

比较不同长度及表面修饰的多壁碳纳米管的细胞毒性和遗传毒性

濮吉¹, 陈田¹, 陈章健¹, 王海芳², 聂海瑜³, 贾光^{1△}

(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. 上海大学纳米化学与生物学研究所, 上海 200444; 3. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

[摘要] **目的:** 比较不同长度和表面修饰的多壁碳纳米管 (multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs) 对人肺泡 II 型上皮细胞 (A549 细胞) 的细胞毒性和遗传毒性的影响。 **方法:** 选取长 (5 ~ 15 μm)、短 (350 ~ 700 nm) 两种不同长度的 MWCNTs, 及羧基 (carboxyl, COOH-)、氨基 (amino, NH₂-) 和牛磺酸 (taurine, Tau-) 3 种不同表面修饰的 MWCNTs 分别进行实验研究, 其中短的 MWCNTs 作为未修饰的 MWCNTs (Pristine-MWCNTs) 与表面修饰的 MWCNTs 进行比较。细胞毒性实验采用 cell counting kit-8 (CCK-8) 法, 染毒浓度为 2、8、32 mg/L, 染毒时间分别为 12、24、36、48 h; 遗传毒性采用单细胞凝胶电泳实验检测 DNA 链断裂, 染毒剂量为 8 mg/L, 染毒时间 24 h。 **结果:** 两种长度的 MWCNTs 在所观察的 12 ~ 48 h 染毒时间内, 均表现出剂量依赖的细胞毒性; 其中在 24 ~ 48 h 处理时间组, MWCNTs 的细胞毒性随长度增加而增大。经过表面修饰的 3 种 MWCNTs 与未修饰的 MWCNTs 相比, 表面修饰过的 MWCNTs 在染毒时间 12 h、染毒浓度为 32 mg/L 时相对细胞活性: COOH-MWCNTs 为 (86.55 ± 1.80)%、NH₂-MWCNTs 为 (84.67 ± 1.32)%、Tau-MWCNTs 为 (80.15 ± 3.53)%, 均高于未修饰 MWCNTs 的细胞活性 (71.44 ± 5.58)%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 在染毒时间 24 h、染毒浓度为 8 mg/L 时修饰过的 MWCNTs 相对细胞活性: COOH-MWCNTs 为 (96.74 ± 1.00)%、NH₂-MWCNTs 为 (96.74 ± 3.35)%、Tau-MWCNTs 为 (106.39 ± 3.83)%, 均高于未修饰 MWCNTs 的细胞活性 (91.02 ± 2.53)%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 在染毒时间 24 h、染毒浓度为 32 mg/L 时修饰过的 MWCNTs 相对细胞活性: COOH-MWCNTs 为 (80.88 ± 2.67)%、NH₂-MWCNTs 为 (82.90 ± 3.25)%、Tau-MWCNTs 为 (82.55 ± 3.32)%, 均高于未修饰 MWCNTs 的细胞活性 (76.08 ± 4.27)%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 在染毒时间 36 h、染毒浓度为 8 mg/L 时修饰过的 MWCNTs 相对细胞活性: COOH-MWCNTs 为 (96.87 ± 1.05)%、NH₂-MWCNTs 为 (96.66 ± 4.76)%、Tau-MWCNTs 为 (100.23 ± 2.84)%, 均高于未修饰 MWCNTs 的细胞活性 (89.61 ± 3.78)%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。在其他观察时间和染毒浓度下, 经过表面修饰的 MWCNTs 与未修饰 MWCNTs 的细胞活性相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。经过表面修饰的 3 种 MWCNTs DNA 链断裂损伤情况: Olive 尾距 COOH-MWCNTs 为 1.56 ± 0.22、NH₂-MWCNTs 为 2.25 ± 1.62、Tau-MWCNTs 为 2.23 ± 0.94, 尾部 DNA 含量 COOH-MWCNTs 为 (3.96 ± 0.60)%、NH₂-MWCNTs 为 (6.16 ± 4.68)%、Tau-MWCNTs 为 (6.05 ± 2.31)%, 均在不同程度上低于未修饰的 MWCNTs [Olive 尾距为 3.00 ± 0.64, 尾部 DNA 含量为 (8.23 ± 2.27)%], 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中 COOH-MWCNTs 所致 DNA 链断裂损伤最小。 **结论:** 上述材料在所观察时间和染毒剂量下, 均引起了 A549 细胞不同程度的细胞毒性和 DNA 链断裂, 相同染毒浓度下, 不同长度的 MWCNTs 所致细胞毒性及 DNA 链断裂程度有所差别; 表面修饰可在一定程度上降低 MWCNTs 对 A549 细胞的细胞毒性和 DNA 链断裂损伤。

[关键词] 纳米管; 碳; 细胞毒性; 免疫; 诱变力试验; 肺泡; 上皮细胞

[中图分类号] R318.08 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2013)03-0405-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-167X.2013.03.013

Comparative analysis for the cytotoxicity and genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes with different lengths and surface modifications in A549 cells

PU Ji¹, CHEN Tian¹, CHEN Zhang-jian¹, WANG Hai-fang², NIE Hai-yu³, JIA Guang^{1△}

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

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 2011CB933402) 资助 Supported by the National Basic Research Program of China (973 program, 2011CB933402)

△ Corresponding author's e-mail, jiaguangjia@bjmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-4-28 15:46:03 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20130428.1546.003.html>

ABSTRACT Objective: To compare the cytotoxicity and DNA strand breakage induced by multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) with different lengths and different surface modifications in human alveolar type II cells (A549 cells). **Methods:** Two different lengths (5 – 15 μm , 350 – 700 nm) of MWCNTs and three different kinds of surface modified MWCNTs (COOH-MWCNTs, NH_2 -MWCNTs, and Tau-MWCNTs) were used in the experiments. The short MWCNTs were used as pristine MWCNTs to compare with the 3 surface modified MWCNTs. The cytotoxicity was determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay at the concentrations of 2, 8, and 32 mg/L at hours 12, 24, 36, and 48 respectively. Single cell gel electrophoresis (SCGE) assay was performed to evaluate DNA strand breakage in A549 cells after 24 h treatment of 8 mg/L of each tested material. **Results:** Long multi-walled carbon nanotubes (Long-MWCNTs) and short multi-walled carbon nanotubes (Short-MWCNTs) showed a dose-dependent cytotoxicity within the exposure time 12 – 48 h. Especially, Long-MWCNTs showed greater cytotoxicity than Short-MWCNTs from 24 to 48 h at the same concentration. The relative cell viability of the 3 surface modified MWCNTs was higher than that of the pristine MWCNTs at h 12 at the concentration of 32 mg/L [COOH-MWCNTs (86.55 \pm 1.80)%, NH_2 -MWCNTs (84.67 \pm 1.32)%, Tau-MWCNTs (80.15 \pm 3.53)% and Pristine-MWCNTs (71.44 \pm 5.58)%], at h 24 at the concentration of 8 mg/L [COOH-MWCNTs (96.74 \pm 1.00)%, NH_2 -MWCNTs (96.74 \pm 3.35)%, Tau-MWCNTs (106.39 \pm 3.83)% and Pristine-MWCNTs (91.02 \pm 2.53)%], at h 24 at the concentration of 32 mg/L [COOH-MWCNTs (80.88 \pm 2.67)%, NH_2 -MWCNTs (82.90 \pm 3.25)%, Tau-MWCNTs (82.55 \pm 3.32)% and Pristine-MWCNTs (76.08 \pm 4.27)%] and at h 36 at the concentration of 8 mg/L [COOH-MWCNTs (96.87 \pm 1.05)%, NH_2 -MWCNTs (96.66 \pm 4.76)%, Tau-MWCNTs (100.23 \pm 2.84)% and Pristine-MWCNTs (89.61 \pm 3.78)%], and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the Pristine-MWCNTs, the relative cell viability of the 3 surface modified MWCNTs didn't demonstrate a statistically significant difference ($P > 0.05$) at other observation time and exposure concentrations. The DNA strand breakage of the 3 surface modified MWCNTs: the Olive tail moment of COOH-MWCNTs was 1.56 \pm 0.22, the Olive tail moment of NH_2 -MWCNTs 2.25 \pm 1.62 and the Olive tail moment of Tau-MWCNTs 2.23 \pm 0.94; the tail DNA% of COOH-MWCNTs was (3.96 \pm 0.60)%, the tail DNA% of NH_2 -MWCNTs (6.16 \pm 4.68)% and the tail DNA% of Tau-MWCNTs (6.05 \pm 2.31)%, which were lower than that of the pristine MWCNTs ($P < 0.05$), whose Olive tail moment was 3.00 \pm 0.64 and tail DNA% (8.23 \pm 2.27)%. Moreover, the COOH-MWCNTs induced the lowest DNA damage among the three modified MWCNTs. **Conclusion:** Long-MWCNTs compared with Short-MWCNTs demonstrated a greater cytotoxicity and lower DNA strand breakage damage. The surface modifications of MWCNTs can reduce the cytotoxicity and DNA strand breakage in A549 cells.

KEY WORDS Nanotubes, carbon; Cytotoxicity, immunologic; Mutagenicity tests; Pulmonary alveoli; Epithelial cells

1991 年日本学者 Iijima^[1]发现碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs),按其管壁层数的不同,可分为单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)和多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs)。MWCNTs 由于具有诸多优良的特性,如超高的韧性、极低的重量、良好的导电性等,在电子、医疗、复合材料等领域得到了广泛的应用。由于 MWCNTs 在生产过程中易于形成气溶胶^[2],可通过呼吸系统进入人体并沉积于肺泡组织,加之具有小尺寸、高表面活性、高穿透性等对健康不利的性质,MWCNTs 的安全性备受关注^[3]。

国内外学者针对 MWCNTs 的毒性已开展了大量研究,发现碳纳米管的许多物理、化学特性可以直接影响其毒性效应,如团聚、粒径、直径和表面修饰等^[4-6],因此,在进行 MWCNTs 生物学效应研究时,应充分考虑不同理化表征参数的意义。另有研究显示经腹腔或胸腔注射 MWCNTs 可诱导小鼠产生肺部炎症、肉芽肿和肿瘤等石棉样的病理改变^[7-8]。石棉是人类确定的致癌物,可以导致恶性间皮瘤的

发生,石棉和 MWCNTs 都是长径比大于 3 的纤维状物质,且石棉的毒性会随长度的增加有所增大,具有长度依赖的毒性效应^[9],因此 MWCNTs 是否具有和石棉类似的毒理作用,成为研究的热点。

未经修饰的 MWCNTs 为不溶性物质,而在经过表面化学修饰后,MWCNTs 的水溶性、分散性和生物相容性均可得到不同程度的改善,使 MWCNTs 在以水为基础的生命环境中有了更为广泛的应用前景^[10]。Sykes 等^[11]研究经过磺酸基和羧基表面修饰的 SWCNTs 对人真皮成纤维细胞的细胞毒性,发现随表面修饰程度的提高,SWCNTs 引起的细胞毒性有降低的趋势。Coccini 等^[12]对氨基和羧基修饰的 MWCNTs 进行研究,结果显示,经过高度氨基修饰的 MWCNTs 具有较好的水溶性和分散性,并且相对未修饰和低修饰程度的 MWCNTs,其引起的细胞毒性较小。经过化学修饰的 MWCNTs 表面将带有不同的电荷,如氨基修饰的 MWCNTs 表面带正电荷、羧基修饰的 MWCNTs 表面带负电荷。当携带不同表面电荷的 MWCNTs 作用于具有负膜电位的细胞

时,则可能引起不同的生物学效应。牛磺酸是一种具有抗炎作用的中药,本课题组之前工作表明,经牛磺酸修饰的 MWCNTs 不仅可以降低细胞毒性,而且能够减弱 MWCNTs 对巨噬细胞吞噬功能的抑制^[13]。了解不同表面修饰对 MWCNTs 毒性效应的影响,将在降低 MWCNTs 毒性、扩大 MWCNTs 应用范围等方面起到积极的作用。

Cell counting kit-8 (CCK-8) 实验是传统 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 实验的替代方法,与 MTT 实验相比,CCK-8 实验具有更高的灵敏度、更好的重现性和更宽的线性范围;单细胞凝胶电泳实验从 DNA 水平检测遗传损伤,是一种成熟且快速灵敏的方法。本研究借助上述两种实验方法,比较不同长度和表面修饰的 MWCNTs 对肺泡上皮 II 型 A549 细胞产生的细胞毒性及遗传毒性,进一步探究长度和表面修饰在 MWCNTs 毒性效应方面的意义,为 MWCNTs 的安全性评价及安全生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞系 A549 细胞系为人肺癌细胞系,购自于美国 ATCC 公司。用含有 10% (体积分数) 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素和 0.1 g/L 链霉素

的 F12 培养基,在 37 °C 恒温、含 5% (体积分数) CO₂ 的培养箱中培养。A549 细胞每 2 ~ 3 天传代 1 次,待细胞生长至对数生长期进行实验。

1.1.2 多壁碳纳米管 实验中所用 MWCNTs 购自深圳纳米港公司,在此基础上,北京大学化学学院刘元方院士课题组对其长度进行切割和对其表面进行化学修饰,获得长度不同、粒径相同的两种 MWCNTs,长的 MWCNTs (long multi-walled carbon nanotubes, Long-MWCNTs) 长度为 5 ~ 15 μm,短的 MWCNTs (short multi-walled carbon nanotubes, Short-MWCNTs) 长度为 350 ~ 700 nm,其中短的 MWCNTs 同时作为未修饰的 MWCNTs (pristine multi-walled nanotubes, Pristine-MWCNTs);另获得长度、粒径相同,表面经羧基 (carboxyl, COOH-)、氨基 (amino, NH₂-) 和牛磺酸 (taurine, Tau-) 修饰的 3 种 MWCNTs。本课题组郭健等^[14] 已对上述材料中 COOH-MWCNTs 和 Tau-MWCNTs 的细胞毒性及内质网相关基因表达进行了研究。本次实验将比较两种长度的 MWCNTs、未修饰与修饰过的 MWCNTs 所引起的细胞毒性与遗传毒性。为充分了解 MWCNTs 的物理、化学性质,使用透射电子显微镜、电感耦合等离子体质谱、热重分析仪、傅里叶红外光谱仪、快速比表面及孔径分布测定仪和多功能成像电子能谱仪对所用 MWCNTs 进行理化性质表征,结果见表 1。

表 1 实验所用 MWCNTs 的理化性质表征数据

Table 1 Physicochemical properties of MWCNTs

Materials	Outer diameter/ nm	Length/ μm	Purity/ (% by weight)	Metal content/ (% by weight)			Surface area/ (m ² /g)	Modification rate/ (% by weight)
				Ni	Fe	Co		
Long-MWCNTs	10 - 20	5.00 - 15.00	97	0.29	0.19	0.23	133.7	
Short-MWCNTs	10 - 20	0.35 - 0.70	98	0.26	0.11	0.02	133.7	
COOH-MWCNTs	10 - 20	0.35 - 0.70	98	0.26	0.11	0.02	133.7	9.0% O
NH ₂ -MWCNTs	10 - 20	0.35 - 0.70	98	0.26	0.11	0.02	133.7	3.52% N
Tau-MWCNTs	10 - 20	0.35 - 0.70	98	0.26	0.11	0.02	133.7	0.061% S

Modification rate, the percentage by weight of characteristic elements in each surface modified MWCNTs.

1.1.3 主要试剂和器材 F12 培养基购自美国 Invitrogen 公司,胎牛血清购自美国 HyClone 公司,青霉素-链霉素溶液购自上海碧云天公司,0.25% (体积分数) 的胰酶细胞消化液购自上海碧云天公司,牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 购自美国 Sigma 公司,二棕榈酰磷脂酰胆碱 (dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC) 购自美国 Sigma 公

司,二甲基亚砷购自北京 Solarbio 公司,正常熔点琼脂糖购自上海 Gene Tech 公司,低熔点琼脂糖和 Triton X-100 购自北京泰格美公司, GelRed 购自 Biotium 公司, CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所。电泳仪 (DYY-6C) 和电泳槽 (DYCP-31DN) 购自六一仪器厂,倒置显微镜 (COIC) 购自重庆光电仪器厂,荧光显微镜 (TE 2000-S) 购自 Nikon 公司,细胞

培养箱 (3111) 和酶标仪 (MK3) 均购自 Thermo 公司, 超低温高速离心机 (3K-15) 购自 Sigma 公司, 电子天平 (BP221S) 购自 Sartorius 公司, 涡旋振荡器 (Vortex Genie 2) 购自 Scientific Industries 公司, 磁力搅拌器 (SH5) 购自北京金北德公司。

1.2 实验方法

1.2.1 多壁碳纳米管的分散及染毒液的配制

碳纳米管在液体环境下易于团聚成束状, 并且可能影响碳纳米管对细胞的毒性^[6], 因此为使碳纳米管在染毒时得到较好的分散效果, 使用 Wang 等^[15] 的分散方法对碳纳米管进行分散。在 F12 完全培养基中加入 BSA 和 DPPC, 配制成含有 0.60 g/L BSA、0.01 g/L DPPC 的分散培养基。称取适量 MWCNTs 于分散培养基中, 每次使用前根据下述步骤分散 MWCNTs: 涡旋振荡器初步混悬 5 s, 之后置于超声清洗器中冰水超声 15 min, 最后使用涡旋振荡器混悬 5 s。每种 MWCNTs 均分别与分散培养基混合配制成质量浓度为 2、8、32 mg/L 的染毒液, 分散培养基作为对照组染毒浓度为 0 mg/L。

1.2.2 细胞毒性实验

参照郭健等^[14] 的方法进行实验。将 A549 细胞接种于 96 孔板, 每孔 6 500 个细胞, 每个染毒组设置 3 个平行样。细胞贴壁 24 h 后进行染毒, 染毒浓度 2、8、32 mg/L。染毒 12、24、36、48 h 后加入 CCK-8 溶液, 继续孵育 2.5 h, 使用酶标仪在检测波长 450 nm、参比波长 630 nm 下分别测量吸光度值 (以 A1 和 A2 表示)。细胞相对活性 = (实验组 A1 - A2) / (对照组 A1 - A2) × 100%。

1.2.3 碱性单细胞凝胶电泳实验

依据 Singh 等^[16] 的方法并稍加修改。取对数生长期的 A549 细胞, 调节细胞密度至 4.75×10^8 个/L, 种于 24 孔板内, 每个染毒组设置 3 个平行样。细胞贴壁 24 h, 每种材料以 8 mg/L 的浓度染毒细胞, 染毒 24 h 后消化收集细胞进行铺胶。之后依次进行裂解、解旋、电泳、中和与染色等步骤。荧光显微镜下每个处理随机选取 100 个细胞进行图像采集, 并使用 CASP (comet assay software project) 1.2.2 软件分析结果。Olive 尾距 (olive tail moment, OTM) 和尾部 DNA 含量 (tail DNA%) 作为 DNA 损伤的评价指标。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件分析实验数据, 所有实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。细胞毒性实验中, 不同材料的各剂量组间比较使用单因素方差分析 (两两比较采用 LSD 法); 相同浓度下不同长度的 MWCNTs 比较采用独立样本 *t* 检验, 相同浓度下不

同表面修饰的 MWCNTs 比较采用单因素方差分析 (两两比较采用 LSD 法)。单细胞凝胶电泳实验数据采用非参数 Kruskal-Wallis 秩和检验, 两两比较使用对 α 水准进行调整后的 Mann-Whitney *U* 检验。所有统计学检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同长度及表面修饰 MWCNTs 对 A549 细胞存活率的影响

两种不同长度的 MWCNTs 细胞毒性的结果显示, 在 12 ~ 48 h 的每个时间点上, A549 细胞的存活率随染毒浓度升高而下降, 表现出了一定的剂量-效应关系 (图 1)。长的 MWCNTs 与短的 MWCNTs 相比, 细胞毒性更为明显, 36 h 时两种不同长度的 MWCNTs 所产生的细胞毒性差异最为明显, 每个剂量组 (2、8、32 mg/L) 的差异都具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

经过表面修饰的 MWCNTs 和未经过修饰的 MWCNTs 细胞毒性结果表明, 表面修饰作用可以显著降低 MWCNTs 对 A549 细胞的毒性 (图 2)。未修饰的 MWCNTs 和表面修饰过的 MWCNTs 细胞毒性在染毒 24 h 时差异最为明显, 染毒浓度为 8 mg/L 和 32 mg/L 时两者差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。经过修饰的 3 种 MWCNTs 的细胞毒性没有显示出明确的剂量-效应关系, 但是在 12 ~ 48 h 的 4 个时间点上 32 mg/L 剂量组的相对细胞活性与对照组相比均表现出了显著的下降 ($P < 0.05$)。除染毒时间 24 h 染毒剂量为 8 mg/L 时 Tau-MWCNTs 的相对细胞活性显著高于 COOH-MWCNTs 和 NH₂-MWCNTs ($P < 0.05$), 在其他染毒时间和染毒剂量下 3 种不同表面修饰 MWCNTs 之间的细胞活性比较差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

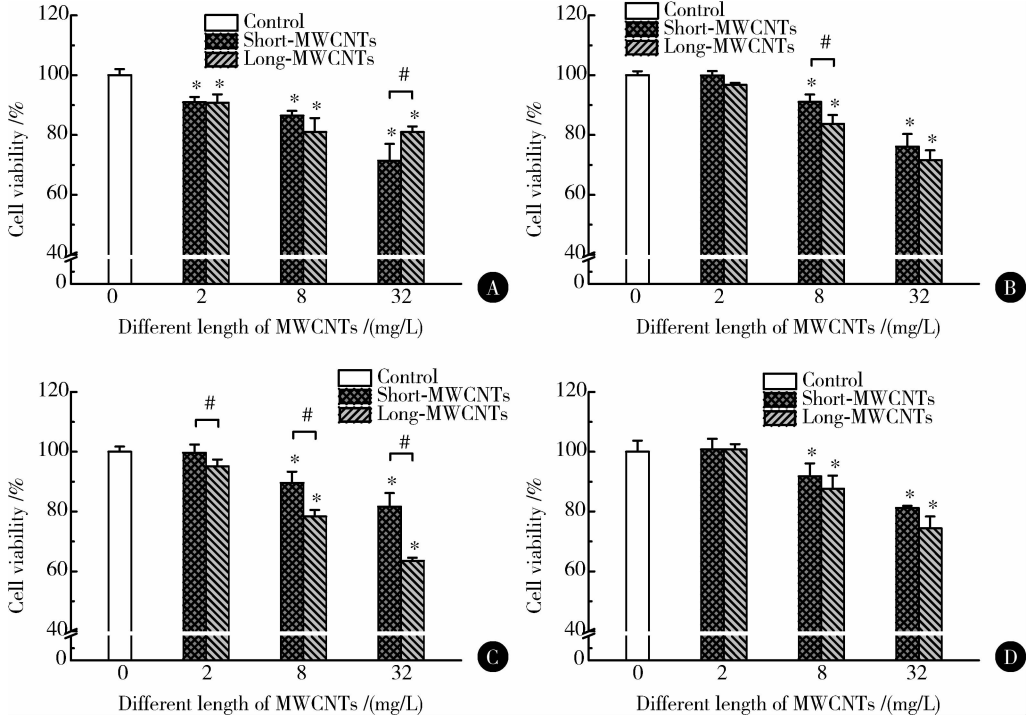
2.2 不同长度及表面修饰的 MWCNTs 对 A549 细胞 DNA 链断裂的影响

依据细胞毒性实验数据, 为避免细胞毒性过大而影响遗传毒性实验结果, 单细胞凝胶电泳实验选取 8 mg/L 的浓度 (A549 细胞活力 > 80%), 处理时间为 24 h, 比较不同实验材料引起的 DNA 断裂水平。

经过 24 h 染毒后, 单细胞凝胶电泳的两项指标 (尾部 DNA 含量、Olive 尾距) 显示, 在 8 mg/L 的染毒剂量下不同长度和不同表面修饰的 MWCNTs 均引起了 A549 细胞不同程度的 DNA 链断裂 (图 3、4)。不同长度的 MWCNTs 相比, 短的 MWCNTs 表现出更严重的 DNA 链断裂 ($P < 0.05$)。表面修饰过的 MWCNTs 较未修饰的 MWCNTs 具有更低的

DNA 链断裂程度,其中 COOH-MWCNTs 的 DNA 链

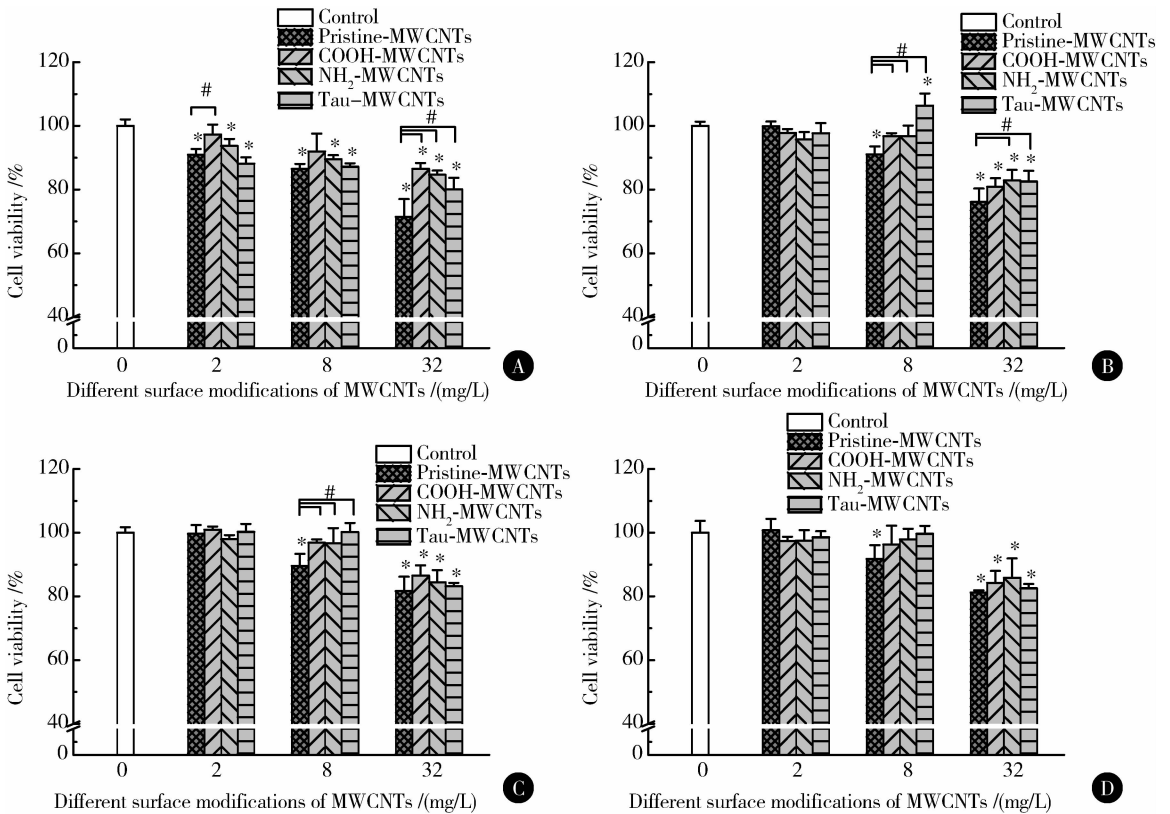
断裂程度最低 ($P < 0.05$)。



A, 12 h; B, 24 h; C, 36 h; D, 48 h; * $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, significant difference between Long-MWCNTs and Short-MWCNTs; $n = 3$.

图 1 不同长度 MWCNTs 对 A549 细胞存活率的影响

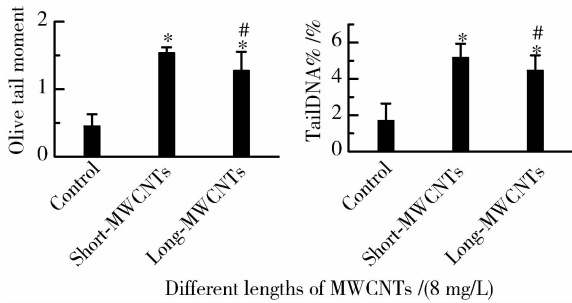
Figure 1 Effect of A549 cell viability after exposure to MWCNTs with different lengths



A, 12 h; B, 24 h; C, 36 h; D, 48 h; * $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with Pristine-MWCNTs; $n = 3$.

图 2 不同表面修饰 MWCNTs 对 A549 细胞存活率的影响

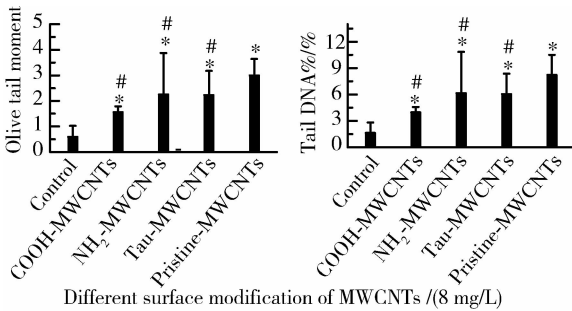
Figure 2 Effect of A549 cell viability after exposure to MWCNTs with different surface modifications



* $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with Short-MWCNTs; $n = 3$.

图3 不同长度 MWCNTs 对 A549 细胞 DNA 链断裂的影响

Figure 3 Effect of DNA strand breakage induced by MWCNTs with different lengths



* $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with Pristine-MWCNTs; $n = 3$.

图4 不同表面修饰 MWCNTs 对 A549 细胞 DNA 链断裂的影响

Figure 4 Effect of DNA strand breakage induced by MWCNTs with different surface modifications

3 讨论

石棉对肺部独特的危害引发了人们对高长径比颗粒 (high aspect ratio nanoparticle, HARN) 健康效应的担忧。MWCNTs 作为高长径比颗粒中应用前景最为广泛的材料,是否会和石棉具有相似的致癌性及长度依赖的毒性效应成为重要的科学问题。Murphy 等^[7]使用不同长度的石棉和 MWCNTs 染毒小鼠胸膜腔,发现长的石棉和 MWCNTs 均可引起胸膜腔灌洗液炎症指标的升高,其中长 MWCNTs 高于长石棉的炎症水平,但是短石棉和短 MWCNTs 则没有引起炎症指标的显著升高。Wick 等^[6]的实验则指出相同染毒浓度下,高度团聚的 MWCNTs 表现出比石棉更大的细胞毒性。Kim 等^[17]利用基因芯片技术比较了 MWCNTs 和石棉染毒人支气管上皮细胞 (normal human bronchial epithelial cell, NHBE) 后基因表达的情况,研究表明石棉和 MWCNTs 同时导致了 12 种间皮瘤相关基因和 22 种肺癌相关基因的异常表达。这些实验结果揭示了石棉和 MWCNTs 在不良生物效应上的相关性,并且提示 MWCNTs 具有不可忽视的毒性效应。

本次实验结果显示,两种长度的 MWCNTs 在一定剂量和时间下均可引起细胞毒性和 DNA 链断裂损伤,并且它们的毒性效应差异有统计学意义。对 MWCNTs 进行表面修饰既降低了 MWCNTs 健康危害,又不影响其应用。修饰作用通过提高 MWCNTs 的水溶性、改变 MWCNTs 的表面电荷和增加具有抗炎作用的牛磺酸基团,以达到降低 MWCNTs 毒性的目的。本研究结果表明,经过修饰的 MWCNTs 能够同时降低细胞毒性和 DNA 链断裂程度,证实了表面修饰的减毒作用,为 MWCNTs 未来的安全生产和医疗应用提供了参考依据。

3.1 细胞毒性实验的选择

选用 CCK-8 试剂盒进行细胞毒性的检测,与常用的 MTT 实验相比,CCK-8 具有更大的线性范围和更高的灵敏度。MTT 与 CCK-8 实验原理近似,都是利用试剂中的四唑盐与细胞线粒体内脱氢酶反应生成橙黄色的甲瓩 (formazan),并通过比色确定细胞的相对活性,然而 MTT 生成的不溶性甲瓩会和碳纳米管形成复杂混合物,影响其显色。Worle-Knirsch 等^[18]以 50 mg/L 的碳管染毒 A549 细胞,结果显示 MTT 相对于 LDH (lactate dehydrogenase)、WST-1 (water soluble tetrazolium-1) 实验会高估碳纳米管的毒性,而 CCK-8 直接生成水溶性的甲瓩则避免了这一现象的发生,所以 CCK-8 适用于检测 MWCNTs 产生的细胞毒性。

3.2 细胞毒性效应

两种长度的 MWCNTs 相比较,Long-MWCNTs 产生了更严重的细胞毒性,与 Kim 等^[19]的研究结果一致。Wick 等^[6]用 7.5、15、30 mg/L 不同团聚程度的碳纳米管染毒人成纤维 MSTO-211H 细胞,结果显示团聚严重的碳纳米管会引起较大的细胞毒性,而 Long-MWCNTs 在溶液中较 Short-MWCNTs 易于团聚,因此团聚程度差异可能使 Long-MWCNTs 展现出了更大的细胞毒性。

3 种不同表面修饰的 MWCNTs 与未经表面修饰的 MWCNTs 相比均表现出了更低的细胞毒性,然而 3 种表面修饰的 MWCNTs 之间互相比较,它们的细胞毒性差异并无统计学意义。经过化学修饰可以使 MWCNTs 表面携带不同的电荷,增加 MWCNTs 的水溶性、分散性,降低其团聚程度,进而降低细胞毒性。Mu 等^[20]利用 FITC-BSA 荧光标记的方法研究了 MWCNTs 在人胚胎肾上皮细胞的摄取过程,发现氨基和羧基修饰的 MWCNTs 均可通过胞吞和直接穿刺的方式进入细胞内,并且液相色谱-质谱/质谱 (liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry,

LC-MS/MS)结果提示两种 MWCNTs 都在培养基中吸附了大量的蛋白质。Gasser 等^[21]对比了未修饰、氨基修饰和羧基修饰的 MWCNTs 在肺表面活性物质和血浆中吸附蛋白质的情况,研究表明 MWCNTs 表面吸附的蛋白质种类在修饰和未修饰的 MWCNTs 之间差异显著,但在两种修饰的 MWCNTs 之间差别很小。化学修饰虽然可以使 MWCNTs 表面带有不同电荷,但是在吸附蛋白质后,这种差异可能会被减弱,使不同表面修饰的 MWCNTs 表现出相似的生物学效应。

随着染毒时间的延长,MWCNTs 引起的细胞毒性并没有显著增大的迹象,反而在 12 h 染毒时间上,各种材料表现出最大的细胞毒性。由于细胞数量会随染毒时间的延长呈指数性增长,而 MWCNTs 又为不溶性物质,所以细胞数量与 MWCNTs 数量的比值会增大,那么细胞和 MWCNTs 接触的机会便随之下降,继而可能会因此掩盖 MWCNTs 的时间毒性效应,导致在 12 h 染毒时间以后 MWCNTs 的细胞毒性有所下降。

3.3 遗传毒性效应

碳纳米管能够通过多种直接或间接的方式损伤遗传物质。碳纳米管可以穿透细胞膜进入细胞,通过核孔复合物或者在有丝分裂期直接接触到遗传物质。碳纳米管引起的氧化应激和介导的炎症反应同样会累及到遗传物质,这些遗传损伤可导致多种细胞反应,如细胞凋亡、细胞周期阻滞和 DNA 修复等。而 DNA 修复的目的是保证遗传的完整性和细胞的生存,但是当修复失败时,就可能会导致基因的突变和癌症的发生^[22]。

实验结果指出两种长度的 MWCNTs 相比,短的 MWCNTs DNA 链断裂程度高于长的 MWCNTs。这可能是由于短的 MWCNTs 较长的 MWCNTs 更易于进入细胞核接触到遗传物质^[20],或者相同质量浓度的两种碳管,短的 MWCNTs 数量超过长的 MWCNTs 的 7 倍,使其具有更大表面积,有能力产生更多的自由基所致,不同长度碳管的氧化应激水平还需要进一步实验确定。

综上所述,不同长度及不同表面修饰的 MWCNTs,在所研究时间和剂量下,均能引起 A549 细胞不同程度的细胞毒性和 DNA 链断裂损伤。两种长度的 MWCNTs 相比,长的 MWCNTs 表现出了更明显的细胞毒性和较低的 DNA 链断裂损伤;修饰作用能够降低 MWCNTs 细胞毒性和 DNA 链断裂程度。MWCNTs 引起细胞毒性与遗传毒性的机制,以及不同长度和修饰如何影响 MWCNTs 毒性的机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon[J]. Nature, 1991, 354(6348): 56-58.
- [2] Helland A, Wick P, Koehler A, et al. Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(8): 1125-1131.
- [3] Oberdörster G, Stone V, Donaldson K, et al. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective [J]. Nanotoxicology, 2007, 1(1): 2-25.
- [4] Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, et al. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(49): 1330-1338.
- [5] Yang H, Liu C, Yang D, et al. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition[J]. J Appl Toxicol, 2009, 29(1): 69-78.
- [6] Wick P, Manser P, Limbach LK, et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity[J]. Toxicol Lett, 2007, 168(2): 121-131.
- [7] Murphy FA, Poland CA, Duffin R, et al. Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura [J]. Am J Pathol, 2011, 178(6): 2587-2600.
- [8] Poland CA, Duffin R, Kinloch I, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study[J]. Nat Nanotechnol, 2008, 3(7): 423-428.
- [9] Schinwald A, Murphy FA, Prina-Mello A, et al. The threshold length for fiber-induced acute pleural inflammation: shedding light on the early events in asbestos-induced mesothelioma[J]. Toxicol Sci, 2012, 128(2): 461-470.
- [10] Shvedova AA, Kisin ER, Porter D, et al. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? [J]. Pharmacol Ther, 2009, 121(2): 192-204.
- [11] Sayes CM, Liang F, Hudson JL, et al. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro* [J]. Toxicol Lett, 2006, 161(2): 135-142.
- [12] Coccini T, Roda E, Sarigiannis DA, et al. Effects of water-soluble functionalized multi-walled carbon nanotubes examined by different cytotoxicity methods in human astrocyte D384 and lung A549 cells [J]. Toxicology, 2010, 269(1): 41-53.
- [13] 王翔, 邓小勇, 王海芳, 等. 气管滴注水溶性牛磺酸-多壁碳纳米管对小鼠肺脏的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2007, 41(2): 85-91.
- [14] 郭健, 聂海瑜, 王海芳, 等. 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[J]. 北京大学学报: 医学版, 2011, 43(3): 342-347.
- [15] Wang X, Xia T, Ntim SA, et al. Quantitative techniques for assessing and controlling the dispersion and biological effects of multiwalled carbon nanotubes in mammalian tissue culture cells [J]. ACS Nano, 2010, 4(12): 7241-7252.
- [16] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Exp Cell Res, 1988, 175(1): 184-191.
- [17] Kim JS, Song KS, Lee JK, et al. Toxicogenomic comparison of multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs) and asbestos[J]. Arch Toxicol, 2012, 86(4): 553-562.
- [18] 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.
- [19] Kim JS, Lee K, Lee YH, et al. Aspect ratio has no effect on genotoxicity of multi-wall carbon nanotubes[J]. Arch Toxicol, 2011, 85(7): 775-786.
- [20] Mu Q, Broughton DL, Yan B. Endosomal leakage and nuclear translocation of multiwalled carbon nanotubes; developing a model for cell uptake[J]. Nano Lett, 2009, 9(12): 4370-4375.
- [21] Gasser M, Rothen-Rutishauser B, Krug HF, et al. The adsorption of biomolecules to multi-walled carbon nanotubes is influenced by both pulmonary surfactant lipids and surface chemistry [J]. J Nanobiotechnology, 2010, 8(1): 1-9.
- [22] Liu W, Chauvand P, Di Giorgio C, et al. Influence of the length of imogolite-like nanotubes on their cytotoxicity and genotoxicity toward human dermal cells[J]. Chem Res Toxicol, 2012, 25(11): 2513-2522.