

文章编号:0253-9950(2010)01-0001-07

# 放射性核素示踪技术在碳纳米颗粒 生物效应研究中的应用

诸 颖,冉铁成,李晴暖\*,徐晶莹,李文新

中国科学院 上海应用物理研究所 核分析技术重点实验室,上海 201800

**摘要:**纳米材料缺少特异的检测和分析手段,因此,放射性核素标记和示踪技术在研究纳米颗粒与生命体相互作用中发挥着重要作用。本文综合介绍了放射性示踪技术在碳纳米颗粒(富勒烯、碳纳米管和纳米碳黑)与整体动物和哺乳动物细胞相互作用研究中的应用概况,列举了实验得到的关于吸收、分布、代谢和排泄资料,以及这些资料对于碳纳米材料在药物研制和纳米材料的生物安全性研究中的作用和意义。最后,根据碳纳米颗粒的奇异特性,分析了放射性核素示踪技术相对于荧光标记技术的优越性,指出核素标记和示踪技术在纳米科技与生命科学交叉领域研究中的应用前景。

**关键词:**放射性核素;示踪技术;碳纳米颗粒;生物效应

**中图分类号:**R817.1 **文献标志码:**A

## Application of Radionuclide Tracer Techniques in Research on Bio-Effects of Carbon Nanoparticles

ZHU Ying, RAN Tie-cheng, LI Qing-nuan\*, XU Jing-ying, LI Wen-xin

Key Laboratory of Nuclear Analysis Techniques, Shanghai Institute of Applied Physics,  
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

**Abstract:** There are few effective means to detect and analyze nanomaterials, therefore, radionuclide labeling and tracing techniques play an important role in the studies of interaction between nanoparticles and living systems. This paper briefly summarizes the main results from the application of radionuclide tracer techniques in the studies of interaction between carbon nanoparticles (fullerenes, carbon nanotubes and nano-carbon blacks) and animals and mammalian cells, cites the experimental information on absorption, distribution, metabolism and excretion of nanomaterials, and indicates the signification of these information in the drug development and bio-safety studies of nanomaterials. Based on the novel properties of carbon nanoparticles, the superiority of radionuclide tracer techniques over fluorescent labeling techniques is stressed. It is expected that the radionuclide tracer

**收稿日期:**2008-08-14; **修订日期:**2009-05-11

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(10775169,10905086,10975179);MOST973 项目(2006CB705605);上海市自然科学基金资助项目(08ZR142270008JC1422600);中国科学院领域前沿资助项目(095501K)

**作者简介:**诸 颖(1981—),女,江苏无锡人,博士,助理研究员,从事纳米材料的生物效应和安全性研究

\* **通讯联系人:**李晴暖, E-mail: liqingnuan@sinap. ac. cn

techniques have an increasing application prospect in the interdisciplinary fields of nano-science and life science.

**Key words:** radionuclide; tracing techniques; nanoparticles; bio-effects

随着纳米科技持续迅速的发展,碳纳米材料的生物效应受到愈来愈广泛的关注。一方面,碳纳米材料由于其进入细胞的高效率,有望用于构建药物靶向输运系统的载体<sup>[1-2]</sup>;另一方面,随着碳纳米管和纳米碳黑的大量生产和应用,它们对环境和人类健康的潜在风险引起人们的担忧,其安全性已经成为当前毒理学研究的另一热点<sup>[3-4]</sup>。无论是作为药物载体的研制、还是生物安全性的研究和评估,都需要了解碳纳米材料如何与生命体系相互作用以及这种作用如何影响生命体系。而纳米材料进入生命体系以及随后在生命体内的吸收、分布、代谢、排泄则是研究两者相互作用和产生相关生物效应的重要基础。

与大多数化学分子或生物分子不同,目前缺乏可以用于碳纳米颗粒本身检测和分析的特异性反应,这成为研究碳纳米材料与生命体系相互作用的障碍。由于放射性核素发射的射线有相当高的探测灵敏度,因此,将放射性核素标记碳纳米颗粒、通过追踪放射性的行迹就能探测到碳纳米颗粒的位置和运动规律。放射性核素标记和示踪技术,由于方法简单、快速,结果直观可信,尤其可以检测复杂生物组织中的纳米颗粒的特点,在生物医药领域得到愈来愈广泛的应用。21 世纪纳米科技的迅猛发展又为放射性示踪技术开辟了新的应用空间。本工作介绍了国内外放射性核素标记技术在碳纳米材料与生命体系相互作用研究中的应用。通过这些介绍不仅可以了解纳米材料与生命体系的相互作用及其科学意义,而且可以进一步认识到经典的放射化学技术在解决纳米科技和生命科学这个新的交叉领域研究中起到的关键作用。

## 1 放射性示踪技术研究碳纳米颗粒的体内生物分布

### 1.1 富勒烯衍生物的体内生物分布

富勒烯家族的典型代表  $C_{60}$ , 是由 60 个碳原子组成的具有中空笼状结构的球形分子, 分子直径为 0.71 nm。 $C_{60}$  的特殊结构赋予其许多奇异的生物活性, 包括选择性切割 DNA、抗病毒、光动力学治疗、清除自由基、抗氧化和抑制生物酶活性

等。同时,  $C_{60}$  分子含有 30 个双键, 具有高度的化学反应活性, 可以连接上多种药物分子成为新的  $C_{60}$ -药物偶联物。由于药物分子尺度增大、溶解特性改变以及  $C_{60}$  基团本身的生物活性, 使得这种新化合物有可能改进药物靶向性、增加药物生物利用度、降低药物的毒副作用, 从而增进药物的治疗效果。因此,  $C_{60}$  作为药物或药物载体在医药领域有着广泛的应用前景,  $C_{60}$  衍生物的生物分布研究引起人们的极大兴趣。

#### (1) 富勒烯衍生物在正常动物体内的生物分布

富勒烯最简单的衍生物是富勒烯多羟基衍生物(富勒醇)和多羧酸衍生物, 由于容易制取、水溶性高, 因而受到特别的关注。Yamago<sup>[5]</sup> 给小鼠口服  $^{14}C$  标记的富勒烯羧酸衍生物, 发现该衍生物只有少量被吸收, 大部分随粪便排出。采用静脉注射方式给药后, 大部分标记物在 1 h 内被迅速输送到各组织, 48 h 后 90% 聚集在肝中, 很少有清除。注射一周后仅有 2.4% 标记物随粪便排出体外, 滞留在器官组织里的不足 2%, 其余标记物分布在肌肉和鼠毛里。标记物在体内滞留时间很长, 并具有逾越血脑屏障的能力, 但无急性中毒现象。Cagle<sup>[6]</sup> 用笼内含放射性  $^{166}Ho$  的  $C_{82}$  多羟基富勒醇,  $^{166}Ho_x @ C_{82}(OH)_y$ , 研究了它在大鼠体内的分布, 结果表明, 除了血液流量少的地方外,  $^{166}Ho_x @ C_{82}(OH)_y$  在全身都有分布, 在肝中选择性高度浓集, 骨摄取居第二, 清除均较慢, 血池有不寻常的长时间残留。注射 4 h 后, 除肾、脾、骨、肝外, 其余组织和器官摄取都显著下降, 脑中无摄取。标记物通过肾排泄, 5 天内排出 20% 完整的  $^{166}Ho_x @ C_{82}(OH)_y$ 。

本研究组曾使用放射性核素  $^{99}Tc^m$ 、 $^{125}I$  和  $^{67}Ga$  标记了 2 种富勒烯多羟基衍生物, 富勒醇  $C_{60}(OH)_x$  ( $x=22\sim24$ ) 和富勒醇环氧化物  $C_{60}(OH)_xO_y$  ( $x+y=22\sim24$ ), 研究了 pH、浓度、温度和时间等对标记率的影响以及标记物的稳定性<sup>[7-12]</sup>。小鼠静脉注射后的生物分布结果指出, 大部分标记物在 1 h 时被迅速输送到除脑外的各器官组织中, 标记物具有微粒样的生物分布特征, 容易富集在网状内皮系统, 主要分布在肝、脾、骨

等部位。富勒烯多羟基衍生物容易发生团聚,实验测定的粒径约 20 nm,这可能是具有微粒样的生物分布特征的原因。此外,富勒醇在小鼠皮毛也有明显的摄取,标记物主要通过肾脏从尿道排出。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记的富勒醇在新西兰大兔体内的单光子发射计算机断层(SPECT)图像显示的体内分布特征与小鼠尸解和放射性测量结果基本相符<sup>[9]</sup>。上述实验得到的生物分布资料为我们在富勒烯作为淋巴肿瘤靶向治疗药物和骨靶向药物的新药物设计和研究提供了实验依据<sup>[13-14]</sup>。

此外,在纳米颗粒的生物安全性研究中,呼吸毒性是另一主要研究内容。利用放射性核素示踪技术了解纳米颗粒通过呼吸道进入生命体后的走向和归宿可以指导呼吸毒性的深入研究。本课题组用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记了 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ ,通过SD大鼠气管滴注研究了 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 经呼吸道进入体内后的生物分布<sup>[15]</sup>。主要脏器的摄取率(%ID/g)和大鼠的SPECT成像指出,纳米尺度的标记物大多滞留在肺中,1 h的肺滞留率高达40%ID/g,并且非常缓慢地降低。考虑到肺的脏器系数,标记物的肺滞留约占气管滴注总量的65%;部分 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-C}_{60}(\text{OH})_x$ 能够迅速通过肺泡-毛细管屏障,进入血液,主要分布在肝、脾和骨中,未能检测到脑摄取,显示了通过气血屏障进入体循环的富勒醇仍保留纳米微粒生物分布的主要特征;血液清除较快,表明大量滞留在肺中的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-C}_{60}(\text{OH})_x$ 不能再继续通过肺泡-毛细管屏障补充进入血液,这种一过性进入血液的行为似乎表明纳米颗粒的尺度对穿越肺泡-毛细管屏障的能力有重要影响。因此,纳米颗粒经呼吸道进入人体后,其呼吸毒性研究除呼吸系统外,还应该包括整个生命体的系统毒性。Nemmar等<sup>[16]</sup>在没有用还原剂的条件下将 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 标记100 nm的碳颗粒,使用吸入法对健康人志愿者进行研究,发现放射性物质很快透过肺泡-毛细管屏障进入血液,1 min时就能在血液中检测到放射性,10~20 min血液的放射性强度达到最高值,并在最高水平保持60 min左右,但呼吸系统仍是主要靶标。目前已经知道,纳米颗粒的巨大比表面能够通过非共价作用吸附多种化合物分子。一旦纳米颗粒吸附环境大气中的其他有毒分子,随碳纳米颗粒从呼吸道进入后,这些有毒分子就会改变原来靶标而定位于呼吸系统,结果导致呼吸系统毒性的增加,这或许就是近年来支气管肺癌发病率迅速上升的重要原因。由此

可见,放射性示踪技术得到的纳米颗粒生物分布资料对大气中超细颗粒的毒理学研究也提供了有益启示。

(2) 富勒烯衍生物在荷瘤动物中的生物分布  
恶性肿瘤是危及人类健康的第二杀手,研制肿瘤靶向药物用于肿瘤的早期诊断和治疗是纳米科技在医药领域的重要研究前沿。研制抗肿瘤药物的关键是药物的靶向性,放射性示踪技术为观察和评价药物的肿瘤靶向性提供了强有力的工具。Tabata等<sup>[17]</sup>用聚乙二醇(PEG)修饰富勒烯,得到 $\text{C}_{60}\text{-PEG}$ 偶联物,一个 $\text{C}_{60}$ 平均与4个PEG结合,其平均分子量为26 000。用氯胺-T碘标记法标记了该衍生物,静脉注射后发现,放射性 $^{125}\text{I}$ 标记的 $\text{C}_{60}\text{-PEG}$ 主要在肿瘤中浓集,而不在其它任何器官中积累,作者的解释是因为肿瘤的脉管系统和不成熟的淋巴腺系统使大分子物质更易在肿瘤组织中滞留。静脉注射 $\text{C}_{60}\text{-PEG}$  24 h后,用汞灯(400~505 nm)照射肿瘤组织,与卟啉相比,发现肿瘤体积更快变小,组织学检查发现,强光源照射下 $\text{C}_{60}\text{-PEG}$ 引起肿瘤组织坏死,而对正常皮肤不产生损害。 $\text{C}_{60}\text{-PEG}$ 的抗肿瘤效果随其浓度和光强度增加而增加,这为 $\text{C}_{60}$ 衍生物用于癌症的光动力治疗开拓了一个有希望的先例。核医学临床上用于炎症诊断的 $^{67}\text{Ga}$ 对肿瘤也有一定的亲和性,本研究组用 $^{67}\text{Ga}$ 标记了 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ <sup>[12]</sup>,研究了 $^{67}\text{Ga}\text{-C}_{60}(\text{OH})_x$ 标记物在荷S180瘤昆明种小鼠的体内分布和肿瘤靶向性<sup>[18]</sup>。结果显示, $^{67}\text{Ga}\text{-C}_{60}(\text{OH})_x$ 在S180肉瘤中有一定富集,但和 $^{67}\text{GaCl}_3$ 相比,没有观察到明显的亲肿瘤特性。

在 $\text{C}_{60}$ 分子上连接临床上使用的抗肿瘤药物,新的 $\text{C}_{60}$ -药物偶联物是否会由于 $\text{C}_{60}$ 基因本身的生物活性和结构效应带来更好的抗肿瘤药效是很有意义的研究课题。紫杉醇是临床上常用的一线抗癌药物,已有报道, $\text{C}_{60}$ -紫杉醇衍生物具有缓释效果<sup>[19]</sup>,因而具有潜在应用价值,但是未见该化合物的体内分布和靶向性研究资料。淋巴道是癌细胞转移的重要通道,及时进行针对淋巴系统的治疗可以降低恶性肿瘤转移几率,减小外科手术切除范围,为原发灶的治疗争取宝贵时间,对提高患者的治愈率、生存率和治疗后的生活质量有重要意义。但是常规剂型的化疗药物没有淋巴靶向性,如上文所述, $\text{C}_{60}$ 具有微粒样的生物分布特征,这使 $\text{C}_{60}$ 作为载体的抗癌药物容易通过毛细淋巴管壁内皮细胞间隙和内皮细胞的胞饮进入淋

巴系统,因而有望构建淋巴靶向给药系统。经皮下或腔内注射以后,荷药微粒顺淋巴道移行,最后被载带到淋巴结并较长时间在淋巴结浓集,从而达到抑制癌细胞转移的目的。本课题组用临床使用的恶性肿瘤化疗药物氮芥,成功合成了  $C_{60}$ -苯甲醛氮芥。进一步通过有机合成和随后的同位素交换反应得到苯环上标记有放射性核素  $^{125}\text{I}$  的  $C_{60}$ -苯甲醛氮芥<sup>[20]</sup>。将标记物行 SD 大鼠爪垫皮下注射。体内分布结果表明,  $C_{60}$ -氮芥在胃和胃内容物中的放射性摄取率最高,达 60% ID/g; 淋巴的摄取率也很高,约 25% ID/g,仅次于胃,这提示该富勒烯衍生物有望用于胃癌治疗,同时具有抑制癌细胞顺淋巴道转移的功效。细胞水平的药效实验表明,  $C_{60}$ -氮芥对癌细胞的抑制作用小于氮芥,但在对大鼠原位胃癌模型的药效分析实验表明,  $C_{60}$ -氮芥的抑瘤效果远大于氮芥,两者的抑瘤率分别为 69.7% 和 33.6%。更有意义的是,  $C_{60}$ -氮芥能有效抑制肿瘤细胞的腹膜转移和淋巴结转移,转移率分别为 0% 和 20%,明显优于氮芥的 40% 和 50%<sup>[13]</sup>。该实验证明,  $C_{60}$ -氮芥的更好药效并不是源于化合物细胞毒性的增强,而是化合物对胃和淋巴系统的高靶向性,与临床应用的氮芥相比,  $C_{60}$ -氮芥可能是更有效且毒副作用更小的治疗胃癌的新药物。由此可见,放射性核素标记和示踪技术在纳米尺度靶向药物的设计、研制和实验验证中起着重要作用。

## 1.2 碳纳米管的体内生物分布

碳纳米管是由碳原子形成的石墨烯片层围绕中心按一定的螺旋角卷曲而成的无缝、中空的纳米管。按纳米管管壁层数分为单壁碳纳米管(SWNTs)和多壁碳纳米管(MWNTs)。在生物医药领域,碳纳米管是非常有效的细胞内输送药物的载体,有望构建新一类药物靶向输运体系。为了开展药物输运系统的研究和碳纳米管大量进入环境后的安全性评估,必须了解碳纳米管在生命体内的生物分布和代谢行为。

### (1) 碳纳米管在正常小鼠体内的生物分布

自 2002 年北京王海芳等<sup>[21]</sup>首次用放射性核素标记和示踪技术开启了碳纳米管在小鼠体内分布的研究以来,几年中,纳米管的生物分布已经积累了比较丰富的资料<sup>[21-25]</sup>。研究过的碳纳米管有水溶性羟基化 SWNTs<sup>[21, 23]</sup>,牛磺酸修饰的 MWNTs<sup>[22, 24]</sup>和葡糖氨修饰的 MWNTs<sup>[25]</sup>。使用的放射性核素有  $^{125}\text{I}$ <sup>[21, 24]</sup>、 $^{14}\text{C}$ <sup>[22]</sup>、 $^{131}\text{I}$ <sup>[23]</sup> 和

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ <sup>[25]</sup>。这些研究结果虽然存在一些差异,但总的生物分布特征基本一致。静脉注射后,检测时相从 1 h<sup>[21]</sup>、10 min<sup>[22]</sup> 缩短到仅 2 min<sup>[23]</sup>,就观察到纳米管的体内分布,证明其可像小分子一样在体内各组织和器官间自由穿梭,迅速迁移。除了脑以外,大部分器官都有摄取,最高的摄取发生在网状内皮系统的肝和脾,此外,骨和肺也有较高的摄取。纳米管通过肾脏从尿液排泄,但体内清除很慢,静脉注射后 90 天,依然在肝和脾中能够检测到大量的纳米管。静脉注射、腹腔注射、灌胃、皮下注射等不同给药途径后,其生物分布无明显差异。Tween-80 非共价修饰的 MWNTs 能显著降低网状内皮系统对 MWNTs 的摄取。

英、法和意大利的联合研究小组使用螯合分子二乙三氨五醋酸(DTPA)对长度为 300~1 000 nm 的 SWNTs 进行功能化修饰,然后将显像核素  $^{111}\text{In}$  连接在 DTPA 上,实现了化学修饰的水溶性 SWNTs 的放射性标记。实验中,每只小鼠从尾静脉注射 200  $\mu\text{L}$  含 60  $\mu\text{g}$  ( $^{111}\text{In}$ )DTPA-SWNTs 的 PBS 溶液<sup>[26]</sup>,但是,生物分布测定结果与文献<sup>[21-25]</sup>有很大不同。标记物在网状内皮系统的肝、脾等没有明显的摄取和滞留,有趣的是肌肉、毛和肺却有异常的摄取。所有脏器和组织的放射性活度很快降低,血液清除很快,半衰期只有约 3 h。标记物通过肾脏从尿液排出,且尿液中可以检出完整的原形 SWNTs。

由于纳米颗粒的复杂性,有关生物效应的实验研究结果缺乏可比性,彼此矛盾的结果也时有发生。对于碳纳米颗粒体内生物分布的研究,今后应该给出有关纳米管形貌、尺度、功能化修饰和疏水性等性质的详细资料。要注意碳纳米管在放射性核素标记以后可能发生的特性变化,同时,放射性标记物的体内稳定性对实验测定的生物分布有非常重要的影响,一旦放射性核素从碳纳米管上脱落,示踪测量得到的是游离核素的生物分布,而不是碳纳米管的生物分布。

### (2) 碳纳米管在荷瘤小鼠体内的生物分布

斯坦福大学的戴洪杰研究小组利用双功能偶联剂 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)将  $^{64}\text{Cu}$  正电子核素连接在非共价修饰在 SWNTs 上的 PEG 上<sup>[27]</sup>。正电子发射计算机断层(PET)技术指出,经 PEG 非共价修饰的 SWNTs 在小鼠体内相当稳定,血液清除时间较长且在肝、脾等内皮网状系统有较高的摄取。在

该纳米管的 PEG 链上接上精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)小肽后能使纳米管高效地靶向到小鼠皮下 U87MG 肿瘤,并且对生物体没有明显的毒副作用。对于分子量为 5 400 的 PEG 修饰的 SWNTs,引入 RGD,使肿瘤摄取从注入剂量的 3%~4%增加到 10%~15%;靶与非靶组织的摄取比增加到 15。结果提示碳纳米管有望作为肿瘤早期诊断药物的载体。但是,肿瘤靶向治疗药物输运系统的研制,还需要进一步研究抗肿瘤药物在碳纳米管上的负载、药物在体内的释放或缓释以及纳米管的最终去向和生物安全性等<sup>[28]</sup>。

## 2 放射性示踪技术研究碳纳米颗粒的体外细胞摄取和分布

细胞是构成生命体的基本单元,外界任何生物活性因子对机体的作用,均可通过细胞的形态与功能的改变表现并检测出来。与动物模型相比,细胞模型具有较为简单、易于控制实验条件、实验结果重复性较好等优点。因此,大量碳纳米颗粒的生物效应研究都采用细胞模型进行。碳纳米颗粒与细胞相互作用的初始阶段就是纳米颗粒被细胞内化而进入细胞。研究纳米颗粒的细胞摄取及其在细胞内的分布是了解碳纳米颗粒细胞生物效应的重要基础。

放射性核素示踪技术用于碳纳米颗粒细胞摄取和分布的研究报道并不多见。2002 年 Foley 等<sup>[29]</sup>研究了水溶性富勒烯的羧酸衍生物  $C_{61}(CO_2H)_2$  与人纤维原细胞 HS68 的相互作用。使用荧光技术,证明了  $C_{61}(CO_2H)_2$  穿越细胞膜进入细胞内;使用差速离心法收集各相应的细胞器组分,放射性计数结果表明该衍生物( $^{14}C-C_{61}(CO_2H)_2$ )在线粒体分布最高,其次是细胞膜和微粒体,而细胞质液中最低。本研究组用<sup>125</sup>I 和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>分别标记了  $C_{60}(OH)_x$ ,研究了标记物和 L02 细胞以及 CHO 细胞的相互作用,未发现这两种细胞对  $C_{60}(OH)_x$  有明显的摄取<sup>[30]</sup>。对于 CHO 细胞,细胞裂解液的放射性水平只有对照组的 2~3 倍,但依然可以看到,无血清细胞培养液中  $C_{60}(OH)_x$  的摄取率比有血清时的更高<sup>[30]</sup>。和  $C_{61}(CO_2H)_2$  相比, $C_{60}(OH)_x$  低的细胞摄取率可能起源于它们比  $C_{61}(CO_2H)_2$  更高的水溶性,而血清蛋白通过和  $C_{60}(OH)_x$  相互作用进一步提高了后者的水溶性,导致更低的细胞摄取。

和水溶性富勒烯衍生物不同,碳纳米管和纳

米碳黑(NCB)有非常高的细胞摄取<sup>[31]</sup>。本课题组用<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>成功标记了 MWNTs 和 3 种不同尺度的 NCB<sup>[32]</sup>,定量检测了人宫颈癌细胞 Hela 对这些颗粒的摄取量。实验指出,碳纳米颗粒浓度为 100 mg/L 时,MWNTs 和 NCB 在完全培养液中的细胞摄取率为 10%左右,当培养液中无血清时,细胞摄取率增加到约 30%<sup>[31, 33]</sup>。根据存活的细胞数,摄取率转换为每 1 000 个细胞对碳纳米颗粒的摄取量。对于直径分别为 51、20、14 nm 的 3 种 NCB,每 1 000 个细胞摄取量分别为 350、389、509 ng。可见,无血清条件下,细胞对 3 种不同尺度 NCB 的摄取具有明显尺度效应,粒径越小,摄取量越大,结果导致实验检测到的细胞毒性也越大<sup>[31, 33]</sup>。MWNTs 的细胞摄取量与毒性关系不符合 NCB 的规律性,提示碳纳米管的细胞毒性机制不同于 NCB,可能由纳米管制备时使用的金属催化剂残留所致<sup>[34-36]</sup>。实验揭示的细胞摄取与血清和纳米颗粒粒径的依赖性对于深入理解碳纳米颗粒与生物大分子的相互作用、纳米颗粒的细胞内化过程以及内化机制具有重要科学意义;对于提高基因治疗药物的转染率以及建立和规范碳纳米颗粒细胞毒性检测方法和评估标准等也有应用价值。由此可见,放射性核素示踪技术能够定量地描述碳纳米颗粒的细胞摄取,预期这将在纳米医药和纳米毒理学领域的研究中发挥更重要、更广泛的作用。

## 3 结论和展望

碳纳米颗粒经过放射性核素标记可以便利地用于纳米颗粒与生命体的相互作用研究,得到纳米颗粒在生命体内的吸收、分布、代谢和排泄等重要资料。这些量化资料对于纳米颗粒作为载体的药物设计、药效研究、纳米材料安全性研究和毒性评估等都起着重要作用。随着放射性核素成像的 SPECT 和 PET 技术的迅速发展,特别是它们和 CT 和 MIR 的图像融合技术的建立和推广,放射性核素标记和示踪技术使纳米颗粒在生命体内的行为和归宿可以用医学图像显示出来,这必将推动纳米科技和生命科学的交叉领域研究的更快发展。

在细胞层次的研究中,尽管传统的荧光标记和细胞成像已占有绝对优势,但放射性示踪技术在未来会有更大的发展空间。其中一个原因是荧光标记物的荧光信号不稳定,分析过程中容易淬

灭,使定量分析的精确度欠高。然而,更重要的原因和碳纳米颗粒本身固有的奇异性质密切相关。碳纳米颗粒的奇异性质源于它们巨大的比表面以及由此带来的高反应活性。放射性检测的灵敏度高于荧光技术,标记在纳米颗粒上的放射性只需要少数放射性原子或无机小分子。相反,荧光标记需要更多、更大的有机荧光分子,其结果将在更大程度上改变碳纳米颗粒的表面性质,影响碳纳米颗粒生物活性的研究。近年来一些实验也证明,人们对荧光素干扰碳纳米材料生物活性研究的担忧不是没有根据。

纳米颗粒的放射性核素标记过程提出了不少属于放射化学的问题,这本身对经典的放射化学也是一项新挑战。 $^{14}\text{C}$  的放射性标记中,核素是在碳纳米材料合成时引进的,因此几乎能够完全保持碳纳米材料原有的特性,但是这种标记技术只有少数实验室能进行,且  $^{14}\text{C}$  寿命很长,影响检测的灵敏度。使用  $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$  和  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$  等放射性核素在碳纳米颗粒上的直接标记都存在机制不清楚的问题,目前尚不知道核素是以共价还是非共价方式和纳米颗粒相结合,这也带来对标记物的体内外稳定性、标记物在体内的放射化学纯度等问题的担忧。若使用偶联剂对碳纳米颗粒进行非直接标记,则标记位点和机制明确,且稳定性也会提高,但可能带来标记后的纳米颗粒是否还保留其本身特性的问题。因此,碳纳米颗粒的放射性核素标记技术推动了碳纳米颗粒生物效应的研究,反过来,也给经典的放射化学提出了更多的研究课题。随着碳纳米管和富勒烯研究和应用的进一步深入和推广,以及碳纳米家族新成员,石墨烯片、石墨烯带和纳米金刚石的出现,放射化学必将在与纳米科技和纳米生物学的交叉研究中得到进一步的充实和发展。

**致谢:**感谢本课题组李宇国和尹娟娟博士提供有用的资料和帮助。

#### 参考文献:

[1] Kam N W S, Dai H J. Carbon Nanotubes as Intracellular Protein Transporters: Generality and Biological Functionality[J]. J Am Chem Soc, 2005, 127: 6 021-6 026.

[2] Kam N W S, Liu Z, Dai H J. Carbon Nanotubes as Intracellular Transporters for Proteins and DNA;

An Investigation of the Uptake Mechanism and Pathway[J]. Angew Chem Int Ed, 2006, 118: 591-595.

- [3] Nel A, Xia T, M dler L, et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel[J]. Science, 2006, 311: 622-627.
- [4] Zhao Y L, Nalwa H S. Nanotoxicology[M]. California, USA: American Scientific Publishers, 2007: 181-200.
- [5] Yamago S, Tokuyama H, Nakamura E, et al. In Vivo Biological Behavior of a Water-Miscible Fullerene:  $^{14}\text{C}$  Labeling, Absorption, Distribution, Excretion and Acute Toxicity[J]. Chem Biol, 1995, 2(6): 385-389.
- [6] Cagle D W, Kenel S J, Mirzadeh S, et al. In Vivo Studies of Fullerene-Based Materials Using Endohedral Metallofullerene Radiotracers[J]. Oroc Nanl Acad Sci USA, 1999, 96: 5 182-5 187.
- [7] Li Q N, Xiu Y, Zhang X D, et al. Preparation of  $^{99\text{m}}\text{Tc}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x(\text{O})_y$  and Its Biodistribution Studies[J]. Chin Sci Bull, 2001, 46(19): 1 615-1 617.
- [8] 李晴暖,李宇国,刘瑞丽,等.富勒烯衍生物的放射性标记及其在生物体内的分布[J].中国学术期刊文摘(科技快报),2001,7(7):919-921.
- [9] Li Q N, Xiu Y, Zhang X D, et al. Preparation of  $^{99\text{m}}\text{Tc}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$  and Its Biodistribution Studies[J]. Nucl Med Biol, 2002, 29(6): 707-710.
- [10] Li Y G, Zhang X D, Li Q N, et al. Radioiodination of  $\text{C}_{60}$  Derivative  $\text{C}_{60}(\text{OH})_x(\text{O})_y$  [J]. J Radioanal Nucl Chem, 2001, 250(2): 363-364.
- [11] Li Y G, Huang X, Liu R L, et al. Preparation of  $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$  and Its Biodistribution[J]. J Radioanal Nucl Chem, 2005, 265(1): 127-131.
- [12] 李宇国,李晴暖,张勇平,等. $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$  标记条件的研究[J].核化学与放射化学,2002,24(3):161-169.
- [13] 冉铁成.抗肿瘤药物富勒烯  $\text{C}_{60}$  吡咯烷苯氮芥的研究[D].上海:中国科学院上海应用物理研究所,2006.
- [14] 尹娟娟.含磷富勒烯衍生物的合成及性质研究[D].上海:中国科学院上海应用物理研究所,2006.
- [15] Xu J Y, Li Q N, Li J G, et al. Biodistribution of  $^{99\text{m}}\text{Tc}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$  in Sprague-Dawley Rats After Intratracheal Instillation[J]. Carbon, 2007, 45: 1 865-1 870.
- [16] Nemmar A, Hoet P H, Vanquickenborne B, et al. Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circula-

- tion in Humans[J]. *Circulation*, 2002, 105 (4): 411-414.
- [17] Tabata Y, Murakami Y, Ikata Y, et al. Photodynamic Effect of Polyethylene Glycol-Modified Fullerene on Tumor[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1997, 88: 1 108-1 116.
- [18] 李宇国. 富勒烯及其衍生物的生物活性研究进展[D]. 上海: 中国科学院上海应用物理研究所, 2003.
- [19] Zakharian T Y, Seryshev A, Sitharaman B, et al. A Fullerene-Paclitaxel Hemotherapeutic: Synthesis, Characterization, and Study of Biological Activity in Tissue Culture[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12 508-12 509.
- [20] 冉铁成, 刘瑞丽, 诸颖, 等.  $^{125}\text{I}\text{-C}_{60}$  吡咯烷苯氮芥的制备和生物分布[J]. *核技术*, 2007, 30(4): 373-375.
- [21] Wang H F, Wang J, Deng X Y, et al. Biodistribution of Carbon Single-Walled Nanotubes in Mice[J]. *J Nanosci Nanotech*, 2004, 4 (8): 1 019-1 024.
- [22] Deng X Y, Jia G, Wang H F, et al. Translocation and Fate of Multi-Walled Carbon Nanotubes *In Vivo* [J]. *Carbon*, 2007, 45: 1 419-1 424.
- [23] Wang J, Deng X Y, Yang S T, et al. Rapid Translocation and Pharmacokinetics of Hydroxylated Single-Walled Carbon Nanotubes in Mice[J]. *Nanotoxicology*, 2008, 2 (1): 28-32.
- [24] Deng X Y, Yang S T, Nie H Y, et al. A Generally Adoptable Radiotracing Method for Tracking Carbon Nanotubes in Animals[J]. *Nanotechnology*, 2008, 19 (7): 075101(6pp).
- [25] Guo J X, Zhang X, Li Q N, et al. Biodistribution of Functionalized Multi-Wall Carbon Nanotubes in Mice[J]. *Nucl Med Biol*, 2007, 34: 579-583.
- [26] Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, et al. Tissue Biodistribution and Blood Clearance Rates of Intravenously Administered Carbon Nanotube Radiotracers[J]. *PNAS*, 2006, 103 (9): 3 357-3 362.
- [27] Liu Z, Cai W B, He L, et al. *In Vivo* Biodistribution and Highly Efficient Tumour Targeting of Carbon Nanotubes in Mice[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(1): 47-52.
- [28] Liu Y F, Wang H F. Nanotechnology Tackles Tumours[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2 (1): 20-21.
- [29] Foley S, Crowley C, Smaih M, et al. Cellular Localisation of a Water-Soluble Fullerene Derivative[J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2002, 294: 116-119.
- [30] 徐晶莹. 富勒醇的药理毒理学研究[D]. 上海: 中国科学院上海应用物理研究所, 2007.
- [31] Zhu Y, Li W X, Li Q N, et al. Effects of Serum Proteins on Intracellular Uptake and Cytotoxicity of Carbon Nanoparticles[J]. *Carbon*, 2009, 47: 1 351-1 358.
- [32] 诸颖, 李玉峰, 张小勇, 等. 碳纳米颗粒的放射性  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  标记[J]. *原子核物理评论*, 2008, 25: 305-310.
- [33] 诸颖. 碳纳米材料的细胞生物效应研究[D]. 上海: 中国科学院上海应用物理研究所, 2008.
- [34] Liu X, Gurel V, Morris D, et al. Bioavailability of Nickel in Single-Wall Carbon Nanotubes[J]. *Adv Mater*, 2007, 19: 2 790-2 796.
- [35] Shvedova A A, Castranova V, Kisin E R, et al. Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity Using Human Keratinocyte Cells[J]. *J Toxicol Env Health, Part A*, 2003, 66: 1 909-1 926.
- [36] Guo L, Morris D G, Liu X Y, et al. Iron Bioavailability and Redox Activity in Diverse Carbon Nanotube Samples[J]. *Chem Mater*, 2007, 19: 3 472-3 478.