

Cytotoxicity of Gold, Silver and Copper Nanoparticles and Their Applications*

Yuling Fan¹, Lihua Ma¹, Bingyu Fan², Shuang Leng³

¹Life Sciences and Environmental Sciences of Development Center, Harbin University of Commerce, Harbin

²Sanchine Pharmaceutical Connaught Jie Limited Liability Company, Harbin Pharmaceutical Group, Suihua

³Antitumor Natural Medicines Engineering Research Center, Ministry of National Education, Harbin

Email: 429776474@qq.com, 524682557@qq.com, 386179009@qq.com, 164723790@qq.com

Received: Mar. 18th, 2013; revised: Mar. 24th, 2013; accepted: April 20th, 2013

Copyright © 2013 Yuling Fan et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Objective: In order to summarize the advance of study on cytotoxicity and application of the metal nanoparticles, the typical representative: gold, silver, copper. **Method:** The national and international literatures looked up in recent years were analyzed. **Results and Conclusions:** Metal nanoparticles have proved to be a potential in anti-cancer. But they are still needed to be further understood and optimized with their powerful characteristics, so that they could be used more effectively in treatment strategies in the fight against cancer with a wide range of clinical applications.

Keywords: Gold; Silver; Copper; Metal Nanoparticles; Cell Cytotoxicity

金银铜纳米粒子的细胞毒性及其应用研究进展*

范玉玲¹, 马丽华¹, 范兵羽², 冷爽³

¹哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究发展中心, 哈尔滨

²哈药集团三精制药诺捷有限责任公司, 绥化

³国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 哈尔滨

Email: 429776474@qq.com, 524682557@qq.com, 386179009@qq.com, 164723790@qq.com

收稿日期: 2013年3月18日; 修回日期: 2013年3月24日; 录用日期: 2013年4月20日

摘要: 目的: 以金、银、铜三种金属为代表综述了金属纳米粒子在细胞毒性及其应用研究方面的进展。方法: 以国内外近年有代表性的文献为依据, 进行分析、整理和归纳。结果与结论: 金属纳米粒子已经证明是强大抗癌工具, 但仍需要进一步的优化和了解它们潜在的特性, 在对抗癌症的有效治疗策略有广泛的临床应用。

关键词: 金; 银; 铜; 金属纳米粒子; 细胞毒性

1. 引言

纳米技术已经应用新合成材料用于生物医学领域, 是直接加强在癌症部位的治疗技术。随着有机物纳米粒子在医院领域应用的不断深入, 尤其是在抗癌方面的研究进展的影响, 无机纳米粒子(其中以金属纳

米粒子为代表)的研究开始兴旺起来。金属纳米粒子的尺寸小可以过细胞表面和细胞里面的活性分子, 产生更好的特殊靶向治疗。由于金属纳米粒子的性质和影响不断扩大, 他们目前正在探索治疗癌症的潜在工具。

金属的物理化学特性是早已被人们熟知的, 但是金属纳米粒子的生物学特性是近年来才被关注的。最近医药方面的专家学者对其纳米粒子的生物学特性非

*黑龙江省教育厅科学技术研究项目, 基金编号: 11521053; 哈尔滨市科技局留学回国人员专项, 基金编号: 2011FRLXS027。

常感兴趣,并且在癌症治疗方面做了大量的研究工作,本文以金、银、铜三种金属为代表,综述了其纳米粒子的细胞毒性方面的研究及其在抗肿瘤方面的应用。

2. 纳米金

金纳米粒子(gold nanoparticles, GNPs)最常用的合成方法是化学还原法,其基本原理是:向一定浓度的氯金酸溶液中加入适量的还原剂,防止纳米颗粒的团聚。Burst 等^[1]通过一步合成了表面功能化的 GNPs,具体方法是巯基稳定剂存在的条件下,使用 NaBH_4 还原 AuCl_4^- 盐,获得了表面带有巯基、单分散性的 GNPs,通过调整巯基的数量,核径可在 1.5~6 nm 范围内调节。在此基础上,Murray 等^[2]又发展了合成多元功能 GNPs 的方法,即引入外源巯基取代原有 GNPs 外包被层上的巯基。

2.1. 金纳米粒子对肿瘤细胞的细胞毒性

金纳米粒子在医药领域的应用,很大程度上取决于固有的细胞毒性。在文献中,金纳米粒子已报告引起不良反应和急性毒性^[3]。因此被认为是在生物医学应用的生物相容性兼容的实体^[3,4]。然而,最近的研究表明有可能金纳米粒子的毒性比已推测的毒性程度反应更强,而且毒性大小与金纳米粒子尺寸大小密切相关^[5,6]。调查表明,降低纳米粒子的尺寸能更广泛的分布于组织,会加剧特定组织的渗透性,更加有效的进入细胞,并增加毒性作用^[7]。在表面功能方面,研究结果表明,修饰的金纳米粒子表面影响其细胞组成和对纳米粒子的吸收、及其相互作用^[8,9]。

2.1.1. 金纳米粒子体外的细胞毒性研究

多项研究表明,金纳米粒子通过诱导氧化应激发挥其细胞毒性。例如,当暴露在 1.4 nm 的金纳米粒子 HeLa 宫颈癌细胞表现出增加的活性氧(ROS)的产生和氧化应激反应,导致蛋白质和脂质过氧化,线粒体功能严重受损,并最终细胞死亡^[10]。同样的研究表明,Z.VAD-fmk,蛋白酶抑制剂是无法拯救垂死的细胞,最终导致细胞坏死亡。因此,全基因组的 mRNA 表达分析验证,用金纳米粒子治疗将引起压力上调因子和炎症基因在细胞周期基因表达同时减少。它出现连续生产,细胞内的内源性活性氧耗尽细胞内的抗氧化池,因此诱导导致不可逆转的破坏,最终导致坏死。

2.1.2. 在体内金纳米粒子的细胞毒性研究

在目前对于金纳米粒子的体内毒性研究提供有限的信息。研究主要集中在金纳米粒子在体内的生物分布。大鼠模型的一项研究显示纳米粒子的大小影响生物分布。静脉注射后金纳米粒子的分布依赖器官。为 10 nm 的金纳米粒子被发现是广泛分布,它渗透到血液和心肺器官系统,如脾脏,胸腺和免疫系统,生殖系统,肝脏,肾脏和大脑。而较大尺寸的(50, 100, 250 nm)的金纳米粒子只定位到血液,肝脏和脾脏中^[11]。一项类似的研究,金银铜纳米粒子的细胞毒性及其应用研究进展使用 15, 50, 100 和 200 nm 的金纳米粒子表明:最大尺寸金纳米粒子只能积聚在静脉注射到小鼠体内的器官,在很多组织中检测到最小尺寸的金纳米粒子,包括血液和其他器官,如肝,肺,脾,肾,脑,胃和心脏^[12]。研究结果表明,较小的尺寸金纳米粒子更容易在体内各组织,因此如果有更小尺寸的纳米粒子的话倾向造成广泛的伤害。

另一组研究人员评估在体内的纳米毒性,在 13 nm 的金纳米粒子与聚(乙烯)乙二醇(PEG)给小鼠静脉注射金纳米粒子,粒子在小鼠肝、脾累计长达一个星期,并引起急性炎症和肝细胞凋亡^[13]。而 4 nm 或 100 nm 的聚乙二醇涂层的金纳米粒子在小鼠诱导凋亡,细胞周期,炎症,肝组织中的代谢过程相关的常见基因调控^[14]。在体纳米粒子细胞毒性研究是从动物模型转向人类的挑战。

2.2. 金纳米粒子在癌症治疗中应用

2.2.1. 金纳米粒子用于探测传感器和成像肿瘤细胞

金纳米粒子在标记应用是很好的载体,因为它们可在可见光下相互作用能力很强。在光下暴露,在金纳米粒子原子中的自由电子是一种集体震荡作为等离子共振,指的是金纳米粒子的能力去吸收和分解可见光^[15]。在标记应用中,金纳米粒子是目标靶向和积累在有兴趣的位点上,集于他们的潜能的分散特性,它们有能力在研究学习下可视化。金纳米粒子也可以被以下几种方式检测:相称显微镜、暗场显微镜、光热成像、光声成像^[16]。此外,对于它的高能原子重力,金纳米粒子保持更倾向于在用透射电镜下标记超微结构可视化和免疫染色^[17]。

成功治疗癌症的关键的一步是早期诊断。金纳米粒子纳米粒子的强光散射性和它们的生物相关性相

结合,使他们更加适用于癌症影像的诊断探针。尽管特异性抗体在癌症细胞中过度表达,金纳米粒子可以直接到达肿瘤细胞,因此探针能够精确的指示癌症细胞在身体的位置。研究表明抗体聚合空心金纳米囊可以被用于增强 MCF7 乳腺癌细胞中过度表达的肿瘤标志物的拉曼光谱成像^[18]。通过最近的纳米分子在表面增强拉曼光谱,拉曼信号被放大数倍。黄金纳米粒子和白银已被证明造成显著增强,因而纳米结构作为传感器使用。通过附加 SERS 传感器可实现敏感的探测细胞内的分子结构的目标^[19]。

2.2.2. 作为癌细胞的给药载体的金纳米粒子

金纳米粒子的一个突出的应用是其传递到细胞分子的载体使用。金纳米粒子已被描述的“有前途的纳米载体疗法”,由于其易于合成和功能性、相对的生物相容性^[20],以及在初步检测中低毒^[21]。然而,各方面的因素需要考虑设计一个有效的药物输送系统。金纳米粒子,如它们的大小,电荷和表面化学性质已被证明影响金纳米粒子的摄取进入细胞以及他们随后的细胞内转运。此外,有效的药物金纳米粒子的相互作用以及药物释放到细胞成为药物金纳米粒子配合物^[22]。如果金纳米粒子仅作为进入细胞的载体,它可以监测任何残余物质的细胞毒性作用;一种可生物降解的纳米粒子载体,其寿命是有限的药物治疗窗将是理想的^[23]。如果纳米载体一次达到它的目的后从系统中清除,它会减少曝光,并限制其在体内的毒副作用。

另一个关注的问题是金纳米粒子进入肿瘤细胞靶位点的渗透率的问题,特别是上皮和内皮障碍是被认为金纳米粒子要克服的主要障碍。像金纳米粒子蛋白酶对基底膜和毒素对细胞紧密连接也许对金纳米载药进入肿瘤细胞吸收有很大用处^[24]。透皮吸收促进剂,可能是有用的协助药物装金纳米粒子吸收进入肿瘤,另一个要考虑的因素是金纳米粒子保留在血液循环。一些研究人员已经发现,颗粒的滞留率和粒子尺寸依赖性和更长的循环时间到达肿瘤靶向的相关率较高^[25]。

2.2.3. 金纳米粒子纳米粒子在光热治疗的应用

传统上通过感应热疗的条件中热已被用于治疗癌症,细胞受到高温条件杀死他们。然而热的来源不

同,例如微波炉,无线电波,声波激光,在过去这种办法没有被广泛使用癌症治疗中,因为间接损害肿瘤的周围正常组织。不同的纳米结构与纳米技术研究的到来,已经生产以光热疗法为目的。研究者对稀有的金纳米粒子例如金纳米粒子(包括金纳米粒子的纳米球,纳米棒,纳米笼)特别感兴趣^[26,27],因为它们所拥有的强吸收横截面、强烈的吸收,有效的激光治疗,以最小的损害肿瘤周围的健康组织。金纳米粒子发挥他们的光热效应机制是通过 SPR(表面等离子共振技术)发挥作用。这将导致形成了激烈的电子气体,然后通过交流与使迅速纳米粒子晶格的能量大约 1 ps 冷却。反过来的纳米粒子的晶格在周围的环境加热,只有约 100 ps^[28]就能通过快速传递能量跨越。能量转换的速度和消散到周围的环境,提出了一种有效手段能迅速诱导热疗在金纳米粒子纳米粒子的附近,用灯光照射。在承受高的温度后变性的蛋白质和细胞膜的破坏造成的不可逆的细胞损害。

使用抗体共轭的基本概念金纳米粒子纳米粒子链对肿瘤细胞的表达特征生物标志物必要性,否则抑制或表达在正常细胞水平显著降低。乳腺癌细胞成功地检测和消除过度表达人表皮生长因子受体 2(HER2),通过使用抗 HER2 免疫针对性金纳米粒子纳米壳随后照射近红外光的作用下能够增强金纳米粒子纳米球壳。诱导的光热效应已报道的抗体介导的靶向肿瘤细胞的纳米金纳米粒子被认为是更加具体的针对肿瘤的两种方法的有效。它是从这里明显的电浆金纳米粒子纳米粒子表现出的光热治疗癌症领域提供了一个巨大的潜力,这意味着专门针对肿瘤细胞。

2.2.4. 金纳米粒子在放射治疗方面的应用

许多研究表明金纳米粒子有可能作为电敏药物的重要应用,这辐射治疗癌症的效果有明显的作用。研究表明小鼠皮下附有 EMT-6 乳腺癌不仅是金纳米粒子具有(直径为 1.9 nm)无毒的性质和经肾脏从体内清除,他们拥有的能力以提高 X 射线治疗的效应,导致显著的生存率为 86%,而不是 20%的 X 射线和 0%单独的金纳米粒子^[29]。然而,至关重要的是要注意 1.9 nm 的金纳米粒子似乎具有辐射增强剂的潜力,最近的一项研究发现急性细胞毒性,DNA 损伤和坏死细胞诱导的氧化应激介导的凋亡摄取 1.9 nm 的金纳米粒子^[30]。这需要进一步了解探索金纳米粒子用于放射疗

法治疗癌症时细胞的反应的潜力。

2.2.5. 金纳米粒子作为单抗抗体血管剂

金纳米粒子具有抗血管生成的属性已报道^[31]。其确切作用机制仍不清晰,但研究指出,金纳米粒子主要通过肝素结合域优先结合血管通透性因子/血管内皮生长因子(VPF/VEGF)-165 和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。此研究表明,金纳米粒子通过抑制血管生成有丝分裂的癌细胞血管生成能够防止影响下游信号^[32]。

3. 纳米银

近年来,由于抗生素滥用导致细菌对抗生素抵抗力增强,随着纳米科技研究的深入,银的抗菌性能又回到了研究的前沿。一方面,纳米银粒子具有较大的比表面积和表面能,抗菌性能远远优于普通银粒和银盐,并表现良好的生物相容性,因而被广泛应用于医药卫生方面。除此之外,研究表明,纳米银具有独特的电学性能、光学性能和催化活性,并可作为表面增强拉曼光谱的基底。因此,关于纳米银的制备和应用得到了普遍关注。另一方面,纳米银性能的优劣取决于银纳米粒子的尺寸和形状,因此,如何得到粒径和形态满足应用要求的纳米银,成为纳米银制备研究中的关键。

3.1. 纳米银对多种细胞的毒性效应

3.1.1. 对成纤维细胞和角质形成细胞的体外毒性

纳米级的银粒子之所以具有高效的抗菌效应,一部分原因是在潮湿环境下,其表面可以发生水解,释放银离子。例如,Acticoat 在潮湿环境下,可以可控地持续性产生抗菌剂量(50~100 ug/mL)的银离子。但是,Hollinger^[33]报道临床使用含银敷料后,常常会出现愈合延迟的状况。Innes 等^[34]也发现,采用 Acticoat 处理供皮区后,与对照组相比,创伤的愈合时间延长,并且疤痕也更明显,目前原因还不清楚。

Poon 等^[35]等尝试应用角质形成细胞的扩增培养来调控愈合过程,这是伤口处理的新思路。一般认为银敷料的毒性可能与银含量有关,但是结果显示并不是这样,如 Contreet Foam 的银含量为 13 ug/cm², Poly Mem Silver 的银含量为 139 ug/cm²,而后的毒性要明显低于前者。另外,毒性效应的决定因素也包括敷料的性质。例如,在研究中用到了两种纳米银晶体的

敷料 ActicoatTM 和 PolyMem Silver,其中,ActicoatTM 在潮湿环境下可以从表面释放出银离子,而 PolyMem Silver 是基于泡沫的敷料,在 5 种敷料中具有最高的吸光度值,其在 3 种液体中释放出的银离子含量也是基本上最低的。因此银被“锁定”在辅料中,是杀菌中心在辅料中,而不是伤口中,这对防止银对正常细胞的损伤很有效。

3.1.2. 对肺部细胞的体外毒性

Soto 等^[36,37]通过对小鼠肺泡巨噬细胞 RAW264.7 和人巨噬细胞 THB-1 以及肺部上皮细胞 A549 的研究,来探究不同纳米粒子对人体和其他哺乳动物的细胞所产生的效应的差别。

研究者首先对纳米粒子的粒径和形态等进行了表征,所用纳米银粒径为 3~100 nm,团聚体粒径为 25 nm~1 um,比表面积(BET 法)约为 15 m²/g,浓度为 5 ug/mL 的该纳米银的毒性指数为 1.8,10 ug/mL 的为 0.1 进而分析了纳米粒子所引起的细胞存活率的变化。在暴露于 5 ug/mL 的该纳米银 48 h 后,三种细胞的存活率均在 0.3 左右,并且其对小鼠肺泡巨噬细胞 PAW264.7、人巨噬细胞 THB-1 和肺部上皮细胞 A549 的半效应浓度依次约为 1 ug/mL、5 ug/mL、1 ug/mL。可见,对人体肺部细胞来说,上皮细胞比巨噬细胞对纳米粒子更敏感,这可能与肺部上皮细胞是抵抗各种外来入侵物质的首道屏障有关。

3.1.3. 对肝源性细胞的体外毒性

对纳米粒子的体内暴露研究表明,纳米粒子可能会进入肝脏并被清滤掉,因此很可能对肝脏细胞具有潜在的影响。有研究者对粒径为 15 nm 和 100 nm 的纳米银对小鼠的肝源性细胞株 BPL3A 的潜在毒性进行了评价^[38]。研究采用如下毒性指标/实验-细胞形态、MTT 试验、乳酸脱氢酶(LDH)实验、谷胱甘肽(GSH)水平、ROS 水平、线粒体膜电位(MMP),对照组和 24 h 暴露组的细胞株进行了对比研究,以评价纳米银对哺乳动物肝细胞的主要生理功能的影响和潜在毒性。

Kawata 等^[39]的一项研究显示,低剂量(<0.5 mg/mL)的纳米银可以加速 HepG2 的增殖。但是高剂量(>1.0 mg/mL)的纳米银会引起细胞形态的变化,表现为细胞收缩或呈不规则形状,且与 Ag₂CO₃ 相比,

纳米银会增加微核生成的频率,使双核细胞达到47.9%,因此表现出更强的染色体损伤。半胱氨酸作为较强的银离子配体只是部分阻止了纳米银引起的微核生成和基因的表达。

3.1.4. 对精原干细胞的体外毒性

配子的发育是一个对环境因素,尤其是化学因素非常敏感的复杂过程。很多化学物质可以直接作用于配子细胞,或者通过影响体细胞间接对其产生作用。最终,这些作用会导致不育、癌症,并且会对胚胎的发育产生不良影响。例如,有些诱变剂会使配子细胞产生可遗传的基因突变以及染色体结构和数目的畸变^[40,41]。

最近有研究显示,大鼠通过静脉或腹腔摄取纳米粒子后,纳米粒子会聚积在很多组织的细胞中,包括大脑和睾丸,说明纳米粒子可以轻易穿越血脑屏障和血睾屏障^[42,43]。

Braydich-Stolle 等以精原干细胞为模型,通过光学显微镜、细胞增殖和其他标准体外细胞毒性分析手段对一系列纳米粒子可能对生殖细胞产生的影响进行了评价,其中所用纳米银平均粒径为15 nm,浓度低于10 µg/mL,因为更高浓度的纳米银的毒性效应因银的团聚和沉淀而无法继续进行研究,对照组采用碳酸银溶液。

3.1.5. 对肾细胞和结肠细胞的体外毒性

Gopinath 等^[44]对幼龄仓鼠肾细胞 BHK21 和人结肠癌细胞 HT29 的体外毒性研究认为,在一定浓度范围内,纳米银可以引起细胞程序性死亡这一特点,具有被应用作基因治疗的潜力。其所有纳米银是通过在 DMEM 中,不同浓度的 AgNO₃ 被 NaBH₄ 还原得到的。对不同浓度的纳米银的细胞毒性,通过细胞形态变化、EB 的进行性核染色、LDH 漏出量和线粒体活性,进行了检测和评价。首先,得到浓度为 10⁻⁴ mol/L 的 Ag⁺有较强毒性,而浓度为 1 × 10⁻⁶ mol/L 和 1 × 10⁻⁸ mol/L 的 Ag⁺对细胞是无毒的。高浓度(>44.0 µg/mL)的纳米银将引起细胞坏死,导致细胞膜的快速破裂。另外,纳米银的 IC₅₀ 为 27.0 µg/mL,但此浓度的纳米银易发生团聚。在这些数据的基础上,他们选择足以引起细胞死亡,而又相对稳定的 11.0 µg/mL 的纳米银进行进一步研究。实验发现,用其处理的细胞变圆,

并随着时间的延长,细胞数目减少、细胞膜收缩、细胞间隙增大,并最终导致细胞从培养皿中脱离,6 h 后可以观察到明显的细胞膜中的气泡。这些都意味着细胞可能发生了凋亡。进一步的吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双染色实验显示,在加入纳米银 4 h~6 h 时,细胞发生凋亡。线粒体活性检测实验也发现在细胞凋亡过程中线粒体膜损伤的发生。在纳米银暴露 16 h 后,对细胞 DNA 碎片进行 BrdU 标记的酶联免疫吸附试验(ELISA)结果显示,细胞凋亡过程中的生物化学变化,使得核酸内切酶被激活,是染色体 DNA 双链降解、断裂,DNA 断裂的部分恰发生在核小体之间,形成 180~200 bp 的单核小体或寡聚核小体碎片,在 DNA 琼脂凝胶电泳上显示核小体大小(180~200 bp)的 DNA 梯带,这是目前认为的判断细胞发生凋亡的主要标准,进一步确认了细胞凋亡是引发纳米银暴露过程中细胞死亡的首要机制。

3.1.6. 对单核细胞核巨噬细胞的体外毒性

2007 年,Shin 等^[45]研究了纳米银对外周血单核细胞(PBMC)的毒性以及对其增殖过程中产生的细胞因子的影响。采用的纳米银小于 5 nm。结果显示,当纳米银浓度超过 15 ppm 时,会抑制细胞的增殖,用 MTT 和 CellTrackerGreenCNFDA 检测共孵育 72 h 后,抑制率分别为 70%和 30%。将 PBMC 与植物凝集素(PHA)共培养 72 h 后,细胞的增殖指数会增加到 3.5,当纳米银浓度为 1.5 ppm 时不会对该指数的增加有影响,而高于 10 ppm 时,会明显影响细胞的增殖;进一步对细胞因子的检测发现,当纳米银浓度高于 10 ppm 时,IL-5 的产生收到显著抑制,当纳米银浓度高于 3 ppm 时,IFN-γ 和 TNF-α 的产生收到显著抑制。也就是说,虽然高浓度的纳米银会对细胞有毒性作用,但是在低浓度时纳米银可以通过抑制细胞因子的产生来抑制炎症的发生。

2009 年,Yen 等^[46]做了体外实验,研究了巨噬细胞对不同粒径的纳米银所产生的免疫应答。实验采用了三种粒径范围的纳米银,分别是 2~4 nm、5~7 nm 和 20~40 nm。结果发现,10 ppm 以上的纳米银可以引起巨噬细胞数量的减少和体积的增大。但是实验采用的 1ppm 的纳米银不会引起巨噬细胞 IL-1、IL-6 和 TNF-α 表达的显著增加。实验并没有发现巨噬细胞对三种不同粒径纳米银的响应有明显区别。与其他研究结果一

致,通过 TEM,他们也观察到了纳米银主要被包裹在细胞质中的囊泡中,但是没有观察到其进入细胞核。

3.2. 在医疗方面的应用

3.2.1. 抗菌纤维与抗菌辅料

在医用防护方面,抗菌纤维发挥着阻断细菌、霉菌的作用。具有广泛抗菌谱的纳米银还具备较高的杀菌或抑菌功效、优良的耐洗性(能满足反复洗涤的要求并具有持久的抗菌功能)、很好的热稳定性和化学稳定性等性质。这些优良的品质是使其广泛应用于织品和非织品。如今,纳米银抗菌纤维已被应用或将要被应用于众多领域:1)人们已将纳米银抗菌纤维制成烧伤烫伤敷料应用于烧烫伤、烧伤植皮和海战火器伤及海水浸泡治疗中;2)用于纳米银切口贴、纳米银创伤贴的制造以及应用于外伤、皮肤、外科手术和切口感染等方面,此类技术已有人申请专利,并有研究证明,此类敷料对久治不愈的褥疮或其他慢性感染创面效果尤其显著;3)载有纳米银抗菌材料的抗菌口罩、防护服、垫材、垫巾、床单、被罩等可防止医院空气中漂浮的大量有害微生物吸附在织物纤维上造成交叉感染,并向院外人群传播。

3.2.2. 医疗器械与医用材料

随着医用高分子材料和介入性医疗技术的发展,医用导管在临床中的应用越来越广泛,但导管介入引起的感染问题长期困扰着人们。而近期研制成功的“纳米银系抗菌导管”具有长效抗菌杀菌性,可改善这个问题。此外,有人将纳米银加入到不锈钢医疗器械中制造出如抗菌不锈钢刀具、抗菌不锈钢夹子等器具。在检测其抗菌效果时发现,表面含纳米银材料的不锈钢器具具有优异的抗菌性能。目前日本的川崎钢铁公司已将纳米银系不锈钢用具投放市场。此外,纳米银抗菌剂还具有牙科抗菌材料领域应用的可行性。

3.2.3. 借助纳米银的表面增强拉曼光谱

表面增强拉曼光谱(SEPS)是一种用于探测和鉴定各种分子的有力而灵敏的分析工具,甚至可以用于单分子检测^[47],其应用于生物分子如 DNA、蛋白质和其他生物活性小分子的检测和鉴定有极其重大的意义^[48-50]。

吸附在粗糙的纳米银表面的分子的拉曼信号能比正常的分子信号强 106 甚至更强,其作用机理至今尚未完全明确,但有两个主要原因已经得到认可。其一是当被激光照射时,纳米银的极小尺度使纳米球腔阵列的协同表面等离子体共振与光耦合,导致电磁场增强,纳米球腔结构对电磁场的聚焦效应可使球腔内电磁场能量密度增大;其二来自于 CT(电荷转移)效应,如分子的电子态与金属之间的动态电荷转移。

SERS 的活性很多因素决定,如金属的本性、入射光的波长和金属表面的粗糙程度。SERS 效应在银、铜、金及一些碱金属的表面都能被观察到,而银因其优良的表面性质、简易的制备方法和适宜的激发波长,被认为是 SERS 最好的金属基底。由于纳米尺度对于得到增强的拉曼光谱非常关键,因此,大都致力于银表面的制作中。先有的银基底包括电化学方法致粗糙的电极、通过 Tollens 反应制备的银薄膜及在聚合物和陶瓷基底上自组装的胶质银。致粗糙的银电极是一种十分稳定的基底,但论灵敏性却是胶质银更胜一筹。

如今,纳米银的水溶液已被广泛地用于鉴定蛋白质^[51]、研究各种药物与蛋白质的相互作用^[52,53]、了解 pH 和其他因素对蛋白质形态的影响^[54]、测定低浓度(10~13 mol/L)的 DNA^[55]、发展微电极基因探针及生物鉴定^[56]。

3.2.4. 借助纳米银的金属增强荧光

荧光检测一直被认为是目前生物学检测的基础。尽管这门技术具有高灵敏性,但荧光技术本身也存在一些局限。金属增强量子点荧光指的是当荧光分子靠近金属纳米粒子时,荧光发射强度增强的效应。其作用机理与 SERS 中局部磁场的加强相仿。因此,金属增强荧光(MEF)可以大大改进现有的荧光技术,并在药物研发、高通量药物筛选、免疫测定、临床诊断和蛋白质—蛋白质检测中都能产生巨大的影响。研究表明,纳米银薄膜能有效地使荧光发射强度平均至少增强 3 倍^[57]。

目前已有多种方法可用来制备 MEF 需要的纳米银包被的基底,包括利用 Tollens 反应^[58-60]在玻璃基底上随机沉积纳米银粒子或将基底浸入湿化学法制备的胶质银溶液中使其沉积,以及利用光刻技术如纳米球刻蚀技术或电子束光刻技术得到轮廓分明的纳米银。

4. 纳米铜

纳米铜是一种已被规模化生产的商品话纳米颗粒。随着纳米铜应用的不断发展, 纳米铜可能通过多种途径释放到环境中并暴露于人体。人体内的铜是保持动态平衡的^[61]。如果摄入的铜超过了机体的耐受能力, 就会引起毒性效应, 如溶血、黄疸、甚至死亡^[62]。许多研究表明, 体内铜超载会引起肝硬化、氧化胁迫、肾功能不全、消化道面膜刺激等^[63]。与具有相同化学组成的大尺寸铜颗粒相比(微米量级), 纳米铜在生物毒性方面表现出较大的差异, 尺寸已成为影响铜颗粒生物学行为和毒性效应的重要因素。由于纳米铜是一种新兴材料, 对于其安全性评价的数据还比较有限, 但已成为一个不容忽视的问题。

4.1. 纳米铜对人肾小管上皮细胞(HK-2)的毒理学效应

肾近端小管上皮细胞具有的特殊结构和功能决定了其成为外源性化合物诱导肾毒性过程中的敏感把微点, 因此, 肾小管上皮细胞是研究肾毒性的可靠细胞模型。

4.1.1. 纳米铜对 HK-2 细胞形态学和 LDH 漏出的影响

纳米铜粒子(5~20 $\mu\text{m}/\text{mL}$)对 HK-2 细胞形态呈现如下影响: 随着刺激浓度的增加, 细胞逐渐变圆, 黏附性变差, 脱落死亡的细胞逐渐增加, 呈现明显的剂量依赖性。乳酸脱氢酶(LDH)释放率是细胞毒理学研究中表征细胞膜完整性的重要指标, 在细胞膜受损的情况下, 细胞膜内的 LDH 会从细胞内释放到细胞外。纳米铜作用于 HK-2 细胞, 在 0~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 范围内纳米铜粒子对细胞膜的损伤呈现剂量依赖性, 随着刺激浓度的增加, 细胞膜的损伤增加, LDH 的释放率逐渐增加。

4.1.2. 纳米铜对 HK-2 细胞的氧化及氧化应激相关因子的影响

线粒体是细胞内的“能量工厂”及 Ca^{2+} 的储存库, 是产生活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)的主要部位。细胞内游离 Ca^{2+} 和 ROS 升高都可以通过一系列的中间环节激活凋亡执行者 caspase 家族, 从而使细胞发生程序性死亡。二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)作为常用还原剂, 有抗氧化作用, 能够保护酶分

子上的还原性基团, 维持还原性环境, 稳定酶的活性。利用 DTT 可以分析纳米铜粒子作用于 HK-2 细胞内活性氧的含量。剂量为 0~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纳米铜作用于 HK-2 细胞均会诱导细胞内 ROS 含量的升高。

细胞中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的水平是评价细胞发生氧化应激反应的重要指标。SOD 几乎存在于所有的真核细胞中, 铜锌超氧化物歧化酶(Cu-Zn-SOD)主要存在于胞浆内, 主要起催化超氧阴离子(O_2^-)歧化为 H_2O_2 和 O_2 的作用。MDA 是细胞膜脂受脂质氧化作用后的终产物, MDA 的产生也能加剧膜的损伤。细胞中 MDA 的含量水平能够代表细胞膜受脂质过氧化作用的程度。

4.1.3. 纳米铜对 HK-2 细胞金属硫蛋白表达的影响

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是低分子质量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白, 普遍存在于真核细胞中, 是肝、肾细胞内主要的铜结合蛋白, 对铜有高亲和力和(7~10 g/mol), 可以螯合细胞内大量游离的铜离子。

剂量为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纳米铜作用 24 h 可以诱导 HK-2 细胞内金属硫蛋白的基因表达水平上调和蛋白表达增强, 这间接提示细胞内出现铜超载, 而这些 MT 主要集中在细胞浆中, 呈棕黄色颗粒状。

4.1.4. 纳米铜对 HK-2 细胞转运功能的影响

Ctrl、Cox17、HAH1/ATOX1、Ctrl、P 型 ATP 酶(包括 ATP7A 或 ATP7B)等都是细胞在摄取和转运铜离子机制中重要的大分子。Ctrl 摄取铜离子后, MT 可以螯合细胞内游离的铜离子, 同伴侣分子负责完成细胞内铜离子的隔室分布, 其中 Cox17 将铜离子转运至线粒体并传递给 Cyt c 氧化酶, 而 HAH1/ATOX1 将铜离子转运至反式高尔基网络, 在此将其传递给 P 型 ATP 酶(包括 ATP7A 或 ATP7B)将铜输出细胞。

纳米铜粒子作用于 HK-2 细胞后, 对表达与摄取、转运铜离子的相关蛋白的 mRNA 也会产生一定的影响。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纳米铜作用于 HK-2 细胞不同时间(4 h、8 h、12 h、24 h 的细胞)后, 细胞中 Ctrl、MT1X、MT2A、ATOX1、Cox17 分子的 mRNA 表达均出现不同程度的上调。

4.2. 纳米铜对人肝癌细胞系细胞的毒理学效应^[64]

人肝癌细胞(HepG2)是一种应用广泛的研究肝毒

性机制的模型,它保留着许多细胞功能,如分化,拥有正常肝细胞拥有的合成白蛋白、转铁蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶、脂蛋白、纤维蛋白原和凝血因子^[65,66]。

4.2.1. 纳米铜对 HepG2 细胞形态和 LDH 释放率的影响

当纳米铜悬浮液(40 ug/mL)与 HepG2 细胞分别作用 0.5 h、1 h、2 h、6 h 后,经透射电镜观察检测,结果显示各时间点细胞内未见单个或聚集的铜粒子,说明 HepG2 细胞不能摄取纳米铜粒子。纳米铜(5~40 ug/mL)作用于 HepG2 细胞 6~8 h 后可见细胞内出现大小不等的空泡,而 40 ug/mL 纳米铜与 HepG2 作用 24 h 后即可出现亚细胞器损伤,线粒体大小不一,内质网排列紊乱,胞浆内空泡变性明显,细胞核形状不规则,呈现明显的剂量和时间依赖性。乳酸脱氢酶(LDH)释放率是细胞毒理学研究中表征细胞膜完整性的重要指标,在细胞膜受损的情况下,细胞膜内的乳酸脱氢酶会从细胞内释放到细胞外。纳米铜作用于 HepG2 细胞,在 0~40 ug/mL 范围内纳米铜粒子对细胞膜的损伤呈现剂量依赖性,随着刺激浓度的增加,细胞膜的损伤增加,LDH 的释放率逐渐增加。

4.2.2. 纳米铜对细胞线粒体膜电位 MMP 和细胞凋亡的影响

正常线粒体膜电位(mitochondria membrane potential, MMP)的形成与保持是氧化磷酸化中的必要过程,MMP 可以调控线粒体膜对各种物质的选择性和通透性,从而维持线粒体的正常结构与功能^[66,67]。

纳米铜诱导细胞凋亡和坏死的过程中伴有细胞内 MMP 的降低,线粒体超微结构的损害也非常明显,由此推测线粒体损伤可能是纳米铜诱导细胞凋亡和坏死发生过程中的重要事件。Rh123 是一种能为线粒体选择性吸收的荧光染料,其吸收值随 MMP 的改变而呈相应变化,但其本身并不干扰 MMP,且无任何细胞毒性^[68]。因此,可以通过检测细胞 Rh123 的荧光强度来反应细胞 MMP。

4.2.3. 纳米铜粒子氧化能力分析以及对氧化应激相关因子的影响

纳米铜作用于 HepG2 细胞也会诱使细胞内 ROS 含量升高,且 24 h 升高幅度比 HK-2 细胞明显,提示纳米铜粒子对 HepG2 细胞线粒体的损伤强于 HK-2 细

胞。将剂量为 0~40 ug/mL 的纳米铜分别与 HepG2 细胞作用 24 h,测定细胞氧化应激相关指标的变化,可见两种细胞培养体系各指标变化趋势一致,细胞内 GSH、培养上清液中的 MDA 水平均呈剂量依赖性升高,而细胞内 MDA、CuZn-SOD 水平升高不明显。

4.3. 纳米铜对肺泡 II 型上皮细胞 A549 的细胞毒性^[69]

纳米铜对肺泡 II 型上皮细胞 A549 的细胞毒同样表现出与颗粒尺寸的依存性关系。与大尺寸的微米铜(粒径)相比,纳米尺寸的铜颗粒(粒径)表现出更强的细胞毒性,并且这种尺寸效应同样与纳米铜在培养介质中的离子化程度有关。

4.3.1. 对细胞死亡率的影响

细胞毒性试验中,纳米铜刺激 4 h 导致 78%的细胞死亡,而同条件下微米铜刺激引起的细胞死亡率只有 4%,纳米氧化铜及微米氧化铜刺激也只能使细胞死亡率分别增加至 6%及 4%,但均无显著差异。

除了纳米铜本身可引起细胞毒性以外,颗粒在液体培养介质中的离子化产物也是导致其毒性效应的因素。纳米氧化铜的培养液溶出部分(不含不溶性微粒)刺激细胞 18 h 后分别引起 17%及 12%的细胞死亡率,而微米氧化铜及微米铜的培养液溶出部分(不含不溶性微粒)则不会引起明显的细胞死亡。

两种微粒在刺激肺泡 II 型上皮 A549 细胞 18 h 后,纳米粒子的细胞毒性也显著强于微粒粒子。刺激 18 h 后,纳米铜及纳米氧化铜引发的细胞死亡率分别为 91%和 94%($P < 0.001$),而相同条件下微米铜及氧化铜引发的细胞死亡率仅为 8%和 38%。

4.3.2. 对 DNA 损伤的影响

纳米铜粒子及纳米氧化铜粒子在刺激肺泡 II 型上皮 A549 细胞 4 h 后,分别引起 30%和 34%的 DNA 降解,在凝胶电泳试验中出现拖尾,而在相同条件下,微米氧化铜粒子诱发的 DNA 降解仅为 14%,微米铜粒子甚至没有引起明显的 DNA 损伤。

对于纳米和微米氧化铜及铜粒子,细胞存活率和 DNA 损伤的情况都显示其不溶性颗粒对细胞的毒性明显强于其培养液溶解部分。有研究显示,纳米颗粒毒性强于其溶解部分的原因可能与其更容易穿透细

胞膜有关^[70,71]。不同尺寸粒子细胞毒性和 DNA 损伤的差异还可能是摄取率差异所致, 纳米粒子的聚合速率和程度都高于微粒粒子等粒径更大的离子, 由于其聚合物的密度低于固体颗粒, 因此其质量摄取率较低。

目前, 对不同粒径铜粒子的尺寸依赖毒性的研究还很少。已有研究显示, 小鼠口服纳米铜会引起多器官严重损伤, 而口服微粒铜则没有发现这些损伤。纳米铜在人工胃液中的溶解速率要显著快于微米铜, 这种溶解速率将直接影响微粒的口服毒性。

5. 结论

金属纳米粒子在治疗癌症方面的研究仍处于起步阶段, 因为许多因素在癌症的治疗成为临床应用的现实前仍有待优化。金属纳米技术可以发挥个性化医学与潜在的亲密作用增加对癌细胞的纳米粒子的亲和力, 增强和放大诊断和治疗的基吸收到病变细胞具有更高的效率。越来越多的研究是必要的, 它是我们了解生物学的影响一个独特的方法。由于纳米粒子的尺度在原子, 分子和超分子尺度(1~100 纳米)范围, 从根本上表现出纳米粒子小结构的属性。利用这些原则, 可以调整金属纳米粒子, 以加强其针对不同的癌症/病变细胞的亲和力和有效地促进了诊断和治疗方法的进步。

参考文献 (References)

- [1] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, et al. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1994, 7: 801-802.
- [2] S. Chen, R. W. Murray. Electrochemical quantized capacitance charging of surface ensembles of gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1999, 103: 9996-10000.
- [3] E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. Murphy and M. Wyatt. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 2005, 1: 325-327.
- [4] R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R. R. Bhonde and M. Sastry. Bio-compatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir*, 2005, 21: 10644-10654.
- [5] Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischer, F. Wen, U. Simon, et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 2007, 3: 1941-1949.
- [6] Y. S. Chen, Y. C. Hung, I. Liau and G. S. Huang. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 2009, 4: 858-864.
- [7] H. Johnston, G. Hutchison, S. Christensen Peters and S. Hankin. Stone A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 2010, 40: 328-346.
- [8] B. Chithrani, A. Ghazani and W. Chan. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters*, 2006, 6: 662-668.
- [9] Y. Pan, A. Leifert, D. Ruau, S. Neuss, J. Bornemann, G. Schmid, et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*, 2009, 5: 2067-2076.
- [10] J. Li, L. Zou, D. Hartono, C. Ong, B. Bay and L. Yung. Gold nanoparticles induce oxidative damage in lung fibroblasts in vitro. *Advanced Materials*, 2008, 20: 138-142.
- [11] G. Sonavane, K. Tomoda and K. Makino. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 66: 274-280.
- [12] W. Cho, S. Kim, B. Han, W. Son and J. Jeong. Comparison of gene expression profiles in mice liver following intravenous injection of 4 and 100nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology Letters*, 2009, 191: 96-102.
- [13] S. Kumar, N. Harrison, R. Richards-Kortum and K. Sokolov. Plasmonic nanosensors for imaging intracellular biomarkers in live cells. *Nano Letters*, 2007, 7: 1338-1343.
- [14] P. Zrazhevskiy, X. Gao. Multifunctional quantum dots for personalized medicine. *Nano Today*, 2009, 4: 414-428.
- [15] R. Sperling, P. Rivera Gil, F. Zhang, M. Zanella and W. Parak. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37: 1896-1908.
- [16] J. Roth. The silver anniversary of gold: 25 years of the colloidal gold marker system for immunocytochemistry and histochemistry. *Histochemistry and Cell Biology*, 1996, 106: 1-8.
- [17] S. Lee, H. Chon, M. Lee, J. Choo, S. Lee, et al. Surface enhanced raman scattering imaging of HER2 cancer markers overexpressed in single MCF7 cells using antibody conjugated hollow gold nanospheres. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24: 2260-2263.
- [18] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig and K. Kneipp. Novel optical nanosensors for probing and imaging live cells. *Nanomedicine*, 2010, 6: 214-226.
- [19] S. H. Lee, K. H. Bae, S. H. Kim, K. R. Lee and T. G. Park. Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 364: 94-101.
- [20] C. Kim, P. Ghosh and V. Rotello. Multimodal drug delivery using gold nanoparticles. *Nanoscale*, 2009, 1: 61-67.
- [21] B. Duncan, C. Kim and V. M. Rotello. Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 2010, 148: 122-127.
- [22] W. H. de Jong, P. J. A. Borm. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 2008, 3: 133-149.
- [23] J. Sakamoto, A. Annapragada, P. Decuzzi and M. Ferrari. Antibiological barrier nanovector technology for cancer applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2007, 4: 359-369.
- [24] G. Zhang, Z. Yang, W. Lu, R. Zhang, Q. Huang, M. Tian, et al. Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. *Biomaterials*, 2009, 30: 1928-1936.
- [25] X. H. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed and M. A. El-Sayed. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*, 2008, 23: 217-228.
- [26] C. Liu, B. Q. Li and C. C. Mi. Fast transient thermal analysis of gold nanoparticles in tissue-like medium. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 2009, 8: 271-280.
- [27] S. Link, M. A. El-Sayed. Shape and size dependence of radiative, nonradiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry*, 2000, 19: 409-453.
- [28] J. Hainfeld, D. Slatkin and H. Smilowitz. The use of gold nano-

- particles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine and Biology*, 2004, 49: N309-N315.
- [29] K. T. Buterworth, J. A. Coulter, S. Jain, J. Forker, S. J. McMahon, G. Schettino, et al. Evaluation of cytotoxicity and radiation enhancement using 1.9 nm gold particles: Potential application for cancer therapy. *Nanotechnology*, 2010, 21: 295101.
- [30] R. Mukhede Bhattacharya, L. Wang, S. Basu, J. A. Nagy, et al. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical Cancer Research*, 2005, 11: 3530-3534.
- [31] R. Bhattacharya, P. Mukhede. Biological properties of naked metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60: 1289-1306.
- [32] M. A. Hollinger. Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals. *Critical Reviews in Toxicology*, 1996, 26: 255-260.
- [33] M. E. Innes, N. Umraw and J. S. Fish. The use of silver coated dressings on donor site wounds: A prospective, controlled matched pair study. *Burns*, 2001, 27: 621-627.
- [34] K. M. V. Poon, A. Burd. In vitro cytotoxicity of silver: Implication for clinical wound care. *Burns*, 2004, 30: 140-147.
- [35] K. Soto, K. M. Garza and L. E. Murr. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomaterialia*, 2007, 3: 351-358.
- [36] K. F. Soto, A. Carrasco, T. G. Powell, et al. Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research*, 2005, 19: 975-983.
- [37] S. M. Hussain, K. L. Hess, J. M. Gearhart, et al. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol in Vitro*, 2005, 19: 975-983.
- [38] K. Kawata, M. Osawa and S. Okabe. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43: 6046-6051.
- [39] J. W. Allen, J. C. Liang, A. V. Carrano, et al. Review of literature on chemical-induced aneuploidy in mammalian male germ cells. *Mutation Research*, 1986, 167: 123-137.
- [40] J. L. Tilly. Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. *Toxicology Letters*, 1998, 103: 497-501.
- [41] P. J. Borm, W. Kreyling. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles-potential implications for drug delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2004, 4: 521-531.
- [42] Y. Chen, Z. Xue, D. Zheng, et al. Sodium chloride modified silica nanoparticles as a non-viral vector with a high efficiency of DNA transfer into cells. *Current Gene Therapy*, 2003, 3: 273-279.
- [43] E. Vlachou, E. Chipp, E. Shale, et al. The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: a study of systemic silver absorption. *Burns*, 2007, 33: 979-985.
- [44] S. H. Shin, K. YeM. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, 2007, 1813-1818.
- [45] H. J. Yen, S. H. Hsu and C. L. Tsai. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*, 2009, 5: 1553-1561.
- [46] S. Nie, S. R. Emoty. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science*, 1997, 275: 1102-1106.
- [47] D. J. Anderson, M. Moskovits. A SERS-active system based on silver nanoparticles tethered to a deposited silver film. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110: 13722-13727.
- [48] X. Li, X. Zhang, W. Xu, et al. Mercaptoacetic acid-capped silver nanoparticles colloid: Formation, morphology, and SERS activity. *Langmuir*, 2003, 19: 4285-4290.
- [49] D. Graham, K. Faulds and E. W. Smith. Biosensing using silver nanoparticles and surface enhanced resonance Raman scattering. *Chemical Communications*, 2006, 42: 4363-4371.
- [50] J. Hu, R. S. Sheng, Z. S. Xu, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of lysozyme. *Spectrochimica Acta*, 1995, 51: 1087-1096.
- [51] P. Miskovsky, D. Jancura, S. S. Cortes, et al. Antiretrovirally active drug hypericin binds the IIA subdomain of human serum albumin: Resonance Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy study. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120: 6374-6379.
- [52] P. Miskovsky, J. Hritz, S. S. Cortes, et al. Interaction of hypericin with serum albumins: Surface-enhanced Raman spectroscopy, resonance Raman spectroscopy and molecular modeling study. *Photochemistry and Photobiology*, 2001, 74: 172-183.
- [53] X. Dou, Y. M. Jung, Z. Q. Cao, et al. Surface-enhanced Raman scattering of biological molecules on metal colloid II: Effects of aggregation of gold colloid and comparison of effects of pH of glycine solutions between gold and silver colloids. *Journal of Applied Spectroscopy*, 1999, 53: 1440-1447.
- [54] T. Vo-Dinh, D. L. Stokes, G. D. Griffin, et al. Surface-enhanced Raman scattering (SETS) method and instrumentation for genomics and biomedical analysis. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1999, 30: 785-793.
- [55] Y. M. C. Cao, R. C. Jin and C. A. Mirkin. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, 2002, 297: 1592-1598.
- [56] V. J. Pugh, H. Szmecinski, W. E. Moore, et al. Submicrometer spatial resolution of metal-enhanced fluorescence. *Applied Spectroscopy*, 2003, 57: 1592-1598.
- [57] G. Liu, X. Li, B. Qin, et al. Investigation of the mending effect and mechanism of copper nano-particles on a tribologically stressed surface. *Tribology Letters*, 2004, 17: 961-966.
- [58] K. Guo, Q. Pan, L. Wang, et al. Nano-scale copper-coated graphite as anode material for lithium-ion batteries. *Journal of Applied Spectroscopy*, 20002, 32: 679-685.
- [59] N. Cioffi, N. Ditaranto, L. Torsi, et al. Analytical characterization of bioactive fluoropolymer ultra-thin coatings modified by copper nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 381: 607-616.
- [60] B. Jese, R. L. Mary. Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2004, 15: 316-322.
- [61] P. Z. Bjorn, H. D. Hermann, L. Max, et al. Epidemiological investigation on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply. *Science of the Total Environment*, 2003, 302: 127-144.
- [62] C. M. Galhardi, Y. S. Diniz, L. A. Faine, et al. Toxicity of copper intake: Lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42: 2053-2060.
- [63] 雷荣辉. 纳米铜肝肾毒性及其机制研究. 北京: 军事医学科学院毒物药物研究所博士论文, 2008.
- [64] S. Lynch, B. Frei. Reduction of copper, but not iron, by human low density lipoprotein (LDL). *ASBMB*, 1995, 270(10): 5158-5163.
- [65] J. Teeguarden, P. Hinderliter, G. Orr. Pharmacokinetics in vitro: Dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences*, 2007, 95(2): 300-312.
- [66] N. Zamzami, P. Marchetti and M. Castedo. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Letters*, 1996, 384(1): 53-57.
- [67] S. Woo, I. Park and M. Park. Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in HeLa cells. *International Journal of Oncology*, 2002, 21(1): 57-63.
- [68] K. Midander, P. Cronholm, H. L. Karlsson, et al. Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper (II) oxide particles: A cross-disciplinary study. *Small*, 2009, 5(3): 389-399.
- [69] A. Bonelli, J. Ponti, M. Farina, et al. Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes in vitro. *Mutagenesis*, 2008, 23(5): 377-382.
- [70] L. K. Limbach, Y. Li, R. N. Grass, et al. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and surface chemistry. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116: 1053-1060.

- meration, and diffusion at low cocetrations. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39: 9370-9376.
- [71] Z. Chen, H. Meng, G. Xing, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology Letters*, 2006, 163: 109-120.