

手性修饰氧化石墨衍生物对小鼠成神经瘤细胞活性的影响^{*}

杨景霏¹, 廖进齐², 陈 敏², 蔡小康², 李仲娟^{2△} (1. 湖北省武钢三中, 湖北武汉 430080;
2. 湖北理工学院, 湖北黄石 435003)

【摘要】 目的 比较手性修饰的氧化石墨(GO)衍生物对小鼠成神经瘤细胞 N2a 活性的影响。**方法** 倒置荧光显微镜观察 N2a 细胞形态, MTT 法检测 N2a 细胞的活性。**结果** 在 0.1~0.4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 GO 衍生物对 N2a 细胞活性影响呈浓度相关, 其中 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的 GO 衍生物对 N2a 细胞生长状况最好; L-型 GO(L-GO)和 D-型 GO(D-GO)促 N2a 细胞增殖率分别为 94% 和 52%, 二者差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 手性修饰的 GO 衍生物在 0.1~0.4 $\mu\text{mol/L}$ 能促进 N2a 细胞生长, L-GO 促进 N2a 细胞生长活性比 D-GO 强。

【关键词】 氧化石墨; 小鼠成神经瘤细胞; 细胞活性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.02.005 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)02-0153-02

Influence of chirally modified graphite oxide derivatives on activity of mouse neuroblastoma cells N2a * YANG Jing-fei¹, LIAO Jin-qi², CHEN Min², CAI Xiao-kang², LI Zhong-juan^{2△} (1. No. 3 High School of Wuhan Iron and Steel Corporation, Wuhan, Hubei 430080, China; 2. Hubei Polytechnic University, Huangshi, Hubei 435003, China)

【Abstract】 Objective To compare the influence of chirally modified graphite oxide (GO) derivatives on the activity of mouse neuroblastoma N2a cells. **Methods** The morphological change of N2a cells was observed by the inversion fluorescence microscope and the activity of N2a cells was measured by the MTT method. **Results** The influence of GO derivatives in the concentration range of 0.1~0.4 $\mu\text{mol/L}$ on the activity of N2a cells showed the concentration correlation, in which the GO derivatives with the concentration of 0.4 $\mu\text{mol/L}$ was best for the growth status of the N2a cells; the promoting N2a cells proliferation rates of the L-type GO and D-type GO were 94% and 52% respectively, the difference between them revealed the statistical significance($P<0.01$). **Conclusion** The chirally modified GO derivatives in the concentration range of 0.1~0.4 $\mu\text{mol/L}$ could promote N2a cell growth, and the activity of L-GO promoting N2a cell growth is stronger than that of D-GO.

【Key words】 graphite oxide; mouse neuroblastoma N2a cells; cellular activity

氧化石墨(graphite oxide, GO)是石墨经氧化而成的新型纳米级材料,人们很早就预测石墨烯在生物医药领域将会有广泛的应用前景^[1-2],GO经超声处理后得到GO溶液,GO通过L(D)-半胱氨酸的还原可以得到不同手性衍生物^[3]。本实验通过L-GO和D-GO对N2a细胞生长状况的考察,探讨其在医药应用中可能存在的差异性。

1 材料与仪器

1.1 材料 手性修饰的GO衍生物由武汉理工大学分子材料实验室友情提供。小鼠成神经瘤细胞N2a购自武汉细胞保存中心, Hanks液、台盼蓝、胎牛血清和PRMI-1640培养粉购自Gibco公司, MTT购自上海博谷生物科技有限公司。培养瓶、胰蛋白酶、培养板和细胞培养用的吸头购自美国Costar公司。二甲基亚砜(dimethyl-sulfoxide, DMSO)购自Sigma公司。

1.2 仪器 苏州净化二级生物安全柜BHC-1300 II B2, 美国ThermoFisher贺利氏CO₂培养箱, 美国伯乐DNM-9602型酶标仪, 日本Olympus CKX41倒置生物显微镜及Olympus 1X74倒置荧光显微镜。

1.3 方法

1.3.1 小鼠成神经瘤细胞N2a的培养^[4] N2a以按10⁵个细胞/瓶用DMEM-F12培养液置37℃5%CO₂培养箱中进行贴壁培养(培养液含10%胎牛血清、双抗100 U/mL青霉素以及100 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸链霉素),每3天用胰酶消化收集细胞洗

涤后更换培养液,取对数期细胞进行实验。

1.3.2 MTT法检测细胞活性^[5] 在96孔培养板中,按10⁴个细胞/孔进行培养,24 h后于不同孔内分别加入0.1~0.4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度L-GO或D-GO液,培养72 h后加20 μL MTT溶液继续培养4 h,再加入150 μL 二甲基亚砜(DMSO)振荡10 min,490 nm处测吸光度(OD)值。

1.4 统计学处理 采用Excel分析软件,用t检验对各组数据进行比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠成神经瘤细胞的观察 对数期N2a细胞经胰蛋白酶消化后用2%胎牛血清Hanks液洗涤,台盼蓝计数活细胞,按 $2\times 10^4/\text{L}$ 的细胞浓度分别加入L-GO和D-GO刺激物在6孔培养板培养3 d,以没有刺激细胞培养孔为空白对照。倒置荧光显微镜观察,无刺激物的对照组细胞呈梭形,圆形或多角生长,培养孔中无漂浮死细胞;L-GO刺激后的细胞呈梭形或多角形蔓延生长,可见极少的漂浮细胞;D-GO刺激后的细胞蔓延生长,细胞老化程度较高,可见部分细胞边界不清,如图1。

2.2 不同浓度GO衍生物对N2a细胞生长活性的影响 对数期N2a细胞按 $2\times 10^5/\text{L}$ 浓度接种于96孔培养板,分别加入L-GO和D-GO刺激培养3 d,用酶标仪检测各孔的吸光度,按刺激物浓度作图,图2显示0.1~0.4 $\mu\text{mol/L}$ 刺激物对N2a细

* 基金项目:教育部留学生启动资金(46-1);湖北理工学院创新团队项目组(201025)。

作者简介:杨景霏,女,在校学生,研究方向为细胞生物学。△ 通讯作者, E-mail:1525677891@qq.com。

胞呈浓度依赖,刺激物浓度在 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 最好,L-GO 对 N2a 细胞的活性高于 D-GO,各浓度比对差异有统计学意义($P<0.01$)。

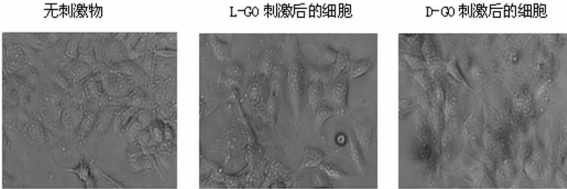


图 1 显微镜观察 N2a 细胞生长活性

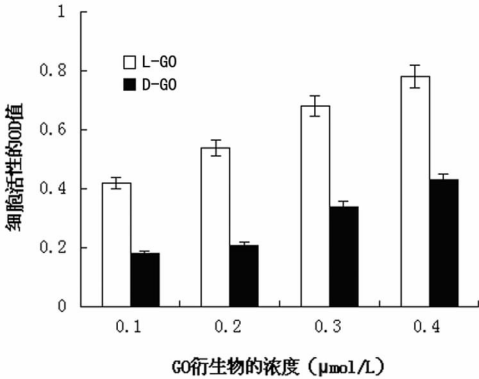


图 2 GO 衍生物对 N2a 细胞生长活性比较

2.3 0.4 $\mu\text{mol/L}$ GO 衍生物对 N2a 细胞增殖比较 图 3 结果显示,L-GO 对 N2a 细胞的活性为 94%,D-GO 对 N2a 细胞的活性为 52%,两者间统计学分析差异有统计学意义($P<0.01$)。

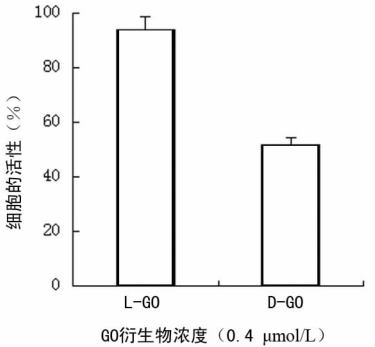


图 3 0.4 $\mu\text{mol/L}$ GO 衍生物对 N2a 细胞生长活性的比较

3 讨 论

GO 衍生物是单原子结构,表面有很多的含氧活性基团,生物相容性很好,而且十分有利于对 GO 的表面进行化学功能化修饰。由于氧化石墨烯表面含有羟基、环氧基、羧基等基团,这些基团成为氧化石墨烯发挥功能的活性中心^[6]。氧化石墨烯在生物医学方面的应用发展十分迅速。最近几年,氧化石墨烯在疾病诊断方面,微生物学方向,药物的运输以及分子生物

学等方面得到了各研究学者的广泛关注^[7],国外也有学者将其作为药物载体开发^[8-9]。最近在阿尔茨海默病(AD)研究中,由于 GO 衍生物能透过血脑屏障,对神经瘤模型细胞具有活性^[10],因此,GO 衍生物也作为靶向药物正在被研究^[11]。本实验以 N2a 细胞为模型,分别考察 L-GO 和 D-GO 诱导下该细胞的生长活性。结果显示,0.1~0.4 $\mu\text{mol/L}$ GO 衍生物对 N2a 细胞的活性呈浓度依存,L-GO 对 N2a 细胞的生长更有促进作用,两者之间的活性差异有统计学意义($P<0.01$)。L-GO 和 D-GO 的这种差异性,为 GO 衍生物作为靶向药物的进一步开发提供了科学依据。

参考文献

[1] Mohammadi T, Pak A. Effect of calcination temperature of ka-olin as a support for zeolite membranes[J]. Sep Purif Technol, 2003, 30(3):241-249.

[2] Feng H, Li CY, Shan H. Effect of calcination temperature of ka-olin microspheres on the in situ synthesis of ZSM-5 [J]. Catal Lett, 2009, 129(1/2):71-78.

[3] 李永锋,刘燕珍,杨永刚,等. L-半胱氨酸还原氧化石墨烯的研究[J]. 材料导报, 2011, 25(12):38-40.

[4] 白瑜,孙斌,尹晓敏,等. 胍蛋白多肽 PrP 106-126 对小鼠成神经瘤细胞 N2a 的毒性研究[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(5):1-4.

[5] 王世召,田野,江荣才,等. 多胺类似物 DENSPM 对人胶质瘤 LN229 细胞增殖的抑制作用[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2013, 12(2):101-105.

[6] 李松,颜红侠,张梦萌,等. 石墨烯的功能化及其在聚合物改性中的应用研究[J]. 材料开发与应用, 2013, 28(12):86-92.

[7] 沈贺,张立明,张智军. 石墨烯在生物医学领域的应用[J]. 东南大学学报:医学版, 2011, 30(1):218-223.

[8] Sun X, Liu Z, Welscher K, et al. Nano-graphene oxide of cellular imaging and drug delivery[J]. Nano Res, 2008, 1(3):203-212.

[9] Xu C, Wu X. Sythesis of amphiic graphene oxide [J]. Carbon, 2008, 46(24):386-389.

[10] Yang W, Wong Y, Ng OT, et al. Inhibition of beta-amyloid peptide aggregation by multifunctional carbazole-based fluorophores [J]. Angew Chem Int Ed, 2012, 51(8):1804-1810.

[11] Li M, Yang X, Ren J, et al. Using graphene oxide high near-infrared absorbance for photothermal treatment of Alzheimer's disease[J]. Adv Mater, 2012, 24(13):1722-1728.

(收稿日期:2014-05-09 修回日期:2014-11-04)

(上接第 152 页)

[3] 任翠平,王晓楠,雷黎,等. 血吸虫感染抗性人血清筛选日本血吸虫童虫 eDNA 文库[J]. 中国地方病学杂志, 2007, 26(5):490-493.

[4] 阎玉涛,刘述先,宋光承,等. 东方田鼠天然抗体相关的日本血吸虫抗原基因筛选和克隆[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(3):153-156.

[5] Lim KC, Sun E, Bahgat M, et al. Block-age of skin invasion by schistosome cercariae by serine protease inhibitors [J]. Am J Trop Med Hyg, 1999, 60(3):487-492.

[6] 李晖,彭礼飞. 寄生线虫丝氨酸蛋白酶抑制剂研究进展 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2011, 39(6):344-349.

(收稿日期:2014-05-22 修回日期:2014-11-06)