

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190103003

韦慧, 吴超权, 夏星, 等. 氧化石墨烯遗传毒性的实验研究[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(6): 136-143

Wei H, Wu C Q, Xia X, et al. Studies on the genotoxicity of graphene oxide [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(6): 136-143 (in Chinese)

## 氧化石墨烯遗传毒性的实验研究

韦慧<sup>1</sup>, 吴超权<sup>2</sup>, 夏星<sup>1</sup>, 钟振国<sup>1,\*</sup>

1. 广西中医药大学科学实验中心, 南宁 530200

2. 广西食品药品检验所, 南宁 530021

收稿日期: 2019-01-03 录用日期: 2019-03-21

**摘要:** 研究氧化石墨烯(GO)的遗传毒性, 考察其致突变作用, 为 GO 在生物领域的安全应用提供依据。采用 Ames 试验、体外 CHL 细胞染色体畸变试验和小鼠体内染色体畸变试验, 分别在细菌水平、细胞水平及整体动物水平研究 GO 的遗传毒性。GO 各剂量组的 Ames 试验结果为阴性。CHL 试验中, CHL 细胞染色体畸变率随 GO 浓度的增加而升高, 其中 1.000 mg·mL<sup>-1</sup> 剂量组(+S<sub>0</sub>)和 0.500 mg·mL<sup>-1</sup> 剂量组(-S<sub>0</sub>)畸变率显著升高( $P<0.05$ )。小鼠骨髓细胞染色体畸变试验中, 骨髓细胞染色体畸变率同样随 GO 浓度的增加而升高, 1.000 和 0.500 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量组的畸变率显著提高( $P<0.05$ )。虽然 Ames 试验结果没有反映出 GO 的遗传毒性, 但在体外及体内染色体畸变试验中, GO 均表现出对哺乳动物细胞染色体有潜在的遗传毒性。

**关键词:** 氧化石墨烯; Ames 试验; 染色体畸变试验; 遗传毒性

文章编号: 1673-5897(2019)6-136-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Studies on the Genotoxicity of Graphene Oxide

Wei Hui<sup>1</sup>, Wu Chaoquan<sup>2</sup>, Xia Xing<sup>1</sup>, Zhong Zhengguo<sup>1,\*</sup>

1. Science Experiment Center, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China

Received 3 January 2019 accepted 21 March 2019

**Abstract:** The genotoxicity and mutagenicity of graphene oxide (GO) were explored to provide the evidence for safe application of GO in the biological field. The genotoxicity of GO on the level of bacteria, cell and animal was determined via Ames test, chromosome aberration assay *in vitro* (CHL cell) and chromosome aberration assay *in vivo* (mouse bone marrow cells) respectively. The result of Ames test in each dosage group of GO was negative. For *in vitro* test, the chromosome aberration rate of CHL cells increased along with the enhancement of GO concentration, of which the aberration rate of both 1.000 mg·mL<sup>-1</sup> dosage group (+S<sub>0</sub>) and 0.500 mg·mL<sup>-1</sup> dosage group (-S<sub>0</sub>) increased significantly ( $P<0.05$ ). For *in vivo* test, the chromosome aberration rate of bone marrow cells increased along with the increase of GO concentration, of which the aberration rate of both 1.000 mg·mL<sup>-1</sup> dosage group and 0.500 mg·mL<sup>-1</sup> dosage group increased markedly ( $P<0.05$ ). There was no genotoxicity of GO shown in the Ames test. However, GO had a potential genotoxicity to mammalian cell chromosomes during the chromosome aberration assay *in vitro* and *in vivo* respectively.

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81660644); 广西中医药大学青年创新研究团队项目(2015QT002); 广西中医药大学自然科学基金项目(P2016004); 2019年广西一流学科建设专项项目(05019038)

**作者简介:** 韦慧(1992—), 男, 硕士, 研究方向为中药药效筛选与中药新药研究, E-mail: 105601439@qq.com

\* 通讯作者( Corresponding author ), E-mail: 1274803638@qq.com

**Keywords:** graphene oxide; Ames test; chromosome aberration test; genotoxicity

石墨烯(graphene)是由碳原子以  $sp^2$  杂化方式形成的纳米晶体,是一种蜂窝状单层二维平面结构的新型纳米材料<sup>[1]</sup>。氧化石墨烯(graphene oxide, GO)是一种石墨烯的含氧衍生物,与石墨烯相比较,GO 具有较大的表面积,良好的水分散性,更好的生物相容性,更强的表面活性<sup>[2]</sup>。GO 独特的物理特性,使其在光电子<sup>[3]</sup>、太阳能电池<sup>[4]</sup>、水处理<sup>[5]</sup>、医学<sup>[6]</sup>、环境能源<sup>[7]</sup>及功能材料<sup>[8]</sup>等多个领域具有潜在的发展前景。GO 能够广泛应用的重要前提是其具有可靠的生物安全性,而目前 GO 在生产、使用或废弃时进入自然环境后,是否存在生物安全性尚有争议。大多数研究者认为 GO 对细菌有毒性作用,但是在细胞和生物整体水平的毒性研究还存在分歧。GO 与生物体之间的相互作用还不甚明确,如毒性、炎症反应、病理变化和体内清除等尚未有一致的结果<sup>[9]</sup>。GO 的潜在致癌和致畸作用的评估,是对其安全性评价中极为重要的一环。已有研究发现,GO 的遗传毒性指数表现为各种类型的染色体畸变,表现出剂量和时间依赖性,特别是在 GO 暴露时间长、剂量高时,染色体畸变显著增加<sup>[10]</sup>。但是目前对 GO 的遗传毒性的研究仍较为匮乏。笔者根据《纳米毒理学与安全性研究方法》<sup>[11]</sup>,选用了 Ames 试验、体外 CHL 细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓细胞染色体畸变试验进行 GO 的遗传毒性研究,考察其潜在的致突变作用,为 GO 的安全使用提供依据。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验材料

氧化石墨烯(GO)棕黑色溶液,生产批号 D160330C2A。由常州第六元素材料科技公司提供。取 GO 样品于 121 °C 下高压灭菌 30 min,无菌操作下加入超纯水稀释成相应浓度后超声 2 h 制备成稳定的水分散液,现配现用。

胰蛋白酶(批号:3206105)、琼脂粉(批号:3206098)均购自广东环凯微生物科技有限公司;D (+)-生物素(批号:20171123)、L-组氨酸(批号:20171013)和牛肉浸膏(批号:20171023)均购自国药集团化学试剂有限公司;冻干型  $S_9$  混合液(批号:3480)购自 Molecular Toxicology 公司;1640 培养基(批号:8118264)、胎牛血清(FBS)(批号:1620769)购自 Gibco 公司;Hank's 液(批号:20170623)、0.25%

胰蛋白酶(批号:20170505)和吉姆萨染液(批号:20161229)均购自北京索莱宝科技有限公司;丝裂霉素(MMC)(批号:12/2017)、环磷酰胺(批号:12/2017)和秋水仙碱(批号:12/2017)均购自 Roche 公司;其他试剂为国产分析纯试剂。

### 1.2 实验仪器

HERAcell 150i 型  $CO_2$  培养箱(Thermo Scientific); DM500 型倒置相差显微镜(LEICA); Infinite M200 PRO 型酶标仪(瑞士帝肯); AC-4S1 型生物安全柜(ESCO Class II BSC); HH-8 型电热恒温水浴锅(国华电器有限公司); Neofuge23R 型低温高速离心机(Heal Force)。

### 1.3 实验菌株

选用鼠伤寒沙门氏组氨酸缺陷型菌株 TA-97a、TA-98、TA-100 和 TA-102 进行试验。菌株均来源于中国典型培养物保藏中心,由广西食品药品检验所提供。按照试验要求,这些菌株经过组氨酸需求试验、结晶紫敏感试验、抗氨苄青霉素试验、抗四环素试验、紫外线敏感试验和自发回变试验鉴定,菌株基因型均符合试验要求。37 °C 震荡培养 16 h,计数生长细菌不少于  $1 \times 10^9$  cells  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 活菌方可使用。 $S_9$  为体外代谢活化系统。

### 1.4 实验细胞

CHL 细胞,来源于中国科学院昆明细胞库,由广西食品药品检验所提供。完全培养液为含 10% 小牛血清的 1640,置 37 °C、5%  $CO_2$  培养箱孵育。

### 1.5 实验动物

SPF 级昆明雄性小鼠,体质量 18 ~ 22 g,由广西食品药品检验所提供。实验动物许可证号:SYXK (桂)2017-002。小鼠饲养于广西食品药品检验所 SPF 动物房,温度 20 ~ 25 °C,相对湿度 55%  $\pm$  15%,换气次数 10 ~ 20 次  $\cdot$  h<sup>-1</sup>。

### 1.6 实验方法

#### 1.6.1 Ames 试验

将 0.1 mL 试验菌株增菌液、0.1 mL GO 溶液和 0.5 mL  $S_9$  混合液(当需要代谢活化时)混合,混匀后倒入底层培养基平板上。设 0.080、0.040、0.020、0.010 和 0.005 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 5 个剂量组,同时设自发回复突变和阳性突变剂对照组,阳性对照药物如表 1 所示,每组 3 个平行皿,37 °C 培养 48 h,计数各平板菌落数并算出均值,重复试验一次。

1.6.2 染色体畸变试验

根据前期用 MTT 法测 GO 对 CHL 的细胞毒性时发现,GO 对细胞的半数抑制浓度, -S<sub>0</sub> 组为 0.415 mg·mL<sup>-1</sup>, +S<sub>0</sub> 组为 0.767 mg·mL<sup>-1</sup>。故+S<sub>0</sub> 组加入 1.000、0.500 和 0.250 mg·mL<sup>-1</sup> GO, 而-S<sub>0</sub> 组加入 0.50、0.250 和 0.125 mg·mL<sup>-1</sup> GO, 阴性对照(1640)和阳性对照(+S<sub>0</sub>: 环磷酰胺 0.020 mg·mL<sup>-1</sup>、-S<sub>0</sub>: 丝裂霉素 0.001 mg·mL<sup>-1</sup>)。置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。终止培养前加入秋水仙碱(0.001 mg·mL<sup>-1</sup>)处理 2 h。制片程序依次为:胰蛋白酶液消化;离心;低渗液低渗;固定液固定,离心;重复 1 次;滴片;干燥;10% Giemsa 染色。各组观察 100 个中期分裂相细胞,计数其染色体畸变率。

1.6.3 小鼠骨髓细胞染色体畸变试验

将小鼠按体质量随机分为 7 组,每组 10 只。根据前期试验测得 GO 对小鼠的半数致死量(LD<sub>50</sub>)为 6.364 mg·kg<sup>-1</sup>。分别设置为 1.000、0.500、0.250 和 0.125 mg·kg<sup>-1</sup> GO 共 4 个剂量组,同时设阴性对

照和阳性对照组(环磷酰胺 40 mg·kg<sup>-1</sup>),每周尾静脉注射(i.v.)一次,小鼠于 28 d 处死。各组动物处死前 4 h 腹腔注射秋水仙素(4 mg·kg<sup>-1</sup>)。处死后,取股骨,制备骨髓细胞染色体标本。每一处理组每只动物选择 100 个分散良好的中期分裂相细胞进行分析,分别记录各组染色体畸变类型和数目,计算畸变率。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。统计描述采用 x±s,多组间比较采用单因素方差分析,率间比较采用 χ<sup>2</sup> 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果(Results)

2.1 GO 的表征

GO 表征结果如图 1 所示。TEM 分析获得了 GO 的形貌(图 1(a)),表征结果显示,GO 的尺寸在 100 nm 左右,为卷曲的透明如纱状的薄片片层结构,出现的褶皱是由 SP<sup>3</sup> 杂化的含氧官能团破坏了 C=C 双键所导致的,而原始石墨烯表层也并非完

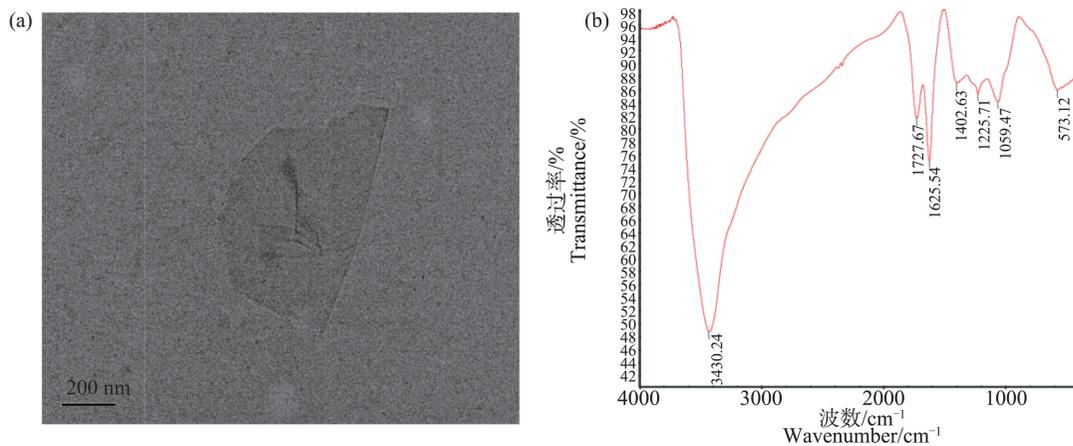


图 1 氧化石墨烯(GO)的表征((a):TEM;(b):FTIR)

Fig. 1 Characterization of graphene oxide (GO) ((a): TEM; (b): FTIR)

表 1 Ames 试验阳性对照药物

Table 1 The positive control drug in Ames test

试验菌株 Test strain	-S <sub>0</sub> 试验 -S <sub>0</sub> test		+S <sub>0</sub> 试验 +S <sub>0</sub> test	
	诱变剂 Mutagen	浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) Concentration/(mg·mL <sup>-1</sup> )	诱变剂 Mutagen	浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) Concentration/(mg·mL <sup>-1</sup> )
TA-97a、TA-98	2,4,7-三硝基-9-芴酮	0.002	2-氨基芴 2-Aminofluorene	0.100
	2,4,7-Trinitro-9-fluorenone			
TA-100	甲酸磺酸甲酯 Methyl formate	0.005	2-氨基芴 2-Aminofluorene	0.100
TA-102	丝裂霉素 C Mitomycin C	0.005	1,8-二羟基蒽醌	0.500
			1,8-Dihydroxyanthraquinone	

全平展,反而会泛起波浪状的褶皱从而保持其热力学稳定性,且降低了表面张力。为了进一步确定组分,采用 FTIR 测试,如图 1(b)所示。GO 在  $3430\text{ cm}^{-1}$  处呈现了一个宽且尖锐的峰,这是由—OH 振动形成的; $1727\text{ cm}^{-1}$  处的峰应归于  $\text{C}=\text{O}$  键的伸缩振动; $1625\text{ cm}^{-1}$  处的峰应归于  $\text{C}=\text{C}$  键的伸缩振动; $1402\text{ cm}^{-1}$  处的峰应归于  $\text{C}-\text{H}$  键的伸缩振动; $1225\text{ cm}^{-1}$  处的峰应归于  $\text{C}-\text{O}$  键的伸缩振动。

2.2 Ames 试验检测 GO 的致突变作用

计算同一菌株同一剂量组的 3 个平行培养皿上的平均菌落数和标准差(表 2),结果显示:无论是否

添加  $\text{S}_9$  活化体系,GO 各剂量组对 TA-97a、TA-98、TA-100 和 TA-102 菌株的回变均无显著影响,各菌株回复突变菌落数均在正常范围内;各剂量组与阴性对照组的回复突变菌落数比较差异不显著( $P > 0.05$ ),并且显著地低于阳性对照组的回复突变菌落数( $P < 0.01$ ),Ames 试验结果均呈阴性。

2.3 GO 对 CHL 细胞的致突变作用

经  $\text{S}_9$  活化体系处理(+ $\text{S}_9$ )的 GO 染色体畸变结果如表 3 所示,通过卡方检验进行比较分析发现,随 GO 浓度的增加,CHL 细胞染色体畸变率也升高,有明显的剂量-反应关系。其中,GO 的 + $\text{S}_9$  剂量组( $1.000\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )与阴性对照组相比,畸变率显著升

表 2 GO 的 Ames 试验结果  
Table 2 Ames test results of GO

组别 Group	剂量 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) Doses ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	TA-97a		TA-98		TA-100		TA-102	
		- $\text{S}_9$	+ $\text{S}_9$	- $\text{S}_9$	+ $\text{S}_9$	- $\text{S}_9$	+ $\text{S}_9$	- $\text{S}_9$	+ $\text{S}_9$
		阴性对照 Negative control	/	120.3±7.1	128.67±7.6	27.0±4.0	26.0±2.7	154.3±13.6	155.7±7.6
氧化石墨烯(GO) Graphene oxide (GO)	0.08	160.0±22.3	136.0±31.2	24.7±5.7	24.7±2.1	172±38.2	144.7±38	234.7±24.1	250.7±43.3
	0.04	149.3±13.4	178.7±2.5	24.3±2.5	24.3±8.5	172±8.0	140±41.4	208.3±14.0	229.3±18.6
	0.02	128.7±14.6	175.3±13.6	31.7±1.5	23.3±4.2	129.0±14.7	128.3±8.4	242.67±42.0	254.7±38.9
氧化石墨烯(GO) Graphene oxide (GO)	0.01	101.3±8.3	152.0±20.7	24.0±4.4	20.0±4.0	130.3±22.3	131.3±30.1	226.7±34.5	214.0±14.0
	0.005	104.0±5.3	136.3±13.1	22.7±4.0	17.7±2.5	115.0±5.0	123±25.6	199.0±11.0	205.7±15.5
阳性对照 Positive control	见表 1 Shown in Table 1	1 346.0±38.0**	1 456.7±51.8**	1 922.0±165.3**	1 989.0±25.5**	1 572.3±74.5**	1 775.3±84.1**	1 265.3±70.6**	1 008.3±23.1**

注: - $\text{S}_9$  表示平皿中没有添加  $\text{S}_9$ , + $\text{S}_9$  表示平皿中添加  $\text{S}_9$ ; 与阴性对照组比较, \*\* 为差异显著( $P < 0.01$ )。

Note: - $\text{S}_9$  means  $\text{S}_9$  was not added in the petri dish, and + $\text{S}_9$  means  $\text{S}_9$  was added in the petri dish; compared with the negative control group, \*\* showed a significant difference ( $P < 0.01$ ).

表 3 GO 对 CHL 细胞染色体畸变的影响 (+ $\text{S}_9$ , 24 h)

Table 3 Effect of GO on chromosomal aberrations in CHL cells (+ $\text{S}_9$ , 24 h)

组别 Group	剂量 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) Doses ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	多倍体数 Polyploid number	染色体畸变类型 Chromosome aberration type					畸变数 Distortion number	畸变率/% Distortion rate/%	结果判定 Result judgment
			断裂 缺失 环状 碎片 交换 Fracture Missing Ring Fragment Exchange							
			阴性对照(1640) Positive control (1640)	/	0	1	1			
氧化石墨烯(GO) Graphene oxide (GO)	1.000	0	7	4	0	0	0	11	11*	+
氧化石墨烯(GO) Graphene oxide (GO)	0.500	0	4	3	0	1	0	8	8	±
氧化石墨烯(GO) Graphene oxide (GO)	0.250	0	1	1	0	0	0	2	2	-
环磷酰胺 Cyclophosphamide	20.000	3	12	10	4	3	2	31	31*	++

注: 与阴性对照组比较, \* 为差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Compared with the negative control group, \* showed a significant difference ( $P < 0.05$ ).

高( $P<0.05$ )。

未经  $S_0$  活化体系处理( $-S_0$ )的 GO 染色体畸变结果如表 4 所示。随 GO 浓度的增加,CHL 细胞染色体畸变率也升高,有明显的剂量-反应关系。其中,0.500  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  剂量组与阴性对照组相比,畸变率显著升高( $P<0.05$ )。

GO 致 CHL 细胞染色体畸变类型如图 2 所示。染色体的断裂,可进一步造成染色体的缺失或各种重排,由此而产生的染色体结构异常称为染色体结

构畸变。正常 CHL 细胞染色体未见明显突变(图 2(a));1.000  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GO 组出现染色体断裂(图 2(b));0.500  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GO 组出现染色体粉碎化(图 2(c));0.125  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GO 组出现染色体缺失(图 2(d));阳性组出现染色体交换、多倍体及环状染色体(图 2(e))。染色体结构畸变观察表明,GO 引起的染色体畸变类型主要为断裂和缺失。

#### 2.4 GO 对小鼠骨髓细胞染色体的致畸变作用

骨髓细胞染色体畸变试验结果如表 5 所示。通

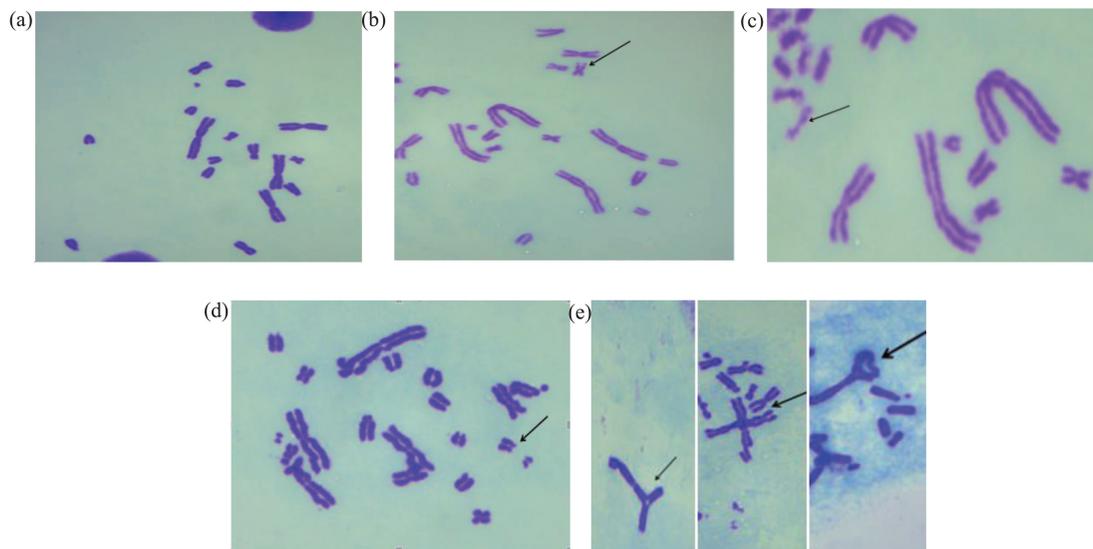


图 2 GO 致 CHL 细胞染色体畸变图

注:(a). 阴性对照组 CHL 细胞染色体;(b). 1.000  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GO 组染色体断裂;(c). 0.500  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GO 组染色体粉碎化;(d). 0.125  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GO 组染色体缺失;(e). 阳性组染色体交换、多倍体、环状染色体;Giemsa 染色,  $\times 100$ 。

Fig. 2 Chromosome aberration diagram of CHL cells induced by GO

Note: (a). normal CHL cell chromosome; (b). 1.000  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GO group chromosome break; (c). 0.500  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GO group chromosome pulverization; (d). 0.125  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GO group chromosome deletion; (e). positive group chromosome exchange, polyploidy and circular chromosome; Giemsa staining,  $\times 100$ .

表 4 GO 对 CHL 细胞染色体畸变的影响 ( $-S_0, 24 \text{ h}$ )

Table 4 Effect of GO on chromosomal aberrations in CHL cells ( $-S_0, 24 \text{ h}$ )

组别 Group	剂量 $(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ Does $(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	多倍体数 Polyploid number	染色体畸变类型 Chromosome aberration type					畸变数 Distortion number	畸变率/% Distortion rate/%	结果判定 Result judgment
			Chromosome aberration type							
			断裂 Fracture	缺失 Missing	环状 Ring	碎片 Fragment	交换 Exchange			
阴性对照(1640) Negative control (1640)	/	0	1	0	0	0	0	1	1	-
氧化石墨烯(GO) Graphene oxide (GO)	0.250	0	4	2	0	0	0	6	6	±
氧化石墨烯(GO) Graphene oxide (GO)	0.125	0	1	0	0	0	0	1	1	-
丝裂霉素 Mitomycin	1.000	1	14	7	2	1	2	26	26*	++

注:与阴性对照组比较,\*为差异显著( $P<0.05$ )。

Note: Compared with the negative control group, \* showed a significant difference ( $P<0.05$ ).

表5 GO对小鼠骨髓细胞染色体畸变率的影响

Table 5 Effect of GO on chromosome aberration rate of mouse bone marrow cells

组别 Group	剂量 (mg·kg <sup>-1</sup> )		多倍体数 Polyploid number	染色体畸变类型 Chromosome aberration type					畸变数 Distortion number	畸变率/% Distortion rate/%
	/(mg·kg <sup>-1</sup> )	<i>n</i>		断裂 Fracture	缺失 Missing	环状 Ring	碎片 Fragment	交换 Exchange		
	/(mg·kg <sup>-1</sup> )									
阴性对照 Negative control	-	10	0	9	4	0	0	0	13	1.3
氧化石墨烯(GO) Graphene oxide (GO)	1.000	10	5	33	24	0	0	0	57	5.7**
	0.500	10	1	19	13	0	0	0	32	3.2*
	0.250	10	0	18	9	0	0	0	27	2.7
	0.125	10	0	18	7	0	0	0	25	2.5
环磷酰胺 Cyclophosphamide	40.000	14	77	62	8	12	10	8	169	16.9**

注:与阴性对照组比较,\*为差异显著( $P<0.05$ ),\*\*为差异显著( $P<0.01$ )。

Note: Compared with the negative control group, \* showed a significant difference ( $P<0.05$ ); \* showed a significant difference ( $P<0.01$ ).

过卡方检验进行比较分析发现,1.000 mg·kg<sup>-1</sup>剂量组细胞畸变率与阴性对照组相比,畸变率显著升高( $P<0.01$ ),0.500 mg·kg<sup>-1</sup>剂量组细胞畸变率显著高于阴性对照组( $P<0.05$ )。0.250和0.125 mg·kg<sup>-1</sup>剂量组细胞畸变率均略高于阴性对照组,但与阴性对照组的差异不显著( $P>0.05$ )。

GO致小鼠骨髓细胞染色体畸变类型如图3所示。阴性对照组小鼠骨髓细胞染色体未见明显畸变发生(图3(a));1.000 mg·kg<sup>-1</sup> GO组出现染色体缺失(图3(b));0.500 mg·kg<sup>-1</sup> GO组出现染色体断裂(图3(c));环磷酰胺组出现染色体粉碎、交换和多倍体染色体(图3(d))。染色体结构畸变观察表明,GO所致染色体畸变类型以染色体断裂为主。

### 3 讨论 (Discussion)

GO独特的理化性质及其与生物体相互作用特性为其提供了广泛的应用前景,它的安全性评价成为研究的热点<sup>[12]</sup>。目前,关于GO毒性的研究主要集中在其细胞毒性方面。大量体外研究发现,GO通过以下几种途径产生毒性:通过与细胞膜脂质双层的相互作用或由于生物分子的吸附而产生的间接毒性;产生活性氧物质或直接物理毒性,促进细胞毒性;由于疏水表面,石墨烯可以与细胞膜脂质显著相互作用,引起细胞毒性<sup>[13]</sup>。此外,GO的细胞毒性与其自身的物理化学性质(大小、形状和表面官能团等)、作用的细胞种类以及作用浓度等有着密不可分的关系<sup>[14]</sup>。Zhang等<sup>[15]</sup>通过放射性元素给GO做标记,并使用放射性示踪法研究小鼠体内的GO的代谢和分布。注射10 mg·kg<sup>-1</sup> GO到小鼠后发现,其

通过血液循环大量积聚在肺,其次分布在肝中,保留时间较长,同时观察到炎症细胞浸润,肉芽肿和肺水肿的形成<sup>[14]</sup>。遗传毒性试验主要用于致癌性预测,而目前在体外细胞水平上的GO遗传毒性研究少有报道。如Chng和Pumera<sup>[16]</sup>研究发现,GO能诱导人肺成纤维HLF细胞的氧化应激反应,细胞毒性呈现浓度依赖性,尾长和尾DNA百分比的增加揭示出

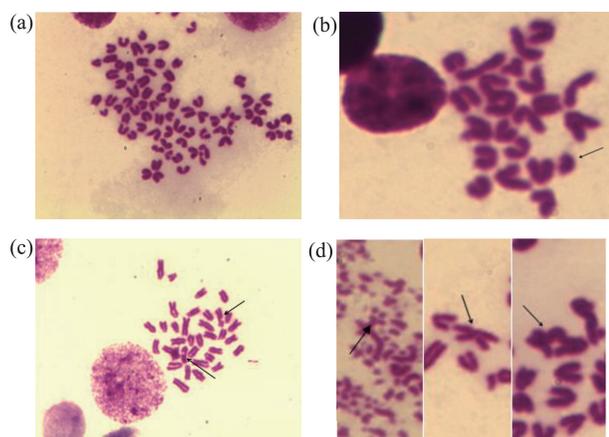


图3 GO致小鼠骨髓细胞染色体畸变图

注:(a). 小鼠骨髓细胞正常染色体;(b). 1.000 mg·kg<sup>-1</sup> GO组染色体断裂;(c). 0.500 mg·kg<sup>-1</sup> GO组染色体缺失;(d). 环磷酰胺组染色体粉碎、交换、多倍体染色体;Giemsa染色,×100。

Fig. 3 Chromosome aberrations of mouse bone marrow cells induced by GO

Note: (a). mouse bone marrow cells normal chromosome;  
(b). 1.000 mg·kg<sup>-1</sup> GO group chromosome break;  
(c). 0.500 mg·kg<sup>-1</sup> GO group chromosome deletion;  
(d). cyclophosphamide group chromosome smashing, chromosome exchange and ploid chromosome; Giemsa staining, ×100.

GO 具有遗传毒性。Stueckle 等<sup>[17]</sup>的彗星试验结果表明, nano-GO 诱导肺部细胞(A549)的 DNA 损伤有很大作用。Mohamed 等<sup>[18]</sup>发现, GO 可以引起 DNA 的迁移, 引起 DNA 损伤, 导致 DNA 片段化。Bengtson 等<sup>[19]</sup>将单次气管内暴露于 GO 和还原氧化石墨烯(rGO)后, 发现 GO 和 rGO 分别在不同时间点可诱导肺、肝 DNA 损伤。此外, 非片层结构的石墨烯同样被发现有一定的遗传毒性, 如 Kim 等<sup>[20]</sup>采用 Ames 试验、体外染色体畸变试验和小鼠骨髓微核试验对单臂碳纳米管(SWCNT)的遗传毒性进行检测。结果显示, Ames 试验未发现细菌回变现象, 微核试验结果为阴性, 体外染色体畸变试验为阳性且额外观察到了细胞增殖抑制现象, 故认为 SWCNT 的遗传毒性为弱阳性。可见 GO 及其基础上进一步衍生的石墨烯类材料的遗传毒性不容忽视。

Ames 从基因水平上反映了遗传物质受损伤情况; 染色体畸变的产生与染色体断裂及纺锤体受损有关。依据《纳米毒理学与安全性研究方法》<sup>[11]</sup>, 针对遗传物质作用终点的不同, 并兼顾体外和体内试验的配套原则, 笔者采用 Ames 试验、CHL 细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓细胞染色体试验, 综合分析这 3 种试验的结果, 以研究 GO 的致突变作用。本研究结果显示, 不管是否加入活化系统(S<sub>9</sub>), GO 各剂量组对 TA-97a、TA-98、TA-100 和 TA-102 这 4 种菌株回复突变菌落数的影响均在正常范围内, 与阴性对照组相比无显著性差异, 提示 GO 在体外 Ames 试验中无致突变作用。但是在细胞水平和体内水平的染色体畸变试验中, 随着 GO 浓度的增加, 染色体畸变率显著升高, 有明显的剂量-反应关系, 提示 GO 在体内外的染色体畸变试验中具有潜在的遗传毒性。已有研究发现, 与啮齿类动物肿瘤相关度最高的传统 Ames 试验无法有效检出纳米粒子的潜在致突变性, 而体外微核试验、染色体畸变试验及彗星试验却通常可以得到阳性结果<sup>[21]</sup>。这与本研究结果一致, 即 GO 的 Ames 致突变性试验结果呈阴性, 但染色体畸变试验结果却呈阳性。进一步分析导致 Ames 试验无法准确评价纳米粒子的致突变作用的原因可能在于: (1)传统的 Ames 试验使用固态培养基, 培养基为碱性环境, 固态且带大量负电荷的培养条件限制细菌与纳米粒子充分接触; (2)菌壁与哺乳动物细胞壁有差异, 加之革兰氏阴性菌的菌壁较厚, 可导致纳米材料不易穿透胞壁, 与细菌接触不充分, 限制纳米粒子被细胞摄取; (3)另外, 有些纳米材料具

有一定的灭菌作用<sup>[22]</sup>。

目前没有任何单一的试验方法可同时涵盖所有遗传终点。为全面考察 GO 的潜在遗传毒性风险, 通常需开展一系列机制上互相补充的试验, 对 GO 的遗传毒性及其作用机制, 可进一步研究和探讨。

**通讯作者简介:** 钟振国(1956—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为生态毒理学。

#### 参考文献 (References):

- [1] McCallion C, Burthem J, Rees-Unwin K, et al. Graphene in therapeutics delivery: Problems, solutions and future opportunities [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 104: 235-250
- [2] Tonelli F M P, Goulart V A M, Gomes K N, et al. Graphene-based nanomaterials: Biological and medical applications and toxicity [J]. *Nanomedicine*, 2015, 10 (15): 2423-2450
- [3] 陈弘达, 黄北举, 毛旭瑞, 等. 石墨烯射频与光电子器件研究进展[J]. *高科技与产业化*, 2017(8): 60-64
- [4] 丁自成, 张璐, 刘俊. 用于高分子太阳能电池的石墨烯量子点电极界面材料[J]. *中国科学: 化学*, 2018, 48(8): 902-913
- [5] 徐浩智. 石墨烯在水处理吸附技术中的应用[J]. *当代化工研究*, 2018(11): 68-70
- [6] 高扬, 吴丁威, 殷广达, 等. 氧化石墨烯在生物医学领域的应用[J]. *材料导报*, 2016, 30(15): 144-150  
Gao Y, Wu D W, Yin G D, et al. A survey for biological applications of graphene oxide [J]. *Materials Review*, 2016, 30(15): 144-150 (in Chinese)
- [7] 孙明娟, 孟良, 侯士峰. 石墨烯在能源与环境领域中的应用[J]. *新材料产业*, 2013(9): 42-44
- [8] 孙赛, 张斌, 汪露馨, 等. 新型二维功能材料及衍生物的设计和制备[J]. *功能高分子学报*, 2018, 31(5): 413-441  
Sun S, Zhang B, Wang L X, et al. Design and preparation of novel 2D functional materials and derivatives [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2018, 31(5): 413-441 (in Chinese)
- [9] Ou L L, Song B, Liang H M, et al. Toxicity of graphene-family nanoparticles: A general review of the origins and mechanisms [J]. *Particle and Fibre Toxicology*, 2016, 13: 57
- [10] El-Yamany N A, Mohamed F F, Salaheldin T A, et al. Graphene oxide nanosheets induced genotoxicity and pulmonary injury in mice [J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2017, 69(6): 383-392

- [11] 张智勇. 纳米毒理学与安全性研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 1-201
- [12] Xie H, Cao T, Rodríguez-Lozano F J, et al. Graphene for the development of the next generation of biocomposites for dental and medical applications [J]. *Dental Materials*, 2017, 33(7): 765-774
- [13] Jarosz A, Skoda M, Dudek I, et al. Oxidative stress and mitochondrial activation as the main mechanisms underlying graphene toxicity against human cancer cells [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(2): 1-14
- [14] Ma J, Liu R, Wang X, et al. Crucial role of lateral size for graphene oxide in activating macrophages and stimulating proinflammatory responses in cells and animals [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(10): 10498-10515
- [15] 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
- [16] Chng E, Pumera M. Toxicity of graphene related materials and transition metal dichalcogenides [J]. *RSC Advances*, 2015, 5(4): 3074-3080
- [17] Stueckle T, Sargent L M, Rojanasakul Y, et al. Genotoxicity and carcinogenic potential of carbon nanomaterials [M]// Chen C Y, Wang H F. *Biomedical Applications and Toxicology of Carbon Nanomaterials*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016: 267-332
- [18] Mohamed W, Din T, Tohamy A, et al. Evaluation of genotoxic and hepatotoxic effects of graphene oxide nanosheets in male Albino mice [J]. *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology)*, 2017, 13(1): 43-53
- [19] Bengtson S, Knudsen K B, Kyjovska Z O, et al. Differences in inflammation and acute phase response but similar genotoxicity in mice following pulmonary exposure to graphene oxide and reduced graphene oxide [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178355
- [20] Kim J S, Song K S, Yu I J. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of single-walled carbon nanotube [J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2015, 31(8): 747-757
- [21] Elespuru R, Pfuhrer S, Aardema M J, et al. Genotoxicity assessment of nanomaterials: Recommendations on best practices, assays, and methods [J]. *Toxicological Sciences*, 2018, 164(2): 391-416
- [22] 张丽, 王林, 钱君芝, 等. 石墨烯/银纳米复合材料的制备及其抗菌性能[J]. *包装工程*, 2017, 38(13): 36-40  
Zhang L, Wang L, Qian J Z, et al. Preparation and antibacterial properties of graphene/silver nanocomposites [J]. *Packaging Engineering*, 2017, 38(13): 36-40 (in Chinese)
- ◆