

石墨烯在生物检测、药物载体及其安全性的研究进展^①

邓学秋¹, 岳桂华¹, 梁健钦², 钟振国^{1②}

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001 E-mail: dengxueqiu@foxmail.com;

2. 广西中医药大学, 中药制剂共性技术研发重点实验室, 广西 南宁 530001)

摘要: 石墨烯及其衍生物能在生物医学、电子信息学、电磁学、光学和力学等诸多学科领域展现出空前的发展前景, 得益于其优异的柔韧性和超强的硬度等力学性能, 以及优秀的导热、电性。本文就近年来石墨烯及其衍生物在生物检测、药物载体及其毒性、安全性的研究进展作综述。

关键词: 石墨烯; 生物检测; 药物载体; 安全性

中图分类号: R331; R73-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)06-0619-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.06.023

2004 年, 英国曼彻斯特大学物理学家安德烈·盖姆和康斯坦丁·诺沃肖洛夫成功从石墨中分离出石墨烯, 两人因此获得 2010 年诺贝尔物理学奖。石墨烯(Graphene)是具有蜂窝状结构的二维晶体, 由单层碳原子紧密排列而形成。石墨烯具有优异的物理化学性能, 如优秀的导电性和导热性、极好的柔韧性和力学性能、巨大的比表面积、良好的气体阻隔性和独特的光学特性。在电子学、生物医学、光学、磁学、催化、储能和传感器等诸多领域展现出巨大的应用潜能^[1-2]。现就石墨烯在生物检测、药物载体及其安全性的研究进展做一综述。

1 石墨烯在生物检测方面领域的应用

近年来, 石墨烯及其衍生物广泛运用于生物成像、生物检测、纳米药物运输系统、肿瘤治疗等方面。最近, 研究人员报道了在生物检测方面, 功能化石墨烯取得的一些进展。比如, 在 DNA、细菌分析和蛋白质检测方面, 以石墨烯为基底的生物传感器或生物装置发挥了不少作用。石墨烯因其制备成本低, 易于大规模生产, 在生物检测方面, 与碳纳米管相比, 其有望实现更为广阔的实际应用。

1.1 荧光分析法 联合纳米石墨烯片和硒化镉量子点探测肝癌的生物标记物甲胎蛋白(AFP), 通过光子激发, 一个电子-空穴对在纳米晶粒中形成, 建立了一种基于纳米石墨烯片为荧光受体, 硒化镉量子点作为能量供体的免疫荧光检测法^[3]。Al-Ogaidi 等^[4]利用该方法通过化学发光共振能量与石墨烯量子点的转移, 成功检测到卵巢癌生物标记物 CA-125。该检测有较高的特异性和灵敏度, 运用该方法可预测肿瘤反应和患者的存活率。通过进一步研究, 该方法有可能成为具有更高灵敏度与特异性的可靠的诊断新技术。

姜利英等^[5]采用荧光基团羧基荧光素(FAM)标记的核酸适体作为识别元件, 纳米氧化石墨烯(NGO)作为淬灭剂, 建立一种高选择性及灵敏度的核酸适体传感器。采用荧光分析法检测, 对比加入胰岛素前后溶液中荧光强度的变化, 获取荧光适体传感器的线性度和灵敏度, 从而实现对胰岛素浓度的测定。Verdian-Doghaei 等^[6]研究也表明, 石墨烯可与 DNA 碱基产生反应, 稳定吸附单链 DNA, 使荧光淬灭, 其淬灭效果明显高于其他有机淬灭剂, 是研究生物传感器的最佳材料^[7-8]。石墨烯纳米孔设备能快速完成 DNA 测序, 与荧光体相比, 在生物成像中石墨烯量子点具有不会出现光漂白、荧光更稳定和不易光衰等特点。

1.2 电化学分析法 窦砚鹏等^[9]直接采用电化学还原法在玻碳电极上制备石墨烯修饰的电极和石墨烯/纳米纤维素/亚甲基蓝复合材料修饰电极, 采用标准三电极体系: 以饱和甘汞电极(SCE)作为参比电极, 以铂丝作为对电极, 以直径为 4 mm 的玻碳电极或经过石墨烯和石墨烯/纳米纤维素/亚甲基蓝复合材料修饰的玻碳电极作为工作电极。60 ml pH7.0 的 PBS 溶液作为支持电解质溶液, 在(25±0.5)℃的条件下进行循环伏安测试, 从而实现抗坏血酸和尿酸共存时两种物质的定量检测。

徐进振等^[10]在玻碳电极表面滴涂一层 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)分散的石墨烯, 制备出石墨烯修饰电极, 建立分别测定去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(EP)和多巴胺(DA)三种儿茶酚胺神经递质的电化学方法。近年来国内外多项研究也表明, 电化学分析法已成为该领域的研究热点, 石墨烯等多种材料被用作电极修饰材料测定儿茶酚胺类神经递质^[11-12]。

越来越多的中草药有效化学成分和电化学指纹图

① 基金项目: 广西中医药大学校级课题项目(P2016004)

② 通信作者, E-mail: zhongzg@gxtcmu.edu.cn

谱使用石墨烯纳米材料来检测。选择不同的检测电极和检测方法检测不同对象,从而获得一种中药的多种成分信息^[13]。建立诸多系统分析技术,例如药材采集、提取、处理、分离、检测条件的优化和样品分析等,用于药材鉴别、药物质量评价、中药制剂的质量控制和药物资源调查等。这拓宽了石墨烯纳米材料的应用范围、应用价值、实际意义和前景空间。

2 石墨烯在药物载体方面的应用

化疗是治疗癌症的一种重要方法。但由于药物抵抗和细胞低摄取效率,出现了多种不良反应,比如对妊娠滋养细胞肿瘤的传统静脉化疗易发生致命性大出血风险^[14];多次经肝动脉化疗栓塞术会加重肝硬化及食管胃底静脉曲张,从而增加了消化道出血的风险^[15]。因此,低毒性、不良反应少、高效率的靶向药物是未来的主要研究方向。目前,许多研究^[16]关注石墨烯及其衍生物,通过外部控制非侵入性药物,运用分子开关,通过极化、磁场强度、红外光、超声、射频等,诱导载体响应来控制药物的释放。国内科研人员在石墨烯修饰的药物载体领域方面开展了很多研究工作。

2.1 NGO 药物载体 NGO 具有其他纳米材料无可比拟的超高载药率,因其具有单原子层厚度,并且它的两个基面都可以吸附药物。以 NGO 为药物载体,对阿霉素(DOX)的装载率能达到 238%,远远超过普通载药材料^[17],在不同 pH 值下装载 DOX 的 NGO 对 DOX 的释放动力学行为不同,实现了 DOX 在 NGO 上高效负载和可控释放^[18]。可见,由于其超高的载药量、靶向输送和药物的可控释放等特性,基于石墨烯的药物载体有望在临床上实现实际应用^[19]。

2.2 聚乙二醇修饰的纳米氧化石墨烯(NGO-PEG)药物载体 有研究发现,NGO-PEG 在药物载体和光热疗法方面拥有巨大的潜力。NGO 经过聚乙二醇(PEG)修饰后,可作为难溶性含芳香结构的抗癌药物载体。在生理条件下,或在血清中,NGO-PEG 均具有良好的生物稳定性和生物相容性,没有明显的生物细胞毒性。将抗癌药物如喜树碱衍生物(SN38)通过 π - π 堆积等物理作用吸附在 PEG 化的 NGO 表面,形成石墨烯-药物复合物(NGO-PEG-SN38),NGO-PEG-SN38 在体外对结肠肿瘤细胞 HCT-116 的杀伤效果是依立替康(CPT-11, FDA 用于治疗结肠癌的 SN38 药物前体)的近 1000 倍^[20]。此外,将 DOX 与 NGO-PEG 制成 NGO-PEG-DOX 后,能促进化疗和光热联合疗法在人体内外对肿瘤的消融作用,提高对肿瘤的治疗效果。与单一的化疗或光热疗法相比,联合疗法具有协同作用,能显著提高疗效,并且系统生物毒性更低^[21]。

2.3 戊二醛(GA)修饰的磁性还原氧化石墨烯(MRGO-GA)药物载体 由于抗生素耐药菌株的出现,普

通的抗生素疗效越来越低,开发一种能够有效抑制或杀死细菌的新型抗菌材料至关重要。石墨烯相比碳纳米管表现出更好的光热抗菌效应。近年来发现的磁还原氧化石墨烯修饰戊二醛(MRGO-GA)是一种相比碳纳米管表现出更好光热抗菌疗效的材料。利用 MRGO-GA 在近红外(NIR)激光照射下优异的光热性能、GA 对细菌的高捕获力以及磁性使得细菌易于被困在一个小体积范围内,MRGO-GA 能有效杀灭革兰氏阳性金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性大肠埃希菌。此外,在微流控芯片系统控制的连续运行模式下,MRGO-GA 显示出可重复使用的性质,为在线光热灭菌提供了一个生物相容性平台^[22]。

3 石墨烯的毒性、安全性问题

3.1 动物整体试验 一种材料是否对生物体具有毒性是衡量其能否作为生物医学材料最重要的标准之一。有研究发现,向昆明种小鼠静脉注射剂量为 1 mg/kg 的单层石墨烯,14 d 后未出现明显的炎症反应。当增加注射剂量至 10 mg/kg 时,小鼠肺部出现明显水肿、炎症反应、肉芽病变和组织纤维化^[23]。将实验动物分为低、中、高剂量组分别注射 0.1 mg、0.25 mg、0.4 mg NGO 时,低、中剂量组未见不良反应,而在高剂量组动物肺脏发现了肉芽病变^[24],并且出现剂量依赖的炎症反应。石墨烯材料的毒性影响主要取决于石墨烯类型、剂量等,使用时需对这些因素进行系统考察,从而最大限度地减小其不良反应。

3.2 细胞模型试验 活性氧自由基导致的氧化应激是碳纳米管和 NGO 产生毒性的主要机制,所以活性氧自由基的产生似乎是引起纳米石墨烯不良反应的重要因素。低浓度(10~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 NGO 对 A549 细胞既不会造成明显的毒性,也没有显著的细胞吞噬,然而高浓度(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 NGO 会产生氧化应激,从而导致细胞活力下降^[25]。还原石墨烯和纳米石墨烯在细胞毒性上比 NGO 大很多,而且都是氧化应激引起的^[26-27]。NGO 对 HeLa 细胞的毒性相对于纳米金刚石及碳纳米管显示出最低的细胞吞噬率,但三种碳纳米材料对 HeLa 细胞的毒性都显示出同样的浓度依赖性^[28]。

4 展望

石墨烯在生物医学领域的相关研究虽然已取得诸多进展,但目前大多都处于起步阶段,还不够系统深入。要实现它的实际应用,还面临着许多的困难和挑战。在载药系统上,石墨烯主要集中在小分子药物运输领域,未来有可能推广到基因和蛋白药物的靶向运输及治疗方面。而石墨烯在生物成像及检测、治疗、生物效应和安全性等领域的研究还比较少,石墨烯对 DNA、蛋白质等生物分子的强烈吸附会不会影响生物体系的生理功能,有待更多学者深入研究。总之,石墨

烯及其衍生物与生物体系的相互作用机制,需要在分子、细胞及器官乃至整体动物层次上进行深入的研究,这将为石墨烯在诸多领域的广泛运用提供更加健全可靠的依据。

参考文献:

- [1] 郑佳. 世界各国积极布局石墨烯产业基础研究与应用并行推进[J]. 新材料产业, 2013(9):19-23.
- [2] 尚玉栋, 李铁虎, 朱新伟, 等. 石墨烯/聚合物复合材料的制备与研究进展[J]. 炭素技术, 2016, 35(2):1-5.
- [3] 黄训, 何杰祥, 周长忍. 石墨烯的生物医用研究进展[J]. 高分子通报, 2016(5):68-81.
- [4] Al-Ogaidi I, Gou H, Aguilar ZP, et al. Detection of the ovarian cancer biomarker CA-125 using chemiluminescence resonance energy transfer to graphene quantum dots [J]. Chemical Communications (Cambridge, England), 2014, 50(11):1344-1346.
- [5] 姜利英, 肖小楠, 周鹏磊, 等. 基于氧化石墨烯荧光适配体传感器的胰岛素检测[J]. 分析化学, 2016, 44(2):310-314.
- [6] Verdian-Doghaei A, Housaindokht MR. Spectroscopic study of the interaction of insulin and its aptamer - sensitive optical detection of insulin[J]. Journal of Luminescence, 2014, 159(1):1-8.
- [7] Xu K, Meshik X, Nichols BM, et al. Graphene-and aptamer-based electrochemical biosensor. [J]. Nanotechnology, 2014, 25(20):696-710.
- [8] 董浩, 赵晓晖, 曲良东, 等. 氧化石墨烯/硒化锌纳米光电材料的制备及其蓝光发射特性[J]. 发光学报, 2014(7):767-771.
- [9] 窦砚鹏, 梁英, 彭俊军, 等. 石墨烯/纳米纤维素/亚甲基蓝电极同时检测抗坏血酸和尿酸[J]. 湖北大学学报:自然科学版, 2016, 38(1):73-78.
- [10] 徐进振, 张红, 同元辉, 等. 石墨烯修饰电极测定三种儿茶酚胺神经递质[J]. 广州化工, 2016, 44(11):160-162.
- [11] Wang XL, Li JJ, Yu ZJ. Selective Determination of Epinephrine in the Presence of Ascorbic Acid on a Carbon Nanotubes Modified Electrode Based on the Enhancement Effects of the Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide [J]. Int J Electrochem Sci, 2015, 10: 93-101.
- [12] Qin M, Cao K, Wang X, et al. Selective determination of catecholamine in the presence of ascorbic acid or uric acid on the membrane of silver nanoparticles/poly l-phenylalanine[J]. Ionics, 2013, 19(12):1891-1896.
- [13] 陈琪雯, 魏邦国, 陈刚. 基于碳基纳米材料的中药有效成分电化学检测技术研究[J]. 上海医药, 2012, 33(9):8-12.
- [14] 刘翠, 罗常华, 蒋绍莉. 静脉化疗与介入性动脉化疗治疗绒毛膜癌的临床对比研究[J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(2):228-229.
- [15] 韦邦宇. 肝动脉化疗栓塞综合治疗肝癌研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2013, 35(5):682-684.
- [16] Thomas, CR, Ferris DR, Lee JH, et al. Noninvasive remote-controlled release of drug molecules in vitro using magnetic actuation of mechanized nanoparticles[J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(31):10623-10625.
- [17] Murakami T, Ajima K, Miyawaki J, et al. Drug-Loaded Carbon Nanohorns: Adsorption and Release of Dexamethasone in Vitro[J]. Molecular Pharmaceutics, 2004, 1(6):399-405.
- [18] Yang X, Zhang X, Liu Z, et al. High-Efficiency Loading and Controlled Release of Doxorubicin Hydrochloride on Graphene Oxide [J]. J. Phys Chem C, 2008, 112(45):17554-17558.
- [19] Yokoyama M, Fukushima S, Uehara R, et al. Characterization of physical entrapment and chemical conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for in vivo delivery to a solid tumor[J]. Journal of Controlled Release, 1998, 50(1-3):79-92.
- [20] Liu Z, Robinson JT, Sun X, et al. PEGylated Nano-Graphene Oxide for Delivery of Water-Insoluble Cancer Drugs[J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(33):10876-10877.
- [21] Zhang W, Guo Z, Huang D, et al. Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide[J]. Biomaterials, 2011, 32(33):8555-8561.
- [22] Wu MC, Deokar AR, Liao JH, et al. Graphene-Based Photothermal Agent for Rapid and Effective Killing of Bacteria[J]. ACS Nano, 2013, 7(2):1281-1290.
- [23] Yang K, Wan J, Zhang S, et al. In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice[J]. ACS Nano, 2011, 5(1):516-522.
- [24] Wang K, Jing R, Song H, et al. Biocompatibility of Graphene Oxide[J]. Nanoscale Research Letters, 2010, 6(1):1-8.
- [25] Chang Y, Yang ST, Liu JH, et al. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells[J]. Toxicology Letters, 2011, 200(3):201-210.
- [26] Liao KH, Lin YS, Macosko CW, et al. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2011, 3(7):2607-2615.
- [27] Zhang Y, Ali SF, Dervishi E, et al. Cytotoxicity Effects of Graphene and Single-Wall Carbon Nanotubes in Neural Phaeochromocytoma-Derived PC12 Cells [J]. ACS Nano, 2010, 4(6):3181-3186.
- [28] Zhang X, Hu W, Li J, et al. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond[J]. Toxicology Research, 2012, 1(1):62-68.

收稿日期:2016-08-21;修回日期:2016-11-24