

石墨烯类材料的制备及其在生物医学领域的应用

刘凤珍¹, 范增杰², 王金清³

(1. 聊城市人民医院, 聊城大学医学院, 山东 聊城 252000)

(2. 兰州大学口腔医学院, 甘肃 兰州 730000)

(3. 中国科学院兰州化学物理研究所 固体润滑国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)



刘凤珍

摘要: 石墨烯是仅由一个原子层厚的C原子构成的二维纳米碳材料, 具有独特光学、电学、力学和热学等性质, 在生物医药、生物传感器、透明导电薄膜、电子器件、能源存储和催化等领域展现出巨大的应用前景, 使其成为纳米生物医学领域研究的热点。目前有关石墨烯及其衍生物的研究主要集中在其物理学、化学和材料学领域, 而石墨烯及其衍生物在生物医学领域的研究工作才刚刚开始。简述了石墨烯的特性、制备方法以及在生物医学领域的最新进展, 包括生物成像、药物和基因载体、光热治疗、抗菌材料及组织工程支架等, 并就该领域未来的发展进行了展望。

关键词: 石墨烯; 碳材料; 生物医学; 展望

中图分类号: R331; R73-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2015)07-0589-06

Preparation of Graphene and Its Applications in Biomedicine

LIU Fengzhen¹, FAN Zengjie², WANG Jinqing³

(1. Liaocheng People's Hospital, Medical School of Liaocheng University, Liaocheng 252000, China)

(2. School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

(3. State Key Laboratory of Solid Lubrication, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Graphene is a two-dimensional carbon material, which is composed of monolayer of carbon atoms tightly packed into hexagonal symmetry. Because of its extraordinary optical, electrical, mechanical and thermal properties, graphene has been widely applied in biomedicine, biosensor, transparent conductive film, electron device, energy storage, catalysis and becomes the research focus of nano-biomedicine. The present study of graphene and its derivatives is mainly concentrated on the field of physics, chemistry and materials, but it has just begun on the biomedical field. This study mainly focuses on the preparation, applications and latest biomedical progress of graphene-based composite materials including biological imaging, drug and gene loading, photothermal therapy, antibacterial materials and scaffolds for tissue engineering. And we also discuss the prospects and future trend in this field.

Key words: graphene; carbon material; biomedical; prospects

1 前言

石墨烯(Graphene, GNs)是由单层碳原子紧密堆积成具有二维蜂窝状晶格结构(Honeycomb Crystal Lattice Structure)的一种碳质新材料^[1]。自2004年British Manchester University的Geim A K和Novoselo K S等^[2]发现以来, GNs由于其独特的结构和优异的性能, 因而具有

重要的应用前景, 科研人员对其研究和应用已备受关注^[3-5]。自GNs发现以来, 其相关研究工作主要集中在物理学、化学和材料学研究领域, 近几年才开始了其在生物医学领域的研究。在生物医学领域应用较多的石墨氧化物(GO), GO含有大量的含氧活性基团如C-O-C、-OH、C=O与-COOH等, 因此具有良好的水溶液稳定性和生物相容性, 也有利于进行化学功能化修饰^[6]。近年来, 石墨烯及其衍生物在生物医学领域如生物成像、药物和基因载体、光热治疗、抗菌材料及组织工程支架等具有广阔的应用前景, 使其成为纳米生物医学领域研究的热点。本文综合国内外相关文献, 主要介绍了石墨烯类材料的特性和制备方法及其在生物医学方面的

收稿日期: 2014-11-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51001070, 51171110)

第一作者: 刘凤珍, 女, 1978年生, 助理研究员, Email: ldcllfz@163.com

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.2015.07.14

应用。

石墨烯是由碳原子以 sp^2 杂化方式相互键合形成蜂窝状结构排布的单原子二维纳米材料, 其 C-C 键长约为 0.142 nm, 厚度只有 0.335 nm, 是目前最薄的二维材料^[1]。GNs 的热导率可达 $5\,000\text{ W} \cdot (\text{m} \cdot \text{K})^{-1}$, 高于碳纳米管和金刚石; 横向电导率高达 10 S/m, 室温下电子迁移率为 $200\,000\text{ cm}^2 \cdot (\text{V} \cdot \text{s})^{-1}$, 高于碳纳米管或硅晶体; 极限强度可达 130 GPa; 拉伸模量为 1.01 TPa, 是目前强度最高的材料, 具有优异的热学、电学及物理机械性能^[7-8]。GO 的表面含有大量的羟基、环氧基、羧基以及羰基等含氧基团^[9-10], 还具有其它一些独特的性质^[11]。

2 石墨烯类材料的制备方法

随着石墨烯的耀眼光芒的绽放, 越来越多的研究者开始关注石墨烯。近年来, 科学家们致力于量产、环保、大尺寸和低成本石墨烯制备方法研究。具体可以归结为以下几种方法。

2.1 氧化还原法

石墨的氧化方法主要有 Brodie 法^[12]、Staudenmaier 法^[13]、Hummer 法^[14]。其中 Hummer 法制备过程相对简单, 对环境的污染较小, 是目前经常采用的制备方法。Hummer 法是以石墨为原料, 采用强氧化剂浓 H_2SO_4 和 KMnO_4 将石墨氧化, O 原子进入到石墨层间, 结合 π 电子, 使层面内的 π 键断裂, 并与层面中的 C 原子以羟基、羧基和环氧基的形式结合形成共价键型的石墨层间化合物, 再通过化学还原剂, 如水合肼、硼氢化钠、抗坏血酸和氯碘等试剂进行化学还原即可得到还原氧化石墨烯。具体过程如图 1 所示。

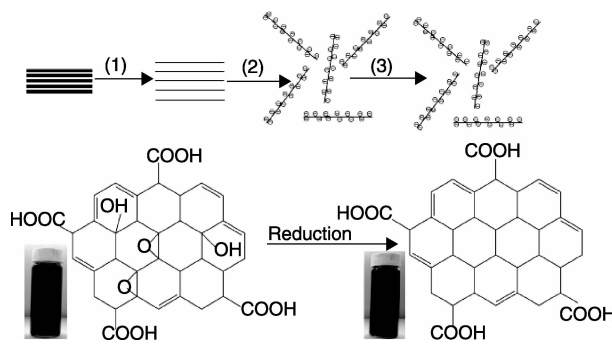


图 1 氧化还原法制备石墨烯的过程

Fig. 1 The reduction-oxidation method for preparation of graphene

2.2 微机械剥离法

微机械剥离是 Geim 和 Novoselov 最早采用的制备石墨烯的方法, 该方法能够直接将石墨烯薄片从较大的石墨晶体上剥离下来。该方法操作简单、效率低、筛选过程繁琐、片层尺寸不易控制, 故只适合实验室操作, 不能进行工业化的大规模生产, 因而该方法现在使用的越来越少。

2.3 化学气相沉积法

化学气相沉积法 (Chemical Vapor Deposition, CVD) 是指利用甲烷、乙醇或乙烯等含碳化合物作为碳源, 通过高温退火使 C 原子沉积在平面基底 (如金属薄膜、金属单晶等) 表面形成 GNs, 最后用化学腐蚀法去除金属基底后即可得到独立的 GNs。Kim 等^[15]利用 CVD 法, 以甲烷为碳源, 在图案化的镍基底上制备了尺寸超过 $1\text{ cm} \times \text{cm}$ 的高质量单层或多层石墨烯, 然后转移到聚二甲基硅氧 (Polydimethylsiloxane, PDMS) 基底上, 蚀刻掉 Ni 基底后, 得到了大面积连续的石墨烯薄膜 (图 2)。

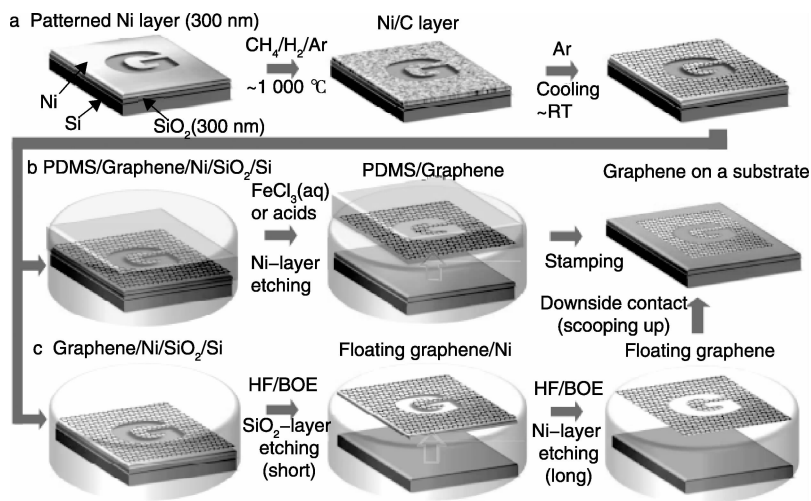


图 2 大尺寸图案化的石墨烯薄膜的合成、蚀刻和转移过程

Fig. 2 Synthesis, etching and transfer processes for the large scale and patterned graphene films

2.4 石墨插层法

石墨插层法是以天然鳞片石墨为原料, 将一些非碳质的原子、离子以及分子等插入石墨片层之间得到石墨插层复合物(GICs), 然后通过超声和离心处理获得石墨烯的方法(图3)。Shoiyama等^[16]采用聚合物对石墨插层复合物进行二次插层, 经剥离获得了纳米石墨; Chen等^[17]采用酸对膨胀石墨进行插层, 经过超声波粉碎处理后制得厚度几十纳米的石墨片。此方法的优点是所制备出的石墨烯仅保留了其原有性质还具备了一些新的物理化学性质。主要的缺陷是石墨烯的厚度一般最小只能达到几十纳米, 无法保证充分有效的插层, 而且插层过程中加入的强酸或者强碱会破坏石墨烯的 sp^2 结构, 影响石墨烯的物理和化学性能。

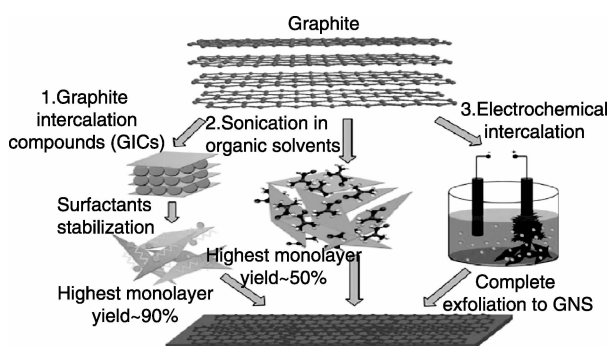


图3 插层石墨法制备石墨烯的示意图

Fig. 3 The schematic of preparation of graphene by intercalating method

此外, 还有多种其它制备石墨烯的方法, 如球磨法^[18]、碳纳米管剥开法^[19]和模板法^[20]等, 但是这些方法不能有效的制备出单层石墨烯, 得到的大部分为多层石墨烯。

3 石墨烯类材料在生物医学领域的应用研究

在生物医学方面, 石墨烯表现出许多优异的应用潜力, 引起了广大研究者的兴趣。石墨烯的衍生物-氧化

石墨烯(GO)在水中的溶解度方面, 克服了石墨烯难以溶解的缺陷, 易溶解在许多溶剂中, 为其在生物医学领域的应用提供了保障。还可以对石墨烯进行表面官能化, 在其表面形成可控的化学基团, 如在表面引入羟基、羧基和环氧基等含氧基团, 通过化学方法接入抗体、药物和DNA等改善其功能, 拓展了其在生物医学上的应用。

3.1 生物成像

石墨烯具有良好的生物相容性, 便于细胞黏附。灵活的化学修饰和独特的光学特色, 使其成为优异的生物成像材料。在早期研究中, 星状聚乙二醇(PEG)共价功能化氧化石墨烯在可见光和红外光区域表现出很强的光致发光能力。当结合了 β 细胞的抗体, 利妥昔单抗后, 可以在人的淋巴瘤细胞内进行近红外荧光成像。也有文献报道, 荧光素通过PEG链接到GO的表面, 该荧光表现出pH值可调的荧光信号, 同时具有很好的生物相容性。当荧光素直接跟石墨烯相连, 氧化石墨烯引起荧光素基团的荧光发生淬灭, 而通过中间体PEG链接可以有效避免荧光素的淬灭^[21]。将荧光素Cy7结合到PEG化的石墨烯表面对鼠的肿瘤细胞进行荧光成像, 研究表明, 由于PEG化的石墨烯存在很多氨基基团, 在溶液中表现出很好的光学吸收和较长的血液半衰期。石墨烯结合荧光素后能够提高荧光素对肿瘤细胞的透过能力, 从而提高肿瘤细胞对荧光素的吸附。在较低能量的近红外光下进行光热治疗后发现, 低剂量(20 mg/kg)的GO表现出有效的肿瘤细胞杀死能力^[22]。对于荧光素标记石墨烯进行荧光成像, 荧光素自身存在的光淬灭现象影响其观测效果。Park等^[23]将盐酸多巴胺结合到石墨烯的表面后, 再与靶向分子透明质酸结合, 透明质酸能够定向结合到肿瘤细胞表面的CD44受体上。通过共聚焦荧光显微镜成像发现, 在A549细胞的CD44受体上出现很强的荧光。同时将阿霉素通过 $\pi-\pi$ 键堆积结合到石墨烯量子点(Graphene Quantum Dots, GNs QDs)表面, 可以定向将抗癌药物输送到癌细胞(图4)。

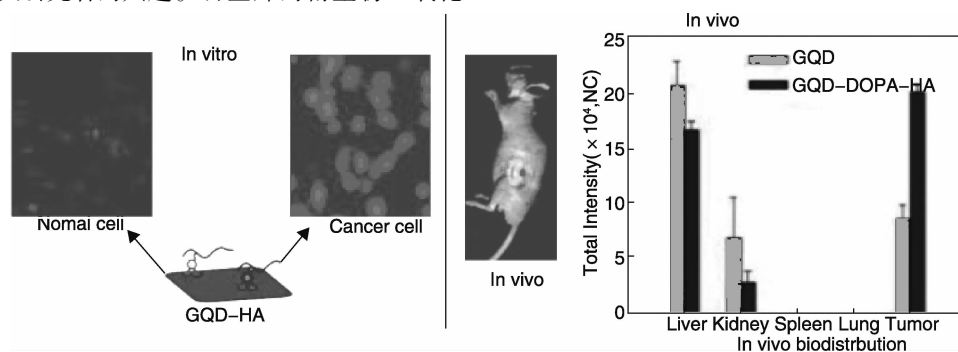


图4 石墨烯量子点用于荧光成像和生物体内荧光强度分布图

Fig. 4 Fluorescent images for graphene quantum dots used in vitro of normal cell and cancer cell, and graph of fluorescent intensity in vivo biodistribution

3.2 药物和基因载体

药物和生物活性分子可以直接转运至细胞内,但由于机体免疫系统,酶及其他因素的影响,通常在到达作用部位前即被降解或吸收,而有效的药物载体可以实现控制释放或缓慢释放,减少药物的毒副作用,提高疗效。Dai 等^[24]在石墨烯生物学的应用方面做出了开创性的研究,其用聚乙二醇(PEG)对石墨烯进行了表面修饰,增加石墨烯的溶解性,同时利用石墨烯表面存在的苯环结

构与不溶性药物 SN38 和喜树碱通过 π - π 键堆积的方式结合,从而有效避免化学方式结合,利于药物在体内的有效释放。同时氧化石墨烯表面的含氧基团提供了多种生物结合位点,如叶酸结合到 GNs 表面,利于使载入的药物定向结合到癌细胞表面,提高药物的利用率^[25](图 5)。总之,基于 GNs 的药物载体由于其超高的载药量、靶向输送和药物的可控释放,有望在临床上实现实际应用。

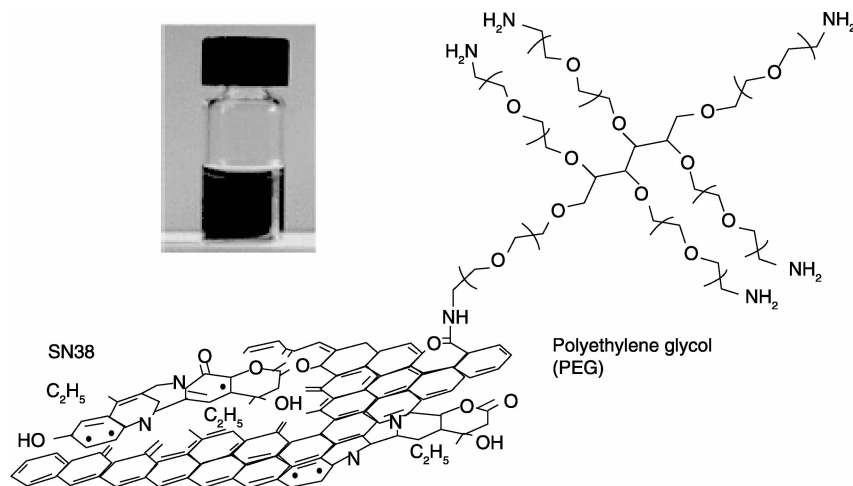


图 5 SN38 负载在 PEG-NGO 上的示意图

Fig. 5 The diagram of SN38 load on PEG-NGO

3.3 组织工程支架

如何从根本上解决组织、器官的丧失或功能障碍这一难题,已成为生命科学领域积极探索的前沿课题。随着生命科学、材料科学及相关物理、化学学科的发展,人们提出了一个新概念-组织工程,致力于发展生物材料以修复、替代并提高人体器官及其功能。在组织工程中,支架材料在组织工程研究中起中心作用,它不仅为特定的细胞提供结构支撑,而且还起到模板作用,引导组织再生和控制组织的结构。石墨烯相关材料在组织工程方面有着潜在的应用。Misra 等^[26]通过链接氧化石墨烯的羧基和 CS 的氨基构建了石墨烯/CS 网络结构支架(图 6)。Loh 等^[27]采用氧化石墨烯和石墨烯薄膜作为一种生物相容性好、可转移的,并且可移植性的平台对于干细胞进行培养。神经干细胞分化为神经再生提供了一条有效的途径,Zhang 等^[28]采用 3D 石墨烯泡沫作为一种新的促神经干细胞分化的支架材料,研究发现该支架不仅能够促进干细胞的生长,而且能够促进干细胞的分化,同时表型分析表明 3D 石墨烯泡沫能促使神经干细胞分化为星型胶质细胞和特殊的神经元。

3.4 肿瘤治疗

恶性肿瘤发病率已超过心血管疾病,成为人类首要

的致死病因,严重威胁人类的生命与健康。人们期待研究一种最小创伤、低剂量、短时间内杀死肿瘤细胞而不伤害正常组织的新型材料。石墨烯能够吸附范围在 700 ~ 1100 nm 的近红外光,然后放射出热从而切除肿瘤细胞。光热治疗的机制包括活性氧基团的产生、半胱天冬酶的激活、线粒体膜的去极化和 DNA 片段的破裂。多种因素相互结合能够使石墨烯在光热治疗后杀死肿瘤细胞^[29]。

3.5 抗菌材料

除了用于生物成像,靶向药物载体和肿瘤治疗外,石墨烯还有一个重要的应用是作为抗菌材料。Fan 等^[30]抽滤石墨烯水溶液制备了石墨烯纸,该纸能明显抑制大肠杆菌的生长。Chen 等^[31]对比了石墨,氧化石墨,氧化石墨烯和还原石墨烯的抗菌效果,研究发现氧化石墨烯的抗菌效果优于还原石墨烯,而还原石墨烯的抗菌效果又优于石墨。在这四种材料中,氧化石墨的抗菌效果最差。主要的抗菌机制是这四种物质能够氧化细菌细胞膜的电子媒介(谷胱甘肽)。

3.6 细胞毒性

衡量一种材料能否作为生物医学材料最重要的标准是该材料对生物体是否具有毒性,因此研究人员开展了

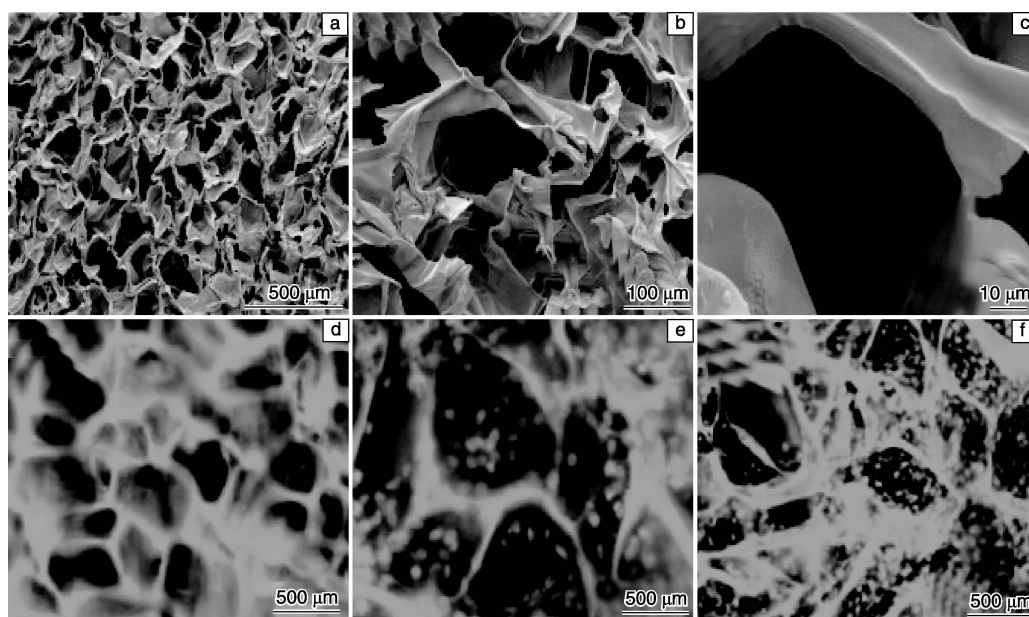


图6 氧化石墨烯/壳聚糖复合物的支架结构及成骨细胞的增殖形态图

Fig. 6 The morphologies of graphene oxide/chitosan composite scaffold and osteoblastic cells proliferation on the scaffold

大量关于评价石墨烯毒性的工作。Zhang 等^[32]在昆明鼠静脉注射 1 mg/kg 的单层石墨烯, 14 天后未出现明显的炎症反应, 但是当注射量提高到 10 mg/kg 时, 在肺部出现明显的肉芽病变、肺部水肿、炎症反应和组织纤维化。Wang 等^[33]分别在实验动物体内注射低、中和高剂量的氧化石墨烯后, 发现注射低剂量和中剂量的动物未出现毒性反应, 而注射高剂量的氧化石墨烯的动物, 出现剂量依赖的炎症反应, 同时在动物的肺脏出现肉芽病变。综上所述, 不同的石墨烯材料具有不同的毒性影响, 其毒性影响依赖于各种因素, 在使用石墨烯时需要对这些因素进行系统评估, 从而最大限度的减小其毒性。

4 结 语

石墨烯在生物医学领域的相关研究已经取得了一些进展, 但目前大都处于起步阶段, 研究还不够深入和系统, 要实现其实际应用, 仍然面临着很多困难和挑战。目前石墨烯作为载药系统主要集中在小分子药物输运研究方面, 有可能推广到基因和蛋白药物靶向输运、治疗方面; 在生物检测、生物成像和肿瘤治疗等方面的研究工作还比较少, 有待于更进一步的研究; 石墨烯的生物效应及其安全性方面的研究目前为止仍然很少。总之, 需要在分子、细胞及器官乃至整体动物层次上, 深入的研究石墨烯及其衍生物与生物体系的相互作用机制, 为将来石墨烯在生物医学以及其他领域的广泛应用提供健康和安全的依据。

参考文献 References

- [1] Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films[J]. *Science*, 2004, 306(5 696): 666 - 669.
- [2] Geim A K, Novoselov K S. The Rise of Graphene[J]. *Nature Materials*, 2007, 6(3): 183 - 191.
- [3] Lee C G, Wei X D, Kysar J W. Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene[J]. *Science*, 2008, 321(5 887): 385 - 388.
- [4] Ping J F, Wang Y X, Fan K, *et al.* Direct Electrochemical Reduction of Graphene Oxide on Ionic Liquid Doped Screen-Printed Electrode and Its Electrochemical Biosensing Application[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 28(1): 204 - 209.
- [5] Mohanty N, Berry V. Graphene-Based Single-Bacterium Resolution Biodevice and DNA Transistor: Interfacing Graphene Derivatives with Nanoscale and Microscale Biocomponents[J]. *Nano Letters*, 2008, 12: 4 469 - 4 476.
- [6] Rao C N, Subrahmanyam K S. A Study of the Synthetic Methods and Properties of Graphenes[J]. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2010, 11(5): 3 280 - 3 294.
- [7] Kim S, Ihm J, Choi H J. Origin of Anomalous Electronic Structures of Epitaxial Graphene on Silicon Carbide[J]. *Physical Review Letters*, 2008, 100(17): 176 802 - 176 805.
- [8] Bolotin K I, Sikes K J, Jiang Z. Ultrahigh Electron Mobility in Suspended Graphene[J]. *Solid State Communications*, 2008, 146(9): 351 - 355.
- [9] Hummers W S, Offeman R E. Preparation of Graphitic Oxide[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80(6): 1

- 339 – 1 339.
- [10] Marcano D C, Kosynkin D V, Berlin J M. Improved Synthesis of Graphene Oxide[J]. *ACS Nano*, 2010, 4(8): 4 806 – 4 814.
- [11] Dikin D A, Stankovich S, Zimney E J. Preparation and Characterization of Graphene Oxide Paper[J]. *Nature*, 2007, 448(7 152): 457 – 460.
- [12] Brodie B C. On the Atomic Weight of Graphite[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1859, 149: 249 – 259.
- [13] Daniela C, Marcano, Dmitry V Kosynkin, *et al.* Improved Synthesis of Graphene Oxide [J]. *ACS Nano*, 2010, 4(8): 4 806 – 4 814.
- [14] Hummers W S, Offeman R E. Preparation of Graphitic Oxide [J]. *J Am Chem Soc*, 1958, 80: 1 339 – 1 339.
- [15] Kim K S, Zhao Y, Jang H, *et al.* Large-Scale Pattern Growth of Graphene Films for Stretchable Transparent Electrodes [J]. *Nature*, 2009, 457: 706 – 710.
- [16] Shioyama H. Cleavage of Graphite to Graphene[J]. *Journal of Materials Science Letters*, 2001, 20: 499 – 500.
- [17] Chen G, Wu D, Weng W, *et al.* Exfoliation of Graphite Flake and Its Nanocomposites[J]. *Carbon*, 2003, 41: 619 – 621.
- [18] Antisari M V, Montone A, Jovic N. Low Energy Pure Shear Milling; a Method for the Preparation of Graphite Nanosheets[J]. *Science Materials*, 2006, 55: 1 047 – 1 050.
- [19] Jiao L Y, Zhang L, Wang X R. Narrow Graphene Nanoribbons from Carbon Nanotubes[J]. *Nature*, 2009, 458: 877 – 880.
- [20] Dreyer D R, Park S, Bielawski C W, *et al.* The Chemistry of Graphene Oxide [J]. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 228 – 240
- [21] Sun X, Liu Z, Welsher K, *et al.* Nano-Graphene Oxide for Cellular Imaging and Drug Delivery [J]. *Nano Res*, 2008, 1: 203 – 212.
- [22] Yang K, Zhang S, Zhang G, *et al.* Graphene in Mice: Ultrahigh in Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy [J]. *Nano Letters*, 2010, 10: 3 318 – 3 323.
- [23] Abdullah Al N, Lee J E, In I, *et al.* Target Delivery and Cell Imaging Using Hyaluronic Acid-Functionalized Graphene Quantum Dots[J]. *Mol Pharm*, 2013, 10: 3 736 – 3 744.
- [24] Liu Z, Robinson J T, Sun X, *et al.* PEGylated Nanographene Oxide for Delivery of Water-Insoluble Cancer Drugs[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 10 876 – 10 877.
- [25] Rana V K, Choi M C, Kong J Y, *et al.* Synthesis and Drug-Delivery Behavior of Chitosan-Functionalized Graphene Oxide Hybrid Nanosheets[J]. *Macromole Mater Eng*, 2011, 296: 131 – 140.
- [26] Depan D, Girase B, Shah J S, *et al.* Structure-Process-Property Relationship of the Polar Graphene Oxide-Mediated Cellular Response and Stimulated Growth of Osteoblasts on Hybrid Chitosan Network Structure Nanocomposite Scaffolds [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7: 3 432 – 3 445.
- [27] Lee W C, Lim C H Y X, Shi H, *et al.* Origin of Enhanced Stem Cell Growth and Differentiation on Graphene and Graphene Oxide [J]. *ACS Nano*, 2011, 5: 7 334 – 7 341.
- [28] Li N, Zhang Q, Gao S, *et al.* Three-Dimensional Graphene Foam as a Biocompatible and Conductive Scaffold for Neural Stem Cells [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1 – 6.
- [29] Dolmans D E J G J, Fukumura D, Jain R K. Photodynamic Therapy for Cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 380 – 387.
- [30] Hu W, Peng C, Luo W, *et al.* Graphene-Based Antibacterial Paper[J]. *ACS Nano*, 2010, 4: 4 317 – 4 323.
- [31] 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 [J]. *ACS Nano*, 2011, 5: 6 971 – 6 980.
- [32] Yang K, Wan J, Zhang S, *et al.* In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PE Gylated Graphene in Mice[J]. *ACS Nano*, 2010, 5: 516 – 522.
- [33] Wang K, Ruan J, Song H, *et al.* Biocompatibility of Graphene Oxide[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2011, 6: 1 – 8.

(编辑 盖少飞)