



生物科学(香港)

Biology Sciences

ISSN: 2957-5087 (print)

雙清學術出版社

Contents lists available at www.qingpress.com

Journal homepage: qingpress.com/zh-cn/journals/41



生物医学检测中常用氧化铁磁性纳米颗粒的生物适应性与毒性研究进展

张澜¹, 王斯佳^{2*}

^{1,2} 西安交通大学, 生命与科学技术学院, 中国

*通讯作者: 王斯佳

摘要: 氧化铁磁性纳米颗粒(IONPs)具有优越的理化性质, 由于其在与检测分子结合后, 可通过磁力进行简便的样品分离, 并可通过表面增强拉曼散射(SERS)和顺磁性放大光学和核磁检测信号, 在生物医学体外诊断领域应用广泛。随着生物医学诊断和治疗需求的发展, 开发适用于体内环境的 IONPs 已成为未来该领域研究的主要方向, 而这就首先需要考虑其在体的生物适应性与毒性问题。本文综述了生物医学检测中常用 IONPs 的体外毒性及影响因素、其对各主要器官和组织的在体毒性及在血液中相容性的相关研究, 并讨论了相关研究中目前还存在的问题和挑战。希望通过本综述能够为 IONPs 在体检测应用的研究提供一些理论基础, 助力 IONPs 材料在生物医学检测领域的进一步发展。

关键词: 氧化铁磁性纳米颗粒, 生物医学检测, 生物适应性, 生物毒性

基金项目: 受武警装备预研项目(WJ2022G00002-001)资助

作者简介: 张澜, 西安交通大学生命与科学技术学院硕士研究生, 主要从事光学纳米材料生物效应与分子机理研究。王斯佳, 西安交通大学生命与科学技术学院副教授, 主要从事生物医学光学检测与治疗方面的研究。

通讯作者: 王斯佳, wang_sijia@xjtu.edu.cn

2957-5087/© Shuangqing Academic Publishing House Limited All rights reserved.

Article history: Received February 3, 2024 Accepted February 25, 2024 Available online February 26, 2024

To cite this paper: 张澜, 王斯佳(2024). 生物医学检测中常用氧化铁磁性纳米颗粒的生物适应性与毒性研究进展. 生物科学(香港), 第1卷, 第2期, 1-27.

Doi: <https://doi.org/10.55375/bs.2024.1.2.1>

Research Progress on the Biological Adaptability and Toxicity of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Used in Biomedical Detection

Zhang Lan, Wang Sijia

Abstract: Iron oxide magnetic nanoparticles (IONPs) have superior physicochemical properties. When combining to target bio-molecular, the molecular can be easily separated via magnetic force and the optical and the optical or nuclear magnetic resonance signal of the molecular can be enhanced by the surface enhanced Raman scattering (SERS) and paramagnetism, making them widely used in in vitro biomedical diagnostics. With the development of biomedical diagnostic and therapeutic needs, the development of IONPs for in vivo environments has become an important research direction, and the top priority work is to consider the biocompatibility and safety of them. Therefore, this review focuses on the in vitro toxicity of IONPs and its influencing factors, as well as the in vivo toxicity and hemocompatibility of IONPs to major organs and tissues, in addition to discussing the problems and challenges in these researches. It is hoped that this review can provide some theoretical basis for the research on the in vivo application of IONPs, and promote their development in the biomedical detection.

Keywords: Iron oxide magnetic nanoparticles, Biomedical detection, Biological adaptability, Biototoxicity

磁性纳米颗粒(Magnetic-Nanoparticles, MNPs)性能独特, 在生物医学领域的各项研究, 如磁共振成像^[1]、药物输送^[2]、细胞治疗^[3]、光学传感^[4]、体外诊断^[5]和热疗^[6]中发挥着重要作用。其中, 氧化铁磁性纳米颗粒(Iron oxide nanoparticles, IONPs)是最常用的 MNPs 之一, 由于其具有价格低廉^[7]、易分散^[8]、易于功能化^[9]、生物相容性好^[10]和稳定性好^[11]等特点, 在体外分子诊断特别是 PCR 检测的样品分离和基于表面增强拉曼散射(surface enhancement of Raman scattering, SERS)的光学标记中应用十分广泛。IONPs 能够有效解决在生物检测中遇到的部分问题, 如减小样品中复杂基质的干扰、降低分析成本、对低丰度分析物的检测更灵敏和便于样本纯化分离等^[12-13]。同时, 由于铁元素相比于其他无机材料具有更好的生物相容性和生物降解性, 相比于有机物材料更好的稳定性和操作性, IONPs 在生物医学检测领域中的应用前景将有更广阔的空间。

但若要 IONPs 进一步应用于体外细胞研究乃至在体成像标记, 特别是满足生物体内分子 SERS 或者核磁信号增强标记成像等更高端生物医学检测领域的要求, 就必须考虑

IONPs 的生物适用性和潜在的生物安全。本文综述了 IONPs 在生物适应性与毒性研究领域的最新进展, 主要对不同表面修饰、尺寸和形状下的 IONPs 的体外毒性以及 IONPs 对体内各主要器官组织的毒性和生物相容性进行详细综述, 以供后续研究参考, 对推动 IONPs 在生物医学检测和成像方面更广泛的应用研究提供价值。

1 IONPs 的体外毒性研究及其影响因素

IONPs 由氧化铁核心和聚合物涂层组成^[14], 目前生物医学检测应用中的 IONPs 通常以磁铁矿(Fe_3O_4)或镁铁矿($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)为核心^[15], 当其尺寸小于 30nm 时粒子具有超顺磁性且不容易聚集, 在医疗中安全性更高^[16]。由于铁元素是人体固有元素, 相比于其他 MNPs, IONPs 的生物相容性和生物降解性更好^[17]。而 IONPs 表面通常会修饰聚合物涂层以提高 IONPs 的稳定性、生物相容性、降低 IONPs 的毒性影响^[18], 同时聚合物涂层还可为 IONPs 的后续反应提供功能基团, 如羧基、羟基和氨基等, 以实现 IONPs 的功能化和对特定生物大分子的靶向性^[19]。由于生物体环境复杂多变, 若要将 IONPs 应用于人体, 就必须首先对颗粒毒性进行试验评估。

体外毒性试验伦理问题少、成本较低、结果更直观, 可以对毒性进行初步定量评估^[14]。研究表明, IONPs 对细胞的毒性主要体现为金属氧化物进入人体, 产生氧化应激反应, 生成的大量 ROS 破坏了生物体正常的抗氧化系统平衡, 造成细胞凋亡、细胞器损伤, 同时, 氧化应激造成的 DNA 和染色体损伤是导致遗传毒性的主要原因之一^[20]。除此之外, IONPs 还会破坏细胞骨架、造成离子失衡、细胞膜受损以及产生炎症反应等^[21]。通常通过 MTT 试验^[8]、LDH 试验、CCK-8 试验、WST-8 试验^[22]、胰蓝染色^[23]等生化检测方法可以对 IONPs 对体外培养细胞活力的影响进行检测。同时, 通过 Western Blot 和 qPCR 等分子生物学技术可以研究 IONPs 对体外培养细胞影响的分子作用机制。除此之外, 还可通过光学显微镜研究其对小鼠骨髓细胞微粒化的影响^[24], 通过电子显微镜和原子力显微镜^[25]进行细胞内定位显微分析, 以及通过彗星试验^[26]等方法对 IONPs 可能的遗传毒性进行评估。目前的研究普遍认为, IONPs 的毒性受主要受其表面涂层以及尺寸结构的影响^[8-39], 本节将对 IONPs 体外毒性试验研究最新进展进行综述。

1.1 IONPs 表面修饰对体外毒性的影响

由于纳米颗粒具有高表面积与体积比, 因此具有较高的表面能, IONPs 会趋向于聚集以减小表面能, 从而容易发生聚沉^[27]。同时, 裸露的氧化铁核心往往化学稳定性较差, 容易被氧化和与生物分子发生反应产生毒性, 所以往往需要通过物理吸附或化学键连接包覆表面修饰涂层的方式以维持 IONPs 的稳定性^[9]。用于生物医学检测的 IONPs 为了能够吸附靶标分子通常会进一步在表面进行修饰响应的特殊官能团或者生物活性基团, 而这些表面修饰涂层是主要与生物分子或组织接触的位点, 因此其化学性质就成为 IONPs 毒性和生物适应性的主要影响因素之一, 如表面涂层为短链共聚物的 IONPs 比涂层为长链聚合物的细胞毒性要高得多^[8]。

夏雷等人的研究中采用共沉淀法利用油酸对 IONPs 进行了表面改性从而避免粒子团聚,

通过接枝形成化学键连接核壳结构,提高了 IONPs 的稳定性。同时采用 MTT 试验法在质量浓度 300–800mg/L 的情况下培育 24h 后验证了油酸修饰的 IONPs 与未修饰的 IONPs 相比对人体肝癌细胞 HepG2 细胞系的毒性要更小^[28],因此选用有一定生物相容性的表面涂层材料可显著降低 IONPs 的毒性。适合 IONPs 表面涂层修饰的生物学相容性较好的材料有二氧化硅、碳、贵金属、硫化物等无机材料,及硅烷剂、脂肪酸,铵盐、多元醇、氨基酸,柠檬酸等小分子^{[27][29][30]}和壳聚糖、右旋糖酐、纤连蛋白、无细胞毒性叶酸、聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol, PVA)、聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)、聚丙烯酸(Polyacrylic acid, PAA)、聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine, PEI)、聚甲基丙烯酸甲酯(Polymethyl methacrylate, PMMA)、聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinylpyrrolidone, PVP)等有机聚合物分子。

除了表面涂层材料本身的化学性质,涂层的表面电荷也会对 IONPs 的生物稳定性、体内循环和细胞内吞机制起到关键作用^[33]。如表面含有氨基、胍基的 IONPs 会带正电荷,而含有羟基、羧基的通常会带负电荷,Nosrati 等人选择了具有胍基的带正电的 L-精氨酸和具有羧基的带负电的 L-天冬氨酸分别制备了氨基酸涂层修饰的 IONPs,并对两种 IONPs 的细胞作用进行了研究。他们的研究表明由于细胞膜带负电荷,正电荷修饰的 IONPs 更容易黏附细胞膜发生内吞,但正电荷过大容易对细胞膜上的活性位点造成损伤而产生毒性,而由带轻微表面负电荷的 IONPs 可以减少与这些成分的非特异性接触,从而减少毒性^[34]。Yang 等人通过在 IONPs 表面涂覆正硅酸四乙酯(Tetraethyl Orthosilicate, TEOS)、3-氨丙基三甲氧基硅烷(3-Aminopropyltrimethoxysilane, APTMS)或 TEOS/APTMS 的方式制备了分别具有羟基和氨基的 IONPs。他们将每种 IONPs 暴露于浓度递增(200–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的溶液 24 小时后,使用 CCK-8 测定法测量人真皮成纤维细胞(HDFs)和人纤维肉瘤(HT-1080)细胞的存活率。结果显示,在低于 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下,所有 IONPs 对纤维肉瘤细胞的细胞毒性和遗传毒性均在 5%或以下,而 APTMS 涂层 IONPs 对正常细胞的毒性则超过 10%。同时,他们还发现带正电荷(APTMS 或 TEOS/APTMS 涂层的) IONPs 都会诱发多种细胞的 DNA 畸变。^[22]另一项研究也表明高表面正电荷的 IONPs 可能会产生更强的毒性,与 PEI-PEG 胶束修饰的 IONPs(表面电荷+31.2mV)相比,表面电荷更高的仅 PEI 修饰的 IONPs (表面电荷+55.6mV)对 SH-SY5Y、MCF-7 和 U937 等多种细胞的毒性以及细胞内活性氧成分都有所增加^[35]。

当然,对于 IONPs 表面涂层的毒性还必须要基于不同类型的细胞分别研究。已有多篇报道表明相同的表面涂层会对不同的细胞产生了不同的毒性影响。如有研究评估和比较了 IONPs 对人牙周韧带成纤维细胞(hPDLFs)和小鼠真皮成纤维细胞(mDFs)的毒性,将细胞与不同浓度的 IONPs(0.1–100mg/mL)分别培养 6、24 和 48h 后,结果表明前 6 小时,hPDLF 细胞的存活率较高,但随后活性显著下降,而 mDF 细胞则在 24 和 48 小时后的存活率仍较高,且 hPDLF 细胞在所有时间点测得的乳酸脱氢酶水平都比 mDF 细胞高得多,6 小时后 hPDLF 细胞中形成的 ROS 明显高于 mDF 细胞,验证了 IONPs 的毒性与细胞类型有关^[36]。另一项研究则发现 IONPs 的细胞毒性与物种类型也有关,他们选择了来自人类或小鼠的神经母细胞瘤细胞系(人类:LA-N-2,小鼠:Neuro-2a)、神经祖细胞系(人类:ReNcell,小

鼠:C17.2)和神经干细胞(人类:hNSC,小鼠:mNSC),发现IONPs对于人体细胞的毒性影响往往比对鼠体细胞的影响更明显,并且无论人或小鼠的神经干细胞都对IONPs更敏感^[37]。这有可能是细胞类型对IONPs的影响与不同物种细胞膜的组成和细胞在体位置导致的防御机制不同有关,因此在对IONPs做体外测试时需要考虑种间差异和细胞类型差异以得到更准确的判断。

此外,当IONPs与体液样本接触后会吸附大量的蛋白质形成蛋白冠^[41],蛋白冠的存在可以逆转带正电荷纳米颗粒的电荷状态,并且影响纳米颗粒在生物环境中的分散,所以在体外毒性研究中探究不同表面涂层与蛋白质的作用造成的影响不可或缺。蛋白冠的形成是动态的,当IONPs与体液样本接触,遇到一些蛋白质后形成最初的蛋白冠,但冠上的蛋白质逐渐会被数量上占据优势的蛋白质或更有亲和力的蛋白质取代,因此其形成与IONPs表面涂层、官能团和表面电荷等因素密切相关^[33]。而蛋白冠的形成能够减少细胞对裸露IONPs的吸收而降低体外毒性。如,Kong等人的研究表明,BSA、牛转铁蛋白等蛋白冠的形成减少了裸露IONPs引起的HeLa细胞自噬,降低了细胞毒性。蛋白冠还可防止活性氧生成和促炎反应,从而降低PEG修饰的IONPs的细胞毒性^[38]。虽然从上述研究可以看出蛋白冠的形成会降低IONPs的毒性影响,但也研究表明仍然存在有消极影响的可能性^[41]。因此,基于IONPs与蛋白质的作用,在体外试验还要注意将IONPs加入体液样本或培养基时,需要考虑IONPs蛋白冠形成对粒子毒性造成的影响,需要在不同样本和培养基中进行更多的试验以排除其影响。

1.2 IONPs颗粒形状和大小体外毒性的影响

除了涂层的影响之外,IONPs的形状和尺寸会通过影响其与生物大分子和细胞的相互作用而很大程度上影响其生物毒性和适应性。目前用于生物医学检测的IONPs形状主要包括,球形、立方体形、花形、纳米棒、纳米线、纳米管、纳米薄膜、纳米片、纳米板和不规则形状等^[39],这些不同形状的IONPs及颗粒大小会对其细胞内化过程产生影响。颗粒的不规则形状可能对细胞内化更有利,有研究表明在人类癌细胞中,赤铁矿纳米棒比纳米球的内化程度更高、速度更快^[40]。IONPs还会影响颗粒的血液循环时间,一般来说,长宽比高的一维纳米结构比球形纳米结构的血液循环时间更长,因为其更容易躲避巨噬细胞的吞噬作用^[33]。此外有报道指出,IONPs的形状对其毒性也有影响, Lee等人使用3种不同形状的IONPs颗粒,包括微米尺寸的M-Fe₂O₃颗粒、纳米尺寸的N-Fe₂O₃颗粒和长宽比为20-30的棒状的R-Fe₂O₃,研究了它们对小鼠巨噬细胞RAW264.7的细胞毒性,结果说明,棒状IONPs的细胞毒性程度和肿瘤坏死因子 α 、ROS产生的程度都最高,R-Fe₂O₃直接或间接地造成了高度的膜损伤时,同时随着浓度增高,R-Fe₂O₃的毒性显著增强,这可能与棒状形状和由此产生的高比表面积有关^[41]。

除了形状,IONPs颗粒大小也会使其具有一些特殊的性质,研究表明IONPs的尺寸会对IONPs的各项性质如磁性、热力学性质有重要作用,还会改变颗粒在溶液中的形状,如油酸处理后的IONPs,所有小于50nm的IONPs都呈球形,当粒子大于50nm时,它们明显

倾向于形成面状^[42]。流体动力学尺寸会影响 IONPs 在体内的循环时间和细胞内吞，通常认为小的 IONPs 更容易穿透细胞，更加难以清除，并对细胞的结构和功能造成破坏，可能会具更强的毒性^[1]。如，Kunzmann 等人的研究证明，对原代单核细胞衍生树突状细胞而言，表面包裹二氧化硅的 IONPs 的尺寸对细胞毒性有明显影响，在尺寸较小(30-50nm)时具有剂量依赖性的细胞毒性，而在尺寸较大(70-120nm)时同样的剂量则未表现出明显毒性^[43]。但也有研究表明大尺寸的 IONPs 毒性稍高，如，Iacovita 等人通过多元醇法在 PEG 和 EG 中分别合成了颗粒尺寸约为 34nm 的小 IONPs 和颗粒尺寸约为 270nm 的大 IONPs，他们用浓度 0.05-0.2mg/毫升的 IONPs 对四种细胞系进行了培养，毒性实验结果表明小 IONPs 几乎没有毒性，而大 IONPs 有轻微的毒性^[44]。

如表 1 所示，近年来对 IONPs 对各生物细胞的体外毒性研究及其毒性影响因素进行了许多研究，基本表明粒子表面涂层、表面电荷、与蛋白质的作用、大小、形状和细胞类型等都会对影响 IONPs 的毒性。但由于可选择的表面涂层材料较多，而各项研究对于 IONPs 的制备方法、使用的细胞类型和毒性实验方法不尽相同，导致实验结果不够全面、可对比性较差。而且体外毒性试验存在检测结果容易受到干扰、试验时间较短、二维细胞无法模拟三维组织中 IONPs 的累积等问题^[45]，所以研究中需要对在体外试验中确定的无毒性或微毒性的颗粒再进行体内试验从而得到更深入的结果。

表 1 近年来进行的 IONPs 对各生物细胞的体外毒性研究及其毒性影响因素

Table 1 In vitro toxicity studies of IONPs on cells of various organisms conducted in recent years

序号	细胞类型	IONPs 表面涂层	粒子尺寸	粒子形状	给药剂量/	孵育时间	研究结果	参考
1	人 HMDM、MDDC	二氧化硅 右旋糖酐	20- 120	球形	100	1-48	所有剂量对 HMDM 细胞均无毒性，30nm 和 50nm SiO ₂ 包覆的颗粒对 MDDC 细胞具有剂量依赖性毒性	[43]
2	人 A549、H1703、DMS114、BEAS-2B	NHS 基团 裸 IONPs	15- 100	球形	0-100	72	均无明显细胞毒性作用	[46]

3	人 HK-2	二氧化硅 氨基	180- 200	球形	25、 100	1-24	两种修饰的都会破坏微管网络，抑制细胞生长活性，且具有时间和剂量依赖性	[47]
4	HeLa	氨基右旋糖酐、3-氨基丙基三乙氧基硅烷	6-10	球形	50-50 0	24-7 2	对细胞毒性非常低	[23]
5	小鼠 RAW264.7	裸 IONPs	50- 1000	棒状 球状	10-20 0	24	棒状 IONPs 比球状 IONPs 毒性更强，与产生的较高程度的膜损伤和 ROS 有关	[41]
6	人 PC3、C4-2HU VECs、HRPEs	聚环氧乙烷(PEO)三嵌段共聚物	8-10	球状	5000	1-72	PEO 尾端嵌段的长度与毒性成反比；具有最短 0.75kDaPEO 尾段的 IONPs 毒性最大，而具有 15kDa PEO 尾段的 IONPs 毒性最小	[8]
7	bEnd. 3、小鼠星形胶质细胞、神经元	氨基硅烷 (AmS)、羧基 (-COOH)	27	多面体	0.1- 224	24	在浓度低于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，均无毒性；当超时，神经元对 AmS-IONPs 更为敏感，而星形胶质细胞对 COOH-AmS-IONPs 更为敏感	[48]
8	HFF-2、HEK-293 细胞系	L-苯丙氨酸	20	离散球形	15-48 0(μM)	72	无毒性，具有生物相容性	[9]
9	Jurkat 细胞	右旋糖酐	7-9	球状	28、56	72	细胞活力下降和膜完整性丧失与时间和剂量有关，72h 后活性氧水平升高	[15]

10	3T3/NIH 、HeLa 细胞系	乳糖酸	147	球状	25-10 0	24	具有很高的生物相容性	[49]
11	HFF2 细 胞系	氨基酸	14-2 0	球状	49-37 3	72	AA 涂层 IONPs 无毒且 具有生物相容性	[50]
12	A549 和 HeLa 细 胞	二氧化硅、 氨基硅烷 或磷酸硅 烷钝化	26	球状	< 5nM	<96	IONPs 表面钝化降低了 氧化应激和铁平衡的改 变，从而降低了整体毒 性。	[26]
13	人 D407、 A548、 MV35、 小鼠 B12F10	聚乙二醇 (PEG)、乙 二醇(EG)	34、 270	立方 体多 面体 球体	<200	24	小 IONPs 几乎没有毒 性，而大 IONPs 有较小 毒性	[44]
14	人 HDFs、 HT-1080	TEOS 、 APTMS 或 TEOS/AP TMS	10、 100- 150	球形	200- 1000	24	带正电荷的 IONPs 会诱 发细胞明显的 DNA 畸 变。较小且带正电荷的 粒子对正常细胞的毒性 比对癌症细胞的毒性更 严重。	[22]
15	小鼠 NIH3T3	裸 SPIONs	10-5 0	球形	0.03- 0.06	48	在培养 3-24 小时内， NIH3T3 细胞的存活率 保持在 95%左右，培养 48 小时后，存活率仅略 有下降。	[25]
16	人 SH-SY5 Y、 MCF-7U 937 细胞 系	PEI、PEG	30-5 0	球形	<100	72	与 MNP-PEI-PEG 相 比，表面电荷更高的 MNP-PEI 增加了对所 有细胞系的细胞毒性作 用和 ROS 生成。高低电 荷 IONPs 都会导致细胞 形态发生变化。	[35]

17	人类外周血细胞	以磷酸 (PA) 和羟肟酸 (HA) 端基的聚乙二醇	12	未说明	0.17-106	24-72	均未见细胞毒性作用	[32]
18	HFF-2 和 HEK-293 细胞系	L-精氨酸 L-天冬氨酸	18.7 5 19.8 6	球状	50-370	72	HFF2 和 HEK-293 细胞系的存活率不受 AAs 涂层 IONPs 影响, 有较高生物相容性	[34]
19	人 hPDLFs、小鼠 mDFs	裸 IONPs	28.3 3	球状	0.1-100	6-48	IONPs 的毒性与细胞类型、浓度和时间有关, 与 hPDLF 细胞相比, mDFs 细胞对 IONPs 暴露更为敏感	[36]

2 IONPs 的在体生物毒性及适应性研究

尽管目前基于 IONPs 的生物学检测主要在体外进行, 但随着 SERS 成像和核磁成像技术的进步以及如肿瘤早期检测等对体内活体实时检测的需求, 基于 IONPs 的在体生物检测方法得到越来越多的研究和应用。因此, 不仅要分析 IONPs 在体外和细胞上的毒性, 还要关注 IONPs 对器官和组织的毒性。常见的 IONPs 在体毒性及适应性研究方法包括急性毒性测试、组织病理学分析、体液生化研究。急性毒性测试通常采用小鼠灌胃、吸入或注射不同剂量 IONPs 后的中毒和死亡状况来评估其半数致死量和生物安全性^[51]; 组织病理学分析主要通过对受试动物的器官组织切片进行 HE 等免疫组化染色进行组织潜在毒性分析^[52]; 而体液生化研究主要对受试动物体液中的主要标志物包括谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、谷胱甘肽 (GSH) 等进行分析来了解 IONPs 对生理代谢功能的影响^[53]。

因此 IONPs 的在体毒性及适应性研究主要通过注射给药、鼻内吸入、口服、肌肉注射和皮肤吸收等途径进入受试动物体内, 其最终可能富集的主要器官也取决于给药途径, 研究表明, IONPs 进入体内后主要会在脾脏、肝脏、肾脏、肺脏、心脏、大脑、睾丸、骨髓等器官中聚集^[54], 通过对主要脏器的组织病理学分析和主要体液中的标志物分析就可以确定 IONPs 具体的生物毒性和适应性。而此部分我们根据 IONPs 对体内不同器官的毒性和生物适应性研究来分类进行综述。

2.1 IONPs 对脾脏、肝脏的毒性研究

静脉注射是最常见的体内 IONPs 给药方式, 静脉注射后 IONPs 通常会在血液中发生溶血吸附蛋白, 随后被巨噬细胞识别并吞噬进行清除^[19]。肝脏和脾脏等器官构成了单核吞噬

细胞系统(mononuclear phagocyte system, MPS)。研究表明, IONPs 在血液系统中被清除后会主要运输进入肝脏和脾脏代谢^[54]。IONPs 的药代动力学分布也会受到尺寸的影响, 流体力学尺寸大于 100nm 的 IONPs 很容易被吞噬细胞捕获并在肝脏和脾脏中积累, 而流体力学尺寸大于 200nm 的 IONPs 由于主要通过由脾脏中产生的尺寸较大的巨噬细胞吞噬后, 在脾脏中的分布会比在肝脏中的吸收率更高^[55]。也有研究表明, IONPs 的药代动力学还会受到表面电荷影响, 带正电荷的 IONPs 主要在肝脏和脾脏积聚, 而带负电荷的粒子则更多在淋巴结中检测到, 同时带电的粒子要比电中性的粒子更容易被肝脏吸收^[33]。

IONPs 对肝脏的毒性影响主要与 IONPs 的剂量和表面涂层有关。IONPs 的剂量会影响细胞内铁离子的浓度、细胞膜离子通道的活性、细胞周期的变化和线粒体的变化^[54]。Sadeghi 等人采用 20mg/kg 和 40mg/kg 剂量的 IONPs 作用于成年雄性 Wistar 大鼠, 随后的组织学分析结果显示, 经过 IONPs 处理的大鼠的肝脏都出现了炎症、间质充血、中央静脉周围脂肪变性和肝细胞坏死。同时, 生化指标结果表明, 高剂量 IONPs 会导致血清中 ALT 和 AST 酶升高, 表明大剂量 IONPs 会对肝细胞产生明显毒性^[56]。有研究表明这是因为当 IONPs 剂量过高, 超过了转铁蛋白的铁结合能力, 使游离铁浓度过高, 就会导致铁在肝脏中蓄积并损害肝脏结构^[19]。表面涂层也会对肝脏的毒性产生影响, 适当的表面涂层也可以防止 IONPs 中有毒离子的溶解和释放。如 Shelat 等人用生物相容性氨基酸(即精氨酸和组氨酸)对 IONPs 进行了表面改性, 然后在雌性大鼠中进行口服急性毒性研究, 组织病理学结果显示没有肝脏组织改变, 且各种肝脏生物标志物研究也显示出最小的毒性^[57]。但部分表面涂层包覆的纳米粒子也会表现出对肝脏的毒性, 如 Salimi 等人通过共沉淀合成 IONPs, 并包覆第四代聚酰胺胺(PAMAM)树状大分子, 给雄性和雌性 BALB/c 小鼠注射 10mg/kg 和 100mg/kg 的 G4@IONPs 后, 肝细胞出现水肿和细胞质丢失^[58]。

脾脏也是主要吸收的 IONPs 的器官之一, 正常脾脏的结构主要由白髓(包括边缘区)和红髓组成。有研究表明, IONPs 在给药后存在于大鼠和小鼠脾脏的红髓区或白髓区周围的边缘区, 脾脏边缘区和红髓区的巨噬细胞会吞噬 IONPs^[54]。Krukemeyer 等人使用 42 只成年 Wag/Rij 大鼠研究耦合药物的 IONPs 对脾脏等器官的影响, 通过静脉注射给药, 七天后采集样本进行组织病理学研究, 结果显示铁颗粒在肝脏和脾脏组织中聚集, 但不会对这些器官造成任何结构性损伤。^[59]但也有一些研究结果表明 IONPs 对脾脏会产生毒性影响, 如, Awaad 研究探讨了 IONPs 灌注后对雌性小鼠脾脏的组织病理学和免疫学影响, 结果显示小鼠注入 IONPs 两周后, 脾滤泡不如正常脾脏明显, 经处理的脾脏中巨核细胞的数量略有增加, 6 周后脾脏组织学受到严重影响, 脾脏结构变形, 巨核细胞数量大幅增加^[60]。这些研究数据表明, IONPs 在可能对脾脏可能存在一定慢性毒性, 在体使用时需要生物相容性材料的修饰包覆。

2.2 IONPs 对肾脏的毒性研究

除了肝脏和脾脏, 肾脏也是身体代谢纳米颗粒的主要器官, 特别是对于一些小粒径的纳米颗粒可以通过肾脏对血液的透析作用通过尿液排出。一般情况下肾脏只允许流体力学尺

寸小于 10-15nm 的 IONPs 被过滤排出体外^[55]。因此,通常是一些小颗粒的 IONPs 会在肾脏中积聚,对这些颗粒的过滤可能伴随肾功能受损,可通过分析血液和尿液中的尿素、尿酸、电解质和肌酐检测肾损伤或脱水情况反应这些颗粒对肾脏的毒性。如 Mahalakshmi 等人使用 IONPs 处理大鼠后,通过使用内源性标记物来测量肾脏的肾小球滤过率,与正常值相比,IONPs 处理后肌酐清除率变低,表明肾功能恶化^[61]。而在另一项研究中,提到小鼠口服植酸和壳聚糖包覆后的 IONPs 后,血清中的尿素水平明显升高,而肌酐水平无明显差异,根据先前的研究,如果肌酐水平正常。可见裸露的 IONPs 存在肾脏毒性,可以通过生物相容性材料包裹后降低其毒性^[62]。Ahmada 等人研究了裸 IONPs 和三重聚合物涂层涂覆后的 IONPs(MNP-AC-G2-pPEG)对瑞士白化小鼠的肾脏的毒性。组织病理学评估结果显示,最高剂量(25mg/kg)的裸 IONPs 会导致肾脏组织结构发生改变,肾皮质和肾小球簇出现异常,观察到肾小球缩小和扭曲,并伴有炎性细胞浸润、水肿、坏死灶形成,同时肾小球和囊周围有炎性白细胞聚集,但涂层磁性纳米粒子在几乎所有剂量下都是安全的^[63]。说明了在实际应用中可通过控制 IONPs 的表面涂层和剂量降低粒子对肾脏的毒性,并尽量采用大粒径的 IONPs。

2.3 IONPs 对肺的毒性研究

肺是对 IONPs 的毒性最敏感的器官,存在于肺泡间隙的巨噬细胞会吞噬 IONPs,阻止 IONPs 进入血液和其他器官^[64]。除了通过注射途径给药后 IONPs 会有少部分分布在肺脏之外,吸入式给药途径会使 IONPs 大量积聚在副组织中从而造成一定毒性。IONPs 的体内研究表明,肺部接触 IONPs 可能会诱发炎症,如, Sadeghi 等人采用吸入法给药,探讨了 IONPs 对成年雄性 Wistar 大鼠肺组织的影响,结果显示肺组织中自由基明显增加,谷胱甘肽减少,中性粒细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润增加,证实了 20 - 40mg/kg IONPs 的吸入会导致肺组织明显的炎症反应。组织学研究也表明,高剂量的 IONPs 会导致大鼠肺气肿、肺间质充血和炎症^[56]。Zhu 等人的研究则表明肺部长期接触 IONPs 还会导致肺纤维化,他们通过气管内灌注给药的方式处理雄性 Sprague Dawley 大鼠,根据 TEM 图像显示,给药 30 天后出现了线粒体肿胀和细胞器溶解,这些现象表明肺泡上皮细胞受损,同时观察到胶原蛋白形成量增加,显示出肺纤维化诱导的趋势^[29]。因此在采用吸入式给药 IONPs 的时候,应尽量减少剂量。

2.4 IONPs 对心脏的毒性研究

许多研究指出心脏也是 IONPs 在体内除 MPS 相关器官外主要的分布位点之一,同时由于心肌组织对铁的敏感性高,所以评估 IONPs 对心脏的毒性是十分必要的。IONPs 对心脏最主要的潜在毒性作用之一在于破坏离子通道平衡。Fu 等人合成了 PAA 包覆的 IONPs,并在体内注射时出现了致死反应,在彩色多普勒超声和动态矢量血流技术下观察到,IONPs 能打破电解质平衡,并进一步导致严重的心力衰竭。从心电图来看,IONPs 对 CaV1, 2 离子通道有明显的影响,从而导致致命性心律失常。但通过后续研究,他们在 IONPs 中加入预螯合 Ca²⁺,当 PAA 封住二价阳离子的结合点时,IONPs 的心脏和电生理学安全性大大提高^[65]。

Gualdani 等人通过膜片钳记录发现 SPIONs 可抑制人类心室外膜下的快速延迟整流电流 (human ether-à-go-go related gene, hERG) 通道, 他们认为 IONPs 释放的 Fe^{2+} 可能是一种心脏风险因素, 因为它们会改变 hERG 门控, 而这些改变可能会损害心脏动作电位。同时, 他们的研究确定了改变 IONPs 的氧化状态、尺寸和涂层会影响粒子对 hERG 通道的抑制作用^[66]。同时 IONPs 也会通过产生 ROS 对心脏产生毒性影响, 而且毒性影响与尺寸有关。Wu 等人的制作了直径分别为 2.3、4.2 和 9.3nm 的 IONPs, 并通过静脉注射评估了它们对小鼠的毒性。结果表明, 超小型 IONPs(2.3nm 和 4.2nm)在体内显示出很高的毒性, 静脉注射后, 在心脏中都观察到了明显升高的羟基自由基水平, 容易导致小鼠产生急性心力衰竭和死亡^[67]。因此在 IONPs 在体使用时应注意表面高价离子的封闭和尽量采用大粒径的 IONPs。

2.5 IONPs 对大脑的毒性研究

尽管存在血脑屏障, 部分小颗粒的 IONPs 可以通过腹腔注射、静脉注射、口服等方式进入大脑^[68]。与其他金属不同, 铁是中枢神经系统发挥正常功能的基本要素, 大脑内异常的铁平衡会产生 ROS, 从而诱导神经毒性并破坏血脑屏障, 这就有可能 IONPs 的使用会对大脑造成一定毒性^[69]。Mabrouk 等人基于硝酸铁和乳酸铁制备 IONPs, 通过评估谷胱甘肽水平等指标, 确定了 IONPs 会显著增加脂质过氧化反应^[70]。IONPs 可能还会影响涉及大脑活动和功能的多个神经通路, Kim 等人通过坐骨神经注射 IONPs, 得出结论, 每天接触氧化铁纳米粒子会影响突触传递和神经传导, 引起神经炎症、细胞凋亡、诱导神经抗氧化反应和免疫细胞浸润^[71]。同时, 不同类型的脑细胞对 IONPs 的敏感度不同, 与其他类型的脑细胞相比, 小神经胶质细胞更容易受到 IONPs 的影响。Petters 等人将涂有荧光二巯基丁二酸酯的 IONPs 应用于小胶质细胞的原代培养物。与 IONPs 接触 6 小时后, 小胶质细胞中的铁含量出现了强烈的浓度依赖性增加, 同时产生了大量活性氧(ROS), 并导致细胞中毒。研究显示, 在小胶质细胞中培养 6 小时后, 大部分 IONP 荧光定位于溶酶体中, 在酸性 pH 下 IONPs 中铁的快速释放和铁催化的 ROS 生成参与了 IONPs 诱导的小胶质细胞毒性^[72]。因此在 IONPs 在使用时也尽量采用大粒径的 IONPs, 减少其通过血脑屏障进入大脑中的可能性。

2.6 IONPs 对生殖系统的毒性研究

IONPs 静脉注射后, 可穿过血睾屏障在睾丸中聚集。研究表明, 高剂量或长期的 IONPs 给药会对雄性睾丸组织和精子质量造成负面影响。如, Varzeghani 等人的研究表明, 腹腔注射 300mg/kg IONPs 后, 小鼠的精子活力、睾丸总体积、曲细精管长度、间质组织体积, 以及白细胞、绒毛细胞、精母细胞、精子细胞和精原细胞的总数均明显减少^[73]。另有研究给成年雄性白化大鼠腹腔注射 IONPs, 剂量分别为 5mg 和 10mg/kg, 每周 3 次, 连续 60 天, 结果表明, 雄性大鼠的睾丸组织出现了一些中度和严重的退行性变化, 精子的数量、活力和存活率都明显下降, 所有经处理的动物均发现精子形态异常^[74]。但也有研究表明, 注射 IONPs 后虽然精子数量减少, 活性降低, 但小鼠的生殖能力不变, 而且停止注射一段时间后, 精液参数可以恢复, 说明 IONPs 可对雄性小鼠的生殖系统造成的损伤是可逆的^[75]。IONPs 对雌性动物子宫的毒性也与剂量密切相关。Rahi 等人给 604 只成熟雌性大鼠分别口服蒸馏水和 1、

5、10mg/kg/天的 IONPs 溶液，发现低剂量的 IONPs 对雌性大鼠生殖甚至有改善作用，而中高剂量则对生殖器官存在负面影响^[76]。Bakhtari 等人用葡聚糖包裹的 SPIONs 处理小鼠卵母细胞和颗粒细胞，研究表明，卵母细胞和颗粒细胞的破坏与 SPIONs 的剂量依赖性增加直接相关，高剂量(250 μ g/ml)SPIONs 组的大多数颗粒细胞的细胞核破碎，细胞膜紊乱，颗粒细胞之间有明显的纳米颗粒聚集，同时降低了卵原细胞向卵母细胞发育潜能^[77]。IONPs 表面电荷和剂量对胚胎发育也有影响。一项研究用带正电荷的 PEI-NPs 或带负电荷的 PAA-NPs 在器官形成的关键时期处理怀孕小鼠，得出结论，无论电荷如何，低剂量的 IONPs 不会诱发毒性。然而，高剂量接触会导致电荷依赖性胎儿死亡，以及存活后代的子宫(两种电荷)和睾丸(仅阳性)形态改变。在器官形成后期给予带正电荷的 PEI-NPs 会导致短期胎儿夭折(42%)和长期生殖改变，包括第二代配种(在子宫内暴露的小鼠)的胎儿夭折率增加。另外，带负电荷的 PAA-NPs 可在器官形成早期诱导胎儿死亡(22%)，但程度低于 PEI-NPs，而且长期观察到的后代子宫组织学变化也很轻微^[78]。因此，IONPs 在体的使用应尽量避免大剂量和长期持续用药，以免对生殖系统造成不可逆的损伤。

2.7 IONPs 对骨髓的毒性研究

IONPs 进入体内后容易被巨噬细胞吞噬清除，因此，随着巨噬细胞活动有可能会扩散到红骨髓。关于 IONPs 对骨髓的影响的研究较少，Faraj 等的研究表明，聚乙二醇和羧基修饰的 IONPs 对骨髓衍生巨噬细胞的生物相容性较好，骨髓细胞中活性氧的释放量低，细胞活力和线粒体膜电位都没有变化^[79]。另外有研究表明，IONPs 对骨髓细胞没有细胞毒性，也不影响细胞表面标志物的表达和脂多糖诱导的小鼠骨髓树突状细胞分泌细胞因子^[80]。当然剂量也是影响 IONPs 对骨髓中细胞的毒性的主要因素之一，在 Shi 等人的一项研究中验证了 IONPs 对成骨细胞的毒性，他们检测了不同浓度 IONPs 处理下成骨细胞的凋亡率，同时，使用激光扫描共聚焦显微镜也显示了成骨细胞细胞骨架的破坏，也发现使用低浓度的 IONPs 对避免成骨细胞受损非常重要^[24]。

表 2 近年来进行的 IONPs 对各主要器官的体内毒性研究

Table 2 In vivo toxicity studies of IONPs on major organs conducted in recent years

序号	研究器官	使用的 IONPs	给药剂量	持续时间	动物模型	给药方式	研究结果	参考文献
1	肺	22 nm 和 280 nm 的 IONPs	0.8、20	1-30	雄性 Sprague Dawley 大鼠	气管内灌注	两种尺寸的 IONPs 气管内暴露均可诱发肺损伤, 与 280 nm 的 IONPs 相比, 222 nm 的 IONP 会增加微血管通透性和肺上皮细胞裂解, 并干扰血液凝固	[29]
2	脾、肝	葡聚糖修饰的 IONPs	1	7	成年 Wag/Rij 大鼠	静脉注射	不会对器官造成结构性损伤	[59]
3	心脏	PAA 包裹的 IONPs	50-350	1-21	SD 大鼠	静脉注射	体内应用时出现了致死反应, 打破电解质平衡, 并进一步导致严重的心力衰竭, 对 CaV _{1.2} 离子通道有明显的影响, 从而导致致命性心律失常	[65]
4	大脑	DMSA、PEG、PEG-Au 包裹的 IONPs	0.5-150mM	0-7	成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠	坐骨内注射	IONPs 可引起免疫细胞浸润、神经炎症和细胞凋亡, 并诱导神经抗氧化反应	[71]
5	脾、肝、肺	DMSA 修饰的 IONPs	15	0-90	雌性 C57BL/6 小鼠	静脉注射	在肝和脾中发生生物转化, 给药后一个月发现了一些急性毒性症状, 但症状短暂的, 不会影响小鼠存活	[52]

6	脾 肝、 生殖 道	裸 IONPs	170 0	2-4 2	14 周成 年雌性 白鼠 (Mus musculu s)	阴道 灌注	脾淋巴细胞出现异核和异色，巨核细胞的数量和淋巴细胞核大小均显著增加；引起肝脏和跗关节真皮的急性炎症；诱导阴道分泌 IgA 和肝细胞中的 Bcl-2 反应性，并诱导生殖道组织中岩藻糖残基的表达和 BM8+细胞的数量	[60]
7	卵巢 子宫	金和 壳聚 糖修 饰的 IONPs	1-1 0	28	成年雌 性 Wister 大鼠	口服	低剂量对雌性生殖有改善作用，而中高剂量则对生殖器官有病理影响	[76]
8	肝	硅 烷 -PE 修 饰 的 14nm IONPs	150 μg	1	成年雄 性 Wister 大鼠	静脉 注射	硅烷-PEG 修饰的 IONPs 诱导的细胞内 ROS 生成量较低，p53 的表达量也较低，而未涂覆 SiPEG 的 IONPs 容易被单核吞噬细胞系统吞噬，释放出的 Fe ²⁺ 离子会导致急性细胞毒性	[81]
9	脾、 肝、 心、 肾	PEG 包裹 的 IONPs	0-9 0	14	7 周龄 Sprague -Dawley 雄性 大鼠和 雌性大	静脉 注射	对脾巨噬细胞有较小毒性，毒性主要通过溶酶体相关信号通路调控	[82]
10	脑、 肝、 肾、 肺、 睾丸	二氧 化硅 外壳 包裹 的 IONPs	10- 100	28	雄性 ICR 小 鼠(6 周 大)	腹腔 注射	可以穿透血脑屏障(BBB)但不会干扰其功能或产生明显的毒性；经过 4 周的观察没有引起明显的毒性	[83]

11	肺、 心、 肾、 胃肝	裸 IONPs	50- 500 0	5	雄性 Wistar 大鼠	灌胃	高剂量和中等剂量会导致昏睡、 共济失调、厌食、孤僻和呼吸心 律失常等症状；低剂量没有出现 中毒症状；在高剂量组中观察到 了特定的组织病理学并发症，如 肺部充血和间质增厚、心脏出血 和肝脏变性	[51]
12	大脑	裸 IONPs	25、 50	28	雄性瑞 士白化 小鼠	腹腔 注射	动物的运动行为和空间记忆发生 了明显变化；对血脑屏障通透性 造成了破坏，反复给药会导致小 鼠大脑中纳米粒子的积累、氧化 应激和细胞凋亡，从而造成神经 行为障碍。	[84]
13	肝、 肾、 脾、 心、 胰腺	裸 IONPs 、 ACG- PEG 修饰	5-2 5	14	雌性瑞 士白化 小鼠	静脉 注射	最高剂量的裸 IONPs 会显著改变 重要器官的生化和组织结构，而 修饰的 IONPs 几乎在所有剂量下 都安全	[63]
14	睾丸	裸 IONPs	20- 80	60	成年雄 性 Wistar	腹腔 注射	长期接触会对雄性精子的生成和 功能产生不利影响，但影响可逆 转	[75]
15	睾丸	裸 IONPs	5、 10	60	成年雄 性白化 大鼠	腹腔 注射	雄性大鼠的睾丸组织出现了一些 退行性变化；精子的数量、活力 和存活率都明显下降、发现精子 形态异常；导致睾酮水平显著下 降、丙二醛水平升高、抗氧化酶 活性受损	[74]
16	睾丸	裸 IONPs	50- 300	4	雄性 NMRI 小鼠	腹腔 注射	高剂量会导致精子多种参数显著 下降，如活力、精原细胞、初级 精母细胞、精子数量以及曲细精	[73]
17	肝、	植酸、	100	14	BALB/	口服	2000 mg/kg 体重剂量导致小鼠	[62]

	肾、脾、脑、心、肺等	壳聚糖包覆的 IONPs	0 、 200 0		c 小鼠		血清尿素水平明显升高；1000 mg/kg 体重剂量导致小鼠血清碱性磷酸酶(ALP)水平明显升高；但小鼠的肝脏和肾脏未出现明显的组织病理学变化	
18	心、肺	裸 IONPs	5	79	5-6 个月大的成年雄性 Wistar 大鼠	口服	降低了心脏和肺部的氧合酶 1、抗氧化酶、总抗氧化能力；肌酸激酶、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 和脂质的生成量呈剂量依赖性增加	[85]
19	心、肝、肺、肾等	多核封装的 IONPs	3.6 -22	90	迷你猪	静脉注射	单次给药无不良反应，没有明显的临床病理变化；92 天观察期间，未发现明显的临床症状，组织病理学评估也未发现炎症、坏死或损伤	[86]
20	肾	常规制备的和绿色合成的	100	14	雄性白 Wistar 大鼠	腹腔注射	常规方法制备的 IONPs 对肾脏及其上皮细胞具有毒性，而绿色合成的 IONPs 显示出低毒性；但在线粒体水平，两种 IONPs 对细胞器都有潜在毒性	[61]
21	肝、心、肾、脾	Co 掺杂 IONPs	1、 10	7	雄兔	腹腔植入	组织学分析表明会导致肝脏、肾脏和手术部位肌肉的组织学紊乱和异常	[87]
22	肺、肝	裸 IONPs	20、 40	14、 28	成年雄性 Wistar 大鼠	肺吸入法	肺组织中自由基明显增加，GSH 减少，产生肺气肿、肺间质充血和炎症；肺组织中出现了多种淋巴细胞，肺组织出现病变；肝细胞损伤导致肝酶渗透到血清中	[56]

3 IONPs 的血液相容性

IONPs 在体内检测中最常通过静脉注射进入，所以 IONPs 进入体内首先会与血液接触。

裸露的 IONPs 进入血液中,可能会导致溶血、凝血、血小板聚集等风险,所以对 IONPs 的进行血液相容性评估是其能否在体内应用的重要考量因素。根据国际标准化组织(International Standards Organization, ISO)10993-4 的定义,血液相容性主要研究:1)材料与血浆蛋白的相互作用;2)生物材料与血细胞的相互作用;3)材料对血管内皮细胞的影响。Schlenk 等人使用了 13 种大小相当、具有不同电荷的聚合物外壳、用于全身给药的 IONPs 研究其与血浆蛋白、血细胞和血管内皮细胞的作用。他们进行的细胞和血液相容性试验表明:1)IONPs 核心本身的性质在短期孵育研究中无关;2)毒性随着 IONPs 表面修饰的聚合物质量、表面电荷(中性=阴离子<阳离子)和电荷密度的增加而增加。同时,他们还利用无壳母鸡卵模型模拟复杂的体内血液环境,在动态流动条件下进行显微注射后,在无壳母鸡卵体外试验中获得的结果与在体外试验中获得的结果相同^[88]。在另一项研究中,阐明了粒子尺寸和表面涂层是影响 IONPs 血液相容性的主要因素,Liu 等人选择了三种广泛使用的有机配体 PAA、透明质酸和壳聚糖对 IONPs 进行了改性,与 10nm 和 30nm 的 SPIONs 相比,5nm 的 IONPs 会影响体外血液凝固时间,还发现与 PAA 改性相比,透明质酸和壳聚糖改性的 IONPs 对红细胞、血小板、凝血和补体活化的影响最小。IONPs 对血液的副作用还可能体现在诱导人体全血中的炎症反应,包括激活补体系统和增加细胞因子的分泌^[89]。Gerogianni 等人研究了 10-30nm IONPs 在人类全血中与内皮细胞相互作用产生的血栓炎症反应,结果表明,IONPs 主要在 C3 水平上诱导补体活化;此外,小颗粒 IONPs 还介导了强烈的血栓炎症反应,27 种分析细胞因子中有 21 种的释放量显著增加,并显示出细胞毒性作用,但研究还表明通过补体抑制有望改善 IONPs 的血液相容性^[90]。最后,也有研究表明,白蛋白包裹的 IONPs 可作为一种血管安全载体进一步研究^[91]。

4 结论和展望

在本文中我们系统地分析了生物医学检测中常用的 IONPs 对各生物细胞、组织和器官的毒性和生物相容性,并探究了 IONPs 对生物体毒性的主要影响因素。综合分析后,我们发现 IONPs 的表面涂层、表面电荷、细胞类型、尺寸、形状、剂量以及蛋白质冠的形成都会对 IONPs 的体外毒性产生显著影响。同时,我们讨论了 IONPs 对各个器官组织的毒性和相容性,并提出,在实际应用中应避免选择小颗粒和高剂量的 IONPs 给药,表面需要用生物相容性高的透明质酸或壳聚糖等材料进行包覆,尽量选用表面呈中性或者负电性的 IONPs,通过这些方法以降低粒子毒性,提高粒子生物相容性。我们也发现,由于缺乏统一的评判标准,且 IONPs 的毒性受多种因素影响,各因素间关系复杂,导致研究结论的可对比性较差,使得关于 IONPs 的理化性质对其毒性的影响产生了许多相互矛盾的结论,这大幅提升了 IONPs 在体内应用的难度。为进一步探究 IONPs 的毒性机制以及提高 IONPs 的生物相容性,我们提出,应建立统一的毒性评判标准从而深入探究 IONPs 的毒性机制,根据毒性机制修饰功能基团或开发新的功能化 IONPs。尽管当前 IONPs 在毒性和生物相容性方面仍面临诸多挑战,但随着研究的深入和技术的不断发展,相信未来 IONPs 会在生物医学检测乃至整个生物医学领域有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Janik-Olchawa, N. , Drozd, A. , Ryszawy, D. , Pudelek, M. , Planeta, K. , Setkowicz, Z. , Sniegocki, M. , Wyrwal-Sarna, M. , Gajewska, M. , & Chwiej, J. (2021). The influence of IONPs core size on their biocompatibility and activity in in vitro cellular models. *Scientific Reports*, 11(1), 1 - 14.
- [2] Xu, H. , Cheng, L. , Wang, C. , Ma, X. , Li, Y. , & Liu, Z. (2011). Polymer encapsulated upconversion nanoparticle/iron oxide nanocomposites for multimodal imaging and magnetic targeted drug delivery. *Biomaterials*, 32(35), 9364 - 9373.
- [3] de Toledo, L. de A. S. , Rosseto, H. C. , & Bruschi, M. L. (2018). Iron oxide magnetic nanoparticles as antimicrobials for therapeutics. *Pharmaceutical Development & Technology*, 23(4), 316 - 323.
- [4] Ansari, K. , Ahmad, R. , Tanweer, M. S. , & Azam, I. (2023). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles as a Tool for the Advancement of Biomedical and Environmental Application: A Review. *Biomedical Materials & Devices*, 1 - 19.
- [5] Wang, C. , Rong, Z. , Li, P. , Wang, S. , Xu, J. , Xiao, R. , & Wang, J. (2015). Polyethylenimine-interlayered silver-shell magnetic-core microspheres as multifunctional SERS substrates. *Journal of Materials Chemistry C*, 3(33), 8684-8693.
- [6] Gawali, S. L. , Barick, B. K. , Barick, K. C. , & Hassan, P. A. (2017). Effect of sugar alcohol on colloidal stabilization of magnetic nanoparticles for hyperthermia and drug delivery applications. *Journal of Alloys and Compounds*, 725, 800 - 806.
- [7] Azizi, S. , Hasanzadeh, M. , & Shadjou, N. (2020). KCC-1 aminopropyl-functionalized supported on iron oxide magnetic nanoparticles as a novel magnetic nanocatalyst for the green and efficient synthesis of sulfonamide derivatives. *Applied Organometallic Chemistry*, 34(1).
- [8] Hafelli, U. O. , Riffle, J. S. , Harris-Shekhawat, L. , Carmichael-Baranauskas, A. , Mark, F. , Dailey, J. P. , & Bardenstein, D. (2009). Cell Uptake and in Vitro Toxicity of Magnetic Nanoparticles Suitable for Drug Delivery. *MOLECULAR PHARMACEUTICS*, 6(5), 1417 - 1428.
- [9] Nosrati, H. , Javani, E. , Salehiabar, M. , Manjili, H. K. , Davaran, S. , & Danafar, H. (2018). Biocompatibility and anticancer activity of L-phenyl alanine-coated iron oxide magnetic nanoparticles as potential chrysin delivery system. *Journal of Materials Research*, 33(11), 1602 - 1611.
- [10] Qu, H. , Ma, H. , Zhou, W. , & O, C. C. J. (2012). In situ surface functionalization of magnetic nanoparticles with hydrophilic natural amino acids. *Inorganica Chimica Acta*, 389, 60 - 65.

- [11] Ghosal, K. , Chatterjee, S. , Thomas, S. , & Roy, P. (2023). A Detailed Review on Synthesis, Functionalization, Application, Challenges, and Current Status of Magnetic Nanoparticles in the Field of Drug Delivery and Gene Delivery System. *AAPS PharmSciTech: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 24(1).
- [12] Li, D.-S. , Liu, B. , Wang, Y.-F. , Liu, W.-L. , Ren, M.-M. , Kong, F.-G. , Wang, S.-J. , Yue, K. , & Meng, Q. (2019). Magnetic ferroferric oxide/phenolic resin/silver core - shell nanocomposite as recyclable substrates for enhancing surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 92(1), 124 - 133.
- [13] Lai, H. , Xu, F. , & Wang, L. (2018). A review of the preparation and application of magnetic nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Materials Science*, 53(12), 8677 - 8698.
- [14] Markides, H. , Rotherham, M. , & ElHaj, A. J. (2012). Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine. *Journal of Nanomaterials*, 1 - 11.
- [15] Balas, M. , Stan, M. S. , Dinischiotu, A. , Ciobanu, C. S. , Predoi, D. , Burtea, C. , & Bezirtzoglou, E. (2017). Synthesis, characterization, and toxicity evaluation of dextran-coated iron oxide nanoparticles. *Metals*, 7(2).
- [16] Mahmoudi, M. , Hofmann, H. , Rothen-Rutishauser, B. , & Petri-Eink, A. (2012). Assessing the In Vitro and In Vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chemical Reviews*, 112(4), 2323 - 2338.
- [17] Chen, Y. , & Hou, S. (2023). Recent progress in the effect of magnetic iron oxide nanoparticles on cells and extracellular vesicles. *Cell Death Discovery*, 9(1).
- [18] Yang, P. , Xu, H. , Zhang, Z. , Yang, L. , Kuang, H. , & Aguilar, Z. P. (2018). Surface modification affect the biodistribution and toxicity characteristics of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *IET Nanobiotechnology*, 12(5), 562-568.
- [19] Reddy, L. H. , Arias, J. L. , Nicolas, J. , & Couvreur, P. (2012). Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chemical Reviews*, 112(11), 5818 - 5878.
- [20] 张岱旭, 屠金浩, 冯逸, 邓慧萍, & 史俊. (2023). 纳米金属氧化物对藻类的毒性效应及致毒机制研究进展, *净水技术*, 42(S1), 26 - 31.
- [21] Vakili-Ghartavol, R. , Momtazi-Borojeni, A. A. , Vakili-Ghartavol, Z. , Aiyelabegan, H. T. , Jaafari, M. R. , Rezayat, S. M. , & Arbabi Bidgoli, S. (2020). Toxicity assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in different tissues. *Artificial Cells, Nanomedicine & Biotechnology*, 48(1), 443 - 451.
- [22] Yang, W. J. , Lee, J. H. , Hong, S. C. , Lee, J. , Lee, J. , & Han, D-W. (2013). Difference between Toxicities of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles with Various

Surface-Functional Groups against Human Normal Fibroblasts and Fibrosarcoma Cells. *Materials* (1996-1944), 6(10), 4689 - 4706.

[23] Calero, M., Gutiérrez, L., Salas, G., Luengo, Y., Lázaro, A., Acedo, P., Morales, M. P., Miranda, R., & Villanueva, A. (2014). Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: Two fundamental requirements for biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(4), 733 - 743.

[24] Shi, S., Jia, J., Guo, X., Zhao, Y., Liu, B., Chen, D., Guo, Y., & Zhang, X. (2012). Toxicity of iron oxide nanoparticles against osteoblasts. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9), 1 - 11.

[25] Jarockyte, G., Daugelaite, E., Stasys, M., Statkute, U., Poderys, V., Karabanovas, V., Rotomskis, R., Tseng, T.-C., & Hsu, S.-H. (2016). Accumulation and toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cells and experimental animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8).

[26] Malvindi, M. A., De Matteis, V., Galeone, A., Brunetti, V., Anyfantis, G. C., Athanassiou, A., Cingolani, R., & Pompa, P. P. (2014). Toxicity Assessment of Silica Coated Iron Oxide Nanoparticles and Biocompatibility Improvement by Surface Engineering. *PLoS ONE*, 9(1), 1 - 11.

[27] Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2023). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters*, Preprints, 1 - 19.

[28] 夏雷, 全姬善, 于婷, 梅萍, 宋晓伟, & 金光玉 (2017). 油酸改性超顺磁性氧化铁纳米粒子的制备. *精细化工*, 34(7), 735 - 779.

[29] Zhu, M.-T., Feng, W.-Y., Wang, B., Wang, M., Wang, Y., Ouyang, H., Zhao, Y.-L., Chai, Z.-F., Gu, Y.-Q., & Wang, T.-C. (2008). Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology*, 247(2 - 3), 102-111.

[30] 刘红玉, 陈若乐, 郑珩, & 顾觉奋 (2023). 磁性纳米粒子在生物医药领域的研究进展. *离子交换与吸附*, 39(04), 342-351.

[31] 左柔柔, 陈柏青, & 孙洪赞 (2023). 超顺磁性氧化铁纳米粒子在肿瘤诊断及治疗方面的应用. *磁共振成像*, 14(08), 197-202.

[32] Patsula, V., Tulinska, J., Trachtová, Š., Kuricova, M., Liskova, A., Španová, A., Ciampor, F., Vavra, I., Rittich, B., Ursinyova, M., Dusinska, M., Ilavska, S., Horvathova, M., Masanova, V., Uhnakova, I., & Horák, D. (2019). Toxicity evaluation of monodisperse PEGylated magnetic nanoparticles for nanomedicine. *Nanotoxicology*, 13(4), 510 - 526.

[33] Nowak-Jary, J., & Machnicka, B. (2022). Pharmacokinetics of magnetic iron oxide nanoparticles for medical applications. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1).

- [34] Nosrati, H. , Salehiabar, M. , Bagheri, Z. , Rashidzadeh, H. , Davaran, S. , & Danafar, H. (2018). Preparation, characterization, and evaluation of amino acid modified magnetic nanoparticles: drug delivery and MRI contrast agent applications. *Pharmaceutical Development & Technology*, 23(10), 1156 – 1167.
- [35] Hoskins, C. , Cuschieri, A. , & Wang, L. (2012). The cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles: Common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism. *Journal of Nanobiotechnology*, 10(1), 15 – 25.
- [36] Dönmez Güngüneş, Ç. , Şeker, Ş. , Elçin, A. E. , & Elçin, Y. M. (2017). A comparative study on the in vitro cytotoxic responses of two mammalian cell types to fullerenes, carbon nanotubes and iron oxide nanoparticles. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(2), 215–227.
- [37] Joris, F. , Valdepérez, D. , Pelaz, B. , Soenen, S. J. , Manshian, B. B. , Parak, W. J. , De Smedt, S. C. , & Raemdonck, K. (2016). The impact of species and cell type on the nanosafety profile of iron oxide nanoparticles in neural cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 1 – 13.
- [38] Kong, H. , Xia, K. , Ren, N. , Cui, Y. , Lv, M. , Yan, Q. , Cui, Z. , Fan, C. , Zhu, Y. , Wang, L. , Liu, R. , Li, Q. , & Shi, J. (2018). Serum protein corona-responsive autophagy tuning in cells. *Nanoscale*, 10(37), 18055–18063.
- [39] Xie, W. , Guo, Z. , Gao, F. , Gao, Q. , Wang, D. , Liaw, B. , Cai, Q. , Sun, X. , Wang, X. , & Zhao, L. (2018). Shape-, size- and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics. *THERANOSTICS*, 8(12), 3284 – 3307.
- [40] Raquel G. D. Andrade, Sérgio R. S. Veloso, & Elisabete M. S. Castanheira. (2020). Shape Anisotropic Iron Oxide-Based Magnetic Nanoparticles: Synthesis and Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2455.
- [41] Lee, J. H. , Ju, J. E. , Kim, B. I. , Pak, P. J. , Chung, N. , Choi, E.-K. , & Lee, H.-S. (2014). Rod-shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphere-shaped nanoparticles to murine macrophage cells. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(12), 2759–2766.
- [42] Klomp, S. , Walker, C. , Christiansen, M. , Newbold, B. , Griner, D. , Cai, Y. , Minson, P. , Farrer, J. , Smith, S. , Campbell, B. J. , Harrison, R. G. , & Chesnel, K. (2020). Size-Dependent Crystalline and Magnetic Properties of 5 – 100 nm Fe₃O₄ Nanoparticles: Superparamagnetism, Verwey Transition, and FeO – Fe₃O₄ Core – Shell Formation. *IEEE Transactions on Magnetics, Magnetics, IEEE Transactions on, IEEE Trans.*

Magn, 56(11), 1 – 9.

[43] Kunzmann, A., Feliu, N., Fadeel, B., Andersson, B., Gabrielsson, S., Scheynius, A., Vogt, C., Ye, F., Toprak, M. S., Muhammed, M., Buerki-Thurnherr, T., Krug, H., Laurent, S., & Vahter, M. (2011). Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253(2), 81–93.

[44] Iacovita, C., Florea, A., Dudric, R., Pall, E., Moldovan, A. I., Tetean, R., Stiuftuc, R., & Lucaciu, C. M. (2016). Small versus Large Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: Hyperthermia and Cell Uptake Properties. *Molecules*, 21(10), 1357 – 1377.

[45] Liu, G., Gao, J., Ai, H., & Chen, X. (2013). Applications and Potential Toxicity of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *SMALL*, 9(9 – 10), 1533 – 1545.

[46] Ruzycka-Ayoush, M., Grudzinski, I. P., & Sobczak, K. (2024). Comparative studies on the cytotoxic effects induced by iron oxide nanoparticles in cancerous and noncancerous human lung cells subjected to an alternating magnetic field. *Toxicology in Vitro*, 95. .

[47] Královec, K., Kročová, E., Kučírková, L., Hauschke, M., Havelek, R., Bartáček, J., Sedlák, M., & Palarčík, J. (2019). Silica coated iron oxide nanoparticles-induced cytotoxicity, genotoxicity and its underlying mechanism in human HK-2 renal proximal tubule epithelial cells. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 844, 35–45.

[48] Sun, Z., Yathindranath, V., Worden, M., Thliveris, J., A., Chu, S., Parkinson, F. E., Hegmann, T., & Miller, D. W. (2013). Characterization of cellular uptake and toxicity of aminosilane-coated iron oxide nanoparticles with different charges in central nervous system-relevant cell culture models. *International Journal of Nanomedicine*, 2013(default), 961 – 970.

[49] Kawish, M., Jabri, T., Elhissi, A., Zahid, H., Muhammad Iqbal, K., Rao, K., Gul, J., Abdullah, M., & Shah, M. R. (2021). Galactosylated iron oxide nanoparticles for enhancing oral bioavailability of ceftriaxone. *Pharmaceutical Development & Technology*, 26(3), 291 – 301.

[50] Nosrati, H., Salehiabar, M., Danafar, H., Attari, E., Davaran, S., & Manjili, H. K. (2018). Green and one-pot surface coating of iron oxide magnetic nanoparticles with natural amino acids and biocompatibility investigation. *Applied Organometallic Chemistry*, 32(2). .

[51] Talesh, S., Koohi, M., Zayerzadeh, E., Hasan, J., & Shabani, M. (2019). Acute toxicity investigation regarding clinical and pathological aspects following repeated oral administration of iron oxide nanoparticles in rats. *Nanomedicine Research Journal*, 4(4), 228 – 233.

- [52] Mejías, R. , Gutiérrez, L. , Salas, G. , Pérez-Yagüe, S. , Zotes, T. M. , Lázaro, F. J. , Morales, M. P. , & Barber, D. F. (2013). Long term biotransformation and toxicity of dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles support their use in biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 171(2), 225 – 233. .
- [53] Utkarsh A. Reddy, P.V. Prabhakar, & M. Mahboob. (2017). Biomarkers of oxidative stress for in vivo assessment of toxicological effects of iron oxide nanoparticles. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1172 – 1180.
- [54] Chrishtop, V. V. , Mironov, V. A. , Prilepskii, A. Y. , Nikonorova, V. G. , & Vinogradov, V. V. (2021). Organ-specific toxicity of magnetic iron oxide-based nanoparticles. *Nanotoxicology*, 15(2), 167 – 204.
- [55] Malhotra, N. , Lee, J.-S. , Liman, R. A. D. , Ruallo, J. M. S. , Villaflores, O. B. , Ger, T.-R. , & Hsiao, C.-D. (2020). Potential Toxicity of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: A Review. *MOLECULES*, 25(14), 3159.
- [56] Sadeghi, L. , Yousefi Babadi, V. , & Espanani, H. R. (2015). Toxic effects of the Fe₂O₃ nanoparticles on the liver and lung tissue. *Bratislava Medical Journal*, 116(6), 373–378. .
- [57] Shelat, R. , Bhatt, L. K. , Khanna, A. , & Chandra, S. (2019). A comprehensive toxicity evaluation of novel amino acid-modified magnetic ferrofluids for magnetic resonance imaging. *Amino Acids: The Forum for Amino Acid, Peptide and Protein Research*, 51(6), 929 – 943.
- [58] Salimi, M. , Sarkar, S. , Fathi, S. , Alizadeh, A. M. , Saber, R. , Moradi, F. , & Delavari, H. (2018). Biodistribution, pharmacokinetics, and toxicity of dendrimer-coated iron oxide nanoparticles in BALB/c mice. *International Journal of Nanomedicine*, ume 13, 1483 – 1493.
- [59] Krukemeyer, M. G. , Wagner, W. , Krenn, V. , & Jakobs, M. (2012). Mitoxantrone-iron oxide biodistribution in blood, tumor, spleen, and liver – Magnetic nanoparticles in cancer treatment. *Journal of Surgical Research*, 175(1), 35–43.
- [60] Awaad, A. (2015). Histopathological and immunological changes induced by magnetite nanoparticles in the spleen, liver and genital tract of mice following intravaginal instillation. *Journal of Basic and Applied Zoology*, 71(C), 32 – 47.
- [61] Mahalakshmi, A. , & Kurian, G. A. (2019). Evaluation of Chemical and Green Synthesized Iron Oxide Nanoparticles' Associated Renal Toxicity in Different Experimental Models: A Comparative Study. *Journal of Cluster Science: Including Nanoclusters and Nanoparticles*, 30(2), 343 – 350.
- [62] Tamsir, N. M. , Esa, N. M. , Shafie, N. H. , Hussein, M. Z. , Hamzah, H. , &

Abdullah, M. A. (2019). The acute effects of oral administration of phytic acid-chitosan-magnetic iron oxide nanoparticles in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17).

[63] Ahmad, A., Ansari, M. M., Kumar, A., Vyawahare, A., Mishra, R. K., Jayamurugan, G., Raza, S. S., & Khan, R. (2020). Comparative acute intravenous toxicity study of triple polymer-layered magnetic nanoparticles with bare magnetic nanoparticles in Swiss albino mice. *Nanotoxicology*, 14(10), 1362 – 1380.

[64] Kornberg, T. G., Stueckle, T. A., Antonini, J. M., Rojanasakul, Y., Castranova, V., Yang, Y., & Rojanasakul, L. W. (2017). Potential Toxicity and Underlying Mechanisms Associated with Pulmonary Exposure to Iron Oxide Nanoparticles: Conflicting Literature and Unclear Risk. *NANOMATERIALS*, 7(10), 307.

[65] Fu, H., Miao, C., Rui, Y., Hu, F., Shen, M., Xu, H., Zhang, C., Dong, Y., Wang, W., Gu, H., & Duan, Y. (2019). Strategy to prevent cardiac toxicity induced by polyacrylic acid decorated iron MRI contrast agent and investigation of its mechanism. *Biomaterials*, 222.

[66] Gualdani, R., Guerrini, A., Fantechi, E., Tadini-Buoninsegni, F., Moncelli, M. R., & Sangregorio, C. (2019). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) modulate hERG ion channel activity. *Nanotoxicology*, 13(9), 1197 – 1209.

[67] Wu, L., Wen, W., Wang, X., Huang, D., Cao, J., Qi, X., & Shen, S. (2022). Ultrasmall iron oxide nanoparticles cause significant toxicity by specifically inducing acute oxidative stress to multiple organs. *Particle and Fibre Toxicology*, 19(1).

[68] Yarjanli, Z., Ghaedi, K., Esmaili, A., Rahgozar, S., & Zarrabi, A. (2017). Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. *BMC Neuroscience*, 18(1), 1 – 12.

[69] Petters, C., Irsack, E., Koch, M., & Dringen, R. (2014). Uptake and Metabolism of Iron Oxide Nanoparticles in Brain Cells. *Neurochemical Research*, 39(9), 1648 – 1660.

[70] Mabrouk, M., Ibrahim Fouad, G., El-Sayed, S. A. M., Rizk, M. Z., & Beherei, H. H. (2022). Hepatotoxic and Neurotoxic Potential of Iron Oxide Nanoparticles in Wistar Rats: a Biochemical and Ultrastructural Study. *Biological Trace Element Research*, 200(8), 3638 – 3665.

[71] Kim, Y., Kong, S. D., Chen, L.-H., Pisanic, T. R., II, Jin, S., & Shubayev, V. I. (2013). In vivo nanoneurotoxicity screening using oxidative stress and neuroinflammation paradigms. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(7), 1057 – 1066.

[72] Petters, C., Dringen, R., & Thiel, K. (2016). Lysosomal iron liberation is responsible for the vulnerability of brain microglial cells to iron oxide nanoparticles: Comparison with

- neurons and astrocytes. *Nanotoxicology*, 10(3), 332-342. .
- [73] Varzeghani, S. M., Parivar, K., Abdollahifar, M.-A., & Karamian, A. (2018). Effects of Iron Oxide Nanoparticles on Mouse Sperm Parameters and Testicular Tissue. *Iranian Journal of Toxicology*, 12(6), 39 - 44.
- [74] Gamal, A., Kortam, L. E., El Ghareeb, A. E. W., & El Rahman, H. A. A. (2022). Assessment of the potential toxic effect of magnetite nanoparticles on the male reproductive system based on immunological and molecular studies. *Andrologia*, 54(11), 1 - 12.
- [75] Verma, G. S., Nirmal, N. K., & John, P. J. (2022). Iron oxide nanoparticles reversibly affect sperm quality in Wistar rats. *Andrologia*, 54(11), 1 - 10. .
- [76] Rahi, K. K., Kadhim, R. J., & Al-Saaidi, J. A. A. (2022). Influence of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Reproductive Functions of Female Rats. *AL-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 21(1), 17 - 26.
- [77] Bakhtari, A., Nazari, S., Alaei, S., Kargar-Abarghouei, E., Mesbah, F., Mirzaei, E., & Molaie, M. J. (2020). Effects of Dextran-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Mouse Embryo Development, Antioxidant Enzymes and Apoptosis Genes Expression, and Ultrastructure of Sperm, Oocytes and Granulosa Cells. *International Journal of Fertility and Sterility*, 14(3), 161 - 170.
- [78] Di Bona, K. R., Xu, Y., Gray, M., Fair, D., Hayles, H., Milad, L., Montes, A., Sherwood, J., Bao, Y., & Rasco, J. F. (2015). Short- and Long-Term Effects of Prenatal Exposure to Iron Oxide Nanoparticles: Influence of Surface Charge and Dose on Developmental and Reproductive Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 30251 - 30268.
- [79] Al Faraj, A. (2013). Preferential magnetic nanoparticle uptake by bone marrow derived macrophages sub-populations: effect of surface coating on polarization, toxicity, and in vivo MRI detection. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(7), 1 - 13.
- [80] Paik, S-Y-R, Kim, J-S, Shin, S. J., & Ko, S. (2015). Characterization, Quantification, and Determination of the Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles to the Bone Marrow Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 22243 - 22257.
- [81] Mohd Nor, N. A., R. Ridwan, N. C. Nordin, W. M. Md Saad, and H. R. Abdul Razak. 2016. "In Vivo Assessment on Acute Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles with Different Coatings." *Jurnal Teknologi* 78 (6 - 7): 31-36.
- [82] Han, J., Tian, Y., Wang, M., Li, Y., Yin, J., Qu, W., Yan, C., Ding, R., Guan, Y., & Wang, Q. (2022). Proteomics unite traditional toxicological assessment methods to evaluate the toxicity of iron oxide nanoparticles. *Frontiers in Pharmacology*, 13.
- [83] Kim, J. S., Yu, K. N., Park, S. J., Kim, H. W., Cho, M. H., Yoon, T.-J.,

- Kim, B. G. , Lee, J.-K. , Park, S. B. , & Lee, K. H. (2006). Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicological Sciences*, 89(1), 338-347.
- [84] Dhakshinamoorthy, V. , Manickam, V. , & Perumal, E. (2017). Neurobehavioural Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles in Mice. *Neurotoxicity Research*, 32(2), 187 - 203.
- [85] Yousef, M. I. , Abuzreda, A. A. , & Kamel, M. A.-N. (2019). Cardiotoxicity and lung toxicity in male rats induced by long-term exposure to iron oxide and silver nanoparticles. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*, 18(6), 4329 - 4339.
- [86] Kraus, S. , Rabinovitz, R. , Sigalov, E. , Eltanani, M. , Khandadash, R. , Tal, C. , Rivlin, O. , Sharaga, E. , Rukenstein, P. , Cohen-Erner, M. , Nyska, A. , Siman-Tov, Y. , & Shalev, O. (2022). Self-regulating novel iron oxide nanoparticle-based magnetic hyperthermia in swine: biocompatibility, biodistribution, and safety assessments. *Archives of Toxicology*, 96(9), 2447 - 2464.
- [87] Tabish, T. A. , Ashiq, M. N. , Ullah, M. A. , Iqbal, S. , Latif, M. , Ali, M. , Ehsan, M. F. , & Iqbal, F. (2016). Biocompatibility of cobalt iron oxide magnetic nanoparticles in male rabbits. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 33(7), 2222 - 2227.
- [88] Schlenk, F. , Werner, S. , Rabel, M. , Jacobs, F. , Bergemann, C. , Clement, J. H. , & Fischer, D. (2017). Comprehensive analysis of the in vitro and ex ovo hemocompatibility of surface engineered iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Archives of Toxicology*, 91(10), 3271-3286.
- [89] Liu, T. , Bai, R. , Zhou, H. , Liu, J. , Zhao, Y. , Chen, C. , & Wang, R. (2020). The effect of size and surface ligands of iron oxide nanoparticles on blood compatibility. *RSC Advances*, 10(13), 7559-7569.
- [90] Gerogianni, A. , Bal, M. , Mohlin, C. , Woodruff, T. M. , Lambris, J. D. , Mollnes, T. E. , Sjöström, D. J. , & Nilsson, P. H. (2023). In vitro evaluation of iron oxide nanoparticle-induced thromboinflammatory response using a combined human whole blood and endothelial cell model. *Frontiers in Immunology*, 14.
- [91] Toropova, Y. G. , Zelinskaya, I. A. , Gorshkova, M. N. , Motorina, D. S. , Korolev, D. V. , Velikonitvsev, F. S. , & Gareev, K. G. (2021). Albumin covering maintains endothelial function upon magnetic iron oxide nanoparticles intravenous injection in rats. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 109(10), 2017-2026.