

多壁碳纳米管诱导 A549 细胞氧化应激 与去极化线粒体膜电位

叶社房¹, 钟李明¹, 吴艺晖¹, 张其清^{1,2}

(1. 厦门大学材料学院, 生物医学工程研究中心, 生物材料系, 福建省生物医学工程重点实验室, 厦门市生物医学工程技术研究中心, 厦门 361005; 2. 中国医学科学院 & 中国协和医科大学生物医学工程研究所, 天津市生物材料重点实验室, 天津 300192)

摘要 以人肺上皮细胞系 A549 为模型细胞, 探讨多壁碳纳米管的细胞毒性效应及其机制. A549 细胞暴露于不同浓度(0 ~ 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的多壁碳纳米管后, 用 MTT 比色法检测细胞活力和 Hoechst 33342 染色法观察细胞形态; 用活性氧(ROS)敏感探针 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)结合流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平; 用荧光探针 JC-1 结合激光共聚焦显微镜检测细胞线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的变化; 用免疫荧光和蛋白印迹法检测细胞氧化应激敏感蛋白血红素氧合酶-1(HO-1)的表达水平. 结果表明, 多壁碳纳米管可引起 A549 细胞活性降低、细胞内活性氧 ROS 过量产生以及谷胱甘肽 GSH 含量下降, 诱导细胞氧化应激效应; 抗氧化剂 *N*-乙酰半胱氨酸(NAC)抑制多壁碳纳米管诱导的 A549 细胞内 ROS 的产生. 多壁碳纳米管处理 A549 细胞 2 h 后, 诱发细胞线粒体膜电位下降; 多壁碳纳米管诱导细胞氧化应激的同时伴有适应性应激蛋白 HO-1 的上调表达. 结果表明, 细胞氧化应激和线粒体膜电位去极化可能是多壁碳纳米管诱导 A549 细胞毒性效应的重要机制.

关键词 多壁碳纳米管; 线粒体膜电位; 氧化应激; 血红素氧合酶-1

中图分类号 O629 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)03-0497-05

碳纳米管(Carbon nanotubes, CNTs)是一种纳米尺度的新型碳材料. 碳纳米管由于其独特的导电性、磁性、力学强度和柔韧性等综合性能, 使其在人工器官、植入组织工程支架、组织引导再生与修复支架、生物大分子的修饰与特异性识别、靶向基因药物载体等生物医学领域显现出潜在的应用前景^[1,2]. 碳纳米管在生物医学领域的应用日渐拓展的同时, 由其可能带来的特殊生物毒理学效应也引起了人们普遍的关注^[3]. 目前, 在细胞及分子水平证实的碳纳米管效应包括^[4]: 蛋白质、DNA 及细胞膜损伤; 细胞凋亡、周期停滞、表型转化; 激活核因子 NF- κ B 和丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)途径等; 在生物整体水平证实的碳纳米管毒理效应包括^[4,5]: 急性肺损伤、慢性炎症、纤维化、多发性肉芽肿、脑损伤等. 但是, 造成碳纳米管毒性效应的机制仍需进一步明确.

研究发现, 不同尺寸和化学组成的纳米颗粒作用细胞后容易向线粒体发生转移, 这种纳米颗粒的靶向性易使线粒体结构损伤及膜电位下降, 使细胞活性氧(ROS)过量产生并干扰细胞的抗氧化防御机制, 引发机体细胞氧化应激(Oxidative stress)状态的产生^[4]. 细胞氧化应激的产生是纳米物质毒性生物效应发生的重要机制之一^[6]. 为此, 本研究采用人肺上皮细胞系 A549 为研究对象, 考察了多壁碳纳米管(Multi-wall carbon nanotubes, MWCNTs)对 A549 细胞形态与增殖、ROS 产生以及线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential, MMP) $\Delta\Psi_m$ 的影响, 并检测了 MWCNTs 对氧化应激敏感热休克蛋白血红素氧合酶-1(Heme oxygenase-1, HO-1)的表达, 为深入阐明 MWCNTs 的氧化应激机制及其生物效应提供了科学依据.

收稿日期: 2008-06-24.

基金项目: 国家重大科学研究计划(批准号: 2006CB933300)和福建省青年人才项目(批准号: 2008F3097)资助.

联系人简介: 叶社房, 男, 博士, 助教, 从事纳米生物效应研究. E-mail: yeshefang@xmu.edu.cn

张其清, 男, 博士, 教授, 从事生物医学工程领域的研究. E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

多壁碳纳米管(MWCNTs, 纯度 >95%), 外径为 20 ~ 30 nm, 长度约为 30 μm , 购自中国科学院成都有机化学研究所. 在对细胞处理之前, 用酸处理法^[7]对 MWCNTs 进行纯化, 去除其中的杂质. 人肺上皮细胞 A549 购自中国科学院上海生命科学研究院; Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS)和 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)购自 Invitrogen 公司; 抗 HO-1 抗体、抗 β -actin 抗体和异硫氰酸荧光素(FITC)-羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司; 噻唑蓝(MTT)、Hoechst 33342 和 *N*-乙酰半胱氨酸(*N*-Acetylcysteine, NAC)购自 Sigma 公司; Enhanced Chemiluminescence(ECL)试剂盒购自 Pierce 公司; 线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1 购自南京凯基生物发展有限公司; GSH/GSSG 检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究所.

美国 Bio-Rad 680 酶标仪; Axiovert 200 荧光倒置显微镜(Carl Zeiss 公司); Coulter Epics XL 流式细胞仪(Beckman 公司); Tcs SP2 激光共聚焦显微镜(Lecia 公司).

1.2 实验过程

1.2.1 A549 细胞培养 将 A549 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 氨苄青霉素及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、湿化的 5% CO_2 孵育箱中培养. 待 A549 细胞生长至 70%~90% 汇合状态时, 加入不同浓度的 MWCNTs 分散液处理(MWCNTs 分散液参照文献[8]的超声分散法制备). MWCNT 分散液每次实验前需重新配制, 超声 5 min, 充分混均后使用.

1.2.2 细胞毒性试验与 Hoechst 33342 染色 收集 MWCNTs 处理的 A549 细胞, 用 MTT 比色法^[8]测定细胞活性; DNA 荧光染料 Hoechst 33342 进行细胞染色后, 用荧光显微镜观察细胞核形态.

1.2.3 细胞内 ROS 的检测 参照文献[9]方法, 用荧光探针 DCF-DA 测定细胞内 ROS 水平. DCF-DA 进入细胞后, 经酯酶作用脱去二酯生成 2',7'-二氯氢化荧光素(DCFH), DCFH 被超氧阴离子和过氧化氢等氧化, 生成发荧光的 2',7'-二氯荧光素(DCF), 通过 DCF 水平的变化即可反映 ROS 水平的变化.

1.2.4 细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)含量测定 参照谷胱甘肽检测试剂盒说明测定 MWCNTs 作用后 A549 细胞内还原型 GSH 的含量.

1.2.5 细胞线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 测定 参照 JC-1 线粒体膜电位试剂盒说明检测线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 变化. 用激光共聚焦显微镜结合 LCS Universal Imaging 软件(Lecia 公司)测定红色/绿色荧光光密度比值, 以此表示线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的变化.

1.2.6 细胞免疫荧光检测 用质量分数为 4% 的多聚甲醛对细胞爬片进行固定后, 以 5% BSA/0.15% Triton X-100 封闭液于室温处理 30 min. 加抗 HO-1 抗体(体积比 1:1000), 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 然后加 FITC 标记的二抗, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h; 经漂洗, 干燥, 封片后, 用激光共聚焦显微镜观察和照相.

1.2.7 蛋白印迹分析 参照文献[8]方法, 提取 MWCNTs 处理后的 A549 细胞总蛋白并进行定量; 取 50 μg 蛋白样品, 经 12% 的 SDS-PAGE 电泳、PVDF 膜电转移、膜封闭后, 与抗 HO-1 抗体(体积比 1:1000)及抗 β -actin 抗体(体积比 1:2000)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 然后与相应的二抗室温孵育 2 h; 最后在暗室中用 ECL 试剂盒进行化学发光法显影.

1.2.8 统计学分析 采用 SPSS 10.0 统计软件对各组数据进行 ANOVA 单因素方差分析, 多组数据之间的比较采用 Student's Newman-Keuls 方法. $p < 0.05$ 认为有显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 MWCNTs 对 A549 细胞活性及形态的影响

不同浓度的 MWCNTs(0 ~ 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理 A549 细胞 72 h 后, 用 MTT 法测定细胞的存活率. 从图 1 可以看出, 随着 MWCNTs 剂量的增加, 细胞的活性逐渐降低, 呈剂量-效应关系. 当 MWCNTs 剂量为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, A549 细胞存活率仍维持在 80% 左右; 当 MWCNTs 剂量增大到 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, A549 细胞存活率下降至 45%. 在一定剂量范围内, 人 T 细胞接触 MWCNTs 后仍有较高的存活率^[10], 提示

MWCNTs 作用后, 细胞的毒性易感性与细胞类型有关.

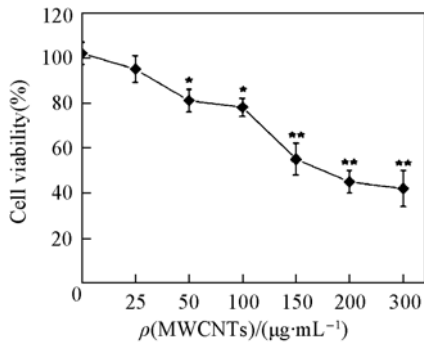


Fig. 1 Effect of MWCNTs concentration on A549 cells viability by MTT assay

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. untreated control.

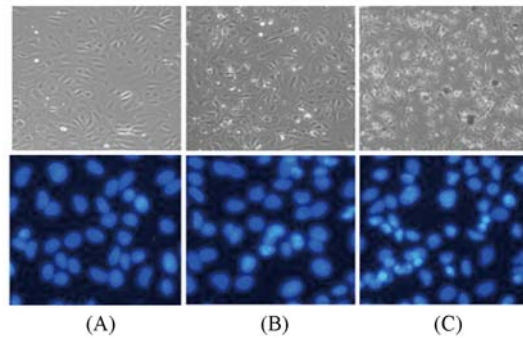


Fig. 2 Nuclear morphology A549 cells stained with Hoechst 33342 ($\times 100$)

(A) Untreated; (B) $\rho(\text{MWCNTs}) = 50 \mu\text{g/mL}$; (C) $\rho(\text{MWCNTs}) = 200 \mu\text{g/mL}$. Upper: Cell morphology examined by phase-contrast microscopy; lower: nuclear morphology stained with Hoechst 33342.

在 MWCNTs 剂量为 50 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 作用 72 h 后, 观察其对培养细胞的形态学变化. 从图 2 中发现, MWCNTs 处理后的 A549 细胞脱落浮起, 呈类圆形, 折光性明显增强; Hoechst 33342 荧光染色发现, 与对照组细胞呈弥散均匀蓝色荧光相比, 暴露于 MWCNTs 后, A549 细胞变圆, 体积缩小, 核染色质致密深染, 形成颗粒状蓝色荧光, 呈典型的凋亡形态学改变(图 2). 以上结果提示, MWCNTs 致细胞活性下降可能与凋亡发生有关, 这与 MWCNTs 对 T 细胞^[10]、人表皮纤维细胞^[11]作用时观察到的结果一致, 即活性氧 ROS 的过量产生对诱导细胞凋亡和促进细胞坏死起重要作用.

2.2 MWCNTs 诱导 A549 细胞 ROS 产生

A549 细胞与 200 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs 共培养后, 用荧光探针 DCF-DA 结合流式细胞仪测定细胞内 ROS 水平, 从图 3 可见, 细胞内 DCF 荧光强度呈时间-效应关系, 提示 MWCNTs 诱导细胞内 ROS 的产生, 证实了 MWCNTs 对细胞的氧化应激效应^[12]. 由于细胞内 ROS 过量产生使细胞处于氧化应激状态, 激活细胞凋亡的相关途径^[8,10,11], 可能是 MWCNTs 致 A549 细胞活性下降的重要机制. 还原型 GSH 是细胞内主要非蛋白质巯基抗氧化剂, 也是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和谷胱甘肽转移酶系统(GST)等酶类的底物. 在氧化应激时, GSH 氧化成 GSSG, GSH/GSSG 比率(质量分数)下降, 这是评估细胞氧化损伤的重要参考指标^[13]. 从图 4 可见, 随着 MWCNTs 剂量和时间的变化, A549 细

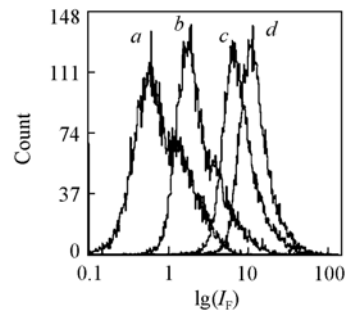


Fig. 3 Induction of ROS by MWCNTs in A549 cells

a. Control; b. 2 h; c. 6 h; d. 12 h.

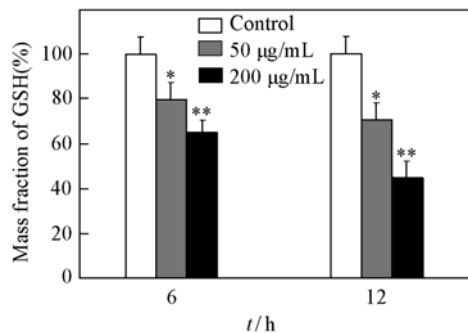


Fig. 4 Depletion of GSH content by MWCNTs in A549 cells

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. untreated control.

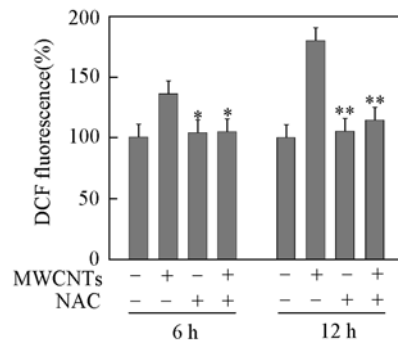


Fig. 5 Effects of NAC on MWCNTs induced ROS in A549 cells

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. MWCNTs-treated cultures.

胞内 GSH 含量逐渐降低. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs 与细胞共培养 6 和 12 h 后, A549 细胞内 GSH 含量较对照组分别下降 38% 和 50%; 细胞内 GSH 含量变化与 ROS 水平一致. 氧自由基清除剂 (NAC) 预处理后, 显著抑制 MWCNTs 诱导细胞产生 ROS (图 5), 证实 MWCNTs 对 A549 细胞的氧化应激诱导效应.

2.3 MWCNTs 对细胞线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的影响

线粒体膜电位是反映线粒体功能的早期敏感指标, 应用荧光探针 JC-1 激光共聚焦观察可敏感地检测到线粒体膜电位变化, 是一种检测线粒体功能变化的理想手段^[14]. JC-1 是一种碳氮化合物类荧光染料, 可以特异性地与线粒体内膜结合, 只在线粒体膜电位崩解时才释放出来, 在细胞内以聚合体和单体两种不同的形式存在, 分别处于不同的荧光发射峰. 当 JC-1 浓度低或膜电位水平低时, 主要以单体形式存在, 呈绿色荧光; 当 JC-1 浓度升高或线粒体膜电位水平较高时, 形成聚合物, 发出红色荧光. 从图 6 可以发现, 对照组 A549 细胞红色荧光较强, 绿色荧光相对较弱, 线粒体膜电位 $\Delta\Psi$ 较高. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs 处理 2, 4, 8 和 12 h 后, A549 细胞绿色荧光逐渐增强, 红色荧光则逐渐减弱; 与对照

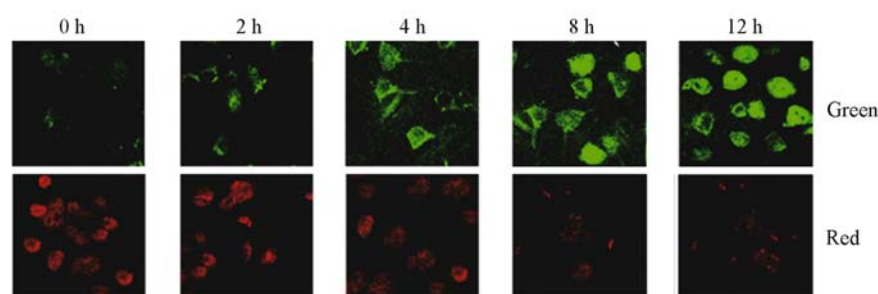


Fig. 6 MWCNTs (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treated cultures showed increased green fluorescence intensity in A549 cells stained with JC-1 ($\times 200$)

组比较, 红色/绿色荧光比值分别下降 13%, 28%, 50% 和 55% (图 7), 这些变化与 A549 细胞 ROS 变化的趋势一致. 文献报道认为, 一些超细微颗粒或纳米颗粒进入细胞后, 具有潜在的线粒体靶向性, 诱导线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 下降, 是细胞内 ROS 过量产生的重要机制^[4, 15]. 但 MWCNTs 诱导的 A549 线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 下降是否直接导致 ROS 过量产生需要进一步研究证实. 研究表明, 线粒体膜电位 $\Delta\Psi$ 下降与细胞 ROS 过量产生可激活细胞凋亡或坏死相关下游信号通路^[8, 10, 11], 这些事件可能参与 MWCNTs 的细胞毒性效应.

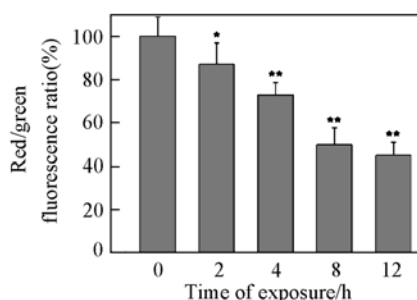


Fig. 7 Decreased red/green fluorescence ratio of JC-1
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

2.4 MWCNTs 上调 A549 细胞氧化应激敏感蛋白 HO-1 的表达水平

当暴露于应激环境中时, 细胞常过量表达热休克蛋白 (Heat shock protein, HSP) 以保护自身免受损伤^[16]. HO-1, 也称作 HSP32, 是细胞内存在的一种重要的可诱导型应激反应蛋白. HO-1 的诱导表达是细胞对氧化应激等的一种适应性反应, 也是细胞氧化应激状态的一个敏感预测生物学指标^[16]. 免疫荧光 [图 8(A)] 和蛋白印迹 [图 8(B)] 表明, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs 对 A549 细胞 HO-1 的诱导表达呈时间依赖性. 抗氧化剂 NAC 可抑制 MWCNTs 诱导 A549 细胞产生 ROS, 降低细胞 HO-1 表达 [图 8(B)],

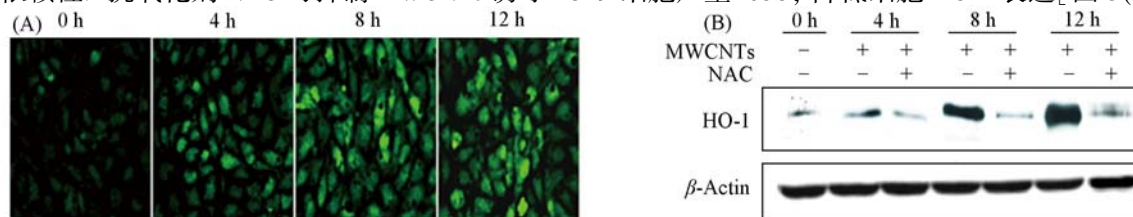


Fig. 8 Effects of MWCNTs (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the induction of oxidative stress-related protein HO-1 by immunofluorescence (A) and Western blotting (B) ($\times 100$)

进一步印证了 MWCNTs 对 A549 细胞的氧化应激效应, 与文献[17]报道的超细、纳米颗粒等氧化应激上调 HO-1 表达的研究结果一致. 结果提示, HO-1 有可能作为 MWCNTs 的氧化应激敏感标志物.

参 考 文 献

- [1] Baughman R. H. , Zakhidov A. A. , Heer D. A. . Science[J], 2002, **297**(5582): 787—792
- [2] MENG Jie(孟洁), SONG Li(宋礼), MENG Jie(孟洁), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], **28**(3): 476—480
- [3] Oberdörster G. , Oberdörster E. , Oberdörster J. . Environ. Health. Perspect. [J], 2005, **113**(7): 823—839
- [4] Nel A. , Xia T. , Madler L. , *et al.* . Science[J], 2006, **311**(5761): 622—627
- [5] Fiorito S. , Serafino A. , Andreola F. , *et al.* . J. Nanosci. Nanotechnol. [J], 2006, **6**(3): 591—599
- [6] Helland A. , Wick P. , Koehler A. , *et al.* . Environ. Health. Perspect. [J], 2007, **115**(8): 1125—1131
- [7] Zhu Y. , Zhao Q. , Li Y. , *et al.* . J. Nanosci. Nanotechnol. [J], 2006, **6**(5): 1357—1364
- [8] Sharma C. S. , Sarkar S. , Periyakaruppan A. , *et al.* . J. Nanosci. Nanotechnol. [J], 2007, **7**(7): 2466—2472
- [9] Park E. J. , Choi J. , Park Y. K. , *et al.* . Toxicology[J], 2008, **245**(1/2): 90—100
- [10] Bottini M. , Bruckner S. , Nika K. , *et al.* . Toxicol. Lett. [J], 2006, **160**(2): 121—126
- [11] Patlolla A. , Tchounwou P. . Environ. Mol. Mutagen. [J], 2007, **48**(7): 563
- [12] Schrand A. M. , Dai L. , Schlager J. J. , *et al.* . Diamond. Relat. Mater. [J], 2007, **16**(21): 2118—2123
- [13] Jones D. P. . Antioxid. Redox. Signal. [J], 2006, **8**(9/10): 1865—1879
- [14] Mashimo K. , Ohno Y. . Arch. Toxicol. [J], 2006, **80**(7): 421—428
- [15] Lewinski N. , Colvin V. , Drezek R. . Small[J], 2008, **4**(1): 26—49
- [16] Seldon M. P. , Silva G. , Pejanovic N. , *et al.* . J. Immunol. [J], 2007, **179**(11): 7840—7851
- [17] Xia T. , Kovichich M. , Brant J. , *et al.* . Nano. Lett. [J], 2006, **6**(8): 1794—1807

Multi-walled Carbon Nanotubes Exposure Induces Oxidative Stress and Depolarizes Mitochondrial Membrane Potential in Cultured A549 Cells

YE She-Fang^{1*}, ZHONG Li-Ming¹, WU Yi-Hui¹, ZHANG Qi-Qing^{1,2*}

- (1. *Research Center of Biomedical Engineering & Department of Biomaterial, Research Center of Biomedical Engineering Technology of Xiamen City, The Key Laboratory of Biomedical Engineering of Fujian Province, College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China;*
2. *Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, The Key Laboratory of Biomedical Material of Tianjin, Tianjin 300192, China*)

Abstract The present study was undertaken to determinate the cytotoxicity exhibited *via* multi-walled carbon nanotubes(MWCNTs) in human A549 lung epithelial cells as a model system. Cell mortality was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assays. The morphological changes of A549 cells were examined by Hoechst 33342 staining. The level of reactive oxygen species(ROS) was detected by means of flow cytometry analysis with a redox-sensitive fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA). The mitochondria membrane potential was observed by a confocal laser-scanning microscope with JC-1 fluorescence. The heme oxygenase-1(HO-1) protein expression was analyzed by immunofluorescence and Western blotting. The result reveal that treatment of A549 cells with MWCNTs lead to loss of cell viability, ROS production, glutathione depletion and decline in mitochondrial membrane potential. MWCNTs were potent toward inducing cellular heme oxygenase-1(HO-1) expression, a sensitive biomarker for oxidative stress. Our observations suggest that MWCNTs exert toxicity by increasing oxidative stress, decreasing the mitochondrial membrane potential in cultured A549 cells.

Keywords Multi-walled carbon nanotubes; Mitochondrial membrane potential; Oxidative stress; Heme oxygenase-1

(Ed. : H, J, Z)