

功能化多壁碳纳米管对四膜虫的生物效应研究

郭金学^{1,2} 辛雪琼¹ 诸颖² 李文新²

¹(青岛科技大学化学与分子工程学院 青岛 266042)

²(中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

摘要 利用癸胺和葡萄糖胺对吸收 γ 光子后的多壁碳纳米管进行化学修饰,得到表面修饰了不同浓度官能团的碳纳米管,这些碳纳米管能够分别溶解于有机溶剂和水。研究了功能化后的多壁碳纳米管对四膜虫(*Tetrahymena pyriformis*)的生物效应。结果显示,表面修饰了癸胺的碳纳米管对四膜虫的生长具有明显的抑制作用,而表面修饰了葡萄糖胺的碳纳米管则能够促进四膜虫的生长。进一步研究发现, γ 光子通过提高碳纳米管表面修饰官能团的量,强化了它们对于四膜虫的生物效应。本工作在研究碳纳米管对单细胞生物所引起的生物效应方面做出了有益探索,并且为碳纳米管生物医药领域的应用提供了新思路。

关键词 多壁碳纳米管, γ 射线, 化学修饰, 细胞毒性, 四膜虫

中图分类号 TB383, X174, TL1

伴随着纳米科技的进步,纳米材料的应用研究取得了很大进展,进入21世纪后,纳米材料、纳米技术在生物医药领域的应用研究成为了新的研究热点^[1]。碳纳米管由于其具有独特的物理、化学和机械性能^[2],其应用研究引起了广泛关注,有望在电子器件、储能、场发射等领域得到广泛应用^[3-5]。碳纳米管经修饰可溶解在水或有机溶剂中,这为在生物医药领域的应用提供了可能^[6-9]。Ball等^[10]预测以后全世界将要年产大约几十吨甚至上百吨的碳纳米管,而大量碳纳米管的生产和应用可能会威胁人类的安全以及对环境造成破坏^[11,12]。

Kam等^[4]指出,本身不能进入细胞内的荧光标记蛋白结合到单壁碳纳米管表面后,能够和单壁碳纳米管一起进入细胞内,因此碳纳米管被认为可以用来作为分子药物的载体运输药物到细胞内^[13,14]。Warheit等^[15]做了单壁碳纳米管对小鼠的肺部毒性实验,他们发现碳纳米管使小鼠肺部出现了肉芽瘤。Lam等^[16]开展了类似的工作,实验显示单壁碳纳米管能在老鼠肺部产生肉芽瘤,并且其毒性比石英的毒性强。

本工作研究影响碳纳米管毒性强弱的因素,从而期望能够在一定程度上控制碳纳米管的毒性使其更好地为人类所用。文献[17]曾经报道过,利用 γ 射线技术,通过控制射线在多壁碳纳米管表面所产生缺陷的不同量来控制接枝到多壁碳纳米管上官能

团的量,进而可以控制多壁碳纳米管在不同溶剂中的溶解度。本实验所选取的梨形四膜虫属于原生动物门,纤毛虫纲、膜口目、四膜虫科,是真核单细胞原生动物,以此为生物模型的相关实验可以获取细胞水平研究结果,对于评判多壁碳纳米管对生物的作用以及对环境和水资源的影响具有重要意义,而且其生长迅速,生活周期短,取材容易,培养方法简单,用来初步判断多壁碳纳米管的生物效应具有一定优越性^[18]。我们期望通过研究多壁碳纳米管及其功能化对四膜虫生物效应的差异,以揭示多壁碳纳米管表面修饰官能团种类、浓度与其生物效应相关的规律。

1 实验材料和方法

1.1 材料和仪器

四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)由中国科学院水生生物所原生动物分类生态组馈赠;计数板(中国科学院水生生物所玻璃车间自制);细胞计数器(上海实生生物有限公司)。

1.1.1 培养液 胰蛋白胨 15 g, 酵母粉 5 g, 葡萄糖 1 g(中国医药集团上海化学试剂公司), 蒸馏水 1L, 搅拌使其溶解均匀后用试管分装, 在 136℃用高压蒸汽灭菌锅灭菌, 放入 60℃烘箱中烘干表面水分, 冷却后在 4℃冰箱中保存。

国家 973 计划(2006CB705600)资助

第一作者: 郭金学, 男, 1978年6月出生, 2006年7月于中国科学院上海应用物理研究所获博士学位, 无机化学专业, 现任职青岛科技大学化学与分子学院, 副教授

收稿日期: 初稿 2007-06-05, 修回 2007-06-28

1.1.2 固定液 多聚甲醛 3 g(中国医药集团上海化学试剂公司), 蒸馏水 100 mL, 充分溶解后 4℃冰箱保存。

碳纳米管 - 深圳纳米港以化学气相沉积 (Chemical vapor deposition, CVD) 方法制备, 经透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM) 观察为多壁、直径 60—100 nm、长度为 0.1—6 μm, 纯度超过 95%, 经热重分析 (Thermogravimetric analyse, TGA) 无定型碳的含量 < 3%, 而等离子体质谱 (Inductively coupled plasma-mass spectrum, ICP-MS) 测定显示其含 0.6% Ni。官能团浓度不同的癸胺修饰的多壁碳纳米管 (Decylamine modified multi-wall carbon nanotubes, D-MWNTs) 利用我们曾经报道过的方法制备^[17]。官能团浓度不同的葡萄糖胺修饰的多壁碳纳米管 (Glucosamine modified multi-wall carbon nanotubes, G-MWNTs) 则是将吸收 γ 射线剂量为 100 kGy 和 250 kGy 的多壁碳纳米管按照文献[9]的方法在其表面修饰葡萄糖胺。

HZQ-QX 型全温振荡器, 中国哈尔滨东联电子技术开发有限公司; ZOOM-620E 型立体显微镜, 上海长方光学仪器有限公司; HL-343 型全自动高压蒸汽灭菌锅, 宏霖仪器有限公司; ZHJH-1106B 型超净台, 上海智城净化设备制造有限公司。

1.2 梨形四膜虫生长曲线的制作

接种四膜虫液到盛有 3 mL 无菌培养液的指形管中(密度约 $2 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$), 在 26℃ 下控制摇床为 100 r/min 进行培养。每隔 12 h 取一次四膜虫液, 用 3% 的多聚甲醛固定后用细胞计数器计数(每组重复 3 次以上)。以培养时间做横坐标, 以每毫升培养液里的细胞数的对数为纵坐标作梨形四膜虫的生长曲线图。

1.3 碳纳米管培养液的配制

分别称取一定量的未修饰的吸收 γ 射线剂量为 100、250 kGy 的碳纳米管, 分别修饰了癸胺和葡萄糖胺的碳纳米管, 分散于四膜虫无菌培养液中, 超声分散 5 min。将它们放入高压蒸汽灭菌锅中在 136℃ 进行 30 min 灭菌, 然后将其放入 60℃ 烘箱中烘干表面水分, 放入冰箱中 4℃ 保存。配好后的碳纳米管培养液可以放置数周而不发生沉淀, 同四膜虫共培育 48 h 后无明显沉淀现象发生。

1.4 梨形四膜虫对多壁碳纳米管的摄取

四膜虫的接种方法同前(密度约 $2 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$), 加入含多壁碳纳米管培养液, 使其终浓度为

100 μg/mL, 以正常培养的四膜虫为对照, 分别在温育 0.5、24、48 h 后取液, 用 3% 的多聚甲醛固定, 用 ZOOM-620E 型立体显微镜观察拍照。

1.5 不同的多壁碳纳米管对梨形四膜虫存活率的影响

四膜虫的接种方法同前(密度约 $2 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$), 加入含多壁碳纳米管培养液, 使其终浓度分别为 0.1、0.5、2.0、10、50 和 100 μg/mL, 以正常培养的四膜虫为对照, 分别在温育 0、12、24、36 和 48 h 后取液, 用 3% 的多聚甲醛固定, 在显微镜下计数(每组重复 3 次以上)。

在 T 式显微镜下对所观察到的全部正常形态的虫体进行计数, 存活率按下列公式计算:

$$S_n = \frac{x_n \times \frac{N_0}{x_0}}{N_n} \times 100\% \quad (1)$$

式中, S_n 为第 n 天存活率, x_n 为实验组虫体在第 n 天存活数; x_0 为实验组起始虫体数, N_0 和 N_n 分别为对照组虫体的起始数和第 n 天的存活数。

2 结果和讨论

图 1 是梨形四膜虫的生长曲线, 由图 1 可知, 梨形四膜虫的数目在 6—48 h 之间增加迅速, 48 h 后生长曲线趋于平缓, 所以它的对数生长周期为 6—48 h。因此本工作在接下来的实验中, 只给出四膜虫和 MWNTs 溶液从温育开始到 48 h 的实验数据。

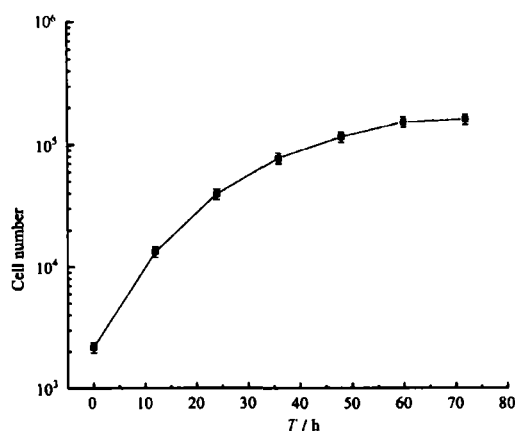


Fig.1 The growth curve of *Tetrahymena thermophila*

本实验经过化学修饰得到的多壁碳纳米管分散性非常稳定, 放置数周不发生沉淀, 加入到四膜虫培养液后, 也可以保持 24 h 基本不发生沉降, 为生物实验数据的可信性提供了必要的条件。

图2是四膜虫和多壁碳纳米管共同培养24、48h后的光学显微镜照片。结果显示,共同培养24h后(图2(a)),碳纳米管被四膜虫大量地摄取到体内并

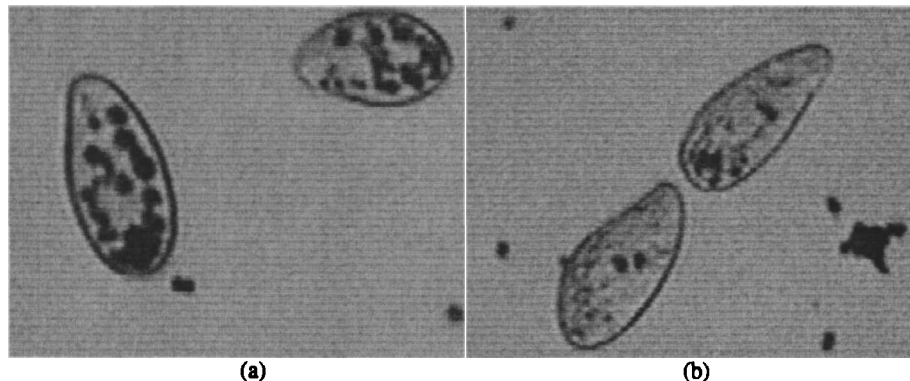


Fig.2 Photos of *Tetrahymena thermophila* after incubation with MWNTs at 24 h (a) and 48 h (b) respectively

图3是浓度为100 $\mu\text{g/mL}$,吸收100 kGy的 γ 射线剂量后修饰了癸胺、葡萄糖胺和未修饰的碳纳米管对四膜虫生物效应的差异。如图所示,碳纳米管表面修饰了不同的官能团后对于四膜虫的生物效应是不同的。D-MWNTs对四膜虫生长有明显的抑制作用,与此相反G-MWNTs则能够促进四膜虫的生长,而未经修饰的碳纳米管对四膜虫生长有微弱的促进作用。

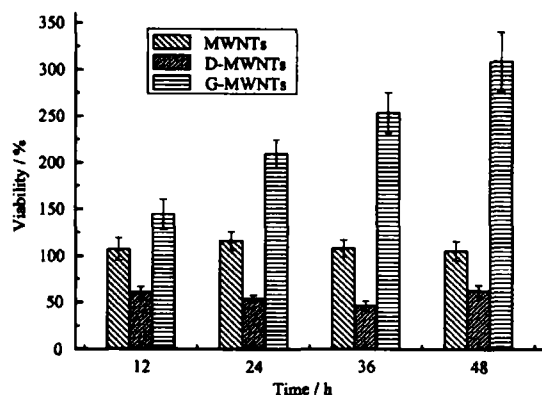


Fig.3 Comparison with bioactivity to *Tetrahymena pyriformis* among MWNTs, D-MWNTs, and G-MWNTs at different time. The dose of particles is $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Results are $\bar{x} \pm s$ of triplicate experiments ($P < 0.05$)

根据我们的工作^[17],多壁碳纳米管吸收不同剂量的 γ 射线后进行化学修饰,其表面就可以连接不同含量的官能团,剂量越高,表面所修饰的官能团含量也越高。从图4中我们可以看到,当碳纳米管表面所连接的葡萄糖胺的含量增加的时候其对于四膜虫生长的促进作用相应增加。而图5的结果与此类似,即碳纳米管表面所连接的癸胺的含量越高,其对四膜虫的抑制作用越强。这说明碳纳米管表面所修饰官能团含量的变化能够影响其生物效应的强弱。

发生一定团聚,经过48h后(图2(b)),可以看到大多数虫体内碳纳米管已被排泄到体外,体内只有少量的残余。

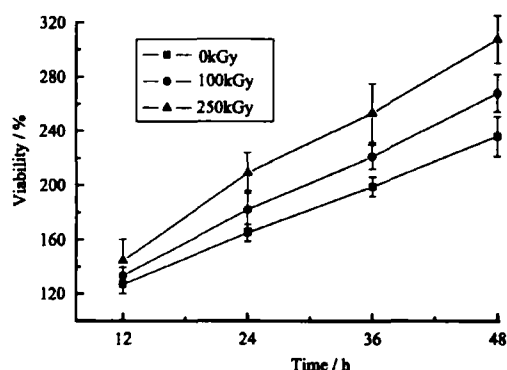


Fig.4 Comparison with promotion to *Tetrahymena pyriformis* among the different glucosamine content of G-MWNTs at different time. The dose of G-MWNTs is $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Results are $\bar{x} \pm s$ of triplicate experiments ($P < 0.05$)

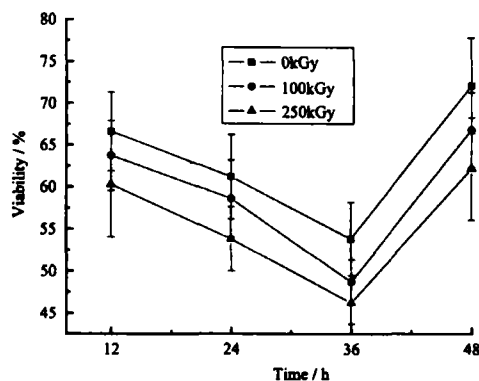


Fig.5 Comparison with toxicity to *Tetrahymena pyriformis* among the different decylamine content of D-MWNTs at different time. The dose of D-MWNTs is $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Results are $\bar{x} \pm s$ of triplicate experiments ($P < 0.05$)

那么是什么原因导致化学修饰后的碳纳米管的生物效应出现如此大的差异呢?在四膜虫的培养过程中分别加入癸胺和葡萄糖胺后发现,加入癸胺后四膜虫在很短的时间内迅速死亡,证明癸胺对于四膜虫是剧毒的;而加入 $10 \mu\text{g/mL}$ 葡萄糖胺后四膜虫的存活率增加到133%,这说明葡萄糖胺是四膜虫的营养物质,能够促进其生长。由此可知,修饰不同

官能团的碳纳米管生物效应是由官能团本身的生物效应所决定的, 同样官能团浓度的变化也能够影响其生物作用的强弱。

3 结论

功能化多壁碳纳米管和四膜虫在培养液中共同培育后发现, 碳纳米管可以被四膜虫摄取到虫体内, 并且随着时间的推移会被排泄出来。当碳纳米管表面修饰不同官能团, 其对四膜虫的生物效应也不同的。研究表明, 表面修饰癸胺的碳纳米管能够抑制四膜虫的生长, 而表面修饰葡萄糖胺的碳纳米管则能够促进四膜虫的生长。改变碳纳米管表面官能团含量, 其生物效应的强弱也随之变化。

利用 γ 射线技术, 可以控制接枝到碳纳米管表面化学基团含量, 从而可以根据实际需要在一定范围内调节碳纳米管的生物毒性。这为探索碳纳米管应用安全性、修饰改造碳纳米管使其符合人类需求提供了新思路。

参考文献

- 1 Colvin V L. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(1): 1166-1170
- 2 Baughman R H, Zakhidov A A, deHeer W A. *Science*, 2002, 297(2): 787-792
- 3 Yakobson B I, Smalley R E. *Am Sci*, 1997, 85(4): 324-337
- 4 Kam N W S, Jessop T C, Dai H, *et al.* *J Am Chem Soc*, 2004, 126(22): 6850-6851
- 5 Service R F. *Science*, 1998, 281(5379): 940-942
- 6 Liu J, Rinzler A G, Smalley R E, *et al.* *Science*, 1998, 280(5367): 1253-1256
- 7 Chen J, Hamon M A, Haddon R C, *et al.* *Science*, 1998, 282(5386): 95-98
- 8 Chen Y, Haddon R C, Smalley R E, *et al.* *J Mater Res*, 1998, 13(9): 2423-2431
- 9 Pompeo F, Resasco D E. *Nano Lett*, 2002, 2(4): 369-373
- 10 Ball P. *Nature*, 2001, 414(6860): 142-144
- 11 Masciangioli T, Zhang W X. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(5): 102A-108A
- 12 Maynard A D, Baron P A, Castranova V, *et al.* *J Toxicol Environ Health*, 2004, A67(1): 87-107
- 13 Pantarotto D, Briand J P, Prato M, *et al.* *Chem Commun*, 2003, 4(1): 16-17
- 14 Murakami T, Ajima K, Shiba Kiyotaka, *et al.* *Mol Pharm*, 2004, 1(6): 399-405
- 15 Warheit D B, Laurence B R, Webb T R, *et al.* *Toxicol Sci*, 2004, 77(1): 117-125
- 16 Lam C W, James J T, Hunter R L, *et al.* *Toxicol Sci*, 2004, 77(1): 126-134
- 17 GUO J, LI Y, LI W, *et al.* *Nanotechnology*, 2005, 16(10): 2385-2388
- 18 Dias N, Mortara R A, Lima N. *Toxicol In Vitro*, 2003, 17(3): 357-366

Bio-effect of modified multi-wall carbon nanotubes on *Tetrahymena pyriformis*

GUO Jinxue^{1,2} XIN Xueqiong¹ ZHU Ying² LI Wenxin²

¹(College of Chemistry and Molecular Engineer, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

²(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

ABSTRACT Multi-walled carbon nanotubes (MWNTs) irradiated with γ -rays were chemically modified with glucosamine and decylamine, respectively. The cytotoxicity of *Tetrahymena pyriformis* exposed to irradiated MWNTs, MWNTs modified with glucosamine and decylamine (denoted by G-MWNTs and D-MWNTs) was carried out. The results indicated that MWNTs modified with different functional groups exhibited different bioactivity to *Tetrahymena pyriformis*. D-MWNTs showed a significant toxicity to *Tetrahymena pyriformis*, and the viability of cells reduced to 46.2%. And G-MWNTs promoted significantly the growth of cells, with the viability being up to 308%. More interestingly, it was shown that the toxicity and bioactivity of modified MWNTs to cells was changed along with the contents of functional groups bound on the surface of MWNTs. The studies may supply a possible strategy for enhancing or reducing the toxicity of MWNTs to meet certain applications in biological and medical field.

KEYWORDS Multi-walled carbon nanotubes (MWNTs), γ -rays, Modification, Toxicity, *Tetrahymena pyriformis*

CLC TB383, X174, TL1