

纳米金的生殖毒理研究进展和展望

孙 斐, 李文清

(中国科学技术大学生命科学学院, 安徽合肥 230027)

摘要: 纳米金具有易合成、易被修饰、光热转换、能包载药物和良好的生物相容性等特性, 被广泛地研究和应用。同时, 纳米金是不能被生物体降解的物质, 从而引起了研究者对纳米金毒性的研究。本文从纳米金对生殖细胞、雌雄生殖系统和后代的毒理方面, 讨论了纳米金生殖毒理研究的进展和展望。

关键词: 纳米金; 生殖毒理; 血睾屏障; 血胎盘屏障

中图分类号: P35 **文献标识码:** A doi:10.3969/j.issn.0253-2778.2013.11.008

引用格式: Sun Fei, Li Wenqing. Research progresses and prospects on reproductive toxicity of gold nanoparticles [J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2013, 43(11):929-932.

孙斐, 李文清. 纳米金的生殖毒理研究进展和展望[J]. 中国科学技术大学学报, 2013, 43(11): 929-932.

特
约
评
述

Research progresses and prospects on reproductive toxicity of gold nanoparticles

SUN Fei, LI Wenqing

(School of life sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

Abstract: Gold nanoparticles have triggered an emerging interest for research and application because of their outstanding characteristics such as easy-synthesis, easy-modification, photothermal transferring and good biocompatibility. Meanwhile, gold nanoparticles are non-degradable by organisms, which causes many researchers investigating the toxicity of gold nanoparticles. This paper focused on the reproductive toxicity of gold nanoparticles on germ cells, female and male, and posterity. The progresses and prospects of research on reproductive toxicity of gold nanoparticles were reviewed.

Key words: gold nanoparticles; reproductive toxicity; blood-testis barrier; blood-placental barrier

0 引言

纳米金是一类重要的研究和应用型纳米材料,

具有易合成、易被修饰、光热转换、能包载药物和良好的生物相容性等特性, 被用于诊断性影像学、药物载体和肿瘤光热治疗等^[1-3]。随着纳米金的广泛应

收稿日期:2013-08-21;修回日期:2013-09-22

基金项目:国家重大科学研究计划(2009CB941700)资助。

作者简介: 孙斐(通讯作者),男,医学博士/教授,国家杰出青年科学基金获得者,中国科学院“百人计划”入选者。2000年获复旦大学医学博士学位。2000~2006年在以色列 Weizmann Institute of Science 和加拿大 University of Calgary 从事博士后研究。现为国家重大科学研究计划“环境和遗传因素导致男性不育与出生缺陷的分子机制”项目首席科学家, Mol Hum Reprod 期刊编委,中国动物学会生殖生物学分会理事,中国中西医结合妇产科专业委员会常委。共发表 Am J Hum Genet, Hum Mol Genet, Nano Lett, Small 等系列 SCI 论文 25 篇,其中 8 篇第一作者或通讯作者论文分别被选作封面论文。
E-mail: feisun@ustc.edu.cn



用,其暴露于人体的可能性大大增加,此外,其他不同类型的纳米材料也可能对人体健康造成潜在威胁^[4-5]。目前,纳米金的细胞毒性和纳米金的动物体毒性研究已经有很多报道^[6-8]。近来有文章报道关于纳米二氧化钛(TiO_2)和碳纳米管的生殖毒性。孕鼠暴露于 TiO_2 将会导致子代的睾丸的生精异常和子代幼鼠的脑基因表达异常^[9]。对雄鼠反复尾静脉注射水溶性的多壁碳纳米管,导致睾丸的可逆性损伤,但不会影响雄鼠的生育能力^[10]。纳米金是不能被生物体降解的物质,因此研究纳米金的生殖毒性也十分重要,这将为以后研究纳米金在生殖系统中的应用提供依据和前提。本文专注于讨论纳米金生殖毒性研究的进展和展望。

1 体外——生殖细胞水平研究

纳米材料可能会引起体细胞的炎症甚至是恶性转化^[11]。然而,较多的纳米金对体细胞的毒性研究结果表明,纳米金是生物相容性高的纳米材料,提示无毒性或低的细胞毒性^[11]。到目前为止,关于纳米金对生殖细胞(配子)影响的研究仅有两篇报道,主要是关于纳米金对雄性生殖细胞(精子)影响方面的研究。Wiwanitkit 等^[12]报道了化学衍生的纳米金粒子暴露下,精子的运动活力降低。Taylor 等^[13]报道了当暴露于激光作用下的配基修饰的自由纳米金粒子时,精子的运动活力降低。在这两个报道中,都提示纳米金可以降低精子的运动活力,但纳米金不引起异常精子数目增加,也不会损伤精子膜。一般认为是纳米金自身没有这方面毒性,主要是表面修饰化学物的毒性。同时,Taylor 等^[11]的研究结果表明,没有修饰的纳米金能影响精子的受精能力。

关于纳米金对雌性生殖方面影响的研究也很少。Stelzer 等^[14]报道了纳米金和卵巢颗粒细胞共孵育 24 h,纳米金破坏细胞内的线粒体,还有类固醇生成。纳米金能促进卵巢颗粒细胞雌激素的分泌^[14]。到目前为止,还没有纳米金对卵母细胞毒性的相关研究报道。

2 体内——动物模型个体水平研究

2.1 纳米金对雄性生殖系统的影响

雄性生殖系统主要由下丘脑-垂体-睾丸(睾丸、附睾、生殖腺)组成。其中的下丘脑、垂体和生殖腺是分泌激素和生殖腺的器官,能够调节精子生成过程和精子活动过程。睾丸是精子发生的器官,由各级生

精细胞组成,产生精子。在生精小管和血管之间形成了一层结构紧密的血睾屏障。这个血睾屏障是由血管内皮细胞、基膜和支持细胞间的紧密连接构成。血睾屏障能保护生精细胞不受外界物质的影响,维持精子发生在一个相对稳定的场所进行。所以研究纳米金对雄性生殖系统(睾丸)影响的第一个关键问题就是纳米金是否能通过血睾屏障?

理论来说,纳米材料是不能通过血睾屏障的,然而实际研究则表明很多纳米材料可以通过血睾屏障^[15]。大量的研究表明,纳米金在生物体的分布具有时间和尺寸的依赖性。Balasubramanian 等^[16]通过尾静脉注射纳米金到大鼠体内,发现纳米金在注射后 1 和 2 个月时,睾丸内纳米金含量增加。这个结果显示纳米金进入睾丸具有时间依赖的特性。De Jong 等^[7]通过尾静脉注射 10, 50, 100 或 250 nm 的纳米金颗粒到大鼠体内,发现 10, 250 nm 的纳米金颗粒在注射 1 d 后,大鼠的睾丸中有纳米金,然而,50, 100 nm 的纳米金颗粒没有在睾丸中检测到,证明了纳米金进入睾丸具有尺寸依赖的特性。以上两个实验结果提示纳米金能通过血睾屏障,然而缺少直接的证据来说明这个结果。我们合成了两种不同化合物修饰的纳米金(氨基化聚乙二醇修饰和甲氧基聚乙二醇修饰纳米金),通过尾静脉注射纳米金到成年雄性小鼠,运用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)结果定量地证明了纳米金能够在雄性小鼠睾丸中富集,且氨基化聚乙二醇(NH_2 -PEG)修饰的纳米金在小鼠睾丸中的富集量是甲氧基聚乙二醇(CH_3O -PEG)修饰纳米金的两倍以上,说明纳米金进入睾丸具有表面修饰基团依赖的特性^[17]。我们进一步通过暗场显微镜观察到小鼠的曲细精管的管腔中存在纳米金,说明纳米金可以通过血睾屏障,以及通过透射电子显微镜拍摄到了生精细胞中有纳米金,证明了纳米金能通过血睾屏障并进入生精细胞。这些实验结果都直接地证明了纳米金能通过血睾屏障^[17]。同时,我们通过连续 3 次重复注射这两种不同化合物修饰的纳米金,检查了血睾屏障相关蛋白含量的变化,发现纳米金通过血睾屏障是依赖于血睾屏障的动态开关,而非直接破坏血睾屏障。这个理论模型与银纳米颗粒通过血睾屏障的门控开关模型假设相符合^[15,17]。

纳米金在体外对生精细胞的毒性研究表明,纳米金对精子运动活力有明显影响。我们报道了通过连续 3 次重复注射纳米金到小鼠体内,氨基化聚乙

二醇(NH_2 -PEG)修饰的纳米金能够增加睾酮的分泌,但不影响小鼠的生育能力,甲氧基聚乙二醇(CH_3O -PEG)修饰的纳米金不影响睾酮的分泌,也不影响小鼠的生育能力^[17].实验结果也提示纳米金自身没有明显毒性,可能主要是表面修饰化学物的毒性带来的毒性效应.同时,实验结果表明纳米金没有明显的生殖毒性.这与体外水平纳米金和精子共孵育时,纳米金能使精子的运动活力降低的报道看起来有些冲突.其实产生这个结果的原因可能是纳米金通过血睾屏障的能力不强,仅有 0.2%(注射纳米金量)的纳米金能分布在睾丸中^[7,16].所以在体内,精子接触到的纳米金就很少了,并不足以影响精子的运动活力或受精能力.

2.2 纳米金对雌性生殖系统的影响

关于纳米金对雌性生殖系统毒性的研究,主要集中在纳米金对雌性孕鼠影响的研究.研究的重点是纳米金是否能通过血胎盘屏障进入子代,以及纳米金是否影响母体的健康两个方面. Challier 等^[18-19]通过髂动脉注射 ^{198}Au 胶体金颗粒(4~200 nm)到 SD 孕鼠,发现在注射 15 min 后,超过 90%的纳米金储存在母体的肝脏中,在羊水、胎膜和胎儿中没有检测到放射性纳米金.这个结果提示纳米金不能通过血胎盘屏障^[18-19].使用表面负电荷的单分散球形的 2 或 40 nm 的胶体金颗粒,对 C57BL/6 孕鼠尾静脉注射 24 h 后杀鼠,在胎儿和胎盘中都没有检测到纳米金,提示纳米金不能通过血胎盘屏障^[19].通过尾静脉注射直径为 5 和 30 nm ^{198}Au 胶体金颗粒到 Wister 孕鼠, Takahashi 等^[20]发现胎儿的放射性显示,在注射后 1 h 和 24 h, 5 nm 的纳米金能在胎儿中检测到,在注射后 24 h, 30 nm 的纳米金能在胎儿中检测到.通过血胎盘屏障的效率很低,如 5 nm 和 30 nm 的通过率仅为 0.018% 和 0.005%.这些实验结果表明纳米金可以通过血胎盘屏障系统. Yang 等^[21-22]通过尾静脉注射铁蛋白、聚乙二醇、柠檬酸修饰的 13 nm 纳米金到妊娠 5.5 d 和 15.5 d 的孕鼠.注射 5 h 后,用电感耦合等离子体质谱仪检测到了胎盘、脐带、羊膜与子宫壁这些胚外组织都有纳米金.纳米金在肝脏、脾脏和肾脏中的积累在不同修饰的纳米金和不同妊娠时间上没有显著的不同.妊娠 11.5 d 之前,各种纳米金都能在胎儿组织中含量较高,妊娠 11.5 d 之后,纳米金在胎儿组织中含量会下降.这些结果提示在孕鼠中暴露纳米金会影响胚胎/胎盘的成熟.

以上的实验结果无论证明了纳米金能或不能通过血胎盘屏障,都研究了纳米金对孕鼠的影响,发现纳米金没有产生很明显的生殖毒性,或认为就没有毒性.

2.3 纳米金对后代的影响

越来越多的实验结果证明了纳米金能通过血胎盘屏障,研究纳米金对生物体生殖毒性影响最终的落脚点是其对后代的影响,因此,研究纳米金对后代的毒性影响就日显重要和迫切.通过尾静脉注射直径为 5 和 30 nm 的 ^{198}Au 胶体金颗粒到孕鼠, Takahashi 等^[20]发现胎儿的放射性,提示纳米金可以通过血胎盘屏障系统.他们的研究表明纳米金没有对后代产生影响. Yang 等通过尾静脉注射铁蛋白、聚乙二醇、柠檬酸修饰的 13 nm 的纳米金,发现胚外组织都有纳米金的富集^[21-22].同时,也没有观察到纳米金对后代产生毒性影响.以上的实验结果都提示纳米金的毒性较小或无毒性.然而,这些是不是能说明纳米金对后代就不会有毒性呢?或许是纳米金通过血胎盘屏障的效率不高,纳米金的累积暴露剂量和累积暴露时间还没到毒性效应剂量.所以,对纳米金在怀孕母亲或幼儿上的运用,还是要相当谨慎才行.

3 研究展望

随着纳米材料的良好发展和广泛应用前景,纳米材料的毒性研究被提上日程,每年开展的国际纳米毒理学和纳米应用学会议,引起了越来越多研究者的关注.其中,纳米材料生殖毒理是一个关乎人类的遗传、发育、后代健康的学科,是一个多学科交叉发展的领域.因此,关于纳米材料生殖毒理的研究,近年来发展尤为迅猛.本文仅对生物相溶性高、稳定性好、应用广泛的纳米金的体内-体外生殖毒理研究进展进行概括,抛砖引玉.关于其他纳米材料的生殖毒理的研究也十分重要.这是众多基础研究领域科学家面临的重大挑战,这也是多领域科学家交叉合作的良好契机.然而,研究纳米生殖毒理的意义就是尽可能减小毒理效应,最终将纳米材料最终应用到对人类有意义的事情上来.我们发现一种高效、安全、可控、廉价的雄性避孕方法^[23].在实验中利用金纳米棒的光热效应,在近红外光的照射下,可有效地将光能转化为热能,杀死睾丸中生精细胞进行雄性避孕.这些关于生殖毒性研究不仅可以推动纳米材料在生殖应用学科的发展,而且也能够促进多学科

的进步.

致谢 衷心感谢中国科学技术大学生命科学学院纳米药物与生物材料实验室王均教授与我们的长期合作.

参考文献(References)

- [1] Ghosh P, Han G, De M, et al. Gold nanoparticles in delivery applications [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60: 1 307-1 315.
- [2] Prabakaran M, Grailer J J, Pilla S, et al. Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumor-targeted drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 6 065-6 075.
- [3] Wilson R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection [J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37: 2 028-2 045.
- [4] Donaldson K, Stone V, Clouter A, et al. Ultrafine particles [J]. *Occupational and Environmental Medicine*, 2001, 58: 211-216.
- [5] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113: 823-839.
- [6] Stearns R C, Paulauskis J D, Godleski J J. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells [J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2001, 24: 108-115.
- [7] De Jong W H, Hagens W I, Krystek P, et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration [J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 1 912-1 919.
- [8] Cho W S, Cho M, Jeong J, et al. Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, 245: 116-123.
- [9] Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice [J]. *Nature Nanotechnology*, 2011, 6: 321-328.
- [10] Bai Y, Zhang Y, Zhang J, et al. Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility [J]. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5: 683-689.
- [11] Taylor U, Barchanski A, Garrels W, et al. Toxicity of gold nanoparticles on somatic and reproductive cells [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012, 733: 125-133.
- [12] Wiwanitkit V, Sereemasapun A, Rojanathanes R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: The first world report [J]. *Fertility and Sterility*, 2009, 91: e7-e8.
- [13] Taylor U, Petersen S, Barchanski A, et al. Influence of gold nanoparticles on vitality parameters of bovine spermatozoa [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2010, 45: 60.
- [14] Stelzer R, Hutz R J. Gold nanoparticles enter rat ovarian granulosa cells and subcellular organelles, and alter in-vitro estrogen accumulation [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2009, 55: 685-690.
- [15] Lan Z, Yang W X. Nanoparticles and spermatogenesis: How do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier [J]. *Nanomedicine*, 2012, 7(4): 579-596.
- [16] Balasubramanian S K, Jittiwat J, Manikandan J, et al. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 2 034-2 042.
- [17] Li W Q, Wang F, Liu Z M, et al. Gold nanoparticles elevate plasma testosterone levels in male mice without affecting fertility [J]. *Small*, 2013, 9: 1 708-1 714.
- [18] Challier J C, Panigel M, Meyer E. Uptake of colloidal ¹⁹⁸Au by fetal liver in rat, after direct intrafetal administration [J]. *International Journal of Nuclear Medicine and Biology*, 1973, 1(2): 103-106.
- [19] Ema M, Kobayashi N, Naya M, et al. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials [J]. *Reproductive Toxicology*, 2010, 30: 343-352.
- [20] Takahashi S, Matsuoka O. Cross placental transfer of ¹⁹⁸Au-colloid in near term rats [J]. *Journal of Radiation Research*, 1981, 22: 242-249.
- [21] Lu X, Liu Y, Kong X, et al. Nanotoxicity: A growing need for study in the endocrine system [J]. *Small*, 2013, 9: 1 654-1 671.
- [22] Yang H, Sun C, Fan Z, et al. Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy [J]. *Scientific Reports*, 2012, 2: 847-854.
- [23] Li W Q, Sun C Y, Wang F, et al. Achieving a new controllable male contraception by the photothermal effect of gold nanorods [J]. *Nano Letters*, 2013, 13: 2 477-2 484.