

纳米生物效应与安全性研究展望

刘颖, 陈春英*

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: chenchy@nanoctr.cn

2018-08-16 收稿, 2018-10-11 修回, 2018-10-14 接受, 2018-11-22 网络版发表

国家重点研发计划“纳米科技”重点专项(2016YFA0201600)资助

摘要 当物质达到纳米尺度时, 会具有一些特殊的物理化学性质, 如量子尺寸效应、表面效应以及宏观量子隧道效应等。即使化学组成相同, 纳米物质的生物学效应也可能不同于微米尺寸以上的常规物质。因此, 根据常规宏观物质研究所得到的生物学效应与安全性评价结果, 可能并不适用于纳米物质。自2003年*Science*发表文章关注纳米生物效应与毒理学效应之后, 各国政府先后启动了对纳米生物效应的研究, 并且支持力度不断增加。我国是世界上较早开展纳米生物效应与安全性研究的国家之一, 研究工作在国际上产生了重要影响。国家纳米科学中心与中国科学院高能物理研究所共同建立的“中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室”, 作为我国第一个也是国际上少有的以纳米材料生物效应与安全性为研究方向的专业实验室, 在了解纳米材料的基本性质-活性关系的基础上, 对更深层次的理化效应展开了深入的研究, 并建立了适用于纳米生物效应与安全性评价的多层次模型, 发展了高灵敏、高分辨率的适用于纳米生物效应和安全性评价的实验技术和研究方法, 为保证纳米科技的可持续发展做出了重要的贡献。本文综述了本实验室近年来在纳米生物效应与安全性领域的研究进展。

关键词 纳米材料, 纳米生物效应, 物理化学性质, 纳米毒理学

纳米生物效应是将纳米技术与化学、物理、生物、毒理学与医学等领域的实验技术结合起来, 研究纳米尺度物质与生命过程相互作用及其结果的一个新兴科学领域。当物质细分到纳米尺度时, 会出现一些特殊的物理化学性质, 例如量子尺寸效应、表面效应以及宏观量子隧道效应等。即使化学组成相同, 纳米物质的生物效应也可能不同于微米尺寸以上的常规物质。因此, 根据常规宏观物质研究所得到的生物学效应与安全性评价结果, 可能并不适用于纳米物质。纳米尺度物质对生命过程的影响可能具有正负两个方面^[1]: 正面纳米生物效应, 将为疾病的早期诊断和高效治疗带来新的机遇和新的方法; 负面纳米生物效应(也称为纳米毒理学, nanotoxicology), 主要是以科学客观的方式描述纳米材料/颗粒在生物环境中的

行为、命运以及毒理学效应, 揭示纳米材料进入人类生存环境对人类健康可能产生的负面影响。纳米毒理学的研究将加强我们对纳米尺度下物质对人体健康效应的认识 and 了解, 这不仅是纳米科技发展产生的新的基础科学的前沿领域, 也是保障纳米科技可持续发展的关键环节。

1 国际纳米生物效应与安全性研究的重要发展历程

自2003年*Science*发表文章关注纳米生物效应后^[2], 各国政府即先后启动了对纳米生物效应的研究, 支持力度不断增加。

2003年10月, 美国政府在没有预算的情况下就

引用格式: 刘颖, 陈春英. 纳米生物效应与安全性研究展望. 科学通报, 2018, 63: 3825–3842

Liu Y, Chen C Y. Development and prospect of biological effects and safety of nanomaterials (in Chinese). Chin Sci Bull, 2018, 63: 3825–3842, doi: 10.1360/N972018-00857

增拨专款600万美元启动了该领域的研究工作。2004年7月29日,英国皇家学会和皇家工程院发布长达95页的报告,建议英国政府成立“纳米物质生物环境效应”研究中心。2004年12月5日,欧共体在布鲁塞尔公布了《欧洲纳米战略》,把研究纳米生物环境健康效应问题的重要性,列在欧洲纳米发展战略的第3位。同时,欧洲宣布启动“纳米安全性综合研究计划”,全面开展纳米生物效应与安全性的研究。2005年,美国把纳米计划的总预算的1%投入纳米健康与环境研究,多个政府部门同时支持此领域,在同年的美国化学会春季年会上,已经将纳米生物效应与纳米毒理学作为新的研究领域。2005年1月, *Nanotoxicology* 在英国出版,推动了纳米毒理学研究思路的进一步拓展,仅2年时间形成了一个新的前沿研究领域。

2008年,英国“土壤协会”发表声明,禁止在所有土壤协会注册的有机产品中使用人造纳米材料。2010年12月和2013年12月,美国职业安全与卫生研究所(NIOSH)分别公开了碳纳米管(CNT)和碳纳米纤维(CNF)的推荐暴露极限和职业暴露最终说明。2011年6月,美国食品药品监督管理局(FDA)发布判断制品是否为纳米产品指导方案。同年,德国环境风险评估委员会(BfR)和联邦环境局(UBA)对各类纳米材料可能产生的致癌作用进行了风险评估。2012年4月, FDA颁布了利用纳米技术生产的食品和化妆品安全性评价指南。美国国家纳米技术发展计划(NNI)在环境健康安全领域的经费逐年提升,从2011年的4%, 2012年的7%到2017年的10%。2013年,为更好地管理纳米材料并对纳米材料的风险进行评估,法国对纳米材料引入了强制性的报告制度。自2013年1月1日起,所有在法国制造、进口到法国或在法国销售的产品中若含有纳米材料,必须向法国政府进行申报。2015年6月9日,经济合作与发展组织(OECD)发表了一份名为“OECD化学研究为纳米材料的安全性指明前进的方向”的报告。该项目横跨110多个不同的化学试验,研究了11种商业上可行的纳米材料种类;结果来自于11个国家的几十个政府机构、大学、研究机构和企业。2015年10月27日,环境工作组(EWG)宣布了“避免有毒和潜在的有害化学物质和污染物在消费品中常见从而使消费者安心”的项目。根据该方案,应用了纳米材料的化妆品产品必须遵循欧盟(EU)的标签指南,必须充分披露其产品的成分。

欧盟第六、七框架计划将纳米科技的人体安全、

健康和环境效应列为最优先支持课题,投入近24亿欧元,并制定了欧盟2015~2025的纳米安全计划:面向纳米材料可持续发展及纳米技术创新的路线规划(Nanosafety in Europe 2015–2025: Towards Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovations)。2017年12月,瑞典化学品管理局(KEMI)建立了强制性报告计划,获取瑞典使用的纳米材料的数量和类型的信息。如果产品含有纳米材料,需要通知化学产品和生物技术生物的专业制造商或进口商;以自己的名义包装、重新包装或更改化学产品或生物技术生物的名称以供进一步分发的人;制造化学产品和生物技术混合物以进一步分发的人;化学农药的制造商或进口商和代表制造商或进口商报告产品的第三方。2017年, FDA发布草案,要求加快含有纳米材料的器械的批准,但前提依然是要对人类的长期健康影响负责,不能违反环境保护局(EPA)对环境长期健康影响的法规(40 CFR Part 704)。2018年1月,美国国家毒理学项目网站发布了由ICCVAM主导的历时一年的“为评估美国化学品及医疗产品安全性建立新方案制定战略发展蓝图”正式文件。2018年5月, NIOSH宣布征求公众对纳米技术研究计划草案的意见“继续保护纳米技术劳动力: 2018~2025年NIOSH纳米技术研究计划”。2018年7月4日, OECD发表题为“调查制造纳米材料的不同类型风险评估: 确定可用于风险管理措施的工具和推动纳米特定数据需求的不确定性”的报告。2018年8月,德国环境署(UBA)发布了在塑料包装中使用纳米材料的情况说明书。

2 我国在纳米生物效应与安全性领域的发展现状

我国是世界上较早开展纳米生物效应与安全性研究的国家之一,研究成果在国际上产生了重要影响。2001年1月,中国科学院高能物理研究所提出“开展纳米生物效应、毒性与安全性研究”的建议,完成了“关于纳米尺度物质生物毒性的研究报告”。2004年,正式成立了我国第一个“纳米生物效应实验室”。2004年11月31日,以“纳米尺度物质的生物效应与安全性”为主题的第243次香山科学会议召开。与会专家经深入讨论后达成共识:在发展纳米技术的同时同步开展其安全性研究,结合我国实际情况选择与大众生活密切相关的、与职业安全相关的纳米材料及生物医药纳米材料为研究对象。2006年6月22日,国家

纳米科学中心与中国科学院高能物理研究所共同建立“中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室”，开展纳米材料的生物效应研究，标志着我国纳米生物效应与安全性研究已初步进入系统化规模化的研究阶段。目前，该重点实验室已经成为国际该领域的代表性实验室。

2007年，世界第一部纳米毒理学领域专著 *Nanotoxicology* 由我国赵宇亮研究员领衔11国科学家共同编著，被国外多所大学选为教材，产生了重要的国际影响^[3]。2009~2015年，我国科学家主编出版了《纳米生物效应与安全性》系列丛书^[4]，包括《纳米毒理学-纳米材料安全应用的基础》，《纳米碳管生物效应与安全应用》，《氧化铁纳米材料生物效应与安全应用》，《二氧化硅和氧化锌纳米材料生物效应与安全应用》，《二氧化钛纳米材料生物效应与安全应用》，《磷灰石纳米粒子的制备改性及其生物安全性》，《纳米药物安全性》，《纳米毒理学与安全性研究方法》，有力地推动了新的分支学科在国内外的形成和发展，为学术研究、工业生产以及管理提供了重要的参考依据和理论支持。2009年，中国台湾地区加强标示纳米食品及化妆品的管理。2011年，国家纳米科学中心赵宇亮和陈春英研究员在碳纳米管金属杂质的高灵敏、高准确定量分析和相关毒理学基础研究上，完成了我国第一项ISO和IEC纳米技术国际标准，填补了国际空白。2012年，国家纳米科学中心与中国科学院高能物理研究所在北京主办了第6届国际纳米毒理学大会，这是首次在亚洲召开的纳米毒理学领域的国际盛会。来自中国、美国、加拿大、英国等30多个国家和地区的600余名专家学者就纳米材料生物效应和安全性开展交流研讨。此次具有重要影响的国际纳米科技会议在中国召开，分别从学术和国际标准制定层面讨论国际上纳米毒理学的发展方向、纳米毒理学的基础研究、如何保障纳米科技相关产业的可持续发展等国际高度关注的重要问题，不仅促进了我国与国际纳米毒理学界的学术交流，而且扩大了我国在国际该领域的影响和地位，将有力地推动我国纳米科技的可持续、健康和快速发展。

2012年，中国毒理学会“纳米毒理学”专业委员会成立；2015年，我国科学家出版了国内第一部针对纳米生产现场的指南《生产与工作场所纳米颗粒暴露监测指南》^[5]，综述了生产场所及工作场所中纳米颗粒暴露的相关知识，包括现场环境中颗粒物的表征

方法、典型纳米材料生产现场的颗粒物暴露国内外重要研究进展等；对暴露现场监测中的具体策略、技术方法和仪器设备进行了详细的阐述；针对纳米颗粒暴露现场的风险评价和安全防护，给出了不同纳米材料的空气暴露剂量阈值(建议值)，提出了指导建议与操作方法；为相关专业的研究生、纳米科技领域的科研人员、气溶胶科学领域的研究人员、预防与劳动卫生工作者等提供参考，尤其是为我国纳米生产相关企业、政府监督管理部门在制定相关政策法规、建立纳米产业安全措施与防护方法上提供了科学依据。2016年6月，美国国会研究服务(CRS)发布“纳米技术：政策入门”，概述了纳米技术的世界研究与开发，环境、健康与安全(EHS)问题，纳米制造以及公众对纳米技术的理解和态度。根据该报告，中国在此领域的纳米技术论文及出版物已经超过了美国。

3 中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室在本领域的研究进展

纳米材料的尺寸、形状、表面、化学组成、金属杂质及聚集状态等一系列基本的理化性质与纳米材料的生物效应与安全性密切相关。随着纳米科技日新月异的发展，纳米材料新的理化性质层出不穷，同时，这些理化性质也受到生物微环境的显著影响。中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室在了解纳米材料基本的性质-活性关系的基础上，对更深层次的理化效应展开了更加深入的研究，并建立了适用于纳米生物效应与安全性评价的多层次模型，发展高灵敏、高分辨率的适用于纳米生物效应和安全性的实验技术和研究方法，为保证纳米科技的可持续发展做出了重要的贡献。

3.1 深入探讨影响纳米材料生物学效应的物理化学特性

3.1.1 率先发现蛋白冠的形成显著影响纳米材料的生物学效应

纳米材料进入生物体内会迅速吸附蛋白分子，形成纳米颗粒-蛋白冠(nanoparticle-protein corona)，简称“纳米蛋白冠”，以不可预测的方式调节纳米材料的化学生物学性质、药理学活性、毒理学性质及其生物医学功能^[6]。“纳米蛋白冠”的形成和机制，因此成为纳米化学与生物医学交叉的诸多领域所关注的

重大基础科学前沿问题. 深入理解其基本结构及其化学生物学行为, 成为纳米材料生物学应用的关键瓶颈.

蛋白冠形成是一个复杂的、非平衡的动力学过程, 很多因素影响蛋白冠的形成和组成. 我们深入研究阐明了不同形状、尺寸、表面电荷、表面化学修饰如何影响纳米颗粒表面蛋白冠的形成和吸附量, 并发现了蛋白吸附量与金纳米棒被细胞摄入的能力之间具有正相关的关系; 系统揭示了纳米蛋白冠的物理化学特性对纳米材料的体内代谢、细胞摄取和清除能力等生物学行为的调控作用. 同时发现血液蛋白与碳纳米管表面形成的“纳米蛋白冠”, 可以降低碳纳米管的细胞毒性, 为设计更安全的纳米药物提供了科学依据.

率先揭示了不同纳米材料形成蛋白冠的不同机制. 碳纳米管(CNTs)与人血液蛋白形成的蛋白冠, 主要是通过蛋白分子的疏水性氨基酸残基与碳管表面发生多重弱相互作用的协同效应, 以及纳米表面多蛋白分子的竞争吸附过程. 首次揭示了碳纳米管的 π 电子密度以及它与蛋白分子的芳香族氨基酸残基之间的相互作用力的大小, 是决定蛋白分子在碳纳米管表面竞争性吸附反应速率以及形成Soft Corona的关键因素(图1). 而对于金属纳米材料, 其纳米蛋白冠的形成机制取决于表面化学键的强弱. 如金纳米棒主要通过Au-S键与体内含硫蛋白发生作用形成Hard Corona, 这种硬蛋白冠会共同参与细胞内

转运和降解过程, 大大改变纳米材料在生物体内的本征特性^[7].

由于碳纳米材料生物效应研究工作的国际影响, 应邀为 *Accounts of Chemical Research* 撰写了以“Understanding the toxicity of carbon nanotubes”为题的专论^[8], 系统论述了碳纳米管的蛋白冠界面作用、细胞转运途径、代谢动力学、表面化学调控机制, 对系统阐明碳纳米材料的体内过程及其医学功能做出了贡献. “纳米蛋白冠”领域的国际权威学者都柏林大学Dawson课题组^[9]在 *Nature Nanotechnology* 发表综述文章, 全文7次引用本工作, 并评价为蛋白冠调控碳纳米管生物效应的“代表性工作”, 阐明了纳米蛋白冠的“独特生物学效应”. 德国明斯特大学Riehemann^[10]以“Nanotoxicity: How the body develops a way to reduce the toxicity of carbon Nanotubes”为题亮点报道, 评价该工作是一项“开创性工作”, 为探索理解纳米材料与生物体系的相互作用机制“开拓了一个重要的新方向”, “是纳米科学领域研究的新焦点(a new focus)”.

进一步的深入研究揭示了纳米材料对血液中主要蛋白成分的吸附规律, 发现纳米材料表面的手性与尺寸、形状、表面电荷等其他性质一样, 是影响表面的蛋白冠的形成方式的重要因素. 纳米颗粒的手性表面(L型、D型、D/L型)决定吸附转铁蛋白的方向及其与受体的相互作用, 对转铁蛋白造成的结构与功能改变不同. AuNPs(L)和AuNPs(D/L)与转铁蛋白

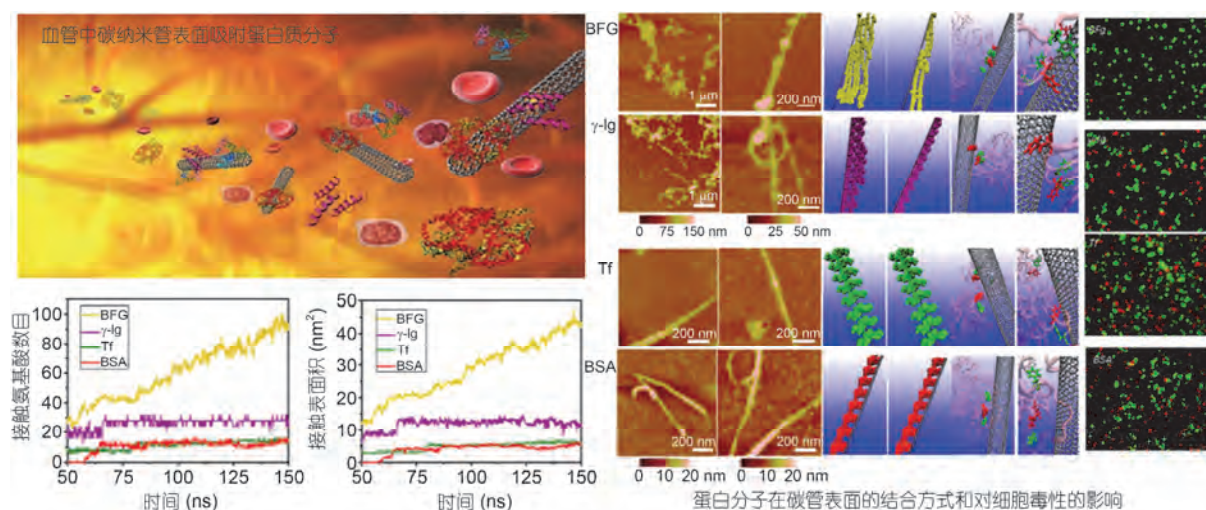


图1 发现蛋白冠的形成显著影响碳纳米管的生物学效应^[7]

Figure 1 Nanoparticle-Corona affects the biological effects of carbon nanotubes significantly^[7]

结合后,表面电荷量相差无几;而AuNPs(D)与转铁蛋白结合后,表面负电荷量较少. AuNPs(L)和AuNPs(D/L)与转铁蛋白的结合面为a1面,暴露面为a2面;而AuNPs(D)与转铁蛋白的结合面为a2面,暴露面为a1面^[10]. 同时,利用QCM-D技术建立了原位、实时定量检测金纳米颗粒手性表面吸附的转铁蛋白与细胞膜表达的受体相互作用的方法,发现AuNPs(D)吸附的转铁蛋白与受体作用较AuNPs(L)和AuNPs(D/L)强,可能是由于对转铁蛋白的构象改变的差异引起的^[11]. 另外,对血液中丰度最大的蛋白——牛血清白蛋白(BSA)在AuNPs手性表面的吸附行为进行了系统研究,发现BSA在金纳米粒子的L-和D-手性表面上的吸附表现出明显的差异,提出盐桥相互作用是蛋白质-纳米手性界面相互作用的主要驱动力. 纳米手性表面蛋白冠的形成显著影响细胞的摄取,从而进一步影响其生物学效应^[12]. 从手性表面的角度研究了纳米材料与血液相互作用后形成蛋白冠的结构,为今后纳米颗粒以及纳米载药体系的靶向性设计研究提供了重要理论依据.

3.1.2 证实金属杂质是影响碳纳米材料生物学效应的重要原因

碳纳米材料的制备过程中的金属催化剂残留,严重影响着其实际应用,例如过渡金属催化剂如Fe, Y, Ni, Mo, Co等. 金属杂质的存在是碳纳米管毒性的一个重要原因^[8]. 实验室在国际上率先建立并突破了纳米生物效应定量分析方法学瓶颈、建立了碳纳米管中金属含量的绝对定量分析方法. 利用中子活化分析(NAA)与电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)相结合,建立了测定CNTs中金属杂质的高灵敏、高准确的定量分析方法. 利用NAA技术,分析了不同生产厂家20余种不同CNTs的金属杂质,发现未纯化的CNTs中金属元素含量约30 wt%(质量百分比),纯化后CNTs中杂质元素含量<3 wt%. 中子活化法作为非破坏性的标准定量方法,而ICP-MS作为实用的实验室常规的分析方法,检测灵敏度极高,可达到ppt级以下的超痕量分析. 相关内容于2011年8月作为CNTs纯度鉴定的国际标准,被国际标准化组织ISO和国际电工技术委员会IEC审定颁布为国际标准分析方法(ISO/TS 13278),填补了这个领域内相关国际标准的空白,也是我国首项ISO和IEC纳米技术国际标准,目前已经被全球160多个国家认可并采用为标准分析方法. 不但为我国CNTs的制备、质量控制和应用提

供相应的技术保障,同时也为保证我国在CNTs可控连续化批量技术方面同步于发达国家做出贡献,提升了我国CNTs产品的国际竞争力,具有极为重要的经济效益.

碳纳米管在生理环境中会有大量的金属溶出、释放到溶液中,释放的量与生物微环境的性质和金属种类有关. 含有金属杂质和通过酸处理去除部分金属杂质的CNTs均能产生羟基自由基,羟基自由基与Fe金属杂质的含量呈正相关. Fe在产生羟基自由基的过程中发挥主要作用,能够增加细胞内活性氧的产生进而损伤细胞. 当浓度小于80 $\mu\text{g/mL}$ 时, CNTs对细胞活力没有显著影响^[13]. 不同Fe金属杂质含量的多壁CNTs对PC12细胞的毒性不同,高Fe含量的多壁CNTs对细胞产生明显的毒性效应,表现为活性下降、细胞骨架受损、减少神经突的形成并抑制神经细胞分化^[14].

低Fe金属杂质和高Fe金属杂质的单壁碳纳米管(SWCNTs)对自发性高血压大鼠呼吸系统及心血管系统的影响不同. SWCNTs暴露可造成急剧的肺部损伤,包括炎症、肉芽瘤的形成、碳纳米管肺泡中不均一沉积和支气管细胞的脱落. ET-1, ACE显著性升高说明肺部内皮功能紊乱和外周血管血栓,血清中AST/ALT, LDH, CK的显著性升高说明气管滴注碳纳米管也造成一定的肝损伤和心肌损伤. SWCNTs中金属残留物的存在加剧其诱发的负面效应,过渡金属可以参与Fenton反应,生成自由基,进而通过蛋白质氧化、脂质过氧化、DNA链损伤诱发细胞损伤,所以在研究纳米材料生物学效应时要考虑金属残留物的影响^[15].

3.1.3 发现纳米材料表面性质对生物效应的影响

纳米材料的不同表面修饰可以引起不同的生物学效应及毒性. 不同表面修饰的金纳米颗粒在荷瘤小鼠模型的药代动力学和生物分布情况相似. 聚乙二醇修饰的二氧化硅包被的金纳米棒(AuNR@SiO₂-PEG), BSA修饰的二氧化硅包被的金纳米棒(AuNR@SiO₂-BSA), 牛血清白蛋白修饰的金纳米棒(AuNR-BSA)3种金纳米颗粒主要蓄积在肝脏和脾脏, 3 d后没有明显的代谢;而牛血清白蛋白修饰的金簇(AuNC-BSA)3 d后Au含量明显降低,显示了尺寸依赖的代谢过程. 通过控制纳米载体的表面性质和尺寸大小,能延长其在血液中的循环时间,提高其在肿瘤组织的富集,可以获得一个更安全、更有效的纳米

药物设计方法^[16]。另外,不同表面修饰的金纳米棒(AuNRs)对机体免疫系统具有显著的调节作用,对DNA具有不同的释放能力,从而使其具有截然不同的细胞转染能力。动物活体研究结果显示,只有当金纳米棒表面进行适当修饰后才能显示出良好的佐剂活性。聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDAC)和聚乙烯亚胺(PEI)修饰的Au NRs可以诱导机体体液和细胞免疫应答。而十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)修饰的Au NRs则引起显著的细胞毒性,不能引起有效的免疫应答^[17]。

不同的表面修饰影响细胞对纳米材料的内吞、胞内转运途径以及外排能力。对于PDDAC, CTAB和PEI修饰的Au NRs来说,只有PDDAC-Au NRs表现出最明显的细胞内吞和最小的细胞毒性(图2)^[18]。CTAB-Au NRs可以选择性地定位于肺癌A549细胞的线粒体,降低线粒体膜电势并增加细胞活性氧水平,诱导肿瘤细胞凋亡;而对于正常细胞, Au NRs主要定位于溶酶体并能被细胞外排。这种差异导致肿瘤细胞中Au NRs蓄积于线粒体,从而降低了线粒体膜电位,引起胞内氧化应激水平增加,最终导致细胞死亡^[19]。50 nm的氨基表面修饰的聚苯乙烯(PS)纳米颗粒可以引起细胞周期G1期延迟,下调细胞周期蛋白D和E的表达。同时,与羧基表面修饰的PS纳米颗粒相比,氨基表面修饰的PS破坏细胞膜的完整性,具有更高的细胞毒性^[20]。

未修饰石墨烯能够通过降低线粒体膜电位(MMP)以及增加细胞内的活性氧(ROS),从而激活线粒体途径,触发细胞凋亡^[21];能够刺激巨噬细胞激活依赖于TLR介导的NF- κ B信号通路,分泌Th1和Th2类细胞因子,引起巨噬细胞形态改变,降低细胞粘附性以及吞噬能力^[22]。而氧化石墨烯的生物学效应明显不同。氧化石墨烯光照后,表面产生大量电子-空穴对,降低其含氧量,产生少量单线态氧,同时对各种抗氧化剂表现出强烈的氧化作用。其中光生电子可以促进氧化石墨烯表面含氧基团的还原反应,原位残留的碳中性自由基则会增强氧化石墨烯的抗菌能力。此外,光生空穴具有强氧化性,能够加速细菌中抗氧化分子与氧化石墨烯之间的电子转移,进而破坏细菌的抗氧化系统,同时加速氧化石墨烯材料自身的还原^[23]。

意大利罗马大学Fratoddi等人^[24]认为不同的表面修饰影响细胞对纳米材料的内吞、胞内转运途径以及

外排能力的工作首次阐明(first example)了“材料的毒性是来源于表面的CTAB分子,而非金纳米棒本身”这一长期困扰大家的问题。Dykman和Khlebtsov^[25]大篇幅连续引用,评价此工作是一项深入的研究(in-depth),认为“金纳米材料的表面功能化对细胞摄入和细胞毒性决定性的影响,远大于几何形状;表面快速形成的血液蛋白介导了其细胞内吞过程”,指出纳米材料这一特性对优化设计纳米材料的生物应用具有重要的指导意义。新加坡国立大学副校长、著名生物化学家Halliwell课题组^[26]认为不同表面修饰的金纳米棒选择性地杀死肿瘤细胞的工作对生物医学领域具有“里程碑式意义(exciting milestone towards merging nanotechnology)”。美国范德堡大学Webb和Bardhan^[27]大篇幅图文引用并高度评价该工作“…从根本上推进了细胞器靶向纳米材料的设计(…ultimately advance the design of organelle targeted)”。美国哈佛大学医学院纳米医学中心主任Farokhzad课题组^[28]评价该工作系统阐明了“纳米颗粒的形状、表面修饰、疏水性以及表面蛋白冠的形成都对其细胞毒性有着重要的作用”。

3.1.4 发现纳米材料尺寸对生物效应的影响

纳米材料的尺寸大小可以显著影响其生物学效应及毒性。不同尺寸金纳米颗粒的药代动力学和生物分布情况明显不同。同样表面修饰的情况下,小尺寸的纳米金簇(7 nm)血液半衰期较长,最终主要通过肾脏排出体外,排泄过程中对肾脏有一过性的毒性作用;较大尺寸的纳米金棒(20 nm $\times$ 50 nm)和纳米金球(20和50 nm)则迅速从血液中清除,高浓度蓄积于肝脏、脾脏,基本无法从体内代谢出去,对肝脏造成明显的形态学损伤^[16]。细胞对纳米材料的摄取也存在尺寸选择性。较大的颗粒(>5 μ m)主要通过经典的吞噬作用和巨胞饮作用,而亚微米的颗粒主要通过受体介导的内吞机制,其依赖的受体类型与尺寸有关^[29]。长度较短(0.5~2 μ m)的多壁碳纳米管对类神经元细胞没有明显的毒性效应,可以显著促神经细胞分化。相比于长的多壁碳纳米管,短的多壁碳纳米管明显促进细胞的内吞和外排过程,更容易影响神经生长因子信号通路,进而促进神经细胞的分化^[30]。

碳纳米管的毒性与其长度密切相关。较长的碳纳米管(20~50 μ m)会引起肺泡巨噬细胞分泌更多的TGF- β ,进而作用于成纤维细胞,导致成纤维细胞的增殖,并促进成纤维细胞分泌胶原蛋白,导致肺纤维

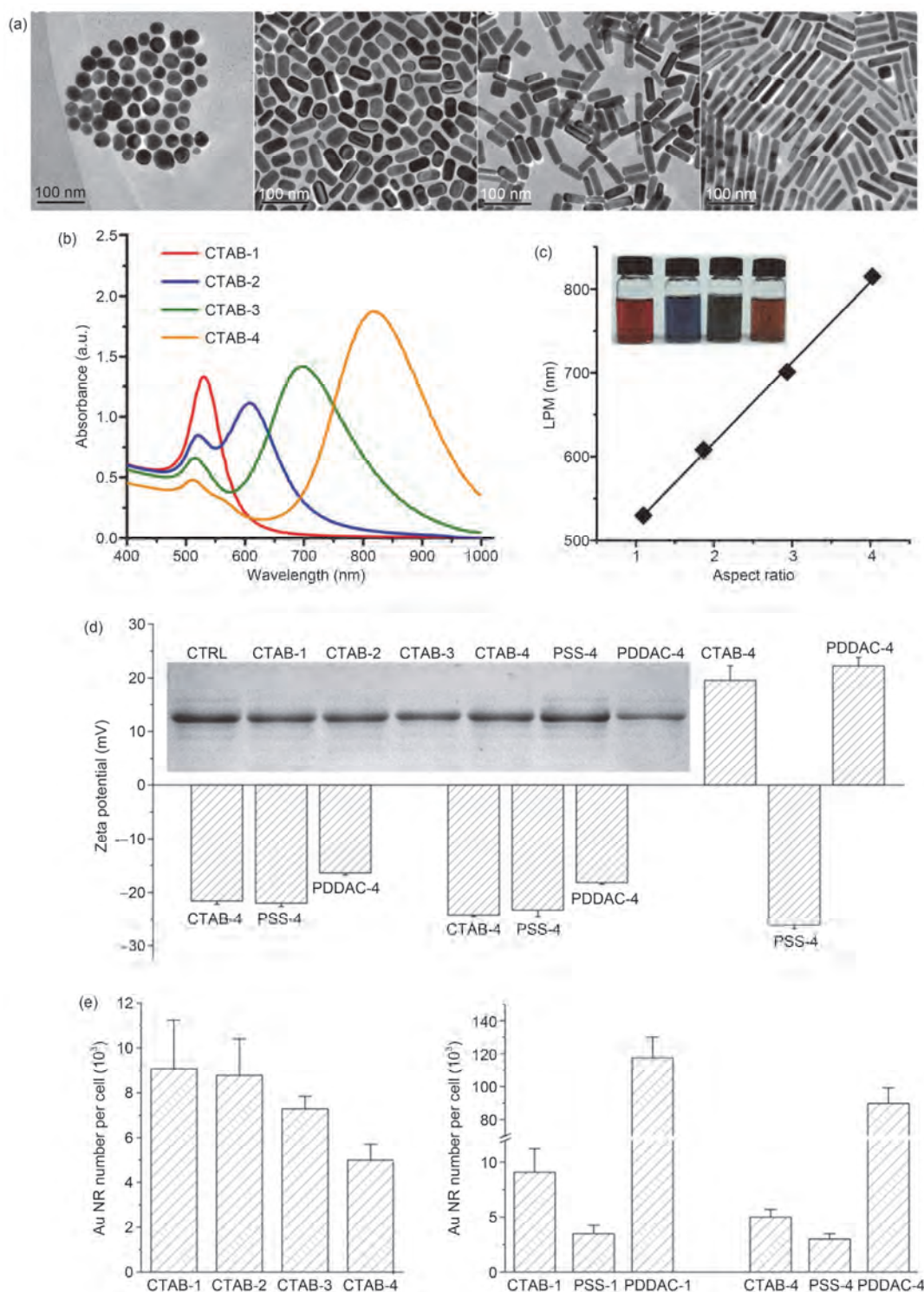


图 2 纳米材料的尺寸、形状与表面性质显著影响碳纳米管的生物学效应^[18]。(a) 不同长径比的纳米金纳米棒的透射电子显微镜(TEM)图;(b) 不同长径比的纳米金纳米棒的吸收光谱;(c) 纵向等离激元最大吸收与ARs之间的关系;(d) 不同纳米结构的形状和表面修饰吸附蛋白不同;(e) 细胞摄入与形状和表面修饰相关

Figure 2 The size, shape and surface properties affect the biological effects of carbon nanotubes significantly^[18]. (a) TEM images of CTAB-coated Au NRs with different ARs. (b) Representative UV-Vis-NIR absorption spectra. (c) The relationship between longitudinal plasmonic maximum and calculated ARs. The straight line is a linear regression of data points. (d) Zeta potentials of as-prepared Au NRs dispersed in aqueous solution. (e) Zeta potentials of AuNRs dispersed in aqueous solution after being incubated with medium with (w/) or without (w/o) newborn calf serum

化。TGF- β /Smad2/collagen III信号通路的激活对于MWCNTs在高血压大鼠中引发肺纤维化具有重要作用^[31]。同时发现较长的碳纳米管不能被巨噬细胞完全吞噬,直接与肺组织中的成纤维细胞以及肺泡上皮细胞发生作用,诱导成纤维细胞的激活,使其高表达肌成纤维细胞相关的蛋白(包括FSP-1, α -SMA等)。通过激活细胞内TGF- β /Smad2信号通路,诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,以及诱导上皮细胞向间质细胞转化^[32]。

3.1.5 发现纳米材料形状和晶体结构对生物效应的影响

形状和晶体结构也是决定纳米材料毒性的关键因素。不同形貌的金纳米颗粒具有相似的药代动力学和生物分布特征。星状和棒状金纳米颗粒都在血液中有较快清除,并且很快在肝脏和脾脏中富集,星状金纳米颗粒的血液半衰期稍大于棒状金纳米颗粒^[33]。乳腺癌细胞MCF-7对不同形状和长径比的金纳米材料的摄取具有形状依赖性,随着长径比增加,细胞摄入的金纳米材料逐渐减少^[18]。调控贵金属纳米材料的晶面可以提高材料的类酶(氧化酶、过氧化物酶)活性,进而调控抗菌效果。类酶模型实验和量子力学计算均表明,高表面能的立方体比低表面能的八面体具有更高的类酶活性。革兰氏阴性菌模型中,由于没有革兰氏阳性菌的细胞壁的阻碍,表面裸露晶面不同的钯纳米材料渗透革兰氏阴性菌细胞膜的速度不同,从而造成材料进入细菌的摄入量存在差异,进而造成抗菌效果的逆转。晶面不同的材料在阴性菌中的分布是不同的,八面体在细菌内分布更高,而在阳性菌中的分布没有体现明显差异,可以通过调控晶面来达到针对不同类型细菌的优化的效果^[34]。

3.1.6 发现纳米材料的降解性能或价态转变对生物效应的影响

纳米材料的降解是研究纳米材料生物学效应需要考虑的一个重要因素。当纳米材料长期蓄积于某个组织或器官,可能会产生毒性作用。但纳米材料在体内降解或价态改变,也有可能对机体产生新的生物学效应。

一直以来,纳米银对人体的健康效应及其化学机制是研究的难点。我们发现,银纳米颗粒可以通过脂筏介导的内吞和不依赖能量的渗透方式进入细胞。银纳米颗粒很快被降解成银离子,随着时间的延长,

细胞不断地摄入银纳米颗粒,降解产生的银离子在细胞内累积。银在细胞内先是以Ag-O-的中间物存在,然后转化成Ag-S-的形式,可能结合在含有SH的氨基酸或多肽分子上。通过加入抗氧化剂和银离子的螯合剂N乙酰半胱氨酸(NAC),可以明显降低银纳米颗粒的细胞毒性,说明银纳米颗粒的毒性主要由银离子的降解和引起的氧化应激引起。不同的表面修饰可降低纳米银的体内蓄积,进而降低其毒性^[35]。借助于同步辐射NanoCT、X射线吸收光谱(XAS)技术,在时间与空间水平上,首次将纳米颗粒的细胞转运与化学转化关联起来;并结合分子与细胞生物学证据,揭示了纳米银细胞毒性的化学机制。纳米银在内吞、降解、外排过程中主要蓄积在细胞核周围的囊泡中,随着降解过程细胞内纳米银逐步降低。纳米银由单质转变为银硫键,后者是诱导细胞毒性的主要形式,导致细胞的氧化应激及线粒体凋亡途径^[36]。而另一种被广泛关注的纳米材料——金纳米棒则在体内长期稳定存在,不会发生降解^[37]。

利用胃肠道模拟液模拟胃肠道环境研究其对银纳米颗粒理化性质和肠道细胞的生物学效应的影响。三种模拟液包括人空腹状态下的胃模拟液(pH 1.6)和肠道模拟液(pH 5.0)以及饮食后的肠道模拟液(pH 6.5)。聚乙烯吡咯烷酮修饰的不同尺寸的银纳米颗粒(30, 50, 100 nm)在空腹的胃模拟液和空腹的肠道模拟液中,出现随时间降低的紫外可见吸收峰和随时间增大的动态水和粒径。银纳米颗粒发生了团聚,并且在纳米颗粒的表面有大量的氯离子,说明银纳米颗粒发生了解离,并且解离出的银离子与溶液中的氯离子结合生成了氯化银沉淀并吸附在银纳米颗粒的表面。在加入少量过氧化氢的条件下,只有在空腹的胃模拟液中,银纳米颗粒产生了很强的羟基自由基的信号,并且羟基自由基的信号强度随着过氧化氢浓度的增加和银纳米颗粒粒径的增大而增大,具有最高的细胞内吞量和最大的细胞毒性^[38]。

3.1.7 其他影响纳米材料生物学效应的因素

我们还关注了其他影响纳米材料生物学效应的因素如化学组成、团聚和分散状态等。

金纳米棒核/银壳纳米结构(Au@AgNRs)和金纳米棒同时孵育原代大鼠颗粒细胞,发现Au@AgNRs可以产生更多的活性氧物质、降低线粒体膜电位并减少三磷酸腺苷的产生。Au@AgNRs促进类固醇生成具备显著的时间和剂量依赖性。Au@AgNR的银离子

释放有助于颗粒细胞的毒性反应^[39]。不同晶型的TiO₂纳米颗粒对脑组织氧化损伤程度不同,均能够在脑组织中沉积,海马区含量最高。沉积的TiO₂纳米颗粒引起脑组织脂质过氧化和蛋白质氧化,增加谷胱甘肽和一氧化氮的释放^[40]。锐钛矿型TiO₂会诱发更明显的毒性效应,随着时间延长,纳米颗粒的沉积增加,通过上调TNF- α 和IL-1 β 的表达引起炎症反应^[41]。

纳米材料的团聚和分散性影响着其在生物微环境中的尺寸和形状,因此也是影响纳米材料毒性的重要因素。大的比表面积和较高的表面能使纳米材料易发生聚集和团聚,形成较大的不均一颗粒。例如,较大的CNTs聚集体沉积在气道,引起肺部损伤和炎症^[13]。因此在评价纳米材料毒性时,必须考虑纳米材料的团聚。

基于中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室十余年的相关工作,以及对此前国际上大量代表性科研成果的调研,我们总结提炼了关键理化特性对纳米材料颗粒动力学行为和对其生物安全性的影响。探讨了纳米材料在体液当中的扩散、沉降和团聚行为及与血液蛋白相互作用过程中纳米特性的影响;在细胞水平上总结了纳米特性对纳米材料在细胞内膜囊泡输运中内吞、细胞内转运及外排的动力学过程的影响;以及对纳米材料生物转化、降解、溶解行为的作用规律;探讨了纳米材料在体内的靶向性、组织器官分布、蓄积、及排泄途径,在体内跨越生物屏障(血脑屏障、肺血屏障、血睾屏障、胎盘屏障、细胞膜)的能力和过程;阐明纳米材料的“性能-颗粒动力学”规律^[29]。

3.2 建立适用于纳米生物效应与安全性评价的多层次模型

传统毒理学研究主要利用哺乳动物、细胞、细菌或植物等作为研究对象,将不可逆转的毒性效应结果作为毒性评价的终点,比如主要针对炎症、凋亡、坏死、纤维化、致畸、致突或致癌等效应表型。但是,由于纳米材料本身独特的理化性质,传统的细胞模型和动物模型已经不能满足纳米材料生物效应研究的需求。对于某一类纳米材料(如碳纳米材料、金纳米材料等),就有广泛的尺寸、形状、化学组成、表面修饰等等,如前所述,所有这些都有可能影响纳米材料的生物学效应与安全性。在考虑生产和使用纳

米材料过程中的危险度评价时,通过哺乳动物一个测试所有的纳米材料,显然是不可行的;而细胞距离生命体特征差距较远。目前,因为缺乏纳米材料危险度评价的标准体系,无法比较不同研究结果。同时,体内、体外结果不一致的矛盾也日益凸显,这就要求大力发展从体外模型、细胞模型、动物模型再到理论模型的多层次毒理学评价模型体系。同时,将预测毒理学引入纳米材料生物效应与安全性评价中,是纳米毒理学的重要进展,可以迅速有效地评估纳米材料潜在危险的筛选方法,同时获取毒理学试验的优先次序。

3.2.1 体外模型

秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)是生物学经典的模式生物,其优势在于既可以从生物个体水平进行研究,又可对其体内的每个细胞进行单独研究,便于从整体、器官、组织、细胞快速、简单、多层次的对纳米材料在生物体内的行为进行研究。基于秀丽线虫模型,研究了量子点(quantum dots, QDs)在线虫体内的分布、代谢、转化和长期毒理效应。发现量子点经摄食进入并积累在秀丽线虫消化系统,定位于消化道内皮细胞的溶酶体,长期蓄积会导致量子点从消化系统向生殖系统迁移,并导致生殖障碍和子代发育毒性^[42]。另外,利用秀丽线虫模型,我们还证实富勒醇可以减缓线虫衰老过程中咽部运动能力的下降、体内脂褐素的积累、下调应激条件下线虫体内的ROS水平、提高线虫的寿命;氧化应激条件下不仅可以提高线虫的存活率,而且可以促进转录因子DAF-16的入核,上调DAF-16下游的应激基因(sod-3, hsp-16.2)^[43]。

3.2.2 计算模型

计算毒理学是现代信息技术与分子生物学的结合,将纳米材料的生物学效应与其物理化学性质进行关联。定量-构效关系建模的应用有助于纳米材料的预测毒理学及其安全设计使用。期望未来可以借助计算机,计算毒理学可能在不预知现有AOP或分子机制的情况下,使用高通量数据和相关的疾病数据就可以迅速有效地预测AOP,从而获取额外毒理试验的优先次序。

多粒径剂量测定(MPPD)模型可用于估计人和大鼠气道中纳米颗粒的剂量,以量化的方式实现风险评估,尤其是对于下呼吸道。例如,空气中的超细颗粒物会在气道中大量沉积,通过肺泡上皮渗透进入

血流, 诱发毒性反应. 不同尺寸的颗粒在呼吸道中具有显著不同的沉积特征. 我们利用精确的体外和体内计算流体动力学模型, 分别在人或大鼠鼻腔的真实3D模型中计算每单位面积的沉积纳米颗粒的定量估计^[44]. 利用计算模拟的方法, 在线切割放电加工车间对纳米颗粒沉积的上呼吸道进行了剂量学研究, 从而评价工业纳米材料的呼吸暴露安全性^[45]. 与车间的背景剂量值相比, 纳米颗粒的质量增加了33倍, 表面积增加了27倍, 工作时间内纳米颗粒剂量增加了8倍. 此外, 粒径分布与粒子沉积速率密切相关. 指出在未来的吸入风险评估中应采用综合指标, 而不仅仅是美国国家职业安全与健康研究所和德国职业安全与健康研究所等监管机构目前采用的单一指标.

纳米材料具有不同的尺寸、形状、化学组成和表面修饰, 所有这些理化性质都可以影响纳米材料的生物效应, 所以预测其带来的风险是非常复杂的. 我们检测了45种不同粒径、长径比、掺杂类型、掺杂浓度和表面的ZnO纳米材料对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)或人肝细胞肝癌细胞(HepG2)的细胞损伤或氧化应激等生物学效应, 初步确定了其构-效关系. 这些实验数据可以用于开发定量和预测计算模型, 将纳米材料的理化特性与细胞活力、膜完整性和氧化应激关联起来, 发现纳米材料的暴露浓度、表面类型、掺杂的性质和程度以及长径比会显著影响其细胞毒性^[46].

同时, 建立纳米材料预测模型研究策略也是非常具有挑战性的. 必须要有大量从材料到终点所有阶段的标准化毒性研究数据, 而且需要以相同的方式进行收集; 同时应设计评估纳米材料物理化学性质的具体而系统的研究方法, 如需要系统评价纳米材料影响其生物活性的多种属性包括电荷、尺寸、表面特性等; 还需要建立一个开放的、用于存储和共享信息的系统, 利于用户共享和访问所有数据, 鼓励科学家广泛参与.

3.3 发展高灵敏、高分辨率的适用于纳米生物效应和安全性的实验技术和研究方法

纳米材料很多情况下是低剂量暴露情况, 例如纳米相关产品中的材料释出或纳米材料生产场所的低剂量呼吸暴露, 这都对纳米毒理学的发展及纳米材料的安全性评价应用提出了更高的要求, 需要配

套发展更精细的、高灵敏、高分辨率的安全性研究方法和最先进的风险评估技术, 建立新型、早期及灵敏的安全性检测评价指标, 以保证其可持续发展.

3.3.1 在将传统毒理学的检测方法应用于纳米材料生物效应和安全性评价的基础上, 建立分层级分子效应标志物

一般毒理学试验主要包括4个阶段, 第1阶段急性毒性试验(主要包括LD50); 第2阶段遗传毒性试验和传统致畸试验; 第3阶段亚慢性毒性试验(~90 d), 繁殖试验和代谢试验; 第4阶段慢性毒性试验(包括致癌试验和代谢动力学试验).

除了利用传统的毒理学研究方法在细胞或动物水平对纳米材料进行毒性鉴别和安全性评估外, 纳米毒理学研究已经提出了新的挑战和要求, 在分子层面对纳米毒性的深入探索可以有效指导纳米产品的安全性设计与合成以减低或消除其环境健康危害. 纳米材料的分子毒理学是从分子水平上研究纳米颗粒与生物机体相互作用的学科, 阐释纳米颗粒的有害结局路径(adverse outcome pathways, AOPs), 探究生物机体对纳米颗粒物结构性质的影响, 即纳米颗粒物的生物转化. 我们从实际安全性评价应用的角度, 将当前毒理学研究中所提倡的替代毒理学方案引入到纳米材料安全性评价中, 并推荐了纳米材料安全性评价的具体执行路线与分层级评价策略, 同时从应用角度, 将高通量筛选、计算毒理学及组学评价技术应用于纳米生物效应与安全性评价中(图3)^[47]. 目前, 通过借鉴传统毒理学的研究方法, 我们对纳米颗粒物的AOPs研究主要集中于以下几个层级:

第一层级是选择合适的分子起始事件(molecular initiating event, MIE), 例如ROS/氧化应激水平、内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress)、Ca⁺变化情况等.

我们证实, 多种金属或金属氧化物纳米材料如Ag^[48], ZnO^[49], TiO₂^[41], Cu和CuO^[50]纳米颗粒均可以通过产生游离的自由基从而诱发氧化应激. 以机体稳态平衡扰动——ER stress作为纳米毒理学早期安全性评价指标的新方法. 以纳米ZnO材料为例, 研究发现细胞在受到低剂量纳米ZnO颗粒刺激下, 可以诱发明显的内质网应激效应, 而内质网应激定量检测本身可以作为测定纳米材料低剂量暴露时的早期、灵敏的安全性评价指标, 可应用于纳米ZnO颗粒物及其他人造纳米材料的安全性评价工作. 同时发现, 在

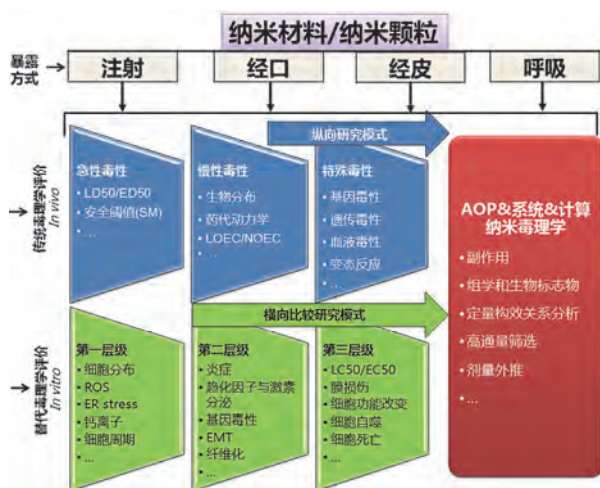


图3 对应传统毒理学安全性评价策略,建立了针对纳米材料的分层次评价策略^[47]

Figure 3 Proposed intelligent analytical strategy for the safety assessment of nanomaterials/nanoparticles compared with the traditional toxicity assessment process^[47]

浓度为1 mg/m³纳米ZnO气溶胶暴露下,成年人呼吸64 min所造成的肺内颗粒沉积,就可诱发肺内明显产生内质网应激效应,相比较美国国家职业安全卫生研究所(NIOSH)给出的ZnO类颗粒物暴露阈值(5 mg/m³气溶胶暴露环境,工人每周工作40 h),此安全性评价检测指标优势明显,且与其他传统评价方法相比,灵敏度更有了进一步的提升。总之,本研究所建立的安全性评价指标——内质网应激,具有灵敏、快速以及早期预警的特点,其在纳米毒理学实验室研究甚至纳米生产现场安全性评价中,都具有很高的应用价值,值得进一步深入研究和探讨^[49]。

通过ER stress评价方法,在体外细胞水平上针对不同来源细胞系进行检测,发现不同细胞系对AgNPs的暴露生物效应差异显著,其中,用呼吸系统细胞系16HBE测得的最低可见效应剂量(lowest observable effect concentrations, LOEC)为1.3 μg/cm²。进一步利用气管滴注AgNPs小鼠暴露,通过检测ER stress及凋亡反应发现不同小鼠脏器敏感性同样区别很大。对动物效应所使用剂量与体外细胞实验获得的剂量值进行了比对,发现动物实验所使用的引起明显效应的剂量4 ng/cm²比体外得到的LOEC值低325倍,提示动物水平安全性评价得到更为严格的剂量效应评价结果,而体外安全性评价数据不能简单地外推作为体内安全剂量结果。我们针对纳米银从安全性评价的本质问题——剂量效应角度进行了详

细探讨,为纳米毒理学研究及各种不同纳米材料的安全性评价工作进行了方法学上的探索^[51]。

第二层级是选择毒性信号通路(toxicity signaling pathways)中的关键因素,例如炎症因子、NF-κB、MAPK、TGF-β等。

ROS是最重要的MIE,我们已经发现纳米颗粒比较大的颗粒更容易产生ROS,并且导致毒性信号通路的激活,例如核因子κB(NF-κB)信号通路和NLRP3炎性小体信号通路。纳米颗粒物一般会与细胞膜受体Toll-Like receptor的相互作用,诱发细胞因子和趋化因子的分泌^[22]。NF-κB是机体调节对感染免疫应答的重要转录因子,可以用于进行纳米材料的风险评估^[8]。如前所述,我们已经证实长的CNTs肺暴露会引起急性和严重的肺损伤,包括氧化应激和炎症^[15]。而续发的心血管效应的亚慢性毒性可能主要由肺免疫毒性反应的间接影响诱发^[52]。NLRP3炎性体主要在巨噬细胞中表达,其活化将导致炎性细胞因子如IL-1β的成熟, NLRP3炎性体通路可用于评估颗粒和纤维的免疫毒性^[53]。这意味着ROS-NF-κB-NLRP3信号传导途径在纳米材料的毒性评估中具有高度优先性。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径控制细胞基本过程,包括增殖、基因表达、分化、有丝分裂、细胞存活和细胞凋亡。主要包含2种调节途径:细胞外信号调节激酶、p38和c-Jun N-末端激酶。后2种MAPK通常对外部刺激和细胞应激具有强烈反应,并且与细胞不良反应如细胞凋亡和炎症密切相关。我们证实,CNTs、石墨烯、富勒醇和一些金属氧化物纳米材料,包括TiO₂和ZnO,均可以通过激活MAPK信号通路,触发细胞凋亡^[21]。

第三层级是选择细胞损伤或恶性转化的相关指标,如细胞周期改变、基因毒性、纤维化、上皮间质转化(EMT)等。

细胞凋亡与坏死是细胞损伤的重要指标。纳米颗粒物与细胞膜接触,与细胞膜脂质分子的相互作用,将引发细胞凋亡与坏死。在进行纳米材料生物效应与安全性评价的最初阶段,可以通过测定乳酸脱氢酶来监测细胞膜的完整性,通过测定细胞活力(如MTT测定用于评估线粒体功能)评估细胞的毒性作用,通过比色测定法定量细胞的死亡(如live/dead试验和台盼蓝染色等),通过膜联蛋白annexin V荧光染色检测细胞的凋亡和坏死。当细胞与纳米材料相互作用时,发生的细胞稳态中断、细胞损伤或细胞死亡

通常是时间和浓度依赖性的,随着时间延长和浓度增加,毒性增强.

纳米颗粒暴露引起的遗传毒性可能与组织纤维化和细胞恶性转化直接相关.由氧化反应产生的DNA加合物和8-OHd G可用作纳米颗粒暴露的经典的遗传毒性标志物.我们证实Ag NPs可以影响细胞的遗传毒性^[32,36].另外利用HPRT基因突变检测方法检测了TiO₂的遗传毒性^[54].同时,研究表明,随着炎症的诱导,长的CNTs可以通过激活TGF- β /Smad信号通路促进成纤维细胞向肌成纤维细胞转化^[31]以及诱导上皮细胞向间质细胞转化^[32],在体内形成明显的肉芽肿.因此,从激活的相关信号传导途径中鉴定分子标志物将有助于纳米材料诱发癌变发生的早期检测.

在多层级评价策略中,高通量筛选越来越显示其重要性,包括毒理学损伤途径、信号通路、细胞膜损伤、器官损伤、细胞凋亡和坏死途径、DNA损伤、致突变性等方面的评估.在基于快速通路的细胞筛选研究中,利用一个或多个上述终点,可以对不同大小、形状、分散性、带隙、表面电荷等材料性能分别进行生物响应测试,以建立纳米材料的性质-活性关系.目前系统生物学方法,特别是组学技术在分子纳米毒理学研究中也发挥着越来越重大的作用.系统生物学方法的优势在于可以对纳米颗粒物引发的生物分子的改变进行系统性的检测.基因组学、蛋白组学、代谢组学已经被用于碳纳米管、二氧化钛、二氧化硅、纳米银等纳米材料毒性机理的研究.但是,尽管组学技术可以鉴定到大量生物分子表达量的变化,但是对于其所对应的AOPs的验证非常有限,主要集中于细胞炎症响应、细胞迁移、细胞凋亡坏死等已知的信号通路.

针对不同纳米材料,建立了高内涵分析技术(high content screening, HCS)及详细的检测实验方法.使用人支气管上皮细胞,针对8种纳米材料,同时检测4种不同生物学效应指标,包括ROS、钙离子的细胞质内的释放变化、线粒体膜电位及溶酶体pH变化,并随后对所得到的结果进行了综合检测分析.研究结果显示纳米材料包括纳米Ag, ZnO, CeO₂及TiO₂等都明显诱发ROS的产生,同时发生剂量相关的膜电位下降和溶酶体pH上调现象,而利用此方法未在24 h处理的细胞中检测到明显的Ca⁺变化情况.继续发展高效、可靠的高内涵分析技术,增加多种指标的获取及结果的综合分析,可以大大提高纳米材料安全性评价的效率.高容量筛选能增进我们对纳米材料

在细胞中产生的生物学现象的认识并完善毒性效应筛选途径.最新的快速通量多参数细胞筛选将是毒理学研究的重要方法.未来数年内的目标是开发和实施新的筛选工具以提高分析效率与速度.

3.3.2 建立了高灵敏和高分辨率的分析方法和分析策略

随着纳米材料定量分析的发展,未来的研究更需要基于纳米-生物体作用过程的特点,发展超高灵敏、超高分辨、原位、非标记、高通量、动态快速检测的新分析方法和分析策略,实现纳米材料的精准定量和准确定位,并动态地获取纳米材料的关键化学结构信息,这些含量、组成及化学结构等时空关联信息将为纳米生物医学的研究提供全方位、真实、可靠的生物学与化学证据.

纳米材料和生物体相互作用的规律研究,尤其是代谢与排泄,是保障纳米材料生物医学应用及在工业等领域安全应用的重要基础科学问题.纳米材料与生物体的相互作用包括吸收、分布、代谢与排泄(absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME)4个主要过程,针对不同过程的特点,需要使用针对性的定量分析方法.(1) 吸收:纳米材料暴露后,首先跨越生物屏障吸收入血,这是一个极为快速的过程,因此,快速、实时成像分析包括超声成像、分子光谱成像、X射线成像等非常适合纳米材料的定量表征.(2) 分布:纳米材料进入生物体,将在生物体内转运、蓄积与组织分布.定量分析研究,既需要考虑分布的动态过程,也需要考虑组织深度的精确定位、极低含量的灵敏检测;因此,既可通过光学、磁共振成像、核成像等方法等定量纳米材料的动态转运过程,也可通过原子光谱(电感等离子耦合质谱等)、同位素标记与示踪、中子活化、同步辐射等高灵敏检测其组织分布.(3) 代谢:不同组织和脏器中的纳米材料通过一系列的物理、化学与生物学过程将逐步被代谢,原位、化学结构分析的定量方法如X射线吸收精细结构谱(XAFS)、高效液相色谱-质谱联用等技术非常适合研究相关过程;通过液体池透射电子显微镜、XAFS与X射线超高分辨成像联用等手段,能够在单细胞、单颗粒水平原位地研究代谢的化学过程与机制.(4) 排泄:经过代谢的纳米材料被机体清除,高分辨、高灵敏的同位素分析、元素成像与定量分析非常适合定量捕捉被排泄的纳米材料及代谢产物(图4)^[55].

基于先进的同步辐射光源的分析技术为纳米毒理学的研究提供了高灵敏的分析表征方法。例如, 基于同步辐射光源的NanoCT分析空间分辨率已达到数十纳米量级, 可用于组织、细胞内纳米材料分布的三维成像。借助于同步辐射NanoCT、X射线吸收光谱(XAS)技术, 在时间与空间水平上首次将纳米颗粒的细胞转运与化学转化关联, 结合分子与细胞生物学证据, 揭示了纳米银细胞毒性的化学机制。由于NanoCT具有高空间分辨、较强的元素分辨能力, 能够实现单细胞内金属纳米颗粒的三维成像; 结合透射电子显微镜, 可以观察到内吞、降解、外排过程中纳米银的三维分布, 发现它们主要蓄积在细胞核周围的囊泡中; 在降解过程中, 细胞内纳米银的信号逐步降低。X射线吸收精细结构(XAFS)谱具有高灵敏的化学形态解析能力, 能表征生物过程中细胞内银元素的化学形态转化; 发现纳米银由单质转变为银硫键, 后者是诱导细胞毒性的主要形式, 导致细胞的氧化应激及线粒体凋亡途径^[36]。同步辐射技术清晰地揭示细胞毒性产生过程中银的化学信息, 为细胞毒性机制的研究提供确凿的科学证据, 可灵敏地反映纳米材料中特定元素在复杂生物、环境样品中的赋存状态, 从而应用于纳米材料的转化与解离研究^[55], 也将为金属及其氧化物等纳米材料毒理学研究提供新方法的借鉴^[56,57]。

软X射线谱学显微成像技术是集合化学衬度显微成像, 形态三维显微成像及透射软X射线近边吸收谱分析于一体的优势成像分析方法。结合软X射线谱学显微光束线站成像技术, 对经过体内和体外不同途径暴露后的免疫细胞摄入的 $\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}$ 的定位和含量进行了观察。通过扫描Gd吸收边附近的能量(200~2000 eV), 获得特征性的近边X射线吸收精细谱(XANES)结构, 选取Gd的吸收边上(1189 eV)及边前(1185 eV)两种能量的X射线对巨噬细胞进行扫描透射成像, 得到了高空间分辨率的能量分布图像。发现巨噬细胞可以摄入大量的 $\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}$, 主要富集于细胞浆内, 随着暴露时间的延长, 摄入量也逐渐增多, 为证实 $\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}$ 直接作用于巨噬细胞提供了最为直观的证据^[53]。同时, 该方法可以用来分析细胞内Gd元素, 具有较高的化学敏感度^[58,59]。由于透射X射线显微术(STXM)的聚焦光斑能达到50 nm以下, 非常有利于细胞内纳米尺度的材料的精细扫描和定位。因此这种具有STXM的高空间分辨能力和适用于XANES研究高化学态分辨能力的成像技术, 是纳米尺度下的结构与功能研究的有力工具。

同时, 基于化学物质的特征能量吸收, 能够在单个细胞水平对纳米材料进行化学形态特异性成像。此外, 由于成像能量低, 还允许对细胞中的纳米材料进行3D成像, 对样品的辐射损伤最小。通过采集和

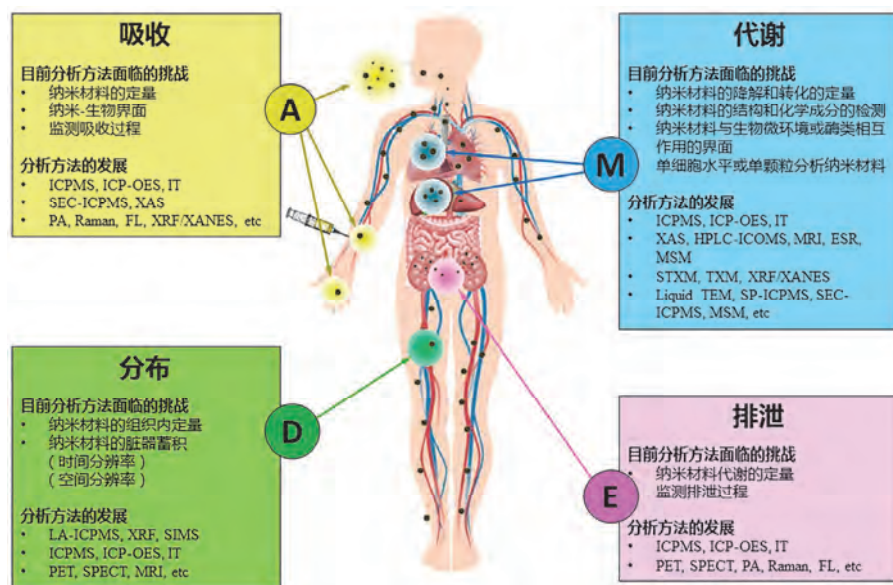


图4 纳米材料的吸收、分布、代谢与排泄过程适用的分析方法与策略^[55]

Figure 4 Diagram of the ADME processes of nanomaterials/nanoparticles *in vivo* and summary of the current challenges for their quantitative analysis^[55]

分析XANES光谱, STXM可用于纳米材料的原位测量, 提供空间分辨的化学信息, 并在小于30 nm的长度尺度上实现化学成像. 通过结合双能量对比X射线显微镜和一个迭代层析成像算法称为等倾斜断层扫描(EST)进行巨噬细胞内 $\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}$ 的三维定量成像, 更加证实主要位于胞浆内, 而在细胞核中未观察到 $\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}$ ^[60]. 该成像技术可用于探测完整的大尺寸细胞内的纳米材料纳米分辨率均匀三维, 可以大大有利于纳米医学和纳米毒理学领域.

另外, 将多种同步辐射技术如X射线原位微区元素成像与化学结构分析技术应用于量子点材料在体内代谢与降解过程的研究. 通过比较量子点荧光的光学成像和量子点组成元素的微束X射线荧光光谱(SR- μ -XRF)成像发现, 位于消化道末端的量子点组成元素Se大量积累. 而光学荧光淬灭, 通过对不同部位的化学价态进行分析(微束X射线近边吸收精细结构谱, μ -XANES)发现, 对于没有表面修饰基团或外壳结构保护的量子点伴随消化过程, 结构不断破坏, 内核元素发生氧化, 导致荧光淬灭, 同时释放有毒重金属离子, 导致毒性. 揭示了量子点在线虫消化系统微环境内降解、氧化和代谢的过程, 提出了理性设计表面修饰或核壳结构对于无机纳米材料安全使用的重要性; 并指出了利用纳米材料光学特性进行分布研究的不可靠性, 提出了集成光学成像、原位元素成像与结构分析、细胞生物学、毒理学等多种方法来研究纳米材料在生物体系内分布代谢等重要问题的系统研究方法^[42].

同步辐射分析技术也是研究“纳米-生物”界面相互作用, 揭示纳米材料生物效应机制的重要手段. 本实验室创新地将同步辐射X射线近边吸收结构谱学技术和分子动力学模拟方法结合, 揭示了金纳米棒与血清白蛋白的结合方式, 研究了金纳米棒-BSA复合体在细胞内的转运和降解过程. 首次实现了“纳米蛋白冠”的具有元素特异、化学形态分辨、高灵敏度的原位和定量分析, 解决了研究“纳米蛋白冠”成键方式、化学结合位点与结合面等方法学难题; 为了深入揭示“纳米蛋白冠”的细胞生物学行为, 建立了基于同步辐射微束X射线荧光光谱分析(SR- μ -XRF)单细胞内纳米颗粒的二维分布的分析方法: 成功检测到纳米材料在单个细胞中与含P, S, Ca等蛋白形成蛋白冠的二维分布, 空间分辨率达到纳米量级、检测灵敏度达到皮克量级, 实现了纳米蛋白冠复合体在细

胞内转运过程的原位成像, 突破了胞内纳米蛋白冠研究的方法学瓶颈, 带动了国际上该领域的深入研究和发 展^[61]. 法国波尔多大学Ortega课题组^[62]评价实验室建立的同步辐射定量解析与原位成像方法为“卓越范例”.

4 总结与展望

纳米材料生物安全性的研究是21世纪前沿科技面临的挑战, 也是各国科学界共同面临的重大科学问题. 纳米毒理学基础研究作为保护人们健康免受纳米材料潜在危害的第一道防线, 依然存在很多问题亟待解决.

纳米毒理学机理研究有待继续深入. 在原有毒理学的理论框架下, 需要引入新的概念和参数, 同时建立新的知识体系. 纳米毒理学研究中, 对于纳米材料的理化性质不应该仅仅局限于考虑其体外状态, 更重要的是应该包括进入机体后纳米材料的性质是否会发生生物/化学变化, 新的代谢产物会进一步影响其生物效应; 此外, 应着重加强纳米材料的机制探讨, 包括其在生命体内的分布和代谢, 与生物大分子的相互作用机制等.

纳米毒理学研究方法学亟待丰富. 迄今为止, 所有传统毒理学实验方法都已经应用于纳米材料的毒理学研究. 然而, 由于纳米材料物理化学性质的特殊性, 除了传统毒理学研究技术外, 一方面许多常规技术需做一些必要的修正, 另一方面, 纳米毒理学需要新的实验研究方法和技术. 同时, 将实验室的研究数据与消费品的安全性指标直接关联必须克服许多重大的知识挑战和技术鸿沟, 其中纳米毒理学检测方法学可能是最重要的方面. 实验室针对单一纳米材料的检测技术, 很多难以直接用于纳米产品的复合体系检测. 从生物分析和化学分析的角度看, 这一新兴学科带来了许多重要的挑战, 尤其是对纳米材料表征技术和生物分析以及化学分析技术的发展, 带来了许多的技术发展的机遇.

纳米技术的快速发展需要配套的安全评估技术和策略来保证其可持续的发展. 基于高通量方法的预测毒理学发展有待加快. 当前, 纳米预测毒理学发展的主要困难包括大批量对纳米材料进行安全性筛选的能力不足, 缺乏用于预测毒性的核心结构-活性关系数据, 无法在一次实验中涵盖所有的潜在有害材料及其性质, 难以对昂贵的动物实验进行优先度

分级, 不考虑总体亚致死和致死剂量响应参数而使用单一响应参数所带来的局限性. 发展高通量和高容量筛选方案, 作为研究纳米材料毒性、危害分级、

区分动物研究、纳米定量构效关系模型以及指导纳米材料的安全设计的通用工具, 可以在保障人类安全的情况下更好地设计并使用纳米材料.

参考文献

- Xu L, Liang H W, Yang Y, et al. Stability and reactivity: Positive and negative aspects for nanoparticle processing. *Chem Rev*, 2018, 118: 3209–3250
- Service R F. Nanomaterials show signs of toxicity. *Science*, 2003, 300: 243
- Zhao Y L, Nalwa S H. *Nanotoxicology: Interactions of Nanomaterials with Biological Systems*. USA, California: American Scientific Publishers, 2007
- Zhao Y L. *Nano-biological Effects* (in Chinese). Beijing: Science Press, 2009, 2010 [赵宇亮. 纳米生物效应系列. 北京: 科学出版社, 2009, 2010]
- Chen C Y, Chen R, Bai R, et al. *Guidelines for Monitoring Exposure to Nanoparticles in Production and Workplace* (in Chinese). Beijing: Science Press, 2015 [陈春英, 陈瑞, 白茹, 等. 生产与工作场所纳米颗粒暴露监测指南. 北京: 科学出版社, 2015]
- Cai R, Chen C Y. Protein corona *in vivo*: Dynamic complement proteins-mediated opsonization and immune modulation. *Sci Bull*, 2017, 62: 976–977
- Ge C C, Du J F, Zhao L N, et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 16968–16973
- Liu Y, Zhao Y L, Sun B Y, et al. Understanding the toxicity of carbon nanotubes. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 702–713
- Monopoli M P, Aberg C, Salvati A, et al. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7: 779–786
- Riehemann K. Nanotoxicity: How the body develops a way to reduce the toxicity of carbon nanotubes. *Small*, 2012, 8: 1970–1972
- Wang X Y, Wang M Z, Lei R, et al. Chiral surface of nanoparticles determines the orientation of adsorbed transferrin and its interaction with receptors. *ACS Nano*, 2017, 11: 4606–4616
- Wang X Y, Wang X F, Wang M Z, et al. Probing adsorption behaviors of BSA onto chiral surfaces of nanoparticles. *Small*, 2018, 14: e1703982
- 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
- 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*, 2013, 313: 49–58
- Ge 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
- Wang J, Bai R, Yang R, et al. Size- and surface chemistry-dependent pharmacokinetics and tumor accumulation of engineered gold nanoparticles after intravenous administration. *Metallomics*, 2015, 7: 516–524
- Xu L G, Liu Y, Chen Z Y, et al. Surface-engineered gold nanorods: Promising DNA vaccine adjuvant for HIV-1 treatment. *Nano Lett*, 2012, 12: 2003–2012
- Qiu Y, Liu Y, Wang L M, et al. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*, 2010, 31: 7606–7619
- Wang L M, Liu Y, Li W, et al. Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: Implications for cancer therapy. *Nano Lett*, 2011, 11: 772–780
- Liu Y X, Li W, Lao F, et al. Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes. *Biomaterials*, 2011, 32: 8291–8303
- Li Y, Liu Y, Fu Y, et al. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials*, 2012, 33: 402–411
- Zhou H J, Zhao K, Li W, et al. The interactions between pristine graphene and macrophages and the production of cytokines/chemokines via TLR- and NF-kappa B-related signaling pathways. *Biomaterials*, 2012, 33: 6933–6942
- Chong Y, Ge C C, Fang G, et al. Light-enhanced antibacterial activity of graphene oxide, mainly via accelerated electron transfer. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 10154–10161
- Fratoddi I, Venditti I, Cametti C, et al. How toxic are gold nanoparticles? The state-of-the-art. *Nano Res*, 2015, 8: 1771–1799

- 25 Dykman L A, Khlebtsov N G. Uptake of engineered gold nanoparticles into mammalian cells. *Chem Rev*, 2014, 114: 1258–1288
- 26 Gruber J, Fong S, Chen C B, et al. Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing. *Biotechnol Adv*, 2013, 31: 563–592
- 27 Webb J A, Bardhan R. Emerging advances in nanomedicine with engineered gold nanostructures. *Nanoscale*, 2014, 6: 2502–2530
- 28 Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, et al. Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 4218–4244
- 29 Zhao F, Zhao Y, Liu Y, et al. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small*, 2011, 7: 1322–1337
- 30 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*, 2013, 9: 1786–1798
- 31 Wang P, Nie X, Wang Y, et al. Multiwall Carbon nanotubes mediate macrophage activation and promote pulmonary fibrosis through TGF-beta/smad signaling pathway. *Small*, 2013, 9: 3799–3811
- 32 Wang P, Wang Y, Nie X, et al. Multiwall carbon nanotubes directly promote fibroblast-myofibroblast and epithelial-mesenchymal transitions through the activation of the TGF-beta/smad signaling pathway. *Small*, 2015, 11: 446–455
- 33 Wang J, Xie Y D, Wang L M, et al. *In vivo* pharmacokinetic features and biodistribution of star and rod shaped gold nanoparticles by multispectral optoacoustic tomography. *RSC Adv*, 2015, 5: 7529–7538
- 34 Fang G, Li W F, Shen X M, et al. Differential Pd-nanocrystal facets demonstrate distinct antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Nat Commun*, 2018, 9: 129
- 35 Jiang X, Miclaus T, Wang L, et al. Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells: Implication for cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 2015, 9: 181–189
- 36 Wang L M, Zhang T L, Li P Y, et al. Use of synchrotron radiation-analytical techniques to reveal chemical origin of silver-nanoparticle cytotoxicity. *ACS Nano*, 2015, 9: 6532–6547
- 37 Wang L M, Li Y F, Zhou L J, et al. Characterization of gold nanorods *in vivo* by integrated analytical techniques: Their uptake, retention, and chemical forms. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396: 1105–1114
- 38 Jiang X M, Wu Y, Gray P, et al. Influence of gastrointestinal environment on free radical generation of silver nanoparticles and implications for their cytotoxicity. *NanoImpact*, 2018, 10: 144
- 39 Jiang X M, Wang L M, Ji Y L, et al. Interference of steroidogenesis by gold nanorod core/silver shell nanostructures: Implications for reproductive toxicity of silver nanomaterials. *Small*, 2017, 13: 1602855
- 40 Wang J X, Chen C Y, Liu Y, et al. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. *Toxicol Lett*, 2008, 183: 72–80
- 41 Wang J X, Liu Y, Jiao F, et al. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology*, 2008, 254: 82–90
- 42 Qu Y, Li W, Zhou Y L, et al. Full assessment of fate and physiological behavior of quantum dots utilizing caenorhabditis elegans as a model organism. *Nano Lett*, 2011, 11: 3174–3183
- 43 Cong W S, Wang P, Qu Y, et al. Evaluation of the influence of fullerene on aging and stress resistance using *Caenorhabditis elegans*. *Biomaterials*, 2015, 42: 78v86
- 44 Dong J L, Shang Y D, Inthavong K, et al. Comparative numerical modeling of inhaled nanoparticle deposition in human and rat nasal cavities. *Toxicol Sci*, 2016, 152: 284–296
- 45 Tian L, Shang Y, Chen R, et al. A combined experimental and numerical study on upper airway dosimetry of inhaled nanoparticles from an electrical discharge machine shop. *Part Fibre Toxicol*, 2017, 14: 24
- 46 Le T C, Yin H, Chen R, et al. An experimental and computational approach to the development of ZnO nanoparticles that are safe by design. *Small*, 2016, 12: 3568–3577
- 47 Chen R, Qiao J, Bai R, et al. Intelligent testing strategy and analytical techniques for the safety assessment of nanomaterials. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410: 6051–6066
- 48 Chen R, Zhao L, Bai R, et al. Silver nanoparticles induced oxidative and endoplasmic reticulum stresses in mouse tissues: Implications for the development of acute toxicity after intravenous administration. *Toxicol Res UK*, 2016, 5: 602–608
- 49 Chen R, Huo L L, Shi X F, et al. Endoplasmic reticulum stress induced by zinc oxide nanoparticles is an earlier biomarker for nanotoxicological evaluation. *ACS Nano*, 2014, 8: 2562–2574
- 50 Zhang L, Bai R, Liu Y, et al. The dose-dependent toxicological effects and potential perturbation on the neurotransmitter secretion in brain following intranasal instillation of copper nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2012, 6: 562–575
- 51 Huo L L, Chen R, Zhao L, et al. Silver nanoparticles activate endoplasmic reticulum stress signaling pathway in cell and mouse models: The role in toxicity evaluation. *Biomaterials*, 2015, 61: 307–315
- 52 Chen R, Zhang L L, Ge C C, et al. Subchronic toxicity and cardiovascular responses in spontaneously hypertensive rats after exposure to

- multiwalled carbon nanotubes by intratracheal instillation. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28: 440–450
- 53 Chen Z Y, Liu Y, Sun B Y, et al. Polyhydroxylated metallofullerenols stimulate IL-1 beta secretion of macrophage through TLRs/MyD88/NF-kappa B pathway and NLRP3 inflammasome activation. *Small*, 2014, 10: 2362–2372
- 54 Chen Z J, Wang Y, Ba T, et al. Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Lett*, 2014, 226: 314–319
- 55 Wang L M, Yan L, Liu J, et al. Quantification of nanomaterial/nanomedicine trafficking *in vivo*. *Anal Chem*, 2018, 90: 589–614
- 56 Liu J, Wang P, Zhang X, et al. Rapid degradation and high renal clearance of Cu₃BiS₃ nanodots for efficient cancer diagnosis and photothermal therapy *in vivo*. *ACS Nano*, 2016, 10: 4587–4598
- 57 He X, Pan Y Y, Zhang J Z, et al. Quantifying the total ionic release from nanoparticles after particle-cell contact. *Environ Pollut*, 2015, 196: 194–200
- 58 Cao M J, Wang P Y, Kou Y, et al. Gadolinium(III)-chelated silica nanospheres integrating chemotherapy and photothermal therapy for cancer treatment and magnetic resonance imaging. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 25014–25023
- 59 Wang J, Liu J, Liu Y, et al. Gd-Hybridized plasmonic au-nanocomposites enhanced tumor-interior drug permeability in multimodal imaging-guided therapy. *Adv Mater*, 2016, 28: 8950–8958
- 60 Yao S K, Fan J D, Chen Z Y, et al. Three-dimensional ultrastructural imaging reveals the nanoscale architecture of mammalian cells. *IUCRJ*, 2018, 5: 141–149
- 61 Wang L M, Li J Y, Pan J, et al. Revealing the binding structure of the protein corona on gold nanorods using synchrotron radiation-based techniques: Understanding the reduced damage in cell membranes. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 17359–17368
- 62 Porcaro F, Roudeau S, Carmona A, et al. Advances in element speciation analysis of biomedical samples using synchrotron-based techniques. *Trac-Trend Anal Chem*, 2017, 1: 1–20

Summary for “纳米生物效应与安全性研究展望”

Development and prospect of biological effects and safety of nanomaterials

Ying Liu & Chunying Chen*

Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety and Center for Excellence in Nanoscience, Chinese Academy of Sciences, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China

* Corresponding author, E-mail: chenchy@nanoctr.cn

Nanomaterials have lots of unique physical and chemical properties, such as quantum size effect, surface effect and macroscopic quantum tunnel effect. The biological effects of nanomaterials might be different from those of bulk materials larger than microns even if their chemical compositions are same. Therefore, the biological effects and safety evaluation results obtained from the bulk materials might not be suitable for the nanomaterials. Since 2003, governments worldwide have initiated the researches on biological effects and safety issues of nanomaterials with increasing financial support. China is one of the earliest countries in the world to carry out researches on biological effects and safety issues of nanomaterials. And some research fields have entered the forefront of the world. The “CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety” established jointly by National Center for Nanoscience and Technology (NCNST) and Institute of High Energy Physics of Chinese Academy of Sciences (IHEP of CAS) was the first professional laboratory focusing on the biological effects and safety of nanomaterials in China.

Scientists in this laboratory have done many in-depth studies of the relationship between the physical-chemical properties and biological responses of nanomaterials. They found several factors which affected the biological effects of carbon nanotubes significantly, such as nanoparticle-Crona, metal impurities, surface, size, shape and so on. They have also established multiple models for hazard recognition and risk assessment. Nanomaterials/nanoparticles (NMs/NPs) are exposed to human beings mostly through four routes, i.e., oral intake, skin contact, inhalation, and intravenous injection. Upon entering the body, NMs/NPs are quickly distributed into specific organs and then metabolized primarily by the liver. The final excretion of NMs/NPs usually occurs in the liver and kidney in the form of urine and feces. In general, the most important issues regarding the absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) processes of NMs/NPs include: (1) Where do and how much NMs/NPs get in (via absorption)? (2) Where do and how much NMs/NPs go (via distribution)? (3) How much, when do, and what form of NMs/NPs remain intact (via metabolism)? (4) Where do, how much, and what form of NMs/NPs stay in the system (via excretion)? At various stages of the ADME processes, the challenges for *in vivo* analysis of NMs/NPs may become largely different. Important analytical methods to resolve the analytical challenges for each absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) process are summarized. The state-of-the-art techniques with high sensitivity and high resolution suitable for safety evaluation have been developed to ensure the sustainable development of nanotechnology, such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), nuclear analysis such as neutron activation analysis (NAA), laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LAICPMS), secondary ion mass spectrometry (SIMS), synchrotron radiation X-ray fluorescence spectroscopy (SRXRF), X-ray absorption spectroscopy (XAS), X-ray fluorescence spectroscopy (XRF), scanning transmission X-ray microscopy (STXM), transmission X-ray microscopy (TXM) and so on. In this review, we summarize these research progresses in recent years.

nanomaterials, nano-biological effect, chemical and physical properties, nanotoxicology

doi: 10.1360/N972018-00857