

## 论著

## 纳米氧化锌 28 d 经口毒性及其对肠道免疫影响研究

樊华<sup>1</sup>, 胡静<sup>2</sup>, 李雨哲<sup>2</sup>, 于洲<sup>2</sup>, 周宇红<sup>2</sup>, 徐海滨<sup>2</sup>, 梁春来<sup>2</sup>

(1. 宁夏医科大学, 宁夏 银川 750004; 2. 国家食品安全风险评估中心 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

**摘要:**目的 研究短期经口摄入纳米氧化锌对大鼠的毒性作用及其对肠道免疫的影响。方法 将断乳 SD 大鼠随机分为 4 组(对照组和低、中、高剂量组), 每组雌、雄各 10 只, 连续 28 d 灌胃给予纳米氧化锌, 剂量分别为 87.5、175、350 mg/kg BW, 观察体质量及摄食量变化; 试验结束后禁食取血, 检测各项血液学、血生化指标, 并剖检进行脏器称重以及组织病理学检查; 取肠道派氏结进行淋巴细胞分型检测以及开展肠液中分泌型免疫球蛋白 A (SIgA) 检测。结果 大鼠一般状况正常, 体质量、进食量、脏器重量、脏器比以及血常规、凝血、血生化等指标均未发现有意义改变; 组织病理学检查发现, 部分动物出现胃黏膜局灶性上皮细胞脱落, 黏膜下层以嗜酸性粒细胞为主的炎细胞浸润及水肿, 小肠绒毛上皮脱落, 与对照组比较, 高剂量组病变发生例数增加; 肠道派氏结淋巴细胞分型检测显示, 雄性大鼠中、高剂量组 T 细胞比例增高, 自然杀伤(NK)细胞比例降低, 各剂量组 SIgA 浓度差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 短期经口摄入纳米氧化锌, 在 350 mg/kg BW 剂量条件下, 可导致大鼠胃肠黏膜损伤, 并对肠道免疫指标产生影响。

**关键词:** 纳米氧化锌; 经口毒性; 肠道免疫

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2019)05-0415-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2019.05.004

**Study on 28-day oral toxicity of nano zinc oxide and its effect on intestinal immunity**FAN Hua<sup>1</sup>, HU Jing<sup>2</sup>, LI Yuzhe<sup>2</sup>, YU Zhou<sup>2</sup>, ZHOU Yuhong<sup>2</sup>, XU Haibin<sup>2</sup>, LIANG Chunlai<sup>2</sup>

(1. Ningxia Medical University, Ningxia Yinchuan 750004, China; 2. National Health Commission Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To study the short-term oral toxicity and the effect of zinc oxide nanoparticles on intestinal immune in rats. **Methods** Weaning rats were randomly divided into 4 groups: control group, low, medium and high-dose groups (10 male and female rats in each group). Zinc oxide nanoparticles were intragastrically administered at doses of 87.5, 175 and 350 mg/kg BW for 28 days, respectively. Blood samples were collected on day 29 for measurement of hematology and clinical biochemistry. Animals were euthanized for necropsy, and selected organs were weighed and fixed for histological examination. Flow cytometric analysis of lymphocyte subsets of Peyer's patch and the level of secretory immunoglobulin A (SIgA) in intestinal fluid were detected. **Results** There were no toxicologically significant changes in clinical signs, body weight, food consumption, necropsy findings and organ weights, hematological and clinical biochemical values. Histopathological examination showed an increased incidence of focal epithelial cell exfoliation in gastric mucosa, inflammatory cell infiltration and edema in gastric submucosa, and villous epithelial cell exfoliation in small intestine. Compared with the control group, the number of lesions in the high dose group increased significantly. Lymphocytes phenotyping analysis showed a significant increase in percentage of T lymphocytes and decrease in percentage of natural killer (NK) cell in Peyer's patch. The concentration of SIgA had no significant difference between dose groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The ingestion of zinc oxide nanoparticles can cause gastrointestinal mucosal damage and can affect the intestinal immune index in rats, at 350 mg/kg BW dose.

**Key words:** Zinc oxide nanoparticles; oral toxicity test; intestinal immunity

收稿日期: 2019-07-01

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2016YFD0400601)

作者简介: 樊华 女 硕士生 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail: 1031721501@qq.com

通信作者: 梁春来 女 副研究员 研究方向为食品毒理学

E-mail: liangchunlai@cfsa.net.cn

纳米材料是由粒径介于 1~100 nm 之间的晶态或非晶态超微粒为基本结构单元构成的材料, 因具有小尺寸效应、表面效应等独特的理化性质<sup>[1]</sup>, 在化妆品和食品等领域得到广泛应用<sup>[2-3]</sup>。纳米氧化锌是应用较为广泛的纳米材料之一<sup>[4]</sup>, 因其对大肠埃希菌、沙门菌和金黄色葡萄球菌等食源性致病菌

有较好的抗菌作用,目前常被应用到食品包装材料<sup>[5]</sup>。随着纳米氧化锌在食品领域的应用,其被人体摄入后潜在的毒性作用备受关注,有研究<sup>[6-8]</sup>报道经口摄入一定剂量纳米氧化锌可引起机体血液、血生化等指标的变化,并对脾脏、胃、胰腺等脏器产生不同程度的毒性作用,但相关的毒性作用剂量水平差异较大,作用机制尚不明确;此外,由于肠道黏膜免疫系统是机体内最大、最复杂的免疫系统,且是经口摄入的受试物接触最多的部位<sup>[9]</sup>,纳米氧化锌的摄入是否会影响肠道黏膜免疫,其敏感性是否优于一般毒性,目前鲜见报道。

本研究参考经济合作与发展组织(OECD)毒性试验指南TG407(啮齿动物28d经口毒性试验)<sup>[10]</sup>,采用灌胃方式给予大鼠纳米氧化锌28d,通过一般体征观察、血液学、血生化指标检测、脏器称重以及组织病理学检查评价纳米氧化锌的短期经口毒性作用,并通过派氏结淋巴细胞分型及肠液中分泌型免疫球蛋白A(SIgA)含量检测,初步探讨纳米氧化锌对肠道黏膜免疫的影响,从而为进一步开展纳米氧化锌长期经口毒性研究的剂量和指标设计提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 受试物

纳米氧化锌购自美国 Nanostructured & AmorPhous Materials,为白色粉末状物质。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

7080全自动生化分析仪(日本日立)、希森美康-XT-1800i全自动血球计数仪(日本希森美康株式会社)、ACL TOP700全自动凝血分析仪(西班牙沃芬)、流式细胞仪(美国BD)、酶标仪、电子天平、离心机、显微镜。

生化试剂(中生北控生物科技股份有限公司)、血球稀释液及溶血剂(上海东湖仪器试剂科技有限责任公司)、淋巴细胞分型检测试剂盒(美国BD)、SIgA检测酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(英国Abcam)。

#### 1.1.3 实验动物

无特定病原体(SPF级)健康断乳SD大鼠80只,雌雄各半,体质量99.1~132.2g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[生产许可证号:SCXK(京)2012-0001],饲养于北京汇智泰康生物科技有限公司动物房[使用许可证号:SYXK(京)2013-0018],饲养温度为20~26℃,湿度为40%~70%。普通维持饲料购自北京华阜康生物科技股份

有限公司[生产许可证号:SCXK-(京)2009-0008]。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 纳米氧化锌表征及灌胃液的制备

用透射电镜对纳米氧化锌的粒径和形态进行表征。称取纳米氧化锌1.4g,加至38.8ml的0.5%葡萄糖(glucose, GLU)溶液中,使用超声破碎仪冰浴条件下超声处理2min,再加入1.2ml胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),摇匀后继续超声处理1min,将纳米氧化锌配制成35mg/ml的混悬液作为高剂量,中、低剂量按同样方法配制成17.5、8.75mg/ml的混悬液,使用纳米粒度仪测定纳米氧化锌在混悬液中的粒径分布。

#### 1.2.2 实验动物分组及处理

断乳SD大鼠80只,按体质量随机分为4组,即对照组和3个受试物组,每组20只,雌雄各半。设纳米氧化锌低、中、高剂量组分别为87.5、175和350mg/kg BW。各剂量组灌胃给予受试物,对照组灌胃给予0.5%GLU和3%FBS,灌胃量均为10ml/kg BW,连续灌胃28d。自由饮食,每周记录大鼠进食量,每周称2次体质量以调整灌胃量,连续观察28d。

#### 1.2.3 纳米氧化锌短期经口毒性检测指标

试验结束后,大鼠空腹过夜,麻醉后腹主动脉取血处死,利用全自动血球计数仪测定红细胞数、血红蛋白含量、红细胞比积、白细胞数及其分类计数、血小板计数、平均血红蛋白含量和平均血红蛋白浓度;利用全自动凝血分析仪检测凝血酶原时间、活化部分凝血酶原时间、凝血酶时间和纤维蛋白原;利用全自动生化分析仪测定谷丙转氨酶、谷草转氨酶、碱性磷酸酶、谷氨酰转氨酶、尿素氮、肌酐、血糖、总蛋白、白蛋白、总胆固醇、甘油三酯、氯、钾、钠。解剖时进行大体观察,取心脏、肝、肾、脾、胸腺和性腺称重,计算相应的脏体比(以百克体质量计算)。将心、肝、脾、肾、脑(大脑、小脑和脑干)、肾上腺、甲状腺、胸腺、胃、肠(十二指肠、空肠和回肠)、胰腺、睾丸、卵巢、膀胱、派氏结和肠系膜淋巴结固定于10%中性福尔马林液中,对对照组和高剂量组动物脏器进行组织病理学检查。

#### 1.2.4 纳米氧化锌对肠道黏膜免疫影响指标

试验结束后,对派氏结淋巴细胞分型和肠液中SIgA含量进行检测。解剖时取下小肠,清除内容物,取下全部派氏结,使用5ml预冷的1640完全培养液洗2遍,倒入培养皿中,用注射器针头将派氏结划碎,经70μm筛网过滤,300×g离心5min,用1640完全培养液洗3遍,悬浮于2ml1640完全培养液中,取1ml经CD4/CD8/CD3[CD3别藻蓝蛋白

(APC)/CD4 藻红蛋白(PE)/CD8a 异硫氰酸荧光素(FITC)] 和 T/B/NK (CD3 APC/CD161a PE/CD45RA FITC) 大鼠流式抗体染色后上流式细胞仪进行淋巴细胞分型检测。解剖时自盲肠向上约 15 cm 处取一段约 5 cm 的肠段,纵向剖开,放入盛有 2 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)的小皿中,用玻片将肠黏膜及其内容物刮下并转移至 EP 管中,377×g 离心 10 min,取上清,按试剂盒说明书进行 SIgA 含量检测。

### 1.3 统计学分析

试验结果以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 SPSS 17.0 进行统计分析,各组间均数比较采用单因素方差分析并对数据进行方差齐性检验,多重比较采用 Bonferroni 法(方差齐时)或 Dunnett T3 法(方差不齐时),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 纳米氧化锌的表征

在电镜下观察,纳米氧化锌呈球形,颗粒粒径为(25.3±5.8) nm,呈现一定程度的聚集/团聚(图 1)。纳米氧化锌配制成 1 mg/ml 的混悬液后测定水合粒径为(203.9±41.0) nm,纳米氧化锌低、中、高剂量经稀释后检测,水合粒径分别为(204.7±28.4)、(207.3±35.6)和(195.4±36.6) nm,与直接配制成 1 mg/ml 时测定结果一致;但是当纳米氧化

锌混悬液浓度增加至 40、45 mg/ml 时,水合粒径分别为(343.3±121.2)、(410.4±130.0) nm,表明随着浓度的增加,纳米氧化锌团聚程度加强,不易被超声分散;因此,本研究中确定以能保持纳米氧化锌团聚稳定性的最高浓度 35 mg/ml 作为高剂量组的灌胃浓度,灌胃量为 10 ml/kg BW,最终确定高剂量组为 350 mg/kg BW,中、低剂量组以 2 倍组间距下设。

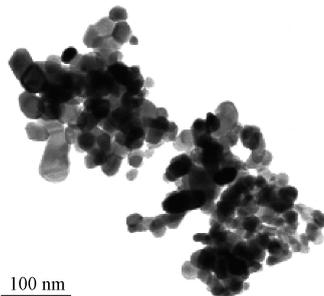


图 1 纳米氧化锌的透射电镜图

Figure 1 Transmission electron micrograph of zinc oxide nanoparticles

### 2.2 大鼠生长状况及一般表现

各组大鼠活动、生长正常,被毛浓密有光泽。由图 2 可见,以 87.5、175 和 350 mg/kg BW 剂量的纳米氧化锌灌胃给予大鼠 28 d,各剂量组雌雄大鼠体重、进食量与对照组比较均差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

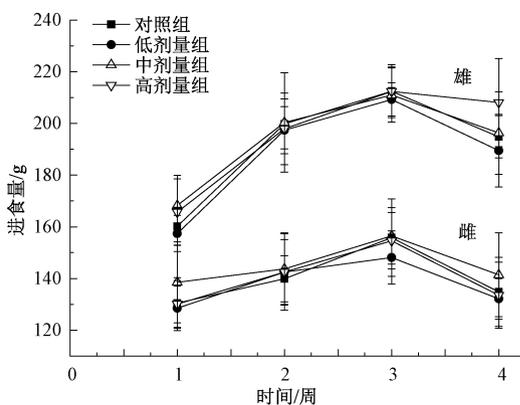
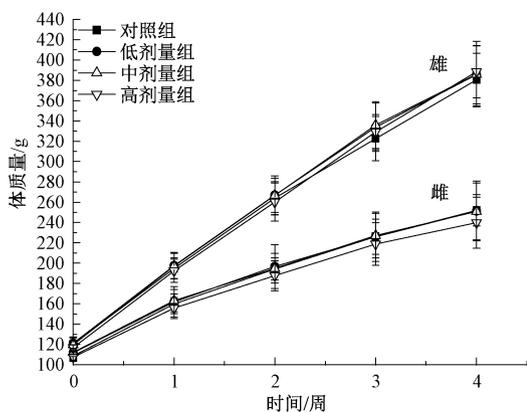


图 2 纳米氧化锌对大鼠体重(左)和周进食量(右)的影响

Figure 2 Effect of zinc oxide nanoparticles on body weight and weekly food consumption of rats

### 2.3 血液学指标

由表 1 可见,与对照组比较,中剂量组雌雄大鼠红细胞计数、血红蛋白含量均升高,差异均有统计学意义( $F = 5.152, P < 0.05; F = 7.368, P < 0.05; F = 8.764, P < 0.05; F = 11.221, P < 0.05$ );中剂量组雌性大鼠红细胞比积升高,高剂量组雄性大鼠淋巴细胞百分比升高,差异均有统计学意义( $F = 5.711, P < 0.05; F = 12.798, P < 0.05$ );高剂量组雄性大鼠

中性粒细胞百分比、其他细胞百分比和平均血红蛋白含量降低,差异均有统计学意义( $F = 9.620, P < 0.05; F = 6.649, P < 0.05; F = 3.332, P < 0.05$ );低、高剂量组雌性大鼠凝血酶时间升高,低、中剂量组雄性大鼠活化部分凝血酶原时间降低,差异均有统计学意义( $F = 10.863, P < 0.05; F = 23.547, P < 0.05$ )。上述指标无剂量-反应关系,且在历史正常对照检测范围内,故认为无生物学意义。

表1 纳米氧化锌对大鼠血液学指标的影响( $\bar{x}\pm s, n=20$ )

Table 1 Effect of zinc oxide nanoparticles on hematological parameters in rats

性别	组别	白细胞计数 /( $\times 10^9/L$ )	红细胞计数 /( $\times 10^{12}/L$ )	血红蛋白含量 /(g/L)	血小板计数 /( $\times 10^9/L$ )	中性粒细胞 /%	淋巴细胞 /%	其他细胞 /%	平均红细胞 体积/fL
雌	对照组	5.0±1.8	6.8±0.2	138.9±4.7	1143.1±102.9	12.9±7.5	82.6±7.4	4.5±1.5	58.8±1.7
	低剂量组	4.3±1.7	7.0±0.4	141.7±7.5	1118.3±126.7	13.2±5.9	81.5±6.1	5.2±1.2	58.6±4.0
	中剂量组	6.5±2.1	7.3±0.3*	149.5±5.5*	1092.7±122.2	6.8±1.8	88.9±2.0	4.4±1.2	58.2±1.8
	高剂量组	4.8±1.2	7.0±0.2	138.5±3.2	1124.4±106.7	9.6±4.2	85.6±4.9	4.9±1.8	57.7±2.0
雄	对照组	7.3±1.9	7.1±0.2	146.3±5.1	1171.7±99.2	10.5±2.3	84.7±2.3	4.8±0.7	60.4±2.1
	低剂量组	7.0±1.5	7.4±0.3	147.2±3.7	1158.4±73.3	11.9±3.4	83.4±3.3	4.8±0.9	58.5±2.8
	中剂量组	9.5±2.2	7.7±0.3*	155.5±4.8*	1154.7±125.5	8.4±2.3	86.4±3.0	5.2±1.4	58.1±1.1
	高剂量组	7.0±2.0	7.2±0.4	141.7±7.4	1088.6±158.0	6.5±1.1*	90.1±1.1*	3.4±0.7*	59.0±3.2

性别	组别	红细胞 比积/%	平均血红 蛋白含量 /pg	平均血红 蛋白浓度 /(g/L)	活化部分 凝血酶原 时间/s	纤维蛋白原 /(g/L)	凝血酶 时间/s	凝血酶 原时间/s
雌	对照组	39.7±1.1	20.6±0.7	349.9±4.0	18.0±1.0	1.5±0.2	20.2±1.6	9.7±0.5
	低剂量组	40.8±2.5	20.3±1.1	347.2±6.7	16.9±0.4	1.5±0.1	22.3±1.1*	10.1±0.6
	中剂量组	42.5±1.3*	20.5±0.6	352.2±3.9	17.0±0.6	1.6±0.1	20.7±1.0	10.1±0.5
	高剂量组	40.3±1.0	19.8±0.7	343.7±3.3	18.8±1.1	1.5±0.1	22.7±0.8*	9.8±0.4
雄	对照组	42.9±1.7	20.6±0.6	341.2±4.4	19.1±1.5	1.7±0.1	20.8±0.8	10.6±0.5
	低剂量组	42.9±1.2	20.1±1.0	343.7±4.6	17.0±0.8*	1.7±0.1	22.3±1.3	10.6±0.6
	中剂量组	44.9±1.1	20.1±0.4	346.2±4.9	16.9±0.6*	1.7±0.1	20.9±1.4	10.7±0.5
	高剂量组	42.4±2.2	19.7±0.9*	334.3±4.8	20.0±0.9	1.6±0.1	23.3±2.8	10.6±0.7

注:\*表示与对照组比较, $P<0.05$ 

## 2.4 血生化指标

由表2可见,与对照组比较,低、中剂量组雌性大鼠和中剂量组雄性大鼠血清氯水平升高,低、中剂量组雌性大鼠血清钠水平升高,低剂量组雄性大鼠尿素氮含量升高,低、中剂量组雄性大鼠肌酐

升高,差异均有统计学意义( $F=10.315, P<0.05$ ;  $F=11.976, P<0.05$ ;  $F=7.841, P<0.05$ ;  $F=10.741, P<0.05$ ;  $F=16.259, P<0.05$ )。上述指标无剂量-反应关系,且在历史正常对照检测范围内,故认为无生物学意义。

表2 纳米氧化锌对大鼠血生化指标的影响( $\bar{x}\pm s, n=20$ )

Table 2 Effect of zinc oxide nanoparticles on serum biochemical parameters in rats

性别	组别	谷丙转氨酶 /(U/L)	谷草转氨酶 /(U/L)	碱性磷酸酶 /(U/L)	尿素氮 /(mmol/L)	肌酐 /( $\mu\text{mol}/L$ )	胆固醇 /(mmol/L)	甘油三酯 /(mmol/L)
雌	对照组	26.9±5.6	125.2±20.2	121.3±27.0	5.3±0.5	30.5±2.7	1.5±0.3	0.37±0.10
	低剂量组	29.0±6.5	98.8±18.5	122.4±68.4	5.7±0.7	33.1±3.2	1.4±0.4	0.29±0.07
	中剂量组	24.5±3.3	138.5±22.8	104.1±18.8	5.7±0.6	34.2±2.9	1.7±0.2	0.40±0.14
	高剂量组	22.0±4.6	101.0±23.6	111.2±35.0	5.3±0.7	29.8±4.4	1.5±0.4	0.46±0.29
雄	对照组	31.2±3.4	120.8±21.2	205.3±64.4	4.4±0.7	24.1±3.3	1.5±0.2	0.85±0.46
	低剂量组	37.5±5.6	117.0±24.5	218.4±66.0	5.7±0.9*	29.5±2.2*	1.4±0.3	0.70±0.20
	中剂量组	36.6±7.8	123.4±24.5	208.0±52.1	5.5±0.7	29.7±1.9*	1.5±0.3	0.75±0.37
	高剂量组	28.0±3.4	96.8±14.5	210.4±27.5	3.9±1.0	23.5±2.9	1.3±0.3	0.70±0.27

性别	组别	血糖 /(mmol/L)	总蛋白 /(g/L)	白蛋白 /(g/L)	谷氨酰转 肽酶/(U/L)	氯 /(mmol/L)	钾 /(mmol/L)	钠 /(mmol/L)
雌	对照组	6.6±0.7	54.3±2.9	29.6±2.3	0.8±0.5	100.7±1.5	4.2±0.3	137.6±0.9
	低剂量组	7.2±1.0	54.8±3.7	30.2±2.3	0.8±0.4	103.7±1.4*	4.1±0.2	139.0±0.6*
	中剂量组	7.0±0.6	54.2±2.1	30.2±1.2	0.8±0.3	103.9±1.8*	4.2±0.2	139.2±1.3*
	高剂量组	6.5±0.9	50.6±2.3	27.9±1.5	1.2±0.5	101.7±1.4	4.4±0.3	137.6±1.0
雄	对照组	7.0±0.6	51.3±1.9	27.7±1.1	0.9±0.5	101.4±1.1	4.4±0.2	139.5±0.4
	低剂量组	7.7±0.7	53.7±2.8	28.6±1.6	0.8±0.4	102.7±0.9	4.5±0.2	139.9±1.5
	中剂量组	7.7±0.6	52.9±2.2	28.9±1.0	0.6±0.4	103.0±0.8*	4.4±0.1	139.5±0.9
	高剂量组	9.7±3.6	50.5±2.3	27.7±1.2	0.6±0.3	100.8±1.0	4.5±0.4	139.0±1.3

注:\*表示与对照组比较, $P<0.05$ 

## 2.5 大鼠脏器重量及脏器比

由表3可见,各剂量组大鼠宰杀前体质量、脏器重量及各脏器脏器比与对照组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

## 2.6 大体解剖及组织病理学检查

大体解剖肉眼观察未发现各脏器异常。对照组和高剂量组大鼠病变结果见表4,部分大鼠出现胃黏膜局灶性上皮细胞脱落,黏膜下层以嗜酸性

表 3 纳米氧化锌对大鼠脏器重量及脏体比的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=20$ )

Table 3 Effect of zinc oxide nanoparticles on absolute and relative organ weights of rats

性别	组别	宰杀前体质量/g	肝脏		脾脏		肾脏	
			重量/g	脏体比/%	重量/g	脏体比/%	重量/g	脏体比/%
雌	对照组	239.9±12.9	7.76±1.13	3.24±0.50	0.59±0.08	0.25±0.04	1.79±0.14	0.75±0.04
	低剂量组	240.6±28.1	7.41±1.28	3.09±0.49	0.55±0.11	0.23±0.03	1.84±0.27	0.77±0.06
	中剂量组	234.3±23.3	7.13±1.09	3.03±0.25	0.55±0.11	0.23±0.03	1.71±0.22	0.73±0.05
	高剂量组	227.2±23.3	7.15±1.01	3.14±0.24	0.60±0.04	0.27±0.03	1.77±0.23	0.78±0.05
雄	对照组	366.5±24.5	11.72±1.24	3.20±0.28	0.76±0.09	0.21±0.02	2.76±0.19	0.75±0.04
	低剂量组	373.9±26.4	11.57±0.99	3.09±0.13	0.70±0.15	0.19±0.04	2.63±0.19	0.70±0.04
	中剂量组	369.4±31.0	11.25±1.16	3.04±0.12	0.78±0.14	0.21±0.04	2.62±0.22	0.71±0.05
	高剂量组	371.3±23.5	12.62±1.14	3.40±0.29	0.84±0.12	0.23±0.03	2.98±0.19	0.80±0.04

性别	组别	宰杀前体质量/g	性腺		胸腺		心脏	
			重量/g	脏体比/%	重量/g	脏体比/%	重量/g	脏体比/%
雌	对照组	239.9±12.9	0.20±0.06	0.08±0.02	0.66±0.10	0.28±0.05	0.90±0.07	0.37±0.02
	低剂量组	240.6±28.1	0.16±0.02	0.07±0.01	0.56±0.18	0.23±0.06	0.84±0.09	0.35±0.01
	中剂量组	234.3±23.3	0.19±0.04	0.08±0.02	0.57±0.14	0.24±0.04	0.89±0.11	0.38±0.04
	高剂量组	227.2±23.3	0.17±0.04	0.07±0.02	0.65±0.16	0.28±0.06	0.84±0.10	0.37±0.02
雄	对照组	366.5±24.5	2.93±0.51	0.80±0.11	0.70±0.11	0.19±0.03	1.34±0.16	0.37±0.04
	低剂量组	373.9±26.4	3.10±0.35	0.83±0.07	0.63±0.14	0.17±0.04	1.31±0.22	0.35±0.05
	中剂量组	369.4±31.0	3.27±0.35	0.89±0.07	0.59±0.14	0.16±0.04	1.30±0.18	0.35±0.05
	高剂量组	371.3±23.5	3.31±0.34	0.89±0.08	0.66±0.16	0.18±0.04	1.32±0.17	0.36±0.04

表 4 大鼠脏器组织病理学检查结果

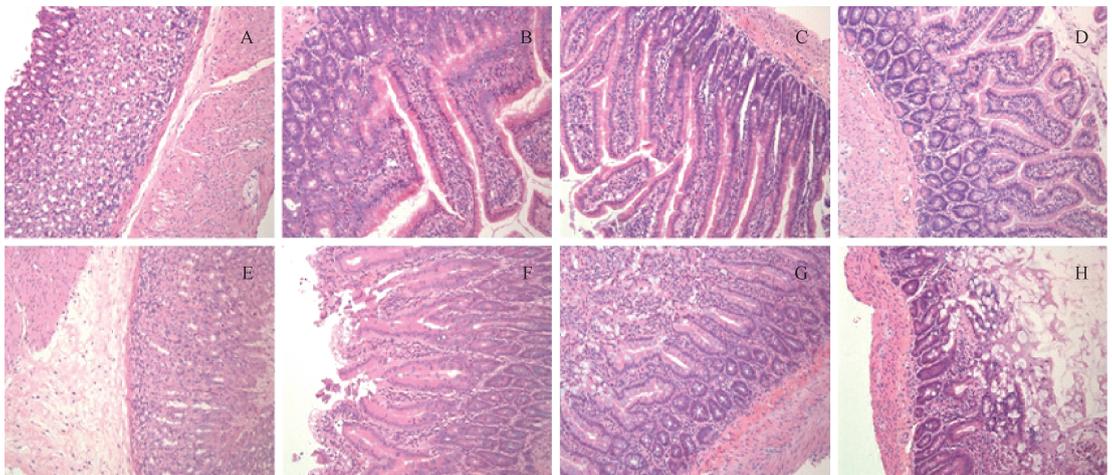
Table 4 Histopathological findings in rats

器官	损伤	对照组/只		高剂量组/只	
		雌	雄	雌	雄
胃	胃黏膜下层局部水肿	0	0	2	5
	胃黏膜局部小灶性上皮细胞脱落,黏膜下层以嗜酸性粒细胞为主的炎细胞浸润	0	0	5	5
十二指肠	部分绒毛顶部上皮细胞脱落	4	0	7	4
空肠	部分绒毛顶部上皮细胞脱落	3	2	8	5
回肠	部分绒毛顶部上皮细胞脱落	2	3	8	4

粒细胞为主的炎细胞浸润以及水肿,十二指肠、空肠、回肠出现绒毛顶部上皮细胞脱落(见图3),上述胃肠病理改变仅在对照组和高剂量组出现,但高剂量组出现病理改变的大鼠数量增多,因此考虑与纳米氧化锌的给予有关。其余脏器未发现有意义的病理改变。

### 2.7 派氏结淋巴细胞分型检测

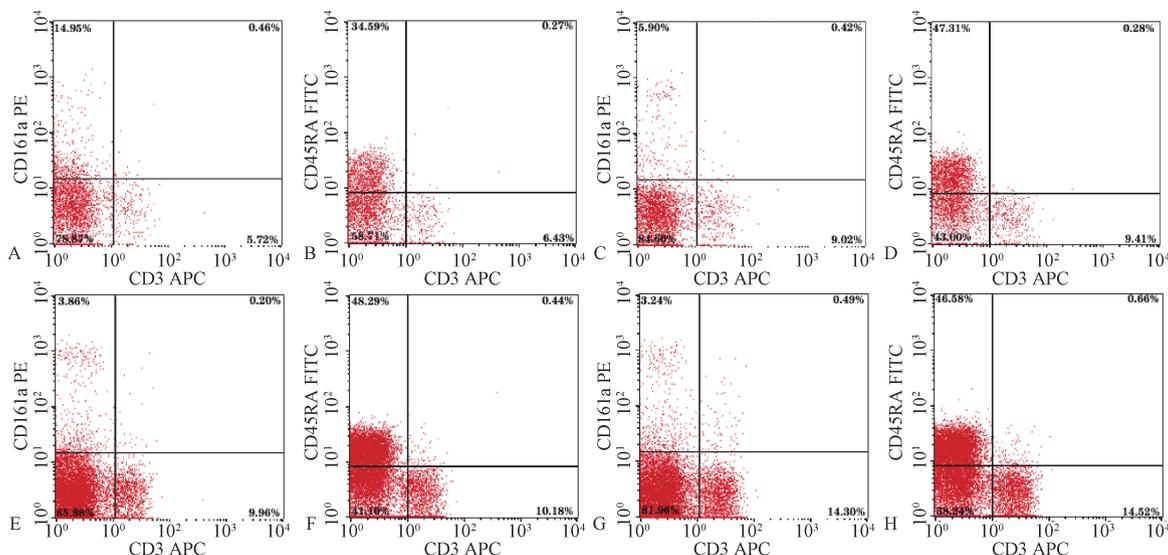
雄性大鼠派氏结淋巴细胞分型流式图见图4。由表5可见,与对照组比较,高剂量组雄性大鼠Th细胞比例、Th/Tc增高,差异有统计学意义( $F=4.231, P<0.05; F=3.756, P<0.05$ ),但无剂量-反应关系,故认为无生物学意义;中、高剂量组雄性大鼠



注:A为正常胃组织;B为正常十二指肠组织;C为正常空肠组织;D为正常回肠组织;E为胃黏膜下层水肿;F为十二指肠绒毛上皮细胞脱落;G为空肠绒毛上皮细胞脱落;H为回肠绒毛上皮细胞脱落

图3 大鼠胃和小肠病理学检查结果(100×)

Figure 3 Photomicrographs of histomorphological examination of stomach and small intestine in rats



注:CD3为T细胞表面标志物;CD45RA为B细胞表面标志物;CD161a为NK细胞亚群表面标志物;A、B为对照组T、B、NK细胞数量;C、D为低剂量组T、B、NK细胞数量;E、F为中剂量组T、B、NK细胞数量;G、H为高剂量组T、B、NK细胞数量

图4 雄性大鼠派氏结淋巴细胞分型结果

Figure 4 Results of lymphocyte typing in male rats

表5 纳米氧化锌对大鼠派氏结淋巴细胞分型的影响( $\bar{x}\pm s, n=20$ )

Table 5 Effect of zinc oxide nanoparticles on percentage of lymphocyte subsets in Peyer's patch of rats

性别	组别	Th 细胞/%	Tc 细胞/%	T 细胞/%	B 细胞/%	NK 细胞/%	Th/Tc
雌	对照组	5.10±2.69	2.51±1.46	20.77±8.36	51.52±11.48	3.41±2.76	2.07±1.19
	低剂量组	4.27±1.14	2.62±1.58	20.62±5.92	41.75±10.14	3.58±1.23	2.18±1.44
	中剂量组	3.24±0.76	1.85±0.77	18.98±6.17	41.87±11.15	3.84±1.41	2.03±1.02
	高剂量组	2.96±0.77	2.09±0.79	24.30±5.82	53.12±12.03	2.32±1.12	1.52±0.37
雄	对照组	10.38±5.35	7.80±4.67	3.24±1.48	45.34±12.46	14.96±9.72	1.51±0.62
	低剂量组	7.04±2.38	7.90±6.13	5.94±3.33	42.91±11.34	10.15±5.61	1.29±0.74
	中剂量组	13.32±8.06	10.02±8.52	7.12±3.58*	42.85±9.09	8.23±7.83*	1.76±1.02
	高剂量组	15.92±6.25*	7.11±1.52	12.48±8.27*	36.45±14.20	5.62±2.09*	2.27±0.77*

注:\*表示与对照组比较, $P<0.05$

T细胞比例增高,NK细胞比例降低,与对照组比较差异有统计学意义( $F=6.372, P<0.05; F=3.247, P<0.05$ )。

### 2.8 肠液中SIgA浓度测定

由图5可知,各剂量组雌雄大鼠肠液中SIgA浓度与对照组比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

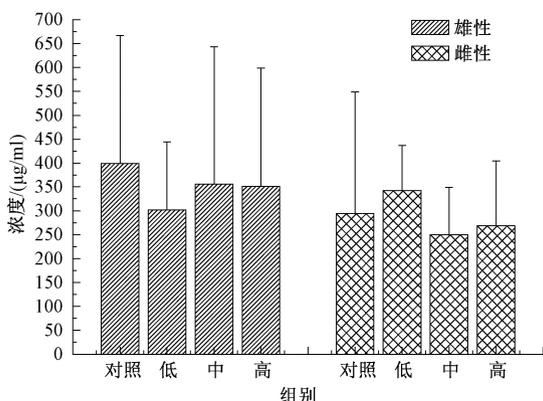


图5 纳米氧化锌对大鼠肠液中SIgA浓度的影响

Figure 5 Effect of zinc oxide nanoparticles on the concentration of SIgA in the intestinal fluid of rats

### 3 讨论

纳米氧化锌由于其良好的抑菌效果在食品领域广泛应用,但也增加了人体的暴露机会,其潜在的毒性作用近年来备受关注。目前对纳米氧化锌经口毒性研究主要有急性毒性、亚急性毒性、亚慢性毒性,结果表明经口摄入一定剂量的纳米氧化锌可引起动物肝、肾、脾、胃肠道、胰腺等器官损伤<sup>[4,8,11]</sup>,因此,本研究通过连续灌胃给予大鼠纳米氧化锌28d,研究纳米氧化锌的短期经口毒性及其对肠道免疫的影响,为研究纳米氧化锌长期经口毒性积累基础数据。

纳米颗粒的毒性与其理化性质(化学成分、粒径、表面电荷及团聚性等)密切相关。由于纳米颗粒的团聚性,分散介质也会影响纳米颗粒的水合粒径<sup>[12]</sup>,而纳米材料是否发生团聚则会影响其毒性作用<sup>[13]</sup>,本实验室前期研究发现纳米氧化锌在不同的分散剂(水、生理盐水、PBS、0.5%GLU和0.5%GLU+3%FBS)中团聚性不同<sup>[14]</sup>,最终选择对纳米氧化锌分散性较好的0.5%GLU+3%FBS作为分散剂,纳

米氧化锌初级粒径为  $(25.3 \pm 5.8)$  nm, 配制成混悬液后水合粒径为 200 nm 左右, 纳米氧化锌浓度在 35 mg/ml 及以下浓度时团聚程度保持稳定。

本研究将纳米氧化锌以 87.5、175 和 350 mg/kg BW 灌胃给予大鼠 28 d, 大鼠体质量、进食量、脏器重量、血液学和血生化指标均未见有意义的异常改变。组织病理学检查结果显示, 纳米氧化锌可引起大鼠胃肠道上皮细胞脱落及黏膜下层以嗜酸性粒细胞为主的炎细胞浸润和水肿等损伤。WANG 等<sup>[11]</sup>研究了纳米氧化锌对小鼠的经口急性毒性, 发现纳米氧化锌可引起胃肠道炎症反应。KONG 等<sup>[4]</sup>的研究表明, 经口摄入纳米氧化锌导致大鼠胃部肿胀和小肠上皮细胞脱落。PARK 等<sup>[8]</sup>在纳米氧化锌 90 d 经口毒性试验中也发现大鼠胃黏膜下水肿并有炎症发生。本研究中胃肠道损伤的结果与文献报道结果基本一致。纳米材料的毒性受到其物理化学因素的双重影响<sup>[15]</sup>, 梅兴国等<sup>[16]</sup>提出物理损伤是纳米毒性的根源, 纳米粒子引起的物理损伤主要包括粘附、膜损坏和大分子卡钳。KIM 等<sup>[7]</sup>和 PARK 等<sup>[8]</sup>在纳米氧化锌 90 d 经口毒性试验中发现胃黏膜病变在恢复期恢复正常, 可能是由纳米氧化锌连续刺激引起的。本研究并未发现与一般毒性有关的血液学、血生化等指标的改变, 因此, 推测本研究中胃肠道上皮细胞脱落、水肿等可能是由纳米氧化锌造成的物理损伤。

肠道是机体消化吸收的重要场所, 是与经口摄入的纳米材料接触最多的部位, 同时肠道黏膜免疫系统是机体内最大的免疫系统, 然而目前纳米颗粒对肠道免疫影响的研究不足。肠道免疫屏障由肠上皮细胞、肠上皮内淋巴细胞、固有层淋巴细胞、派氏结和肠系膜淋巴结等肠道组织及肠道 SIgA 构成<sup>[17]</sup>。其中派氏结是小肠内诱导免疫应答的重要部位, 派氏结中 B 淋巴细胞分化为浆细胞, 是 SIgA 的主要来源, 而 SIgA 是肠黏膜的主要免疫球蛋白, 发挥免疫调节作用<sup>[18]</sup>。杨鹏飞<sup>[19]</sup>将纳米氧化锌灌胃给予小鼠, 发现纳米氧化锌可上调小肠组织中 SIgA 的基因表达, 增加小肠液中 SIgA 的分泌, 并促进或抑制小肠组织中相关炎症因子的表达。本研究中, 纳米氧化锌经口摄入对大鼠肠液中 SIgA 含量和派氏结淋巴细胞分型中 B 细胞比例均未见影响。NK 细胞是一类无需预先致敏即可直接杀伤靶细胞效应的淋巴细胞, 具有非特异性杀伤作用, T 细胞作为免疫调节细胞在机体的细胞免疫和体液免疫中均有重要作用<sup>[20]</sup>。本研究中, 经口摄入纳米氧化锌导致大鼠小肠派氏结淋巴细胞分型中 T 细胞比例增高、NK 细胞比例降低, 可能对肠道免疫产生一定

影响。

综上所述, 研究表明, 纳米氧化锌可引起大鼠胃肠道细胞脱落及胃黏膜下层水肿等病理改变, 同时通过引起雄性大鼠派氏结中 T 细胞比例增高、NK 细胞比例降低, 提示纳米氧化锌的摄入可引起胃肠道的毒性作用并对肠道免疫产生影响, 其长期摄入对机体的毒性作用及其发生机制有待进一步探索研究。

## 参考文献

- [1] 王馨悦. 对纳米材料应用与发展的探究[J]. 当代化工研究, 2018(12):166-167.
- [2] MOHD K Y, GUPTA P, BIHARI B, et al. A review-miracle of nanotechnology in cosmetics [J]. About Research Journal of Topical and Cosmetic Sciences, 2014, 5 (1): 15-21.
- [3] 孔子浩, 王振宇, 陈妮, 等. 纳米氧化锌在食品中的应用及毒理学研究进展[J]. 保鲜与加工, 2019, 19(2): 174-178.
- [4] KONG T, ZHANG S H, ZHANG J L, et al. Acute and cumulative effects of unmodified 50-nm nano-ZnO on mice [J]. Biological Trace Element Research, 2018, 185 (1): 124-134.
- [5] MIRHOSSEINI M, FIROUZABADI F B. Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens [J]. International Journal of Dairy Technology, 2013, 66 (2): 291-295.
- [6] KO J W, HONG E T, LEE I C, et al. Evaluation of 2-week repeated oral dose toxicity of 100 nm zinc oxide nanoparticles in rats [J]. Laboratory Animal Research, 2015, 31 (3): 139-147.
- [7] KIM Y R, PARK J I, LEE E J, et al. Toxicity of 100 nm zinc oxide nanoparticles: a report of 90-day repeated oral administration in Sprague Dawley rats [J]. International Journal of Nanomedicine, 2014, 9 (2): 109-126.
- [8] PARK H S, SHIN S S, MEANG E H, et al. A 90-day study of subchronic oral toxicity of 20 nm, negatively charged zinc oxidenanoparticles in Sprague Dawley rats [J]. International Journal of Nanomedicine, 2014, 9(2): 79-92.
- [9] 孔雪英, 杨怀珍, 周晏阳, 等. 消化道、呼吸道黏膜免疫系统研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(12): 68-72.
- [10] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Repeat dose 28-day oral toxicity study in rodents (OECD TG 407) [R]. Paris: OECD, 2018:477-489.
- [11] WANG B, FENG W Y, WANG T C, et al. Acute toxicity of nano-and micro-scale zinc powder in healthy adult mice [J]. Toxicology Letters, 2006, 161 (2): 115-123.
- [12] BIHARI P, VIPPOLA M, SCHULTES S, et al. Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies [J]. Particle & Fibre Toxicology, 2008, 5(1): 14-27.
- [13] KOENEMAN B A, ZHANG Y, HRISTOVSKI K, et al. Experimental approach for an in vitro toxicity assay with non-aggregated quantum dots [J]. Toxicology in Vitro, 2009, 23 (5): 955-962.
- [14] LIANG C L, HU J, ZHANG X P, et al. Optimized procedure to obtain good dispersion of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles for toxicity evaluation [J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and

- Medicine, 2018, 14 (5):1788.
- [15] European Food Safety Authority Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain [R]. EFSA Journal, 2011,9 (5): 2140.
- [16] 梅兴国,杨臻博,李明媛,等. 物理损伤——纳米毒性的根源[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2014,28(2):154-160.
- [17] 戈娜,袁慧. 肠道免疫屏障功能损伤的研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技,2008,33(1):9-11.
- [18] 王晓东,黄志华. SIgA 在肠道免疫中的作用[J]. 国际消化病杂志,2006,26(5):339-341.
- [19] 杨鹏飞. 纳米氧化锌在小鼠小肠中的吸收转运及对肠道免疫影响的研究[D]. 南昌:南昌大学,2017.
- [20] 焦冰清,梁春来,杨辉,等. 硝酸镧对大鼠免疫功能影响[J]. 中国食品卫生杂志,2019,31(2):99-105.

## · 资讯 ·

# 市场监管总局办公厅关于规范使用食品添加剂的指导意见

市监食生〔2019〕53号

各省、自治区、直辖市及新疆生产建设兵团市场监管局(厅、委):

为督促食品生产经营者(含餐饮服务提供者)落实食品安全主体责任,严格按标准规定使用食品添加剂,进一步加强食品添加剂使用监管,防止超范围超限量使用食品添加剂,扎实推进健康中国行动,现提出以下指导意见:

一、食品生产经营者对生产加工的食品应当制定产品标准或者确定产品配方,按照《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》(GB 2760)规定的食品添加剂的使用原则、允许使用的食品添加剂品种、使用范围及最大使用量或残留量,规范使用食品添加剂。

二、食品生产经营者应当加强生产加工制作过程控制,配备符合要求的计量器具,由专人负责投料,准确称量食品添加剂,并做好称量和投料记录,保证食品添加剂的使用符合产品标准或者产品配方。

三、食品生产经营者生产加工食品使用复配食品添加剂的,应当对复配食品添加剂中所包含的各单一品种食品添加剂的实际名称、含量进行确认计算,确保食品中含有的食品添加剂符合食品添加剂使用标准。

四、食品生产经营者应当加强食品原辅料控制和检验,对食品原辅料中带入的食品添加剂合并计算,防止因原辅料带入导致食品添加剂的超范围超限量使用。

五、食品生产经营者生产加工食品应当尽可能少用或者不用食品添加剂。积极推行减盐、减油、减糖行动。科学减少加工食品中的蔗糖含量,倡导使用食品安全标准允许使用的天然甜味物质和甜味剂取代蔗糖。

六、各地市场监管部门应当督促食品生产经营者落实本意见提出的要求,严格按照本意见和食品添加剂使用标准使用食品添加剂,防止超范围超限量使用食品添加剂。

七、各地市场监管部门应当加强监督检查和抽样检验,重点检查产品标准或者产品配方、原辅料及食品添加剂的采购管理和投料使用、产品检验和标签标识等,依法严厉查处超范围超限量使用食品添加剂的违法行为。

市场监管总局办公厅

二〇一九年九月五日

(相关链接: [http://gkml.samr.gov.cn/nsjg/spsc/201909/t20190910\\_306692.html](http://gkml.samr.gov.cn/nsjg/spsc/201909/t20190910_306692.html))