

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20170709002

陆杰, 姚影, 汪岩, 等. 碲化镉量子点(CdTe QDs)对肝细胞的毒性效应及线粒体介导的毒性机制研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(1): 154-162

Lu J, Yao Y, Wang Y, et al. Study on the toxicity and mitochondrial-mediated mechanism of two hepatocytes induced by CdTe QDs [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(1): 154-162 (in Chinese)

碲化镉量子点 (CdTe QDs) 对肝细胞的毒性效应及线粒体介导的毒性机制研究

陆杰^{1,2}, 姚影^{1,2}, 汪岩^{1,2}, 臧一腾^{1,2}, 瞿靖^{1,2}, 何克宇^{1,2}, 吴添舒^{1,2}, 梁雪^{1,2}, 魏婷婷^{1,2}, 熊丽林^{1,2}, 张婷^{1,2,#}, 唐萌^{1,2,*}

1. 环境医学工程教育部重点实验室, 东南大学公共卫生学院; 苏州纳米科技协同创新中心, 南京 210009

2. 江苏省生物材料与器件重点实验室, 东南大学, 南京 210009

收稿日期: 2017-07-09 录用日期: 2017-08-23

摘要: 本文探讨了碲化镉量子点(CdTe QDs)对肝细胞的毒性效应及其影响因素, 为探索量子点的肝毒性机制提供一定依据。采用人肝癌细胞(HepG2)和人正常肝细胞(L02)为细胞模型, 设置 0、25、50 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 个浓度组, 采用 CCK-8 法检测细胞生存率, 石墨炉法检测细胞内镉元素含量, 采用流式细胞术, 装载荧光探针 DCFH-DA 检测细胞内活性氧水平, 采用 FITC/PI 检测细胞凋亡以及 JC-1 检测细胞 ATP 水平。研究结果显示: CdTe QDs 诱导 2 种肝细胞生存率降低, 细胞凋亡率升高, 细胞对 QDs 的摄入水平具有时间依赖性, 细胞内活性氧水平显著升高, 线粒体膜电位降低和 ATP 含量显著减少, 且 2 种肝细胞比较发现 L02 细胞损伤程度更为严重。CdTe QDs 对 2 种肝细胞造成损伤, 对 L02 细胞损伤更明显, 其原因是 L02 细胞对 CdTe QDs 摄取更多, 导致进入细胞的 QDs 引发更为严重的损伤效应。

关键词: 碲化镉量子点; 肝细胞; 线粒体损伤; 细胞凋亡; 活性氧

文章编号: 1673-5897(2018)1-154-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Study on the Toxicity and Mitochondrial-Mediated Mechanism of Two Hepatocytes Induced by CdTe QDs

Lu Jie^{1,2}, Yao Ying^{1,2}, Wang Yan^{1,2}, Zang Yiteng^{1,2}, Qu Jing^{1,2}, He Keyu^{1,2}, Wu Tianshu^{1,2}, Liang Xue^{1,2}, Wei Tingting^{1,2}, Xiong Lilin^{1,2}, Zhang Ting^{1,2,#}, Tang Meng^{1,2,*}

1. Key Laboratory of Environmental Medicine and Engineering, Ministry of Education, School of Public Health, Collaborative Innovation Center of Suzhou Nano Science and Technology, Southeast University, Nanjing 210009, China

2. Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices; Southeast University, Nanjing 210009, China

Received 9 July 2017 accepted 23 August 2017

Abstract: The aim of this paper was to investigate the hepatotoxicity of cadmium telluride quantum dots (CdTe QDs) and its influencing factors, and provide some basis for exploring the mechanism of liver toxicity of QDs. The

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31671034, 81673218, 81473003, 81302461, 81502783, 81573186); 国家重大科学研究计划项目(No. 2011CB933404)

作者简介: 陆杰(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为纳米毒理学, E-mail: ridge2020@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: tm@seu.edu.cn

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: zhangting@seu.edu.cn

human hepatocellular carcinoma (HepG2) and human normal hepatocytes (L02) were considered as the cell models. The cell viability was measured by CCK-8 method after cells were treated with CdTe QDs at 0, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The content of cadmium in the cells was measured by graphite furnace method. The intracellular reactive oxygen species (ROS) were measured by DCFH-DA assay. The level of ATP was detected through JC-1 method. Apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI-FCM assay. The CCK-8 results showed that CdTe QDs inhibited the proliferation of HepG2 and L02 cells in a concentration- and time-dependent manner. Meanwhile, the apoptosis rate was obviously increased compared with the control ($P<0.05$). The uptakes of CdTe QDs by both hepatocytes were also in a time-dependent manner. The levels of intracellular reactive oxygen species were significantly increased. The mitochondrial membrane potential and ATP content in QDs-treated cells decreased significantly compared to the control, which suggested the mitochondrial damage. Taking into account all the findings, it was concluded that the L02 cells were damaged more seriously by CdTe QDs. CdTe QDs caused damage to both liver cells, and more importantly, the L02 cell damage induced by CdTe QDs is more serious than that of HepG2 cells, possibly because L02 cells prefer to intake more QDs, resulting in more serious detrimental effect.

Keywords: cadmium telluride quantum dots; hepatocyte; mitochondrial damage; apoptosis; reactive oxygen species

量子点(quantum dots, QDs)是由 III ~ V 族或 II ~ VI 族元素组成的一种核-壳结构的纳米材料,直径为 2~10 nm,有独特的荧光特性^[1-2]。QDs 种类繁多,包括碲化镉量子点(CdTe QDs)、硒化镉量子点(CdSe QDs)、石墨烯量子点(graphene quantum dots, GOD)和磷化铟量子点(InP QDs)等^[3-5],其中最为常见的是 CdTe/Se QDs。CdTe QDs 因具有激发光波段范围宽、发射光谱宽度窄、较传统有机荧光染料荧光强度高、稳定性好等优点,在荧光探针、靶向治疗、医学诊断等方面有着广泛应用^[6]。CdTe QDs 具备医学应用潜力的同时,其生物安全性评价也越来越受到关注。

在生产、实验及医疗过程中,QDs 可能通过皮肤、消化道和静脉等多种途径进入生物体。相关研究均表明,不同暴露方式下,QDs 进入大鼠或小鼠体内后,在动物的主要器官,如心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和脑中都可以检测到一定剂量的 QDs,尤其在肝脏、肾脏和脾脏中半衰期较长,可达 2 年之久^[7-11]。Ye 等^[12]以恒河猴为模型,研究了 QDs 在灵长类动物体内分布,实验证明 QDs 主要富集在肝、脾、肾脏中(总计占到染毒剂量的 99%),含量分别是染毒剂量的 35%、58% 和 6%。体外毒性研究结果均显示:CdTe QDs 可以对多种来源的细胞系造成不同程度的损伤,如造成细胞增殖率下降、氧化应激、细胞凋亡等^[13]。

肝脏作为生物体最重要的代谢器官,在生物体内起着去氧化、储存肝糖、分泌性蛋白质的合成等作用,当 QDs 等进入生物体后在肝脏中大量蓄积,因此研究 QDs 对肝脏的毒性作用对全面认识和评估

其毒性显得尤为重要。目前已有关于 CdTe QDs 肝毒性研究报道,Zhang 等^[11]以小鼠正常肝细胞(AML12 细胞)为研究对象,染毒 MPA-CdTe QDs 后,具有剂量和尺寸依赖性的细胞毒性,细胞凋亡为主要毒性表现。Nguyen 等^[14]以 HepG2 细胞为研究对象,CdTe QDs 染毒后,通过死亡受体途径和线粒体途径诱发细胞凋亡。Lu 等^[15]将 CdSe/ZnS QDs 作用于人正常肝细胞(L02)细胞后,除了引起细胞凋亡外,还通过激活 NLRP3 炎性小体,导致 Caspase-1 的激活和白介素 1 β (IL-1 β)的分泌,最终引起细胞焦亡(pyroptosis)。关于 CdTe QDs 引起肝细胞损伤的机制研究目前仍处于探索阶段,还需要进一步研究。

本研究采用人肝癌细胞(HepG2 细胞)和人正常肝细胞(L02 细胞)2 种不同类型的肝细胞作为体外模型评价 CdTe QDs 的肝毒性作用和潜在的机制,探讨 CdTe QDs 对不同肝细胞的毒作用和有关机制,为更全面地进行 CdTe QDs 的安全性评估提供一定科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验细胞

L02 细胞和 HepG2 细胞均购于中国科学院上海细胞所。

1.2 实验试剂和仪器

实验所用 3-巯基丙酸包被的碲化镉量子点(MPA-CdTe QDs)根据詹庆玲等^[16]提供的方法自行合成。合成量子点后,实验前按照 CdTe QDs:丙酮为 1:2(V:V)的比例混合,以 15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心(离心半径为 8.3 cm)20 min,离心 2 次后,用完全培养基配

成一定浓度的储备液备用,经 0.22 μm 滤膜抽滤除菌,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存放,使用前超声分散。

磷酸盐缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司,中国);胎牛血清(杭州四季青公司,中国);杜尔伯科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)(Hyclone 公司,美国);质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶溶液(Biosharp 公司,中国);二甲基亚砜(中国国药集团化学试剂有限公司,中国);CCK-8 试剂、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒、活性氧(ROS)检测试剂盒、ATP 检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒,均购于上海碧云天生物技术有限公司;细胞凋亡试剂盒(江苏省凯基生物技术股份有限公司,中国);3-巯基丙酸(MPA,美国 Sigma 公司), $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 、氢氧化钠、高纯氮气(>99.99%)均购于国药集团化学试剂有限公司。

Series8000 系列-3423 型 CO_2 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司),CK40-F200 倒置显微镜(日本 Olympus 公司),MRX 全自动酶标仪(美国 Dynex Technologies 公司),TDZ6B-WS 离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),BS210S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司),KQ2200E 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司),SW-CJ-2F 净化工作台(中国苏州安泰空气技术有限公司);流式细胞术测定仪(BD 公司,型号:FACS CantoTM);Zetasizer Nano-ZS90 型 Malvern 粒度分析仪(马尔文仪器有限公司,英国)。

1.3 材料表征

利用马尔文激光粒度仪测定 CdTe QDs 在完全培养基中的水合粒径;利用荧光分光光度计测定 CdTe QDs 的最大吸收波长和最大发射波长。

1.4 细胞培养

L02 细胞和 HepG2 细胞采用 DMEM 培养基(含体积分数为 10% 的胎牛血清,体积分数为 1% 的双抗)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中进行培养。每日用倒置显微镜观察细胞生长状况,取对数生长期的细胞进行试验。

1.5 细胞 CCK-8 试验

取对数生长期的细胞种于 96 孔板中,每孔 5×10^3 个细胞,培养 24 h 后弃去培养液。根据预实验结果,加入浓度为 0, 25, 50 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染毒液,每个染毒组设置 5 个复孔。染毒 24 h 后,弃去染毒液,加入含体积分数 10% 的 CCK-8 完全培养基,继续培养 1.5 h,在酶标仪上 490 nm 处测定吸光度。

1.6 细胞形态学观察

取对数生长期细胞种于 6 孔板中,每孔种 $2 \times$

10^5 个细胞,培养 24 h,弃去培养液,加入浓度为 0, 25, 50 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染毒液,染毒 24 h。染毒结束后在生物图像导航仪上进行细胞形态学观察。

1.7 LDH 释放检测

取对数生长期细胞种于 96 孔板中,每孔 5×10^3 个细胞,培养 24 h 后弃去培养基,加入浓度为 0, 25, 50 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染毒液,染毒 24 h。染毒结束后收集染毒液,根据试剂盒上试验步骤进行 LDH 的释放检测。

1.8 细胞对 CdTe QDs 的摄入情况测定

取对数生长期细胞种于 6 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,培养 24 h,弃去培养基,加入浓度为 0, 25, 50 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染毒液,染毒 1 h、2 h、4 h、8 h 和 24 h。染毒结束后,胰酶消化收集细胞,并计数。将收集的细胞置于 15 mL 离心管中,加入 1 mL 浓硝酸硝化过夜,以充分裂解细胞。硝化结束后每管加入 2 mL 过氧化氢,并转移至烧杯中,放在电热板上进行加热赶酸,待烧杯中残留的液体刚好覆盖烧杯底部时停止加热,加入 2% 的稀硝酸 2 mL,并将液体转移至 10 mL 离心管中,并用 2% 稀硝酸定容至 5 mL,抽滤。最后在石墨炉上进行镉元素含量的测定,间接反映细胞对 CdTe QDs 的摄入情况。

1.9 ROS 含量测定

取对数生长期细胞种于 6 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,培养 24 h,弃去培养液,加入浓度为 0, 25, 50 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染毒液,染毒 24 h。染毒结束后按照 1:2 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。去除细胞培养液,每孔加入 1 mL 稀释好的 DCFH-DA,37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 20 min。用无 PBS 洗涤细胞 2 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。使用 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长,在流式细胞仪上检测染毒前后荧光强度的变化。

1.10 细胞凋亡测定

取对数生长期细胞种于 6 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,培养 24 h,弃去培养液,加入染毒液,染毒浓度为 0, 25, 50 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,染毒 24 h。染毒结束后,弃去染毒液,用 PBS 洗 2 遍,加入无 EDTA 的胰酶消化细胞,收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次($2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min)。加入 500 μL Binding Buffer,充分混匀细胞,再加入 5 μL Annexin V-FITC,混匀后再加入 5 μL 混匀后 Propidium Iodide,混匀,在流式细胞仪上检测染毒前后荧光强度的变化。

1.11 ATP 含量检测

取对数生长期细胞种于 6 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,培养 24 h,弃去培养液,加入浓度为 0, 25, 50 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染毒液,染毒 24 h。设置 0、0.05、0.1、0.5、1、5 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 等浓度制作标准曲线。吸除染毒液,按照 6 孔板每孔加入 200 μL 裂解液的比例(即相当于细胞培养液量 2 mL 的 1/10)加入裂解液,裂解细胞。再根据试剂盒说明书配制 ATP 检测工作液,加 100 μL ATP 检测工作液到检测孔或检测管内。室温放置 3~5 min,以使本底性的 ATP 全部被消耗掉,从而降低本底值。在检测孔或检测管内加上 20 μL 样品或标准品,用化学发光检测仪进行检测,最后根据标准曲线计算得出 ATP 含量。

1.12 细胞线粒体膜电位检测

JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential) $\Delta\Psi\text{m}$ 的理想荧光探针。可以检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位。取对数生长期细胞种于 6 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,培养 24 h,弃去培养液,加入浓度为 0, 25, 50 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染毒液,染毒 24 h。染毒结束后,收集细胞,用 0.5 mL 新鲜培养基重悬细胞,再加入 0.5 mL JC-1 染色工作液,充分混匀,细胞培养箱中 37°C 孵育 20 min。 37°C 孵育结束后,600 g、 4°C 离心 3~4 min,沉淀细胞,弃上清。用 JC-1 染色缓冲液(1 \times)洗涤 2 次(600 g、 4°C 离心 3~4 min,沉淀细胞,弃上清。)再用适量 JC-1 染色缓冲液(1 \times)重悬后,在流式细胞仪上检测染毒前后荧光强度的变化。

1.13 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为统计学

差异具有显著意义。

2 结果 (Results)

2.1 材料表征结果

如图 1 所示,荧光分光光度计测得 MPA-CdTe QDs 的最大激发波长为 300 nm,最大发射波长为 555 nm。采用马尔文激光粒度仪测得 CdTe QDs 在 DMEM 完全培养基中的水合粒径和 zeta 电位的结果,水合粒径和 zeta 电位分别为 (31.93 ± 3.92) nm 和 $-(6.62 \pm 0.49)$ mV。

2.2 细胞毒性试验结果

细胞毒性试验结果包括细胞活性测定、LDH 释放检测和细胞形态学观察。细胞活性试验结果如图 2 所示,与对照组相比,染毒组细胞的生存率随着染毒浓度的升高显著降低($P < 0.05$),且具有效应-剂量依赖性关系。QDs 染毒 24 h 后,L02 细胞活力低于 HepG2 细胞,说明 CdTe QDs 对 L02 细胞的毒性大于 HepG2 细胞。

CdTe QDs 染毒细胞 24 h 后,观察 2 种细胞形态学的改变,如图 3 (A 和 B)所示,对照组细胞形态正常,细胞之间紧密连接,细胞堆积生长;染毒组细胞的形态则发生明显改变,在最低浓度组($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),部分细胞开始出现皱缩,细胞变圆,细胞之间连接减少,随着染毒剂量的增大,细胞数量明显减少,细胞连接被破坏,异常形态细胞增多。

细胞膜结构的破坏会导致细胞浆内的酶释放到培养液中,其中包括酶活性较为稳定的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)。通过检测从质膜破裂的细胞中释放到培养液中的 LDH 活性,可以实现对细胞毒性的分析。CdTe QD 染毒 2 种肝细胞 24 h

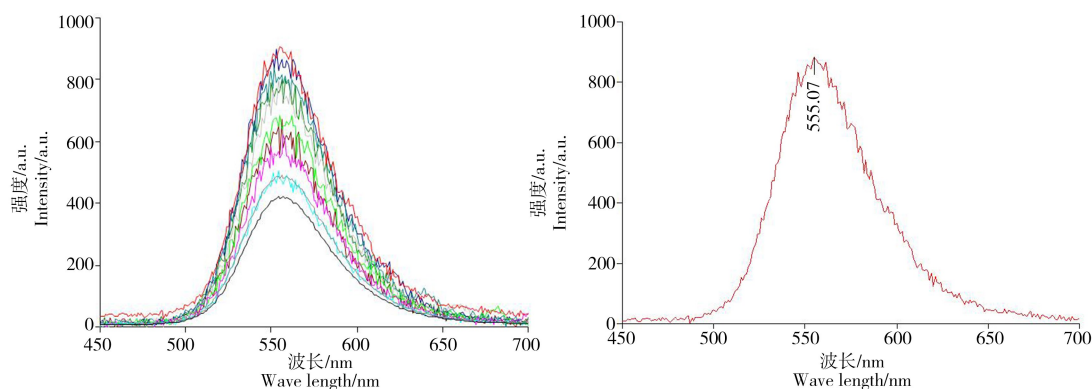


图 1 碲化镉量子点的最大激发波长

Fig. 1 The maximum emission wavelength of cadmium telluride quantum dots

后,检测 LDH 的释放情况,结果表明,与对照组相比,染毒组染毒液中 LDH 含量显著升高($P<0.05$),且具有剂量依赖性,同一染毒剂量下,L02 细胞染毒液中 LDH 含量要高于 HepG2 细胞。

2.3 细胞凋亡检测结果

凋亡是细胞死亡形式之一,当细胞受到有害因素作用,是在一系列基因的调控下细胞程序性死亡的过程。此过程涉及多个基因的激活、表达以及调控作用,细胞凋亡对维持机体的稳态和胚胎发育必不可少。如图 5 所示,CdTe QDs 染毒 2 种细胞 24 h 后,凋亡细胞逐渐增多,并且具有剂量依赖性关系。

2.4 细胞对 CdTe QDs 摄入情况检测

本研究利用石墨炉法检测染毒不同浓度和时间后 2 种细胞内镉元素的含量,间接反应 2 种细胞对 CdTe QDs 的摄入情况。结果如图 6 所示,随着染毒时间的延长,细胞内镉含量显著增多,这与细胞活力的结果相一致,说明 QDs 引起 2 种肝细胞活力的降低与细胞对 CdTe QDs 的摄取相关。同样染毒剂量和时间下,L02 细胞内镉含量显著高于 HepG2 细胞内镉含量。

2.5 ROS 含量检测结果

正常生理状态下,细胞生理代谢过程中会产生少量的 ROS,适量的 ROS 对维持细胞正常的生理功能具有重要作用。但是当细胞受到外界刺激时,细胞内 ROS 会明显升高,过量的 ROS 会造成氧化应激,产生氧化损伤。CdTe QD 染毒 2 种肝细胞 24 h

后,细胞内 ROS 的检测结果如图 7 所示,染毒 24 h 后,细胞内 ROS 显著升高,且具有剂量依赖性关系。

2.6 线粒体功能检测

线粒体是细胞能量代谢的主要场所,对维持细胞内钙离子的稳定也具有重要作用。当线粒体受到损伤时,细胞的氧化呼吸过程被破坏,会诱发细胞凋亡的发生。如图 8 所示,CdTe QDs 染毒细胞 24 h 后,2 种细胞线粒体膜电位都出现不同程度的下降,并随着染毒剂量的增大,线粒体膜电位下降的细胞比率增多,2 种细胞之间比较发现,CdTe QDs 对 L02 细胞线粒体膜电位影响更明显。同时对细胞 ATP 含

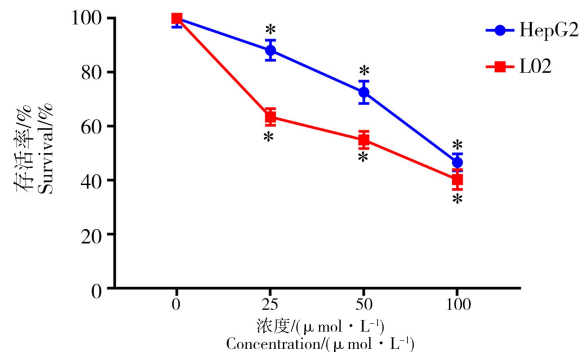


图 2 CCK-8 法检测 CdTe QDs 对 HepG2 和 L02 细胞生存率的影响

注: * $P<0.05$ 表示与对照组相比差异具有统计学意义。

Fig. 2 Effect of CdTe QDs on HepG2 and L02 cell survival by CCK-8

Note: * $P<0.05$, compared with normal control group.

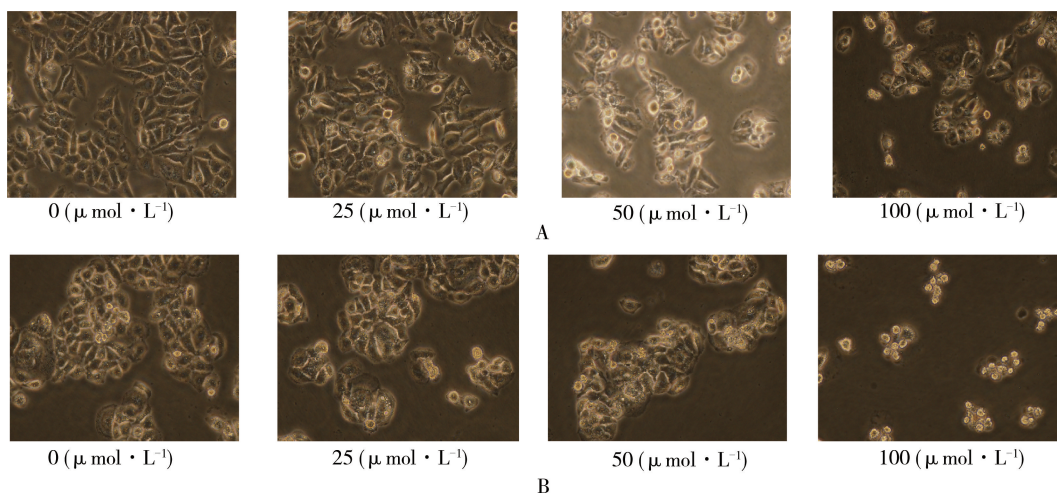


图 3 CdTe QDs 对 HepG2 (A) 和 L02 (B) 细胞的形态学影响

注: * $P<0.05$,与对照组相比差异具有统计学意义。

Fig. 3 Effect of CdTe QDs on HepG2 and L02 cell morphology

Note: A, HepG2 cell; B, L02 cell. $P<0.05$, compared with control group.

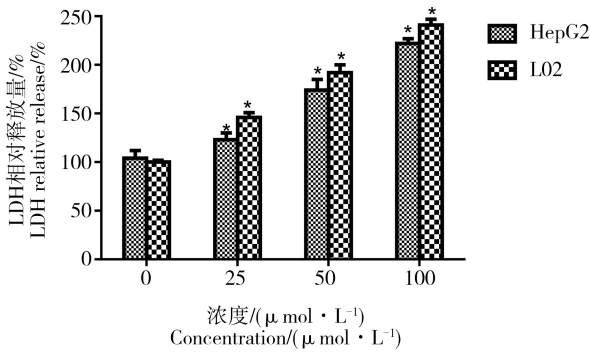


图 4 CdTe QDs 对 HepG2 和 L02 细胞的 LDH 释放检测试验

注: * $P < 0.05$, 与对照组相比差异具有统计学意义。

Fig. 4 Effect of CdTe QDs on HepG2 and L02 cell LDH release

Note: * $P < 0.05$, compared with normal control group.

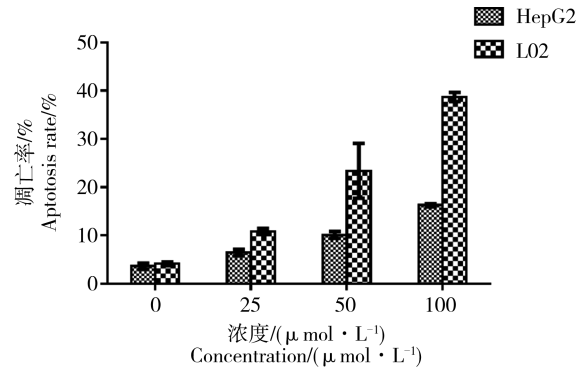


图 5 FITC/PI 法检测 CdTe QDs 对 HepG2 和 L02 细胞凋亡率的影响

注: * $P < 0.05$, 与对照组相比差异具有统计学意义。

Fig. 5 Effect of CdTe QDs on HepG2 and L02 cell apoptosis by FITC/PI assays

Note: * $P < 0.05$, compared with normal control group.

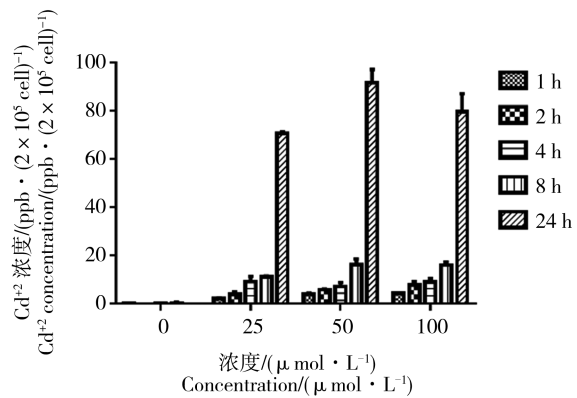
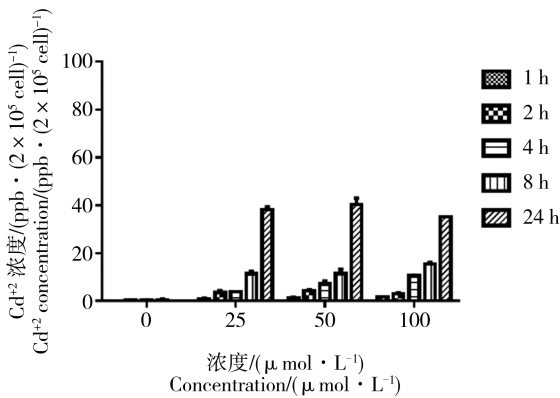


图 6 2 种肝细胞内镉离子浓度

注: 2 种肝细胞 CdTe QDs 染毒浓度为 0~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 染毒 1, 2, 4, 8 和 24 h; * $P < 0.05$, 与对照组相比差异具有统计学意义。A, HepG2 cell; B, L02 cell。

Fig. 6 The concentration determination of cadmium in both liver cells

Note: Both liver cells were treated with 0-100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdTe QDs for 1, 2, 4, 8 and 24 h. * $P < 0.05$, compared with normal control group. A, HepG2 cell; B, L02 cell.

量进行检测,如图 8 所示,随着染毒剂量的增大,细胞 ATP 含量显著降低,并且 L02 细胞 ATP 含量的降低比 HepG2 细胞更为显著,这一结果与线粒体膜电位的结果一致。

3 讨论 (Discussion)

CdTe QDs 本身具有良好的荧光特性,在生物医学领域具有巨大的应用前景,可用于疾病诊断等^[17]。肝脏是机体最为重要的代谢器官,也是 CdTe QDs 体内蓄积的主要器官之一,但是对肝脏的毒性作用研究结果并不一致^[18-20]。Lin 等^[18]的研究表明, CdTe/Se QDs 进入生物体内会蓄积于肝脏中,虽未

引起明显的组织病理学改变,但是引起肝脏中某些微量元素的改变,抗氧化酶活性的升高等。Wang 等^[19]研究了 CdTe QDs 染毒 ICR 小鼠后引起小鼠肝脏明显的组织学改变,金属硫蛋白表达升高,肝细胞凋亡等毒性作用。但是, Fan 等^[20]的研究表明 CdTe /CdS QDs 进入小鼠体内后只引起肝细胞自噬的发生而未引起细胞凋亡。体外肝细胞毒性研究表明, CdTe QDs 能够造成 HepG2 细胞、AML12 细胞等肝细胞生存率降低,细胞凋亡的发生等毒作用^[11-14]。但是研究使用的 CdTe QDs 理化性质各异,研究结果也有矛盾之处,因此 CdTe QDs 的肝毒性机制研究仍需要进一步探讨。

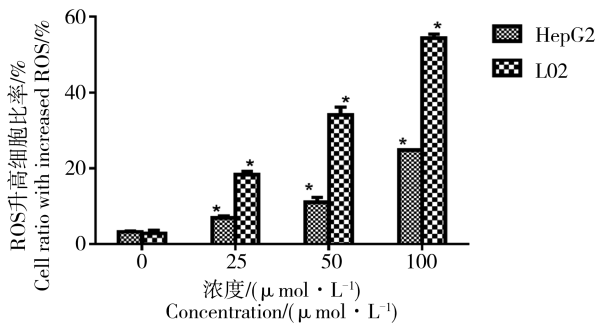


图7 CdTe QDs 诱导 HepG2 和 L02 细胞内 ROS 的检测

注: * $P < 0.05$, 与对照组相比差异具有统计学意义。

Fig. 7 CdTe QDs induced ROS in HepG2 and L02 cell

Note: * $P < 0.05$, compared with normal control group.

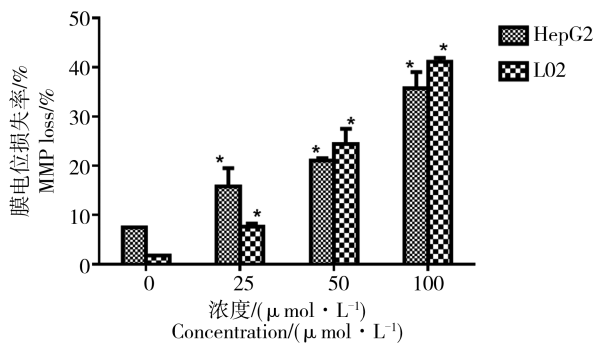


图8 JC-1 法测定 CdTe QDs 对 HepG2 和 L02 细胞线粒体膜电位的影响

注: * $P < 0.05$, 与对照组相比差异具有统计学意义。

Fig. 8 Effect of CdTe QDs on HepG2 and L02 cell mitochondrial membrane potential (MMP) by JC-1 assays

Note: * $P < 0.05$, compared with normal control group.

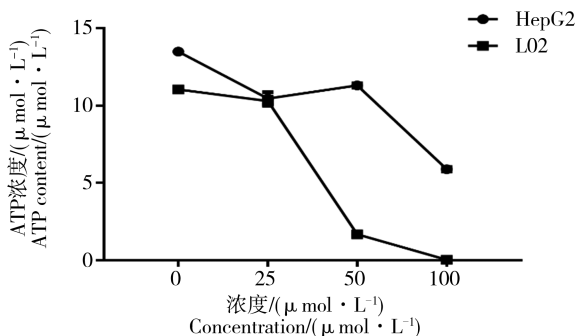


图9 2种肝细胞 ATP 含量检测

注: * $P < 0.05$, 与对照组相比差异具有统计学意义。

Fig. 9 The content determination of ATP in both liver cells

Note: * $P < 0.05$, compared with normal control group.

本研究以 HepG2 和 L02 细胞为体外细胞模型, 探讨 CdTe QDs 对不同类型肝细胞的毒性及其可能

的毒作用机制, 为 CdTe QDs 的安全性评价提供一定的依据。CdTe QDs 染毒 24 h 后引起 2 种肝细胞生存率降低, 同等剂量下, CdTe QDs 对 L02 细胞的损伤比肝癌细胞更严重。细胞凋亡结果表明, 细胞凋亡率显著升高, L02 细胞的凋亡率显著高于 HepG2 细胞, 尤其在中高剂量组, L02 细胞凋亡率远高于 HepG2 细胞, 这一结果与细胞生存率结果一致, 进一步说明 CdTe QDs 对正常肝细胞的毒性要大于肝癌细胞, 且 CdTe QDs 引起细胞死亡的形式以细胞凋亡为主。

已有的研究表明, CdTe QDs 对细胞的毒性与 CdTe QDs 中镉离子的释放和其本身的尺寸效应相关^[21-22]。镉离子作为重金属离子, 其可对细胞直接产生毒性作用^[21-23], 同时被细胞摄取的 CdTe QDs 进入细胞内激活信号转导通路, 破坏细胞正常生物学过程最终诱发细胞死亡^[24]。本次研究利用石墨炉法检测细胞内镉元素含量, 间接反映细胞内 CdTe QDs 的含量。结果显示, 同等染毒时间和染毒剂量情况下, L02 细胞内镉元素含量较 HepG2 细胞高, 说明 L02 细胞对 CdTe QDs 摄取更多, 这也是 CdTe QDs 导致 L02 损伤更为严重的原因之一。同时, 造成 2 种肝细胞对 CdTe QDs 差异性摄入以及摄入 QDs 后在细胞内的分布与代谢也需要进一步研究, 有助于阐明 QDs 的毒性机制。

除镉离子释放外, ROS 的过量生成在纳米材料诱导细胞损伤中扮演重要角色, ROS 与细胞内的大分子结合, 如 DNA、蛋白质和脂质, 影响细胞生物学功能, 最终引发细胞死亡。Paesano 等^[25]研究发现, CdS QD 可造成 HepG2 细胞内 ROS 水平升高, 诱导线粒体途径介导的细胞凋亡的产生。Nguyena 等^[14]的研究结果也表明 CdTe-QDs 可引起 HepG2 细胞内 ROS 水平升高, 导致还原性谷胱甘肽的耗竭, 还原性谷胱甘肽与氧化性谷胱甘肽比值降低, 最终引发死亡受体和线粒体途径介导的 HepG2 细胞凋亡。李艳博等^[26]研究发现, 巯基乙酸(TGA)包被的 CdTe QDs 可导致人肝细胞(HL-7702)细胞 ROS 水平升高, 诱发 DNA 损伤和细胞周期阻滞。在本研究中, CdTe QDs 染毒 24 h 后细胞内 ROS 含量显著升高, 诱发细胞氧化应激, 且 L02 细胞内 ROS 含量比 HepG2 更多, 这结果与细胞活性和凋亡率结果一致, 结合细胞摄取的结果, 提示我们被摄取进入细胞内的 CdTe QDs 引起细胞内氧化应激水平的明显升高, 诱发细胞氧化损伤。进一步检测线粒体功能发

现, CdTe QDs 能够造成肝细胞线粒体膜电位的降低和 ATP 含量的减少, 且具有剂量依赖性关系, 说明 CdTe QDs 诱发过量的 ROS 生成后, CdTe QDs 引发线粒体损伤, 破坏线粒体正常的氧化呼吸过程, 影响了细胞的生物学功能, 从而诱发细胞凋亡。如 Nguyen 等^[27]探讨了 CdTe-QD 对 HepG2 细胞线粒体损伤, 发现 CdTe QDs 造成 HepG2 细胞线粒体膜电位降低, 细胞内钙离子水平升高, 损害了氧化呼吸过程, 降低三磷酸腺苷的含量, 过氧化物酶体增殖物激活受体-c 共激活剂水平(peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator)显著升高, 表明 CdTe QDs 影响了线粒体的生物合成功能。

综上所述, CdTe QDs 对 2 种不同类型的 HepG2 和 L02 细胞均可造成损伤, 降低细胞生存率, 诱发细胞凋亡。2 种肝细胞之间的比较发现 CdTe QDs 对 L02 细胞的毒性作用大于 HepG2 细胞, 其机制是由于 L02 细胞对 CdTe QDs 摄入水平高于 HepG2 细胞, 引发更为严重的线粒体膜损伤, 线粒体功能受损和更高的 ROS 水平, 造成氧化应激, 最终诱发细胞凋亡。但是有关 2 种细胞之间的毒性差异的机制仍需进一步探讨, 需要进一步阐明在分子水平上的差异, 为更好地评价 CdTe QDs 的肝毒性提供理论依据。

通讯作者简介:唐萌(1958—), 男, 卫生毒理学博士, 教授, 主要研究方向为纳米毒理学, 发表学术论文 70 余篇。

共同通讯作者简介:张婷(1982-), 女, 卫生毒理学博士, 副教授, 主要研究方向为纳米毒理学, 发表学术论文 10 余篇。

参考文献 (References):

- [1] Bruchez M J, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels [J]. *Science*, 1998, 281(5385): 2013-2016
- [2] Leutwyler W K, Bürgi S L, Burgl H. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots [J]. *Science*, 1996, 271(5251): 933-937
- [3] Manshian B B, Soenen S J, Al-Ali A, et al. Cell type-dependent changes in CdSe/ZnS quantum dot uptake and toxic endpoints [J]. *Toxicology Science*, 2015, 144(2): 246-258
- [4] Brunetti V, Chibli H, Fiammengio R, et al. InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/shell quantum dots: *In vitro* and *in vivo* toxicity assessment [J]. *Nanoscale*, 2013, 5: 307-317
- [5] Chong Y, Maa Y F, Shen H, et al. The *in vitro* and *in vivo* toxicity of graphene quantum dots [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 5041-5048
- [6] Barroso M M. Quantum dots in cell biology [J]. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2011, 59(3): 237-251
- [7] Fitzpatrick J A J, Andreko S K, Ernst L A, et al. Long-term persistence and spectral blue shifting of quantum dots *in vivo* [J]. *Nano Letters*, 2009, 9(7): 2736-2741
- [8] Hauck T S, Anderson R E, Fischer H C, et al. *In vivo* quantum-dot toxicity assessment [J]. *Small*, 2010, 6(1): 138-144
- [9] Su Y, Peng F, Jiang Z, et al. *In vivo* distribution, pharmacokinetics, and toxicity of aqueous synthesized cadmium-containing quantum dots [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(25): 5855-5862
- [10] Liu W, Zhang S, Wang L, et al. CdSe quantum dot (QD)-induced morphological and functional impairments to liver in mice [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(9): e24406
- [11] Zhang T, Hu Y, Tang M, et al. Liver toxicity of cadmium telluride quantum dots (CdTe QDs) due to oxidative stress *in vitro* and *in vivo* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(10): 23279-23299
- [12] Ye L, Yong K T, Liu L, et al. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots [J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7(7): 453-458
- [13] 陆杰, 张婷, 唐萌, 等. 碲化镉量子点细胞毒性研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(5): 24-31
Lu J, Zhang T, Tang M, et al. Research advances in cytotoxicity of CdTe quantum dots [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(5): 24-31 (in Chinese)
- [14] Nguyen K C, Willmore W G, Tayabali A F. Cadmium telluride quantum dots cause oxidative stress leading to extrinsic and intrinsic apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *Toxicology*, 2013, 306: 114-123
- [15] Lu Y H, Xu S C, Chen H Y, et al. CdSe/ZnS quantum dots induce hepatocyte pyroptosis and liver inflammation via NLRP3 inflammasome activation [J]. *Biomaterials*, 2016, 90: 27-39
- [16] Zhan Q L, Tang M, Zhang T, et al. Effects of CdTe@MPA quantum dots on RAW264.7 cells viability [J]. *Journal of Environment Health*, 2014, 31(2): 111-113
- [17] Breunig M, Bauer S, Goepferich A, et al. Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 68(1): 112-128
- [18] Lin C H, Yang M H, Louis W, et al. Cd/Se/Te-based quantum dot 705 modulated redox homeostasis with hep-

- atotoxicity in mice [J]. *Nanotoxicology*, 2011, 5(4): 650-663
- [19] Wang M M, Wang J L, Sun H B, et al. Time-dependent toxicity of cadmium telluride quantum dots on liver and kidneys in mice: Histopathological changes with elevated free cadmium ions and hydroxyl radicals [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2016, 11: 2319-2328
- [20] Fan J J, Sun Y, Wang S F, et al. Inhibition of autophagy overcomes the nanotoxicity elicited by cadmium-based quantum dots [J]. *Biomaterials*, 2016, 78: 102-114
- [21] Su Y Y, Hub M, Fan C H, et al. The cytotoxicity of CdTe quantum dots and the relative contributions from released cadmium ions and nanoparticle properties [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 4829-4834
- [22] Chen N, He Y, Su Y Y, et al. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots [J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 1238-1244
- [23] Lemarie A, Lagadic G D, Morzadec C, et al. Cadmium induces caspase -independent apoptosis in liver Hep3B cells: Role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor [J]. *Free Radical Biology Medicine*, 2004, 36(12): 1517-1531
- [24] Peng L, He M, Chen B B, et al. Cellular uptake, elimination and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells [J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 9545-9558
- [25] Paesano L, Perotti A, Buschini A, et al. Markers for toxicity to HepG2 exposed to cadmium sulphide quantum dots; damage to mitochondria [J]. *Toxicology*, 2016, 374: 18-28
- [26] Li Y B, Zhang H X, Guo C X, et al. Induction of thioglycolic acid-capped cadmium selenide quantum dots on hepatotoxicity and DNA damage in human hepatic cells [J]. *Journal of Jilin University: Medicine Edition*, 2012, 38(3): 495-500
- [27] Nguyen K C, Rippstein P, Azam F, et al. Mitochondrial toxicity of cadmium telluride quantum dot nanoparticles in mammalian hepatocytes [J]. *Toxicology Science*, 2015, 146(1): 31-42 ◆