

电化学方法研究石墨烯和磷酸三苯酯(TPP)与模拟生物膜间的相互作用

李斐¹, 丁家旺¹, 吴惠丰^{1,2*}, 孟祥敬^{1,3}, 赵建民¹

1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 中国科学院环境过程与生态修复重点实验室, 烟台 264003;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 青岛 266237;

3. 中国科学院大学, 北京 100049

* 联系人, E-mail: hfwu@yic.ac.cn

2017-06-17 收稿, 2017-08-16 修回, 2017-08-21 接受, 2017-11-09 网络版发表

国家自然科学基金(41530642, 21677173)、中国科学院青年创新促进会资金(2017255)、中国科学院重点部署项目(KZZD-EW-14)和中国科学院战略性先导科技专项(XDA11020305)资助

摘要 在自然环境中, 污染物大多以混合物形式存在, 进入生物体后通常会产生联合毒理效应. 石墨烯纳米材料具有优良的吸附性能, 容易与其他污染物发生相互作用, 进而影响污染物的环境行为. 磷酸三苯酯(triphenyl phosphate, TPP)分子中含有多个苯环, 容易与石墨烯发生相互作用. 本文采用电化学方法, 研究了石墨烯和TPP与模拟生物膜间的相互作用. 结果表明, 石墨烯和TPP均可导致磷脂双层膜修饰的金电极的阻抗降低, 说明两者均能影响细胞膜的通透性, 破坏模拟生物膜的完整性, 推测石墨烯和TPP同时存在时可能表现出一定的协同作用, 增大对模拟生物膜的破坏程度. 透过细胞膜进入细胞的污染物有可能与细胞内的DNA或蛋白质等大分子发生作用, 该研究结果可为评价该类污染物的生态风险性提供理论依据.

关键词 石墨烯, 磷酸三苯酯, 模拟生物膜, 联合作用

海岸带区域的污染内容广泛、状况复杂并且管理决策难度较大. 针对海岸带环境中混合形式存在的污染物, 采用单一化学品高剂量暴露下的生态毒性研究和以单一物质的急性或慢性毒性实验为依据的传统风险评价体系, 均难以正确反映实际环境中混合污染物的生态毒理学效应, 这对于综合性环境污染的治理十分不利.

纳米材料在材料科学、生物医学、信息技术、环境污染治理、能源、催化及国家安全等方面均具有广阔的应用前景^[1-3]. 然而, 随着在众多领域的大规模生产和广泛应用, 纳米材料将不可避免地被释放到水、空气和土壤等环境中, 并随之进入生物体内^[4].

由于纳米材料具有独特的理化性质, 其对生态系统和生物体将产生很多潜在的不利影响, 纳米材料的生物安全问题已受到越来越广泛的关注^[5-7]. 石墨烯纳米材料具有优良的吸附性能和表面性质, 进入环境后很容易与其他的环境污染物(如重金属污染物、有机污染物等)发生相互作用, 并影响这些污染物的环境行为^[8-10].

随着溴系阻燃剂的禁用, 磷酸三苯酯(triphenyl phosphate, TPP)作为一种替代产品, 目前已经被大量生产和使用. 由于是添加型阻燃剂, TPP容易被释放到环境中, 目前已在多种环境介质及生物体内不同程度检出^[11,12]. TPP的分子结构中含有多个苯环, 可

引用格式: 李斐, 丁家旺, 吴惠丰, 等. 电化学方法研究石墨烯和磷酸三苯酯(TPP)与模拟生物膜间的相互作用. 科学通报, 2017, 62: 4285-4293

Li F, Ding J W, Wu H F, et al. Interaction between graphene joint triphenyl phosphate (TPP) and the simulated phospholipid bilayer of electrochemical research (in Chinese). Chin Sci Bull, 2017, 62: 4285-4293, doi: 10.1360/N972017-00556

能与石墨烯发生相互作用. 随着石墨烯和TPP需求量与生产量的日益增长, 有必要对石墨烯和TPP的联合毒理效应及作用机制进行研究, 这对于评估石墨烯和TPP的生态风险具有重要意义.

细胞膜是生物体抵御外界环境的重要屏障, 环境污染通常作用于细胞膜后再进入细胞产生毒性作用. 研究表明, 石墨烯及其衍生物在与细胞膜相互作用过程中会对细胞膜产生破坏^[13]. 石墨烯与细胞膜的相互作用主要包括3种方式: (1) 石墨烯可以积聚到细胞膜表面, 影响细胞膜的正常功能; (2) 石墨烯可以通过其锋利的边缘切割、插入细胞膜, 直接破坏细胞膜的正常结构; (3) 石墨烯还会通过胞吞作用直接被细胞摄入^[14]. 石墨烯进入细胞后, 会通过受体结合或产生活性氧(reactive oxygen species, ROS), 对细胞产生更严重的影响^[15].

生物膜是以磷脂双分子层为基础构成的各种膜结构的统称, 是生物体的重要组成部分, 具有很多重要的功能. 由于生物膜系统本身十分复杂, 利用简单的模型来构建人工模拟生物膜可以简单有效地研究石墨烯等纳米材料与生物膜的相互作用^[16]. 固体支撑的磷脂双层膜是一种制备简便、易于重复且性能稳定的模拟生物膜, 可用于电化学检测和表面分析^[17]. 通过构建固体支撑磷脂双层膜, 并使用电化学技术对膜的通透性进行研究的方法, 在生物膜研究领域已经得到越来越多的应用^[18].

目前, 电化学技术在表征金属表面支撑磷脂双层膜方面发挥重要作用. 在模拟生物膜研究中, 交流阻抗法(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)能够初步评估膜的通透性, 且能作为膜结构变化的灵敏探测器^[19,20]. 因此, 电化学方法可被用来研究小分子污染物与模拟生物膜间的相互作用. 本研究采用“冰冻-涂抹”法在金电极表面构建共价结合的磷脂双分子层, 从而形成模拟生物膜, 并使用EIS对石墨烯和TPP与模拟生物膜的相互作用进行研究.

1 方法

(i) 试剂. 石墨烯(1.0 mg/mL)购于美国Sigma-Aldrich公司, TPP(99%)购于德国Dr. Ehrenstorfer公司, 粉末状1,2-二棕榈酰-sn-甘油磷脂酰胆碱(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC, >99%)和1,2-二棕榈酰-sn-甘油磷脂酰硫代乙醇(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphothioethanol, DPPE, >99%)

购于美国Avanti公司, 正癸烷(99%)购于上海麦克林生化科技有限公司. 实验中用到的铁氰化钾($K_3[Fe(CN)_6]$)、亚铁氰化钾($K_4Fe(CN)_6$)、无水乙醇(C_2H_5OH)、浓硫酸(H_2SO_4)、过氧化氢(H_2O_2)、氯化钾(KCl)、氢氧化钠(NaOH)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)等均为国药集团化学试剂有限公司产分析纯试剂. 实验用水经过Cascada LS超纯水机(美国Pall公司)纯化至电阻率大于18 M Ω cm.

(ii) 石墨烯的尺寸表征. 研究表明, 石墨烯的尺寸和厚度对其表面性质有很大的影响, 不同尺寸的石墨烯具有不同的毒性大小, 并且不同尺寸和厚度的石墨烯吸附性能也会有很大的差别^[21]. 因此, 为了研究石墨烯的毒性作用和其与TPP的联合毒理效应, 首先需对其尺寸进行表征. 原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)能够以纳米级分辨率获得物质的表面形貌结构和粗糙程度信息, 常被用于分析纳米材料的表面尺寸等形态特征. 对于石墨烯这种二维纳米材料, 通过AFM扫描, 既可以获得它的形状和尺寸信息, 还可以得到它的厚度信息^[22]. 本研究使用的石墨烯为购自美国Sigma公司的成品悬浊液(1.0 mg/mL), 但产品未标明石墨烯的尺寸特征, 所以需使用AFM对其尺寸大小和厚度进行表征.

石墨烯材料使用无水乙醇稀释至10 mg/L左右, 超声震荡1 h, 以使石墨烯纳米颗粒分散, 然后滴加到云母载玻片上, 晾干后使用AFM轻敲模式对石墨烯进行观察. 使用NanoScope Analysis 1.5软件进行图片和数据的处理.

(iii) 模拟生物膜的构建. 使用DPPC和DPPE在金电极表面构建模拟生物膜(自组装磷脂双分子层). DPPE分子头部含有巯基, 可以在金电极表面形成“Au-S”共价键, 所以将其作为第1层磷脂层共价结合到金电极表面. 磷脂分子一般都具有亲水的头部和疏水的尾部结构, 在水溶液中磷脂分子疏水的尾部就会积聚在一起. 因此, 可以通过亲水和疏水作用力的共同作用使DPPC在DPPE磷脂层表面形成第2层磷脂层, 从而形成自组装的DPPE-DPPC磷脂双分子层. 自组装磷脂双分子层的主要方法如下: 首先使用3000目砂纸对金电极进行打磨, 然后使用氧化铝粉末加水在麂皮上对金电极进行抛光处理; 然后将抛光后的金电极分别在无水乙醇和超纯水中进行超声清洗, 然后将电极在现配的浓硫酸-过氧化氢($H_2SO_4-H_2O_2$)混合溶液(体积比为3:1)中浸泡3 min,

以除去表面杂质,取出用超纯水冲洗干净.将电极连接到电化学工作站,使用0.1 mol/L的硫酸溶液作为电解液,通过循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)进行电位扫描,以进一步去除电极表面的杂质.电位区间0~1.6 V,扫描速度100 mV/s,扫描20周,扫描完成后使用超纯水清洗,吹干备用;之后使用无水乙醇将DPPE粉末溶解,配制成2 mmol/L DPPE溶液.在1.5 mL EP管中加入0.5 mL DPPE无水乙醇溶液,将处理好的金电极浸入,此时DPPE分子就会通过头部的巯基与金形成“Au-S”共价键,即可自组装形成单层膜.浸泡约16 h后将电极取出,使用无水乙醇清洗2 min,以除去电极表面非共价结合的DPPE分子.完成后使用超纯水清洗,吹干备用;最后按照“涂抹-冻结”法在DPPE分子层表面添加DPPC分子层,从而构建出磷脂双分子层^[23].首先使用正癸烷将DPPC粉末溶解,制成浓度为20 mg/mL的DPPC正癸烷溶液.在金电极支撑的DPPE单层膜表面滴加10 μ L配制好的DPPC溶液,室温放置约10 min,再在-20 $^{\circ}$ C冰箱放置约30 min,从而使正癸烷溶剂挥发.将电极取出后在室温下放置约15 min,待溶剂完全挥发后,将金电极在0.1 mol/L KCl溶液中浸泡2 h,这样DPPC分子就会在亲水和疏水两种作用力的共同作用下,自发在DPPE单层膜表面形成第2层磷脂膜.这种在金电极表面自组装形成的磷脂双层膜即可看作模拟生物膜,用于电化学检测.

(iv) 电化学检测. 使用三电极系统进行电化学检测.工作电极为经过双层膜修饰的金电极,参比电极为饱和甘汞电极,辅助电极为铂电极.电化学检测仪器为CHI 760D电化学工作站,采用交流阻抗法(EIS)检测模拟生物膜电导率和阻抗的变化.

交流阻抗参数设置:扫描频率范围为0.01 Hz~

100 kHz,信号振幅设为5 mV,实验采用的电解液为5 mmol/L铁氰化钾/亚铁氰化钾+0.1 mol/L氯化钾+0.1 mol/L硫酸盐缓冲溶液(PBS, pH 6.8).使用电化学工作站自带软件进行数据处理,然后使用Origin Pro 8.0软件作图.

实验时分别将不同浓度的石墨烯和TPP加入电解液中,每次测量前使用磁力搅拌器搅拌均匀.石墨烯单独作用的浓度为:0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L. TPP单独作用的浓度为:0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L. 联合作用使用1.0 mg/L石墨烯和1.0 mg/L TPP进行.每次实验前将石墨烯超声震荡1 h,以使石墨烯纳米颗粒分散.

2 结果与讨论

2.1 石墨烯材料的尺寸表征

通过AFM扫描,既可以获得石墨烯的形状和尺寸信息,还可以得到石墨烯的厚度信息.图1(a)为石墨烯片层的AFM扫描照片,从中可以看出大部分石墨烯纳米颗粒都具有十分锋利的边缘结构;图1(b)为根据AFM扫描数据绘制的石墨烯厚度图,从中可以看出本实验所使用的石墨烯材料厚度在1.0 nm左右,图中选取的3个石墨烯颗粒的横向尺寸分别为0.5, 1.0和0.8 μ m.经过对多个石墨烯颗粒的尺寸进行测量,石墨烯的横向尺寸主要在0.1~0.5 μ m.

2.2 模拟生物膜的表征

首先使用电化学交流阻抗法对在金电极表面自组装形成的磷脂双层膜进行表征,以验证其完整性. EIS又称电化学阻抗谱,经常用来研究工作电极的电导率和电感阻抗^[24].在交流阻抗图中,横坐标为阻抗实部,主要代表电解池的电阻;纵坐标为阻抗虚

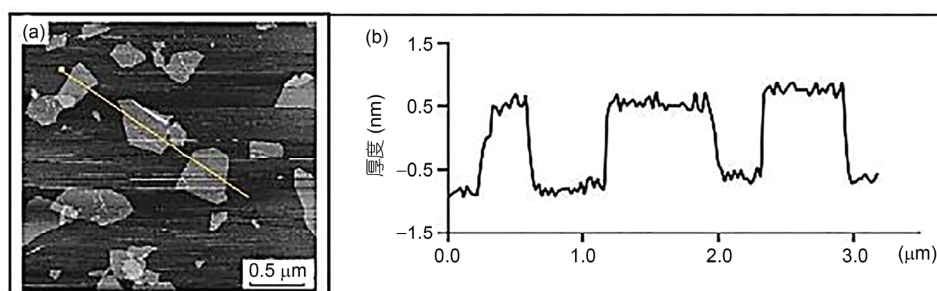


图1 AFM表征的石墨烯尺寸.(a) AFM扫描图片;(b) 通过AFM数据绘制的石墨烯厚度和尺寸图

Figure 1 Size characterization of graphene by AFM. (a) AFM image of graphene, (b) height and lateral size of graphene from AFM

部, 主要代表电解池的电容^[25]. 由于磷脂分子是电中性的, 所以磷脂双层膜具有绝缘性, 对电极界面与电解液之间的电子传递非常不利. 因此, 磷脂双层膜修饰的金电极具有很大的阻抗, 并且阻抗越大说明其完整性越好^[26].

图2为双层膜修饰的金电极、未经修饰的裸金电极、DPPC和DPPTTE分别修饰的金电极进行EIS测定的交流阻抗图, 图中的插图为未经修饰的裸金电极和DPPC修饰的金电极交流阻抗的放大图. 从图2可以看出, 未经修饰的裸金电极的交流阻抗图基本为一条直线, 说明电解液中的铁氰化钾和亚铁氰化钾分子很容易到达电极表面发生反应, 电极上的电子传输十分顺利, 表明此时的电化学反应只受扩散作用控制. DPPTTE修饰的金电极的EIS明显大于裸电极和DPPC修饰的电极, 而双层膜修饰金电极的交流阻抗图出现明显的半圆, 阻抗上升多个数量级, 在所有的实验组中阻抗最大, 表明电极表面的电子传递过程受到了极大的阻碍, 这是表面控制过程.

交流阻抗谱的实验结果可以通过模拟电路图进行数据拟合, 从而得到更加准确的实验结果. 本研究采用Zview 3.1软件对双层膜修饰金电极的交流阻抗结果进行数据拟合. 在考虑了溶液电阻、磷脂膜电阻及电极与溶液界面双层电容等因素的影响, 综合电极结构的特点及阻抗谱的特征提出了模拟等效电路, 得到如图3所示的等效电路图. 图中 R_s 为电解液电阻, R_m 为双层磷脂膜电阻, Q_m 为常相位角元件(constant

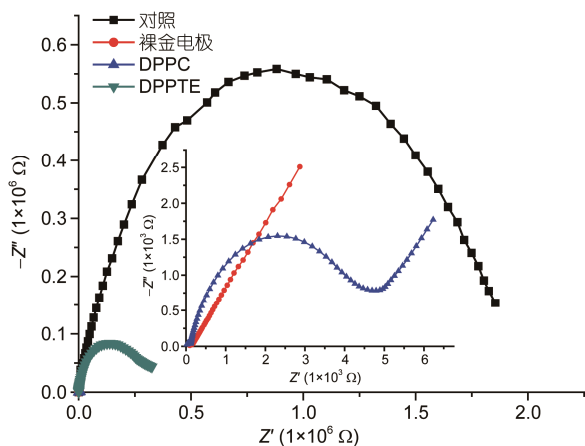


图2 (网络版彩色)双层膜修饰金电极、裸金电极、DPPC和DPPTTE的交流阻抗图

Figure 2 (Color online) Electrochemical impedance spectroscopy of bilayer membrane modified electrode, no-modified electrode, DPPC-modified electrode, and DPPTTE-modified electrode

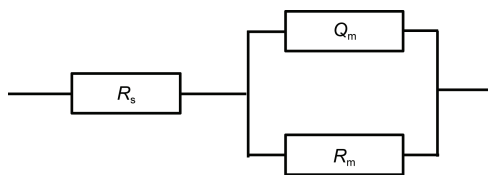


图3 阻抗拟合的等效电路图

Figure 3 Equivalent circuit diagram of EIS fitting

phase element, CPE), CPE为代表电极与溶液界面双层电容的等效元件, 表征“弥散效应”. CPE-T和CPE-P分别表示常相位角元件的两个参数.

在Zview 3.1软件中使用图3的等效电路图对双层膜修饰金电极的交流阻抗谱数据进行拟合, 各元件的相对误差(Error%)都小于5%, 且误差最大的 R_s 的相对误差仅为4.36%, 各元件拟合的数值如表1所示. R_m 达到 $4.46 \times 10^6 \Omega$, 阻抗很大, 说明电极表面成功地制备出了支撑磷脂膜. 由此表明本实验中构建的磷脂双层膜完整性良好, 可以用于下一步的检测分析.

2.3 石墨烯与模拟生物膜的相互作用

在电化学检测过程中, 假设磷脂膜在电解液铁氰化钾/亚铁氰化钾氧化还原电对的不断作用下, 其本身的完整性不会发生显著性变化. 为了证实这一假设, 我们检测了同一膜电极连续工作多次是否受到显著影响, 设计了时间动力学EIS测定, 观察磷脂膜的EIS变化. 结果如图4(a)所示.

结果表明, 在实验时间范围内电解液本身对磷脂膜并未造成显著性破坏, 因此不会对实验结果的准确性产生显著影响. 使用双层膜修饰电极与不同浓度石墨烯进行检测, 结果如图4(b)所示. 使用图3的等效电路图对各实验组进行数据拟合, 得到各组表征磷脂膜电阻的 R_m 值, 结果如表2所示.

从图4和表2可以看出, 通过在电解液中加入不同浓度的石墨烯, 双层膜修饰电极的交流阻抗图发生了明显的变化, 而且随着石墨烯浓度的不断增加, 其阻抗在不断降低. 阻抗的降低表明电解液中的铁氰化钾/亚铁氰化钾分子探针到达金电极表面时受到

表1 各元件的拟合结果和相对误差

Table 1 Fitting results and relative errors of each element

| 元件 | $R_s(\Omega)$ | $R_m(\Omega)$ | Q_m -CPE-T | Q_m -CPE-P |
|---------|---------------|--------------------|-----------------------|--------------|
| 拟合结果 | 71.32 | 4.64×10^6 | 4.98×10^{-7} | 0.75 |
| 相对误差(%) | 4.36 | 1.58 | 0.28 | 2.25 |

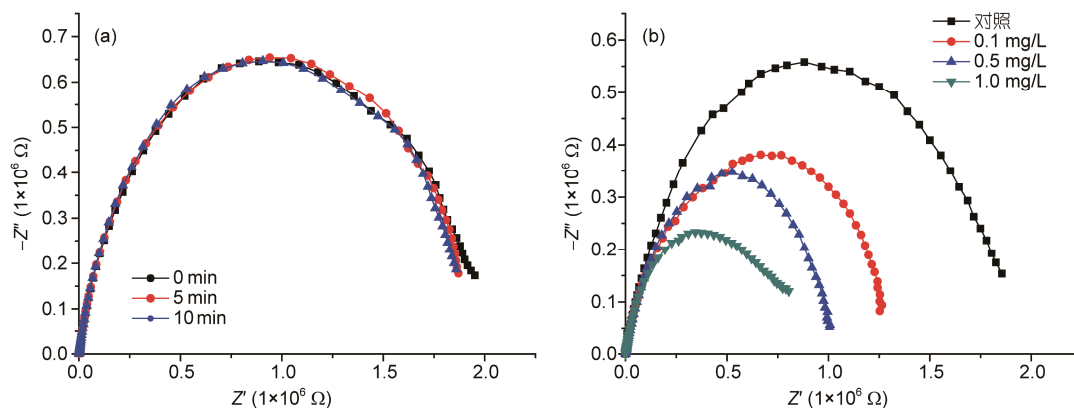


图4 (网络版彩色)交流阻抗图。(a) 不同时间点的双层膜修饰电极;(b) 双层膜修饰电极与不同浓度石墨烯作用
Figure 4 (Color online) Electrochemical impedance spectroscopy. (a) Bilayer membrane modified electrode at different time points; (b) the effect of bilayer membrane modified electrode with different concentrations of graphene

表2 各实验组数据拟合的 R_m 值

Table 2 R_m of each experimental group

| 石墨烯浓度(mg/L) | 0 | 0.1 | 0.5 | 1.0 |
|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| $R_m(\Omega)$ | 7.13×10^6 | 5.67×10^6 | 3.70×10^6 | 2.89×10^6 |
| 相对误差(%) | 3.24 | 1.17 | 2.16 | 2.49 |

的阻力降低,说明加入石墨烯后双层膜的通透性增加,石墨烯的接触对磷脂双层膜具有破坏作用。

石墨烯与模拟生物膜可以通过多种机制相互作用,首先石墨烯锋利的边缘结构会对模拟生物膜造成一定的物理破坏,其次石墨烯可以通过吸附作用抽取模拟生物膜的磷脂分子从而对膜的完整性产生影响,然后石墨烯材料还可以被模拟生物膜包裹形成囊泡^[27]。同时,石墨烯与模拟生物膜之间的相互作用受到多种因素的影响。石墨烯材料表面官能团的种类和其本身的形状大小对与模拟生物膜的结合有很大的影响,含氧官能团较多的氧化石墨烯和大尺寸的石墨烯材料更容易不可逆地贴附到模拟生物膜表面^[28]。模拟生物膜是否带电及周围水溶液的pH对石墨烯与模拟生物膜的结合也有影响,石墨烯材料不易与电中性的模拟生物膜发生作用^[29]。

分子动力学模拟也表明,石墨烯材料与细胞膜之间的作用主要受纳米材料本身的形状大小和表面修饰基团等自身性质及构成细胞膜的磷脂分子种类等因素的影响,同时还会受到外界环境中各种分子的影响。Tu等人^[27]通过分子动力学模拟发现石墨烯纳米片不仅可以插入细胞膜,还可以通过吸附作用抽取磷脂分子,从而对细胞膜产生破坏。Guo等人^[30]

通过计算机模拟,探讨了石墨烯纳米片与脂质双层膜的相互作用,发现石墨烯片层的大小和边缘对两者间的相互作用有很大影响,小尺寸的石墨烯容易插入双层磷脂膜,大尺寸的石墨烯则可以使双层磷脂膜发生易位,并且边缘光滑的圆形石墨烯可以更快地与磷脂膜发生作用。

细胞或动物活体的实验结果表明,石墨烯纳米材料对细胞膜具有破坏作用,且与石墨烯材料的表面结构和尺寸大小密切相关^[27]。Bianco^[31]用秀丽隐杆线虫进行石墨烯纳米材料的毒性研究,发现石墨烯纳米材料可以通过物理切割作用对细胞膜产生破坏。Qu等人^[14]通过体外细胞实验也发现石墨烯及其衍生物可以破坏细胞膜从而进入细胞内部,并且不同尺寸大小的石墨烯对细胞膜产生的破坏作用也会不同。大尺寸的石墨烯容易吸附到细胞膜表面并对细胞膜产生物理破坏,小尺寸的石墨烯则通过细胞的吞噬作用进入细胞内部。本实验以人工磷脂双层膜作为生物膜模型进行研究,也表明石墨烯片层对细胞膜具有一定的破坏作用,可以影响细胞膜的通透性,说明石墨烯在与细胞接触时会穿过细胞膜进入细胞内部。

2.4 TPP与模拟生物膜的相互作用

图5为不同浓度TPP与双层膜修饰电极作用后的交流阻抗图,对各组的交流阻抗数据进行拟合,所得 R_m 的结果见表3。从图5和各组的 R_m 值可以看出,通过在电解液中加入不同浓度的TPP,双层膜修饰电极的交流阻抗图发生了明显的变化,而且随着TPP浓度的不断增加,阻抗不断降低。阻抗降低表明电极上电

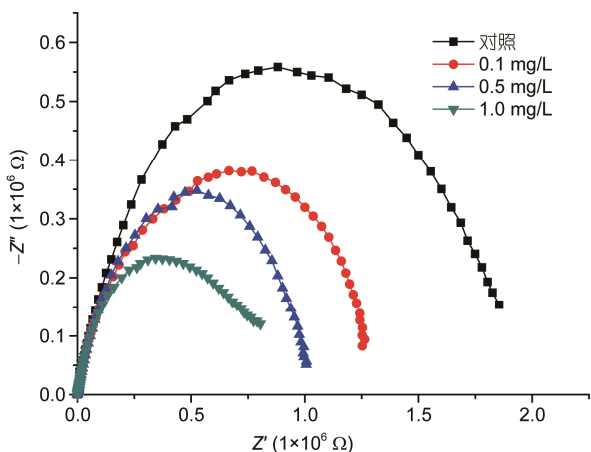


图5 (网络版彩色)双层膜修饰电极与不同浓度TPP作用后的交流阻抗图

Figure 5 (Color online) Electrochemical impedance spectroscopy of bilayer membrane modified electrode with different concentration of TPP

表3 各TPP暴露组数据拟合的 R_m 值

Table 3 R_m of each experimental group exposure of TPP

| 组别 | 对照 | 0.1 mg/L TPP | 0.5 mg/L TPP | 1.0 mg/L TPP |
|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| $R_m(\Omega)$ | 7.05×10^6 | 4.01×10^6 | 3.07×10^6 | 2.03×10^6 |
| 相对误差(%) | 3.39 | 3.17 | 2.89 | 3.03 |

子传递的阻碍降低,说明TPP作用后双层膜的通透性增加,TPP接触使磷脂双层膜的完整性受到了破坏.

TPP是一种有机磷酸酯阻燃剂,由3个苯环取代磷酸基团上的氢原子形成,是一种疏水性的分子^[32].作为一种亲脂性分子,TPP分子很容易融入细胞膜等磷脂双分子层中,并透过细胞膜进入细胞内部^[33].本实验结果表明,TPP分子可以进入磷脂膜,且嵌入磷脂膜后由于其形状的不规则会破坏磷脂膜的完整性,从而导致双层膜修饰电极的阻抗明显降低.因此,TPP在与人体接触并进入体内后,既可以破坏细胞膜的完整性影响细胞的正常功能,又很容易穿过细胞膜进入细胞产生进一步的影响.相关研究表明,TPP具有一定的生物毒性并在现实中具有很大的需求量和生产量,因此TPP对人类健康和环境安全存在着巨大的潜在危害^[32].

2.5 石墨烯和TPP对模拟双层膜的联合作用

本实验使用电化学交流阻抗法研究石墨烯和TPP对支撑磷脂双层膜的联合作用.图6为1.0 mg/L

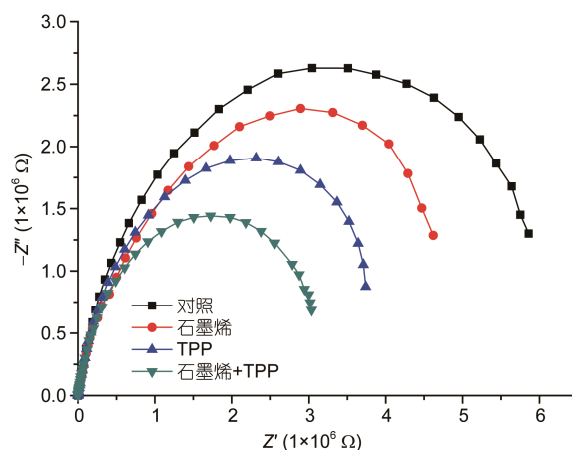


图6 (网络版彩色)石墨烯和TPP共同作用时的交流阻抗图

Figure 6 (Color online) Electrochemical impedance spectroscopy of interaction between graphene and TPP

石墨烯和1.0 mg/L TPP单独以及共同作用时双层膜修饰金电极的交流阻抗图.从图6可以看出,相同质量浓度下TPP作用后阻抗的降低程度比石墨烯作用时更加明显,而且两者共同作用时膜电极的阻抗进一步降低,降低程度显著强于二者分别单独所用,推测石墨烯和TPP对磷脂膜的破坏作用可能具有一定的协同作用.

石墨烯既可以通过吸附作用抽取磷脂分子^[27],又可以吸附TPP,所以当石墨烯和TPP共同作用于磷脂膜时,磷脂分子与TPP之间会存在竞争关系.根据实验结果推测,石墨烯和TPP联合作用于模拟生物膜时可能表现出一定的协同作用,但不能说明石墨烯对哪种分子的吸附能力更强.石墨烯材料经表面功能化处理后,可以提升对某种物质的吸附能力,并可以携带这些物质透过细胞膜进入细胞,在医学上可以利用石墨烯的这种性质使其作为药物载体进行药物输送^[34].石墨烯和TPP联合作用时会受到很多因素的影响,使用模拟生物膜只能初步研究石墨烯和TPP对生物膜的联合作用,作用于实际的生物膜时还是受到膜蛋白和膜糖等更多因素的影响.

由于石墨烯具有很强的吸附性,当与其他污染物同时存在时,会通过吸附作用对它们的毒性产生影响.多氯联苯(PCBs)是一种含苯环的有机污染物,研究发现石墨烯对PCBs具有很强的吸附作用,且吸附能力的大小会受到石墨烯本身性质、温度和pH等的影响^[35].TPP分子也具有多个苯环结构,在被石墨烯吸附后它们之间的结合会比较牢固,所以两者联

合作用时石墨烯会对TPP的毒性和行为产生很大的影响。综上所述,石墨烯和TPP均可以破坏磷脂双层膜的完整性,并推测两者同时存在时可能表现出一定的协同作用,但这种协同作用的分子机制有待于进一步的研究。

3 结论

石墨烯纳米材料具有独特的表面性质,可以吸附环境中的污染物,并影响它们的环境行为,进而对

生态环境和环境安全具有潜在风险性。系统研究石墨烯与污染物的联合毒理效应,是有效评价石墨烯生态风险的重要前提。本研究采用电化学方法,检测了石墨烯和TPP与模拟生物膜间的相互作用。结果表明,石墨烯和TPP均可以使双层膜修饰金电极的阻抗降低,说明两者均可以破坏模拟生物膜的完整性。石墨烯和TPP同时作用时模拟生物膜受到的破坏程度增大,推测可能表现出一定的协同作用。本研究结果可以为评价石墨烯和TPP的生态风险提供理论依据和数据支持。

参考文献

- 1 Yan J D. Strategic consideration of nanotechnology development in China (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2015, 60: 30–37 [闫金定. 我国纳米科学技术发展现状及战略思考. *科学通报*, 2015, 60: 30–37]
- 2 Chen A, Chatterjee S. Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 5425–5438
- 3 Zhang Q, Huang J, Qian W, et al. The road for nanomaterials industry: A review of carbon nanotube production, post-treatment, and bulk applications for composites and energy storage. *Small*, 2013, 9: 1237–1265
- 4 Klaine S J, Alvarez P J, Batley G E, et al. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem*, 2008, 27: 1825–1851
- 5 White J C, Xing B S. Environmental nanotoxicology. *Environ Sci Technol*, 2016, 50: 5423
- 6 Nel A, Xia T, Mädler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 2006, 311: 622–627
- 7 Wiesner M R, Lowry G V, Alvarez P, et al. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 4336–4345
- 8 Du J Y, Wei Y P, Liu F F, et al. Adsorption behavior and mechanism of environmental pollutants on graphene oxide (in Chinese). *Adv Earth Sci*, 2016, 31: 1125–1136 [杜佳媛, 魏永鹏, 刘菲菲, 等. 氧化石墨烯对环境污染物的吸附行为及吸附机理. *地球科学进展*, 2016, 31: 1125–1136]
- 9 Balbi T, Smerilli A, Fabbri R, et al. Co-exposure to n-TiO₂ and Cd²⁺ results in interactive effects on biomarker responses but not in increased toxicity in the marine bivalve *M. galloprovincialis*. *Sci Total Environ*, 2014, 493: 355–364
- 10 Zhao J, Wang Z, White J C, et al. Graphene in the aquatic environment: Adsorption, dispersion, toxicity and transformation. *Environ Sci Technol*, 2014, 48: 9995–10009
- 11 Ding J, Shen X, Liu W, et al. Occurrence and risk assessment of organophosphate esters in drinking water from Eastern China. *Sci Total Environ*, 2015, 538: 959–965
- 12 Li J, Yu N, Zhang B, et al. Occurrence of organophosphate flame retardants in drinking water from China. *Water Res*, 2014, 54: 53–61
- 13 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: 7–17 [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: 7–17]
- 14 Qu G, Liu S, Zhang S, et al. Graphene oxide induces tol-like receptor 4 (TLR4)-dependent necrosis in macrophages. *ACS Nano*, 2013, 7: 5732–5745
- 15 Jarosz A, Skoda M, Dudek I, et al. Oxidative stress and mitochondrial activation as the main mechanisms underlying graphene toxicity against human cancer cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5851035
- 16 Wu L, Jiang X. Recent developments in methodology employed to study the interactions between nanomaterials and model lipid membranes. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408: 2743–2758
- 17 Hughes A V, Holt S A, Daulton E, et al. High coverage fluid-phase floating lipid bilayers supported by omega-thiolipid self-assembled monolayers. *J R Soc Interface*, 2014, 11: 20140447
- 18 Guha I, Kedzierski J, Abedian B. Electrical conductance across self-assembled lipid bilayers. *J Appl Phys*, 2013, 113: 54301
- 19 Sugawara M, Kojima K, Sazawa H, et al. Ion-channel sensors. *Anal Chem*, 1987, 59: 2842
- 20 Harris J J, Bruening M L. Electrochemical and *in situ* ellipsometric investigation of the permeability and stability of layered polyelectrolyte films. *Langmuir*, 2000, 16: 2006–2013

- 21 Zhu Y, Murali S, Cai W, et al. Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications. *Adv Mater*, 2010, 22: 3906–3924
- 22 Hosseini M G, Rasouli H, Shahryari E. Electrochemical behavior of a Nafion-membrane-based solid-state supercapacitor with a graphene oxide-multiwalled carbon nanotube-polypyrrole nanocomposite. *J Appl Polym Sci*, 2017, 134: 44926–44935
- 23 Chen G F, Chen Y Y, Yang N N, et al. Interaction between curcumin and mimetic biomembrane. *Sci China Life Sci*, 2012, 55: 527–532
- 24 Zhu Y, Zhang H, Zhang Z, et al. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) of hydration process and drying shrinkage for cement paste with W/C of 0.25 affected by high range water reducer. *Constr Build Mater*, 2017, 131: 536–541
- 25 Nechache A, Cassir M, Ringuedé A. Solid oxide electrolysis cell analysis by means of electrochemical impedance spectroscopy: A review. *J Power Sources*, 2014, 258: 164–181
- 26 Doménech Ò, Merino-Montero S, Montero M T, et al. Surface planar bilayers of phospholipids used in protein membrane reconstitution: An atomic force microscopy study. *Colloid Surface B*, 2006, 47: 102–106
- 27 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
- 28 Frost R, Svedhem S, Langhammer C, et al. Graphene oxide and lipid membranes: Size-dependent interactions. *Langmuir*, 2016, 32: 2708–2717
- 29 Lei H, Zhou X, Wu H, et al. Morphology change and detachment of lipid bilayers from the mica substrate driven by graphene oxide sheets. *Langmuir*, 2014, 30: 4678–4683
- 30 Guo R, Mao J, Yan L. Computer simulation of cell entry of graphene nanosheet. *Biomaterials*, 2013, 34: 4296–4301
- 31 Bianco A. Graphene: Safe or toxic? The two faces of the medal. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 4986–4997
- 32 Pan L L, Li G Y, Su Y C, et al. Fire retardant mechanism analysis between ammonium polyphosphate and triphenyl phosphate in unsaturated polyester resin. *Polym Degrad Stabil*, 2012, 97: 1801–1806
- 33 Jiang D, Zhou J G, Li N, et al. Quantitative structure-activity relationships between acute toxicity of organophosphates and *vibrio qinghaiensis* sp. -Q67 (in Chinese). *Asian J Ecotoxicol*, 2014, 9: 71–80 [姜丹, 周建国, 李娜, 等. 有机磷酸酯对青海弧菌 Q67 毒性的构效关系. *生态毒理学报*, 2014, 9: 71–80]
- 34 Bali Prasad B, Kumar A, Singh R. Synthesis of novel monomeric graphene quantum dots and corresponding nanocomposite with molecularly imprinted polymer for electrochemical detection of an anticancerous ifosfamide drug. *Biosens Bioelectron*, 2017, 94: 1–9
- 35 Gao L W, Li D Q, Zhuo M N, et al. Organophosphorus flame retardants and plasticizers: Sources, occurrence, toxicity and human exposure. *Environ Pollut*, 2015, 196: 29–46

Summary for “电化学方法研究石墨烯和磷酸三苯酯(TPP)与模拟生物膜间的相互作用”

Interaction between graphene joint triphenyl phosphate (TPP) and the simulated phospholipid bilayer of electrochemical research

LI Fei¹, DING JiaWang¹, WU HuiFeng^{1,2*}, MENG XiangJing^{1,3} & ZHAO JianMin¹

¹Key Laboratory of Coastal Zone Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research (YIC), Yantai 264003, China;

²Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

* Corresponding author, E-mail: hfwu@yic.ac.cn

In the natural environment, organisms are frequently exposed to complex mixtures of pollutants. These pollutants usually enter organisms simultaneously, which leads to joint toxicological effects. With excellent adsorption properties, graphene nanomaterials can interact with other pollutants when they are released into the environment, which may affect the environmental behavior of these pollutants. The molecule structure of triphenyl phosphate (TPP) contains three benzene rings, which leads to that TPP interact with graphene easily. With the mass demand and production of graphene and TPP, it is of great significance to study the joint toxicological effects of graphene and TPP, which will provide theoretical basis and data support for ecological risk assessment. The cell membrane is an important barrier of organism to resist external environment. The environmental pollutants usually act on the cell membrane and then enter the cells to produce toxic effects. Studies have shown that graphene and its derivatives can damage cell membrane in the process of interaction. After entering the cell, graphene can bind with receptors and produce reactive oxygen species, which may have a more serious impact. The biological membrane consists of various phospholipids bilayer membrane structures. The interactions between graphene nanomaterials and biological membrane can be studied simply and effectively using the simple artificial biofilm model. The solid supported bilayer membrane is a kind of simulated biofilm which can be simply prepared, easily repeated and stably performed. At present, the electrochemical technology plays an important role in the characterization of the bilayer membrane supported on the metal surface, which has gained more and more applications in the study field of biofilm. The electrochemical impedance spectroscopy (EIS) can preliminary assess the membrane permeability, and can be used as sensitive detector to membrane structure change. Hence, the electrochemical methods can be used to study the interactions between small molecular contaminants and simulated biofilm. In this study, the "frozen-blotted out" method was adopted to construct covalent binding phospholipid bilayer on the gold electrode surface, thus forming simulation of biofilm, and the EIS was used to study the interactions between graphene/TPP and the simulated phospholipid bilayer. The results showed that graphene and TPP could reduce the impedance of the bilayer membrane modified gold electrode, which indicated that graphene and TPP could influence the permeability of cell membrane and damage the integrity of the simulated phospholipid bilayer. With the combined effects of graphene and TPP, the damage of simulated biomembrane was increased, suggesting a synergistic effect. The pollutants through the cell membrane may interact with large molecules such as DNA or protein in cells, these results can provide theoretical basis for evaluating the ecological risks of this kind of pollutants.

grapheme, triphenyl phosphate (TPP), simulated phospholipid bilayer, joint action

doi: 10.1360/N972017-00556