

# 纳米银对青鳉的亚慢性毒性研究

周艳君 施 阳 吴 源

**摘要** 目的 纳米银对日本青鳉(*medaka*)亚慢性毒性的研究。方法 健康成年 *medaka* 分为 0.10、0.25 mg/L 纳米银暴露组和对照组。在第 14 天统计死亡率,然后处死 *medaka* 检测银离子的组织分布、毒理学[超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)]及组织病理学损伤。结果 0.25 mg/L 纳米银暴露组亚慢性死亡率为 9.375%,对照组总死亡率为 9.375%(3/32)。与对照组相比,纳米银暴露组 *medaka* 的鳃、肠及肝脏中金属银的含量明显增加。纳米银暴露组的 *medaka* 的肝脏中 LDH 和 SOD 及鳃组织中 SOD 活性低于对照组( $P < 0.001$ )。纳米银暴露组肝脏 MDA 含量明显增加( $P < 0.001$ )。与对照组相比,纳米银暴露组肝脏及鳃组织均受到破坏。结论 纳米银对 *medaka* 具有一定的亚慢性毒性。

**关键词** 纳米银;离子态银;亚慢性毒性

**中图分类号** R 595.2

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2017)05-719-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.021

由于纳米银释放  $Ag^+$  而具有抗菌活性<sup>[1]</sup>,使纳米银广泛应用于化妆品、纺织品、个人护理品及医疗用品,而大部分纳米银是通过生活污水进入水环境中,从而使水环境中纳米银含量增加<sup>[2-3]</sup>。进入水环境中的纳米银可以成为溶解性银离子的来源,并可能对水生生物造成毒性效应<sup>[4-7]</sup>,但是毒性作用机制还不清楚,该实验以日本青鳉(*medaka*)暴露于纳米银的条件下,观察 *medaka* 的亚慢性死亡率、组织病理损伤、组织分布及毒理学。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 实验鱼是本实验室驯养多年的橙红系日本青鳉(*medaka*),饲养于流水系统中,水温

保持在  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,人工昼/夜循环 16 h/8 h,每天 2 次投喂丰年虫。

**1.2 试剂与仪器** 纳米银为自制,采用次磷酸盐液相还原法制备纳米银干粉<sup>[8]</sup>,条件略有改变。分别配制 1 mol/L  $AgNO_3$  氧化液和还原液(50 ml 去离子水 + 0.44 g  $NaH_2PO_2$  + 0.40 g 聚乙烯吡咯烷酮 + 0.20 g 六偏磷酸钠 + 1 ml 1 mol/L  $H_2SO_4$  溶液),在  $40 \sim 42^\circ\text{C}$  的水浴中预热。在磁力搅拌下降氧化液滴加到还原液中,滴加完后反应液在  $40 \sim 42^\circ\text{C}$  继续搅拌 30 min。将银胶静置 1 h 后离心(10 000 r/min)除去上部溶液;依次加入钝化剂、丙酮和无水乙醇洗涤、离心,最后在真空干燥箱中( $45^\circ\text{C}$ )干燥 12 h,收集粉体样品到样品瓶中,充入氮气后避光密封保存。纳米银颗粒的平均粒径为 29.9 nm(25.9 ~ 36.7 nm)。酶联免疫分析仪(Varioskan Flash, 美国 Thermo 公司);低温高速离心机(MR1882, 法国 Jouan 公司);光学显微镜(BX41, 日本 OLYMPUS 公司);透射电子显微镜(H-7500, 日本 Hitachi 公司);核酸/蛋白质分析仪(DU800, 美国 Beckman Coulter 公司);超纯水发生器(Milli-Q, 美国 Millipore 公司);电动组织匀浆仪(Tenbroeck, 美国 Wheaton 公司);硝酸银(美国 Sigma-Aldrich 公司);电感耦合等离子体质谱(ICP-MS, 7500CE, 美国 Agilent 公司);牛血清白蛋白第 V 组分(德国 Roche 公司);硝酸(德国 Merk 公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、微量丙二醛(malonaldehyde, MDA)、试剂盒(南京建成生物工程研究所);其它试剂均为分析纯(北京化学试剂公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 暴露方案** 根据纳米银对 *medaka* 96 h 急性毒性的半数致死浓度为 0.87 mg/L<sup>[9]</sup>,将纳米银用去氯自来水分别配制成浓度为 0.10 mg/L 和 0.25 mg/L 的溶液,选取健康成年的 *medaka*,体长  $(3.5 \pm 0.4)$  cm,体重  $(0.35 \pm 0.07)$  kg,每组 16 条,设置为 0.10 mg/L 和 0.25 mg/L 纳米银暴露组,同时设置去氯自来水对照组。24 h 换液,投食丰年虫 2 h

2017-01-20 接收

基金项目:安徽省高等学校自然科学研究重点项目(编号:KJ2015A021);安徽医科大学 博士科研启动基金(编号:XJ201016)

作者单位:安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学,合肥 230032

作者简介:周艳君,女,硕士研究生;

吴 源,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: uyuan@mail.ustc.edu.cn

后换液,连续静水暴露 14 d,重复试验 1 次。

1.3.2 病理学 肝脏及鳃组织进行清洗、脱水、透明、浸蜡、包埋及切片,苏木精-伊红(HE)染色,然后在光学显微镜下观察及拍照。

1.3.3 组织分布 动物麻醉后分别采集肝脏、鳃、肠及脑组织。将生物样品放入消解罐中,然后加入 HNO<sub>3</sub> 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,各 2 ml,放入不锈钢高压焖罐中后放入烘箱中。先 60 °C 加热 3 h,然后 160 °C 加热 1 h,自然冷却至室温后将消解液转移到 10 ml PE 瓶中,用超纯水定重至 10 g。ICP-MS 分析,标准曲线法定量 0~20 μg/L; ICP-MS 的工作参数:等离子体氩气流速 4.0 L/min; 辅助气流速 1.0 L/min; 载气流速 1.0 L/min; Rf 功率 1 350 W; 喷雾室温度 2 °C; 样品提取速率 0.1 ml/min; 采样深度 6.5 mm。

1.3.4 毒理学点评 LDH、SOD、CAT 及 MDALDH 和 CAT 的组织稀释比是 1 g : 200 ml PBS, SOD 和 MDA 的组织稀释比是 1 g : 20 ml PBS, 肝脏、脑组织及鳃组织进行组织匀浆,取上清液根据试剂盒说明书进行生化分析。用 Bradford 法进行蛋白质含量的测定,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.4 统计学处理 使用 OriginPro7.5 软件分析数据,所有参数变量采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验进行统计分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 亚慢性暴露死亡率 0.10 mg/L 和 0.25 mg/L 纳米银暴露组 medaka 连续暴露 14 d 后死亡情况不同。0.10 mg/L 纳米银暴露组无受试动物死亡,0.25 mg/L 纳米银暴露组死亡率为 9.375%。两次实验中,对照组动物均有死亡,第一次试验死亡 1 只,第二次试验死亡 2 只,对照总死亡率 9.375% (3/32)。

### 2.2 组织病理学损伤

2.2.1 肝脏组织病理学 对照组的肝细胞呈多形性排列,细胞核圆形居中,肝实质紧密、肝索清晰可见。0.10 mg/L 纳米银暴露组的肝实质有血液淤积,细胞间的联系遭到破坏,肝实质松散。0.25 mg/L 纳米银暴露组的肝细胞出现灶性坏死及炎症细胞浸润,肝实质松散,见图 1。

2.2.2 鳃组织病理改变 对照组鳃组织的初级鳃小片依次整齐排列,凸出其上的初级鳃小片均匀分布两侧,表面覆盖单层上皮细胞和泌氯细胞。0.1 mg/L 和 0.25 mg/L 纳米银暴露组鳃组织的初级鳃小片之间的间距增大,还有上皮细胞水肿、增生和融

合以及泌氯细胞增生,且有部分次级鳃小片弯曲、断裂,见图 2。

2.3 组织分布 选择 0.25 mg/L 纳米银暴露组的动物的组织进行分布分析,与对照组相比,0.25 mg/L 纳米银暴露组的脑组织中银离子含量减少 ( $t = 12.03, P < 0.001$ ),但是鳃、肠及肝脏中银离子的含量增加,且肠组织及肝组织中银离子含量增加差异有统计学意义 ( $t = 6.46、198.28, P < 0.001$ ),尤其是肝脏中银离子含量增加最大,见图 3。

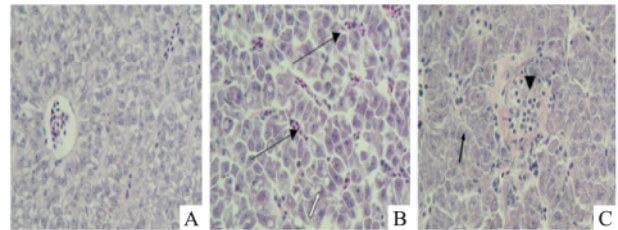


图 1 medaka 肝脏组织病理学 HE × 100

A: 对照组; B: 0.10 mg/L 纳米银暴露组; C: 0.25 mg/L 纳米银暴露组; 黑色箭头指示肝细胞坏死; 长箭头指示血液淤积; 指示炎症细胞浸润; 空心箭头指示肝细胞空泡化

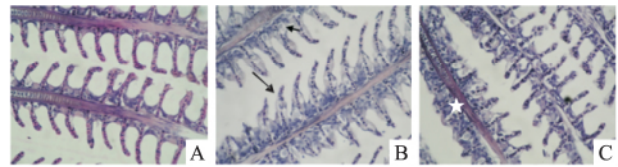


图 2 medaka 鳃组织病理学 HE × 100

A: 对照组; B: 0.10 mg/L 纳米银暴露组; C: 0.25 mg/L 纳米银暴露组; 短剑头指示泌氯细胞增生; 长箭头指示鳃小叶上的增生物; 星号指示上皮细胞增生、融合

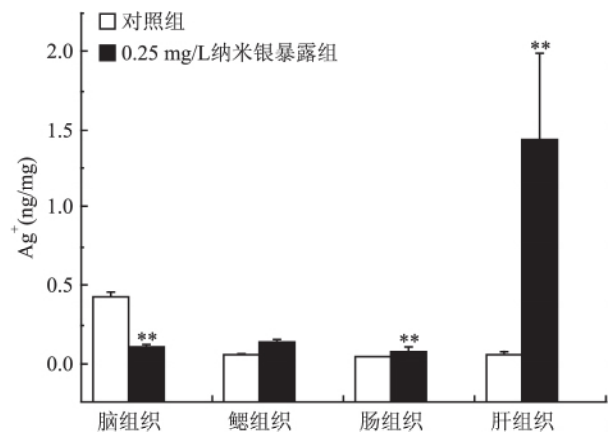


图 3 medaka 体内不同组织 Ag<sup>+</sup> 的含量  
与对照组比较: \*\* *P* < 0.001

### 2.4 毒理学终点

2.4.1 LDH 经过 14 d 的暴露后,与对照组相比,0.10 mg/L 和 0.25 mg/L 纳米银暴露组肝脏中 LDH 的活性降低,差异有统计学意义 ( $t = 3.44、6.06, P <$

0.001) 鳃组织中 LDH 的活性降低,但差异无统计学意义,见图 4。

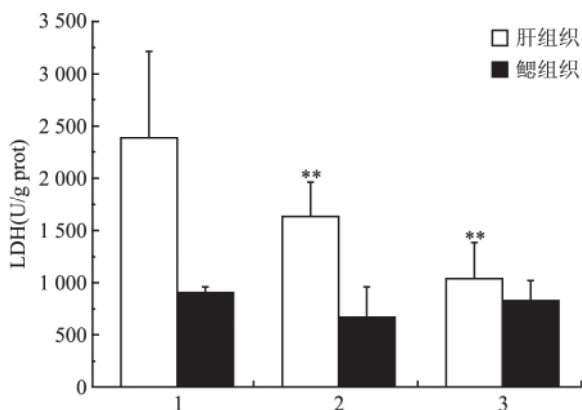


图4 medaka 体内 LDH 的活性

1: 对照组; 2: 0.10 mg/L 纳米银暴露组; 3: 0.25 mg/L 纳米银暴露组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.001$

**2.4.2 抗氧化酶活性** 与对照组相比, 0.10 mg/L 和 0.25 mg/L 纳米银暴露组肝脏中 SOD 活性降低 ( $t = 6.63, 9.31, P < 0.001$ ) ,但是在 0.10 mg/L 纳米银暴露组 鳃组织的 SOD 的活性增高 ( $t = 4.24, P < 0.001$ ) , 0.25 mg/L 纳米银暴露组鳃组织的 SOD 的活性较对照组无明显变化。与对照组相比, 0.10 mg/L 和 0.25 mg/L 纳米银暴露组中肝脏的 CAT 的活性降低 ( $t = 7.87, 5.44, P < 0.001$ ) ,且 CAT 的活性随纳米银浓度的增加而升高,见图 5、6。

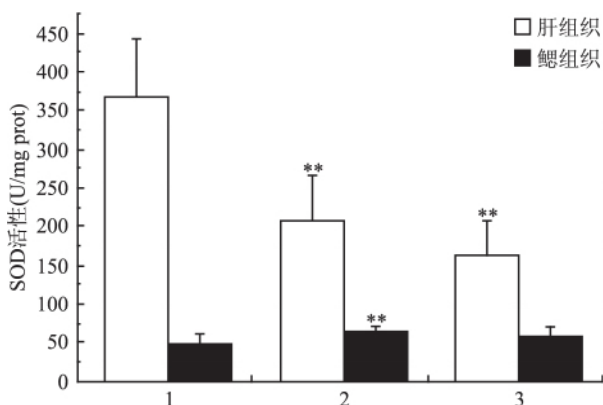


图5 medaka 体内 SOD 的活性

1: 对照组; 2: 0.10 mg/L 纳米银暴露组; 3: 0.25 mg/L 纳米银暴露组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.001$

**2.4.3 脂质过氧化物 MDA 含量** 与对照组相比, 0.10 mg/L 纳米银暴露组肝脏中的 MDA 含量变化无统计学意义, 0.25 mg/L 纳米银暴露组肝脏中 MDA 的含量增加 ( $t = 3.83, P < 0.001$ ) 。与对照组相比, 0.10 mg/L 纳米银暴露组鳃组织的 MDA 含量变化无统计学意义, 0.25 mg/L 纳米银暴露组鳃组

织中的 MDA 含量增加 ( $t = 7.65, P < 0.001$ ) 。脑组织中 MDA 含量变化与对照组相比差异无统计学意义,见图 7。

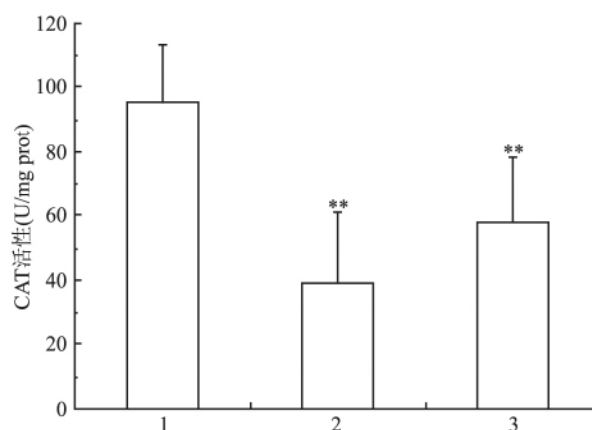


图6 medaka 肝脏 CAT 的活性

1: 对照组; 2: 0.10 mg/L 纳米银暴露组; 3: 0.25 mg/L 纳米银暴露组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.001$

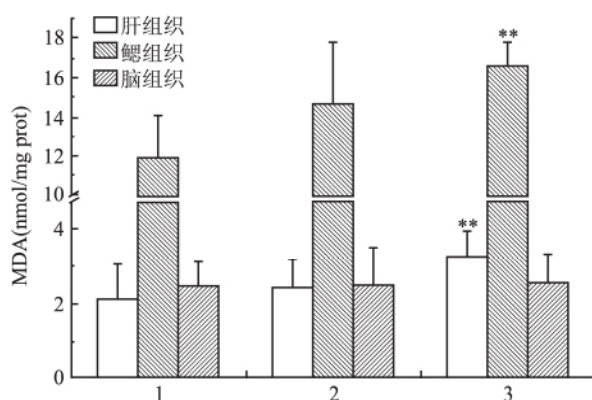


图7 medaka 体内 MDA 含量的变化

1: 对照组; 2: 0.10 mg/L 纳米银暴露组; 3: 0.25 mg/L 纳米银暴露组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.001$

### 3 讨论

与对照组相比, 0.25 mg/L 纳米银暴露组的亚慢性死亡率为 9.375% ,而对照组的总死亡率为 9.375% (3/32) ,本实验的暴露方式为静水暴露,由于纳米银具有杀菌能力,使得纳米银暴露组能够维持一个良好的水质环境,所以在 0.10 mg/L 纳米银暴露组未见实验动物死亡,因而对照组可能因水质恶化造成对照组动物死亡。实验中纳米银在组织中的浓度为肝 > 鳃 > 肠 > 脑,因为纳米银体积小,能快速通过细胞膜<sup>[10]</sup> ,同样 Webb et al<sup>[11]</sup>、Bruneau et al<sup>[12]</sup> 和 Griffitt et al<sup>[4]</sup> 也报道了纳米银在水生动物体内也有相同的积累。但是 0.25 mg/L 纳米银暴露组脑组织中  $Ag^+$  的含量低于对照组,具体原因有待进

一步探讨。银离子在鳃组织的积累会破坏鳃细胞的正常生理形态,鳃能帮助鱼类呼吸、虑食及排泄,所以鳃组织是鱼类机体与环境中氧交换和能量代谢的关键组织器官,因而纳米银在鳃组织的积累有可能使暴露于 0.25 mg/L 纳米银暴露组的死亡率高。肝脏中纳米银的含量最高,肝脏中的 LDH 的活性下降,说明肝细胞受到了破坏,LDH 是存在于组织细胞的胞质中,肝细胞受到破坏,使 LDH 生成减低或泄到血液中,表明纳米银对肝脏是有损害的。Bruneau et al<sup>[12]</sup> 将虹鳟幼鱼暴露于纳米银,发现了鳃和肝脏组织中也有银离子的积累。肝脏中 SOD 和 CAT 的活性受到抑制,显示了氧化应激损伤效应,体内外实验均表明了纳米银具有氧化损伤效应<sup>[13]</sup>,同时高剂量组还造成了肝脏和鳃组织中 MDA 含量的增加。肝脏组织病理学主要表现在肝脏细胞水肿、空泡化和炎症细胞浸润,肝实质淤血。鳃组织病理改变主要是初级鳃小片之间的间距增大,还有上皮细胞水肿、增生和融合以及泌氯细胞的增生,且有部分次级鳃小片弯曲、断裂。鳃上皮细胞增生和巨噬细胞化学发光反应延迟呈正相关,说明上皮细胞的增生影响到鳃组织的免疫能力,同样也意味着低氧<sup>[14]</sup>泌氯细胞对于海水真骨鱼在高盐的环境中能分泌氯化物,对于淡水硬骨鱼能吸收淡水中的氯化物,从而维持鱼体水盐平衡。Monfared et al<sup>[15]</sup> 研究发现虹鳟鱼暴露于不同浓度纳米银溶液中,对鳃组织可造成不同损伤,

综上所述,本研究证明了纳米银释放的  $Ag^+$  对水生生物的毒性作用,同时表明金属纳米颗粒生物效应和毒性作用的复杂性。但是纳米银毒性的原因尚未明确,有必要通过分析纳米银团聚、颗粒表面变化、银阳离子存在形态进一步阐明纳米银的毒性作用机制。

### 参考文献

- [1] Edwards-Jones V. The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare[J]. *Lett Appl Microbiol* 2009 49(2): 147-52.
- [2] Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J, Lankoff A, et al. Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparti-

- cles in male wistar rats[J]. *J Appl Toxicol* 2012 32(11): 920-8.
- [3] Cleveland D, Long S E, Pennington P L, et al. Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of silver nanomaterials leached from consumer products[J]. *Sci Total Environ* 2012 421-422: 267-72.
- [4] Griffith R J, Hyndman K, Denslow N D, et al. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles[J]. *Toxicol Sci* 2009 107(2): 404-15.
- [5] Ašmonaitė G, Boyer S, Souza K B, et al. Behavioural toxicity assessment of silver ions and nanoparticles on zebrafish using a locomotion profiling approach[J]. *Aquat Toxicol* 2016 173: 143-53.
- [6] Xin Q, Rotchell J M, Cheng J, et al. Silver nanoparticles affect the neural development of zebrafish embryos[J]. *J Appl Toxicol* 2015 35(12): 1481-92.
- [7] Lapresta-Fernández A, Fernández A, Blasco J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms[J]. *TrAC Trends Anal Chem* 2012 32(797): 40-59.
- [8] 顾大明, 农高, 程瑾宁. 次磷酸盐液相还原法快速制备纳米银粉[J]. *精细化工* 2002 19(11): 634-5, 37.
- [9] 吴源. 纳米的生物效应及毒性作用机制[D]. 北京: 中国科学技术大学 2010.
- [10] 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): 1897-910.
- [11] Webb N A, Wood C M. Bioaccumulation and distribution of silver in four marine teleosts and two marine elasmobranchs: influence of exposure duration, concentration, and salinity[J]. *Aquat Toxicol* 2000 49(1-2): 111-29.
- [12] Bruneau A, Turcotte P, Pilote M, et al. Fate of silver nanoparticles in wastewater and immunotoxic effects on rainbow trout[J]. *Aquat Toxicol* 2016 174: 70-81.
- [13] Wu Y, Zhou Q, Li H, et al. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test[J]. *Aquatic Toxicol* 2010 100(2): 160-7.
- [14] Muhvich A G, Jones R T, Kane A S, et al. Effects of chronic copper exposure on the macrophage chemiluminescent response and gill histology in goldfish[J]. *Fish Shellfish Immunol* 1995 5: 251-64.
- [15] Monfared A L, Bahrami A M, Hosseini E, et al. Effects of nanoparticles on histo-pathological changes of the fish[J]. *J Environ Health Sci Eng* 2015 13: 62.

## Subchronic toxicity study of silver nanoparticles on medaka

Zhou Yanjun, Shi Yang, Wu Yuan

(Dept of Occupational and Environment Health, School of Public Health, Anhui Medical University Hefei 230032)

**Abstract Objective** To study the sub chronic toxicity of silver nanoparticles on medaka. **Methods** Adult fish

were divided into silver nanoparticles and control group. Animals were collected on 14 days after exposure, and some toxicological endpoints such as death rate, tissue distributed of silver ions, oxidative stress and histopathological damage were measured. **Results** There were significant difference in death rate of medaka treated with silver nanoparticles and control group. Compared with the control group, the content of silver in gill, intestine and liver of medaka treated with silver nanoparticles were increased significantly. Compared with control group, the activity of LDH in liver and SOD in liver and gill were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The content of MDA in liver of medaka treated with silver nanoparticles was significantly increased ( $P < 0.01$ ). The liver and gill of medaka treated with silver nanoparticles were damaged, compared with control group. **Conclusion** Nano silver has a certain subchronic toxicity to aquatic life.

**Key words** silver nanoparticles; medaka; subchronic toxicity

(上接第 718 页)

- district, northwest Ethiopia: a cross-sectional study [J]. *BMC Public Health*, 2015, 15(1): 1-10.
- [3] 陈萍. 艾滋病传播的社会网络分析[D]. 济南: 山东大学, 2006.
- [4] Grootaert C, Bastelaer T V. Understanding and measuring social capital: a multidisciplinary tool for practitioners [J]. *Analysis*, 2002, 65(3): 1-320.
- [5] Sun X, Rehnberg C, Meng Q. How are individual-level social capital and poverty associated with health equity? A study from two Chinese cities [J]. *Int J Equity Health*, 2009, 8: 2.
- [6] Rimal R N, Limaye R J, Roberts P, et al. The role of interpersonal communication in reducing structural disparities and psychosocial deficiencies: experience from the malawi bridge project [J]. *J Commun*, 2013, 63(1): 51-71.
- [7] Kirby D B, Laris B A, Roller L A. Sex and HIV education programs: their impact on sexual behaviors of young people throughout the world [J]. *J Adolescent Health*, 2007, 40(3): 206-17.
- [8] 王文卿. 社会网络对商贩流动人口艾滋病风险的影响机制探析 [J]. *医学与社会*, 2014, 27(3): 23-6.
- [9] Chen W T, Han M, Holzemer W L. Nurses' knowledge, attitudes, and practice related to HIV transmission in northeastern China [J]. *AIDS Patient Care STDS*, 2004, 18(7): 417-22.
- [10] Tavosi A, Zaferani A, Enzevaei A, et al. Knowledge and attitude towards HIV/AIDS among Iranian students [J]. *BMC Public Health*, 2004, 4(1): 17.

## The relation between social communication and AIDS related knowledge attitude behavior among migrants

Wang Wenting<sup>1</sup>, Chen Ren<sup>1,2</sup>, Qin Xia<sup>1,2</sup>, et al

(<sup>1</sup>School of Health Management, <sup>2</sup>Institute

of Health Management, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the relationship between social communication and HIV/AIDS knowledge, attitude and behavior in migrants. **Methods** Convenience sampling was used to choose 758 migrants, data were measured through questionnaires about AIDS KAP and social capital. A cross-sectional study and Logistic regression were used. **Results** Migrants who had close social contact had higher awareness of HIV/AIDS knowledge ( $\chi^2 = 2.54, P = 0.047$ ). Higher levels of AIDS knowledge was associated with positive AIDS behaviors for people who had government and community personnel as close social contact ( $OR = 5.56, 95\% CI: 1.52 \sim 7.03$ ). For people who have government and community personnel and businessman ( $OR = 0.20, 95\% CI: 0.06 \sim 0.66, OR = 0.21, 95\% CI: 0.09 \sim 0.63$ , respectively) as close social contact, higher levels of HIV/AIDS knowledge had more negative attitude. **Conclusion** Social communication plays an positive role in improving HIV/AIDS knowledge and behavior in migrants.

**Key words** social communication; migrants; HIV/AIDS