

纳米锰锌铁氧体颗粒对 L-02 细胞的氧化损伤作用

殷 婕¹, 吴启南¹, 邵 莹¹, 陈 蓉¹, 张东生²

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046; 2. 东南大学医学院, 江苏 南京 210009)

摘要: **目的** 探讨磁性锰锌铁氧体纳米颗粒($\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$)对人肝细胞株 L-02 的毒性作用机制。**方法** $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 L-02 细胞 48 h, 透射电镜观察细胞形态及超微结构的变化。 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 200, 400 和 800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 48 h 后, 检测 L-02 细胞内丙二醛(MDA)的含量、超氧化物歧化酶(SOD)和还原型谷胱甘肽(GSH)的活性; 荧光染色观察凋亡细胞形态; 流式细胞术检测细胞周期及凋亡; 荧光定量 PCR 仪检测胱天蛋白酶 3 mRNA 表达。**结果** $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 48 h 后, 纳米颗粒进入细胞内, 细胞膜发生破损, 细胞器消失, 染色体异常聚集。与正常对照组比较, $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 200 ~ 800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 使细胞内 MDA 含量逐渐升高, SOD 与 GSH 活性逐渐降低($P < 0.05$)。 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 可使细胞周期发生改变, G_0/G_1 期细胞百分率有降低的趋势, S 期和 G_2/M 期细胞百分率有升高的趋势。Hoechst33258 显示明显的细胞凋亡形态。 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 可引起 L-02 细胞发生剂量依赖性的细胞凋亡, $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 48 h 后, 细胞凋亡率达到 30.3%, 是对照组细胞凋亡率(2.4%)的 12.6 倍。胱天蛋白酶 3 mRNA 表达量先增加后降低, 但都明显高于正常对照组($P < 0.05$)。**结论** $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 可破坏细胞膜完整性并进入细胞内, 诱导细胞发生氧化应激, 改变细胞周期, 引发细胞凋亡, 产生细胞毒性。

关键词: 纳米颗粒; $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$; L-02 细胞; 氧化应激; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: R99 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)03-0314-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.03.011

磁性纳米材料被广泛应用于磁性靶向药物载体、生物分离分析、恶性肿瘤热疗和磁共振成像等领域, 在生物医学领域有着良好的应用前景。近年来, 纳米材料在直接关系到人身安全和健康的医药领域的快速发展, 使其安全性引起了各方面的格外关注^[1-5]。纳米锰锌铁氧体($\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$)是一种尖晶石结构以及具有较低居里温度的软磁复合铁氧体。这种纳米粒子具有良好的磁学性能、生物活性以及化学稳定性等, 目前在医药领域开始受到重视, 但对其毒性及毒性机制研究较少。因此, 本实验选用 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒为研究对象, 使其作用于体外培养的人正常肝细胞株 L-02, 观察 L-02 细胞超微结构的改变以及检测不同浓度磁性纳米颗粒作用下细胞内抗氧化物质的变化、细胞周期的改变及对凋亡效应的影响, 探讨 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒暴露引起的细胞毒作用机制, 为磁性纳米颗粒安全性评价提供有益参考。

基金项目: 国家高科技研究发展计划(2007AA03Z356)

作者简介: 殷 婕(1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事中药品质评价研究。

通讯作者: 吴启南, E-mail: qnlxw@yahoo.com.cn; Tel: (025)85811059

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

DMEM 细胞培养基和胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 碘化丙啶(PI)和 RNA 酶均购自美国 Sigma 公司; 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、微量丙二醛(MDA)试剂盒和微量还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; Hoechst33258 试剂盒购自碧云天生物技术研究所; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; TaKaRa PrimeScript[®] Reagent Kit (Perfect Real Time) 逆转录试剂盒以及 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Perfect Real Time) 定量 PCR 试剂盒购自宝生物科技发展有限公司。

电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); 超净工作台(苏州净化设备有限公司); 电热恒温水浴箱(上海精宏实验设备有限公司); 微量高速离心机(美国 LabNet 公司); CO₂ 恒温培养箱(美国 NAPCO 公司); 全波长酶标仪(Powerwave X340, 美国 Bio-Tek 公司); 流式细胞仪(FACSCalibur, 美国 BD 公司); 荧光显微镜(日本 Olympus 公司); Lightcycler 2.0 型定量

PCR 仪(瑞士罗氏应用科技公司)。

NCBI 基因库获知的人胱天蛋白酶(caspase)3 和 GAPDH 基因的序列,参考文献[6]的实时荧光定量 PCR 引物并在 Blast 中进行验证,引物序列交由上海生工技术有限公司合成。所设计的引物的序列见表 1。

Tab. 1 Primer sequences of the objective gene

Gene	Primer	Product/ bp
GAPDH	Sense: 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATT-3'	136
	Antisense: 5'-GAGGCATTGCTGATGATCTTG-3'	
Caspase 3	Sense: 5'-GGCATTGAGACAGACAGTGGTG-3'	153
	Antisense: 5'-GGCACAAAGCGACTGGATGAA-3'	

1.2 纳米锰锌铁氧体颗粒染毒悬液的配制

按照改良的化学共沉淀法^[7]制备 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米颗粒 100 mg,加入 10 ml 生理盐水,配成质量浓度为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液, 121°C , 30 min 高压消毒。使用前,将母液超声混匀 10 min,成为均匀的悬浊液,将混合均匀的母液分别以生理盐水对母液进行不同比例稀释,各组终浓度分别为 2.0, 4.0 和 $8.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。配好的各浓度组超声振荡处理 10 min 后立即用于细胞染毒。

1.3 细胞体外培养及染毒

L-02 细胞(由南京师范大学生命科学学院惠赠)。取培养至对数期的 L-02 细胞,用 0.25% 胰酶消化,用滴管吹打至单细胞悬液,调整细胞密度为 $(4\sim 5)\times 10^7\text{ L}^{-1}$,接种至 6 孔板上,每孔 1800 μl ,培养 24 h 后取出培养板,加入 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 悬液 200 μl ,使终浓度为 200, 400 和 $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,正常对照组加入相同体积的生理盐水,各浓度染毒组均设复孔。将培养板置入 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 48 h。

1.4 透射电镜观察细胞形态及细胞超微结构

染毒培养 48 h 的细胞,胰酶消化, $1500\times g$ 离心 10 min,去上清,用 PBS 洗涤细胞 2 遍, $1500\times g$ 离心 10 min,加入 1 ml PBS,混匀,转移至 1.5 ml 离心管, $1500\times g$ 离心 10 min,小心吸弃上清,最后沿离心管壁缓慢加入 0.25% 戊二醛固定。隔夜把待检测样本送南京军区总医院进行透射电镜切片的制作及透射电镜成像的操作。

1.5 细胞氧化指标的测定

取染毒培养 48 h 的 6 孔板,弃上清后每孔用 PBS 洗 1 遍,往板中加入 RIPA 细胞裂解液进行细胞裂解 1 h,用细胞刮收集细胞, 4°C 下 $12\ 000\times g$ 离心 5 min 后取细胞上清,按照试剂盒操作要求分别测定

细胞蛋白的含量、MDA 含量、SOD 及 GSH 活性,并按照试剂盒中的公式要求进行计算。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

取染毒培养 48 h 的 6 孔板,收集细胞,制备单细胞悬液,置入离心管中, $1500\times g$ 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次。用预冷的 70% 乙醇 4°C 固定 24 h 以上,检测前 PBS 洗涤细胞 2 次,去上清,加入 PI 染液 400 μl ,避光 30 min,立即用流式细胞仪检测细胞周期。

1.7 Hoechst33258 荧光染色观察凋亡细胞形态

取染毒培养 48 h 的 6 孔板,按 Hoechst33258 试剂盒说明书进行细胞荧光染色,用荧光显微镜观察凋亡细胞形态。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡率

取出染毒培养 48 h 的 6 孔板,按检测试剂盒说明书进行 Annexin V-FITC/PI 染色,用流式细胞仪的检测细胞凋亡率。

1.9 适合荧光定量 PCR 检测胱天蛋白酶 3 mRNA 的表达

取出染毒培养 48 h 的 6 孔板,弃上清,提取 RNA,并按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,按照定量 PCR 试剂盒的说明书进行定量 PCR 测定。使用罗氏荧光定量 PCR 软件分析结果,用 GAPDH 作为基因相对表达分析的内标,采用比较循环阈值法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)分析样本中胱天蛋白酶 3 mRNA 表达的相对含量。

1.10 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 纳米颗粒对 L-02 细胞形态及超微结构的影响

正常肝细胞核大而圆,位于中央,核仁明显,核膜清晰。胞质内细胞器丰富,尤其是线粒体和粗面内质网(图 1A)。 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 纳米颗粒刺激的 L-02 细胞会伸出突起伪足样结构包裹纳米粒子或细胞膜发生凹陷, $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米粒子与细胞膜发生融合,纳米粒子团聚体形成膜被小泡内陷进入细胞质(图 1B)。高倍镜下可见较多的单个纳米粒子或小纳米团聚体存在于细胞质中(图 1C),同时细胞染色质分解、稀疏,细胞膜发生破损,胞质出现空泡,细胞器肿胀、破坏,细胞状态差。含有 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米粒的吞噬泡随着细胞膜的破裂被释放到细胞外(图 1D),细胞内染色质浓缩,出现月牙样边集,细胞浆中出现空泡(图 1E)。

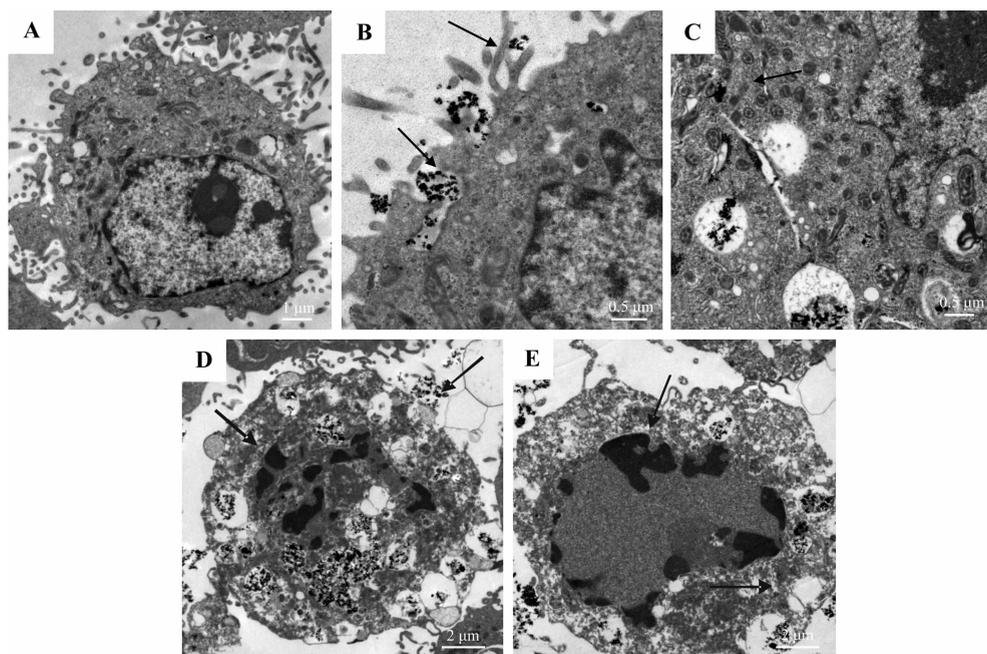


Fig. 1 Morphological changes of L-02 cells treated with $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles for 48 h by transmission electron microscopy. A: normal control group; B - E: $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 800 $mg \cdot L^{-1}$ group. Arrow shows $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles.

2.2 纳米颗粒对 L-02 细胞 MDA 含量、SOD 及 GSH 活性的影响

表 2 结果显示,随着剂量的增加, $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 纳米颗粒染毒组细胞内 MDA 含量增加,SOD 及 GSH 活性逐渐降低;与正常对照组比较,各剂量组有显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 纳米颗粒对 L-02 细胞周期的影响

如表 3 和图 2 所示,不同浓度 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 纳米颗粒作用于 L-02 细胞 48 h 后,随着作用浓度的升高, G_0/G_1 期细胞百分率有降低的趋势,S 期和 G_2/M 期细胞百分率有升高的趋势。各剂量组与对照组比较均具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

Tab. 2 Effect of $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles on malondialdehyde (MDA) content, activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) of L-02 cells

$Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4 /$ $mg \cdot L^{-1}$	MDA/ $\mu mol \cdot g^{-1}$ protein	SOD/ $kU \cdot g^{-1}$ protein	GSH/ $mmol \cdot g^{-1}$ protein
0	0.03 ± 0.001	30.74 ± 0.52	37.26 ± 1.58
200	$0.21 \pm 0.01^{**}$	$21.62 \pm 0.83^{**}$	$34.06 \pm 1.69^*$
400	$0.29 \pm 0.02^{**}$	$21.26 \pm 1.13^{**}$	$19.63 \pm 1.20^{**}$
800	$1.16 \pm 0.15^{**}$	$10.09 \pm 2.01^{**}$	$15.87 \pm 1.98^{**}$

Cells were treated with $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ for 48 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 0 $mg \cdot L^{-1}$ group.

Tab. 3 Effect of $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles on L-02 cell cycle cells

$Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4 /$ $mg \cdot L^{-1}$	Cell cycle/%		
	G_0/G_1	S	G_2/M
0	66.48 ± 2.81	23.80 ± 3.21	9.18 ± 0.84
200	$58.44 \pm 2.24^{**}$	$30.77 \pm 0.48^*$	$11.88 \pm 1.52^*$
400	$54.41 \pm 4.21^{**}$	$34.06 \pm 2.10^{**}$	$12.49 \pm 1.77^*$
800	$54.35 \pm 2.76^{**}$	$33.11 \pm 2.09^{**}$	12.28 ± 2.45

Cells were treated with $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ for 48 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 0 $mg \cdot L^{-1}$ group.

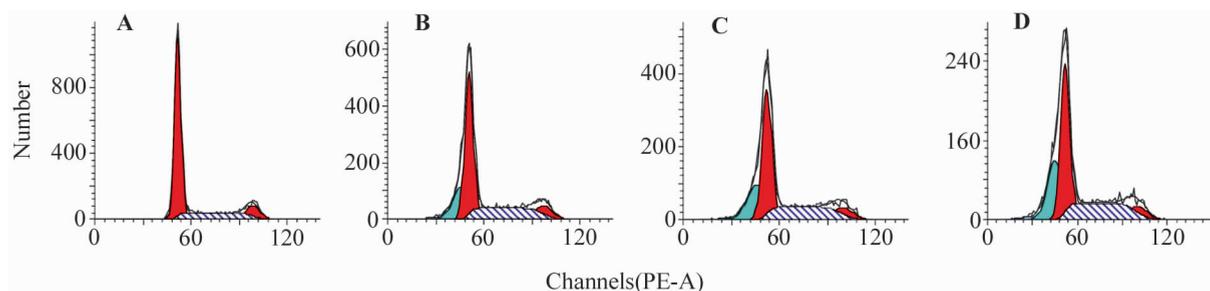


Fig. 2 Effect of $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles on the cell cycle of L-02 cells by flow cytometry. A - D: $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 0, 200, 400 and $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

2.4 纳米颗粒对 L-02 细胞凋亡的影响

2.4.1 荧光染色

图 3 为 Hoechst33258 染色后的细胞荧光照片, 箭头所示凋亡细胞核。正常对照组 L-02 细胞在 Hoechst 染色下, 细胞核呈规则的椭圆形, 染色均匀, 显淡蓝色荧光 (图 3A)。 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组部分细胞核形发生显著性变化, 出现核固缩, 可见浓染致密的颗粒块状亮蓝色荧光 (图 3B); $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞核固缩明显, 凋亡数增多 (图 3C); $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞数量明显减少, 出现细胞碎片及凋亡小体, 凋亡数明显增加

(图 3D)。

2.4.2 流式细胞术

如图 4 所示, $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 纳米颗粒 200 , 400 和 $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 L-02 细胞 48 h 后, 细胞凋亡率分别为 3.6% , 7.8% 和 30.3% 与正常对照组的 2.4% 凋亡率相比, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2.5 纳米颗粒对胱天蛋白酶 3 mRNA 表达的影响

表 4 结果显示, L-02 细胞经 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 纳米材料染毒培养 48 h 后, 随着浓度的增加, 胱天蛋白酶 3 mRNA 的表达量先增大后降低, 但与正常对照组比较, 均显著增高 ($P < 0.05$)。

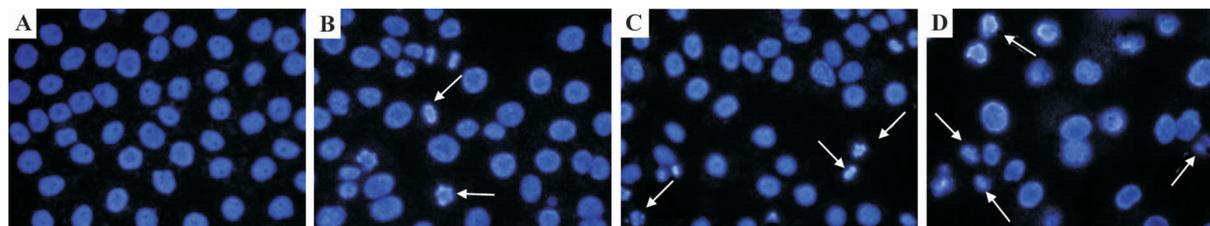


Fig. 3 Effect of $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles on L-02 cells apoptosis by fluorescence photomicrographs. A - D: $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 0, 200, 400 and $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Arrow shows apoptotic cell nucleus.

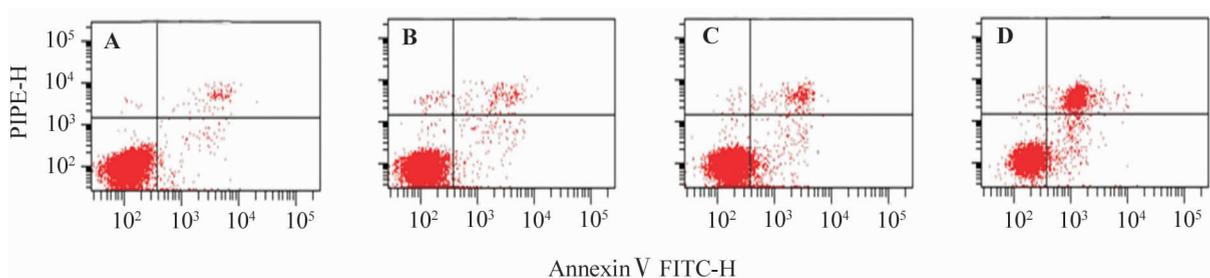


Fig. 4 Effect of $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles on apoptosis of L-02 cells for 48 h. A - D: $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 0, 200, 400 and $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tab. 4 Effect of $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles on caspase3 mRNA expression in L-02 cells

$Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4 / mg \cdot L^{-1}$	Caspase3 mRNA expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
0	1.00 ± 0
200	1.11 ± 0.06 *
400	1.16 ± 0.04 **
800	1.08 ± 0.02 **

Cells were treated with $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ for 48 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with 0 $mg \cdot L^{-1}$ group.

3 讨论

本实验研究结果显示,经 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米材料染毒 48 h 后,L-02 细胞会发生膜凹陷,纳米粒子团聚体形成膜被小泡内陷进入细胞质,纳米颗粒进入细胞后,细胞膜破损,细胞器消失,染色体异常聚集,诱导细胞发生氧化应激反应,细胞周期发生改变,细胞凋亡率显著升高,胱天蛋白酶 3 mRNA 表达量也有升高趋势,表明 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 可对正常人肝细胞株 L-02 产生细胞毒性。

细胞电镜结果证明了胞饮是 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米粒子进入 L-02 细胞的主要方式。加入纳米粒染毒培养 48 h 后,纳米粒团聚、沉积在细胞周围,这些小团聚体逐渐被细胞膜包绕、内陷,以胞饮方式进入细胞质中,最终形成吞噬泡,且有膜状包被。在电镜中可看到少数几个纳米的小团聚体存在于细胞质中,无膜状包被,这可能是耗竭的溶酶体未能完全降解磁性纳米粒子形成的残余体^[8],抑或是磁性纳米粒子经过非内吞的方式(如机械穿膜方式)进入细胞质的,这有待进一步研究。另外,从电镜图发现一些细胞的细胞膜发生破损,细胞染色质分解、稀疏,出现了凋亡现象。这可能是由于磁性纳米颗粒可导致细胞内氧自由基水平的增加,诱导膜的脂质过氧化,从而破坏膜的结构和功能^[9]。细胞膜的损伤直接导致细胞膜通透性的改变,进而导致细胞离子稳态的失衡,膜的流动性降低,最终导致细胞的死亡。此结果与 LDH 在高浓度下显著高于对照组实验结论一致^[10]。提示 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米颗粒可以通过影响细胞膜结构的完整性对细胞造成毒损伤,这可能是纳米颗粒造成细胞毒损伤的途径之一。

氧化应激实验结果表明, $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米材料在与肝细胞 L-02 作用 48 h 后,随着浓度的增加,MDA 含量逐渐升高,SOD 活性和 GSH 含量逐渐降低。这可能是由于 L-02 细胞在受到

$Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米材料刺激后,使细胞内活性氧(ROS)的含量增加,超过了自身抗氧化防御系统的清除能力,破坏了细胞内氧化-抗氧化平衡,使细胞失去正常的调节功能,表现为 MDA 含量增加,SOD 活力下降,GSH 含量降低,使细胞处于氧化应激状态而造成细胞毒损伤。另一方面,有研究报道 ROS 产物可通过 Fenton 反应或 Haber-Weiss 反应引起的自由铁离子的释放,导致脂质过氧化、DNA 损伤和蛋白质氧化^[11]。基于上述机制, $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 纳米粒是一种金属材料,在细胞内可能有少量游离铁离子、锰离子的释放。这些释放的铁离子并没有进入细胞正常的铁代谢途径,而是催化 Fenton 反应引发 $\cdot OH$ 自由基产生,加剧了 L-02 细胞的脂质过氧化,出现了脂质过氧化损伤。

细胞周期的结果提示, $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米颗粒可以使 L-02 细胞发生 S 期、 G_2/M 期细胞比例升高,细胞发生 S 期以及 G_2/M 期阻滞。这可能是由于 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米颗粒引起了 L-02 细胞的 DNA 损伤,激活了 S 期关卡,引起复制阻滞。S 期为 DNA 复制期,大量的细胞聚集在 S 期,使得纳米材料作用于 DNA 的位点增加,此时就易于引起基因表型的改变,从而影响细胞的代谢和功能,导致细胞凋亡的发生。染毒培养的 L-02 细胞在 G_2/M 期也发生阻滞,发生阻滞能给细胞修复提供更长的时间,如果 DNA 损伤被修复,则进入 M 期,如果损伤严重无法修复,会使细胞进入 M 期减少,细胞分裂将减慢或停止,不分裂的异常细胞将进入凋亡程序而被清除。有研究证实 Fe_3O_4 纳米颗粒可致细胞微管和微丝的破裂,会直接影响细胞的有丝分裂,这可能是造成细胞阻滞的原因之一^[12]。但是,目前 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米颗粒对细胞周期影响的研究较少,同时其对 DNA 损伤作用的具体分子机制仍不很清楚,有待进一步研究。

细胞凋亡是多基因严格控制的过程,包括胱天蛋白酶家族、Bcl-2 家族和抑癌基因 p53 等。细胞凋亡形态观察以及流式细胞术检测细胞凋亡的结果仅提示在 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米颗粒的作用下,细胞凋亡率浓度依赖性地增加。活化的胱天蛋白酶 3 是诱导特定的凋亡标志,因此,胱天蛋白酶 3 活性检测已经被认为是一种最为常用的评价凋亡的方法^[13]。有研究报道,纳米羟基磷灰石就能够活化人胃癌细胞胱天蛋白酶 3 和胱天蛋白酶 9 并诱导线粒体依赖的凋亡^[14]。本实验研究结果显示, $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米颗粒引起胱天蛋白酶 3 基因的表达量有升高趋势。 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米

颗粒诱导细胞凋亡可能是一个多途径参与的复杂过程,其中许多调控环节有待今后进一步研究。

已有研究报道^[15-16], ROS 的生成和氧化应激反应是纳米材料引起多种生物毒性效应的主要方式。过量的自由基会突破抗氧化防御系统引起脂类、蛋白质、多糖和 DNA 等生物大分子过氧化,并引起细胞活力的下降,细胞周期的改变,发生凋亡等^[17]。结合本实验研究结果推测,其凋亡机制可能是 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性纳米材料会引起细胞内氧自由基含量升高,过量的氧自由基进攻细胞膜,使细胞膜发生破损,细胞通透性发生改变,导致胞内的离子稳态失衡,诱导细胞凋亡;过量的氧自由基还可以进攻核苷酸造成 DNA 断裂,引起细胞阻滞,胱天蛋白酶 3 开始活化,带动胱天蛋白酶级联效应,从而使细胞发生凋亡。其细胞毒性的其他可能作用机制尚需作进一步深入细致的研究和探讨。

参考文献:

- [1] Khare P, Sonane M, Pandey R, Ali S, Gupta KC, Sati-sh A. Adverse effects of TiO_2 and ZnO nanoparticles in soil nematode, *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2011, **7**(1):116-117.
- [2] Roy R, Tripathi A, Das M, Dwivedi PD. Cytotoxicity and uptake of zinc oxide nanoparticles leading to enhanced inflammatory cytokines levels in murine macrophages: comparison with bulk zinc oxide [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2011, **7**(1):110-111.
- [3] Umrani RD, Paknikar KM. Ayurvedic medicine zinc bhasma: physicochemical evaluation, anti-diabetic activity and safety assessment [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2011, **7**(1):148-149.
- [4] Gann H, Glaspell G, Garrad R, Wanekaya A, Ghosh K, Cillessen L, et al. Interaction of MnO and ZnO nanomaterials with biomedically important proteins and cells [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2010, **6**(1):37-42.
- [5] Maiti S. Nanotoxicity of gold and iron nanoparticles [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2011, **7**(1):65.
- [6] He QZ, Xu XM, Wu SX, Yi L, Li GQ. The apoptosis effect of perfluorooctane sulfonate exposure on L-02 [J]. *J Univ South China (Med Edit)* (南华大学学报·医学版), 2010, **38**(4):47-475.
- [7] Fan XS, Zhang DS, Zheng J, Gu N, Ding AW, Jia XP, et al. Preparation and characterization of nano-magnetoparticles with radiofrequency-induced hyperthermia for cancer treatment [J]. *J Biomed Eng*, 2006, **23**(4):809-813.
- [8] Xu H, Dai W, Han Y, Hao W, Xiong F, Zhang Y, et al. Differential internalization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in different types of cells [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010, **10**(11):7406-7410.
- [9] Kaplan P, Doval M, Majerova Z, Lehotsky J, Racay P. Iron-induced lipid peroxidation and protein modification in endoplasmic reticulum membranes. Protection by stobadine [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, **32**(5):539-547.
- [10] Yin J, Wu QN, Zhang DS. Study on L-02 cells toxicity effect on $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles *in vitro* [J]. *J Toxicol* (毒理学杂志), 2011, **25**(2):111-114.
- [11] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles [J]. *Small*, 2008, **4**(1):26-49.
- [12] Berry CC, Wells S, Charles S, Curtis AS. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts *in vitro* [J]. *Biomaterials*, 2003, **24**(25):4551-4557.
- [13] Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schneckeburger J. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, **72**(2):370-377.
- [14] Chen X, Deng C, Tang S, Zhang M. Mitochondria-dependent apoptosis induced by nanoscale hydroxyapatite in human gastric cancer SGC-7901 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, **30**(1):128-132.
- [15] Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. *Science*, 2006, **311**(5761):622-627.
- [16] Sharma V, Anderson D, Dhawan A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and genotoxicity in human liver cells (HepG2) [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2011, **7**(1):98-99.
- [17] AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells [J]. *ACS Nano*, 2009, **3**(2):279-290.

Oxidative damage of $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles to L-02 cells

YIN Jie¹, WU Qi-nan¹, SHAO Ying¹, CHEN Rong¹, ZHANG Dong-sheng²

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. College of Basic Medical Sciences, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To explore the toxic mechanisms of $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles on L-02 cells. **METHODS** Morphological changes were observed by transmission electron microscopy after L-02 cells were treated with $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h. Malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) activities were determined after cells were exposed to $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles 200, 400 and $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h. Cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. Morphologic changes were observed by Hoe fluorescence microscopes. Expression of caspase 3 mRNA was analyzed by real time PCR. **RESULTS** After L-02 cells were treated with $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h, the ultrastructure of cells changed, cell organelles disappeared and the nucleus shrank in size, which served as evidence of apoptosis when nanoparticles went into L-02 cells. Compared with normal control group, MDA content in $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles 200 – $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ groups significantly increased while GSH and SOD activities significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with normal control group, the percentage in S phase and G_2/M phase increased but decreased in G_0/G_1 phase in $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ treated cells. $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles could induce apoptosis in L-02 cells. After cells were exposed to $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h, the cell apoptosis rate was 30.3%, 12.6 times that in normal control group. Compared with normal control group, the expression of caspase 3 mRNA significantly increased in $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 200 – $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ groups ($P < 0.05$). **CONCLUSION** $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ nanoparticles can change the ultrastructure of cells, which results in apoptosis in L-02 cells through cell cycles and oxidative stress.

Key words: nanoparticles; $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$; L-02 cells; oxidative stress; cell cycle; apoptosis

Foundation item: The project supported by National High Technology Research and Development Program of China (2007AA03Z356)

Corresponding author: WU Qi-nan, E-mail: qnlxw@yahoo.com.cn; Tel: (025)85811059

(收稿日期: 2011-06-28 接受日期: 2011-10-17)

(本文编辑: 乔虹)