

文章编号: 1674 - 991X(2011) 05 - 0420 - 05

纳米银毒理学研究进展

邓芙蓉 魏红英 郭新彪*

北京大学公共卫生学院 北京 100191

摘 要: 纳米银因其优越的抗菌性能被广泛应用于环境、农业、医药等领域。以往的研究从体内试验和体外试验方面对纳米银的健康影响及其作用机制进行了探讨,然而,由于研究设计或研究条件等方面的限制,以往的研究结果仍存在一些不足,迄今为止,有关纳米银对健康的影响及其作用机制仍不很清楚。综述了近年来在纳米银毒理学研究方面所取得的进展以及目前研究中的不足,并展望了未来研究的方向。

关键词: 纳米技术; 纳米银; 毒理学; 进展

中图分类号: X171. 5 文献标识码: A DOI: 10. 3969/j. issn. 1674 - 991X. 2011. 05. 070

Research Progress in the Toxicology of Silver Nanoparticles

DENG Fu-rong , WEI Hong-ying , GUO Xin-biao

School of Public Health , Peking University , Beijing 100191 , China

Abstract: Due to its antibacterial properties , silver nanoparticles has been widely used in various fields , such as environment , agriculture and medicals , etc. Previous studies had investigated the health effects and action mechanism of silver nanoparticles in vivo and in vitro studies. However , due to the limitation of study design or research conditions , the previous research results were still insufficient and the health effects and action mechanism of silver nanoparticles still unclear. The research progress in toxicology of silver nanoparticles in recent years was reviewed , and the lack of current research as well as future research prospects discussed.

Key words: nano-technology; silver nanoparticles; toxicology; progress

纳米材料是指在三维尺度上至少有一维尺度小于 100 nm 的物质。纳米级粒径使这些物质具有与大颗粒不同的理化特性,其具有更大的比表面积,具备更大的反应活性。纳米银是以纳米技术为基础研制而成的新型纳米材料,因其优越的抗菌性能,被广泛用于医疗、食品、纺织、水质净化等领域^[1-2]。日益增加的纳米银的使用逐渐引起大家对其造成的环境危害的重视。最近一项研究揭示,银在洗涮过程中很容易渗漏到废水当中,从而破坏废水处理厂处理废水所用的有用细菌,还可对湖泊或河流中的水生生物造成威胁^[3]。纳米银抗菌洗衣机的使用,使含有纳米银颗粒的洗衣废水排入水环境,造成对水

环境的污染^[4]。此外,有研究表明,纳米银的抗菌性能会影响土壤中的有益菌,从而降低土壤的使用价值^[5]。相对而言,目前有关纳米银对健康的影响及其机制的研究还较为局限,纳米银的毒性及其机制的研究还处于初步探索阶段,有关纳米银使用的安全性还有待进一步探讨。因此,深入探讨纳米银的毒性作用及其机制,对于纳米银的安全使用和开发利用有着非常重要的理论和现实意义。

1 纳米银的体内试验研究

动物试验中纳米银的暴露方式有吸入、灌胃、气管滴注、皮下注射或静脉注射等,以上途径的纳米银

收稿日期: 2011 - 05 - 05

基金项目: 国家自然科学基金(21077006, 30571534)

作者简介: 邓芙蓉(1971—),女,副教授,博士,研究方向为环境医学与健康,lotus321321@126.com

* 责任作者: 郭新彪(1961—),男,教授,博士,研究方向为环境医学,guoxb@bjmu.edu.cn

暴露可对动物的呼吸、皮肤、消化、免疫以及生殖系统等产生影响。

1.1 呼吸系统毒性

Sung 等给大鼠连续吸入粒径为 18 ~ 19 nm 的银颗粒 90 d 后,大鼠出现肺功能下降,肺组织有不同程度的炎性细胞浸润、肺泡壁增厚以及小的肉芽肿样病变^[6-7]。另有研究采用同样的纳米银颗粒和吸入染毒方式,使大鼠连续暴露纳米银 28 d,未观察到任何组织病理学改变和血清生化指标改变^[8],该研究使用的纳米银浓度低于 Sung 的研究,提示纳米银的暴露时间和浓度可能是决定其毒性大小的关键因素。Hyun 等采用纳米银(13 ~ 15 nm)对大鼠进行重复鼻黏膜染毒,28 d 后发现中高剂量组大鼠含有黏液素的杯氏细胞体积和数目显著增加,黏液素中硫黏蛋白有轻微的升高,而唾液黏蛋白没有变化。该研究尽管观察到了纳米银对黏膜黏液素的影响,但这并不足以说明其具有毒性效应。鉴于黏液素在人体呼吸系统健康及宿主抵抗力中的重要作用,因此有待更多的研究进一步证实^[9]。还有研究表明静脉注射胶体银颗粒,引起大鼠发生肺水肿而死亡^[10]。

1.2 对皮肤的影响

纳米银颗粒在纺织品和伤口敷料中的广泛应用使纳米银可直接与皮肤相接触。有研究表明,皮肤涂抹 1% 纳米银膏体制剂可有效抑制 BALB/c 小鼠皮炎的发生,具体表现为肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-12 (IL-12) 分泌被抑制,同时观察到了炎性细胞的凋亡^[11]。Bhol 等在豚鼠试验中也观察到同样的抗炎效应^[12]。这些数据提示,纳米银在抑制炎症方面有积极作用,可用于治疗免疫性疾病或炎性疾病^[13]。但也有研究发现,纳米银可引起大鼠肺泡巨噬细胞中 TNF- α , IL-1 β 和巨噬细胞炎症蛋白的升高,纳米银经呼吸摄入或消化道摄入可分别导致大鼠肺脏和小鼠肝脏炎症的发生^[6-7]。因此,纳米银对不同组织中炎性因子的调节作用可能有所不同,有关纳米银对细胞炎性因子分泌的调节作用还有待进一步的研究。此外,在以猪为动物模型的一项研究显示,纳米银可明显促进皮肤伤口的愈合^[14]。但 Supp 等将含有纳米银的皮肤替代品嫁接于裸鼠,没有观察到任何促进或抑制伤口愈合的作用^[15]。这些结果提示纳米银对皮肤可能具有双重作用,因此,有关纳米银对皮肤的影响及其机制还需要深入研究。

1.3 生殖毒性

有关纳米银颗粒的生殖毒性,目前仅局限于少数对鱼类的体内试验和一些体外试验研究。Bar-Ilan 等将透明斑马鱼胚胎暴露于不同粒径(3, 10, 50 和 100 nm)的胶体银,银颗粒(100 和 250 $\mu\text{mol/L}$)暴露 120 h 可导致斑马鱼胚胎 100% 死亡,相同时间的金颗粒暴露只引起不到 3% 的死亡率;进一步研究发现银颗粒可导致多种胚胎形态异常,该研究表明,纳米银可被胚胎摄入,银的毒性可能是由其自身产生的,也可能是由其进入胚胎体内后产生的银离子而导致的^[16]。上述研究发现,在所有粒径的纳米银和纳米金中,银的毒性较大;当作用时间和浓度一定时,银颗粒的毒性与其粒径有关,说明纳米材料的毒性与其化学性质密切相关。体外试验也表明纳米银可能具有生殖毒性,Bradyich-Stolle 等发现同剂量同时间下纳米银(15 nm)对小鼠精子干细胞株的生殖毒性大于纳米铝(30 nm)和纳米三氧化二铝(30 nm)^[17]。

1.4 肝脏毒性

纳米银或银离子经口服或呼吸暴露后可能进入到血液循环系统,到达体内多个脏器,导致相应器官的损害,其中有关肝脏损害的报道较多。Takenaka 等给大鼠吸入纳米银(4 ~ 10 nm)后发现,雌雄大鼠的肝细胞中均出现空泡变性,高剂量组出现散在肝坏死灶,雌性大鼠还表现出明显的剂量反应关系^[18]。Kim 等对大鼠连续灌胃纳米银颗粒(60 nm) 28 d,发现脑、肝、肾、肺及睾丸中有明显的纳米银蓄积,其中肝毒性表现最为明显。但需要指出的是,该研究中所使用的染毒剂量特别是高剂量组的浓度太高(低、中和高剂量组分别为 30, 300, 1 000 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$),使其科学价值有所降低^[19]。因此,在进行试验设计时,一定要考虑人体暴露的实际浓度,使试验结果更接近于真实。Cha 等采用灌胃的方式分别给予小鼠 2.5 mg 的纳米银(15 nm)和微米银(2 ~ 3.5 μm) 3 d 后纳米银暴露组肝组织出现明显的炎症反应,进一步发现 4 种与炎症有关的基因表达量发生改变,从而证实了纳米银经消化道摄入对肝脏的炎症损害^[20]。

1.5 其他毒性

除以上所讨论的纳米银的毒性效应之外,有文献报道纳米银还可对动物的肾脏和脑组织产生影响。Kim 等用纳米银颗粒(60 nm)对大鼠连续灌胃 28 d 后,肾组织中可出现纳米银剂量依赖性的蓄

积^[19]。Rahman 等对成年雄性小鼠腹腔注射 25 nm 的纳米银颗粒(100, 500 和 1 000 mg/kg) 24 h 后发现小鼠脑部尾状核、前皮质层和海马组织都发生了基因表达的改变。认为纳米银可通过诱导氧化应激,引起基因表达改变,导致凋亡发生,从而引起神经系统损伤^[21]。该研究采用静脉注射的染毒方式评价纳米银的神经毒性,较为罕见,同时其采用的剂量也较高。

有关纳米银吸入后在免疫细胞中的分布情况至今鲜见报道。但 Takenaka 等研究发现,大鼠吸入纳米银后在脾脏中观察到纳米银的存在^[18],静脉注射(LD_{50} 67 mg/kg)或经口给予高浓度的胶体银可引起大鼠死亡,病理解剖发现,大鼠肝脏、脾脏和肾脏均出现褐色斑点,提示静脉注射或经消化道的纳米银暴露可对脾脏产生损害^[10]。

2 纳米银的细胞毒性及其机制研究

多数动物试验研究揭示了纳米银在体内的分布、蓄积,也有研究探讨了纳米银的毒性,但大部分体内试验对于毒性终点的观察是以一般病理学检查和生化指标测定为主,对于纳米银的毒作用机制未能给出更多的解释。近年来,一些研究者对不同表征的纳米银进行了体外毒性及其机制的研究。多数研究认为,与其他表征(主要是粒径)相似的纳米材料相比,纳米银的毒性较强;纳米银的毒性效应与其粒径和表面修饰密切相关,对于不同的细胞类型其毒性效应也有所差异^[22-25]。纳米银的细胞毒性主要表现为降低细胞存活率、损伤细胞膜、诱导氧化应激、影响炎症因子的分泌、影响细胞间隙连接通讯改变、引起 DNA 损伤以及诱发细胞凋亡等。

2.1 纳米银诱导细胞氧化应激和凋亡的发生

研究表明,纳米银暴露可引起细胞产生氧化应激,并由此产生相应的细胞毒性。10 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 的纳米银(15 和 100 nm)即可引起大鼠肝细胞株 BRL3A 细胞胞内活性氧(ROS)显著增加和谷胱甘肽(GSH)明显下降,同时线粒体膜电位下降和细胞存活率降低,并存在明显的剂量反应关系^[24]。此外,纳米银还可引起正常人肺成纤维细胞和人神经胶质瘤细胞胞内活性氧增加和线粒体内三磷酸腺苷(ATP)减少,细胞 DNA 损伤和细胞 G2/M 期阻滞,提示纳米银通过引起线粒体呼吸链损伤导致活性氧产生和 ATP 合成受阻,二者继而引起 DNA 损伤和细胞周期阻滞^[23]。另有研究比较了纳米银(< 100

nm)和微米银(250 μm)对小鼠成纤维细胞 NIH3T3,大鼠血管平滑肌细胞 A10 以及 HCT116 人克隆癌细胞的毒性,发现纳米银可使胞内 ROS 升高,并可引起明显的细胞凋亡,用 N-乙酰半胱氨酸(NAC)预处理细胞可明显减少细胞凋亡的发生,说明在纳米银的细胞毒性作用中有活性氧的参与^[22]。一些研究报道,不同粒径的纳米银诱发细胞凋亡可能与其诱导细胞产生氧化应激有关^[22, 24, 26]。Hsina 等发现纳米银可引起细胞线粒体细胞色素 C 向胞浆释放,同时 Bax 由胞浆向线粒体内转移,进一步研究发现纳米银暴露 6 h 即可引起细胞 JNK, p53 的磷酸化以及 DNA 修复酶 PARP 的裂解,采用 NAC 或 JNK 抑制剂(SP600125)可有效抑制 JNK 激酶和 p53 的活化,细胞凋亡率显著降低,提示纳米银可能通过诱导细胞内氧化应激而激活 JNK 通路,从而诱发细胞凋亡^[22]。

纳米银诱导的细胞凋亡作用也与细胞类型和纳米银的表面修饰有关。Bhol 等发现 1% 的纳米银膏体制剂(50 nm)可引起炎症细胞凋亡,但对皮肤角细胞无明效应,提示对于不同的细胞类型纳米银的作用特征可能有所不同^[11]。还有研究比较了不同表面修饰的纳米银(25 nm)的细胞毒性,发现修饰(多聚糖包被)与未修饰的纳米银均可引起细胞凋亡的发生,而前者还可引起明显的细胞 DNA 损伤,推测经表面修饰的纳米银可能通过 DNA 损伤而引发细胞凋亡,未经表面修饰的纳米银可能通过其他途径而诱发细胞凋亡。

2.2 纳米银对细胞的遗传毒性

国内有学者比较了纳米银和微米银对 HL-7702 肝细胞 DNA 的损伤作用,结果发现,与对照组相比,纳米银可引起肝细胞 DNA 的明显损伤,随着纳米银浓度的升高,其对细胞 DNA 的损伤作用也随之增强,表现出明显的剂量反应关系。但在同样的试验条件下,未观察到微米银对肝细胞 DNA 的损伤作用^[27]。Hackenberg 等研究也发现,0.01 $\mu\text{g/mL}$ 的纳米银在作用 1 h 后即可引起人间质干细胞 DNA 损伤,随着染毒浓度(0.1, 1 和 10 $\mu\text{g/mL}$)的增加和染毒时间(3 和 24 h)的延长,纳米银对细胞 DNA 的损伤作用也显著增强^[28]。以上 2 项研究均提示,纳米银具有一定的遗传毒性,其主要毒性表现为可造成细胞 DNA 损伤。然而,还有研究发现,纳米银单独作用的遗传毒性很弱,但当纳米银与溴化十六烷基吡啶共同存在时,即可表现出明显的遗传毒性^[29]。

因此,有关纳米银的细胞遗传毒性及其机制还有待进一步研究。

2.3 纳米银对细胞间隙连接通讯的影响

细胞间隙连接通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)是哺乳动物细胞间普遍存在的一种细胞间通讯,存在于除血液细胞和骨骼肌细胞以外的所有细胞和组织中。GJIC是相邻细胞之间形成的一种能够开放和关闭的亲水性膜通道结构,间隙连接间信息传递可协调不同细胞和组织的代谢或电传导性,在组织内环境稳定,细胞生长、增殖和分化及生长控制中起着重要的调控作用,对于维持多细胞生物的组织器官间的平衡非常重要。最近的一项研究发现,在未引起明显细胞毒性的浓度范围内,纳米银((69±3) nm)可通过上调间隙连接蛋白Cx43而明显促进人肺上皮细胞GJIC,而银离子却未能观察到此作用。为了更进一步揭示纳米银和银离子对细胞GJIC的影响机制,研究探讨了纳米银和银离子对细胞间隙连接蛋白Cx43 mRNA表达的影响,结果发现,纳米银和银离子在作用24 h后,均可引起细胞Cx43 mRNA表达的增强^[30]。该结果提示,影响GJIC功能可能是纳米银发挥其生物学效应的一个较早期的作用。该研究揭示了纳米银对GJIC的影响,并比较了其于银离子的不同,研究结果为进一步揭示纳米银的生物安全性提供了新的研究方向。

3 小结与展望

纳米银对人体健康具有潜在的危害,很明显,纳米银颗粒的毒性与其内部特性及氧化状态有关,最终导致炎症、细胞毒性以及遗传毒性等的发生。然而,人们对生活中广泛应用的纳米银的粒径、形式以及聚集方式仍不很清楚,毒理学评价证据不足,有关纳米银的毒代动力学,也只有少数动物试验和病例报道的资料。在迄今为止的有关纳米银的毒性研究中,纳米银的组成成分差别很大,有关纳米银的描述和研究使用的纳米银的粒径也不尽相同,暴露途径也各有差异,因此很难在一起进行比较并最终形成一个定论。今后对于纳米银的研究,笔者认为以下问题值得重视:

(1) 纳米银研究设计过程中的暴露和剂量的问题。有关纳米银的暴露问题,包括颗粒物的浓度、暴露持续时间以及所使用的模型,以往个别研究中的高浓度使得结果在外推时受到限制。

(2) 纳米银和银离子的作用问题。可以看出,以上所述的研究大都没有探究组织中蓄积的银是以颗粒状态存在还是以离子状态存在,有关银离子在纳米银的生物学效应中扮演怎样的角色,纳米银对组织或细胞产生毒性的原因是由于纳米银的直接作用所致还是纳米银与细胞接触之后释放出银离子,继而由银离子对细胞产生毒性,还是二者兼而有之,目前尚无清晰的结论。

参考文献

- [1] ROSZEK B, de JONG, GEERTSMA R E. Nanotechnology in medical applications: state-of-the-art in materials and devices [R]. Bilthoven: RIVM, 2005.
- [2] BOUWMEESTER H, DEKKERS S, NOORDAM M, et al. Health impact of nanotechnologies in food production [R]. Bilthoven: RIKILT/RIVM, 2007.
- [3] BENN T M, WESTERHOFF P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics [J]. Environ Sci Technol, 2008, 42(11): 4133-4139.
- [4] VIGNESHWARAN N, KATHE A A, VARADARAJAN P V, et al. Functional finishing of cotton fabrics using silver nanoparticles [J]. Nanosci Nanotechnol, 2007, 7(6): 1893-1897.
- [5] CHEN X, SCHLUESNER H J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application [J]. Toxicol Lett, 2008, 176(1): 1-12.
- [6] SUNG J H, JI J H, YOON J U, et al. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles [J]. Inhal Toxicol, 2008, 20(6): 567-574.
- [7] SUNG J H, JI J H, PARK J D, et al. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles [J]. Toxicol Sci, 2009, 108(2): 452-461.
- [8] JI J H, JUNG J H, KIM S S, et al. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats [J]. Inhal Toxicol, 2007, 19(10): 857-871.
- [9] HYUN J S, LEE B S, RYU H Y, et al. Effects of repeated silver nanoparticles exposure on the histological structure and mucins of nasal respiratory mucosa in rats [J]. Toxicol Lett, 2008, 182(1/2/3): 24-28.
- [10] SCHMAEHL D, STEINHOFF D. Studies on cancer induction with colloidal silver and gold solutions in rats [J]. Z Krebsforsch, 1960, 63: 586-591.
- [11] BHOL K C, SCHECHTER P J. Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis [J]. Br J Dermatol, 2005, 152(6): 1235-1242.
- [12] BHOL K C, ALROY J, SCHECHTER P J. Anti-inflammatory effect of topical nanocrystalline silver cream on allergic contact dermatitis in a guinea pig model [J]. Clin Exp Dermatol, 2004, 29(3): 282-287.
- [13] SHIN S H, YE M K, KIM H S, et al. The effects of nanosilver on

- the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells [J]. *Int Immunopharmacol* ,2007 ,7 (13) : 1813-1818.
- [14] WRIGHT J B ,LAM K ,BURET A G ,et al. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases ,cell apoptosis , and healing[J]. *Wound Repair Regen* ,2002 ,10(3) : 141-151.
- [15] SUPP A P ,NEELY A N ,SUPP D M ,et al. Evaluation of cytotoxicity and antimicrobial activity of Acticoat Burn Dressing for management of microbial contamination in cultured skin substitutes grafted to athymic mice [J]. *J Burn Care Rehabil* , 2005 26(3) : 238-246.
- [16] BAR-ILAN O ,ALBRECHT R M ,FAKO V E ,et al. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos[J]. *Small* 2009 5(16) : 1897-1910.
- [17] BRAYDICH-STOLLE L ,HUSSAIN S ,SCHLAGER J J ,et al. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells[J]. *Toxicol Sci* 2005 88(2) : 412-419.
- [18] TAKENAKA S ,KARG E ,ROTH C ,et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats [J]. *Environ Health Perspect* 2001 ,109(Suppl 4) : 547-551.
- [19] KIM Y S ,KIM J S ,CHO H S ,et al. Twenty-eight-day oral toxicity ,genotoxicity ,and gender-related issue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats [J]. *Inhal Toxicol* , 2008 20(6) : 575-583.
- [20] CHA K ,HONG H W ,CHOI Y G ,et al. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano- sized or micro-sized silver particles [J]. *Biotechnol Lett* ,2008 ,30(11) : 1893-1899.
- [21] RAHMAN M F ,WANG J ,PATTERSON T A ,et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles [J]. *Toxicol Lett* ,2009 ,187 (1) : 15-21.
- [22] HSINA Y H ,CHEN C F ,HUANG S ,et al. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells[J]. *Toxicol Lett* 2008 ,179(3) : 130-139.
- [23] ASHARANI P V ,MUN G L K ,HANDE M P ,et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells [J]. *ACS Nano* 2009 3(2) : 279-290.
- [24] HUSSAIN S M ,HESS K L ,GEARHART J M ,et al. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells[J]. *Toxicol In Vitro* 2005 ,19(7) : 975-983.
- [25] HUSSAIN S M ,JAVORINA A ,SCHRAND A M ,et al. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion [J]. *Toxicol Sci* 2006 92(2) : 456-463.
- [26] FOLDBJERG R ,OLESEN P ,HOUGAARD M ,et al. PVP coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes [J]. *Toxicol Lett* 2009 ,190(2) : 156-162.
- [27] 刘鹏鹏 ,关荣发 ,伍义行 ,等. 纳米银对 HL-7702 肝细胞 DNA 的损伤作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志* ,2010 ,24(6) : 466-470.
- [28] HACKENBERG S ,SCHERZED A ,KESSLER M ,et al. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage ,toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells [J]. *Toxicol Lett* , 2011 201(1) : 27-33.
- [29] CHI Z ,LIU R ,ZHAO L ,et al. A new strategy to probe the genotoxicity of silver nanoparticles combined with cetylpyridine bromide [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2009 72 (3) : 577-581.
- [30] DENG F R ,OLESEN P ,FOLDBJERG R ,et al. Silver nanoparticles up-regulate connexin 43 expression and increase gap junctional intercellular communication in human lung [J]. *Nanotoxicology* 2010 4(2) : 186-195. △