

双亲性氧化石墨烯的合成及生物相容性

李 宁^{1,2,3}, 张 琦², 张庆庆^{2,3}, 宋 琴², 齐 琳²,
王 龙^{2,3}, 唐明亮², 靳 刚^{1,3}, 程国胜^{2,3}

(1. 中国科学院力学研究所, 北京 100190;

2. 中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所纳米生物医学部, 苏州 215123;

3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 以六亚甲基二异氰酸酯(HMDI)为偶联剂,通过与氧化石墨烯(GO)中的羧基或羟基反应,形成酰胺键或氨基甲酸酯键活化GO,然后与TWEEN 80中的羟基反应,将双亲性TWEEN分子偶联于GO表面,制备了双亲性GO.所制备的TWEEN 80接枝GO在水、氯仿和己烷等溶剂中均可稳定分散.以PC12及HeLa细胞为细胞模型,考察TWEEN 80接枝GO所制薄膜的细胞毒性,形态学观察及细胞活性检测(Calcein AM & EthD-1 荧光染色及MTT检测)结果表明其具有良好的生物相容性.

关键词 双亲性氧化石墨烯; 生物相容性; TWEEN 80; 六亚甲基二异氰酸酯

中图分类号 O613.71 文献标志码 A

石墨烯是由单层或少层碳原子组成的二维纳米材料,具有优良的物理化学性能^[1],在分子电子学、微纳器件、复合材料、传感器、电池与储氢材料等领域展现出广阔的应用前景^[2].近年来,其在生物医学领域也备受关注,已被用于细胞成像、药物运输、生物分析、干细胞工程及肿瘤治疗方面^[3-6].

氧化石墨烯(GO)功能化(如表面药物修饰、荧光标记等)过程通常在液相环境中进行,因此,获得在各种溶剂中均分散良好的氧化石墨烯材料成为其进一步应用的前提.目前已有许多共价或非共价修饰方法用于提高石墨烯的溶剂分散性^[7-10],但这些改性石墨烯在一般情况下或者亲水,或者亲脂,往往只能分散于某些特定的溶剂中^[11].既能分散于低极性有机溶剂(如甲苯、氯仿),又能分散于和水互溶的强极性溶剂[如乙醇、甲醇、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)等]中的具有双亲性和良好生物相容性的石墨烯材料还有待进一步研发^[10].

聚氧乙烯去水山梨醇单油酸酯(TWEEN 80)是一种广泛应用于食品和生物医学等领域的表面活性剂^[12],由去水山梨醇五元环核心、3个亲水的带有末端羟基的聚氧乙烯链和疏水的脂肪烃链(油酸酯)组成.基于TWEEN 80的独特结构,通过其修饰可赋予GO双亲特性和良好的生物相容性.

本文发展了一种基于六亚甲基二异氰酸酯(HMDI)偶联剂和TWEEN 80双亲性分子两步改性GO的方法,并评估了所获石墨烯材料的生物相容性.该方法所制备的TWEEN 80接枝GO在水、氯仿和己烷等多种溶剂中均能稳定分散,且具有良好的生物相容性.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

天然石墨(Alfa-Aesar公司); HMDI、TWEEN 80、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)和DMF(Sigma-Aldrich公司); 浓硫酸、甲醇、四氢呋喃(THF)、二甲基亚砜(DMSO)、乙醇、己烷和氯仿(国药集团化学试剂有限公司); RPMI-1640细胞培养基、胎牛血清和青/链霉素混合液(Gibco公司); 细胞活性检测试剂盒(Invitrogen公司).

Nicolet 6700型傅里叶变换红外光谱仪(Thermo公司); Eclipse Ti-E倒置荧光显微镜(Nikon公司);

收稿日期: 2012-03-05.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 31101059)资助.

联系人简介: 程国胜,男,博士,研究员,主要从事纳米-干细胞界面研究. E-mail: gscheng2006@sinano.ac.cn

Victor™ × 4 酶标仪(Perkin Elmer 公司).

1.2 实验过程

1.2.1 HMDI 活化 GO(HMDI-GO) 将 15 mg 采用 Hummers 方法^[13] 制备的 GO 放入带有磁性搅拌子的 50 mL 圆底烧瓶内, 加入 15 mL 无水 DMF, 超声 15 min 以均一化 GO 悬浮液. 然后加入 0.15 g HMDI(10 倍过量), 在氮气气氛中搅拌反应 24 h. 最后, 将反应产物离心, 用无水 DMF 洗涤 6 次后加入 15 mL 无水 DMF.

1.2.2 TWEEN 80 接枝改性 GO(TWEEN 80-GO) 向所得 HMDI-GO 的 DMF 溶液中加入 0.15 g TWEEN 80(10 倍过量), 在氮气保护及搅拌的条件下反应 24 h, 反应产物用无水 DMF 离心洗涤 6 次; 以未改性 GO 为原料, 通过物理吸附方法制备表面吸附 TWEEN 80 的 GO 材料作为对照. 称量反应产物质量, 推算 TWEEN 80 在产物中的含量.

1.2.3 傅里叶变换红外光谱(FTIR) 检测 分别取 HMDI-GO 及 TWEEN 80-GO, 加入 KBr, 研磨、制片, 在 400 ~ 4000 cm^{-1} 范围进行扫描.

1.2.4 细胞毒性检测 首先用 DMF 多次离心、洗涤 TWEEN 80-GO, 然后用大量去离子水透析 72 h. TWEEN 80-GO 经醋酸纤维素膜过滤成膜后迁移至组织培养聚苯乙烯(TCPS) 表面. 细胞培养前预先用含血清的培养基浸泡 TWEEN 80-GO 膜表面 24 h. 细胞毒性检测所用的 PC12 细胞(大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株) 和 HeLa 细胞(人宫颈癌细胞株) 均用含 15% (体积分数) 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养. 取对数生长期的肿瘤细胞, 经胰酶消化、计数后接种于 TCPS 及 TWEEN 80-GO 所制衬底表面, 一定时间后采用倒置显微镜观察拍照并进行 MTT 检测. 依据所购试剂盒说明书进行细胞活性荧光检测操作: 在底部一半为 TWEEN 80-GO 膜一半为 TCPS 的自制培养皿中接种细胞, 培养 24 h 后吸去培养基, 采用灭菌磷酸盐缓冲溶液(PBS) 冲洗 3 次, 加入 2 $\mu\text{mol/L}$ Calcein AM 和 2 $\mu\text{mol/L}$ EthD-1 溶液室温孵育 20 ~ 30 min 后在荧光显微镜下观察. MTT 检测采用底部全部为 TWEEN 80-GO 膜的自制培养皿进行细胞培养, 分别培养 24, 48 和 72 h 后每孔加入适量 MTT 溶液(5 mg/mL), 继续培养 4 h, 弃去上清液, 加入 DMSO 溶解蓝紫色结晶甲瓟, 摇匀后吸入酶标板, 用酶标仪测定 490 nm 波长处各孔的吸光度.

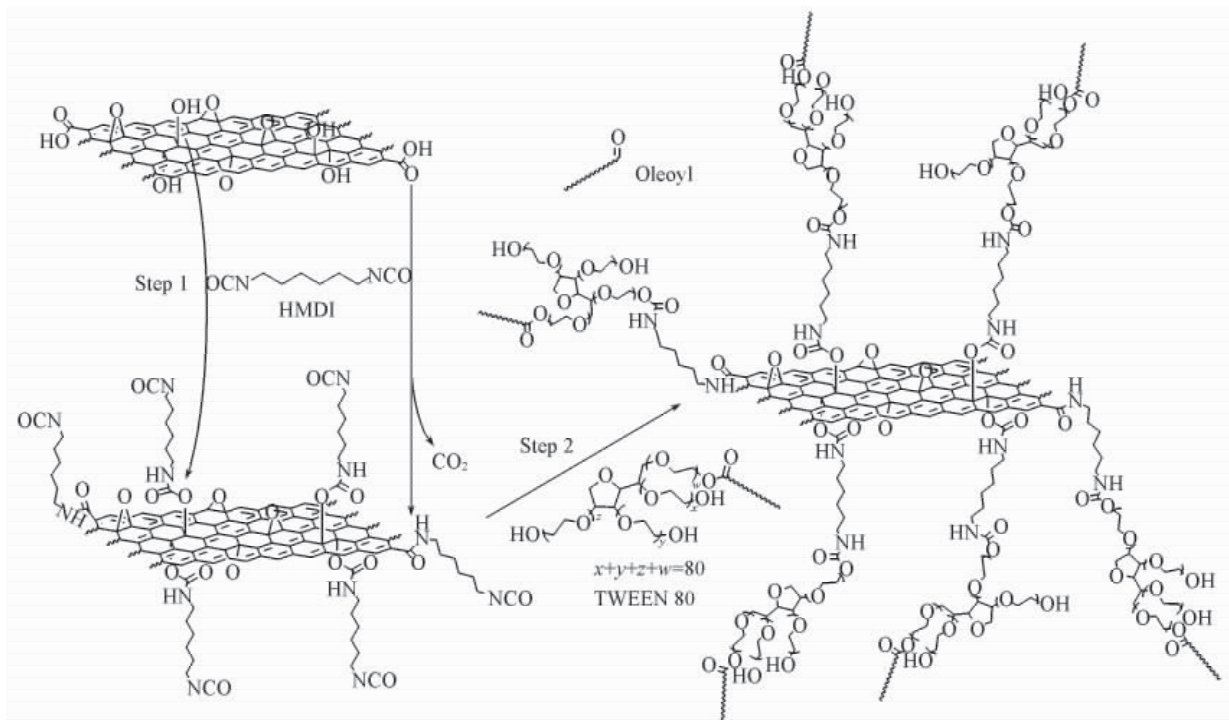
2 结果与讨论

2.1 HMDI-GO 和 TWEEN 80-GO 的表征

通过 TWEEN 非共价吸附方法修饰 GO 能得到水溶性良好的 GO 材料, 但难以获得在非极性溶剂中分散良好的 GO 材料^[6], 这可能是由于采用物理吸附法修饰到 GO 上的 TWEEN 的量相对较少所致. 实验结果表明, 采用物理吸附法所制备的对照组产物中约含 3% ~ 5% (质量分数) 的 TWEEN 分子, 而采用共价修饰法所制备的产物中约含 15% ~ 20% (质量分数) 的 TWEEN 分子. 因此本文采用共价修饰的方法通过 2 步反应制备 TWEEN 80-GO(Scheme 1), 具体步骤如下: 第一步, 在 GO 表面修饰 HMDI. 已有文献表明异氰酸酯能够有效、可控地修饰 GO 材料, 改善其溶剂分散性^[14]. 选用带有双异氰酸酯的 HMDI 为偶联剂, 能够有效简化进一步功能化的工艺流程. 第二步, 利用双异氰酸酯中未反应的异氰酸酯基团与 TWEEN 80 分子中的羟基反应, 在 GO 表面共价引入 TWEEN 80.

由图 1 可以看出, 未经修饰的 GO 在 H_2O 和 DMF 中分散均匀, 但在 CHCl_3 溶液中形成明显团块; HMDI 处理后的 GO 在 THF 及 CHCl_3 溶液中的溶解性均有明显改善. 这与文献^[13] 报道的异氰酸酯改性 GO 结果一致. 进一步观察发现, 80 $^\circ\text{C}$ 下所得产物在水中分散性变差, 但能被 THF 及 CHCl_3 溶液浸润, 这是由于亲水的 GO 接枝了更多的 HMDI 分子, 疏水性增加所致. 100 $^\circ\text{C}$ 下产物在各种溶剂中均不能分散(图略), 这可能由于 GO 官能团高温分解团聚所致.

HMDI 活化 GO 过程中所产生的官能团变化均能反映在 FTIR 光谱中. 如图 2 所示, 采用 HMDI 处理后, GO 的 FTIR 光谱中 1730 cm^{-1} 处由羰基或羧基中 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动产生的尖峰显著减弱, 而在 1618 和 1577 cm^{-1} 处产生新振动峰, 为酰胺键或氨基甲酸酯中 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动和 CHN 变形振动耦合所致, 表明 HMDI 中的异氰酸根能够通过和 GO 边缘羧基和表面羟基反应, 分别生成酰胺键和氨基甲酸



Scheme 1 Synthetic route for TWEEN 80-grafted GO

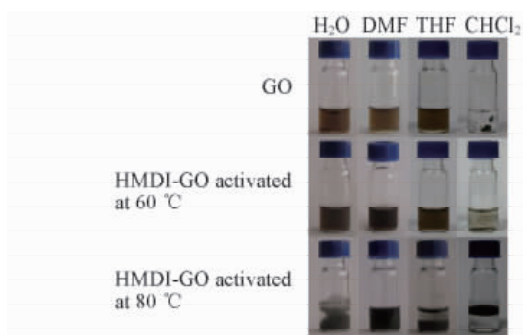
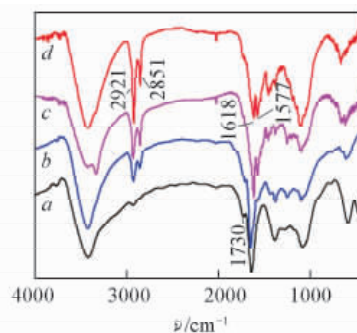
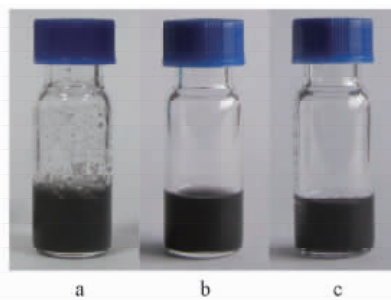
Fig. 1 Dispersibility of GO and HMDI-GO activated at 60 and 80 °C in H₂O, DMF, THF and CHCl₃

Fig. 2 FTIR spectra of GO (a) and HMDI-GO activated at 60 °C (b), 80 °C (c) and 100 °C (d)

酯键^[14]. 另外, HMDI 中亚甲基在 2921 和 2851 cm^{-1} 处的伸缩振动峰强度随反应温度升高而显著增强, 表明提高反应温度可偶联更多 HMDI 分子. 结合溶剂分散性和红外分析数据, 本文选择 80 °C 作为 HMDI 与 GO 的优化反应温度.

将 TWEEN 80 与 HMDI-GO 的反应产物用 DMF 洗涤多次以去除吸附的 TWEEN 分子. 在 H₂O、氯仿和己烷(其极性分别为 10.2, 4.4 和 0.06) 溶液中测试了产物的溶剂分散性. TWEEN 80-GO 能够良好地分散在 3 种溶剂中, 形成半透明且均一的分散体系(图 3), 并能够稳定保持数月, 表明 TWEEN 80-GO 具有优异的双亲性和良好的稳定性. 进一步研究表明, 其在 DMF, DMSO, THF 和乙醇等溶剂中也表现出良好的分散性(图略). 相对于 HMDI-GO, 在 TWEEN 80-GO 的 FTIR 光谱中(图 4) 于 1082 cm^{-1} 处出现了 1 个新吸收峰, 为醚键的伸缩振动吸收峰, 与纯 TWEEN 80 在 1096 cm^{-1} 处的醚

Fig. 3 Photographs of TWEEN 80-GO dispersed in H₂O (a), CHCl₃ (b) and hexane (c)

键吸收峰相比峰位略有红移,可能是由 GO 的大 π 键与醚键之间的相互作用所致^[5]. 上述结果也表明 TWEEN 80 分子成功接枝于 GO 表面.

2.2 TWEEN 80-GO 的细胞毒性评估

GO 本身具有良好的生物相容性、水溶性和一系列优异的物化性质,已在生物载药、成像、热疗等领域得到广泛研究^[15]. 经过 TWEEN 80 功能化的双亲性石墨烯不仅保持了 GO 原有的良好水溶性,还在非极性溶剂中表现出良好的分散特性,这将大大丰富可用于 GO 功能化的生物活性分子的种类. 另外,GO 表面蛋白非特异性吸附是其在药物载体、成像应用中面临的重要挑战^[4,16]. TWEEN 功能化能够有效减少纳米材料表面的蛋白非特异吸附,扩展 GO 在生物医学领域的应用范围^[17].

通过观察细胞形态及细胞与衬底的黏附情况可以粗略评估材料的细胞毒性,细胞变圆、漂浮意味着细胞死亡. 如图 5(A) 和(C) 所示,在 TWEEN 80-GO 过滤制备的薄膜(虚线左边)和 TCPS 衬底(虚线右边)表面,PC12 及 HeLa 细胞形状、密度及漂浮细胞的比例没有显著差异,表明 TWEEN 80-GO 膜与 TCPS 类似,具有良好的生物相容性. 众所周知,TWEEN 能够破坏细胞膜而导致细胞死亡,但本实验中 TWEEN 80-GO 却未表现出明显的细胞毒性,这可能是由于多数吸附于 GO 表面的 TWEEN 80 分子经严格的有机溶剂和去离子水洗涤后得以去除,而共价接枝在 GO 表面的 TWEEN 80 难以扩散到培养基中,因而不会与细胞膜作用产生细胞毒性,这与之前的报道^[6]一致. 经 Calcein AM 和 EthD-1 染色后,TWEEN 80-GO 薄膜表面生长的 PC12 和 HeLa 细胞绝大多数发绿色荧光[图 5(B), (D)],与 TCPS 表面细胞的存活状态并无明显差异,表现出良好的生长状态. 进一步采用 MTT 比色法测量 TWEEN 80-GO 薄膜对细胞增殖的影响,结果如图 6 所示. 可以看到,TWEEN 80-GO 薄膜表面 PC12 和 HeLa 细胞的活性随培养时间的延长而升高,且各个时间点(24,48 及 72 h)的 MTT 测量值与 TCPS 对照相比也无显著差异,可见 TWEEN 80-GO 并不会影响细胞的增殖,进一步表明 TWEEN 80-GO 具有良好的生物相容性.

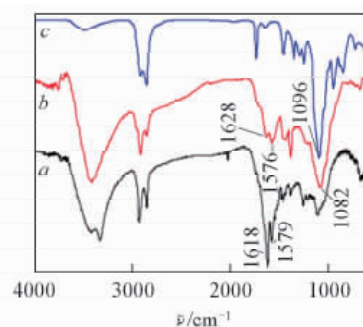


Fig. 4 FTIR spectra of HMDI-GO (a), TWEEN 80-GO(b) and TWEEN 80 (c)

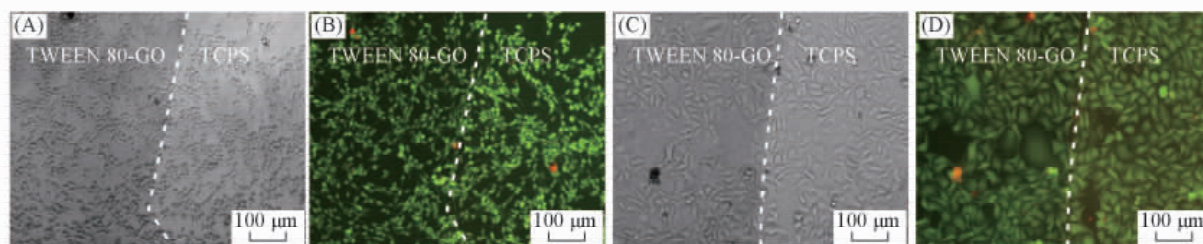


Fig. 5 Optical(A, C) and fluorescent(B, D) images of PC12(A, B) and HeLa(C, D) cultured on the border of TWEEN 80-GO film and TCPS on the first day

Live cells fluoresce green and dead cells fluoresce red.

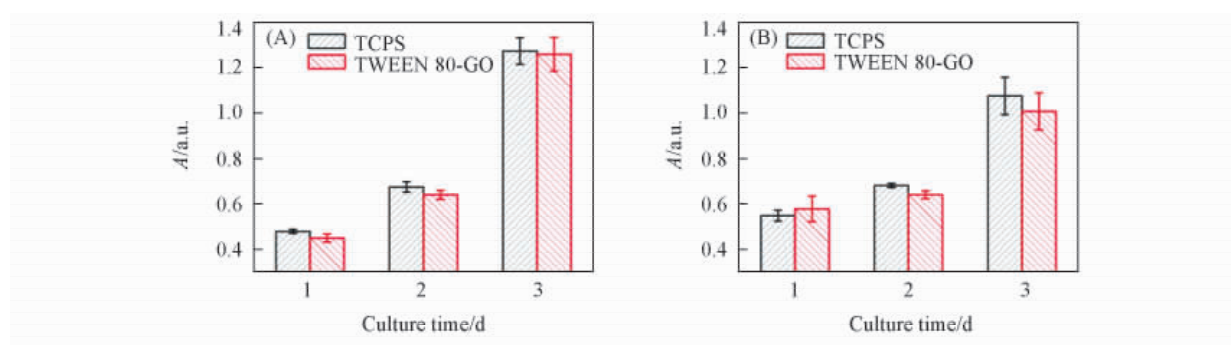


Fig. 6 Cell viability of PC12(A) and HeLa(B) cultured on the TWEEN 80-GO film and TCPS

综上所述,本文报道了一种利用 HMDI 作为偶联分子制备 TWEEN 80 接枝改性 GO 的简便方法,利用 TWEEN 80 的两亲特性获得了具有广泛溶剂分散性的 GO 衍生物,这种 TWEEN 分子接枝改性的 GO 具有良好的生物相容性和广阔的生物应用前景.

参 考 文 献

- [1] Zhu Y., Murali S., Cai W., Li X., Suk J. W., Potts J. R., Ruoff R. S., *Adv. Mater.*, **2010**, 22(35), 3906—3924
- [2] Geim A. K., Novoselov K. S., *Nat. Mater.*, **2007**, 6(3), 183—191
- [3] Cohen-Karni T., Qing Q., Li Q., Fang Y., Lieber C. M., *Nano Lett.*, **2010**, 10(3), 1098—1102
- [4] Liu Z., Robinson J. T., Sun X., Dai H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130(33), 10876—10877
- [5] Yang X., Zhang X., Liu Z., Ma Y., Huang Y., Chen Y., *J. Phys. Chem. C*, **2008**, 112(45), 17554—17558
- [6] Park S., Mohanty N., Suk J. W., Nagaraja A., An J., Piner R. D., Cai W., Dreyer D. R., Berry V., Ruoff R. S., *Adv. Mater.*, **2010**, 22(15), 1736—1740
- [7] Liang Y., Wu D., Feng X., Müllen K., *Adv. Mater.*, **2009**, 21(17), 1679—1683
- [8] Qi X., Pu K. Y., Li H., Zhou X., Wu S., Fan Q. L., Liu B., Boey F., Huang W., Zhang H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49(49), 9426—9429
- [9] Li G. L., Liu G., Li M., Wan D., Neoh K. G., Kang E. T., *J. Phys. Chem. C*, **2010**, 114(29), 12742—12748
- [10] Shen J., Hu Y., Li C., Qin C., Ye M., *Small*, **2009**, 5(1), 82—85
- [11] Ma W. S., Zhou J. W., *Chem. J. Chinese Universities*, **2010**, 31(10), 1982—1986(马文石,周俊文. 高等学校化学学报, **2010**, 31(10), 1982—1986)
- [12] Norman P. S., Marsh D. G., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1978**, 62(5), 314—319
- [13] Hummers W. S. Jr., Offeman R. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80(6), 1339
- [14] Stankovich S., Piner R. D., Nguyen S. B. T., Ruoff R. S., *Carbon*, **2006**, 44(15), 3342—3347
- [15] Shen H., Zhang L. M., Zhang Z. J., *J. Southeast Univ.*, **2011**, 30(1), 218—223(沈贺,张立明,张智军. 东南大学学报, **2011**, 30(1), 218—223)
- [16] Xu D., Zhou N. L., Shen J., *Chem. J. Chinese Universities*, **2010**, 31(12), 2354—2359(徐东,周宁琳,沈健. 高等学校化学学报, **2010**, 31(12), 2354—2359)
- [17] Chi Y. S., Byon H. R., Choi H. C., Choi I. S., *ChemBioChem*, **2007**, 8(12), 1380—1387

Synthesis and Biocompatibility of Amphiphilic Graphene Oxide

LI Ning^{1,2,3}, ZHANG Qi², ZHANG Qing-Qing^{2,3}, SONG Qin², QI Lin², WANG Long^{2,3},
TANG Ming-Liang², JIN Gang^{1,3}, CHENG Guo-Sheng^{2,3*}

(1. Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

2. Division of Nanobiomedicine, Suzhou Institute of Nano-Tech and Nano-Bionics,
Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215123, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Amphiphilic functionalization of graphene oxide(GO) is of the essence for its biomedical applications. TWEEN 80-grafted GO was synthesized by a two-step approach. In step 1, GO surface was activated with hexamethylene diisocyanate(HMDI) through a reaction between GO carboxyl or hydroxyl groups and isocyanate. HMDI-activated GO was then grafted by TWEEN 80 in step 2, resulting in amphiphilic GO nano-sheets. The fabricated TWEEN 80-grafted GO exhibited excellent dispersibility in various solvents, such as water, chloroform and *n*-hexane. Furthermore, PC12 and HeLa cells were cultured on TWEEN 80-grafted GO film to assess its cytotoxicity. Cell morphology analysis and cell viability assay(Calcein AM & EthD-1 staining and MTT assay) indicated that the as-synthesized amphiphilic GO had good biocompatibility.

Keywords Amphiphilic graphene oxide; Biocompatibility; TWEEN 80; Hexamethylene diisocyanate

(Ed.: N, K, M)