

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20171124002

王秀娟, 李婷竹, 陆强, 等. 纳米银和 PVP 包被纳米银对 HepG2 细胞遗传毒性的比较研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(3): 94-102

Wang X J, Li T Z, Lu Q, et al. Comparative study on the genetic toxicity of nano silver and PVP coated silver nanoparticles to HepG2 cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(3): 94-102 (in Chinese)

纳米银和 PVP 包被纳米银对 HepG2 细胞遗传毒性的比较研究

王秀娟^{1,2,3}, 李婷竹^{1,2,3}, 陆强^{1,2,3}, 苏雪荣^{1,2,3}, 薛玉英^{1,2,3,*}, 唐萌^{1,2,3}

1. 环境医学工程教育部重点实验室, 南京 210009
2. 东南大学公共卫生学院 & 苏州纳米科技协同创新中心, 南京 210009
3. 江苏省生物材料与器件重点实验室, 南京 210009

收稿日期: 2017-11-24 录用日期: 2018-01-04

摘要: 为了探讨纳米银对 HepG2 细胞 DNA 损伤、染色体畸变等遗传毒性指标的影响, 以期对纳米银体外遗传毒性评价提供参考依据, 本文采用 2 种纳米银材料(20 nm-PVP 包被纳米银、20 nm-无包被纳米银), 分别以 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的剂量对 HepG2 细胞染毒 24 h, 用 Hoechst-33258 染色法检测细胞凋亡, 彗星实验检测 DNA 损伤, 胞质分裂阻滞微核细胞组学试验法检测染色体畸变。结果表明, 20 nm AgNPs 组在 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时引起细胞凋亡数显著增多($P<0.05$); 20 nm PVP-AgNPs 组在 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量组中细胞凋亡数显著增多($P<0.01$)。2 种纳米银引起 HepG2 细胞发生细胞凋亡, 并呈剂量效应关系。彗星试验结果表明, 20 nm AgNPs 和 20 nm PVP-AgNPs 在 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量组中, Olive 尾矩、尾长和尾部 DNA 百分比与空白对照组相比均有显著差异($P<0.05$)。2 种纳米银对 HepG2 细胞 DNA 损伤程度为: 20 nm AgNPs>20 nm PVP-AgNPs。胞质分裂阻滞微核细胞组学试验结果表明, 2 种纳米银均不会引起核质桥数发生明显改变($P>0.05$), 20 nm AgNPs 在高染毒剂量下引起微核总数、I 型微核、II 型微核、核芽数明显升高($P<0.05$); 20 nm PVP-AgNPs 在各染毒剂量下均会引起微核总数及 I 型微核数量升高($P<0.01$), II 型微核数在 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量下升高明显($P<0.01$), 剂量大于 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时核芽数升高($P<0.01$)。20 nm PVP-AgNPs 对细胞核的影响大于 20 nm AgNPs($P<0.05$)。总之, 2 种纳米银材料均会引起 HepG2 细胞 DNA 损伤及染色体畸变等遗传毒性效应的改变, 无包被纳米银比 PVP 包被纳米银更容易引起 DNA 损伤, PVP 包被纳米银比无包被纳米银更容易引起细胞染色体畸变相关效应; 2 种材料对 HepG2 细胞的损伤存在浓度-效应关系, 浓度越高遗传毒性损伤越严重。

关键词: 纳米银; HepG2 细胞; 彗星实验; 微核; 剂量-效应关系

文章编号: 1673-5897(2018)3-094-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Comparative Study on the Genetic Toxicity of Nano Silver and PVP Coated Silver Nanoparticles to HepG2 Cells

Wang Xiujuan^{1,2,3}, Li Tingzhu^{1,2,3}, Lu Qiang^{1,2,3}, Su Xuerong^{1,2,3}, Xue Yuying^{1,2,3,*}, Tang Meng^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Environmental Medicine and Engineering of Ministry of Education, Nanjing 210009, China
2. School of Public Health of Southeast University & Collaborative Innovation Center of Suzhou Nanoscience and Technology, Nanjing 210009, China
3. Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, Nanjing 210009, China

基金项目: 国家自然科学基金项目(81573186, 81473003); 大学生创新创业计划训练项目(201710286130)

作者简介: 王秀娟(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为纳米毒理学, E-mail: 924153949@qq.com

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

Received 24 November 2017 accepted 4 January 2018

Abstract: The aim of this study was to explore the genetic toxicity of nano silver, such as DNA damage and chromosomal aberration, in HepG2 cells and provide a reference for the *in vitro* evaluation of genetic toxicity. The HepG2 cells were infected with nano silver (20 nm AgNPs and 20 nm PVP-AgNPs) with a series of doses of $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 24 hours. The cell apoptosis was detected by the hoechst-33258 staining, the DNA damage was detected by the comet assay, and the chromosome aberration was detected by the cytoplasmic block micronuclear assay. Results showed that the number of apoptosis was significantly increased in the $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 20 nm AgNPs group compared with the control ($P<0.05$), while the numbers of apoptotic cells in the $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 20 nm PVP-AgNPs group were significantly increased compared to the control ($P<0.05$, $P<0.01$). Two kinds of silver nanoparticles induced apoptosis in HepG2 cells in a concentration dependent manner. In the comet test, olive tail moment, tail length and tail DNA percentage in the $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 20 nm AgNPs and 20 nm PVP-AgNPs were all significantly different from those in the blank control group ($P<0.05$). The DNA damage degree of HepG2 cells in 20 nm AgNPs was higher than that in 20 nm PVP-AgNPs. In the cytoplasmic block micronucleus assay, neither of silver nanoparticles caused any significant change in the number of cytoplasmic bridge ($P>0.05$). However, the number of micronucleus, type I micronucleus, type II micronucleus and nucleation buds were significantly increased when cells were exposed to 20 nm AgNPs with the high exposure dose ($P<0.05$). For the PVP-AgNPs exposure, the total number of micronucleus and type I micronucleus count were all increased when cells were exposed to 20 nm PVP-AgNPs with the three doses ($P<0.01$). The type II micronucleus count increased significantly in $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 20 nm PVP-AgNPs group ($P<0.01$), and the nuclear buds number increased obviously in cells treated with PVP-AgNPs at more than $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($P<0.01$). Generally, The toxic effects of 20 nm PVP-AgNPs on the nucleus were severer than 20 nm AgNPs ($P<0.05$). We concluded that the two types of silver nanoparticles could cause genetic toxicity to HepG2 cells, such as DNA damage and chromosomal aberration. The ability of 20 nm AgNPs causing DNA damage was stronger than 20 nm PVP-AgNPs, while the ability of 20 nm PVP-AgNPs causing chromosomal aberration was stronger than 20 nm AgNPs. Overall, the toxic effects induced by both of AgNPs was in a dose dependent manner, which means higher concentration of nanoparticles induces severer genotoxicity damage in HepG2 cells.

Keywords: nano silver; comet assay; micronucleus; dose-response relationship

随着纳米技术的飞速发展,纳米产品层出不穷。在众多的纳米材料中,纳米银因其优良的抗菌杀菌性能被广泛应用于医疗卫生、食品加工、化妆品、陶瓷、纺织、半导体材料,水质净化等领域^[1]。广泛的应用使人体暴露纳米银的机会大大增加,有研究表明,纳米银可能与体内不同组织、细胞或生物分子产生相互作用^[2-5],带来潜在的安全隐患,评估其生物安全性至关重要。

遗传毒性在安全性评价中不可或缺,有研究者用粒径为 55 nm 的纳米银对 SD 大鼠在其怀孕的第 7~20 天,每天分别以 0、0.2、2、20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量进行灌胃,结果发现纳米银可穿越胎盘屏障,到达胎鼠体内,并引起孕鼠及子鼠体内氧化应激水平的改变^[6]。Wen 等^[7]用纳米银(6.3~629 nm)对大鼠以 5

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量进行静脉染毒,结果发现与空白对照组相比实验组大鼠染色体断裂和多倍体细胞率显著增加,表明纳米银具有潜在的遗传毒性。Tavares 等^[8]用纳米银(5~45 nm)染毒人外周血细胞,彗星实验结果表明在各染毒剂量下(10、25、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)纳米银均会对细胞产生基因毒性作用,但随着时间的推移纳米银对 DNA 的损伤逐渐减少,说明在低剂量染毒细胞时,随着时间的推移,纳米银对细胞造成的遗传毒性会因为细胞修复系统而降低。目前,关于纳米银的体外遗传毒性研究还不是很充分,有待进一步探索。

本研究选择人肝癌(HepG2)细胞株为研究对象,以无包被纳米银和 PVP 包被纳米银为材料,通过彗星实验和胞质分裂阻滞微核细胞组学试验研究纳米

银对 DNA、染色体的影响,从多遗传终点和遗传毒作用机制角度出发,通过分析、比较 2 种纳米银的遗传作用特征,较全面地分析纳米银遗传毒性的剂量-效应关系,为纳米材料体外遗传毒性评估提供实验依据。此外,本研究确定了由彗星实验与胞质分裂阻滞微核细胞组学试验结合的方法,利用 HepG2 细胞作为体外评价模型,能方便快捷检测纳米银材料的遗传毒性效应,进而可以利用该组合实验筛检市场中纳米材料的遗传毒性效应。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料与细胞

20 nm PVP 包被纳米银粉体(上海沪正纳米科技有限公司),20 nm 无包被纳米银粉体(上海允复纳米科技有限公司),重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$, 国药集团化学试剂有限公司),阳性对照丝裂霉素 C(Mitomycin C, MMC, Sigma-Aldrich 公司),HepG2 细胞株(Human hepatoma cell line, 人肝癌细胞,中国科学院上海细胞生物研究所)。

1.2 试剂

DMEM 高糖培养液(美国 GE 公司),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司),磷酸盐缓冲液(PBS, 博士德生物工程有限公司),细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),Oxiselect 彗星实验试剂盒(Oxiselect comet assay kit, 美国 Cell Biolabs 公司),TE 缓冲液(北京天恩泽生物技术有限公司),氯化钠(国药集团化学试剂有限公司),氢氧化钠(国药集团化学试剂有限公司),75% 酒精(永华化学科技(江苏)有限公司),细胞松弛素-B(Cytochalasin B, Cyt-B, CAS: 14930-96-2, 美国 Sigma -Aldrich 公司),吉姆萨粉末(Giemsa, 中国 Biosharp 公司)。

1.3 主要仪器

3423 型 CO_2 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司),TDZ6B-WS 水平离心机(上海卢湘仪器厂),5424R 型离心机(德国 Eppendorf 公司),KQ-2200E 型超声波清洗仪(昆山超声仪器有限公司),FSX100 型智能生物图像导航仪(日本 OLYMPUS 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养

HepG2 细胞使用 DMEM 高糖培养基(含 10% 胎牛血清、 $100 U \cdot mL^{-1}$ 青霉素和 $100 \mu g \cdot mL^{-1}$ 链霉素)于 $37^\circ C$ 、 CO_2 体积分数为 5% 条件下常规传代培养。

1.4.2 Hoechst-33258 染色测细胞凋亡

将洁净盖玻片置于 6 孔板内,取对数生长期的细胞接种于 6 孔板,调节细胞浓度为 1×10^5 个 $\cdot mL^{-1}$,每孔 2 mL,培养过夜,使其密度至 50% ~ 80% 满。后分别用 $20 \mu g \cdot mL^{-1}$ 、 $40 \mu g \cdot mL^{-1}$ 、 $80 \mu g \cdot mL^{-1}$ 、 $160 \mu g \cdot mL^{-1}$ 的纳米银染毒细胞。24 h 后,吸尽培养液,加入 0.5 mL 固定液,固定 10 min,去固定液。用 PBS 洗 2 遍,每次 3 min,吸尽液体。加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液,置摇床上染色 5 min。去染色液,用 PBS 洗 2 遍,吸尽液体。滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,让细胞接触封片液,尽量避免气泡。在生物导航仪上观察细胞。

1.4.3 彗星实验

取对数生长期的细胞接种于 12 孔板,调节细胞密度至 1×10^5 个 $\cdot mL^{-1}$,每孔 1 mL。培养 24 h 后吸去原培养液,空白对照组加入细胞培养液,阳性对照组加入 $294 \mu g \cdot mL^{-1}$ 的重铬酸钾溶液,实验组分别加入 20 、 40 、 80 、 $160 \mu g \cdot mL^{-1}$ 的纳米银溶液,继续培养 24 h 后,收集细胞。按照彗星实验试剂盒操作说明检测 DNA 损伤。实验重复 3 次,每次实验每个剂量随机选择 50 个细胞用 Comet Assay 软件(CASP, <http://casplab.com/>)分析。3 次实验的 Olive 尾矩、尾长和尾部 DNA 百分比的平均值用以表达 DNA 损伤。

1.4.4 胞质分裂阻滞微核细胞组学试验

取对数生长期的细胞接种于 12 孔板,调节细胞密度至 1×10^5 个 $\cdot mL^{-1}$,每孔 1 mL。培养 24 h 后吸去原培养液,实验组分别加入 20 、 40 、 80 、 $160 \mu g \cdot mL^{-1}$ 的纳米银溶液,阳性对照组加入 $0.1 \mu g \cdot mL^{-1}$ 的丝裂霉素 C,胞质阻滞松弛素 B 在染毒时同时加入,浓度为 $4 \mu g \cdot mL^{-1}$,染毒 24 h 后,吸去染毒液将细胞固定滴片,后用 Giemsa 染液进行染色,最后用生物导航仪读片,对 2 种纳米银每个染毒剂量均观察 3 次不同区域的细胞,每次观察 1 000 个双核细胞,统计 1 000 个细胞中总微核(I 型微核+II 型微核)、I 型微核、II 型微核、核芽、核质桥的数量。

1.5 统计学方法

实验数据均以 $\bar{X} \pm S$ 表示。采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,多组比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间比较采用析因设计方差分析;进一步进行组间两两比较时,若方差齐,采用 LSD-t 检验,若方差不齐,采用 Dunnett's T3 检验;

剂量效应关系分析,采用两变量直线相关分析(Bivariate Correlation)。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果(Results)

2.1 纳米银表征结果

透射电镜(TEM)检测结果如图1所示,通过TEM观察到分散于10%胎牛血清的DMEM培养液中的2种纳米银颗粒均为球形,无包被的纳米银有团聚现象,PVP包被的纳米银分散均匀,无团聚现象。通过Nano Measurer 1.2.5软件测量20 nm无包

被纳米银平均粒径为 (18.29 ± 5.50) nm,20 nm PVP包被的纳米银平均粒径为 (19.95 ± 4.75) nm。

2.2 纳米银对HepG2细胞凋亡的影响

生物导航仪读片可见阳性对照组凋亡细胞比较多,各处理组有少量的细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染,其他都为正常的细胞核形态,正常细胞核内DNA分布相对均匀,细胞核无固缩,在视野中呈现体积较大的且染色颜色较浅的核形态,纳米银对HepG2细胞核形态的影响见图2,各实验处理组HepG2细胞凋亡率结果见表1。

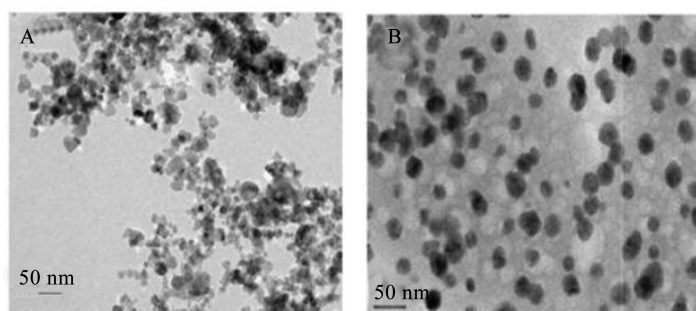


图1 纳米银颗粒TEM图

注:A, 20 nm AgNPs的TEM图; B, 20 nm-PVP AgNPs的TEM图。

Fig. 1 The TEM diagram of nano silver particles

Note: A, the TEM diagram of 20 nm AgNPs; B, the TEM diagram of 20 nm-PVP AgNPs.

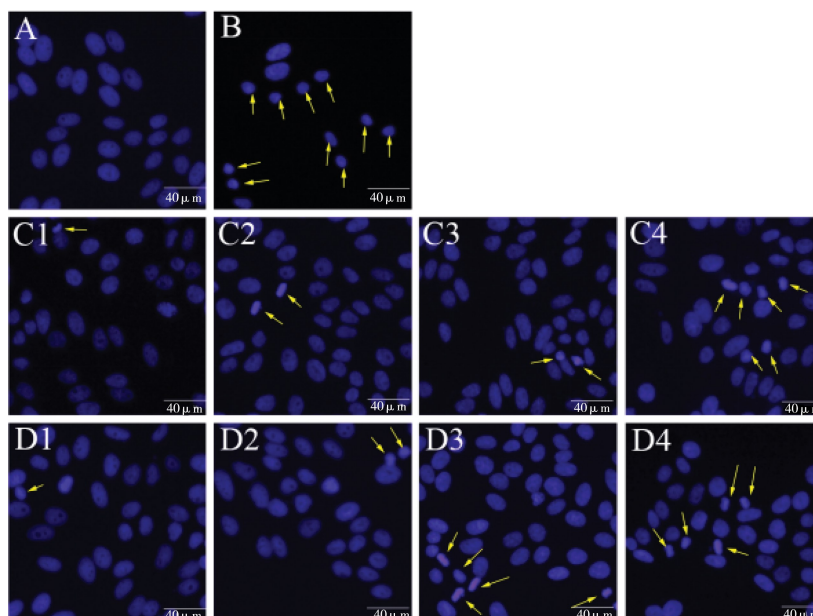


图2 不同特性纳米银对HepG2细胞核形态的影响

注:Hoechst 33258染色,×100,箭头所指为凋亡细胞的细胞核。A,空白对照组;B,阳性对照组;

C1~C4,20 nm AgNPs组(剂量分别为20, 40, 80, 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);D1~D4,20 nm PVP-AgNPs组(剂量分别为20, 40, 80, 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

Fig 2 The influence of different characteristics of nano silver on the nuclear form of HepG2

Note: Hoechst 33258 staining, ×100; the arrow refers to the nucleus of apoptotic cells. A, blank control group; B, positive control group;

C1-C4, 20 nm AgNPs group (20, 40, 80, 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); D1-D4, 20 nm PVP-AgNPs group (20, 40, 80, 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

表1可知,与正常对照组比较,20 nm AgNPs组在剂量为 $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时凋亡细胞核相比于空白对照组明显增多($P<0.05$);20 nm PVP-AgNPs的 $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组凋亡细胞核相比于空白对照组明显增多($P<0.05$, $P<0.01$)。2种纳米银使 HepG2

细胞呈浓度依赖性的细胞凋亡(20 nm AgNPs: $P<0.05$, $r = 0.997$; 20 nm PVP-AgNPs: $P<0.05$, $r = 0.999$)。析因设计方差分析比较可知,20 nm PVP-AgNPs对 HepG2 细胞凋亡的影响大于 20 nm AgNPs($P<0.05$)。

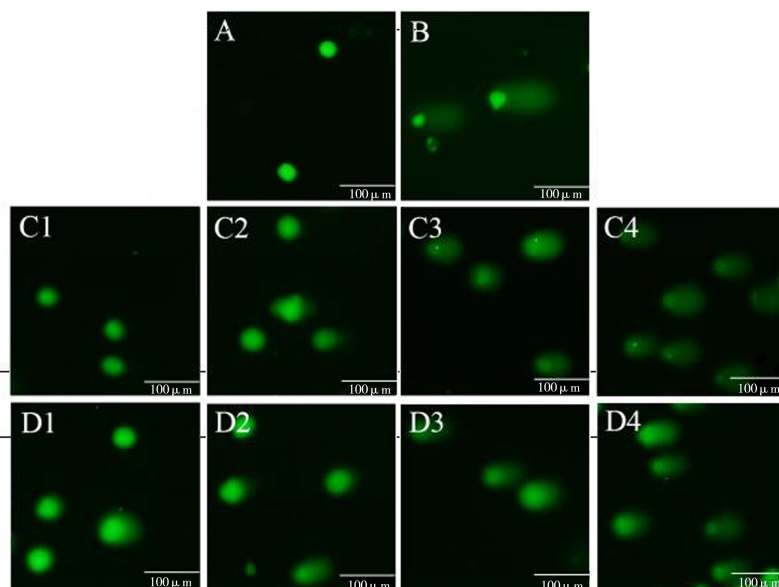


图3 彗星图像($\times 42$)

注:A,空白对照组;B,阳性对照组;C1~C4,20 nm AgNPs组(剂量分别为20,40,80,160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);

D1~D4,20 nm PVP-AgNPs组(剂量分别为20,40,80,160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

Fig. 3 The comet image ($\times 42$)

Note: A, blank control group; B, positive control group; C1-C4, 20 nm AgNPs group (20, 40, 80, 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);

D1-D4, 20 nm PVP-AgNPs group (20, 40, 80, 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

表1 不同特性纳米银对 HepG2 细胞凋亡率的影响($\bar{X}\pm S$)

Table 1 The effect of silver nanoparticles with different properties on the apoptosis rate of HepG2 cells

组别 Group	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ Dose/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞数 Cell number	细胞凋亡率/% Cell apoptosis rate/%
空白对照组 Control group	0	3×500	3.33 ± 0.70
20 nm AgNPs组 20 nm AgNPs group	20	3×500	4.87 ± 0.42
	40	3×500	5.00 ± 0.72^a
	80	3×500	5.80 ± 0.60^b
	160	3×500	7.13 ± 0.42^b
20 nm PVP-AgNPs组 20 nm PVP-AgNPs group	20	3×500	4.93 ± 0.50^a
	40	3×500	5.53 ± 0.61^b
	80	3×500	9.47 ± 1.01^b
K ₂ Cr ₂ O ₇ 组 K ₂ Cr ₂ O ₇ group	160	3×500	10.33 ± 0.94^b
	294	3×500	62.20 ± 3.89^b

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

2.3 纳米银对DNA损伤的影响

实验所得彗星图像见图3,空白对照组彗星头部DNA致密,无尾部;阳性对照组头部DNA集中,亮度很强,尾部由DNA断片组成呈扫帚状,荧光强度不及头部。2种纳米银处理组中小于等于 $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量组均能观察到头部DNA致密,无明显尾部或尾部很短;大于等于 $80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的各个剂量组的彗星头部DNA集中,亮度较强,尾部成呈扫帚状,荧光强度不及头部。利用彗星分析软件(Comet Assay Software Project, CASP)进行数据分析,2种不同包被纳米银的不同浓度的Olive尾矩、尾长和尾部DNA百分比结果见表2。

由单因素方差分析结果可知,在染毒24 h后,阳性对照组Olive尾矩、尾长和尾部DNA百分比与空白对照组对比有显著差异($P<0.01$)。20 nm AgNPs组中除了 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的Olive尾矩与尾长,其余均与空白对照组有显著差异($P<0.05$),20 nm PVP-AgNPs组除了 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的DNA百分比,其余均与空白对照组差异有统计学意义($P<0.05$)。析因设计方差分析比较可知,2种纳米银使HepG2细胞DNA断裂程度:20 nm AgNPs > 20 nm PVP-AgNPs($P<0.05$)。

2.4 纳米银对细胞核的影响

如图4,胞质分裂阻滞微核细胞组学试验中,纳米银引起细胞核出现I型微核数、II型微核、核芽、

核质桥等特征性改变,不同特性纳米银染毒HepG2细胞微核组学效应见表3。

如表3所示,与阴性对照组相比,20 nm AgNPs在 $80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $160\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下染毒HepG2细胞后微核总数显著升高($P<0.01$);20 nm PVP-AgNPs在 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $160\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下染毒HepG2细胞后微核总数均显著升高($P<0.01$)。20 nm AgNPs在 $80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $160\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下染毒HepG2细胞后I型微核数显著升高($P<0.01$);20 nm PVP-AgNPs在 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $160\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下染毒HepG2细胞后I型微核数均显著升高($P<0.01$)。与阴性对照组相比,2种纳米银材料在 $160\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下染毒HepG2细胞后II型微核数均显著升高(20 nm AgNPs, $P<0.05$; 20 nm PVP-AgNPs, $P<0.01$)。20 nm AgNPs在 $160\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下染毒HepG2细胞后核芽数显著升高($P<0.05$);20 nm PVP-AgNPs在 $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $160\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下染毒HepG2细胞后核芽数均显著升高($P<0.01$);与阴性对照组相比,2种纳米银各浓度剂量下核质桥数均无显著差异($P>0.05$)。各效应指标的组间比较结果发现,除核质桥外,2种纳米银材料引起的总微核数、I型微核数、II型微核数、核芽数均有差异($P<0.05$),20 nm PVP-AgNPs对细胞核的影响大于20

表2 2种纳米银染毒HepG2细胞Olive尾矩、尾长、尾部DNA比值结果

Table 2 The results of Olive tail moment, tail length and tail DNA ratio of HepG2 cells exposed to two kinds of nano silver ($\bar{X}\pm S$)

组别 Group	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ Dose/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞数 Cell number	Olive尾矩 Olive tail moment	尾长 Tail length	尾部DNA百分比 Tail DNA%
空白对照组 Control group	0	3×50	0.59±0.17	6.46±0.57	10.50±0.14 ^a
	20	3×50	2.32±0.64	15.76±3.61	10.50±0.14 ^a
20 nm AgNPs组 20 nm AgNPs group	40	3×50	7.15±2.09 ^b	31.14±2.38 ^b	27.81±3.23 ^a
	80	3×50	7.20±1.40 ^b	29.01±4.67 ^b	29.32±2.03 ^b
	160	3×50	9.96±1.42 ^b	37.50±10.76 ^b	40.64±1.51 ^b
	20	3×50	2.27±0.24 ^a	13.58±0.93 ^b	9.56±2.64
20 nm PVP-AgNPs组 20 nm PVP-AgNPs group	40	3×50	4.84±0.68 ^b	20.23±1.21 ^b	17.99±1.43 ^b
	80	3×50	5.87±0.55 ^b	25.97±1.41 ^b	19.75±2.10 ^b
	160	3×50	7.34±1.39 ^b	28.43±0.83 ^b	26.82±5.63 ^b
K ₂ Cr ₂ O ₇ 组 K ₂ Cr ₂ O ₇ group	294	3×50	16.23±2.68 ^b	58.00±5.60 ^b	43.83±1.34 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

nm AgNPs。直线相关分析结果发现,20 nm AgNPs组中,除核质桥外,各效应指标均有随染毒剂量增高而增高的趋势($P<0.05, r>0.7$),20 nm PVP-AgNPs组中,除核质桥和核芽外,其他效应指标均有随染毒剂量增高而增高的趋势($P<0.05, r>0.7$),表明纳米银对

HepG2 细胞的遗传毒性损伤存在一定的剂量-效应关系。

3 讨论 (Discussion)

在纳米银的生产和应用过程中,常用不同材料

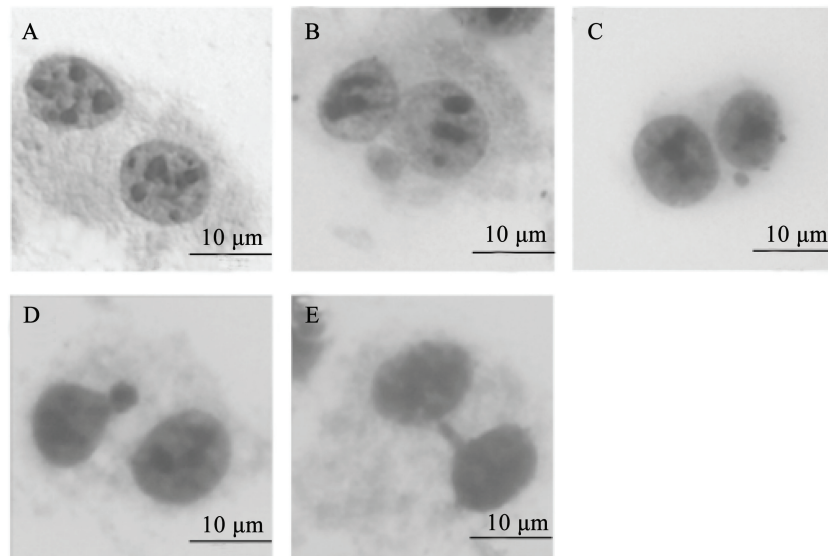


图4 胞质分裂阻滞微核细胞组学试验细胞分类

注:A,双核正常细胞;B,含有I型微核的双核细胞;C,含有II型微核的双核细胞;D,含有核芽的双核细胞;E,含有核质桥的双核细胞。

Fig. 4 The cell classification of cytokinesis micronucleus test cells

Note: A, double nucleus normal cell; B, cells containing I microkernel dual-core; C, cells containing II microkernel dual-core; D, binuclear cells containing nuclear sprouts; E, a dual-core cell containing a nuclear bridge.

表3 不同特性纳米银染毒 HepG2 细胞微核组学效应 ($\bar{X}\pm S$)

Table 3 Micronucleus effect of HepG2 cells exposed to nano silver with different properties ($\bar{X}\pm S$)

组别 Group	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ Dose/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	微核总数 Micronucleus count	I型微核 Type I micronucleus	II型微核 Type II micronucleus	核芽 Nuclear buds	核质桥 Nucleoplasmic bridge
阴性对照组 Negative control group	0	2.33±1.15	1.67±1.53	0.67±0.58	2.67±2.08	0.67±0.58
20 nm AgNPs 组 20 nm AgNPs group	20	6.33±2.89	6.00±2.65	0.33±0.58	3.33±2.08	0.67±0.58
	40	6.67±1.15	5.67±2.08	1.00±1.00	5.67±1.52	1.33±0.58
	80	13.33±2.08 ^b	11.00±2.00 ^b	2.33±0.58	6.67±2.52	1.00±1.00
	160	16.67±2.52 ^b	13.33±2.08 ^b	3.33±0.58 ^a	8.33±1.53 ^a	1.67±1.53
20 nm AgNPs-PVP 组 20 nm AgNPs-PVP group	20	12.00±4.36 ^a	9.33±3.06 ^a	2.67±1.53	7.00±1.73	1.33±0.58
	40	13.33±5.03 ^b	10.00±3.60 ^a	3.33±1.53	11.00±3.60 ^b	1.67±0.58
	80	15.67±4.51 ^b	11.67±3.51 ^b	4.00±1.00	12.33±2.08 ^b	1.00±1.00
丝裂霉素 C Mitomycin C	160	20.67±1.53 ^b	14.33±1.53 ^b	6.33±1.53 ^b	10.33±2.52 ^b	1.67±0.58
	0.1	26.67±1.53 ^b	19.33±3.51 ^b	7.33±2.08 ^b	10.67±2.08 ^b	2.33±0.58 ^a

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

Note: Compared with the blank control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

对纳米银进行表面修饰以改善其分散性和稳定性,如PVP、柠檬酸钠和多聚糖等,不同包被的纳米银可能影响与细胞的相互作用^[9]。Ahamed等^[10]用25 nm多聚糖包被的纳米银和未包被的纳米银以 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对鼠胚胎干细胞与鼠胚胎纤维母细胞进行染毒,结果发现多聚糖包被纳米银比未包被纳米银表现出更强的细胞毒性和遗传毒性。Nguyen等^[11]的研究则表明,用未包被的纳米银(20 nm、40 nm、60 nm、80 nm)染毒鼠巨噬细胞和人结肠上皮细胞比用PVP包被纳米银(10 nm、50 nm、75 nm)和柠檬酸盐包被纳米银(10 nm、50 nm、75 nm)对细胞活性的抑制作用更大。本研究结果表明,PVP包被的纳米银与无包被的纳米银引起细胞DNA损伤与染色体畸变的程度不同,这可能与2种材料的银离子释放量不同有关,因为纳米银的毒性作用可由粒子表面释放的银离子引起^[12],而纳米银的表面涂层材料影响 Ag^+ 释放^[13]。

本研究采用凋亡实验、彗星实验和胞质分裂阻滞微核细胞组学试验结合,从多遗传终点和遗传毒作用机制角度出发,通过分析、比较2种不同纳米银的遗传作用特征,从体外角度较全面地分析纳米银遗传毒性的剂量-效应关系。在进行彗星实验之前,对细胞样本进行“活力检查”是很常见的,最常见的试验是台盼蓝排斥试验。而彗星实验针对细胞核,而非细胞,细胞被检测方法判定死亡不一定核就不完整(例如离心造成的细胞膜破裂,而台盼蓝染料能进入膜破裂的细胞,使细胞染色),在这种情况下细胞活力不是一个有意义的概念,且Hoechst 33258对细胞核染色清晰,不仅能测定凋亡率,而且可以清楚地观察到核形态,所以,在评价遗传毒性前,先用Hoechst 33258荧光染色法评价纳米银对HepG2细胞核形态与凋亡率的影响。

彗星实验结果表明,2种纳米银均会引起DNA损伤,这与很多研究结果类似^[14-15],如用PVP包被纳米银处理宫颈癌(Hela)、乳腺癌(MDA-MB-231和MCF-7)细胞12或24 h,彗星实验结果均显示出严重的DNA损伤^[16]。同样,在本研究的胞质分裂阻滞微核细胞组学试验中,除核质桥及核芽外,2种纳米银引起的染色体畸变各效应指标均呈随染毒浓度增高而增高的趋势,表明纳米银对HepG2细胞染色体丢失、染色体断裂、基因扩增与基因量改变等遗传毒性效应呈浓度相关性。Sahu等^[17]在肝癌细胞HepG2细胞和Caco细胞中,在0.5至 $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的

浓度范围内纳米银诱导具有微核的双核细胞频率以浓度和时间依赖性的方式增加。Papageorgiou等^[18]的研究表明,随着纳米银浓度的增加,MCF-7细胞和HepG2细胞的有丝分裂指数随之下降,浓度越大有丝分裂指数越小,并观察到不同类型的染色体畸变。

综上所述,纳米银对HepG2细胞可产生DNA损伤、染色体畸变等遗传毒性效应,无包被纳米银比PVP包被纳米银更容易引起DNA损伤,PVP包被纳米银比无包被纳米银更容易引起细胞染色体畸变相关效应,且损伤程度与浓度相关,浓度越高遗传损伤越严重。本研究通过彗星实验与胞质分裂阻滞微核细胞组学试验相结合探讨不同包被纳米银的体外遗传毒性差异,为纳米银的体外遗传毒性评估提供参考依据。

通讯作者简介:薛玉英(1965-),女,博士,教授,博士生导师,主要从事纳米毒理学研究。

参考文献(References):

- [1] Yun K, Oh G, Vang M, et al. Antibacterial effect of visible light reactive TiO_2/Ag nanocomposite thin film on the orthodontic appliances [J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2011, 11(8): 7112-7114
- [2] Li Y, Bhalli J A, Ding W, et al. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse [J]. *Nanotoxicology*, 2014, 8(Suppl 1): 36-45
- [3] Nallanthighal S, Chan C, Bharali J, et al. Particle coatings but not silver ions mediate genotoxicity of ingested silver nanoparticles in a mouse model [J]. *NanoImpact*, 2017, 5: 92-100
- [4] Reed R B, Zaikova T, Barber A, et al. Potential environmental impacts and antimicrobial efficacy of silver- and nanosilver-containing textiles [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(7): 4018-4026
- [5] Cattaneo A G, Gornati R, Sabbioni E, et al. Nanotechnology and human health: Risks and benefits [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2010, 30(8): 730-744
- [6] Charehsaz M, Hougaard K S, Sipahi H, et al. Effects of developmental exposure to silver in ionic and nanoparticle form: A study in rats [J]. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 24: 24
- [7] Wen H, Dan M, Yang Y, et al. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(9): 1-16
- [8] Tavares P, Balbinot F, De Oliveria H M, et al. Evaluation of genotoxic effect of silver nanoparticles (Ag-Nps) in

- vitro* and *in vivo* [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2012, 14(4): 1-7
- [9] Kwok K W, Dong W, Marinakos S M, et al. Silver nanoparticle toxicity is related to coating materials and disruption of sodium concentration regulation [J]. Nanotoxicology, 2016, 10(9): 1306-1317
- [10] Ahamed M, Karns M, Goodson M, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2008, 233(3): 404-410
- [11] Nguyen K C, Seligy V L, Massarsky A, et al. Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles [J]. Journal of Physics: Conference Series, 2013, 429: 012025
- [12] Hadrup N, Lam H R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver—A review [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2014, 68: 1-7
- [14] Bastos V, Duarte I F, Santos C, et al. Genotoxicity of citrate-coated silver nanoparticles to human keratinocytes assessed by the comet assay and cytokinesis blocked micronucleus assay [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(5): 5039-5048
- [15] Souza T A, Franchi L P, Rosa L R, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines [J]. Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2016, 795: 70-83
- [16] Juarez-Moreno K, Gonzalez E B, Girónvazquez N, et al. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines [J]. Human and Experimental Toxicology, 2017, 36(9): 931-948
- [17] Sahu S C, Roy S, Zheng J, et al. Contribution of ionic silver to genotoxic potential of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cell evaluated by the cytokinesis-block micronucleus assay [J]. Journal of Applied Toxicology, 2016, 36(4): 532-542
- [18] Papageorgiou I, Brown C, Schins R, et al. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts *in vitro* [J]. Biomaterials, 2007, 28(19): 2946-2958
- ◆