

纳米银的血液相容性及作用机制研究进展

黄河^①, 刘颖^{②*}, 谢黎明^{①*}

① 国家纳米科学中心, 中国科学院纳米标准与检测重点实验室, 北京 100190;

② 国家纳米科学中心, 中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室, 北京 100190

* 联系人, E-mail: liuy1@nanocr.cn; xielm@nanocr.cn

2015-08-18 收稿, 2015-09-30 接受, 2015-11-24 网络版发表

中国科学院战略性先导 A 项目(XDA09040300)资助

摘要 纳米银以其良好的抗菌性能被广泛用于食品工业、生物医药等诸多领域。但随着纳米银产品的不断发展与广泛使用, 其生物安全性备受人们的重视。本文根据近年来国内外研究进展, 全面总结纳米银接触人体进入到血液后引起的一系列血液生物效应(包括红细胞溶血、血小板聚集、白细胞增殖及其炎症反应、凝血级联反应和补体系统激活), 并进一步分析总结了其可能的生物效应作用机制, 以期能为纳米银的生物安全效应评估提供有效的参考, 并对将来制备更高效且无毒的纳米银产品具有一定的指导意义。

关键词

纳米银
血液相容性
生物安全性
作用机制

近些年来, 纳米银作为广谱、有效的抗菌剂开始进入人们的日常生活, 在生活用品、医疗器械、乃至药物载体及靶向治疗等领域都已广泛应用。与此同时, 纳米银的生物安全性问题也引起了高度重视^[1-3]。纳米银的生物安全性与诸多因素相关, 如粒径、聚集程度、表面电荷、表面官能团、剂量、细胞种类等, 当前的文献研究着重于发现新的生物效用而往往弱化了剂量等因素的影响。在现有文献报道中, 纳米银在一定条件下会产生细胞毒性(如细胞活力降低、凋亡等)^[4,5]、膜毒性(如细胞膜受损、通透性改变等)^[6-8]、遗传毒性(如DNA损伤、染色体畸变等)^[9-11]、心血管系统疾病^[12,13]等, 甚至还能引发胚胎发育畸形^[14,15]。

当人体使用含纳米银相关产品时, 纳米银可能会以皮肤沉积、呼吸道吸入、食管和消化道摄入、血管药物注射的方式进入到人体, 再经由血液循环作用被转运至身体的各个部位进而蓄积或直接被排出体外^[16]。因此, 血液在该过程中起到了中转枢纽的作用(图1), 纳米银的血液相容性的研究至关重要。鉴于此, 本文就纳米银的血液相容性及其可能的作

用机制进行了较为系统的归纳和分析, 以期能全面而又充分地揭示纳米银的生物安全效应的研究现状, 为纳米银生物安全性评价以及制备更高效且无毒的纳米银产品提供一定的参考。

1 纳米银的血液相容性

血液作为机体的转运系统, 在机体的新陈代谢和免疫防御过程中发挥非常重要的作用。当纳米银进入到血液后, 直接与血液中的各种组分相互作用产生多种潜在的血液生物效应(图2)^[17]。目前, 文献报道纳米银的血液效应主要包括血细胞(红细胞、白细胞、血小板)生物学效应和血浆(凝血因子、补体蛋白等)生物学效应等。

1.1 纳米银对红细胞的影响

红细胞作为机体与外界环境进行氧气和二氧化碳交换的中转站, 在有机生物体的呼吸作用过程中起着至关重要的作用^[18-20]。当红细胞受到外界物理应激作用、有毒化学物质、病原微生物的侵袭时, 细胞膜会发生不同程度的损伤, 使机体出现贫血、黄疸

引用格式: 黄河, 刘颖, 谢黎明. 纳米银的血液相容性及作用机制研究进展. 科学通报, 2015, 60: 3557-3568

Huang H, Liu Y, Xie L M. Recent progress on blood compatibility of silver nanoparticles and the related mechanisms (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 3557-3568. doi: 10.1360/N972015-00945

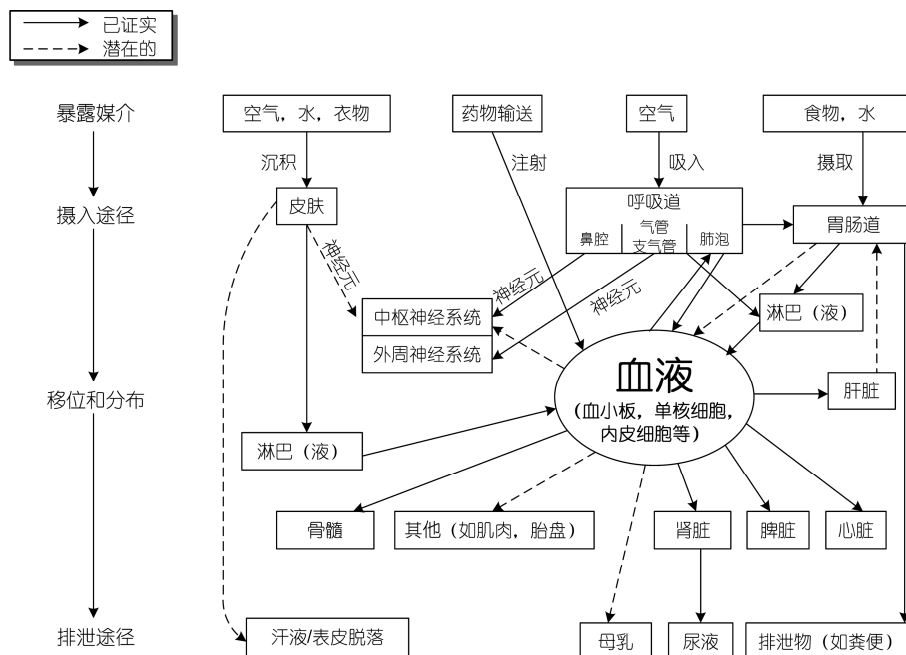


图1 纳米银以不同方式进入人体后的流向图(改编自文献[16])
Figure 1 The flowchart of silver nanoparticles in human body (adapted from ref. [16])

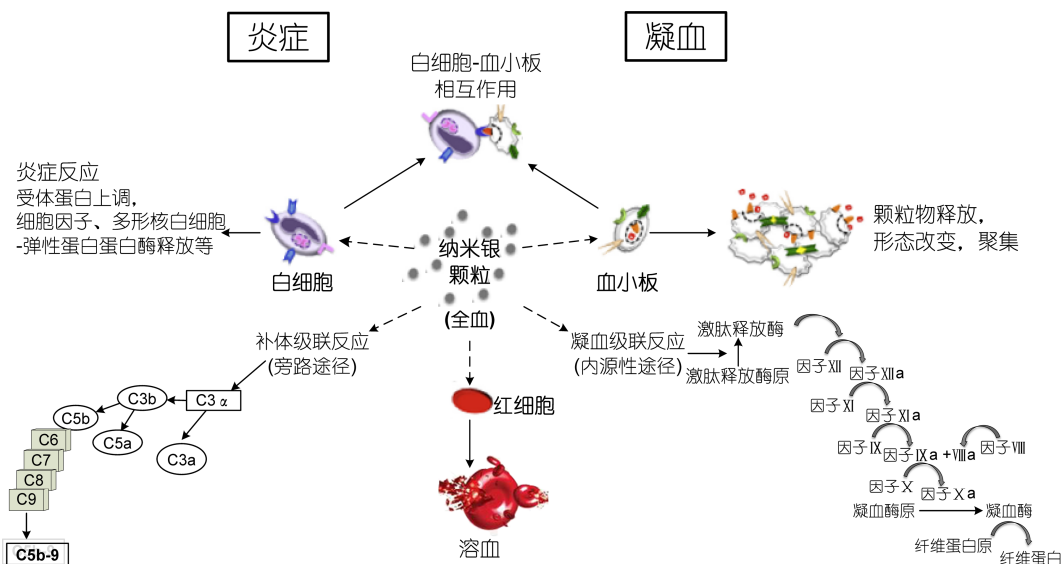


图2 (网络版彩色) 纳米银与血液组分之间的相互作用(改编自文献[17])
Figure 2 (Color online) Interactions between silver nanoparticles and blood components (adapted from ref. [17])

等病理症状^[21,22]。因此，纳米银作为外源物进入血液后，对红细胞的潜在影响可直接作为衡量纳米银血液相容性的一个重要指标。

现今，已有相关文献报道了纳米银大多会引起细胞凋亡和胞膜受损，致使发生严重的溶血现象，还有一些纳米银会引起红细胞形态变化和聚集。而且，

相对于其他材料，纳米银材料更容易造成红细胞损伤。Asharani等人^[23]研究发现，聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)和淀粉包被的纳米银颗粒要比同样包被的金和铂纳米颗粒在浓度为100 μg/mL时更容易引发红细胞聚集、形态异常以及胞膜破裂导致溶血。总结起来，纳米银对于红细胞的干扰主要受4个因素的

影响: (1) 研究发现小粒径要比大粒径的纳米银对红细胞造成的影响更为显著^[24-26]. Choi等人^[24]采用氰化高铁血红蛋白比色法来检测血红蛋白的释放量, 结果发现小粒径(30~50 nm)的纳米银要比大粒径(800~3000 nm)的银颗粒在浓度大于220 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时更易造成红细胞溶血, 这可能与其比表面积大小有关; 另外, 柠檬酸包被的不同粒径纳米银颗粒在浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时也会引起红细胞膜破裂而造成溶血, 其中粒径越小越容易发生溶血(1 > 50 > 100 nm)^[26]. (2) 对于纳米银材料, 材料的形状会造成红细胞毒性的差异. 微流体激光衍射测量法和聚集测量法的结果表明, 在浓度50~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)包被的纳米银颗粒(30或100 nm)要比银纳米线(直径40 nm, 长度1~2 μm)更易引起红细胞形态变化, 而银纳米线则更易导致红细胞聚集, 且当两者的浓度达到300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均会引起红细胞溶血^[25]. (3) 纳米银表面修饰不同, 对红细胞的影响程度也会不尽相同. Kwon等人^[27]研究发现, 在100~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内且处理1~3 h后, 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)比PVP作为纳米银的表面修饰更容易导致红细胞形态改变以及胞膜的易脆性(溶血、钾离子外流、蛋白渗漏). (4) 另有大量实验结果显示, 纳米银对于红细胞的生物学效应具有剂量依赖性^[17,26,28,29]. Coman等人^[28]通过免疫荧光法和酶联免疫技术发现, 粒径为0.65 nm的胶体纳米银会以剂量依赖的方式(5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)引起红细胞的凋亡和二磷酸甘油酸(2,3-DPG)、三磷酸腺苷(ATP)的释放; 表面由聚丙烯酸钠修饰的纳米银(10~15 nm)在30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时诱导红细胞溶血最为显著^[17]. 因此, 影响纳米银对红细胞作用的因素颇多, 比如粒径大小、形状、表面包被、剂量等, 其中尤以粒径大小的影响最为关键.

1.2 纳米银对白细胞的影响

白细胞是一群免疫细胞的统称, 包括单核/巨噬细胞、淋巴细胞以及粒细胞(嗜中性、嗜酸性、嗜碱性). 当机体受到外界病原物的入侵时, 经由抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC, 如单核/吞噬细胞)的识别、吞噬、加工处理后, 诱导细胞且分泌一些细胞因子如白介素(interleukin, IL)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、干扰素(interferon, INF)等以完成免疫应答反应^[30-32]. 因此, 这些免疫细胞

的活力会直接关系到机体的免疫应答过程. 纳米银对白细胞的潜在影响, 也可作为纳米银生物效应一个重要的评价标准. 另外, 通过Ficoll等密度梯度离心可以从外周血中分离出外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 是同时含有单核细胞和淋巴细胞的混合细胞. 目前, PBMCs可通过体外诱导培养成树突状细胞(dendritic cells, DCs)和细胞因子诱导的杀伤性细胞(cytokine induced killer cells, CIK), 在肿瘤细胞免疫治疗中扮演重要的角色^[33,34]. 已有越来越多的科研工作者直接将PBMCs作为纳米银的作用对象, 这样或许比作用于单个免疫细胞能更好地模拟体内多细胞的环境, 使实验结果更可靠.

目前, 根据已有文献报道, 纳米银对白细胞的形态、活力、增殖、炎症因子释放、信号通路中相关蛋白的表达水平以及遗传物质等均有不同程度的影响, 且这些影响与纳米银自身的各种表征特性有很大关联: (1) 纳米银尺寸不同, 对白细胞的影响不同. Zhornik等人^[35]采用原子力显微镜技术, 研究发现浓度为40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 粒径小于20 nm的纳米银能引起淋巴细胞收缩而发生形态改变(不同于细胞膜结构的改变), 而粒径大于200 nm纳米银则没有影响. 粒径越小的PVP包被的纳米银在0.3, 0.6, 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内能诱导单核细胞产生更多的IL-1 β (5>28>100 nm)^[36]; 并且与大粒径相比, 粒径较小的PVP包被的纳米银(10 > 20 > 80 nm)在浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时更能选择性抑制巨噬细胞中TNF, IL-6, 集落刺激因子GM-CSF和趋化因子等细胞因子的表达, 并下调单核细胞中一些与信号通路相关蛋白(如TLR2, NOD2)的mRNA表达水平, 从而抑制衣原体感染J774引起的炎症反应^[37]. (2) 纳米银表面包被不同, 对白细胞的影响不同. 粒径为20 nm, 柠檬酸和聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)分别包被的纳米银均能抑制淋巴细胞的分裂增殖过程, 且PEI较柠檬酸包被后产生的影响更为显著(前者的半抑制浓度为5.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 后者的半抑制浓度为12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 这可能与PEI使纳米银更易黏附细胞而被内化有关^[38]. (3) 纳米银对于白细胞的影响具有时间和剂量依赖性. Barkhordari等人^[39]发现10 nm的纳米银以时间和剂量依赖的方式降低单核细胞的活力, 处理24 h和浓度为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞活力最低. Krajewski等人^[17]研究发现粒径为10~15 nm, 表面由聚丙烯酸钠修饰的纳米银以剂量

依赖效应诱导粒细胞表型分子CD11b的上调,且在30 $\mu\text{g/mL}$ 时最为显著. Shin等人^[40]采用MTS细胞增殖和酶联免疫吸附实验方法,发现粒径为1~2.5 nm的胶体纳米银以剂量依赖的方式抑制PBMCs的增殖(以 $>10 \mu\text{g/mL}$ 时细胞毒性作用最为显著),同时也抑制了PBMCs因植物凝集素(PHA)诱导释放IL-5, INF- γ 以及TNF- α 的能力. Greulich等人^[41]用粒径为 $75 \pm 20 \text{ nm}$, PVP包被的纳米银直接作用PBMCs后,发现纳米银(10~15 $\mu\text{g/mL}$)可以激活单核细胞(表达CD54黏附分子),并被单核细胞摄入,当浓度达到25 $\mu\text{g/mL}$ 时对单核细胞产生毒性,但并不调控T淋巴细胞的增殖. 另外,小鼠的体内实验结果显示,10~20 nm的胶体纳米银能显著降低血液中单核细胞数量,在低浓度(0.25 $\mu\text{g/mL}$)可抑制淋巴细胞的增殖,而中高浓度(2.5和25 $\mu\text{g/mL}$)均不产生影响^[42]. (4) 纳米银的合成方法不同,也会导致其对白细胞的影响发生改变. Gengan等人^[43]利用绿色生物法合成的粒径为4~35 nm纳米银在10和50 $\mu\text{g/mL}$ 时均不影响淋巴细胞的增殖活力.

因此,在影响纳米银与白细胞相互作用的众多因素中,纳米银颗粒的粒径以及剂量是2个比较关键的影响因素. 一般来说,小粒径要比大粒径的影响更为突出,毒性更大^[35-37];高剂量比低剂量的毒性更大^[39,40]. 纳米银的表面修饰不同也会造成其不同的影响,这可能与表面修饰分子介导的细胞吞噬内化作用有关^[38,44,45]. 另外值得注意的是,不同的制备方法也会影响纳米银对白细胞的潜在毒性作用^[43].

1.3 纳米银对血小板的影响

血小板是从骨髓成熟的巨核细胞胞质裂解脱落下来的具有生物活性的小块胞质,在初步止血、伤口愈合、血栓形成以及炎症反应过程中有重要作用^[46]. 血小板数量减少会导致凝血功能不正常,引起机体不同程度的出血;血小板数量增多则导致凝血功能过于亢进而引起血栓的形成. 因此,纳米银作为异物进入血液后对血小板产生的潜在影响(黏附、聚集、激活)既可用于评估纳米银的血液相容性,也能为进一步研发新型促/抗凝血纳米材料以及抗血栓纳米药物提供很好的参考.

有文献报道,一些纳米银可诱导血小板聚集激活,易引发血栓的形成^[29,47,48]. Stevens等人^[47]研究发现用粒径为20 nm的纳米银作为涂层制备的医用导管

材料可引起血小板激活,从而引发血栓的形成; Laloy等人^[29]采用血小板聚集度测量计和SEM技术,研究发现粒径为16 nm, PVP包被的纳米银浓度达到50 $\mu\text{g/mL}$ 时会诱导血小板黏附聚集. 值得注意的是,纳米颗粒达到一定浓度时(30 $\mu\text{g/mL}$)也可以诱导血小板膜溶解性损伤释放 α -颗粒而非自身激活^[17]. 另外,也有文献报道,一些纳米银可抑制血小板激活,起到抗凝血或抗血栓形成的作用^[49,50]. 纳米银可以抑制血小板直接黏附到纤维蛋白上^[50],并下调整联蛋白介导的血小板激活(释放颗粒)和聚集,防止血块的形成^[49],但并不会造成血小板溶解性损伤^[51,52];小鼠体内实验的结果显示,高剂量(25 $\mu\text{g/mL}$)的胶体纳米银(10~20 nm),可显著降低血小板数量^[42]. 显然,纳米银对于血小板的影响还与其浓度有关^[29,53]. 当纳米银的剂量足够低时,将不再具有潜在的毒性作用,如Smock等人^[53]进行了人体的离体实验,结果显示口服商业化的纳米银胶体产品(Lot #071511; American Silver, LLC.)2周后,血清中银浓度 $<10 \mu\text{g/L}$ 时并未造成对血小板聚集的影响. 可见,纳米银与血液接触后,是否影响血小板活性以及如何影响都与纳米银本身的性质有关,因此,针对不同的纳米银,无法得出一致的结论.

1.4 纳米银对凝血过程的影响

当人体受到物理损伤后,首先会引起血管痉挛、收缩,起到迅速减缓流速的作用,与此同时血小板被激活形成血小板止血栓(platelet plug)起到初步止血效果;紧接着是血浆中一系列凝血因子被逐级激活,末端的凝血因子X a进一步激活凝血酶原(prothrombin)形成凝血酶(thrombin);在凝血酶的作用下,纤维蛋白原(fibrinogen)被激活形成纤维蛋白(fibrin)并进一步形成纤维蛋白网格(fibrin meshwork);最后由纤维蛋白网格与血小板止血栓合并一起形成血凝块(platelet-fibrin clot),起到完全止血效果^[54]. 在整个止血过程中,由凝血因子、凝血酶(原)、纤维蛋白(原)组成的凝血级联反应(coagulation cascade)过程,主要有3种凝血途径:内源性凝血途径(intrinsic pathway)、外源性凝血途径(extrinsic pathway)以及共同途径(common pathway)^[55]. 临床实验中,这3种途径可以分别由活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)和凝血酶时间(thrombin time,

TT)来体现。

与血小板作用类似, 纳米银对于凝血过程的影响也并不是单一方向的。目前已有文献报道, 当纳米银进入血液后, 可以通过上调凝血酶的表达量, 促进凝血过程, 诱发血栓的形成, 从而引起一些血栓性疾病^[29,47,48]。除了调控凝血酶以及纤维蛋白的聚合作用外, 纳米银还可以通过激活凝血因子来调控凝血反应。如Krajewski等人^[17]研究发现粒径为10~15 nm, 表面由聚丙烯酸钠修饰的纳米银在30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可显著诱导血液中类激肽释放酶(kallikrein-like)、类接触因子(XIIa-like)的表达含量上调, 可激活内源性凝血途径。而另一方面, 也有报道称纳米银同样可以减缓凝血过程, 抑制血栓形成。如Shrivastava等人^[56]发现粒径为10~15 nm的纳米银能以剂量依赖方式(100, 200, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)抑制凝血酶活性及阻止纤维蛋白聚合作用形成凝血块, 且在高剂量500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时影响最为显著, 起到抑制血栓形成的作用。另外, Martinez-Gutierrez等人^[57]以APTT和PT作为凝血检测指标, 发现粒径为24 nm的纳米银(1.078 mg/mL)可通过内源性途径适度地抑制凝血过程。

1.5 纳米银对补体系统的影响

补体系统(complement, C)是由存在于血液、组织中可溶性的且表达于细胞膜表面的共30多种蛋白质组成, 这些蛋白质通常以非活性状态的酶原前体形式存在^[58,59]。补体系统由3条独立途径激活, 分别是因补体分子C1q与抗体分子结合形成免疫复合物而启动的经典途径(classical pathway)、因补体分子C3自发性水解或病原体表面暴露而启动的旁路途径(alternative pathway)以及因甘露糖结合凝集素(mannose-binding lectin, MBL)识别一些病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)后激活MBL相关丝氨酸蛋白酶(MBL-associated serine proteases, MASPs)而启动的凝集素途径(lectin pathway), 整个过程均表现为一系列的蛋白酶水解级联反应^[60,61]。补体系统在先天性和后天性免疫防御过程中起着非常重要的桥梁作用, 不可或缺。目前, 针对纳米银与补体系统之间相互作用的研究报道还非常少。初步发现, 当纳米银进入血液后以剂量依赖方式激活补体系统。如Krajewski等人^[17]研究发现粒径为10~15 nm, 表面由聚丙烯酸钠修饰的纳米银在低浓度(1和3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)不具有补体激活的影响, 但浓度

达到30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可显著诱导血液中补体分子C3a, 伴随着可溶性末端补体复合物Sc5b-9(soluble terminal complement complex c5b-9)的表达含量增加, 从而激活补体系统。

2 纳米银血液生物学效应的作用机制

纳米银产生的血液生物学效应受多方面因素的影响, 也没有统一化的标准, 所以其产生的效应作用机制也会不尽相同, 即使是作用于同一种细胞也可能会有不同的作用机制, 这导致了研究纳米银血液生物学效应作用机制的复杂性与困难性。目前, 关于纳米银的红细胞生物学效应、白细胞生物学效应、血小板生物学效应以及对凝血过程影响的相关作用机制的研究虽然取得了一定的进展, 但是更加全面和深入的机制研究仍在进行中, 特别是其与血液相互作用的分子机制, 还不够明确。另外, 由于涉及纳米银与补体系统相互作用的研究尚少, 因此其机制研究几乎还是空白, 需要进一步广泛而深入的研究。

(1) 纳米银对红细胞产生生物学效应的作用机制。由于红细胞表面没有任何介导吞噬作用的相关受体, 也没有肌动-肌球蛋白系统, 所以纳米银颗粒首先可能会以一种不同于吞噬作用的渗透方式通过红细胞膜进入胞内^[62], 这种方式可能会造成对细胞膜整体性的破坏, 从而致使红细胞内部的一些蛋白或钾离子渗出^[27]。进入红细胞后, 纳米银可诱导胞内产生超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢(H_2O_2)以及单线态氧($^1\text{O}_2$)等活性氧物质(reactive oxygen species, ROS), 再由ROS诱导红细胞膜脂质过氧化而导致溶血发生^[23,26]。另外, 纳米银颗粒可以某种相互作用力直接作用于细胞膜, 在细胞膜表面形成一些坑或凹陷的形态导致红细胞极易破损而发生溶血^[23]。但关于这种作用力, 目前仍不清楚, 有待深入研究。值得注意的是, 由于纳米银本身会释放银离子, 而银离子可能与磷脂膜上的硫醇基团相互作用引起红细胞膜破坏而溶血^[63,64], 因此, 纳米银对于红细胞的生物学效应, 至少部分地来自其释放的银离子。

(2) 纳米银对白细胞产生生物学效应的作用机制。当纳米银颗粒进入到血液之后, 首先可能会由中性粒细胞或吞噬细胞介导的吞噬作用被摄入到胞内^[65,66]。纳米银进入细胞后, 大多会通过囊泡进入溶酶体, 由于溶酶体的酸性环境, 纳米银可作为类

Fenton试剂,与细胞内的过氧化物发生氧化还原反应,产生最具毒性的ROS-羟基自由基($\cdot\text{OH}$)^[67].当从溶酶体中逃逸后,纳米银多会向线粒体迁移,引起线粒体损伤,破坏呼吸链,并进一步产生更多的ROS^[68].之后,纳米银诱导产生的ROS及其干扰ATP的合成则会进一步引起遗传物质DNA损伤或染色体畸变等^[35,69].另外,纳米银也可能通过破坏细胞骨架抑制白细胞增殖^[70],或是直接与DNA相互作用导致细胞分裂周期停滞在G2/M期而引发细胞凋亡^[71].并且纳米银可以启动细胞受体介导的信号通路如ERK1/2^[72],MAPK^[73]等诱导细胞因子(IL-2/IL-6/TNF- α)的产生来调控淋巴细胞的增殖;类似地,纳米银还可以通过影响JNK^[70],NF- κB ^[74],p53^[75]通路,而调控下游信号分子如凋亡相关蛋白Bax的表达并转移至线粒体,导致细胞色素c(cytochrome c)释放至胞浆中,以及大量表达凋亡蛋白酶Caspase3促使细胞核膜及DNA断裂而导致细胞凋亡.与红细胞作用的可能机制类似,纳米银对白细胞的生物学效应很多也可归因于银离子的释放^[76-79].银离子可以通过与硫醇基团相互作用来直接干扰或破坏胞膜的通透性,还可以直接作用于胞浆内的生物分子(如蛋白、核酸等),抑制呼吸链中的蛋白酶从而降低细胞活力^[80,81].因此,纳米银对白细胞的种种生物学效应,主要来自于ROS的产生和银离子的释放.

(3) 纳米银对血小板产生生物学效应的作用机制.当血小板受到纳米银颗粒的作用刺激后,可能会引起血小板膜上的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)由质膜内侧转向质膜外侧而暴露,为凝血反应提供催化表面,进一步加速凝血酶的产生.一方面凝血酶可引发血小板胞内钙离子(Ca^{2+})增加以及胞内致密颗粒释放5-羟色胺(serotonin)来促进血小板活化,激活后会诱导 α -颗粒内容物的分泌和颗粒跨膜蛋白P-选择素(P-selectin, 整联蛋白家族的一员)迅速通过外排表达在血小板表面上,且在血小板的膜糖蛋白(GPIIb/GPIIIa)介导下协同引发血小板聚集并形成血小板止血栓(platelet plug);另一方面凝血酶可促使纤维蛋白原转变成纤维蛋白,包裹于血小板止血栓上形成牢固的凝血块或血栓^[48,54].

纳米银还可能通过释放的银离子作用于血小板,即所谓的“碰撞机制”.由于纳米银颗粒对氧的高度敏感性,导致其释放出的绝大部分银离子会以表面等离子体共振吸附于氧化态纳米银颗粒周围^[82,83],

而只有少部分银离子吸附到血小板的表层且不会影响血小板功能.当吸附有银离子的氧化态纳米银颗粒与吸附有银离子的血小板相互碰撞(collision)时就会瞬间将纳米颗粒上吸附的大部分银离子转移到血小板外层磷脂膜上,此时血小板与纳米颗粒解吸附后,血小板膜结合的大量银离子则会引起血小板形态变化而被激活^[47].

除此之外,当纳米银颗粒接触到血小板后,既不会破坏血小板膜完整性也不会进入到胞内产生ROS发挥毒性作用,而是先通过改变血小板胞膜的微环境影响血小板功能^[49].纳米银颗粒可能占据血小板表面释放颗粒的管道空间(称为中间颗粒区)以及阻止血小板周缘透明质区的延伸,从而减少了血小板形态变化后互相之间的黏附聚集.然后,纳米银直接作用于血小板膜上的整联蛋白(integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$),改变其空间构象阻止血小板与次级凝血反应过程末端的纤维蛋白结合,从而起到抗凝血、抗血栓的作用^[49].

(4) 纳米银影响凝血过程的作用机制.纳米银可通过改变纤维蛋白的空间构象而抑制其聚合过程^[84].纳米银与纤维蛋白结合后,减弱了纤维蛋白 α 链上的GPR(Gly-Pro-Arg)结构域和 γ 链羧基端之间的镶嵌互补作用^[56].另外,纳米银还可以通过激活凝血酶的产生而促进凝血,该过程可能与血小板激活^[54]或白细胞^[85]有关.但究其对凝血酶活性的抑制作用机制以及其对凝血因子的影响机制,目前仍不清楚.

3 问题、研究难点及可能的解决方案

纳米银的血液相容性评估是目前作为纳米银及其相关产品生物安全效应衡量的一个极其重要的指标.包括血液相容性在内的所有纳米银生物安全效应检测,都会因纳米银各种理化性质的表征方法不一致、材料本身的不稳定性(聚集或氧化)以及检测体系的复杂性等,导致现在仍无法针对纳米银相关的生物学效应评估得到统一而确定的结论.为了将来能更加系统和可靠有效地评估纳米银及其产品的生物安全性,本文就当前存在的问题、研究难点及将来可能会使用到的解决方案作了以下几个方面的概述和总结.

首先,纳米银的制备方法及其稳定性问题均造成了生物学效应结果的不一致.目前,大多数实验过程中使用的纳米银均为化学方法制备,在化学反应

过程中适当加入一些稳定剂(如PVP, PEG, 柠檬酸盐等), 使得纳米银颗粒不易被氧化或是发生聚集^[86-89]. 但同时引入的这些化学试剂可能会随着纳米银一起作用于血液, 对纳米银生物学效应的检测产生一定程度的影响^[90]. 为了避免这种情况的发生, 一方面, 在实验中设计稳定剂对照组; 另一方面, 选择其他的合成方法, 以尽量避免引入其他试剂, 如已有文献报道使用绿色的生物合成法来制备纳米银, 直接利用生物细胞自身的氧化还原反应, 加以细胞内生物属性的一些生物分子的修饰作用, 大大提高了纳米银的稳定性和生物相容性^[43,91-93]. 另外, 针对稳定性不够好的纳米银材料, 有必要在每次生物效应检测之前, 进行简单的理化表征测试, 以保证实验材料的一致性和提高实验结果的可信度.

其次, 纳米银自身理化表征描述的不完全性以及缺乏相应的剂量标准, 也会造成生物学效应结果的不一致^[94]. 一般来说, 透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)可直接测得纳米粒子的尺寸以及粒径分布, 而动态光散射法(dynamic light scattering, DLS)可以检测纳米材料在溶液中的水合直径及其分布. 由于纳米银本身容易聚集, 所以溶剂的不同会严重影响其水合直径的大小^[7,95,96]. 特别是生物检测中, 很多体外检测都是在含有血清的培养基中进行, 而纳米材料遇到血清中的大量蛋白, 会迅速形成蛋白冕(protein corona), 这种被蛋白包裹的纳米颗粒的理化性质会发生较大的改变, 进而影响其生物学效应^[97-101]. 因此, 在不同的生物效应实验体系中, 需要对纳米银进行全面而精准的表征. 例如, 除提供在一般溶剂(如水)中的表征数据以外, 还需要在生物效应检测的实际环境中(如不同的生物学介质——培养基、磷酸缓冲溶液等), 对纳米银进行表征. 而对于体内的生物学效应检测, 则应该根据纳米银的给药方式, 选择合适的介质进行表征(如静脉注射, 需在血液环境中进行表征等). 当然, 特别是针对纳米银的体内生物学效应检测, 如果能够实时动态地捕捉到体内的纳米银并进行表征, 势必更加能够反映纳米银在实验中的真实状态, 将具有非常重要的生物学意义. 另外, 针对实验中纳米银剂量范围的选用以及剂量单位, 不同的文献也不尽相同, 所以大多情况下很难得到统一的横向对比结果. 这可能需要将来建立统一的剂量单位和使用标准. 因此, 传统的剂量或者浓度, 可能不是很好的标准, 可以考虑

其他针对纳米材料的特殊度量标准, 比如表面积、颗粒数目等纳米层面的度量.

再次, 纳米银生物学效应评估实验方法的差异性、局限性也造成了其生物学效应结果的不一致. 目前, 体外检测细胞毒性的方法有MTT, CCK-8, LDH, 细胞计数以及染色法等, 但由于每种方法的原理和步骤的差异, 即使使用相同的实验材料和条件, 往往结果也不完全一致^[102]. 另外, 由于纳米银材料本身的化学性质较为活泼, 纳米银会对检测方法本身产生干扰. 如纳米银颗粒可通过吸附LDH和诱导ROS的产生来干扰LDH检测方法^[103]; 纳米银颗粒对MTT还原生成甲臃的过程同样具有强烈的干扰作用^[104]. 因此, 这就需要科研工作者同时使用多种检测手段从不同角度来综合评价纳米银的生物学效应^[105]. 由于纳米银可能存在很多种细胞作用机制, 所以单一的毒性研究结果是远远不够的. 以本文综述的纳米银血液相容性为例, 如需检测纳米银对于血液的生物学效应, 还需要建立溶血检测、血小板聚集检测、凝血检测以及补体激活检测等生物学评价方法. 另外, 除了细胞死亡或凋亡外, 细胞的亚健康状态也需要关注, 如对于遗传物质的影响、免疫炎症反应以及某些重要功能的改变等评价指标. 只有从不同角度和不同层面来分析, 才能获得更为全面而又准确的纳米银安全性评价结果.

最后, 检测体系、对象(样本)的不同也会造成生物学效应评估的不一致. 目前, 大多数的研究都是采用体外实验, 那么所选用的细胞不同, 作用结果自然不同. 但是有时, 即使是同一种细胞, 由于不同实验室的环境、培养条件及培养代数不同等, 针对同一检测的结果, 也会产生差异^[106,107]. 另外, 相较于体内实验, 体外实验具有便于操作、周期短等优势, 但这往往不能反映出纳米银在体内的真实情况, 所以要想使纳米材料生物学效应的评估更加具有真实性、可靠性, 体内实验是最不能忽略的一个环节, 尤其是针对临床样本的检测, 就显得更加重要了. 此时, 生物样本的个体差异性就会对实验结果造成很大的影响, 这需要扩大样本数量从而得到统计的分析结果, 才能较为准确地评价纳米银的体内生物学效应.

4 总结与展望

本文归纳并总结了近期关于纳米银与血液相互作用的研究报道, 揭示了纳米银接触血液后可能带

来的各种影响。但由于所使用的纳米银材料的多样性,如制备方法、粒径大小、颗粒形状、表面修饰、使用剂量以及检测体系的不同均会造成实验结果的不一致。纳米银接触血液后,对红细胞可能会造成形态变化、聚集、凋亡和膜受损;可能会促使白细胞形态变化、活力降低、增殖促进或抑制、促进或抑制炎症因子释放、遗传物质受损等;促进或抑制血小板的黏附、聚集、激活过程;促进或抑制凝血过程;激活补体系统等。可见,纳米银对于血液的影响是多种多样的,单一的血液检测指标不足以全面评价纳米银的血液相容性。因此,由于多种因素的影响,纳米银的血液生物学效应检测急需一套有针对性的标准化检测方法,以确保检测结果的真实性和可比性。

关于机制方面的研究,虽然已取得一些进展,但是必须承认,大部分生物学效应作用机制并不清楚,如关于纳米银是如何通过影响凝血因子来调控凝血

反应过程,以及如何激活补体系统的作用机制,尚未有研究报道。当纳米银进入整个血液体系后,对血细胞和血浆的影响不是独立的,而是互相关联的(cross-talk)。有文献报道,补体系统在调节红细胞溶血、免疫炎症反应、血小板聚集和凝血反应过程中均可发挥调控的作用^[85]。只有弄清所有的作用细节,才能绘制出纳米银与血液之间的相互作用网络,更加深入地了解纳米银的血液生物学效应作用机制。

随着纳米银及其相关产品商业化模式的日益形成,建立标准化的纳米银生物安全效应检测与评估方案势在必行。标准化的纳米银血液相容性检测流程与方案,作为纳米银生物安全效应评估中非常重要的一部分,不仅可以为制备高效无毒的纳米银产品提供有效可靠的科学实验数据,也能为人们今后广泛、科学而又安全地使用纳米银及其相关产品提供很好的参考。

参考文献

- Ahamed M, Alsalhi M S, Siddiqui M K. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta*, 2010, 411: 1841–1848
- Chen X, Schluesener H J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett*, 2008, 176: 1–12
- Chaloupka K, Malam Y, Seifalian A M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol*, 2010, 28: 580–588
- Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, et al. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett*, 2009, 190: 156–162
- Lankoff A, Sandberg W J, Wegierek-Ciuk A, et al. The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. *Toxicol Lett*, 2012, 208: 197–213
- Song X L, Li B, Xu K, et al. Cytotoxicity of water-soluble mPEG-SH-coated silver nanoparticles in HL-7702 cells. *Cell Biol Toxicol*, 2012, 28: 225–237
- Shi J, Sun X, Zou X, et al. Amino acid-dependent transformations of citrate-coated silver nanoparticles: Impact on morphology, stability and toxicity. *Toxicol Lett*, 2014, 229: 17–24
- Coccini T, Manzo L, Bellotti V, et al. Assessment of cellular responses after short- and long-term exposure to silver nanoparticles in human neuroblastoma (SH-SY5Y) and astrocytoma (D384) cells. *Sci World J*, 2014, 2014: 259765
- Eom H J, Choi J. p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environ Sci Technol*, 2010, 44: 8337–8342
- Awasthi K K, Awasthi A, Kumar N, et al. Silver nanoparticle induced cytotoxicity, oxidative stress, and DNA damage in CHO cells. *J Nanopart Res*, 2013, 15: 1898
- Kovvuru P, Mancilla P E, Shirode A B, et al. Oral ingestion of silver nanoparticles induces genomic instability and DNA damage in multiple tissues. *Nanotoxicology*, 2015, 9: 162–171
- Wijnhoven S W P, Peijnenburg W J G M, Herberts C A, et al. Nano-silver—A review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 2009, 3: 109–138
- De Jong W H, Van Der Ven L T, Sleijffers A, et al. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. *Biomaterials*, 2013, 34: 8333–8343
- Asharani P V, Wu Y L, Gong Z, et al. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 2008, 19: 255102

- 15 Lee K J, Browning L M, Nallathamby P D, et al. *In vivo* quantitative study of sized-dependent transport and toxicity of single silver nanoparticles using zebrafish embryos. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25: 1029–1046
- 16 Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 2005, 113: 823–839
- 17 Krajewski S, Prucek R, Panacek A, et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop *in vitro* assay on human blood. *Acta Biomater*, 2013, 9: 7460–7468
- 18 Nikinmaa M. Oxygen and carbon dioxide transport in vertebrate erythrocytes: An evolutionary change in the role of membrane transport. *J Exp Biol*, 1997, 200: 369–380
- 19 Jensen F B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol Scand*, 2004, 182: 215–227
- 20 De Rosa M C, Carelli Alinovi C, Galtieri A, et al. The plasma membrane of erythrocytes plays a fundamental role in the transport of oxygen, carbon dioxide and nitric oxide and in the maintenance of the reduced state of the heme iron. *Gene*, 2007, 398: 162–171
- 21 Dobrovolskaia M A, Clogston J D, Neun B W, et al. Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties *in vitro*. *Nano Lett*, 2008, 8: 2180–2187
- 22 Arzoumanian L. What is hemolysis, what are the causes, what are the effects? *BD Tech Talk*, 2003, 2: 1–3
- 23 Asharani P V, Sethu S, Vadukumpully S, et al. Investigations on the structural damage in human erythrocytes exposed to silver, gold, and platinum nanoparticles. *Adv Funct Mater*, 2010, 20: 1233–1242
- 24 Choi J, Reipa V, Hitchins V M, et al. Physicochemical characterization and *in vitro* hemolysis evaluation of silver nanoparticles. *Toxicol Sci*, 2011, 123: 133–143
- 25 Kim M J, Shin S. Toxic effects of silver nanoparticles and nanowires on erythrocyte rheology. *Food Chem Toxicol*, 2014, 67: 80–86
- 26 Chen L Q, Fang L, Ling J, et al. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: Size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28: 501–509
- 27 Kwon T, Woo H J, Kim Y H, et al. Optimizing hemocompatibility of surfactant-coated silver nanoparticles in human erythrocytes. *J Nanosci Nanotechnol*, 2012, 12: 6168–6175
- 28 Coman C, Tabaran F, Ilie I, et al. Assessment of silver nanoparticles toxicity in human red blood cells using ELISA and immunofluorescence microscopy techniques. *Biotech Mol Biol Nanomed*, 2013, 1: 61–65
- 29 Laloy J, Minet V, Alpan L, et al. Impact of silver nanoparticles on haemolysis, platelet function and coagulation. *Nanobiomedicine*, 2014, 1: 1–9
- 30 Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*, 2001, 357: 1777–1789
- 31 Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, 2014, 41: 694–707
- 32 Muller W A. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol*, 2013, 50: 7–22
- 33 Lu X C, Yang B, Yu R L, et al. Clinical study of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62: 257–265
- 34 Li Y, Huang Q, Zhong Y, et al. Prospects in adoptive cell transfer therapy for cancer. *J Immunol Clin Res*, 2013, 1: 1–4
- 35 Zhornik A, Baranova L, Volotovskii I, et al. Interaction of nanosilver particles with human lymphocyte cells. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*, 2015, 6: 1–6
- 36 Yang E J, Kim S, Kim J S, et al. Inflammasome formation and IL-1 β release by human blood monocytes in response to silver nanoparticles. *Biomaterials*, 2012, 33: 6858–6867
- 37 Yilma A N, Singh S R, Dixit S, et al. Anti-inflammatory effects of silver-polyvinyl pyrrolidone (Ag-PVP) nanoparticles in mouse macrophages infected with live *Chlamydia trachomatis*. *Int J Nanomed*, 2013, 8: 2421–2432
- 38 Ivask A, Voelcker N H, Seabrook S A, et al. DNA melting and genotoxicity induced by silver nanoparticles and graphene. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28: 1023–1035
- 39 Barkhordari A, Barzegar S, Hekmatimoghaddam H, et al. The toxic effects of silver nanoparticles on blood mononuclear cells. *Int J Occup Environ Med*, 2014, 5: 164–168
- 40 Shin S H, Ye M K, Kim H S, et al. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7: 1813–1818
- 41 Greulich C, Diendorf J, Gessmann J, et al. Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomater*, 2011, 7: 3505–3514
- 42 Malaczewska J. Effect of 28-day oral administration of silver nanocolloid on the peripheral blood leukocytes in mice. *Pol J Vet Sci*, 2014, 17: 263–273

- 43 Gengan R M, Anand K, Phulukdaree A, et al. A549 lung cell line activity of biosynthesized silver nanoparticles using *Albizia adianthifolia* leaf. *Colloid Surface B*, 2013, 105: 87–91
- 44 Suresh A K, Pelletier D A, Wang W, et al. Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types. *Langmuir*, 2012, 28: 2727–2735
- 45 Seiffert J, Hussain F, Wiegman C, et al. Pulmonary toxicity of instilled silver nanoparticles: Influence of size, coating and rat strain. *PLoS One*, 2015, 10: e0119726
- 46 Semple J W, Italiano J E, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 264–274
- 47 Stevens K N J, Crespo-Biel O, van den Bosch E E M, et al. The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood. *Biomaterials*, 2009, 30: 3682–3690
- 48 Jun E A, Lim K M, Kim K, et al. Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity. *Nanotoxicology*, 2011, 5: 157–167
- 49 Shrivastava S, Bera T, Singh S K, et al. Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles. *ACS Nano*, 2009, 3: 1357–1364
- 50 Ragaseema V M, Unnikrishnan S, Kalliyana Krishnan V, et al. The antithrombotic and antimicrobial properties of PEG-protected silver nanoparticle coated surfaces. *Biomaterials*, 2012, 33: 3083–3092
- 51 Bandyopadhyay D, Baruah H, Gupta B, et al. Silver nano particles prevent platelet adhesion on immobilized fibrinogen. *Indian J Clin Biochem*, 2012, 27: 164–170
- 52 Krishnaraj R N, Berchmans S. *In vitro* antiplatelet activity of silver nanoparticles synthesized using the microorganism *Gluconobacter roseus*: An AFM-based study. *RSC Adv*, 2013, 3: 8953
- 53 Smock K J, Schmidt R L, Hadlock G, et al. Assessment of orally dosed commercial silver nanoparticles on human *ex vivo* platelet aggregation. *Nanotoxicology*, 2014, 8: 328–333
- 54 Ogedegbe H O. An overview of hemostasis. *Lab Med*, 2002, 33: 948–953
- 55 Adams R L, Bird R J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology*, 2009, 14: 462–470
- 56 Shrivastava S, Singh S K, Mukhopadhyay A, et al. Negative regulation of fibrin polymerization and clot formation by nanoparticles of silver. *Colloid Surface B*, 2011, 82: 241–246
- 57 Martinez-Gutierrez F, Thi E P, Silverman J M, et al. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 2012, 8: 328–336
- 58 Berhane G. The complement system: Mechanisms of activation, regulation, and role in innate and adaptive immunity. In: *Urticaria and Angioedema: Informa Healthcare*, 2009. 91–122
- 59 Mathern D R, Heeger P S. Molecules great and small: The complement system. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015, 10: 1636–1650
- 60 Sim R B, Tsiftoglou S A. Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32: 21–27
- 61 Nesargikar P N, Spiller B, Chavez R. The complement system: History, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol*, 2012, 2: 103–111
- 62 Rothen-Rutishauser B M, Schurch S, Haenni B, et al. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 4353–4359
- 63 Ballinger P M, Brown B S, Griffin M M, et al. Evidence for carriage of silver by sulphadimidine: Haemolysis of human erythrocytes. *Br J Pharmacol*, 1982, 77: 141–145
- 64 Hatchett D W, White H S. Electrochemistry of sulfur adlayers on the low-index faces of silver. *J Phys Chem*, 1996, 100: 9854–9859
- 65 Haase A, Tentschert J, Jungnickel H, et al. Toxicity of silver nanoparticles in human macrophages: Uptake, intracellular distribution and cellular responses. *J Phys Conf Ser*, 2011, 304: 012030
- 66 Kim S, Choi I H. Phagocytosis and endocytosis of silver nanoparticles induce interleukin-8 production in human macrophages. *Yonsei Med J*, 2012, 53: 654–657
- 67 He W W, Zhou Y T, Wamer W G, et al. Mechanisms of the pH dependent generation of hydroxyl radicals and oxygen induced by Ag nanoparticles. *Biomaterials*, 2012, 33: 7547–7555
- 68 Bressan E, Ferroni L, Gardin C, et al. Silver nanoparticles and mitochondrial interaction. *Int J Dent*, 2013, 2013: 312747
- 69 dos Santos C A, Seckler M M, Ingle A P, et al. Silver nanoparticles: Therapeutic uses, toxicity, and safety issues. *J Pharm Sci*, 2014, 103: 1931–1944
- 70 McShan D, Ray P C, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal*, 2014, 22: 116–127
- 71 Park E J, Yi J, Kim Y, et al. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol Vitro*, 2010, 24: 872–878
- 72 Cote-Maurais G, Bernier J. Silver and fullerene nanoparticles' effect on interleukin-2-dependent proliferation of CD4 (+) T cells. *Toxicol Vitro*, 2014, 28: 1474–1481

- 73 Parnsamut C, Brimson S. Effects of silver nanoparticles and gold nanoparticles on IL-2, IL-6, and TNF-alpha production via MAPK pathway in leukemic cell lines. *Genet Mol Res*, 2015, 14: 3650–3668
- 74 Shi J, Sun X, Lin Y, et al. Endothelial cell injury and dysfunction induced by silver nanoparticles through oxidative stress via IKK/NF-kappaB pathways. *Biomaterials*, 2014, 35: 6657–6666
- 75 Gopinath P, Gogoi S K, Sanpui P, et al. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloid Surface B*, 2010, 77: 240–245
- 76 Kittler S, Greulich C, Diendorf J, et al. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chem Mater*, 2010, 22: 4548–4554
- 77 Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, et al. Toxicity of silver nanoparticles-nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett*, 2012, 208: 286–292
- 78 Hadrup N, Lam H R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver—A review. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2014, 68: 1–7
- 79 Ivask A, ElBadawy A, Kaweeteerawat C, et al. Toxicity mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver. *ACS Nano*, 2014, 8: 374–386
- 80 Guo D, Zhu L, Huang Z, et al. Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. *Biomaterials*, 2013, 34: 7884–7894
- 81 Haase H, Fahmi A, Mahlting B. Impact of silver nanoparticles and silver ions on innate immune cells. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10: 1146–1156
- 82 Lok C N, Ho C M, Chen R, et al. Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem*, 2007, 12: 527–534
- 83 Henglein A. Colloidal silver nanoparticles: Photochemical preparation and interaction with O₂, CCl₄, and some metal ions. *Chem Mater*, 1998, 10: 444–450
- 84 Deng Z J, Liang M, Monteiro M, et al. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6: 39–44
- 85 Gorbet M B, Sefton M V. Biomaterial-associated thrombosis: Roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, 2004, 25: 5681–5703
- 86 Oliveira M M, Ugarte D, Zanchet D, et al. Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*, 2005, 292: 429–435
- 87 Solomon S D, Bahadory M, Jeyarajasingam A V, et al. Synthesis and study of silver nanoparticles. *J Chem Educ*, 2007, 84: 322–325
- 88 Keller A A, Wang H T, Zhou D X, et al. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environ Sci Technol*, 2010, 44: 1962–1967
- 89 Tran Q H, Nguyen V Q, Le A T. Silver nanoparticles: Synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*, 2013, 4: 033001
- 90 Nguyen K C, Seligy V L, Massarsky A, et al. Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles. *J Phys Conf Ser*, 2013, 429: 012025
- 91 Kharisova O V, Dias H V, Kharisov B I, et al. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends Biotechnol*, 2013, 31: 240–248
- 92 Sun Q, Cai X, Li J W, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity. *Colloid Surface A*, 2014, 444: 226–231
- 93 Mukherjee S, Chowdhury D, Kotcherlakota R, et al. Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system). *Theranostics*, 2014, 4: 316–335
- 94 Zhu L Y, Guo D W, Gu N. Advances in *in vitro* detection of cytotoxicity induced by silver nanoparticles (in Chinese). *Chin Sci Bull (Chin Ver)*, 2014, 59: 2145–2152 [朱玲英, 郭大伟, 顾宁. 纳米银细胞毒性体外检测方法研究进展. *科学通报*, 2014, 59: 2145–2152]
- 95 Zeng R, Rong M Z, Zhang M Q, et al. Studies on the surface interaction and dispersity of silver nanoparticles in organic solvents. *Chin Phys Lett*, 2000, 17: 697–699
- 96 Oseguera-Galindo D O, Martinez-Benitez A, Chavez-Chavez A, et al. Effects of the confining solvent on the size distribution of silver NPs by laser ablation. *J Nanopart Res*, 2012, 14: 1133
- 97 Kittler S, Greulich C, Gebauer J S, et al. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *J Mater Chem*, 2010, 20: 512–518
- 98 Maiorano G, Sabella S, Sorce B, et al. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano*, 2010, 4: 7481–7491
- 99 Casals E, Pfaller T, Duschl A, et al. Hardening of the nanoparticle-protein corona in metal (Au, Ag) and oxide (Fe₃O₄, CoO, and CeO₂) nanoparticles. *Small*, 2011, 7: 3479–3486

- 100 Ahlberg S, Antonopulos A, Diendorf J, et al. PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physico-chemical characteristics, cell culture and *in vivo* experiments. *Beilstein J Nanotechnol*, 2014, 5: 1944–1965
 - 101 Shannahan J H, Podila R, Aldossari A A, et al. Formation of a protein corona on silver nanoparticles mediates cellular toxicity via scavenger receptors. *Toxicol Sci*, 2015, 143: 136–146
 - 102 Kim S, Choi J E, Choi J, et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol Vitro*, 2009, 23: 1076–1084
 - 103 Oh S J, Kim H, Liu Y, et al. Incompatibility of silver nanoparticles with lactate dehydrogenase leakage assay for cellular viability test is attributed to protein binding and reactive oxygen species generation. *Toxicol Lett*, 2014, 225: 422–432
 - 104 Sadik O A, Zhou A L, Kikandi S, et al. Sensors as tools for quantitation, nanotoxicity and nanomonitoring assessment of engineered nanomaterials. *J Environ Monit*, 2009, 11: 1782–1800
 - 105 Monteiro-Riviere N A, Inman A O, Zhang L W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 234: 222–235
 - 106 Piao M J, Kang K A, Lee I K, et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol Lett*, 2011, 201: 92–100
 - 107 Piao M J, Kim K C, Choi J Y, et al. Silver nanoparticles down-regulate Nrf2-mediated 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 through inactivation of extracellular regulated kinase and protein kinase B in human Chang liver cells. *Toxicol Lett*, 2011, 207: 143–148
-

Recent progress on blood compatibility of silver nanoparticles and the related mechanisms

HUANG He¹, LIU Ying² & XIE LiMing¹

¹ Key Laboratory of Standardization and Measurement for Nanotechnology of Chinese Academy of Sciences, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China;

² CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China

Due to their excellent antimicrobial properties, silver nanoparticles (AgNPs) have been extensively used for food industry, cosmetics, biomedicine and other application fields. Hence, the potential bio-safety of AgNPs has already garnered more attention. According to the results of domestic and foreign research, this review attempts to summarize important progress of blood toxicities induced by AgNPs, including hemolysis, platelet aggregation, leukocyte proliferation and inflammation, coagulation process and the activation of complement system during AgNPs contacting with blood. Moreover, the possible toxic mechanism was also further generalized. This review would be helpful for a comprehensive bio-safety assessment of AgNPs as a scientific guidance.

silver nanoparticles, blood compatibility, bio-safety, mechanism

doi: 10.1360/N972015-00945