

纳米材料生物效应及其毒理学研究进展*

汪 冰 丰伟悦** 赵宇亮** 邢更妹 柴之芳

(中国科学院高能物理研究所纳米材料生物效应实验室, 北京 100049)

王海芳

(北京大学化学与分子工程学院化学生物学系, 北京 100871)

贾 光

(北京大学公共卫生学院, 北京 100083)

摘要 纳米科学与信息科学和生命科学并列, 已经成为 21 世纪的三大支柱科学领域. 由于纳米材料独特的物理化学性质, 纳米尺度及纳米结构的材料乃至器件, 已逐渐走出实验室, 进入人们的生活. 这些具有独特物理化学性质的纳米材料, 对人体健康以及环境将带来的潜在影响, 目前已经引起科学界, 乃至政府部门的广泛关注. 文中分析综述了几种纳米材料(纳米TiO₂、单壁碳纳米管、多壁碳纳米管及超细铁粉)目前已取得的部分生物效应及毒理学的研究结果, 包括纳米材料在生物体内的分布、作用的靶器官、纳米材料引起的细胞毒性、细胞凋亡等. 文中还评价了纳米颗粒的生物毒性. 纳米颗粒的尺寸越小, 显示出生物毒性的倾向越大; 尽管碳纳米管是由石墨层卷成的圆筒, 但是根据石墨的安全剂量来外推碳纳米管的安全剂量是不可行的, 碳纳米管的生物毒性远大于石墨粉; 表观分子量高达 60 万的水溶性纳米碳管, 在小鼠体内却显示出小分子的生理行为; 一种正在研究的磁性纳米颗粒在动物体内显示出迅速团聚、堵塞血管等现象. 纳米材料在生物体内呈现出的这些生理现象, 仅利用现有的知识尚无法解释. 最后还介绍了纳米物质生物效应(包括毒理学, 安全性)研究的部分实验方法; 展望了该新领域今后的发展方向和亟待研究的重要问题.

2004-08-13 收稿, 2004-12-16 收修改稿

* 国家自然科学基金重大项目(批准号: 10490180)、科技部 973 预研项目(2001CCA03800)、中国科学院知识创新重大项目(KJCX2-N10)和国家纳米中心以及中国科学院高能物理研究所的支持项目

** 联系人, E-mail: fengwy@mail.ihep.ac.cn, zhaoyuliang@ihep.ac.cn

关键词 纳米材料 生物效应 毒理

1 概述

正如微米技术是 20 世纪科学技术的象征, 21 世纪科学技术的象征是纳米技术. 由于纳米尺度(0.1~100 纳米, 1 纳米等于十亿分之一米)下的物质的特殊性质, 在纳米尺度控制和操纵物质(单原子或原子团簇), 对其进行加工, 制造各种功能性器械, 纳米技术几乎在各个领域具有广阔的应用前景. 正如诺贝尔奖得主 Rohrer 所说: 当微米技术成为工业革命技术的基础, 那些最早学会, 并最早、最好使用微米技术的国家, 都在工业的发展中占据了巨大的优势, 成为了现在的先进工业国家. 同样, 未来技术(21 世纪)将属于那些明智地接受纳米技术, 并首先学习和使用它的国家.

纳米材料由于其尺寸很小, 结构特殊, 因此具有许多新的物理化学特性, 如小尺寸效应、大的比表面、极高的反应活性、量子效应等. 这些特性使纳米科学已经成为当今世界上三大支柱科学(生命科学、信息科学、纳米科学)之一. 纳米技术的优点在于: 不仅在近期可以改造传统工业技术(如减少原料消耗, 减少污染排放, 降低成本, 提高性能等), 而且在远期有望给 21 世纪的科学技术、工业和农业等领域带来革命性的变化. 随着纳米技术的产业化, 各种形式的纳米尺度的物质已经以各种不同的途径进入我们的生活. 比如, 纳米材料目前已经应用于染料、涂料、医药诊断等传统产业中, 或在生产和使用过程中直接进入人体, 或通过环境、食物链进入人体. 总之, 人们在工作和生活中接触到纳米材料的机会越来越多.

正因为如此, 2003 年 4 月 Science^[1]、2003 年 7 月 Nature^[2], 相继发表编者文章, 开始讨论纳米尺度物质的生物效应、对环境和健康的影响问题. 2004 年 1 月美国化学会的 Environmental Science & Technologies^[3]杂志、2004 年 6 月 Science^[4]又再次载文强调, 必须对纳米技术的安全性问题进行研究. 同时, 英国皇家科学院^[5]也相继发表文章, 讨论纳米尺度物质对生物、环境、健康等可能带来的潜在影响.

纳米技术的生物安全性问题之所以受到科学家们的如此关注, 缘于一种宏观思考, 即, 纳米技术的发展是否也将带来纳米物质对人体以及生态环境的污染, 从而危及人类健康. 同时, 认识和解决这一问题, 也是促进和保障纳米科技健康和可持续发展的必要条件. 我们知道, 当物质细分到纳米尺度时, 其性质会发生很大变化, 从而导致它们在生物体内的生理行为与常规物质可能有很大的不同. 因此, 对宏观物质的安全性评价, 包括对人体健康及生态环境的影响, 也许并不适用于纳米尺度物质. 以最近的研究结果为例^[6], 北京大学刘元方研究组将一种水溶性的纳米碳管(直径约 1.4 nm, 长约 400 nm)导入小鼠体内, 结果发现表观分子量高达 60 万的这种羟基化的水溶性纳米碳管可以在小鼠的不同器官之间自由穿梭, 通过尿液排泄. 而 60 万分子量的常规物质是不可能出现如此奇特的现象的, 以现有的生物学和生理学的知识无法解释这种现象. 最近, 中国科学院高能物理研究所的纳米材料生物效应实验室与中国科学院武汉物理数学研究所合作, 在研究磁性纳米颗粒物在动物体内的生理行为时, 发现有的磁性纳米颗粒物在小鼠的血管内会逐渐变大, 将血管堵塞, 最后导致小鼠死亡^[7]. 美国宇航局太空中心的一个研究小组将含 0.1mg 碳纳米管的悬浮液, 通过支气管注入大鼠和小鼠肺部. 7 和 90d 后, 组织病理学检验结果表明, 所有的颗粒都会以一定的方式进入肺泡, 这些颗粒甚至在长达 90d 的时间里仍停留在肺部. 用于对照的碳黑颗粒只引起了小鼠肺部轻微的炎症, 而单壁碳纳米管甚至在低浓度下都引起了肺部肉芽肿的形成. 令人担心的是, 由碳纳米管引起的肉芽肿的形成并没有伴随在通常情况下由石棉和无机粉尘所引起的肉芽肿所特有的炎症症状^[8]. 纽约州罗切斯特大学的一个研究小组让大鼠在含有 20 nm 聚四氟乙烯颗粒的空气中生活 15 min, 就导致大多数大鼠在 4 h 内死亡^[9].

严格地说, 这些研究结果还是很初步的. 目前已有的研究数据还很有限. 正因为如此, 很容易使人们误认为所有的纳米材料都有很大毒性. 要消除这种

误解, 得到准确、客观、负责的科学结论, 可能还需要几年或者更长时间。由于纳米材料的生物环境效应、毒性、安全性的研究刚刚起步, 不仅实验数据有限, 而且实验方法学也有很大难度。如何保证所观察现象, 以及由此所得出的结论是来自于物质的纳米尺度特性对生物体的影响, 仅靠单纯的生物学、医学和纳米技术无法满足要求。因此, 有关纳米尺度材料的生物效应及其毒理的研究在方法学上具有很大的挑战性。为此, 本文首先综述纳米材料毒理学的研究现状, 介绍已经建立的实验方法, 并结合我们自己的研究结果, 尽量全面地分析现有的文献数据。最后提出存在的重要问题, 同时展望将来的研究重点。

2 纳米材料生物效应及其毒理学研究现状与分析

2.1 纳米TiO₂的生物效应及其毒理学

目前对纳米材料毒理学的研究尚处于起步阶段, 但正如化学家Vicki Colvin^[4]所强调的那样: “当这一领域尚处于早期阶段, 并且人类受纳米材料的影响比较有限时, 一定要对纳米材料的生物毒性给予关注。我们必须现在, 而不是在纳米技术被广泛应用之后, 才来面对这个问题”。目前为止, 科学家们只对纳米TiO₂、SiO₂、碳纳米管、富勒烯和纳米铁粉等少数几个纳米物质的生物效应进行了初步的研究。

纳米TiO₂在涂料、抗老化、污水净化、化妆品、抗静电等方面存在广泛应用, 因而产量较高, 对其毒

性研究也较多。表 1 总结了现有的研究结果。在体内和体外的实验研究中, 纳米尺度的TiO₂颗粒均比微米尺度的TiO₂颗粒对肺部的损伤程度大, 这与纳米颗粒小的粒径和大的比表面积有直接关系。实验方法主要包括: 用支气管吸入法或支气管注入法将TiO₂颗粒导入动物体内。与注入法相比, 吸入法更接近人类真实的暴露情况。因此应尽量采用吸入法来模拟人类实际的暴露情况, 研究纳米颗粒物的生物学行为。使用外推法评价纳米颗粒物对人体的生物效应, 对于纳米技术相关政策、法规和防护标准的制订等是很重要的。

Afaq等^[10]用支气管注入法研究超细TiO₂(<30 nm, 用量 2 mg)对大鼠的毒性时, 发现肺泡巨噬细胞的数量增加, 同时细胞内的谷胱甘肽过氧化酶、谷胱甘肽还原酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、谷胱甘肽硫转移酶的活性均升高。而且, 酶活性升高并没有阻止脂质过氧化和过氧化氢的生成, 这表明受到TiO₂纳米颗粒作用时, 尽管细胞启动自我保护机制诱导了抗氧化酶的生成, 却未能消除TiO₂纳米颗粒产生的毒副作用。进一步的研究观察到了纳米TiO₂颗粒引起的一系列生物效应^[9,11]。20 nm的TiO₂颗粒引起了肺组织间质化, 并诱发炎症反应, 使上皮组织的渗透性增加, 肺泡灌洗液内生理指标的变化与纳米颗粒的比表面积(尺寸大小)有关^[11]。同时纳米TiO₂引起了支气管肺泡灌洗液内蛋白质总量、乳酸脱氢酶及 β -葡萄糖苷酸酶的活性普遍升高, 而且比表面积—效应曲线

表 1 纳米TiO₂的生物效应研究

尺寸	研究方法	研究结果	文献
20 和 250 nm	支气管注入法	与细颗粒(250 nm)相比, 超细颗粒(20 nm)引起的支气管肺泡灌洗液内炎性细胞总数、蛋白质总量、乳酸脱氢酶的活性及 β -葡萄糖苷酸酶的活性增加	[9]
<30 nm	支气管注入法	肺泡巨噬细胞的数量升高; 细胞内的谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、谷胱甘肽硫转移酶(谷胱甘肽-S-转移酶)的活性升高	[10]
体内研究 20 和 200 nm	支气管注入法	超细颗粒(20 nm)与细颗粒(200 nm)相比, 超细颗粒物(20 nm)引起了肺部组织间质化, 并呈现炎症反应	[11]
20 和 250 nm	支气管注入法	肺泡对超细TiO ₂ (20 nm)的清除半减期(541d)是细颗粒TiO ₂ (250 nm, 177d)的 3 倍	[12]
20 nm	支气管注入法	自由基的产生是纳米TiO ₂ 产生毒副作用的原因之一	[13]
21 nm	支气管吸入法和支气管注入法	暴露于等量的超细TiO ₂ 颗粒(21 nm), 支气管吸入法与支气管注入法相比, 肺部的炎症效应降低, 并且颗粒在肺部持续的时间较短	[14]
≤ 20 和 >200 nm	原代大鼠胚胎成纤维细胞	用超细颗粒(20 nm)处理的细胞, 细胞内微核数目显著升高, 并引起了细胞凋亡。而细颗粒(200 nm)没有引起细胞内微核数目的变化	[15]
体外研究 29 和 250 nm	J774.2 巨噬细胞株	TiO ₂ 超细颗粒(29 nm)与细颗粒(250 nm)相比, 巨噬细胞的吞噬能力降低程度增加, 颗粒物的清除时间延长	[16]

与实际的炎症情况有很好的相关性,这意味着TiO₂纳米物质的生物效应与尺寸效应有关^[9].因此,我们在讨论纳米材料生物效应时,即使是同一种材料,也需要注明具体尺寸大小(这和常规物质有很大的不同),因为纳米尺寸的改变,会引起其生物效应发生改变.

肺是环境有害物质进入机体的主要途径之一.肺泡巨噬细胞是一多功能的间质细胞,广泛分布于肺泡内及呼吸道上皮表面,具有吞噬、清除异物和保护肺的功能,是呼吸道的第一道防线.因此,研究巨噬细胞对纳米颗粒的清除功能,对预测纳米物质的毒性十分重要. Oberdörster等^[12]比较了大鼠肺泡巨噬细胞对相同质量、不同尺寸的TiO₂(20 和 250 nm)粉末的清除机制.结果肺泡巨噬细胞对 250 nm 的TiO₂的清除半减期为 177 d;对 20 nm 的TiO₂的清除半减期为 541 d.这表明,尺寸越小,越难以被巨噬细胞清除.巨噬细胞清除外来异物的能力降低,其吞噬能力也会降低. Renwick等^[16]在研究 29 nm 的超细TiO₂和 250 nm 的TiO₂颗粒对巨噬细胞株(J774.2 MF)吞噬能力的影响时表明,29 nm比 250 nm的TiO₂颗粒对巨噬细胞的吞噬能力降低更明显.因此,可以推测,纳米颗粒的粒径(表面积)和数目是其造成肺损伤的关键因素之一.事实上,对于这些纳米颗粒产生毒副作用的机制还不清楚. Zhang等^[13]认为纳米颗粒可以诱导自由基的产生,导致体内氧化应激,因此产生了生物毒性作用.

纳米颗粒是否对细胞凋亡过程产生特殊的影响,也是人们关心的重要问题之一. Rahman等^[15]在比较了 20 nm 的超细TiO₂颗粒和 200 nm 的细TiO₂颗粒对原代大鼠胚胎成纤维细胞的影响时发现,20 nm 的超细颗粒处理后的细胞,其微核数目显著升高,并引起了细胞凋亡.而 200 nm 的细颗粒却没有引起细胞内微核数目的变化.尽管对纳米颗粒引起的细胞凋亡的机理还不清楚,但是,根据上面的一些结果推测,可能是由于反应活性很大的纳米颗粒和细胞膜相互作用产生了活性氧物质,产生的氧化应激引起细胞膜脂质层的破裂,细胞内钙稳态失去平衡,导致依赖于Ca²⁺离子浓度的核酸内切酶的活化,引起了细胞凋亡.

2.2 碳纳米管的生物效应及其毒理学

碳纳米管是在 1991 年由 Iijima 发现的,它是一种完全人造的一维结构材料.由于具有优越的力学、电子学和化学等性能,在很多领域显示出广泛的应用前景.比如作为高灵敏度的化学传感器,制作超强度的电缆以及扫描探测显微镜的探针,既可以取代铜作为导体,也可以取代硅作为半导体.现在单壁碳纳米管的生产能力有限,不会对人类造成太大的危害.但是一旦设计出便宜的大批量生产单壁碳纳米管的方法,无疑会增大其对人类健康的影响.

但是,如何检测在动物体内的纳米碳管是一个难题.最近Wang等^[6,17]利用射线探测技术的高灵敏度的优点,部分地解决了这个问题. Wang等^[6]在直径 1.4 nm、长 400 nm(约 50000 个碳原子组成)的水溶性(羟基化)单壁碳纳米管(SWCNT)的外表面平均标记约 1 个¹²⁵I原子,然后研究了羟基化单壁碳纳米管在小鼠体内的生物分布以及代谢过程.为了不影响单壁碳纳米管本身的性质,只要能够满足测量的要求,标记的¹²⁵I原子越少越好.

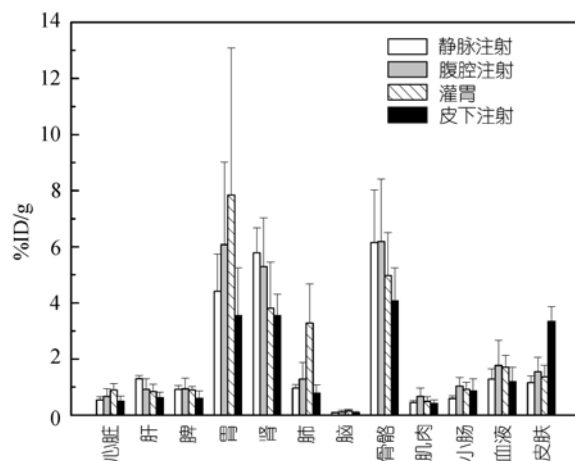


图1 不同的暴露途径对羟基化单壁碳纳米管在小鼠体内分布的影响^[6]

实验采用了4种不同的暴露途径:静脉注射、腹腔注入、灌胃和皮下注射,将羟基化单壁碳纳米管导入小鼠体内,计算小鼠每克湿组织的剂量百分比(%ID/g),结果如图1所示.从图1中看出,羟基化碳纳米管主要分布在胃、肾脏和骨骼中,在其他的脏器中

也有分布。4 种不同给药途径对羟基化碳纳米管的生物分布影响很小。此外, 在 11 d 后收集尿液和粪便, 测其放射性计数, 发现仍有大约 30% 的羟基化单壁碳纳米管蓄积在体内^[6]。因此, 进一步对羟基化单壁碳纳米管的亚慢性毒性进行研究是非常有必要的。该研究还发现, 表观分子量约 60 万的羟基化纳米碳管可以在小鼠体内的不同区室之间自由穿梭(扩散), 通过尿液排泄^[6]。60 万分子量的常规物质不可能出现如此奇特的行为, 现有的生物学、生理学知识无法解释这种现象。进一步的深入研究还在继续。

用石英(SiO_2)颗粒作为对照物, Jia 等^[18,19]用 MTT 法进一步研究了单壁碳纳米管对肺泡巨噬细胞的影响。从图 2 中可以看出, 单壁碳纳米管和等量的石英相比表现出更显著的细胞毒性。这与 Lam 等^[8]的研究结果是一致的。同时, 单壁碳纳米管与多壁碳纳米管均可以引起细胞结构的改变。

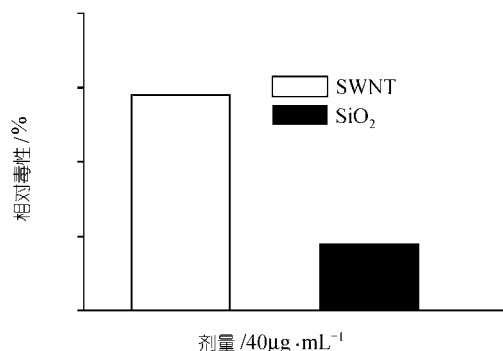


图 2 单壁碳纳米管和二氧化硅对巨噬细胞毒性的比较^[18]

图 3 为暴露于单壁碳纳米管和多壁碳纳米管(MWCNT)的巨噬细胞结构的变化^[18]。从图 3 可以看出, 对照组的巨噬细胞结构完整, 呈圆形, 周围有吞噬体和线粒体。而暴露于 $5 \mu\text{g/mL}$ 单壁碳纳米管组, 巨噬细胞出现皱折, $5 \mu\text{g/mL}$ 多壁碳纳米管组细胞核变性、核基质减少。当剂量升高到 $20 \mu\text{g/mL}$ 时, 单壁碳纳米管组巨噬细胞肿胀, 并出现空泡和吞噬小体; 多壁碳纳米管组染色质浓缩, 出现月牙样边集, 细胞浆中出现空泡, 这些都是细胞凋亡的症状。因此在一定剂量下单壁和多壁碳纳米管诱导了明显的细胞凋亡。而且这不同于细胞坏死, 它不会产生炎症反应,

这不仅支持了 Warheit 等人^[20]的研究结果, 同时也对其观察到的现象作出了部分解释。

Lam 等^[8]采用支气管注入的方式对单壁碳纳米管的毒性进行了研究。发现注入 0.1 mg 单壁碳纳米管的小鼠无明显的可诊断的毒性迹象。而剂量为 0.5 mg 时, 一部分动物死亡, 另一部分出现明显的肺部毒性, 结果如图 4、5 所示。Warheit 等^[20]也采用支气管注入(剂量为 1 mg/kg 体重)法研究了单壁碳纳米管对大鼠的肺部毒性, 同 Lam 的发现一样, Warheit 也观察到了多中心肉芽肿的生成, 结果如图 6 和 7 所示。但是 Warheit 等^[20]发现单壁碳纳米管并未引起持续的肺部炎症、细胞增殖及支气管肺泡灌洗液内乳酸脱氢酶活性的持续升高。这与由毒性粉尘引起肺部肉芽肿的毒性机制是不一样的。

图 4 的肺部组织病理切片显示吞噬了碳黑颗粒的巨噬细胞分散在肺泡间质中, 而吞噬了不同单壁碳纳米管的巨噬细胞均移向肺泡的中心部位, 通过肺泡膜在肺泡上皮组织产生了肉芽肿。这表明单壁碳纳米管的毒性不是由所含金属引起的, 而是由单壁碳纳米管本身造成的。和石英相比, 等量的单壁碳纳米管表现出更大的毒性。从图 5 中可以看出纯化的和夹杂有催化金属的碳纳米管颗粒(未经纯化)都会进入肺泡, 90 d 后这些颗粒仍不能被清除。灌注了碳黑颗粒的肺部组织只出现了轻微的炎症, 而单壁碳纳米管却引起了以肉芽肿为特征的肺部损伤。

图 6 和 7 分别为用支气管注入的方式给大鼠灌注 1 mg/kg 体重单壁碳纳米管一周和一个月后的肺部组织病理切片^[20]。从图 6 中看出肉芽肿在肺部组织中的分布是不均匀的, 这可能是由于碳纳米管在肺部的不均匀沉积造成的。从图 7 中看出, 多中心肉芽肿主要分布在碳纳米管的周围, 将碳纳米管隔离, 这是非同寻常的反应。由单壁碳纳米管引起的这种损伤可能是由于其独特的物理化学特性使其在生物体内和生态系统中长期存在而引起的。因此, 低剂量的单壁碳纳米管在体内的滞留性是其长期暴露的关键问题, 然而要想彻底了解其毒性的机制, 需要进一步的研究。

假设一只 30 g 的小鼠每分钟吸入 30 mL 的空气, 可吸入的碳纳米管颗粒假定有 40% 沉积在肺部, 以

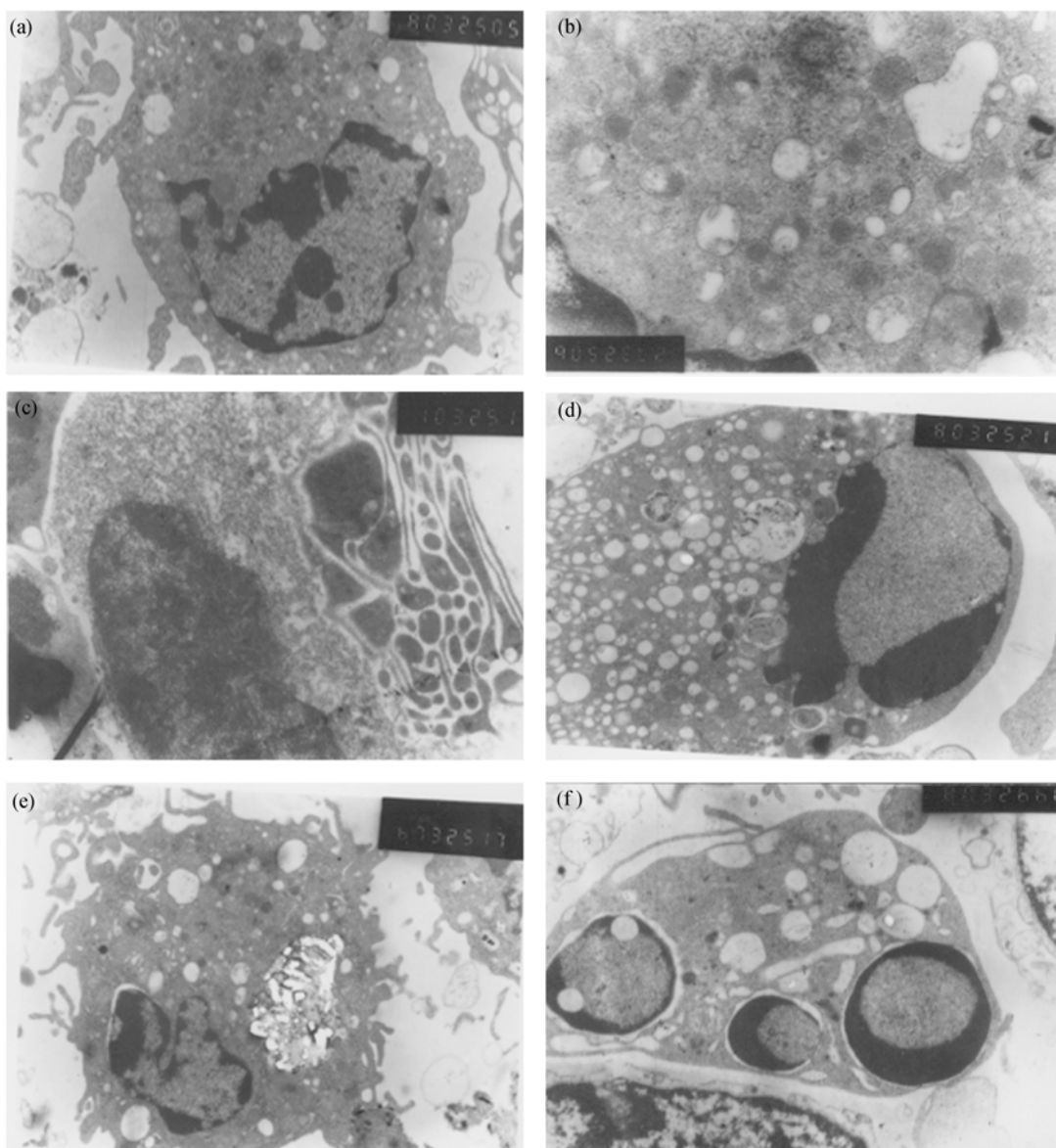


图 3 暴露于不同剂量单壁碳纳米管和多壁碳纳米管下, 巨噬细胞结构的变化^[18]

(a) 对照组; (b) 对照组; (c) 5 $\mu\text{g/mL}$ 的单壁碳纳米管组; (d) 20 $\mu\text{g/mL}$ 的单壁碳纳米管组; (e) 5 $\mu\text{g/mL}$ 的多壁碳纳米管组, (f) 20 $\mu\text{g/mL}$ 的单壁碳纳米管组

每天 8 h 的暴露时间来计算, 在碳纳米管颗粒浓度为 5 mg/m^3 (Occupational Safety and Health Administration, OSHA 制定的 8 h 允许暴露的石墨最高浓度) 的空气中暴露 17 d 后, 其肺部的浓度就可达到 0.5 mg , Lam 证明在此剂量下碳纳米管已经产生了明显的肺部损伤^[8]. 尽管碳纳米管仅仅是石墨层卷成的圆筒, 但是由于几何结构不同, 不能简单根据石墨的安全

剂量来外推碳纳米管的安全剂量, 只有通过大量的研究获得充足的毒理学研究数据, 才能得出纳米材料对人类的安全剂量^[8].

2.3 超细铁粉的生物效应及其毒理学

铁在环境中广泛存在, 并且是大气颗粒物中主要成分, 因此在研究由大气污染而带来的健康损伤

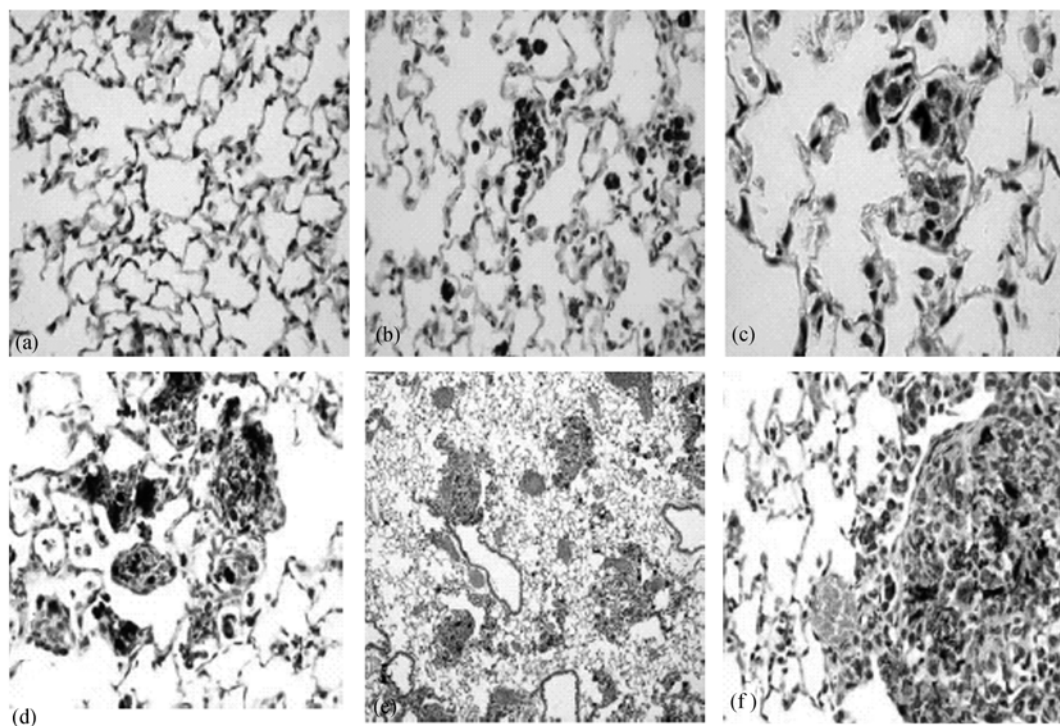


图 4 灌注 0.5 mg 的小鼠, 7 d 后肺部组织病理切片^[8]

(a) 血清对照组; (b) 碳黑组; (c) 石英组; (d) 碳纳米管(含镍)组; (e) 未经纯化的碳纳米管(含铁)组; (f) 纯化的碳纳米管组

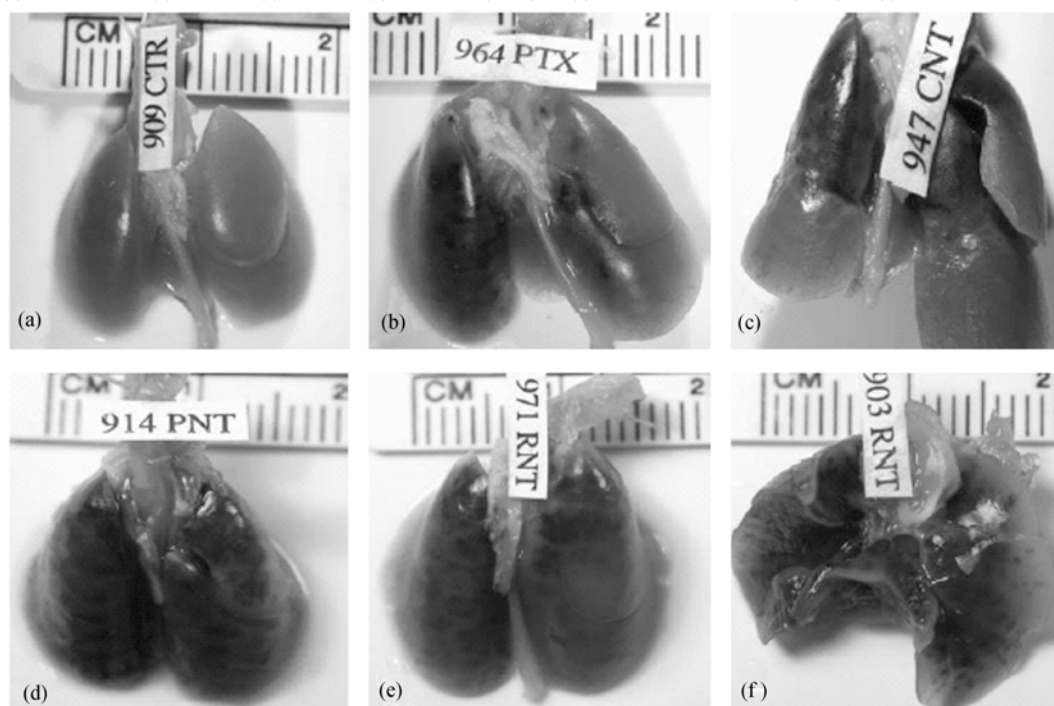


图 5 灌注 0.5 mg 单壁碳纳米管颗粒的小鼠, 90 d 后肺部组织病理学观察结果^[8]

(a) 血清对照组; (b) 碳黑; (c) 碳纳米管(含镍)组; (d) 纯化的碳纳米管组; (e) 未经纯化的碳纳米管(含铁)组; (f) 未经纯化的碳纳米管(含铁)组的背面图

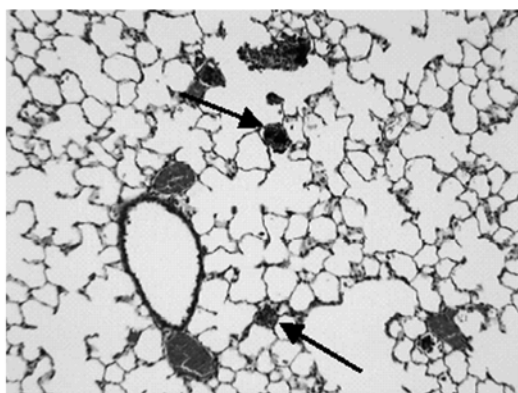


图 6 暴露于单壁碳纳米管(1 mg/kg体重)的大鼠一周后肺部组织病理切片($\times 100$)^[20]

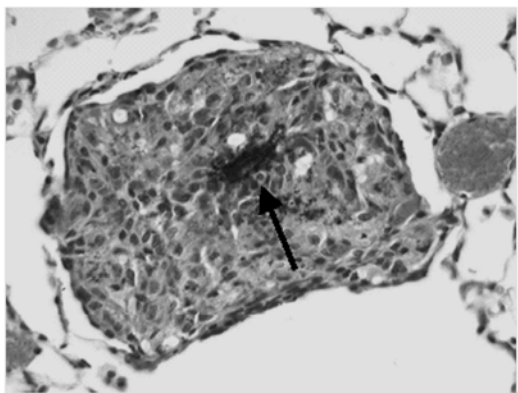


图 7 暴露于单壁碳纳米管(1 mg/kg体重)1 个月后大鼠的肺部组织($\times 400$)病理切片^[20]

时,铁扮演了重要的角色. Zhou等^[21]研究了大鼠吸入浓度为 57 和 90 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 的超细铁粉颗粒物(72 nm, 3 d)对健康的影响. 结果发现吸入 57 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 的铁粉颗粒没有引起大鼠明显的生物学效应,而吸入 90 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 的铁粉颗粒引起了轻微的呼吸道反应,如铁蛋白和肺泡灌洗液内蛋白质总量的明显升高、乳酸脱氢酶(LDH)水平的轻微变化和细胞核因子(NF κ B)与DNA结合能力的显著升高. 另有报道表明,呼吸道上皮细胞暴露于含铁的大气颗粒物后,细胞中铁蛋白的表达量升高^[22]. 铁蛋白的升高可能是由于大鼠肺部沉积的铁粉颗粒转化成了生物活性的铁. 但在Zhou等^[21]的实验中铁粉主要是以难溶的三氧化二铁(Fe_2O_3)的形式存在于体内. 因此实验中生物活性铁的产生,很可能

是由于沉积在肺部末端的纳米铁粉颗粒,容易迁移到细胞表面,从而通过细胞膜被细胞吸收成为生物活性的铁.

可以看出随着暴露剂量的升高,超细铁粉已经表现出了轻微的毒副作用,然而实验中的浓度(90 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)还远远低于OSHA制定的可允许暴露的铁粉最高浓度(15mg/ m^3),因此有必要对其生物效应做进一步的研究. 上述实验主要以短期暴露为模型^[21],为了更接近人类实际的暴露情况,将来可以采用低剂量长期暴露的动物模型,可能更全面反映纳米铁粉颗粒给人类带来的健康影响.

3 将来的研究重点和展望

最近,美国国家科学基金会和美国环保署资助的一个研究小组指出,对工业纳米颗粒或纳米材料进行风险评价需要解决以下几个关键问题^[23]:

- (1) 研究工业纳米颗粒物的毒理学;
- (2) 建立工业纳米颗粒物的安全暴露评价体系;
- (3) 研究使用现有的颗粒和纤维暴露毒理学数据库外推工业纳米颗粒物毒性的可能性;
- (4) 工业纳米颗粒在环境和生物链中的迁移过程(Transportation)、持续时间(Persistence)及形态转化(Transformation);
- (5) 工业纳米颗粒在生态环境系统中的再循环能力(Recyclability)和总的持续性(Overall sustainability).

对工业纳米粉体,如纳米金属粉、纳米氧化物等进行毒性研究时,可以选取一些免疫细胞如巨噬细胞、淋巴细胞、粒细胞等进行体外研究;同时在体内可以通过急性毒性实验获得半致死量(LD_{50})和最大耐受剂量(MTD)等基本数据,对其毒性进行分级,初步了解受试物的毒性强度、性质和可能的靶器官,获得剂量—反应关系,为进一步的毒性实验研究提供依据. 具体研究重点包括:

- (1) 根据急性毒性实验获得的基本数据对纳米颗粒进行吸入毒理学方面的研究,如肺组织病理变化,支气管肺泡灌洗液(BAL)内生指标变化和肺匀浆液中一些酶活性的变化;
- (2) 研究纳米颗粒在体内的吸收、分布和排泄的

生物转运过程和代谢过程;

(3) 采用不同暴露途径研究不同工业纳米颗粒的一般毒性和特殊毒性;

(4) 研究混合纳米颗粒及纳米颗粒与大气污染物混合的毒性;

(5) 从分子水平阐释纳米颗粒和纳米材料的毒性机理。

综上所述, 纳米尺度材料已经显示出一些特殊的生物效应以及对人体健康潜在的影响。目前也只是对众多的纳米材料中很少的几种有所研究, 且研究数据也很不全面。因此, 对纳米尺度物质的生物效应, 尤其是毒理学与安全性问题, 目前尚无法得到明确的结论。更重要的是, 当我们讨论纳米尺度物质的生物效应或毒性这个问题时, 不能泛泛而言, 必须明确材料的种类、形态、尺寸(粒径)大小、以及剂量的多少等参数。比如, 即使同一种类的纳米材料, 当其尺寸(粒径)大小不同, 其生物效应相差很大。因此, 在研究纳米材料生物学效应时, 几何效应显得尤为重要, 必须对每一种不同粒径的材料进行研究。这极大地增加了研究的工作量和复杂性。因此, 正如纳米科学技术是一个长久的、持续的研究开发过程一样, 纳米尺度物质的生物效应(包括生物毒性)的研究, 也将是一个长久的、持续的过程。

4 纳米毒性的修饰化学与纳米生物效应的应用

纳米生物效应的研究结果给化学领域提出了新的研究方向——降低乃至消除纳米毒性的修饰化学。对具有负的生物效应的纳米分子进行化学修饰, 在保持其功能特性的同时消除其毒性, 这方面的化学研究已经开始。比如, 富勒烯(C_{60})已经被广泛应用于癌症治疗和靶向药物输运等领域, 然而 C_{60} 的毒副作用限制于它在医疗上的应用。因此为了减少 C_{60} 对生物和环境的副作用, Sayes等^[24]进行了体外细胞实验, 研究了人表皮纤维细胞(HDF)暴露于未经衍生化的 C_{60} 和表面衍生化的 $C_{60}(OH)_{24}$ 的半致死剂量。结果表明在相同条件下, 未经衍生化的 C_{60} 的半致死剂量(LC_{50})为 20 ppb; 而 $C_{60}(OH)_{24}$ 的半致死量为 $LC_{50} > 5000000$ ppb, 将富勒烯的纳米毒性降低了 100000 倍。

而且Sayes还发现未经衍生化的 C_{60} 能够引起人表皮纤维细胞(HDF)和人肝癌细胞(HepG2)的细胞膜破裂, 乳酸脱氢酶的含量升高, 而 $C_{60}(OH)_{24}$ 组, 细胞无明显变化。这可能是由于未经衍生化的 C_{60} 能够产生氧自由基, 导致细胞膜被氧化, 从而产生细胞毒性。这是通过化学修饰降低纳米材料负生物效应第一例研究结果。我们也在致力于通过一定的化学修饰和/或物理处理来降低和消除某些纳米材料对生物体的负面生物效应(毒性), 同时保持其有益的纳米特性。

尤其值得提到的是, 我们在开展纳米材料的生物效应(如毒性)研究的同时, 也开展纳米生物负面效应的反向应用研究, 把观察到的负面生物效应应用到纳米医学诊断和治疗技术上, 已经取得了一些初步的结果。

致谢 特别感谢北京大学化学学院刘元方院士对本文提出的宝贵意见。

参 考 文 献

- 1 Service R F. Nanomaterials show signs of toxicity. *Science*, 2003, 300 (11): 243 [\[DOI\]](#)
- 2 Brumfiel G. A little knowledge. *Nature*, 2003, 424(17): 246 [\[DOI\]](#)
- 3 Zhang Wei-xian. Environmental technologies at the nanoscale. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(5): 103~108
- 4 Kelly K L. Nanotechnology grows up. *Science*, 2004, 304: 1732~1734 [\[DOI\]](#)
- 5 Dowling A, Clift R, Grobert N, et al. Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties. London: The Royal Society & The Royal Academy of Engineering Report, Jul 2004
- 6 Wang Hai-fang, Liu Yuan-fang, Zhao Yu-liang, et al. Preparation and biodistribution of ^{125}I -labeled water-soluble single-wall carbon nanotubes. *J Nanosci Nanotech*, 2004, 4(8): 1~8 [\[DOI\]](#)
- 7 Xing Geng-mei, Zhao Yu-liang, Lei Hao, et al. Biologically accelerated chemical aggregation of magnetic nanoparticles in blood vessel of mice. *JACS*, submitted
- 8 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): 126~34 [\[DOI\]](#)
- 9 Oberdörster G, Finkelstein J N, Johnston C. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst*, 2000, 96: 5~74
- 10 Afaq F, Abidi P, Matin R, et al. Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J Appl Toxicol*, 1998, 18: 307~312 [\[DOI\]](#)
- 11 Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, et al. Role of the alveolar

- macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 1992, 97: 193~199
- 12 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
- 13 Zhang Q, Kusaka Y, Sato K, et al. Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to 3 ultrafine metals: Role of free radical. *J Toxicol Environ Health A*, 1998, 53(6): 423~438 [\[DOI\]](#)
- 14 Osier M, Oberdörster G. Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: differences in particle effects. *Fundam Appl Toxicol*, 1997, 40(2): 220~227 [\[DOI\]](#)
- 15 Rahman Q, Lohani M, Dopp E, et al. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Perspect*, 2002, 110: 797~800
- 16 Renwick L C, Donaldson K, Clouter A. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 172: 119~127 [\[DOI\]](#)
- 17 Wang Hai-Fang, Liu Yuan-fang, Zhao yu-ling, et al. XPS study of C-I covalent bond on single-walled carbon nanotubes (SWNTs). *Acta Phys-Chim Sinica*, 2004, 20(7): 673~675
- 18 Jia Guang, Wang Hai-fang, Zhao Yu-liang, et al. Biological activities of carbon nanomaterials: Single wall nanotubes, multi wall nanotubes and fullerene. *Environ Sci Technol*, 2005, to be published on March 1. 2005
- 19 Jia Guang, Wang Hai-fang, Zhao Yu-liang, et al. Nanosize effects on the cytotoxicity of carbon nanomaterials, *Toxicological Sciences*, submitted
- 20 Warheit D B, Laurence B R, Reed K L, et al. Comparative pulmonary toxicity assesment of single wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci*, 2004, 77(1): 117~25 [\[DOI\]](#)
- 21 Zhou Ya-mei, Zhong Cai-yun, Kennedy I M, et al. Pulmonary responses of acute exposure to ultrafine iron particles in healthy adult rats. *Environ Toxicol*, 2003, 18: 227~235 [\[DOI\]](#)
- 22 Brown L M, Collings N, Harrison R M, et al. Ultrafine particles in the atmosphere: introduction. *Philos Trans R Soc Lond A*, 2000, 358: 2563~2565
- 23 Dreher K L. Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicol Sci*, 2004, 77: 3~5 [\[DOI\]](#)
- 24 Sayes C M, John D F, Guo W, et al. Differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett*, 2004, 4(10): 1881 [\[DOI\]](#)