

金纳米粒的细胞毒性及毒副作用研究进展^Δ

徐世一^{1*}, 李 燕², 阎雪莹^{3#}(1.黑龙江中医药大学药学院2014级, 哈尔滨 150040; 2.黑龙江中医药大学药学院2015级, 哈尔滨 150040; 3.黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R979.1⁹ 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)28-4010-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.28.37

摘要 目的:为金纳米粒(GNPs)在抗肿瘤方面的研究提供理论依据。方法:以“金纳米粒”“毒性”“细胞毒性”“副作用”“Gold nanoparticles”“Toxicity”“Cytotoxicity”“Side effect”等为关键词,组合查询1998年1月—2016年5月在PubMed、OSA、ACS、中国知网、万方、维普等数据库中的相关文献,就GNPs对肿瘤细胞的毒性及体内毒副作用的研究进行综述。结果与结论:共检索到英文文献200余篇,中文文献400余篇,其中有效文献30篇。GNPs细胞毒性和毒副作用受到粒径、表面电荷、表面修饰及给药剂量等因素的影响。其中,GNPs对肿瘤细胞的毒性与粒径相关;用还原剂/抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、三苯基膦磷酸修饰GNPs可降低其细胞毒性;增加GNPs的给药浓度可增强其对肿瘤细胞的毒性作用。在毒副作用方面,不同粒径的GNPs蓄积的组织器官不同,对机体造成的损伤类型也不同;阴离子型GNPs对机体无毒,而阳离子型GNPs相对来说具有中等毒性;聚乙二醇修饰的GNPs易引发炎症反应;增加GNPs的给药剂量也易引发进一步的毒副作用。GNPs的细胞毒性及毒副作用的相关研究需要更加深入,尤其是在其表面修饰物及粒径对细胞毒性和毒副作用的影响规律方面。

关键词 金纳米粒;细胞毒性;毒副作用

金(Gold)是最古老的一种金属,在现代医学中其可作为基因治疗的载体^[1]。金纳米粒(Gold nanoparticles, GNPs)作为基因治疗转染剂和抗肿瘤药^[2-4],也作为纳米载体的一种,其毒理学效应受到人们的重视^[5]。GNPs对肿瘤细胞具有靶向性,可携带多种抗肿瘤药特异性地聚集于肿瘤细胞,对正常细胞基本无细胞毒性^[6],因此GNPs细胞毒性被广泛地应用于肿瘤的治疗。然而已经有研究发现,金疗法(Chrysotherapy)有2/3的不良反应都是形式不同的皮炎,在临床推荐剂量下约有一半的患者发生不同形式的毒性反应,包括皮肤瘙痒、皮疹、嗜酸性粒细胞增多症、慢性唇炎、接触过敏性紫癜和玫瑰糠疹等;更严重的毒性反应包括血液病、肺炎和肾病综合征^[1]。笔者以“金纳米粒”“毒性”“细胞毒性”“副作用”“Gold nanoparticles”“Toxicity”“Cytotoxicity”“Side effect”等为关键词,组合查询1998年1月—2016年5月在PubMed、OSA、ACS、中国知网、万方、维普等数据库中的相关文献。结果,共检索到英文文献200余篇,中文文献400余篇,其中有效文献30篇。现就GNPs对肿瘤细胞的毒性及体内毒副作用的研究进行综述,以期对GNPs在抗肿瘤方面的研究提供理论依据。

1 GNPs的细胞毒性研究

1.1 GNPs的粒径对其细胞毒性的影响

Gao W等^[7]研究了谷胱甘肽修饰的GNPs对HL7702细胞的毒性作用发现,GNPs可改变HL7702细胞的氧化还原状态,对HL7702细胞凋亡的信号转导通路中的氧化还原起到调节作用,8 nm的GNPs具有很高的细胞毒性,而粒径较大的37 nm的GNPs则具有相对中等的毒性,说明GNPs粒径的减小,会增加其对HL7702细胞的毒性。

Coradeghini R等^[8]将5 nm与15 nm的GNPs进行比较时发现,5 nm的GNPs在浓度 $\geq 50 \mu\text{mol/L}$ 时就会显现出对Balb/3T3细胞的毒性,而15 nm的GNPs并没有发现细胞毒性。免

疫印迹和免疫组化结果显示,小窝蛋白的表达水平并没有因为GNPs进入细胞而发生变化;在观察72 h后研究人员发现,网格蛋白表达降低,网格蛋白重链裂解。而网格蛋白重链的裂解会导致癌细胞分裂异常,从而表现出细胞毒性作用,而这一切可能是GNPs的内化发挥了作用。Pan Y等^[9]研究了0.8~15 nm的GNPs对具有屏障与吞噬功能的4个主要类型的细胞系的毒性作用发现,结缔组织中的成纤维细胞、上皮细胞、巨噬细胞和黑色素瘤细胞对粒径为1.4 nm的GNPs最敏感,半数抑制浓度(IC₅₀)范围为30~56 $\mu\text{mol/L}$;相比之下,15 nm的GNPs在60~100倍的高浓度之下也是无毒的;粒径为1.4 nm的GNPs在12 h内导致细胞快速的死亡,而粒径为1.2 nm的GNPs主要是通过诱导细胞凋亡来影响细胞编程性死亡。

Liu ZX等^[10]在研究GNPs对肺癌细胞的作用时发现,5 nm的GNPs可抑制A549细胞的生长,但是会导致细胞浸润;吞噬10 nm的GNPs后显著促进了95D细胞的浸润,侵袭活性的增强可能与基质金属蛋白酶9和细胞间黏附分子1表达增加有关。2 nm的GNPs可穿透细胞及细胞室(如细胞核),这使得其具有毒性^[11]。球形的1.4 nm的GNPs通过氧化应激机制导致各类肿瘤细胞系中的线粒体损伤甚至坏死^[12]。Connor EE等^[13]研究发现,较大的GNPs(18 nm)进入细胞以后并没有对细胞产生固有的毒性。

Patra HK等^[14]的研究也证实了GNPs容易被A549细胞、95D细胞通过非特异性的细胞内吞作用定位在细胞内小泡中。小粒径的GNPs可抑制肺癌细胞的增殖,直径为5 nm的GNPs效果较显著,可促进细胞凋亡,将肺癌细胞系的细胞周期阻滞在G₀/G₁期;相比之下,10、20、40 nm的GNPs对肺癌细胞系并没有明显的细胞毒作用;相反20、40 nm的GNPs作用于A549细胞24 h后却促进了细胞的增殖,但是在95D细胞中并未观察到这种现象;此外,5、10 nm的GNPs可促进A549、95D细胞的浸润,然而粒径大于20 nm的GNPs并没有发现这种现象。由此可见,GNPs对肿瘤细胞的抑制及毒性作用与其粒径有关。然而,GNPs并不是对所有类型的细胞都有相同的作用^[12]。针对不同细胞系调整GNPs的粒径,对于提高其靶向性及抑制癌细胞增殖、促进其凋亡可起到重要作用。

1.2 GNPs的表面电荷和表面修饰对其细胞毒性的影响

^Δ 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No.12521z022)

* 硕士研究生。研究方向:靶向、缓控释制剂的研究及药物的体内代谢。E-mail:994010246@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:靶向、缓控释制剂的研究及药物的体内代谢。电话:0451-87266827。E-mail:15159267@qq.com

Pan Y 等^[12]研究发现,用还原剂/抗氧化剂 *N*-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、三苯基膦磷酸(TPPMS)修饰 1.4 nm 的 GNPs 可降低其对肿瘤细胞的毒性;在表面修饰不同但是粒径相同的 GNPs 中,与谷胱甘肽连接的 GNPs 则毒性明显较小。由此可见,除了粒径对 GNPs 毒性有重要影响外,表面电荷和表面修饰也是确定其细胞毒性程度的重要参数。

1.3 GNPs 给药浓度对其细胞毒性的影响

Paino IMM 等^[15]研究发现,即使在很低的浓度下,GNPs 都可以和 HepG2 细胞以及外周血单个核细胞相互作用产生基因毒性,而且其对 HepG2 细胞的 DNA 损伤较大,给药浓度增加,其毒性也会随之增大。

2 GNPs 对正常组织细胞的毒副作用研究

2.1 GNPs 的粒径对其毒副作用的影响

有研究发现,粒径为 12.5 nm 的 GNPs 在肝、肾、脾和脑部并没有毒性反应^[16-17];不同粒径(3、10、50、100 nm)的 GNPs 对斑马鱼胚胎只显示最小亚致死毒性效应^[18]。但是 De Jong WH 等^[19]研究发现,不管是 10 nm 还是 250 nm 的 GNPs,都在肝脏和脾脏中有着大量的蓄积;此外,还有一定数量的 GNPs 蓄积在血液中。由此可见,不论粒径大小,GNPs 在组织器官中都会有一定量的蓄积。Coulter JA 等^[20]研究发现,与未处理的细胞相比,GNPs 处理的细胞存在着潜在的放射增敏风险。那么,GNPs 在组织器官中的蓄积就很有可能引发进一步的毒副作用。

Yang H 等^[21]研究不同粒径(1.5、4.5、13、30、70 nm)的 GNPs 对非妊娠期和妊娠期不同孕龄(5.5、7.5、9.5、11.5、13.5 d)大鼠的毒性大小时发现,30 nm 的 GNPs 会诱导孕期大鼠发生轻度肺气肿样改变,说明孕期大鼠的器官特异性不良反应可能与 GNPs 的粒径有关。

Tsoli M 等^[22]研究发现,GNPs 1.4 nm 的粒径是攻击 DNA 的有效临界值。Bar-Ilan O 等^[23]运用斑马鱼模型评估胶态微粒金的毒性(透明的斑马鱼胚胎具有高度的同源性的人类基因,经常被用于毒性实验的研究),用 3、10、50、100 nm 的胶态银、金微粒进行研究时发现,受孕 120 h 后斑马鱼死亡率分别为 100% 和 3%,而且胶态金微粒会引起轻微的亚致死毒性效应,从而产生各种胚胎畸形。同时证明其毒性大小的确与粒径具有紧密的关系,似乎是粒径越小则毒性越大,但是胶态银微粒的毒性要大于胶态金微粒。

Zhang XD 等^[24]研究了 5、10、30、60 nm 的 GNPs 在大鼠体内的毒性作用时发现,5、10 nm 的 GNPs 主要蓄积在肝脏,30 nm 的 GNPs 主要蓄积在脾脏,而 60 nm 的 GNPs 在任何器官都没有明显的蓄积量。虽然通过透射电子显微镜观察发现,5、10、30、60 nm 的 GNPs 在血液和骨髓细胞中也有一定量的蓄积,但 5、60 nm 的 GNPs 优先蓄积在血细胞中,其主要蓄积的部位对其毒性具有重要影响,导致脾脏指数和胸腺指数明显增加。这预示着这些小分子纳米粒已经对免疫系统造成了影响:10 nm 的 GNPs 造成了白细胞的增加,而 5、30 nm 的 GNPs 造成白细胞和红细胞的减少;10、60 nm 的聚乙二醇(PEG)修饰的 GNPs 引起了丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶水平显著增加,肝脏受到轻微损伤;10、60 nm 的 GNPs 的毒性明显高于 5、30 nm 的 GNPs。由此可见,粒径较小的 GNPs 具有更大的毒性这种说法并不可靠。

2.2 GNPs 的表面电荷和表面修饰对其毒副作用的影响

Goodman CM 等^[25]研究发现,阴离子型 GNPs 对机体无毒,而阳离子型 GNPs 相对来说具有中等毒性。De Brosse MC 等^[26]

研究发现,与修饰物 PEG 相比,单宁酸可显著增加人永生表皮细胞对 GNPs 的摄取,并且长时间地增加细胞内 GNPs 的浓度会引发一定程度的细胞损伤。Cho WS 等^[27]研究发现,PEG 修饰的 GNPs 会分布到含有巨噬细胞的器官中(如肝脏和脾脏),并被困在肝脏的 Kupper 细胞和脾脏的巨噬细胞中,而没有 PEG 修饰的 GNPs 则可以穿透细胞的核膜。但是近期研究中也发现 PEG 修饰的 GNPs 也可以穿透细胞的核膜^[28],这是由于其与信号配位体结合后通过诱导迁移而进入到细胞核内的。而 13 nm 的 PEG 修饰的 GNPs 被证实会引发大鼠肝脏的急性炎症反应和细胞凋亡,因为该纳米粒子在注射进入体内 7 d 后仍然发现蓄积在肝脏和脾脏中,且其血液循环时间长达 30 h。虽然有一些文献认为 PEG 修饰的 GNPs 是无毒的^[26],但是这样长时间的蓄积显然可作为其引发急性炎症的依据^[27]。PEG 修饰的 GNPs 的蓄积性可能是 GNPs 应用于生物医学中的一个障碍,其对细胞的毒性还有待进一步研究。

纳米粒子是否能通过肾小球的滤过主要取决于其大小和表面静电位^[29],如果 GNPs 无法从肾脏中排泄出去,那么随着量的蓄积就会造成肾脏的负担。GNPs 的药动学、生物利用度、生物富集和毒性可能依赖于纳米粒的组成、粒径和表面特性,对药理特性影响较大的就是粒子的表面静电位;而且 GNPs 在制备过程中吸附了枸橼酸盐后表面就会携带负电荷^[18],因而不被肾小球滤过。

2.3 GNPs 给药剂量对其毒副作用的影响

Cho WS 等^[27]研究发现,单剂量注射粒径为 13 nm 的 GNPs,24 h 和 7 d 后都可以在肝、脾、肾、肺、脑、睾丸等组织器官中找到 GNPs 的存在,而且其浓度依赖于注射时间,其积累量依赖于给药剂量。但是机体内环境是十分复杂的,那么 GNPs 在实际应用中的剂量、浓度是否会对其毒副作用产生影响? Imperatore R 等^[30]研究了 2-巯基-1-甲基咪唑修饰的 GNPs 的神经毒性,以 0.1 mg/ml 的最低浓度培养细胞,神经元细胞表现出了典型的细胞凋亡的征兆,这意味着即使是最低的给药浓度依然能造成神经元的损伤。Lasagna-Reeves C 等^[16]分别以 3 个不同剂量[40、200、400 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]对大鼠腹腔注射粒径为 12.5 nm 的 GNPs 8 d,其在血液、肝脏及脾脏中的蓄积量随着剂量的增加而增加,并且 7 d 后仍有一部分 GNPs 蓄积在肝脏及脾脏中,但是并没有产生亚急性生理损伤,即没有明显的器官毒性产生。GNPs 在脑组织中的含量虽然比较低,但是依然能穿透血脑屏障,增加神经毒性损伤的风险。由以上文献我们发现,GNPs 会穿透血脑屏障,即使在很低的剂量下也会造成神经元的损伤;同时,GNPs 也会在其他组织器官中蓄积,但并无明显毒副作用。

3 结语

GNPs 细胞毒性和毒副作用受到粒径、表面电荷、表面修饰及给药剂量等因素的影响。其中,GNPs 对肿瘤细胞的毒性与粒径相关;用还原剂/抗氧化剂 *N*-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、TPPMS 修饰 GNPs 可降低其细胞毒性;增加 GNPs 的给药浓度可增强其对肿瘤细胞的毒性作用。在毒副作用方面,不同粒径的 GNPs 蓄积的组织器官不同,对机体造成的损伤类型也不同;阴离子型 GNPs 对机体无毒,而阳离子型 GNPs 相对来说具有中等毒性;PEG 修饰的 GNPs 易引发炎症反应;增加 GNPs 的给药剂量也易引发进一步的毒副作用。

GNPs 表面修饰物的不同是否会影响到其对机体的毒副作用还有待进一步研究。虽然 Lasagna-Reeves C 等^[16]研究发现,大鼠腹腔注射不同浓度的 GNPs 并没有产生明显的毒性,但是

GNPs 不论多次给药还是单剂量给药,其给药剂量越大 GNPs 在体内的蓄积量越多仍可能引发进一步的毒性反应。另外, GNPs 的细胞毒性及毒副作用的相关研究需要更加深入的探究,尤其是在其表面修饰物及粒径对细胞毒性和毒副作用的影响规律方面。

参考文献

- [1] Merchant B. Gold, the noble metal and the paradoxes of its toxicology[J]. *Biologicals*, 1998, 26(1):49.
- [2] Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, *et al.* Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy[J]. *Nanomedicine*, 2007, 2(5):681.
- [3] Dreaden EC, Mackey MA, Huang X, *et al.* Beating cancer in multiple ways using nanogold[J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(7):3 391.
- [4] Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, *et al.* Gold nanoparticles for biology and medicine[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49(19):3 280.
- [5] 黄琴琴,王永禄,李学明.纳米载体材料毒理学效应及其作用机制研究进展[J].*中国药房*, 2011, 22(21):2 004.
- [6] 刘文佳,谷小虎,丁轶,等.纳米金在抗肿瘤研究中的应用[J].*现代生物医学进展*, 2010, 10(5):982.
- [7] Gao W, Xu KH, Ji LF, *et al.* Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells[J]. *Toxicol Lett*, 2011, 205(1):86.
- [8] Coradeghini R, Gioria S, Garcia CP, *et al.* Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 217(3):205.
- [9] Pan Y, Neuss S, Leifert A, *et al.* Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles[J]. *Small*, 2007, 3(11):1 941.
- [10] Liu ZX, Wu YC, Guo ZR, *et al.* Effects of internalized gold nanoparticles with respect to cytotoxicity and invasion activity in lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): 99 175.
- [11] Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?[J]. *J Nanopart Res*, 2010, 12(7):2 313.
- [12] Pan Y, Leifert A, Ruau D, *et al.* Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage[J]. *Small*, 2009, 5(18):2 067.
- [13] Connor EE, Mwamuka J, Gole A, *et al.* Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity[J]. *Small*, 2005, 1(3):325.
- [14] Patra HK, Banerjee S, Chaudhuri U, *et al.* Cell selective response to gold nanoparticles[J]. *Nanomedicine*, 2007, 3(2):111.
- [15] Paino IMM, Marangoni VS, de Oliveira RCS, *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 215(2):119.
- [16] Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, *et al.* Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(4):649.
- [17] Schmid G. The relevance of shape and size of Au₅₅ clusters[J]. *Chem Soc Rev*, 2008, 37(9):1 909.
- [18] Hirn S, Semmler-Behnke M, Schleh C, *et al.* Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 77(3):407.
- [19] De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, *et al.* Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(12): 1 912.
- [20] Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, *et al.* Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7(6): 2 673.
- [21] Yang H, Du LB, Tian X, *et al.* Effects of nanoparticle size and gestational age on maternal biodistribution and toxicity of gold nanoparticles in pregnant mice[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 230(1):10.
- [22] Tsoli M, Kuhn H, Brandau W, *et al.* Cellular uptake and toxicity of Au₅₅ clusters[J]. *Small*, 2005, 1(8/9):841.
- [23] Bar-Ilan O, Albrecht RM, Fako VE, *et al.* Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos[J]. *Small*, 2009, 5(16):1 897.
- [24] Zhang XD, Wu D, Shen X, *et al.* Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, doi:10.2147/IJN.S21657.
- [25] Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, *et al.* Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains[J]. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15(4): 897.
- [26] De Brosse MC, Comfort KK, Untener EA, *et al.* High aspect ratio gold nanorods displayed augmented cellular internalization and surface chemistry mediated cytotoxicity[J]. *Mater Sci Eng C*, 2013, 33(7):4 094.
- [27] Cho WS, Cho M, Jeong J, *et al.* Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 236(1):16.
- [28] Thomas M, Klibanov AM. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(16):9 138.
- [29] Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats[J]. *Nanomedicine: Lond*, 2008, 3(5):703.
- [30] Imperatore R, Carotenuto G, Di Grazia MA, *et al.* Imidazole-stabilized gold nanoparticles induce neuronal apoptosis: an in vitro and in vivo study[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(4):1 436.

(收稿日期:2016-03-13 修回日期:2016-06-16)

(编辑:余庆华)