

# 纳米二氧化硅对体外培养 A549 细胞氧化应激与凋亡的影响

张士涵, 梁雪, 汪岩, 陆杰, 姚影, 吴添舒, 张婷, 薛玉英, 唐萌

## 摘要:

[目的] 研究纳米二氧化硅染毒对人肺腺癌 A549 细胞氧化应激与凋亡的影响。

[方法] 用质量浓度(后称“浓度”)为 25、50、100、200 mg/L 的纳米二氧化硅溶液染毒 A549 细胞, 染毒时长为 24、48 h, 对照组不予处理。用荧光显微镜观察细胞形态变化; 采用细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK-8)检测各组在各时间段的细胞存活率并计算出细胞抑制率与半数抑制浓度( $IC_{50}$ ), 绘制细胞抑制百分率曲线; 用试剂盒检测各组细胞丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)及乳酸脱氢酶(LDH)活性; 采用流式细胞术检测各组细胞活性氧(ROS)含量和细胞凋亡率。

[结果] 纳米二氧化硅染毒 A549 细胞 24、48 h 后, 随着染毒浓度的升高, 细胞形态发生改变, 细胞出现皱缩、空泡。染毒 24、48 h 后, 与对照组比较, 各剂量组 A549 细胞抑制率均明显增加( $P < 0.05$ ),  $IC_{50}$  分别为 125.8、50.83 mg/L。染毒 24、48 h 后, 与对照组相比, 各浓度染毒组 MDA 含量、LDH 活性随着染毒浓度的升高而升高( $P < 0.05$ ), 而 SOD 活性随着染毒浓度升高呈下降趋势( $P < 0.05$ )。ROS 含量与凋亡率检测结果显示, 与对照组相比, 染毒 24、48 h 的染毒组中 ROS 与细胞凋亡率随着染毒浓度升高而升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

[结论] 纳米二氧化硅能够损伤 A549 细胞的细胞膜, 产生氧化应激反应并刺激 ROS 的释放, 引起细胞凋亡甚至死亡。

关键词: 纳米二氧化硅; A549 细胞; 氧化应激; 细胞凋亡

引用: 张士涵, 梁雪, 汪岩, 等. 纳米二氧化硅对体外培养 A549 细胞氧化应激与凋亡的影响[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(5): 449-453. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16814

**Oxidative damage and apoptosis induced by silica nanoparticles in A549 cells *in vitro*** ZHANG Shi-han, LIANG Xue, WANG Yan, LU Jie, YAO Ying, WU Tian-shu, ZHANG Ting, XUE Yu-ying, TANG Meng (School of Public Health, Collaborative Innovation Center of Suzhou Nano Science and Technology, Key Laboratory of Environmental Medicine and Engineering, Ministry of Education, Jiangsu key Laboratory for Biomaterials and Devices, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China). Address correspondence to TANG Meng, E-mail: tm@seu.edu.cn · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

## Abstract:

[Objective] To assess the effects of silica nanoparticles on oxidative damage and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells.

[Methods] A549 cells were treated with silica nanoparticles at mass concentrations of 25, 50, 100, and 200 mg/L, respectively, for 24 and 48 h, and the control group was exposed to the culture media without silica nanoparticles. The morphologies of A549 cells after 24 and 48 h exposure were observed by fluorescence microscope. Cell viability was measured by cell counting kit (CCK-8), cell inhibition rate and 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) were calculated, and the curve of percentage of cell inhibition was also drawn. Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and lactate dehydrogenase (LDH) were detected by commercial kits. Flow cytometry was used to detect reactive oxidative species (ROS) and apoptosis rate.

[Results] After being exposed to silica nanoparticles for 24 and 48 h, the A549 cells showed various morphological changes, including cell vacuolar degeneration and cell shrinkage. The cell inhibition rates were both increased after 24 and 48 h treatment compared with the control group ( $P < 0.05$ ). Moreover, the  $IC_{50}$  of the 24 h exposure group was 125.8 mg/L and that of the 48 h exposure

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划项目(编号: 2011CB933404); 国家自然科学基金项目(编号: 81302461, 81473003, 81502783, 81573186, 31671034, 81673218); 江苏省研究生创新人才培养基金(编号: SJLX15\_0072)

[作者简介] 张士涵(1992—), 男, 硕士生; 研究方向: 纳米毒理学; E-mail: 494145330@qq.com

[通信作者] 唐萌, E-mail: tm@seu.edu.cn

[作者单位] 东南大学公共卫生学院, 苏州纳米科技协同创新中心, 环境医学工程教育部重点实验室, 江苏省生物材料与器件重点实验室, 江苏 南京 210009

group was 50.83 mg/L. The levels of MDA, LDH, ROS, and the apoptosis rates were higher in the groups exposed to higher doses of silica nanoparticles ( $P < 0.05$ ) and the SOD levels showed in an inverse manner ( $P < 0.05$ ).

[ Conclusion ] Silica nanoparticles could change cell morphology, aggregate oxidative stress, increase ROS, and even lead to cell apoptosis and death in A549 cells.

**Keywords:** silica nanoparticle; A549 cell; oxidative stress; cell apoptosis

**Citation:** ZHANG Shi-han, LIANG Xue, WANG Yan, et al. Oxidative damage and apoptosis induced by silica nanoparticles in A549 cells *in vitro*[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(5): 449-453. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16814

纳米二氧化硅作为纳米材料大家族中的一员,因其化学纯度高、性质稳定、生物相容性好等诸多优异特性,而被广泛地运用于医学、生化及日常生活等领域<sup>[1-2]</sup>。与此同时,大量的纳米二氧化硅存在并蓄积于环境中,人们经过呼吸道、口、皮肤等途径接触的机会也大大增加。纳米二氧化硅易沉积于肺组织,与肺泡巨噬细胞以及肺泡上皮细胞相互作用,引起细胞损伤,加剧氧化应激反应,释放细胞因子并进一步导致炎症反应最终可引起肺癌。动物实验研究表明<sup>[3-4]</sup>,经气管灌注染毒的大鼠肺实质会出现肺泡塌陷、肉芽形成、支气管上皮脱落等情况,灌注 30 d 后能够明显见其双肺体积增大与白色病灶,从而对大鼠的肺组织造成严重损伤。体外研究表明<sup>[5-10]</sup>,纳米二氧化硅能够引起细胞的形态变化,降低细胞活力,引起 DNA 损伤、细胞凋亡,但也有研究表明<sup>[11]</sup>,低浓度的纳米二氧化硅对大鼠肺泡 I 型上皮细胞没有明显的毒性,由此可见,现有的研究关于纳米二氧化硅体外毒性的结论并不完全一致。

本研究以平均粒径 30 nm 的纳米二氧化硅为实验材料,通过体外培养,不同时间染毒 A549 细胞的方法,检测氧化应激指标与细胞凋亡情况,从细胞水平探讨纳米二氧化硅的肺毒性,为充分认识纳米二氧化硅肺毒性的作用机制提供毒理学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与材料

A549 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所;纳米二氧化硅(平均粒径 30 nm,纯度 99.9%,结晶型)购自北京德科岛金科技有限公司。

### 1.2 试剂

DMEM 高糖培养基( GE, 美国),胰蛋白酶( Gibco, 美国),胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,中国),磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(博士生物工程技术有限公司,中国),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物研究所,中国),丙二醛

(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒、CCK-8 试剂等(南京建成生物工程研究所,中国),活性氧(reactive oxidative species, ROS)试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒等(杭州联科生物科技股份有限公司,中国)。

### 1.3 仪器

8000 系列 3432 型 CO<sub>2</sub> 培养箱( Thermo Science, 美国),CK40-F200 倒置荧光显微镜( Olympus, 日本),Zetasizer Nano-ZS90 型 Malven 粒度分析仪(马尔文仪器有限公司,英国),TDZ6B-W.S 离心机(上海卢湘离心机仪器有限公司,中国),BS210S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司,中国),KQ2200E 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司,中国),SW-CJ-2F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,中国),酶标仪( Bio Tek, 美国),FACS Canto™ II 流式细胞仪( BD, 美国),JEM-2100 型透射电镜( TEM )( JEOL, 日本)。

### 1.4 试验方法

1.4.1 材料表征 用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)表征纳米二氧化硅颗粒的粒径大小和形状。将纳米二氧化硅材料经高温高压消毒灭菌后,加入无血清 DMEM 培养液中,配成浓度为 200 mg/L 的溶液,超声 30 min 使其充分分散,材料粒径大小通过 Malven 粒径分析仪测得。

1.4.2 细胞培养和分组 A549 细胞用高糖 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)在 37℃、体积分数 5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下传代培养。将细胞分为对照组和 4 个实验组,对照组加入培养液,实验组分别加入 25、50、100、200 mg/L 纳米二氧化硅溶液,每组设定 3 个复孔。用荧光显微镜观察 0、25、50、100、200 mg/L 纳米二氧化硅溶液染毒 24、48 h 后 A549 细胞的形态变化。

1.4.3 细胞活力检测 将 A549 细胞按每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板中,用 25、50、100、200 mg/L 纳米二氧化硅溶液染毒 24、48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8

试剂,继续培养4 h后,采用酶标仪测定450 nm处的光密度 $D$ 值,计算细胞抑制率。公式为:细胞抑制率 $=100\% - [(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$ ,并据此绘制细胞抑制率曲线;采用寇氏法计算出半数抑制浓度( $IC_{50}$ )。

**1.4.4 细胞氧化应激指标检测** 取处于对数生长期的细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^5$ 个/mL,接种于6孔板中,每孔2 mL培养液,25、50、100、200 mg/L纳米二氧化硅溶液染毒24、48 h后,收集细胞。按照MDA、SOD、LDH试剂盒操作说明测定细胞MDA、SOD、LDH含量。采用流式细胞仪检测细胞内ROS含量。

**1.4.5 细胞凋亡检测** 调整A549细胞密度为 $1 \times 10^5$ 个/mL,分别接种于6孔板,每孔2 mL培养液,用25、50、100、200 mg/L纳米二氧化硅溶液染毒24、48 h后收集细胞。将细胞悬浮于200  $\mu$ L结合缓冲液中,加入5  $\mu$ L的膜蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和5  $\mu$ L碘化丙啶(PI),轻轻混匀,室温避光反应15 min。再加入200  $\mu$ L结合缓冲溶液,采用流式细胞仪检测凋亡情况。

## 1.5 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),实验组与对照组之间采用Dunnett- $t$ 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 纳米二氧化硅表征

纳米二氧化硅透射电镜结果见图1。透射电镜结果显示,纳米二氧化硅为球形,分散均匀,平均颗粒粒径为30 nm。Malvern粒径分析仪的结果显示,分散于不含血清的DMEM培养液中的纳米二氧化硅颗粒粒径为 $(855.9 \pm 7.9)$  nm,比原始粒径大。

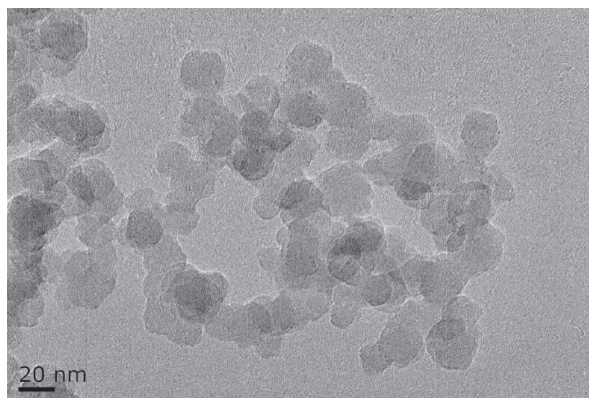
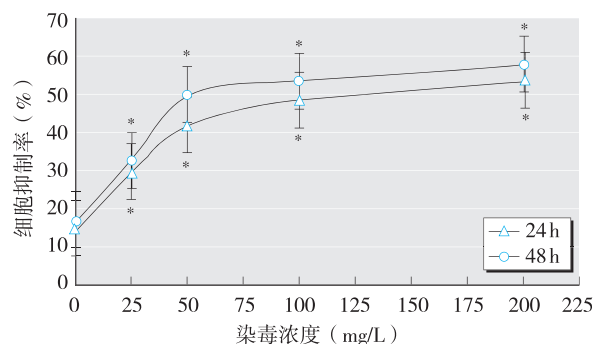


图1 纳米二氧化硅透射电镜图

### 2.2 纳米二氧化硅对A549细胞形态及其活力的影响

纳米二氧化硅染毒A549细胞24、48 h后细胞形态发生改变,随着染毒浓度的升高,细胞出现皱缩,观察到细胞内有大量空泡的产生。

不同浓度纳米二氧化硅染毒A549细胞24、48 h后,细胞抑制百分率结果见图2。与对照组相比较,A549细胞染毒组的抑制率明显增高( $P<0.05$ );在染毒浓度相同的情况下,各组48 h细胞抑制率都高于24 h染毒组,随着染毒浓度的增大,对细胞的抑制也趋于稳定。24 h组 $IC_{50}$ 为125.8 mg/L,48 h组 $IC_{50}$ 为50.83 mg/L。



[注]\*: 与同时时间对照组比较, $P<0.05$ 。

图2 纳米二氧化硅染毒A549细胞24、48 h的细胞抑制率曲线

### 2.3 纳米二氧化硅对A549细胞氧化应激指标的影响

不同浓度纳米二氧化硅染毒A549细胞24、48 h后,细胞MDA、SOD、LDH的变化情况见图3。

如图3(A~C)所示,与对照组相比较,各染毒组随着染毒浓度的升高,MDA含量、LDH活性明显增高( $P<0.05$ );在染毒浓度相同的情况下,各组48 h的MDA含量都高于24 h染毒组。

与对照组相比较,随着染毒浓度的增加,各染毒组细胞内SOD酶活性越来越低,其差异具有统计学意义( $P<0.05$ );相同浓度下,染毒48 h组SOD酶活性比染毒24 h组低。

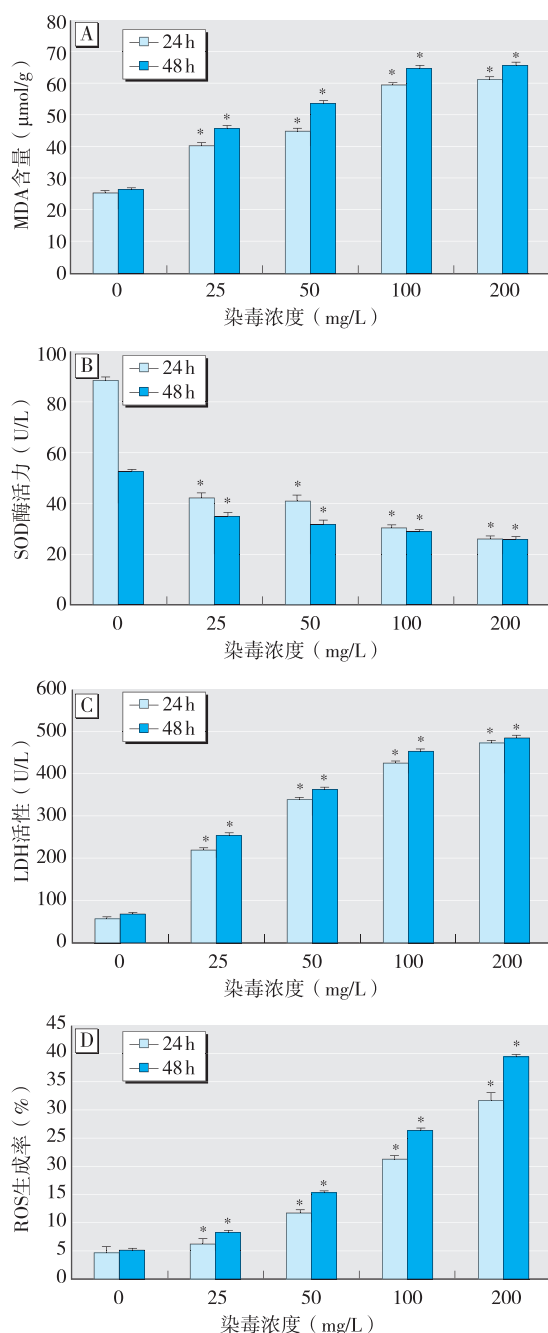
纳米二氧化硅染毒A549细胞24、48 h细胞活性氧(ROS)结果见图3D。与对照组相比较,各染毒组随着染毒浓度的升高,ROS水平明显增高( $P<0.05$ )且有上升的趋势。

### 2.4 纳米二氧化硅对A549细胞凋亡的影响

由表1可见,随着染毒浓度的升高,纳米二氧化硅导致A549细胞的死亡率越来越高。纳米二氧化硅染毒A549细胞24、48 h的细胞凋亡情况见图4。如图4所示,与对照组相比,各染毒组随着染毒浓度的升



高,细胞凋亡率明显升高( $P<0.05$ );在同一浓度内,染毒48h组的细胞凋亡率要高于染毒24h组的细胞。



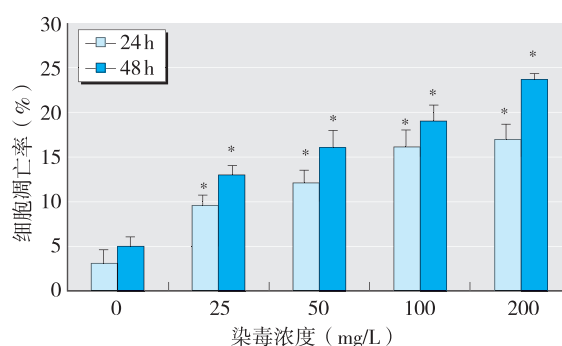
[注]\*: 与同时间对照组比较,  $P<0.05$ 。

图3 纳米二氧化硅染毒A549细胞24、48h细胞氧化应激指标检测结果

表1 纳米二氧化硅染毒A549细胞24、48h的细胞死亡率 ( $n=3$ , %)

| 染毒浓度 (mg/L) | 24h           | 48h           |
|-------------|---------------|---------------|
| 0           | 1.07 ± 0.21   | 2.20 ± 0.20   |
| 25          | 2.80 ± 0.10*  | 3.60 ± 0.40*  |
| 50          | 6.47 ± 0.21*  | 7.63 ± 0.25*  |
| 100         | 10.27 ± 0.51* | 12.60 ± 0.11* |
| 200         | 12.97 ± 1.93* | 18.50 ± 1.14* |

[注]\*: 与同时间对照组比较,  $P<0.05$ 。



[注]\*: 与同时间对照组比较,  $P<0.05$ 。

图4 纳米二氧化硅染毒A549细胞24、48h细胞凋亡率结果

### 3 讨论

人肺腺癌A549细胞作为一种在体外培养的肺上皮细胞,与呼吸性毒物有紧密联系,在毒理学体外研究中得到广泛使用,该细胞易于培养、对外界刺激较为敏感,适合用来做纳米材料体外毒性研究<sup>[12]</sup>。Lin等<sup>[13]</sup>曾研究15、46nm的二氧化硅对A549细胞的毒性作用,发现在10~100mg/L剂量范围内,二氧化硅染毒48h后细胞活力明显降低,呈剂量-反应关系。本实验研究发现经30nm二氧化硅刺激后的A549细胞,在25~200mg/L范围内,染毒24、48h后细胞抑制百分率随着染毒浓度和时间的增加而增加,与Lin等人的研究结果一致。

本研究通过测定纳米二氧化硅染毒后A549细胞MDA、LDH、SOD、ROS的变化水平来反映细胞氧化损伤的程度。MDA是机体在清除自由基过程中发生脂质过氧化的最终产物,是反映细胞受损程度的指标<sup>[14-15]</sup>,随着染毒浓度和时间的升高,MDA含量也逐渐升高,由此可见纳米二氧化硅具有明显细胞毒性并能够损伤细胞膜。LDH是胞浆的标记酶,细胞膜受损后被释放出,细胞外液中LDH活性可反映细胞膜通透性变化和细胞膜受损程度<sup>[16]</sup>。本实验以细胞LDH活性高低来评价纳米二氧化硅对A549细胞损伤程度,实验结果表明25~200mg/L浓度范围内,染毒组的LDH活性与对照组相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且随着染毒浓度和时间的升高,呈现一定的剂量-反应关系。SOD作为细胞内的氧自由基清除酶,可抵抗超氧化物对细胞的损伤,由此推测纳米二氧化硅导致A549细胞内ROS失衡,发生氧化应激反应并进一步引起细胞凋亡。由于纳米二氧化硅的物理刺激以及细胞膜发生脂质过氧化反应,细胞内ROS的产生与清除失去平衡,大量ROS通过氧化细胞中的脱氧

核糖核酸、脂质以及蛋白从而破坏细胞的一些重要功能,对细胞造成损害。本实验结果也表明,纳米二氧化硅能够引起A549细胞内ROS的增加,随着染毒浓度升高、染毒时间延长,细胞内SOD活性明显下降( $P < 0.05$ ),在25~200 mg/L浓度范围内,染毒24、48 h后的细胞凋亡率不断升高,与对照组相比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

综上所述,纳米二氧化硅可引起A549细胞增殖抑制与凋亡,并引起细胞内MDA、SOD、LDH、ROS等指标的变化,推测纳米二氧化硅作用于A549细胞后,细胞内发生氧化应激反应,生成大量ROS并参与脂质过氧化反应,大量的过氧化物与自由基攻击细胞膜并导致细胞膜损坏,LDH渗出,抑制细胞增殖,引起细胞凋亡,严重时导致细胞死亡,而其具体的机制尚有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Sahu D, Vijayaraghavan R, Kannan G M. Silica nanoparticle induces oxidative stress and provokes inflammation in human lung cells[J]. J Exp Nanosci, 2015, 10(13): 983-1000.
- [2] Kim IY, Joachim E, Choi H, et al. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type[J]. Nanomedicine, 2015, 11(6): 1407-1416.
- [3] 应杏秋, 曾群力, 祝慧娟, 等. 纳米SiO<sub>2</sub>与标准SiO<sub>2</sub>致大鼠急性肺损伤的作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(2): 116-117.
- [4] 董静, 陈莹, 金一和, 等. 纳米SiO<sub>2</sub>与常规SiO<sub>2</sub>粉尘致肺纤维化作用的研究[J]. 卫生毒理学杂志, 2004, 18(4): 215-217.
- [5] Kim JE, Kim H, An SS, et al. *In vitro* cytotoxicity of SiO<sub>2</sub> or ZnO nanoparticles with different sizes and surface charges on U373MG human glioblastoma cells[J]. Int J Nanomedicine, 2014, 9(S2): 235-241.
- [6] Gehrke H, Frühmesser A, Pelka J, et al. *In vitro* toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells[J]. Nanotoxicology, 2012, 7(3): 274-293.
- [7] Balakrishnan V, Ab Wab H A, Razak K A, et al. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of colloidal amorphous silica nanoparticles designed for drug delivery on human cell lines[J]. J Nanomater, 2013, 2013: 729306.
- [8] 张帮勇, 李婷竹, 孙晋都, 等. 纳米银对人肺癌和肝癌细胞毒性的差异[J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(3): 195-199, 204.
- [9] 应佳丽, 张婷, 唐萌. 金属氧化物纳米材料对L02细胞和Hep G2细胞毒性预测模型的构建[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(3): 209-214.
- [10] 昂盛骏, 熊雨林, 唐萌. PM<sub>2.5</sub>对人肺腺癌A549细胞iNOS合成的影响及其作用机制[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(5): 433-437.
- [11] 王雯, Günter O, 刘晓梅, 等. 纳米SiO<sub>2</sub>粒子特性及其在无细胞体系中氧化能力的检测及意义[J]. 吉林大学学报(医学版), 2009, 35(2): 242-245.
- [12] 张帮勇, 薛玉英, 唐萌. 纳米银诱导细胞毒性和遗传毒性研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2015, 34(5): 836-840.
- [13] Lin W, Huang Y W, Zhou X D, et al. Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells[J]. Int J Toxicol, 2006, 25(6): 451-457.
- [14] Heikkilä T, Santos H A, Kumar N, et al. Cytotoxicity study of ordered mesoporous silica MCM-41 and SBA-15 microparticles on Caco-2 cells[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2010, 74(3): 483-494.
- [15] Napierska D, Thomassen LC, Rabolli V, et al. Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells[J]. Small, 2009, 5(7): 846-853.
- [16] Xu Y, Wang N, Yu Y, et al. Exposure to silica nanoparticles causes reversible damage of the spermatogenic process in mice[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101572.

(收稿日期: 2016-12-21; 录用日期: 2017-03-21)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 陈姣; 校对: 丁瑾瑜)