评述

石墨烯和氧化石墨烯对细胞脂膜破坏作用研究[†]涂育松^①, 方海平^{②*}^① 扬州大学物理科学与技术学院, 扬州 225009;^② 中国科学院上海应用物理研究所, 水科学和技术研究室, 上海 201800

*联系人, E-mail: fanghaiping@sinap.ac.cn

[†]赵鸿编委约稿

收稿日期: 2015-08-24; 接受日期: 2015-10-19

国家自然科学基金(批准号: 11422542, 11290164)和中国科学院重点部署项目(编号: KJZD-EW-M03)资助

摘要 石墨烯作为一种新型材料不断受到关注, 如何与生物分子(如蛋白质、细胞脂膜等)发生作用是其生物相容性方面的重要问题之一. 石墨烯以 sp^2 杂化的碳为主的成键方式, 形成独特的二维结构, 具有显著的疏水特征. 细胞脂膜主要是由双亲的磷脂分子在水环境中自组装而成. 早期实验组观察到石墨烯的抗菌现象, 认为锋利的侧边可能会以类似于刀片的方式插入、切割细胞膜. 在理论上, 我们阐述了一种可能的石墨烯的细胞毒性的分子机理: 石墨烯不仅会通过主动插入、切割细胞脂膜, 而且会将大量的磷脂分子抽离细胞脂膜, 从而破坏细胞膜的完整性导致细胞死亡; 尽管氧化石墨烯表面分布着大量的亲水氧化基团, 但氧化基团高关联分布特点致使氧化石墨烯有着类似的破坏细胞脂膜的能力. 本文综述了石墨烯、氧化石墨烯纳米片与细胞脂膜相互作用的理论研究进展, 着重阐述石墨烯和氧化石墨烯从细胞脂膜中大量地抽取磷脂分子的过程以及在此过程中环境水分子所起的关键作用. 在石墨烯、氧化石墨烯和细胞脂膜的相互作用中所表现出的特点有可能是一种共性, 也会出现在其他疏水特性的纳米材料(如纳米碳管、碳纳米线和大面积的富勒烯等)与细胞脂膜的相互作用过程中.

关键词 石墨烯的毒性, 细胞脂膜自组装结构, 水分子, 亲水与疏水性, 分子动力学模拟

PACS: 81.05.ue, 87.16.dr, 64.75.Yz, 83.10.Rs

1 引言

纳米材料作为一种新型材料, 随着纳米科技的发展不断涌现出来, 与此同时, 它们在生物相容性方面的潜在风险也越来越多地受到关注^[1-7]. 探索各种纳米材料与生物分子的相互作用已成为重要课题之一, 包括基因传递^[8]、细胞成像^[9]、肿瘤治疗^[10]等方

面. 近期, 人们已经开展了大量的实验和理论工作, 包括纳米颗粒和生物分子(如蛋白质^[11,12]、细胞膜^[13-16])的相互作用^[1,17-20], 例如, 在蛋白质和疏水的纳米材料的相互作用等方面^[11,21-29]. 2010 年, 我们沿着这个方向发现, 碳纳米管可以插入到 WW 结构域(YAP65, YJQ8, PIN1 结构域)的疏水核心^[21], 从而阻止原配体与此关键残基结合^[30]; 我们还发现疏水

引用格式: 涂育松, 方海平. 石墨烯和氧化石墨烯对细胞脂膜破坏作用研究. 中国科学: 物理学 力学 天文学, 2016, 46: 060501

Tu Y S, Fang H P. Destructive extraction of phospholipids from cell membranes by graphene and graphene oxide nanosheets (in Chinese). Sci Sin-Phys Mech Astron, 2016, 46: 060501, doi: 10.1360/SSPMA2015-00428

的气体分子集聚体也可以很强地吸附到 SH3 域 (Src-Homology 3 结构域) 的活性位点上, 导致 SH3 丧失相应生物活性, 然而分散的气体分子与 SH3 域并没有表现出显著的作用效应^[22].

从生物效应上说, 纳米材料要进入细胞, 首先要接触到细胞膜. 与蛋白质不同, 细胞膜是由双亲磷脂分子自组装而成的双层脂膜, 主要作用是保护细胞免受周围环境的破坏. 近年来, 在这种自组装的结构与纳米颗粒之间的相互作用, 已引起了人们的广泛兴趣, 主要工作包括细胞脂膜与零维(0D)的富勒烯^[31-33]、一维(1D)的纳米管^[15,34-38]和纳米线^[16]的相互作用的研究, 聚焦在这些纳米材料穿透双层脂膜的行为等方面^[15,16,35,38,39].

石墨烯是一种单原子厚度的二维的(2D)纳米材料, 具有独特的结构和力学、电学等方面的性质, 被认为具有广泛的应用前景^[40-42], 包括超快纳米电子器件^[43,44]、单分子探测器^[45]、超级电容器^[46]以及光电电子器件^[47]等方面. 举例来说, 石墨烯具有高比表面积, 在生物功能相关的纳米技术应用领域的研究中具有重要优势, 如基于纳米技术的药物输运^[48-51]; 石墨烯拥有光滑、连续的二维结构和生物阻抗性, 在异物诱导的癌变和肿瘤生长的研究中发挥独特作用^[52,53]. 事实上, 在石墨烯和氧化石墨烯的生物安全性方面, 安全、抑或存在潜在毒性, 已成为一个争论的热点问题^[17,49,50,54-58].

实验上, 石墨烯和氧化石墨烯的纳米片已经显现出很强的抗菌能力^[59-63], 包括对革兰氏阴性、阳性菌都具有很强的细胞毒性^[59-61]. 实验结果暗示石墨烯和氧化石墨烯的纳米片的细胞毒性可能来自于物理接触, 推测其锋利的侧边可能会造成细胞膜的严重损坏, 也就是说, 石墨烯的高比表面积和光滑、连续的表面形貌, 在与细胞膜的相互作用过程中可能会给细胞膜带来严重的破坏^[59-61]. 初步研究表明, 由磷脂分子包裹的石墨烯纳米片可以与细胞膜发生融合, 而停留在双层脂膜内的疏水区域^[64], 进一步工作还包括研究石墨烯的纳米片穿过细胞脂膜时的跨膜行为的研究^[14,65,66].

在我们的前期工作中, 通过大量的分子动力学模拟(分子动力学已作为研究分子原子尺度问题的重要工具之一被广泛应用^[67-71]), 发现石墨烯不仅会通过主动插入、切割细胞膜, 而且会将大量的磷脂分子抽离细胞脂膜^[13,14]. 本文综述了石墨烯、氧化石墨烯

的纳米片与细胞脂膜相互作用的理论研究进展, 在全原子的分子动力学模拟结果的基础上, 着重阐述在石墨烯与细胞脂膜的相互作用过程中环境水分子的关键作用.

2 石墨烯与双层脂膜的相互作用

虽然细胞脂膜的厚度只有几纳米, 但在阻断细胞内、外界环境上起着至关重要的作用. 细胞脂膜通常是由磷脂分子自组装而成的双层脂膜, 磷脂的亲水头部朝外与水接触, 两个疏水尾链指向脂膜内部. 石墨烯是由 sp^2 杂化的碳原子排列成的蜂窝状的二维晶格结构^[44,72,73], 主要表现疏水特征, 但经氧化后的石墨烯表面同时分布有大量的亲水基团. 在石墨烯、氧化石墨烯与细胞脂膜之间, 存在着十分独特的相互作用过程.

最近, 为了弄清楚石墨烯、氧化石墨烯具有很强抗菌能力的原因, 即石墨烯、氧化石墨烯如何破坏细胞膜, 我们基于全原子分子动力学模拟方法研究了石墨烯、氧化石墨烯与细胞脂膜之间相互作用, 发现石墨烯可以插入、切割细菌的细胞脂膜, 并大量地将磷脂分子抽离双层脂膜, 从而阐述了一种可能的石墨烯的细胞毒性的分子机理^[13]. 在我们的全原子模拟中, 采用了纯 POPE 脂膜(Palmitoyl-oleoyl-conjugated Phosphatidylethanolamine), 模拟大肠杆菌细胞(革兰氏阴性脂膜)的外膜, 和采用 3:1 的 POPE 和 POPG (Palmitoyl-oleoyl-conjugated Phosphatidylglycerol)混合脂膜, 模拟大肠杆菌细胞的内膜. 在同期发表的一篇文章中^[14], 布朗大学 Gao 课题组^[14]采用微米尺度的更大石墨烯片层, 片层厚度保持在单原子级别, 并通过全原子和粗粒化的动力学模拟与模型分析, 也预言了石墨烯片层会表现出插入、切割细胞脂膜的行为, 同时他们也在实验上采用共焦荧光成像和电子显微镜成像的方法在哺乳动物细胞上直接观察到石墨烯插入细胞脂膜表面的现象.

石墨烯在与不同类型的双层脂膜发生作用的过程中, 并没有表现出特异性. 除 POPE 脂膜和 POPE-POPG 混合脂膜之外, 还在其他类型脂膜中, 如 DMPC, DPPC 和 DOPC (Dimyristoyl-, Dipalmitoyl-, Dioleoyl-conjugated Phosphatidylcholines), 同样观察到石墨烯插入细胞脂膜和抽取磷脂分子的现象. 图 1 给出了两个典型的分子动力学过程, 展示了石墨烯

图 1 (网络版彩图)两个典型的动力学轨迹显示石墨烯纳米片插入 DMPC 双层脂膜并从中抽取磷脂分子过程. 两行图片分别显示了两个轨迹的 4 个不同时刻, 每幅图右下角标有相应时间. 磷脂分子疏水尾链表示为棕褐色线, 采用彩色球表示磷脂分子的亲水带电原子(氢, 白色; 氧, 红色; 氮, 深蓝色; 碳, 青绿色; 磷, 橙色), 石墨烯用黄色晶格片层表示, 其中角上一个大黄色球为在模拟中位置受约束的原子, 被抽离的磷脂分子更清楚地用大球展示出来, 水分子用紫色线表示

Figure 1 (Color online) Two representative simulated trajectories of graphene nanosheet insertion and lipid extraction in the lipid membrane (DMPC). The snapshot times are shown in the top left corners, for both trajectories. The phospholipids are shown in tan lines with hydrophilic charged atoms as colored spheres (hydrogen, white; oxygen, red; nitrogen, dark blue; carbon, cyan; phosphorus, orange), the graphene sheet is shown as a yellow-bonded sheet with a large sphere marked at one corner as the restrained atom in simulations, extracted phospholipids are shown as larger spheres, and water is shown in violet.

纳米片插入 DMPC 双层脂膜并从中抽取磷脂分子的行为. 与文献[13]类似, 此处仍然观察到 3 种不同的运动模式: 游离、插入和抽取模式. 在游离模式中, 石墨烯纳米片层绕着受约束位置自由转动, 持续了几十纳秒后, 尾端会贴在双层脂膜上, 从而进入快速插入模式; 石墨烯纳米片层的尾端一旦开始插入脂膜里面, 仅仅几纳秒后, 石墨烯纳米片便快速插入到脂膜里面; 在随后的抽取模式中, 石墨烯纳米片从双层脂膜中大量地抽取磷脂分子, 从而严重破坏了双层脂膜的结构.

前期, 采用粗粒化模型的研究也发现由磷脂分子包裹的石墨烯纳米片可以与细胞膜发生融合而停留在膜内的疏水区域^[64]. 后来, 石墨烯插入或穿透细胞脂膜的行为也被进一步研究, 但在粗粒化模型的模拟中并没有观察到磷脂分子被抽离的现象^[14,65,66]. 原因可能在于粗粒化模型低估了水分子的作用, 其

中, 4 个或多个水分子通常在模型粗粒化的过程中被简化成一个小球.

接下来, 我们讨论水分子在石墨烯与细胞脂膜的相互作用过程中的作用. 众所周知, 磷脂分子在水环境中会不断自组装自身结构, 也就是说亲水头部通过静电作用相互吸引堆砌在一起, 并和周围的水分子形成氢键, 疏水尾链部分则将水分子排出, 从而形成双层脂膜的结构. 我们将石墨烯纳米片悬停于双层脂膜的表面, 执行分子动力学模拟计算(图 2), 在模拟中, 整个石墨烯纳米片的位置被约束, 片层平面方向与双层脂膜保持垂直, 一端刚好接触到脂膜的表面; 该约束条件下的相互作用形式导致石墨烯从脂膜中抽取磷脂分子变得更加困难. 从图 2 中可以看出, 尽管石墨烯本身的柔性以及位置都被加以限制, 仍然可以从双层脂膜结构中大量抽取磷脂分子. 在初期的 57 ns 内, 因为出现悬停的石墨烯, 双层脂

图 2 (网络版彩图)受约束石墨烯纳米片悬停在 POPE 双层脂膜表面,在水分子的帮助下抽取磷脂分子的过程. 每幅图左上角标出了相应时间,颜色设置与图 1 保持一致,采用彩色球显示与第一个被抽离的磷脂分子形成氢键的水分子

Figure 2 (Color online) A representative trajectory of the phospholipid extraction by a fully restrained graphene nanosheet docked at the membrane surface (POPE) with assistance from hydrogen-bonding interactions. The snapshot times are shown in the top left corners, the color settings are the same as in Figure 1, and the water molecules that are hydrogen-bonded with the first-extracted phospholipid are shown in large, red-and-white spheres for clarity.

膜显示出一些适应性的结构变化;之后,在石墨烯悬停位置附近的磷脂分子试图沿着石墨烯表面爬升;此后的几十纳秒内,在与水分子的氢键相互作用的帮助下,第一个磷脂分子的亲水头部突破亲水头部之间的堆砌结构探入水中,随后其疏水尾链爬上石墨烯的表面;最后,许多邻近磷脂分子也加入进来,表现出一种集体的攀爬行为。

在石墨烯与细胞脂膜的相互作用过程中,水分子作用表现得十分微妙.图 3(a)显示了第一个被抽离的磷脂分子与水、与石墨烯纳米片以及与脂膜上的其他磷脂分子之间的相互作用能量,还同步给出第一个被抽离的磷脂分子的质心与脂膜质心的相对垂直距离的随时间变化关系.在 57 ns 左右,开始抽出第一个磷脂分子,被抽离双层脂膜的时间大约是在 70 ns,紧跟着许多磷脂分子也被不断抽离出来.从相互作用能量的角度来看,在图 3(a)中的灰色区域,即在第

一个磷脂分子被抽出之前,这个磷脂分子与其他磷脂分子之间的相互作用能量一直维持在 -800 kJ/mol 左右,它主要来自堆砌在一起的磷脂亲水头部之间的静电作用,磷脂分子必须突破这个强相互作用的约束才可能被抽离双层脂膜.十分有趣,在抽离过程中(图 3(a)浅蓝色区域),磷脂分子之间的强相互作用可以被磷脂分子与水分子之间的氢键作用补偿抵消.在灰色区域内,这两条能量曲线同步且互补性地涨落波动,在浅蓝色区域,磷脂分子之间能量骤然减弱而与水分子之间的能量突然增强,之后被抽离的磷脂分子与水分子之间相互作用的能量值一直保持稳定,并通过绿色区域.可以看出,磷脂分子在水分子氢键的帮助下才能突破堆砌在一起的亲水头部之间的相互吸引作用,其亲水头部伸出,之后其疏水尾链顺着石墨烯疏水表面实现不断攀爬.从质心变化的轨迹来看,也可细致地观察磷脂分子被抽离的过程.图 3(b)给出了被抽离的磷脂分子的亲水头部在石墨烯纳米片上的指向角度分布(ϕ_{head}).角度分布出现两个峰值,第一个峰出现在 $\phi_{\text{head}}=15^\circ$ 附近,表明在石墨烯纳米片中部区域的磷脂分子倾向于将亲水头部抬起来探入水中,第二个峰出现在 $\phi_{\text{head}}=90^\circ$ 附近,表明在石墨烯纳米片边缘区域的磷脂分子倾向于将亲水头部平行于石墨烯平面的方向伸入到水中。

上述过程表明石墨烯从双层脂膜中抽取磷脂分子的过程并不是简单的疏水相互作用造成的.水分子积极参与抽取磷脂分子的过程,通过与磷脂分子亲水头部形成氢键,补偿堆砌在一起的磷脂分子之间的静电相互吸引作用,致使磷脂分子能突破双层脂膜的亲水头部区域,再由疏水尾链沿石墨烯疏水表面爬出双层脂膜.此过程正印证了 Ball^[74]的评论:“水分子不仅仅作为简单的‘生命溶剂’,而是会以复杂、微妙的形式本质性地主动参与生物分子发生作用的分子”.因此,石墨烯纳米片与磷脂尾链的相互作用,主要是石墨烯表面给磷脂分子的攀爬提供了一个疏水的轨道,对比磷脂分子之间以及磷脂分子与水分子之间的静电相互作用,石墨烯与磷脂分子之间的直接相互作用显然要弱很多。

进一步,我们调节石墨烯碳原子的范德华势阱(ϵ_{CC})后重新执行计算,模拟结果证实了石墨烯抽取磷脂分子过程的鲁棒性.在模拟中,采用上述同样方法约束石墨烯纳米片,使其悬停在了双层脂膜的表面,但采用了不同的势阱深度 ϵ'_{CC} (ϵ_{CC} 分别乘以 1/8,

图3 (网络版彩图)在石墨烯抽取磷脂分子过程中的能量变化曲线(数据来自于图2的轨迹), 以及被抽取的磷脂分子亲水头部在石墨烯纳米片上的指向角度分布. (a) 第一个被抽离的磷脂分子分别与水分(黑线)、与石墨烯(红线)与双层脂膜中其他磷脂分子(紫线)的相互作用能(E , 对应于左边纵轴), 以及第一个被抽离的磷脂分子质心到脂膜表面的相对垂直距离(蓝线, r , 对应于右边纵轴); (b) 被抽离的磷脂分子的亲水头部在石墨烯纳米片上的指向角度分布(ϕ_{head}). 左下角插图给出 ϕ_{head} 定义: $\mathbf{n}$ 表示石墨烯纳米片的法线方向, $\mathbf{r}_{\text{head}}$ 表示从磷脂分子亲水头部的磷原子指向氮原子的向量, ϕ_{head} 为两个向量的夹角. 右边插图显示箭头所指峰值对应角度的磷脂分子亲水头部取向构型. 色彩设置与图2保持一致

Figure 3 (Color online) Energy profiles calculated for the representative trajectory shown in Figure 2, together with the distribution of phospholipid head orientations angles (ϕ_{head}) on the graphene nanosheet. (a) Interaction energies (E) of the first-extracted phospholipid with water (black line), with graphene (red), and with the other phospholipids in the lipid membrane (violet), (corresponding to the left Y-axis in black), together with the displacement of the center of mass (COM) of this first-extracted phospholipid, along the normal direction to the membrane surface, r (blue, corresponding to the right Y-axis in blue); (b) distribution of phospholipid head orientations angles (ϕ_{head}) on the graphene nanosheet. The ϕ_{head} angle is defined in the left-bottom inset, where $\mathbf{n}$ is normal to the graphene surface, $\mathbf{r}_{\text{head}}$ is the vector from the phosphorus (P) atom to the nitrogen (N) atom in a hydrophilic head, and ϕ_{head} is the angle between these two vectors. The right insets on the graph show representative structures that correspond to the indicated (arrows) peaks in the curve; the colors of atoms in the phospholipid are the same as in Figure 2.

1/6, 1/4, 1/2, 1, 2 和 4), 所有模拟都运行了 250 ns, 最后的 50 ns 用于计算平均相互作用能. 图 4 显示了在不同的势阱深度 ε'_{CC} 下石墨烯纳米片与双层脂膜(纯 POPE)之间的相互作用能. 从中可以看出 ε'_{CC} 分成了两个区域, 右边是相互作用能的一个快速下降区域, 表明磷脂分子被从双层脂膜中抽离出来并吸附在石墨烯纳米片上, 左边呈现一个能量值相对高且稳定的区域, 表明磷脂分子并没有被抽离出来, 即, 当 $\varepsilon'_{\text{CC}} > 1/4 \varepsilon_{\text{CC}}$ 时石墨烯纳米片是可以将磷脂分子抽离出来的. 这一结果证实正常情况下石墨烯纳米片抽取磷脂分子行为的鲁棒性.

事实上, 抽取磷脂分子行为的鲁棒性同样反映了水分子在石墨烯抽取磷脂分子过程中的重要作用. 在较大的 ε'_{CC} 变化范围内, 石墨烯都可实现抽取磷脂分子, 这表明石墨烯纳米片的主要贡献在于提供了一个疏水的轨道, 而水分子和被抽离的磷脂分子间的氢键在抽离的初始阶段具有决定性的作用. 这个氢键作用使得磷脂分子可以克服堆砌在一起的磷脂上亲水头部之间的吸引作用, 在突破了双层脂膜的亲头部区域之后, 才可以沿着石墨烯纳米片提供的疏水轨道攀爬. 因此, 水在磷脂抽取过程中提供

图4 (网络版彩图)石墨烯纳米片与双层脂膜的相互作用能与石墨烯中碳原子的不同范德华势阱深度(ε'_{CC})的依赖关系. 两种不同背景条纹(红色和绿色)分别标记两个截然不同的区域: $\varepsilon'_{\text{CC}} \leq 1/4 \varepsilon_{\text{CC}}$ (左边, 红色), $\varepsilon'_{\text{CC}} > 1/4 \varepsilon_{\text{CC}}$ (右边, 绿色), 对应着可抽取磷脂分子区域和不可抽取区域. 图片来自于文献[13]

Figure 4 (Color online) Dependence of the average interaction energy between the lipid membrane and the fully restrained graphene nanosheet docked at the membrane surface on different well-depth potentials, ε'_{CC} . The two different background patterns (red and green) indicate two distinct regions; one is $\varepsilon'_{\text{CC}} \leq 1/4 \varepsilon_{\text{CC}}$ (left, red) and the other is $\varepsilon'_{\text{CC}} > 1/4 \varepsilon_{\text{CC}}$ (right, green). Reproduced with permission [13], 2013, copyright Nature Nanotechnology.

了初始的“抽取力”。

3 氧化石墨烯与双层脂膜的相互作用

氧化石墨烯相比原生态石墨烯具有更好的水溶性, 在细胞毒性和生物医学应用上存在着许多应用^[50,56,58,75]。那么自然会有一个问题, 氧化石墨烯是否与石墨烯一样具有抽取磷脂分子的能力? 众所周知, 氧化石墨烯表面分布着各种氧化基团, 它们是在石墨烯的氧化过程中产生的^[75,76]。传统观点认为, 氧化基团在石墨烯上通常是随机分布的, 这些亲水氧化基团可能致使氧化石墨烯片丧失原有的疏水特性。最近, 我们证明这种分布并不是随机的而是高度相关的, 也正因为此, 在氧化石墨烯上会同时存在大片的未氧化区域和氧化区域^[77]。图 5(a)给出一个 10 nm×10 nm 的氧化石墨烯纳米片, 显示氧化石墨烯上的氧化基团的典型分布情况。最近的各种实验, 如固态 ¹³C 核磁共振谱^[81]、透射电子显微镜^[76,82–85]、中子衍射^[86]、X 射线吸收光谱^[87]和扫描隧道显微镜^[88], 都报道了氧化石墨烯上存在一些大的、未氧化的类似石墨烯的区域^[81,83–86,88,89]。为此, 根据氧化位点之间的相关性, 我们人为构造了一个氧化石墨烯纳米片(图 5(b)), 并应用分子动力学模拟计算, 检验氧化石墨烯从双层脂膜中抽取磷脂分子的能力。图 6 给出了氧化石墨烯纳米片与 POPE 膜相互作用过程的分子动力学轨迹, 结果与原始的石墨烯抽取磷脂膜的行为类似。首先, 氧化石墨烯纳米片悬停于双层脂膜表面, 双层脂膜出现一些适应性的结构变化, 之后, 悬停位置附近一些磷脂分子突破脂膜的磷脂分子亲水头部区域, 并沿着氧化石墨烯表面向上爬升, 在几百纳秒内, 许多其他的磷脂分子也被抽离爬上了氧化石墨烯纳米片。在图 6 中, 可以观察到磷脂分子的疏水尾链倾向在未氧化的疏水区域铺展, 而亲水头部由于静电作用倾向于会与氧化石墨烯上的氧化基团和水分子接触。

与石墨烯比较而言, 氧化石墨烯也具有类似地从双层脂膜中抽取磷脂分子的能力, 分子模拟结果也表明它们之间的明显不同之处。主要区别在于在氧化石墨烯上的氧化基团与磷脂亲水头之间存在静电相互作用, 这些静电作用会干扰从双层脂膜中抽取磷脂分子的过程。氧化石墨烯的氧化基团(羟基和环氧)本身的极化电量相比水分子而言要小一些, 因此它们与磷脂分子的相互作用也较弱, 依据估算, 磷

图 5 (网络版彩图)氧化石墨烯上的氧化基团分布情况。(a) 约 20%碳原子的氧化比例的氧化石墨烯纳米片(10 nm×10 nm)。氧化过程依据局域芳香烃结构(芘)的 52 条反应路径(从密度泛函理论计算中获得^[77])展开。边缘羧基基团被忽略, 氧化程度可表示为分子式 $C_{10}O_1(OH)_1$ ^[78–80], 虚线大致标明了未氧化的完整地 sp^2 碳原子区域; (b) 依据氧化位点的高相关性(如图 5(a)), 人为构造出氧化石墨烯纳米片(7.62 nm×3.69 nm), 其氧化程度表示成分子式 $C_{10}O_1(OH)_1(COOH)_{0.5}$ 。未氧化的碳原子用黄色键表示, 羟基和环氧基的氧原子用红球表示, 氢原子用灰球表示, 羧基的碳原子被显示成青绿色球

Figure 5 (Color online) Oxidation patterns in graphene oxide nanosheets. (a) Graphene oxide nanosheet was obtained with a degree of oxidation (~20%) of a pristine graphene 10 nm×10 nm sheet. This oxidation process was implemented with 52 oxidation-reaction paths with local pyrene structures (identified with calculations based on density functional theory) [77] and it followed the degree of oxidation dictated by a molecular formula, $C_{10}O_1(OH)_1$, when elements of carboxyl groups were omitted on the graphene edges [78–80]. The dashed lines enclose patches with residual intact sp^2 domains. (b) A 7.62 nm×3.69 nm graphene oxide nanosheet, with a distribution of oxidized groups ($C_{10}O_1(OH)_1(COOH)_{0.5}$), artificially constructed assuming a similarly high correlation between oxidation loci in Figure 5(a). The unoxidized carbon atoms are shown as yellow bonds, the oxygen atoms, as red spheres, the hydrogen atoms, as grey spheres, and the carbon atoms of carboxyl groups, as cyan spheres.

脂分子与环氧、羟基、水之间的相互作用能分别为-23, -37 和-44 kJ/mol。比较这些能量来看, 氧化石墨烯上的未氧化区域从双层脂膜中抽取磷脂分子的行为不会从根本上改变, 但疏水区域周围的氧化基团对磷脂分子在这些区域的攀爬速度有明显的影响。在模拟中, 这些氧化基团致使氧化石墨烯对磷脂分子抽取速度比原始石墨烯慢了 4–5 倍, 但是两者的速率都仍然在微纳秒的时间尺度内。

4 总结和展望

本文综述了石墨烯、氧化石墨烯与细胞脂膜相互

图 6 (网络版彩图)受约束氧化石墨烯纳米片悬停在 POPE 双层脂膜表面,典型的动力学轨迹显示大量磷脂分子被从双层脂膜中抽离的过程. 每幅图左上角标出了相应的时间,脂膜颜色设置与图 1 保持一致,氧化石墨烯的颜色设置与图 5 一致,为了清楚起见并没有显示水分子. 最后的第 281 ns 图片重新以两个额外角度显示: 从图 6(f)图逆时针旋转 90° 为图 6(g), 旋转 -90° 为图 6(h)

Figure 6 (Color online) A representative trajectory (Figures 6(a)–(f)) of the phospholipids extraction by a fully restrained graphene oxide nanosheet docked at the membrane surface (POPE), with the last snapshot shown in more view angles (Figures 6(g) and (h), rotated anticlockwise by angle, 90° , -90° , from the view of f to obtain the current view). The snapshot times are shown in the top left corners. Colors indicate different molecules, as described in Figure 1, but water is omitted for clarity.

作用的理论研究进展,着重阐述了在石墨烯、氧化石墨烯与细胞脂膜的相互作用过程中环境水分子的关键作用. 石墨烯、氧化石墨烯纳米片插入细胞脂膜,并从中抽取磷脂分子,此行为并不限于特定类型的细胞脂膜,在与各种类型的脂膜的相互作用中也观察到类似的行为,包括 POPE, POPE-POPG 混合膜,

DMPC, DPPC 和 DOPC 等脂膜.

我们详细讨论了磷脂分子抽离双层脂膜的过程,发现水分子积极参与石墨烯和氧化石墨烯从双层脂膜中抽取磷脂分子的相互作用过程. 水分子会与磷脂分子亲水头部形成氢键,补偿磷脂分子之间的堆砌的静电相互吸引作用,在这个氢键的帮助下,磷脂分子才能突破双层脂膜的亲水头部区域,之后疏水尾链沿石墨烯疏水表面攀爬,最终导致磷脂分子被双层脂膜中抽离出来. 被抽出的磷脂疏水尾链沿着石墨烯纳米片提供的疏水轨道上攀爬,就像是“一条蠕虫抬着头往公路上爬行”. 氧化石墨烯也具有类似的从双层脂膜中抽取磷脂分子的能力,主要原因在于在氧化的过程中氧化位点间存在着高度相关性,导致氧化石墨烯上留下的大量的未氧化的区域^[77],这些未氧化区域仍然为磷脂疏水尾链的攀爬行为提供的疏水轨道,但所产生的氧化基团会降低磷脂分子在氧化石墨烯上的移动速率.

模拟结果表明水分子积极参与了石墨烯、氧化石墨烯与细胞脂膜的相互作用过程. 我们相信如此相互作用模式不是石墨烯、氧化石墨烯所特有的,应该在具有疏水特性的纳米材料与细胞脂膜的作用过程中普遍存在. 实际上,两个较早的研究碳纳米管渗透到细胞膜的模拟也发现了类似的磷脂抽取行为^[35,38]. 另一方面,细胞脂膜提供了生物膜的主要框架结构,生物膜上还同时包含如胆固醇、蛋白等成分,其主要依附于脂膜框架并对生物膜的性质有着重要的影响. 当前理论计算主要围绕着纯脂膜来展开,这有利于理解生物膜的基本性质,而在这些脂膜中进一步考虑胆固醇以及各种蛋白质结构,可反映更为真实的生物膜性质,就其与石墨烯及氧化石墨烯之间的相互作用方面,包括相关的胆固醇生物效应等问题,同样非常值得进一步展开深入研究.

致谢 本文作者感谢美国 IBM Watson 研究院的周如鸿教授、中国科学院上海应用物理研究所的黄庆教授、石国升博士、杨金荣博士、张萌博士、吕敏博士和浙江大学的修鹏博士等的非常有益的帮助和讨论.

参考文献

- 1 Song B, Sun Q, Li H, et al. Irreversible denaturation of proteins through aluminum-induced formation of backbone ring structure. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 6358–6363
- 2 Langer R, Tirrell D A. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 2004, 428: 487–492

- 3 Service R F. Nanotechnology takes aim at cancer. *Science*, 2005, 310: 1132–1134
- 4 Zhao Y, Xing G, Chai Z. Nanotoxicology: Are carbon nanotubes safe? *Nat Nanotechnol*, 2008, 3: 191–192
- 5 Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater*, 2009, 8: 15–23
- 6 Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 2008, 4: 26–49
- 7 Zhu Y, Zhang Y, Shi G, et al. Nanodiamonds act as Trojan horse for intracellular delivery of metal ions to trigger cytotoxicity. *Part Fibre Toxicol*, 2015, 12: 2
- 8 Rosi N L, Giljohann D A, Thaxton C S, et al. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science*, 2006, 312: 1027–1030
- 9 Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, et al. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science*, 2005, 307: 538–544
- 10 Grossman J H, McNeil S E. Nanotechnology in cancer medicine. *Phys Tod*, 2012, 65: 38–42
- 11 Ge C, Du J, Zhao L, et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 16968–16973
- 12 Kang S-G, Zhou G, Yang P, et al. Molecular mechanism of pancreatic tumor metastasis inhibition by $\text{Gd@C}_{82}(\text{OH})_{22}$ and its implication for *de novo* design of nanomedicine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 15431–15436
- 13 Tu Y, Lv M, Xiu P, et al. Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets. *Nat Nanotechnol*, 2013, 8: 594–601
- 14 Li Y, Yuan H, Von Dem Bussche A, et al. Graphene microsheets enter cells through spontaneous membrane penetration at edge asperities and corner sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12295–12300
- 15 Shi X, Von Dem Bussche A, Hurt R H, et al. Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6: 714–719
- 16 Yang K, Ma Y Q. Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5: 579–583
- 17 Kostarelos K, Novoselov K S. Exploring the interface of graphene and biology. *Science*, 2014, 344: 261–263
- 18 Nel A E, Madler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*, 2009, 8: 543–557
- 19 Nel A, Xia T, Mädler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 2006, 311: 622–627
- 20 Albanese A, Tang P S, Chan W C W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng*, 2012, 14: 1–16
- 21 Zuo G, Huang Q, Wei G, et al. Plugging into proteins: Poisoning protein function by a hydrophobic nanoparticle. *ACS Nano*, 2010, 4: 7508–7514
- 22 Zhang M, Zuo G, Chen J, et al. Aggregated gas molecules: Toxic to protein? *Sci Rep*, 2013, 3: 1660
- 23 Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi M R, et al. Protein-nanoparticle interactions: Opportunities and challenges. *Chem Rev*, 2011, 111: 5610–5637
- 24 Brown S, Jespersen T S, Nygård J. A genetic analysis of carbon-nanotube-binding proteins. *Small*, 2008, 4: 416–420
- 25 Lynch I, Dawson K A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Tod*, 2008, 3: 40–47
- 26 Cedervall T, Lynch I, Foy M, et al. Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 5754–5756
- 27 Lindman S, Lynch I, Thulin E, et al. Systematic investigation of the thermodynamics of HSA adsorption to N-iso-propylacrylamide/N-tert-butylacrylamide copolymer nanoparticles. Effects of particle size and hydrophobicity. *Nano Lett*, 2007, 7: 914–920
- 28 Gao H, Kong Y. Simulation of DNA-nanotube interactions. *Annu Rev Mater Res*, 2004, 34: 123–150
- 29 Wang S, Humphreys E S, Chung S Y, et al. Peptides with selective affinity for carbon nanotubes. *Nat Mater*, 2003, 2: 196–200
- 30 Zuo G, Gu W, Fang H, et al. Carbon nanotube wins the competitive binding over proline-rich motif ligand on SH3 domain. *J Phys Chem C*, 2011, 115: 12322–12328
- 31 Barnoud J, Rossi G, Monticelli L. Lipid Membranes as solvents for carbon nanoparticles. *Phys Rev Lett*, 2014, 112: 068102
- 32 Wong-Ekkabut J, Baoukina S, Triampo W, et al. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. *Nat Nanotechnol*, 2008, 3: 363–368
- 33 Qiao R, Roberts A P, Mount A S, et al. Translocation of C_{60} and its derivatives across a lipid bilayer. *Nano Lett*, 2007, 7: 614–619
- 34 Poland C A, Duffin R, Kinloch I, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol*, 2008, 3: 423–428
- 35 Skandani A A, Zeineldin R, Al-Haik M. Effect of chirality and length on the penetrability of single-walled carbon nanotubes into lipid

- bilayer cell membranes. *Langmuir*, 2012, 28: 7872–7879
- 36 Lelimosin M, Sansom M S P. Membrane perturbation by carbon nanotube insertion: Pathways to internalization. *Small*, 2013, 9: 3639–3646
- 37 Zhang Y, Ali S F, Dervishi E, et al. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano*, 2010, 4: 3181–3186
- 38 Wallace E J, Sansom M S P. Blocking of carbon nanotube based nanoinjectors by lipids: A simulation study. *Nano Lett*, 2008, 8: 2751–2756
- 39 Gao H. Probing mechanical principles of cell-nanomaterial interactions. *J Mech Phys Solids*, 2014, 62: 312–339
- 40 Novoselov K S, Falko V I, Colombo L, et al. A roadmap for graphene⁷. *Nature*, 2012, 4907: 192–200
- 41 Zhu Y, Murali S, Cai W, et al. Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications. *Adv Mater*, 2010, 22: 3906–3924
- 42 Huang X, Yin Z, Wu S, et al. Graphene-based materials: Synthesis, characterization, properties, and applications. *Small*, 2011, 7: 1876–1902
- 43 Novoselov K S, Jiang D, Schedin F, et al. Two-dimensional atomic crystals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 10451–10453
- 44 Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, et al. Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene. *Nature*, 2005, 438: 197–200
- 45 Schedin F, Geim A K, Morozov S V, et al. Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene. *Nat Mater*, 2007, 6: 652–655
- 46 Zhu Y, Murali S, Stoller M D, et al. Carbon-based supercapacitors produced by activation of graphene. *Science*, 2011, 332: 1537–1541
- 47 Bonaccorso F, Sun Z, Hasan T, et al. Graphene photonics and optoelectronics. *Nat Photon*, 2010, 4: 611–622
- 48 Liu Z, Robinson J T, Sun X, et al. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 10876–10877
- 49 Feng L, Liu Z. Graphene in biomedicine: Opportunities and challenges. *Nanomedicine*, 2011, 6: 317–324
- 50 Sanchez V C, Jachak A, Hurt R H, et al. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: An interdisciplinary review. *Chem Res Toxicol*, 2011, 25: 15–34
- 51 Zhang L, Xia J, Zhao Q, et al. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small*, 2010, 6: 537–544
- 52 Okada F. Beyond foreign-body-induced carcinogenesis: Impact of reactive oxygen species derived from inflammatory cells in tumorigenic conversion and tumor progression. *Int J Cancer*, 2007, 121: 2364–2372
- 53 Soldano C, Mahmood A, Dujardin E. Production, properties and potential of graphene. *Carbon*, 2010, 48: 2127–2150
- 54 Bianco A. Graphene: Safe or toxic? The two faces of the medal. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 4986–4997
- 55 Perreault F, Tousley M E, Elimelech M. Thin-film composite polyamide membranes functionalized with biocidal graphene oxide nanosheets. *Environ Sci Technol Lett*, 2013, 1: 71–76
- 56 Seabra A B, Paula A J, De Lima R, et al. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27: 159–168
- 57 Geim A K. Graphene: Status and prospects. *Science*, 2009, 324: 1530–1534
- 58 Yang K, Li Y, Tan X, et al. Behavior and toxicity of graphene and its functionalized derivatives in biological systems. *Small*, 2013, 9: 1492–1503
- 59 Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano*, 2010, 4: 5731–5736
- 60 Hu W, Peng C, Luo W, et al. Graphene-based antibacterial paper. *ACS Nano*, 2010, 4: 4317–4323
- 61 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. *ACS Nano*, 2011, 5: 6971–6980
- 62 Krishnamoorthy K, Veerapandian M, Zhang L H, et al. Antibacterial efficiency of graphene nanosheets against pathogenic bacteria via lipid peroxidation. *J Phys Chem C*, 2012, 116: 17280–17287
- 63 Liu S, Hu M, Zeng T H, et al. Lateral dimension-dependent antibacterial activity of graphene oxide sheets. *Langmuir*, 2012, 28: 12364–12372
- 64 Titov A V, Král P, Pearson R. Sandwiched graphene—Membrane superstructures. *ACS Nano*, 2009, 4: 229–234
- 65 Guo R, Mao J, Yan L T. Computer simulation of cell entry of graphene nanosheet. *Biomaterials*, 2013, 34: 4296–4301
- 66 Dallavalle M, Calvaresi M, Bottoni A, et al. Graphene can wreak havoc with cell membranes. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 4406–4414
- 67 Zhao L, Wang C, Liu J, et al. Reversible state transition in nanoconfined aqueous solutions. *Phys Rev Lett*, 2014, 112: 078301
- 68 Wan R, Hu J, Fang H. Asymmetric transportation induced by thermal noise at the nanoscale. *Sci China-Phys Mech Astron*, 2012, 55: 751–756

- 69 Sheng N, Tu Y, Guo P, et al. Asymmetrical free diffusion with orientation-dependence of molecules in finite timescales. *Sci China-Phys Mech Astron*, 2013, 56: 1047–1052
- 70 Wang C, Yang Y, Fang H. Recent advances on “ordered water monolayer that does not completely wet water” at room temperature. *Sci China-Phys Mech Astron*, 2014, 57: 802–809
- 71 Wan R, Fang H. Biased transportations in a spatially asymmetric system at the nano-scale under thermal noise. *Sci China-Phys Mech Astron*, 2010, 53: 1565–1567
- 72 Zhang Y, Tan Y W, Stormer H L, et al. Experimental observation of the quantum Hall effect and Berry’s phase in graphene. *Nature*, 2005, 438: 201–204
- 73 Novoselov K, Geim A, Morozov S, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 2004, 306: 666–669
- 74 Ball P. Water as an active constituent in cell biology. *Chem Rev*, 2008, 108: 74–108
- 75 Chen D, Feng H, Li J. Graphene oxide: Preparation, functionalization, and electrochemical applications. *Chem Rev*, 2012, 112: 6027–6053
- 76 Mao H Y, Laurent S, Chen W, et al. Graphene: Promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine. *Chem Rev*, 2013, 113: 3407–3424
- 77 Yang J, Shi G, Tu Y, et al. High correlation between oxidation loci on graphene oxide. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 10190–10194
- 78 Lerf A, He H, Forster M, et al. Structure of graphite oxide revisited. *J Phys Chem B*, 1998, 102: 4477–4482
- 79 Shih C J, Lin S, Sharma R, et al. Understanding the pH-dependent behavior of graphene oxide aqueous solutions: A comparative experimental and molecular dynamics simulation study. *Langmuir*, 2012, 28: 235–241
- 80 Medhekar N V, Ramasubramaniam A, Ruoff R S, et al. Hydrogen bond networks in graphene oxide composite paper: Structure and mechanical properties. *ACS Nano*, 2010, 4: 2300–2306
- 81 Cai W, Piner R D, Stadermann F J, et al. Synthesis and solid-state NMR structural characterization of ^{13}C -labeled graphite oxide. *Science*, 2008, 321: 1815–1817
- 82 Meyer J C, Girit C O, Crommie M F, et al. Imaging and dynamics of light atoms and molecules on graphene. *Nature*, 2008, 454: 319–322
- 83 Gómez-Navarro C, Meyer J C, Sundaram R S, et al. Atomic structure of reduced graphene oxide. *Nano Lett*, 2010, 10: 1144–1148
- 84 Erickson K, Erni R, Lee Z, et al. Determination of the local chemical structure of graphene oxide and reduced graphene oxide. *Adv Mater*, 2010, 22: 4467–4472
- 85 Pacilé D, Meyer J, Fraile Rodríguez A, et al. Electronic properties and atomic structure of graphene oxide membranes. *Carbon*, 2011, 49: 966–972
- 86 Johnson J, Benmore C, Stankovich S, et al. A neutron diffraction study of nano-crystalline graphite oxide. *Carbon*, 2009, 47: 2239–2243
- 87 Saxena S, Tyson T A, Negusse E. Investigation of the local structure of graphene oxide. *J Phys Chem Lett*, 2010, 1: 3433–3437
- 88 Mkhoyan K A, Contryman A W, Silcox J, et al. Atomic and electronic structure of graphene-oxide. *Nano Lett*, 2009, 9: 1058–1063
- 89 Meyer J C, Girit C O, Crommie M, et al. Imaging and dynamics of light atoms and molecules on graphene. *Nature*, 2008, 454: 319–322

Destructive extraction of phospholipids from cell membranes by graphene and graphene oxide nanosheets

TU YuSong¹ & FANG HaiPing^{2*}

¹ *College of Physics Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;*

² *Division of Interfacial Water and Key Laboratory of Interfacial Physics and Technology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China*

While graphene has attracted wide interests, the emergence of its relevant nanomaterials represents an increase in the potential hazard to human health. Consequently, there is currently an urgent need to understand the interaction between graphene and biomolecules, such as proteins and cell membranes. Experimentally, graphene and graphene-oxide nanosheets have shown strong antibacterial activity, and its cytotoxicity was hypothesized to arise from direct interactions between graphene and bacteria cell membranes. In theory, we revealed an important molecular mechanism that underlies the interaction between lipid membranes and graphene/graphene oxide, to understand the strong antibacterial activity of graphene/graphene-oxide nanosheets, i.e., the graphene could penetrate/cut into and destructively extract out large amounts of phospholipids from lipid membranes, inducing the degradation of cell membranes; although there exist hydrophilic oxidized-groups on graphene oxide nanosheets, the high correlation between oxidation loci ensures the similar ability of graphene oxide nanosheets to damage cell membranes. In this paper, we review the recent theoretical progress on graphene/graphene-oxide nanosheets and their interactions with lipid membranes. In particular, we focus on the destructive extraction of lipid molecules from cell membranes by graphene and graphene oxide and the significance of water molecules during the extracting processes. The water-mediated interactions of graphene and graphene oxide with lipid membranes presented here are expected to be common for the interaction between nanomaterials with hydrophobic characteristics and cell membranes.

graphene cytotoxicity, assembly of membranes, water, hydrophilicity and hydrophobicity, molecular dynamics simulation

PACS: 81.05.ue, 87.16.dr, 64.75.Yz, 83.10.Rs

doi: 10.1360/SSPMA2015-00428