

纳米银的银离子释放及其对细胞的毒性作用

孙晋都¹, 张帮勇¹, 李婷竹¹, 高晓洁¹, 王君君¹, 薛玉英¹, 唐萌^{1,2}

摘要:

[目的] 检测三种纳米银颗粒在不同质量浓度、不同时间、不同溶液下的银离子释放动力学,并探讨纳米银释放银离子对细胞毒性作用的影响。

[方法] 将无包被 20 nm、50 nm 纳米银(nano-Ag20 和 nano-Ag50)和聚乙烯吡咯烷酮包被的 20 nm 纳米银(nano-Ag20PVP)颗粒分散于 pH3.6 醋酸盐缓冲液、pH6.0 醋酸盐缓冲液和 pH7.0 去离子水中,配制银质量浓度为 0.2、0.5、1.0 g/L 的悬液,37℃ 孵育后超速离心加超滤法分离出银离子,检测银离子含量。将 nano-Ag20PVP 分散于细胞培养液中,配制银质量浓度为 0、20、40、80、160 mg/L 的染毒液,37℃ 孵育 24 h 和 48 h 后检测银离子含量。用 nano-Ag20PVP 悬液染毒 A549 和 HepG2 细胞,银质量浓度为 0.625、2.5、5、10 mg/L 的硝酸银溶液作对照,MTT 法比较细胞活力。

[结果] nano-Ag20PVP 分散较好,nano-Ag20 和 nano-Ag50 有团聚现象。不同的 pH 条件下,三种纳米银的银离子含量与孵育时间呈正相关。相同 pH 条件和质量浓度下,nano-Ag20PVP 比 nano-Ag20 释放更多银离子($P < 0.05$);在 pH7.0 的 1.0 g/L 组,nano-Ag50 的银离子比率高于 nano-Ag20($P < 0.05$)。20 mg/L 和 160 mg/L nano-Ag20PVP 染毒液中的银离子比率分别为 0.02% 和 0.09%,孵育 24 h 和 48 h 后仅在 160 mg/L 组检测到比率分别为 0.01% 和 0.02% 的银离子。A549 细胞和 HepG2 细胞暴露 nano-Ag20PVP 染毒液 24 h 和 48 h 后,细胞内银含量和银离子比率都与染毒液的银质量浓度呈正相关;暴露 24 h 后,HepG2 细胞内的银含量高于 A549 细胞($P < 0.05$),暴露 48 h 后,HepG2 细胞内的总银含量低于 A549 细胞($P < 0.05$);暴露 24 h 和 48 h 后,HepG2 细胞内的银离子比率低于 A549 细胞($P < 0.05$)。暴露于 10~160 mg/L 的 nano-Ag20PVP 24 h 和 48 h 后,HepG2 细胞的存活率高于 A549 细胞($P < 0.05$);暴露于 5、10 mg/L 的硝酸银 24 h 和 48 h 后,HepG2 细胞的存活率高于 A549 细胞($P < 0.05$);在相同质量浓度(5、10 mg/L)下,nano-Ag20PVP 染毒组的细胞存活率高于硝酸银组($P < 0.05$)。

[结论] 有包被的纳米银比无包被的纳米银容易释放银离子。nano-Ag20PVP 进入细胞后能进一步释放银离子,后者在纳米银诱导的细胞毒性中发挥重要作用。纳米银对细胞的毒性作用由纳米银颗粒及其释放的银离子共同作用所致。

关键词: 纳米银; 银离子; A549 细胞; HepG2 细胞; 细胞毒性

引用: 孙晋都,张帮勇,李婷竹,等.纳米银的银离子释放及银离子对细胞的毒性作用[J].环境与职业医学,2017,34(7):636-641.

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16695

Release of silver ions from silver nanoparticles and their cytotoxicity SUN Jin-du¹, ZHANG Bang-yong¹, LI Ting-zhu¹, GAO Xiao-jie¹, WANG Jun-jun¹, XUE Yu-ying¹, TANG Meng^{1,2} (1.School of Public Health, Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education, Southeast University, Jiangsu, Nanjing 210009, China; 2.Collaborative Innovation Center of Suzhou Nano Science and Technology, Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, Jiangsu, Nanjing 210009, China). Address correspondence to XUE Yu-ying, E-mail: yyxue@seu.edu.cn · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To test the silver ion release kinetics of three kinds of silver nanoparticles under different conditions (such as mass concentration, time, and solution) and assess the cytotoxicity of released silver ions.

[Methods] Uncoated 20 nm, uncoated 50 nm, and polyvinylpyrrolidone coated 20 nm silver nanoparticles (nano-Ag20, nano-Ag50, and

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81573186, 81502783, 81473003, 81302461)

[作者简介] 孙晋都(1991—),男,硕士生;研究方向:纳米毒理学;E-mail: zddjsun@163.com

[通信作者] 薛玉英, E-mail: yyxue@seu.edu.cn

[作者单位] 1.东南大学公共卫生学院,教育部环境医学工程重点实验室,江苏 南京 210009; 2.苏州纳米科技协同创新中心,江苏省生物材料与器件重点实验室,江苏 南京 210009

nano-Ag20PVP) were dispersed in different pH buffers such as pH3.6 acetate buffer, pH6.0 acetate buffer, and pH7.0 deionized water to prepare 0.2, 0.5, and 1.0 g/L suspensions. After incubation at 37 °C, silver ions were separated by ultracentrifugation and ultrafiltration for detection. Nano-Ag20PVP were dissolved in cell culture to prepare solutions of 0, 20, 40, 80, and 160 mg/L concentrations, then incubated at 37 °C, and followed by silver ion detection after 24 and 48 h, respectively. A549 and HepG2 cells were exposed to nano-Ag20PVP suspensions, with silver nitrate solution used as positive control, to determine cell viability by MTT assay.

[Results] Higher degree of dispersion was found in nano-Ag20PVP than in nano-Ag20 or nano-Ag50. In all designed pH conditions, the silver ion content of three kinds of silver nanoparticles was positively correlated with mass concentration and time. Under same pH and mass concentration conditions, the silver ion ratio of nano-Ag20PVP was always higher than that of nano-Ag20 ($P < 0.05$). At pH7.0, the silver ion ratio of nano-Ag50 was higher than that of nano-Ag20 ($P < 0.05$) in the 1.0 g/L group. The silver ion ratios of the 20 mg/L and the 160 mg/L nano-Ag20PVP solutions were 0.02% and 0.09%, respectively. After incubation for 24 h and 48 h, the silver ion ratios of the 160 mg/L nano-Ag20PVP were 0.01% and 0.02%, respectively. After treatment for 24 h and 48 h with nano-Ag20PVP, both silver content and silver ion ratio in A549 and HepG2 cells were positively associated with the mass concentration of nano-Ag20PVP. After 24 h with nano-Ag20PVP treatment, the content of silver in HepG2 cells was higher than that in A549 cells ($P < 0.05$), but it was lower after 48 h ($P < 0.05$). After treatment for 24 h and 48 h with nano-Ag20PVP, the contents of silver ion in HepG2 cells were lower than those in A549 cells ($P < 0.05$). After treatment for 24 h and 48 h with 10-160 mg/L nano-Ag20PVP, the cell viabilities of HepG2 cells were higher than those of A549 cells ($P < 0.05$). After treatment for 24 h and 48 h with 5 and 10 mg/L silver nitrate, the cell viabilities of HepG2 cells were higher than those of A549 cells ($P < 0.05$). At the same mass concentration (5 and 10 mg/L), the cell viability of the nano-Ag20PVP group was higher than that of the silver nitrate group ($P < 0.05$).

[Conclusion] Coated silver nanoparticles release more silver ions than uncoated silver nanoparticles. Nano-Ag20PVP could still release silver ions in cells, which plays an important role in the cytotoxicity induced by silver ions in selected cell lines. Silver nanoparticles and released silver ions jointly induce cytotoxicity.

Keywords: silver nanoparticle; silver ion; A549 cell; HepG2 cell; cytotoxicity

Citation: SUN Jin-du, ZHANG Bang-yong, LI Ting-zhu, et al. Release of silver ions from silver nanoparticles and their cytotoxicity[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(7): 636-641. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16695

纳米银具有广谱抗菌性以及良好的催化性能,被广泛用于生物医药、日用品、化妆品以及化学工业生产等与人类密切相关的领域^[1-6]。同时,纳米银的体内外毒性作用备受关注。研究发现纳米银能诱导氧化应激而产生细胞毒性^[7-9],体内研究发现纳米银主要靶器官为肝脏和肺脏^[10-12]。然而,对于纳米银的体外动力学研究还相对匮乏。

颗粒大小、形状、团聚状态及表面功能化被认为是影响纳米银颗粒生物效应的主要因素,此外,银离子对纳米银的生物效应的影响也值得考虑。有体外研究报道纳米银在分散液中可以释放出银离子^[13],纳米银的自身理化特性以及环境对银离子释放的影响还需要探讨。对于纳米银引起的毒性作用,是由纳米银颗粒本身引起,还是由其释放的银离子所致,或者是两者共同引起,目前还尚不明确。

本研究通过超滤法把溶液中的纳米银和银离子进行分离,再用原子吸收光谱石墨炉法测定纳米银在不同条件下的银离子含量,然后用纳米银溶液染毒A549和HepG2两种细胞株,分别检测细胞摄取的纳米银及其银离子含量,通过比较纳米银和硝酸银对细胞活力的影响,初步探讨纳米银及其释放银离子在细胞毒效应中

的作用,为探索纳米银毒作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、细胞来源、主要仪器与试剂

1.1.1 材料与细胞 无包被20 nm、50 nm纳米银(nano-Ag20、nano-Ag50,上海允复纳米科技有限公司,纯度为99.99%),聚乙烯吡咯烷酮包被的20 nm纳米银(nano-Ag20PVP,上海沪正纳米科技有限公司,纯度为99.99%)。A549和HepG2细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.1.2 试剂 DMEM高糖培养液(GE,美国),胰蛋白酶(Gibco,美国),胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,中国),PBS(武汉博士德生物工程有限公司,中国),硝酸银(Sigma,美国),nano-Ag标准溶液[(GSB G 62039-90,4701),1000 mg/L,国家钢铁材料测试中心钢铁研究总院,中国]。其他试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器 JEM-2100型透射电镜(JEOL,日本);Amicon-Ultra-0.5离心超滤管(30 KD X Millipore,美国);3423型CO₂培养箱(Thermo Scientific,美国);TDZ6B-WS水平离心机(上海卢湘仪器厂,中国);

5424R型离心机(Eppendorf, 德国); Epoch型酶标仪(Bio Tek, 美国); Q700型超声细胞破碎仪(Qsonica, 美国); GFA-7000A原子吸收光谱仪(岛津, 日本); UB-7型精密pH计(Denver, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 总银含量的测定 采用石墨炉原子吸收光谱法。将总银含量待检样品加入3 mL 65% HNO₃消化过夜。次日加入2 mL 30% H₂O₂, 于电热板(200 °C)上加热消解, 直到液体体积挥发至约1 mL。使用2% HNO₃定容样品至3 mL, 4 °C保存待测。使用nano-Ag标准溶液配制质量浓度为0、2、4、6、8、10 µg/L的标准溶液, 绘制银标准曲线, 检测样品。

1.2.2 溶液中纳米银和银离子的分离 银离子待检样品先进行超速离心(4 °C, 20 000 × g, 20 min), 取上清液0.5 mL, 加入超滤管(30 KD, 即孔径7 nm, 银离子粒径0.28 nm^[14])中, 再进行超滤分离(4 °C, 15 000 × g, 20 min), 取超滤液, 4 °C保存待测。

1.2.3 纳米银材料的表征 使用含10%胎牛血清DMEM高糖培养液配制成银质量浓度为160 mg/L的母液, 混悬后滴在铜网上, 使用透射电子显微镜观察检测, 结果用Nano-Measurer 1.2.5软件分析纳米银粒径分布。再将母液用浓HNO₃消化检测纳米银的银含量。

1.2.4 溶液中银离子释放的检测 将三种纳米银(nano-Ag20、nano-Ag50及nano-Ag20PVP)分别分散在pH3.6、6.0的醋酸盐缓冲液(根据中国药典配制而成)和pH7.0去离子水中, 再分别配制成银质量浓度为0.2、0.5、1.0 g/L的纳米银悬液, 共27种纳米银溶液, 孵育0、1、6、12和24 h后超滤分离并检测银离子含量, 每种溶液重复检测3次。

1.2.5 细胞培养液中银离子释放的检测 选择分散良好的nano-Ag20PVP, 用含10%胎牛血清的细胞培养液配制成银质量浓度为20、40、80、160 mg/L的纳米银悬液, 于37 °C培养箱孵育24、48 h后超滤分离并检测银离子含量, 每种悬液重复检测3次。细胞培养液中的银离子释放较少, 采用培养液银离子比率(培养液中银离子含量/培养液中银含量)来描述银离子释放程度。

1.2.6 细胞内银离子释放的检测 使用DMEM高糖培养液(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/L链霉素)培养A549、HepG2细胞, 于37 °C、5%CO₂培养箱中常规传代培养。调整A549、HepG2细胞密度为1 × 10⁵个/mL, 分别接种于6孔板中, 每孔2 mL。培

养24 h后吸去旧培养液, 对照组加入细胞培养液, 实验组分别加入20、40、80、160 mg/L nano-Ag20PVP悬液, 37 °C、5%CO₂培养箱中孵育24、48 h后, PBS洗涤三次后收集细胞并计数, 每个样品取3 × 10⁵个细胞于新的离心管中, 按上述步骤消化处理, 检测细胞内银元素含量。取同样细胞数样品, 用超声细胞破碎仪处理, 按上述超滤法分离银离子, 检测细胞内银离子含量。采用细胞内银离子比率(细胞内银离子含量/细胞内银含量)来描述细胞内银离子释放程度。

1.2.7 细胞活力的测定 调整细胞密度, 将A549和HepG2细胞分别以2 × 10⁴个/孔、5 × 10⁴个/孔接种于96孔板中, 每孔100 µL。于细胞培养箱贴壁24 h后, 对照组加入细胞培养液, 实验组加入5、10、20、40、80、160 mg/L nano-Ag20PVP悬液, 用银质量浓度为0.625、1.25、5、10 mg/L的HNO₃作对照, 每组设定4个复孔。培养24、48 h后MTT法检测细胞活力。

1.3 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。各剂量组与对照组比较, 若方差齐, 采用Dunnett-*t*检验; 若方差不齐, 采用Games-Howell检验。同剂量组不同时间之间比较采用配对*t*检验, 相同剂量下两细胞株之间的比较用独立样本*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 纳米银材料的表征

透射电子显微镜结果显示, 3种纳米银颗粒均呈球形, nano-Ag20PVP分散较好, nano-Ag20和nano-Ag50有团聚现象。nano-Ag20PVP、nano-Ag20和nano-Ag50的粒径分别为23.4、22.8、53.6 nm。nano-Ag20PVP、nano-Ag20和nano-Ag50的银含量分别为25.5%、99.0%和99.5%。

2.2 不同溶液中的银离子释放

如表1所示, 在pH3.6、6.0的醋酸盐缓冲液和pH7.0的去离子水中, 3种纳米银的银离子含量均与孵育时间呈正相关, 但在绝大多数情况下, 与银质量浓度未显现正相关。同一质量浓度下, nano-Ag20PVP的银离子含量明显高于nano-Ag20($P<0.05$)。在去离子水的1.0 g/L组, nano-Ag50的银离子含量高于nano-Ag20($P<0.05$)。其他两种溶液及其他质量浓度组下, nano-Ag50与nano-Ag20的银离子含量差异无统计学意义。

表1 纳米银在不同溶液中不同孵育时间的银离子含量(*n*=3)

溶液种类	质量浓度 (g/L)	不同孵育时间的银离子含量(mg/L)					<i>r</i>	<i>P</i>
		0h	1h	6h	12h	24h		
pH3.6 醋酸盐缓冲液								
nano-Ag20	0.2	0.1233 ± 0.0095	0.2296 ± 0.0166	0.3624 ± 0.0074	0.6754 ± 0.0045	0.7763 ± 0.0135	0.945	0.015
	0.5	0.3659 ± 0.0215	0.4710 ± 0.0131	0.5449 ± 0.0299	0.9855 ± 0.0353	1.1348 ± 0.0271	0.952	0.013
	1.0	0.5201 ± 0.0118	0.7348 ± 0.0291	0.9837 ± 0.0424	1.6784 ± 0.0558	1.9641 ± 0.0385	0.957	0.011
nano-Ag20PVP	0.2	0.3306 ± 0.0131 ^a	0.7539 ± 0.0165 ^a	1.1196 ± 0.0369 ^a	2.4213 ± 0.0155 ^a	2.7345 ± 0.0413 ^a	0.937	0.019
	0.5	1.5631 ± 0.0111 ^a	1.9640 ± 0.0183 ^a	2.0262 ± 0.0585 ^a	2.5080 ± 0.0400 ^a	3.1048 ± 0.0325 ^a	0.975	0.005
	1.0	1.7983 ± 0.0559 ^a	2.5862 ± 0.0379 ^a	3.0907 ± 0.0295 ^a	5.9897 ± 0.0362 ^a	6.1432 ± 0.0531 ^a	0.907	0.034
nano-Ag50	0.2	0.1384 ± 0.0095	0.2502 ± 0.0122	0.3630 ± 0.0308	0.6808 ± 0.0142	0.7163 ± 0.0214	0.916	0.029
	0.5	0.3340 ± 0.0275	0.3825 ± 0.0172	0.5733 ± 0.0337	0.9558 ± 0.0529	1.1427 ± 0.0413	0.966	0.007
	1.0	0.5573 ± 0.0332	0.7076 ± 0.0309	0.9402 ± 0.0103	1.6514 ± 0.0273	1.8612 ± 0.0317	0.948	0.014
pH6.0 醋酸盐缓冲液								
nano-Ag20	0.2	0.0128 ± 0.0011	0.0412 ± 0.0016	0.1724 ± 0.0086	0.2125 ± 0.0137	0.2915 ± 0.0122	0.940	0.017
	0.5	0.0374 ± 0.0011	0.1288 ± 0.0091	0.3095 ± 0.0156	0.4504 ± 0.0096	0.5429 ± 0.0257	0.933	0.020
	1.0	0.1150 ± 0.0033	0.2011 ± 0.0126	0.5027 ± 0.0289	0.5225 ± 0.0228	0.6922 ± 0.0303	0.910	0.032
nano-Ag20PVP	0.2	0.0452 ± 0.0053 ^b	0.1022 ± 0.0067 ^b	0.3446 ± 0.0096 ^b	0.5241 ± 0.0216 ^b	0.6156 ± 0.0156 ^b	0.931	0.022
	0.5	0.0852 ± 0.0073 ^b	0.1729 ± 0.0098 ^b	0.6488 ± 0.0087 ^b	0.7788 ± 0.0148 ^b	0.8794 ± 0.0166 ^b	0.876	0.051
	1.0	0.1803 ± 0.0119 ^b	0.4723 ± 0.0237 ^b	0.7762 ± 0.0304 ^b	0.9891 ± 0.0407 ^b	1.2888 ± 0.0457 ^b	0.942	0.016
nano-Ag50	0.2	0.0453 ± 0.0064	0.0972 ± 0.0029	0.2049 ± 0.0172	0.2336 ± 0.0207	0.3443 ± 0.0115	0.958	0.010
	0.5	0.0625 ± 0.0015	0.1534 ± 0.0083	0.3338 ± 0.0081	0.3871 ± 0.0157	0.5936 ± 0.0257	0.965	0.008
	1.0	0.1269 ± 0.0061	0.2091 ± 0.0095	0.5188 ± 0.0224	0.5668 ± 0.0215	0.7798 ± 0.0141	0.936	0.019
pH7.0 去离子水								
nano-Ag20	0.2	0.2257 ± 0.0153	0.2675 ± 0.0116	0.6878 ± 0.0302	0.8161 ± 0.0515	1.2213 ± 0.0395	0.974	0.005
	0.5	0.6245 ± 0.0269	1.0899 ± 0.0161	1.7659 ± 0.0603	2.4788 ± 0.0164	2.5488 ± 0.0286	0.884	0.046
	1.0	0.9233 ± 0.0209	1.9558 ± 0.0495	3.1518 ± 0.0639	3.2819 ± 0.0413	3.0666 ± 0.0599	0.684	0.203
nano-Ag20PVP	0.2	1.2695 ± 0.0207 ^c	2.499.1 ± 0.0211 ^c	4.826.7 ± 0.0298 ^c	8.7862 ± 0.0557 ^c	9.4859 ± 0.0568 ^c	0.923	0.026
	0.5	1.9687 ± 0.0316 ^c	4.103.8 ± 0.0342 ^c	5.395.7 ± 0.0677 ^c	9.5294 ± 0.0719 ^c	10.1603 ± 0.0687 ^c	0.913	0.030
	1.0	4.9663 ± 0.0289 ^c	7.006.3 ± 0.0698 ^c	11.149.7 ± 0.0567 ^c	13.2255 ± 0.0518 ^c	15.7384 ± 0.0542 ^c	0.934	0.020
nano-Ag50	0.2	0.2326 ± 0.0178	0.3689 ± 0.0206	0.5544 ± 0.0065	0.8768 ± 0.0316	1.3531 ± 0.0179	0.996	0.001
	0.5	0.5896 ± 0.0302	1.2919 ± 0.0381	1.8517 ± 0.0522	2.0995 ± 0.0608	2.6359 ± 0.0328	0.909	0.033
	1.0	1.2488 ± 0.0317 ^c	2.8896 ± 0.0222 ^c	3.6362 ± 0.0576 ^c	5.4943 ± 0.0604 ^c	6.4046 ± 0.0356 ^c	0.928	0.023

[注] a : 与 pH3.6 nano-Ag20 相同质量浓度组比较 , *P* < 0.05 ; b : 与 pH6.0 nano-Ag20 相同质量浓度组比较 , *P* < 0.05 ; c : 与 pH7.0 nano-Ag20 相同质量浓度组比较 , *P* < 0.05。

2.3 nano-Ag20PVP在细胞培养液中的银离子释放

孵育 0h 时 , 20、40、80 和 160mg/L 组的银离子比率分别为 0.02%、0.06%、0.08% 和 0.09% ; 孵育 24h 和 48h 后 , 20、40 和 80mg/L 组中检测不到银离子 , 160 mg/L 组 24h 和 48h 的银离子比率分别为 0.01% 和 0.02%。同样孵育 24h , 表 1 中 nano-Ag20PVP 0.2g/L 组在去离子水(pH7.0) 中的银离子比率为 4.74%(9.486 mg/0.2 g) , 远高于其 160 mg/L(与 0.2 g/L 最接近) 组在细胞培养液(pH7.3~7.4) 里的银离子比率(0.01%)。

2.4 nano-Ag20PVP的细胞摄取及细胞内银离子释放

两种细胞内的银含量均与染毒质量浓度呈正相关。两种细胞 20 mg/L 染毒组 24h 银含量均低于 48h (*P* < 0.05) ; 80、160 mg/L 染毒组 24h 银含量均高于 48h (*P* < 0.05)。4 个染毒组 A549 细胞 24h 银含量低于 HepG2 细胞 ; HepG2 细胞 48h 银含量低于 A549 细胞。

两种细胞内银离子比率与质量浓度呈正相关 , 但银离子比率总体表现为 A549 细胞高于 HepG2 细胞。见表 2。

2.5 nano-Ag20PVP和硝酸银对细胞活力影响

如表 3 所示 , A549 和 HepG2 细胞暴露于不同银质量浓度的 nano-Ag20PVP 和硝酸银 24、48h 后 , 两种细胞株细胞存活率与质量浓度呈现负相关。染毒 24h 后 , nano-Ag20PVP 所有质量浓度组的 A549 细胞和 HepG2 细胞存活率均高于染毒 48h 组(*P* < 0.05)。染毒 24h 后 , nano-Ag20PVP 10、20、40、80、160 mg/L 组的 HepG2 细胞存活率均高于同等质量浓度下的 A549 细胞存活率 (*P* < 0.05)。染毒 24、48h 后 , 硝酸银 2.5、5、10mg/L 组的 A549 和 HepG2 细胞存活率均低于空白对照组(*P* < 0.05)。染毒 24h 后 , 硝酸银 2.5、5、10mg/L 组的 A549 和 HepG2 细胞存活率均高于染毒 48h 组(*P* < 0.05)。染毒 24、48h 后 , 硝酸银 2.5mg/L 组的 HepG2 细胞存

活率低于同等质量浓度的 A549 细胞存活率 ($P < 0.05$), 5、10 mg/L 组的 HepG2 细胞存活率高于同等质量浓度的 A549 细胞存活率 ($P < 0.05$)。

染毒 24、48 h 后, 5、10 mg/L 的 nano-Ag20PVP 与相同质量浓度的硝酸银相比较, nano-Ag20PVP 组两种细胞存活率远高于硝酸银组两种细胞存活率 ($P < 0.05$)。

A549 细胞和 HepG2 细胞染毒 24 h 后, 5 mg/L nano-Ag20PVP 组细胞存活率为 94.41% 和 93.63%, 5 mg/L 硝酸银组细胞存活率为 7.16% 和 15.22%; A549 细胞和 HepG2 细胞染毒 48 h 后, 5 mg/L nano-Ag20PVP 组细胞存活率为 85.83% 和 88.50%, 5 mg/L 硝酸银组细胞存活率为 6.11% 和 9.27%。

表 2 nano-Ag20PVP 染毒后细胞内银含量及银离子比率 ($n=3$)

nano-Ag20PVP (mg/L)	A549 细胞				HepG2 细胞			
	24 h		48 h		24 h		48 h	
	银含量 ($\mu\text{g/L}$)	银离子比率 (%)	银含量 ($\mu\text{g/L}$)	银离子比率 (%)	银含量 ($\mu\text{g/L}$)	银离子比率 (%)	银含量 ($\mu\text{g/L}$)	银离子比率 (%)
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	10.2 $\pm$ 1.4 ^{ab}	71.7 ^{ab}	59.9 $\pm$ 8.0 ^b	20.7 ^b	22.9 $\pm$ 1.0	25.1 ^a	26.3 $\pm$ 4.6	17.8
40	55.2 $\pm$ 2.8 ^{ab}	20.9 ^b	66.3 $\pm$ 21.5 ^b	20.1 ^b	84.3 $\pm$ 27.2 ^a	5.8 ^a	48.9 $\pm$ 4.6	12.6
80	180.4 $\pm$ 27.7 ^{ab}	12.4 ^{ab}	155.7 $\pm$ 20.5 ^b	15.1 ^b	306.6 $\pm$ 20.3 ^a	4.0 ^a	129.7 $\pm$ 8.4	8.8
160	612.1 $\pm$ 44.8 ^{ab}	4.3 ^{ab}	416.6 $\pm$ 53.6 ^b	9.7 ^b	739.8 $\pm$ 51.7 ^a	2.5 ^a	256.7 $\pm$ 3.1	5.4
r, P	$r=0.976, P=0.005$		$r=0.987, P=0.002$		$r=0.990, P=0.001$		$r=0.998, P=0.001$	

[注] ND 为未检测到银。a : 与 48 h 组比较, $P < 0.05$; b : 与相同染毒条件的 HepG2 细胞比较, $P < 0.05$ 。

表 3 nano-Ag20PVP 和硝酸银对 A549 和 HepG2 细胞存活率的影响 ($n=6$)

银溶液 (mg/L)	A549 细胞存活率 (%)		HepG2 细胞存活率 (%)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
nano-Ag20PVP				
0 (空白对照)	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
5	94.41 $\pm$ 5.65 ^{abd}	85.83 $\pm$ 6.41 ^{ad}	93.63 $\pm$ 4.54 ^{abd}	88.50 $\pm$ 4.46 ^{acd}
10	80.39 $\pm$ 3.58 ^{abd}	72.92 $\pm$ 4.2 ^{ad}	93.02 $\pm$ 6.36 ^{abd}	81.77 $\pm$ 6.51 ^{acd}
20	65.06 $\pm$ 2.22 ^{ab}	59.86 $\pm$ 4.3 ^a	89.58 $\pm$ 2.43 ^{abc}	76.27 $\pm$ 4.37 ^{ac}
40	55.91 $\pm$ 4.7 ^{ab}	52.97 $\pm$ 5.7 ^a	84.83 $\pm$ 3.46 ^{abc}	60.25 $\pm$ 3.19 ^{ac}
80	44.91 $\pm$ 3.33 ^{ab}	30.12 $\pm$ 3.89 ^a	81.84 $\pm$ 2.42 ^{abc}	40.03 $\pm$ 2.57 ^{ac}
160	34.83 $\pm$ 2.42 ^{ab}	17.06 $\pm$ 2.33 ^a	62.06 $\pm$ 1.35 ^{abc}	32.93 $\pm$ 4.46 ^{ac}
r, P	$r=-0.868, P=0.011$	$r=-0.904, P=0.005$	$r=-0.979, P=0.001$	$r=-0.913, P=0.004$
硝酸银				
0 (空白对照)	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.01	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
0.625	95.88 $\pm$ 3.30	96.86 $\pm$ 6.52	100.26 $\pm$ 4.29 ^c	104.94 $\pm$ 6.58
1.25	99.52 $\pm$ 5.44	98.29 $\pm$ 3.53	100.59 $\pm$ 2.25	105.20 $\pm$ 4.21
2.5	37.87 $\pm$ 6.44 ^{ab}	26.28 $\pm$ 4.23 ^a	22.98 $\pm$ 6.29 ^{abc}	11.56 $\pm$ 2.14 ^{ac}
5	7.16 $\pm$ 2.27 ^{ab}	6.11 $\pm$ 1.17 ^a	15.22 $\pm$ 4.25 ^{abc}	9.27 $\pm$ 1.21 ^{ac}
10	6.06 $\pm$ 1.18 ^{ab}	5.66 $\pm$ 2.10 ^a	14.98 $\pm$ 3.16 ^{abc}	9.07 $\pm$ 2.18 ^{ac}
r, P	$r=-0.859, P=0.029$	$r=-0.828, P=0.042$	$r=-0.789, P=0.062$	$r=-0.764, P=0.077$

[注] a : 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b : 与 48 h 组比较, $P < 0.05$; c : 与相同染毒质量浓度的 A549 细胞比较, $P < 0.05$; d : 与相同染毒质量浓度的硝酸银组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

纳米银表面容易被氧化, 在水、体液、生物体内很容易释放离子态银 (Ag^+)^[15-16]。生理因素 (离子、蛋白质等)、环境因素 (温度、pH、氧气等)、浓度、包被材料和时间对纳米银的离子释放都有影响^[17]。本研究首

先对纳米银在不同溶液 (包括 pH)、包被、质量浓度条件下以及细胞培养液中的银离子含量进行定量检测。结果发现, 纳米银在各溶液中的银离子含量与孵育时间呈正相关, 且纯水中的银离子含量要高于醋酸盐缓冲液。

本研究发现, nano-Ag20PVP 溶液孵育 24 h 后, 在去离子水中的银离子含量要远高于 10% 胎牛血清细胞培养液 (4.74% $>$ 0.01%)。胎牛血清里含有蛋白质、多肽、激素和氨基酸等物质, 因此推测是细胞培养液中的大分子和银离子产生络合作用, 或是银离子在培养液中形成银盐沉淀所致。

研究发现, A549 和 HepG2 细胞内银含量和银离子含量与染毒质量浓度呈正相关, 说明纳米银和银离子可以进入细胞。与 160 mg/L nano-Ag20PVP 培养液 24 h 银离子比率 (0.01%) 相比较, 两种细胞在该条件下细胞内银离子比率更高 (A549 细胞为 4.3%, HepG2 细胞为 2.5%), 这说明纳米银在细胞内存在银离子的进一步释放。有研究发现, 10 mg/L PVP 包被纳米银中银离子比率为 5.2%, 对人肝癌细胞染毒 24 h 后, 癌细胞内银离子比率为 10.3%^[18]。另有研究使用 10 mg/L 柠檬酸包被纳米银对人肝癌细胞染毒 24 h, 并使用相同银含量的硝酸银作为对照, 结果发现细胞摄取银含量相似^[19]。结合本实验研究, 说明纳米银和银离子不仅可以进入细胞, 并且纳米银在细胞内会进一步释放一定量的银离子。

为了研究纳米银的毒性是由其本身引起, 还是其

释放的银离子所致,或者是两者共同作用,本研究中使用 nano-Ag20PVP 给 A549 和 HepG2 两种细胞染毒,比较相同银含量的硝酸银(代表银离子)对细胞存活率的影响,发现相同银含量下,银离子比纳米银有更强的细胞毒作用。有研究报道银离子的毒性要远大于纳米银的毒性^[19],课题组使用纳米银对人肝癌细胞和人正常肝细胞的增殖与凋亡影响的研究也发现类似现象^[20],结合本实验研究结果,推测纳米银释放的银离子在细胞毒性上有重要作用。

综上所述,纳米银能在分散液中释放一定量的银离子,这种释放能力受自身属性及环境因素的影响。纳米银和银离子都可以被细胞摄取,进入细胞内的纳米银能更进一步的释放出银离子;由于银离子的高毒性,所以纳米银的毒性可能主要来自其释放的银离子。

参考文献

- [1] Liang GD, Bao SP, Tjong SC. Microstructure and properties of polypropylene composites filled with silver and carbon nanotube nanoparticles prepared by melt-compounding[J]. Mater Sci Eng B, 2007, 142(2/3): 55-61.
- [2] Lem KW, Choudhury A, Lakhani AA, et al. Use of nanosilver in consumer products[J]. Recent Pat Nanotechnol, 2012, 6(1): 60-72.
- [3] Pulit-Prociak J, Stokłosa K, Banach M. Nanosilver products and toxicity[J]. Environ Chem Lett, 2015, 13(1): 59-68.
- [4] Schluesener JK, Schluesener HJ. Nanosilver: application and novel aspects of toxicology[J]. Arch Toxicol, 2013, 87(4): 569-576.
- [5] 闫江梅,陶辉旺,曾牡玲,等. 纳米银催化氧化偶联硫醇制二硫化物[J]. 催化学报, 2009, 30(9): 856-858.
- [6] Han M, Lin H, Yuan Y, et al. Pressure drop for two phase counter-current flow in a packed column with a novel internal[J]. Chem Eng J, 2003, 94(3): 179-187.
- [7] McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver[J]. J Food Drug Anal, 2014, 22(1): 116-127.
- [8] Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival[J]. J Cell Physiol, 2002, 192(1): 1-15.
- [9] Chairuangkitti P, Lawanprasert S, Roytrakul S, et al. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways[J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(1): 330-338.
- [10] Sung JH, Ji JH, Park JD, et al. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles[J]. Toxicol Sci, 2009, 108(2): 452-461.
- [11] Sung JH, Ji JH, Yoon JU, et al. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles[J]. Inhal Toxicol, 2008, 20(6): 567-574.
- [12] 张姗姗,薛玉英,唐萌,等. 纳米银在小鼠体内的组织分布[J]. 东南大学学报(自然科学版), 2012, 42(2): 388-392.
- [13] Kittler S, Greulich C, Diendorf J, et al. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions[J]. Chem Mater, 2010, 22(16): 4548-4554.
- [14] Xin Q, Rotchell JM, Cheng JP, et al. Effects of silver nanoparticles and silver ions on the early development of zebrafish embryos and toxicity mechanisms[J]. Asian J Ecotoxicol, 2015, 10(4): 55-64.
- [15] Benn TM, Westethoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics[J]. Environ Sci Technol, 2008, 42(11): 4133-4139.
- [16] Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, et al. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Environ Sci Technol, 2008, 42(23): 8959-8964.
- [17] Liu J, Hurt RH. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids[J]. Environ Sci Technol, 2010, 44(6): 2169-2175.
- [18] Yu SJ, Chao JB, Sun J, et al. Quantification of the uptake of silver nanoparticles and ions to HepG2 cells[J]. Environ Sci Technol, 2013, 47(7): 3268-3274.
- [19] Vrček IV, Žuntar I, Petlevski R, et al. Comparison of *in vitro* toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells[J]. Environ Toxicol, 2016, 31(6): 679-692.
- [20] 黄艳梅,巩凡,张婷,等. 纳米银对人肝癌细胞及正常肝细胞增殖与凋亡的影响[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(9): 770-772.

(收稿日期: 2016-10-25; 录用日期: 2017-03-14)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 陶黎纳; 校对: 洪琪)