

碳纳米管呼吸系统毒性作用机制及其影响因素的研究进展

王越^①, 王鹏^②, 陈春英^②, 赵宇亮^{②*}

① 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040;

② 国家纳米科学中心, 中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室, 北京 100190

* 联系人, E-mail: zhaoyl@nanoctr.cn

2013-03-27 收稿, 2013-05-16 接受

国家重点基础研究发展计划(2011CB933401, 2010CB934004)和国家自然科学基金(21277037, 31000337)资助

摘要 碳纳米管具有独特的力学、电学以及化学性质,使其能够在信息、光电、能源、传感、材料以及医疗等多个领域都有潜在的应用.与此同时,随着碳纳米管的广泛应用及其生产规模的日益扩大,碳纳米管的生物安全性也引起了越来越广泛的关注.近年来,许多研究人员从不同层次包括分子、细胞以及动物水平研究了碳纳米管的呼吸系统毒性,取得了大量的实验数据,然而许多研究结论并不一致,甚至相互矛盾,这可能与研究者所用碳纳米管的金属杂质种类及其含量、分散性、长度、直径等因素有关.本文从碳纳米管的结构和性质出发,阐述了近年来关于碳纳米管呼吸系统毒性及其细胞作用机制的研究进展,对可能影响碳纳米管细胞毒性的诸多因素进行了归纳和讨论.最后,我们对将来如何系统科学地研究和评价碳纳米管呼吸系统毒性作了展望.

关键词

碳纳米管
纳米毒理学
肺毒性
毒性机制
理化性质

1 碳纳米管概述

碳纳米管(CNTs)是一种直径在几纳米到几十纳米之间的中空碳纤维.其长度为数微米,甚至毫米,远大于其直径,因而被称为“碳纳米管”.碳纳米管根据其结构主要可分为单壁碳纳米管(SWCNTs)和多壁碳纳米管(MWCNTs)两大类^[1].SWCNTs是仅由一层石墨烯片卷曲而成的闭合的筒状结构,厚度在一个原子大小,直径在1 nm左右.碳纳米管在合成过程中,由两段帽状结构,通过碳碳键连接形成环状结构.SWCNTs结构上存在差异是由于其碳原子排列不同,根据手性矢量可将SWCNTs分为扶手椅式(*armchair*)、锯齿形(*zigzag*)、手性(*chiral*)三类.单壁扶手椅式手性结构的特点是截面出现的椅形结构垂直于管轴;锯齿形手性结构的特点是有一个V形结构垂直于管轴;螺旋式手性结构则属于不同于上述两种类型的结构.碳纳米管的手性程度决定了它的电学性质和导电性

能,这使碳纳米管在各种纳米元器件的制造方面,有着广泛的应用前景.除此之外,碳纳米管手性特征也决定了它的直径和金属性、半导体性等物理性质^[2,3].MWCNTs是由2~10层石墨烯片卷曲形成的,厚度大于一个原子,直径大于10 nm^[4].MWCNTs根据石墨烯片层的排列不同分为三大类:一类是多层石墨烯片层同轴卷曲而成,小直径碳管被大直径碳管包裹,另一类被称为羊皮纸模型,单层石墨烯片层自身卷曲成筒状组成MWCNTs,貌似卷曲的羊皮纸或卷起的报纸^[5].还有一类,结构近似于SWCNTs,由两层石墨烯片卷曲而成,叫做双壁碳纳米管.MWCNTs在生物医药领域有广泛的应用前景^[6].除了以上几种之外,碳纳米管还可以根据结构修饰、制备方法、溶解性等几种方式分类,比如功能化的碳纳米管、溶剂分散的碳纳米管、表面活性剂修饰的碳纳米管、生物分子的碳纳米管等等(图1).

碳纳米管作为一维的碳纳米材料,其重量轻,六

引用格式: 王越, 王鹏, 陈春英, 等. 碳纳米管呼吸系统毒性作用机制及其影响因素的研究进展. 科学通报, 2013, 58: 2007-2020
WANG Yue, WANG Peng, CHEN ChunYing, et al. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary toxicity caused by carbon nanotubes with various physiochemical properties (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 2007-2020, doi: 10.1360/972013-352

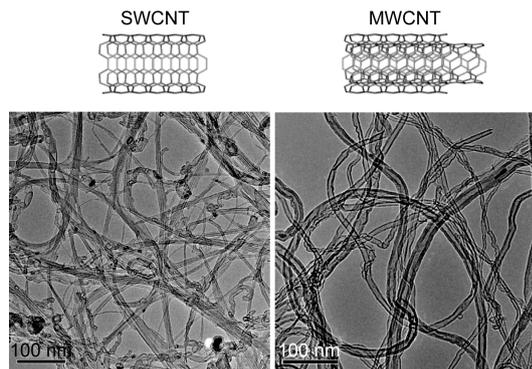


图1 碳纳米管的基本形态以及相应的电子显微镜图片
(a) 单壁碳纳米管, (b) 多壁碳纳米管^[7]

边形结构连接完美, 具有许多独特的力学、电学和化学性能, 因而在电子器件、复合材料、生物医学等众多领域都有着广泛的应用前景(图2)^[8]. 在生物学领域, 碳纳米管作为一种高级生物传感器材料已被实际应用, 如抗原识别、酶催化反应和 DNA 杂交等; 碳纳米管还拥有独特的一维纳米结构, 是多种药物或基因理想的纳米载体; 碳纳米管的复合材料可以作为人造骨骼植入体内, 为新生肌肉提供骨架和载体, 并能诱导骨骼细胞的定向分化; 碳纳米管还可以作为神经生长的基质、多功能生物传输器和近红外射线选择性杀伤癌细胞的媒介等. 近些年随着科学家对碳纳米管研究的深入, 其广阔的应用前景也不断展现出来. 与此同时, 随着碳纳米管的广泛应用及其生产规模的日益扩大, 碳纳米管的生物安全性也引起越来越广泛的关注. 人们在碳纳米管的生产过程中或生物应用后, 可能形成与碳纳米管长期的接触. 这种长时间的接触很可能在机体内引发一系列毒性反应. 综合目前有关碳纳米管的毒理学研究数据, 主要有以下两个特点: 第一, 数据主要集中在碳纳米管对呼吸系统的毒性研究. 由于碳纳米管尺寸小、密度低, 因而在职业场所中可能以气溶胶的形式存在于周围环境中, 并有可能被工作人员吸入并在其肺中聚集. 正因为如此, 研究者在实验中模拟了碳纳米管对大鼠或小鼠呼吸暴露过程, 许多研究结果显示, 与碳纳米管的长期接触会引起机体氧化应激水平升高, 产生明显的肺部炎症, 造成多种细胞发生凋亡, 从而诱发肺部毒性反应, 甚至可能导致基因损伤和突变, 引发间皮瘤(图2)^[9]. 第二, 至今对于碳纳米管是否具有细胞毒性仍存在争议. 一部分研究者认为碳纳米管具有毒性, 并给出了各种毒性产生的机理; 另一

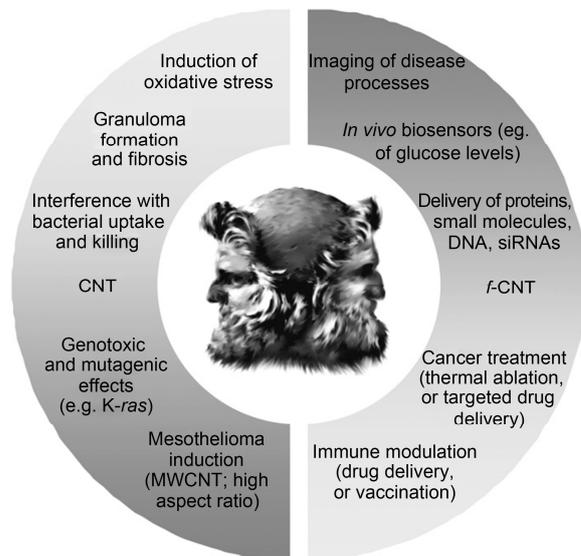


图2 碳纳米管在应用过程中的两面性
左侧是碳纳米管在细胞或动物模型中存在的潜在毒性, 右侧为功能化修饰后碳纳米管在生物医药领域的应用^[8]

部分研究者发现碳纳米管没有细胞毒性, 但可以肯定的是, 之所以有这样矛盾的结果, 是因为有诸多外在和内在的因素影响了研究者对碳纳米管细胞毒性的判断. 因此, 本文着重综述了碳纳米管与呼吸系统的相互作用及其分子机制的研究进展, 确定影响碳纳米管细胞毒性的主要因素, 对将来更加安全、合理地应用碳纳米管具有重要意义.

2 碳纳米管在机体内的转移与分布

生物分布是毒理学研究中承上启下的一环, 也是评价纳米材料安全性必不可少的研究内容. 生物分布能够提供材料或药物在动物体内的转运蓄积等信息, 为有针对性地开展毒理学研究提供依据, 减少研究的盲目性. 由于碳纳米管在多个领域都具有潜在的应用, 碳纳米管很可能通过呼吸系统或者随食物链进入人体, 并且积累于人体各个组织或器官. 因此, 研究碳纳米管在体内的分布和代谢对其安全性评估具有非常重要的意义.

由于碳纳米管尺寸小, 很容易通过呼吸道随着吸入的空气进入肺部. Muller 等人^[10]研究了 MWCNTs 经过气管滴注进入小鼠肺部后在肺部的清除速率, 检测是基于 MWCNTs 制备中使用的钴催化剂, 这些残留在 MWCNTs 上的钴在 37 的生理盐水中孵育 60 天仅释放 5%, 所以可以用作定量研究. 28 天后碳

纳米管能被清除 20% 左右, 残余量 78.4%, 60 天后发现 MWCNTs 并没有被进一步清除, 残余量仍高达 81.2%. Deng 等人^[11]报道了牛磺酸修饰的多壁碳纳米管 (Tau-MWCNTs) 的肺部清除及可能的转运. 气管滴注后碳纳米管最开始主要集中在肺部, 随时间增加缓慢从肺部排出, 气管滴注 24 h 后, 78% 分布在肺中, 28 天后仍有 20% 蓄积. 尽管肺部含量很高, 但没有在血液及其他脏器中检测到 MWCNTs 存在, 所以推测碳纳米管并没有进入血液循环, 仅通过肺部排出体外. Oberdorster 等人^[12]将大鼠全身呼吸式暴露于浓度为 80 或 180 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 的 ^{13}C 标记的碳纳米材料 (20~29 nm) 6 h 后, 他们在大鼠的肝脏中能检测到大量碳纳米材料. 他们进一步的研究还发现, 吸入的 ^{13}C 标记的碳纳米材料会到达嗅球、大脑和小脑, 这暗示碳纳米材料可能通过鼻黏膜和嗅觉神经转移到大脑^[13]. 有研究表明, 碳纳米管在呼吸道的分布, 主要取决于它们的尺寸和结构^[14].

还有研究发现碳纳米管通过其他途径如尾静脉注射进入机体后, 它们会快速分布到中枢神经系统、外周神经系统、淋巴和血液中, 并且快速聚集到心、脾、骨髓和肝脏等器官中^[15]. Wang 等人^[16]对羟基化修饰的单壁碳纳米管在小鼠体内的分布情况做了更为细致的研究, 他们将 ^{125}I -SWNTols 以不同的时间间隔注入小鼠体内, 观察 ^{125}I -SWNTols 在体内的分布情况. 研究表明 ^{125}I -SWNTols 可以在短时间

内快速分布到机体除脑以外的各个组织和器官中. 此外, 他们还发现 ^{125}I -SWNTols 在胃、肾脏和骨骼中分布得最多, 并且随着时间的延长, 在骨骼中蓄积的材料最多(图 3).

碳纳米管在体内沉积后, 通过各种途径和不同的机制转移到其他区域并最终到达各个器官和组织. 一般地, 纳米材料进入血液循环可能通过胞转作用, 由呼吸道进入间质组织. 机体清除沉积于呼吸道的纳米颗粒, 主要有两种机制: (1) 物理性的迁移; (2) 化学清除过程. 化学清除是针对纳米颗粒在细胞内或细胞外液中的可溶性或脂溶性部分. 纳米颗粒的可溶性成分经过吸收和分解后转化成蛋白质或其他亚细胞成分^[17]. 然而, 上述研究结果表明, 碳纳米管能否经过呼吸道进入机体还有待深入研究, 碳纳米管迁移到体内的能力可能依赖于它们的化学反应特性、表面特征和与血液中蛋白的结合能力.

3 碳纳米管的肺毒性及相关机理研究

纳米材料较其他材料具有更独特的性质, 如纳米材料具有大的表面积和体积比, 这些使得纳米材料具有相对独特的毒性机理. 已经有大量的研究表明, 纳米材料的毒性与其尺寸大小、比表面积、组成和形状密切相关^[18~24]. 随着纳米材料尺寸减小, 纳米材料的相对表面积会成指数上升. 因此, 改变纳米材料的表面积对纳米材料自身的性质及其周围的

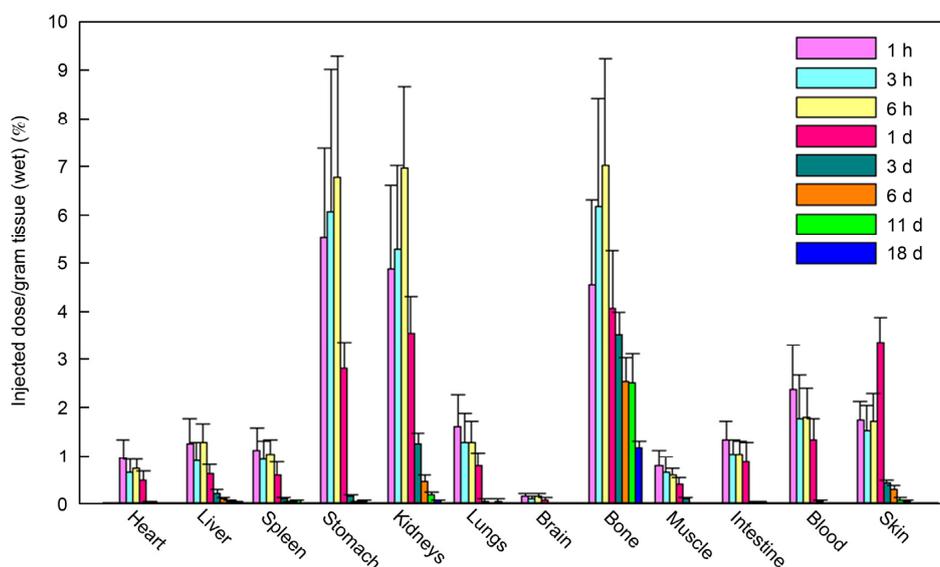


图 3 ^{125}I -SWNTols 在短时间内快速分布到机体除脑以外的各个组织和器官主要集中在胃、肾脏和骨骼中, 随着时间的延长, 在骨骼中蓄积得最多^[16]

环境都会产生很大的影响^[25-27]. 纳米材料在细胞或生物体内的积聚, 可能会影响到决定细胞正常生长与代谢的生物学功能, 最终改变组织对营养物质或各种生物因子的正常摄取等等. 下面将对近几年碳纳米管引发肺部毒性的相关研究进行总结.

3.1 单壁碳纳米管的肺毒性

SWCNTs 的直径一般在 0.7~1.5 nm 之间. 对于 SWCNTs 的肺毒性的研究, 主要集中在 SWCNTs 对肺部巨噬细胞和上皮细胞的影响, 及其促纤维化过程等方面. 在诸多的研究中, 研究者们发现 SWCNTs 对巨噬细胞的毒性反应要大于 MWCNTs 或其他肺纤维化相关的纳米材料如石英、富勒烯等^[28]. 但对于 SWCNTs 毒性的报道也不尽相同, Kalbacova 等人^[29]研究表明 SWCNTs 对人单核巨噬细胞(THP-1)有毒性作用, 而 Fiorito 等人^[30]研究则发现 SWCNTs 对人巨噬细胞没有显著的细胞毒性. 同时有人认为, 所有原始的和功能化修饰的 SWCNTs 在体外对巨噬细胞的毒性都是有限的, 包括对其生长、细胞活力、迁移能力和细胞形态等方面的影响^[31]. 多种动物体的肺部暴露于 SWCNTs 后, 在其肺部都能观察到明显的肉芽肿形成. SWCNTs 会导致肺上皮细胞和间皮细胞损伤, 进而促进肉芽肿形成和纤维化发生^[32]. Warheit 等人^[33]在评估 SWCNTs 造成大鼠肺部毒性的研究中, 将 SWCNTs 气管滴注到大鼠的肺部, 连续暴露一周后, 在大鼠肺部发现有不均一的肉芽肿形成, 并且他

们研究发现肉芽肿的形成与碳管的浓度无关. Chou 等人^[34]在 SWCNTs 对小鼠肺损伤的研究中, 同样观察到慢性炎症反应和肉芽肿形成. 然而, 另有研究则发现 SWCNTs 诱导上皮样间皮瘤形成和间质炎发生, 具有浓度依赖性^[35]. Jia 等人^[36]在多种碳纳米材料的细胞毒性研究中, 也发现 SWCNTs 对豚鼠的肺泡巨噬细胞的细胞毒性也与 SWCNTs 的浓度成正相关.

当然, 对于 SWCNTs 的毒性研究, 不仅仅止步于其促纤维化的发生和肉芽肿形成. 近年来还有研究发现, 气管滴注 SWCNTs 后, 沉积于小鼠肺部的 SWCNTs 在促进肺肉芽肿形成和局部组织纤维化的同时还会引发心血管毒性^[37]. 在我们以前的研究中, 利用气管滴注的方法在高血压大鼠肺部引入 SWCNTs, 发现 SWCNTs 在有心血管疾病的高血压大鼠中更容易引发毒性反应, 并且 Fe 杂质含量高的 SWCNTs 会引起更显著的不良反应. 我们研究发现, SWCNTs 暴露 24 h 后, 在高血压大鼠的肺部能观察到大量的肉芽肿形成, 并且这一现象在 Fe 杂质含量高组较 Fe 杂质含量低组更为严重(图 4(a)~(d)). 在高血压大鼠的心脏组织中观察到 SWCNTs 引起高血压大鼠左心室病变, 导致动脉血管及周围肌细胞变性(图 4(e)~(h))^[38]. 这些结果预示着, SWCNTs 除了引发肺部毒性外, 对心血管系统和其他系统都可能存在潜在的毒性.

3.2 多壁碳纳米管的肺毒性

纵观 MWCNTs 毒性的研究, 高长径比的 MWCNTs

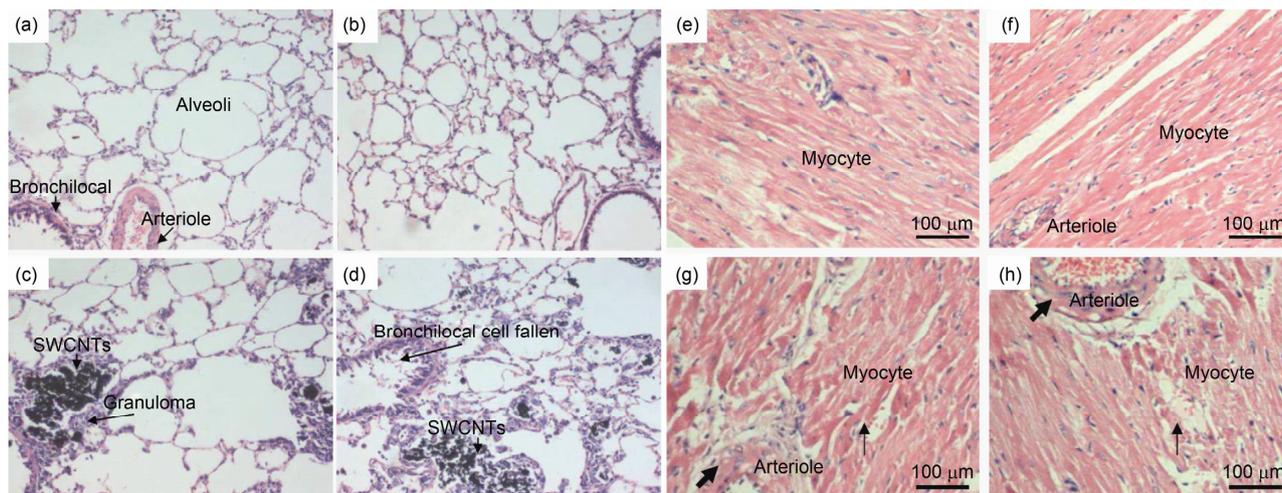


图4 SWCNTs暴露24 h后, 高血压大鼠肺部组织HE染色明场: (a) 空白组; (b) 盐水组; (c) Low-Fe SWCNTs处理组; (d) High-Fe SWCNTs处理组. 高血压大鼠心脏组织 HE 染色明场: (e) 空白组; (f) 盐水组; (g) High-Fe SWCNTs组; (h) Low-Fe SWCNTs组^[38]

也能够诱发炎症和促进肉芽肿形成. Muller 等人^[10]在对 MWCNTs 呼吸毒性的研究中发现, MWCNTs 长期暴露会导致 SD 大鼠产生肺部炎症和纤维化反应. 同时他们在 SD 大鼠的支气管管腔和周围组织中观察到肉芽肿的形成. 他们认为大量的 MWCNTs 在大鼠肺部沉积是造成这一系列损伤的原因. 目前, 已有许多报道表明, MWCNTs 会诱发肺部毒性反应, 包括肺炎、纤维化、遗传毒性等等. 然而, 对于 MWCNTs 肺毒性的相关机制研究还不是很清楚. 其中, 有的研究者认为 MWCNTs 的毒性主要来源于碳纳米管制造过程中残留的金属催化剂, 也有研究者认为 MWCNTs 的毒性与碳纳米管的结构有密切关系. 比如, 有研究发现经过高温加热修饰过的 MWCNTs 对大鼠肺泡上皮细胞会产生急性肺毒性反应和遗传毒性, 并且他们认为 MWCNTs 的毒性可能主要来源于碳纳米管结构上的缺陷^[10,18,19].

另有研究^[39]发现, 羧基化的 MWCNTs 会引起小鼠的急性肺损伤和心脏毒性, 他们认为造成这种毒性的原因与团聚的 MWCNTs 在器官中未及时清除有关. 同时, 他们还发现团聚系数高的 MWCNTs 较分散性好的 MWCNTs 更难以被清除. 器官内团聚的 MWCNTs 持续沉积, 就会引发肺部炎症反应. Chiaretti 等人^[40]在对比较原始的 MWCNTs 和氧化后的 MWCNTs 对人 T 淋巴细胞毒性的研究中, 发现 MWCNTs 可以通过影响细胞的程序性死亡, 进而引发更严重的细胞毒性反应.

与 SWCNTs 毒性研究结果类似, 对于 MWCNTs 毒性的报道也并不完全一致. 有研究发现呼吸暴露

MWCNTs 会造成慢性肺部毒性而非急性毒性反应. Li 等人^[41]在对 MWCNTs 造成肺部毒性的评估研究中发现, MWCNTs 呼吸暴露 30 天, 并没有造成肺部毒性反应, 而暴露 60 天后, 观察到了严重的肺部毒性. 正是由于这些结论不一的研究结果, 使得深入探究碳纳米管对呼吸系统毒性作用机制及其影响因素的研究者越来越多. 另外, 尽快找出一种适用于碳纳米管评估的标准化体系越来越被研究者们重视.

3.3 碳纳米管产生的细胞生物学毒性及其分子机制研究

碳纳米管可以通过皮肤、鼻腔、口腔等多种途径进入机体, 根据现有研究结果, 其毒性机制主要包括氧化应激、炎症反应、诱导细胞发生恶性转化、DNA 损伤和突变、肉芽肿形成以及发生间质纤维化. CNTs 诱发氧化应激已经是公认的诱发毒性的机制之一. 另外, 近些年碳纳米管对免疫系统的影响, 对巨噬细胞、上皮细胞、成纤维的作用(图5), 也引起了研究者的广泛关注. 下面主要围绕 CNTs 对巨噬细胞、上皮细胞以及成纤维细胞的作用这三个方面对 CNTs 的毒性机制进行阐述.

(1) 对巨噬细胞的作用. 在机体中, 肺泡巨噬细胞构成了第一道免疫防线, 抵御外来颗粒进入肺部组织. 目前, 已经有许多报道阐述了 CNTs 对巨噬细胞的毒性作用. 巨噬细胞吞噬 SWCNTs 后, SWCNTs 会激活巨噬细胞表达各种转录因子, 例如核因子(NF- κ B)、激活蛋白(AP-1)等等. 进而诱导氧化应激反应, 引起促炎症因子的释放, 导致炎症反应产生, 最

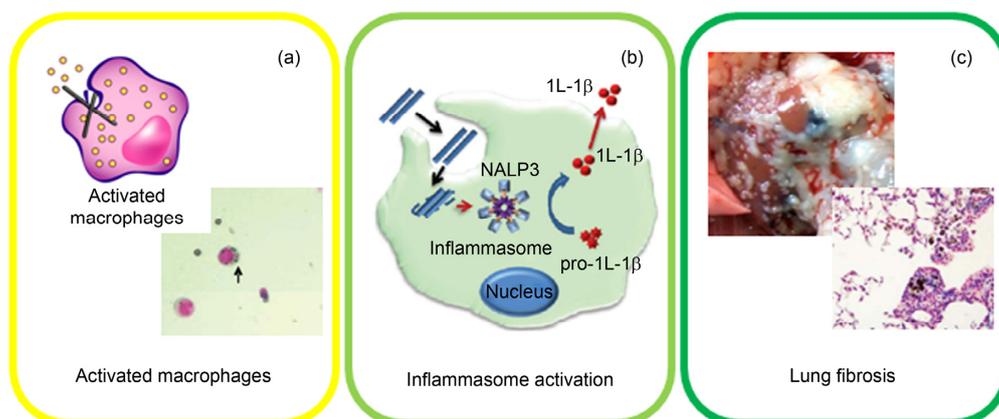


图5 碳纳米管的细胞毒性机制

(a) 活化巨噬细胞, 刺激巨噬细胞分泌细胞因子^[21,38]; (b) 刺激炎症小体, 分泌炎症因子^[42]; (c) 促间皮瘤以及肺纤维化发生^[21,38]

后促进肉芽肿和肺纤维化的形成,还可能致肺癌基因的活化^[43].

将小鼠暴露于 SWCNTs 中会诱发严重的肺部炎症反应和早期的纤维化现象,同时伴随氧化应激反应的发生和抗氧化剂的消耗.用 SWCNTs 同时处理维生素 E 缺乏的小鼠和正常小鼠,结果发现维生素 E 缺乏的小鼠肺抗氧化水平明显低于正常小鼠.这一研究表明,SWCNTs 对诱导急性炎症反应有较高的敏感度,这些急性炎症反应检测的指标一般包括炎症细胞的总数、中性粒细胞的数量、乳酸脱氢酶 LDH 的释放、肺灌洗液中总蛋白的量、以及促炎症细胞因子的水平(如 TNF- α 和 IL-6).同时,SWCNTs 还可以增强促纤维化反应(如转化生长因子 TGF- β 和胶原产生)^[44].Park 等人^[45]对小鼠进行 SWCNTs 呼吸暴露,分别暴露 1 天、7 天、28 天.暴露 1 天后,他们在肺泡和肺泡壁周围观察到巨噬细胞的聚集,并且随着暴露时间的延长,这些巨噬细胞向肺间质区移动.在不同暴露时间的肺灌洗液中,检测到 IL-2 和 IL-10 等炎症因子较对照组均有明显上调.Ge 等人^[38]将 SWCNTs 滴注到自发性高血压大鼠的肺部,24 h 后在肺灌洗液中观察到炎症的生物标志物、氧化应激水平都有显著升高.同时,也检测到在血浆和肺灌洗液中内皮素-1 和血管紧张素转化酶都有所升高.

Shvedova 等人^[46]认为,NADPH 氧化酶在 SWCNTs 诱发肺部炎症的过程中扮演重要的角色.他们将 NADPH 氧化酶敲除的小鼠和正常小鼠分别暴露 SWCNTs,结果发现 NADPH 氧化酶敲除的小鼠与正常小鼠比较,肺部有大量中性粒细胞积累,并且细胞凋亡水平升高,促炎症细胞因子产生,而抗炎因子、促纤维化细胞因子 TGF- β 以及胶原表达减少.综上所述,这些结果表明 CNTs 进入肺部后,通过与巨噬细胞作用,刺激巨噬细胞分泌一系列细胞因子,进而激活机体的免疫调节功能.

(2) 对上皮细胞的作用.已有许多研究证明,纤维化的发生与发展参与癌变的过程,这可能是通过刺激上皮细胞发生典型或不典型的病变而起作用的.这些研究结果对阻止肿瘤迁移提供了新的思路 and 新的治疗靶点^[47].Rotoli 等人^[48]研究发现,将人类呼吸道上皮细胞暴露于 MWCNTs 中,会改变上皮细胞膜的渗透性.Chang 等人^[32]研究发现,SWCNTs 通过诱导上皮间质转化过程促进肺纤维化的形成.他们将小鼠呼吸暴露 SWCNTs 长达 56 天后发现 SWCNTs

可以诱导上皮细胞向成纤维细胞转化.在暴露第 28 天,在小鼠的肺组织切片中检测到有大量 TGF- β 产生;在暴露第 42 天,他们观察到上皮来源的成纤维细胞变得越来越多.Wang 等人^[49]还在体外通过低浓度 SWCNTs 处理人正常的肺上皮细胞 12 周后,发现这些细胞出现了肿瘤恶化转变,获得了肿瘤细胞的相关表型,如高增殖活性、迁移与侵袭活性以及抗凋亡等.这些研究结果共同证明 CNTs 可能通过诱导上皮细胞发生上皮间质转化过程,导致局部纤维化病变,最终可能导致癌症的发生.

也有部分研究认为,CNTs 被细胞吞噬后,可以直接导致上皮细胞发生凋亡.Tsukahara 等人^[50]将人支气管上皮细胞(BEAS-2B)暴露于 CNTs,研究发现 CNTs 会被人支气管上皮细胞吞噬,一方面会诱导上皮细胞释放各种细胞因子,另一方面会引起细胞 DNA 损伤,导致细胞凋亡.同时,他们证明 ROS 并没有参与 CNTs 诱导上皮细胞凋亡的过程.Cavallo 等人^[51]将人肺上皮细胞暴露于 MWCNTs 中,他们观察到细胞膜表面发生了改变,如微绒毛密度降低、微绒毛结构发生改变,质膜出现孔洞.因而,在这些现象的基础上,他们提出,可以通过判定细胞的完整性,来对 CNTs 的毒性进行早期的风险评估.综上所述,这些评价方法的建立和提出,不仅能帮助我们分析 CNTs 的生物安全性,还有助于阐明 CNTs 造成细胞毒性的分子机理.

(3) 对成纤维细胞的作用.纤维化在细胞层面主要表现为细胞内某些骨架蛋白的特异表达(如 α -SMA)和细胞外基质的积累,特别是胶原的过量表达.Castranova 等人^[52]研究发现分散性好的 SWCNTs 可以促进人成纤维细胞的胶原表达,同时在动物水平也检测到肺部胶原表达量升高.

最近的研究表明,MWCNTs 在诱导纤维化的过程中,不仅可以刺激巨噬细胞分泌各种炎症因子,同时还引起了细胞之间多重和相互交织的信号传导.MWCNTs 通过激活 NF- κ B 信号通路,刺激巨噬细胞分泌各种细胞因子和趋化因子(TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 和 MCP1),导致最初的炎症反应产生.同时 MWCNTs 诱导巨噬细胞分泌 TGF- β 和 PDGF,促进成纤维细胞向肌成纤维细胞转化^[53].目前,我们研究发现 MWCNTs 可以通过激活 TGF- β 信号通路,进而上调成纤维细胞内胶原和 α -SMA 的表达,最终导致纤维化的发生以及肉芽肿形成.

4 影响碳纳米管毒性的因素

4.1 金属杂质

越来越多的研究表明,导致碳纳米管毒性的一个重要因素,就是生产过程中作为催化剂而残留的金属杂质,包括 Fe, Ni, Cu, Co 等. 金属杂质的存在,对碳纳米管的生物相容性、毒性、风险评估等方面的研究是起反作用的,同时限制了碳纳米管在工业上、生物医药领域的进一步应用. 在用化学气相沉积的方法进行大规模生产碳纳米管的过程中,金属催化剂残留造成的污染是不可避免的^[54]. 虽然这些碳纳米管在商业化前经过了去杂质的处理,但是在其实际应用过程中残留的金属杂质依然可能从碳纳米管中溢出. 以 Ni 为例,可能的溢出机制主要有两种:其一,在碳纳米管使用前的超声处理,或者其表面逐渐被氧化或磨损后,金属杂质可能在碳纳米管与生物体接触前就快速释放在碳纳米管的分散液中;其二,金属杂质随碳纳米管被内吞到细胞中,在溶酶体等酸性细胞器中,金属杂质从逐渐溶解的碳纳米管中缓慢释放到细胞中. 因此,在细胞培养和动物实验过程中,这些金属杂质可能逐步从碳管中游离出来,增加碳纳米管的毒性^[55]. 商业的 SWCNTs 和 MWCNTs 金属杂质含量高,酸处理过的 SWCNTs 可有效降低其中的金属杂质含量,提高其生物相容性,使其能够穿过细胞膜^[56]. Kagan 等人^[57]研究发现,高铁的 SWCNTs 处理 Raw264.7 细胞,会导致细胞内产生超氧自由基,同时他们发现高铁的 SWCNTs 较纯净的 SWCNTs 影响更大. Pulskamp 等人^[56]研究认为碳纳米管中含有的金属催化剂是产生一系列生物毒性的原因. 实验表明未经纯化的商品化碳纳米管可造成细胞内活性氧升高和线粒体膜电位降低,而经过酸化处理,含有较少金属催化剂的碳纳米管则没有这一现象. 研究还发现,修饰前的 CNTs 样品中通常混杂金属杂质和不定形碳,都可能引起细胞内氧化应激水平的增高,但是,这两种杂质可能通过刺激不同的途径引起氧化应激. 他们发现,不定形碳杂质能够在短短 10 min 内迅速引起细胞内自由基含量的升高,而金属杂质只有经过较长时间的接触(如 24 h),才能引起细胞内自由基含量的提高. 研究还发现,虽然除掉杂质能够减弱 CNTs 引起的氧化应激,但是并不能完全消除. 也就是说, CNTs 本身可能也具有导致细胞产生氧化应激的能力. 我们以前的研究也发现,呼

吸暴露 SWCNTs 会诱发自发性高血压大鼠的急性肺毒性反应和心血管反应,且 SWCNTs 中的金属杂质 Fe 会加剧这种不利影响^[38]. 同时,我们最新的研究成果还表明: MWCNTs 中的金属杂质 Fe 可能是其导致神经细胞毒性的主要原因. 铁杂质含量高的 MWCNTs 会降低 PC12 细胞的细胞活力(图 6(a)~(c)),并通过阻碍未分化细胞的骨架形成,进而抑制其形成成熟神经突触的能力(图 6(d)~(f)). 该结果突出证明了 MWCNTs 对神经细胞的毒性作用与其金属杂质 Fe 密切相关^[58].

准确、快速对 CNTs 中金属杂质进行定量分析对其安全性评价非常重要. 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)作为一种实用方法,被广泛应用于地质、环境和生物样品中金属含量的测定,它具有出色的灵敏度和良好的精度. 我们以前的一项工作曾将 ICP-MS 应用于 CNTs 中金属杂质含量的测定. 由于用 ICP-MS 测定的样品都必须经过预处理,我们采用不同的预处理方法对每组样品进行预处理. 研究发现不同的预处理条件,测定出的金属杂质的含量有很大差异. 该研究不仅提供了定量分析 CNTs 中金属杂质的理论方法和分析条件,还提供了 CNTs 样品预处理的最合适方法^[59]. 我们最近还分别用 ICP-MS, NAA 两种方法对来自不同厂家生产的 CNTs 中的金属杂质含量进行了定量分析. 结果发现,尽管厂家提供的是无催化剂的产品,金属杂质的质量分数仍在 0.44%~3%之间. 其中,大部分金属杂质为过渡金属,如 Fe, Ni, Mo, Y, Co 和 Cr. 我们选取了 3 种进一步纯化过的 MWCNTs 进行了 ICP-MS 定量分析. 结果说明进行传统的酸反流净化可以降低 MWCNTs 中金属杂质的总量,但是并不能完全去除 CNTs 中的金属杂质^[60].

因此,在开发 CNTs 生物学应用的过程中,应该密切关注 CNTs 中的金属杂质对生物体的影响. 目前, CNTs 的完全纯化仍然是一个有待突破的课题^[61].

4.2 表面化学修饰

在 CNTs 的医学应用中,除了要尽可能降低 CNTs 的杂质含量,另一个需要解决的重要问题是如何提高 CNTs 的分散性或亲水性. 事实上, CNTs 经过不同的表面修饰后,不仅具有不同的分散性,在其他理化性质上也会有较大的差异,这会改变 CNTs 的细胞生物学效应.

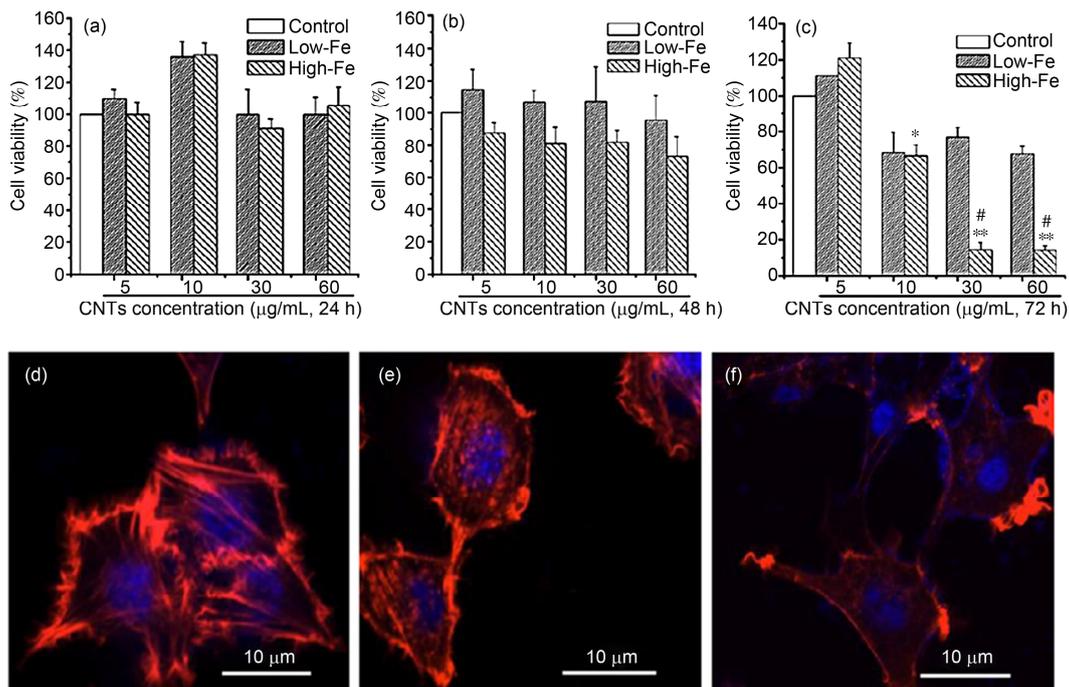


图6 (a)~(c) MWCNTs 处理细胞不同时间后, CCK-8 检测细胞活力, (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 72 h. (d)~(f) 细胞骨架 F-actin 免疫荧光染色图, (d) 空白组, (e) Low-Fe MWCNTs 组, (f) High-Fe MWCNTs 组^[58]

因此, 在 CNTs 的毒性机理研究中, CNTs 的表面修饰也应该作为必须考虑的因素之一. 目前认为 CNTs 的表面修饰对于降低 CNTs 毒性, 使其更适于在生物体内应用起着重要的作用. 要提高 CNTs 的亲水性, 就不可避免地要引入一些基团(如羟基、羧基)在 CNTs 的表面, 这些基团同时可以作为特定分子通过共价键结合发挥药物运输或治疗的目的. 有研究表明, CNTs 的高比表面积及其表面修饰的功能化基团与其药物代谢动力学和毒性的产生有密切的关系. 羟基化的 SWCNTs(¹²⁵I-SWNTols)可以快速分布到机体的各个组织, 并且会长时间在骨骼中蓄积^[16]. 牛磺酸修饰的 MWCNTs(¹⁴C-tau-MWCNTs)主要蓄积在肝脏中, 3 个月后出现低的肝毒性^[11]. DTPA 功能化的 SWCNTs, 在 3 h 内可以经由肾脏从全身血液循环中快速清除, 不在任何网状内皮样的器官中蓄积(肝或脾)^[15]. 因此, CNTs 的表面修饰可以改变 CNTs 与细胞膜的脂质双分子层的相互作用过程, 从而影响细胞对它的吞噬过程, 以及 CNTs 对细胞的作用^[62].

4.3 表面包被蛋白

纳米颗粒进入人体后, 首先可能进入的是血液

循环系统. 而纳米颗粒进入血液循环与血液中蛋白的相互作用机制, 还知之甚少. 许多不同的蛋白质(如血清蛋白、免疫球蛋白、葡萄球菌蛋白 A、抗生素蛋白链菌素)已经被证实能够非特异性地吸附在未修饰的碳纳米管上^[63]. 已经有许多研究证明了 CNTs 的生物效应与 CNTs 和蛋白之间的相互作用能力密切相关^[22,64,65]. 例如, CNTs 能结合肺表面活性蛋白 A 和 D, 导致小鼠肺部感染^[66]. 一些功能化 CNTs 与蛋白酶结合后, 会抑制蛋白酶的活性. 此外, 研究发现 CNTs 结合在蛋白表面后也有积极的一面, 比如增加蛋白的稳定性, 减缓酶对蛋白的降解^[67]. 蛋白质在纳米颗粒上的吸附依赖于纳米颗粒的表面特征、组成和制备方法. 研究表明碳纳米管与蛋白质相互作用后可以增强其在生物体内的相容性^[68]. 研究还发现经过蛋白质修饰的碳纳米管毒性将大大降低甚至表现出无毒^[69]. 我们之前研究就发现, 当碳纳米管进入含有血液蛋白的溶液中, 血液中的主要蛋白(如纤维蛋白原、免疫球蛋白、白蛋白、转铁蛋白)会在碳纳米管的表面进行竞争性吸附, 形成不同外形的所谓“王冠”形状的蛋白-碳管复合物. 我们进一步通过分子动力学理论模拟分析了蛋白分子与碳管表面的作

用机制, 结果显示碳纳米管的 π 电子与蛋白分子的芳香族氨基酸之间的相互作用力的大小, 决定蛋白分子在碳管表面的竞争性吸附速率. 最后, 我们在进一步的细胞毒性实验研究中发现纳米碳管与血液蛋白结合, 降低了碳纳米管对不同种类细胞的细胞毒性^[70].

在我们最新的一项关于 CNTs 与蛋白之间相互作用的研究中, 发现 CNTs 对蛋白质的吸附原理主要依赖于 CNTs 的类型、排列方式、尺寸和表面修饰. 我们对蛋白质与 CNTs 之间的相互作用进行了吸附动力学研究, 用质谱确定蛋白质的种类, 结合原子力显微镜(AFM)模拟了 CNTs 对蛋白质的吸附模型, 并对蛋白质的量作了半定量分析. 实验结果表明, CNTs 对蛋白质的吸附能力由强到弱顺序为 SWCNT, aligned MWCNT (A-MWCNT), carboxyl MWCNT (F-L-MWCNT), short MWCNT (S-MWCNT), short carboxyl MWCNT (F-S-MWCNT) (图 7(a)). 此外, 我们还研究了不同 PEG 修饰对 SWCNT 吸附蛋白功能的影响. 研究发现, 经过 PEG 4000, PEG 6000, PEG 8000 修饰 12 h(图 7(b))或 24 h(图 7(c))后, SWCNT 吸附蛋白的能力都明显降低, 并且 PEG 6000 对 SWCNT 吸附蛋白能力的抑制作用最强^[71].

4.4 长度、直径和表面积

纳米材料的毒性与其尺寸大小、表面积、组成和形状相关^[18]. 不同长度的 CNTs 会引发不同程度的毒性作用. 最早 Muller 等人^[10]研究了碾磨前后 MWCNTs 对呼吸系统造成的影响, 结果发现经支气管滴注 MWCNTs 后, 完整的未碾磨碳管(平均长度为 5.9 μm)主要滞留在主支气管中, 而碾磨后碳管(长度约为 0.7 μm)分散于整个肺部组织. 60 天后, 短碳管引发的肺部炎症较重. 实验结果还表明, MWCNTs 对肺部组织

的影响包括炎症反应、肉芽肿的形成以及肿瘤坏死因子的产生, 并出现剂量依赖性的炎症以及肉芽肿形成, 且炎症不是暂时的, 而是持续了 60 天. 然而, Sato 等人^[23]在实验中比较了不同长度 MWCNTs 的生物效应. 他们通过用不同孔径的滤膜进行多步筛分的方法制备了平均长度分别为 220 和 825 nm 的 MWCNTs, 发现这两种碳管都能激活巨噬细胞并诱导其表达 TNF- α , 长的 MWCNTs 引起细胞内 TNF- α 表达量升高的幅度要大于短的 MWCNTs. 他们推测, 短的 MWCNTs 更容易被细胞吞噬和包裹, 因而引起的免疫反应更小; 长的 CNTs 更容易穿透细胞, 造成细胞损伤^[72]. 之后又有研究发现, 长而粗的 MWCNTs 较细的 MWCNTs 更容易造成 DNA 损伤和炎症反应^[73]. Nagai 等人^[21]在此基础上对 SWCNTs 易产生细胞毒性的长度和直径的范围, 做了更为细致的研究. 他们的研究表明, 并非又长又细的 CNTs 更容易造成巨噬细胞毒性, 而是长度较长同时具有一定刚性的 CNTs 更容易直接和间接地造成巨噬细胞损伤. Wang 等人^[24]应用体外实验研究 MWCNTs(直径范围在 10~20, 40~60, 60~100 nm)对豚鼠肺泡巨嗜细胞的细胞毒性、尺寸效应和剂量效应. 他们发现不同直径的 MWCNTs 具有截然不同的细胞毒性和生物活性, 大直径 MWCNTs 比小直径 MWCNTs 造成更为严重的细胞毒性. 最新的研究结果还表明直径与碳管引发的间皮瘤密切相关^[21]. 这些研究都共同证明了 CNTs 的长度和直径与其毒性密切相关.

我们最近的研究也发现 CNTs 的长度在刺激 PC12 细胞分化过程中同样起到关键作用. 我们知道, 在神经生物学领域, CNTs 可作为神经元生长的支架材料. 我们发现短的 MWCNTs 比长的 MWCNTs 更

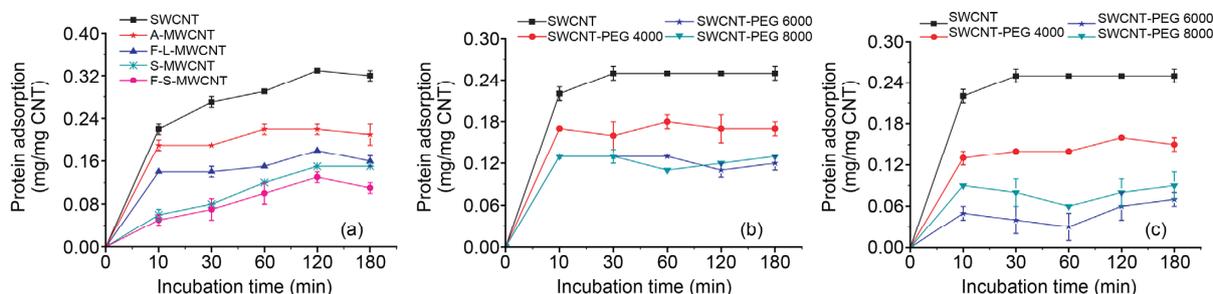


图 7 5 种碳纳米管与胎牛血清孵育后对蛋白的吸附动力学曲线 (a) 和 PEG 4000, PEG 6000, PEG 8000 修饰(b) 12 h, (c) 24 h 对 SWCNT 吸附蛋白功能的影响^[71]

容易被 PC12 细胞吞噬, 在细胞内发生易位, 短的 MWCNTs 能更有效地促进 PC12 细胞分化. 进一步研究还发现, 短的 MWCNTs 通过调节 TrkA 受体的蛋白表达(图 8(a)), 进而促进 NGF 通路的信号传递, 最终调控 PC12 细胞的分化过程(图 8(b))^[74]. 在我们未发表的工作中, 也发现长的 MWCNTs 能够促进巨噬细胞分泌 TGF- β , 从而促进成纤维细胞分泌胶原蛋白, 最终诱导肺纤维化.

除了长度和直径, 研究还发现与 CNTs 的比表面积(表面积/体积比)与其毒性也有密切关系, 比表面积越大纳米毒理效应越强^[75]. SWCNTs 有着较大的比表面积, 而 MWCNTs 则由多个同轴 SWCNTs 组成, 比表面略低. 有研究表明, SWCNTs 的细胞毒性要大于 MWCNTs^[76]. 在 Jia 等人^[36]的研究中, 暴露 6 h 后 SWCNTs 和 MWCNTs 都使细胞存活率降低, 削弱其吞噬功能, 但质量浓度分析结果显示, 平均直径 1.4 nm 的 SWCNTs 对细胞的毒性远大于平均直径为 10~20 nm 的 MWCNTs. SWCNTs 在暴露剂量低至 0.38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时就会引起细胞的严重损伤, 而 MWCNTs 在暴露剂量高达 3.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时才导致细胞损伤.

综上所述, 目前研究普遍认为, 长度较长且具有一定刚性的 CNTs 引起的细胞毒性更大, 最终导致机

体的炎症反应更强. 同时, 由于 SWCNTs 比 MWCNTs 具有更大的比表面积, 使得其毒性比较大.

5 总结与展望

随着纳米技术的飞速发展, 人类将会在越来越多的领域以不同途径接触到各类纳米材料, 包括呼吸道、消化道、皮肤等. 碳纳米管由于其优越的力学、电学和化学性质, 在诸多领域得到越来越广泛的应用. 然而, 近些年越来越多的报道也表明它们对人类健康存在着潜在的危害. 在以前的诸多报道中, 可能由于研究者使用的碳纳米管的理化性质不同、评价方法不同、甚至暴露方式不同等, 导致有不同的甚至相互矛盾的研究结果存在. 因此, 本文首先对碳纳米管的毒性机理做了分类总结, 为进一步揭开碳纳米管诱发肺毒性机理提供了参考依据. 其次, 我们总结了包括金属杂质、表面化学修饰、表面包被蛋白、长度、直径、表面积等不同理化性质对碳纳米管毒性的影响. 诸多研究成果表明, 我们在开发碳纳米管优良特性服务于人类的同时, 还必须关注它们潜在的“双刃剑”效应. 在今后开发商业化碳纳米管的过程中, 我们应该注意以下几点: (1) 采用合适的方法对碳纳米管进行纯化, 去除其中残留的金属杂质; (2) 通过特

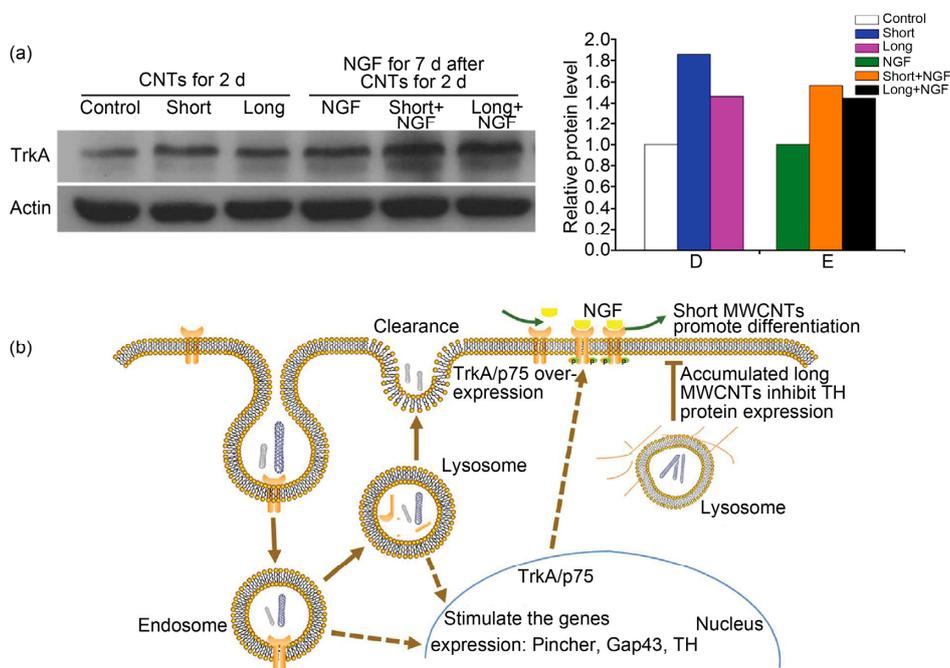


图 8 (a) 左: 蛋白免疫印迹法, 检测 TrkA 表达量. 右: TrkA/Actin 相对量. (b) MWCNTs 对 PC12 细胞中神经生长因子转导信号通路影响的机制示意图^[74]

殊的表面化学修饰改善碳纳米管的生物相容性; (3) 在不显著影响碳纳米管应用价值的情况下, 尽量避免选用长度较长并同时具有刚性的 CNTs。此外, 由于影响碳纳米管毒性的因素众多, 而在生产和纯化过程中又很难使这些因素保持一致, 因此, 我们需要尽快建立一个国际公认的、标准的碳纳米管安全评价

体系。这将对我们进一步开发高效低毒的碳纳米管提供良好的理论依据, 也为将来对碳纳米管的生物安全性评价提供可循的标准化方法。希望在不久的将来, 我们能够在利用碳纳米管独特的力学、电学和化学性能造福人类的同时, 避免其可能给人类健康带来的危害。

参考文献

- 1 Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. Pharmaceutical properties. *Nanomedicine-NBM*, 2008, 4: 173–182
- 2 Dresselhaus M S, Dresselhaus G, Charlier J C, et al. Electronic, thermal and mechanical properties of carbon nanotubes. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, 2004, 362: 2065–2098
- 3 Schöenberger C, Forró L. Physics of multiwall carbon nanotubes. *Phys World*, 2000, 13: 1–10
- 4 Joselevich E. Electronic structure and chemical reactivity of carbon nanotubes: A chemist's view. *Chemphyschem*, 2004, 5: 619–624
- 5 Flahaut E, Bacsá R, Peigney A, et al. Gram-scale ccvd synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chem Commun*, 2003, 1442–1443
- 6 Danailov D, Keblinski P, Nayak S, et al. Bending properties of carbon nanotubes encapsulating solid nanowires. *J Nanosci Nanotech*, 2002, 2: 503–507
- 7 Ge C C, Li Y, Yin J J, et al. The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials. *NPG Asia Mater*, 2012, 4: e32, doi: 10.1038/am.2012.60
- 8 Shvedova A, Kisin E, Porter D, et al. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of janus? *Pharmacol Ther*, 2009, 121: 192
- 9 Zhao Y L, Xing G M, Chai Z F. Nanotoxicology: Are carbon nanotubes safe? *Nat Nanotechnol*, 2008, 3: 191–192
- 10 Muller J, Huaux F, Moreau N, et al. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 207: 221–231
- 11 Deng X, Jia G, Wang H, et al. Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes *in vivo*. *Carbon*, 2007, 45: 1419–1424
- 12 Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, 2004, 16: 437–445
- 13 Hallock M F, Greenley P, DiBerardinis L, et al. Potential risks of nanomaterials and how to safely handle materials of uncertain toxicity. *Chem Health Saf*, 2009, 16: 16–23
- 14 Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 2005, 113: 823
- 15 Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, et al. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 3357–3362
- 16 Wang H, Wang J, Deng X, et al. Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice. *J Nanosci Nanotech*, 2004, 4: 1019–1024
- 17 Jain A K, Mehra N K, Lodhi N, et al. Carbon nanotubes and their toxicity. *Nanotoxicology*, 2007, 1: 167–197
- 18 Li X H, Zhang C, Le Guyader L, et al. “Smart” nanomaterials for cancer therapy. *Sci China Chem*, 2010, 53: 2241–2249
- 19 Muller J, Huaux F, Fonseca A, et al. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: Toxicological aspects. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21: 1698–1705
- 20 Fenoglio I, Greco G, Tomatis M, et al. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: Physicochemical aspects. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21: 1690–1697
- 21 Nagai H, Okazaki Y, Chew S H, et al. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: E1330–E1338
- 22 Lundqvist M, Stigler J, Elia G, et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 14265–14270
- 23 Sato Y, Yokoyama A, Shibata K, et al. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line thp-1 *in vitro* and subcutaneous tissue of rats *in vivo*. *Mol BioSyst*, 2005, 1: 176–182
- 24 Wang X, Jia G, Wang H, et al. Diameter effects on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *J Nanosci Nanotechnol*, 2009, 9: 3025–3033
- 25 Soto K, Garza K M, Murr L E. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater*, 2007, 3: 351–358
- 26 Wick P, Manser P, Limbach L K, et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett*, 2007, 168: 121–131

- 27 Fraczek A, Menaszek E, Paluszkiwicz C, et al. Comparative *in vivo* biocompatibility study of single- and multi-wall carbon nanotubes. *Acta Biomater*, 2008, 4: 1593–1602
- 28 Liu Y, Zhao Y L, Sun B, et al. Understanding the toxicity of carbon nanotubes. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 702–713
- 29 Kalbacova M, Kalbac M, Dunsch L, et al. The study of the interaction of human mesenchymal stem cells and monocytes/macrophages with single-walled carbon nanotube films. *Phys Status Solidi (b)*, 2006, 243: 3514–3518
- 30 Fiorito S, Serafino A, Andreola F, et al. Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon*, 2006, 44: 1100–1105
- 31 Porter A E, Gass M, Bendall J S, et al. Uptake of noncytotoxic acid-treated single-walled carbon nanotubes into the cytoplasm of human macrophage cells. *ACS Nano*, 2009, 3: 1485–1492
- 32 Chang C C, Tsai M L, Huang H C, et al. Epithelial-mesenchymal transition contributes to swcnt-induced pulmonary fibrosis. *Nanotoxicology*, 2012, 6: 600–610
- 33 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: 117–125
- 34 Chou C C, Hsiao H Y, Hong Q S, et al. Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model. *Nano Lett*, 2008, 8: 437–445
- 35 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: 126–134
- 36 Jia G, Wang H, Yan L, et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: Single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol*, 2005, 39: 1378–1383
- 37 Li Z, Hulderman T, Salmen R, et al. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ Health Persp*, 2007, 115: 377–382
- 38 Ge C C, Meng L, Xu L, et al. Acute pulmonary and moderate cardiovascular responses of spontaneously hypertensive rats after exposure to single-wall carbon nanotubes. *Nanotoxicology*, 2012, 6: 526–542
- 39 Qu G B, Bai Y H, Zhang Y L, et al. The effect of multiwalled carbon nanotube agglomeration on their accumulation in and damage to organs in mice. *Carbon*, 2009, 47: 2060–2069
- 40 Chiaretti M, Mazzanti G, Bosco S, et al. Carbon nanotubes toxicology and effects on metabolism and immunological modification *in vitro* and *in vivo*. *J Phys Condens Matter*, 2008, 20: 474203
- 41 Li J G, Li Q N, Xu J Y, et al. The pulmonary toxicity of multi-wall carbon nanotubes in mice 30 and 60 days after inhalation exposure. *J Nanosci Nanotechnol*, 2009, 9: 1384–1387
- 42 Nel A, Xia T, Meng H, et al. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: Use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 607–621
- 43 Shvedova A A, Kisin E, Murray A R, et al. Inhalation vs. Aspiration of single-walled carbon nanotubes in c57bl/6 mice: Inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295: L552–L565
- 44 Shvedova A A, Kisin E R, Murray A R, et al. Vitamin e deficiency enhances pulmonary inflammatory response and oxidative stress induced by single-walled carbon nanotubes in c57bl/6 mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 221: 339–348
- 45 Park E J, Roh J, Kim S N, et al. Biological toxicity and inflammatory response of semi-single-walled carbon nanotubes. *PLoS One*, 2011, 6: e25892
- 46 Shvedova A A, Kisin E R, Murray A R, et al. Increased accumulation of neutrophils and decreased fibrosis in the lung of nadph oxidase-deficient c57bl/6 mice exposed to carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 231: 235–240
- 47 Shvedova A A, Fabisiak J P, Kisin E R, et al. Sequential exposure to carbon nanotubes and bacteria enhances pulmonary inflammation and infectivity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38: 579–590
- 48 Rotoli B M, Bussolati O, Bianchi M G, et al. Non-functionalized multi-walled carbon nanotubes alter the paracellular permeability of human airway epithelial cells. *Toxicol Lett*, 2008, 178: 95–102
- 49 Wang L Y, Luanpitpong S, Castranova V, et al. Carbon nanotubes induce malignant transformation and tumorigenesis of human lung epithelial cells. *Nano Lett*, 2011, 11: 2796–2803
- 50 Tsukahara T, Haniu H. Cellular cytotoxic response induced by highly purified multi-wall carbon nanotube in human lung cells. *Mol Cell Biochem*, 2011, 352: 57–63
- 51 Cavallo D, Fanizza C, Ursini C L, et al. Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial cells. *J Appl Toxicol*, 2012, 32: 454–464
- 52 Wang L, Castranova V, Mishra A, et al. Dispersion of single-walled carbon nanotubes by a natural lung surfactant for pulmonary *in vitro* and *in vivo* toxicity studies. *Part Fibre Toxicol*, 2010, 7: 31

- 53 He X, Young S H, Schwegler-Berry D, et al. Multiwalled carbon nanotubes induce a fibrogenic response by stimulating reactive oxygen species production, activating NF-kappaB signaling, and promoting fibroblast-to-myofibroblast transformation. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24: 2237–2248
- 54 Pumera M. Carbon nanotubes contain residual metal catalyst nanoparticles even after washing with nitric acid at elevated temperature because these metal nanoparticles are sheathed by several graphene sheets. *Langmuir*, 2007, 23: 6453–6458
- 55 Liu X, Gurel V, Morris D, et al. Bioavailability of nickel in single-wall carbon nanotubes. *Adv Mat*, 2007, 19: 2790–2796
- 56 Pulskamp K, Diabaté S, Krug H F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett*, 2007, 168: 58
- 57 Kagan V E, Konduru N V, Feng W, et al. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5: 354–359
- 58 Meng L, Jiang A H, Chen R, et al. Inhibitory effects of multiwall carbon nanotubes with high iron impurity on viability and neuronal differentiation in cultured PC12 cells. *Toxicology*, 2012, doi: org/10.1016/j.tox.2012.11.011
- 59 Ge C C, Lao F, Li W, et al. Quantitative analysis of metal impurities in carbon nanotubes: Efficacy of different pretreatment protocols for icpms spectroscopy. *Anal Chem*, 2008, 80: 9426–9434
- 60 Ge C C, Li W, Li Y, et al. Significance and systematic analysis of metallic impurities of carbon nanotubes produced by different manufacturers. *J Nanosci Nanotechnol*, 2011, 11: 2389–2397
- 61 Lu F, Wang X, Meziani M J, et al. Effective purification of single-walled carbon nanotubes with reversible noncovalent functionalization. *Langmuir*, 2010, 26: 7561–7564
- 62 Lopez C F, Nielsen S O, Moore P B, et al. Understanding nature's design for a nanosyringe. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 4431–4434
- 63 Kam N W S, Dai H. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: Generality and biological functionality. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 6021–6026
- 64 Cedervall T, Lynch I, Lindman S, et al. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 2050–2055
- 65 Linse S, Cabaleiro-Lago C, Xue W F, et al. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 8691–8696
- 66 Salvador-Morales C, Townsend P, Flahaut E, et al. Binding of pulmonary surfactant proteins to carbon nanotubes; potential for damage to lung immune defense mechanisms. *Carbon*, 2007, 45: 607–617
- 67 Zhang B, Xing Y, Li Z, et al. Functionalized carbon nanotubes specifically bind to α -chymotrypsin's catalytic site and regulate its enzymatic function. *Nano Lett*, 2009, 9: 2280
- 68 Nel A E, Mädler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*, 2009, 8: 543–557
- 69 Shim M, Kam N W S, Chen R J, et al. Functionalization of carbon nanotubes for biocompatibility and biomolecular recognition. *Nano Lett*, 2002, 2: 285–288
- 70 Ge C, Du J, Zhao L, et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 16968–16973
- 71 Du J, Ge C, Liu Y, et al. The interaction of serum proteins with carbon nanotubes depend on the physicochemical properties of nanotubes. *J Nanosci Nanotechnol*, 2011, 11: 10102–10110
- 72 Kostarelos K. The long and short of carbon nanotube toxicity. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 774–776
- 73 Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, et al. Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. *Inflammation*, 2010, 33: 276–280
- 74 Meng L, Chen R, Jiang A H, et al. Short multiwall carbon nanotubes promote neuronal differentiation of PC12 cells via up-regulation of the neurotrophin signaling pathway. *Small*, 2012, 9: 1786–1798
- 75 Teeguarden J G, Hinderliter P M, Orr G, et al. Particokinetics *in vitro*: Dosimetry considerations for *in vitro* nanoparticle toxicity assessments. *Toxicol Sci*, 2007, 95: 300–312
- 76 Zhang X, Wang X, Lu Q, et al. Influence of carbon nanotube scaffolds on human cervical carcinoma hela cell viability and focal adhesion kinase expression. *Carbon*, 2008, 46: 453–460

Cellular and molecular mechanisms of pulmonary toxicity caused by carbon nanotubes with various physiochemical properties

WANG Yue¹, WANG Peng², CHEN ChunYing² & ZHAO YuLiang²

¹ Heilongjiang University of Chinese Medicine, Herbin 150040, China;

² CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China

Due to their unique mechanical, electronic and chemical properties, carbon nanotubes (CNTs) have been promising candidates for a wide variety of revolutionary applications in information, photovoltaic, energy, sensors, materials, medicine and so on. Meanwhile, with the increasing large-scale production and application of CNTs, their bio-safety assessment has raised wide attention. Although there is considerable experimental data of CNT pulmonary toxicity at the molecular, cellular and whole animal levels, many conclusions are inconsistent and in some cases directly conflicting. The conflicting reports can be attributed to real sample-to-sample variation in material properties, such as types and contents of metal impurities, dispersity, aspect ratio, etc.. In this review, we describe recent research progress on respiratory toxicity of CNTs and its cellular mechanisms, which may depend on the structure and properties of CNTs. Furthermore, many factors that may affect cytotoxicity of CNTs are summarized and discussed here. Finally, we provide a prospect to the future work on studying and evaluating pulmonary toxicity of the CNTs systematically and scientifically.

carbon nanotubes, nanotoxicology, pulmonary toxicity, toxicity mechanism, physiochemical properties

doi: 10.1360/972013-352