

PEG 接枝氧化石墨烯的制备与细胞成像

徐国强 徐鹏武 施冬健 陈明清*

(江南大学化学与材料工程学院, 食品胶体与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

摘要: 通过酯化反应将不同分子量的聚乙二醇(PEG)接枝到氧化石墨烯(GO)表面, 得到系列 GO-PEG。利用傅里叶变换红外光谱(FTIR)、拉曼光谱(Raman)、扫描电子显微镜(SEM)对 GO-PEG 的结构和形貌进行了表征, 用热重分析(TGA)测定了 GO-PEG 中 PEG 的接枝量。SEM 结果表明 GO-PEG 的剥离程度高于 GO。GO-PEG 在磷酸盐缓冲溶液中具有较好的分散稳定性, 稳定性与接枝量呈正相关。GO-PEG 通过非共价键合作用对荧光素(Flu)的负载量可达 $1.75 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$, 且负载量受接枝量影响; 另外, GO-PEG 对 Flu 的释放行为具有 pH 值触发药物释放性能。将接枝 PEG 的端羟基与 Flu 共价键合, 所得 GO-PEG₆₀₀₀-Flu 荧光探针实现了对 HepG2 细胞的成像。

关键词: 氧化石墨烯; 聚乙二醇; 荧光素; 负载; 细胞成像

中图分类号: O613.71 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2014)09-1994-06

DOI: 10.11862/CJIC.2014.280

Preparation and Cellular Imaging of PEG Grafted Graphene Oxide

XU Guo-Qiang XU Peng-Wu SHI Dong-Jian CHEN Ming-Qing*

(Key Laboratory of Food Colloids and Biotechnology, Ministry of Education,
School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: A series of functionalized graphene oxide (GO) with biocompatibility were prepared by grafting polyethylene glycol (PEG) with different molecular weights onto the surface of GO via esterification. Fourier transform infrared (FTIR), Raman spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM) were used to investigate structures and morphologies of the as-prepared GO-PEG. Grafting ratios were determined by thermogravimetric analysis (TGA). SEM results indicate that GO-PEG is better exfoliated than GO. GO-PEG displays excellent water dispersity and stability in phosphate buffered saline, and the dispersive stability depends on the grafting ratio. By noncovalent binding interaction, GO-PEG has high loading capacity (as high as $\sim 1.75 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$) for fluorescein (Flu) depending on the grafting ratio. GO-PEG also shows pH-triggered release property for Flu. In addition, by covalent binding between terminal hydroxy groups of the grafted PEG chains and Flu, GO-PEG₆₀₀₀-Flu fluorescent probes are prepared and cellular imaging of HepG2 cells is realized by the probes.

Key words: graphene oxide (GO); polyethylene glycol (PEG); fluorescein(Flu); loading; cellular imaging

自 Novoselov 和 Geim 等^[1]制备出单层石墨烯以来,其在电化学、传感器和复合材料等领域的应用受到广泛关注^[2]。石墨烯有大的比表面积,可通过范德华力、 π - π 堆叠等非共价键合作用高效吸附芳香

族化合物^[3-4],因此作为载体也成为研究热点。氧化石墨烯(GO)表面随机分布着大量的羟基、羧基和环氧基等含氧官能团,较石墨烯有更好的亲水性^[5],经功能分子的共价修饰可实现其在特定领域的应

收稿日期:2014-01-24。收修改稿日期:2014-04-22。

国家自然科学基金(No.21341009 和 51173072)资助项目。

*通讯联系人。E-mail:mqchen@jiangnan.edu.cn

用^[6-9]。荧光素(Flu)的量子产率高且激发与发射波长范围广,适用于荧光标记和探针^[10],GO可作为荧光物质的载体用于生物医药领域^[11-14]。Flu与GO的非共价键合作用会引起荧光猝灭^[15-16],因此以聚乙二醇(PEG)桥接GO和Flu防止荧光猝灭,增强GO基荧光探针的溶液分散稳定性,实现细胞成像。

本工作将不同分子量的PEG在相同的反应条件下接枝到GO表面,研究PEG的接枝量对GO-PEG分散稳定性的影响;以GO-PEG为载体,探讨PEG的接枝量对Flu负载量的影响,考察Flu/GO-PEG₆₀₀₀在磷酸盐缓冲溶液(PBS)中的释放行为;以接枝PEG键合Flu,观察GO-PEG₆₀₀₀-Flu的细胞成像效果。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

氧化石墨,实验室制备;透析袋(MWCO=14 kDa),购于国药集团化学试剂有限公司;氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、荧光素、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、聚乙二醇(PEG₁₀₀₀、PEG₂₀₀₀和PEG₆₀₀₀)均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和4-甲氨基吡啶(DMAP)均为分析纯,购于阿拉丁试剂(上海)有限公司;胎牛血清和细胞培养基(DMEM)购于南京凯基生物科技发展有限公司;HepG2肝癌细胞购于上海博谷生物科技有限公司。

所用仪器有:FALA2000-104型傅里叶变换红外光谱仪(加拿大ABB Boman公司),InVia型拉曼光谱仪(英国Renishaw公司),UV-1100型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司),RF-5301PC荧光光谱仪(日本岛津公司),TGA-1100SF型热重分析仪(瑞士Mettler-Toledo公司),S-4800型场发射扫描电子显微镜(日本日立公司),DB-525型zeta电位及粒度分析仪(美国Brookhaven公司),LSM710型共聚焦激光显微镜(德国Zeiss公司)。

1.2 GO-PEG的制备

取Hummers法^[9]制备的氧化石墨在DMF中超声分散,得到1 mg·mL⁻¹的分散液,将100 mg PEG₁₀₀₀、200 mg PEG₂₀₀₀和600 mg PEG₆₀₀₀分别与50 mL分散液加入100 mL圆底烧瓶中超声10 min,再加入一定量DCC/DMAP(物质的量的比5:1),超声30 min后在60℃下反应12 h,将分散液装入透析袋中透析1周,除去游离的PEG和催化剂,经冷冻干燥

得GO-PEG。

1.3 Flu/GO-PEG的制备

在5 mL不同浓度(3.2~28.8 μg·mL⁻¹)的Flu溶液中加入0.5 mL GO水分散液(0.1 mg·mL⁻¹),室温下搅拌24 h。离心30 min后,由标准曲线测出上层清液中未负载的Flu,进而计算出Flu在GO上的负载量。以相同的方法计算出Flu在GO-PEG的负载量。

1.4 Flu的释放

将Flu/GO-PEG₆₀₀₀装入透析室中,置于盛有20 mL不同pH值(5、7.2和9.18)磷酸盐缓冲液(PBS)的烧杯中,在37℃恒温下透析3 d,在设定的时间点从烧杯中取出3 mL PBS,并立即补充3 mL PBS,在475 nm波长下测定取出溶液的吸光度,根据标准曲线计算出Flu的释放率。

1.5 GO-PEG₆₀₀₀-Flu的制备

取1 mg·mL⁻¹ GO-PEG₆₀₀₀的DMF分散液、5 mg Flu和DCC/DMAP(物质的量的比2:5:1)装入100 mL圆底烧瓶,超声20 min后置于60℃下反应24 h,将体系透析一周,经冷冻干燥得到GO-PEG₆₀₀₀-Flu。

1.6 细胞培养与观察

37℃、5% CO₂条件下,在盛有10%胎牛血清的DMEM培养液中培养HepG2细胞,将30 μg·mL⁻¹ GO-PEG₆₀₀₀、Flu/GO-PEG₆₀₀₀和GO-PEG₆₀₀₀-Flu分别加入HepG2细胞培养液中培养24 h,将细胞移植到24孔板中,继续培养6 h,用PBS漂洗3次,将细胞置于载玻片上,加90%甘油-PBS封片,于共聚焦激光显微镜(CLSM)下观察(激光波长460 nm)。

2 结果与讨论

2.1 GO-PEG的结构与形貌表征

图1为GO(a)和GO-PEG(b~d)的红外谱图。GO在~3 400 cm⁻¹附近吸收峰较宽,包含COOH和O-H的吸收,~1 718 cm⁻¹处峰为C=O的伸缩振动峰。经PEG修饰后,~2 880 cm⁻¹和~1 095 cm⁻¹处出现了PEG的C-H和C-O的振动吸收峰,~1 724 cm⁻¹处为接枝PEG后形成酯键的振动峰,~1 248 cm⁻¹处为PEG的C-O-C的非对称弯曲振动,表明PEG接枝成功。

图2是石墨(a)、GO(b)和GO-PEG(c~e)的拉曼光谱图。1 350 cm⁻¹、1 579~1 605 cm⁻¹附近的峰分别代表D带和G带。相较石墨,GO的G带变宽并发生

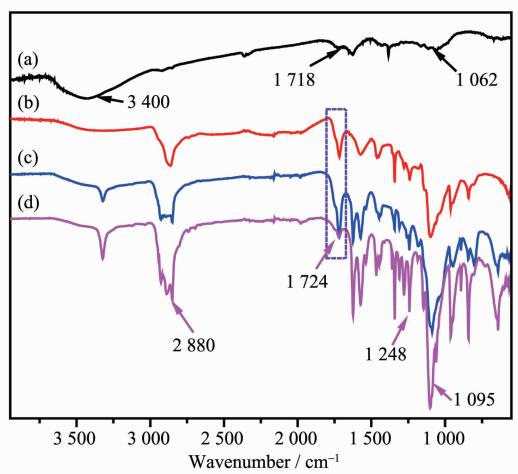


图 1 (a) GO、(b) GO-PEG₁₀₀₀、(c) GO-PEG₂₀₀₀ 和(d) GO-PEG₆₀₀₀ 的红外谱图

Fig.1 FTIR spectra of (a) GO, (b) GO-PEG₁₀₀₀, (c) GO-PEG₂₀₀₀ and (d) GO-PEG₆₀₀₀

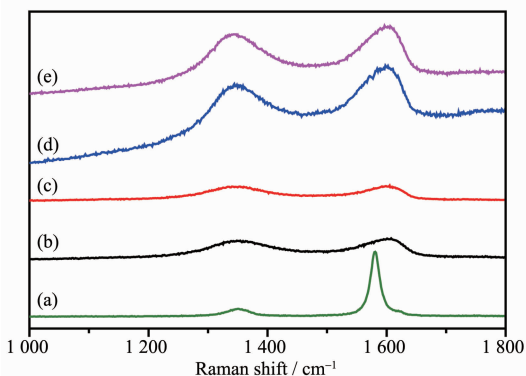


图 2 (a) 石墨、(b) GO、(c) GO-PEG₁₀₀₀、(d) GO-PEG₂₀₀₀ 和 (e) GO-PEG₆₀₀₀ 的拉曼光谱图

Fig.2 Raman spectra of (a) Graphite, (b) GO, (c) GO-PEG₁₀₀₀, (d) GO-PEG₂₀₀₀ and (e) GO-PEG₆₀₀₀ under a laser excitation wavelength of 532 nm

蓝移, I_D/I_G 明显增加, 原因是石墨的氧化过程降低了石墨层的 sp^2 杂化程度, 使石墨层的缺陷和混乱程度增加, 蓝移由孤立的双键引起^[17-20]。GO-PEG 的 I_D/I_G 与 GO 相比略有增大, 但总体变化不大, 表明 PEG 的接枝对其面内 sp^2 领域大小的影响不大。

GO 和 GO-PEG 的 TGA 曲线(图 3)显示, GO(a) 在 N_2 气氛下低于 100 °C 的热失重归因于水分的蒸发, ~160 °C 处显著的热失重归因于 GO 表面含氧官能团的热分解^[19]。GO-PEG(b~d) 在 ~200 °C 为表面剩余含氧官能团的热失重, 250~400 °C 为接枝 PEG 的热失重, 根据其热失重的变化, 可计算出 PEG 的接枝量与接枝密度^[21]分别为 14.2%、18 个 PEG₁₀₀₀ 链/10000 碳 (b), 52.5%、66 个 PEG₂₀₀₀ 链/10000 碳 (c),

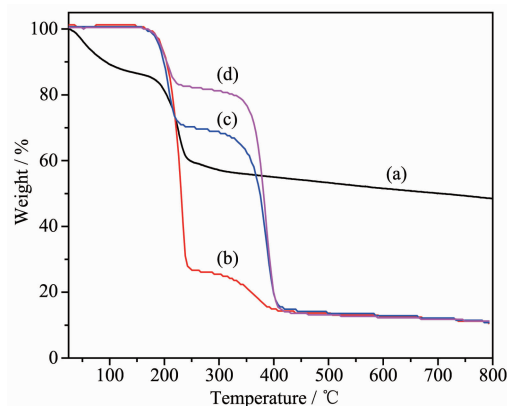


图 3 (a) GO、(b) GO-PEG₁₀₀₀、(c) GO-PEG₂₀₀₀ 和(d) GO-PEG₆₀₀₀ 的 TGA 曲线

Fig.3 TGA curves of (a) GO, (b) GO-PEG₁₀₀₀, (c) GO-PEG₂₀₀₀ and (d) GO-PEG₆₀₀₀ in nitrogen

68.4%、43 个 PEG₆₀₀₀ 链/10000 碳(d)。

图 4(a)显示经超声剥离所得 GO 是径厚比较大的卷曲的薄片,但仍有一定程度的聚集。经 PEG 修饰后,PEG 对 GO 片层间的范德华力和氢键的弱化作用有利于 GO 片层的剥离与延展以及阻止 GO 的聚集^[22-23],所以 GO-PEG 的形貌(图 4b~d)及静置状态下的分散稳定性发生了明显的变化(图 5)。GO-PEG 剥离程度高于 GO;GO-PEG₆₀₀₀ 分散稳定性最佳,30 天仍可稳定分散在 PBS 中(图 5d),表明产物的分散稳定性与接枝量呈一定的正相关。

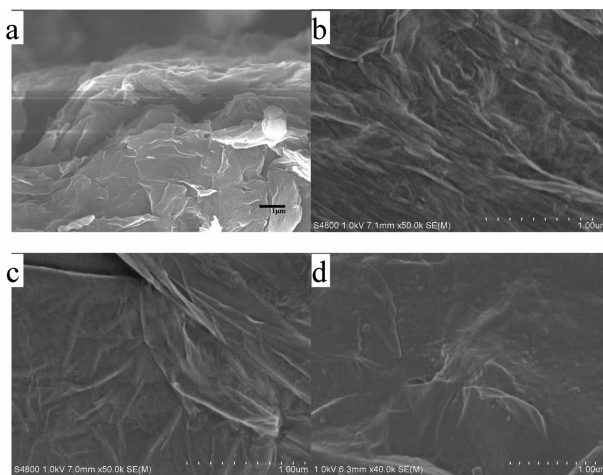


图 4 (a) GO、(b) GO-PEG₁₀₀₀、(c) GO-PEG₂₀₀₀ 和(d) GO-PEG₆₀₀₀ 的 SEM 照片

Fig.4 SEM images of (a) GO, (b) GO-PEG₁₀₀₀, (c) GO-PEG₂₀₀₀ and (d) GO-PEG₆₀₀₀

2.2 GO-PEG 的负载功能

图 6 中 a→h 的变化趋势表明随着 GO-PEG₆₀₀₀ 用量的增大, 由 Flu 与 GO-PEG₆₀₀₀ 的碳平面间的非

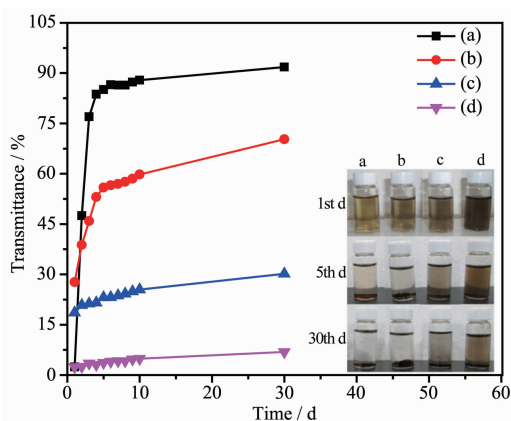


图5 (a) GO、(b) GO-PEG₁₀₀₀、(c) GO-PEG₂₀₀₀ 和(d) GO-PEG₆₀₀₀ 在 PBS 中的分散稳定性($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Fig.5 Stability of (a) GO, (b) GO-PEG₁₀₀₀, (c) GO-PEG₂₀₀₀ and (d) GO-PEG₆₀₀₀ in PBS ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), photograph of samples on selected time (inset)

共价键合作用引起的荧光猝灭作用逐渐增强, 荧光强度逐渐减弱。GO 和 GO-PEG 对 Flu 的负载量如图 7 所示, Flu 浓度达到 $28.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其负载量在 $1.4 \sim 1.9 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$, 高于许多负载体系^[4,24]。GO 具有最大的负载量; 经 PEG 修饰后, GO-PEG 的负载量受其表面接枝量的影响而不同, 其中 GO-PEG₁₀₀₀ 的接枝量最小, 载药面积受影响程度最小, 对 Flu 的负载量达 $1.75 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

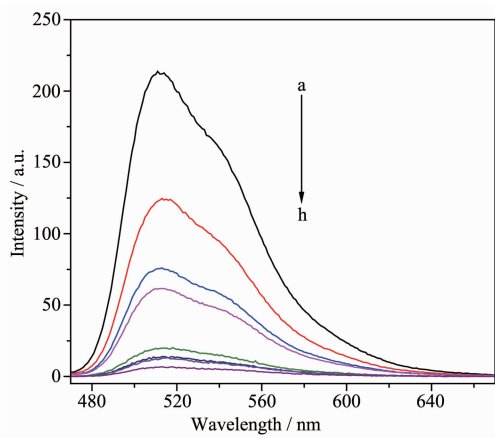


图6 GO-PEG₆₀₀₀ 用量增加对 Flu 溶液荧光强度的影响

Fig.6 Fluorescence intensity of Flu solution as a function of GO-PEG₆₀₀₀ amount (from a to h: 10, 30, 50, 70, 90, 100, 110 and 120 μL), with the excitation wavelength of 460 nm

通过分散稳定性(图 5)和负载(图 7)实验可知, GO-PEG₆₀₀₀ 兼具良好的分散稳定性与负载性能, 因此以 Flu/GO-PEG₆₀₀₀ 为研究对象, 其在 37°C 、不同 pH 值 PBS 中的释放行为如图 8 所示。在不同 pH 值

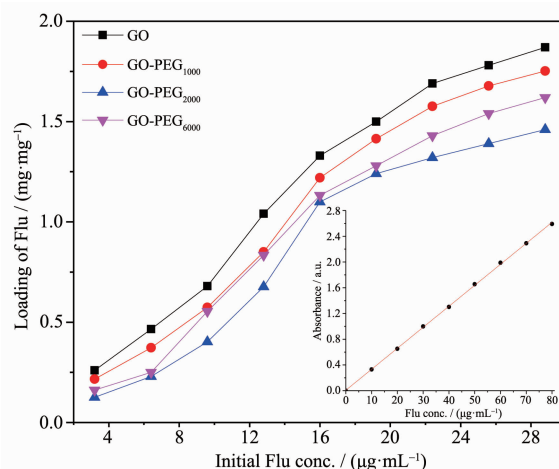


图7 不同 Flu 浓度下载体的负载量

Fig.7 Loading capacity of carriers in different Flu concentrations, standard curve of Flu (inset)

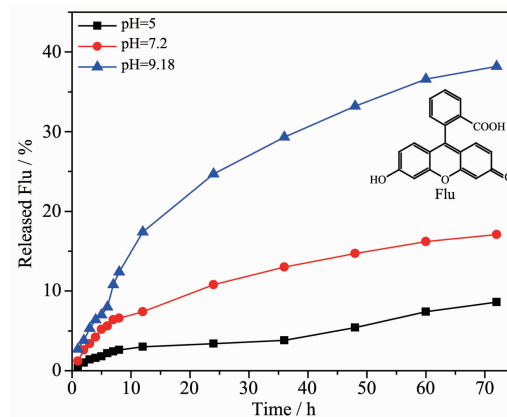


图8 Flu/GO-PEG₆₀₀₀ 的释放行为

Fig.8 Release behaviors of Flu/GO-PEG₆₀₀₀

条件下, 起始阶段均具有较快的释放速率, 12 h 后释放速率放缓; 碱性条件下具有更快的释放速率, 其原因是 Flu 的羟基和羧基与载体表面残留羧基及羟基间的氢键作用受到破坏, 而酸性与中性环境对此类氢键的影响较小, 这与模型药物罗丹明在石墨烯基负载上呈现的 pH 响应释放相异^[3,14]。Flu 可作为一种模型药物为研究结构类似药物的 pH 响应释放提供一定的理论支持。

2.3 GO-PEG₆₀₀₀-Flu 的细胞成像功能

图 9 为 GO-PEG₆₀₀₀-Flu(a) 和 Flu(b) 的红外谱图。a 谱线中, 944 cm^{-1} 、 843 cm^{-1} 处出现归属于 Flu 芳环中 C-O-C 和 C=C 的特征峰, 另外, 相较于 GO-PEG₆₀₀₀, Flu 的键合引入了新的 C=O, 可以看到 $\sim 1724 \text{ cm}^{-1}$ 处 $I_{\text{C=O}}$ 明显增强, 可表明 GO-PEG₆₀₀₀-Flu 合成成功。经多次离心分离、超声分散后可得到尺寸较小的 GO-PEG₆₀₀₀-Flu 分散液(图 10), 其荧光发

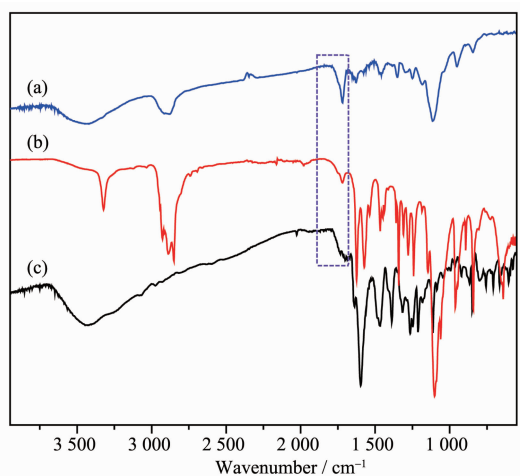


图 9 (a) GO-PEG₆₀₀₀-Flu, (b) GO-PEG₆₀₀₀ 和 (c) Flu 的红外谱图

Fig.9 FTIR spectra of (a) GO-PEG₆₀₀₀-Flu, (b) GO-PEG₆₀₀₀ and (c) Flu

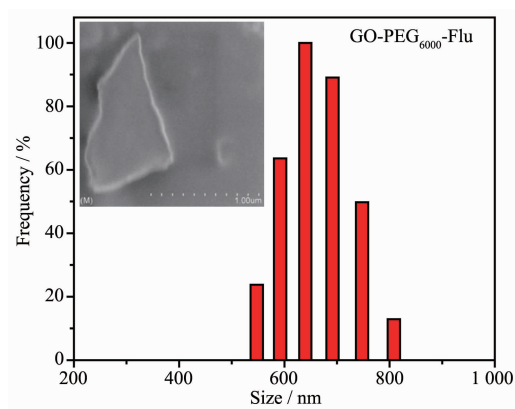


图 10 GO-PEG₆₀₀₀-Flu 的尺寸分布

Fig.10 Size distribution of GO-PEG₆₀₀₀-Flu, SEM image of GO-PEG₆₀₀₀-Flu (inset)

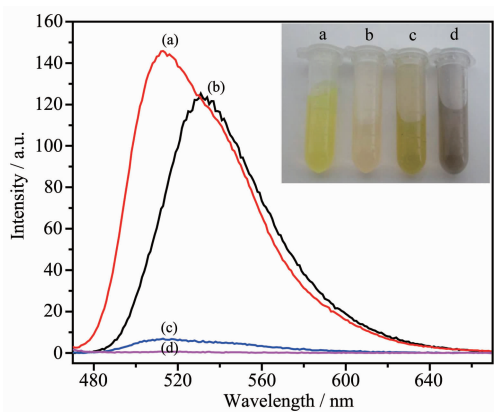


图 11 (a) Flu, (b) GO-PEG₆₀₀₀-Flu, (c) Flu/GO-PEG₆₀₀₀ 和 (d) GO-PEG₆₀₀₀ 水溶液的荧光光谱

Fig.11 Fluorescence spectra of (a) Flu, (b) GO-PEG₆₀₀₀-Flu, (c) Flu/GO-PEG₆₀₀₀ and (d) GO-PEG₆₀₀₀ solution, photograph of samples (inset)

射光谱如图 11(b)所示,与 Flu(a)相比发生了~10 nm 的红移,而 Flu/GO-PEG₆₀₀₀(c)发生了荧光猝灭;表明 PEG 的桥接有效防止了 GO 片层对 Flu 的荧光猝灭作用,同时导致发射波长发生转变,有望作为一种荧光探针。为了考察 GO-PEG₆₀₀₀-Flu 荧光探针的细胞成像功能,将 GO-PEG₆₀₀₀-Flu/GO-PEG₆₀₀₀、GO-PEG₆₀₀₀-Flu 分别加入 HepG2 细胞培养液。通过 CLSM 对细胞进行观察,结果如图 12 所示。摄入 Flu/GO-PEG₆₀₀₀ 的 HepG2 细胞因其荧光猝灭作用导致荧光显像不清晰(B₁,B₃),摄入 GO-PEG₆₀₀₀-Flu 的细胞荧光显像效果较显著(C₁,C₃),能较清晰地看到细胞,表明探针通过细胞的吞入作用进入细胞质。同时,该探针具有较好的细胞相容性,在测试过程中未见明显的细胞凋亡现象。

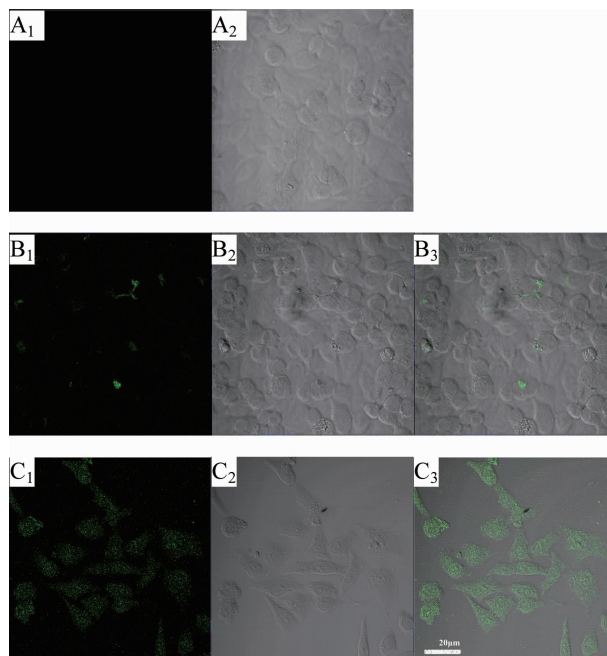


图 12 (A) GO-PEG₆₀₀₀、(B) Flu/GO-PEG₆₀₀₀ 和 (C) GO-PEG₆₀₀₀-Flu 标记的 HepG2 细胞的 CLSM 图片, 1 表示暗场, 2 表示明场, 3 表示明暗场重叠

Fig.12 CLSM images of HepG2 cells incubated with (A) GO-PEG₆₀₀₀, (B) Flu/GO-PEG₆₀₀₀ and (C) GO-PEG₆₀₀₀-Flu, Dark-field (1), bright-field(2) and overlap of the two fields (3), scale bar: 20 μ m

3 结论

GO-PEG 具有良好的水分散稳定性,与 PEG 的接枝量呈一定的正相关;GO-PEG 对 Flu 具有较高的负载能力,负载量受接枝量影响,其释放行为具有 pH 值触发释放性能;GO-PEG₆₀₀₀-Flu 作为一种荧光探针具有较好的细胞成像功能。

参考文献:

- [1] Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, et al. *Science*, **2004**,**306**(5696):666-669
- [2] Zhu Y W, Murali S, Cai W W, et al. *Adv. Mater.*, **2010**,**22**(35):3906-3924
- [3] Liu K P, Zhang J J, Cheng F F, et al. *J. Mater. Chem.*, **2011**,**21**(32):12034-12040
- [4] Depan D, Shah J, Misra R D K, et al. *Mater. Sci. Eng. C*, **2011**,**31**(7):1305-1312
- [5] Compton O C, Nguyen S T. *Small*, **2010**,**6**(6):711-723
- [6] Georgakilas V, Otyepka M, Bourlinos A B, et al. *Chem. Rev.*, **2012**,**112**(11):6156-6214
- [7] Shen H, Liu M, He H X, et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**,**4**(11):6317-6323
- [8] Sun X M, Liu Z, Welsher K, et al. *Nano Res.*, **2008**,**1**(3):203-212
- [9] Liu Z, Robinson J T, Sun X M, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**,**130**(33):10876-10877
- [10] Wang B Y, Guan X L, Hu Y L, et al. *J. Polym. Res.*, **2008**,**15**(6):427-433
- [11] Baskaran D, Mays J W, Zhang X P, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**,**127**(19):6916-6917
- [12] Treossi E, Melucci M, Liscio A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**,**131**(43):15576-15577
- [13] Liu Z, Sun X M, Nakayama-Ratchford N, et al. *ACS Nano*, **2007**,**1**(1):50-56
- [14] Li X Y, Huang X L, Liu D P, et al. *J. Phys. Chem. C*, **2011**,**115**(44):21567-21573
- [15] Lu C H, Yang H H, Zhu C L, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**,**48**(26):4785-4787
- [16] Peng C, Hu W B, Zhou Y T, et al. *Small*, **2010**,**6**(15):1686-1692
- [17] NIU Yu-Lian(牛玉莲), XIAO Xue-Qing(肖雪清), GU Zhi-Guo(顾志国), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2012**,**28**(4):751-756
- [18] WANG Kai(王凯), JI Bing-Cheng(季炳成), HAN Mei-Jia(韩美佳), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2013**,**29**(10):2105-2109
- [19] Stankovich S, Dikin D A, Piner R D, et al. *Carbon*, **2007**,**45**(7):1558-1565
- [20] Kudin K N, Ozbas B, Schniepp H C, et al. *Nano Lett.*, **2008**,**8**(1):36-41
- [21] Kan L Y, Xu Z, Gao C. *Macromol.*, **2011**,**44**(3):444-452
- [22] Stankovich S, Piner R D, Chen X Q, et al. *J. Mater. Chem.*, **2006**,**16**(2):155-158
- [23] Stankovich S, Dikin D A, Dommett G H B, et al. *Nature*, **2006**,**442**(7100):282-286
- [24] Yang X Y, Zhang X Y, Ma Y F, et al. *J. Mater. Chem.*, **2009**,**19**(18):2710-2714