

石墨烯及其复合材料在组织工程领域的研究进展

赵 梦 温朝辉

摘 要 随着细胞及器官移植的发展以及在材料科学与工程领域取得的显著进展,组织工程和再生医学领域也引起广泛的关注。为了实现更快的愈合和大规模缺损的重建,找到适合于附着、增殖甚至可以诱导干细胞的分化的支架对组织的再生过程是至关重要的。石墨烯及其衍生物具有巨大应用潜力,因其具有特殊的物理、化学和生物学性质,预期将在不久的将来改变各个领域,尤其是生物医学领域。本文主要综述了石墨烯及其复合材料的生物相容性及在组织工程领域的应用进展,尤其是对干细胞分化、骨再生和神经修复的研究。

关键词 石墨烯 组织工程 细胞分化 骨再生 神经修复

中图分类号 R318.08

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.12.043

石墨烯材料已被探索应用于各种生物医学,如生物医学领域的成像、生物传感器、光热癌症治疗、组织工程和药物递送等,但对其安全性考虑仍然有待于进一步研究^[1]。石墨烯在体外和体内的生物学研究没有一致的结果,有时结果甚至是矛盾的,其对干细胞的相互作用机制以及在体内促进组织修复再生的能力也是多变的。因此,了解石墨烯材料与生物体之间的生物相容性以及作用机制有利于推进其在生物医学领域的发展和应用。

一、石墨烯的性质

石墨烯是碳原子以 sp^2 杂化方式紧密堆积成的一种单层二维结构碳质材料,是目前已知的最薄、最坚硬且导热导电性能最强的一种新型有潜力的纳米材料。在组织工程的应用当中,与其他材料相比,仅加入少量的石墨烯就会有显著的性能提高,因此石墨烯可用作加强材料以提高复合材料的机械性能^[2,3]。石墨烯具有最高的杨氏模量 $[(0.5 \sim 1.0) \text{TPa}]$,且韧性较强,可以加载到任何不规则的表面上或弯曲成不同的形状^[4]。此外,石墨烯具有良好的生物相容性和潜在的刺激细胞分化的特性,在生物医学领域得到了广泛的研究和应用^[5]。因此,石墨烯在组织工程领域中尤其是改善材料骨再生和神经修复功能方面具有良好的应用前景。

1. 石墨烯的可生物降解特性:作为一种医用植入材料,其能否降解以及降解后产物能否被安全吸收或

排泄是至关重要。Cirish 等^[6]在小鼠模型中静脉施用石墨烯,并用拉曼分析在降解过程中石墨烯在肺、肝、肾以及脾组织中的分布。结果表明,在 8~90 天可以看到石墨烯从器官周边逐渐向内扩散。石墨烯的生物降解性主要是通过巨噬细胞吞噬作用和基因表达的可调节炎症免疫反应。此外,对巨噬细胞进行的体外研究也显示吞噬后石墨烯的紊乱结构,重申了巨噬细胞在生物降解中的作用。石墨烯在体内的生物降解特性,对其在生物学和医学领域的进一步研究及实际应用奠定了良好的基础。

2. 石墨烯的抗菌性能:放置植入物后的细菌感染被认为是最严重的并发症以及导致植入失败的主要原因之一^[7]。Chang 等^[8]对石墨烯材料的抑菌性能进行了研究,研究表明氧化石墨烯(GO)具有固有的抗菌性能,这种独特的性质可用于预防植入物引起的感染。Hu 等^[9]将 GO 与大肠杆菌共同培养,结果显示随着 GO 浓度的不断增加,大肠杆菌的代谢活性逐渐下降,GO 浓度升至 $80 \mu\text{g/ml}$ 时大肠杆菌的代谢活力下降到 13%,表明石墨烯对大肠杆菌的生长有显著的抑制作用。Lim 等^[10]合成了一种新的银/石墨烯复合材料作为有希望的抗菌剂。结果表明由于良好分散性的银纳米颗粒和高品质的石墨烯基板,银/石墨烯复合材料表现出突出和稳定的抗菌活性。

3. 石墨烯的细胞毒性作用:生物相容性是生物材料研究的基础,研究材料的细胞毒性作用以及毒性作用与应用浓度之间的联系对其更好的改进与临床应用具有重要的意义。Wang 等^[11]成功制备水溶性 GO 并研究其对人成纤维细胞和小鼠的影响,结果表明, $<20 \mu\text{g/ml}$ 的 GO 对人成纤维细胞没有显示毒性,并

基金项目:国家自然科学基金资助项目(51272058)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学第一附属医院

通讯作者:温朝辉,电子信箱:wenzhaohui1968@163.com

且 $> 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的剂量表现出明显的细胞毒性。 $0.10 \sim 0.25 \text{mg}$ 的 GO 对小鼠没有表现出明显的毒性,但应用 0.4mg 时显示出慢性毒性。Ruiz 等^[12] 研究显示 GO 能大大增强哺乳动物细胞的附着和增殖。在 Zhang 等^[13] 的研究,GO 显示出与红细胞良好的生物相容性。Chang 等^[8] 检测 GO 对人非小细胞肺癌细胞形态、活力、病死率和膜完整性的影响。结果表明,GO 可导致细胞的剂量依赖性氧化应激,并在高浓度下轻微导致细胞存活力的损失。总的来说,GO 是一种在细胞水平上非常安全的材料。Zhang 等^[14] 通过改进的 Hummers 方法,合成均匀的超小型 GO 纳米片。由于其横向尺寸的优点,与任意的大 GO 纳米片相比,均匀的超小型 GO 纳米片显示出优异的生物相容性,较低的细胞毒性和较高的细胞摄取量。因此,调整石墨烯的应用剂量、性状和大小在其今后的生物应用开发中非常重要。

二、石墨烯复合材料在骨组织工程中的应用

骨科植入材料是一种用于代替或支持受损的关节或骨头而制作的医疗装置。创伤、肿瘤、畸形和感染等引起的骨缺损患者数量较大,所以对骨置换的需求量是巨大的。导致骨植入材料术后失败的原因有很多种:碎片等导致的人工假体松动、过快的降解速率以及随之而来的较高的碱度、植入物与组织表面结合力差以及术后感染等^[15]。此外,植入材料的表面性质以及能否增强成骨细胞分化对于手术的成功和失败起决定性作用。以石墨烯为基底或掺杂石墨烯的骨植入材料,在骨外科、整形外科和牙科中具有广阔的临床应用前景。

1. 石墨烯复合材料生物活性及生物相容性的研究:已经有许多植入材料表面改性的研究,特别是生物活性陶瓷表面涂层技术具有同时促进成骨细胞增殖分化并且抑制细菌增殖的功能。其中,羟基磷灰石(HA)作为最有发展前途的生物硬组织替代材料之一,由于其表面有极性,会选择性地吸附富含酸性氨基酸和丝氨酸的蛋白质,以诱导骨生长且其无毒性,能够与骨发生化学反应,具有优异的成骨作用,已经成为生物医用材料研究的重点内容^[16]。然而,其较差的韧性能和黏附性限制了其作为骨替代材料的应用^[2]。在此基础上,在膜层中加入石墨烯以进一步提高材料的机械性能、生物活性以及生物相容性。

Mohandes 等^[17] 用电泳沉积方法制备了新型聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)/GO/HA 纳米复合材

料。在这项工作中,将 HA 和 PEG/GO/HA 纳米复合材料浸泡在模拟体液(simulated body fluid, SBF)中进行评价。通过电感耦合等离子体发射光谱法对浸泡后 SBF 溶液中的化学组成进行分析,与纯 HAP 相比,PEG/GO/HA 纳米复合材料释放出的 Ca 和 P 量更多,表明 PEG/GO/HAP 纳米复合材料的具有更高的生物活性。此外,PEG/GO/HAP 纳米复合材料在 SBF 溶液中浸渍 14 天后,可以观察到其表面的新磷灰石增加。Mohandes 等^[18] 还制备了一种含有壳聚糖(chitosan, CS)/GO/HA 的新型纳米复合材料。同样通过在体外 SBF 浸泡实验监测化学成分的变化以评价 CS/GO/HA 纳米复合材料的生物活性,得出的结论是,相比纯 HA,CS/GO/HA 能释放出更多的 Ca 和 P 离子,且浸渍 14 天后其表面的新磷灰石也增加。综上所述,GO 的加入能够提高材料的生物活性高。

Li 等^[19] 通过阴极电泳沉积技术将 GO 作为纳米增强材料用于 HA 涂层中,涂层的附着强度从 $(1.55 \pm 0.39) \text{MPa}$ (HA) 增加至 $(2.75 \pm 0.38) \text{MPa}$ (2wt. % GO/HA) 和 $(3.30 \pm 0.25) \text{MPa}$ (5wt. % GO/HA)。此外,复合材料表现出更高的耐腐蚀性和优异的生物相容性,2wt. % GO/HA 的细胞活力为 95% 的,5wt. % GO/HA 的细胞存活率 80% ~ 90%。Zhang 等^[20] 使用放电等离子体烧结制作了石墨烯纳米片(graphene nanosheets, GNS)/HA 复合材料,并对其机械性能和体外生物相容性进行了评价。结果表明,1.0wt. % 的 GNS/HA 复合材料的断裂韧度与纯 HA 相比提升了约 80%。在体外培养成骨细胞生长试验表明,添加 GNS 有助于改善成骨细胞黏附和磷灰石矿化。从这项工作中发现,GNS/HA 复合材料有望用于骨科植入物的理想材料。

2. 石墨烯促进细胞成骨分化及骨再生的研究:在骨组织工程中,必须设计多功能生物材料,能够诱导细胞分化和促进骨修复和再生。到目前为止,尽管人类干细胞研究取得了巨大进展,但只有少数使用碳纳米技术在干细胞领域研究的报道。根据最近的研究,人工合成碳基生物材料如石墨烯和碳纳米管(carbon nanotubes, CNT)被证明可以促进干细胞的增殖和分化。在这部分评论中,笔者讨论最近关于石墨烯和衍生物作为有价值的纳米材料干细胞研究的相关发现。

Nayak 等^[21] 研究表明石墨烯具有良好生物相容性,其不妨碍人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)的增殖,且能加速其特异性分化成

骨细胞,表明石墨烯作为支架诱导干细胞的潜力。GO 与磷酸钙(calcium phosphate, CaP)纳米复合材料已经被证实加速干细胞分化为成骨细胞的显着协同效应。Tatavarty 等^[22]合成了一种新的 GO - CaP 纳米复合材料,并通过骨结节和成骨细胞标志物检测评估其诱导 hMSCs 成骨分化的能力。结果表明,GO - CaP 能显著促进 hMSCs 骨形成和进一步增强钙成骨细胞沉积。Oyefusi 等^[23]制作了石墨烯 - HA 复合材料并检查其对胎儿成骨细胞(human fetal osteoblastic cell, hFOB 1.19)的增殖和分化速率。骨钙蛋白表达的总蛋白测定和蛋白质印迹分析用作细胞增殖和分化的指标。结果表明 hFOB 1.19 细胞在经过石墨烯 - HA 的处理后增殖和分化良好。

Liu 等用角叉胶(carrageenan, Gar)将氧化石墨烯官能化得到 GO - Car 复合物,并研究 GO - Car 复合材料对小鼠胚胎成骨细胞前体细胞(MC3T3 - E1)的影响。结果显示与 GO - Car 复合材料培养后的 MC3T3 - E1 具有良好的生物相容性,能够促进细胞附着、细胞增殖以及钙沉积。体外研究清楚地显示 GO - Car 能够提示升 HA 促进细胞矿化和分化的功能。这表明 GO - Car 复合材料诱导骨组织再生和生物植入材料的合成。Nair 等将 GO 掺入明胶(gelatin) - HA(GHA)中以增强支架的机械强度和成骨分化的作用,研究结果表明,当支架在 PBS 中浸泡持续 60 天后,约为 50% ~ 60% 的 GO 以线性的方式缓慢释放,且浓度能控制在在毒性范围内。此外,细胞培养实验表面,在不提供成骨诱导剂的情况下 GOGHA 能诱导人类脂肪来源的间充质干细胞的成骨分化。Wu 等制备了 GO 改性 - 磷酸三钙(GO - modified β - tricalcium phosphate, β - TCP - GRA)支架,然后探讨材料在体外和体内的成骨能力以及一些分子机制。结果表明, β - TCP - GRA 能显著促进人骨髓基质干细胞的增殖、碱性磷酸酶的表达和成骨基因表达。体内研究表明,在颅骨缺损中与 β - TCP 支架相比 β - TCP - GRA 支架促进新骨形成速率的明显增加,表明 GO 对体内成骨的刺激作用。

三、石墨烯复合材料在神经组织工程中的应用

对于神经组织工程,其成功高度依赖于支架的诱导神经修复及再生功能。使用组织工程技术修复再生缺损,特别是基于干细胞,近年来已经引起广泛关注。诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)作为再生医学的细胞来源在治疗各种神经系统疾病中展现出非常良好的前景。Chen 等研究石墨

烯和 GO 表面对 iPSCs 增殖和自发分化的影响。与玻璃表面相比,在石墨烯表面上培养的 iPSC 显示类似的细胞黏附和增殖程度,而 GO 表面上的 iPSC 能以更快的速率黏附和增殖。此外,石墨烯有利地保持 iPSC 在未分化状态,而 GO 能加速 iPSC 分化。结果表明石墨烯材料有用作促进 iPSCs 增殖和分化材料的潜力。Li 等制备了三维石墨烯泡沫(three - dimensional graphene foam, 3D - GFs)支架并研究其是否支持神经干细胞(neural stem cell, NSC)增长。结果表明,3D - GFs 可以保持 NSC 处于活跃增殖的状态并且能够促进其分化为星形胶质细胞,特别是神经元细胞。3D - GFs 支架的研究对于 NSC 的治疗提供了一种有前途的神经再生方法。

神经损伤的愈合是一个重要的医学问题。可生物降解的神经引导导管(nerve guide channel, NGC)是一种很有前途的治疗方案,以提供一个空间促进和指导轴突生长和再生,从而帮助神经愈合。C - 12 细胞株来源于鼠嗜铬细胞瘤,可以对神经生长因子有可逆的神经元显形反应。Rotman 等提出了一种聚三甲基碳酸酯(poly trimethylene carbonate, PTMC)与甲基丙烯酸酐(methacrylic anhydride, MA)和还原氧化石墨烯(reduced graphene oxide, rGO)结合的复合材料(PTMC - MA/rGO)。结果表明,随着 PTMC - MA/rGO 材料中 rGO 含量的增加,复合材料显示出增加的导电性,而 PC - 12 细胞的培养显示,在初始细胞黏附后,细胞在 PTMC - MA/rGO 复合膜的表面上的增殖与 rGO 负载量无关。PTMC - MA/rGO 有望作为 NGC 以增加轴突再生的速率,从而改善受损周围神经的功能恢复。Liu 等将 GO 和 CNT 共价功能化得到可交联的 GO - 丙烯酸酯(GO - acrylate, GOa)和 CNT 聚乙二醇丙烯酸酯(CNTpega),随后在 L - 抗坏血酸溶液中进行化学还原得到 GOa - CNTpega - 聚乙二醇水凝胶。研究结果表明,rGOa - CNTpega - OPF 具有良好的生物相容性和促进 PC12 细胞增殖以及附着在其表面上,更重要的是它还可以强烈刺激神经突的发展。这些结果表明 rGOa - CNTpega - OPF 复合水凝胶非常具有成为神经组织工程的神经引导导管的潜力。Soltani 等使用 CS 和聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物为基质,0.5 ~ 1.5wt. % 石墨烯作为增强材料制备纳米复合膜,检测和比较 CS/石墨烯膜和 PLGA/石墨烯膜的电导率和生物学性质。结果显示 1.5wt. % 石墨烯的膜是所有检查膜中具有最高电导率值的,其中 1.5wt. % 石墨烯/CS 膜促进 PC12 细胞

增殖的作用最显著,表明其有希望用于神经组织工程应用。

四、展 望

石墨烯及其衍生物纳米复合材料具有较好的生物活性和生物相容性,多种研究表明其对细胞增殖、分化及矿化有促进作用,有利于组织的再生修复,在组织工程领域具有巨大的应用前景。在本文中,笔者总结不同类型的石墨烯纳米材料的优良生物活性以及其对骨再生及神经修复的良性影响。目前石墨烯作为组织工程材料的相关研究都是在基础阶段,还存在许多待解决的问题。首先,石墨烯的含量、尺寸、形状、厚度、形态以及氧化程度对生物材料的整体性能有着重要的影响。特定石墨烯的结构及功能与细胞特异性分化的关系有待于进一步研究,以助于更好地应用石墨烯来提升复合材料促进组织修复及再生的功能。其次,石墨烯参与干细胞分化潜在的机制和信号转导通路是未知的,进一步研究了解这些细胞水平的机制可以为开发用于组织工程的特异性支架开辟新的途径。再次,石墨烯材料的安全性研究也不容忽视,其长期降解过程中的生物毒性作用、细胞摄取机制、细胞内和体内代谢途径对于其临床的应用是至关重要。最后,石墨烯复合材料在体内研究将成为重点,评测材料在体内的促进修复和再生的能力、相应机制以及与时间相关性可以对其今后的改进及临床应用提供依据。

参考文献

- 1 Syama S, Mohanan PV. Safety and biocompatibility of Graphene: A new generation nanomaterial for biomedical application [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 86: 546 – 555
- 2 Fan Z, Wang J, Wang Z, *et al.* One – pot synthesis of graphene/hydroxyapatite nanorod composite for tissue engineering [J]. *Carbon*, 2014, 66: 407 – 416
- 3 Zhao X, Zhang Q, Chen D, *et al.* Enhanced mechanical properties of graphene – based poly (vinyl alcohol) composites [J]. *Macromolecules*, 2010, 43 (5): 2357 – 2363
- 4 Lee Y, Bae S, Jang H, *et al.* Wafer – scale synthesis and transfer of graphene films [J]. *Nano Lett*, 2010, 10 (2): 490
- 5 Zhang B, Wang Y, Zhai G. Biomedical applications of the graphene – based materials [J]. *Mater Sci Eng C*, 2016, 61 (8): 953 – 964
- 6 Girish CM, Sasidharan A, Gowd GS, *et al.* Confocal Raman imaging study showing macrophage mediated biodegradation of graphene in vivo [J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2 (11): 1489 – 1500
- 7 Jafari SM, Coyle C, Mortazavi SM, *et al.* Revision hip arthroplasty: infection is the most common cause of failure [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468 (8): 2046 – 2051
- 8 Chang Y, Yang ST, Liu JH, *et al.* In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells [J]. *Toxicol Lett*, 2011, 200 (3): 201 – 210
- 9 Hu W, Peng C, Luo W, *et al.* Graphene – based antibacterial paper [J]. *ACS Nano*, 2010, 4 (7): 4317
- 10 Lim HN, Huang NM, Loo CH. Facile preparation of graphene – based chitosan films: Enhanced thermal, mechanical and antibacterial properties [J]. *J Non Cryst Solids*, 2012, 358 (3): 525 – 530
- 11 Wang K, Jing R, Song H, *et al.* Biocompatibility of graphene oxide [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2011, 6 (1): 1 – 8
- 12 Ruiz ON, Fernando KAS, Wang B, *et al.* Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth [J]. *ACS Nano*, 2011, 5 (10): 8100 – 8107
- 13 Zhang X, Yin J, Peng C, *et al.* Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration [J]. *Carbon*, 2011, 49 (3): 986 – 995
- 14 Zhang H, Peng C, Yang J, *et al.* Uniform ultrasmall graphene oxide nanosheets with low cytotoxicity and high cellular uptake [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5 (5): 1761 – 1767
- 15 Groll J, Fiedler J, Bruellhoff K, *et al.* Novel surface coatings modulating eukaryotic cell adhesion and preventing implant infection [J]. *Int J Artif Organs*, 2009, 32 (9): 655
- 16 Yu LG, Khor KA, Li H, *et al.* Effect of spark plasma sintering on the microstructure and in vitro behavior of plasma sprayed HA coatings [J]. *Biomaterials*, 2003, 24 (16): 2695 – 2705
- 17 Mohandes F, Salavati – Niasari M. In vitro comparative study of pure hydroxyapatite nanorods and novel polyethylene glycol/graphene oxide/hydroxyapatite nanocomposite [J]. *J Nanopart Res*, 2014, 16 (9): 2604 – 2616
- 18 Mohandes F, Salavatianiasari M. Freeze – drying synthesis, characterization and in vitro bioactivity of chitosan/graphene oxide/hydroxyapatite nanocomposite [J]. *Rsc Advances*, 2014, 38 (49): 4501 – 4509
- 19 Li M, Liu Q, Jia Z, *et al.* Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrophoretic nanotechnology for biological applications [J]. *Carbon*, 2014, 67 (3): 185 – 197
- 20 Zhang L, Liu W, Yue C, *et al.* A tough graphene nanosheet/hydroxyapatite composite with improved in vitro biocompatibility [J]. *Carbon*, 2013, 61 (11): 105 – 115
- 21 Nayak TR, Henrik A, Makam VS, *et al.* Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *ACS Nano*, 2011, 5 (6): 4670 – 4678
- 22 Tatavarty R, Ding H, Lu G, *et al.* Synergistic acceleration in the osteogenesis of human mesenchymal stem cells by graphene oxide – calcium phosphate nanocomposites [J]. *Chem Commun*, 2014, 50 (62): 8484 – 8487
- 23 Oyefusi A, Olanipekun O, Neelgund GM, *et al.* Hydroxyapatite grafted carbon nanotubes and graphene nanosheets: promising bone implant materials [J]. *Spectrochim Acta A*, 2014, 132C (21): 410 – 416

(收稿日期:2017 – 03 – 19)

(修回日期:2017 – 03 – 26)