

功能化氧化石墨烯作为药物载体材料的研究进展

王晨, 许军*, 刘燕华, 王增涛, 胡越, 田太平, 易梦娟

(江西中医药大学药物化学教研室, 南昌 330004)

摘要 功能化氧化石墨烯基于石墨烯的结构改造得到, 具有良好的水溶性、生物相容性、较高的载药率以及易于修饰等优点, 在国内外引起广泛的关注。本文综述了氧化石墨烯的表面修饰, 以及它作为药物递送载体在抗肿瘤、抗菌、高血压治疗、基因治疗以及生物安全性评价等方面的应用, 为其在生物医药领域的应用提供新方法和新思路。

关键词 氧化石墨烯; 功能化; 药物载体; 应用; 进展

中图分类号 R945 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)01-0117-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170118

引用本文 王晨, 许军, 刘燕华, 等. 功能化氧化石墨烯作为药物载体材料的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2016, 48(1):117-124.
Cite this article as: WANG Chen, XU Jun, LIU Yanhua, *et al.* Research progress on functionalized graphene oxide as drug carriers[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 48(1):117-124.

Research progress on functionalized graphene oxide as drug carriers

WANG Chen, XU Jun*, LIU Yanhua, WANG Zengtao, HU Yue, TIAN Taiping, YI Mengjuan

Department of Medicinal Chemistry, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract Functionalized graphene oxide is prepared based on graphene. It has attracted great interest from all over the world due to its good solubility, biocompatibility, high loading rate, and easy modification. This paper summarizes the surface modification of graphene oxide, and its applications on anti-tumor, antibacteria, anti-hypertension, gene therapy and biosafety as a drug carrier, providing new methods and ideas in the biomedical field.

Key words graphene oxide; functionalized; drug carrier; applications; progress

This study was supported by the Scientific Research Program for Traditional Chinese Medicines of Health and Family Planning Commission of Jiangxi Province (No. 2014B002)

功能化氧化石墨烯(functionalized graphene oxide, FGO)是在石墨烯的基础上通过进一步氧化、改造得到的, 其表面富含羟基、羧基、环氧基等功能基团, 具有特殊的光学、热学及亲水性等性能, 比表面积较高。通过其表面活性羧基的酰胺化或酯化反应, 可连接各种有机小分子、高分子、生物大分子等生物活性分子及其他功能基团, 以提高石墨烯的生物相容性, 实现石墨烯的功能化。此外, FGO 还具有良好的水溶液稳定性, 对中药中难溶性的活性成分以及化学合成药物在发挥药效上起到至关重要的作用。本文从 FGO 的表面修饰及其作为药物

载体方面的应用和生物安全性等方面作一综述。

1 氧化石墨烯的表面修饰

石墨烯的结构较为完整, 稳定性高, 与其他介质的相互作用力较弱, 不利于其作为药物载体的研究。因此, 对其结构进行改造尤为重要。FGO 是石墨烯经氧化得到氧化石墨烯(graphene oxide, GO)后, 再进一步与其他小分子、高分子或生物大分子相结合而得到, 其目的是提高石墨烯的生物相容性, 降低生物毒性以及在作为药物载体方面具备较高载药率, 或使某些药物具有缓释、控释的特点

等。制备 FGO, 首先要将石墨烯经过氧化得到结构中含有羟基、羧基、羰基、环氧基等官能团的 GO (图 1)。对于 GO 较为广泛接受的说法是将其看作一种两亲性物质, 即亲水性的羧基存在于 GO 侧面, 而羟基和疏水基团环氧基则处于 GO 基底面 (basal plane)^[1]。然后再将得到的 GO 与其他小分子、高分子或生物大分子相结合经改造得到 FGO。

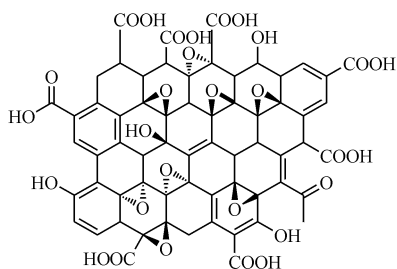


图 1 氧化石墨烯 (graphene oxide, GO) 的化学结构

1.1 共价修饰

GO 表面含有丰富的活性基团 (羟基、羧基、环氧基), 可与多种亲水性大分子通过酯键、酰胺键等共价键连接完成功能化, 改善其稳定性、生物相容性等。Si 等^[2]将 GO 经过硼氢化钠还原, 然后进行磺化处理, 最后用胍还原得到磺酸基功能化 GO。通过共价结合的方式引入亲水性磺酸基, 增加了 GO 的水溶性, 从而提高了 GO 的分散稳定性和表面活性。马文石等^[3]在相对温和的条件下将乙醇胺与 GO 进行反应, 然后经水合胍还原, 通过形成酯键和酰胺键的方式得到乙醇胺功能化 GO, 干燥后经超声处理, 能够稳定分散于水、乙醇等溶剂中。乙醇胺的引入提高了 GO 在溶液中的再分散性, 同时, 其结构中的伯羟基与仲胺基可进一步反应, 为功能化石墨烯的进一步研究创造条件。Mallakpour 等^[4]以天然氨基酸为功能化试剂, 通过与 GO 上的羧基发生酰化反应以及与环氧基发生开环反应, 得到的氨基酸功能化 GO 能够稳定分散于水溶液和有机溶剂中。Liu 等^[5]将端氨基聚乙二醇 (NH₂-PEG) 引入 GO, 通过 GO 上的羧基与 NH₂-PEG 上的氨基以酰胺键连接完成功能化。该衍生物能够稳定存在于血浆或其他细胞溶液等介质中。PEG 亲水性强, 引入后能够极大程度增加衍生物在水溶液中的稳定性, 有助于疏水性药物的负载。

1.2 非共价修饰

除了共价修饰, GO 还可通过氢键、静电相互

作用、范德华力、疏水作用和 π - π 键堆叠等非共价作用力与高分子或生物大分子结合完成功能化修饰。Depan 等^[6]将壳聚糖 (CS) 和叶酸 (FA) 引入 GO, 提高复合物在水溶液中的均一性和分散性。叶酸通过 π - π 堆叠作用与 GO 结合, 而壳聚糖则通过静电相互作用与含电负性基团较多的叶酸和 GO 相结合, 完成对 GO 的功能化。由于壳聚糖结构中含有一个氨基和两个羟基, 引入后水溶性增强。Guo 等^[7]用 β -环糊精 (β -CD) 制备了环糊精功能化 GO, 通过 β -CD 上的羟基与 GO 上的含氧基团以氢键结合, 在水溶液及有机溶剂中呈现了良好的溶解性和稳定性。鉴于石墨烯良好的电性质和 β -CD 独特的超分子识别能力, 该复合材料能够有效增强多巴胺、尿酸等小分子的电化学响应。Feng 等^[8]利用 GO 表面所含羧基、羟基等带负电荷基团, 通过静电相互作用吸附带有正电荷基团的聚醚酰亚胺 (PEI), 提高 GO 在生理溶液中的稳定性。另外, 利用 GO 中具有 π 键共轭结构和大量可修饰的基团, 也可用金属纳米粒和金属氧化物纳米粒等修饰。Yang 等^[9]将 GO 上的羧基碱化变成羧酸根离子后与 FeCl₃ 和 FeCl₂ 溶液在氮气保护下反应, 得到顺磁性的 GO-Fe₃O₄, 可稳定分散于水溶液中。GO-Fe₃O₄ 能够在酸性环境中聚集, 在碱性环境中又重新稳定分散, 而在外加磁场下能够有规律地运动, 或能作为药物载体材料应用于医药领域。Liu 等^[10]在氯仿溶液中加入表面活性剂, 之后再加入银和溴化银混合物, 在一定条件下反应得到 Ag-AgBr-GO, 增强了对可见光的吸收。

2 功能化氧化石墨烯作为药物载体的应用

在生物医药领域, FGO 作为一种新型的药物载体材料, 以其突出的载药性能和优良的生物相容性、较高的载药率、靶向给药等方面得到广泛的关注。作为递送药物的载体, 它不仅负载小分子药物, 也可以结合抗体、DNA、蛋白质等大分子^[11]。这对改善难溶性药物的水溶性, 降低药物不良反应以及提高药物稳定性和生物利用度等方面有非常重要的研究意义。

2.1 作为抗肿瘤药物递送载体

2.1.1 化学合成药物的负载 方加龙等^[12]通过氢键相互作用与 π - π 键堆积将氟尿嘧啶 (5-Fu) 负载到 β -CD 功能化氧化石墨烯上, 形成 β -CD-GO-5-

Fu,并通过标准曲线计算得到其包封率高达105%。 β -CD表面有众多反应性羟基,可参与机体内代谢,避免体内聚积,同时还可以改善药物的稳定性,降低5-Fu对胃肠道的刺激性,减少不良反应的发生。杨琳等^[13]通过动物实验对比GO负载5-Fu和5-Fu本身杀死肿瘤细胞的效率,发现含等量药物的GO-5-Fu杀死乳腺癌4T1细胞的能力远比5-Fu本身高。

Wang等^[14]研究氯霉素(CTX)结合GO后负载多柔比星(DOX),用于治疗神经胶质瘤。GO与氯霉素在催化剂作用下于常温反应得到CTX-GO,然后再借助多柔比星与GO形成氢键实现对多柔比星的高效负载,载药量达到570 mg/g。体外细胞毒实验中测试GO-DOX、DOX和CTX-GO-DOX等对C6细胞的毒性。结果对比GO-DOX和DOX,CTX-GO-DOX对C6细胞的致死率最高。同时,引入氯霉素也增加了DOX在细胞中的蓄积,延长了多柔比星的作用时间。在研究CTX-GO-DOX释放行为时,在pH为7.4时复合物能够缓慢可控地释放多柔比星,而在pH为5的酸性环境下因 H^+ 对氨基的质子化作用会减弱多柔比星与CTX-GO之间的氢键作用因此或能更好地释放。而实验中观察到60 h的释放不到30%,酸性环境下载体与多柔比星之间仍然存在很强的 π - π 堆叠作用,释放效果并不理想,需进一步深入研究。这种pH依赖式的释放行为在药物递送的研究上提供了一定思路。

张龙蛟等^[15]用叶酸修饰GO并装载多柔比星,加入到pH为5的磷酸缓冲溶液中,于37℃恒温振荡箱中考察药物的体外释放。定时量取一定体积的锥形瓶中溶液用紫外分光光度法测量药物的释放量。结果表明,当释放时间达到157 h时,药物累积释放量为44.58%,与释放时间呈正相关,具有缓释性。An等^[16]将明胶(gelatin)与纳米石墨烯片(GNS)结合,得到gelatin-GNS。通过 π - π 键堆积将甲氨蝶呤(MTX)高效负载到gelatin-GNS上,形成MTX-gelatin-GNS复合物。明胶起到还原GO以及充当功能化试剂的作用,以保证载药后的复合物能够在水和各种生理性溶液中保持良好的分散性和稳定性。细胞毒性实验中,MTX-gelatin-GNS通过非特异性内吞作用被肺肿瘤细胞A549摄取,产生杀伤作用。MTT结果发现在不同浓度

的gelatin-GNS溶液中培养24 h后细胞仍然有较高的存活率,未有明显的细胞毒性,证明了载体的安全性。Chowdhury等^[17]将GO通过聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)功能化制成药物传递系统O-GNR-PEG-DSPE,然后用一种简单的非共价结合方法负载核酸内切酶APE-1抑制剂鲁坎松(Luc)治疗多形性胶质细胞瘤。实验中发现该复合物对胶质瘤细胞U251细胞有显著毒性。

2.1.2 传统中药的负载 另外,FGO在对传统中药的负载方面也有进展。徐远志等^[18]从毛萼香薷中提取分离得到贝壳杉烷二萜类化合物毛萼乙素(eriocalyxin B)。将 NH_2 -PEG引入GO,改善其亲水性和在盐溶液中的稳定性。毛萼乙素水溶性较差,通过 π - π 键堆叠作用负载到PEG-GO上后能够增加其在水溶液中的溶解度。通过标准曲线计算得到PEG-GO载药率达18.8%。分别对A549细胞进行细胞毒性试验,对比毛萼乙素本身和经PEG-GO负载的毛萼乙素,给药48 h后,前者相对细胞存活率为28.5%,而后者仅为21.8%,说明负载后的药物对细胞有更大的杀伤力。此外,仅对PEG-GO作用于细胞,在PEG-GO质量浓度为100 mg/L下培养48 h,细胞相对存活率仍能达到85%以上,说明GO-PEG几乎没有毒性,对细胞的杀伤作用来自于毛萼乙素。

2.1.3 光动力疗法 除了用传统药物治疗肿瘤的方法外,近年来光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)治疗肿瘤逐渐兴起。PDT原理是利用光敏分子在合适的光线照射下产生活性氧簇(ROS)来杀死肿瘤细胞。Huang等^[19]尝试将叶酸功能化GO,负载光敏剂Ce6,研究其在PDT中的治疗效果。Ce6通过疏水作用力和 π - π 键堆叠作用与FA-GO结合。绘制标准曲线计算得到复合物负载率达到80%。选取胃肿瘤细胞MGC803研究FA-GO-Ce6的光动力疗法作用,当质量比满足FA-GO:Ce6为2:1时能够对MGC803细胞产生最大的杀伤作用,此时细胞存活率仅约为10%。可能因为FA-GO-Ce6由内吞进入细胞质后经由叶酸受体介导通路形成内体,然后逐渐转变成溶酶体。此时溶酶体微环境发生改变,Ce6从载体被释放出来进入胞液,在一定波长照射下产生具有细胞毒性的单线态氧 1O_2 ,对肿瘤细胞产生杀伤作用。Tian等^[20]研究将PEG功能化GO结合形成PEG-GO后通过超分

子 π - π 堆叠负载 Ce6。PEG 的引入使得复合物具有极其良好的水溶性。虽然结合 GO-PEG 后产生 $^1\text{O}_2$ 的能力不如 Ce6 本身,但 GO 在近红外区有较强的光吸收性,使得 GO-PEG-Ce6 周围的肿瘤细胞温度升高,极大加强了杀死肿瘤细胞的能力。

Hu 等^[21]将 $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$ 与 GO 在一定条件下反应生成 TiO_2 -GO (GOT)。 TiO_2 的引入能够提高复合物对光的吸收和光催化能力,在可见光照射下产生 ROS。同时 GOT 还能降低细胞抗氧化酶的活性,诱导细胞凋亡,增强对肿瘤细胞的杀伤力。MTT 试验表明,在一定光照强度下,光照时间越强,HeLa 细胞存活率越低。此外,Yan 等^[22]利用 GO-PEG 负载华卟啉钠 (DVDMS) 形成 GO-PEG-DVDMS 复合物,通过对比 DVDMS 本身,GO-PEG-DVDMS 对 PDT 效果有显著提高,而体内试验表明,静脉注射 GO-PEG-DVDMS 能 100% 的清除恶性胶质瘤细胞,阻止了肿瘤细胞的再生长。同样,Rong 等^[23]也利用 PEG-GO 负载光克洛 (HPPH),并作用于小鼠乳腺癌细胞 4T1 细胞。虽然较 HPPH 本身产生的单线态氧 $^1\text{O}_2$ 少,但仍然能够显著提高 PDT 的作用。目前,将石墨烯引入该疗法需解决的首要问题是由于石墨烯结构中的共轭 π 键带来的外部光吸收从而干扰 PDT 的能量转换。经修饰的石墨烯或能在临床上为诊断和治疗提供便利。

2.1.4 光热疗法 除了光动力疗法,光热疗法 (photothermal therapy, PTT) 也成为一种治疗肿瘤的新方法。与光动力疗法产生 ROS 的原理不同,应用光热疗法所使用的物质会将吸收的光转变成热能输送到细胞内环境,产生局部的高热杀死肿瘤细胞^[24]。Olena 等^[25]研究出一种治疗卵巢癌的新方法,即以低含氧量的 GO (LOGr) 为载体负载药物达到同时产生光热疗法与光动力疗法作用的目的。要达到这个目的,其中一个关键性问题是使体内的药物受激发产生作用的可见光仅能够穿透组织以下几毫米,因此需要选择合适的物质使其进入生物组织之后在近红外区域有较为强烈的吸收,并能够高效地将吸收的能量转化为热能以及生成 ROS。但是目前,只有石墨烯负载的萘酞菁被用于光动力疗法-光热疗法治疗,而通过 π - π 堆叠相互作用力将萘酞菁负载到石墨烯上会极大程度减少荧光程度以及 ROS 的产生。针对上述问题,选用聚丙烯

亚胺 (PPiG4) 与硅酞菁衍生物 (Pc) 结合 LOGr 形成 LOGr-Pc-PPiG4 复合物。为增强其生物相容性与治疗肿瘤的靶向性,再结合 PEG 和促黄体素释放素 (LHRH),完成载体的功能化。培养卵巢癌耐药细胞株 A2780/AD 测试复合物在光动力疗法-光热疗法上的治疗效果。结果显示,光照 15 min 后仅有 5% 的肿瘤细胞存活,作用结果十分显著。由于适用光动力疗法与光热疗法的两种物质可能在单色光源下不能同时产生吸收,因此这种新方法的难点在于如何找到同时适用于光动力疗法与光热疗法协同作用的物质,使其在实际治疗时同时发挥作用,缩短治疗时间,减轻患者病痛。

Wang 等^[26]通过将铁氧化物纳米粒结合 PEG-GO 得到 GO-IONP-PEG,通过直接注射的方法经由淋巴管转运至肿瘤处达到治疗胰腺癌区域淋巴结转移的目的。将 GO-IONP-PEG 作用于人胰腺腺癌细胞 BxPC-3 上,改变 GO 浓度、近红外光照强度及作用时间。结果显示,当 GO 质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,光照强度分别为 2 和 3 W/cm^2 ,作用时间为 5 min 时,细胞死亡率约为 32.45% 和 46.23%,而其他因素保持不变,提高 GO 浓度,细胞死亡率提升到 56.56% 和 81.26%,说明 GO 浓度是影响光热疗法效果的关键因素。目前,直接切除区域淋巴结是治疗胰腺癌转移的唯一方法,不可避免会造成创伤和各种并发症,切除率也不高。因此将 GO 应用于光热疗法或能为临床治疗提供新思路。

2.2 作为抗菌药物递送载体

GO 在结构上的特殊性,使得它在抗菌方面有一定应用。氯霉素在水溶液中稳定性较差,易发生水解反应。张雁雯等^[27]将氯霉素通过分子间氢键和 π - π 键堆叠作用负载到 β -CD-GO 上,包封率达 115%,经过加速试验和长期稳定性试验后检测二醇物含量为 7.28%,较市售处方中所含 10.13% 低,证明该载药体系可改善药物的稳定性,提高氯霉素的生物利用度。

此外,FGO 本身也具有一定得抗菌作用。Akhavan 等^[28]在研究 GO 的毒性时发现,它对革兰阳性菌和革兰阴性菌均有杀伤作用,其机制是通过片层较为锋利的边缘在与细菌细胞直接接触后破坏了细胞膜而产生杀伤作用。因此,与药物结合或能产生更好的抗菌效果。马歌等^[29]用化学共沉淀法制备了 ZnFe_2O_4 功能化石墨烯复合物,通过对大

肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌测试样品的抑菌圈直径(ZID)和最小抑菌浓度(MIC),结果发现,当 m_{GO} 与 $m_{ZnFe_2O_4}$ 之比为0.4时,复合物抗菌性能最好。He等^[30]研究了GO对口腔中病原菌的作用效果,TEM显示GO破坏病原体细胞的细胞壁和细胞膜的完整性,使细胞内容物渗出从而起到杀伤作用。Zanin等^[31]通过化学气相沉积法制备出GO,对三毛滴虫原虫的细胞膜有很强的相互作用,在治疗牛的滴虫病方面是较为理想的载药材料。

2.3 作为基因药物递送载体

Rana等^[32]将GO作为基因载体应用于基因疗法上。将八精氨酸寡肽(R8)以不同比例通过两步酰胺化反应与羧基化GO(GO-COOH)结合,得到R8-GO衍生物。实验中引入增强型绿色荧光蛋白(pEGFP)作为模型基因来研究R8-GO对哺乳动物细胞的转染能力,结果表明GO表面连接的肽的数量与细胞转染能力相关。较高的基因装载率和基于MTT法试验的低细胞毒性使得R8-GO可应用于生物技术药物的开发和临床应用。Paul等^[33]研究可注射的生物相容性水凝胶用于高效递送GO和VEGF165促血管生成基因(DNA_{VEGF})用于治疗缺血性心脏病。通过聚乙烯亚胺(PEI)功能化GO并与DNA_{VEGF}结合,再被低模甲基丙烯酸酯明胶水凝胶(GelMA)所包合得到纳米复合物PEI-GO-DNA_{VEGF}-GelMA。该复合物能够高效转染心肌组织,治疗效果好且没有细胞毒性。利用急性心肌梗死造模的小鼠进行试验,对梗死部位周围进行心肌内注射,2周后发现心肌细胞密度有了显著提高,并且观察到用PEI-GO负载的DNA_{VEGF}-GelMA比DNA_{VEGF}-GelMA本身对损伤部位的修复效果更为显著。

Feng等^[34]首次利用GO的光热性质来进行光可控基因的递送。通过将GO结合阳离子聚合物PEG与聚乙烯亚胺(PEI)实现功能化,得到GO-PEI-PEG,再通过共价结合负载siRNA得到GO-PEI-PEG-siRNA,在近红外激光照射下通过基因转染达到下调Polo样激酶1(Plk1)表达的目的。光热加热条件能够增强细胞膜渗透性,因此即使在低功率近红外照射下也能增加细胞对GO-PEI-PEG的摄取,从而提高siRNA对细胞中质粒DNA的转染效率。血清会破坏PEG和PEI的结构,实验中加入血清后GO-PEI-PEG-siRNA依然能够保持良

好的转染作用,在一定程度上保证了复合物的稳定性。同样,Zhang等^[35]也用聚乙烯亚胺功能化GO并负载siRNA作用于B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2),同时再负载多柔比星,对HeLa细胞作用显著。此外,Bao等^[36]为了增加GO的水溶性,引入壳聚糖制成GO-CS,通过负载喜树碱(CPT),使其作用于人肝癌细胞HepG2和HeLa细胞。与喜树碱本身相比,负载后的药物对两种细胞都显示出更强的毒性作用。另外,GO-CS还能稳定负载质粒DNA(pDNA),在HepG2和HeLa细胞中产生转染作用。

2.4 作为高血压药物递送载体

Long等^[37]通过 π - π 键堆叠和氢键作用将抗高血压药物贝那普利(BENA)负载到GO上,以改善其难溶于水,难吸收和作用时间短的缺点。实验得出载药率与BENA/GO的浓度初始比值呈线性关系,比值越高,BENA的载药量也越高,当贝那普利与GO浓度比达到3:1时,载药量可达到1.12 mg/mg。释放结果表明,药物的释放速率并非恒定不变,而是随着时间的推移逐渐减小。在中性环境下,24 h后释放率达到40%,有效改善了BENA作用时间短的特点,延长服药周期。同时,改变环境pH,释放量也有所改变。24 h内,酸性环境中的释放量达到54%,而碱性环境中则只有26%,利用这种依赖pH的特性可针对靶器官的不同有选择地释放药物。由于在酸性环境中的良好释放,BENA-GO或可经口服给药在胃肠道中吸收^[38]。

2.5 作为蛛网膜下腔出血药物递送载体

蛛网膜下腔出血(SAH)是一种严重且常见的临床综合征。吡啶酮类药物吡非尼酮通过抑制二次脑出血和脑梗死达到治疗效果。但是,血-脑脊液屏障会阻碍药物进入脑部,导致治疗效果不佳^[39]。Yang等^[40]研究将GO上的羧基与转录激活因子(Tat)上的氨基结合,并利用 π - π 键的堆叠和疏水作用力连接甲氧基聚乙二醇(mPEG),将吡非尼酮装载到Tat-mPEG-GO上。Tat和mPEG的引入使得负载的药物能够透过血-脑脊液屏障并且维持其在血液循环中的稳定性。将Tat-mPEG-GO负载吡非尼酮,通过紫外检测结果发现载药率会随吡非尼酮初始质量浓度的增加而逐渐提高,且当吡非尼酮初始质量浓度达到4 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,载药率达到了45%。另外,考察在不同pH环境下吡非尼酮的释放。中性环境中,72 h后累积释放率只有

20%, 而 pH 减小到 5 时, 累积释放达到近 40%, 可能由于在酸性环境中吡非尼酮与疏水性的石墨烯表面的结合作用力变弱, 吡非尼酮水溶性相对增强, 释放率提高。体外细胞毒性试验显示在较低浓度下 Tat-mPEG-GO 靶向作用于神经元 PC12 细胞后没有产生毒性, 在一定程度上证明负载物的安全性。

2.6 作为生物分子递送载体

联合肿瘤治疗因其较为高效的治疗作用, 可降低肿瘤细胞耐药性以及降低单一治疗时产生的一系列不良反应等优点受到关注。Jiang 等^[41]尝试将 FGO 负载蛋白质和抗肿瘤小分子化合物, 以达到协同治疗的目的。首先将 GO-COOH 与 NH_2 -PEG- N_3 通过酰胺键结合完成功能化, 然后通过超分子 π - π 键堆叠负载 DOX。第二步利用肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 上的氨基与弗林蛋白裂解肽上的巯基相结合, 再与 GO 上的 PEG 链相连接, 完成 GO 的负载, 得到 TRAIL/DOX-

PEG-GO (图 2)。对 A549 细胞进行试验, 激光共聚焦显微镜观察到给药 9 h 后, 超过 80% 的多柔比星被释放并蓄积于细胞内。流式细胞仪检测细胞凋亡率达到 17.6%。而当多柔比星质量浓度达到 2 mg/mL, TRAIL 质量浓度为 200 ng/mL 时, 细胞存活率不到 10%。其作用机制是 TRAIL/DOX-PEG-GO 经静脉注射, 由血管运输到达肿瘤部位之后, GO-COOH 上的裂解酶与肿瘤细胞表面的弗林蛋白酶 (furin) 作用使其释放出 TRAIL。游离的 TRAIL 与细胞表面的死亡受体 (death receptor) 作用激活细胞质中的半胱氨酸天冬氨酸 3 (caspase-3) 从而诱导细胞凋亡。与此同时, GO-COOH 进入细胞形成内体, 多柔比星在弱酸性环境下从载体上释放出来, 蓄积于细胞核中对细胞 DNA 造成损伤, 产生杀伤作用。实验中还发现, 抗肿瘤药物的释放能够极大增加死亡受体的表达, 增强细胞的凋亡作用, 实现了小分子药物与治疗性多肽的协同治疗。

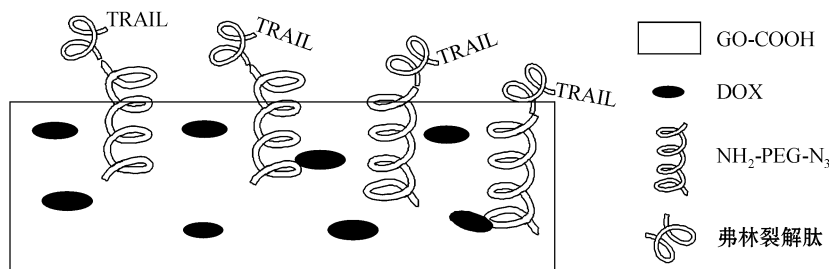


图 2 PEG-GO 表面负载 DOX 并通过弗林裂解肽负载肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL)

3 GO 和 FGO 的生物安全性

随着石墨烯越来越广泛的应用, 增加了人体接触这类碳材料的机会。因此, 关于石墨烯材料的生物安全性逐渐引起了人们的关注。Horváth 等^[42]针对 GO 在肺腔中的上皮细胞和巨噬细胞的毒性做了一定研究。MTT 试验结果表明, GO 在一定浓度下 ($12.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 对两种细胞呈现出轻度急性毒性, 而原生的石墨烯则表现出更严重的毒性反应。Wang 等^[43]尝试研究 GO 对人肺成纤维细胞 (HLF) 的 DNA 的损伤, 通过单细胞凝胶电泳对结果进行表征, 研究结果表明, 当 GO 质量浓度分别为 50 和 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 人肺成纤维细胞中 DNA 损伤量达到 18% 和 25%。接着又尝试通过结合不同修饰物对 GO 进行功能化, 以 GO 为空白组, 对比

PEI-GO、PEG-GO 和乳糖酸聚乙二醇氧化石墨烯 (LA-PEG-GO) 对该 DNA 的损伤情况。结果表明, 当质量浓度达到 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, LA-PEG-GO 造成的损伤明显比其他组低, 仅有 10%。另外, 用 MTT 实验测试 GO 对人肺成纤维细胞的存活率, 结果表明, 当 GO 质量浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, 并培养 24 h 后细胞存活率未见明显下降。而质量浓度提高到 50 和 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$, 经过 24 h 培养后, 其存活率也依然很高, 达到 80%。

Yang 等^[44-45]将 PEG-GO 经尾静脉注入小鼠体内, 一段时间后发现复合物主要聚集在网状内皮系统, 并最终被降解。同样剂量下持续观测注射后的小鼠, 90 d 内注入的复合物对小鼠没有明显的机体损伤。Zhang 等^[46]在 GO 上经共价修饰右旋糖酐 (DEX), 并用 ^{125}I 进行示踪, 经小鼠尾静脉注

入并观察一段时间后发现复合物同样聚集在网状内皮系统,在 7 d 内可由机体代谢,且未有短期的毒性反应。Zhang 等^[47]在研究通过注射不同剂量 GO 对小鼠的影响时发现,当注射剂量达到 0.40 mg 时,小鼠出现慢性毒性反应,肺部出现肉芽肿,GO 在肺、肝、脾、肾均有沉积现象,且无法经肾脏代谢清除,小鼠死亡率达到 44.4%。可能由于 GO 进入小鼠体内后被免疫细胞识别为异物,在免疫细胞和肺细胞的共同作用下形成肉芽肿,而当注射剂量低于 0.4 mg 时则无明显毒性。

关于 GO 和 FGO 在生物安全性方面的研究虽然已经有了一定基础,但由于其制备方法的多样性以及生物系统的复杂性等特点,尚不能轻易得出 GO 或 FGO 安全无毒或低毒的结论,需要更多深入研究以确定其作用机制。

4 展 望

在 FGO 作为药物载体的应用中,石墨烯在保持了原有的性质上经氧化和功能化改造后更能满足实际应用。GO 作为载药材料已越来越多地应用于医药临床领域。如抗肿瘤药物的负载和靶向治疗,光动力和光热治疗,以及针对抗菌、抗病毒、高血压治疗、基因治疗等药物的缺点进行研究,并通过 FGO 的负载和释放进行改善。目前,药物经 FGO 负载后虽然显示出较为优异的药理作用,且 GO 在一定浓度下对正常细胞产生的毒性作用较小,但 FGO 作为药物载体尚停留在研究阶段,仍然有许多问题亟待解决。例如在生物安全性方面,对机体内正常细胞的毒性,体内代谢、排泄过程等研究结论尚存在争议,进入体内引发的一系列生理生化反应及其作用机制有待深入研究。同时,由于制备方法不同,较难制备出理化性质稳定的 GO 和 FGO,而被各种材料功能化后的 GO 在负载和释放药物方面具有怎样的特点以及能否精准释放药物等问题急需解决。除此之外,制备出性质稳定、结构明确、安全无毒的 GO 和 FGO 是其作为载药材料进入临床研究的先决条件。

参 考 文 献

- [1] Kim J, Cote LJ, Kim F, *et al.* Graphene oxide sheets at interfaces [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(23): 8180–8186.
- [2] Si Y, Samulski ET. Synthesis of water soluble graphene [J]. *Nano Lett*, 2008, **8**(6): 1679–1682.
- [3] Ma WS, Zhou JW, Lin XD, *et al.* Preparation and characterization of functionalized graphene with ethanolamine [J]. *Acta Chim Sin* (化学学报), 2011, **12**(69): 1463–1468.
- [4] Mallakpour S, Abdolmaleki A, Borandeh S. Covalently functionalized graphene sheets with biocompatible natural amino acids [J]. *Appl Surf Sci*, 2014, **307**(15): 533–542.
- [5] Liu Z, Robinson JT, Sun X, *et al.* PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(33): 10876–10877.
- [6] Depan D, Shah J, Misra RDK. Controlled release of drug from folate-decorated and graphene mediated drug delivery system: Synthesis, loading efficiency, and drug release response [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol App*, 2011, **31**(7): 1305–1312.
- [7] Guo Y, Guo S, Ren J, *et al.* Cyclodextrin functionalized graphene nanosheets with high supramolecular recognition capability: synthesis and host-guest inclusion for enhanced electrochemical performance [J]. *ACS Nano*, 2010, **4**(7): 4001–4010.
- [8] Feng L, Zhang S, Liu Z. Graphene based gene transfection [J]. *Nanoscale*, 2011, **3**(3): 1252–1257.
- [9] Yang XY, Zhang XY, Ma YF, *et al.* Superparamagnetic graphene oxide-Fe₃O₄ nanoparticles hybrid for controlled targeted drug carriers [J]. *J Mater Chem*, 2009, **19**(18): 2710–2714.
- [10] Liu J, Cui L, Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications [J]. *Acta Biomater*, 2013, **9**(12): 9243–9257.
- [11] Zhu M, Chen P, Liu M. Graphene oxide enwrapped Ag/AgX (X = Br, Cl) nanocomposite as a highly efficient visible-light plasmonic photocatalyst [J]. *ACS Nano*, 2011, **5**(6): 4529–4536.
- [12] Fang JL, Xu J, Zhang YW, *et al.* Preparation and *in vitro* release of functionalized graphene oxide loading fluorouracil [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2014, **31**(10): 1215–1219.
- [13] Yang L, Liu XS, Sun JL, *et al.* Graphene oxide absorbed 5-Fu, antibody and cytokine are bioactive *in vitro* [J]. *Canc Res Prev Treat* (肿瘤防治研究), 2014, **41**(4): 340–344.
- [14] Wang H, Gu W, Xiao N, *et al.* Chlorotoxin-conjugated graphene oxide for targeted delivery of an anticancer drug [J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, **9**(2): 1433–1442.
- [15] Zhang LJ, Zhang YD, Shen YP, *et al.* Evaluation of drug loading property of folic acid modified graphene oxide materials loaded with doxorubicin [J]. *Mater Rev* (材料导报 B: 研究篇), 2014, **28**(6): 59–62.
- [16] An J, Gou Y, Yang C, *et al.* Synthesis of a biocompatible gelatin functionalized graphene nanosheets and its application for drug delivery [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, **33**(5): 2827–2837.
- [17] Chowdhury SM, Surhland C, Sanchez, Z, *et al.* Graphene nanoribbons as a drug delivery agent for lucanthone mediated therapy of

- glioblastoma multiforme [J]. *Nanomedicine*, 2015, **11** (1): 109–118.
- [18] Xu YZ, Li YJ, Shi P, *et al.* Functionalized graphene oxide as a nanocarrier for loading and delivering of Eriocalyxin B [J]. *Chin J Org Chem* (有机化学), 2013, **33** (10): 2162–2168.
- [19] Huang P, Xu C, Lin J, *et al.* Folic Acid-conjugated graphene oxide loaded with photosensitizers for targeting photodynamic therapy [J]. *Theranostics*, 2011, **1** (1): 240–250.
- [20] Tian B, Wang C, Zhang S, *et al.* Photothermally enhanced photodynamic therapy delivered by nano-graphene oxide [J]. *ACS Nano*, 2011, **5** (9): 7000–7009.
- [21] Hu Z, Huang Y, Sun S, *et al.* Visible light driven photodynamic anticancer activity of graphene oxide/TiO₂ hybrid [J]. *Carbon*, 2012, **50** (3): 994–1004.
- [22] Yan X, Niu G, Lin J, *et al.* Enhanced fluorescence imaging guided photodynamic therapy of sinoporphyrin sodium loaded graphene oxide [J]. *Biomaterials*, 2015, **42**: 94–102.
- [23] Rong P, Yang K, Srivastan A, *et al.* Photosensitizer loaded nano-graphene for multimodality imaging guided tumor photodynamic therapy [J]. *Theranostics*, 2014, **4** (3): 229–239.
- [24] Huang HW, Liah CT. Review: therapeutical applications of heat in cancer therapy [J]. *J Med Biol Eng*, 2012, **32** (1): 1–11.
- [25] Taratula O, Patel M, Schumann C, *et al.* Phthalocyanine-loaded graphene nanoplateform for imaging-guided combinatorial phototherapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, **10** (1): 2347–2362.
- [26] Wang S, Zhang Q, Luo XF, *et al.* Magnetic graphene-based nanotheranostic agent for dual-modality mapping guided photothermal therapy in regional lymph nodal metastasis of pancreatic cancer [J]. *Biomaterials*, 2014, **35** (35): 9473–9483.
- [27] Zhang YW, Xu J, Fang JL, *et al.* Functionalized graphene oxide as a nanocarrier for loading of chloramphenicol [J]. *Chin J Antibio* (中国抗生素杂志), 2014, **39** (9): 665–668.
- [28] Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria [J]. *ACS Nano*, 2010, **4** (10): 5731–5736.
- [29] Ma G, Chen Y, Li L, *et al.* Preparation and antibacterial property of graphene/zinc ferrite composites [J]. *Sci Sin Chim* (中国科学: 化学), 2014, **44** (10): 1544–1552.
- [30] He J, Zhu X, Qi Z, *et al.* Killing dental pathogens using antibacterial graphene oxide [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, **7** (9): 5605–5611.
- [31] Zanin H, Margraf-Ferreira A, da Silva NS, *et al.* Graphene and carbon nanotube composite enabling a new prospective treatment for trichomoniasis disease [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, **41** (1): 65–69.
- [32] Imani R, Emami SH, Faghihi S. Synthesis and characterization of an octaarginine functionalized graphene oxide nano-carrier for gene delivery applications [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2015, **17** (9): 6328–6339.
- [33] Paul A, Hasan A, Kindi HA, *et al.* Injectable graphene oxide/hydrogel-based angiogenic gene delivery system for vasculogenesis and cardiac repair [J]. *ACS Nano*, 2014, **8** (8): 8050–8062.
- [34] Feng L, Yang X, Shi X, *et al.* Polyethylene glycol and polyethylenimine dual-functionalized nano-graphene oxide for photothermally enhanced gene delivery [J]. *Small*, 2013, **9** (11): 1989–1997.
- [35] Zhang L, Lu Z, Zhao Q, *et al.* Enhanced chemotherapy efficacy by sequential delivery of siRNA and anticancer drugs using PEI-grafted graphene oxide [J]. *Small*, 2011, **7** (4): 460–464.
- [36] Bao H, Pan Y, Ping Y, *et al.* Chitosan-functionalized graphene oxide as a nanocarrier for drug and gene delivery [J]. *Small*, 2011, **7** (11): 1569–1578.
- [37] Long Y, Wang J, Tao C, *et al.* The loading and release properties of a novel drug carrier for benazepril based on nano graphene oxide [J]. *J Control Release*, 2013, **172** (1): e88–e89.
- [38] Wang J, Qin S, Long Y, *et al.* A mechanistic study on the loading of benazepril onto graphene oxide and its release [J]. *J Control Release*, 2013, **172** (1): e39–e40.
- [39] Benninger F, Raphaeli G, Steiner I. Subarachnoid hemorrhage mimicking myocardial infarction [J]. *J Clin Neurosci*, 2015, **22** (12): 1981–1982.
- [40] Yang L, Wang F, Han H, *et al.* Functionalized graphene oxide as a drug carrier for loading pirfenidone in treatment of subarachnoid hemorrhage [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, **129** (1): 21–29.
- [41] Jiang T, Sun W, Zhu Q, *et al.* Furin-Mediated sequential delivery of anticancer cytokine and small-molecule drug shuttled by graphene [J]. *Adv Mater*, 2015, **27** (6): 1021–1028.
- [42] Horváth L, Magrez A, Burghard M, *et al.* Evaluation of the toxicity of graphene derivatives on cells of the lung luminal surface [J]. *Carbon*, 2013, **64** (11): 45–60.
- [43] Wang A, Pu K, Dong B, *et al.* Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity and genotoxicity of graphene oxide towards human lung fibroblast cells [J]. *J Appl Toxicol*, 2013, **33** (10): 1156–1164.
- [44] 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.
- [45] Yang K, Zhang S, Zhang G, *et al.* Graphene in mice: ultrahigh *in vivo* tumor uptake and efficient photothermal therapy [J]. *Nano Lett*, 2010, **10** (9): 3318–3323.
- [46] Zhang S, Yang K, Feng L, *et al.* *In vitro* and *in vivo* behaviors of dextran functionalized graphene [J]. *Carbon*, 2011, **49** (12): 4040–4049.
- [47] Zhang Y, Ali SF, Dervishi E, *et al.* Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells [J]. *ACS Nano*, 2010, **4** (6): 3181–3186.