

# 不同修饰多壁碳纳米管诱导的细胞毒性及内质网相关基因表达

郭 健<sup>1</sup>, 聂海瑜<sup>2,3</sup>, 王海芳<sup>3</sup>, 贾 光<sup>1△</sup>

(1. 北京大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 北京 100191; 2. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871; 3. 上海大学纳米化学与生物学研究所, 上海 200444)

**[摘 要]** **目的:**比较表面不同修饰的两种多壁碳纳米管,即羧基化多壁碳纳米管(carboxylic multi-walled carbon nanotubes, c-MWCNTs)和牛磺酸修饰的多壁碳纳米管(taurine-modified multi-walled carbon nanotubes, tau-MWCNTs)对 RAW264.7 细胞的毒性,初步探究内质网在 MWCNTs 诱导细胞凋亡中的作用。**方法:**用尺寸和杂质含量一致的 tau-MWCNTs 和 c-MWCNTs 以 0、1.56、3.12、6.25、12.50、25.00  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  剂量染毒 RAW264.7 细胞 3、6、12、24 h,通过 WST-1 法和 AnnexinV-FITC/PI 双染,检测细胞毒性和细胞凋亡。应用实时荧光定量 PCR 技术,检测与内质网钙离子调控、应激和凋亡相关的 *CRT*、*GRP78* 以及 *CHOP* 的 mRNA 表达水平。**结果:**tau-MWCNTs 在所有的染毒剂量和染毒时间内,细胞毒性均比 c-MWCNTs 低。在  $\geq 12.50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  剂量下染毒 3 h 以上,或在  $\geq 3.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  剂量下染毒 12 h 以上,两种 MWCNTs 均能产生明显的细胞毒性且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。凋亡检测发现,两种 MWCNTs 染毒细胞 24 h 的细胞凋亡率显著高于 12 h,且 c-MWCNTs 组的凋亡率普遍高于 tau-MWCNTs 组。实时荧光定量 PCR 结果显示,在所研究的染毒剂量及时间内,*CRT*、*GRP78* 和 *CHOP* mRNA 表达与对照相比差异很小,无统计学意义。**结论:**tau-MWCNTs 对 RAW264.7 细胞的毒性较 c-MWCNTs 明显降低,未观察到 MWCNTs 对 RAW264.7 细胞内质网造成损伤,提示内质网通路可能不是 MWCNTs 导致细胞凋亡的主要机制。

**[关键词]** 纳米管;碳;细胞凋亡;内质网;基因表达

**[中图分类号]** R349.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2011)03-0342-06

**doi:**10.3969/j.issn.1671-167X.2011.03.006

## The cytotoxicity and expression changes of endoplasmic reticulum related genes induced by MWCNTs with different surface modifications

GUO Jian<sup>1</sup>, NIE Hai-yu<sup>2,3</sup>, WANG Hai-fang<sup>3</sup>, JIA Guang<sup>1△</sup>

(1. Department of Occupational and Environmental Health, Peking University School of Public Health, Beijing 100191, China; 2. College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China; 3. Institute of Nanochemistry and Nanobiology, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

**ABSTRACT Objective:** To compare the cytotoxicity of RAW264.7 cells induced by two types of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) with different surface modifications (MWCNTs modified by taurine and MWCNTs treated by acid), and explore the role of endoplasmic reticulum (ER) in MWCNTs-induced apoptosis. **Methods:** RAW264.7 cells were exposed to tau-MWCNTs or c-MWCNTs, of which the diameters and impurity contents were the same, at the dose of 0, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25.00  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  for 3, 6, 12 and 24 h, respectively. Then the cytotoxicity of MWCNTs was determined by WST-1 assay, and the percentages of apoptosis were analyzed via flow cytometry with AnnexinV-FITC/PI label. Real-time PCR was used to detect mRNA expression levels of *CRT*, *GRP78* and *CHOP* genes which were related to ER calcium regulation, stress and apoptosis. **Results:** Compared with the c-MWCNTs groups, the cytotoxicity of tau-MWCNTs was lower at the same dose and treatment time. Both the two types of MWCNTs could induce cytotoxicity apparently and statistically, when the cells were treated for only 3 h at the doses of more than 12.50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  or treated for more than 12 h at the lower dose of 3.12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $P < 0.05$ ). The results of flow cytometry showed that the two MWCNTs could induce apoptosis of RAW264.7 cells in the dose-and time-dependently manner. The apoptosis rate of the cells treated for 24 h was higher than that for 12 h. And at each dose, the apoptosis rate induced by c-MWCNTs was also higher than that of the water soluble tau-MWCNTs within our study design. However, in this study, the mRNA expression levels of *CRT*, *GRP78* and *CHOP* mRNA treated with both types of MWCNTs did not

show any significant differences compared with the control groups. **Conclusion:** The cytotoxicity of tau-MWCNTs was much lower than that of c-MWCNTs. Unfortunately, we found the expression of genes related to ER had little effects on the apoptosis of RAW264.7 treated with MWCNTs, indicating that the ER pathway might not be the mechanism of MWCNTs-induced apoptosis.

**KEY WORDS** Nanotubes, carbon; Apoptosis; Endoplasmic reticulum; Gene expression

碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)自1991年被发现以来,就以其独特的物理<sup>[1-2]</sup>(量子效应、电学、磁学、结构特性等)、化学<sup>[3-5]</sup>(氧化还原反应、自由基等)性质应用于复合材料、电化学微电极、催化剂载体、医学传感器等诸多方面,因其能直接或间接与人体接触,所以碳纳米管的生物安全性备受关注。已有研究表明,多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs)在染毒剂量为 $3.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时,即可对肺泡巨噬细胞产生损伤,影响其吞噬功能;而相对于MWCNTs,单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)的毒性更高<sup>[6]</sup>。研究表明,化学修饰是降低纳米材料毒性的一种方法。为降低碳纳米管的生物毒性,使其能被广泛安全地应用,各种修饰方法应运而生,化学修饰就是其中最常用的手段之一。

通过化学方法破坏碳纳米管端口或侧壁的C-C键,引入-COOH,即形成羧基化多壁碳纳米管(carboxylic multi-walled carbon nanotubes, c-MWCNTs),在此基础上通过酰化反应与牛磺酸( $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ )作用,进而得到牛磺酸修饰的多壁碳纳米管(taurine-modified multi-walled carbon nanotubes, tau-MWCNTs)。本课题组前期通过蛋白质组学技术比较了这两种不同修饰的MWCNTs对巨噬细胞蛋白表达的差异<sup>[7]</sup>,研究发现,经过修饰的MWCNTs可诱导钙网蛋白(calreticulin, CRT)、翻译控制肿瘤蛋白、GDP解离抑制因子等多种蛋白差异表达,这些蛋白主要定位于内质网和线粒体。

本研究将通过细胞毒性和凋亡评价,比较不同修饰对碳纳米管毒性的影响,同时应用实时荧光定量PCR(real-time PCR, RT-PCR)技术,检测与内质网钙离子调控、应激和凋亡相关的CRT、GRP78(glucose-regulated protein 78)以及CHOP(C/EBP-homologous protein)mRNA的表达情况,从基因转录水平对内质网这一可能的毒性通路进行初步筛查,为碳纳米管的毒理学评价和安全应用提供一定的实验数据和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞系

实验所用RAW264.7细胞系为小鼠腹腔巨噬细胞(购自北京协和细胞资源中心)。用含有10%

(体积分数)胎牛血清、100 IU/mL青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养基在含有5%(体积分数)CO<sub>2</sub>的37℃恒温孵育箱中培养。

### 1.2 碳纳米管

碳纳米管购自深圳纳米港公司。c-MWCNTs和tau-MWCNTs由北京大学化学学院刘元方院士课题组制备。两种MWCNTs管径均为10~20 nm,长度300~700 nm。通过红外显微镜(IR)、X线电子能谱(XPS)、透射电子显微镜(TEM)和元素分析等方法,证实tau-MWCNTs上约有0.5%的碳原子上修饰了牛磺酸;两者的比表面积均为 $133.7 \text{ m}^2/\text{g}$ ,纯度为97%,仅有极微量金属残留[Ni: 0.86%(质量分数),Fe: 0.06%(质量分数)和Co: 0.04%(质量分数)]。透射电子显微镜可清晰显示MWCNTs的形态(图1,2)。

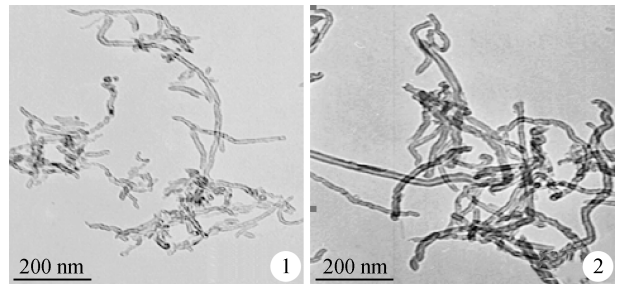


图1 tau-MWCNTs的透射电子显微镜照片

图2 c-MWCNTs的透射电子显微镜照片

Figure 1 The image of tau-MWCNT by TEM

Figure 2 The image of c-MWCNTs by TEM

### 1.3 实验所用试剂和器材

试剂:DMEM培养基购于Gibco BRL公司,WST-1细胞增殖与细胞毒性检测试剂盒购于上海碧云天公司,RNA提取试剂盒购于Gene Star公司,Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购于北京宝赛生物技术有限公司,RT reagent Kit及SYBR Premix Ex Taq购于Takara Biotechnology(Dalian),引物由北京六合通经贸有限公司合成。

仪器包括:电子天平(BP221S,Sartorius)、倒置显微镜(重庆光学仪器厂)、恒温孵育箱(3111型,Thermo)、超低温高速离心机(3K-15,Sigma)、荧光显微镜(TE 2000-S,Nikon)、酶标仪(MK3,Thermo)、PCR仪(My Cyclor,Bio-rad)、实时荧光定量PCR仪(LineGene FQD-48A,Bioer)、多功能核酸蛋白测定仪(BioSpec-MiNi,Shimadzu)、流式细胞仪(Cell Quest Pro,

BD)、超声清洗仪(KQ3200)和漩涡混合器(MVS-1)。

### 1.4 染毒液配制

将两种 MWCNTs 分别与 DMEM 培养基混合配成质量浓度为 0、5、10、20、40、80 mg/L 的染毒液<sup>[6]</sup>。染毒时,按染毒平皿底面积和染毒体积换算成 0、1.56、3.10、6.25、12.50、25.00  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。96 孔板底面积为 0.32  $\text{cm}^2/\text{孔}$ ,6 孔板底面积为 9.6  $\text{cm}^2/\text{孔}$ 。

### 1.5 细胞毒性试验

将 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板内,  $2 \times 10^4$  个/孔,每个剂量种 5 孔,且每组设一无细胞对照,培养过夜后弃去培养液,加入不同浓度的染毒液 0.1 mL/孔[染毒剂量为(0.1C/0.32)  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ],分别培养 3、6、12、24 h 后,每孔加入 WST-1 溶液 10  $\mu\text{L}$ ,继续孵育 3 h,用酶标仪(450 nm)测光密度值(D)。细胞相对活性 = (实验组 D 值 - 实验组空白 D 值) / (对照组 D 值 - 对照组空白 D 值)。

### 1.6 Annexin V-FITC 凋亡检测实验

将 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板,  $6 \times 10^5$  个/孔,每个剂量种 1 孔,培养过夜后弃去培养液,加入不同浓度的染毒液 3 mL/孔[染毒剂量为(3C/9.6)  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ],分别培养 12、24 h 后,收集培养液和细胞,反复离心清洗后,加 Annexin V-FITC,室温避光反应 15 min。筛网过滤后加 PI 上流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

### 1.7 CRT、GRP78、CHOP mRNA 表达检测

细胞培养及染毒同凋亡检测,染毒 12、24 h 后,收集细胞,按试剂盒操作提取总 RNA,经反转录后得到 cDNA。用 cDNA 进行 SYBR 荧光实时定量 PCR 扩增,反应体系为 25  $\mu\text{L}$ ,包括 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(2  $\times$ ) 12.5  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物(表 1)各 0.5  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,40 个循环;梯度溶解曲线。每个样本的目的 mRNA 含量根据各自的  $\beta$ -actin 含量进行标准化,以对照组表达量为 1 做比值,mRNA 相对表达量以相对比值表示。

表 1 CRT、GRP78、CHOP 和  $\beta$ -actin 的引物序列

Table 1 The primer sequence of CRT, GRP78, CHOP, and  $\beta$ -actin

Gene	Primer sequence (5' - 3')	Length (bp)
CRT	CGTTCACCTTCATAGACCTTGAT	160
	CTCATTGCCAAACTCCTCTG	
GRP78	TGATCTGCTACTGCTTGATGTT	174
	CGTTCACCTTCATAGACCTTGAT	
CHOP	TGTTGAAGATGACGGGTGG	160
	CAAGGTGAAAGGCAGGACTC	
$\beta$ -actin	CTATTGGCAACGAGCGGTTTC	140
	GGCATAGAGCTCTTTACGGATGT	

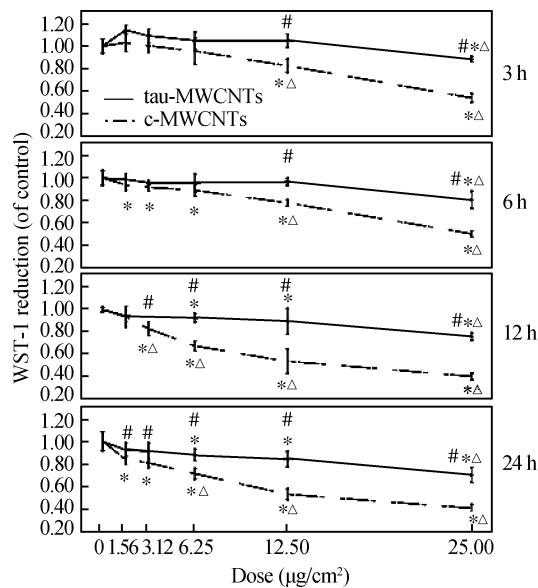
### 1.8 统计学分析

使用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,各实验数据结果用  $\bar{x} \pm s_e$ ,各组间比较采用单因素方差分析(两两比较采用 LSD-t 检验),方差不齐的采用非参数秩和检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞毒性试验

染毒后,随着染毒剂量的增加,两种 MWCNTs 对细胞的毒性逐渐增加,且 c-MWCNTs 对细胞增殖的抑制比 tau-MWCNTs 明显(图 3)。当染毒剂量在 12.50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  以上时,即使染毒时间很短(3 h),两者也能产生明显的毒性,且两者间差异有统计学意义。染毒 6、12、24 h 后,c-MWCNTs 各剂量组与对照组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 tau-MWCNTs 仅两个高剂量组与对照组相比差异有统计学意义。当染毒时间超过 12 h,即使染毒剂量很低(3.12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ),两者间也产生了明显差异。



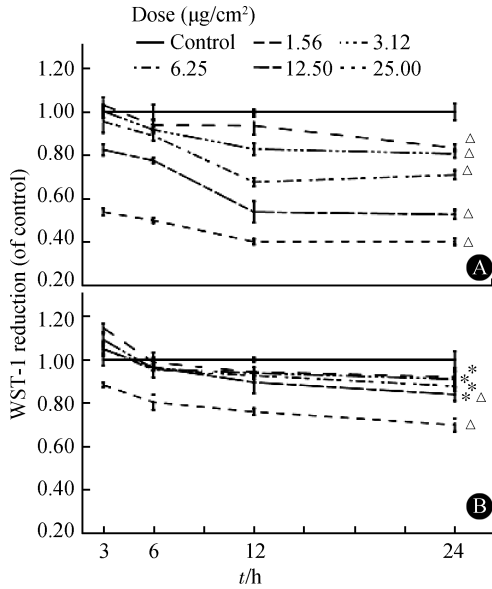
\*  $P < 0.05$ , compared with control group;  $\Delta$   $P < 0.05$ , compared with all other groups; #  $P < 0.05$ , significant differences between two MWCNTs.

图 3 MWCNTs 对 RAW264.7 细胞毒性的剂量效应曲线(WST-1,  $n = 5$ )

Figure 3 The dose response cytotoxicity of MWCNTs to RAW264.7 cells determined by WST-1 ( $n = 5$ )

相同染毒剂量在不同的染毒时间下,毒性也有差异。研究发现,随着染毒时间的增长,两种 MWCNTs 的毒性均逐渐增高(图 4)。c-MWCNTs 各剂量组中,24 h 染毒组与 3、6 h 组相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );而 tau-MWCNTs 仅在 12.50、25.00  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  两个剂量下,24 h 染毒组与 3、6 h 组相比差异有统计学意义,其他剂量组仅与 3 h 组差

异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 并且毒性的时间效应曲线相对平缓, 弱于剂量效应。



A, c-MWCNTs; B, tau-MWCNTs; \*  $P < 0.05$ , significant differences between 24 h and 3 h;  $\Delta P < 0.05$ , 24 h group compared with 3 h and 6 h groups.

图4 MWCNTs对RAW264.7细胞毒性的时间效应曲线(WST-1,  $n = 5$ )

Figure 4 The time response cytotoxicity of MWCNTs to RAW264.7 cells determined by WST-1 ( $n = 5$ )

## 2.2 凋亡检测结果

细胞凋亡测定检测了12 h和24 h的染毒情况, 本文仅列出24 h数据结果作为代表(图5~7)。染

毒24 h的细胞凋亡率要明显高于12 h, 且随着染毒剂量的增加, 凋亡细胞逐渐增多, 在相同剂量下, c-MWCNTs组的凋亡率高于tau-MWCNTs组, 结果与细胞毒性实验相一致。

## 2.3 CRT、GRP78、CHOP mRNA表达情况

实时荧光定量PCR检测结果显示, 随着MWCNTs剂量的增加, CRT、GRP78和CHOP mRNA表达与对照相比差异很小, 并没有明显增多或减少的趋势, 且不同的染毒时间表达量也无明显的变化(图8,9)。

## 3 讨论

牛磺酸是一种水溶性极好的氨基酸分子, 修饰后能明显增加碳纳米管的水溶性。通过WST-1毒性实验, 我们发现经牛磺酸修饰后, tau-MWCNTs对RAW264.7细胞的毒性较c-MWCNTs明显降低。在25.00  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  剂量、各时间点毒性均约降至c-MWCNTs毒性的一半, 可见牛磺酸修饰对于降低MWCNTs毒性有明显作用。

Annexin V/PI双染的结果表明, 修饰后的MWCNTs可诱导细胞凋亡, 且凋亡的增加趋势与细胞增殖抑制趋势相一致。凋亡的发生为安全应用MWCNTs带来了新的挑战, 而研究比较不同修饰MWCNTs的凋亡机制不仅可以帮助寻找解决方案, 还能筛选出有效的生物学标志物来检测MWCNTs的毒性作用。

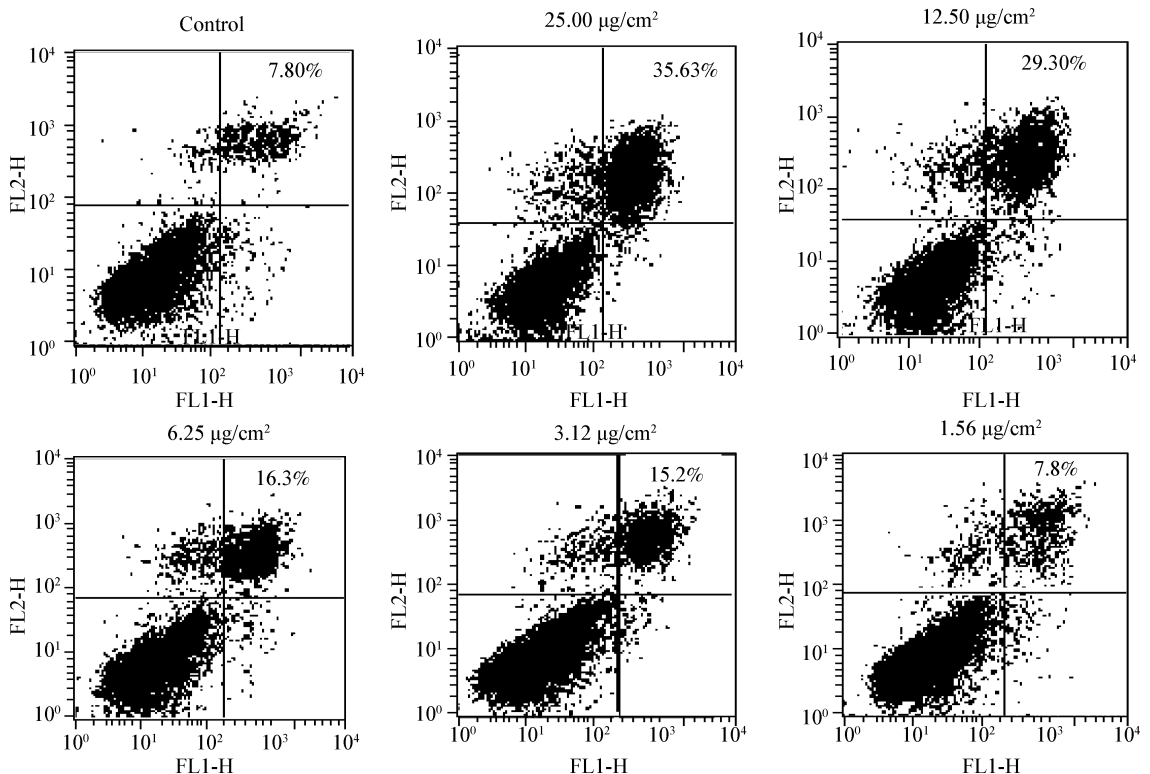


图5 c-MWCNTs染毒RAW264.7细胞24 h凋亡检测结果(右上角数值为总凋亡率)

Figure 5 Apoptosis rate of c-MWCNTs to RAW264.7 cells after 24 h exposure

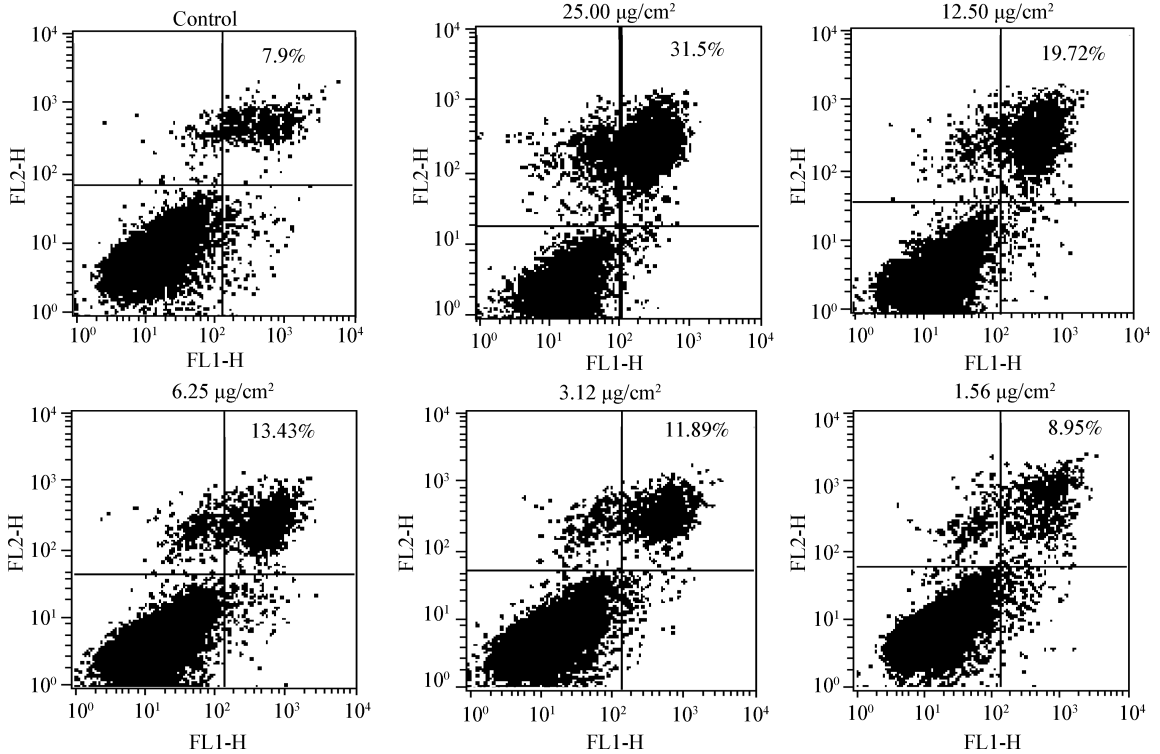


图 6 tau-MWCNTs 染毒 RAW264.7 细胞 24 h 凋亡检测结果 ( 右上 角 数 值 为 总 凋 亡 率 )

Figure 6 Apoptosis rate of tau-MWCNTs to RAW264.7 cells after 24 h exposure

有研究认为线粒体是碳纳米管潜在的靶器官之一<sup>[8-9]</sup>,碳纳米管通过线粒体损伤诱发氧化应激,引起线粒体膜电位降低、通透性改变,并最终诱导细胞凋亡<sup>[10-11]</sup>。本课题组之前的研究也发现,MWCNTs引起的RAW264.7细胞蛋白差异表达与能量代谢、ATP合成有关,但还有一些差异表达蛋白与内质网功能、钙离子调控相关<sup>[7]</sup>,这引起了我们的关注。内质网可能和线粒体一样,是碳纳米管作用的靶器官之一。

已有研究表明,约5%~20%的线粒体膜与内质网相连接<sup>[12]</sup>,当应激发生时,内质网释放的钙离子约有20%~40%会通过膜接触流入线粒体<sup>[13]</sup>,进而导致线粒体功能发生改变<sup>[14]</sup>。碳纳米管对细胞线粒体的损伤,往往伴有钙离子的浓度升高,鉴于此,我们推测内质网很可能是碳纳米管导致线粒体损伤的上游机制。通过对CRT、GRP78和CHOP mRNA转录水平的检测,可初步了解MWCNTs对RAW264.7细胞内钙离子调控和内质网功能的影响。

CRT是一种极强的钙结合蛋白,存在于内质网腔,可通过与内质网Ca<sup>2+</sup>-ATP酶糖基化C-末端相互作用调节内质网Ca<sup>2+</sup>浓度:两者解离,内质网回收Ca<sup>2+</sup>增加;两者结合,抑制ATP酶活性,回收减少。Arnaudeau等<sup>[14]</sup>研究发现钙网蛋白过表达会导

致内质网Ca<sup>2+</sup>储量增多,同时增加内质网Ca<sup>2+</sup>的流通(内流和外排),但降低线粒体Ca<sup>2+</sup>浓度及线粒体膜电位。对钙网蛋白表达的检测可直接或间接反映Ca<sup>2+</sup>调控和线粒体的损伤情况。

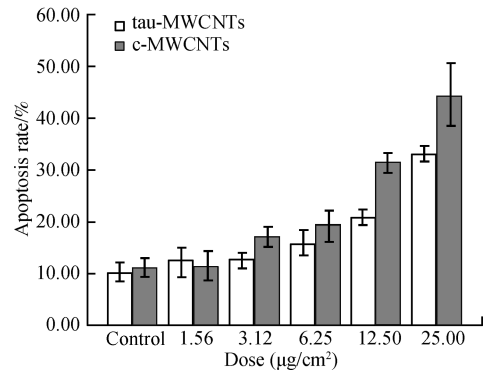


图 7 MWCNTs 染毒 RAW264.7 细胞 24 h 后的细胞凋亡检测结果 (n = 3)

Figure 7 The apoptosis rate of MWCNTs to RAW264.7 cells after 24 h exposure (n = 3)

GRP78属内质网分子伴侣,正常情况下与内质网应激感应蛋白PERK、ATP6、IRE-1相结合,处于无激活状态。当内质网应激(ERS)时,GRP78解离成游离态,启动未折叠蛋白反应,降低未折叠或错误折叠蛋白的产生和集聚,因而,GRP78是内质网应激发生的标志性蛋白,通过检测其表达情况,可明确内质网应激的发生。

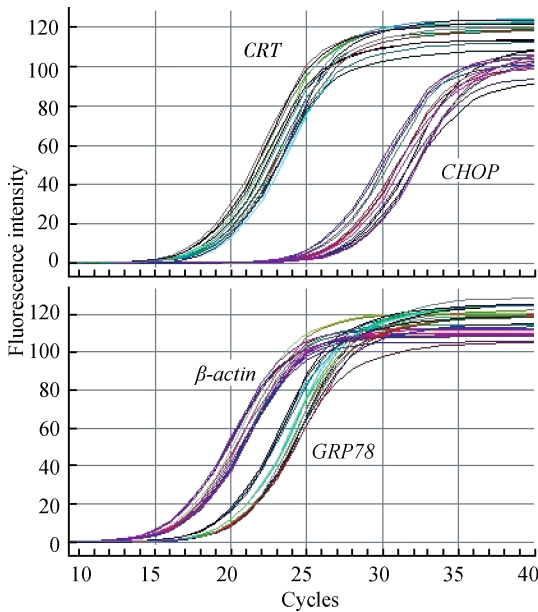


图8 MWCNTs 染毒 RAW264.7 细胞 24 h  $\beta$ -actin、CRT、GRP78 和 CHOP cDNA 的扩增曲线

Figure 8 Amplification curves of ACTB, CRT, GRP78, and CHOP cDNA after exposing MWCNTs to RAW264.7 cells for 24 h (real-time PCR)

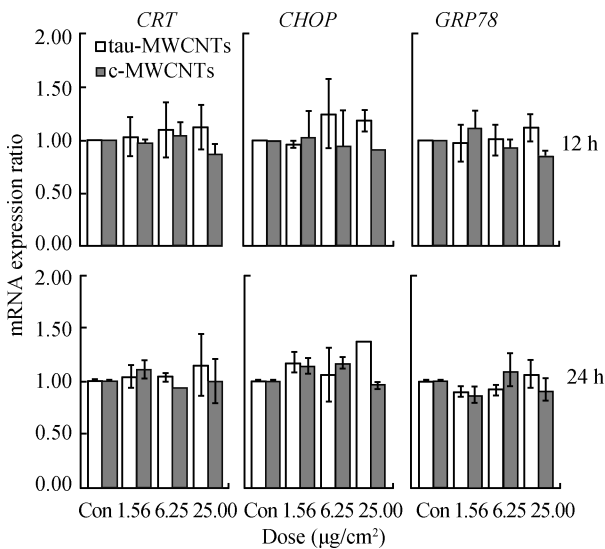


图9 MWCNTs 染毒 RAW264.7 细胞后 CRT、GRP78 和 CHOP mRNA 表达情况 ( $n=4$ )

Figure 9 The expression levels of CRT, GRP78 and CHOP mRNA induced by MWCNTs ( $n=4$ )

CHOP 是内质网应激特异的转录因子,是联系内质网应激和细胞凋亡的重要中间信号分子,其可与其他家族成员形成二聚体,通过下调 Bcl-2 表达、耗竭谷胱甘肽、促进活性氧(ROS)生成等多途径促进细胞凋亡,是细胞由抗凋亡向促凋亡转换的标志蛋白。

综上所述,CRT、GRP78 和 CHOP mRNA 的转录水平与细胞内质网功能息息相关,同时也是反映内质网凋亡途径的检测指标。本研究发现,CRT、

GRP78 和 CHOP mRNA 表达与对照相比差异很小,并没有明显增多或减少的趋势,两种不同修饰的 MWCNTs 之间也无差异。本研究未观察到 MWCNTs 对 RAW264.7 细胞内质网造成明显影响,提示内质网通路可能不是 MWCNTs 导致的细胞凋亡的主要机制,当然这一结论还需要在蛋白质表达水平进一步确证。

两种 MWCNTs 均能引起 RAW264.7 细胞增殖抑制,且能够诱导细胞凋亡,tau-MWCNTs 的毒性较 c-MWCNTs 明显降低。尽管在本研究中,并未发现 MWCNTs 对细胞内质网的影响,不同修饰间也无明显差异,但细胞凋亡与内质网间的相互关系正逐渐被人们关注<sup>[15]</sup>,内质网正逐渐成为继细胞核和线粒体之后,又一个被人关注的焦点,其在 MWCNTs 诱导的细胞毒性中所发挥的作用有待进一步的研究。

#### 参考文献

- [1] 成会明. 纳米碳管——制备、结构、物性及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] 麦亚潘 M. 碳纳米管——科学与应用[M]. 刘忠范, 译. 北京: 科学出版社, 2007.
- [3] Sun YP, Fu K, Lin Y, et al. Functionalized carbon nanotubes: properties and applications [J]. Accounts Chem Res, 2002, 35 (12): 1096–1104.
- [4] Bahr JL, Tour JM. Covalent chemistry of single-wall carbon nanotubes [J]. J Mater Chem, 2002, 12(7): 1952–1958.
- [5] Hirsch A. Functionalization of single-walled carbon nanotubes [J]. Angew Chem Int Edit, 2002, 41(11): 1853–1859.
- [6] Jia G, Wang HF, Yan L, et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials; single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene [J]. Environ Sci Technol, 2005, 39(5): 1378–1383.
- [7] 沈臻霖, 聂海瑜, 王海芳, 等. 表面不同修饰的两种多壁碳纳米管引起的 RAW264.7 细胞蛋白质差异表达[J]. 北京大学学报: 医学版, 2010, 3(42): 345–350.
- [8] Worle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays [J]. Nano Lett, 2006, 6(6): 1261–1268.
- [9] Zhu Y, Zhao Q F, Li Y G, et al. The interaction and toxicity of multi-walled carbon nanotubes with *Styloynchia mytilus* [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2006, 6(5): 1357–1364.
- [10] Gilmour PS, Brown DM, Beswick PH, et al. Free radical activity of industrial fibers: role of iron in oxidative stress and activation of transcription factors [J]. Environ Heal Persp, 1997, 105 (suppl 5): 1313–1317.
- [11] Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin VA, et al. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW264.7 macrophages: Role of iron [J]. Toxicol Lett, 2006, 165(1): 88–100.
- [12] Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $Ca^{2+}$  responses [J]. Science, 1998, 280(5370): 1763–1766.
- [13] Pachter P, Csordas P, Schneider T, et al. Quantification of calcium signal transmission from sarco-endoplasmic reticulum to the mitochondria [J]. J Physiol, 2000, 529(3): 553–564.
- [14] Arnaudeau S, Frieden M, Nakamura K, et al. Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria [J]. J Biol Chem, 2002, 277(48): 46696–46705.
- [15] Ludivine W, Gyorgy H. Mitochondria and endoplasmic reticulum: The lethal interorganelle cross-talk [J]. J Bioenerg Biomembr, 2005, 3(37): 191–206.