

碳纳米管在纳米医药中的研究进展

但志刚¹,蔡建明²,倪瑾² (1.第二军医大学药学院有机化学教研室,上海 200433; 2.第二军医大学海军医学系放射医学教研室,上海 200433)

摘要 目的:总结碳纳米管在纳米医药领域中的最新研究进展,为进一步研究和应用碳纳米管提供相关依据。方法:收集近年来国内外相关文献,对碳纳米管的毒理学和药理学方面的研究进行总结分析。结果与结论:近年来碳纳米管在生物医学中有多种应用,在诊断学和治疗学上出现了一个新领域。

关键词 碳纳米管;毒理学;药理学;纳米医药

中图分类号: TB383 **文献标识码**: A **文章编号**: 1006-0111(2009)03-0167-04

1 引言

随着近几年纳米材料的不断出现,纳米产品广泛应用于各领域,并在生物医学上已经有了多方面的应用。尽管纳米医药的应用前景广阔,但由于其有害因素尚未明确,人们对纳米医药缺乏足够的信心。临床上常选择的核医学介入放射治疗肿瘤的方法与纳米医药有相似之处,介入疗法能达到治疗或根除疾病组织的目的,效果良好,但存在副作用,往往要以牺牲正常组织的某些功能为代价。纳米医药是不是也有类似情况,值得深入研究。

本文将对碳纳米管(carbon nanotube, CNT)作为纳米药物的初步体内研究状况作一简要的回顾,这些研究主要集中于纳米材料的安全性和毒性方面。目前对CNT药理学特性的研究已经开始,随着其药理学研究的深入,CNT在纳米医药上的应用机制、局限性或良好前景将会逐渐明朗。

2 碳纳米管(CNT)

2.1 结构 CNT的结构类似于由碳原子形成的六边形网络片层所组成的管状中空体。这种新的纳米材料是富勒烯家族中的一种。根据其结构,CNT大致可分为两类:由单层石墨片卷曲而成的单壁碳纳米管(single-walled nanotubes, SWNTs)和由多层石墨卷曲而成的多壁碳纳米管(multi-walled nanotubes, MWNTs)。碳纳米管有不同纳米级别:单壁碳纳米管的直径在0.4~2.0 nm,长度可达20~1000 nm;多壁碳纳米管直径在1.4~100 nm,长度达几个 μm 。

2.2 理化性质 CNT有着非常好的物理化学性能:如结构有序、机械性能好、导电性和导热性好、具

有金属或半金属性能以及大的表面积。这些性状使得CNT作为一种特殊的材料应用于包括生物医学在内的各个领域中^[1],应用范围从遗传学检测、异常分子的传感器到组织再生中细胞生长的底物以及各种诊断和治疗试剂的传递系统。其中药物传递是生物医药领域最感兴趣的应用。

3 药物传递系统

碳纳米管用作药物、抗原和基因载体系统,是利用其细胞穿透性,并最大限度降低毒副作用。Liu等^[2]研究了CNT在小鼠体内的生物分布和肿瘤靶向作用,发现SWNTs主要分布在肝和脾中,在肌肉、骨骼、皮肤及其他器官中只有少量的聚集,SWNTs独特的一维形状和柔韧的结构使得能够产生多价效应,并增强肿瘤亲和力,促进SWNTs从微血管中渗透出来并穿越血管和间隙屏障到达肿瘤细胞。

Prato研究小组^[3]报道,通过SWNTs和MWNTs装载多肽、蛋白质、核酸及药物并注入到哺乳动物细胞,表现出了较好的生物效应。Liu等^[4]利用PEG修饰CNT,制得水溶性的CNT并载带紫杉醇,用乳腺癌肿瘤小鼠模型检测了抗肿瘤作用,与紫杉醇相比,CNT载带提高了穿透性以及血液循环中的贮留时间,对4T1乳腺癌细胞有很好的抑制作用,且对正常细胞没有明显毒副作用。Hampel等^[5]将CNT氧化开口并载带卡铂,通过成活力分析研究了CNT的细胞增殖及细胞毒性作用,体外研究表明载带卡铂的CNT抑制膀胱癌细胞的生长,而未载带卡铂的CNT对癌细胞的生长几乎没有抑制作用。

Pantaro等^[6]将口蹄疫病毒感染细胞的中性B细胞表位偶联到CNT上,中性B细胞表位仍暴露在外,可被抗体识别。实验发现肽修饰的CNT仍可引发抗体的应答,CNT与抗体之间并没有交叉反应,说明CNT不影响抗原表位,可用作疫苗载体。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670615)。

作者简介:但志刚(1984-),男,硕士研究生。E-mail: dzhigang329@163.com。

通讯作者:倪瑾。E-mail: jini@smmu.edu.cn。

Venkatesan等^[7]的研究表明在不同类型的纳米颗粒中,CNT给药系统在提高红细胞生成素(EPO)的生物利用度方面是最好的,这项研究表明CNT载药系统能够非常成功提供EPO口腔选择性给药,但由于EPO在胃的特殊环境中以及酶的作用下变性,目前还没有能够实现临床应用。随着纳米医药时代的到来,CNT系统的药理学和治疗学特性将会在更多的体内研究中阐明。因此,对CNT结构技术的进一步研究将必定对诊断和治疗应用带来新的希望。

4 CNT的毒性研究

总体上,纳米颗粒的有害影响是由各种因素综合作用所引起的,其中有两个比较重要的因素:大的表面积和其内在毒性。与常规的较大平均粒径的颗粒相比,100 nm内的纳米颗粒对肺的潜在毒性大,纳米颗粒可以活化炎症和免疫应答,可能影响正常组织功能^[8]。由于CNT纳米级别的尺寸,进入到生物体内可能会诱导出意想不到的毒理学效应。

4.1 CNT对整体环境的影响 目前大多数研究都是关于CNT的毒理学,特别是从公共健康和CNT生产工人的身体健康角度,论述其对人类健康和环境的负面影响。Maynard等^[9]已经研究了在小规模生产实验室中未纯化的SWNTs在空气中的释放以及与工作者潜在的接触途径。他们发现处理未纯化的产品空气中的微粒浓度达到 $53 \mu\text{g}/\text{m}^3$,手套沉积物为 $0.2 \sim 6 \text{ mg}$ 。Cheng等^[10]通过不同环境条件下的CNTs的特性以及斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎的发育来研究CNT对水生环境的影响。研究表明胚胎绒毛膜对SWNTs团块是一个有效的防护屏障,并推断孵化延迟可能是由SWNTs中残留的痕量催化剂Co和Ni引起的,表明粗的SWNTs中的金属污染物释放到水生环境中将影响水生生命。Huczko等^[11]用含有吐温或十二烷基硫酸钠(SDS)的盐溶液通过对豚鼠肺功能试验和支气管肺泡灌洗检测了CNT分散度的影响。短间接接触CNT烟尘对皮肤没有刺激,没有过敏现象,而长期接触将会引起呼吸性窘迫和诱导肺部组织病变。

4.2 CNT对器官、组织的毒性 Lam等^[12]研究了SWNTs在小鼠中的肺毒性。通过将SWNTs分散系单独注入肺中观察7 d和90 d的组织生理学研究,含有不同类型和含量的残留金属催化剂SWNTs在7 d时诱导上皮肉芽肿及慢性间质性肾炎,并一直在持续着,90 d时发展为支气管周围的炎症和坏死。Donaldson等^[13]研究表明,纳米材料的结构特性(如CNT的纤维状、长度和聚积状况),同样可以引起在肺部的局部沉积和免疫应答。Warheit等^[14]

报道了SWNTs在小鼠中的急性肺毒性。将SWNTs用1%吐温80分散在磷酸盐缓冲液(PBS)中,以 $5 \text{ mg}/\text{kg}$ 注入到气管内,致死率为15%。研究者认为SWNTs在气管中的聚积是致死的首要原因。Shvedova等^[15]为了扩充肺反应中对剂量相关的理解,让小鼠吸入纯的SWNTs。试验显示了纯的SWNTs的PBS混悬液产生了急性炎症,逐渐纤维化,最后形成肉芽瘤。此外,试验还证实了蛋白水平(即BAL中乳酸脱氢酶和谷氨酰基转移酶活性)的提高,以及对正常的肺功能的持续影响。Yokoyama等^[16]评估了帽状叠加纳米碳纤维植入到小鼠皮下组织中的生物相容性,1周后观察到在纳米碳纤维的周围肉芽肿的炎症性的改变以及4周后的纤维结缔组织。然而,缺少坏死或中性粒细胞侵入使得研究者得出这样的结论:组织的伤口愈合能力没有被抑制,并且纳米碳纤维在小鼠的皮下组织中没有急性毒性。Muller等^[17]阐明了CNT的长度调节免疫应答、生物利用度,与CNT功能化与否并无关系。

4.3 CNT对细胞的毒性 体外研究表明,人体表皮角质化细胞(HEKs)用 $0.05 \text{ mg}/\text{mL}$ 氨基己酸(AHA)修饰的SWNTs处理24 h后的透射电子显微显示AHA-SWNTs聚积于细胞质的空泡中,而用1%Pluronic F127表面活性剂处理后AHA-SWNTs则分散于培养基中,且毒性减小^[18]。此外,共价修饰的SWNTs随着侧壁功能化程度的增加而毒性减小^[19]。Pulskamp等^[20]以碳黑和石英作为参照粒子,用不同的CNT产品培养NR8383和人A549肺细胞,没有观察到任何急性毒性。但检测到了这两种细胞用未纯化的CNT处理后细胞内的活性氧簇的剂量和时间依从性的增加,而纯化过的CNT没有影响。Chou等^[21]用 0.5 mg SWNTs气管内滴注8周大的雄性鼠,发现SWNTs诱导肺泡巨噬细胞活化,各种慢性炎症应答以及严重的肉芽肿形成,各种分析和实验验证巨噬细胞接触SWNT将引起氧化应激,释放致炎细胞因子以及活化T细胞。

4.4 CNT的分子生物效应及毒性 Shama等^[22]研究了SWNTs对肺上皮细胞(LE)细胞过氧化物歧化酶(SOD-1和SOD-2)的影响,这些酶在接触SWNTs24 h后会减少,证明了SWNTs诱导LE细胞中的氧化应激并使其丧失抗氧化作用。Radomsky等^[23]指出,血小板很容易被CNT靶向及激活,从而使体内颈动脉血栓的加速形成。另外,用单一的SWNTs滴注剂诱导活化转基因小鼠血红素氧化酶-1(HO-1),在肺部、主动脉以及心脏组织中标记HO-1的氧化发作。试验发现C57BL/6小鼠接触SWNTs,在接触7、28、60 d后的主动脉mDNA损伤,并伴随

有主动脉线粒体谷光甘肽和蛋白质羰基水平的改变。Li等^[24]又评价了在 ApoE (-/-)转基因小鼠反复接触 SWNTs是否刺激发生动脉粥样硬化。动脉粥样化饮食模型小鼠接触 SWNTs后加速了 ApoE (-/-)鼠的蚀斑形成, SWNTs处理过的小鼠主动脉中的斑块区域、头脑血管中的斑块区域明显增加,这些反应伴随有 mtDNA 损伤增加但无炎症。

5 CNT的药理研究

纳米颗粒的生物分布和药物动力学极大地取决于它们的理化性质,如尺寸、形状、聚积性、化学组成、表面功能化和溶解性^[25]。Wang等^[26]用¹²⁵I标记多羟基化的 SWNTs (¹²⁵I-SWNT-OH),并氧化 CNT,主要是腹腔内给药后放射性示踪其在小鼠体内的生物分布,并与其它给药方式如皮下给药、口服及静脉给药进行比较。这项研究报道发现给药途径对 CNT的生物分布没有明显的影响,¹²⁵I-SWNT-OH很快分布于全身,主要聚积在胃、肾脏及骨骼中。从安全角度考虑,这项研究观察到的最重要的是 94%的纳米管从尿液中排泄,6%通过粪便排泄。Singh等^[27]研究了集中在静脉给药以及用不同表面化学(例如经由 1,3-偶极的环加成反应)功能化的 SWNTs和 MWNTs与 Wang所用的 SWNTs比较。CNT用螯合物二乙三胺五乙酸(DTPA)功能化和 [¹¹¹In]放射性标记([¹¹¹In]DTPA-CNT)。在这项研究中,DTPA 不同程度表面功能化对生物分布和血液循环半衰期的影响,分别用 100%和 60% (剩下的 40%功能基为氨基)的 DTPA 表面功能化,这两种不同的 [¹¹¹In] DTPA-SWNTs的生物分布特性非常相似,并显示了给药 30 min后在肾、肌肉、皮肤、骨骼和血液有亲和性。然而,发现所有类型的 CNT都在各种组织中清除很快,最大血液循环半衰期为 3.5 h。而静脉注射给药的 DTPA-CNT排泄途径,100% DTPA 功能化的 SWNTs和 MWNTs都是通过肾脏排泄的。

从以上的研究中可以看出,与未功能化的 CNT非常严重的组织沉积及炎症反应相比,这些功能化的 CNT给药后并没有急性毒性或副反应。CNT作为一类新颖的纳米医药的组成部分,研究结果表明 CNT的生物学应用最重要的是其表面功能化和体内生物分布有关。CNT功能化后增强了水溶性以及生物相容性,改变了毒理性质。

6 结语

纳米医药的发展取决于有前景的和新颖的纳米材料,而其限制就是毒理学和药理学特性。到目前为止,毒理学和药理学研究表明,与粗的、未功能化的

CNT相比,功能化的 CNT可以开发为纳米药物。功能化后的 CNT的水溶性、生物相容性增强,使其通过肾脏的排泄加快,并减少了组织聚积。CNT的开发为用于纳米药物用于诊断和治疗的机会之门已被打开,对其治疗效果的系统研究已在预料之中,但 CNT生物毒理、药理作用机制,还有待更深入的研究。

参考文献:

- [1] Bianco A, Kostarebs K, Partidos CD, *et al* Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes [J]. *Chem Commun*, 2005: 571.
- [2] Liu Z, Cai WB, He LN, *et al* In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice [J]. *Nature Nanotechnology*, 2006, 2: 47.
- [3] Wu W, Wieckowski S, Pastorin G, *et al* Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44: 6358.
- [4] Liu Z, Chen K, Davis C, *et al* Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(16): 6652.
- [5] Hampel S, Kunze D, Haase D, *et al* Carbon nanotubes filled with a chemotherapeutic agent: a nanocarrier mediates inhibition of tumor cell growth [J]. *Nanomed*, 2008, 3(2): 175.
- [6] Pantarotto D, Partidos CD, Hoebeke J, *et al* Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses [J]. *Chem Biol*, 2003, 10: 961.
- [7] Venkatesan N, Yoshimitsu J, Ito Y, *et al* Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics [J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 7154.
- [8] Donaldson K, Stone V, Tran CL, *et al* Nanotoxicology [J]. *Occup Environ Med*, 2004, 61: 727.
- [9] Maynard AD, Baron PA, Foley M, *et al* Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material [J]. *J Toxicol Environ Health, Part A*, 2004, 67: 87.
- [10] Cheng J, Flahaut E, Cheng SH, *et al* Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2007, 26(4): 708.
- [11] Huczko A, Lange H, Bystrzejewski M, *et al* Pulmonary toxicity of 1-D nanocarbon materials [J]. *Fuller Nanotub Carbon Nanostruct*, 2005, 13: 141.
- [12] Lam CW, James JT, McCluskey R, *et al* Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 77: 126.
- [13] Donaldson K, Aitken R, Tran L, *et al* Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 92: 5.
- [14] Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, *et al* Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 77: 117.
- [15] Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, *et al* Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 289: 698.

3.3.6 稳定性试验 取 3.3.3项下供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样,测得 RSD 为 1.21%,表明样品在 24 h 内稳定。

3.3.7 重现性试验 用同种方法提取 5份三七总皂苷粗品,按 3.3.3项下供试品溶液的制备方法制备,分别依法测定,得 $RSD = 0.48\%$,说明本试验重现性良好。

3.3.8 回收率试验 称取同一已知含量样品 9份,分三组,每组分别准确加入 1.2、1.5、1.8 mL 对照品溶液 (0.598 mg/mL),按 3.3.4项下方法制备加样回收试样,分别测定其含量,得平均回收率为 99.3%, $RSD = 1.06\%$ 。

4 讨论

4.1 将样品上大孔吸附树脂后,以水洗脱至无色澄清,先后用 30%、50%、70%、95%的乙醇洗脱,并分别收集洗脱液,制成供试品溶液,发现 75%乙醇的洗脱液色谱峰的强度最大,故选择水洗后,再用 75%的乙醇洗脱。

4.2 三七总皂苷的含量采用分光光度法进行测定时,应注意控制加热温度和加热时间,当温度高于 60 长时间加热时,糖类吸收干扰显著,总皂苷的测定以 60 ,加热 15 min 为宜,三七总皂苷显色在 1 h 内稳定,故显色后均要求 1 h 内测定。

4.3 本研究认为超声提取法最好:方法简捷,只需 6 h 即可完成全部提取过程。提取率高,总皂苷提取率可达到 99%以上,杂质减少,剂量减小,使用提取物体积最小,故本试验方法的提取物适于做现代制剂如缓释片、速崩片等。

参考文献:

- [1] 魏均娴,杜元冲.三七——现代科学研究与应用[M].昆明:云南科技出版社,1996:31.
- [2] 谢茵,刑桂琴.三七提取液中三七总皂苷分离纯化工艺研究[J].山西医科大学学报,2006,37(6):613.
- [3] 郑明,楼宜嘉.三七总皂苷分离纯化工艺研究[J].中国现代应用药学杂志,2007,24(2):118.
- [4] 魏风玲,朱春波,朱丽萍,等.三七总皂苷提取工艺优选[J].中国中药杂志,2000,25(12):722.
- [5] 张宪臣,王淑敏,陈光,等.人参总皂苷超声提取工艺的研究[J].现代中药研究与实践,2008,19(6):55.
- [6] 章观德.吸附树脂法测定三七及其制剂冠心宁总皂苷[J].中草药,1981,12(11):23.
- [7] 吴清,陈贤春.大孔吸附树脂法富集人参叶中人参总皂苷的工艺研究[J].北京中医药大学学报,2006,29(5):344.
- [8] 刘向前.三七总皂苷水提取工艺的优化试验[J].中国药师,2006,9(3):215.
- [9] 常新全,丁丽霞.中药活性成分分析手册[M].北京:学苑出版社,2006,2:63.

收稿日期:2009-03-30

(上接第 169 页)

- [16] Yokoyama A, Sato Y, Nodasaka Y, *et al* Biological behavior of hat-stacked carbon nanofibers in the subcutaneous tissue in rats[J]. Nano Lett, 2005, 5: 157.
- [17] Muller J, Huaux F, Moreau N, *et al* Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 207: 221.
- [18] Zhang LW, Zeng L, Barron AR, *et al* Biological interactions of functionalized single-wall carbon nanotubes in human epidermal keratinocytes [J]. Int J Toxicol, 2007, 26(2): 103.
- [19] Sayes CM, Liang F, Hudson JL, *et al* Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro[J]. Toxicol Lett, 2006, 161: 135.
- [20] Pulskamp K, Diabate S, Krug HF. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants [J]. Toxicol Lett, 2007, 168(1): 58.
- [21] Chou CC, Hsiao HY, Hong QS, *et al* Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model[J]. Nano Lett, 2008, 8(2): 437.
- [22] Shama CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, *et al* Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress in rat lung epithelial cells[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2007, 7(7): 2466.
- [23] Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, *et al* Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis[J]. Br J Pharmacol, 2005, 146: 882.
- [24] Li Z, Huldeman T, Salmen R, *et al* Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(3): 377.
- [25] Nel A, Xia T, Maedler L, *et al* Toxic potential of materials at the nanolevel[J]. Science, 2006, 311: 622.
- [26] Wang HF, Wang J, Deng XY, *et al* Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2004, 4: 1019.
- [27] Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, *et al* Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 3357.

收稿日期:2008-05-27