

功能化石墨烯的生物医药应用研究

张海燕^{1,2}, 邬伟魁¹, 杨明^{1,3*}

1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004
2. 西南交通大学 材料先进技术教育部重点实验室, 四川 成都 610003
3. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

摘要: 从2004年被发现至今, 石墨烯这种特殊的纳米材料的研究和应用备受关注。石墨烯的功能化是其进一步加工以充分发挥其优良性质的基础。石墨烯的生物医药应用还处在探索阶段, 如何根据实际需求对功能化石墨烯进行生物相容性、药物载体、生物检测等研究是极富挑战的工作。重点阐述了石墨烯在生物医药领域应用的最新研究进展, 并对其发展作了展望。

关键词: 石墨烯; 功能化; 生物医药; 纳米材料; 药物载体

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1235-04

Application of functionalized graphene materials in biomedicine

ZHANG Hai-yan^{1,2}, WU Wei-kui¹, YANG Ming^{1,3}

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
2. Key Laboratory of Advanced Technology of Materials, Ministry of Education, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610003, China
3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Key words: graphene; functionalization; biomedicine; nanomaterials; drug carrier

2004年, 英国曼彻斯特大学物理学家安德烈·海姆和康斯坦丁·诺沃肖洛夫成功地在实验中从石墨中分离出石墨烯(graphene)。由于他们在二维石墨烯材料的开创性研究, 共同获得2010年度诺贝尔物理学奖。石墨烯为“单层石墨片”, 是构成石墨的基本结构单元; 而碳纳米管(carbon nanotubes)是由石墨烯卷曲而成的圆筒结构。石墨烯的研究受碳纳米管相关研究的启发, 其发展历程与碳纳米管相似。在碳纳米管被发现之前, 碳的晶体结构主要有3种: 石墨(graphite)、金刚石(diamond)和富勒烯(fullerene)。由于石墨烯具有性能优异、成本低廉、可加工性好等众多优点, 人们普遍预测石墨烯在电子、信息、能源、材料和生物医药等领域具有重大的应用前景, 可望在21世纪掀起一场新的技术革命^[1]。

纳米医药是使用纳米结构的物质来诊断和治疗疾病的科学。人们常选择特殊给药途径(如口服、

脉管或瘤内给药), 将纳米物质安全有效地传递到靶器官发挥其应有的作用。作为药物载体、基因载体和显像剂, 纳米物质可以和受损组织或瘤生长部位结合, 这在未来医药领域具有较大的潜力^[2-3]。石墨烯的化学稳定性高, 其表面呈惰性状态, 与其他介质的相互作用较弱, 难溶于水及常用的有机溶剂。功能化是实现石墨烯分散、溶解和成型加工的重要手段。由于分子表面具有很多亲水性官能团, 且面积较大, 石墨烯氧化物(graphene oxide, GO)可以极细小的颗粒悬浮于水溶液或生理环境体系, 或应用于注射剂的研究。GO在水中具有较好的溶解性, 但其还原产物容易发生聚集, 并且很难再次分散; 功能化GO可有效增强其稳定性。虽然困难重重, 近年来, 石墨烯的生物医药应用还是取得了一定的进展, 为今后的研究奠定了基础。本文重点阐述了石墨烯在生物医药领域应用的最新研究进

收稿日期: 2011-01-12

基金项目: 中医药行业科研专项资助项目(200708006); 新药创制重大专项资助项目(2009ZX09103-393); 中药新型给药系统技术平台“十一五”重大新药创制项目(2009ZX09310-005)

作者简介: 张海燕(1980—), 女, 河北承德人, 讲师, 在读博士研究生, 从事中药新辅料、新工艺、医用材料研究。

Tel: (0791)7119010 E-mail: haiyansl@163.com

*通讯作者 杨明 Tel: (0791)7118658 E-mail: yangming16@126.com

展, 并对其发展作了展望。

1 生物相容性在体研究

在生物医药领域应用 GO 的可行性研究中, 其吸收、代谢、分布、排泄和生物相容性等方面的信息显得尤为重要。Zhang 等^[4]用放射性示踪技术和一系列的生物分析技术, 研究了 GO 在鼠体内的分布和生物相容性。结果显示, GO 主要分布在肺部, 滞留时间较长; 较之其他碳纳米材料, GO 的血循环时间较长 [半衰期为 (5.3±1.2) h], 其网状内皮系统吸收较少; 给予 1 mg/kg GO, 14 d 未见脏器病理学改变。GO 还具有良好的红细胞相容性。结果提示, 在生物医药领域 GO 具有很大的应用潜力, 特别是作为肺部靶向给药载体。值得注意的是, 在 10 mg/kg 剂量时, GO 引起显著的脏器病理学改变, 如炎症细胞浸润、肺水肿和肉芽肿。今后需特别重视其不良反应研究。

2 细胞毒性研究

Sun 等^[5]将抗肿瘤药物多柔比星 (DOX) 负载于石墨烯, 进行载药后的细胞 (人 B 淋巴瘤细胞株 Raji 细胞、白血病 CEM 细胞) 毒性研究。结果显示, 聚乙二醇修饰的纳米石墨烯氧化物负载上抗癌药并接上抗体后, 在体外可以特异性抑制特定的癌细胞, 且药物浓度存在一个治疗窗。

Chang 等^[6]研究了 GO 对肺上皮细胞 (A549) 的细胞毒性 (形态、活性、死亡率和膜完整性)。结果提示, GO 不进入细胞, 无明显细胞毒性。但是 GO 存在细胞氧化应激作用, 且有一定的剂量依赖性, 高浓度可导致细胞活性稍微降低。GO 的细胞毒性与剂量和粒径大小有关, 这是 GO 在生物应用中应考虑的问题。总体而言, GO 在细胞水平上是一种安全的材料, 细胞在 GO 薄膜片上生长状态良好, 这一点也证实了其安全性。

Kalbacova 等^[7]用化学蒸发沉淀法制备了单层石墨烯, 用人成骨细胞和间充质细胞评价其细胞毒性。重点研究了细胞在石墨烯上的黏附、形态和增殖能力。结果发现, 两种细胞在石墨烯上的黏附和增殖能力都优于硅片。提示石墨烯片无细胞毒性, 有望成为具有骨传导和骨诱导作用的骨移植体 (或其组成部分)。

3 载药研究

在药物医学研究领域, 希望得到表面有特殊功能团、可以负载药物的多功能纳米材料^[8-9]。粒径小于 100 nm 的 Au^[10]、Fe₃O₄^[11]和高分子聚合物^[12]等

毫微粒已在不同程度上用于载药研究。由于石墨烯具有单原子层结构, 其比表面积很大, 非常适合用作药物载体。有研究表明, GO 具有很高的载药能力^[13], 并可通过非共价键作用吸附芳香药物, 负载疏水药物^[14], 对于水难溶性药物的剂型设计意义重大。Liu 等^[14]制备了具有生物相容性的聚乙二醇功能化的石墨烯 (NGO-PEG), 厚度为 5~50 nm (GO 厚度为 50~500 nm)。使石墨烯具有很好的水溶性, 并且能够在血浆等生理环境下保持稳定分散; 然后利用 π - π 相互作用首次成功地将抗肿瘤药物喜树碱衍生物 (难溶性芳香分子 SN38) 负载到石墨烯上, 开启了石墨烯在载药方面的应用研究。Sun 等^[5]还将抗肿瘤药物 DOX 负载到石墨烯上, 并进行载药后的细胞毒性研究。制备方法是 将 0.5 mmol/L DOX 和 NGO-PEG 溶液 (0.2 mg/mL) 混合, 调 pH 值至 8, 过夜。未结合的 DOX 用滤器滤过除去, 反复冲洗。NGO-PEG/DOX 复合物重新混悬, 4 °C 保存。

利用氢键作用, 以可溶性石墨烯作为药物载体, 实现了抗肿瘤药物阿霉素 (DXR) 在石墨烯上的高效负载^[13]。由于石墨烯具有很高的比表面积, DXR 的负载量可达 235%, 远远高于其他传统的药物载体的负载量 (100%)。DXR 在中性条件下负载量最高, 碱性条件下次之, 酸性条件下最低; 其释放过程也可以通过 pH 值来控制, 通过调节 pH 值改变石墨烯与负载物的氢键作用, 实现药物的可控负载和释放。另外, 利用 Fe₃O₄ 功能化的石墨烯作为药物载体, 可制得靶向给药系统^[15]。DXR 在 Fe₃O₄ 功能化的石墨烯上的负载量可达 108%, 高于传统药物载体。该负载物在酸性条件下可以发生聚沉, 并且在磁场作用下发生定向移动; 在碱性条件下又可以重新溶解。以上研究表明, 功能化的石墨烯材料在可控释放及靶向控制的药物载体中崭露头角, 在生物医药和生物诊断等领域的应用前景广阔。最近, Yang 等^[16]研制了一个 pH 敏感型的多重靶向 GO 载药体系, 对 DXR 的负载量达 38.7%。

Fe₃O₄ 纳米粒通过与羧基的共价作用连接到 GO 表面 (羧基的定位作用可削弱 Fe₃O₄ 的团聚), 形成直径 2~4 nm 的颗粒; 该 Fe₃O₄ 石墨烯复合物 (Fe₃O₄-GO) 可以在外部磁场作用下向肿瘤组织定向移动。基于多数肿瘤表面含有大量的叶酸受体及叶酸偶联蛋白白纳米粒在肿瘤细胞中的摄取量显著提高的理论, 把叶酸连接到 Fe₃O₄-GO, 可增加体系对肿瘤细胞的亲和力。由于 GO 极高的比表面积、sp²

共轭效应和分子氢键供受体, 该载体可以通过 π - π 堆积和氢键作用负载大量的 DXR; 随着 pH 值的改变, DXR 和载体形成的氢键种类还会发生变化。由于肿瘤细胞较正常细胞而言显酸性, 该体系对癌细胞预期释药量将高于正常细胞, 从而形成三重靶向效果。在实验条件下, 乳腺癌 SK3 细胞株对 DXR 的摄取量远高于其他正常细胞, 且没有显著不良反应, 证实了该多重靶向载药体系的安全性和有效性。

Bai 等^[17]制备了载药 GO 聚乙烯醇复合物 (GO/PVA) 水凝胶, 并在生理 pH 条件下评价药物释放情况。该载药凝胶含 5 mg/mL GO, 药物 VB₁₂ 负载量为 3 mmol/L。Zhang 等^[18]以罗丹明 B (RB) 为模型药物, 设计了一种实时监测载药和释药的方法。通过监测不同时间的累积释药量, 研究了 RB 在不同 pH 时的释放机制。体外实验结果表明, RB 在 GO 上的负载量为 50%。在 pH 7.4、4.5 的苯巴比妥钠 (PBS) 溶液中的释放结果提示, RB 释药为 pH 敏感型, 高 pH 值导致疏水力和氢键较弱, 故释药量较大; PBS 溶液和双蒸水中的释药量不同, 提示离子强度也对 RB 的释放产生影响。这种实时监测释药的方法与一般的渗透分析法不同, 亦可用于生物学其他实时监测研究中。Zhang 等^[19]在 GO 的生物毒性、可控联合载药和靶向运输等方面进行研究, 并取得新进展。研究表明, 纳米 GO 可被细胞吸收但没有明显的细胞毒性, 对一些芳香类的小分子药物具有超强的吸附能力, DXR 的载药率高达 400%, 远高于一般纳米材料载体, 非常适合作为靶向药物载体。运用化学法制备的 GO 化学偶联生物分子叶酸, 实现了抗癌药物阿霉素和喜树碱的可控联合载药和生物靶向运输, 并且在体外实验中表现出比单一载药更高的抗肿瘤效果。

4 生物检测研究

Yin 等^[20]装配了石墨烯、壳聚糖和 Fe₃O₄ 毫微粒改性玻璃碳电极 (graphene-chitosan/nano-Fe₃O₄/GCE), 用扫描电镜和电化学阻抗光谱鉴定了该电极。用循环伏安法和差分脉冲伏安法研究了鸟嘌呤核苷 (guanosine) 在 pH 7.0 PBS 条件下的电化学氧化行为。结果表明, 改性电极对鸟嘌呤核苷的氧化起到电催化和吸附作用。改性电极对鸟嘌呤核苷、鸟嘌呤 (guanine)、腺苷 (adenosine) 有不同的电化学氧化响应。该方法在尿样品和中医药研究中得到进一步应用, 结果令人满意。Li 等^[21]探索了一种直接又灵敏的检测手段, 用基于石墨烯修饰的

玻璃碳 (GN/GC) 电极复合基质, 检测抗肿瘤药芦荟大黄素 (AE)。修饰电极对 AE 有很好的电化响应, 比多层碳纳米管改性电极更灵敏且价廉。通过检测芦荟提取物 AE 和人尿样品, 评价了该电极的分析性能。结果表明, GN/GC 电极是简单、快速、灵敏的生物学分析手段, 前景广阔。

另外, 有研究报道石墨烯已被应用于电化学生物传感器, 利用剥落石墨烯纳米片替代碳纳米管构建了葡萄糖电化学传感器^[22-23]。

5 抗菌研究

Das 等^[24]通过化学还原 GO 混悬液中 AgNO₃ 的方法合成了 Ag 毫微粒。X 光衍射和透射电子显微术提示, Ag 毫微粒的粒径为 5~25 nm, 微粒的大小和形状取决于 AgNO₃ 溶液的浓度。用大肠杆菌和铜绿假单胞菌研究 Ag 毫微粒-GO 混悬液的抗菌活性, 结果表明, 铜绿假单胞菌对此杂化材料较敏感。

6 其他

石墨烯纳米片 (graphene nanosheets, GNS) 的功能化在生物医学研究和应用中非常重要。Hu 等^[25]用微波辐射法制备壳聚糖 (chitosan, CS) 修饰 GNS (GNS-CS), 并通过傅里叶变换红外光谱 (FTIR)、透射电镜 (TEM) 和 X 衍射 (XRD) 等方法表征。结果显示, CS 通过酰胺键共价结合到 GNS 表面, GNS-CS 纳米复合物可在乙酸水溶液中溶解, 分散性良好。有研究表明^[26], 通过诱导氧化应激和线粒体损伤介导的石墨烯纳米粒的光热治疗, 可导致肿瘤细胞的凋亡和坏死。石墨烯的光热治疗作用优于碳纳米管, 且具有表面积较大、价格较低、毒性更小等优点。纳米石墨烯或将成为癌症光热治疗的替代材料。

7 结语

功能化石墨烯具有良好的生物相容性、极低的细胞毒性、良好的载药性能和生物检测特质, 在生物医药领域崭露头角。特别是在药物溶解性和靶向性方面, 更是前景广阔。水难溶性药物负载于石墨烯, 可显著增加其溶解度, 在液体制剂特别是注射剂中应用潜力巨大。此外, 现代中药制剂需要新材料的应用, 可将石墨烯引入中药研究中。中药注射剂难溶性成分常影响其制剂质量, 增溶性辅料的加入却在一定程度上降低了注射剂的安全性; 功能化石墨烯的应用, 或许将给中药注射剂安全使用揭开新的序幕。中药多成分、多靶点的特点也使得其在抗肿瘤领域独具特色, 若将中药负载于石墨烯上,

构建靶向给药系统, 将能更好地发挥中药抗肿瘤作用。石墨烯药物载体系统的设计关系到载药量、释药行为等工艺; 同时, 应特别关注载体在生物体内的降解和排泄等问题。复合 GO 载药系统的有效性和载体的安全性是其进一步研究和扩大应用的关键所在。

参考文献

- [1] 黄毅, 陈永胜. 石墨烯的功能化及其相关应用 [J]. 中国科学 B 辑: 化学, 2009, 39(9): 887-896.
- [2] Kateb B, Chiu K, Black K L, *et al.* Nanoplatforams for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: What should be the policy? [J]. *Neuro Image*, 2011, 54: S106-S124.
- [3] 吴芸, 严国俊, 蔡宝昌. 纳米技术在中药领域的研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 403-408.
- [4] Zhang X Y, Yin J L, Peng C, *et al.* Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration [J]. *Carbon*, 2011, 49: 986-995.
- [5] Sun X M, Liu Z, Welsher K, *et al.* Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery [J]. *Nano Res*, 2008, 1: 203-212.
- [6] Chang Y L, Yang S T, Liu J H, *et al.* *In vitro* toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells [J]. *Toxicol Lett*, 2010, doi: 10. 1016/j. toxlet. 2010. 11. 016.
- [7] Kalbacova M, Broz A, Kong J, *et al.* Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells [J]. *Carbon*, 2010, 48: 4323-4329.
- [8] Chi F L, Guo Y N, Liu J, *et al.* Size-tunable and functional core-shell structured silica nanoparticles for drug release [J]. *J Phys Chem C*, 2010, 114: 2519-2523.
- [9] Suh W H, Suh Y H, Stucky G D. Multifunctional nanosystems at the interface of physical and life sciences [J]. *Nano Today*, 2009, 4: 27-36.
- [10] Ghosh P, Han G, De M, *et al.* Gold nanoparticles in delivery applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 1307-1315.
- [11] Zhang R Y, Wang X M, Wu C H, *et al.* Synergistic enhancement effect of magnetic nanoparticles on anticancer drug accumulation in cancer cells [J]. *Nanotechnology*, 2006, 17: 3622-3626.
- [12] Qiu L Y, Bae Y H. Polymer architecture and drug delivery [J]. *Pharm Res*, 2006, 23: 1-30.
- [13] Yang X Y, Zhang X Y, Liu Z F, *et al.* High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide [J]. *J Phys Chem C*, 2008, 112: 17554-17558.
- [14] Liu Z, Robinson J T, Sun X M, *et al.* PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 10876-10877.
- [15] Yang X Y, Zhang X Y, Ma Y F, *et al.* Superparamagnetic graphene oxide-Fe₃O₄ nanoparticles hybrid for controlled targeted biological applications [J]. *J Mater Chem*, 2009, 19: 2710-2714.
- [16] Yang X Y, Wang Y S, Huang X, *et al.* Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity [J]. *J Mater Chem*, 2010, doi: 10. 1039/c0jm02494e.
- [17] Bai H, Li C, Wang X L, *et al.* A pH-sensitive graphene oxide composite hydrogel [J]. *Chem Commun*, 2010, 46: 2376-2378.
- [18] Zhang R Y, Hummelgard M, Lv G, *et al.* Real time monitoring of the drug release of rhodamine B on graphene oxide [J]. *Carbon*, 2010, doi: 10. 1016/j. carbon.
- [19] Zhang L M, Xia J G, Zhao Q H, *et al.* Functional graphene oxide as nanocarriers for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs [J]. *Small*, 2010, 6: 537-544.
- [20] Yin H S, Zhou Y L, Ma Q, *et al.* Electrocatalytic oxidation behavior of guanosine at graphene, chitosan and Fe₃O₄ nanoparticles modified glassy carbon electrode and its determination [J]. *Talanta*, 2010, 82: 1193-1199.
- [21] Li J, Chen J H, Zhang X L, *et al.* A novel sensitive detection platform for antitumor herbal drug aloe-emodin based on the graphene modified electrode [J]. *Talanta*, 2010, 83: 553-558.
- [22] Lu J, Drzal L T, Worden R M, *et al.* Simple fabrication of a highly sensitive glucose biosensor using enzymes immobilized in exfoliated graphite nanoplatelets nafion membrane [J]. *Chem Mater*, 2007, 19(25): 6240-6246.
- [23] Lu J, Do I, Drzal L T, *et al.* Nanometal-decorated exfoliated graphite nanoplatelet based glucose biosensors with high sensitivity and fast response [J]. *ACS Nano*, 2008, 2(9): 1825-1832.
- [24] Das M R, Sarma R K, Saikia R, *et al.* Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide sheets and its antimicrobial activity [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 83: 16-22.
- [25] Hu H T, Wang X B, Wang J C, *et al.* Microwave-assisted covalent modification of graphene nanosheets with chitosan and its electrorheological characteristics [J]. *Appl Surf Sci*, 2011, 257: 2637-2642.
- [26] Markovic Z M, Trajkovic L M H, Markovic B M T, *et al.* *In vitro* comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 1121-1129.