

纳米银颗粒及纳米二氧化钛颗粒的体外遗传毒性研究

朱海美¹, 黄鹏程², 赵田田³, 周长慧^{2,3}, 李若婉³, 于春荣^{2,3}, 陈志勇², 顾林峰², 常艳^{1,2,3}

1. 上海工程技术大学化学化工学院, 上海 201620
2. 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203
3. 中国医药工业研究总院, 上海 201201

摘要: 纳米物质以其独特的物理性质广泛用于化妆品、医药和食品工业,但它们的安全性和遗传毒性仍然存在争议。本研究拟采用基于人成淋巴 TK6 细胞的体外彗星实验整合体外 *PIG-A* 基因突变实验对纳米银颗粒(AgNPs)和纳米二氧化钛颗粒(TiO₂NPs)的致 DNA 断裂作用和致突变性进行初步研究。本研究探究了最高至 200 μmol/L 浓度时,TK6 细胞暴露于两种纳米物质 4 h 时的彗星实验和经过暴露 24 h 以及 10 d 基因突变表达期后的 *PIG-A* 基因突变结果。同时,本研究还检测了 TK6 细胞暴露于纳米颗粒 4 h 及 24 h 对纳米物质的摄取能力。在纳米物质摄取实验中,随着纳米物质浓度的升高,TK6 细胞在流式细胞仪检测图中的侧向散射角(side scatter, SSC)呈现浓度与时间依赖性升高,表明 TK6 细胞可摄取两种纳米颗粒。在 4 h 彗星实验中,AgNPs 可导致彗星尾 DNA 荧光%强度呈现浓度依赖性显著升高,为阳性结果。而 TiO₂NPs 则不能诱导彗星尾 DNA 荧光%强度呈现浓度依赖性显著升高,但最高浓度组尾 DNA 荧光%超过本实验室阴性历史对照数据,为可疑结果。而在体外 *PIG-A* 基因突变实验结果中,AgNPs 和 TiO₂NPs 均不能诱导 TK6 细胞的 *PIG-A* 基因突变率出现阳性升高。AgNPs 可导致 TK6 细胞出现 DNA 损伤,但不能诱导 *PIG-A* 基因突变率升高。TiO₂NPs 既不能诱导 TK6 细胞出现 DNA 损伤,也不能诱导 *PIG-A* 基因突变率升高, TiO₂NPs 的遗传毒性有待进一步验证。

关键词: 纳米银颗粒; 纳米二氧化钛颗粒; 彗星实验; *PIG-A* 基因突变实验; 遗传毒性

收稿日期: 2020-07-18; 修回日期: 2020-10-08

基金项目: “十三五”重大新药创制科技重大专项(编号: 2018ZX09201017-008)和上海市科委研发公共服务平台专项(编号: 18DZ2290100)资助[Supported by “the 13th Five-Year plan” Major New Drug Innovation and Technology Major Project (No. 2018ZX09201017-008), and the Shanghai Municipal Science and Technology Commission R&D Public Service Platform Project (No. 18DZ2290100)]

作者简介: 朱海美,在读硕士研究生,专业方向: 毒理学方向, E-mail: 1695051900@qq.com

黄鹏程, 硕士,专业方向: 毒理学方向, E-mail: 774121501@qq.com

朱海美和黄鹏程为并列第一作者。

通讯作者: 常艳, 博士, 研究员, 研究方向: 遗传及生殖毒理学方向。E-mail: ychang@ncdser.com

DOI: 10.16288/j.ycz.20-161

网络出版时间: 2020/11/13 9:13:04

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20201112.1343.001.html>

In vitro genotoxicity study of silver nanoparticles and titanium dioxide nanoparticles

Haimei Zhu¹, Pengcheng Huang², Tiantian Zhao³, Changhui Zhou^{2,3}, Ruowan Li³, Chunrong Yu^{2,3}, Zhiyong Chen², Linfeng Gu², Yan Chang^{1,2,3}

1. School of Chemistry and Chemical Engineer, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China

2. Shanghai Innostar Bio-tech Co. Ltd, Shanghai 201203, China

3. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201201, China

Abstract: Nanoparticles are widely used in cosmetic, pharmaceutical, and food industries, but their safety and genetic toxicity are still unclear. In this study, the genotoxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and titanium dioxide nanoparticles (titanium dioxide nanoparticles) were evaluated by *in vitro* comet assay and *PIG-A* assay in TK6 cells. We exposed TK6 cells to two types of nanoparticles at the highest concentration of 200 $\mu\text{mol/L}$ for 4 h and conducted the *in vitro* comet assay. We examined the mutation results of *PIG-A* gene *in vitro* after 4 h, 24 h and 10 days of exposure, respectively. We also examined the endocytosis of nanoparticles in TK6 cells exposed to nanoparticles for 24 h. In the endocytosis assay, with the increase of nano-material concentration, the side scatter (SSC) of TK6 cells in flow cytometry showed a concentration-dependent and time-dependent increase, indicating that TK6 cells could uptake both types of nanoparticles. In the comet assay, AgNPs could induce a concentration-dependent increase in DNA tail intensity. However, titanium dioxide NPs could not induce the concentration-dependent increase of DNA fluorescence intensity of comet tail. In the *PIG-A* assay, both AgNPs and TiO_2NPs did not induce *PIG-A* gene mutation frequency in TK6 cells. The results showed that AgNPs could induce DNA damage in TK6 cells, but could not induce increase of *PIG-A* gene mutation frequency. TiO_2NPs neither induce DNA damage in TK6 cells nor increase *PIG-A* mutation frequency. Further tests are needed to determine whether TiO_2NPs are genotoxic.

Keywords: silver nanoparticles; titanium dioxide nanoparticles; comet assay; *in vitro* *PIG-A* assay; genotoxicity

纳米物质独特的粒子直径可使得纳米物质的物理性质, 包括表面效应、光效应、体积效应等发生改变。纳米物质现已广泛应用于食品、化妆品、医药和材料等科学领域。纳米粒子(nanoparticle, NP)的国际标准定义为尺寸在纳米级别(粒径范围 1~100 nm), 长轴和短轴无显著差异的微小粒子。近几十年来, 纳米银颗粒(AgNPs)因其与实体纳米颗粒不同的特性而被认为是一种极具前景的材料。其主要特点是高表面积体积比, 这使得这种纳米结构在生物、电子、医药、环境修复、生物传感器、农业和食品工业等领域得到了广泛的应用^[1]。AgNPs 在电气、医疗保健、食品和纺织产品方面的全球消费量以及 AgNPs 供应商数量激增^[2]。纳米二氧化钛颗粒(TiO_2NPs)也被广泛应用于工业、表面涂层材料、食

品、饲料、杀菌剂和兽药等。研究报道 TiO_2NPs 可在肾、肝、肺、脾、脑和生殖器官中积累^[3]。由于纳米物质的广泛应用, 使其遗传毒性研究越来越受重视。目前对纳米物质的遗传毒性研究常采用化合物遗传毒性标准组合实验, 如 Ames 实验、体内/外微核、染色体畸变实验等^[4]。但在 Ames 实验中因纳米物质不易穿透细菌细胞壁, Ames 实验可能不适用于纳米物质遗传毒性的检测; 体外双核微核试验中添加的细胞松弛素 B, 可能影响细胞对纳米物质的胞吞作用。因此, 需开发或改进体外遗传毒性评价系统^[5]。

Singh 等^[6]最早创建了最原始的碱性彗星试验, 称为单细胞凝胶电泳试验。1990 年 Olive 等^[7]以彗星形状来形容 DNA 在凝胶中的形状因此将此试验

方法命名为彗星试验,他们也介绍了评价 DNA 迁移的指标 DNA 的尾密度。尾 DNA 密度指标的应用进一步发展了彗星细胞的检测方法,即用软件检测彗星细胞的荧光强度,其荧光强度现已成为彗星试验中评价 DNA 损伤的主要指标^[8]。目前彗星实验已经成为应用最广泛的评价 DNA 在细胞及组织内损伤和修复的方法。

过去 10 年中,用于评估内源性磷脂酰肌醇聚糖 A 类基因(*PIG-A* 基因)突变方法的开发、验证和应用已取得较为快速的发展。研究人员已经探索了少数几种哺乳动物细胞株用于体外 *PIG-A* 基因突变试验的可能性。Kruger 等^[9]率先使用了人成淋巴母细胞系 TK6 细胞,建立了通过流式细胞术检测 TK6 细胞中 GPI(-)频率(*PIG-A* 基因突变率)的方法。Rees 等^[10]对比了 TK6 细胞和 MCL-5 细胞应用于 *PIG-A* 基因突变试验的利弊,同时对流式细胞术的检测方法进行优化。

本研究主要通过本实验室前期建立的体外彗星试验和体外 *PIG-A* 基因突变试验方法对两种常用纳米物质的遗传毒性进行评价,以初步预测纳米银颗粒(AgNPs)和纳米二氧化钛颗粒(TiO₂NPs)的体外遗传毒性。

1 材料与方法

1.1 材料及主要仪器

人成淋巴 TK6 细胞购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC); AgNPs 和 TiO₂NPs 均购自南京先丰纳米物质科技有限公司; RPMI-1640 培养基、热灭活马血清、磷酸缓冲液溶液(PBS)和 L-谷氨酰胺购自美国 Gibco 公司;牛白蛋白(BSA)购自国药集团化学试剂有限公司; APC 鼠抗人 CD19 抗体、PE 鼠抗人 CD55 抗体、PE 鼠抗人

CD59 抗体和核酸染料 7-氨基放线菌素 D (7-Aminoactinomycin D, 7-AAD)均购自美国 BD Bioscience 公司;氢氧化钠、二甲亚砜、浓盐酸购自国药集团化学试剂有限公司;SYBR Gold 染液购自 Invitrogen (货号: S11494);流式细胞仪为 BD 公司 Accuri™ C6 PLUS;细胞计数仪购自丹麦 Chemometec 公司(型号 NucleoCounter®NC-100),彗星试剂盒及电泳仪购自美国 Trevigen 公司; Comet Assay IV 彗星分析软件为 Perceptive Instruments (英国)。

1.2 细胞培养

复苏本实验室建立的已清除 *PIG-A* 突变阳性的 TK6 细胞,培养于含 10% 马血清和 4 mmol/L L-谷氨酰胺的 RPMI-1640 完全培养基中,在 37℃、CO₂ 体积分数为 5% 的加湿条件下悬浮培养。每周传代 2~3 次,保证细胞密度在 1~10×10⁵/mL 之间。准备足够量的对数生长期细胞供试验使用。

1.3 受试物配制

纳米物质 AgNPs 和 TiO₂NPs 均为不溶性纳米物质,其在 H₂O 或 DMSO 等溶剂中均不可溶解。因此,本研究中进行纳米物质受试物配制时,均使用灭菌注射用水(本研究阴性对照)配制,超声波振荡 15 min 以上制成纳米物质混悬液。在进行加样时,使用移液器反复吹打,尽可能保证混悬液的均匀分散状态,且加样体积为 10% (v/v)。纳米物质的表征及受试浓度见表 1,纳米银与纳米二氧化钛的透射电镜图见图 1。

1.4 供试品加样及彗星、纳米物质摄取和体外 *PIG-A* 基因突变实验方法

传代至对数生长期的 TK6 细胞,调整细胞密度至 3×10⁵/mL。将细胞转移到 T25 细胞培养瓶中并加入不同浓度的受试物 AgNPs 或 TiO₂NPs 溶液或阴性

表 1 纳米颗粒表征及受试浓度

Table 1 Characterization and concentration of nanoparticles

纳米物质	纯度	粒径范围(nm)	比表面积(m ² /g)	振实密度(g/cm ³)	外观描述	受试浓度(μmol/L)
AgNPs	>99.9%	60~80	≥3	≥2.5	黑色粉末	20、60、200
TiO ₂ NPs	99%	15~25	77.37	—	白色蓬松粉末	20、60、200

以上信息由南京先丰纳米物质科技有限公司提供。—: 未获得相关信息。受试浓度参考文献^[11]选择。

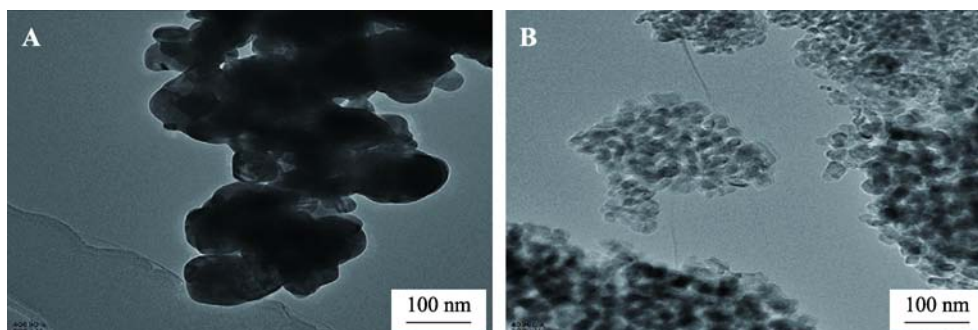


图 1 两种纳米物质材料的透射电镜图

Fig. 1 Transmission electron microscope image of two nanomaterials

A: AgNPs; B: TiO₂NPs。

对照/阳性对照(彗星实验以 50 $\mu\text{mol/L}$ 的过氧化氢(H_2O_2)处理 TK6 细胞 10 min 为阳性对照;体外 *PIG-A* 基因突变实验以 200 $\mu\text{mol/L}$ 的甲磺酸乙酯(EMS)为阳性对照),每个浓度重复 3 瓶。轻轻振荡混匀后放入培养箱培养。

4 h 后融化低熔点琼脂糖, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。每瓶吸取 30 μL 细胞悬液(将剩余细胞放入培养箱中继续培养)与 300 μL 低熔点琼脂糖混匀后取 30 μL 涂布于彗星玻片孔中。2~8 $^{\circ}\text{C}$ 、避光冷却 10 min 后浸入裂解液中裂解过夜(16 h)。第 2 d, 将玻片使用 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的去离子水清洗后浸入解旋液中解旋 20 min, 然后进行碱性(pH>13)彗星电泳, 电泳条件设置为电压 0.7 v/cm, 电流 300 mA。电泳 20 min。电泳后的玻片经中和、无水乙醇脱水、干燥和荧光染色后采用 Comet assay IV 彗星分析软件分析各浓度彗星尾 DNA% (标准步骤参考彗星试剂盒附带说明书)。

用于体外 *PIG-A* 基因突变实验的细胞培养箱继续培养至 24 h, 每瓶取 100 μL 细胞悬液, 使用 PBS 稀释 10 \times 后使用流式细胞仪分析细胞群的 SSC 值和浓度关系。SSC 值反应细胞的内部复杂程度, 细胞摄取纳米颗粒后的其内部复杂程度增加, SSC 值的增加可反映细胞对纳米颗粒的摄取量。

剩余细胞用于体外 *PIG-A* 基因突变实验。首先采用流式细胞仪计数细胞密度, 计数相对细胞增值数(RICC)。再每瓶取 200 万细胞经离心、洗涤后调整细胞密度至 $0.8 \times 10^5/\text{mL}$, 进入基因 *PIG-A* 基因突变表达期传代。细胞分别在第 4、6、8、10 d 分别使用细胞计数仪进行计数, 计算每个处理组在表达期内的 RICC 变化并且每次传代调整细胞密度至

$0.8 \times 10^5/\text{mL}$ (不足 $0.8 \times 10^5/\text{mL}$ 时, 按照原密度接种), 第 10 d 调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 传代。

RICC 计算公式如下:

$$\text{RICC}(\%) = \frac{\text{处理组细胞密度} \times \text{接种细胞密度}}{\text{对照组细胞密度} \times \text{接种细胞密度}} \times 100\%$$

*: 接种细胞密度为每次调整接种时的细胞密度。

1.5 结果判定标准

各浓度组彗尾 DNA% 含量的中位数和 *PIG-A* 基因突变率均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。彗尾 DNA % 含量的中位数均数相对于阴性对照组呈现显著增加(具有统计学差异, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 则判定为彗星实验阳性; 体外 *PIG-A* 基因突变实验中至少一个浓度的 *PIG-A* 基因突变率与阴性对照相比有 2 倍以上增加且呈现浓度-效应关系, 判定为 *PIG-A* 基因突变阳性。

1.6 彗星结果统计方法

计算每孔 75 个彗星细胞的彗尾 DNA% 含量的中位数, 以各组织两孔或多孔彗尾 DNA% 中位数的均值作为该组织彗尾 DNA% 含量的个体数据; 计算各组肝脏彗尾 DNA% 个体数据的均数和标准差。

将受试物各剂量组的彗尾 DNA% 含量分别与阴性对照组的彗尾 DNA% 含量进行统计分析比较, 采用如下方法进行统计: (1) 用 Levene's 检验检测数据的方差齐性, 当方差齐 ($P > 0.05$), 则进行单因素方差分析(ANOVA); 当方差不齐 ($P \leq 0.05$), 则 Dunnett *t* 检验进行组间比较(0.05 和 0.01 水平)。(2) 当方差分析结果有统计学差异 ($P \leq 0.05$), 则进一步用 Dunnett T3 检验进行组间比较(0.05 和 0.01 水平); 当方差分

析结果无统计学差异($P>0.05$), 则统计结束。分析统计软件采用 SPSS 21.0。

2 结果与分析

2.1 4 h 彗星实验结果

彗星实验中各浓度计数 150 个细胞(每个浓度 2 个复孔, 每孔计数 75 个细胞), 实验数据由 SPSS 软件统计分析其各浓度的尾 DNA% 中位数的均值。阳性对照组尾 DNA% 含量中位数的均值相对于阴性对照组显著增加($P<0.01$), 表明实验系统成立。

AgNPs 各浓度组尾 DNA% 含量中位数的均数相对于阴性对照组均有统计学显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且呈现浓度依赖性增加, AgNPs 的 4 h 体外彗星实验结果判定为阳性(图 2A)。TiO₂NPs 各浓度组尾 DNA% 含量中位数均数相对于阴性对照组均无显著性差异($P>0.05$)。TiO₂NPs 的 4 h 体外彗星实验结果判定为阴性(图 2B)。

2.2 4 h 及 24 h 纳米物质摄取实验

本实验中 AgNPs 处理后 TK6 细胞的 SSC 值呈现浓度相关性升高; 相比于阴性对照组, SSC 值分别升高 1.02、1.05 和 1.29 倍(4 h)及 1.14、1.25 和 1.67 倍(24 h) (图 3, A 和 C)。TK6 细胞暴露于 TiO₂NPs 后, 在 4 h 及 24 h 检测 20、60 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 TiO₂NPs 处理后细胞的流式细胞术 SSC 值同样呈现浓度相关性升高; 相对于阴性对照组, SSC 值分别升高 1.12、1.15、和 1.23 倍(4 h)及 1.12、1.23 和 1.34

倍(24 h) (图 3, B 和 D)。上述结果表明, TK6 细胞能够摄取两种纳米物质 AgNPs 和 TiO₂NPs, 且呈现浓度和时间相关性升高。

2.3 体外 PIG-A 基因突变实验 RICC 结果

在体外 PIG-A 基因突变实验中, 受试物组 RICC 呈现先升后降趋势, 最后逐渐恢复正常水平(图 4)。AgNPs 和 TiO₂NPs 高浓度在 24 h (第 2 d) 均具有较高的细胞毒性, 但是在受试物去除后其 RICC 能快速恢复, 其 RICC 在第 2 d 达到最低, 随后逐渐回升至与阴性对照组同等水平。

2.4 体外 PIG-A 基因突变实验结果

本实验中, 根据流式细胞仪 SSC 结果表明 TK6 细胞在 24 h 时可摄取 AgNPs 或 TiO₂NPs, 且随着暴露浓度的提高, 两者的 RICC 均呈现剂量依赖性降低, 表明纳米颗粒暴露充分, 且可被细胞摄取。PIG-A 基因表达期末(第 10 d), 在最高至 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, AgNPs 和 TiO₂NPs 仍不能诱导 TK6 细胞的 PIG-A 基因突变率呈现浓度相关性升高, 体外 PIG-A 基因突变实验结果均为阴性。

3 讨论

本研究选择两种纳米物质 TiO₂NPs 和 AgNPs 作为受试物, 使用体外彗星实验联合体外 PIG-A 基因突变实验方法检测其致 DNA 断裂性和诱变性, 初步探讨两种纳米物质的遗传毒性。

流式细胞术中细胞的侧向散射角(SSC)反映了

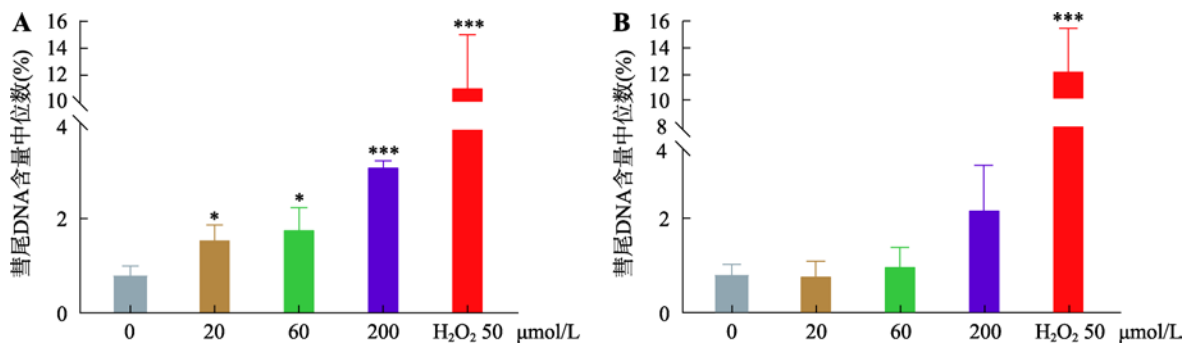


图 2 AgNPs 和 TiO₂NPs 4 h 彗星实验结果

Fig. 2 Results of AgNPs and TiO₂NPs 4 h Comet test

A: AgNPs 彗星实验结果; B: TiO₂NPs 彗星实验结果。*: $P<0.05$; ***: $P<0.01$ (与阴性对照组相比)。H₂O₂ 为阳性对照。

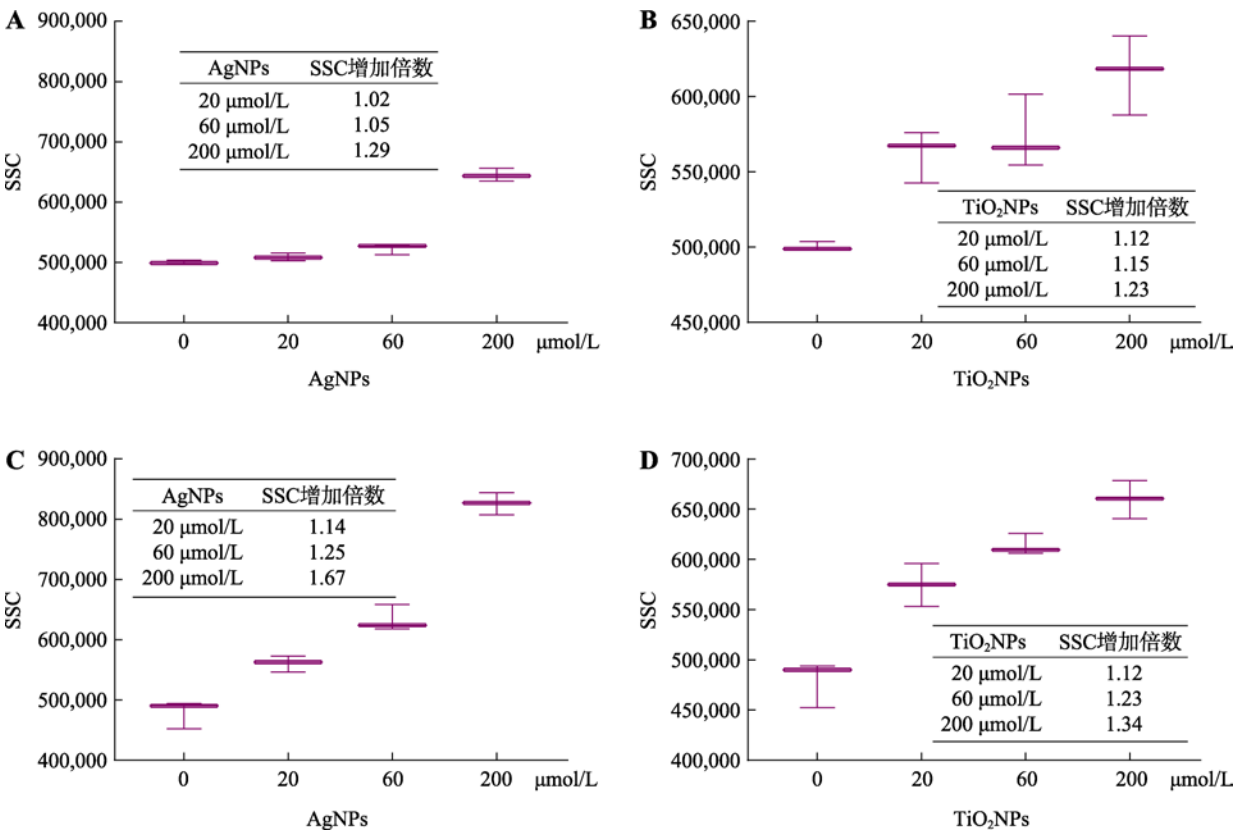


图 3 AgNPs 和 TiO_2NPs 细胞摄取实验结果

Fig. 3 Results of AgNPs and TiO_2NPs cell uptake tests

A: 4 h AgNPs SSC 浓度-反应关系; B: 4 h TiO_2NPs SSC 浓度-反应关系; C: 24 h AgNPs SSC 浓度-反应关系; D: 24 h TiO_2NPs SSC 浓度-反应关系。

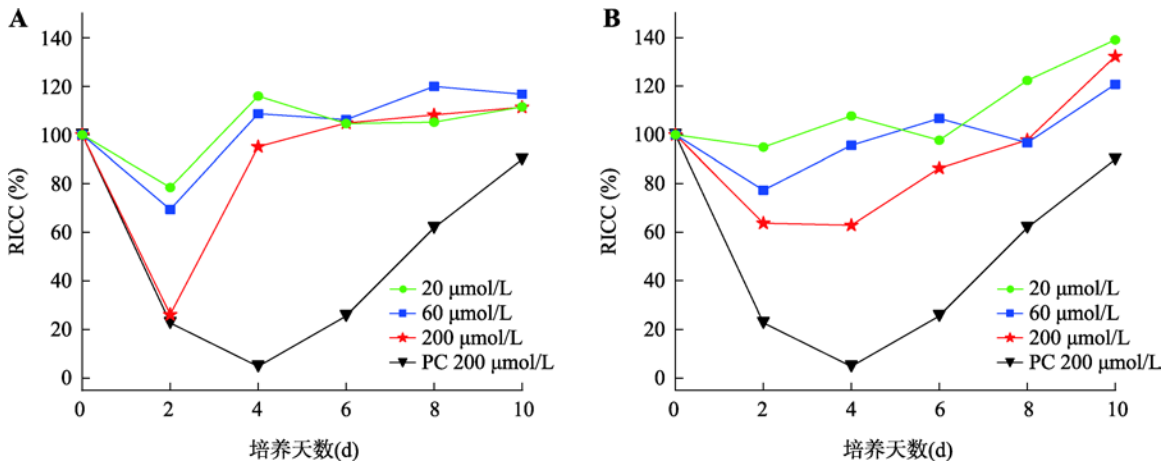


图 4 受试物在 $\pm\text{S9}$ 条件下，第 2 d 至第 10 d 各浓度组 RICC 变化曲线

Fig. 4 Under the $\pm\text{S9}$ condition, the RICC change curve of each concentration group of Day 2-Day 10

A: 4 种浓度下 AgNPs RICC 变化曲线; B: 4 种浓度下 TiO_2NPs RICC 变化曲线。PC (阳性对照): 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 EMS。+S9: 添加肝微粒体代谢酶的体外活化系统; -S9: 无肝微粒体代谢酶体外活化系统。

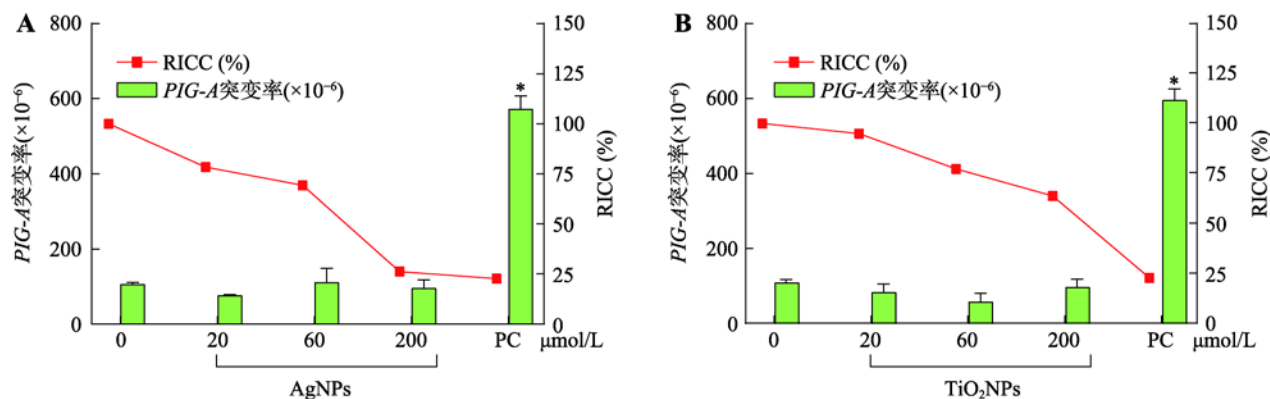


图 5 受试物在-S9 条件下体外 *PIG-A* 基因突变检测结果

Fig. 5 Results of the test substance *in vitro* *PIG-A* gene mutation detection under -S9 conditions

A: 不同浓度下 AgNPs 24 h-S9 突变率; B: 不同浓度下 TiO₂NPs 24 h-S9 突变率。PC (阳性对照): 200 μmol/L 的 EMS; *: *PIG-A* 基因突变率超过阴性对照组至少 2 倍为阳性。

细胞内部的复杂程度^[12]。体外培养的细胞系为单一细胞群体,其 SSC 荧光强度不随培养时间等变化。细胞接触纳米物质后,细胞通过胞吞的方式将纳米物质摄取进入细胞内部,并以囊泡的形式存在于细胞质中。当细胞通过胞吞左右吞噬摄取纳米颗粒后,细胞质中大量的纳米颗粒可增加细胞内部复杂程度,进而导致流式细胞仪检测时 SSC 值的增大。因此通过细胞暴露于纳米物质后检测细胞的 SSC 值可反应细胞对纳米物质的摄取量,以反映纳米物质对细胞的暴露水平^[13]。研究结果提示 TK6 细胞在暴露 24 h 时其 SSC 值相对于阴性对照组显著升高,表明本实验中 TK6 细胞暴露充分,可被 TK6 细胞摄取,且有浓度-效应关系。

AgNPs 具有高效的抗菌活性,且不易产生抗性,因此 AgNPs 常被用于材料、电器、生物医药等领域^[13]。根据多项体外遗传毒性实验结果,AgNPs 可在体外培养细胞中诱导微核率升高或者彗星尾 DNA 含量增高,但不同实验室的实验结果并非完全一致^[12]。目前研究者们对于 AgNPs 的毒性是由纳米颗粒引起的还是银离子引起,或两者共同引起还存在争议^[14]。有体外研究报道称 AgNPs 在分散液中可以释放出 Ag⁺,且是纳米银产生细胞毒性的重要原因^[15]。也有报道称 AgNPs 所释放的银离子含量微乎其微,用电感耦合等离子体-质谱仪(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)并未检测到 Ag⁺的释放^[16]。一些体内实验研究结果也提示,纳米

银的毒性不仅仅只取决于释放出的 Ag⁺。如 Kawata 等^[17]发现 AgNPs 处理的肝脏肿瘤细胞中出现微核,这些微核不能完全被银离子配体半胱氨酸所清除。究其原因与纳米银颗粒大小、形状、团聚状态及表面功能化等有关,有研究报道称 20~80 nm 的 AgNPs 的毒性主要来源于 Ag⁺的释放,而 10 nm 的 AgNPs 由于尺寸较小更易穿透细菌的细胞膜,毒性主要归于自身的尺寸效应^[18]。Liu 等^[19]也发现 5 nm 纳米银比 20 nm 和 50 nm 纳米银更加容易进入人肝癌细胞,诱导更强的细胞增殖、细胞膜损伤、活性氧产生、细胞周期抑制和细胞凋亡。因此对于本实验中对 AgNPs 中银离子的含量测定及同浓度下的 Ag⁺引起的遗传毒性需进行进一步探究。

本研究中 AgNPs 的 4 h 彗星实验结果为阳性,而体外 *PIG-A* 基因突变实验结果为阴性。文献报道 AgNPs 的遗传毒性可能由 Ag 纳米颗粒诱导细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)升高,进而导致 DNA 损伤,但是该损伤多发生在纳米颗粒暴露于细胞后短时间内,且该损伤能够被细胞修复^[20]。因此,推测本研究中 AgNPs 体外 *PIG-A* 基因突变实验结果为阴性的原因是由于纳米物质导致的 DNA 损伤被修复(彗星阳性),无法诱导 TK6 细胞产生可稳定遗传的 *PIG-A* 基因突变(体外 *PIG-A* 基因突变阴性)。

TiO₂NPs 常用于白色无机染料或者化妆品中。TiO₂NPs 遗传毒性检测多采用体外微核实验或体外彗星实验,结果也存在阴性/阳性两种结果^[21,22]。本

研究中 TiO_2NPs 的彗星实验结果为阴性, 而体外 *PIG-A* 基因突变实验结果为阴性。文献报道 TiO_2NPs 可能的遗传毒性与 AgNPs 相似, 均可诱导细胞内 ROS 升高, 进而导致 DNA 损伤^[23], 该损伤为可修复的 DNA 损伤^[24]; 也有文献报道其遗传毒性可能由光催化或表面毒性吸附导致^[25]。 TiO_2NPs 的遗传毒性作用机制仍有待阐明。

综上所述, 本研究采用具有 *P53* 基因功能的 TK6 细胞, 使用体外彗星实验和体外 *PIG-A* 基因突变实验方法检测两个常用纳米物质 TiO_2NPs 和 AgNPs 的致 DNA 断裂性和诱变性, 初步证实彗星实验适用于纳米物质的遗传毒性, 而对于 *PIG-A* 基因突变实验是否适用于纳米物质的遗传毒性评价有待进一步研究。本研究采用的方法简便、快速, 在纳米物质的遗传毒性体外检测方面有一定的开发前景。

致谢

感谢上海益诺思生物技术股份有限公司遗传毒理实验室的经费等支持!

参考文献(References):

- [1] Tortella GR, Rubilar O, Durán N, Diez MC, Martínez M, Parada J, Seabra AB. Silver nanoparticles: toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *J Hazard Mater*, 2019, 390: 121974. [DOI]
- [2] Calderón-Jiménez B, Johnson ME, Montoro Bustos AR, Murphy KE, Winchester MR, Vega Baudrit JR. Silver nanoparticles: technological advances, societal impacts, and metrological challenges. *Front Chem*, 2017, 5: 6. [DOI]
- [3] Patel S, Patel P, Bakshi SR. Titanium dioxide nanoparticles: an *in vitro* study of DNA binding, chromosome aberration assay, and comet assay. *Cytotechnology*, 2017, 69(2): 245–263. [DOI]
- [4] Zhang R, Wu AQ, Shi LL. A review of the performance evaluation and application of nano-silver antibacterial agents. *J Yangtze Univ (Nat Sci Ed)*, 2015, 12(25): 23–25. 张然, 吴安琪, 施伶俐. 纳米银抗菌剂性能评价和应用现状综述. 长江大学学报(自科版), 2015, 12(25): 23–25. [DOI]
- [5] Gamucci O, Bertero A, Malvindi MA, Sabella S, Pompa PP, Mazzolai B, Bardi G. Detection of fluorescent nanoparticle interactions with primary immune cell subpopulations by flow cytometry. *J Vis Exp*, 2014, (85): 51345. [DOI]
- [6] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988, 175(1): 184–191. [DOI]
- [7] Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res*, 1990, 122(1): 86–94. [DOI]
- [8] Kwon JY, Lee SY, Koedrich P, Lee JY, Kim KM, Lee JK, Jeong J, Maeng EH, Lee BJ, Seo YR. Lack of genotoxic potential of ZnO nanoparticles in *in vitro* and *in vivo* tests. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2014, 761: 1–9. [DOI]
- [9] Krüger CT, Fischer BM, Armant O, Morath V, Strähle U, Hartwig A. The *in vitro* *PIG-A* gene mutation assay: glycosylphosphatidylinositol (GPI)-related genotype-to-phenotype relationship in TK6 cells. *Arch Toxicol*, 2016, 90(7): 1729–1736. [DOI]
- [10] Rees BJ, Tate M, Lynch AM, Thornton CA, Jenkins GJ, Walmsley RM, Johnson GE. Development of an *in vitro* *PIG-A* gene mutation assay in human cells. *Mutagenesis*, 2017, 32(2): 283–297. [DOI]
- [11] Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V, Dusinska M. Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2014, 8(3): 233–278. [DOI]
- [12] Sheng LP, Wang ZD, Zhou PK. The genetic toxicity and toxicology mechanism of metal nano materials. *Chin J Prev Med*, 2015, (9): 831–834. 沈丽萍, 王治东, 周平坤. 金属纳米材料的遗传毒性及遗传毒理机制. 中华预防医学杂志, 2015, (9): 831–834. [DOI]
- [13] Du XM, Gao SX, Hong LL, Zheng X, Zhou QY, Wu JH. Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the mouse lymphoma assay and the Ames test. *Mutat Res*, 2019, 838: 22–27. [DOI]
- [14] Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 2015, 20(5): 8856–8874. [DOI]
- [15] Lubick N. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles--or

- both?. *Environ Sci Technol*, 2008, 42(23): 8617. [DOI]
- [16] Xin Q, Zhang Q, Cheng JP. Effects of silver nanoparticles and silver ions on the early development of zebrafish embryos and toxicity mechanisms. *Asian J Ecotoxicol*, 2015, 10(4): 55–64.
辛琦, 章强, 程金平. 纳米银和银离子对斑马鱼胚胎早期生长发育的影响及作用机制. *生态毒理学报*, 2015, 10(4): 55–64. [DOI]
- [17] Kawata K, Osawa M, Okabe S. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(15): 6046–6051. [DOI]
- [18] Hsiao IL, Hsieh YK, Wang CF, Chen IC, Huang YJ. Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(6): 3813–3821. [DOI]
- [19] Liu W, Wu Y, Wang C, Li HC, Wang T, Liao CY, Cui L, Zhou QF, Yan B, Jiang GB. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology*, 2010, 4(3): 319–330. [DOI]
- [20] Tavares P, Balbinot F, de Oliveira HM, Fagundes GE, Venâncio M, Ronconi JVV, Merlini A, Streck EL, da Silva Paula MM, de Andrade VM. Evaluation of genotoxic effect of silver nanoparticles (Ag-Nps) *in vitro* and *in vivo*. *J Nanopart Res*, 2012, 14(4): 791–800. [DOI]
- [21] Gong Y, Ji YJ, Liu F, Li J, Cao Y. Cytotoxicity, oxidative stress and inflammation induced by ZnO nanoparticles in endothelial cells: interaction with palmitate or lipopolysaccharide. *J Appl Toxicol*, 2017, 37(8): 895–901. [DOI]
- [22] Dobrzyńska MM, Gajowik A, Radzikowska J, Lankoff A, Dušínská M, Kruszewski M. Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats *in vivo*. *Toxicology*, 2014, 315(1): 86–91. [DOI]
- [23] Proquin H, Rodríguez-Ibarra C, Moonen CGJ, Ortega IMU, Briedé JJ, de Kok TM, van Loveren H, Chirino YI. Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis*, 2017, 32(1): 139–149. [DOI]
- [24] Wen HR, Shao AL, Chen L, Dan M, Hu YP, Wang X, Xu LM. Selection of a suitable method for the evaluation of genetic toxicity of nanomaterials. *Carcinog Teratog Mutag*, 2018, 30(4): 326–331.
文海若, 邵安良, 陈亮, 淡墨, 胡燕平, 王雪, 徐丽明. 适合纳米材料遗传毒性评价方法的选择. *癌变·畸变·突变*, 2018, 30(4): 326–331. [DOI]
- [25] Karlsson HL, Di Bucchianico S, Collins AR, Dusinska M. Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? *Environ Mol Mutagen*, 2015, 56(2): 82–96. [DOI]

(责任编辑: 周钢桥)