

涂料中的纳米颗粒与原生纳米颗粒

在 小鼠体内的毒性

纳米材料独特的物理和化学性质使得它在越来越多的工业应用中被使用,漆料添加剂中也广泛使用了纳米材料。例如,二氧化钛(TiO_2)工程纳米颗粒(ENP)具有良好的抗 UV,自清洁和空气净化效果。银(Ag) ENPs 以其抗微生物能力而闻名,二氧化硅(SiO_2) ENP 用作阻燃剂和抗刮涂层。本研究比较了三种原始 ENPs (TiO_2 , Ag 和 SiO_2),实验将含有 ENPs (TiO_2 , Ag 和 SiO_2) 的三种老化涂料与不含 ENPs 的对照涂料的毒性效应和生物分布进行对比。用 ENP 或油漆颗粒($20\text{ }\mu\text{g}$ /吸出)让 BALB/c 小鼠口咽吸入,每周一次,持续 5 周,并在最后抽吸治疗后 2 或 28 天令其死亡。进行支气管肺泡灌洗,评估全身血液毒性,并完成炎症细胞诱导因子和关键的血液参数的细胞计数。此外,提取出肺,肝,肾,脾和心脏并测定金属浓度。

原始 ENPs 在肺中引起的影响较小,在血液中引起的改变也可以忽略不计。在吸入含有 Ag ENPs 的气体后观察到的毒性作用最显著;测定了嗜中性粒细胞和促炎细胞因子分泌物(角化细胞化学引诱物(KC)和白细胞介素-1 β (IL-1 β))的量增加了两倍以上。含有 TiO_2 ENP 的涂料不改变巨噬细胞和嗜中性粒细胞计数,但轻度诱导 KC 和 IL-1 β 。含有 Ag 或 SiO_2 的涂料没有显示显著的毒性。生物分布实验显示吸入 Ag 或 SiO_2 ENPs 后,Ag 和 Si 在肺外的分布。总提来讲,该研究证明即使直接暴露于 ENPs 环境下能够诱导出一些毒性作用,但当他们被嵌入一个复杂的油漆基质后,期不良的毒理作用被大幅度降低甚至微乎其微。

工程纳米粒子(ENPs)的当前应用覆盖广泛的工业和消费部门,包括化妆品,药物和材料科学。在结构领域,ENP 可以改善重要的材料特性,例如提高强度和耐久性,同时降低总重量。ENP 还显示出对材料添加有用的性质,包括热,自清洁和防雾效果。ENPs 在木材,金属,陶瓷,天然石材,混凝土,复合材料和塑料的新涂料和涂料体系的开发中也显示了作为涂料添加剂的巨大潜力。在工业应用方面,涂料,涂料和颜料是 ENPs 在总体使用方面的最重要的应用。

在油漆和涂料中使用的三种最普遍的 ENP 是二氧化钛(TiO_2),银(Ag)和二氧化硅(SiO_2)。2008 年 Mueller 和 Nowack 的一项研究表明,在欧洲,35%的纳米 Ag 生产和 25%的纳米 TiO_2 生产被涂料和涂料行业使用,使该行业成为纳米 Ag 的第一个终端用户,纳米 TiO_2 的第二终端用户。纳米 TiO_2 的光催化和疏水性质产生具有自清洁,空气净化和抗 UV 性能的涂层。纳米 Ag 替代化学杀菌剂的抗菌效率,而添加纳米二氧化硅将增加涂料和涂料的耐划伤性和耐火性。目前在油漆和涂料中使用的其它 ENP 主要来源于具有自清洁和抗 UV 性能的氧化锌(ZnO),以及以耐火性和高拉伸强度见长的碳纳米管。

油漆和涂料中使用的 ENP 接触可能在生产过程中或当涂覆涂层时发生。气体吸入是最可能的接触途径,特别是当涂料通过喷涂应用通常在涂料工业中进行时。同时,材料的老化过程例如长时间暴露在 UV 环境中,热应力作用,水损坏和划痕或在砂磨、钻孔过程中暴露在空气中。此外,在空间狭小缺乏通风的室内,毒性物质的含量要比室外环境更高。

ENPs 的毒性是过去几年的主要研究焦点。但当它们嵌入复杂的涂料或涂料基质中后,

人们对它们的毒性了解却并不多。在本研究中，比较了三种原始 ENPs (TiO₂, Ag 和 SiO₂)，含有 ENPs (TiO₂, Ag 和 SiO₂) 的三种老化涂料与不含 ENPs 的对照涂料的炎症和毒性作用。通过口咽吸入使小鼠肺部与有毒物质接触。此外，通过电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 评估原始 ENP 和包含 ENP 的老化涂料对不同器官 (肺，肾，脾，肝和心脏) 造成的影响。我们的研究表明，虽然接触原始 ENPs 确实能够诱发毒性反应，但在油漆基质阻止了大多数颗粒的毒性传递。

材料和方法

材料

含有 (TiO₂, Ag 和 SiO₂) ENPs 的涂料和没有 ENPs 的对照涂料由工业项目合作伙伴提供。异氟烷 (Forene) 获自 Abbott Laboratories (SA Abbott NV, Ottignies, Belgium)。戊巴比妥 (Nembutal)，来自 SanofiSantéAnimale (CEVA, Brussels, Belgium)。

制造老化的粉末涂料颗粒

使用涂膜器将液体涂料施加在塑料板上，产生 200 μm 厚的均匀膜。在室温 (20°C) 下干燥 24 小时后，使用金属刮刀手动除去油漆以获得粉末涂料。这些粉末使用行星式球磨机研磨，最后暴露于 UV-A (Philips TL20W/09N) 500 小时 (64 个亮度循环，光暗时间 4h-4h) 式材料老化。

粒子表征

扫描电子显微镜

将老化的涂料粉末沉积在用自粘碳标签 (G3347N, Agar Scientific, Essex, UK) 覆盖的铝柱上。在金溅射之后，通过扫描电子显微镜 (SEM) (Jeol JSM-6610 LV, 加速电压: 10kV, 工作距离: 10mm) 表征涂料颗粒。

动态光散射

在 ALV/CGS 3 仪器 (ALV, Langen, 德国) 上进行多角动态光散射 (DLS) 测量。为了避免任何可能的污染，用过滤的丙酮 (450nm Chromafil PTFE 过滤器) 清洁毛细管，并在测量前在 110°C 下干燥。将样品置于超声浴中 15 分钟，并在测量前插入 5 分钟以允许温度稳定。在 30° 至 150° 的散射角度下以 15° 的步长执行几组 60s 的 DLS 测量，波长为 632.8nm。这种多角度方法将允许校正由颗粒各向异性和/或多分散性导致的散射强度的角度依赖性。强度自相关函数的建模使用累积方法 (如果适用) 和用最大熵方法进行交叉检查。

ζ 电位

ζ 电位测量在 ZetaPlus zeta 电位分析仪上进行，用 ZetaPALS 选项扩展。PALS (相位分析光散射) 比基本 ZetaPlus 设置中使用的 Doppler 方法更灵敏。在 DLS 测量之后回收 ζ 电势测量的样品，并使用 Smoluchowski 模型分析获得的结果。

老鼠

雄性 BALB / c OlaHsd 小鼠（6 周龄）。将小鼠饲养在具有 12-h 暗/光循环的常规动物房中。将它们容纳在过滤器顶笼中并且随意接受轻微酸化的水和颗粒状食物。所有实验程序由当地动物实验伦理委员会批准。

实验方案

在第 0,7,14,21 和 28 天，在光异氟烷麻醉下接受原始 ENP 的口咽吸入（25 μ l），含有 ENP 的老化的涂料颗粒，控制老化的涂料颗粒（0.8mg / ml）或赋形剂盐水（0.9%NaCl）。在最终抽吸治疗（第 30 天）后 2 天通过腹膜内注射戊巴比妥（90mg / kg 体重）处死小鼠。暴露于原始 ENP 或载体的第二组小鼠在最终抽吸治疗（第 56 天）后 28 天处死。实验方案的示意图如图 1 所示。

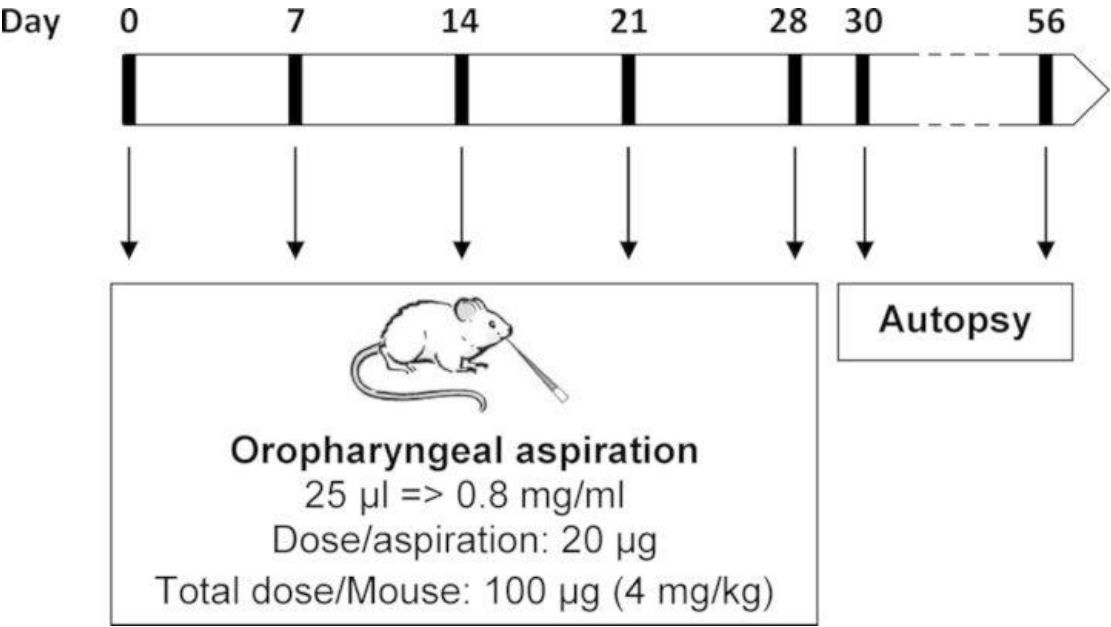


图 1：实验设计示意图。

在第 0,7,14,21 和 28 天通过在异氟醚麻醉下口咽吸入将小鼠暴露于不同的颗粒。
在第 30 或 56 天进行尸体解剖。

肺部炎症（支气管肺泡灌洗）

在用 0.4ml 无菌盐水（0.9%NaCl）原位灌注右肺之前夹住左肺支气管三次，收集回收的液体。使用 Bürker 血细胞计数器计数总细胞，并将支气管肺泡灌洗（BAL）流体离心（1000g，10 分钟）。通过分光光度监测丙酮酸盐的还原在上清液中测定乳酸脱氢酶，将剩余的上清液冷冻（-80℃）直至进一步分析。对于白细胞亚群的细胞计数，将 250 μ l 重悬浮的颗粒（100,000 细胞/ ml）旋转（300g，6 分钟）到显微镜载玻片上，空气干燥。对于每个样品，对 200 个细胞计数巨噬细胞和嗜中性粒细胞的数目。在冷冻上清液解冻后，使用 Bio-Rad 蛋白质测定，根据 Bradford 方法测定总蛋白质水平。

细胞因子

取出两片左肺叶，在液氮中快速冷冻并储存在-80℃直至进一步分析。在均质化的肺组织中用小鼠炎症因子 7 测量炎症细胞因子（白介素-1β（IL-1β），IL-12p70，IFN-γ，IL-6，角质形成细胞化学引诱物（KC），IL-10 和 TNF-α-Plex Ultra-Sensitive Kit。

金属浓度

通过 ICP-MS 在另一肺片，肾，脾，肝和心脏中测量 Ti，Ag 和 Si 浓度。将 1 毫升硝酸（HNO₃）60%ultrapur 加入~30mg 组织或 3-4mg 涂料颗粒中，并在 140℃下加热 5 小时。最后，将样品在 Milli-Q 水中稀释至 10ml，并通过 ICP-MS（Agilent 7700x ICP-MS）测量 Ti，Ag 和 Si 浓度。使用 Ge 和 Rh 作为内标，测量元素为 47Ti，107Ag 和 28Si。溶液中的定量限为 0.15µg/l（Ag 和 Ti）或 15µg/l（Si）。

系统性炎症（血液参数）

从眶后丛收集血液。在 Cell-Dyn 3500R 计数器（Abbott，Diegem，Belgium）上进行血细胞计数和差异。将全血离心（14,000g，10 分钟）后获得的血浆样品储存在-80℃直至进一步分析。使用 Mouse ProInflammatory 7-Plex Ultra-Sensitive Kit 在血浆中测量炎症细胞因子（IL-1β，IL-12p70，IFN-γ，IL-6，KC，IL-10 和 TNF-α-Gaithersburg）。

数据分析

所有数据表示为平均值和标准偏差（SD）。使用非参数 Kruskal-Wallis 检验，随后通过 Dunn 多重比较检验（分析所有数据。p<0.05 的水平被认为是显著的。

结果

所有原始 ENPs 的详细表征早已由 Smulders 等人公开。（2012）。短时间，透射电子显微镜分析显示 15nm（TiO₂），25-85nm（Ag）和 19nm（SiO₂）的平均粒度。DLS 分析显示 396nm（TiO₂），90nm（Ag）和 192nm（SiO₂）的单个群体。包含 ENPs 和对照漆的老化漆粒子的 SEM 图像的选择显示在图 2.2 中。所有涂料显示非常不均匀的组合物，显示大（>10 µm）和更小的颗粒（<1 µm）。较小的颗粒主要存在于与其它小颗粒的聚集体中或附着在较大颗粒的表面上。所有漆颗粒的流体动力学尺寸和ζ电位示于表表 1.1 中。通过 ICP-MS 分析的不同老化的涂料颗粒和老化的对照涂料的元素组成显示在补充表 4 中。与对照涂料相比，Ti，Ag 和 Si 的浓度在它们各自的涂料中更高，低于未老化的液体涂料（数据未显示）。

涂层粒子	动态激光散射半径	电动电势
P(TiO2)	313	-4.03 ± 2.06
P(CONTR)	191	-6.65 ± 1.27
P(AG)	652	-3.99 ± 2.12
P(CONTR)	450	-3.62 ± 3.52
P(SiO2)	530	-1.90 ± 1.69
P(CONTR)	303	-3.51 ± 0.60

老化油漆颗粒和对照漆的流体动力学尺寸和ζ电位

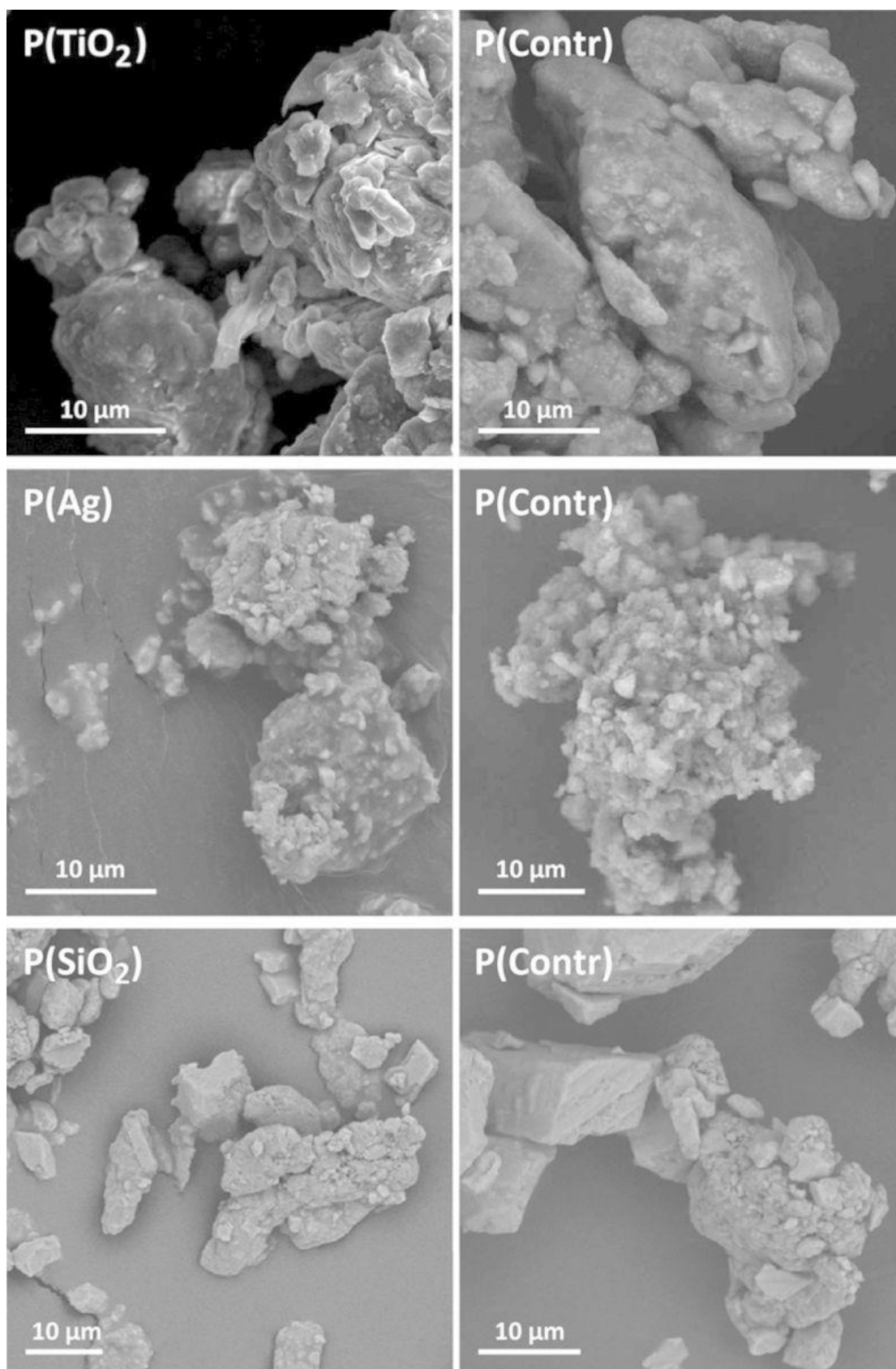


图 2：不同老化涂料颗粒的电子显微镜图像。
通过 SEM 获得包含 TiO_2 ，Ag 或 SiO_2 ENP 的老化漆颗粒（左图）
没有 ENPs 的对照漆颗粒（右图）。

在光异氟醚麻醉下，小鼠在第 0,7,14,21 和 28 天接受口咽吸入（25 μ l）的颗粒（0.8mg / ml），并在第 30 天处死。第二组的小鼠在第 56 天处死。

在暴露于未经处理的 Ag 或 SiO₂ ENP 的组中，与第 30 天的对照组相比，在 BAL 液中可以看到总细胞的增加（图 3）。暴露于原始 TiO₂ ENPs 或含有 TiO₂，Ag 或 SiO₂ 的老化漆粒子组总细胞没有增加。差异细胞计数显示在第 30 天暴露于原始 TiO₂，Ag 和 SiO₂ ENP 的组中嗜中性粒细胞有限但显著的增加，这在原始 Ag ENPs 的情况下最显著（图 3）。原始 SiO₂ ENP 暴露组中巨噬细胞的增加。所有暴露于含有 TiO₂，Ag 或 SiO₂ 的老化涂料颗粒的组在第 30 天没有嗜中性粒细胞和巨噬细胞增加。肺组织中的细胞因子分析显示暴露于原始 Ag ENP 和老化涂料颗粒的组中 IL-1 β 和 KC 的增加含有 TiO₂ ENPs（图 4）。当暴露于含有 TiO₂ ENP 的老化漆颗粒和老化的对照漆颗粒时，未观察到 IL-1 β 和 KC 的显著差异，表明后者组中的效果部分来自对照漆本身的组分（补充表 3）。其他测量的细胞因子（IL-12p70，IFN- γ ，IL-6，IL-10 和 TNF- α ）的浓度在所有组中低于检测限。

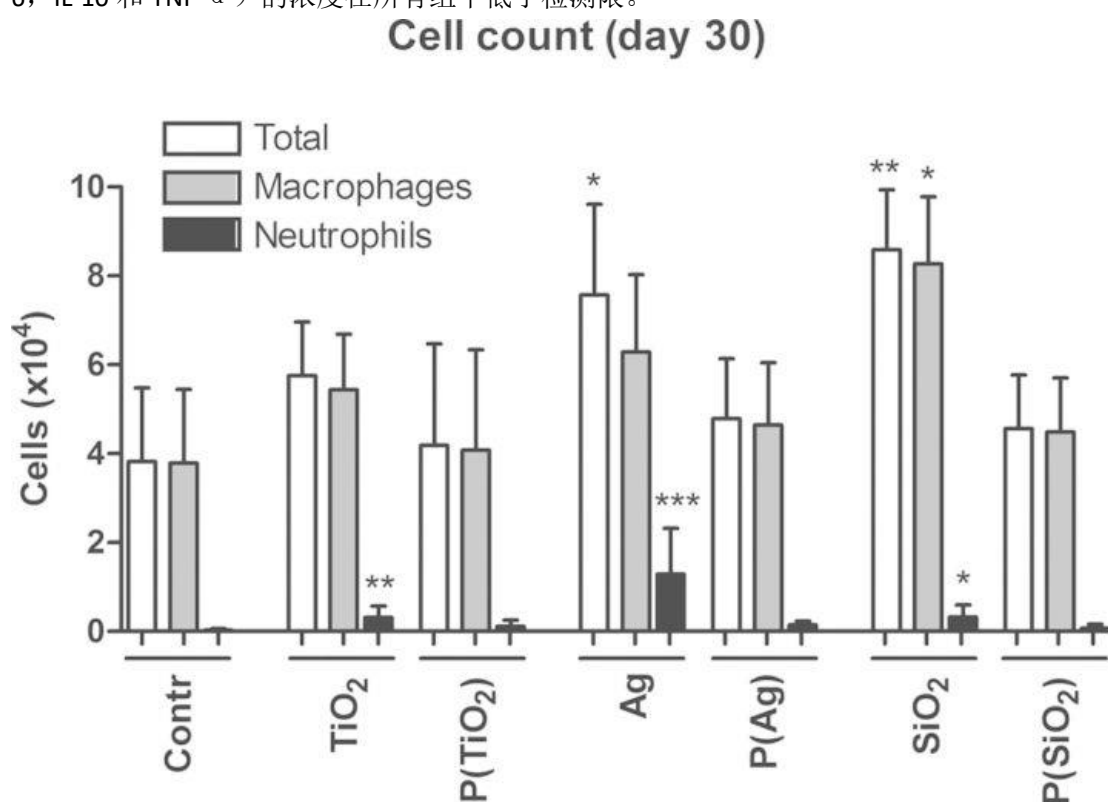


图 3：吸入原始 ENP 或老化的涂料颗粒小鼠第 30 天的 BAL 细胞计数。

小鼠暴露于原始 ENP（TiO₂，Ag 或 SiO₂）或包含 TiO₂，Ag 或 SiO₂ 的老化涂料。在 BAL 液中进行总和差异（巨噬细胞和嗜中性粒细胞）细胞计数。与对照（0.9%NaCl）相比，平均值 $\pm$ SD，n = 4。* p < 0.05，** p < 0.01，*** p < 0.001。

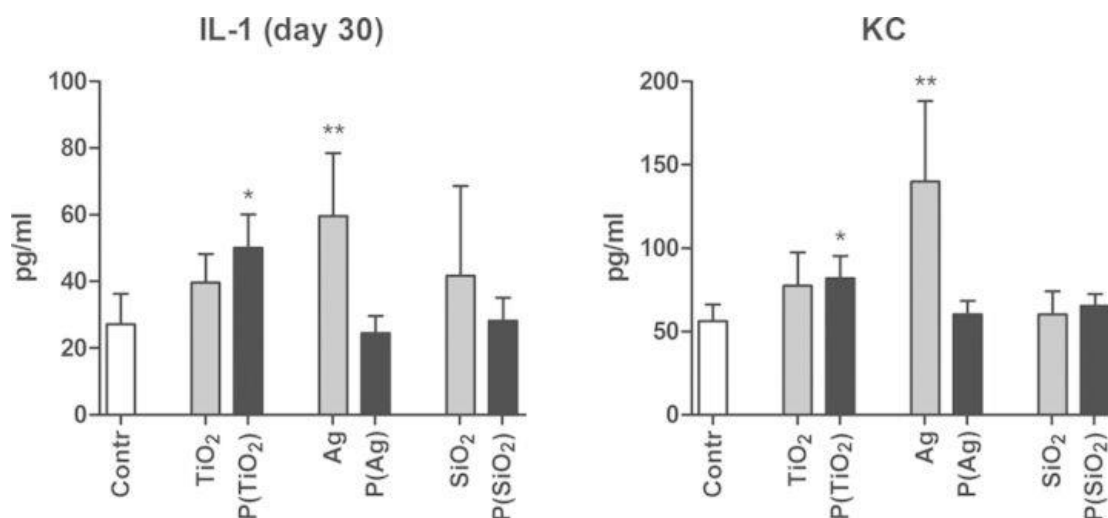
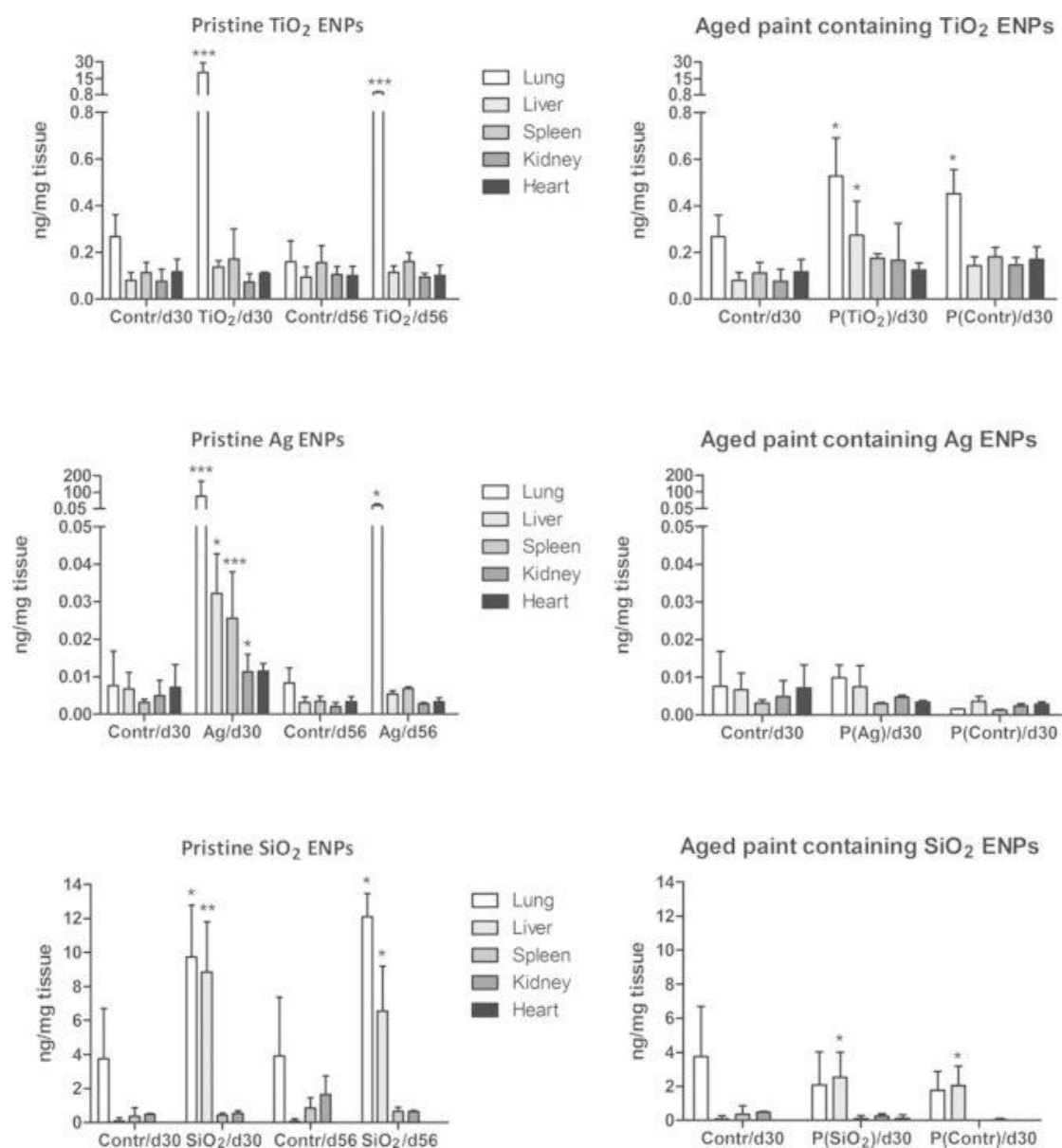


图 4: 吸入原始 ENP 或老化的涂料颗粒的小鼠第 30 天在肺组织中的 IL-1 和 KC。
将小鼠暴露于原始 ENP (TiO₂, Ag 或 SiO₂) 或含有 TiO₂ ENPs, Ag ENP 或 SiO₂ ENP 老化涂
料。在匀浆的肺组织中测量细胞因子。
与对照 ((0.9%NaCl)) 相比, 平均值+ SD, n = 4。* p <0.05, ** p <0.01

主要血液参数的分析显示细胞计数 (白细胞, 淋巴细胞, 嗜中性粒细胞和红细胞) 以及所有组中的血红蛋白和血细胞比容没有显著变化。

在补充表 5,6 和 7 中, 总结了所有数据。第二设置的结果, 其中在稍后的时间点 (第 56 天) 进行尸检, 没有显示肺部炎症。当将含有 ENP 的老化涂料与它们的适当对照 (没有 ENP 的老化涂料) 进行比较时, 没有观察到显著差异。

ENP 生物分布的结果显示在图 5 (左图) 中。与对照组相比, 在 TiO₂ ENPs 暴露的小鼠中在第 30 天在肺组织中发现增加的 Ti 含量 (contr / d30)。在第 56 天, Ti 含量仍然高于对照组 (contr / d56), 但是低于第 30 天。在肝, 脾, 肾和心脏中, 没有观察到 Ti 浓度的显著差异。在暴露于含有 TiO₂ ENP 和对照涂料 (不含 TiO₂ ENP) 的老化涂料之后, 在肺中观察到 Ti 的显著增加 (图 5, 右图) 原始的 Ag ENPs 暴露的小鼠在两个时间点 (第 30 和 56 天) 在肺中显示出增加的 Ag, 在第 30 天最明显。在肝脏, 脾脏, 和肾脏, 而在第 56 天没有观察到这些器官和心脏的增加。关于含银涂料, 在任何研究的器官中没有观察到 Ag 的显著增加。SiO₂ ENP 暴露的小鼠显示在在两个时间点 (第 30 天和 56 天), 肺中发现增加的 Si 含量。在第 30 天, 暴露于含有 SiO₂ 或对照油漆的油漆的小鼠暴露于肝脏中的 Si 含量增加。



原始 ENPs 和包含 ENP 的老化涂料在不同器官中的分布。 在第 30 天 (d30) 或第 56 天 (d56)，通过口咽吸入将小鼠暴露于盐水 (对照)，原始 ENP (TiO₂, Ag 或 SiO₂)，含有 ENP 的老化涂料或未含 ENP 的老化对照涂料，。 收获肺，肝，脾，肾和心脏，并且使用 ICP-MS 测定 Ti, Ag 或 Si 的浓度。 值为平均值±SD。 *与相应对照 (盐水 (0.9%NaCl)) 相比，p < 0.05，** p < 0.01，*** p < 0.001。