

碳纳米管的细胞生物学效应*

高素莲¹ 李秀娥² 翟淑梅² 曲广波² 张 斌^{2* *}

(1 山东大学环境研究院, 济南, 250100; 2 山东大学药学院, 济南, 250012)

摘 要 在碳纳米管生物学效应的研究中, 细胞实验比动物实验更易于控制并且耗费较低, 目前已取得了多方面的进展. 本文从碳纳米管的细胞毒性、现行毒性评价方法的可靠性及细胞对碳纳米管的摄入机制三个方面进行介绍, 并对该领域的研究前景进行了展望和分析.

关键词 碳纳米管, 细胞生物学效应.

碳纳米管是由石墨碳原子层卷曲而成的无缝、中空的管体, 分为单壁碳纳米管 (Single-walled Carbon Nanotubes, SWNTs) 和多壁碳纳米管 (Multiwalled Carbon Nanotubes, MWNTs), 其直径为几纳米到几十纳米, 具有优良的光学、力学、化学和电学等特性^[1, 2]. 目前, 这种新型纳米材料已被应用到轮胎、平板显示器和汽车制造等领域. 除此之外, 碳纳米管在生物医学领域也显现出广泛的应用前景. 为实现其在生物医学领域的应用, 需对碳纳米管进行生物分子修饰, 通常所采用的修饰基团包括: 示踪性基团 (tracking ligand)、靶向性基团 (targeting ligand) 和治疗性基团 (therapeutic ligand)^[3]. 研究表明碳纳米管可以用作基因、多肽、蛋白质及小分子药物的输送载体及生物传感器^[4-8]; 研究还发现, 碳纳米管在近红外区域有荧光信号, 而在这个区域细胞本底荧光较小, 不会产生干扰, 因此, 可以用碳纳米管的近红外荧光特性实现对细胞表面低表达蛋白的灵敏检测, 从而进行疾病诊断并在细胞水平上对治疗效果进行评价^[9]. 然而, 碳纳米管生产过程中加入的铁、镍等金属催化剂会引起细胞内发生氧化还原反应 (如 Fenton 反应), 造成活性氧含量的升高, 从而改变细胞内的氧化还原状态, 对细胞产生损伤作用, 并且由于碳纳米管不能被生物降解和不能被组织清除, 因此, 应时其生物学效应进行合理的评价. 与动物实验相比较, 细胞水平的实验更容易被控制且实验耗费较低^[10], 尽管碳纳米管的细胞生物学效应研究已取得了较大进展, 但研究的结果尚存在许多有争议的地方, 主要原因有以下几方面: 第一, 碳纳米管的制备和纯化方法多样性; 第二, 样品的分散方法不一致; 第三, 细胞毒性评价方法多样性; 第四, 所用的细胞系模型多样性^[11].

1 碳纳米管的细胞毒性

纳米颗粒由于粒径较小、质量轻, 很容易在空气中传播, 能够经呼吸道和皮肤接触进入人体, 而引发一些呼吸道疾病和肺部疾病. 肺部巨噬细胞 (AM) 可以吞噬外来异物, 对肺部起着重要的保护作用, 而研究发现 SWNTs 在 $0.38\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 的低剂量下对 AM 就有明显的损伤作用, MWNTs 则在 $3.06\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 的剂量下对 AM 有损伤作用^[12]. Soto 等人的研究也表明 MWNTs 对鼠巨噬细胞有毒性^[13]. T 淋巴细胞在免疫应答中起着核心作用, 是身体抵抗疾病的重要武器之一, Bottin^[14] 等人通过评价 MWNTs 对 T 淋巴细胞生存能力的影响, 发现 MWNTs 可以引起 T 淋巴细胞的凋亡. 研究还发现氧化的碳纳米管的毒性要大于未经氧化的碳纳米管及无定形炭黑的毒性.

1.1 细胞毒性的影响因素

物质有没有毒性关键在于剂量的问题, 除了这个控制要素外, 材料本身的物理化学性质也起着决定性的作用. 研究表明, 碳纳米管对细胞产生明显毒性的浓度一般在微克级, 同时, 碳纳米管的细胞毒性与其表面修饰及在溶液中的分散性等物理化学性质也有着极为密切的关系^[15].

表面修饰 碳纳米管表面的化学修饰可以改变碳纳米管与细胞之间的作用, Sayes^[16] 等人探讨了

2008 年 2 月 2 日收稿.
* 山东省自然科学基金项目 (Y2006B19). * * 通讯作者, E-mail binzhang1968@ hotmail . com.

不同程度功能化 SWNTs 的细胞毒性, 发现碳纳米管的细胞毒性与功能化密度有关. 所用的碳纳米管包括 SWNT-phenyl-SO₃H, SWNT-phenyl-SO₃Na (碳和功能团的比率即 C/FG 有 18、41 和 80 三种), SWNT-phenyl-(COOH)₂ (C/FG 为 23 种) 及经过表面活性剂分散的未衍生化碳纳米管. C/FG 值愈大表明功能化密度愈小. 同一类型的碳纳米管, C/FG 愈小, 经过相同的处理之后, 细胞死亡率也较低, 用表面活性剂分散的未衍生化碳纳米管的毒性最大. Nimmagadda 等人^[17]通过研究发现, 经过纯化或功能化的单壁碳纳米管的细胞效应与直接购买的单壁碳纳米管存在着较大的差异, 为了增强碳纳米管的亲水性能或和引入功能化基团, 需要经过复杂的纯化过程并对其表面进行修饰.

分散性 碳纳米管在水溶液中的分散性一直是一个难以解决的问题, 目前主要有以下几种方法进行分散: 加入一定浓度的表面活性剂, 对其表面进行衍生化或直接加入含血清的培养基经过超声分散. 不同分散程度的碳纳米管的细胞毒性是不同的. Wick 等人^[18]详细研究了不同团聚状态的碳纳米管的细胞毒性, 结果发现结块的碳纳米管细胞毒性要比分散性较好的碳纳米管的细胞毒性大.

除此以外, 碳纳米管的尺寸、比表面积等也是影响细胞毒性的重要因素^[19-20]. 因此, 在探讨碳纳米管毒性的时候, 对其进行全面的表征是非常必要的.

1.2 细胞毒性的产生机制

金属催化剂 碳纳米管的生产过程中会使用一些金属催化剂, 如铁、镍等, 当这些物质进入细胞之后可能会引发氧化还原反应, 产生过氧化氢及自由基等活性氧, 最终对细胞造成损伤. Pulskamp 等人^[21]的研究表明, 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, 因此, 他们推断碳纳米管中含有的金属催化剂是产生一系列生物学效应的原因. 自由基能够对 DNA 造成损伤, 为了保持基因的完整性, 细胞本身会启动一些保护机制, 如可以激活 P53 蛋白和细胞周期检验点, 导致细胞周期停滞, 修复 DNA. 正常情况下, P53 蛋白表达较低, 而 P53 蛋白的过表达则可以引起细胞的凋亡. 另外, 经过 MWNTs 的处理, P53 蛋白表达增加, 碱基切除修复通路酶和双链断裂修复蛋白的表达增加, 这说明碳纳米管的确对 DNA 造成了损伤^[22-23].

颗粒作用模型 Cui 等人^[24]的实验表明, 经过碳纳米管处理的细胞, 其黏附性能会受到严重影响. Western blot 的结果表明, 细胞基质粘附相关蛋白的表达如纤维连接蛋白、层粘蛋白、胶原蛋白、粘着斑激酶及 P 钙粘蛋白等都出现了不同程度的降低, 同时凋亡相关基因的表达如 P16 出现了上调, 细胞被阻滞在 G1 期和 S 期细胞显著减少. 对此, 一种关于颗粒-细胞相互作用的模型被提出: 碳纳米管接触细胞表面时首先会激活细胞外基质 (ECM) 蛋白信号, 这种信号传至细胞内和细胞核, 引发粘附相关基因表达的下调, 从而导致细胞粘附性的降低并且引起细胞脱壁、悬浮和皱缩, 同时碳纳米管会引起凋亡相关基因如 P16、Rb 和 P53 表达的上调, 从而使细胞阻滞在 G1 期, 最终导致细胞凋亡.

碳纳米管表面极易吸附蛋白, 在进行细胞实验时, 碳纳米管经过超声分散在细胞培养液中, 再作用于细胞, 导致碳纳米管与培养液及血清蛋白发生作用, 使培养基中营养成分降低从而造成毒性^[25].

2 细胞毒性检测方法

Wolrle-Knirsch 等人^[26]在研究 SWNTs 的细胞毒性时, 发现 MTT 方法的检测结果显示出较大的毒性, 而 WST-1 实验和 LDH 实验、MMP (线粒体膜电位) 实验和则显示碳纳米管对细胞存活没有影响. 经透射电镜观察, SWNTs 的表面能吸附 MTT-甲臜颗粒, 而这种结合物不能被 SDS、酸化异丙醇和丙酮等溶解, 从而造成吸光度降低出现假阳性结果, 在 WST-1 实验中则没有这种现象. Belyanskaya 等人^[27]也探讨了 MTT 还原实验用于评价碳纳米管对细胞影响的可靠性及局限性, 碳纳米管对 MTT 实验的干扰是受 MTT 实验方案、分散剂和碳纳米管类型等因素影响. 光谱实验表明碳纳米管能够吸附多种用于检测细胞毒性的染料, 从而降低相关物质的吸光度或者荧光强度, 造成假阳性结果^[28]. 因此, 在对碳纳米管的细胞毒性进行检测时, 用于细胞毒性检测的传统光谱学方法遇到了严峻的挑战, 目前亟需寻找新的替代方法用以客观评价碳纳米管的毒性. 除了灵敏、安全、简单和耗费较低之外, 理想的检测方法应该不存在对待检测物质的干扰. 基于这种理念, Herzog 等人^[29]提出用细胞克隆的方法评价碳纳米材料的细胞毒性, 以形成的细胞克隆数目及大小来反映样品的毒性. 这种方法早在

1956年就被提出，此后被广泛用于检测物质的细胞毒性，方法不涉及任何指示剂染料，因此，避免了光度的干扰，可以比较可靠的反映材料的细胞毒性。细胞克隆方法与比色法之间的关系还有待于进一步研究。在今后的 5—15 年内还需要对工程化纳米材料的毒性评价方法进行开发和论证^[30]。

3 细胞对碳纳米管的摄入机制

细胞外颗粒物进入细胞可以通过多种途径，如内吞途径和非内吞途径，而内吞途径又包括多种方式，如胞吞、胞饮、依赖网格蛋白的受体介导内吞和不依赖网格蛋白的内吞作用等，而包含网格蛋白包被小泡的受体介导内吞是最常见的内吞途径。

研究人员通常采用荧光基团 (如 FITC) 对碳纳米管进行表面修饰以研究其进入细胞的机制。Pantarotto等人^[31]的研究首次证明多肽修饰的功能化 SWNTs能够穿过细胞膜进入细胞，并且发现这种摄入并不受温度和内吞抑制剂的影响，是一种不依赖能量的非内吞作用机制。该研究认为碳纳米管通过嵌入或扩散的方式穿过细胞膜的脂双层进入细胞，其行为类似细胞穿膜多肽 (CPPs)，穿膜肽可以通过一种无耗能、无受体介导的方式穿过真核细胞的质膜，但具体的迁移机制目前仍不清楚。Dai等人^[32]发现蛋白质或 DNA 修饰的 SWNTs是通过依赖网格蛋白的内吞途径进入细胞。Kostarelos等人^[33]的研究表明功能化碳纳米管的细胞摄入与修饰的官能团和细胞类型无关，并且细胞摄入碳纳米管不仅仅是依赖于内吞的机制。该研究表明功能化碳纳米管可以像纳米注射器一样穿过不同的细胞屏障进入细胞。Porter等人^[34]利用电子能量损失谱成像技术、能量过滤透射电镜和共聚焦显微镜分析了单壁碳纳米管在细胞内的定位，提出了两种可能的机制：能量介导的内吞作用和穿过脂双层的扩散作用。

综上所述，碳纳米管对细胞产生的效应受许多因素的影响，在研究碳纳米管的细胞毒性时，需要注意以下几个方面的问题：（1）细胞毒性评价方法：在没有确定一种适合于评价碳纳米管毒性的方法之前，需要用多种方法来相互验证。（2）碳纳米管的表征：有许多因素会影响碳纳米管的细胞毒性，除了剂量以外，还有许多与碳纳米管本身的物理化学性质相关的因素，如直径、形状、分散性、表面修饰情况和化学组成等，在探讨碳纳米管毒性的同时，需要对其进行很好的表征。

参 考 文 献

[1] O'Connell M J, Bachilo SM, Huffman C B et al., Band Gap Fluorescence from Individual SingleWalled Carbon Nanotubes *Science* 2002, **297**: 593—596

[2] Dai H., Carbon Nanotubes: Opportunities and Challenges. *Surface Science*, 2002, **500**: 218—241

[3] Lacerda L, Raffa S, Prato M et al., Cell Penetrating CNTs for Delivery of Therapeutics. *Nanotoday*, 2007, **2** (6): 38—43

[4] Bianco A, Kostarelos K, Partidos C D et al., Biomedical Applications of Functionalised Carbon Nanotubes. *Chem. Commun.*, 2005, 571—577

[5] Kan N W S, O'Connell M, Wisdom J A et al., Carbon Nanotubes as Multifunctional Biological Transporters and Near Infrared Agents for Selective Cancer Cell Destruction. *PNAS*, 2005, **102** (33): 11600—11605

[6] Gao L, Nie L, Wang T et al., Carbon Nanotube Delivery of the GFP Gene into Mammalian Cells. *Chem. Biochem.*, 2006, **7**: 239—242

[7] Veetil J V, Ye K., Development of Immunosensors Using Carbon Nanotubes. *Biotechnol. Prog.*, 2007, **23** (3): 517—531

[8] Feazell R P, Nakayama R, Atchford N, Dai H et al., Soluble Single-Walled Carbon Nanotubes as Longboat Delivery Systems for Platinum (IV) Anticancer Drug Design. *J Am Chem. Soc.*, 2007, **129**: 8438—8439

[9] Welsher K, Liu X, Daranciang D et al., Selective Probing and Imaging of Cells with SingleWalled Carbon Nanotubes as Near Infrared Fluorescent Molecules. *Nano. Lett.*, 2008, **8** (2): 586—590

[10] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* 2008, **4** (1): 26—49

[11] Becker M L, Fagan J A, Gallant N D et al., Length-Dependent Uptake of DNA-Wrapped SingleWalled Carbon Nanotubes. *Adv. Mater.*, 2007, **19**: 939—945

[12] Jia G, Wang H, Yan L et al., Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: SingleWall Nanotube, MultiWall Nanotube, and Fullerene. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**: 1378—1383

[13] Soto K F, Camasco A, Powell T G et al., Biological Effects of Nanoparticulate Materials. *Materials Science and Engineering C*, 2006, **26** (8): 1421—1427

[14] Bottini M, Bruckner S, Naka K et al., MultiWalled Carbon Nanotubes Induce T Lymphocyte Apoptosis. *Toxicology Letters*, 2006, **160**: 121—126

[15] Zhou H, Mu Q, Gao N et al., A Nano-Combinatorial Library Strategy for the Discovery of Nanotubes with Reduced Protein Binding Cytotoxicity, and Immune Response. *Nano Lett.*, 2008, **8** (3): 859—865

- [16] Sayes C M, Liang F, Hudson J L et al., Functionalization Density Dependence of Single-Walled Carbon Nanotubes Cytotoxicity in Vitro. *Toxicology Letters*, 2006, **161**: 135—142
- [17] Nimmagadda A, Thurston K, Nollert M U et al., Chemical Modification of SWNT Affects in Vitro Cell-SWNT Interactions. *Journal of Biomaterial Materials Research Part A*, 2006, **76A** (3): 614—625
- [18] Wick P, Manser P, Linbach L K et al., The Degree and Kind of Agglomeration Affect Carbon Nanotube Cytotoxicity. *Toxicology Letters*, 2007, **168**: 121—131
- [19] Tian F, Cui D, Schwarz H et al., Cytotoxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes on Human Fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 2006, **20**: 1202—1212
- [20] 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
- [21] Pulskamp K, Dibatjes K, Knigh F, Carbon Nanotubes Show No Sign of Acute Toxicity but Induce Intracellular Reactive Oxygen Species in Dependence on Contaminants. *Toxicology Letters*, 2007, **168**: 58—74
- [22] Schrand A M, Dai L, Schlager J J et al., Differential Biocompatibility of Carbon Nanotubes and Nanodiamonds. *Diamond & Related Materials*, 2007, **16**: 2118—2123
- [23] Zhu L, Chang D W, Dai L et al., DNA Damage Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells. *Nano Lett.*, 2007, **7** (12): 3592—3597
- [24] Cui D, Tian F, Ozkan C S et al., Effect of Single-Walled Carbon Nanotubes on Human HEK293 Cells. *Toxicology Letters*, 2005, **155**: 73—85
- [25] Casey A, Davoren M, Herzog E et al., Probing the Interaction of Single-Walled Carbon Nanotubes within Cell Culture Medium as a Precursor to Toxicity Testing. *Carbon*, 2007, **45**: 34—40
- [26] Wolfrum Knirsch J M, Pulskamp K, Knigh F, Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Lett.*, 2006, **6** (6): 1261—1268
- [27] Belyanskaya L, Manser P, Spohn P et al., The Reliability and Limits of the MTT Reduction Assay for Carbon Nanotubes Cell Interaction. *Carbon*, 2007, **45**: 2643—2648
- [28] Casey A, Herzog E, Davoren M et al., Spectroscopic Analysis Confirms the Interactions between Single-Walled Carbon Nanotubes and Various Dyes Commonly Used to Assess Cytotoxicity. *Carbon*, 2007, **45**: 1425—1432
- [29] Herzog E, Casey A, Lyng F M et al., A New Approach to the Toxicity Testing of Carbon-Based Nanomaterials: the Cytogenic Assay. *Toxicology Letters*, 2007, **174**: 49—60
- [30] Maynard A D, Aiken R J, Butz T et al., Safe Handling of Nanotechnology. *Nature*, 2006, **144**: 267—269
- [31] Pantarotto D, Briand J P, Prato M et al., Translocation of Bioactive Peptides across Cell Membranes by Carbon Nanotubes. *Chem. Commun.*, 2004, **6** (1): 16—17
- [32] Kan N W S, Liu Z, Dai H, Carbon Nanotubes as Intracellular Transporters for Proteins and DNA: an Investigation of the Uptake Mechanism and Pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**: 577—581
- [33] Kostarelos K, Lacerda L, Pastorin G et al., Cellular Uptake of Functionalized Carbon Nanotubes Is Independent of Functional Group and Cell Type. *Nature Nanotechnology*, 2007, **2**: 108—113
- [34] Porter A E, Gass M, Muller K et al., Direct Imaging of Single-Walled Carbon Nanotubes in Cells. *Nature Nanotechnology*, 2007, **2**: 713—717

CELLULAR BIOLOGICAL EFFECTS OF CARBON NANOTUBES

GAO Su-lian¹ LIX iu⁻² ZHAI Shu-mei² QU Guang-bo² ZHANG Bin²

(1 Environmental Research Institute Shandong University, Jinan, 250100 China)

2 School of Pharmaceutical Sciences Shandong University, Jinan, 250012, China)

ABSTRACT

In the last years, carbon nanotubes (CNTs) have been intensively investigated for its wide potential applications especially in biomedicine because of the unique physicochemical properties. Thus, it is imperative to study effects of CNTs on biological systems. Compared to animal studies, cellular testing is easier to control and less expensive. Several groups have reported the cellular biological effects of CNTs and lots of information has been obtained. This review mainly presents cytotoxicity of CNTs, the reliability of the cytotoxicity evaluation methods and the cellular uptake mechanism.

Keywords carbon nanotubes, cellular biological effects