeastern University, Shenyang 110819, China)

Abstract: Fluorescent carbon dots (CDs) were synthesized by a solvothermal method with glucose as the carbon source. UV absorption and fluorescence spectroscopy, and transmission electron microscopy (TEM) results showed that the synthesized CDs feature the excellent optical performance and high dispersion without agglomeration. The as-prepared CDs solution displayed a concentration quenching phenomenon and emitted the strongest fluorescence after being diluted 60 times. By using *Saccharomyce cerevisiae* yeast as a model organism, we investigated the dependence of yeast's growth on the concentration of fluorescent CDs at various growth periods (adjustment, initial and middle logarithmic phases). It is shown that there is no influence on yeast's growth curve even the concentration of fluorescent CDs as high as $27.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The yeast cytotoxicity of fluorescent CDs and CdTe quantum dots were also compared under the same fluorescent intensity, indicating a much lower cytotoxicity fluorescent of CDs than that CdTe quantum dots.

Key words: fluorescent carbon dots; solvothermal method; *Saccharomyce cerevisiae* yeast; cytotoxicity

0 引 言

荧光碳点(Fluorescent carbon dots, CDs),又称荧光碳纳米粒子,是继量子点之后又一种新型的荧光纳米材料。与传统的有机染料相比,荧光碳点具有稳定性高、激发波长和发射波长可调、易于表面功

能化、无“光闪烁”现象和抗光漂白性强等优点^[1-2],引起了人们广泛的关注,成为荧光纳米材料领域一个新的研究热点。目前,荧光碳点的合成方法主要有电化学法^[3-5]、浓酸氧化法^[6-7]、激光消融法^[8]、有机物碳化法^[9-10]、模板法^[11-12]等。其中,有机物碳化法相比于其它方法来说,对实验设备要求不高、成本低、

收稿日期:2011-07-14。收修改稿日期:2011-09-16。

国家自然科学基金(No.20875011)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: xushukun46@126.com, Tel: 024-83681343

碳源丰富、操作简单。Zhu 等^[13]报道了用微波辅助加热来碳化糖类物质以合成荧光碳点,目前还未见采用溶剂热法碳化糖类物质制备荧光碳点的报道。

荧光碳点是理想的生物荧光标记材料之一,具有广阔的应用前景。目前,已有大量报道将荧光碳点应用于细胞标记^[6,8,12,14-15],并被认为是生物相容性好,毒性低,对细胞损伤小^[6]。另外,荧光碳点既可用于单光子成像,又可用于双光子成像^[16],有望代替量子点成为生物医学领域中最具应用前景的环境友好型荧光纳米材料。然而,作为可能短期或长期存在于生物体内的荧光探针,荧光碳点是否也如量子点一样存在潜在的负面生物效应,至今还没有人进行过系统的研究。鉴于此,本实验以真核模式生物-酿酒酵母为研究对象,系统考察了以葡萄糖为碳源,溶剂热法合成的荧光碳点对不同生长时期酿酒酵母生长的影响,并比较了相同荧光强度条件下荧光碳点与 CdTe 量子点对酿酒酵母的细胞毒性。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

碲粉(纯度 99.999%,中国医药集团上海化学试剂公司); $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 、 NaBH_4 、巯基乙酸、甘氨酸、葡萄糖、乙二醇、 NaOH 均为分析纯试剂,购自国药集团化学试剂有限公司;胰蛋白胍购自上海生物工程有限公司;酵母提取物购自 BIO BASIC INC。酿酒酵母 Y45 购自中国科学院沈阳生态研究所。实验用水为 3 次蒸馏水。

UV-2000 紫外-可见分光光度计(北京瑞利公司),LS-55 荧光分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司),Technai F20 透射电镜(荷兰 FEI 公司),Leica DMIL 荧光显微镜(德国莱卡公司),ZHWHY 多振幅轨道式恒温培养振荡器(上海智诚分析仪器制造有限公司);HPX-9082MBE 电热恒温培养箱和 YXQ-LS-305 II 全自动立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),DS-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂),所有测试均在室温下完成。

1.2 荧光碳点的制备

荧光碳点的制备采用溶剂热法合成:取 0.5 g 葡萄糖溶于 25 mL 乙二醇/水(1:1 V/V)溶液中,并转移至反应釜中,在 180 °C 下反应 3 h。取出冷却至室温后,再加入 0.15 g 甘氨酸粉末于上述反应液中,于 120 °C 烘箱中恒温加热 12 h 进行钝化,即得到红

褐色的荧光碳点溶液,以碳计所制备荧光碳点的浓度是 $0.67 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 CdTe 量子点的制备

巯基乙酸稳定的 CdTe 量子点采用水热法合成,参照文献^[17-18]方法制备略有改动。将 0.1276 g 碲粉和 0.1211 g NaBH_4 分别倒入反应瓶中,注入 4.0 mL 水,在冰水浴和磁力搅拌下进行反应,约 4 h 后得白色混浊液,静置 10 min 后,得上层无色 NaHTe 水溶液。向三口烧瓶中加入 40 mL 浓度为 $0.020 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 溶液,并向其中通入 N_2 ,再加入 0.14 mL 巯基乙酸,用 $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液将上述溶液的 pH 调至 11.2~11.8 范围内,剧烈搅拌下用 N_2 脱氧 20 min。然后,迅速将上述新制备的 NaHTe 溶液注入到三口烧瓶中,继续搅拌 20 min,得桔黄色透明 CdTe 量子点原溶液。取一定量 CdTe 量子点原溶液加入到聚四氟乙烯反应罐中,在 140 °C 烘箱中恒温加热 90 min 即得到 CdTe 量子点,以 Te^{2-} 计量子点浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.4 酿酒酵母的培养与计数

酿酒酵母培养实验中所用培养液、锥形瓶、量筒和移液枪枪头等均在实验前经过 0.1 MPa,120 °C 高温高压灭菌 20 min。酿酒酵母 Y45 的培养基为:葡萄糖, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;蛋白胍, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;酵母提取物, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取少量斜面种子在 100 mL 锥形瓶(内装培养基 10 mL)培养基中,旋转式摇床($180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),温度 28 °C 条件下,培养 24 h 后取 0.1 mL 接入 100 mL 锥形瓶(内有培养基 10 mL),在相同条件下发酵 30 h。

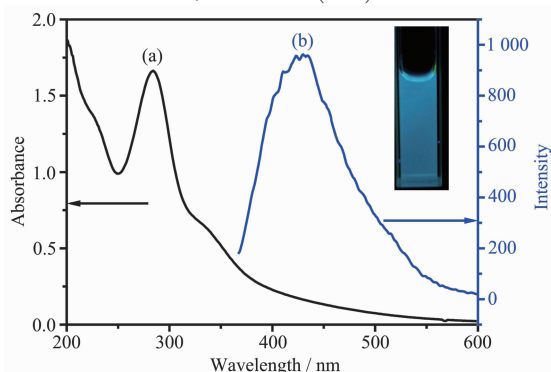
酿酒酵母的计数采用紫外吸收光度法,即每隔一段时间从各个锥形瓶中吸取 400 μL 酵母菌溶液于 5 mL 离心管中,加入 2 mL 蒸馏水稀释,以蒸馏水作空白,测定 600 nm 处的吸光度值(OD_{600} 值),以此判断酿酒酵母的生长阶段及相对数量。

2 结果与讨论

2.1 荧光碳点的表征

图 1 为合成的荧光碳点的紫外吸收与荧光发射光谱谱图。从图中可以看出,曲线 a 在 280 nm 左右处出现了明显的荧光碳点的特征吸收峰^[13]。在 345 nm 波长激发下,荧光碳点在 435 nm 处得到一个较强的发射峰(曲线 b),这与在紫外灯下荧光碳点发射的明亮蓝色荧光(图 1)一致。图 2 是该样品的透射电镜(TEM)照片,从图中可以看出,该方法合成的荧光碳点为直径 4~6 nm 左右的圆形颗粒,分散性好,无

团聚现象。高分辨电镜照片(HRTEM)显示,该碳点晶面间距为 0.213 nm,与石墨相(100)晶面十分吻合。



Inset is the photo of the solution illuminated by and UV lamp

图 1 荧光碳点溶液的紫外吸收光谱(a)、荧光发射光谱(b)以及暗场紫外灯照射下的照片

Fig.1 UV absorption (a) and FL spectrum (b) of the CDs in aqueous solution and its image under the UV light in dark field

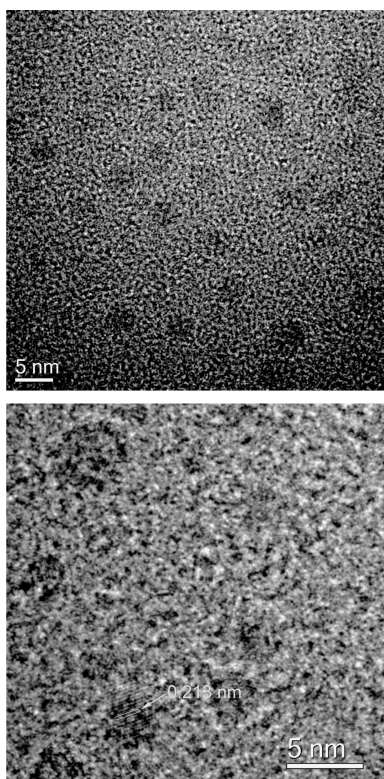


图 2 荧光碳点的透射电镜照片

Fig.2 TEM images of CDs

实验中还考察了所合成的荧光碳点在不同浓度下荧光强度的变化。如图 3a 所示,合成的荧光碳点原液用水稀释成不同的浓度,并没有出现发射峰位的移动,表明该水相法合成的荧光碳点能够稳定地分散在水溶液中。从图 3b 可以看出,随着碳点溶

液的不不断稀释,荧光强度呈现先增高后降低的趋势,当稀释到 60 倍的时候,荧光强度达到最大值。这可能是因为当碳点浓度过高时,碳点之间的距离很小,由此产生浓度淬灭现象,使得荧光较弱,因此制得的荧光碳点原液基本没有荧光(图中未给出)。当稀释到 60 倍时(浓度为 $11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)荧光强度最大,对荧光的浓度淬灭效应基本已经不存在,继续稀释溶液,荧光强度就随着碳点浓度降低而降低。因此理论上认为,该浓度为最佳的细胞标记浓度,后续的细胞毒性实验都是在该浓度下进行的。

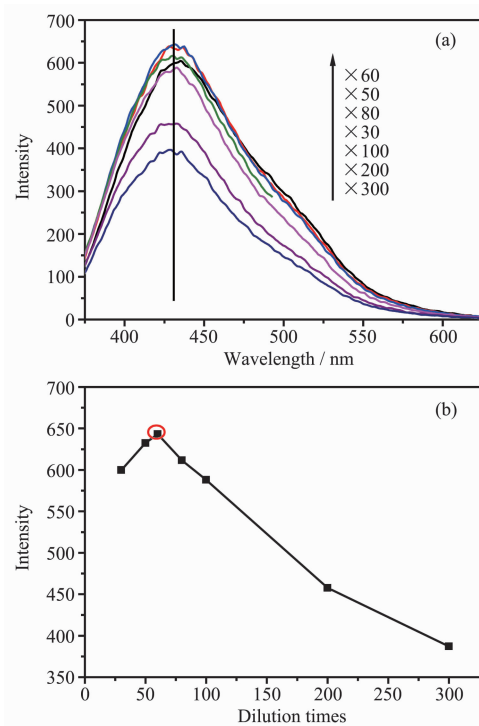


图 3 不同稀释倍数下荧光碳点的荧光发射光谱(a)和荧光强度与稀释倍数之间的关系(b)

Fig.3 Fluorescence emission spectra of CDs with different dilution times (a) and dilution time dependence of the luminescent intensity of CDs (b)

2.2 酿酒酵母生长曲线的测定

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),又称出芽酵母,它与同为真核生物的动物和植物细胞具有很多相同的结构,又容易培养,因此常被用作研究真核生物的模式生物。本实验采用酿酒酵母 Y45 菌种作为细胞毒性研究对象,以此考察合成的荧光碳点对细胞生长的毒性作用。酿酒酵母的生长一般有 4 个时期:调整期,对数期,稳定期,衰亡期。将酿酒酵母以 1%的接种量接种于培养基中,在 28°C , $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下培养,定期测定酵母菌的 OD_{600} 值,得生长曲

线如图 4 所示。由图中可知,随着酵母菌培养时间的增加,吸光度值逐渐增大,说明培养瓶中的酵母菌细胞逐渐增多,当培养时间为 24 h 时吸光度值基本达到最大,继续培养,吸光度值基本不发生变化。具体来说,在培养 0~6 h 时吸光度值变化不大,说明此时酿酒酵母处于生长的调整期;6~24 h 吸光度值迅速增加,说明此阶段细胞生长最快,为酿酒酵母的生长对数期;24 h 后酿酒酵母的生长基本达到稳定状态。

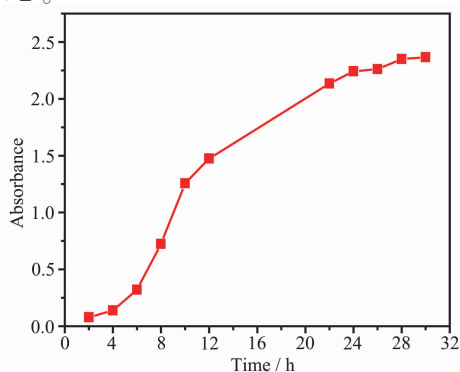


图 4 酿酒酵母的生长曲线

Fig.4 Growth curve of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts

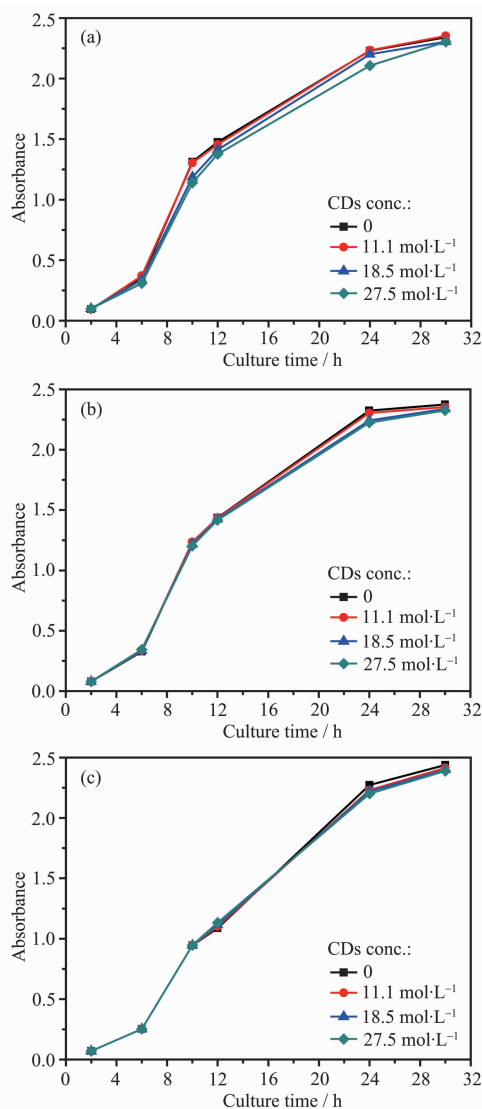
2.3 荧光碳点对酿酒酵母的细胞毒性

量子点是荧光碳点问世之前一种很有发展潜力的新型荧光生物探针^[19],在生物标记^[20-22]和生物检测^[23-24]领域具有良好的应用前景。然而,随着研究的深入,量子点的细胞毒性效应逐渐显现^[25],人们不得不对量子点的生物应用前景进行重新审视。作为与量子点类似的荧光碳点,也很有必要考察其细胞毒性。

2.3.1 荧光碳点对酿酒酵母生长的影响

根据酿酒酵母不同的生长阶段即在培养 2 h (调整期)、6 h (对数期早期)和 12 h (对数期中期)时分别加入用培养基稀释的浓度为 11.1 mmol·L⁻¹、18.5 mmol·L⁻¹、27.75 mmol·L⁻¹ 荧光碳点,然后在不同时间测酿酒酵母的吸光度值并绘制生长曲线。图 5 分别为在培养 2 h、6 h 和 12 h 时加入不同浓度碳点溶液后酿酒酵母的生长曲线图。由图 5a 可以看出,在酿酒酵母的调整期(2 h)加入荧光碳点,在经共培养至 10 h 时,酵母菌的数量与空白对照比较有明显的降低,同时数量的降低与荧光碳点的浓度有关,即碳点浓度越高,酵母菌的活性降低越多。由图中还可以看出碳点对酵母菌的影响主要体现在生长对数期,在这个阶段,荧光碳点的浓度越大,则对应的溶液中的酵母菌数量越少,表明酵母菌的活性越

差,该结果说明荧光碳点对处于调整期的酵母菌具有一定毒性,浓度越高毒性越大。继续培养,各样品间酵母菌的数量差别逐渐减小,当培养至 30 h 时,所有样品的酵母菌数量几乎相同,这说明荧光碳点对酵母细胞的毒性可通过菌自身的解毒作用消除。当在对数期早期(6 h)加入荧光碳点后(如图 5b 所示),与不同浓度碳点的共培养基本没有改变酿酒酵母的生长曲线,共培养至 10 h 与 12 h 时,各样品中酵母菌数量几乎没有差异,虽然在 24 h 时略有差异,但在 30 h 后各样品中酵母菌数量几乎相同。



(a) Adjustment phase, (b) Initial logarithmic phase and (c) Middle logarithmic phase

图 5 不同生长期酿酒酵母与不同浓度荧光碳点溶液共培养后的生长曲线

Fig.5 Growth curve of yeast in different grown phase adding CDs with different concentration

在对数期中期(12 h)时加入不同浓度的荧光碳点得到的生长曲线如图 5c 所示,从图中可以看出,加入不同碳点浓度的酵母菌的生长曲线与空白对照基本一致,酵母细胞数量只有微量的下降。表明荧光碳点在一定浓度范围内($<27.75 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)对酿酒酵母的生长基本不会产生影响,细胞毒性低到可以忽略。相对而言,在酵母菌的调整期和对数期早期时加入荧光碳点共培养,其细胞毒性要稍微大于在酵母菌对数期中期加入荧光碳点共培养的表现,因此后续实验主要在酿酒酵母的调整期(2 h)和对数期早期(6 h)比较荧光碳点和 CdTe 量子点的毒性。

2.3.2 荧光碳点和 CdTe 量子点细胞毒性比较

要比较荧光碳点与量子点对酿酒酵母的细胞毒性,有必要使得两种纳米发光材料的荧光强度相同。通过初步实验测得,当荧光碳点的荧光最强,即浓度为 $11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对应的发射相同荧光强度 CdTe 量子点的浓度为 $16.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过分别考察上述浓度的荧光碳点溶液和量子点溶液与不同生长期酿酒酵母共培养后的生长曲线可知,如图 6 所示,在酵母菌生长到 2 h 时加入荧光碳点(实线表示)与 CdTe 量子点(虚线表示)溶液,酵母菌的数量基本相同。继续培养至 10 h 时,加入 CdTe 量子点的酵母菌数量与图 4 所示的空白对照相比明显降低,培养 12 h 后酵母菌数量只见少量增长,继续培养则已不增加酵母菌的数量,而加入荧光碳点共培养的酵母菌生长没有受到影响,与空白对照所示的生长曲线基本相同。从在 6 h 时加入荧光碳点与量子点所得到的酵母菌生长曲线可以看出,在 10 h 之前二者对酵母菌生长的影响没有显著区别,细胞增长数量基本相同,说明 4 h 内毒物对酵母菌的影响很小。10 h 后与荧光碳点共培养的酵母菌继续生长,与图 4 所示空白对照基本一致,而与量子点共培养的酵母菌数量已不再增加。以上结果说明,荧光碳点的加入不影响酿酒酵母的生长,其生物相容性较好,毒性低,而 CdTe 量子点的细胞毒性则相对较强,它的加入改变了酿酒酵母的生长曲线,明显抑制酵母菌的生长,说明在相同荧光强度下,荧光碳点的细胞毒性明显小于 CdTe 量子点。同时,量子点对不同生长时期的酵母菌影响不同,相对而言,对调整期的酵母菌的影响要大于对数期的酵母菌。另一方面,量子点对酵母菌的毒性并不是一开始就产生作用,而是经过一段时间之后才会发挥作用,这可能与酵母

菌本身对重金属离子的解毒机制有关^[26]。

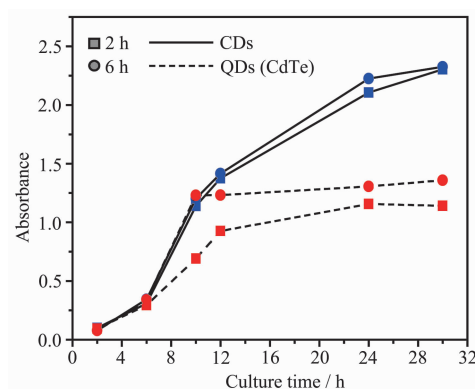


图 6 酵母菌调整期与对数早期分别加入相同荧光强度荧光碳点与量子点共培养后的生长曲线

Fig.6 Growth curve of yeast in adjustment and logarithmic phase after adding the CDs and QDs with same fluorescence intensity

实验还考察了更高浓度下,荧光碳点和量子点对酿酒酵母毒性的影响。设定上述相同荧光强度的荧光碳点(浓度为 $11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)与 CdTe 量子点(浓度为 $16.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的量为 1,继续增加荧光碳点和量子点的浓度,于对数期早期(6 h)加入酵母菌中与之共培养,培养 30 h 后测定酵母菌的 OD_{600} 值,结果如图 7 所示。由图可见,在荧光碳点溶液的量分别为 2 倍、3 倍和 6 倍时分别只引起了酵母菌数量 2.2%、4.8%、11.9% 的降低;相对应的,增加 2 倍、3 倍和 6 倍的 CdTe 量子点溶液则分别引起了酵母菌活性 50.1%、55.4%、61.2% 的降低。证明荧光碳点对细胞的毒性很小,即使在很高的浓度下,也只产生了微量的毒性;而相对来说,CdTe 量子点的细胞毒性则明显高于荧光碳点。

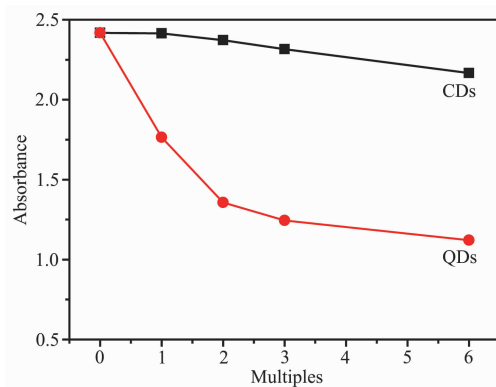


图 7 与不同浓度荧光碳点和量子点共培养后酿酒酵母的 OD_{600} 值

Fig.7 OD_{600} of yeast treated with different concentration of CDs and QDs

图 8 分别为空白对照(a)、与荧光碳点(b)以及量子点(c)共培养 24 h 后酿酒酵母的细胞形态显微照片。与空白相比,与荧光碳点共培养后的酿酒酵母细胞形态完好,出芽率相当,生长正常。而与量子点共培养后的酿酒酵母细胞虽然在形态上没有明显的改变,但出芽率降低,而且细胞数量明显减少,该现象说明量子点的存在抑制了酿酒酵母的生长。

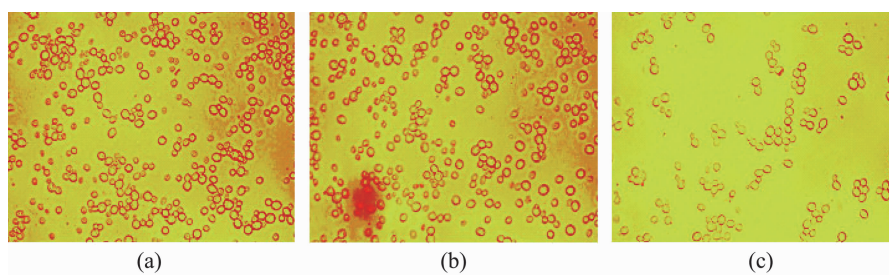


图 8 空白(a)、加入荧光碳点(b)、加入 CdTe 量子点(c)的酿酒酵母细胞形态

Fig.8 Morphology of yeast of control (a), treated with CDs (b) and CdTe QDs (c)

3 结 论

以葡萄糖为碳源,溶剂热法合成了发光稳定、荧光强度高、紫外灯下发蓝光且在水溶液中高分散的荧光碳点。其发光强度受浓度影响,原溶液稀释 60 倍时荧光强度最大。实验考察了荧光碳点对酿酒酵母生长的影响,分别在酿酒酵母生长调整期、对数期早期和对数期中期加入不同浓度的碳点溶液,利用紫外吸收光度法测定了不同条件下酵母菌的生长曲线。实验结果表明,分别在这 3 个不同时期加入碳点,酵母菌均生长良好,与空白相比基本没有毒性。比较相同荧光强度下的荧光碳点与 CdTe 量子点对酵母菌细胞毒性的实验结果表明,量子点的毒性远远大于荧光碳点的毒性。由此可见,荧光碳点具有优越的生物相容性,是一种很有应用前景的生物荧光探针。然而,目前合成的碳点与量子点相比,量子产率还存在很大差距。因此,应该进一步改进碳点的合成与修饰方法,制备出多色的高荧光强度和高质量量子产率的荧光碳点,促进其生物应用。

参考文献:

- [1] Han M Y, Gao X H, Su J Z, et al. *Nature Biotech.*, **2001**,**19** (7):631-635
- [2] Liu H P, Ye T, Mao C D. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**,**46** (34):6473-6475
- [3] Zhou J G, Booker C, Li R Y, et al. *JACS*, **2007**,**129**:744-745
- [4] Zhao Q L, Zhang Z L, Huang B H, et al. *Chem. Commun.*,

2008,**41**:5116-5118

- [5] Lu J, Yang J X, Wang J Z, et al. *ACS Nano*, **2009**,**3**(8):2367-2375
- [6] Ray S C, Saha A, Jana N R, et al. *J. Phys. Chem. C*, **2009**,**113**(43):18546-18551
- [7] Tian L, Ghosh D, Chen W, et al. *Chem. Mater.*, **2009**,**21**(13):2803-2809
- [8] Sun Y P, Zhou B, Lin Y, et al. *JACS*, **2006**,**128**(24):7756-7757
- [9] Peng H, Travas-Sejdic J. *Chem. Mater.*, **2009**,**21**(23):5563-5565
- [10] Bourlinos A B, Stassinopoulos A, Anglos D, et al. *Small*, **2008**,**4**(4):455-458
- [11] Bourlinos A B, Stassinopoulos A, Anglos D, et al. *Chem. Mater.*, **2008**,**20**(14):4539-4541
- [12] Liu R L, Wu D Q, Liu S H, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**,**48**(25):4598-4601
- [13] Zhu H, Wang X L, Li Y L, et al. *Chem. Commun.*, **2009**,**34**:5118-5120
- [14] Cao L, Wang X, Meziani M J, et al. *JACS*, **2007**,**29** (37):11318-11319
- [15] Li Q, Ohulchanskyy T Y, Liu R L, et al. *J. Phys. Chem. C*, **2010**,**114**(28):12062-12068
- [16] Sun Y P, Wang X, Lu F S, et al. *J. Phys. Chem. C*, **2008**,**112**(47):18295-18298
- [17] Li M Y, Ge Y X, Xu S K, et al. *Talanta*, **2007**,**72**(1):89-94
- [18] DONG Zai-Zheng(董再蒸), ZHOU Hua-Meng(周华萌), XU Shu-Kun(徐淑坤), et al. *Chin. J. Anal. Chem.(Fenxi Huaxue)*, **2009**,**8**(37):1215-1218
- [19] Shevchenko E V, Talapin D V, Kotov N A, et al. *Nature*,

- 2006,489:55-59**
- [20]SONG Qiang(宋强), ZHAO Chuan-Li(赵川莉), LI Li-Zhen (李丽珍), et al. *J. Shandong Univ. (Shandong Daxue Xuebao)*, **2005,43**(8):753-755
- [21]ZHANG Hai-Li(张海丽), LIU Tian-Cai(刘天才), WANG Jian-Hao(王建浩), et al. *Chinese J. Anal. Chem. (Fenxi Huaxue)*, **2006,34**(10):1491-1495
- [22]YANG Dong-Zhi(杨东芝), XU Shu-Kun(徐淑坤), CHEN Qi-Fan(陈启凡). *Spectrosc. Spectr. Anal. (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2007,27**(7):1807-1810
- [23]LI Zhi-Gang(李志刚), YANG Kai(杨凯). *Med. Recapitul. (Yixue Zongshu)*, **2011,17**(7):963-966
- [24]LI Meng-Ying(李梦莹), ZHOU Hua-Meng(周华萌), DONG Zai-Zheng(董再蒸), et al. *Metallurg. Anal. (Yejin Fenxi)*, **2008,28**(12):7-11
- [25]Su Y Y, Hu M, Fan C H, et al. *Biomaterials*, **2010,31**:4829-4834
- [26]CHEN Can(陈灿), WANG Jian-Long(王建龙). *China Biotechnol. (Zhongguo Shengwu Gongcheng Zazhi)*, **2006,26** (1):69-76