

文章编号: 1000-5641(2010)02-0102-09

纳米银对体外培养细胞附着形态 及膜功能的影响

余文娟, 王向晖, 史芹, 黄蕊

(华东师范大学 物理系, 上海 200062)

摘要: 通过研究纳米银的急性细胞毒性及其对体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和人脐动脉平滑肌细胞(HUASMC)附着形态、膜流动性和膜完整性的影响, 初步探讨了纳米银的生物安全性. 实验结果表明: 浓度为 0.003 9~0.5 mg/mL 的纳米银没有急性细胞毒性, 但会影响细胞的附着形态, 使细胞变小变圆, 附着性变差; 纳米银聚集沉积在细胞膜周围, 影响细胞膜的流动性和细胞膜的完整性, 从而产生一定的细胞毒性.

关键词: 纳米银; 生物安全性; 细胞毒性

中图分类号: R318 **文献标识码:** A

In vitro study of the effect of silver nanoparticles on the adhesion and membrane function of cells

YU Wen-juan, WANG Xiang-hui, SHI Qin, HUANG Rui

(Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: In this paper, the acute cytotoxicity of silver nanoparticles, as well as their influence on the adhesion state and membrane functions of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) and Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells (HUASMC) were studied in vitro, for the sake of clinic using security. The results are as follows. Silver nanoparticles whose concentration ranged from 0.003 9 mg/mL to 0.5 mg/mL did not show acute cytotoxicity within 8 hours, but the effects on the adhesion state of both cell lines were observed. The shape of the cells abnormally became small and round, which indicated that they were not well adhered on the culture plate. At the mean time, silver nanoparticles were found aggregating on the cell membrane, and the membrane fluidity and integrity of the cells were alternated, which implied that Ag nanoparticles had cytotoxicity in a certain degree.

Key words: silver nanoparticles; biological safety; cytotoxicity

0 引 言

纳米银因具有优异的抗菌活性, 被越来越多地作为抗菌材料用于医用产品^[1]. 近年来,

收稿日期: 2009-04

第一作者: 余文娟, 女, 硕士研究生, 研究方向为生物材料. E-mail: yuwenjuan1008@126.com.

通讯作者: 王向晖, 女, 副教授, 研究方向为生物材料. E-mail: xhwang@phy.ecnu.edu.cn.

纳米银在医学领域的应用已经成为研究的热点,新型的纳米银抗菌纤维、纳米银敷料、纳米银凝胶、纳米银骨水泥、纳米银烧烫伤贴、纳米银妇科产品及计生用品等不断被开发出来^[1-3]. 与此同时,对它的生物安全性也逐渐引起人们的关注. 现有实验结果表明,纳米银及其相关医疗产品属于无毒物质^[4-6]. 但医学生物领域中,纳米银材料常常直接与人体的血液系统接触. 如纳米银凝胶直接用于烧伤创面,与创面的血液、体液直接接触;含纳米银的骨水泥或涂层纳米银的关节假体都可直接植入人体内与血液系统或淋巴系统直接相连^[7]. 这些产品中载带的纳米银很有可能通过血管内皮细胞和血管平滑肌细胞进入人体血液循环系统,进而在人体内深部蓄积,产生一系列不良的生物学效应^[3,8]. 因此,研究纳米银与人血管内皮细胞以及平滑肌细胞的相互作用,探讨纳米银对人体内皮细胞和平滑肌细胞的细胞毒性及其机制,从而进一步确认纳米银对人体的使用安全性具有重要的意义.

在纳米银的毒性研究实验报道中,大多利用相关细胞增殖情况予以评价,如果细胞的增殖受到影响则认为具有一定的细胞毒性,而对于细胞毒性的具体表现和毒性机理讨论较少. 仅有 Carlson 等人^[9]指出,大小为 15 nm 的纳米银粒子会使巨噬细胞的活性氧(ROS)水平增高,谷胱甘肽(GSH)水平降低;表明细胞遭受到氧胁迫,最终导致细胞死亡. 在本文的前期增殖实验也发现,纳米银对体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和人脐动脉平滑肌细胞(HUASMC)的增殖都有抑制作用. 且两种细胞对纳米银的增殖响应规律不同:较高浓度(0.125~0.25 mg/mL)的纳米银对 HUVEC 增殖的抑制大于 HUASMC,而较低浓度(0.062 5 mg/mL)的纳米银正好相反. 这说明纳米银具有一定的细胞毒性,且对不同细胞的作用有可能不完全相同,需要作进一步的分析与研究. 因此,为了进一步探讨纳米银影响细胞增殖的机制,本文从急性细胞毒性、细胞附着形态和膜功能几个方面研究了不同浓度的纳米银对体外培养的血管内皮细胞和血管平滑肌细胞的毒性影响,以进一步为纳米银的毒性机制提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

纳米银溶液(上海沪正纳米科技有限公司,TEM 测得粒径范围为:15~25 nm,平均粒径约为 20 nm);人脐静脉内皮细胞(HUVEC,上海午立生物技术有限公司);F-12K 培养基(NUTRIENT MIXTURE F-12 HAM KAIGHN' S, Sigma);人脐动脉平滑肌细胞(HUA-SMC, science11);SMCM 培养基(cat. no. 1101,上海麦莎生物有限公司);胎牛血清(FBS,杭州四季青);1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH, Sigma),NADH(Sigma);丙酮酸钠(Amresco).

1.2 实验仪器

D/max 2550 型 X 射线衍射仪(XRD), 318 MC 型多功能酶标仪,日立 JEM-2100 透射电子显微镜,日立 F-4500 荧光分光光度计,奥林巴斯 IX-70 荧光显微镜.

1.3 细胞培养

HUVEC 培养于含 10% FBS 的 F-12K 培养液中, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱内常规传代培养. 取生长状态良好的细胞进行实验.

HUASMC 培养于含 2% FBS, 1% 双抗, 1% 生长因子的 SMC 培养液中, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱内常规传代培养. 取生长状态良好细胞进行实验.

1.4 纳米银的急性细胞毒性

采用 LDH 方法测量纳米银的细胞毒性^[10]. 实验中 LDH 反应液的配制参照文献进行^[11], HUVEC 和 HUASMC (1×10^6 个/cm²) 均匀接种 5 h 后, 加入不同浓度的纳米银 (0.003 9~0.5 mg/mL) 作用 2 min, 2 h, 4 h, 6 h 和 8 h 后, 吸取一定量的培养液与 LDH 反应液反应, 多功能酶标仪动态检测 340 nm 处吸光度值变化, 按文献报道的方法计算 LDH 活性^[11]. 以不加纳米银的正常细胞为对照组.

1.5 纳米银对细胞附着形态的影响

上述两种细胞 1×10^6 个/cm² 均匀接种于常规培养 5 h 待细胞正常后换新鲜的含有不同浓度 (0.5~0.015 625 mg/mL) 纳米银的培养液中, 继续培养 4 h, 用荧光显微镜观察与银作用前后细胞形态的变化, 并拍照记录. 对照组为不加纳米银的正常细胞组.

1.6 纳米银对细胞膜的影响

以 DPH (1,6-二苯基-1,3,5-己三烯) 为荧光探针, 采用荧光偏振法检测纳米银对细胞膜流动性的影响^[12]. 纳米银作用于细胞后, 用 0.25% 的胰酶消化细胞, 1 500 r/m 离心 5 min 收集细胞, 用 4 mL pH 7.0 的 PBS 缓冲液洗涤, 离心, 弃上清, 加入 3 mL DPH 使用液 (DPH 先用四氢呋喃配成 2×10^{-3} mol/L 母液, 避光 4 °C 保存, 使用时用 PBS 稀释成 2×10^{-6} mol/L), 置于 37 °C 培养箱中温浴 30 min, 重复离心分离操作, 将收集到的细胞悬浮在 3 mL PBS 溶液中, 用荧光分光光度计测定已用 DPH 标记的细胞的荧光强度, 计算荧光偏振和细胞膜的流动性^[13]. 荧光分光光度计的主要参数设置如下, 激发光 362 nm, 发射光 432 nm, 狭缝 5.0 nm.

用透射电镜观察纳米银对细胞膜完整性的影响. 细胞与纳米银作用后, 消化离心收集细胞, 经 2.5% 的戊二醛固定, Spurr 树脂包埋, 超薄切片机切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 然后 JEM-2100 透射电镜观察和拍照.

2 实验结果与讨论

2.1 纳米银的急性细胞毒性实验结果

LDH (乳酸脱氢酶) 是一种稳定的蛋白质, 存在于正常细胞的胞质中, 一旦细胞膜受损或细胞死亡, LDH 即被释放到细胞外, 通过检测细胞培养上清液中 LDH 的活性, 可以计算出细胞的死亡率. 生物材料常用此法判定材料的急性细胞毒性. 表 1 和表 2 分别为一定浓度的纳米银与内皮细胞和平滑肌细胞作用一定时间后, 培养基中 LDH 活性值的测量结果, 对照组均为不加纳米银的正常细胞组. 与对照组相比, 加入不同浓度纳米银的内皮细胞实验组和平滑肌细胞实验组在各个时间点测得的 LDH 活度值均没有显著差异 (内皮细胞实验组 P 值分别为 0.752, 0.784, 0.724, 0.742, 0.867 和 0.961; 平滑肌细胞实验组 P 值分别为 0.774, 0.988, 0.855, 0.920 和 0.779). 这表明在 8 h 以内所有实验浓度下的纳米银都不会导致内皮细胞和平滑肌细胞急性毒性死亡, 实验浓度范围内纳米银不具有急性细胞毒性.

2.2 纳米银对细胞附着形态的影响结果

图 1 是奥林巴斯 IX-70 倒置荧光显微镜放大 100 倍观察的细胞形态. 与纳米银作用前, 所有内皮细胞与平滑肌细胞的附着形态均与图 1a 和 A 所示的正常细胞形态相同. 加入不

同浓度的纳米银后,两种细胞的附着形态都不同程度的变化,总的趋势是随着纳米银浓度的增加,细胞的形态变差,细胞分别由正常的梭形和纺锤形向圆形变化,细胞的附着面积也趋向于减小,表明细胞未能正常铺展。

表 1 纳米银与内皮细胞作用后的 LDH 活性测量结果($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 LDH activities results of HUVEC cultured in Ag nanoparticles contained medium($n=5, \bar{x} \pm s$)

sample name	LDH activities/(mU · mL ⁻¹)				
	2 min	2 h	4 h	6 h	8 h
Ag(0.5 mg/mL)	0.020 ± 0.002	0.007 ± 0.000	0.020 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.010 ± 0.001
Ag(0.25 mg/mL)	0.022 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.010 ± 0.001
Ag(0.125 mg/mL)	0.023 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.011 ± 0.001
Ag(0.062 5 mg/mL)	0.022 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.019 ± 0.001	0.014 ± 0.002	0.010 ± 0.002
Ag(0.031 25 mg/mL)	0.021 ± 0.006	0.008 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.010 ± 0.001
Ag(0.015 6 mg/mL)	0.021 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.011 ± 0.001
Control	0.021 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.011 ± 0.001

表 2 纳米银与平滑肌细胞作用后的 LDH 活性测量结果($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 LDH activities results of HUASMC cultured in Ag nanoparticles contained medium ($n=5, \bar{x} \pm s$)

sample name	LDH activities/(mU · mL ⁻¹)				
	2 min	2 h	4 h	6 h	8 h
Ag(0.25 mg/mL)	0.013 ± 0.001	0.022 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.015 ± 0.002	0.012 ± 0.001
Ag(0.062 5 mg/mL)	0.015 ± 0.000	0.021 ± 0.001	0.009 ± 0.000	0.013 ± 0.001	0.013 ± 0.001
Ag(0.015 6 mg/mL)	0.014 ± 0.002	0.023 ± 0.002	0.010 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.013 ± 0.000
Ag(0.007 8 mg/mL)	0.015 ± 0.003	0.022 ± 0.000	0.009 ± 0.000	0.014 ± 0.000	0.014 ± 0.002
Ag(0.003 9 mg/mL)	0.014 ± 0.001	0.023 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.013 ± 0.001
Control	0.015 ± 0.001	0.022 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.013 ± 0.001

其中,在低浓度条件下(见图 1 中 b-d 和 B-D),纳米银首先在细胞表面团聚和吸附,随着浓度增加,纳米银开始在细胞间团聚,且随着浓度的增加,团聚变得越来越严重.总的看来,在同浓度条件下,平滑肌细胞实验组中纳米银的团聚现象比内皮细胞实验组严重.在高浓度条件下(见图 1 中 e-f 和 E-F,黑色部分为团聚的纳米银),两种细胞中纳米银的团聚都非常严重,细胞表面几乎全部被纳米银覆盖,以致于无法获得细胞形态信息.两种细胞培养环境中纳米银的团聚程度不一样,这可能与两种细胞所使用的培养基成分有关,HUVEC 体外培养所使用的 F12K 培养基中含有 10% 的 FBS,而 HUASMC 体外培养所使用的 SMCM 培养基中只含有 2% 的 FBS,血清能溶解纳米银,包覆在纳米银颗粒表面,对纳米银颗粒的分散起着保护作用^[14],由于 HUVEC 中含有较多 FBS,其对纳米银的分散保护作用也较强,因此 HUVEC 培养基中纳米银的团聚比 HUASMC 中严重.纳米银团聚和吸附在细胞周围,会影响细胞的正常附着形态,这可能是在可见细胞的纳米银浓度条件下,平滑肌细胞附着形态差于内皮细胞,导致低浓度下平滑肌细胞增殖受到的影响比内皮细胞大的原因之一。

细胞表面黏附分子和细胞骨架是影响血管细胞附着、变形和游走的分子基础,在此基础上血管细胞才能维持正常的形态,并发挥迁移、增殖等功能^[15,16].肌动蛋白是细胞骨架的主要组成成分,参与细胞形态维持、细胞间紧密连接,且与细胞外基质附着有关.加入纳米银后,细胞附着形态改变的原因可能是因为纳米银吸附和沉积在细胞膜周围,影响了细胞表面

粘附分子的表达,也可能是因为纳米银影响了肌动蛋白的装配,使细胞膜附近的肌动蛋白纤维解聚成肌动蛋白单体,这两各方面都有会导致细胞原黏附机制丧失,细胞骨架重组,细胞形态发生改变,最最终导致细胞附着性能改变,进而影响细胞的后续增殖.

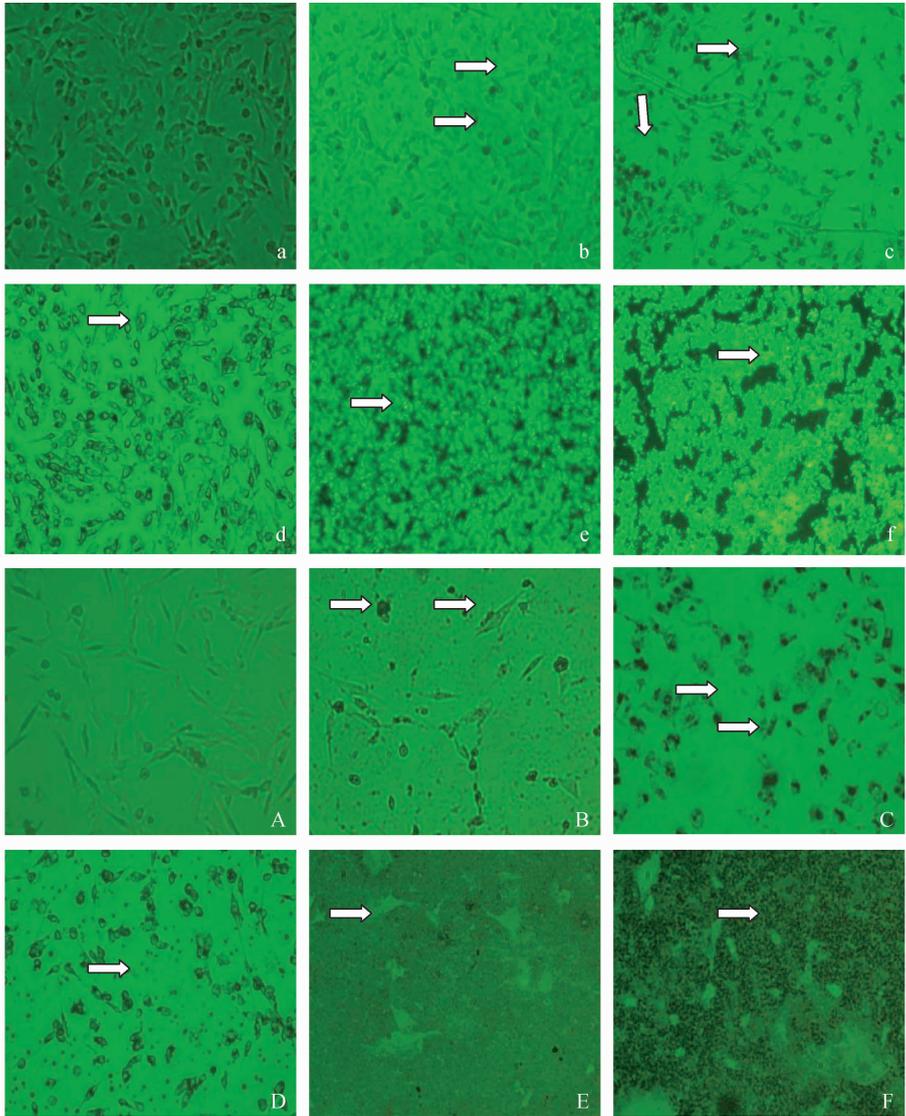


图1 内皮细胞、平滑肌细胞与不同浓度纳米银接触培养后的细胞形态照片($\times 100$)

Fig. 1 Images of HUVEC and HUASMC after exposed to silver nanoparticles contained medium for 4 h ($\times 100$)

注:a,b,c,d,e,f表示加0.0,0.015 625,0.031 25,0.062 5,0.125, 0.25 mg/mL 纳米银 4 h后的内皮细胞组;
A,B,C,D,E,F表示加0.0,0.015 625,0.031 25,0.062 5,0.125, 0.25 mg/mL 纳米银 4 h后的平滑肌细胞组;
“ \Rightarrow ”指向吸附和集聚在细胞周围的纳米银颗粒

2.3 纳米银对细胞膜流动性的影响结果

图2为不同浓度的纳米银与内皮细胞、平滑肌细胞作用4 h之后,两种细胞膜流动性的计算结果,每组数据测量10次取平均值进行计算,共重复3次实验.由图中可以看出:随着

培养基中纳米银剂量的增加,细胞的膜流动性呈非线性变化,但总体呈下降趋势.纳米 Ag 浓度较低时,与对照组相比,平滑肌细胞膜流动性下降更明显,这与低浓度时观察到平滑肌细胞附着形态更差一致;纳米 Ag 浓度较高时,内皮细胞的膜流动性下降更明显.由图 2 可以看到:当培养基中纳米银浓度为 0.25 mg/mL 时,内皮细胞的膜流动性降为最低,平滑肌细胞的膜流动性反而较高.当培养基中纳米银浓度为 0.062 5 mg/mL 时,平滑肌细胞的膜流动性降低较内皮细胞更为明显,这与我们前期增殖实验中不同浓度的纳米银对两种细胞的不同增殖响应是一致的,说明细胞膜流动性的下降可能是导致纳米银产生细胞毒性使细胞的增殖受到抑制的原因之一.

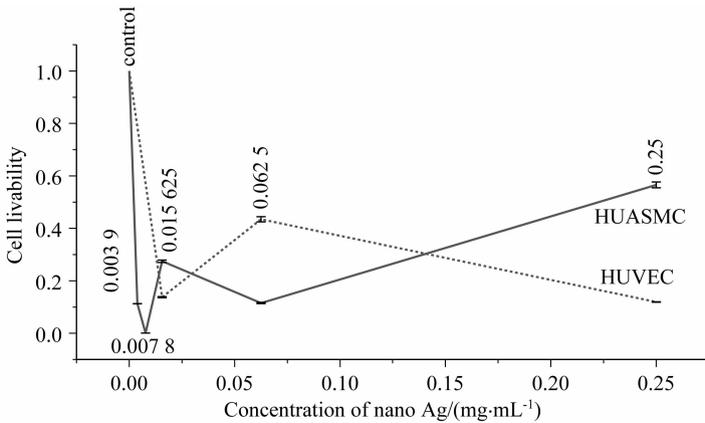


图 2 纳米银对内皮细胞和平滑肌细胞膜流动的影响

Fig. 2 Influence of the concentration of silver nanoparticles on cell membrane fluidity

由膜流动性的实验结果可知,加入纳米银后,两种细胞的膜流动性均明显减小.影响膜流动性的可能性原因有三种:一,由于纳米银颗粒团聚和吸附在细胞膜的周围,使细胞膜两侧的膜电位发生改变,从而搅乱了细胞膜与外界环境交换信息、输送能量的正常功能,使得细胞膜流动性减小;二,细胞膜上的蛋白质在纳米银的作用下,其构象可能会发生变化,甚至导致蛋白质部分变性^[17],这种局部变性作用可能也是导致膜流动性减小的另一原因;三,细胞和纳米银作用后,可能会造成细胞膜的通透性的改变,导致有的地方膜孔变大,有的地方膜孔变小,破坏了细胞膜原有的正常流动机制^[12],从而导致膜流动性的下降.

由于细胞膜流动性下降,膜粘度增加,可能导致附着在其上的酶失去活性,从而引起细胞代谢功能发生紊乱,进而影响细胞的增殖.因此纳米银对细胞膜流动性的影响也可能成为影响细胞增殖的另一因素.

2.4 透射电镜观测纳米银对细胞膜完整性的影响

图 3 是平滑肌细胞与 0.25 mg/mL 的纳米银接触培养 24 h 后的透射电镜照片,实验中发现当纳米银与细胞接触培养 4,6 和 8 h 时,采用 TEM 观察发现对细胞的膜完整性无显著影响,但由图 3 中与纳米银接触培养 24 h 后的细胞透射电镜照片可以看出:在含有纳米银的培养基中培养 24 h 后,纳米银会聚集在细胞膜的周围(见图 3a)并与细胞膜发生作用,使细胞膜结构变得不是十分平滑完整(如图中箭头所指部分),图 3b 部分地方出现明显的细胞膜破损现象,纳米银可能会通过破损的细胞膜进出到细胞中.如图 3b 所示,细胞膜局部凹陷,纳米银团簇在细胞膜已破损的凹陷部位,有可能进一步扩散到细胞质中,但也有可能是

已进入细胞的纳米银随细胞膜的破裂而被排出细胞外. 实验中观察到了细胞质内有团簇的纳米银存在(见图 3c), 其电子衍射花样表明, 该处为多晶结构的银, 但是不能确定纳米银是如何进入细胞部的. 尽管有文献报导说纳米颗粒会以胞吞的形式进入细胞内部^[18], 但由于实验中没有观察到吞饮小泡, 因此不能确定纳米银是否以胞吞的形式进入, 还是以通过破损的细胞膜进入. 进入细胞的纳米银存在于细胞质中, 在细胞核及细胞器中并未发现纳米银颗粒的存在(见图 3d), 这些部位的电子衍射花样均为非晶结构的晕环, 说明不存在具有晶格结构的银颗粒.

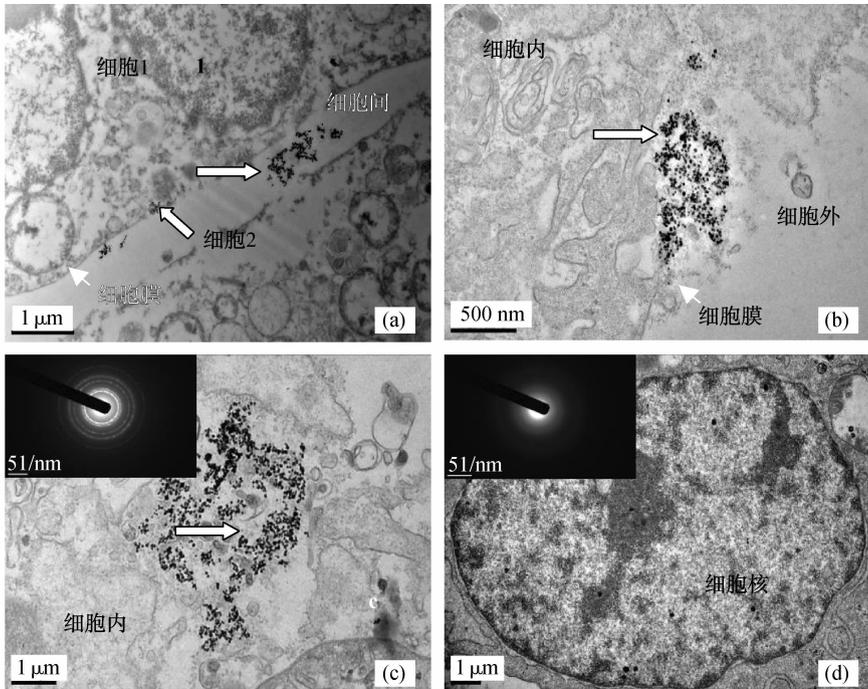


图3 平滑肌细胞与0.25 mg/mL的纳米银接触培养24 h后的透射电镜照片

Fig. 3 TEM images of HUASMC contacted with 0.25 mg/mL of silver nanoparticles for 24 hours

注：“⇒”示意纳米银颗粒

此外, 实验中发现当纳米银与细胞作用8 h以内纳米银并未对细胞膜造成破坏, 这和前面所做的LDH急性细胞毒性实验结果吻合, 但作用24 h后, 纳米银会影响细胞膜的完整性, 继而引起细胞的死亡. 其破坏原因, 可能是因为纳米银聚集吸附在细胞表面, 与细胞膜或膜蛋白质发生作用, 改变膜流动性, 并造成对细胞膜的破坏^[12]; 也可能是因为纳米银吸附和聚集在细胞表面, 影响了补体调节蛋白与膜上受体的结合, 使得细胞膜上补体调节蛋白对补体蛋白分子聚合的抑制作用减弱, 因此补体蛋白会在细胞膜上大量聚合, 形成膜攻击复合体, 膜攻击复合体会导致细胞膜磷脂双层中小孔的形成, 多重补体蛋白的交联聚合会扩大这个孔, 导致膜完整性的破坏和细胞死亡^[19]. 纳米银会进入细胞, 并对细胞膜造成损失, 也体现了纳米银具有一定的细胞毒性.

3 结 论

上述实验结果表明: 0.003 9~0.5 mg/mL 浓度范围内的纳米银, 没有急性细胞毒性,

不会导致细胞的急性死亡,但与细胞接触一段时间后,会产生一定的细胞毒性,主要表现为:细胞的附着形态变得异常,细胞的膜流动性下降,细胞的膜完整性遭到了破坏,并且纳米银对细胞这三方面的影响与纳米银浓度之间呈非线性变化关系.纳米银对细胞附着形态、膜流动性和膜完整性的影响,是导致细胞的后续增殖受到抑制的可能机理,也是纳米银的毒性表现之一.

需要指出的是,由于整个实验是在体外培养细胞的基础上进行的,与实际的体内情况可能会有一定的差异性,有些影响不一定会在体内实验中显现,如细胞的附着.但是体外实验仍能在一定程度上说明纳米银对细胞的影响途径,例如纳米银会与对细胞膜产生影响,使细胞形态的变化,细胞膜受到损害等.体内与体外实验的差异性还有待进一步的研究.此外,根据本文的体外实验结果,下一步的研究计划拟针对纳米银对细胞膜的影响机制展开.

[参 考 文 献]

- [1] 程央红. 纳米银医学的研发热点[J]. 中国执业药师, 2005, 3(15): 33.
CHENG Y H. The developmental focuses of nano-silver medicine[J]. China Licensed Pharmacist, 2005, 3(15): 33.
- [2] 程定超, 杨洁, 赵艳丽. 纳米银抗菌材料在医疗器械与生活用品中的应用[J]. 医疗卫生装备, 2004(11): 27-30.
CHENG D C, YANG J, ZHAO Y L. Antibacterial materials of silver nanoparticles application in medical appliances and appliances for daily use[J]. Chinese Medical Equipment Journal, 2004(11): 27-30.
- [3] FURNO F, MORLEY KS, WONG B, et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: A new approach to prevention of infection? [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, 54(6): 1019-1024.
- [4] ALT V, BECHERT T, STEINRUCKE P, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement[J]. Biomaterials, 2004, 25: 4383.
- [5] ALT V, BECHERT T, STEINRUCKE P, et al. Nanoparticulate silver: A new antimicrobial substance for bone cement[J]. Orthopade, 2004, 33(8): 885.
- [6] IMAI K, NAKAMURA M. In vitro embryo toxicity testing of metals for dental use by differentiation of embryonic stem cell test [J]. Congenit Anom (Kyoto), 2006, 46(1): 34.
- [7] 汤京龙, 奚廷斐. 纳米银生物安全性研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2008, 25(4): 958-961.
TANG J L, XI Y F. Status of biological evaluation on silver nanoparticles[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2008, 25(4): 958-961.
- [8] JASON E L, RUNGBY J, HANSON J C, et al. Serum concentration and accumulation of silver in skin during three months treatment with an anti-smoking chewing gum containing silver acetate[J]. Hum Toxicol, 1988(7): 535-540.
- [9] CARLSON C, HUSSAIN S M, SCHRAND A M, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species[J]. J Phys Chem B, 2008, 112(43): 13608-13619.
- [10] DOYLE A, GRIFFITHS A. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology[M]. Chichester, Laboratory Bioelectrochemistry, 1998: 71-75.
- [11] 魏荣慧, 黄燕萍, 李珊珊, 等. 荧光偏振光谱法探测光动力过程中癌细胞膜的流动性[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(11): 1827-1829.
WEI R H, HUANG Y P, LI S S, et al. Fluorescence polarization used to derive cell membrane fluidity during photodynamic therapy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2005, 25(11): 1827-1829.
- [12] 张鹰, 曾新安, 温其标, 等. 荧光偏振法研究脉冲电场对酿酒酵母细胞膜流动性影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(1): 156-160.
ZHANG Y, ZENG X A, WEN Q B, et al. Fluorescence polarization used to investigate the cell membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* treated by pulsed electric field[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(1):

156-160.

- [13] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
CHEN G Z, HUANG X Z, ZHENG Z Z, et al. Fluorescence Analysis [M]. Beijing: Science Press, 1990.
- [14] LIU R T, SUN F, ZHANG L J, et al. Evaluation on the toxicity of nano Ag to bovine serum albumin[J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(13): 4184-4188.
- [15] INGBER D E. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology[J]. Circ Res, 2002, 91(10): 877.
- [16] REDDING P J, JULIANO R L. Clinging to life: Cell to matrix adhesion and cell survival[J]. Cancer Metastasis Rev, 2005, 24(3): 425.
- [17] SHVEDO V A A, CAST RANOVA V, KISIN E R, et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells[J]. Toxicol Environ Health A, 2003, 66(20): 1909.
- [18] KRT P, PILLE S, MATS H, et al. Cell transduction pathways of transportans[J]. Bioconjugate Chem, 2005, 16(6): 1399-1410.
- [19] NICULESCU F, RUS H. The rule of complement activation in atherosclerosis[J]. Immunol Res, 2004, 30(1): 73-80.

(上接第 49 页)

- [23] 王朝辉, 宗志强, 李生秀. 蔬菜的硝态氮累积及菜地土壤的硝态氮残留[J]. 环境科学, 2002, 23(3): 79-84.
WANG Z H, ZONG Z Q, LI S X. Nitrate accumulation in vegetables and its residual in vegetable fields[J]. Environmental Science, 2002, 23(3): 79-84.
- [24] 李俊良, 陈新平, 李晓林, 等. 大白菜氮肥施用的产量效应、品质效应和环境效应[J]. 土壤学报, 2003, 40(2): 261-266.
LI J L, CHEN X P, LI X L, et al. Effect of N fertilization on yield, nitrate content and N apparent losses of Chinese cabbage[J]. Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(2): 261-266.
- [25] 陈新平, 邹春琴, 刘亚萍, 等. 菠菜不同品种累积硝酸盐能力的差异及其原因[J]. 植物营养与肥料学报, 2000, 6(1): 30-34.
CHEN X P, ZHOU C Q, LIU Y P, et al. The nitrate content difference and the reason among four spinach varieties[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2000, 6(1): 30-34.
- [26] 王朝辉, 田霄鸿, 李生秀. 土壤水分对蔬菜硝态氮积累的影响[J]. 西北农业大学学报, 2000, 25(6): 15-20.
WANG Z H, TIAN X H, LI S X. Effects of soil moisture on nitrate accumulation in vegetables[J]. Journal of Northwest Agricultural University, 2000, 25(6): 15-20.