

纳米氧化锌对人肺腺癌细胞 A549 的毒性^{*}

王 琳 王莉娟 张 芳 丁文军[†]

(中国科学院研究生院生命科学院, 北京 100049)

(2008 年 4 月 24 日收稿; 2008 年 5 月 6 日收修改稿)

Wang L, Wang LJ, Zhang F, et al. Cytotoxicity of ZnO nanoparticles in human lung cancer cell lines A549. *Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, 2009, 26(1): 83 ~ 90

摘 要 探讨纳米氧化锌(ZnO)对体外培养的人肺腺癌细胞 A549 的生物学效应. 使用原子力显微镜(AFM)、透射电镜(TEM)和 X 射线衍射仪(XRD)研究纳米 ZnO 颗粒物的理化性质. 然后, 使用 0mmol/L、0.1mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L、5mmol/L、10mmol/L 的纳米 ZnO 处理体外培养的人肺腺癌 A549 细胞, MTT 法测定细胞生长活性. 并且测定 1mmol/L 纳米 ZnO 染毒 24h 后细胞培养液上清中, 乳酸脱氢酶(LDH)和胞内的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的活性, 以及丙二醛(MDA)的含量. 使用透射电镜和流式细胞仪检测细胞凋亡的情况. 荧光染色检测细胞产生活性氧(ROS)的生成. 实验所用的 ZnO 纳米颗粒为长 75nm、直径 20nm 的针状纤锌矿晶体. 细胞实验结果表明, 纳米 ZnO 颗粒对 A549 细胞的生长活性具有明显的抑制作用, 存在剂量-效应关系. 培养液上清中 LDH 活性显著升高($P < 0.05$), 胞内 CAT 活性显著下降、MDA 含量显著升高($P < 0.01$), 但 SOD 活性下降不明显. 荧光染色检测发现染毒后 A549 细胞出现细胞凋亡, 而且细胞内 ROS 的生成与纳米 ZnO 存在剂量-效应关系. 结论是纳米氧化锌诱导人肺腺癌 A549 细胞产生活性氧, 引发细胞凋亡, 并产生细胞毒性.

关键词 纳米氧化锌, 人肺腺癌 A549 细胞, 细胞毒性

中图分类号 R994.6

近几年来, 随着纳米技术的产业化, 纳米材料已经应用于染料、涂料、医药诊断等传统产业中^[1]. 纳米 ZnO 是当前应用前景较为广泛的一种多功能无机材料, 由于其颗粒尺寸的细微化, 比表面积急剧增加, 表面分子排布、电子结构和晶体结构都发生变化, 从而使纳米 ZnO 具有一系列特殊的物理、化学、表面和界面性质, 在磁、光、电、催化等方面具有一般 ZnO 所无法比拟的性能和用途^[2]. 纳米颗粒可在生产和使用过程中直接进入人体, 或通过食物链被摄入人体, 因此, 纳米材料产生的生物效应引起了人们的广泛关注, 尤其是对呼吸系统的影响. 研究发现, 纳米颗粒能大大降低巨噬细胞的吞噬能力, 导致巨噬细胞清除外来异物的能力降低. 纳米颗粒可以穿过肺泡上皮细胞进入肺间质组织中, 引发肺部严重的炎症反应, 导致肺的间质纤维化^[3~5].

在过去的研究中, ZnO 的生物效应主要集中在其抗菌作用上. 研究表明^[6~8], ZnO 对革兰氏阳性和阴性细菌均有抑制作用, 纳米 ZnO 比微米 ZnO 的抑菌作用更加明显. 随着氧化锌纳米颗粒的大规模使用, 纳米 ZnO 的毒性作用越来越受到关注. Wang 等^[2]比较了纳米 ZnO 和微米 ZnO 对小鼠的经口急性毒性作用, 结果表明, 纳米 ZnO 在较低的剂量下对胃、肝、脾、心和胰等脏器造成明显的病理损伤. 体外实

^{*} 973 重大项目(2006CB705603)资助

[†] 通讯联系人, E-mail: dingwj@gucas.ac.cn

验结果表明,纳米 ZnO 具有较强的细胞毒性^[9], $3.75\mu\text{g/g}$ 纳米 ZnO 可使间皮瘤细胞和成纤维细胞的活性明显降低^[10].目前,有关纳米 ZnO 生物效应的研究及其报道还比较少.

本实验选用了纳米 ZnO 作为实验材料,在理化性质表征的研究基础上,使其作用于体外培养的人肺腺癌细胞 A549,探讨纳米 ZnO 粒子对 A549 细胞的生物效应,从体外实验方面评价纳米 ZnO 的细胞毒性.

1 材料与方法

1.1 材料

A549 细胞(购于协和医大基础医学院细胞中心).ZnO 纳米材料(粒径 20nm,购自江苏海泰纳米材料有限公司).

1.2 试剂

A549 细胞培养液:DMEM (Gibco),10% 标准胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限责任公司).胰蛋白酶(Sigma)、噻唑蓝(MTT, Sigma)、二甲基亚砜(DMSO)、羧甲基纤维素钠(CMCC)(北京化学试剂公司).乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(南京建成生物工程研究所),活性氧(ROS)检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究所).所用化学试剂均为分析纯.

1.3 仪器

CO_2 恒温培养箱(MCO-15AC, SANYO, Japan),酶联免疫检测仪(MK3, Thermo, USA),紫外可见分光光度计(TU-1901, 北京普析通用仪器有限责任公司),超声波破碎仪(VCX130, Sonics, USA),透射电子显微镜(CM120, Philips, Netherlands),原子力显微镜(SPM-9500J3, Shimadzu, Japan),动态光散粒度仪(90 plus/BIMAS, Brookhaven, USA),电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, Perkin-Elmer SCIEX Elan 5000, Thornhill, Ontario, Canada),氮吸附比表面仪(ASAP2010, Micromeritics, USA),广角 X 射线衍射仪(D/max 2400, Rigaku, Japan),流式细胞分析仪(FACS420, BD, USA),荧光和化学发光检测仪(Fluoroskan Ascent FL, Thermo, USA).

1.4 实验方法

1.4.1 ZnO 纳米颗粒的表征

使用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)分析纳米 ZnO 材料的纯度,原子力显微镜(AFM)和透射电镜(TEM)表征纳米 ZnO 颗粒的粒径大小和形状,广角 X 射线衍射仪(XRD)分析纳米 ZnO 颗粒的晶体结构.并用氮吸附比表面仪分析纳米 ZnO 颗粒的比表面积,动态光散粒度仪测量纳米 ZnO 悬液中 ZnO 颗粒的粒径分布.

1.4.2 纳米 ZnO 悬液的制备

称取一定质量的纳米 ZnO 颗粒,用含 0.025% 羧甲基纤维素钠的细胞培养液配制终浓度分别为 0.1mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L、5mmol/L、10mmol/L 的纳米 ZnO 颗粒悬浮液,超声处理 30s(每次 5s,间隔 10s)后立即用于细胞染毒.

1.4.3 MTT(噻唑蓝)法检测细胞活性

0.25%胰酶消化收集对数生长期 A549 细胞,用 DMEM 培养液配制细胞悬液,调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,接种于 96 孔细胞培养板内($100\mu\text{L}/\text{孔}$), 37°C 恒温培养 12h.对照组换用 $100\mu\text{L}$ 含 0.025% 羧甲基纤维素钠的细胞培养液,实验组换用 $100\mu\text{L}$ 上述 5 个浓度的纳米 ZnO 颗粒悬浮液,培养 12h 后加入 MTT 溶液(5g/L) $10\mu\text{L}/\text{孔}$,培养 4h,去上清,每孔加入 DMSO $150\mu\text{L}$,轻微震荡 30s,每孔吸出 $100\mu\text{L}$ 于酶标条中,然后用酶标仪测定 570nm 处吸光度值(OD).以同样的方法检测与 ZnO 共同培养 24h、36h、48h 的细胞活性.以细胞活性百分比作为纳米颗粒对细胞活性影响的评价指标,其计算公式为:细胞活性百分比 (%) = (染毒组各孔 OD 值 - 空白 OD 值)/(对照组 OD 均值 - 空白 OD 值) $\times 100\%$,对照组细胞活性百分

比为 100% .

1.4.4 细胞生化指标的检测

1mmol/L 纳米 ZnO 悬液染毒处理 A549 细胞 24h 后,收集培养液上清,按照 LDH 试剂盒使用说明进行检测;细胞经过超声破碎,按照 SOD、CAT、MAD 试剂盒操作说明测定胞内的 SOD、CAT 活性和 MAD 含量.

1.4.5 细胞内活性氧含量的检测

用 0.1mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L 纳米 ZnO 悬液染毒 A549 细胞后,用活性氧检测试剂盒检测 A549 胞内活性氧浓度.

1.4.6 细胞凋亡检测

1mmol/L 和 5mmol/L 纳米 ZnO 悬液染毒处理 A549 细胞 12h 后,使用流式细胞仪检测细胞凋亡.

1.5 统计分析

实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示.使用 SPSS13.0 进行单因素方差分析 (One way AMOVA), $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义, Pearson 检验相关性.

2 结果

2.1 ZnO 纳米颗粒的表征

使用 ICP-MS 分析纳米 ZnO 的化学成分,几种杂质金属的含量如表 1 所示.该结果表明,纳米 ZnO 的纯度很高,大于 99.8% .在纳米 ZnO 粒径大小的表征分析中,首先用 AFM 表征纳米 ZnO 的粒径大小,结果表明,纳米 ZnO 平均粒径为 (45 ± 27) nm.然后用 TEM 表征纳米 ZnO 的粒径大小及晶体形状,图 1 结果说明纳米 ZnO 颗粒发生聚集,其单个粒子为针状的纤锌矿晶体,长约 75nm,直径约为 20nm.这与商家标定的 20nm 尺寸存在一定的差异.为此,我们采用广角 X 射线衍射仪分析纳米 ZnO 的晶体形状. XRD 谱 (图 2) 表明,比对证实纳米 ZnO 为具有六方形晶胞的纤锌矿晶体^[11].采用快速比表面积和孔径分布测定仪测定纳米 ZnO 的比表面积,分析结果为 35.34m²/g.采用动态光散粒度仪测量了各浓度纳米 ZnO 悬液中的颗粒粒径,结果各浓度 ZnO 悬液中 ZnO 的粒径在 150 ~ 400nm 之间,最终保持在 350nm 左右.结果表明,纳米 ZnO 在 DMEM 细胞培养液中发生了聚集,加入 0.025% 羧甲基纤维素钠再经过超声处理后, ZnO 颗粒可以较稳定的在溶液中分散和悬浮.



图 1 ZnO 纳米颗粒的透射电镜照片

表 1 ZnO 纳米颗粒中杂质金属的含量 (%)					
Mn	Fe	Ni	Cu	Pb	Ca
0.000174	0.006471	0.001617	0.000447	0.022828	0.162748

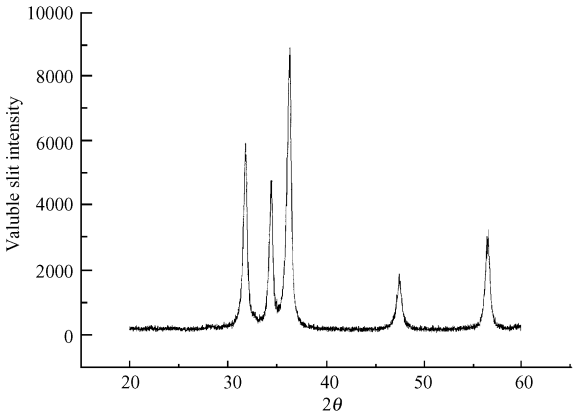


图 2 ZnO 纳米颗粒的 X 射线衍射图谱

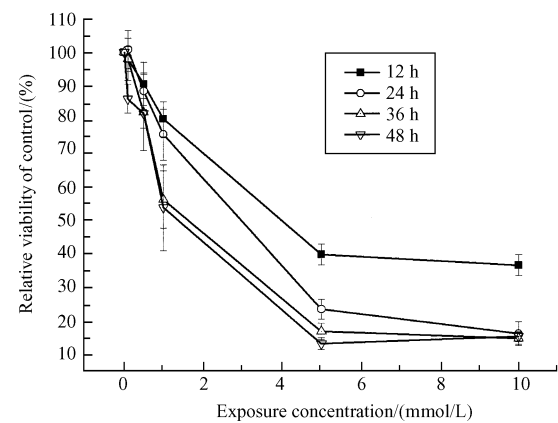


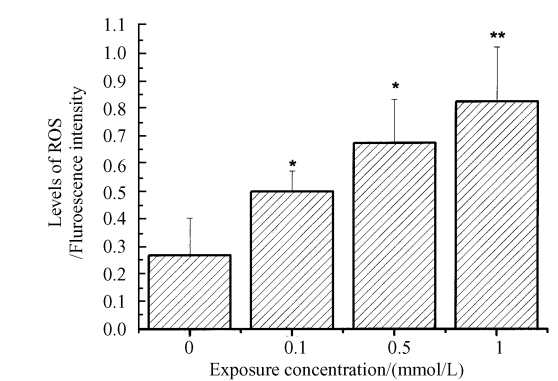
图 3 不同浓度的纳米 ZnO 对 A549 细胞活性的影响

组($P < 0.01$),MDA 含量明显高于对照组($P < 0.01$),SOD 的活性低于对照组,但无统计学意义($P > 0.05$).

表 2 纳米 ZnO 对 A549 细胞生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Group	LDH/(U/L)	CAT/(U/mg)	SOD/(U/mg)	MDA(μ mol/g)
Control	333.48 \pm 14.79	3.55 \pm 0.31	22.91 \pm 2.03	0.253 \pm 0.014
ZnO(1mmol/L,24h)	371.57 \pm 19.39*	1.68 \pm 0.19**	20.57 \pm 1.99	0.34 \pm 0.04**

* 实验组与对照组比较 $P < 0.05$; **实验组与对照组比较 $P < 0.01$.



* 实验组与对照组相比 $P < 0.05$; **实验组与对照组相比 $P < 0.01$.

图 4 纳米 ZnO 对 A549 细胞产生 ROS 的影响

2.2 纳米 ZnO 对 A549 细胞活性的影响

如图 3 所示,MTT 实验的结果表明,在不同时间点 A549 细胞的活性均随着纳米 ZnO 剂量的增大而显著降低,细胞活性与纳米 ZnO 浓度之间为显著负相关($r = -0.898, P < 0.01$).纳米 ZnO 浓度为 1mmol/L 时,细胞的活性与染毒时间之间为显著负相关($r = -0.988, P < 0.01$);当纳米 ZnO 浓度为 5mmol/L 时,A549 细胞的活性明显降低.

2.3 纳米 ZnO 对 A549 细胞生化指标的影响

A549 细胞经 1mmol/L 纳米 ZnO 悬液染毒处理 24h 后,其 LDH、SOD、CAT、MDA 的变化情况见表 2 所示.染毒组细胞培养液上清中的 LDH 活性显著高于对照组($P < 0.05$).染毒组细胞内的 CAT 活性极显著地低于对照组

2.4 纳米 ZnO 对 A549 细胞产生 ROS 的影响

用 0.1mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L 纳米 ZnO 悬液染毒 A549 细胞 6h 后,检测细胞产生 ROS 的情况.如图 4 所示,各染毒组细胞产生的活性氧量显著高于对照组($P < 0.05$).当 ZnO 浓度达到 1mmol/L 时,细胞产生的活性氧量极显著高于对照组和其他染毒组($P < 0.01$).ROS 产生的荧光强度与纳米 ZnO 浓度之间为显著正相关($r = 0.935, P < 0.05$).

2.5 纳米 ZnO 对 A549 细胞凋亡的影响

采用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测了 1mmol/L 纳米 ZnO 悬液染毒 A549 细胞 12 h 后的细胞凋亡情况,图 5 中的统计数字表明,对照组仅有 2.72% 的细胞发生凋亡,而染毒组细胞的凋亡率为 17.49%,明显高于对照组.

3 讨论

随着全球范围内纳米科技的发展,人造纳米颗粒的生物学效应越来越引起科学家们的关注.纳米颗粒的毒性受多种因素的影响,如粒径、形状、表面特征(电荷或化学物修饰等)、化学组成等.目前,大多数研究者认为纳米材料的毒性不仅依赖于其小粒径、大的比表面积,而且与纳米粒子自身的一些理化性质,如晶体形状、聚合态、表面电荷等有关^[10].研究表明,纳米颗粒的表面特征是影响其毒性大小的主要因素之一^[12~14].因此,纳米材料的性质对其毒性效应的研究是至关重要的.如果一项毒理学效应研究没有对所用材料的性质进行表征,那么该研究将毫无意义^[15].纳米材料的表征研究不仅包括其物理化

学特性,而且还要对其纯度、晶体形状、表面积、粒度分布和分散状态等进行研究^[16].纳米氧化锌晶体本身由于制备条件的不同,其形貌会发生很大的变化,并影响其生物效应的研究.在本研究中,我们首先对所用的纳米 ZnO 进行了较为详细的表征.TEM 的结果表明,实验所用 ZnO 是一种针状的晶体结构,不同于普通球形颗粒^[17].该晶体形态有可能对细胞膜造成严重的机械损伤,从而增大其细胞毒性作用^[10].氧化物金属纳米颗粒在生物体液环境中的聚集是一种固有的物理特性,本实验选用了羧甲基纤维素钠作为分散剂,使得纳米 ZnO 在细胞培养液中稳定分散.我们研究发现,0.025%的羧甲基纤维素钠既能够使纳米 ZnO 稳定在 350nm 左右,也能减少分散剂对细胞生长的影响.

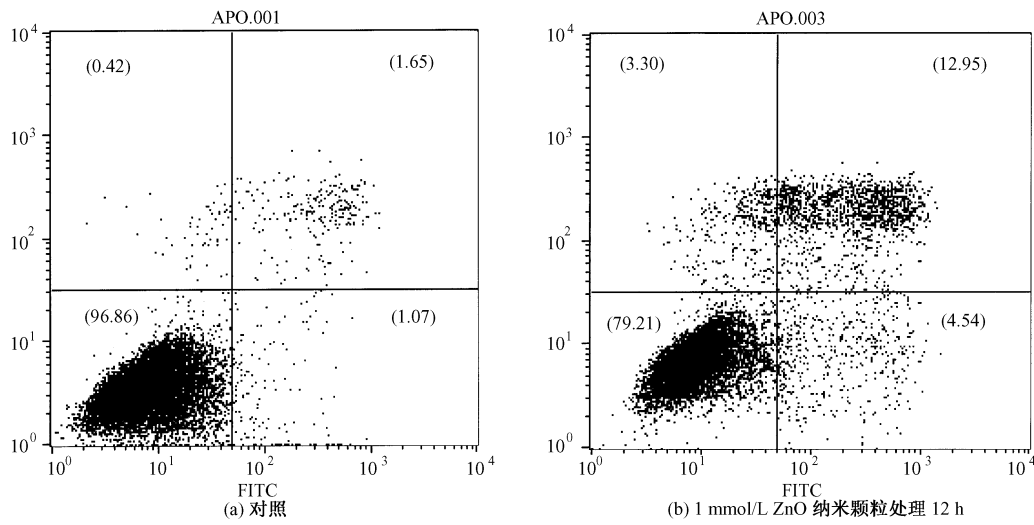


图 5 流式细胞仪检测 A549 细胞凋亡

人肺腺癌细胞 A549 作为一种肺上皮细胞在肺毒理学的体外研究中得到广泛使用^[18~20].该细胞易于培养,对外加作用因子较为敏感,比较适用于纳米材料的体外毒性作用研究.

在纳米 ZnO 对细胞生长代谢状态影响的研究中,MTT 方法可用于评价细胞的存活率^[20].实验结果表明,纳米 ZnO 颗粒在各个时间点对培养的 A549 细胞产生很强的毒性,细胞活性与纳米 ZnO 浓度呈负相关性.与纳米 SiO₂、TiO₂ 等材料相比^[16],纳米 ZnO 具有很强的细胞毒性.此外,乳酸脱氢酶(LDH)为胞浆酶,当细胞膜受损或通透性增加时可漏出至细胞外,导致细胞外液中 LDH 的活性明显增加,因此,细胞培养液上清中 LDH 活性的大小可反映细胞膜的受损程度,而膜通透性的改变是许多毒性物质作用于细胞膜时的一种常见的早期反应,能够表明细胞的损伤程度^[17].本研究的 LDH 检测结果显示,纳米 ZnO 染毒组 A549 细胞膜的损伤程度明显高于对照组.该结果提示纳米颗粒影响细胞膜结构的完整性并对细胞造成毒性损伤.

目前的研究显示,纳米颗粒引起的活性氧(ROS)可能是纳米颗粒产生细胞毒性的主要原因之一^[21].吴凯等发现,纳米颗粒表面的电子受体和供体活动位点能与分子氧(O₂)发生作用,形成超氧离子,并通过歧化反应产生过量的 ROS,过量的 ROS 可以使细胞或机体内的氧化压力增加,并对核苷酸进行攻击,导致 DNA 断裂^[22].丙二醛(MDA)作为细胞发生脂质过氧化反应的代表性产物,是氧化损伤的标记物,其生成量是一个反映体内 ROS 生成量的间接指标^[23].在细胞抗氧化反应方面,超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)作为细胞内的氧自由基清除酶可以抵抗超氧阴离子的损伤和分解过氧化氢,减少细胞 DNA 的氧化损伤^[24].本研究发现,染毒组细胞内 ROS 水平显著高于对照组,与 ZnO 的浓度存在显著的正相关关系($r = 0.808, P < 0.05$).而且,细胞内 SOD 和 CAT 的活性均降低,MDA 的含量显著升高.该结果说明,纳米 ZnO 导致细胞产生过量的 ROS,导致细胞内氧化和抗氧化状态失去平衡,发生氧化应激反应^[25,26].由此证实了纳米颗粒引起的活性氧可能是纳米颗粒产生细胞毒性的主要原因之一.

细胞凋亡是细胞受外来或内源性刺激后的一种主动死亡形式. Rahman 等^[27]用粒径小于 20nm 的

TiO₂ 颗粒作用于原代大鼠胚胎纤维原细胞,其微核数目明显升高,DNA 发生变化,细胞核核仁消失,细胞膜起泡,形成小体,DNA 出现梯状的随机断裂.通过 TEM 检测还可发现细胞核染色质聚集,表明纳米 TiO₂ 引发了细胞凋亡.并推测其作用机制可能是反应活性很大的纳米颗粒产生的氧化应激引起细胞膜脂质层的破裂,细胞内钙稳态失去平衡,导致依赖于 Ca²⁺ 离子浓度的核酸内切酶的活化,引起了细胞凋亡^[27].本实验也观察到纳米 ZnO 引起细胞核核仁消失,凋亡细胞数目明显增多,引发体外培养的 A549 细胞发生凋亡.结合细胞氧化指标和细胞活性氧含量检测的结果,我们认为,纳米 ZnO 产生的氧化应激与 A549 细胞的凋亡存在着密切联系.

到目前为止,纳米粒子的毒性作用机制仍然没有定论.有的研究者认为纳米材料的毒性作用可能与微粒的表面电荷分布有关^[13].纳米颗粒比表面积较大,电荷不均匀,表面电荷越多,氧化还原能力越强,其生物学毒性效应相应越强^[28].纳米颗粒产生的细胞毒性主要由 2 个方面共同作用:(1)纳米颗粒自身化学组成所产生的化学毒性,例如释放的金属粒子或者颗粒表面催化的化学反应等.(2)纳米颗粒的大小、表面或形状等因素造成的机械损伤作用.但是,这 2 个方面的作用并不是完全独立的^[10].本文的研究结果显示,实验采用的针状纤锌矿纳米 ZnO 颗粒对 A549 细胞产生了很大的毒性作用.分析其原因一方面可能是由于 Zn²⁺ 在胞外或者胞内的聚集,对细胞产生化学损伤;另一方面则可能是由于纳米 ZnO 颗粒的特殊形状所引起的机械损伤.该梭状的颗粒结构两端很尖,在与细胞接触时,很容易刺伤细胞膜或者进入到细胞内损伤胞内的功能性结构^[29].

综上所述,纳米氧化锌可以降低体外培养 A549 细胞的生长活性,破坏细胞膜的完整性.纳米 ZnO 产生的氧化应激诱导细胞发生凋亡,产生细胞毒性.由此可见,纳米材料的毒性大小与粒径、形状及化学组成等因素相关,其细胞毒性的作用机制尚需作进一步的细致研究和探讨.

参考文献

- [1] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 2005, 113:823 ~ 839
- [2] Wang B, Feng WY, Wang M, *et al.* Acute toxicological impact of nano-and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *Nanopart Res*, 2007, DOI 10.1007/s1105-007-9245-3
- [3] Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence and lung injury. *Environ Health Perspect*, 1994, 102(suppl.5):173 ~ 179
- [4] Renwick LC, Brown DM, Clouter A, *et al.* Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med*, 2004, 61:442 ~ 447
- [5] Wiethoff AJ, Reed KL, Webb TR, *et al.* Assessing the role of neutrophil apoptosis in the resolution of particle-induced pulmonary inflammation. *Inhal Toxicol*, 2003, 15:1231 ~ 1246
- [6] Sawai J, Igarashi H, Hashimoto A, *et al.* Effect of ceramic powders on spores of *Bacillus subtilis*. *Chem Eng Japan*, 1995, 28:288 ~ 293
- [7] Sawai J, Igarashi H, Hashimoto A, *et al.* Effect of particle size and heating temperature of ceramic powders on antibacterial activity of their slurries. *Chem Eng Japan*, 1996, 29:251 ~ 256
- [8] Zhang LL, Jiang YH, Ding YL. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Nanoparticle Research*, 2007, 9:479 ~ 489
- [9] Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in *Vitro* measurements to in *Vivo* pulmonary toxicity profiles. *Toxicological Sciences*, 2007, 97(1):163 ~ 180
- [10] Brunner TJ, Wick P, Manser P, *et al.* In *Vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol*, 2006, 40:4374 ~ 4381
- [11] 聂登攀, 薛涛, 曾舒, 等. 纳米氧化锌的结构分析. 贵州工业大学学报, 2006, 35(2):27 ~ 28
- [12] Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biol Med*, 2003, 34:1507 ~ 1516
- [13] Sayes CM, Liang F, Hudson JL, *et al.* Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in *Vitro*. *Toxicol Lett*, 2006, 161:135 ~ 142
- [14] Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot

- nanoparticles in epidermal keratinocytes. *Invest Dermatol*, 2007, 127(1):143 ~ 153
- [15] Power KW, Brown SC, Krishna VB, *et al.* Forum series: research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part VI: Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol Sci*, 2006, 90(2):296 ~ 303
- [16] Soto KF, Carrasco A, Powell TG, *et al.* Comparative *in Vitro* cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *Nanoparticle Research*, 2005, 7:145 ~ 169
- [17] 杨 辉, 杨丹凤, 张华山, 等. 4 种典型纳米材料对小鼠胚胎成纤维细胞毒性的初步研究. 生态毒理学报, 2007, 2(4):428 ~ 434
- [18] Stearns RC, Paulauskis JD, Godleski JJ. Endocytosis of Ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24:108 ~ 115
- [19] Bitterle E, Karg E, Schroepel A, *et al.* Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the air-liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles. *Chemosphere*, 2006, 65:1784 ~ 1790
- [20] Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, *et al.* Correlating nanoscale titania structure with toxicity: A cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci*, 2006, 92(1):174 ~ 185
- [21] Nel A, Xia T, Madler L, *et al.* Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 2006, 311: 622 ~ 627
- [22] 吴 凯, 杨光涛, 娄小华, 等. 甲醛致小鼠肺 DNA 蛋白质交联和 DNA 断裂效应的研究. 公共卫生与预防医学, 2006, 17(2):15 ~ 21
- [23] 李 岩, 彭光银, 何胡军, 等. 碳纳米管导致小鼠肺部急性氧化损伤作用的研究. 生态毒理学报, 2006, 1(4):357 ~ 361
- [24] Kinnula VL. Oxidant and antioxidant mechanisms of lung disease caused by asbestos fibres. *European Respiratory Journal*, 1999, 14:706 ~ 716
- [25] Manna SK, Sarkar S, Wise K, *et al.* Single-walled carbon nanotube induce oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kB in human keratinocytes. *Nano Letters*, 2005, 9:1676 ~ 1684
- [26] Brown DM, Donaldson K, Borm PJ. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286:344 ~ 353
- [27] Rahman Q, Lohani M, Dopp E, *et al.* Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in syrian hamster embryofibroblasts. *Environ Health Perspect*, 2002, 110(8):797 ~ 800
- [28] 刘云波, 孟金萍, 孙淑华, 等. 纳米二氧化钛对人皮肤基底细胞癌和胚胎皮肤成纤维细胞的生物学效应. 毒理学杂志, 2007, 21(3):180 ~ 182
- [29] Papageorgiou I, Brown C, Schin R, *et al.* The effect of nano -and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts *in Vitro*. *Biomaterials*, 2007, 28:2946 ~ 2958

Cytotoxicity of ZnO nanoparticles in human lung cancer cell lines A549

WANG Lin WANG Li-Juan ZHANG Fang DING Wen-Jun[†]

(College of Life Sciences, Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The aim of the study was to investigate the toxic effects of nanosized ZnO *in Vitro*. Characterization of ZnO nanoparticles was carried out by atomic force microscope (AFM), transmission electron microscope (TEM) and X-ray diffraction (XRD). In this study, lung cancer cell lines A549 were exposed to 0mmol/L, 0.1mmol/L, 0.5mmol/L, 1mmol/L, 5mmol/L, 10mmol/L of ZnO nanoparticles, respectively. MTT assay was performed to evaluate the viabilities of ZnO-treated cells after 12 h, 24 h, 36 h and 48 h exposure. The activities of lactate dehydrogenase (LDH), cellular superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA) were determined after exposure to 1mmol/L ZnO for 24h. Moreover, apoptotic characteristics and reactive oxygen species (ROS) production in A549 cells were measured. ZnO nanoparticles were needlelike crystals (75nm length; 20nm diameter). The viability of A549 cells were reduced after being exposed to ZnO nanoparticles in a dose-dependent manner. The activities of LDH and the levels of MDA were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), respectively. However, the activities of CAT were significantly decreased ($P < 0.01$). No significant difference in the activities of SOD was observed between the ZnO-treated cells and the controls. ZnO nanoparticles at 1mmol/L induced apoptosis in A549 cells. The levels of ROS in ZnO-treated cells were significantly higher than those in controls. These results suggested that ZnO nanoparticles could result in apoptosis in A549 cells through oxidative stress.

Key words ZnO nanoparticles, human lung cancer cell lines A549, cytotoxicity