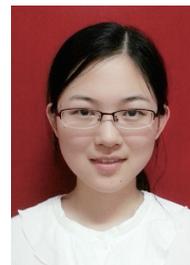


· 论 著 ·

硝酸银和不同粒径纳米银在大鼠体内的急性毒性作用及生物分布研究

李婷竹 巩凡 张帮勇 孙晋都 张婷 孔璐 薛玉英 唐萌



【摘要】 目的 探讨硝酸银和 2 种粒径纳米银对大鼠的急性毒性作用及蓄积靶器官。 方法 选取 36 只成年 SD 大鼠,按照随机数字表法分为小粒径纳米银组、大粒径纳米银组、硝酸银组和对照组,每组 9 只。上述 4 组大鼠分别经尾静脉一次性注射 10 mg/mL 纳米银溶液(纳米银颗粒直径为 20 nm,生理盐水配制),银注射剂量为 30 mg/kg;10 mg/mL 纳米银溶液(纳米银颗粒直径为 100 nm,生理盐水配制),银注射剂量为 30 mg/kg;1.67 mg/mL 硝酸银溶液(葡萄糖溶液配制),银注射剂量为 3 mg/kg;30 mg/mL 聚乙烯吡咯烷酮溶液(生理盐水配制),注射剂量为 90 mg/kg。(1)毒性实验。注射后 14 d 内每日行大体观察,记录注射前分别与注射后 1、7、14 d 的体质量差值。于注射后 1、7、14 d 每组各取 3 只大鼠,采用全自动生化分析仪检测血清中 ALT、AST、总蛋白、白蛋白含量;之后立即处死大鼠,取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和大脑组织,计算各个脏器系数。选取脏器系数变化明显的脏器标本,每组各时相点 3 个样本,行 HE 染色观察组织病理学变化。(2)生物分布实验。选取小粒径纳米银组、大粒径纳米银组、硝酸银组大鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏标本,每组各时相点 3 个样本,采用电感耦合等离子体质谱仪检测各脏器银含量。对数据行析因设计方差分析、LSD 检验、Dunnnett's T3 检验。 结果 (1)对照组和硝酸银组大鼠注射后大体情况无异常;2 个纳米银组大鼠注射后 1 d 出现状态不佳、眼部有黑色分泌物等现象,注射后 3 d 起恢复。(2)与对照组比较,硝酸银组、大粒径纳米银组大鼠注射后 14 d 与注射前的体质量差值明显减少(P 值均小于 0.01);小粒径纳米银组大鼠该指标则与之接近($P > 0.05$)。与对照组比较,另 3 组大鼠注射后 1、7 d 与注射前的体质量差值无明显变化(P 值均大于 0.05)。(3)与对照组比较,注射后 1 d 硝酸银组大鼠血清中总蛋白含量下降、肝脏系数明显上升(P 值均小于 0.05)。注射后 1 d,大粒径纳米银组大鼠血清中 ALT 含量为 (61.0 ± 8.7) U/L,明显高于对照组的 (40.0 ± 4.6) U/L, $P < 0.01$ 。与对照组的 (126.0 ± 3.5) U/L、 4.05 ± 0.23 比较,注射后 1 d 小粒径纳米银组、大粒径纳米银组大鼠血清中 AST 含量明显上升 $[(249.7 \pm 107.2)、(237.0 \pm 38.3)$ U/L],肝脏系数 $(3.50 \pm 0.38、3.31 \pm 0.07)$ 明显下降, P 值均小于 0.05。与对照组的 (69.2 ± 4.8) U/L、 4.32 ± 0.39 比较,注射后 7 d 小粒径纳米银组、大粒径纳米银组大鼠血清中 AST 含量 $[(181.0 \pm 51.5)、(167.7 \pm 16.5)$ U/L] 亦明显上升,肝脏系数 $(3.55 \pm 0.18、3.62 \pm 0.21)$ 亦明显下降, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。与对照组比较,注射后 14 d 另 3 组大鼠血清中 4 项肝脏生化指标、各个脏器系数均无明显变化(P 值均大于 0.05)。(4)注射后 1 d,硝酸银组大鼠肝脏有轻微变性;注射后 7 d,小粒径纳米银组大鼠肝脏中央静脉周围肝细胞轻微变性,大粒径纳米银组大鼠肝脏肝细胞重度嗜酸性变。其余时相点各组大鼠的肝脏无明显病理改变。(5)注射后 1 d,小粒径纳米银组大鼠肺脏、肾脏与大粒径纳米银组大鼠脾脏、肾脏及注射后 7 d 2 个纳米银组大鼠心脏、肾脏的银含量明显少于硝酸银组(P 值均小于 0.05),注射后 14 d 小粒径纳米银组大鼠肝脏、脾脏的银含量明显多于硝酸银组(P 值均小于 0.05)。与硝酸银组比较,大粒径纳米银组大鼠注射后 1 d 肺脏及注射后 7 d 肝脏的银含量明显增多(P 值均小于 0.05),注射后 14 d 各脏器银含量无明显变化(P 值均大于 0.05)。大粒径纳米银组大鼠注射后 1 d 心脏、肺脏、肾脏及注射后 7 d 心脏的银含量明显多于小粒径纳米银组(P 值均小于 0.05),注射后 14 d 2 组大鼠各脏器银含量相近(P 值均大于 0.05)。 结论 硝酸银和 2 种粒径的纳米银对大鼠的肝脏有短暂的急性毒性作用,肝脏对这种毒性作用有一定的自愈能力。纳米银主要蓄积于肝脏,大粒径纳米银在脏器中的分布较小粒径纳米银更广。

【关键词】 金属纳米粒子; 银; 硝酸银; 毒性作用; 生物分布

DOI:10.3760/ema.j.issn.1009-2587.2016.10.007

作者单位:210009 南京,环境医学工程教育部重点实验室,东南大学公共卫生学院 & 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

通信作者:薛玉英,Email:yyxue@seu.edu.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2011CB933404); 国家自然科学基金 (81573186、81502783、81473003、81302461); 江苏省普通高校研究生科研创新计划 (SJLX15-0073)

Acute toxicity and bio-distribution of silver nitrate and nano-silver with different particle diameters in rats Li Tingzhu, Gong Fan, Zhang Bangyong, Sun Jindu, Zhang Ting, Kong Lu, XueYuying, Tang Meng. Key Laboratory of Environmental Medicine and Engineering, Ministry of Education, School of Public Health & Collaborative Innovation Center of Suzhou Nano Science and Technology, Southeast University, Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, Nanjing 210009, China

Corresponding author: XueYuying, Email: yyxue@seu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the acute toxic effect and the cumulative target organ of silver nitrate and nano-silver with two different particle diameters in rats. **Methods** Thirty-six adult SD rats were divided into small particle size nano-silver group (SNS), large particle size nano-silver group (LNS), silver nitrate group (SN), and control group (C) according to the random number table, with 9 rats in each group. The rats of the four groups were respectively injected with 10 mg/mL nano-silver solution (particle diameter of 20 nm, prepared by saline) in silver dose of 30 mg/kg by tail vein for once, 10 mg/mL nano-silver solution (particle diameter of 100 nm, prepared by saline) in silver dose of 30 mg/kg, 1.67 mg/mL silver nitrate solution (prepared by glucose solution) in silver dose of 3 mg/kg, and 30 mg/mL polyvinylpyrrolidone solution (prepared by saline) in dose of 90 mg/kg. (1) Toxicity test. The general observation was performed within 14 days after injection, and the deviation between value of body mass before injection and each of that on post injection day (PID) 1, 7, and 14 were respectively recorded. On PID 1, 7, and 14, 3 rats of each group were harvested for determination of serum content of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein, and albumin by fully automatic biochemical analyzer. Then the rats were sacrificed immediately, and heart tissue, liver tissue, spleen tissue, lung tissue, kidney tissue, and brain tissue were collected to calculate the organ coefficient. Organ samples with obvious changes in organ coefficient were collected for histopathological observation by HE staining, with 3 samples in each group at each time point. (2) Bio-distribution. The specimens of heart, liver, spleen, lung, and kidney of rats from groups SNS, LNS, and SN were collected for detection of silver content by inductively coupled plasma mass spectrometry, with 3 samples in each group at each time point. Data were processed with analysis of variance of factorial design, LSD test, and Dunnett's T3 test. **Results** (1) The general condition of rats in groups C and SN after injection were normal. The state of rats of groups SNS and LNS was poor with black secretion in the eye and other phenomena on PID 1, which recovered from PID 3 on. (2) The deviations between values of body mass before injection and that on PID 14 in rats of groups LNS and SN were significantly decreased as compared with deviation of group C (with P values below 0.01), but deviation of group SNS was not significantly changed ($P > 0.05$). The deviations between values of body mass before injection and each of that on PID 1 and 7 in rats in the other three groups were similar to those in group C (with P values above 0.05). (3) Compared with those in group C, the serum content of total protein of rats in group SN on PID 1 was significantly decreased, and liver coefficient was significantly increased (with P values below 0.05). On PID 1, the serum content of ALT of rats in group LNS was (61.0 ± 8.7) U/L, which was significantly higher than that in group C [(40.0 ± 4.6) U/L, $P < 0.01$]. Compared with those in group C [(126.0 ± 3.5) U/L and 4.05 ± 0.23], the serum content of AST of rats in groups SNS and LNS on PID 1 [(249.7 ± 107.2) and (237.0 ± 38.3) U/L] was significantly increased, and liver coefficients (3.50 ± 0.38 and 3.31 ± 0.07) were significantly decreased, with P values below 0.05. Compared with those in group C [(69.2 ± 4.8) U/L and 4.32 ± 0.39], the serum content of AST of rats in groups SNS and LNS on PID 7 [(181.0 ± 51.5) and (167.7 ± 16.5) U/L] was also significantly increased, and liver coefficients (3.55 ± 0.18 and 3.62 ± 0.21) were also significantly decreased, $P < 0.05$ or $P < 0.01$. On PID 14, the four liver biochemical indexes in serum and all organ coefficients of rats in the other three groups were similar to those in group C (with P values above 0.05). (4) The liver of rats in group SN had slight degeneration on PID 1, the liver cells around the central vein of liver of rats in group SNS had slight degeneration on PID 7, and the liver cells got severely eosinophilic degeneration in liver of rats in group LNS on PID 7. There was no significant pathological change in the liver of rats in each group at the rest time points. (5) The silver content of lung and kidney in rats of group SNS on PID 1, that of spleen and kidney in rats of group LNS on PID 1, and that of heart and kidney in rats of groups LNS and SNS on PID 7 was significantly less than that of group SN (with P values below 0.05). The silver content of liver and spleen in rats of group SNS on PID 14 was significantly more than that of group SN (with P values below 0.05). Compared with that of group SN, the silver content of lung on PID 1 and liver on PID 7 in rats of group LNS was significantly increased (with P values below 0.05). On PID 14, there was no significant change in the silver content of all organs of rats between group SN and group LNS (with P values above 0.05). The silver con-

tent of heart, lung, and kidney on PID 1 and heart on PID 7 in rats of group LNS was significantly more than that of group SNS (with P values below 0.05). On PID 14, the silver content of each organ of rats in group SNS was close to that in group LNS (with P values above 0.05). **Conclusions** Silver nitrate and nano-silver with two different particle diameters have a short acute toxic effect on the liver of rats, and the liver has certain ability of self-healing. Nano-silver is mainly accumulated in the liver. The distribution of nano-silver with large particle diameter in organs is more widely than that of nano-silver with small particle diameter.

【Key words】 Metal nanoparticles; Silver; Silver nitrate; Toxic actions; Bio-distribution

Fund program: National Basic Research Program of China (2011CB933404); National Natural Science Foundation of China (81573186, 81502783, 81473003, 81302461); Scientific Research Innovation Program for College Graduates of Jiangsu Province (SJLX15-0073)

随着纳米科技的不断发展,纳米产品逐渐进入到人们的日常生活之中,纳米银产品作为其中应用最广泛的产品之一,与人体接触的机会也越来越多^[1]。纳米银单体和析出的银离子可能与人体内不同的组织和细胞以及生物分子交互作用,给人体带来一定影响,特别是生物医疗领域的纳米银和银离子产品如含银离子敷料和纳米银凝胶等^[2-3]应用于烧伤创面的治疗,可能直接进入体液;近年来纳米银产品的应用还由体外消毒灭菌扩大到体内抗感染治疗^[4],如将含纳米银的骨水泥植入人体^[5]。本实验通过对大鼠经尾静脉注射不同粒径纳米银和硝酸银进行急性毒性实验,评价纳米银对大鼠的急性毒性作用,并了解纳米银可能蓄积的靶器官。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器来源

聚乙烯吡咯烷酮(PVP)购自国药集团化学试剂有限公司,直径 20 nm 纳米银颗粒(PVP 包被,银质量分数为 25.0%)购自上海沪正纳米科技有限公司,直径 100 nm 纳米银颗粒(银质量分数为 99.5%)购自美国 Sigma 公司,硝酸银购自上海化学试剂有限公司试剂一厂。7150 型全自动生化分析仪购自日本日立公司,FSX100 型智能生物图像导航仪购自日本 Olympus 公司,NexION 300X 型电感耦合等离子体质谱仪购自美国 PerkinElmer 公司。

1.2 动物分组及处理

36 只清洁级雄性成年 SD 大鼠,体质量 300 g 左右,购自上海杰思捷实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2012-0006。大鼠饲养于东南大学医学院实验动物中心,自由摄入标准饲料和饮用灭菌去离子水。饲养环境:温度(22.0 ± 2.0) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(65 ± 10)%,正常通风换气,人工昼/夜每日各 12 h。采用随机数字表法将 36 只大鼠分为小粒径纳米银组、大粒径纳米银组、硝酸银组和对照组,每组 9 只,称取体质量后分别经尾静脉一次性注射 10 mg/mL

纳米银溶液(纳米银颗粒直径为 20 nm,生理盐水配制),银注射剂量为 30 mg/kg;10 mg/mL 纳米银溶液(纳米银颗粒直径为 100 nm,生理盐水配制),银注射剂量为 30 mg/kg;1.67 mg/mL 硝酸银溶液(50 g/L 葡萄糖溶液配制),银注射剂量为 3 mg/kg;30 mg/mL PVP 溶液(生理盐水配制),注射剂量为 90 mg/kg。配制纳米银溶液时,将粉体溶于生理盐水中振荡后,超声处理 1 min 以达到稳定状态。

1.3 检测指标

1.3.1 大体观察及注射前后体质量变化 注射后 14 d 内每日观察大鼠的外观、行为、食量等情况。于注射后 1、7、14 d 称取各组大鼠的体质量,记录注射前与注射后各时相点的体质量差值。

1.3.2 血清 4 项肝脏生化指标及脏器系数 于注射后 1、7、14 d 每组各取 3 只大鼠经股动脉取全血制备血清,采用全自动生化分析仪检测 ALT、AST、总蛋白、白蛋白含量;随后立即处死大鼠,解剖取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和大脑组织,称取质量并计算各个脏器系数。脏器系数 = 脏器湿质量 \div 各时相点的大鼠体质量。

1.3.3 组织病理学观察 选择 1.3.2 脏器系数变化明显的脏器标本,每组各时相点 3 个样本。置于体积分数 10% 甲醛溶液中固定,随后石蜡包埋、切片(厚度为 5 μm)并行 HE 染色,采用生物图像导航仪观察各脏器组织病理学变化。

1.3.4 各脏器组织中的银含量 取 1.3.2 中小粒径纳米银组、大粒径纳米银组、硝酸银组大鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏标本 100 ~ 200 mg,每组各时相点 3 个样本。放入锥形瓶中,加入体积分数 65% 硝酸约 5 mL,静置于避光处过夜,次日加入 2 mL 体积分数 30% 过氧化氢。将混合物置于 200 $^{\circ}\text{C}$ 电热板上加热消解挥发,直到锥形瓶中的混合物体积约 1 mL 转移至试管中,使用体积分数 2% 硝酸定容至 10 mL,采用电感耦合等离子体质谱仪联用标准银溶液绘制的标准曲线,检测银含量^[6-7],结果以

各脏器组织银含量与各组大鼠银注射剂量的比值表示^[8]。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 21.0 统计软件行析因设计方差分析;组间两两比较,方差齐时采用 LSD 检验(软件自动略去该统计量值),方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验(软件自动略去该统计量值)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体指标和注射前后体质量变化

对照组和硝酸银组大鼠注射后毛色、状态、摄食和饮水均无异常。2 个纳米银组大鼠注射后 1 d 毛色轻微灰暗,状态不佳,摄食和饮水减少,眼部有黑色分泌物;注射后 3 d 起恢复。与对照组比较,硝酸银组、大粒径纳米银组大鼠注射后 14 d 与注射前的体质量差值明显减少(P 值均小于 0.01);小粒径纳米银组大鼠该指标则与之接近(P > 0.05)。与对照组比较,另 3 组大鼠注射后 1、7 d 与注射前的体质量差值无明显变化(P 值均大于 0.05)。见表 1。

2.2 血清 4 项肝脏生化指标

注射后 1 d,与对照组比较,硝酸银组大鼠血清中总蛋白含量明显下降,小粒径纳米银组大鼠血清中 AST 含量明显上升,大粒径纳米银组大鼠血清中 ALT 和 AST 含量均明显上升, P < 0.05 或 P < 0.01。注射后 7 d,与对照组比较,小粒径纳米银组和大粒径纳米银组大鼠血清中 AST 含量明显上升

表 1 各组大鼠注射前与注射后各时相点的体质量差值比较(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	注射后 1 d	注射后 7 d	注射后 14 d
对照组	36.7 ± 11.4	46.2 ± 18.6	78.2 ± 25.9
硝酸银组	30.7 ± 5.9	9.5 ± 11.0	-1.5 ± 2.0 ^a
小粒径纳米银组	52.0 ± 18.0	22.3 ± 11.6	53.3 ± 14.4
大粒径纳米银组	31.3 ± 17.6	30.0 ± 31.8	8.7 ± 4.0 ^a

注:各组注射后 1、7、14 d 的鼠数分别为 9、6、3 只;处理因素主效应, F = 0.744, P > 0.05;时间因素主效应, F = 1.879, P > 0.05;两者交互作用, F = 5.907, P < 0.01;与对照组比较,^aP < 0.01

(P 值均小于 0.01)。与对照组比较,注射后 14 d 另 3 组大鼠血清 4 项肝脏生化指标无明显变化(P 值均大于 0.05)。见表 2。

2.3 脏器系数

注射后 1 d,与对照组比较,硝酸银组大鼠的肝脏系数明显上升,而小粒径纳米银组和大粒径纳米银组大鼠的肝脏系数明显下降(P 值均小于 0.05);注射后 7 d,与对照组比较,小粒径纳米银组和大粒径纳米银组大鼠肝脏系数明显下降(P 值均小于 0.05)。与对照组比较,注射后 14 d 另 3 组大鼠各个脏器系数无明显变化(P 值均大于 0.05)。见表 3。

2.4 肝脏病理的改变

注射后 1 d,2 个纳米银组大鼠肝脏未见明显病理改变,与对照组(图 1A)相似;硝酸银组大鼠肝脏有轻微变性(图 1B)。注射后 7 d,小粒径纳米银组大鼠肝脏中央静脉周围肝细胞轻微变性(图 1C),大粒径纳米银组大鼠肝脏肝细胞重度嗜酸性变(图

表 2 各组大鼠各时相点血清中 4 项肝脏生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别与时相点	样本数	ALT(U/L)	AST(U/L)	总蛋白(g/L)	白蛋白(g/L)
对照组	9				
注射后 1 d		40.0 ± 4.6	126.0 ± 3.5	56.67 ± 2.52	19.00 ± 1.00
注射后 7 d		51.3 ± 4.5	69.2 ± 4.8	55.33 ± 2.31	18.33 ± 0.58
注射后 14 d		44.7 ± 2.5	87.0 ± 5.7	58.33 ± 6.03	19.00 ± 3.61
硝酸银组	9				
注射后 1 d		38.7 ± 6.7	184.0 ± 57.4	51.33 ± 2.52 ^b	18.00 ± 0.03
注射后 7 d		37.0 ± 5.0	64.5 ± 2.1	52.33 ± 4.04	18.00 ± 1.73
注射后 14 d		35.7 ± 4.6	88.7 ± 35.4	59.33 ± 2.31	18.00 ± 1.73
小粒径纳米银组	9				
注射后 1 d		38.3 ± 1.5	249.7 ± 107.2 ^b	58.33 ± 3.79	17.33 ± 2.52
注射后 7 d		39.0 ± 3.6	181.0 ± 51.5 ^a	57.00 ± 1.00	20.00 ± 1.00
注射后 14 d		88.3 ± 8.1	99.7 ± 31.2	57.00 ± 2.00	20.00 ± 1.00
大粒径纳米银组	9				
注射后 1 d		61.0 ± 8.7 ^a	237.0 ± 38.3 ^b	55.00 ± 1.00	18.67 ± 0.58
注射后 7 d		76.0 ± 10.4	167.7 ± 16.5 ^a	57.00 ± 1.00	17.67 ± 1.53
注射后 14 d		37.0 ± 7.0	91.3 ± 34.0	54.00 ± 0.03	17.67 ± 1.53

注:每组各时相点样本数为 3;ALT、AST、总蛋白、白蛋白处理因素主效应, F 值分别为 21.765、7.504、2.280、0.150, P 值分别为 < 0.01、< 0.01、> 0.05、> 0.05;时间因素主效应, F 值分别为 4.667、19.142、1.654、0.551, P 值分别为 < 0.05、< 0.01、> 0.05、> 0.05;两者交互作用, F 值分别为 31.327、1.768、2.558、1.330, P 值分别为 < 0.01、> 0.05、< 0.05、> 0.05;与对照组比较,^aP < 0.01,^bP < 0.05

表 3 各组大鼠各时相点脏器系数比较($\bar{x} \pm s$)

组别与时相点	样本数	心脏	肝脏	脾脏	肺脏	肾脏	大脑
对照组	9						
注射后 1 d		0.43 ± 0.06	4.05 ± 0.23	0.21 ± 0.04	0.47 ± 0.07	0.80 ± 0.06	0.66 ± 0.04
注射后 7 d		0.36 ± 0.03	4.32 ± 0.39	0.25 ± 0.06	0.45 ± 0.06	0.70 ± 0.06	0.59 ± 0.11
注射后 14 d		0.37 ± 0.03	3.89 ± 0.14	0.24 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.78 ± 0.03	0.62 ± 0.03
硝酸银组	9						
注射后 1 d		0.40 ± 0.05	4.65 ± 0.35 ^a	0.23 ± 0.03	0.51 ± 0.11	0.85 ± 0.09	0.65 ± 0.03
注射后 7 d		0.36 ± 0.03	4.61 ± 0.57	0.21 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.72 ± 0.05	0.60 ± 0.04
注射后 14 d		0.40 ± 0.04	3.66 ± 0.29	0.31 ± 0.17	0.45 ± 0.03	0.80 ± 0.05	0.57 ± 0.05
小粒径纳米银组	9						
注射后 1 d		0.54 ± 0.25	3.50 ± 0.38 ^a	0.26 ± 0.04	0.49 ± 0.06	0.83 ± 0.05	0.70 ± 0.05
注射后 7 d		0.37 ± 0.03	3.55 ± 0.18 ^a	0.22 ± 0.03	0.44 ± 0.07	0.74 ± 0.07	0.61 ± 0.04
注射后 14 d		0.41 ± 0.04	3.49 ± 0.35	0.19 ± 0.03	0.44 ± 0.04	0.77 ± 0.03	0.56 ± 0.03
大粒径纳米银组	9						
注射后 1 d		0.41 ± 0.07	3.31 ± 0.07 ^a	0.25 ± 0.03	0.48 ± 0.06	0.75 ± 0.04	0.63 ± 0.03
注射后 7 d		0.40 ± 0.05	3.62 ± 0.21 ^a	0.23 ± 0.04	0.50 ± 0.06	0.76 ± 0.03	0.56 ± 0.03
注射后 14 d		0.33 ± 0.03	3.59 ± 0.39	0.22 ± 0.04	0.46 ± 0.03	0.73 ± 0.03	0.63 ± 0.06

注:每组各时相点样本数为 3;心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大脑处理因素主效应, F 值分别为 1.022、14.320、0.306、1.963、1.132、1.048, 除肾脏对应 P 值小于 0.01 外,其余 P 值均大于 0.05;时间因素主效应, F 值分别为 2.652、3.930、0.150、2.222、2.891、10.614, P 值分别为 >0.05 、 <0.05 、 >0.05 、 >0.05 、 >0.05 、 <0.01 ;两者交互作用, F 值分别为 0.771、2.437、1.098、0.880、0.970、2.591,除大脑对应 P 值小于 0.05 外,其余 P 值均大于 0.05;与对照组比较, ^a $P < 0.05$

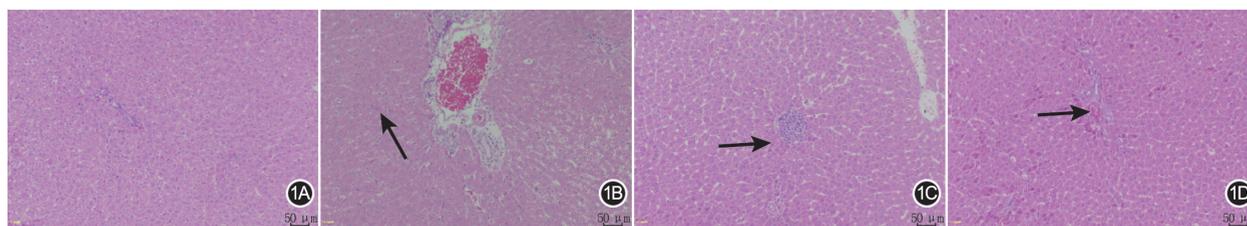


图 1 注射后 4 组大鼠肝脏组织病理学变化 HE × 100, 图中标尺为 50 μm。1A. 注射后 1 d, 对照组大鼠肝脏组织正常;1B. 注射后 1 d, 硝酸银组大鼠肝脏轻微变性(↑);1C. 注射后 7 d, 小粒径纳米银组大鼠肝脏中央静脉周围肝细胞轻微变性(→);1D. 注射后 7 d, 大粒径纳米银组大鼠肝脏肝细胞重度嗜酸性变(→)

1D), 硝酸银组大鼠肝脏未见明显病理改变。注射后 14 d, 另 3 组大鼠肝脏与对照组相似, 未见明显病理改变。

2.5 各脏器组织中的银含量

小粒径纳米银组大鼠注射后 1 d 肺脏、肾脏的银含量及注射后 7 d 心脏、肾脏的银含量明显少于硝酸银组 (P 值均小于 0.05), 而注射后 14 d 肝脏、脾脏的银含量明显多于硝酸银组 (P 值均小于 0.05)。大粒径纳米银组大鼠注射后 1 d 脾脏、肾脏的银含量及注射后 7 d 心脏、肾脏的银含量明显少于硝酸银组 (P 值均小于 0.05), 注射后 1 d 肺脏的银含量、注射后 7 d 肝脏的银含量明显多于硝酸银组 (P 值均小于 0.05), 注射后 14 d 2 组大鼠各脏器银含量差异无统计学意义 (P 值均大于 0.05)。大粒径纳米银组大鼠注射后 1 d 心脏、肺脏、肾脏的银含量及注射后 7 d 心脏的银含量明显多于小粒径纳米银组 (P 值均小于 0.05), 该 2 组大鼠注射后 14 d

各脏器银含量相近 (P 值均大于 0.05)。见表 4。

3 讨论

急性毒性试验是了解外源性化学物质对机体产生急性毒性的根本依据, 是毒理学安全性评价的基础工作, 可以在较短的时间内获得较多有价值的资料和信息。PVP 作为常用药用辅料, 大鼠静脉注射的最低中毒剂量为 750 mg/kg^[9]。本课题组之前的研究显示, 小剂量的 PVP 对肝细胞无毒性作用^[10], 故本研究对照组 PVP 给药剂量为 90 mg/kg。本研究显示, 注射后 14 d, 与对照组比较, 硝酸银组和大粒径纳米银组大鼠体质量变化显著。硝酸银组大鼠的体质量下降过于明显, 可能归因于样本量小, 有待后期增加样本进一步实验观察。Tiwari 等^[11]观察到静脉注射直径 15 ~ 40 nm 纳米银 16 d, 注射剂量大于或等于 20 mg/kg 对大鼠体质量有影响。本实验采用的纳米银注射剂量为 30 mg/kg, 其中大粒径纳

表 4 各组大鼠各时相点各脏器银含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别与时相点	样本数	心脏	肝脏	脾脏	肺脏	肾脏
硝酸银组	9					
注射后 1 d		0.44 ± 0.11	4.14 ± 0.76	7.33 ± 0.30	2.70 ± 0.50	0.79 ± 0.05
注射后 7 d		0.46 ± 0.03	1.14 ± 0.31	1.37 ± 0.10	0.89 ± 0.33	0.78 ± 0.04
注射后 14 d		0.17 ± 0.06	0.65 ± 0.41	1.66 ± 0.85	0.20 ± 0.06	1.05 ± 0.57
小粒径纳米银组	9					
注射后 1 d		0.05 ± 0.03	16.95 ± 3.16	5.93 ± 1.48	0.44 ± 0.22 ^a	0.15 ± 0.03 ^a
注射后 7 d		0.05 ± 0.03 ^a	17.40 ± 6.42	14.25 ± 3.75	0.19 ± 0.03	0.13 ± 0.11 ^a
注射后 14 d		0.05 ± 0.03	13.59 ± 9.38 ^a	7.59 ± 5.34 ^a	0.14 ± 0.06	0.20 ± 0.09
大粒径纳米银组	9					
注射后 1 d		0.20 ± 0.03 ^b	3.49 ± 0.37	2.07 ± 0.58 ^a	12.05 ± 2.22 ^{ab}	0.28 ± 0.04 ^{ab}
注射后 7 d		0.11 ± 0.03 ^{ab}	2.61 ± 0.27 ^a	1.59 ± 0.38	0.70 ± 0.47	0.08 ± 0.03 ^a
注射后 14 d		0.04 ± 0.03	1.83 ± 0.40	1.37 ± 0.15	0.17 ± 0.08	0.03 ± 0.03

注:每组各时相点样本数为 3;表中数据以银含量与银注射剂量的比值表示;心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏处理因素主效应, F 值分别为 85.306、22.187、17.032、47.009、28.664, P 值均小于 0.01;时间因素主效应, F 值分别为 19.553、0.717、1.383、76.848、0.399, P 值分别为 <0.01、>0.05、>0.05、<0.01、>0.05;两者交互作用, F 值分别为 8.328、0.145、4.615、42.757、0.920, P 值分别为 <0.01、>0.05、<0.01、<0.01、>0.05;与硝酸银组比较,^a P <0.05;与小粒径纳米银组比较,^b P <0.05

米银组出现明显的大鼠体质量变化,由此说明,静脉注射纳米银在一定剂量下可能会影响大鼠生长。

脏器系数是毒理实验中常用指标,具有简单敏感的特点,是研究外源性化学物质靶器官的指标之一^[12]。吉俊伟等^[13]通过给小鼠鼻腔滴注纳米氧化铝,观察到各注射剂量组小鼠的肝脏系数均下降,解剖见肝脏有淤血,表明肝脏系数下降对肝脏毒性有一定的指示作用。本实验中,与对照组比较,注射后 1 d 硝酸银组大鼠的肝脏系数增大,说明硝酸银可能引起大鼠肝脏充血、水肿等反应;注射后 1、7 d,小粒径纳米银组和大粒径纳米银组大鼠的肝脏系数明显下降,提示肝脏受到一定程度的急性损伤。注射后 7、14 d 硝酸银组大鼠和注射后 14 d 2 个纳米银组大鼠分别与对照组肝脏系数接近,大体观察中 2 个纳米银组大鼠注射后 1 d 出现状态不佳等异常现象但于注射后 3 d 起恢复,可能是由于硝酸银和 2 种粒径纳米银在大鼠体内代谢较快,提示大鼠肝脏对硝酸银和 2 种粒径纳米银的毒性作用有自愈能力。

在前期研究中,笔者观察到小鼠肝脏可能是纳米银的靶器官^[7],故本研究针对肝脏进行了 4 项血生化指标检测及组织病理学检查。血清生化指标检测显示注射后 1、7 d,小粒径纳米银组和大粒径纳米银组大鼠血清中 AST 含量均明显上升,注射后 1 d 大粒径纳米银组大鼠血清中 ALT 含量也明显上升,与其他研究结果^[14-15]基本一致。本课题组在之前的实验中也观察到纳米银能够引发体外培养的肝细胞凋亡^[16],此说明大鼠注射剂量为 30 mg/kg 的 2 种粒径纳米银时,肝脏是主要的靶器官。本研究组织病

理学结果显示,2 个纳米银组大鼠注射后 7 d 肝组织发生了变性。Patlolla 等^[14]的研究也观察到,口服 50 mg/kg 和 100 mg/kg 纳米银后,大鼠肝脏门静脉发生了一定的损伤。故笔者推测 2 种粒径纳米银均能在短时间内作用于肝脏,使肝脏细胞受损。本实验中硝酸银组大鼠血清中的 AST 和 ALT 与对照组接近,只有总蛋白含量于注射后 1 d 下降,与 van der Zande 等^[8]经口给予硝酸银和纳米银的研究结果有所不同,需后续实验验证。注射后 14 d,硝酸银组及 2 个纳米银组大鼠血清中 4 项肝脏生化指标含量与对照组接近,且组织病理学检查未观察到肝脏有明显的病理改变,也再次证明肝脏对硝酸银和 2 种粒径纳米银的毒性作用有自愈能力。

本课题组在前期预实验时选择 5 mg/kg 硝酸银对大鼠行尾静脉注射,24 h 内大鼠全部死亡。后采用 3 mg/kg 剂量染毒,24 h 内大鼠状态良好,未发生死亡,因此本实验选择纳米银(30 mg/kg)剂量 10% 的硝酸银进行对比实验。为便于比较,笔者将各脏器银含量进行标准化处理,即将银含量除以银制剂注射剂量。结果显示,2 种粒径纳米银均比硝酸银更易聚集在肝脏中,提示肝脏可能是纳米银作用潜在的主要靶器官。此外,小粒径纳米银较硝酸银还易聚集于脾脏、大粒径纳米银较硝酸银还易聚集于肺脏,且大粒径纳米银在脏器中的分布较小粒径纳米银更广,可见粒径大小影响纳米银颗粒在各个器官中的聚集程度。

综上,硝酸银和 2 种粒径纳米银对大鼠的肝脏有短暂的急性毒性作用,肝脏对这种毒性作用有一

定的自愈能力。纳米银主要蓄积于肝脏,粒径大小影响纳米银在脏器中的聚集程度,大粒径纳米银在脏器中的分布较小粒径纳米银更广。

参考文献

- [1] Mishra A, Sardar M. Cellulase assisted synthesis of nano-silver and gold: application as immobilization matrix for biocatalysis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 77: 105-113. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.03.014.
- [2] 吕庆兵, 于冶, 肖贵喜, 等. 浸浴结合银离子敷料治疗大面积烧伤患者残余创面的疗效[J]. *中华烧伤杂志*, 2013, 29(2): 203-204. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2013.02.027.
- [3] 张劲峰, 郝建波, 张劲鹏, 等. 生物敷料的研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2015, 29(2): 254-259. DOI: 10.7507/1002-1892.20150053.
- [4] 有传刚, 韩春茂, 王新刚, 等. 纳米银的抗菌和毒性机制及临床研究进展[J]. *中华烧伤杂志*, 2011, 27(3): 243-246. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2011.03.031.
- [5] 王守立. 纳米银骨水泥预防关节置换术后感染的实验研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [6] Xue Y, Zhang S, Huang Y, et al. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice[J]. *J Appl Toxicol*, 2012, 32(11): 890-899. DOI: 10.1002/jat.2742.
- [7] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1001-0505.2012.02.037.
- [8] van der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, et al. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(8): 7427-7442. DOI: 10.1021/nn302649p.
- [9] 硅谷高科技公司. 化学物质毒性数据库 [DB/OL]. 旧金山: 硅谷高科技公司, 2016 [2016-02-03]. <http://www.drugfuture.com/toxic/q102-q445.html>.
- [10] 张帮勇, 巩凡, 黄艳梅, 等. 纳米银对肝细胞体外增殖作用的实验研究[J]. *环境与健康杂志*, 2014, 31(10): 897-900. DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2014.10.025.
- [11] Tiwari DK, Jin T, Behari J. Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2011, 21(1): 13-24. DOI: 10.3109/15376516.2010.529184.
- [12] 恽时锋, 胡玉红, 田小芸. 不同品种实验兔主要脏器重量及脏器系数的研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2004, 14(6): 350-354. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2004.06.010.
- [13] 吉俊伟, 张勤丽, 高福平, 等. 纳米氧化铝致小鼠脏器毒性的基本病理变化[J]. *毒理学杂志*, 2011, 25(6): 442-447. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2011.06.018.
- [14] Patlolla AK, Hackett D, Tchounwou PB. Silver nanoparticle-induced oxidative stress-dependent toxicity in Sprague-Dawley rats [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 399(1/2): 257-268. DOI: 10.1007/s11010-014-2252-7.
- [15] Yarmohammadi P, Arabi M, Yarmohammadi P. Subacute dermal toxicity investigation of nanosilver on serum chemical biomarkers in male mice[J]. *Nanomed J*, 2014, 1(4): 285-291.
- [16] 巩凡, 张帮勇, 黄艳梅, 等. 纳米银在 HepG2 和 L02 细胞中的生物分布及凋亡作用研究[J]. *环境与健康杂志*, 2014, 31(10): 893-896. DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2014.10.024.

(收稿日期: 2016-02-03)

(本文编辑: 莫恩)

本文引用格式

李婷竹, 巩凡, 张帮勇, 等. 硝酸银和不同粒径纳米银在大鼠体内的急性毒性作用及生物分布研究[J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(10): 606-612. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.10.007.

Li TZ, Gong F, Zhang BY, et al. Acute toxicity and bio-distribution of silver nitrate and nano-silver with different particle diameters in rats[J]. *Chin J Burns*, 2016, 32(10): 606-612. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.10.007.

· 科技快讯 ·

黏着斑激酶和类固醇激素受体共活化因子同时失活 能改善增生性瘢痕形成

增生性瘢痕是一种严重的皮肤纤维化疾病, 由于其分子机制不明确目前尚无满意的治疗手段。黏着斑激酶(FAK)和类固醇激素受体共活化因子(Src)是 2 个重要的非受体酪氨酸激酶, 可能参与增生性瘢痕形成的病理过程。作者观察到 FAK 和 Src 在增生性瘢痕中被激活, 正常皮肤的 Fb 在经过 TGF- β_1 刺激后细胞中 FAK/Src 也能被激活。免疫共沉淀和双标记免疫荧光染色揭示了增生性瘢痕中 FAK 与 Src 表达增强且分布一致。运用基因过表达及定点突变的方法, 作者又研究了 FAK/Src 的激活及其相互作用对增生性瘢痕发病机制的影响。结果表明, 与单独转染野生型或突变型 FAK/Src 比较, 只有同时过表达非磷酸化突变型 FAK Y407F 和磷酸化突变型 Src y529E 才能显著下调体外培养的增生性瘢痕 Fb 中 I 型胶原、III 型胶原及 α 平滑肌肌动蛋白的表达。FAK 和 Src 同时失活能减少增生性瘢痕组织中 ECM 沉积, 并使胶原纤维排列更有序。光甘草定能够阻止肿瘤组织中 FAK/Src 复合物形成, 然而在增生性瘢痕的治疗中, 光甘草定可能是通过对 FAK/Src 复合物的灭活作用, 导致 FAK/Src 复合物共同作用减弱来发挥作用的。该研究表明, FAK/Src 复合物可以作为一个潜在的分子靶点, 使 2 个物质双失活可能是治疗增生性瘢痕的新策略。

李琼, 编译自《Sci Rep》, 2016, 6:26023; 韩春茂, 审校