

基于石墨烯的纳米材料可否在干细胞领域应用

https://doi.org/10.12307/2022.099

沈佳华, 付勇

投稿日期: 2020-06-20

送审日期: 2020-06-30

采用日期: 2020-11-09

在线日期: 2021-03-25

中图分类号:

R459.9; R318.08; R-1

文章编号:

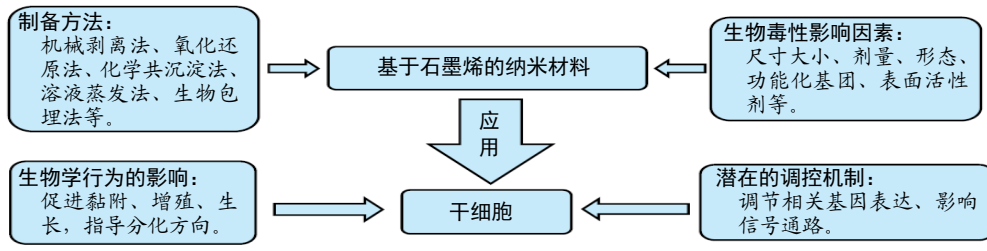
2095-4344(2022)04-00604-06

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章描述—

△石墨烯作为一种材料具有许多优良性能,目前已经开发出了许多基于石墨烯的纳米材料,将其引入干细胞领域后,发现这些纳米材料对多种不同的干细胞的生物学行为有不同的影响,可以应用于组织工程及生物医学方面。
△文章阐释了目前制备基于石墨烯纳米材料的常用方法,总结了这些纳米材料对不同干细胞黏附、增殖、生长和分化方面的作用及其调控干细胞机制方面的研究,探讨了石墨烯材料的生物毒性机制及影响毒性因素。



文题释义:

基于石墨烯的纳米材料: 石墨烯是一种单原子厚度的二维六边形碳原子薄片,由sp²杂化轨道上的碳原子构成,可以通过各种方法结合各种基团制备出许多具有不同性能的基于石墨烯的纳米材料,被应用于电化学、催化化学反应、燃料电池及生物医学等领域。

干细胞: 是一类具有自我复制能力的多潜能细胞,在一定条件下可以分化成多种功能细胞,将干细胞或相关衍生产品移植入患者体内有望替代损伤细胞,从而治愈疾病,因此干细胞在疾病治疗和再生医学领域有广阔应用前景。

摘要

背景: 石墨烯作为一种新兴的纳米材料被应用于各个领域,有许多研究发现基于石墨烯的纳米材料可以影响干细胞的生物学行为。

目的: 综述基于石墨烯的纳米材料在干细胞领域的应用及进展。

方法: 使用主题词及关键词检索PubMed、Web of Science及CNKI中国期刊全文数据库中收录的涉及基于石墨烯的纳米材料在干细胞领域应用的文献。英文检索词为“graphene, nanomaterials, stem cell”,中文检索词为“石墨烯; 纳米材料; 干细胞”,最终纳入57篇文献进行总结论述。

结果与结论: 基于石墨烯的纳米材料具有良好的稳定性和耐腐蚀性、较高的机械强度、良好的生物相容性,在生物医学中拥有广泛的应用前景。干细胞作为一种可以分化为人体内各种分化成熟细胞的未分化细胞,在组织工程、再生医学等领域具有广阔的应用前景。目前许多研究证明,基于石墨烯的纳米材料能影响干细胞的生物学行为,能促进各种干细胞的生长、增殖、黏附和分化,并且这些纳米材料可能通过调节相关基因表达、各种信号通路等方面影响干细胞的生物学行为。但基于石墨烯的纳米材料具有生物毒性,制约其在生物方面的应用,并且目前研究多在细胞层面,如何应用于生物体内仍需进一步研究。

关键词: 材料; 石墨烯; 纳米材料; 干细胞; 黏附; 增殖; 生长; 分化; 组织工程; 再生医学; 综述

Application of graphene-based nanomaterials in stem cells

Shen Jiahua, Fu Yong

Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, Zhejiang Province, China

Shen Jiahua, Master candidate, Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, Zhejiang Province, China

Corresponding author: Fu Yong, MD, Chief physician, Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, Zhejiang Province, China

Abstract

BACKGROUND: As a kind of newly-developing nanomaterial, graphene has been used in many fields. Many recent studies have found that graphene-based nanomaterials can affect the biological behaviors of stem cells.

OBJECTIVE: To review the application and progress of graphene-based nanomaterials in stem cells.

浙江大学医学院附属儿童医院, 浙江省杭州市 310052

第一作者: 沈佳华, 女, 1995年生, 浙江省杭州市人, 汉族, 浙江大学医学院在读硕士, 主要从事耳鼻咽喉科学研究。

通讯作者: 付勇, 博士, 主任医师, 浙江大学医学院附属儿童医院, 浙江省杭州市 310052

https://orcid.org/0000-0001-7566-7377 (沈佳华)

引用本文: 沈佳华, 付勇. 基于石墨烯的纳米材料可否在干细胞领域应用 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(4):604-609.



METHODS: We searched the articles about the application of graphene-based nanomaterials in stem cells published in PubMed, Web of Science, and CNKI databases with the search terms “graphene, nanomaterials, stem cell” in English and Chinese. Finally, 57 articles met the criteria for review.

RESULTS AND CONCLUSION: Graphene-based nanomaterials have good stability and corrosion resistance, high mechanical strength, good biocompatibility, which are accepted as one of the most promising nanomaterials in biomedicine. Stem cells are undifferentiated cells that can differentiate into various mature cells in human body, which have a broad application prospect in tissue engineering, regenerative medicine and other fields. Many recent studies have applied graphene-based nanomaterials to stem cell research and found that they can affect the growth, proliferation, adhesion and differentiation of stem cells, and these nanomaterials may affect the biological behavior of stem cells by regulating the expression of related genes and various signaling pathways. However, graphene-based nanomaterials have biological toxicity, which restrict their application in biological aspects. Moreover, most researches only involved cellular level, and it needs further animal studies and *in vivo* experimental researches.

Key words: material; graphene; nanomaterials; stem cells; adhesion; proliferation; growth; differentiation; tissue engineering; regenerative medicine; review

How to cite this article: SHEN JH, FU Y. Application of graphene-based nanomaterials in stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(4):604-609.

0 引言 Introduction

石墨烯是一种单原子厚度的二维六边形碳原子薄片，由 sp² 杂化轨道上的碳原子构成^[1]。2004 年，英国科学家 NOVOSELOV 等^[2]通过微机械力剥离制备了石墨烯而获得诺贝尔物理学奖，石墨烯成为了目前最有前途的纳米材料之一。近年来开发了许多基于石墨烯的纳米材料^[3]，比如氧化石墨烯、还原氧化石墨烯、功能化石墨烯等，尽管石墨烯材料具有天然生物毒性^[4]，但是由于比表面积大、弹性延性好、生物相容性好、机械强度高优点，在平衡生物毒性后可应用于生物传感器、生物成像、医学诊断与治疗及干细胞和组织工程等领域^[2, 5-6]。

干细胞是一类具有自我复制能力的多潜能细胞，在一定条件下可以分化成多种功能细胞，根据其发展阶段，干细胞可分为两大类，胚胎干细胞和体细胞干细胞。胚胎干细胞是从胚胎中分离出来的一类干细胞，而具有与胚胎干细胞相似特性的诱导多能干细胞，是通过引入某些基因和因子的表达将体细胞基因重编程产生的。胚胎干细胞和诱导多能干细胞是具有最大分化潜能和无限自我更新能力的干细胞，鉴于这种特性，可以通过将其或其相关衍生产品移植入患者体内替代损伤细胞，从而治愈疾病。近年来，从骨髓、脂肪组织、脐血和神经组织中分离出的间充质干细胞及神经干细胞作为体细胞干细胞，已成为用于组织再生和组织工程中受关注的干细胞来源。由于在疾病治疗和再生医学领域的广阔应用前景，干细胞已成为 21 世纪生命科学和医学研究的前沿和热点^[7]。许多研究发现，各种因素都能影响干细胞的生物学行为，但是目前干细胞定向分化、维持和调控的机制尚不清楚，这成为了目前干细胞研究面临的瓶颈问题^[8]。

许多研究将基于石墨烯的纳米材料引入干细胞领域后，发现这些纳米材料对多种不同的干细胞的黏附、增殖、生长和分化具有积极的促进作用，同时在调控机制方面的研究取得了一定的进展^[9-10]。但是石墨烯材料的天然生物毒性制约着其在干细胞方面的应用，如何在控制其生物毒性的同时发挥最大的优势也是值得研究的问题^[11]。文章将介绍基于石墨烯的纳米材料在干细胞领域的应用和进展，为今后的基础及临床应用研究提供一定的理论基础。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者在 2019 年 12 月进行检索。在 PubMed、Web of Science 及 CNKI 中国期刊全文数据库检索 1994 年 12 月至 2019 年 12 月的相关文献，以“graphene, nanomaterials, stem cell”为英文检索词，以“石墨烯；纳米材料；

干细胞”为中文检索词，进行主题词及关键词检索。

1.2 入选标准 涉及石墨烯纳米材料制备的相关研究；涉及应用石墨烯纳米材料影响干细胞生物学行为及可能调节机制的相关研究；涉及基于石墨烯的纳米材料毒性的相关研究；以及纳入文献中的引用文献。通过文献精读后提炼出与文章相关性较强的研究原著及综述性论文，排除与研究目的不相关的文献及内容重复或观点陈旧的文献。

1.3 数据的提取 共检索到文献 201 篇，其中英文文献 183 篇、中文文献 18 篇，排除研究目的相关性差及内容陈旧、重复文献 144 篇，纳入 57 篇符合标准的文献进行综述，见图 1，分别探讨了石墨烯纳米材料的制备方法、石墨烯纳米材料对干细胞生物行为的影响及可能的调节机制、石墨烯材料的生物毒性。

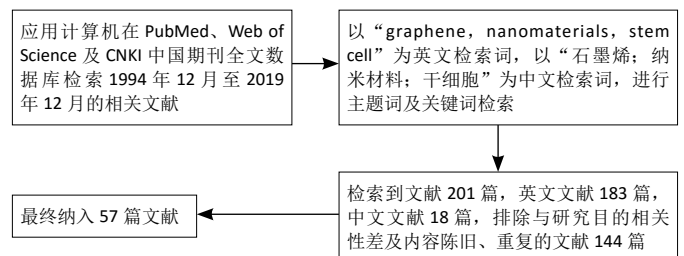


图 1 | 文献筛选流程图

2 结果 Results

2.1 基于石墨烯纳米材料的制备方法 石墨烯材料的传统制备方法有机械剥离法、氧化还原法、化学共沉淀法、石墨化法、溶剂化法、热方法、有机合成、溶液蒸发法、热剥离与液相夹层及电化学剥离等^[5, 10, 12]。石墨烯薄片存在基面和边缘两个位置，通过在基面和边缘上进行共价添加不同基团可以改变石墨烯的结构，实现石墨烯的功能化，以制备成不同的基于石墨烯的纳米材料，这些制备成的纳米材料具有与石墨烯不同的电子和化学性质，可以用于不同的干细胞研究中^[13]。常用石墨烯纳米材料的制备方法见表 1。

表 1 | 常用的石墨烯纳米材料的制备方法

制备方法	原料	制备结果	文献
氧化还原法	石墨	氧化石墨烯、石墨烯	CHEN 等 ^[14]
还原法	抗坏血酸、氧化石墨烯	还原氧化石墨烯	ZHAO 等 ^[15]
化学共沉淀法	氧化石墨烯、氧化亚铁	磁化氧化石墨烯	SUN 等 ^[16]
溶液蒸发法	聚乳酸-羟基乙酸、氧化石墨烯	聚乳酸-羟基乙酸/氧化石墨烯	FU 等 ^[17]
生物包埋法	r-藻红蛋白分子、硝酸银、氧化石墨烯	氧化石墨烯-银	CHOI 等 ^[18]

2.2 基于石墨烯的纳米材料对干细胞生物学行为的影响

2.2.1 胚胎干细胞 胚胎干细胞是从早期胚胎中分离出来的一类细胞，具有多能性，能够分化为3种胚胎胚层中的所有细胞类型，进而分化成体动物所有的组织和器官。胚胎干细胞具有无限的增殖和分化能力，已被广泛应用于组织工程和再生医学领域^[7]。

ZHAO等^[15]报道还原氧化石墨烯能代替滋养细胞、细胞外基质作为培养基，能让小鼠胚胎干细胞在其表面上快速黏附和增殖，同时通过比较孔径大小发现，30 μm孔径的还原氧化石墨烯能显著促进和维持胚胎干细胞的自我更新能力并维持多能性。

GARCIA-ALEGRIA等^[19]研究发现，氧化石墨烯涂层覆盖的玻璃器皿表面能促进小鼠和人的胚胎干细胞向造血祖细胞的分化。YANG等^[20]研究了小鼠胚胎干细胞分别在碳纳米管、石墨烯和氧化石墨烯上的分化，结果表明，只有氧化石墨烯能有效促进胚胎干细胞向多巴胺神经元的分化，并进一步增强多巴胺神经元相关基因的表达。

2.2.2 诱导多能干细胞 诱导多能干细胞是一种通过4种转录因子(Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc)的过表达将体细胞重新编程至多能状态的干细胞，这种干细胞与胚胎干细胞具有相似的分化能力，几乎可以分化成3胚层中所有类型的细胞，还能克服使用胚胎干细胞的伦理问题，允许进行基因定制，为组织工程和再生医学提供了新的机遇^[7, 21]。

YANG等^[20]使用石墨烯和氧化石墨烯作为底物培养诱导多能干细胞，发现相比于玻璃表面，石墨烯表面培养的诱导多能干细胞具有与之相似的细胞黏附和增殖程度，而氧化石墨烯表面的诱导多能干细胞的黏附和增殖速度更快。氧化石墨烯能加速诱导多能干细胞的分化，而石墨烯能较好地保持诱导多能干细胞的未分化状态。石墨烯和氧化石墨烯表面培养的诱导多能干细胞能自发分化为外胚层和中胚层细胞，但石墨烯抑制诱导多能干细胞向内胚层谱系的分化，氧化石墨烯能增强诱导多能干细胞向内胚层谱系的分化，这证明了石墨烯和氧化石墨烯的不同表面性质对诱导多能干细胞的行有有不同的影响。

SABURI等^[22]将诱导多能干细胞分别在静电纺丝法制备的聚乙烯-氧化石墨烯和聚乙烯表面上培养，比较培养出的细胞在碱性磷酸酶活性和钙含量、Runx2、骨钙素、骨连接基因表达的不同，证实了聚乙烯-氧化石墨烯表面能增强诱导多能干细胞体外成骨分化的潜能。

2.2.3 间充质干细胞 间充质干细胞是一种多能性细胞，存在于多种组织如骨髓、脐血和脐带组织、胎盘组织、脂肪组织中，具有自我更新和分化为多种特定细胞的潜能，可以诱导分化为成骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞、成软骨细胞和神经元等，其中骨髓间充质干细胞具有免疫调节功能，可以避免移植后的免疫排斥反应得到较多研究^[23-24]。目前已有多项研究发现，基于石墨烯的纳米材料能够促进间充质干细胞的增殖、黏附及控制间充质干细胞向成骨细胞、脂肪细胞、成软骨细胞和神经元分化^[7, 25]。

HE等^[26]研究证明，磁性氧化石墨烯在低浓度下具有生物活性，可以显著加速人骨髓间充质干细胞的成骨分化，并证明人骨髓间充质干细胞在磁性氧化石墨烯上的成骨分化能力优于

石墨烯。DELIORMANLI^[27]研究发现，小鼠骨髓间充质干细胞在网格状石墨烯/聚己内酯复合支架上良好附着和增殖，并在缺乏生长因子的情况下表现出软骨分化趋势。

VERRE等^[28]报道了氧化石墨烯及还原氧化石墨烯上培养的脂肪间充质干细胞能分化为类许旺细胞，这种类许旺细胞能表达胶质纤维酸性蛋白、S100和p75等胶质细胞标志物，从而推测氧化石墨烯及还原氧化石墨烯可以促进脂肪间充质干细胞向神经胶质细胞分化。

SEONWOO等^[29]通过静电纺丝技术制备了还原氧化石墨烯-聚己内酯复合电纺丝，并将其用于培养人牙髓干细胞，证实了还原氧化石墨烯-聚己内酯复合电纺丝能促进人牙髓干细胞向神经分化的潜能。

2.2.4 神经干细胞 神经干细胞是存在于神经系统中的多能干细胞，具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力^[30]。众所周知，神经是一种对电刺激作出反应的电活动组织，电场可以加强干细胞分化过程中的神经发生^[31-32]。近年来，利用具有电导率性质的纳米材料来传输电场发出的电信号已经得到了广泛应用。

KIM等^[33]将氧化石墨烯纳米颗粒添加于人胚胎神经干细胞培养基，发现与未添加纳米颗粒相比，人胚胎神经干细胞表现出更强的自我更新能力和更快的分化速度。

FU等^[17]将神经干细胞置于导电聚乳酸-羟基乙酸/氧化石墨烯纳米复合膜上培养，并联合电刺激，发现神经干细胞能向神经元分化，同时发现神经干细胞纳米复合膜和电刺激单独都能促进神经干细胞向神经元分化，但是联合电刺激的神经干细胞纳米复合膜上培养的神经干细胞相较于单独氧化石墨烯膜上培养的神经干细胞更少地分化为星形胶质细胞。

TANG等^[34]对神经干细胞在石墨烯基质上分化的转录组进行了分析，发现石墨烯基质上培养的神经干细胞可以分化为神经元和星形胶质细胞，同时通过比较聚苯乙烯上培养的神经干细胞中神经元标记物Tuj-1的表达，发现石墨烯基质上分化Tuj-1阳性细胞数量远高于聚苯乙烯组，由此证明石墨烯基质促进神经干细胞向神经元分化。

2.2.5 肿瘤干细胞 肿瘤干细胞是肿瘤中具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的一类干细胞^[35]。残余肿瘤干细胞的存活被认为是驱动肿瘤复发、远处转移和耐药的原因，很难用传统的癌症治疗方法如化疗和放疗来根除^[36]。因此，促进肿瘤干细胞的分化可能是一种有效治疗肿瘤的新途径。

FIORILLO等^[37]研究发现，氧化石墨烯可以有效抑制6种不同类型癌症(乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌和胶质母细胞瘤)的多种细胞系中肿瘤球的形成，意味着氧化石墨烯可以抑制这些肿瘤干细胞的克隆扩增，而且氧化石墨烯可以通过几个关键的信号通路(Wnt、Notch和实体信号转导)促进肿瘤干细胞向肿瘤细胞的分化。

CHOI等^[18]用r-藻红蛋白分子介导合成还原氧化石墨烯-银纳米复合材料，将之用于孵育人卵巢癌细胞和卵巢癌干细胞，发现r-藻红蛋白分子介导合成还原氧化石墨烯-银纳米复合材料通过介导活性氧的产生、线粒体膜电位的降低、凋亡基因的表达增强等途径降低细胞活力，可能引起细胞凋亡。同时发现，r-藻红蛋白分子介导合成还原氧化石墨烯-银纳米复合材料联

合诱导癌细胞凋亡水平是单独使用沙利霉素的 5 倍。

基于石墨烯的纳米材料对干细胞生物行为的影响, 见表 2。

表 2 | 基于石墨烯的纳米材料对干细胞生物行为的影响

干细胞	石墨烯材料	作用	文献
胚胎	还原氧化石墨烯	黏附、增殖、生长	ZHAO 等 ^[15]
干细胞	氧化石墨烯	促进向造血祖细胞分化	GARCIA-ALEGRIA 等 ^[19]
	氧化石墨烯	促进向多巴胺神经元分化	YANG 等 ^[20]
诱导多能干细胞	石墨烯	黏附和增殖、抑制向内胚层谱系分化	CHEN 等 ^[14]
	氧化石墨烯	黏附和增殖、增强向内胚层谱系分化	CHEN 等 ^[14]
	聚乙烯-氧化石墨烯	增强向成骨分化	SABURI 等 ^[22]
间充质干细胞	磁性氧化石墨烯	促进向成骨分化	HE 等 ^[26]
	网格状石墨烯/聚己内酯	促进向软骨分化	DELIORMANLI 等 ^[27]
神经干细胞	氧化石墨烯、还原氧化石墨烯	促进向神经胶质细胞分化	VERRE 等 ^[28]
	还原氧化石墨烯-聚己内酯	促进向神经分化	SEONWOO 等 ^[29]
	氧化石墨烯	增强自我更新能力、加速分化	KIM 等 ^[33]
	导电聚乳酸-羟基乙酸/氧化石墨烯	促进向神经元分化	FU 等 ^[17]
肿瘤干细胞	石墨烯	促进向神经分化	TANG 等 ^[34]
	氧化石墨烯	抑制克隆增殖、促进向肿瘤细胞分化	FIORILLO 等 ^[37]
	还原氧化石墨烯-银	降低细胞活力、增强抗癌药物效应	CHOI 等 ^[18]

2.3 潜在调控机制的研究 基于石墨烯的纳米材料在干细胞的黏附、增殖、生长和分化上都取得了不同进展, 目前关于其调控机制方面也有了不同的猜想, 但许多仍未得到准确证实。

YANG 等^[20] 研究发现, 氧化石墨烯有显著的剂量依赖性, 更高剂量的氧化石墨烯对增强细胞黏附、增殖和分化具有更高的促进作用, 可能是由于氧化石墨烯表面具有大量含氧基团、亲水性更强。而且氧化石墨烯能上调多巴胺神经元标记基因 TH 的表达来促进胚胎干细胞向多巴胺神经元分化。ZHAO 等^[15] 研究发现, 还原氧化石墨烯不仅能深化 E-钙黏蛋白转导和信息交互, 还能激活 β -钙黏蛋白的表达, 通过 DKK1 修饰还原氧化石墨烯底物并构建转染 E-钙黏蛋白的细胞系, 首次证明还原氧化石墨烯通过调节 E-钙黏蛋白/Wnt 信号通路保持胚胎干细胞的多能性, 同时保持胚胎干细胞的自我更新能力和多能性。

WEI 等^[38] 提出, 氧化石墨烯纳米薄片可以通过激活 Wnt/B-catenin 信号通路促进间充质干细胞成骨分化。SHUAI 等^[39] 研究发现, 家蚕丝素蛋白/氧化石墨烯 10 通过驱动 F-肌动蛋白组装增加细胞扩散面积, 具有较强的促进间充质干细胞黏附的能力。

TANG 等^[34] 通过对神经干细胞在石墨烯上分化的转录基因分析发现, 石墨烯上调神经干细胞中 Cfp44、Dnah5、Dnah11、Ccdc108 这些运动蛋白基因来促进神经干细胞向神经元分化。其中 Dnah11 是 dynein 重链家族的一分子, 具有诱导迁移和神经突生长的能力。

2.4 基于石墨烯的纳米材料的生物毒性 石墨烯作为一种化学物质对生物具有天然毒性, 基于其开发的纳米材料在用于生物医学应用时必须进行体外细胞毒性和体内生物相容性评估^[40]。该文主

要讨论基于石墨烯的纳米材料在干细胞领域的应用, 较少涉及生物体内研究, 故现在只讨论其体外细胞毒性。

2.4.1 毒性机制 石墨烯与细胞的相互作用受各种物理化学性质(例如形状、大小、官能团密度和电荷转移能力)的影响, 其毒性主要与细胞内活性氧损伤有关^[41-42]。研究阐明了石墨烯介导的活性氧损伤的两种机制: 氧化石墨烯内化后干扰电子传输系统, 诱导 H_2O_2 和羟基自由基的过度产生, 触发 cytc 的释放, 从而诱导钙从内质网释放并激活 caspase3 和 7 导致细胞死亡^[43]; 氧化石墨烯诱导 MAPK 和 TGF- β 信号通路的激活, 从而导致 Bcl-2 蛋白激活, 激活线粒体诱导的细胞凋亡^[44]。除了活性氧损伤机制外, 氧化石墨烯可以激活 toll 样受体并通过炎症途径诱导自噬^[45]。

同时, 数项研究报道了石墨烯材料尖锐的边缘通过直接接触细胞膜使细胞膜失去稳定性, 以破坏细胞完整性^[43, 46]。TALUKDAR 等^[47] 研究发现, 单层氧化石墨烯纳米带由于细胞与纳米带锋利边缘之间相互作用表现出比氧化石墨烯纳米片和石墨烯纳米球更大的细胞和基因毒性, 可引起 DNA 断裂和染色体畸变。LI 等^[48] 研究表明, 石墨烯微片通过在角点和边缘凹凸处的自发膜穿透进入细胞。TU 等^[49] 发现石墨烯与脂质之间存在强烈的相互作用, 可以渗透细胞膜并从中提取出大量磷脂, 进而导致细胞毒性。

2.4.2 生物毒性的主要影响因素

尺寸大小: CHANG 等^[50] 研究了各种尺寸的氧化石墨烯 [(160±90), (430±300), (780±410) nm] 对 A549 (人肺腺癌) 细胞的毒性大小, 发现尺寸为 (780±410) nm 的氧化石墨烯比 (160±90) nm 和 (430±300) nm 的氧化石墨烯生成的活性氧高 50% 以上, 表明氧化石墨烯的细胞活力和活性氧生成潜力取决于石墨烯片的尺寸。YUE 等^[51] 的报告也指出, 氧化石墨烯的细胞内化和细胞应答的调节直接取决于其尺寸大小, 微米大小的氧化石墨烯可引起更强的炎症反应和细胞因子释放。

剂量、时间和形态: ZHANG 等^[52] 研究了石墨烯与大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞的相互作用, 发现 0.01-10 mg/L 石墨烯中没有细胞死亡, 而 100 mg/L 石墨烯处理后可观察到近 15%-20% 的细胞死亡, 与此同时观察到 100 mg/L 单壁碳纳米管处理后有超过 70% 的细胞死亡, 表明纳米材料的细胞毒性取决于材料的形态与剂量。LV 等^[53] 研究发现, 人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞在低质量浓度 (<80 mg/L) 氧化石墨烯条件下不会发生细胞凋亡, 反而增强了视黄酸诱导的 SH-SY5Y 细胞分化, 增加神经突长度和 MAP2(神经标记) 的表达。

功能化基团: SASIDHARAN 等^[54] 将猴肾细胞用原始石墨烯和羧基氧化石墨烯处理, 发现原始的石墨烯积聚在细胞膜上引起氧化应激, 导致细胞凋亡, 而羧基官能化的亲水性石墨烯被细胞内化而不引起任何毒性^[55]。他的另一个研究也发现, 只有 4% 经功能化石墨烯处理的猴肾细胞在功能化质量浓度高达 75 mg/L 时表现出活性氧生成, 但没有表现出毒性作用, 表明原始石墨烯的表面功能化可以防止其大部分毒性。

表面活性剂: WOJTONISZAK 等^[56] 研究了 3 种不同的表面活性剂 (聚乙二醇-聚乙二醇-聚丙二醇-聚乙二醇和脱氧胆酸钠) 中分散的氧化石墨烯和还原氧化石墨烯对小鼠成纤维细胞的细胞毒性, 发现分散在聚乙二醇中的氧化石墨烯表现出最佳

的细胞相容性。HU等^[57]用胎牛血清包被氧化石墨烯处理A549细胞,发现胎牛血清涂层的氧化石墨烯不会引起任何膜损伤,氧化石墨烯的细胞毒性可以通过胎牛血清覆盖来减少。

3 讨论 Discussion

石墨烯自被发现以来已被应用于许多领域,包括电化学、催化化学反应、燃料电池及生物医学等,表现出与其他材料相比更强的性能。由于石墨烯优良的性能及广阔的应用前景,现在已经通过各种方法开发出了各种基于石墨烯的纳米材料,可以复合许多基因表现出不同的物理、化学性质以更好地应用于生物医学领域。目前许多研究证明,基于石墨烯的纳米材料能影响干细胞的生物学行为,能促进各种干细胞的生长、增殖、黏附和分化,并且探索调控机制发现这些纳米材料可能通过调节相关基因表达、各种信号通路等方面影响干细胞的生物学行为。

许多研究发现,不同的石墨烯纳米材料均可以增强不同干细胞的生长、增殖和黏附能力,但同一种干细胞采用不同的石墨烯纳米材料进行培养可以分化为不同的细胞。石墨烯可以抑制诱导多能干细胞向内胚层谱系分化,但氧化石墨烯可以增强诱导多能干细胞向内胚层谱系分化,磁性氧化石墨烯可以促进间充质干细胞向成骨分化,网格状石墨烯/聚己内酯可以促进间充质干细胞向软骨分化,两种完全相反的分化方向可能是不同石墨烯纳米材料所具有的不同功能基因导致的,石墨烯纳米材料这种指导不同分化方向的能力对于通过干细胞获取不同成熟细胞的细胞工程具有非常重大的意义,因为目前干细胞定向分化的技术仍未成熟,石墨烯纳米材料有望成为干细胞分化的可靠技术之一。同时也发现,不同材料对同一种干细胞具有相似的诱导分化能力,比如氧化石墨烯和还原氧化石墨烯都能促进间充质干细胞向神经胶质细胞分化,由此推断这两种材料的某些相似之处是诱导间充质干细胞向神经胶质细胞分化的关键所在,可以进一步研究以明确间充质干细胞向神经胶质细胞分化的调控机制。

但是石墨烯天然生物毒性限制着基于石墨烯的纳米材料在生物方面的应用,研究发现石墨烯材料可以影响细胞膜稳定性而导致细胞毒性,而且能介导活性氧损伤造成细胞凋亡。而石墨烯纳米材料的尺寸、剂量、功能化基因修饰及表面活性剂会影响其毒性,提示可以改变这些因素来降低毒性。

目前仍有一些问题需要解决:基于石墨烯的各种纳米材料如何影响干细胞的细胞学行为仍需要进一步研究,调节机制的确定能揭示纳米材料如何发挥作用;目前的研究大多集中在细胞层面上,如何将纳米材料和干细胞共同应用于生物个体仍是重大的挑战,并且需要研究基于石墨烯的纳米材料在生物体内的毒性,值得进一步开展相关的动物体内实验。

作者贡献: 沈佳华负责综述构思设计,付勇负责文章写作校对,沈佳华参与文献收集、分析总结,付勇负责项目指导。全体作者都阅读并同意最终的文本。

经费支持: 该文章未接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- HALIM A, LUO Q, JU Y, et al. A Mini Review Focused on the Recent Applications of Graphene Oxide in Stem Cell Growth and Differentiation. *Nanomaterials (Basel)*. 2018;8(9):736.
- NOVOSELOV KS, GEIM AK, MOROZOV SV, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*. 2004;306(5696):666-669.
- SANCHEZ VC, JACHAK A, HURT RH, et al. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chem Res Toxicol*. 2012;25(1):15-34.
- JASTRZĘBSKA AM, KURTYCZ P, OLSZYNA AR. Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. *J Nanopart Res*. 2012;14(12):1320.
- YAN L, ZHENG YB, ZHAO F, et al. Chemistry and physics of a single atomic layer: strategies and challenges for functionalization of graphene and graphene-based materials. *Chem Soc Rev*. 2012;41(1):97-114.
- GEETHA BAI R, MUTHOOSAMY K, MANICKAM S, et al. Graphene-based 3D scaffolds in tissue engineering: fabrication, applications, and future scope in liver tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:5753-5783.
- 王立宾, 祝贺, 郝捷, 等. 干细胞与再生医学研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2015,31(6):871-879.
- 周琪, 任小波, 杨旭, 等. 面向未来的新一轮医疗技术革命——干细胞与再生医学研究战略性先导科技专项进展 [J]. *中国科学院院刊*, 2015,30(2):262-271.
- MENAA F, ABDELGHANI A, MENAA B. Graphene nanomaterials as biocompatible and conductive scaffolds for stem cells: impact for tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(12):1321-1338.
- HAN S, SUN J, HE S, et al. The application of graphene-based biomaterials in biomedicine. *Am J Transl Res*. 2019;11(6):3246-3260.
- GUO X, MEI N. Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials. *Food Drug Anal*. 2014;22(1):105-115.
- ZHAO D, LI Z, LIU L, et al. Progress of Preparation and Application of Graphene/Carbon Nanotube Composite Materials. *Acta Chimica Sinica*. 2014;72(2):185.
- CHEN J, HONG F, ZHANG C, et al. Differentiation and transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived otic epithelial progenitors in mouse cochlea. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):230.
- CHEN GY, PANG DW, HWANG SM, et al. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. *Biomaterials*. 2012;33(2):418-427.
- ZHAO J, TANG M, CAO J, et al. Structurally Tunable Reduced Graphene Oxide Substrate Maintains Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency. *Advanced Science*. 2019;6(12):1802136.
- SUN J, LIANG Q, HAN Q, et al. One-step synthesis of magnetic graphene oxide nanocomposite and its application in magnetic solid phase extraction of heavy metal ions from biological samples. *Talanta*. 2015;132:557-563.
- FU C, PAN S, MA Y, et al. Effect of electrical stimulation combined with graphene-oxide-based membranes on neural stem cell proliferation and differentiation. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019;47(1):1867-1876.

- [18] CHOI YJ, GURUNATHAN S, KIM JH. Graphene Oxide-Silver Nanocomposite Enhances Cytotoxic and Apoptotic Potential of Salinomycin in Human Ovarian Cancer Stem Cells (OvCSCs): A Novel Approach for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):710.
- [19] GARCIA-ALEGRIA E, ILIUT M, STEFANSKA M, et al. Graphene Oxide promotes embryonic stem cell differentiation to haematopoietic lineage. *Sci Rep.* 2016;6:25917.
- [20] YANG D, LI T, XU M, et al. Graphene oxide promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons. *Nanomedicine (Lond).* 2014;9(16):2445-2455.
- [21] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676.
- [22] SABURI E, ISLAMI M, HOSSEINZADEH S, et al. In vitro osteogenic differentiation potential of the human induced pluripotent stem cells augments when grown on Graphene oxide-modified nanofibers. *Gene.* 2019;696:72-79.
- [23] PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-147.
- [24] LI N, HUA J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(13):2345-2360.
- [25] ZHOU M, LOZANO N, WYCHOWANIEC JK, et al. Graphene oxide: A growth factor delivery carrier to enhance chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in 3D hydrogels. *Acta Biomater.* 2019;96:271-280.
- [26] HE Y, LI Y, CHEN G, et al. Concentration-dependent cellular behavior and osteogenic differentiation effect induced in bone marrow mesenchymal stem cells treated with magnetic graphene oxide. *J Biomed Mater Res A.* 2020;108(1):50-60.
- [27] DELIORMANLI AM. Direct Write Assembly of Graphene/Poly(ϵ -Caprolactone) Composite Scaffolds and Evaluation of Their Biological Performance Using Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Appl Biochem Biotechnol.* 2019;188(4):1117-1133.
- [28] VERRE AF, FARONI A, ILIUT M, et al. Improving the glial differentiation of human Schwann-like adipose-derived stem cells with graphene oxide substrates. *Interface Focus.* 2018;8(3):20180002.
- [29] SEONWOO H, JANG KJ, LEE D, et al. Neurogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells on Graphene-Polycaprolactone Hybrid Nanofibers. *Nanomaterials (Basel).* 2018;8(7):554.
- [30] BÁTIZ LF, CASTRO MA, BURGOS PV, et al. Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches. *Front Cell Neurosci.* 2016;9:501.
- [31] CHANG KA, KIM JW, KIM JA, et al. Biphasic electrical currents stimulation promotes both proliferation and differentiation of fetal neural stem cells. *PLoS One.* 2011;6(4):e18738.
- [32] ZHAO H, STEIGER A, NOHNER M, et al. Specific Intensity Direct Current (DC) Electric Field Improves Neural Stem Cell Migration and Enhances Differentiation towards β III-Tubulin+ Neurons. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129625.
- [33] KIM J, YANG K, LEE JS, et al. Enhanced Self-Renewal and Accelerated Differentiation of Human Fetal Neural Stem Cells Using Graphene Oxide Nanoparticles. *Macromol Biosci.* 2017;17(8). doi: 10.1002/mabi.201600540.
- [34] TANG M, LI J, HE L, et al. Transcriptomic profiling of neural stem cell differentiation on graphene substrates. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019;182:110324.
- [35] TROTT KR. Tumour stem cells: the biological concept and its application in cancer treatment. *Radiother Oncol.* 1994;30(1):1-5.
- [36] PRIETO-VILA M, TAKAHASHI R, USUBA W, et al. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2574.
- [37] FIORILLO M, VERRE AF, ILIUT M, et al. Graphene oxide selectively targets cancer stem cells, across multiple tumor types: implications for non-toxic cancer treatment, via "differentiation-based nano-therapy". *Oncotarget.* 2015;6(6):3553-3562.
- [38] WEI C, LIU Z, JIANG F, et al. Cellular behaviours of bone marrow-derived mesenchymal stem cells towards pristine graphene oxide nanosheets. *Cell Prolif.* 2017;50(5):e12367.
- [39] SHUAI Y, MAO C, YANG M. Protein Nanofibril Assemblies Templated by Graphene Oxide Nanosheets Accelerate Early Cell Adhesion and Induce Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(38):31988-31997.
- [40] NEZAKATI T, COUSINS BG, SEIFALIAN AM. Toxicology of chemically modified graphene-based materials for medical application. *Arch Toxicol.* 2014;88(11):1987-2012.
- [41] LALWANI G, D'AGATI M, KHAN AM, et al. Toxicology of graphene-based nanomaterials. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;105(Pt B):109-144.
- [42] OU L, SONG B, LIANG H, et al. Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. *Part Fibre Toxicol.* 2016;13(1):57.
- [43] LIAO C, LI Y, TJONG SC. Graphene Nanomaterials: Synthesis, Biocompatibility, and Cytotoxicity. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3564.
- [44] LI Y, LIU Y, FU Y, et al. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF- β signaling pathways. *Biomaterials.* 2012;33(2):402-411.
- [45] CHEN G, YANG H, LU C, et al. Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide. *Biomaterials.* 2012;33(27):6559-6569.
- [46] PATTAMMATTEL A, PANDE P, KUTTAPPAN D, et al. Controlling the Graphene-Bio Interface: Dispersions in Animal Sera for Enhanced Stability and Reduced Toxicity. *Langmuir.* 2017;33(49):14184-14194.
- [47] TALUKDAR Y, RASHKOW J, LALWANI G, et al. The effects of graphene nanostructures on mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2014;35(18):4863-4877.
- [48] 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 U S A.* 2013;110(30):12295-12300.
- [49] TU Y, LV M, XIU P, et al. Destructive extraction of phospholipids from Escherichia coli membranes by graphene nanosheets. *Nat Nanotechnol.* 2013;8(8):594-601.
- [50] CHANG Y, YANG S, LIU J, et al. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol Lett.* 2011;200(3):201-210.
- [51] YUE H, WEI W, YUE Z, et al. The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. *Biomaterials.* 2012;33(16):4013-4021.
- [52] ZHANG Y, ALI SF, DERVISHI E, et al. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano.* 2010;4(6):3181-3186.
- [53] LV M, ZHANG Y, LIANG L, et al. Effect of graphene oxide on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells line. *Nanoscale.* 2012;4(13):3861-3866.
- [54] SASIDHARAN A, PANCHAKARLA LS, SADANANDAN AR, et al. Hemocompatibility and macrophage response of pristine and functionalized graphene. *Small.* 2012;8(8):1251-1263.
- [55] SASIDHARAN A, PANCHAKARLA LS, CHANDRAN P, et al. Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. *Nanoscale.* 2011;3(6):2461-2464.
- [56] WOJTONISZAK M, CHEN X, KALENCZUK RJ, et al. Synthesis, dispersion, and cytocompatibility of graphene oxide and reduced graphene oxide. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012;89:79-85.
- [57] HU W, PENG C, LV M, et al. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *ACS Nano.* 2011;5(5):3693-3700.

(责任编辑: GW, ZN, SX)