

单壁碳纳米管的肺毒性及氧化应激机制

吕高建¹, 汤莹², 沈亚峰², 雷长海², 赵文茹¹, 陈新^{1,3*}, 杨勇骥^{2*}

1. 华东理工大学材料科学与工程学院, 超细材料制备与应用教育部重点实验室, 上海 200237
2. 第二军医大学基础部生物物理学教研室, 上海 200433
3. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 信息功能材料国家重点实验室, 上海 200050

[摘要] **目的** 研究单壁碳纳米管(single-wall carbon nanotubes, SWCNTs)的肺毒性,并探讨其毒性机制,为安全生产和应用 SWCNTs 提供实验依据。**方法** A549 细胞用质量浓度为 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$ 的 SWCNTs 溶液孵育 24 h,用 CCK-8 和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒分别检测 SWCNTs 对 A549 细胞活性和细胞膜的影响,Hoechst 33342 和 PI 荧光双染法检测细胞死亡情况,透射电镜(TEM)观察细胞超微结构变化,并检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平、谷胱甘肽(glutathione, GSH)浓度和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力以评估氧化应激情况。分别将 0.5 mg/mL 和 1 mg/mL 的 SWCNTs 溶液通过气管灌流的方法使大鼠肺部染毒,3 d 后取大鼠肺脏,常规 H-E 染色,检测肺组织病理学变化。**结果** SWCNTs 对 A549 细胞表现出明显毒性,使细胞活性降低,死亡细胞增多,细胞膜和细胞结构损伤严重,细胞内 ROS 水平升高,GSH 浓度和 SOD 活力降低。体内毒性检测结果表明 SWCNTs 在大鼠肺组织内积累,造成肺泡壁水肿增厚。**结论** 体外细胞毒性检测和动物毒性检测结果表明 SWCNTs 具有较大的肺毒性,其主要毒性机制是氧化应激反应。

[关键词] 单壁碳纳米管;肺毒性;氧化性应激;氧化还原平衡
[中图分类号] R 135.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)07-0815-06

Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes and its oxidative stress mechanism

LÜ Gao-jian¹, TANG Ying², SHEN Ya-feng², LEI Chang-hai², ZHAO Wen-ru¹, CHEN Xin^{1,3*}, YANG Yong-ji^{2*}

1. Key Laboratory for Ultrafine Materials of Ministry of Education, School of Material Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China
2. Department of Biophysics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. State Key Laboratory of Functional Materials for Informatics, Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China

[Abstract] **Objective** To systematically study the pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes (SWCNTs) and to explore the related cytotoxicity mechanism, so as to provide a theoretical basis for the safe production and application of SWCNTs. **Methods** A549 cells were cultured in the media containing 0, 25, 50, 100, 150, and 200 $\mu\text{g/mL}$ SWCNTs for 24 h, and then the cell viability and degree of cell membrane damage were assessed by CCK-8 and lactate dehydrogenase (LDH) release assay kit, respectively; the ultrastructural alteration of A549 cells was detected by transmission electron microscope (TEM). The oxidative stress response was evaluated by assessing reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD). The rats were exposed to SWCNTs by intratracheal inhalation, and then the animals were sacrificed 3 days later and the pathological sections of lung tissue were examined. **Results** SWCNTs showed considerable toxicity to A549 cells, decreasing cell viability, causing severe damage of cell membrane and ultrastructure, increasing the intracellular ROS level, and decreasing GSH content and SOD activity. It was found that oxidative stress is the main mechanism

[收稿日期] 2016-03-30 **[接受日期]** 2016-05-17

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAK15B04 之 31-1122ZCKF),上海市重点学科和重点实验室项目(B502,08DZ2230500),上海市科学技术委员会资助项目(11nm0507000),信息功能材料国家重点实验室开放课题(SKL201306). Supported by National Science and Technology Pillar Program (2011BAK15B04 [31-1122ZCKF]), Project for Key Discipline and Key Laboratory of Shanghai (B502,08DZ2230500), Program of Shanghai Science and Technology Committee (11nm0507000), and Open Project of National Key Laboratory on Functional Information Materials (SKL201306).

[作者简介] 吕高建,硕士生. E-mail: lvgaojian8@163.com

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-64253582, E-mail: xinchen73@hotmail.com; Tel: 021-81870923, E-mail: yangyj22@smmu.edu.cn

of SWCNTs toxicity on A549 cells. *In vivo* toxicity results showed that SWCNTs accumulated in the lung tissue, causing alveolar wall edema. **Conclusion** *In vitro* and *in vivo* toxicity results have found that SWCNTs possess a significant pulmonary toxicity, with its main toxicity mechanism being oxidative stress.

[Key words] single-wall carbon nanotubes; pulmonary toxicity; oxidative stress; redox homeostasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(7): 815-820]

碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)是碳的一种同素异形体,呈圆筒状,直径尺寸在纳米级别,长度通常为微米级。按组成碳原子层的数目,可将CNTs分为2种:单壁碳纳米管(single-wall carbon nanotubes, SWCNTs)和多壁碳纳米管(multi-wall carbon nanotubes, MWCNTs)^[1]。因为CNTs具有优良的导电、导热、机械性能和生物相容性,被广泛应用在电子、催化剂、材料和生物医药领域^[2-4]。随着CNTs的生产规模和应用范围不断扩大,人类和动物与之接触的概率也不断增加,在应用CNTs材料的同时,不能忽略其毒性研究^[5]。CNTs质量较轻,容易在空气中漂浮并随之扩散,有研究表明空气中的CNTs可以通过呼吸的方式进入到肺泡内^[6],因此研究CNTs的肺毒性具有十分重要的意义。本研究结合体外细胞毒性检测和动物体内毒性检测2种方法,较系统地评估SWCNTs的肺毒性大小,并从氧化应激角度初步探讨SWCNTs肺毒性的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 SWCNTs来自国家纳米科学中心,直径1~2 nm,长度<5 μm ,纯度90%;A549细胞购自武汉大学保藏中心;细胞高糖DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰酶、青霉素和链霉素购于Invitrogen公司;CCK-8细胞活性检测试剂盒为东仁化学公司产品;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒购自碧云天生物科技公司;Hoechst 33342和碘化丙啉(propidium iodide, PI)为Sigma-Aldrich公司产品;其他化学试剂均为分析纯。

1.2 SWCNTs形貌检测 在毒性检测前,先利用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察SWCNTs形貌。SWCNTs经超声和震荡处理后充分分散在双蒸水中,取少量分散液滴到有碳膜的铜网上,待水分蒸发完毕,利用TEM(H-7650, 日立)观察样品。

1.3 细胞毒性检测 选体外培养A549细胞作为

检测SWCNTs毒性的体外模型。每天更换细胞培养液1次,每2 d将细胞传代1次。细胞培养液为含10% FBS的DMEM,利用该培养液配制不同浓度的SWCNTs分散液。

1.3.1 CCK-8法检测细胞活性 按每孔5 000个细胞的密度将A549细胞接种到96孔培养板中,然后利用质量浓度为0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的SWCNTs溶液孵育细胞24 h,最后用CCK-8试剂检测细胞活性,用酶标仪测定450 nm波长下的光密度(D)值,计算细胞活性。

1.3.2 LDH释放法检测细胞膜损伤 LDH是细胞内一种稳定的酶,当细胞膜损伤或破裂时,LDH会释放到细胞外的培养液中,通过检测培养液中LDH的浓度可评估细胞膜的损伤程度。将不同浓度的SWCNTs处理的细胞孵育24 h后,利用LDH试剂盒检测培养液中LDH浓度。未处理的细胞作为阴性对照组,LDH释放液处理过的细胞作为阳性对照组,测定波长为490 nm下的D值,计算LDH释放率。

1.3.3 Hoechst 33342和PI荧光双染检测细胞死亡 Hoechst 33342和PI是2种不同的核酸荧光探针,Hoechst 33342可以透过活细胞的细胞膜进入到细胞内,从而对细胞核染色;PI不能透过活细胞的细胞膜,所以只有当细胞膜损伤严重或细胞死亡时才能进入细胞,对核酸染色。将细胞接种到无菌盖玻片上,在SWCNTs溶液中孵育24 h后,利用Hoechst 33342和PI两种荧光探针对细胞染色,充分漂洗后封片,荧光显微镜下观察。

1.3.4 TEM观察细胞超微结构损伤 实验细胞经胰酶消化后,4%多聚甲醛固定,梯度乙醇和丙酮脱水,812树脂包埋,切成70 nm薄片,醋酸铀和硝酸铅染色,利用TEM观察。

1.4 细胞氧化应激反应检测

1.4.1 DCFH-DA法检测细胞内ROS含量 DCFH-DA是检验ROS常用的一种试剂,它可进入细胞内通过酶分解和ROS氧化生成具有荧光的DCF,检验荧光强度用来评估ROS浓度。将细胞在SWCNTs溶液中孵育4 h,经DCFH-DA荧光探针染色,充分漂洗,利用荧光酶标仪检测荧光强度(激发波长:488 nm,发射波长:525 nm)。

1.4.2 GSH 和 SOD 试剂盒检测细胞内 GSH 含量和 SOD 活力 细胞与 SWCNTs 溶液作用 24 h 后, 将细胞裂解后离心取上清液, 分别按照试剂盒说明书要求检测 GSH 浓度和 SOD 活力。

1.5 大鼠肺毒性检测 健康雄性 SD 大鼠购自第二军医大学实验动物中心 [许可证号: SCXK (沪) 2012-0003], 标准化饲养, 待体质量达 220~250 g 时可进行毒性检测。分别将 1 mL 生理盐水、0.5 mg/mL SWCNTs 和 1 mg/mL SWCNTs 通过气管灌流的方法, 使大鼠肺部染毒(若每只大鼠体质量按 250 g 计算, 则 0.5 mg/mL 剂量可换算成 2 mg/kg, 1 mg/mL 剂量为 4 mg/kg)。具体实验操作如下: (1)腹腔注射麻药将大鼠麻醉, 插入中空玻璃细管到大鼠气管; (2)将三通管的一端连接到中空玻璃细管, 一端连接动物呼吸机, 材料分散液则通过三通管的第三端接口注射到大鼠肺脏中; (3)SWCNTs 溶液要随着大鼠的呼吸频率注射, 使材料能够充分进入大鼠肺脏。染毒结束后大鼠自由进食。3 d 后麻醉大鼠并取出肺脏, 经 4% 多聚甲醛固定, 按常规方法制成组织病理切片, 常规 H-E 染色, 光镜下观察。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件分析数据。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较组间差异, 检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 SWCNTs 的表征 SWCNTs 的基本信息由生产商提供。在毒性测试前, 先利用 TEM 观察 SWCNTs 的形貌和分散状态, 可见镜下 SWCNTs 呈分散的管状(图 1)。

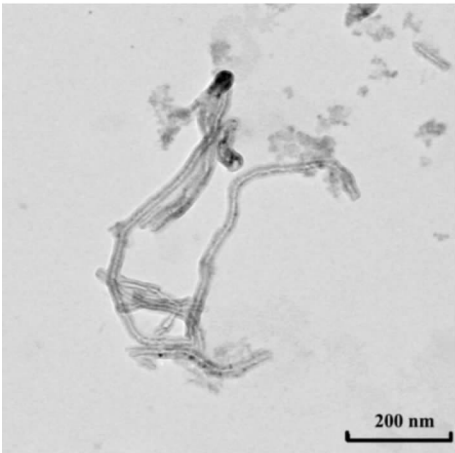


图 1 透射电镜观察 SWCNTs 形貌

Fig 1 Appearance of SWCNTs under transmission electron microscope

SWCNTs: Single-wall carbon nanotubes

2.2 SWCNTs 对 A549 细胞的毒性 A549 细胞活性检测结果(图 2A)显示, 细胞在 SWCNTs 溶液中孵育 24 h 后, 细胞活性随着 SWCNTs 浓度的增加而逐渐减小, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下为 69.0%, 在 200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下降至 42.3%。LDH 释放检测结果(图 2B)显示, 细胞外 LDH 浓度随着 SWCNTs 浓度增加呈上升趋势, 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下 LDH 释放率为 26.8%, 表明细胞膜在该浓度下明显受到损伤; 在 200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下 LDH 释放率高达 73.4%, 表明此时细胞膜损伤严重。为了进一步研究 SWCNTs 对 A549 细胞的毒性, 采用 Hoechst 33342 和 PI 荧光双染的方法检测细胞死亡情况, 结果(图 3)显示, 对照组细胞几乎无红色荧光(PI), 随着 SWCNTs 浓度增加, 被 PI 着色的细胞比例增加, 且红色荧光强度也增强, 表明随着 SWCNTs 浓度增加, 死亡细胞越来越多。采用 TEM 检测细胞超微结构变化, 结果(图 4)显示, A549 细胞在 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 SWCNTs 溶液中孵育 24 h 后, SWCNTs 主要以团聚的形式存在于细胞质中, 细胞核中没有发现 CNTs 的存在; 细胞超微结构受到严重损伤, 线粒体出现明显肿胀, 线粒体嵴溶解。

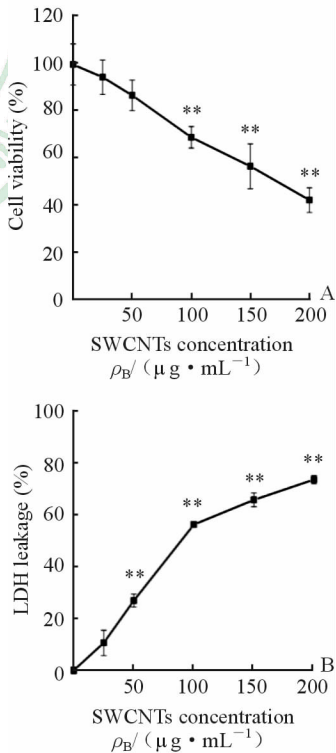


图 2 SWCNTs 对 A549 细胞活性(A)和 LDH 释放(B)的影响

Fig 2 Effects of SWCNTs on cell viability (A) and LDH leakage (B) of A549 cells

SWCNTs: Single-wall carbon nanotubes; LDH: Lactate dehydrogenase. * * $P < 0.01$ vs control (0 $\mu\text{g/mL}$ SWCNTs) group. $n = 5, \bar{x} \pm s$

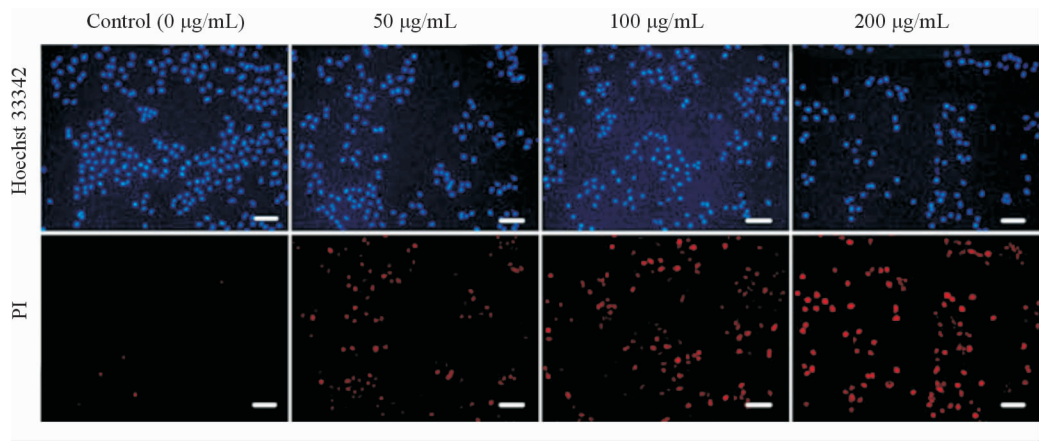


图 3 SWCNTs 对 A549 细胞死亡的影响

Fig 3 Effects of SWCNTs on death of A549 cells

SWCNTs: Single-wall carbon nanotubes; PI: Propidium iodide. Hoechst 33342: Blue; PI: Red. Scale bar: 20 μm

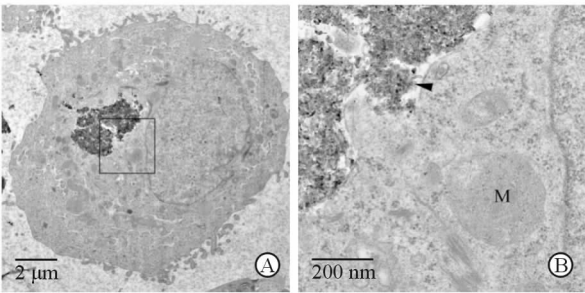


图 4 SWCNTs 对 A549 细胞超微结构的影响

Fig 4 Effects of SWCNTs on ultrastructure of A549 cells

B is the higher magnification of the area limited in A. The arrow indicates SWCNTs in cytoplasm; M indicates mitochondria.

SWCNTs: Single-wall carbon nanotubes

2.3 SWCNTs 对 A549 细胞氧化应激反应的影响 由荧光酶标仪检测结果(图 5A)可见, A549

细胞在 SWCNTs 溶液中培养 4 h 后,细胞内 ROS 含量明显增加,SWCNTs 质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时 ROS 含量为 207.2%,SWCNTs 质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时 ROS 含量增高至 345.6%。总体上,随着 SWCNTs 浓度增加,ROS 含量呈现先增加后保持不变的趋势。由图 5B 可见,细胞与不同浓度的 SWCNTs 作用 24 h 后,细胞内 GSH 含量随着 SWCNTs 浓度增加而降低,在 150 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下 GSH 相对含量降低至 65.2%。由图 5C 可见,SOD 活力随着 SWCNTs 浓度增加而逐渐降低,在 200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下 SOD 活性降至 50.6%。

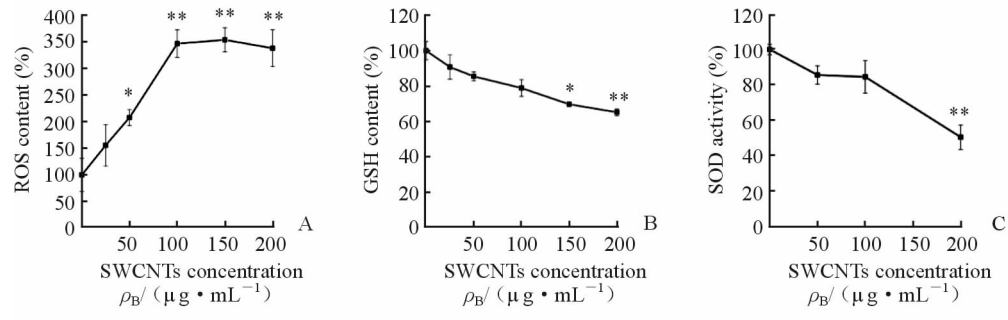


图 5 SWCNTs 对 A549 细胞氧化应激反应的影响

Fig 5 Effects of SWCNTs on oxidative stress of A549 cells

A: ROS content; B: GSH content; C: SOD activity. SWCNTs: Single-wall carbon nanotubes; ROS: Reactive oxygen species; GSH: Glutathione; SOD: Superoxide dismutase. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control (0 $\mu\text{g/mL}$ SWCNTs) group. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

2.4 SWCNTs 对大鼠肺组织病理的影响 通过气管灌流的方法使大鼠染毒不同剂量的 SWCNTs,饲养 3 d 后,大鼠体质量和毛发未发生明显变化,且没

有出现死亡和异常行为。切取大鼠肺组织进行病理学检测,结果(图 6)显示,SWCNTs 能进入到肺泡内,并在肺组织中积累,使肺泡壁出现明显水肿增

厚,从而使得肺泡空间减小。

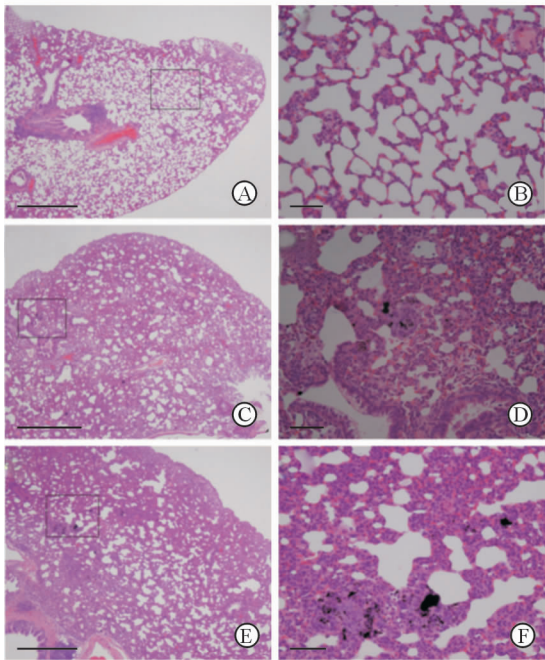


图 6 SWCNTs 对大鼠肺组织病理的影响

Fig 6 Effects of SWCNTs on pulmonary pathology of rats
A, B: Control; C, D: 2 mg/kg SWCNTs; E, F: 4 mg/kg SWCNTs; B, D and F are higher magnifications of the areas limited in A, C and E, respectively. SWCNTs: Single-wall carbon nanotubes. Scale bar: 1 000 μm (A, C, E), 100 μm (B, D, F)

3 讨论

由于具有特殊的物理化学性能,SWCNTs 被应用在多个科学领域^[7],人类通过呼吸接触到 SWCNTs 的概率也随之增大,因此不能忽视对其肺毒性的研究^[8-9]。本研究通过细胞毒性检测和动物实验,比较系统地研究了 SWCNTs 对肺毒性的 大小,并针对 SWCNTs 的毒性机制进行探究。

A549 作为肺上皮细胞系,被广泛应用在体外肺毒性的评估中^[10-11]。本研究发现,当 A549 细胞暴露在不同剂量的 SWCNTs 溶液中 24 h 后,细胞活性随着 SWCNTs 浓度增加而降低,在高浓度(100~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)下细胞活性显著降低。SWCNTs 不仅能引起 A549 细胞活性降低,还能破坏细胞膜和细胞超微结构。LDH 释放能反映细胞膜的损伤^[12],SWCNTs 在较低的剂量下能引起 LDH 明显释放,表明细胞膜容易被 SWCNTs 损伤。Hoechst 33342/PI 荧光双染结果发现,随着 SWCNTs 剂量增加,死亡细胞也逐渐增加,表现为细胞红色荧光增强。此外,暴露在 SWCNTs 环境下,A549 细胞结构

也发生了较大变化,细胞质内有大量团聚的 SWCNTs,线粒体受损严重,出现明显肿胀,线粒体内嵴基本溶解。作为细胞内重要的一种细胞器,线粒体的主要功能是为细胞提供 ATP,线粒体结构损伤势必会影响到正常生理功能,进而引起细胞死亡。

研究表明 CNTs 通过损伤线粒体引发 ROS 产生^[13],细胞内 ROS 具有较高的反应活性,可以对细胞产生多种危害,包括引发炎症反应、产生基因毒性、影响信号通路、诱发细胞凋亡等^[14-16]。细胞内 ROS 的产生往往早于其他变化^[17],本研究检测了 SWCNTs 暴露 4 h 内细胞内 ROS 含量变化,发现 ROS 浓度明显升高。GSH 和 SOD 作为细胞内 2 种重要的抗氧化剂,它们的含量和活力与 ROS 浓度有密切关系。实验结果也显示,高浓度的 SWCNTs 会引起细胞内 GSH 含量和 SOD 活力显著降低。有文献报道,CNTs 引发细胞内 ROS 产生,进而使脂质过氧化物 (lipid peroxidation, LPO) 浓度升高,使 SOD 活力和 GSH 浓度发生变化^[18-19]。细胞内 ROS 含量明显增加,抗氧化剂 GSH 和 SOD 明显降低,使得细胞内氧化能力强于还原能力,细胞氧化还原平衡被打破,细胞氧化还原能力失衡后引起细胞死亡^[20-21]。综合上述结果,我们认为氧化应激反应是 SWCNTs 引发 A549 细胞毒性的主要机制。

本研究通过大鼠体内毒性检测,发现 SWCNTs 可以在肺泡内积累,大多数 CNTs 被肺泡壁包裹。与正常大鼠相比,染毒 SWCNTs 的肺泡壁出现明显水肿增厚,肺泡体积明显减小。CNTs 化学性能较稳定,很难在人体内分解,文献报道,CNTs 在肺组织内长期积累,能引发肺纤维化、肉芽瘤和细胞癌变^[5, 22]。长期接触 CNTs 可能会使 CNTs 在肺组织内不断积累,从而造成肺脏发病率升高,甚至引发肺癌。积累在肺组织中的 SWCNTs 可能会穿过毛细血管壁,进入到血液中,对血液中的蛋白质和血细胞产生不利影响,同时还能借助血液循环扩散到其他器官,比如肾脏、脾脏和肝脏等。因此,在 CNTs 工业生产和大量应用中,应尽量全面通风,穿戴工作服、防尘口罩和手套,避免直接接触 CNTs;高浓度环境下需佩戴防护眼镜,并注意个人卫生,避免长时间接触 CNTs。

本研究发现无论是体外毒性检测还是体内毒性检测,SWCNTs 都表现出明显的肺毒性,其主要毒性机制是氧化应激反应。本研究内容和结果为安全生产和应用 SWCNTs 提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] JIA G, WANG H, YAN L, WANG X, PEI R, YAN T, et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene[J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 39: 1378-1383.
- [2] LIU Y, ZHAO Y, SUN B, CHEN C. Understanding the toxicity of carbon nanotubes[J]. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 702-713.
- [3] ZHAO X, LIU R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels[J]. *Environ Int*, 2012, 40: 244-255.
- [4] HE H, PHAM-HUY L A, DRAMOU P, XIAO D, ZUO P, PHAM-HUY C. Carbon nanotubes; applications in pharmacy and medicine[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 578290.
- [5] LAMBERTI M, PEDATA P, SANNOLO N, PORTO S, DE ROSA A, CARAGLIA M. Carbon nanotubes; properties, biomedical applications, advantages and risks in patients and occupationally-exposed workers[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2015, 28: 4-13.
- [6] CLIFT M J, ENDES C, VANHECKE D, WICK P, GEHR P, SCHINS R P, et al. A comparative study of different *in vitro* lung cell culture systems to assess the most beneficial tool for screening the potential adverse effects of carbon nanotubes[J]. *Toxicol Sci*, 2014, 137: 55-64.
- [7] ZHANG Q, HUANG J Q, QIAN W Z, ZHANG Y Y, WEI F. The road for nanomaterials industry: a review of carbon nanotube production, post-treatment, and bulk applications for composites and energy storage[J]. *Small*, 2013, 9: 1237-1265.
- [8] MORIMOTO Y, HORIE M, KOBAYASHI N, SHINOHARA N, SHIMADA M. Inhalation toxicity assessment of carbon-based nanoparticles[J]. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 770-781.
- [9] EMA M, GAMO M, HONDA K. A review of toxicity studies of single-walled carbon nanotubes in laboratory animals[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 74: 42-63.
- [10] FUJITA K, FUKUDA M, ENDOH S, MARU J, KATO H, NAKAMURA A, et al. Size effects of single-walled carbon nanotubes on *in vivo* and *in vitro* pulmonary toxicity[J]. *Inhal Toxicol*, 2015, 27: 207-223.
- [11] DAVOREN M, HERZOG E, CASEY A, COTTINEAU B, CHAMBERS G, BYRNE H J, et al. *In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21: 438-448.
- [12] FOTAKIS G, TIMBRELL J A. *In vitro* cytotoxicity assays; comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride[J]. *Toxicol Lett*, 2006, 160: 171-177.
- [13] HE X, YOUNG S H, SCHWEGLER-BERRY D, CHISHOLM W P, FERNBACK J E, MA Q. Multiwalled carbon nanotubes induce a fibrogenic response by stimulating reactive oxygen species production, activating NF- κ B signaling, and promoting fibroblast-to-myofibroblast transformation[J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24: 2237-2248.
- [14] MA Q. Transcriptional responses to oxidative stress; pathological and toxicological implications [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 125: 376-393.
- [15] ALARIFI S, ALI D, VERMA A, ALMAJHDI F N, AL-QAHTANI A A. Single-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity and DNA damage via reactive oxygen species in human hepatocarcinoma cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2014, 50: 714-722.
- [16] YE S, ZHANG H, WANG Y, JIAO F, LIN C, ZHANG Q. Carboxylated single-walled carbon nanotubes induce an inflammatory response in human primary monocytes through oxidative stress and NF- κ B activation[J]. *J Nanopart Res*, 2011, 13: 4239-4252.
- [17] CHEN B, LIU Y, SONG W M, HAYASHI Y, DING X C, LI W H. *In vitro* evaluation of cytotoxicity and oxidative stress induced by multiwalled carbon nanotubes in murine RAW 264. 7 macrophages and human A549 lung cells[J]. *Biomed Environ Sci*, 2011, 24: 593-601.
- [18] WANG J, SUN P, BAO Y, LIU J, AN L. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25: 242-250.
- [19] GUO Y Y, ZHANG J, ZHENG Y F, YANG J, ZHU X Q. Cytotoxic and genotoxic effects of multi-wall carbon nanotubes on human umbilical vein endothelial cells *in vitro*[J]. *Mutat Res*, 2011, 721: 184-191.
- [20] AOYAMA K, NAKAKI T. Glutathione in cellular redox homeostasis; association with the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1)[J]. *Molecules*, 2015, 20: 8742-8758.
- [21] YE Z W, ZHANG J, TOWNSEND D M, TEW K D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850: 1607-1621.
- [22] WANG L, STUECKLE T A, MISHRA A, DERK R, MEIGHAN T, CASTRANOVA V, et al. Neoplastic-like transformation effect of single-walled and multi-walled carbon nanotubes compared to asbestos on human lung small airway epithelial cells [J]. *Nanotoxicology*, 2014, 8: 485-507.