

纳米材料生物效应研究进展*

周国强^{1,3)} 陈春英^{1,2)**} 李玉锋¹⁾ 李 炜^{1,3)} 高愈希¹⁾ 赵宇亮^{1,2)}

⁽¹⁾中国科学院高能物理研究所纳米生物效应与安全性实验室, 北京 100049;

⁽²⁾国家纳米科学中心纳米生物效应与安全性实验室, 北京 100190; ⁽³⁾中国科学院研究生院化学学院, 北京 100049)

摘要 随着纳米技术的快速发展, 纳米材料在医学成像、疾病诊断、药物传输、癌症治疗、基因治疗等领域的应用和基础研究也在飞速发展. 同时, 纳米材料的这些有益应用使得人体通过吸入、经口、皮肤吸收和静脉注射等不同方式受到暴露. 当纳米材料与生物体系发生相互作用时, 有可能产生负面生物学效应, 而这些潜在的毒理效应都是未知的. 综述了纳米材料在生物医学领域巨大的应用前景, 关注其对心血管系统、呼吸系统及转运到其他器官可能造成的负面效应, 并探讨了纳米颗粒在引起心血管疾病及肺部炎症方面的可能机理与作用途径. 最后对纳米材料的安全性评估和研究重点进行了总结.

关键词 纳米材料, 生物医学应用, 纳米毒理学, 环境健康

学科分类号 Q5, R54

纳米科学、信息科学和生命科学并列成为 21 世纪的三大支柱科学领域. 纳米颗粒(nanoparticles, NPs)和超细颗粒物(ultrafine particles, UFPs), 一般是指尺寸至少有一维在 1~100 nm 间的粒子. 纳米尺度是处在原子簇和宏观物体交界的过渡区域, 处于这个区域的材料具有一些独特性质, 如小尺寸效应、表面-界面效应和量子尺寸效应等. 空气中纳米颗粒虽然浓度很低, 但具有很高的颗粒物数目, 表 1 给出了 4 种不同尺寸空气颗粒的颗粒物数目和表面积的巨大差异, 每种尺寸颗粒密度都是 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 其中 20 nm 颗粒物单位体积颗粒数目超过了 1×10^6 个^[1]. 将宏观物体细分成纳米颗粒后, 它的光学、热学、电学、磁学、力学以及化学性质和大体积固体相比将会显著不同. 纳米材料的小尺寸、化学成分、表面结构、溶解性、外形和聚集情况决定着它们特殊的物理化学性质, 这些性质使得纳米材料在将来有着广泛的用途.

当前, 纳米材料越来越多地用于商业用途, 像装填物、折光剂、催化剂、半导体、化妆品、微电子学和药物载体等方面, 纳米材料的广泛应用可能对环境与健康产生正面和负面的影响. 在药物化学、药剂学等领域, 一些纳米物质以其特殊的化学结构、表面性质和微小粒径, 成为潜在的新型药物载体和应用于分子影像学领域, 从而为特定位置的药物传输和靶向治疗提供了新的视角. 同时, 纳米材料的新颖性引起人们对其负面生物效应的关注. 一些研究提出纳米材料并不完全是有益的, 它们在细胞、亚细胞和蛋白质水平上影响着生物学行为. 吸入的 NPs 可能避开免疫系统的吞噬作用, 蓄积在某些靶器官, 也可跨越不同生物屏障, 重新转运分布到身体的其他组织器官, 产生系统的健康效应. 纳米粉体生产和制造过程中潜在的职业暴露、医学应用和周围大气污染造成的直接暴露将会是人类纳米材料暴露的主要途径. 人们担心纳米技术的快速增长和使用可能会使纳米材料有可能成为 21 世纪的“石棉”, 给环境和人类健康带来潜在的影

Table 1 Particle number and particle surface area per 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ airborne particles^[1]

表 1 每 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 大气颗粒物的颗粒数目和表面积^[1]

颗粒直径 /nm	颗粒数目 / cm^{-3}	颗粒物表面积 /($\mu\text{m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$)
5	153 000 000	12 000
20	2 400 000	3 016
250	1 200	240
5 000	0.15	12

* 国家自然科学基金(20751001)和国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB705603)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-82545560, E-mail: chenchy@nanoctr.cn

收稿日期: 2008-01-21, 接受日期: 2008-03-18

响。因此, 我们非常有必要在关注纳米材料有益生物效应的同时, 考虑其负面的作用, 以对纳米技术的发展和應用起到很好的指导作用。

1 正面生物医学应用

1.1 成像和诊断

分子影像学是生物学和医学上一门重要的学科, 它可以探测、量化和显示发生在体外和体内的分子和细胞变化。分子影像学的成像技术主要有 3 种: 核医学、磁共振、光学成像技术。基于直径小于 100 nm 的 NPs 探针具有高亮度、光稳定性、宽光谱范围吸收等优点, 成为监测和定量体内生物分子的理想工具, 如作为探针连接到肽、抗体或核酸分子上探测细胞内目标分子, 用于生物学和疾病的检测。

Wu 等^[2]观察到, 基于量子点的肿瘤标记 Her2 的免疫荧光标记, 比常规荧光染料标记不同的靶细胞表面受体、细胞骨架、核抗原和其他细胞器更有效。他们也发现了生物结合的胶体量子点在细胞标记、细胞示踪、DNA 检测和体内成像方面很有价值。Zhang 等^[3]发现用乙二醇和叶酸表面修饰后的超顺磁性 NPs 能够促进癌细胞的噬菌作用, 可用于潜在的癌症诊断与治疗材料。Gao 等^[4]进行了体内量子点成像和肿瘤定位的动物研究, 观察到量子点在肝、脾、脑、心、肾和肺中的吸收、滞留和分布有逐渐减少的规律, 在裸鼠前列腺癌异种移植瘤的研究中, 量子点在瘤组织内特异性蓄积呈现出亮橙红色。本实验室研究 $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ 纳米材料, 拟将其开发成新型的核磁共振造影成像剂, 实验证明使用仅为造影剂 Gd-DTPA 临床剂量 1/33 的 $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ 就可以获得更好的成像效果^[5]。

1.2 药物输运

特定定位点靶向性的药物输运对调节有效药物剂量和治疗疾病是很重要的, 使用纳米载体的药物靶向性输运能有效提高药物生物利用率、减小负面效应、降低成本和对其他器官的毒性。而基于 NPs 的药物输运不管是疏水还是亲水状态通过各种途径包括口服、血管和吸入等方式给药都是可行的。

在药物传输方面, 已经研究了一些可以实现药物有效剂量特定定位点传输的方法, 包括使用脂质体、聚合胶囊、树枝状高分子、陶瓷 NPs、氧化铁、蛋白质、共价结合、吸收、连接和包封的方法^[6]。据报道, 脂质体包裹的阿霉素体循环效率比单独的阿霉素要高 300 倍, 治疗 Kaposi's 肉瘤和转

移癌比单独的阿霉素药物代谢动力学效果要好。在结核病的化学治疗中, 基于 NPs 的药物传输提高了生物药物利用率, 减少了剂量频率, 克服了在控制结核病传染方面遇到的无法规则给药问题^[7]。梁伟研究组^[8]采用阿霉素包载于聚乙二醇衍生化磷脂嵌段共聚物(PEG-PE)胶束中, 获得了粒径小而均一、包封效率高的纳米胶束, 当药物/脂质摩尔比为 1:2 时, 包封率达 99.4%, 平均粒径约为 (11 ± 2.8) nm。体外细胞毒试验和体内抗肿瘤试验结果表明, 阿霉素包载于胶束中可以显著地提高阿霉素的细胞毒作用(IC_{50} < 游离阿霉素 3 倍), 载药纳米胶束增强药物的抗肿瘤作用、促进药物在肿瘤细胞内聚集。我们用荧光实时成像技术对 C_{60} 丙二酸衍生物 $\text{C}_{60}(\text{C}(\text{COOH})_2)_2$ 和活细胞的作用及跨膜方式进行了研究, 结果显示: $\text{C}_{60}(\text{C}(\text{COOH})_2)_2$ 容易进入细胞, 并且能够把不能跨膜进入细胞的分子带入细胞, 在 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^2$ mg/L 的范围内, 没有表现出明显的细胞毒性, 这为药物输运和靶向治疗提供了新的视角^[9]。

1.3 癌症治疗

常规的抗癌治疗着意于直接杀死肿瘤细胞, 同时不可避免地杀死人体正常细胞和破坏免疫系统, 从而引发严重的系统毒性。纳米载药系统将纳米技术与现代药剂学结合, 具有的药物缓、控释性和靶向性等特性可以大幅度提高药物的生物利用率、降低用药量、减少毒副作用, 已成为国际肿瘤药物研制中的热点和前沿。

近期在癌症治疗上, 一项振奋人心的纳米技术的应用是探索肿瘤特异性热手术刀来加热和烧死肿瘤组织。O'Neal 等^[10]使用近红外吸收聚乙二醇包被的 130 nm 金纳米壳选择性辐射热切除肿瘤, 可以抑制肿瘤生长, 与对照组相比小鼠存活时间延长达 90 天。同样, DeNardo 等^[11]利用裸鼠在治疗后 24 h 内发现抗体包被铁 NPs 能特异性与肿瘤结合, 且肿瘤出现坏死现象。一些研究已经对连接到 NPs 不同抗体包括铁转移蛋白和表皮生长因子受体的功效在动物实验中进行了实验^[12], 利用抗原和抗体、配体和受体之间高度特异的结合, 通常能获得靶向效果较好的主动靶向性。我们发现, 腹腔注射一定剂量 $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ 纳米颗粒(约 22 nm)对 H22 肝癌荷瘤鼠的肿瘤生长具有明显的抑制作用, 效果好于目前临床使用的环磷酰胺或顺铂。在机制研究中发现, $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ 和常规的抗肿瘤药物不同, 其高效抗肿瘤生长能力不是通过直接杀死肿瘤细

胞,而是通过调节体内氧化-还原平衡,显著缓解荷瘤鼠体内氧化性损伤,增强机体免疫力从而抑制肿瘤细胞的生长和侵袭正常细胞^[13,14].

1.4 基因治疗

过去20年,治疗遗传疾病的一种流行方法是尝试将正常基因转染到体细胞中.在基因治疗中,正常基因是通过载体分子嵌入到异常致病基因位置进行治疗的.常规病毒载体的使用常伴随着对宿主产生免疫、炎症反应和引起疾病等负面影响.纳米生物材料,如脂质体、聚丙交酯-乙交酯(PLGA)、聚乳酸(PLA)、聚乙二醇(PEG)、壳聚糖等,由于具有良好的生物安全性、可方便有效地实现基因靶向性及高效表达和缓释,成为制备高效、靶向基因治疗载体系统的良好介质,日益在基因治疗载体系统中受到广泛重视.

Gopalan等^[15]发现基于NPs的新肿瘤抑制基因FUS1基因治疗,对肺癌的基因治疗很有效.Li等^[16]在BALB/C小鼠实验中利用聚左旋赖氨酸修饰的二氧化硅NPs进行基因运输,可分布在肠内黏膜细胞中,并且具有较低的细胞毒性.Dufes等^[17]报道,在静脉注射装载于NPs载体体系的TNF- α 质粒所进行的基因治疗中,发现大鼠转染基因表达增加,并且长期存活时间增加,没有产生任何毒性.Kaul等^[18]观察到聚乙二醇修饰的凝胶NPs在肿瘤靶向性基因传输中具有高效性、生物相容性、生物可降解性和长的体内循环时间,增加实体瘤组织内的蓄积量.乳腺癌体外细胞实验证明了载有野生型p53基因的纳米基因载体具有较好的基因传递效率.基于纳米生物材料的基因治疗载体显著提高了细胞的摄取和目的基因持续的表达水平,这些是其他载体所不具有的^[19].PLGA纳米粒包裹或吸附的治疗基因一般在24h内经历首次突发释放,可占其负载量的50%,其后进入缓慢释放的阶段长达一月之久,并保持所携带质粒结构和功能的完整性,使质粒持久地释放和表达.因此,基于纳米生物技术的基因治疗载体系统,在实现安全性、靶向性、智能化的基因传递方面,具有很好的临床应用前景.

2 负面生物学效应

2.1 纳米颗粒作用于心血管引起的发病率和死亡率

心血管疾病是现今社会中引起死亡的主要病因,流行病学调查结果发现环境大气颗粒污染物和

心血管疾病之间有着密切的关系.过去几十年,工业发达和发展中国家成人和易感人群由于空气污染导致的发病率和死亡率持续上升.Peters等^[20]发现空气污染的等级跟危害人体健康的心律不齐有关系,可以诱发心肌梗死.他们还发现持续暴露在污染空气中超过2h可诱发心肌梗死.流行病学和病理生理学证据支持超细颗粒空气污染和心血管死亡率之间的关系,例如能够引起肺部和系统炎症、动脉硬化、心脏功能紊乱等^[21].Dockery等^[22]在一项对500000成人癌症预防16年的跟踪研究中,发现可吸入颗粒物(particulate matter 2.5 μm , PM_{2.5})每增加10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$,死亡率增加8%~18%,死亡原因是与缺血性心脏病、心律不齐、功能紊乱和心脏停搏等有关.

用浓缩环境颗粒物(concentrated ambient particles, CAPs)进行的动物实验发现,肺部脉管系统是环境大气颗粒毒性的一个靶器官,颗粒物加剧心肌缺血引起冠状动脉阻塞.Batalha等^[23]发现短期暴露CAPs的正常大鼠和有慢性支气管炎的大鼠出现小肺动脉血管收缩现象.Wellenius等^[24]发现患有冠状动脉阻塞的狗吸入CAPs后加剧了心肌缺血.患有冠状心脏病的病人与正常人相比炎症细胞因子水平增加,如白细胞介素IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、C反应蛋白和纤维蛋白原等.Seaton等^[25]提出假说:a.到达心血管系统的UFPs可能引发凝结、血栓或其他损伤;b.UFPs在肺部的持续炎症促进了介体和细胞因子的释放,诱发心肺疾病导致增加的发病率和死亡率.

Nurkiewicz等^[26]用动物模型对这些现象进行了研究,他们发现大鼠暴露在残留的飘尘(residual fly ash, ROFA < 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$)或TiO₂(< 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$)颗粒物中导致系统循环参与了这一过程.暴露细颗粒物削弱了系统微血管功能的改变,伴随着粒性白细胞流入大鼠斜方肌小静脉中,表明和小动脉有关的内皮组织扩张和功能削弱,同时大鼠全身血压升高和微血管对管腔内血管扩张剂响应失败也支持这一结果.Li等^[27]最近的研究表明,UFPs可能还诱发其他机制,如通过增强MAPK信号激活血管紧缩素1受体从而使血管收缩,UFPs对胞外信号调节激酶ERK1/ERK2和p38 MAPK的磷酸化具有时间和剂量依赖效应.由ROFA引起氧化应激导致MAPK、炎症细胞因子TNF- α 和IL-6、巨噬细胞炎症蛋白2(MIP-2)的活化,为研究肺部炎症提供了新的视角.

2.2 肺部炎症引起的发病率和死亡率

UFPs 引起的肺部毒性作用中, 肺部炎症导致的恶化占很大比重. 在患有哮喘和慢性阻塞性肺病的病人中, 恶化是很重要的分子机制. 预测心血管疾病和肺病起因有不同的分子机制, 肺暴露 UFPs 和 NPs 更容易产生炎症反应. Geiser 等^[20]最近的研究表明, 吸入的 TiO_2 超细颗粒物在肺部毛细血管中可以找到, 推测颗粒物是以非噬菌作用机制穿过细胞膜进入肺. 肺外转运依赖于颗粒的大小、化学特性和表面修饰等.

2.2.1 细胞实验研究. 使用实验室制造的 UFPs 和大气过滤收集的 CAPs 进行的实验研究都表明, 细胞对 UFPs 有更高的炎症和毒性应答, 呈现出不同程度的前炎症反应和与氧化应激有关的细胞响应^[29, 30]. UFPs 的大比表面积增加了它们以及连在这些颗粒上的不同类型过渡金属与细胞发生相互作用的机会, 引起氧化应激, UFPs 和过渡金属在产生 ROS 和炎症方面有协调作用的机制^[29]. Brown 等^[30]对不同尺寸和组成的 UFPs 和细颗粒及大颗粒引发细胞氧化应激的能力进行了比较. UFPs 是巨噬细胞和上皮细胞中最有效的氧化应激诱导者, 通过诱导血红素加氧酶 -1 和耗尽细胞内谷胱甘肽而起作用. UFPs 诱发的氧化应激也参与了 MAPKs 的激活, 引起细胞内相关基因表达, 同时也参与了 AP-1 和 NF- κ B 的激活, 在前炎症因子和其他细胞因子包括黏附因子的基因表达中起了重要作用^[31].

体外实验的结果证实了与氧化应激有关的基因表达和细胞信号通路改变是 UFPs 作用的潜在机制, 同时燃烧产生的 UFPs 含有的过渡金属和特定有机化合物也起到了一定作用(图 1)^[32]. 它们可以改变细胞信号通路, 包括 Ca^{2+} 信号和细胞激酶信号. 但体外实验的解释比较困难, 因为常常使用的是不同化学组成的颗粒物及靶细胞, 另外持续暴露时间、观察终点和剂量水平也不尽相同.

2.2.2 活性氧.

体内和体外实验证明, 各种化学组成的 NPs 都能够产生 ROS, 已发现富勒烯 C_{60} 、SWNTs、QDs 和 UFPs 能够产生 ROS, 尤其是同时暴露在光、紫外线和过渡金属的情况下. 各种尺寸和化学组成的 NPs 优先到达线粒体, 线粒体是具有氧化还原活性的细胞器, 很可能产生大量 ROS 引起超载或影响机体抗氧化剂防御机制. ROS 的产生是 NPs 引起炎症和毒性的一个主要因素, 原来研究者认为 UFPs 导致肺损伤和疾病的能力是颗粒物的大

比表面积、小尺寸和含有的金属污染物所致, 现在 UFPs 引起 ROS 产生导致氧化应激、激活信号通路和凋亡被认为是研究肺部和其他疾病的新视角. 这些过程可以用下面的氧化应激分级模型图来表示(图 2)^[33].

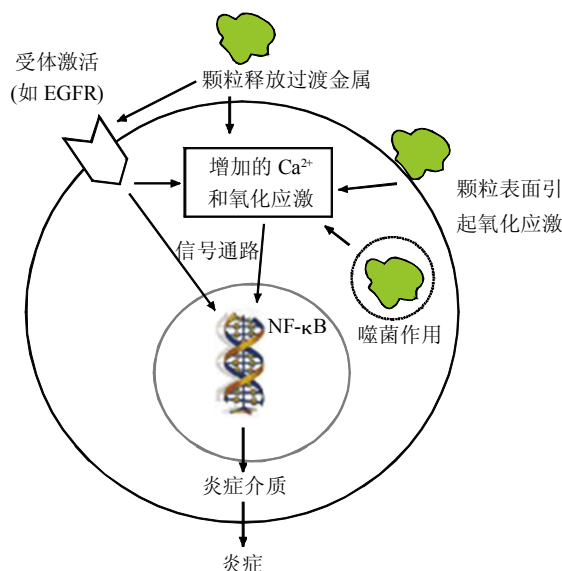


Fig. 1 Hypothetical cellular interaction of NPs^[32]

图 1 NPs 与细胞相互作用的假设图^[32]

EGFR、表皮生长因子受体、炎症和氧化应激能被以下几种途径激活: a. 颗粒表面引起氧化应激导致细胞内 Ca^{2+} 水平增加和基因激活; b. 颗粒释放的过渡金属导致氧化应激、细胞内增加的 Ca^{2+} 水平和基因激活; c. 细胞表面受体被颗粒释放的过渡金属激活, 导致后续基因激活; d. 进入细胞内的 NPs 到达线粒体产生氧化应激.

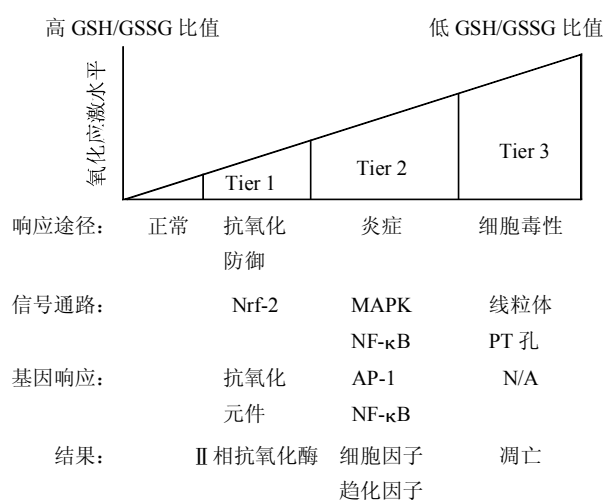


Fig. 2 The hierarchical oxidative stress model^[33]

图 2 氧化应激的分级模型^[33]

低水平氧化应激时(tier 1), 通过 Nrf-2 激活抗氧化元件的转录, II 相抗氧化酶可恢复细胞氧化还原动态平衡. 中级水平氧化应激时(tier 2), MAPK 和 NF- κ B 的激活诱发前炎症反应. 高级水平氧化应激时(tier 3), 线粒体 PT 孔的扰乱和电子转移体系的破坏导致细胞凋亡或坏死.

UFPs 中几种金属可以通过直接类似 Fenton 反应或细胞还原后产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基, 证明水溶性和不溶性 UFPs 的组分都有产生氧化剂的能力. NPs 产生 ROS 的精确机制还不完全清楚, 可能的机制包括: a. 光激发富勒烯和 SWNTs 导致体系间跨越产生自由电子; b. NPs 的新陈代谢产生氧化还原活性中间体, 尤其是代谢经过细胞色素 P450s; c. 体内炎症反应可能通过巨噬细胞释放氧自由基.

ROS 的产生导致氧化应激是解释吸入 NPs 后产生毒理效应的机理之一. 在正常线粒体环境中, ROS 低频率产生很容易被像 GSH 的抗氧化剂和抗氧化酶中和, 但是在产生过量 ROS 的情况下, 如环境或职业纳米颗粒暴露的肺和循环系统中, 机体抗氧化剂大量消耗, 从而导致 GSH 耗尽同时 GSSG 积聚的状态, 而产生氧化应激. 我们以前的工作发现 $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ 纳米颗粒对于小鼠 H22 肝癌的生长有很好的抑制作用, 我们比较了经 $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ 治疗后的荷瘤小鼠和正常小鼠之间一些抗氧化酶的活性. 结果显示 $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ 能够有效修复荷瘤小鼠的肝和肾损伤, 所有和氧化应激有关的酶活性和其他指标经治疗后都下调接近于正常水平, 也就是说这种纳米颗粒能够调控小鼠体内 ROS 的产生^[14].

2.2.3 肺部病理响应.

Oberdörster 等^[34]观察到超细 TiO_2 灌注到大鼠和小鼠体内比细 TiO_2 更容易引起促炎症反应. Bermudez 研究组将不同种的雌性小鼠和大鼠每天在 0.5、2.0 和 10 mg/m^3 浓度的 TiO_2 (21 nm) 体系中暴露 6 h, 每周 5 天共持续 13 周, 染毒结束后, 实验动物分别在 4、13、26 和 52 周后处死, 对肺部、淋巴中 TiO_2 含量和相关指标进行测定后发现, 纳米 TiO_2 粉末可以引起大鼠、小鼠巨噬细胞和嗜中性粒细胞数目增多, 还可引起乳酸脱氢酶升高、肺泡灌洗液总蛋白含量升高等变化. 病理学观察也表明, 纳米 TiO_2 可以引起炎症、肺细胞增生等病理改变^[35]. 美国两个研究组分别使用小鼠暴露在单壁碳纳米管(SWCNTs)中, 从低剂量到高剂量都观察到明显的肺部病理结果. Lam 等^[36]的研究中, 所有剂量(3.6~16.6 mg/kg)引起的肉芽肿损伤持续炎症达 90 天. Shvedova 等^[37]使用含少量杂质的 SWCNTs 在 10~40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量时, 观察到随着小鼠肺功能降低, 肺纤维化产生, 出现急性炎症反应. 大鼠常常被认为是颗粒物引起的肺部反应敏感而夸大其响应的动物模型. 使用大鼠进行毒性评

价的研究常常得到有争议的结果, 如大鼠暴露于 SWCNTs, 二氧化硅和羰基铁分别作为阳性和阴性对照, 得出有争议的结果. Warheit 等^[38]报道, 大鼠暴露 SWCNT 能够产生炎症, 形成肺部肉芽肿、并且肉芽肿随时间推移可能消退. 这些实验结果跟前面几种动物和人的颗粒物暴露毒理学响应资料并不一致. Lam 和 Shvedova 的实验中小鼠暴露剂量比 Warheit 大鼠实验采用的暴露剂量要低, 现在还无法对这些不一致的实验结果进行解释.

总结近年来的研究, 三种机理可以解释人群暴露于环境空气污染中纳米颗粒物引起与心肺有关的发病率和死亡率. 第一种是肺中纳米颗粒刺激自主神经系统导致心脏节律改变直接或间接损害心脏; 第二种是吸入的纳米颗粒物直接由肺-气通路进入系统循环到达靶器官, 从而触发炎症、分泌细胞因子、活性氧、C 反应蛋白进而诱发心脏事件; 第三种机理提出吸入的纳米颗粒物在肺部引发急性炎症反应, 从而刺激分泌细胞因子、化学增殖素、ROS 和转录因子.

2.3 转运和对其他器官的毒性

过去, 心血管、神经和分泌系统没有被当作是吸入毒理学和病理学的二级靶器官. 但是, 近年来许多动物和人体研究证明 UFPs 能够转运到肺以外的位置如血液、肝脏、心、脾和脑. 尽管目前 UFPs 转运过程还不清楚, 但这些初步研究为 UFPs 转运到其他器官, 包括心触发和 / 或引起心血管发病率和死亡率提供了一定的毒理学支持. 研究表明 UFPs 能够比大颗粒更深地渗透到肺间隙处并躲避清除^[29]. UFPs 躲避清除的能力使得它们在肺间隙滞留更长的时间, 增加了它们转运到肺以外器官的可能性. Hoet 等^[39]得出结论, 肺泡巨噬细胞的噬菌作用和上皮细胞内皮细胞的内吞作用是 UFPs 转运到组织循环和肺以外器官的重要途径. 我们对纳米 TiO_2 颗粒(25 和 80 nm)和微米 TiO_2 (155 nm)颗粒对成年小鼠的急性毒理进行了评价, 单次经口暴露 5 g/kg 体重 TiO_2 颗粒没有观察到明显的急性毒性. 但是, 从血清生化指标的变化和组织病理学观察看, TiO_2 颗粒在雌性小鼠身上引起了严重的肝和肾损伤. 利用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)定量分析 TiO_2 颗粒主要分布在肝、肾、脾和肺, 表明 TiO_2 颗粒经胃肠道吸收后可能转运到其他组织和器官^[40].

2.3.1 神经元转移. 这条路径由嗅觉和三叉感知神经末端及支气管区域复杂的感知神经网络组成, 颗

颗粒物从鼻嗅黏膜经神经传递到嗅球经过很短的距离。早期的研究关注于通过鼻腔滴注猩猩和猕猴 30 nm 的脊髓灰质炎病毒^[41, 42]。他们的研究显示嗅神经和嗅球的确是鼻腔滴注的纳米脊髓灰质炎病毒颗粒进入中枢神经系统的途径。Bodian 和 Howe^[41]测定病毒在轴突浆中的传递速率是 2.4 mm/h, 跟后来 Adams 和 Bray^[43]直接微注射到蟹的巨轴突固体颗粒物神经传递速率以及 de Lorenzo^[44]在松鼠猴测定银包被的胶体金颗粒(50 nm)传递速率也一致。de Lorenzo^[44]研究表明, 鼻腔滴注松鼠猴银包被的胶体金颗粒顺利通过嗅觉神经的轴突转移到嗅球, 50 nm 的金颗粒在 1 h 鼻腔滴注后甚至能穿过嗅球中的突触到达僧帽细胞树突。Oberdörster 等^[45]发现, 大鼠吸入 ¹³C 标记的碳粉 UFPs 后 30 min ¹³C 大量蓄积在肝中, 一天时间内蓄积量增加了 5 倍, 他们观察到吸入的 UFPs 以 2.5 mm/h 的速度转移到嗅觉神经。同时, 吸入的 ¹³C UFPs 第一天在嗅球中含量有显著增加, 暴露 7 天后含量逐渐增加, 且在大脑皮层和小脑持续缓慢增加^[46], 而肺中含量呈逐渐下降的趋势。另一项大鼠吸入纳米 MnO₂ 颗粒的研究结果表明, 暴露 12 天后嗅球中 Mn 含量显著增加, 增加幅度超过 3.5 倍, 而肺中 Mn 含量只增加 1 倍。如果在暴露 6 h 过程中堵住一个鼻孔, 只有一侧敞开的鼻孔则大大限制了嗅球中的 Mn 蓄积量^[47]。这个结果和大鼠吸入更大尺寸的 MnO₂ 颗粒 15 天, 而嗅球中 Mn 蓄积量没有显著增加形成鲜明的对比^[48]。我们采用小鼠鼻腔滴注方式研究发现, 滴注的 TiO₂ 纳米颗粒经鼻黏膜吸收后能够经嗅神经通路进入到嗅球及大脑皮层、海马和小脑等各分区中^[49, 50], 对单胺类神经递质代谢造成一定影响^[51]。因此, 现有的研究提示, 嗅觉神经通路是鼻内吸入颗粒转运最有可能的路径, 这些 NPs 是否转移到脑造成对中枢神经系统损伤, 进而引起神经系统的退行性, 目前还未完全得到证实。

2.3.2 皮肤暴露和转运。皮肤是人体最大的器官, 总共约有 18 000 cm² 表面积面向外界环境。真皮层有大量的组织巨噬细胞、淋巴管、树突状细胞和 5 种不同类型的感觉神经末梢及丰富的血液供应。纳米材料通过细胞旁路可以渗透角质层, 光学机械波能扩充腔隙而增加角质层的渗透性, 从而形成一个瞬间通路使纳米材料转运到表皮。Tinkle 等^[52]提出完整的皮肤屈曲时如腕关节运动会使 NPs 渗透过表皮的假说, 他们在一项实验中证明, 屈曲而不是平坦的皮肤的确使 1 μm 荧光球渗透到真皮, 随后

被淋巴系统和局部淋巴结摄取, 进而从淋巴结转运到血液循环。大于 1 μm 的颗粒穿透健康皮肤的能力是有限的, 除了一些擦伤、受伤或机械拉长的区域。已有报道遮光剂里含有的 TiO₂ 微粒能够穿透角质层和头发的毛孔^[53]。Kim 等^[54]在小鼠和猪皮内注入近红外量子点, 证实 NPs 一旦到达真皮, 将会停留在局部淋巴结, 从而有利于活体成像。到达真皮的颗粒能够通过巨噬细胞和树突状细胞转运到淋巴系统。当吞噬 NPs 的巨噬细胞和树突状细胞跟 T 淋巴细胞相互作用后, 会引起免疫应答。例如, Chen 等^[55]在小鼠腹腔注射连有甲状腺球蛋白和血清白蛋白的 C₆₀ 后, 能引起免疫原性, 产生 C₆₀ 的特异性抗体。需要进一步研究确定的是, NPs 是否和在什么情况下能够被免疫系统识别, 随后遵循什么途径被器官摄取。

3 总 结

目前一些纳米材料已经广泛地用于创伤敷料、牙科黏合剂、遮光剂、燃料电池、轮胎、衣物和电子方面。当前公众对纳米技术用于日常生活还存有一些担心, 因此在纳米技术广泛应用之前一定要谨慎检验和评估其对环境 and 人体健康的影响, 评估与纳米技术有关的社会效益及潜在风险。美国国立科学基金会和美国环保局的研究组对纳米材料安全性评价提出了如下建议^[56]: a. 对工业纳米材料的安全暴露评价; b. 研究人造纳米颗粒的毒理学; c. 利用已知的颗粒物和纤维的毒理学数据外推纳米材料的毒性; d. 人造纳米颗粒或纳米材料的环境和生物学迁移、持续和转化; e. 纳米材料在生态系统中的回收再利用。

纳米材料应用为生物医学领域打开了一个巨大的机会和市场, 但是一旦它们被引入生物体内, 对人体免疫反应造成的潜在负面影响目前还知之甚少。到目前为止, 关于纳米材料临床相关的毒性还从未报道过, 现在就对纳米材料的危害下结论还为时过早。纳米材料独特的物理化学性质是否引入新的损伤机制以及是否引入新的病理学都是未知的, 如炎症、凋亡、坏死、纤维化、过度增大、组织变形和致癌作用等(表 2)。未来的研究重点应该包括: a. 纳米材料在日常生活中的传播途径, 如吸入、经口、皮肤吸收和静脉注射等, 以及不同暴露途径给环境和人体健康带来的影响有什么不同; b. 纳米材料的结构和尺寸与其生物毒性之间的关系, 究竟什么参数(质量、粒径、比表面积、表面反应活

性、剂量)才是决定其毒性的关键参数; c. 能够从器官、组织、细胞、分子等不同层面解释纳米材料与生物体系相互作用的机理; e. 建立有效的纳米

材料生物安全性评定标准或体系, 来确保纳米材料的安全生产和使用。

Table 2 Effects as the basis for pathophysiology and toxicity of Nanomaterials^[1]

表 2 纳米材料的病理生理学和毒理学效应^[1]

纳米材料生物效应	可能的病理生理学结果
产生 ROS	蛋白质、DNA 和膜损伤, 氧化应激
氧化应激	II 相酶作用、炎症、线粒体混乱
炎症	炎症细胞组织浸润、纤维化、肉芽肿、动脉粥样硬化、急性期蛋白质表达 (如: C 反应蛋白)
网状内皮系统的摄取	NPs 在肝、脾、淋巴结的无症状隔离和贮存, 可能造成器官扩张和功能紊乱
蛋白质变性、降解	酶活性丢失, 自身抗原性
细胞核摄取	DNA 损伤, 核蛋白凝聚, 自身抗原
神经组织的摄取	脑和末梢神经系统损伤
吞噬细胞功能紊乱、" 粒子超载 "、介质释放	慢性炎症、纤维化、肉芽肿、干扰感染物质的清除
内皮机能障碍、凝血作用	动脉粥样硬化、形成血栓、中风、心肌梗塞
新抗原产生, 免疫耐受性破坏	自身免疫、辅助效应
改变的细胞周期调节	增殖、细胞周期停滞、老化
DNA 损伤	遗传突变、组织变形、致癌作用

毫无疑问的是纳米技术将会有广泛的应用, 对人类生活许多方面将会产生深远影响, 包括环境净化、水净化、廉价的电力和更好的疾病治疗形式。现在面临的挑战是我们缺乏暴露不同纳米材料可能带来的一些负面健康效应信息。因此纳米技术产业的发展需要在政府的安全引导下进行, 包括制造、监控工人暴露的剂量、环境中 NPs 的释放和风险评估都是促进纳米技术经济发展和生物学应用的当务之急。

参 考 文 献

- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 2005, **113**: 823~839
- Wu X, Liu H, Liu J, *et al.* Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(1): 41~46
- Zhang Y, Kohler N, Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*, 2002, **23**(7): 1553~1561
- Gao X, Cui Y, Levenson R M, *et al.* *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(8): 969~976
- Qu L, Cao W B, Zhao Y L, *et al.* Study of rare earth encapsulated carbon nanomaterials for biomedical uses. *J Alloy Compound*, 2006, **408**: 400~404
- Moghimi S M, Hunter A C, Murray J C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J*, 2005, **19**(3): 311~330
- Allen T N, Cullis P R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 2004, **303**(5665): 1818~1821
- Tang N, Du G, Wang N, *et al.* Improving penetration in tumors with nano-assemblies of phospholipids and doxorubicin. *J Natl Cancer I*, 2007, **99** (13): 1004~1015
- Ye C, Chen C Y, Chen Z, *et al.* *In situ* observation of $C_{60}(C(COOH)_2)_2$ interacting with living cells using fluorescence microscopy. *Chinese Sci Bull*, 2006, **51**(9): 1060~1064
- O'Neal D P, Hirsch L R, Halas N J, *et al.* Photothermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett*, 2004, **209**(2): 171~176
- DeNardo S J, DeNardo G L, Miers L A, *et al.* Development of tumor targeting bioprobes (^{111}In -chimeric L6 monoclonal antibody nanoparticles) for alternating magnetic field cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(19pt 2): 7087s~7092s
- El-Sayed I H, Huang X, El-Sayed M A. Selective laser photothermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett*, 2006, **239**(1): 129~135
- Chen C Y, Xing G M, Wang J X, *et al.* Multihydroxylated $[\text{Gd}@C_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ nanoparticles: antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity. *Nano Lett*, 2005, **5**(10): 2050~2057
- Wang J X, Chen C Y, Li B, *et al.* Antioxidative function and biodistribution of $[\text{Gd}@C_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ nanoparticles in tumor-bearing mice. *Biomed Pharm*, 2006, **71**(6): 872~881
- Gopalan B, Ito I, Branch C D, *et al.* Nanoparticle based systemic gene therapy for lung cancer: molecular mechanisms and strategies to suppress nanoparticle-mediated inflammatory response. *Technol Cancer Res Treat*, 2004, **3**(6): 647~657
- Li Z, Zhu S, Gan K, *et al.* Poly-L-lysine-modified silica nanoparticles: a potential oral gene delivery system. *J Nanosci*

- Nanotechnol, 2005, **5**(8): 1199~1203
- 17 Dufes C, Keith W N, Bilsland A, *et al.* Synthetic anticancer gene medicine exploits intrinsic antitumor activity of cationic vector to cure established tumors. *Cancer Res*, 2005, **65**(18): 8079~8084
 - 18 Kaul G, Amiji M. Tumor-targeted gene delivery using poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles: *in vitro* and *in vivo* studies. *Pharm Res*, 2005, **22**(6): 951~961
 - 19 Prabha S, Labhasetwar V. Nanoparticle-mediated wildtype p53 gene delivery results in sustained antiproliferative activity in breast cancer cells. *Mol Pharm*, 2004, **1**(3): 211~219
 - 20 Peters A, Liu E, Verrier R L, *et al.* Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology*, 2000, **11**(1): 11~17
 - 21 Pope C A, Burnett R T, Thurston G D, *et al.* Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*, 2004, **109**(1): 71~77
 - 22 Dockery D W, Luttmann-Gibson H, Rich D Q, *et al.* Association of air pollution with increased incidence of ventricular tachyarrhythmias recorded by implanted cardioverter defibrillators. *Environ Health Perspect*, 2005, **113**(6): 670~674
 - 23 Batalha J R, Saldiva P H, Clarke R W, *et al.* Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ Health Perspect*, 2002, **110**(12): 1191~1197
 - 24 Wellenius G A, Coull B A, Godleski J J, *et al.* Inhalation of concentrated ambient air particles exacerbates myocardial ischemia in conscious dogs. *Environ Health Perspect*, 2003, **111**(4): 402~408
 - 25 Seaton A, MacNee W, Donaldson K, *et al.* Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet*, 1995, **345**(8943): 176~178
 - 26 Nurkiewicz T R, Porter D W, Barger M, *et al.* Particulate matter exposure impairs systemic microvascular endothelium-dependent dilation. *Environ Health Perspect*, 2004, **112**(13): 1299~1306
 - 27 Li Z, Carter J D, Dailey L A, *et al.* Pollutant particles produce vasoconstriction and enhance MAPK signaling via angiotensin type I receptor. *Environ Health Perspect*, 2005a, **113**(8): 1009~1014
 - 28 Geiser M, Rothen R B, Kapp N, *et al.* Ultrafine particles cross cell membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect*, 2005, **113**(11): 1555~1560
 - 29 Brown D M, Wilson M R, MacNee W, *et al.* Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, **175**(3): 191~199
 - 30 Dick C A, Brown D M, Donaldson K, *et al.* The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol*, 2003, **15**(1): 39~52
 - 31 Oberdörster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health*, 2001, **74**(1): 1~8
 - 32 Donaldson K, Tran C L. Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal Toxicol*, 2002, **14**(1): 5~27
 - 33 Nel A, Xia T, Madler L, *et al.* Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 2006, **311**(5761): 622~627
 - 34 Oberdörster G, Ferin J, Lehnert B E. Correlation between particle size, *in vivo* particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect*, 1994, **102**(suppl 5): 173~179
 - 35 Edilberto B, James B M, Brian A W, *et al.* Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci*, 2004, **77**(2): 347~357
 - 36 Lam C W, James J T, McCluskey R, *et al.* Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci*, 2004, **77**(1): 126~134
 - 37 Shvedova A A, Kisin E R, Mercer R, *et al.* Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, **289**(5): L698~L708
 - 38 Warheit D B, Laurence B R, Reed K L, *et al.* Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci*, 2004, **77**(1): 117~125
 - 39 Hoet P H, Bruske-Hohlfeld I, Salata O V. Nanoparticles-known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology*, 2004, **2**(1): 12
 - 40 Wang J X, Zhou G Q, Chen C Y, *et al.* Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*, 2007, **168**(2): 176~185
 - 41 Bodian D, Howe H A. Experimental studies on intraneural spread of poliomyelitis virus. *Bull Johns Hopkins Hos*, 1941a, **69**: 248~267
 - 42 Howe H A, Bodian D. Portals of entry of poliomyelitis virus in the chimpanzee. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1940, **43**: 718~721
 - 43 Adams R J, Bray D. Rapid transport of foreign particles microinjected into crab axons. *Nature*, 1983, **303**(6): 718~720
 - 44 de Lorenzo A J. The olfactory neuron and the blood-brain barrier. In: *Taste and Smell in Vertebrates* (Wolstenholme G, Knight J, eds). London: Churchill, 1970. 151~176
 - 45 Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, *et al.* Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health*, 2002, **A65**(20): 1531~1543
 - 46 Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, *et al.* Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, 2004, **16**(6/7): 437~445
 - 47 Feikert T, Mercer P, Corson N, *et al.* Inhaled solid ultrafine particles (UFP) are efficiently translocated *via* neuronal naso-olfactory pathways. *Toxicologist*, 2004, **78**(suppl 1): 435~436
 - 48 Fechter L D, Johnson D L, Lynch R A. The relationship of particle size to olfactory nerve uptake of a non-soluble form of manganese into brain. *Neurotoxicology*, 2002, **23**(2): 177~183
 - 49 王江雪, 陈春英, 孙 瑾, 等. 用 SRXRF 研究纳米 TiO₂ 颗粒沿小鼠嗅觉神经系统的迁移. *高能物理与核物理*, 2005, **29**(增刊): 76~79
 - 50 Wang J X, Chen C Y, Sun J, *et al.* HEP&NP, 2005, **29**(suppl): 76~79
 - 51 Wang J X, Chen C Y, Yu H W, *et al.* Distribution of TiO₂ particles in the olfactory bulb of mice after nasal inhalation using microbeam SRXRF mapping techniques. *J Radioanal Nucl Chem*, 2007b, **272**(3): 527~531

- 单胺类神经递质的影响. 中华预防医学杂志, 2007, **41**(2): 91
- Wang J X, Li Y F, Zhou G Q, *et al.* Chin J Prev Med, 2007, **41**(2): 91
- 52 Tinkle S S, Antonini J M, Rich B A, *et al.* Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. Environ Health Perspect, 2003, **111**(9): 1202~1208
- 53 Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, *et al.* Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 1999, **12**(5): 247~256
- 54 Kim S, Lim Y S, Soltész E G, *et al.* Near infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. Nat Biotechnol, 2004, **22**(1): 93~97
- 55 Chen B, Wilson S, Das M, *et al.* Antigenicity of fullerenes: antibodies specific for fullerenes and their characteristics. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95**: 10809~10813
- 56 Dreher K L. Toxicological highlight: health and environmental impact of nanotechnology. Toxicol Sci, 2004, **77**: 3~5

Recent Progress on The Pro and Cons of Biological Effects of Nanomaterials*

ZHOU Guo-Qiang^{1,3)}, CHEN Chun-Ying^{1,2)**}, LI Yu-Feng¹⁾, LI Wei^{1,3)}, GAO Yu-Xi¹⁾, ZHAO Yu-Liang^{1,2)}

⁽¹⁾Laboratory for Bio-Environmental Effects on Nanomaterials and Nanosafety, Institute of High Energy Physics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ⁽²⁾Laboratory for Bio-Environmental Effects on Nanomaterials and Nanosafety, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China;

⁽³⁾College of Chemistry, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract With the rapid developing of nanotechnology, the use of nanomaterials in medical imaging, disease diagnoses, drug delivery, cancer treatment, gene therapy, and basic research have also progressed quickly. The beneficial uses of nanomaterials may cause human exposure through inhalation, ingestion, skin uptake, and intravenous injection. When nanomaterials interact with biological systems, they may generate adverse biological effects. The possible toxic effects of these nanomaterials are unknown until now. The positive applications in biomedicine as well as the negative biological effects of nanomaterials on cardiovascular, respiratory and other systems are highlighted, the possible mechanisms by which nanoparticles result in cardiovascular and pulmonary morbidity are also discussed, and the possible interaction routes and sequences is farther reviewed. Finally, the perspective of risk assessment of nanomaterials in the future is summarized.

Key words nanomaterials, biomedical application, nanotoxicology, environmental health

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (20751001) and The Chinese Ministry of Science and Technology (2006CB705603).

**Corresponding author . Tel: 86-10-82545560, E-mail: chenchy@nanoctr.cn

Received: January 21, 2008 Accepted: March 18, 2008