石墨烯表面官能团种类多样性对诱导大型溞氧化应激的影响

姚洪烨, 李雪花*, 张丽丽, 黄杨, 罗天烈, 陈景文

大连理工大学环境学院, 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 大连 116024

* 联系人, E-mail: lixuehua@dlut.edu.cn

2018-09-19 收稿, 2018-10-19 修回, 2018-10-25 接受, 2018-11-28 网络版发表

国家自然科学基金(21477016, 21777019)和中央高校基本科研业务费专项(DUT16LK13)资助

摘要 石墨烯纳米材料进入到环境后, 可能通过一系列转化形成表面官能化衍生物. 因此, 研究表面修饰的石墨烯纳米材料对水生生物造成的毒性效应对于评价其生态风险具有重要意义. 本研究考察了石墨烯(u-G)、羧基化石墨烯(G-COOH)、氨基化石墨烯(G-NH₂)、羟基化石墨烯(G-OH)及巯基化石墨烯(G-SH)对大型溞(*Daphnia magna*)体内活性氧物种(ROS)、抗氧化酶、抗氧化剂及脂质过氧化水平的影响, 评价了其诱导大型溞氧化应激的程度. 结果表明: 相同暴露条件下(24 h, 2 mg/L), u-G, G-COOH和G-OH诱导大型溞体内丙二醛含量显著升高, 且u-G诱导产生的丙二醛含量显著高于G-COOH和G-OH, 表明u-G造成大型溞氧化损伤的程度高于G-COOH和G-OH. 此外, 这3种材料也导致大型溞体内ROS升高和谷胱甘肽(GSH)含量显著变化, 其中u-G和G-OH还诱导超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性显著降低. 在24 h暴露期间内, G-SH在不影响大型溞体内ROS水平的情况下, 诱导SOD和CAT活性降低, 可能是由于G-SH破坏了这些抗氧化酶的结构. G-NH₂暴露没有影响大型溞体内的氧化应激标志物. 综上, 石墨烯及其表面官能化衍生物对大型溞造成氧化应激的能力: u-G>G-COOH≈G-OH>G-SH>G-NH₂.

关键词 石墨烯, 大型溞, 氧化应激, 活性氧物种, 脂质过氧化

石墨烯是一种由碳原子以sp²杂化轨道组成的六角形呈蜂巢晶格的二维纳米材料^[1]. 由于具有优异的光学、电学及力学特性, 石墨烯纳米材料在能源、电子产品、生物医学等领域得到了广泛的应用^[2~8]. 预计到2027年, 全球石墨烯纳米材料的产量将达到3800吨/年, 总价值约为3亿美元^[9]. 石墨烯的生产和应用使其不可避免地释放到水环境中, 对水生生物造成潜在的危害.

石墨烯纳米材料进入到环境后, 可能会通过氧化还原、光化学、水解等反应发生转化, 其表面会形成含氮、氧和硫的官能团^[10]. 石墨烯表面被官能团修饰后可改变石墨烯的溶解性, 也影响生物毒性^[11].

因此, 研究表面修饰的石墨烯纳米材料对水生生物造成的毒性效应对于评价其生态风险具有重要意义.

石墨烯纳米材料主要通过氧化应激对生物体造成毒性损伤^[12]. 当纳米材料暴露于生物体内时, 可以与核酸、脂质、蛋白等生物分子发生相互作用, 诱导产生活性氧物种(ROS), 影响抗氧化防御系统, 造成氧化损伤^[13~15]. 目前石墨烯相关材料诱导生物体产生氧化应激的研究主要集中在氧化石墨烯上. 氧化石墨烯进入斑马鱼胚胎, 诱导产生O₂^{·-}, 降低过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)相关基因的表达, 造成脂质过氧化^[16]. 氧化石墨烯也可以在大型溞体内富集, 引起SOD活性升高, 造成氧化损伤^[17].

引用格式: 姚洪烨, 李雪花, 张丽丽, 等. 石墨烯表面官能团种类多样性对诱导大型溞氧化应激的影响. 科学通报, 2019, 64: 419–429

Yao H Y, Li X H, Zhang L L, et al. Effect of different surface functional groups of graphene on oxidative stress in *Daphnia magna* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 419–429, doi: 10.1360/N972018-00960

此外,暴露在氧化石墨烯下,小眼虫体内SOD和CAT活性升高,其生长受到抑制^[18]。虽然,这些研究关注了氧化石墨烯在生物体内产生氧化应激的机制,但是不同种类的表面官能团(氨基、巯基等)对石墨烯诱导生物体产生氧化应激的影响机制尚不明确。

生物体内抗氧化防御系统维持着ROS的动态平衡。抗氧化酶SOD, CAT及抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)等对ROS的生成和清除起着重要的作用^[19]。ROS氧化生物体内的不饱和脂肪酸而生成的脂质过氧化物产物丙二醛(MDA),可用于评价生物体氧化损伤的程度^[19]。因此,本研究选取5种石墨烯及其表面官能化衍生物,包括石墨烯(u-G)、羧基化石墨烯(G-COOH)、氨基化石墨烯(G-NH₂)、羟基化石墨烯(G-OH)以及巯基化石墨烯(G-SH),测定了不同暴露时间(2, 12, 24 h)及24 h净化期间大型蚤体内ROS水平、脂质过氧化水平以及SOD, CAT, GSH的动态变化。同时,通过分析不同种类的表面官能团对石墨烯诱导生物体产生氧化应激的影响,综合评价了5种石墨烯及其表面官能化衍生物诱导大型蚤氧化应激的程度。

1 材料与方法

(i) 实验材料。石墨烯(u-G, 纯度>90%, O/C为0.142), 羧基化石墨烯(G-COOH, 纯度>95%, O/C为0.664)和氨基化石墨烯(G-NH₂, 纯度>95%, N/C为0.162)购买自南京先丰纳米材料科技有限公司。羟基化石墨烯(G-OH, 纯度>80%、羟基含量为4%(质量百分比))和巯基化石墨烯(G-SH, 纯度>80%、巯基含量为4%(质量百分比))购买自苏州碳丰石墨烯科技有限公司。2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针购买自Sigma-Aldrich公司。GSH, MDA, CAT和SOD试剂盒购买自南京建成生物工程研究所。其余化学试剂均为分析纯试剂(纯度≥99%), 购买自科密欧化学试剂有限公司。

(ii) 大型蚤(*Daphnia magna*)。大型蚤(*Daphnia magna*)在恒温培养箱中培养, 饲以绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)。培养箱温度20±1℃, 光暗周期比16:8, 溶解氧>3 mg/L。实验用水为测试水。测试水成分为CaCl₂·2H₂O: 294.0 mg/L; MgSO₄·7H₂O: 123.3 mg/L; NaHCO₃: 64.8 mg/L; KCl: 5.8 mg/L。pH: 7.8±0.2。

(iii) 石墨烯纳米材料暴露溶液配制。称取10 mg石墨烯及其表面官能化衍生物溶解于500 mL超纯

水, 使用超声波细胞粉碎机(Xinyi, JY92-2D, 中国)分散, 功率设置为400 W(间歇超声时间为5 s), 超声3 h。储备液在每次使用前重新超声20 min。使用测试水稀释石墨烯及其表面官能化衍生物储备液, 配制暴露溶液。基于水生环境中碳纳米材料可能的浓度值^[20,21], 本研究选择0~16 mg/L石墨烯及其表面官能化衍生物进行24 h急性毒性实验。结果表明, 当石墨烯及其表面官能化衍生物浓度超过2 mg/L时, 大型蚤的活动开始受到抑制。因此, 本研究将石墨烯及其表面官能化衍生物的暴露浓度设为2 mg/L。

(iv) 大型蚤对石墨烯及其表面官能化衍生物的摄取。出生5 d的大型蚤暴露在石墨烯及其表面官能化衍生物24 h后, 置于不含石墨烯及其表面官能化衍生物的测试水中净化24 h。使用倒置荧光显微镜(Olympus, IX71+DP71, 日本)观察, 在暴露阶段和净化阶段大型蚤对石墨烯及其表面官能化衍生物的摄取情况。

(v) 大型蚤体内ROS的测定。使用DCFH-DA荧光探针测定大型蚤体内ROS的水平^[22]。DCFH-DA通过被动扩散进入细胞内, 与酯酶反应生成二氯荧光素(DCFH)。细胞内ROS将DCFH氧化, 形成荧光物质2,7-二氯荧光黄(DCF)^[23]。

使用测试水冲洗大型蚤3次, 去除大型蚤表面的石墨烯材料, 随后大型蚤转移至12孔板。20 μmol/L DCFH-DA加入12孔板, 避光孵育5 h。酶标仪(Tecan, Tecan Infinite 200 pro, 澳大利亚)测定DCF荧光强度。DCF的激发和发射波长分别是488和525 nm。以空白对照为参考, 实验组ROS以实验组荧光强度除以对照组荧光强度乘以100%表示。

(vi) 大型蚤体内抗氧化酶、抗氧化剂及脂质过氧化的测定。使用滤纸吸干大型蚤表面水分, 称重, 并加入0.9%的生理盐水, 冰水浴下机械搅拌, 离心, 配制得到1%的匀浆液, 分别测定SOD, CAT活性及GSH, MDA含量。大型蚤体内SOD活性和MDA含量的测定分别采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸比色法^[24,25]。钼酸铵可以迅速中止CAT分解H₂O₂的反应, 并且与剩余的H₂O₂反应形成一种淡黄色的络合物, 通过测定淡黄色化合物来计算CAT活性^[26]。GSH分子中含有巯基(-SH), 可以与二硫代二硝基甲苯酸反应产生一种黄色化合物, 通过测定黄色化合物来计算GSH含量^[27]。SOD, CAT活性和GSH含量单位为U/mg protein^[28]。MDA单位为nmol/mg protein^[25]。

(vii) 数据统计. 对所有实验数据采用SPSS22.0软件进行统计分析, 方差分析采用单因素方差分析(one way analysis of variance), 并以Tukey's test进行多重比较. $P < 0.05$ 表示有显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 大型蚤对石墨烯及其表面官能化衍生物的摄取

如图1所示, 与对照组(Ctrl)相比, 大型蚤在2 mg/L石墨烯及其表面官能化衍生物中暴露24 h, 肠道附近出现了明显的黑色物质, 表明摄取的石墨烯及其表面官能化衍生物主要分布在肠道内. u-G的暴露使大型蚤表面也被黑色物质包覆, 表明强疏水性材料u-G易吸附在生物表面. 净化24 h后, 大型蚤去除掉吸附在其表面的u-G, 但肠道内仍有大量的u-G残留, 而表面官能团修饰的石墨烯纳米材料在大型蚤肠道仅有部分残留. 该结果表明, 短时间内大型蚤不能完全清除肠道内的石墨烯及其表面官能化衍生物.

有研究指出, 在食物充足的情况下, 大型蚤在96 h内蜕皮3次^[29]. 本研究观察到, 在不喂食的情况下, 大型蚤48 h内蜕皮1次. 净化24 h后, 本研究在测试水中发现了大型蚤脱掉的表皮. 通过显微镜观察后发现, 脱掉的表皮上含有u-G, 表明大型蚤吸附在表皮上的u-G不仅可以在净化水中直接脱附, 还可以通过脱皮去除表面的u-G. 已有研究表明, 将暴露在2 mg/L富勒烯中的大型蚤置于清水中净化24和48 h, 大型蚤对富勒烯的清除率仅为46%和76%^[30]. 而大型蚤对不同种类表面官能化石墨烯的清除情况, 仍未见报道. 本研究发现对于石墨烯纳米材料而言, 疏水性的u-G与生物体肠道表面能够产生较强的相互作用, 非常容易在肠道聚集, 难于在短时间内清除. 但是, 通过表面官能团修饰, 增加了石墨烯的亲水性, 更有利于大型蚤将其从肠道中清除.

2.2 大型蚤体内ROS水平的变化

大型蚤暴露在2 mg/L石墨烯及其表面官能化衍生物下, 其体内ROS水平的变化如图2所示. 暴露2 h时u-G诱导大型蚤体内ROS水平显著升高, 但是G-COOH, G-OH, G-NH₂和G-SH对其体内ROS水平无显著影响, 表明u-G可以在短时间内诱导大型蚤产生ROS. 暴露12 h时5种材料均未导致大型蚤体内ROS

图1 (网络版彩色)大型蚤对石墨烯及其表面官能化衍生物的摄取
Figure 1 (Color online) Ingestion of graphene and its surface functionalized derivatives by *Daphnia magna*

的显著变化. 然而, 暴露24 h时u-G, G-COOH和G-OH诱导大型蚤体内ROS显著升高, 表明随着暴露时间的增加, G-COOH和G-OH也可诱导大型蚤体内产生ROS. 但是在整个暴露期间内, G-NH₂和G-SH未显著影响大型蚤体内的ROS水平. 停止暴露24 h后, 大型蚤体内ROS恢复到正常水平. 该结果表明, 净化24 h后, 虽然大型蚤肠道内仍有石墨烯纳米材料, 但是大型蚤的抗氧化防御系统能够对石墨烯材料诱导产生的ROS进行清除, 维持ROS的动态平衡.

2.3 大型蚤体内抗氧化酶活性的变化

大型蚤暴露在2 mg/L石墨烯及其表面官能化衍生物下, 其体内SOD活性的变化如图3所示. 暴露2 h

图2 (网络版彩色)石墨烯及其表面官能化衍生物诱导大型溞ROS水平. (a) 2 h; (b) 12 h; (c) 24 h; (d) 净化24 h, 柱形图上不同字母表示存在显著性差异($P < 0.05$)

Figure 2 (Color online) Level of ROS in *Daphnia magna* induced by graphene and its surface functionalized derivatives. (a) 2 h; (b) 12 h; (c) 24 h; (d) depuration 24 h, different letters above each column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$)

时u-G诱导大型溞体内SOD活性显著降低, G-COOH, G-NH₂, G-OH和G-SH对SOD活性无显著影响. 暴露2 h时, 为了清除u-G诱导产生的过量的ROS, SOD被大量消耗, 机体处于氧化和抗氧化失衡的状态, 产生了氧化应激.

暴露12 h时G-OH诱导大型溞体内SOD活性降低, SOD转化O₂^{•-}为H₂O₂的途径受阻, 但是大型溞体内GSH等抗氧化剂也可将O₂^{•-}转化为H₂O₂, 弥补SOD活性降低对ROS清除带来的影响, 使大型溞体内ROS维持在正常水平. 因此, 在G-OH下暴露12 h, 大型溞体内SOD活性降低, ROS无显著变化. 该结果也在大型溞暴露在G-OH下体内GSH含量的变化中得到证实. 暴露12 h时G-SH诱导大型溞体内SOD活性降低, 而G-SH暴露下大型溞体内ROS无显著变化, 表明G-SH在没有引起大型溞体内ROS变化的情况下, 抑制SOD活性.

暴露24 h时u-G诱导大型溞体内SOD活性显著降低, G-COOH, G-NH₂, G-OH和G-SH对SOD活性无显著影响. 整个暴露周期内, u-G暴露下大型溞体内SOD活性的降低都伴随着ROS水平的升高, 表明SOD活性的降低可能与u-G诱导大型溞体内产生的ROS水平超过了SOD的承受能力有关. 停止暴露24 h后, G-COOH, G-OH和G-SH诱导大型溞体内SOD活性降低, u-G和G-NH₂暴露下的大型溞, 体内SOD活性无显著变化. 该结果表明净化24 h后, 大型溞肠道内的G-COOH, G-OH和G-SH可以继续对大型溞的抗氧化防御系统造成影响.

如图4所示, 暴露2 h时u-G和G-OH诱导大型溞体内CAT活性显著降低, 表明u-G和G-OH暴露下CAT活性受到抑制, 其转化H₂O₂的途径受阻. 暴露12 h时5种材料均未对大型溞体内CAT活性造成影响. 暴露24 h时u-G, G-OH和G-SH诱导大型溞体内CAT活性

图3 (网络版彩色)石墨烯及其表面官能化衍生物诱导大型溞SOD活性的变化。(a) 2 h; (b) 12 h; (c) 24 h; (d) 净化 24 h, 柱形图上不同字母表示存在显著性差异($P<0.05$)

Figure 3 (Color online) Activity of SOD in *Daphnia magna* induced by graphene and its surface functionalized derivatives. (a) 2 h; (b) 12 h; (c) 24 h; (d) depuration 24 h; different letters above each column indicate statistically significant differences ($P<0.05$)

降低。虽然G-SH暴露下大型溞体内CAT活性降低,但是ROS无显著变化。该结果表明G-SH可以在不影响大型溞体内ROS水平的情况下,抑制CAT活性。G-SH可能破坏CAT的结构,造成CAT功能性失活。已有研究表明,多壁碳纳米管的暴露使虎斑猛水蚤(*Tigriopus japonicus*)体内ROS无显著变化,但是诱导了CAT、谷胱甘肽-s-转移酶活性降低^[31]。此外,多壁碳纳米管在不影响日本青鳉(*Oryzias latipes*)体内ROS水平的情况下,诱导抗氧化酶活性降低^[32]。Liu等人^[33]研究证实了多壁碳纳米管可以改变CAT的二级结构,造成酶功能性失活。由于石墨烯与多壁碳纳米管具有一定的相似性,G-SH暴露可能也破坏抗氧化酶CAT的结构,影响CAT的活性。在整个暴露周期内,G-COOH和G-NH₂并未引起CAT活性的改变。暴露停止24 h,大型溞体内CAT活性与对照组相比均没有显著变化。

2.4 大型溞体内谷胱甘肽含量的变化

如图5所示,暴露2 h时u-G, G-COOH和G-OH诱导大型溞体内GSH含量显著升高。暴露在u-G下大型溞体内GSH含量显著高于暴露在G-COOH和G-OH下GSH的含量。暴露2 h时u-G诱导大型溞体内产生ROS,大型溞体内通过上调GSH水平对ROS进行清除。但是,2 h时u-G诱导产生的ROS超出了大型溞体内GSH对ROS的清除能力,ROS升高。G-COOH和G-OH下暴露2 h,大型溞体内GSH含量升高,对G-COOH和G-OH诱导产生的ROS进行清除,从而维持ROS的动态平衡。暴露12 h时u-G诱导大型溞体内GSH含量显著增加,与暴露2 h时相比,大型溞体内GSH含量增加70%,表明随着暴露时间的增加,大型溞进一步增加GSH的含量来对过量的ROS进行清除,缓解氧化应激。因此,大型溞暴露在u-G下12 h,其体内ROS水平无显著变化。暴露24 h时u-G, G-COOH

图4 (网络版彩色)石墨烯及其表面官能化衍生物诱导大型溞CAT活性的变化。(a) 2 h; (b) 12 h; (c) 24 h; (d) 净化24 h; 柱形图上不同字母表示存在显著性差异($P < 0.05$)

Figure 4 (Color online) Activity of CAT in *Daphnia magna* induced by graphene and its surface functionalized derivatives. (a) 2 h; (b) 12 h; (c) 24 h; (d) depuration 24 h; different letters above each column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$)

和G-OH诱导大型溞体内GSH含量显著性降低。暴露24 h时这3种材料诱导大型溞体内产生的ROS的量超过了大型溞体内GSH的承载能力, GSH被大量消耗来清除ROS, 机体氧化还原平衡被打破。在整个暴露周期内, G-NH₂和G-SH并未引起GSH含量的变化。净化24 h后, G-COOH, G-OH和G-SH诱导GSH含量显著升高, SOD活性显著降低。GSH含量的增加弥补SOD活性降低所引起的O₂⁻转化受阻, 维持ROS的动态平衡。

2.5 大型溞体内脂质过氧化水平

如图6所示, 在整个暴露阶段u-G均诱导大型溞体内MDA含量显著升高, MDA水平分别提高了66%(2h), 36%(12h)和78%(24h), 表明u-G显著诱导大型溞体内产生脂质过氧化, 造成氧化损伤。暴露2 h时, u-G诱导大型溞体内ROS升高, SOD活性降低使

O₂⁻转化受阻, GSH也不足以清除体内的ROS。因此, 未能被抗氧化防御系统清除的过量ROS与大型溞体内的不饱和脂肪酸发生反应, 造成了脂质过氧化。暴露12 h时, 由于大型溞体内SOD活性恢复到正常水平, GSH含量进一步增加, 使大型溞体内的ROS保持在正常水平, 并且缓解大型溞体内脂质过氧化的程度。因此, u-G暴露12 h, 大型溞体内MDA增加量相较于暴露2 h时降低了30%。随着暴露时间的增加, u-G暴露下大型溞体内ROS含量增高, 超过了抗氧化酶SOD和抗氧化剂GSH的承载能力, 抗氧化防御系统失衡, 脂质过氧化程度进一步加剧。暴露24 h时G-COOH和G-OH也诱导大型溞体内MDA含量显著增加, 表明G-COOH和G-OH可以诱导大型溞体内产生氧化损伤。但是暴露24 h时u-G暴露下大型溞体内MDA含量显著高于暴露在G-COOH和G-OH下, 表

图5 (网络版彩色)石墨烯及其表面官能化衍生物诱导大型溞GSH含量的变化。(a) 2 h; (b) 12 h; (c) 24 h; (d) 净化24 h; 柱形图上不同字母表示存在显著性差异($P<0.05$)

Figure 5 (Color online) GSH content in *Daphnia magna* induced by graphene and its surface functionalized derivatives. (a) 2 h; (b) 12 h; (c) 24 h; (d) depuration 24 h; different letters above each column indicate statistically significant differences ($P<0.05$)

明G-COOH和G-OH诱导大型溞脂质过氧化化的程度要小于u-G。在整个暴露周期内, G-NH₂和G-SH并未引起大型溞脂质过氧化。与对照组相比, 净化24 h后, 大型溞体内MDA含量无显著性变化, 表明大型溞通过自身的调节, 可以在一定程度上缓解u-G, G-COOH和G-OH对其造成的氧化损伤。对于u-G而言, 其主要分布在大型溞表面以及肠道内。净化24 h后, 大型溞通过脱皮去去除吸附在表面的u-G, 但在肠道内仍大量残留u-G, 此时, 与对照组相比, 大型溞体内ROS水平、SOD和CAT活性以及GSH含量没有显著变化, 表明吸附在大型溞表面的u-G可能是造成大型溞氧化应激的主要原因。在整个暴露和净化过程中, G-NH₂暴露并未对大型溞体内ROS水平、抗氧化酶等氧化应激标志物造成影响。前人研究也证实了, 氨基官能团修饰的石墨烯纳米材料对人的血小板无显著影

响, 也不会引起小鼠的肺血栓栓塞症, 在生物医学领域具有良好的应用前景^[34]。但也有少许研究指出, 氨基官能团修饰的多壁碳纳米管在高浓度下(350 mg/L)可以造成细胞体内ROS和乳酸脱氢酶含量的升高^[35]。

3 结论

(1) 石墨烯及其表面官能化衍生物对大型溞造成氧化应激的能力: u-G>G-COOH≈G-OH>G-SH>G-NH₂。表面官能团的修饰, 可以缓解石墨烯对大型溞造成的氧化应激程度。此外, 净化24 h后, 通过大型溞自身的调节, 其体内MDA含量可以恢复到正常的生理水平, 缓解u-G, G-COOH和G-OH对大型溞造成的氧化损伤。

(2) 5种石墨烯及其表面官能化衍生物诱导大型溞产生氧化应激的机理不尽相同(图7)。u-G, G-COOH及

图6 (网络版彩色)石墨烯及其表面官能化衍生物诱导大型溞MDA含量的变化。(a) 2 h; (b) 12 h; (c) 24 h; (d) 净化24 h; 柱形图上不同字母表示存在显著性差异($P < 0.05$)

Figure 6 (Color online) MDA content in *Daphnia magna* induced by graphene and its surface functionalized derivatives. (a) 2 h; (b) 12 h; (c) 24 h; (d) depuration 24 h; different letters above each column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$)

图7 (网络版彩色)石墨烯及其表面官能化衍生物诱导大型溞产生氧化应激的机理

Figure 7 (Color online) Mechanism of oxidative stress induced by graphene and its surface functionalized derivatives in *Daphnia magna*

G-OH造成大型溞氧化应激的主要原因是产生ROS, 导致抗氧化防御系统失衡, 造成脂质过氧化. G-SH主要抑制SOD和CAT抗氧化酶的活性, 影响抗氧化防御系统. G-SH对SOD和CAT活性的抑制可能是破

坏了抗氧化酶结构, 造成酶功能性失活. 然而, 在G-NH₂暴露下, 大型溞体内ROS水平、抗氧化酶等氧化应激的标志物均没有显著变化, 表明氨基官能团修饰能够提高石墨烯的生物相容性.

参考文献

- 1 Stankovich S, Dikin D A, Dommett G H B, et al. Graphene-based composite materials. *Nature*, 2006, 442: 282–286
- 2 Dai L. Functionalization of graphene for efficient energy conversion and storage. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 31–42
- 3 Kostarelos K, Novoselov K S. Exploring the interface of graphene and biology. *Science*, 2014, 344: 261–263
- 4 Szcz Niak B, Choma J, Jaroniec M. Gas adsorption properties of graphene-based materials. *Adv Colloid Interface Sci*, 2017, 243: 46–59
- 5 Xu Y, Liu J. Graphene as transparent electrodes: Fabrication and new emerging applications. *Small*, 2016, 12: 1400–1419
- 6 Bitounis D, Ali-Boucetta H, Hong B H, et al. Prospects and challenges of graphene in biomedical applications. *Adv Mater*, 2013, 25: 2258–2268
- 7 Wang Z, Ciacchi L C, Wei G. Recent advances in the synthesis of graphene-based nanomaterials for controlled drug delivery. *Appl Sci*, 2017, 7: 1175–1192
- 8 Ferrari A C, Bonaccorso F, Fal'Ko V, et al. Science and technology roadmap for graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems. *Nanoscale*, 2015, 7: 4598–4810
- 9 Jr G D, Adeleye A S, Sung L, et al. Detection and quantification of graphene-family nanomaterials in the environment. *Environ Sci Technol*, 2018, 52: 4491–4513
- 10 Hu X, Zhou M, Zhou Q. Ambient water and visible-light irradiation drive changes in graphene morphology, structure, surface chemistry, aggregation, and toxicity. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 3410–3418
- 11 Hu X, Zhou Q. Health and ecosystem risks of graphene. *Chem Rev*, 2013, 113: 3815–3835
- 12 Ou L, Song B, Liang H, et al. Toxicity of graphene-family nanoparticles: A general review of the origins and mechanisms. *Par Fibre Toxicol*, 2016, 13: 57–80
- 13 Marques B F, Cordeiro L F, Kist L W, et al. Toxicological effects induced by the nanomaterials fullerene and nanosilver in the polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae) and in the bacteria communities living at their surface. *Mar Environ Res*, 2013, 89: 53–62
- 14 De M L, Neto V, Pretti C, et al. Physiological and biochemical impacts of graphene oxide in polychaetes: The case of *Diopatra neapolitana*. *Com Biochem Phys C*, 2017, 193: 50–60
- 15 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
- 16 Zhang X, Zhou Q, Zou W, et al. Molecular mechanisms of developmental toxicity induced by graphene oxide at predicted environmental concentrations. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 7861–7871
- 17 Lv X, Yao Y, Yi T, et al. A mechanism study on toxicity of graphene oxide to *Daphnia magna*: Direct link between bioaccumulation and oxidative stress. *Environ Pollut*, 2018, 234: 953–959
- 18 Hu C, Wang Q, Zhao H, et al. Ecotoxicological effects of graphene oxide on the protozoan *Euglena gracilis*. *Chemosphere*, 2015, 128: 184–190
- 19 Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol*, 2011, 101: 13–30
- 20 Ahmed F, Rodrigues D F. Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: A case study. *J Hazard Mater*, 2013, 256–257: 33–39
- 21 Fan W, Liu Y, Xu Z, et al. The mechanism of chronic toxicity to *Daphnia magna* induced by graphene suspended in a water column. *Environ Sci Nano*, 2016, 3: 1405–1415
- 22 Pourahmad J, O'Brien P J, Jokar F, et al. Carcinogenic metal induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes. *Toxicol in Vitro*, 2003, 17: 803–810
- 23 Dominguez G A, Lohse S E, Torelli M D, et al. Effects of charge and surface ligand properties of nanoparticles on oxidative stress and gene expression within the gut of *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol*, 2015, 162: 1–9
- 24 Zhang J Q, Ming S, Zhu C C, et al. 3-Nitropropionic acid induces ovarian oxidative stress and impairs follicle in mouse. *PLoS One*, 2014, 9: e86589
- 25 Ernster L, Nordenbrand K. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol*, 1978, 52: 302–310

- 26 Fan W, Wang X, Cui M, et al. Differential oxidative stress of octahedral and cubic Cu₂O micro/nanocrystals to *Daphnia magna*. Environ Sci Technol, 2012, 46: 10255–10262
- 27 Song Y, Wu T, Yang Q, et al. Ferulic acid alleviates the symptoms of diabetes in obese rats. J Funct Foods, 2014, 9: 141–147
- 28 Bergmeyer H U. Methods of Enzymatic Analysis. New York: Academic Press, 1974. 671–684
- 29 Dabrunz A, Duester L, Prasse C, et al. Biological surface coating and molting inhibition as mechanisms of TiO₂ nanoparticle toxicity in *Daphnia magna*. PLoS One, 2011, 6: e20112
- 30 Tervonen K, Waissi G, Petersen E J, et al. Analysis of fullerene-C60 and kinetic measurements for its accumulation and depuration in *Daphnia magna*. Environ Toxicol Chem, 2010, 29: 1072–1078
- 31 Jin W L, Won E J, Kang H M, et al. Effects of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) on antioxidant depletion, the ERK signaling pathway, and copper bioavailability in the copepod (*Tigriopus japonicus*). Aquat Toxicol, 2016, 171: 9–19
- 32 Kim D H, Puthumana J, Kang H M, et al. Adverse effects of MWCNTs on life parameters, antioxidant systems, and activation of MAPK signaling pathways in the copepod *Paracyclops nana*. Aquat Toxicol, 2016, 179: 115–124
- 33 Guan J, Dai J, Zhao X, et al. Spectroscopic investigations on the interaction between carbon nanotubes and catalase on molecular level. J Biochem Mol Toxic, 2014, 28: 211–216
- 34 Singh S K, Singh M K, Kulkarni P P, et al. Amine-modified graphene: Thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for bio-medical applications. ACS Nano, 2012, 6: 2731–2740
- 35 Demir E, Marcos R. Toxic and genotoxic effects of graphene and multi-walled carbon nanotubes. J Toxicol Environ Heal A, 2018, 81: 645–660

Summary for “石墨烯表面官能团种类多样性对诱导大型溞氧化应激的影响”

Effect of different surface functional groups of graphene on oxidative stress in *Daphnia magna*

Hongye Yao, Xuehua Li*, Lili Zhang, Yang Huang, Tianlie Luo & Jingwen Chen

Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering (MOE), School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

* Corresponding author, E-mail: lixuehua@dlut.edu.cn

Graphene could be modified by functional groups through a series of transformation processes after being released into environment. Meanwhile, the properties of graphene, such as solubility and biotoxicity, could be altered by surface modification. It is important to investigate the aquatic toxicity of graphene and its surface functionalized derivatives for assessing their ecological risks. Oxidative stress is one of the main toxicity mechanisms of graphene nanomaterials, but the effect mechanism of different surface functional groups (amino and thiol) on the oxidative stress induced by graphene is still unclear. In order to illuminate the toxicity mechanism and evaluate the extent of oxidative stress, a series of graphene nanomaterials including unfunctionalized grapheme (u-G), carboxylated grapheme (G-COOH), aminated grapheme (G-NH₂), hydroxylated grapheme (G-OH) and sulfydryl grapheme (G-SH) were selected to determine the levels of reactive oxygen species(ROS), antioxidant enzymes, antioxidant and lipid peroxidation in *Daphnia magna* induced by these graphene nanomaterials. *Daphnia magna* were exposed to graphene and its surface functionalized derivatives during 24 h period. Following treatment, the parameters reflecting oxidative stress such as ROS, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH) and malondialdehyde in *Daphnia magna* were measured. The results showed that malondialdehyde, a marker of lipid peroxidation in *Daphnia magna*, was significantly increased by u-G, G-COOH and G-OH, respectively. The level of malondialdehyde was significantly higher under u-G exposure than that under G-COOH or G-OH exposure. It is indicated that the degree of oxidative damage induced by u-G in *Daphnia magna* was more serious than that of G-COOH and G-OH. In addition, the three nanomaterials also caused the changes in ROS and glutathione (GSH) levels, and activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were decreased by u-G and G-OH. However, G-SH and G-NH₂ did not cause oxidative damage within 24 h exposure period. Marked inactivation of antioxidant enzymes in an ROS-independent manner was observed in response to G-SH, suggesting that G-SH may cause a structural change in enzymes, leading to functional inactivity. G-NH₂ did not affect the levels of ROS, antioxidant enzymes, antioxidant and lipid peroxidation. At 24 h after stopping exposure, *Daphnia magna* can alleviate the oxidative damage induced by u-G, G-COOH and G-OH to a certain extent by its own regulation. The ability of graphene nanomaterials to cause oxidative stress in *Daphnia magna* is as follows: u-G>G-COOH≈G-OH>G-SH>G-NH₂. The main reasons of oxidative stress in *Daphnia Magna* induced by u-G, G-COOH and G-OH were the generation of ROS, which led to the imbalance of antioxidant defense system and lipid peroxidation. G-SH mainly inhibited the activities of SOD and CAT antioxidant enzymes and affected the antioxidant defense system. However, there were no significant changes in ROS levels and antioxidant enzymes in *Daphnia magna* under G-NH₂ exposure.

graphene, *Daphnia magna*, oxidative stress, reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation

doi: 10.1360/N972018-00960