

纳米氧化锌对人胚肺成纤维细胞的生物毒性

袁金华¹, 李光¹, 陈慧珍², 查河霞¹, 宋黎军¹

(1. 南京市疾病预防控制中心理化科, 江苏 南京 210003; 2. 中山大学东校区教学实验中心, 广东 广州 510006)

摘要: 【目的】研究化妆品添加剂-氧化锌纳米粒子对正常人胚肺成纤维细胞(HEL F)的生物毒性。【方法】采用 MTT 法检测氧化锌纳米粒子对体细胞存活率的影响;利用光学显微镜评价细胞的形态学变化;电子显微镜观察细胞与纳米氧化锌作用前后表面微结构的变化。【结果】在测试的 2.5 ~ 150 mg·L⁻¹ 浓度范围内,氧化锌纳米粒子对 HEL F 细胞均有抑制作用,细胞毒性呈明显的剂量依赖效应关系。浓度在 20 mg·L⁻¹ 以上时,氧化锌纳米粒子可致使细胞生存率低于 10%。荧光显微镜可见典型的细胞凋亡改变。扫描电子显微镜观察到 HEL F 细胞表面与高浓度纳米粒子作用后产生的纳米级孔。【结论】纳米氧化锌粒子由于小尺寸效应和 Zn²⁺自身毒性的协同作用,高浓度时抑制细胞结活性,致使细胞死亡。在化妆品中添加氧化锌纳米粒子作为紫外屏蔽剂时,建议控制浓度为 20 mg·L⁻¹ 以下。旨在对化妆品生产企业在功效添加方面起到警示作用,也为卫生监督提供理论依据。

关键词: 肺;成纤维细胞细胞;氧化锌纳米粒子;生物毒性;化妆品添加剂

中图分类号: R114 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)02-0170-04

Cytotoxicity on Human Embryonic Lung Fibroblasts of ZnO Nanoparticles in Cosmetics

YUAN Jin-hua¹, LI Guang¹, CHEN Hui-zhen², ZHA He-xia¹, SONG Li-jun¹

(1. Department of Physics and Chemistry, Nanjing Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210003, China;

2. The Education and Experiment Center of East Campus, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: 【Objective】To study the potential biological toxicity of nanosized ZnO particles used as cosmetic additives on human embryonic lung fibroblasts (HEL F) cells. 【Methods】The effect of ZnO nanoparticles on the survival rate of normal cell line HEL F was evaluated by MTT assay. Morphological changes of these cells were evaluated by optical microscope and the surface microstructure of cells before and after nanosized ZnO treatment were observed by scanning electric microscopy (SEM). 【Results】At the concentration of 2.5 ~ 150 mg·L⁻¹, ZnO nanoparticles water suspensions had inhibitory effect on HEL F cells and the cytotoxicity showed an obvious dose-dependent relationship. While the concentrations were more than 20 mg·L⁻¹, ZnO nanoparticles led to the livability of the tested cells lower than 10%. HEL F cells apoptosis could be observed under fluorescence microscope. Furthermore, SEM images showed nanometer holes in HEL F cells surface induced by high-concentration nanoparticles. 【Conclusions】Due to the small size effect and synergistic effect of their toxicity, high-concentration ZnO nanoparticles lead to the inhibition of cell viability and cell death. Therefore, it is suggested that the concentration should be less than 20 mg·L⁻¹ when ZnO nanoparticles were used as the anti-UV agents in cosmetics for the sake of people health. It is to provide some caution in additives in cosmetics industrial enterprise and theoretical basis for health supervision.

Key words: human embryonic lung fibroblasts cell; nanosized ZnO particle; biological toxicity; cosmetic additive

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2009, 30(2): 170-173, 178]

近年来,无机物理防晒剂,主要是纳米氧化锌和二氧化钛粒子,越来越多地应用到防晒护肤品中,有效避免了过量使用复合有机紫外吸收剂导

致的皮肤过敏,安全高效,已成为防晒化妆品抗击紫外线 UVA 的主力^[1-3]。但同时,纳米材料安全性问题引起世人注意。已见报道如,能抑制种子培育

收稿日期:2008-10-26

基金项目:南京市医学重点科技发展项目(ZKX06030);江苏省预防医学科研课题(Y2006026)

作者简介:袁金华,理学博士,研究方向:理化检验。E-mail: njedekitly@163.com

和根生长^[4]、和有较强的抗细菌活性^[5]等。一般认为^[6],常规超微氧化锌是一种生物安全性的较好的一种材料。而纳米氧化锌的生物毒性较为显著,如杨辉等发现^[7],纳米氧化锌随着剂量增加,对小鼠胚胎成纤维细胞毒性作用显著升高。但目前为止,笔者还没发现作纳米氧化锌对人胚肺成纤维细胞(human embryonic lung fibroblast, HELF)毒性的相关测试。本研究以目前市售化妆品用添加剂-氧化锌粒子(约 40 nm)为目标,受试前仅对其进行了 1 h 的紫外消毒杀菌处理,然后以不同浓度与 HELF 作用,得到细胞生存率,利用光学显微镜和扫描电子显微镜观察细胞与纳米氧化锌粒子作用前后的形态,探索出致使细胞凋亡的浓度限量,旨在为防晒化妆品的卫生监督必要的标准依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

RPMI 1640 培养基 (RPMI 1640 10.40 g/L, HEPES 4.70 g/L, NaHCO₃ 2.40 g/L, 青霉素 0.06 g/L, 链霉素 0.15 g/L, 100 mL/L 胎牛血清) 购自 GIBIC (Co. USA)。搅拌溶解后,均用直径为 220 nm 滤膜除菌过滤;氧化锌纳米粉末购自江苏常泰纳米有限公司,直接销售用于化妆品工业生产。扫描电镜(TEM)检测其粒径为 40 nm 左右,X 电子衍射(XRD)分析为的六方晶型纤维 ZnO 结构。受试前紫外照射 1h 消毒杀菌。准确称取 0.012 g,溶解配制 4.0 mL 培养基的无菌管中,作为母液备用。自配无菌 0.01 mol·L⁻¹ PBS 溶液 (NaCl 8.00 g/L, KCl 0.20 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 1.85 g/L, KH₂PO₄ 0.20 g/L)。本实验中使用的细胞 HELF,来自于东南大学吴健雄实验室,在 RPMI-1640 培养基中培养维持,置于 37 °C 和含有体积分数 5% CO₂ 水饱和气氛中培育备用。

1.2 实验方法

1.2.1 人体细胞培养和细胞与纳米材料作用后的生存率实验 将浓度为 2 × 10⁵/mL 的 HELF 细胞种植在无菌 96 孔培养板中,每孔 100 μL,每浓度平行 3 次;同时边缘分别培养基和纯细胞做空白对照。将纳米氧化锌用 RPMI 培养基稀释浓度梯度,使等体积加入到细胞后的最终浓度依次为 (150, 75, 37.5, 18.7, 9.4, 4.7, 2.35, 1.2, 0.6)

mg·L⁻¹,置 37 °C,95%湿度和体积分数 5% CO₂ 恒温细胞培养箱中培养 72 h。再向 96 孔板各细胞孔中加入 20 μL,5 g/L 的新配制的噻唑兰 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT, 贺力士,德国)溶液,重新置于原环境,继续培养 4 h。MTT 是一种接受氢离子的染料黄色化合物,可作用于活细胞线粒体中的呼吸链,在琥珀酸脱氢酶和细胞色素 C 的作用下 tetrazolium 环开裂,生成蓝色的 formazan 结晶。吸出上清液,加入 150 μL DMSO 溶解后,避光放置 30 min 后,利用酶标仪(Bio-rad, USA)测定 590 nm 波长下的光密度 OD 值。得不同孔反应器的光密度(OD)值。取三次 OD 值的平均值。由于死细胞中的琥珀酸脱氢酶消失,不能将 MTT 还原,formazan 结晶的生成量仅与活细胞数目成正比,所以,测得的 OD 值可以细胞存活率形式表示出活细胞数目大小。细胞存活率按以下公式计算:

$$\text{细胞存活率} = A_{\#} / A_{\square} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

公式(1):A_# = 加样孔的 OD 平均值; A_□ = 空白细胞孔的 OD 平均值^[8]

1.2.2 形态学观察 同 1.2.1 细胞操作,将 HELF 分别用 (50, 25, 12.5, 6.25, 1.6)mg·L⁻¹ 五种浓度纳米氧化锌处理 72 h 后,在倒置显微镜下放大 100 倍,观察细胞与氧化锌纳米粒子作用前后的形态细胞集落形态,并拍照记录。

1.2.3 细胞样品的制备及电子显微镜表征 无菌条件下,HELF 细胞种植于 3 mm × 10 mm 玻璃片各四块,各内置 24 孔培养板中培养,以细胞浓度为 2 × 10⁵/mL,每孔 0.1 mL,共 3 孔;周围加无菌水。将纳米 ZnO 用培养基稀释成 25, 12.5 μg/mL,每孔对应依次各加 0.1 mL;空白孔则加等体积培养基。在 37 °C,95%湿度和 5% CO₂ 恒温细胞培养箱中继续培育 24 h。将各孔中上清液吸出弃去,用上述 PBS 溶液洗涤 3 次,每次 5 min;接着用 300 mL/L 乙醇脱水,每次静置 10 min,重复一次;再用 40 mL/L、50 mL/L、60 mL/L、70 mL/L、80 mL/L、90 mL/L、95 mL/L、100 mL/L 乙醇依次脱水,每次均静置 10 min,均重复一次;最后真空干燥(DZF-6020)15 ~ 20 min;取出备用。将样品进行真空喷金层,先在仪器(JEOL, JFC-1600 Auto Fine Coater)中抽真空,当真空度在 10 Pa 以下时,以最小电流 10 mA 连续喷铂 10 次,每次喷 50 s。取出后置于扫描电镜(JSM-5610LV)观察细胞表面微形态。

2 结 果

2.1 细胞生存率

以细胞生存率为纵坐标,对 ZnO 纳米粒子浓度(横坐标)作图,结果如图 1 所示。图中可见,HELFL 细胞与不同浓度的 40 nm 氧化锌纳米粒子相互作用 72 h 后,细胞生存率与纳米氧化锌浓度的增大而急剧减小。当 ZnO 纳米粒子浓度低于 $2.45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞几乎没有明显变化;而当浓度达到约 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率已低于 10%。这表明细胞的生存率受纳米氧化锌浓度影响非常明显。实验过程发现,纳米氧化锌浓度超过 $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,溶液已出现明显浑浊,影响了光线透光率,导致吸光度失真增大。所以,图中显示细胞生存率下降趋势平缓。

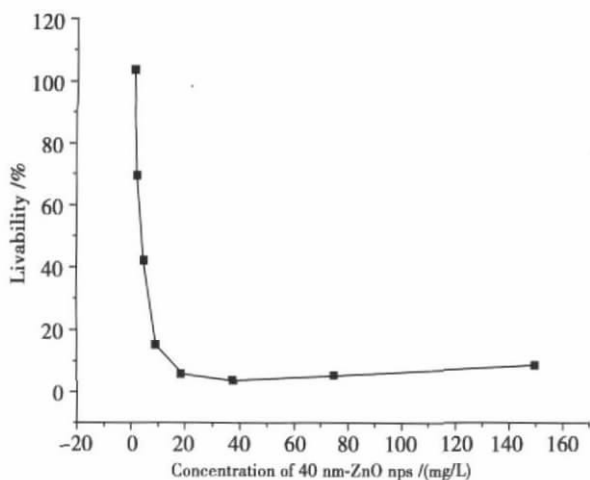


图 1 HELFL 细胞与不同浓度 40 nm 氧化锌纳米粒子作用后的存活率

Fig.1 Livability of HELFL cells with the treatment of 40 nm-ZnO nanoparticles (NPs) at different concentrations

正如文献报道^[7],在较低浓度时,氧化锌纳米粒子的生物安全性是也可靠的。本实验中浓度高于 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,人胚肺成纤维细胞死亡率显著增加。

2.2 光学显微镜下观察细胞形态

HELFL 细胞与不同浓度 ZnO 纳米粒子作用 72 h 小时后,在倒置光学显微镜下,呈现出不同的细胞形态。如图 2 中箭头所示为空白的细胞 HELFL 放大 100 倍后的形态图,形态规则,呈梭形或三角形,胞质透明,细胞完整。HELFL 在经过(1.6,6.25,

12.5,25,50) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 五种浓度纳米氧化锌处理 72 h 后,光镜放大 100 倍分别得图: A、B、C、D、E 五种细胞形态图。在与低浓度如 (1.6,6.25,12.5) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnO 纳米粒子作用下,如图 2A, 2B 和 2C, HELFL 细胞并没明显异样;而当 ZnO 纳米粒子浓度增加到 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,图 2D 中可见明显的 HELFL 细胞变形、脱落等凋亡现象,大量细胞收缩成圆形;图 2E 表明,诸浓度比较而言,与 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnO 纳米粒子作用后,HELFL 细胞凋亡最为严重。

显然图 1、2 均表明,高浓度氧化锌纳米粒子有可能诱使 HELFL 细胞凋亡。此结论与已有研究^[7]一致,在研究纳米材料对小鼠胚胎成纤维细胞毒性中也发现,随着剂量的升高纳米氧化锌的细胞毒性升高相当显著。

2.3 电子显微镜下细胞与纳米粒子作用前后表面微结构形态

为进一步研究细胞和纳米粒子作用前后的表面微结构变化,笔者采用绿色简单固定细胞样品的方法,避免了常规使用的有毒固定剂戊二醛和锇酸^[9],同样取得良好效果。将细胞贴附在玻璃载体上,与氧化锌纳米粒子作用;然后再用本文描述的方法制样,在扫描电镜中能较好地获得细胞的真实形貌。将上述载玻片置于二次水中,摇床上轻微震撼清洗 30 min,晾干,按上述喷金过程,进行电镜观察结果。如图 3 所示。图 3A 为空白 HELFL 细胞表面形态;与 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnO 纳米粒子作用 72 h 后,HELFL 细胞的表面镶满了不规则形态的氧化锌纳米粒子(图 3 B),这说明纳米粒子占据了细胞表面某些活性位点。在摇床中水洗 30 min 后,与空白 HELFL 水洗后的表面形态(3C)相比,HELFL 细胞表面(3D)可见大量纳米孔,孔径约 40 nm 左右,与纳米粒子直径相吻合,推测为原氧化锌纳米粒子的结合位点。因为目前报道中没发现类似与纳米氧化锌作用于裸细胞的微孔结构,纳米材料与细胞毒性机理还要进行深层次分析,还有待进一步研究。

3 讨 论

HELFL 是一种贴壁生长的细胞,与表皮细胞一样,都属于正常细胞。但相比于表皮细胞,HELFL 更易于培养和分离等实验操作;遗传学性状接近体内正常细胞,对外加作用因子比较敏感,适于用来

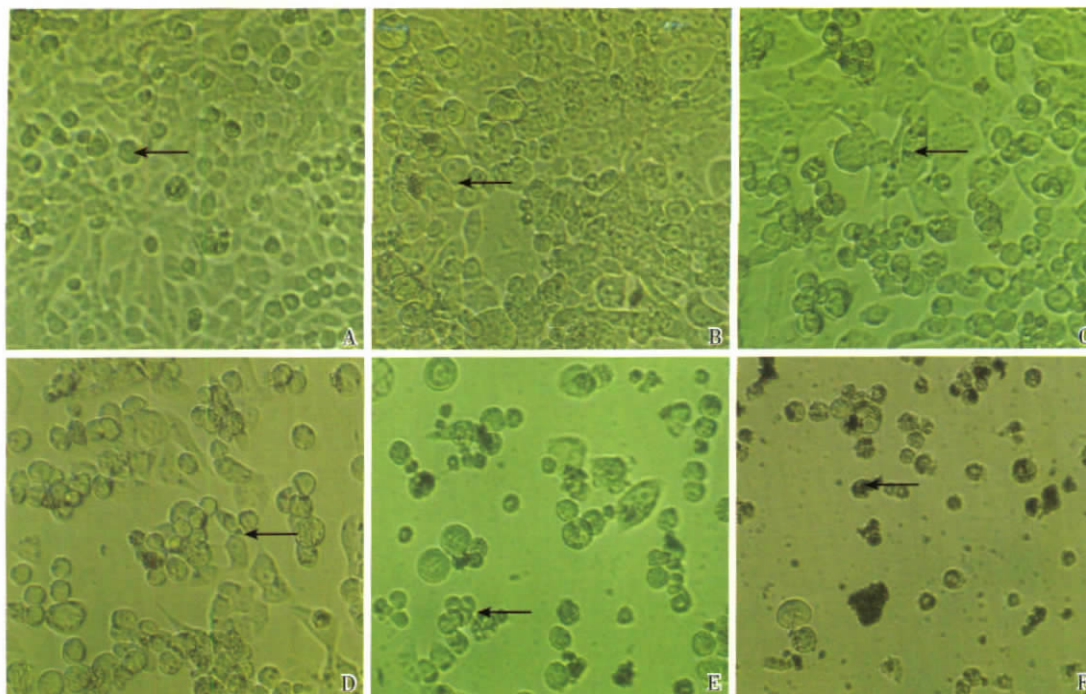


图 2 不同浓度纳米氧化锌处理 72 h 后的 HELF 形态图

Fig.2 HELF cells separately interacted with ZnO NPs at different concentrations for 72 h

A: morphology graph of blank HELF cells ($\times 100$); B: $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, C: $6.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, D: $12.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, E: $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, F: $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

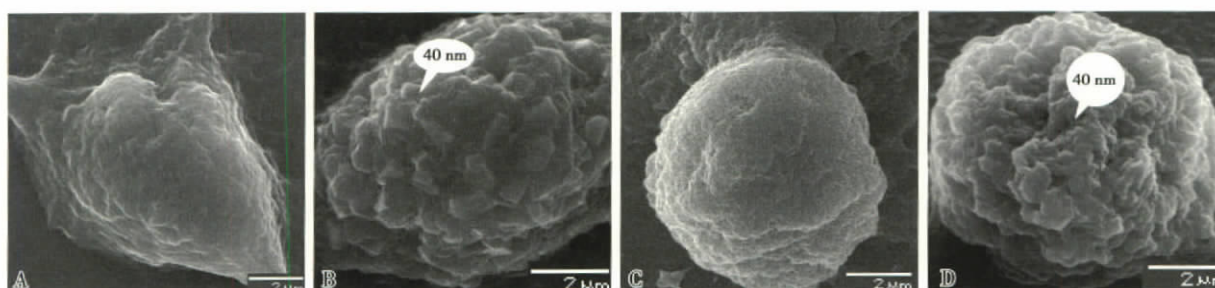


图 3 扫描电镜图(俯视图)

Fig.3 SEM images (top view)

A: blank HELF cells; B: HELF cells after treated with $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnO (40 nm) for 72 h; C: blank HELF cells after rinsed in water; D: HELF cells after treated with $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnO (40 nm) for 72 h and removed ZnO NPs in water

体外毒性研究的评价^[7],尤其是研究人用化妆口中纳米氧化锌的生物毒性更有着直接的意义。

常规超微氧化锌是一种生物安全性较好的一种材料^[6]。而纳米氧化锌细胞的生物毒性较为显著,原因可能在于:一方面,氧化锌纳米材料由于小尺寸效应,具有巨大的比表面积,与细胞膜作用形成微孔,并侵入细胞内部;另一方面,进入细胞后能够迅速反应、溶解,其产物有可能进一步导致大量自由基生成,或直接进入某些细胞器甚至细胞核内,继而引发细胞超微结构和功能的损伤,可能与 Zn^{2+} 细胞毒性有关。这些与已有实验结果一致,常规尺寸氧化锌粒

子不能进入细胞内部,所以安全无毒^[5];有些纳米粒子如二氧化硅;其毒性明显低于氧化锌纳米粒子^[6]。由于本研究着眼于防晒化妆品用纳米氧化锌的毒性研究,主要探索对细胞的生存率有着明显毒性的对应浓度,所以,有关纳米氧化锌与常规氧化锌和其他纳米材料的比较实验,在此没有列入。

本研究发现,浓度超过 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnO 氧化锌纳米粒子能够抑制 HELF 细胞存活,诱导细胞凋亡。鉴于氧化锌纳米粒子潜在的生理毒性,建议在用于日用化学品紫外屏蔽剂时,要将其浓度控制

(下转第 178 页 to page 178)

因此, 构建慢病毒载体共表达抗生素抗性基因和目的基因, 结合 W3R 细胞作为饲养层细胞以筛选细胞保证外源基因的表达。在细胞移植免疫缺陷小鼠, 荧光素酶基因可用于活体定量和定位监测转基因人胚胎干细胞移植的动向。

致谢: 本研究得到了美国 JOHNS HOPKINS UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL 的 Linzhao Cheng 实验室的大力帮助, 尤其是 Linzhao Cheng 博士、Zhaohui Ye 博士给予理论上的指导, 并无私赠送了 W3R 细胞和多种慢病毒载体。

参考文献:

- [1] Wu JC, Spin JM, Cao F, et al. Transcriptional profiling of reporter genes used for molecular imaging of embryonic stem cell transplantation [J]. *Physiol Genomics*, 2006, 25(1): 29-38.
- [2] Li Z, Suzuki Y, Huang M, et al. Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4): 864-873.
- [3] Cai L, Ye Z, Zhou BY, et al. Promoting human embryonic stem cell renewal or differentiation by modulating Wnt signal and culture conditions [J]. *Cell Res*, 2007, 17(1): 62-72.
- [4] Dravid G, Hammond H, Cheng L. Culture of human embryonic stem cells on human and mouse feeder cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 331: 91-104.
- [5] 史艳侠, 韩文杰, 彭柔君, 等. 使用 FLAG 标签肽及慢病毒载体共同筛选小鼠 foxp3 基因 RNA 干扰的有效靶点 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2007, 28(6): 641-644.
- [6] Zhou BY, Ye Z, Chen G, et al. Inducible and reversible transgene expression in human stem cells after efficient and stable gene transfer [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(3): 779-789.
- [7] Tsien RY. The green fluorescent protein [J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 509-544.
- [8] Griffin BA, Adams SR, Tsien RY. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells [J]. *Science*, 1998, 281(5374): 269-272.
- [9] Contag CH, Contag PR, Mullins JI, et al. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts [J]. *Mol Microbiol*, 1995, 18(4): 593-603.
- [10] Swijnenburg RJ, Schrepfer S, Govaert JA, et al. Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(35): 12991-12996.
- [11] 麦庆云, 周灿权, 李涛, 等. 玻璃化冷冻法保存人类胚胎干细胞 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(3): 357-360.

(编辑 张恩健)

(上接第 173 页 from page 173)

在 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下。在最大限度发挥其屏蔽紫外线功效的同时, 也要重视其安全性, 让氧化锌纳米材料真正起到保护皮肤和人类健康的作用。这一结论, 一方面对生产企业在功效成分的选择和添加有警示作用; 另外也为卫生疾控监督提供了理论依据, 具有重要的卫生学意义。

致谢: 感谢南京大学现代分析中心电镜室马翔老师在生物样品的观察上给予的帮助! 感谢南京市医学重点科技发展项目(ZKX06030)的资助!

参考文献:

- [1] 姚超, 吴凤芹, 林西平, 等. 纳米技术与纳米材料()-纳米氧化锌在防晒化妆品中的应用 [J]. *日用化学工业*, 2003, 33(6): 393-397.
- [2] Schulz J, Hohenberg H, Pflucker F, et al. Distribution of sunscreens on skin [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54(Suppl 1): S157-S163.
- [3] Rastogi SC. UV filters in sunscreen products—a survey [J]. *Contact Dermatitis*, 2002, 46(6): 348-351.
- [4] Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth [J]. *Environ Pollut*, 2007, 150(2): 243-250.
- [5] Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO_2 , SiO_2 , and ZnO water suspensions [J]. *Water research*, 2006, 40(19): 3527-3532.
- [6] 祖庸, 王训, 吴金龙, 等. 新型无机抗菌剂—超微细氧化锌 [J]. *化工时刊*, 1999, 13(1): 7-9.
- [7] 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 [J]. *生态毒理学学报*, 2007, 2(4): 427-434.
- [8] Cheryl D, Helgason, Cindy L. *Methods in molecular biology™: basic cell culture protocols* [M]. 3rd edition, Humana Press, Volume 290: 2903-2911.
- [9] 冯健, 刘永坚, 田丽霞, 等. 草鱼实验性镉中毒的肝、肾病理学研究 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2003, 42(2): 226-230.

(编辑 孙慧兰)