

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200503001

向思靓, 曾洁, 阮锋凯, 等. 黑磷纳米片应用及生物毒性研究进展[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(3): 115-127

Xiang S L, Zeng J, Ruan F K, et al. Advances in application and biotoxicity of black phosphorus nanosheet [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(3): 115-127 (in Chinese)

黑磷纳米片应用及生物毒性研究进展

向思靓, 曾洁, 阮锋凯, 左正宏, 何承勇*

厦门大学生命科学院, 细胞应激生物学国家重点实验室, 厦门 361102

收稿日期: 2020-05-03 录用日期: 2020-06-23

摘要: 黑磷纳米片(black phosphorus nanosheet, BPNS)是一种新型纳米材料,它拥有可调节的带隙宽度、高度各向异性、高载流子迁移率、广谱光吸收性和良好生物相容性等诸多特性,在电子、光电、电化学、环保和生物医学等领域表现出巨大的应用潜力。近年来,随着对BPNS研究的深入,其生物安全性问题备受关注。本文简要介绍了BPNS的应用现状和前景,着重综述了其环境危害、健康危害以及毒性机制研究进展,为生产生物安全性更高、环境更友好的黑磷纳米材料提供科学依据。

关键词: 黑磷纳米片; 毒性; 毒性机制

文章编号: 1673-5897(2021)3-115-13 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Advances in Application and Biotoxicity of Black Phosphorus Nanosheet

Xiang Siliang, Zeng Jie, Ruan Fengkai, Zuo Zhenghong, He Chengyong*

State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China

Received 3 May 2020 accepted 23 June 2020

Abstract: Black phosphorus nanosheet (BPNS) is a type of novel nanomaterial with tunable bandgap width, high anisotropy, high carrier mobility, broad optical absorption, excellent biocompatibility and many other features, showing great potential for application in the fields of electronics, optoelectronics, electrochemistry, environmental protection and biomedicine. Following further study on BPNS in recent years, its biosafety issue has drawn much attention. This paper briefly summarizes the current status of application and prospect of BPNS, and highlights the research progress on its environmental hazard, health risks and mechanisms of toxicity, which will provide a scientific basis to manufacture safer and more environment-friendly black phosphorus nanomaterials.

Keywords: black phosphorus nanosheet; toxicity; mechanism of toxicity

黑磷(black phosphorus, BP)是纳米材料家族的新成员,主要包括黑磷量子点(black phosphorus quantum dot, BPQD)、黑磷纳米颗粒(black phosphorus nanoparticle, BPNP)和黑磷纳米片(black phosphorus nanosheet, BPNS)。2014年, Li等^[1]将二维层状

BPNS从块状黑磷(Bulk-BP)中剥离出后,便引起了研究人员的广泛关注。BPNS是二维结构材料,由单原子层厚度的纳米片堆积而成。BPNS的层状结构赋予其较大表面积,有利于在医学上用于药物运载^[2]。BPNS可通过机械剥离^[3]、液相剥离^[4]或电化

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32071301); 厦门大学校长基金资助项目(20720180045)

第一作者: 向思靓(1999—), 女, 学士, 研究方向为纳米毒理学, E-mail: xslyz1106@163.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: hecy@xmu.edu.cn

学剥离^[5]等方法制备。随着纳米技术的飞速发展和人们对 BP 材料的研究深入, BPNS 在生产生活中的应用会愈加广泛, 我们可能频繁接触到 BPNS, 或使用 BPNS 制成的药物, 因此, 有必要深入了解 BPNS 对人体和生物体潜在的影响。近期 Qu 等^[6]全面详细地综述了 BP 相关研究进展, 从 BP 的物理化学特性、合成、钝化、生物医学应用, 到 BP 与生物分子、细胞、动物间的相互作用, 以及 BP 潜在的生态风险和 BP 的改性修饰。这篇综述对 BP 纳米材料实验研究的开展及未来发展方向, 提供了重要的指导。本文主要关注和论述 BPNS 的生物毒性研究进展, 试图更详细地分析 BPNS 对人体和环境生物的影响, 阐述 BPNS 生物安全性研究的现状与不足, 为将来的研究提供方向和思路。

本文首先简要介绍 BPNS 在电子、光电、电化学、环境和生物医学等领域的应用前景, 并从 BPNS 的环境危害和健康危害的角度进行综述。通过对环境生物包括细菌及单细胞水生生物毒性检测, 来评估 BPNS 潜在生态风险。通过对哺乳动物体内外毒理实验综述, 以期评估 BPNS 对人类的健康风险。由于哺乳动物的结构更加复杂、生命周期更长, BPNS 与其之间的相互作用更加繁杂。但不管是哺乳动物还是单细胞生物, BPNS 对它们的毒性机制可能存在一定的相似之处, 比如 BPNS 与生物膜界面的相互作用方式、BPNS 体内降解产物诱发毒性损伤等。本文重点论述国内外在 BPNS 生物毒性方面的研究进展, 为开发应用更加安全、更加环境友好的 BP 纳米材料提供科学依据。

1 BPNS 的结构性能及应用 (Structural performance and application of BPNS)

1.1 BPNS 的结构性能

BP 属于磷的一种同素异形体, 相比于白磷和红磷, 它的活性较弱, 在空气中不易自燃, 比较稳定^[7]。BP 晶体具有层状结构, 该结构是由正交晶体中的褶皱六边形环组成^[8]。而 BPNS 是 BP 的单层或几层形式, 在其层状结构中, 每个磷原子都与相邻的 3 个磷原子通过共价键结合, 从而形成了沿锯齿状方向的双层结构和沿扶手椅方向的皱缩结构。层间靠范德华力维系^[9]。这种结构对于 BPNS 的光学特性、力学特性、导电性能以及拓扑结构都有重要影响。

相比其他二维材料, BPNS 拥有独特的优势。石墨烯近 10 年来发展迅速, 但其零带隙结构特点限制了石墨烯在半导体领域的应用^[10]。而 BPNS 的带

隙取决于它的层数, 可剥离成少数几层, 故它拥有可调节的带隙宽度, 若应用于光电设备, 可优化设计, 提高灵活性^[11]。BPNS 在平面内还有极高的各向异性, 可应用于生物传感^[12]。同时, BPNS 能够广泛吸收可见光、红外光以及紫外光, 拥有优异的光学性能^[13]。BPNS 还有很高的开关电流比, 可应用于场效应晶体管传感^[14]。相比于 MoS₂, BPNS 有很高的载流子迁移率, 可应用于气体传感器等领域^[14]。此外, BPNS 还具有很高的生物相容性, 在体内可降解为对人体无害的磷酸盐, 这是其他无机纳米材料所不具备的, 具有应用于生物医学领域的良好前景。总的来说, BPNS 具有直接带隙、高度各向异性、广谱光吸收性、高开关电流比、高载流子迁移率和高生物相容性等优点。因此, BPNS 在电子、光电、电化学、环保和生物医学等领域具有广泛的应用前景(图 1)。

1.2 BPNS 的应用

1.2.1 BPNS 在电子、光电及电化学领域的应用

在 2014 年, 新型的 BPNS 二维半导体材料出现后, 由于其场效应与硅相似, 有望代替硅, 应用于制作场效应晶体管。研究发现, BPNS 场效应管可进行双极操作^[15], 优化传输性能^[16]。另外, 纳米 BPNS 对周围环境非常敏感, 当处于气体环境或有气体吸附其上时, 电阻率会发生变化, 因此可用于制备气体传感器^[17-18]。

由于有可调带隙, BPNS 吸收能量后, 可以光子形式将能量再释放出来。因此, BPNS 能够高效地将电信号转化为光信号。BPNS 还可广泛吸收红外光、可见光以及紫外光, 可制备优良的光电元件^[19-20]。

BPNS 的可调带隙特性使得它还可作为电化学装置中的电极材料。以 BPNS 作为电极材料, 制备的超级电容器, 具有快速的充电/放电速率, 高功率密度以及长循环寿命等优势^[21]。BPNS 也可用于锂离子电池的阳极, 如此制得的电池具有高容量、高导电性和长寿命^[22]。

1.2.2 BPNS 在生物医学领域的应用

由于 BPNS 尺寸较小, 它可以利用肿瘤的增强渗透滞留效应, 在肿瘤部位富集。同时, 相比于小分子药物, BPNS 又不至于因为尺寸太小而被肾脏过滤排出^[2]。除此之外, 由于 BPNS 的本质是磷元素, 而磷元素是生物体的大量元素之一, 故 BPNS 拥有出色的生物相容性。BPNS 还拥有良好的光敏和光动力特征。因此, BPNS 在生物医学领域拥有巨大

的应用前景。

BPNS 被光照射后,能将其吸收的光子能量以热能形式散发,然后引起温度迅速升高。而当温度升高到一定时,肿瘤细胞可被诱导凋亡。因此 BPNS 可制成高效的光热制剂,用于光热疗法(photothermal therapy, PTT)。通过对肿瘤细胞 BPNS 富集部位局部照射,抑制肿瘤的生长,同时减少周围正常细胞的损伤^[23-24]。BPNS 还可以制成光敏剂,用于光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)。研究表明,在整个可见光区域里,超薄 BPNS 在肿瘤细胞内产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[25],进一步抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡。相比其他光敏剂, BPNS 所需量更少,产生 ROS 需要光照时间更短^[26]。更重要的是, BPNS 在光照下可以转化为生物相容性良好的磷酸盐化合物,生物残留少。另外,在 Yang 等^[27]研究中, BPNS 可与糖酵解抑制剂协同作用,可以抑制自噬和能量代谢,有望在肿瘤饥饿治疗中发挥重要作用。

由于 BPNS 的比表面积大,它还可以作为药物载体,与带正电的小分子药物结合。相比其他二维纳米材料, BPNS 载药量较大^[28]。而且,在酸性肿瘤微环境下, BPNS 能快速释放药物;以 BPNS 作为药物载体,还可保持药物的稳定状态且对生物体副作用较小^[29-30]。

研究表明, BPNS 可用于治疗金属离子浓度过高导致的神经退行性疾病。由于 BPNS 可以选择性地捕获 Cu^{2+} ,降低神经毒性。而且在近红外光(near

infrared, NIR)照射下, BPNS 透过血脑屏障比例显著提高,还能抑制神经细胞凋亡^[31]。BPNS 所制成的复合支架在轻度氧化应激刺激下,可诱导血管和神经生成,促进轴突伸长和髓鞘增厚^[32]。除了神经损伤修复以外, BPNS 还可用于骨再生^[33],修复肿瘤引起的骨缺损;还可作为伤口敷料,在 NIR 照射下,能显著促进伤口愈合和皮肤再生^[34]。

1.2.3 BPNS 在环境与能源领域的应用

太阳能产氢是绿色环保的新方法,但需要非常高效的光催化剂。BPNS 具有可调带隙和高载流子迁移特性,可利用以 BPNS 为原料设计的光催化剂来实现电子有效迁移,驱动水分解反应^[35]。BPNS 经过可见光和 NIR 活化,可催化氢气产生,快速析出氢气^[36-37]。BPNS 作为光催化剂,还可用于污染物降解,解决环境污染问题^[38-40]。

2 BPNS 的环境危害 (Environmental hazard of BPNS)

2.1 BPNS 对细菌毒性

Xiong 等^[41]研究了 BPNS 对 2 种模式细菌——大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的毒性,结果表明, BPNS 的毒性呈现时间和剂量依赖性。当 BPNS 浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其对大肠杆菌的杀菌效果最大可达 91.65%,对枯草芽孢杆菌可达 99.69%。相比于枯草芽孢杆菌, BPNS 处理 6 h 时对大肠杆菌的毒性更强,随后毒性减弱。其原因可能是大肠杆菌的细胞壁相较薄,对 BPNS 更敏感,在更早期就表现出毒

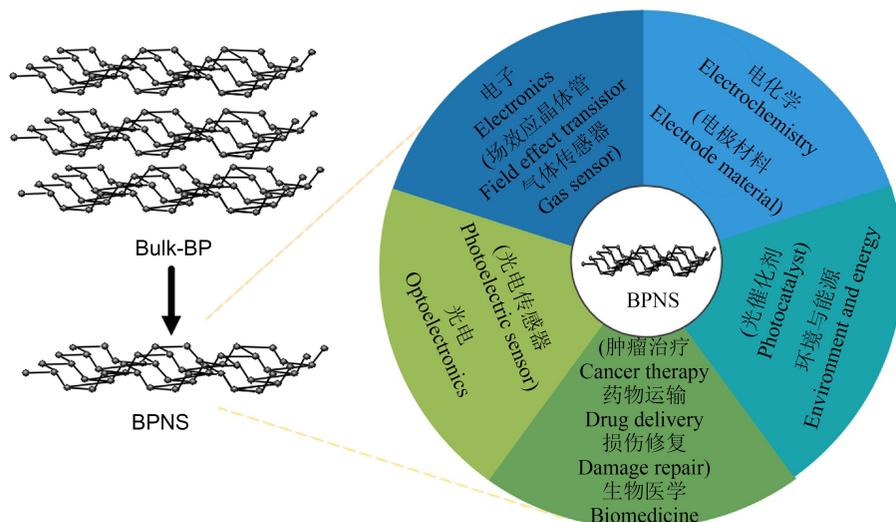


图1 黑磷纳米片 (BPNS) 结构及应用领域

Fig. 1 The structure and applications of black phosphorus nanosheet (BPNS)

性反应。另外,由于大肠杆菌外膜有自我修复能力,使得毒性部分逆转,随着暴露时间推移 BPNS 对大肠杆菌的毒性降低。BPNS 的杀菌机制主要是产生 ROS 和破坏细胞膜。Ouyang 等^[42]用银纳米粒子 (Ag nanoparticles, AgNP) 修饰 BPNS, 构建了 Ag@BP 纳米杂化物。Ag@BP 经 NIR 照射,可在短时间内通过局部高温杀死金黄色葡萄球菌,显示出良好的杀菌能力。

2.2 BPNS 对水生单细胞生物毒性

Wu 等^[43]研究了 BPNS 对嗜热四膜虫的毒性, 10 mg·L⁻¹ BPNS 暴露 8 h 后,嗜热四膜虫细胞密度下降 46.3%。BPNS 还可导致嗜热四膜虫严重变形,利用显微镜观察到细胞膜和纤毛严重损伤。研究者还发现四膜虫通过口器内吞 BPNS,其蓄积在食物泡或溶酶体中而引起毒性效应。另外,BPNS 在四膜虫体内降解,降解的磷酸盐也能引起部分毒性。另一方面,BPNS 对藻类也有影响,Li 等^[44]的研究表明,1 mg·L⁻¹ BPNS 可促进小球藻生长;而 5 mg·L⁻¹ 和 10 mg·L⁻¹ BPNS 抑制其生长、干扰其氨基酸、脂肪酸和核苷酸代谢,进一步研究发现 BPNS 对于小球藻的影响并非由 BPNS 本身造成,而是由 BPNS 降解过程逐渐释放的磷酸盐——PO₂³⁻、PO₃³⁻ 和 PO₄³⁻ 引起,而这 3 种磷酸盐在不同浓度下分别对小球藻的作用效果不同。低浓度时 PO₂³⁻ 可促进小球藻生长;中浓度时,PO₂³⁻ 不影响藻类生长,而同浓度的 PO₃³⁻ 和 PO₄³⁻ 可抑制其生长;高浓度时,这 3 种磷酸盐均对小球藻表现出抑制作用。

综上所述,BPNS 对于环境生物具有较显著的毒性,可破坏生物膜结构,甚至导致死亡。其次,BPNS 会通过吞噬内在化或降解成磷酸盐,干扰水生生物的正常生长、代谢和繁殖等,以上研究表明 BPNS 对环境生物具有毒性效应,可能对生态环境造成不良影响(表 1)。

3 BPNS 健康危害 (Health risks of BPNS)

纳米材料尺寸较小,易穿透各种屏障。但同时,纳米材料在人体内半衰期长、不易被清除,容易积累在特定的细胞或组织,可能对机体造成损害。而且,纳米材料的组成、横向尺寸、厚度、表面功能化和晶体结构等都能影响其在生物界面上的作用^[45]。BPNS 由于其独特的物理化学性质,在生物医药领域被寄予厚望。随着 BPNS 将来广泛应用,BPNS 对哺乳动物毒性研究是必不可少的。

3.1 BPNS 体外毒性

BPNS 毒性主要集中在体外细胞毒性研究。我们将主要从 BPNS 的细胞毒性及修饰对细胞毒性影响进行论述。

Qiu 等^[46]为了检测 BPNS 细胞毒性,用不同浓度 BPNS 处理 MDA-MB-231、A549、HeLa 和 B16 这 4 种细胞,结果显示,即使在 200 μg·mL⁻¹ 高浓度下,也几乎没有观察到毒性作用。Chen 等^[28]将 BPNS 与红细胞共培养 8 h,溶血率 <5%;然后又测试了 BPNS 对 4T1、HeLa、L929 和 A549 这 4 种细胞的毒性,发现当 BPNS 浓度高达 200 μg·mL⁻¹ 时,也几乎没有毒性作用。相反地,Latiff 等^[47]将不同浓度 BPNS 处理 A549 细胞,BPNS 细胞毒性具有剂量依赖性,50 μg·mL⁻¹ BPNS 可将细胞存活率降至 48% (WST-8 法检测)和 34% (MTT 法检测),细胞毒性介于石墨烯和 MoS₂ 之间;他们还观察到,高浓度的 BPNS 由于对光具有显著的吸收作用,对 WST-8 和 MTT 这类通过检测吸光度值的实验结果存在干扰。在后续研究中^[48],比较了磷其他同素异形体(紫磷和红磷),以及气相生长的 BP (BP VPG)和高压转化的 BP (BP HPC)细胞毒性,发现 BP 细胞毒性较紫磷和红磷更高,较薄的 BP HPC 比 BP VPG 毒性大,另外氧化比例高的磷材料毒性更大。

Zhang 等^[49]的研究证明 BPNS 的细胞毒性还有材料尺寸大小和靶细胞类型依赖性。横向尺寸和厚度最大的 BPNS 表现出最强细胞毒性,而尺寸过大的 BPNS 可直接破坏细胞膜的完整性,导致细胞内容物释放,甚至细胞死亡。并且不同细胞系敏感性有所差异,该实验中对 BPNS 的敏感度顺序为 293T > NIH3T3 > HCoEpiC。Song 等^[50]研究了 BPNS 对成纤维细胞 L-929 的毒性,结果表明,毒性与 BPNS 浓度及暴露时间成比例,且毒性机制是氧化应激介导的代谢活性降低与膜完整性破坏。Sun 等^[51]的 BPNS 体外研究结果表明,BPNS 会降低人支气管上皮细胞活力,且具有时间和剂量依赖性。机制研究表明,BPNS 会降低线粒体电位,导致细胞内 ROS 增加,进而活化 caspase-3,引起细胞凋亡。

不同检测方法对细胞毒性结果也有影响,比如 Fojtů 等^[52]分析和比较了 5 种常用于测定 BPNS 对细胞毒性的方法,发现不同测定方法所得出的结论存在高度不一致性,并提出基于蛋白酶法的商业分析法结合扫描电镜观察最适合用于 BP 毒性分析。

另外,Mo 等^[53]的研究证明,血浆蛋白会吸附到

BPNS 上,形成 BP 纳米材料-蛋白冠复合物,这会影
响巨噬细胞的摄取,且复合物激活了 NF- κ B 通路,
使得促炎细胞因子分泌增加,增强巨噬细胞的促炎
和免疫干扰作用。为了进一步开发可有效用于生物
医学的 BPNS,后续应更加关注 BPNS 的修饰,控制
蛋白冠的形成。另一方面,Zhang 等^[54]研究了 BPNS
与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和牛血
红蛋白(bovine hemoglobin, BHB)的结合机理,结果
表明,BPNS 抑制了 BSA 和 BHB 的固有荧光,诱导

了蛋白质肽链的延伸,改变了 BHB 的三级结构,破
坏了 BHB 与胆红素的结合域。Tao 等^[55]的研究表
明,聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰的 BPNS
可使自噬体数量显著增加,诱导癌细胞自噬。

在环境条件下,BPNS 较不稳定性,对氧气和水
具有很高的反应性,导致化学变化、发生降解^[56]。
BPNS 降解速率也影响它的毒性,而降解速率与
BPNS 的厚度和表面修饰关系密切,较薄的 BPNS
降解速度更快^[57]。目前,针对 BPNS 的不稳定性,研

表 1 BPNS 对环境生物的毒性
Table 1 Toxicity of BPNS on environmental organisms

表面修饰 Surface chemistry	大小/nm Size/nm	表面电荷 Surface charge	浓度 Concentration	时间/h Time/h	生物模型 Model organism	测定方法 Methods	毒性效应 Toxic effects	参考文献 References
无 Free	215.84± 82.09	负 Negative	10、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	6、12	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	光密度值测量, 扫描电子显微镜 Optical density value measurement, scanning electron microscopy (SEM)	最大杀菌效率 为 91.65%,细胞膜 损伤,毒性部分可逆 The maximum bactericidal efficiency is 91.65%, cell membrane damage, partially reversible toxicity	[41]
无 Free	215.84± 82.09	负 Negative	10、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	6、12	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	光密度值测量, 扫描电子显微镜 Optical density value measurement, SEM	最大杀菌效率为 99.69%, 细胞膜损伤 The maximum bactericidal efficiency is 99.69%, cell membrane damage	[41]
AgNP	220	负 Negative	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24	金黄色葡萄 球菌(MRSA) Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	光密度值测量 Optical density value measurement	经 near infrared (NIR) 照射后, 未观察到菌落 After near infrared (NIR) irradiation, observe no colonies	[42]
无 Free	167.9± 51.9	负 Negative	1、5、10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	24	小球藻 <i>Chlorella vulgaris</i>	光密度值测量, 扫描电子显微镜 Optical density value measurement, SEM	BPNS 降解产物抑制 生长,干扰氨基酸、脂肪酸 和核苷酸代谢 The degradation product of BPNS inhibits growth, interferes with the metabolism of amino acids, fatty acids and nucleotides	[44]
无 Free	448.8	负 Negative	0.5、1、2、5、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	4、8、24	嗜热四膜虫 <i>Tetrahymena thermophila</i>	流式细胞仪, 扫描电子显微镜 Flow cytometry analysis, SEM	细胞密度下降了 46.3%, 细胞膜和纤毛损伤 The cell density drops by 46.3%, cell membrane and cilia damage	[43]

究人员已从多个方面进行改良。例如,Zhao 等^[58]使用几种不同的离子溶液,再结合研磨与超声处理,剥离到厚度分别为 3.58、5.50 和 8.90 nm 的多层 BPNS。Zhao 等^[56]将磷酸钛配体(TiL_4)用于 BPNS 的表面配位,配位后的 BPNS 在水环境中或长期暴露于空气时,均表现出良好的稳定性,显著延长了 BPNS 寿命。Qu 等^[59]的研究表明, TiL_4 配位的 BPNS 可逃避巨噬细胞的摄取,并减少细胞毒性和抑制促炎作用。还有聚多巴胺^[60]、尼罗蓝染料^[61]等也被应用于 BPNS 的表面修饰,增强其稳定性。

细胞毒性机制可能是 BPNS 诱导细胞内产生 ROS,进而致使其凋亡,还可破坏生物膜的完整性。而且 BPNS 进入细胞内,还可能诱导细胞自噬。除此之外,BPNS 可形成蛋白冠影响免疫细胞的功能,还可导致某些特定蛋白质结构的改变。

总而言之,BPNS 的体外毒性呈现出剂量、时间、尺寸以及靶细胞类型依赖性,且与 BPNS 降解速率相关。为了更加准确地测定 BPNS 毒性,需要运用多种标准方法综合评价其体外毒性,以减少不同方法间的系统误差。研究细胞毒性时,为了减少细胞敏感性差异,还需要采用多种细胞系综合判定。而且,有必要区别 BPNS 对肿瘤细胞和正常细胞的影响,如果 BPNS 在治疗肿瘤方面应用,应对肿瘤细胞有较好的抑制作用,而对正常细胞的影响可忽略不计^[62]。目前,纳米材料体外毒性评价主要是利用二维培养的细胞系,可以利用原代细胞^[63]、干细胞^[64]、诱导性多潜能细胞^[65],以及类器官等模型进行毒性评估。其中,类器官在体外环境下培育形成,具备类似真实器官的三维结构,能部分模拟来源组织或器官的生理功能,类器官比二维培养细胞更具代表性,具有类似组织的三维结构和细胞间相互作用,维持细胞对药物、污染物的代谢能力,因此在纳米材料生物安全性评价等方面具有诱人的应用前景^[66]。我们前期成功构建出小鼠肾类器官,并利用它筛选发现 BPQD 具有肾脏毒性,其敏感性显著高于二维培养的人近曲小管上皮细胞株 HK-2,同时还发现 BPQD 会引起胰岛素敏感度下降以及内质网应激。类器官将来也可应用于 BPNS 生物安全性评价和毒性机制研究^[67]。针对不同尺寸、电荷和修饰的纳米材料,需要充分比较这些物理化学特征及其对 BPNS 毒性影响,可以运用计算毒理学的技术手段找到影响生物安全性的关键影响因素。关于 BPNS 毒性效应机制的研究,需要区分是 BPNS 本身还是其降解产生的

磷酸盐导致的毒性^[43]。此外,仅仅有体外毒性评价远远不够,需要进行开展体内暴露实验,才能更全面的评价 BPNS 的生物安全性。表 2 归纳了相关文献中有关 BPNS 的细胞毒性的实验及结论。

3.2 BPNS 体内毒性

关于 BPNS 的体内暴露实验较少,对于其体内毒性效应还不甚清楚。本文也将从目前仅有的 BPNS 毒性效应和机制进行论述。

Shao 等^[68]制备了结合 BPNS 的温度敏感水凝胶(BP@PLEL),可用于 PTT 治疗癌症。单次皮下注射 BP@PLEL 到小鼠的背部,20 d 后,主要器官无明显病变。Chen 等^[28]在给健康小鼠单次注射 BPNS,7 d 后未检测到肝肾功能的明显变化。Jin 等^[69]合成了负载有药物氟西汀(floxetine, Flu)的 BPNS 用来治疗抑郁症,体内毒性研究结果显示,小鼠的血液生化指标均正常,肾功能无显著变化。Hou 等^[70]通过实验发现,BPNS 会优先积累在肾脏,在生物体内最终降解为 P_xO_y 离子,对心、肝、脾、肺和肾均无明显损伤。Sun 等^[71]向小鼠静脉注射 100 μg PEG 修饰的 BPNP,通过组织病理学分析,没用观察到明显的器官损伤。然而在 Sun 等^[51]的研究中,单次注射的 BPNS($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)对小鼠器官没有明显损伤,但当 3 次注射 BPNS 后,小鼠的肝脏和肾受损,不过一定时间后可恢复正常。Kong 等^[72]的研究表明,低剂量时 BPNS 可用于抑制肿瘤和药物负载,当小鼠静脉注射过高剂量的 BPNS($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)时,肝脏与肾脏内的 ROS 增加,并观察到水肿现象,炎性细胞浸润导致的凝固性坏死,淋巴细胞浸润,肾小球萎缩以及肾小管肿胀。在表 3 中归纳了以上关于 BPNS 急性暴露后体内毒性损伤效应。

总体而言,目前 BPNS 体内毒性试验一般都是单次急性暴露,大部分结果显示 BPNS 相对比较安全,但剂量过高会引起组织损伤和炎症反应。另外,Qu 等^[59]发现当给小鼠按 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 静脉注射暴露于 BPQD 后,短时间内会出现明显的炎症反应,例如嗜中性粒细胞数量增加,一部分炎症细胞因子浓度升高。长时间后症状消失。Mu 等^[73]评估了 BPQD 对机体的毒性,其体内研究表明,BPQD 可短暂地诱导氧化应激反应和脂质过氧化,降低过氧化氢酶活性,诱发 DNA 断裂以及骨髓有核细胞损伤,但这些损伤可逐渐恢复。这些 BPQD 相关的体内毒性研究结果可能对于 BPNS 毒性研究具有一定参考价值,但是否完全相似有待后续研究比较。

表 2 BPNS 对不同细胞的毒性
Table 2 Toxicity of BPNS to different cells

纳米材料 Nanomaterials	表面修饰 Surface chemistry	大小/nm Size/nm	表面电荷 Surface charge	浓度 Concentration	时间/h Time/h	细胞类型 Type of cells	测定方法 Methods	毒性效应 Toxic effects	参考文献 References						
水凝胶, 聚乙二醇(PEG) Hydrogel, polyethylene glycol (PEG)	无 Free	155.6	负 Negative	≤ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	48	MDA-MB-231、 A549、HeLa、B16	CCK-8	无毒性 Nontoxic	[46]						
			正 Positive	≤ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24	4T1、HeLa、 L929、A549	MTT	无毒性 Nontoxic	[28]						
			负 Negative	3.125 ~ 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24	A549	WST-8、MTT	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率 48% (WST-8) 和 34% (MTT) At 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, cell viabilities are 48% (WST-8) and 34% (MTT)	[47]						
无 Free	884.0±102.2, 425.5±78.8, 208.5±46.9	负 Negative	6.25 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	12、24、48	NIH 3T3、 HCoEpic、293T	实时无标记细胞 分析技术(RTCA) Real time cellular analysis (RTCA)	黑磷(BP)毒性有浓度、大小和 细胞类型依赖性 Toxicity of black phosphorus (BP) is dependent on concentration, size and cell type	[49]							
									无 Free	0 ~ 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24、48、72	L-929	CCK-8、LDH	BP 毒性表现出剂量和时间依赖性 Toxicity of BP shows dose and time dependence	[50]
									无 Free	25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24、48	BEAS-2B	MTT	BP 毒性表现出剂量和时间依赖性 Toxicity of BP shows dose and time dependence	[51]
聚(D,L-丙交酯)-聚(乙 二醇)-聚(D,L-丙交 酯) (PLEL) Poly (D,L-lactide)-poly (ethylene glycol)-poly (D,L-lactide) (PLEL)	无 Free	288.3±122.4	—	50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	48	hMSCs、L929、 MCF7、HeLa	CCK-8	无毒性 Nontoxic	[68]						
			正 Positive	25、50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	72	U251、HUVEC、 4T1、LLC	CCK-8	无毒性 Nontoxic	[69]						
			正 Positive	20、40、80、160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24	HepG2、LO2	CCK-8	低毒性 Low toxicity	[25]						

续表 2

纳米材料 Nanomaterials	表面修饰 Surface chemistry	大小/nm Size/nm	表面电荷 Surface charge	浓度 Concentration	时间/h Time/h	细胞类型 Type of cells	测定方法 Methods	毒性效应 Toxic effects	参考文献 References
黑磷纳米颗粒 (BPNP)	无	100 ~ 300	负	0 ~ 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24	A2780、PC-3	MTT、WST-8、LDH、MultiTox-Glo 叠加细胞毒性检测、刃天青法	5 种测定方法所得 结果高度不一致	[52]
Black phosphorus nanoparticle (BPNP)	Free	100 ~ 300	Negative	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24	A2780、PC-3	MTT, WST-8, LDH, MultiTox-Glo multiplex cytotoxicity assay, Resazurin viability assay	Results of the five methods are highly inconsistent	[52]

注: CCK-8 表示 Cell Counting Kit-8; MTT 表示噻唑啉比色法, WST-8 表示水溶性四唑盐, LDH 表示乳酸脱氢酶细胞毒性检测法。

Note: CCK-8 means Cell Counting Kit-8; MTT means methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide viability test; WST-8 means water-soluble tetrazolium; LDH means lactate dehydrogenase cytotoxicity assay.

表 3 BPNS 体内毒性

Table 3 *In vivo* toxicity of BPNS

纳米材料 Nanomaterials	表面修饰 Surface chemistry	大小/nm Size/nm	表面电荷 Surface charge	浓度 Concentration	总剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{鼠}^{-1})$ Total dose $/(\mu\text{g}\cdot\text{mouse}^{-1})$	暴露方式 Administration route	暴露时间/d Exposure time/d	毒性效应 Toxic effects	参考文献 References
BPNP	PEG	21.7	负 Negative	$2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	100	单次注射 Single injection	42	无明显的器官损伤 No significant organ damage	[71]
	PEG	120	负 Negative	$7.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	142	单次注射 Single injection	1, 7, 14	无明显损伤 No significant damage	[55]
	PLEL	288.3 ± 122.4	—	$50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	10	单次皮下注射 Single subcutaneous injection	20	无明显病变 No significant damage	[68]
	无 Free	225.8 ± 4.0	负 Negative	$6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$120\sim 180$	单次注射 Single injection	1	无明显损伤, 优先积累在肝脏 No significant damage, preferentially accumulate in the liver	[70]
	Flu	200	正 Positive	$5.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	~ 105	单次静脉注射 Single intravenous injection	28	无明显损伤 No significant damage	[69]
BPNS	PEI、AuNPs	343 ± 58.6	正 Positive	$80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	4	单次注射 Single injection	14	无明显损伤 No significant damage	[25]
	无 Free	500	负 Negative	$20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	400	多次注射, 每 2 天一次, 共 3 次 Multiple injection every two days for 3 times	7, 21	短时间内, 肝脏和肾脏损伤 In a short time, liver and kidney damage	[51]
	PEG	150	负 Negative	$30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	—	静脉注射, 每 3 天一次, 共 3 次 Intravenous injection every three days for 3 times	21	水肿, 炎性细胞浸润的凝固性坏死, 肾小球萎缩, 肾小管肿胀 Edema, coagulative necrosis infiltrated by inflammatory cells, glomerular atrophy and renal tubules swell	[72]

然而,仅有急性毒性数据不足以全面评价 BPNS 生物安全性,需要继续开展体内急性重复暴露、亚急性、亚慢性、慢性暴露实验,以及遗传毒性、生殖毒性、代谢动力学等方面实验。另外,目前组织病理实验主要是观察肝、肾、心、肺、脾。而之前有研究表明,一些无机纳米材料可对肠道或胰腺产生损伤,可能促进炎症性肠病,导致肠道屏障功能异常,以及影响肠膜的正常结构,致使肠道通透性增加,损害胰腺的正常功能,从而影响代谢^[74-77]。BPNS 如果长期重复暴露,也可能对肠道及胰腺产生不良作用。除了小鼠之外,也还需对其他模式动物如爪蟾、斑马鱼、四膜虫和线虫等,进行 BPNS 的潜在毒性研究。

4 总结与展望 (Summary and prospect)

近些年来,BPNS 在很多领域成为热门,与此相关的研究也日益增多。虽然 BPNS 在电子学、光电学、电化学、环境以及生物医学尤其是肿瘤治疗方面取得了可喜的进展,但还必须考虑 BPNS 对机体以及环境可能存在的毒性效应。影响 BPNS 毒性的因素有很多(图 2),BPNS 对不同类型的细胞引起的毒性效应可能不尽相同,不同尺寸的 BPNS 对同种细胞的毒性效果也存在差异,文献结果表明尺寸大的

BPNS 毒性可能更大^[49]。暴露时间、材料浓度和降解速率也是影响 BPNS 毒性的重要因素。另外,检测方法在一定程度上也可影响实验结果。对 BPNS 进行表面修饰可改变其毒性大小,如 PEG、水凝胶、聚多巴胺和 TiL₄ 等,修饰后可中和 BPNS 表面部分负电荷,增强纳米材料稳定性,降低毒性效应。

在毒性机制方面(图 3),BPNS 可在细胞内产生 ROS,引起氧化应激、相关酶活性下降和 DNA 损伤,最终诱导细胞凋亡^[51,72]。BPNS 进入细胞内还可导致自噬体数量增加,诱导细胞自噬^[55]。层状的 BPNS 还可破坏细胞膜的完整性,释放内容物,导致细胞死亡^[50]。BPNS 还能对免疫细胞^[53]和血浆蛋白^[54]产生影响,导致溶血现象^[28]。

目前,关于 BPNS 的生物毒性和机制均未完全了解。在毒性评估过程中,细胞类型会影响 BPNS 毒性检测结果,所以将来研究要以多种细胞系作为研究对象。还可以用原代细胞^[63]、干细胞^[64]以及类器官^[65-66]等更接近人体细胞或真实体内环境的模型,评估 BPNS 纳米材料生物毒性效应和作用机制。其次,在研究 BPNS 细胞毒性时,最好运用多种标准的方法综合评估,以减少不同方法间的系统误差。再者,还要分析比较 BPNS 材料本身物理化学性质

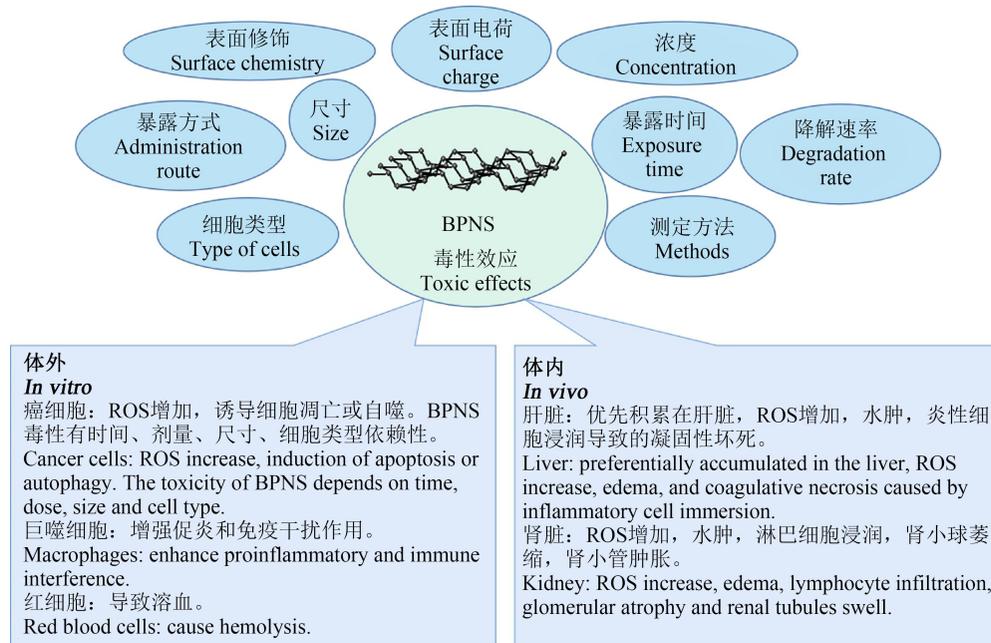


图 2 BPNS 毒性作用和毒性影响因素

注:ROS 表示活性氧。

Fig. 2 The toxic effects of BPNS and its influencing factors

Note: ROS means reactive oxygen species.

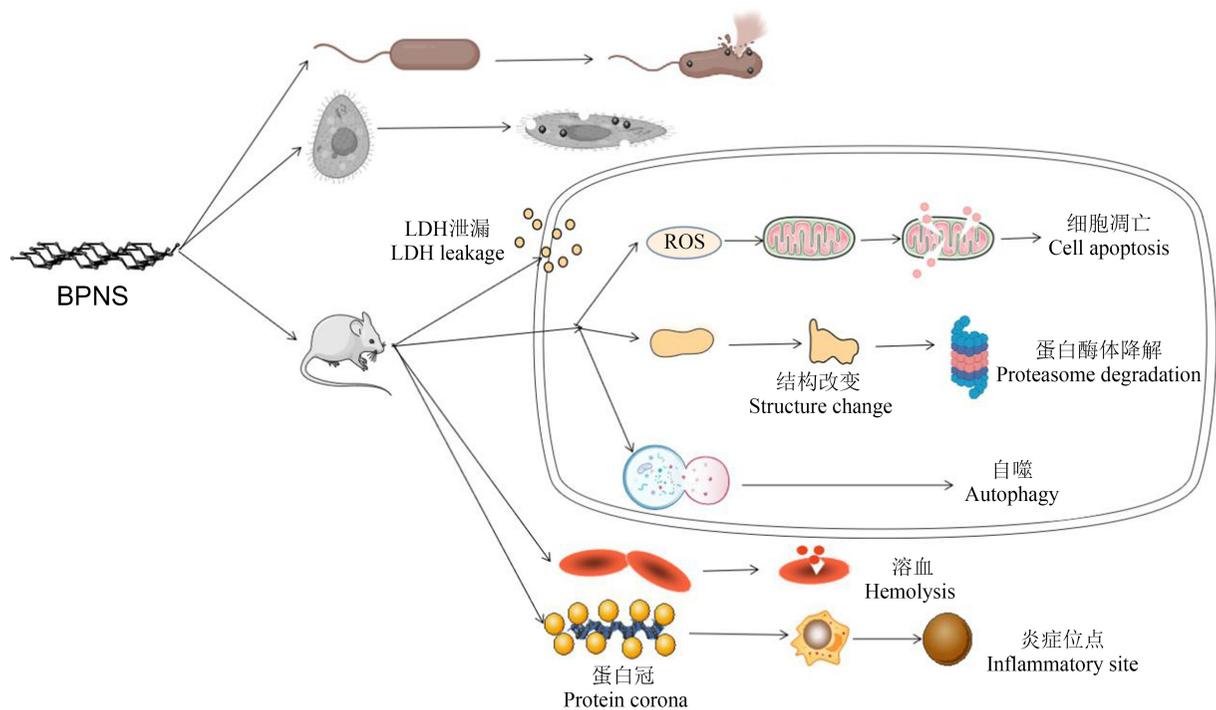


图3 BPNS 生物毒性机制

Fig. 3 Mechanisms of BPNS's biotoxicity

对生物毒性的影响,例如尺寸、形状、聚集状态、电荷密度和带隙等。表面修饰也会影响 BPNS 稳定性和降解速率。例如,有研究通过粒子掺杂和表面钝化等方式设计出更安全的纳米材料^[78],这也为解决 BPNS 将来在临床转化中的安全性问题提供了一个思路。

动物实验对于全面评估 BPNS 毒性至关重要,现有关于 BPNS 体内毒性研究还不够全面、深入。(1)目前 BPNS 体内毒理学实验较少,实验对象也局限在小鼠上,缺乏对 BPNS 在其他脊椎动物体内的研究,如鱼类、两栖类等。Peng 等^[79]将体外建立的氧化应激模式应用于水生生物斑马鱼体内,以此来评估纳米颗粒对生物体的潜在损伤作用。(2)BPNS 缺乏急性重复、亚急性和慢性暴露实验数据,目前实验多数采取的是单次急性暴露。将来 BPNS 大量投入使用,人们势必在日常生产、生活中通过接触、摄入、吸入等多种方式频繁暴露于 BPNS。因此,有必要开展多种途径、长期毒性暴露实验。(3)还要研究 BPNS 对不同器官、组织的影响,寻找 BPNS 的毒性靶器官,全面评估 BPNS 生物安全性,深入研究揭示 BPNS 的毒性机制。(4)在对 BPNS 纳米材料进行风险评估时,应该将暴露特征与潜在危害综合起来分析。如同 Lin 等^[80]总结了纳米材料进入水环境的潜

在接触途径、纳米材料的命运、在不同介质间的转移,以及使用模式生物进行的毒性测试,以此对纳米材料进行更系统的风险评估。

总而言之,BPNS 与生物大分子及生态环境之间的相互影响和作用机制亟待开展研究,BPNS 生物安全性研究有助于其未来的安全应用,可促进 BP 纳米材料的产业转化,保障人群和生态环境健康。

通讯作者简介:何承勇(1985—),男,博士,副教授,硕士生导师,主要研究方向为环境毒理学和纳米生物安全性评价。

参考文献 (References):

- [1] Li L K, Yu Y J, Ye G J, et al. Black phosphorus field-effect transistors [J]. *Nature Nanotechnology*, 2014, 9(5): 372-377
- [2] 陈万松, 刘又年. 黑磷纳米材料及其在生物医药中的应用[J]. *科学*, 2017, 69(6): 18-21, 4
Chen W S, Liu Y N. Black phosphorus nanomaterials and their biomedical applications [J]. *Science*, 2017, 69(6): 18-21, 4 (in Chinese)
- [3] Chen Y, Jiang G B, Chen S Q, et al. Mechanically exfoliated black phosphorus as a new saturable absorber for both Q-switching and mode-locking laser operation [J]. *Optics Express*, 2015, 23(10): 12823-12833

- [4] Kang J, Wood J D, Wells S A, et al. Solvent exfoliation of electronic-grade, two-dimensional black phosphorus [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(4): 3596-3604
- [5] Ambrosi A, Sofer Z, Pumera M. Electrochemical exfoliation of layered black phosphorus into phosphorene [J]. *Angewandte Chemie*, 2017, 56(35): 10443-10445
- [6] Qu G B, Xia T, Zhou W H, et al. Property-activity relationship of black phosphorus at the nano-bio interface: From molecules to organisms [J]. *Chemical Reviews*, 2020, 120(4): 2288-2346
- [7] Keyes R W. The electrical properties of black phosphorus [J]. *Physical Review*, 1953, 92(3): 580-584
- [8] Ling X, Wang H, Huang S X, et al. The renaissance of black phosphorus [J]. *PNAS*, 2015, 112(15): 4523-4530
- [9] Kou L Z, Chen C F, Smith S C. Phosphorene: Fabrication, properties, and applications [J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2015, 6(14): 2794-2805
- [10] Wang X. Graphene nanoribbons: Chemical stitching [J]. *Nature Nanotechnology*, 2014, 9(11): 875-876
- [11] Kim J, Baik S S, Ryu S H, et al. Observation of tunable band gap and anisotropic Dirac semimetal state in black phosphorus [J]. *Science*, 2015, 349(6249): 723-726
- [12] Choi J R, Yong K W, Choi J Y, et al. Black phosphorus and its biomedical applications [J]. *Theranostics*, 2018, 8(4): 1005-1026
- [13] Liu H, Neal A T, Zhu Z, et al. Phosphorene: An unexplored 2D semiconductor with a high hole mobility [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(4): 4033-4041
- [14] Perera M M, Lin M W, Chuang H J, et al. Improved carrier mobility in few-layer MoS₂ field-effect transistors with ionic-liquid gating [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(5): 4449-4458
- [15] Buscema M, Groenendijk D J, Blanter S I, et al. Fast and broadband photoresponse of few-layer black phosphorus field-effect transistors [J]. *Nano Letters*, 2014, 14(6): 3347-3352
- [16] Viti L, Politano A, Zhang K, et al. Thermoelectric terahertz photodetectors based on selenium-doped black phosphorus flakes [J]. *Nanoscale*, 2019, 11(4): 1995-2002
- [17] Abbas A N, Liu B L, Chen L, et al. Black phosphorus gas sensors [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(5): 5618-5624
- [18] Liu Y, Wang Y, Ikram M, et al. Facile synthesis of highly dispersed Co₃O₄ nanoparticles on expanded, thin black phosphorus for a ppb-level NO_x gas sensor [J]. *ACS Sensors*, 2018, 3(8): 1576-1583
- [19] Wu J, Koon G K W, Xiang D, et al. Colossal ultraviolet photoresponsivity of few-layer black phosphorus [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(8): 8070-8077
- [20] Zheng J L, Yang Z H, Si C, et al. Black phosphorus based all-optical-signal-processing: Toward high performances and enhanced stability [J]. *ACS Photonics*, 2017, 4(6): 1466-1476
- [21] Hao C X, Yang B C, Wen F S, et al. Flexible all-solid-state supercapacitors based on liquid-exfoliated black-phosphorus nanoflakes [J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(16): 3194-3201
- [22] Zhang Y P, Wang L L, Xu H, et al. 3D chemical cross-linking structure of black Phosphorus@CNTs hybrid as a promising anode material for lithium ion batteries [J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(12): 1909372
- [23] Wang H M, Zhong L, Liu Y, et al. A black phosphorus nanosheet-based siRNA delivery system for synergistic photothermal and gene therapy [J]. *Chemical Communications*, 2018, 54(25): 3142-3145
- [24] Xing C Y, Chen S Y, Qiu M, et al. Conceptually novel black phosphorus/cellulose hydrogels as promising photothermal agents for effective cancer therapy [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2018, 7(7): e1701510
- [25] Zhang D, Lin X, Lan S Y, et al. Localized surface plasmon resonance enhanced singlet oxygen generation and light absorption based on black Phosphorus @ AuNPs nanosheet for tumor photodynamic/thermal therapy [J]. *Particle & Particle Systems Characterization*, 2018, 35(4): 1800010
- [26] Wang H, Yang X Z, Shao W, et al. Ultrathin black phosphorus nanosheets for efficient singlet oxygen generation [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(35): 11376-11382
- [27] Yang B W, Ding L, Chen Y, et al. Augmenting tumor-starvation therapy by cancer cell autophagy inhibition [J]. *Advanced Science*, 2020, 7(6): 1902847
- [28] Chen W S, Ouyang J, Liu H, et al. Black phosphorus nanosheet-based drug delivery system for synergistic photodynamic/photothermal/chemotherapy of cancer [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(5): 1603864
- [29] Fojtů M, Chia X Y, Sofer Z, et al. Black phosphorus nanoparticles potentiate the anticancer effect of oxaliplatin in ovarian cancer cell line [J]. *Advanced Functional Materials*, 2017, 27(36): 1701955
- [30] Zong S F, Wang L L, Yang Z Y, et al. Black phosphorus-based drug nanocarrier for targeted and synergetic chemophotothermal therapy of acute lymphoblastic leukemia [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(6): 5896-5902
- [31] Chen W S, Ouyang J, Yi X Y, et al. Black phosphorus nanosheets as a neuroprotective nanomedicine for neuro-

- degenerative disorder therapy [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(3): 1703458
- [32] Qian Y, Yuan W E, Cheng Y, et al. Concentrically integrative bioassembly of a three-dimensional black phosphorus nanoscaffold for restoring neurogenesis, angiogenesis, and immune homeostasis [J]. *Nano Letters*, 2019, 19 (12): 8990-9001
- [33] Yang B W, Yin J H, Chen Y, et al. 2D-black-phosphorus-reinforced 3D-printed scaffolds: A stepwise countermeasure for osteosarcoma [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30 (10): 1705611
- [34] Huang X W, Wei J J, Zhang M Y, et al. Water-based black phosphorus hybrid nanosheets as a moldable platform for wound healing applications [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(41): 35495-35502
- [35] Yan J Q, Verma P, Kuwahara Y, et al. Recent progress on black phosphorus-based materials for photocatalytic water splitting [J]. *Small Methods*, 2018, 2(12): 1800212
- [36] Zhu X J, Zhang T M, Sun Z J, et al. Black phosphorus revisited: A missing metal-free elemental photocatalyst for visible light hydrogen evolution [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(17): 1605776
- [37] Zhu M S, Osakada Y, Kim S, et al. Black phosphorus: A promising two dimensional visible and near-infrared-activated photocatalyst for hydrogen evolution [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2017, 217: 285-292
- [38] Lee H U, Lee S C, Won J, et al. Stable semiconductor black phosphorus (BP)@titanium dioxide (TiO₂) hybrid photocatalysts [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8691
- [39] Wang X, Zhou B Q, Zhang Y M, et al. *In-situ* reduction and deposition of Ag nanoparticles on black phosphorus nanosheets co-loaded with graphene oxide as a broad spectrum photocatalyst for enhanced photocatalytic performance [J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2018, 769: 316-324
- [40] Hu J D, Chen D Y, Mo Z, et al. Z-scheme 2D/2D heterojunction of black phosphorus/monolayer Bi₂WO₆ nanosheets with enhanced photocatalytic activities [J]. *Angewandte Chemie*, 2019, 58(7): 2073-2077
- [41] Xiong Z Q, Zhang X J, Zhang S Y, et al. Bacterial toxicity of exfoliated black phosphorus nanosheets [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 161: 507-514
- [42] Ouyang J, Liu R Y, Chen W S, et al. A black phosphorus based synergistic antibacterial platform against drug resistant bacteria [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6(39): 6302-6310
- [43] Wu Q, Yao L L, Zhao X C, et al. Cellular uptake of few-layered black phosphorus and the toxicity to an aquatic unicellular organism [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(3): 1583-1592
- [44] Li P, Zeng L, Gao J, et al. Perturbation of normal algal growth by black phosphorus nanosheets: The role of degradation [J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2020, 7(1): 35-41
- [45] Guiney L M, Wang X, Xia T, et al. Assessing and mitigating the hazard potential of two-dimensional materials [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(7): 6360-6377
- [46] Qiu M, Wang D, Liang W Y, et al. Novel concept of the smart NIR-light-controlled drug release of black phosphorus nanostructure for cancer therapy [J]. *PNAS*, 2018, 115(3): 501-506
- [47] Latiff N M, Teo W Z, Sofer Z, et al. The cytotoxicity of layered black phosphorus [J]. *Chemistry*, 2015, 21 (40): 13991-13995
- [48] Mohamad Latiff N, Mayorga-Martinez C C, Sofer Z, et al. Cytotoxicity of phosphorus allotropes (black, violet, red) [J]. *Applied Materials Today*, 2018, 13: 310-319
- [49] Zhang X J, Zhang Z M, Zhang S Y, et al. 2D materials: Size effect on the cytotoxicity of layered black phosphorus and underlying mechanisms (small 32/2017) [J]. *Small*, 2017, 13(32): 201770171
- [50] Song S J, Shin Y, Lee H, et al. Dose- and time-dependent cytotoxicity of layered black phosphorus in fibroblastic cells [J]. *Nanomaterials*, 2018, 8(6): 408
- [51] Sun Y R, Fan S H, Fan S H, et al. *In vitro* and *in vivo* toxicity of black phosphorus nanosheets [J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2020, 20(2): 659-667
- [52] Fojtů M, Balvan J, Raudenská M, et al. Black phosphorus cytotoxicity assessments pitfalls: Advantages and disadvantages of metabolic and morphological assays [J]. *Chemistry*, 2019, 25(1): 349-360
- [53] Mo J B, Xie Q Y, Wei W, et al. Revealing the immune perturbation of black phosphorus nanomaterials to macrophages by understanding the protein corona [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2480
- [54] Zhang H M, Han Q Q, Yin X L, et al. Insights into the binding mechanism of two-dimensional black phosphorus nanosheets-protein associations [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 227: 117662
- [55] Tao W, Zhu X B, Yu X H, et al. Black phosphorus nanosheets as a robust delivery platform for cancer theranostics [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(1): 1603276
- [56] Zhao Y T, Wang H Y, Huang H, et al. Surface coordination of black phosphorus for robust air and water stability [J]. *Angewandte Chemie*, 2016, 55(16): 5003-5007

- [57] Zhou Q H, Chen Q, Tong Y L, et al. Light-induced ambient degradation of few-layer black phosphorus: Mechanism and protection [J]. *Angewandte Chemie*, 2016, 55(38): 11437-11441
- [58] Zhao W C, Xue Z M, Wang J F, et al. Large-scale, highly efficient, and green liquid-exfoliation of black phosphorus in ionic liquids [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(50): 27608-27612
- [59] Qu G B, Liu W, Zhao Y T, et al. Improved biocompatibility of black phosphorus nanosheets by chemical modification [J]. *Angewandte Chemie*, 2017, 56(46): 14488-14493
- [60] Zeng X W, Luo M M, Liu G, et al. Polydopamine-modified black phosphorous nanocapsule with enhanced stability and photothermal performance for tumor multimodal treatments [J]. *Advanced Science*, 2018, 5(10): 1800510
- [61] Zhao Y T, Tong L P, Li Z B, et al. Stable and multifunctional dye-modified black phosphorus nanosheets for near-infrared imaging-guided photothermal therapy [J]. *Chemistry of Materials*, 2017, 29(17): 7131-7139
- [62] He C Y, Jiang S W, Jin H J, et al. Mitochondrial electron transport chain identified as a novel molecular target of SPIO nanoparticles mediated cancer-specific cytotoxicity [J]. *Biomaterials*, 2016, 83: 102-114
- [63] Klingberg H, Oddershede L B, Loeschner K, et al. Uptake of gold nanoparticles in primary human endothelial cells [J]. *Toxicology Research*, 2015, 4(3): 655-666
- [64] Zhu L, Chang D W, Dai L M, et al. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells [J]. *Nano Letters*, 2007, 7(12): 3592-3597
- [65] Tiong H Y, Huang P, Xiong S J, et al. Drug-induced nephrotoxicity: Clinical impact and preclinical *in vitro* models [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2014, 11(7): 1933-1948
- [66] Fatehullah A, Tan S H, Barker N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease [J]. *Nature Cell Biology*, 2016, 18(3): 246-254
- [67] He C Y, Ruan F K, Jiang S W, et al. Black phosphorus quantum dots cause nephrotoxicity in organoids, mice, and human cells [J]. *Small*, 2020, 16(22): e2001371
- [68] Shao J D, Ruan C S, Xie H H, et al. Black-phosphorus-incorporated hydrogel as a sprayable and biodegradable photothermal platform for postsurgical treatment of cancer [J]. *Advanced Science*, 2018, 5(5): 1700848
- [69] Jin L G, Hu P, Wang Y Y, et al. Fast-acting black-phosphorus-assisted depression therapy with low toxicity [J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(2): e1906050
- [70] Hou J J, Wang H, Ge Z L, et al. Treating acute kidney injury with antioxidative black phosphorus nanosheets [J]. *Nano Letters*, 2020, 20(2): 1447-1454
- [71] Sun C X, Wen L, Zeng J F, et al. One-pot solventless preparation of PEGylated black phosphorus nanoparticles for photoacoustic imaging and photothermal therapy of cancer [J]. *Biomaterials*, 2016, 91: 81-89
- [72] Kong N, Ji X Y, Wang J Q, et al. ROS-mediated selective killing effect of black phosphorus: Mechanistic understanding and its guidance for safe biomedical applications [J]. *Nano Letters*, 2020, 20(5): 3943-3955
- [73] Mu X Y, Wang J Y, Bai X T, et al. Black phosphorus quantum dot induced oxidative stress and toxicity in living cells and mice [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(24): 20399-20409
- [74] Böhmert L, Niemann B, Lichtenstein D, et al. Molecular mechanism of silver nanoparticles in human intestinal cells [J]. *Nanotoxicology*, 2015, 9(7): 852-860
- [75] Yao M F, He L L, McClements D J, et al. Uptake of gold nanoparticles by intestinal epithelial cells: Impact of particle size on their absorption, accumulation, and toxicity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(36): 8044-8049
- [76] Wang B, Feng W Y, Wang M, et al. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2008, 10(2): 263-276
- [77] Heller A, Jarvis K, Coffman S S. Association of type 2 diabetes with submicron titanium dioxide crystals in the pancreas [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2018, 31(6): 506-509
- [78] Lin S J, Yu T, Yu Z Y, et al. Nanomaterials safer-by-design: An environmental safety perspective [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(17): e1705691
- [79] Peng G T, He Y, Wang X X, et al. Redox activity and nano-bio interactions determine the skin injury potential of Co₃O₄-based metal oxide nanoparticles toward zebrafish [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 4166-4177
- [80] Lin S J, Wang H T, Yu T. A promising trend for nano-EHS research—Integrating fate and transport analysis with safety assessment using model organisms [J]. *Nano-Impact*, 2017, 7: 1-6