



石墨烯的生物安全性研究进展

田甜^{①②}, 吕敏^{①*}, 田旻^③, 孙艳红^①, 李晓霞^①, 樊春海^①, 黄庆^①

① 中国科学院上海应用物理研究所, 物理生物学与生物成像部, 上海同步辐射光源, 上海 201800;

② 中国科学院大学, 北京 100049;

③ 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

* 联系人, E-mail: lvmin@sinap.ac.cn

2014-02-21 收稿, 2014-04-21 接受, 2014-06-12 网络版发表

国家自然科学基金(31300825)和上海市科学技术委员会(13NM1402300)资助

摘要 石墨烯是一种由碳原子以 sp^2 杂化轨道组成六角型呈蜂巢晶格的二维碳纳米材料, 具有优异的光学、电学、力学特性, 在材料学、微纳加工、能源、生物医学和药物传递等方面具有重要的应用前景, 被认为是一种未来革命性的材料. 随着石墨烯在实际中的大规模生产和广泛应用, 其生物安全性问题也备受关注. 大量报道认为石墨烯是一种生物相容性良好的碳纳米材料, 部分研究却发现石墨烯具有一定的生物毒性. 石墨烯的生物毒性主要依赖于其理化性质(大小、形状、表面电荷、官能团等), 与其使用剂量也密切相关. 近年来, 研究发现石墨烯纳米材料作用于不同生物体会表现出完全迥异的生物毒性. 基于此, 本文综述了近年来关于石墨烯在细胞毒性、动物毒性和抗菌性方面的研究进展, 以期对石墨烯生物安全性评估和生物医学应用提供参考.

关键词

石墨烯
生物安全性
细胞毒性
动物毒性
抗菌性

2004 年, 英国 Manchester 大学 Novoselov 和 Geim 等人^[1]通过微机械力剥离法首次制备了单层石墨烯(graphene), 并因此于 2010 年获得诺贝尔物理学奖. 石墨烯是一种由碳原子以 sp^2 杂化轨道组成六角型呈蜂巢晶格的二维碳纳米材料, 其厚度仅为一个碳原子, 是世界上已知的最薄材料. 它具有优异的电学、光学、力学特性和良好的生物相容性, 在物理学、化学、材料学和生物学等领域备受关注, 展现出广阔的应用前景^[2-6]. 2012 年, *Nature* 发表了题为“A roadmap for graphene”的文章, 总结并规划性地指出, 在未来, 石墨烯将被集中并广泛应用于电子、复合材料、能源再生与存储、传感器以及生物医药等领域^[7]. 然而, 随着石墨烯纳米材料大规模的生产和应用, 石墨烯的生物安全性问题显得尤为突出和重要.

2008 年, Chen 等人^[8]在研究中发现小鼠成纤维细胞 L-929 可以在石墨烯膜上很好地附着并增殖, 提

示石墨烯具有很好的生物相容性. 之后, 越来越多的研究表明证实了这点^[9-12], 但也有少数研究认为石墨烯对人类健康和生态环境存在一定的危害性^[13-17]. 基于此, 本文综述了近年来关于石墨烯生物安全性的研究工作, 主要包括水分散性良好的石墨烯氧化物的细胞毒性、动物毒性以及微生物毒性, 以期能够全面而充分地揭示石墨烯材料的生物安全性, 为石墨烯的功能化和生物医学应用提供一定的指导.

1 石墨烯及其衍生物

石墨烯及其衍生物是个庞大的家族, 区分不同存在形式的石墨烯是了解其理化特性和研究其生物毒性的重要前提. 根据石墨烯层数的不同, 可将石墨烯分为单层石墨烯、少数层石墨烯(2~10 层)、超细石墨烯(10 层以上, 但厚度小于 100 nm); 根据氧化程度不同, 石墨烯又分为石墨烯氧化物(graphene oxide,

引用格式: 田甜, 吕敏, 田旻, 等. 石墨烯的生物安全性研究进展. 科学通报, 2014, 59: 1927-1936

Tian T, Lü M, Tian Y, et al. Progress in biological safety of graphene (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 1927-1936, doi: 10.1360/N972014-00091

GO)和还原型石墨烯氧化物(reduced graphene oxide, rGO);根据形态的不同,石墨烯还可分为石墨烯薄片、石墨烯纳米带以及量子点石墨烯等.不同理化性质的石墨烯通常需要不同的制备方法.

目前,制备石墨烯的方法主要有物理方法和化学方法.其中,物理方法主要包括机械剥离法、取向生长法和石墨插层法.机械剥离法是借助机械力将石墨烯片层从石墨晶体表面剥离出来,该方法可以保证石墨烯片层的完整性,但却很难控制石墨烯片层的大小^[18-22];取向生长法制得的石墨烯片层厚薄不均一,且容易和生长基底相黏合^[23-26];石墨插层法是将石墨层与层之间插入非碳物质,从而生成新的层状物^[27].常用的化学方法有碳化硅加热法、气相沉积法和石墨烯氧化物还原法.单晶碳化硅加热法主要是通过加热碳化硅脱去硅 Si,进而得到在碳化硅表面衍生出的单层和多层石墨烯^[28,29];气相沉积法将气态物质进行化学反应,所生成新物质沉积在基底,此法制出的石墨烯性能受基底影响^[30,31].目前生物学研究中最常用的方法是石墨烯氧化物还原法,该方法借助还原^[32,33]、加热等手段,去掉石墨烯氧化物片层上的含氧基团,最终得到独立单层的石墨烯片.但是,石墨烯的水分散性比较差,严重限制了其在生物医学领域的发展和应用.因此,运用物理或者化学方法,对石墨烯进行改性,提高其水溶性成为人们的共识.石墨烯氧化物就是石墨烯改性的代表衍生物之一,其表面含有丰富亲水基团(羧基、羟基和环氧基等),除了具备石墨烯片层结构的特殊性质外,还具有良好的水溶性,在药物运输^[2,34,35]和生物成像^[36,37]等方面得到了深入研究.石墨烯氧化物的合成主要通过氧化和超声的方法.根据氧化方式的不同,可得到不同氧化程度的石墨烯氧化物.早在 1859 年, Brodie^[38]就利用 KClO_3 和浓 HNO_3 氧化石墨制取石墨氧化物;到 1898 年, Staudenmaier^[39]在 Brodie 的实验基础上增加了 KClO_3 和浓 H_2SO_4 的量,降低反应混合物的 pH,最终得到了近乎全面氧化的石墨.此后, Hummers 等人^[40]在前人的基础上进一步发展了石墨氧化的方法,采用 KMnO_4 和浓 H_2SO_4 的混合物对石墨进行氧化,最终得到全面氧化的石墨.该法即为目前研究中应用较为广泛的 Hummers 法.

2 石墨烯的生物安全性

石墨烯及其衍生物类似于其他纳米材料,其生

物安全性一直备受人们关注.目前,石墨烯的生物安全性研究主要集中于石墨烯及其衍生物的细胞毒性、动物毒性以及抗菌性研究.

2.1 石墨烯的细胞毒性

石墨烯及其衍生物的细胞毒性是石墨烯生物安全性评估的重要指标之一.大量研究表明石墨烯纳米材料的细胞毒性与其自身的物理化学性质(大小、形状、表面官能团等)、作用的细胞种类、以及作用浓度等有着密不可分的关系.

中国科学院上海应用物理研究所黄庆课题组对石墨烯的细胞毒性进行了比较系统的研究.2010 年, Hu 等人^[41]比较了石墨烯氧化物和还原型石墨烯氧化物对人肺腺癌细胞 A549 的细胞毒性. A549 与浓度为 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ GO 纳米片层共孵育 24 h 后,细胞活力为 80%;当浓度达到 $85\text{ }\mu\text{g/mL}$,细胞活力降至 50%;两种浓度下,GO 只抑制了 A549 细胞增殖,并未诱发细胞凋亡和死亡,呈现了良好的生物相容性.研究还发现,相同剂量下, rGO 纳米片层对 A549 细胞的毒性高于 GO,这说明石墨烯表面的官能团也会影响到其细胞毒性. Hu 等人^[42]进一步研究发现 GO 的细胞毒性表现出明显的浓度依赖性,却不存在时间依赖性.通过研究 GO 对胎牛血清 FBS 的吸附动力学和比较 GO 在有血清和无血清状态下的细胞毒性,他们认为 GO 这种非时间依赖性的毒性可能与 GO 和细胞间相互作用有关.当 GO 加入含有血清 FBS 的细胞培养基时,GO 表面会吸附培养基中 FBS 形成蛋白包裹体,进而阻碍了 GO 本身与细胞膜的直接作用,从而降低 GO 的细胞毒性;然而,当 GO 加入无血清的细胞培养基时,GO 与细胞可直接相互作用,引发细胞膜损伤,导致细胞死亡.GO 的这种吸附能力主要与其具有大的比表面积和丰富官能团有关^[43]. Lü 等人^[44]在研究 GO 的神经细胞毒性时也发现 GO 的神经细胞毒性存在剂量依赖性.人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 与低剂量 GO(小于 $80\text{ }\mu\text{g/mL}$)相互作用 96 h 后,细胞仍然有很好的代谢活力;但是,当 GO 浓度大于 $80\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,该材料对 SH-SY5Y 细胞的毒性呈现出浓度和时间正相关性.更令人惊喜的是,当 GO 与视黄酸同时加入培养基时,GO 可以通过静电吸附作用载带一定量的视黄酸进入细胞,提高细胞内局部视黄酸浓度,显著提高 SH-SY5Y 细胞的分化.2013 年, Zhang 等人^[45]对不同尺寸石墨烯氧化物(205.8, 146.8, 33.78

nm)的细胞毒性和细胞摄取率进行了研究,发现 HeLa 细胞对 3 种不同尺寸 GO 的摄取率存在一定的尺度依赖性,尺寸越小细胞摄取量越大;同等浓度下,尺寸越小,GO 的细胞毒性越小,尺度小于 50 nm 的 GO 具有低毒和高摄取的优势,可用于药物运输和生物成像的研究中。

上述研究说明,石墨烯的氧化程度与尺寸大小直接影响其细胞毒性,而且存在明显的浓度依赖性。不同氧化程度的石墨烯,GO 比 rGO 具有更好的生物相容性。不同尺寸的石墨烯氧化物,细胞毒性随着尺寸的减小而显著降低;GO 的尺寸大于 100 nm 时,只有低于一定浓度才表现出良好的生物相容性。这一个结论在其他研究^[45~48]中也得到了很好的证实。Yue 等人^[49]选取了 2 种尺寸 GO(350 nm 和 2 μ m)分别作用于 6 种细胞(腹膜巨噬细胞 PM ϕ , 小鼠肺癌 Lewis 细胞 LLC, 小鼠单核巨噬细胞 J774A.1, 人肝癌细胞 HepG2, 人脐静脉内皮细胞 HUVEC 和人乳腺癌细胞 MCF-7),结果显示两种材料浓度在 20 μ g/mL,与细胞作用 24 h 后均未出现细胞毒性。Chang 等人^[46]的研究发现,3 种不同尺寸 GO(588, 556, 148 nm)在浓度小于 50 μ g/mL 时,无明显的细胞毒性。值得注意的是,不同细胞株对 GO 的敏感性存在差异。Chowdhury 等人^[48]比较了石墨烯氧化物纳米带对人宫颈癌细胞 HeLa, 人乳腺癌上皮细胞 MCF7 和高表达 ErbB2 人乳腺癌细胞 SKBR3 的细胞毒性,发现同种浓度下 GO 对 HeLa 细胞的毒性明显强于 MCF7 和 SKBR3 细胞。

目前,石墨烯和细胞相互作用的途径和机制尚不清楚。关于摄取机制方面,小片层石墨烯氧化物(500 nm 以下)主要通过丝状伪足包裹或网格蛋白介导的内吞作用进去细胞,而大片层石墨烯氧化物(1~2 μ m)则主要通过吞噬作用进入细胞^[49,50]。毒性机制方面,大多数研究者认为 GO 的细胞毒性主要由氧化应激介导^[51,52]。Chen 等人^[53]发现 GO 可诱导巨噬细胞 RAW264.7 自噬,且激活 Toll 样受体信号通路引发炎症反应。同样,Sasidharan 等人^[54]在对猴肾细胞 Vero 的研究中也发现 GO 聚集在 Vero 细胞的膜表面,并诱发纤维状肌动蛋白的无序排列,引起高水平氧化应激,从而导致细胞凋亡。但也有少数研究认为石墨烯氧化物对细胞的毒性可能是材料与细胞膜之间相互作用引起的^[42]。石墨烯的细胞毒性机制还有待于进一步的研究。

除了对石墨烯自身材料的研究外,石墨烯及其衍生物制成薄膜的生物相容性也受到研究者的关注。Chen 等人^[8]用小鼠成纤维细胞(L-929)评估了石墨烯膜的生物相容性,研究发现该细胞在石墨烯膜上可以黏附并且增殖,证明石墨烯膜有较好的生物相容性。Biris 等人^[55]发现成骨细胞(MC3T3-E1)在石墨烯膜上也能很好的生长。Agarwal 等人^[56]则指出,还原石墨烯氧化物膜与少突胶质细胞、成骨细胞和大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 均有较好的生物相容性,且比单壁碳纳米管的生物相容性好。更有趣的是, Park 等人^[57]在对神经干细胞的研究中,发现石墨烯薄膜作为细胞附着基底可以增强神经干细胞向神经元细胞分化的几率,从而减少干细胞向胶质细胞分化,这一发现为再生医学的研究提供了极好的思路。

随着越来越多石墨烯及其衍生物被作为载药材料,其材料自身和血液的相容性也引起了研究者的关注。Liao 等人^[58]对两种片层石墨烯氧化物(5 和 2.5 μ m)的溶血作用做了考察,发现材料浓度大于 12.5 μ g/mL 时,两种材料均显示出一定的溶血性。但是,2.5 μ m 石墨烯氧化物其表面含氧基数目较少,溶血作用相对较弱。为了解决这一问题,研究者用壳聚糖包裹材料,发现溶血性显著下降。Singh 等人^[59,60]也指出单片层石墨烯氧化物(0.2~5 μ m)可引起血小板聚集,但如果表面修饰了氨基就可以减弱这一现象。这表明石墨烯材料的表面功能化在改善石墨烯血液相容性方面具有重要的作用(表 1)。

2.2 石墨烯的动物毒性

石墨烯及其衍生物的动物毒性是石墨烯生物安全性评估的又一重要指标。Zhang 等人^[63]用放射性同位素铈(¹⁸⁸R)示踪 GO,通过尾静脉将 ¹⁸⁸R-GO(1 mg/kg)注入小鼠体内,发现 GO 主要沉积在小鼠肺部,但网状内皮系统对 GO 的摄取量较少;当 ¹⁸⁸R-GO 浓度提高到 10 mg/kg 时,小鼠肺部会出现明显的病理性改变,提示高剂量的 GO 存在肺毒性。随后, Li 等人^[64]进一步研究了纳米尺寸石墨烯氧化物(nano-GO, NGO)对小鼠的毒性作用。研究发现 NGO 处理后的小鼠表现出明显的急性肺损伤和慢性纤维肺;但该损伤在地塞米松的治疗下可以得到缓解,提示 GO 引起的肺毒性可能与氧化应激有关。

石墨烯氧化物诱发动物出现的肺损伤是 GO 动物毒性的主要症状^[65,66],但修饰后的 GO 可以极大地

表 1 石墨烯及其衍生物细胞毒性的研究概况^{a)}

材料	尺寸(nm)	细胞	浓度	参考文献
石墨烯氧化物膜	—	小鼠成纤维细胞	—	[8]
GO	不均一	人肺腺癌细胞	20~100 µg/mL	[41]
rGO	不均一	人肺腺癌细胞	20~100 µg/mL	[42]
FBS-GO	100~600	人骨髓神经母细胞瘤	<80 µg/mL 生物安全	[44]
GO	205.8, 146.8, 33.78	人宫颈癌细胞	20~100 µg/mL	[45]
GO	588, 556, 148	人肺腺癌细胞	10~200 µg/mL	[46]
GO	不均一	人成纤维细胞	<50 µg/mL 生物安全	[47]
GO 纳米带	125~220 (宽), 500~2500 (长)	人宫颈癌细胞	5~100 µg/mL	[48]
GO	350, 2000	人乳腺癌细胞	10~400 µg/mL	[49]
		腹膜巨噬细胞	<20 µg/mL 生物安全	
		小鼠肺癌细胞		
		小鼠单核巨噬细胞		
		人肝癌细胞		
		人脐静脉内皮细胞		
		人乳腺癌细胞		
蛋白包裹的 GO	500, 1000	小鼠成肌细胞	50 µg/mL	[50]
石墨烯	100~110	大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤	0.01~100 µg/mL	[51]
			<0.01 µg/mL 生物安全	
GO	2400, 350	小鼠巨噬细胞	5~100 µg/mL	[53]
GO	—	非洲绿猴肾细胞	10~300 µg/mL	[54]
			<50 µg/mL 生物安全	
金-石墨烯复合物	—	小鼠胚胎成骨细胞	0.1~50 µg/mL	[55]
rGO 膜	—	大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤	—	[56]
		少突胶质细胞		
		造骨细胞		
石墨烯膜	—	人神经干细胞	—	[57]
石墨烯	5000, 2500	红细胞	25~200 µg/mL	[58]
GO	—	成纤维细胞		
GO	—	人血小板	2~10 µg/mL	[59]
rGO	—			
氨基修饰的石墨烯	—			
GO	—	小鼠巨噬细胞	0~70 µg/mL	[61]
		红细胞		
GO	—	人视网膜色素上皮细胞	<100 µg/mL	[62]

a) “—”示无值

降低该损伤. Duch 等人^[65]在研究 GO 肺毒性的同时将 GO 分散于聚丙乙醇和环氧乙烷加聚物(普朗尼克), 发现 GO 诱发的肺毒性被明显减弱. Sahu 等人^[67]将 GO 用普朗尼克制成水凝胶, 皮下注射于小鼠, 病理苏木精-伊红染色法(HE)结果显示, 该材料处理 3 周后, 注射部位仅显示出轻度炎性反应, 8 周后炎性反应消失; 注射期间其他部位并未发现明显的炎性、组织坏死等病变. Yang 等人^[68,69]用聚乙二醇(PEG)修饰石墨烯氧化物后, 将其经尾静脉注入小鼠体内, 发现材料主要聚集在网状内皮系统(肝脏、脾脏), 并且材

料最终被降解; 该研究持续观测注射后的小鼠, 发现 90 d 内, PEG-GO 处理并没有引起小鼠机体损伤. Zhang 等人^[70]在石墨烯氧化物片层上共价修饰右旋糖酐 DEX, 并用 ¹²⁵I 进行示踪, 通过小鼠尾静脉注入材料后, 发现材料在网状内皮系统富集, 但该材料在一周内可被清除, 且没有短期毒性.

上述研究均提示 GO 对哺乳动物的肺毒性在一定程度上可以通过对 GO 的修饰来避免. 除了在哺乳动物体内考察 GO 的毒性外, 研究者还用线虫作为模型进行研究. Zhang 等人^[71]在对 GO 毒性机制的研究

中发现, 正常条件下, 线虫体内过氧化氢有限且细胞色素 *c* 定位于线粒体内膜, GO 仅催化少量过氧化氢, 不会引起细胞色素 *c* 外溢造成的细胞凋亡, 因此机体不表现出损伤; 病理应激条件下, GO 将生物分子上的电子传递给氧继而生成过氧化氢, 体内堆积大量的过氧化氢, 最终导致细胞色素 *c* 外溢, 细胞凋亡. 该研究提示 GO 的体内毒性可能与其电子传递作用有关(表 2).

2.3 石墨烯的抗菌性

石墨烯与细胞或动物相互作用表现了良好的生物相容性, 但令人惊奇的是, 石墨烯与微生物作用却表现出优异的抗菌性能. 2010 年, Huang 课题组^[41]首次报道了石墨烯具有优异的抗菌性, 发现石墨烯氧化物纳米悬液与大肠杆菌共孵育 2 h 后, 可明显抑制大肠杆菌的生长, 抑制率超过 90%; 通过抽滤法制备而成的纸片样的宏观石墨烯膜也表现出优异的抗菌性能. 深入研究推测, 石墨烯氧化物的抗菌性可能源于其对大肠杆菌细胞膜的破坏. 石墨烯片层结构具有比较坚硬的边缘, 类似于一把刀, 与细菌相互作用过程中, 会造成对细菌细胞膜的机械损伤. 然而, 当石墨烯氧化物与哺乳动物细胞孵育却只表现出微弱的细胞毒性. 这说明石墨烯是一种兼具优异抗菌性能和良好生物相容性的纳米材料, 在生物医学应用中具有极大的潜力.

目前, 石墨烯抗菌性研究主要分为两方面. 一方

面, 人们利用石墨烯具备多环芳香烃的结构, 化学修饰性突出, 通过物理化学方法制备基于石墨烯的新型复合纳米抗菌材料. Liu 等人^[74]通过二相法(甲苯-水)制得直径 6 nm 的纳米银-氧化石墨烯复合物, 材料浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$ 时, Ag-GO 复合物对大肠杆菌的抑菌率可达到 99%; 同浓度时, GO 的抑菌率仅有 10%, 单独纳米银的抑菌率也只有 86%, 说明 Ag-GO 复合物具有更好的抗菌性, 展现了复合材料抗菌的优越性. Shen 等人^[75]通过水热合成法, 在盐溶液中一步法合成纳米银-还原石墨烯氧化物复合材料, 当复合物浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对大肠杆菌的抑菌率便可达到 99.7%. 类似的研究均发现纳米 Ag-GO 复合材料表现了更优越的抗菌性^[76-78]. 此外, 多聚物-石墨烯复合材料的研究也受到广泛关注. Santos 等人^[79]将聚乙烯咪唑连接到氧化石墨烯上形成新型复合物, 研究发现修饰后的复合物并不影响 GO 本身的抑菌作用, 抑菌率可达 90%, 抗菌能力优于同浓度下石墨烯氧化物的抑菌率. 这说明石墨烯纳米材料复合过程中依然保持甚至提高了其抗菌性, 在涂料、包装和医用中具有广阔的应用前景.

另一方面, 科研工作者试图通过改变石墨烯的理化性质, 深入研究石墨烯的抗菌性能和抗菌机制. Akhavan 等人^[80]通过比较石墨烯氧化物纳米墙(graphene oxide nanowalls, GONWs)和还原型石墨烯氧化物纳米墙(reduced graphene nanowalls, RGNWs)对革兰氏阴性菌(大肠杆菌)及革兰氏阳性菌(金黄色

表 2 石墨烯及其衍生物动物毒性的研究概况^{a)}

材料	尺寸(nm)	动物	浓度	参考文献
GO	—	家兔	100~300 $\mu\text{g/眼}$	[62]
¹⁸⁸ R-GO	10~800	小鼠	1 mg/kg	[63]
		大鼠	10 mg/kg	
NGO	<100	小鼠	10 mg/kg	[64]
GO	514	小鼠	50 $\mu\text{g/mL}$	[65]
石墨烯				
普朗尼克包裹的石墨烯				
GO	100~500, 1000~5000	小鼠	10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$	[66]
GO 水凝胶	100, 500	小鼠	GO 0.25 wt% gel	[67]
聚乙二醇-GO	10~50	小鼠	20 mg/kg	[68,69]
GO-地塞米松	—	小鼠	20 mg/kg	[70]
GO	80, 106	秀丽隐杆线虫	5~20 $\mu\text{g/mL}$	[71]
多聚左旋赖氨酸-聚乙二醇-GO				
GO	100~500	小鼠	50 $\mu\text{g/只}$	[72]
石墨烯纳米片	—	秀丽隐杆线虫	50~250 $\mu\text{g/mL}$	[73]

a) “—”示无值

葡萄球菌)的抑制作用,发现这两种石墨烯衍生物均有良好的抑菌性;并且,石墨烯抑菌性主要来自其对细菌细胞膜完整性的破坏, RGNWs 具有更锐利的边缘,因而抗菌性优于 GONWs. 为了探究石墨烯抑菌的原理, Akhavan 等人^[81]进一步研究发现, GONWs 可以捕获细菌,使细菌脱离其生长环境,而 GONWs 的抗菌性也正是由于细菌脱离营养进而不能生存所引起的. Liu 等人^[82,83]比较了不同理化性质的石墨烯纳米材料的抗菌性,发现石墨烯抗菌性主要与石墨烯材料的稳定性、片层大小相关. 研究指出 GO 相对于 rGO 表现出更强的抗菌性;大尺寸 GO 比小尺寸 GO 拥有更好的抗菌性. 同时,研究认为石墨烯的抗菌性主要来自对细胞膜的破坏,也可能来自氧化损伤. 研究分析抗菌性可能存在 3 个环节:首先细菌黏附在材料上,其次石墨烯通过尖锐的边角破坏细胞膜,最后超氧离子介导氧化应激最终导致菌体死亡. 但是,该研究仅发现石墨烯衍生物能够氧化还原型谷胱甘肽,尚未直接证明石墨烯能够引发细菌体内活性氧簇 ROS 水平的变化. Krishnamoorthy 等人^[84]证实石墨烯可以通过脂质过氧化作用进行抗菌,间接说明了石墨烯的抗菌性可能与其氧化损伤相关,但是仍然缺

乏直接的证据.

最近, Tu 等人^[85]就石墨烯抗菌的作用机制提出了新的理论. 他们认为石墨烯与细菌相互作用,刀片状的石墨烯不仅可以切割细菌导致细菌死亡;而且可以将细胞膜上磷脂分子大规模直接抽取,破坏细胞膜从而杀死细菌. 该研究将计算机分子动力学模拟与生物电子显微镜实验相结合,计算机分子动力学模拟指出石墨烯独特的二维结构使其可以与细菌细胞膜上的磷脂分子发生超强的相互作用,从而导致大量磷脂分子脱离细胞膜并吸附到石墨烯的表面. 生物电子显微镜实验直接观察到了细菌细胞膜与石墨烯氧化物作用后产生的大范围空腔结构,为理论计算结果提供了实验证据. 这一研究为揭示纳米材料的细胞毒性及抗菌性提供了一种全新的分子机制. 但是,石墨烯与细菌细胞膜的相互作用是非常复杂的,其分子机制的全面阐述和石墨烯抗菌机制的研究依然需要长期的研究.

目前,石墨烯具有优异的抗菌性能已经被广泛的证实. 然而, Ruiz 等人^[86]却发现 GO 可以非特异地提高细胞的生长能力,不仅促进哺乳动物细胞的生长,而且促进细菌的生长. 这种促进作用主要是由于

表 3 石墨烯及其衍生物抗菌性的研究概况^{a)}

材料	尺寸(nm)	菌种	浓度	参考文献
GO 膜	1500(厚)	大肠杆菌	20, 85 $\mu\text{g/mL}$	[41]
rGO 膜	4500(厚)			
Ag-GO	6	大肠杆菌	80, 100 $\mu\text{g/mL}$	[74]
Ag-rGO	—	大肠杆菌	50 $\mu\text{g/mL}$	[75]
Ag-rGO	40	大肠杆菌	6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$	[77]
聚乙烯亚胺-rGO	—	大肠杆菌	958 mg/L	[78]
		金黄色葡萄球菌		
聚乙烯吡啶-GO	—	大肠杆菌	—	[79]
GO 纳米墙	—	金黄色葡萄球菌	—	[80,81]
		大肠杆菌		
石墨烯	—	金黄色葡萄球菌	1~10 $\mu\text{g/mL}$	[84]
		大肠杆菌		
		枯草芽孢杆菌		
		粪肠球菌		
GO 膜	—	大肠杆菌	25 $\mu\text{g/mL}$	[86]
石墨	5250	大肠杆菌	400 $\mu\text{g/mL}$	[82]
氧化石墨	4420			
GO	560			
rGO	293			
GO 片层	—	大肠杆菌	5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$	[83]
GO-Ag	500~1100	大肠杆菌	—	[87]
GO	—	铜绿假单胞菌	0~150 $\mu\text{g/mL}$	[88]
rGO				

a) “—”示无值

石墨烯氧化物吸附细菌生长所需的营养物质后,为细菌的繁殖提供了一个营养丰富的附着基底所致。因此,石墨烯与生物体相互作用的介质也是影响其生物毒性的因素之一。Hu 等人^[42]在石墨烯氧化物的细胞毒性研究中也得出了相同的结论。当石墨烯氧化物与哺乳动物细胞在含有不同量血清的培养基中相互作用时,血清含量的多少直接关系着 GO 的细胞毒性强弱。当 GO 在正常培养基中(含有 10%血清)与细胞孵育时,由于 GO 吸附培养中的血清蛋白形成蛋白包裹体,呈现了很低的细胞毒性。石墨烯这种超强的表面吸附能力,对于石墨烯功能化,进而有效发挥石墨烯的抗菌性,规避细胞和动物毒性具有很好的参考价值(表 3)。

3 总结与展望

本文总结了当前已报道的石墨烯及其衍生物在生物安全性方面的研究,研究表明石墨烯及其衍生物具有良好的生物相容性,在生物医学方面具有潜在的应用价值;石墨烯对哺乳动物及其细胞存在的

潜在危害与材料的理化性质和使用剂量密切相关,人们可以通过石墨烯表面改性和使用剂量调控缓解其诱发的生物毒性。同时,基于石墨烯纳米材料优异的抗菌性能,在医用、涂料和包装等方面展示了广阔的应用前景。

石墨烯的生物安全性研究已经积累了一定的研究基础,但是由于石墨烯制备方法的多样性和生物系统的复杂性,石墨烯的生物安全性问题仍不能简单归纳得出结论,需要综合多方面的因素进行深入研究。由于石墨烯制备方法多样,石墨烯的尺寸、表面官能团和电荷等性质,很难只有单一差异因素,因而制备理化性质差异单一的石墨烯及其衍生物,确定影响生物安全的真正原因,是未来的研究重点。此外,石墨烯与生物体相互作用的机制研究尚处于初级阶段,石墨烯作用于生物体后引发的生理生化反应以及机制尚未有深入的研究。特别是,石墨烯氧化物对细菌细胞和哺乳动物细胞迥异的毒性,除了培养介质不同外,是否还存在其他影响因素?这些问题对于深入了解石墨烯的生物安全具有重要意义。

参考文献

- 1 Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 2004, 306: 666–669
- 2 Liu Z, Robinson J T, Sun X M, et al. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 10876–10877
- 3 Loh K P, Bao Q L, Eda G, et al. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat Chem*, 2010, 2: 1015–1024
- 4 Cui Y, Kim S N, Naik R R, et al. Biomimetic peptide nanosensors. *Accounts Chem Res*, 2012, 45: 696–704
- 5 Huang X, Qi X Y, Boey F, et al. Graphene-based composites. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 666–686
- 6 Li C X, Adamcik J, Mezzenga R. Biodegradable nanocomposites of amyloid fibrils and graphene with shape-memory and enzyme-sensing properties. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7: 421–427
- 7 Novoselov K S, Fal'ko V I, Colombo L, et al. A roadmap for graphene. *Nature*, 2012, 490: 192–200
- 8 Chen H, Mueller M B, Gilmore K J, et al. Mechanically strong, electrically conductive, and biocompatible graphene paper. *Adv Mater*, 2008, 20: 3557–3561
- 9 Shen H, Zhang L M, Liu M, et al. Biomedical applications of graphene. *Theranostics*, 2012, 2: 283–294
- 10 Zhang Y, Nayak T R, Hong H, et al. Graphene: A versatile nanoplatform for biomedical applications. *Nanoscale*, 2012, 4: 3833–3842
- 11 Yang K, Feng L Z, Shi X Z, et al. Nano-graphene in biomedicine: Theranostic applications. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 530–547
- 12 Yang K, Li Y J, Tan X F, et al. Behavior and toxicity of graphene and its functionalized derivatives in biological systems. *Small*, 2013, 9: 1492–1503
- 13 Feng L Z, Liu Z A. Graphene in biomedicine: Opportunities and challenges. *Nanomedicine*, 2011, 6: 317–324
- 14 Yan L A, Zhao F, Li S J, et al. Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes. *Nanoscale*, 2011, 3: 362–382
- 15 Jastrzebska A M, Kurtysz P, Olszyna A R. Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. *J Nanopart Res*, 2012, 14: 1320–1328
- 16 Sanchez V C, Jachak A, Hurt R H, et al. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: An interdisciplinary review. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25: 15–34
- 17 Bussy C, Ali-Boucetta H, Kostarelos K. Safety considerations for graphene: Lessons learnt from carbon nanotubes. *Accounts Chem Res*, 2013, 46: 692–701

- 18 Lu X K, Huang H, Nemchuk N, et al. Patterning of highly oriented pyrolytic graphite by oxygen plasma etching. *Appl Phys Lett*, 1999, 75: 193–195
- 19 Lu X K, Yu M F, Huang H, et al. Tailoring graphite with the goal of achieving single sheets. *Nanotechnology*, 1999, 10: 269–272
- 20 Novoselov K S, Jiang D, Schedin F, et al. Two-dimensional atomic crystals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 10451–10453
- 21 Fasolino A, Los J H, Katsnelson M I. Intrinsic ripples in graphene. *Nat Mater*, 2007, 6: 858–861
- 22 Meyer J C, Geim A K, Katsnelson M I, et al. The structure of suspended graphene sheets. *Nature*, 2007, 446: 60–63
- 23 Stankovich S, Dikin D A, Dommett G H B, et al. Graphene-based composite materials. *Nature*, 2006, 442: 282–286
- 24 Sutter P W, Flege J I, Sutter E A. Epitaxial graphene on ruthenium. *Nat Mater*, 2008, 7: 406–411
- 25 Ohno Y, Maehashi K, Yamashiro Y, et al. Electrolyte-gated graphene field-effect transistors for detecting pH protein adsorption. *Nano Lett*, 2009, 9: 3318–3322
- 26 He Q Y, Sudibya H G, Yin Z Y, et al. Centimeter-long and large-scale micropatterns of reduced graphene oxide films: Fabrication and sensing applications. *ACS Nano*, 2010, 4: 3201–3208
- 27 Viculis L M, Mack J J, Mayer O M, et al. Intercalation and exfoliation routes to graphite nanoplatelets. *J Mater Chem*, 2005, 15: 974–978
- 28 Berger C, Song Z M, Li T B, et al. Ultrathin epitaxial graphite: 2D electron gas properties and a route toward graphene-based nanoelectronics. *J Phys Chem B*, 2004, 108: 19912–19916
- 29 Berger C, Song Z M, Li X B, et al. Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene. *Science*, 2006, 312: 1191–1196
- 30 Kim K S, Zhao Y, Jang H, et al. Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. *Nature*, 2009, 457: 706–710
- 31 Li X S, Magnuson C W, Venugopal A, et al. Graphene films with large domain size by a two-step chemical vapor deposition process. *Nano Lett*, 2010, 10: 4328–4334
- 32 Stankovich S, Piner R D, Chen X Q, et al. Stable aqueous dispersions of graphitic nanoplatelets via the reduction of exfoliated graphite oxide in the presence of poly(sodium 4-styrenesulfonate). *J Mater Chem*, 2006, 16: 155–158
- 33 Mkhoyan K A, Contryman A W, Silcox J, et al. Atomic and electronic structure of graphene-oxide. *Nano Lett*, 2009, 9: 1058–1063
- 34 Sun X M, Liu Z, Welsher K, et al. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano Res*, 2008, 1: 203–212
- 35 Zhang L M, Xia J G, Zhao Q H, et al. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small*, 2010, 6: 537–544
- 36 Lu C H, Zhu C L, Li J, et al. Using graphene to protect DNA from cleavage during cellular delivery. *Chem Commun*, 2010, 46: 3116–3118
- 37 Wang Y, Li Z H, Hu D H, et al. Aptamer/graphene oxide nanocomplex for in situ molecular probing in living cells. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 9274–9276
- 38 Brodie B C. On the Atomic weight of graphite. *Philos Trans R Soc London*, 1859, 149: 249–259
- 39 Staudenmaier L. Verfahren zur darstellung der graphitsäure. *Ber Deutsch Chem Ges*, 1898, 31: 1481–1487
- 40 Hummers W S, Offeman R E. Preparation of graphitic oxide. *J Am Chem Soc*, 1958, 80: 1339
- 41 Hu W B, Peng C, Luo W, et al. Graphene-based antibacterial paper. *ACS Nano*, 2010, 4: 4317–4323
- 42 Hu W B, Peng C, Lü M, et al. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *ACS Nano*, 2011, 5: 3693–3700
- 43 Dreyer D R, Park S, Bielawski C W, et al. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 228–240
- 44 Lü M, Zhang Y J, Liang L, et al. Effect of graphene oxide on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells line. *Nanoscale*, 2012, 4: 3861–3866
- 45 Zhang H, Peng C, Yang J Z, et al. Uniform ultrasmall graphene oxide nanosheets with low cytotoxicity and high cellular uptake. *ACS Appl Mater Int*, 2013, 5: 1761–1767
- 46 Chang Y L, Yang S T, Liu J H, et al. *In vitro* toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol Lett*, 2011, 200: 201–210
- 47 Wang K, Ruan J, Song H, et al. Biocompatibility of graphene oxide. *Nanoscale Res Lett*, 2011, 6: 8–15
- 48 Chowdhury S M, Lalwani G, Zhang K, et al. Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons. *Biomaterials*, 2013, 34: 283–293
- 49 Yue H, Wei W, Yue Z G, et al. The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. *Biomaterials*, 2012, 33: 4013–4021
- 50 Mu Q X, Su G M, Li L W, et al. Size-dependent cell uptake of protein-coated graphene oxide nanosheets. *ACS Appl Mater Inter*, 2012, 4: 2259–2266
- 51 Zhang Y B, Ali S F, Dervishi E, et al. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano*, 2010, 4: 3181–3186
- 52 Li Y, Liu Y, Fu Y J, et al. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials*, 2012, 33: 402–411

- 53 Chen G Y, Yang H J, Lu C H, et al. Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide. *Biomaterials*, 2012, 33: 6559–6569
- 54 Sasidharan A, Panchakarla L S, Chandran P, et al. Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. *Nanoscale*, 2011, 3: 2461–2464
- 55 Biris A R, Mahmood M, Lazar M D, et al. Novel multicomponent and biocompatible nanocomposite materials based on few-layer graphenes synthesized on a gold/hydroxyapatite catalytic system with applications in bone regeneration. *J Phys Chem C*, 2011, 115: 18967–18976
- 56 Agarwal S, Zhou X, Ye F, et al. Interfacing live cells with nanocarbon substrates. *Langmuir*, 2010, 26: 2244–2247
- 57 Park S Y, Park J, Sim S H, et al. Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. *Adv Mater*, 2011, 23: 263–268
- 58 Liao K H, Lin Y S, Macosko C W, et al. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Appl Mater Int*, 2011, 3: 2607–2615
- 59 Singh S K, Singh M K, Kulkarni P P, et al. Amine-modified graphene. Thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for biomedical applications. *ACS Nano*, 2012, 6: 2731–2740
- 60 Singh S K, Singh M K, Nayak M K, et al. Thrombus inducing property of atomically thin graphene oxide sheets. *ACS Nano*, 2011, 5: 4987–4996
- 61 Sasidharan A, Panchakarla L S, Sadanandan A R, et al. Hemocompatibility and macrophage response of pristine and functionalized graphene. *Small*, 2012, 8: 1251–1263
- 62 Yan L, Wang Y P, Xu X, et al. Can graphene oxide cause damage to eyesight? *Chem Res Toxicol*, 2012, 25: 1265–1270
- 63 Zhang X Y, Yin J L, Peng C, et al. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon*, 2011, 49: 986–995
- 64 Li B, Yang J Z, Huang Q, et al. Biodistribution and pulmonary toxicity of intratracheally instilled graphene oxide in mice. *NPG Asia Mater*, 2013, 5: e44
- 65 Duch M C, Budinger G R S, Liang Y T, et al. Minimizing oxidation and stable nanoscale dispersion improves the biocompatibility of graphene in the lung. *Nano Lett*, 2011, 11: 5201–5207
- 66 Liu J H, Yang S T, Wang H F, et al. Effect of size and dose on the biodistribution of graphene oxide in mice. *Nanomedicine*, 2012, 7: 1801–1812
- 67 Sahu A, Choi W I, Tae G. A stimuli-sensitive injectable graphene oxide composite hydrogel. *Chem Commun*, 2012, 48: 5820–5822
- 68 Yang K, Wan J M, Zhang S A, et al. *In vivo* pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of pegylated graphene in mice. *ACS Nano*, 2011, 5: 516–522
- 69 Yang K, Zhang S A, Zhang G X, et al. Graphene in mice: Ultrahigh *in vivo* tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Lett*, 2010, 10: 3318–3323
- 70 Zhang S A, Yang K, Feng L Z, et al. *In vitro* and *in vivo* behaviors of dextran functionalized graphene. *Carbon*, 2011, 49: 4040–4049
- 71 Zhang W D, Wang C, Li Z J, et al. Unraveling stress-induced toxicity properties of graphene oxide and the underlying mechanism. *Adv Mater*, 2012, 24: 5391–5397
- 72 Ali-Boucetta H, Bitounis D, Raveendran-Nair R, et al. Purified graphene oxide dispersions lack *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* pathogenicity. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2: 433–441
- 73 Zanni E, De Bellis G, Bracciale M P, et al. Graphite nanoplatelets and caenorhabditis elegans: Insights from an *in vivo* model. *Nano Lett*, 2012, 12: 2740–2744
- 74 Liu L, Liu J, Wang Y, et al. Facile synthesis of monodispersed silver nanoparticles on graphene oxide sheets with enhanced antibacterial activity. *New J Chem*, 2011, 35: 1418–1423
- 75 Shen J, Shi M, Yan B, et al. One-pot hydrothermal synthesis of Ag-reduced graphene oxide composite with ionic liquid. *J Mater Chem*, 2011, 21: 7795–7801
- 76 Ma J, Zhang J, Xiong Z, et al. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-modified graphene oxide. *J Mater Chem*, 2011, 21: 3350–3352
- 77 Xu W P, Zhang L C, Li J P, et al. Facile synthesis of silver@graphene oxide nanocomposites and their enhanced antibacterial properties. *J Mater Chem*, 2011, 21: 4593–4597
- 78 Cai X, Lin M, Tan S, et al. The use of polyethyleneimine-modified reduced graphene oxide as a substrate for silver nanoparticles to produce a material with lower cytotoxicity and long-term antibacterial activity. *Carbon*, 2012, 50: 3407–3415
- 79 Santos C M, Tria M C R, Vergara R A M V, et al. Antimicrobial graphene polymer (PVK-GO) nanocomposite films. *Chem Commun*, 2011, 47: 8892–8894

- 80 Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano*, 2010, 4: 5731–5736
- 81 Akhavan O, Ghaderi E, Esfandiar A. Wrapping bacteria by graphene nanosheets for isolation from environment, reactivation by sonication, and inactivation by near-infrared irradiation. *J Phys Chem B*, 2011, 115: 6279–6288
- 82 Liu S, Zeng T H, Hofmann M, et al. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: Membrane and oxidative stress. *ACS Nano*, 2011, 5: 6971–6980
- 83 Liu S, Hu M, Zeng T H, et al. Lateral dimension-dependent antibacterial activity of graphene oxide sheets. *Langmuir*, 2012, 28: 12364–12372
- 84 Krishnamoorthy K, Veerapandian M, Zhang L H, et al. Antibacterial efficiency of graphene nanosheets against pathogenic bacteria via lipid peroxidation. *J Phys Chem C*, 2012, 116: 17280–17287
- 85 Tu Y, Lü M, Xiu P, et al. Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets. *Nat Nanotechnol*, 2013, 8: 594–601
- 86 Ruiz O N, Fernando K A S, Wang B J, et al. Graphene oxide: A nonspecific enhancer of cellular growth. *ACS Nano*, 2011, 5: 8100–8107
- 87 Sreeprasad T S, Maliyekkal M S, Deepti K, et al. Transparent, luminescent, antibacterial and patternable film forming composites of graphene oxide/reduced graphene oxide. *ACS Appl Mater Int*, 2011, 3: 2643–2654
- 88 Gurunathan S, Han J W, Dayem A A, et al. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 5901–5914

Progress in biological safety of graphene

TIAN Tian^{1,2}, LÜ Min¹, TIAN Yang³, SUN YanHong¹, LI XiaoXia¹, FAN ChunHai¹ & HUANG Qing¹

¹ Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Division of Physical Biology & Bioimaging Center, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China;

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³ College of Life and Environmental Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Graphene, a carbon nanomaterial with sp^2 -hybridized carbon atoms tightly packed into a two-dimensional (2D) honeycomb lattice. Owing to the excellent optical, electrical, and mechanical properties, graphene has emerged as a revolutionary carbon material with great potential in materials science, micro-nanomachining, energy, biomedicine, and drug deliver. With the mass production and the widespread use of graphene, the biological safety issues of graphene have caused a lot of concern. As similar to other nano particles, the biotoxicity of graphene and its derivative depends on their physicochemical property, and also depends on their concentration. But the biotoxicity of graphene and its derivative is complicated. The same material may have different effect on the different organisms. So we must do further studies to clarify the biotoxicity of graphene. This review summarizes the current biotoxicity studies of graphene and its derivative. We want to provide a reference for biological safety assessment, and to provide a scientific guidance in the application of biological and medical domain.

graphene, biological safety, cytotoxicity, animal toxicity, antibacterial property

doi: 10.1360/N972014-00091