

氧化石墨烯纳米片对淀粉样蛋白纤维的影响

鄢朋¹ 霍庚阳¹ 储新星¹ 张公军² 李宾³ 周星飞¹

1(宁波大学 物理系 宁波 315211)

2(中国科学院宁波材料技术与工程材料所 宁波 315211)

3(中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

摘要 淀粉样蛋白纤维是引发神经退行性疾病的重要原因,抑制和阻碍蛋白纤维的形成已成为预防相关疾病的重要手段。为了快速、高效地清除、降解成熟胰岛素纤维以治疗II型糖尿病,本文用Hummer法制备了平均厚度为1 nm的氧化石墨烯纳米片(Graphene Oxide Nanosheets, GOs),研究了GOs对胰岛素纤维的作用。实验结果显示:GOs能够快速解离成熟胰岛素纤维并清除,其解离效果随GOs浓度的提高而显著加强。结合ThT荧光和显微傅里叶红外变换光谱(Micro Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Micro-FTIR)的测量结果推测GOs是通过抽取胰岛素纤维的蛋白分子改变纤维的二级结构,将其从原来的 β 折叠结构转变为 α 螺旋结构从而达到解离作用。

关键词 氧化石墨烯纳米片,胰岛素纤维,降解

中图分类号 TL99

DOI: 10.11889/j.0253-3219.2019.hjs.42.090501

The effect of graphene oxide nanosheets on the dissociation of amyloid fibers

YAN Peng¹ HUO Gengyang¹ CHU Xinxing¹ ZHANG Gongjun² LI Bin³ ZHOU Xingfei¹

1(School of Physical, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

2(Ningbo Institute of Material Technology and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Ningbo 315211, China)

3(Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

Abstract [Background] The formation of amyloid fibers is closely related to the neurodegenerative diseases. Inhibiting the formation of mature amyloid fibers has become an important approach to prevent related diseases. [Purpose] This work aims to prepare an efficient and rapid material to remove and degrade mature insulin fibers for the treatment of type II diabetes mellitus. [Methods] In this study, the effect of graphene oxide nanosheets (GOs) with an average thickness of 1 nm on mature insulin fibers was prepared by Hummer method. Both the ThT fluorescence and Micro Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Micro-FTIR) were employed to measure the outputs. [Results] GOs can effectively dissociate mature insulin fibers into short fibers and remove them. The dissociation effect is significantly enhanced with the increase of GOs concentration. [Conclusions] Combining the

国家自然科学基金(No.11474173、No.31670871)、浙江省自然科学基金(No.LY18A040003)、宁波市自然基金(No.2018A610220)资助

第一作者: 鄢朋, 男, 1991年出生, 2015年毕业于井冈山大学, 现为硕士研究生, 研究领域为淀粉样蛋白对神经退行性疾病影响

通信作者: 周星飞, E-mail: zhouxingfei@nbu.edu.cn

收稿日期: 2019-05-29, 修回日期: 2019-07-03

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.11474173, No.31670871), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.LY18A040003), Ningbo Natural Fund (No.2018A610220)

First author: YAN Peng, male, born in 1991, graduated from Jing Gang Shan University in 2015, master student, focusing on effect of amyloid protein on neurodegenerative diseases

Corresponding author: ZHOU Xingfei, E-mail: zhouxingfei@nbu.edu.cn

Received date: 2019-05-29, revised date: 2019-07-03

results of ThT fluorescence and Micro-FTIR, speculate that GOs changes the second structures of the mature insulin fibers by extracting the protein molecules, transforming it from the original beta fold to an alpha spiral structure.

Key words Graphene oxide nanosheets, Insulin fibers, Degradation

近年来,研究发现淀粉样蛋白沉积物可能是引发阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease, AD)、帕金森氏病(Parkinson's Disease, PD)及II型糖尿病(Type II Diabetes, T2D)的重要原因之一^[1-4]。具有 β 折叠结构的难溶性淀粉样蛋白聚集物对神经细胞有较大的毒性,是导致相关细胞发生功能性障碍或凋亡的主要因素^[5-7]。另外在淀粉样蛋白聚集物与AD的研究中认为抑制或清除相关蛋白的聚集物是治疗AD的有效方法^[8-9]。因此,合成相关药物以减缓淀粉样蛋白聚集物形成的速度或数量是缓解或治愈神经退行性疾病的重要途径之一。

随着纳米科技的发展,纳米材料(尤其是纳米颗粒)已经被广泛的应用到生物医疗领域,如纳米药物运载体、纳米造影剂、纳米生物传感器等^[10-11]。纳米颗粒对蛋白聚集的影响是一个非常复杂的生化过程,不同的纳米颗粒对淀粉样蛋白聚集的影响有显著的差异^[12-17]。由于碳纳米材料(石墨烯量子点、碳纳米管以及氧化石墨烯等)具有优异的物化性能,使其在基因递送、细胞成像和肿瘤治疗等方面有着广阔的应用前景^[18-20],如Ge等^[21]通过实验发现石墨烯可以干扰细胞膜的识别、摄取以及相关的生化反应而进入细胞质;Tu等^[22]通过研究表明裸露的石墨烯纳米片通过抽取细胞膜的磷脂分子来破坏大肠杆菌的膜结构,实现抑菌作用。同时,Duan等^[23]发现表面附有牛血清蛋白的氧化石墨烯纳米片(Graphene Oxide nanosheets, GOs)可以调控GOs对活细胞的毒性。特别地,Yang、Ge等^[24]基于荧光实验提出对“对接模型”和“嵌入模型”,并用分子模拟进一步研究了石墨烯、碳纳米管对A β 蛋白纤维的影响。他们认为石墨烯、碳纳米管和蛋白分子间的色散力、疏水作用力以及 π - π 堆积是诱导A β 纤维解离的主要原因。与石墨烯相比,GOs不仅具有较强的吸附作用力,更重要的是其表面有40%的碳原子被氧化而具有强亲水性和生物融合性,能与生物分子水溶液形成稳定环境。为此我们设计了不同浓度的GOs,研究了其对均匀、稳定成熟胰岛素纤维解离的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

胰岛素干粉末(Insulin)购于美国Aladdin试剂有限公司(上海),纯度 $\geq 24\%$;ThT荧光试剂购于美

国Sigma-Aldrich试剂有限公司(上海);去离子水的电导率优于 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$;HCl、H₂SO₄、KMnO₄等购于上海国药集团化学试剂有限公司。

实验测量采用的原子力显微镜(Atomic Force Microscope, AFM)为德国Bruker公司的Nanoscope V型;针尖为MikroMasch公司产的NSC11;ThT荧光和红外光谱(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)分别采用Fluoroskan Ascen-374标准型荧光光谱仪(美国赛默飞精密仪器有限公司)和美国Agilent有限公司的CARY-660型光谱仪。

1.2 实验方法

成熟胰岛素纤维溶液配制:在pH为2的盐酸溶液中加入一定质量的胰岛素干粉末,得到 $375 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胰岛素单体溶液,在70℃的水浴箱中连续培养3 d,就得到了成熟胰岛素纤维溶液,将其保存于-20℃环境中备用。

ThT荧光试剂配制:用去离子水将高浓度的ThT荧光试剂稀释成 $90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液并保存在4℃环境下。

GOs制备:利用改良后的Hummers法^[25]制备GOs,具体步骤为在鳞片石墨、硝酸钾、KMnO₄的混合固体中加入一定量的浓H₂SO₄,搅拌过夜,将混合液转移至去离子水中得到紫色混合液,冷却至室温后,在搅拌的条件下滴加H₂O₂溶液至混合液变成亮黄色,室温搅拌1 h,离心、洗涤后得到高浓度GOs水溶液,并于4℃冰箱中保存。解离实验前将浓的GOs分散液用水分别稀释至 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 并均匀分散。

胰岛素纤维解离实验:首先将2 mL $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 成熟胰岛素纤维溶液和2 mL去离子水等体积混合作为参照组,然后将2 mL $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 成熟胰岛素纤维溶液分别和2 mL $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的GOs分散液等体积混合作为实验组;并分别在各对照组和实验组混合液中加入2 mL $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ThT荧光试剂;在震荡机中摇动2 min后,将上述混合溶液置于37℃的恒温箱中培养3 d,将所得混合液做AFM测试(Tapping模式,用新剥离的云母作为衬底)^[26],扫描速率为1 Hz。AFM测试中所有形貌数据均用NanoScope-V1.20获取。并利用Micro-FTIR(采用透射模式,用金刚石制样)检测胰岛素纤维中的二级结构。为了实时监测不同浓度的GOs对成熟胰岛素纤维的动态解离过

程,我们取出 100 μL 的混合液并迅速转移到微孔板(孔径约 1.8 mm)中,并用干净透明的保鲜膜密封后置于 Fluoroskan Ascen-374 标准型荧光光谱仪样品架中,设置激发波长和发射波长分别设为 440 nm 和 485 nm,测量时间为 350 min。

2 实验结果与讨论

2.1 GOs 的表征

图 1(a) 是 GOs 在云母衬底上的 AFM 表面形貌,

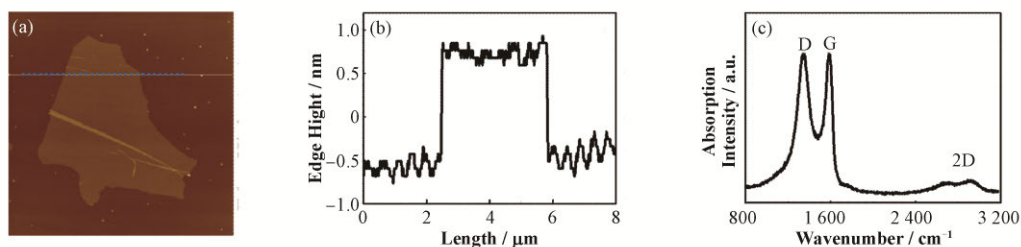


图 1 (a) GOs 的 AFM 形貌图, (b) 边沿高度图, 与图(a)的标记线对应, (c) GOs 拉曼光谱图。其中, AFM 的测量面积为 $10\ \mu\text{m}\times 10\ \mu\text{m}$, 氧化石墨烯纳米片浓度为 $75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Fig.1 (a) Surface morphology of GOs by AFM, (b) Edge height map of GOs, (c) Raman spectra of GOs

2.2 AFM 测量成熟胰岛素纤维长度

图 2 是胰岛素纤维经不同浓度的 GOs 处理 3 d 后的形貌图。用浓度为 $0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GOs 处理成熟胰岛素纤维溶液 3 d 后的 AFM 形貌作为对照组, 如图 2(a) 所示。图 2(b~d) 是用三种浓度的 GOs ($25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理成熟胰岛素纤维后的图像。显然, 从对照组图像中可以看出, 没有加 GOs 时胰岛素纤维很长; 然而在实验组的 AFM 图像中可以看出, 当 GOs 的浓度从 $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增加到 $75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以后, 胰岛素长纤维的长度发生了明显的变化, 从密集的点状结构变成稀疏的点状结构。因此 GOs 的浓度是影响成熟胰岛素纤维长度的重要因素, 而且纤维的长度随着 GOs 浓度的增加而减少。对图 2(a~d) 的胰岛素纤维长度统计结果如图 2(e) 所示。从图 2(e) 可以看出, 当 GOs 的浓度分别为 $0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 胰岛素纤维的长度分别为 $(3.56\pm 1.56)\ \mu\text{m}$ 、 $(1.38\pm 0.52)\ \mu\text{m}$ 、 $(0.48\pm 0.27)\ \mu\text{m}$ 和 $(0.15\pm 0.10)\ \mu\text{m}$, 表明胰岛纤维的解离跟 GOs 的浓度密切相关, 随着 GOs 的浓度增加, 成熟胰岛素纤维的长度明显变短。这说明 GOs 对成熟胰岛素纤维具有解离并清除作用。

2.3 成熟胰岛素纤维解离的动态过程

为了进一步研究 GOs 对成熟胰岛素纤维具有

图 1(b) 是标记线 AFM 的截面图, 可以看出 GOs 的表面平整且平均厚度约为 1.2 nm。Akhavan 等^[27] 认为单层石墨烯的厚度约是 0.43~1 nm, 因此我们实验中估计 GOs 为 2~3 层。图 1(c) 是 GOs 的拉曼光谱图, 图中位于 $1587\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1350\ \text{cm}^{-1}$ 和 $2678\ \text{cm}^{-1}$ 的峰分别代表 GOs 的 G、D 和 2D 峰^[28]。其中, G 峰是由 GOs 中碳原子的晶格振动引起; D 峰和 GOs 的结构缺陷有关系, 如晶界或边缘碳原子空缺^[29-30]; G、D 峰的强度比接近 1, 表明该样品的结构缺陷较大, 可能是由 GOs 表面丰富的含氧官能团^[31] 导致。

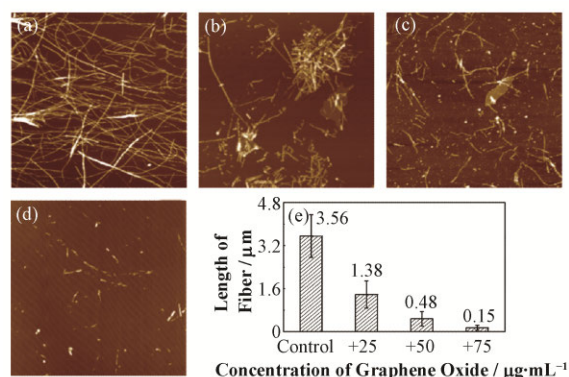


图 2 GOs 对胰岛素纤维的影响 (a~d) 胰岛素纤维分别与 $0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GOs 混合培养 3 d 后的 AFM 形貌, (e) 纤维长度统计图

Fig.2 AFM images of insulin fibers incubated at $37\ ^\circ\text{C}$ for three days in the presence of GOs at different concentrations (a) $0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (b) $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (c) $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (d) $75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (e) The statistical diagram of lengths of insulin fibers incubated with GOs at different concentration

解离作用, 我们利用 ThT 荧光标记法^[32-34] 动态检测 GOs 对成熟胰岛素纤维解离的过程, 如图 3(a) 所示。曲线 a 为对照组, 曲线 b~d 是实验组, 是分别用浓度为 $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GOs 处理胰岛素纤维时的测量结果。

当胰岛素溶液经浓度为 $0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GOs 处理后, ThT 的荧光强度相对比较稳定, 并维持在同一水平线上, 在后期荧光强度稍微有些增长, 我们认为这

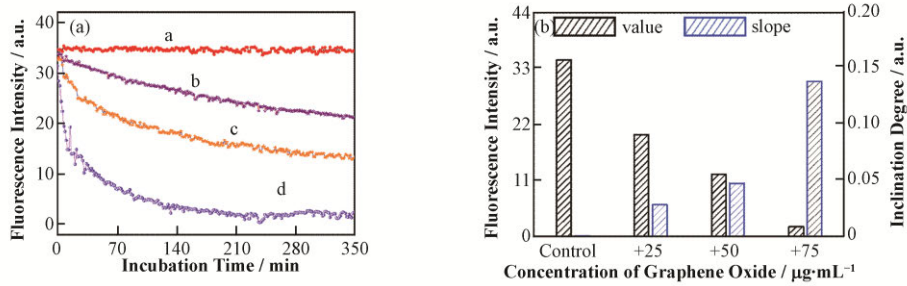


图3 (a) ThT荧光光谱检测不同浓度的GOs对胰岛素纤维的影响过程,其中曲线a~d分别代表GOs的浓度为 $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (b) 纤维解离过程的计算结果

Fig.3 (a) Kinetic analysis of insulin fibrils dissociation monitored by ThT fluorescence in the presence of GOs at different concentrations $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (b) The results of the process of insulin fibers dissociation

可能是测量过程中水溶液蒸发引起的结果。当GOs的浓度增加到 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后, ThT荧光强度极其短暂的时间内发生了明显的下降。从图2(a)中的曲线可以看出, 当GOs浓度从 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增加到 $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 其下降的程度越来越剧烈。对不同浓度的GOs, 荧光到达稳定时的时间约分别是240 min、360 min、400 min, 这个过程我们称为胰岛素纤维的解离期; 最后三组实验组的荧光强度逐渐趋向稳定, 分别维持在20.0、12.2和1.96, 我们称这个阶段为稳定期。如图3(b)所示, 加入不同浓度的GOs后胰岛素纤维溶液到达稳定期时的荧光强度。

从ThT荧光强度动态分析, 我们认为成熟胰岛素纤维被GOs解离过程可能经历解离期和稳定期。当GOs与胰岛素纤维接触后, 由于GOs与蛋白分子的吸附作用力远大于蛋白分子之间的相互作用力, 所以蛋白分子逐渐地吸附在GOs的表面实现蛋白分子的加速抽取(解离期)。当蛋白分子吸附在GOs表面后, 由于疏水作用力以及 π - π 堆积作用, 使胰岛素蛋白铺满GOs表面并形成稳定结构(稳定期), 最终导致纤维结构被破坏^[35-36]。如图3(b)是纤维在解离期的斜率和稳定期的荧光强度。斜率(K , 表示解离效果)的计算表达式如下:

$$K = \left| \frac{V_{\max} - V_{\min}}{\Delta T} \right|$$

结果表明:GOs的浓度直接影响解离效果, 浓度越大 K 值越高, 解离效果越明显, 这结果与AFM的观察结果是一致的。

2.4 成熟胰岛素纤维的二级结构变化

此外, 我们进一步通过Micro-FTIR光谱研究了GOs对胰岛素纤维二级结构的影响。一般在显微傅里叶红外变化光谱中的酰胺I带的 α 螺旋以及 β 折叠结构的特征峰会分别在 $1650\sim 1658 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1610\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ 区域内。正常情况下, 胰岛素单体

的二级结构主要是以 α 螺旋为主, 而成熟的胰岛素纤维的二级结构主要是以 β 片层结构为主。室温下胰岛素纤维经 $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的GOs处理3 d后, 胰岛素纤维的二级结构发生了显著的变化, 如图4所示。在对照组(图4a)和实验组(图4b~d)中, 可以明显地看到, 在 $1610\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1650\sim 1658 \text{ cm}^{-1}$ 区域内有两组完全不同吸收强度的峰值(称为 β 区、 α 区), 分别代表胰岛素的两种不同结构: α 螺旋、 β 片层折叠结构^[33]。如图4, 曲线a是对照组的实验(GOs浓度为 $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)结果, 从中我们可以看到 β 峰的吸收强度明显大于 α 峰的吸收强度, 这表明在成熟胰岛素纤维溶液中胰岛素纤维是以 β 片层折叠结构为主。然而在实验组b~d, 随着GOs的浓度不断提高($25\sim 75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 可以看到 α 和 β 峰的吸收强度出现了不同程度的变化。当成熟胰岛素纤维溶液经 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的GOs处理后(图4b)。 β 峰的吸收值发生了明显的减弱, 然而 α 峰出现了增强, 这表明经GOs处理后的成熟胰岛素纤维的二级结构发生了变化。有意思的是在曲线c和d中, 当GOs的浓度提高到 $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, α 峰和 β 峰的吸收强度与对照组的结果完全相反, α 峰的吸收强度远高于 β 峰的吸收强度, 说明此时的成熟胰岛素纤维溶液是以 α 螺旋结构为主。这表明样液中 β 折叠结构的纤维向 α 螺旋结构的单体发生转变。

另外, 波数段 $1610\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ β 峰的面积与 $1650\sim 1658 \text{ cm}^{-1}$ α 峰的面积比(S_{β}/S_{α})可以表征 β 折叠结构的向 α 螺旋结构的转变。因此, 我们计算了图4中a~d组的 S_{β}/S_{α} 值。在对照组实验中, 当GOs的浓度为 $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, S_{β}/S_{α} 值为4.92, 而当GOs的浓度从 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 提高到 $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, S_{β}/S_{α} 值分别从1.28降至0.48, 直到面积比为0.27。这表明随着GOs浓度的增加, 具有 β 折叠结构的成熟胰岛素纤维可以转变成以 α 螺旋为主的结构。根据实验结

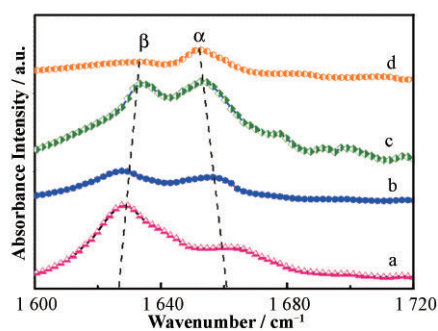


图4 常温下,胰岛素纤维经不同浓度的GOs处理3 d后的Micro-FTIR图

Fig.4 Micro-FTIR spectra of insulin fibers incubated at 37 °C for three days in the absence or in the presence of GOs at different concentration

果,我们推测GOs通过抽取成熟胰岛素纤维的蛋白分子的方式改变了胰岛素纤维原来的 β 折叠结构,形成了以 α 螺旋为主的结构,从而实现胰岛素纤维的解离,且解离效果是随GOs的浓度增加而显著提高^[35-36],如图5所示。

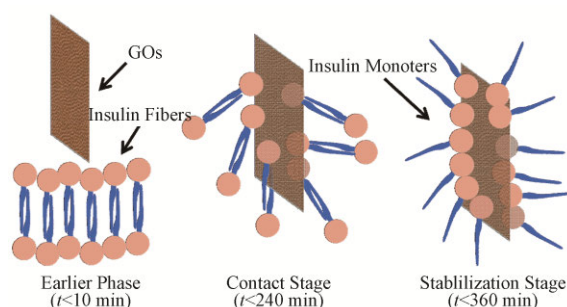


图5 GOs对胰岛素纤维作用过程示意图

Fig.5 Diagram of the process of insulin fibers treated by GOs

3 结语

我们用Hummer法制备了一种分散性良好的无机二维材料GOs,用于解离成熟胰岛素纤维。用多种生物物理实验的方法初步地探究了不同浓度的GOs对成熟胰岛素纤维的影响。AFM实验结果表明:GOs能够减小成熟胰岛素纤维长度,并对成熟胰岛素纤维具有高效的解离和清除作用。通过ThT荧光动态检测到GOs对成熟胰岛素纤维的解离作用需要经历两个阶段,即:解离期以及稳定期,而且解离过程和GOs的浓度密切相关。此外Micro-FTIR光谱显示:GOs不仅可以改变胰岛素纤维的二级结构,而且二级结构的改变速率还与GOs的浓度密切相关。GOs和蛋白的相互作用的分子机理还需要进一步研究。

参考文献

- 1 Khan M V, Zakariya S M, Khan R H. Protein folding, misfolding and aggregation: a tale of constructive to destructive assembly[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, **112**: 217-229.
- 2 Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases[J]. Cell, 2012, **148**(6): 1188-1203.
- 3 Soto Claudio. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2003, **4**(1): 49-60.
- 4 吕小平, 谭相石. 阿尔茨海默病相关的金属内稳态平衡调控研究[J]. 化学进展, 2013, **25**(4): 511-519.
LYU Xiaoping, TAN Xiangshi. Metals homeostasis and related proteins in Alzheimer's disease[J]. Progress in Chemistry, 2013, **25**(4): 511-519.
- 5 Konarkowska B, Aitken J F, Kistler J, et al. The aggregation potential of human amylin determines its cytotoxicity towards islet beta-cells[J]. FEBS Journal, 2006, **273**(15): 3614-3624.
- 6 Cooper G J S, Willis A C, Clark A, et al. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987, **84**(23): 8628-8632.
- 7 Zraika S, Hull R L, Udayasankar J, et al. Oxidative stress is induced by islet amyloid formation and time-dependently mediates amyloid-induced beta cell apoptosis [J]. Diabetologia, 2009, **52**(4): 626-635.
- 8 Howlett D, Cutler P, Heales S, et al. Hemin and related porphyrins inhibit β -amyloid aggregation[J]. FEBS Letters, 1997, **417**(2): 249-251.
- 9 Morshedi D, Rezaei-Ghaleh N, Ebrahim-Habibi A, et al. Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives-possible mechanism of action[J]. FEBS Journal, 2008, **274**(24): 6415-6425.
- 10 Sahni J, Doggui S, Ali J, et al. Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease[J]. Journal of Controlled Release, 2010, **152**(2): 208-231.
- 11 Chen Y, Chen Z, Sun Y, et al. Mechanistic insights into the inhibition and size effects of graphene oxide nanosheets on the aggregation of an amyloid- β peptide fragment[J]. Nanoscale, 2018, **10**(19): 8989-8997.
- 12 Cabaleiro-Lago C, Lynch I, Dawson K A, et al. Inhibition of IAPP and IAPP(20-29) fibrillation by polymeric nanoparticles[J]. Langmuir, 2009, **26**(5): 3453-3461.

- 13 Majzik A, Fülöp L, Csapó E, *et al.* Functionalization of gold nanoparticles with amino acid, β -amyloid peptides and fragment[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, **81**(1): 235–241.
- 14 Choi J S, Choi H J, Jung D C, *et al.* Nanoparticle assisted magnetic resonance imaging of the early reversible stages of amyloid β self-assembly[J]. *Chemical Communications*, 2008, **19**(19): 2197–2199.
- 15 Yoo S I, Yang M, Subramanian V, *et al.* Mechanism of fibrillation inhibition of amyloid peptides by inorganic nanoparticles reveal functional similarities with proteins [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, **50** (22): 5110–5115.
- 16 Park E J, Choi J, Park Y K, *et al.* Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells [J]. *Toxicology*, 2008, **245**(1–2): 90–100.
- 17 崔成毅, 张金海, 周星飞. 温度对胰高血糖素纤维生长的影响[J]. *核技术*, 2008, **31**(11): 877–880.
CUI Chengyi, ZHANG Jinhai, ZHOU Xingfei. Temperature effects on growth of glucagon fibers[J]. *Nuclear Techniques*, 2008, **31**(11): 877–880.
- 18 Sanchez V C, Jachak A, Hurt R H, *et al.* Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2011, **25**(1): 15–34.
- 19 Ristic B, Milenkovic M, Dakic L, *et al.* Photodynamic antibacterial effect of graphene quantum dots[J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(15): 4428–4435.
- 20 周晓艳, 汪冰, 陈汉清, 等. 同步辐射圆二色谱研究氧化石墨烯与腐殖酸的相互作用[J]. *核技术*, 2015, **38**(3): 030101. DOI: 10.11889/j.0253-3219.2015.hjs.38.030101.
ZHOU Xiaoyan, WANG Bing, CHEN Hanqing, *et al.* Study of the interaction between graphene oxide and humic acid by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy[J]. *Nuclear Techniques*, 2015, **38**(3): 030101. DOI: 10.11889/j.0253-3219.2015.hjs.38.030101.
- 21 Ge C, Tian J, Zhao Y, *et al.* Towards understanding of nanoparticle – protein corona[J]. *Archives of Toxicology*, 2015, **89**(4): 519–539.
- 22 Tu Y, Lyu M, Xiu P, *et al.* Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets[J]. *Nature Nanotechnology*, 2013, **8** (8): 594–601.
- 23 Duan G, Kang S G, Tian X, *et al.* Protein corona mitigates the cytotoxicity of graphene oxide by reducing its physical interaction with cell membrane[J]. *Nanoscale*, 2015, **7**(37): 15214–15224.
- 24 Yang Z, Ge C, Liu J, *et al.* Destruction of amyloid fibrils by graphene through penetration and extraction of peptides[J]. *Nanoscale*, 2015, **7**(44): 18725–18737.
- 25 Chen J, Yao B, Li C, *et al.* An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide[J]. *Carbon*, 2013, **64**(11): 225–229.
- 26 陈圣福, 韩公社, 阎隆飞, 等. 微管 APS-云母上的固定和 AFM 成像[J]. *核技术*, 1999, **22**(6): 354–357.
CHEN Shengfu, HAN Gongshe, YAN Longfei, *et al.* Immobilizing microtubule on APS-mica and imaging with atomic force microscopy[J]. *Nuclear Techniques*, 1999, **22** (6): 354–357.
- 27 Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene an graphene oxide nanowalls against bacteria[J]. *ACS Nano*, 2010, **4** (10): 5731–5736.
- 28 Mahmoudi M, Akhavan O, Ghavami M, *et al.* Graphene oxide strongly inhibits amyloid beta fibrillation[J]. *Nanoscale*, 2012, **4**(23): 7322–7325.
- 29 Gu Y, Wu H, Xiong Z, *et al.* The electrocapacitive properties of hierarchical porous reduced graphene oxide templated by hydrophobic CaCO_3 spheres[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2014, **2**(2): 451–459.
- 30 Ferrari A C, Meyer J C, Scardaci V, *et al.* The Raman fingerprint of graphene[J]. *Physical Review Letters*, 2006, **97**(18): 41–47.
- 31 Malard L, Pimenta M A, Dresselhaus G, *et al.* Raman spectroscopy in graphene[J]. *Physics Reports*, 2009, **473** (5): 51–87.
- 32 Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, **1804**(7): 1405–1412.
- 33 Robbins K J, Liu G, Selmani V, *et al.* Conformational analysis of thioflavin T bound to the surface of amyloid fibrils[J]. *Langmuir*, 2012, **28**(48): 16490–16495.
- 34 Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, *et al.* Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils[J]. *Journal of Structural Biology*, 2005, **151**(3): 229–238.
- 35 Monopoli M P, Aberg C, Salvati A, *et al.* Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials[J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, **7**(12): 779–786.
- 36 Mahmoudi M, Monopoli M P, Rezaei M, *et al.* The protein corona mediates the impact of nanomaterials and slows amyloid beta fibrillation[J]. *ChemBiochem*, 2013, **14**(5): 568–572.