

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01234

• 综 述 •

几种纳米材料细胞毒性效应的研究现状

张艳芳^{1,2}, 金 婵², 马春旺¹, 杨勇骥^{2*}

1. 河南师范大学物理与信息工程学院理论物理研究所, 新乡 453007
2. 第二军医大学基础部生物物理教研室, 上海 200433

[摘要] 随着社会经济、科技的发展, 纳米材料在各个领域中的应用也越来越广泛, 在给人们生活带来便利的同时, 纳米材料的毒性效应也日益受到人们的高度关注。本文就纳米材料的特殊物理化学特性、纳米材料细胞生物毒性的研究方法、纳米材料对细胞造成的毒性效应等方面, 综合阐述几种纳米材料(碳基纳米材料、金属及金属氧化物等)的细胞毒性效应及存在的问题。最后, 展望了该研究方向的研究重点和亟待研究的重要问题, 为研究纳米材料的生物安全性提供导向。

[关键词] 纳米材料; 细胞毒性效应; 生物安全性

[中图分类号] R 12 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1234-05

Study on cytotoxic effects of several types of nano-materials: the current status

ZHANG Yan-fang^{1,2}, JIN Chan², MA Chun-wang¹, YANG Yong-ji^{2*}

1. Institute of Theoretical Physics, College of Physics and Information Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Hennan, China
2. Institute of Biophysics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Nano-materials have been increasingly widely used in various fields with the progression in science and technology. While bringing benefit to our life, their toxic effects also come to our attention. In this paper we review the cytotoxic effects and some problems of several kinds of nano-materials (carbon-based nano-materials, metal and metallic oxides and other nano-materials), considering the physicochemical characteristics of nano-materials, research methods of the nano-material cytotoxic effects, and the cytotoxicity of nano-materials. Finally, we also discuss the research focus of the area and issues need to be addressed, hoping to provide a guide for bio-safety research of nano-materials.

[Key words] nano-materials; cytotoxicity effect; bio-safety

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(11):1234-1238]

随着科技的快速发展, 纳米材料(nano-material)因其特殊性而被广泛应用于化妆品、电学器件、染料、涂料及医药诊断等各个领域^[1-3]。纳米材料的大量应用, 使人们在工作与生活中与其接触的机会也越来越多。同时, 大气颗粒物中也包含大量纳米级的颗粒污染物, 这些都对人类的健康造成了威胁, 纳米材料的生物安全性问题成为目前各国政府和科学家们关心的热点问题之一^[4-6]。

2003年4月, *Science* 和 *Nature* 相继发表文章^[7-8], 讨论纳米材料的生物学效应及对环境与健康的影响问题; 2004年6月, *Science* 和英国皇家科学院又再次载文^[9-10]强调, 必须对纳米材料的安全性问题进行研究。同年12月, 欧洲启动了《纳米安全综合研究计划》^[11]。我国也于2006年启动了“人造纳米材料的安全性研究及解决方案探索”^[12-13]。经过科学

家们几年的研究, 纳米材料对生物安全性的评估工作取得一定的进展^[14-17], 但不能解决其机制问题, 同时不同纳米材料对生物体的作用也各有差异, 同一材料不同构象、粒径对生物体的作用也各有千秋, 因此对于该方面的工作仍需要不断地推进。本文简要阐述几种纳米材料细胞毒性效应的研究现状。

1 纳米材料的物理化学特性

纳米材料是指物质结构在三维空间中至少有一维的尺度处于纳米量级(1~100 nm)或由纳米结构单元构成的材料。构成纳米材料的基本单位尺度很小, 且具有很大的表面积, 使得纳米材料具有不同于宏观尺度材料的许多特殊效应^[8]和物理化学特性^[6, 18]。

[收稿日期] 2010-04-19 **[接受日期]** 2010-06-29

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(2006CB932505), 上海市科学技术委员会纳米专项(0752nm020)。Supported by State Key Development Program for Basic Research of China (2006CB932505) and Special Fund for Nano Research of Shanghai Committee of Science and Technology (0752nm020).

[作者简介] 张艳芳, 硕士生。E-mail: zhangyanfang2202@163.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81870923, E-mail: yjyang22@163.com

1.1 小尺寸效应 纳米粒子的粒径非常小, 当与许多物理特性长度(如光波波长、传导电子的德布罗意波长)相当, 甚至更小时, 晶体周期性的边界条件将被破坏, 导致其磁性、光吸收、热、化学活性、催化性和熔点等性质发生变化, 表现出奇异的小尺寸效应。纳米尺寸材料其粒径远小于一般细胞或者是红细胞的直径。这使得它们有机会进入细胞内, 由经过人体的血液循环, 对人体的各个部位造成损伤。

1.2 表面效应 纳米材料的表面效应即纳米颗粒表面原子数与总原子数之比随纳米微粒尺寸变小而急剧增大, 粒子的表面能及表面张力也随之增加。即纳米粒子的粒径越小, 其表面积越大, 表面原子的比例就越高^[19], 表面能就越高。由于表面缺陷和许多悬挂键, 致使表面原子极易与其他原子结合而稳定下来, 具有很高的化学反应活性, 这有利于吸收、催化、烧结等。

1.3 宏观量子隧道效应 隧道效应是指微观粒子具有贯穿势垒的能力, 后来人们发现一些宏观量如磁化强度、磁通量也具有隧道效应, 称之为宏观隧道效应。纳米粒子的隧道效应特性同量子尺寸效应一起确定了微电子器件的微型化极限, 也限制了信息储存的最短时间。

2 纳米材料的细胞毒性效应研究现状

2.1 细胞毒性效应的研究方法 研究纳米材料对细胞毒性作用, 第一步要解决的问题是明确纳米材料对细胞造成作用的检测方法问题。与常规材料的生物学效应不同, 纳米材料的生物效应与其物理化学特性有密切的相关, 如纯度、粒径、表面积、结构、团聚程度等等。

目前, 研究细胞毒性效应的研究方法主要根据细胞膜完整性、通透性发生改变以及线粒体的活动来进行检测。常用的方法大致分为三类: 第一类是通过细胞存活率判断细胞毒性大小, 如 MTT 法、XTT 法、WST-1 法和 CCK-8 法。实验原理是细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶, 可将四唑盐类物质(如 MTT、XTT、WST-1、WST-8 等)还原生成有颜色的甲臞(formazan), 然后通过酶标仪在相应波长处读取光密度 D 值, 从而检测细胞毒性大小。其中, MTT 法^[20-24]是目前纳米材料细胞毒性检测中最常用的方法, 步骤有点烦琐, 且 MTT 被线粒体内的一些脱氢酶还原生成的 formazan 不是水溶性的, 需要有特定的溶解液来溶解, 引起实验误差。XTT、WST-1 和 WST-8 产生的 formazan 都是水溶性的, 操作简单且无误差。WST-8 产生的 formazan 比 XTT 和 WST-1 产生的 formazan 更易溶解, 反应时间也短, 实验结果更稳定。第二类是用锥虫蓝、中性红以及碘化丙啶(PI)等染料染色, 再结合光学显微镜、酶标仪、荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜进行计数或检测, 来研究细胞毒性大小。由于成本低, 操作简单, 锥虫蓝^[25]、中性红^[26]以及碘化丙啶^[24, 26]染色法也常用于纳米材料细胞毒性效应的研究。第二军医大学基础部生物物理教研室在研究过程中采用 PI 染色利用激光共聚焦观察, 这样可以有效地研究纳米材料对细胞膜的作用。第三类是用乳酸脱氢酶(LDH)释放法检测细胞毒性^[27-28]。乳酸脱氢酶是一种稳定的蛋白质, 存在于正常细胞的胞质中, 细胞受损伤或凋亡时释放到细胞外, 此时细胞培养液中

LDH 活性与细胞死亡数目成正比, 通过检测细胞培养上清中 LDH 的活性, 可判断细胞受损的程度。此法操作简便快捷, 是常用的研究纳米材料细胞毒性的方法之一。另外, 还可以考虑通过测定蛋白浓度或细胞中 ATP 水平等方法间接检测纳米材料对细胞器的毒性作用的大小。

随着对纳米材料细胞毒性效应机制的深入研究, 纳米材料细胞毒性的研究方法推广至氧化应激反应^[6, 14, 18]、基因毒性等方面。其中, 测定谷胱甘肽浓度^[8, 14, 29]、TBA 法测量丙二醛含量及活性氧的检测^[30]常用于评价纳米材料引起的氧化应激反应; 检测纳米材料对 DNA 潜在毒性的实验方法有流式细胞术^[5]、彗星实验^[31-32]、原子力显微镜^[33]和同步辐射^[34]等检测手段。由此可见, 有关纳米材料细胞毒性效应以及相关的研究方法比较多, 在研究工作中需要采用几种实验方法相互结合、相互印证, 得到可靠的实验结果, 有效地评估纳米材料对细胞毒性的作用。因此, 建立适用纳米颗粒对细胞毒性作用的方法也是目前迫在眉睫的工作。目前, 第二军医大学基础部生物物理教研室在研究过程中主要采用透射电子显微镜、激光扫描共聚焦显微镜、同步辐射、分子生物学等检测方法。

2.2 碳基纳米材料的细胞毒性效应 碳基纳米材料包括富勒烯(fullerenes)和碳纳米管(CNTs)两种不同形式的纳米材料, 其中富勒烯是由 60 个碳原子组成的碳原子簇结构分子 C_{60} , 它们是由非平面的五元环、六元环等构成的封闭式空心球形或椭球形结构的共轭烯; 碳纳米管是一维纳米材料, 根据管壁结构中碳原子层数的不同, 分为单壁碳纳米管(SWNTs, 直径 0.7~1.5 nm)和多壁碳纳米管(MWNTs, 直径 2~50 nm)。

富勒烯在不同条件下对不同细胞毒性效应的研究确定些许成果。2004 年, Sayes 等^[35]研究未经衍生化的 C_{60} 和表面衍生化的 $C_{60}(OH)_{24}$ 对 HDF 和人肝癌细胞(HepG2)的影响, 结果显示: 未经衍生化的 C_{60} 能够引起人表皮纤维细胞(HDF)和 HepG2 的细胞膜破裂, 乳酸脱氢酶的含量升高, 而经过表面衍生化的 $C_{60}(OH)_{24}$ 组细胞无明显变化。2006 年, Isakovic 等^[36]比较研究了 C_{60} 和 $[C_{60}(OH)_n]$ 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, 研究纳米颗粒作用 24 h 后的细胞存活率, 发现 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 C_{60} 可致细胞存活率下降至 20% 以下, 而 $[C_{60}(OH)_n]$ 在 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的暴露浓度下对细胞存活率仍无明显影响, 当剂量增加至 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时可使细胞存活率下降至 40% 左右, 这说明 C_{60} 对肿瘤细胞杀伤力远远高于 $[C_{60}(OH)_n]$ 。由上述研究可知, 同一材料不同结构形态所引起的细胞生物学效应也存在很大的差异, 且影响富勒烯毒性大小的主要因素有材料经修饰与否、剂量及其细胞的不同。因此, 对于富勒烯对细胞的毒性作用则需要从其材料本身的特征、其所修饰的物质以及计量等方面去考虑。

碳纳米管具有强度高、吸收能力强、热稳定性好和电磁学等多种特性, 已广泛应用于生产、生活中, 由它引起生物安全性的问题, 也日渐受到人们高度的关注。2003 年, Shvedova 等^[37]研究未纯化的单壁碳纳米管对人上皮角质细胞(HaCaT)的作用, 结果显示: 不同浓度的单壁碳纳米管致使

细胞内自由基介导的氧化加强、细胞存活率降低、细胞形态也发生变化。2005年, Jia等^[23]的研究结果显示: 平均直径1.4 nm的单壁碳纳米管对肺巨噬细胞的毒性远大于平均直径为10~20 nm多壁碳纳米管, 单壁碳纳米管在暴露剂量为0.38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时造成巨噬细胞超微结构的严重损伤, 而多壁碳纳米管则当暴露剂量达到3.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时才会造成细胞结构的损伤。相关研究结果^[23, 38]还显示, 在单壁碳纳米管和多壁碳纳米管的计量达到一定值时会诱导细胞凋亡。崔大祥等^[39]研究了SWNTs对人HEK293细胞的影响, 发现SWNTs会使细胞分裂过程停留在G₁期, 引起细胞凋亡, 降低细胞的黏附能力, 并呈现良好的剂量-效应关系。Shie等^[40]研究结果显示多壁碳纳米管引起DNA单链断裂, 它的细胞毒性与长度及金属的纯度无关。An等^[33]发现碳纳米管还结合于DNA上, 导致DNA的损伤效应。由上述研究可知, 碳纳米管可以引起细胞结构的损伤、存活率下降、细胞内自由基含量升高以及DNA断链等, 致使在一定条件下细胞的凋亡。然后, 对细胞的毒性作用与碳纳米管的管壁厚度成线性关系, 即管壁越厚, 对细胞的损伤越小。不过对于这些研究结构也存在争议。Shi等^[28]未发现功能化的单壁碳纳米管对人早幼粒白血病细胞(HL60)的损伤作用; Fiorito等^[41]也未检测到经化学气相沉积法纯化的单壁碳纳米管对鼠巨噬细胞(J771)的毒性效应; Dumortier等^[42]的研究也显示, 功能化碳纳米管能被B淋巴细胞、T淋巴细胞和巨噬细胞摄取, 且这些碳纳米管不影响免疫细胞的功能活性。由此可见, 碳纳米管对细胞毒性作用的研究需进一步的开展, 不仅要考虑从纳米材料本身的特性考虑, 同时还需考虑不同细胞对碳纳米管的效应差异。

近年来, 国内外有关碳基纳米材料细胞毒性的研究已经广泛地开展。研究过程中暴露了各种问题, 尤其是其对细胞作用的机制问题。为进一步深入研究碳基纳米材料细胞毒性的机制, 应该从研究手段、细胞的选择、化学修饰、真实暴露等几个方面着手, 更为深入地了解其对细胞的毒性作用。

2.3 金属及金属氧化物纳米材料的细胞毒性效应

金属纳米材料在涂料、化妆品、药物引导等领域的应用尤其广泛。纳米二氧化钛材料是应用十分广泛的金属氧化物纳米材料之一。目前, 对于纳米二氧化钛对细胞毒性效应的研究更为系统。首先研究纳米二氧化钛颗粒(TiO₂ NPs)与细胞膜的相互作用。Sakai等^[43]研究显示, 纳米TiO₂能引起人体膀胱细胞系细胞内钙离子浓度显著上升。即, 当细胞及细胞器中的膜受到破坏, 大量钙离子渗入细胞内。进而引起TiO₂ NPs与进入细胞和细胞器, 发生氧化应激反应, 造成细胞的深度损伤, 甚至凋亡。Gurr等^[44]报道纳米TiO₂颗粒引起人支气管上皮细胞的氧化损伤, 存在着尺寸效应。Heinlaan等^[45]研究了纳米TiO₂等纳米金属氧化物对细菌细胞的毒性作用, 除了进入细胞内的纳米颗粒引起细胞损伤外, 未进入细胞的纳米材料引起接触部位附近局部环境的改变, 这会增加纳米金属氧化物的溶解或产生损害细胞膜的活性氧物种。Rahman等^[46]在比较直径20 nm的TiO₂颗粒和直径200 nm的TiO₂颗粒对原代大鼠胚胎成纤维细胞的研究中发现: 经直径20 nm的TiO₂ NPs处理后的细胞, 其微核数目显著升高, 并引起

了细胞凋亡; 而直径200 nm的TiO₂ NPs未引起细胞内微核数目的变化。TiO₂ NPs还可以引起DNA的氧化损伤, 使DNA解旋与断裂^[47]; 还能结合于DNA碱基^[32]中, 引起细胞遗传物质DNA的结构和表达。Dunford等^[48]研究发现含有纳米TiO₂(直径20~50 nm)的防晒化妆品经紫外线照射后, 会引起细胞内DNA的解旋与断裂。Wamer等^[49]证实纳米TiO₂对RNA的损伤间接影响了细胞遗传信息的表达。另外, 肺泡巨噬细胞是一多功能的间质细胞, 具有吞噬、清除异物和保护肺的功能, 是呼吸道的第一道防线。TiO₂ NPs对巨噬细胞的作用是较早开展的研究工作之一, 该方面的报道相当广泛。Oberdorster等^[50]的结果显示: 肺泡巨噬细胞对直径250 nm的TiO₂ NPs清除周期是对直径20 nm TiO₂ NPs清除周期的3倍。即纳米颗粒的尺寸越小, 越难以被巨噬细胞清除。Renwick等^[51]研究纳米TiO₂对巨噬细胞株(J774.2MF)吞噬能力的影响, 其结果显示: 直径29 nm TiO₂ NPs比直径250 nm TiO₂ NPs对巨噬细胞的吞噬能力降低能力更明显。近年来, 研究TiO₂ NPs对细胞毒性效应由原先不同尺寸, 过渡到TiO₂ NPs本身晶体结构类型的差异; 由原来的细胞水平, 渐入到基因水平、蛋白水平。Li等^[34]通过皮肤暴露的方式, 研究不同晶体结构的纳米二氧化钛对角质化细胞株(HEL-30)的毒性效应, 其结果显示锐钛矿型纳米TiO₂材料的细胞毒性效应要大于红金石型纳米TiO₂材料。Wang等^[52]通过嗅球滴注小鼠, 研究了锐钛矿型和红金石型纳米TiO₂材料的神经毒性, 其结果显示, 锐钛矿型TiO₂ NPs在海马中的分布更为密集, 对记忆系统的损伤更为严重。Bernardeschi等^[53]利用锥虫蓝排斥法、单细胞凝胶电泳研究了两种晶相纳米二氧化钛对宽嘴海豚白细胞潜在的毒性效应。这些研究结果显示, 锐钛矿型TiO₂ NPs的毒性要远大于金红石型。相关报道^[14]也显示: 锐钛矿型纳米材料通过产生活性氧物种, 对细胞及DNA造成损伤; 而金红石型TiO₂ NPs就未出现上述现象。上述相关报道从TiO₂ NPs的尺度、构象等方面研究其对细胞的毒性效应, 但多种手段的研究并未能解决最本质的机制问题, 因此该方面的工作需要进一步的开展。第二军医大学基础部生物物理教研室也利用TEM、SR等各种技术手段作进一步深入的研究。为TiO₂ NPs的生物安全性研究提供可靠地实验依据。

对于其他金属及金属氧化物纳米材料的研究也很广泛。Hussain等^[54]研究不同粒径的多种金属和金属氧化物材料对大鼠肝细胞(BRL3A)的毒性作用, 主要材料包括Ag(15, 100 nm)、MoO₃(150 nm)、Al(103 nm)、Fe₃O₄(30, 47 nm)、TiO₂(40 nm)、CdO(1 μm)、MnO₂(1~2 μm)、W(27 μm)。结果显示, 当纳米材料的浓度 $\geq 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时肝细胞均出现萎缩或细胞结构异常, 当剂量低于10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时并未呈现明显的毒性效应; 同一浓度下不同材料所表现出的细胞毒性也不同, 其中Ag纳米材料的细胞毒性最为显著。Cengelli等^[55]将修饰过的超顺磁性氧化铁纳米颗粒分别作用于大鼠脑血管内皮细胞(EC219)和小鼠小胶质细胞(N9和N11), 通过测定细胞内铁浓度发现, 不同类型的纳米颗粒进入细胞的能力不一, 对细胞造成的损伤也存在明显的差异。Karlsson等^[5]报道, 铁氧化物纳米材料的毒性很小且与颗粒尺寸的大小无

明显关系。

2.4 大气颗粒物中纳米材料的细胞毒性效应 2004 年, Block 等^[56] 研究小胶质细胞在纳米尺寸的汽车尾气颗粒 (DHP) 诱导的多巴胺能神经元退化性中的作用, 发现 DHP 激活了小胶质细胞, 产生了自由基, 导致多巴胺能神经元的凋亡。目前, 关于大气排放污染物中纳米级颗粒所引起的生物安全性研究甚少。

3 展 望

纳米材料的细胞生物毒性效应研究工作广泛开展, 相关实验现象还需要进一步验证, 提供更为可靠的依据, 这为今后的研究提供方向。关于纳米材料细胞生物毒性效应的研究重点可能为: (1) 进一步根据纳米材料的立体效应研究其细胞毒性效应, 提供更为可靠的实验数据; (2) 纳米材料的材料构象不同造成的细胞毒性效应; (3) 从分子水平研究纳米材料的细胞毒性效应; (4) 经过各种化学方法修饰后, 尽量保持纳米材料的特性, 但使其的细胞毒性效应降到最低。

大量研究表明, 多种纳米颗粒显示其细胞生物毒性效应, 且这些效应与纳米颗粒的粒径、比表面积、晶体构象、暴露剂量以及暴露方式有关。纳米材料在未进入细胞前, 对细胞的局部环境造成损伤; 进入细胞后, 对细胞、遗传性都存在潜在的损伤和危害。因此, 对纳米材料的细胞生物安全性评估成为不可避免的问题。目前, 对于纳米材料的安全性评估还很不完善, 但是纳米材料的毒性效应并不是绝对的, 可以通过化学修饰保持纳米材料的优越性又避免其毒性效应, 使其更为安全、广泛地应用于各个领域。

[参 考 文 献]

[1] Lee Y J, Ruby D S, Peters D W, McKenzie B B, Hsu J W. ZnO nanostructures as efficient antireflection layers in solar cells[J]. *Nano Lett*, 2008, 8: 1501-1505.

[2] Han J Y, Yu Z T, Zhou L. The effects of different hydroxyapatite/TiO₂ composite coatings on protein expression of osteoblast [J]. *Mater Sci Forum*, 2009, 610-613: 1104-1108.

[3] Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy[J]. *Part Fibre Toxicol*, 2005, 2: 8.

[4] Chhabra R, Sharma J, Wang H, Zou S, Lin S, Yan H, et al. Distance-dependent interactions between gold nanoparticles and fluorescent molecules with DNA as tunable spacers[J]. *Nanotechnology*, 2009, 20: 485201.

[5] Karlsson H L, Gustafsson J, Cronholm P, Moller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size[J]. *Toxicol Lett*, 2009, 188: 112-118.

[6] Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel[J]. *Science*, 2006, 311: 622-627.

[7] Service R F. Nanomaterials show signs of toxicity[J]. *Science*, 2003, 300: 243.

[8] Brumfiel G. Nanotechnology: a little knowledge[J]. *Nature*, 2003, 424: 246-248.

[9] Dreher K L. Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles[J]. *Toxicol Sci*, 2004, 77: 3-5.

[10] Service R F. Nanotoxicology: nanotechnology grows up[J]. *Science*, 2004, 304: 1732-1734.

[11] Dowling A, Clift R, Grobert N, Hutton D, Oliver R, O'Neill O, et al. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties[M]. London: The Royal Society & The Royal Academy of Engineering Report, 2004: 61-64.

[12] Chen Z, Meng H, Xing G M, Chen C Y, Zhao Y L. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo* [J]. *Toxicol Lett*, 2006, 163: 109-120.

[13] Wang B, Feng W Y, Wang T C, Jia G, Wang M, Shi J W, et al. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice[J]. *Toxicol Lett*, 2006, 161: 115-123.

[14] Auffan M, Rose J, Bottero J Y, Lowry G V, Jolivet J P, Wiesner M R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective[J]. *Nat Nanotechnol*, 2009, 4: 634-641.

[15] Amano T, Toyooka T, Ibuki Y. Preparation of DNA-adsorbed TiO₂ particles—augmentation of performance for environmental purification by increasing DNA adsorption by external pH regulation[J]. *Sci Total Environ*, 2010, 408: 480-485.

[16] Kurepa J, Paunesku T, Vogt S, Arora H, Rabatic B M, Lu J, et al. Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO₂ alizarin red S nanoconjugates in arabisopsis thaliana [J]. *Nano Lett*, 2010, 10: 2296-2302.

[17] Hung A M, Micheel C M, Bozano L D, Osterbur L W, Wallraff G M, Cha J N. Large-area spatially ordered arrays of gold nanoparticles directed by lithographically confined DNA origami[J]. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5: 121-126.

[18] Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Semp J, Oberley T, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm[J]. *Nano Lett*, 2006, 6: 1794-1807.

[19] Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles[J]. *Environ Health Perspect*, 2005, 113: 823-839.

[20] Yang H, Wu Q, Tang M, Liu X, Deng H H, Kong L, et al. *In vitro* study of silica nanoparticle-induced cytotoxicity based on real-time cell electronic sensing system[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010, 10: 561-568.

[21] Roa W, Zhang X, Guo L, Shaw A, Hu X, Xiong Y, et al. Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle [J]. *Nanotechnology*, 2009, 20: 375101.

[22] Trickler W J, Nagvekar A A, Dash A K. A novel nanoparticle formulation for sustained paclitaxel delivery[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2008, 9: 486-493.

[23] 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.

[24] Worle-Knirsch J M, Pulskamp K, Krug H F. Oops they did it a-

- gain! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays[J]. *Nano Lett*, 2006, 6: 1261-1268.
- [25] Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, et al. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis[J]. *Toxicol Lett*, 2006, 160: 121-126.
- [26] Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, et al. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells[J]. *Nano Lett*, 2006, 6: 1522-1528.
- [27] Isakovic A, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Mirkovic M, et al. Distinct cytotoxic mechanisms of pristine *versus* hydroxylated fullerene[J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91: 173-183.
- [28] Shi Kam N W, Jessop T C, Wender P A, Dai H. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 6850-6851.
- [29] Simon-Deckers A, Loo S, Mayne-L'hermite M, Herlin-Boime N, Menguy N, Reynaud C, et al. Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria[J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43: 8423-8429.
- [30] Jang D, Lee H Y, Park M, Nam S R, Hong J I. Nano- and micro-structure fabrication by using a three-component system[J]. *Chemistry*, 2010, 16: 4836-4842.
- [31] Donaldson K, Stone V, Tran C L, Kreyling W, Borm P J. Nanotoxicology[J]. *Occup Environ*, 2004, 61: 727-728.
- [32] Sayes C M, Liang F, Hudson J L, Mendez J, Guo W, Beach J M, et al. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro*[J]. *Toxicol Lett*, 2006, 161: 135-142.
- [33] An H, Liu Q, Ji Q, Jin B. DNA binding and aggregation by carbon nanoparticles[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393: 571-576.
- [34] Li N, Ma L L, Wang J, Zheng L, Liu J, Duan Y M, et al. Interaction between nano-anatase TiO₂ and liver DNA from mice *in vivo*[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2010, 5: 108-115.
- [35] Sayes C M, Gobin A M, Ausman K D, Mendez J, West J L, Colvin V L. Nano-C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation[J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 7587-7595.
- [36] Isakovic A, Markovic Z, Nikolic N, Todorovic-Markovic B, Vranjes-Djuric S, Harhaji L, et al. Inactivation of nanocrystalline C₆₀ cytotoxicity by gamma-irradiation[J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 5049-5058.
- [37] Shvedova A, Castranova V, Kisin E, Schwegler-Berry D, Murry A, Gandelman V, et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2003, 66: 1909-1926.
- [38] Zheng L X, O'Connell M J, Doorn S K, Liao X Z, Zhao Y H, Akhadvov EA, et al. Ultralong single-wall carbon nanotubes[J]. *Nat Mater*, 2004, 3: 673-676.
- [39] Cui D, Tian F, Ozkan C S, Wang M, Gao H. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells[J]. *Toxicol Lett*, 2005, 155: 73-85.
- [40] Shie J W, Yogeswaran U, Chen S M. Electroanalytical properties of cytochrome c by direct electrochemistry on multi-walled carbon nanotubes incorporated with DNA biocomposite film[J]. *Talanta*, 2008, 74: 1659-1669.
- [41] Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Togna A, Togna G. Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2006, 6: 591-599.
- [42] Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, et al. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells[J]. *Nano Lett*, 2006, 6: 1522-1528.
- [43] Sakai H, Ito E, Cai R X, Yoshilka T, Kubota Y, Hashimoto K, et al. Intracellular Ca²⁺ concentration change of T24 cell under irradiation in the presence of TiO₂ ultrafine particles[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1201: 259-265.
- [44] Gurr J R, Wang A S, Chen C H, Jan K Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells[J]. *Toxicology*, 2005, 213: 66-73.
- [45] Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier H C, Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*[J]. *Chemosphere*, 2008, 71: 1308-1316.
- [46] Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss D G, et al. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts[J]. *Environ Health Perspect*, 2002, 110: 797-800.
- [47] Hall J D, McLean T M, Smalley S J, Waterland M R, Telfer S G. Chromophoric dipyrin complexes capable of binding to TiO₂: Synthesis, structure and spectroscopy[J]. *Dalton T*, 2010, 39: 437-445.
- [48] Dunford R, Salinaro A, Cai L, Serpone N, Horikoshi S, Hidaka H, et al. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients[J]. *Febs Lett*, 1997, 418: 87-90.
- [49] Wamer W G, Timmer W C, Wei R R, Miller S A, Kornhauser A. Furocoumarin-photosensitized hydroxylation of guanosine in RNA and DNA[J]. *Photochem Photobiol*, 1995, 61: 336-340.
- [50] Oberdorster G, Ferin J, Lehnert B E. Correlation between particle size, *in vivo* particle persistence, and lung injury[J]. *Environ Health Perspect*, 1994, 102: 173-179.
- [51] Renwick L C, Donaldson K, Clouter A. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 172: 119-127.
- [52] Wang J, Chen C, Liu Y, Jiao F, Li W, Lao F, et al. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases[J]. *Toxicol Lett*, 2008, 183: 72-80.
- [53] Bernardeschi M, Guidi P, Scarcelli V, Frenzilli G, Nigro M. Genotoxic potential of TiO₂ on bottlenose dolphin leukocytes[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396: 619-623.
- [54] Hussain S M, Hess K L, Gearhart J M, Geiss K T, Schlager J J. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells[J]. *Toxicol In vitro*, 2005, 19: 975-983.
- [55] Cengelli F, Maysinger D, Tschudi-Monnet F, Montet X, Corot C, Petri-Fink A, et al. Interaction of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles with brain structures[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318: 108-116.
- [56] Block M L, Wu X, Pei Z, Li G, Wang T, Qin L, et al. Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase[J]. *FASEB J*, 2004, 18: 1618-1620.