

# 纳米颗粒物的中枢神经毒性效应

王云<sup>①③</sup>, 丰伟悦<sup>①\*</sup>, 赵宇亮<sup>①②\*</sup>, 柴之芳<sup>①</sup>

① 纳米生物效应与安全性中国科学院重点实验室及核分析技术重点实验室 中国科学院高能物理研究所, 北京 100049;

② 国家纳米科学中心, 北京 100090;

③ 中国科学院研究生院, 北京 100049

\* 通讯作者, E-mail: [fengwy@mail.ihep.ac.cn](mailto:fengwy@mail.ihep.ac.cn), [zhaoyuliang@mail.ihep.ac.cn](mailto:zhaoyuliang@mail.ihep.ac.cn)

收稿日期: 2008-09-02; 接受日期: 2009-01-06

**摘要** 随着纳米科技的迅速发展, 纳米颗粒物的安全性评价备受人们关注, 而由于中枢神经系统有可能是纳米颗粒作用的潜在靶器官, 纳米颗粒的中枢神经毒性效应已成为研究热点. 本文首先总结了纳米颗粒进入中枢神经系统的可能途径, 从生物整体水平和细胞水平分析了纳米颗粒对中枢神经系统的毒性效应研究以及可能的机制. 最后讨论了目前的实验研究中所存在的问题与缺陷, 并对纳米颗粒的中枢神经毒性效应方面的研究方向进行了探讨.

## 关键词

纳米颗粒  
中枢神经系统  
入脑途径  
毒性效应  
毒性机制

## 1 概述

纳米材料由于具有独特的物理化学性质——小尺寸效应、表面效应、量子尺寸效应、宏观量子隧道效应、介电限域效应等, 广泛应用于电子、光学、磁学、能源化工、生物医学、环境保护和纳米微加工技术等各大领域. 随着纳米技术的产业化进程, 纳米材料大规模投入生产并得到广泛应用, 使得人们接触到纳米材料的机会大大提高, 有关纳米材料对人体的健康安全性评价日益受到人们的关注. 目前已有的研究表明纳米颗粒物可经由呼吸道吸入、胃肠道摄入、经皮接触、药物注射等方式进入人体, 并在体内经淋巴、血液循环转运到达全身各个器官, 从而产生潜在的生物毒性效应<sup>[1-4]</sup>.

血脑屏障的高选择性, 能阻止异物进入大脑组织. 但现有的研究显示, 纳米材料由于其小尺寸和高表面活性, 可相对容易地跨越血脑屏障进入大脑, 同时发现纳米颗粒还可沿嗅神经转运, 这就使得由脑和脊髓组成的中枢神经系统有可能成为纳米材料暴

露后的蓄积靶器官<sup>[2-4]</sup>. 虽然目前关于纳米材料的神经生物效应研究尚处于起步阶段, 但已有研究报道显示进入中枢神经系统的纳米颗粒可引起一定的神经毒性效应, 从而导致神经组织损伤<sup>[2-4]</sup>. 一般组织受损后, 可以通过再生进行修复, 而神经元不具有分裂的能力, 虽然有报道显示成人脑内存在少量的神经干细胞可分化为神经元<sup>[5]</sup>, 但神经组织的再生能力仍然非常有限, 故大多神经损伤具有不可逆性. 同时大多数治疗药物不可通透血脑屏障转运入脑从而直接发挥治疗作用, 这就使得对于神经损伤的控制治疗十分困难. 因此对纳米材料的神经毒性效应进行全面详细的评价, 为预防、控制和干预神经疾患的发生提供科学依据, 显得尤为重要.

本文综述了纳米颗粒的中枢神经毒性效应研究进展, 介绍了纳米颗粒进入中枢神经系统的三种可能路径, 对大气纳米颗粒和人造纳米颗粒的神经损伤作用进行了分别讨论, 从细胞水平上分析了小胶质细胞在纳米颗粒的神经生物效应研究中所发挥的

重要作用, 并重点介绍了氧化应激和炎症反应学说解释纳米颗粒的毒性作用机制, 最后对于目前实验研究中存在的问题进行了分析讨论, 提出了针对纳米颗粒的神经毒性效应研究尚待解决的科学问题.

## 2 纳米颗粒进入中枢神经系统的途径

### 2.1 纳米颗粒跨越血脑屏障

纳米材料由于其小尺寸和独特的物理化学特性, 人体暴露后可以逃避宿主防御和吞噬调理作用, 相对容易地跨过生物屏障而进入到循环系统, 经淋巴或血液流动转运至全身各个脏器和组织, 从而产生损伤作用<sup>[6,7]</sup>. 而任何物质由血液进入大脑都必须通过血脑屏障, 血脑屏障因其特殊的结构特点, 具有很高的选择性, 从而阻止异物(微生物、毒素等)的侵入而对大脑发挥保护作用. 但已有大量研究显示, 纳米材料可以跨越血脑屏障而进入中枢神经系统<sup>[8-16]</sup>, 如表 1 所示.

通过模拟人体暴露纳米颗粒的方式, Kreyling 等<sup>[8]</sup>将WKY雄性大鼠吸入暴露于 15 和 80 nm 的<sup>192</sup>Ir 纳米颗粒 1 h, 发现纳米颗粒可从肺组织吸收进入血液循环并转运到脑组织. 当ICR小鼠吸入暴露于 50 nm 荧光磁性纳米材料(FMNP), 4 周后荧光检测显示 FMNP 也可以通过血脑屏障到达脑组织<sup>[9]</sup>. 我们实验室通过支气管灌注 22 nm 的<sup>59</sup>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>颗粒于SD雄性大鼠, 发现<sup>59</sup>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>纳米颗粒可穿越肺血屏障进入系统循环, 并转运至脑组织<sup>[10]</sup>. 同时采用灌胃法研究 25、80 和 155 nm TiO<sub>2</sub>在ICR小鼠体内的分布和毒性, 单次给药剂量为 5g/kg 体重, 2 周后观察到TiO<sub>2</sub>暴露组小鼠脑内的Ti含量明显升高<sup>[15]</sup>. 比较研究腹腔注射、皮下注射、灌胃和静脉注射四种给药方式下<sup>125</sup>I标记的羟基化单壁碳纳米管(<sup>125</sup>I-SWNTols, 直径 1.4 nm)在雄性KM小鼠内的代谢分布, 四种给药方式下都可在鼠脑内观测到少量的<sup>125</sup>I-SWNTols, 且其含量不受给药方式影响<sup>[16]</sup>. 说明纳米颗粒经呼吸暴露、消化道摄入、注射等方式进入生物体后, 可以进入血液循环, 并跨越血脑屏障进入脑组织.

正是由于纳米材料的小尺寸和高表面活性, 可相对容易跨越血脑屏障, 科学家们开始考虑将纳米材料进行一定的表面修饰, 提高其跨越血脑屏障的能力, 从而可以利用纳米颗粒来辅助进行脑部疾病

治疗和诊断. Lockman等<sup>[11]</sup>将Fischer-344 雄性大鼠经左侧颈动脉插管, 按 10 mL/min泵入纳米颗粒 [<sup>3</sup>H]thiamine-NPs和[<sup>3</sup>H]NPs(直径 67 nm, 浓度 20 μg/mL)5~120 s, 纳米颗粒可跨越血脑屏障进入大脑, 并不损伤血脑屏障完整性, [<sup>3</sup>H]thiamine-NPs比[<sup>3</sup>H]NPs更易通过血脑屏障进入大脑, 且其转运模式与硫酸通过血脑屏障的方式相同. 将 BALB/c 雌性小鼠经尾静脉注射 5 mg/kg 的<sup>111</sup>In 标记的硫酸或 PEG 包被的纳米材料(直径 67 nm), 注射 2 和 6 h 后检测发现脑组织中有大量<sup>111</sup>In 放射性存在, 说明硫酸或 PEG 包被的纳米颗粒可转运到大脑, 且进入脑组织的量无明显差异. 将磁性纳米颗粒用二氧化硅包被后标记荧光素罗丹明 B 异硫氰酸盐(MNPs@SiO<sub>2</sub> (RITC), 50 nm), 经腹腔注于 ICR 雄性小鼠 4 周, 在大脑观测到大量的纳米颗粒存在, 研究显示 MNPs@SiO<sub>2</sub>(RITC)能够穿透血脑屏障而不影响血脑屏障完整性<sup>[14]</sup>. 纳米颗粒经改性处理后, 可明显改善其跨越血脑屏障的能力, 进入脑组织内的纳米颗粒含量大大提高, 具有一定的应用价值, 但同时需要进一步研究进入脑组织内的纳米颗粒将会如何代谢分布, 并是否会发挥神经损伤作用, 以确保其应用安全性.

### 2.2 鼻腔黏膜摄入纳米颗粒至嗅球, 经嗅神经转运

纳米颗粒除跨越血脑屏障转运入脑外, 还可沿神经转运. 已有研究证实, 经嗅神经转运外来物质进入中枢神经系统的途径是存在的<sup>[17-19]</sup>. 呼吸暴露纳米材料后, 在鼻腔部会有大量的纳米颗粒沉积, 人们开始关注鼻腔沉积的纳米颗粒是否也可经嗅粘膜上皮转运到达嗅球, 并经嗅神经转运入脑. Bodian 和 Howe<sup>[20,21]</sup>于 1941 年首先报道了鼻腔滴注 30 nm 的脊髓灰质炎病毒(polio virus)可经嗅神经转运入猴脑, 其传输速度可达 2.4 mm/h. 之后 de Lorenzo<sup>[22]</sup>在 1970 年报道了鼻腔滴注 50 nm 的金颗粒于松鼠猴后, 同样发生了嗅神经转运, 传输速度为 2.5 mm/h.

近期的研究报道显示, 将 Fischer 344 雌性大鼠呼吸暴露于 133 μg Ag/m<sup>3</sup> (颗粒浓度 3×10<sup>6</sup>/cm<sup>3</sup>, 颗粒直径 15 nm) 6 h 后, 用 ICP-MS 测试发现鼻腔(尤其是鼻腔后部)有大量的 Ag 颗粒蓄积, 嗅球及大脑内也检

表 1 纳米颗粒跨越血脑屏障进入脑组织的研究报道<sup>a)</sup>

纳米材料	研究对象	暴露方式	研究方法	研究结果	文献
15、80 nm <sup>192</sup> Ir颗粒	WKY 雄性大鼠	吸入	γ谱仪测定组织中 <sup>192</sup> Ir放射性活度	<sup>192</sup> Ir纳米颗粒可经肺组织吸收进入血循环, 并转运到脑组织	[8]
50 nm 荧光标记的磁性纳米颗粒(FMNPs)	ICR 小鼠	吸入	脑核磁共振成像(MRI)与激光共聚焦显微镜(CLSM)成像分析	FMNPs 可以通过血脑屏障, 并在脑组织观察到明显增多的 FMNPs	[9]
22 nm <sup>59</sup> Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 颗粒	SD 雄性大鼠	支气管灌注	高纯锗γ谱仪测定组织中 <sup>59</sup> Fe放射性活度	脑组织内观察到少量 <sup>59</sup> Fe, <sup>59</sup> Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 纳米颗粒可穿越肺血屏障进入系统循环, 并转运至脑组织	[10]
67 nm <sup>3</sup> H标记的未包被或硫胺包被的纳米颗粒([ <sup>3</sup> H]NPs、[ <sup>3</sup> H]thiamine-NPs)	Fischer-344 雄性大鼠	颈动脉注射	γ谱仪测定组织中 <sup>3</sup> H放射性活度	二种纳米颗粒都可迅速跨越血脑屏障进入大脑, 同时并不损伤血脑屏障完整性。但[ <sup>3</sup> H]thiamine-NPs进入脑组织的含量明显高于[ <sup>3</sup> H]NPs, 且其转运模式与硫胺通过血脑屏障的方式相同	[11]
67 nm <sup>111</sup> In标记的硫胺或聚乙二醇包被的纳米颗粒([ <sup>111</sup> In]thiamine-NPs、[ <sup>111</sup> In]PEG-NPs)	BALB/c 雌性小鼠	尾静脉注射	γ谱仪测定组织中 <sup>111</sup> In放射性活度	二种纳米颗粒都可迅速跨越血脑屏障进入大脑, 同时并不损伤血脑屏障完整性, 比较其进入脑组织的含量, 二种纳米颗粒之间并无明显差异	[11]
10~30 nm 直径, 2~3 μm 长径骨架碳为富集 <sup>13</sup> C的单壁碳纳米管( <sup>13</sup> C-SWNT)	KM 雄性小鼠	尾静脉注射	同位素质谱仪测定 <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C 比	脑组织内观测到一定含量的 <sup>13</sup> C, 说明 <sup>13</sup> C-SWNT转运进入大脑	[12]
21 nm SiO <sub>2</sub> 包被的CdSeS量子点	ICR 雄性小鼠	尾静脉注射	ICP-MS测定组织中 <sup>111</sup> Cd含量	脑组织内观测到少量的 Cd, 说明量子点转运进入大脑	[13]
50 nm 罗丹明 B 异硫氰酸盐标记的二氧化硅包被的磁性纳米颗粒 [ MNPs@SiO <sub>2</sub> (RITC)]	ICR 雄性小鼠	腹腔注射	激光共聚焦显微镜 (CLSM)成像分析	脑组织内观测到大量的荧光纳米颗粒存在, MNPs@SiO <sub>2</sub> (RITC)能够穿透血脑屏障同时不影响血脑屏障完整性	[14]
25、80、155 nm TiO <sub>2</sub> 颗粒	ICR 小鼠	灌胃	ICP-MS 测定组织中 Ti 含量	TiO <sub>2</sub> 暴露组小鼠脑内的Ti含量明显升高	[15]
1.4 nm <sup>125</sup> I标记的羟基化单壁碳纳米管( <sup>125</sup> I-SWNTols)	KM 雄性小鼠	腹腔注射、皮下注射、静脉注射、灌胃	γ谱仪测定组织中 <sup>125</sup> I放射性活度	四种暴露方式下都可在鼠脑内观测到少量的 <sup>125</sup> I-SWNTols, 其含量不受暴露方式影响	[16]

a) 英文缩写摘自引用文献

测到少量的 Ag, 说明 Ag 纳米颗粒经嗅神经发生了转运<sup>[23]</sup>. Oberdörster 等<sup>[24]</sup>研究雄性 Fischer 344 大鼠吸入 36 nm  $^{13}\text{C}$  颗粒( $160\ \mu\text{g}\ ^{13}\text{C}/\text{m}^3$ )6 h 后, 观察大鼠肺、嗅球、大脑、小脑中的  $^{13}\text{C}$  浓度在暴露 1、3、5、7 天内的变化情况, 结果显示肺中  $^{13}\text{C}$  从  $1.39\ \mu\text{g}/\text{g}$  下降至  $0.59\ \mu\text{g}/\text{g}$ , 而嗅球中  $^{13}\text{C}$  从  $0.35\ \mu\text{g}/\text{g}$  上升至  $0.43\ \mu\text{g}/\text{g}$ , 大脑和小脑中的  $^{13}\text{C}$  浓度也有所升高, 但随时间变化趋势不一, 可能是受到血脑屏障的影响, 肺部的  $^{13}\text{C}$  转运入脑受限, 同时嗅球内的部分  $^{13}\text{C}$  缓慢转运到大脑和小脑. 该研究结果显示经嗅球途径转运是  $^{13}\text{C}$  纳米颗粒进入大脑的重要机制之一.

另外, Elder 等<sup>[25]</sup>将 Fischer 344 雄性大鼠呼吸暴露于 30 nm 氧化锰颗粒( $\sim 500\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ ;  $18 \times 10^6$  颗粒/ $\text{cm}^3$ )6 h/天, 每周 5 天, 暴露 12 天后嗅球内 Mn 含量增加 3.5 倍, 在纹状体、额叶皮质和小脑内也观察到 Mn 含量增加. 当堵塞大鼠右侧鼻孔进行暴露实验, 则仅在左侧嗅球观察到 Mn 含量升高. 研究表明吸入纳米氧化锰颗粒可以经嗅球途径转运至中枢神经系统.

以上的研究显示, 经嗅神经转运是纳米材料进入中枢神经系统的可能途径之一. 但由于大鼠具有和人明显不同的生理和解剖特点, 这就使得实验动物的结果外推到人存在一定的局限性. 首先, 大鼠只能通过鼻腔呼吸, 而人除鼻腔外还可通过口呼吸; 其次, 大鼠嗅黏膜上皮占鼻腔黏膜上皮总面积的 50%, 而人体仅占 5%; 再则, 相对于自身体重, 人体的嗅球比重为  $168\ \text{ng}/70\ \text{kg}$  体重, 而大鼠的嗅球比重为  $85\ \text{ng}/0.2\ \text{kg}$  体重, 是人体的 177 倍<sup>[4]</sup>. 说明人体经嗅神经通路转运纳米颗粒入脑, 相比大鼠而言似乎更困难, 其转运的纳米颗粒数量也更少. 但这并不能排除其存在可能性, 且在灵长类动物观察到嗅球通路转运纳米颗粒<sup>[20-22]</sup>, 这就更加增强了经鼻腔黏膜摄入纳米颗粒至嗅球, 并经嗅神经转运纳米颗粒的途径在人体的存在可能性.

## 2.3 经感觉神经末梢直接摄入及神经转运

除嗅神经转运外, 由三叉神经发出的感觉神经末梢贯穿于鼻腔黏膜及嗅黏膜, 呼吸暴露后鼻腔沉积的纳米材料可直接经末梢神经转运入脑. Hunter 和 Dey<sup>[26]</sup>研究 Fisher-344 雄性大鼠鼻腔滴注 20~200 nm

罗丹明荧光染料标记的乳胶微球, 发现乳胶颗粒可经眼支和上颌支神经元摄入并转运到三叉神经节. 随后 Hunter 和 Udem<sup>[27]</sup>给豚鼠气管滴注同样的纳米颗粒, 研究显示乳胶颗粒积聚在支气管上皮组织内, 且不能迁移至基底膜, 而广泛分布在支气管区域的感觉神经可摄入乳胶颗粒, 并将其转运至颈部的迷走神经结状神经节.

关于经感觉神经摄入并转运纳米颗粒的报道虽不多, 但其重要性不容忽视. 流行病学调查结果显示, 心血管疾病的发生和大气颗粒物暴露之间存在一定的相关性<sup>[28-30]</sup>, 但具体的原因尚不明确. 从已知的研究结果可以提出一个可能的假设机制: 进入呼吸道的大气超细颗粒物可被位于该区域的感觉神经末梢摄入并转运至自主神经系统, 从而发挥直接损伤作用, 导致自主神经功能紊乱, 进而引发心血管疾病<sup>[31]</sup>. 因此, 纳米颗粒进入中枢神经系统的转运途径, 以及纳米颗粒在转运过程中对神经纤维的损伤作用, 对正常神经元及神经功能的影响, 值得人们继续深入研究与探索.

## 3 纳米颗粒的中枢神经毒性效应

### 3.1 体内实验研究纳米颗粒引发的神经系统损伤

目前对于纳米颗粒的神经生物效应研究, 可根据纳米颗粒的来源不同而分为二类: 一类是针对天然来源的纳米颗粒, 如柴油、汽油等燃烧后产生的大气超细颗粒物( $\text{PM}_{0.1}$ , 粒径  $<100\ \text{nm}$ , 也称大气纳米颗粒物)进行神经毒性效应研究; 另一类是研究人工制造的新型纳米颗粒物对神经系统的生物学作用, 如碳纳米管、富勒烯、量子点、金属及其金属氧化物纳米材料等.

#### 3.1.1 大气纳米颗粒物暴露引发的神经系统炎症反应

关于大气纳米颗粒物与中枢神经系统疾病之间的相关性, 已有大量研究报道<sup>[32-39]</sup>. 长期暴露于大气污染环境中, 肺部炎症因子可以进入血液循环系统引发系统性炎症反应, 从而诱导中枢神经系统炎症发生. 同时大气纳米颗粒物进入中枢神经系统, 发挥直接损伤作用, 导致神经病变. 其机制可能是超细颗粒引起大脑组织产生氧化应激, 诱导脑部炎症反应, 从



而增加了神经变性疾病的易感性<sup>[32]</sup>。

Calderón-Garcidueñas 等比较研究了暴露于空气污染严重和空气质量相对良好的城市内的狗的脑组织的病理变化, 发现大气污染对大脑具有损伤作用<sup>[33,34]</sup>。研究发现生活在重污染城市内的狗, 鼻咽部和呼吸道黏膜首先发生损伤, 肺组织病变严重, 脑组织部也发生明显病理变化, 如脑组织内神经元高表达核转录因子NFκB; 在脑血管内皮细胞、胶质细胞、神经元大量表达iNOS; 嗅球海马区观察到大量AP位点, 提示发生了DNA损伤; 在脑血管内皮细胞、胶质细胞高表达环氧化酶-2(COX-2); 脑血管、胶质细胞和神经元观察到大量载脂蛋白E(ApoE); 在神经元和脑病变斑块内发现淀粉样前体蛋白APP和β-淀粉样蛋白的表达; 血脑屏障发生损伤。当对生活在高污染城市内的居民进行尸检, 同样在人脑组织中观察到类似的病理变化<sup>[35,36]</sup>。说明长期暴露于大气污染环境中, 可诱使脑部发生炎症反应和淀粉样病变, 引起神经功能紊乱。随着疾病的进一步恶化, 可促使神经元斑形成和发生神经纤维缠结, 最终导致阿尔茨海默病的发生。而大气超细颗粒广泛沉积于肺泡引起严重的炎症反应, 及颗粒经鼻粘膜转运导致嗅球损伤, 在大气污染引发脑损伤方面发挥重要作用<sup>[33-36]</sup>。

为了进一步说明大气纳米颗粒物与神经组织病变的关系, Campbell等<sup>[37]</sup>通过给BALB/c雄性小鼠每日鼻腔滴注卵清蛋白以提高动物对损伤的敏感性后, 将小鼠呼吸暴露于正常大气环境和颗粒浓度含量较高的大气环境中(颗粒直径小于2.5 μm或180 nm) 4 h/天, 每周5天, 2周后取脑组织检测发现大气颗粒暴露组的IL-1α和TNF-α、NF-κB表达水平明显上升。说明大气颗粒暴露能引发神经组织炎症反应, 从而导致神经疾病发生。van Berlo等<sup>[38]</sup>将雄性Fischer F344大鼠呼吸暴露于含1.9 mg/m<sup>3</sup>柴油机废气颗粒(直径65 nm)的大气环境中2 h, 分别于暴露后4和72 h处死动物取脑垂体、下丘脑、嗅球、嗅结节、大脑皮质和小脑, qRT-PCR法提取RNA研究血红素氧化酶(HO-1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧化酶-2(COX-2)和细胞色素P450 1A1(CYP1A1)表达水平。发现短期暴露柴油机废气颗粒后脑组织内HO-1、COX-2和CYP1A1表达水平明显升高。大量的前炎症因子表达

水平升高, 启动神经组织内炎症反应发生, 造成神经系统功能损伤。

以上的研究表明, 大气纳米颗粒经吸入进入生物体后, 主要通过引起机体脑部组织的炎症反应, 进而导致神经功能损伤。

### 3.1.2 人造纳米材料与神经损伤

人造纳米材料的广泛使用, 大大增加了人体暴露于纳米颗粒物的机会。研究显示, 人造纳米材料的暴露同样可以导致中枢神经系统的毒性。人造纳米材料富勒烯(C<sub>60</sub>)可形成水溶胶nC<sub>60</sub>, 具有亲脂性和氧化还原活性, 生物体暴露于C<sub>60</sub>可引起氧化损伤。Oberdörster<sup>[39]</sup>将大口黑鲈暴露于四氢呋喃C<sub>60</sub>溶胶(nC<sub>60</sub>)环境中, 通过检测脂质过氧化、蛋白氧化和GSH水平来评价C<sub>60</sub>对鱼脑的氧化损伤作用。结果显示暴露于0.5 μg/mL C<sub>60</sub>水溶胶(nC<sub>60</sub>)48 h后, 大口黑鲈脑部发生明显的脂质过氧化, GSH水平显著下降。且由于nC<sub>60</sub>的杀菌活性, 水透明度增高。之后Zhu等<sup>[40]</sup>比较研究了将C<sub>60</sub>分别溶解于四氢呋喃(THF)和水中, 对大型蚤和黑头软口鲮(Fathead Minnows)的毒性作用。染毒48 h, THF-nC<sub>60</sub>作用于大型蚤的LC<sub>50</sub>为0.8 μg/mL, 而H<sub>2</sub>O-nC<sub>60</sub>的LC<sub>50</sub>>35 μg/mL。在0.5 μg/mL的染毒浓度下, 黑头软口鲮暴露于THF-nC<sub>60</sub>中6~18 h就可全部死亡, 而H<sub>2</sub>O-nC<sub>60</sub>处理48 h却未发现死亡现象发生, 但在鱼脑和腮部检测到明显脂质过氧化, 肝组织CYP2同工酶表达显著上升。说明溶解介质对C<sub>60</sub>的生物活性有一定的影响, C<sub>60</sub>可导致水生鱼类的脑组织发生脂质过氧化, 造成氧化损伤。

鼻腔滴注14和95 nm的碳黑颗粒于BALB/c雄性小鼠, 每周滴鼻一次, 每次125 μg纳米碳黑颗粒, 四周后取嗅球和海马组织, 用RT-PCR方法研究细胞因子和趋化因子的mRNA表达水平。研究发现鼻腔滴注14 nm碳黑颗粒的小鼠嗅球组织中, 细胞因子(IL-1β和TNF-α)、趋化因子(单核细胞趋化蛋白-1/CCL-2和巨噬细胞炎症蛋白1α/CCL-3)、趋化因子配体(干扰素-γ诱导单核因子/CXCL-9)的mRNA表达水平明显升高, 而在海马组织并无明显改变<sup>[41]</sup>。Lockman等<sup>[42]</sup>给雄性Fischer-344大鼠左侧颈动脉插管, 接蠕动泵以10 mL/min的速度经颈动脉泵入[<sup>3</sup>H]

标记的各种纳米颗粒悬液(纳米颗粒浓度为 10 和 20  $\mu\text{g/mL}$ )60 s 后, 比较研究表面电荷不同的纳米颗粒对血脑屏障功能的影响. 研究显示, 表面电荷显中性的纳米颗粒(neutral-NPs)和低浓度的表面带负电纳米颗粒(anionic-NPs)不影响血脑屏障功能, 而高浓度带负电纳米颗粒(anionic-NPs)和表面带正电荷纳米颗粒(cationic-NPs)可明显破坏血脑屏障的完整性.

采用灌胃法研究 25、80 和 155 nm  $\text{TiO}_2$  在 ICR 小鼠体内的分布和毒性, 发现  $\text{TiO}_2$  暴露 2 周后导致了小鼠轻微的脑部损伤, 海马神经元发生脂肪变性<sup>[15]</sup>. 将 Fischer 344 雄性大鼠呼吸暴露于 30 nm 氧化锰颗粒( $\sim 500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ;  $18 \times 10^6$  颗粒/ $\text{cm}^3$ )6 h/天, 每周 5 天, 暴露 11 天就可在嗅球、大脑皮质、中脑、纹状体和小脑组织观察到  $\text{TNF-}\alpha$ 、巨噬细胞炎症蛋白(MIP-2)、GFAP、神经细胞黏附分子应激反应蛋白的 mRNA 水平表达明显升高, 其中以嗅球内含量最高,  $\text{TNF-}\alpha$  蛋白可升高 30 倍. 显示吸入纳米氧化锰颗粒引起各个脑区的炎症反应的发生<sup>[25]</sup>. 我们实验室<sup>[43]</sup>采用长期低剂量(130  $\mu\text{g}$ )鼻腔滴注 21 和 280 nm  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  于 CD-1 雄性小鼠, 研究纳米氧化铁的神经毒性效应. 结果显示  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  暴露组的小鼠脑组织发生明显的氧化应激, 其中嗅球和海马组织内 GSH-Px、CuZn-SOD 和 cNOS 活性明显升高, T-GSH 和 GSH/GSSG 水平显著性下降, 而在大脑皮质、小脑和脑干组织内变化不明显; 海马区还观察到单胺类神经递质含量升高; 21 nm 暴露组脑组织损伤水平明显高于 280 nm. TEM 显示神经细胞超微结构改变, 21 nm  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  暴露组小鼠嗅球神经突起变性、膜性结构破坏和溶酶体增多, 海马粗面内质网轻度扩张和溶酶体增多; 而 280 nm 暴露组细胞形态损伤相对轻微, 仅在嗅球区可见轻度肿胀的线粒体, 在海马胞浆中可见少量空泡. 说明鼻腔滴注纳米氧化铁可诱导脑组织发生氧化应激, 并导致神经细胞损伤, 且具有纳米尺寸效应, 小尺寸纳米颗粒导致的神经损伤作用更严重.

总而言之, 人造纳米颗粒对神经系统的损伤作用类似于大气纳米颗粒, 并因纳米颗粒的小尺寸和大比表面积, 具有很高的表面反应活性, 当其进入生物体后, 首先引起神经组织发生氧化应激反应, 进而引发炎症反应, 导致神经组织损伤.

## 3.2 体外实验研究纳米材料的神经生物学效应

### 3.2.1 神经细胞摄入纳米颗粒及其在亚细胞器内的分布

纳米材料因其小尺寸和高比表面积活性, 能被细胞内化而分布于各亚细胞器内. Garcia-Garcia 等<sup>[44]</sup>将 166 nm  $^{14}\text{C}$ -PHDCA 和 171 nm  $^{14}\text{C}$ -PEG-PHDCA( $^{14}\text{C}$  标记的聚乙二醇包覆的聚十六烷基氨基丙烯酸酯)按 20  $\mu\text{g/mL}$  的剂量分别暴露于大鼠脑血管内皮细胞(RBEC)20 min, 结果显示 80% 的 PHDCA 吸附在细胞膜表面, 只有 10% 左右 PHDCA 进入到细胞浆和囊泡内; 而 PEG-PHDCA 相对容易进入细胞, 48% 吸附在细胞膜表面, 24% 在细胞浆内, 20% 在细胞囊泡内, 8% 在细胞核、细胞骨架和胞膜窖内, 内吞作用是 PEG-PHDCA 纳米颗粒进入细胞的主要方式. 同时用荧光染液尼罗红标记 PEG-PHDCA 纳米材料, 按 20  $\mu\text{g/mL}$  的剂量暴露于 RBEC 20 min, 共聚焦显微镜观察显示 RBEC 细胞浆内和细胞核周表现高荧光强度, 提示大量 PEG-PHDCA 纳米颗粒进入大鼠脑血管内皮细胞.

Cengelli 等<sup>[45]</sup>将葡聚糖修饰的超顺磁性氧化铁纳米颗粒 SPIONs(Endorem 和 Sinerem, 水合粒径分别为 80~150, 15~30 nm)分别暴露于 EC219 大鼠脑血管内皮细胞、N9 和 N11 小鼠小胶质细胞 2~24 h, 测定细胞内含铁量的变化, 结果显示, 只有 N11 小胶质细胞内含铁量上升, 而 EC219 和 N9 细胞内含铁量无明显变化. 随着 Endorem 暴露剂量和暴露时间的增加, N11 细胞内铁含量逐渐缓慢增大, 脂多糖处理活化 N11 小胶质细胞可增加其摄入 Endorem 含量; 而 Sinerem 暴露只在低剂量水平促使 N11 细胞内含铁量上升, 将 EC219 分别与 N9、N11 小鼠小胶质细胞共培养, 并用脂多糖处理活化小胶质细胞, 细胞内含铁量都无明显变化. 说明脑来源细胞对葡聚糖修饰 SPIONs 的摄入水平较低并摄入缓慢. 比较研究各种聚乙烯醇包覆的 SPIONs(PVA-SPIONs、氨基 aminoPVA-SPIONs、羧基 carboxyPVA-SPIONs、硫醇 thiolPVA-SPIONs; 水合粒径 30 nm)的生物效应, 发现只有表面带正电荷的 aminoPVA-SPIONs 可被 N11 小鼠小胶质细胞和 EC219 大鼠脑血管内皮细胞摄入, 但 EC219 摄入 aminoPVA-SPIONs 的水平低于

N11 细胞, 且随着暴露剂量和时间的增加, 细胞内铁含量逐渐增大, 但并未引起细胞活化, 胞内 NO 水平未见升高. N9 小鼠小胶质细胞暴露于荧光素标记的氨基聚乙烯醇 SPIONs(Cy3.5-aminoPVA-SPIONs), 细胞内铁含量随着温度和暴露时间的变化而改变, 以 20  $\mu\text{g Fe/mL}$  的浓度暴露 20 h, 共聚焦显微镜观察显示纳米颗粒位于 N9 细胞浆内. 取孕 16 天大鼠的胎鼠端脑组织进行三维细胞培养, 随着培养时间的延长, 神经元和胶质细胞不断分化而处于不同的状态. 分别于细胞培养第 7、14、21、28 天加入 11.3  $\mu\text{g Fe/mL}$  的 aminoPVA-SPIONs, 暴露 72 h 后更换新鲜培养液继续培养 48 h, 观察处于不同分化状态的细胞摄入 SPION 的能力. 结果显示分化早期(1~2 周), 细胞内分布的染色铁颗粒成不规则形状, 甚至在细胞团聚体的第二层细胞内也可观察到铁颗粒, 而在高度分化时期(3~4 周), 细胞复层结构完全建立, 染色铁颗粒只在表层细胞内观察可见. 细胞内 BS-1 lectin 染色显示小胶质细胞未活化, 细胞内 NO 水平未见升高. 结果说明 aminoPVA-SPIONs 可被脑组织细胞摄入, 并不造成组织损伤.

已有研究表明, 纳米颗粒进入细胞, 受两方面的作用影响. 一是纳米颗粒本身, 纳米颗粒因其小尺寸, 可相对容易穿过细胞膜进入细胞内, 但不同类型的纳米颗粒进入细胞的能力不同. 经表面修饰的纳米颗粒具有更高的生物相容性, 相对容易进入细胞内; 且由于哺乳动物细胞表面带负电, 受静电作用影响, 表面带正电的纳米颗粒更容易进入细胞内. 另一方面是由于不同种类的细胞对纳米颗粒的摄入能力不同, 直接影响纳米颗粒进入细胞的含量, 小胶质细胞具有吞噬能力, 相对能摄入较多的纳米颗粒.

3.2.2 纳米材料的神经细胞毒性

神经组织由神经元和神经胶质细胞组成. 神经

元是神经系统的结构和功能单位, 具有接受刺激、传导冲动和整合信息的功能. 神经胶质细胞对神经元起支持、营养、保护、绝缘等作用, 构成神经元生长分化和功能活动的微环境. 其中又以星形胶质细胞和小胶质细胞最受人们关注. 星形胶质细胞参与组成血脑屏障, 阻止异物侵入, 并可通过增生修复病变组织, 在中枢神经系统损伤反应中具有保护功能. 小胶质细胞作为中枢神经系统的主要免疫细胞, 具有提呈抗原、分泌多种细胞因子、吞噬病原体和坏死组织的作用. 当纳米材料进入到神经组织, 小胶质细胞首先被激活发挥免疫活性, 吞噬清除纳米颗粒, 同时分泌产生毒性因子, 导致神经元功能损伤<sup>[46,47]</sup>, 如图 1 所示.

Block等<sup>[46]</sup>取孕 14 天大鼠的胎鼠中脑组织进行体外神经元和胶质细胞混合培养, 分别暴露于 25 和 50  $\mu\text{g/mL}$ 直径<0.22  $\mu\text{m}$ 的柴油机排出颗粒(diesel exhaust particles, DEP)7 天, 暴露组神经元多巴胺摄入量明显下降, 酪氨酸羟化酶免疫组织化学染色阳性细胞数量下降, 而GABA摄入量和NeuN阳性细胞数量无明显变化, 提示DEP选择性损伤多巴胺能神经元(DA); OX-42 免疫组织化学染色显示小胶质细胞着色深, 胞体粗大, 形状无规则而处于活化状态. 单独进行纯神经元细胞培养, 用 50  $\mu\text{g/mL}$  DEP处理后并不导致DA神经毒性, 而将小胶质细胞与神经元细胞混合后, 再用 50  $\mu\text{g/mL}$  DEP处理就能观察到明显的DA神经毒性, 且随着小胶质细胞加入数量的增加而毒性增大. 将 25 和 50  $\mu\text{g/mL}$  DEP作用于小胶质细胞, 可产生大量的超氧阴离子和活性氧, 而细胞松弛素D预处理可抑制DEP诱导小胶质细胞产生超氧阴离子, 说明小胶质细胞吞噬的DEP诱导细胞产生了超氧阴离子. 取孕 14 天小鼠的胎鼠中脑组织进行体外神经元和胶质细胞混合培养, 暴露于 50  $\mu\text{g/mL}$  DEP 8-9 天, 正常小鼠来源的多巴胺能神经元数量减

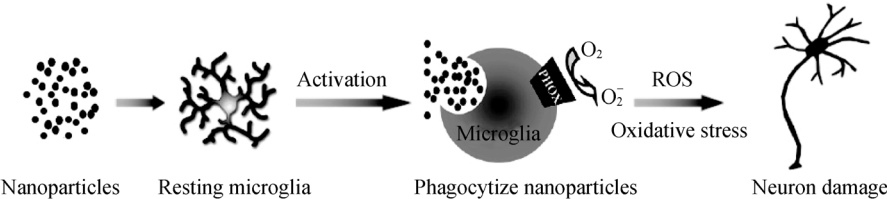


图 1 纳米材料的神经损伤作用



少, 而 gp91(phox)基因敲除小鼠来源的多巴胺能神经元无损伤, 说明 NADPH 氧化酶在 DEP 毒性机制中发挥主要作用. 上述研究结果显示 DEP 选择性损伤多巴胺能神经元, 主要通过激活小胶质细胞发挥作用, DEP 被活化的小胶质细胞吞噬, 激活 NADPH 氧化酶, 产生大量自由基导致氧化损伤, 从而损伤多巴胺能神经元.

此外, Long 等<sup>[47]</sup>把 BV2 小鼠小胶质细胞暴露于 Degussa P25 TiO<sub>2</sub> 纳米颗粒中 (2.5~120 μg/mL), 研究发现 BV2 暴露于 P25 (≥10 μg/mL) 不到 5 min 就能迅速产生 ROS, 且 ROS 水平具有剂量依赖性, 并可持续保持至 120 min; TEM 显示暴露于 2.5 μg/mL P25 颗粒 6~18 h, BV2 细胞吞噬 P25, 细胞质内聚集分布着大量的纳米 TiO<sub>2</sub> 颗粒, 细胞线粒体亦发生肿胀和结构紊乱. 说明 Degussa P25 纳米 TiO<sub>2</sub> 颗粒可被 BV2 小胶质细胞吞噬, 刺激细胞迅速发生呼吸爆发, 随后干扰线粒体能量代谢功能, 从而诱导 BV2 细胞产生大量的自由基反应, 但并不导致细胞死亡. 随后 Long 等<sup>[48]</sup>把 BV2 小鼠小胶质细胞, N27 大鼠多巴胺能神经元和原代培养的胚胎大鼠脑纹状体组织分别暴露于 2.5~120 μg/mL 的 Degussa P25 纳米 TiO<sub>2</sub> 颗粒. 研究发现 BV2 小胶质细胞迅速产生 ROS 并长时间保持 ROS 高水平, 同时 BV2 细胞发生凋亡; 基因芯片技术分析 P25 暴露 3 h (20 μg/mL) 的 BV2 细胞上调炎症、凋亡和细胞周期相关基因表达水平, 下调细胞能量代谢相关基因表达水平. TEM 显示暴露于 P25 的 N27 大鼠多巴胺能神经元细胞浆内分布有大量的 P25 纳米颗粒及其团聚体, 但并未观察到细胞吞噬和胞饮现象, 线粒体结构无异常. 原代培养的胚胎大鼠脑纹状体组织暴露于 5 μg/mL 的 P25 纳米 TiO<sub>2</sub> 颗粒 6~24 h, NSE 免疫组织化学染色阳性细胞数量明显下降, 并在镜下可观察到凋亡细胞. 上述结果显示, P25 纳米 TiO<sub>2</sub> 颗粒可激发 BV2 小胶质细胞产生活性氧, 但对 N27 多巴胺能神经元无毒性. 然而, 低浓度 P25 可迅速损伤纹状体组织中的神经元, 可能是通过激活小胶质细胞产生的活性氧而产生神经元损伤作用.

总的说来, 纳米材料对脑组织内神经元的毒性效应, 大多通过活化小胶质细胞而间接发挥作用, 但也有研究报道显示纳米材料可直接影响神经细胞的

分化和功能. 以大鼠嗜铬细胞瘤细胞 PC12 的研究报道为例, PC12 细胞具有嗜铬细胞瘤和肾上腺嗜铬细胞相关的表型, 能合成、储存并释放适量的儿茶酚胺 (主要为多巴胺和去甲肾上腺素). PC12 细胞的重要生物学特征之一是可对神经生长因子 (NGF) 产生反应, 在暴露于 NGF 数天之后, PC12 细胞表型发生显著变化, 获得许多交感神经元特有的生物性质. 如经 NGF 处理的细胞将停止增殖, 生长出神经突起, 可形成网络并建立细胞间连接, 具有电兴奋性并有许多与神经细胞分化有关的组分改变. 故 PC12 广泛用于有关神经细胞分化和功能的各种研究.

Hussain 等<sup>[49]</sup>将 PC12 细胞分别暴露于 5~50 μg/mL 的 40 nm 氧化锰、15 nm 银颗粒 (阳性对照)、醋酸锰和硝酸银 (分别用 Mn<sup>2+</sup> 和 Ag<sup>+</sup> 作对照) 24 h 后, 15 nm Ag 和 Ag<sup>+</sup> 可导致 PC12 细胞皱缩、细胞边界不清, 而 40 nm 氧化锰和 Mn<sup>2+</sup> 暴露组细胞形态无明显变化, 但 40 nm 氧化锰可被 PC12 细胞内化, 并导致线粒体功能障碍, 细胞产生 ROS 水平显著升高. 同时发现 40 nm 氧化锰和 Mn<sup>2+</sup> 可致多巴胺 (DA) 及其代谢产物二羟苯乙酸 (DOPAC)、高香草酸 (HVA) 水平下降, 并具有剂量依赖性; 而 15 nm Ag 和 Ag<sup>+</sup> 在 50 μg/mL 的高浓度下才能显著下调 DA 及其代谢产物水平. 提示 40 nm 氧化锰损耗 DA 可能与其产生的高水平 ROS 有关.

Pisanic 等<sup>[50]</sup>将 PC12 细胞暴露于含 1.5 mmol/L Fe 浓度的表面带负电荷的 DMSA 包覆的 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 纳米颗粒 (AMNPs, 直径 5~12 nm) 24 h, TEM 结果显示大量的 AMNPs 可进入 PC12 细胞并聚集分布在细胞核周的细胞浆和内涵体内. 暴露于含 0.15、1.5、15 mmol/L Fe 的 AMNPs 2~6 天, 可导致细胞死亡, PC12 细胞存活率随暴露剂量和暴露时间的增加而下降, 同时贴壁生长的 PC12 细胞大量脱落, 其脱落的细胞数量随暴露剂量和暴露时间的增加而增加. PC12 暴露于 AMNPs 6 天, 用 NGF 刺激 5 天, 免疫荧光分别标记肌动蛋白和微管蛋白, 研究发现 0.15 mmol/L Fe 含量的低剂量水平 AMNPs 暴露就可使 PC12 神经元样细胞胞体内肌动蛋白微丝数量减少, 随着暴露剂量的增大, 胞体内肌动蛋白微丝数量显著下降, 15 mmol/L Fe 的 AMNPs 暴露下, PC12 细胞内观察不到完整的肌动蛋



白微丝, 细胞成圆形, 不形成神经突起, 说明AMNPs可明显影响PC12细胞骨架结构. 通过对PC12伸出的细胞突起进行计数, 计算平均每个细胞含有的突起数, 结果显示AMNPs暴露使PC12细胞的突起明显变短, 长突起数量显著下降, 且随着暴露剂量的增加, 单个细胞所含的突起数量明显减少, 建立细胞连接的突起数量亦明显下降. West-blot显示, 随着AMNPs暴露剂量的增加, PC12细胞的神经生长相关蛋白(GAP-43)表达水平显著下降. 结果说明, 暴露于AMNPs可降低PC12细胞存活率, 影响NGF对PC12细胞的诱导分化作用, 并具有剂量依赖性.

### 3.2.3 纳米材料的独特生物学效应及其潜在应用

纳米材料尺寸小, 在单位体积中的比表面积非常大, 使纳米材料具有很强的表面活性, 拥有与普通材料截然不同的物理化学性质, 这也导致纳米材料作用于生物体时, 能产生一些独特的生物学效应. Schubert等<sup>[51]</sup>研究发现CeO<sub>2</sub>、Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>纳米颗粒因其特殊的原子结构特点, 具有氧化还原活性, 能作为抗氧化剂发挥神经保护作用. 他们用HT22小鼠海马神经细胞作为研究对象, 发现CeO<sub>2</sub>、Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>纳米颗粒暴露不影响HT22细胞存活率, 但当用谷氨酰胺预处理HT22导致海马神经元发生氧化应激进而导致细胞死亡, 加入CeO<sub>2</sub>和Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>纳米颗粒可抑制HT22海马神经元产生ROS, 下调氧化应激水平而提高神经元存活率, 而Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>纳米颗粒不发挥作用.

纳米材料的独特物理化学性质和其独特的生物学效应, 使其具有潜在的应用价值. 如纳米铁氧化合物( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)具有超顺磁性, 可透过生物屏障进入器官组织和细胞内并不引起毒性效应, 被广泛应用于MRI造影对比剂和药物靶向传输. Fleige等<sup>[52]</sup>将大鼠胶质瘤细胞系C6和F98、大鼠胶质肉瘤细胞系9L、单核巨噬细胞系P-388D1、原代培养星形胶质细胞、小胶质细胞暴露于1.5、3、6 mmol/L荧光标记葡聚糖修饰的超顺磁性铁氧化物纳米颗粒(USPIO, 水合粒径(31.3 ± 15.8) nm)30 min, 发现只有单核巨噬细胞系P-388D1和小胶质细胞细胞内有大量的USPIO, 细胞摄入USPIO后, 在胞内形成内涵体, USPIO位于细胞囊泡内, 细胞浆内并无散在分布. 采

用增强型绿色荧光蛋白(eGFP)基因转染F98大鼠胶质瘤细胞后, 注入Fischer CD 344大鼠脑内建立F98大鼠胶质瘤模型. 接种14天后, 处死动物并取脑组织切片, 置于3 mmol/L的荧光标记葡聚糖修饰的超顺磁性铁氧化物纳米颗粒(USPIO, 水合粒径31.3 ± 15.8 nm)溶液中30 min, OX-42免疫荧光标记脑内巨噬细胞和小胶质细胞, 共聚焦显微镜观察可见, 大量的巨噬细胞和小胶质细胞迁移至胶质瘤细胞周围, 活化小胶质细胞和巨噬细胞内摄入大量的USPIO并密集分布在肿瘤组织周围, 将肿瘤组织与正常组织的边界明显区别开来, 因此USPIO可用来确定脑内胶质瘤的大小和范围. 同时实验也证实小胶质细胞摄入USPIO可用MRI监测. 采用F98胶质瘤模型动物, 肿瘤细胞接种14天后, 用300 μmol USPIO/kg体重的剂量处理动物, MRI观察动物脑部结构, 通过小胶质细胞和巨噬细胞摄入USPIO并在肿瘤组织周围形成边界可确定脑部肿瘤位置和大小.

在研究纳米材料的毒性效应时, 科学家们意外地发现某些富勒烯类化合物具有显著的抗肿瘤效应<sup>[53]</sup>, 为肿瘤药物的开发提供了一个新的研究方向. Isakovic等<sup>[54]</sup>比较研究了C<sub>60</sub>和[C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>]纳米材料对L929小鼠纤维肉瘤细胞、C6大鼠神经胶质瘤和U251人神经胶质瘤细胞的细胞毒性行为. 结晶紫染色法检测纳米颗粒暴露24 h后的细胞存活率, 1 μg/mL的C<sub>60</sub>可致细胞活力下降至20%以下, 而[C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>]在10 μg/mL的暴露浓度下对细胞活力仍无明显影响, 当剂量增加至1000 μg/mL时可使细胞活力下降至40%左右, 说明C<sub>60</sub>对肿瘤细胞杀伤力远远高于[C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>]. Annexin V-FITC和PI荧光双染检测细胞坏死和凋亡, 结果显示1 μg/mL C<sub>60</sub>诱导细胞迅速发生坏死(暴露6 h), 细胞坏死与ROS的水平升高相关, 而1000 μg/mL [C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>]诱导迟发性细胞凋亡(暴露24 h), 但与细胞ROS水平无明显相关. 加入抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸可减轻C<sub>60</sub>诱导的细胞坏死, 但对[C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>]诱导的细胞凋亡无作用, 而加入pan-caspase抑制剂可明显减弱[C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>]致细胞凋亡作用, 但不影响C<sub>60</sub>的致细胞坏死作用. 结果说明C<sub>60</sub>通过诱导细胞迅速发生ROS依赖的细胞坏死而产生细胞毒作用, 而[C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>]通过诱导不依赖于ROS的迟发性细胞凋亡

而发挥细胞毒作用. 随后Harhaji等<sup>[55]</sup>将C6 大鼠神经胶质瘤和U251 人神经胶质瘤细胞暴露于C<sub>60</sub>水溶胶(nC<sub>60</sub>)24 h后, 研究发现随着暴露剂量的增大, 细胞活力明显下降. 高剂量nC<sub>60</sub>暴露(1 μg/mL)可诱导细胞坏死, 是由于C<sub>60</sub>刺激细胞产生大量ROS, 引起氧化应激反应, 激活了ERK所介导的信号转导通路, 从而导致细胞坏死. 低剂量nC<sub>60</sub>暴露(0.25 μg/mL)并不诱导细胞发生凋亡和坏死, 却可使细胞发生G<sub>2</sub>/M期阻滞, 从而抑制细胞增殖, 此生物效应的发生不依赖于氧化应激的产生和ERK激酶活化. 在nC<sub>60</sub>暴露的细胞质内发现酸性囊泡存在, 细胞可能发生自体吞噬现象. 用bafilomycin A1 预处理细胞以抑制自体吞噬, 低剂量nC<sub>60</sub>暴露(0.25 μg/mL)所致的细胞生物效应可明显被削弱, 而高剂量nC<sub>60</sub>暴露(1 μg/mL)所致的细胞坏死不受影响. 将原代培养的星形胶质细胞暴露于nC<sub>60</sub>, 却并未观察到G<sub>2</sub>/M期阻滞和细胞坏死现象, 说明nC<sub>60</sub>特异性地作用于肿瘤细胞, 通过抑制细胞增殖和诱导细胞坏死发挥抗肿瘤效应.

#### 4 纳米材料的神经毒性效应机制研究

根据现有的研究结果, 推测纳米材料导致中枢神经损伤的可能途径有以下三种<sup>[34]</sup>. 首先, 进入机体的纳米颗粒引发组织炎症反应, 如吸入纳米颗粒大量沉积于肺泡组织引起肺部炎症, 使大量的炎症因子进入血液循环并引起系统炎症反应, 进而引起脑部炎症反应导致功能损伤; 其次, 转运到中枢神经系统内的纳米颗粒, 可通过激活小胶质细胞, 导致自由基、炎症因子等神经毒性分子大量表达, 导致神经损伤; 最后, 纳米颗粒在感觉神经内转运的同时, 亦损伤神经元的正常功能, 直接导致脑边缘系统毒性效应.

关于纳米材料所产生的生物效应机制研究, 目前主要关注的是纳米材料的氧化应激和炎症反应学说<sup>[3,56,57]</sup>. 纳米材料通过引起生物体产生活性氧, 促使氧化应激发生, 从而产生炎症反应和其他生物毒性效应. 正常情况下, 线粒体活性氧产生量非常少, 且可轻易地被机体的抗氧化防御系统如抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)和抗氧化酶所清除. 当纳米材料暴露于生物体时, 会导致过量ROS生成, 体内的抗氧化防御

系统无法清除完全, 从而打破机体的氧化系统和抗氧化系统平衡, 导致氧化应激的产生, 引起生物体氧化损伤.

按照氧化应激毒性机制假说, 可以将其分为三个不同的等级水平<sup>[56]</sup>. 第一层次, 在氧化应激低水平状态, 抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)和抗氧化酶广泛参与清除活性氧等自由基, 转录因子Nrf-2 活化促使Ⅱ期酶(phase II enzymes)大量表达, 表现为生物体抗氧化能力水平上升, 机体处于主动防御状态; 第二层次, 随着氧化应激水平的上升, 机体的保护作用逐渐被炎症反应和细胞毒作用所替代, 大量的前炎症基因表达活跃, 如AP-1、NF-κB, MAPK激酶信号转导通路活化, 炎症因子和趋化因子大量表达分泌, 引起炎症反应发生; 第三层次, 在氧化应激高水平状态, 线粒体结构与功能紊乱, 凋亡信号通路被激活, 细胞发生程序性死亡. 在纳米材料的生物效应研究中, 对处于不同层次水平的氧化应激反应损伤都已有报道, 各种类型的纳米材料都可直接靶向损伤线粒体<sup>[2-4]</sup>.

与其他脏器组织相比, 大脑对氧化应激反应损伤更敏感. 这是由其特殊的生理结构特性所决定的. 首先, 脑组织是以氧化分解为主获取能量的, 故脑耗氧量很大, 约占全身总耗氧量的20%~30%. 其次, 脑内含有丰富的不饱和脂肪酸、核酸和蛋白质, 易受氧自由基攻击而发生脂质过氧化和氧化损伤. 再则, 脑组织内抗氧化酶如过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化酶含量较低, 当氧自由基产生较多时, 脑内抗氧化防御系统根本无法将其完全清除. 纳米材料因其特殊的物理化学特性, 具有很高的表面活性, 易发生氧化还原反应, 从而导致大量的自由基产生而发生氧化应激, 这就使得具有氧化应激敏感性的脑组织容易成为纳米材料的毒性效应靶器官.

Veronesi等<sup>[58]</sup>采用C25BL/6 正常健康小鼠和ApoE基因缺陷小鼠作为研究对象, 呼吸暴露于正常大气环境和颗粒浓度含量较高的大气环境(concentrated ambient particles, CAPs), 取脑组织切片进行免疫组织化学染色, 酪氨酸羟化酶(TH)用于标记多巴胺神经元, 神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)用于特异性标记星形胶质细胞. C25BL/6 小鼠CAPs暴露组与大气暴露组表达TH和GFAP水平无差异, 而

ApoE 基因缺陷小鼠 CAPs 暴露组相对大气暴露组黑质部位 TH 水平明显下降, GFAP 水平明显升高。这是由于 ApoE 基因缺陷小鼠相对 C25BL/6 小鼠, 在大气颗粒物的刺激作用下, 能引起大脑产生高水平的氧化应激反应, 从而促使多巴胺神经元发生变性。该研究证明氧化应激是大气纳米颗粒物引起脑部损伤导致神经变性疾病的机制之一。

Kleinman等<sup>[59]</sup>将C25BL/6 雄性ApoE基因缺陷小鼠分成三组分别呼吸暴露于正常大气环境、高水平CAPs(CAP<sub>15</sub>, 114.2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )和低水平CAPs(CAP<sub>4</sub>, 30.4  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )大气环境中, 每周暴露3天, 每天6h, 6周后取各脏器组织进行检测。脑组织内核转录因子NF $\kappa$ B和AP-1 表达水平随大气颗粒物浓度升高而增高, 可促使脑部炎症反应的发生。GFAP表达水平上升提示胶质细胞活化。为了阐述其机制, 研究了MAPK信号转导通路, 显示ERK-1、I $\kappa$ B、P38 活化水平无明显改变, 而JNK活化水平明显升高, 提示大气纳米颗粒物通过激活JNK相关的MAP激酶信号转导通路, 从而使核转录因子NF $\kappa$ B和AP-1 表达升高, 引起脑部炎症反应。

从现有的研究报道显示, 纳米材料的神经毒性效应机制主要表现为纳米颗粒刺激神经组织产生活性氧, 引起氧化应激, 并激活 MAPK 信号转导通路, 使大量的前炎症因子表达, 诱导炎症反应, 从而发挥组织损伤作用。

## 5 存在问题与展望

虽然纳米材料的生物毒性研究已经取得了较大的进展<sup>[11~4,60~62]</sup>, 但是对于神经毒性的研究还很有限。这是由于中枢神经系统的功能复杂性, 以及现有的实验手段对于纳米毒性研究的适用性还存在争议, 给实验研究带来一定的难度和困难。目前研究纳米材料在生物体和细胞内的分布, 主要基于四种实验方法, 一是通过组织和细胞切片, 应用组织细胞染色方法和透射电子显微镜(TEM), 直接在显微镜下观察纳米颗粒的分布; 二是采用放射性同位素标记纳米颗粒, 通过测定各器官组织内的放射性活度来定量纳米颗粒的组织分布; 三是采用荧光素标记纳米颗粒, 应用荧光显微镜观察和测定荧光强度的方法来

确定组织和细胞内纳米颗粒的分布; 四是用ICP-MS或ICP-AES测定组织和细胞内元素含量的变化, 可以定量测定进入细胞的纳米颗粒的量。

上述实验研究方法, 有各自的优点, 但同时也存在一定的缺陷。使用组织染色和 TEM 方法, 肉眼可直接观察到组织和细胞内纳米颗粒, 具有很高的直观可信性, 但观察的样品数量和范围有限, 使得测量结果缺乏统计性, 且具有很大的偶然性。用同位素和荧光素标记纳米颗粒, 每个纳米颗粒上结合的同位素和荧光素并不均匀一致, 且同位素和荧光素与纳米颗粒的结合并不能始终保持稳定, 同位素和荧光素可能从纳米颗粒上面脱落下来, 因此通过观察与测定同位素和荧光素, 并不能完全准确地确定纳米颗粒的组织分布。

纳米材料进入生物体后, 在机体的调理作用下会发生溶解现象, 溶解的纳米材料组份可随循环转运到全身各个脏器。尤其是纳米材料中的金属组分, 在机体内的各种还原剂(如超氧阴离子、抗坏血酸和谷胱甘肽)和金属螯合剂(如转铁蛋白、乳铁蛋白、柠檬酸、尿酸)作用下, 可溶解成金属离子而发生转运。故采用ICP-MS或ICP-AES通过单纯测定组织内的元素含量增高, 并不能说明纳米颗粒本身也能转运到脑<sup>[63]</sup>。Fechter等<sup>[64]</sup>曾报道雄性大鼠吸入 1.3  $\mu\text{m}$ 的MnO<sub>2</sub>颗粒, 在嗅球和大脑皮质内都检测到升高的Mn水平。但大鼠的嗅神经元直径<200 nm, 远远小于MnO<sub>2</sub>颗粒直径, 故不可能在嗅神经发生固体颗粒转运, 所测定的大脑内Mn水平升高应该是因为MnO<sub>2</sub>颗粒发生了溶解, 进而经嗅神经转运入脑。当神经组织内离子水平过高时, 会导致神经功能障碍并引发神经疾病<sup>[65,66]</sup>。因此, 在进行纳米材料生物效应研究时, 需要考虑到纳米材料的溶解问题, 并尽量采用多种实验方法相结合的方式实验研究, 对实验结果应该进行综合分析考虑, 力求更准确地解释纳米颗粒的神经生物效应。

目前对于纳米材料的中枢神经毒性研究尚处于起步阶段, 虽然已经证实纳米颗粒可经嗅球和感觉神经摄入, 但纳米颗粒神经摄入机制仍不清楚, 是否是由于受体介导的内吞、胞饮作用, 还是轴突的转运机制发挥主要作用? 经神经转运的纳米颗粒是否可



到达脑部各个分区,是否又可从脑组织进入循环系统从而转运到全身各器官,并是否能引起各器官组织损伤?纳米颗粒的毒性分子机制尚不完全明了,活性氧激活的 MAPK 信号转导通路中,有哪些信号分子被活化发挥作用,是否有关键信号分子存在?除了氧化应激学说之外,是否还存在其他的毒性作用机制?实验研究纳米材料多是采用实验动物作为研究对象,而将动物实验结果外推到人存在一定的

局限性,且实验中采用的暴露剂量过大,不能说明人体正常的暴露环境下,纳米材料在人体内发生中枢神经转运的机制,以及纳米颗粒是否可以引起中枢神经系统损伤,这些都需要进一步的深入研究提供直接证据来证实.而上述这些问题,正是纳米颗粒的神经毒性效应研究中尚待急需解决的问题,今后的研究方向也将更多地关注在针对上述问题的解答性研究.

**致谢** 本工作得到国家重大基础研究专项基金(批准号:2006CB705605)、中国科学院和国家自然科学基金(批准号:20475055,10675139)资助.

## 参考文献

- 1 Hoet P H, Bröske-Hohlfeld I, Salata O V. Nanoparticles-known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology*, 2004, 2(1): 12 [\[DOI\]](#)
- 2 Medina C, Santos-Martinez M J, Radomski A, Corrigan O I, Radomski M W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol*, 2007, 150(5): 552—558 [\[DOI\]](#)
- 3 Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 2005, 113: 823—839
- 4 Stern S T, McNeil S E. Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicol Sci*, 2008, 101(1): 4—21 [\[DOI\]](#)
- 5 von Bohlen Und Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res*, 2007, 329(3): 409—420 [\[DOI\]](#)
- 6 Nemmar A, Hoet P H, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts M F, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*, 2002, 105(4): 411—414 [\[DOI\]](#)
- 7 Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A*, 2002, 65(20): 1531—1543 [\[DOI\]](#)
- 8 Kreyling W G, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A*, 2002, 65(20): 1513—1530 [\[DOI\]](#)
- 9 Kwon J T, Hwang S K, Jin H, Kim D S, Minai-Tehrani A, Yoon H J, Choi M, Yoon T J, Han D Y, Kang Y W, Yoon B I, Lee J K, Cho M H. Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *J Occup Health*, 2008, 50(1): 1—6 [\[DOI\]](#)
- 10 Zhu M T, Feng W Y, Wang Y, Wang B, Wang M, Ouyang H, Zhao Y L, Chai Z F. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment. *Toxicol Sci*, 2009, 107(1): 342—351 [\[DOI\]](#)
- 11 Lockman P R, Oyewumi M O, Koziara J M, Roder K E, Mumper R J, Allen D D. Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles. *J Control Release*, 2003, 93(3): 271—282 [\[DOI\]](#)
- 12 Yang S T, Guo W, Lin Y, Deng X Y, Wang H, Sun H F, Liu Y F, Wang X, Wang W, Chen M, Sun Y P. Biodistribution of pristine single-walled carbon nanotubes in vivo. *J Phys Chem C*, 2007, 111(48): 17761—17764 [\[DOI\]](#)
- 13 Zhen C, Chen H, Meng H, Xing G M, Gao X Y, Sun B Y, Shi X L, Yuan H, Zhang C C, Liu R, Zhao F, Zhao Y L, Fang X H. Biodistribution and metabolic paths of silica coated CdSeS quantum dots. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 230(3): 364—371 [\[DOI\]](#)
- 14 Kim J S, Yoon T J, Yu K N, Kim B G, Park S J, Kim H W, Lee K H, Park S B, Lee J K, Cho M H. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol Sci*, 2006, 89(1): 338—347 [\[DOI\]](#)

- 15 Wang J X, Zhou G Q, Chen C Y, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. Acute toxicity and bio-distribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*, 2007, 168(2): 176—185 [\[DOI\]](#)
- 16 Wang H F, Wang J, Deng X Y, Sun H F, Shi Z J, Gu Z N, Liu Y F, Zhao Y L. Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice. *J Nanosci Nanotechnol*, 2004, 4(8): 1019—1024 [\[DOI\]](#)
- 17 Arvidson B. A review of axonal transport of metal. *Toxicology*, 1994, 88: 1—14 [\[DOI\]](#)
- 18 Tjälve H, Henriksson J. Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *NeuroToxicity*, 1999, 20(2—3): 181—196
- 19 Dorman D C, Brenneeman K A, McElveen A M, Lynch S E, Roberts K C, Wong B A. Olfactory transport: A direct route of delivery of inhaled manganese phosphate to the rat brain. *J Toxicol Environ Health A*, 2002, 65(20): 1493—1511 [\[DOI\]](#)
- 20 Bodian D, Howe H A. The rate of progression of poliomyelitis virus in nerves. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 1941, LXIX(2): 79—85
- 21 Howe H A, Bodian D. Poliomyelitis in the chimpanzee: A clinical-pathological study. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 1941, LXIX(2): 149—182
- 22 De Lorenzo A J D. The olfactory neuron and the blood-brain barrier. In: Wolstenholme G E W, Knight J, eds. *Taste and Smell in Vertebrates*. London: CIBA Foundation Symposium Series J&A Churchill, 1970. 151—176
- 23 Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect*, 2001, 109 Suppl 4: 547—551 [\[DOI\]](#)
- 24 Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, 2004, 16(6-7): 437—445 [\[DOI\]](#)
- 25 Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect*, 2006, 114(8): 1172—1178
- 26 Hunter D D, Dey R D. Identification and neuropeptide content of trigeminal neurons innervating the rat nasal epithelium. *Neuroscience*, 1998, 83(2): 591—599 [\[DOI\]](#)
- 27 Hunter D D, Udem B J. Identification of substance P content of vagal afferent neurons innervating the epithelium of the guinea pig trachea. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159: 1943—1948
- 28 Brook R D, Franklin B, Cascio W E, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R V, Mittleman M A, Samet J M, Smith S C J, Tager I B. Air Pollution and Cardiovascular Disease: A statement of the health care professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association. *Circulation*, 2004, 109: 2655—2671 [\[DOI\]](#)
- 29 Schulz H, Harder V, Ibaldo-Mulli A, Khandoga A, Koenig W, Krombach F, Radykewicz R, Stampfl A, Thorand B, Peters A. Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles. *J Aerosol Med*, 2005, 18: 1—22 [\[DOI\]](#)
- 30 Peters A. Particulate matter and heart disease: Evidence from epidemiological studies. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 207: 477—482 [\[DOI\]](#)
- 31 Utell M J, Frampton M W, Zareba W, Devlin R B, Cascio W E. Cardiovascular effects associated with air pollution: potential mechanisms and methods of testing. *Inhal Toxicol*, 2002, 14: 1231—1247 [\[DOI\]](#)
- 32 Peters A, Veronesi B, Calderón-Garcidueñas L, Gehr P, Chen L C, Geiser M, Reed W, Rothen-Rutishauser B, Schürch S, Schulz H. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. Part I. *Fibre Toxicol*, 2006, 3: 13 [\[DOI\]](#)
- 33 Calderón-Garcidueñas L, Azzarelli B, Acuna H, Garcia R, Gambling T M, Osnaya N, Monroy S, DEL Tizapantzi M R, Carson J L, Villarreal-Calderon A, Rewcastle B. Air pollution and brain damage. *Toxicol Pathol*, 2002, 30: 373—389 [\[DOI\]](#)
- 34 Calderón-Garcidueñas L, Maronpot R R, Torres-Jardon R, Henríquez-Roldán C, Schoonhoven R, Acuña-Ayala H, Villarreal-Calderón A, Nakamura J, Fernando R, Reed W, Azzarelli B, Swenberg J A. DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicol Pathol*, 2003, 31: 524—538 [\[DOI\]](#)
- 35 Calderón-Garcidueñas L, Reed W, Maronpot R R, Henríquez-Roldán C, Delgado-Chavez R, Calderón-Garcidueñas A, Dragustinovis I, Franco-Lira M, Aragón-Flores M, Solt A C, Altenburg M, Torres-Jardón R, Swenberg J A. Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol*, 2004, 32(6): 650—658 [\[DOI\]](#)
- 36 Calderón-Garcidueñas L, Solt A C, Henríquez-Roldán C, Torres-Jardón R, Nuse B, Herritt L, Villarreal-Calderón R, Osnaya N, Stone I, García R, Brooks D M, González-Macié A, Reynoso-Robles R, Delgado-Chávez R, Reed W. Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate depo-

- sition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicol Pathol*, 2008, 36(2): 289—310 [\[DOI\]](#)
- 37 Campbell A, Oldham M, Becaria A, Bondy S C, Meacher D, Sioutas C, Misra C, Mendez L B, Kleinman M. Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. *Neurotoxicology*, 2005, 26(1): 133—140 [\[DOI\]](#)
  - 38 van Berlo D, Albrecht C, Knaapen A, Cassee F, Gerlofs-Nijland M, Kooter I, Palomero-Gallagher N, Bidmon H, van Schooten F J, Wessels A, Krutmann J, Schins R. Investigations on the effects of short term diesel exhaust inhalation in rat brain. *Toxicol Lett*, 2007, 172S: S1—S240
  - 39 Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect*, 2004, 112(10): 1058—1062
  - 40 Zhu S, Oberdörster E, Haasch M L. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, *Daphnia* and fat-head minnow. *Mar Environ Res*, 2006, 62 Suppl: S5—9 [\[DOI\]](#)
  - 41 Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto S, Ahmed S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H. Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black. *Toxicol Lett*, 2006, 163(2): 153—160 [\[DOI\]](#)
  - 42 Lockman P R, Koziara J M, Mumper R J, Allen D D. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J Drug Target*, 2004, 12(9-10): 635—641 [\[DOI\]](#)
  - 43 Wang B, Feng W Y, Zhu M T, Wang Y, Wang M, Gu Y Q, Ouyang H, Wang H J, Li M, Zhao Y L, Chai Z F, Wang H F. Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice. *J Nanopart Res*, 2009, 11: 41—53 [\[DOI\]](#)
  - 44 Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Kim H R, Le Doan T, Desmaële D, d'Angelo J, Taran F, Georgin D, Couvreur P. A methodology to study intracellular distribution of nanoparticles in brain endothelial cells. *Int J Pharm*, 2005, 298(2): 310—314 [\[DOI\]](#)
  - 45 Cengelli F, Maysinger D, Tschudi-Monnet F, Montet X, Corot C, Petri-Fink A, Hofmann H, Juillerat-Jeanneret L. Interaction of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles with brain structures. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(1): 108—116 [\[DOI\]](#)
  - 46 Block M L, Wu X, Pei Z, Li G, Wang T, Qin L, Wilson B, Yang J, Hong J S, Veronesi B. Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB J*, 2004, 18(13): 1618—1620
  - 47 Long T C, Saleh N, Tilton R D, Lowry G V, Veronesi B. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): Implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(14): 4346—4352 [\[DOI\]](#)
  - 48 Long T C, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry G V, Veronesi B. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in Brain Microglia and damages neurons *in vitro*. *Environ Health Perspect*, 2007, 115(11): 1631—1637
  - 49 Hussain S M, Javorina A K, Schrand A M, Duhart H M, Ali S F, Schlager J J. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci*, 2006, 92(2): 456—463 [\[DOI\]](#)
  - 50 Pisanic T R 2nd, Blackwell J D, Shubayev V I, Fiñones R R, Jin S. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials*, 2007, 28(16): 2572—2581 [\[DOI\]](#)
  - 51 Schubert D, Dargusch R, Raitano J, Chan S W. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(1): 86—91 [\[DOI\]](#)
  - 52 Fleige G, Nolte C, Synowitz M, Seeberger F, Kettenmann H, Zimmer C. Magnetic labeling of activated microglia in experimental gliomas. *Neoplasia*, 2001, 3(6): 489—499 [\[DOI\]](#)
  - 53 Chen C Y, Xing G M, Wang J X, Zhao Y, Li B, Tang J, Jia G, Wang T, Sun J, Xing L, Yuan H, Gao Y, Meng H, Chen Z, Zhao F, Chai Z, Fang X. Multihydroxylated [Gd@C<sub>82</sub>(OH)<sub>22</sub>]<sub>n</sub> nanoparticles: antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity. *Nano Lett*, 2005, 5(10): 2050—2057 [\[DOI\]](#)
  - 54 Isakovic A, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Mirkovic M, Dramicanin M, Harhaji L, Raicevic N, Nikolic Z, Trajkovic V. Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. *Toxicol Sci*, 2006, 91(1): 173—183 [\[DOI\]](#)
  - 55 Harhaji L, Isakovic A, Raicevic N, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Markovic I, Trajkovic V. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene. *Eur J Pharmacol*, 2007, 568(1-3): 89—98 [\[DOI\]](#)



- 56 Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the Nanolevel. *Science*, 2006, 311(5761): 622—627[DOI]
- 57 Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita*, 2003, 39(3): 405—410
- 58 Veronesi B, Makwana O, Pooler M, Chen LC. Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles. VII. Degeneration of dopaminergic neurons in Apo E<sup>-/-</sup> mice. *Inhal Toxicol*, 2005, 17(4-5): 235—241[DOI]
- 59 Kleinman M T, Araujo J A, Nel A, Sioutas C, Campbell A, Cong P Q, Li H, Bondy S C. Inhaled ultrafine particulate matter affects CNS inflammatory processes and may act via MAP kinase signaling pathways. *Toxicol Lett*, 2008, 178(2): 127—130[DOI]
- 60 Zhao Y L, Nalwa S H. *Nanotoxicology*. California: American Scientific Publishers, 2007
- 61 Meng H, Chen Z, Zhao Y L. Biological and toxicological effects of some nanomaterials. *Basic Med Clinic*, 2006, 26(7): 699—703
- 62 汪冰, 韦伟悦, 赵宇亮, 邢更妹, 柴之芳, 王海芳, 贾光. 纳米材料生物效应及其毒理学研究进展. *中国科学 B 辑: 化学*, 2005, 35(1): 1—10
- 63 Ghio A J, Bennett W D. Metal particles are inappropriate for testing a postulate of extrapulmonary transport. *Environ Health Perspect*, 2007, 115(2): A70; author reply A70-1
- 64 Fechter L D, Johnson D L, Lynch R A. The relationship of particle size to olfactory nerve uptake of a non-soluble form of manganese into brain. *Neurotoxicology*, 2002, 23, 177—183[DOI]
- 65 Olanow C W. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1012: 209—223[DOI]
- 66 Weiss B. Economic implications of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 2006, 27(3): 362—368[DOI]